

Učinak proteinskog hidrolizata iz uljne pogače sjemenki konoplje na rast i produktivnost CHO DP-12 stanica

Bojanić, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:463255>

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

**UČINAK PROTEINSKOG
HIDROLIZATA
IZ ULJNE POGAČE SJEMENKI
KONOPLJE
NA RAST I PRODUKTIVNOST CHO
DP-12 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 HIDROLIZATA IZ ULJNE POGAČE SJEMENKI KONOPLJE NA RAST I PRODUKTIVNOST CHO DP-12 STANICA

Karla Bojanić 873/MB

Sažetak: Nusproizvodi prehrambene industrije poput uljne pogače konoplje, koja zaostaje nakon ekstrakcije ulja zbog izbalansiranog sastava aminokiselina predstavlja potencijalni supstrat u tehnologiji životinjskih stanica. U ovom radu ispitan je utjecaj medija s različitim udjelima FBS i proteinskog hidrolizata iz uljne pogače sjemenki konoplje dobivenog pomoću proteolitičkih enzima *Alcalase* i *Protamex* na rast i produktivnost CHO DP-12 stanica, proizvođača rekombinantnog humanog anti-IL8 te mogućnost zamjene dijela seruma hidrolizatom. Istraživanje je pokazalo da medij s 9% FBS i 1% hidrolizata dobivenog pomoću enzima *Alcalase*, te medij s 5-9% FBS i 1-5% hidrolizata dobivenog pomoću enzima *Protamex* predstavljaju pozitivan učinak na rast i produktivnost, dok u mediju s 1% FBS i 9% hidrolizata dolazi do inhibicije rasta. Pokazano je da hidrolizat ne može biti potpuna zamjena za serum, ali da u određenoj mjeri doprinosi povećanju rasta i produktivnosti.

Ključne riječi: uljna pogača sjemenki konoplje, proteinski hidrolizat, monoklonsko protutijelo, CHO DP-12 stanična linija

Rad sadrži: 56 stranica, 19 slika, 3 tablica, 50 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. Doc. dr. sc. Kristina Radošević
2. Izv. prof. dr. sc. Igor Slivac
3. Doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
4. Prof. dr. sc. Ksenija Durgo

Datum obrane: 25. siječnja 2019.

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 HEMP SEED MEAL PROTEIN HYDROLYSATE ON GROWTH AND PRODUCTIVITY OF CHO DP-12 CELLS

Karla Bojanić 873/MB

Abstract: By-products of food industry such as hemp seed meal, which remains after oil extraction because of amino-acid composition can potentially be used in animal cell technology. Therefore, in this study, the effect of medium containing different amount of FBS and hemp seed meal protein hydrolysate obtained using two proteolytic enzymes *Alcalase* and *Protamex* on growth and productivity of human recombinant anti-IL8 producing CHO DP-12 cells, was investigated as well as eventually substitution FBS by hydrolysate. The results showed that the medium containing 9% FBS and 1% hydrolysates obtained by *Alcalase*, and medium containing 5-9% FBS and 1-5% hydrolysates obtained by *Protamex* has positive effect on growth and productivity of CHO DP-12 cells, while medium containing 1% FBS and 9% hydrolysates has inhibitory effect. Also, it has been proven that this hydrolysate cannot be used as a substitute for serum, but might be a supplementation to achieve enhanced growth and productivity.

Keywords: hemp seed meal, protein hydrolysate, monoclonal antibody, CHO DP-12 cell line

Thesis contains: 56 pages, 19 figures, 3 tables, 50 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: *Ph.D.* Igor Slivac, Associate professor

Reviewers:

1. *Ph.D.* Kristina Radošević, Assistant Professor
2. *Ph.D.* Igor Slivac, Associate Professor
3. *Ph.D.* Andreja Leboš Pavunac, Assistant Professor
4. *Ph.D.* Ksenija Durgo, Full Professor

Thesis defended: 25 January 2019

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. Kultura životinjskih stanica	3
2.1.1. Faze rasta životinjskih stanica.....	5
2.1.2. Metabolizam u kulturi životinjskih stanica	6
2.1.2.1. ELISA test	7
2.1.3. Stanična linija CHO	8
2.2. Hranjivi medij za uzgoj	9
2.2.1. Serum	11
2.2.2. Formuliranje medija za uzgoj	12
2.2.3. Hidrolizati proteina	13
2.2.4. Gel elektroforeza (SDS-PAGE)	16
2.3. Konoplja - proizvodnja i sastav	18
2.3.1. Pogača konoplje	19
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. Materijali	20
3.1.1. Kemikalije	20
3.1.2. Otopine	21
3.1.3. Uređaji i oprema	23
3.1.4. CHO DP-12 stanična linija	23
3.2. Metode rada	24
3.2.1. Priprava proteinskog izolata iz pogače konoplje	24
3.2.2. Priprava hidrolizata iz proteinskog izolata pogače konoplje	25
3.2.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u	25

3.2.4. Određivanje stupnja hidrolize	26
3.2.5. SDS-PAGE proteina uzoraka hranjivih medija za uzgoj	27
3.2.6. Uzgoj CHO DP-12 stanica u T- bocama	27
3.2.7. Utjecaj dodatka hidrolizata proteina brašna konoplje na rast i produktivnost CHO DP-12 stanica	28
3.2.8. Određivanje broja stanica metodom <i>Trypan Blue</i>	28
3.2.9. Određivanje koncentracije glukoze u hranjivom mediju	29
3.2.10. ELISA test	30
3.2.11. Određivanje parametara rasta CHO DP-12 stanica	30
3.2.11.1. Određivanje specifične brzine rasta stanica	30
3.2.11.2. Određivanje specifične produktivnosti (Qp)	31
3.2.11.3. Određivanje volumetrijske produktivnosti	31
3.2.12. Statistička obrada podataka	31
4. REZULTATI I RASPRAVA	32
4.1. Priprava proteinskog izolata konoplje i određivanje udjela proteina	33
4.2. Određivanje stupnja hidrolize izolata konoplje dobivenih pomoću proteaza <i>Alcalase</i> i <i>Protamex</i>	35
4.3. Karakterizacija proteinskog izolata brašna konoplje, hidrolizata konoplje te hranjivog medija za uzgoj CHO DP-12 stanica pomoću SDS- PAGE.....	36
4.4. Učinak dodatka različitih volumnih udjela hidrolizata konoplje dobivenih pomoću proteaza <i>Alcalase</i> i <i>Protamex</i> na rast CHO DP-12 stanica	40
4.5. Specifična potrošnja glukoze CHO DP-12 stanica.....	45
4.6. Produktivnost CHO DP-12 stanica	47
5. ZAKLJUČCI	50
6. LITERATURA	51

1. UVOD

Za *in vitro* uzgoj životinjskih stanica, te uspješan rast, proliferaciju i produktivnost potrebno je zadovoljiti određene parametre. Stanice u mikrokolišu s odgovarajućom temperaturom, pH te sastavom zraka zahtijevaju i odgovarajući hranjivi medij. Medij se najčešće priprema kombiniranjem mješavine hranjivih tvari koja uključuje soli, aminokiseline, vitamine, ugljikohidrate i serum. Najčešće korišten serum je fetalni teleći serum koji sadrži tvari poput faktora rasta, regulatornih faktora i sl. koji djeluju na proliferaciju stanica. Sastav seruma je nedefiniran i varijabilan, što ponekad dovodi do nedosljednosti u staničnom rastu i produktivnosti, a ujedno je i jedna od najskupljih komponenti medija te potencijalni izvor kontaminacije (Butler, 2004).

Zbog nedostataka upotrebe seruma te trenda izbjegavanja komponenti životinjskog podrijetla sve se više pristupa oblikovanju medija bez seruma i formuliranju potpuno kemijski definiranih medija za upotrebu u proizvodnji raznih biofarmaceutika (Chabanon i sur., 2008). Iako je kemijski definiran medij bez dodatka seruma poželjan, njegovo korištenje često dovodi do smanjenja rasta i produktivnosti stanica u odnosu na stanice uzgajane u mediju sa serumom. No, s obzirom da je medije bez seruma potrebno razvijati i obogaćivati potrebnim biološkim komponentama specifičnim 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 (Heidemann i sur., 2000) i repice (Deparis i sur., 2003).

Vrstu, količinu i izvor upotrijebljenog hidrolizata treba pažljivo odabrati i prilagoditi jer oni utječu na stanični rast i metabolizam. 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 (Keenan i sur., 2006).

Kvaliteta hidrolizata proteina tj. njegove fizikalno-kemijske i nutritivne karakteristike ovisi o početnoj sirovini, hidrolizirajućem sredstvu, parametrima procesa te stupnju hidrolize (Lobo-Alfonso i sur., 2010). Kao izvor hidrolizata proteina biljnog podrijetla mogu se upotrijebiti otpadni sastojci i nusproizvodi prehrambene industrije koji imaju značajan udio proteina. Kako u današnje vrijeme ekonomska i ekološka održivost imaju sve veću važnost traže se načini za iskorištavanje takvih organskih tvari. 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, također se dobivaju novi proizvodi kao što su aminokiseline, enzimi, organske kiseline, jednostanični proteini i biološki aktivni metaboliti.

Dosad su u literaturi opisani postupci priprave i karakterizacije proteinskih izolata i hidrolizata iz pogače uljane repice (Chabanon i sur., 2008), soje i pšenice (Franěk i sur., 2000), konoplje (Wang i sur., 2009) te je određivan učinak tih proteinskih hidrolizata na proliferaciju CHO stanica te prinos i kvalitetu rekombinantnog proizvoda (Kim i Lee, 2009; Spearman i sur., 2014). Međutim, priprava i karakterizacija proteinskih hidrolizata iz uljne pogače sjemenki konoplje te njihov mogući učinak na proliferaciju i produktivnost industrijskih staničnih linija do sada nije opsežno 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 hidrolizata uljne pogače sjemenki konoplje na rast i produktivnost CHO DP-12 stanica, producenta rekombinantnog humanog IgG protutijela anti-IL8. Također, ispitalo se djelovanje dvaju proteolitičkih enzima mikrobnog porijekla tj. *Alcalase* i *Protamex* u dobivanju proteinskog hidrolizata te mogućnost zamjene dijela seruma hidrolizatom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA

Kultura životinjskih stanica je tehnika uzgoja životinjskih stanica *in vitro* te je u različitim oblicima prisutna oko nas više od stoljeća. Prva iskustva u radu sa životinjskim tkivima sežu još u 1880. godinu kada je Wilhem Roux održavao pileće embrije u otopini soli, a iskustva u radu s kulturama životinjskih stanica započinju u 20. stoljeću kada je Ross Harrison, između 1906. i 1910., koristeći tehniku viseće kapi i žablju limfu srca, pokušao objasniti kako je nastalo živčano vlakno. Prvi period, od oko 40 godina je bio vezan većinom za eksplantate i proučavanje ponašanja rasta stanica iz eksplantata predvođen od strane Harrison, 1907. godine i Carrel 1912. godine. Jedno od glavnih ciljeva primjene kulture životinjskih stanica bila je razvoj virusnih cjepiva, koja je najraniji zamašnjak stekla nakon 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.

Drugi period od otprilike 50-60 godina, bio je povezan s dobivanjem staničnih linija: konačnih, kao što su WI (Hayflick & Moorhead, 1961) i MRC-5 (Jacobs, 1970) i kontinuiranih kao što su L stanice (Earle, 1943), HeLa (Gey, 1952), CHO (Puck, 1957) i sl. Treći, trenutni period istraživanja, odnosi se na analizu i manipulaciju ekspresijom gena staničnih linija i unapređenjem tehnološke primjene stanične kulture.

Znanstveno područje razvilo se od istraživanja kako uzgojiti stanice *in vitro* do glavnog alata u staničnoj i molekularnoj biologiji, virologiji, staničnoj patologiji, bioinženjerstvu i industrijskoj farmaciji. Osim etičkih razloga, prednost upotrebe kulture životinjskih stanica prema živim jedinkama su konzistentnost i ponovljivost u izvođenju eksperimenta. Istraživanja u kulturama životinjskih stanica obuhvaćaju ispitivanje fiziologije i biokemijskih puteva u stanicama, učinaka metabolita, hormona, faktora rasta i sl. komponenti na specifične tipove stanica, proizvodnju umjetnih tkiva kombiniranjem različitih specifičnih stanica te sintetiziranje visokovrijednih proizvoda poput virusnih cjepiva, terapijskih rekombinantnih proteina i monoklonskih antitijela (Butler, 2004).

Tako se danas 60-70% svih rekombinantnih terapijskih 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).

Sa razumijevanjem uloge transkripcijskih faktora u ekspresiji gena, genetičkom manipulacijom često kultiviranih stanica kao što su fibroblasti kože, mogu se dobiti pluripotentne matične stanice koje se mogu diferencirati u različite tipove stanica.

Kulture životinjskih stanica mogu se podijeliti na:

- primarne kulture,
- stanične linije i
- stanične sojeve.

Primarne kulture stanica mogu se dobiti direktno iz organa ili tkiva na način da se mehaničkom, enzimskom ili kemijskom razgradnjom izoliraju iz životinjskog tkiva te se prenesu u medij za uzgoj. Primarne stanice dobivene na takav način su najčešće heterogene te zadržavaju svojstva tkiva iz kojeg potječu i na taj način najbolje opisuju *in vivo* uvjete te su stoga 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 procesom subkultiviranja dobivaju stanične linije.

Subkultivirane stanice, selekcionirane na način da tvore populaciju stanica jednog tipa, tj. stanične linije mogu biti konačne ili kontinuirane. Konačne stanične linije (netransformirane), kao i kontinuirane stanične linije (transformirane) mogu biti propagirane iz dobro karakterizirane banke stanica, gdje su sačuvane krioprotektivnim tehnikama.

Takve zbirke tj. kolekcije stanica prodaju stanične suspenzije ($\sim 10^7$ st mL⁻¹) u smrznutom obliku, koje se transportiraju u suhom ledu. Dvije najveće kolekcije stanica koje obuhvaćaju više od 3000 staničnih linija su: *American Type Culture Collection* (ATCC) i *The European Collection of Animal Cell Culture* (ECACC).

Konačne linije dobivene su najčešće iz normalnog tkiva, dok kulture dobivene od tumora mogu biti kontinuirane. Postoje primjeri kontinuiranih staničnih linija dobivenih od normalnog netumorogenog tkiva, kao što su BHK 21 (baby hamster kidney fibroblast), MDCK (Madin-Darby canine kidney epitelne stanice) i 3T3 fibroblasti (Freshney, 2000).

Nastanak besmrtno stanične linije može se dogoditi spontano, što je rijetko ili procesom transformacije induciranim karcinogenim kemijskim sredstvom, viralnom infekcijom, uvođenjem u genom viralnih gena ili onkogenih te overekspresijom gena regulatora staničnog ciklusa koji su sposobni nadvladati senescenciju (Alves i sur., 2008).

Glavne prednosti kontinuirane stanične linije su: brži stanični rast, dobivanje kulture veće stanične gustoće što je posebno važno za bioreaktore, mogućnost korištenja „serum-free“

i „protein-free“ medija već dostupnih na tržištu, potencijal za suspenzijski rast u bioreaktorima i sl. Glavni nedostatak ovih kultura je kromosomska nestabilnost, veće fenotipska razlika u odnosu na stanice izvornog tkiva i nepostojanje karakterističnih tkivnih markera.

Selekcijom ili kloniranjem primarne kulture ili stanične linije može se razviti stanični soj. Stanice koje se danas koriste u eksperimentima potekle su iz primarnih staničnih kultura, a naknadnom selekcijom i transformacijama konstruirane su u besmrtno stanične linije željenih svojstava (Freshney, 2000).

2.1.1. Faze rasta životinjskih stanica

Životinjske stanice kada su im zadovoljeni uvjeti rasta prema sigmoidalnoj krivulji rasta koja je odraz adaptacije kulture, dostupnosti nutrijenata, učinkovitosti te ukoliko se radi o adherentnim stanicama o dostupnosti površine za rast. Faze staničnog rasta u kulturi su:

- Lag faza ili faza prilagodbe,
- Eksponecijalna ili log faza,
- Stacionarna faza i
- Faza odumiranja.

Lag faza počinje nakon inokulacije, traje od 2 do 24 sata, te tijekom nje ne dolazi do porasta gustoće stanica ili je porast izrazito mali. To je period adaptacije u kojem stanice resintetiziraju elemente glikokaliksa izgubljene tripsinizacijom. Tijekom širenja stanica po površini za uzgoj ponovno se pojavljuje citoskelet i sintetiziraju se novi strukturni proteini. Duljina ove faze ovisi o fiziološkom stanju stanica, odnosno u kojoj su fazi rasta nacijepljene na novu podlogu te o gustoći i koncentraciji nacijepljenih stanica. Stanice koje su nacijepljene u većoj početnoj koncentraciji ili one koje su nacijepljenje na novu podlogu, a nalazile su se u prethodnoj podlozi u log fazi rasta, trebat će manje vremena da se adaptiraju na medij tj. imati će kraću lag fazu.

