

11-9146

INDUSTRIA Y COMERCIO
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD

PCT

PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-009146- -00000-0000

EXPEDIENTE N° _____

Fecha: 2011-01-27 15:12:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Ira. 11 PATENTE IYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 67

TITULO: COMPOSICIÓN DE NISINA LIQUIDA

CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL : A23L 3/3463 (2006.01)

SOLICITANTE: DSM IP ASSETS B.V.

DOMICILIO: HEERLEN, PAISES BAJOS

APODERADO: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

Bogotá, 27 de enero de 2011

CLARKE, MODET & CO. COLOMBIA LTDA

12-02-2011

09-03-2011



No. 11-009146- -00000-0000

Fecha: 2011-01-27 15:12:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Ira. 11 PATENTEIYII Eve. 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 67

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

SOLICITUD DE REGISTRO DE:

1

☒ Patente de Invención ☐ Patente Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I ☒ Capítulo II

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **DSM IP ASSETS B.V.**
Dirección: Het Overloon 1, 6411 TE Heerlen,
Países Bajos
Nacionalidad o domicilio: Heerlen, Países Bajos
Lugar de Constitución: Países Bajos

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

Nombre: **DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN**
Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá
D.C., Colombia
Teléfono: 6181088 Fax: 6350824
E. Mail: info@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT: ☐ ☐
C.E. ☐ OTRO ☐
NÚMERO: 41.654.882
TP: 20824 CSJ

4

**INVENTOR(ES)
(72)**

Nombre: **1. VISSER, Johannes Martinus Jacobus; 2. HAAN, DE, Ben
Rudolf**
Dirección: 1. Waterloop 22, NL-2614 XC Delft, Países Bajos; 2. Park de
Wervelaan 19 2283 TN Rijswijk, (ZH) Países Bajos
Nacionalidad o domicilio: 1. Holandés, 2. Holandés

5 **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/060413 Fecha 12 DE AGOSTO DE 2009

Publicación Internacional No. WO2010/018186 A1 Fecha 18 DE FEBRERO DE 2010

Título (54) COMPOSICIÓN DE NISINA LÍQUIDA

7 **Clasificación Internacional (51) A23L 3/3463 (2006.01)**

8 **Prioridad**

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

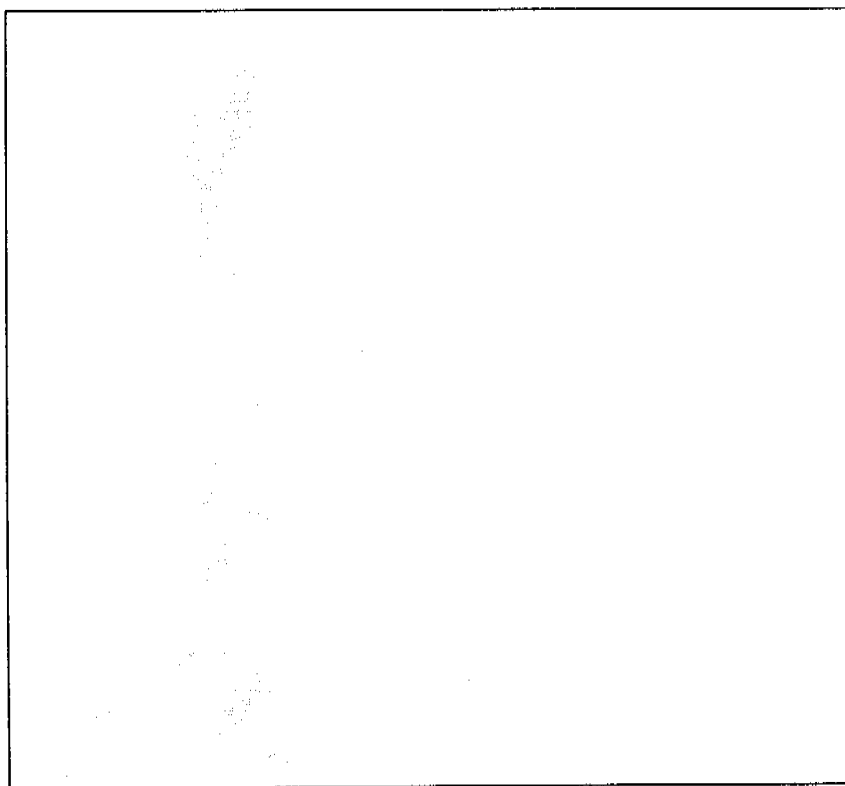
AGO.12, 2008

(31) Número de Solicitud

08162201.1

9 **Comprobante de pago No. 11-002334//11-002426//11-002594//11-002568 de Ene. 12, 2011**

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes si fuese el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de examen preliminar (IPER)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros: Notificación cambio de dirección de inventor.

12 FIGURA CARACTERISTICA**13 Solicito la concesión de la patente,****NOMBRE : DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN****FIRMA:**

C.C/ 41.654.882 T.P. 20824 CSJ

ANEXO
INVENTORES

1. **VISSER, Johannes Martinus Jacobus**
(Waterloop 22, NL - 2614 XC Delft, Países Bajos);

- 2.) **HAAN, DE, Ben Rudolf**
(Park de Wervelaan 19, 2283 TN Rijswijk (ZH) Países Bajos);

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 002334

Bogotá D.C., 12 de 2011 - 16:56:24

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353168620	11/01/2011	77.745.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1. TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-009146- -00000-0000

Fecha: 2011-01-27 15:12:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 379 FASENACIONAL II
Act. 411 PRESENTACION Folios: 67

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 12 de 2011 - 16:56:43

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 002426

Bogotá D.C., 12 de 2011 - 16:56:24

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

***** Soporte del Pago *****

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353168620	11/01/2011	77.745.000.00

***** Conceptos Pagados *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	200.000.00	200.000.00
				\$200.000.00

SON: **DOSCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-009146- -00000-0000

Fecha: 2011-01-27 15:12:57 Dep. 2020 DIR.NULVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 67

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 12 de 2011 - 16:56:47

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 002594

Bogotá D.C., 12 de 2011 - 16:56:24

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353168620	11/01/2011	77.745.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	2.000.00	2.000.00
				\$2.000.00

SON: **DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-009146- -00000-0000

Fecha: 2011-01-27 15:12:57 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 379 FASENACIONALII
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 67

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 12 de 2011 - 16:56:55

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 002568

Bogotá D.C., 12 de 2011 - 16:56:24

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353168620	11/01/2011	77.745.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	21 CERTIFICACIONES	14.000.00	14.000.00
				\$14.000.00

SON: **CATORCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-009146- -00000-0000

Fecha: 2011-01-27 15:12:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Lve. 379 FASENACIONALII
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 67

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 12 de 2011 - 16:56:53

COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 Fax: (57 1) 6350824 Email: info@clarkemodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñanzas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

legal representative(s) of

DSM IP Assets B.V.

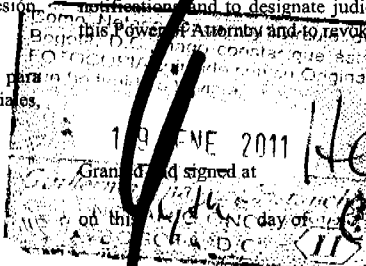
an organization existing under the laws of The Netherlands

and in present execution of its business activity, domiciled at

Het Overloon 1, 6411 TE Heerlen, The Netherlands

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.



Firma / Signature

DSM IP Assets B.V.

CERTIFICADO NOTARIAL

(Cuando el solicitante es SOCIEDAD)

(Poderes otorgados en: El Salvador, Estados Unidos, México y Venezuela)

A los _____ días del mes de _____ de _____
el Notario que suscribe DA FE de que:

1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado en _____
firmó de su puño
y letra el documento que antecede.

2. Conoce al (a la) otorgante y que este (a) está legalmente capacitado para el otorgamiento.

3. El otorgante ha firmado el referido documento en su carácter de _____
de la persona jurídica _____

4. La citada persona jurídica con sede en _____ está legalmente constituida, que tiene actualmente existencia legal y que el acto para el cual se ha otorgado este poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.
5. El otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta, que esta es legítima y que está facultado para otorgar este poder.
6. Las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5, me constan porque he tenido a la vista los documentos auténticos.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____ de _____
el Notario que suscribe DA FE de que:

1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado en _____
firmó en su presencia
el documento que antecede, conoce al otorgante y que este está legalmente capacitado para el otorgamiento.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

Para todos los demás países el Señor Cónsul de Colombia o ante quien se otorgue, debe expedir una certificación dejando constancia de la existencia legal de la sociedad, 2) de que esta ejerce actualmente su objeto social, y 3) de que la persona o personas que otorgan el poder están facultadas para hacerlo, dejando constancia así mismo de que tuvo a la vista las pruebas que acrediten tales circunstancias.

LEGALIZACIÓN POR EL CONSUL DE COLOMBIA
O POR APOSTILLA

NOTARIAL CERTIFICATE

(When the applicant is a CORPORATION)

(Powers of attorney granted in: El Salvador, Mexico, U.S.A. and Venezuela)

This _____ day of _____
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. _____
(name of the person who signs the power of attorney)

of _____ legal _____ age _____ and _____ domiciled in _____ set his hand on the foregoing document.

2. The grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

3. The grantor has executed the foregoing document in his capacity of _____ of the juridical person _____

4. The mentioned juridical person with place of business in _____ is duly organized, has actual legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. The grantor has in fact the referred quality and that his/her representation is legal and that he/she is empowered to grant this power of attorney.

6. I have based the above certifications 3, 4 and 5, on the authentic documents which for such purpose were exhibited to me.

Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

NOTARIAL CERTIFICATE (When the applicant is an INDIVIDUALS)

On this _____ day of _____
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. _____
(name of the person who signs the Power of Attorney)

of legal age and domiciled at _____ signed in his presence the foregoing document, the grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

For all other countries the Colombian Consul or before who it is granted must issue a certification stating 1) the legal existence of the corporation, 2) that the corporate purposes are actually being accomplished, 3) that the person or persons who grant this Power of Attorney are empowered to do it. The Consul will certify also that the documents evidencing those circumstances were exhibited to him.

LEGALIZATION BY THE COLOMBIAN CONSUL, OR BY APOSTILLE.

ELABORADO: DILIA RODRÍGUEZ D' ALEMAN	REVISADO: JULIANA ESCOBAR	APROBADO: DILIA RODRÍGUEZ D' ALEMAN	CODIGO 6.8
--	------------------------------	--	---------------

7095 1/10/10

The undersigned, JOHAN REINDER EGBERT KIELSTRA, civil law notary, residing at The Hague, The Netherlands, hereby certifies that the attached document was signed by mr. Ralph Leon Marie Oscar Thomas, born on April 27, 1963, Dutch passport number NK4183805, who is authorized as proxy holder to sign for and on behalf of the private limited liability company **DSM IP Assets B.V.**, established at Heerlen, the Netherlands.

The Hague, this 12th day of October 2010.



Handwritten signature of the notary, Mr. J.R.E. Kielstra.

APOSTILLE

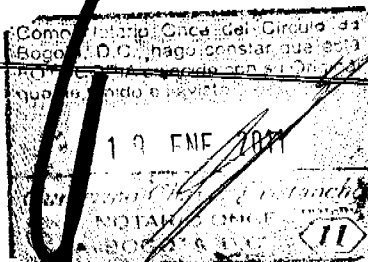
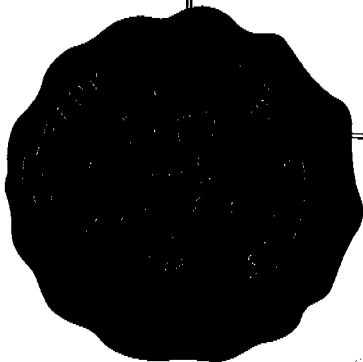
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: THE NETHERLANDS
2. This public document has been signed by **mr. J.R.E. Kielstra**
3. acting in the capacity of notary at **'s-Gravenhage**
4. bears the seal/stamp of aforesaid notary
Certified
5. at **'s-GRAVENHAGE**
6. on **14-10-2010**
7. by the clerk of the court (Rechtbank)
8. no. **2010/6869/8**

Seal/stamp:

10. Signature:

S. Petronilia



Traducción oficial de un documento que está originalmente en inglés

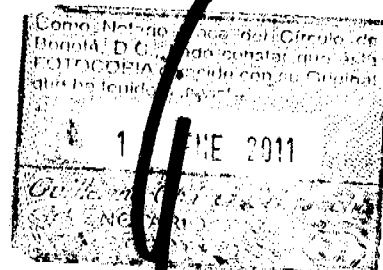
El suscrito JOHAN REINDER EGBERT KIELSTRA, notario de asuntos civiles, residente en La Haya, Países Bajos, por el presente documento certifica que el documento adjunto fue firmado por el señor Ralph Leon Marie Oscar Thomas, nacido el 27 de abril de 1963, identificado con el pasaporte número NK4183805, quien está autorizado como titular del poder para firmar en nombre de la compañía privada de responsabilidad limitada **DSM IP Assets B.V.** establecida en Heerlen, Países Bajos.

La Haya, este día 12 de octubre de 2010.

(Firmado)

Sello: "Sr. J.R.E. Kielstra, Notario de 's-Gravenhage"

Apostille:



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

APOSTILLA:

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Países Bajos
- El presente documento público
2. Ha sido firmado por: J.R.E. Kielstra
3. Actuando en calidad de: Notario de 's-Gravenhage.
4. Lleva el sello/estampilla de: Notaario antes mencionado
- Certificado
5. En: 's-Gravenhage
6. El: 14 de octubre de 2010
7. Por: El Secretario de la Corte (Rechtbank)
8. Bajo el No.: 2010/6869/8
9. Sello / estampilla: Hay un sello.
10. Firma: Firmado. S. Petronilia

FIN DE LA TRADUCCIÓN

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción auténtica y completa del inglés al español del documento adjunto, la cual he elaborado según mi leal saber y entender.

Documento: "Certificación Notarial - Apostilla Países Bajos"

Fecha: 28 de octubre de 2010.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes (Sello y firma digital debidamente registrados ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia)

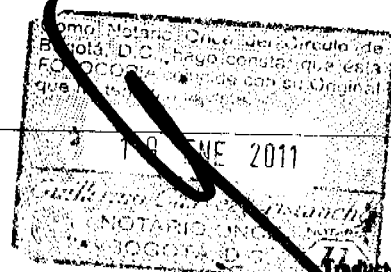
Licencia # 376 de 1993, expedida por el Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 # 99-18 Of. 411, Bogotá, D.C.

Teléfonos: (571) 218 2308, (571) 623 2925.

E-mail: teseser1@yahoo.com

Traducción # 15-596



JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2000 OCT 20 11:20
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

627989
Lore Soria
CUYA FIRMA AVARELLA II
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

Como Notario del Circuito de
Bogotá D.C. hago constar que esta
FOTOCOPIA coincide con su Original
que se encuentra en mi poder
19 ENE 2011
Notario Once
BOGOTÁ D.C.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
18 February 2010 (18.02.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/018186 A1

(51) International Patent Classification:
A23L 3/3463 (2006.01) **A23B 5/16** (2006.01)
A23L 2/44 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2009/060413

(22) International Filing Date:
12 August 2009 (12.08.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
08162201.1 12 August 2008 (12.08.2008) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): **DSM IP ASSETS B.V.** [NL/NL]; Het Overloon 1, NL-6411 TE Heerlen (NL).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **VISSER, Johannes Martinus Jacobus** [NL/NL]; Waterloop 22, NL-2614 XC Delft (NL). **HAAN, DE, Ben Rudolf** [NL/NL]; Watertorenlaan 17, NL-2275 AW Voorburg (NL).

