

Učinak proteinskog izolata iz uljne pogače lana na rast i produktivnost kulture životinjskih stanica

Logarušić, Marijan

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:415160>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, travanj 2018.

Marijan Logarušić

794/MB

**UČINAK PROTEINSKOG IZOLATA
IZ ULJNE POGAČE LANA
NA RAST I PRODUKTIVNOST
KULTURE ŽIVOTINJSKIH STANICA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu HRZZ projekta IP-2016-06-3848 „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica“ pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Igora Slivca.

Zahvaljujem se mentoru izv.prof.dr.sc. Igoru Slivcu na posvećenom vremenu, trudu i prenesenom znanju tijekom provođenja eksperimenata i pisanja ovog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji, a posebno roditeljima, na iznimnoj potpori i bodrenju tijekom studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

UČINAK PROTEINSKOG IZOLATA IZ ULJNE POGAČE LANA NA RAST I PRODUKTIVNOS KULTURE ŽIVOTINJSKIH STANICA

Marijan Logarušić 794/MB

Sažetak: Mnoge industrije sve više teže za efikasnijim iskorištavanjem organskih ostataka nastalih nakon prerade proizvoda iz različitih grana poljoprivrede i proizvodnje hrane. Kao jedan od takvih organskih ostataka s velikim potencijalom primjene ističe se uljna pogača koja zaostaje nakon ekstrakcije ulja. Pogače lana, zbog svog sastava proteina, predstavljaju potencijalnu sirovinu za primjenu u tehnologiji životinjskih stanica. Stoga je u ovom radu ispitan utjecaj proteinskih izolata iz uljne pogače lana na rast i produktivnost CHO-RP stanične linije koja proizvodi rekombinantni protein. Također, ispitan je utjecaj proteinskih izolata i na rast HEK-293T stanične linije. Budući da serum, kao standardni nutritivni suplement u hranjivom mediju, ima određenih nedostataka, istražena je mogućnost korištenja proteinskih izolata kao potencijalna zamjena za serum. Istraživanje je pokazalo da dodatak proteinskih izolata u koncentracijama od 0,1 g L⁻¹ i 0,2 g L⁻¹ u hranjivi medij ima pozitivan učinak na rast i produktivnost CHO-RP stanica, dok u koncentracijama većim od 1 g L⁻¹ dolazi do inhibicijskog djelovanja na rast obje stanične linije. Također je dokazano da se proteinski izolati uljne pogače lana ne mogu koristiti kao djelomična zamjena za serum jer nisu pokazali utjecaj na rast stanica u mediju s 1% seruma.

Ključne riječi: uljna pogača lana, proteinski izolat, rekombinantni protein, kulture životinjskih stanica

Rad sadrži: 48 stranica, 17 slika, 6 tablica, 39 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (pdf format) pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Igor Slivac

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Višnja Gaurina Srček
2. Izv.prof.dr.sc. Igor Slivac
3. Doc.dr.sc. Andreja Leboš Pavunc
4. Izv.prof.dr. Ivana Kmetič (zamjena)

Datum obrane: 18. travnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Technology and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

EFFECT OF PROTEIN ISOLATES FROM FLAXSEED MEAL ON ANIMAL CELL CULTURE GROWTH AND PRODUCTIVITY

Marijan Logarušić 794/MB

Abstract: A lot of industries are looking for efficient exploitation of organic residues from various domain of agriculture and food manufacturing. Oil meal, a substance that remains after oil extraction from seeds, is one of these organic residues with great potential of application. Because of its protein content, the flaxseed meal can potentially be used in animal cell technology. Therefore, in this work, the influence of protein isolates from flaxseed meal on growth and productivity of a recombinant protein producing cell line (CHO-RP) was investigated. The effect of protein isolates on growth of HEK-293T cell line was observed as well. Since the serum, as a standard nutritional supplement in culture media, has certain disadvantages, protein isolates were investigated as possible serum replacement. The results of the research have shown that the addition of protein isolates at concentrations of 0.1 g L⁻¹ and 0.2 g L⁻¹ in cell culture medium has positive effect on growth and productivity of CHO-RP cells. However, when concentration of protein isolates in medium is above 1 g L⁻¹ there is an inhibitory effect on cell growth. Also, it has been proven that protein isolates from flaxseed meals cannot be used as a partial substitution for serum because they have not shown the effect on cell growth in 1% serum media.

Keywords: flaxseed meal, protein isolate, cell culture recombinant protein, animal cell culture

Thesis contains: 48 pages, 17 figures, 6 tables, 39 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *PhD.* Igor Slivac, Associate professor

Reviewers:

1. *Ph.D.* Višnja Gaurina Srček, Full Professor
2. *Ph.D.* Igor Slivac, Associate professor
3. *Ph.D.* Andreja Pavoš Lebunc, Assistant Professor
4. *Ph.D.* Ivana Kmetič, Associate Professor (substitute)

Thesis defended: 18 April 2018

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA.....	3
2.1.1. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica	5
2.1.2. Faze rasta životinjskih stanica	6
2.1.3. Metabolizam u kulturi životinjskih stanica	7
2.1.3.1. <i>Metabolizam glukoze u kulturi životinjskih stanica</i>	8
2.1.3.2. <i>ELISA test</i>	9
2.2. HRANJIVI MEDIJ ZA UZGOJ STANICA	10
2.2.1. Serum.....	12
2.2.2. Hidrolizati proteina kao sastojci medija bez seruma	13
2.3. VAŽNOST PROIZVODNJE I SASTAV LANA	14
2.3.1. Pogača lana.....	15
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Kemikalije	17
3.1.2. Otopine	18
3.1.3. Uređaji i oprema	19
3.1.4. Stanična linija HEK-293T	20
3.1.5. Stanična linija CHO-RP	20
3.2. METODE RADA	21
3.2.1. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u.....	21
3.2.2. SDS-PAGE elektroforeza proteina iz uzoraka hranjivih medija za uzgoj.....	22
3.2.3. Uzgoj HEK-293T i CHO-RP stanica u T-bocama	23
3.2.4. Utjecaj dodatka izolata proteina iz uljne pogače lana na rast i produktivnost stanica HEK-293T i CHO-RP	23
3.2.5. Određivanje broja stanica metodom <i>Trypan Blue</i>	24
3.2.6. Određivanje koncentracije glukoze u hranjivom mediju.....	25
3.2.7. ELISA test	26
3.2.8. Izračunavanje parametara rasta CHO-RP i HEK-293T stanica.....	26

3.2.8.1. <i>Određivanje specifične brzine rasta stanica</i>	26
3.2.8.2. <i>Određivanje specifične produktivnosti (Qp)</i>	27
3.2.8.3. <i>Određivanje vremena udvostručenja stanica</i>	27
3.2.8.4. <i>Određivanje prinosa stanica</i>	28
3.2.9. Statistička obrada podataka	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. OREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA METODOM PO LOWRY-U I NJIHOVOG SASTAVA SDS-PAGE ELEKTROFOREZOM IZ UZORAKA HRANJIVIH MEDIJA ZA UZGOJ STANIČNIH LINIJA HEK-293T I CHO-RP	30
4.2. UČINAK RAZLIČITIH KONCENTRACIJA PROTEINSKOG IZOLATA IZ ULJNE POGAČE LANA NA RAST I PROLIFERACIJU HEK-293T STANICA	32
4.3. UČINAK RAZLIČITIH KONCENTRACIJA PROTEINSKOG IZOLATA IZ ULJNE POGAČE LANA NA RAST I PROLIFERACIJU CHO-RP STANICA	34
4.4. POTROŠNJA GLUKOZE CHO-RT STANICA	39
4.5. UČINAK RAZLIČITIH KONCENTRACIJA PROTEINSKOG IZOLATA IZ ULJNE POGAČE LANA NA PRODUKTIVNOST CHO-RP STANIČNE LINIJE	41
5. ZAKLJUČCI	43
6. LITERATURA	44

1. UVOD

Kako bi kultura stanica imala uspješan rast, proliferaciju i produktivnost nužno joj je osigurati optimalne uvjete mikrokoliša u *in vitro* uvjetima. Uz parametre poput odgovarajuće temperature, pH i sastava zraka, stanicama je potreban i odgovarajući hranjivi medij. Stoga medij za uzgoj mora sadržavati hranjive tvari poput ugljikohidrata, soli, aminokiselina te serum životinjskog podrijetla. Međutim, posljednjih 30-ak godina pokušava se izbjegavati dodavanje seruma u medij zbog negativnih strana njegovog korištenja. Nedostaci korištenja medija poput nedefiniranog sastava, potencijalnog izvora bioloških kontaminanata (gljivice, virusi, prioni) te otežanog pročišćavanja konačnog proizvoda potakli su znanstvenu zajednicu da pristupe oblikovanju medija bez seruma i formuliranju potpuno kemijski definiranih medija koji bi se onda koristili u proizvodnji raznih biofarmaceutika (Chabanon i sur., 2008). Iako je kemijski definiran medij bez dodatka seruma poželjan, njegovo korištenje često dovodi do smanjenja rasta stanica i njihove produktivnosti u odnosu na stanice uzgajane u mediju sa serumom. No, s obzirom da je medije bez seruma potrebno razvijati i obogaćivati potrebnim biološkim komponentama posebno za pojedine tipove stanica i pojedine proizvode, cijena takvog medija je najčešće puno skuplja od medija s dodatkom seruma (Kim i Lee, 2009).

Razvoj medija bez seruma potaknuo je interes za primjenom hidrolizata proteina dobivenih iz tkiva životinja, mlijeka, kvasca te biljaka poput soje, pšenice, riže i graška (Farges-Haddani i sur., 2006). Dodatkom hidrolizata proteina u medij, nadomještaju se proteini koji su inače bili osigurani dodatkom seruma. Kako je prema današnjim regulativama zabranjeno korištenje tvari animalnog porijekla u mediju za uzgoj stanica te biofarmaceutskoj proizvodnji, biljni hidrolizati imaju primat u korištenju kao alternativa proteinskog izvora (Kim i Lee, 2009). Hidrolizati proteina dobivaju se postupkom enzimske, kiselinske ili mikrobne hidrolize biološkog materijala, a sadrže različite hranjive tvari kao što su aminokiseline, oligopeptidi, lipidi, elementi u tragovima, vitamini i minerali te ostale spojeve koji potiču proliferaciju i utječu na povećanje aktivnosti stanica sisavaca (Franěk i sur., 2000; Sung i sur., 2004). Kao izvor hidrolizata proteina biljnog podrijetla mogu se upotrijebiti nusproizvodi prehrambene industrije koji u svom sastavu između ostalog imaju i značajne koncentracije proteina. Time se stvara vrijednost organskih ostataka, odnosno nusproizvoda, čime se ostvaruje ekonomska održivost prehrambene industrije. Veliki potencijal primjene imaju ostaci iz proizvodnje jestivog ulja tzv. uljne pogače koje zaostaju nakon ekstrakcije ulja i danas se uglavnom koriste kao stočna hrana ili gnojivo. Iz uljnih pogača se danas proizvode i proizvodi s dodanom

vrijednošću kao što su aminokiseline, enzimi, organske kiseline, jednostanični proteini i biološki aktivni metaboliti.

Dosad su u literaturi opisani postupci pripreme i karakterizacije proteinskih izolata i hidrolizata iz pogače uljane repice (Chabanon i sur., 2008) te iz soje i pšenice (Franěk i sur., 2000), kao i određivanje učinka tih proteinskih hidrolizata na proliferaciju CHO stanica te prinos i kvalitetu rekombinatnog proizvoda (Kim i Lee, 2009; Spearman i sur., 2014). Međutim, priprava i karakterizacija proteinskih izolata i hidrolizata iz uljnih pogača lana kao i njihov mogući učinak na proliferaciju i produktivnost industrijskih staničnih linija do sada nije temeljito istražen.

Imajući u vidu dosad ispitana i dokazana svojstva proteinskih hidrolizata različitog biljnog podrijetla na rast i produktivnost stanica, cilj ovog rada je bilo ispitati učinak proteinskog izolata, kao sirovine koja prethodi dobivanju hidrolizata proteina, iz uljne pogače lana, na rast i produktivnost važne industrijske stanične linije CHO-RP koja proizvodi rekombinantni protein. Također, ispita se utjecaj proteinskih izolata i na rast još jedne industrijski značajne stanične linije HEK-293T te potencijalna vrijednost izolata da budu djelomična zamjena za serum.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA

Kulture stanica dobivaju se razgradnjom tkiva mehaničkim, enzimskim ili kemijskim putem. Možemo ih podijeliti na:

- Primarne kulture
- Stanične linije i
- Stanične sojeve.

Primarne kulture stanica nastaju direktno iz organa ili tkiva tako što se mehaničkim usitnjavanjem, uz pomoć skalpela ili enzimskom disocijacijom, izdvoje iz životinjskog tkiva te se prenesu u medij za uzgoj. Primarne stanice su redovno heterogene te zadržavaju svojstva tkiva iz kojeg potiču i na taj način najbolje opisuju *in vivo* uvjete. Iz tog razloga takve kulture su pogodne za ispitivanje svojstava i odgovora koji daju diferencirane stanice. Ove stanice imaju ograničen kapacitet rasta i životni vijek te se stoga za potrebe dugotrajnije upotrebe poseže za postupkom subkultiviranja čime se dobivaju stanične linije jednog tipa stanica.

Stanična linija je pojam koji se odnosi na populaciju stanica koje mogu kontinuirano rasti kroz više subkultura što dovodi do razvoja kulture stanica, mogućnosti kloniranja, mogućnosti čuvanja te veće ujednačenosti stanica (Alves i sur., 2008). Stanične linije mogu biti konačne (netransformirane) i kontinuirane (transformirane). Netransformirane stanične linije imaju ograničen broj generacija nakon čega obično odumiru, dok transformirane poprimaju sposobnost neograničenog rasta. Kontinuirane stanične linije mogu nastati spontanim mutacijama (rijetko) ili stvaranjem hibridnih stanica, transfekcijom viralnim genima, transdukcijom virusima te overekspresijom gena regulatora staničnog ciklusa (Alves i sur., 2008). Selekcijom ili kloniranjem primarne kulture ili stanične linije može se razviti stanični soj.

Danas je primjena kulture životinjskih stanica u biotehnologiji neizostavna. Uz postojanje etičkih razloga, čime se preferiraju kulture stanica nasuprot pokusa na živim jedinkama, prednost kulture stanica su i konzistentnost i ponovljivost u izvođenju eksperimenta, točno utvrđeni fizikalno-kemijski uvjeti te znatno niži troškovi ispitivanja. Stanice koje se danas koriste u eksperimentima diljem svijeta potekle su iz primarnih staničnih kultura, a naknadnom selekcijom i transformacijama konstruirane su u besmrtnu staničnu liniju željenih svojstava. Kolekcije stanica prodaju stanične suspenzije ($\sim 10^7$ st mL⁻¹) u smrznutom obliku, koje se transportiraju u suhom ledu. *American Type Culture Collection* (ATCC) i *The European*

Collection of Animal Cell Culture (ECACC) su dvije najveće kolekcije stanica koje obuhvaćaju više od 3000 staničnih linija.

Razlozi korištenja i primjene kulture životinjskih stanica:

- Istraživanje fiziologije ili biokemijskih puteva u stanicama
- Testiranje učinaka raličitih supstanci (metaboliti, hormoni, faktori rasta) na specifičnim tipovima stanica
- Proizvodnja umjetnih tkiva kombiniranjem specifičnih tipova stanica u nizu
- Sintetiziranje visokovrijednih proizvoda u velikoj količini (virusna cjepiva, terapijski rekombinantni glikoproteini, monoklonska antitijela) (Butler, 2005).

