

## AcNPV 감염 조건이 *Spodoptera frugiperda* 21 세포에서의 재조합 단백질 생산에 미치는 영향

김지선 · 이기웅 · 강석권<sup>1</sup> · 양재명<sup>2</sup> · 정인식\*  
경희대 유전공학과, <sup>1</sup>서울대 농생물학과, <sup>2</sup>서강대 생물학과

## Effect of AcNPV Infection Conditions on Recombinant Protein Production in *Spodoptera frugiperda* 21 Cells

Kim, Jee-Sun, Ki-Woong Lee, Seok-Kwon Kang<sup>1</sup>,  
Jai-Myung Yang<sup>2</sup> and In-Sik Chung\*

Department of Genetic Engineering, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea  
<sup>1</sup>Department of Agricultural Biology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea  
<sup>2</sup>Department of Biology, Sogang University, Seoul 120-749, Korea

**Abstract** — The effect of AcNPV infection conditions such as serum concentration, pH, CaCl<sub>2</sub>, lysosomotropic agent, cell density at infection, agitation, aeration and nutritional supplementation on recombinant protein production in *Spodoptera frugiperda* 21 cells was investigated using tissue culture flask, bottle and spinner flask. It was shown that serum, CaCl<sub>2</sub>, pH and cell density at infection affected recombinant protein production. The lysosomotropic agent did not significantly influence recombinant protein production. Increased β-gal production was obtained at 100 rpm in the media containing 0.3% methylcellulose. Aeration at the rate of 25 ml/min using silicone tubing method resulted in higher β-gal production. It was shown that fructose and glutamate supplementation improved β-gal production in an AcNPV-infected cell.

*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV)는 생물학적 살충제로써 뿐만 아니라 세균, 효모, 식물, 포유 동물로부터 온 외부 유전자에 대한 효율적인 발현 벡터로써도 널리 이용되고 있다(1-3). AcNPV는 강력한 promoter를 가지고 있는 polyhedrin 유전자에 외래 유전자를 삽입시킬 수 있으며 post-translational modification이 원활히 이루어지며 발현 후의 생물학적 활성도가 높다(4-5). AcNPV는 이러한 여러가지 장점 때문에 분자 수준에서의 단백질 기능에 대한 이해 뿐만 아니라 유전자의 작용 조절 기작에 대한 곤충 바이러스의 연구를 위해서도 많이 이용되고 있다(6-8).

현재 확립된 곤충 세포주는 *Aedes albopichis*, *Aedes*

*aegypti*, *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni* 등 여러 종류가 있으나 Lepidoptera로부터 만들어진 두 종류의 세포주가 AcNPV 발현 벡터의 숙주 세포로 주로 이용되고 있으며 이들은 fall army worm에서 유기된 *S. frugiperda*와 cabbage looper에서 유기된 *T. ni*이다. 그런데 *T. ni* 세포는 attachment dependent 세포이므로 현탁 배양이 가능한 *S. frugiperda*가 산업적으로 이용 가능성이 높은 것으로 알려져 있다(9).

곤충 세포-AcNPV 시스템을 이용하여 재조합 단백질을 생산하고자 할 때 중요한 것은 효율적으로 대량 생산해 내는 일이다. 그래서 이러한 시스템을 효과적으로 활용하기 위해서 세포 배양 조건, 무혈청 배지, 고농도 세포 배양용 생물 반응기 등에 대해서 많은 연구가 수행되고 있다(10-14). 그리고 재조합 단백질의 생산은 곤충 세포에의 재조합 AcNPV의 감염 과정과 밀접한 관계를 가지고 있어 AcNPV 복제 및 단백질

**Key words:** Recombinant protein production, *Spodoptera frugiperda* 21, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, infection

\*Corresponding author

생산에 필요한 DNA 및 단백질의 합성과 같은 세포의 생리적인 기능도 감염 환경 인자에 좌우될 수 있으므로 곤충 세포에서의 AcNPV에 의한 재조합 단백질 생산이 AcNPV 감염 조건에의 의존성에 대한 이해가 필요하다. 곤충 세포에 AcNPV가 감염될 때 감염 배지 중의 serum 농도 및 감염시의 세포 농도 등이 재조합 단백질 생산에 미치는 영향은 일부 보고된 바(15-17)가 있으나 감염 환경 인자와 재조합 단백질 생산과의 관계에 대한 체계적인 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 재조합 AcNPV에 의해 *S. frugiperda* IPLB-Sf-21가 감염될 때 혈청의 농도, pH, CaCl<sub>2</sub>의 농도, lysosomotropic agent, 감염시의 cell density, 교반 속도, 통기 및 영양원 첨가가 재조합 단백질 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 세포주와 배지

본 실험에 사용된 곤충 세포주는 *S. frugiperda* IPLB-Sf-21(SF-21)이다(14). Sf-21는 명시되지 않은 경우에 곤충 세포 배양용 Grace의 insect medium(Gibco)에 FBS 10%와 gentamycin sulfate 50 µg/ml, fungizone 2.5 µg/ml 및 sodium bicarbonate 0.35 g/ml가 첨가된 배지에서 배양되어졌다. 배지의 pH도 명시되지 않은 경우에는 6.2로 맞추어 사용하였다. 감염 배지로서는 Grace 배지에 gentamycin sulfate 50 µg/ml, fungizone 2.5 µg/ml 및 sodium bicarbonate 0.35 g/ml가 첨가된 배지 외에 FBS, 당, 아미노산, pH, CaCl<sub>2</sub> 또는 lysosomotropic agent가 조정된 배지를 이용하였다. 그리고 모든 배지는 0.2 µm cellulose nitrate membrane filter로 여과 살균하였다.

### 감염 조건 영향 실험

감염시 환경 조건으로 교반 속도, 통기량의 영향에 대한 실험은 bottle 및 spinner reactor를 사용하였으며 기타 명시되지 않은 경우에는 tissue culture flask(25 cm<sup>2</sup>)를 이용하였다. 통기량의 영향을 조사하기 위한 실험에서는 실리콘 튜브를 이용하여 생물 반응기에 통기하였다. 실리콘 튜브(직경 1 mm, 길이 750 mm)는 reactor(working volume 250 ml, Techne) 내부에 세 번 둘러 감았으며 튜브에 주입한 공기의량은 air flow meter로 측정하였다.

### 재조합 바이러스

Polyhedrin promoter 하단부에 대장균의 β-galactosidase 유전자가 삽입된 재조합 AcNPV를 사용하였다(14). 재조합 AcNPV를 곤충 세포에 감염시킬 경우 tissue culture flask, bottle 및 spinner reactor에서 multiplicity of infection(MOI)가 각각 0.5, 10, 10이 되도록 하였다.

### 세포의 생존도, 재조합 AcNPV의 수 및 재조합 단백질 측정

곤충 세포의 수는 hemacytometer로 측정하였고 세포의 생존도는 0.4% trypan blue dye exclusion 방법으로 착색하여 측정하였다(14). 재조합 AcNPV의 수는 plaque assay를 이용하여 측정하였다(18). 재조합 AcNPV에 의해 감염된 세포로부터 만들어지는 재조합 단백질의 생산은 Miller의 β-galactosidase assay 방법을 이용하여 그 활성도를 측정하였다(19).

