



Biotechnologia komórkowych kultur owadzych

Anna Olejnik, Włodzimierz Grajek

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

Biotechnology of insect cell tissue culture

Summary

The commercial exploitation of the baculovirus expression system for heterologous protein or biopesticides production requires an efficient large-scale cultivation method. This review summarized recent developments concerning the scale-up of insect cell culture and baculovirus gene expression. We described novel bioreactor systems (stirred tank bioreactor, bioreactor air-lift and cell-lift, membrane bioreactor), culture modes (batch, fed-batch, continuous) and different strategies used for cell cultivation and baculovirus replication.

Key words:

insect cell culture, baculovirus, bioreactor, scale-up.

1. Wstęp

W ostatnich latach zanotowano wzrastające zainteresowanie kulturami komórkowymi owadów. Szacuje się, że hodowle komórek owadzych prowadzone są przez co najmniej 2000 laboratoriów na całym świecie (1). W badaniach wykorzystywanych jest ponad 400 ciągłych linii komórkowych pochodzących od około stu gatunków owadów. Duża popularność kultur owadzych związana jest z ich wykorzystaniem do replikacji bakulowirusów stosowanych jako bioinsektycydy lub wektory ekspresyjne.

Duża wrażliwość komórek owadzych na stresowe czynniki środowiskowe oraz ich wysokie wymagania żywieniowe stanowią poważną trudność w powiększaniu skali hodowli. Odmienne

Adres do korespondencji

Anna Olejnik,
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Akademia Rolnicza
im. Augusta
Cieszkowskiego,
ul. Wojska Polskiego 48,
60-623 Poznań.

warunki hodowli panujące w kolejnych etapach powiększania skali stanowią o konieczności adaptacji i optymalizacji wzrostu kultury w każdym naczyniu hodowlanym o zróżnicowanej objętości. Wyniki uzyskane we wstępnych badaniach optymalizacyjnych, prowadzonych w skali laboratoryjnej, ułatwiają wybór odpowiedniej konstrukcji bioreaktora oraz najbardziej efektywnej metody produkcji biopreparatu. Współczesna biotechnologia umożliwia prowadzenie hodowli komórek zwierzęcych w skali dochodzącej do 10 tys. litrów. Należy jednak podkreślić, że dotychczas przeważała tendencja do stosowania bioreaktorów małych, o objętości nie przekraczającej 2-3 tys. litrów. Wynikało to z wysokich kosztów pożywek i obaw o ponoszenie zbyt dużych strat w przypadku zakażeń, a także trudności technologicznych związanych z utrzymaniem odpowiedniej gęstości komórek oraz właściwym napowietrzeniem pożywki przy ograniczonym stresie mechanicznym. Stąd większość wytwórni biotechnologicznych wyposażona jest w dużą liczbę małych bioreaktorów pracujących metodą okresową.

W pracy przedstawiono systemy bioreaktorowe stosowane do hodowli komórek owadzych, opisano również metody hodowli i podstawowe problemy biotechnologiczne związane z ich zastosowaniem.

2. Systemy hodowli komórek owadzych w dużej skali

Pierwszymi systemami do hodowli komórek owadzych na dużą skalę były butle obrotowe o powierzchni wzrostu 600-1600 cm² (2). Weiss i in. (1981a) stosując tego rodzaju naczynia i zmodyfikowany półautomatyczny system hodowli uzyskali gęstości komórek na poziomie $3 \times 10^6/\text{cm}^3$ oraz ciała okluzyjne wirusa (poliedry) w ilości $9 \times 10^7/\text{cm}^3$ pożywki (3). Weiss i Vaughn (4) dla zwiększenia powierzchni dostępnej do wzrostu komórek owadzych wykorzystali naczynie wyposażone w spiralny rdzeń. System oferował powierzchnię wzrostu 9500 cm² przy objętości bioreaktora 1,7 dm³ oraz możliwość dożywiania kultury i odprowadzania metabolitów wtórnych w sposób ciągły. Przy zastosowaniu szybkości rozcieńczania 25 cm³ na godzinę osiągnięto $2,3 \times 10^7$ poliedrów w cm³ pożywki (4).

Ze względu na zdolność kultur owadzych do wzrostu w zawieszynie, większość badań nad układem komórki owadzie/bakulowirusy (BSE) wykonywana jest z wykorzystaniem prostych naczyń hodowlanych wyposażonych w mieszadła magnetyczne, tzw. spinnerów. Zastosowanie tego typu urządzeń pozwala na prowadzenie hodowli w objętości maksymalnie 3 dm³ i uzyskanie gęstości populacji komórkowej na poziomie $2-3 \times 10^6$ kom./cm³ (5). Głównym czynnikiem limitującym wzrost komórkowy jest w tym przypadku niewystarczająca ilość tlenu w pożywce. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem skali hodowli maleje stosunek powierzchni wymiany gazowej do objętości kultury, tym samym obniża się wydajność transferu tlenu i liczebność populacji komórkowej nie podlegającej tlenowym ograniczeniom. Szybkość transferu tlenu w 3-litrowym spinnerze została określona jako 0,6 h⁻¹. Wartość ta nie powo-

dowała ograniczenia tempa namnażania komórek *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) tylko do poziomu $0,7 \times 10^6$ kom./cm³ (6).

W ostatnim dziesięcioleciu ukazało się wiele prac nad BSE wykorzystujących cały szereg różnorodnych typów bioreaktorów, takich jak reaktory z mieszaniem mechanicznym, pneumatycznym czy membranowym.

2.1. Bioreaktor z mechanicznym sposobem mieszania

Do hodowli komórek owadzych znajdują zastosowanie klasyczne reaktory stosowane w procesach mikrobiologicznych, po dokonaniu niewielkich zmian konstrukcyjnych. Zmiany te polegają przede wszystkim na wymianie mieszadeł turbinowych na mieszadła typu śruby okrętowej, generujące najmniejsze siły ścinające, a tym samym wywołujące najmniejsze uszkodzenia komórek (7). Opisywany system zapewnia dobre mieszanie, pozwalające na uzyskanie wysokiego stopnia homogenności kultury. Bioreaktory z mechanicznym sposobem mieszania były stosowane w hodowlach wielkoskalowych przez wielu autorów (8-13). Na podstawie doświadczeń zdobytych przez wymienionych autorów można stwierdzić, że przy powiększaniu skali hodowli, na kolejnych jej etapach uzyskuje się coraz to niższe gęstości populacji komórkowych o obniżonej przeżywalności. Wszyscy autorzy osiągnęli w pełni zadowalające rezultaty przy zastosowaniu fermentorów o objętości nie przekraczającej 5 dm³. Jednocześnie wskazują oni, że ważnym parametrem, który należy uwzględnić przy optymalizacji każdej hodowli, jest szybkość mieszania. Krytyczną wartość dla tej wielkości oszacowano na 270 obrotów na minutę. Cruz i in. (12) stwierdzili, że przekroczenie tej granicy powoduje ograniczenie szybkości wzrostu komórek owadzych, natomiast mieszanie kultury z szybkością 335 obr./min całkowicie hamuje jej rozwój.

