



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

BT

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

PCT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

10-24524

54. TÍTULO AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS FORMADORES DE GLOBULOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE MICROBIA, INC. Y TATE LILIE INGREDIENTS AMERICAS, INC.

DOMICILIO LEXINGTON, MA 02421, US Y
DECATUR, IL 62521, US

74. APODERADO ALVARO CORREA ORDOÑEZ

22. BOGOTÁ, D.C., Marzo 01, 2010

(FORMA P-10)

Título, Poder, Com
05-04-2010
No Efectivo

PETITORIO



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-024524- -00000-0000

Fecha: 2010-03-02 15:53:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 151

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: MICROBIA, INC. Y
TATE & LYLE INGREDIENTS AMERICAS, INC.
Dirección: 60 Westview Street, Lexington, MA 02421, US y
2200 East Eldorado Street, Decatur, IL 62521, US (Respectiv.)
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América
Lugar de Constitución: Estados Unidos de América
Teléfono: Fax:
E-Mail

IDENTIFICACION

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

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ
Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6
Teléfono: 6341500 Fax: 3762211
E-Mail: office.bogota@bakernet.com
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de propiedad Industrial, sírvase indicar el número de
radicación (del poder). _____

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 79.143.366 Usaquén TP 20281

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: TRUEHEART, Joshua; LIEVENSE, Jefferson; IVERSON, Sara
Dirección: 172 Annursnac Hill Road Concord, MA 01742 (US); Clay; 916 Stevens Creek Circle Forsythe, IL 62535 (US);
60 Chase Avenue Lexington, MA 02421 (US)
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

5

PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/075352 Fecha 05.09.2008
Publicación Internacional No. WO2009/032987 Fecha 12.03.2009

6

Título (54)

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS FORMADORES DE GLÓBULOS (Folio 16A)

7

Clasificación Internacional (51)

C12N 15/01; C12N 1/00

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen
US

(32) Fecha
05.09.2007

(31) Número de Solicitud
60/970,101

9

Comprobante de pago No. 10-3,806

Fecha Febrero 29, 2010

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

10

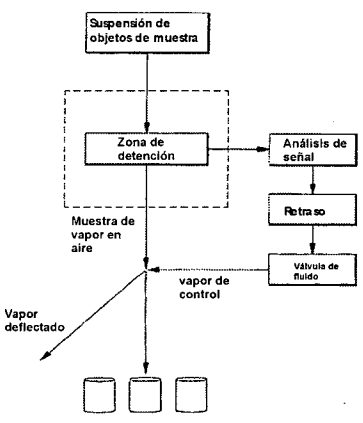
ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ 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 del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 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: Extractos

11

FIGURA CARATERISTICA

Figura 1



12

Solicito la concesión de la patente:

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

3

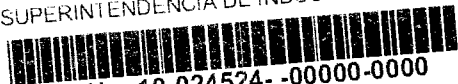
20100002

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 3,806
FECHA : ENERO 15 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-024524- -00000-0000

Fecha: 2010-03-02 15:53:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 151

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	111704736	14/01/2010	66.910.000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON. QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION ____ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional: C12N 15/01; C12N 1/00

(71) Solicitante(s) MICROBIA, INC. Y TATE & LYLE INGREDIENTS AMERICAS, INC.

(72) Inventor(es) TRUEHEART, Joshua; LIEVENSE, Jefferson; IVERSON, Sara

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

(30) Prioridad

(31) **No. Prioridad**

(32)

Fecha

(33) **País**

60/970,101

05.09.2007

US

(85) Fecha inicio fase nacional: 05-04-2010

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 12.03.2009

Fecha de presentación de la solicitud: 05.09.2008

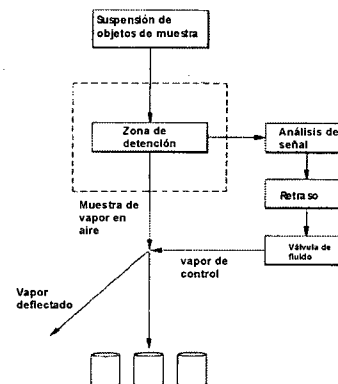
N° publicación: WO2009/032987

No. de solicitud PCT/US2008/075352

(54) Título: AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS FORMADORES DE GLÓBULOS

(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional : C12N 15/01; C12N 1/00			
(71) Solicitante(s) MICROBIA, INC. Y TATE & LYLE INGREDIENTS AMERICAS, INC.			
(72) Inventor(es) TRUEHEART, Joshua; LIEVENSE, Jefferson; IVERSON, Sara			
(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/970,101	05.09.2007	US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 05-04-2010		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 12.03.2009	
Fecha de presentación de la solicitud: 05.09.2008		No. Publicación: WO2009/032987	
No. de solicitud PCT/US2008/075352			

Figura 1



(54) Título: AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS FORMADORES DE GLÓBULOS

(57) Resumen: La presente descripción proporciona tecnologías para identificar, caracterizar y/o clasificar microorganismos formadores de glóbulos tal como bacterias y/o hongos (por ejemplo, levadura) en cultivo líquido, y particularmente bajo condiciones de fermentación. En algunas realizaciones, los microorganismos formadores de glóbulos producen uno o más productos comerciales. Por ejemplo, en algunas realizaciones los microorganismos formadores de glóbulos producen uno o más ácidos orgánicos, compuestos carotenoides, ácidos grasos esenciales, enzimas industriales, fármacos activos, carbohidratos extracelulares, y compuestos insecticidas, etc. En muchas realizaciones, los organismos se clasifican en su forma de glóbulo.

CONTINUA AL RESPALDO ...

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 March 2009 (12.03.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/032987 A1

(51) International Patent Classification:
C12N 15/01 (2006.01) C12N 1/00 (2006.01)

(74) Agent: FURMAN, Margo, H.; Choate, Hall & Stewart
LLP, Two International Place, Boston, MA 02110 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2008/075352

(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, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:
5 September 2008 (05.09.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/970,101 5 September 2007 (05.09.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): MICRO-BIA PRECISION ENGINEERING, INC. [US/US]; 320 Bent Street, Cambridge, MA 02141 (US).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, 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).

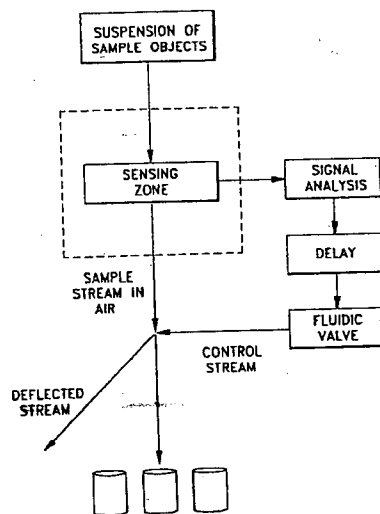
(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): TRUEHEART, Joshua [US/US]; 172 Annursnac Hill Road, Concord, MA 01742 (US). LIEVENSE, Jefferson, Clay [US/US]; 916 Stevens Creek Circle, Forsythe, IL 62535 (US). IVERSON, Sara [US/US]; 60 Chase Avenue, Lexington, MA 02421 (US).

Published:
— with international search report

(54) Title: ISOLATION OF PELLET-FORMING MICROORGANISMS

Figure 1.



(57) Abstract: The present disclosure provides technologies for identifying, characterizing and/or sorting pellet-forming microorganisms such as bacteria and/or fungi (e.g., yeast) in liquid culture, and particularly under fermentation conditions. In some embodiments, the pellet-forming microorganisms produce one or more commercial products. For example, in some embodiments the pellet-forming microorganisms produce one or more organic acids, carotenoid compounds, essential fatty acids, industrial enzymes, active pharmaceuticals, extracellular carbohydrates, and insecticidal compounds, etc. In many embodiments, the organisms are sorted while in their pellet form.

WO 2009/032987 A1

ISOLATION OF PELLET-FORMING MICROORGANISMS

Related Applications

[0001] This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/970,101, filed September 5, 2007, the contents of which are hereby incorporated by reference in their entirety.

Background

[0001] A huge percentage of biological research is performed on a small number of model organisms that have proven to be experimentally tractable. However, as the field of industrial biotechnology continues to develop, there is an increasing desire to harness the characteristics of different microorganisms. There is a need in the field for the development of improved techniques for handling microorganisms with more complex growth characteristics, such as growth characteristics that are not typically encountered during routine laboratory cultivation.

[0002] For example, most microbial organisms typically used in the biotechnology industry (e.g., planktonic microorganisms) grow as simple, uninuclear cells. However, many organisms that produce industrially relevant compounds have more complicated biology. For instance, many such organisms are naturally filamentous, and may grow in pellet form. Filamentous organisms that grow in pellet form are generally not amenable to many standard methods applied to planktonic microorganisms that grow as single uninuclear cells. Among other things, the filamentous morphology generates significant viscosity and limits mass transfer of nutrients and oxygen. Furthermore, the pellet formed by such organisms can be comprised of a number of cells that may represent a heterogeneous population with respect to growth stage and/or metabolic activity. Thus, such pellet-forming microorganisms, although they may display certain intriguing production characteristics, also present technological challenges. There is a need therefore for the development of techniques for handling microorganisms (e.g., filamentous fungi and bacteria) that may grow in pellet form. There is a particular need to develop techniques that can identify desirable microorganisms within a complex population of

microorganisms and/or in a physiological context, such as growth in the pellet form, that is expected to be reflective of performance in industrial scale fermentations.

Summary

[0003] The present disclosure provides technologies for handling and analyzing pellet-forming microorganisms, and microorganisms produced by the technologies. The present disclosure particularly provides systems for identifying variants of pellet-forming microorganisms and/or for sorting pellet-forming microorganisms. In particular, the present disclosure provides methods for physically sorting pellet-forming microorganisms on the basis of one or more optically detectable properties (e.g., size, optical density, presence and/or intensity of fluorescent emission, autofluorescence, etc.).

[0004] In certain embodiments of the disclosure, pellet-forming microorganisms are sorted during and/or after growth in liquid culture. This offers many advantages over sorting (e.g., screening and/or selection) schemes that utilize growth on solid or other media, as such schemes may not reflect the behavior of the microorganisms under fermentation conditions. In some embodiments, the present disclosure allows identification, analysis, and/or sorting of pellet-forming microorganisms under growth conditions similar or identical to fermentation conditions, for example to fermentation conditions utilized so that the microorganisms produce a particular product. In many embodiments, pellet-forming microorganisms are sorted while in their pellet form. In some embodiments, at least some pellet-forming microorganisms are harvested from a collection produced by sorting.

[0005] In certain embodiments of the present disclosure, a sample to be characterized and/or sorted includes a genetically diverse population of microorganisms. In some embodiments, individual microorganisms within such a genetically diverse population are related to one another as progeny of a parent microorganism that has been exposed to a mutagenic protocol.

[0006] In some embodiments, a sample to be characterized and/or sorted includes one or more microorganisms that produce(s) a product. For example, in some embodiments, such a sample includes one or more microorganisms that produce one or more organic acids, carotenoid compounds, essential fatty acids, industrial enzymes, active pharmaceuticals, extracellular carbohydrates, insecticidal compounds, etc.

[0007] In some embodiments of the present disclosure, pellet-forming microorganisms in liquid suspension are sorted by application of a pulse of air that diverts fluid flow; in some embodiments, pellet-forming microorganisms in liquid suspension are sorted by changing collection chambers without necessarily altering fluid flow trajectory.

Description of the Drawing

[0008] *Figure 1* is reproduced from Figure 1 of United States patent 6,400,453 and presents a highly schematic representation of a particular flow cytometer system that can be utilized to identify, analyze, and/or sort pellet-form microorganisms in accordance with the present disclosure.

[0009] *Figure 2* is an autofluorescence spectra, as detected by fluorimeter, for **strain 2** pellets of varying ages. *Top*: excitation at 488 nm; *bottom*: 350 nm. The 18 hr results are skewed by low pellet numbers.

[0010] *Figure 3* is a scatter plot of peak heights (PH) for 2, 3, and 4 day autofluorescence (combined *in silico*). dark grey: 2 days old; black: 3 days; light grey: 4 days.

Definitions

[0011] *Carotenoid compound*: A "carotenoid compound", as that term is used herein, refers to a compound derived from isoprenoid pathway intermediates. The commitment step in carotenoid biosynthesis is the formation of phytoene from geranylgeranyl pyrophosphate. Carotenoids can be acyclic or cyclic, and may or may not contain oxygen, so that the term carotenoid compounds includes both carotenes and xanthophylls. In general, carotenoids are hydrocarbon compounds having a conjugated polyene carbon skeleton formally derived from the five-carbon compound isopentyl pyrophosphate (IPP), including triterpenes (C₃₀ diapocarotenoids) and tetraterpenes (C₄₀ carotenoids) as well as their oxygenated derivatives and other compounds that are, for example, C₃₅, C₅₀, C₆₀, C₇₀, C₈₀ in length or other lengths. Many carotenoids have strong light absorbing properties and may range in length in excess of C₂₀₀. C₃₀ diapocarotenoids typically consist of six isoprenoid units joined in such a manner that the arrangement of isoprenoid units is reversed at the center of the molecule so that the two central methyl groups are in a 1,6-positional relationship and the remaining non-terminal methyl groups are in a 1,5-

positional relationship. Such C_{30} carotenoids may be formally derived from the acyclic $C_{30}H_{42}$ structure, having a long central chain of conjugated double bonds, by: (i) hydrogenation (ii) dehydrogenation, (iii) cyclization, (iv) oxidation, (v) esterification/glycosylation, or any combination of these processes. C_{40} carotenoids typically consist of eight isoprenoid units joined in such a manner that the arrangement of isoprenoid units is reversed at the center of the molecule so that the two central methyl groups are in a 1,6-positional relationship and the remaining non-terminal methyl groups are in a 1,5-positional relationship. Such C_{40} carotenoids may be formally derived from the acyclic $C_{40}H_{56}$ structure, having a long central chain of conjugated double bonds, by (i) hydrogenation, (ii) dehydrogenation, (iii) cyclization, (iv) oxidation, (v) esterification/glycosylation, or any combination of these processes. The class of C_{40} carotenoids also includes certain compounds that arise from rearrangements of the carbon skeleton, or by the (formal) removal of part of this structure. More than 600 different carotenoids have been identified in nature; carotenoids include but are not limited to: antheraxanthin, adonirubin, adonixanthin, astaxanthin, canthaxanthin, capsorubrin, β -cryptoxanthin, α -carotene, β -carotene, β,ψ -carotene, δ -carotene, ϵ -carotene, echinenone, 3-hydroxyechinenone, 3'-hydroxyechinenone, γ -carotene, ψ -carotene, 4-keto- γ -carotene, ζ -carotene, α -cryptoxanthin, deoxyflexixanthin, diatoxanthin, 7,8-didehydroastaxanthin, didehydrolycopene, fucoxanthin, fucoxanthinol, isorenieratene, β -isorenieratene, lactucaxanthin, lutein, lycopene, myxobactone, neoxanthin, neurosporene, hydroxyneurosporene, peridinin, phytoene, phytofluene, rhodopin, rhodopin glucoside, 4-keto-rubixanthin, siphonaxanthin, spheroidene, spheroidenone, spirilloxanthin, torulene, 4-keto-torulene, 3-hydroxy-4-keto-torulene, uriolide, uriolide acetate, violaxanthin, zeaxanthin- β -diglucoside, zeaxanthin, and C_{30} carotenoids. Additionally, carotenoid compounds include derivatives of these molecules, which may include hydroxy-, methoxy-, oxo-, epoxy-, carboxy-, or aldehydic functional groups. Further, included carotenoid compounds include ester (e. g., glycoside ester, fatty acid ester) and sulfate derivatives (e. g., esterified xanthophylls).

[0012] *Commercial product:* As used herein, a "commercial product" is a product that is sold in commerce.

[0013] *Commercially relevant fermentation product:* As used herein, the phrase "commercially relevant fermentation product" refers to a compound or other agent that is

produced by fermentation of a filamentous organism and is useful in production of a commercial product. In some embodiments of the disclosure, the compound or other agent itself, and/or the cell that produces it, is a commercial product; in some embodiments, a compound or other agent is derivatized to generate a commercial product; in some embodiments, a compound or other agent, derivative thereof, and/or producing cell, is combined together with one or more other ingredients or components, to generate a commercial product. To give but a few examples, compounds, agents, derivatives and/or cells may be combined with other ingredients or components to produce, for example, laundry and dishwashing detergents, foods and animal feeds, baked goods, lens cleaners, cosmetics, surfactants, solvents, fibers, flocculants for waste water treatment, gums for industrial and food applications, bacteriostatic agents in a variety of applications, soaps, shampoos, papers, and coatings, among others.

[0014] *Derivative:* The term "derivative" as used herein means a compound whose structure is closely related to that of the parent compound of which it is a "derivative" and that can be produced from the parent molecule by any number of processes including physical treatments, fermentation, biocatalysis, chemical transformation and combinations thereof. To give but a few examples, exemplary derivatives of organic acids include hydrogenated forms of the compounds and/or esters (e.g., dibasic esters) and diamines of organic acids. Also, in some embodiments, polymers of organic acids, including biodegradable polymers (see for example Zeikus et al. (1999) Appl Microbiol Biotechnol 51: 545-552 which is hereby incorporated by reference in its entirety), are considered to be derivatives of organic acids. Particular compounds that are considered to be derivatives of organic acids according to the present disclosure include, for example, tetrahydrofuran (THF), butanediol (e.g. 1,4-butanediol), γ -butyrolactone, pyrrolidinones (e.g. N-methyl-2-pyrrolidone), 4,4-Bionelle, hydroxybutyric acid, succindiamide, 1,4-diaminobutane, and succinonitrile, hydroxybutyrolactone, hydroxysuccinate, adipic acid, and unsaturated succinate derivatives. Exemplary "derivatives" of carotenoid compounds include, but are not limited to, glycoside and fatty acid esters of carotenoids and oil emulsions containing carotenoid compounds. Exemplary "derivatives" of fatty acids include, but are not limited to, esters of fatty acids such as biological oils (e.g. triglycerides). To give but a few examples, exemplary "derivatives" of extracellular carbohydrates include, but are not limited to, modified polysaccharides containing one or more than one of $\beta 1 \rightarrow 4$ -linked sugars (e.g. hexoses,

13

pentoses), $\beta 1 \rightarrow 4$ -linked amino sugars (e.g. glucosamine, galactosamine, N-acetylglucosamine), or covalently linked (e.g. $\beta 1 \rightarrow 3$, $\beta 1 \rightarrow 6$) sugar-containing side chains. Exemplary "derivatives" of industrial enzymes typically are proteins that share significant sequence identity with the parent enzyme and particularly include a set of shared characteristic sequence elements. In many embodiments, a derivative of an industrial enzyme will include at least about 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or more overall sequence identity and further more will include at least one characteristic sequence element comprising a stretch of at least 5-15 amino acids that shows at least about 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% identity with the parent enzyme. Typically, the characteristic sequence element will include a plurality of residues involved in catalysis. An exemplary "derivative" of an active pharmaceutical ingredient is a pro-drug of the active form of the compound.

[0015] *Fermentation Conditions*: "Fermentation conditions", as that term is used herein, refers to defined parameters utilized in liquid growth of pellet-forming organisms. Specific parameters that contribute to fermentation conditions include, but are not limited to, medium composition (including substances such as surfactants and particulate materials, identity of carbon source, etc), pH, temperature, duration of culturing, aeration and/or mechanical agitation, and inoculum quantity and form (e.g. spores or vegetative culture). In many embodiments, fermentation conditions are designed and/or selected to promote the accumulation of one or more desired fermentation products such as one or more organic acids, carotenoid compounds, fatty acids, extracellular carbohydrates, industrial enzymes, active pharmaceutical ingredients, or insecticidal compounds. In many embodiments, fermentation conditions used for sorting are substantially identical to those used for industrial production of a particular commercially relevant fermentation product.

[0016] *Genetically Engineered*: A microorganism that has been "genetically engineered", as that term is used herein, is one whose genetic material has been manipulated by the hand of man. *Homogeneous*: As used herein, "homogeneous" and "homogeneity" refer to how closely clustered are the values determined for a given parameter analyzed from a set of fungal pellets. Homogeneity can be determined by assessing the standard deviation of a sample set. In comparing different sample sets, a smaller standard deviation value indicates greater homogeneity. Standard deviation can be determined for a sample set, wherein the number of

14

samples in the set provides a confidence level of at least 90%, and in many cases at least 95%, in the determination. Typically, at least 3 samples can be used. Where multiple samples sets are used, e.g., both a control sample set and a test sample set, each set can contain the same number of samples, e.g., at least 3 samples each.

[0017] *Improved size and Improved density:* As used herein, an "improved size" refers to a finding that fungal pellets of a treated sample set, in comparison to those of a control sample set, exhibit an increased proportion of pellets whose diameter is from 100-175 microns, and, when comparing multiple fungal pellet sample sets that both exhibit about the same percentage of pellets falling within this range, that further exhibit a more homogeneous pellet diameter throughout the sample population. The diameter measured for each pellet can be the major diameter or a representative or approximate average diameter thereof.

[0018] As used herein, an "improved density" refers to a finding that fungal pellets of a treated sample set, in comparison to those of a control sample set, exhibit an increased proportion of pellets whose optical density falls within a range of 33-100% of the maximum optical density found for pellets in the sample population, and, when comparing multiple fungal pellet sample sets that both exhibit about the same percentage of pellets falling within this range, that further exhibit a more homogeneous optical density value for pellets throughout the sample population. This is based on optical density measurements for individual pellets. In various embodiments, optical density can be assessed by measuring Extinction, and the relevant comparison window is then 33-100% of maximum Extinction found for pellets in the sample population. Extinction can be measured according to any of various methods known in the art and this can be done by detection of photo-transmission (or absorbance) of the pellets, e.g., densitometry. Any useful wavelength(s) can be employed for this; some useful examples include 515 nm, 545 nm, and 610 nm, and combinations thereof. Extinction can also be measured according to manufacturer's instructions accompanying various analytical instruments, such as the COPAS™ instruments (available from Union Biometrica, Holliston, MA, USA). Other examples of useful protocols for extinction measurements that can be readily adapted for fungal pellet measurement include those described in: T. Kodadek & K. Bachhawat-Sikder, "Optimized protocols for the isolation of specific protein-binding peptides or peptoids from combinatorial libraries displayed on beads," *Molecular BioSystems* 2(1):25ff. (2006); US Patent

Publication No. 2007/0298411 to Choo for "Cell Culture" (see Ex. 11); and R. Pulak, "Techniques for Analysis, Sorting, and Dispensing of *C. elegans* on the COPAS™ Flow-Sorting System," in K. Strange (ed.), *C. elegans: Methods and Applications*, pp. 275-286, in series J.M. Walker (series ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 351 (Aug. 15, 2006).

[0019] Such size and/or density measurements can be performed mechanically, e.g., by obtaining an optical signal that is proportion to the selected parameter of size or density, although in alternative embodiments visual inspection can be employed. Various analytical techniques and instruments for such optical signal measurements are known from the fields of spectrometry, flow cytometry, and densitometry. In some embodiments, optical signals can be obtained from the pellets without labeling. For example, fungal pellets can be stimulated to emit an inherent fluorescence signal. In other embodiments, labeling, e.g., with dye or other detectable label, can be used, and this can be a fluorescent dye. In order to prepare optical signal data for comparison of sample populations, the data can be first converted to size or density values that are then used in performing the comparison, or the optical signal data can be used therein without prior conversion. The order of such steps is non-limiting in embodiments hereof. In some embodiments hereof, filamentous fungal cells can be employed that are not part of a pellet, but can be part of a hypha, cell agglomerate, or other fungal form, or can be solitary anamorphs; however, in any embodiments in which a cell is described for use herein, the cell can be situated as part of a pellet that is provided, treated to produce treated cells thereof, propagated to produce progeny pellets therefrom, or otherwise manipulated according to the description.

[0020] *Mutagenic Protocol*: A "mutagenic protocol", as that term is used herein, refers to steps applied to a parent cell or strain to produce progeny cells or strains that contain one or more genetic differences from the parent. In some embodiments, a mutagenic protocol involves introduction of one or more nucleic acids into the progeny cells; in some embodiments, a mutagenic protocol involves application of a chemical or other (e.g., radiation such as UV-radiation, etc.) mutagen to a parent cell or strain; in some embodiments, a mutagenic protocol involves replication of target DNA in a cell with impaired DNA repair enzymes.

[0021] *Pellet-Forming Microorganism*: As used herein, the term "pellet-forming microorganism" is intended to refer to a fungus or bacterium that exhibits pellet-form growth. Typically, a pellet-forming microorganism forms pellets on the order of approximately 75-500

microns in diameter, which may ultimately achieve a pellet size of 1-2 millimeters by the end of fermentation. In many embodiments, a pellet-forming microorganism is a non-coagulative pellet-forming microorganism, meaning that, when cultured under fermentation conditions, its pellets are formed from a single or very small number (e.g., fewer than 5, 4, 3, or 2) of cells rather than from the agglomeration and subsequent growth of a significant number (e.g., greater than 10 or more) of spores and/or hyphae to form clumps. In some embodiments, a single pellet is formed from growth of a single spore. Non-coagulative pellet-forming microorganisms are particularly useful in the practice of the present disclosure because pellets formed from a single spore are genetically homogeneous (i.e., clonal). The present invention encompasses the recognition that the tendency of non-coagulative pellet-forming microorganisms to generate clumps formed from only one spore can be exploited in order to allow separation of genetically distinct progeny cells after mutagenesis of a parent cell. By contrast, if progeny of a mutagenized parent cell form agglomerations or clumps, such agglomerations or clumps typically contain genetically heterogeneous cells, resulting from growth of genetically heterogeneous spores.

Description of Certain Preferred Embodiments

[0022] As described herein, the present disclosure provides methodologies for identifying, categorizing, and/or physically sorting pellet-forming microorganisms based on an optically detectable property.

Pellet-Forming Microorganisms

[0023] The strategies of the present disclosure are applicable to any pellet-forming microorganism. In many embodiments, these techniques are applied to pellet-forming bacteria and/or to pellet-forming fungi (e.g., filamentous fungi). In some embodiments, the pellet-forming microorganisms are unicellular; in some embodiments, the pellet-forming microorganisms are multicellular. In some embodiments of the present disclosure, a mixture of pellet-forming microorganisms to be sorted includes both unicellular and multicellular organisms. In some embodiments, individual cells of a pellet-forming microorganism may be multinucleate.

[0024] For example, pellet-forming microorganisms that may be utilized in accordance with the present disclosure include, for example, filamentous fungi and filamentous bacteria.

[0025] Representative filamentous fungi include, but are not limited to, filamentous fungi of the genus *Acremonium*, *Aspergillus*, *Blakeslea*, *Emericella*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Nodulisporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phycomyces*, *Rhizopus*, or *Trichoderma*. In some embodiments, the present disclosure utilizes filamentous fungi of the species *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Mortierella alpina*, *Paecilomyces sp*, *Rhizopus oryzae*, or *Trichoderma reesei*.

[0026] Representative filamentous bacteria include, but are not limited to, filamentous bacteria of the genus *Actinosynnema*, *Amycolaptopsis*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, or *Streptomyces*. In some particular embodiments, the present disclosure utilizes filamentous bacteria of the species *Actinosynnema pretiosum*, *Amycolaptopsis orientalis*, *Nocardia farcinica*, *Rhodococcus erythropolis*, *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces clavuligerus*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces tsukubaensis*, or *Streptomyces venezuelae*.

[0027] In general, the present disclosure is particularly applicable to sorting samples containing genetically diverse microorganisms. In some embodiments of the present disclosure, utilized pellet-forming microorganisms are wild type form. It will be appreciated by those of ordinary skill in the art that the wild-type form need not be homogeneous (e.g., clonal); in some embodiments of the present invention, therefore, a wild type sample that comprises natural heterogeneity is sorted. In many embodiments, however, the sample to be sorted includes at least some microorganisms that have been genetically engineered. In some embodiments, a sample to be sorted contains microorganisms related as progeny produced through application of a mutagenic protocol to a parent microorganism.

[0028] In some embodiments of the present disclosure, at least some of the microorganisms in a sample to be analyzed and/or sorted as described herein produce at least one commercially relevant fermentation product (including, for example, precursors of or intermediates to commercial products or components thereof). In some embodiments, a sample includes genetically diverse microorganisms that differ in their ability to produce the fermentation

product(s). For example, in some embodiments, a sample includes both a parent microorganism and at least one progeny microorganism generated through application of a mutagenic protocol, wherein the progeny microorganism differs from the parent in its ability to produce the fermentation product (e.g., the parent microorganism does not produce the product, or the progeny produces more of the product than the parent microorganism under identical fermentation conditions).

[0029] For example, representative commercially relevant fermentation products that may be produced by microorganisms utilized in accordance with the present disclosure include, but are not limited to, organic acids, carotenoid compounds, essential fatty acids, industrial enzymes, active pharmaceutical ingredients, extracellular carbohydrates, insecticidal compounds, derivatives thereof, etc., and combinations thereof.

[0030] Exemplary organic acids that may be produced as described herein include, for example, C2-C6 mono- and di-carboxylic acids, C3-C6 tri-carboxylic acids, acetic acid, butyric acid, citraconic acid, citric acid, fumaric acid, glycolic acid, hydroxybutyric acid, isocitric acid, itaconic acid, lactic acid, maleic acid, malic acid, malonic acid, oxaloacetic acid, propionic acid, pyruvic acid, succinic acid, tartaric acid, tartronic acid, tricarballic acid, derivatives thereof, and combinations of any of the foregoing.

[0031] Exemplary carotenoid compounds that may be produced as described herein include, for example, astaxanthin, beta-carotene, canthaxanthin, lycopene, lutein, phytoene, phytofluene, zeaxanthin, derivatives thereof, and combinations of any of the foregoing.

[0032] Exemplary essential fatty acids that may be produced as described herein include, for example, linoleic acid (e.g. conjugated linoleic acid), arachidonic acid (ARA), docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA), derivatives thereof, and combinations of any of the foregoing.

