

# Djelovanje proteinskog hidrolizata iz uljne pogače lana na rast i produktivnost CHO DP-12 stanica

---

**Berljavac, Sara**

**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:159:859177>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-14**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

Sara Berljavac  
1014/MB

**DJELOVANJE PROTEINSKOG  
HIDROLIZATA ULJNE POGAČE  
LANA  
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 i Marijanu Logarušiću, mag. ing. na posvećenom vremenu, trudu i prenesenom znanju tijekom provođenja eksperimenata. Također bih se zahvalila doc. dr. sc. Kristini Radošević na izrazitoj susretljivosti i pomoći, kao i svim zaposlenicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na ugodnoj radnoj atmosferi i pristupačnosti.*

*Veliko hvala mojim roditeljima i prijateljima 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

### DJELOVANJE PROTEINSKOG HIDROLIZATA IZ ULJNE POGAČE LANA NA RAST I PRODUKTIVNOST CHO DP-12 STANICA

*Sara Berljavac 1014/MB*

**Sažetak:** Posljednjih desetljeća uočeni su rizici vezani uz korištenje seruma u proizvodnji terapeutika pomoću kultura životinjskih stanica, pa se sve više nastoje razviti mediji bez dodatka seruma. Hidrolizati osiguravaju važne nutrijente stanicama, a osim što mogu potaknuti rast staničnih linija, istraživanja su pokazala da pozitivno utječu i na produktivnost staničnih linija. Cilj ovog rada bio je ispitati učinak proteinskih hidrolizata, dobivenih pomoću enzima *Alcalase*, *Neutralse* i *Protamex*, uljne pogače lana na rast i produktivnost stanične linije CHO DP-12, proizvođača humanog protutijela imunoglobulina (IgG) anti IL-8. Također, istražena je i mogućnost zamjene dijela seruma proizvedenim hidrolizatima. Istraživanje je pokazalo da sva tri proteinska hidrolizata pozitivno djeluju na rast stanica, no samo proteinski hidrolizat dobiven pomoću *Alcalase* ima statistički značajan pozitivan učinak na produktivnost CHO DP-12 stanične linije. Hidrolizati lana mogu se koristiti kao djelomična zamjena za serum s obzirom da je dodatkom i najmanjeg volumnog udjela hidrolizata postignut dobar stanični rast.

**Ključne riječi:** proteinski hidrolizati, monoklonsko protutijelo, CHO DP-12 stanična linija, uljna pogača lana

**Rad sadrži:** 54 stranice, 19 slika, 1 tablicu, 33 literaturna navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof. dr. Višnja Gaurina Srček
2. Izv. prof. dr. sc. Igor Slivac
3. Doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
4. Prof. dr. sc. Ksenija Durgo

**Datum obrane:** 18. srpnja 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 FLAXSEED CAKE PROTEIN HYDROLYSATE ON GROWTH AND PRODUCTIVITY OF CHO DP-12 CELLS**

*Sara Berljavac 1014/MB*

**Abstract:** Scientists are trying to develop a serum free medium because of the risks associated with the use of serum in the production of therapeutics using animal cell cultures. Hydrolysates provide important nutrients to the cells and cause growth stimulation and positive effect on the productivity of cell lines. The aim of this study was to investigate the effect of protein hydrolysates from flaxseed cake obtained by the Alcalase, Neutrase and Protamex enzymes on the growth and productivity of CHO DP-12 cell lines, producers of immunoglobulin (IgG) anti IL-8. Also, the possibility of replacing part of serum with hydrolysates was investigated. Research has shown that all protein hydrolysates positively affect cell growth but only the protein hydrolysate obtained with Alcalase has a statistically significant positive effect on the productivity. Flax hydrolysates can be used as a partial substitution for serum since a good cell growth has been achieved by addition of the smallest volume of hydrolysates.

**Keywords:** protein hydrolysate, monoclonal antibody, CHO DP-12 cell line, flaxseed cake

**Thesis contains:** 54 pages, 19 figures, 1 table, 33 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD.* Igor Slivac, Associate professor

**Reviewers:**

1. *Ph.D.* Višnja Gaurina Srček, full professor
2. *Ph.D.* Igor Slivac, associate professor
3. *Ph.D.* Andreja Leboš Pavunc, assistant professor
4. *Ph.D.* Ksenija Durgo, full professor

**Thesis defended:** 18 July 2019

## Sadržaj

|                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. UVOD</b> .....                                                                                                              | 1  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....                                                                                                     | 3  |
| <b>2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA</b> .....                                                                                    | 3  |
| 2.1.1. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica.....                                                                                    | 5  |
| 2.1.2. Faze rasta životinjskih stanica .....                                                                                      | 6  |
| 2.1.3. Metabolizam u kulturi životinjskih stanica.....                                                                            | 8  |
| 2.1.3.1. Metabolizam glukoze u životinjskim stanicama.....                                                                        | 9  |
| 2.1.4. CHO stanična linija .....                                                                                                  | 10 |
| <b>2.2. HRANJIVI MEDIJ ZA UZGOJ STANICA</b> .....                                                                                 | 10 |
| 2.2.1. Serum .....                                                                                                                | 13 |
| 2.2.2. Hidrolizati proteina kao sastojci medija bez seruma .....                                                                  | 14 |
| <b>2.3. LAN - PROIZVODNJA I SASTAV</b> .....                                                                                      | 15 |
| 2.3.1. Pogača lana.....                                                                                                           | 16 |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....                                                                                               | 17 |
| <b>3.1. MATERIJALI</b> .....                                                                                                      | 17 |
| 3.1.1. Kemikalije .....                                                                                                           | 17 |
| 3.1.2. Otopine .....                                                                                                              | 18 |
| 3.1.3. Uređaji i oprema.....                                                                                                      | 21 |
| 3.1.4. Stanična linija CHO-DP12 .....                                                                                             | 22 |
| <b>3.2 METODE RADA</b> .....                                                                                                      | 23 |
| 3.2.1. Priprava proteinskog hidrolizata lana .....                                                                                | 23 |
| 3.2.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u .....                                                                | 23 |
| 3.2.3. Određivanje stupnja hidrolize.....                                                                                         | 25 |
| 3.2.4. SDS-PAGE elektroforeza proteina iz uzoraka proteinskih hidrolizata lana .....                                              | 25 |
| 3.2.5. Uzgoj CHO-DP12 stanica u T-bocama .....                                                                                    | 26 |
| 3.2.6. Utjecaj dodatka proteinskog hidrolizata lana na rast i produktivnost stanica CHO DP-12.....                                | 26 |
| 3.2.7. Određivanje broja stanica metodom <i>Trypan Blue</i> .....                                                                 | 27 |
| 3.2.8. Određivanje koncentracije glukoze u hranjivom mediju .....                                                                 | 28 |
| 3.2.9. Određivanje koncentracije laktata u hranjivom mediju .....                                                                 | 29 |
| 3.2.10. Određivanje koncentracije IgG u hranjivom mediju .....                                                                    | 29 |
| 3.2.11. Izračunavanje parametara rasta CHO DP-12 stanica.....                                                                     | 30 |
| 3.2.11.1. Određivanje specifične brzine rasta stanica.....                                                                        | 30 |
| 3.2.11.2. Određivanje volumetrijske produktivnosti.....                                                                           | 30 |
| 3.2.12. Statistička obrada podataka .....                                                                                         | 31 |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....                                                                                              | 31 |
| <b>4.1. ODREĐIVANJE STUPNJA HIDROLIZE I OPTIMIZACIJA PROCESA LANA POMOĆU<br/>    PROTEAZA ALCALASE, NEUTRASE I PROTAMEX</b> ..... | 33 |



|                                                                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.2. RAST CHO-DP12 STANICA U MEDIJU S RAZLIČITIM UDJELOM SERUMA .....</b>                                                                                        | <b>36</b> |
| <b>4.3. UČINAK DODATKA RAZLIČITIH VOLUMNIH UDJELA HIDROLIZATA LANA DOBIVENOG POMOĆU ENZIMA ALCALASE NA RAST, PRODUKTIVNOST I METABOLIZAM CHO DP-12 STANICA.....</b> | <b>39</b> |
| <b>4.4. UČINAK DODATKA RAZLIČITIH VOLUMNIH UDJELA HIDROLIZATA LANA DOBIVENOG POMOĆU ENZIMA NEUTRASE NA RAST, PRODUKTIVNOST I METABOLIZAM CHO DP-12 STANICA.....</b> | <b>43</b> |
| <b>4.5. UČINAK DODATKA RAZLIČITIH VOLUMNIH UDJELA HIDROLIZATA LANA DOBIVENOG POMOĆU ENZIMA PROTAMEX NA RAST, PRODUKTIVNOST I METABOLIZAM CHO DP-12 STANICA.....</b> | <b>46</b> |
| <b>5. ZAKLJUČCI.....</b>                                                                                                                                            | <b>50</b> |
| <b>6. LITERATURA.....</b>                                                                                                                                           | <b>51</b> |

# 1. UVOD

Kulture životinjskih stanica se sve više koriste za proizvodnju biofarmaceutika, jedna od strategija koja može osigurati visoku produktivnost i proliferaciju stanica je promjena formulacije medija za uzgoj stanica. Dodatak seruma, hidrolizata animalnih tkiva i peptona stanicama osigurava potrebne nutrijente i faktore za rast, no upotrebom nutrijenata životinjskog porijekla javlja se rizik od kontaminacija virusima, prionima i mikoplazmama, a moguće su i promjene u glikolizaciji sekretornih proteina. Kvaliteta i sastav ovakvih suplemenata redovito varira, što je onda „usko grlo“ u primijeni tzv. dobre proizvođačke prakse ili tzv. *GMP*. Pored toga ti dodaci sadrže brojne proteine koje treba ukloniti prilikom pročišćavanja rekombinantno proizvedenog proteina što dodatno poskupljuje cijeli tehnološki postupak (Spearman i sur., 2014). Zbog navedenih nedostataka nutritivnih komponenti životinjskog porijekla, traže se rješenja koja bi pomogla u optimizaciji medija za uzgoj stanica. Jedan od značajnih i u posljednje vrijeme najaktualnijih pristupa je promjena izvora proteina (i njihovih derivata) odnosno primjena hidrolizata biljnog porijekla.

Proteinski hidrolizati su poznati kao potencijalni izvor metabolizirajućih komponenti uključujući aminokiseline, oligopeptide, soli željeza, neke lipide i elemente u tragovima. U posljednje vrijeme sve se više fokusira na upotrebu biljnih hidrolizata zbog niza pozitivnih učinaka na životinjske stanične kulture (Chun i sur., 2007). Do sada su provedena brojna istraživanja, a Farges-Haddani i sur. (2006) su pokazali da hidrolizat uljne repice u kombinaciji sa RPMI medijem rezultira jednim sigurnim *serum-free* medijem. Takav medij je jednostavan, potpuno definiran i može se koristiti za kultivaciju stanica u šaržnim uvjetima s miješanjem, za brzu prilagodbu staničnih linija na *serum-free* medij te za bolju staničnu vijabilnost i oporavak nakon smrzavanja.

Uljne pogače su nusproizvodi dobiveni nakon ekstrakcije ulja iz sjemenki, a zbog visokog udjela proteina koriste se kao hrana za životinje. Zbog sve veće težnje za ekonomskom i ekološkom održivošću nastoje se naći i novi načini za iskorištavanje takvih nusproizvoda. Stoga, uljne pogače imaju primjenu i u biotehnološkoj industriji za proizvodnju enzima, antibiotika, biopesticida, vitamina i drugih kemikalija. Osim toga koriste se i kao dodaci hrani te za pripremu proteinskih hidrolizata (Ramachandran i sur., 2006). Jedan od primjera nutritivno značajnih pogača je i lanena pogača koja sadrži proteine, lignane, topiva

vlakna, minerale i vitamine, te ostale bioaktivne komponente. Zbog toga se danas koristi u različite svrhe i privlači interes industrije (Ćapin, 2016).

Na temelju dosadašnjih istraživanja i dokazanih učinaka proteinskih hidrolizata biljnog porijekla na rast i produktivnost staničnih linija, cilj ovog rada bio je ispitati učinak proteinskog hidrolizata uljne pogače lana pripremljenog pomoću tri proteolitička enzima: *Alcalase*, *Neutrase* i *Protamex* na rast i produktivnost stanične linije CHO DP-12 koja proizvodi rekombinantno humano protutijelo imunoglobulin (IgG) anti IL-8. Također, ispitana je i mogućnost zamjene dijela seruma pripremljenim hidrolizatima.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA

Pod kulturom stanica podrazumijevamo proces u kojem prokariotske, eukariotske ili biljne stanice rastu u kontroliranim uvjetima. Kultura životinjskih stanica je uzgoj stanica koje su izolirane iz različitih tkiva životinja i prenesene u umjetni hranjivi medij. Takve pojedinačne stanice izdvojene iz tkiva ili organa mogu se održavati u umjetnom okolišu i smatrati zasebnim organizmom u *in vitro* uvjetima. Kulture životinjskih stanica obično sadrže stanice jednog tipa (npr. fibroblasti). Također, stanice u kulturi mogu biti genetički identične i takve nazivamo homogenom populacijom ili mogu pokazivati genetičke varijacije, stoga je to heterogena populacija. Homogena populacija koja je potekla iz jedne roditeljske stanice naziva se klon i sve su stanice iz klonalne populacije genetički jednake.

Kulture životinjskih stanica mogu se podijeliti na :

- primarne kulture
- stanične linije
- stanične sojeve

Primarne kulture stanica izoliraju se direktno iz organa ili tkiva kemijskom, enzimskom ili mehaničkom razgradnjom te se prenese u medij za uzgoj. Takve stanice su heterogene i zadržavaju svojstva tkiva iz kojeg su izolirane te u *in vitro* uvjetima održavaju svojstva *in vivo*. Zbog toga su najpogodnije za ispitivanje svojstava i odgovora koje daju diferencirane stanice. S obzirom na to da primarne kulture imaju ograničen kapacitet rasta i životni vijek, subkultiviranjem i imortalizacijom primarnih kultura postižu se stanične linije.

Subkultivirane stanice dizajnirane su tako da formiraju populaciju stanica jednog tipa te mogu biti konačne (netransformirane) ili kontinuirane (transformirane). Konačne stanične linije su najčešće dobivene iz normalnog tkiva i imaju ograničen broj generacija, dok su kontinuirane dobivene iz tumorskog tkiva i mogu tvoriti besmrtne stanice. Besmrtne stanice mogu nastati spontano ili procesom tzv. neoplastične transformacije inducirane kemijskim agensom ili fizikalnim postupkom. Najveća učinkovitost imortalizacije stanica postiže se ipak viralnom infekcijom, integracijom virusnih gena ili onkogeni u stanični genom te overekspresijom gena koji reguliraju stanični ciklus uključujući i reaktivaciju telomeraznog

gena. Besmrtnost i klonalnost nužne su za rad sa stanicama jer osiguravaju stabilnost i predvidljivost u ponašanju kulture. Obje vrste staničnih linija mogu se propagirati iz dobro karakterizirane banke stanica u kojima se čuvaju krioprotektivnim tehnikama (Alves i sur., 2008). Selekcijom i kloniranjem primarne kulture ili stanične linije može se razviti stanični soj.

Stanične linije i sojeve koje koristimo u tehnologiji životinjskih stanica mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine ovisno o tome je li im za rast potrebno osigurati površinu za prihvaćanje ili ne. Dijelimo ih na adherentne stanice i suspenzijske stanice. Adherentne su one koje rastu jedino prihvaćene za čvrstu površinu, dok suspenzijske mogu rasti i neovisno o površini tj. kao suspendirane čestice u tekućem mediju, uz odgovarajuću dinamiku miješanja.

Sve primarne kulture i većina diploidnih staničnih linija raste pričvršćeno za površinu. Rast adherentnih stanica može započeti tek nakon njihovog prihvaćanja i vezanja na prikladnu površinu. Za uspješno prihvaćanje i uzgoj adherentnih stanica koristi se mnogo različitih materijala poput stakla (aluminij-borsilikatno), plastike, želatine (kolagen) ili metala (titan, čelik). Vrlo je bitno da ti materijali ne ugrožavaju stanicu, da nisu toksični, te da pružaju mehaničku sigurnost. Najčešće korišteni su plastične mase (polistiren, polietilen, polikarbonat, PVC, teflon), dekstran, celuloza i kolagen (Freshney, 2010). Nakon što se uspostavi početno prihvaćanje za površinu prilikom kojeg stanice mijenjaju oblik iz kuglastog u spljošteni, stanice počinju rasti i razmnožavati se.

Kulture životinjskih stanica danas se koriste u :

- u istraživanjima fiziologije ili biokemijskih procesa u stanicama
- testiranjima različitih tvari na specifičnim tipovima stanica, poput metabolita, hormona ili faktora rasta
- proizvodnji umjetnih tkiva kombinacijom specifičnih tipova stanica u nizu (npr. umjetna koža)
- sintezi visokovrijednih proizvoda u većoj količini (virusna cjepiva, monoklonska protutijela, terapijski rekombinantni glikoproteini)

Prednosti primjene kulture životinjskih stanica su dobivanje ponovljivih i pouzdanih rezultata zbog mogućnosti korištenja istog tipa stanica ili čak homogene populacije tj. klonova; bolja mogućnost kontrole staničnog okoliša (temperatura, pH, kisik, hranjive tvari, proizvodi metabolizma), razumijevanje procesa za pojedini tip stanica, manja količina reagensa i smanjenje broja pokusnih životinja. Nedostaci su visoki troškovi početnih ulaganja, nabava medija i seruma za uzgoj, diferencijacija stanica tijekom vremena i njihov gubitak

proizvodnih svojstava te potrebno znanje i iskustvo te posebno obučeno osoblje za rad s kulturama stanica (Butler, 2004).

