

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-536567

(P2004-536567A)

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	4 B 0 2 9
C 1 2 N 1/00	C 1 2 N 1/00	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 94 頁)

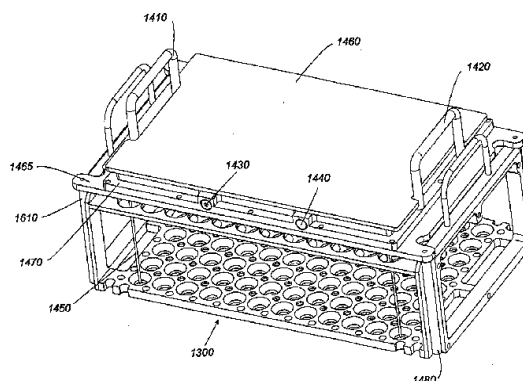
(21) 出願番号	特願2002-562764 (P2002-562764)	(71) 出願人	503287649 アイアールエム エルエルシー イギリス領バークマード諸島 ハミルトン エイチエム エルエックス チャーチ ストリート 48 ソフィア ハウス
(86) (22) 出願日	平成14年2月8日 (2002.2.8)	(74) 代理人	100064355 弁理士 川原田 一穂
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月8日 (2003.8.8)	(72) 発明者	ロバート・チャールズ・ダウンズ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 037 ラ ジョラ ラ ジョラ コロナ ドライブ 5795
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/003817	(72) 発明者	スコット・アラン・レスリー アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 129 サン ディエゴ ホップシード レーン 8474
(87) 国際公開番号	W02002/063027		
(87) 国際公開日	平成14年8月15日 (2002.8.15)		
(31) 優先権主張番号	09/780, 591		
(32) 優先日	平成13年2月8日 (2001.2.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多数サンプルの発酵器及びその使用方法

(57) 【要約】

多数発酵容器を使用して、既知の繰り返し可能な量の非汚染発酵生成物を製造する発酵装置が記載される。他の処理工程と両立し得る処理を容易に行なうため、発酵装置は、容器機構中に並べたサンプル容器の配列を有する(図14)。容器機構は、発酵中、サンプル容器配列中のサンプル容器、及び他の処理ステーションへ又はステーションから容器配列の輸送を保持するように構成される。サンプル容器配列中のサンプル容器の数に対応して、サンプル容器内にはカニューレが配置できる。このカニューレ配列は、ガス源から酸素及び/又は1つ以上の他のガスをカニューレによりサンプル容器に配送するガス分配器に取付けられる。この発酵装置は、多数のプロセスパラメーター(例えば細胞の増殖速度)の同時最適化に利用できる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 複数のサンプル容器を収容するために構成された容器機構、及び
 (b) 前記複数のサンプル容器が前記容器機構に配置された時、該サンプル容器にガスを供給するために構成されたガス分配配列、
 を備えた発酵装置。

【請求項 2】

前記ガス分配配列は、複数のカニューレにガスを配送するために構成されたガス入口を有し、該カニューレは、前記サンプル容器が前記容器機構に配置された時、該サンプル容器にガスを供給するために構成されている請求項 1 に記載の発酵装置。

10

【請求項 3】

前記ガス分配配列が、

(a) 頂部分及び底部分を有すると共に、該底部分と頂部分とは、両者の間に中空の空間を置いて、互いに結合している分配プレート、

(b) 前記底部分の底面に配置されたサンプル容器領域の配列であって、各サンプル容器領域は、凹部を有すると共に、サンプル容器の配列に対応して配置されている該サンプル容器領域の配列、

(c) 前記中空空間と流動可能に連通すると共に、前記サンプル容器領域を貫通して前記分配プレートの底面から突き出ているカニューレの配列、及び

(d) 発酵中、ガスを前記カニューレにより複数のサンプル容器中に配送するため前記中空空間と流動可能に連通するガス入口、
 を有する請求項 1 に記載の発酵装置。

20

【請求項 4】

各カニューレが複数の通路を有する請求項 3 に記載の発酵装置。

【請求項 5】

各カニューレが少なくとも 3 つの通路を有する請求項 4 に記載の発酵装置。

【請求項 6】

前記ガス分配配列が、前記サンプル容器に 1 つ以上の試薬を配送するために構成されている請求項 3 に記載の発酵装置。

【請求項 7】

前記容器機構が、サンプル容器の配列を収容するために構成されている請求項 1 に記載の発酵装置。

30

【請求項 8】

前記容器機構が、サンプル容器の 8 × 1 2 配列を収容するために構成されている請求項 7 に記載の発酵装置。

【請求項 9】

前記容器機構が、少なくとも 9 6 のサンプル容器を収容するために構成されている請求項 7 に記載の発酵装置。

【請求項 10】

前記容器機構が、9 6、3 8 4 又は 1 5 3 6 のサンプル容器を収容するために構成されている請求項 9 に記載の発酵装置。

40

【請求項 11】

前記容器機構が輸送可能である請求項 1 に記載の発酵装置。

【請求項 12】

前記容器機構が、後発酵処理ステーションに輸送するために構成されている請求項 11 に記載の発酵装置。

【請求項 13】

前記容器機構が、温度制御された領域内での配置用に構成され、且つ温度コントローラが該容器機構及び / 又は複数のサンプル容器に結合している請求項 1 に記載の発酵装置。

【請求項 14】

50

前記温度制御された領域が、水浴又は温度制御された部屋を有する請求項 1 3 に記載の発酵装置。

【請求項 1 5】

前記容器機構が、オートクレーブ殺菌可能である請求項 1 に記載の発酵装置。

【請求項 1 6】

前記容器機構及びガス分配配列が、オートクレーブ殺菌可能である請求項 1 に記載の発酵装置。

【請求項 1 7】

複数のサンプル容器を更に備える請求項 1 に記載の発酵装置。

【請求項 1 8】

各サンプル容器の容量が、50 ~ 100 ml である請求項 1 7 に記載の発酵容器。

【請求項 1 9】

各サンプル容器が、1つのサンプルを含有する請求項 1 7 に記載の発酵容器。

【請求項 2 0】

各サンプルが 80 ml 以下である請求項 1 9 に記載の発酵容器。

【請求項 2 1】

各サンプルが、ほぼ同じ組成を有する請求項 1 9 に記載の発酵容器。

【請求項 2 2】

各サンプルが、異なる組成を有する請求項 1 9 に記載の発酵容器。

【請求項 2 3】

前記サンプル容器が、ガラス、プラスチック、金属、ポリカーボネート、及び/又はセラミックからなる請求項 1 7 に記載の発酵容器。

【請求項 2 4】

1つ以上のサンプル容器が、1つの通気口を有する請求項 1 7 に記載の発酵装置。

【請求項 2 5】

前記複数のサンプル容器中の1つ以上のサンプルと接触するセンサーを更に備える請求項 1 に記載の発酵装置。

【請求項 2 6】

前記ガス分配配列が、該装置の操作中、各サンプル容器に酸素、又は酸素と他の少なくとも1つのガスとの混合物を供給するガス供給源を有する請求項 1 に記載の発酵装置。

【請求項 2 7】

前記ガス分配配列に操作可能に結合したプロセスコントローラを更に備える請求項 1 に記載の発酵装置。

【請求項 2 8】

前記複数のサンプル容器中に試薬を分配する分配器を更に備える請求項 1 に記載の発酵装置。

【請求項 2 9】

前記分配器が、サンプル容器に対応する複数の開口部から前記複数のサンプル容器中に前記試薬を分配するために構成されている請求項 2 8 に記載の発酵装置。

【請求項 3 0】

(a) 頂部分及び底部分を有すると共に、該底部分と頂部分とは、両者の間に中空の空間を置いて、互いに結合している分配プレート、

(b) 前記底部分の底面に配置されたサンプル容器領域の配列であって、各サンプル容器領域は、凹部を有すると共に、サンプル容器の配列に対応して配置されている該サンプル容器領域の配列、

(c) 前記中空空間と流動可能に連通すると共に、前記サンプル容器領域を貫通して前記分配プレートの底面から突き出ているカニューレの配列、及び

(d) 発酵中、ガスを前記カニューレにより複数のサンプル容器中に配送するため前記中空空間と流動可能に連通するガス入口、

を備えた、多数サンプル発酵用発酵器ヘッド。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1】

前記分配プレートが、発酵中、サンプルにアクセスするための開口部の配列を更に有する請求項 3 0 に記載の発酵器ヘッド。

【請求項 3 2】

前記カニューレの配列が、8 × 1 2 配列を有する請求項 3 0 に記載の発酵器ヘッド。

【請求項 3 3】

前記カニューレの配列が、少なくとも 9 6 のカニューレを有する請求項 3 0 に記載の発酵器ヘッド。

【請求項 3 4】

前記カニューレの配列が、9 6、3 8 4、又は 1 5 3 6 のカニューレを有する請求項 3 0 に記載の発酵器ヘッド。 10

【請求項 3 5】

前記カニューレが、第一プレートの底面の下に 1 5 ~ 1 6 c m 延びている請求項 3 0 に記載の発酵器ヘッド。

【請求項 3 6】

前記サンプル容器の容量が、5 0 ~ 2 0 0 m l である請求項 3 0 に記載の発酵器ヘッド。

【請求項 3 7】

前記サンプル容器の容量が、5 0 ~ 1 0 0 m l である請求項 3 0 に記載の発酵器ヘッド。

【請求項 3 8】

前記カニューレが、サンプル容器の底部分付近にガスを配送する請求項 3 0 に記載の発酵器ヘッド。 20

【請求項 3 9】

前記ガス入口が、第二プレートの内部空間中に酸素又は窒素を配送し、こうして発酵中、酸素又は窒素をカニューレにより前記サンプル容器に供給する請求項 3 0 に記載の発酵器ヘッド。

【請求項 4 0】

各カニューレが、少なくとも 3 つの通路を有する請求項 3 0 に記載の発酵器ヘッド。

【請求項 4 1】

前記カニューレが、発酵中、サンプル容器からガスを配送するか、液体を配送するか、或いは液体を吸引するために適合される請求項 3 0 に記載の発酵器ヘッド。 30

【請求項 4 2】

(a) 各サンプル容器が 1 つのサンプルを含有する複数のサンプル容器を容器機構中に供給する工程、

(b) 該複数のサンプル容器中で複数のサンプルを発酵させる工程であって、同時にガスを、複数のサンプル容器に関連する複数のカニューレにより各サンプル容器に配送する工程を有する該発酵工程、

を含む複数のサンプルの発酵方法。

【請求項 4 3】

各サンプルの容量が 1 0 0 m l 未満である請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記サンプル容器中でサンプルを前処理又は後処理する工程を更に含む請求項 4 2 に記載の方法。 40

【請求項 4 5】

前記前処理及び / 又は後処理工程が、工程 (b) とは異なる場所で行なわれる請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記前処理及び / 又は後処理工程が、機械的に行なわれる請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記前処理及び / 又は後処理工程が、1 つ以上の試薬の遠心、吸引、又は分配を含む請求項 4 4 に記載の方法。 50

【請求項 4 8】

ガスの配送工程が、前記複数のサンプルに酸素、空気、及び/又は窒素を配送する工程を含む請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 9】

ガスの配送工程が、所定時間に亘って前記複数のサンプルに空気及び酸素を配送すると共に、該所定時間中、空気と酸素との比が変化する工程を含む請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記比が、経時と共に直線的に変化するか、又は段階的に変化する請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記サンプル容器を容器機構内で長方形配列、八二カム配列、又は直線的配列に構成する工程を更に含む請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記サンプル容器を遠心回転機中に移送する工程を更に含む請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 5 3】

1 つ以上の発酵条件を、1 つ以上のサンプル容器に結合したセンサーで検出し、該サンプル容器中の発酵条件を調節する工程を更に含む請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

所定の時間間隔で検出し調節する工程を含む請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記発酵条件の調節工程が、前記サンプル容器に供給原料溶液を添加する工程を更に含む請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記検出工程が、複数サンプルの中の 1 つのサンプルの pH を測定する工程、複数サンプルの中の 1 つのサンプルの酸化還元電位を測定する工程、複数サンプルの中の 1 つのサンプルの光学密度を測定する工程、及び/又は複数サンプルの中の 1 つのサンプルから発光を検出する工程を含む請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記容器機構中の複数のサンプル容器をオートクレーブ殺菌する工程を更に含む請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記複数のカニューレを、容器機構中の複数のサンプル容器と同時にオートクレーブ殺菌する工程を更に含む請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

(a) 複数のサンプル容器を配列状態に維持する輸送可能な容器機構中に該サンプル容器を配置する工程、

(b) 該複数のサンプル容器中に複数のサンプルを入れる工程、

(c) 該容器機構に、カニューレの配列を有する発酵器ヘッドを取付ける工程であって、該カニューレの配列は前記サンプル容器の配列に対応し、該サンプル容器中に挿入される該取付け工程、

(d) 該複数のサンプル容器中の複数のサンプルを発酵させる工程であって、同時にガスを該カニューレの配列経路で複数のサンプルに配送する工程を有する該発酵工程、を含む複数のサンプルの発酵方法。

【請求項 6 0】

工程 (c) が、工程 (b) の前に行なわれる請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

工程 (b) が、工程 (a) の前に行なわれる請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 2】

ガスの配送工程が、工程 (d) の間中、酸素、窒素、及び/又は空気を前記サンプル容器に配送する工程を含む請求項 5 9 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 63】

工程 (d) が、サンプル容器中で嫌気条件を維持するために不活性ガスを配送する工程を含む嫌気発酵である請求項 59 に記載の方法。

【請求項 64】

各サンプル容器の容量が 50 ~ 200 ml である請求項 59 に記載の方法。

【請求項 65】

サンプル容器の容量が 80 ~ 100 ml である請求項 59 に記載の方法。

【請求項 66】

各サンプルの容量が 200 ml 未満である請求項 59 に記載の方法。

【請求項 67】

各サンプルの容量が 100 ml 未満である請求項 59 に記載の方法。

【請求項 68】

前記容器機構中のサンプル容器を機械的に輸送する工程を含む請求項 59 に記載の方法。

【請求項 69】

前記容器機構中の複数のサンプル容器を処理ステーションに同時に輸送する工程を更に含む請求項 59 に記載の方法。

【請求項 70】

前記処理ステーションが、遠心機、吸引器、及び / 又は分配器を有する請求項 69 に記載の方法。

【請求項 71】

前記サンプル容器機構が、遠心機と共用できる請求項 70 に記載の方法。

【請求項 72】

前記複数のサンプル容器が、遠心機と共用できる請求項 70 に記載の方法。

【請求項 73】

前記容器機構からサンプル容器を取り出して、該サンプル容器を遠心機に導入する工程を更に含む請求項 70 に記載の方法。

【請求項 74】

前記吸引器が、前記容器機構内のサンプル容器の配列に対応する吸引ヘッドを有し、該方法がサンプル容器に該吸引ヘッドを操作可能に取付け、同時に複数のサンプル容器内の複数のサンプルを吸引する工程を更に含む請求項 70 に記載の方法。

【請求項 75】

1 つ以上の材料を複数のサンプル容器中に分配する工程を更に含む請求項 70 に記載の方法。

【請求項 76】

前記分配器が、前記サンプル容器の配列に対応する分配ヘッドを有し、該方法がサンプル容器に該分配ヘッドを操作可能に取付け、同時に複数のサンプル容器内に 1 つ以上の材料を分配する工程を更に含む請求項 70 に記載の方法。

【請求項 77】

前記配列が 8 x 12 配列を含む請求項 59 に記載の方法。

【請求項 78】

前記配列が、96、384、又は 1536 のサンプル容器を有する請求項 59 に記載の方法。

【請求項 79】

発酵温度を制御するため、発酵工程中、前記容器機構中のサンプル容器を水浴に配置する工程を更に含む請求項 59 に記載の方法。

【請求項 80】

(a) 複数のサンプル容器中で複数の発酵サンプルを発酵させて、複数の発酵したサンプルを得る工程、

(b) 該発酵したサンプルを含有する複数のサンプル容器を遠心機ヘッドに機械的に輸送する工程、及び

10

20

30

40

50

(c) 発酵を行なった同じサンプル容器中の発酵したサンプルを遠心分離する工程、を含む複数の発酵サンプルの処理方法。

【請求項 8 1】

前記発酵サンプルを遠心分離した後、前記複数のサンプル容器から上澄液を単離する工程を更に含む請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】

少なくとも 4 つのサンプル容器が、同時に前記遠心機ヘッドに機械的に輸送される請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 3】

少なくとも 10 のサンプル容器が、同時に前記遠心機ヘッドに機械的に輸送される請求項 8 0 に記載の方法。 10

【請求項 8 4】

各サンプル容器が、100 ml 未満の発酵サンプルを含有する請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記複数のサンプル容器が、8 x 12 配列で保持される請求項 8 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

著作権通知

37 C. F. R. 1.71 (e) に従って、この特許文書の一部は著作権の保護を受ける資料 (material) を含む。著作権所有者は、特許庁の特許ファイル又は記録にあるような該特許文書又は特許開示のファクシミリ複写する誰にも反対しないが、さもなければ、全ての著作権の権利を保有する。 20

関連出願への相互参照

35 U. S. C. 120 及びその他の適用可能な法令又は規則に従って、本出願は 2001 年 2 月 8 日出願の "Multi-Sample Fermentor and Method of Using Same" と題する米国特許出願 No. 09/780,591 の一部継続出願であって、前記出願による利益及び優先権を主張する。該出願の開示は、あらゆる目的のためその全体をここに援用した。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

発酵は、多くの分野及び産業界で重要な技術であり、量産規模でも実験的な作業台規模でも行なわれている。例えば、抗生物質、ワクチン、合成生重合体、合成アミノ酸、蛋白質等、多数の製品の製造に、発酵システムが使用されている。発酵技術は、E. coli のような生体組織、及びその他、多数の細胞培養を用いた組換え蛋白質の製造に不可欠である。例えば組換えインスリン (Eli Lilly)、エリトロプロテイン (Amgen)、インターフェロン (Roche) 等の市販医薬品の製造には、全て発酵を必須工程として含んでいる。

【0003】

更に最近では、ヒトゲノムを含む数万の遺伝子の同定には、発酵、即ちこれらの遺伝子によってコード化された蛋白質の製造を利用することが重要であることを強調している。各遺伝子の機能の決定は、最も重要であるから、これら遺伝子によってコード化された蛋白質は、例えば発酵法によって作らなければならない。各遺伝子は少なくとも 1 つの遺伝子をコード化するので、数万の蛋白質を作り、単離しなければならない。しかし得られた蛋白質製品の発酵及び単離には、通常、幾つかの労力及び手間のかかる手順を必要とする。したがって、数万の異なる蛋白質を例えば分析に十分な量で製造できる発酵システムが必要である。他の利点は、高スループット処理や、多くの生物工学的用途に使用されるマイクロタイタープレートフォーマットに追従し得る発酵システムである。

【0004】

30

40

50

生物学の急速な進歩により、従来の実験室的作業台に対する高スループット代替法が発展できたが、発酵法は、自動化には追従できなかった。例えば、現在の発酵技術での制限が、自動化高スループットシステムの特徴である連続処理を妨げている。現存の発酵システムは通常、バッチ式処理法又は連続式処理法のいずれかによる多数の取扱い工程を持っている。

【0005】

発酵は通常、バッチ式又は連続式で行なわれる。バッチ式方法は、発酵器に、細胞が増殖する媒体を満たし、下流、即ち後処理のため、発酵器の端部から取り出した全内容物によって発酵を進行させる方法である。次いで発酵器を洗浄し、再び媒体を満たし、更に発酵法を再度行なうため、接種する。例えば、現在の製造規模のバッチ法は、まず大規模な容量の発酵容器中で発酵させ、次いで発酵媒体を処理して所望の発酵製品を単離した後、この製品を次の処理のため製造流中に移送し、最後に次のバッチ処理のため、発酵装置を洗浄するというものである。大規模バッチ式培養では、長時間に亘って細胞の増殖を維持するため、一般に、供給する栄養素の初期濃度を高くする必要がある。その結果、細胞の増殖の初期段階で基質阻害が起こり、次いで発酵の遅い段階で栄養素が不足する恐れがある。これらの欠点により、最適の細胞増殖速度及び発酵収率は得られない。この方法の他の欠点は、次の処理のため、大規模発酵装置から複数の発酵製品をそれぞれ別々のサンプル容器に分配する必要があることである。こうして、発酵製品を大規模に製造することにより、発酵製品は、自動化処理に直ぐには役立たない。更に別の欠点として、この材料を別のサンプル容器に移送したり、更には次のバッチ処理のため、発酵装置を洗浄、殺菌する際の効率低下がある。これらの欠点により、製造コストが増大し、製造時間が非効率的となり、収率も低下する。

10

20

【0006】

連続バッチ法は、大規模発酵容器から発酵製品をサイホンで取り、次いで、計算した指数増殖曲線に従って、この発酵媒体に連続的に栄養素を添加するというものである。しかし、この曲線は、近似式に過ぎず、大規模な工業的量の発酵媒体中での細胞の増殖を正確に予測するものではない。したがって、大規模発酵環境の予測できない性質のため、経験者は、供給速度を極めて綿密にモニターする必要がある。発酵環境の変化によっては、有毒化した発酵製品をサイホンで取って製造流に入れたり、或いは発酵媒体の不足のため最適な製造収率が低下する恐れがある。更に別の欠点として、予測できない発酵製品の収量は、次の処理工程の正確な実施に影響を与えることである。例えば、発酵収率が低下すると、吸引量、試薬の分配量、又は遠心時間がもはや最適化できないか、或いは予測さえできない。発酵方法を頻繁に又は連続的にモニターすることは、製造規模の方法では実施できないか或いは効率的でないことが多い。

30

【0007】

現在の方法は、いずれも効率的な自動化した製造規模の発酵を提供していない。しかし、多くの産業界、特に生物学工業では発酵は、重要な処理工程を維持し、したがって自動化高スループットシステムには発酵方法を取り入れる必要性が存在する。現代の製造方法に発酵法を融合させるには、人の限定的相互作用又はサンプル容器の移送により汚染されていない発酵製品を正確で既知で且つ繰り返し可能な量製造する方法が必要である。本発明は、これらの必要性を満足すると共に、他の必要性を満足することは、以下の詳細な説明及び図面の説明から明らかとなる。

40

【特許文献1】

US N 09 / 780 , 589

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

発明の概要：

本発明は、複数のサンプル、例えば8×12配列の小サンプルを同時に発酵させる方法及び装置を提供する。例えば本発明は、複数のサンプル容器を収容するために構成された容

50

器機構、及び該サンプル容器に結合したガス分配配列を備えた発酵装置を提供する。この発酵器は、非常に多くのサンプルを発酵させて、例えば非常に多くの蛋白質を製造するために提供する。或いは、本発明の発酵器は、製造規模の発酵に一層効率的な道筋を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

一面では本発明は、複数のサンプル容器を、例えば配列状態で収容するために構成された容器機構、及び例えば複数のサンプル容器が該容器機構に配置された時、該サンプル容器にガスを供給するために構成されたガス分配配列を提供する。この容器機構は通常、サンプル容器の配列、例えば少なくとも約96、384、又は1536のサンプルを保持した例えば8×12配列を収容するために構成されている。ガス分配配列は通常、複数のカニューレにガスを配送するために構成されたガス入口を有し、該カニューレは、サンプル容器にガスを供給するために構成されている。

10

【0010】

一実施態様では、容器機構は、例えば後発酵処理ステーションに輸送するために構成された輸送可能な容器機構である。更に、この容器機構は、温度制御された領域内、例えば水浴又は温度制御された部屋での配置用に任意に構成され、ここで温度コントローラが該容器機構及び/又は容器機構内の1つ以上のサンプル容器に結合している。

他の実施態様では、容器機構はオートクレーブ殺菌可能である。例えば容器機構は、それ自体で、又はガス分配配列及び/又はサンプル容器と組合せて、オートクレーブ殺菌可能である。

20

【0011】

サンプル容器は通常、ガラス、プラスチック、金属、ポリカーボネート、又はセラミック等からなる。各サンプル容器は、50~100mlの容量を有し、例えば約80ml未満、更に例えば約65mlのサンプルを保持するのに使用される。複数のサンプル容器中の各サンプルは、例えば単一の蛋白質を多量に作るため、或いは同時に多数の蛋白質を作るため、ほぼ同じか又は異なる組成を有する。他の実施態様では、サンプル容器は、例えば発酵中に生成した圧力を解放するため、任意に通気口を備える。また、例えば温度、pH等をモニターするため、複数のサンプル容器中の1つ以上のサンプルと接触して、センサーが任意に配置される。

30

【0012】

一実施態様では、ガス分配配列は、分配プレート、サンプル容器領域の配列、カニューレの配列、及び1つのガス入口を有する。分配プレートは通常、頂部分と底部分との間に中空の空間が生じるように、互いに結合した頂部分と底部分とを有する。サンプル容器領域の配列は通常、この底部分の底面に配置される。各サンプル容器領域は、凹部を有すると共に、サンプル容器の配列に対応して配置される。カニューレの配列は、例えばサンプル容器にガス流を供給するため、通常、前記中空空間と流動可能に連通すると共に、前記サンプル容器領域を貫通して前記分配プレートの底面から突き出ている。幾つかの実施態様では、カニューレは、複数の通路、例えば少なくとも3つの通路を有する。ガス入口は通常、発酵中、ガスを前記カニューレにより複数のサンプル容器中に配送するため前記中空空間と流動可能に連通している。例えばガス分配配列は、幾つかの実施態様では、装置の操作中、各サンプル容器に酸素、又は酸素と他の少なくとも1つのガスとの混合物を供給するガス供給源を有する。

40

【0013】

他の実施態様では、ガス分配配列は、1つ以上の試薬をサンプル容器に配送するために、任意に構成されている。例えば1つ以上の試薬を複数のサンプル容器に分配するため、例えば分配器がガス分配配列に任意に結合している。分配器は通常、例えば複数のサンプル容器に対応する複数の開口部から複数のサンプル容器中に試薬を分配するために構成されている。

更に、例えば発酵中の複数のサンプルへのガス流を制御及び/又はモニターするため、ブ

50

ロセスコントローラがガス分配配列に操作可能に結合している。

【0014】

他の一面では本発明は、多数サンプルの発酵用発酵器ヘッドを提供する。通常、発酵器ヘッドは、頂部分及び底部分を有する分配プレート、サンプル容器領域の配列、カニューレの配列及びガス入口を備える。分配プレートの底部分と頂部分とは、両者の間に中空の空間が生じるように、互いに結合している。サンプル容器領域の配列は通常、分配プレートの底部分の底面に配置され、各サンプル容器領域は、凹部を有すると共に、サンプル容器の配列に対応して配置されている。カニューレの配列は通常、前記中空空間と流動可能に連通すると共に、サンプル容器領域、例えば15～16cmを貫通して分配プレートの底面から突き出ている、またガス入口は、発酵中、ガスをカニューレにより複数のサンプル容器中に配送するため前記中空空間と流動可能に連通している。カニューレは通常、サンプル容器の底部分付近にガスを配送する。幾つかの実施態様では分配プレートは、サンプルにアクセスするための開口部の配列を更に有する。或いは、カニューレは、発酵中、サンプル容器からガスを配送するか、液体を配送するか、或いは液体を吸引するために適合される。発酵器ヘッドと一緒に使用したサンプル容器及びサンプルは通常、前述のものと同じである。