2.2. Bioreaktor z pneumatycznym sposobem mieszania (*airlift*)

W celu zminimalizowania efektów działania sił ścinających, powstających na końcach mieszadła korzystnym rozwiązaniem jest zastosowanie bioreaktora z pneumatycznym mieszaniem cieczy typu *airlift*. Fermentory *airlift* zapewniają łagodną cyrkulację kultury i wysoką wydajność transferu tlenu do pożywki. Maiorella i in. (6) stwierdzili, że wraz ze wzrostem skali hodowli rośnie wydajność transferu tlenu (K_{La}). Wartość współczynnika K_{La} dla hodowli prowadzonej w objętości 90 dm³ oszacowano na 3 h⁻¹ i była ona dwukrotnie wyższa niż dla hodowli 21-litrowej.

W światowej literaturze istnieją doniesienia promujące zastosowanie reaktorów typu *airlift* o pojemności większej niż 5 dm³ do hodowli kultur owadzych (5,14-17). Weiss i in. (5) do namnażania komórek Sf-9 stosowali trzy bioreaktory *airlift* o pojemnościach 5, 10 i 40 dm³. Naukowcy stwierdzili, że wraz ze wzrostem skali ho-

dowli maleje gęstość komórek uzyskiwana w *plateau* kultury. W fermentorze 5-litrowym otrzymano maksymalnie $6,4 \times 10^6$ kom./cm³, natomiast w 40-litrowym $2,4 \times 10^6$ kom./cm³.

Odmienne rezultaty badań uzyskali Barkhem i in. (15) oraz Shah i in. (18), którzy zajmowali się porównaniem wzrostu komórek Sf-9 oraz wydajności ekspresji obcego białka w reaktorach *airlift* 2- i 100-litrowym oraz 5- i 30-litrowym. Autorzy stwierdzili, że kinetyka procesu oraz parametry hodowli (czas podwojenia liczby komórek) na obu etapach są bardzo do siebie zbliżone. Barkhem i in. (15) uzyskali również porównywalny poziom produkcji zrekombinowanego białka (spadek ilości syntetyzowanego białka w 100 dm³ bioreaktorze wynosił około 20%). Satisfakcjonujące rezultaty hodowli w opisywanym systemie uzyskali również McGlynn i in. (17), którzy oszacowali maksymalną liczbę komórek Sf-9 na poziomie 9×10^6 kom./cm³. Zdecydowanie niższe produktywności stwierdzili Besile i in. (16), otrzymując w 15 dm³ reaktorze gęstości komórek *Trichoplusia ni* (Tn-368) w zakresie od 1 do 2×10^6 kom./cm³. W tym przypadku, niższa wydajność produkcji mogła być związana z zastosowaniem pożywki bezsurowiczej i odmiennej linii komórkowej, wykazującej mniejszy potencjał wzrostu w hodowlach zawieszinowych.

Niekorzystnym zjawiskiem dotyczącym tego typu reaktorów są duże siły hydrodynamiczne, związane z procesem napowietrzania (19-21). Stwierdzono, że podstawową przyczyną śmierci komórek w tego typu bioreaktorach jest rozrywanie pęcherzyków powietrza na granicy fazy gazowej i ciekłej. Wszyscy autorzy zaobserwowali, że komórki posiadają zdolność adhezji do powierzchni pęcherzyków powietrza. Zaadsorbowane komórki wraz z pęcherzami powietrza są unoszone ku górze, gdzie na powierzchni pożywki formują warstwę piany. Pęcherzyki pod powierzchnią cieczy tworzą wzniesienia i otaczają się cienkim płynnym filmem. Film stając się coraz cieńszy w końcu zanika i dochodzi do rozerwania pęcherzyka na granicy międzyfazowej. Rozrywaniu pęcherzyków powietrza towarzyszą duże siły hydrodynamiczne powodujące uszkodzenia i śmierć komórek. Udowodniono, że duże pęcherze powietrza generują zdecydowanie mniejszy stres hydrodynamiczny niż pęcherze małe (19,21). Siły hydrodynamiczne związane z pękaniem pęcherza o średnicy 0,7 mm mogą być 100 razy większe niż siły towarzyszące rozrywaniu pęcherza o średnicy 6,7 mm. Stres wywołany pęknięciem pęcherza może osiągać wartość nawet 3000 D/cm², podczas kiedy przyczyną lizy komórek może być siła 12 D/cm² (21). Autorzy prac nad interakcjami pomiędzy komórkami a pęcherzykami powietrza stwierdzili, że dodatek do pożywki takich związków jak metyloceluloza czy Pluronic F-68 powoduje wzrost odporności komórek na stres hydrodynamiczny. Osłonowe działanie tych substancji polega na zapobieganiu adhezji komórek do pęcherzy powietrza lub cienkiego filmu powstającego na ich powierzchni na granicy dwóch faz. Maiorela i in. (6) stwierdzili, że 0,1% dodatek Pluronic F-68 skutecznie chroni komórki przed uszkodzeniem wywołanym zarówno stresem hydrodynamicznym, jak i mechanicznym, a także zapobiega tworzeniu piany w czasie hodowli i pełni rolę czynnika przeciwpianowego. Autorzy uzyskali w 21-litrowym bioreaktorze *airlift* stosun-

kowo duże gęstości komórek Sf-9 wynoszące $5 \times 10^6/\text{cm}^3$ oraz wysoki poziom produkcji czynnika stymulującego kolonie ludzkich makrofagów, sięgający $40 \text{ mg}/\text{dm}^3$, co było porównywalne z wynikami otrzymanymi w 100 cm^3 hodowli nie wzbogacanej w tlen prowadzonej w naczyniu typu spinner. Opisane rezultaty osiągnięto przy szybkości napowietrzania $420\text{-}1260 \text{ cm}^3/\text{min}$ i średnicy pęcherzyków powietrza w granicach od 0,5 do 1 cm (6). Stosunkowo wysokie produktywności zrekombinowanego białka ($30 \text{ mg}/\text{dm}^3$) uzyskano w prostym i tanim, litrowym bioreaktorze kolumnowym z pęcherzykowym napowietrzaniem i mieszaniem hodowli (14).

Autorzy prac nad BSE zwracają uwagę na możliwość wyposażenia bioreaktorów w systemy napowietrzania, nie powodujące formowania pęcherzyków gazu. Akhnoikh i in. (22) zastosowali do napowietrzania 10-litrowej hodowli komórek owadzych system 15-metrowych silikonowych węży przepuszczalnych dla tlenu. W omawianym systemie komórki *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) osiągnęły w *plateau* hodowli gęstość od 1 do $5 \times 10^6/\text{cm}^3$ (22).

2.3. Bioreaktor z napowietrzaniem membranowym

Kolejną alternatywą dla łagodnego napowietrzania jest zastosowanie ruchomych mikroporowatych, polipropylenowych membran typu *hollow fibre* (23,24). Jaeger i in. (23) zastosowali ten system do hodowli kilku zwierzęcych linii komórkowych, w tym trzech owadzych: Sf-21 i *Drosophila* (Kc i Schneider-2). W hodowlach okresowych uzyskano następujące koncentracje komórek, dla Sf-21 – $1,8 \times 10^6/\text{cm}^3$, dla Kc – $6,2 \times 10^6/\text{cm}^3$ i dla Schneider-2 – $1,2 \times 10^7/\text{cm}^3$. Prowadzenie hodowli metodą ciągłą pozwoliło na zwiększenie gęstości komórek odpowiednio dla Sf-21 do $1,2 \times 10^7/\text{cm}^3$, dla Kc do $1,6 \times 10^7/\text{cm}^3$ i dla Schneider-2 do $3,1 \times 10^7/\text{cm}^3$ (23).