Prvu animalnu kulturu je uspješno uspostavio Ross Harrison 1907. godine, no one su tek nakon 40-ak godina zaista postale dostupne znanstvenicima. Razlog tomu je i razvoj antibiotika koji su olakšali i riješili problem kontaminacije, te razne metode i tehnike poput korištenja tripsina za odvajanje stanica. Zbog potrebe za cjepivima došlo je i do dizajniranja procesa u velikom mjerilu za uzgoj stanica sisavaca, no još veći interes za takve stanične kulture povezan je s razvojem tehnologije rekombinantnih proteina 1970-ih i 1980-ih godina.

Razvoj tehnologije životinjskih stanica kreće još 1880. godine kada je Wilhem Roux održavao pileće embrije u otopini soli. Ross Harrison je 1907. godine bio jedan od prvih koji je pokazao staničnu kulturu *in vitro* i razvio metodu viseće kapi pomoću koje je mogao promatrati elongaciju živčanih vlakna kroz nekoliko tjedana. Između 1910. i 1920. godine Alexis Carrel je koristio aseptičnu tehniku kako bi uspostavio dugotrajne stanične kulture, a Rous i Jones su koristili tripsin za odvajanje adherentnih stanica od podloge. Između 1950. i 1960. godine važniji događaji bili su uspostavljanje HeLa stanične kulture te Eagleovo razvijanje kemijski definiranog medija za kulture stanica (Butler, 2004).

### 2.1.1. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica

Jedan od najvećih problema u radu s kulturama stanica je mogućnost kontaminacije mikroorganizmima (najčešće bakterije, plijesni i kvasci). Iz tog razloga treba poznavati tehnike i steći iskustvo u radu s kulturama stanica, te održavati aseptične uvjete. Oprema za rad dijeli se u osnovnu i dodatnu. Osnovna oprema podrazumijeva komoru za sterilan rad (laminar), koja cirkulacijom zraka kroz HEPA filter omogućuje sterilne uvjete tijekom rada i precjepljivanja stanica, CO<sub>2</sub> inkubator koji osigurava konstantnu temperaturu, koncentraciju CO<sub>2</sub> i vlažnost tijekom uzgoja stanica, autoklav za sterilizaciju otopina i pribora, te svjetlosni mikroskop za svakodnevno praćenje rasta stanica i općeg stanja kulture. Dodatna oprema uključuje hladnjake, zamrzivače, centrifuge, miješalice, pipete, posude za uzgoj stanica itd. Prije rada u laminaru potrebno je radnu površinu prebrisati 70 % etanolom i uključiti UV-svjetlo, sterilizirati posuđe i reagense, nositi odgovarajuću zaštitnu odjeću.

Osim sterilnih uvjeta, stanicama je potrebno osigurati i povoljan okoliš u kojem će moći rasti i dijeliti se, što uključuje i fizikalno-kemijske parametre poput optimalne temperature, pH, hranjivog medija, osmolalnosti. Optimalna temperatura za staničnu kulturu

ovisi o tjelesnoj temperaturi životinje iz koje su stanice izolirane. Preporučena temperatura za humane stanice i stanice potekle iz toplokrvnih životinja je 37 °C, za stanice ptica 38 °C, a hladnokrvne životinje od 18-25 °C. Temperatura u inkubatoru se obično namjesti na nešto nižu od optimalne jer je pregrijavanje opasnije nego snižavanje temperature. Ukoliko je temperatura niža od optimalne stanice će sporije rasti jer će doći do usporavanja metabolizma, no dođe li do povećanja temperature javlja se rizik od adaptivnog šoka kod stanica. Nužno je održavati konzistentnost temperature radi reproducibilnosti te su dozvoljena odstupanja od  $\pm 0,5$  °C.

Optimalni pH za većinu stanica je 7,4, iako se on razlikuje između različitih staničnih sojeva, no uglavnom se podešava na vrijednost između 7-7,4. Do promijene pH vrijednosti može doći zbog CO<sub>2</sub> koji uzrokuje povišenje, dok prekomjerna proizvodnja laktata pri visokim koncentracijama stanica uzrokuje sniženje pH. Kako bi se promjena lakše uočila, u hranjivi medij dodaje se indikator fenol crveno koji sniženjem pH ispod 7,0 mijenja boju iz crvene u narančastu, pa u žutu, a povišenjem pH iznad 7,6 u ružičastu, zatim u ljubičastu. Za stabilizaciju pH potreban je pufer koji se također dodaje u medij. Jedan od najčešćih je bikarbonatni pufer zbog toga što nutritivno pridonosi kulturi, niske je toksičnosti i niske cijene (Freshney, 2010).

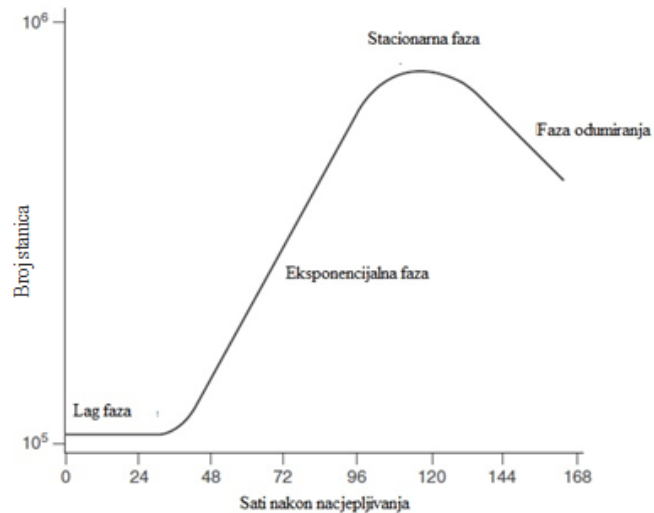
Stanice ne bi mogle rasti i razmnožavati se bez hranjivog medija koji sadrži hranjive tvari poput ugljikohidrata i aminokiselina, tj. kataboličke supstrate koji se razgrađuju te stanicama pružaju energiju. Osim navedenog medij mora sadržavati i vitamine, anorganske soli te serum sisavaca koji stanicama osigurava prisutnost hormona, faktora rasta i drugih hranjivih komponenti (Ryan, 2008). Osmolalnost je važna za protok supstanci u i van stanice, te vrijednost koja je prihvatljiva za većinu stanica je između 260 mOsm kg<sup>-1</sup> i 320 mOsm kg<sup>-1</sup>. Također, važnu ulogu pri uzgoju stanica ima i sastav atmosfere, stoga se on kontrolira uzgojem u inkubatoru, a sastav čini 5 % CO<sub>2</sub> i 95 % zraka.

### 2.1.2. Faze rasta životinjskih stanica

Prilikom rasta, stanične kulture pokazuju sigmoidalnu krivulju ukoliko su im zadovoljeni uvjeti. Krivulja rasta odraz je adaptacije kulture, okolišnih uvjeta, dostupnosti hranjivih tvari i površine za prihvaćanje, te učinkovitosti. Faze staničnog rasta su :

- Lag faza,

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



**Slika 1.** Tipična krivulja rasta stanica (Davis, 2011).

Lag faza, tijekom koje se stanice ne dijele, započinje nakon naciopljivanja i traje 2 do 24 sata. Tijekom ove faze adherentne stanice resintetiziraju elemente glikokaliksa izgubljene tripsinizacijom, vežu se i šire po površini za prihvaćanje (Leo i sur., 2008). Trajanje ove faze ovisi o nekoliko faktora, uključujući fazu rasta u kojoj su stanice bile prije naciopljivanja na novu površinu te o koncentraciji stanica koja se naciopljuje. Stanice naciopljene u većoj početnoj koncentraciji imat će kraći period lag faze, dok će onima naciopljenim u manjoj početnoj koncentraciji trebati više vremena da se adaptiraju na medij (Davis, 2011).

Eksponecijalna (log) faza je period u kojem dolazi do aktivne proliferacije tijekom kojeg se broj stanica povećava eksponecijalno. U log fazi, postotak stanica koje se nalaze u staničnom ciklusu je 90-100 %, te se smatra da su u ovom stadiju najvitalnije. Faktori koji utječu na trajanje eksponecijalne faze su gustoća naciopljenih stanica, brzina rasta te dostupnost površine za rast. Također, vrlo bitni faktori su i sastav medija, dostupnost kisika, temperatura itd. (Davis, 2011).

Nakon eksponecijalne faze rast stanica se usporava zbog postizanja konfluentnosti i/ili nedostatka esencijalnih nutrijenata te one ulaze u stacionarnu fazu. Tijekom stacionarne faze brzina rasta stanica jednaka je brzini odumiranja te značajne promjene u broju stanica



nema. Osim zbog niske koncentracije nutrijenata, brzina rasta stanica smanjuje se i zbog nakupljanja inhibitornih produkata metabolizma stanica. Također, dolazi i do kontaktne inhibicije uslijed formiranja monosloja koji prekriva površinu za rast, te se nove stanice ne mogu prihvatiti za podlogu. Stacionarna faza je poprilično bitna s obzirom da stanice tijekom njezinog trajanja sintetiziraju specifične proteine. Stoga, dodatkom svježeg hranjivog medija možemo ju produžiti te osigurati veću proizvodnju sekundarnih metabolita od interesa.

Posljednja faza je faza odumiranja u kojoj dolazi do pada gustoće stanica. Zbog iscrpljenosti samih stanica, nedostatka nutrijenata, kisika, zbog kontaktne inhibicije i inhibicije nastalim metabolitima, više stanica umire nego što nastaje. Dva su mehanizma stanične smrti, programirana stanična smrt tj. nekroza i apoptoza, stanična smrt pod utjecajem vanjskih čimbenika (Leo i sur., 2008).

### 2.1.3. Metabolizam u kulturi životinjskih stanica

Metabolizam je skup svih kemijskih reakcija koje se odvijaju u stanici, a regulirane su brojnim enzimima. Svrha metabolizma je osigurati kemijsku energiju pomoću svjetlosne energije ili razgradnjom energetski bogatih nutrijenata iz okoliša, pretvoriti nutrijente i prekursorske molekule u makromolekule koje su potrebne za izgradnju stanice, polimerizirati monomere u makromolekule (proteini, nukleinske kiseline, polisaharidi) te sintetizirati i razgraditi biomolekule potrebne za posebne stanične funkcije. Cijela ta mreža reakcija funkcionira pomoću enzima koji ih kataliziraju te su svi metabolički putevi regulirani na nekoliko razina u stanici.

Stanice koje su izolirane iz animalnog tkiva nastavit će svoj rast ukoliko ih se opskrbljuje nutrijentima i faktorima rasta koji im dozvoljavaju da rastu kao nezavisne jedinice i dijele se mitozom.

Animalne stanice kao izvor energije zahtijevaju ugljikohidrate, najčešće glukozu te aminokiselinu glutamin. Kataboličkom razgradnjom ovih supstrata nastaju dva koenzima (ATP i NADH) koji su esencijalni za vijabilnost stanica. Koncentracija supstrata s ugljikom i dušikom u hranjivom mediju također utječe na energetski status i metabolizam stanica, dok su lipidi značajni kao prekursori za sintezu komponenti stanične membrane (Amable i Butler, 2008).

Metabolizmom mogu nastati primarni i sekundarni metaboliti. Primarni metaboliti nastaju primarnim metabolizmom, koji se najčešće odvija za vrijeme log faze rasta. To su

spojevi koji mogu biti gradivne jedinice ili makromolekule, te se neke mogu ponašati kao enzimi, tj. bitni su za rast, razvoj, funkcioniranje i reprodukciju stanica (ugljikohidrati, aminokiseline, organske kiseline, purini, pirimidini, vitamini). Sekundarni metaboliti su spojevi koji nisu esencijalni za strukturu i funkciju stanice, ne utječu direktno na njezin rast i razvoj, ali imaju veliku ulogu kod održavanja metaboličkih aktivnosti i zdravlja stanice. Sekundarni metaboliti nastaju sekundarnim metabolizmom, uglavnom tijekom stacionarne faze raste i neki od njih su antibiotici, hormoni, interferoni, polipeptidni faktori rasta te terapijski proteini (Sateesh, 2003).

### *2.1.3.1. Metabolizam glukoze u životinjskim stanicama*

Glukoza je monosaharid, šećer koji je vrlo bitan za metabolizam i stvaranje energije u stanicama sisavaca. Glukoza se može metabolizirati glikolizom, citratnim ciklusom ili pentoza fosfatnim putem te na taj način osloboditi energiju. Također, osim energije, ovaj monosaharid osigurava i prekursora za formiranje riboze, kroz pentoza fosfatni put, koja je izuzetno bitna kao gradivna jedinica nukleinskih kiselina (Petch i Butler, 1994).

Tijekom glikolize iz jedne molekule glukoze nastaju dvije molekule piruvata, dvije molekule ATP-a, dvije molekule NADH, te velik broj intermedijera za biosinteze. U aerobnim uvjetima piruvat koji nastaje kao krajnji produkt glikolize oksidira se u acetat (acetyl-CoA) koji ulazi u citratni ciklus te se oksidira u  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ , pri čemu se sintetizira još intermedijera za biosintezu te 36 molekula ATP-a. Međutim, tijekom nepotpune oksidacije glukoze tijekom glikolize, tj. u prisustvu anaerobnih uvjeta glavni produkt bit će laktat. Tada nastaje puno manje energije tj. samo 2 molekule ATP-a. U većini staničnih kultura se samo mala količina glukoze potpuno oksidira putem citratnog ciklusa.

Nakon što se stanice resuspendiraju u svježem mediju koji obično sadrži 5-25 mM koncentraciju glukoze moraju se prilagoditi novim uvjetima. Kao rezultat, stanična potrošnja glukoze i proizvodnja laktata je najviša u početnoj fazi kulture te se kasnije smanjuje. Početkom eksponencijalne faze stanice imaju visoku specifičnu brzinu utroška glukoze i glutamina, te u slučaju animalnih stanica i visoku proizvodnju laktata. Povećanjem vremena uzgoja stanica potrošnja glukoze i formiranje laktata smanjuje se kako koncentracija nutrijenata u mediju opada (Neerman i Wagner, 1996). Na metabolizam glukoze osim same njezine koncentracije mogu još utjecati i okolišni uvjeti kao što su temperatura i pH (Petch i Butler, 1994).

#### 2.1.4. CHO stanična linija

Stanična linija CHO (eng. *Chinese Hamster Ovary*) jedna je od najčešće korištenih staničnih linija za proizvodnju rekombinantnih proteina. Ovu staničnu liniju ovarija kineskog hrčka uspostavio je Theodor T. Puck 1957. godine. CHO stanice su epitelne stanice koje prekrivaju organe i šupljine, rastu kao pojedinačne stanice, lako se održavaju u kulturi te su stabilne. Jedne su od glavnih stanica koje se koriste zbog dobrog rasta kao adherentne, ali i suspenzijske stanice. Podložne su genetičkim modifikacijama, a metode za transfekciju stanica, ekspresiju rekombinantnih proteina i selekciju klonova dobro su karakterizirane.

Odobrena biotehnološka primjena kroz tzv. dobru proizvođačku praksu (*GMP, Good Manufacturing Practice*), od strane nadležnih nacionalnih regulatornih institucija (FDA, *Food and Drug Administration* i EMA, *The European Medicines Agency*), relativno lagana adaptacija na medij bez seruma i dobro proučeni i razvijeni procesi uzgoja CHO stanica u velikim mjerilima samo su neki od razloga njihove široke uporabe. Također, uz sve naprednije tehnike kloniranja i genomskih izmjena, razvijene su visokoproduktivne stabilne stanične linije koje mogu proizvesti do  $10 \text{ g L}^{-1}$  rekombinantnog proteina (Wurm i Wurm, 2017). Proizvedeni proteini su sekretorni tj. bivaju izlučeni u medij što znatno olakšava njihovu izolaciju i pročišćavanje kao proizvoda (Omasa, 2010). Osim toga, rekombinantni proteini nastali u CHO stanicama su funkcionalno i strukturno slični nativnim jer su pojedini stanični sojevi izmijenjeni na način da provode posttranslacijske modifikacije (poglavito glikozilaciju) nalik onoj u ljudskim stanicama. To ih čini idealnim za proizvodnju proteina dijagnostičke i terapijske primjene. Preko 35 % rekombinantnih terapeutika danas se proizvodi u CHO stanicama, u usporedbi s drugim ekspresijskim sustavima poput *E. coli* (29 %) i *S. cerevisiae* (16 %), sam taj podatak dovoljno govori o važnosti te stanične linije (Wurm, 2013).

## 2.2. HRANJIVI MEDIJ ZA UZGOJ STANICA

Životinjske stanice u kulturi zahtijevaju uvjete slične onima *in vivo*, a to se odnosi na temperaturu, kisik, ugljikov dioksid, pH, osmolalnost i nutrijente. U *in vivo* uvjetima stanice se opskrbljuju nutrijentima putem cirkulacije krvi, stoga za rast u *in vitro* uvjetima zahtijevaju kompleksnu kombinaciju nutrijenata. Stanične kulture su se na početku, iz prethodno

navedenih razloga, uzgajale u prirodnom mediju baziranom na ekstraktima tkiva i tjelesnim tekućinama poput ekstrakata pilećih embrija, plazme, seruma i limfe (Moraes i sur., 2008). Sve veći razvitak tehnologije životinjskih stanica zahtijevao je veće količine medija što je konačno dovelo do uspostavljanja kemijski definiranog medija. *Eagle's Basal Medium* (BME) i *Eagle's Minimal Essential Medium* (MEM) postali su široko prihvaćeni i primjenjivani uz dodatke goveđeg, humanog ili konjskog seruma, proteinskih hidrolizata i ekstrakata embrija. No, zbog daljnjeg razvoja tehnologije i uspostavljanja kultura različitih stanica bilo je nužno razviti slične medije u svrhu prilagođavanja pojedinim stanicama. Započeo je i proces optimizacije te zamjene seruma, stoga je jedan od najkorištenijih medija postao DMEM (*Dulbecco's modification of Eagle's medium*) koji ima visok udio aminokiselina i vitamina (Freshney, 2010).

