

Učinak hidrolizata proteina uljne pogače sjemenki lana na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije

Cavrić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:786316>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Marija Cavrić

1312/MB

**UČINAK HIDROLIZATA
PROTEINA ULJNE POGAČE
SJEMENKI LANA
NA RAST, PRODUKTIVNOST I
METABOLIZAM CHO DP-12
STANIČNE LINIJE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Igora Slivca te uz pomoć mag. ing. Marijana Logarušića.

Diplomski rad je izrađen u sklopu HRZZ projekta IP-2016-06-3848 „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica“.

Zahvaljujem se mentoru, izv. prof. dr. sc. Igoru Slivcu i Marijanu Logarušiću, mag. ing., na uloženom trudu i vremenu, danim savjetima te prenesenom znanju tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Također, hvala svim ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na pomoći, ugodnoj radnoj atmosferi i pristupačnosti.

Veliko hvala mojoj obitelji na kontinuiranoj podršci, bez njih sve ovo ne bi bilo moguće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

UČINAK HIDROLIZATA PROTEINA ULJNE POGAČE SJEMENKI LANA NA RAST, PRODUKTIVNOST I METABOLIZAM CHO DP-12 STANIČNE LINIJE

Marija Cavrić 1312/MB

Sažetak: Životinjski serum je standardni dodatak mediju za uzgoj životinjskih stanica. Međutim, zbog određenih nedostataka već više od tri desetljeća istražuje se upotreba biljnih hidrolizata proteina kao zamjene serumu u biotehnološkim postupcima proizvodnje rekombinantnih proteina pomoću životinjskih stanica. Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj hidrolizata proteina uljne pogače sjemenki lana, dobivenih pomoću proteolitičkih enzima *Alcalase*, *Neutralse* i *Protamex*, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije. Osim utjecaja hidrolizata ukupnog sadržaja peptida, ispitan je i utjecaj peptidnih frakcija veličine do 10 i do 1 kDa kao dodataka mediju za uzgoj u koncentraciji od 2 i 0.5 g L⁻¹. Rezultati su pokazali kako dodani hidrolizati i njihove frakcije nemaju značajan utjecaj na rast stanica, dok je pokazan pozitivan utjecaj na produktivnost. Dodatak hidrolizata dobivenog pomoću enzima *Protamex* u koncentraciji 2 g L⁻¹ rezultirao je visokom produktivnošću dok je istovremeno usporio rast stanica.

Ključne riječi: uljna pogača lana, proteinski hidrolizat, hranjivi medij, CHO DP-12 stanična linija, monoklonsko protutijelo

Rad sadrži: 62 stranice, 22 slike, 7 tablica, 39 literaturnih navoda

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

Pomoć pri izradi: Marijan Logarušić, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 24. rujan, 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

EFFECT OF FLAXSEED OIL CAKE PROTEIN HYDROLYSATES ON GROWTH, PRODUCTIVITY AND METABOLISM OF CHO DP-12 CELL LINE

Marija Cavrić 1312/MB

Abstract: Animal serum is a standard media supplement for animal cultures, but because of its disadvantages, for more than three decades, the use of plant protein hydrolysates as a serum replacement in biotechnological processes for the production of recombinant proteins with cell cultures is researched. This study aimed to determine the influence of flaxseed oil cake protein hydrolysates, obtained by proteolytic enzymes, *Alcalase*, *Neutralse* and *Protamex*, on growth, productivity and metabolism of CHO DP-12 cell line. In addition to the influence of hydrolysates of the total peptide content, fractions of peptides size up to 10 kDa and 1 kDa were tested as culture media supplements in concentrations of 2 and 0.5 g L⁻¹. Research showed that the added hydrolysates and their fractions did not have a significant impact on cell growth while a positive effect on productivity was shown. The addition of hydrolysate obtained with *Protamex* in a concentration of 2 g L⁻¹ resulted in high productivity while at the same time slowing down cell growth.

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

Thesis content: 62 pages, 22 figures, 7 tables, 39 references

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

Technical support and assistance: Marijan Logarušić, mag.ing.

Reviewers:

1. PhD. Višnja Gaurina Srček, Full professor
2. PhD. Igor Slivac, Associate professor
3. PhD. Marko Obranović, Assistant professor
4. PhD. Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor (substitute)

Defence date: 24 September, 2021.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA.....	3
2.1.1. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica u kulturi	5
2.1.2. Faze rasta životinjskih stanica	6
2.1.3. Metabolizam u kulturi životinjskih stanica.....	8
2.1.3.1. Metabolizam nusprodukata, laktata i amonijaka	10
2.1.4. CHO stanična linija	11
2.2. MEDIJ ZA UZGOJ ŽIVOTINJSKIH STANICA	11
2.2.1. Medij bez seruma	13
2.2.2. Hidrolizati proteina kao sastojci medija bez seruma	14
2.3. LAN.....	15
2.3.1. Pogača lana.....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. Kemikalije	18
3.1.2. Otopine	19
3.1.3. Uređaji i oprema	21
3.1.4. Stanična linija CHO DP-12	22
3.2. METODE RADA	23
3.2.1. Priprava proteinskog izolata lana	23
3.2.2. Priprava proteinskog hidrolizata lana	24
3.2.3. Frakcioniranje.....	24
3.2.4. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u	26
3.2.5. Određivanje stupnja hidrolize.....	28
3.2.6. SDS-PAGE elektroforeza proteina iz uzoraka proteinskih hidrolizata lana	28
3.2.7. Uzgoj CHO DP-12 stanica u Erlenmeyerovim tikvicama za uzgoj stanica	29
3.2.8. Utjecaj dodatka hidrolizata i frakcija proteina iz uljne pogače lana na rast i produktivnost CHO DP-12 stanica.....	29
3.2.9. Određivanje broja stanica metodom <i>Trypan Blue</i>	30
3.2.10. Određivanje koncentracije glukoze u uzorcima hranjivog medija za uzgoj	30

3.2.11. Određivanje koncentracije laktata u uzorcima hranjivog mediju za uzgoj	31
3.2.12. Određivanje koncentracije amonijaka u uzorcima hranjivog medija za uzgoj	32
3.2.13. Određivanje koncentracije IgG u hranjivom mediju za uzgoj	33
3.2.14. Izračunavanje parametara rasta CHO DP-12 stanica.....	34
3.2.14.1. <i>Određivanje najveće specifične brzine rasta stanica (μ_{max})</i>	34
3.2.14.2. <i>Određivanje specifične produktivnosti (Q_p)</i>	35
3.2.14.3. <i>Određivanje volumetrijske produktivnosti</i>	35
4. REZULTATI I RASPRAVA	37
4.1. ODREĐIVANJE STUPNJA HIDROLIZE PROTEINSKOG IZOLATA ULJNE POGAČE LANA DJELOVANJEM PROTEAZA <i>ALCALASE</i> , <i>NEUTRASE</i> I <i>PROTAMEX</i>	39
4.2. ANALIZA PROTEINSKIH HIDROLIZATA I PEPTIDNIH FRAKCIJA	40
4.3. UČINAK PROTEINSKOG HIDROLIZATA I NJегоVIH FRAKCIJA DOBIVENIH ENZIMOM <i>ALCALASE</i> NA RAST, PRODUKTIVNOST I METABOLIZAM CHO DP-12 STANICA.	43
4.4. UČINAK PROTEINSKOG HIDROLIZATA I NJегоVIH FRAKCIJA DOBIVENIH ENZIMOM <i>NEUTRASE</i> NA RAST, PRODUKTIVNOST I METABOLIZAM CHO DP-12 STANICA	48
4.5. UČINAK PROTEINSKOG HIDROLIZATA I NJегоVIH FRAKCIJA DOBIVENIH ENZIMOM <i>PROTAMEX</i> NA RAST, PRODUKTIVNOST I METABOLIZAM CHO DP-12 STANICA	53
5. ZAKLJUČCI	58
6. LITERATURA	59