Jaeger i Kobold (24) prowadzili badania porównawcze nad hodowlą komórek Sf-9 i ekspresją interleukiny-2 w tradycyjnych spinnerach z powierzchniowym napowietrzaniem i w tzw. superspinnerach, wyposażonych w mieszadło z hydrofobową polipropylenową membraną napowietrzającą. Już po 24 godzinach hodowli w tradycyjnych spinnerach autorzy zaobserwowali obniżenie szybkości podziałów komórkowych, wynikających z niedoboru tlenu. Ograniczeń tlenowych nie zanotowano w hodowlach napowietrzanych membranowo i osiągnięto w nich pięciokrotnie wyższe gęstości komórek, wynoszące ponad $3 \times 10^6/\text{cm}^3$. Podobnie, zbyt małe nasycenie pożywki tlenem powodowało znaczne obniżenie skuteczności infekcji, szybkości replikacji wirusa i poziomu produkcji zrekombinowanego białka. Wydajność syntezy interleukiny-2 w superspinnerze była około 23 razy większa niż w spinnerze tradycyjnym. Ponadto, za dodatkową zaletę systemu membranowego autorzy uznali brak konieczności stosowania środków przeciwpieńnych, które mogą negatywnie wpływać na sekrecję białka i utrudniać jego pozyskiwanie (24).

Systemy bioreaktorowe wykorzystujące napowietrzanie membranowe są niewątpliwie jednymi z najlepszych rozwiązań, pozwalającymi na uzyskanie kultur o du-

zych gęstościach i wysokich przeżywalnościach komórek. Jednakże wysoki koszt membran i możliwość ich zapychania oraz wymagana duża pojemność reaktorów znacznie ograniczają zastosowanie tego systemu na dużą skalę.

2.4. Bioreaktory ze złożem upakowanym

W światowej literaturze spotyka się doniesienia o zastosowaniu w BSE bioreaktorów ze złożem upakowanym. Technologia związana z zasiedlaniem nośników może być przydatna tylko do hodowli komórek owadzych, wykazujących stosunkowo duże zdolności adhezyjne. Shuler i in. (25) wykorzystali system złożony z reaktora wypełnionego szklanymi kulkami o średnicy 3 mm, połączonego od góry i od dołu z kolumną napowietrzającą, umożliwiającą ciągłą cyrkulację pożywki na zasadzie *airlift*. Autorzy w opisywanym układzie uzyskali wysoki poziom produkcji β -galaktozydazy (200 μ g białka/10⁶kom.) przez silnie adherentne komórki *Trichoplusia ni* (Tn-5B1-4), infekowane zrekombinowanym wirusem AcNPV (25). Wyższą wydajność ekspresji β -galaktozydazy stwierdzili Kompier i in. (26), którzy zastosowali do immobilizacji komórek Sf-21 i upakowania reaktora włóknisty poliestrowy nośnik powlekany poli-D-lizyną (*fibra-cel*) o średnicy 4 mm. Badacze stwierdzili wysoką produktywność bioreaktora w hodowlach prowadzonych zarówno na pożywce z 10% dodatkiem, jak i bez dodatku surowicy. Maksymalne gęstości komórek Sf-21 uzyskane w ósmej dobie hodowli wynosiły 6×10^6 kom./cm³ (26). Do immobilizacji komórek owadzych wykorzystywano również mikronośniki dekstranowe typu Cytodex, żełe alginianowe i kolagenowe, porowate szkło, włókna szklane. Niektórzy autorzy stosowali również metodę mikrokapkułkowania oraz systemy cienkich włóknistych membran typu *hollow fiber*.

Obok szeregu cennych zalet wynikających z zastosowania układów immobilizowanych, jak wyższa odporność komórek na stres panujący w reaktorze, duża koncentracja komórek oraz ułatwiona ich separacja i prostsze oczyszczanie produktu wydzielanego do pożywki hodowlanej, zauważono dość istotne wady uniemożliwiające wydajną ekspresję obcych genów. Jedną z nich są ograniczenia pokarmowe związane z dużą gęstością komórek. Niekorzystne warunki żywieniowe można wyeliminować poprzez zastosowanie układu w systemie ciągłym-perfuzyjnym, jednak ze względu na lityczny charakter BSE celowość takich procesów jest dyskusyjna. Kolejną wadą tego rodzaju technologii jest obniżona skuteczność infekcji, co związane jest z utrudnionym dostępem cząstek wirusowych do powierzchni komórek owadzych (27).

2.5. Bioreaktor *cell-lift*

Bioreaktor typu *cell-lift* oferuje wiele korzystnych właściwości, wśród których można wyróżnić specjalny system mieszający, pozwalający na utrzymanie homogenności kultury przy zminimalizowanym stresie mechanicznym. Mieszadło ma postać

tuby zakończonej trzema wylotami, które podczas mieszania wywołują w jej wnętrzu niewielkie podciśnienie. Za pomocą wytworzonego ciśnienia zawieszona komórek zaciągana jest z dna naczynia do wnętrza tuby. Pożywka wraz z komórkami opuszcza miesadło przez króćce usytuowane w jego górnej części. Komórki opadają na dno naczynia, skąd ponownie są pompowane do góry. W ten sposób uzyskuje się prawidłową cyrkulację kultury i wysoki stopień jednorodności hodowli przy niskich szybkościach mieszania, wynoszących 30-60 obr./min. Kolejną zaletą bioreaktora *cell-lift* może być system membranowego napowietrzania. Gazy po przejściu przez filtr mikrobiologiczny są wprowadzane do wnętrza miesadła, gdzie dalej wędrują pomiędzy wewnętrzną ścianą miesadła a membraną o porowatości 1 μm . Wskutek bezpośredniego kontaktu z pożywką następuje dyfuzyjne przenikanie cząsteczek gazu do fazy ciekłej. Tak zaprojektowany system napowietrzania hodowli zabezpiecza komórki przed niszczącym działaniem pęcherzyków gazu.

Pomimo wielu korzystnych właściwości oferowanych przez opisywany system hodowli, niewiele jest publikacji na temat zastosowania tego typu bioreaktorów do hodowli komórek owadzych, produkcji zrekombinowanych białek czy bakulowirusowych biopreparatów. Wysoką przydatność bioreaktora *cell-lift* do namnażania komórek Sf-9 wykazano w pracach Carona i in. (28) oraz Weissa i in. (29). Badacze uzyskali w *plateau* hodowli odpowiednio 8 i $4,6 \times 10^6$ kom./ cm^3 w 5- i 4-litrowych bioreaktorach (28,29).

3. Metody hodowli komórek owadzych

W praktyce realizowane są trzy podstawowe metody hodowli kultur owadzych: okresowa, okresowo-dolewowa i ciągła. Podstawowym kryterium oceny przydatności wymienionych metod jest ich wpływ na właściwą szybkość wzrostu i aktywność metaboliczną komórek.