(74) Agents: **BIERMANN, Jan** et al.; DSM Intellectual Property, Delft Office (600-0240), P.O. Box 1, NL-2600 MA Delft (NL).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, ~~AZ~~, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

(54) Title: **LIQUID NISIN COMPOSITIONS**

(57) Abstract: The present invention relates to liquid nisin compositions having a high anti-microbial activity. The invention further relates to a method for preparing the liquid nisin compositions as well as their use as a preservative in food products.

WO 2010/018186 A1

COMPOSICIÓN DE NISINA LÍQUIDA

RESUMEN

La presente invención se relaciona con composiciones de nisina líquida que tienen una alta actividad antimicrobiana. La invención se relaciona adicionalmente con
5 un método para preparar las composiciones de nisina líquida así como también su uso como un conservante en productos alimenticios.

COMPOSICIONES DE NISINA LÍQUIDA

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con composiciones de nisina líquida, con métodos para preparar las composiciones, con su uso como un conservante y con
5 métodos para preservar los alimentos en donde se utilizan las composiciones.

Antecedente de la Invención

La necesidad de métodos mejorados para la conservación de alimentos es grande. Se ha estimado que una gran parte del suministro mundial de alimentos se pierde como resultado de la descomposición microbiana y las infecciones microbianas
10 transmitidas por los alimentos representan una amenaza constante y seria para la salud humana.

Varias especies bacterianas que pueden contaminar y crecer en los alimentos y cultivos son patogénicas o producen toxinas y generan un rango de enfermedades de intoxicación alimentaria. A pesar del mejoramiento sustancial en la tecnología e
15 higiene, los productos alimenticios se pueden exponer al deterioro y a bacterias patogénicas en el medio en el que se manipulan los alimentos y el número de intoxicación por alimentos aún se incrementa en la mayoría de países. Las técnicas de conservación de alimentos, por ejemplo el procesamiento por calor, congelamiento, ultrasonido, irradiación, y tratamiento a alta presión, reducen significativamente la
20 carga antimicrobiana pero es de particular interés la evidencia de que los alimentos procesados se contaminan con microorganismos luego del procesamiento y antes del empaque. Son de creciente preocupación en la industria de los alimentos los problemas microbianos relacionados con varios alimentos tal como productos lácteos y cárnicos, alimentos frescos y refrigerados y alimentos de mar.

25 Especialmente los productos alimenticios en el rango de pH de 4.5 a 7.0 se sabe que son susceptibles al deterioro microbiano por microorganismos, que incluyen patógenos y bacterias formadoras de esporas. En niveles de pH inferiores, las levaduras, mohos y bacterias tolerantes al ácido son más relevantes. Sobre todo, los alimentos procesados no se consumen directamente después de procesamiento,
30 permitiendo por lo tanto que las bacterias sobrevivan al proceso de producción o se introduzcan y crezcan mediante post-contaminación. Debido a que puede ocurrir el consumo de alimentos sin el recalentamiento de los alimentos procesados a temperaturas suficientes y durante el tiempo suficiente, existe un riesgo de intoxicación por alimentos o deterioro de los alimentos.

Adicionalmente, la reciente tendencia de alimentos mínimamente procesados con las cualidades nutricionales y sensoriales intrínsecas de materias primas y alimentos frescos ha elevado el riesgo. Los tratamientos de conservación moderados, tal como alta presión hidrostática y técnicas de campo eléctrico pulsado han probado ser exitosos, pero frecuentemente se basan en obstáculos efectivos, *es decir* cadena de frío y la adición de antimicrobianos naturales.

Se ha hecho una investigación exhaustiva en el campo de la seguridad alimenticia para desarrollar diseños de productos antimicrobianos efectivos, que resulten en una combinación de composiciones, procesamiento y conservación.

La nisina es una sustancia antibacteriana similar a péptido producida por *Lactococcus lactis subsp. lactis*. Esta comprende 34 aminoácidos y es activa contra las bacterias principalmente gram-positivas. La nisina no es tóxica y está libre de efectos colaterales. La nisina es Generalmente Reconocida como sustancia Segura y se utiliza ampliamente en una variedad de alimentos. Ejemplos de tales productos son queso procesado, leche, crema cuajada, postres lácteos, mezclas para helado, huevo líquido, productos de harina horneados, aderezos y cerveza. La nisina es estable al calor y sobrevive a temperaturas de pasteurización con pérdida mínima de actividad.

Usualmente, la nisina se obtiene mediante la fermentación de una especie de *Lactococcus lactis* y se formula adicionalmente como un polvo seco que se puede utilizar como un conservante como tal o después de haberse resuelto primero en un disolvente adecuado. Delvoplus® y Nisaplin® son nombres comerciales para el polvo de nisina que contiene 1 millón IU por gramo. Ellos se distribuyen por DSM y Danisco, respectivamente. Estos productos de nisina en polvo tienen varias desventajas: el polvo se genera luego de manipulación, y es difícil la dosificación y mezcla de cantidades pequeñas de polvos en los productos. Por lo tanto, se prefieren comercialmente las composiciones de nisina líquida que no tienen las desventajas descritas anteriormente.

Las composiciones de nisina líquida como tal se conocen en la técnica. Aunque se ha reportado que las composiciones de nisina líquida tienen actividad contra bacterias gram-positivas (ver Mota-Meira *et al.* (2000), Montville *et al.* (1999), US 5,584,199 y US 4,597,972) y aún bacterias gram-negativas (ver EP 0 453 860, US 5,260,271 y US 5,559,096), existen aún composiciones de nisina líquida que tienen una actividad antimicrobiana mejorada, particularmente contra bacterias gram-positivas encontradas en la industria de los alimentos.

Resumen de la Invención

De forma sorprendente, ahora se han encontrado composiciones de nisina que tienen una actividad muy alta contra bacterias gram-positivas. Debido a su alta actividad antimicrobiana, solo se necesitan bajas cantidades de las composiciones para la acción efectiva contra bacterias *por ejemplo* bacterias gram-positivas. Las composiciones tienen buena estabilidad microbiológica que en combinación con su buena estabilidad física y química hacen adecuadas las composiciones para almacenamiento prolongado y por consiguiente les da una larga vida útil. Adicionalmente, las composiciones de la invención pueden tener una baja turbidez, que las hace adecuadas para uso en aplicaciones alimenticias, en donde es de importancia la adición de aditivos de baja turbidez. En claridad de las características anteriores, las composiciones de la invención se pueden emplear ventajosamente como conservantes de alimentos.

Descripción Detallada de la Invención

De acuerdo con un primer aspecto la invención proporciona un método para preparar una composición de nisina líquida, preferiblemente una composición acuosa de nisina líquida. El método comprende las etapas de: a) preparar una primera nisina líquida que contiene la composición que tiene un pH de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 12, preferiblemente aproximadamente 3 a aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 3.5 a aproximadamente 9.5, más preferiblemente aproximadamente 4 a aproximadamente 9, todavía más preferiblemente aproximadamente 4.5 a aproximadamente 8.5, aún más preferiblemente aproximadamente 5 a aproximadamente 8, más preferiblemente aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7.5, y en particular aproximadamente 5.5 por debajo de 7, b) aislar los compuestos sólidos de la primera nisina líquida preparada que contiene la composición, c) poner en contacto los compuestos sólidos aislados con una solución que tiene un pH de aproximadamente 0 a aproximadamente 5, preferiblemente aproximadamente 0.5 a aproximadamente 4.5, más preferiblemente aproximadamente 1 a aproximadamente 4, aún más preferiblemente aproximadamente 1.5 a aproximadamente 3.5, más preferiblemente aproximadamente 1.5 a aproximadamente 3 y en particular aproximadamente 2 a aproximadamente 3 para preparar una segunda composición de nisina líquida, y d) remover los compuestos sólidos de la segunda composición de nisina líquida. La etapa d es opcional, pero en una realización preferida esta se desarrolla en el método de la invención.

En una realización adicional el método de la invención comprende la etapa de:
e) ajustar el pH de la segunda composición de nisina líquida a un valor de pH deseado tal como un pH entre 2 y 6, *por ejemplo* un pH entre 2 y 3 o a pH entre 5 y 6.

Opcionalmente, por lo menos uno de los compuestos funcionales adicionales
5 mencionados adelante se pueden agregar antes, durante o después de por lo menos una de las etapas del método de la invención. Por ejemplo, un crioprotector, *por ejemplo* glicerol, se puede agregar durante la etapa c, de tal manera que la segunda composición de nisina líquida comprende 35% a 60% p/p de crioprotector. En otro
10 ejemplo, un compuesto que reduce o disminuye la formación de espuma y/o un compuesto antimicrobiano adicional, *por ejemplo* un ácido orgánico o una sal del mismo, se puede agregar antes de la etapa b. En una realización preferida sin embargo por lo menos un compuesto funcional adicional se agrega después de la etapa d y antes de la etapa e, o durante o después de la etapa e.

En una etapa de la realización comprende mezclar nisina con una solución
15 acuosa para preparar una primera nisina líquida que contiene la composición que tiene una sal inorgánica final (*por ejemplo* NaCl) en concentración de 1.5 M o menor, preferiblemente 0.05 M a 1.5 M y más preferiblemente 0.1 M a 1.5 M. La primera nisina líquida que contiene la composición tiene un pH de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 12, preferiblemente aproximadamente 3 a aproximadamente 10,
20 preferiblemente aproximadamente 3.5 a aproximadamente 9.5, más preferiblemente aproximadamente 4 a aproximadamente 9, aún más preferiblemente aproximadamente 4.5 a aproximadamente 8.5, todavía aún más preferiblemente aproximadamente 5 a aproximadamente 8 y más preferiblemente aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7.5 y en particular aproximadamente 5.5 por debajo de 7.
25 Cualquier fuente de nisina se puede suspender y/o disolver en la solución acuosa. En una realización preferida la nisina es un polvo, preferiblemente un polvo seco. Por ejemplo, se pueden utilizar las composiciones en polvo de nisina disponibles comercialmente tal como Delvoplus® y Nisaplin®. La fuente puede comprender nisina A, nisina Z o una combinación de las mismas. La solución acuosa puede ser una
30 solución amortiguadora, *por ejemplo* un amortiguador de fosfato tal como $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$. También se pueden utilizar otros amortiguadores adecuados frecuentemente. Estos incluyen, pero no se limitan a, amortiguadores de acetato, amortiguadores de lactato, amortiguadores de citrato, amortiguadores de glicina/HCl y cualquier combinación de los mismos.

Los compuestos sólidos se pueden separar/aislar desde la primera nisina líquida que contiene la composición mediante técnicas de aislamiento bien conocidas. En una realización preferida la etapa b se desarrolla por medio de centrifugación, filtración o cualquier combinación de los mismos.

5 Posteriormente, se puede preparar una segunda composición de nisina líquida al *por ejemplo* poner en contacto, *por ejemplo* disolver o mezclar o suspender, los compuestos sólidos aislados con/en una solución, preferiblemente una solución acuosa, que tiene un pH de aproximadamente 0 a aproximadamente 5, preferiblemente aproximadamente 0.5 a aproximadamente 4.5, más preferiblemente
10 aproximadamente 1 a aproximadamente 4, aún más preferiblemente aproximadamente 1.5 a aproximadamente 3.5, más preferiblemente aproximadamente 1.5 a aproximadamente 3 y en particular aproximadamente 2 a aproximadamente 3. En una realización un compuesto funcional adicional mencionado adelante se agrega durante esta etapa.

15 Luego, la segunda composición de nisina líquida se puede purificar al remover *por ejemplo* los residuos restantes y/o las proteínas sin nisina o partes de las mismas. Esta etapa de purificación se puede desarrollar mediante técnicas de aislamiento bien conocidas. En una realización preferida la etapa d se desarrolla por medio de centrifugación, filtración o cualquier combinación de los mismos.

20 El método descrito anteriormente resulta en una composición de nisina líquida que tiene una actividad mucho mayor contra los microorganismos, particularmente bacterias gram-positivas, que las composiciones de nisina líquida descritas en la técnica anterior. En otras palabras, el método de la presente invención resulta en composiciones de nisina líquida que tienen una concentración inhibidora mucho menor
25 (MIC) contra microorganismos, particularmente bacterias gram-positivas, que las composiciones de nisina líquida descritas en la técnica anterior.

 Por lo tanto, una composición de nisina que se puede obtener mediante un método de acuerdo con la invención es otra parte de la presente invención. La composición de nisina puede ser sólida, pero preferiblemente esta es una composición
30 líquida.

 En una realización las composiciones de nisina de la invención tienen un MIC de 1.0 µg/ml o menos contra por lo menos una bacteria gram-positiva. El MIC se refiere a la concentración mínima de un compuesto o composición necesaria para inhibir el crecimiento del organismo probado. Preferiblemente, el MIC es un promedio
35 de por lo menos tres repeticiones independientes. Las composiciones de la presente

invención tienen un MIC de 1.0 µg/ml o menos cuando se prueba para el crecimiento de la inhibición de por lo menos una bacteria gram-positiva en el ensayo descrito anteriormente. En una realización las composiciones de la invención tienen un MIC de 0.5 µg/ml o menos, preferiblemente un MIC de 0.1 µg/ml o menos, más preferiblemente un MIC de 0.05 µg/ml o menos, aún más preferiblemente un MIC de 0.01 µg/ml o menos, todavía aún más preferiblemente un MIC de 0.005 µg/ml o menos, particularmente un MIC de 0.001 µg/ml o menos, más particularmente un MIC de 0.0005 µg/ml o menos contra por lo menos una bacteria gram-positiva y más particularmente un MIC de 0.0001 µg/ml o menos contra por lo menos una bacteria gram-positiva. Las bacterias gram-positivas incluyen, pero no se limitan a, *Micrococcus* sp., *Listeria* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Clostridium* sp., *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp. y *Lactococcus* sp. En una realización la bacteria gram-positiva se selecciona del grupo que consiste de *Bacillus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* y *Micrococcus*. Las especies adecuadas dentro del género *Bacillus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* y *Micrococcus* incluyen, pero no se limitan a, *B. subtilis*, *L. lactis*, *S. aureus*, *L. innocua* y *M. luteus*, respectivamente. Dentro de las especies que dan cepas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, *Bacillus subtilis* ATCC 31578, *Lactococcus lactis* ATCC 19257, *Staphylococcus aureus* ATCC 27661, *Listeria innocua* LMD 92.20 y *Micrococcus luteus* B212, respectivamente. En una realización preferida las composiciones de la presente invención tienen un MIC de 0.5 µg/ml o menos, preferiblemente un MIC de 0.1 µg/ml o menos, más preferiblemente un MIC de 0.05 µg/ml o menos, aún más preferiblemente un MIC de 0.01 µg/ml o menos, todavía aún más preferiblemente un MIC de 0.005 µg/ml o menos, particularmente un MIC de 0.001 µg/ml o menos y más particularmente un MIC de 0.0005 µg/ml o menos contra por lo menos una cepa de *M. luteus*, preferiblemente *M. luteus* B212.