Hranjivi medij stanicama mora osigurati esencijalne nutrijente, vitamine, kofaktore, metaboličke supstrate, aminokiseline, anorganske ione te elemente u tragovima potrebne za normalno funkcioniranje i razvoj novih stanica. Osim elemenata bitnih za rast u medij se dodaje i pufer zbog održavanja optimalne pH vrijednosti. Na taj način eliminira se utjecaj kiselih otpadnih produkata metabolizma poput CO<sub>2</sub> i laktata. Najčešći pufer koji se koristi je bikarbonatni pufer koji se kombinira s atmosferom CO<sub>2</sub> od 5-10 % kako bi se održao pH medija. U nekim slučajevima može se koristiti i neki drugi pufer poput HEPES-a, no s obzirom da su bikarbonati potrebni stanicama i kao nutrijenti znanstvenici ih češće biraju (Davis, 2011).

Voda je jedna od osnovnih komponenti medija i s obzirom da ona može biti jedan od izvora kontaminacija životinjske stanice su poprilično osjetljive na njezinu kvalitetu. Potencijalni kontaminanti u vodi su anorganski spojevi (metali, željezo, kalcij, klor), organski spojevi (detergenti), mikroorganizmi te njihovi proizvodi (endotoksini, pirogeni). Kako bi se uklonile sve neželjene čestice voda se priprema i pročišćava posebnim standardiziranim tehnikama (Moraes i sur., 2008).

Ugljikohidrati su glavni izvor energije koji koriste stanične kulture, a glukoza je sastavni dio većine hranjivih medija. Metabolizira se glikolizom do piruvata koji se može prevesti u laktat ili acetoacetat tj. završno do CO<sub>2</sub>, ovisno metabolizira li se aerobnim ili anaerobnim putem. Oba produkta dovest će do acidifikacije medija, a osim promijene pH, ustanovljeno je i da laktat može biti toksičan za stanice. Osim glukoze, mogu se koristiti i šećeri kao što su maltoza, saharoza, fruktoza, galaktoza i manoza te su neka istraživanja pokazala da se metabolizmom alternativnih šećera reducira nakupljanje laktata (Davis, 2011).

Esencijalne aminokiseline su one koje se ne sintetiziraju u tijelu, a potrebne su stanicama. Među esencijalne aminokiseline ubrajamo arginin, cistein, histidin, izoleucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan i valin, a osim njih često se dodaju i cistein i tirozin, s obzirom da različite stanice zahtijevaju i različite aminokiseline. One su bitne za sintezu proteina, lipida, nukleotida, a mogu se koristiti i kao izvor energije. Glavni izvori ovih značajnih komponenti su proteinski hidrolizati ili hidrolizati biljnog porijekla. Koncentracija aminokiselina koja se dodaje u medij za uzgoj najčešće iznosi između 0,1 i 1 mM. Koncentracija aminokiselina obično limitira maksimalnu koncentraciju stanica i uravnotežuje preživljenje stanica i njihov rast. Glutamin je glavna aminokiselina koju zahtijevaju sve stanične kulture. Izvor je ugljika, dušika, energije i obično se u medij dodaje u visokoj koncentraciji od 1-5 mM. Jedan od problema koji se javlja prilikom dodavanja glutamina je njegova spontana degradacija. Zbog svoje nestabilnosti radi temperaturne osjetljivosti, u mediju za uzgoj stanica ima polu život od 3-5 dana, te dolazi do nakupljanja amonijaka kao nusprodukta, a on može biti toksičan. Kao alternativa umjesto glutamina dodaje se glutamax, alanil-glutamin dipeptid koji je stabilan, a u slučaju dodavanja glutamina potrebno ga je skladištiti zamrznuto i dodati u boce s medijem netom prije upotrebe (Davis, 2011).

Vitamini se u mediju koriste kao enzimski kofaktori, potrebni za glavni metabolizam u stanici. Askorbinska kiselina je potrebna za sintezu kolagena, vitamin A utječe na rast i diferencijaciju stanica, vitamin K je bitan za pravilno procesiranje proteina, dok vitamin D regulira transport kalcija (Moraes i sur., 2008). Većina stanica zahtijeva komplekse vitamina B koji su značajni za rast stanica i umnožavanje, te se često nalaze u osnovnom mediju zbog topljivosti u vodi (Freshney, 2010).

Zbog uspostavljanja osmotskog pritiska, puferiranja medija, uspostavljanja membranskog potencijala, te osiguravanja kofaktora enzimima u medij se dodaju i uravnotežene otopine soli. Najbitniji ioni su :  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  i  $\text{HCO}_3^-$  (Davis, 2011).

Antibiotici se dodaju u medij za uzgoj stanica radi reduciranja kontaminacija, najviše u slučaju nemogućnosti sterilizacije materijala, izbjegavanja posljedica nepažljivog aseptičnog rada i slično. No, postoji mnogo negativnih strana korištenja antibiotika u hranjivom mediju poput razvitka rezistentnih organizama, mogućnost prikrivanja infekcija mikoplazmama, antimetabolički učinak na stanice sisavaca itd. (Freshney, 2010).

### 2.2.1. Serum

Serum je bezstanična krvna komponenta koja se dobiva zgrušavanjem krvi životinjskog podrijetla. To je kompleksna smjesa koja se dodaje u medij za uzgoj stanica jer stimulira rast i druge stanične aktivnosti, potiče sposobnost adhezije stanica pomoću specifičnih proteina (također inhibira djelovanje tripsina) te osigurava stanicama proteine potrebne za transport hormona, minerala i lipida itd. Glavne sastavnice seruma su aminokiseline, faktori rasta, vitamini, hormoni, proteini, lipidi i minerali (Moraes i sur., 2008). Neki od važnih proteina su albumin, transferin i fibronektin, od hormona inzulin, glukagon, hormon rasta te prostaglandini, a od vitamina askorbinska kiselina, vitamin A, vitamini B skupine i vitamin E. Najviše se koristi goveđi serum, posebno onaj fetalnog podrijetla (FBS) zbog visokog udjela faktora rasta, a niske koncentracije protutijela (Davis, 2010). Obično se u medij za uzgoj dodaju koncentracije od 5-10 % (v/v) seruma.

Upotreba seruma životinjskog porijekla u staničnim kulturama ima i brojne nedostatke. Gledano iz perspektive stanične biologije jedan od problema može predstavljati varijabilnost sastava seruma, te zbog nepotpuno istraženog i kemijski nedefiniranog sastava seruma može se javiti opasnost od toksičnosti za neke tipove stanica zbog prisutnosti neprikladne količine specifičnih faktora rasta. Također, postoji i opasnost od endotoksina i mikrobnih kontaminacija (fungi, bakterije, mikoplazme, virusi, prioni), tako da svaku šaržu treba dodatno ispitati. Osim toga, s obzirom da se tijekom godine u svijetu proizvede 500 000 litara seruma za koje je potrebno više od 1 000 000 goveđih fetusa javlja se i etičko pitanje (Brunner i sur., 2010). Tijekom posljednjih desetljeća uočeni su rizici vezani uz korištenje seruma u proizvodnji terapeutika pomoću kultura životinjskih stanica, stoga se sve više nastoji razviti medij bez dodatka seruma.

Hayashi i Sato su 1976. godine među prvima zamijenili serum dodatkom odabranih hormona koji su poticali rast i stimulirali diferencijaciju specifičnih stanica te na taj način razvili kemijski definirani, *serum-free* medij. U posljednjih 10 godina proučavanje staničnih funkcija dovelo je do spoznaje mnogih komponenti koje su vrlo korisne u formiranju medija za uzgoj bez dodatka seruma. Priprava takvog medija započinje od osnovnog medija DMEM/Ham's F-12 (50:50 %, v/v) obogaćenog s inzulinom, transferinom i selenom (ITS). Radi vezanja adherentnih stanica na površinu podloge dodaju se faktori za pričvršćivanje, zatim hormoni i faktori rasta. Ovisno o tipu stanica mogu se dodati i stanično specifični

faktori rasta poput nervnog faktora rasta kod neurona. Na kraju dodaju se i lipidi, antioksidansi i vitamini čime se povećava specifičnost medija bez seruma (van der Valk i sur., 2010).

### 2.2.2. Hidrolizati proteina kao sastojci medija bez seruma

Proteinski hidrolizati komercijalno su dostupni iz animalnih tkiva, mliječnih proizvoda, mikroorganizama i biljaka te su poznati kao potencijalni izvori metabolizirajućih komponenti uključujući aminokiseline, oligopeptide, soli željeza, neke lipide i elemente u tragovima. Smatra se da je to koncentrirana i izbalansirana smjesa nutrijenata koja djelomično ili potpuno može zamijeniti serum. Neka istraživanja su pokazala da su hidrolizati odlični dodaci nutrijenata koji pozitivno utječu na rast stanica, produktivnost i kvalitetu proizvoda. U posljednje vrijeme sve se više fokusira na upotrebu hidrolizata biljnog podrijetla jer njihove frakcije imaju niz pozitivnih učinaka na životinjske stanične kulture (Chun i sur., 2007).

Biljni proteinski hidrolizati mogu biti izvor kratkih lančanih peptida s biološkim svojstvima koji uključuju imunomodulaciju, antimikrobni, antitrombotski i antipiretski učinak te učinak na inhibiciju proteaza, kao i na rast i aktivnost stanica sisavaca. Nekoliko studija pokazalo je da biljni peptoni osim što mogu biti dobri nutrijenti također mogu povećati produktivnost stanica i suprimirati njihovu apoptozu. Oligopeptidi koji se nalaze u hidrolizatima razlikuju se po veličini, hidrofobnosti i naboju, stoga ne pokazuju istu biološku aktivnost. Prije upotrebe potrebno je pročistiti i fracionirati hidrolizate jer je pokazano da različite frakcije peptida ne utječu jednako na produktivnost i kapacitet životinjskih stanica. No, cijeli taj proces može biti skup pogotovo ukoliko se radi o većim količinama i industrijskom mjerilu. Ispitivanje djelovanja nefracioniranog hidrolizata i frakcija hidrolizata uljane repice pokazalo je da ukupni hidrolizat nije imao učinak na kinetiku stanica dok su frakcije pokazivale ili citotoksični učinak ili bolju proliferaciju staničnih linija. Neke proteinske frakcije hidrolizata uljane repice u kombinaciji sa RPMI osnovnim medijem pokazale su vrlo jednostavan *serum-free* medij koji nije kompromitirao rast stanica, već je čak i smanjio odumiranje stanica u usporedbi s medijem koji sadrži animalni serum. Kao posljedica pojavila se i povećana proizvodnja rekombinantnih proteina (Frages-Haddani i sur., 2006). Trenutne spoznaje ne mogu potpuno odgovoriti na pitanje javlja li se pozitivan učinak hidrolizata zbog malih peptidnih frakcija ili velikih peptida. Jako mali peptidi i slobodne

masne kiseline pridonose nutritivnoj vrijednosti medija, dok oni veći mogu djelovati kao signalne molekule oponašajući faktore rasta i preživljavanja (Franek i sur., 2000).

Proteinski hidrolizati se rutinski koriste kao hranjiva dopuna staničnim kulturama, no najprije je potrebno ispitati pravu dozu hidrolizata koja u kombinaciji s medijem najbolje doprinosi rastu stanica, vijabilnosti i povećanoj proizvodnji proteina. Mogu djelomično ili potpuno zamijeniti serum u osnovnom mediju, a mogu se dobiti kiselinskom ili enzimskom hidrolizom proteinskih izolata (Babcock i sur., 2010). Ukoliko se hidrolizati dobivaju pomoću enzima, njihova priroda i sastav peptidne smjese ovisit će o specifičnosti enzima, uvjetima u kojima on djeluje te trajanju postupka digestije. Istraživanje koje su proveli Chabanon i suradnici pokazalo je da je specifičnost enzima vrlo bitna jer peptidi slične veličine i istog aminokiselinskog sastava nisu pokazivali istu učinkovitost (Chabanon i sur., 2008).

Istraživanje u kojem su se uspoređivala djelovanja hidrolizata soje, pšenice i sjemena pamuka dodanih u kemijski definirani medij pokazalo je zanimljivo djelovanje hidrolizata sjemena pamuka koji je produžio vijabilnost stanica. Osim toga, pokazano je da u nekim slučajevima kombinacija suplemenata koji se dodaju u kemijski definirani medij može dati bolji rezultat od pojedinačnih. Primjer je dodatak pšeničnog hidrolizata i rekombinantnog humanog albumina što je rezultiralo znatno višom proizvodnjom IgG-a CHO stanica. Sam dodatak rekombinantnog humanog albumina povećava proizvodnju za više od 30 %, dok je ovom kombinacijom vrijednost porasla na nešto više od 180 %. Uvođenje ovakvih suplemenata koji djeluju sinergistički postaje sve popularnije u razvoju i optimizaciji *upstream* procesa. Danas, 6 do 10 biofarmaceutskih proizvođača aktivno koristi proteinske hidrolizate kao dodatke kemijski definiranim medijima (Babcock i sur., 2010).

### **2.3. LAN - PROIZVODNJA I SASTAV**

Lan je jednogodišnja biljka iz obitelji *Linaceae* koja uključuje 10 rodova u više od 150 vrsta, a uzgaja se za proizvodnju tekstilnih vlakana i sjemena. Sorte lana koje se koriste za proizvodnju tekstilnih vlakana imaju dužu stabljiku i manje sjeme, dok sorte koje se koriste za dobivanje ulja imaju kraće i jako razgranate stabljike te veći broj sjemenki. Lan za rast i razvoj zahtjeva plodno tlo fine teksture i ilovačka tla (pijesak, mulj i glina). Jedan je od najbogatijih prehrambenih izvora esencijalne  $\alpha$ -linolenske masne kiseline jer njegovo sjeme sadrži čak 40 % ulja, a najviše polinezasićenih masnih kiselina. Osim toga sadrži i oko 20 % proteina, 30 % topivih vlakna te je bogat lignanima, mineralima i vitaminima (Ćapin, 2016).



### 2.3.1. Pogača lana

U posljednjih nekoliko desetljeća povećano je iskorištavanje organskih ostataka iz različitih područja agrikulture i industrije. Ostaci usjeva poput mekinja, ostataka šećerne trske, sjemenki voća i slično smatraju se potencijalnim sirovim materijalima u bioprocima jer pružaju izvrstan supstrat za rast mikroorganizama i omogućuju im osnovne nutrijente. Uljne pogače su nusproizvodi dobiveni nakon ekstrakcije ulja iz sjemenki. Postoje dva tipa uljnih pogača, jestive i nejestive. Jestive imaju visoku nutritivnu vrijednost, pogotovo udio proteina od 15 % do 50 %, a sastav im ovisi o vrsti, uvjetima uzgoja i metodama ekstrakcije. Zbog visokog udjela proteina koriste se kao hrana za životinje, pogotovo preživače i ribe. Nejestive se koriste kao organska gnojiva bogata dušikom i za neke je potvrđeno da povećavaju udio dušika u biljkama, ali i štite ih od nematoda, insekata i parazita. Sastav i nutritivna svojstva uljnih pogača variraju ovisno o kvaliteti sjemenki, tj. sirovine te metodi ekstrakcije ulja, uvjetima skladištenja itd. Uljne pogače se koriste široko za proizvodnju industrijskih enzima, antibiotika, biopesticida, vitamina i drugih biokemikalija. Također, često se koriste i kao dodaci hrani te za pripremu proteinskih hidrolizata, izvor energije itd. (Ramachandran i sur., 2006).

Lanena pogača je nusproizvod, odnosno kruti ostatak koji je nastao hladnim prešanjem lanenih sjemenki. Sve se više koristi u različite svrhe npr. kao obnovljivi izvor energije, stočna hrana, sirovinna osnova za izolaciju proteina, vlakna i ostalih bioaktivnih komponenti. Najzastupljeniji minerali u pogači lana su kalcij, mangan, fosfor i kalij, a što se tiče masnih kiselina, najzastupljenija je linolenska s udjelom od 58,5-59,7 %, a slijede ju linolna s 15,8-16,9 % i oleinska s 15,0-15,6 % (Ogunronbi, 2011). Pogača lana je i bitan izvor lignana i fenolnih kiselina, te proteina i polisaharida. Odmašćena pogača se podvrgava centrifugiranju, pa se zatim iz tekućeg dijela dobivaju proteini, a iz krutog polisaharidi. Udio proteina iznosi 27,3 %, dok je udio polisaharida 10,7 % (Gutierrez, 2010).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 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, Gubco BRL, SAD

Tripsin-EDTA, Sigma, St. Louis, SAD

Tripan-plavo, Sigma, St. Louis, SAD

Natrijev hidroksid, Kemika, Hrvatska

Natrijev karbonat, Kemika, Hrvatska

Bakrov sulfat pentahidrat, Kemika, Hrvatska

Kalij natrij tetrahidrat, Kemika, Hrvatska

$\beta$ -merkaptoetanol, LKB, Bromma, Švedska

Bromfenol plavo, Kemika, Zagreb, RH

*Coomassie* plavo, Sigma, St. Louis, SAD

EDTA (Kompleksal III), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Octena kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Glicerol, Kemika, Zagreb, Hrvatska

TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin), 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 18

Bisakrilamid (N,N'-metilenbisakrilamid), Fluka, Buchs, Švicarska

Amonijev persulfat, LKB, Bromma, Švedska

D-glukoza, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Enzim *Alcalase*, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Enzim *Neutrase*, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Enzim *Protamex*, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

### 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 |

### Otopina TCA (0,22 M)

10 % triklor-octena kiselina (TCA)

90 % destilirana voda

### 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)  $\beta$ -merkaptoetanol

50 mM Tris-HCl pH=6,8

### Gel za sabijanje

4,5 % (m/v) akrilamid 19

0,12 % (m/v) *N, N'* – metilenbisakrilamid

0,1 % (m/v) SDS

0,075 % (v/v) *N, N, N', N'*- tetrametiletildiamin (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

25 mM TRIS-glicin pufer pH=6,8

Coomassie otopina za bojanje gelova

0,25 % Coomassie plavo boja

10 % ledena octena kiselina

50 % glicerol

destilirana voda

Reagens za određivanje glukoze

fosfatni pufer (pH 7.5) 0,1 mol L<sup>-1</sup>

fenol 0,75 mmol L<sup>-1</sup>

4-Aminoantipirin 0,25 mmol L<sup>-1</sup>

glukozaoksidaza (GOD) ≥ 15 kU L<sup>-1</sup>

peroksidaza (POD) ≥ 1,5 kU L<sup>-1</sup>

Standard za određivanje glukoze

Glukoza 100 mg dL<sup>-1</sup> (5,55 mmol L<sup>-1</sup>)

Reagens za određivanje laktata

Tris pufer (pH 7,5) 150 mmol L<sup>-1</sup>

laktat oksidaza (LOD) > 0,3 kU L<sup>-1</sup>

peroksidaza (POD) > 1,0 kU L<sup>-1</sup>

|                  |                          |
|------------------|--------------------------|
| 4-Aminoantipirin | 0,3 mmol L <sup>-1</sup> |
| TBHB*            | 2,5 mmol L <sup>-1</sup> |

\*Tribrom-3-hidroksibenzenska kiselina

Standard za određivanje laktata

|        |                        |
|--------|------------------------|
| Laktat | 30 mg dL <sup>-1</sup> |
|--------|------------------------|

Reagensi za određivanje Imunoglobulina G2

R1:

|                     |                          |
|---------------------|--------------------------|
| Tris pufer (pH 7,8) | 200 mmol L <sup>-1</sup> |
| NaCl                | 85 mmol L <sup>-1</sup>  |
| Polietilenglikol    | 3,5 %                    |
| Konzervans          | < 0,1 %                  |

R2:

Anti-human IgG antitijelo (koza)

|                     |                          |
|---------------------|--------------------------|
| TRIS pufer (pH 7,8) | 200 mmol L <sup>-1</sup> |
| NaCl                | 400 mmol L <sup>-1</sup> |
| Konzervans          | < 0,1 %                  |

3.1.3. Uređaji i oprema

- inkubator s kontroliranom atmosferom CO<sub>2</sub> , 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 cm<sup>2</sup> i 50 cm<sup>2</sup> , 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
- digitalna magnetna mješalica Model 682/1
- SevenCompact pH/Ion, Mettler-Toledo

#### 3.1.4. Stanična linija CHO-DP12

Stanična linija CHO-DP12 je adherentna stanična linija fibroblasta ovarija kineskog hrčka. Klon navedene stanične linije proizvodi anti-IL8, rekombinantno humano monoklonsko protutijelo, izotopa IgG. Pohranjena je u *American Type Cell Colletion* banci 8 Manassas, Virginia, SAD, kao stanična linija (ATCC®CRL 12444™).