1. UVOD

Kulture životinjskih stanica se već dugi niz godina koriste u svrhu proizvodnje farmaceutika, hormona, monoklonskih protutijela, cjepiva itd. Ova grana biotehnologije od iznimne je važnosti jer su zahtjevi za proizvodnjom sve veći te ju je potrebno razvijati u svrhu dobivanja što kvalitetnijih proizvoda u visokom prinosu, osim toga, bitan je faktor smanjenje troškova proizvodnje. Za uspješan rast i produktivnost kultura životinjskih stanica bitno je osigurati optimalne uvjete mikrookoliša u *in vitro* uvjetima. Osim uvjeta temperature, pH i sastava zraka, bitan faktor kod uzgoja kultura životinjskih stanica je odgovarajući hranjivi medij. Medij za uzgoj stanicama osigurava sve bitne nutrijente poput izvora ugljikohidrata, aminokiselina, soli, vitamina i minerala. Životinjski serum je također jedna od komponenti medija za uzgoj životinjskih stanica koja je između ostalog izvor hormona i faktora rasta koji potiču proliferaciju i rast stanica, međutim zadnjih desetljeća sve se više pridodaje važnosti negativnih aspekata korištenja životinjskog seruma. Osim što ima neujednačen sastav, također je izvor kontaminacija i otežava pročišćavanje proizvoda (Merten, 1999). Stoga, iako ima svojih prednosti, životinjski serum nastoji se zamijeniti korištenjem alternativnih izvora koji bi imali jednak ili bolji učinak na proliferaciju stanica i produktivnost procesa.

Kao zamjena životinjskom serumu, zadnjih desetljeća sve se više ispituje utjecaj biljnih hidrolizata proteina, među njima našli su se i hidrolizati lana koji imaju svoj potencijal za upotrebu kao dodatak hranjivom mediju. Lan je biljka koja se dugi niz godina istražuje zbog potencijalnih benefita na ljudsko zdravlje korištenjem u prehrani. Lan se, osim u prehrambene svrhe, koristi i u tekstilne svrhe i za dobivanje sjemena. Dobivanjem lanenog ulja zaostaju velike količine jeftinog nusprodukta, uljne pogače lana na koju se djelovanjem raznim proteolitičkim enzimima dobivaju hidrolizati proteina koji mogu pronaći svrhu kao dodatak uzgoju kultura stanica zbog kompleksnog sastava.

Zbog svega navedenog, cilj ovog rada bio je proučiti djelovanje proteinskih hidrolizata uljne pogače sjemenki lana na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije koja proizvodi rekombinantno humano protutijelo, imunoglobulin (IgG) anti IL-8. Ispitani su hidrolizati dobiveni djelovanjem tri proteolitička enzima, *Alcalase*, *Neutrase* i *Protamex*. Osim testiranja utjecaja hidrolizata ukupnog sadržaja peptida, testirane su i peptidne frakcije veličina ispod 10 kDa

te ispod 1 kDa u dvije različite koncentracije od 2 i 0.5 g L⁻¹ kao dodatak hranjivom mediju bez seruma (eng. *serum free media*, SFM).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA

Kultura stanica je proces u kojem prokariotske, eukariotske ili biljne stanice rastu u kontroliranim uvjetima, a izraz se najčešće odnosi na kulturu životinjskih stanica. Kultura životinjskih stanica proces je kojim se humane, životinjske ili stanice insekata uzgajaju u idealnom 'umjetnom' okolišu, odnosno umjetnom hranjivom mediju. Stanice koje se koriste mogu poteci iz mnogostaničnih eukariota, već uspostavljenih staničnih linija ili staničnih sojeva. Kultura životinjskih stanica postala je često korištena tehnika u laboratorijima tek sredinom 20. stoljeća, međutim sama tehnika uzgajanja stanica odvojenih od njihovog prirodnog staništa, otkrivena je na početku 20. stoljeća, kada je Ross Harrison između 1906. i 1910., koristeći tehniku viseće kapi i limfe žabljeg srca, pokušao objasniti nastanak živčanog vlakna. Svojim eksperimentom potvrdio je kako su stanice primarna razvojna jedinica višestaničnih organizama (Alves i sur., 2008). Kultura životinjskih stanica je prvi puta korištena u industrijskom mjerilu i za komercijalne svrhe 1950-ih godina kada je proizvedeno cjepivo za dječju paralizu iz inaktiviranih virusa. Mnoge životinjske stanice mogu rasti izvan primarnih organa ili tkiva uz zadovoljavajuće uvjete *in vitro*, koje čine medij s nutrijentima i faktorima rasta te odgovarajuće vrijednosti pH, temperature, CO₂, kisika i osmolalnosti.

Kultura životinjskih stanica koristi se u različitim područjima, od bazičnih do primjenjenih istraživanja, gdje se pokazala kao odličan modelni sustav za:

- Proučavanje biologije stanica, staničnog ciklusa, specijaliziranih funkcija stanica te stanica-stanica i stanica-matriks interakcija,
- testove toksičnosti za proučavanje utjecaja novih lijekova,
- gensku terapiju,
- karakterizaciju tumorskih stanica, ulogu raznih kemikalija, virusa i zračenja kod tumorskih stanica,
- proizvodnju cjepiva, monoklonskih protutijela, farmaceutika i
- proizvodnju virusa u svrhu proizvodnje cjepiva.

Danas je kultura životinjskih stanica preduvjet za proizvodnju terapeutika poput hormona, protutijela, interferona, faktora zgrušavanja i cjepiva. (Verma i sur., 2020)

Kulture stanica dobivaju se razgradnjom tkiva mehaničkim, enzimskim ili kemijskim putem. Dije se na:

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

Kod primarnih kultura, stanice se izuzimaju direktno iz tkiva i organa. Stanice se zatim uzgajaju u primjerenim staklenim ili plastičnim posudama u kompleksnom mediju za uzgoj. Uobičajeno imaju usporen stanični rast te su heterogene, ali su i dalje preferirane u odnosu na stanične linije jer zadržavaju svojstva tkiva iz kojeg su izuzete zbog čega su najbolji model za opisivanje *in vivo* uvjeta. Uz ograničeni kapacitet rasta, ove stanice imaju i ograničen životni vijek te ih je u svrhu dugotrajnije uporabe potrebno subkultivirati čime se dobivaju stanične linije. Primarne kulture stanica mogu se podijeliti na adherentne i suspenzijske, ovisno o tipu stanica u kulturi. Adherentnim stanicama potrebna je stabilna, netoksična i inertna podloga za rast te ih je teško uzgojiti u suspenziji. Suspenzijske stanice ne trebaju čvrstu površinu za rast već se mogu kontinuirano uzgajati u tekućem mediju. (Verma i sur., 2020)

Stanične linije dobivaju se subkultivacijom primarne kulture stanice. Mogu biti konačne (netransformirane) i kontinuirane (transformirane). Netransformirane stanične linije imaju ograničen broj generacija te su najčešće dobivene iz normalnog tkiva, dok kulture dobivene iz tumorskih stanica mogu rezultirati kontinuiranim staničnim linijama. Međutim, kontinuirane stanične linije mogu se dobiti iz normalnog, netumorskog tkiva spontanom putem, što je rjeđe, ili nakon procesa transformacije koji može biti potaknut kancerogenim kemijskim agensima, virusnom infekcijom ili umetanjem virusnog gena ili onkogeno u genom stanice. (Alves i sur., 2008) Glavne prednosti kontinuiranih staničnih linija su: brži stanični rast, dostizanje visokih gustoća stanica (posebice u bioreaktorima), mogućnost korištenja definiranog hranjivog medija (najčešće medija bez seruma i medija bez proteina) te imaju potencijal da se uzgajaju u suspenziji u velikom mjerilu. Glavni nedostaci kontinuiranih staničnih linija su: kromosomska nestabilnost, varijacije u fenotipu u odnosu na tkivo donora te promjena specifičnih i karakterističnih tkivnih markera. (Verma i sur., 2020) Selekcijom ili kloniranjem primarne kulture ili stanične linije može se razviti stanični soj.