Se puede medir la actividad de nisina utilizando el siguiente bioensayo bien conocido por la persona experta (ver Pongtharangkul and Demirci, 2004), que incluye pretratar la composición de nisina en pH bajo. En resumen, el *M. luteus* B212 que contiene placas agar (agar Iso-sensitest) se prepara utilizando un cultivo que ha crecido recientemente. Después del secado, se utiliza una bomba de vacío para crear agujeros pequeños en el agar. Las muestras y sus diluciones (10 µl) se transfieren a los agujeros y se les permite difundir dentro del agar durante 18 horas a 5°C. Posteriormente, se incuban las placas de agar durante 24 horas a 30°C y se miden las zonas de inhibición alrededor de la muestra que contiene los agujeros. Paralelo a las

muestras, se incluyen los controles con cantidades conocidas de nisina (0 – 1600 IU/ml). Sus zonas de inhibición se utilizan para preparar una curva de calibración requerida para determinar los niveles de nisina de las muestras. Todas las etapas se llevan a cabo asépticamente. El IU para nisina ya se ha definido como sigue. El The

5 World Health Organization Committee on Biological Standardization, vigésimo segundo informe.. Informe Técnico de la Organización Mundial de la Salud serie, No. 444 en 1970, ha establecido una preparación de nisina de referencia internacional, y la unidad internacional (de aquí en adelante IU) se define como 0.001 mg de esta preparación. Delvoplus® y Nisaplin®, nombres comerciales para productos en polvo

10 de nisina que contiene 1 millón IU por gramo, se distribuyen por DSM y Danisco, respectivamente. Por medio del ensayo anterior se puede determinar la concentración de nisina en las muestras.

Las composiciones MIC de nisina se pueden medir por medio del siguiente ensayo MIC. La actividad de nisina se mide utilizando el ensayo de caldo de cultivo de

15 microdilución estándar, bien conocido por la persona experta. En resumen, un *Micrococcus luteus* B212 que contiene el caldo de cultivo Iso-sensitest se prepara utilizando un cultivo que ha crecido recientemente. El número de células por ml se determina utilizando una cámara de conteo. Preferiblemente, se utiliza un conteo celular de 10^3 . Se agrega 100 µl de inóculo a cada pozo de una placa de microtítulo de

20 96 pozos. Se agrega 100 µl de una composición de nisina al primer pozo (A1) y se mezcla apropiadamente al pipetear hacia arriba y hacia abajo tres veces. Se hace una dilución en serie al transferir 100 µl del primer pozo al siguiente pozo (A2) y se diluye apropiadamente. Esto se repite hasta que cada componente se diluye en serie en 36 pozos. Luego, las placas se incuban a 30°C durante 7 días y se leen cada día para el

25 crecimiento bacteriano. Las concentraciones MIC son la concentración más baja que inhibe completamente el crecimiento.

En una realización las composiciones de la invención tienen un pH de aproximadamente 0 a aproximadamente 5, preferiblemente aproximadamente 0.5 a aproximadamente 4.5, más preferiblemente aproximadamente 1 a aproximadamente

30 4, aún más preferiblemente aproximadamente 1.5 a aproximadamente 3.5, más preferiblemente aproximadamente 1.5 a aproximadamente 3 y en particular aproximadamente 2 a aproximadamente 3. En tales condiciones de pH, la estabilidad microbiológica de las composiciones de la invención es buena y el MIC de las composiciones es baja y estable durante almacenamiento.

En una realización adicional las composiciones de acuerdo con la invención comprenden 0.01 a 5%, preferiblemente 0.05 a 2.5%, más preferiblemente 0.1 a 1.0%, más preferiblemente 0.15 a 0.5% y en particular 0.2 a 0.3 % (p/p) de nisina.

Las composiciones de nisina de la invención pueden comprender una cantidad
5 baja de sales tal como sales inorgánicas *por ejemplo* NaCl. Se entiende que no significa que los compuestos funcionales adicionales mencionados adelante (*por ejemplo* compuestos antimicrobianos tal como ácidos orgánicos o sus sales) se incluyan dentro de la definición de "sal". En una realización las composiciones de la invención comprenden una sal, *por ejemplo* sal inorgánica, para la relación de nisina
10 de 100:1 a 1:100, preferiblemente 50:1 a 1:100, más preferiblemente 25:1 a 1:100 y en particular 10:1 a 1:100. En una realización las composiciones de nisina de la invención son esencialmente libres de sales, preferiblemente sales inorgánicas tal como *por ejemplo* NaCl. La sal inorgánica puede ser cualquiera adecuada, sal inorgánica de grado alimenticio. Ejemplos de sales inorgánicas son NaCl, Na₂SO₄,
15 (Ca)₃(PO₄)₂, KNO₃, KCl y MgCO₃. La concentración de estas sales en las composiciones es 100 mg/ml o menos, preferiblemente 50 mg/ml o menos, más preferiblemente 25 mg/ml o menos y en particular 15 mg/ml o menos. La concentración de sal se puede medir mediante análisis catiónico separado, mediante análisis aniónico de absorción atómica, mediante HPLC o preferiblemente mediante la
20 determinación del contenido de ceniza mediante ignición (550+/- 25°C). Las composiciones de nisina que tienen una baja concentración de sales inorgánicas son muy atractivas, debido a que ellas no interferirán con la matriz de alimentos para dar reacciones indeseadas y alteraciones de sabor y/o estructura.

Las composiciones de nisina de la invención pueden comprender bajas
25 cantidades de componentes diferentes de nisina y sal. Estos componentes pueden ser proteínas o sus partes. Se entiende que no significa que los compuestos funcionales adicionales mencionados adelante (*por ejemplo* compuestos antimicrobianos, agentes antiespumantes, tensoactivos, etc.) se incluyan dentro de la definición de "componentes diferentes a nisina y sal". En una realización las composiciones de la
30 invención comprenden un componente diferente de nisina para la relación de nisina de 100:1 a 1:100, preferiblemente 10:1 a 1:100 y más preferiblemente 2:1 a 1:100. En una realización las composiciones de nisina de la invención están esencialmente libres de estos componentes. Los componentes se pueden originar de la biomasa producida durante el proceso de fermentación de nisina utilizando *Lactococcus lactis*. La
35 concentración de nisina se puede medir primero mediante el ensayo descrito

anteriormente. Posteriormente, la concentración de proteína total se puede estimar utilizando ensayos clásicos conocidos por la persona experta. La concentración de proteína sin nisina se puede estimar al sustraer la concentración de nisina de la concentración de proteína total.

5 En todavía otra realización las composiciones de la invención son composiciones líquidas claras. Las composiciones claras de nisina líquida se pueden utilizar en y/o en cualquier tipo de producto. En vista de su claridad, ellas se pueden utilizar ventajosamente en productos en donde la claridad es de importancia tal como productos con base en gelatina *por ejemplo* postres, jugos de frutas, bebidas y
10 aplicaciones de superficie sobre los productos alimenticios. Las composiciones líquidas claras como se utiliza aquí son las composiciones líquidas que tienen una turbidez de 0 a 100 FNU, preferiblemente 0 a 50 FNU, más preferiblemente 0 a 25 FNU y particularmente 0 a 10 FNU. Las composiciones líquidas turbias son composiciones líquidas que tienen una turbidez por encima de 100 FNU. La turbidez
15 en FNU (Unidad Nefelométrica de Formazina) se puede determinar con un método de dispersión de luz y se puede medir utilizando un fotómetro de turbidez Nephla con el método DIN medido EN 27027/ISO 7027. Las composiciones claras así como también composiciones turbias de nisina líquida se pueden preparar por medio del método de acuerdo con la invención. Se prepara una composición líquida clara, si se prepara una
20 nisina líquida que contiene la composición que tiene un pH de aproximadamente 5 o más, preferiblemente un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, en la etapa a del método de la invención. Se prepara una composición líquida turbia, si una nisina líquida que contiene la composición que tiene un pH por debajo de aproximadamente 5, preferiblemente un pH de aproximadamente 1.5 por debajo de aproximadamente 5,
25 o un pH por encima de aproximadamente 9, preferiblemente a un pH por encima de aproximadamente 9 a aproximadamente 12 se prepara en la etapa a del método de la invención. Las composiciones claras y turbias de nisina líquida tienen alta actividad descrita anteriormente contra los microorganismos, en particular bacterias gram-positivas.

30 Un método en donde la concentración de sal inorgánica final (*por ejemplo* NaCl) de la primera nisina líquida que contiene la composición (*es decir* la composición de nisina líquida preparada en la etapa a del método de acuerdo con la invención, ver anterior) que está por encima de 1.5 M tiene varias desventajas comparado con un método en donde la concentración de sal inorgánica final de la
35 primera nisina líquida que contiene la composición es 1.5 M o menos. Primero, la

primera composición de nisina líquida que tiene una concentración de sal inorgánica final por encima de 1.5 M muestra un desempeño de separación reducido en centrifugación (*es decir* tiene bajo índice de sedimentación) en comparación con las composiciones de nisina líquida con una concentración de sal inorgánica final de 1.5 M o menos. Segundo, la composición de nisina líquida final resultante que se prepara al desarrollar el método de acuerdo con la presente invención (*es decir* etapas a hasta c y opcionalmente etapas d y e, ver anterior), en donde la primera nisina líquida que contiene la composición tiene una concentración de sal inorgánica final por encima de 1.5 M, tiene varias desventajas:

- es turbia;
- tiene una pureza inferior de las composiciones de nisina líquida finales que se han hecho por medio de un método de acuerdo con la presente invención en donde la primera nisina líquida que contiene la composición contiene un concentración de sal inorgánica final de 1.5 M o menos;
- tiene una actividad antimicrobiana inferior que la de las composiciones de nisina líquida finales que se han hecho por medio de un método de acuerdo con la presente invención en donde la primera nisina líquida que contiene la composición contiene una concentración de sal inorgánica final de 1.5 M o menos;
- y
- tiene un riesgo mayor de precipitarse que las composiciones de nisina líquida finales que se han hecho por medio de un método de acuerdo con la presente invención en donde la primera nisina líquida que contiene la composición contiene un concentración de sal inorgánica final de 1.5 M o menos

Las composiciones de nisina líquida de la invención tienen por lo menos una de las desventajas mencionadas adelante comparada con las preparaciones de nisina líquida conocidas en la técnica:

- las composiciones de la invención tienen una mejor eficacia antimicrobiana comparado con composiciones de nisina líquida de la técnica anterior, y/o
- las composiciones de la invención están esencialmente libres de sales tal como *por ejemplo* sales inorgánicas *por ejemplo* NaCl y esencialmente libres de otros componentes diferentes de nisina. Como un resultado de esto, en las aplicaciones alimenticias, se evita el uso de las composiciones de la invención que no interfieren con la matriz de alimentos para dar las reacciones y alteraciones indeseadas de sabor y/o estructura, y/o

– las composiciones de la invención pueden ser claras, *es decir* tienen una baja turbidez (entre 0 y 100 FNU). Tales composiciones no interfieren con el color y/o la claridad de los productos a los que ellos se aplican.

– De acuerdo con otra realización, las composiciones de la invención comprenden adicionalmente por lo menos un compuesto funcional adicional que incluye, pero no se limita a, un compuesto antimicrobiano adicional tal como un ácido *por ejemplo* ácido sórbico, ácido propiónico, ácido benzoico, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido cinámico, o una sal de cualquiera de estos ácidos, una oxidasa glucosa, natamicina, lisozima, poli-L-lisina, nistatina, lucensomicina, amfotericina B, filipina, pediocina; un tensoactivo *por ejemplo* SDS, Tween, ácidos grasos; un agente que ajusta el pH tal como HCl o NaOH o un agente amortiguante *por ejemplo* una sal de fosfato o sal de acetato; un crioprotector tal como glicerol o propanodiol; agentes espesantes *por ejemplo* goma xantano, goma guar, goma Arábica, goma tragacanto, goma gelano, goma garrofín, goma carragenano, goma ramxano, alginato, almidón, carboximetilcelulosa, carboxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, alcohol polivinílico, polietilenglicol, polipropilenglicol. Más aún, las composiciones de la invención pueden comprender agentes que reducen o disminuyen la formación de espuma. Se pueden agregar compuestos adicionales a las composiciones de la invención en forma líquida o sólida y se pueden mezclar con bastante antelación o directamente antes de uso. Utilizar por lo menos un compuesto/conservante antimicrobiano adicional en las composiciones de nisina de la invención se espera que lo estabilice adicionalmente microbiológicamente y por lo tanto puede ser benéfico para su vida útil.

La actividad de nisina presente en una composición líquida acuosa se puede incrementar sustancialmente al remover las impurezas. Más aún, el índice de solubilización de nisina en las composiciones acuosas se incrementa mediante la remoción de impurezas tal como *por ejemplo* sales inorgánicas. La nisina se puede vincular parcialmente a impurezas que resultan en nisina que no está disponible para su actividad conservante. En otras palabras, la nisina tiene una biodisponibilidad limitada en la presencia de impurezas. Como se utiliza aquí, el término "biodisponibilidad" se refiere a la disponibilidad, cantidad (*por ejemplo*, concentración), o actividad de nisina en una formulación sólida, semisólida o líquida. Las impurezas tal como proteínas sin nisina u otros componentes diferentes de nisina, los residuos de pared celular y las sales pueden tener un efecto negativo en el índice de solubilización

de nisina. Se encuentra que aproximadamente menos del 50% de la nisina presente en tal formulación líquida está disponible como un conservante en caso que estén presentes estas impurezas. Se ha encontrado que las impurezas están presentes en productos de nisina disponibles comercialmente. La nisina disponible comercialmente
5 contiene en general 5-25% de proteína sin nisina o residuos celulares. Estas impurezas se originan del proceso de producción de la nisina. Se utiliza frecuentemente la recuperación, purificación o reformulación luego de la fermentación de las sales que aún están presentes en la formulación de nisina final.

En un aspecto adicional la invención se relaciona con una suspensión acuosa
10 de nisina que comprende agentes espesantes. Por supuesto, también se pueden utilizar dos o más agentes espesantes diferentes. Las suspensiones de la invención comprenden 0.01 a 5%, preferiblemente 0.05 a 2.5%, más preferiblemente 0.1 a 1%, más preferiblemente 0.15 a 0.5% y en particular 0.2 to 0.3% (p/p) de nisina. Las suspensiones de la invención comprenden 0.01 a 5%, preferiblemente 0.05 a 5%, más
15 preferiblemente 0.1 a 5%, más preferiblemente 0.2 a 5% y en particular 0.5 a 5% (p/p) de agente espesante. El agente espesante se selecciona del grupo que consiste de goma xantano, goma guar, goma Arábica, goma tragacanto, goma gelano, goma garrofín, goma carragenano, goma ramxano, alginato, almidón, carboximetilcelulosa, carboxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa,
20 alcohol polivinílico, polietilenglicol y polipropilenglicol. En una realización preferida el agente espesante es una goma tal como goma xantano. El pH de la suspensión de acuerdo con la invención es aproximadamente 2 a aproximadamente 12, preferiblemente aproximadamente 2 a aproximadamente 11, más preferiblemente aproximadamente 2 a aproximadamente 10, aún más preferiblemente
25 aproximadamente 2 a aproximadamente 9, todavía aún más preferiblemente aproximadamente 2 a aproximadamente 8, más preferiblemente aproximadamente 2 a aproximadamente 7 y en particular aproximadamente 2 a aproximadamente 6. La suspensión de la invención es estable. "Suspensión estable" como se utiliza aquí significa una suspensión físicamente estable, es decir una suspensión que muestra
30 50% o menos, preferiblemente 40% o menos, más preferiblemente 30% o menos, aún más preferiblemente 20% o menos, más preferiblemente 10% o menos y en particular 0% de sedimentación después de almacenamiento a temperatura ambiente durante 9 días a pH 5. La estabilidad física de las suspensiones se puede medir mediante los métodos conocidos en la técnica tal como el ensayo de sedimentación como se
35 muestra aquí (ver Ejemplo 9).