3.1. Hodowle okresowe

Hodowle okresowe (*batch culture*) są najczęściej stosowaną metodą hodowli komórek owadzych. Prostota tej techniki, względy ekonomiczne i ograniczenie ryzyka zakażeń mikrobiologicznych zadecydowały o jej szerokim zastosowaniu zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak i przemysłowych. Należy jednak zauważyć, że metoda okresowa ma wady, z których najważniejszymi są: zmienność środowiska w czasie hodowli wynikająca ze zmiany stężenia składników pokarmowych i nagromadzenia toksycznych metabolitów oraz stosunkowo niska gęstość kultury komórkowej, i – tym samym – niewielka produktywność objętościowa bioreaktora. W procesach okresowych nie wykorzystuje się w pełni potencjału metabolicznego komórek, gdyż optymalne warunki dla ich rozwoju utrzymywane są tylko przez

krótki czas hodowli. Jednym ze sposobów redukcji tego problemu jest zastosowanie okresowo-dolewowej, półciągłej lub ciągłej metody hodowli.

3.2. Hodowle ciągłe

Wysoki koszt hodowli kultur owadzi spowodował rosnące zainteresowanie technologiami pozwalającymi na osiągnięcie dużych gęstości komórek i wysokiej wydajności produkcji zarówno bakulowirusów, jak i zrekombinowanych białek. Dążenie do intensyfikacji bioprosesów przyczyniło się do zwiększenia popularności i coraz częstszego stosowania w BSE procesów ciągłych.

Długoterminowe hodowle ciągłe polegają na stałym zasilaniu kultury świeżą pożywką z jednoczesnym usuwaniem zużytego medium wraz z komórkami lub bez komórek. Metoda ta jest dostosowana głównie do produkcji biomasy komórkowej lub jej pierwszorzędowych metabolitów. Wzrost komórek odbywa się cały czas w logarytmicznej fazie wzrostu, przy całkowitym braku czynników ograniczających ich rozwój.

Najprostszą technologią procesów ciągłych jest zastosowanie reaktora przepływowego ze stałym dostarczaniem świeżej pożywki i odbieraniem zużytej wraz z komórkami przy zachowaniu stałej objętości roboczej bioreaktora. Warunkiem utrzymania hodowli ciągłej jest zachowanie równowagi pomiędzy ilością komórek wymywanych i ponownie namnożonych w wyniku podziałów komórkowych. Szybkość przepływu pożywki powinna być tak dobrana, aby zapewnić stałą, wysoką koncentrację komórek w bioreaktorze i utrzymanie hodowli w stanie chemostatu. W tym przypadku gęstość komórek i stężenie substratu mają wartości stałe, a zatem miernikiem właściwej szybkości wzrostu komórek jest szybkość rozcieńczania pożywki (30).

Na podstawie danych literaturowych wskazuje się na ograniczone możliwości zastosowania ciągłych bioreaktorów przepływowych do badań nad BSE. Autorzy zgodnie stwierdzili, że przyczyną spadku produktywności bioreaktorów w miarę upływu czasu hodowli jest tzw. efekt pasażowania wirusa (31-33). Kompier i in. (32) stosując ciągły dwustopniowy system hodowli, uzyskali przez pierwszych 25 dni stałą produkcję poliedrów, przez kolejne dni obserwowano wyraźny spadek wydajności (55 i 26% komórek zawierających poliedry), a po 56. dniu hodowli stwierdzono całkowite zahamowanie wytwarzania ciał wtrętowych w jądrach zakażonych komórek (32).

Van Lier (33) stosował ciągłą metodę hodowli do namnażania wirusa dzikiego AcNPV oraz do syntezy zrekombinowanej β -galaktozydazy. W celu podniesienia efektywności procesu infekcji, do układu zaprojektowanego przez Kompiera i in. (32) wprowadził dodatkowe naczynie do namnażania wirusa. W celu zastosowania trzeciego bioreaktora było oddzielenie procesów infekcji i ekspresji genów wirusowych. Skutkiem takiej strategii było zwiększenie frakcji komórek zawierających po-

liedry, lecz przy jednoczesnym obniżeniu produktywności. Niekorzystną cechą było wcześniejsze ujawnienie efektu pasażowania, co nastąpiło już po 2 tygodniach hodowli. Ta sama grupa naukowców w badaniach nad syntezą β -galaktozydazy stwierdziła podobne zależności. Przez pierwsze 25 dni hodowli autorzy obserwowali stały poziom produkcji enzymu, a następnie w czterdziestym dniu hodowli jego gwałtowny spadek do minimum. Obniżonej ekspresji obcego genu towarzyszyło zredukowane miano wirusa (33).

Do najnowocześniejszych technik hodowlanych należy metoda perfuzyjna, polegająca na dostarczaniu do układu w sposób ciągły świeżej pożywki i usuwaniu zużytego płynu, z zatrzymaniem komórek w bioreaktorze. Proces zasilania hodowli pożywką prowadzony jest ze stałą szybkością, gwarantującą niezmienny poziom składników pokarmowych. W związku z tym, że odbierany płyn pohodowlany pozbawiony jest komórek, ich stężenie w czasie trwania hodowli wzrasta. Podstawową korzyścią wynikającą z zastosowania perfuzyjnego systemu hodowli jest możliwość uzyskiwania wysokich gęstości komórek i dużych wydajności produkcji. Wykorzystanie tego systemu na dużą skalę związane jest z podwyższonym ryzykiem zakażeń mikrobiologicznych (27,30).

Jednym z najnowocześniejszych systemów służących do hodowli perfuzyjnych jest bioreaktor membranowy. Składa się on z tradycyjnego bioreaktora połączonego z modułem filtracyjnym. Porowatość filtra membranowego zwykle wynosi 0,14-0,45 μm , co pozwala na zatrzymanie komórek. W ten sposób przez układ przepływa pożywka, a komórki cyrkulują w zamkniętej przestrzeni bioreaktora i systemu filtrującego (34).

W odniesieniu do komórek owadzych podobne układy hodowlane opisali Tom i in. (35), Caron i in. (36). Do hodowli komórek Sf-9 zastosowano bioreaktory o pojemnościach 3 i 11 dm^3 wyposażone w mieszadła śrubowo-wstęgowe, sprzężone z płaskimi mikrofiltrami o przepływie krzyżowym (0,3 μm , Filtron) (35). Natomiast Caron i in. (36) wykorzystali 4 dm^3 bioreaktor typu *cell-lift* połączony ze specjalnie skonstruowanym stycznym separatorem membranowym do recyrkulacji komórek. Autorzy badań uzyskali w ciągu 3-4 dni, przy szybkości przepływu 1,5-3,0 cm^3/min , koncentrację komórek na poziomie $1,5 \times 10^7/\text{cm}^3$, zachowując przy tym ich 98% żywotność (36).

Do namnażania bakulowirusów i produkcji obcych białek metodą ciągłą z zatrzymywaniem komórek mogą być wykorzystane moduły hodowlane typu *hollow fiber* (27). Reaktory *hollow fiber* wypełnione są wieloma cienkimi kapilarami, których ściany zbudowane są z porowatych materiałów przepuszczających cząsteczki o określonej średnicy. Hodowane komórki przyczepiają się do powierzchni membran od zewnętrznej lub wewnętrznej strony wiązki kapilar. W zależności od konstrukcji, wewnątrz lub na zewnątrz kapilar przepływa natleniona pożywka i dzięki porowatości ścian zachodzi transfer składników pokarmowych i tlenu. Oddzielenie komórek od strefy zasilania świeżą pożywką chroni kulturę przed zakażeniem, działaniem sił hydrodynamicznych oraz pozwala na prowadzenie procesu w sposób ciągły (34). Ukła-

dy do namnażania komórek owadzych i ekspresji genów bakulowirusowych, wykorzystujące zewnętrzne wkłady filtracyjne *hollow fibre* zastosowali Guillaume i in. (37), uzyskując dużą koncentrację komórek wynoszącą $2 \times 10^7/\text{cm}^3$ oraz odpowiednio wysoką wydajność produkcji β -galaktozydazy równą $1 \text{ g}/\text{dm}^3$ (37).