[0033] Exemplary industrial enzymes that may be produced as described herein include, for example, carbohydrases, including but not limited to alpha-amylase, beta-amylase, cellulase, beta-glucanase, beta-glucosidase, dextranase, dextrinase, alpha-galactosidase (melibiase), glucoamylase, hemicellulase, invertase, laccase, naringinase, pentosanase, pectinase, pullulanase, and xylanase; proteases, including but not limited to, trypsin, acid proteinase, alkaline protease, bromelain, and pepsin; peptidases, including but not limited to, aminopeptidase, endo-peptidase, and subtilisin;

lipases and esterases, including but not limited to, aminocyclase, glutaminase, lysozyme, penicillin acylase, and isomerases; oxidoreductases, including but not limited to, alcohol dehydrogenase, amino acid oxidase, catalase, chloroperoxidase, and peroxidase; lyases, including but not limited to, acetolactate decarboxylase, aspartic β -decarboxylase, and histidase; transferases, including but not limited to, cyclodextrin glycosyltransferase; phytases; derivatives thereof, and combinations of any of the foregoing.

[0034] Exemplary active pharmaceutical ingredients that may be produced as described herein include, for example, metabolites, e.g., cytotoxic metabolites, e.g., anti-bacterial agents. An "anti-bacterial" is a molecule that has cytocidal or cytostatic activity against some or all bacteria. Anti-bacterials include, without limitation, β -lactams; β -lactamase inhibitors such as clavulanic acid; aminoglycosides such as gentamycin, neomycin, streptomycin and tobramycin; ansamycins such as geldanamycin, rifamycin, and ansamitocin; glycopeptides such as teicoplanin and vancomycin; macrolides such as erythromycin, azithromycin, and clarithromycin; polypeptides such as bacitracin, colistin and polymyxin B; and tetracyclines such as doxycycline, minocycline, and oxytetracycline. β -lactams include, without limitation, penicillins and cephalosporins and biosynthetic intermediates thereof. Penicillins and biosynthetic intermediates include, without limitation, isopenicillin N, 6-aminopenicillanic acid (6-APA), penicillin G, penicillin N, and penicillin V. Cephalosporins and biosynthetic intermediates include, without limitation, deacetoxycephalosporin V (DAOC V), deacetoxycephalosporin C (DAOC), deacetylcephalosporin C (DAC), 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid (7-ADCA), cephalosporin C, 7-B -(5-carboxy-5-oxopentanamido)-cephalosporanic acid (keto-AD-7ACA), 7-B -(4-carboxybutanamido)-cephalosporanic acid (GL-7ACA), and 7-aminocephalosporanic acid (7ACA).

[0035] In certain embodiments of the disclosure, the active pharmaceutical ingredient is an anti-hypercholesterolemic or a biosynthetic intermediate thereof. An "anti-hypercholesterolemic" is a drug administered to a patient diagnosed with elevated cholesterol levels, for the purpose of lowering the cholesterol levels. Anti-hypercholesterolemics include statins, which include, without limitation, atorvastatin, rosuvastatin, fluvastatin lovastatin, mevastatin (compactin), simvastatin, cerivastatin, pitavastatin, and pravastatin.

20

[0036] In certain embodiments of the disclosure, the active pharmaceutical ingredient is an immunosuppressant or a biosynthetic intermediate thereof. An "immunosuppressant" is a molecule that reduces or eliminates an immune response in a host when the host is challenged with an immunogenic molecule, including immunogenic molecules present on transplanted organs, tissues or cells. Immunosuppressants include, without limitation, members of the cyclosporin family, mycophenolic acid, rapamycin, tacrolimus, sirolimus and beauverolide L. Cyclosporins include, without limitation, cyclosporin A and cyclosporin C.

[0037] In certain embodiments of the disclosure, the active pharmaceutical ingredient is an ergot alkaloid or a biosynthetic intermediate thereof. An "ergot alkaloid" is a member of a large family of alkaloid compounds that are most often produced in the sclerotia of fungi of the genus *Claviceps*. An "alkaloid" is a small molecule that contains nitrogen and has basic pH characteristics. The classes of ergot alkaloids include clavine alkaloids, lysergic acids, lysergic acid amides, and ergot peptide alkaloids. Ergot alkaloids include, without limitation, ergotamine, ergosine, ergocristine, ergocryptine, ergocornine, ergotaminine, ergosinine, ergocristinine, ergocryptinine, ergocorninine, ergonovine, ergometrine, and ergoclavine.

[0038] In certain embodiments of the disclosure, the active pharmaceutical ingredient is an inhibitor of angiogenesis or a biosynthetic intermediate thereof. An "angiogenesis inhibitor" is a molecule that decreases or prevents the formation of new blood vessels. Angiogenesis inhibitors have proven effective in the treatment of several human diseases including, without limitation, cancer, rheumatoid arthritis, and diabetic retinopathy. Inhibitors of angiogenesis include, without limitation, fumagillin and ovalicin.

[0039] In certain embodiments of the disclosure, the active pharmaceutical ingredient is a glucan synthase inhibitor or a biosynthetic intermediate thereof. A "glucan synthase inhibitor" is a molecule that decreases or inhibits the production of 1,3- β -D-glucan, a structural polymer of fungal cell walls. Glucan synthase inhibitors are a class of antifungal agents. Preferred glucan synthase inhibitors include, without limitation, echinocandin B, pneumocandin B, aculeacin A, and papulacandin.

[0040] In certain embodiments of the disclosure, the active pharmaceutical ingredient is an anti-neoplastic compound or a biosynthetic intermediate thereof. An "anti-neoplastic" compound

is a molecule that prevents or reduces tumor formation. Anti-neoplastic compounds include, without limitation, taxol (paclitaxel) and related taxoids.

[0041] Exemplary insecticidal compounds include, but are not limited to, avermectin and nodulisporic acid.

[0042] Exemplary extracellular carbohydrates that may be produced as described herein include, for example, chitin, chitosan, N-acetylglucosamine, glucosamine, polygalactosamine, pullulan, scleroglucan, derivatives thereof, and combinations of any of the foregoing.

[0043] Typically, pellet-forming microorganisms for use in accordance with the present disclosure are grown under conditions that support pellet-form growth, such that the sample that is analyzed includes organisms in pellet form. As will be appreciated by those of ordinary skill in the art, a variety of different parameters can impact whether and to what extent a particular microorganism grows in a pelleted or mycelial form. Furthermore, by varying one or more of these fermentation condition parameters, it is possible to impact whether a particular pellet-forming microorganism grows as a non-coagulative pellet-forming microorganism or rather forms clumps as the result of agglomeration of a significant number of spores and/or hyphae.

[0044] To give but a few examples, the concentration of the inoculum can profoundly influence both whether a microorganism grows in mycelial form or in pellet form, and further can influence whether it forms non-coagulative pellets clumps. In general, for filamentous organisms, lower concentration inocula are more likely to promote growth in a mycelial form than pellet-form growth. Increased concentrations of inocula are more likely to result in pellet-form growth. In general, extremely high inocula result in clumping, whereas, within a given range of fairly high inocula, it is often possible to promote non-coagulative pellet-form growth. Those of ordinary skill in the art will appreciate, however, that the absolute amount of inoculum that will promote pellet formation can vary widely across organisms and fermentation processes. For example, in some embodiments, pellets are formed over a spore concentration range of about 1.0×10^4 to about 1.0×10^6 spores/ml.

[0045] Other parameters that can affect pellet form growth include, for example, medium composition (including the presence or absence of substances such as specific cations, surfactants, and particulate materials and/or identity of carbon source), pH, temperature, duration of culturing, presence and/or degree of aeration and/or mechanical agitation.

[0046] Conditions that support pellet-form growth, particularly of filamentous microorganisms are well known in the art and are described, for example, in *Appl Biochem Biotechnol.* 2006 Sep;134(3):249-62, *Appl Biochem Biotechnol.* 2006 Spring;129-132:844-53, *J Eukaryot Microbiol.* 2006 May-Jun;53(3):199-203, *Microbiol Res.* 2005;160(4):375-83, *Biotechnol Prog.* 2005 Sep-Oct;21(5):1389-400, *Biotechnol Bioeng.* 2005 Dec 5;92(5):614-23, *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2005 Jun;32(6):227-33, *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005 Aug;68(3):305-10, *J Biotechnol.* 2005 Mar 2;116(1):61-77, *J Microbiol.* 2004 Mar;42(1):64-7, *Bioprocess Biosyst Eng.* 2004 Oct;26(5):315-23, *J Appl Microbiol.* 2004;96(6):1296-305, *Biotechnol Bioeng.* 2004 Jan 5;85(1):96-102, *J Appl Microbiol.* 2003;94(1):120-6, *Curr Microbiol.* 2003 Jan;46(1):24-7, *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001 Jun;55(6):704-11, *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001 Jul;56(1-2):88-92, *Appl Biochem Biotechnol.* 2000 Spring;84-86:779-89, *Biotechnol Prog.* 2000 Mar-Apr;16(2):222-7, *Biotechnol Bioeng.* 1999 May 20;63(4):442-8, *Biotechnol Bioeng.* 1998 Oct 20;60(2):216-29, *Biotechnol Bioeng.* 1998 Jun 5;58(5):478-85, *Enzyme Microb Technol.* 1996 Sep;19(4):261-6, *Biotechnol Prog.* 1995 Jan-Feb;11(1):93-8, *Appl Microbiol Biotechnol.* 1992 May;37(2):157-63, *Biotechnol Bioeng.* 1977 ; 19:781-99, and United States Patent Application 20030215950.

Optical Parameters

[0047] As described herein, pellet-form microorganisms may be sorted based on any of a variety of optical parameters. For example, microorganisms may be sorted based on one or more optical parameters selected from the group consisting of size, optical density, presence and/or intensity of fluorescent emission, etc., and combinations thereof.

[0048] When microorganisms are sorted based on size, the microorganisms are sorted for a defined axial length which is defined by the time of flight of a single pellet across a fixed sensing zone of a flow cell. In brief, pellets are individually passed through the focus of a laser beam, and signals are recorded by a forward scatter detector and fluorescence detectors. Relative size, or time of flight (TOF), is measured by an axial light-loss detector, which records the time that the light blockage signal remains above a pre-set threshold level.

[0049] Sorting by pellet size is desirable, among other things, because pellet size can impact industrial scale fermentations in several manners, including but not limited to, altering oxygen transfer properties across both the entire culture and different regions of a given pellet and altering the energy requirements and cost for physically stirring and/or aerating the culture. Size can also be used as a readout for desirable properties, including but not limited to, enhanced ability to utilize a specific or complex substrate or the enhanced resistance of a given pellet to harsh culture conditions such as extreme pH (e.g., low or high pH), high osmolarity of either carbon source or fermentation product, presence of toxic product or biosynthetic intermediate or by-product, etc.

[0050] When microorganisms are sorted based on optical density of pellets, the optical density of a pellet, or optical extinction, is determined by the total integrated signal of the light blockage (as determined by an axial light-loss detector).

[0051] Sorting by optical density of pellets is desirable because, among other things, pellet optical density, like pellet size, can also impact industrial scale fermentation and can be a readout for other desirable (or undesirable) characteristics.

[0052] When microorganisms are sorted based on fluorescence, the fluorescence intensity can be simultaneously determined at one or more than one different wavelengths by excitation and emission filters. The relevant fluorescent emission may represent autofluorescence of the microorganisms or may alternatively (or additionally) reflect fluorescence of a particular fluorescent label associated with one or more of the microorganisms. For example, in some embodiments, a sample of microorganisms is contacted with a reagent that is covalently associated with a fluorescent label and that binds non-covalently (directly or indirectly) with one or more microorganism components. To give but one example, in some embodiments, a sample of microorganisms is contacted with a labeled antibody that binds specifically with one or more microorganism markers that may be expressed on or produced by only some of the microorganisms within a sample.

[0053] In some embodiments, a fluorescent label is associated with the exterior of a microorganism (e.g., via interaction with a cell surface component); in some embodiments, a fluorescent label is associated with the interior of a microorganism (e.g., having been taken up by

24

metabolizing or replicating cells, etc.). In some embodiments, a fluorescent label is associated with both the interior and the exterior of a microorganism.

[0054] In some embodiments, a sample of microorganisms contains more than one potential source of fluorescent emission. In some cases, a sample of microorganisms contains more than one fluorescent label. In some embodiments, fluorescence (and/or intensity) of more than one fluorophore is monitored and may provide a basis for sorting. In some embodiments, fluorescence intensity at one or more wavelengths is monitored in combination with size and/or optical density of the pellet-forming microorganism.

[0055] To give but a few specific examples of sources of fluorescent emission that may be utilized in accordance with the present disclosure, in some embodiments, the source of fluorescent emission may be a fluorescent dye that is an analog or derivative of a carbohydrate used for the cultivation of pellet-form microorganisms. In some such embodiments, the analog or derivative of a carbohydrate is an analog or derivative of glucose such as, for example, 2-NBDG (2-(*N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxy-D-glucose) or 6-NBDG (6-(*N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-6-deoxyglucose), or combinations thereof. Such glucose analogs can be employed as indicators of glucose uptake and perhaps overall metabolic activity. For example, pellet-forming microorganisms can be incubated with medium containing the fluorescent glucose (and generally lacking non-labelled glucose), then rinsed of the fluorescent medium and analyzed for fluorescent emission. Pellet-forming microorganisms that exhibit specific fluorescent intensities can be identified followed by excitation and emission at specific wavelengths (e.g. excitation at 488 nm and emission at 545 nm).

[0056] In some embodiments, the source of fluorescent emission may be a fluorescent dye that is an indicator of viability of pellet-form microorganisms. In some such embodiments, the indicator of viability is selected from the group consisting of acridine orange, FUN1 (2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenylquinolinium iodide), neutral red, propidium iodide, resazurin, trypan blue, and combinations thereof. As an example, FUN1 is a dye that forms red intravacuolar structures in live cells of many species of fungi. Both living and dead cells take up the FUN1 fluorescent probe when the plasma membrane is intact, and this dye is first seen as a diffuse green fluorescence in the cytosol of both live and dead cells. Subsequently, in metabolically active cells, FUN1 is transported into

the vacuole and converted into red cylindrical intravacuolar structures (CIVS). Pellet-forming microorganisms can be stained with FUN1 and sorted for pellet with the desired level of red fluorescence. The fluorescent intensity is believed to correlate with the metabolic activity of the pellets.

[0057] In some embodiments, the source of fluorescent emission may be a fluorescent dye that is an indicator of the intracellular pH of a pellet-form microorganism. In some such embodiments, the indicator of the intracellular pH is selected from the group consisting of SNAFL, SNARF 4F, SNARF 5F, and combinations thereof. SNARF 4F (seminaphthorhodafluor-4F 5-(and-6)-carboxylic acid), which is a fluorinated derivative of C-SNARF-1, and other related dyes (e.g. SNAFL and SNARF 5F) are fluorescent ratiometric probes that allow intracellular pH quantification independent of probe concentration and/or laser intensity. SNARF 4F dye has a pH dependent spectral shift such that it is excited at one wavelength and the emission is measured at two wavelengths. It is assumed that the dye exists as a mixture of two forms, the monoanionic (naphthol) and dianionic (naphtholate) states, between which a pH-sensitive equilibrium is established depending on the acidity or alkalinity of the solution or intracellular milieu. A ratio of fluorescence intensities for the two emission wavelengths is used to determine pH. Dyes that indicate intracellular pH can be useful for staining pellet-forming microorganisms. In some embodiments, a pH indicator can be used to identify pellets capable of maintaining a particular range of intracellular pH, even under conditions such as significant change in extracellular pH (e.g. pH less than 3.0) or the presence of other agents known to impact pH homeostasis (e.g. uncoupling agents).

[0058] In some embodiments, the source of fluorescent emission may be a fluorescent dye that is an indicator of mitochondrial activity (e.g., gradients, internal reduction-oxidation state, mass, etc.) of a pellet-forming microorganism. For example, a fluorescent dye may be differentially taken up by a microorganism based on differential chemical and/or potential gradients across a mitochondrial membrane. Alternatively or additionally, a fluorescent dye may be differentially taken up based on a different internal reduction-oxidation state. Yet also, some fluorescent dyes accumulate in the mitochondria based on mitochondrial size and therefore differentially stain microorganisms with different mitochondrial mass. In some embodiments, a fluorescent dye that is an indicator of mitochondrial size and/or activity is selected from the

group consisting of MitoTracker Green, MitoTracker Red, rhodamine 123, rhodamine B hexyl ester, SYTO 18, and combinations thereof.

[0059] MitoTracker Green and Mitotracker Red are two examples of fluorescent dyes that are sequestered in functioning mitochondria, and therefore the dyes can be employed to estimate mitochondrial size and/or activity. The cell-permeant MitoTracker probes contain a thiol-reactive chloromethyl moiety. Once a MitoTracker probe accumulates in the mitochondria, it can react with accessible thiol groups on peptides and proteins to form an aldehyde-fixable conjugate. Unlike other fluorescent dyes used to estimate mitochondrial size or activity (e.g. rhodamine 123), staining with MitoTracker Green or Red is generally thought to be retained under conditions where the mitochondrial membrane potential has been disturbed. Different chloromethyl moieties on the MitoTracker dyes exhibit different reactivities (and therefore sensitivities to loss of membrane potential). Furthermore, different MitoTracker probes exhibit varying fluorescent properties (e.g. fluorescence in aqueous environments prior to accumulation in mitochondria) and specific probes can also differentially impact specific cellular functions (e.g. respiration) when used to treat intact cells. In some embodiments, a dye that can be sequestered in functioning mitochondria can be used to identify pellets capable of exhibiting a particular range of metabolic activity (e.g. respiration) under specific growth conditions.

[0060] In some embodiments, the source of fluorescent emission may be a fluorescent dye that is an indicator of the intracellular lipid or polyhydroxyalkanoate level. In some such embodiments, the fluorescent dye is Nile red.

[0061] In some embodiments, the source of fluorescent emission may be a fluorescent dye that is an indicator of extracellular carbohydrate levels. For example, in some such embodiments, the dye is a fluorescent conjugate of wheat germ agglutinin, concanavalin A, or calcofluor.

[0062] In some embodiments, the source of fluorescent emission may be a fluorescent dye that is an indicator of cytoplasmic membrane potential. For example, in some such embodiments, the dye is DiOC₆, bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol (DiBAC₄(3)), or combinations thereof. Carbocyanines, such as DiOC₆, are examples of dyes that can be used as indicators of membrane potential in cytoplasmic and other membranes. These cationic dyes accumulate on hyperpolarized membranes and are translocated into the lipid bilayer.

27

Aggregation within the confined membrane interior usually results in decreased fluorescence and absorption shifts, although the magnitude and even the direction of the fluorescence response is strongly dependent on the concentration of the dye and its structural characteristics. In many instances, carbocyanine fluorescence is dependent not only on the membrane potential, but also on cell size. Membrane potential dyes can be utilized to both examine changes in membrane potential as well as to follow significant alterations in membrane levels and/or structure (e.g. apoptosis). In some embodiments, a membrane potential dye can be used to identify pellets that exhibit a specific range of hyperpolarized membranes.

[0063] In some embodiments, microorganisms are sorted based on more than one optically detectable parameters, e.g., at least two parameters, e.g., at least two parameters of intensity of fluorescent emission.

Sorting Pellet-Form Microorganisms Based on Optical Parameters

[0064] According to the present disclosure, it is desirable to identify, analyze, and/or sort pellet-forming microorganisms in liquid culture. In many embodiments, it is desirable to sort pellet-forming microorganisms in liquid culture under conditions similar or identical to those used for industrial scale fermentation (e.g., for production of one or more commercially relevant fermentation products). By contrast, many standard techniques for characterizing or sorting (e.g., by screen or selection) microorganisms rely on growth on agar plates (for example that contain an indicator or selector). The present disclosure encompasses the recognition that such techniques suffer from the disadvantage that a microorganism's germination or growth behavior on agar plates may differ substantially from its behavior in liquid culture, and in particular under fermentation conditions.

[0065] Those of ordinary skill in the art will appreciate that any of a variety of liquid culture conditions can be employed in the practice of the present invention, and will particularly appreciate those parameters that might be varied in order to achieve conditions appropriate for industrial scale fermentation of a particular organism to produce a particular product. To give but a few examples, temperature, pressure, pH, osmolarity, osmolality, carbon source (e.g., use of glucose or non-glucose carbon sources such as, for example, fructose [e.g., fructose syrup], galactose, glycerol, oils, sucrose, triglycerides, etc), other aspects of medium composition (e.g.,

including presence, amount, and/or identity of substances such as surfactants and particulate materials, etc.), culture density, culture volume, duration of culturing, aeration and/or mechanical agitation, inoculum quantity and form (e.g. spores or vegetative culture), etc can be adjusted to optimize extent of production, identity or relative amounts of produced products, extent or nature of pellet formation, cost, or other desirable parameter or aspect of industrial processing.

[0066] Of course, technologies are available for sorting cells in liquid culture. For example, the fluorescence-activated cell sorter (FACS) is a powerful, useful tool that allows researchers to analyze single cell populations and to sort them based on a particular characteristic. In most such devices, a suspension of single cells is passed by one or more focused lasers that excite fluorescent markers that are present in or on some, but not all, of the cells in the suspension. Fluorescent radiation is then collected and analyzed, so that cells that do or do not have the relevant marker(s) are distinguished from one another. Cells are then sorted through application of an acoustic vibration to the stream, which separates the stream into droplets. An electric charge is then applied to those droplets that contain cells of interest (e.g., that do or do not have a particular marker), as determined in advance by the operator. Charged and uncharged droplets are then diverted toward different collection vials via a static electric field.

[0067] Standard FACSs cannot sort pellet-form organisms, however. Among other problems, conventional FACSs cannot handle objects of the size of a typical pellet. Depending on the microorganism, fermentation conditions, and time period of a fermentation, pellet-forming microorganisms typically exhibit a pellet size range between 50 and 2000 microns in diameter. In most embodiments, pellet-forming microorganisms to be sorted range between 75 and 500 microns in diameter. In particular embodiments, pellet-forming microorganisms to be sorted range between 50 and 200 microns in diameter.

[0068] The present disclosure encompasses the recognition that pellet-forming microorganisms can be efficiently sorted through use of a flow cytometer that utilizes large bore microfluidics, so that pellet-forming microorganisms can pass through. In some embodiments of the present disclosure, a flow cytometer is utilized that has a microfluidics bore size capable of sorting pellets within the range of about 100 to 250 microns in diameter. In some embodiments of the present disclosure, a flow cytometer is utilized that has a microfluidics bore size capable of sorting pellets within the range of about 40 to 200 microns in diameter. In some embodiments

of the present disclosure, a flow cytometer is utilized that has a microfluidics bore size capable of sorting pellets within the range of about 100 to 600 microns in diameter.

[0069] The present disclosure encompasses the recognition that pellet-forming microorganisms can be diverted without use of electric charge, which can potentially damage such microorganisms. In some embodiments, the present disclosure utilizes a flow cytometer that diverts organisms with a fluidic switch comprised of a pulse of air that alters fluid flow.

[0070] One particular example of a flow cytometer that utilizes a fluidic switch and can be utilized in accordance with the present disclosure is described in, for example, in one or more of United States patent 6,400,453, United States patent 7,116,407, PCT Patent Application WO 200/36396, PCT Patent Application WO 2002/066960, and/or PCT Patent Application WO 2003/016875, each of which is incorporated herein by reference in its entirety. Exemplary such instruments (e.g., COPAS instruments) are available from Union Biometrica, Inc (Somerville, MA). These instruments were designed for application to multicellular test organisms such as nematodes, *Drosophila* larvae, plant seeds or zebrafish, as well as inanimate objects such as beads; the present inventors demonstrate herein that they can be utilized to sort pellet-forming microorganisms, including bacteria and fungi.

[0071] In the Union Biometrica device, items passing through a flow cell are pneumatically diverted by application of a puff of air (see Figure 1). Specifically, a sample containing objects to be sorted is flowed into a pre-analysis chamber where it is surrounded by a sheath solution to generate a stabilized laminar flow. The sample then flows through a sensing zone, where different lasers can be directed at the sample to excite fluorophores and/or allow measurement of other optical properties (e.g., optical density). Objects that meet specified criteria are flowed into collection vessels, while objects that do not meet the specified criteria are diverted, by application of a puff of air, to a waste or other sample container. The Union Biometrica device typically uses a red diode laser (670 nm) to measure size and/or optical density, and a multi-line argon laser to excite use-selected fluorophores.

[0072] In other embodiments, a flow cytometer such as that described in United States Patent 6,482,652 can be utilized. In such a flow cytometer fluid flow is not diverted, but rather alternative collection tubes are positioned under the fluid flow stream depending on the classification of items present in the stream. Alternatively or additionally, instruments available

from Becton Dickinson and Company, such as the FACStar Plus and/or the FACScaliber, which are available with special flowcells with larger than normal (i.e., approximately 70 micron) flow channels, can be utilized. These instruments are intended for use with samples suspended in water, buffer or biological saline.

[0073] In many embodiments, a flow cytometer utilized to identify, analyze, and/or sort pellet-form microorganisms according to the present disclosure includes at least one sensor system that allows detection and/or measurement of at least one optical parameter of pellet-form microorganisms.

[0074] For example, in some embodiments, a flow cytometer includes at least one sensor system that allows detection and/or measurement of size and/or optical density of pellet-form microorganisms. In some embodiments, such a sensor system comprises a red diode laser (670 nm) together with a red filter and PIN photodiode detector and a multiline argon laser (488 nm and 514 nm), which are coupled with specific filters and emission detectors. In some embodiments, dsRed (red fluorescent protein), YFP (yellow fluorescent protein), and GFP (green fluorescent protein) filters are used in conjunction with photomultiplier tubes to monitor fluorescent emission at 610 nm, 545 nm, and 510 nm, respectively.

[0075] Alternatively or additionally, a flow cytometer for use in accordance with the present disclosure may include at least one sensor system that allows detection and/or measurement of fluorescent radiation associated with pellet-forming microorganisms. Such a sensor system typically includes a laser or other radiation source for exciting particular fluorophores. In many embodiments, such a sensor system includes a plurality of lasers or other radiation sources so that multiple fluorophores can be excited. In some embodiments, a flow cytometer for use in accordance with the present disclosure includes at least one blue/green laser (e.g., one argon laser). In some embodiments, a multi-line argon laser (488 nm and 514 nm) is used in conjunction with specific filters and emission detectors. In some embodiments, dsRed, YFP, and GFP filters are used together with photomultiplier tubes to monitor fluorescent emission at 610 nm, 545 nm, and 510 nm, respectively.

[0076] In some embodiments, a flow cytometer for use in accordance with the present disclosure includes at least one sensor system that allows detection and/or measurement of a parameter selected from the group consisting of size, cell density, and combinations thereof, and

further includes at least one sensor system that allows detection and/or measurement of fluorescent radiation associated with pellet-forming microorganisms.

Applications

[0077] The present disclosure can be used to identify, analyze, and/or sort pellet-forming microorganisms for any purpose. To give but a few examples, the present disclosure is useful when it is desirable to distinguish microorganisms from one another. In some instances, the microorganisms to be distinguished may be different strains of a same species; in some instances, the microorganisms to be distinguished may represent one or more different progeny lines of the same parent exposed to at least one mutagenic protocol.

[0078] In some embodiments of the present disclosure, microorganisms that are identified, characterized, and/or isolated according to the techniques described herein are subsequently cultivated to allow production of a particular product. For example, representative commercially relevant fermentation products that may be produced by microorganisms utilized in accordance with the present disclosure include, but are not limited to, organic acids, carotenoid compounds, essential fatty acids, industrial enzymes, active pharmaceutical ingredients, extracellular carbohydrates, insecticidal compounds, etc., and combinations thereof (see discussion above).

[0079] In some embodiments, it may be desirable to identify a particular progeny microorganism that has improved production characteristics in regard to at least one commercially relevant fermentation product as compared with a parent microorganism. In some embodiments, the parent microorganism is subjected to at least one mutagenic protocol to generate progeny microorganisms; at least one sample containing at least one such progeny microorganism is subjected to analysis and/or sorting as described herein, and sorted progeny is/are used to produce a commercial product. In some embodiments, the basis for sorting is intended to reflect an improved production characteristic with regard to the commercially relevant fermentation product. It is not necessary that the basis for sorting be a direct measure of the improved production characteristic; in many embodiments, however, the sorting basis will act as a proxy for (i.e., correlate with) a desirable production characteristic of interest.

[0080] In some embodiments of the present invention, identified organisms are utilized to produce one or more commercially relevant fermentation products. In some embodiments, one

or more produced compounds is/are isolated and directly used for commercial application. In some embodiments, one or more produced compounds is/are derivatized or otherwise modified before being utilized in commercial application. In some embodiments, one or more produced compounds or derivatives thereof is combined with additional ingredients or components before commercial application.

To give but a few examples, compounds and/or derivatives thereof produced by pellet-forming microorganisms as described herein may be combined with other ingredients or components to produce, for example, laundry and dishwashing detergents, foods and animal feeds, baked goods, lens cleaners, cosmetics, surfactants, solvents, fibers, flocculants for waste water treatment, gums for industrial and food applications, bacteriostatic agents in a variety of applications, soaps, shampoos, papers, and coatings, among others.

Additional embodiments

[0081] The methods described herein can be used to identify pellet-forming microorganisms that are characterized by a particular feature. Microorganisms can be treated to induce a phenotypic change in the cells, and progeny of the treated cells selected based on a parameter that can be correlated with the feature of interest.

[0082] In certain embodiments, the present disclosure provides a method for identifying a fungal strain having an increased capacity for organic acid biosynthesis or tolerance. The method includes, for example, providing at least one pellet-forming filamentous fungus; applying to cells of the fungus at least one treatment capable of inducing a phenotypic change in the cells, thereby forming at least one treated cell; culturing the treated cell under conditions in which a population of progeny pellets is propagated from the cell; contacting progeny pellets of the population with at least one detectable label that provides an optical signal whose magnitude is proportional to a parameter selected from the group consisting of carbohydrate uptake by, mitochondrial volume of, mitochondrial function in, and intracellular pH of the fungus, and combinations thereof, thereby forming at least one labeled pellet; detecting an optical signal from the at least one labeled pellet, thereby obtaining a test optical signal specific to the labeled pellet; comparing the test optical signal with a control optical signal produced under equivalent conditions by a control pellet of the filamentous fungus that has been contacted with the

detectable label of step; identifying those pellets exhibiting a test optical signal that is different from the control optical signal; correlating the difference in optical signal with an increase in organic acid biosynthesis or tolerance (e.g., wherein the difference is a statistical average of a plurality of differences), thereby identifying at least one fungal strain having an increased capacity for organic acid biosynthesis or tolerance.

