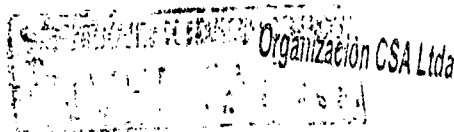




CSA673871



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

09-112336

21. EXPEDIENTE Nº

54. TÍTULO CATALIZADOR DE BASE BIOLÓGICA PARA RETRASAR
LOS PROCESOS DE DESARROLLO DE LAS PLANTAS.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A01N 63/00

71. SOLICITANTE GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION, INC.

DOMICILIO Atlanta, Georgia, Estados Unidos de América.

74. APODERADO DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.

20/09/2009 No hay Excedente
FN. 02-41-2009



No. 09-112336- -00000-0000

Fecha: 2009-10-09 14:44:52 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 114

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

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Capítulo I ☒ Capítulo II

2
**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **GEORGIA STATE UNIVERSITY
RESEARCH FOUNDATION, INC.**
Dirección: P.O. Box 3999, Atlanta, Georgia
30302-3999, Estados Unidos de América.
Nacionalidad o Domicilio: Atlanta, Georgia,
Estados Unidos de América
Lugar de Constitución: Georgia, Estados
Unidos de América
Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número

3
**REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

Nombre: **DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN**
Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6
Teléfono: 6 181088 Fax: 6350824
E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

**Número 41.654.882
T.P 20824 CSJ**

4
**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: **VER HOJA ANEXA**
Dirección:
Nacionalidad o domicilio:

5 **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/058286 Fecha 26 de marzo de 2008
Publicación Internacional No. WO 2008/124307 A3 Fecha 16 de octubre de 2008

6 **TÍTULO (54)** CATALIZADOR DE BASE BIOLÓGICA PARA RETRASAR LOS PROCESOS DE
DESARROLLO DE LAS PLANTAS.

7 **Clasificación Internacional (51)** A01N 63/00

8 **Prioridad**

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen
Estados Unidos de
América

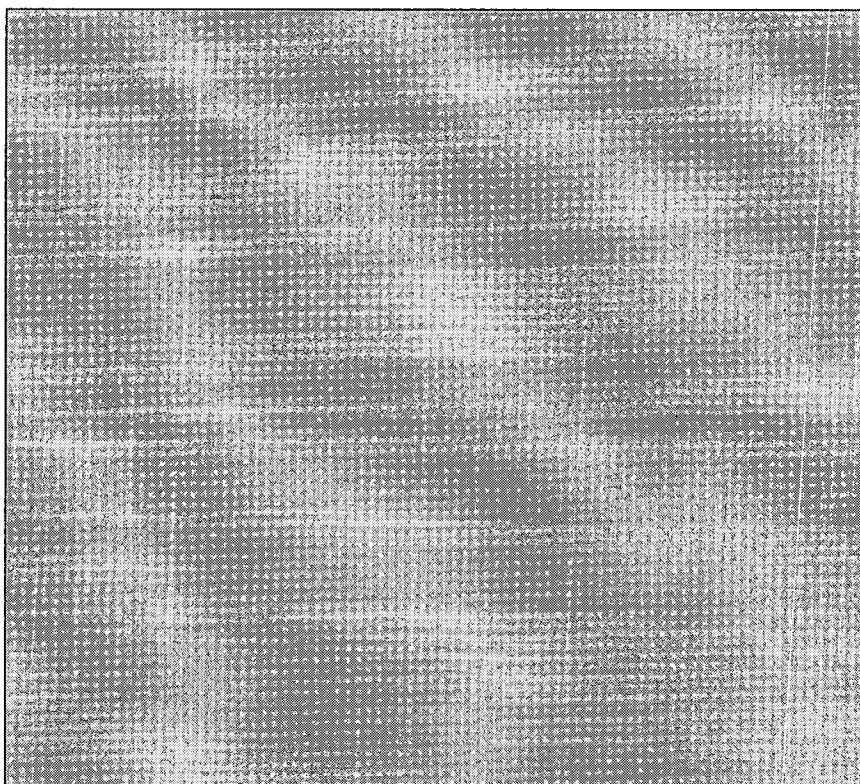
(32) Fecha
2 de abril de 2007

(31) Número de Solicitud
11/695,377

9 **Comprobante de pago No.** 9-65,604 // 9-65,605 // 09-69,207 // 09-60,059 // 09-60,060
Fecha 03/09/09 // 03/09/09 // 15/09/09 // 12/09/09 // 12/08/09

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona
- ☐ Poderes si fuere 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 (IPEA).
- ☐ 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 deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ 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 * Declaración de inventores bajo la regla 4.17.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA: _____

C.C. 41.654.882

T.R. 20824

As. P-2320

NIT : 8001244444

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 9 - 65,604
FECHA : SEPTIEMBRE 3 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-112336-00000-0000

Fecha: 2009-10-09 14:44:52

Dep. 2020 NUECREACIONI

Tra: 11-PATENTEIYII

Eve: 379 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 114

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	129129744	03/09/2009	80,800,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02	PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
		TOTAL :	\$ 643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL ASUNTO No.

P-2320
2

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 9 - 65,605
FECHA : SEPTIEMBRE 3 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-112336- -00000-0000

Fecha: 2009-10-09 14:44:52 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 114

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	129129744	03/09/2009	80,800,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02	PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
		TOTAL :	\$ 643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL ASUNTO No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-112336- -00000-0000

Fecha: 2009-10-09 14:44:52 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 114

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 69,207
FECHA : SEPTIEMBRE 15 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	110620134	15/09/2009	49,098,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMI	25,000.00
		TOTAL :	\$ 25,000.00

SON: VEINTICINCO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 80

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-112336- -00000-0000

Fecha: 2009-10-09 14:44:52 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 114

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 60,059

FECHA : AGOSTO 12 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODEY Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105328123	12/08/2009	3,270,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	2,000.00
		TOTAL :	\$ 2,000.00

SON: DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 80017

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-112336-00000-0000

Fecha: 2009-10-09 14:44:52 Dep: 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 114

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 60,060

FECHA : AGOSTO 12 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105328123	12/08/2009	3,270,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$
			2,000.00

SON: DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

ANEXOS

INVENTORES

1.)

PIERCE, George E.

(112 Rosebury Drive, Canton, Georgia 30115, Estados Unidos de América);

2.)

GANGULY, Sangeeta

(1500 East Lake Cook Road, Buffalo Grove, Illinois 60089, Estados Unidos de América);

3.)

DRAGO, Gene K.

(4138 NW 46th Drive, Gainesville, Florida 32606, Estados Unidos de América).

CATALIZADOR DE BASE BIOLÓGICA PARA RETRASAR LOS PROCESOS DE
DESARROLLO DE LAS PLANTAS

RESUMEN

La presente invención está dirigida a métodos para retrasar un proceso de desarrollo de las plantas que comprende exponer una planta o parte de la planta a una o más bacterias o enzimas. En formas de realización específicas, dichas una o más bacterias se seleccionan del grupo que consiste de *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutaricum*, y una mezcla que comprende cualquier combinación de estas bacterias. Aparatos para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas que comprenden un catalizador que comprende una o más de las bacterias anteriores.

1

CATALIZADOR DE BASE BIOLÓGICA PARA RETRASAR LOS PROCESOS DE DESARROLLO DE LAS PLANTAS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para retrasar el desarrollo de las plantas que comprende exponer una planta o parte de la planta a una o más bacterias o enzimas.

Se proveen, además, aparatos para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La producción de etileno en las plantas y partes de las plantas es inducida por una variedad de factores externos y factores estresantes, que incluyen lesiones, aplicación de hormonas (por ejemplo, auxina), condiciones anaeróbicas, helada, calor, sequía e infección por patógenos.

La producción incrementada de etileno también se observa durante una variedad de procesos de desarrollo de las plantas, con inclusión de maduración de las frutas o verduras, germinación de las semillas, abscisión de las hojas y senescencia de las flores.

La biosíntesis de etileno en las plantas se ilustra en general como un esquema enzimático que implica tres enzimas, denominadas de manera tradicional "el ciclo Yang" en el cual la S-adenosil-L-metionina (SAM, del inglés *S-adenosyl-L-methionine*) sintasa cataliza la conversión de metionina a S-adenosil-L-metionina (AdoMet); el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) sintasa cataliza la conversión de AdoMet a ACC; y la ACC oxidasa cataliza la conversión de ACC a etileno y los subproductos dióxido de

carbono y cianuro de hidrógeno. Véase, por ejemplo, Srivastava (2001) *Plant Growth and Development: Hormones and Environment* (Academic Press, New York) para una descripción general de la biosíntesis de etileno en las plantas y los procesos de desarrollo de las plantas regulados por etileno.

La investigación previa ha establecido que la maduración climatérica de las frutas se desencadena, al menos en parte, por un incremento repentino y significativo en la biosíntesis de etileno.

Si bien un aumento repentino en la producción de etileno participa en el proceso de maduración de las frutas climatéricas, no se entiende completamente el mecanismo exacto, sobre todo en las frutas no climatéricas. Si bien no existe un aumento repentino de la producción de etileno en la fruta no climatérica, la fruta no climatérica responde al etileno. Además, las frutas, las verduras y otros productos vegetales varían en la cantidad de etileno sintetizado y también en la sensibilidad del producto particular al etileno. Por ejemplo, las manzanas exhiben un alto nivel de producción de etileno y sensibilidad a etileno, mientras que las alcachofas muestran un bajo nivel de biosíntesis de etileno y sensibilidad a etileno. Véase, por ejemplo, Cantwell (2001) "*Properties and Recommended Conditions for Storage of Fresh Fruits and Vegetables*" en el sitio

postharvest.ucdavis.edu/Produce/Storage/index.shtml

(accedido por última vez el 6 de marzo de 2007), que se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad. La maduración de las frutas típicamente genera un cambio en el color, ablandamiento del pericarpio, y cambios en el contenido de azúcar y sabor de la fruta. Si

bien la maduración inicialmente hace que la fruta sea más comestible y atractiva de comer, el proceso eventualmente lleva a la degradación y deterioro de la calidad de la fruta, tornándola inaceptable para su consumo, ocasionando pérdidas monetarias significativas a nivel comercial. El control del proceso de maduración es deseable para mejorar la vida útil y extender el tiempo disponible para el transporte, almacenamiento y venta de la fruta y otros productos agrícolas sometidos a maduración.

Además de un incremento repentino en la biosíntesis de etileno en las frutas climatéricas, los cambios relacionados con la maduración también están asociados con una suba en la velocidad de respiración. El calor se produce como consecuencia de la respiración en las frutas, las verduras y otros productos vegetales y, en consecuencia, impacta la vida útil y las condiciones de almacenamiento requeridas (por ejemplo, refrigeración) para estos productos. Los productos vegetales con velocidades superiores de respiración (por ejemplo, alcachofas, flores cortadas, espárrago, brócoli, espinaca, etc.) exhiben vidas útiles más cortas que aquellos con velocidades inferiores de respiración (por ejemplo, nueces, dátiles, manzanas, cítricos, uvas, etc.). La respiración se ve afectada por un número de factores ambientales que incluyen temperatura, composición atmosférica, tensión física, luz, tensión química, radiación, tensión del agua, reguladores del crecimiento y ataque de patógenos. En particular, la temperatura juega un papel significativo en la velocidad de respiración. Para una descripción general del metabolismo respiratorio y condiciones atmosféricas controladas recomendadas para las frutas, las verduras y otros productos vegetales, véase, por ejemplo, Kader (2001)

Postharvest Horticulture Serie No. 22A:29-70 (University of California - Davis); Saltveit (University of California - Davis) "Respiratory Metabolism" en el sitio usna.usda.gov/hb66/019respiration.pdf (accedido por última vez el 6 de marzo de 2007); y Cantwell (2001) "*Properties and Recommended Conditions for Storage of Fresh Fruits and Vegetables*" en el sitio postharvest.ucdavis.edu/Produce/Storage/index.shtml (actualizado por última vez el 6 de marzo de 2007) que se incorporan en la presente a modo de referencia en su totalidad.

Los métodos y las composiciones para retrasar el proceso de maduración de frutas incluyen, por ejemplo, la aplicación de sales de plata (por ejemplo, tiosulfato de plata), 2,5-norbornadieno, permanganato de potasio, 1-metilciclopropeno (1-MCP), ciclopropeno (CP) y derivados de los mismos. Estos compuestos tienen ventajas significativas, tales como la presencia de metales pesados, olores pestilentes, y propiedades explosivas cuando se comprimen, que los pueden hacer inaceptables para - o de aplicabilidad limitada para - uso en la industria alimenticia. Los enfoques transgénicos para controlar la producción de etileno para retrasar los procesos de desarrollo de las plantas (por ejemplo, maduración de frutas) al introducir secuencias de ácido nucleico que limitan la producción de etileno, particularmente al reducir la expresión de las enzimas ACC sintasa o ACC oxidasa, también se encuentran bajo investigación. Sin embargo, la respuesta del público a los productos genéticamente modificados no ha sido del todo favorable.

Por consiguiente, persiste la necesidad imperante en el arte de métodos y aparatos seguros para retrasar los

procesos de desarrollo de las plantas. Dichos métodos y aparatos podrían brindar un mejor control de la maduración de frutas, maduración de verduras, senescencia de flores, abscisión de hojas, y germinación de semillas, y extender la vida útil de varios productos agrícolas (por ejemplo, frutas, verduras y flores cortadas), permitiendo así el transporte de mayores distancias de estos productos, sin necesidad de refrigeración, incrementando el deseo de consumir el producto por parte de los consumidores, y reduciendo los costos monetarios asociados con la pérdida del producto debido a la maduración y senescencia a destiempo.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCION

Se proveen métodos para retrasar un proceso de desarrollo de las plantas, que incluyen mas no se limitan a la maduración de frutas, maduración de verduras, senescencia de flores, y abscisión de hojas. Los métodos de la presente invención comprenden en general exponer una planta o parte de la planta a una o más bacterias en una cantidad suficiente para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas de interés. En ciertos aspectos de la invención, las bacterias se seleccionan del grupo que consiste de *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, y mezclas de las mismas. Las bacterias usadas en la práctica de los presentes métodos se pueden tratar, además, con un agente inductor, que incluye, por ejemplo, asparagina, glutamina, cobalto, urea, y mezclas de los mismos, para inducir la habilidad de las bacterias de retrasar el proceso de desarrollo de las plantas de interés.

La presente invención provee, además, aparatos para

retrasar el proceso de desarrollo de las plantas que comprende un catalizador que comprende una o más bacterias, particularmente *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, o una mezcla de las mismas. Cualquier aparato que permite la exposición de una planta o parte de la planta al catalizador y retrasa el proceso de desarrollo de las plantas de interés está comprendido por la presente invención. Los aparatos de ejemplo incluyen aquellos en los cuales el catalizador es inmovilizado en una matriz y colocado en, colocado sobre, o de alguna manera fijado a cualquier estructura física. Varias configuraciones de los aparatos divulgados se contemplan y describen en mayor detalle a continuación, en la presente. Los métodos y aparatos de la invención para retrasar un proceso de desarrollo de las plantas encuentran particular uso en incrementar la vida útil y facilitar el transporte a mayor distancia de productos vegetales tales como frutas, verduras y flores, mejorando la satisfacción del producto al consumidor, y reduciendo la pérdida del producto ocasionada por la maduración o senescencia a destiempo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Habiendo descrito la invención en términos generales, se hará referencia ahora a los dibujos adjuntos, que no necesariamente se ilustran a escala, y en los cuales:

La FIG. 1 muestra una ilustración no limitativa de un aparato de tres capas para retrasar la maduración de frutas. Las capas exteriores (designadas A y B) proveen integridad estructural al aparato. La capa catalizadora, como se define en la presente a continuación, comprende una o más de las enzimas de la invención y se ubica entre las capas exteriores.

La FIG. 2A-C provee una ilustración no limitativa de varios aparatos para retrasar la maduración de frutas. Estos aparatos comprenden una capa catalizadora, una o más capas destinadas a proveer integridad estructural, y una o más capas destinadas a ser extraídas antes del uso del aparato. La extracción de una o más de estas capas puede, por ejemplo, exponer un adhesivo para el ajuste del aparato a otra estructura física.

Las FIGS. 3A-3B muestran una ilustración no limitativa de un aparato para retrasar maduración de frutas. El aparato comprende un catalizador inmovilizado sobre una capa de película y unido a una estructura física (por ejemplo, una caja adecuada para almacenamiento/transporte de frutas).

La FIG. 4 muestra una ilustración no limitativa de un aparato para retrasar maduración de frutas. El aparato comprende una estructura de cámara ranurada que permite la inserción y el reemplazo de uno o más elementos de módulos catalizadores, como se define a continuación. Las capas exteriores de la estructura física pueden estar compuestas de un material que permite que el aire fluya dentro del catalizador.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención será descrita en mayor detalle a partir de ahora, con referencia a las formas de realización específicas de la invención, y particularmente a los varios dibujos provistos con la presente. De hecho, la invención puede llevarse a cabo en muchas formas diferentes y no debería limitarse a las formas de realización establecidas en la presente; por el contrario, estas formas de realización se proveen de manera tal que esta divulgación

satisfaga los requisitos legales en vigencia. Como se usa en esta memoria descriptiva, y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la", incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto claramente dicte lo contrario.

En toda la memoria descriptiva, la palabra "comprender" o sus variaciones gramáticas, deben entenderse a fin de incluir un elemento citado, número entero o paso, o grupo de elementos, números enteros o pasos, mas no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o paso, o grupo de elementos, números enteros o pasos.

La presente invención provee métodos para retrasar un proceso de desarrollo de las plantas de interés que comprende exponer una planta o parte de la planta a una o más bacterias.

En formas de realización particulares, los métodos se dirigen a retrasar el proceso de desarrollo de las plantas que comprenden exponer una planta o parte de la planta a una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste de *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, y mezclas de las mismas, en donde una o más bacterias son expuestas a la planta o parte de la planta en una cantidad suficiente para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas. También se proveen los aparatos para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas de interés y para llevar a cabo los métodos descritos en la presente. Los métodos y aparatos de la invención se pueden usar, por ejemplo, para retrasar la maduración de frutas/verduras o senescencia de las flores y para incrementar la vida útil de las frutas, verduras o flores, facilitando de esta manera el transporte, distribución y comercialización de dichos productos vegetales.