En una realización la suspensión de acuerdo con la invención comprende adicionalmente por lo menos un compuesto funcional adicional seleccionado del grupo que consiste de un compuesto antimicrobiano adicional, un tensoactivo, un agente que ajusta el pH, y un crioprotector. Ejemplos de compuestos antimicrobianos adicionales
5 adecuados son ácidos tal como ácido sórbico, ácido propiónico, ácido benzoico, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido cinámico, ácido o sales de cualquiera de estos ácidos, una oxidasas glucosa, natamicina, lisozima, poli-L-lisina, nistatina, lucensomicina, amfotericina B, filipina, pediocina. Ejemplos de tensoactivos adecuados son SDS, Tween, ácidos grasos, por mencionar solo unos pocos. Ejemplos
10 de pH adecuado que ajustan los agentes están entre otros HCl o NaOH o agentes amortiguadores tal como sales fosfato y sales de acetato. Ejemplos de crioprotectores adecuados son glicerol y propanediol. Más aún, las suspensiones de la invención pueden comprender agentes que reducen o disminuyen la formación de espuma. Se pueden agregar compuestos adicionales a las suspensiones de la invención en forma
15 líquida o sólida y se pueden mezclar bien previamente o directamente antes de uso.

En una realización adicional la invención se relaciona con un método para preparar una suspensión de acuerdo con la invención, el método que comprende las etapas de: a) agregar nisina y agentes espesantes, separadamente o como una composición en polvo, a una solución acuosa (*por ejemplo* agua), y b) mezclar para
20 obtener una suspensión. Si es necesario, se puede ajustar el pH de la suspensión a pH de aproximadamente 2 a aproximadamente 12, preferiblemente aproximadamente 2 a aproximadamente 11, más preferiblemente aproximadamente 2 a aproximadamente 10, aún más preferiblemente aproximadamente 2 a aproximadamente 9, todavía aún más preferiblemente aproximadamente 2 a
25 aproximadamente 8, más preferiblemente aproximadamente 2 a aproximadamente 7 y en particular aproximadamente 2 a aproximadamente 6.

El agente espesante y la nisina se pueden agregar separadamente a la solución acuosa. Ellos pueden estar en forma de polvo o en forma líquida. Alternativamente, la nisina y el agente espesante pueden estar presentes en una
30 composición de polvo y esta composición de polvo se puede agregar a la solución acuosa. En una realización adicional la invención se relaciona con una composición el polvo que comprende nisina y agentes espesantes. La nisina y/o el agente espesante se puede agregar junto con un compuesto funcional adicional descrito anteriormente para la solución acuosa y luego se mezclan para obtener una suspensión.
35 Alternativamente, se pueden agregar compuestos funcionales adicionales después de

la suspensión que comprende nisina y se ha obtenido el agente espesante. En una realización adicional se agrega primero nisina a la solución acuosa, seguido por un compuesto funcional adicional y después se agrega el agente espesante y la solución de mezcla para obtener una suspensión. En todavía una realización adicional se agregan primero agentes espesantes a la solución acuosa, seguido por un compuesto funcional adicional y después se agrega nisina y se mezcla la solución para obtener una suspensión. De nuevo en una realización adicional el compuesto funcional adicional se agrega primero a la solución acuosa, seguido por la adición de agentes espesantes y/o nisina.

Otro aspecto de la invención se relaciona con el uso de una suspensión acuosa de acuerdo con la invención para la preparación de un líquido de tratamiento para el tratamiento de un alimento, concentrado o producto agrícola. El tratamiento líquido se puede preparar al mezclar una solución acuosa con la suspensión de acuerdo con la invención. El tratamiento del alimento, concentrado o producto agrícola se puede hacer mediante pulverización, inmersión, inmersión, cepillado por mencionar unos pocos.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una composición o suspensión de acuerdo con la invención como un conservante en y/o sobre el alimento, concentrado o producto agrícola. De aquí en adelante, el término "suspensión" también incluye un líquido de tratamiento preparado de una suspensión de acuerdo con la invención. Las composiciones y suspensiones de la invención no tienen desventajas asociadas con formulaciones de polvo: ellos son más fáciles de utilizar (fácil dosificación) y no existe formación de polvo cuando se utilizan. Adicionalmente, se evitan la formación de espuma y los problemas de disolución que ocurren cuando se solubiliza el polvo de nisina en un solvente. Los niveles efectivos de nisina para conservar los productos alimenticios varían de 1 a 1500 IU/g o 0.025 a 37.5 ppm de nisina. Las composiciones y suspensiones de acuerdo con la invención se pueden utilizar solas, pero también en combinación con otras composiciones antimicrobianas, *por ejemplo* las composiciones comprenden ácidos orgánicos o sus sales, lisozima. Las composiciones antimicrobianas se pueden aplicar al alimento, concentrado o producto agrícola. antes, durante o después de la aplicación de las composiciones o suspensiones de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional la invención es pertinente a un contenedor que comprende 1 a 1000 litro de una composición o suspensión de acuerdo con la

invención. El contenedor puede ser una botella, bolsa o tanque, por mencionar solo unos pocos.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona un método para preservar el alimento, concentrado o producto agrícola, en donde se utilizan las composiciones de nisina o suspensiones de la invención, *por ejemplo* aplicadas en y/o en los productos respectivos. Las composiciones de nisina y las suspensiones se pueden aplicar mediante pulverización, inmersión, inmersión, cepillado, por mencionar solo unos pocos métodos. En el caso que el sustrato/producto sea un líquido o semilíquido, se puede agregar directamente. Las composiciones o suspensiones aún pueden tener un recubrimiento, *por ejemplo* un recubrimiento antimicrobiano, un sustrato a/en el cual se aplican. Opcionalmente, en una etapa adicional, el producto también se puede pasteurizar/esterilizar. Esta etapa por supuesto también se puede desarrollar antes de aplicación de las composiciones de nisina o suspensiones de la invención. Todos los tipos de los productos alimenticios se pueden tratar con las composiciones o suspensiones de la invención. Los productos alimenticios pueden ser productos alimenticios lácteos; productos alimenticios que contienen o que son derivados de huevos, carnes, especialmente pollo *por ejemplo* pollo frescamente sacrificado, vegetales, crustáceos y pescados; productos de arroz tal como productos de arroz hervido; productos alimenticios de panadería; bebidas; productos alimenticios congelados; productos alimenticios claros tal como productos alimenticios con base en jalea tal como postres; jugos; pastas para untar; mermelada; frutas enlatadas y otros productos enlatados; los productos alimenticios en donde las composiciones o suspensiones de la invención se aplican sobre la superficie. Los productos alimenticios lácteos incluyen, pero no se limitan a, leche procesada, leche, crema, postres de leche, mezclas de crema para helado, aderezos y yogures. Las composiciones y suspensiones de acuerdo con la invención también se pueden utilizar en el tratamiento de empaques de alimentos y equipo de manipulación y se pueden incluir en/sobre los materiales de empaque utilizados para empacar el alimento, alimentos o productos agrícolas. Las composiciones y suspensiones de la invención también se pueden utilizar como un desinfectante para limpiar superficies y cocinar utensilios en las plantas de procesamiento de alimentos y cualquier área en la que los alimentos se preparan o sirven tal como hospitales, clínicas, restaurantes, especialmente restaurantes de comida rápida, delicatessen y similares. Las composiciones y suspensiones de acuerdo con la invención son capaces de inhibir el crecimiento bacteriano en productos durante un periodo extendido, por ejemplo por lo menos

aproximadamente 1 día, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 días y preferiblemente por lo menos aproximadamente 1000 días. Se pueden utilizar composiciones y suspensiones de acuerdo con la invención para evitar el crecimiento bacteriano, *por ejemplo* el crecimiento de bacterias gram-positivas tal como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria*, y *Coryneform* bacteria. Estas aún se pueden utilizar para evitar el crecimiento de bacterias gram-negativas tal como bacterias Gram negativas tal como *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia Coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacterioides*, y *Actinobacillus* bacteria.

Por consiguiente, un alimento, alimentos, o producto agrícola que comprende una composición de nisina o suspensión de acuerdo con la invención es otra parte de la invención.

En todavía otro aspecto, la invención pertenece a un método para producir un sólido, *por ejemplo* polvo, la composición de nisina que comprende la etapa de someter la composición de nisina líquida de acuerdo con la invención a *por ejemplo* una etapa de secado, etapa de liofilización, etapa de cristalización (si es necesario seguido por filtración o centrifugación) o una etapa de precipitación (si es necesario seguido por filtración o centrifugación), por mencionar solo unos pocos. Las etapas se pueden desarrollar inmediatamente después de la etapa c, d o e del método para preparar las composiciones de nisina de la invención como se describió anteriormente. Ellas también se pueden hacer después que se han almacenado las composiciones de nisina líquida de la invención durante un periodo. Las composiciones de nisina sólida/en polvo resultantes se pueden mezclar con composiciones en polvo que comprenden otros compuestos adecuados tal como *por ejemplo* los compuestos funcionales adicionales descritos anteriormente.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no se deben construir como limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Preparación de composiciones de nisina líquida

Se preparan las siguientes composiciones de nisina líquida:

Composición A: Diez gramos de polvo de nisina Nisaplin® (Danisco, Dinamarca) que contiene 2.5% p/p de nisina y por lo menos 50% p/p de NaCl se disuelve en una solución de HCl acuosa (pH 2.0-3.0; volumen total 100 ml).

Composición B: Diez gramos de polvo de nisina Nisaplin® (Danisco, Dinamarca) que contiene 2.5% p/p de nisina y por lo menos 50% p/p de NaCl se disuelve en una solución de HCl acuosa (pH 5.5-6.5; volumen total 100 ml).

Composiciones C y D: Diez gramos de polvo de nisina Nisaplin® (Danisco, Dinamarca) que contiene 2.5% p/p de nisina y por lo menos 50% p/p de NaCl se disuelve en una solución acuosa amortiguada de 0.2 M de dihidrogenofosfato de sodio y hidrogenofosfato de disodio (pH 7.0; volumen total 100 ml; en adición a la composición que tiene un pH de 6 y se hacen las composiciones que tienen un pH de 6.5). La mezcla se mezcla posteriormente durante aproximadamente 15 minutos. La mezcla se centrifuga a 4,500xg durante 15 minutos a 10°C y se obtiene un glóbulo que contiene nisina. Posteriormente, el glóbulo se disuelve en una solución de ácido cítrico acuosa (pH 2.0 a 3.0; volumen total 100 ml). La mezcla se agita durante 15 minutos. La solución obtenida que contiene nisina se centrifuga a 4,500xg durante 15 minutos a 10°C para remover los componentes sólidos restantes. Las composiciones líquidas obtenidas se mantienen en un pH de 2.0 a 3.0 (Composición C) o el pH se ajusta a un pH entre 5.5 y 6.5 mediante la adición de NaOH (Composición D).

Composiciones E y F: La preparación de las composiciones E y F es idéntica a la preparación de las composiciones C y D con la condición que el glóbulo se disuelve en una solución de HCl acuosa que tiene un pH de 2.0 a 3.0.

Composiciones G y H: Diez gramos de polvo de nisina Nisaplin® (Danisco, Dinamarca) que contiene 2.5% p/p de nisina y por lo menos 50% p/p de NaCl se disuelve en una solución de HCl acuosa (pH 2.0-3.0; volumen total 100 ml). La mezcla obtenida se dializa durante 24 horas en una solución de HCl acuosa de pH 2.0 a 3.0. Luego, la mezcla dializada se centrifuga a 4,500xg durante 15 minutos a 10°C. Las composiciones líquidas obtenidas se mantienen en un pH de 2.0 a 3.0 (composición G) o el pH se ajusta a un pH entre 5.5 y 6.5 mediante la adición de NaOH (Composición H). Las composiciones obtenidas se utilizan en los siguientes experimentos.

Ejemplo 2

Ensayo MIC

Para el ensayo MIC se obtienen células *Micrococcus luteus* recientemente cultivadas (B212) y células *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) de un crecimiento de cultivo durante la noche en Caldo de Cultivo Iso Sensitest (Oxoid) y Caldo de Cultivo de Conteo de Placas (Difco), respectivamente, a 30°C. Una suspensión madre de 4.3×10^5 y 2.5×10^4 unidades formadoras de colonia CFU/ml, respectivamente, se

prepara en solución salina fisiológica. Se agregan 30 µl de la solución madre respectiva a 30 ml del Caldo de Cultivo Iso Sensitest (suspensión A) y Caldo de Cultivo de Conteo de Placas (suspensión B), respectivamente. Luego, se transfiere 100 µl de la suspensión A a cada pozo de una primera placa de microtítulo de 96 pozos y se transfiere 100 µl de la suspensión B a cada pozo de una segunda placa de microtítulo de 96 pozos. Las composiciones de nisina se preparan de acuerdo con Ejemplo 1. Se utiliza 100 µl de una composición de en un ensayo de caldo de cultivo de microdilución estándar para determinar la Concentración de Inhibición Mínima (MIC) de cada composición de nisina. Los resultados, presentados en la Tabla 1, muestran que las composiciones de nisina C, D, E y F muestran la actividad mayor (es decir MIC menor) contra ambos microorganismos (un microorganismo gram-positivo, es decir *M. luteus*, y un microorganismo gram-negativo, es decir *P. aeruginosa*) en pH 2.5 y pH 6.0. El MIC de las composiciones C y E está entre aproximadamente 40- a aproximadamente 100-veces menos que el MIC de las composiciones A y G (todas las composiciones tienen un pH de 2.5), aunque el MIC de las composiciones D y F es significativamente menor que el MIC de las composiciones B y H (todas las composiciones tienen un pH de 6.0). El MIC de las composiciones C y D preparadas con 0.1 M de amortiguador de fosfato a pH 7 es comparable con el MIC de las composiciones C y D preparadas con 0.2 M de amortiguador de fosfato a pH 6 o pH 6.5.

En un experimento separado las concentraciones de MIC de las composiciones A y C se comparan con *Bacillus subtilis* frescamente cultivados (ATCC 31578), *Staphylococcus aureus* (ATCC 27661), *Lactococcus lactis* (ATCC 19257) y *Listeria innocua* (LMD92.20). El experimento se hace idénticamente al experimento descrito anteriormente, con la condición que la suspensión madre preparada contiene 1.0×10^6 , 1.3×10^6 , 7.7×10^4 , y 2.8×10^5 CFU/ml del microorganismo respectivo, respectivamente. Los resultados muestran que el MIC de la composición C para los microorganismos gram-positivos probados está entre aproximadamente 5 -a aproximadamente 300-veces menores que el MIC de la composición A (datos no mostrados). El MIC de la composición C preparada con 0.1 M de amortiguador de fosfato a pH 7 es comparable con el MIC de la composición C preparada con 0.2 M de amortiguador de fosfato a pH 6 o pH 6.5.