[0083] In some embodiments, the treatment to induce a phenotypic change comprises a genetic modification. In some embodiments, the organic acid is selected from the group consisting of C2-C6 mono- and di-carboxylic acids, C3-C6 tri-carboxylic acids, and combinations thereof. In some embodiments, the organic acid is selected from the group consisting of acetic, glycolic, lactic, propionic, pyruvic, butyric, hydroxybutyric, oxaloacetic, malonic, tartaric, tartronic, succinic, malic, maleic, fumaric, itaconic, citraconic, tricarballic, isocitric, and citric acids, and combinations thereof.

[0084] In some embodiments, the parameter comprises carbohydrate uptake, and the carbohydrate is selected from the group consisting of monosaccharides, disaccharides, trisaccharides, oligosaccharides, and glycerol, and combinations thereof.

[0085] The present disclosure also features a method for identifying a fungal strain having an increased cultivatability in stirred tank reactor. The method includes, for example, providing at least one pellet-forming filamentous fungus; applying to cells of the fungus at least one treatment capable of inducing a phenotypic change in the cells, thereby forming at least one treated cell; culturing the treated cell under conditions in which a population of progeny pellets is propagated from the cell; detecting an optical signal from a progeny pellet of the population, which signal is proportional to pellet size or density, thereby obtaining a test optical signal specific to the progeny pellet; repeating the detecting to produce a set of test optical signals for progeny pellets that is representative of the population, thereby obtaining at least one test data set; providing a control data set of corresponding control optical signals produced under equivalent conditions by control pellets of the filamentous fungus of step; comparing the test data set(s) and the control data set; identifying, based on the comparison, a test data set obtained in step (e), that exhibits an improved size or an improved density relative to the control data set, thereby obtaining an improved test data set; and assigning the progeny pellet population associated with the improved

test data set as a population having increased stirred-tank-reactor cultivatability, thereby identifying a fungal strain having an increased cultivatability in stirred tank reactor.

[0086] In some embodiments, the treatment comprises a genetic modification.

In some embodiments, the increased cultivatability comprises increased productivity of a desired metabolite or biotransformation product, improved fermentation broth rheology, or a combination thereof.

[0087] In some embodiments, the comparing comprises first converting the optical signals to corresponding size or density values and then comparing the size or density values.

Exemplification

Example 1: Distinguishing Strains of *A. niger*

[0088] Certain strains of the pellet-forming organism *Aspergillus niger* are known to produce citric acid. Different variants of *A. niger* produce citric acid at different levels, and this difference may, at least in part, be due to a difference in the extent to which they take up glucose throughout or at specific points during a fermentation.

[0089] In order to assess whether a large bore flow cytometer could be used to identify, analyze, and/or sort pellet-forming microorganisms according to the present disclosure, we prepared two different citric-acid-producing, pellet-forming strains of *A. niger*, related as predecessor (**strain 1**) and descendant (**strain 2**). These two strains were known to produce different levels of citric acid and also to display distinguishable glucose uptake properties (monitored through use of a fluorescent glucose analog, 2-NBDG) as measured in a fluorimeter. For example, in glucose-free shake flask medium, **strain 2** pellets were more intensely stained than were **strain 1** pellets.

[0090] Pellets of **strain 2** and **strain 1** were combined either in equal numbers or in a ratio of 1:100 (**strain 2:strain 1**), were exposed to 2-NBDG, were washed, were flowed through a COPASTM Select instrument obtained from Union Biometrica (Somerville, MA), and were sorted onto tomato juice agar microtiter wells. Microorganisms deposited in the wells were then classified as **strain 2** or **strain 1** based on a phenotypic distinction: **strain 1** sporulates on TJA at 33 °C in two days, yielding a distinct brown pigment, whereas the sporulation of **strain 2** is delayed by 24 hours and the culture appears white after two days.

[0091] The machine was set to sort for pellets with either high (expect **strain 2** isolates) or low (expect **strain 1** isolates) fluorescence intensities after exposure to the 2-NBDG dye. Results are shown in Table 1 below:

Table 1

<u>Sort ratio</u>	<u>Expected</u>	<u>Actual</u>
50:50	strain 2 (96 wells)	92 white (strain 2), 1 brown (strain 1), 2 misses
50:50	strain 1 (96 wells)	92 brown (strain 1), 3 white, 1 mixed
1:100 strain 2 : strain 1	strain 2 (10)	8 white (strain 2), 2 misses

[0092] These data demonstrate that a large bore flow cytometer can be utilized to sort pellet-forming microorganisms with a high degree of accuracy. Furthermore, these data demonstrate that a large bore flow cytometer can be used to sort an obligate aerobic organism (i.e., *A. niger*). This finding was unexpected given that it had previously been reported that the particular flow cytometer utilized in this Example, achieved only anaerobic sorting.

Example 2: Screening Variants of an *A. niger* Strain

[0093] According to the present disclosure, it is desirable to identify, analyze, and/or isolate variant *A. niger* strains with altered ability to produce citric acid. As demonstrated in Example 1, *A. niger* strains with a different ability to take up glucose can be distinguished from one another in accordance with the present disclosure by using a large bore flow cytometer that assesses fluorescence of pellet-forming microorganisms that have been exposed to NBDG.

[0094] Others have previously attempted to identify mutants of **strain 2** that exhibit increased staining with NBDG and enhanced citric acid productivity. However, as demonstrated herein, sorting provides a unique advantage over traditional plate- or shake flask-based strain improvement methods in that, among other things, it is possible to examine many orders of magnitude greater number of samples in a fixed period of time. Furthermore, it may be possible to sort for multiple parameters in a given screening campaign. Screening methods were

performed to identify pellets that displayed a desired fluorescent activity when stained with 2-NBDG, 6-NBDG, MitoTracker Green, or MitoTracker Red..

[0095] Spores were generated from a -80°C 25% glycerol stock generated from a single colony of *A. niger* **strain 2** (Tate&Lyle Ingredients North America, Decatur, IL); the single spore isolate of **strain 2** was designated **strain 2a**. A small number of spores (~10³) from the frozen stock are spread on a 100 mm or 150 mm Tomato Juice Agar (TJA) petri plate, and after 5-7 days at 33°C, the resulting spores are harvested in water and stored at 4°C. Typical spore concentrations are in the range of 10⁷-10⁸ per ml with 5-15 mls total volume harvested.

Tomato Juice Agar (TJA)	
Tomato juice no salt or low salt	250 ml
Deionized water	750 ml
Difco agar (Technical grade 0812-17-9)	15 g
Maltose (Difco 216830)	20 g
Pharmamedia	10 g
Antifoam	0.1 ml

After the pH was adjusted to 6.85 - 7.15 with NaOH, the tomato juice agar was mixed and heated on a hot plate to 55°-70°C before being autoclaved and dispensed.

[0096] *A. niger* **strain 2a** spores, as well as subsequent generations of populations of spores (e.g. spores derived from strain 3 (see below)), were mutagenized either by treatment with nitrosoguanidine (NTG), by exposure to UV irradiation, or by treatment with nitrous acid. In all cases, percent viable spores (100 x [cfu/ml post-treatment ÷ cfu/ml pre-treatment]) were determined by serial dilutions on TJA. For NTG mutagenesis, 10⁹ spores are washed three times in 0.1M citric buffer (pH 5.5). Mutagenized spores were resuspended in citric buffer such that the spore concentration is 10⁸ spores per ml. 100µg/ml NTG was added to the resuspended spores, and the samples were mixed and incubated at 33°C for 1 hour. After the incubation, the spores were washed three times with 0.1 M phosphate buffer (pH 7).

[0097] For UV mutagenesis, 10⁹ spores were suspended in 50 ml water in a 150 x 15 mm Petri dish. The dish was place in a GS GeneLinker (BioRad, Hercules, CA) and exposed to UV

irradiation for 1 to 10 seconds on the STR setting. Subsequent plating steps were performed in the dark to prevent photoreactivation.

[0098] Nitrous acid mutagenesis was done by inoculating 20 mls of Difco YM broth containing 0.01% Tween 80 with 2×10^7 spores per ml. The 250 ml baffled flask was incubated at 33°C and 225 rpm for 6 hours. After 6 hours incubation the spores were transferred to a centrifuge tube and spun down into a pellet (5 minutes at 6,000 rpm). The broth was decanted and the spores were resuspended in 20 ml of 0.1 M sodium acetate buffer. Spores were resuspended, spun down, and the buffer was decanted again.

0.1 M Sodium acetate buffer (pH 4.6)

Acetic acid	3.06 g
Sodium acetate	4.02 g
Tween 80	0.10 ml

The buffer was brought to 1000 ml with deionized water and the pH adjusted to between 4.55 – 4.65 with weak sodium hydroxide or sulfuric acid solution.

Nitrous acid solution (freshly prepared for each experiment)

Sodium nitrite	0.345 g
0.1 M sodium acetate buffer	100 ml

[0099] 20 mls of fresh nitrous acid solution was added and spores were vortexed to re-suspend. Spores in nitrous acid solution were then incubated at 34°C for one minute increments up to 1 hour. At specific times, samples of spores were removed from the flask and diluted into water and plated onto TJA to determine percent viable and also 1 ml was removed and plated onto TJA to grow and sporulate, thereby providing mutated spores for citric acid assays.

[00100] Following the various mutageneses, mutagenized spores (0.245% - 14.5% viable) were either grown directly in shake flask medium (SFM), or alternatively, amplified on TJA by plating 1 ml or all of the spores from the mutagenesis onto a 150 mm TJA plate, incubating the plate at 33°C for several days until the plated spores have grown and sporulated.

Citric Acid Shake Flask Medium (SFM)

Recipe for 1 liter

Staleydex 333	150-300 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.037 g
Stock salt solution	10 ml
Urea	2.00 g
Ammonium sulfate	1.90 g
Citric acid	20.0 g
Tween 81	0.45 ml
pH before sterilization (with NH ₄ OH (approximately 3.9 ml of 29%))	2.6 - 2.65
Deionized water	to 1,000 ml
5mg/ml Methylbenzethonium chloride (MBT)	2 ml
Flask volume	30 ml
One milk filter disk/flask	
Sterilize 10 min @ 121°C on slow exhaust	

Stock Salt Solution

MgSO ₄ .7H ₂ O	20.3 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.80 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	3.90 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22 g
K ₂ HPO ₄	60 g
Citric acid	50 g
H ₂ SO ₄ (concentrated)	7.5 ml

For the stock salt solution, after the other reagents were added, deionized water was added to 1 liter and then the solution was filter sterilized with a 0.2 micron filter.

[00101] 1.2×10^7 viable mutagenized spores were used to inoculate 30 ml aliquots of SFM in 250 ml baffled flasks capped with filter paper, and agitated (250 rpm; 2-inch throw) at 33°C and 60% humidity for 3 to 5 days, during which time the spores germinate into ~200 μ m pellets.

[00102] Three basic staining protocols were used for most of the dyes. In the first method, the dye was added to 1 ml of pellets that had been taken from the growth flask and transferred to a 24 well plate. This staining method worked for most dyes that are not impacted by components of spent medium or the pH of the medium. Dyes for mitochondria, membrane potential, physiostatic, and some viability dyes can be used in this manner.

[00103] When the dye is an analog of a medium component, such as 2- or 6-NBDG, then the pellets are typically first rinsed free of the spent medium and placed into fresh medium lacking glucose; after this the pellets are ready for staining. A more detailed protocol for this is presented in the specific example for NBDG below.

[00104] The third staining method involves addition of a dye loading aid. This method is typically employed when the dye is bulky and is more difficult to load into the pellets. One dye loading aid is Influx pinocytic cell-loading reagent (Invitrogen #114402), which facilitates the loading of water-soluble materials into live cells via a rapid and simple technique based on the osmotic lysis of pinocytic vesicles. This loading was achieved by mixing the water-soluble dye/stain with the Influx reagent blended into growth medium, then incubating the cells in the medium to allow pinocytic uptake of the surrounding solution. When the pellets were transferred to a slightly hypotonic medium, pinocytic vesicles within the cells released the trapped material and filled the cytosol with the dye. This reagent is useful for large dyes such as dextrans and charged dyes such as pH sensors.

[00105] The useful staining concentration for each dye was empirically determined by performing a dose response curve to establish which concentration resulted in detectable staining with an optimal signal to noise ratio. Specificity of staining could be affected by a variety of parameters, including the age of the pellet and pH of the staining medium.

[00106] In order to use NBDG staining as a means to enrich for improved citric acid strains from a mutagenized population of **strain 2**, one ml aliquots of a 3–5 day old culture that was started from NTG mutagenized spores was placed in 15 ml SFM (lacking glucose and Tween 81; SFM-GT) and transferred to a 15 ml Isolute SPE cartridge (Biotage, LLC, Charlottesville, VA).

40

The pellets were washed by gentle vacuum filtration followed by resuspension in 15 ml SFM-GT and refiltration, and resuspended in 1 ml SFM-GT. Washed pellets were subsequently transferred to one well of a 24 well culture plate, to which 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose (2-NBDG; Invitrogen, Baltimore MD) was subsequently added, and shaken at 33 °C for 10 minutes in the dark. Stained pellets were diluted into 50 ml COPAS sheath solution (SS; Union Biometrica, Somerville, MA), vacuum-washed in SS once as described above and resuspended in 5 ml SS.

[00107] Stained and washed pellets were analyzed with the COPAS as described in the Union Biometrica COPAS Select Operator's Manual. Pellets that had higher incorporation of fluorescent glucose were selected by sorting for those with high fluorescence in the 545nm channel. Pellets that met the sort criteria were deposited into 96 well plates containing TJA. The plates were incubated at 33°C overnight. Wells that contained growing mycelia were then transferred to larger TJA plates for the generation of spores to be used for inoculation of shake flask cultures.

[00108] The spores on the TJA were harvested and used to inoculated three 250 ml flasks at 4×10^5 spores/ml in SFM for citric acid determination. Cultures grew at 33°C for 3 to 5 days prior to citric and glucose analysis by HPLC. Citric values were compared to the parent strain. This experiment was run with these mutants 3 or 4 times.

[00109] Tables 2 and 3 below provide a summary of a variety of sorting campaigns performed using multiple parent strains and multiple fluorescent dyes. These data demonstrate that COPAS-based sorting enables the screening of large number of samples and that dyes such as NBDG and the MitoTracker dyes (Green and Red) are useful tools for enriching for pellets with greater citric acid production potential.

41

Table 2
Fluorescent sorting for improved citric acid strains derived from strain 2a

Sort #	Age at sort (days)	Strain/mutagen/dye	# viable pellets sorted	# pellets screened	# hits >3% enhanced citric acid yield (relative to strain 2)
37	3	strain2a/NTG/amplified/2NBDG	24	38584	2
41	3	strain2a/NTG/2NBDG	24	79244	0
42	3	strain2a/NTG/6NBDG	20	118074	1
43	4	strain2a/NTG/2NBDG	12	104314	0
44	4	strain2a/NTG/6NBDG	17	145143	0
45	5	strain2a/NTG/2NBDG	8	43053	2
46	5	strain2a/NTG/6NBDG	10	78026	1
47	3	strain2a/NTG/MTG	42	47419	0 of 24 tested

Table 3
Fluorescent sorting for improved citric acid strains derived from strain 3

Sort #	Age at sort (days)	Strain/mutagen/dye	# viable pellets sorted	# pellets screened	# hits >4% enhanced citric acid yield (relative to strain 2)	# assayed for citric
49	<1.6	strain 3/UV/2NBDG	68	64422	3*	67
50	2.1	strain 3/UV/MTG	127	9860	6+	127
51	2.1	strain 3/UV/low MTG	9	NA	NA	0
52	14.5	strain 3/UV/2NBDG	82	110147	3+	70
53*	0.4	strain 3/UV/Amplified/2NBDG	12	29257	1	12
54*	0.4	strain 3/UV/Amplified/2NBDG	4	92058	2	4
55	0.04	strain 3/UV/Amplified/2NBDG	29	214891	3*	29
56	0.04	strain 3/UV/Amplified/2NBDG/ upper spur	32	1204	2*	22
57	5.20	strain 3/UV/Amplified/MTG	537	122841		7
58	5.20	strain 3/UV/Amplified/MTR580	92	12343	33*	52
59	5.20	strain 3/UV/Amplified/ NBDG+MTR580	4	32020	0 of 3	4
60	1.04	strain 3/UV/Amplified/MTG	~300	51720	ND	48

[00110] Table 4 below shows that the mutated strains perform better for citric accumulation, yield and rate than their parent. All of these mutants were selected from the entire mutated

43

population based on their higher fluorescence value for staining with either NBDG or a MitoTracker dye.

Table 4
Characterization of citric acid production from strains identified by fluorescent sorting for NBDG or MitoTracker staining (changes reported relative to strain 2 (i.e. (value from improved strain)-(value from strain 2)))

Strain	# times tested (in triplicate cultures)	Average increase in accumulation (accumulation = % citric acid (w/v))	Average increase in yield (yield = 100 * (g citric acid produced / g glucose consumed))	Average change in rate (rate = g citric acid per liter hour)
strain 4	5	1.19	5.24	0.10
strain 5	5	0.72	5.36	0.06
strain 6	6	2.38	5.52	0.20
strain 7	6	1.41	4.94	0.12
strain 8	6	1.20	5.01	0.10
strain 9	4	1.48	5.42	0.13
strain 10	3	2.64	6.95	0.22
strain 11	4	2.24	6.10	0.19
strain 12	4	1.92	5.39	0.16
strain 13	4	1.65	5.50	0.14
strain 3	10	0.93	1.84	0.04

[00111] As described above, mutant strains were also identified based on increased optical density of pellets after growth in medium containing a non-glucose carbon source. Mutated spores were grown in SFM containing the alternative carbon source instead of glucose for three days. After three days the pellets were rinsed with SS and analyzed with the COPAS™. The

44

pellets were sorted for a specified large time of flight (size), not too large to include clumps, and medium optical density.

[00112] Pellets that met the sort criteria were deposited into 96 well plates containing TJA. The plates were incubated at 33°C overnight. Wells that contained growing mycelia were then transferred to larger TJA plates for the generation of spores. The spores on the TJA were harvested and used to inoculate three 250 ml flasks at 4×10^5 spores/ml in SF for citric acid determination. Cultures grew at 33°C for 3 to 5 days prior to citric and glucose analysis by HPLC. Citric acid values were compared to the parent strain. The mutant microorganism that produced denser cell pellets when grown on the alternative carbon source was re-grown and assayed for its ability to produce citric acid; it was found to show consistent improvement in citric acid production when grown on either the alternative carbon source or on glucose.

[00113] Additional screening criteria can be used to select pellet-forming microorganisms with desired properties. For example, the autofluorescence of the pellet can be a facile and useful primary or secondary screening parameter. Autofluorescence is a broad-spectrum natural fluorescence that is present in most fluorescent channels. It is caused by endogenous molecules that absorb light in many regions of the near ultraviolet and visible light spectrum.

Autofluorescence of the pellets was examined for **strain 2** at three ages. Figure 2 depicts the spectra of pellets excited at either 350 or 488 nm in a fluorimeter, and confirms that changes in autofluorescence over time can be detected. Age-dependent autofluorescence of **strain 2** was also examined with the COPAS. Three cultures of **strain 2** were initiated at 24 hour intervals and observed together at effectively 2, 3, and 4 days after inoculation. As seen in Figure 3, the use of a red/yellow sorting axis (peak height (PH) for red fluorescence was detected at 610 nm, PH for red fluorescence was detected at 545 nm; shown in dark grey/light grey, respectively, in Figure 3) allows one to clearly distinguish the three ages despite significant overlap. While the source of this phenomenon is not known, it provides an example of the process of correlating fluorescent signatures with important fermentation states. One can imagine a selection where a pellet from a late, less productive stage of fermentation is chosen due to its possession of a signature associated with an earlier productive phase.

[00114] Mutants were identified that at 5 days old have the autofluorescence characteristics of two-day-old pellets, more yellow fluorescence, less red. Pellets were sorted from 5 day old NTG

strain 2 mutant pellets. The sort was designed to select for pellets that were more yellow than most of the mutant population or more red than most of the mutant population (a negative control). For this experiment the pellets were deposited in a batch of 20–100 on a small TJA plate and allowed to grow and sporulate. Once sporulation occurred the spores were harvested, inoculated, grown for 3 days, and retested in the COPAS to determine if they still maintained the characteristic for which they were selected. In general, the pool of pellets that were selected to have the younger, more yellow autofluorescent signature maintained that phenotype when re-grown. The pellets that were selected for a more red phenotype also maintained that phenotype when re-grown.

[00115] Furthermore, additional fluorescent dyes can be employed. For instance, the SNARF series of dyes provides a means to identify pellets with a desired range of intracellular pH. SNARF dyes can be used to identify citric acid producing strains that are capable of maintaining an intracellular pH within a certain range, even in the presence of high concentrations of citric acid and low pH broth conditions (e.g. pH 2.0). These strategies, as well as others described herein, will be useful.

[00116] These data therefore demonstrate that the present disclosure can be utilized to identify, analyze, and sort pellet-forming microorganisms from a genetically diverse mixture, and specifically illustrates identification and isolation of pellet-forming microorganisms with increased ability to produce a particular commercial product (i.e., citric acid).

Equivalents

[00117] Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the disclosure, described herein. The scope of the present disclosure is not intended to be limited to the above Description, but rather is as set forth in the appended claims.

[00118] In the claims articles such as “a,” “an,” and “the” may mean one or more than one unless indicated to the contrary or otherwise evident from the context. Claims or descriptions that include “or” between one or more members of a group are considered satisfied if one, more than one, or all of the group members are present in, employed in, or otherwise relevant to a given product or process unless indicated to the contrary or otherwise evident from the context.

[00119] The disclosure includes embodiments in which exactly one member of the group is present in, employed in, or otherwise relevant to a given product or process. The disclosure includes embodiments in which more than one, or all of the group members are present in, employed in, or otherwise relevant to a given product or process. Furthermore, it is to be understood that the disclosure encompasses all variations, combinations, and permutations in which one or more limitations, elements, clauses, descriptive terms, *etc.*, from one or more of the listed claims is introduced into another claim. For example, any claim that is dependent on another claim can be modified to include one or more limitations found in any other claim that is dependent on the same base claim. Furthermore, where the claims recite a composition, it is to be understood that methods of using the composition for any of the purposes disclosed herein are included, and methods of making the composition according to any of the methods of making disclosed herein or other methods known in the art are included, unless otherwise indicated or unless it would be evident to one of ordinary skill in the art that a contradiction or inconsistency would arise.

[00120] Where elements are presented as lists, *e.g.*, in Markush group format, it is to be understood that each subgroup of the elements is also disclosed, and any element(s) can be removed from the group. It should be understood that, in general, where the disclosure, or aspects of the disclosure, is/are referred to as comprising particular elements, features, *etc.*, certain embodiments of the disclosure or aspects of the disclosure consist, or consist essentially of, such elements, features, *etc.* For purposes of simplicity those embodiments have not been specifically set forth *in haec verba* herein.

[00121] It is noted that the term "comprising" is intended to be open and permits the inclusion of additional elements or steps.

[00122] Where ranges are given, endpoints are included. Furthermore, it is to be understood that unless otherwise indicated or otherwise evident from the context and understanding of one of ordinary skill in the art, values that are expressed as ranges can assume any specific value or subrange within the stated ranges in different embodiments of the disclosure, to the tenth of the unit of the lower limit of the range, unless the context clearly dictates otherwise.

[00123] In addition, it is to be understood that any particular embodiment of the present disclosure that falls within the prior art may be explicitly excluded from any one or more of the

47

claims. Since such embodiments are deemed to be known to one of ordinary skill in the art, they may be excluded even if the exclusion is not set forth explicitly herein. Any particular embodiment of the compositions of the disclosure can be excluded from any one or more claims, for any reason, whether or not related to the existence of prior art.

[00124] The publications discussed above and throughout the text are provided solely for their disclosure prior to the filing date of the present application. Nothing herein is to be construed as an admission that the inventors are not entitled to antedate such disclosure by virtue of prior disclosure.

Claims

1. A method comprising steps of:
 - a. obtaining a sample containing genetically diverse microorganisms in pellet form;
 - b. detecting one or more optically detectable parameters of individual pellets within the sample; and
 - c. sorting individual pellets into separate containers based on the detected one or more parameters.
2. The method of claim 1, wherein the step of obtaining comprises cultivating a collection of pellet-forming microorganisms under conditions that support pellet-form growth.
3. The method of claim 2, wherein the step of obtaining comprises harvesting at least some pellets from the collection.
4. The method of claim 2, wherein the collection comprises microorganisms related as progeny of a parent microorganism, which progeny were generated through application of a mutagenic protocol.
5. The method of claim 2, wherein the collection comprises microorganisms related to the natural heterogeneity found within a parent microorganism.
6. The method of claim 1, wherein the optically detectable parameter is size of the microorganism pellet.
7. The method of claim 1, wherein the optically detectable parameter is optical density of the microorganism pellet.
8. The method of claim 1, wherein the optically detectable parameter is intensity of fluorescent emission.
9. The method of claim 8, wherein the fluorescent emission is autofluorescence of the pelleted microorganism.
10. The method of claim 8, wherein the fluorescent emission quantifies a fluorescent dye present in or on certain individual pellets.
11. The method of claim 10, wherein the fluorescent dye is an analog or derivative of a carbohydrate used for the cultivation of pellet-forming microorganisms.

12. The method of claim 11, wherein the analog or derivative of a carbohydrate is an analog or derivative of glucose.
13. The method of claim 12, wherein the analog or derivative of glucose is either 2-NBDG or 6-NBDG.
14. The method of claim 10, wherein the fluorescent dye is an indicator of viability of pellet-forming microorganisms.
15. The method of claim 14, wherein the indicator of viability is FUN1, propidium iodide, trypan blue, neutral red, resazurin or acridine orange.
16. The method of claim 10, wherein the fluorescent dye is an indicator of intracellular pH in a pellet-forming microorganism.
17. The method of claim 16, wherein the indicator of the intracellular pH is SNAFL, SNARF 4F or SNARF 5F.
18. The method of claim 10, wherein the fluorescent dye is an indicator of mitochondrial size or activity in a pellet-forming microorganism.
19. The method of claim 18, wherein the indicator of the mitochondrial size or activity is rhodamine 123, rhodamine B hexyl ester, MitoTracker Green, MitoTracker Red or SYTO 18.
20. The method of claim 10, wherein the fluorescent dye is an indicator of intracellular lipid or polyhydroxyalkanoate level.
21. The method of claim 20, wherein the indicator of intracellular lipid or polyhydroxyalkanoate level is Nile red.
22. The method of claim 10, wherein the fluorescent dye is an indicator of extracellular carbohydrate levels.
23. The method of claim 22, wherein the indicator of extracellular carbohydrate levels is calcofluor, concanavalin A, or fluorescent conjugates of wheat germ agglutinin.
24. The method of claim 10, wherein the fluorescent dye is an indicator of cytoplasmic membrane potential.
25. The method of claim 24, wherein the indicator of cytoplasmic membrane potential is DiOC₆ or bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol.
26. The method of claim 1, wherein the step of detecting comprises detecting more than one optically detectable parameters.

27. The method of claim 26, wherein each of the more than one optically detectable parameters is selected from the group consisting of size, optical density, intensity of fluorescent emission, and combinations thereof.
28. The method of claim 27, wherein the more than one optically detectable parameters comprises at least two parameters of intensity of fluorescent emission.
29. The method of any of claims 1-28, wherein the microorganism is a filamentous fungus.
30. The method of any of claims 1-28, wherein the microorganism is a filamentous bacterium.
31. The method of claim 29, wherein the filamentous fungus is of the genus *Aspergillus*, *Emericella*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Mortierella*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Blakeslea*, *Mucor*, or *Phycomyces*.
32. The method of claim 31, wherein the filamentous fungus is *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Rhizopus oryzae*, *Mortierella alpine*, *Trichoderma reesei* or *Paecilomyces sp.*
33. The method of claim 30, wherein the filamentous bacterium is of the genus *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Amycolaptopsis*, *Actinosynnema*, *Saccharomonospora*, or *Saccharopolyspora*.
34. The method of any of claims 29-33, wherein the sorted pellet is subsequently used for a biomanufacturing purpose.
35. The method of claim 34, wherein the biomanufacturing purpose comprises production of an organic acid.
36. The method of claim 35, wherein the organic acid comprises one or more of the group of citric acid, lactic acid, malic acid, succinic acid, itaconic acid, tartaric acid, fumaric acid, and derivatives thereof.
37. The method of claim 36, wherein the organic acid is citric acid.
38. The method of claim 36, wherein the organic acid is lactic acid.
39. The method of claim 36, wherein the organic acid is malic acid.
40. The method of claim 36, wherein the organic acid is succinic acid.
41. The method of claim 36, wherein the organic acid is fumaric acid.
42. The method of claim 34, wherein the biomanufacturing purpose comprises production of a carotenoid compound.

- 81
43. The method of claim 42, wherein the carotenoid compound comprises one or more of the group of phytoene, lycopene, lutein, beta-carotene, zeaxanthin, canthaxanthin, astaxanthin, and derivatives thereof.
44. The method of claim 34, wherein the biomanufacturing purpose comprises production of an essential fatty acid.
45. The method of claim 44, wherein the essential fatty acid comprises one or more of the group of DHA, ARA, EPA, and derivatives thereof.
46. The method of claim 34, wherein the biomanufacturing purpose comprises production of an industrial enzyme.
47. The method of claim 46, wherein the industrial enzyme comprises one or more of the group of alpha-amylase, beta-amylase, cellulase, beta-glucanase, beta-glucosidase, dextranase, dextrinase, alpha-galactosidase (melibiase), glucoamylase, hemicellulase, invertase, laccase, naringinase, pentosanase, pectinase, pullulanase, xylanase; acid proteinase, alkaline protease, bromelain, pepsin, aminopeptidase, endo-peptidase, subtilisin, aminocyclase, glutaminase, lysozyme, penicillin acylase, isomerases, alcohol dehydrogenase, amino acid oxidase, catalase, chloroperoxidase, peroxidase, acetolactate decarboxylase, aspartic beta-decarboxylase, histidase, cyclodextrin glycosyltransferase, and phytase.
48. The method of claim 34, wherein the biomanufacturing purpose comprises production of an active pharmaceutical ingredient.
49. The method of claim 48, wherein the active pharmaceutical ingredient comprises one or more of the group of lovastatin, mevastatin (compactin), mycophenolic acid, cyclosporine, a beta-lactam antibiotic, a cytotoxic metabolite, an immunosuppressant, and derivatives thereof.
50. The method of claim 34, wherein the biomanufacturing purpose comprises production of an extracellular carbohydrate.
51. The method of claim 50, wherein the extracellular carbohydrate comprises one or more of the group of chitin, chitosan, N-acetylglucosamine, glucosamine, polygalactosamine, pullulan, scleroglucan, and derivatives thereof.
52. The method of claim 34, wherein the biomanufacturing purpose comprises production of an insecticidal compound.