U današnje vrijeme u laboratorijima se uzgajaju stanice dobivene iz raznih tkiva i organa, dok je prije glavni fokus istraživanja bio promatranje staničnog ciklusa, staničnog rasta i potreba

stanica za rast, danas su istraživanja na homogenim kulturama usmjerena na dobivanje umjetnog tkiva te proučavanje porijekla i biologije stanica.

2.1.1. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica u kulturi

Uvjeti uzgoja životinjskih stanica u kulturi *in vitro* su poprilično zahtjevni s obzirom na to da stanice potječu iz kompleksnih višestaničnih organizama. Bitno je održavanje aseptičnih uvjeta kako bi se spriječio nastanak kontaminacija te je bitno stanicama osigurati što sličnije uvjete onima *in vivo*. Najveća opasnost je upravo kontaminacija mikroorganizmima, posebice bakterijama s obzirom na to da je njihovo generacijsko vrijeme 30 minuta, dok je za životinjske stanice prosjek 24 sata. Kontaminacije najčešće uzrokuju pad u pH vrijednosti medija što se brzo očitava mijenjanjem boje indikatora fenol-crveno u narančastu, zatim žutu te naposljetku dolazi do zamućenja kulture. Kako bi se stanice mogle održavati kroz dug vremenski period, bitno je osigurati odgovarajuću opremu za rad i primjenjivati aseptičnu tehniku rada. Ono što je osnovno za uzgoj životinjskih stanica u kulturi su komora za sterilan rad (laminar), CO₂ inkubator koji osigurava konstantnu temperaturu, koncentraciju CO₂ i vlažnost, autoklav i svjetlosni mikroskop. (Slivac i sur., 2016)

pH medija za uzgoj je vrlo bitan faktor za rast i gustoću stanica. Optimalan pH za većinu stanica je oko pH 7, ali stanice mogu relativno dobro rasti od pH 5.5 do 8.5. pH koji ide izvan ovih okvira, vrlo će negativno utjecati na stanični rast te može uzrokovati staničnu smrt (Oyeleye i sur., 2016). pH medija ovisi o njegovim komponentama, staničnom metabolizmu, puferima te o aeraciji. On se može kontrolirati lužinama (NaOH, KOH) ili kiselinama (HCl), ali održavanje pH vrijednosti konstantom u najvećoj mjeri se postiže korištenjem CO₂ i najčešće natrijevog bikarbonata. (Verma i sur., 2020) Bitnu ulogu ima i sastav atmosfere koji se kontrolira u inkubatoru i postavlja na 5 % CO₂ i 95 % zraka.

Optimalna temperatura za kulture stanica ovisi o temperaturi domaćina iz kojeg su stanice izuzete. Za većinu humanih i životinjskih stanica optimalna je temperatura 36-37 °C, za stanice insekata je 27 °C, životinjske stanice koje potječu iz hladnokrvnih životinja imaju optimalnu temperaturu u rasponu od 15 do 26 °C, dok je za ptice ona 38.5 °C (Anonymus 3, 2021). Temperaturu je potrebno držati konstantnom (± 0.5 °C) kako bi rezultati bili ponovljivi. Za kulturu stanica, pregrijavanje je puno veći problem od pada temperature, zbog čega je često temperatura u

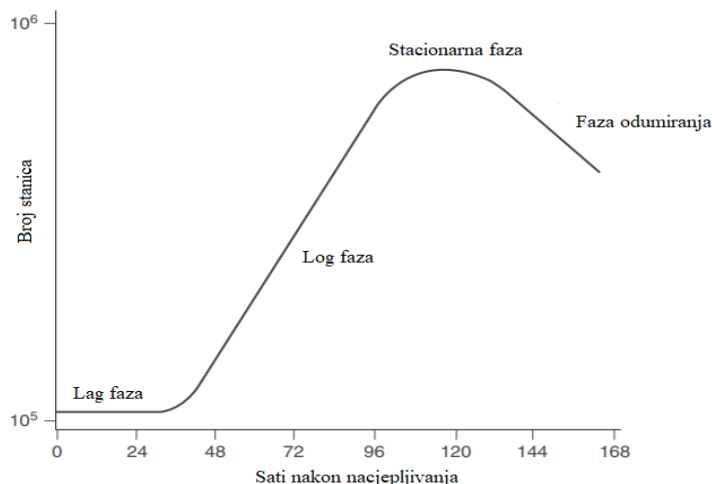
inkubatoru postavljena na nešto nižu od optimalne. Uzgajanje pri nižim temperaturama od optimalne može pridonijeti većoj proizvodnji proteina od interesa s obzirom na to da se stanični rast pri nižim temperaturama obustavlja, a metabolizam se usmjerava prema proizvodnji (Kumar i sur., 2008).

Osmolalnost je vrlo bitan faktor jer regulira protok tvari u i van stanice. Raspon optimalnih vrijednosti osmolalnosti je dosta uzak za pojedini tip stanica. Kod staničnih linija prihvatljive vrijednosti su između 260 i 320 mosmol kg⁻¹. Ono što je bitno je da se stanice drže na konstantnoj osmolalnosti, ± 10 mosmol kg⁻¹, posebice u odsutnosti seruma i makromolekularnih komponenti medija. (Freshney, 2005)

Osim navedenih uvjeta, za uzgoj kulture stanica bitan je hranjivi medij koji sadrži glukozu, aminokiseline, vitamine, anorganske soli te dodatak seruma sisavaca koji osigurava prisutnost hormona, faktora rasta i drugih hranjivih komponenti u mediju.

2.1.2. Faze rasta životinjskih stanica

Rast je povećanje u biomasi i može se postići povećanjem mase stanica ili povećanjem broja stanica, međutim rast stanica najčešće predstavlja proliferaciju stanica, odnosno povećanje broja stanica. Rast stanične kulture, ako su zadovoljeni svi uvjeti, prikazivat će sigmoidalnu krivulju rasta koja je odraz adaptacije stanične kulture, okolišnih uvjeta, dostupnosti nutrijenata, te za adherentne stanice, dostupnosti slobodne adherentne površine (Leo i sur., 2008). Standardna kinetika rasta stanične kulture započinje lag fazom, slijedi eksponencijalna (log faza), zatim stacionarna faza te na kraju faza odumiranja stanica što je prikazano na slici 1.



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

Lag faza je period adaptacije stanica na novi okoliš, započinje inokulacijom stanica i u ovoj fazi nema diobe stanice ili se ona događa rijetko. Trajanje faze ovisi o najmanje dva faktora: fazi u kojoj su stanice bile izuzete za inokulaciju te o koncentraciji u kojoj su inokulirane. Primjerice, stanice koje su izuzete iz faze eksponencijalnog rasta imaju kraću lag fazu od stanica izuzetih iz stacionarne faze. Također, lag faza je dulja ako je početna koncentracija stanica nakon inokulacije manja. (Leo i sur., 2008) Ako ova faza potraje duže, može doći do visokog postotka mrtvih stanica.

Eksplozivna faza ili log faza je faza tijekom koje se stanice aktivno dijele te se broj stanica eksponencijalno povećava. Postotak stanica u diobi može dostići 90-100 %, pri čemu se stanice nalaze u najboljem fiziološkom stanju te se upravo te stanice najčešće koriste za proučavanje staničnih funkcija. Faktori koji utječu na trajanje log faze su koncentracija inokuluma, brzina rasta, te za adherentne stanice, bitan je faktor slobodna površina za rast. Brzina proliferacije stanica nije određena samo karakteristikama stanične linije, već i uvjetima uzgoja, odnosno sastavom medija, dostupnosti kisika, temperaturom itd. (Davis, 2011).

Nakon log faze, zbog nedostatka nutrijenta, posebice faktora rasta, ali i zbog inhibitornog djelovanja staničnih metabolita, stanice ulaze u stacionarnu fazu koja je obilježena smanjenjem rasta stanica gdje je manje od 10 % stanica u diobi. Rast stanica jednak je brzini odumiranja stanica čime nema značajne promjene u broju stanica. U stacionarnoj fazi može doći do povećane sinteze specifičnih proteina u odnosu na strukturne proteine što se onda može prolongirati dodatkom svježeg hranjivog medija (Freshney, 2005).