Ejemplo 3

Uso de composiciones de nisina líquida en una aplicación de levadura

Se preparan dos tortas. Para cada torta se mezcla 1000 gramos de Moscovisch Powder Damco con 800 gramos de huevos líquidos y 100 gramos de agua. Una torta se prepara al agregar 120 mg de polvo de nisina Nisaplin® (Danisco, Dinamarca) para los huevos líquidos. Se prepara una segunda torta al agregar 1.2 gramos de la composición C a los huevos líquidos. Las mismas cantidades de nisina se utilizan en ambas tortas (150 mg nisina/l huevo). La mezcla se mezcla durante 10 minutos en un mezclador Hobart en el tercer equipo, y se hace hornea en un horno a 170°C durante 25 minutos. Ambas tortas se hornean de la misma forma.

La torta horneada que comprende la composición C muestra una estructura de migajas lanosas, finas, mientras que la que comprende polvo de nisina muestra una estructura de migajas irregular dura. Esto muestra claramente que los productos horneados en donde se utilizan las composiciones de la invención tienen una mejor estructura que los productos horneados en donde se utiliza polvo de nisina. La estructura de un producto horneado se mejora al agregar una composición de nisina de acuerdo con la invención cuando se compara con agregar polvo de nisina. El ejemplo también muestra que las composiciones de acuerdo con la invención se pueden agregar al producto antes de horneado.

Ejemplo 4

Uso de composiciones de nisina líquida en una aplicación de bebida

En este experimento la composición A y C se prueban por su capacidad de reducir el conteo viable de diferentes microorganismos contaminantes en una aplicación de bebida. Las composiciones A y C se preparan de acuerdo con el Ejemplo 1, utilizando polvo de nisina de Silver Elephant, China. La bebida utilizada es una bebida de malta, Pony de Bavaria, Colombia. Para el experimento se obtienen células *Listeria monocytogenes* recientemente cultivadas (LMD 92.20), células *Leuconostoc oenos* (ML-34) y células *Leuconostoc mesenteroides* aisladas de un producto contaminado de un cultivo que crece durante la noche a 30°C en Caldo de Cultivo de Conteo de Placas (Difco). Las suspensiones madre de 3.8×10^5 , 5.7×10^6 y 7.2×10^5 CFU/ml, respectivamente, se preparan en solución salina fisiológica. Se agrega 25 µl de la solución madre respectiva a 25 ml de espiga de bebida con la composición A o C. La concentración de nisina probada es 0.5 ppm para células *Listeria monocytogenes*, 4 ppm para células *Leuconostoc oenos* y 2 ppm para células *Leuconostoc mesenteroides*. Un control que no comprende nisina se incluye para

cada microorganismo. Las muestras se incuban a temperatura ambiente y el conteo total de los microorganismos (en CFU/ml) se mide en diferentes intervalos de tiempo utilizando métodos bien conocidos.

Los resultados se muestran en la Tabla 2. Ellos demuestran claramente que para cada uno de los tres microorganismos diferentes probados de la composición C reduce el conteo celular viable por debajo del límite de detección de 1 CFU/ml en menos de un día, mientras que la composición A necesita dos o tres días para llevar a cabo esto. La composición C es por lo menos 24-48 horas más rápida que la composición A.

10 Ejemplo 5

Uso de composiciones de nisina líquida en un modelo de aplicación de alimentos

En este experimento las composiciones A y C se prueban por su capacidad de reducir el conteo viable de *Listeria monocytogenes* en un modelo de aplicación de alimentos. Después de la reducción del conteo celular viable por debajo del límite de detección de 10 CFU/ml las composiciones de nisina también se prueban por su capacidad de mantener este nivel bajo y evitar la extensión de las células sobrevivientes. Las composiciones A y C se preparan de acuerdo con el Ejemplo 1, utilizando nisina de Silver Elephant, China. El modelo de aplicación se prepara utilizando Caldo de Cultivo de Conteo de Placas (Difco). El pH del medio se fina a un pH 7.0 con HCl y se lleva a autoclave durante 15 minutos a 121°C. Para el experimento se obtienen células *Listeria monocytogenes* recientemente cultivadas (LMD 92.20) de un cultivo que crece durante la noche en el Caldo de Cultivo de Conteo de Placas (Difco) a 30°C. Se prepara una suspensión madre de 3.4×10^7 de CFU/ml en solución salina fisiológica. Se agrega 250 µl de la solución madre a 25 ml del medio modelo en punta con la composición A o C. La concentración de nisina probada es 2.5 µg/ml para el experimento a 10°C y 6.25 y 12.5 µg/ml para el experimento a temperatura ambiente. Un control que no comprende nisina se incluye para cada temperatura probada. Las muestras se incuban a 10°C y a temperatura ambiente y el conteo total de microorganismos (en CFU/ml) se mide en intervalos de tiempo diferentes utilizando métodos bien conocidos.

Los resultados demuestran claramente que la composición C inhibe la extensión de *Listeria monocytogenes* en un modelo de aplicación de alimento a 10°C durante más de 25 días, mientras que la composición A solo inhibe la extensión durante cuatro días (ver Tabla 3). Los resultados muestran adicionalmente que la

composición C inhibe la extensión de *Listeria monocytogenes* en un modelo de aplicación de alimento a temperatura ambiente durante más de 25 días, mientras que la composición A solo inhibe la extensión durante dos o tres días (ver Tabla 4).

Ejemplo 6

5 Preparación de composiciones de nisina líquida en escala piloto utilizando centrifugación

Se disuelve 100 kg de polvo de nisina (Silver Elephant, China) que contiene 2.5% p/p de nisina y por lo menos 50% p/p de NaCl en agua. El pH se fija en 7.0 con NaOH. La mezcla se mezcla posteriormente durante aproximadamente una hora. Un
10 agente antiespumante (Clerol FBA 3107) se agrega a una mezcla 1.5 g/kg. La mezcla se somete a centrifugación continua a 10°C a 12,000xg con un índice de alimentación de 200 l/h. Se recupera el concentrado que contiene sólidos de nisina. Posteriormente, el concentrado se disuelve en una solución de HCl acuosa (pH 2.0 a 3.0; masa de mezcla completa: 1000 kg). La mezcla se agita durante por lo menos una hora. La
15 solución obtenida que contiene nisina se somete de nuevo a centrifugación continua en 10°C a 12,000xg con un índice de alimentación de 200 l/h seguido por filtración profunda (con un filtro que tiene un tamaño de poro de 3 micras) y filtración estéril para remover los componentes sólidos restantes. La composición líquida obtenida se mantiene a un pH de 2.0 a 3.0. La turbidez del producto final es 21 FNU, *es decir* se
20 obtiene una composición líquida clara. La composición de nisina líquida obtenida tiene una buena actividad antimicrobiana, *es decir* un MIC comparable con el MIC de la composición C (ver Ejemplo 2).

El proceso anterior también se desarrolla sin desarrollar la segunda etapa de centrifugación continua. El producto final tiene las mismas propiedades como el
25 producto final descrito anteriormente.

Adicionalmente, el proceso se desarrolla sin la segunda etapa de centrifugación continua y sin la etapa de filtración profunda. El producto resultante también tiene las mismas propiedades como el producto final descrito anteriormente.

Ejemplo 7

30 Preparación de composiciones de nisina líquida en escala piloto utilizando filtración

Se disuelve 100 kg de polvo de nisina (Silver Elephant, China) que contiene 2.5% p/p de nisina y por lo menos 50% p/p de NaCl en una solución acuosa amortiguada de 0.2 M de dihidrogenofosfato de sodio y hidrogenofosfato de disodio (pH
35 7.0; masa de mezcla completa: 1000 kg). La mezcla se mezcla posteriormente

durante aproximadamente una hora. La mezcla se filtra mediante filtración sin salida a 10°C utilizando una ayuda de filtro Dicalite BF. Se recupera la torta de filtro que contiene sólidos de nisina. Posteriormente, la torta de filtro se disuelve en una solución de ácido cítrico acuosa (pH 2.0 a 3.0; masa de mezcla completa: 1000 kg). La mezcla se agita durante por lo menos una hora. La solución obtenida que contiene nisina se somete a filtración sin salida, filtración profunda y filtración estéril a 10°C para remover los componentes sólidos restantes. La composición líquida obtenida se mantiene a un pH de 2.0 a 3.0. La turbidez del producto final es 25 FNU, *es decir* se obtiene una composición líquida clara. La composición de nisina líquida obtenida tiene una buena actividad antimicrobiana, *es decir* un MIC comparable con el MIC de la composición C (ver Ejemplo 2).

Ejemplo 8

Preparación de composiciones de nisina líquida utilizando filtración en pH bajo

Se disuelve en agua 100 g de polvo de nisina (Silver Elephant, China) que contiene 2.5% p/p de nisina y por lo menos 50% p/p de NaCl. El pH se fija en 4.0 con NaOH. La mezcla se mezcla posteriormente durante aproximadamente una hora. La mezcla se filtra filtración sin salida a 10°C utilizando ayuda de filtro Dicalite BF. Se recupera la torta de filtro que contiene sólidos de nisina. Posteriormente, la torta de filtro se disuelve en una solución de HCl acuosa (pH 2.0 a 3.0). La mezcla se agita durante por lo menos una hora. La solución obtenida que contiene nisina se filtra utilizando filtración sin salida, filtración profunda y filtración estéril a 10°C para remover los componentes sólidos restantes. La composición líquida obtenida se mantiene en un de 2.0 a 3.0. La turbidez del producto final es 123 FNU, *es decir* se obtiene una composición líquida turbia. La composición de nisina líquida obtenida tiene una buena actividad antimicrobiana, *es decir* un MIC comparable con el MIC de la composición C (ver Ejemplo 2).

Ejemplo 9

Preparación de suspensión de polvo de nisina estable

El polvo de nisina (Silver Elephant, China) que contiene 2.5% p/p de nisina y por lo menos 50% p/p de NaCl se suspende en agua. Se agregan varios agentes espesantes en varias cantidades. El pH se fija a pH 2 o pH 5 con soluciones de HCl y NaOH. La estabilidad física de las suspensiones se analiza después de almacenamiento durante 9 días a temperatura ambiente mediante análisis de la altura de la sedimentación frontal en un tubo de 50 ml que contiene 47.5 ml de la suspensión. Los resultados se describen en la Tabla 5. La concentración de nisina en

5 todas las suspensiones es 0.25% p/p. se expresa la sedimentación como el porcentaje de líquido claro que se observa (*es decir* el líquido que no contiene partículas). 0% indica que no ha ocurrido sedimentación y que la suspensión por lo tanto tiene una buena estabilidad física. Los resultados muestran que a pH 2 y pH 5 las suspensiones son físicamente estables cuando se utiliza goma xantano en una concentración mayor de 0.05% (p/p). Los resultados muestran adicionalmente que en pH 2 y pH 5 las suspensiones son físicamente estables cuando se utilizan CMC o alginato en una concentración de 1% (p/p) o mayor, aunque para HPMC una concentración de 3% (p/p) o mayor conduce a suspensiones de nisina estables físicas.

10 Tabla 1: valores MIC de las composiciones nisina en µg/ml contra *M. luteus* y *P. aeruginosa*.

Nombre	<i>M. luteus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Composición A	0.015-0.0077	>64800
Composición B	0.5-0.23	>61200
Composición C	0.00012-0.00006	1900-1000
Composición D	0.012-0.006	6400-3200
Composición E	0.0004-0.0002	>50000
Composición F	0.05-0.025	>52000
Composición G	0.03-0.015	>32000
Composición H	0.16-0.08	>41000

Tabla 2: Días hasta que se reduce el microorganismo respectivo por debajo del límite de detección de 1 CFU/ml en una aplicación de bebida con diferentes composiciones de nisina.

	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Leuconostoc oenos</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Control	>4	>4	>4
Composición A	3	3	2
Composición C	<1	<1	<1

15 Tabla 3: Cantidad de días de extensión de *Listeria monocytogenes* se inhibe por debajo del límite de detección de 10 CFU/ml en un modelo de aplicación de alimento a 10°C con diferentes composiciones de nisina.

	Cantidad de días que se inhibe la extensión a 10°C
Control	<1
Composición A	4

Composición C	>25
---------------	-----

Tabla 4: Cantidad de días que se inhibe la extensión *Listeria monocytogenes* por debajo del límite de detección de 10 CFU/ml en un modelo de aplicación de alimento a temperatura ambiente con diferentes composiciones de nisina.

	Cantidad de días que se inhibe la extensión a temperatura ambiente
Control	<1
Composición A (250 µg/ml)	2
Composición A (500 µg/ml)	3
Composición C (250 µg/ml)	>25
Composición C (500 µg/ml)	>25

5 Tabla 5: Estabilidad física de la suspensión de polvo de nisina con diferentes agentes espesantes.

Agente espesante	Concentración de agente espesante (%p/p)	Porcentaje de sedimentación pH 2 (%)	Porcentaje de sedimentación pH 5 (%)
Agente no espesante	0	79	77
Goma xantano	0.05	79	79
	0.1	40	40
	0.2	0	0
	0.4	0	0
	1	0	0
	3	0	0
	5	0	0
CMC	0.05	92	93
	0.2	89	87
	0.4	87	79
	1	0	0
	3	0	0
	5	0	0
HPMC	0.05	81	94
	0.2	83	87

	0.4	83	87
	1	73	66
	3	40	11
	5	5	0
Alginate	0.05	72	94
	0.2	77	89
	0.4	63	58
	1	42	0
	3	0	0
	5	0	0

REFERENCIAS

Montville TJ, Chung HJ, Chikindas ML y Chen Y (1999), Nisina A depletes intracellular ATP y acts in bactericidal manner contra *Mycobacterium smegmatis*. Letters in Appl. Microbiol. 28:189-193.

- 5 Mota-Meira M, LaPointe G, Lacroix C y Lavoie MC (2000), MICs of Mutacin B-NY266, Nisina A, Vancomicina, y Oxacillin contra bacterial pathogens. Antimicrobial Agents y Chemotherapy 44:24-29.

Pongtharangkul T y Demirci A (2004). Evaluation of agar diffusion bioassay for nisina quantification, Appl. Microbiol. Biotechnol. 65:268 –272.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición de nisina líquida, que comprende las etapas de:
 - a) Mezclar la nisina en polvo con una solución acuosa para preparar una primera nisina líquida que contiene composición que tiene un pH de 3.5 a 12 y un concentración de sal inorgánica final de 1.5 M o menos,
 - b) aislar los compuestos sólidos de la primera nisina líquida preparada que contiene composición,
 - c) poner en contacto los compuestos sólidos aislados con una solución que tiene un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 para preparar una segunda composición de nisina líquida, y opcionalmente
 - d) remover los compuestos sólidos de la segunda composición de nisina líquida.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de:
 - e) ajustar el pH de la segunda composición de nisina líquida a un valor deseado.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde los compuestos sólidos se aíslan o se remueven mediante centrifugación, filtración o cualquier combinación de los mismos.
4. Una composición de nisina líquida que se puede obtener mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Composición de acuerdo con la reivindicación 4 que tiene una concentración inhibidora mínima (MIC) de 0.001 µg/ml o menos contra *Micrococcus luteus* B212.
6. Composición de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 que tiene un pH de 1.5 a 5.
7. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde composición comprende una sal para la relación de nisina de 100:1 a 1:100.
8. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 que tiene una turbidez de 0 a 100 FNU.