53. The method of claim 52, wherein the insecticidal compound comprises one or more of the group of nodulisporic acid and avermectin.
54. A method comprising steps of:
- obtaining a sample containing genetically diverse pellet-forming microorganisms;
 - culturing the sample so that microorganisms adopt their pellet form;
 - detecting one or more optically detectable parameters of individual microorganism pellets within the sample;
 - sorting individual microorganism pellets into separate containers based on the one or more optically detectable parameters; and
 - cultivating at least one of the sorted individual microorganism pellets under conditions that allow it to produce a predetermined product.
55. The method of claim 54, wherein the step of obtaining comprises cultivating a collection of pellet-forming microorganisms under conditions that support pellet-form growth.
56. The method of claim 55, wherein the step of obtaining comprises harvesting at least some microorganisms from a collection of pellet-forming microorganisms.
57. The method of claim 55, wherein the collection comprises microorganisms related as progeny of a parent microorganism, which progeny were generated through application of a mutagenic protocol.
58. The method of claim 57 wherein the parent microorganism produces the predetermined product.
59. The method of claim 57 wherein the parent microorganism does not produce the predetermined product.
60. The method of any of claims 54-59 wherein the at least one sorted individual microorganism pellet differs from the parent in its production of the predetermined product.
61. The method of claim 60 wherein the at least one sorted individual microorganism pellet produces more of the predetermined product than does the parent microorganism under identical fermentation conditions.
62. A pellet-forming microorganism resulting from isolating a pelleted microorganism obtained by a method of any of claims 1-61.

63. A sorted and cultivated pellet-forming microorganism obtained by a method comprising steps of:
 - a. obtaining a sample containing genetically diverse pellet-forming microorganisms;
 - b. culturing the sample so that microorganisms adopt their pellet form;
 - c. detecting one or more optically detectable parameters of individual microorganism pellets within the sample;
 - d. sorting individual microorganism pellets into separate containers based on the one or more optically detectable parameters; and
 - e. cultivating at least one of the sorted individual microorganism pellets under conditions that allow it to produce a predetermined product.
64. The sorted and cultivated pellet-forming microorganism of claim 63, wherein the microorganism produces a predetermined product.
65. The sorted and cultivated pellet-forming microorganism of claim 64, wherein sample comprises progeny of a parent that does not produce the predetermined product.
66. The sorted and cultivated pellet-forming microorganism of claim 65 wherein the microorganism pellet differs from the parent in its production of the predetermined product.
67. The sorted and cultivated pellet-forming microorganism of claim 65 wherein the microorganism pellet produces more of the predetermined product than does the parent microorganism under identical fermentation conditions.
68. The method of any of claims 1-61, wherein the step of sorting employs a flow cytometry and sorting instrument that measures one or more of size, optical density and intensity of fluorescent emission parameters.
69. A process for identifying a fungal strain having an increased capacity for organic acid biosynthesis or tolerance, comprising:
 - a. providing at least one pellet-forming filamentous fungus;
 - b. applying to cells of the fungus at least one treatment capable of inducing a phenotypic change in the cells, thereby forming at least one treated cell;
 - c. culturing the treated cell under conditions in which a population of progeny pellets is propagated from the cell;

- d. contacting progeny pellets of the population with at least one detectable label that provides an optical signal whose magnitude is proportional to a parameter selected from the group consisting of carbohydrate uptake by, mitochondrial volume of, mitochondrial function in, and intracellular pH of the fungus, and combinations thereof, thereby forming at least one labeled pellet;
 - e. detecting an optical signal from the at least one labeled pellet, thereby obtaining a test optical signal specific to the labeled pellet;
 - f. comparing the test optical signal with a control optical signal produced under equivalent conditions by a control pellet of the filamentous fungus of step (a) that has been contacted with the detectable label of step (d);
 - g. identifying those pellets exhibiting a test optical signal that is different from the control optical signal;
 - h. correlating the difference in optical signal with an increase in organic acid biosynthesis or tolerance, thereby identifying at least one fungal strain having an increased capacity for organic acid biosynthesis or tolerance.
70. The process according to claim 69, wherein the treatment of step (b) comprises a genetic modification.
71. The process according to claim 69, wherein the organic acid is selected from the group consisting of C2-C6 mono- and di-carboxylic acids, C3-C6 tri-carboxylic acids, and combinations thereof.
72. The process according to claim 69, wherein the organic acid is selected from the group consisting of acetic, glycolic, lactic, propionic, pyruvic, butyric, hydroxybutyric, oxaloacetic, malonic, tartaric, tartronic, succinic, malic, maleic, fumaric, itaconic, citraconic, tricarballic, isocitric, and citric acids, and combinations thereof.
73. The process according to claim 69, wherein the parameter of step (d) comprises carbohydrate uptake, and wherein the carbohydrate is selected from the group consisting of monosaccharides, disaccharides, trisaccharides, oligosaccharides, and glycerol, and combinations thereof.
74. The process according to claim 69, wherein the difference in step (h) is a statistical average of a plurality of differences identified in step (g).

75. A process for identifying a fungal strain having an increased cultivatability in stirred tank reactor, comprising:

- a. providing at least one pellet-forming filamentous fungus;
- b. applying to cells of the fungus at least one treatment capable of inducing a phenotypic change in the cells, thereby forming at least one treated cell;
- c. culturing the treated cell under conditions in which a population of progeny pellets is propagated from the cell;
- d. detecting an optical signal from a progeny pellet of the population, which signal is proportional to pellet size or density, thereby obtaining a test optical signal specific to the progeny pellet;
- e. repeating step (d) to produce a set of test optical signals for progeny pellets that is representative of the population, thereby obtaining at least one test data set;
- f. providing a control data set of corresponding control optical signals produced under equivalent conditions by control pellets of the filamentous fungus of step (a);
- g. comparing the test data set(s) and the control data set;
- h. identifying, based on the comparison, a test data set obtained in step (e), that exhibits an improved size or an improved density relative to the control data set, thereby obtaining an improved test data set;
- i. assigning the progeny pellet population associated with the improved test data set as a population having increased stirred-tank-reactor cultivatability, thereby identifying a fungal strain having an increased cultivatability in stirred tank reactor.

76. The process according to Claim 75, wherein the treatment of step (b) comprises a genetic modification.

77. The process according to Claim 75, wherein the increased cultivatability comprises increased productivity of a desired metabolite or biotransformation product, improved fermentation broth rheology, or a combination thereof.

78. The process according to Claim 75, wherein step (g) of comparing comprises first converting the optical signals to corresponding size or density values and then comparing the size or density values.

Figure 1.

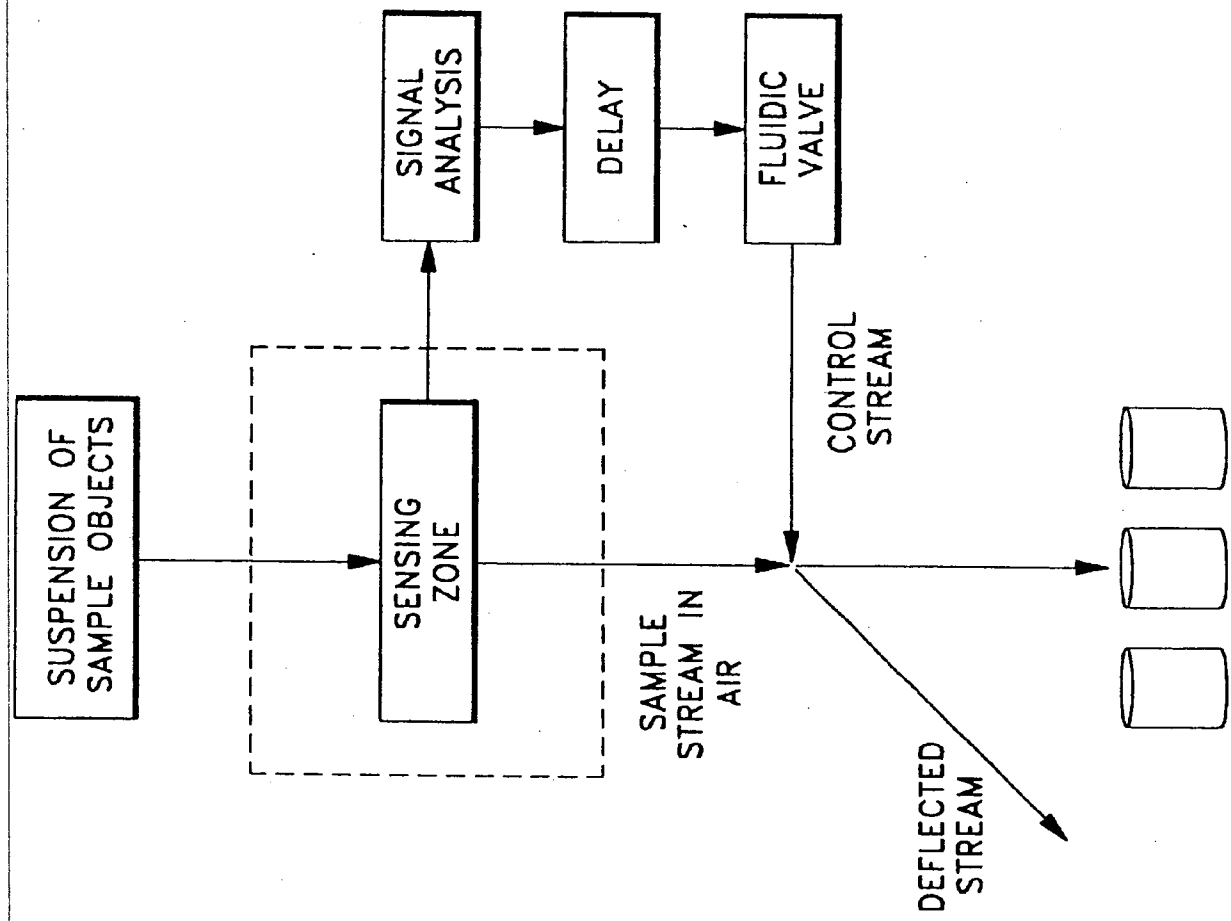
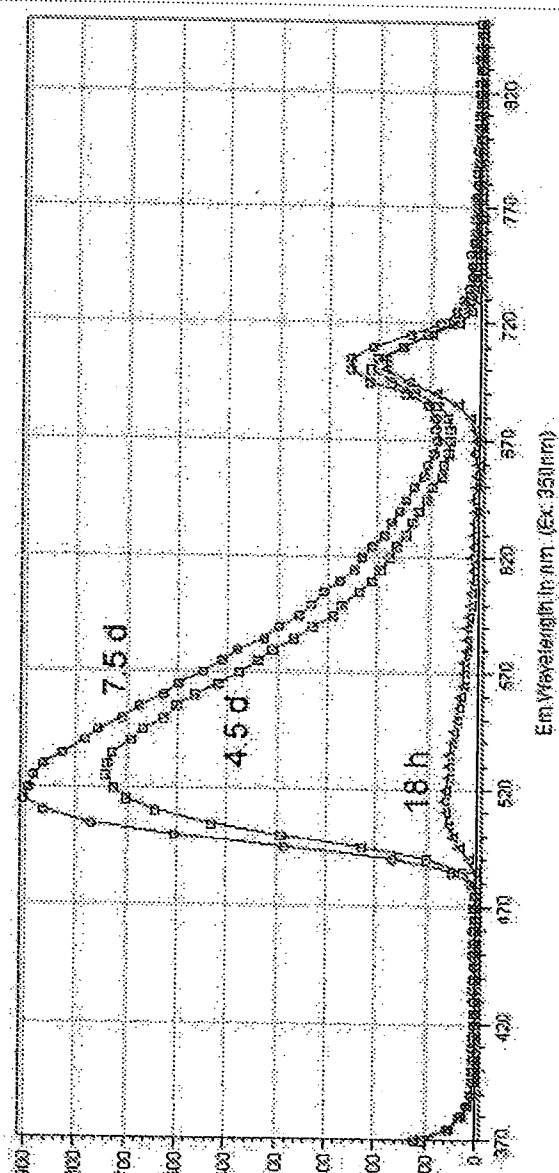
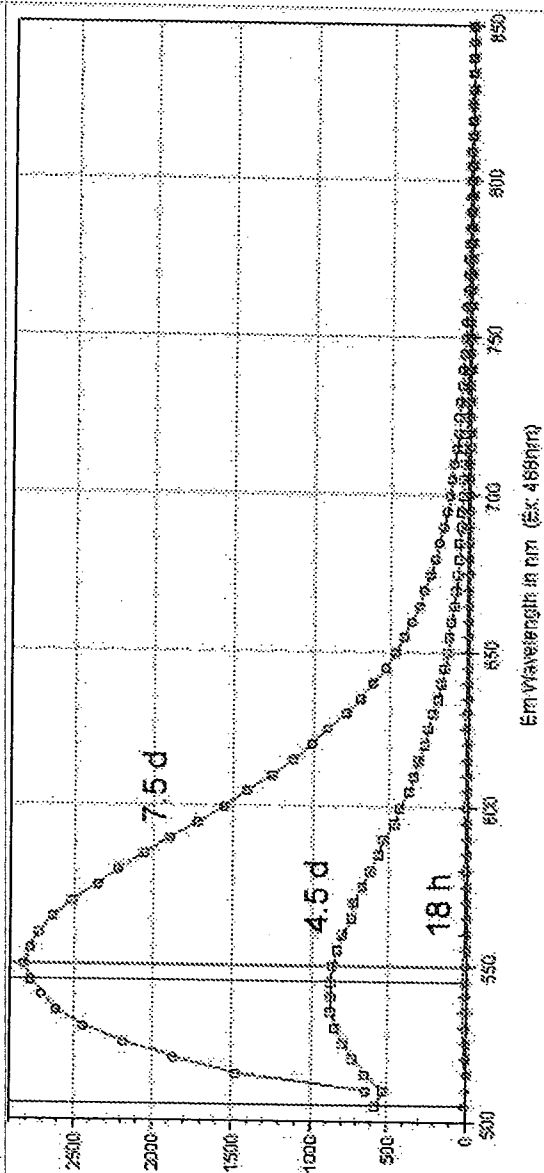
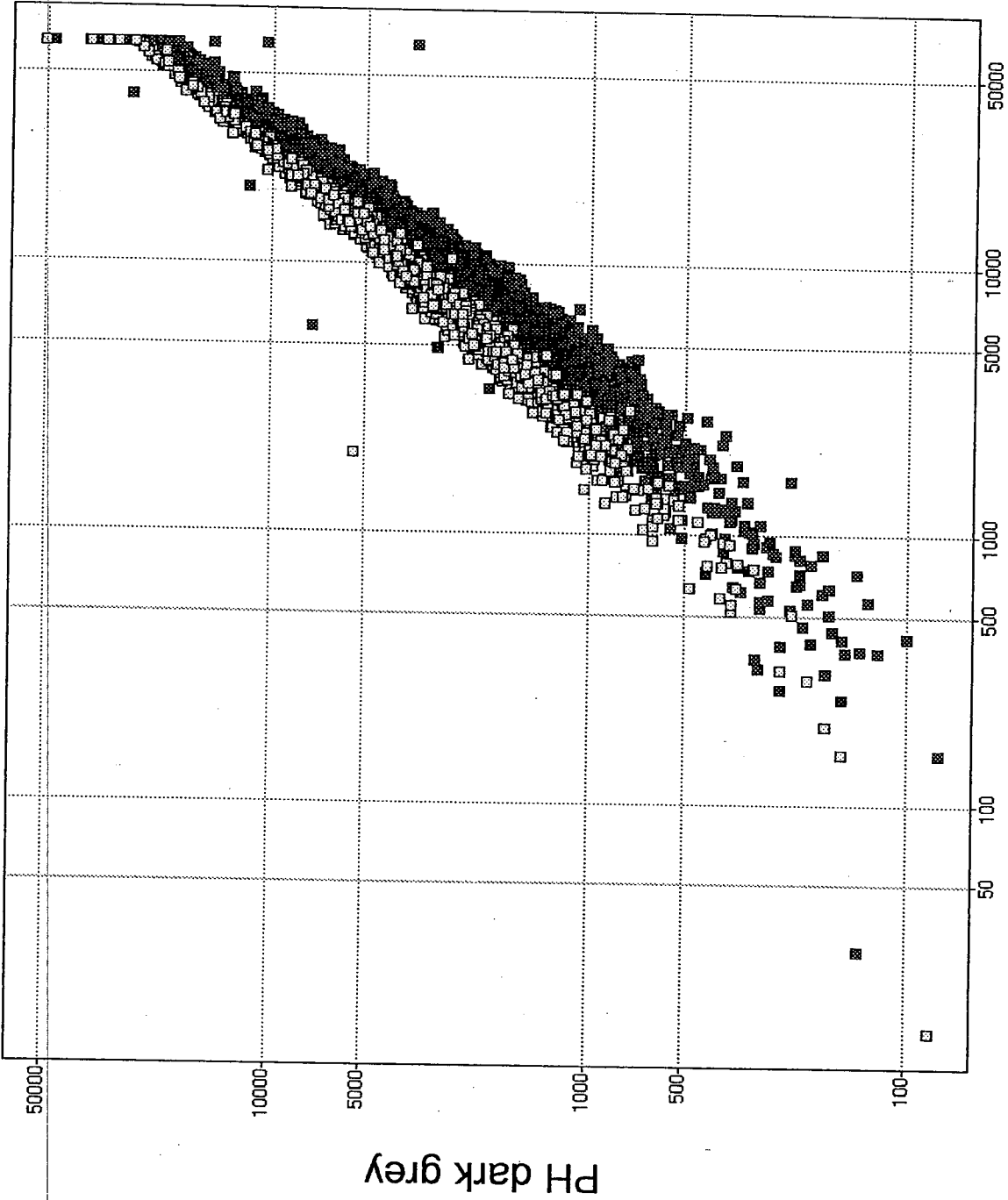


Figure 2.



Scatter Plot



PH light grey

Figure 3.

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS FORMADORES DE GLÓBULOS

Solicitudes Relacionadas

5 [0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud Provisional, Estadounidense No. 60/970,101, presentada en Septiembre 5, 2007, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

10

Antecedente

[0001] Un amplio porcentaje de la investigación biológica se desarrolla sobre un número pequeño de organismos modelo que han probado ser experimentalmente tratables. Sin embargo, como el
15 campo de la biotecnología industrial continúa en desarrollo, existe un reciente deseo para aprovechar las características de diferentes microorganismos. Subsiste la necesidad en el campo para el desarrollo de técnicas mejoradas de manejo de
microorganismos con más características de crecimiento complejas,
20 tal como características de crecimiento que no se encuentran típicamente durante el cultivo en laboratorio de rutina.

[0002] Por ejemplo, la mayoría de organismos microbianos utilizados típicamente en la industria de biotecnología crecen
25 como células unicelulares simples (por ejemplo, microorganismos planctónicos). Sin embargo, muchos organismos que producen compuestos importantes industrialmente tienen una biología más complicada. Por ejemplo, muchos de tales organismos son naturalmente filamentosos, y pueden crecer en forma de glóbulos. Los

organismos filamentos que crecen en la forma de glóbulo generalmente no son agradables muchos métodos estándar aplicados a microorganismos planctónicos que crecen como células unicelulares sencillas. Entre otras cosas, la morfología de filamento genera viscosidad significativa y limita la transferencia de masa de nutrientes y oxígeno. Adicionalmente, el glóbulo formado mediante tales organismos puede estar comprendido de un número de células que pueden representar una población heterogénea con respecto a la etapa de crecimiento y/o actividad metabólica. Así, tales microorganismos formadores de glóbulos, aunque pueden presentar ciertas características de producción intrincada, también presentan retos tecnológicos. Subsiste la necesidad para el desarrollo de técnicas para manejar microorganismos (por ejemplo, hongos de filamento y bacterias) que pueden crecer en forma de glóbulo. Subsiste una necesidad particular para desarrollar técnicas que pueden identificar microorganismos deseables dentro de una población compleja de microorganismos y/o en un contexto fisiológico, de tal manera que el crecimiento en la forma de glóbulo, que se espera sea el reflejo del desempeño en las fermentaciones a escala industrial.

Resumen

[0003] La presente descripción proporciona tecnologías para manejar y analizar microorganismos formadores de glóbulo, y microorganismos, producidos por tales tecnologías. La presente descripción proporciona particularmente sistemas para identificar variantes de microorganismos formadores de glóbulos y/o para clasificar microorganismos formadores de glóbulos. En particular,

la presente descripción proporciona métodos para clasificar físicamente microorganismos formadores de glóbulos sobre la base de una o más propiedades ópticamente detectables (por ejemplo, tamaño, densidad óptica, presencia y/o intensidad de emisión fluorescente, autofluorescencia, etc.).

[0004] En ciertas realizaciones de la descripción, los microorganismos formadores de glóbulos se almacenan durante y/o después del crecimiento en cultivo líquido. Esto ofrece muchas ventajas sobre los esquemas de clasificación (por ejemplo, detección y/o selección) que utilizan crecimiento en medio sólido u otro medio, tal como esquemas que no pueden reflejar el comportamiento de microorganismos bajo condiciones de fermentación. En algunas realizaciones, la presente descripción permite la identificación, análisis y/o clasificación de microorganismos formadores de glóbulos bajo condiciones de crecimiento similares o idénticas a las condiciones de fermentación, por ejemplo con condiciones de fermentación utilizadas de tal manera que los microorganismos producen un producto particular. En muchas realizaciones, los microorganismos formadores de glóbulos se clasifican por su forma de glóbulo. En algunas realizaciones, por lo menos algunos de los microorganismos formadores de glóbulos se cosechan a partir de una colección producida por clasificación.

25

[0005] En ciertas realizaciones de la presente descripción, una muestra a ser caracterizada y/o clasificada incluye una población de microorganismos genéticamente diversos. En algunas realizaciones, los microorganismos individuales dentro de tal una

población genéticamente diversa se relacionan con otro como progenie de un microorganismo progenitor que ha estado expuesto a un protocolo mutagénico.

5 [0006] En algunas realizaciones, una muestra a ser caracterizada y/o clasificada incluye uno o más microorganismos que producen un producto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, tal una muestra incluye uno o más microorganismos que producen uno o más ácidos orgánicos, compuestos carotenoides, ácidos
10 grasos esenciales, enzimas industriales, farmacéuticos activos, carbohidratos extracelulares, compuestos insecticidas, etc.

[0007] En algunas realizaciones de la presente descripción, los microorganismos formadores de glóbulos en suspensión líquida
15 se clasifican por aplicación de un pulso de aire que diverge el flujo del fluido; en algunas realizaciones, los microorganismos formadores de glóbulos en la suspensión líquida se clasifican al cambiar las cámaras de recolección sin alterar necesariamente
20 tras la trayectoria del flujo del fluido.

Descripción de los Dibujos

[0008] *Figure 1* se reproduce a partir de la Figura 1 de la patente Estadounidense 6,400,453 y presenta una representación
25 altamente esquemática de un sistema citómetro de flujo particular que se puede utilizar para identificar, analizar y/o clasificar microorganismos de forma de glóbulo de acuerdo con la presente descripción.

[0009] *Figura 2* es una espectro autofluorescente, detectado por fluorímetro, para los glóbulos de **cepa 2** de edad variantes. Parte superior: excitación a 488 nm; parte inferior: 350 nm. Los resultados a 18 hr están sesgados por los bajos números de

5 glóbulos.

[0010] *Figura 3* es una gráfica de dispersión de las alturas pico (PH) para 2, 3, y 4 días de autofluorescencia (combinados en sílico). Gris oscuro: 2 días de edad; negro: 3 días; gris claro:

10 4 días.

Definiciones

[0011] *Compuesto Carotenoide*: Un "compuesto carotenoide", como

15 se utiliza ese término aquí, se refiere a un compuesto derivado de intermedios de ruta isoprenoide. La etapa de compromiso en la biosíntesis de carotenoide es la formación de fitoeno a partir de geranilgeranil pirofosfato. Los carotenoides puede ser cíclicos o

● acíclicos, y pueden o no contener oxígeno, de tal manera que el

20 término compuestos carotenoides incluye carotenos y xantofilos. En general, los carotenoides son compuestos de hidrocarburos que tienen un esqueleto de polieno carbono conjugado derivado formalmente del compuesto de cinco carbonos isopentil pirofosfato (IPP), que incluye triterpenos (diapocarotenoides C_{30}) y

25 tetraterpenos (carotenoides C_{40}) así como también sus derivados oxigenados y otros compuestos que son, por ejemplo, C_{35} , C_{50} , C_{60} , C_{70} , C_{80} de longitud u otras longitudes. Muchos carotenoides tienen fuertes propiedades de absorción liviana y puede variar en longitud en exceso de C_{200} . Los diapocarotenoides C_{30} consiste

típicamente de seis unidades isoprenoides unidas en tal una forma que la disposición de las unidades de isoprenoides se conserva en el centro de la molécula de tal manera que los dos grupos metilos centrales están en una relación posicional 1,6 y los grupos metilo no terminales restantes están en una relación posicional 1,5. Tales carotenoide C_{30} se pueden derivar formalmente de la estructura acíclica $C_{30}H_{42}$, que tiene una cadena central larga de enlaces dobles conjugados, por: (i) hidrogenación (ii) deshidrogenación, (iii) ciclización, (iv) oxidación, (v) esterificación/glicosilación, o cualquier combinación de estos procesos. Los carotenoides C_{40} consisten típicamente de ocho unidades isoprenoides unidas en tal una forma que la disposición de las unidades isoprenoides se conserva en el centro de la molécula de tal manera que los dos grupos metilo centrales están en una relación de posición 1,6 y los restantes grupos metilo no terminales están en una relación de posición 1,5. Tales carotenoides C_{40} se pueden derivar formalmente de la estructura acíclica $C_{40}H_{56}$, que tienen una cadena central larga de enlaces dobles conjugados por (i) hidrogenación, (ii) deshidrogenación, (iii) ciclización, (iv) oxidación, (v) esterificación/glicosilación, o cualquier combinación de estos procesos. La clase de carotenoides C_{40} también incluye ciertos compuestos que surgen de las redistribuciones del esqueleto de carbono, o por la remoción (formal) de parte de su estructura. Se ha identificado más de 600 carotenoides diferentes en la naturaleza; los carotenoides incluyen pero no se limitan a: anteraxantina, adonirubina, adonixantina, astaxantina, cantaxantina, capsorubrin, β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno, β,ψ -caroteno, δ -caroteno, ϵ -caroteno, equinenona, 3-

hidroxiequinenona, 3'-hidroxiequinenona, γ -caroteno, ψ -caroteno, 4-ceto- γ -caroteno, ζ -caroteno, α -criptoxantina, deoxiflexixantina, diatoxantina, 7,8-didehidroastaxantina, didehidrolipopeno, fucoxantina, fucoxantanol, isorenierateno, β -
5 isorenierateno, lactucaxantina, luteína, licopeno, mixobactona, neoxantina, neurosporeno, hidroxineurosporeno, peridino, fitoeno, fitoflueno, rodopina, glucosida rodopina, 4-ceto-rubixantina, sifonaxantina, esferoideno, esferoidenona, espiriloxantina, toruleno, 4-ceto-toruleno, 3-hidroxi-4-ceto-toruleno, uriolida,
10 acetato uriolida, violaxantina, zeaxantina- β -diglucosida, zeaxantina, y carotenoides C_{30} . Adicionalmente, los compuestos carotenoides incluyen derivados de éstas moléculas, que pueden incluir grupos funcionales hidroxí-, metoxi-, oxo-, epoxi-, carboxi-, o grupos aldehídicos. Adicionalmente, los compuestos
15 carotenoides incluyen éster (por ejemplo, éster glicosida, éster de ácido graso) y derivados de sulfato (por ejemplo, xantofilos esterificados).

[0012] *Producto comercial*: Como se utiliza aquí, un "producto
20 comercial" es un producto que se vende en el comercio.

[0013] *Producto de fermentación comercialmente importante*: Como se utiliza aquí, la frase "Producto de fermentación comercialmente importante" se refiere a un compuesto u otro
25 agente que se produce por fermentación de un organismo filamentoso y es útil en la producción de producto comercial. En algunas realizaciones de la descripción, el compuesto u otro agente en sí mismo, y/o la célula que lo produce, es un producto comercial; en algunas realizaciones, un compuesto u otro agente

se deriva para generar un producto comercial; en algunas realizaciones, un compuesto u otro agente, derivado del mismo, y/o célula productora, se combina junto con uno o más ingredientes o componentes, para generar un producto comercial.

- 5 Para dar unos pocos ejemplos, los compuestos, agentes, derivados y/o células se pueden combinar con otros ingredientes o componentes para producir, por ejemplo, detergentes para lavandería y lavaplatos, alimentos y alimentos para animales, productos horneados, limpiadores para lentes, cosméticos, 10 tensoactivos, disolventes, fibras, floculantes para tratamiento de aguas residuales, gomas para aplicaciones alimenticias e industriales, agentes bacteriostáticos en una variedad de aplicaciones, jabones, shampoos, papeles y recubrimientos, entre otros.