10

【0015】

他の一面では本発明は、複数サンプルの発酵方法を提供する。この方法は通常、各サンプル容器が1つのサンプルを含有する複数のサンプル容器を容器機構中に供給する工程を含む。複数のサンプル中の複数のサンプルは通常、発酵させる。この発酵工程は、同時にガス、例えば酸素、空気、及び/又は窒素を、複数のサンプル容器に関連する複数のカニューレにより各サンプル容器に配送する工程を含む。各サンプルは通常、100ml未満の容積を有し、例えば前述のようなサンプル容器及び容器機構を使用する。幾つかの実施態様では、これらサンプルへのガスの配送工程は、空気と酸素との比率が変化する間中、例えば直線的な時間に亘って、或いは段階的な時間に亘って、サンプルにガスを配送する工程を含む。

20

【0016】

幾つかの実施態様では、これらの方法は、1つ以上の発酵条件を、1つ以上のサンプル容器に結合したセンサーで検出し、該サンプル容器中の発酵条件を調節する工程を更に含む。例えば、発酵条件の調節工程は任意に、供給原料溶液をサンプル容器に添加する工程を含む。検出工程は任意に、複数サンプルの中の1つのサンプルのpHを測定する工程、複数サンプルの中の1つのサンプルの酸化還元電位を測定する工程、複数サンプルの中の1つのサンプルの光学密度を測定する工程、及び/又は複数サンプルの中の1つのサンプルから発光を検出する工程を含む。

30

【0017】

幾つかの実施態様では、これらの方法は、例えば、発酵工程と同じか又は異なる場所の同じセットのサンプル容器中のサンプルを前処理又は後処理する工程を更に含む。幾つかの実施態様では、この前処理及び/又は後処理工程は、機械的に行なわれる。前処理及び/又は後処理工程としては、限定されるものではないが、1つ以上の試薬の遠心、吸引、及び/又は分配が挙げられる。例えばこれらの方法は、サンプル容器を発酵後、遠心回転器に移送するか、或いはサンプル容器を例えば発酵前に容器機構中でオートクレーブ殺菌する工程を任意に含む。更に、カニューレも任意に容器機構でオートクレーブ殺菌できる。

40

【0018】

他の面では本発明方法は、複数のサンプル容器を配列状態に維持する輸送可能な容器機構中に該サンプル容器を配置する工程を含む。これら複数のサンプルは、容器機構中に複数のサンプル容器を配置する前又は配置した後、これらのサンプル容器中に任意に入れる。発酵器ヘッドは通常、例えばサンプルを容器に加える前又は加えた後、容器機構に取付ける。発酵器ヘッドは通常、前述のようにカニューレの配列を有する。カニューレの配列は通常、サンプル容器の配列に対応し、発酵器ヘッドの取付け時にサンプル容器中に挿入される。次いで、サンプル容器中のサンプルを、同時にガス、例えば酸素、窒素、及び/又

50

は空気を該カニューレの配列経路で複数のサンプルに配送することにより、発酵させる。幾つかの実施態様では、この発酵は、サンプル容器中で嫌気条件を維持するために不活性ガスを配送する工程を含む嫌気発酵である。これらの方法は、前述のような機械的工程、前処理工程、及び/又は後処理工程を任意に含む。例えば、これらの方法で使用されるサンプル容器及び/又はサンプル容器機構は、遠心機と共用可能 (compatible) にするため、任意に構成される。但し、この方法は、容器機構及び/又はサンプル容器を遠心分離のため遠心機に輸送する工程を更に含む。

【0019】

幾つかの実施態様では、これらの方法は、吸引器又は分配器への輸送工程を含む。ここで吸引器は通常、容器機構内のサンプル容器の配列に対応する吸引ヘッドを有する。但し、この方法は、複数のサンプル容器に吸引ヘッドを操作可能に取付け、同時にサンプル容器内のサンプルを吸引する工程を更に含む。他の幾つかの実施態様では分配器は、サンプル容器の配列に対応する分配ヘッドを有し、またこの方法は、サンプル容器に分配ヘッドを操作可能に取付け、同時に複数のサンプル容器内に1つ以上の材料を分配する工程を更に含む。

10

【0020】

別の一実施態様では、本発明は、複数の発酵サンプルを処理する方法を提供する。この方法は、複数のサンプル容器中で複数の発酵サンプルを発酵させて、複数の発酵したサンプルを得る工程、発酵したサンプルを含有するサンプル容器を遠心機ヘッドに機械的に輸送する工程、及び発酵を行なった同じサンプル容器中の発酵したサンプルを遠心分離する工程を含む。例えば、約4～約10個のサンプル容器を同時に遠心機ヘッドに機械的に任意に輸送する。個の方法は、発酵サンプルを遠心分離後、サンプル容器から上澄液を単離する工程も任意に含む。

20

【0021】

発明の詳細な説明：

本発明は、発酵装置及び発酵方法を提供する。ここに提示した発酵器及び発酵方法は、以下に説明するような製造規模の発酵、例えば自動高スループット発酵を提供する。例えば本発明は、輸送可能な容器機構を備えた多数サンプル発酵器を提供する。この発酵器は、容器機構内の整列したサンプル容器中に保持された複数のサンプルを同時に発酵させるために構成されている。これらのサンプル容器は、比較的小容量、例えば各サンプル容器中で約50～80ml、更に通常は65mlののバッチ発酵を提供する。更に、輸送可能な容器機構は、従来の発酵システムにはなかった高スループット性 (aspect) をこのシステムに与える。この容器機構は、処理、例えば同じサンプル容器内の上流又は下流での処理を行なうのに使用される。

30

【0022】

本発明は、複数の小サンプルを用いたバッチ式発酵が可能な新規の発酵器装置を提供する。例えば、小さいサンプルサイズにより、大きなバッチ式プロセスで生じる最適増殖速度及び収率の低下という欠点が除去される。更に、本システムは、後発酵処理のためのサンプルの取扱を必要としない。本発明ではサンプル容器は、いかなる後処理工程においても直接使用され、同様に多くの洗浄及び滅菌工程を省略し、これにより一層安価で効率的で且つ迅速な発酵方法を提供する。

40

【0023】

本発明は、例えば小さいサンプルサイズを使用することにより、連続供給システムの欠点を除去する。例えば、大規模連続供給方法で使用される見積りの増殖曲線は、本発明では不要である。したがって、連続供給方法における予想外の結果や頻繁にモニターするという問題は、本発明ではない。

【0024】

本発明は、例えば小サンプルサイズを用い、多数のサンプルを同時に発酵させることにより、上記課題を解決する発酵装置を提供する。バッチ式で多数発酵、例えば小規模発酵を行なうことにより、最適の混合が達成され、最適温度及びpHが維持できると共に、以下

50

の更なる説明により他の多数の利点が明白になるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0025】

I. 多数サンプル発酵装置

本発明は、多数サンプル発酵装置を提供する。通常、本発明の装置は、サンプルホルダー又は容器機構と、ガス分配システムとを備える。例えば、一実施態様では、容器機構は、サンプル容器の配列を発酵のため保持及び/又は輸送するのに使用される。例えばサンプル容器の配列に対応するカニューレの配列を有する発酵器ヘッドは、例えば容器機構及び/又はサンプル容器に直接結合している。ガスが、多数サンプルの発酵を与えるカニューレ及び発酵器ヘッド経由で多数サンプル容器中に分配される。装置の各種構成成分を以下

10

【0026】

複数のサンプル容器の保持に使用される容器機構

ここで用いた“容器機構”とは、複数のサンプル容器を所望の配列に保持及び/又は維持する配列を云う。通常、本発明の容器機構は、輸送可能で且つオートクレーブ殺菌可能である。更に容器機構は、移動可能な部品を持っている。輸送可能な容器機構は、サンプル容器を所望の配列に保持しながら、容易に輸送、移動されるものである。例えば本発明の容器機構は、例えば発酵終了後、処理ステーションに輸送するためのハンドルを任意に有する。オートクレーブ殺菌可能な容器機構は、例えば所望ならばサンプル容器及びサンプルを含む滅菌用オートクレーブ中に直接置くことができるものである。

20

【0027】

輸送可能な容器機構を用いることにより、サンプル容器の全体の配列は、多数プロセス製造の際、一つの発酵処理ステーションに輸送したり、一つの発酵処理ステーションから他の処理ステーションに輸送するのに任意に使用される。例えば、輸送可能な容器機構は、サンプル容器の配列を、水浴のような温度制御領域、例えば水浴中に浸漬した温度コントローラ及び温度コイルにより制御された水浴中に輸送するのに任意に使用される。他の形態の温度制御、例えば温度制御された、ゲル浴、オープン、グローブボックス、又は空気室も任意に使用される。

【0028】

通常、容器機構は、複数のサンプル容器を配列状態、例えば長方形配列に維持する。図1

30

【0029】

本発明の容器機構は通常、複数のサンプル容器を例えば配列して置くための複数の配置ウエルを有する。例えば配置ウエルは、内部にサンプル管が任意に配置される容器機構の底部に複数の凹みを任意に含む。容器機構底部のこれらの凹み又はウエルの他に、容器機構は、例えばサンプル管の上部を支持すると共に、これらの位置を維持するため、任意に上

40

【0030】

例えば各個々のサンプル容器の底部は、通常、配置ウエル、例えば図1の配置ウエル257又は図13の配置ウエル1350内に配置される。配置ウエルの配列は、好ましくはサンプル容器配列の構成を反映し、輸送可能な容器機構中に埋め込まれる。しかし配置ウエルは、他の構成で配列してよい。例えば配置ウエルは、各々一列のサンプル容器を保持した直線的なトラフとして配列できる。他の実施態様では、配置ウエルは、輸送可能な容器機構に存在しない。例えば容器機構は、凹み又はウエルのない堅固な底面を任意に有する。この場合、複数のサンプル容器は、容器機構中に例えば配列の構成を維持するため容器

50

機構の側面に対し堅く詰めて配置される。

【0031】

本発明のサンプル容器としては、通常、試験管、その他のサンプル管、ジャー、フラスコ又はその他のサンプル保持用容器が挙げられる。通常、サンプル容器の容量は、約50～約200ml、更に通常は、約80～約100mlである。サンプル容器は通常、例えばオートクレーブ殺菌、処理、発酵等のため、容器機構の配置ウエル配列中に置かれる。

【0032】

幾つかの実施態様では、サンプル容器は、パイレックスガラス又はポリカーボネートで作られるが、他の好適な材料が、サンプル容器の製造に任意に使用される。例えば、発酵媒体に不活性であるか、多数プロセス製造において考えられる別の方法、例えば高スループットシステムに含まれるその他の材料に不活性である、プラスチック、セラミック、金属、例えばアルミニウム、その他の材料が任意に使用される。更に、発酵媒体が各個々のサンプル容器中で同じ媒体であってよいこと、或いはサンプル容器の配列が異種の発酵媒体の組合せを任意に含むことは理解されよう。例えば発酵媒体は、各個々のサンプル容器中で同じであってよく、また大量(bulk)合成法用の同じ発酵液(broth)培地を含有してよい。或いは、配列中の各サンプル容器は、特定成分の製造収率を最適化するため、僅かに異なる発酵液培地を持っていてよい。

10

【0033】

幾つかの実施態様では、グリッパ(掴み部)付きサンプル容器が任意に使用される。この実施態様では、容器機構は通常、例えば複数の容器を所望の構成に維持するため、又はサンプル容器の配列を発酵ステーション及び/又は処理ステーションに、また発酵ステーション及び/又は処理ステーションから輸送するのを助けるため、対応するグリッパ面を有する。

20

他の実施態様では、本発明のサンプル容器にセンサーが任意に設けられる。例えば発酵反応をモニターするため、サンプル容器内又は付近にpH又は温度のセンサーが任意に配置される。

【0034】

発酵サンプルは、サンプル容器を容器機構に配置する前又は後にサンプル要器中に置かれる。一実施態様では、例えばサンプル容器をサンプル機構に収容しながら、細菌の移植、その他の準備工程が実施される。例えば細菌及び初期栄養剤を、前の処理ステーションの各サンプル容器中に分配する。各個々のサンプル容器中で直接、細菌を調製できるので、サンプルを発酵装置に移送する前に、別個の容器中で培養を接種して移植を開始する必要がない。発酵性細菌の移植に本発明の容器機構配列を用いると、別個の移植配列をなくすことにより、コストが低下する。いったん細菌を移植すると、サンプル容器は、例えば容器機構内で、発酵ステーション、例えば水浴、又はその他、加熱室のような温度制御領域に都合良く輸送される。発酵ステーションで又はその前の時間でも、ガス分配配列は、各サンプル容器中でガスを泡立たせ、発酵させるため、容器機構に取付ける。ガス分配配列を以下、詳細に説明する。

30

【0035】

複数サンプル容器へのガス供給に使用されるガス分配配列

40

ガス分配配列は、発酵中、サンプル容器にガス流を供給するのに使用される。このガス分配システムは通常、ガス供給源から容器機構の複数のサンプル容器中にガスを流すために構成される。通常、ガス分配配列は、例えば頂部に置くか、ネジ止めした容器機構に取付ける。例えば、ガス分配配列は通常、ガスが流れる複数のカニューレを有するか、或いはこれに結合させる。カニューレは、ガス配送のため、各サンプル容器内、例えばサンプル容器の底部まで延びている。このようなカニューレは、サンプル容器内のサンプルの攪拌も任意に与える。

【0036】

ガス源は通常、1つ以上のガス、例えば空気及び酸素の供給源を有する。例えば一実施態様では、ガス源は、N₂ガス用入口及びO₂

50

ガス用入口を有する。各ガスの比率は、プロセスコントローラを用いて手動で又は遠隔で制御できる。ガス比の調節能力によって、本発明では発酵中、増殖条件が変化した場合、必要なガス、例えば酸素の量を最適化できる。例えばプロセスコントローラは、発酵の過程
中、空気/酸素比を直線的に変化させるのに使用される。或いはこの比は、発酵の進行に従って段階的に変化させる。いかなる種類、混合物又は数のガスも本発明のガス源に任意に導入、混合され、1つ以上のサンプル容器に含まれる発酵サンプルに、例えば1セットのカニユーレを介して供給される。

【0037】

カニユーレは、ダクト又は容器、例えばここで提供したような醗酵サンプル容器又は管に挿入するための小管である。本発明ではカニユーレは、サンプル容器の内側に配置でき、
例えば通常、軟質又は硬質の管で構成され、サンプル容器に各種ガスを配送するため、サンプル容器中に挿入される。一実施態様では、これらカニユーレは通常、サンプル容器の配列に対応する配列に並べられる。本発明の一例の配列は、各々関連する硬質カニユーレを有するサンプル容器8×12個の配列を含む。通常、カニユーレは、通気及び混合を促進するため、各個々のサンプル容器のほぼ底部まで延びている。例えばカニユーレは、ガス分配配列の底面から約15~16cm任意に延びている。幾つかの実施態様では、各サンプル容器中に2つ以上のカニユーレを備える。

10

【0038】

図8に示す実施態様では、ガスは、カニユーレ22内の3つの通路内を流れる。通路内のガス流は、任意に個々に又は集団で調整される。カニユーレ内の1本の大きい通路よりも
多数の小さい通路の方では小さい気泡が得られる。その結果、これらの多数通路で生じた気泡は、1本の通路で生じた気泡よりも表面積が大きい。好ましい実施態様では、各通路内のガス流を更に正確に調節すると共に、1組のサンプル容器に対し(across)確実に均一なガス配送を行なうため、通路は精密に貫通されている。本発明では、更に少ないか多い通路を用いることができる。例えば、カニユーレは通常、約1~約5の通路、更には通常、2又は3の通路を有する。これらの通路は、任意に同じか又は異なるサイズを有し、また円形であっても、或いは長方形、楕円形又は三角形のような他のいかなる非円形であってもよい。

20

【0039】

一実施態様では、カニユーレは、複数のサンプル容器に対応する個々のカニユーレの配列
からなるカニユーレアッセンブリに含まれる。各個々のカニユーレは、カニユーレをガス分配配列に結合させる留め具により任意に接続される。

30

ガス、例えば酸素又は酸素/空気混合物は、例えばマニホールド又はその他の分配システムからカニユーレによりサンプル容器に配送され、こうして、所望ならば、容器機構内のサンプル容器の配列全体を酸素化する。例えばガス源は、図6、12、14に示すように、マニホールドを使用し又は使用することなく、ガス分配配列に任意に直接結合させる。

【0040】

このようにして、ガス源から送られたガスの正確な混合物は、各個々のカニユーレアッセンブリに均一に分配される。ガス分配配列としては、ガス源から酸素、酸素含有混合物、又はサンプルを醗酵できる他のガス又はガス混合物を、複数のサンプル容器中に配送する
ものであれば、いかなるものも任意に使用される。ガス分配配列の例を図1、3、12、14に示し、以下にこれらの例について更に詳細に説明する。

40

幾つかの実施態様では、ガス分配配列は、例えばマニホールドを使用したカニユーレの配列及びガス入口に1つ以上のプレートを取付けて構成され、酸素、酸素含有ガス混合物、又はサンプルを醗酵できる他のガス又はガス混合物をカニユーレにより複数のサンプル容器中に配送する

【0041】

通常、これらのプレートは、例えば気密液密シールを形成するため、一緒に整列してしっかりと固定される。通常、プレート間、又は1つのプレート内には、中空の空間又は内部空間が存在し、この空間を
通ってガスは、関連するカニユーレ配列に均一に分配される。い

50

かなる留め具も使用できる。例えばガイドピン、リベット、釘又は鋸、ナット/ボルトの組合せ、又は磁石が使用できる。好ましい実施態様では、ネジ又はナット/ボルトの組合せのような解放可能の留め具が使用されるが、幾つかの用途には接着剤のような永久型留め具が望ましいかも知れない。ガス分配配列には垂直の支持体が任意に取付けられ、これによりガス分配配列をサンプル容器の配列上に支持する。

【0042】

これらのプレートは、醗酵中、プレートの構造一体性を維持するいずれかの好適な材料で任意に構成される。例えばプレートは、金属、プラスチック、セラミック、又はいずれかの好適な複合物で任意に構成される。一例では、プレートは、テフロン（登録商標）塗被アルミニウムで構成され、これによりプレートは、前述のような容器機構及びサンプル容器と一緒にオートクレーブ殺菌処理を受けることができる。

10

【0043】

一実施態様では、ガス分配配列は、2つのプレートを有する。第一のプレート、例えば底プレートは通常、底面に複数のサンプル容器領域又は複数の凹みを有する。これらの凹みは、容器機構に保持されたサンプル容器の配列に対応し、これらのサンプル容器に蓋をするのに役立つ。図9～11は、凹み、例えば底部分646上のサンプル容器領域又は凹み625で囲まれた様相を示す。これらの凹み又は凹部は、例えば容器機構内のサンプル容器を固定するためにも使用される。図では凹みは円形で示したが、任意に、例えば各種のサンプル容器に対応するいずれかの形状である。

【0044】

サンプル容器領域の周囲には通常、ガス及び集結圧力をサンプル容器から逃がすため、1つ以上の通気口が任意に設けられる。図11は、通気空間の一実施態様を示す。しかし、その他の通気空間及び凹部の構成は、サンプル容器内の集結圧力が他のサンプル容器を汚染することなく逃げられるように、任意に構成される。

20

【0045】

サンプル容器の上面がガス分配配列の底面に隣接する場合、ガス、液体、エマルジョン、又はサンプル容器中に集結した過剰圧力は、ガス分配配列に作られた凹部及び/又は通気空間を通して逃げる。これら逃亡用エレメントの相互汚染は、ガス分配配列底面にある垂直端が、隣接するサンプル容器から各サンプル容器を分離するので、著しく減少する。更に、カニユーレからのガス流は、特定のサンプル容器外側の汚染物が通気口内に吸引されないように、サンプル容器内で正圧を維持する。

30

【0046】

幾つかの実施態様では、第一プレートは、ガスをサンプル容器に配送する複数のカニユーレを有する。これらのカニユーレは通常、このプレートの上面から該プレートを通して該プレートの底面の下に延びている。カニユーレの長さは、一般にサンプル容器の底部から約1～約0.1cm以内に届くのに十分な長さである。カニユーレは、例えばカニユーレを通してサンプル容器内に分配されるガスのため、プレートの上面まで開いている。これらのカニユーレは、例えば容器機構に保持されたサンプル容器の配列に配置可能に構成される。

【0047】

カニユーレの他、第一プレートは、サンプル容器の配列に対応する複数の開口部を任意に備える。例えばこれらの開口部は、第一プレートを貫通する開口を備え、ガス分配配列を容器機構に取付けた時、この開口から液体がサンプル容器内に添加される。

40

第一プレートは通常、例えばネジ又は接着剤で第二プレートに取付けられ、この第二プレートは通常、ガス流を第一プレートのカニユーレ中に供給するため、1つ以上のガス入口を備える。このガス入口は、第二プレートと第一プレートとの間に作られた内部空間の中まで開いている。この内部空間は、ガス流をカニユーレに供給する。

【0048】

更に第二プレートも、例えばサンプル容器への液体の通路を与えるため、複数の開口部を有する。第二プレートの開口部は通常、第二プレートと第一プレートとを結合した際、第

50

ープレート上の開口部と整列するか又は合致する。これらの開口部は、ガス分配配列に取付けた容器機構のサンプル容器中に液体を添加できる開口を有する。また開口部は、液体をサンプル容器中に吸引又は分配するのに使用できる吸引器又は分配器の配列用開口としても役立つ。他の実施態様では、これらの開口部からサンプルを吸引したり、或いは栄養剤、水等を添加するのに、ピペット又は注入器が使用される。ガス分配配列は、密封環境を望む場合、開口部を覆うための蓋も任意に有する。第一プレート及び第二プレートは共同で、ガス又は液体をサンプル容器の配列に配送するための醗酵器ヘッド又はマニホールドを有する。更に詳細な例を以下に示す。

【0049】

本発明の醗酵装置には、例えばカニューレへのガス流を制御する；カニューレ内で泡立つ空気対酸素比を変える；温度をモニターし、制御する；各種試薬の添加を支持する等のため、プロセスコントローラが任意に結合される。プロセスコントローラを用いた自動化プロセスを以下の例で更に詳細に説明する。 10

【0050】

本発明の醗酵器装置には、その他の装置も任意に結合される。例えば分配器 (dispenser)、吸引器、遠心機、その他の処理装置が、例えば醗酵を行なう同じ容器中でサンプルが処理できるように、任意に醗酵器に結合されるか、或いは容器機構と併用するため任意に構成される。例えば分配器が、液体を例えばガス分配配列中の複数の開口部から、容器機構に保持された複数のサンプル容器中に分配するため、任意に構成される。同様に吸引器が、本発明の容器機構及びガス分配マニホールドと調和 (coordinate) 20

【0051】

遠心機も醗酵サンプルの処理に任意に使用される。例えば遠心機は、遠心分離の前にサンプルの移送を防止する遠心管としてサンプル容器を受け取るため、任意に構成される。本発明で使用される遠心分離システムに関する更なる情報は、例えば2001年8月9日出願の Downs 等による "Automated Centrifuge and Method of using same" と題する US SN 09/780,589 参照。

【0052】

II. 多数サンプル醗酵器によるサンプルの醗酵法

前述の多数サンプル醗酵器は、例えば処理ステーションに輸送可能な例えば容器機構中で、複数のサンプルを同時に醗酵させるために使用される。本発明は、例えば1つ以上の処理工程と協力して、このような醗酵器を使用する方法も提供する。例えばこれらの方法は、容器機構中に通常、各サンプル容器が約50~約100ml、更に通常65mlのサンプルを含有する複数のサンプル容器を供給する工程を含む。これらのサンプルは、容器機構内のサンプル容器中で醗酵させる。 30

【0053】

ここで使用される醗酵は、一般に細胞を用いて、例えば水、空気、糖類、無機塩、窒素供給源等の原料、又は酵素基質を所望の生成物、例えば蛋白質に転化するいずれかの方法のことを云う。使用される細胞の種類としては、限定されるものではないが、動物細胞、イースト細胞、及び細菌細胞、例えば E. coli、Bacillus 等が挙げられる。これらの細胞は通常、増殖媒体中で増殖してから、生成物が得られる。醗酵工程は通常、例えば細胞の増殖を促進するため、サンプル容器に関連する複数のカニューレを介して各サンプル容器にガスを同時に配送する工程を含む。例えばこれらの方法は通常、醗酵させる複数のサンプルを含有する容器機構に前述のような醗酵器ヘッドを取付ける工程を含む。いったん醗酵すると、サンプルは、後処理ステーション、例えば遠心機に移送される。通常、後処理ステーションは、サンプルを醗酵させた同じ容器を受け入れるために構成される。更に幾つかの処理ステーションは、サンプル容器含有容器機構を受け取るために、例えば分配又は吸入ステーションに構成される。具体的な方法は、以下、図4、5で説明する。 40

【0054】

図4は、本発明に従って実施される醗酵方法300を説明する。ブロック310は、複数のサンプル容器15を供給する。多数の小容量の醗酵容器を供給することにより、大量醗酵法で使用される標準製造規模の容量よりも小容量の増殖媒体の方が収量及び栄養剤の必要量をいっそう予測できる点で、本方法は、大きな醗酵容器を使用する製造規模の醗酵方法よりも有利である。一回で醗酵できるサンプル容器の数は、本発明では制限されず、制限されるのは、いずれか一つの醗酵装置の構成の実施可能性だけか、或いは製造時、更なる処理工程で取り扱う可能性があるサンプル容器の数だけである。

【0055】

ブロック315は、複数のサンプル容器を配列、例えば8×12の長方形配列に並べる。しかし、この配列は、醗酵装置に実用的ないかなる形状でも任意に構成される。例えばサンプル容器は、長方形配列、八ニカム構造、或いは直線配列で任意に並べられる。

ブロック320は、複数のカニユーレをサンプル容器に対応する配列に並べる。本発明では、このカニユーレ配列中の各カニユーレは、ブロック315において並べたサンプル容器配列中の個々のサンプル容器に対応する。一実施態様では、複数のカニユーレは、ブロック315で並べたサンプル容器の数により制限される。

【0056】

ブロック325は、酸素及び/又は1つ以上の他のガスをサンプル容器中の醗酵媒体に配送するためのガス分配配列を作る。例えば一実施態様は、マニホールドの接続したガス分配器にカニユーレ配列を固定する。カニユーレ配列は、液密シールが得られるいかなる手段でも固定してよい。例えばカニユーレは、ユニオンコネクタによりガス分配器に任意に接続される。或いはカニユーレは、空気圧で分配器に接続するか、カニユーレ配列及びガス分配配列は、単一のユニットとして任意に成形される。他の実施態様では、分配器は、マニホールドを用いずに、ガス源に直接接続する。ガス分配配列の作製方法は、ガスが、対応するカニユーレを通して各個々のサンプル容器に選択的に又は集団で配送されるように、ガス源から酸素及び/又は1つ以上の他のガスをガス分配器に均一に配送するいかなる方法を用いても任意に達成される。

【0057】

ブロック330は、複数のサンプル容器を含有する容器機構を温度制御領域に輸送する。当業者に公知の他の温度制御法も本発明内で意図するものである。例えば容器機構は、加熱ゲル浴又は一定温度に維持するのに使用される温度制御室に任意に輸送される。

ブロック335は、ブロック330で作ったガス分配配列を、例えばネジを用いるか、単に頂部に置いて、図14に示すような溝アッセンブリーにより所定位置に保持することにより、容器機構の頂部に置く。このような構成により、サンプル容器の配列は、ブロック340において醗酵する。

【0058】

いったん醗酵が終わると、ブロック345は、容器機構からガス分配配列を取り除く。サンプル容器は、例えば各サンプル容器に設けた掴み面を巧みに操作することにより、容器機構からブロック350の後醗酵処理ステーションに直接、任意に移送される。この後醗酵処理ステーションは、サンプル容器から醗酵生成物を直接処理できるいずれかの処理工程を含む。例えばサンプル容器は、手動で又は機械的に容器機構から自動化遠心機に直接移送してよい。或いはサンプル容器は、吸引ステーション又は検出ステーションに移送してよい。他の実施態様では、サンプル容器は、容器機構から取り除かず、更なる処理、例えば容器機構中のサンプル容器の配列と調和させるために構成された分配器又は吸引器を用いて定量分配又は吸引のような更なる処理のためそのまま残す。

【0059】

ブロック350では、サンプル容器中の醗酵生成物は、後醗酵処理ステーションに直接移送され、ブロック355では醗酵生成物はサンプル容器自体の中で直接処理される。例えば一実施態様では、サンプル容器は、遠心機ステーションに直接移送され、ここで、サンプル容器が遠心分離管として働くと共に、醗酵生成物が従来公知の方法に従って遠心分離されるように、サンプル容器は遠心機内に直接配置される。吸引、試薬分配、又は検出の

10

20

30

40

50

ような更なる処理工程も醗酵方法で使用されるサンプル容器中で直接生じる。この方法では、醗酵容器は、全製造方法中、サンプルを保持するサンプル容器を供給し、これによりサンプル容器からサンプル容器にサンプル材料を移送する余分の無駄を除去すると共に、製造方法の各工程でのサンプル容器の他、醗酵装置の洗浄及び殺菌に要するコストを低下させる。その他の多数プロセス製造又は分析も本発明に従って実施できる。

【0060】

図5では、ブロックダイアグラム400は、本発明を1つの多数工程・多数プロセス製造に統合する方法を示す。ブロック410は、発酵前の処理ステーションを示す。一実施態様では、発酵液及び発酵栄養剤は、前処理ステーション410においてサンプル容器に添加される。多数工程製造又は分析に含まれる他の処理工程も本発明に従って意図するものである。例えば細菌移植は、前処理ステーション410においてサンプル容器内で起こる。前処理工程の例としては、限定されるものではないが、例えば溶剤の脱イオン化、材料の低温殺菌、例えば細胞栄養剤液の混合等が挙げられる。これらの工程は通常、水、細胞液、砂糖、窒素供給源等の発酵用原料を処理するのに使用される。輸送手段420、例えばロボット、技術者、又はコンベアベルト等は、処理ステーション410から発酵装置100のような発酵装置にサンプル容器を輸送するのに任意に使用される。本発明に従って示した他の実施態様の発酵装置も使用できる。例えば図14又は図1に示した発酵装置が任意に使用される。

10

【0061】

更に、輸送手段420が、サンプル容器を個々に、集団で、又は発酵装置用に構成された配列で移送できることは理解されよう。例えば一実施態様では、容器機構は、サンプル容器配列を発酵装置100に輸送する。同様に、発酵後、輸送手段430は、サンプル容器を発酵装置から後発酵処理ステーション410に輸送する。一実施態様では、輸送手段430は、サンプル容器の配列を保持した容器機構を、遠心機処理ステーション410に輸送する。後処理ステーション410は任意に、吸引工程、分配工程、又は検出工程のような、多数プロセス又は分析において起こる他のいずれかの処理工程である。後処理工程の例としては、限定されるものではないが、脱イオン化、クロマトグラフィー、蒸発、ろ過、遠心分離、結晶化、乾燥等が挙げられる。これらの工程は、一般に発酵で生成した材料の精製、検索、及び濃縮に向けたものである。このようにして、多数処理工程は、同一サンプル容器中に含まれる各サンプルについて行なわれ、その結果、発酵方法を高スループット又はその他の多数プロセスシステムに導入することが可能である。具体的な発酵条件は次のとおりである。

20

30

【0062】

本発明は、好ましくは可溶性蛋白質の高水準の製造が可能な発酵条件を用いる。これらの発酵条件は、高水準のイースト抽出物及びバクトトリプトン (*bactotryptone*) (豊富な媒体、ひどい液 (*terrific broth*) 又はTBと云う) の使用を含んでよい。第二に、この媒体は、1%グリセリン (追加の炭素供給源) で補強される。最後に、この媒体は、好ましくは通常50mM MOPSで緩衝処理される。或いは、アミノ酸、及びMOPSとは対照的な50mMホスフェートを含む限定的な (*defined*) 媒体が使用される。最初の2つの添加物は、栄養剤を外見上失うことなく、細胞を約10時間以下の間、増殖させる。高度に緩衝処理された媒体は、発酵中、日常的に起こる、細胞が高水準の酸 (低いpH) に曝されるのを防止する。

40

意外にも、ノーマル *Lutia Broth* 又はLB媒体で発現される5%未満のヒト蛋白質が通常、可溶性であることが見いだされた。しかし、上記媒体を使用すると、*E. coli* で発現される15~20%のヒト蛋白質は、今や可溶性で現れる。

【0063】

好ましい実施態様では、発酵媒体は次のようにして調製される。TB媒体を7Lバッチで調製する。発酵ランに使用する日までTB媒体に抗体を加えない。7Lバッチを調製するため、以下の工程を行なう。(1) 清浄な10Lパイレックス瓶に~4L DI H₂O 又は18メガオーム水を満たし、大きい攪拌棒を入れる。(2) イースト抽出物168g

50

を加える。(3) Tryptone 84gを加える。(4) グリセリン70mlを加える。(5) 完全に溶解するまで攪拌プレート上で攪拌する。(6) 例えば18メガオーム水で6.3LにQS。(7) 最長の液体サイクルでオートクレーブ殺菌する。例えばカーボン源のカラメル化又は燃焼を防止するため及び/又は急速冷却のため、できるだけ速くオートクレーブからTB媒体を取り出す。(8) TB媒体を室温で保存する。次いで(9) プロセスを記録する。TB媒体は全発酵器ランについて同じである。しかし、発酵器媒体は全てのランで同じである必要はない。例えば媒体の1つの相違は、発酵直前に加える抗体である。同じ日の発酵ランでは、TB媒体に以下のものを加えてよい。(1) 350mlの1M MOPS pH7.6、(2) 消泡剤7ml、(3) 20mg/ml クロラムフェニコール 7ml、(4) 100mg/ml アンピシリン 7ml、(5) 7L以下の容量まで充分18メガオーム水を添加、(6) ラベルにTB媒体に加えたものを全て記入、(7) きっちり蓋をし、瓶をよく振る、(8) プロセスを記録する。上記媒体は、本発明の発酵器及び方法で任意に使用する当業者に公知の多数の可能な選択の1つにすぎない。発酵終了後、サンプル容器は、例えば容器機構中の前述のような後処理ユニットに手動で又は機械的に移送する。例えばロボットが容器機構からサンプル容器を取り出して、例えば遠心機中に置く。

10

【0064】

III. 発酵システム例

発酵器例 # 1

本発明による発酵装置の例を図1に示す。発酵装置10は、一般にサンプルホルダー配列255、カニューレアッセンブリ80及びガス分配配列270を備える。図示の発酵装置10は、前述のような直接、前-及び後-発酵処理と適合し得るサンプル容器中の多数バッチサンプルを別々に同時に発酵させるために構成されている。

20

【0065】

サンプルホルダー配列255は、掴み面17、通常、配列110のようなサンプル容器の配列を形成する個々のサンプル容器15、輸送可能な容器機構250、及び配列110に対応する配置ウエルの配列260で構成される。掴み面17は、集団でサンプル容器配列110を形成する各個々のサンプル容器15上に任意に設けられる。掴み面17は、各サンプル容器の底部にあるのが好ましいが、サンプル容器15を、容器機構250又は他の処理ステーションに或いは容器機構250又は他の処理ステーションから移送できるならば、サンプル容器のいずれの面にも掴み面17は任意に設けられる。

30

【0066】

各個々のサンプルウエル15の底部は、配置ウエル、例えば配置ウエル257内に置かれる。配置ウエルの配列260は、好ましくは配列110の構成を反映し、輸送可能な容器機構250中に埋め込まれる。

輸送可能な容器機構250を用いることにより、サンプル容器の全体の配列110は、多数プロセス製造において、1つの発酵処理ステーションに任意に輸送されたり、この発酵ステーションから他の処理ステーションに任意に輸送される。図示の本例では、輸送可能な容器機構250は、サンプル容器の配列110を、水浴のような温度制御された領域210に輸送する。この実施態様では、温度制御領域210は、水浴容器215中の水浴240で構成され、容器215は、水浴240中に浸漬された水浴温度コントローラ220及び温度コイル230により制御される。

40

【0067】

図1~3にガス分配配列の例を示す。ガス分配配列270は、マニホールド75にガス供給源85を接続して構成される。導管70は、マニホールド75をコネクター65に接続する。コネクター65は、マニホールド75をガス分配器55に接続する。図1、3の実施態様では、カニューレアッセンブリ80は、カニューレ配列120で構成され、この配列120は、サンプル容器配列110に対応する個々のカニューレ22で構成される。各個々のカニューレ22は、カニューレ22をガス分配配列270に結合させる留め具35により任意に接続される。カニューレ22は、好ましくは通気及び混合を促進するため

50

、各個々のサンプル容器 1 5 のはぼ底部まで延びている。

【 0 0 6 8 】

他の実施態様では、各個々のカニューレは、ガス分配配列 2 7 0 に気密液密状に直接取付けられる。留め具の必要性をなくす場合、この実施態様は、カニューレ 2 2 を直接ガス分配配列 2 2 に一体的に統合し、これにより細菌汚染の可能性のある表面、溝、及び / 又は凹みの数を減らして、発酵損傷の機会を低減させる。同様に、ガス分配配列 2 7 0 に統合すると、カニューレ 2 2 は、ガス分配配列 2 7 0 と一緒に任意にオートクレーブ殺菌され、これにより各カニューレ 2 2 を清浄化及び滅菌する前に、別々にほども必要がなくなる。この利便性により、各バッチの均一性に加えて、時間も経費も節約される。例えば各カニューレ 2 2 は、各発酵ランの前に、個々に固定したり、或いは清浄化及び滅菌する前に個々にほども必要がないので、人による過失の可能性は最小限になる。また、いずれか 1 つのカニューレ 2 2 中に不均一性があっても、個々のカニューレ 2 2 が各ランにおいて、常に同じサンプル容器と関連しているため、直ぐに明らかになる。図 1 4 に、統合したカニューレを示す。

10

【 0 0 6 9 】

図 3 において、ガス、例えば酸素は、マニホール 7 5 から分配器 5 5 の中空空間 6 0 を通って分配器 5 5 の全ての部分に配送され、こうして所望ならば、サンプル容器 1 1 0 の全配列を酸素化する。酸素及び / 又は 1 つ以上の他のガスは、カニューレアッセンブリ 8 0 手段により分配器 5 5 に接続した個々のカニューレ 2 2 を通って分配器 5 5 から配送される。

20

【 0 0 7 0 】

一実施態様では、カニューレアッセンブリ 8 0 は、分配器 5 5 の内面上のコネクター 4 5 と、分配器 5 5 の外面上のコネクター 4 0 とで構成される。留め具 3 5 は、個々のカニューレ 2 2 を分配器 5 5 上のコネクター 4 0 に取付ける。矢印 2 5 は、酸素及び / 又は 1 つ以上の他のガスの流れを示し、酸素等のガスは、カニューレ 2 2 から発酵媒体 2 0 中に流れて気泡 3 0 を生成する。例えばガス源 8 5 は、図 6、1 2 に示すように、マニホールを使用することなく、直接、分配プレート 6 4 5 に任意に結合させる。同様に、カニューレアッセンブリ 8 0 は、他の方法で作製できる。例えば図 1 2 に示すように、カニューレ 2 2 は、分配プレート 6 4 5 に直接取付ける。

【 0 0 7 1 】

この方法では、ガス源 8 5 から配送された正確なガス混合物は、各個々のカニューレアッセンブリ 8 0 に均一に分配される。酸素、酸素含有化合物、又はサンプルを発酵できる他のガス又はガス混合物をガス源 8 5 からサンプル容器 1 5 中に均一に配送するいかなるガス分配配列も任意に使用される。

30

【 0 0 7 2 】

図 6、1 2 は、ガス分配配列の他の実施態様を示す。ガス分配配列 2 7 0 は、マニホール、マニホール導管、又はマニホールコネクターなしで構成されたカニューレ配列 1 2 0 に分配プレート 6 4 5 を直接取付けて構成される。この実施態様では、分配プレート 6 4 5 は、底部分 6 4 6 及び頂部分 6 4 7 (図示せず) で構成される。入口 6 3 0 は、酸素、酸素含有ガス混合物、又はサンプルを発酵できる他のガス又はガス混合物をガス源 8 5 (図示せず) から分配プレート 6 4 5 に配送する。

40

【 0 0 7 3 】

底部分 6 4 6 及び頂部分 6 4 7 は整列し、例えば気密液密シールを形成するため、開口部 6 4 0 を介して互いにしっかりと固定される。両部分 6 4 6 及び 6 4 7 間には中空空間が存在し、この空間を通してガスは、カニューレ配列 1 2 0 に均一に分配される。複数の開口部 6 3 5 は、分配プレート 6 4 5 に垂直支持体を固定するのに使用され、分配プレート 6 4 5 は、サンプル容器配列 1 1 0 に隣接して止める (r e s t) 。いかなる好適な留め具も使用してよい。図示の例では、上部分 6 4 7 と底部分 6 4 6 とは、ネジで結合されて、分配プレート 6 4 5 を形成している。ネジは、アルミニウム脚を分配プレート 6 4 5 に垂直支持体として固定する。

50

【0074】

図9～11は、ガス分配配列の別の実施態様を示す。この実施態様ではカニューレ22は、底部分646に直接取付ける。開口部620は、栄養剤及びその他の溶液をサンプル容器15中に分配するための分配管760（図示せず）を保持する。開口部620は、例えばピペット又は注入器を用いてサンプルを吸い取ったり、或いは栄養剤、水等をサンプル容器に加えるため、発酵プロセス中、サンプル用通路に任意に使用される。固定用溝650により分配管760は、分配プレート645に固定できる。凹み655及び垂直端665で円形凹部を作り、サンプル容器領域625内のサンプル容器15の不動化を助ける。この実施態様では、凹み655は円形で、サンプル容器15の形状に対応しているが、他の好適な形状も使用できる。

10

【0075】

サンプル容器領域625の周囲上には、通気口610が配置され、ガス及び集結圧力をサンプル容器15に逃がす。図11において、通気口610は、通気用空間675を形成する。垂直端670は、垂直端665よりも大きいので、通気用空間675は、凹部655よりも深い凹部を占める。垂直端670と665との高さの差は、垂直端680の高さに等しく、通気用空間675の深さを決定する。通気用空間675及び凹部655（したがって垂直端665、670、680も）の他の構成は、サンプル容器15内の集結圧力が他のサンプル容器を汚染することなく、通気用空間675を通して逃げられるように作ってよい。

【0076】

サンプル容器15の上面が面660に接すると、ガス、液体、エマルジョン、又はサンプル容器15内に集結した過剰の圧力は、凹部655及び通気用空間675を通して逃げる事ができる。これらの脱出用エレメントの相互汚染は、垂直端670によりサンプル容器15と隣接するサンプル容器15とが分離されるので、著しく減少する。更にカニューレ22からのガス流は、サンプル容器15の外側の汚染物が通気用空間675を通して凹部625、655又は675によりサンプル容器15中に引き込まれないように、サンプル容器15内を正圧に維持する。その他の通気口610は、過剰のガス、液体、エマルジョン又は下方の圧力が、他のサンプル容器15を相互汚染することなく、通気口610を通して逃げられるように構成してよい。

20

【0077】

図2に示すガス分配配列270の他の実施態様では、サンプル容器配列110は、ガス分配配列270が例えば分配プレート645を利用するのは対照的に各個々のサンプル容器15を酸素化するように構成される。こうして、サンプル容器の配列110は、カニューレアッセンブリ80をいずれかの個々のサンプル容器15に調節することにより、集団で又は個々に任意に酸素化される（又は他の適当なガスを供給する）。例えば一利用例では、A部はB部よりも2倍長く酸素化できる（又は他の適当なガスを供給できる）。

30

【0078】

図示の例では、カニューレ配列120は、個々のサンプル容器15で構成されたサンプル容器配列110に対応する。各個々のサンプル容器15は、分配器55に接続した個々のカニューレアッセンブリ80にも対応する。酸素及び/又は1つ以上の他のガスは、マニホールドコネクタ65を通して分配器55に配送される。酸素及び/又は1つ以上の他のガスは、各カニューレアッセンブリ80を通るか、或いは選択的に特定のアッセンブリ80に配送してよい。例えばA部及びB部のカニューレアッセンブリ80が利用できるが、C部及びD部にはガスを流さない。

40

【0079】

図3、12において、掴み面17は、例えば発酵が終了と、発酵装置又は他の処理ステーションに、或いは発酵装置又は他の処理ステーションからサンプル容器15を自動化又は手動により移送させる。一実施態様では、掴み面17は、磁石が掴み面17を引き付けて、サンプル容器を他の処理ステーションに移送させるように、磁石である。他の実施態様では、掴み機構は、サンプル容器の外側を握って移送を行なう。更に他の実施態様では、

50

掴み面 17 は、サンプル容器の上部の所でリップである。発酵処理ステーションに又は発酵処理ステーションからサンプル容器を輸送するため掴むことができるその他の面は、本発明の範囲内である。例えば掴み面 17 は、サンプル容器 15 の内側、外側、上部又は底部上に任意に存在する。他の実施態様では、サンプルは、グリッパ構造の助けで所定位置に保持、輸送される。

【0080】

図 12 は、ガス分配配列の一実施態様を示す。ガス分配配列 270 及びカニユーレ 22 は、サンプル容器にガスを供給するのに共に使用される。本例では酸素、酸素と他のガスとの混合物、又は他のガス又はガス混合物は、入口 630 を通って分配プレート 645 内に導入される。ネジのような留め具は、開口部 640 を介して上部分 647 を底部分 646 に接続、整列させる。分配管 760 及びカニユーレ 22 は、分配プレート 645 に直接取り付けられ、部分 646、647 をほどき、分配管 760 又はカニユーレ 22 のいずれか一方又は両方を取り替え、次いで再び部分 646、647 を固定することにより、取り替えることができる。分配管 760、カニユーレ 22、入口 630、及び部分 646、647 については、これらのエレメントが一ユニットとしてオートクレーブ殺菌されるように、共に固定したままにしておくことが好ましい。これにより各エレメントを別々に殺菌するため、各発酵後、配列 270 を解体する時間及びコストをかけることなく、重要な殺菌が行なえる。

10

【0081】

図示の例では、個々のサンプル容器 15 の上面は、サンプル容器領域 625 内の面 660 に直接接している。サンプル容器 15 の上面は、凹部 655 内に配置される。面 660 は、好ましくはサンプル容器 15 の上面の全周とは接触していない。また通気口 610 は、面 660 とサンプル容器 15 の垂直端との間に隙間 672 が存在するように、面 660 に隣接して配置することが好ましく、これによりサンプル容器 15 から通気用空間 675 を通って逃げる過剰のガス、エマルジョン、又は圧力用の通路を作る。カニユーレ 22 を通るガス流は、汚染物が通気用空間 675 を通ってサンプル容器 15 内に引き込まれないように十分な圧力を供給する。

20

【0082】

発酵器例 # 2

図 13 ~ 21 は本発明発酵装置の他の実施態様を示す。一般にこの装置は、位置ウエルを有する容器機構、及びカニユーレ配列を有するガス分配配列を備える。各部品を以下に図面を参照して更に詳細に説明する。

30

図 13 に示すような容器機構 1300 は、底部分 1310 及び頂部分 1320 を側部分 1325、1330 で結合して構成される。この容器は、例えば側部分 1325、1330 に結合した取っ手 1335、1340 を握ることにより容易に輸送可能である。各側 1325 及び 1330 は、例えばピン 1480 を用いて、図 16 に示すようなガス分配配列を固定するためのピンを受けることができる 2 つの溝を有する。頂部分 1320 及び底部分 1310 は、共同で配置ウエルの配列 1350 を形成する。容器機構の底部分 1310 は、サンプル容器が配置される配置ウエルの底部として役立つ複数の凹みを有する。例えば容器機構 1300 は、8 × 12 配列の配置ウエルを有する。頂部分 1320 は、合わせ用の孔 1360 配列を有し、これらの孔は、複数のサンプル容器を容器機構中に受け入れて、これらを容器機構内の所定位置に保持する。容器機構 1300 の孔 1360 及び凹み 1355 は、共同で複数のサンプル容器、例えば管を保持するための棚を形成する。孔 1360 は、円形で示したが、この形状は、いかなる所望のサンプル容器も受け入れるために任意に構成される。

40

【0083】

図 14 は、容器機構 1300 に結合したガス分配配列を示す。ガス分配配列は、ガス分配配列を容器機構上の所定位置に保持するため、溝 1345 内を滑動する 4 つのピン 1480 を有する。図 14 に示すように、ガス分配配列は通常、例えばネジ又はピンを用いて共に固定された第一プレート 1465 及び第二プレート 1470 を有する。任意の蓋 146

50

0も示す。更に、ガス分配配列は、ガス分配配列を簡単に配置し、取り外すため、第二プレート1470に取っ手1410、1420を取付けて構成される。

【0084】

入口1430、1440は、ガス分配配列へのガス入口を与える。これらのガス入口は通常、ガス源からガスを受け入れて、これを例えば複数のカニューレに配送する。これ複数のカニューレは通常、ガス分配配列に例えば第一プレートの一部として取付けられる。例えば図示の実施態様では、カニューレ1450は、第一プレート1465の一部であり、第一プレートの上部から第一プレートを貫通して下方まで延びているので、カニューレは、配置ウエル、例えばウエル1350の内部、又は配置ウエル1350内に配置されたサンプル容器の内部に配置可能である。

10

【0085】

第一プレート1465は通常、カニューレ配列及び複数の開口部を有する。第一プレートの開口部は、配置ウエル内のサンプル容器への道(access)を与えるため、第二プレート上の1セットの開口部と整列している。カニューレ配列は、第一プレートの一部として任意に成形するか、別途に成形した後、第一プレートに取付ける。例えば開口部中に受容してから、O-リングを用いて固定されるカニューレ配列を受けるため、例えば第一プレートには、別のセットの開口部が任意に存在する。

【0086】

図18は、第一プレート1465の底面を示す。例えば第一プレートの底面上には、サンプル容器を覆って上記例1で説明したような通気空間を付与するため、サンプル容器領域1810又は凹みの配列が使用される。各サンプル容器領域は、関連する配置ウエル、ガスを配置ウエル内に置かれた各サンプル容器中にガスを配送するため各配置ウエルに関連するカニューレ、及び発酵中、集結した圧力を解放するための通気口と一緒に配置されたサンプル容器への道を与える開口部を有する。更に図18は、例えば第一プレートに第二プレートを例えば1セットのネジで取付けるのに使用される開口部1830、1840を示す。図19は、開口部1920、通気口1930、及びカニューレ1940を示す図18の一部の詳細図である。更に図19は、第一プレートと第二プレート間をシールするのに役立つガスケット又はO-リング1950を示す。

20

【0087】

第二プレート1470は通常、プレート1465の1セットの開口部と対応する前述のような1セットの開口部を有する。2つのプレートのこれら開口部は、結合して、配置ウエル1350への道用両プレートを貫通して延びる通路を形成する。開口部は、シールシステムを望む場合は、図14に示すように、内部空間から閉じ、蓋を用いて覆うことができる。更に第二プレート1470は通常、ガス入口1430を有し、ここからガスは内部空間に流れる。図21は、図14に示すようなガス分配配列の側面図である。例えば図21は、第一プレートの下から配置ウエル中に延びるカニューレ1450と第一プレート及び第二プレートを貫通して延びる開口部1920とを示す。

30

【0088】

図20は、第一プレート及び第二プレートとを有する図14のガス分配配列の断面図を示す。上プレート1470は、例えば開口部1830及び1840を貫通するネジを用いて、底プレート1465に取付ける。底部上にある第一プレートは、開口部2010及びカニューレ2020を有する。これらの開口部は、第一プレート1465中の開孔で、上プレートである第二プレート1470中の同様な開口部と整列している。カニューレは、例えば上プレートと底プレート間にシールを形成するため、O-リングで固定した他の1セットの開口部を通して第一プレート内に挿入される。これらのカニューレは、配置ウエル中に保持されたサンプル容器の配列中に容易に配置されるように、プレート1475から配置ウエル1350の中まで延びている。カニューレ2020は、プレート1470の中まで延びていないが、これと接している。カニューレ2020とプレート1470とが接する所に隣接して、通気用空間2030があり、この空間によって、カニューレは上プレートの内部空間2040に連結している。内部空間2040には、ガスが入口、例えば入口

40

50

1430から流入する。

【0089】

図15は、液体添加マニホールドアッセンブリーに連結した容器機構を示す。容器機構1300は、ピン1480を用いて上部に配置した第一プレート1465と一緒に示した。第一プレート上には第二プレート1470が配置され、またこのガス分配システムの第二プレート上には液体添加マニホールド1510を示した。液体添加マニホールドは、例えば第一及び第二プレート中の対応するセットの開口部を通して液体をサンプル容器中に加えるのに使用される。図16は、液体添加マニホールド1510を更に詳細に、例えばガス分配配列の第一及び第二プレート上の開口部と整列した開口部1620を示す。開口部1620は、液体試薬を装置のサンプル容器中に配送するのに使用される。マニホールド1510は、例えばピンを用いて、ガス分配システム上に置く。更に、A-A線に沿った液体添加マニホールドの断面図である図17は、サンプル容器に液体を分配するためのピペット又は添加用 (a d d i t i o n a l) カニューレの使用方法を示す。

10

【0090】

システム例3：自動化システム

図7は、自動化発酵装置の一例を示す。プロセスコントローラ705は、装置700の各種構成成分をモニターし、制御するもので、好ましくはオペレーターインターフェース付きのプログラム可能なコンピュータである。或いはプロセスコントローラ705は、機構のタイミング、溶液添加、温度調節、ガス流速及びガス混合物の調節、測定の検出、及び/又はオペレーターの介入を促進する警報又は注意報の送達のような装置の多数の構成成分を調整する (c o o r d i n a t e) いずれかの好適なプロセッサである。電子結合710、775、795は、発酵装置700の各種構成成分をプロセスコントローラ705に接続する。例えば電子結合710により、コントローラ705は供給原料溶液720、735、745から溶液流を開始、停止、及びモニターできる。同様に、電子結合775により、コントローラ705は、サンプル容器15中へのサンプルの分配を開始、停止、モニターできる。電子結合795によっても、コントローラ705がセンサー790から情報を送ったり、受け取ったり、また温度制御された領域をモニターしたり調節することができる。その他の電子結合も本発明では任意に使用される。

20

【0091】

発酵装置700の一実施態様では、供給原料溶液720、735、745は、個々の原料管725から分配管715中に（単独に、組合せて、連続的に、又は集団で）ポンプ送りされる。適切なソレノイドを選択すると、どの原料溶液を分配管725にポンプ送りするかが決まる。例えばソレノイド730は、原料溶液720から原料管725への流れを制御する。他の利用では、原料溶液720と735との混合物は同時に分配管715にポンプ送りされる。別の利用では、原料溶液720は、まず分配管715に供給した後、所定時間、温置し（コントローラ705で指示）、次いで原料溶液735を分配管715にポンプ送りする。供給原料の各種組合せを任意に使用して、一層多いか少ない原料溶液を何らかの所望の利用に従って装置700と併用してよい。

30

【0092】

任意にぜん動ポンプであるポンプ710を用いて、分配管715は、原料溶液を個々の分配管760に移送する。各個々の分配管760は、個々のサンプル容器15に対応し、また管760は、例えばソレノイド765がいったん開くと、原料溶液720が分配管760から対応するサンプル容器15中に容量的に移送されるように配置される。各ソレノイド765は、個々のサンプル容器15に対応する。原料溶液の容量分配は、好ましくは分配する量、速度及び時間を制御するプロセスコントローラ705で制御される。分配管760は、プラスチック、金属、又は分配される原料溶液に対し反応しないいずれかの材料で任意に構成される。

40

【0093】

一実施態様では、配送ソレノイド765は、原料溶液720、735及び745のような多数原料溶液を個々のサンプル容器15中に配送するため、ポンプ710及びコントロー

50

ラ705と共同で働く。各ソレノイド765は、サンプル容器15に対応し、またこれらのソレノイド765は、共に多岐化され(manifolded together)、単独のぜん動ポンプ710の出力により供給される。各ソレノイド765は、好ましくは原料溶液720の容量を分配するため、連続的に開く。しかし、平行的に添加することも本発明内であると考える。

【0094】

一実施態様では、原料溶液720を個々の分配管760に配送するため、ポンプ710及びソレノイド765を用い、原料溶液720は、分配管715経由で栄養剤を発酵媒体20に導入する。原料溶液720を添加後、ソレノイド730は閉じ、濯ぎ溶液745に対応するソレノイド740は開く。ポンプ710は、分配管715経由で濯ぎ溶液745を配送し、これにより分配管715を溶液745で濯ぎ、次いで廃棄物容器785中に流入させる。ソレノイド780は、分配管715から廃棄物容器785への流れを制御する。原料溶液735は、次に分配管715内をポンプ送りされ、管760に分配される。分配管715は、他に添加する前に、濯ぎ溶液745で再び濯ぐ。ソレノイド765は、下流での無駄な容量を最小にするため、好ましくは分配管760の極めて近くに配置する。このようにして、分配管715は、既知量の原料溶液720、735を、分配管715を経由する次の又は別の原料溶液の添加の際、相互汚染又は汚染することなく、正確に配送する。したがって、各添加は容量的に正確で、前の添加の原料溶液が次の添加を希釈するのは、最小の既知量である。このようにして、添加用の栄養剤、痕跡量のミネラル、ビタミン、糖類、炭水化物、窒素含有化合物、蒸発性液体、pHバランス用化合物、緩衝液、及びその他の液体を自動化でしかも高精度の方法で発酵媒体20に添加できる。

10

20

【0095】

プロセスコントローラ705により調整されて、各種構成成分は、所定の時間間隔で、又はサンプル容器15内の特定の物性の測定に応じて、活性化できる。例えば一実施態様ではオペレーターは、特定の温度で所定時間、サンプル容器15を温置し、所望量の原料溶液720を添加し、更に、異なる温度で別の所定時間、温置することをプロセスコントローラ705にプログラムする。発酵条件のいかなる組合せもプロセスコントローラ705中にプログラムしてよい。このコントローラは、コンピュータ、コンピュータネットワーク、又はその他のデータ入力モジュール等を任意に備える。

【0096】

好ましい実施態様では、プロセスコントローラ705は、温度制御、原料溶液の添加、ガス速度及びガス混合物の調節、温置時間、及びセンサー790から受けたデータにตอบสนองして濯ぎを調整する。センサー790は、色調変化を吸光分光分析的に検出し、蒸発速度をモニターし、光学密度の変化を測定し、光変化を測光的に検出し、pH変化を検出し、酸化還元電位を電解的に測定し、温度の変動をモニターし、或いはその他の物理的变化を検出して、このデータをプロセスコントローラ705に送ることができる。これに従って応答の際、プロセスコントローラ705は、装置700の各種構成成分を調節する。例えば酸化還元電位を測定することにより、センサー790は、発酵サンプルが過剰に酸素化されているか、或いは他のガスが過剰に供給されている場合を検出し、プロセスコントローラ705は、これに従ってガス流又はガス混合物比を調節する。別の例として、プロセス

30

40

【0097】

各発酵媒体20、カニューレ22及び原料溶液の分配が均一なので、極めて少ない、例えば1つのセンサー790が、サンプル容器の配列110をモニターするのに必要な全てである。或いはサンプル容器15が各種の発酵媒体20を含むか、又は異なる発酵条件を受けける場合は、多くのセンサー790が任意に使用される。

【0098】

50

上記自動化方法は、当業者に公知のいずれの発酵装置又は方法とも共同で任意に使用される。特にここで提示した発酵器を用いて発酵を実施すると、有益である。しかし、ここに提示した例は、説明の目的に提供したのであって、制限のないことが注目される。以上の発明は、明確性及び理解の目的で若干詳細に説明したが、この開示内容を読めば当業者ならば、形態及び詳細の各種変化も本発明の範囲を逸脱しない限り、可能であることは明らかであろう。例えば上記技術及び装置の全ては、種々組合せて使用でき、また本発明のその他の用途も考えられる。またこの説明で検討した特定の実施態様についての均等物も同様に本発明で使用できることが注目される。

【0099】

本出願で引用した刊行物、特許、特許出願又はその他の文書は、各個々の刊行物、特許、特許出願又はその他の文書が、個別にあらゆる目的のため援用することを指摘したのと同様な程度まで、あらゆる目的のためここにその全体を援用した。

【図面の簡単な説明】

【0100】

【図1】本発明による発酵装置の概略斜視図である。

【図2】本発明による発酵装置の概略上面図である。

【図3】本発明による各発酵サンプル容器の概略斜視図である。

【図4】本発明による発酵方法のブロックダイアグラムである。

【図5】本発明による多数処理手法における発酵システムの使用法を示すブロックダイアグラムである。

【図6】本発明によるガス配列の概略底面図である。

【図7】本発明による自動化発酵アッセンブリーである。

【図8】本発明によるカニューレの断面図である。

【図9】図6における分配プレートのサンプル容器領域の底面図である。

【図10】図9のE-E線におけるサンプル容器領域の断面図である。

【図11】図9のF-F線に沿ったサンプル容器領域の断面図である。

【図12】本発明による分配プレートを使用した発酵サンプル容器の概略斜視図である。

【図13】複数のサンプル容器を整列配置状態に維持するための容器機構を示す概略図である。

【図14】ガス分配配列に結合した図13の容器機構の概略図である。

【図15】液体添加用に構成された他のガス分配配列と結合した図13の容器機構の概略図である。

【図16】図15の液体添能力を有するガス分配マニホールドの概略図である。

【図17】図16のA-A線に沿った断面の概略図である。

【図18】図14に示すガス分配配列の底面の概略図である。

【図19】図18の一部の詳細図である。

【図20】図19のB-B線に沿った、上プレート及び底プレートを有するガス分配配列の断面の概略図である。

【図21】図14に示すガス分配配列の側面の概略図である。

【符号の説明】

【0101】

- 10 発酵器
- 15 サンプル容器
- 17 掴み面
- 20 発酵媒体
- 22 カニューレ
- 25 ガス流
- 30 気泡
- 55 分配器
- 60 中空空間

10

20

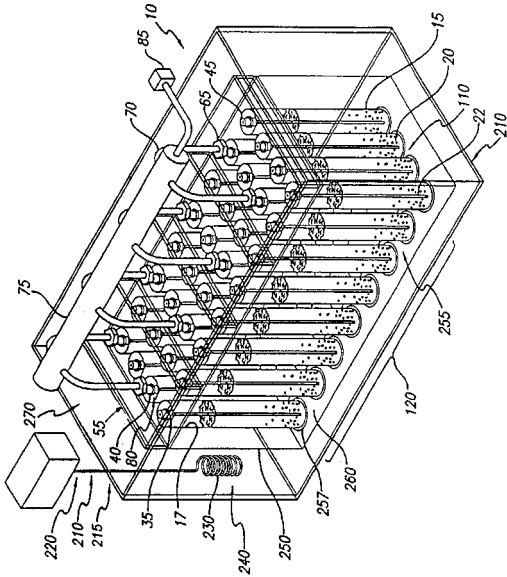
30

40

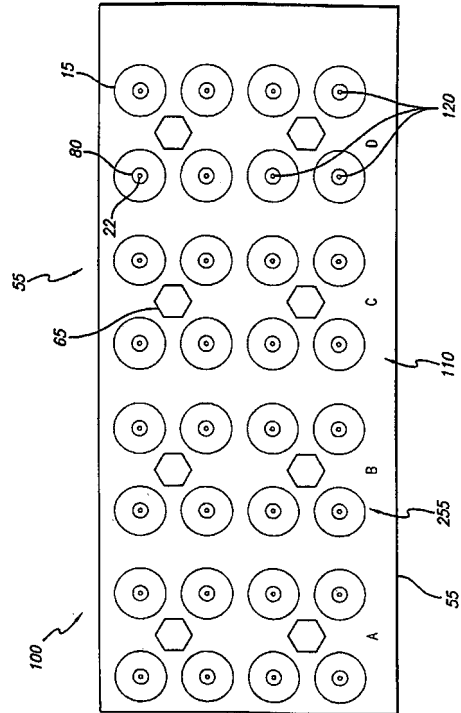
50

7 5	マニホールド	
8 0	カニューレアッセンブリー	
8 5	ガス源	
1 1 0	サンプル容器の配列	
1 2 0	カニューレの配列	
2 1 0	温度制御領域	
2 5 0	容器機構	
2 7 0	ガス分配配列	
3 0 0	発酵方法	
6 1 0	通気口	10
6 2 0	開口部	
6 2 5	サンプル容器領域又は凹み	
6 4 0	孔	
6 4 5	分配プレート	
6 4 6	底部分	
6 4 7	頂部分又は上部分	
6 5 5	凹み又は凹部	
7 0 5	プロセスコントローラ	
7 0 5、7 1 0、7 7 5	電子結合	
7 1 0	分配器	20
7 1 5、7 6 0	分配管	
7 2 0、7 3 5、7 4 5	供給原料溶液	
7 3 0、7 6 5、7 8 0	ソレノイド	
7 8 5	廃棄物容器	
7 9 0	センサー	
1 3 0 0	容器機構	
1 3 1 0	底部分	
1 3 2 0	頂部分又は上部分	
1 3 4 5	溝	
1 3 5 0	配置ウエル	30
1 3 5 5	凹み	
1 3 6 0	孔	
1 4 3 0、1 4 4 0	ガス入口	
1 4 6 0	蓋	
1 4 6 5	第一プレート	
1 4 7 0	第二プレート	
1 4 8 0	ピン	
1 4 5 0	カニューレ	
1 5 1 0	液体添加マニホールド	
1 6 2 0	開口部	40
1 8 1 0	サンプル容器領域	
1 8 3 0、1 8 4 0	開口部	
1 9 2 0	開口部	
1 9 3 0	通気口	
1 9 4 0	カニューレ	
1 9 5 0	O - リング	
2 0 1 0	開口部	
2 0 2 0	カニューレ	
2 0 3 0	通気用空間	
2 0 4 0	上プレートの内部空間	50

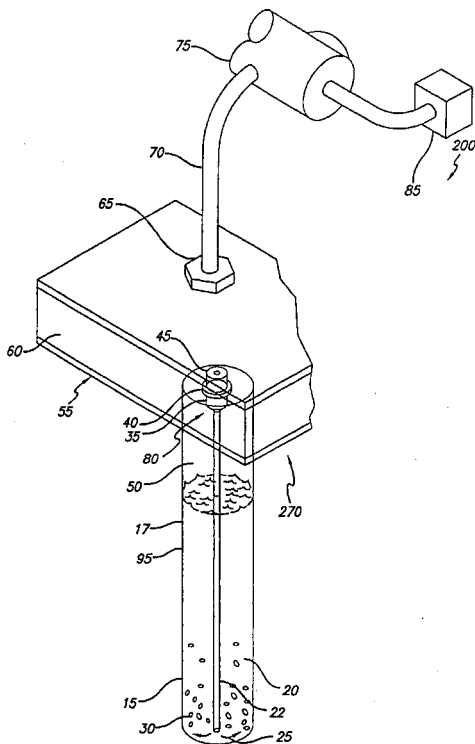
【 図 1 】



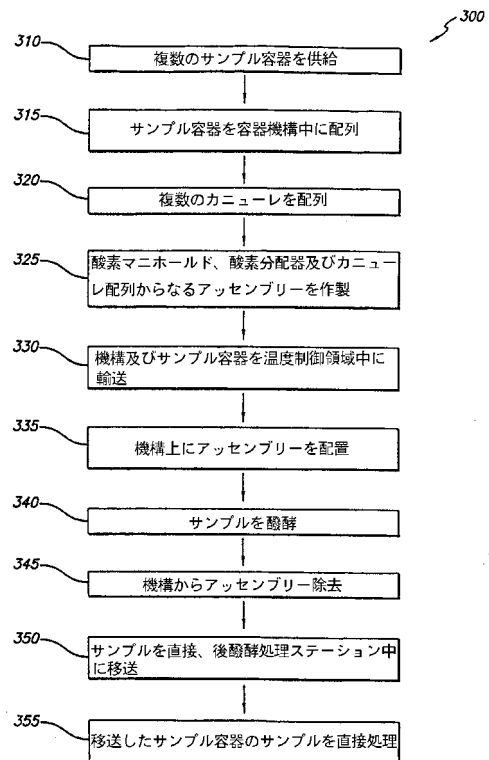
【 図 2 】



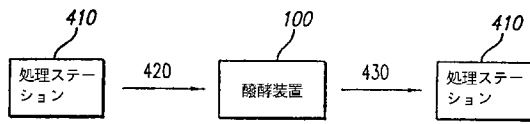
【 図 3 】



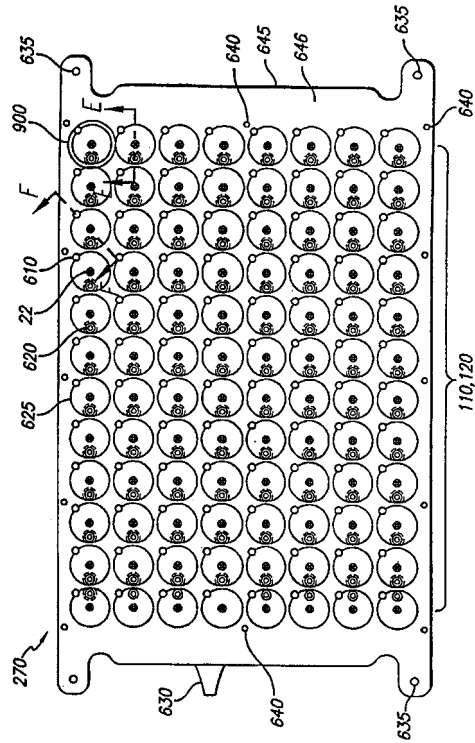
【 図 4 】



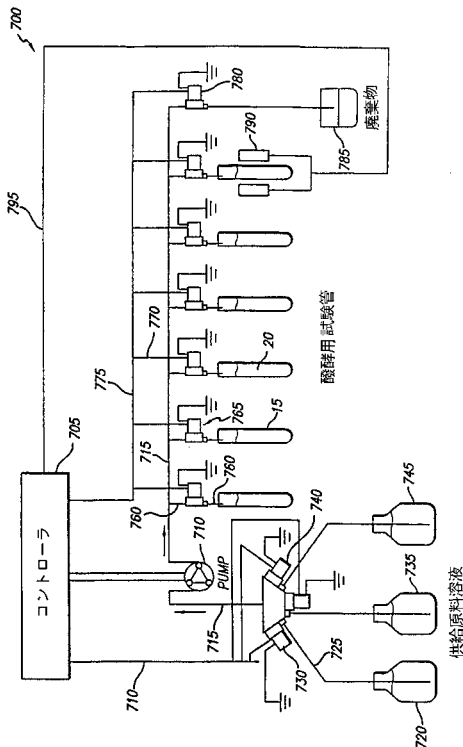
【 図 5 】



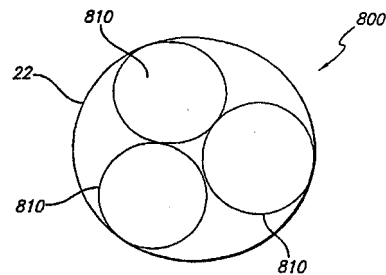
【 図 6 】



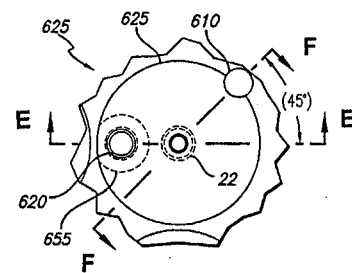
【 図 7 】



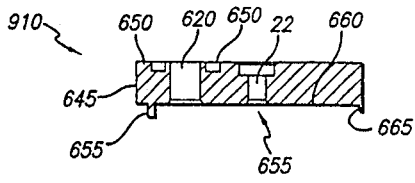
【 図 8 】



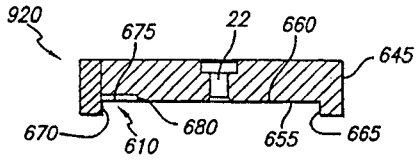
【 図 9 】



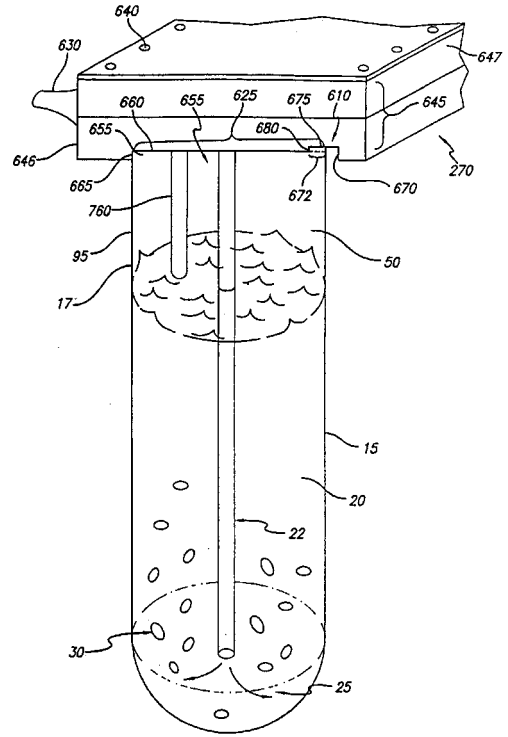
【 図 1 0 】



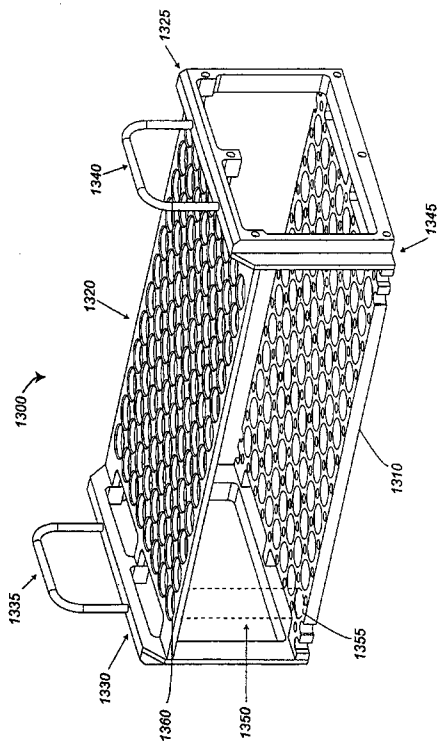
【 図 1 1 】



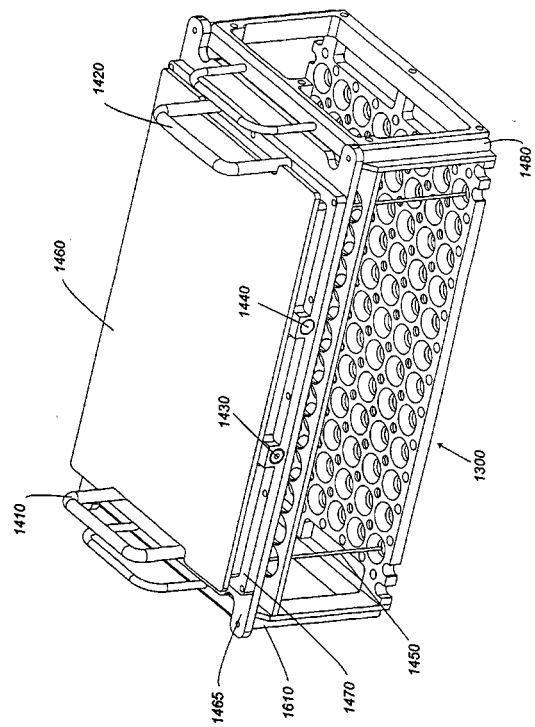
【 図 1 2 】



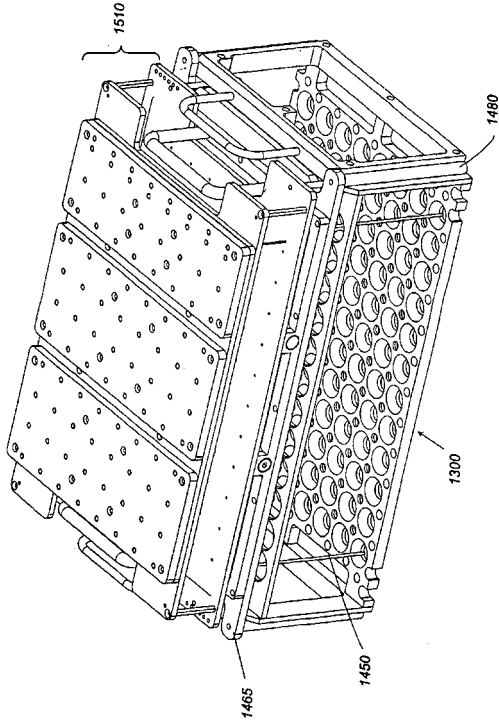
【 図 1 3 】



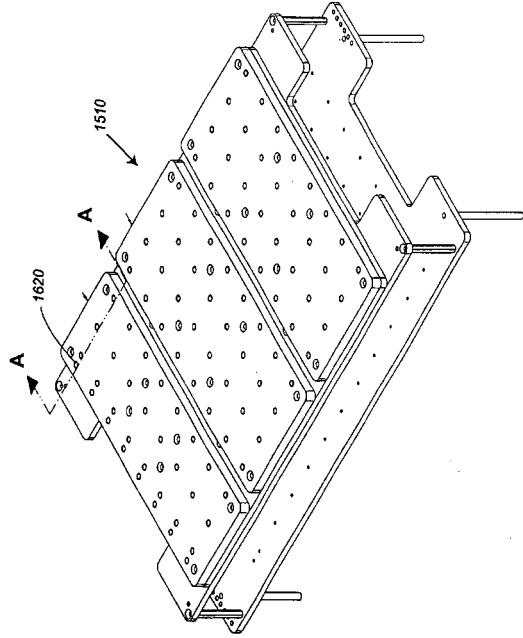
【 図 1 4 】



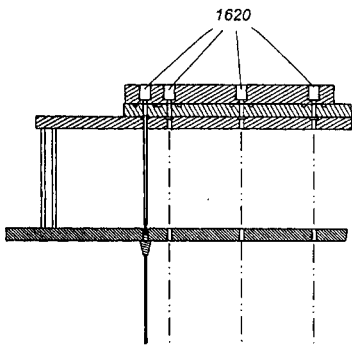
【 図 15 】



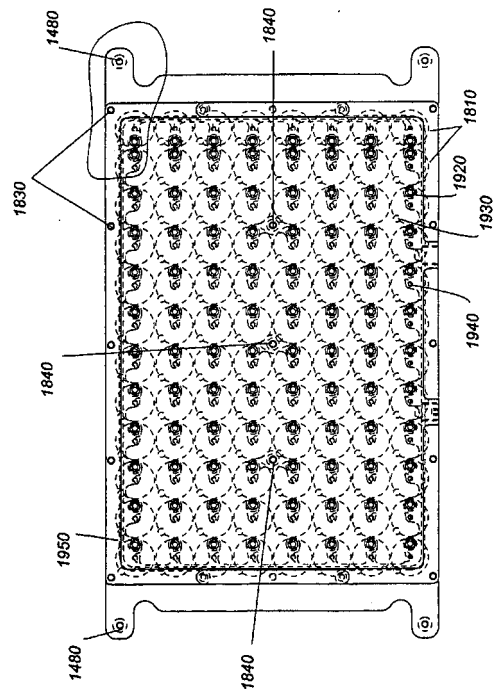
【 図 16 】



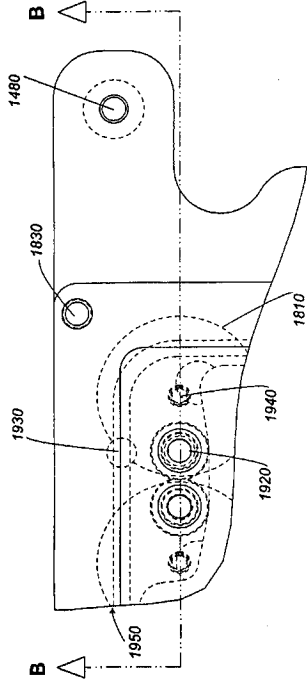
【 図 17 】



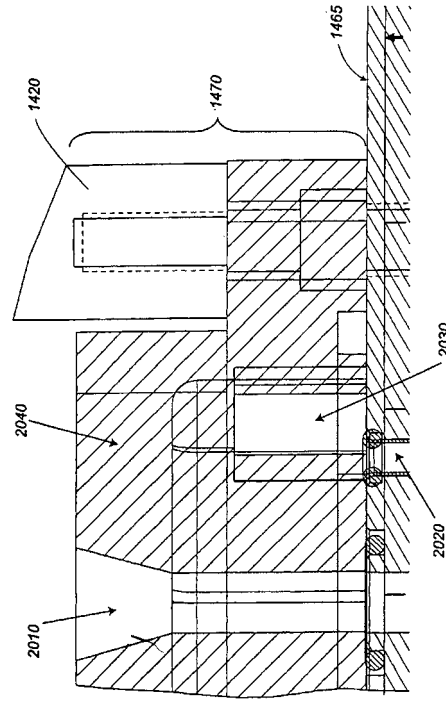
【 図 18 】



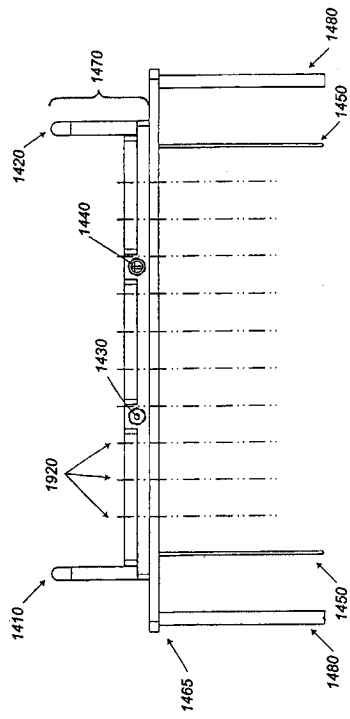
【 図 19 】



【 図 20 】



【 図 21 】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 August 2002 (15.08.2002)

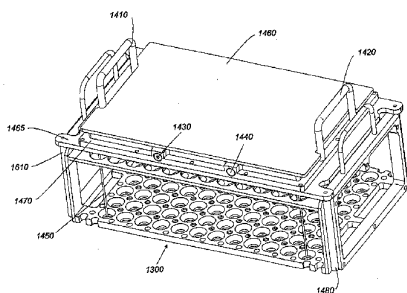
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/063027 A1

- (51) International Patent Classification: C12P 1/00, C12M 3/00, 3/04, B25J 5/00, 11/00
- (21) International Application Number: PCT/US02/03817
- (22) International Filing Date: 8 February 2002 (08.02.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/780,591 8 February 2001 (08.02.2001) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: 09/780,591 (CIP) Filed on 8 February 2001 (08.02.2001)
- (71) Applicant (for all designated States except US): IRMLLC [US/US]; Sofia House, 48 Church Street, Hamilton HMLX (BM).
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): DOWNS, Robert, Charles [US/US]; 5795 La Jolla Corona Drive, La Jolla, CA 92037 (US); LESLEY, Scott, Allan [US/US]; 8474 Hopwood Lane, San Diego, CA 92129 (US); MAIN-QUIST, James, Kevin [US/US]; 12695 Aida Street, San Diego, CA 92130 (US); MCMULLAN, Daniel, Terence [US/US]; 10237 Caminito Pitaya, San Diego, CA 92131 (US); MEYER, Andrew, J. [US/US]; 3876 1/2 Haines street, San Diego, CA 92109 (US); NASOFF, Marc [US/US]; 11734 Mira Lago Way, San Diego, CA 92131 (US).
- (74) Agents: QUINE, Jonathan, Alan; Quine Intellectual Property Law Group, P.C., P.O. Box 458, Alameda, CA 94501 et al. (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, [Continued on next page]



(54) Title: MULTI-SAMPLE FERMENTOR AND METHOD OF USING SAME



(57) Abstract: A fermentation apparatus is described to produce known and repeatable amount of unattended fermentation product using multiple fermentation vessels. To facilitate compatible processing with other processing steps, the fermentation apparatus has an array of sample vessels arranged in a container frame (Figure 14). The container frame is configured to hold the sample vessels during fermentation and transport of the vessel array to, or from another processing station. Corresponding to the number of sample vessels in the sample vessel array, a cannula may be placed inside a sample vessel. The cannula array is attached to a gas distributor that delivers oxygen and/or one or more other gases from a gas source through the cannula into the sample vessel. Because of its design, this fermentation apparatus is applicable for simultaneous optimization of a number of process parameters (e.g., cell growth rates).

WO 02/063027 A1

WO 02/063027 A1 

SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BI, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Multi-Sample Fermentor and Method of Using Same**COPYRIGHT NOTIFICATION**

Pursuant to 37 C.F.R. 1.71(e), a portion of this patent document contains material which is subject to copyright protection. The copyright owner has no objection to the facsimile reproduction by anyone of the patent document or the patent disclosure, as it appears in the Patent and Trademark Office patent file or records, but otherwise reserves all copyright rights whatsoever.

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

Pursuant to 35 U.S.C. § 120, and any other applicable statute or rule, the present application is a continuation-in-part of and claims benefit of and priority to U.S. Patent Application Serial No. 09/780,591, filed February 8, 2001 entitled "Multi-Sample Fermentor and Method of Using Same," the disclosure of which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Fermentation is a key technology in many fields and industries and is performed both on a mass production scale and on an experimental, bench top scale. For example, fermentation systems are used for the production of a large number of products such as antibiotics, vaccines, synthetic biopolymers, synthetic amino acids, and proteins. Fermentation technology is integral in the production of recombinant proteins using biological organisms, such as *E. coli*, and many other cell cultures. For example, production of commercial pharmaceuticals such as recombinant insulin (Eli Lilly), erythropoietin (Amgen), and interferon (Roche) all involve fermentation as an essential step.

In addition, the recent identification of the tens of thousands of genes comprising the human genome highlight an important use of fermentation, namely the production of the proteins encoded by those genes. The determination of each gene's function is of paramount importance and therefore, the proteins encoded by those genes must be produced, e.g., by fermentation methods. Because each gene encodes at least one protein, tens of thousands of proteins must be produced and isolated. However, fermentation and isolation of the resulting protein products typically requires several labor intensive and time-

WO 02/063027

PCT/US02/03817

consuming procedures. Fermentation systems that can produce tens of thousands of different proteins, e.g., in amounts sufficient for analysis are therefore needed. An additional advantage would be fermentation systems that are amenable to high throughput processes and the microtiter plate format used in many biotechnology applications.

Although, rapid advances in biotechnology have enabled the development of high throughput alternatives to traditional laboratory bench top processes, fermentation methods have not been amenable to automation. For example, limits in current fermentation technology prevent the uninterrupted processing flow that characterizes automated high throughput systems. Existing fermentation systems typically involve multiple handling steps by either a batch processing method or a continuous processing method.

Fermentations are typically carried out in batch mode or continuous mode.

Batch mode processes are those in which a fermentor is filled with a medium in which cells are grown and the fermentation is allowed to proceed with the entire contents removed from the fermentor at the end for downstream or post-processing. The fermentor is then cleaned, re-filled, and inoculated for the fermentation process to be performed again. For example, current production scale batch processes involve first fermenting in large scale, bulk fermentation vessels, then processing the fermentation medium to isolate the desired fermentation product, followed by transferring this product into the production stream for further processing, and finally cleaning the fermentation apparatus for the next batch. In a large scale batch culture, it is generally necessary to provide a high initial concentration of nutrients in order to sustain cell growth over an extended time. As a result, substrate inhibition may occur in the early stages of cell growth and then may be followed by a nutrient deficiency in the late stages of fermentation. These disadvantages result in sub-optimal cell growth rates and fermentation yields. Another disadvantage of this method lies in the need to individually dispense the fermentation products from the bulk fermentation apparatus into separate sample vessels for further processing. Thus, by producing the fermentation product on a bulk scale, the fermentation product is not immediately available for automated processing. Further disadvantages include the decreased efficiency of both transferring the material to another sample vessel, as well as cleaning and sterilizing the fermentation apparatus for the next batch. These disadvantages result in increased production costs, inefficient production times and decreased yields.

Continuous batch processes involve siphoning off the fermentation product from the bulk fermentation vessel and continuously adding nutrients to the fermentation

WO 02/063027

PCT/US02/03817

medium according to a calculated exponential growth curve. This curve, however, is merely an approximation that does not accurately predict cell growth in large, industrial scale quantities of fermentation medium. Consequently, due to the unpredictable nature of large scale fermentation environments, experienced personnel are required to monitor the feeding rate very closely. Changes in the fermentation environment may result in either poisoned fermentation products being siphoned off into the production stream or sub-optimal production yields due to starved fermentation mediums. As a further disadvantage, unpredictable fermentation product yields affect the accuracy of subsequent processing steps. For example, when the fermentation yield decreases, the amount of aspirating, the amount of reagent dispensed, or the centrifuge time is no longer optimized, or even predictable. Frequent or continuous monitoring of the fermentation process and adjustment of the fermentation conditions is often not practicable or efficient in a production scale process.

Neither of the current processes provides an efficient, automated production scale fermentation. However, fermentation remains a key processing step in a number of industries, particularly in biotechnology industries, and thus a need exists for incorporating fermentation processes into automated high throughput systems. A process that produces a precise, known, and repeatable amount of untainted fermentation product with limited human interaction or sample vessel transfer is essential to integrating fermentation into modern production processes. The present invention meets these as well as other needs that will be apparent upon review of the following detailed description and figures.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides methods and apparatuses for simultaneously fermenting a plurality of samples, e.g., small samples in an 8 by 12 array. For example, the present invention provides a fermentation apparatus comprising a container frame configured to contain a plurality of sample vessels and a gas distribution arrangement coupled to the container frame. The fermentor provides for fermentation of large numbers of samples, e.g., to produce a large number of proteins. Alternatively, the fermentors of the invention provide a more efficient route for production scale fermentations.

In one aspect the invention provides a container frame configured to contain a plurality of sample vessels, e.g., in an array; and, a gas distribution arrangement configured to provide gas to a plurality of sample vessels, e.g., when the sample vessels are positioned in

WO 02/063027

PCT/US02/03817

the container frame. The container frame is typically configured to contain an array of sample vessels, e.g., an 8 by 12 array, e.g., holding at least about 96, 384, or 1536 samples. The gas distribution arrangement typically comprises a gas inlet configured to deliver gas to a plurality of cannulas, which are configured to provide gas to the sample vessels.

In one embodiment, the container frame is a transportable container frame, e.g., configured for transport to a post-fermentation processing station. In addition, the container frame is optionally configured for placement within a temperature controlled area, e.g., water bath or a temperature controlled room, wherein a temperature controller is coupled to the container frame and/or to one or more sample vessels within the container frame.

In other embodiments, the container frame is autoclavable. For example, the container frame is autoclavable on its own or in combination with the gas distribution arrangement and/or the sample vessels.

The sample vessels typically comprise glass, plastic, metal, polycarbonate, ceramic, or the like. Each sample vessel typically has a volume of about 50 to 100 ml, e.g., and is used to hold a sample comprising less than about 80 mls, more typically about 65 mls. The samples in the plurality of sample vessels each have substantially the same composition or different compositions, e.g., to produce a large quantity of a single protein, or to produce multiple proteins simultaneously.

In other embodiments, the sample vessels optionally comprise a vent, e.g., for releasing built up pressure during fermentation. Sensors are also optionally placed in contact with one or more of the samples in the sample vessels, e.g., for monitoring temperature, pH, and the like.

In one embodiment, the gas distribution arrangement comprises a dispensing plate, an array of sample vessel areas, an array of cannulas, and a gas inlet. The dispensing plate typically comprises a top portion and a bottom portion that are joined together such that a hollow space exists between them. The array of sample vessel areas is typically located in a bottom surface of the bottom portion. Each sample vessel area comprises a recess and is positioned to correspond to the array of sample vessels. The array of cannulas are typically in fluid communication with the hollow space and protrude from a bottom surface of the dispensing plate through the sample vessel areas, e.g., to provide gas flow to the sample vessels. In some embodiments, the cannulas comprises a plurality of passages, e.g., at least three passages. The gas inlet is typically in fluid communication with the hollow space for delivering gas into a plurality of sample vessels via the cannulas during fermentation. For

WO 02/063027

PCT/US02/03817

example, the gas distribution arrangement in some embodiments comprises a gas source that provides oxygen or a mixture of oxygen and at least one other gas to each sample vessel during operation of the apparatus.

In other embodiments, the gas distribution arrangement is optionally configured to allow delivery of one or more reagents to the sample vessels. For example, a dispenser is optionally coupled to the gas distribution arrangement, e.g., for dispensing one or more reagents into the plurality of sample vessels. The dispenser is typically configured to dispense reagents into the plurality of sample vessels, e.g., via a plurality of apertures corresponding to the sample vessels.

In addition, a process controller is operably coupled to the gas distribution arrangement, e.g., for controlling and/or monitoring gas flow to the plurality of sample being fermented.

In another aspect, the present invention provides a fermentor head for multiple sample fermentation. A typical fermentor head comprises a dispensing plate that comprises a top portion and a bottom portion, an array of sample vessel areas, an array of cannulas and a gas inlet. The bottom portion and the top portion of the dispensing plate are joined together such that a hollow space exists between them. The array of sample vessel areas is typically located in a bottom surface of the bottom portion of the dispensing plate, which sample vessel areas each comprise a recess and are positioned to correspond to an array of sample vessels. The array of cannulas are typically in fluid communication with the hollow space and protrude from a bottom surface of the dispensing plate through the sample vessel areas, e.g., 15 to 16 cm; with the gas inlet in fluid communication with the hollow space for delivering gas into a plurality of sample vessels via the cannulas during fermentation. Typically, the cannulas deliver gas adjacent to a bottom of the sample vessels. In some embodiments, the dispensing plate further comprises an array of apertures for accessing samples during fermentation. Alternatively, the cannulas are adapted to deliver gas, deliver fluid, or aspirate fluid from the sample vessels during fermentation. The vessels and samples used with the fermentor head typically correspond to those described above.

In another aspect, the present invention provides a method of fermenting a plurality of samples. The method typically comprises providing a plurality of sample vessels in a container frame, wherein each of the sample vessels contains a sample. The samples in the plurality of sample vessels are typically fermented, which fermenting comprises simultaneously delivering gas, e.g., oxygen, air, and/or, nitrogen, to each of the sample

WO 02/063027

PCT/US02/03817

vessels via a plurality of cannulas associated with the sample vessels. Each sample typically has a volume of less than 100 ml, e.g., using sample vessels and a container frame as described above. In some embodiments, delivering gas to the samples comprises delivering air and oxygen to the samples over a period of time, during which period of time, the ratio of air to oxygen changes, e.g., linearly over time or in a stepwise manner over time.

In some embodiments, the methods further comprise detecting one or more fermentation conditions with a sensor coupled to one or more sample vessels and adjusting the fermentation conditions in the sample vessels, e.g., at pre-determined time intervals. For example, adjusting the fermentation conditions optionally comprises adding a feed solution to the sample vessels. Detecting optionally comprises measuring a pH of one of the samples; measuring a redox potential of one of the samples; measuring an optical density of one of the samples; and/or measuring a light emission from one of the samples.

In some embodiments, the methods further comprise pre-processing or post-processing the samples in the same set of sample vessels, e.g., in the same or a different location as the fermentation step. In some embodiments, the pre-processing and/or post-processing are performed robotically. Pre-processing and/or post-processing steps include, but are not limited to, centrifugation, aspiration, and/or dispensing of one or more reagent. For example, the methods optionally comprise transferring the sample vessels into a centrifuge rotor after fermentation or autoclaving the sample vessels, e.g., in the container frame prior to fermentation. In addition, the cannulas are also optionally autoclavable with the container frame.

In another aspect, the methods of the invention comprise positioning a plurality of sample vessels into a transportable container frame, which container frame maintains the sample vessels in an array. The plurality of samples is optionally placed into the plurality of sample vessels, e.g., before or after the vessels are positioned in the frame. A fermentor head is typically attached to the container frame, e.g., prior to or after the samples have been added to the vessels. The fermentor head typically comprises an array of cannulas, e.g., as described above. The cannulas typically correspond to the array of sample vessels and are inserted into the sample vessels when the fermentor head is attached. The samples in the sample vessels are then fermented, e.g., by simultaneously delivering a gas, e.g., oxygen, nitrogen, and/or air, to the samples via the array of cannulas. In some embodiments, the fermentation is an anaerobic fermentation comprising delivering an inert gas to maintain anaerobic fermentation conditions in the sample vessels. The methods optionally comprise

WO 02/063027

PCT/US02/03817

robotic steps pre-processing steps, and/or post processing steps as described above. For example, the sample vessels and/or the sample container used in the above methods are optionally configured to be compatible with a centrifuge, wherein the method further comprises transporting the container frame and/or sample vessels to the centrifuge for centrifugation.

In some embodiments, the methods comprise transportation to an aspirator or dispenser, wherein the aspirator typically comprises an aspirator head which corresponds to the array of sample vessels within the container frame, in which case, the method further including operably attaching the aspirator head to the sample vessels and simultaneously aspirating the samples within the sample vessels. In other embodiments, a dispensing step is included, wherein the dispenser comprises a dispensing head corresponding to the array of sample vessels and the method further includes operably attaching the dispenser head to the sample vessels and simultaneously dispensing one or more materials into the sample vessels.

In another embodiment, the present invention provides a method of processing a plurality of fermentation samples. The method comprises fermenting a plurality of fermentation samples in a plurality of sample vessels, resulting in a plurality of fermented samples; robotically transporting the sample vessels containing the fermented samples to a centrifuge head; and centrifuging the fermented samples in the same sample vessels in which the fermentation was performed. For example, about 4 to about 10 sample vessels are optionally robotically transported to the centrifuge head at the same time. The method also optionally includes isolating a supernatant from the sample vessels after centrifuging the fermentation samples.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 is a schematic showing a perspective view of a fermentation apparatus in accordance with the present invention.

Figure 2 is a schematic showing a top view of a fermentation apparatus in accordance with the present invention.

Figure 3 is a schematic illustrating a perspective view of an individual fermentation sample vessel in accordance with the present invention.

Figure 4 is a block diagram of a fermentation method in accordance with the present invention.

WO 02/063027

PCT/US02/03817

Figure 5 is a block diagram showing the use of a fermentation system within a multiple process procedure in accordance with the present invention.

Figure 6 is a schematic illustrating a bottom view of a gas arrangement in accordance with the present invention.

Figure 7 is an automated fermentation assembly in accordance with the present invention.

Figure 8 is a cross sectional view of a cannula in accordance with the present invention.

Figure 9 is schematic showing a bottom view of a sample vessel area of a dispensing plate shown in Figure 6 in accordance with the present invention.

Figure 10 is a schematic showing a cross sectional view of the sample vessel area shown in Figure 9 taken along the line E-E in accordance with the present invention.

Figure 11 is a schematic showing a cross sectional view of the sample vessel area shown in Figure 9 taken along line F-F in accordance with the present invention.

Figure 12 is a schematic showing a perspective view of a fermentation sample vessel employing a dispensing plate in accordance with the present invention.

Figure 13 is a schematic drawing that illustrates a container frame for maintaining a plurality of sample vessels in an array configuration.

Figure 14 is a schematic drawing that illustrates the container frame of Figure 13 coupled to a gas distribution arrangement.

Figure 15 is a schematic drawing that illustrates the container frame of Figure 13 coupled to an alternative gas distribution arrangement configured for liquid additions.

Figure 16 is a schematic drawing that illustrates the gas distribution manifold with a liquid addition capacity of Figure 15.

Figure 17 is a schematic drawing that illustrating a cross-sectional view taken along line A-A of Figure 16.

Figure 18 is a schematic drawing that illustrates a bottom view of gas distribution arrangement as shown in Figure 14.

Figure 19 is a detail illustration from Figure 18.

Figure 20 is a schematic drawing illustrating a cross-sectional view of a gas distribution arrangement including top and bottom plates taken along line B-B of Figure 19.

Figure 21 is a schematic drawing that provides a side view of the gas distribution arrangement as shown in Figure 14.

WO 02/063027

PCT/US02/03817

DETAILED DISCUSSION OF THE INVENTION

The present invention provides a fermentation apparatus and methods of fermentation. The fermentors and methods presented herein provide production scale fermentation, e.g., automated high throughput fermentation, as described below. For example, the present invention provides a multi-sample fermentor comprising a transportable container frame. The fermentor is configured to simultaneously ferment a plurality of samples held in an array of sample vessels within a container frame. The sample vessels provide relatively small volume batch fermentations, e.g., about 50 ml to 80 ml of sample in each sample vessel, more typically 65 ml. In addition, the transportable container frame provides a high throughput aspect to the system that has been absent in previous fermentation systems. The container frame is used to provide processing, e.g., upstream or downstream processing in the same sample vessels.

The present invention provides a novel fermentor apparatus that allows batch mode fermentation using a plurality of small samples. For example, small sample sizes overcome the disadvantage of sub-optimal growth rates and yields that exist in large batch mode processes. In addition, the present system eliminates the need for sample handling for post-fermentation processing. The sample vessels in the present invention are used directly in any post-processing steps, which eliminates many cleaning and sterilizing steps as well, thereby providing a less expensive, more efficient, and faster fermentation process.

The present invention also overcomes the disadvantages of the continuous feed systems, e.g., with the small sample sizes used. For example, the estimated growth curves used in large scale continuous feed processes are unnecessary in the present invention. Therefore, the unpredictable results and frequent monitoring of continuous feed processes are not a problem in the present invention.

The present invention provides a fermentation apparatus that solves the above problems, e.g., by using small sample sizes and fermenting the multiple samples simultaneously. By simultaneously performing multiple fermentations, e.g., small scale fermentations, in batch mode, optimal mixing is achieved, optimal temperature and pH can be maintained as well as many other advantages that will be apparent upon further reading of the present description.

WO 02/063027

PCT/US02/03817

I. A multi-sample fermentation apparatus

The present invention provides a multi-sample fermentation apparatus. Typically, the apparatuses of the invention comprise a sample holder or container frame and a gas distribution system. For example, in one embodiment, a container frame is used to hold and/or transport an array of sample vessels for fermentation. A fermentor head, e.g., comprising an array of cannulas corresponding to the array of sample vessels, is coupled, e.g., directly, to the container frame and/or sample vessels. Gas is distributed into the multiple sample vessels via the cannulas and fermentor head providing multi-sample fermentation. Various components of the apparatuses are described in more detail below followed by methods of using the apparatuses and example fermentors.

A container frame is used to hold a plurality of sample vessels

A "container frame" as used herein refers to an arrangement that holds and/or maintains a plurality of sample vessels in a desired arrangement. Typically, the container frames of the invention are transportable and autoclavable. In addition, they typically have no movable parts. A transportable container frame is one that is easily transported or moved while holding the sample vessels in the desired arrangement. For example, a container frame of the invention optionally has handles for transportation to a processing station, e.g., after fermentation is complete. An autoclavable container frame is one that can be placed directly in an autoclave for sterilization, e.g., including the sample vessels and samples if desired.

By using a transportable container frame, the entire array of sample vessels is optionally transported to and from one fermentation processing station to another processing station in a multiple process production. For example, a transportable container frame is optionally used to transport an array of sample vessels into a temperature controlled area such as a water bath, e.g., a water bath controlled by a temperature controller and temperature coil immersed in the water bath. Other forms of temperature control are also optionally used, such as temperature controlled gel baths, ovens, glove boxes, or air chambers.

Typically, the container frame maintains the sample vessels in an array, e.g., a rectangular array. In an embodiment shown in Figure 1, individual sample vessels 15 are configured in a rectangular array, but the array is optionally configured in any physical construct that is conducive to fermentation or that is compatible with other processing steps. For example, a honeycomb, circular, triangular, or linear configuration may be more efficient in other contemplated applications of the present invention.

WO 02/063027

PCT/US02/03817

The container frames of the present invention typically have a plurality of placement wells for positioning the plurality of sample vessels, e.g., in an array. For example, the placement wells optionally comprise indentations in the bottom of a container frame, into which sample tubes are optionally placed. In addition to the indentations or wells in the bottom of the container frame, the container frames optionally include an upper portion, e.g., for supporting the tops of the sample tubes and maintaining their position. Example container frames are shown in Figures 1 (container frame 250) and Figure 13 (container frame 1300).

For example, the bottom of each individual sample vessel is typically positioned within a placement well, e.g., placement well 257 in Figure 1 or placement well 1350 in Figure 13. The array of placement wells preferably mirrors the configuration of the sample vessel array and is embedded in the transportable container frame. Placement wells may, however, be arranged in alternative configurations. For example, placement wells may be arranged as linear troughs, each holding a row of sample vessels. In another embodiment, placement wells are absent from the transportable container frame. For example, the container frame optionally has a solid bottom surface with no indentations or wells. The sample vessels are then positioned in the frame, e.g., tightly packed against the sides of the frame to maintain the array configuration.

Sample vessels of the present invention typically comprise test tubes, other sample tubes, jars, flasks or any other container for holding a sample. Typically, the sample vessels have a volume of about 50 to about 200 milliliters, more typically about 80 to about 100 ml. The sample vessels are typically placed in an array of placement wells in a container frame, e.g., for autoclaving, processing, fermentation, and the like.

In some embodiments, the sample vessels are constructed of Pyrex glass or polycarbonate, but other suitable materials are optionally used to construct the sample vessels. For example, plastic, ceramic, metal, e.g., aluminum, or any other material is optionally used that is non-reactive to fermentation medium or to other materials involved in additional processes contemplated in a multiple process production, such as in a high throughput system. It will further be appreciated that the fermentation medium may be the same medium in each individual sample vessels or, alternatively, the array of sample vessels optionally includes a combination of different fermentation mediums. For example, fermentation medium may be the same in each individual sample vessel and contain the same fermentation broth for a bulk synthetic process. Alternatively, each sample vessel in an array

WO 02/063027

PCT/US02/03817

may have a slightly different fermentation broth in order to optimize the production yield of a certain component.

In some embodiments, sample vessels with gripper surfaces are optionally used. In this embodiment, the container frame typically comprises a corresponding gripper surface, e.g., for maintaining the vessels in the desired configuration or to aid in transporting the array of sample vessels to and from a fermentation station and/or processing station.

In other embodiments, sensors are optionally included in the sample vessels of the invention. For example, a pH or temperature sensor is optionally positioned proximal to or within a sample vessel to monitor the fermentation reaction.

Fermentation samples are optionally placed in the sample vessels prior to their placement in the container frame or after such placement. In one embodiment, colonization of bacteria and other preparative steps are performed within the sample vessels, e.g., while they are contained in the container frame. For example, bacteria and initial nutrients are dispensed into each sample vessel at a prior processing station. Being able to prepare bacteria directly in each individual sample vessel eliminates the need to inoculate a culture and initiate colonization in a separate container before transferring the sample to the fermentation apparatus. Using the container frame arrangement of the present invention to colonize the fermenting bacteria decreases costs by eliminating a separate colonization arrangement. Once bacteria are colonized, sample vessels are conveniently transported, e.g., within the container frame, to a fermentation station, e.g., a water bath or any other temperature controlled area, such as a heated room. At the fermentation station or any time prior, a gas distribution arrangement is attached to the container frame to bubble gas into each sample vessel for fermentation. The gas distribution arrangements are described in more detail below.

A gas distribution arrangement is used to provide gas to a plurality of sample vessels

The gas distribution arrangement is used to provide gas flow to the sample vessels during fermentation. The gas distribution system typically comprises a gas inlet which is configured to flow gas from a gas source into a plurality of sample vessels in a container frame. Typically, the gas distribution arrangement is attached to the container frame, e.g., placed on top or screwed down. For example, the gas distribution arrangement typically comprises or is coupled to a plurality of cannulas through which the gas is flowed. The cannulas extend into each sample vessel for delivery of gas, e.g., to the bottom of the

WO 02/063027

PCT/US02/03817

sample vessel. Such cannulas also optionally provide agitation of the sample within the sample vessel.

A gas source typically comprises a source of one or more gases, for example, air and oxygen. For example, in one embodiment the gas source contains an inlet for N₂ gas and an inlet for O₂ gas. The ratio of each gas can be controlled either manually or remotely by using a process controller. The ability to adjust gas ratios enables the present invention to optimize the amount of gas, e.g., oxygen, needed as the growing conditions change throughout the fermentation. For example, a process controller is optionally used to linearly change the ratio of air/oxygen over the course of a fermentation. Alternatively, the ratio is changed stepwise as fermentation proceeds. Any type, mixture, or number of gases are optionally introduced and mixed through the gas sources of the invention and provided to fermentation samples contained in one or more sample vessels, e.g., through a set of cannulas.

A cannula is a small tube for insertion into a duct or vessel, e.g., a fermentation sample vessel or tube as provided herein. In the present application, the cannulas are positionable inside the plurality of sample vessels, e.g., they typically comprise flexible or rigid tubes that are inserted into sample vessels for the delivery of various gases into the sample vessels. In one embodiment, the cannulas are arranged into an array, which array typically corresponds to an array of sample vessels. An example array of the invention comprises an 8 by 12 member array of sample vessels each having an associated rigid cannula. Typically, a cannula extends substantially to the bottom of each individual sample vessel in order to increase aeration and mixing. For example, the cannula optionally extend about 15 to about 16 cm from the bottom surface of a gas distribution arrangement. In some embodiments, two or more cannulas are provided in each sample vessel.

In the embodiment illustrated in Figure 8, gas flows through cannula 22 through three passages. Gas flow through passages are optionally individually or collectively regulated. Smaller gas bubbles are obtained with multiple small passages than with a single, larger passage through the cannula. As a result, gas bubbles formed from these multiple passages have more surface area than bubbles formed from a single passage. In a preferred embodiment, passages are precision drilled in order to more accurately adjust gas flow within each passage and to ensure uniform gas delivery across the set of sample vessels. Fewer or more passages may be used according to the specific application of the present invention. For example, the cannulas typically have about 1 to about 5 passages, more typically, 2 or 3

WO 02/063027

PCT/US02/03817

passages. Passages are optionally the same or different sizes and may be circular or any non-circular shape, such as rectangular, oval, or triangular.

In one embodiment cannula are included in a cannula assembly comprised of an array of individual cannulas corresponding to the plurality of sample vessels. Each individual cannula is optionally connected by a fastener which couples the cannula to a gas distribution arrangement.

Gas, e.g., oxygen or an oxygen/air mixture, is delivered, e.g., from a manifold or other distribution system, to the sample vessels via the cannulas, thus oxygenating, if desired, the entire array of sample vessels within the container frame. For example, a gas source is optionally coupled directly to the gas distribution arrangement, e.g., with or without the use of a manifold, as illustrated in Figures 6, 12, and 14.

In this manner, the exact mixture of gases delivered from the gas source is uniformly distributed to each individual cannula assembly. Any gas distribution arrangement is optionally employed that uniformly delivers oxygen, an oxygen containing mixture, or another gas or gas mixture capable of fermenting the sample, from a gas source into the plurality of sample vessels. Example gas distribution arrangements are provided in Figures 1, 3, 12, and 14, which are described in more detail in the examples provided below.

In some embodiments, the gas distribution arrangement is comprised of one or more plates attached to an array of cannula, e.g., using a manifold, and a gas inlet, which delivers oxygen, an oxygen containing gas mixture, or another gas or gas mixture capable of fermenting the sample, to the sample vessels via the cannula.

Typically, the plates are aligned and fastened together, e.g., to form an airtight, liquid-tight seal. A hollow space or interior space typically exists between the plates or within one of the plates through which gases are uniformly distributed to the associated cannula array. Any suitable fastener may be used. For example, guide pins, rivets, nails, nut/bolt combinations, or magnets may be used. A releasable fastener, such as a screw or nut/bolt combination, is used in a preferred embodiment, although permanent type fasteners, such as adhesives, may be desired in some applications. Vertical supports are optionally attached to the gas distribution arrangement, thus supporting the arrangement on an array of sample vessels.

The plates are optionally composed of any suitable material that maintains the structural integrity of the plate during fermentation. For example, a plate is optionally composed of metal, plastic, ceramic, or any suitable composite. In one example, the plates

WO 02/063027

PCT/US02/03817

comprise Teflon™-coated aluminum, thus enabling the plates to undergo autoclave sterilization procedures along with the container frame and sample vessels as described above.

In one embodiment, the gas distribution arrangement comprises two plates. The first plate, e.g., the bottom plate, typically comprises a plurality of sample vessel areas or indentations on the bottom surface. The indentations correspond to the array of sample vessels held in the container frame and serve to cap the sample vessels. Figures 9-11 illustrate features encompassed by the indentations, e.g., sample vessel area or indentation 625 on bottom portion 646. The indentations or recesses are also used, e.g., to immobilize the sample vessel within the container frame. Although the indentations are illustrated as circular, they are optionally any shape, e.g., to correspond to a variety of sample vessels.

One or more vents are typically positioned on the circumference of the sample vessel area, cap, or recess to allow gases and built up pressure to escape the sample vessel. Figure 11 illustrates one embodiment of a venting space. However, other configurations of venting spaces and recesses are optionally constructed such that built-up pressure within sample vessels can escape without contaminating other sample vessels.

When the top surface of a sample vessel abuts the bottom surface of the gas distribution arrangement, gases, liquids, emulsions, or excess pressure built up in the sample vessel escape through a recess and/or venting space created in the gas distribution arrangement. Cross-contamination of these escaping elements is significantly reduced because a vertical edge in the bottom surface of the gas distribution arrangement separates each sample vessel from an adjacent sample vessel. Moreover, gas flow from the cannulas maintains a positive pressure within the sample vessel such that contaminants outside a particular sample vessel are not drawn in through the vent.

In some embodiments, the first plate comprises the plurality of cannulas that deliver gas to the sample vessels. The cannulas typically extend from the top surface of the plate, through the plate, and below the bottom surface of the plate. The cannulas are generally of sufficient length to reach within about 1 cm to about 0.1 cm of the bottom of the sample vessels. The cannulas open to the top surface of the plate, e.g., for gas to be distributed through the cannulas into the sample vessels. The cannulas are configured to be positionable in an array of sample vessels, e.g., held in a container frame.

In addition to the cannulas, the first plate optionally includes a plurality of apertures that correspond to the array of sample vessels. For example, the apertures

WO 02/063027

PCT/US02/03817

optionally provide an opening through the first plate, through which fluids may be added into the sample vessels when the gas distribution arrangement is attached to a container frame.

The first plate is typically attached to a second plate, e.g., with screws or adhesives, which second plate typically comprises one or more gas inlets for providing gas flow into the cannulas of the first plate. The gas inlet opens into an interior space created between the second plate and the first plate, which interior space provides gas flow to the cannulas.

In addition, the second plate also comprises a plurality of apertures, e.g., to provide liquid access to the sample vessels. The apertures of the second plate typically align with or match the apertures on the first plate when the two plates are coupled. The apertures provide openings through which liquid can be added into the sample vessels in a container frame attached to the gas distribution arrangement. The apertures also serve as openings for an array of aspirators or dispensers that can be used to aspirate or dispense liquid into the sample vessels. In other embodiments, pipettes or syringes are used to draw samples or add nutrients, water, etc, e.g., through the apertures. The gas distribution arrangement also optionally comprises a lid for covering the apertures when a sealed environment is desired. The first plate and second plate together comprise a fermentor head or manifold for delivering gas or fluid to a plurality of sample vessels. More detailed examples are provided below.

A process controller is also optionally coupled to the fermentation apparatus of the invention, e.g., for controlling gas flow to the cannulas, for altering ratios of air to oxygen that are bubbled through the cannulas, for monitoring and controlling temperature, for directing the addition of various reagents, and the like. An automated process using a process controller is described in more detail in the examples below.

Other devices are also optionally coupled to the fermentor apparatus of the present invention. For example, dispensers, aspirators, centrifuges, and other processing devices are optionally coupled to the fermentor or configured for use with a container frame, e.g., so that samples can be processed in the same vessel in which fermentation is carried out. For example, a dispenser is optionally configured to dispense liquid into a plurality of sample vessels held in a container frame, e.g., through a plurality of apertures in a gas distribution arrangement. Aspirators are likewise optionally configured to coordinate with the container frame and gas distribution manifolds of the present invention.

WO 02/063027

PCT/US02/03817

A centrifuge is also optionally used in processing fermentation samples. For example, a centrifuge is optionally configured to accept the sample vessels as centrifuge tubes to avoid transferring of samples prior to centrifugation. For more information on centrifugation systems for use in the present invention, see, e.g., USSN 09/780,589, entitled "Automated Centrifuge and Method of Using Same," by Downs et al, filed 02/08/2001.

II. Methods of fermenting samples in a multi-sample fermentor

The multi-sample fermentors described above are used for simultaneously fermenting a plurality of samples, e.g., in a container frame that is transportable, e.g., to a processing station. The present invention also provides methods of using such fermentors, e.g., in conjunction with one or more processing steps. For example, the methods provided typically comprise providing a plurality of sample vessels in a container frame, each of which sample vessels contains a sample of about 50 to about 100 milliliters, more typically 65 ml. The samples are fermented in the sample vessels within the container frame.

Fermentation is used herein to refer generally to any process in which cells are used to convert raw materials, e.g., water, air, sugars, mineral salts, nitrogen sources, and the like, or enzyme substrates into desired products, e.g., proteins. Types of cells used include, but are not limited to, animal cells, yeast cells, and bacterial cells, e.g., E. coli, Bacillus, and the like. The cells are typically grown in a growth medium and then products are harvested. Fermenting typically involves simultaneously delivering gas to each of the sample vessels through a plurality of cannulas associated with the sample vessels, e.g., to aid growth of the cells. For example, the methods typically comprise attaching a fermentor head as described herein to a container frame containing the plurality of samples to be fermented. Once fermented, the samples are transferred to a post-processing station, e.g., a centrifuge. Typically, the post-processing station is configured to accept the same sample vessels in which the samples were fermented. In addition, some processing stations are configured to receive the container frame containing the sample vessels, e.g., a dispensing or aspirating station. An example method is described below and in Figures 4 and 5.

Figure 4 describes fermentation method 300 practiced in accordance with the present invention. Block 310 provides for a plurality of sample vessels 15. By providing a number of smaller volume fermentation vessels, this method is more advantageous than production scale fermentation methods that use bulk fermentation vessels, in that smaller volumes of growth medium are more predictable in their yield and nutrient needs than are

WO 02/063027

PCT/US02/03817

standard production scale volumes that are utilized in bulk fermentation methods. The number of sample vessels that may be fermented at any one time is unlimited by the present invention, and instead is only limited either by the configurational practicalities of any one fermentation apparatus or by the number of sample vessels that may be handled by further processing steps in the production.

Block 315 arranges a plurality of sample vessels into an array, e.g., a rectangular 8 by 12 array. However, the array is optionally configured in any shape that is practicable for the fermentation apparatus. For example, sample vessels are optionally arranged in a rectangular array, a honeycomb configuration, or a linear array.

Block 320 arranges a plurality of cannula into an array corresponding to the sample vessels. According to the present invention, each cannula in this cannula array corresponds to an individual sample vessel in the sample vessel array, which are arranged in block 315. In one embodiment, the plurality of cannula is limited by the number of sample vessels arranged in block 315.

Block 325 creates a gas distribution arrangement for delivering oxygen and/or one or more other gases to a fermentation media in the sample vessels. For example, one embodiment fastens a cannula array to a gas distributor, which is connected to a manifold. The cannula array may be fastened by any means achieving a liquid-tight seal. For example, cannula are optionally connected via a union connector to a gas distributor. Alternatively, cannula are pneumatically connected to the distributor, or the cannula array and gas distributor are optionally molded as a single unit. In another embodiment, the distributor connects directly to a gas source without using a manifold. The methods of creating a gas distribution arrangement are optionally achieved using any method of uniformly delivering oxygen and/or one or more other gases from a gas source to a gas distributor such that gas is delivered to each individual sample vessel selectively or collectively by way of a corresponding cannula.

Block 330 transports the container frame containing the plurality of sample vessels to a temperature controlled area. Other methods known to those of skill in the art for controlling temperature are also contemplated within the present invention. For example, the container frame is optionally transported to a heated gel bath or a controlled temperature room used to maintain a constant temperature.

Block 335 positions the gas distribution arrangement created in block 330 on top of the container frame, e.g., using screws or by merely being placed on top and held in

WO 02/063027

PCT/US02/03817

position by a groove assembly as shown in Figure 14. From this configuration, the array of sample vessels is fermented in block 340.

Once fermentation is complete, block 345 removes the gas distribution arrangement from the container frame. The sample vessels are optionally transferred from the container frame directly to a post-fermentation processing station in block 350, e.g., by manipulating a gripping surface located on each sample vessel. This post-fermentation processing station includes any processing step where the fermentation product may be processed directly from the sample vessel. For example, the array of sample vessels may be transferred, either manually or robotically, from the container frame directly to an automated centrifuge. Alternatively, sample vessels may be transferred to an aspirating station or detecting station. In other embodiments, the sample vessels are not removed from the container frame but remain in it for further processing, such as dispensing or aspirating, using a dispenser or aspirator configured to coordinate with the array of sample vessels in the container frame.

In block 350, the fermentation product in the sample vessels is directly transferred into a post-fermentation processing station and in block 355 the fermentation product is directly processed in the sample vessels themselves. For example, in one embodiment, sample vessels are transferred directly to a centrifuge station in which the sample vessels are positioned directly inside the centrifuge such that the sample vessels act as centrifugation tubes and the fermentation product is centrifuged according to methods known in the art. Further processing steps such as aspirating, reagent dispensing, or detecting also optionally occur directly in the sample vessel used in the fermentation process. In this way, the fermentation vessel provides a sample vessel that holds the sample throughout the entire production process, thereby eliminating excess waste from transferring sample material from sample vessel to sample vessel as well as decreasing the cost of washing and sterilizing a fermentation apparatus in addition to sample vessels from each production process step. Other multiple process productions or analyses may also be practiced in accordance with the present invention.

In Figure 5, block diagram 400 shows how the present invention is integrated into a multiple step, multiple process production. Block 410 depicts a processing station prior to fermentation. In one embodiment, fermentation broth and fermentation nutrients are added to sample vessels at prior processing station 410. Other processing steps involved in a multiple step production or analysis are also contemplated in accordance with the present

WO 02/063027

PCT/US02/03817

invention. For example, bacteria colonization may occur in sample vessels at prior processing station 410. Example pre-processing steps include, but are not limited to, deionization, e.g., of solvents, pasteurization of materials, and mixing, e.g., of cell nutrient broths and the like. Such steps are typically used to process the raw materials, such as water, cell broths, sugars, nitrogen sources, and the like, used for the fermentation. Transporter 420, e.g., a robot, a technician, a conveyor belt, or the like, is optionally used to transfer the sample vessels from processing station 410 to a fermentation apparatus such as fermentation apparatus 100. Other embodiments of a fermentation apparatus practiced in accordance with this invention may also be used. For example, the fermentation apparatus shown in Figure 14 or in Figure 1 is optionally used.

It will further be appreciated that transporter 420 may transfer the sample vessels individually, in groups, or in an array configured for the fermentation apparatus. For example, in one embodiment, a container frame transports the sample vessel array to fermentation apparatus 100. Similarly, after fermentation, transporter 430 transports sample vessels from a fermentation apparatus to a post-fermentation processing station 410. In one embodiment, transporter 430 transports a container frame holding an array of sample vessels to a centrifuge processing station 410. Post-processing station 410 is optionally any other processing step occurring in a multiple process or analysis, such as an aspirating step, a dispensing step, or a detecting step. Example post-processing steps include, but are not limited to, precipitation, deionization, chromatography, evaporation, filtration, centrifugation, crystallization, drying, and the like. These steps are generally directed to purification, retrieval, and concentration of materials produced in the fermentation. In this manner, multiple processing steps are executed on each sample contained in the same sample vessel, thus enabling fermentation processes to be incorporated into high throughput or other multiple process systems. Example fermentation conditions are described below.

The present invention preferably uses fermentation conditions that lead to high level production of soluble proteins. These fermentation conditions may employ the use of high levels of yeast extract and bactotryptone (rich media, referred to as terrific broth or TB). Secondly, this media is optionally supplemented with 1% glycerol (additional carbon source). Lastly, the media preferably is typically buffered with 50 mM MOPS. Alternatively, a defined media comprising amino acids and 50 mM phosphate as opposed to MOPS is used. The first two additions allow the cells to be grown for up to about 10 hours without apparent

WO 02/063027

PCT/US02/03817

loss of nutrients. The highly buffered media prevents the cells from being exposed to high levels of acid (low pH) which routinely occurs during fermentation.

Surprisingly less than 5% of human proteins expressed in normal Luria Broth or LB media, are typically found to be soluble. However, using the above media, 15-20% of human proteins expressed in *E. coli* now appear to be soluble.

In a preferred embodiment, the fermentation media is prepared as follows. TB media is prepared in 7L batches. Antibiotics are not added to TB media until the day it will be used for a fermentation run. To prepare the 7L bath, the following steps are performed: (1) Fill a clean 10L pyrex bottle with ~4L DI H₂O or 18 megohm water, add a large stirbar; (2) Add 168g Yeast Extract; (3) Add 84g Tryptone; (4) Add 70ml Glycerol; (5) Stir on stirplate until completely dissolved; (6) QS to 6.3L, e.g., with 18 megohm water; (7) Autoclave on the longest liquid cycle. Remove TB media from the autoclave as soon as possible, e.g., to prevent caramelization or burning of the carbon source and/or to allow for a quick cool down; (8) Store TB media at room temperature; and (9) Record process. TB Media is the same for all fermentor runs. However, Fermentor Media is not necessarily the same for all runs. For example, one difference in media is the antibiotic(s) added just before fermentation. On the same day of a fermentation run, the following may be added to TB media: (1) 350 mls of 1 M MOPS pH 7.6; (2) 7ml Antifoam; (3) 7ml 20 mg/ml Chloramphenicol; (4) 7ml 100 mg/ml Ampicillin; (5) Add enough 18 megohm H₂O to bring the volume up to 7L; (6) Write everything added to TB media on its label; (7) Cap tightly and shake bottle well; and (8) Record process. The above medium is only one of many possible choices known to those of skill in the art, which are optionally used with the present fermentors and methods.

When fermentation is complete, the sample vessels are transferred to a post-processing unit as described above, e.g., in the container frame, either manually or robotically. For example, a robot optionally removes the sample vessels from the container frame and places them, e.g., in a centrifuge.

III. Examples fermentation systems

Example Fermentor # 1

In accordance with the present invention, an example fermentation apparatus is provided in Figure 1. Fermentation apparatus **10** generally comprises sample holder arrangement **255**, cannula assembly **80** and gas distribution arrangement **270**. The illustrated

WO 02/063027

PCT/US02/03817

fermentation apparatus 10 is configured to separately and simultaneously ferment multiple batch samples in sample vessels that are compatible with direct pre- and post-fermentation processing as described above.

Sample holder arrangement 255 is comprised of gripping surfaces 17, individual sample vessels 15, which typically form an array of sample vessels, such as array 110, a transportable container frame 250, and an array of placement wells 260 corresponding to array 110. Gripping surfaces 17 are optionally located on each individual sample vessel 15, which collectively form sample vessel array 110. It is preferable that gripping surface 17 resides on the bottom of each sample vessel, but gripping surface 17 is optionally located on any surface of the sample vessel that enables sample vessel 15 to be transferred to or from container frame 250 or another processing station.

The bottom of each individual sample well 15 is positioned within a placement well, e.g., placement well 257. The array of placement wells 260 preferably mirrors the configuration of array 110 and is embedded in transportable container frame 250.

By using transportable container frame 250, the entire array of sample vessels 110 is optionally transported to and from one fermentation processing station to another processing station in a multiple process production. In this illustrated example, transportable container frame 250 transports array of sample vessels 110 into a temperature controlled area 210 such as a water bath. In this embodiment, temperature controlled area 210 is comprised of water bath 240 in water bath container 215, which is controlled by water bath temperature controller 220 and temperature coil 230 immersed in water bath 240.

In Figures 1-3, an example gas distribution arrangement is shown. Gas distribution arrangement 270 is comprised of gas source 85 connected to manifold 75. Conduit 70 connects manifold 75 to connector 65. Connector 65 connects manifold 75 to gas distributor 55.

In the embodiment illustrated in Figures 1 and 3, cannula assembly 80 is comprised of cannula array 120, which is composed of individual cannulas 22 that correspond to sample vessel array 110. Each individual cannula 22 is optionally connected by a fastener 35, which couples cannula 22 to a gas distribution arrangement 270. Cannula 22 preferably extends substantially to the bottom of each individual sample vessel 15 in order to increase aeration and mixing.

In another embodiment, each individual cannula is attached directly to gas distribution arrangement 270 in an airtight, liquid-tight manner. Eliminating the need for a

WO 02/063027

PCT/US02/03817

fastener, this embodiment directly integrates cannula 22 into gas distribution arrangement 270, thereby decreasing the number of surfaces, grooves, and/or pockets available for possible bacterial contamination, and thus decreasing the opportunities for fermentation spoilage. Likewise, cannula 22, when integrated into a gas distribution arrangement 270 are optionally autoclaved with gas distribution arrangement 270, thereby eliminating the need to unfasten each cannula 22 separately before cleaning and sterilization. This convenience saves both time and money as well as adding to the uniformity of each batch. For example, the possibility for human error is minimized, because each cannula 22 does not have to be fastened individually before each fermentation run or unfastened individually prior to cleaning and sterilization. Also any non-uniformities in any one cannula 22 will be immediately apparent as an individual cannula 22 will be constantly associated with the same sample vessel in each run. Integrated cannula are shown in Figure 14.

Referring to Figure 3, gas, e.g., oxygen, is delivered from manifold 75 to all parts of distributor 55 through a hollow space 60 of distributor 55, thus oxygenating, if desired, the entire array of sample vessels 110. Oxygen and/or one or more other gases is delivered from distributor 55 through individual cannula 22, which is connected to distributor 55 by way of cannula assembly 80.

In one embodiment, cannula assembly 80 is comprised of a connector 45 on an inside face of distributor 55 as well as connector 40 on an outside face of distributor 55. Fastener 35 attaches individual cannula 22 to connector 40 on distributor 55. Arrows 25 depict oxygen and/or one or more other gases flowing from cannula 22 into fermentation medium 20 and producing gas bubbles 30. For example, gas source 85 is optionally coupled directly to dispensing plate 645 without the use of manifold 75, as illustrated in Figures 6 and 12. Likewise, cannula assembly 80 may be constructed by alternative methods. For example, as shown in Figure 12, cannula 22 is attached directly to dispensing plate 645.

In this manner, the exact mixture of gases delivered from gas source 85 is uniformly distributed to each individual cannula assembly 80. Any gas distribution arrangement is optionally employed that uniformly delivers oxygen, an oxygen containing mixture, or another gas or gas mixture capable of fermenting the sample, from gas source 85 into sample vessel 15.

Figures 6 and 12 illustrate another embodiment of a gas distribution arrangement. Gas distribution arrangement 270 is comprised of a dispensing plate 645 directly attached to an array of cannula 120, that is configured without a manifold, manifold

WO 02/063027

PCT/US02/03817

conduit, or manifold connector. In this embodiment, dispensing plate 645 is comprised of a bottom portion 646 and a top portion 647 (not shown). Inlet 630 delivers oxygen, an oxygen containing gas mixture, or another gas or gas mixture capable of fermenting the sample, to dispensing plate 645 from gas sources 85 (not shown).

Bottom portion 646 and top portion 647 are aligned and fastened together through apertures 640, e.g., to form an air-tight, liquid-tight seal. A hollow space exists between portions 646 and 645 through which gases are uniformly distributed to cannula array 120. Apertures 635 are used to fasten vertical supports to dispensing plate 645 that allow dispensing plate 645 to rest adjacent to array of sample vessels 110. Any suitable fastener may be used. In the illustrated example, screws connect upper portion 647 and bottom portion 646 to form dispensing plate 645. Screws also fasten aluminum legs to dispensing plate 645 as vertical supports.

Figures 9-11 illustrate yet another embodiment of a gas distribution arrangement. In this embodiment, cannula 22 is directly attached to bottom portion 646. Aperture 620 holds a dispensing tube 760 (not shown) for dispensing nutrients and other solutions into sample vessel 15. Aperture 620 is optionally used to access samples during the fermentation process, using, e.g., pipettes or syringes to draw samples or add nutrients, water, and/or the like into the sample vessels. Fastening groove 650 enables dispensing tube 760 to be fastened to dispensing plate 645. Indentation 655 and vertical edge 665 create a circular recess that helps immobilize sample vessel 15 within sample vessel area 625. Although in this embodiment, indentation 655 is circular and corresponds to the shape of sample vessel 15, other suitable shapes may be used.