Unatoč dominaciji kultura životinjskih stanica u proizvodnji biofarmaceutika u posljednje vrijeme, ova vrsta tehnologije nije bila standardizirana za masovnu proizvodnju i upotrebu sve do 1990-ih godina. Štoviše, prva iskustva u radu s kulturama životinjskih stanica sežu u početak 20. stoljeća kada je Ross Harrison, između 1906. i 1910., koristeći tehniku viseće kapi i žablju limfu srca, pokušao objasniti kako je nastalo živčano vlakno. Jedno od glavnih svrha razvoja kulture životinjskih stanica bila je potraga za virusnim cjepivima, započeta tijekom Drugog svjetskog rata, osobito za poliomijelitis. Rezultat toga je bila proizvodnja inaktiviranog polio cjepiva, proizvedenog u velikim količinama u primarnim stanicama bubrega majmuna od strane Endersa, Syvertona i Salke 1955. godine. Nakon tog perioda, a pogotovo u posljednjih 15-ak godina, upotreba životinjskih stanica strahovito se povećala (Alves i sur., 2008). Danas proteinski terapeutici (monoklonska antitijela, peptidi te rekombinantni proteini) predstavljaju najveću grupu proizvoda u biofarmaceutskoj industriji (Dumont i sur., 2015). Tako se danas 60-70% svih rekombinantnih terapeutskih proteina proizvodi pomoću staničnih linija sisavaca, poput stanične linije ovarija kineskog hrčka (CHO), mijeloidne stanične linije miša (NS0), stanične linije mladog hrčka (BHK), stanične linije bubrega ljudskog embrija (HEK-293) te ljudske mrežnice (Wurm, 2004). Jedne od najkorištenijih staničnih linija su CHO i HEK-293. HEK-293 su stanice dobivene transformacijom humanih embrionalnih stanica bubrega s DNA adenovirusom 5. Ranih 70-ih godina prošlog stoljeća, Alex van der Eb je uzgojio staničnu liniju, dok je transformaciju izveo Frank Graham po čijoj metodi dobivaju ime. HEK je skraćena engleskog naziva ove stanične linije (eng. *Human Embryonic Kidney*), dok 293 predstavlja redni broj eksperimenta kojim je nastala ova stanična linija. Stanice se često koriste jer se brzo i jednostavno umnažaju i održavaju, a daju se lako i transfektirati zbog čega se često koriste u biološkim istraživanjima. Značajno je i to da je ovoj staničnoj liniji sekvencioniran cijelokupni genom. Glavna primjena im je u proizvodnji rekombinantnih terapeutskih proteina ili virusa,

za farmaceutsku i biomedicinsku namjenu te u raznim istraživanjima (Lin i sur., 2014). CHO je skraćena engleskog naziva ove stanične linije (eng. *Chinese Hamster Ovary*). Ova stanična linija ovarija kineskog hrčka dobivena je 1957. godine zaslugom Theodora T. Pucka. CHO stanična linija prometnula se u jedan od glavnih izbora među staničnim linijama u istraživanjima i industriji zbog svojeg izrazito brzog rasta, mogućnosti transfekcije i visoke stope proizvodnje rekombinantnih proteina (3-10 grama rekombinantnih proteina po litri kulture). Ove stanice su važne u istraživanjima i zbog njihove stabilnosti koja se očituje malim brojem spontanijih mutacija. Također rekombinantni proteini nastali u CHO stanicama su funkcionalno i strukturno slični nativnim proteinima. Cijelokupni genom CHO stanične linije je također u potpunosti sekvencioniran. Stoga, glavna primjena ovih stanica je u biološkim i medicinskim istraživanjima, kao i u masovnoj proizvodnji terapijskih proteina (Wurm i Hocker, 2011).

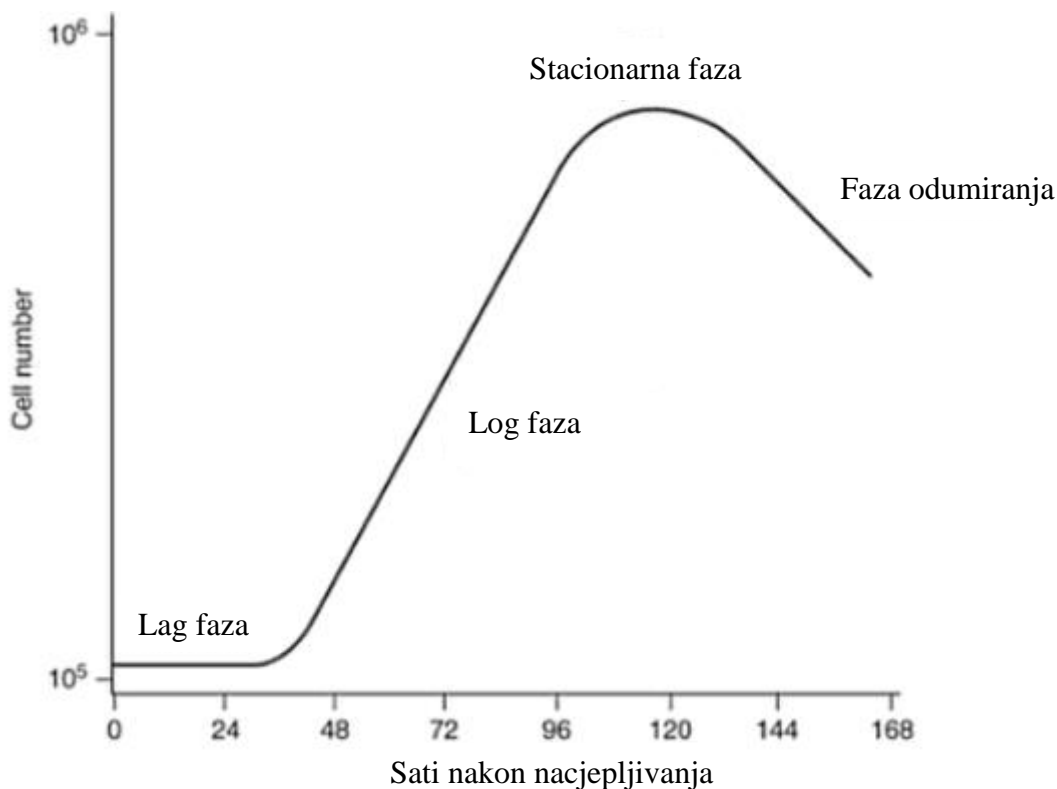
2.1.1. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica

Dobri uvjeti uzgoja su oni u kojima stanice uspjevaju preživjeti u kulturi. Kako bismo imali što uspješniji uzgoj životinjskih stanica *in vitro* potrebno je osigurati uvjete što sličnije uvjetima kojima su stanice bile izložene *in vivo*. Stoga je potrebno osigurati fizikalno-kemijske parametre pogodne za uzgoj kulture stanica. Tako je temperatura određena temperaturom domaćina iz kojeg su stanice izuzete te za stanice sisavaca uglavnom iznosi između 35 i 37 °C. Ukoliko temperatura znatno padne ispod optimalne dolazi do usporavanja staničnog metabolizma, a nagli porast temperature pak može dovesti do adaptivnog šoka kod stanice. pH vrijednost se nastoji održati između 7,0 - 7,4. Za korigiranje pH vrijednosti najčešće se koristi bikarbonatni pufer zbog svoje niske toksičnosti i relativno niske cijene. Osmolarnost, koja je važna za protok supstanci u i iz stanica, iznosi 280 – 320 mOsm kg⁻¹. Također, bitnu ulogu u uzgoju stanica ima i sastav atmosfere pa se tako podešava njen sastav kojeg čini 5% CO₂ i 95% zraka. Stanice ne bi mogle rasti i razmnožavati se bez hranjivog medija koji sadrži glukozu, aminokiseline, vitamine, anorganske soli te dodatak seruma sisavaca koji osigurava prisutnost hormona, faktora rasta i drugih hranjivih komponenata u mediju (Ryan, 2008).

2.1.2. Faze rasta životinjskih stanica

Kada su im osigurani svi potrebni uvjeti, stanice će rasti prema sigmoidalnoj krivulji rasta čiji će nagib ovisiti o dostupnosti hranjivih tvari i površine, učinkovitosti površine te uvjetima okoline. Definiranje krivulje rasta važno je za određivanje protokola eksperimenta. Faze staničnog rasta u kulturi su:

- Lag faza,
- Eksponencijalna (log) faza,
- Stacionarna faza,
- Faza odumiranja (slika 1).



Slika 1. Krivulja rasta stanica (Davis, 2011).

Nakon naciepljivanja stanica, stanice se nalaze u lag fazi, koja traje od 2 do 24 sata, tijekom koje ne dolazi do porasta koncentracije ili je porast izrazito mali. Duljina ove faze ovisi o fiziološkom stanju stanica, odnosno u kojoj su fazi rasta naciepljenje na novu podlogu te o gustoći i koncentraciji naciepljenih stanica. Stanice koje su naciepljene u manjoj početnoj koncentraciji trebati će više vremena da se adaptiraju na medij. S druge strane, stanice koje su naciepljene na novu podlogu, a nalazile su se u prethodnoj podlozi u log fazi, imat će kraći

period lag faze (Davis, 2011). Lag faza je period adaptacije u kojem se adherentne stanice vežu za podlogu i šire. Dolazi do sinteze svih potrebnih faktora u dovoljnim koncentracijama kako bi stanice mogle ući u iduću fazu, log fazu (Leo i sur., 2008).

Log fazu karakterizira vrlo aktivna proliferacija tijekom koje se broj stanica povećava eksponencijalno. Tijekom ove faze stanična populacija se smatra da je u „najzdravijem“ stanju pa se uobičajeno koriste stanice iz log faze kad se proučavaju stanične funkcije. Faktori koji utječu na dužinu ove faze su gustoća naciepljivanja, brzina rasta stanica te dostupnost površine za rast. Brzina proliferacije tijekom eksponencijalne faze je određena samim karakteristikama stanične linije, ali i uvjetima u kojima se stanice uzgajaju (sastav medija, dostupnost kisika, temperatura itd.) (Davis, 2011).

Tijekom stacionarne faze brzina rasta stanica je jednaka brzini odumiranja stanica te nema značajne promjene u broju stanica. Brzina rasta stanica je smanjena zbog smanjene koncentracije nutrijenata kao i zbog nakupljanja metabolita koji imaju inhibitorno djelovanje na rast. Također stanice su formirale monosloj koji prekriva cijelu površinu za rast te dolazi do kontaktne inhibicije. Stacionarna faza može biti produžena ako se nadoda svježi hranjivi medij. Trajanje ove faze je promjenljivo i djelomično nam može biti pokazatelj izdržljivosti stanične linije.

Nakon stacionarne faze, stanice ulaze u fazu odumiranja, gdje više stanica umire nego nastaje novih, zbog iscrpljenosti samih stanica iz razloga nedostatka nutrijenata, kontaktne inhibicije i inhibicije nastalim metabolitima. Smrt stanice može se odviti pomoću dva mehanizma: programirane stanične smrti, apoptoze ili nekroze, stanične smrti pod utjecajem vanjskih čimbenika (Leo i sur., 2008).

2.1.3. Metabolizam u kulturi životinjskih stanica

Stanične kulture *in vitro* pokazuju veoma sličan tip metabolizma kao stanice u izvornom organizmu (*in vivo*). Tako i jedne i druge stanice trebaju za svoj rast i proliferaciju organske izvore ugljika. Glavni putevi središnjeg metabolizma stanica sisavaca uključuju katabolizam dva glavna izvora ugljika i energije: glukoze i glutamina. Metabolizam stanica u *in vitro* uvjetima je kompleksna i fleksibilna struktura sastavljena od velikog broja metaboličkih puteva. Središnji metabolički putevi stanica u kulturi uključuju glikolizu, pentoza-fosfatni ciklus, ciklus limunske kiseline, oksidativnu fosforilaciju, glutaminolizu i metabolizam drugih aminokiselina.

Isto tako metabolizam možemo podijeliti na primarni i sekundarni. Tijekom primarnog metabolizma, koji se najčešće odvija za vrijeme log faze rasta, nastaju oni metaboliti koji

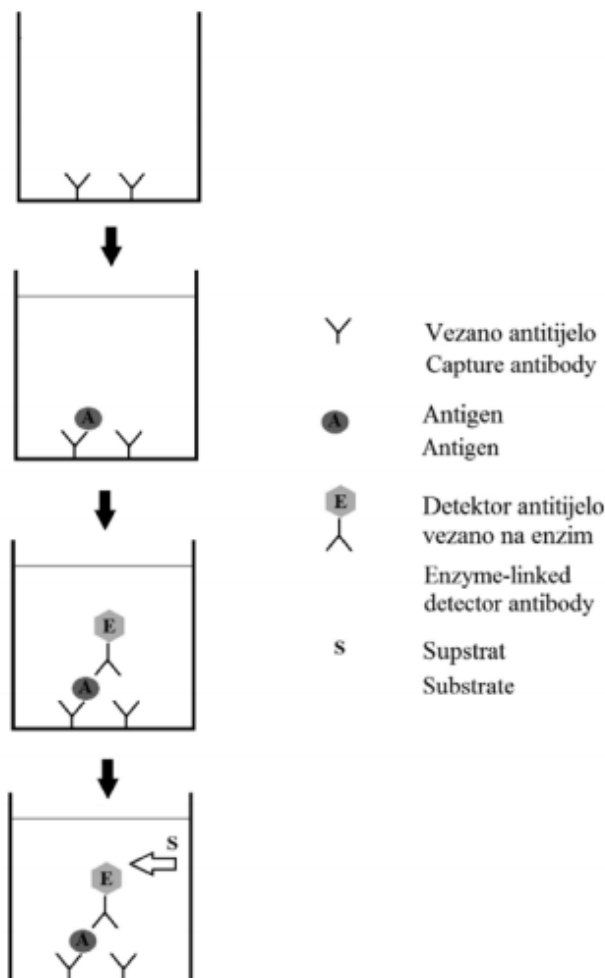
stanici osiguravaju gradivne jedinice i komponente potrebne za rast, razvoj, funkcioniranje i reprodukciju stanica. S druge strane, sekundarni metabolizma se najčešće odvija za vrijeme stacionarne faze rasta, te tijekom tog razdoblja nastaju oni metaboliti koji ne utječu direktno na rast i razvoj stanice, odnosno nisu nužni za život same stanice, ali imaju veliku ulogu u održavanju kvalitete zdravlja i metaboličkih aktivnosti. Neki od sekundarnih metabolita su hormoni, interferoni, polipeptidni faktori rasta te terapijski proteini (Sateesh, 2003).

2.1.3.1. Metabolizam glukoze u kulturi životinjskih stanica

Glukoza je izvor energije, ali i izvor prekursora koji sudjeluju u izgradnji staničnih dijelova. Najčešći je izvor ugljika koji se koristi tijekom uzgoja stanica te je uključen u sastav hranjive podloge u koncentraciji 5-25 mM. U katabolizam glukoze uključeno je nekoliko važnih metaboličkih puteva počevši od glikolize, pentoza-fosfatnog ciklusa te ciklusa limunske kiseline. Procesom glikolize glukoza se razgrađuje do piruvata. U tom procesu dolazi do sinteze velikog broja intermedijera za biosinteze, dvije molekule ATP-a i dvije molekule NADH. U prisutnosti kisika, piruvat se oksidacijskom dekarboksilacijom prevodi u acetyl-CoA koji zatim ulazi u ciklus limunske kiseline, dok se u anaerobnim uvjetima piruvat reducira do laktata. Glukoza se potpuno oksidira do CO₂ tijekom ciklusa limunske kiseline pri čemu se sintetizira dodatnih 36 molekula ATP-a te isto tako nastaju intermedijeri za biosintezu. Produkt nepotpune oksidacije glukoze tijekom glikolize u kulturi životinjskih stanica je laktat prilikom čega nastaje samo 2 ATP-a što je značajno manje u usporedbi s 36 molekula ATP-a koliko ih nastane kada se glukoza nakon glikolize potpuno oksidira ciklusom limunske kiseline. Određeni, mali dio glukoze (4-8%) ulazi u pentoza-fosfatni put gdje se razgrađuje te stanicu opskrbljuje riboza-5-fosfatom koji je nužan za proces sinteze nukleotida (Petch i Butler, 1994; Neerman i Wagner, 1996; Paredes i sur., 1998). Ovisno o fazi rasta stanica dolazi do promijene u specifičnoj brzini utroška glukoze (Miller i sur., 1989). Na metabolizam glukoze također utječu okolišni uvjeti poput temperature, pH te sama njena koncentracija. Pri nižim temperaturama, potrošnja glukoze i proizvodnja laktata se značajno smanjuje (Petch i Butler, 1994; Paredes i sur., 1998). Također je dokazano da povišeni pH (7,4-7,8) potiče trošenje glukoze, dok sniženi pH može imati toksičan učinak na rast nekih stanica (Bode, 2001). Prisustvo laktata u mediju za uzgoj u koncentraciji iznad 20 mM inhibira stanični metabolizam i rast stanica što rezultira smanjenjem produktivnosti. Stoga dodatno povećanje koncentracije glukoze ne potiče bolji stanični rast, nego uzrokuje povećanje proizvodnje laktata.

2.1.3.2. ELISA test

Imunoenzimskim ELISA testom (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA) se određuje prisutnost i količina antigena. Temelj ove metode leži u vezanju antitijela i antigena iz uzorka te spektrofotometrijskom mjerenju nastale reakcije do koje dolazi zbog promjene boje. ELISA, kao visoko osjetljiva i selektivna metoda omogućuje određivanje vrlo niskih koncentracija analita od primjerice nekoliko ng po kg ispitivanog uzorka. Postoji više vrsta tehnika imunološkog određivanja pomoću testa ELISA: indirektna, "sendvič", konkurentna i nova višestruka i prijenosna metoda pomoću mikrotitarskih ploča (Butorac i sur., 2013).



Slika 2. Imunoenzimski test ELISA (Butorac i sur., 2013).

Otkriće da se topljivi antigen ili protutijela mogu vezati za čvrstu podlogu tako da se ne isperu puferiranom fiziološkom otopinom dovelo je do uvođenja ELISA metode u istraživanja. Tijekom istraživanja koriste se polistirenske mikrotitracijske ploče četvrtastog oblika koje obično imaju 96 (12 x 8) jažica (Runje i Cvrtila, 2006).