Stacionarnu fazu slijedi faza odumiranja stanica gdje stanična smrt nije kompenzirana stanicama u diobi. Stanična smrt može nastupiti apoptozom ili nekrozom. Apoptoza je programirana stanična smrt, proces koji se zasniva na aktivnosti cisteinskih aspartat-specifičnih proteaza koje nazivamo kaspazama. Nekroza je nekontrolirani oblik stanične smrti, najčešće je rezultat patofiziološkog stanja poput infekcija i upala gdje takav stres za stanicu uzrokuje nemogućnost obavljanja njenih normalnih funkcija kao što su održavanje osmotske ravnoteže, membranski transport i proizvodnja energije što dovodi do gubljenja normalne homeostaze. (Buršić, 2018)

Definiranje staničnog rasta za pojedinu staničnu liniju bitno je za identificiranje specifičnih karakteristika. Ponašanje stanica i metabolizam mijenjaju se u svakoj fazi rasta, zato je vrlo bitno poznavati krivulju rasta pojedine stanične linije kako bi se uspostavili optimalni uvjeti koncentracije inokuluma, predviđanje duljine trajanja pojedine faze i eksperimenta te poznavanje optimalnog vremena uzorkovanja. (Leo i sur., 2008)

2.1.3. Metabolizam u kulturi životinjskih stanica

Metabolizam čini skup reakcija kataliziranih enzimima koje se događaju unutar stanica živih organizama. Proces metabolizma uključuje razne stanične puteve kojima se nastoji osigurati energija stanicama za njihovo normalno funkcioniranje. Kod eukariota, metabolički putevi odvijaju se u citosolu i mitohondriju gdje se većina energije dobiva iz glukoze i masnih kiselina. Metabolizam je organiziran na način da se proizvodi velika količina energije ili smanji njena potrošnja, ovisno o potrebama stanice. Može se podijeliti u dva dijela prema tipu reakcije, a to su katabolizam i anabolizam. U anabolizmu se troši energija za sintezu makromolekula i biopolimera, dok se cijepanjem istih molekula u manje, u katabolizmu, energija oslobađa. (Judge i Dodd, 2020) Stanice uklonjene iz životinjskog tkiva ili organa, rasti će ako im se pruži zaliha nutrijenata i faktora rasta što omogućuje stanicama da se neovisno dijele procesom mitoze. Životinjskim stanicama su potrebni ugljikohidrati kao izvor energije, preferirano glukoza i aminokiselina glutamin. Njihovom kataboličkom razgradnjom nastaju dva koenzima, ATP i NADH, koji su esencijalni za vijabilnost stanica. Mediji za uzgoj stanica, osim izvora ugljikohidrata, sadrže raspon aminokiselina potrebnih za rast stanica, osim toga, lipidi su važni kao izvor energije i prekursor za sintezu komponenti staničnih membrana. Stanice u kulturi nemaju u potpunosti jednak metabolizam kao *in vivo*,

primjerice dolazi do velike konzumacije glukoze i glutamina na početku uzgoja što se kasnije smanjuje, kao i specifična brzina rasta. Koncentracija nutrijenata je viša nego što je potrebno za zadovoljavanje potrebe stanica za prekursorima i energijom, što dovodi do stvaranja nusprodukata poput laktata, amonijaka i alanina. (Amable i Butler, 2008)

Glukoza je glavni izvor ugljika za uzgoj životinjskih stanica, obzirom da transporteri heksoza imaju visok afinitet za nju, iako se, od drugih šećera, mogu koristiti još i galaktoza, fruktoza i manosa. Glukoza može ući u proces glikolize, ciklus limunske kiseline ili pentoza fosfatni put te time osloboditi energiju, ali i osigurati prekursore za druge metaboličke puteve. Procesom glikolize, iz jedne molekule glukoze nastat će dvije molekule piruvata, dvije molekule ATP-a i dvije molekule NADH, te velik broj prekursora za biosintezu. U aerobnim uvjetima, proizvedeni piruvat transportirat će se u mitohondrij i potpuno će oksidirati do CO_2 i H_2O procesom zvanim ciklus limunske kiseline. Potpuna oksidacija dvije molekule piruvata u mitohondriju rezultira dobivanjem 36 molekula ATP-a. Dok se prilikom nepotpune oksidacije glukoze, odnosno u anaerobnim uvjetima, piruvat prevodi u laktat čime se regenerira NAD^+ molekula. Tada se oslobađaju samo dvije molekule ATP-a. Stanice se ne ponašaju kao u *in vivo* uvjetima, ne mogu u potpunosti oksidirati visoke koncentracije glukoze zbog čega velika količina nastalog piruvata ne ulazi u citratni ciklus već nastaju velike količine laktata. Sam odnos konzumacije glukoze i proizvodnje laktata ovisi o dostupnoj količini glukoze, jer se pri nižim koncentracijama glukoze, stanice okreću prema proizvodnji energije, odnosno ne proizvode laktat. U eksponencijalnoj fazi staničnog rasta, proizvede se najviše laktata, čak 60-80 % piruvata prevodi se u laktat. U većini medija korištenih za uzgoj životinjskih stanica, koncentracije glukoze je 10-25 mM, kako bi se smanjila proizvodnja laktata, glukoza se može postepeno dodavati tijekom odvijanja procesa. (Amable i Butler, 2008)

Glutamin je izvor energije, ugljika i dušika za životinjske stanice. Od svih aminokiselina, glutamin se najviše konzumira te može pružiti 35-70 % stanične energije čime može biti i glavni izvor energije za životinjske stanice. Glutamin prolazi proces glutaminolize. Glutamin ulazi u ciklus limunske kiseline prethodnom konverzijom u α -ketoglutarat. Glutaminolizom dolazi do potpune oksidacije glutamina do CO_2 čime se oslobađaju 24 molekule ATP-a i 3 molekule NADPH. Ovaj metabolički put je posebice preferiran kada glukoza ne može zadovoljiti potrebe za energijom. (Tayi i Butler, 2014) Glutamin se uobičajeno dodaje u koncentraciji 1-5 mM, što je više od svih ostalih aminokiselina. Nedostatak upotrebe glutamina je što njegovom deaminacijom

nastaje amonijak koji se nakuplja u kulturi stanica i već u koncentraciji 2-4 mM može inhibirati rast stanica, također može doći do spontane razgradnje glutamina pri 37 °C što dovodi do nakupljanja amonijaka u mediju (Amable i Butler, 2008). Problem se može smanjiti postupnim dodavanjem glutamina tijekom uzgoja.

2.1.3.1. Metabolizam nusprodukata, laktata i amonijaka

Kao što je spomenuto u prethodnom odjeljku, laktat je jedan od glavnih nusprodukata kod uzgoja životinjskih stanica zbog njihove konzumacije velikih količina glukoze. Pokazalo se da koncentracija laktata iznad 20 mmol L⁻¹ ima negativan utjecaj na produktivnost i rast stanica. Jedan od razloga je što visoke koncentracije laktata snižavaju pH medija za uzgoj što negativno utječe na rast stanica. Akumulacija laktata može se umanjiti zamjenom glukoze galaktozom koja se razgrađuje sporije zbog malog afiniteta heksokinaza što rezultira puno manjom koncentracijom proizvedenog laktata. Faktori koji utječu na proizvodnju laktata su metabolizam šećera, NAD⁺/NADH omjer, aktivnost različitih enzima te komponente medija za uzgoj. (Tayi i Butler, 2014)

Amonijak ima jači negativan utjecaj od laktata jer već pri puno nižim koncentracijama djeluje negativno na stanični rast. *In vivo*, amonijak koji nastaje transportira se u mitohondrij hepatocita gdje ulazi u urea ciklus i prevodi se u ureu. *In vitro*, sav amonijak koji nastaje izlučuje se iz stanica i nakuplja se u mediju. (Tayi i Butler, 2014) Kao što je spomenuto u prethodnom odlomku, amonijak nastaje kod metabolizma aminokiselina, posebice u prva dva koraka glutaminolize te nastaje termalnom degradacijom glutamina pri 37 °C. Neki od negativnih utjecaja amonijaka su: inhibicija enzima (u glikolizi, citratnom ciklusu, glutaminolizi i pentoza fosfatnom putu), promjene u transcelularnom ionskom gradijentu, modifikacije unutarstaničnog pH, utjecaj na kvalitetu proizvedenih rekombinantnih proteina te povećanje sekrecije alanina. (Amable i Butler, 2008) Pokazalo se kako dodatak određenih aminokiselina, treonina, prolina i glicina u medij, može umanjiti toksičan učinak amonijaka na stanični rast, produktivnost i kvalitetu proteina. (Chen i Harcum, 2005)