Eksponecijalna ili log faza period je vrlo aktivne proliferacije tijekom koje se broj stanica povećava ekspanzionalno. U log fazi više od 90% stanica nalazi se u fazi diobe i smatra se da su stanice u svojem najboljem fiziološkom stanju, što je i najpovoljnije za proučavanje staničnih funkcija. Faktori koji utječu na duljinu ove faze su gustoća nacijepljivanja, brzina rasta stanica, dostupnost površine za rast i nakupljanje produkata staničnog metabolizma. Brzina proliferacije tijekom ekspanzionalne faze je određena samim karakteristikama stanične linije, ali i uvjetima u kojima se stanice uzgajaju poput sastava medija, dostupnosti kisika, temperaturi itd. (Freshney, 2000).

Tijekom stacionarne faze rasta nema značajne promjene broja stanica i brzina rasta stanica je jednaka brzini odumiranja stanica, a postotak stanica koje se nalaze u fazi diobe je oko 10%. Brzina rasta se smanjuje zbog niske koncentracije nutrijenata i nakupljanja inhibitornih produkata metabolizma stanica. Također dolazi do kontaktne inhibicije stanica i manje izloženosti mediju uslijed formiranja monosloja koji prekriva cijelu površinu za rast. Tijekom ove faze dolazi do sinteze specifičnih proteina, kao i do promjene površine samih stanica. Stacionarna faza može biti produžena dodavanjem svježeg hranjivog medij. Trajanje ove faze je promjenjivo i može biti djelomični pokazatelj izdržljivosti stanične linije.

Nakon stacionarne faze slijedi faza pada gustoće stanica, gdje više stanica umire nego nastaje novih, zbog iscrpljenosti samih stanica iz razloga nedostatka nutrijenata i kisika, kontaktne inhibicije i inhibicije nastalim metabolitima. Stanična smrt odvija se pomoću mehanizma programirane stanične smrti tj. apoptoze ili nekroze te stanične smrti pod utjecajem vanjskih čimbenika (Leo i sur., 2008).

Određivanje profila staničnog rasta je važno za karakterizaciju kulture stanica, za predviđanje ponašanja stanica i biokemijskih puteva koji se znatno razlikuju u pojedinim fazama staničnog rasta. Također, prema profilu staničnog rasta odabire se početna gustoća stanica, predviđa se trajanje eksperimenta te vremenski intervali uzimanja uzoraka.

2.1.2 Metabolizam u kulturi životinjskih stanica

Stanične kulture *in vitro* pokazuju veoma sličan tip metabolizma koji se odvija velikim brojem metaboličkih puteva kao kod stanica u izvornom organizmu (*in vivo*). Središnji metabolički putevi stanica u kulturi uključuju glikolizu, pentoza-fosfatni ciklus, ciklus limunske kiseline, oksidativnu fosforilaciju, glutaminolizu i metabolizam drugih aminokiselina.

Metabolizam se može podijeliti na primarni i sekundarni. Primarnim metabolizmom nastaju oni metaboliti koji stanici osiguravaju gradivne jedinice i komponente potrebne za rast, razvoj, funkcioniranje i reprodukciju stanica. S druge strane, sekundarnim metabolizmom nastaju metaboliti koji ne utječu direktno na rast i razvoj stanice, odnosno nisu nužni za održavanje života stanica, ali imaju veliku ulogu u održavanju dobrih fizioloških uvjeta i metaboličkih aktivnost. Primarni metabolizam odvija se većinom tijekom log faze, dok se sekundarni odvija većinom tijekom stacionarne faze. Neki od sekundarnih metabolita su hormoni, interferoni, polipeptidni faktori rasta te terapijski proteini (Sateesh, 2003).

Glukoza je izvor energije i prekursor za sintezu staničnih dijelova koji se koristi tijekom uzgoja stanica te se u sastav hranjivog medija za uzgoj dodaje većinom u koncentraciji od 5 do

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 te 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). 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). 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.

2.1.2.1. ELISA test

Imunoenzimskim ELISA testom (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; ELISA) se određuje prisutnost i količina antigena. Metoda se temelji na vezanju protutijela 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). Metodologija ELISA tehnike uključuje imobilizaciju jedne ili dvije komponente, tj. antigena ili protutijela na čvrstu podlogu. To uklanja probleme separacije, s obzirom da nakon reakcije između vezane i nevezane komponente jedna komponenta ostaje pričvršćena na čvrstu podlogu,

a ostatak se jednostavno uklanjanja pri čemu ostavlja vezani reaktant u lako mjerljivom obliku. Mjerenje predstavlja drugu veliku prepreku koja je obzirom na metodologiju riješena na način da se detektor protutijelo označi s enzimom. Tada se obilježena protutijela mogu detektirati. Nakon dodatka supstrata za enzim, reakcija rezultira mjerljivim promjenama intenziteta obojenja (Bonwick i Smith, 2004).

"Sendvič", ELISA mjeri količinu antigena između dvaju slojeva protutijela (hvatanje i detekcija protutijela). Antigen koji se određuje mora sadržavati najmanje dva antigenska mjesta sposobna za vezanje na protutijela, jer najmanje dva antitijela djeluju u "sendviču". Prednost ovih testova je što uzorak ne mora biti čist prije analize i ispitivanja mogu biti jako osjetljiva. Izmjerena apsorbancija je direktno proporcionalna koncentraciji analita (Besler i sur., 2002).

2.1.3. Stanična linija CHO

Stanična linija CHO (eng. *Chinese Hamstery Ovary*) je skraćena engleskog naziva ove stanične linije, jedne od najčešće korištenih staničnih linija u istraživanjima i proizvodnji. Ova stanična linija ovarija kineskog hrčka dobivena je 1957. godine zaslugom Theodora T. Pucka. To su epitelne stanice koje prekrivaju organe i šupljine, rastu kao pojedinačne stanice tvoreći monosloj i karakterističnu strukturu i relativno se lako održavaju u kulturi te su stabilne tj. događa se mali broj spontanijih mutacija. CHO stanična linija je tumorska stanična linija i može se neograničeno umnažati sve dok su joj osigurane potrebne hranjive tvari i uvjeti uzgoja.

CHO stanice su široko korištene za komercijalnu upotrebu u proizvodnji terapijskih proteina zbog svojeg izrazito brzog rasta, modifikacije transgenima i visoke stope proizvodnje rekombinantnih proteina (3-10 grama rekombinantnih proteina po litri).

S obzirom da se radi o liniji čija je biotehnološka primjena odobrena kroz tzv. dobru proizvodnu praksu (GMP, *Good Manufacturing Practice*) od strane nadležnih nacionalnih regulatornih institucija (FDA, EMA), vrlo je vjerojatno da će uporaba CHO stanica nastaviti rasti kako raste i potražnja za terapijskim proteinima (Chiou, 2009).

Također rekombinantni proteini nastali u CHO stanicama su funkcionalno i strukturno slični nativnim proteinima te je cjelokupni genom CHO stanične linije u potpunosti sekvencioniran (Wurm, 2004).

2.2. HRANJIVI MEDIJ ZA UZGOJ

Kako bi rast stanica bio što bolji potrebno je osigurati podlogu koja omogućuje prihvaćanje i rast stanica te medij za uzgoj koji sadrži hranjive tvari poput ugljikohidrata i aminokiselina tj. kataboličke supstrate koji se razgrađuju i osiguravaju stanicama energiju. Osim navedenog, medij sadrži i biosintetske prekursore potrebne za odvijanje niza metaboličkih puteva sinteze složenih molekula tj. anabolizam. Medij sadrži i vitamine i elemente u tragovima, koji imaju katalitičku funkciju te anorganske ione (elektrolite) s katalitičkim i fiziološkim djelovanjem kao što je npr. održavanje pH i osmolarnosti. Dobri uvjeti uzgoja su oni u kojima stanice uspijevaju 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*. Potrebno je osigurati fizikalno-kemijske parametre pogodne za uzgoj kulture stanica kao:

- pH

Optimalan pH za većinu životinjskih staničnih linija je 7,4. Ipak, neke transformirane stanične linije pokazale su bolji rast kod malo kiselijeg okoliša (pH 7,0-7,4), a neke stanice fibroblasta rastu bolje u bazičnijem okolišu (pH 7,4-7,7). Reguliranje pH najčešće se postiže kroz jedan od dva puferska sustava: prirodno prisutni $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ puferski sustav, kojeg koristi većina znanstvenika zbog cijene i netoksičnosti te drugi puferski sustav održavan pomoću HEPES zwitteriona koji je bolji, ali može biti toksičan za stanice u većoj koncentraciji. Komercijalne kulture kao pH indikator najčešće koriste fenol crveno koji promjenom boje u žuto označava povišenje kiselosti, odnosno u ljubičasto povišenje alkaliteta te potrebu za zamjenom medija.

- CO_2

Regulacija CO_2 , odnosno održavanje ravnoteže između otopljenog ugljičnog dioksida i bikarbonata bitna je jer o njoj ovisi pH. Većina znanstvenika upotrebljava 5-7% CO_2 , a postiže se uzgojem u inkubatoru. Svaki medij ima preporučenu koncentraciju ugljičnog dioksida i bikarbonata kako bi se održao pH i osmolarnost.

- Temperatura

Optimalna temperatura stanične linije ovisi o temperaturi tijela domaćina iz kojeg su izolirane stanice. Povišenje temperature iznad optimalne opasnije je za staničnu liniju nego snižavanje. Zbog toga je temperatura u inkubatoru namještena na malo nižu vrijednost od optimalne temperature. Optimalna temperatura za uzgoj humanih staničnih linija i staničnih

linija sisavaca je 36-37°C. Stanične linije koje potječu od hladnokrvnih životinja (npr. ribe) podnose temperature 15-26°C. Odstupanja od optimalnih vrijednosti ne smiju biti veća od ±0,5°C.

- Osmotski pritisak

Uzgoj životinjskih stanica optimalan je pri 260-320 mOsm kg⁻¹. Kad se osmolarnost uspostavi važno ju je održavati u rasponu od ±10 % od te vrijednosti.

- Viskoznost

Na viskoznost kompletnog medija uglavnom utječu sastojci seruma te viskoznost ima bitnu ulogu za rast stanica kod suspenzijskih sustava s miješanjem.

Najvažniji predstavnik ugljikohidrata jest glukoza koja je glavni izvor energije i preteča u biosintezi staničnih komponenti. Njezina koncentracija u mediju najčešće je 5-25 mM tj. od 1g L⁻¹ do 4.5 g L⁻¹. 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 mogu biti esencijalne i njih stanica proizvodi sama i neesencijalne koje stanica ne može sama sintetizirati. Aminokiseline služe za sintezu proteina, nukleotida i lipida, ali mogu poslužiti i kao izvor energije. Esencijalne aminokiseline, a to su: arginin, cistein, glutamin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan, tirozin i valin nužno je uvijek dodati u medij. Predstavnici neesencijalnih aminokiselina koje se najčešće dodaju u medij su: alanin, asparagin, asparaginska kiselina, prolin, glicin i serin. Glutamin služi kao izvor ugljika i dušika, ima ulogu preteče za dobivanje intermedijera ciklusa limunske kiseline, prekursor je u sintezi purina, pirimidina i asparagina, te se obično dodaje u većoj koncentraciji u odnosu na druge aminokiseline (1-5 mM).

Proteini i peptidi su posebno važne u mediju bez seruma te najčešće uključuju albumin, transferin, fibronektin i fetuin, a koriste se kao nadomjestak proteinima prirodno prisutnim u mediju s dodatkom seruma.

Masne kiseline i lipide poput kolesterola, steroida i drugih se kao i proteini i peptidi dodaju u "serum-free" medij za uzgoj određenih vrsta stanica kako bi nadomjestili komponente prirodno prisutne u mediju sa serumom.

Soli koje se uglavnom dodaju u medij su: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} i HCO_3^{2-} , a služe kao kofaktori enzima, u održavanju osmotskog pritiska, membranskog potencijala i pH. Koncentracije magnezija i kalcija utječe na agregaciju stanica i njihovu adheziju te se stoga u suspenzijskim kulturama njihova koncentracija nastoji održati niska.

Elementi u tragovima kao cink, željezo, selen i intermedijeri trikarbonske kiseline se također dodaju u medij.

Antibiotici se dodaju u hranjivi medij zbog kontrole i spriječavanja potencijalne kontaminacije. Penicilin, streptomycin ili gentamicin se najčešće dodaju za suzbijanje bakterijske kontaminacije, a nistatin ili amfotericin za suzbijanje antifungalne kontaminacije.

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).

Najčešće korišteni mediji za uzgoj životinjskih stanica su: BME (*Basal Medium Eagle's*), EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*), oblikovan kao poboljšanje BME; DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*) koji sadrži 4 puta veću koncentraciju aminokiselina i vitamina od BME; GMEM (*Glasgow's Modification of Eagles's Medium*); 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).

2.2.1. Serum

U cilju održavanja stanica živima u *in vitro* uvjetima kroz duži vremenski period i kako bi se odvijala proliferacija, migracija i diferencijacija stanica, osnovnom mediju se moraju dodati još neke komponente koje to pospješuju. U tu se svrhu najčešće koriste serum animalnog podrijetla, a standard među serumima je fetalni goveđi serum (*Fetal Bovine Serum*, FBS) koji se najčešće koristi za uzgoj životinjskih stanica.

FBS je supernatant zaostao nakon koagulacije proteina krvi fetusa goveda i korišten je kao dodatak "serum-free" mediju za uzgoj kultura životinjskih stanica nekoliko desetljeća. U

serumu se nalaze razne vrste proteina (serumski proteini, transportni proteini, enzimi), hormoni, faktori rasta, citokini, masne kiseline i lipidi, vitamini, minerali, elementi u tragovima, faktori prihvatanja i širenja, ugljikohidrati te neproteinski izvori dušika koji pospješuju rast stanica i sadrži visok dio albumina koji osigurava bolje uvjete, kao što su sprječavanje fluktuacije pH i sl., a mediju se dodaje u koncentraciji od 5-20% (v/v).

Sastav seruma je kvalitativno prilično dobro definiran, međutim razmatrano količinski, udio njegovih komponenti varira ovisno o izvoru, što dovodi do nedosljednosti u rastu i produktivnosti stanica, a ujedno je i jedna od najskupljih komponenti seruma i potencijalni izvor kontaminacije. Također, proteini prisutni u serumu otežavaju pročišćavanje i izdvajanje proizvoda (Butler, 2004).

Navedeni nedostaci upotrebe seruma doveli su do potrebe za razvojem SFM (*serum-free* medija). Također, uzgoj stanica u mediju sa smanjenim udjelom seruma ili SFM predstavlja značajan iskorak u smanjivanju troškova procesa s kulturama stanicama odnosno utječe na povećanje sigurnosti proizvoda dobivenih ovom tehnologijom (van der Valk i sur., 2010). Upotreba medija bez seruma, medija bez proteina ili kemijski definiranih medija ima ograničenu primjenu zbog:

- određenih komponenti koje mogu imati negativan utjecaj na stanice,
- produženog vremena prihvatanja stanica za podlogu,
- povećanja rizika od proteolitičke razgradnje zbog nedostatka inhibitora proteaza prisutnih u serumu i
- smanjenja specifične brzine rasta i produktivnosti stanica (Sung i sur., 2004).

Kako bi se prevladali ovi nedostaci, u medijima bez seruma često se dodaju hidrolizati proteina.

2.2.2 Formuliranje medija za uzgoj

Rani pokušaji dobivanja "seruma-free" medija koji su kao nadomjestak serumu sadržavali komponente kao što su inzulin, transferin, albumin i kolesterol. Pojava kravljeg ludila označila je početak zabrinutosti oko upotrebe komponenata životinjskog podrijetla u proizvodnji biofarmaceutika. To je dovelo do potražnje formula za kulture životinjskih stanica bez komponenata životinjskog podrijetla, međutim nije bilo moguće dizajnirati jedinstveni serum za različite stanične linije zbog njihovih različitih zahtjeva. Tako čak i različiti sojevi

CHO stanične linije zahtijevaju različitu formulaciju medija za uzgoj za postizanje optimalnog rasta i produktivnosti. U cilju formuliranja medija za uzgoj staničnih linija postoji više pristupa.