Innym rozwiązaniem konstrukcyjnym wykorzystywanym w BSE jest bioreaktor z wewnętrznym, ruchomym modułem filtracyjnym (38-40). Weiss i in. (39) po dwunastu dniach hodowli, przy szybkości rozcieńczania od 0,01 do $0,04 \text{ h}^{-1}$, uzyskali gęstość komórek Sf-21 na poziomie $1,45 \times 10^7/\text{cm}^3$ (39). Liczba komórek Sf-9 otrzymana przez Kim i in. (40) w piątym dniu hodowli, przy szybkości przepływu $0,01-0,06 \text{ h}^{-1}$, wynosiła $3-3,5 \times 10^6/\text{cm}^3$. Autorzy oprócz kinetyki wzrostu komórek, badali również wydajność syntezy β -galaktozydazy i stwierdzili, że w miarę zwiększania szybkości rozcieńczania następowało dramatyczne jej zahamowanie. Przypuszcza się, że przyczyną tak drastycznego spadku sekrecji białka mógł być efekt pasażowania wirusa lub efekt nadmiernej gęstości komórek (40).

Jaeger i in. (41) opisali inną konstrukcję bioreaktora służącego do hodowli ciągłych, prowadzonych w systemie perfuzyjnym. Podstawę stanowił tradycyjny reaktor z mechanicznym mieszadłem wyposażonym w podwójną membranę filtracyjną, umożliwiającą łagodne napowietrzanie kultury oraz zatrzymywanie komórek. Maksymalne gęstości komórek uzyskane w tym układzie były bardzo wysokie i wynosiły $5,5 \times 10^7/\text{cm}^3$, natomiast liczba zrekombinowanych białek była tylko nieco wyższa niż uzyskana w hodowlach okresowych (41).

Korzystnym rozwiązaniem pozwalającym na stałe zasilanie kultury owadziej jest hodowla komórek w formie związanej z nośnikiem. Zastosowanie porowatej żywicy poliwinylowej do immobilizacji kultury Sf-9 umożliwiało upakowanie $5,0 \times 10^7$ komórek w cm^3 pożywki. Hodowla komórek Sf-9 metodą perfuzyjną doprowadziła do uzyskania wysokiej produktywności właściwej zrekombinowanej β -galaktozydazy (42). Niestety proponowany przez autorów system znajduje zastosowanie jedynie do produkcji wirusa i białek sekrecyjnych.

3.3. Hodowle okresowe z zasilaniem

Prowadzenie hodowli komórkowych metodą ciągłą wiąże się z wieloma trudnościami natury technicznej i biologicznej, stąd opracowano układy pośrednie, z jednej strony zbliżone do procesu ciągłego, a z drugiej stanowiące modyfikację hodowli okresowej.

Technika okresowo-dolewowa (*fed-batch culture* – FBC) polega na wprowadzeniu do hodowli pod koniec fazy logarytmicznego wzrostu świeżej pożywki lub mieszaniny najważniejszych jej składników. W tym przypadku początkowe wypełnienie bioreaktora wynosi 30-50%, a kolejne porcje pożywki są dostarczane ze stałą lub zmienną szybkością. W metodzie FBC występują tylko dwie fazy cyklu komórkowego: fazy logarytmiczne oddzielone krótkotrwałymi fazami adaptacyjnymi, zapoczątk-

kowanymi przez wprowadzenie świeżej pożywki. Dlatego, hodowle okresowo-dolewowe, w porównaniu z hodowlami okresowymi, pozwalają na uzyskanie kilkukrotnie większych gęstości komórek i produktywności bioreaktora (43,44). Na przykład, maksymalna liczba komórek Sf-9 w hodowli okresowej została oszacowana na $1 \times 10^7/\text{cm}^3$ (45), natomiast w systemie okresowo-dolewowym na $3 \div 5 \times 10^7/\text{cm}^3$ (43,44).

Innym sposobem prowadzenia hodowli okresowo-dolewowej jest metoda półciągła, która realizowana jest przez okresowe odbieranie części hodowli i zastępowanie jej porcją świeżej pożywki. Pionierami w zastosowaniu tej techniki w badaniach nad BSE byli Hink i Strauss (46). Autorzy opisali proces wielostopniowej produkcji wirusów AcNPV w komórkach Tn-368 hodowanych w tradycyjnym reaktorze z mechanicznym sposobem mieszania. System składał się z kilku bioreaktorów, gdzie w pierwszym z nich prowadzona była kultura komórkowa, a w kolejnych odbywało się namnażanie wirusów. Co 24 godziny 50% hodowli z pierwszego naczynia przepompowywano do kolejnego, a ubytek płynu w obu reaktorach był uzupełniany przez dodatek porcji świeżej pożywki. Autorzy badań stwierdzili dużą skuteczność infekcji i wysoki poziom produkcji ciał wtępowych w pierwszych czterech etapach hodowli. Natomiast w piątym i szóstym stadium zaobserwowali wyraźne załamanie hodowli (46).

Zhang i in. (47) zastosowali dwustopniowy system hodowli. W pierwszym bioreaktorze prowadzono hodowlę komórek, w drugim proces produkcji transferazy chloramfenikolu przez modyfikowanego genetycznie wirusa AcNPV. Po uzyskaniu wysokich gęstości komórek ($3,5 \times 10^6$ kom./ cm^3), 90% kultury przenoszono do następnego naczynia i poddawano procesowi infekcji. Pozostałe 10% hodowli komórkowej wykorzystywano jako inokulum dla następnego cyklu produkcyjnego. W drugim naczyniu, po zakończeniu fazy adsorpcji wirusa do powierzchni komórek, prowadzono separację komórek techniką membranową i dokonywano wymiany zużytej pożywki na świeżą. Pod koniec fazy produkcyjnej, wypompowywano zawartość bioreaktora i powtarzano cały proces od początku. Autorzy tej technologii uzyskali stały poziom syntezy zrekombinowanego białka sięgający $250 \text{ mg}/\text{dm}^3$ w czterech kolejnych cyklach produkcyjnych, trwających ponad 600 godzin (47).

Podobny system hodowli zaproponowali również Kloepfinger i inni (48). Metodyczne różnice w prowadzeniu hodowli dotyczyły wymiany pożywki przed procesem infekcji oraz zastosowania 5% hodowli wirusa jako inokulum wirusowego do infekcji komórek w kolejnych cyklach produkcyjnych. Autorzy wykorzystując metodę okresowo-dolewową do namnażania wirusa AcNPV w komórkach Sf-9 stwierdzili wysoki poziom jego produkcji przez kilka kolejnych tygodni, bez widocznego załamania hodowli (48).