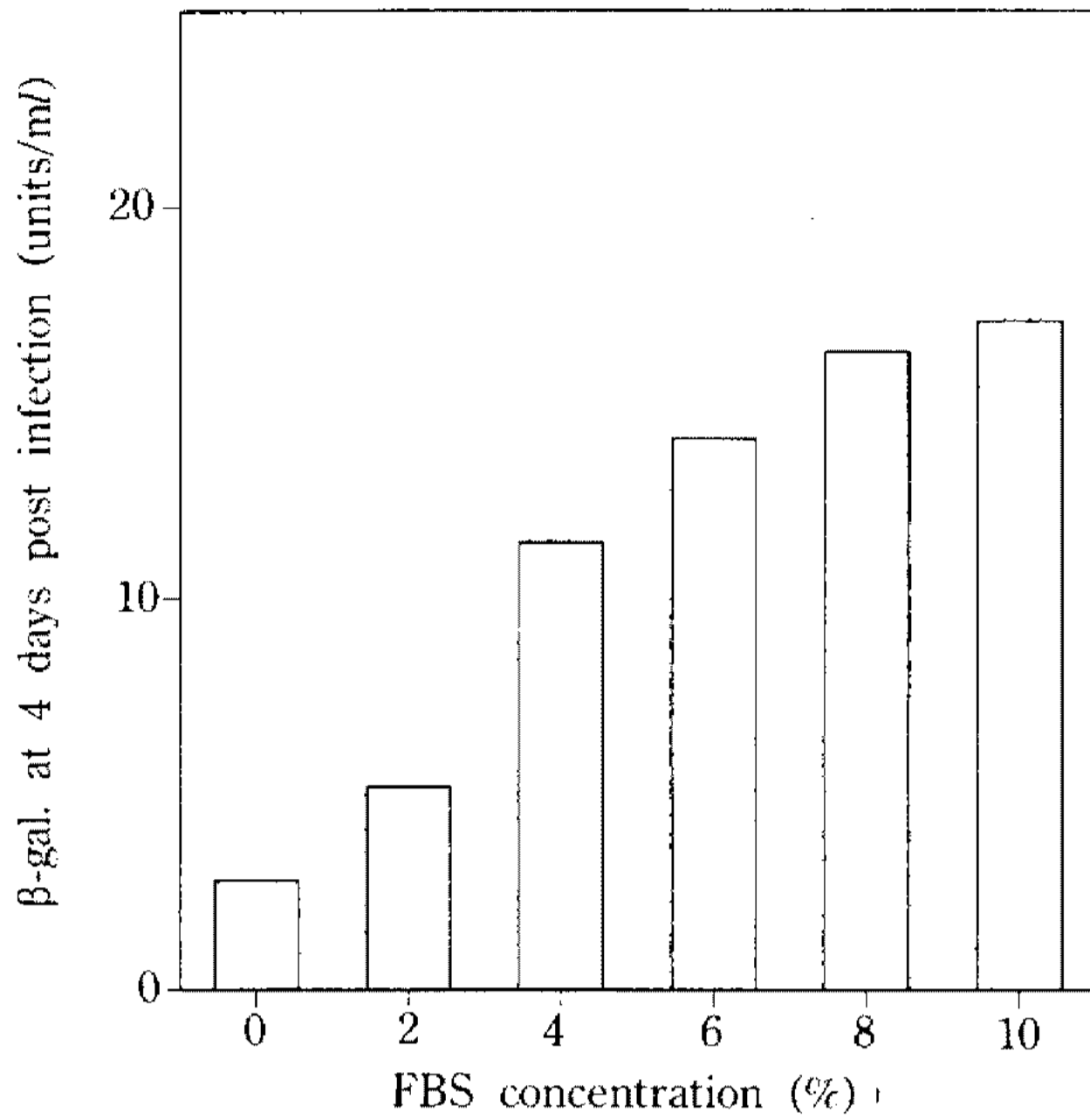
## 결과 및 고찰

곤충 세포에서 재조합 AcNPV의 증식은 감염 과정의 여러가지 요인들에 의해 그 정도의 차이가 생길 수 있으며 재조합 AcNPV에 의한 단백질 생산량도 달라질 수 있다. 따라서 재조합 AcNPV가 곤충 세포에 감염될 때 감염시의 여러가지 환경 인자들이 세포의 β-galactosidase(β-gal) 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 각각의 환경 인자에 대하여 명시된 경우를 제외하고 초기의 세포 농도는 tissue culture flask에서 1~2×10<sup>6</sup> cells/plate였고 suspension culture에서는 1~2×10<sup>5</sup> cells/ml이었으며, 감염 후 4일째의 β-gal 생산량으로 비교하였다.

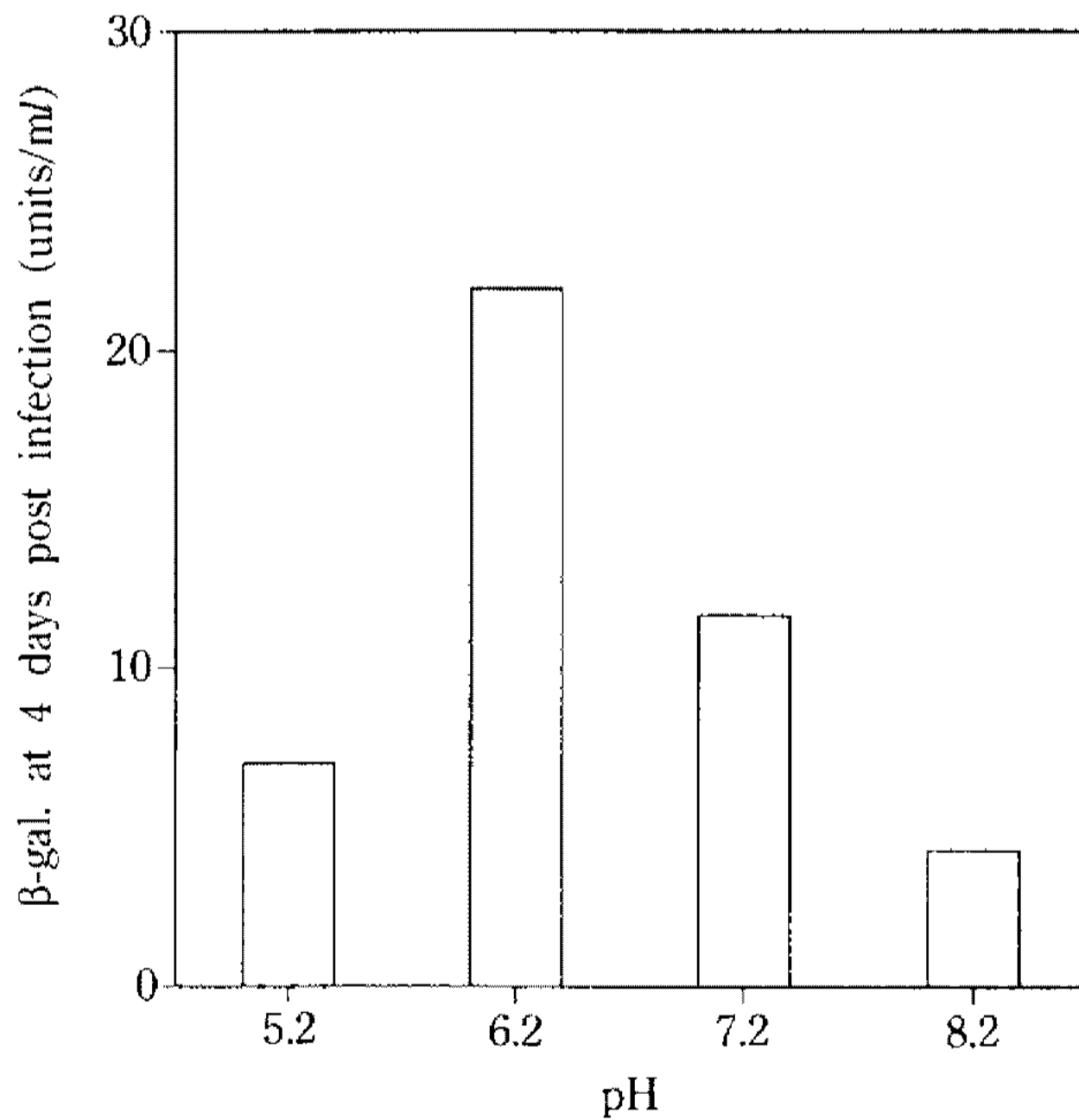
### 감염 배지 중의 serum 농도

Fig. 1은 FB serum을 0, 2, 4, 6, 8, 10%로 보강한 각각의 배지에서 감염 시켰을 때 감염된 바이러스의 β-gal assay 결과를 나타낸 것이다. FB serum의 농도가 증가할수록 β-gal의 생산도 증가하였으며 10%로 보강한 경우에 18 units/ml로서 가장 높게 나타났다. 이러한 실험 결과는 감염 배지 중의 serum 농도가 0.5%에서 10%로 증가함에 따라 재조합 단백질 수율이 감소하였다는 보고(17)와는 다른 것이었지만 비감염 세포의 최적 배양 조건과는 일치하며(14) AcNPV 감염시 serum 농도가 중요한 인자임을 나타낸다.