- 5 9. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, que comprende adicionalmente por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste de un compuesto antimicrobiano adicional, un tensoactivo, un agente que ajusta el pH, un crioprotector, un agente antiespumante y agentes espesantes.
10. Una suspensión acuosa de nisina que comprende agentes espesantes y que tiene un pH de 2 a 12.
11. La suspensión de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende 0.01 a 5% (p/p) de nisina y 0.05 a 5% (p/p) de agente espesante.
- 10 12. La suspensión de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en donde el agente espesante se selecciona del grupo que consiste de goma xantano, goma guar, Goma Arábica, goma tragacanto, goma gelano, goma garrofín, goma carragenano, goma ramxano, alginato, almidón, carboximetilcelulosa, carboxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, alcohol polivinílico, polietilenglicol, polipropilenglicol.
- 15 13. La suspensión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende adicionalmente por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste de un compuesto antimicrobiano adicional, un tensoactivo, un agente que ajusta el pH, un agente antiespumante y un crioprotector.
- 20 14. Un método para preparar una suspensión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, el método que comprende las etapas de:
- 25 a) agregar nisina y agentes espesantes, separadamente o como una composición en polvo, a una solución acuosa,
- b) mezclar para obtener una suspensión, y
- c) si es necesario, ajustar el pH de la suspensión de 2 a 12.
15. Una composición el polvo para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 14 que comprende nisina y agentes espesantes.
- 30 16. Uso de una suspensión acuosa como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 para la preparación de un líquido de tratamiento para el tratamiento de un alimento, alimentos o producto agrícola.
- 35 17. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 o una suspensión de acuerdo con una cualquiera de

las reivindicaciones 10 a 13 como un conservante en y/o sobre un alimento, alimentos o producto agrícola.

- 5 18. Un método para preservar un alimento, alimentos o producto agrícola, en donde una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 o una suspensión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 se aplica al alimento, alimentos o producto agrícola.
- 10 19. Un método para producir una composición de nisina sólida que comprende la etapa de someter una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 a una etapa de secado, etapa de liofilización, etapa de cristalización o etapa de precipitación.
- 15 20. Un alimento, concentrado o producto agrícola que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 o una suspensión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13.

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPEA/ EP

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:
The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty.

For International Preliminary Examining Authority use only		
Identification of IPEA		Date of receipt of DEMAND
Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION		Applicant's or agent's file reference 26952-WO-PCT
International application No. PCT/EP2009/060413	International filing date (day/month/year) 12 August 2009 (12/08/2009)	(Earliest) Priority date (day/month/year) 12 August 2008 (12/08/2008)
Title of invention LIQUID NISIN COMPOSITIONS		
Box No. II APPLICANT(S)		
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) DSM IP Assets B.V. Het Overloon 1 6411 TE HEERLEN The Netherlands		Telephone No. +31 45 5788111
		Facsimile No. +31 45 5719753
		Applicant's registration No. with the Office 4438030.1
☐ E-mail authorization: Marking this check-box authorizes the International Preliminary Examining Authority to use the e-mail address indicated in this Box to send, if the Authority so wishes, advance copies of notifications in respect of this international application. (See also the Notes to Box No. II.)		E-mail address
State (that is, country) of nationality: NL		State (that is, country) of residence: NL
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) VISSER, Johannes Martinus Jacobus Waterloop 22 2614 XC DELFT The Netherlands		
State (that is, country) of nationality: NL		State (that is, country) of residence: NL
☒ Further applicants are indicated on a continuation sheet.		

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*
HAAN, DE, Ben Rudolf
Watertorenlaan 17
2275 AW VOORBURG
The Netherlands

State *(that is, country)* of nationality:
NL

State *(that is, country)* of residence:

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

☐ Further applicants are indicated on another continuation sheet.

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCEThe following person is ☒ agent ☐ common representativeand ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked.☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation.
The address must include postal code and name of country.)*BIERMANN, Jan
DSM Intellectual Property
Delft Office (600-0240)
P.O. Box 1
2600 MA DELFT
The Netherlands

Telephone No.

+31 15 2792151

Facsimile No.

+31 15 2793957

Agent's registration No. with the Office

☒ **E-mail authorization:** Marking this check-box authorizes the International Preliminary Examining Authority to use the e-mail address indicated in this Box to send, if the Authority so wishes, advance copies of notifications in respect of this international application. *(See also the Notes to Box No. II.)*

E-mail address

ip.delft@dsm.com

☐ **Address for correspondence:** Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.**Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION****Statement concerning amendments:***

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☒ the international application as originally filedthe description ☒ as originally filed☐ as amended under Article 34the claims ☐ as originally filed☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)☒ as amended under Article 34the drawings ☒ as originally filed☐ as amended under Article 342. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.3. ☐ Where the IPEA wishes to start the international preliminary examination at the same time as the international search in accordance with Rule 69.1(b), the applicant requests the IPEA to **postpone** the start of the international preliminary examination until the expiration of the applicable time limit under Rule 69.1(d).4. ☐ The applicant expressly wishes the international preliminary examination to **start earlier** than at the expiration of the applicable time limit under Rule 54bis.1(a).

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: English☒ which is the language in which the international application was filed.☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.☐ which is the language of publication of the international application.☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.**Box No. V ELECTION OF STATES**

The filing of this demand constitutes the election of all Contracting States which are designated and are bound by Chapter II of the PCT.

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:

- | | | | |
|--|---|-------|--------|
| 1. translation of international application | : | _____ | sheets |
| 2. amendments under Article 34 | : | 3 | sheets |
| 3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19 | : | _____ | sheets |
| 4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19 | : | _____ | sheets |
| 5. letter | : | 6 | sheets |
| 6. other (<i>specify</i>) | : | _____ | sheets |

For International Preliminary
Examining Authority use only

- | received | not received |
|--------------------------|--------------------------|
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

- | | |
|---|--|
| 1. ☒ fee calculation sheet | 5. ☐ statement explaining lack of signature |
| 2. ☐ original separate power of attorney | 6. ☐ sequence listing in electronic form |
| 3. ☐ original general power of attorney | 7. ☐ other (<i>specify</i>): |
| 4. ☐ copy of general power of attorney;
reference number, if any: | |

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand).

BIERMANN, Jan
Delft, The Netherlands
11 May 2010

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due
to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):

3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply.
☐ The applicant has been informed accordingly.
4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5.
5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

6. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of the time limit under Rule 54bis.1(a) and item 7 or 8, below, does not apply.
7. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit under Rule 54bis.1(a) as extended by virtue of Rule 80.5.
8. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of the time limit under Rule 54bis.1(a), the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

NOTES TO THE DEMAND FORM (PCT/IPEA/401)

These Notes are intended to facilitate the filling in of the demand form and to give some information concerning international preliminary examination under Chapter II of the Patent Cooperation Treaty (PCT). For more detailed information, see the *PCT Applicant's Guide*, a WIPO publication, which is available, together with other PCT related documents, at WIPO's website: www.wipo.int/pct/en/. The Notes are based on the requirements of the PCT, the Regulations and the Administrative Instructions under the PCT. In case of any discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable.

In the demand form and these Notes, "Article", "Rule" and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the Administrative Instructions, respectively.

The demand form shall be typed or printed; check-boxes may be marked by hand with dark ink (Rules 11.9(a) and (b) and 11.14).

The demand form and these Notes may be downloaded from WIPO's website at the address given above.

IMPORTANT GENERAL INFORMATION

Who May File a Demand? (Article 31(2)(a) and Rule 54): A demand (for international preliminary examination) may only be filed by an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II of the PCT; furthermore, the international application must have been filed with a receiving Office of, or acting for, a State bound by Chapter II. Where there are two or more applicants (for the same or different elected States) at least one of them must qualify.

Where Must the Demand Be Filed? (Article 31(6)(a)): The demand must be filed with a competent International Preliminary Examining Authority (IPEA). The receiving Office with which the international application was filed will, upon request, give information about the competent IPEA (or see the *PCT Applicant's Guide*, Annex C). If several IPEAs are competent, the applicant has the choice and the demand must be filed with (and the fees must be paid to) the IPEA chosen by the applicant. The IPEA chosen by the applicant may be identified, preferably by an indication of the name or two-letter code of the IPEA, at the top of the first sheet of the demand in the space provided for that purpose.

When Must the Demand Be Filed? (Article 39(1) and Rule 54bis.1): As long as certain designated Offices are still not bound by the 30-month time limit under Article 22 for entry into the national phase, the demand – because it contains the required election of designated States – must be filed within 19 months from the priority date if the applicant wishes to postpone entry into the national phase from 20 to 30 months from the priority date in respect of those designated Offices. For updated information about those Offices, see the *PCT Applicant's Guide*, National Chapters, Summaries, available on the WIPO website at the address indicated above. It is recalled that the time limit of 30 months from the priority date applies to all other designated Offices regardless of whether or not a demand is filed.

If the applicant wishes to file a demand, but not because of the reason explained above, the applicable time limit for filing such demand is three months from the date of transmittal of the international search report or of the declaration referred to in Article 17(2)(a), and the written opinion established by the International Searching Authority or 22 months from the priority date, whichever expires later (see Rule 54bis.1(a)).

Any demand made after the expiration of the applicable time limit will be considered as if it had not been submitted and the IPEA shall so declare.

In Which Language Must the Demand Be Filed? (Rule 55.1): The demand must be filed in the language in which international preliminary examination will be carried out (see Notes to Box No. IV).

What is the Language of Correspondence? (Rules 66.9 and 92.2 and Section 104): Any letter from the applicant to the IPEA must be in the same language as the international application to which it relates. However, where the international preliminary examination will be carried out on the basis of a translation (see Notes to Box No. IV), any letter from the applicant to the IPEA must be in the language of the translation. The IPEA may authorize the use of other languages for letters which do not contain or relate to amendments of the international application. Any letter from the applicant to the International Bureau must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

BOX No. I

Applicant's or Agent's File Reference: A file reference may be indicated, if desired. It should not exceed 12 characters. Characters in excess of 12 may be disregarded (Section 109).

Identification of the International Application (Rule 53.6): The international application number must be indicated in Box No. I. Where the demand is filed at a time when the international application number has not yet been notified by the receiving Office, the name of that Office must be indicated instead of the international application number.

International Filing Date and (Earliest) Priority Date (Section 110): Dates must be indicated by the Arabic number of the day, the name of the month and the Arabic number of the year – in that order; after, below or above such indication, the date should be repeated in parentheses, using two-digit Arabic numerals each for the number of the day and for the number of the month followed by the number of the year in four digits, in that order, and separated by periods, slants or hyphens, for example, "20 March 2008 (20.03.2008)", "20 March 2008 (20/03/2008)" or "20 March 2008 (20-03-2008)". Where the international application claims the priority of several earlier applications, the filing date of the earliest application whose priority is claimed must be indicated as the priority date.

Title of the Invention: If a new title has been established by the International Searching Authority, that title must be indicated in Box No. I.

BOX No. II

Applicant(s) (Rule 53.4): All the applicants for the elected States must be indicated in the demand. It should be noted that the persons named as "inventor only" in the request need not be named in the demand.

Make in Box No. II of the demand the required indications as appearing in Boxes Nos. II and III of the request. The Notes to the request apply *mutatis mutandis*. If there are two or more applicants for the States elected in the demand, give the required indications for each of them; if there are more than three applicants, make the required indications on the "Continuation Sheet".

If different applicants were indicated in the request for different designated States, there is no need to again indicate in the demand the States for which a person is applicant, because those indications have been made in the request.

Applicant's registration number with the Office (Rule 53.4): Where the applicant is registered with the national or regional Office that is acting as International Preliminary Examining Authority, the demand may indicate the number or other indication under which the applicant is so registered.

An E-mail address should be indicated for the person named in Box No. II in order to allow rapid communication with the applicant (see Rule 4.4(c)). Any telephone or facsimile number should include the applicable country and area codes. A single e-mail address only should be indicated.

Unless the associated check-box is marked, any e-mail address supplied will be used only for the types of communication which might be made by telephone. If the associated check-box is marked, the International Preliminary Examining Authority may, if it wishes to do so, send advance copies of notifications in respect of the international application to the applicant, thus avoiding processing or postal delays. Any such e-mail notifications will always be followed by the official notification on paper. Only that paper copy of the notification is considered the legal copy and only the date of mailing of that paper copy will commence any time limit within the meaning of Rule 80.

Note that it is the applicant's responsibility to keep any e-mail address details up-to-date and to ensure that incoming e-mails are not blocked, for any reason, on the recipient's side. Changes to the e-mail address indicated should be requested to be recorded, preferably directly at the International Bureau, under Rule 92bis. Where the e-mail authorization is given both in respect of the applicant and in respect of an agent or common representative, the International Preliminary Examining Authority will send e-mail communications only to the appointed agent or common representative.

BOX No. III

Agent or Common Representative (Rules 53.5, 90.1 and 90.2): Mark the applicable check-boxes to indicate *first* whether the person named in this Box is agent or common representative, *then* whether that person *has been appointed earlier* (i.e., during the procedure under Chapter I), or *is appointed in the demand* and any earlier appointment of another person is revoked, or *is appointed specifically for the procedure before the IPEA* (without revocation of any earlier appointment), in addition to the person(s) appointed earlier.

Where an additional person is appointed specifically for the procedure before the IPEA, all notifications issued by the IPEA will be addressed only to that additional person.

A separate power of attorney must be filed with the IPEA, the International Bureau or the receiving Office, if the person appointed at the time the demand is filed (i.e., was not appointed earlier) signs the demand on behalf of the applicant (Rule 90.4). However, the receiving Office, the International Bureau or the IPEA may waive the requirement that a separate power of attorney be filed. For details, see the *PCT Applicant's Guide*, Annex B2(IB), Annex C and Annex E.

Agent's registration number with the Office (Rule 53.5): Where the agent is registered with the national or regional Office that is acting as International Preliminary Examining Authority, the demand may indicate the number or other indication under which the agent is so registered.

E-mail address (see Notes to Box. No. II).

Address for Correspondence (Rule 4.4(d) and Section 108): Where an agent is appointed, any correspondence intended for the applicant will be sent to the address indicated for that agent (or for the first-mentioned agent, if more than one is appointed). Where one of two or more applicants is appointed as common representative, the address indicated for that applicant in Box No. III will be used.

Where no agent or common representative is appointed, any correspondence will be sent to the address, indicated in Box No. II, of the applicant (if only one person is named as applicant) or of the applicant who is considered to be common representative (if there are two or more persons named as applicants). However, if the applicant wishes correspondence to be sent to a different address in such a case, that address may be indicated in Box No. III instead of the designation of an agent or common representative. In this case, and only in this case, the last check-box of Box No. III must be marked (that is, the last check-box must not be marked if either of the check-boxes "agent" or "common representative" in Box No. III has been marked).

BOX No. IV

Statement Concerning Amendments (Rules 53.2(a)(v), 53.9, 62, 66.1 and 69.1): The international preliminary examination will start on the basis of the international application as filed or, if amendments have been filed, as amended. Mark the appropriate check-box(es) to enable the IPEA to determine when and on what basis it can start international preliminary examination.