Sama metodologija ELISA tehnika uključuje imobilizaciju jedne ili dvije komponente, tj. antigena ili antitijela na čvrstu podlogu. To uklanja probleme separacije, obzirom da nakon reakcije između vezane i nevezane komponente jedna komponenta ostaje pričvršćena na čvrstu podlogu, a ostatak se jednostavno uklanja pri čemu ostavlja vezani reaktant u obliku u kojem ga je moguće lako izmjeriti. Mjerenje predstavlja drugu veliku prepreku koja je obzirom na metodologiju riješena na način da se jedna komponenta, odnosno detektor antitijelo, obilježi s enzimom. Tada se obilježena antitijela mogu detektirati. Nakon dodatka supstrata za enzim, reakcija rezultira mjerljivim promjenama intenziteta obojenja. Ilustracija postupka prikazana je na slici 2. Imunoenzimski testovi dolaze u mnogim oblicima i imaju brojne primjene. Analitičarima su dostupni komercijalni testovi ili pak razvijaju specifične testove za svoje vlastite primjene (Bonwick i Smith, 2004).

2.2. HRANJIVI MEDIJ ZA UZGOJ STANICA

Sastav medija jedan je od najbitnijih faktora u kulturi životinjskih stanica. Njegova funkcija je da osigura odgovarajući pH i osmolarnost za preživljavanje stanica, njihov metabolizam i njihovo razmnožavanje, kao i sve potrebne kemijske supstance potrebne stanicama koje nisu u mogućnosti same proizvesti (Butler, 2005).

Postoji veliki broj standardnih medija u kojima se stanice uzgajaju. Najčešće upotrebljavani mediji su BME (Basal Medium Eagle's), MEM (Minimum essential Medium), koji ima dva puta više aminokiselina od BME, zatim DMEM (Dulbecco's modified MEM), koji pak sadrži četiri puta veću koncentraciju aminokiselina i vitamina od BME, Ham's F-12 s ulogom u uzgoju raznih staničnih linija te RPMI 1640 koji se koristi za uzgoj staničnih kultura limfocita i hibridoma stanica (Yao, 2017). Kako bi se dobili uvjeti kao u izvornom tkivu hranjivi medij mora sadržavati ove komponente:

- Ugljikohidrate
- Aminokiselinine
- Anorganske soli
- Vitamine i minerale
- Antibiotike
- Serum

Najvažniji predstavnik ugljikohidrata jest glukoza koja predstavlja glavni izvor energije i preteču za biosintezu staničnih komponenti. Njezina koncentracija u mediju najčešće je 5-25 mM. Glukoza se uglavnom procesom glikolize razgrađuje do piruvata koji se može reducirati

do laktata ili acetoacetata te postati dijelom citratnog ciklusa te se naposljetku oksidirati do CO₂ i vode. Međutim, nakupljanje laktata u mediju upućuje na to da citratni ciklus nije potpuno funkcionalan kao u *in vivo* uvjetima te može sniziti pH medija što dovodi do smanjenja brzine rasta stanica. Zamjenom glukoze drugim ugljikohidratima poput fruktoze, galaktoze ili maltoze, smanjuje se brzina glikolize te time i količina stvorenog laktata.

Aminokiseline se uobičajeno dodaju kao definirane komponente u medij, ali isto tako postoje i nedefinirani izvori aminokiselina u mediju kao što je serum. Koncentracija koja se najčešće dodaje iznosi 0,1- 1 mM. Aminokiseline služe za sintezu proteina, nukleotida i lipida, ali također mogu poslužiti kao izvor energije. Postoje dvije vrste aminokiselina potrebnih za rast stanica: esencijalne i neesencijalne. Razlika između njih je ta da esencijalne aminokiseline stanica ne može sama sintetizirati, dok neesencijalne može. Stoga je nužno esencijalne aminokiseline uvijek dodavati u medij, a to su: arginin, cistein, glutamin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan, tirozin i valin. Predstavnicima neesencijalnih aminokiselina koje se najčešće dodaju u medij su: alanin, asparagin, asparaginska kiselina, prolin, glicin i serin. Glutamin se obično dodaje u većoj koncentraciji u odnosu na druge aminokiseline (1- 5 mM) s obzirom da služi kao izvor ugljika, dušika i energije budući da ima ulogu preteče za intermedijere ciklusa limunske kiseline te prekursora za sintezu purina, pirimidina i asparagina.

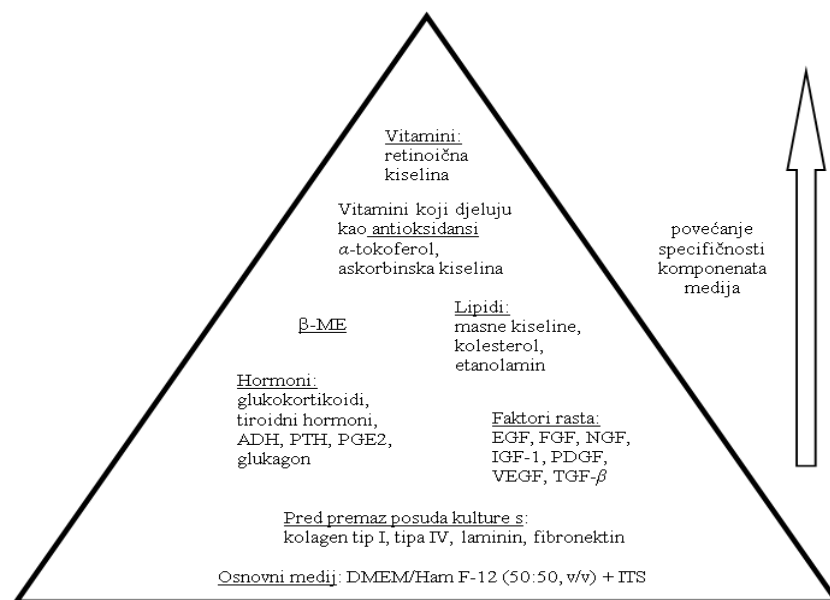
Soli koje se uglavnom dodaju u medij su Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻ i HCO₃⁻. Ovi ioni služe kao enzimski kofaktori te su važni u održavanju osmotskog pritiska, membranskog potencijala i pH. Koncentracija magnezija i kalcija utječe na agregaciju stanica i njihovu adheziju te se stoga u suspenzijskim kulturama pazi da njihova koncentracija bude niska.

Iz razloga kontrole i suzbijanje potencijalnih kontaminanata u hranjivi medij se često dodaju i antibiotici. Pencilin, streptomycin ili gentamicin se najčešće dodaju za sprečavanje bakterijske kontaminacije, dok se za sprječavanje antifungalne kontaminacije koriste nistatin ili amfotericin.

Vitamini se koriste u vrlo malim količinama (μmol) kao enzimski kofaktori koji su esencijalni za opći stanični metabolizam. Većina stanica treba medij koji je obogaćen vitaminima B skupine: biotin, folna kiselina, pantotenska kiselina, tiamin, niacin, nikotinamid, piridoksin i riboflavin, dok se ostatak vitamina i minerala pojavljuju u mediju dodatkom seruma. Ukoliko je koncentracija seruma smanjena, potrebno je dodati Fe, Zn, Se i druge elemente u tragovima (Moraes i sur., 2008).

2.2.1. Serum

Životinjski serum je izrazito kompleksna smjesa velikog broja sastavnica i biomolekula s različitim fiziološkim učinkom na aktivnosti rasta i inhibicije. Najčešće korišteni serum jest fetalni teleći serum (FBS) zbog visokog sadržaja faktora rasta i niske koncentracije gama-globulina. Serum se dodaje u medij u koncentraciji od 5-10 % (v/v) radi bržeg staničnog rasta. Njegov sastav nije u potpunosti definiran, ali se zna da njegove komponente znatno utječu na rast i proliferaciju stanica. Tako je poznato da se u serumu nalaze razne vrste proteina (serumski proteini, transportni proteini, enzimi), hormoni, faktori rasta i citokini, masne kiseline i lipidi, vitamini, minerali i elementi u tragovima, faktori prihvatanja i širenja, ugljikohidrati te neproteinski izvori dušika. Međutim, korištenje seruma ima i svoje nedostatke. Budući da serum nema točno definiran sastav svaku novu šaržu je potrebno prethodno ispitati. Također, serum može sadržavati različite količine endotoksina, hemoglobina i drugih štetnih faktora kao i biti potencijalan izvor mikrobiološke kontaminacije kao npr. bakterija, gljivica, mikoplazma, virusa i priona (Brunner i sur., 2010). Isto tako, cijena, pogotovo FBS-a, je vrlo visoka te predstavlja 90% cijene medija za uzgoj kad je dodan u koncentraciji od 10% (Murhammer i Goochee, 1998).



Slika 3. Shematski prikaz razvoja medija bez dodatka seruma (van der Valk i sur., 2010).

Danas se nastoji izbjeći korištenje seruma u hranjivoj podlozi („serum-free“ medij) za uzgoj čime se smanjuje rizik kontaminacije, cijena proizvodnje kao i cijena pročišćavanja proizvoda (Zhaolie i sur., 1996). Kako bi se dobio medij za uzgoj stanične kulture bez dodatka seruma i pri tome se zadržala svojstva poput adhezije stanica, njihovog rasta i proliferacije, potrebno je

dodati veliki broj različitih komponenata u osnovni medij za uzgoj. Priprava takvog medija započinje od osnovnog medija DMEM/Ham's F-12 (50:50%, v/v) obogaćenog s inzulinom, transferinom i selenom (ITS). S ciljem omogućavanja vezanja adherentnih stanica na površinu podloge potrebno je dodati i faktore pričvršćivanja. Zatim slijedi dodavanje specifičnih hormona i faktora rasta jer se ti spojevi prirodno nalaze u serumu u različitim koncentracijama. Epidermalni faktor rasta i glukokortikoidi se dodaju u većinu medija, dok se ostali faktori rasta i hormoni dodaju ovisno o specifičnim potrebama stanica (npr. nervni faktor rasta). Naposljetku se dodaju lipidi, antioksidansi i vitamini te se time povećava specifičnost sastava medija bez seruma. Vitamin A potreban je kulturi raznih epitelnih stanica, dok su vitamini E i C te β -merkaptotanol i selen važni antioksidansi (van der Valk i sur., 2010). Shema postupka zamjena seruma potrebnim sastojcima prikazana je na slici 3. Na ovakvom tipu piramide može se uočiti kako se povećava specifičnost u dodavanju komponenata osnovnom mediju za uzgoj stanica.

2.2.2. Hidrolizati proteina kao sastojci medija bez seruma

Korištenje kemijski definiranih medija, medija bez seruma ili bez proteina ima limitiranu primjenu iz sljedećih razloga:

- Prisutnost određenih komponenti koje mogu imati nepoželjan utjecaj na stanice
- Vrijeme prihvaćanja stanice za podlogu je produženo
- Zbog nedostatka inhibitora proteaza inače prisutnih u serumu dolazi do povećanja rizika od proteolitičke razgradnje
- Specifična brzina rasta i produktivnost stanica su smanjeni (Sung i sur., 2004).

U cilju prevladavanja ovih nedostatak, hidrolizati proteina, posebice oni biljnog podrijetla, se često dodaju u medije bez seruma. Hidrolizati proteina dobivaju se enzimskom, kiselinskom ili mikrobnom hidrolizom biološkog materijala izoliranog iz životinjskog i biljnog tkiva, mikroorganizama ili mliječnih proizvoda koji su bogati različitim hranjivim tvarima poput aminokiselina, vitamina i minerala, lipida, oligopeptida, elemenata u tragovima te tvarima koje potiču proliferaciju i djeluju na povećanje aktivnosti stanice (Franěk i sur., 2000; Sung i sur., 2004).

Za razliku od prvotne uporabe hidrolizata proteina kao dodatnog izvora dušika, danas se ti hidrolizati koriste u različitim područjima biotehnologije te imaju svoju primjenu u:

- kulturama životinjskih stanica za proizvodnju monoklonskih protutijela, terapijskih proteina i enzima,
- kulturama biljaka i insekata za dobivanje različitih proizvoda,

- posebnim medijima za rast i ekspresiju gena genetički modificiranih mikroorganizama,
- za povećanje prinosa i produktivnost usjeva,
- stočnoj hrani kako bi prinosi bili veći (prinos mlijeka, kvalitetnije meso, povećanje tjelesne mase) (Pasupuleti i Demain, 2010).

Sve ove navedene primjene hidrolizata proteina zahtjevaju hidrolizate visoke kvalitete. U skladu s tim prohtjevima, industrija je započela s proizvodnjom nutritivno visoko vrijednih hidrolizata koji sadrže di-, tri-, oligopeptide i aminokiseline koji imaju sposobnost utjecaja na fiziološku funkciju stanica te time povećavaju produktivnost i poboljšavaju fermentacijske sposobnosti kulture stanica. Zbog veće sigurnosti primjene tj. smanjenja mogućnosti kontaminacije te niže cijene, sve se više upotrebljavaju hidrolizati proteina mikrobnog (npr. kvašćev hidrolizat), biljnog (npr. hidrolizat soje, uljane repice, riže) ili životinjskog podrijetla (npr. Primatome TM RL) kao potencijalni aktivatori rasta (Pasupuleti i Demain, 2010).

Ovisno o koncentraciji i podrijetlu proteinskih hidrolizata, njihov utjecaj na rast, proliferaciju i diferencijaciju stanica te na sintezu različitih proizvoda može biti pozitivan ili negativan. Dodatkom hidrolizata proteina soje u medij bez seruma, postignuto je to da je takav medij pokazao pozitivan utjecaj na rast i vijabilnost stanica CHO (Chun i sur., 2007), dok se dodatkom peptidnih frakcija hidrolizata uljane repice pokazao isto tako pozitivan učinak na rast i produktivnost CHO stanica u proizvodnji rekombinantnog interferona (Farges-Haddani i sur., 2006). Međutim, vrlo visoke koncentracije hidrolizata proteina mogu imati inhibitorno djelovanje na rast stanica jer se pretpostavlja da zbog vrlo visoke koncentracije aminokiselina i oligopeptida dolazi do narušavanja ravnoteže hranjivih tvari u mediju (Chun i sur., 2007).

2.3. VAŽNOST PROIZVODNJE I SASTAV LANA

Lan je jednogodišnja biljka iz obitelji *Linaceae* koja uključuje 10 rodova i više od 150 vrsta. Uzgaja se za proizvodnju tekstilnih vlakana i ulja. Visina onih sorti lana koje se koriste za proizvodnju tekstilnih vlakana iznosi 80-120 cm te takve sorte imaju manje sjeme. S druge pak strane, sorte koje se koriste za dobivanje ulja imaju kraće i razgranate stabljike, visine 60-80 cm te veći broj sjemenki. Mnoga istraživanja su pokazala da su plodna tla fine teksture i ilovačka tla (pijesak, mulj i glina) najpogodnija za rast i razvoj lana. Svjetska proizvodnja lana varira između 2 i 3 milijuna tona godišnje.

Laneno sjeme pa samim time i lanena pogača su najveći izvori lignana. Također, lan je važan izvor fenolnih kiselina koje imaju izrazitu biološku aktivnost kao npr. antioksidacijsko, antimikrobno i antikancerogeno djelovanje. Uz lignan i fenolne kiseline, laneno sjeme je važan

izvor masnih kiselina i minerala. Tako su najzastupljenije masne kiseline: linolenska s udjelom od 58,5-59,7% te linolna i oleinska s udjelima između 15-17%. Najzastupljeniji minerali prisutni u sjemenkama lana su: kalcij, mangan, fosfor i kalij. Isto tako iz pogače lana se mogu izolirati proteini i polisaharidi. Centrifugiranjem odmašćene pogače se iz tekućeg dijela dobivaju proteini, a iz krutog polisaharidi. Udio proteina iznosi 27,3%, dok polisaharida iznosi 10,7%. Laneno ulje, baš poput drugih ulja, ima visok udio globulina 18,6% i sadrži protein albumin koji čini 17,7% ukupnog proteina. Još jedna važna komponenta pogače lana su pektini koji se dobivaju vodenom ekstrakcijom. Njihov sastav predstavlja heterogenu smjesu polisaharida: ksiloza, glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoze, fukoze i galakturonske kiseline. Veliki broj polisaharida koji se mogu ekstrahirati iz lanenog sjemena izaziva veliko zanimanje, kako zbog očitih zdravstvenih prednosti zbog sadržaja topljivih vlakana, tako i zbog potencijalne primjene lanenog sjemena kao funkcionalne hrane, iskorištavanjem njegovih fizikalnih svojstava kao emulgatora i zgušnjivača. Grupa oligosaharida s antimikrobnim učincima su tzv. hitooligosaharidi koji posjeduju antitumorska i antioksidacijska svojstva te sposobnost vezanja slobodnih radikala (Ćapin, 2016).

2.3.1. Pogača lana

Nusproizvod koji nastaje kao ostatak nakon prešanja sjemenki lana naziva se pogača lana te se donedavno uglavnom smatrao otpadom i beskorisnim ostatkom. Po završetku ekstrakcije ulja ostaje velika količina prešane pogače lana, koja se uglavnom odbacuje jer se još uvijek smatra otpadom ili u najboljem slučaju nusproizvodom. Pogača lana se uglavnom koristi kao stočna hrana te kao aditiv u pekarskim proizvodima, a ima i potencijal za primjenu u ljudskoj prehrani. Budući da se može koristiti kao obnovljivi izvor energije te kao sirovinska osnova za izolaciju proteina, vlakana i ostalih bioaktivnih komponenti, danas pogača lana privlači sve veći interes industrije i znanstvene zajednice (Gutiérrez i sur., 2010).