Jedan od pristupa formuliranja medija je kombiniranje standardnih bazalnih medija koji se mogu testirati za određivanje minimuma koncentracije seruma potrebnog za dobivanje odgovarajućeg rasta i produktivnosti stanica. Tako se na početku uzgoja formulira osnovni medij koji sadrži DMEM/Ham F-12 medij (50:50 v/v) obogaćen dodatkom inzulina, transferina i selena (ITS). U ovoj fazi razvoja potrebno je omogućiti prihvaćanje stanica za površinu posude na kojoj se uzgaja te je stoga potrebno dodati odgovarajuće faktore prihvaćanja i vezivanja na površinu. Sljedeći korak u prelasku na medij bez dodatka seruma je dodavanje specifičnih hormona i faktora rasta, jer su oni u različitim koncentracijama prirodni sastojci seruma. U većini medija potreban je dodatak glukokortikoida i epidermalnog faktora rasta, dok se ostali hormoni dodaju ovisno o specifičnim potrebama stanica (npr. nervni faktor rasta za neurone). Specifičniji sastav medija bez seruma dobiva se dodatak lipida, antioksidansa i vitamina. Vitamin A (retinol) potreban je za kulturu raznih epitelnih stanica, a vitamin E (α -tokoferol), vitamin C (askorbat), β -merkaptotanol i selen važni su antioksidansi (van der Valk i sur., 2010).

U nekim slučajevima metabolička analiza može pomoći u formuliranju medija za uzgoj životinjskih stanica kao kod npr. NS0 mijeloma stanice kojima je nefunkcionalan put sinteze kolesterola pa zahtijevaju lipoproteinske dodatke u mediju (Gorfien i sur., 2000).

Analizom potrošnje pojedinih komponenti medija može se ustanoviti koji specifični nutrijent je potreban kao dodatak hranjivu ili kao sastojak medija. Za formulaciju medija za uzgoj može se koristiti statistički Plackett-Burman eksperimentalni dizajn, tako da mješavina komponenti može biti testirana simultano u matičnim pokusima rasta i produktivnosti.

Također, može se pristupiti i identifikaciji u mikrotitarskim (*microarray*) analizama specifičnih receptora eksprimiranim tijekom rasta stanica, tako da odgovarajući ligand može biti dodan u medij te korištenju statističkih modela poput faktorijalnog dizajna (Chun i sur., 2003). Ovi pristupi su do sada bili korišteni da omoguće formulaciju medija bez sastojaka životinjskog podrijetla za proizvodnju različitih rekombinantnih proteina.

2.2.3. Hidrolizati proteina

Hidrolizati proteina dobivaju se enzimskom, kiselinskom ili mikrobnom hidrolizom biološkog materijala izoliranog iz tkiva životinja, biljaka, mikroorganizama ili mliječnih proizvoda koji su bogati različitim hranjivim tvarima, kao što su aminokiseline, oligopeptidi,

lipidi, elementi u tragovima, vitamini i minerali te tvarima koje potiču proliferaciju i utječu na povećanje aktivnosti stanica (Franek i sur., 2000; Sung i sur., 2004).

Zbog niže cijene i trenda izbjegavanja materijala životinjskog podrijetla radi veće sigurnosti primjene tj. smanjene mogućnosti kontaminacije te kao potencijalni aktivatori rasta stanica, sve se više koriste hidrolizati proteina mikrobnog (npr. kvašćev hidrolizat) i biljnog podrijetla poput hidrolizat soje, pšeničnog glutena, riže, uljane repice (Pasupuleti i Demain, 2010).

U početku su se hidrolizati proteina koristili kao dodatni izvor dušika u hranjivom mediju za uzgoj, dok danas imaju široku primjenu u različitim područjima biotehnologije te se koriste:

- za povećanje rasta i produktivnosti u kulturama životinjskih stanica za proizvodnju monoklonskih protutijela, terapijskih proteina, enzima i vakcina,
- kao stabilizatori u fermentacijskim procesima pri proizvodnji vakcina,
- kulturama biljaka i insekata za dobivanje različitih proizvoda,
- posebnim medijima za rast i ekspresiju gena genetički modificiranih mikroorganizama,
- kao dodatak stočnoj hrani ili sastojak prehrane životinja za dobivanje kvalitetnijeg mesa te za povećanje tjelesne mase u što kraćem vremenu,
- kao regulatori rasta biljaka za povećanje prinosa ili u kontroli korova

Vrstu, količinu i izvor upotrijebljenog hidrolizata treba pažljivo odabrati i prilagoditi jer oni utječu na stanični rast i metabolizam (Sung i sur., 2004). Pri upotrebi treba uzeti u obzir svrhu aminokiselina odnosno koriste li se:

- direktno kao izvor aminokiselina (zamjena za slobodne aminokiseline),
- indirektno kao stimulator rasta stanica i/ili produktivnosti te
- kao zaštita od okolišnog stresa.

Nekoliko je objašnjenja vezano uz načine na koji hidrolizati proteina pozitivno djeluju na rast i produktivnost stanica. Jedno od objašnjenja je da ukoliko je rast stanica u kulturi baziran na prisutnosti oligopeptida, intracelularne rezerve aminokiselina su određene aktivnošću unutarstaničnih peptidaza, što utječe na cjelokupni stanični metabolizam te time na rast i produktivnost metabolita. Drugo objašnjenje je da unos peptida nakon hidrolize proteazama predstavlja energetski povoljniji unos od unosa slobodnih aminokiselina.

Kvaliteta hidrolizata proteina tj. njegove fizikalno-kemijske i nutritivne karakteristike ovisi o početnoj sirovini, hidrolizirajućem sredstvu, parametrima procesa te stupnju hidrolize (Lobo-Alfonso i sur., 2010) te primjenjenim posthidrolitičkim metodama.

Najvažniji kriterij u odabiru supstrata su njihova hranjiva vrijednost, cijena, antigenost, topivost i funkcionalnost. S obzirom na fizikalno-kemijske i nutritivne karakteristike najčešće korišteni supstrati su kazein, proteini sirutke i biljni proteini kao npr. soja.

Za proizvodnju hidrolizata manjih molekulskih masa najpogodnija je enzimska hidroliza. Otkrića vezana za tehniku enzimske hidrolize vezana su većinom za postupke proteolize u fermentacijskim procesima. Glavne prednosti su :

- blagi uvjeti hidrolize proteina,
- mala količina i specifičnost enzima koja omogućuje preciznu kontrolu stupnja hidrolize i lako zaustavljanje reakcije,
- ne dolazi do uništavanja aminokiselina,
- nastaju manje kompleksne mješavine peptida koje je lakše pročititi,
- odabir prikladne kombinacije enzima za dobivanje željenih hidrolitičkih produkata određenog supstrata,
- hidroliza može biti provedena u jednom koraku ili u više faza koristeći više enzima.

Najčešće korišteni enzimi su: životinjski pankreatin, tripsin, pepsin, biljni bromelin i papain te bakterijske i fungalne proteaze. Kako bi se zadovoljila potreba za visoko kvalitetnim hidrolizatima proteina za razliku od „sirovih“ preparata, industrija je započela s proizvodnjom nutritivno visoko vrijednih hidrolizata koji sadrže di-, tri-, oligopeptide i aminokiseline, a koji utječu na fiziološku funkciju stanica i time povećavaju produktivnost i poboljšavaju fermentacijske sposobnosti kulture stanica. Tako se hidrolizati u današnje vrijeme proizvode u velikom mjerilu u fermentacijskim procesima te kopuliranjem aminokiselina.

Općenito, industrijski proces dobivanja hidrolizata se sastoji od otapanja proteinskog izolata u vodi do 8-20% suhe tvari. Ako je potrebno otopina se zagrije i podesi joj se pH na optimalne uvjete za djelovanje enzima, koji mora biti određenog stupnja čistoće. Vrijeme trajanja hidrolize je od 1 h do 100 h, i ako se radi o duljem trajanju hidrolize koriste se bakteriostatici, tretman UV zračenjem, pulsirajuće električno polje ili ozon radi suzbijanja kontaminacije. Stupanj hidrolize kontrolira se uzimanjem uzoraka i kad je postignut odgovarajući stupanj reakcija se može zaustaviti deaktivacijom enzima povišenjem temperature kroz odgovarajući vremenski period. Ovisno o primjeni, hidrolizat se može pasterizirati, osušiti,

liofilizirati tj. obraditi u više koraka " *downstream* " procesa. Ako se hidrolizat koristi u kulturi životinjskih stanica potrebno ga je pročititi i najčešće je prvi korak odvajanje topivog od netopivog dijela korištenjem centrifuge, pločaste filter preše, mikro ili ultrafiltracijskog sistema u nekoliko ponavljanja dok se ne postigne željena boja i čistoća. Također, često se koristi aktivni ugljen za odbojavanje.

Uporaba hidrolizata proteina u mediju bez seruma ima svoje prednosti i nedostatke.

Neke od prednosti su:

- hidrolizati proteina se proizvode u velikim mjerilima,
- relativno su stabilni i mogu se skladištiti pod posebnim uvjetima,
- upotrebom hidrolizata neanimalnog podrijetla izbjegava se mogućnost kontaminacije što predstavlja i regulatornu prednost.

Neki od nedostataka su :

- limitiranost izvora što predstavlja problem nabave,
- neisplativost zbog troškova proizvodnje,
- biokemijski nedefiniran sastav koji može otežati proces pročišćavanja i izolacije proizvoda i djelovati na produktivnost.

2.2.4. Gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Pod pojmom elektroforeza označavamo gibanje čestica u električnom polju, a njihova pokretljivost ovisi o jakosti električnog polja, svojstvima čestica (neto naboju, veličini, obliku) te sredini u kojoj se čestice gibaju (ionska jakost, viskoznost, temperatura). Većina čestica koje elektroforetski razdvajamo, pa tako i proteini, amfoterne su molekule. Najveći dio naboja proteina potječe od ionizacije karboksilnih i amino skupina. Pokretljivost u električnom polju raste proporcionalno s porastom omjera naboja i mase tj. gustoće naboja. Primjenom električnog polja nabijene čestice se gibaju različitim brzinama prema anodi ili katodi i na taj način je moguće razdvojiti proteine koji će se kretati u različitim zonama. Elektroforetski razdvojene čestice u slobodnoj se tekućini, zbog difuzije, opet izmiješaju čim prestane djelovanje električnog polja. Stoga se koriste nosači poput papira, škroba, celuloza acetata, agaroze i akrilamida koji omogućuju da razdvojene komponente ostanu u oštro odvojenim zonama. Za nosače je važno da su inertni, čime se sprječava pojava elektroosmoze koja smanjuje kvalitetu razdvojenosti zona. Agarozni gelovi najviše se primjenjuju u analizi nukleinskih kiselina, no često se upotrebljavaju i za izoelektrično fokusiranje proteina.

Poliakrilamidni gel nastaje vinilnom polimerizacijom monomera akrilamida u duge lance poliakrilamida, te njihovim unakrsnim povezivanjem (*cross linking*) ugradnjom odgovarajućeg ko-monomera N, N'-metilen-bis-akrilamida. Reakcija polimerizacije katalizirana je kemijski dodatkom amonij persulfata i TEMED-a (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin) ili fotokemijski, dodatkom riboflavina i TEMED-a. U polimerizacijskoj reakciji nastaju lanci poliakrilamida u koje se u malom postotku ugrađuju molekule Bis-a koje onda reagiraju s grupama drugih lanaca te tvore trodimenzionalnu mrežu.

Polikiakrilamidni gelovi služe u razdvajanju molekula molekularne mase 1000-200000 Da. U vertikalnom sustavu za elektroforezu proteini putuju kroz gel od vrha do dna kroz pločasti gel određene debljine, koji je lijevan između dvije ploče od stakla ili pleksiglasa odvojenih razmaknicama kojima je definirana debljina gela, a koja se kreće od 0,5 do 1,5 mm. Gelovi imaju utore za nanošenje uzoraka na vrhu gela, a oblikuju se tijekom polimerizacije pomoću češlja koji se uklanja po završetku polimerizacije. Gelovi se najčešće sastoje od od 2 dijela: gela za sabijanje tj. kratkog gela većih pora kojemu je svrha sabijanje molekula proteina u oštru zonu debljine 1-100 μm , te gela za razdjeljivanje manjih pora u kojemu se provodi razdjeljivanje proteina. Polimerizirani gel između dvije staklene ploče donjim dijelom se uranja u donji rezervoar s puferom, a dio prostora iznad utora za nanošenje uzorka ispuni se puferom što čini gornji rezervoar za pufer. U jažice gela se potom nanese otprilike 30 μL uzorka, aparatura se spoji s izvorom struje te se molekule razdjeljuju određeno vrijeme, pri definiranim uvjetima jakosti struje, napona i snage. Proces razdjeljivanja se zaustavlja kada bromfenol plavo boja dostigne anodni kraj gela. Proteinske trake se potom detektiraju specifičnim ili nespecifičnim bojanjem.

SDS-PAGE ili poliakrilamid gel elektroforeza u prisustvu Na-dodecil sulfata (SDS) se koristi za razdvajanje proteina na osnovi molekularne mase. Metoda se temelji na obradi proteina otopinom SDS, koji je anionski detergent i svojim se hidrofobnim grupama veže na hidrofobne grupe proteinskih molekula, izaziva denaturaciju i razmotavanje molekula koje tada nose negativan naboj koji potječe od SDS-a. Tada svi proteini imaju jednak omjer mase i naboja, te putuju kroz gel razdvajajući se samo obzirom na molekularnu masu. Manje molekule putuju brže od većih i u gelu dolazi do raspoređivanja u oštre proteinske vrpce (Dunn i sur., 1993).

2.3. KONOPLJA-PROIZVODNJA I SASTAV

Cannabis sativa L, industrijska konoplja je važan izvor vlakana, medicinskih ulja i hrane. Vrste kanabisa koje se ne koriste kao lijek, obično se nazivaju konopljom i tijekom 20. stoljeća njihov nutritivni potencijal nije se značajno proučavao niti se značajno koristio u industrijskim procesima. U proteklih 10-ak godina, konoplja se legalno koristi kao hrana za ljude u Kanadi i Sjedinjenim Američkim Državama, ali uzgoj konoplje i dalje nije legalan u većini država svijeta (Callaway, 2004).

Cijelo neoljušteno sjeme se koristi kao hrana za ptice i ribe. Drvenasti dio stabljike - pozder uspješno se koristi za proizvodnju boja i lakova, celuloze, papira te ekološkog građevinskog materijala za zvučnu i toplinsku izolaciju. Industrijske konoplja se može uzgajati i za proizvodnju biogoriva kao što su peleti, tekuća goriva i plin (Pospišil, 2013).

Oljušteno sjeme, zbog velike hranjive vrijednosti, predstavlja cijenjeni prehrambeni proizvod posebno u azijskoj hrani te u makrobiotičkoj prehrani.

Sadržaj ulja u sjemenki konoplje varira od 28 do 35%, ovisno o sorti, klimatskim uvjetima, geografskom području i godini uzgoja (Matthäus i Brühl, 2008). Osim ulja, sjemenka konoplje sadrži 20-25% bjelančevina, 20-30% ugljikohidrata, 10-15% vlakana i nutritivno je bogata mineralima osobito fosforom, kalijem, magnezijem, sumporom, kalcijem, željezom, cinkom, te sadrži vitamine A, B1, B2, B3, B6, D i E u lako probavljivom obliku (Brckan i Katić, 2013).

Albumin, globulin, edestin i legumin su glavni proteini sjemenki konoplje te su bolje probavljivi (88%–91%) u usporedbi sa sojinim proteinima (71%) nakon hidrolize enzimima tripsinom i pepsinom. S obzirom na sastav proteini konoplje usporedivi su s drugim visokokvalitetnim proteinima.

Osim toga, sjemenke konoplje dobar su izvor esencijalnih aminokiselina naročito metionina i cisteina, aminokiselina koje sadrže sumpor, kao i arginina i glutaminske kiseline (Odani i Odani, 1998; Callaway, 2004). Sjemenke industrijske konoplje sadrže THC i ostale kanabinoide na površini zbog toga što su bile u kontaktu s dijelovima biljke koji ih sadrže u većoj količini.

Ulje konoplje sadrži više od 80% polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) i izuzetno je bogat izvor dvije linoleinske kiseline (18: 2 *omega*- 6) i *alfa*-linolenske kiseline (18: 3 *omega*-3). Omjer *omega*- 6/*omega*-3 (n6 / n3) u ulju konoplje obično je između 2:1 i 3:1, što se smatra optimalnim za ljudsko zdravlje. Također, prisutni su i biološki metaboliti dvije esencijale masne kiseline, *gama*-linolenske kiseline (18: 3 *omega*- 6; 'GLA') i stearidonske kiseline (18: 4 *omega*-

3; 'SDA'). Klinička ispitivanja identificirala su konopljino ulje kao funkcionalnu hranu zbog jedinstvenog profila masnih kiselina te eikozanoida, a istraživanja vezana za ishranu životinja pokazala su brojne prednosti konoplje kao dodatka prehrani (Callaway, 2004).

Provode se istraživanja *in vitro* antioksidativnih svojstava peptida konopljinih sjemenki s dokazivanjem sposobnosti u reduciranju slobodnih radikala, keliranju metalnih iona i inhibiranju oksidacije linoleinske kiseline te različiti istraživači istražuju efekt ekstezivne ili limitirane hidrolize u smislu poboljšanja funkcionalnih svojstava proteina sjemenki konoplje.