Mark the corresponding check-box(es) under No. 1 where the international preliminary examination should start on the basis of the international application as originally filed or where amendments are to be taken into account, as the case may be. Where amendments are to be taken into account, the applicant must submit *with the demand* a copy of amendments to the claims under Article 19 (Rule 53.9(a)(i)) and/or the amendments of the international application under Article 34 (Rule 53.9(c)), as the case may be. If a check-box is marked but the demand is not accompanied by the documents referred to, the start of international preliminary examination will be delayed until the IPEA receives them.

Mark check-box No. 2 if amendments of the claims under Article 19 have been filed with the International Bureau during the Chapter I procedure, but the applicant wishes those amendments to be considered reversed by an amendment under Article 34 (Rule 53.9(a)(ii)).

Mark check-box No. 3 where the applicant wants to keep the option for the filing of amendments of the claims under Article 19 open and where the IPEA wishes to start the international preliminary examination at the same time as the international search in accordance with Rule 69.1(b). The applicant may request the IPEA to **postpone** the start of international preliminary examination until the expiration of the applicable time limit (Rules 46.1, 53.9(b) and 69.1(d)).

Mark check-box No. 4 if the applicant wishes that the international preliminary examination start earlier than at the expiration of the applicable time limit under Rule 54bis.1(a).

Where the ISA and IPEA are not the same Authority, examination will not commence until the IPEA is in possession of the international search report, or a notice of the declaration under Article 17(2)(a) and the written opinion established by the ISA.

The applicable time limit under Rule 54bis.1(a) is three months from the date of transmittal of the international search report or of the declaration referred to in Article 17(2)(a), and the written opinion established by the International Searching Authority, or 22 months from the priority date, whichever expires later.

If no check-box is marked, refer to the footnote at the bottom of the Box.

Language for the Purposes of International Preliminary Examination (Rule 55.2): Where neither the language in which the international application is filed nor the language in which the international application is published is accepted by the IPEA that is to carry out the international preliminary examination, the applicant must furnish with the demand a translation of the international application into a language which is both a language accepted by that Authority and a language of publication.

Where such translation has already been furnished to the International Searching Authority for the purposes of carrying out international search and the IPEA is part of the same Office or intergovernmental organization as the International Searching Authority, the applicant need not furnish another translation. In such a case the international preliminary examination is carried out on the basis of the translation furnished for the purposes of international search.

The language for the purposes of international preliminary examination should be indicated in Box No. IV, on the dotted line, and the corresponding check-box should be marked.

Language of Amendments (Rules 55.3 and 66.9): Amendments and letters relating thereto must be in the same

language as that in which the international preliminary examination is carried out, as explained in the preceding paragraphs.

Time Limit for Furnishing Translation of the International Application (Rule 55.2): Any required translation of the international application should be furnished (by the applicant) together with the demand. If it is not so furnished, the IPEA will invite the applicant to furnish it within a time limit which shall not be less than one month from the date of the invitation. That time limit may be extended by the IPEA.

BOX No. V

Election of States (Rule 53.7): The making of a demand shall constitute the election of all States which have been designated and which are bound by Chapter II of the PCT.

BOX No. VI

Check List: It is recommended that this Box be filled in carefully in order for the IPEA to determine as soon as possible whether it is in possession of the documents on the basis of which the applicant wishes international preliminary examination to start.

Where the international application contains disclosure of one or more nucleotide and/or amino acid sequences, and a copy of the sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions is required by the IPEA, the applicant may furnish the listing in electronic form to the IPEA with the demand. If this is the case, check-box No. 6 must be marked.

BOX No. VII

Signature (Rules 53.8, 60.1(a-ter), 90.3(a) and 90.4(a) and (d)): The demand must be signed by the applicant or by his agent; if there are several applicants, the demand must be signed by all of them, or by the common agent or the common representative of all of them. However, if the signature(s) of one or more applicants is missing, the IPEA will not invite the applicants to furnish the missing signature(s) provided that at least one of the applicants has signed the demand.

Important: Should a notice of withdrawal be filed at any time during the international phase, that notice will have to be signed by the applicant or, if there are two or more applicant's by all of them (Rule 90bis.5(a)), or by an agent or a common representative whose appointment has been effected by each applicant signing, at his choice, the request, the demand or a separate power of attorney (Rule 90.4(a)).

PCT

FEE CALCULATION SHEET

Annex to the Demand

<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 50%; padding: 5px;">International application No. PCT/EP2009/060413</td><td style="width: 50%; padding: 5px;">For International Preliminary Examining Authority use only</td></tr><tr><td style="padding: 5px;">Applicant's or agent's file reference 26952-WO-PCT</td><td style="padding: 5px;">Date stamp of the IPEA</td></tr></table>	International application No. PCT/EP2009/060413	For International Preliminary Examining Authority use only	Applicant's or agent's file reference 26952-WO-PCT	Date stamp of the IPEA															
International application No. PCT/EP2009/060413	For International Preliminary Examining Authority use only																		
Applicant's or agent's file reference 26952-WO-PCT	Date stamp of the IPEA																		
Applicant DSM IP Assets B.V. et al																			
CALCULATION OF PRESCRIBED FEES <table style="width: 100%;"><tr><td style="width: 60%;">1. Preliminary examination fee</td><td style="width: 20%; text-align: right;">1760,00</td><td style="width: 20%; text-align: center;">P</td></tr><tr><td colspan="3"> </td></tr><tr><td>2. Handling fee (<i>Applicants from certain States are entitled to a reduction of 90% of the handling fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the amount to be entered at H is 10% of the handling fee.</i>)</td><td style="text-align: right;">132,00</td><td style="text-align: center;">H</td></tr><tr><td colspan="3"> </td></tr><tr><td>3. Total of prescribed fees Add the amounts entered at P and H and enter total in the TOTAL box</td><td style="text-align: right;">1892,00</td><td></td></tr><tr><td></td><td style="text-align: center;">TOTAL</td><td></td></tr></table>		1. Preliminary examination fee	1760,00	P				2. Handling fee (<i>Applicants from certain States are entitled to a reduction of 90% of the handling fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the amount to be entered at H is 10% of the handling fee.</i>)	132,00	H				3. Total of prescribed fees Add the amounts entered at P and H and enter total in the TOTAL box	1892,00			TOTAL	
1. Preliminary examination fee	1760,00	P																	
2. Handling fee (<i>Applicants from certain States are entitled to a reduction of 90% of the handling fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the amount to be entered at H is 10% of the handling fee.</i>)	132,00	H																	
3. Total of prescribed fees Add the amounts entered at P and H and enter total in the TOTAL box	1892,00																		
	TOTAL																		
MODE OF PAYMENT (Not all modes of payment may be available at all IPEAs) <table style="width: 100%;"><tr><td>☒ authorization to charge current account with the IPEA (see below)</td><td>☐ credit card (<i>details should be furnished separately and not included on this sheet</i>)</td></tr><tr><td>☐ cheque</td><td>☐ revenue stamps</td></tr><tr><td>☐ postal money order</td><td>☐ cash</td></tr><tr><td>☐ bank transfer</td><td>☐ other (<i>specify</i>):</td></tr></table>		☒ authorization to charge current account with the IPEA (see below)	☐ credit card (<i>details should be furnished separately and not included on this sheet</i>)	☐ cheque	☐ revenue stamps	☐ postal money order	☐ cash	☐ bank transfer	☐ other (<i>specify</i>):										
☒ authorization to charge current account with the IPEA (see below)	☐ credit card (<i>details should be furnished separately and not included on this sheet</i>)																		
☐ cheque	☐ revenue stamps																		
☐ postal money order	☐ cash																		
☐ bank transfer	☐ other (<i>specify</i>):																		
AUTHORIZATION TO CHARGE (OR CREDIT) CURRENT ACCOUNT (This mode of payment may not be available at all IPEAs) <table style="width: 100%;"><tr><td style="width: 50%; vertical-align: top;">☒ Authorization to charge the total fees indicated above. ☒ (<i>This check-box may be marked only if the conditions for current accounts of the IPEA so permit</i>) Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.</td><td style="width: 50%; vertical-align: top;">IPEA/ <u>EP</u> Current Account No.: <u>2809 0052</u> Date: <u>11 May 2010</u> Name: <u>BIERMANN, Jan</u> Signature: _____</td></tr></table>		☒ Authorization to charge the total fees indicated above. ☒ (<i>This check-box may be marked only if the conditions for current accounts of the IPEA so permit</i>) Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.	IPEA/ <u>EP</u> Current Account No.: <u>2809 0052</u> Date: <u>11 May 2010</u> Name: <u>BIERMANN, Jan</u> Signature: _____																
☒ Authorization to charge the total fees indicated above. ☒ (<i>This check-box may be marked only if the conditions for current accounts of the IPEA so permit</i>) Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.	IPEA/ <u>EP</u> Current Account No.: <u>2809 0052</u> Date: <u>11 May 2010</u> Name: <u>BIERMANN, Jan</u> Signature: _____																		

NOTES TO THE FEE CALCULATION SHEET (ANNEX TO FORM PCT/IPEA/401)

The purpose of the fee calculation sheet is to help the applicant to identify the prescribed fees and to calculate the amounts to be paid. It is strongly recommended that the applicant complete, by entering the appropriate amounts in the boxes provided, and submit the fee calculation sheet at the time of filing of the demand. This will help the International Preliminary Examining Authority (IPEA) to verify the calculations and to identify any error in them.

CALCULATION OF PRESCRIBED FEES

Two fees must be paid for international preliminary examination:

- (i) the preliminary examination fee for the benefit of the IPEA (Rule 58.1);
- (ii) the handling fee for the benefit of the International Bureau (Rule 57).

Both fees must be paid to the IPEA within one month from the date on which the demand is submitted or 22 months from the priority date, whichever expires later. The amount payable is the amount applicable on the date of payment (Rules 57.3 and 58.1(b)). The fees must be paid in a currency acceptable to the IPEA.

Information about the amount of those fees or about equivalent amounts in other currencies can be obtained from the IPEA or the receiving Office. This information is also published in the *PCT Applicant's Guide*, Annex E, and from time to time in *Official Notices (PCT Gazette)*.

Box P: The amount of the preliminary examination fee must be entered in Box P.

Box H: The amount of the handling fee must be entered in Box H.

Reduction of the Handling Fee for Applicants from Certain States: An applicant who is a natural person and who is a national of and resides in a State whose per capita national income is below 3,000 US dollars (according to the average per capita national income figures used by the United Nations for determining its scale of assessments for the contributions payable for the years 1995, 1996 and 1997), or who is a national of and resides in one of the following States: Antigua and Barbuda, Bahrain, Barbados, the Libyan Arab Jamahiriya, Oman, the Seychelles, Singapore, Trinidad and Tobago and the United Arab Emirates; or an applicant, whether a natural person or not, who is a national of and resides in a State that is classed as a least developed country by the United Nations, is entitled, in accordance with the Schedule of Fees, to a reduction of 90% of certain PCT fees including the handling fee. If there are several applicants, each must satisfy the above-mentioned criteria. The reduction of the handling fee will be automatically available to any applicant (or applicants) who is (or are) so entitled on the basis of the indications of name, nationality and residence given in Box No. II of the demand.

The fee reduction will be available even if one or more of the applicants are not from PCT Contracting States, provided that each of them is a national and resident of a State that meets the above-mentioned requirements and that at least one of the applicants is a national or resident of a PCT Contracting State and thus is entitled to file an international application.

Information about PCT Contracting States whose nationals and residents are entitled to a reduction of 90% of certain PCT fees, including the handling fee, is contained in the *PCT Applicant's Guide*, Annex C and on the WIPO website (see www.wipo.int/pct/en/), and is also published and regularly updated in the *Official Notices (PCT Gazette)* and the *PCT Newsletter*.

Calculation of the Handling Fee in Case of Fee Reduction: Where the applicant is (or all applicants are) entitled to a reduction of the handling fee, the total to be entered at Box H is 10% of the handling fee.

Total Box: The total of the amounts inserted in Boxes P and H is the amount which must be paid to the IPEA.

MODE OF PAYMENT

In order to help the IPEA identify the mode of payment of the prescribed fees, it is recommended to mark the applicable check-box(es).

AUTHORIZATION TO CHARGE (OR CREDIT) CURRENT ACCOUNT

The applicant should check whether the IPEA allows the use of current accounts for payment of PCT fees. In addition, it is recommended that the applicant check what are the specific conditions applicable to the use of current accounts with the IPEA since not all IPEAs provide the same services.

Finally, if the IPEA is not the same national Office or intergovernmental organization as that with which the international application was filed, the current account with the receiving Office cannot be charged for the purpose of paying the preliminary examination and handling fees due to the IPEA.

The IPEA will not charge fees to current accounts unless the current account authorization is signed and indicates the current account number.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 26952-WO-PCT		FOR FURTHER ACTION	See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/EP2009/060413	International filing date (day/month/year) 12.08.2009	Priority date (day/month/year) 12.08.2008	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A23L3/3463			
Applicant DSM IP Assets B.V.			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>10</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau a total of <u>3</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☒ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☒ Box No. VII Certain defects in the international application ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 2010-05-11		Date of completion of this report 25.11.2010	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel: +31 70 340 - 2040 Fax: +31 70 340 - 3016		Authorized officer Diller, Reinhard Telephone No. +31 70 340-9418 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2009/060413

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1-23 as originally filed

Claims, Numbers

1-18 filed with telefax on

11-05-2010

- ☐ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.
3. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:
 - ☐ the description, pages
 - ☒ the claims, Nos. 1-20
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
 4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).
 6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) have been received and taken into account in drawing up this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2009/060413

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☐ In response to the invitation to restrict or pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ restricted the claims.
 - ☐ paid additional fees.
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee.
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid.
 - ☐ neither restricted the claims nor paid additional fees.
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is:
- ☐ complied with.
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos. .

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-8, 17</u>
	No: Claims	<u>9, 11, 12, 14-16, 18</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-8, 17</u>
	No: Claims	<u>9-16, 18</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-18</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2009/060413

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item IV

Lack of unity of invention

This International Preliminary Examination Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims 1-8, 15 (partially), 16 (partially), 17, 18 (partially)

A method for preparing a liquid nisin composition, comprising the steps of:

a) Mixing powder nisin with an aqueous solution to prepare a first liquid nisin containing composition having a pH of 3.5 to 12 and a final inorganic salt concentration of 1.5 M or below,

b) isolating solid compounds from the prepared first liquid nisin containing composition by centrifugation, filtration, or any combination thereof,

c) contacting the isolated solid compounds with a solution having a pH of 1 to 3 to prepare a second liquid nisin composition,

a composition obtainable by said method and its use as a preservative in and/or on a food, feed or agricultural product,

a method of applying it to food, feed or agricultural product, a method for producing a solid nisin composition comprising the step of subjecting the composition to a drying step, lyophilisation step, crystallisation step or precipitation step, and a food, feed or agricultural product comprising said composition.