15

- [0014] *Derivado*: El término "derivado" como se utiliza aquí significa un compuesto cuyo estructura se relaciona cercanamente con aquella del compuesto progenitor del que es un "derivado" y 20 que se puede producir a partir de la molécula progenitora mediante cualquier número de procesos que incluyen tratamiento físicos, fermentación, biocatálisis, transformación química, y sus combinaciones. Para dar unos pocos ejemplos, los ejemplos de derivados de ácidos orgánicos incluyen formas hidrogenadas de los compuestos y/o esteres (por ejemplo, esteres dibásicos) y 25 diaminas de ácidos orgánicos. También, en algunas realizaciones, los polímeros de ácidos orgánicos, que incluyen polímeros biodegradables (ver por ejemplo Zeikus et al. (1999) Appl Microbiol Biotechnol 51: 545-552 que se incorpora aquí como referencia en su totalidad, se considera que son derivados de

ácidos orgánicos. Particularmente los compuestos que se considera que son derivados de ácidos orgánicos de acuerdo con la presente descripción incluyen, por ejemplo, tetrahidrofuran (THF), butanediol (por ejemplo 1,4-butanediol), γ -butiro lactona, 5 pirrolidinonas (por ejemplo N-metil-2-pirrolidona), 4,4-Bionelo, ácido hidroxibutírico, succindiamida, 1,4-diamino butano, y succinonitrilo, hidroxibutiro lactona, hidroxisuccinato, ácido adípico, y derivados de succinato insaturados. Ejemplos de "derivados" de compuestos carotenoides incluyen, pero no se 10 limitan a, esteres de ácido graso y glicosida de carotenoides y emulsiones aceitosas que contienen compuestos carotenoides. "Derivados" de ejemplo de ácidos grasos incluyen, pero no se limitan a, esteres de ácidos grasos tales como aceites biológicos (por ejemplo triglicéridos). Para dar solo unos pocos ejemplos, 15 "derivados" de ejemplo de hidrocarburos extracelulares incluyen, pero no se limitan a, polisacáridos modificados que contienen uno o más de azúcares β 1 $\rightarrow$ 4-ligados (por ejemplo hexosas, pentosas), azúcares amino β 1 $\rightarrow$ 4-ligados (por ejemplo glucosamina, galactosamina, N-acetilglucosamina), o cadenas laterales que 20 contienen azúcar ligadas covalentemente (por ejemplo β 1 $\rightarrow$ 3, β 1 $\rightarrow$ 6). "Derivados" de ejemplo de enzimas industriales son típicamente aquellas que comparten identidad de secuencia significativa con la enzima progenitora e incluyen particularmente un conjunto de elementos de secuencia característicos compartidos. En muchas 25 realizaciones, un derivado de una enzima industrial inducirá por lo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más durante de identidad de secuencia general y adicionalmente incluirá por lo menos un elemento de secuencia característico que comprende una extensión de por lo

menos 5-15 amino ácido que muestra por lo menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con la enzima progenitora. Típicamente, el elemento de secuencia característico incluirá una pluralidad de residuos involucrados en catálisis. Un "derivado" de ejemplo de un ingrediente farmacéutico activo es un pro-fármaco de la forma activa del compuesto.

[0015] *Condiciones de Fermentación:* Las "Condiciones de fermentación", como se utiliza ese término aquí, se refiere a parámetros definidos utilizados en el crecimiento líquido de organismos formadores de glóbulos. Los parámetros específicos que contribuyen a las condiciones de fermentación incluyen, pero no se limitan a, composición de medio (que incluye sustancias tal como tensoactivos y materiales particulados, identificación de fuentes de carbono, etc.), pH, temperatura, duración de cultivo, aireación y/o agitación mecánica, y cantidad de inoculación y forma (por ejemplo esporas o cultivo vegetativo). En muchas realizaciones, las condiciones de fermentación se diseñan y/o seleccionan para promover la acumulación de uno o más productos de fermentación deseados tal como uno o más ácidos orgánicos, compuestos carotenoides, ácidos grasos, carbohidratos extracelulares, enzimas industriales, ingredientes farmacéuticos activos, o compuestos insecticidas. En muchas realizaciones, las condiciones de fermentación utilizadas para almacenamiento son sustancialmente idénticas a aquellas utilizadas para la producción industrial de un producto de fermentación relevante comercialmente particular.

[0016] *Construcción con Ingeniería Genética*: Un microorganismo que ha sido "construido con ingeniería genética", como se utiliza ese término aquí, es uno cuyo material genético se ha manipulado por la mano del hombre. *Homogéneo*: Como se utiliza aquí, "homogéneo" y "homogeneidad" se refiere a como se agrupan cercanamente los valores determinados para un parámetro dado analizado desde un grupo de glóbulos fúngicos. La homogeneidad se puede determinar al evaluar la desviación estándar de un conjunto de muestra. En la comparación de diferentes conjuntos de muestra, un valor de desviación estándar pequeño indica mayor homogeneidad. La desviación estándar se puede determinar para un conjunto de muestras, en donde el número de muestras en el conjunto suministra un nivel de confianza de por lo menos 90%, y en muchos casos por lo menos 95%, en la determinación. Típicamente, se pueden usar por lo menos 3 muestras. Cuando se utilizan múltiples conjuntos de muestras, por ejemplo, un conjunto de muestra de control y un conjunto de muestra de prueba, cada conjunto puede contener el mismo número de muestras, por ejemplo, por lo menos 3 muestras cada uno.

20

[0017] *Densidad mejorada y tamaño mejorado*: Como se utiliza aquí, un "tamaño mejorado" se refiere a un hallazgo de glóbulos fúngicos de un conjunto de muestra tratado, en comparación con aquellos de un conjunto de muestras de control, que exhiben una proporción de glóbulos incrementada cuyo diámetro es de 100-175 micras, y, cuando se comparan los conjunto de muestra de glóbulos fúngicos múltiples que exhiben aproximadamente el mismo porcentaje de glóbulos caen dentro de éste rango, que exhiben adicionalmente un diámetro de glóbulo más homogéneo a través de

25

la población de muestra. El diámetro medido para cada glóbulo puede ser el diámetro mayor o un diámetro promedio representativo o aproximado del mismo.

5 [0018] Como se utiliza aquí, una "densidad mejorada" se refiere a un hallazgo de que los glóbulos fúngicos de un conjunto de muestra tratado, en comparación con aquellos de un conjunto de muestra de control, presentan una proporción de glóbulos incrementada cuya densidad óptica cae dentro de un rango de 33-
10 100% de la densidad óptica máxima encontrada para glóbulos en la misma población y, cuando se compara con conjuntos de muestras de glóbulos fúngicos exhiben aproximadamente el mismo porcentaje de glóbulos que caen dentro de éste rango, que exhibe adicionalmente un valor de densidad óptico más homogéneo para los glóbulos a
15 través de la población de muestra. Esto se basa en las mediciones de densidad óptica para glóbulos individuales. En varias realizaciones, la densidad óptica se puede evaluar al medir la Extinción y la ventana de comparación relevante es luego de 33-
20 100% de Extinción máxima encontrada para los glóbulos en la población de muestra. La Extinción se puede medir de acuerdo con varios métodos conocidos en la técnica y esto se puede hacer por detección de foto-transmisión (o absorbancia) de los glóbulos, por ejemplo, densitometría. Cualquier longitud de onda útil se puede emplear para esto; algunos ejemplos útiles incluyen 515 nm,
25 545 nm, y 610 nm, y sus combinaciones. La Extinción también se puede medir de acuerdo con las instrucciones del fabricante que acompañan varios instrumentos analíticos, tal como los instrumentos COPASTM (disponible de Union Biometrica, Holliston, MA, USA). Otros ejemplos de protocolos útiles para las mediciones

de extinción que se pueden adaptar fácilmente para la medición de glóbulos fúngicos incluyen aquellos descritos en: T. Kodadek & K. Bachhawat-Sikder, "Optimized protocols for the isolation of specific protein-binding peptides o peptoids from combinatorial
 5 libraries displayed on beads," *Molecular BioSystems* 2(1):25ff. (2006); Publicación de Patente Estadounidense No. 2007/0298411 otorgada a Choo para "Cell Culture" (ver Ej. 11); y R. Pulak, "Techniques for Analysis, Sorting, y Dispensing de *C. elegans* on the COPAS™ Flow-Sorting System," in K. Strange (ed.); *C. elegans: Methods and Applications*, pp. 275-286, in series J.M. Walker (series ed.), Methods in Molecular Biology, vol. 351 (Aug.
 10 15, 2006).

[0019] Tales mediciones de tamaño y/o densidad se pueden
 15 desarrollar mecánicamente, por ejemplo, al obtener una señal óptica que está en proporción al parámetro de tamaño o densidad seleccionado, aunque en realizaciones alternas se puede emplear inspección visual. Se conocen varios instrumentos y técnicas
 20 analíticas para tal medición de señal óptica provenientes de los campos de la espectrometría, citometría de flujo, y densitometría. En algunas realizaciones, se pueden obtener señales ópticas a partir de glóbulos sin etiquetar. Por ejemplo, los glóbulos fúngicos se pueden estimular para emitir una señal fluorescente inherente. En otras realizaciones, el etiquetado,
 25 por ejemplo, con tinte u otra marca detectable se puede utilizar, y este puede ser un tinte fluorescente. Con el fin de preparar los datos de señal óptica para comparación de poblaciones de muestra, los datos se pueden convertir primero a valores de densidad o tamaño que se utilizan luego en desarrollar la

comparación, o se pueden utilizar los datos de señal ópticos allí sin la anterior conversión. El orden de tales etapas no limita las realizaciones mismas. En algunas realizaciones de estas, se pueden emplear células fúngicas filamentosas que no son parte de un glóbulo, pero pueden ser parte de una hifa, aglomerado de célula, u otra forma fúngica, o pueden ser amorfos solitarios; sin embargo, en muchas realizaciones en las que se describen células para uso allí, la célula se puede situar como parte de un glóbulo que se suministra, tratadas para producir células de las mismas tratadas, propagadas para producir glóbulos progenitores de los mismos, u otras manipuladas de acuerdo con la descripción.

[0020] *Protocolo Mutagénico:* Un "protocolo mutagénico", como se utiliza el término aquí, se refiere a etapas aplicadas a una células progenitora o estirpe para producir células progenitoras o estirpes en las que contienen una o más diferencias genéticas de la progenitora. En algunas realizaciones, un protocolo mutagénico involucra la introducción de uno o más ácidos nucleicos en las células progenitoras; en algunas realizaciones, un protocolo mutagénico involucra la aplicación de un químico u otro mutágeno (por ejemplo, radiación tal como radiación UV, etc.) a una célula progenitora o estirpe; en algunas realizaciones, un protocolo mutagénico involucra la aplicación de un ADN objetivo en una célula con enzimas de reparación de ADN deterioradas.

[0021] *Microorganismos Formadores de Glóbulos:* Como se utiliza aquí, el término "microorganismos formadores de glóbulos" está destinado a referirse a un hongo a bacteria que presenta

crecimiento de formas de glóbulos. Típicamente, un microorganismo formador de glóbulos forma glóbulos del orden de aproximadamente 75-500 micras de diámetro, que pueden finalmente alcanzar un tamaño de glóbulo de 1-2 milímetros hacia el final de la fermentación. En muchas realizaciones, un microorganismo en forma de glóbulos es un microorganismo formador de glóbulo no coagulante, lo que significa que, cuando se cultiva bajo condiciones de fermentación, sus glóbulos se forman a partir de un número pequeño o muy pequeño de células (por ejemplo, menores de 5, 4, 3, o 2) a diferencia de la aglomeración y posterior crecimiento de un número significativo (por ejemplo, más de 10 o más) de esporas y/o hifas para formar grupos. En algunas realizaciones, se forma un único glóbulo del crecimiento de una única espota. Los microorganismos formados de glóbulos no coagulantes son particularmente útiles en la práctica de la presente descripción debido a que los glóbulos formados a partir de una única espota son genéticamente homogéneos (es decir, clónicos). La presente invención abarca el reconocimiento de que la tendencia de microorganismos formadores de glóbulos no coagulantes generan grupos formados de solo una espota que se pueden explotar con el fin de permitir la separación de células progenitoras genéticamente distintas después de mutagenia de una célula progenitora. En contraste, su la progeie de una célula progenitora mutagenizada forma aglomeraciones o conjuntos, tales aglomeraciones o conjuntos, contienen típicamente células genéticamente heterogéneas, que resultan del crecimiento de esporas genéticamente heterogéneas.

Descripción de Ciertas Realizaciones Preferidas

[0022] Como se describe aquí, la presente descripción proporciona metodologías para identificar, categorizas y/o
5 clasificar físicamente microorganismos formadores de glóbulos basados en una propiedad ópticamente detectable.

Microorganismos formadores de glóbulos

10 [0023] Las estrategias de la presente descripción se pueden aplicar a cualquier microorganismo formador de glóbulos. En muchas realizaciones, estas técnicas se aplican a bacterias formadoras de glóbulos y/o a hongos formadores de glóbulos (por ejemplo, hongos filamentosos). En algunas realizaciones, los
15 microorganismos formadores de glóbulos son unicelulares; en algunas realizaciones, los microorganismos formadores de glóbulos son multicelulares. En algunas realizaciones de la presente descripción, una mezcla de microorganismos formadores de glóbulos
● a ser clasificada incluye organismos unicelulares y
20 multicelularas. En algunas realizaciones, las células individuales de un microorganismo formador de glóbulos pueden ser multinucleadas.

[0024] Por ejemplo, los microorganismos formadores de glóbulos
25 que se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción incluyen, por ejemplo, hongos filamentosos y bacterias filamentosas.

[0025] Los hongos filamentosos representativos incluyen, pero no se limitan a, hongos filamentosos del género *Acremonium*, *Aspergillus*, *Blakeslea*, *Emericella*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Nodulisporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phycomyces*, *Rhizopus*, o

5 *Trichoderma*. En algunas realizaciones, la presente descripción utiliza hongos filamentosos de las especies *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Mortierella alpina*, *Paecilomyces sp*, *Rhizopus oryzae*, o *Trichoderma reesei*.

10 [0026] Bacterias filamentosas representativas incluyen, pero no se limitan a, bacterias filamentosas del género *Actinosynnema*, *Amycolaptopsis*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolispora*, o *Streptomyces*. En algunas realizaciones

15 particulares, la presente descripción utiliza bacterias filamentosas de las especies *Actinosynnema pretiosum*, *Amycolatopsis orientalis*, *Nocardia farcinica*, *Rhodococcus erythropolis*, *Saccharopolispora erythraea*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces clavuligerus*, *Streptomyces coelicolor*,

● *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces*

20 *hygroscopicus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces tsukubaensis*, o *Streptomyces venezuelae*.

[0027] En general, la presente descripción se puede aplicar particularmente para clasificar muestras que contienen

25 microorganismos genéticamente diversos. En algunas realizaciones de la presente descripción, los microorganismos formadores de glóbulos utilizados son de la forma de tipo natural. Se apreciará por aquellos medianamente versados en la técnica que la forma tipo natural necesita no se homogénea (por ejemplo, clónica); en

algunas realizaciones de la presente invención, por lo tanto se clasifica una muestra tipo intacta que comprende heterogeneidad. En muchas realizaciones, sin embargo, la muestra a ser clasificada incluye por lo menos algunos microorganismos que se han construido con ingeniería genética. En algunas realizaciones, una muestra a ser clasificada contiene microorganismos relacionados como progenie producida a través de la aplicación de un protocolo mutagénico a un microorganismo progenitor.

10 [0028] En algunas realizaciones de la presente descripción, por lo menos algunos de los microorganismos en una muestra a ser analizada y/o clasificada como se describe aquí produce por lo menos un producto de fermentación comercialmente importante (que incluye, por ejemplo, precursores de o intermedios para producto
15 comerciales o componentes de los mismos). En algunas realizaciones, una muestra incluye microorganismos genéticamente diversos que difieren en su capacidad para producir los productos de fermentación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una muestra incluye un microorganismo progenitor y por lo menos
20 microorganismo de progenie generado a través de la aplicación de un protocolo mutagénico, en donde el microorganismo de progenie difiere del progenitor en su capacidad para producir el producto de fermentación (por ejemplo, el microorganismo progenitor no produce el producto, y la progenie produce más del producto que
25 el microorganismo progenitor bajo idénticas condiciones de fermentación).

[0029] Por ejemplo, los productos de fermentación comercialmente importantes representativos que se pueden producir

por microorganismos utilizados de acuerdo con la presente descripción incluyen, pero no limitan a, ácidos orgánicos, compuestos carotenoides, ácidos grasos esenciales, enzimas industriales, ingredientes farmacéuticos activos, carbohidratos extracelulares, compuestos insecticidas, sus derivados, etc., y combinaciones de los mismos.

[0030] Los ácidos orgánicos de ejemplo que se puede producir como se describe aquí incluyen, por ejemplo, ácidos C2-C6 mono y di-carboxílicos, ácidos C3-C6 tri-carboxílicos, ácido acético, ácido butírico, ácido citracónico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido glicólico, ácido hidroxibutírico, ácido isocítrico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido maléico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxaloacético, ácido propiónico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido tartrónico, ácido tricarbalílico, sus derivados, y combinaciones de cualquier de los anteriores.

[0031] Ejemplos de compuestos carotenoides que se pueden producir como se describe aquí incluye, por ejemplo, astaxantina, beta-caroteno, cantaxantina, licopeno, luteína, fitoeno, fitoflueno, zeaxantina, sus derivados, y combinaciones de cualquiera de los anteriores.

[0032] Ácidos grasos esenciales de ejemplo que se pueden producir como se describe aquí incluyen, por ejemplo, ácido linoléico (por ejemplo ácido linoléico conjugado), ácido araquidónico (ARA), ácido docosahexaenóico (DHA), ácido

eicosapentaenóico (EPA), sus derivados, y combinaciones de cualquier de los anteriores.

[0033] Enzimas industriales de ejemplo que se pueden producir como de describe aquí incluyen, por ejemplo, carbohidrasas, que incluyen pero no se limitan a alfa-amilasa, β -amilasa, celulasa, β -glucanasa, β -glucosidasa, dextranasa, dextrinasa, alfa-galactosidasa (melibiasa), glucoamilasa, hemicelulasa, invertasa, laccasa, naringinasa, pentosanasa, pectinasa, pululanasa, y xilanasas; proteasas, que incluyen pero no se limita a, tripsina, proteinasa ácida, proteasa alcalina, bromelaina, y pepsina; peptidasas, que incluyen pero no se limitann a, aminopeptidasa, endo-peptidasa, y subtilisina; lipasas y esterasas, que incluyen pero no se limita a, aminociclasa, glutaminasa, lisozima, acilasa penicilina, e isomerasas; oxidoreductasas, que incluyen pero no se limitan a, deshidrogenasa alcohol, aminoácido oxidasa, catalasa, cloroperoxidasa, y peroxidasa; liasas, que incluyen pero no se limitan a, decarboxilasa acetolactato, β -decarboxilasa aspártico, e histidasa; transferasas, que incluyen pero no se limitan a, glicosiltransferasa ciclodextrina; fitasas; derivados de las mismas, y combinaciones de cualquiera de los anteriores.

[0034] Ingredientes farmacéuticos activos de ejemplo que se pueden producir como de describe aquí incluyen, por ejemplo, metabolitos, por ejemplo, metabolitos citotóxicos, por ejemplo, agentes anti-bacterianos. Un "anti-bacteriano" es una molécula que tiene actividad citocida o citostática contra algunas o todas las bacterias. Anti-bacteriales incluyen, sin limitación, β -lactamas; inhibidores β -lactamasa tal como ácido clavulánico;

aminoglicosidas tal como gentamicina, neomicina, estreptomycin y tobramicina; ansamicinas tal como geldanamicina, rifamicina, y ansamitocina; glicopéptidos tal como teicoplanina y vancomicina; macrolidas tal como eritromicina, azitromicina, y claritromicina; 5 polipéptidos tal como bacitracina, colistina y polimixina B; y tetraciclinas tal como doxiciclina, minociclina, y oxitetraciclina. β -lactamas incluyen, sin limitación, penicilinas y cefalosporinas e intermedios biosintéticos de los mismos. Penicilinas y intermedios biosintéticos incluyen, sin limitación, 10 isopenicilina N, ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), penicilina G, penicilina N, y penicilina V. Cefalosporinas e intermedios biosintéticos incluyen, sin limitación, deacetoxicefalosporina V (DAOC V), deacetoxicefalosporina C (DAOC), deacetylcefalosporina C (DAC), ácido 7-aminodeacetoxicefalosporánico (7-ADCA), 15 cefalosporina C, ácido 7-B- (5-carboxi-5-oxopentanamido)-cefalosporánico (ceto-AD-7ACA), ácido 7-B- (4-carboxybutanamido)-cefalosporánico (GL-7ACA), y ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA).

20 [0035] En ciertas realizaciones de la descripción, el ingrediente farmacéutico activo es un anti-hipercolesterolémico o un intermedio biosintético del mismo. Un "anti-hipercolesterolémico" es un fármaco administrado a un paciente diagnosticado con niveles de colesterol elevados, para el 25 propósito de reducir los niveles de colesterol. Anti-hipercolesterolémicos incluyen estatinas, que incluyen, sin limitación, atorvastatina, rosuvastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina (compactina), simvastatina, cerivastatina, pitavastatina, y pravastatina.

[0036] En ciertas realizaciones de la descripción, el ingrediente farmacéutico activo es un inmunosupresor o un intermedio biosintético del mismo. Un "inmunosupresor" es una molécula que reduce o elimina una respuesta inmune en un anfitrión cuando el anfitrión se cambia con una molécula inmunogénica, que incluye moléculas inmunogénicas presentes en órganos, tejidos o células transplantadas. Inmunosupresores incluyen, sin limitación, miembros de la familia ciclosporina, ácido micofenólico, rapamicina, tacrolimus, sirolimus y beauverolida L. incluye Ciclosporinas, sin limitación, ciclosporina A y ciclosporina C.

[0037] En ciertas realizaciones de la descripción, el ingrediente farmacéutico activo es un alcaloide ergot o intermedio biosintético del mismo. Un "alcaloide ergot" es un miembro de una gran familia de compuestos alcaloides que se producen más frecuentemente en la esclerótica de hongos del genero Claviceps. Un "alcaloide" es una molécula pequeña que contiene nitrógeno y tiene características de pH básicas. Las clases de alcaloides ergot incluyen alcaloides clavina, ácidos lisérgicos, aminoácidos lisérgicos, y alcaloides de péptidos ergot. Los alcaloides ergot incluyen, sin limitación, ergotamina, ergosina, ergocristina, ergocriptina, ergocornina, ergotaminina, ergosinina, ergocristinina, ergocriptinina, ergocorninina, ergonovina, ergometrinina, y ergoclavina.

[0038] En ciertas realizaciones de la descripción, el ingrediente farmacéutico activo es un inhibidor de la angiogenia

ó un intermediario biosintético de la misma. Un "inhibidor de la angiogenia" es una molécula que reduce o evita la formación de nuevos vasos sanguíneos. Los inhibidores de angiogenia han probado ser efectivos en el tratamiento de diversas enfermedades humanas que incluyen, sin limitación, cáncer, artritis reumatoide, y retinopatía diabética. Los inhibidores de la angiogenia incluyen, sin limitación, fumagilina y ovalicina.

[0039] En ciertas realizaciones de la descripción, el ingrediente farmacéutico activo es un inhibidor de sintasa glucano o un intermediario biosintético del mismo. Un "inhibidor de sintasa glucano" es una molécula que reduce o inhibe la producción 1,3- β -D-glucano, un polímero estructural de paredes celulares fúngicas. Los inhibidores de sintasa glucano son una clase agentes antifúngicos. Los inhibidores de sintasa glucano incluyen, sin limitación, equinocandina B, pneumocandina B, aculeacina A, y papulacandina.

[0040] En ciertas realizaciones de la descripción, el ingrediente farmacéutico activo es un compuesto anti-neoplástico o un intermediario biosintético del mismo. Un compuesto "anti-neoplástico" es una molécula que evita o reduce la formación de tumores. Los compuestos anti-neoplásticos incluyen, sin limitación, taxol (paclitaxel) y taxoides relacionados.

[0041] Ejemplos de compuestos insecticidas incluyen, pero no se limitan a, avermectina y ácido nodulispórico.

[0042] Carbohidratos extracelulares de ejemplo que se pueden producir como de describe aquí incluyen, por ejemplo, quitina, quitosan, N-acetilglucosamina, glucosamina, poligalactosamina, pululán, escleroglucano, derivados de los mismos, y combinaciones
5 de cualquiera de los anteriores.

[0043] Microorganismos formadores de glóbulos típicos, para uso de acuerdo con la presente descripción se hacen crecer bajo condiciones que soportan el crecimiento de la forma de glóbulos,
10 de tal manera que la muestra que se analiza incluye organismos en forma de glóbulos. Como se apreciará por aquellos medianamente versados en la técnica, una variedad de diferentes parámetros puede tener un impacto y en qué medida crece un microorganismo particular en una forma de glóbulo o de micela. Adicionalmente,
15 al variar uno o más de estos parámetros de condición de fermentación, es posible impactar un microorganismo formador de glóbulo particular que crece como un microorganismo formador de glóbulo no coagulante o diferentes formas de grupos como un
● resultado de la aglomeración de un número significativo de
20 esporas y/o hifas.

[0044] Solo para dar pocos ejemplos, la concentración del inóculo puede influenciar profundamente un microorganismo que crece en una forma micela o en forma de glóbulo, y puede
25 influenciar adicionalmente las formas de grupos de glóbulos no coagulantes. En general, para organismos filamentosos, entre menor es la concentración de inóculo se promueve más probablemente el crecimiento en una forma de micela que el crecimiento en forma de glóbulo. Concentraciones incrementadas de

inocula pueden resultar más probablemente en forma de crecimiento de glóbulo. En general, la inocula extremadamente alta resulta en agrupamiento, aunque, dentro de un rango de inocula claramente alto, es frecuentemente posible promover el crecimiento en forma de glóbulo no coagulante. Aquellos medianamente versados en la técnica apreciarán, son embargo, que la cantidad absoluta de inoculo que promoverá la formación de glóbulo puede variar ampliamente a través de organismos y procesos de fermentación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los glóbulos se forman sobre un rango de concentración de espora de aproximadamente 1.0×10^4 a aproximadamente 1.0×10^6 esporas/ml.

[0045] Otros parámetros que pueden afectar el crecimiento en forma de glóbulos incluye, por ejemplo, la composición del medio (que incluyen la presencia o ausencia de sustancias tal como cationes específicos, tensoactivos, y materiales particulados y/o la identidad de la fuente de carbón), pH, temperatura, duración del cultivo, presencia y/o grado de aireación y/o agitación mecánica.

[0046] Condiciones que soportan el crecimiento de formar de glóbulo, particularmente de microorganismos filamentosos se conoce bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Appl Biochem Biotechnol.* 2006 Sep; 134(3):249-62, *Appl Biochem Biotechnol.* 2006 Spring; 129-132:844-53, *J Eukaryot Microbiol.* 2006 May-Jun; 53(3): 199-203, *Microbiol Res.* 2005; 160(4):375-83, *Biotechnol Prog.* 2005 Sep-Oct; 21(5): 1389-400, *Biotechnol Bioeng.* 2005 Dec 5; 92(5):614-23, *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2005 Jun; 32(6):227 -33, *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005 Aug;

68(3):305-10, *J Biotechnol.* 2005 Mar 2; 116(1):61-77, *J Microbiol.* 2004 Mar; 42(1):64-7, *Bioprocess Biosyst Eng.* 2004 Oct; 26(5):315-23, *J Appl Microbiol.* 2004; 96(6): 1296-305, *Biotechnol Bioeng.* 2004 Jan 5; 85(1):96-102, *J Appl Microbiol.* 2003; 94(1): 120-6, *Curr Microbiol.* 2003 Jan; 46(1):24-7, *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001 Jun; 55(6):704-11, *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001 Jul; 56(1-2):88-92, *Appl Biochem Biotechnol.* 2000 Spring; 84-86:779-89, *Biotechnol Prog.* 2000 Mar-Apr; 16(2):222-7, *Biotechnol Bioeng.* 1999 May 20; 63(4):442-8, *Biotechnol Bioeng.* 1998 Oct 20; 60(2):216-29, *Biotechnol Bioeng.* 1998 Jun 5; 58(5):478-85, *Enzyme Microb Technol.* 1996 Sep; 19(4):261-6, *Biotechnol Prog.* 1995 Jan- Feb; 11(1):93-8, *Appl Microbiol Biotechnol.* 1992 May; 37(2): 157-63, *Biotechnol Bioeng.* 1977; 19:781-99, y Solicitud de Patente Estadounidense 20030215950.

Parámetros Ópticos

[0047] Como se describe aquí, los microorganismos men forma de glóbulos se pueden clasificar con base en cualquiera de una variedad parámetros ópticos. Por ejemplo, se pueden clasificar los microorganismos con base en uno o más parámetros ópticos seleccionados de los grupos que consisten de tamaño, densidad óptica, presencia y/o intensidad de emisión fluorescente, etc., y combinaciones de los mismo.

25

[0048] Cuando se clasifican microorganismos con base en el tamaño, los microorganismos se clasifican por una longitud axial definida que se define por el tiempo de vuelo de un glóbulo sencillo a través de una zona de detección fija de una célula de

flujo. En resumen, los glóbulos se pasan individualmente a través del foco de un rayo láser, y se registran las señales mediante un detector de dispersión delantero y detectores de fluorescencia. El tamaño relativo, o tiempo de vuelo (TOF), se mide por un
5 detector de pérdida de la luz axial, que registra el tiempo en que permanece la señal de bloqueo de luz sobre un nivel umbral pre-establecido.

[0049] La clasificación por tamaño de glóbulo es deseable,
10 entre otras cosas, porque el tamaño de la partícula puede impactar las fermentaciones a escala industrial de varias maneras, que incluye pero no se limita a, alterar las propiedades de transferencia de oxígeno a través del cultivo completo y de diferentes regiones de un glóbulo dado y alterar los
15 requerimientos de energía y costo para agitación física y/o aireación del cultivo. El tamaño también se puede utilizar como una lectura para propiedades deseables, que incluyen pero no se limitan a, capacidad mejorada para utilizar un sustrato complejo
● específico o la resistencia mejorada de un glóbulo dado para
20 endurecer condicione de cultivo tal como pH extremo (por ejemplo, mayor o menor pH), alta osmolaridad de la fuente de carbono o producto de fermentación, presencia de productos tóxicos o intermedios biosintéticos o sub-productos, etc.

25 [0050] Cuando se clasifican los microorganismos con base en una densidad óptica de los glóbulos, la densidad óptica de un glóbulo, o extinción óptica, se determina por la señal integrada total del bloqueo de luz (como se determina por un detector de pérdida de luz axial).