2.3.1. Pogača konoplje

Uljna pogača konoplje, zaostala nakon ekstrakcije ulja predstavlja izvrstan izvor proteina biljnog podrijetla. Proteini dobiveni od otpadnih tvari i nusproizvoda sjemenki uljarica, žitarica i leguminoza predstavljaju ekonomski privlačne, održive i obnovljive alternative za proteine životinjskog podrijetla, posebno ako ih karakterizira visok udio aminokiselina koji sadrže sumpor (Teh i sur., 2013).

Pogača sjemenki konoplje može biti podijeljena na frakciju bogatu proteinima i na frakciju bogatu vlaknima, nakon suhog mljevenja i prosijavanja. Dok frakcija bogata proteinima sadrži 41–44% proteina i 5–7% vlakana, frakcija bogata vlaknima sadrži 21–29% vlakana i samo 10–20% proteina (Pojić i sur., 2004).

Najčešće korišteni postupci pripreme proteinskih izolata iz sjemenki uljarica uključuju alkalnu ekstrakciju tj. izoelektrično taloženje. Slijedi alkalna ekstrakcija (izluživanje) proteinskih komponenti, uklanjanje netopivog materijala centrifugiranjem i proteinsko taloženje u ekstraktu s podešenim pH na vrijednost izoelektrične točke.

Biljni proteini izolirani taloženjem u izoelektričnoj točki imaju limitiranu primjenu u prehrambenom smislu zbog okusa i boje povezane s koekstrakcijom i neproteinskim sastojcima kao što je npr. fenolna kiselina. Tako je već pokazano da proteini dobiveni korištenjem alkalne ekstrakcije tj. izoelektričnim taloženjem imaju sivozelenkastu boju (Girgih, 2014; Isinguzo, 2011), većinom povezanu s fenolnim spojevima i njihovim polimerizacijskim produktima (Callaway, 2004). Druga karakteristika koja ograničava upotrebu proteina konoplje u prehrambenoj industriji usprkos poželjnim nutritivnim svojstvima je slaba topivost u usporedbi sa sojinim proteinima zahvaljujući agregaciji edesina pri niskim pH vrijednostima (Tang i sur., 2006).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

Tijekom ovog istraživanja korišten je proteinski hidrolizat dobiven iz brašna konoplje (Bio proteini konoplje, proizvođač: Šakti ko d.o.o), komercijalno dostupnog u trgovinama zdrave prehrane. Proteinski izolat dobiven je postupkom opisanim u poglavlju 3.2.1. Hidrolizati proteinskog izolata dobiveni su postupkom hidrolize enzimima *Alcalase* i *Protamex*, Sigma Aldrich, SAD opisanim u poglavlju 3.2.2.

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 (Trypan Blue), 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

Enzim *Alcalase*

Enzim *Protamex*

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

Otopina TCA (0,22M)

10 % triklor-octena kisela (TCA)

90 % destilirana voda

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
- SevenCompact pH/Ion, Mettler-Toledo
- Digitalna magnetna mješalica Model 682/1
- Liofilizator Alpha 1-2 LD plus, Christ, Njemačka

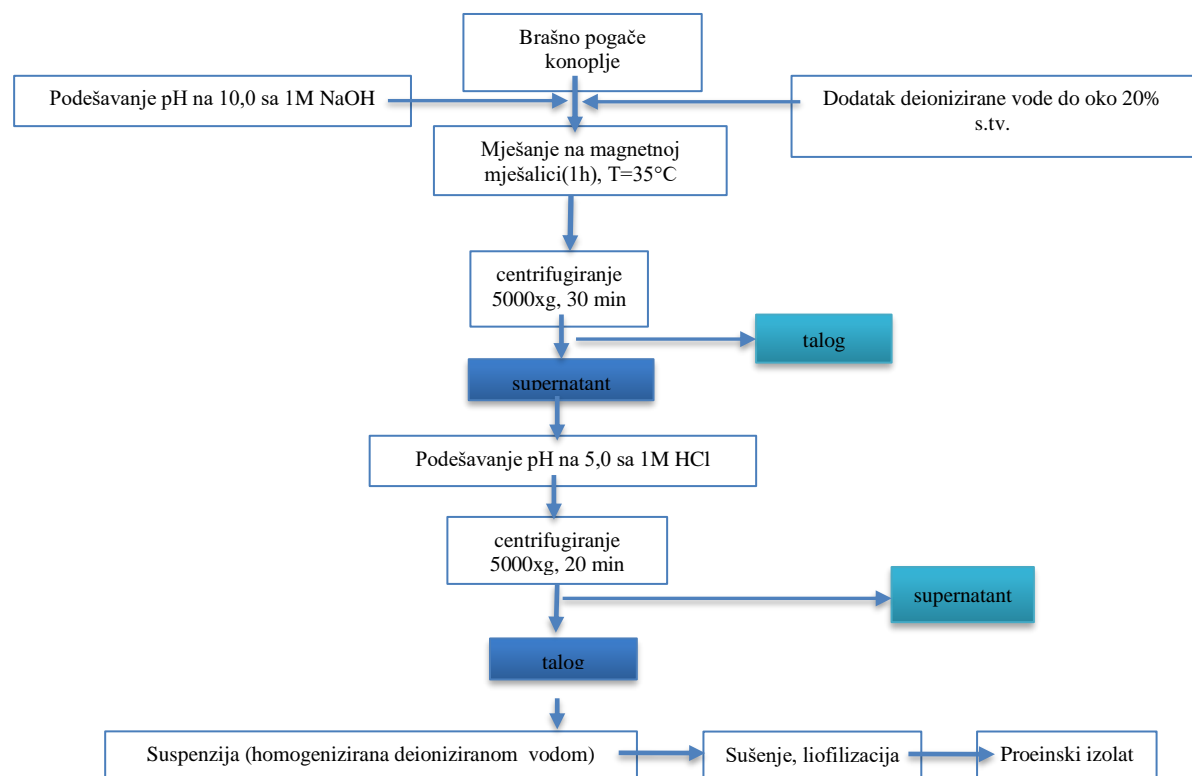
3.1.4. CHO DP-12 stanična linija

Stanična linija CHO DP-12 je adherentna stanična linija fibroblasta ovarija kineskog hrčka, a klon navedene linije je producent rekombinantnog humanog monoklonskog anti-IL8, izotipa IgG. Pohranjen je u banci *American Type Cell Collection* (Manassas, Virginia, SAD) kao stanična linija (ATCC® CRL 12444™).

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprava proteinskog izolata iz pogače konoplje

Proteinski izolat konoplje je pripremljen prema shemi prikazanoj na slici 1. na način da je odvaganih 300 g brašna pogače konoplje otopljeno u 1500 mL deionizirane vode (20% w/v), nakon čega je pH vrijednost smjese podešena na 10,0 pomoću 1 M NaOH te je smjesa zagrijana na 35 °C i ostavljena da se miješa na magnetskoj miješalici tijekom 1 sata. Nakon sat vremena miješanja uz praćenje te održavanje konstantne temperature i pH, smjesa je centrifugirana 30 minuta na 5000g pri 20 °C pri čemu su razdvojeni supernatant i talog. Supernatant je sačuvan, pH mu je podešen pomoću 1M HCl na vrijednost 5,0 i pomoću staklenog lijevka s filter papirom raspoređen u boce za centrifugiranje. Zatim je slijedilo još jedno centrifugiranje pri 5000g i 20 °C tijekom 20 minuta te je pritom odvojen talog. Talog je homogeniziran deioniziranom vodom i podešena mu je pH vrijednost na 6,8 pomoću 1 M NaOH. Tako pripremljena suspenzija je raspoređena u nekoliko petrijevih zdjelica na način da suspenzija prekrije dno zdjelice te je osušena korištenjem liofilizatora. Dobiveni liofilizirani proteinski izolat je usitnjen u tarioniku, izvagan i spremljen u kivete te ostavljen na 4 °C do korištenja.



Slika 1. Shema dobivanja proteinskog izolata iz brašna konoplje.

3.2.2. Priprava hidrolizata iz proteinskog izolata pogače konoplje

Za enzimsku hidrolizu izoliranih proteina korištene su mikrobne proteaze: *Protamex* i *Alcalase*. Odvagano je po 10 g liofiliziranog proteinskog izolata konoplje, a enzimi su dodani 5% (v/w) prema supstratu, odnosno 5 ml *Alcalase* jer je razrijeđen 10x, odnosno 2,5 mL *Protamex* jer je razrijeđen 5x. Proteinski izolat je pripremljen prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.1. te je otopljen u 200 ml deionizirane vode. Otopina se zagrije i podesi joj se pH na optimalne uvjete za djelovanje određenog enzima, odnosno na 56°C i pH 8,5 za enzim *Alcalase* te na 50°C i pH 7,0 za djelovanje enzima *Protamex*. Vrijeme provođenja hidrolize je bilo 150 min, a uzorci za određivanje stupnja hidrolize su uzeti prije dodatka enzima i za vrijeme djelovanja enzima nakon 15, 30, 60, 90, 120 i 150 min. Stupanj hidrolize kontrolira se uzimanjem uzoraka i kad je postignut odgovarajući stupanj reakcija se zaustavlja deaktivacijom enzima povišenjem temperature na temperaturu vrenja tijekom 5 min.

3.2.3. 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.

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.

Kako bi se konstruirao baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina uzoraka nepoznate koncentracije pripremljene su različite koncentracije otopine BSA iz originalne otopine BSA $\gamma(\text{BSA}) = 1 \text{ mg mL}^{-1}$. Pripremljeno je po 1 mL standardnog niza, prikazano u tablici 1.

Tablica 1. 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 otpipetira po 100 µL otopina standardnog niza i uzorka (proteinski izolat pogače konoplje ili hranjivi medij s različitim koncentracijama hidrolizata konoplje) te se doda 1 mL reagensa C, smjesa se promiješa na vortex miješalici i ostavi 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta, u svaku epruvetu naglo se doda 100 µL Folin-Ciocalteau reagensa na vortexu te se smjesa ostavi 40 min na sobnoj temperaturi. Nakon termostatiranja očita se apsorbancija standardnog niza kao i uzorka pri valnoj duljini 740 nm, uz slijepu probu (S0).

3.2.4. Određivanje stupnja hidrolize

Stupanj hidrolize (*degree of hydrolysis*, DH) određuje se kao %-tni udio topivih proteina u 10%-tnoj otopini trikloroetene kiseline (TCA) u odnosu na ukupnu količinu proteina u uzorku prema matematičkom izrazu [1]. Ukupni proteini u uzorcima se kvantificiraju metodom po Lowry-u opisanoj u poglavlju 3.2.2. Topivi proteini se određuju na način da se alikvot od 500 µL hidrolizata proteina pomiješa s 500 µL 0,22 M TCA otopine da bi se dobila topiva i netopiva frakcija proteina. Nakon 30 minute inkubacije na sobnoj temperaturi otopina se centrifugira 5 min na 3000g i u supernatantu se odredi količina topivih proteina metodom po Lowryju opisanoj u poglavlju 3.2.2.

$$\text{DH (\%)} = \frac{\text{količina topivih proteina (mg) u 0,22M TCA}}{\text{količina ukupnih proteina (mg)}} \times 100 \quad [1]$$

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

Proteini prisutni u proteinskom izolatu, proteini prisutni u proteinskim hidrolizatima dobiveni hidrolizom pomoću *Protamex* i *Alcalase* te proteini prisutni u pripremljenim hranjivim medijima za uzgoj stanica razdvojeni su SDS-PAGE elektroforezom po Laemmli-ju (Laemmli, 1970). Uzorcima je dodano 5 µL 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 etanolnom 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. Odbojenje gelova provedeno je u otopini za odbojenje u kojoj se gelovi i čuvaju.

3.2.6. Uzgoj CHO DP-12 stanica u T-bocama

Uzgoj započinje odmrzavanjem stanica koje se čuvaju zamrznute na -80 °C u mediju za zamrzavanje. Ampule sa zamrznutim stanicama (1 mL) u koncentraciji od 1×10^7 stanica mL⁻¹ odmrznu se naglim uranjanjem u vodenu kupelj na 30 °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⁻¹. 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 °C uz odgovarajuću atmosferu (95% zraka + 5% CO₂). 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 radi sprječavanja njihovog štetnog učinka i održavanja optimalnog pH kulture.

3.2.7. Utjecaj dodatka hidrolizata proteina brašna pogače konoplje na rast i produktivnost CHO DP-12 stanica

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 dostatno 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 2×10^4 st mL^{-1} u 0,5 mL DMEM medija za uzgoj s dodatkom 10% FBS seruma. Stanice su tako ostavljene tijekom 24 h 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 dodanim različitim koncentracijama FBS i proteinskog hidrolizata konoplje dobiven pomoću alkalaze i protamexa. Tako su pripremljeni DMEM mediji koji sadrži 10% FBS, medij s 9% FBS i 1% hidrolizata konoplje, medij s 5% FBS i 5% hidrolizata konoplje i medij s 1% FBS i 9% hidrolizata konoplje dobivenog pomoću enzima *Alcalase* te je pripremljeni mediji s istim omjerima FBS i hidrolizatom konoplje dobivenim pomoću enzima *Protamex*. Dinamika rasta stanica praćena je tijekom 6 dana brojanjem u Neubaerovoj komorici uz dodatak boje *Trypan Blue*. Svakih 24 sata hranjivi medij, u kojem se nalaze stanice je izuzet te spremljen u Eppendorf kivete radi daljnjih postupaka analize.

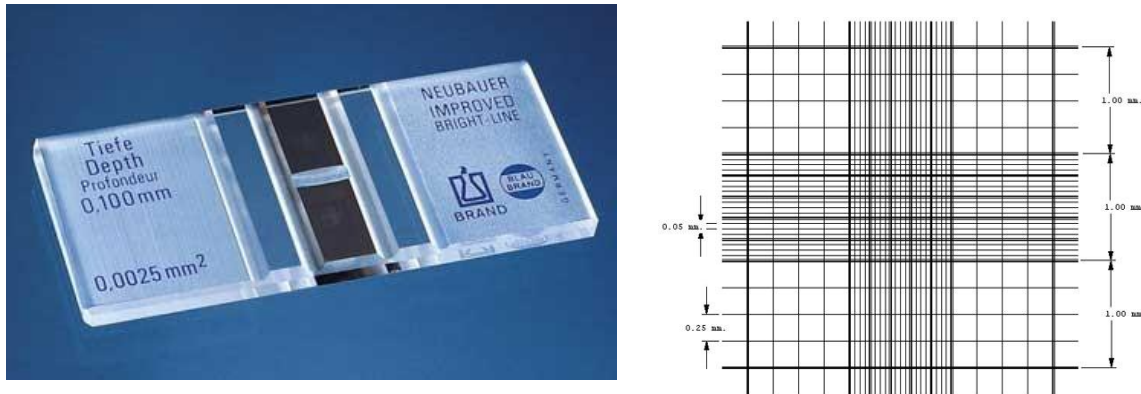
3.2.8. Određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*

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 2.). Uzorak za brojanje 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:

$$\text{Broj stanica/mL suspenzije} = X_{\text{sr}} \times \text{faktor razrjeđenja} \times 5 \times 10^3 \quad [2]$$

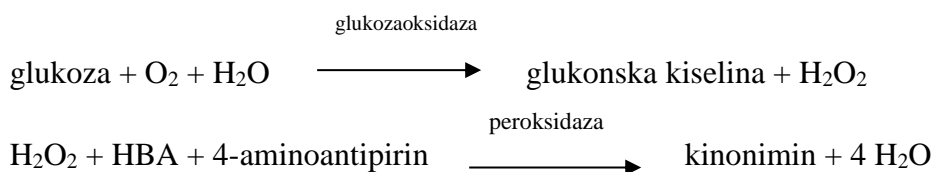
pri čemu je X_{sr} - srednja vrijednost broja stanica unutar 4 središnja kvadrata komorice.



Slika 2. Neubaerova komorica za brojanje stanica (Anonymus 1, 2018).

3.2.9. Određivanje koncentracije glukoze u hranjivom mediju

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



HBA= 4-hidroksibenzojeva kiselina

Standard: glukoza 5 mmol L⁻¹

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 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:

$$\text{Koncentracija glukoze} = \frac{\Delta A / \text{min uzorka}}{\Delta A / \text{min standarda}} \times 5 \text{ mM} \quad [3]$$

3.2.10. ELISA test

Imunoenzimskim ELISA testom određivala se koncentracija produciranog monoklonskog protutijela kojeg proizvodi stanična linija CHO DP-12. Proizvođač ELISA testa koji se koristio u ovom radu je Sigma-Aldrich® te je postupak proveden po službenom protokolu proizvođača.