Como se usa en la presente, "planta" o "parte de la planta" se define en el sentido amplio para incluir plantas o cualquier parte de una planta, con inclusión, mas sin limitación a frutas, verduras, flores, semillas, hojas, nueces, embriones, polen, óvulos, ramas, cáscaras, espigas, mazorca, semillas, tallos, raíces, nervaduras, anteras y similares. En formas de realización particulares, la parte de la planta es una fruta, una verdura o una flor. En ciertos aspectos de la invención, la parte de la planta es una fruta, más particularmente una fruta climatérica, como se describe en más detalle a continuación.

Los métodos y aparatos de la invención están dirigidos a retrasar el proceso de desarrollo de las plantas, tal como el proceso de desarrollo de las plantas generalmente asociado con la biosíntesis incrementada de etileno. "Proceso de desarrollo de las plantas" está destinado a significar cualquier proceso de crecimiento o desarrollo de una planta o parte de la planta, con inclusión, mas sin limitación a, la maduración de frutas, maduración de verduras, senescencia de flores, abscisión de hojas, germinación de semillas, y similares. En formas de realización particulares, el proceso de desarrollo de las plantas de interés es la maduración de frutas o verduras, senescencia de flores, o abscisión de hojas, más particularmente maduración de frutas o verduras. Como se define en la presente, "retrasar el proceso de desarrollo de las plantas", y sus variantes gramáticas, se refiere a cualquier disminución, interrupción, supresión o inhibición del proceso de desarrollo de las plantas de interés o los cambios fenotípicos o genotípicos a la planta o parte de la planta asociados en general con el proceso específico de desarrollo de las plantas. Por ejemplo, cuando el proceso

de desarrollo de las plantas de interés es la maduración de frutas, un retraso en la maduración de frutas puede incluir la inhibición de los cambios generalmente asociados con el proceso de maduración (por ejemplo, cambio en color, ablandamiento del pericarpio (es decir, pared del ovario), incrementos en el contenido de azúcar, cambios en el sabor, degradación/deterioro general de la fruta, y eventuales disminuciones del deseo de consumir la fruta por parte de los consumidores, como se describió en los párrafos anteriores). La persona versada en el arte apreciará que la duración de tiempo necesaria para que ocurra la maduración de las frutas depende de, por ejemplo, el tipo de fruta y las condiciones específicas de almacenamiento utilizadas (por ejemplo, temperatura, humedad, flujo de aire, etc.). Por consiguiente, "retrasar la maduración de frutas" puede constituir un retraso de 1 a 90 días, particularmente 1 a 30 días, más particularmente 5 a 30 días. Los métodos para evaluar un retraso en el proceso de desarrollo de las plantas tales como maduración de frutas, maduración de verduras, senescencia de flores, y abscisión de hojas se encuentran dentro de las capacidades de rutina de la persona versada en el arte y se pueden basar, por ejemplo, en la comparación con los procesos de desarrollo de las plantas en plantas o partes de plantas no tratadas. En ciertos aspectos de la invención, los retrasos en el proceso de desarrollo de las plantas generados de la práctica de los presentes métodos pueden ser evaluados con relación a las plantas o partes de plantas no tratadas o con las plantas o partes de plantas que han sido tratadas con uno o más agentes conocidos por retrasar el proceso de desarrollo de las plantas de interés. Por ejemplo, un retraso en la maduración de las frutas generado a partir de

la realización de un método de la invención se puede comparar con los tiempos de maduración de frutas no tratadas o frutas que han sido tratadas con un agente anti-maduración, tales como los descritos en la presente con anterioridad.

Los métodos de la invención para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas por lo general comprenden exponer una planta o parte de la planta a una o más de las siguientes bacterias: *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, o una mezcla que contiene cualquier combinación de estas bacterias. En ciertas formas de realización, dicha una o más bacterias incluyen *Rhodococcus spp.*, más particularmente la cepa de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253, cepa de *Rhodococcus sp.* DAP 96622, *Rhodococcus erythropolis*, o mezclas de las mismas. Como se usa en la presente, exponer una planta o parte de la planta a una o más de las bacterias anteriores incluye, por ejemplo, exposición a células bacterianas intactas, lisados celulares bacterianos, y extractos bacterianos que poseen actividad enzimática (es decir, "extractos enzimáticos"). Los métodos para preparar lisados y extractos enzimáticos a partir de las células, con inclusión de células bacterianas, son de rutinarios en el arte. Dichas una o más bacterias usadas en los métodos y aparatos de la invención pueden a veces ser aludidas con más frecuencia en la presente como el "catalizador".

De acuerdo con los métodos de la invención, dichas una o más bacterias son expuestas a la planta o parte de la planta en una cantidad suficiente para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas. "Exponer" una planta o parte de la planta a una o más de las bacterias de la invención incluye cualquier método para presentar una bacteria a la

planta o parte de la planta. Los métodos indirectos de exposición incluyen, por ejemplo, colocar la bacteria o mezcla de bacterias en la proximidad general de la planta o parte de la planta (es decir, exposición indirecta). En otras formas de realización, las bacterias pueden ser expuestas a la planta o parte de la planta por contacto directo o más cercano. Asimismo, como se define en la presente, una cantidad "suficiente" de dichas una o más bacterias de la invención depende de una variedad de factores, que incluyen, mas no se limitan a, las bacterias particulares utilizadas en el método, la forma en la cual la bacteria se expone a la planta o parte de la planta (por ejemplo, como células bacterianas intactas, lisados celulares, o extractos enzimáticos, como se describen en párrafos anteriores), el medio por el la bacteria se expone a la planta o parte de la planta, y la duración de tiempo de exposición. Sería cuestión de experimentación de rutina para la persona versada en el arte determinar la cantidad "suficiente" de dichas una o más bacterias necesarias para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas de interés.

Si bien en formas de realización particulares de la invención, dichas una o más bacterias se seleccionan del grupo que consiste de *Rhodococcus* spp., *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, cualquier bacteria que retrasa el proceso de desarrollo de las plantas cuando se expone a una planta o parte de la planta puede ser usada en los presentes métodos y aparatos. Por ejemplo, las bacterias que pertenecen al género *Nocardia* [véase la solicitud de patente japonesa No. 54-129190], *Rhodococcus* [véase la solicitud de patente japonesa No. 2-470], *Rhizobium* [véase la solicitud de patente japonesa No.

5-236977], *Klebsiella* [solicitud de patente japonesa No. 5-30982], *Aeromonas* [solicitud de patente japonesa No. 5-30983], *Agrobacterium* [solicitud de patente japonesa No. 8-154691], *Bacillus* [solicitud de patente japonesa No. 8-187092], *Pseudonocardia* [solicitud de patente japonesa No. 8-56684], *Pseudomonas*, y *Mycobacterium* son ejemplos no limitativos de microorganismos que pueden ser usados de acuerdo con la invención.

No todas las especies dentro de un determinado género pueden exhibir las mismas propiedades. Por ende, es posible tener un género que generalmente es conocido por incluir cepas capaces de exhibir una actividad deseada (por ejemplo, la habilidad de retrasar un proceso particular de desarrollo de las plantas tal como, por ejemplo, maduración de frutas) pero tener una o más especies que por lo general no exhiben la actividad deseada. A la luz de la divulgación provista en la presente y el conocimiento general en el arte, sería cuestión de experimentación de rutina para la persona versada en el arte llevar a cabo un ensayo para determinar si una especie particular posee una o más de las actividades deseadas.

Además, los ejemplos específicos de las bacterias útiles de acuerdo con la invención incluyen, mas no se limitan a, *Nocardia* sp., *Rhodococcus* sp., *Rhodococcus rhodochrous*, *Klebsiella* sp., *Aeromonas* sp., *Citrobacter freundii*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthobacter flavas*, *Erwinia nigruens*, *Enterobacter* sp., *Streptomyces* sp., *Rhizobium* sp., *Rhizobium loti*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium merioti*, *Candida guilliermondii*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus smithii*, *Pseudonocardia thermophila*, *Pseudomonas*

chloroaphis, *Pseudomonas erythropolis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Rhodococcus erythropolis*, *Nocardia farcinica*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Helicobacter pylori*. En formas de realización particulares, las bacterias del género *Rhodococcus*, más específicamente la cepa de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 (Depósito ATCC No. 55899; depositado en ATCC el 11 de diciembre de 1996), la cepa *Rhodococcus* sp. DAP 96622 (Depósito ATCC No. 55898; depositado en ATCC el 11 de diciembre de 1996), *Rhodococcus erythropolis*, o mezclas de las mismas, se usan en los métodos y aparatos de la invención.

En ciertos aspectos de la invención, dichas una o más bacterias son "inducidas" para exhibir una característica deseada (por ejemplo, la habilidad de retrasar un proceso de desarrollo de las plantas tal como maduración de las frutas) por exposición a, o tratamiento con, un agente inductor adecuado. Los agentes inductores incluyen, mas no se limitan a, asparagina, glutamina, cobalto, urea o cualquier mezcla de los mismos. En formas de realización particulares, las bacterias se exponen a, o se tratan con, el agente inductor asparagina, más particularmente una mezcla de los agentes inductores que comprenden asparagina, cobalto y urea. El agente inductor puede ser agregado en cualquier momento durante el cultivo de las células deseadas. Por ejemplo, con respecto a las bacterias, el medio de cultivo puede ser complementado con un agente inductor antes del comienzo del cultivo de las bacterias. En forma alternativa, las bacterias podrían ser cultivadas en un medio durante una cantidad predeterminada de tiempo para cultivar las bacterias y el agente inductor podría ser agregado en uno o más tiempos predeterminados para inducir la actividad enzimática deseada en las bacterias. Además,

el agente inductor podría ser agregado al medio de cultivo (o a una mezcla separada que incluye la bacteria previamente cultivada) para inducir la actividad deseada en las bacterias una vez que se completó el cultivo de las bacterias.

Si bien no debe limitarse a un mecanismo particular, "inducir" las bacterias de la invención puede generar la producción (o producción incrementada) de una o más enzimas, tales como una hidratasa de nitrilo, amidasa y/o asparaginasa, y la inducción de una o más de estas enzimas puede jugar un rol en retrasar el proceso de desarrollo de las plantas de interés. Los términos "hidratasa de nitrilo", "amidasa" y "asparaginasas" comprenden las familias de enzimas presentes en células de varios organismos, que incluyen, mas no se limitan a, bacterias, hongos, plantas y animales. Dichas enzimas son conocidas para las personas versadas en el arte, y cada clase de enzima posee actividades enzimáticas reconocidas. "Actividad enzimática", como se usa en la presente, se refiere en general a la habilidad de una enzima de actuar como catalizador en un proceso, tal como la conversión de un compuesto en otro compuesto. En particular, la hidratasa de nitrilo cataliza la hidrólisis del nitrilo (o cianohidrina) a la correspondiente amida (o ácido hidroxilo). La amidasa cataliza la hidrólisis de una amida al correspondiente ácido o ácido hidroxilo. En forma similar, una enzima asparaginasa, tal como asparaginasa I, cataliza la hidrólisis de asparagina a ácido aspártico.

En ciertos aspectos de la invención, la actividad enzimática puede ser aludida en términos de "unidades" por masa de enzima o células (típicamente basadas en el peso seco de las células, por ejemplo, unidades/mg cdw). Una

"unidad" en general se refiere a la habilidad de convertir una cantidad específica de un compuesto en un compuesto diferente bajo un conjunto definido de condiciones como una función de tiempo. En las formas de realización específicas, una "unidad" de actividad de la hidratasa de nitrilo puede relacionarse con la habilidad de convertir un μmol de acrilonitrilo en su correspondiente amida por minuto, por miligramo de células (peso seco) a un pH de 7,0 y una temperatura de 30 °C. En forma similar, una unidad de actividad de amidasa puede relacionarse con la habilidad de convertir 1 μmol de acrilamida en su correspondiente ácido por minuto, por miligramo de células (peso seco) a un pH de 7,0 y una temperatura de 30 °C. Asimismo, una unidad de actividad de asparaginasa puede relacionarse con la habilidad de convertir 1 μmol de asparagina en su correspondiente ácido por minuto, por miligramo de células (peso seco) a un pH de 7,0 y una temperatura de 30°C. Los ensayos para medir la actividad de la hidratasa de nitrilo, amidasa o asparaginasa son conocidos en el arte e incluyen, por ejemplo, la detección de amoníaco libre. Véase, Fawcett y Scott (1960) *J. Clin. Pathol.* 13:156-159, que se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad.

Los métodos para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas que comprende exponer una planta o parte de la planta a una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste de hidratasa de nitrilo, amidasa, asparaginasa, o una mezcla de las mismas, en donde dichas una o más enzimas son expuestas a la planta o parte de la planta en una cantidad o a un nivel de actividad enzimática suficiente para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas son también comprendidas por la presente invención. Por

ejemplo, las células completas que producen, son inducidas a producir, o son genéticamente modificadas para producir una o más de las enzimas anteriores (es decir, hidratasa de nitrilo, amidasa y/o asparaginasa) pueden usarse en los métodos para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas. En forma alternativa, la hidratasa de nitrilo, amidasa, y/o asparaginasa pueden ser aisladas, purificadas o semipurificadas a partir de cualquiera de las células anteriores y expuestas a la planta o parte de la planta en una forma más aislada. Véase, por ejemplo, Goda et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:23480-23485; Nagasawa et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:138-144; Soong et al. (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1947-1952; Kato et al. (1999) *Eur. J. Biochem.* 263:662-670, que se incorporan en la presente a modo de referencia en su totalidad. La persona versada en el arte advertirá, además, que un solo tipo celular puede ser capaz de producir (o ser inducido o genéticamente modificado para producir) más de una de las enzimas de la invención. Dichas células son adecuadas para el uso en los métodos y aparatos revelados.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para varias hidratatas de nitrilo, amidasas y asparaginasas a partir de varios organismos son divulgadas en las bases de datos de secuencias disponibles al público. Una lista no limitativa de las hidratatas de nitrilo y amidasas alifáticas representativas conocidas en el arte se establece en las Tablas 1 y 2 y en el listado de secuencias. El "puntaje de la proteína" referido en las Tablas 1 y 2 provee un panorama de los intervalos de confianza porcentuales (% de intervalo de confianza) de la identificación de las proteínas aisladas sobre la base de los datos de espectroscopia de masa data.

Tabla 1: Información de secuencia de aminoácido para
hidratasa de nitrilo representativas

Organismo fuente	Acceso N.º	Identificador de secuencia	Puntaje de secuencia (% de intervalo de confianza)
<i>Rhodococcus sp.</i>	806580	SEQ ID NO:1	100%
<i>Nocardia sp.</i>	27261874	SEQ ID NO:2	100%
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	49058	SEQ ID NO:3	100%
Bacteria no cultivada (BD2); subunidad beta de hidratasa de nitrilo	27657379	SEQ ID NO:4	100%
<i>Rhodococcus sp.</i>	806581	SEQ ID NO:5	100%
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	581528	SEQ ID NO:6	100%
Bacteria no cultivada (SP1); subunidad alfa de hidratasa de nitrilo	7657369	SEQ ID NO:7	100%

Tabla 2: Información de secuencia de aminoácido para
amidasas alifáticas representativas.

Organismo fuente	Acceso No.	Identificador de secuencia	Puntaje de secuencia (% de intervalo de confianza)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	62461692	SEQ ID NO:8	100%
<i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152	54022723	SEQ ID NO:9	100%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	15598562	SEQ ID NO:10	98,3%
<i>Helicobacter pylori</i> J99	15611349	SEQ ID NO:11	99,6%
<i>Helicobacter pylori</i> 26695	2313392	SEQ D NO:12	97,7%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	150980	SEQ ID NO:13	94%

En general, cualquier célula bacteriana, fúngica, vegetal o animal capaz de producir o ser inducida a producir hidratasa de nitrilo, amidasa, asparaginasa o cualquier combinación de las mismas se puede usar en la práctica de la invención. Una hidratasa de nitrilo, amidasa, y/o asparaginasa puede producirse en forma constitutiva en una célula a partir de un organismo particular (por ejemplo, una bacteria, hongo, célula vegetal o célula animal) o, en forma alternativa, una célula puede producir la enzima o enzimas deseadas solamente después de la "inducción" con un agente inductor

adecuado. "En forma constitutiva" hace referencia a que al menos una enzima de la invención es producida o expresada continuamente en un tipo celular particular. Otros tipos celulares, no obstante, pueden necesitar ser "inducidos", como se describe con anterioridad, para expresar hidratasa de nitrilo, amidasa, y/o asparaginasa a una cantidad o nivel de actividad enzimática suficiente para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas de interés. Es decir, una enzima de la invención puede sólo ser producida (o producida a niveles suficientes) después de la exposición a, o tratamiento con, un agente inductor adecuado. Dichos agentes inductores son conocidos en el arte y se resaltaron en párrafos anteriores. Por ejemplo, en ciertos aspectos de la invención, dichas una o más bacterias son tratadas con un agente inductor tal como asparagina, glutamina, cobalto, urea, o cualquier mezcla de las mismas, más particularmente una mezcla de asparagina, cobalto y urea. Asimismo, como se revela en la solicitud estadounidense pendiente No. 11/669.011, intitulada "*Induction and Stabilization of Enzymatic Activity in Microorganisms*", presentada el 30 de enero de 2007, la actividad de asparaginasa I puede ser inducida en *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96622 (Gram positiva) o *Rhodococcus* sp. DAP 96253 (Gram-positiva), en medio complementado con amida que contiene aminoácidos, o sus derivados. Otras cepas de *Rhodococcus* también pueden ser preferentemente inducidas de manera similar para exhibir actividad enzimática de asparaginasa I utilizando amida que contiene aminoácidos, o sus derivados.