[0051] La clasificación por densidad óptica de los glóbulos es deseable debido, entre otras cosas, a la densidad óptica del glóbulo, como el tamaño del glóbulo, que también puede impactar la fermentación a escala industrial y puede ser una lectura para otras características deseables (o indeseables).

[0052] Cuando se clasifican microorganismos con base en la fluorescencia, la intensidad de la fluorescencia se puede determinar simultáneamente en uno o más de una longitud de onda diferentes por filtros de excitación y de emisión. La emisión fluorescente relevante puede representar autofluorescencia de los microorganismos o puede alternativamente (o adicionalmente) la fluorescencia de una etiqueta fluorescente particular asociada con uno o más de los microorganismos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se pone en contacto una muestra de microorganismos con un reactivo que se asocia covalentemente con una etiqueta fluorescente y que se une no covalentemente (directa o indirectamente) con uno o más componentes de microorganismos. Para dar solo un ejemplo, en algunas realizaciones, se pone en contacto una muestra de microorganismos con un anticuerpo etiquetado que se une específicamente con uno o más marcadores de microorganismos que se pueden expresar en o producir solo por algunos de los microorganismos dentro de una muestra.

[0053] En algunas realizaciones, una etiqueta fluorescente se asocia con el exterior de un microorganismo (por ejemplo, a través de la interacción con un componente de superficie celular); en algunas realizaciones, una etiqueta fluorescente se

asocia con el interior de un microorganismo (por ejemplo, han sido ocupados por células de replicación o metabolización, etc.). En algunas realizaciones, una etiqueta fluorescente se asocia con el interior y el exterior de un microorganismo.

5

[0054] En algunas realizaciones, una muestra de microorganismos contiene más de una fuente potencial de emisión fluorescente. En algunos casos, una muestra de microorganismos contiene más de una etiqueta fluorescente. En algunas realizaciones, la fluorescencia (y/o intensidad) de más de un fluoróforo se monitorea y puede proporcionar una base para clasificación. En algunas realizaciones, la intensidad de la fluorescencia en una o más longitudes de onda se monitorea en combinación con el tamaño y/o densidad óptica del microorganismo formador de glóbulo.

10

15

20

25

[0055] Solo para dar unos pocos ejemplos específicos de fuentes de emisión fluorescente que se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción, en algunas realizaciones, la fuente de emisión fluorescente puede ser un tinte fluorescente que es un análogo o derivado de un carbohidrato utilizado para el cultivo de microorganismos con forma de glóbulo. En algunas de tales realizaciones, el análogo o derivado de un carbohidrato es un análogo o derivado de glucosa tal como, por ejemplo, 2-NBDG (2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-deoxi-D-glucosa) o 6-NBDG (6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-6-deoxiglucosa), o combinaciones de los mismos. Tales análogos de glucosa se pueden emplear como indicadores de captación de glucosa y quizá de la actividad metabólica general. Por ejemplo,

se pueden incubar microorganismos formadores de glóbulos con medio que contiene glucosa fluorescente (y generalmente que le falta glucosa no marcada), luego se enjuaga el medio fluorescente y se analiza para emisión fluorescente. Los microorganismos formadores de glóbulos que presentan intensidad fluorescente específica se pueden identificar seguidos por excitación y emisión en longitudes de onda específicos (por ejemplo excitación a 488 nm y emisión a 545nm).

10 [0056] En algunas realizaciones, la fuente de emisión fluorescente puede ser un tinte fluorescente que es un indicador de la viabilidad de los microorganismos con forma de glóbulo. En algunas de tales realizaciones, el indicador de viabilidad se selecciona del grupo que consiste de naranja acridina, FUN1
15 (yoduro de 2-cloro-4-(2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metilideno)-1-fenilquinolinio), rojo neutro, yoduro de propidio, resazurina, azul tripan, y combinaciones de los mismos. Como un ejemplo, FUN1 es una tinte que forma estructuras
intravacuolares rojas en células vivas de muchas especies de
20 hongos. Las células vivas y muertas colocan en la sonda fluorescente FUN1 cuando la membrana del plasma ésta intacta, y éste tinte se ve primero como una fluorescencia verde difusa en el citosol de las células vivas y muertas. Posteriormente, en células metabólicamente activas, FUN1 se transporta en las
25 vacuolas y se convierte en estructuras intravacuolares cilíndricas rojas (CIVS). Los microorganismos formadores de glóbulos se pueden teñir con FUN1 y clasificar por glóbulos con el nivel de fluorescencia roja deseada. La intensidad de

fluorescencia se considera que se correlaciona con la actividad metabólica de los glóbulos.

[0057] En algunas realizaciones, la fuente de emisión
5 fluorescencia puede ser un tinte fluorescente que es un indicador del pH intracelular de un microorganismo con forma de glóbulo. En algunas de tales realizaciones, el indicador del pH intracelular se selecciona del grupo que consiste de SNAFL, SNARF 4F, SNARF 5F, y combinaciones de estos. SNARF 4F (ácido seminaftorodafluor-
10 4F 5-(and-6)-carboxílico), que es un derivado fluorinado de C-SNARF-1, y otros tintes relacionados (por ejemplo SNAFL y SNARF 5F) son sondas radiométricas fluorescentes que permiten la cuantificación del pH intracelular independiente de la concentración de la sonda y/o la intensidad del láser. El tinte
15 SNARF 4F tiene un cambio de espectro dependiente del pH de tal manera que éste se excita en una longitud de onda y la emisión se mide en dos longitudes de onda. Se asume que el tinte existe como mezcla de dos formas, los estados monoaniónicos (naftol) y
20 dianiónicos (naftolato), entre los que se establece un equilibrio sensible al pH dependiendo de la acidez o alcalinidad de la solución o mildiu intracelular. Una relación de intensidades de fluorescencia para las dos longitudes de onda de emisión se utiliza para determinar el pH. Los tintes que indican pH intracelular pueden ser útiles para teñir microorganismos
25 formadores de glóbulos. En algunas realizaciones, un indicador de pH se puede utilizar para identificar glóbulos capaces de mantener un rango particular de pH intracelular, aún bajo condiciones tal como el cambio significativo en el pH extracelular (por ejemplo un pH menor de 3.0) o la presencia de

otros agentes conocidos por impactar la homeostasis del pH (por ejemplo agentes de desacoplamiento).

[0058] En algunas realizaciones, la fuente de emisión fluorescente puede ser un tinte fluorescente que es un indicador de la actividad mitocondrial (por ejemplo, gradientes, estados internos de reducción-oxidación, masa, etc.) de un microorganismo formado de glóbulos. Por ejemplo, un tinte fluorescente puede ser tomado diferencialmente por un microorganismo basado en los gradientes diferencial y/o potenciales químicos a través de una membrana mitocondrial. Alternativamente o adicionalmente, un tinte fluorescente puede ser tomado diferencialmente con base en un estado de reducción-oxidación interno diferente. Todavía aún, algunos tintes fluorescentes acumulados en la mitocondria se basan en el tamaño mitocondrial y por lo tanto tiñen diferencialmente microorganismos con diferente masa mitocondrial. En algunas realizaciones, un tinte fluorescente que es un indicador del tamaño mitocondrial y/o actividad se selecciona del grupo que consiste de Verde MitoTracker, Rojo MitoTracker, rodamina 123, hexil éster rodamina B, SYTO 18, y combinaciones de estos.

[0059] MitoTracker Green y Mitotracker Rojo son dos ejemplos de tintes fluorescentes que son secuestrados en el funcionamiento de la mitocondria, y por lo tanto los tinte se pueden emplear para estimar el tamaño y/o actividad de la mitocondria. Las sondas Mito Tracker que permean la célula contienen un grupo funcional clorometilo reactivo al tiol. Una vez la sonda Mito Tracker se acumula en la mitocondria, ésta puede reaccionar con

grupos tiol accesibles en los péptidos y proteínas para formar un conjugado que se puede a aldehído. A diferencia de otros tintes fluorescentes utilizados para estimar el tamaño o actividad mitocondrial (por ejemplo rodamina 123), el teñido con Mito Tracker Verde o Rojo se considera generalmente que retiene bajo condiciones en donde se ha interrumpido el potencial de la membrana mitocondrial. Diferentes grupos funcionales de clorometilo en los tintes Mito Tracker exhiben diferentes reactividades (y por lo tanto sensibilidad a la pérdida de potencial de membrana). Adicionalmente, diferentes sondas Mito Tracker exhiben propiedades fluorescentes variantes (por ejemplo fluorescencia en ambientes acuosos antes de acumulación en la mitocondria) y sondas específicas también pueden impactar diferencialmente funciones celulares específicas (por ejemplo respiración) cuando se utiliza para tratar células intactas. En algunas realizaciones, un tinte puede ser secuestrado en el funcionamiento de la mitocondria que se puede utilizar para identificar glóbulos capaces de exhibir un rango particular de actividad metabólica (por ejemplo respiración) bajo condiciones específicas de crecimiento.

[0060] En algunas realizaciones, la fuente de emisión fluorescente puede ser un tinte fluorescente que es un indicador del nivel polihidroxialcanoato o de lípido intracelular. En muchas de tales realizaciones, el tinte fluorescente es rojo nilo.

[0061] En algunas realizaciones, la fuente de emisión fluorescente puede ser un tinte fluorescente que es un indicador

de los niveles de carbohidratos extracelulares. Por ejemplo, en algunas de tales realizaciones, el tinte es un conjugado fluorescente de aglutinina de germen de trigo, concanavalina A, o calcofluor.

5

[0062] En algunas realizaciones, la fuente de emisión fluorescente puede ser un tinte fluorescente que es un indicador del potencial de membrana citoplásmica. Por ejemplo, en algunas de tales realizaciones, el tinte es DiOC₆, bis-(ácido 1,3-dibutilbarbitúrico)trimetina oxonol (DiBAC₄(3)), o sus combinaciones. Carbocianinas, tal como DiOC₆, son ejemplos de tintes que se puede utilizar como indicadores de potencial de membrana en membranas citoplásmicas y otras membranas. Estos tintes catiónicos se acumulan en las membranas hiperpolarizadas y se translocan en la bicapa de lípidos.

La agregación dentro del interior de la membrana confinada resulta usualmente en fluorescencia reducida y cambios de absorción, aunque la magnitud y aún la dirección de la respuesta de fluorescencia es fuertemente dependiente de la concentración del tinte y sus características estructurales. En muchos casos, la fluorescencia de carbocianina es dependiente no solo del potencial de la membrana, sino también del tamaño de la célula. Los tintes potenciales de membrana se pueden utilizar para examinar cambios en el potencial de la membrana así como también para seguir las alteraciones significativas en los niveles de la membrana y/o estructura (por ejemplo apoptosis). En algunas realizaciones, se puede utilizar un tinte potencial de membrana

para identificar los glóbulos que presenten un rango específico de membranas hiperporalizadas.

[0063] En algunas realizaciones, se clasifican microorganismos con base en más de un parámetro ópticamente detectable, por ejemplo, por lo menos dos parámetros, por ejemplo, por lo menos dos parámetros de intensidad de emisión fluorescente .

Clasificación de Microorganismos con Forma de Glóbulo Basado en

10 Parámetros Ópticos

[0064] De acuerdo con la presente descripción, es deseable identificar, analizar, y/o clasificar microorganismos formadores de glóbulos en cultivos líquidos. En muchas realizaciones, es deseable clasificar microorganismos formadores de glóbulos en cultivos líquidos bajo condiciones similares o idénticas a aquellas utilizadas para la fermentación a escala industrial (por ejemplo, para la producción de uno o más productos de fermentación comercialmente importantes). En contraste, muchas técnicas estándar para caracterizar o clasificar microorganismos (por ejemplo, mediante detección o selección) se basan en el crecimiento en platos agar (por ejemplo que contienen un indicador o selector). La presente descripción abarca el reconocimiento de que tales técnicas sufren de las desventajas de que una germinación de microorganismos o comportamiento de crecimiento sobre platos agar puede diferir sustancialmente de su comportamiento en cultivo líquido, y en particular bajo condiciones de fermentación.

[0065] Aquellos medianamente versados en la técnica apreciarán que cualquiera de una variedad de condiciones de cultivo líquido se puede emplear en la práctica de la presente invención, y apreciará particularmente aquellos parámetros que se puedan
5 variar con el fin de alcanzar condiciones apropiadas para la fermentación a escala industrial de un organismo particular para producir un producto particular. Solo para dar unos pocos ejemplos, temperatura, presión, pH, osmolaridad, osmolalidad, fuente de carbono (por ejemplo, uso de fuentes de carbón de
10 glucosa o no glucosa tal como, por ejemplo, fructosa [por ejemplo, jarabe de fructosa], galactosa, glicerol, aceites, sacarosa, triglicéridos, etc.), otros aspectos de composición de medio (por ejemplo, que incluyen presencia, cantidad, y/o identidad de sustancias tal como tensoactivos y materiales
15 particulados, etc.), densidad de cultivo, volumen de cultivo, duración de cultivo, aireación y/o agitación mecánica, cantidad de inóculo y forma (por ejemplo esporas o cultivo vegetativo), etc. se pueden ajustar para optimizar el grado de producción, identidad de las cantidades relativas de productos producidos,
20 grados o naturaleza de la fermentación, costo, u otros parámetros deseables o aspectos del procesamiento industrial.

[0066] Por supuesto, las tecnologías están disponibles para clasificar células en cultivos líquidos. Por ejemplo, el
25 clasificador de células de fluorescencia activa (FACS), en una herramienta útil, poderosa que permite a los investigadores analizar poblaciones celulares sencillas y clasificarlas con base en características particulares. En la mayoría de tales dispositivos, una suspensión de células sencillas se pasa por uno

o más láseres enfocados que excitan los marcadores fluorescentes que están presentes en o en algunas, pero no todas, las células en la suspensión. La radiación fluorescente se recolecta luego y se analiza, de tal manera que las células que tiene o no los marcadores relevantes se distinguen de las otras. Luego se clasifican las células a través de la aplicación de una vibración acústica a la corriente, que separa la corriente en gotas. Una carga eléctrica se aplica luego a aquellas gotas que contienen las células de interés (por ejemplo que tiene o no un marcador particular), según se determina por el avance del operador. Las gotas cargadas o no cargadas se derivan hacia diferentes frascos de recolección a través de un campo eléctrico estático.

[0067] Los estándares FACS no pueden clasificar organismos con forma de glóbulos. Entre otros problemas, el FACS convencional no puede manipular objetos del tamaño de un glóbulo típico. Dependiendo del microorganismo, las condiciones de fermentación, y el tiempo de una fermentación, los microorganismos formadores de glóbulos presentan típicamente un rango de tamaño de glóbulo entre 50 y 2000 micras de diámetro. En la mayoría de las realizaciones, los microorganismos formadores de glóbulos a ser almacenados están en un rango entre 75 y 500 micras de diámetro. En realizaciones particulares, los microorganismos formadores de glóbulos a ser almacenados varían entre 50 y 200 micras de diámetro.

[0068] La presente descripción abarca el reconocimiento de que los microorganismos formadores de glóbulos se pueden clasificar eficientemente a través del uso de un citómetro de flujo que

utiliza microfluidos de calibre grande, de tal manera que los microorganismos formadores de glóbulos puedan pasar a través. En algunas realizaciones de la presente descripción, se utiliza un citómetro de flujo que tiene tamaños de microfluídicos capaces de clasificar glóbulos dentro del rango de aproximadamente 100 a 250 micras de diámetro. En algunas realizaciones de la presente descripción, se utiliza un citómetro de flujo que tiene un tamaño de microfluídicos capaz de clasificar glóbulos dentro del rango de aproximadamente 40 a 200 micras de diámetro. En algunas realizaciones de la presente descripción, se utiliza un citómetro de flujo que tiene un tamaño de microfluídicos capaz de clasificar glóbulos dentro del rango de aproximadamente 100 a 600 micras de diámetro.

[0069] La presente descripción abarca el reconocimiento de que los microorganismos formadores de glóbulos se pueden derivar sin el uso de carga eléctrica, que puede dañar potencialmente tales microorganismos. En algunas realizaciones, la presente descripción utiliza un citómetro de flujo que deriva organismos con un interruptor fluídico comprendido de un pulso de aire que altera el flujo de fluido.

[0070] Un ejemplo particular de un citómetro de flujo que utiliza un interruptor fluídico y que se puede utilizar de acuerdo con la presente descripción se describe en, por ejemplo, en una o más de las patentes Estadounidenses 6,400,453, las patentes Estadounidenses 7,116,407, Solicitud de Patente PCT WO 200/36396, Solicitud de Patente PCT WO 2002/066960, y/o Solicitud de Patente PCT WO 2003/016875, cada una de las cuales de

incorpora aquí como referencia en su totalidad. Ejemplos de tales instrumentos (por ejemplo, instrumentos COPAS) están disponibles de Union Biometrica, Inc (Somerville, MA). Estos instrumentos se diseñan para la aplicación a organismos de prueba multicelulares tal como nematodos, larvas Drosophila, semillas de planta o pez zebra, así como también objetos inanimados tal como globos; los presentes inventores de muestran aquí que ellos se pueden utilizar para clasificar microorganismos formadores de glóbulos, que incluyen bacterias y hongos.

10

[0071] In el dispositivo de Union Biométrica, los elementos que pasan a través de una célula de flujo se derivan neumáticamente mediante la aplicación de un soplo de aire (ver Figura 1). Específicamente, una muestra que contiene objetos a ser clasificados está seguida dentro de una cámara de pre-análisis en donde está rodeada por una solución de recubrimiento para generar un flujo laminar estabilizado. La muestra luego fluye a través de una zona de detección, en donde se pueden dirigir diferentes láseres a la muestra para excitar los fluoróforos y/o para permitir la medición de otras propiedades ópticas (por ejemplo, densidad óptica). Los objetos que cumplen el criterio especificado pasan a recipientes de recolección, aunque los objetos que no cumplen el criterio especificado se derivan mediante la aplicación de un soplo de aire, a un recipiente de otras muestras o de desperdicio. El dispositivo Union Biométrica utiliza típicamente un láser de diodo rojo (670 nm) para medir el tamaño y/o densidad óptica, y un láser de argón multi-línea para excitar el uso de los fluoróforos seleccionados.

[0072] En otras realizaciones, un citómetro de flujo se puede utilizar tal como aquel descrito en la Patente Estadounidense 6,482,652. En tal flujo de fluido de citómetro de flujo no se deriva, pero a diferencia se posicionan los tubos de recolección alternos bajo la corriente de flujo de fluido dependiendo de la clasificación de los elementos presentes en la corriente. Alternativamente o adicionalmente, los instrumentos disponibles de Becton Dickinson and Company, tal como el FACStar Plus y/o el FACScaliber, se pueden utilizar canales de flujo que están disponibles con células de flujo especiales mayores que las normales (es decir, aproximadamente 70 micras). Estos instrumentos están destinados al uso con muestras suspendidas en agua, amortiguador o en solución salina biológica.

[0073] En muchas realizaciones, un citómetro de flujo utilizado para identificar, analizar, y/o clasificar microorganismos con forma de glóbulo de acuerdo con la presente descripción incluye por lo menos un sistema detector que permite la detección y/o medición de por lo menos un parámetro óptico de microorganismos con forma de glóbulo.

[0074] Por ejemplo, en algunas realizaciones, un citómetro de flujo incluye por lo menos un sistema detector que permite la detección y/o medición del tamaño y/o densidad óptica de microorganismos con forma de glóbulo. En algunas realizaciones, tal un sistema detector comprende un láser de diodo rojo (670 nm) junto con un filtro rojo y un detector de fotodiodo PIN y un láser argón multilínea (488 nm y 514 nm), que se acoplan con filtros específicos y detectores de emisión. En algunas

realizaciones, se utilizan filtros dsRojo (proteína fluorescente roja), YFP (proteína fluorescente amarilla), y GFP (proteína fluorescente verde) en conjunto con tubos de fotomulticapas para monitorear la emisión fluorescente en 610 nm, 545 nm, y 510 nm, respectivamente.

[0075] Alternativamente o adicionalmente, un citómetro de flujo para uso de acuerdo con la presente descripción puede incluir por lo menos un sistema sensor que permita la detección y/o medición de la radiación fluorescente asociada con microorganismos que forman glóbulos. Tal un sistema sensor incluye típicamente un láser u otra fuente de radiación para excitar fluoróforos particulares. En muchas realizaciones, tal un sistema sensor incluye una pluralidad de láseres u otras fuentes de radiación con el fin de que se puedan excitar múltiples fluoróforos. En algunas realizaciones, un citómetro de flujo para uso de acuerdo con la presente descripción incluye por lo menos un láser azul/verde (por ejemplo, un láser argón). En algunas realizaciones, se utiliza un láser argón multi-línea (488 nm y 514 nm) en conjunto con detectores de emisión y filtros específicos. En algunas realizaciones, se utilizan filtros dsRed, YFP, y GFP junto con tubos de fotomulticapa para monitorear la emisión fluorescente en 610 nm, 545 nm, y 510 nm, respectivamente.

[0076] En algunas realizaciones, un citómetro de flujo para uso de acuerdo con la presente descripción incluye por lo menos un sistema sensor que permite la detección y/o medición de un parámetro seleccionado del grupo que consiste de tamaño, densidad

celular, y combinaciones de estos, e incluye adicionalmente por lo menos un sistema sensor que permite la detección y/o medición de la radiación fluorescente asociada con microorganismos formadores glóbulos.

5

Aplicaciones

[0077] La presente descripción se puede utilizar para identificar, analizar, y/o clasificar microorganismos formadores de glóbulos para cualquier propósito. Solo para dar pocos ejemplos, la presente descripción es útil cuando se desea distinguir un microorganismos del otro. En algunos casos, los microorganismos a ser distinguidos pueden ser cepas diferentes de una misma especie; en algunos casos, los microorganismos a ser distinguidos pueden representar una o más estirpes de progenies diferentes del mismo progenitor expuesto a por lo menos un protocolo mutagénico.

[0078] En algunas realizaciones de la presente descripción, los microorganismos que se identifican, caracterizan y/o aíslan de acuerdo con las técnicas descritas aquí se cultivan posteriormente para permitir la producción de un producto particular. Por ejemplo, las productos de fermentación comercialmente importantes representativos que se pueden producir por los microorganismos utilizados de acuerdo con la presente descripción incluyen, pero no limitan a, ácidos orgánicos, compuestos carotenoides, ácidos grasos esenciales, enzimas industriales, ingredientes farmacéuticos activos, carbohidratos

extracelulares, compuestos insecticidas, etc., y combinaciones de estos (ver discusión anterior).

[0079] En algunas realizaciones, puede ser deseable
5 identificar un microorganismo de progenie particular que tiene característica de producción mejoradas con respecto a por lo menos un producto de fermentación comercialmente importante según se compara con un microorganismo progenitor. En algunas realizaciones, el microorganismo progenitor está sujeto a por lo
10 menos un protocolo mutagénico para generar microorganismos de progenie; por lo menos una muestra que contiene por lo menos uno de tales microorganismos de progenie que está sujeto a análisis y/o clasificación como se describe aquí, y la progenie clasificada se utiliza para producir un producto comercial. En
15 algunas realizaciones, la base para clasificar se destina a reflejar una característica de producción mejorada con respecto al producto de fermentación comercialmente importante. No es necesario que la base para clasificar sea una medición directa de
20 las características de producción mejoradas; en muchas modalidades, sin embargo, la base de clasificación actuará como un proxy para (es decir, correlacionarse con) una característica de interés de producción deseable.

[0080] En algunas realizaciones de la presente invención, se
25 utilizan organismos identificados para producir uno o más productos de fermentación comercialmente importantes. En algunas realizaciones, uno o más compuestos producidos se aíslan y utilizan directamente para la aplicación comercial. En algunas realizaciones, se derivan uno o más compuestos producidos o

modificados de otra forma antes de ser utilizados en la aplicación comercial. En algunas realizaciones, uno o más compuestos o derivados producidos de los mismos se combinan con ingredientes adicionales o componentes antes de la aplicación
5 comercial.

Solo para dar unos pocos ejemplos, compuestos y/o derivados de los mismos producidos por microorganismos formadores de glóbulos como se describe aquí se pueden combinar con otros ingredientes o
10 componentes para producir, por ejemplo, detergentes de lavandería y lavaplatos, alimentos y alimentos para animales, productos horneados, limpiadores para lentes, cosméticos, tensoactivos, disolventes, fibras, floculantes para tratamientos de aguas residuales, gomas para aplicaciones alimenticias e industriales,
15 agentes bacteriostáticos en una variedad de aplicaciones, jabones, shampoos, papeles, y recubrimientos, entre otros.

Realizaciones adicionales

20 [0081] Los métodos descritos aquí se pueden utilizar para identificar microorganismos formadores de glóbulos que se caracterizan por un rasgo particular. Los microorganismos se pueden tratar para inducir cambios fenotípicos en las células, y la progenie de las células tratadas se selecciona con base en un
25 parámetro que se puede correlacionar con el rasgo de interés.

[0082] En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para identificar una cepa fúngica que tiene una capacidad incrementada para la biosíntesis o tolerancia de

ácido orgánico. El método incluye, por ejemplo, suministrar por lo menos un hongo filamentoso que forma glóbulos; aplicar a las células el hongo en por lo menos un tratamiento capaz de inducir un cambio fenotípico en las células, formando por lo tanto por lo menos una célula tratada; cultivar la célula tratada bajo condiciones en las que una población de glóbulos de progenie se propaga a partir de la célula; poner en contacto la progenie de glóbulos de la población con por lo menos un marcador detectable que suministra una señal óptica cuya magnitud es proporcional a un parámetro seleccionado del grupo que consiste de carbohidrato tomado por, volumen mitocondrial de, función mitocondrial en, y pH intracelular del hongo, y combinaciones de los mismo, formando por lo tanto por lo menos un glóbulo marcado; detectar una señal óptica del por lo menos un glóbulo marcado, obteniendo por lo tanto una señal óptica de prueba específica para el glóbulo marcado; comparar la señal óptica de prueba con una señal óptica de control producida bajo condiciones equivalentes por un glóbulo de control del hongo filamentoso que se ha puesto en contacto con la marca detectable de la etapa; identificar aquellos glóbulos que presentan una señal óptica de prueba que es diferente de la señal óptica de control; correlacionar la diferencia en la señal óptica con un incremento en la biosíntesis ácida orgánica o tolerancia (por ejemplo, en donde la diferencia es un promedio estadístico de una pluralidad de diferencias), identificando por lo tanto por lo menos una cepa fúngica que tiene una capacidad incrementada de biosíntesis o tolerancia.

[0083] En algunas realizaciones, el tratamiento para inducir un cambio fenotípico comprende una modificación genética. En

algunas realizaciones, el ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste de ácidos C2-C6 mono y di-carboxílicos, ácidos C3-C6 tri-carboxílicos, y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste de ácido acético, glicólico, láctico, propiónico, pirúvico, butírico, hidroxibutírico, oxaloacético, malónico, tartárico, tartrónico, succínico, málico, maleico, fumárico, itacónico, citracónico, tricarbalílico, isocítrico, y cítrico, y sus combinaciones.

10 [0084] En algunas realizaciones, el parámetro comprende la captación de carbohidrato, y el carbohidrato se selecciona del grupo que consiste de monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos, y glicerol, y combinaciones de los mismo.

15 [0085] La presente descripción también representa un método para identificar una cepa fúngica que tiene una capacidad de cultivo incrementada en un reactor de tanque agitación. El método incluye, por ejemplo, suministrar por lo menos un hongo
● filamentoso formador de glóbulos; aplicar a las células del hongo
20 por lo menos un tratamiento capaz de inducir un cambio fenotípico en las células, formando por lo tanto por lo menos una célula tratada; cultivar la célula tratada bajo condiciones en las que una población de glóbulos progenie se propaga a partir de la célula; detectar una señal óptica a partir de un glóbulo progenie
25 de la población, cuya señal es proporcional al tamaño del glóbulo o densidad, obteniendo por lo tanto una señal óptica de prueba específica al glóbulo progenie; repetir la detección para producir un conjunto de señales ópticas de prueba para glóbulos de progenie que sea representativo de la población, obteniendo

por lo tanto por lo menos un conjunto de datos de prueba;
suministrar un conjunto de datos de control de señales ópticas de
control correspondientes producida bajo condiciones equivalentes
para controlar glóbulos del hongo filamentoso del conjunto;
5 comparar el conjunto de datos de prueba y el conjunto de datos de
control; identificar, basado en la comparación, un conjunto de
datos de prueba obtenidos en la etapa (e), que presenta un tamaño
mejorado o una densidad mejorada con relación al conjunto de
datos de control, obteniendo por lo tanto un conjunto de datos de
10 prueba mejorado; y evaluar la población de glóbulo de progenie
asociada con el conjunto de datos de prueba mejorado como una
población que tiene capacidad de cultivo de reactor de tanque
agitado incrementada, identificando por lo tanto una cepa fúngica
que tiene una capacidad de cultivo incrementada en el reactor de
15 tanque de agitación.

[0086] En algunas realizaciones, el tratamiento comprende una
modificación genética. En algunas realizaciones, la capacidad de
cultivo incrementada comprende productividad incrementada de un
20 producto de biotransformación o metabolito deseado, reología de
caldo de cultivo de fermentación mejorada, o una combinación de
los mismos.

[0087] En algunas realizaciones, la comparación comprende
25 convertir primero las señales ópticas con el tamaño
correspondiente o valores de densidad y luego comparar los
valores de tamaño o densidad.

Ejemplificación

Ejemplo 1: Distinguir Cepas *A. niger*

[0088] Se conocen ciertas cepas del organismo formador de glóbulos *Aspergillus niger* que producen ácido cítrico. Diferentes variantes de *A. niger* producen ácido cítrico en diferentes niveles, y ésta diferencia puede, por lo menos en parte, deberse a una diferencia en el grado en el que ellas captan la glucosa a través de o en puntos específicos durante la fermentación.

10

[0089] Con el fin de evaluar si un citómetro de flujo de diámetro grande se puede utilizar para identificar, analizar y/o clasificar microorganismos formadores de glóbulos de acuerdo con la presente descripción, preparaos dos cepas diferentes formadoras de glóbulos que producen ácido cítrico de *A. niger*, relacionadas como predecesor (**cepa 1**) y descendiente (**cepa 2**). Esta dos cepas se conocen por producir diferentes niveles de ácido cítrico y también por presentar propiedades de captación de glucosa distinguibles (monitoreadas a través del uso de un análogo de glucosa fluorescente, 2-NBDG) según se mide en un fluorímetro. Por ejemplo, en un medio de frasco de agitación libre de glucosa, los glóbulos de la capa 2 se tiñeron más intensamente de lo que lo hicieron los glóbulos de la **cepa 1**.