3.2.11. Izračunavanje parametara rasta CHO DP-12 stanica

3.2.11.1. Određivanje specifične brzine rasta stanica

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad [4]$$

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:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad [5]$$

Obzirom da je masa proporcionalna broju stanica, onda je:

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{\Delta t} \quad [6]$$

N – broj stanica u 1 mL na kraju log faze

N₀ – broj stanica u 1 mL na početku log faze

Δt – vremenski interval (h)

3.2.11.2. Određivanje specifične produktivnosti (Qp)

$$Q = \frac{\frac{c}{N}}{\Delta t} \quad [7]$$

C – koncentracija (μg IgG po mL)

N - broj stanica po mL

Δt – vremenski interval (h)

3.2.11.3. Određivanje volumetrijske produktivnosti

$$\text{Volumetrijska produktivnost} = \mu\text{g IgG}/(\text{volumen} \times \text{vrijeme}) = \text{konc IgG}/\text{vrijeme} \quad [8]$$

3.2.12. Statistička obrada podataka

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

$$\text{Srednja vrijednost} \quad x_{sr} = \sum_{i=1}^n Xi - X \quad [9]$$

$$\text{Varijanca} \quad s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (Xi - X)^2 \quad [10]$$

$$\text{Standardna devijacija} \quad s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (Xi - X_{sr})^2} \quad [11]$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kako se u novije vrijeme sve više pažnje predaje ekonomskoj održivosti prehrambene industrije te smanjenju rizika onečišćenja okoliša, iskorištenje sirovina biljnog podrijetla i stvaranje dodane vrijednosti otpadnom biljnom materijalu sve više dobiva na značaju. Takvi proteinima bogati nusproizvodi, otpadni materijali prehrambene industrije, predstavljaju novu potencijalnu sirovinu s mogućom primjenom u kulturama životinjskih stanica. Veliki potencijal imaju ostaci iz proizvodnje jestivog ulja tj. uljne pogače koje zaostaju nakon proizvodnje jestivog ulja i danas se 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%).

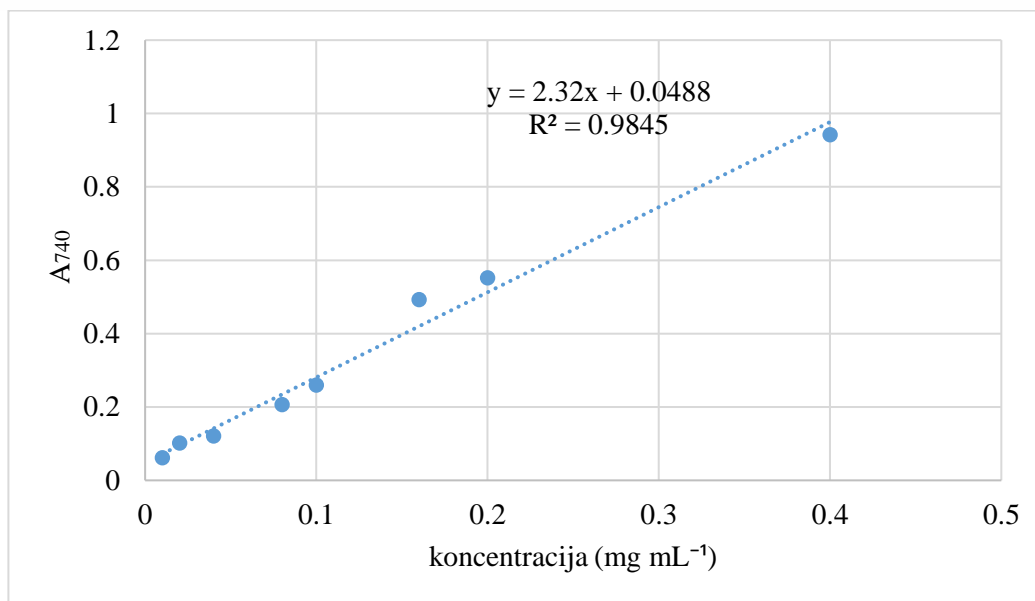
Pogača konoplje sadrži oko 35% proteina (Callaway, 2004), a proteini koji zaostaju u pogačama nakon ekstrakcije ili prešanja ulja zbog izbalansiranog sadržaja aminokiselina mogu se koristiti kao nadomjestak za dio seruma ili dodatak medijima bez seruma. S obzirom da pogače sadrže i tvari ne-proteinskog porijekla, one se moraju ukloniti kako bi se uklonilo i njihovo moguće nepoželjno biološko djelovanje na stanice (Franěk i sur., 2000). Fizikalno-kemijska i funkcionalna svojstva proteinskog hidrolizata konoplje su prema istraživanjima nekih znanstvenika slabija u usporedbi s npr. izolatima sojinih proteina. Sukladno tome sve se više pažnje predaje ispitivanju fizikalnih, kemijskih i enzimskih tretmana za modificiranje proteinske strukture u cilju dobivanja željenih funkcionalnih karakteristika. Tako je u mnogim, uključujući i ovo istraživanje korištena enzimaska hidroliza za dobivanje željenih funkcijskih svojstva proteinskih hidrolizata.

Tako je određen različit učinak s obzirom na različitu dodanu koncentraciju 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). Tako je medij bez dodatka seruma, ali s dodatkom hidrolizata proteina soje pokazao pozitivan utjecaj na rast i vijabilnost stanica CHO (Chun i sur., 2007), dok je dodatak peptidnih frakcija hidrolizata uljane repice pokazao pozitivan učinak na rast stanica CHO i produktivnost rekombinantnog interferona (Farges-Haddani i sur., 2006). S druge pak strane, vrlo visoke koncentracije hidrolizata proteina mogu imati inhibitoran utjecaj na rast stanica jer se pretpostavlja da dolazi do narušavanja ravnoteže hranjivih tvari u mediju zbog vrlo visoke koncentracije aminokiselina i oligopeptida (Chun i sur., 2007).

Uzimajući u obzir dosad dobivene rezultate istraživanja učinaka proteinskih hidrolizata biljnog porijekla kao potencijalnih aktivatora rasta te zbog niže cijene i trenda izbjegavanja materijala životinjskog podrijetla radi veće sigurnosti primjene, cilj ovog rada je bio ispitati učinak proteinskih hidrolizata konoplje dobivenih pomoću dvaju proteaza *Alcalase* i *Protamex* na rast i produktivnost industrijske stanične linije CHO DP-12, važne u proizvodnji rekombinantnog humanog anti-IL8, te vidjeti da li hidrolizati proteina imaju potencijalnu vrijednost kao djelomična zamjena za serum. Također, uspoređeno je djelovanje navedenih proteolitičkih enzima na proteinski izolat konoplje, odnosno eventualni utjecaj dobivenog različitog proteinskog profila hidrolizata na rast i produktivnost stanica.

4.1. PRIPRAVA PROTEINSKOG IZOLATA KONOPLJE I ODREĐIVANJE UDJELA PROTEINA

U ovom radu pripremljen je proteinski izolat iz pogače konoplje prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.1. Uzeti su uzorci prije te nakon provedenog postupka izolacije, koji su korišteni za određivanje proteina metodom po Lowry-u. Kako bi se mogao odrediti sadržaj proteina u izolatima te u kasnije u radu uzimanim uzorcima najprije je napravljen baždarni dijagram za određivanje nepoznate koncentracije uzoraka (slika 3.) tako da su pripremljene različite koncentracije otopine BSA iz originalne prikazano u tablici 1. te im je izmjerena apsorbanca pri 740 nm.



Slika 3. Graf ovisnosti apsorbanca pri 740 nm o koncentraciji proteina (mg mL⁻¹).

U tablici 2. prikazane su kemijske komponente i izračunate vrijednosti njihovih udjela u brašnu uljne pogače konoplje i njenom proteinskom izolatu izražen kao %-tni udio s obzirom na početnu masu brašna pogača konoplje.

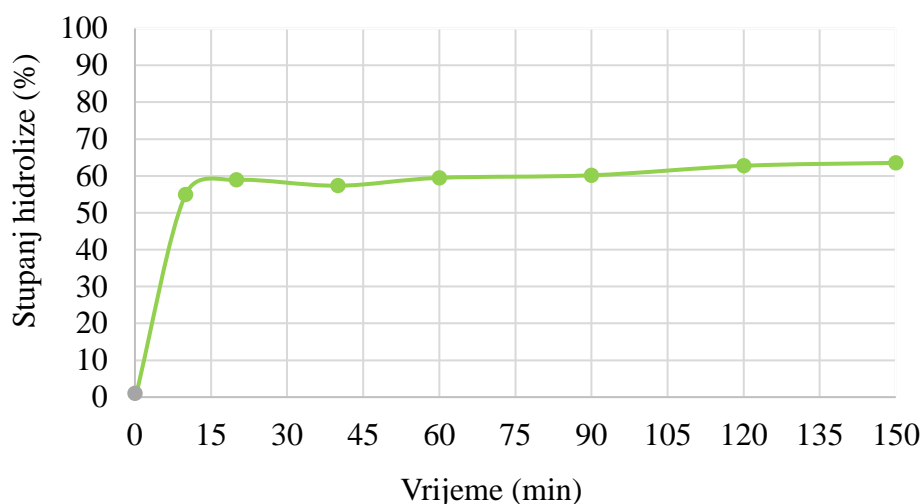
Tablica 2. Sastav uljne pogače i proteinskog izolata konoplje izražen u %-tnim udjelima.

	Vlaga (%)	Pepeo (%)	Proteini (%)	Lipidi i ugljikohidrati (%)
Uljna pogača konoplje	7,01	9,75	31,20	52,04
Proteinski izolat	5,04	4,5	82,68	7,78

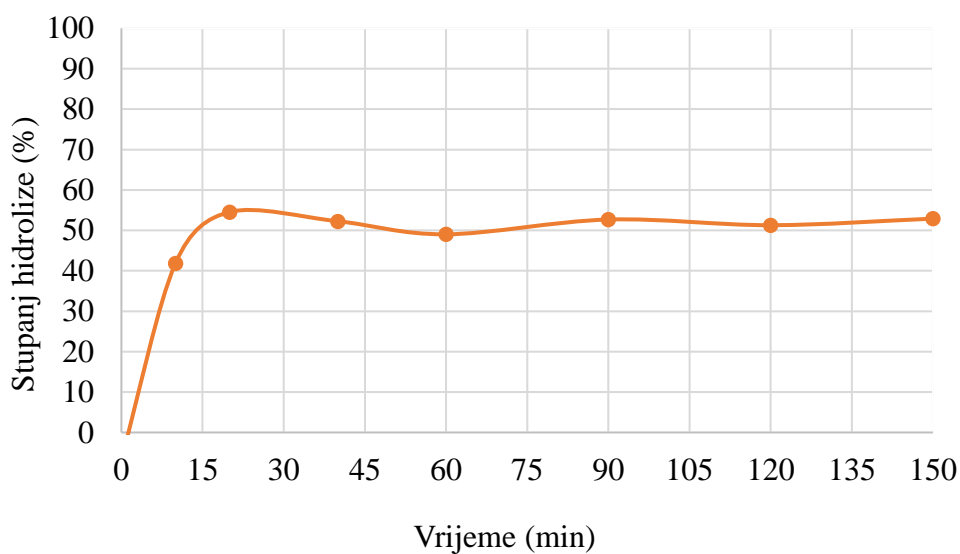
Postotni udio proteina u uljnoj pogači konoplje dobiven u ovom istraživanju iznosi 31,2%, što je u korelaciji s rezultatima nekih drugih istraživanja. Callaway (2004) navodi u istraživanju da udio proteina u uljnoj pogači konoplje iznosi 33,5%, Pojić i sur. (2014) odredili 27,4%, House i sur. (2010) navode udio 31,0-53,3%, Silversides i Lefrancois (2005) navode 30,7%. Tang i sur (2006) navode rezultat od 50% što je u skladu s vrijednostima koje se navode na deklaracijama komercijalno dostupnih proizvoda (House i sur., 2010), pri čemu je važno napomenuti da je u polaznom materijalu izolacija ulja konoplje provedena ekstrakcijom superkritičnim CO₂ koji je zasigurno superiornija metoda ekstrakcije u usporedbi s ekstrakcijom otapalima ili dobivanja ulja prešanjem kada u pogačama zaostaje znatno više ulja, a što ima utjecaja na rezultate određivanja kemijskog sastava brašna pogača. Stoga se može zaključiti da razlike u udjelu proteina u početnom materijalu tj. brašnu pogače konoplje ovise i o načinu i iskorištenju ekstrakcije ulja konoplje. Nadalje, Tang i sur. (2006) su u proteinskom izolatu pogače konoplje odredili udio proteina od 86,9%, Wang i sur. (2008) su odredili čak 90,5% dok je u našem uzorku udio proteinske komponente iznosio 82,67%. Ovo prisutno odstupanje, nije značajno različito od literaturnih podataka, a moguće je uvjetovano razlikama u udjelu proteina u početnom materijalu odnosno različitoj početnoj sirovini, a jedan od uzroka može biti i razlika u metodologiji izolacije. Naime Tang i sur. (2006) su u svojoj metodi pripreme proteinskog izolata centrifugiranje provodili pri 8000g.

4.2. ODREĐIVANJE STUPNJA HIDROLIZE IZOLATA KONOPLJE DOBIVENIH POMOĆU PROTEAZA *ALCALASE* I *PROTAMEX*

Proteinski izolati su hidrolizirani pomoću proteolitičkih enzima *Alcalase* u jednom pokusu i *Protamex* u drugom. Za praćenje hidrolize uzeti su uzorci prije dodatka enzima, te nakon 10, 20, 40, 60, 90, 120 i 150 min djelovanja svakog enzima. Stupanj hidrolize izračunat je prema izrazu [1] te su rezultati grafički prikazani na slikama 4. i 5.



Slika 4. Hidroliza proteinskog izolata konoplje dobivenog pomoću enzima *Alcalase*.

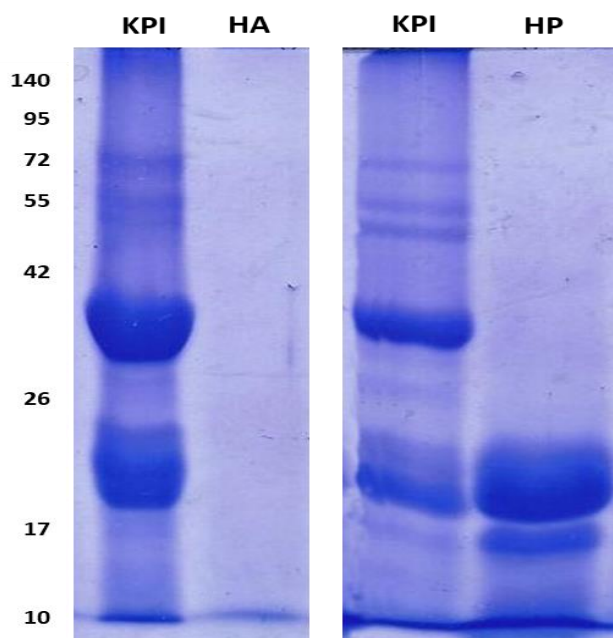


Slika 5. Hidroliza proteinskog izolata konoplje dobivenog pomoću enzima *Protamex*.

Iz grafova na slikama 4. i 5. se vidi kako se djelovanjem enzima *Alcalase* na hidrolizat proteinskog izolata postiže malo veći stupanj hidrolize u kraćem vremenu nego enzimom *Protamex* iz čega možemo zaključiti da je za navedeni supstrat enzim *Alcalase* nešto učinkovitiji od *Protamex*. Za enzim *Alcalase* stupanj hidrolize već nakon 10 min djelovanja je 55%, te se daljnjim djelovanjem stupanj hidrolize kreće oko 60%, dok je kod *Protamex* nakon 10 min djelovanja stupanj hidrolize 42% te se daljnjim djelovanjem kreće oko 55%. Rezultati se mogu objasniti činjenicom da enzim *Alcalase* ima nešto veći afinitet za cijepanje peptidne veze. Također, općenito alkalne proteaze poput *Alcalase* pokazuju bolju aktivnost u hidrolizi peptida u usporedbi s kiselim ili neutralnim proteazama (Klompong i sur., 2007).

4.3. KARAKTERIZACIJA PROTEINSKOG IZOLATA BRAŠNA KONOPLJE, HIDROLIZATA KONOPLJE TE HRANJIVOG MEDIJA ZA UZGOJ CHO DP-12 STANICA POMOĆU SDS-PAGE

U cilju određivanja proteinskih profila i njihove moguće razlike uslijed hidrolize različitim enzimima, napravljena je SDS-PAGE elektroforeza proteinskih izolata pogače konoplje te hidrolizata istog dobivenih pomoću *Alcalase* i *Protamex* te su rezultati prikazani na slici 6.