En otros aspectos de la invención, la *P. chloroaphis* (Depósito en ATCC N.º 43051), que produce actividad de asparaginasa I en presencia de asparagina, y la *B. kletoglutamicum* (Depósito en ATCC No. 21533), una bacteria

Gram-positiva que también ha demostrado producir actividad de asparaginasa, se usan en los métodos divulgados. Las células fúngicas, tales como aquellas del género *Fusarium*, las células vegetales y las células animales que expresan una hidratasa de nitrilo, una amidasa y/o una asparaginasa, también se pueden usar en los métodos y aparatos revelados en la presente, ya sea como células completas o como una fuente a partir de la cual se aíslan una o más de las enzimas anteriores.

En formas de realización adicionales, las células huésped que han sido genéticamente manipuladas para expresar una hidratasa de nitrilo, amidasa y/o asparaginasa se pueden usar para exponerse a una planta o parte de la planta de acuerdo con los presentes métodos y aparatos para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas. En forma específica, un polinucleótido que codifica una hidratasa de nitrilo, amidasa o asparaginasa (o polinucleótidos múltiples, cada uno de los cuales codifica una hidratasa de nitrilo, amidasa o asparaginasa) puede ser introducido por medio de técnicas estándares de biología molecular en una célula huésped para producir una célula transgénica que expresa una o más de las enzimas de la invención. El uso de los términos "polinucleótido", "constructo de polinucleótido", "nucleótido", o "constructo de nucleótido" no han de limitar la presente invención a los polinucleótidos o nucleótidos que comprenden ADN. Las personas versadas en el arte advertirán que los polinucleótidos y nucleótidos pueden comprender ribonucleótidos y combinaciones de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. Dichos desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos incluyen tanto moléculas de ocurrencia natural como análogos sintéticos.

Los polinucleótidos de la invención también comprenden todas las formas de secuencias que incluyen, mas no se limitan a, formas monocatenarias, formas bicatenarias y similares.

Las variantes y fragmentos de polinucleótidos que codifican polipéptidos que retienen la actividad enzimática deseada (es decir, actividad de hidratasa de nitrilo, amidasa o asparaginasa) también se pueden usar en la práctica de la invención. Por "fragmento" se hace referencia a una parte del polinucleótido y, por ende, también codifica una parte de la correspondiente proteína. Los polinucleótidos que son fragmentos de una secuencia de nucleótidos enzimática en general comprenden al menos 10, 15, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, o 1400 nucleótidos contiguos, o hasta el número de nucleótidos presentes en una secuencia de polinucleótidos enzimática de longitud completa. Un fragmento de polinucleótido codifica un polipéptido con una actividad enzimática deseada y, en general, codifica al menos 15, 25, 30, 50, 100, 150, 200 ó 250 aminoácidos contiguos, o hasta el número total de aminoácidos presentes en una secuencia de aminoácidos enzimática de longitud completa de la invención. "Variante" hace referencia a secuencias sustancialmente similares. En general, las variantes de una secuencia enzimática particular de la invención tiene al menos alrededor del 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la secuencia enzimática de referencia, como lo determinan programas de alineación de secuencias estándares. Los polinucleótidos variantes englobados por la invención codifican polipéptidos con la

actividad enzimática deseada.

Como se usa en el contexto de producción de células transgénicas, el término "introducir" hace referencia a presentar a una célula huésped, particularmente un microorganismo tal como *Escherichia coli*, con un polinucleótido que codifica una hidratasa de nitrilo, una amidasa y/o una asparaginasa. En algunas formas de realización, el polinucleótido se presenta de manera tal que la secuencia gana acceso al interior de una célula huésped, con inclusión de su potencial inserción en el genoma de la célula huésped. Los métodos de la invención no dependen de un método particular para introducir una secuencia en una célula huésped, solamente que el polinucleótido gana acceso al interior de al menos una célula huésped. Los métodos para introducir polinucleótidos en células huésped son conocidos en el arte con inclusión, mas sin limitarse a, métodos de transfección estable, métodos de transfección transitoria y métodos mediados por virus. "Transfección estable" hace referencia a que el constructo de polinucleótido introducido en una célula huésped se integra en el genoma del huésped y es capaz de ser heredado por la progenie del mismo. "Transfección transitoria" o "expresión transitoria" hace referencia a que un polinucleótido es introducido en la célula huésped pero no se integra en el genoma del huésped.

Asimismo, la secuencia nucleotídica de hidratasa de nitrilo, amidasa o asparaginasa puede estar contenida en, por ejemplo, un plásmido para introducción en la célula huésped. Los plásmidos de interés típicos incluyen vectores que tienen sitios de clonación definidos, orígenes de replicación y marcadores seleccionables. El plásmido puede incluir, además, secuencias de iniciación de transcripción

y traducción y terminadores de transcripción y traducción. Los plásmidos también pueden incluir casetes de expresión genéricos que contienen al menos una secuencia terminadora independiente, secuencias que permiten la replicación del casete en eucariotas o procariotas, o ambas, (por ejemplo, vectores lanzadera) y marcadores de selección para los sistemas tanto procarióticos como eucarióticos. Los vectores son adecuados para la replicación e integración en procariotas, eucariotas o -de manera óptima- ambas. Para las descripciones generales de sistemas y métodos de clonación, envasado y expresión, véase Gilman y Smith (1979) *Gene* 8:81-97; Roberts et al. (1987) *Nature* 328:731-734; Berger y Kimmel (1989) *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*, Vol. 152 (Academic Press, Inc., San Diego, California); Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols. 1-3 (2d ed; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York); y Ausubel et al., eds. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols* (Green Publishing Associates, Inc., y John Wiley & Sons, Inc., New York; 1994 Supplement). Las células huésped transgénicas que expresan una o más de las enzimas de la invención pueden ser usadas en los métodos y aparatos revelados como células completas o como una fuente biológica a partir de la cual una o más enzimas de la invención pueden ser aisladas.

Los aparatos para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas y para realizar los métodos de la invención también son provistos. En formas de realización particulares, un aparato para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas, particularmente maduración de frutas, que incluye un catalizador que comprende una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste de

Rhodococcus spp., *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, y mezclas de las mismas, está comprendido por la presente invención.

La cepa de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253, cepa de *Rhodococcus sp.* DAP 96622, *Rhodococcus erythropolis*, o mezclas de las mismas pueden ser usadas en ciertos aspectos de la invención. Dichas una o más bacterias de un aparato de la invención se proveen en una cantidad suficiente para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas de interés, como se definió en la presente con anterioridad. En otros aspectos de la invención, el catalizador comprende una o más enzimas (es decir, hidratasa de nitrilo, amidasa, y/o asparaginasa) en una cantidad o a un nivel de actividad enzimática suficiente para retrasar un proceso de desarrollo de las plantas. Las fuentes de las enzimas deseadas para uso como catalizador en los aparatos de la invención también se describieron en detalle con anterioridad. Por ejemplo, el catalizador se puede usar en la forma de células completas que producen (o son inducidos o genéticamente modificados para producir) una o más de las enzimas de la invención o puede comprender la(s) enzima(s) en sí misma(s) en una forma aislada, purificada o semi-purificada.

Los aparatos para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas comprendidos por la presente invención pueden estar provistos en una variedad de formatos adecuados y pueden ser apropiados para uso único o usos múltiples (por ejemplo, "recargables"). Asimismo, los aparatos de la invención encuentran uso tanto en establecimientos residenciales como comerciales. Por ejemplo, dichos aparatos pueden ser integrados en refrigeradores residenciales o comerciales, incluidos en trenes, camiones,

etc. para el transporte a larga distancia de frutas, verduras o flores, o usados como cabinas individuales para el almacenamiento o transporte de dichos productos vegetales. Los aparatos no limitativos a modo de ejemplo de la invención se describen en la presente a continuación y se ilustran en las Figuras 1-4.

En formas de realización particulares, el catalizador se provee en un formato inmovilizado.

Cualquier proceso o matriz para inmovilizar el catalizador se puede usar siempre que la habilidad de dichas una o más bacterias (o enzimas) para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas sea retenida. Por ejemplo, el catalizador puede ser inmovilizado en una matriz que comprende alginato (por ejemplo, alginato de calcio), carragenano, DEAE-celulosa, o poliacrilamida. Otras matrices son conocidas en el arte y pueden ser entrecruzadas además con cualquier agente de entrecruzamiento, que incluye, mas no se limita a glutaraldehído o polietilenimina, para incrementar la fuerza mecánica de la matriz del catalizador. En un aspecto de la invención, el catalizador es inmovilizado en una matriz de DEAE-celulosa entrecruzada con glutaraldehído. El catalizador, particularmente el catalizador en forma inmovilizada puede presentar además como un "elemento de módulo catalizador". Un elemento de módulo catalizador comprende un catalizador, tal como un catalizador inmovilizado, en una estructura adicional que, por ejemplo, reduce el contacto potencial con el catalizador, facilita el reemplazo del catalizador, o permite que fluya aire a través del catalizador.

En una forma de realización, la matriz comprende alginato, o sus sales. El alginato es un copolímero lineal

con bloques homopoliméricos de β -D-manuronato (M) (1-4)-enlazado y sus residuos de epímero C-5 α -L-guluronato (G), respectivamente, enlazados en forma covalente en diferentes secuencias o bloques. Los monómeros pueden aparecer en bloques homopoliméricos de G-residuos consecutivos (G-bloques), M-residuos consecutivos (M-bloques), M- y G-residuos alternados (MG-bloques), o bloques organizados de manera aleatoria. En una forma de realización, el alginato de calcio se usa como el sustrato, más particularmente, el alginato de calcio que ha sido entrecruzado, tal como con polietilenimina, para formar un sustrato de alginato de calcio endurecido. La descripción adicional de dichas técnicas de inmovilización se pueden encontrar en Bucke (1987) "Cell Immobilization in Calcium Alginate" en *Methods in Enzymology*, Vol. 135(B) (Academic Press, Inc., San Diego, California; Mosbach, ed.), que se incorpora en la presente a modo de referencia. Un método ejemplificativo de inmovilización que usa alginato de calcio entrecruzado con polietilenimina también se describe a continuación en el Ejemplo 5. En otra forma de realización, la matriz comprende un polímero que contiene amida. Cualquier polímero que comprende uno o más grupos amida podría ser usado de acuerdo con la invención. En una forma de realización, el sustrato comprende un polímero de poliacrilamida.

La fuerza mecánica incrementada de una matriz catalizadora inmovilizada puede ser alcanzada a través de entrecruzamiento. Por ejemplo, las células pueden ser entrecruzadas de manera química para formar aglutinaciones de células. En una forma de realización, las células cosechadas son entrecruzadas usando glutaraldehído. Por ejemplo, las células se pueden suspender en una mezcla de

agua desionizada y glutaraldehído seguido de la adición de polietilenimina hasta que se alcance la máxima floculación. Las células entrecruzadas (por lo general en la forma de partículas formadas de un número de células) pueden ser cosechadas por filtración simple. La descripción adicional de dichas técnicas se provee en López-Gallego et al. (2005) *J. Biotechnol.* 119;70-75, que se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad. Un protocolo general para la inmovilización de células, particularmente células *Rhodococcus spp.* en DEAE-celulosa entrecruzada con glutaraldehído también se destaca a continuación en el Ejemplo 4.

En ciertos aspectos de la invención, el catalizador inmovilizado o uno o más elementos de módulos catalizadores se colocan en, colocan sobre, o se unen a una "estructura física". La estructura física incluye, mas no se limita a, una película, una lámina, una capa de revestimiento, una caja, saco, bolsa, o cámara ranurada capaz de alojar uno o más elementos de módulos catalizadores. En ciertas formas de realización, la estructura física comprende un contenedor adecuado para el transporte o almacenamiento de frutas, verduras o flores. La estructura física puede comprender, además, más de una estructura individual, por lo cual todas las estructuras individuales se conectan a un catalizador central o elemento de módulo catalizador. Una estructura física descrita en la presente con anterioridad puede ser refrigerada, de manera opcional, por medios externos, o comprender una unidad de refrigeración dentro de la estructura física en sí misma.

Los elementos para monitorear la eficacia del catalizador para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas de interés (por ejemplo, evaluar cuándo el

catalizador o módulo catalizador debería ser reemplazado) o para medir o controlar el flujo de aire, contenido de humedad y niveles de dióxido de carbono, pueden ser incluidos en forma opcional en un aparato de la invención. Cualquier aparato para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas puede comprender, además, uno o más elementos para permitir el flujo de aire hacia o a través del catalizador o elemento de módulo catalizador. La persona versada en el arte advertirá con facilidad otras posibles modificaciones a los aparatos descritos en la presente para monitorear y controlar las condiciones atmosféricas (por ejemplo, flujo de aire, humedad y niveles de dióxido de carbono) del catalizador, el elemento de módulo catalizador, o la estructura física. Las condiciones tales como temperatura, composición atmosférica (por ejemplo, humedad relativa, niveles de O_2 y CO_2 , tensión física, luz, tensión química, radiación, tensión de agua, reguladores de crecimiento, y ataque de patógenos juegan un rol importante en las velocidades de respiración e impactan de manera significativa la vida útil de frutas, verduras y flores, y otros productos vegetales relacionados. Si bien la temperatura y las condiciones atmosféricas para almacenamiento varían dependiendo de la fruta, verdura u otro producto vegetal de interés, las temperaturas de almacenamiento recomendadas por lo general se encuentran en el rango de alrededor de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a alrededor de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con niveles de O_2 y CO_2 en los rangos aproximados de 1-10% y 0-20%, respectivamente. Una humedad relativa de alrededor del 50% a alrededor del 100%, particularmente 85% a alrededor del 95%, más particularmente alrededor del 90% a alrededor del 95% es recomendada en general para el almacenamiento de frutas, verduras y productos vegetales relacionados. Dada

la correlación significativa entre la velocidad de respiración y vida útil de los productos vegetales, el control de los factores anteriores es importante para retrasar el deterioro de dichos productos. Por consiguiente, un barredor de dióxido de carbono puede ser provisto en el aparato para reducir el contenido de dióxido de carbono.

En formas de realización particulares de la invención, se proveen aparatos catalizadores permeables al aire para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas que comprenden múltiples capas.

Por ejemplo, como se ilustra en la Figura 1, un aparato catalizador 10 puede incluir capas exteriores 12 y 14 y una capa catalizadora intermedia 16 ubicada entre las capas exteriores 12 y 14. La capa catalizadora 16 comprende una o más bacterias (por ejemplo, *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, y mezclas de las mismas) o enzimas (una hidratasa de nitrilo, amidasa, asparaginasa, y mezclas de las mismas), en donde dichas una o más bacterias o enzimas se proveen en una cantidad suficiente para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas de interés, y una tercera capa. En esta forma de realización, una o más de las capas exteriores 12 y 14 proveen integridad estructural al aparato catalizador 10. Las capas exteriores 12 y 14 por lo general permiten el flujo de aire a la capa catalizadora 16 si bien -en algunas formas de realización- puede ser ventajoso tener una capa exterior que no sea permeable al aire, por ejemplo, si el aparato forma el costado de la caja y existe el deseo de no permitir que la capa más exterior de la caja exponga la capa catalizadora al ambiente. El aparato catalizador 10 puede proveerse en bolsas o sacos reutilizables o no

reutilizables de acuerdo con la invención. En una forma de realización, la capa catalizadora 16 comprende células *Rhodococcus spp.*, particularmente la cepa de *Rhodococcus rhodochromus* DAP 96253, cepa de *Rhodococcus sp.* DAP 96622, *Rhodococcus erythropolis*, o mezclas de las mismas. Las células bacterianas utilizadas como catalizador en un aparato de la invención pueden ser inducidas con uno o más agentes inductores (por ejemplo, asparagina, glutamina, cobalto, urea, o una mezcla de las mismas), como se describió en detalle con anterioridad.

Las Figuras 2A-2C ilustran aparatos alternativos de acuerdo con la invención para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas. Estos aparatos comprenden múltiples capas, en donde una o más de las capas son extraíbles. Como se ilustra en la Figura 2A, el aparato puede incluir una capa estructural permeable al aire 22 y una capa catalizadora 24. Las capas extraíbles 26 y/o 28 pueden estar provistas a lo largo de la capa estructural 22 y/o la capa catalizadora 24 y por lo general están destinadas a ser extraídas antes de usar o activar el catalizador. En ciertos aspectos de la invención, la extracción de las capas extraíbles 26 y 28 exponen un adhesivo que facilita la colocación o ajuste de la estructura catalizadora a una estructura física separada. La Figura 2B ilustra una forma de realización alternativa en donde el aparato 30 incluye dos capas estructurales permeables al aire 32 y 34, una capa catalizadora intermedia 36 y una capa extraíble 38. La Figura 2C ilustra otra forma de realización en donde el aparato 40 incluye dos capas estructurales permeables al aire 42 y 44, una capa catalizadora intermedia 46 y dos capas extraíbles 48 y 50.

Las Figuras 3A-3B ilustran una forma de realización alternativa 60 en donde el catalizador se destina al interior de un contenedor tal como una caja de cartón. Como se ilustra en la Figura 3A, un costado 62 del contenedor incluye una capa catalizadora 64 unida al mismo a través del uso de una capa adhesiva 66. Una película desprendible 68 puede ser provista adyacente a la capa catalizadora 64 para proteger la capa catalizadora de la exposición al ambiente. La película desprendible 68 puede ser extraída para activar el catalizador en la capa catalizadora 64 al exponer el catalizador a una parte de la planta provista en el contenedor para retrasar así el proceso indeseado de desarrollo de las plantas.

La Figura 3B ilustra una estructura catalizadora 70 antes de unir la estructura catalizadora al interior de un contenedor de la manera ilustrada en la Figura 3A. Además de la capa catalizadora 64, la capa adhesiva 66, y la película desprendible 68, la estructura catalizadora 70 incluye una película desprendible adicional 72. La película desprendible 72, como la película desprendible 68, protege la estructura catalizadora 70 cuando es envasada, transportada o almacenada. La película desprendible 72 puede ser extraída para exponer la capa adhesiva 66 para permitir que la estructura catalizadora 70 se una al interior del contenedor de la manera ilustrada en la Figura 3A.