## 3.2 METODE RADA

### 3.2.1. Priprava proteinskog hidrolizata lana

Proteinski hidrolizat dobiven je enzimski, iz proteinskog izolata lana, komercijalnim mikrobnim proteazama *Alcalase*, *Neutralse* i *Protamex*. Odvagano je 4 g liofiliziranog proteinskog izolata lana i otopljeno u 80 mL destilirane vode, a enzimi su dodani 5 % (v/w) prema supstratu. Otopina proteinskog izolata je zagrijana, te joj je podešen pH na uvjete optimalne za djelovanje pojedinog enzima, 55 °C i pH 8,5 za *Alcalase*, 55 °C i pH 7,0 za *Neutralse* te 50 °C i pH 7,0 za *Protamex*. Vrijeme provođenja hidrolize bilo je 240 min, a uzorci za određivanje stupnja hidrolize uzeti su prije dodatka enzima, te za vrijeme djelovanja u 5, 30, 60, 90, 120, 180 i 240 minuti. Svaki uzeti uzorak inkubiran je 10 minuta na temperaturi vrenja zbog deaktivacije enzima.

### 3.2.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u

Metoda za određivanje koncentracije proteina po Lowry-u temelji se na reakciji bakrenih iona vezanih na amino skupine peptidne veze i fenolne skupine bočnih ograna aminokiseline tirozin (Tyr) u proteinu s Folin-Ciocalteu reagensom. Prilikom te reakcije nastaje kompleks plavo-ljubičastog obojenja s apsorpcijskim maksimumom pri 740 nm.

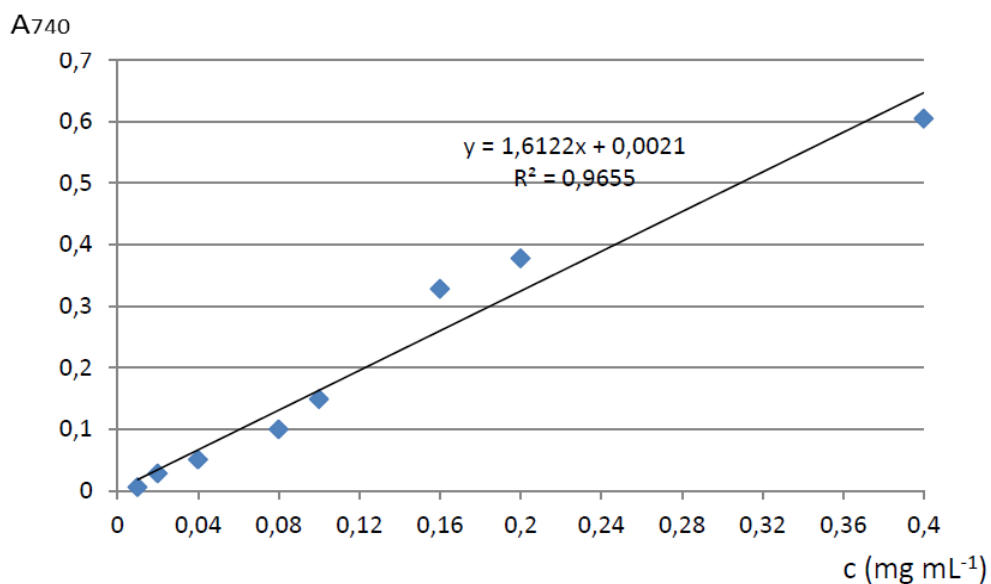
Folin-Ciocalteu (Folinov) reagens sadrži fosfovolframatnu i fosfomolibdensku kiselinu koje se reduciraju u volfram i molibden plavo djelovanjem bakrenih iona koordinirano vezanih na amino skupine peptidne veze i fenolnu skupinu tirozina.

Za određivanje koncentracije proteina iz uzoraka nepoznate koncentracije potrebno je konstruirati baždarni dijagram. U tu svrhu pripremljene su različite koncentracije otopina BSA (*Bovine Serum Albumin*) iz ishodišne otopine,  $\gamma(\text{BSA}) = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Pripremljeno je po 1 mL standardnih otopina (tablica 1.), te je konstruiran baždarni dijagram (slika 2.).



**Tablica 1.** Priprema standardnih otopina BSA

| Uzorak | Koncentracija<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | Volumen BSA<br>(mL) | Volumen vode<br>(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                 |

**Slika 2.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina po Lowry-u

U epruvete je otpipetirano po 200  $\mu$ L otopina standardnog niza razrjeđenja i uzorka (hidrolizat lana ili hranjivi medij s različitim koncentracijama hidrolizata lana) i 1 mL reagensa C uz miješanje na vrtložnoj miješalici te je smjesa inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 15 minuta u svaku epruvetu je naglo na vortex-u dodano 100  $\mu$ L Folin-Ciocalteau reagensa te je smjesa inkubirana u mraku na sobnoj temperaturi 45 minuta.

Apsorbancija standarda i uzoraka proteinskih hidrolizata očitana je pri valnoj duljini 740 nm, uz slijepu probu (S0).

### 3.2.3. Određivanje stupnja hidrolize

Stupanj hidrolize (*DH, degree of hydrolysis*) određuje se kao %-tni udio topljivih proteina u 10 %-tnoj otopini trikloroctene kiseline (TCA) u odnosu na ukupnu količinu proteina u uzorku prema matematičkom izrazu [1]. Ukupna količina proteina u uzorku određuju se metodom po Lowry-u opisanoj u poglavlju 3.2.2. Topljivi proteini se određuju na način da se hidrolizat proteina pomiješa s 0,22 M otopinom TCA u istom omjeru kako bi se dobila topljiva i netopljiva frakcija proteina. Smjesa se najprije inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega se centrifugira 10 minuta na 10000 rpm. Nakon centrifugiranja izdvoji se supernatant u kojem se odredi količina topljivih proteina metodom po Lowry-u.

$$DH(\%) = \frac{\text{količina topljivih proteina(mg)u 0,22 MTCA}}{\text{količina u kupnih proteina (mg)}} \times 100 \quad [1]$$

### 3.2.4. SDS-PAGE elektroforeza proteina iz uzoraka proteinskih hidrolizata lana

Proteini prisutni u uzorcima proteinskih hidrolizata lana 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. Uzorci i smjesa standardnih proteina male molarne mase su zatim nanjeni 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. Tijek elektroforeze praćen je migracijom boje brom fenol plavo. Nakon završetka elektroforeze gel je skinut s ploče i obojan otopinom *Coomassie* plavo te ostavljen preko noći. Odbojavanje gelova provedeno je u otopini za odbojavanje u kojoj se gelovi i čuvaju.

### 3.2.5. Uzgoj CHO-DP12 stanica u T-bocama

Uzgoj započinje odmrzavanjem stanica koje se čuvaju zamrznute u mediju za zamrzavanje na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ampule sa zamrznutim stanicama ( $1\text{ mL}$ ) u koncentraciji od  $1\cdot 10^7$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  odmrznu se naglim uranjanjem u vodenu kupelj na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sadržaj se prenese u sterilnu kivetu te se u nju doda  $5\text{--}10\text{ mL}$  medija za uzgoj. Stanice se odvajaju centrifugiranjem tijekom  $5$  minuta na  $1000$  okretaja  $\text{min}^{-1}$ . Supernatant se zatim pažljivo ukloni, a talog stanica se resuspendira u mediju za uzgoj koji sadrži  $5\%$  (v/v) FBS-a. Stanice se prebace u T-bocu koja se stavlja u inkubator na temperaturu od  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  uz odgovarajuću atmosferu ( $95\%$  zraka +  $5\%$   $\text{CO}_2$ ). Uzgoj u T-bocama predstavlja prvu fazu laboratorijskih šaržnih bioprocasa. Pod inverznim mikroskopom se svakodnevno vrši provjera prihvaćanja stanica za podlogu, njihova morfologija, brojnost i opće stanje. Nagla promjena boje DMEM medija, koji standardno sadrži fenolno crvenilo kao indikator, često ukazuje na pojavu kontaminacije u kulturi, stoga je nužno pratiti i boju tijekom uzgoja. Redovito prihranjivanje važno je zbog nadomjestaka sastojaka medija koji se iscrpljuju, te radi uklanjanja proizvoda metabolita kako bi se eliminirao njihov štetan učinak i održao optimalan pH kulture.

### 3.2.6. Utjecaj dodatka proteinskog hidrolizata lana na rast i produktivnost stanica CHO DP-12

Stanice su uzgajane u T-boci sve dok nije uspostavljen monosloj. Prvi korak je uklanjanje medija za uzgoj iz T-boce sterilnom pipetom, a zatim dodavanje tripsina, prethodno odmrznutog i zagrijanog na sobnu temperaturu. Dodano je  $1,5\text{ mL}$  tripsina, odnosno onoliko koliko je potrebno za prekrije cijeli monosloj stanica. Nakon  $5$  do  $10$  minuta inkubacije s tripsinom njegovo djelovanje se provjeri pod inverznim mikroskopom. Ukoliko su sve stanice zaokružene i odvojene od podloge dodaje se volumen od  $3\text{ mL}$  medija s dodatkom seruma kako bi se zaustavilo djelovanje tripsina i spriječilo daljnje razaranje stanica. Nakon toga, stanice u nacijepljene u ploče s  $24$  jažice u početnoj koncentraciji od  $2\cdot 10^4$  st  $\text{mL}^{-1}$  u  $0,5\text{ mL}$  DMEM medija za uzgoj s različitim koncentracijama seruma i proteinskog hidrolizata lana dobivenog pomoću enzima *Alcalase*, *Neutrase* i *Protamex*. Pripremljeni su DMEM mediji za uzgoj koji su sadržavali  $10\%$  FBS, medij s  $9\%$  FBS i  $1\%$  hidrolizata lana, medij s  $5\%$  FBS i  $1\%$  hidrolizata lana, medij s  $5\%$  FBS i  $5\%$  hidrolizata

lana, te mediji s 9 % FBS i 5 % FBS kojima su naknadno dodani hidrolizati tijekom rasta stanica. Dinamika rasta stanica praćena je kroz 10 dana brojanjem u Neubaerovoj komorici uz dodatak boje tripan-plavo. Peti dan uzgoja, stanicama koje su se nalazile u mediju bez hidrolizata, odnosno u mediju koji je sadržavao 9 % FBS i 5 % FBS dodani su hidrolizati lana u koncentracijama koje odgovaraju takvim prethodno pripremljenim medijima s odmah dodanim proteinskim hidrolizatima. Svakih 24 sata hranjivi medij u kojem su se nalazile stanice bio je izuzet i spremljen u Eppendorf kivete za daljnje postupke analize.

### 3.2.7. Određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*

Za određivanje broja stanica koristi se metoda tripan-plavo. Mrtve se stanice razlikuju od živih po tome što se zbog oštećene membrane boje plavo, dok se žive stanice na oboje. Uzorak za brojanje priprema se tako da se sterilnom pipetom ukloni hranjivi medij iz jažica te doda 0,1 mL tripsina, proteolitičkog enzima koji služi za odvajanje adherentnih stanica od podloge za uzgoj. Ploča sa stanicama i tripsinom inkubira se na 37 °C 5 do 10 minuta. Nakon inkubacije, pod reverznim mikroskopom se provjeri djelovanje tripsina, te ukoliko su stanice odvojene od podloge bit će kružnog oblika. Odvojenim stanicama dodaje se 0,2 mL medija sa serumom kako bi se zaustavila reakcija tripsinizacije. Stanice se resuspendiraju te se uzme 10  $\mu$ L suspenzije stanica te 10  $\mu$ L boje tripan plavo. Od tako pripremljenog uzroka uzima se alikvot od 10  $\mu$ L i nanosi na Neubauerovu komoricu (slika 3.). Neubauerova komorica se sastoji od 9 kvadrata (slika 3.) površine 0,0025 mm<sup>2</sup> i dubine 0,1 mm. Stanice se broje u 4 kvadrata koji se nalaze na kutevima velikog kvadrata i podijeljeni su na 16 (4x4) malih kvadrata. Broj stanica se računa prema formuli :

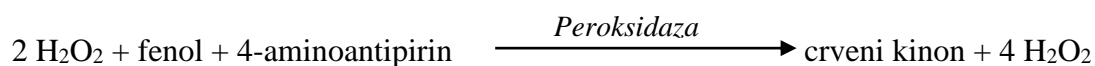
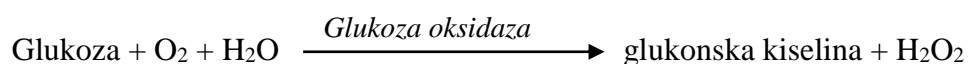
$$\text{Broj stanica mL}^{-1} \text{ suspenzije} = \text{broj stanica izbrojenih u sva 4 kvadrata} \times 5000 \quad [2]$$



**Slika 3.** Neubaerova komorica za brojanje stanica (Anonymous 1, 2019)

### 3.2.8. Određivanje koncentracije glukoze u hranjivom mediju

Koncentracija glukoze određena je kolorimetrijsko-enzimskom PAP metodom koja služi za *in vitro* određivanje. Koncentracija glukoze u uzorcima hranjivog medija za uzgoj određena je spektrofotometrijski prema specifičnim reakcijama :



Standard: glukoza 5 mmol L<sup>-1</sup>

Uvjeti određivanja:

Temperatura 37 °C

Valna duljina 500 nm

Reakcija : porast apsorbancije

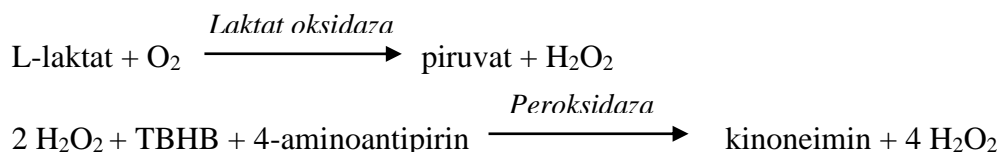
Uzorak je pripremljen na način da je u epruvetu otpipetirano 10 µL uzorka medija za uzgoj ili standarda glukoze, te 1 mL otopine reagensa. Slijepa proba je umjesto uzorka sadržavala destiliranu vodu. Uzorci su zatim inkubirani na temperaturi od 37 °C kroz 10-15 minuta. Mjerenje se provodi u spektrofotometru pri valnoj duljini od 500 nm. Koncentracija

crvenog kinona određuje se na temelju intenziteta obojenja koje daje, a njegova koncentracija je proporcionalna koncentraciji glukoze koja se izračuna prema formuli :

$$\text{Koncentracija glukoze} = \frac{A_{\text{uzorka}}}{A_{\text{standarda}}} \times 5\text{mM} \quad [3]$$

### 3.2.9. Određivanje koncentracije laktata u hranjivom mediju

Laktat je u uzorcima hranjivog medija određen pomoću *Fluitest*<sup>®</sup> testa koji se koristi za kvantitativno određivanje u plazmi ili cerebrospinalnoj tekućini. Radi na temelju reakcije laktat oksidaze koja cijepa laktat u piruvat i vodikov peroksid koji u daljnjim reakcijama, prikazanim ispod, daje crveno obojenje.