2.1.4 CHO stanična linija

CHO (eng. Chinese Hamster Ovary) stanice izolirane su iz ovarija kineskog hrčka te postale kontinuiranom staničnom linijom 1950-ih godina u laboratoriju Dr. Theodora Puck-a i aktivno se koriste već preko 60 godina. Primarna stanična linija bila je CHO-K1 te su se druge varijacije pojavile s vremenom. Prednost CHO stanica, u odnosu na tada korištene HeLa stanice je malen broj kromosoma (22) zbog čega je lakše raditi s njima u proučavanju genetike, također, obzirom da su životinjskog porijekla, rizik kontaminacije humanim virusima je manji. Uz navedeno, imaju stabilan rast i mogu rasti suspenzijski ili adherentno te se mogu uzgajati u kemijski definiranom mediju što omogućava ponovljivost rezultata i kvalitetnije eksperimente.

Stanice sisavaca su glavni domaćini za proizvodnju komercijalnih terapijskih proteina. Iako postoje druge stanične linije poput HEK-293 i NSo, 70 % svih rekombinantnih terapijskih proteina te gotovo sva monoklonska protutijela proizvedena danas, dolaze od CHO stanica (Kim i sur., 2012), jer osim što su prilagodljive raznim uvjetima uzgoja, lako ih je genetski modificirati u svrhu proizvodnje proteina od interesa. Naprednim tehnikama kloniranja i amplifikacije gena, razvijene su visokoproduktivne stanične linije koje mogu proizvesti do 10 g L^{-1} proteina od interesa. Osim toga, proizvedeni rekombinantni proteini funkcionalno su i strukturno slični nativnima jer CHO stanice mogu uspješno provoditi posttranslacijske modifikacije koje su kompatibilne i bioaktivne u ljudima. (Tihanyi i Nyitray, 2021)

2.2. MEDIJ ZA UZGOJ ŽIVOTINJSKIH STANICA

Kemijski složen tekući medij za uzgoj stanica najvažnija je komponenta u umjetnom okolišu stanica. Osim što regulira pH i osmolalnost kulture stanica, on osigurava potrebne nutrijente, faktore rasta i hormone neophodne za preživljavanje i proliferaciju stanica. U početnim eksperimentima s kulturama stanica, korišteni medij uziman je iz tkiva i tjelesnih tekućina, ali kako je s vremenom rasla potražnja ali i potreba za standardizacijom i visokom kvalitetom medija, razvijen je kemijski definiran medij koji se temeljio na analizama prethodno korištenih medija. Tri glavne vrste medija su bazalni medij, medij sa smanjenim udjelom seruma i SFM.

Često korišteni mediji u kulturi stanica, MEM (Eagle's medium) i DMEM (Eagle's medium modified by Dulbeco), uvedeni su 1955. te 1959. godine, oni su suplementirani s humanim,

konjskim i goveđim serumom, proteinskim hidrolizatima i ekstraktima embrija. Razvoj novih medija okrenuo se pronalasku medija s manjim udjelom potrebnog seruma te pronalasku idealnog medija za druge tipove stanica, tako je razvijen RPMI 1640 za stanične kulture limfocita i hibridoma stanica. (Freshney, 2005)

Glavne komponente hranjivog medija za uzgoj su :

- Ugljikohidrati
- Aminokiseline
- Anorganske soli
- Vitamini i minerali
- Antibiotici
- Serum (proteini, lipidi, hormoni)

Ugljikohidrati su najčešći izvor energije, među kojima se pretežito koristi glukoza koja se dodaje u medij u koncentraciji 5-25 mM. Glukoza se uglavnom metabolizira glikolizom pri čemu nastaje piruvat koji se metabolizira do laktata i acetil-CoA koji ulazi u ciklus limunske kiseline. Metabolizmom glukoze mogu nastati velike količine laktata, čak 80% glukoze se konvertira do laktata anaerobnom glikolizom. Manji dio glukoze metabolizira se pentoza-fosfatnim putem. Laktat negativno utječe na pH i osmolalnost što u konačnici ima toksičan efekt na stanice. Kako bi se reduciralo nakupljanje laktata u mediju, moguće je supstituirati dio glukoze drugim šećerima poput manoze, sukroze ili galaktoze. (Moraes i sur., 2008)

Za rast stanica potrebne su dvije vrste aminokiselina, esencijalne i neesencijalne. Esencijalne aminokiseline, za razliku od neesencijalnih, stanica ne može sama sintetizirati stoga ih je potrebno uvijek dodavati u medij. Esencijalne aminokiseline za kulture stanica su arginin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan, valin, cistein, tirozin i glutamin. Neesencijalne aminokiseline koje se dodaju u medij su: alanin, asparagin, asparaginska kiselina, prolin, glutaminska kiselina, glicin i serin. (Price, 2017) Aminokiseline su bitne za sintezu proteina, lipida i nukleotida, a mogu poslužiti i kao izvor energije. Svaka pojedina aminokiselina se dodaje u koncentraciji od 0.1 do 1mM, osim glutamina koji se obično dodaje u većoj koncentraciji (1-5mM), jer služi kao izvor ugljika, dušika i energije. (Moraes i sur., 2008)

Soli koje se najčešće dodaju u medij su Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} i HCO_3^- . Navedeni ioni važni su za uspostavljanje ionske ravnoteže i osmotskog pritiska, uz ulogu enzimskih kofaktora. Kod suspenzijskih kultura, važno je imati nisku koncentraciju kalcija i magnezija kako

bi se spriječila agregacija i adhezija stanica. Drugi metali, poput željeza, magnezija, selena, cinka, bakra, vanadija i molibdena se također dodaju u hranjivi medij u niskim koncentracijama, pretežito kada se radi o SFM.

Vitamini se obično dodaju u vrlo malim količinama te služe kao enzimski kofaktori koji su esencijalni za opći metabolizam stanica. Većini stanica potreban je kompleks B vitamina, dok su zalihe drugih vitamina zadovoljene dodatkom seruma u hranjivi medij. Ako se koristi SFM, potrebno je dodati vitamine topive u vodi, ali i vitamine topive u mastima, poput biotina, folne kiseline, niacina, tiamina, pantotenske i askorbinske kiseline, kao i vitamine B12, A, D, E i K. (Moraes i sur., 2008)

Kako bi se spriječile potencijalne kontaminacije, u medij za uzgoj stanica često se dodaju antibiotici. Međutim korištenje antibiotika ima svoje negativne strane poput razvoja rezistentnih organizama, sakrivanja kontaminacije mikoplazmom, poticanje loših aseptičnih uvjeta itd.

Većina staničnih linija dobro raste u bazalnom mediju koji je izvor aminokiselina, vitamina, anorganskih soli te izvora ugljika poput glukoze. Međutim, bazalni medij mora biti suplementiran serumom.