25 [0090] Los glóbulos de la **capa 2** y **cepa 1** se combinan en números iguales o en una proporción de 1: 100 (**cepa 2: cepa 1**), se exponen a 2-NBDG, se lavan, se hacen fluir a través de un instrumento COPASTM Select obtenido de Union Biométrica (Somerville, MA), y se clasifican en pozos de microtítulo agar de

jugo de tomate. Los microorganismos depositados en los pozos se clasifican luego como **cepa 2** o **cepa 1** con base en una distinción fenotípica: esporulados de **cepa 1** en TJA a 33° C en dos días, produce un pigmento marrón distinto, mientras que la esporulación de la **cepa 2** se retrasa en 24 horas y aparece el cultivo blanco después de dos días.

[0091] La máquina se configura para clasificar glóbulos con intensidad de fluorescencia alta (aislados esperados **cepa 2**) o baja (aislados esperados cepa 1) después de exposición al tinte 2-NBDG. Los resultados se muestran en la Tabla 1 adelante:

Tabla 1

Proporción de clasificación	Esperada	Actual
50:50	Cepa 2 (96 pozos)	92 blancos (cepa 2), 1 marrón (cepa 1), 2 perdidos
50:50	Cepa 1 (96 pozos)	92 marrón (cepa 1), 3 blancos, 1 mezclado
cepa 1:100 2:cepa 1	Cepa 2 (10)	8 blancos (cepa 2), 2 perdidos

[0092] Estos datos demuestran que el citómetro de flujo de diámetro grande se puede utilizar para clasificar microorganismos formadores de glóbulos con un alto grado de exactitud. Adicionalmente, estos datos demuestran que un citómetro de flujo de diámetro grande se puede utilizar para clasificar un organismo aeróbico ligado (es decir, *A. niger*). Este hallazgo es inesperado dado que se ha informado previamente que el citómetro de flujo particular utilizado en éste ejemplo, alcanza solo clasificación anaeróbica.

Ejemplo 2: Variantes de Detección de un Cepa *A. niger*

[0093] De acuerdo con la presente descripción, es deseable
5 identificar, analizar, y/o aislar cepas *A. niger* variantes con
capacidad alterada para producir ácido cítrico. Como se demuestra
en el Ejemplo 1, las cepas *A. niger* con una capacidad diferente
para captar glucosa se pueden distinguir una de otra de acuerdo
con la presente descripción al utilizar un citómetro de flujo de
10 diámetro grande que evalúa la fluorescencia de los
microorganismos formadores de glóbulos que han estado expuestos
NBDG.

[0094] Otros han intentado identificar previamente mutantes de
15 la **cepa 2** que presentan teñido incrementado con NBDG y
productividad de ácido cítrico mejorada. Sin embargo, como se
demuestra aquí, la clasificación proporciona una única ventaja
sobre los métodos de mejora de cepas basado en frascos de
agitación o placas tradicionales en que, entre otras cosas, es
20 posible examinar muchos órdenes de mayor magnitud de número de
muestras en un periodo fijo. Adicionalmente, puede ser posible
clasificar múltiples parámetros en una campaña de detección dada.
Los métodos de detección se desarrollan para identificar glóbulos
que presentan una actividad fluorescente deseada cuando se tiñen
25 con 2-NBDG, 6-NBDG, MitoTracker Green, o MitoTracker Red.

[0095] Las esporas se generan a partir de materia prima de
glicerol -80° C 25% generadas de una única colonia de *A. niger*
cepa 2 (Tate&Lyle Ingredients North America, Decatur, IL); el

aislado de espora sencillo de la **cepa 2** se designa **cepa 2a**. Un número pequeño de esporas ($\sim 10^3$) de materia prima congelada se dispersa en un plato petri Agar de Jugo de Tomate (TJA) de 100 mm o 150 mm, y después de 5-7 días a 33°C , las esporas resultantes se cosechan en agua y se clasifican a 4°C . Las concentraciones de esporas típicas están en el rango de 10^7 - 10^8 por ml con 5-15 ml de volumen total cosechado.

Agar Jugo de Tomate (TJA)	
Jugo de tomate sin sal o bajo en sal	250 ml
Agua desionizada	750 ml
Agar difco (Grado técnico 0812-17-9)	15 g
Maltosa (Difco 216830)	20 g
Farmamedia	10 g
Antiespumante	0.1 ml

10

15

Después que se ha ajustado el pH a 6.85 - 7.15 con NaOH, el agar jugo de tomate se mezcla y se calienta en un plato caliente a 55° - 70°C antes de ir al autoclave y ser suministrado.

20

25

[0096] Las esporas *A. niger* **cepa 2a**, así como también las posteriores generaciones de poblaciones de esporas (por ejemplo esporas derivadas de la cepa 3 (ver adelante)), se mutagenizan mediante tratamiento con nitrosoguanidina (NTG), mediante exposición a irradiación UV, o mediante tratamiento con ácido nitroso. En todos los casos, el porcentaje de esporas viable ($100 \times [\text{cfu/ml post-tratamiento} \div \text{cfu/ml pre-tratamiento}]$) se determina mediante dilución en serie en TJA. Para mutagenia NTG, es lavan 10^9 esporas tres veces en 0.1 M de amortiguador cítrico (pH 5.5). Las esporas mutagenizadas se resuspenden en amortiguador cítrico de tal manera que la concentración de la espora es 10^8 esporas por ml. 100µg/ml NTG se agrega a las esporas resuspendidas, y las muestras se mezclan e incuban a 33°

C durante 1 hora. Después de incubación, las esporas se lavan tres veces con 0.1 M de amortiguador de fosfato (pH 7).

[0097] Para mutagenia UV, se suspenden 10^9 esporas en 50 ml de agua en un plato Petri de 150 x 15 mm. El plato se coloca en un GS GeneLinker (BioRad, Hercules, CA) y se expone a irradiación UV durante 1 a 10 segundos en la configuración STR. Se desarrollan las siguientes etapas de ubicación en platos en la oscuridad para evitar la fotoreactivación.

[0098] Se hace mutagenia de ácido nitroso al inocular 20 ml de caldo de cultivo Difco YM que contiene 0.01% Tween 80 con 2×10^7 esporas por ml. Se incuba un frasco amortiguado de 250 ml a 33°C y 225 rpm durante 6 horas. Después de 6 horas de incubación las esporas se transfieren a un tubo de centrífuga y se centrifugan en un glóbulo (5 minutos a 6,000 rpm). El caldo de cultivo se decanta y las esporas se resuspenden en 20 ml de amortiguador de acetato de sodio 0.1 M. Las esporas se resuspenden, se centrifugan, y el amortiguador se decanta de nuevo.

Amortiguador de acetato de sodio 0.1 M (pH 4.6)

Ácido acético	3.06 g
Acetato de sodio	4.02 g
Tween 80	0.10 ml

El amortiguador se lleva a 1000 ml con agua desionizada y se ajusta el pH entre 4.55 - 4.65 con solución de ácido sulfúrico o hidróxido de sodio débil.

Solución de ácido nitroso (preparado fresco para cada experimento)

Nitrato de sodio 0.345 g

Amortiguador de acetato de sodio 0.1 M de 100 ml

5

[0099] Se agrega 20 ml de solución de ácido nitroso fresco y se centrifugan las esporas para ser resuspendidas. Las esporas en solución de ácido nitroso se incuban luego a 34° C para incrementos de un minuto hasta 1 hora. En momentos específicos, las muestras de esporas se remueven del frasco y se diluyen en agua y se colocan en placas en TJA para determinar el porcentaje de viabilidad y también se remueve 1 ml y colocan platos en TJA para crecimiento y esporulación, suministrando por lo tanto esporas mutadas ensayos de ácido cítrico.

15

[00100] Luego de las varias mutagenias, las esporas mutagenizadas (0.245% - 14.5% viable) se hacen crecer directamente en medios de fresco de agitación (SFM), o alternativamente, amplificado en TJA al colocar en placas de 1 ml o todas las esporas de la mutagenia en un plato PJA de 150 mm, incubando la placa a 33° C durante varios días hasta que las esporas en los platos han crecido y esporulado.

25

**Medio en Frasco de Agitación con Ácido
citríco (SFM)**

**Receta para 1
litro**

	Staleydex 333	150-300 g
	CaCl ₂ * 2H ₂ O	0.037 g
5	Solución de sal para ganado	10 ml
	Urea	2.00 g
	Sulfato de amonio	1-90 g
	Ácido cítrico	20.0 g
	Tween 81	0.45 ml
	pH antes de esterilización (con NH ₄ OH (aproximadamente 3.9 ml de 29%))	2.6 - 2.65
10	Agua desionizada	a 1 ,000 ml
	5mg/ml Cloruro de metilbencetono (MBT)	2 ml
	Volumen de frasco	30 ml
	Disco/frasco con filtro de leche	
	Esteriliza 10 min @ 121° C en escape lento	

Solución de Sal para Ganado

15	MgSO ₄ .7H ₂ O	20.3 g
	FeSO ₄ JH ₂ O	0.80 g
	CuSO ₄ .5H ₂ O	3.90 g
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22 g
	K ₂ HPO ₄	60 g
	Ácido cítrico	50 g
20	H ₂ SO ₄ (concentrado)	7.5 ml

Para la solución de sal para ganado, después se agregan otros reactivos, se agrega agua desionizada a 1 litro y luego la solución se filtra esterilizada con un filtro de 0.2 micras.

[00101] Se utilizan 1.2×10^7 esporas mutagenizadas viables para inocular alícuotas de 30 ml de SFM en frascos amortiguados de 250 ml tapados con papel filtro, y agitados (250 rpm; 2-

pulgadas) a 33° C y 60% de humedad durante 3 a 5 días, durante cuto tiempo las esporas germinan en glóbulos ~200 µm.

[00102] Se utilizan tres protocolos de teñido básicos para la
5 mayoría de los tintes. En el primer método, se agrega tinte a 1
ml de glóbulos que se han sacado del frasco de crecimiento y
transferido a una placa de 24 pozos. Este método de teñido
trabajado por la mayor parte de tintes que no se impactan por los
componentes de medio gastados o el pH del medio. Los tintes para
10 mitocondria, potencial de membrana, fisio estáticos, y algunos
tintes de viabilidad se pueden utilizar de ésta manera.

[00103] Cuando el tinte es un análogo de componente de medio,
tal como 2- o 6-NBDG, entonces los glóbulos se enjuagan
15 típicamente libres del medio gastado y se colocan en medio fresco
que le falta glucosa. Después de esto, los glóbulos están listos
para teñido. Un protocolo más detallado para esto se presenta en
el ejemplo específico para NBDG adelante.

[00104] El tercer método de teñido involucra la adición de un
20 auxiliar de carga de tinte. Este método se emplea típicamente
cuando el tinte es voluminoso y es más difícil de cargar en los
glóbulos. Una vez el auxiliar de carga de tinte es reactivo a la
carga de célula pinocítica de influjo (Invitrogen #114402), que
25 facilita la carga de materiales solubles al agua en células vivas
a través de un técnica simple y rápida basada en lisis osmótica
de vesículas pinocíticas. Esta carga se alcanza al mezclar el
tinte soluble en agua con el reactivo Influx mezclado con medio
de crecimiento, luego incubar las células en el medio para

permitir la captación pinocítica de la solución circundante. Cuando los glóbulos se transfieren a un medio ligeramente hipotónico, las vesículas pinocíticas dentro de las células liberan el material atrapado y llenan el citosol con el tinte.

- 5 Este reactivo es útil para tintes mayores tal como dextranos y tintes cargados tal como sensores del pH.

[00105] La concentración de teñido útil para cada tinte se determina empíricamente al desarrollar una curva de respuesta de
10 dosis para establecer que concentración resulta en teñido detectable con una señal óptima al ruido. La especificidad del teñido se puede afectar mediante una variedad de parámetros, que incluyen la edad, el glóbulo y el pH del medio de teñido.

- 15 [00106] Con el fin de utilizar teñido NBDG como un medio para enriquecer las cepas de ácido cítrico mejoradas de la población mutagenizada de la **cepa 2**, alícuotas de un ml de un cultivo de 3-5 días de edad se inicia a partir de esporas mutagenizadas NTG
que se colocan en 15 ml de SFM (que le falta glucosa y Tween 81;
20 SFM-GT) y se transfieren a un cartucho de 15 ml Isolute SPE (Biotage, LLC, Charlottesville, VA). Los glóbulos se lavan mediante filtración en vacío seguido por resuspensión en 15 ml SFM-GT y refiltración, y se resuspenden en 1 ml SFM-GT. Los
glóbulos lavados se transfieren posteriormente a un pozo de una
25 placa de cultivo de 24 pozos, a los que agrega posteriormente 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-deoxiglucosa (2-NBDG; Invitrogen, Baltimore MD), y se agita a 33° C durante 10 minutos en la oscuridad. Los glóbulos teñidos se diluyen en 50 ml de solución recubrimiento COPAS (SS; Union Biometrica,

Somerville, MA), se lava en vacío en SS una vez como se describió anteriormente y se resuspende en 5 ml de SS.

[00107] Se analizan glóbulos lavados y teñidos con COPAS como se describe en el Manual del Operador del Union Biometrica COPAS Select. Los glóbulos que tienen mayor incorporación de glucosa fluorescente se seleccionan al clasificar aquellos con alta fluorescencia en el canal 545nm. Los glóbulos que cumplen el criterio de clasificación se depositan en placas de 96 pozos que contiene TJA. Los glóbulos se incuban a 33° C durante la noche. Los pozos que contienen micela en crecimiento se transfieren luego a platos TJA más grandes para la generación de esporas a ser utilizadas para la inoculación de cultivos en frascos de agitación.

[00108] Las esporas en el TJA se cosechan y se utilizan para inocular tres frascos de 250 ml en 4×10^5 esporas/ml en SFM para la determinación del ácido cítrico. Los cultivos crecen a 33° C durante 3 a 5 días antes de análisis de glucosa y cítricos por HPLC. Se comparan los valores cítricos con la cepa progenitora. Este experimento se corre con estos mutantes 3 o 4 veces.

[00109] Las Tablas 2 y 3 adelante suministran un resumen de una variedad de campañas de clasificación desarrolladas utilizando múltiples cepas progenitoras y múltiples tintes fluorescentes. Estos datos demuestran que la clasificación basada en COPAS permite la detección de gran número de muestras y que tales tintes como NBDG y los tintes MitoTracker (Verde y Rojo) son

herramientas útiles para enriquecer los glóbulos con mayor potencial de producción de ácido cítrico.

Tabla 2

5 Clasificación fluorescente para cepas de ácido cítrico mejoradas derivadas de la cepa 2a

Clasificación · #	Edad en clasificación (días)	Cepa/mutageno/tinte	# de glóbulos clasificados viables	# de glóbulos detectados	# de aciertos >3% de rendimiento de ácido cítrico mejorado (con relación a la cepa 2)
37	3	cepa2a/NTG/amplificado/2NBDG	24	38584	2
41	3	cepa2a/NTG/2NBDG	24	79244	0
42	3	cepa2a/NTG/6NBDG	20	118074	1
43	4	cepa2a/NTG/2NBDG	12	104314	0
44	4	cepa2a/NTG/6NBDG	17	145143	0
45	5	cepa2a/NTG/2NBDG	8	43053	2
46	5	cepa2a/NTG/6NBDG	10	78026	1
47	3	cepa2a/NTG/MTG	42	47419	0 de 24 probados

Tabla 3

Clasificación fluorescente para cepas de ácido cítrico mejoradas derivadas de la cepa 3

Clasificación·#	Edad en clasificación (días)	Cepa/mutageno/tinte	# de glóbulos clasificados viables	# de glóbulos detectados	# de aciertos >4% de rendimiento de ácido cítrico mejorado (con relación a	# de ensayo para cítrico
49	<1.6	cepa3/UV/2NBDG	68	64422	3*	37
50	2.1	cepa3/UV/MTG	127	9860	6+	127
51	2.1	cepa3/UV/MTG bajo	9	NA	NA	0
52	14.5	cepa3/UV/2NBDG	82	110147	3+	70
53*	0.4	cepa3/UV/Amplificado/2NBDG	12	29257	1	12
54*	0.4	cepa3/UV/Amplificado/2NBDG	4	92058	2	4
55	0.04	cepa3/UV/Amplificado/2NBDG	29	214891	3*	29
56	0.04	cepa3/UV/Amplificado/2NBDG desvío superior	32	1204	2*	22
57	5.20	cepa3/UV/Amplificado/MTG	537	122841		7
58	5.20	cepa3/UV/Amplificado/MTR580	92	12343	33*	52
59	5.20	cepa3/UV/Amplificado/NBDG+MTR5 80	4	32020	0 de 3	4
60	1.04	cepa3/UV/Amplificado/MTG	~300	51720	ND	48

[00110] La Tabla 4 adelante muestra que las cepas mutadas se desarrollan mejor para la acumulación de ácido cítrico, rendimiento y tasa que su progenitor. Todos estos mutantes se seleccionan de la población mutada completa basada en su mayor valor de fluorescencia para teñido con NBDG o un tinte MitoTracker.

Tabla 4

Caracterización de producción de ácido cítrico a partir de cepas identificadas por clasificación fluorescente para NBDG o teñido MitoTracker (cargas reportadas con relación a la cepa 2 (es decir (valor de la cepa mejorada)-(valor de la cepa 2)))

Cepa	# de tintes probados (en cultivos por triplicado)	Incremento en acumulación promedio (acumulación = % de ácido cítrico)	Incremento promedio en rendimiento (rendimiento = 100 * (g de ácido	Cambio promedio en proporción (proporción = g de ácido cítrico por litro hora)
cepa 4	5	1.19	5.24	0.10
cepa 5	5	0.72	5.36	0.06
cepa 6	6	2.38	5.52	0.20
cepa 7	6	1.41	4.94	0.12
cepa 8	6	1.20	5.01	0.10
cepa 9	4	1.48	5.42	0.13
cepa 10	3	2.64	6.95	0.22
cepa 11	4	2.24	6.10	0.19
cepa 12	4	1.92	5.39	0.16
cepa 13	4	1.65	5.50	0.14
cepa 3	10	0.93	1.84	0.04

[00111] Como se descrió anteriormente, las cepas mutante también se identifican con base en densidad óptica incrementada de glóbulos después de crecimiento en medio que contiene una

sucrosa de carbón sin glucosa. Las esporas mutadas se hacen crecer en SFM que contiene la fuente de carbón alterna en cambio de glucosa durante tres días. Después de tres días se enjuagan los glóbulos con SS y se analizan con COPASTM. Los glóbulos se clasifican durante un periodo de luz largo (tamaño), no muy largo para incluir grupos, y medio de densidad óptico.

[00112] Los glóbulos que cumplen el criterio de clasificación se depositan en placas de 96 pozos que contiene TJA. Las placas se incuban a 33° C durante la noche. Los pozos que contiene micela en crecimiento se transfieren luego a platos TJA más grandes para la generación de esporas. Las esporas en el TJA se cosechan y utilizan para inocular tres frascos de 250 ml en 4 x 10⁵ esporas/ml en SF para determinación de ácido cítrico. Los cultivos crecen a 33° C durante 3 a 5 días antes de análisis de cítrico y glucosa por HPLC. Los valores de ácido cítrico se comparan con la cepa progenitora. El microorganismo mutante que produce glóbulos celulares más densos cuando crecen sobre fuente de carbón alterno se hacen crecer nuevamente y se ensayan por su capacidad ara producir ácido cítrico; y se encuentra que muestran mejora consistente en la producción de ácido cítrico cuando se hacen crecer en fuente de carbón alterno o sobre glucosa.

[00113] Se puede utilizar criterio de detección adicional para seleccionar microorganismos formadores de glóbulos con propiedades deseadas. Por ejemplo, la autofluorescencia del glóbulo puede ser un parámetro de detección primario o secundario fácil y útil. La autofluorescencia es una fluorescencia natural de amplio espectro que está presente en la mayoría de canales

fluorescentes. Se origina por moléculas endógenas que absorben la luz en muchas regiones o cerca al espectro de luz visible y ultravioleta. La autofluorescencia de los glóbulos se examina para la **cepa 2** en las tres edades. La Figura 2 describe el espectro de glóbulos excitados a 350 o 488 nm en un fluorímetro, y confirma que los cambios en autofluorescencia se pueden detectar con el tiempo. La autofluorescencia dependiente de la edad de la **cepa 2** también se examina con COPAS. Se inician tres cultivos de la **cepa 2** en intervalos de 24 horas y se observan juntos en 2, 3, y 4 días efectivamente después de inoculación. Como se ve en la Figura 3, el uso del eje de clasificación rojo/amarillo (altura de pico (PH) para fluorescencia roja se detecta en 610 nm, el PH para fluorescencia roja se detecta en 545 nm; mostrando gris oscuro/gris claro, respectivamente, en la Figura 3) le permite a uno distinguir claramente las tres edades a pesar de la sobreposición significativa. Aunque la fuente de éste fenómeno no se conoce, se proporciona un ejemplo del proceso de correlación de las firmas fluorescentes con importantes estados de fermentación. Uno puede imaginar una selección en donde el glóbulo de una etapa de fermentación menos productiva, tardía se selecciona debido a su posesión de una firma asociada con una fase productiva anterior.

[00114] Se identifican mutantes que en a los 5 días de edad tienen las características de autofluorescencia de dos glóbulos de dos días de edad, más la fluorescencia amarilla, menos la roja. Los glóbulos se clasifican desde los 5 días de edad de glóbulos mutantes de cepa 2NTG. La clasificación se diseña para seleccionar glóbulos que son más amarillos que la mayoría de la

población mutante o más rojos que la mayoría de la población mutante (un control negativo). Para este experimento se depositan glóbulos en una tanda de 20-100 sobre un plato TJA pequeño y se le permite crecer y esporular. Una vez ocurre la esporulación se cosechan las esporas, se inoculan, se hacen crecer durante 3 días, y se vuelven a probar en el COPAS para determinar si ellas mantienen aún las características para las que ellas fueron seleccionadas. En general, el grupo de glóbulos que se seleccionaron por tener la firma de autofluorescencia más joven, más amarilla, mantiene ese fenotipo cuando se vuelven a hacer crecer. Los glóbulos que se seleccionan para un fenotipo más rojo también mantienen ese fenotipo cuando se vuelven a hacer crecer.

[00115] Adicionalmente, se pueden emplear tintes fluorescentes adicionales. Por ejemplo, la serie de tintes SNARF proporciona unos medios para identificar glóbulos con un rango deseado de pH intracelular. Los tintes SNARF también se pueden utilizar para identificar cepas que producen ácido cítrico que son capaces de mantener un pH intracelular dentro de un cierto rango, aún en la presencia de altas concentraciones de ácido cítrico y condiciones de caldo de cultivo de bajo pH (por ejemplo pH 2.0). Estas estrategias, así como también otras descritas aquí, serán útiles.

[00116] Por lo tanto estos datos demuestran que la presente descripción se puede utilizar para identificar, analizar, y clasificar microorganismos formadores de glóbulos a partir de una mezcla genéticamente diversa, e ilustra específicamente la identificación y aislamiento de microorganismos formadores de

glóbulos con una capacidad incrementada para producir un producto comercial particular (es decir, ácido cítrico).

Equivalentes

5

[00117] Aquellos expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de terminar utilizando nada más que la rutina de experimentación, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la descripción dada aquí. El alcance de la presente descripción no se pretende que sea limitante a la anterior descripción, siendo por el contrario se establecen las reivindicaciones adjuntas.

10

[00118] En las reivindicaciones artículos tales como "un," "uno," y "el" puede significar uno o más que uno amenos que se indique lo contrario o sea evidente de otra forma a partir del contexto. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechos si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, empleados en, o son importantes de otra forma para un producto o proceso dado a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otra forma a partir del contexto.

15

20

[00119] La descripción incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente en, se emplea, o es importante de otra forma para un producto o proceso dado. La descripción incluye realizaciones en las que más de uno o todos los miembros del grupo están presentes en, empleados en, o importantes de otra forma para un producto o proceso dado.

25

Adicionalmente, se entiende que la descripción abarca todas las variaciones, combinaciones, y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más reivindicaciones listadas se introduce en otra reivindicación. Por ejemplo, cualquier reivindicación que sea dependiente de otra reivindicación se puede modificar para incluir una o más limitaciones encontradas en una cualquiera de otras reivindicaciones que sean dependientes de la misma reivindicación base. Adicionalmente, en donde las reivindicaciones mencionan una composición, se entiende que los métodos para utilizar la composición para cualquiera de los propósitos descritos aquí se incluyen, y los métodos para elaborar la composición de acuerdo con cualquiera de los métodos para elaborar la descripción aquí o los métodos conocidos en la técnica se incluyen, a menos que se indique de otra forma o a menos que fuera evidente para el experto en la técnica que pudiera surgir una contradicción o inconsistencia.

[00120] En donde se presentan elementos como listas, por ejemplo, en el formato de grupo Marcush, se entiende que cada subgrupo de elementos también se describe, y cualquier elemento se puede remover del grupo. Se debe entender que, en general, cuando la descripción, o aspectos de la descripción, se refieren como que comprenden elementos particulares, características, etc., ciertas modalidades de la descripción o aspectos de la descripción consisten, o consisten esencialmente de, tales elementos, características, etc. Para propósitos de simplicidad aquellas realizaciones no se han establecido específicamente aquí en *haec verba*.

[00121] Cabe notar que el término "que comprende" está destinado a ser abierto y permite la inclusión de elementos o etapas adicionales.

5

[00122] Cuando se dan rangos, se incluyen valores iniciales. Adicionalmente, se entiende que a menos que se indique otra cosa o sea evidente de otra forma a partir del contexto y el entendimiento de una persona medianamente versada en la técnica, los valores que se expresan como rangos pueden asumir cualquier valor específico o subrango dentro de los rangos establecidos en diferentes realizaciones de la descripción, al décimo de unidad del límite inferior del rango, a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

15

[00123] Adicionalmente, se entiende que cualquier realización particular de la presente descripción que cae dentro de la técnica anterior se puede excluir explícitamente de una cualquiera o más de las reivindicaciones. Debido a que tales realizaciones parecen ser conocidas por la persona medianamente versada en la técnica, se pueden excluir aún si la exclusión no se establece explícitamente aquí. Cualquier realización particular de las composiciones de la descripción se pueden excluir a partir de una cualquiera o más de las reivindicaciones, por cualquier razón, sea o no que se relacionen con la existencia de la técnica anterior.

20

25

[00124] Las publicaciones discutidas anteriormente y a lo largo del texto se proporcionan únicamente para su descripción antes de

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende las etapas de:

5 a. obtener una muestra que contiene microorganismos genéticamente diversos en forma de glóbulo;

b. detectar uno o más parámetros ópticamente detectables de glóbulos individuales dentro de la muestra; y

10 c. clasificar glóbulos individuales en recipientes separados con base en el uno o más parámetros detectados.

15 2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de obtener comprende cultivar una colección de microorganismos formadores de glóbulos bajo condiciones que soportan el crecimiento para formar el glóbulo.

20 3. El método de la reivindicación 2, en donde la etapa de obtener comprende cosechar por lo menos algunos glóbulos de la colección.

25 4. El método de la reivindicación 2, en donde la colección comprende microorganismos relacionados con la progenia de un microorganismo progenitor, cuya progenia se genera a través de la aplicación de un protocolo mutagénico.

5. El método de la reivindicación 2, en donde la colección comprende microorganismos que se relacionan con la

heterogeneidad natural encontrada en un microorganismo progenitor.

- 5 6. El método de la reivindicación 1, en donde el parámetro ópticamente detectable es del tamaño de el glóbulo de microorganismo.
- 10 7. El método de la reivindicación 1, en donde el parámetro ópticamente detectable tiene densidad óptica del glóbulo de microorganismo.
- 15 8. El método de la reivindicación 1, en donde el parámetro ópticamente detectable tiene intensidad de emisión fluorescente.
- 20 9. El método de la reivindicación 8, en donde la emisión fluorescente es autofluorescencia del microorganismo de glóbulo.
- 25 10. El método de la reivindicación 8, en donde la emisión fluorescente cuantifica un tinte fluorescente presente en o en ciertos glóbulos individuales.
11. El método de la reivindicación 10, en donde el tinte fluorescente es un análogo o derivado de un carbohidrato utilizado para el cultivo de microorganismos que forman glóbulos.

12. El método de la reivindicación 11, en donde el análogo o derivado de un carbohidrato es un análogo o derivado de glucosa.

5 13. El método de la reivindicación 12, en donde el análogo o derivado de glucosa es 2-NBDG o 6-NBDG.

10 14. El método de la reivindicación 10, en donde el tinte fluorescente es un indicador de la viabilidad de microorganismos que forman glóbulos.

15 15. El método de la reivindicación 14, en donde el indicador de viabilidad es FUN1, yoduro de propidio, azul tripan, rojo neutro, resazurina o naranja acridina.

16. El método de la reivindicación 10, en donde el tinte fluorescente es un indicador de pH intracelular en un microorganismo que forma glóbulos.

20 17. El método de la reivindicación 16, en donde el indicador del pH intracelular es SNAFL, SNARF 4F o SNARF 5F.

25 18. El método de la reivindicación 10, en donde el tinte fluorescente es un indicador de tamaño o actividad mitocondrial en un microorganismo que forma glóbulos.

19. El método de la reivindicación 18, en donde el indicador del tamaño o la actividad mitocondrial es rodamina 123, hexil

éster rodamina B, Verde Mito Tracker, Rojo Mito Tracker o SYTO 18.

20. El método de la reivindicación 10, en donde el tinte
5 fluorescente es un indicador de lípido intracelular o el nivel de polidroxialcanoato.

21. El método de la reivindicación 20, en donde el indicador de
10 lípido intracelular o el nivel de polidroxialcanoato es rojo del nilo.

22. El método de la reivindicación 10, en donde el tinte
15 fluorescente es un indicador de niveles de carbohidrato extracelulares.

23. El método de la reivindicación 22, en donde el indicador de
niveles de carbohidrato extracelulares es calcofluor, concanavalina A, o conjugados fluorescentes de aglutinina de
germen de trigo.