Uzorci su pripremljeni na način da je u eprivete dodano 4  $\mu\text{L}$  uzorka ili kalibrotora i 0,5 mL reagensa. Slijepu probu činilo je samo 0,5 mL reagensa. Uzorci su inkubirani 5 minuta na 37 °C nakon čega je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 540 nm. Koncentracija laktata proporcionalna je razvijenom obojenju, a izračunata je prema izrazu :

$$\text{Koncentracija laktata (mmol L}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta A_{\text{uzorak}}}{\Delta A_{\text{kalibrator}}} \times \text{koncentracija kalibratora} \times 0,111 \quad [4]$$

### 3.2.10. Određivanje koncentracije IgG u hranjivom mediju

Koncentracija proizvedenog IgG u hranjivom mediju određena je pomoću imunodetekcijskog kita *Turbidex*<sup>®</sup> IgG-2 testa koji služi za kvantitativnu detekciju IgG-a u humanom serumu, plazmi i cerebrospinalnoj tekućini. Postupak je proveden prema protokolu navedenom u uputama proizvođača. Kao slijepa proba korišten je početni medij za uzgoj

stanica, a svi volumeni navedeni u protokolu umanjani su za 1/3 kako bi se povećala iskoristivost kita.

### 3.2.11. Izračunavanje parametara rasta CHO DP-12 stanica

#### 3.2.11.1. Određivanje specifične brzine rasta stanica

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad [5]$$

x - masa stanica

dx - povećanje biomase stanica

dt - vremenski interval

$\mu$  je konstanta u lag fazi, a približno vrijedi i za fazu usporenog rasta pa vrijedi jednačba:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad [6]$$

Obzirom da je masa proporcionalna broju stanica, tada je :

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{\Delta t} \quad [7]$$

N - broj stanica u 1 mL na kraju log faze

N<sub>0</sub> - broj stanica u 1 mL na početku log faze

$\Delta t$  - vremenski interval (h)

#### 3.2.11.2. Određivanje volumetrijske produktivnosti

$$\text{Volumetrijska produktivnost} = \frac{\text{Koncentracija IgG}}{\text{Volumen} \times \text{Vrijeme}} \quad [8]$$

### 3.2.12. Statistička obrada podataka

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

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

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

Standardna devijacija 
$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - X)^2} \quad [11]$$



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Posljednjih nekoliko desetljeća sve se više nastoje iskoristiti industrijski organski nus-proizvodi jer su potencijalni izvori nutrijenata za mikroorganizme koji mogu proizvoditi visokovrijedne proizvode. Primjer nus-proizvoda kojima se sve više pridaje pažnja i vrijednost su uljne pogače, koje zaostaju nakon proizvodnje jestivih ulja. Uljne pogače se dugo koriste u prehrani peradi, riba i svinja. Bogate su proteinima pa se stoga smatraju dobrim dodacima prehrani. Zbog težnje za smanjenjem troškova u procesima proizvodnje ulja, uljne pogače privukle su pažnju kao dobar izvor proteina za proizvodnju vitamina, industrijskih antibiotika, biopesticida i drugih biokemikalija (Ramachandran i sur., 2007).

Lan je već dugo izvor ulja koje se koristi u proizvodnji boja, no ujedno i u ljudskoj prehrani. Posljednja istraživanja su pokazala da pogača lana ima potencijalnu upotrebu kao izvor bioaktivnih peptida. U istraživanjima je pokazano da takvi peptidi imaju antimikrobna, antihipertenzijska, protuupalna, antioksidacijska i antidijabetička svojstva (Nawachukwu i Aluko, 2018). Lanene sjemenke su bogate proteinima, 31-50 % (w/w) te imaju visok udio aspartatne kiseline, glutaminske kiseline, leucina i arginina (Karamać i sur., 2016).

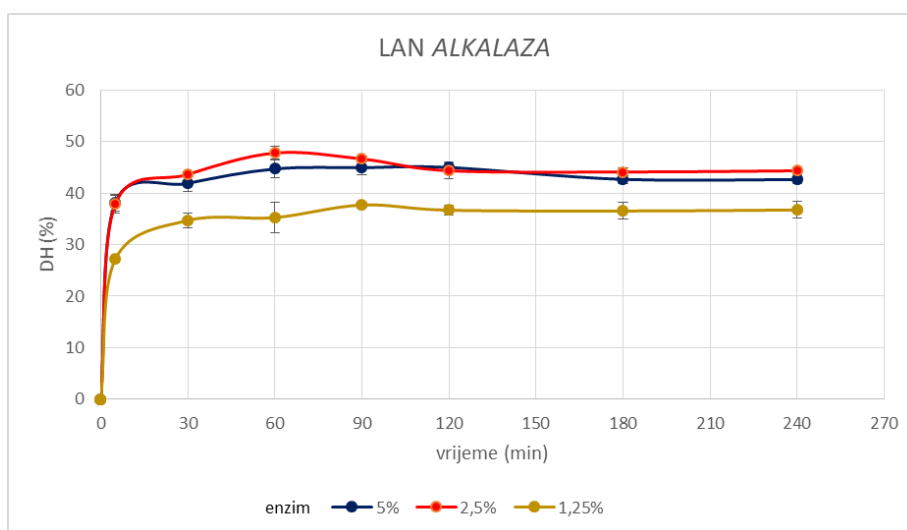
Proteini iz sirovina najčešće se podvrgavaju enzimskoj hidrolizi kako bi se dobili oblici koji omogućavaju lakšu apsorpciju aminokiselina. Enzimska hidroliza je poželjnija od kiselinske jer enzimi imaju veću specifičnost vezanja na proteine i cijepanje veza te daju konzistentne proizvode. Kiselinska hidroliza se provodi pri ekstremnim uvjetima temperature i pH što može rezultirati nastajanjem neželjenih spojeva koji mogu utjecati na sigurnost proizvoda. Inicijalni produkt hidrolize je proteinski hidrolizat koji sadrži peptide koji se razlikuju u duljini i lanca, aminokiselinskim sekvencama i biološkoj aktivnosti. Pokazano je da brojni hidrolizati biljnog podrijetla potiču rast stanica u *serum-free* mediju te se sve više koriste u optimizaciji medija za uzgoj kultura životinjskih stanica, kako bi zamijenio što veći udio seruma (Chabanon i sur., 2008). Hidrolizati osiguravaju važne nutrijente stanicama, a osim što mogu potaknuti rast staničnih linija, istraživanja su pokazala da pozitivno utječu i na produktivnost CHO stanične linije (Frages-Haddani i sur., 2006; Chun i sur., 2007; Babcock i sur., 2010).

S obzirom na dosadašnja istraživanja i obećavajuće rezultate učinaka proteinskih hidrolizata biljnog porijekla te njihovu potencijalnu upotrebu u svrhu izbjegavanja dodataka životinjskog podrijetla, u ovom radu cilj je bio ispitati djelovanje proteinskih hidrolizata lana

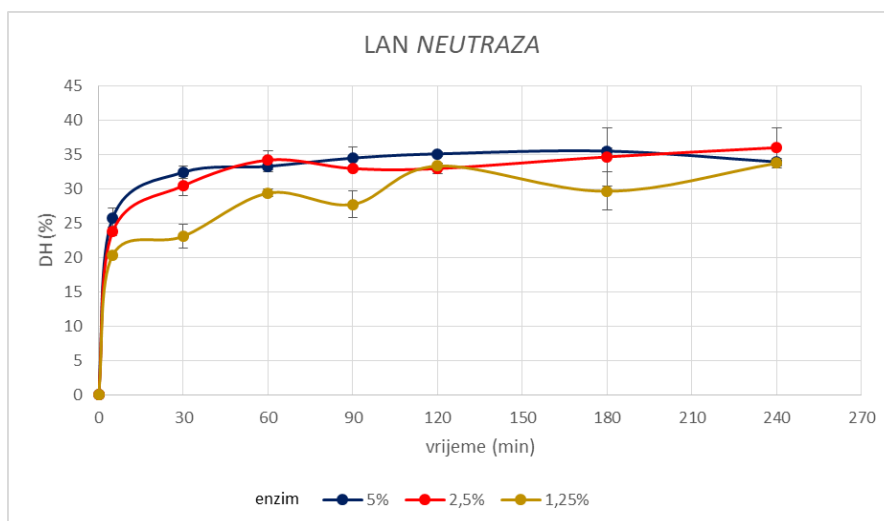
dobivenih pomoću tri proteaze *Alcalase*, *Neutrase* i *Protamex* na rast i produktivnost stanične linije CHO DP-12. Također, provedena je i optimizacija procesa hidrolize promjenom koncentracije enzima sa svrhom pronalaska uvjeta za provedbu najučinkovitije razgradnje proteina tj. dobivanje hidrolizata. Hidrolizati dobiveni najdjelotvornijim i najekonomičnijim postupkom, s obzirom na količinu korištenog enzima, testirani su u staničnoj kulturi kao djelomični supstituenti seruma.

#### 4.1. ODREĐIVANJE STUPNJA HIDROLIZE I OPTIMIZACIJA PROCESA LANA POMOĆU PROTEAZA *ALCALASE*, *NEUTRASE* I *PROTAMEX*

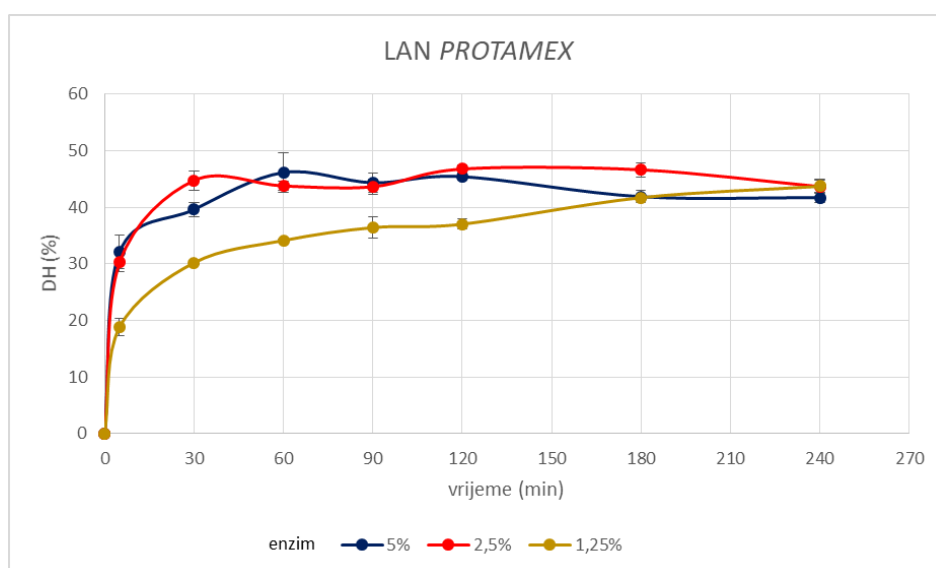
Proteinski izolati lana hidrolizirani su pomoću proteolitičkih enzima *Alcalase*, *Neutrase* i *Protamex* u tri različita eksperimenta. Vrijeme provođenja hidrolize bilo je 240 min, a uzorci za određivanje stupnja hidrolize uzeti su prije dodatka enzima, te za vrijeme djelovanja u 5, 30, 60, 90, 120, 180 i 240 minuti. Za svaki enzim provedena je optimizacija kako bi utvrdili koja količina enzima je dovoljna za postizanje najboljeg stupnja hidrolize. Ispitivan je dodatak 5 %, 2,5 % u 1,25 % enzima u odnosu na masu proteinskog izolata lana. Stupanj hidrolize izračunat je prema izrazu [1] te su rezultati prikazani grafički na slikama 4, 5 i 6.



**Slika 4.** Prikaz utjecaja različitih količina enzima *Alcalase* te različitih vremena reakcija na stupanj hidrolize (DH) proteinskog izolata lana.



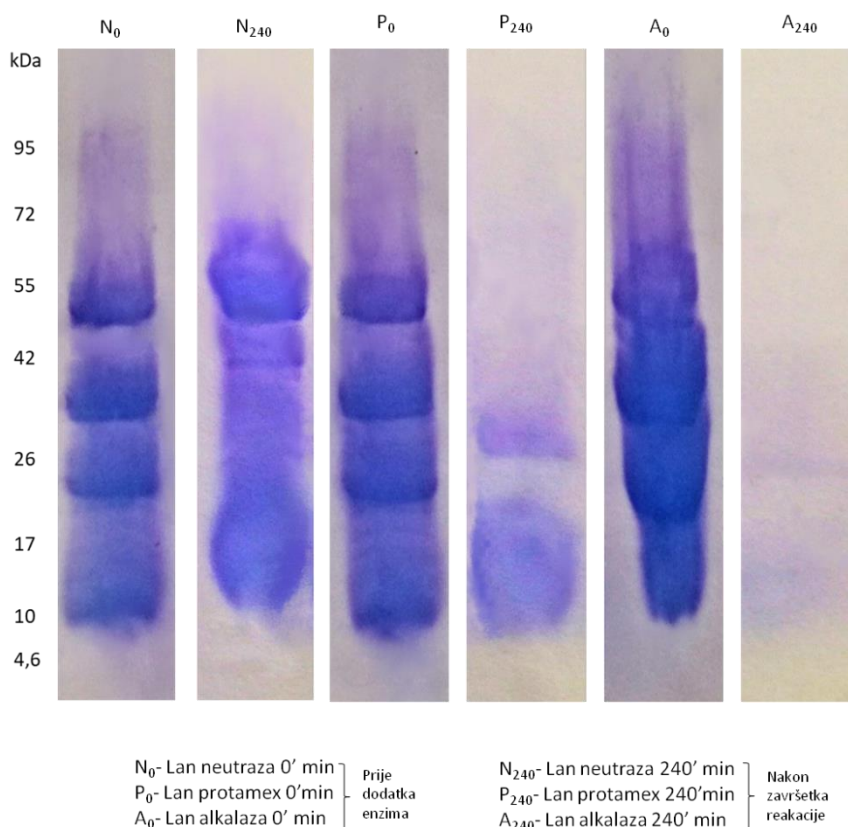
**Slika 5.** Prikaz utjecaja različitih količina enzima *Neutraxe* te različitih vremena reakcija na stupanj hidrolize (DH) proteinskog izolaza lana.



**Slika 6.** Prikaz utjecaja različitih količina enzima *Protamex* te različitih vremena reakcija na stupanj hidrolize (DH) proteinskog izolaza lana.

Iz grafova na slikama 4., 5. i 6. vidljivo je da je najveći stupanj hidrolize postignut s 2,5 % koncentracijom enzima. Također, veći stupanj hidrolize u 240. minuti postignut je djelovanjem enzima *Alcalase* i *Protamex* i iznosio je nešto više od 40 %, dok je djelovanjem *Neutraxe* dobiveni stupanj hidrolize oko 35%. Za enzim *Alcalase* već nakon 5 minuta djelovanja stupanj hidrolize bio je nešto niži od 40 % što znači da je enzim hidrolizirao većinu

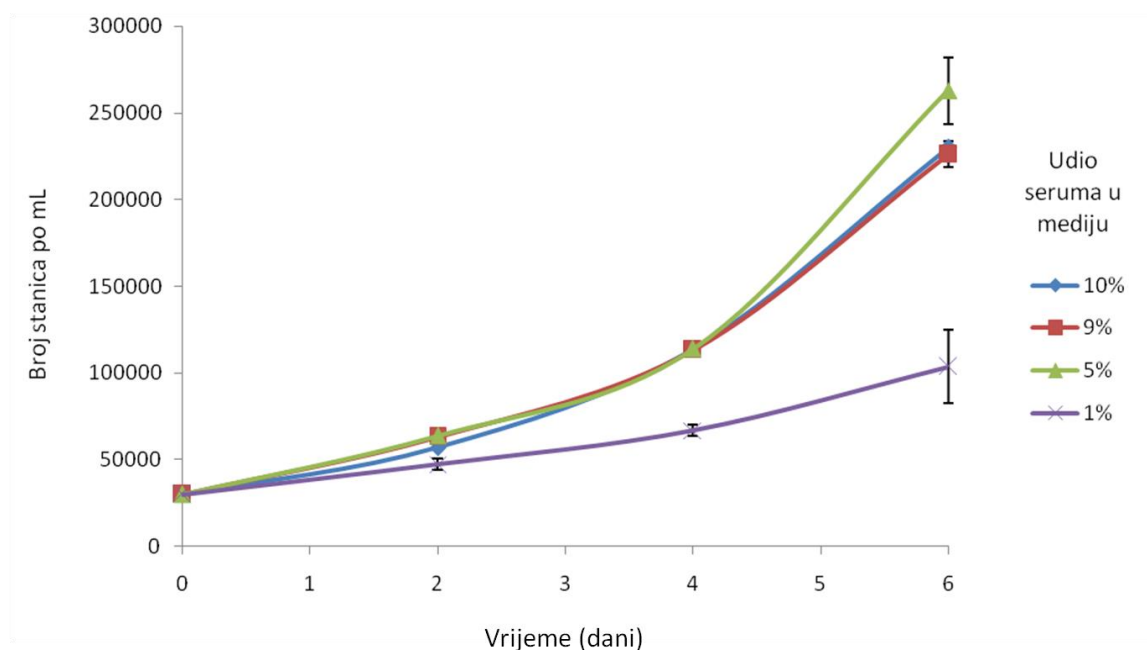
veza na samom početku. Dobiveni rezultati usporedivi su s rezultatima određivanja stupnja hidrolize enzimom *Alcalase* te još pet proteaza pri čemu je zaključeno da je *Alcalase* imala najveći učinak hidrolize u prvih 30 minuta (Tang i sur., 2009). Međutim, prema istraživanjima u kojima se navodi da veća koncentracija enzima rezultira većim brojem manjih peptida u hidrolizatima (Gosh i sur., 2017), za daljnja istraživanja kao optimalniji korišteni su hidrolizati lana dobiveni s 5 % enzima. Slika 7. prikazuje profil proteina nakon provedene elektroforeze (SDS-PAGE), te je na njoj vidljiva razlika u proteinskim vrpcama izolata pogače konoplje (0'-prije dodatka enzima) i hidrolizata iste (240'). U uzorku izolata pogače lana vidljivo više vrpce nego u uzorku hidrolizata. Također, na slici 7. se vidi razlika u proteinskom profilu hidrolizata dobivenih različitim proteazama. Kod uzorka dobivenog pomoću enzima *Alcalase* gotovo ni nema vrpce, kod hidrolizata dobivenog uz *Protamex* ih je nešto više, dok ih je najviše vidljivo u uzorku dobivenom pomoću *Neutrase*. Ovi rezultati potvrđuju da se dodatkom enzima *Alcalase*, a u jednakom trajanju postupka hidrolize, proteini razgrađuju do nižih molekulskih masa, manjih nego kod ostala dva enzima.