Dwustopniową hodowlę okresowo-dolewową do syntezy β -galaktozydazy stosował van Lier (33). Autor badań stwierdził, że w porównaniu z dwunaczyniową hodowlą ciągłą, przedłużono czas działania całego układu, zachowując zbliżoną produktywność bioreaktorów, bez wystąpienia zmian mutacyjnych w genomie wirusów (33).

3.4. Strategie hodowlane

Podstawowym celem optymalizacji hodowli komórek owadzych jest uzyskanie wysokiej gęstości populacji komórkowej w jak najkrótszym czasie. Kolejnym ważnym etapem procesu jest wybór odpowiedniego momentu infekcji, zapewniającego dalszy rozwój kultury. Następnie, ze względu na duże obciążenie metaboliczne komórek po infekcji, korzystnym zabiegiem jest ich dożywienie, co może być realizowane przez całkowitą wymianę zużytej pożywki, wprowadzenie porcji pożywki świeżej lub jej najważniejszych składników. Z uwagi na ilość i jakość uzyskiwanych produktów podstawowym punktem procesu jest moment zakończenia hodowli, który powinien być równoznaczny z osiągnięciem *plateau*.

Korzystną strategię prowadzenia procesu produkcji biopreparatów przedstawił Caron i in. (49). Dla pierwszego etapu hodowli komórek owadzych zaproponowano metodę okresową, a uzyskane populacje komórek stanowiły inokulum dla kolejnych hodowli prowadzonych w naczyniach o coraz większej objętości roboczej. W zależności od skali procesu, pierwszy etap hodowli może być przeprowadzany jedno- lub kilkustopniowo. W drugim etapie, wykorzystano bioreaktor membranowy w systemie ciągłym, co miało na celu uzyskanie dużych gęstości populacji komórek owadzych. Komórki utrzymywane były w fazie wzrostu logarytmicznego, pod koniec której osiągnęły koncentrację przekraczającą poziom 10^7 kom./cm³. W trzecim etapie dokonano infekcji bakulowirusowej, wprowadzając do bioreaktora stosowną ilość inokulum wirusowego, odpowiadającą dawce pięciu infekcyjnych cząstek wirusa na komórkę. Proces infekcji trwał 60 minut, w czasie których nie prowadzono procesu wymiany pożywki. Następnie metodą ultrafiltracji usuwano 75% płynu pohodowlanego i napełniano reaktor świeżą pożywką. Ostatni produkcyjny etap procesu może być prowadzony metodą okresową lub ciągłą (49).

4. Aspekty technologiczne hodowli kultur owadzych

4.1. Wielkość inokulum komórkowego

Ilość i jakość materiału posiewowego jest jednym z czynników determinujących szybkość proliferacji i końcową koncentrację komórek owadzych. Dla zapoczątkowania hodowli, zalecana wielkość inokulum komórkowego wynosi od $1-3 \times 10^5$ kom./cm³. Z uwagi na to, że proliferacja komórek regulowana jest przez wydzielane do pożywki, a następnie przyłączane do powierzchniowych receptorów komórek, komórkowe czynniki wzrostowe, zastosowanie inokulum komórkowego w liczbie mniejszej niż 1×10^5 kom./cm³ prowadzi do obniżenia czasu generacji i żywotności komórek, spowolnienia szybkości wzrostu kultury i znacznie niższych gęstości populacji komórkowej w *plateau* hodowli. Najbardziej dynamiczny rozwój kultury owa-

dziej zapewnia inokulum pochodzące z późnej fazy wzrostu logarytmicznego, kiedy komórki charakteryzują się dużym potencjałem wzrostu i wysokim stopniem przeżywalności (50).

4.2. Natlenianie hodowli

Wieloletnie doświadczenia nad hodowlą komórek zwierzęcych wykazują, że krytycznym parametrem hodowli wielkoskalowych jest stopień natlenienia. Zapotrzebowanie komórek owadzych na tlen, w porównaniu z komórkami ssaków, jest stosunkowo małe, lecz zdecydowanie wzrasta po infekcji wirusowej. Na ogół nasycenie pożywki tlenem nie przekracza 50-60% (51). Wielkość transferu tlenu z fazy gazowej do fazy ciekłej (pożywki) zależy od powierzchni wymiany międzyfazowej, a ta z kolei jest determinowana przez odpowiednio duże rozdrobnienie pęcherzyków powietrza i ich długie przebywanie w pożywce. Wymaga to intensywnego mieszania pożywki, tymczasem jest to niemożliwe z uwagi na wrażliwość komórek na destrukcyjne działania sił mechanicznych. Konsekwencją tego są specjalne wymagania stawiane systemom mieszająco-napowietrzającym stosowanych w bioreaktorach przeznaczonych do hodowli kultur owadzych.

Najmniejszy problem stanowi natlenianie pożywki w hodowlach prowadzonych na skalę laboratoryjną. W kulturach stacjonarnych, w butelkach hodowlanych ilość tlenu znajdująca się nad powierzchnią pożywki jest wystarczająca do pokrycia zapotrzebowania rosnących komórek. Podobnie w kulturach zawieszinowych prowadzonych w naczyniach typu spinner o pojemności nie przekraczającej trzech litrów problem dostarczania do hodowli tlenu nie istnieje. Sam proces mieszania oraz wystarczająco duża ilość powietrza nad pożywką zabezpieczają odpowiedni stopień natlenienia kultury.

4.3. Siły hydrodynamiczne i mechaniczne w bioreaktorach

Stosunkowo duże rozmiary komórek owadzych oraz brak ścian komórkowych czyni je, podobnie jak komórki ssaków, szczególnie wrażliwymi na mechaniczne czynniki stresowe, co bardzo utrudnia powiększanie skali hodowli. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że krytyczną wielkością sił ścinających, działających na komórki Sf-9 w hodowli zawieszinowej, jest wartość 1-4 Nm⁻², po przekroczeniu której następują uszkodzenia błony komórkowej (52). Podstawowym źródłem stresu mechanicznego są siły ścinające, towarzyszące procesowi mieszania oraz generowane w urządzeniach pomocniczych takich jak pompy, moduły filtracyjne, przewody transportowe. Destrukcyjne działanie mają także dynamiczne oddziaływania cieczy na komórki oraz zderzenia komórek z częściami stałymi aparatury. Innym czynnikiem niszczącym są oddziaływania występujące na granicy kontaktu fazy ciekłej (po-

żywki) z fazą gazową (pęcherzyki powietrza), a szczególnie niebezpieczny jest moment pęknięcia pęcherzyków przy opuszczaniu pożywki. Za najbardziej szkodliwe dla komórek owadzych uważa się małe wiry, o średnicy mniejszej niż średnice komórek (9-15 μm), znane w piśmiennictwie pod nazwą wirów Kołmogorowa. Stres mechaniczny powoduje zwolnienie szybkości wzrostu kultury owadziej, indukuje zmiany morfologiczne komórek, uszkodzenia błony cytoplazmatycznej, zmniejszenie adhezji do nośników oraz prowadzi do obniżenia wydajności produkcji biopreparatów.