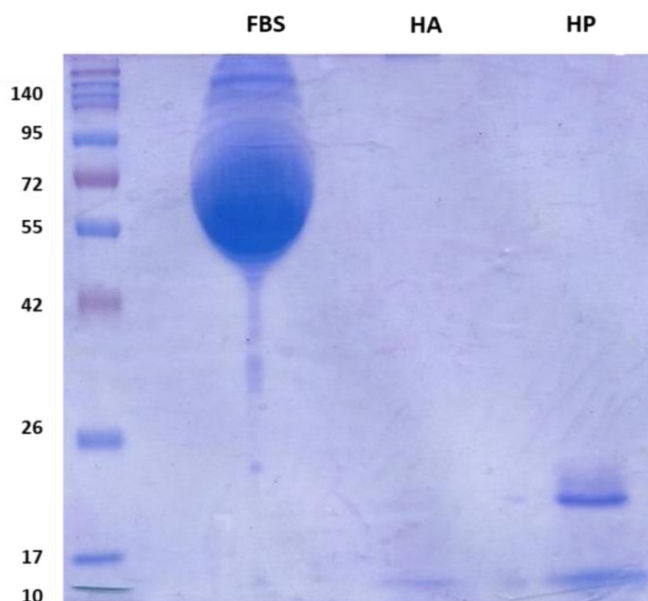


Slika 6. Gel nakon SDS-PAGE proteina izolata pogače konoplje (KPI) i hidrolizata iste dobivenog pomoću proteaza *Alcalase* (HA) i *Protamex* (HP).

Na slici je vidljiva razlika u proteinskom profilu izolata pogače konoplje i hidrolizata iste, te razlika između proteinskog profila hidrolizata izolata dobivenog pomoću dvaju proteaza. Na slici gela uzorka izolata pogače konoplje vidljivo je više bendova nego kod hidrolizata istog. Također, na slici gela uzorka hidrolizata dobivenog pomoću *Alcalase* nisu vidljivi bendovi molekulske mase većih od 10 kDa čime se potvrđuje potpuna hidroliza na peptide malih molekulske mase, dok je kod uzorka hidrolizata dobivenog pomoću *Protamex* vidljivo nekoliko bendova, od kojih dva izraženija od 15 kDa i 20 kDa. Bend od 15 kDa je moguće komponenta albumina, a onaj od 20 kDa prema molekulskoj masi odgovara baznoj podjedinici edestina. Kod proteinskih izolata najizraženiji su 2 benda koji odgovaraju standardima molekulske mase oko 33 kDa i 20 kDa, te je vidljivo još nekoliko vrlo svjetlih bendova tj. male koncentracije koji odgovaraju vrijednosti standarda molarne mase 48 kDa koji odgovara 7S proteinu sjemenki konoplje te 53 kDa i 72 kDa. Kako se radi o denaturirajućim uvjetima odvijanja elektroforeze može se smatrati da se radi o dvjema podjedinicama: kisela (33 kDa) i bazna (20 kDa) koje odgovaraju proteinu edestinu. Bendovi većih molekulske mase su moguće nepotpuno denaturiran edesetin kao npr. monomer. Naime, edestin je heksamerni protein tj. sastoji od 6 podjedinica pri čemu svaka sadrži kiselu i baznu podjedinicu međusobno povezanih disulfidnom vezom, a koju je u ovom slučaju razorio β -merkaptoetanol. Peptidi manji od 18 kDa su moguće komponente albumina.

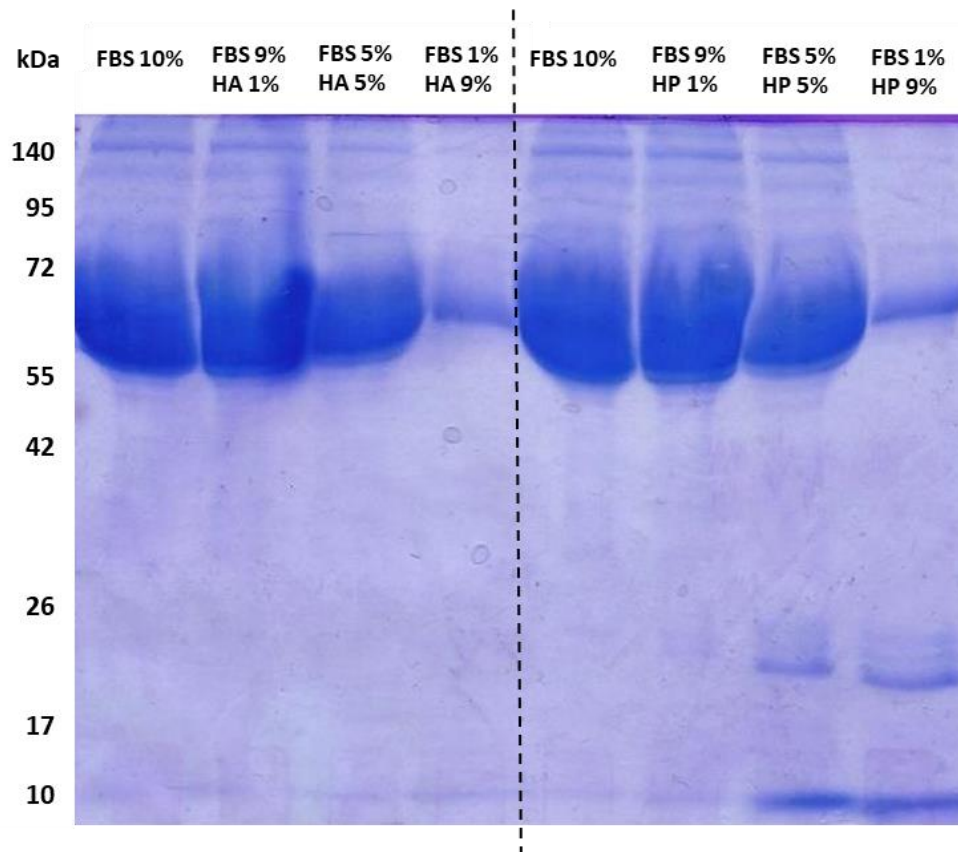
Edestin je najzastupljeniji protein u proteinskom izolatu konoplje i prema literaturnim podacima čini 82% ukupnih proteina sjemenki konoplje, te su prema tome dobiveni rezultati bili očekivani, odnosno u korelaciji s rezultatima koje su objavili Tang i sur. (2006).

Radi usporedbe proteinskog profila FBS i proteinskih hidrolizata konoplje dobivenih djelovanjem proteaza *Alcalase* (HA) i *Protamex* (HP), a koji će se koristiti kao dodaci hranjivom mediju za uzgoj CHO DP-12 stanica provedena je SDS-PAGE, te su rezultati su prikazani na slici 7.



Slika 7. Gel nakon SDS-PAGE proteina uzoraka; FBS-Fetal bovine serum; HA-Proteinski hidrolizat konoplje dobiven djelovanjem *Alcalase*; HP-Proteinski hidrolizat konoplje dobiven djelovanjem *Protamex*.

Na slici nema vidljivih bendova većih od 10 kDa kod uzoraka hidrolizata proteina dobivenih djelovanjem enzima *Alcalase*, kao i na slici 6., čime se potvrdila prethodna SDS-PAGE. Kod uzorka hidrolizata dobivenog djelovanjem enzima *Protamex*, također je kao i na slici 6. vidljiv bend koji odgovara standardu veličine oko 20-23 kDa koji odgovara baznoj podjedinica edestina, koja je ostala nehidrolizirana djelovanjem *Protamex*, te bend koji odgovara standardu molarne mase 15 kDa koji je moguće dio albumina. Općenito, bazna podjedinica je manje podložna hidrolizi od kisele. To može biti povezano i s razlikom u položaju podjedinica u molekularnoj strukturi, te ukoliko su u unutrašnjosti bit će manje dostupne katalitičkom mjestu enzima (Tang, 2009). Kod uzorka FBS vidljivo je nekoliko bendova većih od 72 kDa i jedan široki bend koji odgovara molekularnoj masi oko 55-72 kDa iz čega možemo zaključiti da je albumin (58kD) najzastupljeniji protein u FBS što je u korelaciji s ostalim literaturnim podacima.

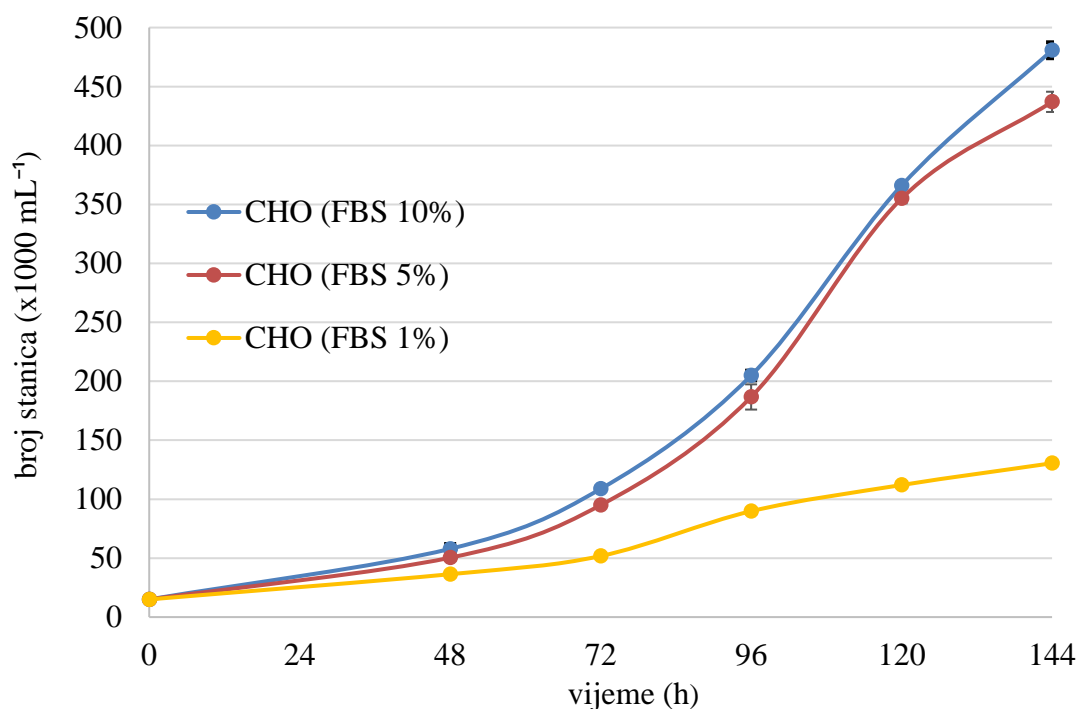


Slika 8. SDS-PAGE hranjivog medija za uzgoj CHO DP-12 stanične linije s različitim omjerom dodanog FBS i hidrolizata konoplje dobivenog pomoću enzima *Alcalase* i *Protamex*.

Iz slike gela vidljiva je razlika u sastavima medija s različitim volumnim udjelima FBS i hidrolizata dobivenog pomoću *Alcalase* i *Protamex*. Kod svih uzoraka medija različitih sastava je vidljiv bend koji odgovara standardu molekulske mase od 58 kDa koji odgovara albuminu, a karakterističan je za FBS i ujedno najzastupljeniji protein u FBS. Intenzitet navedenog benda je najveći kod 10% i 9% FBS. Intenzitet bendova tj. koncentracija albumina u ostalim uzorcima medija za uzgoj opada kako opada udio dodanog FBS u hranjivi medij, te je kod medija s 5% FBS slabiji nego kod medija s 9% FBS, a kod medija s 1% FBS intenzitet je najslabiji, što je i očekivano. Na gelu nema vidljivih bendova karakterističnih za proteinski hidrolizat dobiven pomoću *Alcalase* kako su u hidrolizatu prisutni samo peptidi manjih molekulskih masa od 10 kDa. Kod medija s dodanim hidrolizatom dobivenim pomoću *Protamex* u udjelu 5% i 9% vidljiva su dva benda od oko 20-23 kDa i 10 kDa koja nisu vidljiva u ostalim uzorcima, a karakteristična su za proteinski hidrolizat dobiven pomoću *Protamex*.

4.4. UČINAK DODATKA RAZLIČITIH VOLUMNIH UDJELA HIDROLIZATA KONOPLJE DOBIVENIH POMOĆU PROTEAZA *ALCALASE* I *PROTAMEX* NA RAST CHO DP-12 STANICA

Da bi se istražio učinak proizvedenog proteinskog hidrolizata uljne pogače konoplje kao nutritivnog dodatka i djelomične zamjene za serum u mediju stanične kulture, najprije je potrebno utvrditi potrebu stanica za serumom. Za eksperiment u svaku jažicu naciepljeno je 10 000 CHO DP-12 stanica te je tijekom 6 dana praćen njihov rast u DMEM. CHO stanice naciepljene su u *Dulbecco MEM/F-12* medij s različitim volumnim udjelima FBS tj. 1%, 5% i 10%. Broj poraslih stanica određivan je svaka 24 h tijekom 6 dana od naciepljivanja metodom Trypan-plavo (Slika 2) te su rezultati prikazani na slici 9. Iz dobivenog grafa rasta uz pomoć izraza [4] izračunata je i specifična brzina rasta stanica μ (h^{-1}) te su rezultati prikazani u tablici 3.



Slika 9. Graf ovisnosti broja CHO DP-12 stanica (x1000 mL^{-1}) o vremenu (h) za medij s različitim udjelom FBS.

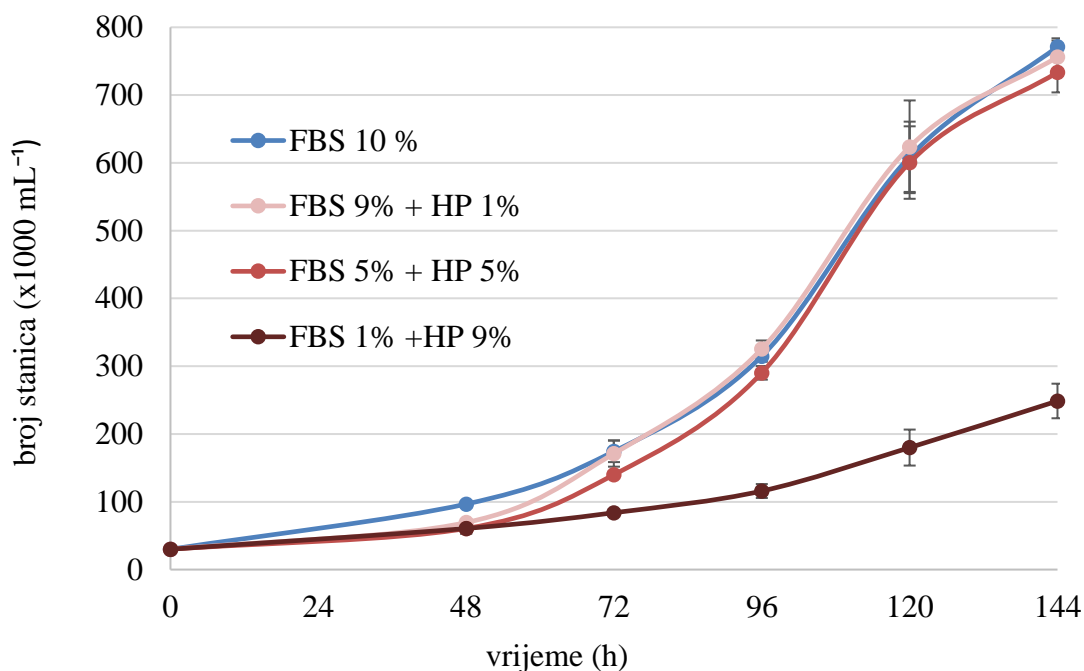
Tablica 3. Specifične brzine rasta μ (h^{-1}) stanica u mediju s različitim udjelom FBS.

Udio FBS u mediju	μ (h^{-1})
FBS 10%	0,024
FBS 5%	0,023
FBS 1%	0,0087

Iz grafa je vidljivo da najbrži rast imaju stanice s dodatkom 10% FBS, nešto sporiji rast imaju stanice kojima je u medij za rast dodano 5% FBS, dok značajnije sporiji rast imaju stanice kojima je dodano 1% FBS. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da dodatak FBS u volumnom udjelu 5-10% u hranjivi medij ima stimulativan utjecaj na rast stanica CHO DP-12. To nam dokazuje da stanice bez zadovoljavajućeg postotka seruma u mediju rastu sporije vjerojatno zbog manjka potrebnih nutrijenata (Arora, 2016).