Tablica 1. Kemijski sastav pogače lana (Gutierrez i sur., 2010).

Komponente pogače lana	%
Vlaga	8,30
Proteini	21,34
Lipidi	43,90
Vlakna	6,21
Pepeo	2,66
Ekstrakt (bez prisustva dušika)	17,59

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

Tijekom ovog istraživanja korišten je proteinski izolat dobiven iz brašna odmašćene pogače lana (koncentracija proteinskog izolata iznosi $45,6 \text{ g L}^{-1}$), a koji je pripremljen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije u sklopu izrade diplomskog rada Petre Bosanac pod nazivom „Proteinski izolati iz uljnih pogača lana i konoplje-priprava, karakterizacija i biološka aktivnost“.

3.1.1. Kemikalije

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Sigma, ST. Louis, SAD

Fetalni teleći serum (FBS), Gibco BRL, SAD

Anti-Anti antibiotik, Gibco BRL, SAD

Tripsin-EDTA, Sigma, St. Louis, SAD

Tripan-plavo, Sigma, St. Louis, SAD

Natrijev hidroksid, Kemika, Hrvatska

Natrijev karbonat, Kemika, Hrvatska

Bakrov sulfat pentahidrat, Kemika, Hrvatska

Kalij natrij tetrahidrat, Kemika, Hrvatska

β -merkaptotanol, LKB, Bromma, Švedska

Bromfenol plavo, Kemika, Zagreb, RH

Coomassie plavo, Sigma, St. Louis, SAD

EDTA (Kompleksal III), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Octena kiselina, Kemika, Zagreb

Glicerol, Kemika, Zagreb

TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametiletildiamin), LKB, Bromma, Švedska

Smjesa standardnih proteina niskih molarnih masa (LMW Calibration Kit), GE Healthcare, SAD

TRIS [Tris(hidroksimetil)aminometan], Kemika, Zagreb, Hrvatska

SDS (natrijev dodecilsulfat), LKB, Bromma, Švedska

Folin-Ciocalteu-ov reagens, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Akrilamid, Sigma, St. Louis, SAD

Bisakrilamid (N,N'-metilenbisakrilamid), Fluka, Buchs, Švicarska
Amonijev persulfat, LKB, Bromma, Švedska
D-glukoza, Kemika, Zagreb

3.1.2. Otopine

Reagens A

Natrijev hidroksid	2 g
Natrijev karbonat	10 g
Destilirana voda	do 500 mL

Reagens B1

Bakrov sulfat pentahidrat	1 g
Destilirana voda	do 100 mL

Reagens B2

Kalij natrij tartarat	2 g
Destilirana voda	do 100 mL

Reagens C

Reagens A	50 ml
Reagens B1	0,5 ml

Pufer za uzorke za SDS elektroforezu

2 mM EDTA III
2% (m/v) SDS
10% (v/v) glicerol
0,001% (v/v) bromfenol plavo
5% (v/v) β -merkaptoetanol
50 mM Tris-HCl pH=6,8

Gel za sabijanje

4,5% (m/v) akrilamid

0,12% (m/v) *N, N'* – metilenbisakrilamid
0,1% (m/v) SDS
0,075% (v/v) *N, N, N', N'*- tetrametiletilendiamin (TEMED)
7,5% (m/v) amonijev persulfat (APS)
0,5 M Tris-HCl pufer pH=6,8

Gel za razdvajanje (12 %)

12% (m/v) akrilamid
0,32% (m/v) *N, N'* – metilenbisakrilamid
0,066% (v/v) TEMED
0,086% (m/v) APS
0,5 M Tris-HCl pufer pH=8,8

Pufer za proteinsku elektroforezu

0,1% (m/v) SDS
25mM TRIS-glicin pufer pH=6,8

Coomassie otopina za bojanje gelova

0,25% Coomassie plavo boja
10 % ledena octena kiselina
50 % glicerol
destilirana voda

Reagensa za određivanje glukoze

4-aminoantipirin 0,30 mmol L⁻¹
glukozaoksidaza > 12,000 U L⁻¹
peroksidaza > 60 U L⁻¹
4-hidroksibenzojeva kiselina 6 mmol L⁻¹
fosfatni pufer 71 mmol L⁻¹ pH 7.5 ± 0.10 na 18-22 °C

3.1.3. Uređaji i oprema

- inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Iskra PIO, Slovenija
- komora za sterilni rad (*laminar flow cabinet*), Kambič, Slovenija

- inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Neubaerova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright - Line, Njemačka
- T - boce od 25 cm² i 50 cm², Corning, SAD
- ploče s jažicama, Corning, SAD
- laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, kivete, epruvete)
- laboratorijska vaga, Boeco, Njemačka
- hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- hladnjak (-80 °C), TT 80 FRYKA, Njemačka
- spektrofotometar Thermo Scientific Genesys 10 S UV/VIS, SAD
- sistem za vertikalnu elektroforezu CVS10D, Clever Scientific Ltd., Rugby, Velika Britanija
- sustav napajanja za elektroforezu, Consort, Turnhout, Belgija
- čitač ploča, TECAN, Mannedorf, Švicarska

3.1.4. Stanična linija HEK-293T

Tijekom izrade ovog rada korištena je humana stanična linija bubrega ljudskog embrija HEK-293T, dobivena iz radne banke stanica *American Type Culture Collection* (ATCC). T označava prisutnost mutanta SV40 velikog T antigena u genomu unesenog procesom transfekcije. Cjelokupni genom ove stanične linije je sekvencioniran.

3.1.5. Stanična linija CHO-RP

Izvorna stanična linija CHO-K1 dobivena je iz radne banke stanica *American Type Culture Collection* (ATCC). Međutim, u ovom radu korištena je životinjska stanična linija ovarija kineskog hrčka CHO-RP (sa sposobnošću proizvodnje specifičnog rekombinantnog terapijskog protein), koja je dobivena iz CHO-K1 procesom transfekcije gena koji kodiraju za specifični rekombinantni terapijski protein. Genom ove stanične linije nije u potpunosti sekvencioniran.

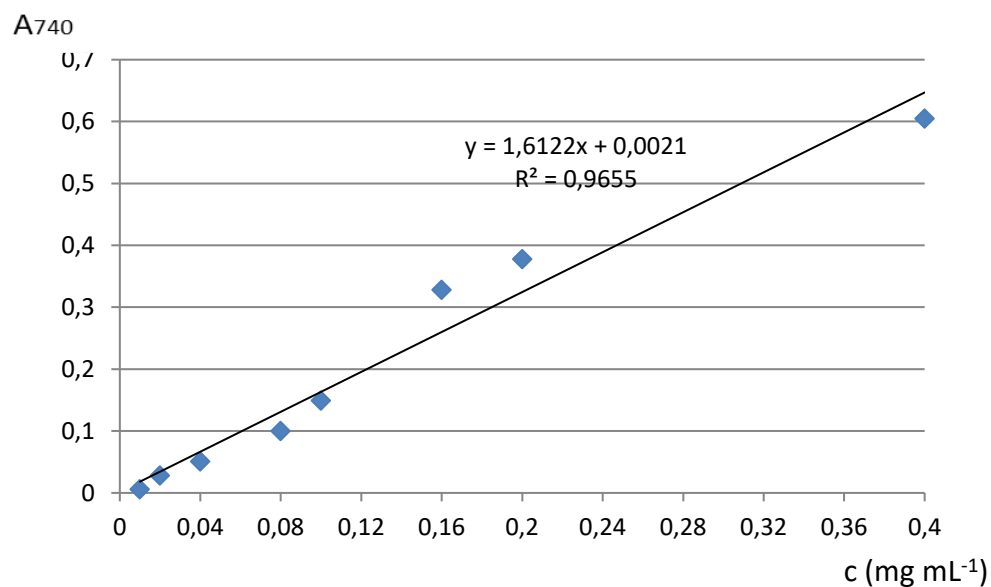
3.2. METODE RADA

3.2.1. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u

Metoda po Lowryu za određivanje koncentracije proteina se temelji na reakciji bakrenih iona vezanih na amino skupine peptidne veze i fenolne skupine bočnog ogranka aminokiseline Tyr u proteinu s Folin-Ciocalteu reagensom, pri čemu nastaje kompleks plavo-ljubičastog obojenja s apsorpcijskim maksimumom pri 740 nm.

Bakreni ioni koordinirano vezani na amino skupine peptidne veze i fenolna skupina tirozina (Tyr) reduciraju fosfovolframatnu i fosfomolibdensku kiselinu Folinovog reagensa u volfram i molibden plavilo. Folin-Ciocalteu (Folinov) reagens sadrži fosfovolframatnu i fosfomolibdensku kiselinu koje bakreni ioni koordinirano vezani na amino skupine peptidne veze i fenolna skupina tirozina (Tyr) reduciraju u volfram i molibden plavilo.

Iz otopine BSA, $\gamma(\text{BSA}) = 1 \text{ mg mL}^{-1}$, pripremljeno je po 1 mL standardnog niza (tablica 2.), kako bi se napravio baždarni dijagram (slika 4.).



Slika 4. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina po Lowryu.

Tablica 2. Priprema standardnog niza razrjeđenja BSA.

Uzorak	Koncentracija (mg mL ⁻¹)	Volumen BSA (mL)	Volumen vode (mL)
S0	0,00	0	1,0
S1	0,01	0,01	0,99
S2	0,02	0,02	0,98
S3	0,04	0,04	0,96
S4	0,08	0,06	0,94
S5	0,1	0,1	0,90
S6	0,16	0,16	0,84
S7	0,2	0,2	0,80
S8	0,4	0,4	0,60

U epruvete se pipetira po 100 μ L otopina standardnog niza i uzorka (medij s dodatkom seruma i različitim koncentracijama lana) doda se 1 mL reagensa C, smjesa se promiješa na vrtložna miješalici i ostavi 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta, u svaku epruvetu naglo se doda 100 μ L Folin-Ciocalteau reagensa na vortexu te se smjesa ostavi 40 min na sobnoj temperaturi. Nakon termostatiranja očita se apsorbancija standardnog niza kao i uzoraka proteinskih izolata pri valnoj duljini 740 nm, uz slijepu probu (S0).

3.2.2. SDS-PAGE elektroforeza proteina iz uzoraka hranjivih medija za uzgoj

Proteini prisutni u pripremljenim hranjivim medijima za uzgoj stanica razdvojeni su SDS-PAGE elektroforezom po Laemmli-ju (Laemmli, 1970). Uzorcima je dodano 5 μ L pufera za uzorke za elektroforezu po Laemmli-ju te su tretirani 2-3 minute u kipućoj vodenoj kupelji. Zatim su uzorci i smjesa standardnih proteina male molarne mase naneseni na prethodno pripremljenu 12%-tnu poliakrilamidnu ploču za elektroforezu. Elektroforeza je provedena u puferu za elektroforezu u aparatu za elektroforezu pri stalnom naponu od 200 V uz hlađenje etanolom pumpom. Pomoću migracije boje brom fenol plavo praćen je tijek elektroforeze, a po njenom završetku gel je skinut s ploče za elektroforezu i obojan Coomassie plavo otopinom za bojanje te ostavljen preko noći. Odbojavanje gelova provedeno je u otopini za odbojavanje u kojoj se gelovi i čuvaju.

3.2.3. Uzgoj HEK-293T i CHO-RP stanica u T-bocama

Uzgoj započinje odmrzavanjem stanica koje se čuvaju zamrznute na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u mediju za zamrzavanje. Ampule sa zamrznutim stanicama (1 mL) u koncentraciji od $1 \cdot 10^7$ stanica mL^{-1} odmrznu se naglim uranjanjem u vodenu kupelj na $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. U sterilnu kivetu se prenese sadržaj ampule te se u nju doda 5-10 mL medija za uzgoj. Stanice se odvajaju centrifugiranjem tijekom 5 minuta na 1000 okretaja/min. Supernatant se zatim pažljivo ukloni, a talog stanica se resuspendira u mediju za uzgoj koji sadrži 5% (v/v) FBS. Stanice se prebace u T-bocu koja se stavlja u inkubator na temperaturu od $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz odgovarajuću atmosferu (95% zraka + 5% CO_2). Uzgoj u T-bocama predstavlja prvu fazu laboratorijskih šaržnih bioprocasa. Pod inverznim mikroskopom svakodnevno se vrši provjera prihvaćanja stanica za podlogu, njihova morfologija, brojnost te njihovo opće stanje. Nagla promjena boje medija često ukazuje na pojavu kontaminacije u kulturi te je stoga nužno tijekom uzgoja pratiti njegovu boju. Redovito prihranjivanje važno je radi nadomjestaka sastojaka medija koji su se iscrpili te da se uklone proizvodi metabolizma kako bi se uklonio njihov štetni učinak i održao optimalan pH kulture.

3.2.4. Utjecaj dodatka izolata proteina iz uljne pogače lana na rast i produktivnost stanica HEK-293T i CHO-RP

Stanice su uzgajane u T-boci sve dok ne uspostave monosloj nakon čega se sterilnom pipetom iz T-boce ukloni medij za uzgoj. Nakon toga se doda tripsin, koji je prethodno odmrznut i zagrijan na sobnu temperaturu, u količini od 1,5 ml, odnosno dostatnoj da se prekrije cijeli monosloj stanica. Tretiranje stanica tripsinom traje oko 5-10 min u inkubatoru imajući u vidu da nakon dužeg vremena izloženosti tripsinu on može imati štetno djelovanje na stanice. Pod inverznim mikroskopom napravi se provjera učinka tripsina, odnosno da li su sve stanice odvojene od podloge. Zatim se dodaje medij s dodatkom seruma u volumenu od 3 ml kako bi inhibirao djelovanje tripsina i daljnje razaranje stanica. Potom smo stanice nacijepili u ploče s 24 jažice u početnoj koncentraciji od $2 \cdot 10^4$ st mL^{-1} u 0,5 mL DMEM medija za uzgoj s dodatkom 5% FBS seruma i 1% antibiotika. Stanice su tako ostavljene tijekom 24h da se prihvate za dno jažica. Nakon tog vremena, iz jažica je uklonjen medij u kojem su stanice dan ranije nacijepljene, a dodan je novi medij s različitim koncentracijama proteinskog izolata lana kao i s različitim koncentracijama seruma. Tako su za HEK-293T staničnu liniju pripremljeni DMEM mediji koji sadrže 5% seruma i 1% antibiotika, dok su za CHO-RP staničnu liniju pripremljeni DMEM mediji sa sadržajem od 1% i 5% seruma s dodatkom 1% antibiotika te je u

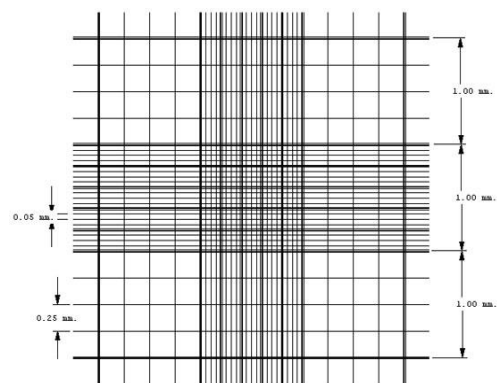
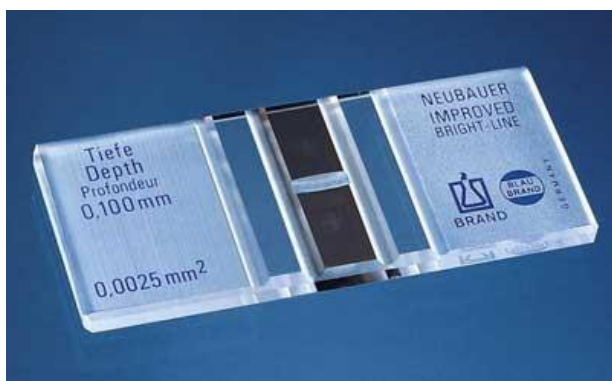
sve medije dodan i proteinski izolat iz pogače lana u koncentracijama od 0,1 g L⁻¹, 0,2 g L⁻¹, 0,4 g L⁻¹, 1 g L⁻¹, 2 g L⁻¹ i 4 g L⁻¹. Kao kontrola su korišteni DMEM mediji s dodatkom 1% i 5% FBS-a i 1% antibiotika, a bez dodatka izolata proteina. Dinamika rasta stanica praćena je tijekom 6 dana brojanjem u Neubaerovoj komorici uz dodatak boje tripan-plavo. Svakih 48h sati hranjivi medij, u kojem se nalaze stanice, je izuzet te spremljen u Eppendorf kivete radi daljnjih postupaka analize. Nakon uklanjanja medija na stanice se dodaje 0,1 mL tripsina koji djeluje kroz desetak minuta, što je vrijeme potrebno da se stanice odvoje od podloge na kojoj rastu. Zatim se dodaje 0,2 mL medija sa serumom kako bi se inhibiralo djelovanje tripsina te se pristupa brojanju stanica.