La Figura 4 ilustra una estructura catalizadora 80 que incluye dos ranuras 82 y 84 para recibir un casete catalizador (por ejemplo casete 86). El casete catalizador 86 es permeable al aire y puede ser insertado con facilidad en -o ser extraído de- la ranura 84. Por ende, el casete catalizador 86 puede ser reemplazado con facilidad si se

desea un casete catalizador nuevo para uso en la estructura catalizadora 80. El casete catalizador 86 incluye un catalizador tal como el descrito en la presente y que es preferentemente inmovilizado en una matriz. La estructura catalizadora 80 puede incluir superficies permeables al aire opuestas 88 y 90 de manera tal que las pantallas de malla permitan que el aire fluya a través del casete catalizador 86. La estructura catalizadora 80 puede, en formas de realización alternativas, incluir solamente una superficie permeable al aire, dos superficies permeables al aire no opuestas o más de dos superficies permeables al aire, como lo ha de entender la persona versada en el arte. Si bien la Figura 4 incluye dos ranuras 82 y 84 para recibir un casete catalizador (por ejemplo casete 86), la persona versada en el arte entenderá que la estructura catalizadora 80 podría incluir una o más ranuras para recibir un casete. La estructura catalizadora 80 puede ser provista dentro de un contenedor usado para transportar una parte de una planta tal como fruta o flores, o puede estar unida a un contenedor, por ejemplo, mediante el uso de una capa adhesiva, como se discute en la presente.

Los presentes métodos y aparatos se pueden usar para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas de cualquier planta o parte de la planta de interés. En las formas de realización particulares, los métodos y aparatos de la invención están dirigidos a retrasar la maduración y la parte de la planta es una fruta (climatérica o no climatérica), verdura o cualquier otra parte de la planta sujeta a maduración. La persona versada en el arte reconoce que las "frutas climatéricas" exhiben un aumento repentino de la producción de etileno durante la maduración de la fruta, mientras que en general se cree que las "frutas no

climatéricas" no experimentan un incremento significativo en la biosíntesis de etileno durante el proceso de maduración. Las frutas, verduras y otros productos vegetales de interés, a modo de ejemplo, incluyen, mas no se limitan a: manzanas, damascos, biribá, fruta de pan, chirimoya, feijoa, higo, guayaba, jaca, kiwi, bananas, duraznos, aguacates, manzanas, cantalupos, mangos, melones almizcleños, mandarinas, caqui, zapote, guanábana, aceitunas, papaya, maracuyá, peras, ciruelas, tomates, morrones, arándanos, cacao, castañas de cajú, pepinos, moras, limones, limas, pimientos, cerezas, naranjas, uvas, ananás, frutillas, melones, tamarillos y nueces.

En otros aspectos de la invención, los métodos y aparatos se dirigen a retrasar la senescencia de las flores, marchitamiento, abscisión, o cierre de pétalos. Cualquier flor se puede usar en la práctica de la invención. Las flores ejemplificativas de interés incluyen, mas no se limitan a, rosas, claveles, orquídeas, verdolaga, malva y begonias. Las flores cortadas, más particularmente las flores cortadas importantes a nivel comercial como rosas y claveles, son de particular interés. En ciertas formas de realización, las flores que son sensibles a etileno se usan en la práctica de la invención. Las flores sensibles a etileno incluyen, mas no se limitan a, flores del género *Alstroemeria*, *Aneomone*, *Anthurium*, *Antirrhinum*, *Aster*, *Astilbe*, *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dahlia*, *Dendrobium*, *Dianthus*, *Eustoma*, *Freesia*, *Gerbera*, *Gypsophila*, *Iris*, *Lathyrus*, *Lilium*, *Limonium*, *Nerine*, *Rosa*, *Syringa*, *Tulipa* y *Zinnia*. Las flores sensibles a etileno representativas también incluyen aquellas de las familias *Amarylidaceae*, *Alliaceae*, *Convallariaceae*, *Hemerocallidaceae*, *Hyacinthaceae*, *Liliaceae*, *Orchidaceae*, *Aizoaceae*,

Cactaceae, Campanulaceae, Caryophyllaceae, Crassulaceae, Gentianaceae, Malvaceae, Plumbaginaceae, Portulacaceae, Solanaceae, Agavaceae, Asphodelaceae, Asparagaceae, Begoniaceae, Caprifoliaceae, Dipsacaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Onagraceae, Saxifragaceae y Verbenaceae. Véase, por ejemplo, Van Doom (2002) *Annals of Botany* 89:375-383; Van Doom (2002) *Annals of Botany* 89:689-693; y Elgar (1998) "Cut Flowers and Foliage - Cooling Requirements and Temperature Management" en el sitio hortnet.co.nz/publications/hortfacts/hf305004.htm (accedido por última vez el 20 de marzo de 2007), que se incorporan en la presente a modo de referencia en su totalidad. Los métodos y aparatos para retrasar abscisión de hojas también están comprendidos por la presente invención. Existe un interés comercial significativo en las industrias de las plantas, frutas, verduras y flores en los métodos y aparatos para regular los procesos de desarrollo de las plantas tales como maduración, senescencia y abscisión.

La persona versada en el arte reconocerá, además, que cualquiera de los métodos o aparatos revelados en la presente pueden ser combinados con otros métodos y aparatos para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas, particularmente aquellos procesos generalmente asociados con la biosíntesis incrementada de etileno (por ejemplo, maduración de frutas/verduras, senescencia de flores, y abscisión de hojas). Además, como se describió en los párrafos anteriores, la producción incrementada de etileno ha sido observada durante el ataque de las plantas o partes de las plantas por parte de organismos patogénicos. Por consiguiente, los métodos y aparatos de la invención pueden encontrar uso, además, en mejorar la respuesta de la planta a los patógenos.

Los siguientes ejemplos se proveen a modo de ilustración mas no de limitación:

EXPERIMENTACIÓN

La presente invención será descrita con referencia específica a los varios ejemplos. Los siguientes ejemplos no están destinados a limitar la invención sino que, en cambio, se proveen como formas de realización ejemplificativas.

Ejemplo 1: Maduración retrasada de frutas después de la exposición a *Rhodococcus spp.* inducida

Las células *Rhodococcus spp.* inducidas con asparagina, acrilonitrilo, o acetonitrilo fueron inmovilizadas en una matriz entrecruzada con glutaraldehído de DEAE-celulosa. Los métodos para inducir células y preparar la matriz anterior se describen en mayor detalle a continuación en la presente.

La matriz catalizadora de DEAE-celulosa entrecruzada fue colocada en tres bolsas de papel separadas (aproximadamente 1-2 gramos por peso húmedo del paquete de células por bolsa), cada bolsa conteniendo bananas, duraznos o aguacates no maduros. Como controles negativos, las mismas frutas fueron colocadas en bolsas de papel separadas, en ausencia de la matriz catalizadora. Las bolsas de papel fueron retenidas a temperatura ambiente, y los productos fueron observados diariamente para advertir signos de maduración y degradación.

Todos los productos expuestos a la matriz catalizadora exhibieron retrasos significativos en la maduración. En particular, la firmeza y la integridad de la cáscara de los duraznos se mantuvieron más tiempo en presencia de la

matriz catalizadora. De manera similar, con las bananas, se retrasó la aparición de manchas marrones, y la firmeza se mantuvo más tiempo en relación con los controles negativos.

Ejemplo 2: Protocolos generales de fermentación e inducción Proceso de fermentación

Los siguientes protocolos generales y medios de cultivo fueron utilizados para la fermentación de las cepas de *Rhodococcus spp.*, *Rhodococcus sp.* DAP 96622 y *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96523 para uso en otros experimentos:

Los recipientes de fermentación se configuraron con sondas para medir el oxígeno disuelto del (DO inglés, *Dissolved Oxygen*) y pH, así como también con dispositivos de toma de muestras para medir la concentración de glucosa (fuera de línea). Se usaron puertos adicionales para agregar correctores (por ejemplo, ácido, base o antiespuma), inductores, nutrientes y suplementos. Se esterilizaron los recipientes previamente limpiados en el lugar. Se usó un medio de base adecuado (1 o 1,5X) R2A o R3A. Los componentes específicos de estos medios de cultivo se establecen a continuación. Se realizaron ciertas sustituciones a los contenidos de los medios en ciertos experimentos. Por ejemplo, a veces se usó Proflo® (Trader's Protein, Memphis, TN) en lugar de la proteosa peptona y/o ácidos casamino. Además, en ciertos experimentos, se usó Hy-Cotton 7803® (Quest International, Hoffman Estates, IL), hidrosilato de semilla de algodón, hidrosilato de semilla de algodón ultrafiltrado (Marcor Development Corp., Carlstadt, NJ) en lugar de Proflo® (Trader's Protein, Memphis, TN).

Un perfil de alimentación para provisión de nutrientes

fue fijado para reemplazar gradualmente el medio de base R2A o R3A con un medio más rico, a saber 2X YEMEA, cuyos componentes también se describen en mayor detalle a continuación. Otros suplementos nutrientes opcionales incluyeron maltosa 50% (p/v) y dextrosa 50% (p/v).

Los productos comerciales que contienen equivalentes de dextrosa (glucosa, maltosa y polisacáridos superiores) se usaron a veces en lugar de maltosa y dextrosa.

Se prepararon los inoculantes a partir de los cultivos de las cepas *Rhodococcus* sp. DAP 96622 y *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96523 en un medio sólido adecuado y se incubaron a su temperatura apropiada (por ejemplo, 30 °C). En formas de realización particulares, las células se cultivaron en placas de agar YEMEA durante 4-14 días, preferentemente 7 días.

En forma alternativa, se prepararon los inoculantes a partir de concentrados celulares congelados de tandas de fermentación previas. Los concentrados celulares se prepararon típicamente a una concentración de 20X por sobre la presente en el fermentador. Además, el inoculante se preparó a veces a partir de un medio bifásico adecuado (es decir, una combinación de medio líquido cubriendo un medio sólido de la misma composición o una diferente). Cuando se usó un medio bifásico, el medio generalmente contenía YEMEA tanto en las capas líquidas como en las capas sólidas.

Para la inducción de hidratasa de nitrilo, a $t=0$ hora, se agregó $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ estéril y urea para alcanzar concentraciones de 5-200 ppm de CoCl_2 y 750 mg/l-10 g/l de urea, generalmente preferido 10-50 ppm CoCl_2 y 7500 mg/l - 7,5 g/l de urea. En una forma de realización particular, se agregó urea y/o cobalto nuevamente durante la fermentación.

Por ejemplo, se agregó un volumen equivalente de urea

y 150 ppm CoCl_2 a 4 - 6 horas o a 24 - 30 horas. Además de urea, se agregó una concentración final de 300 - 500 ppm de acrilonitrilo/acetonitrilo o 0,1 M - 0,2 M asparagina, por pasos o a una velocidad constante, comenzando en varios momentos. Las tandas de fermentación terminaron cuando la masa celular y las concentraciones enzimáticas fueron aceptables, en general a 24-96 horas.

Las células se cosecharon luego mediante cualquier método aceptable que incluye, mas no se limita a centrifugación, decantación o filtración por lotes o continuas. Las células cosechadas fueron resuspendidas a un volumen concentrado de 20X en un tampón adecuado tal como 50 mM de solución salina tamponada en fosfato. (PBS del inglés, *Phosphate Buffered Saline*) complementado con el inductor usado durante el proceso de fermentación. Los concentrados celulares luego se congelaron, particularmente por congelamiento rápido. Las células congeladas fueron almacenadas a -20°C -80°C o bajo nitrógeno líquido, para uso posterior.

Descripción de medio de cultivo

Medio R2A (Ver Reasoner y Geldreich(1985) *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1-7.)

Extracto de levadura	0,5g
Proteasa peptona #3	0,5g
Ácidos casamino	0,5g
Glucosa	0,5g
Almidón soluble	0,5g
K_2HPO_4	0,3g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
Piruvato de sodio	0,3g
H_2O dest o DI	1,0 litro

Medio R3A (Ver Reasoner y Geldreich, *supra*)

Extracto de levadura	1,0g
Proteasa peptona #3	1,0g
Ácidos casamino	1,0g
Glucosa	1,0g
Almidón soluble	1,0g
K ₂ HPO ₄	0,6g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
Piruvato de sodio	0,5g
H ₂ O dest o DI	1,0 litro

Medio YEMEA

	<u>1X</u>	<u>2X</u>
Extracto de levadura	4,0g	8,0g
Extracto de malta	10,0g	20,0g
Glucosa	4,0g	8,0g
H ₂ O dest o DI	1,0 litro	1,0 litro

Inducción

El siguiente protocolo general fue utilizado para la inducción de las cepas de *Rhodococcus spp.*, *Rhodococcus sp.* DAP 96622 y *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96523:

Se agregaron inductores líquidos volátiles (por ejemplo, acrilonitrilo/acetónitrilo) en forma volumétrica como inductores líquidos esterilizados en filtros basados en la densidad del inductor líquido particular. En el caso de los inductores sólidos (por ejemplo, asparagina/glutamina), los sólidos se pesaron y se agregaron directamente al medio de cultivo. Los medios resultantes se autoclavarón. Cuando se utilizaron

inductores esterilizados en filtros, el medio de cultivo solo fue autoclavado y enfriado a 40 °C antes de agregar el inductor líquido. Las concentraciones típicas para los inductores de interés fueron: 500 ppm de acrilonitrilo/acetonitrilo; 500 ppm de asparagina/glutamina; y 50 ppm de succinonitrilo. Las células luego se cultivaron en medios específicos y se analizaron además en cuanto a sus actividades enzimáticas y biomasa particulares.

Ejemplo 3: Análisis de biomasa y actividad de hidratasa de nitrilo, amidasa y asparaginasa en células *Rhodococcus spp.* inducidas por asparagina

La biomasa y actividad de hidratasa de nitrilo, amidasa y asparaginasa fueron evaluadas en las células inducidas por asparagina de las cepas de *Rhodococcus spp.*, *Rhodococcus sp.* DAP 96622 y *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96523. Varias modificaciones a los componentes de los medios de cultivo, los métodos de administración, velocidades y concentraciones de asparagina provistos a las células, y la fuente de las células fueron analizados con respecto a sus efectos sobre las actividades de las enzimas anteriores y sobre la biomasa.

Las Secciones A a G de este Ejemplo describen las especificaciones de cada conjunto de condiciones de evaluación y brindan un resumen de las actividades enzimáticas y biomasa obtenidas bajo cada una de las condiciones específicas.

A. Como se describió esencialmente con anterioridad en el Ejemplo 2, un fermentador de 20 litros inoculado usando

células de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 cosechadas a partir de medio sólido fue continuamente provisto con la asparagina inductora (120 μ l/minuto de una solución de 0,2 M). Se usó Hy-Cotton 7803® en lugar de la proteosa peptona #3 en el medio R3A descrito con anterioridad. Al final de la tanda de fermentación, la actividad de la hidratasa de nitrilo, actividad de amidasa y biomasa específicas de acrilonitrilo fueron medidas de acuerdo con las técnicas estándares conocidas en el arte.

Los resultados para la actividad de la hidratasa de nitrilo, actividad de amidasa y biomasa se proveen a continuación en la Tabla 3, con las actividades provistas en unidades/mg cdw (peso seco celular, del inglés *cell dry weight*). Una unidad de actividad de hidratasa de nitrilo se relaciona con la habilidad para convertir 1 μ mol de acrilonitrilo en su correspondiente amida por minuto, por miligramo de células (peso seco) a pH de 7,0 y una temperatura de 30 °C. Una unidad de actividad de amidasa se relaciona con la habilidad para convertir 1 μ mol de acrilamida en su correspondiente ácido por minuto, por miligramo de células (peso seco), a pH de 7,0 y una temperatura de 30 °C. Las biomasa se informa como las células agrupadas en g/l cww (peso húmedo celular, del inglés *cell wet weight*).

Tabla 3: Actividades enzimáticas y biomasa de células *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96523 después de la inducción con asparagina

Actividad de hidratasa de nitrilo (unidades/mg/cdw)	Actividad de amidasa (unidades/mg/cdw)	Biomasa (g/l cww)

168	2	36
-----	---	----

B. Como se describió esencialmente con anterioridad en el Ejemplo 3A, con los cambios al medio como se nota a continuación, las actividades enzimáticas y biomasa fueron evaluadas con células *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96523. En particular, se agregó YEMEA, dextrosa o maltosa a un medio R3A modificado, que contenía además Hy-Cotton 7803® sustituido por la proteosa peptona #3. Se agregó una solución de asparagina de 0,2 M a una velocidad continua de 120 µl/minuto comenzando a t=8 horas. Al final de la tanda de fermentación, se midió la actividad de hidratasa de nitrilo, actividad de amidasa y biomasa específicas de acrilonitrilo. Los resultados se resumen en la Tabla 4. Se observó un rendimiento incrementado de la biomasa con la adición de YEMEA, dextrosa o maltosa al medio.

Tabla 4: Actividades enzimáticas y biomasa de células *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96523 después de la inducción continua con asparagina

Actividad de hidratasa de nitrilo (unidades/mg/cdw)	Actividad de amidasa (unidades/mg/cdw)	Biomasa (g/l cww)
155	6	52

C. Se usaron células *Rhodococcus* sp. DAP 96622 a partir de medio sólido como fuente del inoculante para una tanda de fermentación de 20 litros (ver Ejemplo 2 para los detalles del proceso de fermentación). Se agregó una solución de asparagina de 0,2 M en forma semi-continua cada 6 horas, comenzando a t=24 horas, durante 50-70 minutos a

una velocidad de 2 ml/minuto. Se usó Hy-Colton 7803® en lugar de la proteosa peptona #3 en un medio R3A modificado. Al final de la tanda de fermentación, se midió la actividad de hidratasa de nitrilo, actividad de amidasa y biomasa específicas de acrilonitrilo. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Actividades enzimáticas y biomasa de células Rhodococcus DAP 96622 después de la inducción semicontinua con asparagina

Actividad de hidratasa de nitrilo (unidades/mg/cdw)	Actividad de amidasa (unidades/mg/cdw)	Biomasa (g/l cww)
172	2	44

D. Se usaron células *Rhodococcus sp.* DAP 96622 a partir de un medio sólido como fuente del inoculante para una tanda en un fermentador de 20 litros. Se agregó una solución de asparagina de 0,2 M en forma semicontinua cada 6 horas, comenzando a t=12 horas, durante 12-85 minutos a una velocidad de 2,5 ml/minuto. Se usó hidrosilato de semilla de algodón en lugar de la proteosa peptona #3 en un medio R3A modificado. Al final de la tanda de fermentación, se midió la actividad de hidratasa de nitrilo, actividad de amidasa y biomasa específicas de acrilonitrilo, y los resultados fueron resumidos en la Tabla 6.