### 감염 시의 pH

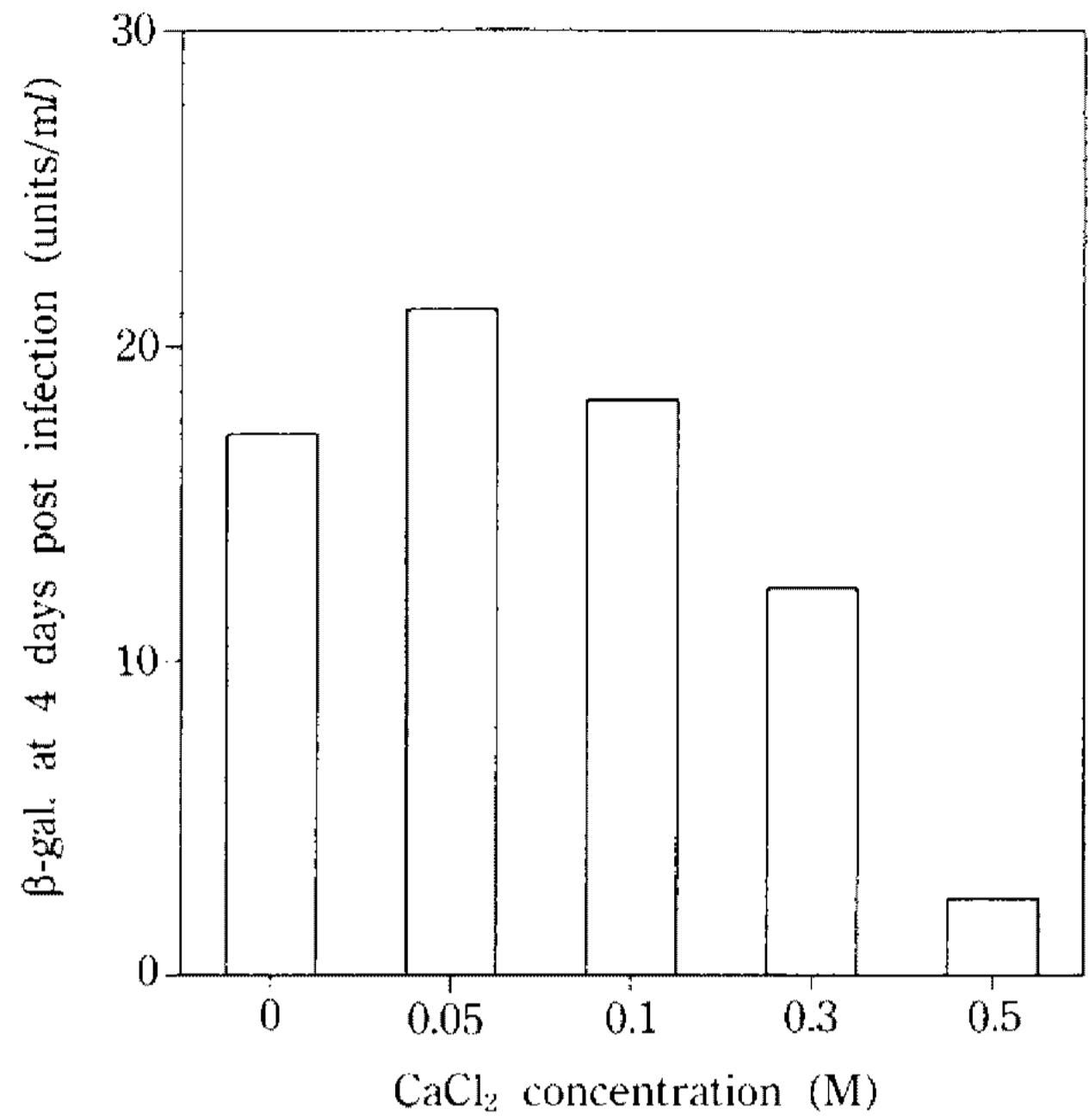


**Fig. 1. Effect of serum concentration on recombinant  $\beta$ -gal production.**  
Initial cell density,  $1.5 \times 10^6$  cells/plate. MOI, 0.5



**Fig. 2. Effect of pH on recombinant  $\beta$ -gal production.**  
Initial cell density,  $1.5 \times 10^6$  cells/plate. MOI, 0.5

곤충 세포 배양시의 최적 pH는 6.0~6.25로 알려져 있다(9). AcNPV 감염시의 pH가 cell-virus interaction 또는 cell metabolism에 영향을 줄 수 있으므로 pH 변화에 따른  $\beta$ -gal 생산량을 조사하였다. pH 5.2, 6.2, 7.2, 8.2로 맞추어진 배지에서 혈청 농도의 경우와 마찬가지로 실험하였는데 Fig. 2에서 보여주듯이 pH 6.2의 경우에 21 units/ml로 가장 높게 나타났다. 따



**Fig. 3. Effect of  $\text{CaCl}_2$  concentration on recombinant  $\beta$ -gal production.**  
Initial cell density,  $1.5 \times 10^6$  cells/plate. MOI, 0.5

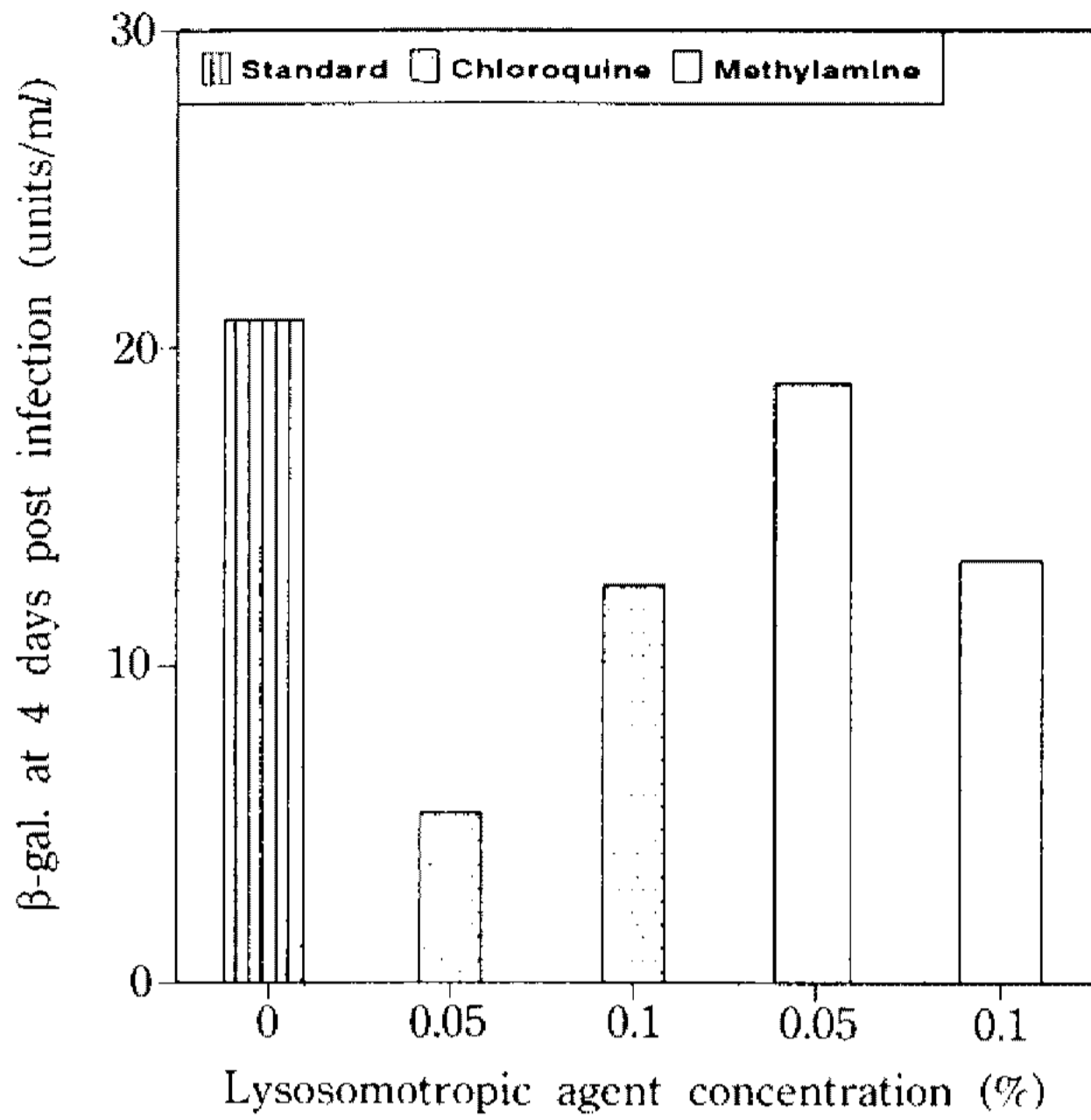
라서 이 실험에서 Sf-21에의 감염시 최적 pH는 세포 배양의 최적 조건과 일치함을 알 수 있었다.

#### 감염 배지 중의 $\text{CaCl}_2$ 농도

Cell-cell interaction 및 cell metabolism 등에 영향을 주는 것으로 알려진  $\text{CaCl}_2$ 의 농도가 재조합 단백질 생산에 미치는 영향을 조사하였다(20). Fig. 3에 나타나 있듯이 사용한  $\text{CaCl}_2$ 의 첨가 농도에 따라  $\beta$ -gal 생산에 현저한 차이를 보여주었는데 0 M에서 0.05 M로 증가할수록  $\beta$ -gal 생산이 증가하다가 0.05 M 이상에서는 감소하였다. 이것은 0.05 M 이상으로  $\text{CaCl}_2$ 의 농도가 높을 때는 cell-virus interaction은 증가하지만 cell metabolism 자체에는 좋지 않은 영향을 주기 때문인 것 같다. 따라서  $\text{CaCl}_2$  첨가 실험에서  $\beta$ -gal 생산은 0.05 M이 최적인 것으로 보인다.

#### Lysosomotropic agent

Vaccinia virus를 HeLa 세포에 감염시킬 경우 endosome의 pH를 변화시켜서 virus 감염을 용이하게 해주는 것으로 보고된 lysosomotropic agent를 사용하여(21) 그 효과를 관찰하였다. Lysosomotropic agent로는 methylamine( $\text{CH}_5 \cdot \text{HCl}$ )과 chloroquine( $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{ClN}_3 \cdot 2\text{H}_3\text{PO}_4$ )을 사용하였다. Fig. 4에서와 같이 재조합 AcNPV의 경우는 vaccinia virus와는 달리 methylamine과 chloroquine이  $\beta$ -gal 생산을 상당히



**Fig. 4. Effect of lysosomotropic agent on recombinant  $\beta$ -gal production.**

Initial cell density,  $1.5 \times 10^6$  cells/plate. MOI, 0.5

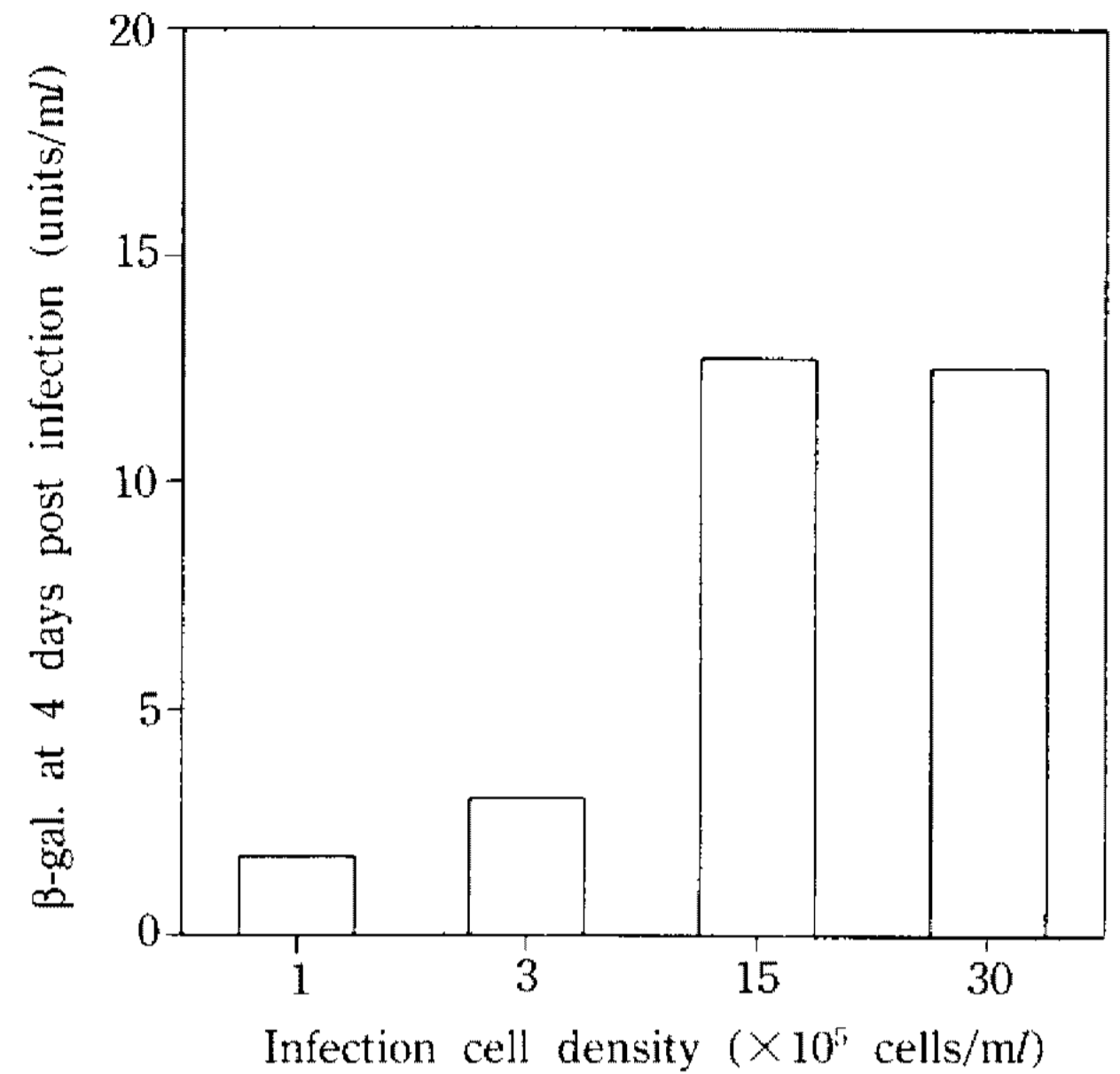
억제함을 발견하였다. 이것은 Chloroquine 및 Methylamine은 acidic endosome의 pH를 증가시킴으로 endocytosis로 들어온 AcNPV의 세포내에서의 process 즉 receptor-ligand의 dissociation에 defect를 초래하여 재조합  $\beta$ -gal 생산이 저해된 것으로 생각된다.

**감염시의 세포 농도**

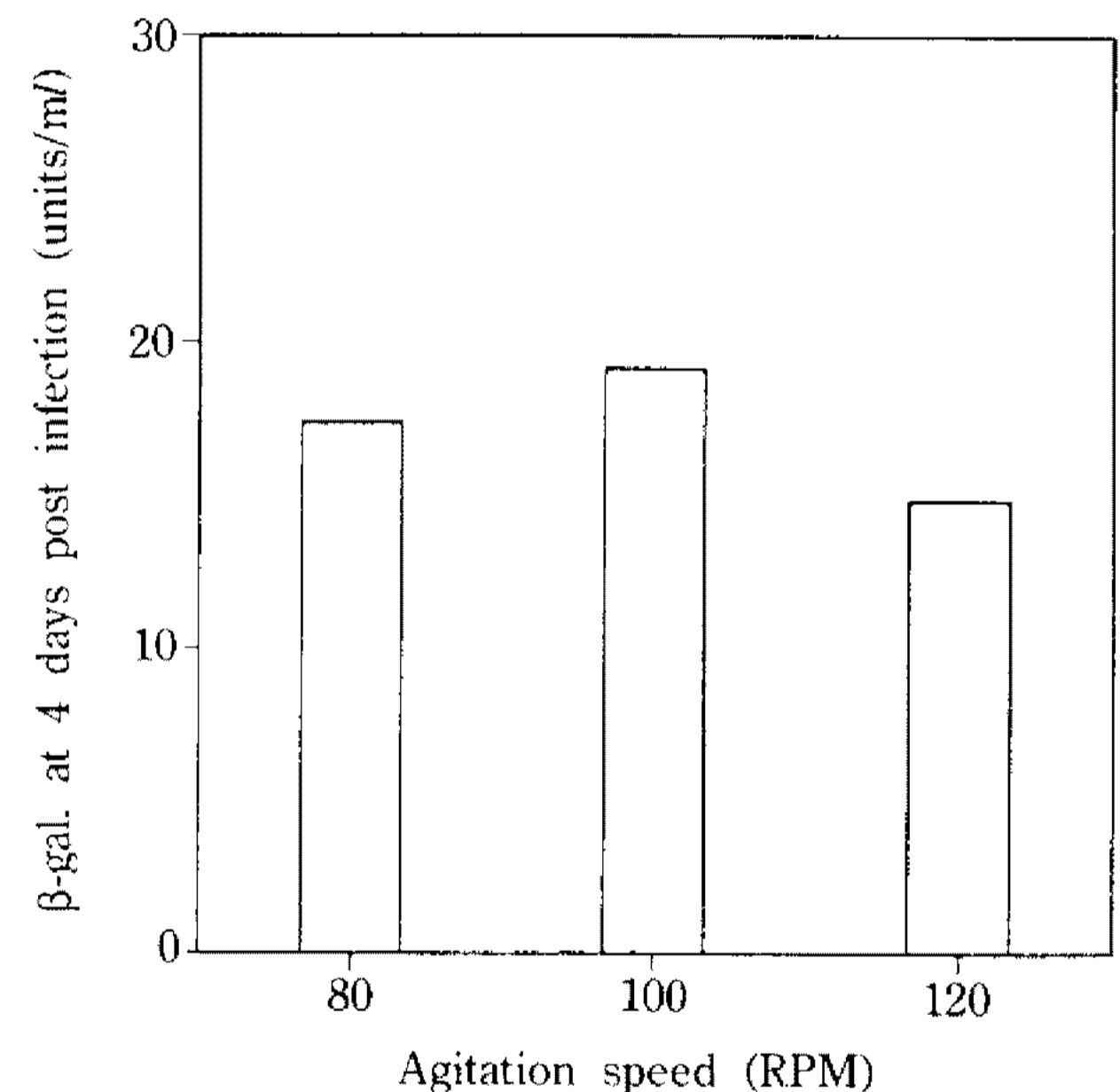
Fig. 5는  $\beta$ -galactosidase 생산에 감염시의 곤충 세포 농도의 영향을 살펴본 결과이다. AcNPV 감염시 숙주인 SF-21 세포의 농도가  $1 \times 10^5$  cells/plate,  $5 \times 10^5$  cells/plate,  $1.5 \times 10^6$  cells/plate,  $3 \times 10^6$  cells/plate 일 때 각각의  $\beta$ -gal 생산 정도를 비교하여 보았다.  $1.5 \times 10^6$  cells/plate에서  $3 \times 10^6$  cells/plate까지는 비교적 좋은  $\beta$ -gal 생산을 보여주는 것으로 나타났으며 이미 보고된 바(16, 17)와 같이 감염시의 세포 농도가 중요함을 알 수 있었다.

**교반 속도**

현탁 배양 중 교반 속도가 AcNPV 감염 과정에 미치는 영향을 조사하였다. 이 실험에는 0.3% methylcellulose를 첨가한 배지를 사용하였으며 재조합 AcNPV를 감염시킨 후 80, 100, 120 rpm의 교반 속도에서의  $\beta$ -gal 생산량을 알아보았다(Fig. 6).  $\beta$ -gal 생산의 경우에 100 rpm이 80 rpm, 120 rpm에 비해 약간 높은 것으로 나타나 0.3% methylcellulose 첨가시 100



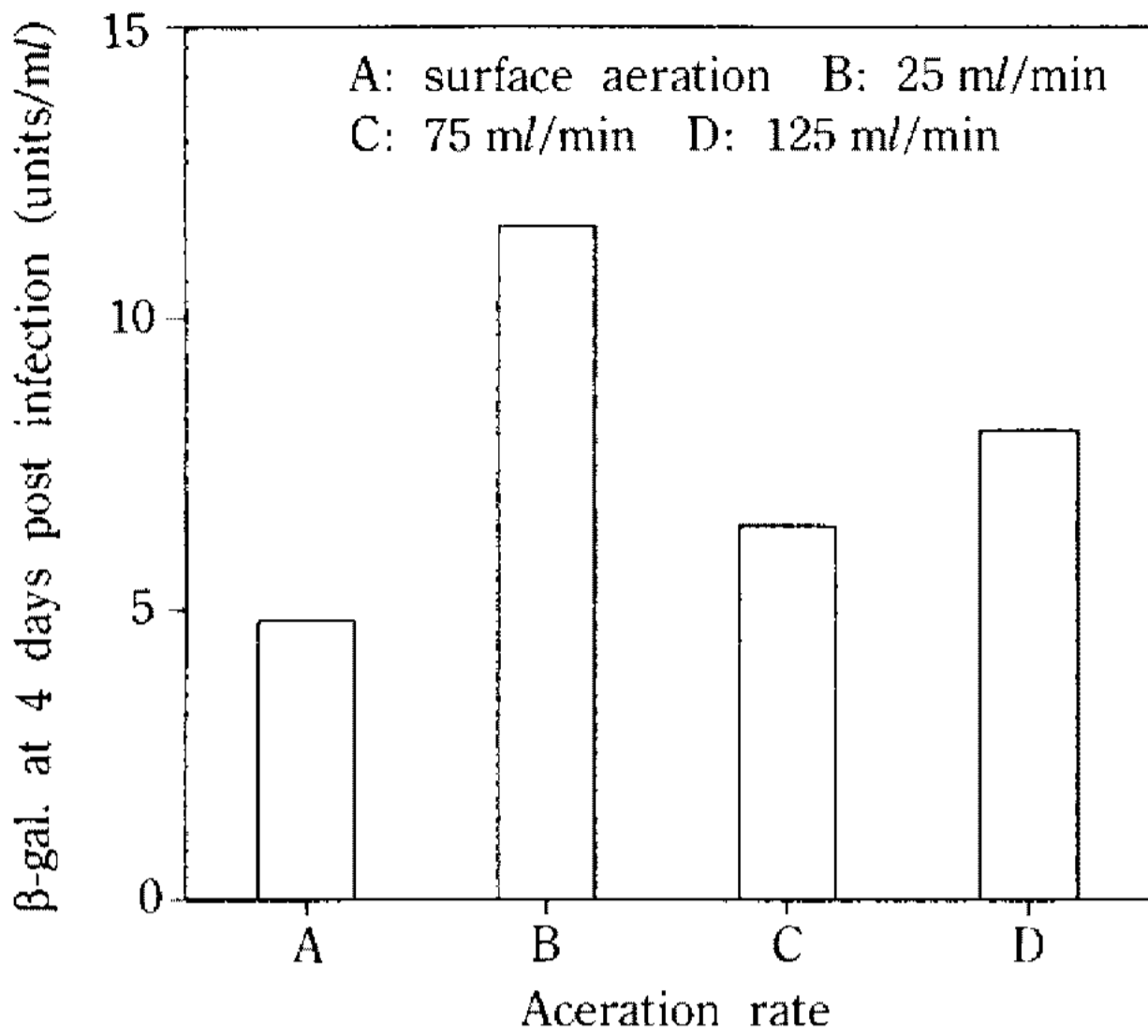
**Fig. 5. Effect of cell density at infection on recombinant  $\beta$ -gal production.**  
MOI, 0.5



**Fig. 6. Effect of agitation on recombinant  $\beta$ -gal production.**

Initial cell density,  $1 \times 10^5$  cells/ml. MOI, 10

rpm까지는 교반 속도를 높여도 좋은 것으로 생각된다. 이 조건에서  $\beta$ -gal 생산량은 20 units/ml이었으며 감염 초기 세포 농도에 대한 specific productivity는 20 units/ $10^5$  cells이었다. 그리고 감염 세포에 대한 이러한 최적 조건은 비감염 세포 배양에서 교반 속도의 영향에 관련된 타 연구자의 보고(14, 22-24)와 유사하였다.



**Fig. 7. Effect of aeration on recombinant β-gal production.**

Agitation speed, 80 rpm. Initial cell density,  $1.3 \times 10^5$  cells/ml. MOI, 10

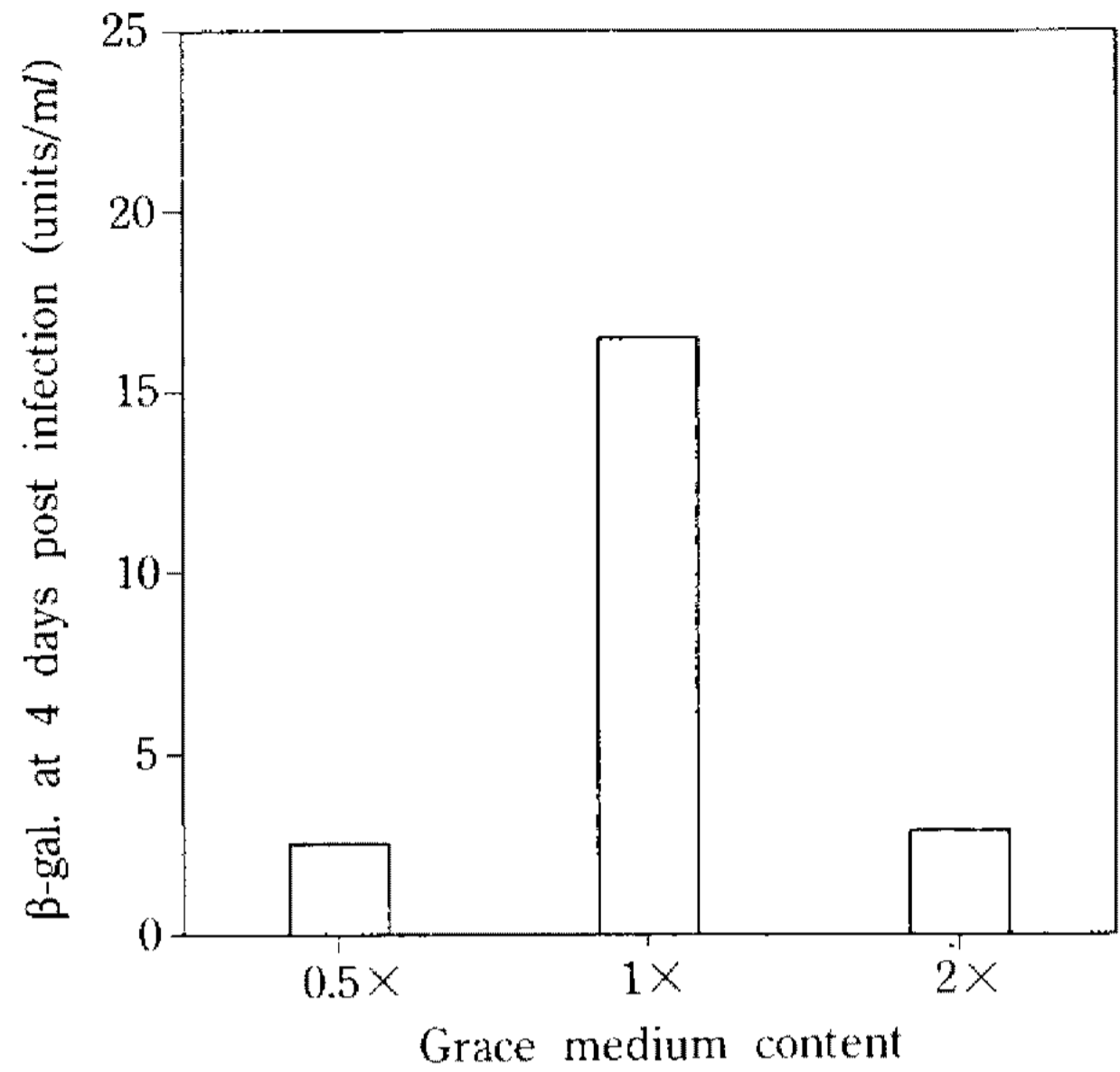
**통기량**

곤충 세포는 mammalian cell처럼 산소 요구량이 크며 oxygen limitation에 민감한 것으로 알려져 있다 (14, 25-27). 감염 세포내의 virus 복제시 통기의 영향을 알아보기 위하여 silicone tubing을 이용해서 25, 75, 125 ml/min으로 통기한 경우 및 25 ml/min의 surface aeration의 경우에 대하여 조사하였다. Surface aeration과 silicone tubing에서의 75 ml/min 및 125 ml/min의 통기 등 세 가지의 경우에는 거의 비슷한 정도였으나 25 ml/min의 silicone tubing에 의한 통기에서는 더 높은 농도의 β-gal이 생산되었다(Fig. 7). 따라서 감염 세포에서의 β-gal 생산에 최적 통기량이 존재함을 확인할 수 있었다.

**영양 요구성**

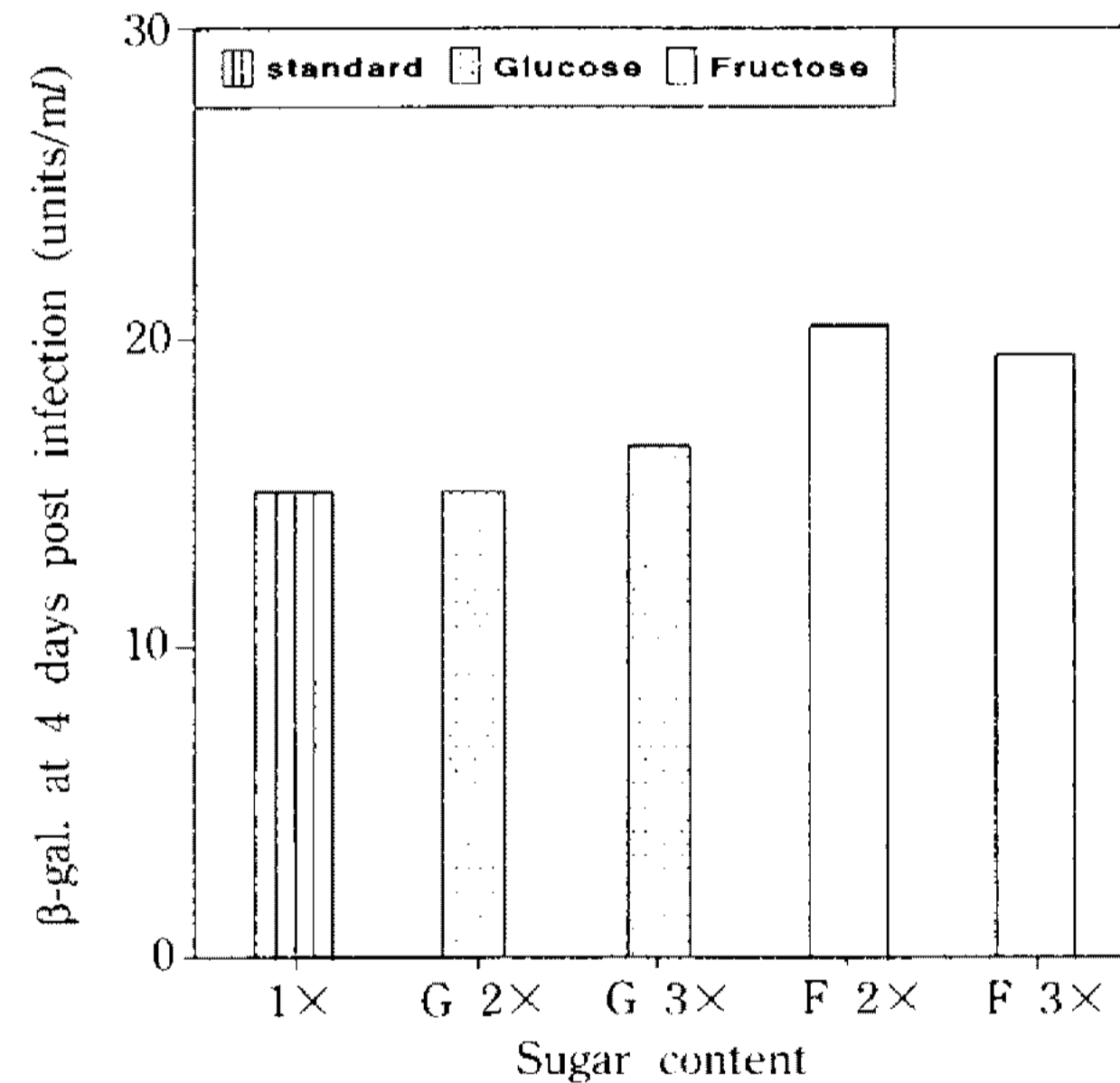
감염된 곤충 세포내에서 일어나는 바이러스 복제시의 영양 요구성을 알아보기 위하여 Grace 배지를 0.5X, 1X, 2X로 준비하여 감염시의 배지로 이용하였다. Fig. 8은 시간에 따른 β-gal 농도를 나타낸 그림으로 0.5X나 2X에 비해 1X 배지가 훨씬 더 높은 수준을 유지하였다. 따라서, 1X 배지를 기본 배지로 하고 곤충 세포 배지내의 중요 성분으로 알려진 당과 아미노산의 농도를 변화시켜 실험하였다(16, 28-29).

Glucose와 fructose의 성분만을 두 배(2X) 또는 세 배(3X) 더 첨가한 배지를 만들어 β-gal 생산성을 조사하였는데 Fig. 9에서 보는 바와 같이 glucose의 경우는 1X, 2X, 3X 모두 큰 차이는 없었지만 fruc-



**Fig. 8. Effect of Grace media on recombinant β-gal production.**

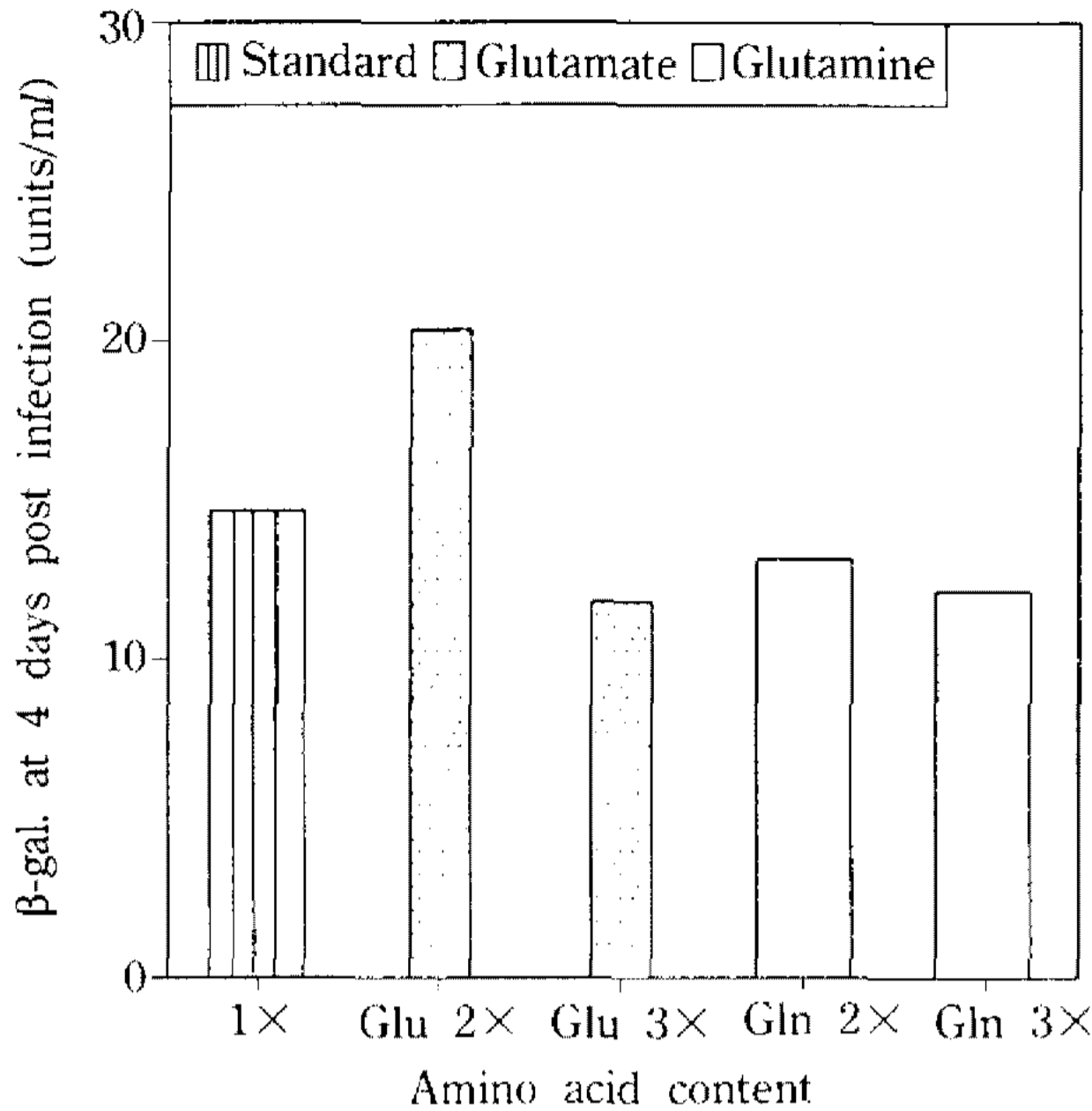
Initial cell density,  $1.6 \times 10^6$  cells/plate. MOI, 0.5



**Fig. 9. Effect of glucose and fructose concentration on recombinant β-gal production.**

Initial cell density,  $2 \times 10^6$  cells/plate. MOI, 0.5

tose의 경우는 2X 배지에서 높은 β-gal 생산을 보여주었다. 아미노산의 경우는 glutamate, glutamine의 각각의 성분만을 두 배(2X) 또는 세 배(3X)로 더 첨가하여 실험해 보았다. Glutamine의 경우는 2X와 3X 배지에서 β-gal 생산이 감소하였지만 glutamate의 경우는 2X 배지에서 높은 β-gal 생산을 보여주었다(Fig. 10). 따라서 배지에 영양원으로써 fructose와 glutamate의 보강 첨가는 β-gal 생산을 향상시킴을 알 수 있었다.



**Fig. 10. Effect of glutamate and glutamine concentration on recombinant beta-gal production.**  
Initial cell density,  $2 \times 10^6$  cells/plate. MOI, 0.5

**요 약**

Tissue culture flask, bottle 및 spinner flask를 이용하여 *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus의 Sf-21 세포에의 감염시 혈청의 농도, pH,  $CaCl_2$ 의 농도, lysosomotropic agent, 감염시의 세포 농도, 교반 속도, 통기량, 영양 요구성 등 여러가지 감염 조건의 재조합 단백질 생산에 대한 영향을 살펴보았다. AcNPV의 재조합 단백질 생산은 혈청의 농도,  $CaCl_2$ , pH, 감염시의 세포 농도에 영향을 받았으나 lysosomotropic agent는 beta-gal 생산을 높이는데 효과적이지 못했다. 교반 속도는 100 rpm에서 높은 beta-gal 농도를 보여주었으며 실리콘 튜빙을 이용한 25 ml/min의 통기량에서 높은 beta-gal이 생산되었다. 배지내의 fructose와 glutamate의 보강 첨가는 beta-gal 생산을 향상시키는 것을 알 수 있었다.

**감사의 말**

본 연구는 91년도 과학 재단 목적 기초 연구비 지원 (과제번호 : 91-0500-13)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

**참고문헌**

1. Smith, G.E., M.D. Summers and M.J. Frazer.

1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 2156-2165.  
 2. Mariorella, B., D. Inlow, A. Shauger and D. Harane. 1990. Large-Scale insect cell-culture for recombinant protein production. *Bio/Technology.* **6**: 1406-1410.  
 3. Luckow, V.A. and M.D. Summers. 1988. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/technology.* **6**: 47-55.  
 4. Jarvis, D.L., J.A.G.W. Fleming, G.R. Kovacs, M. D. Summers and L.A. Guarino. 1990. Use of early baculovirus promoters for continuous expression and efficient processing of foreign gene products in stably transformed lepidopteran cells. *Bio/Technology.* **8**: 950-955.  
 5. Luckow, V.A. 1991. Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors, Pp. 97-152. In Prokop, A., R.K. Bajpai and C.S. Ho(eds), *Recombinant DNA Technology and Applications*. McGraw-Hill, New York.  
 6. Friesen, P.D. and L.K. Miller. 1986. The regulation of baculovirus gene expression, Pp. 31-50. In Doerfler, W. and P. Boehm(eds), *The Molecular Biology of Baculoviruses*. Springer-Verlag, Berlin.  
 7. Thiem, S.M. and L.K. Miller. 1989. Identification, sequence and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis. *J. Virol.* **63**: 2008-2018.  
 8. Thiem, S.M. and L.K. Miller. 1990. Differential gene expression mediated by late, very late and hybrid baculovirus promoters. *Gene.* **91**: 89-94.  
 9. 김학렬, 정인식. 1991. 곤충 세포의 현탁 배양 기술. *생물화공.* **5**: 28-35.  
 10. Murhammer, D.W. and C.F. Goochee. 1988. Scaleup of insect cell cultures: Protective effects of Pluronic F-68. *Bio/Technology.* **6**: 1411-1418.  
 11. Wu, J., G. King, A.J. Daugulis, P. Faulkner, D.H. Bone and M.F.A. Goosen. 1989. Engineering aspects of insect cell suspension culture: a review. *Appl. Microbial Biotechnol.* **32**: 249-255.  
 12. Van Lier, F.L., E.T van den End, C.D. de Gooijer, J.M. Vlak and J. Tramper. 1990. Continuous production of baculovirus in a cascade of insect-cell reactors. *Appl. Microbial. Biotechnol.* **33**: 43-47.  
 13. Wu, S.C., B.E. Dale and J.C. Liao. 1993. Kinetic characterization of baculovirus-induced cell death in insect cell culture. *Biotechnol. and Bioeng.* **41**: 104-110.  
 14. Park, Y.M. 1991. Development of mass production system of useful proteins in insect cells. M.S.

- Thesis, Kyunghee University, Korea.
15. Broussarad, D.R. and M.D. Summers. 1989. Effect of serum concentration and media composition on the level of polyhedrosis and foreign gene expression by baculovirus vectors. *J. Invert. Pathol.* **52**: 144-150.
  16. Caron, A.W., J. Kamen, and B. Massie. 1990. High-level recombinant protein production in bioreactors using the baculovirus insect cell expression system. *Biotechnol. and Bioeng.* **36**: 1133-1140.
  17. Lazarte, J.E., P.F. Tosi and C. Nicdau. 1992. Optimization of the production of full-length rCD4 in baculovirus-infected Sf 9 cells. *Biotechnol. and Bioeng.* **40**: 214-217.
  18. Summers, M.D. and G.E. Smith. 1987. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas A & M university, Texas.
  19. Miller, J.H. 1992. Assay of beta-galactosidase. Pp. 352-355. *In Experiments in molecular biology*, Cold Spring Harbor, New York.
  20. Prokop, A. 1991. Implications of cell biology in animal cell biotechnology, Pp. 21-58. *In Ho, C.S. and D.I.C. Wang(eds), Animal Cell Bioreactors*, Butterworth-Heinemann, U.S.A.
  21. Chillakuru, R.A., D.D.Y. Ryu and T. Yilma. 1991. Propagation of recombinant vaccinia virus in HeLa cells. *Biotechnol. Prog.* **7**: 85-92.
  22. Agathos, S.N., Y.H. Jeong, A.M. Fallon and K. Venkat. 1990. Growth kinetics of free and immobilized insect cell cultures. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **589**: 372-398.
  23. 김학렬. 1992. 곤충 세포를 이용한 재조합 단백질 생산의 최적화 및 생물 반응기 개발, 석사학위논문, 경희대학교.
  24. Neutra, R., B.Z. Levi and Y. Shoham. 1992. Optimization of protein production by the baculovirus vector system in shake flasks. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* **37**: 74-78.
  25. Street, D.A. and W.F. Hink. 1978. Oxygen consumption of *Trichoplusia ni* (TN-368) insect cell line infected with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Invert. Pathol.* **32**: 112-113.
  26. Murhammer, D.W. and C.F. Goochee. 1990. Sparged animal cell bioreactors: Mechanism of cell damage and pluronic F-68 production. *Biotechnol. Prog.* **6**: 395-397.
  27. Scott, R.I., J.H. Blanchard and C.H.R. Ferguson. 1992. Effect of oxygen on recombinant protein production by suspension cultures of *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) insect cells. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 798-804.
  28. Kamen, A.A., R.L. Thon, A.W. Caron, C. Chavarie, B. Massie and J. Archambault. 1991. Culture of insect cells in a helical ribbon impeller bioreactor. *Biotechnol. and Bioeng.* **38**: 619-628.
  29. Wang, M.Y., S. Kwong and W.E. Bentley. 1993. Effect of Oxygen/Glucose/glutamine feeding on insect cell-baculovirus expression: A study on epoxide hydrolase production. *Biotechnol. Prog.* **9**: 355-361.

(Received August 26, 1993)