3.2.5. Određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*

Za određivanje broja stanica koristi se metoda bojanja otopinom tripan-plavo. Mrtve se stanice razlikuju od živih po tome što se zbog oštećene membrane boje plavo, dok se žive stanice ne oboje. Za brojanje se koristi Neubauerova komorica (slika 5.). Uzorak za brojenje pripremamo tako da sterilnom pipetom uklonimo hranjivi medij iz jažica te dodamo 0,1 mL tripsina koji odvaja stanice od podloge. Odvojenim stanicama dodajemo 0,2 mL medija sa serumom kako bi se spriječilo daljnje djelovanje tripsina. Stanice se resuspendiraju i uzima se 10 µL suspenzije stanice te 10 µL boje tripan-plavo. Od tako pripremljenog uzorka uzima se alikvot od 10 µL i nanosi na Neubauerovu komoricu. Pod mikroskopom se određuje broj živih stanica brojanjem u četiri središnja kvadrata komorice. Broj živih stanica po mL suspenzije računa se na sljedeći način:

$$\text{Broj stanica/mL suspenzije} = X_{sr} \times \text{faktor razrjeđenja} \times 5 \times 10^3 \quad [1]$$

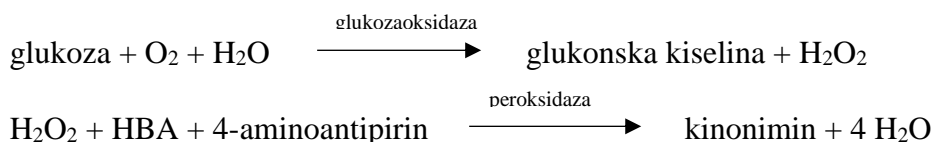
pri čemu je X_{sr} - srednja vrijednost broja stanica unutar 4 središnja kvadrata komorice.



Slika 5. Neubaerova komorica za brojanje stanica (Anonymous 1, 2017).

3.2.6. Određivanje koncentracije glukoze u hranjivom mediju

Kolorimetrijsko-enzimska glukoza-PAP (fenol i aminoantipirin) je metoda koja služi za *in vitro* određivanje koncentracije glukoze u krvi, plazmi, serumu, urinu i likvoru. Koncentracija glukoze u uzorku hranjivog medija za uzgoj određena je spektrofotometrijski prema specifičnim reakcijama:



HBA= 4-hidroksibenzojeva kiselina

Standard: glukoza 5 mmol/L

Uvjeti određivanja:

Temp. 37 °C

Primarna valna duljina 500 nm

Reakcija: porast apsorbancije

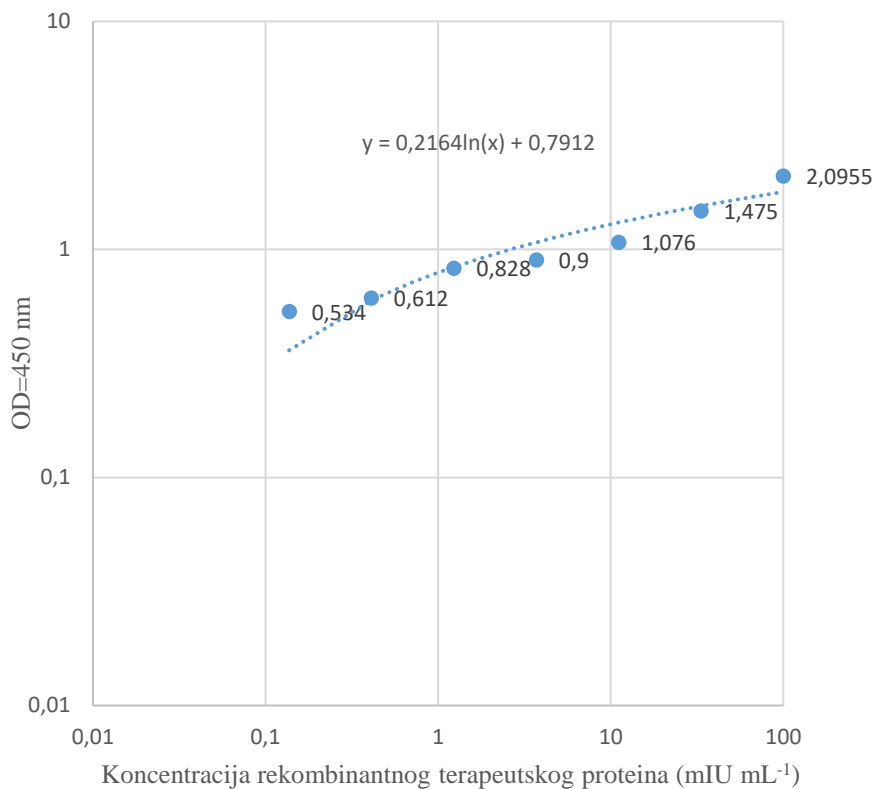
Uzorak : reagens= 1:150

Mjerenje se provodi pri apsorbanciji od 500 nm. Koncentracija kinonimina je proporcionalna koncentraciji glukoze, a na osnovi intenziteta boje njegove otopine (obojen spoj) spektrofotometrijski se odredi njegova koncentracija. Uzorak za mjerenje apsorbancije priređen je tako da je u epruvetu otpipetirano 10 μ L uzorka medija za uzgoj ili standarda glukoze i 1,35 mL otopine reagensa. Uzorci su se inkubirali na temperaturi od 37 °C 10-15 minuta i potom se očitala apsorbanciju pri 500 nm. Slijepa proba umjesto uzorka sadržavala je destiliranu vodu. Koncentracija glukoze u mediju za uzgoj izračuna se prema formuli:

$$\text{Koncentracija glukoze} = \frac{\Delta A / \text{min uzorka}}{\Delta A / \text{min standarda}} \times 5 \text{ mM} \quad [2]$$

3.2.7. ELISA test

Imunoenzimskim ELISA testom određivala se koncentracija specifičnog rekombinantnog proteina kojeg proizvodi stanična linija CHO-RP. Proizvođač ELISA testa koji se koristio u ovom radu je Sigma-Aldrich®. Ovaj ELISA test je proveden po službenom protokolu proizvođača. Kako bi se odredila koncentracija rekombinantnog terapijskog proteina u mediju na temelju apsorbancije, slijedeći protokol proizvođača, pripremljen je baždarni dijagram uz pomoć standarada (slika 6.) te uzorci kojima je očitana apsorbancija.



Slika 6. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije rekombinantnog proteina testom ELISA.

3.2.8. Izračunavanje parametara rasta CHO-RP i HEK-293T stanica

3.2.8.1. Određivanje specifične brzine rasta stanica

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad [3]$$

x – masa stanica

dx - povećanje biomase stanica

dt - vremenski interval

μ je konstanta u lag fazi, a približno vrijedi i za fazu usporenog rasta pa vrijedi jednadžba:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad [4]$$

Obzirom da je masa proporcionalna broju stanica, onda je:

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{\Delta t} \quad [5]$$

N – broj stanica u 1 mL na kraju log faze

N_0 – broj stanica u 1 mL na početku log faze

Δt – vremenski interval (h)

3.2.8.2. Određivanje specifične produktivnosti (Q_p)

$$Q = \frac{C}{N \Delta t} \quad [6]$$

C – koncentracija rekombinantnog proteina (mIU/mL)

N - broj stanica po mL

Δt – vremenski interval (h)

3.2.8.3. Određivanje vremena udvostručenja stanica

Vrijeme udvostručenja stanice je računato prema izrazu:

$$t_D = \ln 2 / \mu \quad [7]$$

t_D – vrijeme udvostručenja stanice

μ – specifična brzina rasta

3.2.8.4. Određivanje prinosa stanica

Prinos = broj stanica/ 1 mL na kraju log faze rasta - broj stanica/ 1 mL na početku uzgoja [8]
ili

Prinos = broj stanica na kraju log faze rasta - broj stanica na početku uzgoja [9]

3.2.9. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine (x_{sr}) određenog broja mjerenja (n).

Srednja vrijednost $x_{sr} = \frac{\sum_{i=1}^n Xi}{n} - X$ [10]

Varijanca $s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (Xi - X)^2$ [11]

Standardna devijacija $s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (Xi - Xsr)^2}$ [12]

4. REZULTATI I RASPRAVA

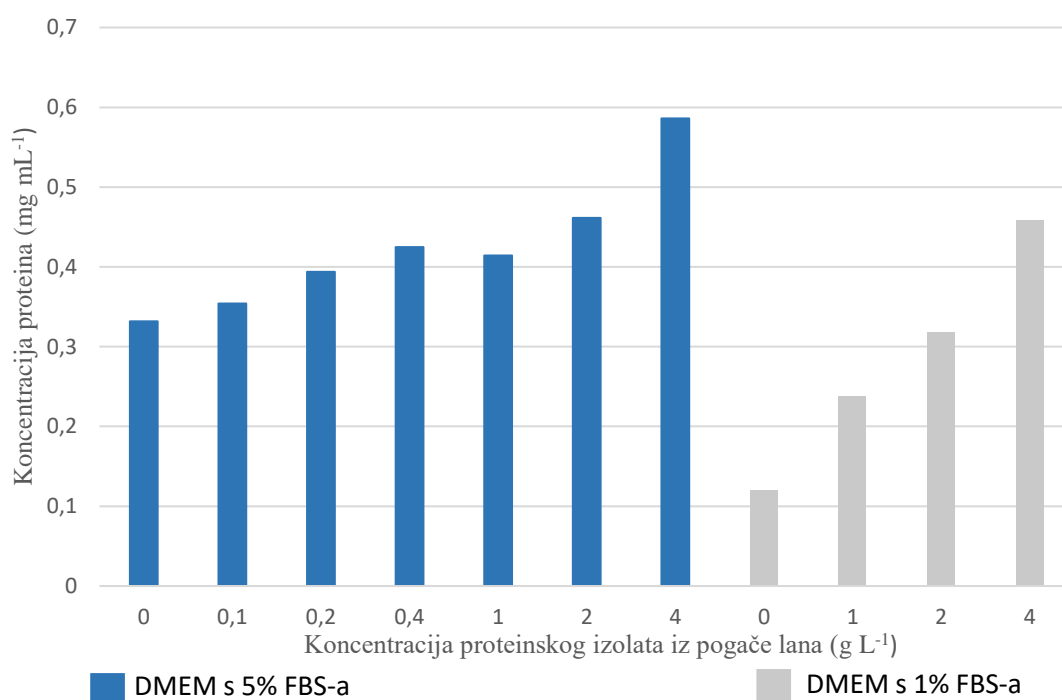
U današnje vrijeme jedno od najvećih tržišta na svijetu je ono prehrambenih proizvoda što dovodi do sve većeg rasta konkurentnosti među proizvođačima. Sukladno tome, povećao se i interes proizvođača za boljim iskorištavanjem kako izvornih sirovina tako i proizvedenog otpadnog materijala. Takvi otpadni materijali, nusproizvodi prehrambene industrije, koji između ostalog sadrže i proteine, predstavljaju novu potencijalnu sirovinu s mogućom primjenom i u kulturama životinjskih stanica. Stvaranjem vrijednosti za takve materijale omogućuje se ekonomska isplativost i održivost prehrambene industrije. Jedan od takvih nusproizvoda koji imaju veliki potencijal su ostaci iz proizvodnje jestivog ulja, takozvane uljne pogače koje se danas uglavnom koriste kao stočna hrana ili gnojivo. Najzastupljenije pogače, s obzirom na podrijetlo, su pogača soje (57%), uljane repice (15%), pamuka (10%) te lana i konoplje (<10%).

S ciljem što boljeg i kvalitetnijeg iskorištavanje uljnih pogača, a imajući u vidu njihov sastav proteina, objavljeni su brojni radovi u kojima se ispitivao utjecaj proteinskih hidrolizata iz uljnih pogača na rast i produktivnost životinjskih staničnih linija. Tako je određen učinak, koji varira s obzirom na dodane koncentracije i sastav, proteinskih hidrolizata iz uljane repice na proliferaciju CHO stanica (Chabanon i sur., 2008) kao i učinak proteinskog hidrolizata iz soje i pšenice na rast i produktivnost iste stanične linije (Spearman i sur., 2014; Kim i Lee, 2009). Poznavajući nedostatke seruma, proteinski hidrolizati iz biljaka mogu se koristiti kao zamjena za dio seruma ili seruma u cijelosti zbog svog izbalansiranog sastava nutrijenata. Međutim, u pogačama su prisutni i tvari ne-proteinskog karaktera koje se moraju ukloniti kako bi se onemogućilo njihovo neželjeno biološko djelovanje na stanice (Franěk i sur., 2000).

Uzimajući u obzir dosad dobivene rezultate istraživanja učinaka proteinskih hidrolizata biljnog porijekla na stanice, cilj ovog rada je bio ispitati učinak proteinskih izolata iz pogače lana na rast i produktivnost industrijske stanične linije CHO-RP, važne u proizvodnji rekombinantnih terapijskih proteina te vidjeti da li izolati proteina imaju potencijalu vrijednost kao djelomična zamjena za serum. Također se promatrao i učinak proteinskih izolata na rast HEK-293T stanice. Imajući u vidu da uljna pogača lana sadrži 30-40% proteina (Mueller i sur., 2010) te da su proteinski izolati sirovina koja prethodi u dobivanju proteinskih hidrolizata, htio se ispitati njihov utjecaj i svojstva na stanične linije prije dobivanja i upotrebe hidrolizata.

4.1. OREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA METODOM PO LOWRY-U I NJIHOVOG SASTAVA SDS-PAGE ELEKTROFOREZOM IZ UZORAKA HRANJIVIH MEDIJA ZA UZGOJ STANIČNIH LINIJA HEK-293T I CHO-RP

Za potrebe ovog rada pripremljeni su DMEM hranjivi mediji s različitim koncentracijama seruma i proteinskog izolata iz uljne pogače lana za potrebe uzgoja staničnih linija-HEK 293T i CHO-RP. Kako bi se odredila koncentracija proteina u uzorcima hranjivih medija korištena je metoda po Lowry-u. Iz dobivenih apsorbancija uzoraka, a uz pomoć baždarnog dijagrama (slika 4.), određena je koncentracija proteina u svim uzorcima.



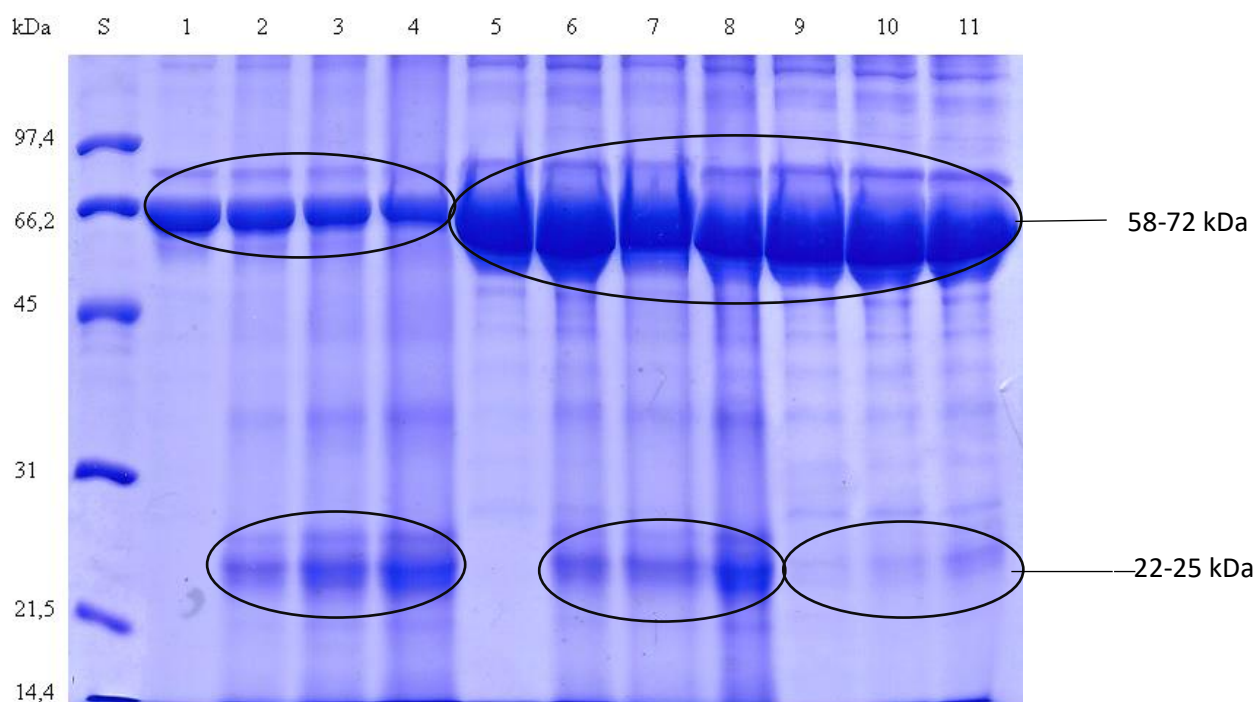
Slika 7. Ukupna koncentracija proteina u medijima nakon dodatka seruma i proteinskog izolata iz uljne pogače lana.