Autorzy badań nad BSE wykazali, że najbardziej destrukcyjnym sposobem natleniania hodowli jest nawet bardzo słabe napowietrzanie pęcherzykowe. Teza ta została potwierdzona w pracach Kioukia i in. (50). Autorzy zaobserwowali, że zastosowanie w bioreaktorze mieszadła typu turbiny Rashtona, mieszającego pożywkę z szybkością aż 400 obr./min nie powoduje wyraźnych zmian w przebiegu hodowli, lecz rozpoczęcie napowietrzania pożywki gwałtownie zwiększa śmiertelność komórek i prowadzi do zmniejszenia gęstości populacji komórek (13).

Podstawowym sposobem ochrony komórek przed mechanicznymi uszkodzeniami, obok zastosowania systemu komórek immobilizowanych, jest dodatek do pożywki rozpuszczalnych polimerów zwiększających lepkość cieczy. Największe zastosowanie znalazły Pluronic F-68 (emulsja niejonowych poliglikoli w olejach), stosowany w stężeniach 0,2% oraz metyloceluloza w stężeniach 0,1-0,5%. Rzadziej jako środki ochronne dodaje się mieszaninę tłuszczową zawierającą olej wątrobowy dorsza, cholesterol, octan tokoferolu, wspomniany Pluronic F-68 i Tween 90 (53). Bardzo skutecznym, lecz kosztownym środkiem ochronnym, jest surowica bydlęca dodawana do hodowli w ilości nie przekraczającej 10%.

4.4. Sterylność hodowli

Duża podatność pożywek wykorzystywanych do hodowli komórkowych na zakażenia mikrobiologiczne oraz trudności w utrzymaniu wysokiego stopnia sterylności w systemach bioreaktorowych stanowią o konieczności zabezpieczania hodowli poprzez stosowanie antybiotyków. Antybiotyki, z jednej strony, muszą zapewnić skuteczną ochronę przed inwazją mikroorganizmów, a z drugiej nie powinny negatywnie wpływać na wzrost komórek i produktywność układu komórki owadzie/bakulowirusy. Najczęściej stosowanymi antybiotykami są: gentamycyna, penicilina, streptomycyna i kanamycyna. Jeżeli istnieje ryzyko zakażeń, nystatyna lub amfoterycyna stosowane są jako czynniki fungistatyczne (53).

Proces produkcji biopreparatów w hodowlach komórkowych obarczony jest wyjątkowo rygorystycznymi standardami higienicznymi, które dotyczą zarówno urządzeń technologicznych, jak i całej biowytwórni. W praktyce główne pomieszczenia produkcyjne są utrzymywane w niewielkim nadciśnieniu przez wtłaczanie powietrza przez system filtrów klasy HEPA. Dzięki temu blokowany jest dopływ powietrza skażonego mikroorganizmami i wirusami. Pomieszczenia produkcyjne wykończone są

specjalnymi materiałami, o dużej gładkości, bez kantów i zakamarków pozwalających na osadzanie się pyłów i zanieczyszczeń. Ściany malowane są farbami epoksydowymi, w pomieszczeniach brak jest otwieranych okien, a wejścia do pomieszczeń produkcyjnych prowadzą przez specjalne śluzy. Dużą wagę przywiązuje się także do jakości aparatury produkcyjnej. Bioreaktory, wirówki, filtry i inne urządzenia muszą być absolutnie hermetyczne, tak aby uniknąć wycieków i tworzenia wszelkich aerozoli.

4.5. Monitorowanie przebiegu hodowli

Nowoczesne bioreaktory wyposażone są w przyrządy pomiarowe służące do detekcji zmian parametrów fizykochemicznych hodowli, takich jak: temperatura, pH pożywki, ciśnienie, stopień rozpuszczalności gazów, szybkość obrotów mieszadła, masa bioreaktora czy szybkość podawania świeżej pożywki. Jedną z istotniejszych wielkości opisujących przebieg hodowli jest gęstość komórek, którą zwykle oznacza się hemacytometrycznie. Należy jednak podkreślić, że częste pobieranie prób z bioreaktora wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zakażenia mikrobiologicznego hodowli. Zdecydowanie lepszą metodą jest pomiar *in situ*, dokonywany wewnątrz bioreaktora lub w przepływie poza nim, który polega na wykorzystaniu sondy do pomiaru absorbancji pożywki przy długości fali 660 nm, przy założeniu, że zmętnienie płynu hodowlanego jest spowodowane wyłącznie obecnością namnażających się komórek (54). W ostatnich latach opracowano także szereg bioczuźników pozwalających na określenie gęstości populacji komórkowej poprzez pomiar ATP czy DNA przy wykorzystaniu metod spektralnych, głównie pomiaru luminescencji. Na rynku dostępne są także sondy pomiarowe umożliwiające ciągłe oznaczanie glukozy, aminokwasów, amoniaku i kwasu mlekowego *in line*. Większość sond stosowanych do pomiaru stężenia składników pożywek ma charakter dwufunkcyjny. Podstawę czujnika stanowi tradycyjny przyrząd pomiarowy, jak sonda pH, sonda jonoselektywna lub sonda tlenowa. Do sondy przyczepiony jest element biologiczny, jak enzym, przeciwciało, żywa komórka lub tkanka. Element biologiczny przeprowadza zwykle reakcję, której produkty są oznaczane za pomocą tradycyjnej sondy pomiarowej, mierzącej wielkość sygnału elektrycznego.

Sprawny i bezpieczny z punktu widzenia mikrobiologicznego, system kontroli i ciągłego monitorowania przebiegu hodowli jest bardzo ważnym elementem decydującym o powodzeniu procesu produkcyjnego.

Literatura

1. Luckow V. A., (1991), *Recombinant DNA technology and applications*, Eds. Prokop A., Bajpai R., Ho C. S., McGraw Hill, New York, 97-133.
2. Vaughn J. L., (1976), *J. Invertebr. Pathol.*, 28, 233-237.