Tabla 6: Actividades enzimáticas y biomasa de células Rhodococcus DAP 96622 después de la inducción semicontinua con asparagina

Actividad de	Actividad de	Biomasa
--------------	--------------	---------

hidratasa de nitrilo (unidades/mg/cdw)	amidasa (unidades/mg/cdw)	(g/l cww)
165	2	57

E. Se usaron células *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 previamente congeladas como fuente del inoculante para una tanda de fermentación de 20 litros. Se agregó YEMEA, dextrosa o maltosa a un medio R3A modificado que contenía además Hy-Cotton 7803® como sustituto para proteosa peptona #3. Una solución de 0,15 M de asparagina se agregó a una velocidad continua de 120 µl/minuto comenzando a t=8 horas. Al final de la tanda de fermentación, la actividad de hidratasa de nitrilo, actividad de amidasa y biomasa específicas de acrilonitrilo. Los resultados se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7: Actividades enzimáticas y biomasa de células *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96523 después de la inducción continua con asparagina

Actividad de hidratasa de nitrilo (unidades/mg/cdw)	Actividad de amidasa (unidades/mg/cdw)	Biomasa (g/l cww)
171	4	74

F. Las células *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 cultivadas en medio bifásico se usaron como fuente de inoculante para una tanda de fermentación de 20 litros. Se usó un medio R3A modificado que fue complementado por adición de un carbohidrato (es decir, YEMEA, dextrosa o maltosa) y que contenía, además, hidrosilato de semilla de

algodón en lugar de proteosa peptona #3. Se agregó una solución de 0,15 M de asparagina a una velocidad continua de 1000 µl/minuto comenzando a t=10 horas. Al final de la tanda de fermentación, se midió la actividad de hidratasa de nitrilo, actividad de amidasa, actividad de asparaginasa I y biomasa específicas de acrilonitrilo. Los resultados se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8: Actividades enzimáticas y biomasa de células Rhodococcus rhodochrous DAP 96523 después de la inducción continua con asparagina

Actividad de hidratasa de nitrilo (unidades/mg/c dw)	Actividad de amidasa (unidades/mg/c dw)	Actividad de asparaginasa I (unidades/mg/cdw)	Biomasa (g/l cww)
159	22	16	16

G. Se usaron células *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 cultivadas en medio bifásico como fuente de inoculante para una tanda de fermentación de 20 litros. Se usó medio R3A modificado que contenía maltosa (en lugar de dextrosa) y Hy-Cotton 7803® como sustituto para proteosa peptona #3. Se agregó una solución de 0,15 M de asparagina a una velocidad continua de 476 µl/minuto comenzando a t=8 horas. Al final de la tanda de fermentación, se midió la actividad de hidratasa de nitrilo, actividad de amidasa y biomasa específicas de acrilonitrilo. Los resultados se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9: Actividades enzimáticas y biomasa de células Rhodococcus rhodochrous DAP 96523 después de la inducción

continua con asparagina

Actividad de hidratasa de nitrilo (unidades/mg/cdw)	Actividad de amidasa (unidades/mg/cdw)	Biomasa (g/l cww)
137	6	35

Ejemplo 4: Inmovilización de células *Rhodococcus* spp. en
DEAE-celulosa entrecruzada con glutaraldehído

Un proceso modificado derivado de los métodos descritos en la patente estadounidense Nro. 4.229.536 y en López-Gallego et al. (2005) *J. Biotechnol.* 119:70-75 se usa para inmovilizar las células *Rhodococcus* spp. en una matriz que comprende DEAE-celulosa entrecruzada con glutaraldehído.

Preparación de células

Se cultivaron células *Rhodococcus* en un medio de cultivo apropiado (por ejemplo, YEMEA-maltosa + inductores, cultivos bifásicos, etc.) y se cosecharon por centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos. El sedimento celular resultante se resuspende en 100 ml de tampón de fosfato 50 mM (pH 7,2) y centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos. Este proceso de resuspender el sedimento celular y centrifugar a 8000 rpm durante 10 minutos se repite dos veces. El peso húmedo (ww, del inglés *wet weight*) de la muestra celular final es anotado. La actividad de hidratasa de nitrilo de una muestra pequeña de las células se realiza para evaluar la actividad enzimática de las células completas.

Inmovilización de células.

Se obtiene una cantidad de DEAE-celulosa equivalente a la de las células *Rhodococcus spp.* cosechadas, y las células y la DEAE-celulosa se resuspenden en 100 ml de H₂O desionizada. Un volumen de una solución de 25% de glutaraldehído suficiente para alcanzar una concentración final de 0,5% se agrega agitando la mezcla de células/DEAE-celulosa. La mezcla se agita durante 1 hora, después de lo cual 400 ml de H₂O desionizada se agrega con agitación adicional. Mientras se agita, se agrega 50% (por peso de solución) de polietilenimina (PEI; MW 750000). Continúa la agitación hasta que se completa la floculación. La mezcla floculada se filtra y extruda a través de una jeringa de tamaño apropiado. Las células inmovilizadas se quiebran en pequeñas partes, se secan toda la noche y se cortan en gránulos de aproximadamente 2-3 mm antes del uso.

Ejemplo 5: Inmovilización de células *Rhodococcus spp.* en alginato de calcio y endurecimiento de microesferas de alginato de calcio

Un proceso adaptado del método descrito en Bucke (1987) "Cell Immobilization in Calcium Alginate" en *Methods in Enzymology*, Vol. 135(B) (Academic Press, Inc., San Diego, California; Mosbach, ed.) se usa para inmovilizar las células *Rhodococcus spp.* en alginato de calcio.

Preparación de células

Las células *Rhodococcus spp.* se preparan como se describió con anterioridad en el Ejemplo 4.

Inmovilización de células

Se producen 25 g de una solución de alginato de sodio al 4% disolviendo 1 g de alginato de sodio en 24 ml de 50 mM Tris-HCl (pH 7,2). Se agrega 25 mg de metaperyodato de sodio a la solución de alginato y se agita a 25 °C durante 1 hora o hasta que se disuelve completamente el alginato. Las células preparadas como se describió con anterioridad se resuspenden a un volumen final de 50 ml en 50 mM Tris-HCl (pH 7,2) y luego se agregan a la solución de alginato de sodio con agitación. Las microesferas resultantes se extrudaron a través de una jeringa de calibre 27 en 500 ml de una solución de CaCl_2 a 0,1 M. La aguja se coloca en general aproximadamente dos pulgadas por sobre la solución para evitar la entrada de aire en las microesferas y evitar la adhesión de las microesferas. Las microesferas se curan durante 1 hora en la solución de CaCl_2 , y las microesferas luego se enjuagan con agua y se almacenan a 4 °C en una solución de CaCl_2 a 0,1 M antes del uso.

Endurecimiento de las microesferas de alginato de calcio que comprenden células Rhodococcus spp.

Las microesferas de alginato de calcio preparadas como se destacó con anterioridad pueden ser reforzadas adicionalmente por entrecruzamiento con PEI. Las microesferas son incubadas en 2 L de 0,5% PEI en una solución de CaCl_2 a 0,1 M (20 g de 50% de PEI en una solución de CaCl_2 a 0,1 M). El pH de la solución final se une a 7,0 con HCl o NaOH, de ser necesario, y las microesferas se incuban durante 24 horas. Las microesferas luego se enjuagan con agua y se almacenan a 4 °C en una solución de CaCl_2 a 0,1 M antes del uso.

Muchas modificaciones y otras formas de realización de la invención establecidas en la presente serán advertidas

por la persona versada en el arte al cual estas invenciones pertenecen y que tienen el beneficio de las enseñanzas presentadas en las presentes descripciones. Por ende, ha de entenderse que las invenciones no limitan las formas de realización específicas reveladas y que las modificaciones y otras formas de realización están destinadas a estar incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Si bien en la presente se emplean términos específicos, se usan en sentido genérico y descriptivo solamente, y no a los fines de limitación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para retrasar un proceso de desarrollo de las plantas que comprende exponer una planta o parte de la planta a una o más bacterias, en donde dichas una o más bacterias se seleccionan del grupo que consiste de *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, y mezclas de las mismas, y en donde dichas una o más bacterias son expuestas a la planta o parte de la planta en una cantidad suficiente para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas una o más bacterias incluyen *Rhodococcus spp.*

3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la *Rhodococcus spp.* incluye la cepa de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253, la cepa de *Rhodococcus sp.* DAP 96622, *Rhodococcus erythropolis*, o mezclas de las mismas.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas una o más bacterias son inducidas por exposición a un agente inductor seleccionado del grupo que consiste de asparagina, glutamina, cobalto, urea, y mezclas de las mismas.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dichas una o más bacterias son inducidas por exposición a asparagina.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dichas una o más bacterias son inducidas por exposición a asparagina, cobalto y urea.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la planta o parte de la planta es indirectamente expuesta a dichas una o más bacterias.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la planta o parte de la planta es directamente expuesta a dichas una o más bacterias.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el proceso de desarrollo de las plantas es maduración de frutas o verduras.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la parte de la planta es una fruta.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la fruta es una fruta climatérica.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la fruta climatérica se selecciona del grupo que consiste de bananas, duraznos y aguacates.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la fruta es una fruta no climatérica.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la parte de la planta es una verdura.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la parte de la planta es una flor y el proceso de desarrollo de las plantas es la senescencia de la flor.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la flor es un clavel, rosa, orquídea, verdolaga, malva o begonia.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el proceso de desarrollo de las plantas es abscisión de hojas.

18. Un aparato para retrasar un proceso de desarrollo de las plantas que comprende un catalizador que comprende una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste de *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, y mezclas de las mismas, en donde dichas una o más bacterias se proveen en una cantidad suficiente para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas.

19. El aparato de la reivindicación 18, en donde dichas una o más bacterias incluyen *Rhodococcus spp.*

20. El aparato de la reivindicación 19, en donde la *Rhodococcus spp.* incluye cepa de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253, cepa de *Rhodococcus sp.* DAP 96622, *Rhodococcus erythropolis*, o mezclas de las mismas.

21. El aparato de la reivindicación 18, en donde dichas una o más bacterias son inducidas por exposición a un agente inductor seleccionado del grupo que consiste de asparagina, glutamina, cobalto, urea, y mezclas de las mismas.

22. El aparato de la reivindicación 18, en donde el

proceso de desarrollo de las plantas se selecciona del grupo que consiste de maduración de frutas o verduras, senescencia de flores, y abscisión de hojas.

23. El aparato de la reivindicación 18, en donde dichas una o más bacterias son inmovilizadas en una matriz que comprende DEAE-celulosa entrecruzada, una matriz que comprende alginato, una matriz que comprende carragenano, una matriz que comprende alginato entrecruzado, una matriz que comprende carragenano entrecruzado, una matriz que comprende poliacrilamida, o microesferas de alginato de calcio.

24. El aparato de la reivindicación 23, en donde la matriz comprende DEAE-celulosa entrecruzada, en donde la DEAE-celulosa es entrecruzada con glutaraldehído.

25. El aparato de la reivindicación 18, en donde el catalizador está presente en un módulo catalizador que se coloca en, coloca sobre, o une a una estructura física.

26. El aparato de la reivindicación 18, que comprende, además, un dispositivo de control para ajustar la exposición del catalizador a una planta o parte de la planta.

27. El aparato de la reivindicación 18, que comprende, además, un dispositivo de monitoreo para monitorear la eficacia del catalizador para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas.

28. El aparato de la reivindicación 25, en donde la

estructura física se selecciona del grupo que consiste de una película, lámina, capa de revestimiento, una cámara ranurada, una caja, un saco y una bolsa.

29. El aparato de la reivindicación 25, en donde el módulo catalizador puede ser extraído y reemplazado con un segundo módulo catalizador.

30. El aparato de la reivindicación 25, en donde más de un módulo catalizador se coloca en, coloca sobre, o se une a la estructura física.

31. El aparato de la reivindicación 25, en donde la estructura física permite que el aire fluya en el módulo catalizador.

32. El aparato de la reivindicación 31, que comprende, además, un elemento para controlar el flujo del aire en el módulo catalizador.

33. El aparato de la reivindicación 25, en donde la estructura física se provee como una estructura refrigerada.

34. El aparato de la reivindicación 25, que comprende, además, un elemento para controlar el nivel de humedad en la estructura física.

35. El aparato de la reivindicación 25, que comprende, además, un elemento para regular el nivel de dióxido de carbono en la estructura física.

36. Un aparato catalizador permeable al aire para retrasar un proceso de desarrollo de las plantas que comprende:

una primera capa;

una segunda capa que incluye un catalizador que comprende una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste de *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, y mezclas de las mismas, en donde dichas una o más bacterias se proveen en una cantidad suficiente para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas; y

una tercera capa;

en donde la segunda capa se ubica entre la primera y la tercera capas y al menos una de dichas primera y tercera capas proveen integridad estructural al aparato.

37. El aparato de la reivindicación 36, en donde dichas una o más bacterias incluyen *Rhodococcus spp.*

38. El aparato de la reivindicación 37, en donde la *Rhodococcus spp.* incluye la cepa de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253, cepa de *Rhodococcus sp.* DAP 96622, *Rhodococcus erythropolis*, o mezclas de las mismas.

39. El aparato de la reivindicación 36, en donde dichas una o más bacterias son inducidas por exposición a un agente inductor seleccionado del grupo que consiste de asparagina, glutamina, cobalto, urea, y mezclas de las mismas.

40. El aparato de la reivindicación 36, en donde el proceso de desarrollo de las plantas se selecciona del

grupo que consiste de maduración de frutas o verduras, senescencia de flores y abscisión de hojas.

41. El aparato catalizador de acuerdo con la reivindicación 36, en donde dicha tercera capa se puede extraer de dicha segunda capa para exponer una capa adhesiva que se puede usar para unir el aparato catalizador a una estructura separada.

42. El aparato catalizador de acuerdo con la reivindicación 41, en donde dicha segunda capa es dicha capa adhesiva.

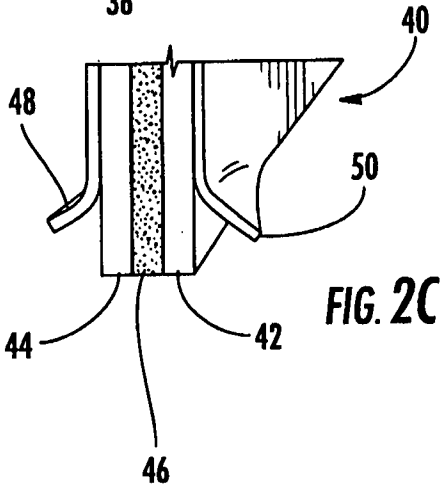
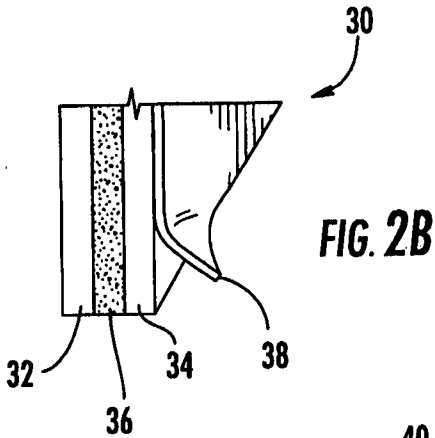
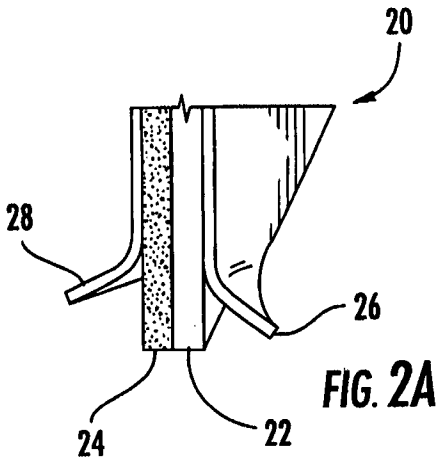
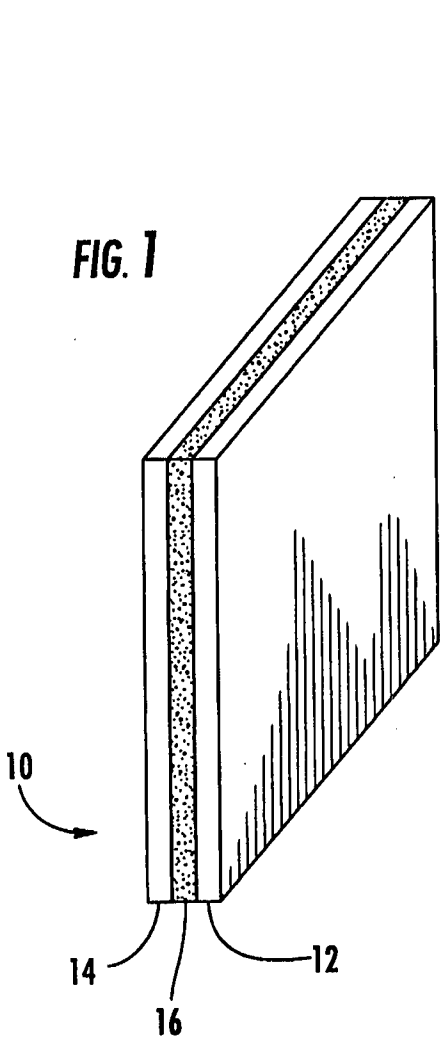
43. El aparato catalizador de acuerdo con la reivindicación 36, que comprende, además, una cuarta capa adyacente a dicha tercera capa que se puede extraer de dicha tercera capa para exponer una capa adhesiva que se puede usar para unir la estructura catalizadora a una estructura separada.