2.2.1 Medij bez seruma

Serum je bezstanična krvna komponenta koja se dobiva zgrušavanjem krvi životinjskog porijekla, njegov sastav nije u potpunosti definiran ali je on vrlo bitan izvor faktora rasta, hormona, lipida, vitamina, proteina, aminokiselina i minerala u bazalnom mediju. Iako su proteini važna komponenta seruma, njihova funkcija je uglavnom nepoznata. Među važnije proteine ubrajamo albumin, globulin, fibronektin i transferin, od hormona inzulin, hidrokortizon i hormon rasta. (Freshney, 2005) Najčešće korišten serum je fetalni teleći serum (FBS) uz kojeg se još koriste goveđi i konjski serum. Glavna funkcija seruma je da stimulira rast, proliferaciju i druge stanične funkcije kao izvor hormona i faktora rasta, također regulira propusnost stanične membrane i služi kao nosač hormona, lipida, enzima, mikronutrijenata i elemenata u tragovima. FBS je postao često korišten serum zbog visokog udjela faktora rasta te niskog udjela γ -globulina, u većini slučajeva dodaje su u koncentraciji od 10 % (v/v). (Brunner i sur., 2010)

Međutim, serum ima i svoje nedostatke u koje spadaju: visoka cijena, nepoznavanje točnog sastava što dovodi do problema sa standardizacijom i varijabilnostima u eksperimentima, također

može biti izvor endotoksina, kontaminacije mikoplazmom, virusima i prionima. Osim toga, serum može imati negativan učinak na stimulaciju, odnosno inhibiciju rasta ili drugih staničnih funkcija kod određenih staničnih kultura.

Upravo zbog nepoznavanja sastava i varijabilnosti koncentracija pojedinih komponenti seruma što dovodi do neponovljivosti eksperimenata, ali i ostalih navedenih mana upotrebe seruma, poželjno je izbjegavati medije suplementirane serumom te se okrenuti upotrebi hranjivog medija bez seruma. Upotreba SFM-a također umanjuje etičke probleme patnje životinja. 2002. godine, proizvedeno je oko 600 000 L FBS-a, od čega je samo 1/3 zadovoljila potrebne uvjete za upotrebu u staničnoj terapiji, a potreba za serumom godišnje raste za 10-15% zbog čega uskoro neće biti moguće zadovoljiti povećane potrebe za serumom. (Karnieli i sur., 2016)

Kod SFM-a, serum se zamjenjuje s odgovarajućim nutritivnim i hormonalnim formulacijama. Već postoje SFM za mnoge primarne kulture stanica i stanične linije, uključujući i rCHO. Jedna od glavnih prednosti korištenja ovakvog medija je mogućnost pripreve najidealnijeg medija za određeni tip stanica s odgovarajućim kombinacijama faktora rasta. (Anonymus 3, 2021) SFM se najčešće sastoji od bazalnog medija suplementiranog s definiranim i/ili nedefiniranim sastojcima, s obzirom na to da su bazalni mediji često u deficitu većine nutritivnih komponenti. Tu spadaju antioksidansi, elementi u tragovima, lipidi, masne kiseline (kolesterol, fosfolipidi), proteini (albumin, transferin), inzulin, hormoni te faktori rasta. (Karnieli i sur., 2016)

2.2.2. Hidrolizati proteina kao sastojci medija bez seruma

Iako su zbog navedenih nedostataka seruma, hranjivi mediji bez seruma poželjni, ne postoji univerzalni SFM za sve stanične linije, stoga je potrebno razviti medij za pojedinu staničnu liniju kako bi se optimirao uzgoj, rast i produktivnost. Samostalno korištenje kemijski definiranih medija bez seruma često dovodi do pada u rastu i proizvodnji proteina, ali i je sam proces razvoja medija za pojedinu staničnu liniju dugotrajan te skup. To se pokušava premostiti korištenjem hidrolizata proteina. Hidrolizati proteina mogu biti dobra opcija kao alternativa serumu jer sadrže oligopeptide, peptide i aminokiseline dobivene hidrolizom kazeina, biljnog i životinjskog tkiva ili kvasca.

Kako je jedan od nedostataka korištenja seruma otežan proces pročišćavanja proizvoda, korištenje hidrolizata može olakšati taj dio procesa na način da umanjuje mogućnost pojave kontaminacija ali i agregata te nepoželjnih glikoformi proteina, stoga je prilikom upotrebe

hidrolizata potrebno staviti fokus i na nizvodni dio biotehnološkog procesa kao i na uzvodni. Dodatak hidrolizata soje, pšenice i kvasca može utjecati na glikozilaciju interferona proizvedenih u CHO stanicama (Ho i sur., 2016).

Sve se više pažnje pridodaje biljnim hidrolizatima proteina kao dodacima mediju bez seruma, jer osim što su izvor nutrijenata (peptida, aminokiselina, ugljikohidrata, lipida), osiguravaju stanicama faktore rasta i antiapoptotičke faktore te stimulirajuće faktore za proizvodnju proteina (Moraes i sur., 2008). Procesom enzimske hidrolize dobije se prvotni proizvod a to je hidrolizat proteina jer sadrži smjesu peptida koji se razlikuju u duljini, aminokiselinskom sastavu i bioaktivnosti. Tome često slijedi korak membranske ultrafiltracije kako bi se peptidi razdvojili po veličini frakcija, međutim, može se dogoditi da prvotni hidrolizati proteina imaju bolja bioaktivna svojstva od frakcija. Park i sur. (2010) pokazali su kako manji peptidi iz soje (<3 kDa) imaju bolja antioksidativna svojstva od većih peptida (> 30 kDa). Dok su Franek i sur. (2000) pokazali kako hidrolizati proteina ne služe samo kao izvor aminokiselina već peptidi dobiveni frakcioniranjem mogu djelovati kao signalne molekule oponašajući faktore rasta i preživljavanja. Istraživanje koje su proveli Lee i sur. (2009) eksperimentiralo je s nekoliko različitih izvora hidrolizata proteina (za koje se prethodno pokazalo kako imaju pozitivan utjecaj na stanični rast) te pokazalo kako smjese hidrolizata imaju pozitivan utjecaj na rast i vijabilnost CHO stanica. Također su došli do zaključka kako dodatak smjese frakcioniranih i nefrakcioniranih biljnih hidrolizata mediju, može poboljšati stanični rast i vijabilnost CHO stanica u usporedbi s medijem kojem je dodan jedan hidrolizat.

S obzirom na to da kemijski definirani medij i hidrolizati proteina dijele neke zajedničke komponente, moguće je da će njihova suplementacija negativno utjecati na sustav zbog prevelikog doziranja pojedinih komponenti zbog čega je potrebno ispitati i odrediti pravilnu dozu hidrolizata za pojedini medij kako bi imala pozitivan efekt.

2.3. LAN

Lan (lat. *Linum usitatissimum*) je jednogodišnja biljka s kratkim vretenastim korijenom koja se već stoljećima koristi u svrhu ekstrakcije ulja. Osim u svrhu dobivanja ulja, lan se uzgaja u tekstilne svrhe te za proizvodnju sjemena. Za uzgoj lana pogodna su plodna, fino teksturirana tla te ilovačka tla. Sjemenke lana (slika 2.), koje su smještene u gornjim dijelovima biljke u okruglim plodovima, izvor su visoko kvalitetnih proteina, topivih vlakana te visokog udjela polinezasićenih

masnih kiselina. Prosječno, lipidi zauzimaju 30-40 % sastava sjemenki lana, proteini 20-25 %, vlaga 4-8 %, pepeo 3-4 % i vlakna 20-25 %, od kojih su 10 % topiva vlakna. Lan je važan izvor fenolnih kiselina koje imaju antioksidativno, antimikrobno i antikancerogeno djelovanje. Također je važan izvor masnih kiselina i minerala, od kojih su najzastupljenije masne kiseline linolenska, linolna i oleinska. Najzastupljeniji minerali u sjemenkama lana su kalcij, mangan, fosfor i kalij. Lanene sjemenke, kao i mnoge druge sjemenke, imaju visok udio globulina, 18.6% i sadrže protein sličan albuminu koji čini 17.7% ukupnih proteina. Proteini lana su bogati argininom, asparaginom i glutaminom, dok su limitirane aminokiseline lizin, metionin i cistein. (Gutierrez i sur., 2010) Iako se lan odavno koristi u ljudskoj populaciji, pokazalo se kako proteini lana imaju potencijal da se koriste kao izvor bioaktivnih peptida, (Nwachukwu i Aluko, 2018)



Slika 2. Prikaz sjemenki lana (lat. *Linum usitatissimum*). (Anonymus 1, 2021)

2.3.1. Pogača lana

Pogača lana je kruti ostatak dobiven nakon prešanja sjemenki lana prilikom proizvodnje lanenog ulja koji se donedavno smatrao otpadom. U najboljem slučaju se koristi kao stočna hrana, ali ima veliki potencijal u prehrani ljudi te može služiti za izolaciju lignana, proteina i polisaharida. Pogača lana sadrži mješavinu polisaharida koja se sastoji od ksiloze, glukoze, galaktoze, arabinoze, ramnoze, fukoze i galakturonske kiseline. Raznovrsnost polisaharida pobudila je interese farmaceutske industrije zbog vlakana topivih u vodi. Pogača lana spada u 8 uljanih pogača koje

dominiraju svjetskim tržištem s udjelom proteina od 32 %. Prema kemijskom sastavu lanena pogača sadrži 11-14 % vode, 30-34 % proteina, 6-9 % masti, 31-35 % ekstrahiranih tvari bez dušika i 9-10 % celuloze. Od biološki važnih aminokiselina sadrži 22,5 % arginina, 8,7 % lizina, 3,1 % cisteina i 5,4 % triptofana od ukupnog aminokiselinskog udjela u pogači. (Mikolaj, 2017).