3. Weiss S. A., Smith G. C., Kalter S. S., Vaughn J. L., Dougherty E., (1981a), *Intervirology*, 15, 213-222.
4. Weiss S. A., Vaughn J. L., (1986), *The biology of baculoviruses. II-Practical applications for insect control*, Eds. Granados R. R., Federici B. A., CRC Press, Inc., Boca Raton, 63-87.
5. Weiss S. A., Smith G. C., Kalter S. S., Vaughn J. L., (1981b), *In Vitro*, 17, 495-502.
6. Maiorella B., Inlow D., Shauger A., Harano D., (1988), *Bio/Technol.*, 6, 1406-1410.
7. Jankowski T., Grajek W., (1993), *Biotechnologia* 3(22), 166-183.
8. Meij P., Vervoort M. B. H. J., de Gooijer K., Bloemena E., Meijer C. J. L. M., Middeldorp J. M., (2000), *Protein Expr. Purif.*, 20(2), 324-333.
9. Wolff M. W., Zhang F. M., Roberg J. J., Caldwell E. E. O., Kaul P. R., Serrahn J. N., Murhammer D. W., Linhardt R. J., Weiler J. M., (2001), *Protein Expr. Purif.*, 22(3), 414-421.
10. Hu Y. C., Bentley W. E., (1999), *Biotechnol. Prog.*, 15, 1065-1071.
11. Klaassen C. H., Bovee-Geurts P. H. M., Decaluwe G. L. J., Degrip W. J., (1999), *Biochem. J.*, 342, 293-300.
12. Cruz P. E., Cunha A., Peixoto C. C., Clemente J., Moreira J. L., Carrondo M. J. T., (1998b), *Biotechnol. Bioeng.*, 60(4), 408-418.
13. Kioukia N., Nienow A. W., Al-Rubeai M., Emery A. N., (1996), *Biotechnol. Prog.*, 12, 779-785.
14. Eichenmuller B., Ahrens D. P., Li Q. W., Suprenant K. S., (2001), *Cell Motil. Cytoskeleton*, 50, 161-172.
15. Barkhem T., Carlsson B., Danielsson A., Norinder U., Frieberg H., Ohmann L., (1992), *Workshop on baculovirus and recombinant protein production processes*, Eds. Vlask J. M., Schlaeger E. J., Bernard A. R., Roche, Basel, Switzerland, 235-246.
16. Belisle B. W., Celeri C., Tang K., Montgomery T., Gong T., (1992), *Workshop on baculovirus and recombinant protein production processes*, Eds. Vlask J. M., Schlaeger E. J., Bernard A. R., Roche, Basel, Switzerland, 226-233.
17. McGlynn E., Liebetanz J., Reutener S., Gay B., Becker M., Lydon N. B., (1992), *Workshop on baculovirus and recombinant protein production processes*, Eds. Vlask J. M., Schlaeger E. J., Bernard A. R., Roche, Basel, Switzerland, 209-215.
18. Shah G., Crossett B., Hale R. S., (1992), *Workshop on baculovirus and recombinant protein production processes*, Eds. Vlask J. M., Schlaeger E. J., Bernard A. R., Roche, Basel, Switzerland, 216-225.
19. Chalmers J. J., (1995), *Baculovirus expression systems and biopesticides*, Eds. Shuler M. L., Wood H.A., Granados R.R., Hammer D.A., Wiley-Liss, Inc., New York, 175-204.
20. Tramper J., Gooijer de K.D., Vlask J.M., (1993), *Insect cell culture engineering*, Eds. Goosen M. F. A., Daugulis A. J., Faulkner P., Marcel Dekker, Inc., New York, 139-177.
21. Garcia-Briones M., Bavarian F., Hink F., Chalmers J., (1992), *Work on baculovirus and recombinant protein production processes*, Eds. Vlask J. M., Schlaeger E. J., Bernard A. R., Roche, Basel, Switzerland, 328-338.
22. Akhnouk R., Kretzmer G., Schugerl K., (1993), *Bioproc. Eng.*, 8, 229-233.
23. Jaeger V., Blasey H. D., Claus J., Kratje R. B., Lucki-Lange M., Marx U., Ryll T., Schutz C., Wagner R., (1990), *Biologicals from recombinant microorganisms and animal cells-New strategies in production and recovery*, Eds. White M. D., Reuveny S., Shafferman A., VCH publishers, Weinheim.
24. Jaeger V., Kobold A., (1995), *Biotechnol. Techniques*, 6, 435-440.
25. Shuler M. L., Cho T., Ogonah O., Kool M., Hammer D. A., Granados R. R., Wood H. A., (1990), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 589, 399-422.
26. Kompier R., Kislev N., Segal I., Kadouri A., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 822-827.
27. Taticek R. A., Hammer D. A. Shuler M. L., (1995), *Baculovirus expression systems and biopesticides*, Eds. Shuler M. L., Wood H. A., Granados R. R., Hammer D. A., Wiley-Liss, Inc., New York, 131-174.
28. Caron A. W., Archambault J., Massie B., (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 1133-1140.
29. Weiss S. A., Whitford W. G., Godwin P. G., Reid S., (1992), *Work on baculovirus and recombinant protein production processes*, Eds. Vlask J. M., Schlaeger E. J., Bernard A. R., Roche, Basel, Switzerland, 306-315.
30. Handa-Corrigan A., (1991), *Mammalian cell biotechnology*, Ed. Butler M., Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 139-158.

31. Pijlman G. P., van den Born E., Martens D. E., Vlak J. M., (2001), *Virology*, 283, 132-138.
32. Kompier R., Tramper J., Vlak J. M., (1988), *Biotechnol. Lett.*, 10, 849-854.
33. van Lier F., (1995), *Two-stage baculovirus production in insect-cell bioreactors*, PhD. Thesis, Agricultural University Wageningen, 57-88.
34. Grajek W., (1993), *Biotechnologia*, 2(21), 22-34.
35. Tom R. L., Debanne M. T., Bedard C., Caron A. W., Massie B., Kamen A. A., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 53-58.
36. Caron A. W., Tom R. L., Kamen A. A., Massie B., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 881-891.
37. Guillaume J. M., Couteault N., Hurwitz D. R., Crespo A., (1992), *Workshop on baculovirus and recombinant protein production processes*, Eds. Vlak J. M., Schlaeger E. J., Bernard A. R., Roche, Basel, Switzerland, 285-296.
38. Stiens L. R., Buntmeyer H., Lutkemeyer D., Lehmann J., Bergmann A., Weglohner W., (2000), *Biotechnol. Prog.*, 16, 703-709.
39. Weiss S. A., Whitford W. G., Godwin G., (1991), *Eighth International Conference on Invertebrate and Fish Tissue Culture*, Anaheim, Canada.
40. Kim H. R., Oh J. H., Yang J. M., Kang S. K., Yoon H. H., Chung I. S., (1992), *Proceedings of Asia-Pacific biochemical engineering conference*, Eds. Furusaki S., Endo I., Matsuno R., Springer-Verlag, Tokyo.
41. Jaeger V., Grabenhorst E., Kobold A., Deutschmann S. M., Conradt H. S., (1992), *Workshop on baculovirus and recombinant protein production processes*, Eds. Vlak J. M., Schlaeger E. J., Bernard A. R., Roche, Basel, Switzerland, 274-284.
42. Yamaji H., Tagai S. I., Sakai K., Izumoto E., Fukuda H., (2000), *J. Biosci. Bioeng.*, 89, 12-17.
43. Elias C. B., Zeiser A., Bedard C., Kamen A. A., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 68, 381-388.
44. Bedard C., Perret S., Kamen A. A., (1997), *Biotechnol. Lett.*, 7, 629-632.
45. Schmid G., (1996), *Cytotechnol.*, 22, 43-56.
46. Hink W. F., Strauss E. M., (1980), *Invertebrate systems in vitro*, Eds. Kurstak E., Maramorosch K., Dumbendorfer A., Elsevier North Holland, Amsterdam, 27-33.
47. Zhang J., Kalogerakis N., Behie L. A., Iatrou K., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 357-366.
48. Kloepfinger M., Fertig G., Fraune E., Miltenburger H. G., (1990), *Cytotechnol.*, 4, 271-278.
49. Caron A. W., Tom R. L., Kamen A. A., Massie B., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 881-891.
50. Kioukia N., Nienow A. W., Emery A. N., Al-Rubeai M., (1995), *J. Biotechnol.*, 38, 243-251.
51. Zhang F. M., Saarinene M. A., Itle L. J., Lang S. C., Murhammer D. W., Linhardt R. J., (2002), *Biotechnol. Bioeng.*, 77, 219-224.
52. Tramper J., Williams J. B., Joustra D., (1986), *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 33-36.
53. O'Reilly D. R., Miller L. K., Luckow V. A., (1994), *Baculovirus expression vectors*, Oxford University Press.
54. Bedard C., Kamen A., Tom R., Massie B., (1994), *Cytotechnol.*, 15, 129-138.