Iz slike 7. vidljiva je razlika u koncentraciji proteina prisutnih u medijima s dodatkom 5% i 1% seruma bez dodatka proteinskog izolata. Povezano s time, razumljivo je zašto su ukupne koncentracije proteina veće u medijima s 5% FBS-a, nego u medijima s 1% nakon dodatka zadanih koncentracija proteinskih izolata pogače lana. Isto tako, iz grafičkog prikaza (slika 7.) se da uočiti kako se s povećavanjem koncentracije dodanih proteinskih izolata, povećava i ukupna koncentracija proteina u uzorcima hranjivih medija.

Kako bismo dodatno dokazali različitost proteinskog sastava i koncentracija provedena je SDS-PAGE elektroforeza (slika 8.). Kao što se može vidjeti, slika gela je u skladu s rezultatima dobivenim metodom po Lowry-u. Na slici 8. je uočljiva razlika između medija s

različito dodanim postocima seruma, vidljiva po razlici u debljini i intezitetu vrpce oko 66 kDa. Tako možemo zaključiti da su kolone 1-4 mediji u koje je dodan 1% FBS-a te sadrže manju koncentraciju proteina, dok su kolone od 5 do 11 mediji s dodatkom 5% seruma te imaju veću koncentraciju proteina. Isto tako možemo razlikovat kolone 1 i 5, kao medije u koje nisu dodani proteinski izolati pogače lana jer nemaju vrpce 22-25 kDa koje su karakteristične za proteine lana. S druge strane, kolone 2-4 te 6-8 predstavljaju medije u koje je redom dodan proteinski izolat u koncentraciji od 1 g L⁻¹, 2 g L⁻¹ i 4 g L⁻¹ lana. Kolone 9-11 se odnose na medije u kojima je koncentracija izolata iznosila 0,1 g L⁻¹, 0,2 g L⁻¹ i 0,4 g L⁻¹. Do ovih zaključka nas dovodi uočljiva razlika u intezitetu i debljini vrpce pri 22-25 kDa koja je u kolonama 9-11 manja nego u vrpcama 2-4 i 6-8, što upućuje na manju koncentraciju proteina, a što je i sukladno koncentraciji dodanih proteinskih izolata.

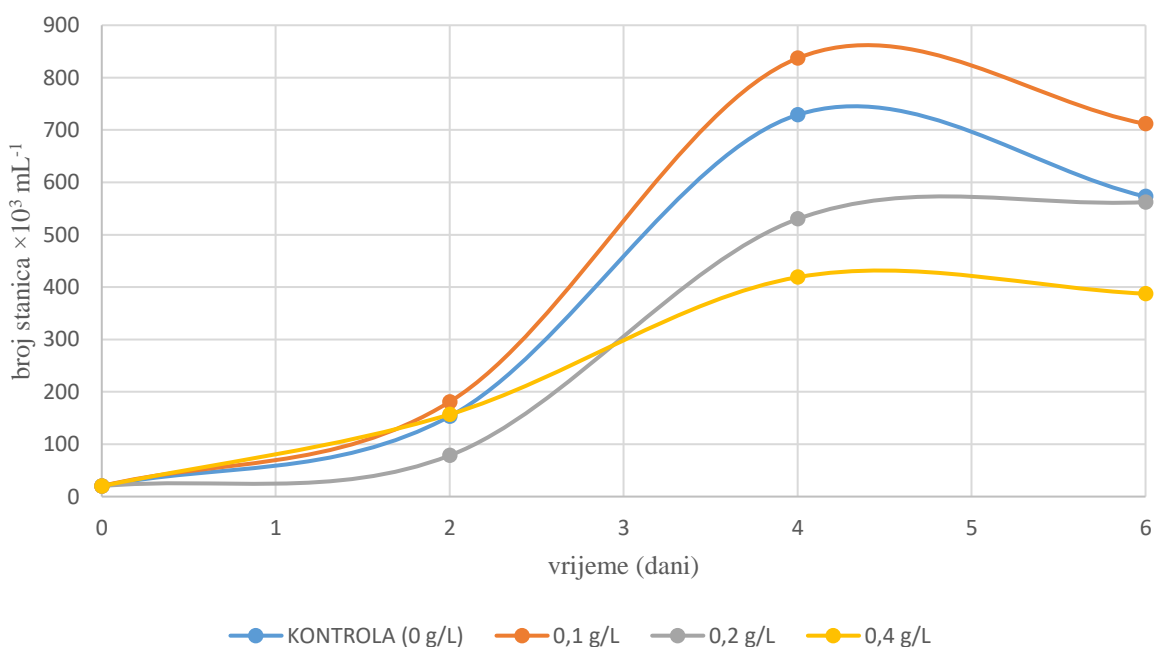
Svi ovi rezultati daju nam potvrdu da smo pripremili zadane medije, s različitim postocima seruma i različitim koncentracijama proteinskog izolata iz uljne pogače lana, u kojima smo potom uzgajali ispitivane stanične linije.



Slika 8. SDS-PAGE elektroforeza proteina u uzorcima medija. S-standardi. Medij s 1% seruma te 0, 1, 2 i 4 g L⁻¹ izolata pogače lana (1-4). Medij s 5% seruma te 0, 1, 2 i 4 g L⁻¹ izolata pogače lana (5-8); i 0,1, 0,2 i 0,4 g L⁻¹ izolata pogače lana (9-11).

4.2. UČINAK RAZLIČITIH KONCENTRACIJA PROTEINSKOG IZOLATA IZ ULJNE POGAČE LANA NA RAST I PROLIFERACIJU HEK-293T STANICA

Da bi se istražio učinak proteinskog izolata iz pogače lana na dinamiku rasta stanica, u svaku jažicu naciijepljeno je 10 000 HEK-293T stanica te je tijekom 6 dana praćen njihov rast u DMEM mediju s dodatkom različitih koncentracija proteinskog izolata. Koncentracije dodanih proteina pogače lana iznosile su 0,1, 0,2, 0,4 g L⁻¹ te 1, 2 i 4 g L⁻¹. Kontrole su nam bili mediji u koje nismo dodavali proteinske izolate. Broj stanica određivan je svaki drugi dan (slika 9. i 10.).



Slika 9. Krivulja rasta HEK-293T stanica pri različitim koncentracijama proteinskog izolata iz uljne pogače lana u mediju s 5% seruma.

Tablica 3. Parametri rasta HEK-293T stanica pri različitim koncentracijama proteinskog izolata u mediju s 5% seruma:

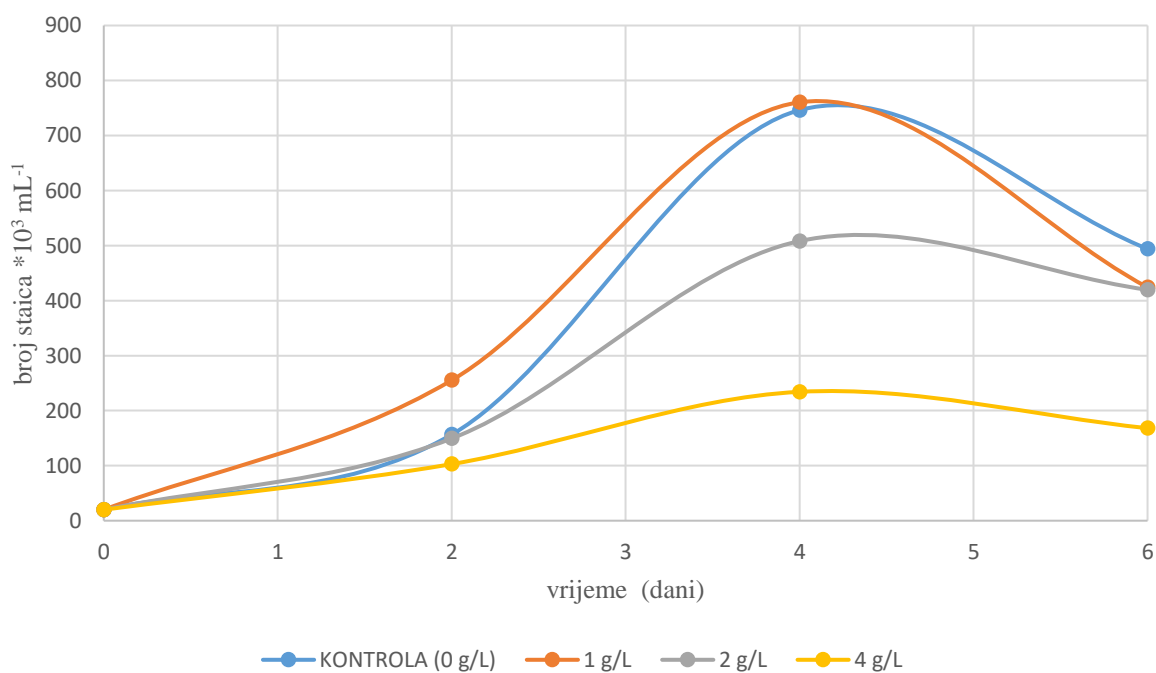
- koncentracije proteinskog izolata 0,1 g L⁻¹, 0,2 g L⁻¹, 0,4 g L⁻¹ + kontrola
- koncentracije proteinskog izolata 1 g L⁻¹, 2 g L⁻¹, 4 g L⁻¹ + kontrola.

a)

Proteinski izolat iz pogače lana (g L ⁻¹)	Prinos stanica (broj stanica mL ⁻¹)	Spec. brzina rasta stanica (h ⁻¹)	Vrijeme udvostručenja (h)
0 (kontrola)	70,9×10 ⁴	0,0402	17,24
0,1	81,7×10 ⁴	0,0418	16,58
0,2	54,3×10 ⁴	0,0371	18,68
0,4	39,9×10 ⁴	0,0336	20,63

b)

Proteinski izolat iz pogače lana (g L ⁻¹)	Prinos stanica (broj stanica mL ⁻¹)	Spec. brzina rasta stanica (h ⁻¹)	Vrijeme udvostručenja (h)
0 (kontrola)	72,6×10 ⁴	0,0404	17,16
1	74,1×10 ⁴	0,0407	17,03
2	48,8×10 ⁴	0,0359	19,31
4	21,4×10 ⁴	0,0266	26,06



Slika 10. Krivulja rasta HEK-293T stanica pri različitim koncentracijama proteinskog izolata iz uljne pogače lana u mediju s 5% seruma.

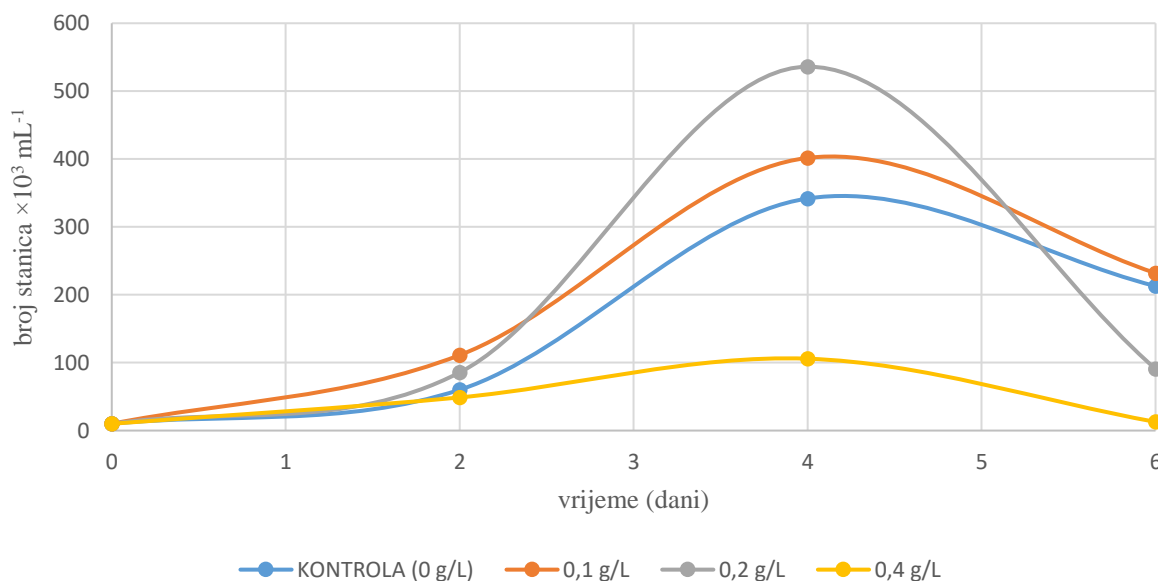
Na osnovu parametara rasta HEK-293T stanica (tablica 3. a) pri različitim koncentracijama proteinskog izolata iz uljne pogače lana u DMEM mediju s dodatkom 5% FBS-a, može se uočiti

da je najveća specifična brzina rasta stanica u mediju s $0,1 \text{ g L}^{-1}$ proteina ($0,0418 \text{ h}^{-1}$). Pri toj koncentraciji postignut je i najveći prinos stanica od $81,7 \times 10^4 \text{ st mL}^{-1}$. Također ispitujući veće koncentracije proteinskog izolata, iz tablice 3. b) i slike 10., vidljivo je da je samo kod koncentracije izolata od 1 g L^{-1} ($74,1 \times 10^4 \text{ st mL}^{-1}$) prinos stanica veći od kontrole ($72,6 \times 10^4 \text{ st mL}^{-1}$) te da je kod ove koncentracije najveća specifična brzina rasta stanica ($0,0407 \text{ h}^{-1}$) u odnosu na ostale dvije ispitivane koncentracije proteinskog izolata, 2 g L^{-1} ($0,0359 \text{ h}^{-1}$) i 4 g L^{-1} ($0,0266 \text{ h}^{-1}$). Uspoređujući rezultate jednog i drugog ispitivanja paralelno može se uočiti da je prinos stanica kod koncentracije od $0,2 \text{ g L}^{-1}$ ($54,3 \times 10^4 \text{ st mL}^{-1}$) veći nego kod koncentracije 2 g L^{-1} ($48,8 \times 10^4 \text{ st mL}^{-1}$) i 4 g L^{-1} ($21,4 \times 10^4 \text{ st mL}^{-1}$) proteinskog izolata (tablica 3. b)).

Ovi rezultati ukazali su da dodavanjem proteinskog izolata iz uljne pogače lana, a pogotovo koncentracija manjih od 1 g L^{-1} , dolazi do potencijalno pozitivnih efekata na rast stanica HEK-293T.

4.3. UČINAK RAZLIČITIH KONCENTRACIJA PROTEINSKOG IZOLATA IZ ULJNE POGAČE LANA NA RAST I PROLIFERACIJU CHO-RP STANICA

Analizirajući rezultate HEK-293T stanica, uočeno je da dodatkom, u DMEM medij s 5% seruma, proteinskog izolata iz uljne pogače lana u koncentracijama uglavnom manjim od 1 g L^{-1} dolazi do blagog učinka na rast i proliferaciju stanica. Stoga se pristupilo daljnjem ispitivanju tih koncentracija na rast CHO-RP stanične linije po istom principu.



Slika 11. Krivulja rasta CHO-RP stanica pri različitim koncentracijama proteinskog izolata iz uljne pogače lana u mediju s 5% seruma.