44. El aparato catalizador de acuerdo con la reivindicación 43, en donde dicha tercera capa es dicha capa adhesiva.

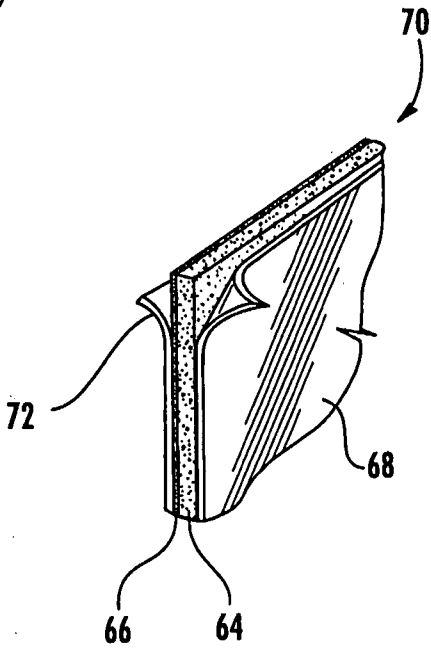
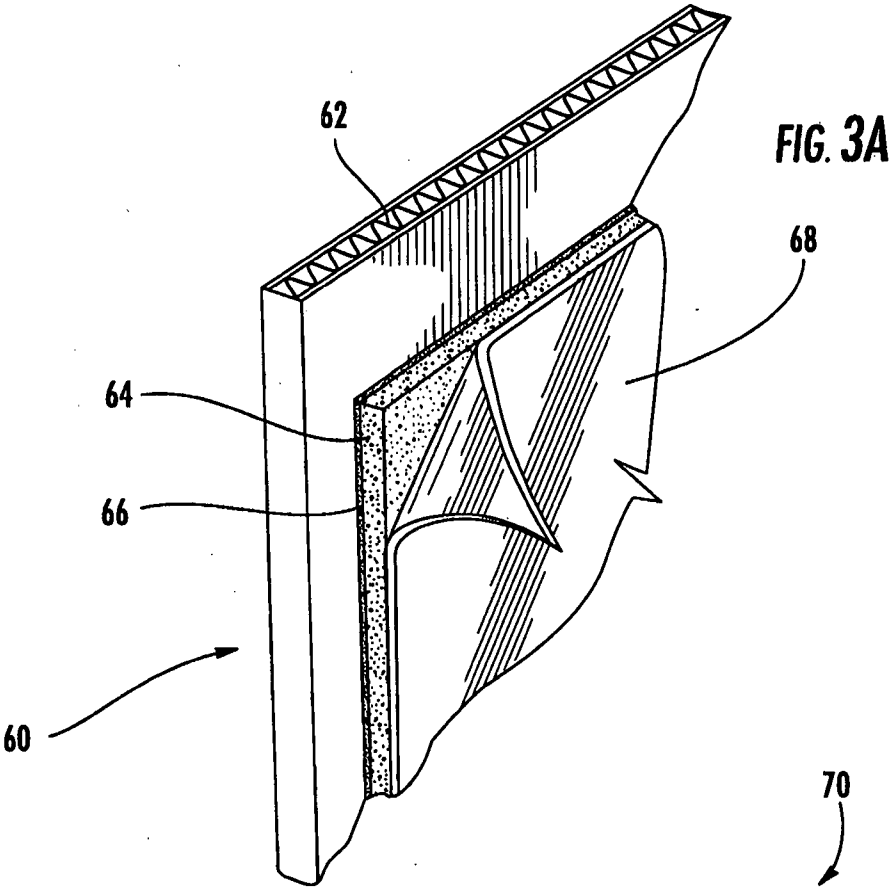
45. Una bolsa o saco permeable al aire que incluye el aparato catalizador de acuerdo con la reivindicación 36.

46. Un método para retrasar un proceso de desarrollo de las plantas que comprende exponer una planta o parte de la planta a un extracto enzimático de una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste de *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, y

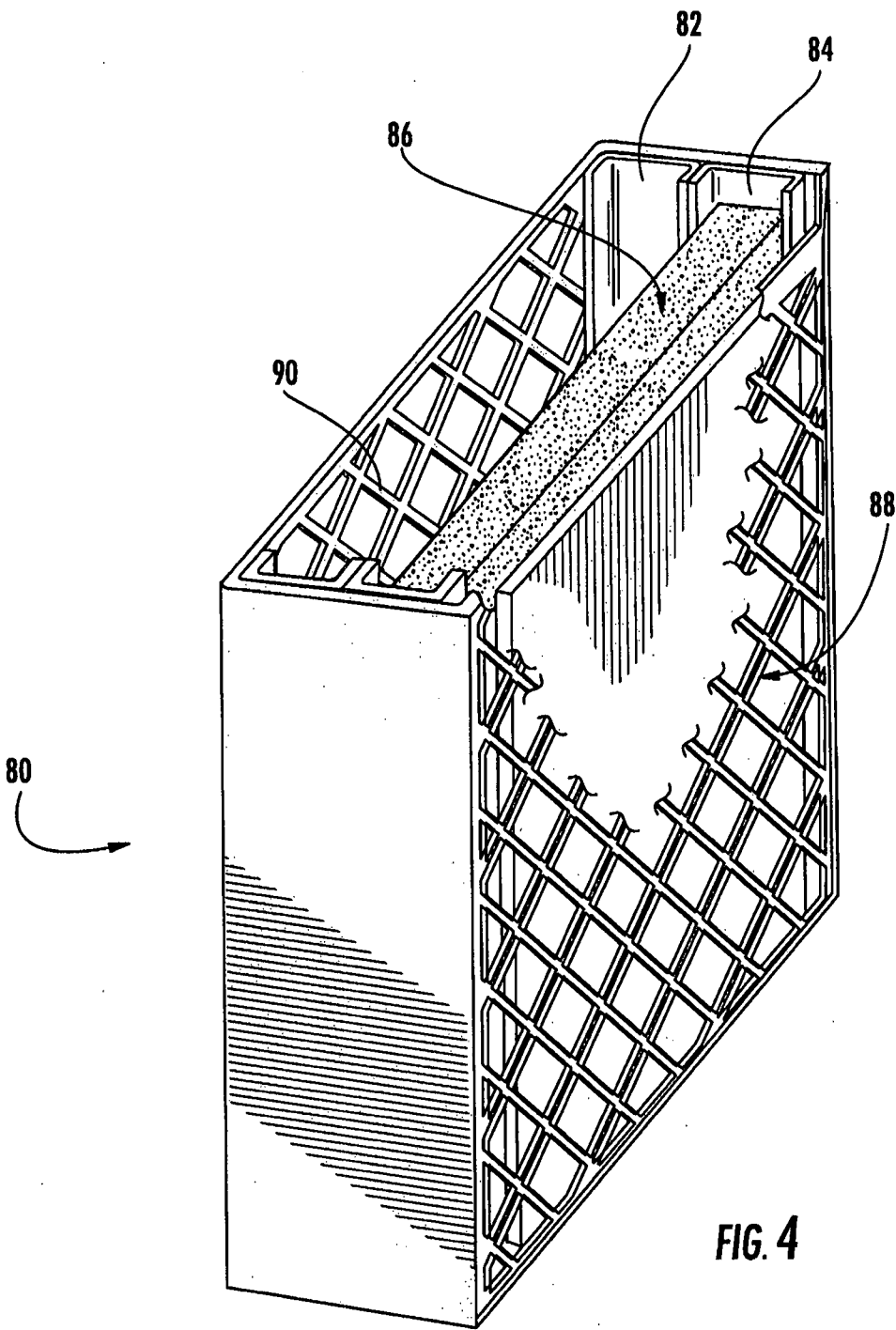
mezclas de las mismas, dichas bacterias siendo inducidas por un agente inductor seleccionado del grupo que consiste de asparagina, glutamina, cobalto, urea, y mezclas de las mismas y dicho extracto enzimático estando expuesto a la planta o parte de la planta en una cantidad suficiente para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas.



2/3



3/3



PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.51.026.201 MT/FOP 20080101/0.20.5.10
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	23339-004WO1
I	Title of Invention	BIOLOGICAL-BASED CATALYST TO DELAY PLANT DEVELOPMENT PROCESSES
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC.
II-5	Address	P.O. Box 3999 Atlanta, Georgia 30302-3999 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	(404) 892-5005
II-9	Facsimile No.	(877) 769-7945
II-10	e-mail	apsi@fr.com

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	PIERCE, George E.
III-1-5	Address	112 Rosebury Drive Canton, Georgia 30115 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US
III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	GANGULY, Sangeeta
III-2-5	Address	1500 East Lake Cook Road Buffalo Grove, Illinois 60089 United States of America
III-2-6	State of nationality	IN
III-2-7	State of residence	US
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	DRAGO, Gene K.
III-3-5	Address	785 Kirkwood Avenue Atlanta, Georgia 30316 United States of America
III-3-6	State of nationality	US
III-3-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	MEUNIER, Andrew T.
IV-1-2	Address	FISH & RICHARDSON P.C. P.O. Box 1022 60 South Sixth Street, 3300 Dain Rauscher Plaza Minneapolis, Minnesota 55440-1022 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	(404) 892-5005
IV-1-4	Facsimile No.	(877) 769-7945
IV-1-5	e-mail	Meunier@fr.com
IV-1-6	Agent's registration No.	40726
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	MCKEON, Tina Williams (43791); ASAM, Michael R. (51417); SALMON, Tiffany B. (55589)
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	02 April 2007 (02.04.2007)
VI-1-2	Number	11/695,377
VI-1-3	Country	US
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VI-3	Incorporation by reference : where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.		
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	1	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	1	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	in relation to this international application GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i v)		an assignment from PIERCE, George E. to GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC., dated 03 May 2007 (03.05.2007)
VIII-2-1(i v)		an assignment from GANGULY, Sangeeta to GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC., dated 23 April 2007 (23.04.2007)
VIII-2-1(i v)		an assignment from DRAGO, Gene K. to GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC., dated 03 May 2007 (03.05.2007)

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	in relation to this international application GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC. is entitled to claim priority of earlier application No. 11/695,377 by virtue of the following:
VIII-3-1(i v)		an assignment from PIERCE, George E. to GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC., dated 03 May 2007 (03.05.2007)
VIII-3-1(i v)		an assignment from GANGULY, Sangeeta to GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC., dated 23 April 2007 (23.04.2007)
VIII-3-1(i v)		an assignment from DRAGO, Gene K. to GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC., dated 03 May 2007 (03.05.2007)

PCT REQUESTOriginal (for **SUBMISSION**)

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	8	✓
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	32	-
IX-3	Claims	6	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	3	-
IX-7a	Sub-total number of sheets	50	
IX-6a	Sequence listing part of description	11	-
IX-7	TOTAL	61	
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-16(A)	Sequence listing in electronic form		
IX-16(A) - (i)	copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)	-	1 .txt - EFS
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-18	other	PCT Transmittal Letter	
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	4	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative	/Andrew T. Meunier, Reg. No. 40,726/	
X-1-1	Name (LAST, First)	MEUNIER, Andrew T.	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
16 October 2008 (16.10.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/124307 A2

(51) International Patent Classification:

A01N 63/00 (2006.01) A01N 47/28 (2006.01)
A01P 21/00 (2006.01) A01N 37/44 (2006.01)
A01N 59/16 (2006.01) A01N 25/34 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2008/058286

(22) International Filing Date: 26 March 2008 (26.03.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

11/695,377 2 April 2007 (02.04.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC. [US/US]; P.O. Box 3999, Atlanta, Georgia 30302-3999 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): PIERCE, George E. [US/US]; 112 Rosebury Drive, Canton, Georgia 30115

(US). GANGULY, Sangeeta [IN/US]; 1500 East Lake Cook Road, Buffalo Grove, Illinois 60089 (US). DRAGO, Gene K. [US/US]; 4138 NW 46th Dr, Gainesville, FL 32606 (US).

(74) Agents: MEUNIER, Andrew T. et al.; Fish & Richardson P.C., P.O. Box 1022, 60 South Sixth Street, Minneapolis, Minnesota 55440-1022 (US).

(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, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, 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,

[Continued on next page]

(54) Title: BIOLOGICAL-BASED CATALYST TO DELAY PLANT DEVELOPMENT PROCESSES

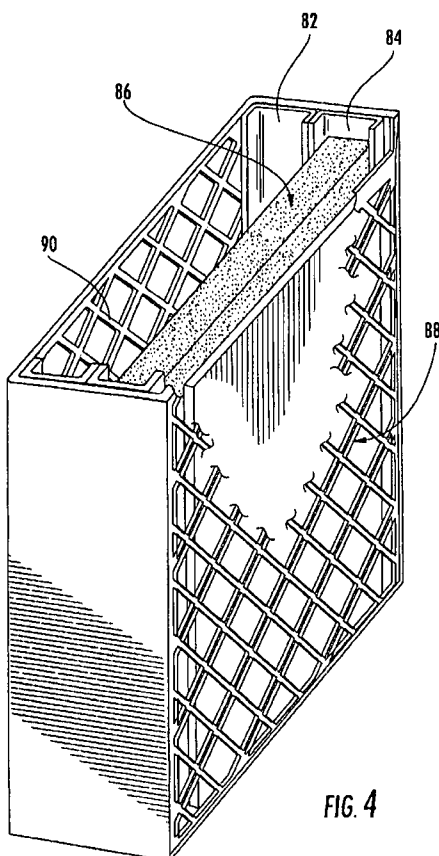


FIG. 4

(57) Abstract: The present invention is directed to methods for delaying a plant development process comprising exposing a plant or plant part to one or more bacteria or enzymes. In specific embodiments, the one or more bacteria are selected from the group consisting of *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, and a mixture comprising any combination of these bacteria. Apparatuses for delaying a plant development process comprising a catalyst that comprises one or more of the above bacteria.



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, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

- *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

Published:

- *without international search report and to be republished upon receipt of that report*
- *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
16 October 2008 (16.10.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/124307 A3

(51) International Patent Classification:

A01N 63/00 (2006.01) A01P 21/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2008/058286

(22) International Filing Date: 26 March 2008 (26.03.2008)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

11/695,377

2 April 2007 (02.04.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC.** [US/US]; P.O. Box 3999, Atlanta, Georgia 30302-3999 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **PIERCE, George E.** [US/US]; 112 Rosebury Drive, Canton, Georgia 30115 (US). **GANGULY, Sangeeta** [IN/US]; 1500 East Lake Cook Road, Buffalo Grove, Illinois 60089 (US). **DRAGO, Gene K.** [US/US]; 4138 NW 46th Dr, Gainesville, FL 32606 (US).

(74) Agents: **MEUNIER, Andrew T.** et al.; Fish & Richardson P.C., P.O. Box 1022, 60 South Sixth Street, Minneapolis, Minnesota 55440-1022 (US).

(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, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, 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, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(88) Date of publication of the international search report:

23 April 2009

(54) Title: BIOLOGICAL-BASED CATALYST TO DELAY PLANT DEVELOPMENT PROCESSES

(57) Abstract: The present invention is directed to methods for delaying a plant development process comprising exposing a plant or plant part to one or more bacteria or enzymes. In specific embodiments, the one or more bacteria are selected from the group consisting of *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, and a mixture comprising any combination of these bacteria. Apparatuses for delaying a plant development process comprising a catalyst that comprises one or more of the above bacteria.

WO 2008/124307 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2008/058286

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A01N63/00 A01P21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANDREW J. REED ET AL.: "Delayed Ripening Tomato Plants Expressing the Enzyme-1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Deaminase. 1. Molecular Characterization, Enzyme Expression, and Fruit Ripening Traits" JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 43, 1995, pages 1954-1962, XP002517044 page 1955 page 1960 - page 1961 ----- -/--	1,7-11, 18,22, 25,28,30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 February 2009

Date of mailing of the international search report

11/03/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fort, Marianne

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2008/058286

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOZDROJ J ET AL: "Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere" SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 36, no. 11, 1 November 2004 (2004-11-01), pages 1775-1784, XP004565344 ISSN: 0038-0717	1,8,14, 18,22, 25-45
Y	p.8, left column, 1.28-40	4-6,21, 46
X	----- WO 92/12249 A (MONSANTO CO [US]) 23 July 1992 (1992-07-23) page 4, line 19 - page 5, line 30 examples 3,8,9 -----	1,7-18, 22,25, 28,30
X	DATABASE CA [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; KULIKOVA, A. K. ET AL: "Ethylene epoxidation by native and immobilized cells of the propane-assimilating culture Rhodococcus erythropolis 3/89" XP002517045 retrieved from STN Database accession no. 2000:107646 abstract & PRIKLADNAYA BIOKHIMIYA I MIKROBIOLOGIYA , 35(6), 611-615 CODEN: PBMIK; ISSN: 0555-1099, 1999, -----	18-20, 22-25, 28-31
Y	NAGASAWA T ET AL: "OPTIMUM CULTURE CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF COBALT-CONTAINING NITRILE HYDRATASE BY RHODOCOCCLUS RHODOCHROUS J1" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 34, no. 6, 1 March 1991 (1991-03-01), pages 783-788, XP002941747 ISSN: 0175-7598 page 785 -----	4-6,21, 46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/058286

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9212249	A	23-07-1992	
		AU 9113791 A	17-08-1992
		BR 9107191 A	14-06-1994
		CA 2096637 A1	27-06-1992
		EP 0564524 A1	13-10-1993
		FI 932960 A	24-06-1993
		JP 9238689 A	16-09-1997
		JP 6504668 T	02-06-1994
		US 5512466 A	30-04-1996

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

Fish & Richardson P.C.
P.O. Box 1022
Minneapolis MN 55440-1022
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

20.08.2009

Applicant's or agent's file reference
23339-004WO1

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2008/058286

International filing date (day/month/year)
26.03.2008

Priority date (day/month/year)
02.04.2007

Applicant
Georgia State University Research Foundation, Inc.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

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

Authorized Officer

Cardenas, Claudette

Tel. +31 70 340-3370



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 23339-004WO1		FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/US2008/058286		International filing date (day/month/year) 26.03.2008		Priority date (day/month/year) 02.04.2007
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A01N63/00				
Applicant Georgia State University Research Foundation, Inc.				
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>6</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>8</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 and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 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 2009-06-11		Date of completion of this report 20.08.2009		
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 Fort, Marianne Telephone No. +31 70 340-4123		



85
713

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/US2008/058286

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

1-32 as originally filed

Claims, Numbers

1-62 filed with telefax on 11.06.2009

Drawings, Sheets

1/3-3/3 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ 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 they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*):
- ☐ any table(s) related to 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)).