Pogača lana se uglavnom koristi kao stočna hrana te kao aditiv u pekarskim proizvodima, a ima i potencijal za primjenu u ljudskoj prehrani. S obzirom na to da sadrži značajne koncentracije proteina, vlakana i biološki aktivnih spojeva sve se više ispituje njen potencijal u industriji i znanstvenoj zajednici, pa tako i kao zamjena za serum ili dodatak hranjivom mediju u tehnologiji životinjskih stanica (Logarušić i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1 Kemikalije

Goveđi serumski albumin (BSA), Sigma-Aldrich, SAD

Tripan-plavo, Sigma, St. Louis, SAD

Natrijev hidroksid, Kemika, Hrvatska

Natrijev karbonat, Kemika, Hrvatska

Bakrov sulfat pentahidrat, Kemika, Hrvatska

Kalij natrij tetrahidrat, Kemika, Hrvatska

β -merkaptotanol, LKB, Bromma, Švedska

Bromfenol plavo, Kemika, Zagreb, RH

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

EDTA (Kompleksal III), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Octena kiselina, Kemika, Hrvatska

Trikloroctena kiselina (TCA), Fisher Scientific, Leicestera, UK

Klorovodična kiselina, Kemika, Hrvatska

Glicerol, Kemika, Zagreb

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

SDS (natrijev dodecilsulfat), LKB, Bromma, Švedska

Protein Markers, Lonza Rockland, Maine, SAD

Mini-Protean® TGX™ gelovi, Bio-Rad, Hercules, SAD

Enzimi *Alcalase, Neutrase, Protamex*, Sigma Aldrich, SAD

Medij PowerCHO®-2 CD, Chemically Defined Selective Medium, Lonza, Verviers, Belgija

Rh-inzulin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Metotreksat (MTX), Cerilliant, SAD

Anti-Clumpin Agent, Gibco, SAD

Ala-Gln, Sigma-Aldrich Handels GmbH, Beč, Austrija

Antibiotik antimikotik, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

L-Lactic Acid (L-Lactate) Assay Kit, Megazyme, Bray, Co. Wicklow, Irska

L-Glutamine/Ammonia Assay Kit (Rapid), Bray, Co. Wicklow, Irska

Turbitex® IgG-2, Analyticon® Biotechnologies AG , Njemačka

Glucose GOD-PAP, BIOLABO SAS, Maizy, Francuska

3.1.2.Otopine

Reagens A

Natrijev hidroksid	2g
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
Reagens B2	0.5 mL

Otopina TCA (0.44 M)

Triklor-octena kiselina	7,189 g
Destilirana voda	100 mL

Pufer za uzorke za SDS elektroforezu

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

Pufer za proteinsku elektroforezu

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

Coomassie otopina za bojanje gelova

0,25% Coomassie plavo boja
10 % ledena octena kiselina

50 % glicerol

destilirana voda

3.1.3. Uređaji i oprema

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂ , Memmert, Njemačka

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

Erlenmeyerove tikvice za uzgoj staničnih kultura, 125 mL, Corning, New York, 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), DF 290, NUVE, Turska

Tresilica, Biosan shaker PSU-10i, Biosan, Riga, Latvija

Centrifuga, ECEN-205, MRC Lab, Izrael

Centrifuga, Falcon 6/300, MSE, London, Ujedinjeno Kraljevstvo

Centrifuga, Z 446 K, HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka

Sistem za vertikalnu elektroforezu CVS10D, Clever Scientific Ltd., Rugby, Velika Britanija

Sustav napajanja za elektroforezu, Consort, Turnhout, Belgija

Amicon® □ Ultra Centrifugal Filters – 10K, 50K, Merck Millipore Ltd., Cork, Irska

Amicon® Stirred Cell 50 mL, EMD Millipore Corporation, Billerica, SAD

Stericup® Quick Release Durapore®, 0.22 µm PVDF, 500 mL , Merck, SAD

Ultracel® 1 kDa Ultrafiltration Discs, EMD Milipore Corporation, SAD

Liofilizator, Alpha 1-2 LDplus, Martin Christ, Njemačka

Filtar za špricu, CHROMAFIL® CA-20/25 (S), MACHEREY-NAGEL, Njemačka

Membrana za dijalizu- SnakeSkin® Dialysis Tubing 10K MWCO, Thermo Scientific, SAD

Spektrofotometar Thermo Scientific Genesys 10 S UV/VIS, SAD

Digitalna magnetna mješalica Model 682/1

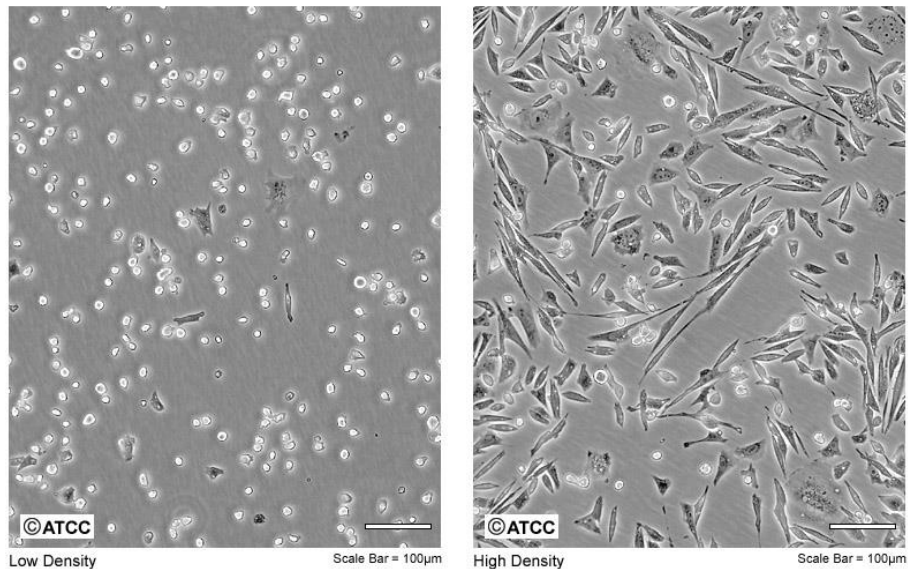
SevenCompact pH/Ion, Mettler-Toledo

MF-Millipore® Membranski filteri, 0.22 µm veličina pora, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Švicarska

3.1.4. Stanična linija CHO DP-12

Tijekom izrade ovog rada korištena je životinjska stanična linija fibroblasta ovarija kineskog hrčka, CHO DP-12, sa sposobnošću proizvodnje rekombinantnog humanog monoklonskog protutijela, anti-IL8. Pohranjena je u *American Type Cell Collection* (slika 2.) banci 8 Manassas, Virginia, SAD, pod oznakom (ATCC®CRL 12444TM). Stanična linija izvorno je adherentna, a naknadno je adaptirana na suspenzijski rast u mediju bez seruma u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i bioransformacija.