**Slika 7.** Usporedba dijelova gela nakon elektroforeze proteina (SDS-PAGE) izoliranih iz pogače lana i hidrolizata istih dobivenih pomoću proteaza *Neutrase* (N), *Protamex* (P) i *Alcalase* (A).

## 4.2. RAST CHO-DP12 STANICA U MEDIJU S RAZLIČITIM UDJELOM SERUMA

Da bi se ispitaio učinak djelomične zamijene seruma proteinskim hidrolizatom lana u kulturi stanica, potrebno je najprije utvrditi potrebu stanica za serumom. Za eksperiment je u svaku jažicu nacijejpljeno 30 000 CHO DP-12 st mL<sup>-1</sup>. Stanice su nacijejpljene u DMEM mediju s različitim volumnim udjelima FBS; 1 %, 5 %, 9 % i 10 %. Rast stanica praćen je tijekom 6 dana, broj poraslih stanica određivan je svaka 2 dana metodom Trypan plavo, a rezultati su prikazani na slici 8.

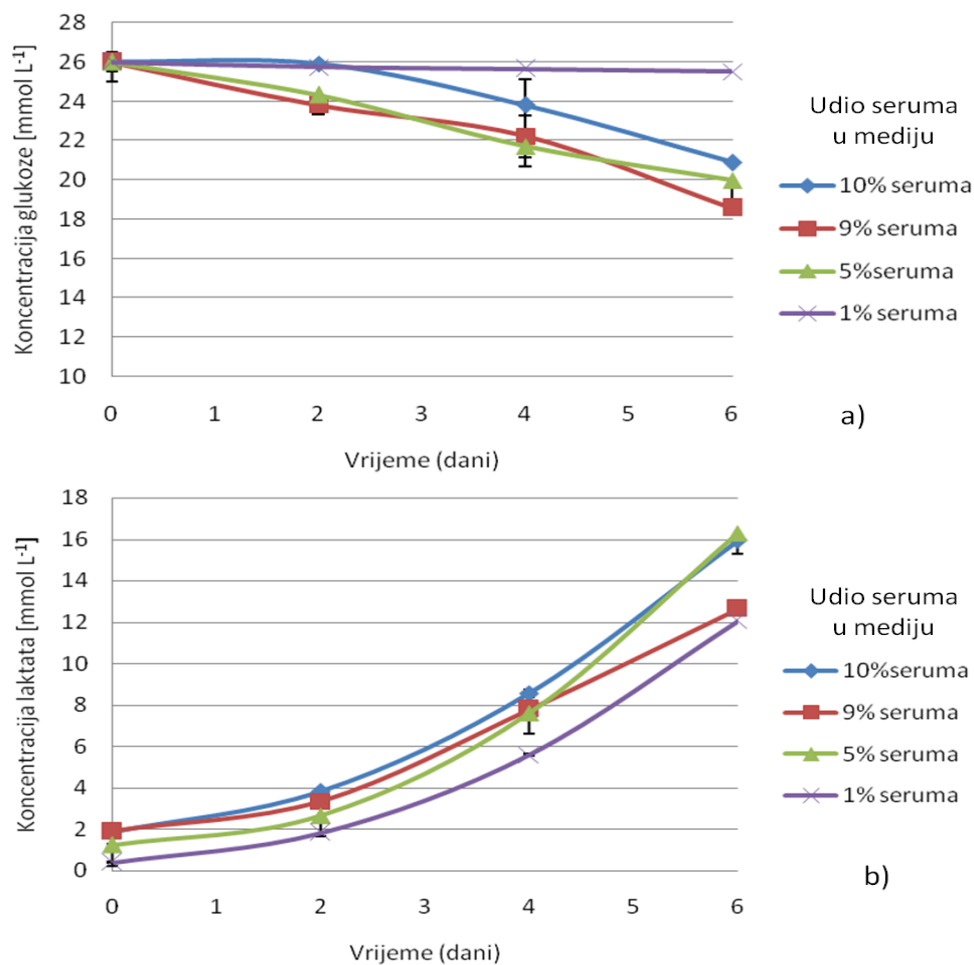


**Slika 8.** Prikaz ovisnosti broja CHO DP-12 stanica o vremenu (h) tijekom rasta u mediju s različitim udjelom seruma.

Iz slike 8. je vidljivo da stanicama najbolje pogoduje medij s 5 % seruma jer je nakon 6 dana postignuta najveća koncentracija stanica. Najslabiji rast su postigle stanice koje su rasle uz dodatak 1 % seruma. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da dodatak FBS u volumnom udjelu 5-10 % u hranjivi medij ima stimulativan učinak na rast stanica CHO DP-12. Rezultat je u skladu s očekivanjima jer se pri standardnim postupcima uzgoja CHO stanica preporučuje dodatak seruma u rasponu od 5 do 10 %. Pritom je stanični rast najbrži, a s

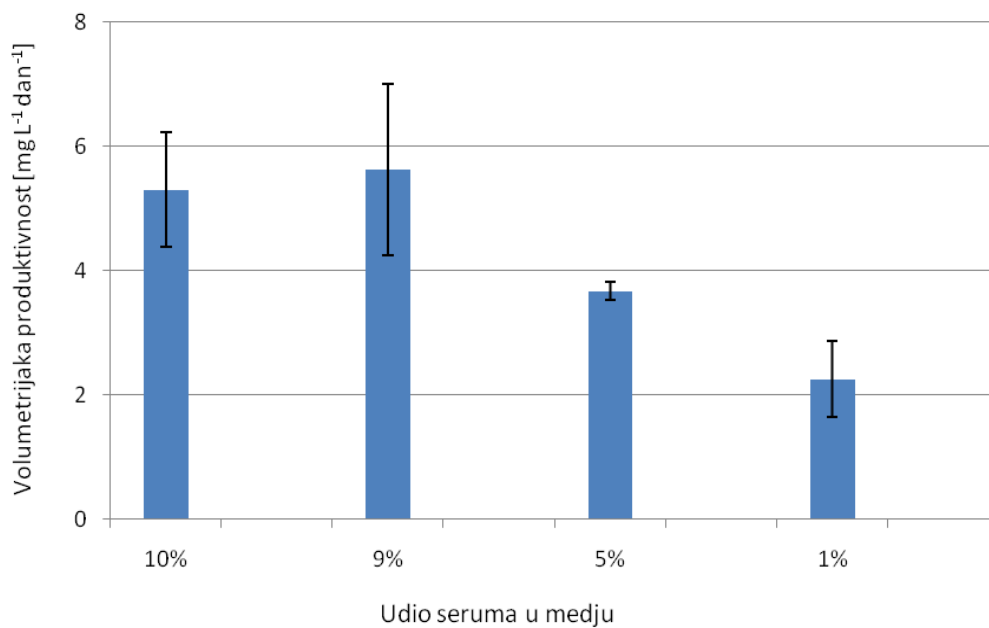
tehnološkog aspekta, medij je sastava koji omogućuje isplativu i učinkovitu izolaciju rekombinantnog staničnog proizvoda (Ozturk i Palsson, 1991).

Tijekom uzgoja CHO DP-12, osim praćenja broja stanica, uzorkovan je i medij za određivanje glukoze, laktata i IgG. Rezultati dobiveni provedenim metodama prikazani su na slici 9. te na slici 10.



**Slika 9.** Grafički prikaz potrošnje glukoze (a), te nastajanja laktata (b) u kulturi CHO DP-12 stanica, tijekom uzgoja u mediju s različitim udjelom seruma.

Koncentracija glukoze s vremenom se smanjuje jer ju stanice troše za svoj rast, dok koncentracija laktata raste. Najmanja potrošnja glukoze vidljiva je kod stanica kojima je za rast u medij dodan samo 1 % FBS, s obzirom da je u tim uvjetima bilo najmanje stanica. Najviše laktata proizvele su stanice koje su rasle u mediju 5 % i 10 % dodanog FBS što je i očekivano s obzirom da je u tim uvjetima bilo najviše poraslih stanica.

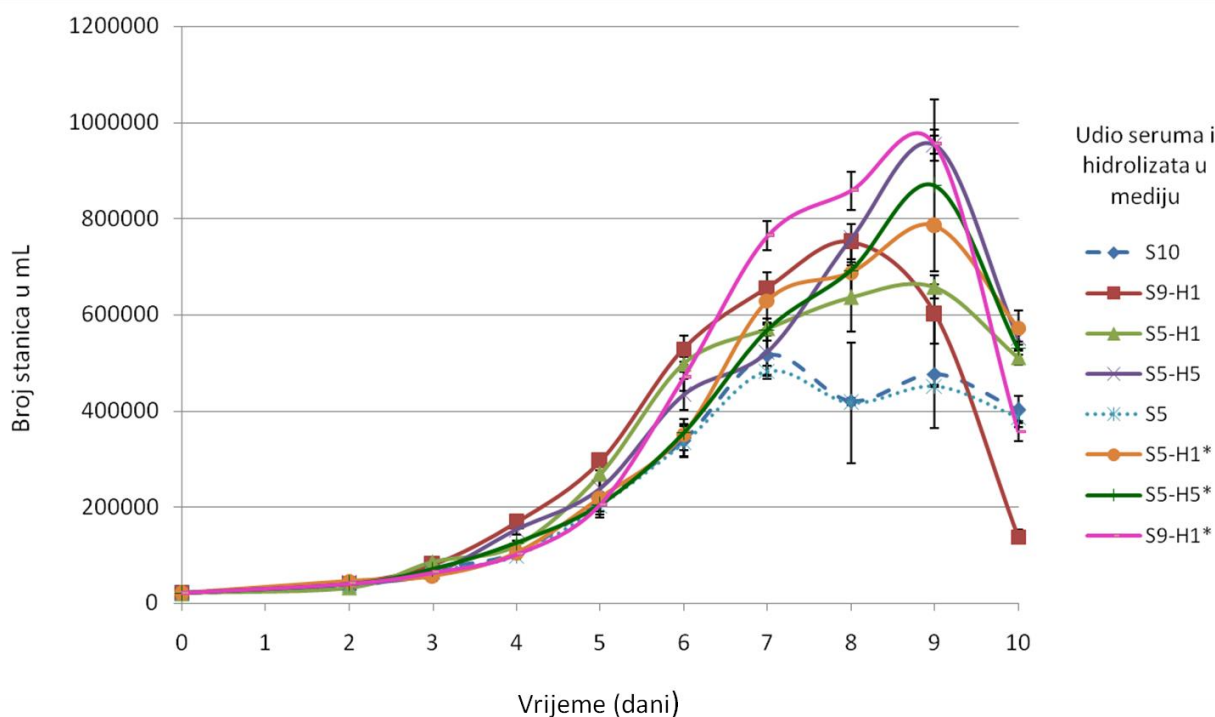


**Slika 10.** Volumetrijska produktivnost IgG CHO DP-12 stanica u mediju s različitim udjelom seruma.

Iz slike 10. možemo vidjeti da su najmanju količinu IgG proizvele CHO DP-12 stanice koje su rasle u mediju s 1 % seruma, što je i očekivano s obzirom na to da im je brojnost bila najmanja u tom uvjetu. Najveću statistički značajnu produktivnost pokazale su one koje su rasle u uvjetima s 9 % i 10 % seruma. Iako su najbolji rast pokazivale stanice u mediju s 5 % seruma, može se zaključiti da volumni udio seruma u mediju od 9 %, tj. 10 %, stanicama osigurava nutrijente za vrlo dobar rast, ali i nešto bolje uvjete za proizvodnju rekombinantnog proteina IgG od onih u mediju s 5 % seruma.

### 4.3. UČINAK DODATKA RAZLIČITIH VOLUMNIH UDJELA HIDROLIZATA LANA DOBIVENOG POMOĆU ENZIMA ALCALASE NA RAST, PRODUKTIVNOST I METABOLIZAM CHO DP-12 STANICA

Za potrebe ispitivanja učinka proizvedenog proteinskog hidrolizata uljne pogače lana na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanica pripremljeni su DMEM hranjivi mediji s različitim udjelima seruma i hidrolizata te je tijekom 10 dana praćen njihov rast. Krivulje koje su na grafu označene zvjezdicom prvih 5 dana rastle su bez dodatka hidrolizata, te je on dodan u 5. danu kako bi se ispitao i učinak naknadno dodanog hidrolizata. Rezultati su prikazani grafički na slici 11. kao ovisnost broja stanica o vremenu rasta u danima. Na slici 12.a prikazana je koncentracija glukoze u ovisnosti o vremenu, a na slici 12.b koncentracija laktata. Volumetrijska produktivnost IgG CHO DP-12 stanica prikazana je na slici 13.

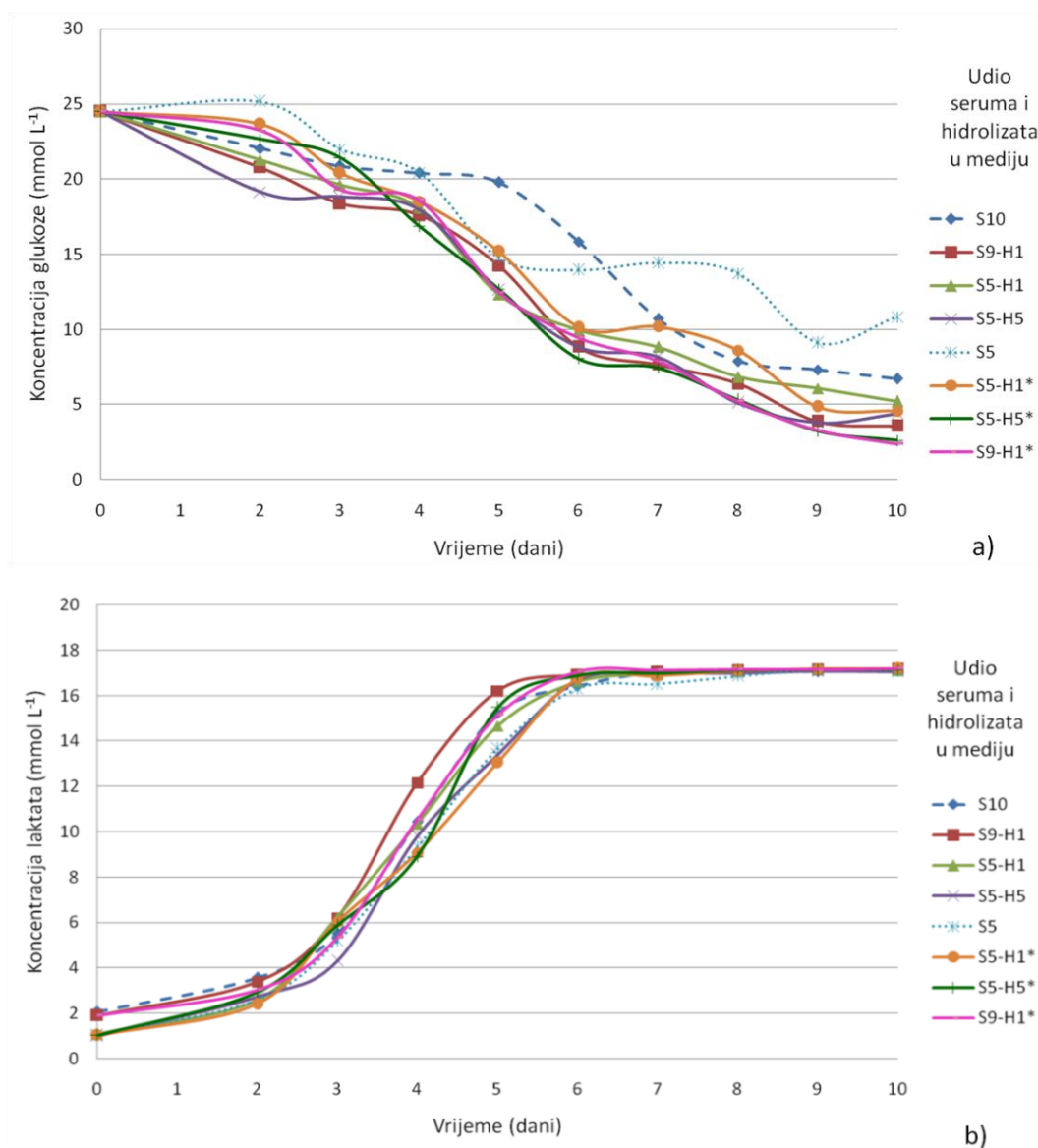


**Slika 11.** Prikaz ovisnosti broja CHO DP-12 stanica o vremenu (dani) tijekom uzgoja stanica u mediju s različitim udjelom seruma (S) i hidrolizata lana dobivenog pomoću enzima *Alcalase* (H). Objašnjenje sastava medija: **S10** = 10 % FBS; **S5** = 5 % FBS; **S9-H1** = 9 %



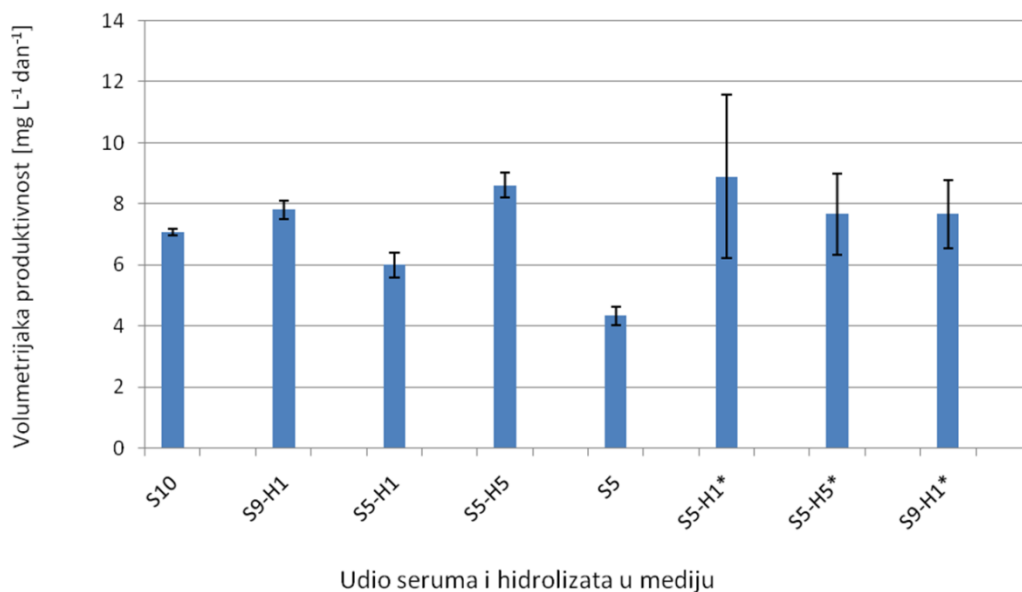
FBS + 1 % hidrolizata; **S5-H5** = 5 % FBS + 5 % hidrolizata; **S5-H1** = 5 % FBS + 1 % hidrolizata. \* označava dodatak hidrolizata u medij petog dana uzgoja.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da kontrolne stanične linije u mediju bez ikakvog dodatka proteinskog hidrolizata (S10 i S5) rastu najlošije u odnosu na ostale. Stoga, može se zaključiti da dodatak proteinskog hidrolizata lana povoljno djeluje na rast CHO DP-12 stanica. Najbolji rast pokazale su stanice uzgajane u uvjetima s 9 % seruma i 1 % naknadno dodanog hidrolizata u 5. danu, te su postigle velik broj od skoro 1 000 000 stanica u mL. Stanice uzgajane u istim uvjetima, ali s hidrolizatom dodanim na početku uzgoja pokazale su slabiji rast i ranije su ušle u fazu odumiranja. Iz toga možemo pretpostaviti da su stanice ranije počele trošiti sastojke koji doprinose rastu. Također, postoji mogućnost da proteinski hidrolizati doprinose vijabilnosti stanica, a tu tvrdnju možemo potkrijepiti rezultatima istraživanja koje su proveli Chun i suradnici (2007). Naime, oni su u suspenzijsku kulturu stanica dodali hidrolizate biljnog porijekla što je rezultiralo s više od 50 % vijabilnih stanica kroz više od 8 dana. Najlošiji rast pokazale su stanice u mediju s 5 % seruma i 1 % proteinskog hidrolizata.