86
114

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>1-20, 24, 29-30, 35-62</u>
	No: Claims	<u>21-23, 25-28, 31-34</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-20</u>
	No: Claims	<u>21-62</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-62</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Re Item V

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

Reference is made to the following documents:

- D1: ANDREW J. REED ET AL.: "Delayed Ripening Tomato Plants Expressing the Enzyme 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Deaminase. 1. Molecular Characterization, Enzyme Expression, and Fruit Ripening Traits" JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 43, 1995, pages 1954-1962, XP002517044
- D2: KOZDROJ J ET AL: "Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere" SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 36, no. 11, 1 November 2004 (2004-11-01), pages 1775-1784, XP004565344 ISSN: 0038-0717
- D3: WO 92/12249 A (MONSANTO CO [US]) 23 July 1992 (1992-07-23)
- D4: DATABASE CA [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; KULIKOVA, A. K. ET AL: "Ethylene epoxidation by native and immobilized cells of the propane-assimilating culture Rhodococcus erythropolis 3/89" XP002517045 retrieved from STN Database accession no. 2000:107646
- D5: NAGASAWA T ET AL: "OPTIMUM CULTURE CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF COBALT-CONTAINING NITRILE HYDRATASE BY RHODOCOCCUS RHODOCHROUS J1" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 34, no. 6, 1 March 1991 (1991-03-01), pages 783-788, XP002941747 ISSN: 0175-7598

Before dealing with the question of novelty, the following remarks are made: the wording of claims 21 and 39 "apparatus for delaying a plant development process" must be construed as meaning merely apparatus suitable for carrying out the process (see Guidelines Part II Chapter 5, 5.23).

1) Novelty

The objection as to lack of novelty based on each of D1 and D3 is not maintained since

both documents relate to genetically engineered plants expressing the ACC deaminase.

It is known from D2 that P-chlorophasis shows a small growth-retarding effect towards maize (see D2, p.1782). The inoculant preparation is obviously stored in a container before use. D2 is therefore novelty-destroying for the subject-matter of claims 21, 25, 28 and 31-34 (Article 33(2) PCT).

Amended claims 1, 8, 14 do no longer include the species of *Pseudomonas* and are thus novel vis-à-vis D2 (Article 33(2) PCT). As to new claims 50-62, which are directed to *Pseudomonas*, they are also novel vis-à-vis D2 (Article 33(2) PCT) since they recite that the bacteria is induced prior to exposure to plant or plant.

D4 discloses the adsorption of cells of *Rhodococcus erythropolis* on various carriers including DEAE-cellulose. D4 is novelty-destroying for the subject-matter of claims 21-23, 25-28 and 31-34 (Article 33(2) PCT).

2) Inventive step

D2 can be considered to represent the closest prior art for the subject-matter of claims 1-20.

The subject-matter of claims 1-20 differs from the teaching of D2 merely in the use of *Rhodococcus* spp. or of *Brevibacterium ketoglutanicum*.

In the absence of evidence for any effect provided by the above difference, the problem underlying the present invention may be seen as that of providing an alternative method for delaying a plant development process.

The skilled person had no incentive to use a bacteria selected from the group consisting of *Rhodococcus* spp. and *Brevibacterium ketoglutanicum* as an alternative to *Pseudomonas chloroaphis*. Thus the subject-matter of claims 1-20 can be considered as being inventive (Article 33(3) PCT).

The subject-matter of claims 29-30 and 35-48 differs from the teaching of D2 in the choice of the apparatus used for applying the bacteria.

The problem underlying claims 29-30 and 35-48 can therefore be seen as that of providing a device for applying the bacteria to the plant.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2008/058286

Since it is known from each of D4 or D5 to immobilized the bacteria on a solid substrate, the subject-matter of claims 29-30 as well as the choice of air-permeable multi layer apparatus (Claims 35-48) are considered as normal normal design options which in the absence of any unexpected effect cannot be considered as being inventive (Article 33(3) PCT).

The subject-matter of claim 49-62 differs from the teaching of D2 in the use of an inducing agent to induce the desired enzymatic activity in the bacteria. The problem underling claims 49-62 may thus be seen as that of "inducing" the bacteria. Since D5 discloses the use of urea for optimum conditions of production of cobalt-containing nitrile hydratase, the subject-matter of claim 49 as far as relating to the use of *Pseudomonas chloroaphis* and the subject-matter of claims 50-62 cannot be considered as being inventive (Article 33(3) PCT).

For the same reasons, the subject-matter of claim 24 cannot be considered as inventive either (Article 33(3) PCT).

Attorney Docket No. 23339-0004WO1

THAT WHICH IS CLAIMED:

1. A method for delaying a plant development process comprising exposing a plant or plant part to one or more bacteria, wherein the one or more bacteria are selected from the group consisting of *Rhodococcus spp.*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, and mixtures thereof, and wherein the one or more bacteria are exposed to the plant or plant part in a quantity sufficient to delay the plant development process.
2. The method of claim 1, wherein the one or more bacteria include *Rhodococcus spp.*
3. The method of claim 2, wherein the *Rhodococcus spp.* includes *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 strain, *Rhodococcus sp.* DAP 96622 strain, *Rhodococcus erythropolis*, or mixtures thereof.
4. The method of claim 1, wherein the one or more bacteria are induced by exposure to an inducing agent selected from the group consisting of asparagine, glutamine, cobalt, urea, and mixtures thereof.
5. The method of claim 4, wherein the one or more bacteria are induced by exposure to asparagine.
6. The method of claim 4, wherein the one or more bacteria are induced by exposure to asparagine, cobalt, and urea.
7. The method of claim 1, wherein the plant or plant part is indirectly exposed to the one or more bacteria.
8. The method of claim 1, wherein the plant or plant part is directly exposed to the one or more bacteria.

Attorney Docket No. 23339-0004WO1

9. The method of claim 1, wherein the plant development process is fruit or vegetable ripening.
10. The method of claim 9, wherein the plant part is a fruit or a vegetable.
11. The method of claim 10, wherein the fruit is a climacteric fruit.
12. The method of claim 11, wherein the climacteric fruit is selected from the group consisting of bananas, peaches, plums, nectarines, apples, tomatoes, pears and avocados.
13. The method of claim 10, wherein the fruit is a nonclimacteric fruit.
14. The method of claim 9, wherein the plant part is a cucumber.
15. The method of claim 1, wherein the plant part is a flower and the plant development process is flower senescence, wilting, abscission or petal closure.
16. The method of claim 15, wherein the flower is a carnation, rose, orchid, portulaca, malva, or begonia.
17. The method of claim 1, wherein the plant development process is leaf abscission.
18. The method of claim 1, wherein the plant part is a cut flower.
19. The method of claim 1, wherein delaying the plant development process results in increased shelf-life or facilitates longer-distance transportation of the plant or plant part.

Attorney Docket No. 23339-0004WO1

20. The method of claim 1, wherein the one or more bacteria are immobilized and are placed in, placed on, or affixed to a physical structure suitable for transport or storage of the plant or plant part.

21. An apparatus for delaying a plant development process comprising a catalyst that comprises one or more bacteria selected from the group consisting of *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, and mixtures thereof, wherein the one or more bacteria are provided in a quantity sufficient to delay the plant development process.

22. The apparatus of claim 21, wherein the one or more bacteria include *Rhodococcus spp.*

23. The apparatus of claim 22, wherein the *Rhodococcus spp.* includes *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 strain, *Rhodococcus sp.* DAP 96622 strain, *Rhodococcus erythropolis*, or mixtures thereof.

24. The apparatus of claim 21, wherein the one or more bacteria are induced by exposure to an inducing agent selected from the group consisting of asparagine, glutamine, cobalt, urea, and mixtures thereof.

25. The apparatus of claim 21, wherein the plant development process is selected from the group consisting of fruit or vegetable ripening, flower senescence, wilting, petal closure, and leaf abscission.

26. The apparatus of claim 21, wherein the one or more bacteria are immobilized in a matrix comprising cross-linked DEAE-cellulose, a matrix comprising alginate, a matrix comprising carrageen, a matrix comprising cross-linked alginate, a matrix comprising cross-linked carrageen, a matrix comprising polyacrylamide, or calcium alginate beads.

Attorney Docket No. 23339-0004WO1

27. The apparatus of claim 26, wherein the matrix comprises cross-linked DEAE-cellulose, wherein the DEAE-cellulose is cross-linked with glutaraldehyde.

28. The apparatus of claim 21, wherein the catalyst is present in a catalyst module that is placed in, placed on, or affixed to a physical structure.

29. The apparatus of claim 21, further comprising a control device to adjust exposure of the catalyst to a plant or plant part.

30. The apparatus of claim 21, further comprising a monitoring device for monitoring the efficacy of the catalyst in delaying the plant development process.

31. The apparatus of claim 28, wherein the physical structure is selected from the group consisting of a film, sheet, coating layer, a slotted chamber, a box, a pouch, and a bag.

32. The apparatus of claim 28, wherein the catalyst module can be removed and replaced with a second catalyst module.

33. The apparatus of claim 28, wherein more than one catalyst module is placed in, placed on, or affixed to the physical structure.

34. The apparatus of claim 28, wherein the physical structure permits air flow into the catalyst module.

35. The apparatus of claim 34, further comprising an element for controlling the air flow into the catalyst module.

36. The apparatus of claim 28, wherein the physical structure is provided as a refrigerated structure.

Attorney Docket No. 23339-0004WO1

37. The apparatus of claim 28, further comprising an element for controlling the moisture level in the physical structure.

38. The apparatus of claim 28, further comprising an element for regulating the carbon dioxide level in the physical structure.

39. An air-permeable catalyst apparatus for delaying a plant development process comprising:

a first layer; and

a second layer that includes a catalyst comprising one or more bacteria selected from the group consisting of *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, and mixtures thereof, wherein the one or more bacteria are provided in a quantity sufficient to delay the plant development process; wherein the first layer provides structural integrity to the apparatus.

40. The apparatus of claim 39, wherein the one or more bacteria include *Rhodococcus spp.*

41. The apparatus of claim 39, wherein the *Rhodococcus spp.* includes *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253 strain, *Rhodococcus sp.* DAP 96622 strain, *Rhodococcus erythropolis*, or mixtures thereof.

42. The apparatus of claim 39, wherein the one or more bacteria are induced by exposure to an inducing agent selected from the group consisting of asparagine, glutamine, cobalt, urea, and mixtures thereof.

43. The apparatus of claim 39, wherein the plant development process is selected from the group consisting of fruit or vegetable ripening, flower senescence, and leaf abscission.

Attorney Docket No. 23339-0004WO1

44. The catalyst apparatus of claim 39, further comprising a third layer, wherein said third layer can be removed from said second layer to expose an adhesive layer that can be used to affix the catalyst apparatus to a separate structure.

45. The catalyst apparatus of claim 44, wherein said second layer is said adhesive layer.

46. The catalyst apparatus of claim 44, further comprising a fourth layer adjacent said third layer that can be removed from said third layer to expose an adhesive layer that can be used to affix the catalyst structure to a separate structure.

47. The catalyst apparatus of claim 46, wherein said third layer is said adhesive layer.

48. An air-permeable bag or pouch including the catalyst apparatus of claim 39.

49. A method for delaying a plant development process comprising exposing a plant or plant part to an enzymatic extract of one or more bacteria selected from the group consisting of *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, and mixtures thereof, said bacteria being induced by an inducing agent selected from the group consisting of asparagine, glutamine, cobalt, urea, and mixtures thereof and said enzymatic extract being exposed to the plant or plant part in a quantity sufficient to delay the plant development process.

50. A method for delaying a plant development process comprising exposing a plant or plant part to one or more bacteria, wherein the one or more bacteria are *Pseudomonas chloroaphis* that have been induced by exposure to an inducing agent selected from the group consisting of asparagine, glutamine, cobalt, urea and mixtures thereof, and wherein the one or more bacteria are exposed to the plant or plant part in a quantity sufficient to delay the plant development process.

Attorney Docket No. 23339-0004WO1

51. The method of claim 50, wherein the one or more bacteria are induced by exposure to asparagine or asparagine, cobalt, and urea.

52. The method of claim 50, wherein the plant or plant part is directly or indirectly exposed to the one or more bacteria.

53. The method of claim 50, wherein the plant development process is fruit or vegetable ripening.

54. The method of claim 50, wherein the plant part is a fruit, a vegetable or a flower.

55. The method of claim 54, wherein the fruit is a nonclimacteric or climacteric fruit.

56. The method of claim 55, wherein the climacteric fruit is selected from the group consisting of bananas, pears, plums, nectarines, apples, tomatoes, peaches, and avocados.

57. The method of claim 50, wherein the plant part is a flower and the plant development process is flower senescence, wilting, abscission or petal closure.

58. The method of claim 57, wherein the flower is a carnation, rose, orchid, portulaca, malva, or begonia.

59. The method of claim 50, wherein the plant development process is leaf abscission.

60. The method of claim 50, wherein the plant part is a cut flower.

Attorney Docket No. 23339-0004WO1

61. The method of claim 50, wherein delaying the plant development process results in increased shelf-life or facilitates longer-distance transportation of the plant or plant part.

62. The method of claim 50, wherein the one or more bacteria are immobilized and are placed in, placed on, or affixed to a physical structure suitable for transport or storage of the plant or plant part.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

Fish & Richardson P.C.
Attn. Meunier, Andrew T.
P.O. Box 1022
Minneapolis MN 55440-1022
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing (day/month/year) 11/03/2009	
Applicant's or agent's file reference 23339-004W01	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US2008/058286	International filing date (day/month/year) 26/03/2008
Applicant GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC.	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Joëlle Gerber
--	-------------------------------------

99
722

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

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

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the International search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

* * * COMMUNICATION RESULT REPORT (JUN. 11. 2009 3:16PM) * * *

FAX HEADER 1: 4049423596
FAX HEADER 2: FISH & RICHARDSONTRANSMITTED/STORED : JUN. 11. 2009 3:04PM
FILE MODE OPTION

ADDRESS

RESULT

PAGE

9679 MEMORY TX

+498923994465

OK

31/31

REASON FOR ERROR
E-1) HANG UP OR LINE FAIL
E-3) NO ANSWERE-2) BUSY
E-4) NO FACSIMILE CONNECTION

Attorney Docket No.: 23339-0004WO1

**OFFICIAL COMMUNICATION: FACSIMILE
FOR THE PERSONAL ATTENTION OF PCT EXAMINER (EP/IPEA)****FAX NO: 011 49 89 2399 4465**Applicant : Georgia State University Research Foundation, Inc.
Serial No. : PCT/US2008/058286
Filing Date : March 26, 2008
Title : BIOLOGICAL-BASED CATALYST TO DELAY PLANT DEVELOPMENT
PROCESSES

Number of pages including this page 31

European Patent Office
Erhardtstrasse 27
D-80298 Munich
GERMANY

Sir:

Attached to this facsimile communication cover sheet are:

EPO Form 1037.1 in duplicate (2 sheets)
PCT Demand Form PCT/IPEA/401 (4 sheets)
PCT Fee Calculation (Annex to the Demand - 1 sheet)
Copy of General Power of Attorney (1 sheet)
Amendment Under Article 34 and Response to Written Opinion (13 sheets)
Replacement pages 33 through 41 (9 sheets)faxed this 11th day of June 2009 to the European Patent Office.

Respectfully submitted,

Date: 11 June 2009


Tiffany B. Salmon
Agent of RecordFish & Richardson P.C.
1180 Peachtree Street, N.E., 21st Floor
Atlanta, GA 30309
Telephone: (404) 892-5005
Fax: (404) 892-5002

12100347.doc

NOTE: This facsimile is intended for the addressee only and may contain privileged or confidential information. If you have received this facsimile in error, please immediately call us collect at (404) 892-5005 to arrange for its return. Thank you.

**OFFICIAL COMMUNICATION: FACSIMILE
FOR THE PERSONAL ATTENTION OF PCT EXAMINER (EP/IPEA)**

FAX NO: 011 49 89 2399 4465

Applicant : Georgia State University Research Foundation, Inc.
Serial No. : PCT/US2008/058286
Filing Date : March 26, 2008
Title: : BIOLOGICAL-BASED CATALYST TO DELAY PLANT DEVELOPMENT
PROCESSES

Number of pages including this page 31

European Patent Office
Erhardtstrasse 27
D-80298 Munich
GERMANY

Sir:

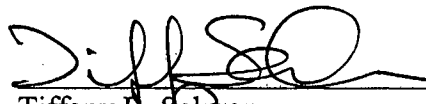
Attached to this facsimile communication cover sheet are:

EPO Form 1037.1 in duplicate (2 sheets)
PCT Demand Form PCT/IPEA/401 (4 sheets)
PCT Fee Calculation (Annex to the Demand – 1 sheet)
Copy of General Power of Attorney (1 sheet)
Amendment Under Article 34 and Response to Written Opinion (13 sheets)
Replacement pages 33 through 41 (9 sheets)

faxed this 11th day of June 2009 to the European Patent Office.

Respectfully submitted,

Date: 11 June 2009


Tiffany B. Salmon
Agent of Record

Fish & Richardson P.C.
1180 Peachtree Street, N.E., 21st Floor
Atlanta, GA 30309
Telephone: (404) 892-5005
Fax: (404) 892-5002

12100347.doc

NOTE: This facsimile is intended for the addressee only and may contain privileged or confidential information. If you have received this facsimile in error, please immediately call us collect at (404) 892-5005 to arrange for its return. Thank you.