2. Claims 9-14, 15 (partially), 16 (partially), 18 (partially)

An aqueous suspension of nisin having a pH of 2 to 12 and comprising 0.2 to 5% (w/w) xanthan gum, a method of preparing said suspension, comprising the steps of

a) adding nisin and xanthan gum, either separately or as a powder composition, to an aqueous solution,

b) mixing to obtain a suspension comprising 0.2 to 5% (w/w) xanthan gum,

a powder composition for use in said method comprising nisin and xanthan gum,

the use of said suspension for preparation of a treatment liquid for treatment of food, feed or agricultural product or as a preservative in and/or on a food, feed or agricultural product,

a method for preserving a food, feed or agricultural product, wherein the suspension is applied to the food, feed or agricultural product, and

a food, feed or agricultural product comprising said suspension.

The common feature linking these two inventions is an aqueous suspension of nisin having an acidic pH. It appears that the pH of the resulting composition according to the method of claim 1, and the composition of claim 3 have both an acidic pH (pH 1-3, or 1.5-5, respectively) and that the suspension of claim 9 has a pH of 2-12, which includes an acidic pH of 2-5).

These features are not novel, as illustrated by D1. This document discloses (cf. page 490, left col., par. 3 to right col., l. 11; table 4) the preparation of pure nisin wherein a nisin powder is suspended in 700 mL of distilled water, 3 mL of conc. HCl is added to obtain a brown liquid, the pH is adjusted to 1.8, 28 g NaCl (0.48 M) are dissolved and the resulting precipitate is filtered off and discarded. The resulting solution is salted out with 29 g NaCl (0.50 M) whereby first a suspension resulting from equilibrium not being established is obtained. Further, the resulting precipitate is stirred for about 30 min in its mother liquor, which represents also an acidic suspension. There is hence no single general inventive concept in the sense of Rule 13 (1) PCT linking the two groups of inventions.

Also considering the special technical features approach (Rule 13 (2) PCT) and the problem to be solved by both inventions, one comes to the conclusion that the requirements of unity of invention are not met:

Invention 1 seeks to solve the problem of providing a liquid nisin composition having a much higher activity against micro-organisms (cf. page 2, l. 19-24). To solve this problem, a liquid nisin composition is obtained by the purification method of claim 1. The special technical feature of the first invention is the purification of a nisin powder by mixing it with an aqueous solution, isolating the resulting precipitate and dissolving said precipitate in an acidic solution to obtain a purified liquid nisin composition without impurities having a much higher activity (cf. page 10, l. 1-15 of the description).

The second invention is directed to a stable aqueous suspension of nisin (cf. example 9) having improved physical stability. The special technical feature of the second invention is therefore the addition of 0.2 to 5% (w/w) xanthan gum to an aqueous suspension of nisin.

There is no technical relationship among these inventions, involving the same or corresponding technical features, as the purification method of claim 1 does not improve the physical stability of an aqueous suspension of nisin, but rather its antimicrobial activity. On the other hand, the addition of xanthan gum does not increase the antimicrobial activity per se, but rather avoids sedimentation of nisin suspensions at a pH of 2 or 5 (cf. example 9) which could cause precipitation of a purified liquid nisin composition (according to claim 1), if it is not further stabilised by addition of xanthan gum (according to claim 9).

The requirements of Rule 13 (2) PCT are hence not fulfilled.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Invention 1

1.1 Document D1 is regarded as being the prior art closest to the subject-matter of claim 1 as it is directed to the same purpose of obtaining highly active preparations of nisin (cf. p. 486, left-hand column, first par.). D1 discloses (cf. page 490, left col., par. 3 to right col., l. 11; table 4) the preparation of pure nisin wherein a nisin powder is suspended in 700 mL of distilled water, 3 mL of conc. HCl is added to obtain a brown liquid, the pH is adjusted to 1.8, 28 g NaCl (0.48 M) are dissolved and the resulting precipitate is filtered off and discarded. The resulting solution is salted out with 29 g NaCl (0.50 M) to obtain a precipitate, which is further filtered off and resuspended in enough distilled water to dissolve slowly. The solution is salted-out and consolidated and the precipitate is dissolved by addition of ethanol and warming to give a clear brown solution, whereby the starting pH of 3.5 is adjusted to a pH of 4.21. However,

the pH of the starting solution (1.8) differs from the pH of 3.5 to 12 of step a) and the starting pH of 3.5 differs from the pH of 1-3 of the solution in step c), which renders the subject-matter of claim 1 and of dependent claim 2 novel over D1.

Moreover, it seems that the nisin composition according to claim 3 obtained by the method of claim 1 is distinguished from the compositions of D1, because the measured MIC values according to table 1 of the present application are significantly lower for compositions C-E (prepared by dissolving nisin powder in a solution having a pH of 7) than for composition G (obtained by dissolving nisin powder at pH 2-3) as brought forward by the applicant.

Thus, the subject-matter of claims 1-8 is novel in the sense of Article 33(2) PCT, and therefore the criteria of Article 33(1) PCT are met.

1.2 Both distinguishing features seem to cause the technical effect, that the obtained liquid nisin composition shows a higher activity against micro-organisms and thus can be applied in a lower dose and causes less side effects than the nisin composition according to D1.

The problem to be solved by the present application in view of D1 is regarded as the provision of a method for producing a nisin composition that can be administered in a lower dose and causes less side effects.

This problem is solved by employing the pH conditions of claim 1. As neither D1, nor D2-D4 suggest to dissolve nisin at a pH of 3.5 - 12 according to step a) and to contact the isolated solid compounds with a solution having a pH of 1-3 according to step c), the person skilled in the art gets no motivation to develop the method of claim 1 in order to arrive at the composition of claim 3. The same applies for dependent claims 2, 4-8, and 17.

Consequently, the subject-matter of claims 1-8 and 17 of the present application is considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT), and therefore the criteria of Article 33(1) PCT are met.

The same holds true for the alternatives of claims 15, 16, and 18 referring to claims 3-8.

2. Invention 2

2.1 D3 discloses (cf. example 4) an anti-microbial composition comprising 0.5 g Delvopius (comprising 2,5% nisin, see p. 13, l. 13-15) wherein the Delvopius is mixed with NaCl and tapwater. Further, 0.2% xanthan is added and the pH is adjusted to 4.5 with citric acid. The resulting suspension is used as a food coating to prevent microbial growth on cheese.

Concerning the addition of 0.2% xanthan, the applicant submitted that it is not disclosed whether the percentage is %(w/w), %(v/v), or %(w/v). The attention of the applicant is drawn to the fact that the other ingredients are added exclusively in solid form to tapwater (1 gram of Delvocid, 0.5 gram of Delvopius and 100 gram NaCl). Further, the whole document discloses merely percentages by weight. Thus, the disclosure of 0.2% xanthan implies unambiguously 0.2% (w/v) and the person skilled in the art would readily interpret the percentage as % (w/v) with a mind willing to understand the disclosure of D3.

Thus, the subject-matter of claims 9, 11-12, 14-16 and 18 is not new in the sense of Article 33(2) PCT in view of D3.

2.2 Moreover, the subject-matter of claim 10 is considered as being obvious in view of a combination of D3 and D5 (disclosing a tablet comprising 500 mg nisin, see example 3) or D6 (disclosing mayonnaise spreads comprising differing levels of nisin-containing whey, see tables 2-5). In addition, the formulation example of D5 renders the subject-matter of claim 13 obvious (cf. example 3).

Thus, the subject-matter of dependent claims 10 and 13 cannot be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT), and therefore the criteria of Article 33 (1) PCT are not met.

Re Item VII

Certain defects in the international application

It is strongly recommended to amend the incorrect citation on page 2, l. 21, of the description to cite "US 4,584,199".

Re Item VIII

Certain observations on the international application

Claim 2 attempts to define the subject - matter in terms of the result to be achieved as far as the feature of "adjusting the pH" is concerned. Such a definition is only allowable under the conditions elaborated in the PCT- Guidelines II 5.35. In this instance, however, such a formulation is not allowable because it appears possible to define the subject matter in more concrete terms, viz. in terms of how the effect is to be achieved (e. g. by adding a pH value of the description, p. 3, l. 19-21).

PCT/EP2009/060413

11 May 2010

CLAIMS

1. A method for preparing a liquid nisin composition, comprising the steps of:
 - a) Mixing powder nisin with an aqueous solution to prepare a first liquid nisin containing composition having a pH of 3.5 to 12 and a final inorganic salt concentration of 1.5 M or below,
 - b) isolating solid compounds from the prepared first liquid nisin containing composition by centrifugation, filtration or any combination thereof,
 - c) contacting the isolated solid compounds with a solution having a pH of 1 to 3 to prepare a second liquid nisin composition, and optionally
 - d) removing solid compounds from the second liquid nisin composition.
2. The method according to claim 1, further comprising the step of:
 - e) adjusting the pH of the second liquid nisin composition to a desired value.
3. A liquid nisin composition obtainable by the method according to claim 1 or 2.
4. The composition according to claim 3 having a minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.001 µg/ml or less against *Micrococcus luteus* B212.
5. The composition according to claim 3 or 4 having a pH of 1.5 to 5.
6. The composition according to any one of the claims 3 to 5, wherein the composition comprises a salt to nisin ratio of 100:1 to 1:100.
7. The composition according to any one of the claims 3 to 6 having a turbidity of 0 to 100 FNU.
8. The composition according to any one of the claims 3 to 7, further comprising at least one compound selected from the group consisting of an additional antimicrobial compound, a surfactant, a pH adjusting agent, a cryoprotectant, an anti-foaming agent and a thickening agent.

62

PCT/EP2009/060413

11 May 2010

9. An aqueous suspension of nisin having a pH of 2 to 12 and comprising 0.2 to 5% (w/w) xanthan gum.
10. The suspension according to claim 9, comprising 0.01 to 5% (w/w) nisin.
11. The suspension according to claim 9 or 10, further comprising at least one compound selected from the group consisting of an additional antimicrobial compound, a surfactant, a pH adjusting agent, an anti-foaming agent and a cryoprotectant.
12. A method of preparing a suspension according to any one of the claims 9 to 11, the method comprising the steps of:
 - a) adding nisin and xanthan gum, either separately or as a powder composition, to an aqueous solution,
 - b) mixing to obtain a suspension comprising 0.2 to 5% (w/w) xanthan gum, and
 - c) if necessary, adjusting the pH of the suspension to 2 to 12.
13. A powder composition for use in a method according to claim 12 comprising nisin and xanthan gum.
14. Use of an aqueous suspension as claimed in any one of the claims 9 to 11 for preparation of a treatment liquid for treatment of a food, feed or agricultural product.
15. Use of a composition according to any one of the claims 3 to 8 or a suspension according to any one of the claims 9 to 11 as a preservative in and/or on a food, feed or agricultural product.
16. A method for preserving a food, feed or agricultural product, wherein a composition according to any one of the claims 3 to 8 or a suspension according to any one of the claims 9 to 11 is applied to the food, feed or agricultural product.
17. A method for producing a solid nisin composition comprising the step of subjecting a composition according to any one of the claims 3 to 8 to a drying step, lyophilisation step, crystallisation step or precipitation step.

PCT/EP2009/060413

11 May 2010

18. A food, feed or agricultural product comprising a composition according to any one of the claims 3 to 6 or a suspension according to any one of the claims 9 to 11.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición de nisina líquida, que comprende las etapas de:
 - a) Mezclar la nisina en polvo con una solución acuosa para preparar una primera composición de nisina líquida que tiene un pH de 3.5 a 12 y un concentración de sal inorgánica final de 1.5 M o menos,
 - b) aislar los compuestos sólidos de la primera composición preparada que contiene nisina líquida por centrifugación, filtración o cualquier combinación de las mismas,
 - c) poner en contacto los compuestos sólidos aislados con una solución que tiene un pH de 1 a 3 para preparar una segunda composición de nisina líquida, y opcionalmente
 - d) eliminar los compuestos sólidos de la segunda composición de nisina líquida.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de:
 - e) ajustar el pH de la segunda composición de nisina líquida a un valor deseado.
3. Una composición de nisina líquida que se puede obtener mediante el método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
4. Composición de acuerdo con la reivindicación 3 que tiene una concentración inhibidora mínima (MIC) de 0.001 µg/ml o menos contra *Micrococcus luteus* B212.
5. Composición de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 que tiene un pH de 1.5 a 5.
6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde composición comprende una relación de sal a nisina de 100:1 hasta a 1:100.
7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 que tiene una turbidez de 0 a 100 FNU.
8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, que comprende adicionalmente por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste de un compuesto antimicrobiano adicional, un tensoactivo, un agente que ajusta el pH, un crioprotector, un agente antiespumante y un agente espesante.
9. Una suspensión acuosa de nisina que tiene un pH de 2 a 12 y comprende de 0.2 a 5% (p/p) de goma de xantano.

ENMIENDAS

10. La suspensión de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende 0.01 a 5% (p/p) de nisina.
11. La suspensión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, que comprende adicionalmente por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste de un compuesto antimicrobiano adicional, un tensoactivo, un agente que ajusta el pH, un agente antiespumante y un crioprotector.
12. Un método para preparar una suspensión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, comprendiendo el método las etapas de:
 - a) agregar nisina y goma de xantano, bien separadamente o como una composición en polvo, a una solución acuosa,
 - b) mezclar para obtener una suspensión que comprende de 0.2 a 5% (p/p) de goma de xantano, y
 - c) si es necesario, ajustar el pH de la suspensión de 2 a 12.
13. Una composición el polvo para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende nisina y goma de xantano.
14. Uso de una suspensión acuosa como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 para la preparación de un líquido de tratamiento para el tratamiento de un alimento, concentrado o producto agrícola.
15. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 o una suspensión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 como un conservante en y/o sobre un alimento, concentrado o producto agrícola.
16. Un método para preservar un alimento, concentrado o producto agrícola, en donde una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 o una suspensión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 se aplica al alimento, concentrado o producto agrícola.
17. Un método para producir una composición de nisina sólida que comprende la etapa de someter una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 a una etapa de secado, etapa de liofilización, etapa de cristalización o etapa de precipitación.
18. Un alimento, concentrado o producto agrícola que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 o una suspensión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.

ENMIENDAS

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BIERMANN, Jan
DSM Intellectual Property
Delft Office (600-0240)
P.O. Box 1
NL-2600 MA Delft
PAYS-BAS

Date of mailing (day/month/year) 07 January 2011 (07.01.2011)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 26952-WO-PCT	
International application No. PCT/EP2009/060413	International filing date (day/month/year) 12 August 2009 (12.08.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address HAAN, DE, Ben Rudolf Watertorenlaan 17 NL-2275 AW Voorburg Netherlands	State of Nationality NL	State of Residence NL
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address HAAN, DE, Ben Rudolf Park de Wervelaan 19 2283 TN Rijswijk (ZH) Netherlands	State of Nationality NL	State of Residence NL
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☒ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 89 75	Authorized officer Schraner Franziska e-mail pt05.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 05
---	--



No. 11-009146- -00000-0000

Fecha: 2011-01-27 15:12:57
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCH
Eve. 379 FASENACIONALII
Folios: 67

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art. 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

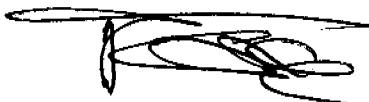
2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
RODRIGUEZ D^r ALEMAN DILIA MARIA
Apoderado(a) y/o Representante de
DSM IP ASSETS B.V.

REFERENCIA	Radicación No.	11 9146
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/060413
	Fecha inicio fase nacional	12/03/2011
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	13353
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,



JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

adpall