**Slika 12.** Metabolizam CHO DP-12 stanica; potrošnja glukoze kroz vrijeme (a), te proizvodnja laktata kroz vrijeme (b) u medijima s različitim koncentracijom seruma i proteinskog hidrolizata lana dobivenog enzimskom hidrolizom uz enzim *Alcalase*. Objašnjenje sastava medija: **S10** = 10 % FBS; **S5** = 5 % FBS; **S9-H1** = 9 % FBS + 1 % hidrolizata; **S5-H5** = 5 % FBS + 5 % hidrolizata; **S5-H1** = 5 % FBS + 1 % hidrolizata. \* označava dodatak hidrolizata u medij petog dana uzgoja.

Grafovi prikazuju očekivane rezultate, odnosno koncentracija glukoze s vremenom se smanjuje, a koncentracija laktata se povećava što vrijedi za stanice uzgajane u svim uvjetima. Proteinski hidrolizati znatno ne utječu na proizvodnju glukoze i potrošnju laktata jer sve krivulje imaju sličan profil te su konačne postignute koncentracije približno jednake. Također je vidljivo da se stupanj metabolizma smanjuje nakon eksponencijalne faze te da stanice tijekom faze odumiranja imaju isti metabolički koeficijent (Ozturk i Palsson, 1991).

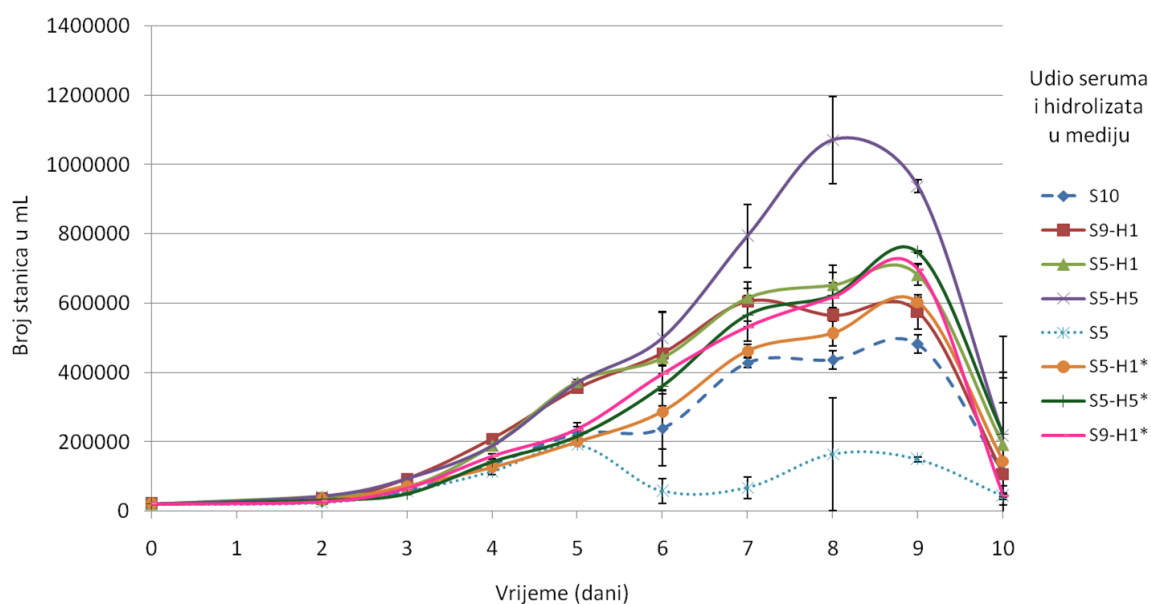


**Slika 13.** Volumetrijska produktivnost IgG CHO DP-12 stanica u mediju s različitim udjelom seruma i proteinskog hidrolizata lana dobivenog pomoću enzima *Alcalase*. Objašnjenje sastava medija: **S10** = 10 % FBS; **S5** = 5 % FBS; **S9-H1** = 9 % FBS + 1 % hidrolizata; **S5-H5** = 5 % FBS + 5 % hidrolizata; **S5-H1** = 5 % FBS + 1 % hidrolizata. \* označava dodatak hidrolizata u medij petog dana uzgoja.

Kao što je vidljivo na slici 13., stanice rasle u uvjetima bez dodatka hidrolizata, tj. kontrolne stanice i CHO DP-12 stanice uzgajane u uvjetima s 5 % seruma i 1 % proteinskog hidrolizata lana imaju najmanju volumetrijsku produktivnost. Te su stanice pokazale najmanji rast, pa posljedično tome i manju proizvodnju IgG. Stanice uzgajane u ostalim uvjetima s dodacima hidrolizata pokazale su produktivnost veću od stanica kojima u medij nije dodan hidrolizat iz čega zaključujem da proteinski hidrolizat lana dobiven enzimom *Alcalase* ima pozitivan učinak na produktivnost CHO DP-12 stanične linije.

#### 4.4. UČINAK DODATKA RAZLIČITIH VOLUMNIH UDJELA HIDROLIZATA LANA DOBIVENOG POMOĆU ENZIMA *NEUTRASE* NA RAST, PRODUKTIVNOST I METABOLIZAM CHO DP-12 STANICA

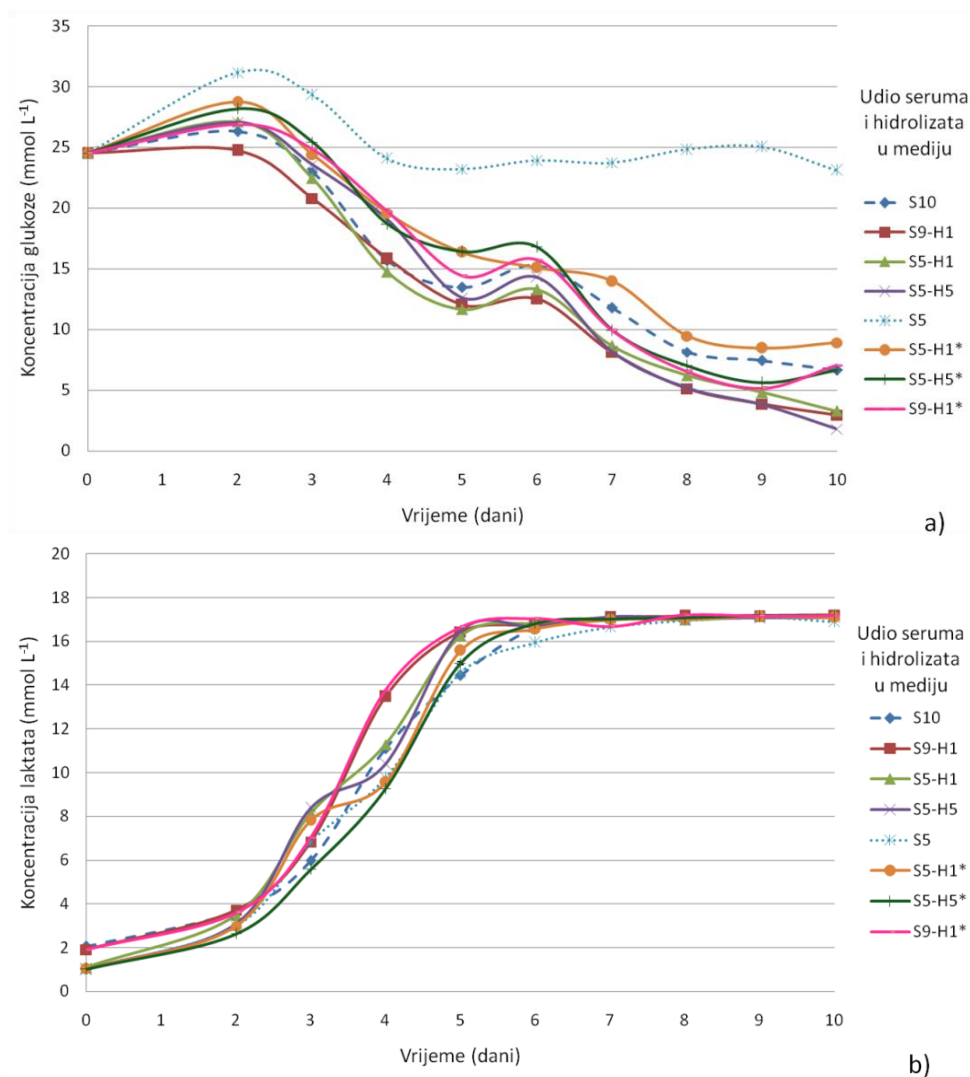
Postupak opisan u poglavlju 4.3. ponovljen je i za ispitivanje učinka proteinskog hidrolizata uljne pogače lana dobivenog pomoću enzima *Neutrased* na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanica. Krivulje rasta prikazane su na slici 14., metabolizam stanica na slici 15., te volumetrijska produktivnost IgG na slici 16.



**Slika 14.** Prikaz ovisnosti broja CHO DP-12 stanica o vremenu (dani) tijekom uzgoja stanica u mediju s različitim udjelom seruma (S) i hidrolizata lana dobivenog pomoću enzima *Neutrased* (H). Objašnjenje sastava medija: **S10** = 10 % FBS; **S5** = 5 % FBS; **S9-H1** = 9 % FBS + 1 % hidrolizata; **S5-H5** = 5 % FBS + 5 % hidrolizata; **S5-H1** = 5 % FBS + 1 % hidrolizata. \* označava dodatak hidrolizata u medij petog dana uzgoja.

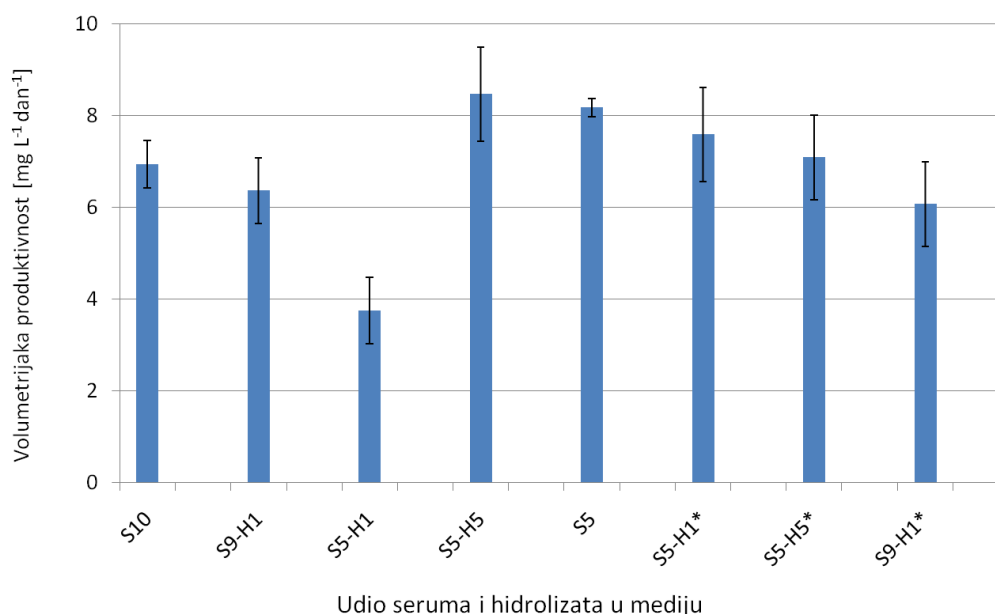
Iz krivulja rasta prikazanih na slici 14. možemo vidjeti da dodaci hidrolizata lana pogoduju rastu stanica jer su stanice uzgajane u mediju s dodatkom hidrolizata postigle veću gustoću nego one uzgajane u mediju samo s dodatkom seruma. Najveći broj dostigle su

stanice u mediju s 5 % seruma i 5 % početno dodanog proteinskog hidrolizata lana. Ostale krivulje rasta pokazuju sličan profil. Sličan učinak pokazali su Chabanon i suradnici (2008) u istraživanju u kojem su ispitali učinak proteinskog hidrolizata uljane repice na CHO stanice u mediju bez seruma, te su dokazali da ima pozitivan utjecaj na rast. U našem slučaju, jedino je iznenađujuće nisko porasla kontrolna kultura stanica s 5% seruma.



**Slika 15.** Metabolizam CHO DP-12 stanica; potrošnja glukoze kroz vrijeme (a), te proizvodnja laktata kroz vrijeme (b) u medijima s različitim koncentracijom seruma i proteinskog hidrolizata lana dobivenog enzimskom hidrolizom uz enzim *Neutralse*. Objašnjenje sastava medija: **S10** = 10 % FBS; **S5** = 5 % FBS; **S9-H1** = 9 % FBS + 1 % hidrolizata; **S5-H5** = 5 % FBS + 5 % hidrolizata; **S5-H1** = 5 % FBS + 1 % hidrolizata. \* označava dodatak hidrolizata u medij petog dana uzgoja.

Na slici 15. može se vidjeti kako se koncentracija glukoze s vremenom smanjuje jer ju stanice troše za svoj rast, dok koncentracija laktata raste. Dodatak različitih volumnih udjela seruma i proteinskih hidrolizata lana nema znatan utjecaj na potrošnju odnosno proizvodnju metabolita, te sve krivulje imaju sličan profil i u 8. danu postižu jednaku koncentraciju laktata koja ostaje konstantna do kraja uzgoja.



**Slika 16.** Volumetrijska produktivnost IgG CHO DP-12 stanica u mediju s različitim udjelom seruma i proteinskog hidrolizata lana dobivenog pomoću enzima *Neutralse*. Objašnjenje sastava medija: **S10** = 10 % FBS; **S5** = 5 % FBS; **S9-H1** = 9 % FBS + 1 % hidrolizata; **S5-H5** = 5 % FBS + 5 % hidrolizata; **S5-H1** = 5 % FBS + 1 % hidrolizata. \* označava dodatak hidrolizata u medij petog dana uzgoja.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti da najveću volumetrijsku produktivnost imaju CHO DP-12 stanice u mediju s 5 % seruma i 5 % hidrolizata. Jedino su one proizvele više IgG od stanica uzgajanih u DMEM mediju samo uz dodatak seruma. Iznenadjuće visoku produktivnost u mediju s 5% seruma moguće je pripisati nesukladno malom staničnom prinosu ostvarenom u tom mediju (slika 14.), a što nije primjećivano u sličnim eksperimentima s preostalim hidrolizatima. Ovakav zaključak nalazi uporište u istraživanjima koja tvrde da je u stacionarnoj fazi rasta proizvodnja rekombinantnih proteina, naročito IgG, najizdašnija. Pretpostavlja se da je to vezano uz preusmjerenje utroška nutrijenata u

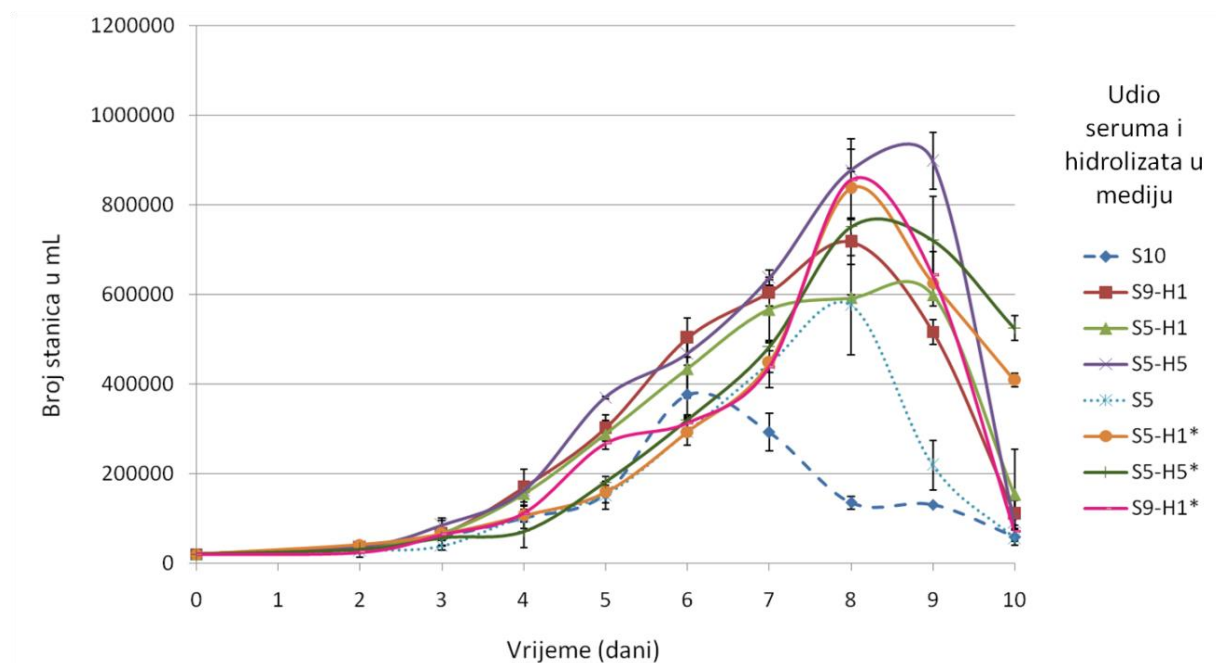
metaboličke tokove različite od onih stanične diobe (Templeton i sur., 2013).