Einsender / Sender / Expéditeur (bitte ausfüllen / please complete / veuillez compléter) :

MEUNIER, Andrew T.
SALMON, Tiffany B.
Fish & Richardson P.C.
P.O. Box 1022
60 South Sixth Street, 3300 RBC Plaza
Minneapolis, MN 55440-1022

80298 Munich
Germany
Tel. +49(0)89 2399-0 I Fax -4465

P.O. Box 5818
2280 HV Rijswijk
Netherlands
Tel. +31(0)70 340-2040 I Fax -3016

10958 Berlin
Germany
Tel. +49(0)30 25901-0 I Fax -840

Empfangsbescheinigung² für
beim Europäischen Patentamt
nachgereichte Unterlagen zu
Patentanmeldungen / Patenten

Datum und Ort des Eingangs sind aus dem
Eingangsstempel bzw. der Perforation dieser
Empfangsbescheinigung ersichtlich.
(M + Datum = Einreichungsort München;
H + Datum = Einreichungsort Den Haag;
Datum + B = Einreichungsort Berlin)

Acknowledgement of receipt²
by the European Patent Office of
subsequently filed items relating
to patent applications / patents

The date and place of receipt are indicated
by the stamp or perforation on this receipt.
(M + date = Munich as place of receipt;
H + date = The Hague as place of receipt;
date + B = Berlin as place of receipt)

Accusé de réception² de pièces
envoyées à l'Office européen des
brevets postérieurement au dépôt
d'une demande de brevet / à la
délivrance d'un brevet européen

La date et le lieu de réception sont indiqués
par le cachet de réception ou la perforation
du présent accusé de réception.
(M + date = pièces reçues à Munich ;
H + date = pièces reçues à La Haye ;
date + B = pièces reçues à Berlin)

Eingereichte Unterlagen

Items filed

Pièces produites

Anmeldenummer/Patentnummer Application Number/Patent Number Numéro de la demande/numéro du brevet	Ihr Zeichen Your reference Votre référence	ggfs. Art und Datum der Unterlagen ¹ Nature and date of items (optional) ¹ Nature et date des pièces (facultatif) ¹
1. PCT/US2008/058286	23339-0004WO1	Demand Form PCT/IPEA/401
2. PCT/US2008/058286	23339-0004WO1	Fee Calculation Sheet
3. PCT/US2008/058286	23339-0004WO1	Copy of Power of Attorney
4. PCT/US2008/058286	23339-0004WO1	Amendment Under Art. 34
5. PCT/US2008/058286	23339-0004WO1	Replacement Pages 33-41
6.		
7.		
8.		

Nachgereichte Unterlagen können auch online eingereicht werden; siehe www.epoline.org
Items may also be filed subsequently online; please see www.epoline.org
Les pièces produites ultérieurement peuvent être aussi déposées en ligne ; voir www.epoline.org

- 1) Bitte Adressfeld ausfüllen
2) Bitte 2-fach einreichen
3) Der Eingang der angegebenen Unterlagen
wird bestätigt. Enthält diese Spalte keine
Eintragungen, so wird lediglich bestätigt,
dass eine Sendung zu dem angegebenen
Aktenzeichen eingegangen ist.

- (1) Please fill in address.
(2) Please submit two copies.
(3) Receipt of the items indicated is confirmed.
If this column does not contain any entries,
only the receipt of an item for the file indicated
is confirmed.

- 1) Veuillez compléter le champ ci-dessous.
2) A soumettre en 2 exemplaires.
3) La réception des pièces indiquées est confir-
mée. Faute de mention dans cette colonne,
le présent accusé de réception se rapporte
à une pièce quelconque envoyée sous la
référence indiquée.

Empfangsbescheinigung für Einsender I Acknowledgement of receipt for sender I Accusé de réception à l'intention de l'expéditeur



Einsender 'Sender' / Expéditeur (bitte ausfüllen / please complete / veuillez compléter) :

MEUNIER, Andrew T.
SALMON, Tiffany B.
Fish & Richardson P.C.
P.O. Box 1022
60 South Sixth Street, 3300 RBC Plaza
Minneapolis, MN 55440-1022

80298 Munich
Germany
Tel. +49(0)89 2399-0 I Fax -4465

P.O. Box 5818
2280 HV Rijswijk
Netherlands
Tel. +31(0)70 340-2040 I Fax -3016

10958 Berlin
Germany
Tel. +49(0)30 25901-0 I Fax -840

Empfangsbescheinigung² für
beim Europäischen Patentamt
nachgereichte Unterlagen zu
Patentanmeldungen / Patenten

Acknowledgement of receipt²
by the European Patent Office of
subsequently filed items relating
to patent applications / patents

Accusé de réception² de pièces
envoyées à l'Office européen des
brevets postérieurement au dépôt
d'une demande de brevet / à la
délivrance d'un brevet européen

Datum und Ort des Eingangs sind aus dem
Eingangsstempel bzw. der Perforation dieser
Empfangsbescheinigung ersichtlich.
(M + Datum = Einreichungsort München;
H + Datum = Einreichungsort Den Haag;
Datum + B = Einreichungsort Berlin)

The date and place of receipt are indicated
by the stamp or perforation on this receipt.
(M + date = Munich as place of receipt;
H + date = The Hague as place of receipt;
date + B = Berlin as place of receipt)

La date et le lieu de réception sont indiqués
par le cachet de réception ou la perforation
du présent accusé de réception.
(M + date = pièces reçues à Munich ;
H + date = pièces reçues à La Haye ;
date + B = pièces reçues à Berlin)

Eingereichte Unterlagen

Items filed

Pièces produites

Anmeldenummer/Patentnummer Application Number/Patent Number Numéro de la demande/numéro du brevet	Ihr Zeichen Your reference Votre référence	ggfs. Art und Datum der Unterlagen ³ Nature and date of items (optional) ³ Nature et date des pièces (facultatif) ³
1. PCT/US2008/058286	23339-0004WO1	Demand Form PCT/IPEA/401
2. PCT/US2008/058286	23339-0004WO1	Fee Calculation Sheet
3. PCT/US2008/058286	23339-0004WO1	Copy of Power of Attorney
4. PCT/US2008/058286	23339-0004WO1	Amendment Under Art. 34
5. PCT/US2008/058286	23339-0004WO1	Replacement Pages 33-41
6.		
7.		
8.		

Nachgereichte Unterlagen können auch online eingereicht werden; siehe www.epoline.org
Items may also be filed subsequently online; please see www.epoline.org
Les pièces produites ultérieurement peuvent être aussi déposées en ligne ; voir www.epoline.org

- 1) Bitte Adressfeld ausfüllen
2) Bitte 2-fach einreichen
3) Der Eingang der angegebenen Unterlagen
wird bestätigt. Enthält diese Spalte keine
Eintragungen, so wird lediglich bestätigt,
dass eine Sendung zu dem angegebenen
Aktenzeichen eingegangen ist.

- (1) Please fill in address.
(2) Please submit two copies.
(3) Receipt of the items indicated is confirmed.
If this column does not contain any entries,
only the receipt of an item for the file indicated
is confirmed.

- 1) Veuillez compléter le champ ci-dessous.
2) A soumettre en 2 exemplaires.
3) La réception des pièces indiquées est confir-
mée. Faute de mention dans cette colonne,
le présent accusé de réception se rapporte
à une pièce quelconque envoyée sous la
référence indiquée.

Kopie für EPA I Copy for EPO I Exemplaire OEB

REIVINDICACIONES

1. Un método para retrasar un proceso de desarrollo de las plantas que comprende exponer una planta o parte de la planta a una o más bacterias, en donde dichas una o más bacterias se seleccionan del grupo que consiste de *Rhodococcus spp.*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, y mezclas de ellas, y en donde dichas una o más bacterias son expuestas a la planta o parte de la planta en una cantidad suficiente para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas una o más bacterias incluyen *Rhodococcus spp.*

3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la *Rhodococcus spp.* incluye la cepa de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253, la cepa de *Rhodococcus sp.* DAP 96622, *Rhodococcus erythropolis*, o mezclas de ellas.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas una o más bacterias son inducidas por exposición a un agente inductor seleccionado del grupo que consiste de asparagina, glutamina, cobalto, urea, y mezclas de ellas.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dichas una o más bacterias son inducidas por exposición a asparagina.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dichas una o más bacterias son inducidas por exposición a asparagina, cobalto y urea.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la planta o parte de la planta es indirectamente expuesta a dichas una o más bacterias.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la planta o parte de la planta es directamente expuesta a dichas una o más bacterias.

9. El método de acuerdo con la reivindicación, en donde el proceso de desarrollo de las plantas es maduración de frutas o verduras.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la parte de la planta es una fruta o una verdura.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la fruta es una fruta climatérica.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la fruta climatérica se selecciona del grupo que consiste de bananas, duraznos, ciruelas, mandarinas, manzanas, tomates, peras y aguacates.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la fruta es una fruta no climatérica.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la parte de la planta es un pepino.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la parte de la planta es una flor y el proceso de desarrollo de las plantas es la senescencia de la flor,

marchitamiento, abscisión o cierre de pétalos.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la flor es un clavel, rosa, orquídea, verdolaga, malva o begonia.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el proceso de desarrollo de las plantas es abscisión de hojas.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la parte de la planta es una flor cortada.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el retraso del proceso de desarrollo de las plantas genera una vida útil incrementada o facilita el transporte a mayor distancia de la planta o parte de la planta.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha una o más bacterias son inmovilizadas y se colocan en, colocan sobre, o unen a una estructura física adecuada para transporte o almacenamiento de la planta o parte de la planta.

21. Un aparato para retrasar un proceso de desarrollo de las plantas que comprende un catalizador que comprende una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste de *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, y mezclas de ellas, en donde dichas una o más bacterias se proveen en una cantidad suficiente para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas.

22. El aparato de la reivindicación 21, en donde dichas una o más bacterias incluyen *Rhodococcus spp.*

23. El aparato de la reivindicación 22, en donde la *Rhodococcus spp.* incluye cepa de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253, cepa de *Rhodococcus sp.* DAP 96622, *Rhodococcus erythropolis*, o mezclas de ellas.

24. El aparato de la reivindicación 21, en donde dichas una o más bacterias son inducidas por exposición a un agente inductor seleccionado del grupo que consiste de asparagina, glutamina, cobalto, urea, y mezclas de ellas.

25. El aparato de la reivindicación 21, en donde el proceso de desarrollo de las plantas se selecciona del grupo que consiste de maduración de frutas o verduras, senescencia de flores, marchitamiento, cierre de pétalos y abscisión de hojas.

26. El aparato de la reivindicación 21, en donde dichas una o más bacterias son inmovilizadas en una matriz que comprende DEAE-celulosa entrecruzada, una matriz que comprende alginato, una matriz que comprende carragenano, una matriz que comprende alginato entrecruzado, una matriz que comprende carragenano entrecruzado, una matriz que comprende poliacrilamida, o microesferas de alginato de calcio.

27. El aparato de la reivindicación 26, en donde la matriz comprende DEAE-celulosa entrecruzada, en donde la DEAE-celulosa es entrecruzada con glutaraldehído.

28. El aparato de la reivindicación 21, en donde el

catalizador está presente en un módulo catalizador que se coloca en, coloca sobre, o une a una estructura física.

29. El aparato de la reivindicación 21, que comprende, además, un dispositivo de control para ajustar la exposición del catalizador a una planta o parte de la planta.

30. El aparato de la reivindicación 21, que comprende, además, un dispositivo de monitoreo para monitorear la eficacia del catalizador para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas.

31. El aparato de la reivindicación 28, en donde la estructura física se selecciona del grupo que consiste de una película, lámina, capa de revestimiento, una cámara ranurada, una caja, un saco y una bolsa.

32. El aparato de la reivindicación 28, en donde el módulo catalizador puede ser extraído y reemplazado con un segundo módulo catalizador.

33. El aparato de la reivindicación 28, en donde más de un módulo catalizador se coloca en, coloca sobre, o se une a la estructura física.

34. El aparato de la reivindicación 28, en donde la estructura física permite que el aire fluya en el módulo catalizador.

35. El aparato de la reivindicación 34, que comprende, además, un elemento para controlar el flujo del aire en el módulo catalizador.

36. El aparato de la reivindicación 28, en donde la estructura física se provee como una estructura refrigerada.

37. El aparato de la reivindicación 28, que comprende, además, un elemento para controlar el nivel de humedad en la estructura física.

38. El aparato de la reivindicación 28, que comprende, además, un elemento para regular el nivel de dióxido de carbono en la estructura física.

39. Un aparato catalizador permeable al aire para retrasar un proceso de desarrollo de las plantas que comprende:

una primera capa; y

una segunda capa que incluye un catalizador que comprende una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste de *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, y mezclas de ellas, en donde dichas una o más bacterias se proveen en una cantidad suficiente para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas;

en donde la primera capa provee integridad estructural al aparato.

40. El aparato de la reivindicación 39, en donde dichas una o más bacterias incluyen *Rhodococcus spp.*

41. El aparato de la reivindicación 39, en donde la *Rhodococcus spp.* incluye la cepa de *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253, cepa de *Rhodococcus sp.* DAP 96622, *Rhodococcus erythropolis*, o mezclas de ellas.

42. El aparato de la reivindicación 39, en donde dichas una o más bacterias son inducidas por exposición a un agente inductor seleccionado del grupo que consiste de asparagina, glutamina, cobalto, urea, y mezclas de ellas.

43. El aparato de la reivindicación 39, en donde el proceso de desarrollo de las plantas se selecciona del grupo que consiste de maduración de frutas o verduras, senescencia de flores y abscisión de hojas.

44. El aparato catalizador de acuerdo con la reivindicación 39, que comprende, además una tercera capa, en donde dicha tercera capa se puede extraer de dicha segunda capa para exponer una capa adhesiva que se puede usar para unir el aparato catalizador a una estructura separada.

45. El aparato catalizador de acuerdo con la reivindicación 44, en donde dicha segunda capa es dicha capa adhesiva.

46. El aparato catalizador de acuerdo con la reivindicación 44, que comprende, además, una cuarta capa adyacente a dicha tercera capa que se puede extraer de dicha tercera capa para exponer una capa adhesiva que se puede usar para unir la estructura catalizadora a una estructura separada.

47. El aparato catalizador de acuerdo con la reivindicación 46, en donde dicha tercera capa es dicha capa adhesiva.

48. Una bolsa o saco permeable al aire que incluye el aparato catalizador de acuerdo con la reivindicación 39.

49. Un método para retrasar un proceso de desarrollo de las plantas que comprende exponer una planta o parte de la planta a un extracto enzimático de una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste de *Rhodococcus* spp., *Pseudomonas chloroaphis*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, y mezclas de ellas, dichas bacterias siendo inducidas por un agente inductor seleccionado del grupo que consiste de asparagina, glutamina, cobalto, urea, y mezclas de ellas y dicho extracto enzimático estando expuesto a la planta o parte de la planta en una cantidad suficiente para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas.

50. Un método para retrasar un proceso de desarrollo de las plantas que comprende exponer una planta o parte de la planta a una o más bacterias, en donde dichas una o más bacterias son *Pseudomonas chloroaphis* que han sido inducidas por exposición a un agente inductor seleccionado del grupo que consiste de asparagina, glutamina, cobalto, urea, y mezclas de ellas y en donde dichas una o más bacterias se exponen a la planta o parte de la planta en una cantidad suficiente para retrasar el proceso de desarrollo de las plantas.

51. El método de acuerdo con la reivindicación 50, en donde dichas una o más bacterias son inducidas por exposición a asparagina o asparagina, cobalto y urea.

52. El método de acuerdo con la reivindicación 50, en donde la planta o parte de la planta es directa o indirectamente expuesta a dicha una o más bacterias.

53. El método de acuerdo con la reivindicación 50, en donde el proceso de desarrollo de las plantas es maduración de frutas o verduras.

54. El método de acuerdo con la reivindicación 50, en donde la parte de la planta es una fruta, una verdura o una flor.

55. El método de acuerdo con la reivindicación 54, en donde la fruta es una fruta climatérica o no climatérica.

56. El método de acuerdo con la reivindicación 55, en donde la fruta climatérica se selecciona del grupo que consiste de bananas, duraznos, ciruelas, mandarinas, manzanas, tomates, peras y aguacates.

57. El método de acuerdo con la reivindicación 50, en donde la parte de la planta es una flor y el proceso de desarrollo de las plantas es la senescencia de la flor, marchitamiento, abscisión o cierre de pétalos.

58. El método de acuerdo con la reivindicación 57, en donde la flor es un clavel, rosa, orquídea, verdolaga, malva o begonia.

59. El método de acuerdo con la reivindicación 50, en donde el proceso de desarrollo de las plantas es abscisión de la hoja.

60. El método de acuerdo con la reivindicación 50, en donde la parte de la planta es una flor cortada.

61. El método de acuerdo con la reivindicación 50, en donde el retraso del proceso de desarrollo de las plantas genera una vida útil incrementada o facilita el transporte a mayor distancia de la planta o parte de la planta.

62. El método de acuerdo con la reivindicación 50, en donde dicha una o más bacterias son inmovilizadas y se colocan en, colocan sobre, o unen a una estructura física adecuada para transporte o almacenamiento de la planta o parte de la planta.



No. 09-112336- -00000-0000

Fecha: 2009-10-09 14:44:52
Tra. 11: PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONE
Eve: 379 FASENACIONALII
Folios: 114

io
A

REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

[]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de 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 []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de 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 []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Federico Navarro

Firma Responsable

Fecha 09-10-2009



Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D^a ALEMAN DILIA MARIA

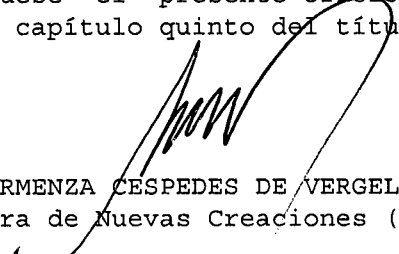
REFERENCIA	Radicación No.	9 112336
	Solicitud internacional	PCT/US2008/058286
	Fecha inicio fase nacional	02/11/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	12509

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 3 NOV. 2009
adpall



Bogotá,
2020

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Doctor(a)
RODRIGUEZ D^a ALEMAN DILIA MARIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION INC

REFERENCIA	Radicación No.	9 112336
	Solicitud internacional	PCT/US2008/058286
	Fecha inicio fase nacional	02/11/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	12510

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de quince reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 13 NOV. 2009
adpall

Al contestar favor indique el número
de radicación consignado en el rótulo

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int.2. Tel 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia