

SẢN XUẤT PROTEIN ERYTHROPOIETIN THÔNG QUA QUÁ TRÌNH CHUYỂN GEN TRÊN TẾ BÀO CHO - K1 (CHINESE HAMSTER OVARY)

Development Erythropoietin via Transfection of Chinese Hamster Ovary Cell Type K1 (CHO – K1)

Lê Trâm Nghĩa Thụ¹, Trần Phong¹, Hoàng Thanh Tuấn¹, Quan Quốc Đăng²,
Đỗ Minh Sĩ¹, Đàm Sao Mai³

¹Phòng thí nghiệm Nghiên cứu và Ứng dụng tế bào gốc, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp.HCM

²Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học động vật, Trường Đại học Công nghiệp Tp.HCM

³Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Trường Đại học Công nghiệp Tp.HCM

Địa chỉ email tác giả liên lạc: damsaomai@foodtech.edu.vn

Ngày gửi đăng: 21.01.2010; Ngày chấp nhận : 17.03.2010

TÓM TẮT

Erythropoietin (EPO) là nhân tố tăng trưởng máu, chịu trách nhiệm chính cho việc kích thích, điều hòa sự sản xuất hồng cầu ở động vật hữu nhũ. EPO được sử dụng trong điều trị bệnh thiếu máu liên quan đến suy thận mãn tính. EPO tái tổ hợp trên thị trường rất khan hiếm và có giá thành cao. Quá trình chuyển gene *epo* vào tế bào CHO - K1 bằng ExGen 500 được thực hiện nhằm tạo dòng tế bào có khả năng sản xuất Erythropoietin. Sau khi xác định sự biểu hiện protein tạm thời thành công, tế bào được nuôi cấy chọn lọc trong môi trường có Zeocin (100 µg/ml). Bằng phương pháp PCR, tế bào sau chọn lọc được xác định có sự biểu hiện gen *epo*. Năng suất sản xuất EPO trung bình của những tế bào này được định lượng qua phương pháp ELISA sandwich là $2,055 \pm 0,015$ pg/tế bào/ngày.

Từ khóa: Chuyển gene, EPO, protein tái tổ hợp, tế bào CHO-K1.

SUMMARY

Erythropoietin (EPO) is a haemopoietic growth factor. It is primarily responsible for stimulating and regulating erythropoiesis in mammals. EPO was first used therapeutically for the treatment of anaemia associated with chronic kidney failure. Recombinant EPO is not readily available in the market and temporarily, its price is relatively high. Therefore, we transfected and detected CHO - K1 cells expressing *epo* gene by transfecting pEPO into the cells via ExGen 500. After being detected transient protein expression, those cells were cultured on the selective medium with 100 microgram zeocin per milliliter in two weeks in order that cells containing entire vector integrated into chromosomal DNA could survive. Finally, we analyzed screened cells which integrated *epo* gene into host cell genome by PCR method and EPO production of stable transfected cells was quantified by sandwich ELISA (2.055 ± 0.015 picogram per cell per day). The transfected cells could be used to clone single cell lines that have high and stable EPO production.

Key words: CHO-K1 cell, EPO, gene transfection, recombinant protein.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Công nghệ sinh học được, ngành công nghệ sinh học chuyên sản xuất các phân tử sinh học chủ yếu bằng con đường tái tổ hợp ngày càng phát triển trong việc sản xuất các protein trị liệu trên người. Ngành công nghiệp này mang lại lợi nhuận khổng lồ cho các nhà sản xuất, ví dụ như công ty Genentech's (Vacaville, CA, Mỹ), chỉ với một mặt hàng duy nhất là thuốc chữa bệnh thiếu máu do suy thận EPOGEN (hay AMGEN), bản chất là erythropoietin tái tổ hợp sản xuất từ tế bào CHO đã thu lợi trung bình hàng năm là 6,5 tỉ USD. Tuy nhiên, trong vài năm trở lại đây, khả năng cung cấp các mặt hàng của ngành công nghệ sinh học được vẫn chưa theo kịp nhu cầu ngày càng tăng của thị trường.

Erythropoietin (EPO) là một nhân tố tăng trưởng máu, chịu trách nhiệm cơ bản cho việc kích thích và điều hòa sự sản xuất hồng cầu ở động vật hữu nhũ. EPO kích thích sự sản xuất hồng cầu bằng cách gia tăng số lượng tế bào có khả năng biệt hóa thành hồng cầu, đẩy mạnh tỉ lệ biệt hóa của những tế bào đó, gia tăng tỉ lệ tổng hợp haemoglobin trong các tế bào đang phát triển. EPO được sử dụng trị liệu đầu tiên vào năm 1989 để điều trị bệnh thiếu máu liên quan tới suy thận mãn tính (Gary Walsh, 2003).