Tablica 4. Parametri rasta CHO-RP stanica pri različitim koncentracijama proteinskog izolata u mediju s 5% seruma:

a) koncentracije proteinskog izolata 0,1 g L⁻¹, 0,2 g L⁻¹, 0,4 g L⁻¹ + kontrola

b) koncentracije proteinskog izolata 1 g L⁻¹, 2 g L⁻¹, 4 g L⁻¹ + kontrola.

a)

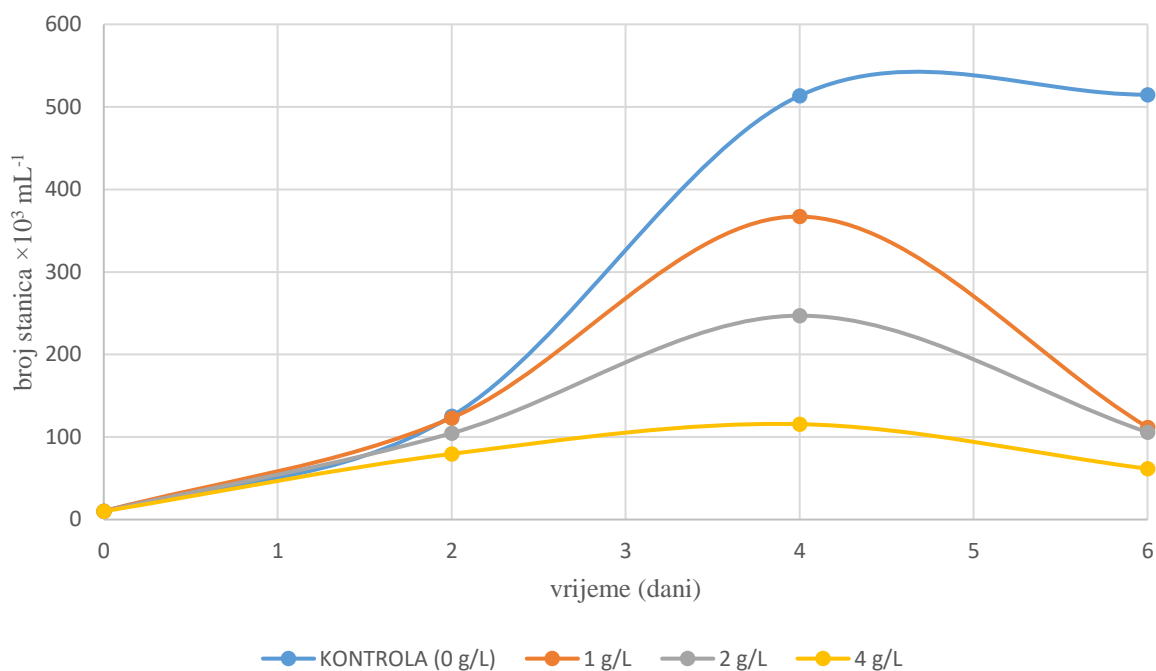
Proteinski izolat iz pogače lana (g L ⁻¹)	Prinos stanica (broj stanica mL ⁻¹)	Spec. brzina rasta stanica (h ⁻¹)	Vrijeme udvostručenja (h)
0 (kontrola)	32,2×10 ⁴	0,0311	22,29
0,1	38,2×10 ⁴	0,0331	20,94
0,2	51,6×10 ⁴	0,0365	18,99
0,4	8,6×10 ⁴	0,0198	35,01

b)

Proteinski izolat iz pogače lana (g L ⁻¹)	Prinos stanica (broj stanica mL ⁻¹)	Spec. brzina rasta stanica (h ⁻¹)	Vrijeme udvostručenja (h)
0 (kontrola)	49,4×10 ⁴	0,0360	19,25
1	34,7×10 ⁴	0,0320	21,66
2	22,7×10 ⁴	0,0273	25,39
4	9,7×10 ⁴	0,0182	38,09

Prilikom izvođenja ovog eksperimenta zapažen je povećan prinos stanica u medijima s dodanom koncentracijom proteinskih izolata u iznosu 0,1 g L⁻¹ (38,2×10⁴ st mL⁻¹) i 0,2 g L⁻¹ (51,6×10⁴ st mL⁻¹) u odnosu na kontrolu (32,2×10⁴ st mL⁻¹) (tablica 4. a)). Također specifična brzina rasta stanica dodatkom 0,2 g L⁻¹ izolata pokazuje najveću vrijednost od 0,0365 h⁻¹. Ovi podaci, kao i krivulja rasta (slika 11.), nam još jednom potvrđuju da koncentracije 0,1 g L⁻¹ i 0,2 g L⁻¹ pokazuju pozitivan trend u vidu blagog utjecaja na rast i proliferaciju stanica CHO-RP u odnosu na mediji u koji nisu dodani izolati proteina.

Kako smo HEK-293T stanice uzgojili i pri većim koncentracija proteinskog izolata, u tim smo uvjetima proveli uzgoj i CHO-RP stanične linije kako bismo provjerili da li na ovu staničnu liniju ti uvjeti imaju kakvih pozitivnijih učinaka nego na HEK-293T.



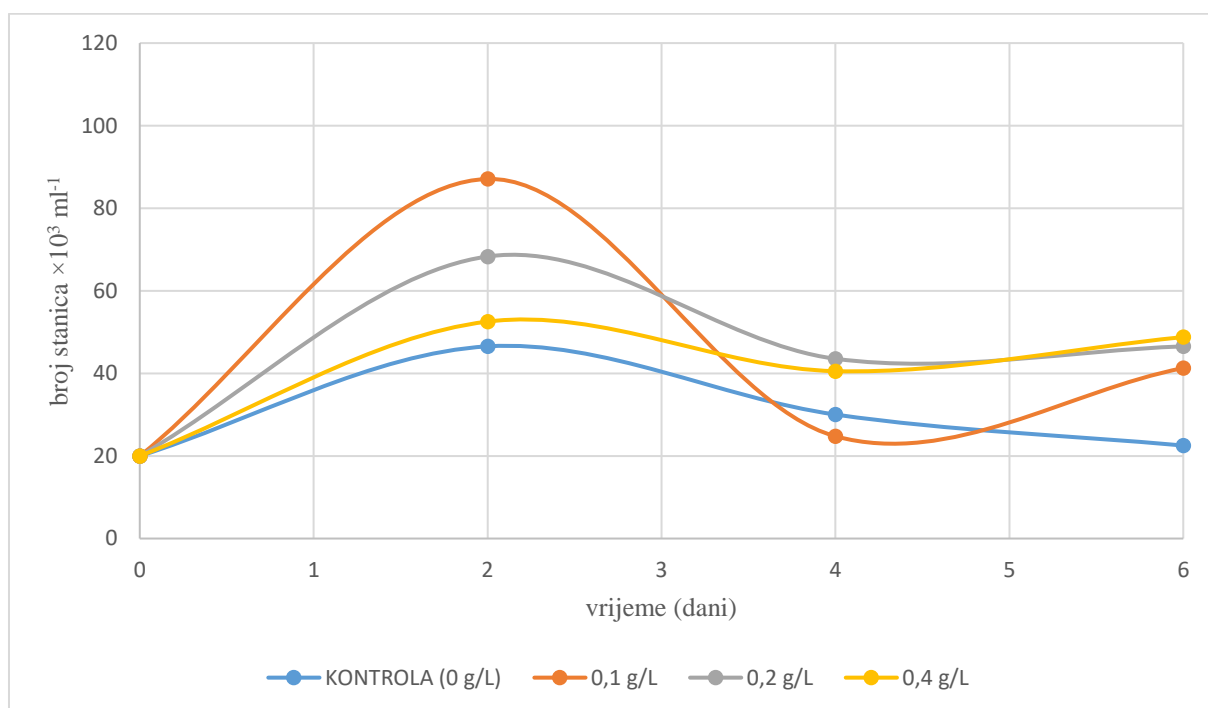
Slika 12. Krivulja rasta CHO-RP stanica pri različitim koncentracijama proteinskog izolata iz uljne pogače lana u mediju s 5% seruma.

Promatrajući parametre rasta CHO-RP stanica (tablica 4. b)) i krivulju rasta (slika 12.) uočeno je da ove koncentracije nemaju značajan učinak na rast stanične linije budući da je prinos stanica najveći u kontroli ($49,4 \times 10^4$ st mL^{-1}). Štoviše, moguće je da imaju potencijalni inhibicijski utjecaj na stanice, pogotovo koncentracije 2 g L^{-1} i 4 g L^{-1} proteinskog izolata iz pogače lana.

Imajući u vidu povećan prinos CHO-RP stanica pri koncentracijama izolata $0,1 \text{ g L}^{-1}$ i $0,2 \text{ g L}^{-1}$ s obzirom na kontrolu, pokušali smo ispitati utjecaj proteinskog izolata iz pogače lana u DMEM hranjivom mediju s 1% FBS-a. Htjeli smo vidjeti da li dodatak proteinskog izolata može djelomično nadomjestiti serum, budući da su određene koncentracije pokazale pozitivan učinak na rast i proliferaciju stanica. Tako je pripremljen DMEM hranjivi medij s dodatkom 1% seruma te su u njega dodane sve do sada ispitane koncentracije izolata.

Prvo je ispitan utjecaj koncentracija izolata od $0,1 \text{ g L}^{-1}$, $0,2 \text{ g L}^{-1}$ i $0,4 \text{ g L}^{-1}$ u DMEM hranjivom mediju s 1% seruma. Kao što je vidljivo iz krivulje rasta (slika 13.) i parametara rasta (tablica 5. a)) prinos stanica u kontroli je značajno manji nego u prijašnjim slučajevima kada nam je u kontroli bilo dodano 5% seruma. To nam dokazuje da stanice, bez zadovoljavajućeg postotka seruma u mediju, sporije i teže rastu jer su u deficitu s potrebnim nutrijentima i faktorima za svoj rast i proliferaciju (Arora, 2016). Isto tako se može uočiti i povećani prinos stanica i specifična brzina rasta pri testiranim koncentracijama izolata,

pogotovo $0,1 \text{ g L}^{-1}$ i $0,2 \text{ g L}^{-1}$, u odnosu na kontrolu (tablica 5. a)). Uspoređujući rezultate prinosa stanica pri ovim koncentracijama u DMEM mediju s 1% i 5% seruma jasno je uočljiva razlika u ukupnom broju stanica što nam sugerira da ove koncentracije izolata ne mogu u pravoj mjeri nadomjestiti svojstva seruma i da stanice izrazito slabo rastu te da nam je serum potreban. Međutim, ovi rezultati nas navode da zaključimo kako ove koncentracije proteinskog izolata iz lana, bez obzira što nemaju značajan učinak na rast i proliferaciju, imaju blago protektivno djelovanje na CHO-RP stanice.



Slika 13. Krivulja rasta CHO-RP stanica pri različitim koncentracijama proteinskog izolata iz uljne pogače lana u mediju s 1% seruma.

Tablica 5. Parametri rasta CHO-RP stanica pri različitim koncentracijama proteinskog izolata u mediju s 1% seruma:

- koncentracije proteinskog izolata $0,1 \text{ g L}^{-1}$, $0,2 \text{ g L}^{-1}$, $0,4 \text{ g L}^{-1}$ + kontrola
- koncentracije proteinskog izolata 1 g L^{-1} , 2 g L^{-1} , 4 g L^{-1} + kontrola.

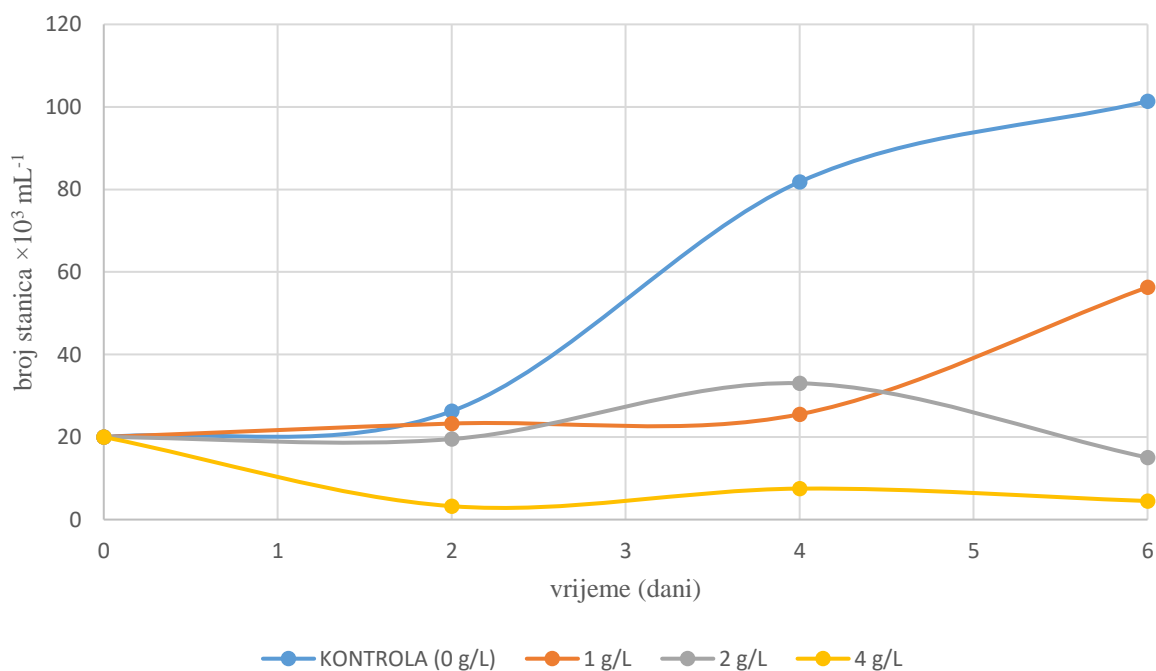
a)

Proteinski izolat iz pogače lana (g L^{-1})	Prinos stanica (broj stanica mL^{-1})	Spec. brzina rasta stanica (h^{-1})	Vrijeme udvostručenje (h)
0 (kontrola)	$2,7 \times 10^4$	0,0207	33,49
0,1	$6,7 \times 10^4$	0,0347	19,98
0,2	$4,8 \times 10^4$	0,0279	24,84
0,4	$3,3 \times 10^4$	0,0268	25,86

b)

Proteinski izolat iz pogače lana (g L^{-1})	Prinos stanica (broj stanica mL^{-1})	Spec. brzina rasta stanica (h^{-1})	Vrijeme udvostručenje (h)
0 (kontrola)	$8,1 \times 10^4$	0,014	49,51
1	$3,6 \times 10^4$	0,0113	61,34
2	$1,3 \times 10^4$	0,007	99,02
4	0	0	0

Zatim je ispitan utjecaj koncentracija izolata od 1 g L^{-1} , 2 g L^{-1} i 4 g L^{-1} u DMEM hranjivom mediju s 1% seruma kako bi se vidjelo kakav učinak imaju te koncentracije na rast i proliferaciju CHO-RP stanica.



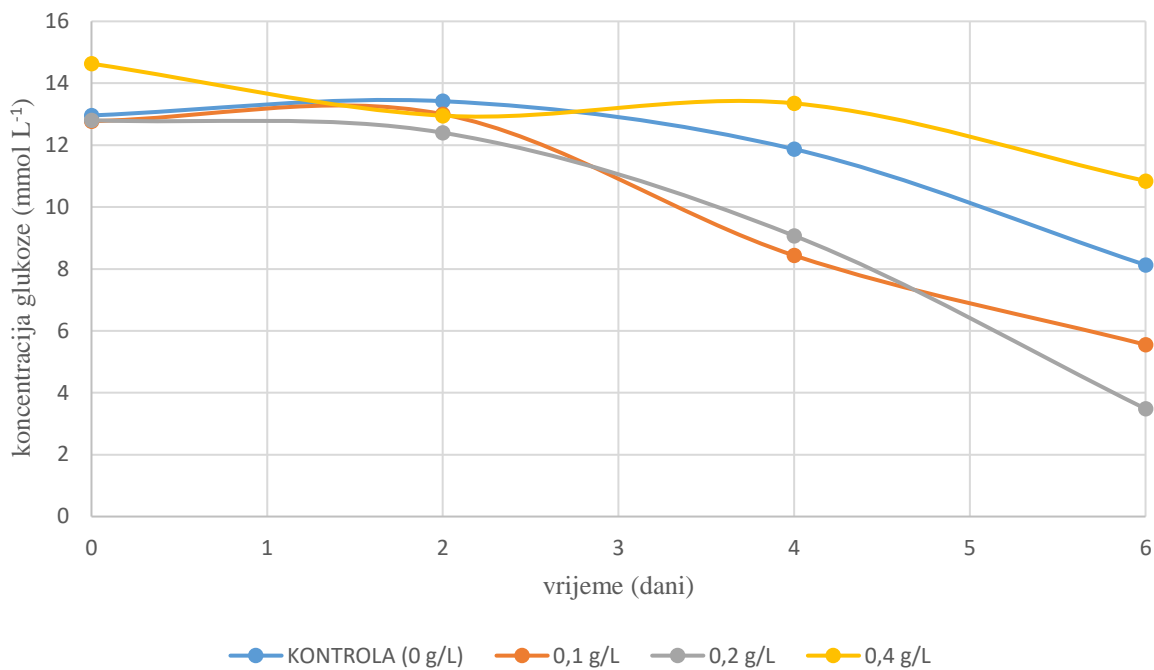
Slika 14. Krivulja rasta CHO-RP stanica pri različitim koncentracijama proteinskog izolata iz uljne pogače lana u mediju s 1% seruma.

I ovdje je na temelju krivulje rasta (slika 14.) i dobivenih rezultata vidljiva razlika u prinosu stanica (tablica 5. b)) u kontroli ($8,1 \times 10^4$ st mL^{-1}) naspram prinosa u kontrolama s 5% seruma (tablice 3. i 4.). Isto tako vidimo da pri koncentraciji od 1 g L^{-1} proteinskog izolata stanice pokazuju mali porast broja stanica ($3,6 \times 10^4$ st mL^{-1}) u odnosu na kontrolu, dok pri 4 g L^{-1} stanice ni ne preživljavaju. Možemo reći da ove koncentracije imaju gotovo pa inhibitoran, štetan učinak na rast i proliferaciju stanica.

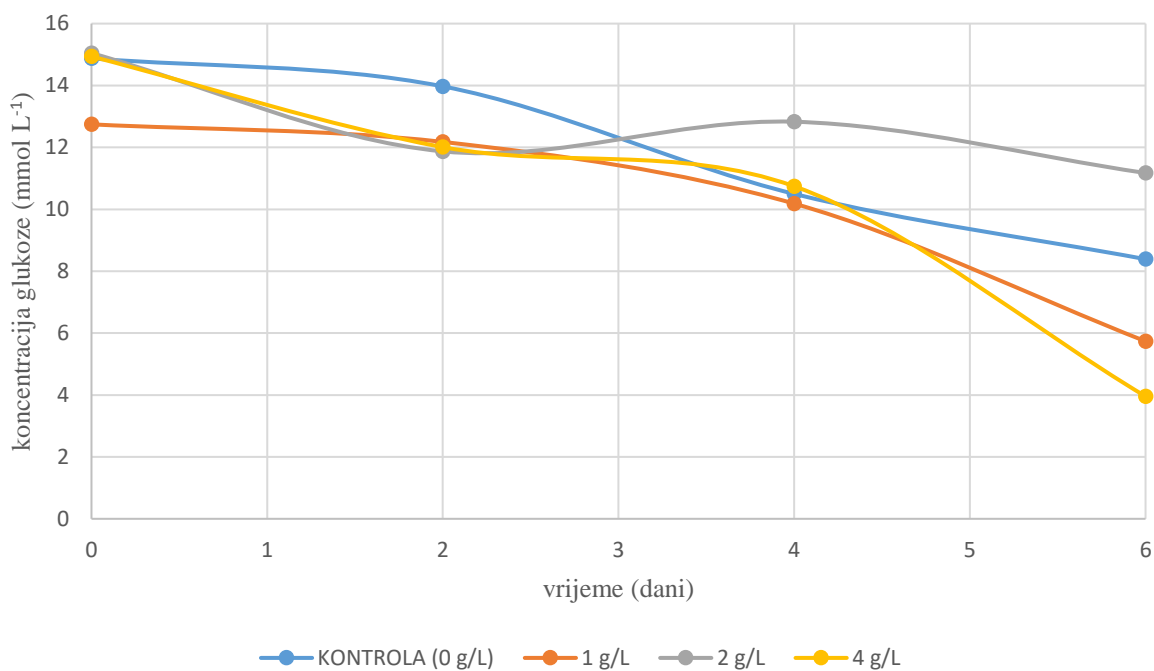
Analizirajući rezultate iz svih provedenih eksperimenata sa CHO-RP staničnom linijom vidljivo je da različite koncentracije dodanog proteinskog izolata iz lana imaju drugačije efekte na stanice. Tako u mediju s 5% seruma, dolazi do blagog pozitivnog učinka na rast CHO-RP stanica u odnosu na kontrolu, nakon dodavanja $0,1 \text{ g L}^{-1}$ te $0,2 \text{ g L}^{-1}$ izolata proteina. Također iz svih dobivenih parametara rasta, da se iščitati da dodane koncentracije izolata veće od 1 g L^{-1} imaju zapravo negativno djelovanje na rast i proliferaciju stanica. Neosporno je da proteinski izolati uz proteine sadrže i druge tvari koje pokazuju stimulacijsko djelovanje na proliferaciju stanica (bioaktivni spojevi) kao i antinutritivne komponente koje imaju inhibicijsko djelovanje na rast stanica i koje bi bilo poželjno ukloniti iz ovih pripravaka (Franěk i sur., 2000). Također, vrlo visoke koncentracije izolata i hidrolizata proteina mogu imati inhibitorno djelovanje na rast stanica jer se pretpostavlja da zbog vrlo visoke koncentracije aminokiselina i oligopeptida dolazi do narušavanja ravnoteže hranjivih tvari u mediju (Chun i sur., 2007).

4.4. POTROŠNJA GLUKOZE CHO-RT STANICA

Prikazom potrošnje glukoze htjelo se pokazati kako je glukoza važan izvor energije i prekursor za sintezu drugih spojeva te da se tijekom rasta i proliferacije stanica troši (Butler, 2005). To je i uočljivo iz slika 15. i 16. budući da je koncentracija glukoze manja na kraju nego na početku uzgoja stanica.



Slika 15. Potrošnja glukoze u mediju s 5% seruma i s dodatkom proteinskog izolata.



Slika 16. Potrošnja glukoze u mediju s 5% seruma i s dodatkom proteinskog izolata.

Tablica 6. Specifična potrošnja glukoze CHO-RP stanica u odnosu sa specifičnom brzinom rasta te koncentracijom proteinskog izolata iz uljne pogače lana u mediju s 5% seruma:

- a) koncentracije proteinskog izolata 0,1 g L⁻¹, 0,2 g L⁻¹, 0,4 g L⁻¹ + kontrola
 b) koncentracije proteinskog izolata 1 g L⁻¹, 2 g L⁻¹, 4 g L⁻¹ + kontrola.

a)

Proteinski izolat iz pogače lana (g L ⁻¹)	Specifična potrošnja glukoze [(mmol stanica ⁻¹) dan ⁻¹]	Spec. brzina rasta stanica (h ⁻¹)
0 (kontrola)	8,459×10 ⁻⁷	0,0311
0,1	2,843×10 ⁻⁶	0,0331
0,2	1,809×10 ⁻⁶	0,0365
0,4	3,729×10 ⁻⁶	0,0198

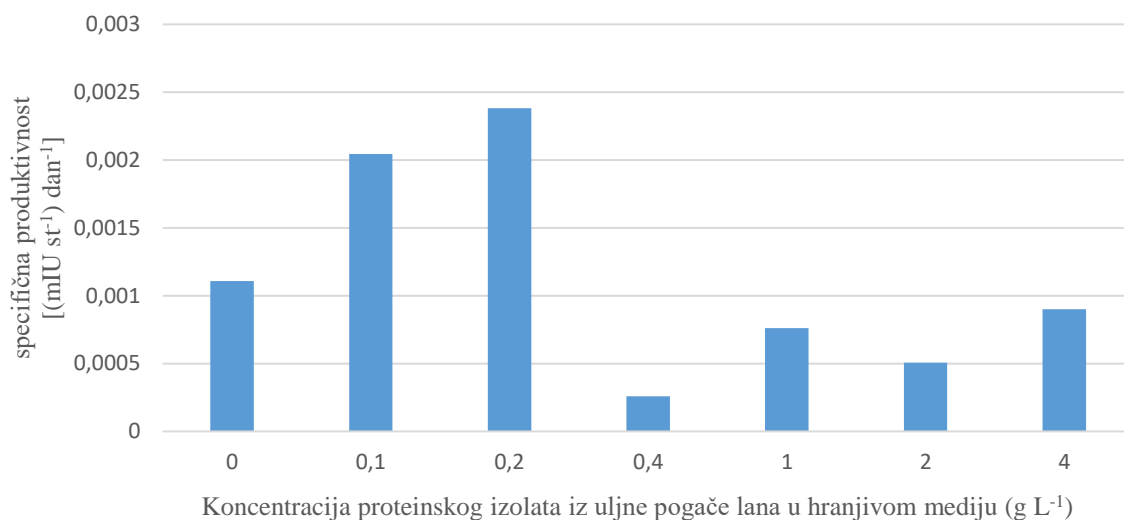
b)

Proteinski izolat iz pogače lana (g L ⁻¹)	Specifična potrošnja glukoze [(mmol stanica ⁻¹) dan ⁻¹]	Spec. brzina rasta stanica (h ⁻¹)
0 (kontrola)	2,218×10 ⁻⁶	0,0360
1	1,845×10 ⁻⁶	0,0320
2	2,441×10 ⁻⁶	0,0273
4	1,097×10 ⁻⁵	0,0182

Također istražen je i utjecaj različitih koncentracija proteinskog izolata iz uljne pogače lana na utrošak glukoze. Analizirajući rezultate dobivene po formuli [6] u tablici 6. a) i b) jednoznačno se ne može zaključiti kako proteinski izolati iz uljne pogače lana utječe na utrošak glukoze u stanicama.

4.5. UČINAK RAZLIČITIH KONCENTRACIJA PROTEINSKOG IZOLATA IZ ULJNE POGAČE LANA NA PRODUKTIVNOST CHO-RP STANIČNE LINIJE

Budući da je CHO-RP stanična linija koja ima i svojstvo proizvodnje specifičnog rekombinantnog proteina, osim utjecaja proteinskog izolata na rast, pratio se i njegov utjecaj na produktivnost ove stanične linije. Budući da je rast CHO-RP stanica u DMEM mediju s 1% serumu bio jako mali, produktivnost se određivala samo u mediju s 5% seruma s dodanim koncentracijama izolata nakon 4 dana uzgoja ELISA metodom.



Slika 17. Specifična produktivnost CHO-RP stanične linije.

Na temelju baždarnog dijagrama (slika 6.) te po formuli [6] dobivena je specifična produktivnost stanica.

Kako se može uočiti iz rezultata (slika 17.), najveća specifična produktivnost je pri koncentracijama proteinskog izolata od 0,1 g L⁻¹ (0,00205 (mUI st⁻¹) dan⁻¹) i 0,2 g L⁻¹ (0,00238 (mUI st⁻¹) dan⁻¹). Kako su pri tim koncentracijama i specifične brzine rasta stanica bile najviše može se zaključiti da ove koncentracije imaju pozitivno djelovanje na rast i produktivnost CHO-RP stanica. Druge koncentracije nisu pokazale neku značajnu specifičnu produktivnost. To možemo pripisati tome da koncentracije i sastavi izolata mogu ne samo različito djelovati na rast nego i na produktivnost stanica (Spearman i sur., 2014).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Dodatak proteinskih izolata u koncentracijama većim od 1 g L^{-1} u hranjivi medij sa serumom djeluje inhibicijski na rast ispitivanih staničnih linija CHO-RP i HEK-293T.
2. Proteinski izolati iz uljne pogače lana dodani u DMEM medij, s 5% seruma, u koncentracijama $0,1 \text{ g L}^{-1}$ i $0,2 \text{ g L}^{-1}$ imaju blago pozitivno djelovanje na rast CHO-RP stanica.
3. Proteinski izolati iz uljne pogače lana dodani mediju s 5% seruma u koncentracijama $0,1 \text{ g L}^{-1}$ i $0,2 \text{ g L}^{-1}$ pokazuju pozitivan učinak na produktivnost CHO-RP stanične linije za proizvodnju rekombinantnog proteina.
4. Serum je sastavnica hranjivog medija koja je neophodna CHO-RP stanicama za rast i proliferaciju. Smanjenjem postotka seruma u mediju smanjio se prinos stanica u postupku uzgoja.
5. Sukladno prethodnom zaključku, proteinski izolati uljne pogače lana ne mogu se koristiti kao djelomična zamjena za serum jer nisu pokazali utjecaj na rast stanica u mediju s 1% seruma.

6. LITERATURA

Alves, P. M., Carrondo, M. J. T., Cruz, P. E. (2008) Introduction to animal cell technology. U: Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy (Castilho, L. R., Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Butler M., ured.), Taylor & Francis Group, New York, str. 1-11.

Anonymous 1 (2017) < <http://kinesis-usa.com/brand-general-consumables-counting-chamber-blaubrand-neubauer-improved-ivd-w-o-spring-clips-double-rul-bright-line-717810.html> >
Pristupljeno 07. listopada 2017.

Arora, M. (2016) Cell Culture Media: A Review < <https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html> >. Pristupljeno 12. listopada 2017.

Bode, B. P. (2001) Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *J. Nutr.* **131**, 2475-2485.

Bonwick, G. A., Smith, C. J. (2004) Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. *Int. J. Food Sci. Tech.* **39**, 817-827.

Bosanac P. (2017) Proteinski izolati iz uljnih pogača lana i konoplje- priprava, karakterizacija i biološka aktivnost. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska.

Brunner, D., Frank, J., Appl, H., Schöffl, H., Pfaller, W., Gstraunthaler, G. (2010) Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media Interactive Online Database. *Altex.* **27**, 53-62.

Butler M. (2005) Animal cell culture and technology, 2. izd., Taylor & Francis Group, London, str. 1-75.

Butorac, A., Marić, M., Badanjak Sabolović, M., Hruškar, M., Rimac Brnčić, S., Bačun Družina, V. (2013) Analitičke metode u forenzici hrane. *CJFTBN* **8**, 90-101.

Chabanon, G., Alves da Costa, L., Farges, B., Harscoat, C., Chenu, S., Georgen, J. L., Marc, A., Marc, I., Chevalot, I. (2008) Influence of the rapeseed protein hydrolysis process on CHO cell growth. *Biores. Technol.* **99**, 7143-7151.

Chun, B. H., Kim, J. H., Lee, H. J., Chung, N. H. (2007) Usability of size-excluded fractions of soy protein hydrolysates for growth and viability of Chinese hamster ovary cells in protein-free suspension culture. *Bioresour. Technol.* **98**, 1000–1005.

Ćapin, M. (2016) Izolacija bioaktivnih spojeva iz nusproizvoda proizvodnje lanenog ulja. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska.

Davis, J. M. (2011) *Animal Cell Culture: Essential Methods*. Wiley- Blackwell, Chichester.

Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S., Kshirsagar, R. (2015) Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 1110-1122.

Farges-Haddani, B., Tessier, B., Chenu, S., Chevalot, I., Harscoat, C., Marc, I., Goerge, J. L., Marc, A. (2006) Peptide fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal proteins in CHO cell culture media. *Proc. Biochem.* **41**, 2297-2304.

Franěk, F., Hohenwarter, O., Katinger, H. (2000) Plant protein hydrolysates: Preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotech. Progress.* **16**, 688-692.

Gutierrez, C., Rubilar, M., Jara, C., Verdugo, M., Siniero, J., Shene, C. (2010) Flaxseed and flaxseed cake as a source of compounds for food industry. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **10**, 454 – 463.

Kim, S. H., Lee, G. M. (2009) Development of serum-free medium supplemented with hydrolysates for the production of therapeutic antibodies in CHO cell cultures using design of experiments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**, 639-648.

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Leo, P., Galesi, A. L. L., Suazo, A. T. S., Moraes, A. M. (2008) Animal cells: basic concepts U: Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy (Castilho, L. R., Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Butler M., ured.), Taylor & Francis Group, New York, str. 20-27.

Lin, Y., Boone, M., Meruris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., Reumers, J., Moisse, M., Plaisance, S., Drmac, R., Chen, J., Spleleman, F., Lambrechts, D., Van de Peer, Y., Tavernier, J., Callwaert, N. (2014) Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat. Commun.* **5**, 1-12.

Miller, W. M., Wilke, C. R., Blanch, H. W. (1989) Transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: 1. Glucose pulse and step changes. *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 477-486.

Moraes, A. M., Mendonca, R. Z., Suazo, C. A. T. (2008) Culture media for animal cell. U: Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy (Castilho, L. R., Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Butler M., ured.), Taylor & Francis Group, New York, str. 111-122.

Mueller, K., Eisner, P., Yoshie-Stark, Y., Nakada, R., Kirchoff, E. (2010) Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum* L). *J. Food Eng.* **98**, 453-460.

Murhammer, D. W., Goochee, C. F. (1988) Scale up of insect cell cultures: Prospective effects of Pluronal F-68. *Bio/Tecnol.* **4**, 1411-1418.

Neerman, J., Wagner, R. (1996) Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *J. Cell. Physiol.* **166**, 152-169.

Paredes, C., Sanfeliu, A., Cardenas, F., Cairo', J. J., Go'dia, F. (1998) Estimation of the intracellular fluxes for a hybridoma cell line by material balances. *Enzyme Microb. Tech.* **23**, 187-198.

Pasupuleti, V. K., Demain, A. L. (2010) State of the art manufacturing of protein hydrolysates. U: Protein hydrolysates in biotechnology, (Pasupuleti, V. K., Demain, A. L., ured.), Springer Dordrecht Heilderberg, London/New York, str. 33-55.

Petch, D., Butler, M. (1994) Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilization. *J. Cell. Physiol.* **161**, 71-76.

Ryan, J.A. (2008) Introduction to animal cell culture <http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/intro_animal_cell_culture.pdf> . Pristupljeno 07. listopada 2017.

Runje, M., Cvrtila, Ž. (2006) ELISA u analitici hrane. *Meso* **7**, 92-94.

Sateesh, M. K. (2003) Biotechnology-5: Animal Cells, Immunology & Plant Technology, New Age International (P) Limited, New Delhi, str. 5-10.

Spearman, M., Lodewyks, C., Richmond, M., Butler, M. (2014) The Bioactivity and fractionation of peptide hydrolysates in cultures of CHO cells. *Biotechnol. Prog.* **30**, 584-593.

Sung, Y. H., Lim, S. W., Chung, J. Y., Lee, G. M. (2004) Yeast hydrolysate as a low-cost additive to serum-free medium for the production of human thrombopoietin in suspension cultures of Chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* **63**, 527-536.

van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, Å., Gstraunhaler, G., Honegger, P., Knudsen, L. E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M. L. (2010) Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicol. in vitro* **24**, 1053 – 1063.

Wurm, F. M. (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1393-1398.

Wurm, F. M., Hacker D. (2011) First CHO genome. *Nat. Biotechnol.* **29**, 718-720.

Yao, T., Asayama, T. (2017) Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod. Med. Biol.* **16**, 99-117.

Zhaolie, C., Chengzu, X., Hong, L., Benchuan, W., Xihua, J. (1996) A novel serum-free medium for the cultivation of Vero cells on microcarriers. *Biotechnol. Tech.* **10**, 449-452.