24. El método de la reivindicación 10, en donde el tinte
20 fluorescente es un indicador del potencial de membrana citoplásmica.

25. El método de la reivindicación 24, en donde el indicador del
potencial de membrana citoplásmica es DiOC₆ o bis-(ácido 1,3-dibutilbarbitúrico)trimetina oxonol.

26. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de detectar comprende detectar más de uno de los parámetros ópticamente detectables.

5 27. El método de la reivindicación 26, en donde cada uno de los más de uno de los parámetros ópticamente detectables se selecciona del grupo que consiste de tamaño, densidad óptica, intensidad de emisión fluorescente, y combinaciones de estos.

10 28. El método de la reivindicación 27, en donde el más de uno de los parámetros ópticamente detectables comprende por lo menos dos parámetros de intensidad de emisión fluorescente.

15 29. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en donde el microorganismo es un hongo filamentoso.

30. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en donde el microorganismo es una bacteria filamentosa.

20 31. El método de la reivindicación 29, en donde el hongo filamentoso es del género *Aspergillus*, *Emmericella*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Mortierella*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Blakeslea*, *Mucor*, o *Phycomyces*.

25 32. El método de la reivindicación 31, en donde el hongo filamentoso es *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Rhizopus oryzae*, *Mortierella alpine*, *Trichoderma reesei* o *Paecilomyces sp.*

33. El método de la reivindicación 30, en donde la bacteria filamentosa es del género *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Amycolaptosis*, *Actinosynnema*,
5 *Saccharomonospora*, o *Saccharopolispora*.

34. El método de cualquiera de las reivindicaciones 29-33, en donde el glóbulo clasificado se utiliza posteriormente para un propósito de biofabricación.

10 35. El método de la reivindicación 34, en donde el propósito de biofabricación comprende la producción de un ácido orgánico.

15 36. El método de la reivindicación 35, en donde el ácido orgánico comprende uno o más del grupo de ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico, ácido succínico, ácido itacónico, ácido tartárico, ácido fumárico, y derivados de los mismos.

20 37. El método de la reivindicación 36, en donde el ácido orgánico es ácido cítrico.

38. El método de la reivindicación 36, en donde el ácido orgánico es ácido láctico.

25 39. El método de la reivindicación 36, en donde el ácido orgánico es ácido málico.

40. El método de la reivindicación 36, en donde el ácido orgánico es ácido succínico.

5 41. El método de la reivindicación 36, en donde el ácido orgánico es ácido fumárico.

42. El método de la reivindicación 34, en donde el propósito de biofabricación comprende la producción de un compuesto carotenoide.

10 43. El método de la reivindicación 42, en donde EL compuesto carotenoide comprende uno o más del grupo de fitoeno, licopeno, luteína, beta-caroteno, zeaxantina, cantaxantina, astaxantina, y derivados de los mismos.

15 44. El método de la reivindicación 34, en donde el propósito de biofabricación comprende la producción de un ácido graso esencial.

20 45. El método de la reivindicación 44, en donde el ácido graso esencial comprende uno o más del grupo de DHA, ARA, EPA, y derivados de los mismos.

25 46. El método de la reivindicación 34, en donde el propósito de biofabricación comprende la producción de una enzima industrial.

47. El método de la reivindicación 46, en donde la enzima industrial comprende uno o más del grupo de alfa-amilasa, β -

amilasa, celulasa, β -glucanasa, β -glucosidasa, dextranasa, dextrinasa, alfa-galactosidasa (melibiasa), glucoamilasa, hemicelulasa, invertasa, laccasa, naringinasa, pentosanasa, pectinasa, pululanasa, xilanasa; proteinasa ácida, proteasa alcalina, bromelaina, pepsina, aminopeptidasa, endopeptidasa, subtilisina, aminociclasa, glutaminasa, lisozima, acilasa penicilina, isomerasas, deshidrogenasa alcohol, oxidasa de aminoácido, catalasa, cloroperoxidasa, peroxidasa, decarboxilasa acetolactato, β -decarboxilasa aspártica, histidasa, glicosiltransferasa ciclodextrina, y fitasa.

48. El método de la reivindicación 34, en donde el propósito de biofabricación comprende la producción de un ingrediente farmacéutico activo.

49. El método de la reivindicación 48, en donde el ingrediente farmacéutico activo comprende uno o más del grupo de lovastatina, mevastatina (compactina), ácido micofenólico, ciclosporina, un antibiótico beta-lactama, un metabolito citotóxico, un inmunosupresor, y derivados de los mismos.

50. El método de la reivindicación 34, en donde el propósito de biofabricación comprende la producción de un carbohidrato extracelular.

51. El método de la reivindicación 50, en donde el carbohidrato extracelular comprende uno o más del grupo de chitina, chitosan, N-acetilglucosamina, glucosamina,

poligalactosamina, pululán, escleroglucano, y derivados de los mismos.

52. El método de la reivindicación 34, en donde el propósito de biofabricación comprende la producción de un compuesto insecticida.

53. El método de la reivindicación 52, en donde el compuesto insecticida comprende uno o más del grupo de ácido nodulispórico y avermectina.

54. Un método que comprende las etapas de:

a. obtener una muestra que contiene microorganismos genéticamente diversos que forman glóbulos;

b. cultivar la muestra ya que los microorganismos adoptan su forma de glóbulo;

c. detectar uno o más parámetros ópticamente detectables de glóbulos de microorganismos individuales dentro de la muestra;

d. clasificar glóbulos de microorganismos individuales en recipientes separados con base en el uno o más parámetros ópticamente detectables; y

e. cultivar por lo menos uno de los glóbulos de microorganismos clasificados individuales bajo condiciones que le permiten producir un producto o o predeterminado.

5 55. El método de la reivindicación 54, en donde la etapa de obtener comprende cultivar una colección de microorganismos formadores de glóbulos bajo condiciones que soportan el crecimiento para formar el glóbulo.

10 56. El método de la reivindicación 55, en donde la etapa de obtener comprende cosechar por lo menos algunos microorganismos de una colección de microorganismos que forman glóbulos.

15 57. El método de la reivindicación 55, en donde la colección comprende microorganismos relacionados con la progenia de un microorganismo progenitor, cuya progenia se genera a través de la aplicación de un protocolo mutagénico.

20 58. El método de la reivindicación 57 en donde el microorganismo progenitor produce el producto o o predeterminado.

59. El método de la reivindicación 57 en donde el microorganismo progenitor no produce el producto o o predeterminado.

25 60. El método de cualquiera de las reivindicaciones 54-59 en donde el por lo menos un glóbulo de microorganismo individual clasificado difiere del progenitor en su producción del producto o o predeterminado.

61. El método de la reivindicación 60 en donde el por lo menos un glóbulo de microorganismo individual clasificado produce más del producto o o predeterminado que el microorganismo progenitor bajo condiciones de fermentación idénticas.

62. Un microorganismo que forma glóbulos que resulta de aislar un microorganismo de glóbulo obtenido por un método de cualquiera de las reivindicaciones 1-61.

63. Un microorganismo que forma glóbulos cultivado y clasificado obtenido por un método que comprende las etapas de:

a. obtener una muestra que contiene microorganismos genéticamente diversos que forman glóbulos;

b. cultivar la muestra ya que los microorganismos adoptan su forma de glóbulo;

c. detectar uno o más parámetros ópticamente detectables de glóbulos de microorganismos individuales dentro de la muestra;

d. clasificar glóbulos de microorganismos individuales en recipientes separados con base en el uno o más parámetros ópticamente detectables; y

e. cultivar por lo menos uno de los glóbulos de microorganismos clasificados individuales bajo condiciones que le permiten producir un producto o o predeterminado.

5 64. El microorganismo que forma glóbulos cultivado y clasificado de la reivindicación 63, en donde el microorganismo produce un producto o o predeterminado.

10 65. El microorganismo que forma glóbulos cultivado y clasificado de la reivindicación 64, en donde la muestra comprende la progenia de un progenitor que no produce el producto o o predeterminado.

15 66. El microorganismo que forma glóbulos cultivado y clasificado de la reivindicación 65 en donde el glóbulo de microorganismo difiere del progenitor en su producción del producto o o predeterminado.

20 67. El microorganismo que forma glóbulos cultivado y clasificado de la reivindicación 65 en donde el glóbulo de microorganismo produce más del producto o o predeterminado que el microorganismo progenitor bajo condiciones de fermentación idénticas.

25 68. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-61, en donde la etapa de clasificar emplea una citometría de flujo y clasificar el instrumento que mide uno o más parámetros de tamaño, densidad óptica y intensidad de emisión fluorescente.

69. Un proceso para identificar una cepa fúngica que tiene una capacidad incrementada para la biosíntesis o tolerancia del ácido orgánico, que comprende:

5

a. proporcionar por lo menos un hongo filamentoso que forma glóbulos;

10

b. aplicar a las células del hongo por lo menos un tratamiento capaz de inducir un cambio fenotípico en las células, que forma por lo tanto por lo menos una célula tratada;

15

c. cultivar la célula tratada bajo condiciones en las que una población de glóbulos de progenia se propaga de la célula;

20

d. poner en contacto glóbulos de progenia de la población con por lo menos una etiqueta detectable que proporciona una señal óptica cuya magnitud es proporcional a un parámetro seleccionado del grupo que consiste de recaptación de carbohidrato mediante, volumen mitocondrial de, función mitocondrial en, y pH intracelular de los hongos, y combinaciones de estos, que forma por lo tanto por lo menos un glóbulo marcado;

25

e. detectar una señal óptica del por lo menos un glóbulo marcado, por lo tanto obtener una señal óptica de prueba específica al glóbulo marcado;

f. comparar la señal óptica de prueba con una señal óptica de control producida bajo condiciones equivalentes por un glóbulo de control del hongo filamentoso de la etapa (a) que se ha puesto en contacto con la marca detectable de la etapa (d);

g. identificar aquellos glóbulos que exhiben una señal óptica de prueba que es diferente de la señal óptica de control;

h. correlacionar la diferencia en la señal óptica con un incremento en biosíntesis de ácido orgánico o tolerancia, por lo tanto identificar por lo menos una cepa fúngica que tiene una capacidad incrementada para la biosíntesis o tolerancia del ácido orgánico.

70. El proceso de acuerdo con la reivindicación 69, en donde el tratamiento de la etapa (b) comprende una modificación genética.

71. El proceso de acuerdo con la reivindicación 69, en donde el ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste de Ácidos mono y di-carboxílicos C2-C6, Ácidos tri-carboxílicos C3-C6, y combinaciones de estos.

72. El proceso de acuerdo con la reivindicación 69, en donde el ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste de ácido acético, glicólico, láctico, propiónico, pirúvico, butírico,

hidroxibutírico, oxaloacético, malónico, tartárico, tartrónico, succínico, málico, maleico, fumárico, itacónico, citracónico, tricarbalílico, isocítrico, y ácidos cítricos, y combinaciones de estos.

5

73. El proceso de acuerdo con la reivindicación 69, en donde el parámetro de la etapa (d) comprende recaptación de carbohidrato, y en donde el carbohidrato se selecciona del grupo que consiste de monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos, y glicerol, y combinaciones de estos.

10

74. El proceso de acuerdo con la reivindicación 69, en donde la diferencia en la etapa (h) es un promedio estadístico de una pluralidad de diferencias identificadas en la etapa (g).

15

75. Un proceso para identificar una cepa fúngica que tiene una cultivabilidad incrementada en reactor de tanque agitado, que comprende:

20

a. proporcionar por lo menos un hongo filamentoso que forma glóbulos;

b. aplicar a las células del hongo por lo menos un tratamiento capaz de inducir un cambio fenotípico en las células, que forma por lo tanto por lo menos una célula tratada;

25

c. cultivar la célula tratada bajo condiciones en las que una población de glóbulos de progenia se propaga de la célula;

5 d. detectar una señal óptica de un glóbulo de progenia de la población, cuya señal es proporcional al tamaño o densidad del glóbulo, por lo tanto obtener una señal óptica de prueba específica al glóbulo de progenia;

10 e. repetir la etapa (d) para producir un conjunto de señales ópticas de prueba para glóbulos de progenia que es representativo de la población, por lo tanto obtener por lo menos un conjunto de datos de prueba;

15 f. proporcionar un conjunto de datos de control de señales ópticas de señal correspondientes producidas bajo condiciones equivalentes por los glóbulos de control del hongo filamentoso de la etapa (a);

20 g. comparar el conjunto de datos de prueba y el conjunto de datos de control;

h. identificar, con base en la comparación, un conjunto de datos de prueba obtenidos en la etapa (e), que exhibe un tamaño mejorado o una densidad mejorada con relación al conjunto de datos de control, por lo tanto obtener un conjunto de datos de prueba mejorados;

25

i. asignar la población del glóbulo de progenia asociado con el conjunto de datos de prueba mejorados como una población que tiene cultivabilidad del reactor de tanque agitado incrementada, por lo tanto identificar una cepa fúngica que

5 tiene una cultivabilidad incrementada en reactor de tanque agitado.

76. El proceso de acuerdo con La reivindicación 75, en donde el tratamiento de la etapa (b) comprende una modificación

10 genética.

77. El proceso de acuerdo con la reivindicación 75, en donde la cultivabilidad incrementada comprende la producto o ividad incrementada de un metabolito deseado o producto o o de

15 biotransformación, reología de caldo de cultivo de fermentación mejorada, o una combinación de los mismos.

78. El proceso de acuerdo con La reivindicación 75, en donde la etapa (g) de comparar comprende convertir primero las

20 señales ópticas a los valores de densidad o tamaño correspondientes y luego comparar los valores de densidad o tamaño.

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS QUE FORMAN GLÓBULOS

Resumen

5 La presente descripción proporciona tecnologías para identificar, caracterizar y/o clasificar microorganismos formadores de glóbulos tal como bacterias y/o hongos (por ejemplo, levadura) en cultivo líquido, y particularmente bajo condiciones de fermentación. En algunas realizaciones, los microorganismos
10 formadores de glóbulos producen uno o más productos o los comerciales. Por ejemplo, en algunas realizaciones los microorganismos formadores de glóbulos producen uno o más ácidos orgánicos, compuestos carotenoides, ácidos grasos esenciales, enzimas industriales, farmacéuticos activos, carbohidratos
15 extracelulares, y compuestos insecticidas, etc. En muchas realizaciones, los organismos se clasifican en su forma de glóbulo.

Figura 1

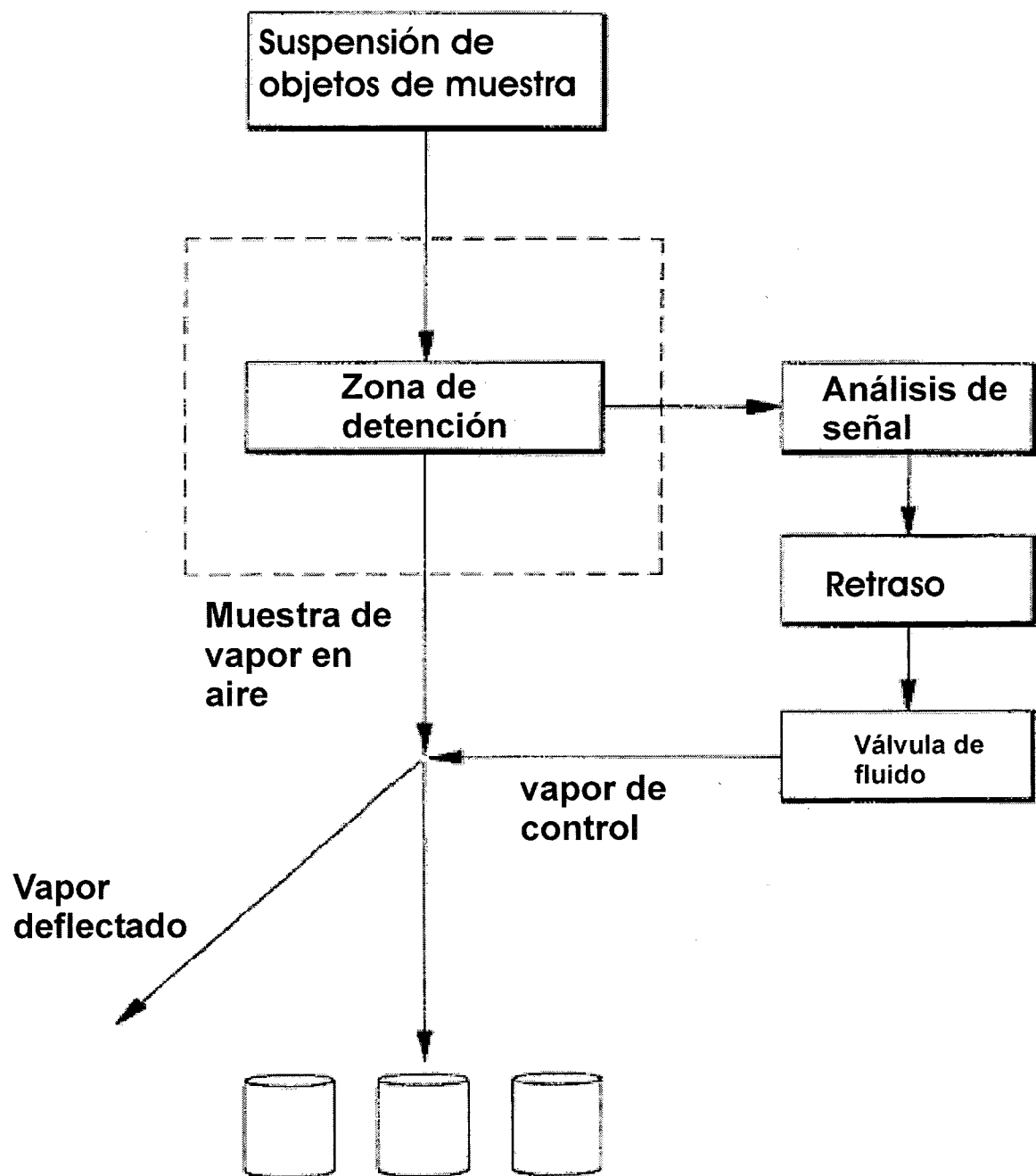


Figura 2

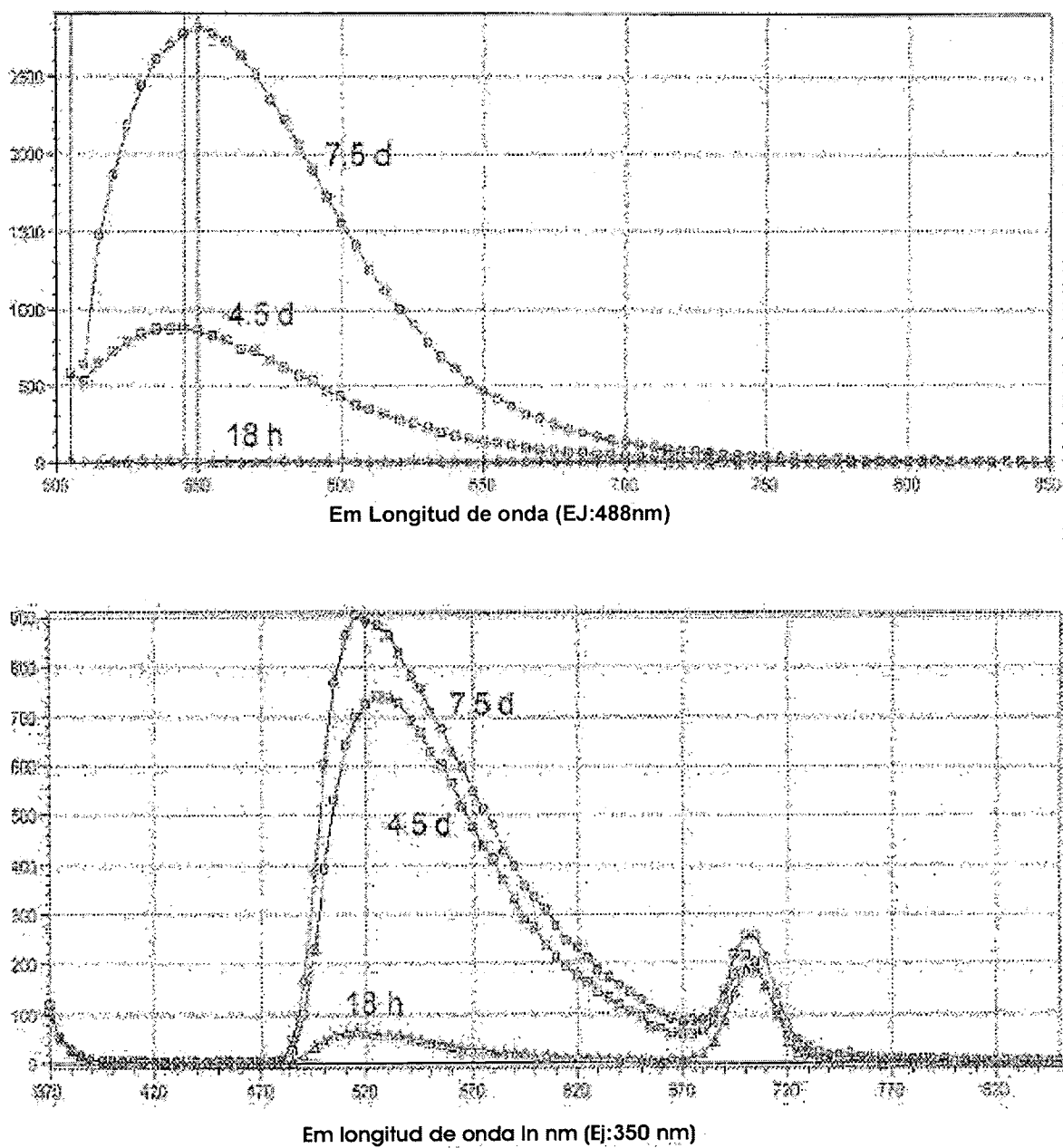
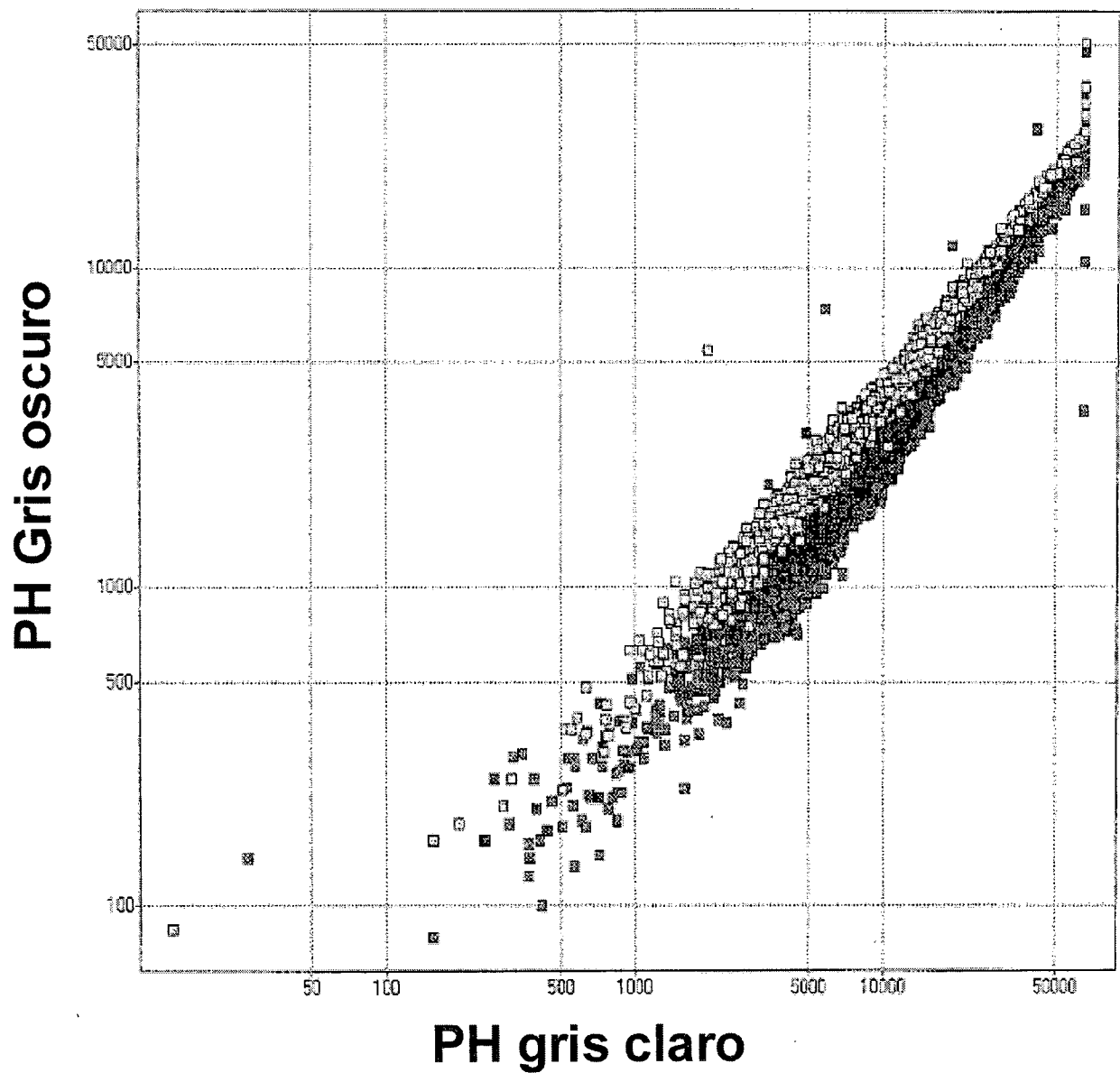


Figura 3

Gráfica de dispersión



From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

FURMAN, Margo, H.
Choate, Hall & Stewart LLP
Two International Place
Boston, MA 02110
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 06 May 2009 (06.05.2009)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 2005862-0047	
International application No. PCT/US2008/075352	International filing date (day/month/year) 05 September 2008 (05.09.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

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

Name and Address MICROBIA INC. 60 Westview Street Lexington, MA 02421 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No. 617-621-8419	
	Facsimile No. 617-494-0908	
	E-mail address	

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

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

Name and Address MICROBIA, INC. 60 Westview Street Lexington, MA 02421 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No. 617-621-8419	
	Facsimile No. 617-494-0908	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

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

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

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Panakal Joseph
Facsimile No. +41 22 338 90 90	e-mail pt07.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 07

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:
FURMAN, Margo, H. Choate, Hall & Stewart LLP Two International Place Boston, MA 02110 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 06 April 2009 (06.04.2009)
Applicant's or agent's file reference 2005862-0047
International application No. PCT/US2008/075352

IMPORTANT NOTIFICATION
International filing date (day/month/year) 05 September 2008 (05.09.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:			
☒ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent	☐ the common representative
Name and Address MICROBIA PRECISION ENGINEERING, INC. 20 Bent Street Cambridge, MA 02141 United States of America		State of Nationality US	State of Residence US
		Telephone No.	
		Facsimile No.	
		E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:			
☐ the person	☒ the name	☒ the address	☐ the nationality ☐ the residence
Name and Address MICROBIA INC. 60 Westview Street Lexington, MA 02421 United States of America		State of Nationality US	State of Residence US
		Telephone No. 617-621-8419	
		Facsimile No. 617-494-0908	
		E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
--

4. A copy of this notification has been sent to:	
☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 90 90	Authorized officer Panakal Joseph e-mail pt07.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 07
---	--

CORRECTED VERSION

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

FURMAN, Margo, H.
Choate, Hall & Stewart LLP
Two International Place
Boston, MA 02110
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)

15 September 2009 (15.09.2009)

Applicant's or agent's file reference

2005862-0047

International application No.

PCT/US2008/075352

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)

05 September 2008 (05.09.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant

☐ the inventor

☐ the agent

☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

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

☒ the person

☐ the name

☐ the address

☐ the nationality

☐ the residence

Name and Address

TATE & LYLE INGREDIENTS AMERICAS, INC.
2200 East Eldorado Street
Decatur, IL 62521
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for all designated States except the United States of America.

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

☒ the receiving Office

☐ the International Searching Authority

☐ the Authority(ies) specified for supplementary search

☐ the International Preliminary Examining Authority

☒ the designated Offices concerned

☐ the elected Offices concerned

☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Panakal Joseph

e-mail pt07.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 07

Facsimile No. +41 22 338 90 90

PCT/IB/2006 (1-11-2006)

10/0000000000

150

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

FURMAN, Margo, H.
Choate, Hall & Stewart LLP
Two International Place
Boston, MA 02110
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)

18 August 2009 (18.08.2009)

Applicant's or agent's file reference

2005862-0047

International application No.

PCT/US2008/075352

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)

05 September 2008 (05.09.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant

☐ the inventor

☐ the agent

☐ the common representative

Name and Address

United States of America

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

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

☒ the person

☐ the name

☐ the address

☐ the nationality

☐ the residence

Name and Address

TATE & LYLE INGREDIENTS AMERICAS, INC.
2200 East Eldorado Street
Decatur, IL 62521
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for all designated States except the United States of America.

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

☒ the receiving Office

☐ the International Searching Authority

☐ the Authority(ies) specified for supplementary search

☐ the International Preliminary Examining Authority

☒ the designated Offices concerned

☐ the elected Offices concerned

☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 90 90

Authorized officer

Panakal Joseph

e-mail pt07.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 07



No. 10-024524- -00000-0000

Fecha: 2010-03-02 15:53:12
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve. 378 FASE NACIONAL I
Folios: 151

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐



Bogotá,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO

REFERENCIA	Radicación No.	10 24524
	Solicitud internacional	PCT/US2008/075352
	Fecha inicio fase nacional	05/04/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	NO 04807

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.

2. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

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

Continúa en la página siguiente...

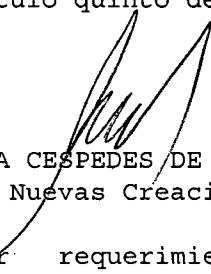
Al contestar favor indique el número
de radicación consignado en el rótulo

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



Radicación No.:10 24524

e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica 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 _____
adpall 09 ABR. 2010



Bogotá,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO
Apoderado(a) y/o Representante de
MICROBIA INC

REFERENCIA	Radicación No.	10 24524
	Solicitud internacional	PCT/US2008/075352
	Fecha inicio fase nacional	05/04/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

104800

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez 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 CESPÉDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 09 ABR. 2010
adpall