Ở Việt Nam, việc chuyển gene epo chưa được thực hiện rộng rãi, các nghiên cứu về tế bào động vật chuyển gene ổn định cũng như việc sản xuất protein tái tổ hợp bằng tế bào động vật cũng chưa được tiến hành nhiều. Do vậy, nhóm nghiên cứu về chuyển gen và protein tái tổ hợp đã tiến hành hướng nghiên cứu nuôi cấy dòng tế bào CHO-K1 để chuyển gene, sau đó chọn lọc quần thể tế bào CHO-K1 sản xuất EPO ổn định. Tế bào CHO-K1 được chọn làm tế bào chủ vì chúng mang bộ máy dịch mã và biến đổi sau dịch mã gần như ở cơ thể người, có sự phát triển nhanh chóng, khả năng sản xuất protein cao, có tính an toàn cao do dòng tế bào này không nhiễm các virus độc hại trong quá trình chuyển gen, sự biểu hiện gene ổn định lâu

dài cùng với giá thành nuôi cấy thấp (Florian và Martin Jordan, 2003; Jayapal và cs., 2007; Kao và Puck, 1968; Lubiniecki và cs., 1990).

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Tế bào CHO-K1 (ATCC CCL 61).
- Hóa chất dùng cho chuyển gene ExGen 500, PCR, điện di, ELISA... của các hãng Sigma, Merck, Fermentas, Invitrogen... được pha tùy theo mục đích sử dụng và theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phương pháp chuyển gene EPO vào tế bào CHO-K1 bằng ExGen 500

Tế bào được nuôi cấy trong đĩa 24 giếng (Corning, Hoa Kỳ) với mật độ 10^5 tế bào/ml sau 24 giờ được sử dụng làm nguồn vật liệu cho quá trình chuyển gen. Pha loãng 1 μ g DNA vào 100 μ l NaCl 150 mM, vortex 5 giây. Sau đó thêm 3,3 μ l ExGen 500, vortex dung dịch ngay lập tức trong 10 giây, ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau thời gian ủ, đổ bỏ dịch nuôi cấy tế bào trong đĩa, rửa với dịch đệm PBS. 300 μ l môi trường HAMF12 mới 10% FBS không kháng sinh được bổ sung vào. Phức hợp ExGen 500/DNA được thêm nhỏ giọt vào giếng. Đĩa được ủ ở 37°C, 5% CO₂. Sau 2 - 3 giờ bổ sung 600 μ l HAMF12 10% FBS không kháng sinh.

2.2.2. Phương pháp đánh giá sự biểu hiện của tế bào được chuyển gene

• Phương pháp ELISA sandwich

Phiến được ủ bằng kháng thể đa dòng kháng EPO (polyclonal anti EPO) (Abcam) 0,1 μ g/ml (pha trong PBS) qua đêm ở nhiệt độ phòng. Sau đó các giếng được rửa 5 lần bằng dung dịch rửa. Tiếp tục khóa phiến 1 giờ ở nhiệt độ phòng bằng dung dịch khóa phiến (1% BSA trong PBS) rồi rửa phiến 5 lần bằng dung dịch rửa. Sau khi rửa phiến, kháng nguyên (EPO) được thêm vào như sau: Mẫu chuẩn pha loãng bậc 2 từ 5 μ g/ml,

mẫu cần định lượng không pha loãng rồi ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Tiếp đến ủ kháng thể đơn dòng kháng EPO (0,1 µg/ml) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng sau khi đã rửa phiên 5 lần bằng dung dịch rửa. Sau khi ủ, tiến hành rửa phiên 5 lần bằng dung dịch rửa và ủ kháng thể thứ cấp (kháng thể kháng IgG chuột gắn men PO) 0,1 µg/ml trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Tiếp tục rửa phiên 7 lần bằng dung dịch rửa. Cuối cùng, thêm cơ chất TMB và ngừng phản ứng bằng H₂SO₄ 2M. Kết quả được đọc bằng máy đọc ELISA ở bước sóng 450 nm.

• Phương pháp PCR

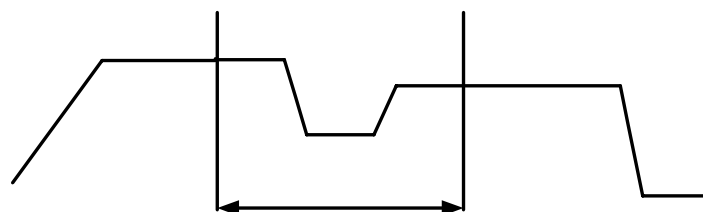
Phương pháp PCR dùng để khuếch đại chuyên biệt đoạn gene mục tiêu. Vì vậy nó được sử dụng nhằm xác định xem có sự chèn gene *epo* vào trong bộ gene của tế bào được chuyển hay chưa. Sản phẩm PCR sau đó được phát hiện nhờ điện di, nếu có tín hiệu nghĩa là tế bào chuyển gene đã mang gene

epo trong bộ gene của nó. DNA nhiễm sắc thể (NST) được tách từ những tế bào chuyển gene sử dụng bộ KIT Wizard™ Geneomic DNA Purification Kit (Promega).

Phản ứng PCR được thiết kế như sau:

Mater mix 20X	12,5 µl
DNA	2 µl
Môi EPO	1,5 µl
H ₂ O đủ	25 µl

Bổ sung các thành phần của phản ứng PCR trong các loại eppendorf sau: eppendorf chứa DNA bộ gene của tế bào chuyển gene sống sót sau 2 tuần chọn lọc, eppendorf chứa DNA bộ gene của tế bào không chuyển gene, eppendorf chứa DNA vector (đối chứng dương) và eppendorf không chứa DNA khuôn (đối chứng âm) cho đủ 25 µl và thực hiện phản ứng trong máy PCR (BioHit, Hoa Kỳ) như sau:



Giai đoạn tách mạch ban đầu	94°C	3'	
Giai đoạn tách mạch	94°C	45"	40
Giai đoạn gắn môi	52°C	45"	chu
Giai đoạn tổng hợp	72°C	60"	kỳ
Giai đoạn tổng hợp cuối cùng	72°C	10'	

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Biểu hiện gene *epo* tạm thời

Do EPO được tạo ra bằng sử dụng vector pEPO trong nghiên cứu này là protein tiết nên để đánh giá sự biểu hiện tức thời của gene *epo* nên sau 72 giờ, dịch môi trường nuôi cấy ở giếng chuyển gene và giếng đối chứng được thu nhận. Dịch môi trường được cô đặc bằng dụng cụ ly tâm cô đặc và được sử dụng trong thử nghiệm

ELISA sandwich. Dịch môi trường ở giếng chuyển gene sau khi cô cạn được chia thành 3 phần kí hiệu EPO1, EPO2, EPO3, tương tự như vậy, dịch cô cạn của giếng không chuyển gene cũng được chia thành 3 phần kí hiệu DC1, DC2, DC3. Để xác định được nồng độ EPO, ta phải thực hiện phản ứng ELISA với các giếng có EPO với nồng độ đã biết trước và đối chứng âm (PBS). Số liệu đo mật độ quang ở bước sóng 450 nm của các giếng được trình bày ở bảng 1.

94°C 94°C
3 phút 45 s

52°C
45 s

Bảng 1. Kết quả ELISA của môi trường nuôi cấy tế bào chuyển gene tạm thời

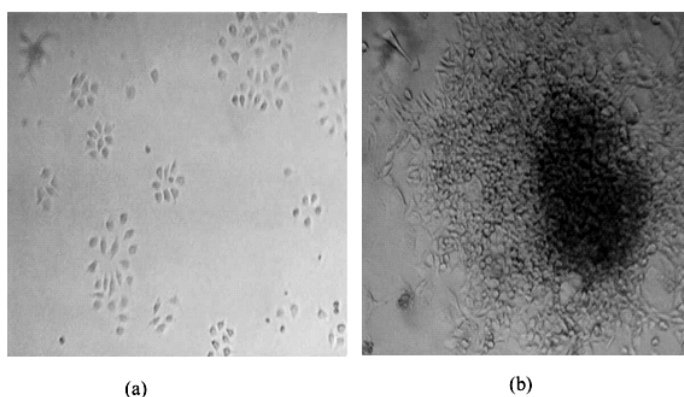
Giếng TN	OD	Giếng chứa EPO chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)	OD
EOP1	0,132	1,250	0,310
EOP2	0,130	0,625	0,203
EOP3	0,129	0,313	0,175
DC1	0,104	0,156	0,142
DC2	0,102	0,078	0,115
DC3	0,096	0,039	0,102
Đối chứng âm	0,102	0,0195	0,098

Từ số liệu ở bảng 1, phương trình tuyến tính có được là $y = 0,167x + 0,104$. Theo lý thuyết các mẫu dịch chiết nuôi cấy có OD 450 > OD của đối chứng âm (0,102) sẽ là các mẫu dương tính. Tuy nhiên dựa vào phương trình tuyến tính, giá trị cut-off (là giá trị được chọn để quy định các mẫu âm tính, dương tính) sẽ là 0,104. Những giá trị trên ngưỡng giá trị cut-off là các mẫu dương tính thật. Chỉ có các giếng EPO mới có giá trị OD trên ngưỡng cut-off, thay các giá trị OD này vào công thức $y = 0,167x + 0,104$, ta tính được nồng độ EPO của 3 mẫu, sau đó tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn là $0,159 \pm 0,005$ ($\mu\text{g/ml}$). Do mẫu dịch môi trường ban đầu có thể tích tổng $V = 1$ ml và dịch dùng trong thử nghiệm ELISA được cô cạn 3 lần so với dịch môi trường ban đầu, nên lượng EPO được biểu hiện tức thời sẽ là $0,477 \pm 0,015$ μg . Điều này cho thấy rằng tế bào CHO-K1 đã được chuyển gene thành công và có biểu hiện tức thời gene

epo. Những tế bào này được tiếp tục chọn lọc trong môi trường Ham's F12, 10% FBS, 100 $\mu\text{g/ml}$ Zeocin trong 2 tuần để thu được tế bào chuyển gene bền vững.

3.2. Tuyển chọn tế bào chuyển gene ổn định bằng môi trường chọn lọc

Sau khi chuyển gene thành công và biết được nồng độ kháng sinh tối thiểu để giết chết tế bào, việc chọn lọc những tế bào chuyển gene ổn định từ những tế bào chuyển gene tạm thời bằng việc nuôi cấy chúng trong môi trường chọn lọc có nồng độ kháng sinh zeocin 100 $\mu\text{g/ml}$ trong 14 ngày đã được tiến hành (không được nêu trong bài báo này). Kết quả là chỉ có một vài tế bào còn sống sót, đó là những tế bào có vector còn nguyên vẹn được sát nhập ổn định vào DNA NST của tế bào chủ. Những tế bào này sẽ tăng sinh và hình thành những cụm tế bào (cell cluster hay cell colony) (Hình 1).



Hình 1. Những cụm tế bào CHO-K1 được hình thành từ tế bào chuyển gene ổn định sau khi chọn lọc bằng môi trường chọn lọc: (a) những cụm tế bào sau 10 ngày chọn lọc (x 100); (b) cụm tế bào sau 20 ngày chọn lọc (x 100)

Sau thời gian chọn lọc từ 14 ngày, tế bào chuyển gene được nuôi trong môi trường có nồng độ kháng sinh thấp hơn chứa 50 µg/ml zeocin. Đây là nồng độ zeocin được sử dụng để duy trì sự tồn tại của gene mục tiêu đã chèn vào trong DNA NST để tránh sự mất gene của các tế bào đã biểu hiện gene bền vững.

3.3. Biểu hiện gene epo bền vững

Để khẳng định tế bào sau chọn lọc là tế bào chuyển gene ổn định, có nghĩa là vector đã được chèn ổn định vào trong bộ gene của tế bào chủ, tiến hành xác định sự chèn gene *epo* vào bộ gene tế bào chủ bằng phương pháp PCR và xác định nồng độ EPO được tiết ra bằng phương pháp ELISA sandwich.

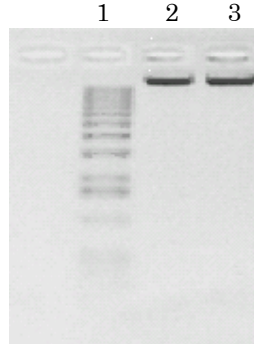
3.3.1. Sự sát nhập của gene *epo* vào bộ gene tế bào chủ

Để thực hiện phản ứng PCR nhằm xác định có xảy ra sự chèn gene *epo* vào trong DNA NST, đầu tiên DNA NST của tế bào sau 2 tuần chọn lọc bằng kháng sinh và DNA NST của tế bào không chuyển gene được tách bằng bộ kit Wizard™ Geneomic DNA Purification KIT (Promega). Để đánh giá tương đối DNA NST thì sau khi tách DNA,

DNA NST của tế bào chuyển gene ổn định và tế bào chưa chuyển gene được điện di trên gel agarose 1% và kết quả được thể hiện ở hình 2 và 3.

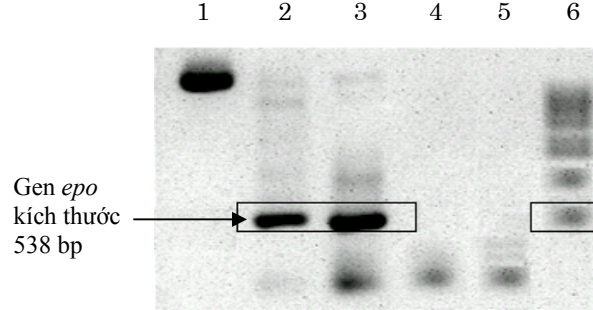
Từ hình 2 cho thấy, cả 2 giếng DNA NST của tế bào chuyển gene ổn định và tế bào chưa chuyển gene đều có một vạch và 2 vạch này trùng nhau và cường độ phát sáng khá mạnh, chứng tỏ quá trình tách chiết tốt, không có sự đứt gãy nhiều DNA NST và lượng DNA đủ để sử dụng trong phản ứng PCR tiếp theo. Sau khi kiểm tra DNA NST vừa tách, các mẫu DNA này được dùng làm mạch khuôn cho phản ứng PCR. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

Tại giếng 5 không có vạch nào xuất hiện (Hình 3), chứng tỏ kết quả của phản ứng PCR đáng tin cậy, không bị nhiễm bất cứ DNA lạ nào. Ở giếng 3, có một vạch có kích thước gần 578 bp (đối chiếu dựa trên vạch ở giếng 6) và vạch này trùng hoàn toàn với vạch ở giếng 2; cùng với sự đối chiếu với giếng 4 (không có vạch nào) chứng tỏ đã có sự sát nhập của *epo* vào trong DNA NST và các tế bào này biểu hiện bền vững gene *epo*.



Hình 2. Kết quả điện di DNA NST của tế bào chuyển gene và tế bào không chuyển gene

Giếng 1: thang DNA 1kb (Fermentas)
Giếng 2: DNA NST của tế bào chuyển gene
Giếng 3: DNA NST của tế bào không chuyển gene



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gene *epo*

Giếng 1: Vector pEPO
Giếng 2: Đối chứng dương (DNA khuôn là pEPO)
Giếng 3: Sản phẩm PCR của DNA NST của tế bào chuyển gene
Giếng 4: Sản phẩm PCR của DNA NST của tế bào không chuyển gene
Giếng 5: Đối chứng âm (không có DNA khuôn)
Giếng 6: Thang DNA

3.3.2. Năng suất sản xuất EPO trung bình của tế bào chủ

Các tế bào sau 2 tuần chọn lọc còn sống sót biểu hiện EPO bền vững, tuy nhiên đây là một quần thể các dòng tế bào với năng suất sản xuất khác nhau. Do vậy trước khi tiến hành pha loãng để thu được dòng tế bào đơn sản xuất EPO với năng suất cao, ta cần đánh giá năng suất sản xuất EPO trung bình của các tế bào này trong một ngày. Các tế bào chuyển gene ổn định được chia thành 3 phần cho vào các bình tam giác có thể tích là 25 ml và nuôi cấy trong 3 ngày, sau đó dịch nuôi cấy được xác định bằng thí nghiệm ELISA, đồng thời số lượng tế bào cuối cùng cũng được đếm nhằm có thể xác định năng suất sản xuất EPO trung bình của tế bào trong một ngày (pg EPO/tế bào/ngày).

Dịch môi trường ở các flask được kí hiệu như sau EPOf1, EPOf2, EPOf3, tương tự dịch cô cạn của giếng không chuyển gene cũng được chia thành 3 phần kí hiệu DCf1, DCf2, DCf3. Để xác định được nồng độ EPO ta phải thực hiện ELISA với các giếng có EPO với nồng độ đã biết trước và đối chứng

âm (PBS). Số liệu mật độ quang ở bước sóng 450 nm của các giếng cho ở bảng 2 và 3.

Các tế bào chuyển gene ổn định có năng suất sản xuất EPO trung bình là $2,055 \pm 0,015$ (pg/tế bào/ngày), những tế bào này có thể được dùng để tạo dòng những tế bào đơn có sản xuất ổn định EPO với năng suất cao (Bảng 3). So với kết quả nghiên cứu của Lubiniecki và cs. (1990) thì kết quả nghiên cứu này thấp hơn (2.055 ± 0.015 so với $2,315 \pm 0,008$), nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa khi so sánh toàn bộ số liệu chưa xử lý trong quá trình thao tác giữa hai nghiên cứu ($\alpha = 0,05$). Theo các số liệu tham khảo của những công ty dược phẩm công bố, với các nghiên cứu sản xuất erythropoietin tái tổ hợp từ các số liệu từ 1990 đến nay thì kết quả này thấp hơn, tuy vậy do các công bố này không được xuất bản trên các tạp chí khoa học liên quan nên chưa có cơ sở khoa học để so sánh. Kết quả thu nhận trong nghiên cứu này là kết quả đầu tiên tại Việt Nam trong lĩnh vực sản xuất protein tái tổ hợp erythropoietin thông qua quá trình sản xuất từ tế bào động vật hữu nhũ.

Bảng 2. Kết quả ELISA của môi trường nuôi cấy tế bào chuyển gene ổn định

Giếng	OD	Giếng chứa EPO chuẩn (µg/ml)	OD
EPOf1	0,398	5,000	0,893
EPOf2	0,364	2,500	0,539
EPOf3	0,372	1,250	0,316
DCf1	0,102	0,625	0,201
DCf2	0,101	0,313	0,176
DCf3	0,099	0,0156	0,114
Đối chứng âm	0,103	0,078	0,112

Bảng 3. Năng suất sản xuất EPO trung bình

Mẫu thử nghiệm	EPOf1	EPOf2	EPOf3
OD ₄₅₀	0,398	0,364	0,372
Nồng độ EPO (µg/ml)	1,786	1,572	1,623
Thể tích tổng (ml)	3,100	3,350	3,240
Lượng EPO (µg)	5,537	5,267	5,259
Tổng số tế bào trong flask của mẫu thử nghiệm	$9,02 \cdot 10^5$	$8,63 \cdot 10^5$	$8,93 \cdot 10^5$
Thời gian tế bào được nuôi cấy (ngày)	3	3	3
Năng suất sản xuất EPO (pg/tế bào/ngày)	2,051	2,042	2,071
Năng suất sản xuất EPO trung bình (pg/tế bào/ngày)	$2,055 \pm 0,015$		

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình chuyển gene *epo* vào tế bào CHO-K1. Bằng việc sử dụng cationic polymer và bằng nuôi cấy trong môi trường chọn lọc với nồng độ kháng sinh zeocin 100 µg/ml, đã chọn lọc được quần thể tế bào biểu hiện EPO bền vững – có khả năng sản xuất erythropoietin với hàm lượng $2,055 \pm 0,015$ (pg/tế bào/ngày). Kết quả thu nhận trong nghiên cứu này là kết quả đầu tiên tại Việt Nam trong lĩnh vực sản xuất protein tái tổ hợp erythropoietin thông qua quá trình sản xuất từ tế bào động vật hữu nhũ. Từ những kết quả đạt được, nghiên cứu này sẽ tiếp tục tiến hành tạo dòng tế bào đơn biểu hiện EPO bền vững với năng suất sản xuất EPO cao hơn và làm thích nghi dòng tế bào biểu hiện EPO trong môi trường không huyết thanh để phục vụ cho việc tinh chế erythropoietin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Florian M. Wurm and Martin Jordan (2003). Gene transfer and gene amplification in mammalian cells. In Gene Transfer and

Expression in Mammalian Cells (S.C. Makrides, eds.) pp. 7. Elsevier Science B.V, USA.

Gary Walsh (2003). Biopharmaceuticals-Biochemistry and biotechnology, 2nd. John Wiley & Sons, Ltd, England, chapter 1, 2, 7, 9.

Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu WS, Yap MGS. (2007). Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells - 20 Years and Counting. Chemical Engineering Progress 103, 40-47.

Kao FT, Puck TT (1968). Genetics of somatic mammalian cells. *Proc.Natl. Acad. Sci.* 60(4), pp. 1275–1281.

Lubiniecki, A., R. Arathoon, G. Polastri, J. Thomas, M. Wiebe, R. Garnick, A. Jones, R. van Reis, and S. Builder. (1990). Selected strategies for manufacture and control of recombinant tissue plasminogen activator prepared from cell culture, p. 442–451. In R. E. Spier, J. B. Griffiths, J. Stephenne, and P. J. Crooy (ed.), Advances in animal cell biology and technology for bioprocesses. Butterworths, London, United Kingdom.