Iz razloga neočekivano slabog porasta kontrolne skupine stanica (naročito S5) nije jednoznačno pokazan bolji učinak dodanog hidrolizata na proizvodnju IgG-a. Naime hidrolizat evidentno poboljšava produktivnost, ali taj učinak pritom nije statistički značajan. Ponovljeni eksperimenti dat će jasniji odgovor.

Slične rezultate pokazalo je istraživanje gdje je korištena mješavina hidrolizata soje i pšenice koja je dobro djelovala na rast CHO stanične linije, no na produktivnost nije imala značajan utjecaj (Spearman i sur., 2004).

#### **4.5. UČINAK DODATKA RAZLIČITIH VOLUMNIH UDJELAHIDROLIZATA LANA DOBIVENOG POMOĆU ENZIMA *PROTAMEX* NA RAST, PRODUKTIVNOST I METABOLIZAM CHO DP-12 STANICA**

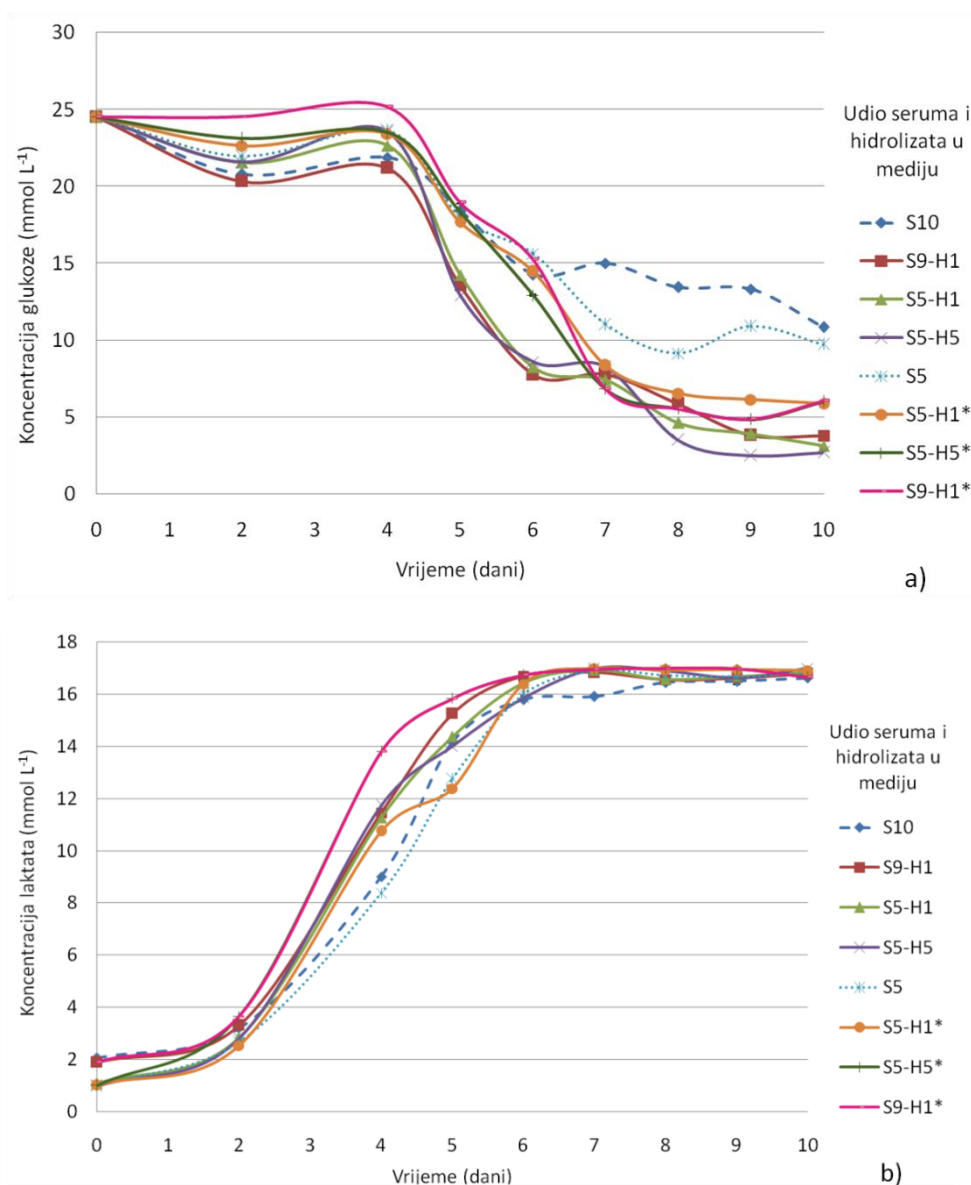
Za ispitivanje učinka proteinskog hidrolizata uljne pogače lana dobivenog pomoću enzima *Protamex* na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanica ponovljen je postupak iz prethodna dva poglavlja te su rezultati prikazani na slikama ispod. Krivulja rasta CHO DP-12 stanica u medijima s različitim udjelima seruma i hidrolizata prikazana je na slici 17., a metabolizam CHO DP-12 stanične linije na slici 18. Volumetrijska produktivnost koja pokazuje količinu proizvedenog IgG nakon 10 dana na slici 19.



**Slika 17.** Prikaz ovisnosti broja CHO DP-12 stanica o vremenu (dani) tijekom uzgoja stanica u mediju s različitim udjelom seruma (S) i hidrolizata lana dobivenog pomoću enzima *Protamex* (H). Objašnjenje sastava medija: **S10** = 10 % FBS; **S5** = 5 % FBS; **S9-H1** = 9 % FBS + 1 % hidrolizata; **S5-H5** = 5 % FBS + 5 % hidrolizata; **S5-H1** = 5 % FBS + 1 % hidrolizata. \* označava dodatak hidrolizata u medij petog dana uzgoja

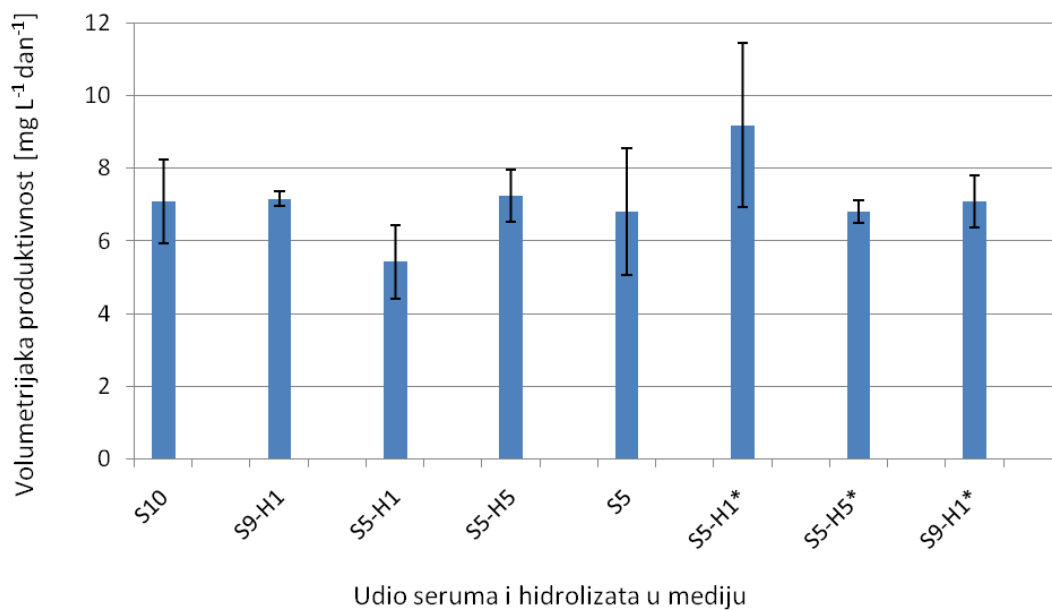
Iz slike 17. vidljivo je da ponovno stanice uzgajane uz dodatak hidrolizata rastu bolje nego kontrolne stanice, kao i u prethodna dva eksperimenta s proteinskim hidrolizatima lana dobivenim uz *Alcalase* i *Neutralse*. Najbolji rast pokazala je stanična linija CHO DP-12 u mediju s dodatkom 5 % seruma i 5 % na početku dodanog proteinskog hidrolizata lana. Slijede ih i sve stanice kojima je naknadno dodan proteinski hidrolizat. Iz krivulje koja prikazuje rast stanica u ovisnosti o vremenu u mediju s 9 % seruma i 1 % naknadno dodanog hidrolizata 5. dan, može se vidjeti da je iz usporenog rasta 5. i 6. dan, 7. dan postignuta brža proliferacija i znatno veći broj stanica. Pretpostavka je da su stanice naglo potrošile nutrijente iz seruma, a dodatkom hidrolizata medij je obogaćen novima koji su im omogućili daljnje razmnožavanje. Dodatak hidrolizata sjemena pamuka u kemijski definirani medij uzrokuje produženu vijabilnost stanica (Babcock i sur., 2010), stoga to može biti slučaj i u ovom eksperimentu.





**Slika 18.** Metabolizam CHO DP-12 stanica; potrošnja glukoze kroz vrijeme (a), te proizvodnja laktata kroz vrijeme (b) u medijima s različitom koncentracijom seruma i proteinskog hidrolizata lana dobivenog enzimskom hidrolizom uz enzim *Protamex*. Objašnjenje sastava medija: **S10** = 10 % FBS; **S5** = 5 % FBS; **S9-H1** = 9 % FBS + 1 % hidrolizata; **S5-H5** = 5 % FBS + 5 % hidrolizata; **S5-H1** = 5 % FBS + 1 % hidrolizata. \* označava dodatak hidrolizata u medij petog dana uzgoja.

Koncentracija glukoze prikazana na slici 18.a s vremenom se smanjuje kako stanice rastu i troše ju za razmnožavanje i metabolizam. Stanice koje su postigle najmanji broj tijekom 10 dana uzgoja, očekivano su potrošile i najmanje glukoze. Koncentracija laktata s vremenom se povećava te na kraju dostiže vrijednost koja ostaje konstantna zadnjih nekoliko dana uzgoja. Povećanjem vremena uzgoja stanica potrošnja glukoze i formiranje laktata smanjuje se kako koncentracija nutrijenata u mediju opada (Neerman i Wagner, 1996).



**Slika 19.** Volumetrijska produktivnost IgG CHO DP-12 stanica u mediju s različitim udjelom seruma i proteinskog hidrolizata lana dobivenog pomoću enzima *Protamex*. Objašnjenje sastava medija: **S10** = 10 % FBS; **S5** = 5 % FBS; **S9-H1** = 9 % FBS + 1 % hidrolizata; **S5-H5** = 5 % FBS + 5 % hidrolizata; **S5-H1** = 5 % FBS + 1 % hidrolizata. \* označava dodatak hidrolizata u medij petog dana uzgoja.

Volumetrijska produktivnost prikazana na slici 19. najveća je kod stanica u mediju s 5 % seruma i 1 % naknadno dodanog hidrolizata. U ostalim uvjetima stanice nisu proizvele puno više IgG od kontrolnih stanica. Proteinski hidrolizat lana dobiven enzimskom hidrolizom ne djeluje znatno na produktivnost CHO DP-12 stanica. Peptidi dobiveni cjepanjem ovim enzimom pogoduju rastu stanica, dok na produktivnost djeluju pozitivno, ali ipak ne statistički značajno.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i rezultata može se zaključiti:

1. Serum je sastavni dio hranjivog medija za uzgoj CHO DP-12 stanica i potreban im je za proliferaciju i rast u DMEM mediju. Smanjenjem postotka seruma u mediju smanjuje se i prinos stanica u uzgoju.
2. Djelomična zamjena seruma proteinskim hidrolizatima uljne pogače lana u mediju za uzgoj CHO DP-12 stanica poticajno djeluje na rast. U cilju povećanja prinosa stanica u kulturi, hidrolizati lana se stoga mogu koristiti kao djelomična zamjena za serum s obzirom da je dodatkom i najmanjeg volumnog udjela hidrolizata postignut poboljšani stanični rast.
3. Proteinski hidrolizat lana dobiven pomoću enzima *Alcalase* ima pozitivan učinak na produktivnost CHO DP-12 stanične linije, dok hidrolizati dobiveni enzimima *Neutrase* i *Protamex* imaju poboljšano djelovanje, ali koje nije statistički značajno.
4. Što se tiče sastava medija, opaža se trend prema kojem najbolji učinak hidrolizata na staničnu produktivnost daju mediji kojima je polovica standardne količine seruma (10 % v/v) zamijenjena hidrolizatima (*serum 5 % + hidrolizat 5 %*), te kod medija dvostruko umanjene količine seruma kojima je hidrolizat dodan usred eksponencijalne faze staničnog rasta, naročito sastava *serum 5 % + hidrolizat 1 %*.

## 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., Morales, Â., Augusto, E. F. P., Butler, M., ured.), Taylor & Francis Group, New York, str. 1-11.

Amable, P., Butler, M. (2008) Cell metabolism and its control in culture. U: Animal Cell Technology : From Biopharmaceuticals to Gene Therapy (Castilho, L., Morales, Â., Augusto, E. F. P., Butler, M., ured.), Taylor & Francis Group, New York, str. 75-104.

Anonymous 1 (2019) <[https://www.researchgate.net/figure/Neubauerchamber\\_fig1\\_274063071](https://www.researchgate.net/figure/Neubauerchamber_fig1_274063071)> Pristupljeno 15. svibnja 2019.

Babcock, J., Wilcox, C., Huttinga, H. (2010) Partial replacement of chemically defined media with pland-derived protein hydrolysates. *BioPharm.* **23**, 36-42.

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

Butler, M. (2004) *Animal Cell Culture and Technology*, 2.izd., Garland Science/Bios Scientific Publishers. New York, str. 1-77.

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. *Bioresource Technol.* **99**, 7143-7151.

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

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

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

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.

Freshney, R. I. (2010) *Animal Cell Culture: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6. izd., John Wiley & Sons Inc., Hoboken.

Gosh, B. C., Prasad, L. N., Saha, N. P. (2017) Enzymatic hydrolysis of whey and its analysis. *J. Food Sci. Technol.* **54**, 1476-1483.

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

Karamać, M., Kosińska-Cagnazzo, A., Kulczyk, A. (2016) Use of different proteases to obtain flaxseed protein hydrolysates with antioxidant activity. *Int. J. Mol. Sct.* **17**, 1027.

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.

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.

Nawachukwu, I. D., Aluko, R. E. (2018) Antioxidant Properties of Flaxseed Protein Hydrolysates: Influence of Hydrolytic Enzyme Concentration and Peptide Size. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* (objavljeno *online* 16. siječnja 2018.). doi: 10.1002/aocs.12042

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

Ogunronbi, O., Jooste, P. J., Abu, J. O., Van der Merwe, B. (2011) Chemical composition, storage stability and effect of cold-pressed flaxseed oil cake inclusion on bread quality. *J. Food Process. Pres.* **35**, 63-79.

Omasa, T., Onitsuka, M., Kim, W. D. (2010) Cell Engineering and Cultivation of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **11**, 233-240.

Ozturk, S.S., Palsson, B.O. (1991) Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 2. Effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor. *Biotechnol. Prog.* **7**, 481-494.

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

Ramachandran, S., Singh, S. K., Larroche, C., Soccol, C. R., Pandey, A. (2006) Oil cakes and their biotechnological applications - A review. *Bioresource Technol.* **98**, 2000-2009.

Ryan, J.A. (2008) Introduction to animal cell culture <<https://www.coursehero.com/file/8241921/intro-animal-cell-culture/>>. Pristupljeno 31. svibnja 2019.

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

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

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.

Templeton, N., Dean, J., Reddy, P., Young, J. D. (2013) Peak Antibody Production is Associated With Increased Oxidative Metabolism in an Industrially Relevant Fed-Batch CHO Cell Culture. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 2013-2024.

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.

Wurm, F. M. (2013) CHO Quasispecies—Implications for Manufacturing Processes. *Processes* **1**, 296- 311.

Wurm, F. M., Wurm, M. J. (2017) Cloning of CHO Cells, Productivity and Genetic Stability—A Discussion. *Processes* **5**, 20

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

*Sara Bergovac*

---

Ime i prezime studenta