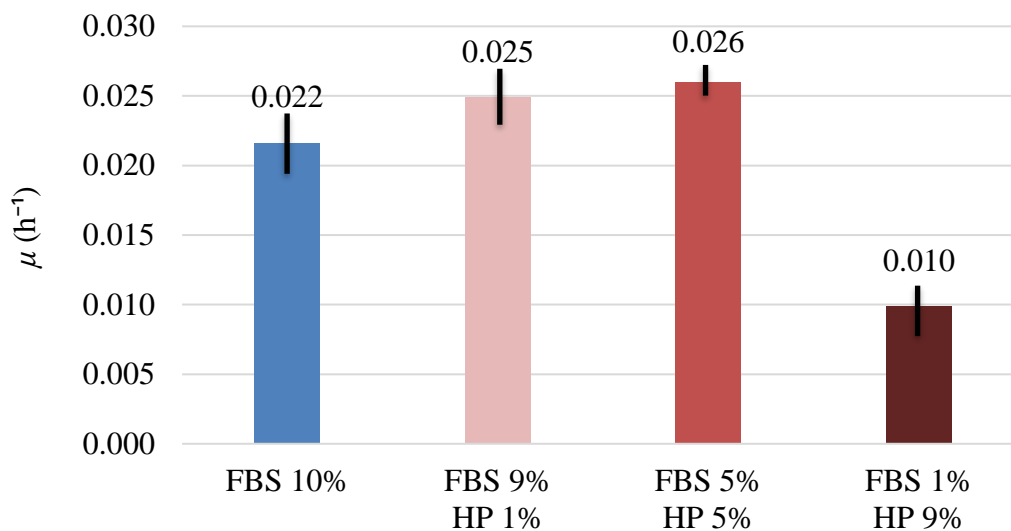
Za potrebe istraživanja pripremljeni su DMEM hranjivi mediji s različitim udjelima FBS i HP (hidrolizata proteina konoplje dobivenog pomoću enzima *Protamex*) te FBS i HA (hidrolizata konoplje dobivenog pomoću enzima *Alcalase*) te je tijekom 6 dana praćen njihov rast. Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost broja stanica $\times 1000 \text{ mL}^{-1}$ u ovisnosti o vremenu rasta (h) na slikama 10. i 12.

Uz pomoć krivulji rasta prikazanih na slikama 10. i 12. prema izrazu [4]. izračunata je specifična brzina rasta CHO DP-12 stanica prema te su rezultati prikazani grafički na slici 11. i 13.



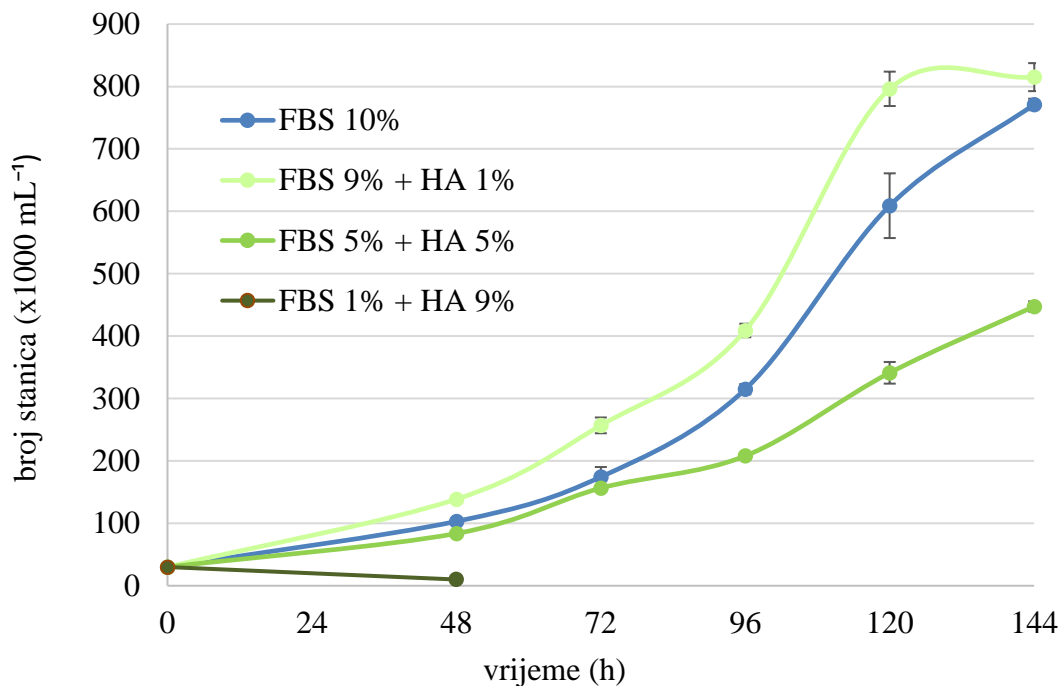
Slika 10. Graf ovisnosti broja CHO DP-12 stanica ($\times 1000 \text{ mL}^{-1}$) o vremenu (h) za medij s različitim udjelom FBS i hidrolizata konoplje dobivenog pomoću *Protamex* (HP).

Iz dobivenih rezultata je vidljivo da stanice u hranjivim medijima s 9% FBS i 1% HP te 5% FBS i 5% HP pokazuju sličan profil krivulje rasta kao i medij s 10% FBS bez dodatka hidrolizata te možemo zaključiti da dio seruma može biti zamijenjen hidrolizatom proteina konoplje dobivenog pomoću enzima *Protamex*. Stanice u mediju s 1% FBS i 9% HP pokazuju značajno sporiji rast i proliferaciju iz čega možemo zaključiti da HP ne može biti potpuna zamjena serumu. Moguće je da proteinski hidrolizat ne sadrži dovoljnu količinu peptida tj. aminokiselina i/ili proteini prisutni u hidrolizatu dobivenom pomoću *Protamex* nisu odgovarajućeg sastava kao oni u FBS te je moguće da općenito hidrolizat ne sadrži sve potrebne sastojke koje doprinose rastu poput faktora rasta i sl., a koji se inače nalaze u serumu.



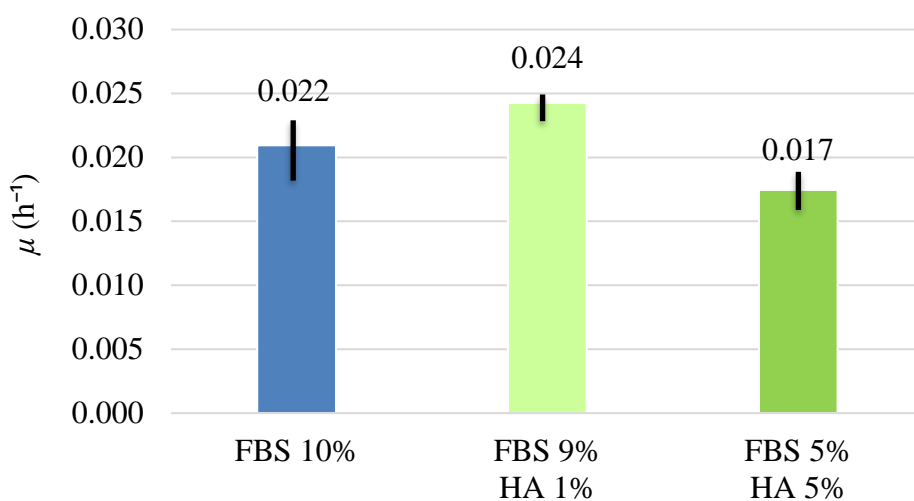
Slika 11. Specifična brzina rasta μ (h^{-1}) CHO DP-12 stanica u medijima s dodatkom različitog volumnog udjela FBS i hidrolizata konoplje dobivenog pomoću *Protamex* (HP).

Veće specifične brzine rasta od kontrole tj. medija s 10% FBS bez dodatka hidrolizata ($0,022 \text{ h}^{-1}$) postignute su u medijima gdje je 50% FBS zamijenjeno HP ($0,026 \text{ h}^{-1}$), te u mediju gdje je 10% FBS zamijenjeno HP ($0,025 \text{ h}^{-1}$). Iz dobivenih rezultata je vidljivo da dio seruma, do 50% može biti zamijenjeno hidrolizatom proteina dobivenih pomoću enzima *Protamex*, štoviše da zamjena u tolikom udjelu djeluje stimulatивно na rast. Kod medija u kojem je 90% FBS zamijenjeno HP postignuta je manja specifična brzina rasta ($0,010 \text{ h}^{-1}$) od kontrole te time možemo zaključiti da HP ne može biti potpuna zamjena za serum.



Slika 12. Graf ovisnosti broja CHO DP-12 stanica ($\times 1000 \text{ mL}^{-1}$) o vremenu (h) za medij s različitim udjelom FBS i hidrolizata konoplje dobivenog pomoću *Alcalase* (HA).

Iz dobivenih krivulja rasta vidljivo je da stanice u mediju u kojemu je 10% FBS zamijenjeno HA pokazuju bolji profil rasta od kontrole tj. medija s 10% FBS. Stanice u mediju u kojemu je 50% FBS zamijenjeno HA pokazuju nešto slabiji rast i proliferaciju od kontrole, dok je u mediju gdje je 90% FBS zamijenjeno s HA postignut znatno slabiji rast stanica od kontrole. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da se serum može djelomično zamijeniti hidrolizatom konoplje dobivenim pomoću *Alcalase*, štoviše HA u udjelu 1% kao zamjena za serum pokazuje stimulativan utjecaj na rast stanica. Međutim, HA ne može biti potpuna zamjena za serum kako u mediju gdje je kao zamjena za serum dodan u udjelu od 9% pokazuje inhibitoran utjecaj na rast stanica.

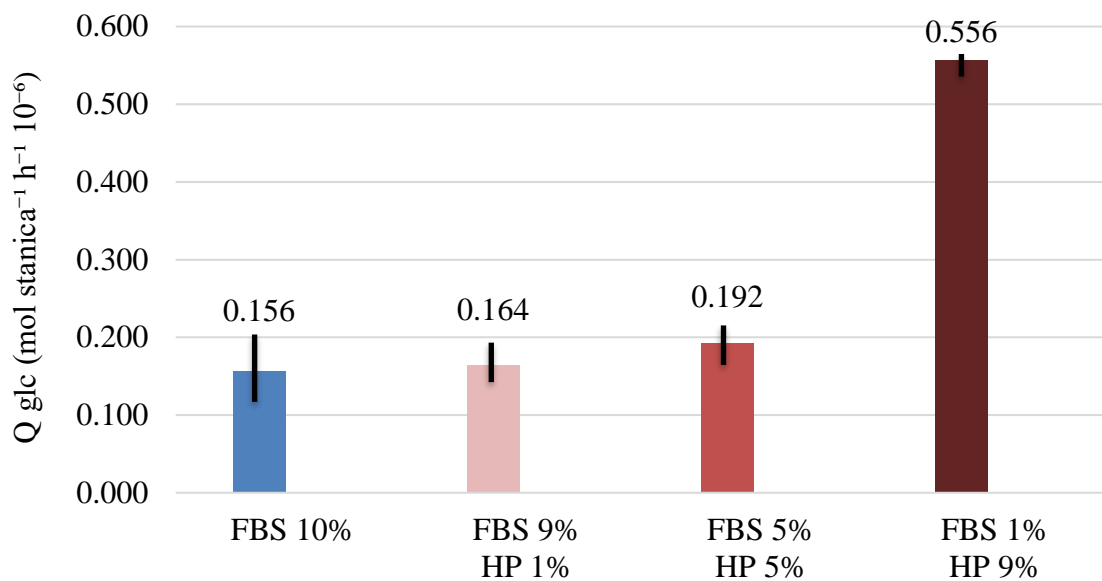


Slika 13. Specifična brzina rasta (h^{-1}) CHO DP-12 stanica u mediju s različitim udjelom FBS i hidrolizata proteina dobivenog pomoću *Alcalase*.

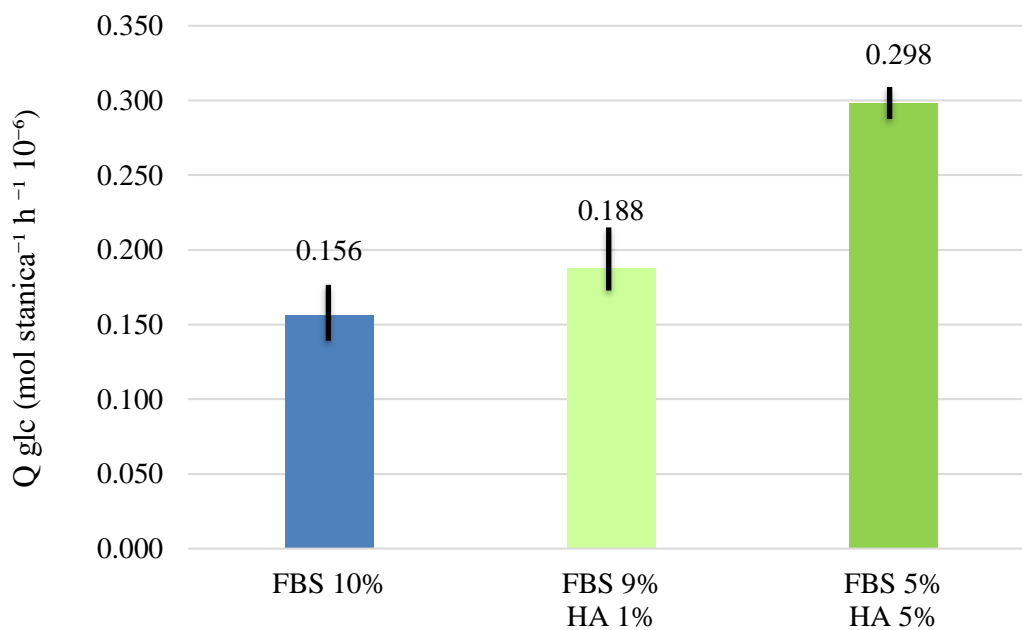
Izračunata specifična brzina rasta u kontroli (10% FBS) je iznosila $0,022 h^{-1}$, u mediju gdje je 10% FBS zamijenjen HA $0,024 h^{-1}$, dok je u mediju u kojem je 50% FBS zamijenjeno HA $0,017 h^{-1}$. Iz dobivenih rezultata je vidljivo da je nešto brži rast postignut u mediju gdje je 1% FBS zamijenjeno HA čime možemo zaključiti da zamjena 10% FBS hidrolizatom konoplje dobivenim pomoću *Alcalase* pokazuje stimulativan utjecaj na rast i proliferaciju CHO DP-12 stanica te da u navedenom udjelu može služiti kao zamjena na serum. U mediju u kojem je FBS 50% zamijenjeno HA ostvarena je manja specifična brzina rasta od kontrole tj. $0,017 h^{-1}$ te možemo zaključiti da zamjena seruma s HA u navedenom udjelu djeluje inhibitorno na rast i proliferaciju stanica.

4.5. SPECIFIČNA POTROŠNJA GLUKOZE CHO DP-12 STANICA

Glukoza važan izvor energije i prekursor za sintezu drugih spojeva te se tijekom rasta i proliferacije stanica troši (Butler, 2004). U uzorcima na početku i kraju uzgoja određena je koncentracija glukoze prema izrazu [3] te je izračunata specifična potrošnja glukoze, a rezultati su prikazani grafički na slikama 14. i 15.



Slika 14. Specifična brzina potrošnje glukoze (mol stanica⁻¹ h⁻¹ 10⁻⁶) CHO DP-12 stanica u mediju s različitim udjelom FBS i hidrolizata konoplje dobivenog pomoću enzima *Protamex* (HP).

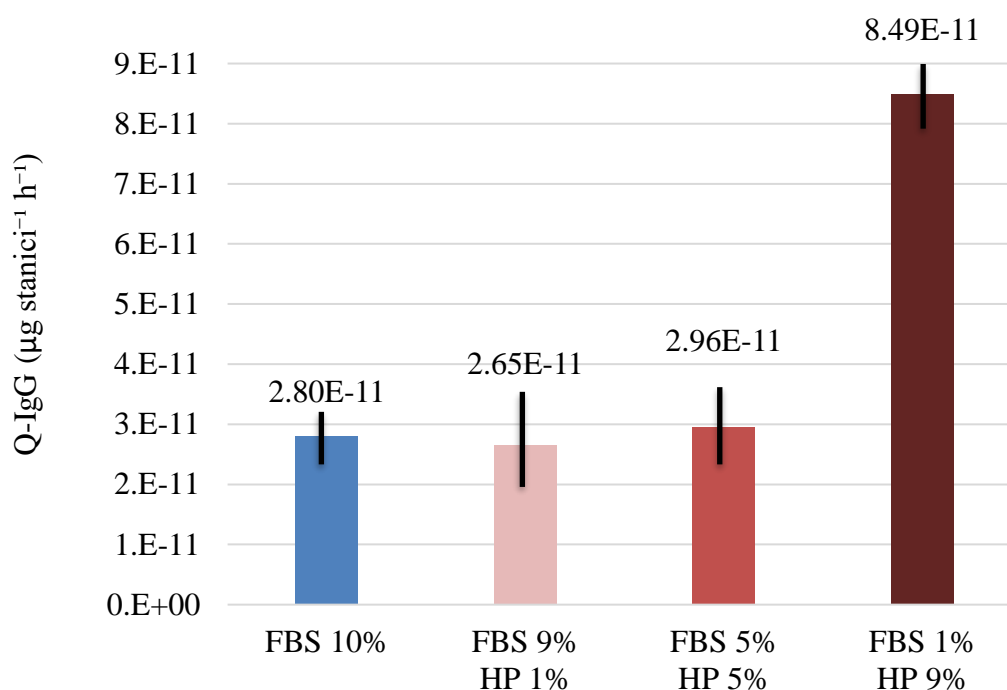


Slika 15. Specifična brzina potrošnje glukoze (mol stanica⁻¹ h⁻¹ 10⁻⁶) CHO DP-12 stanica u mediju s različitim udjelom FBS i hidrolizata konoplje dobivenog pomoću *Alcalase* (HA).