Vent 610 is positioned on the circumference of sample vessel area 625 and allows gases and built up pressure to escape sample vessel 15. Referring to Figure 11, vent 610 creates venting space 675. Because vertical edge 670 is larger than vertical edge 665, venting space 675 occupies a deeper recess than recess 655. The difference in height between vertical edges 670 and 665 is equal to the height of vertical edge 680 and determines the depth of venting space 675. Other configurations of venting space 675 and recess 655 (and, accordingly, vertical edges 665, 670, and 680) may be constructed such that built-up pressure within sample vessel 15 can escape through venting space 675 without contaminating other sample vessels.

When the top surface of sample vessel 15 abuts surface 660, gases, liquids, emulsions, or excess pressure built up in sample vessel 15 may escape through recess 655 and

WO 02/063027

PCT/US02/03817

venting space 675. Cross-contamination of these escaping elements is significantly reduced because vertical edge 670 separates sample vessel 15 from an adjacent sample vessel 15. Moreover, gas flow from cannula 22 maintains a positive pressure within sample vessel 15 such that contaminants outside sample vessel 15 are not drawn in through venting space 675 into sample vessel 15 by way of recess 625, 655, or 675. Other vents 610 may be configured such that excess gases, liquids, emulsions, or excess pressure may escape through vent 610 without cross-contaminating other sample vessels 15.

In another embodiment of gas distribution arrangement 270, illustrated in Figure 2, array 110 is configured such that gas distribution arrangement 270 oxygenates, for example, each individual sample vessel 15 as opposed to utilizing a dispensing plate 645. Thus, array of sample vessels 110 is optionally oxygenated (or provided with other appropriate gas) collectively or individually by adjusting cannula assembly 80 for any individual sample vessel 15. For example, in one application, section A may be oxygenated (or provided with other appropriate gas) twice as long as section B.

In the illustrated example, cannula array 120 corresponds to sample vessel array 110, which is composed of individual sample vessels 15. Each individual sample vessel 15 also corresponds to an individual cannula assembly 80 which is connected to distributor 55. Oxygen and/or one or more other gases are delivered to distributor 55 through manifold connector 65. Oxygen and/or one or more other gases may be delivered through each cannula assembly 80, or selectively to certain assemblies 80. For example, cannula assemblies 80 in sections A and B may be utilized, while no gases flow to sections C and D.

Referring to Figures 3 and 12, gripping surface 17 allows for automated or manual transfer of sample vessel 15 to and from the fermentation apparatus or another processing station, e.g., upon conclusion of fermentation. In one embodiment, gripping surface 17 is magnetic such that a magnet attracts gripping surface 17 and transfers the sample vessel to another processing station. In another embodiment, a gripping mechanism grips the outer sides of the sample vessel to effect transfer. In yet another embodiment, gripping surface 17 is a lip at the top of the sample vessel. Other surfaces that may be gripped in order to transport the sample vessel to or from the fermentation processing station are within the scope of the present invention. For example, gripping surface 17 is optionally on the inside, outside, top or bottom of sample vessel 15. In other embodiments, the samples are held in place and transported with the aid of a gripper structure.

WO 02/063027

PCT/US02/03817

Figure 12 illustrates one embodiment of a gas distribution arrangement. Gas distribution arrangement 270 and cannula 22 are used together to provide gas to a sample vessel. In this example, oxygen, a mixture of oxygen and other gases, or another gas or gas mixture is introduced into dispensing plate 645 through inlet 630. Fasteners such as screws connect and align upper portion 647 to bottom portion 646 through apertures 640. Dispensing tube 760 and cannula 22 are directly attached to dispensing plate 645 and can be replaced by unfastening portions 646 and 647, replacing either or both dispensing tube 760 or cannula 22, and refastening portions 646 and 647. It is preferable for dispensing tube 760, cannula 22, inlet 630, and portions 646 and 647 to remain fastened together such that these elements are autoclaved as one unit. This allows for significant sterilization without the time and cost expense of dismantling arrangement 270 after each fermentation in order to separately sterilize each element.

In the illustrated example, a top surface of individual sample vessel 15 abuts directly onto surface 660 within sample vessel area 625. The top surface of sample vessel 15 is positioned within recess 655. Surface 660 preferably is not in contact with the entire circumference of the top surface of sample vessel 15. Also preferably, vent 610 is positioned adjacent to surface 660 such that a gap 672 exists between surface 660 and the vertical edge of sample vessel 15, thereby creating a passage for excess gases, emulsions, or pressure to escape from sample vessel 15 through venting space 675. Gas flow through cannula 22 provides sufficient pressure such that contaminants are not drawn into sample vessel 15 through venting space 675.

Example Fermentor # 2

Figures 13 -21 illustrate another embodiment of the fermentor apparatus of the present invention. Generally, the apparatus comprises a container frame comprising placement wells, and a gas distribution arrangement comprising a cannula array. Each piece is described in more detail below and by reference to the figures.

Container frame 1300, as shown in Figure 13, comprises bottom 1310 and top portion 1320 connected by side portions 1325 and 1330. The container is easily transportable, e.g., by grasping handles 1335 and 1340 which are attached to sides 1325 and 1330. Each side 1325 and 1330 has two grooves 1345 which can each receive a pin for securing a gas distribution arrangement, such as that shown in Figure 16, e.g., using pins 1480. Top portion 1320 and bottom portion 1310 together form an array of placement wells

WO 02/063027

PCT/US02/03817

1350. Bottom portion 1310 of the container frame has a plurality of indentations that serve as bottoms for the placement wells, in which sample vessels are placed. For example, container frame 1300 comprises an 8 by 12 array of placement wells. Top portion 1320 comprises a matching array of holes 1360 which holes receive the sample vessels into the container frame and hold them in position within the container frame. Together holes 1360 and indentations 1355 in container frame 1300 form a rack for holding a plurality of sample vessels, e.g., tubes. Although holes 1360 are shown as circles, the shape is optionally configured to receive any desired sample vessel.

Figure 14 illustrates a gas distribution arrangement coupled to container frame 1300. The gas distribution arrangement comprises four pins 1480 which slide into grooves 1345 to hold the gas distribution arrangement in place over the container frame. As shown in Figure 14, the gas distribution arrangement comprises first plate 1465 and second plate 1470, which are typically fastened together, e.g., using screws or pins. An optional lid, e.g., lid 1460, is also shown. In addition, the gas distribution arrangement comprises handles 1410 and 1420 attached to second plate 1470 for easy positioning and removal of the gas distribution arrangement.

Inlets 1430 and 1440 provide gas inlets to the gas distribution arrangement, which gas inlets typically receive gas from a gas source and deliver it, e.g., to a plurality of cannulas. Typically, the plurality of cannulas is attached to the gas distribution arrangement, e.g., as part of the first plate. For example, in the illustrated embodiment, cannula 1450 is part of first plate 1465 and extends from the top of the first plate, through the first plate and below, such that the cannula is positionable inside a placement well, e.g., well 1350, or inside a sample vessel positioned within placement well 1350.

Typically, first plate 1465 comprises the cannula array and a plurality of apertures. The apertures of the first plate align with a set of apertures on the second plate to provide access to the sample vessels within the placement wells. The cannula array is optionally molded as part of the first plate or separately formed and then attached to the first plate. For example, an additional set of apertures is optionally present in the first plate to accept the array of cannula, e.g., which are received into the aperture and secured using o-rings.

Figure 18 illustrates the bottom surface of first plate 1465. For example, on the bottom surface of the first plate, an array of sample vessel areas 1810 or indentations are used to cap the sample vessels and provide venting space as described above in Example 1.

WO 02/063027

PCT/US02/03817

Each sample vessel area comprises an aperture to provide access to the sample vessel positioned with the associated placement well, a cannula associated with each placement well for delivering gas into each sample vessel positioned within the well, and a vent for relieving pressure build up during fermentation. In addition, Figure 18 illustrates apertures 1830 and 1840, which are used, e.g., to attach the second plate to the first plate, e.g., via a set of screws. Figure 19 provides a detail drawing of a portion of Figure 18 illustrating aperture 1920, vent 1930, and cannula 1940. In addition, Figure 19 illustrates gasket or o-ring 1950 that serves to provide a seal between the first and second plates.

Second plate 1470 typically comprises a set of apertures as described above, which correspond to the set of apertures in plate 1465. These apertures are used, e.g., for liquid dispensing and/or venting. The apertures in the two plates connect to form a passageway that extends through both plates for access to placement wells 1350. The apertures are closed off from the interior space and can be capped using a lid as shown in Figure 14 when a sealed system is desired. In addition, second plate 1470 typically comprises the gas inlet, e.g., inlet 1430, and an interior space through which gas is flowed. Figure 21 provides a side view of the gas distribution arrangement as shown in Figure 14. For example, Figure 21 shows cannulas 1450 extending below the first plate into the placement wells and apertures 1920 extending through the first plate and the second plate.

Figure 20 illustrates a cross-sectional view of the gas distribution arrangement of Figure 14, which comprises a first and a second plate. Top plate 1470 is attached to bottom plate 1465, e.g., using screws positioned through apertures 1830, and 1840. The first plate, which is on the bottom, comprises apertures 2010 and cannulas 2020. The apertures are open holes in first plate 1465, which align with similar apertures in second plate 1470, the top plate. The cannulas are inserted into the first plate through another set of apertures secured with O-rings, e.g., to form a seal between the top and bottom plates. The cannulas extend from the top surface of plate 1475 into placement wells 1350 such that they are easily positioned in an array of sample vessels held in the placement wells. Cannula 2020 does not extend into plate 1470, but abuts it. Adjacent to where cannula 2020 abuts plate 1470 is venting space 2030 which couples the cannula to interior space 2040 of the top plate through which interior space gas flows in through an inlet, e.g., inlet 1430.

Figure 15 illustrates a container frame with a liquid addition manifold assembly coupled to it. Container frame 1300 is shown with first plate 1465 positioned on top using pins 1480. Second plate 1470 is positioned on top of the first plate and liquid

WO 02/063027

PCT/US02/03817

addition manifold **1510** is shown on top of the second plate of the gas distribution system. The liquid addition manifold is optionally used to add liquid into the sample vessels, e.g., through corresponding sets of apertures in the first and second plate. Figure 16 illustrates liquid addition manifold **1510** in more detail, e.g., apertures **1620**, which align with apertures on the first and second plates of the gas distribution arrangement. Apertures **1620** are used to deliver liquid reagents into the sample vessels contained in the apparatus. Manifold **1510** is placed, e.g., using pins, on top of the gas distribution system. In addition, Figure 17, a cross-sectional view of the liquid addition manifold along line A-A, illustrates how pipettes or additional cannulas are used to dispense liquid into the sample vessels.

Example System 3- an automated system

Figure 7 illustrates an example of an automated fermentation apparatus. Process controller **705** monitors and controls various components of apparatus **700** and preferably is a programmable computer with an operator interface. Alternatively, process controller **705** is any suitable processor that coordinates multiple components of apparatus **700**, such as timing mechanisms, adding solutions, adjusting temperature, adjusting gas flow rates and gas mixtures, detecting measurements, and/or sending an alarm or notification prompting operator intervention. Electronic couples **710**, **755**, and **795** connect various components of fermentation apparatus **700** to process controller **705**. For example electronic couple **710** enables controller **705** to start, stop, and monitor solution flow from feed solutions **720**, **735**, and **745**. Likewise, electronic couple **775** enables controller **705** to start, stop and monitor reagent dispensing into sample vessels **15**. Electronic couple **795** also enables controller **705** to transmit and receive information from sensors **790** as well as monitor and adjust temperature controlled areas. Other coupling devices are also optionally used in the present invention.

In one embodiment of fermentation apparatus **700**, feed solutions **720**, **735**, and **745** are pumped (either singly, in combination, sequentially, or collectively) from individual feed tubes **725** into dispensing tube **715**. Selecting the appropriate solenoid determines which feed solution is pumped through dispensing tube **715**. For example, solenoid **730** controls flow from feed solution **720** through feed tube **725**. In another application, a mixture of feed solutions **720** and **735** are simultaneously pumped into dispensing tube **715**. In another application, feed solution **720** is fed into dispensing tube first, followed by an incubation period (directed by controller **705**), followed by feed solution

WO 02/063027

PCT/US02/03817

735 being pumped into dispensing tube 715. Different combinations of feed solutions are optionally used and more or fewer feed solutions may be used with apparatus 700 according to any desired application.

Using pump 710, which is optionally a peristaltic pump, dispensing tube 715 transfers feed solution to an individual dispensing tube 760. Each individual dispensing tube 760 corresponds to an individual sample vessel 15 and tube 760 is positioned such that feed solution 720, for example, is transferred volumetrically from dispensing tube 760 into its corresponding sample vessel 15 once solenoid 765 is opened. Each solenoid 765 corresponds to an individual sample vessel 15. Volumetric dispensing of feed solutions is controlled by process controller 705 which preferably controls the amount, the rate and the time of dispensing. Dispensing tube 760 is optionally composed of plastic, metal, or any material that is non-reactive to the feed solution being dispensed.

In one embodiment, delivery solenoids 765 work in conjunction with pump 710 and controller 705 to deliver multiple feed solutions such as feed solutions 720, 735, and 745 into individual sample vessels 15. Each solenoid 765 corresponds to a sample vessel 15 and the solenoids 765 are manifolded together and fed by the output of a single peristaltic pump 710. Each solenoid 765 preferably opens sequentially in order to dispense a volumetric amount of feed solution 720. However, parallel addition is also contemplated within the present invention.

In one embodiment, feed solution 720 introduces nutrients into fermentation medium 20 through dispensing tube 715 using pump 710 and solenoid 765 to deliver solution 720 to individual dispensing tube 760. After addition of feed solution 720, solenoid 730 is closed and solenoid 740 corresponding to rinse solution 745 opens. Pump 710 delivers rinse solution 745 through dispensing tube 715, thereby rinsing dispensing tube 715 with solution 745, which is then flushed into waste container 785. Solenoid 780 controls flow from dispensing tube 715 into waste container 785. Feed solution 735 is then pumped through dispensing tube 715 and dispensed through tube 760. Dispensing tube 715 is rinsed again with rinse solution 745 before another addition. Solenoids 765 are preferably located very near to dispensing tube 760 in order to minimize dead volume downstream. In this way, dispensing tube 715 accurately delivers a known amount of feed solution 720 and 735 without cross contaminating or fouling the next or different addition of feed solution through dispensing tube 715. Accordingly, each addition is volumetrically precise with a minimal, known amount of feed solution from a previous addition diluting the next addition. In this

WO 02/063027

PCT/US02/03817

way, feed solutions such as additional nutrients, trace minerals, vitamins, sugars, carbohydrates, nitrogen containing compounds, evaporating liquids, pH balancing compounds, buffers, and other liquids may be added to fermentation media 20 in an automated, yet highly precise manner.

Coordinated by process controller 705, various components may be activated either at pre-determined time intervals or in response to the measurement of some physical property within sample vessel 15. For example, in one embodiment, an operator programs process controller 705 to incubate sample vessels 15 for a pre-determined time period at a particular temperature, add a desired amount of feed solution 720, and incubate further for another pre-determined time period at a different temperature. Any suitable combination of fermentation conditions may be programmed into process controller 705, which optionally comprises a computer, computer network, other data input module, or the like.

In a preferred embodiment, process controller 705 coordinates temperature control, the addition of feed solutions, adjustment of gas rates and gas mixtures, incubation periods, and rinsing in response to data received from sensors 790. Sensors 790 are optionally located inside or outside of individual sample vessels 15. Sensors 790 can detect color changes spectrophotometrically, monitor evaporation rates, measure changes in optical density, detect light changes photometrically, detect pH changes, electrolytically measure redox potentials, monitor temperature fluctuations, or detect other physical changes and transmit this data to process controller 705. In response, process controller 705 accordingly adjusts various components of apparatus 700. For example, by measuring the redox potential, sensors 790 detect when a fermentation sample is being over-oxygenated or over-provided with another gas and process controller 705 accordingly adjusts the gas flow or gas mixture ratio. As another example, process controller 705 can respond to a change in pH, as detected by sensors 790, by adding a pH buffer from feed solution 720. In one embodiment, maximum protein expression may be detected by monitoring light emission, at which point fermentation is halted to minimize wasting fermentation resources after optimum fermentation yield has been reached.

Because of the uniformity of each fermentation medium 20, cannula 22, and dispensing of feed solutions 720, very few, for example, one, sensor 790 is all that is necessary to monitor the entire array of sample vessels 110. Alternatively, when sample vessels 15 contain different fermentation media 20 or undergo different fermentation conditions, numerous sensors 790 are optionally employed.

WO 02/063027

PCT/US02/03817

The above automated process is optionally used in conjunction with any fermentor apparatus or method to known to those of skill in the art. In particular, it is useful when practicing fermentation using the fermentors presented herein. However, it is noted that the examples presented herein are provided for purposes of illustration and not of limitation. While the foregoing invention has been described in some detail for purposes of clarity and understanding, it will be clear to one skilled in the art from a reading of this disclosure that various changes in form and detail can be made without departing from the true scope of the invention. For example, all the techniques and apparatus described above may be used in various combinations and other uses for the present invention are also contemplated. It is also noted that equivalents for the particular embodiments discussed in this description may be used in the invention as well.

All publications, patents, patent applications, or other documents cited in this application are incorporated by reference in their entirety for all purposes to the same extent as if each individual publication, patent, patent application, or other document were individually indicated to be incorporated by reference for all purposes.

WO 02/063027

PCT/US02/03817

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A fermentation apparatus comprising:
 - (a) a container frame configured to contain a plurality of sample vessels; and,
 - (b) a gas distribution arrangement that is configured to provide gas to a plurality of sample vessels when the sample vessels are positioned in the container frame.
2. The fermentation apparatus of claim 1, wherein the gas distribution arrangement comprises a gas inlet configured to deliver gas to a plurality of cannulas, which cannulas are configured to provide gas to the sample vessels when the sample vessels are positioned in the container frame.
3. The fermentation apparatus of claim 1, wherein the gas distribution arrangement comprises:
 - (a) a dispensing plate that comprises a top portion and a bottom portion, wherein the bottom portion and the top portion are joined together such that a hollow space exists between the top portion and the bottom portion;
 - (b) an array of sample vessel areas located in a bottom surface of the bottom portion, which sample vessel areas each comprise a recess and are positioned to correspond to an array of sample vessels;
 - (c) an array of cannulas that are in fluid communication with the hollow space and protrude from a bottom surface of the dispensing plate through the sample vessel areas; and
 - (d) a gas inlet in fluid communication with the hollow space for delivering gas into a plurality of sample vessels via the cannulas during fermentation.
4. The fermentation apparatus of claim 3, wherein each of the cannulas comprises a plurality of passages.
5. The fermentation apparatus of claim 4, wherein each of the cannulas comprises at least three passages.
6. The fermentation apparatus of claim 3, wherein the gas distribution arrangement is configured to allow delivery of one or more reagent to the sample vessels.

WO 02/063027

PCT/US02/03817

7. The fermentation apparatus of claim 1, wherein the container frame is configured to contain an array of sample vessels.
8. The fermentation apparatus of claim 7, wherein the container frame is configured to contain an 8 by 12 array of sample vessels.
9. The fermentation apparatus of claim 7, wherein the container frame is configured to contain at least 96 sample vessels.
10. The fermentation apparatus of claim 9, wherein the container frame is configured to contain 96, 384, or 1536 sample vessels.
11. The fermentation apparatus of claim 1, wherein the container frame is transportable.
12. The fermentation apparatus of claim 11, wherein the container frame is configured for transport to a post-fermentation processing station.
13. The fermentation apparatus of claim 1, wherein the container frame is configured for placement within a temperature controlled area, wherein a temperature controller is coupled to the container frame and/or to the plurality of sample vessels.
14. The fermentation apparatus of claim 13, wherein the temperature controlled area comprises a water bath or a temperature controlled room.
15. The fermentation apparatus of claim 1, wherein the container frame is autoclavable.
16. The fermentation apparatus of claim 1, wherein the container frame and the gas distribution arrangement are autoclavable.
17. The fermentation apparatus of claim 1, further comprising a plurality of sample vessels.
18. The fermentation apparatus of claim 17, wherein each of the sample vessels has a volume of 50 to 100 ml.

WO 02/063027

PCT/US02/03817

19. The fermentation apparatus of claim 17, wherein each sample vessel comprises a sample.
20. The fermentation apparatus of claim 19, wherein each sample is 80 mls or less.
21. The fermentation apparatus of claim 19, wherein the samples each have substantially the same composition.
22. The fermentation apparatus of claim 19, wherein the samples each have a different composition.
23. The fermentation apparatus of claim 17, wherein the sample vessels comprise glass, plastic, metal, polycarbonate, and/or ceramic.
24. The fermentation apparatus of claim 17, wherein one or more of the sample vessels comprises a vent.
25. The fermentation apparatus of claim 17, further comprising a sensor in contact with one or more of the samples in the sample vessels.
26. The fermentation apparatus of claim 1, wherein the gas distribution arrangement comprises a gas source which gas source provides oxygen or a mixture of oxygen and at least one other gas to each sample vessel during operation of the apparatus.
27. The fermentation apparatus of claim 1, further comprising a process controller operably coupled to the gas distribution arrangement.
28. The fermentation apparatus of claim 1, further comprising a dispenser for dispensing one or more reagents into the plurality of sample vessels.
29. The fermentation apparatus of claim 28, wherein the dispenser is configured to dispense the reagents into the plurality of sample vessels via a plurality of apertures that correspond to the sample vessels.
30. A fermentor head for multiple sample fermentation, the fermentor head comprising:

WO 02/063027

PCT/US02/03817

- (a) a dispensing plate that comprises a top portion and a bottom portion, wherein the bottom portion and the top portion are joined together such that a hollow space exists between the top portion and the bottom portion;
- (b) an array of sample vessel areas located in a bottom surface of the bottom portion, which sample vessel areas each comprise a recess and are positioned to correspond to an array of sample vessels;
- (c) an array of cannulas that are in fluid communication with the hollow space and protrude from a bottom surface of the dispensing plate through the sample vessel areas; and
- (e) a gas inlet in fluid communication with the hollow space for delivering gas into a plurality of sample vessels via the cannulas during fermentation.

31. The fermentor head of claim 30, wherein the dispensing plate further comprises an array of apertures for accessing samples during fermentation.

32. The fermentor head of claim 30, wherein the array of cannulas comprises an 8 by 12 array.

33. The fermentor head of claim 30, wherein the array of cannulas comprises at least 96 cannulas.

34. The fermentor head of claim 33, wherein the array of cannulas comprises 96, 384, or 1536 cannulas.

35. The fermentor head of claim 30, wherein the cannulas extend 15 to 16 centimeters below the bottom surface of the first plate.

36. The fermentor head of claim 30, wherein the sample vessels have a volume of 50 to 200 ml.

37. The fermentor head of claim 30, wherein the sample vessels have a volume of 50 to 100 ml.

38. The fermentor head of claim 30, wherein the cannulas deliver gas adjacent to a bottom of the sample vessels.

WO 02/063027

PCT/US02/03817

39. The fermentor head of claim 30, wherein the gas inlet delivers oxygen or nitrogen into the interior space of the second plate, thereby providing oxygen or nitrogen to the sample vessels via the cannulas during fermentation.

40. The fermentor head of claim 30, wherein each of the cannula comprises at least three passages.

41. The fermentor head of claim 30, wherein the cannulas are adapted to deliver gas, deliver fluid, or aspirate fluid from the sample vessels during fermentation.

42. A method of fermenting a plurality of samples, the method comprising:

- (a) providing a plurality of sample vessels in a container frame, wherein each of the sample vessels contains a sample;
- (b) fermenting the samples in the plurality of sample vessels, which fermenting comprises simultaneously delivering gas to each of the sample vessels via a plurality of cannulas associated with the sample vessels.

43. The method of claim 42, wherein each sample has a volume of less than 100 ml.

44. The method of claim 42, further comprising pre-processing or post-processing the samples in the sample vessels.

45. The method of claim 44, wherein the pre-processing or post-processing is performed in a different location than step (b).

46. The method according to claim 44, wherein the pre-processing and/or post-processing are performed robotically.

47. The method according to claim 44, wherein the pre-processing and/or post-processing comprises centrifugation, aspiration, or dispensing of one or more reagent.

48. The method of claim 42, wherein delivering gas comprises delivering oxygen, air, and/or, nitrogen to the samples.

49. The method of claim 42, wherein delivering gas comprises delivering air and oxygen to the samples over a period of time, during which period of time, the ratio of air to oxygen changes.

WO 02/063027

PCT/US02/03817

50. The method of claim 49, wherein the ratio changes linearly over time or in a stepwise manner over time.
51. The method of claim 42, further comprising configuring the sample vessels into a rectangular array, a honeycomb array, or a linear array within the container frame.
52. The method of claim 42, further comprising transferring the sample vessels into a centrifuge rotor.
53. The method according to claim 42, further comprising detecting one or more fermentation conditions with a sensor coupled to one or more sample vessels and adjusting the fermentation conditions in the sample vessels.
54. The method according to claim 53, comprising detecting and adjusting at pre-determined time intervals.
55. The method according to claim 53, wherein the adjusting the fermentation conditions comprises adding a feed solution to the sample vessels.
56. The method according to claim 53, wherein the detecting comprises: measuring a pH of one of the samples; measuring a redox potential of one of the samples; measuring an optical density of one of the samples; and/or measuring a light emission from one of the samples.
57. The method of claim 42, further comprising autoclaving the sample vessels in the container frame.
58. The method of claim 57, further comprising autoclaving the plurality of cannulas simultaneously with the sample vessels in the container frame.
59. A method of fermenting a plurality of samples, the method comprising:
- (a) positioning a plurality of sample vessels into a transportable container frame, which container frame maintains the sample vessels in an array;
 - (b) placing the plurality of samples into the plurality of sample vessels;
 - (c) attaching a fermentor head to the container frame, which fermentor head comprises an array of cannulas, wherein the array of cannulas corresponds to the array of sample vessels and is inserted into the sample vessels;

WO 02/063027

PCT/US02/03817

- (d) fermenting the samples in the sample vessels, which fermenting comprising simultaneously delivering a gas to the samples via the array of cannulas.
60. The method of claim 59, wherein step (c) is performed prior to step (b).
61. The method of claim 59, wherein step (b) is performed prior to step (a).
62. The method of claim 59, wherein delivering a gas comprising delivering oxygen, nitrogen, and/or air to the sample vessels during step (d).
63. The method of claim 59, wherein step (d) is an anaerobic fermentation comprising delivering an inert gas to maintain anaerobic fermentation conditions in the sample vessels.
64. The method of claim 59, wherein the sample vessels each have a volume between 50 and 200 ml.
65. The method of claim 59, wherein the sample vessels have a volume between 80 and 100 ml.
66. The method of claim 59, wherein each sample has a volume less than 200 ml.
67. The method of claim 59, wherein each sample has a volume of less than 100 ml.
68. The method of claim 69, comprising robotically transporting the sample vessels in the container frame.
69. The method of claim 59, further comprising simultaneously transporting the plurality of sample vessels in the container frame to a processing station.
70. The method of claim 69, wherein the processing station comprises a centrifuge, an aspirator, and/or a dispenser.
71. The method of claim 70, wherein the sample container is compatible with the centrifuge.
72. The method of claim 70, wherein the sample vessels are compatible with the centrifuge.

WO 02/063027

PCT/US02/03817

73. The method of claim 70, further comprising removing the sample vessels from the container frame and introducing the sample vessels into the centrifuge.

74. The method of claim 70, wherein the aspirator comprises an aspirator head which corresponds to the array of sample vessels within the container frame, the method further including operably attaching the aspirator head to the sample vessels and simultaneously aspirating the samples within the sample vessels.

75. The method of claim 70, the method further dispensing one or more materials into the sample vessels.

76. The method of claim 70, wherein the dispenser comprises a dispensing head corresponding to the array of sample vessels, the method further including operably attaching the dispenser head to the sample vessels and simultaneously dispensing one or more materials into the sample vessels.

77. The method of claim 59, wherein the array comprises an 8 by 12 array.

78. The method of claim 59, wherein the array comprises 96, 384, or 1536 sample vessels.

79. The method of claim 59, further comprising positioning the sample vessels in the container frame in a water bath during the fermenting step in order to control the fermentation temperature.

80. A method of processing a plurality of fermentation samples, the method comprising:

- (a) fermenting a plurality of fermentation samples in a plurality of sample vessels, resulting in a plurality of fermented samples;
- (b) robotically transporting the sample vessels containing the fermented samples to a centrifuge head; and
- (c) centrifuging the fermented samples in the same sample vessels in which the fermentation was performed.

81. The method of claim 80, the method further including isolating a supernatant from the sample vessels after centrifuging the fermentation samples.

WO 02/063027

PCT/US02/03817

82. The method of claim 80, wherein at least 4 sample vessels are robotically transported to the centrifuge head at the same time.

83. The method of claim 80, wherein at least 10 sample vessels are robotically transported to the centrifuge head at the same time.

84. The method of claim 80, wherein each sample vessel contains less than 100 mL of fermentation sample.

85. The method of claim 80, wherein the plurality of sample vessels are held in an 8 by 12 array.

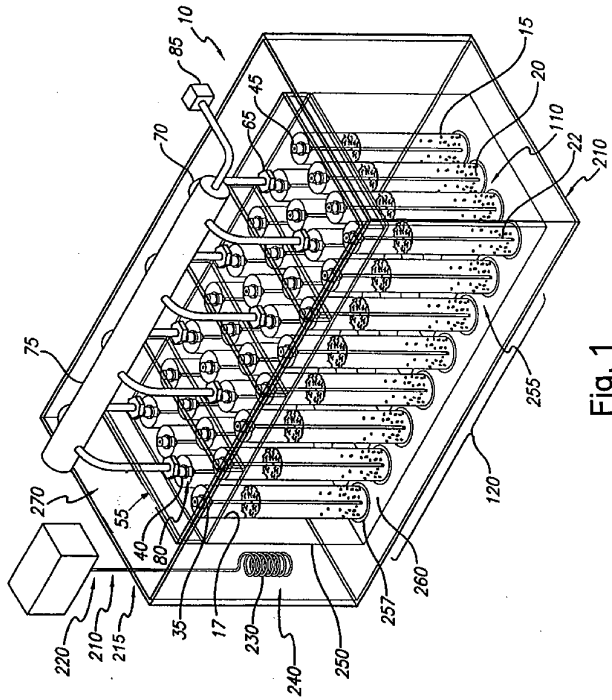


Fig. 1

2/17

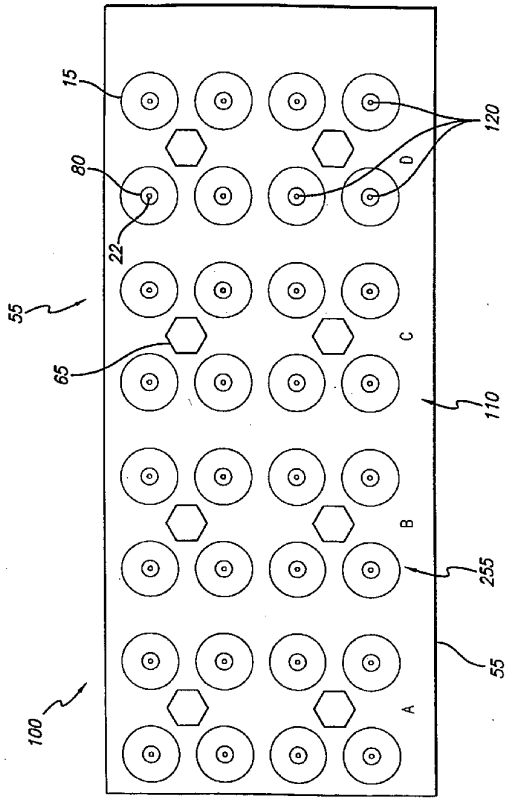
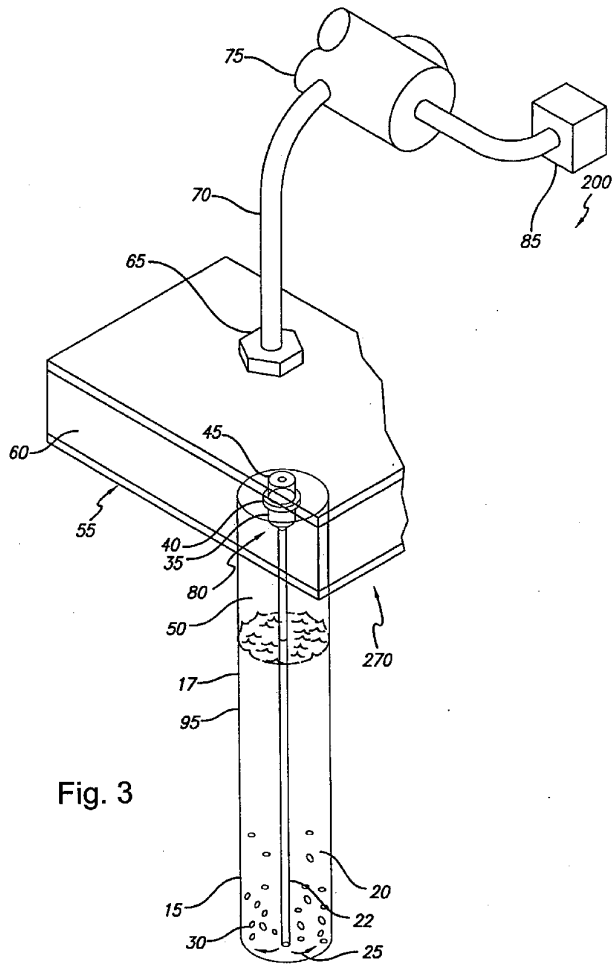


Fig. 2

WO 02/063027

PCT/US02/03817

3/17



WO 02/063027

PCT/US02/03817

4/17

300

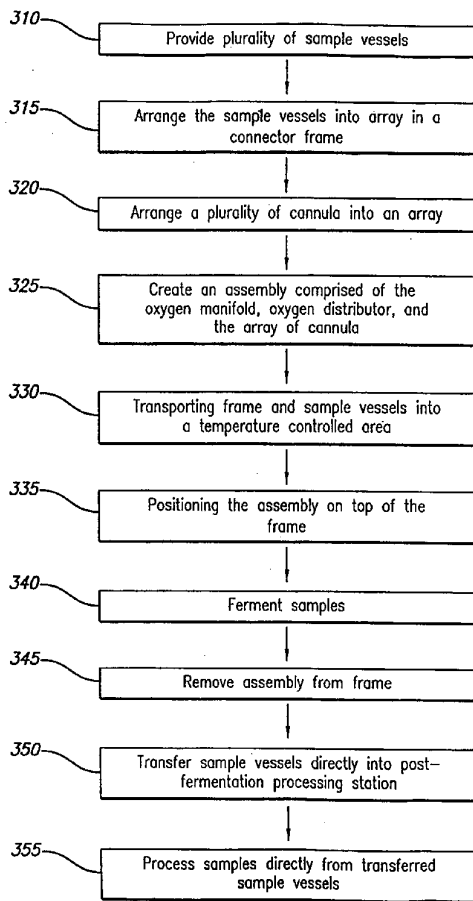


Fig. 4

WO 02/063027

PCT/US02/03817

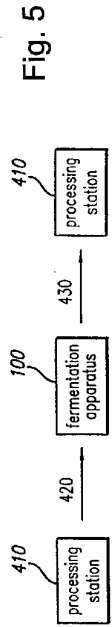


Fig. 5

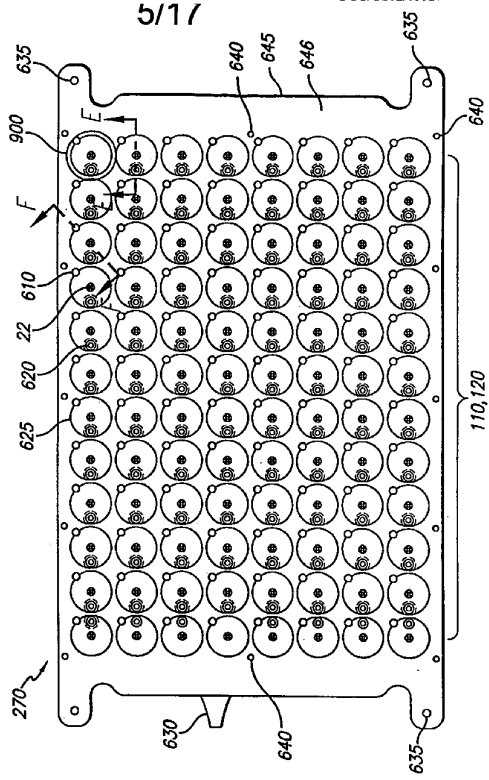


Fig. 6

WO 02/063027

6/17

PCT/US02/03817

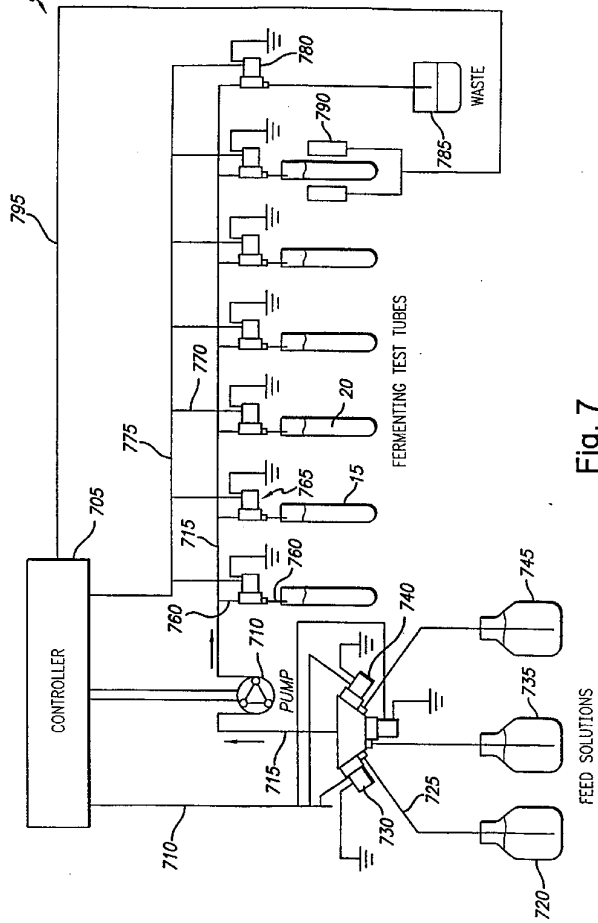
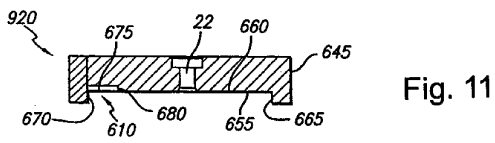
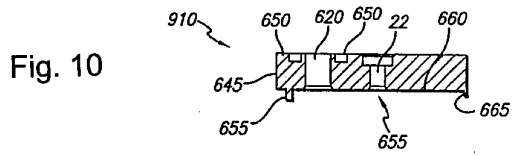
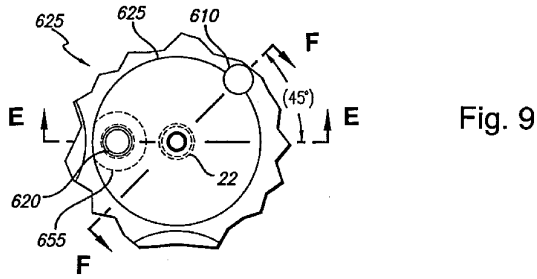
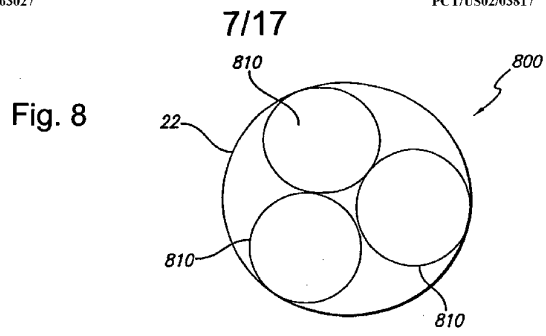


Fig. 7

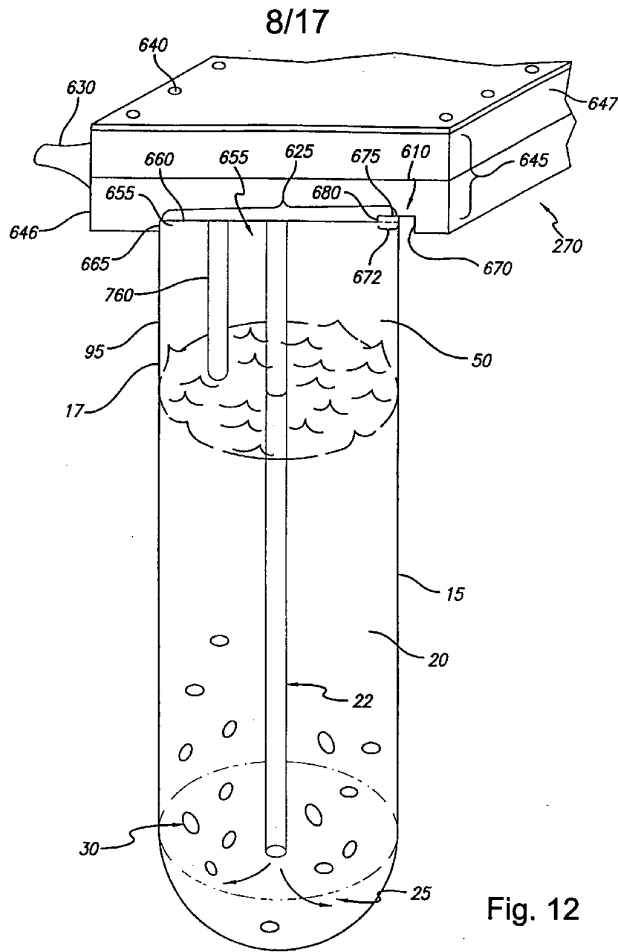
WO 02/063027

PCT/US02/03817



WO 02/063027

PCT/US02/03817



10/17

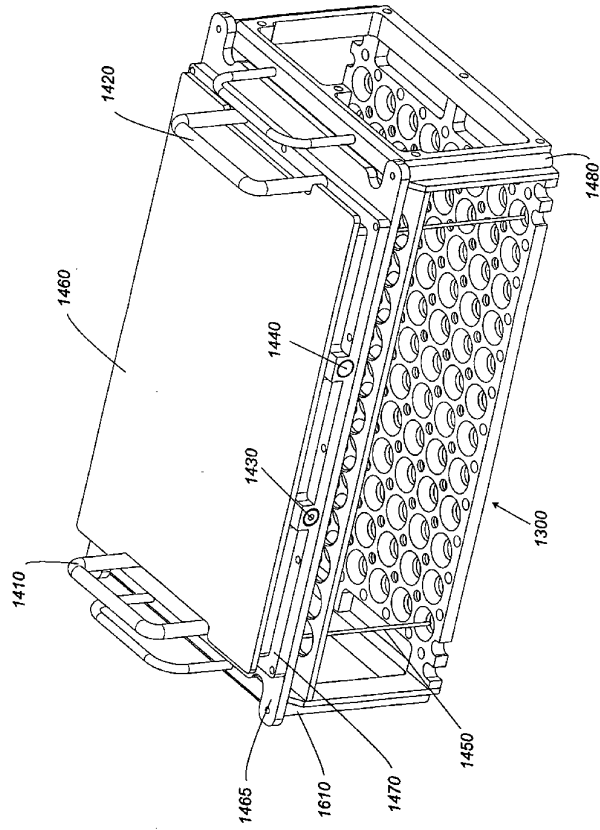


Fig. 14

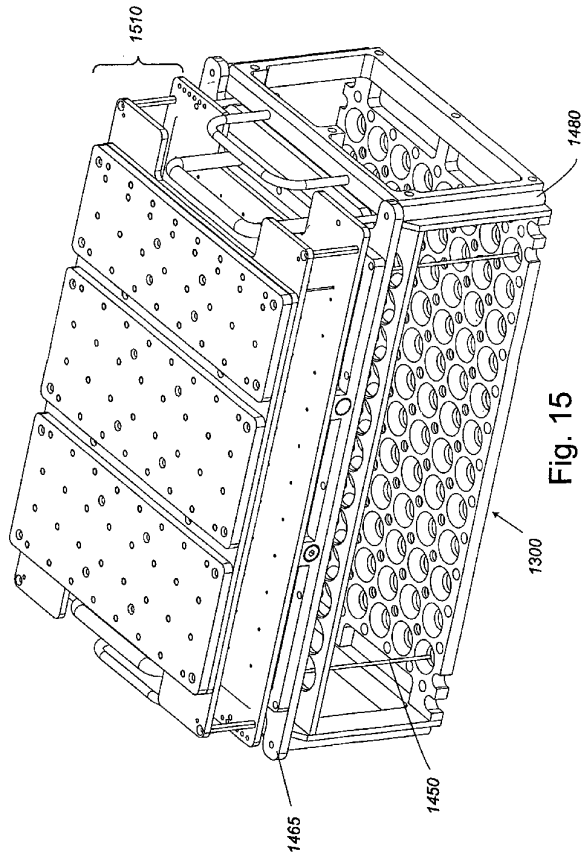


Fig. 15

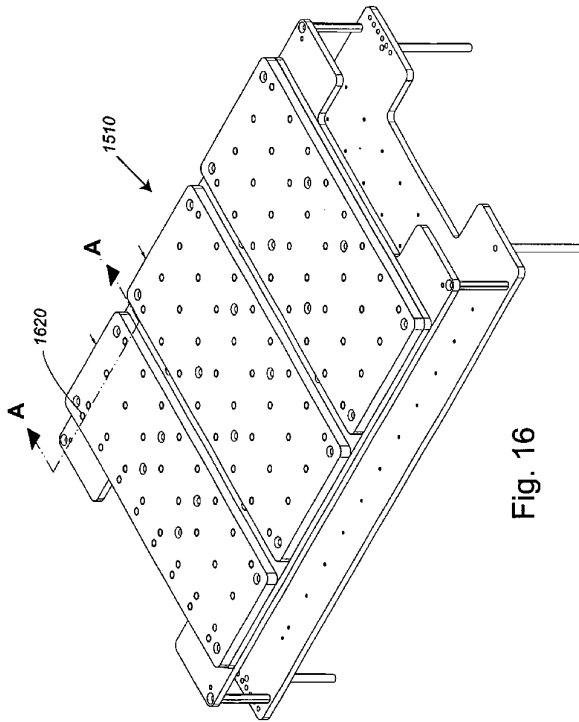


Fig. 16

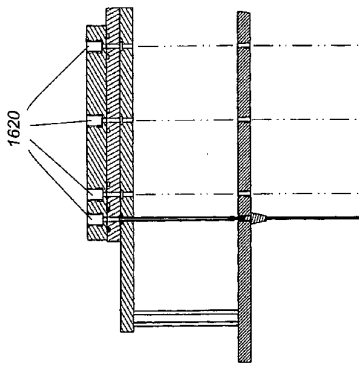


Fig. 17

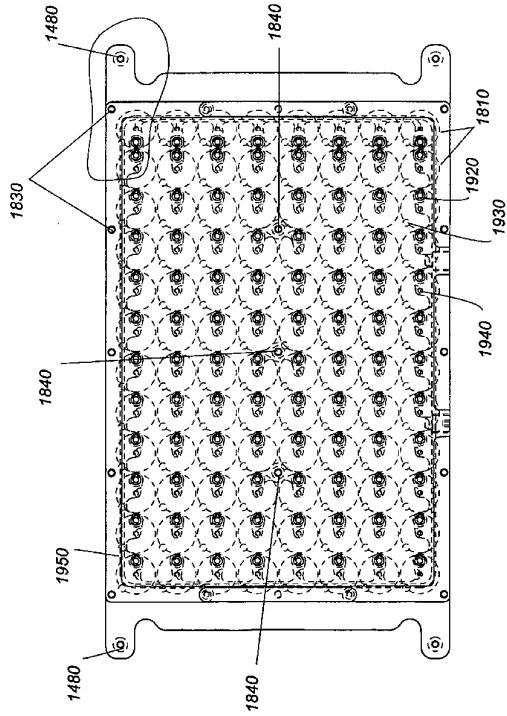


Fig. 18

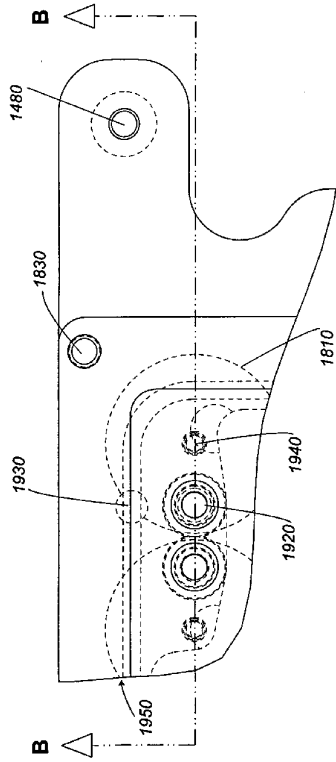


Fig. 19

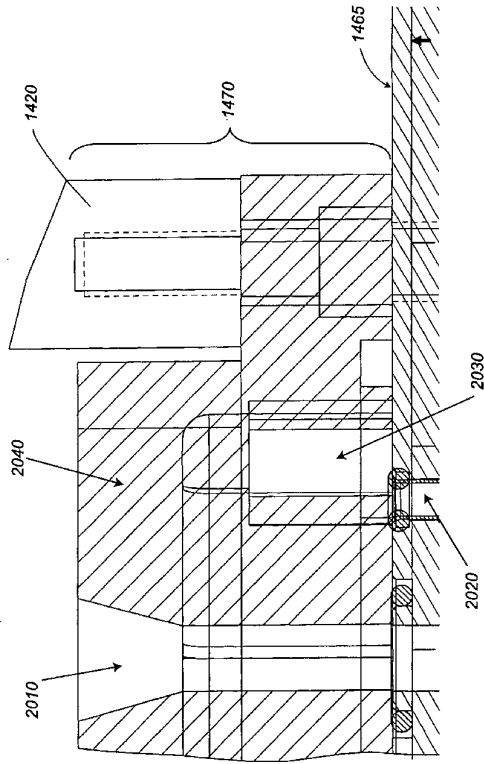


Fig. 20

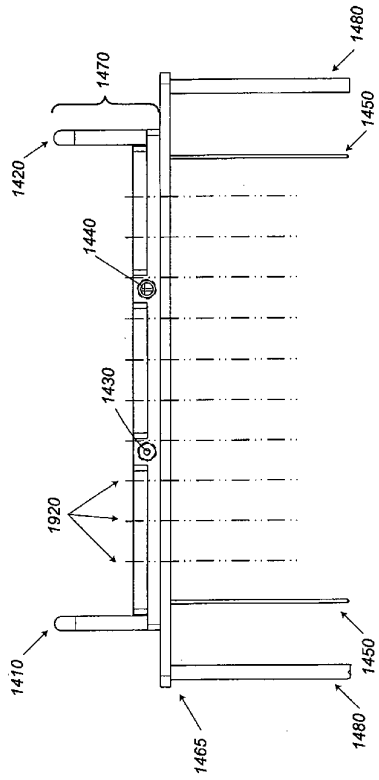


Fig. 21

【 国際調査報告 】

International Patent Classification: C12P 1/00
C12M 3/00, 3/04, B251 5/00, 11/00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/03817

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C12P 1/00; C12M 3/00, 3/04; B251 5/00, 11/00
US CL : 435/41, 289.1, 294.1, 299.2, 300.1, 304.1, 305.2, 305.3; 901/1, 6
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 435/41, 289.1, 294.1, 299.2, 300.1, 304.1, 305.2, 305.3

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
USPT, PCPB, JPAB, EPAB, DWPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 3,843,809 A (LUCCK) 22 October 1974, see entire document.	1-68
Y	US 5,864,395 A (Laurberg) 26 January 1999, see entire document.	69-85
Y	US 6,008,010 A (Greenberger et al.) 28 December 1999, see entire document.	1-85

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

* Special categories of cited documents:
 A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 E earlier application or patent published on or after the international filing date
 L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search: 18 April 2002 (18.04.2002)
 Date of mailing of the international search report: 14 JUN 2002

Name and mailing address of the ISA/US
 Commissioner of Patents and Trademarks
 Box PCT
 Washington, D.C. 20531
 Facsimile No. (703)305-3230
 Authorized officer: DR. Kailash C. Srivastava
 Telephone No. (703)-308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

パイレックス

(72) 発明者 ジェイムズ・ケヴィン・メインクイスト

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 3 0 サン ディエゴ アイダ ストリート 1 2
6 9 5

(72) 発明者 ダニエル・テレンス・マクマラン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 3 1 サン ディエゴ カミニート ピタヤ 1 0 2
3 7

(72) 発明者 アンドリュー・ジェー．．メーヤー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 0 9 サン ディエゴ 1 / 2 ハイネス ストリート 3 8 7 6

(72) 発明者 マーク・ナソッフ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 3 1 サン ディエゴ ミラ ラゴ ウェイ 1 1 7
3 4

Fターム(参考) 4B029 AA02 BB01 DB17 DF10

4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X BC01 BC05 CA60