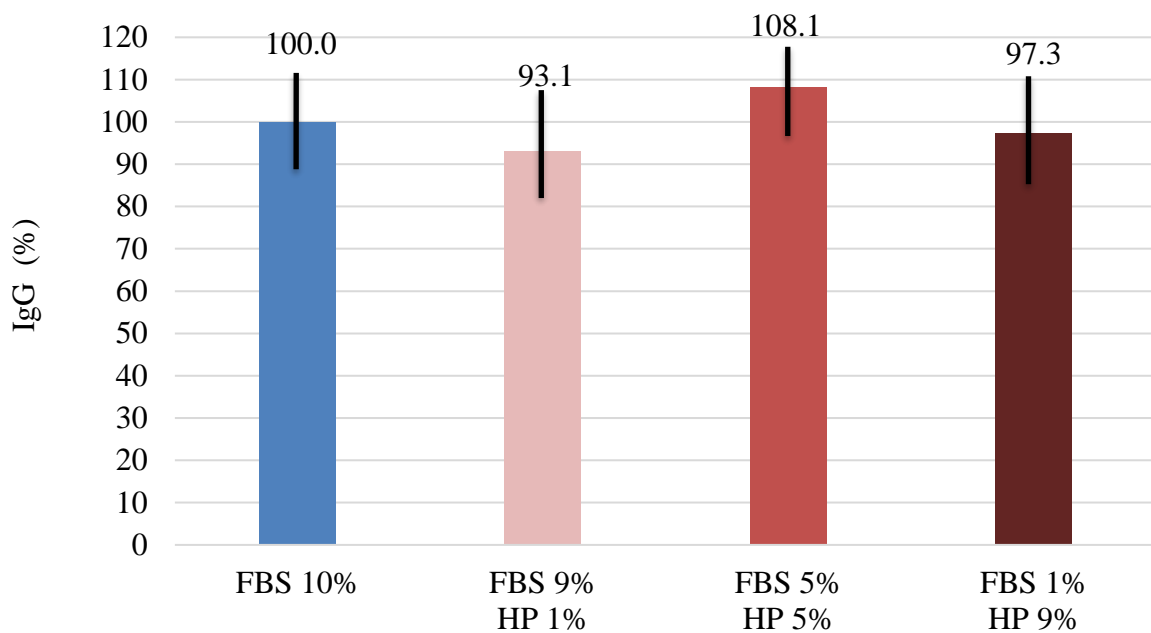
Iz izračunatih specifičnih brzina potrošnje glukoze vidljivo je da je najmanja potrošnja glukoze u kontroli tj. mediju s 10% FBS, bez hidrolizata konoplje. Povećanjem udjela dodanog hidrolizata konoplje povećava se i specifična brzina potrošnja glukoze, no ne može se jednoznačno odrediti korelacija između specifične brzine rasta stanica i specifične brzine potrošnje glukoze. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da je moguće da zbog razlike u kemijskom sastavu seruma i hidrolizata dolazi do povećane potrošnje glukoze čak i kod medija gdje je manja specifična brzina rasta nego kod kontrole.

4.6. PRODUKTIVNOST CHO DP-12 STANICA

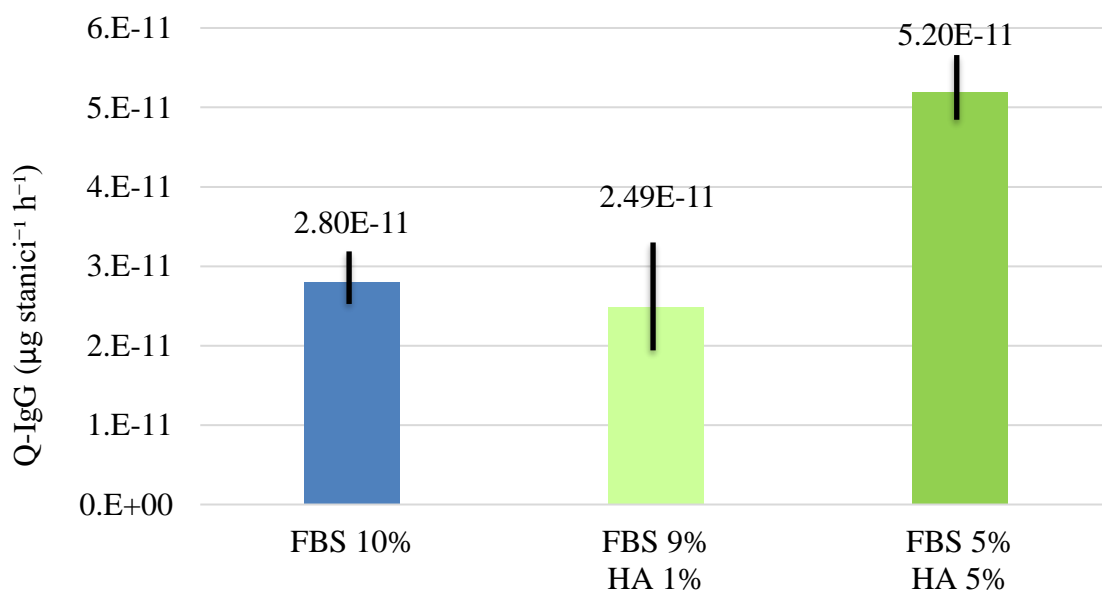
Osim utjecaja različitog udjela dodanog hidrolizata konoplje dobivenog pomoću *Alcalase* i *Protamex* na rast stanica i potrošnju glukoze, praćen je i utjecaj na produktivnost CHO DP-12 stanica. Izračunate su specifična i relativna volumetrijska produktivnost prema izrazima [7] i [8] te su rezultati prikazani grafički na slikama 16.-19.



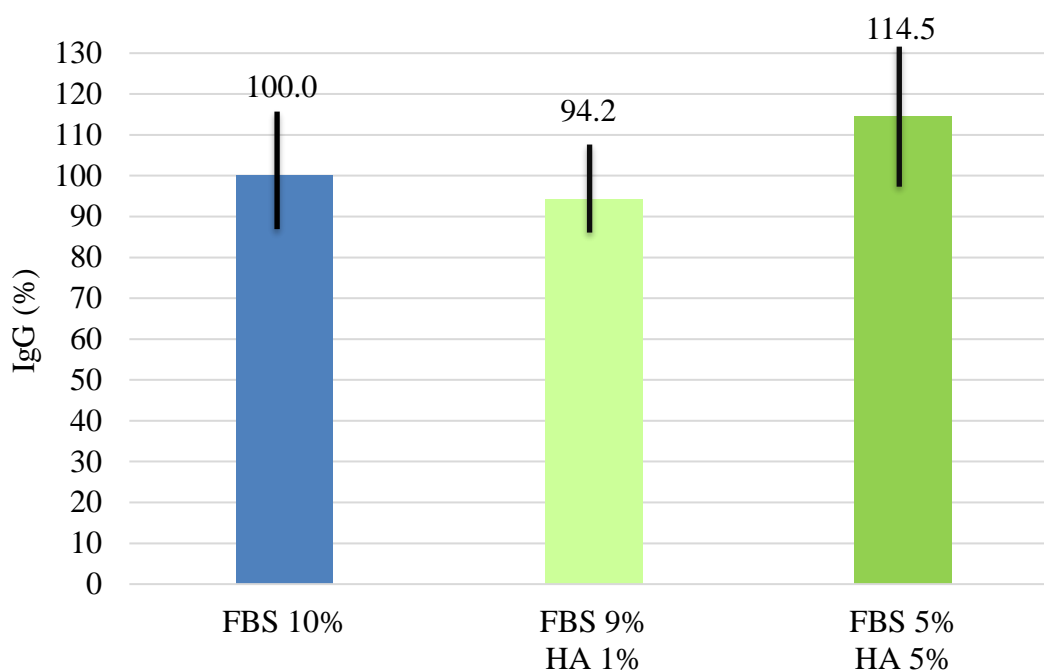
Slika 16. Specifična produktivnost IgG-a CHO DP-12 stanica u mediju s različitim udjelom FBS i hidrolizata proteina konoplje dobivenog pomoću enzima *Protamex*.



Slika 17. Relativna volumetrijska produktivnost IgG-a CHO DP-12 stanične linije u mediju s različitim volumnim udjelom FBS i hidrolizata konoplje dobivenog pomoću *Protamex* (HP).



Slika 18. Specifična produktivnost stanične linije CHO DP-12 u mediju s različitim udjelom FBS i hidrolizata proteina konoplje dobivenog pomoću *Alcalase*.



Slika 19. Relativna volumetrijska produktivnost IgG-a CHO DP-12 stanične linije u mediju s različitim volumnim udjelom FBS i hidrolizata konoplje dobivenog pomoću *Alcalase* (HA).

Iz izračunatih vrijednosti specifične produktivnosti i relativne volumetrijske produktivnosti vidljivo je da je u medijima u kojima je do 90% FBS zamijenjeno hidrolizatima dobivenim pomoću *Protamex* i *Alcalase* postignuta bolja produktivnost CHO DP-12 stanica nego u kontroli, iz čega možemo zaključiti da zamjena 50-90% FBS djeluje stimulatивно na produktivnost stanica. Međutim, kako se na stimulaciju rasta i proliferacije učinkovitije pokazalo zamjena manjeg udjela tj. zamjena 10-50% FBS hidrolizatima možemo kao daljnje smjernice navesti ispitivanje primjene hidrolizata u kasnijim fazama uzgoja. Kako do produkcije IgG kao i ostalih sekundarnih metabolita dolazi većinom u kasnijim fazama staničnog ciklusa bitno je pratiti u kojoj se fazi staničnog ciklusa nalazi proizvodna linija, a u tu svrhu najbolje je koristiti analizu stanica putem tehnika protočne citometrije.

Kao daljne smjernice istraživanja moguće je navesti ispitivanje djelovanja različitih peptidnih frakcija hidrolizata na rast i produktivnost proizvodne stanične linije kako su u predhodnim istraživanjima hidrolizati različitih karakteristika (prema topivosti i veličini peptidne frakcije) pokazali različit utjecaj na CHO stanice. Kao jednu od mogućnosti u dobivanju određenih peptidnih frakcija može se navesti metoda isključne (*size-exclusion*) kromatografije (Chabanon i sur., 2008; Chun i sur., 2007).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Iz brašna uljne pogače konoplje koja sadrži oko 31% (v/w) proteina, izdvojeni su ukupni proteini čistoće preko 82% (v/w).
2. Uspostavljen je postupak uspješne hidrolize proteinskog izolata mikrobnim proteazama *Alcalase* i *Protamex*.
3. Hidrolizat konoplje ne može se koristiti kao potpuna zamjena za serum s obzirom da se zamjenom 90% seruma hidrolizatom konoplje postiže inhibicijski utjecaj na rast CHO DP-12 stanica.
4. Male doze hidrolizata, tj. zamjena 10-50% seruma hidrolizatom konoplje može djelovati stimulativno na rast i proliferaciju CHO DP-12 stanica.
5. Zamjena 50% seruma proteinskim hidrolizatom konoplje pokazala je najbolji učinak na povećanje produktivnost CHO DP-12

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 04. prosinca 2018.

Arora, M. (2016) Cell Culture Media: A Review < <https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>>. Pristupljeno 2. prosinca 2018.

Besler, M., Kasel, U., Wichmann, G. (2002) Review: Determination of Hidden Allergens in Foods by Immunoassays. Internet Symposium on Food Allergens. *J. Agric. Food. Chem.* **4**, 1-18.

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.

Brckan, J., Katić, M. (2013) Utjecaj parametara proizvodnje na kemijski sastav nerafiniranih ulja konoplje, Zagreb.

Butler, M. (2004) *Animal Cell Culture and Technology*, 2. izd., Garland Science/Bios Scientific Publishers, New York, str 30-98.

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.

Callaway, J. C. (2004) Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* **140**, 65–72.

Chabanon, G., Alves da Costa, L., Farges, B., Harscoat, C., Chenu, S., Goergen, 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.

Chiou, M. J., Chen, L. K., Peng, K. C., Pan, C.Y., Lin, T. L., Chen, J.Y. (2009) Stable expression in a Chinese hamster ovary (CHO) cell line of bioactive recombinant chelonianin, which plays an important role in protecting fish against pathogenic infection. *Dev Comp. Immuno.* **33**, 117–126

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.

Chun, C., Heineken, K., Szeto, D., Ryll, T., Chamow, S., Chung, J. D. (2003) Application of factorial design to accelerate identification of CHO growth factor requirements. *Biotechnology Prog.* **19**, 52–57.

Deparis, V., Durrieu, C., Schweizer, M., Marc, I., Goergen, J.L., Chevalot, I., Marc, A. (2003) Promoting effect of rapeseed proteins and peptides on Sf9 insect cell growth. *Cytotechnology* **42**, 75-85.

Dunn, M. J. (2000) *Gel Electrophoresis: Proteins*, BIOS Sci. Pub., Oxford.

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.

Freshney, R.I. (2000) *Animal Cell Culture*, 2.izd., Oxford University Press, New York.

Girgih, A. T., He, R., Alashi, A. M., Malomo, S. A., Aluko, R. E. (2014a) Preventive and treatment effects of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) meal protein hydrolysate against blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Nutr.* **53**, 1237–1246.

Gorphien, S., Paul, B., Walowitz, J, Keen, R., Biddle, W., Jayme, D. (2000) *Biotechnology Progress* **16**.

Heidemann, R., Zhang, C., Qi, H., Rule, J. L., Rozales, C., Park, S., Chuppa, S., Ray, M., Michaels, J., Konstantinov, K., Naveh, D. (2000) The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnology* **32**, 157–167.

House, J.D., Neufeld, J., Leson, G. (2010) Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 11801-11807.

Huang, E.P., Marquis, C.P., Gray, P. (2007) Development of Super-CHO protein-free medium based on a statistical design. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **82**, 431–441.

Isinguzo, G. (2011) Physicochemical, Functional and in vitro Bioactive Properties of Hempseed (*Cannabis sativa*) Protein Isolates and Hydrolysates. MSc theses. Faculty of Graduate Studies of the University of Manitoba, Canada.

Keenan, J., Pearson, D., Clynes, M. (2006) The role of recombinant proteins in the development of serum-free media. *Cytotechnology* **50**, 49–56.

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.

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Shahidi, F. (2007) Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroidesleptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem.* **102**, 1317-1327.

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.

Lobo-Alfonso J., Price P., Jayme D. (2010) Benefits and limitations of protein hydrolysates as components of serum-free media for animal cell culture applications. U: *Protein hydrolysates in biotechnology*, (Pasupuleti, V. K., Demain, A. L., ured.) Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York, str. 55-78.

Matthäus B, Brühl L. (2008) Virgin Hemp Seed Oil: An Interesting Niche Product. *Eur. J. Lip. Sci. Tech.* **110**, 655–661.

Miller, W. M., Wilke, C. R., Blanch, H. W. (1989) Transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: I. 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.

Odani, S., Odani, S. (1998) Isolation and Primary Structure of a Methionine and Cystine-Rich Seed Protein of *Cannabis sativa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 650-654.

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.

Pojić, M., Mišan, A., Sakač, M., Dapčević Hadnađev T., Šarić, B., Milovanović, I., Hadnađev, M. (2014) Characterization of Byproducts Originating from Hemp Oil Processing. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 12436–12442.

Pospišil, M. (2013) Ratarstvo. 2. dio – industrijsko bilje. Zrinski, Čakovec.

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

Shapiro, H.M. (2003) Practical Flow Cytometry. 4 izd. Wiley-Liss, New York.

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.

Tang, C., Ten, Z., Wang, X., Yang, X. (2006) Physicochemical and Functional Properties of Hemp (*Cannabis sativa* L.) Protein Isolate. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 8945–8950.

Tang, C., Wang, X., Yang, X. (2009) Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chem.* **114**, 1484-1490.

Teh, S. S., Birch, J. (2013) Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *J. Food Compos. Anal.* **30**, 26-3.

van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, Ä., 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.

Wang, X., Tang, C., Chang, L., Yang, X. (2009) Characterization and Antioxidant Properties of Hemp Protein Hydrolysates Obtained with Neutrase. *Food Technol. Biotechnol.* **47**, 428–434.

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

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