ATCC Number: **CRL-12444**
Designation: **CHO DP-12**



Slika 3. CHO DP-12 stanična linija pohranjena u *American Type Cell Collection*. (ATCC, 2021)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprava proteinskog izolata lana

Kod pripreme proteinskog izolata lana korišteno je brašno uljne pogače lana (*Nutrimedica*). U 1400 mL deionizirane vode otopljeno je 70 g brašna (5 % w/v), nakon čega je pH vrijednost podešena na 5,0 pomoću 2 M HCl te je smjesa zagrijana na 37 °C i stavljena na miješanje na magnetskoj miješalici tijekom 4 sata. Smjesi je dodano 0,7 g celuloze (1 % w/v). Tijekom miješanja potrebno je održavati navedene vrijednosti pH i temperature. Nakon 4 sata, miješanje je zaustavljeno te je smjesa ohlađena na sobnu temperaturu, nakon čega joj je pH vrijednost podešena na 10,0 pomoću 2 M NaOH. Slijedilo je centrifugiranje smjese pri 8000xg tijekom 30 minuta pri 10 °C nakon čega je izuzet supernatant kojem je podešena pH vrijednost na 4.2 pomoću 2M NaOH. Tome je uslijedilo miješanje na magnetskoj miješalici 20 minuta te je smjesa ostavljena preko noći u hladnjaku. Nakon toga, smjesa iz hladnjaka je centrifugirana pri 8000xg tijekom 30 minuta pri 10 °C, nakon čega je izdvojeni talog homogeniziran malom količinom destilirane vode čiji je pH

prethodno podešen na 4.2 pomoću 2 M HCl. Slijedilo je centrifugiranje pri 8000xg tijekom 30 minuta pri 10 °C, izuzet je talog koji je homogeniziran malom količinom destilirane vode i podešena mu je pH vrijednost na 7.0 dodatkom 2 M NaOH. Tako pripremljena suspenzija stavljena je na dijalizu preko noći, veličina pora membrana je 10 kDa. Nakon dijalize, smjesa je stavljena na -80 °C te je provedena liofilizacija nakon čega je dobiven proteinski izolat.

3.2.2. Priprava proteinskog hidrolizata lana

Hidrolizat lana dobiven je iz proteinskog izolata lana enzimski, korištenjem komercijalnih mikrobnih proteaza *Alcalase*, *Neutralse* i *Protamex*. Odvagano je 6.5 g liofiliziranog proteinskog izolata lana i otopljeno u 130 mL destilirane vode, nakon što su postignuti idealni uvjeti temperature i pH za određeni enzim, oni su dodani 5 % (w/v) prema supstratu. Za *Alcalase*, idealni uvjeti su 55 °C i pH 8.5, za *Neutralse* su 55 °C i pH 7.0 te 50 °C i pH 7.7 za *Protamex*. Hidroliza je provedena 240 minuta te su prilikom procesa uzimani uzorci za određivanje stupnja hidrolize. Uzorci su uzeti prije dodatka enzima, te za vrijeme djelovanja u 5', 30', 60', 90', 120', 180' i 240'. Prilikom izuzimanja, uzorci su inkubirani 10 minuta na temperaturi vrenja kako bi se deaktivirali enzimi. Nakon procesa hidrolize, smjesa je inkubirana na temperaturi vrenja tijekom 15 minuta te je ohlađena na sobnu temperaturu. Zatim joj je podešena pH vrijednost na 7.4 nakon čega je centrifugirana pri 5000xg tijekom 50 minuta i sterilno filtrirana kako bi se uklonile „nečistoće“ te spriječila pojava kontaminacije do sljedeće uporabe. Filtrat je zatim spremljen na 4 °C.

3.2.3. Frakcioniranje

Proces frakcioniranja proveden je u svrhu dobivanja frakcija proteinskih hidrolizata manjih od 10 i 1 kDa. Dio hidrolizata dobivenih nakon tretiranja enzimima *Alcalase*, *Neutralse* i *Protamex* je sačuvan, dok je ostatak volumena raspoređen u Amicon® tube za ultracentrifugiranje s filterima veličine 50 kDa, hidrolizati su zatim centrifugirani kroz navedeni filter u periodima od po 15 minuta pri 4500xg dok sav volumen nije bio filtriran. Uslijedilo je centrifugiranje kroz filtere koji ne propuštaju molekule veće od 10 kDa koje je provedeno po istom principu kao prijašnje te je na

kraju dobiveno 27 mL frakcija hidrolizata *Alcalase*, 24 mL frakcija hidrolizata *Neutrased* te 36 mL frakcija hidrolizata *Protamex*. Od navedenih volumena, uzeto je pola u svrhu dobivanja frakcija molekula manjih od 1 kDa. Frakcije veličine manje od 1 kDa dobivene su pomoću Amicon® Stirred Cell uređaja za filtraciju pod tlakom (4.5 bar). Dobiveno je 10 mL frakcija hidrolizata *Alcalase*, 11 mL frakcija hidrolizata *Neutrased* te 16 mL frakcija hidrolizata *Protamex*. Pripremljene frakcije su sterilno filtrirane kroz filtere veličine pora 0.22 µm i spremljena na -80 °C.

Tablica 1. Prikaz korištenih hidrolizata i njihovih frakcija proteina uljne pogače lana dobivenih djelovanjem proteolitičkih enzima *Alcalase*, *Neutrased* i *Protamex*, korištenih u dvije različite koncentracije kao dodatak hranjivom mediju tijekom suspenzijskog uzgoja CHO DP-12 stanične linije.

Uzorak	Kratica uzorka
Hidrolizat dobiven djelovanjem enzima <i>Alcalase</i> u koncentraciji od 2 g L ⁻¹	HLA UK 2
Hidrolizat dobiven djelovanjem enzima <i>Alcalase</i> u koncentraciji od 0.5 g L ⁻¹	HLA UK 0.5
Frakcija hidrolizata dobivenog djelovanjem enzima <i>Alcalase</i> veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 2 g L ⁻¹	HLA <10 2
Frakcija hidrolizata dobivenog djelovanjem enzima <i>Alcalase</i> veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 0.5 g L ⁻¹	HLA <10 0.5
Frakcija hidrolizata dobivenog djelovanjem enzima <i>Alcalase</i> veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 2 g L ⁻¹	HLA <1 2
Frakcija hidrolizata dobivenog djelovanjem enzima <i>Alcalase</i> veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 0.5 g L ⁻¹	HLA <1 0.5
Hidrolizat dobiven djelovanjem enzima <i>Neutrased</i> u koncentraciji od 2 g L ⁻¹	HLN UK 2
Hidrolizat dobiven djelovanjem enzima <i>Neutrased</i> u koncentraciji od 0.5 g L ⁻¹	HLN UK 0.5
Frakcija hidrolizata dobivenog djelovanjem enzima <i>Neutrased</i> veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 2 g L ⁻¹	HLN <10 2
Frakcija hidrolizata dobivenog djelovanjem enzima <i>Neutrased</i> veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 0.5 g L ⁻¹	HLN <10 0.5
Frakcija hidrolizata dobivenog djelovanjem enzima <i>Neutrased</i> veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 2 g L ⁻¹	HLN <1 2

Frakcija hidrolizata dobivenog djelovanjem enzima <i>Neutrase</i> veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 0.5 g L ⁻¹	HLN <1 0.5
Hidrolizat dobiven djelovanjem enzima <i>Protamex</i> u koncentraciji od 2 g L ⁻¹	HLP UK 2
Hidrolizat dobiven djelovanjem enzima <i>Protamex</i> u koncentraciji od 0.5 g L ⁻¹	HLP UK 0.5
Frakcija hidrolizata dobivenog djelovanjem enzima <i>Protamex</i> veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 2 g L ⁻¹	HLP <10 2
Frakcija hidrolizata dobivenog djelovanjem enzima <i>Protamex</i> veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 0.5 g L ⁻¹	HLP <10 0.5
Frakcija hidrolizata dobivenog djelovanjem enzima <i>Protamex</i> veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 2 g L ⁻¹	HLP <1 2
Frakcija hidrolizata dobivenog djelovanjem enzima <i>Protamex</i> veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 0.5 g L ⁻¹	HLP <1 0.5

3.2.4. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u

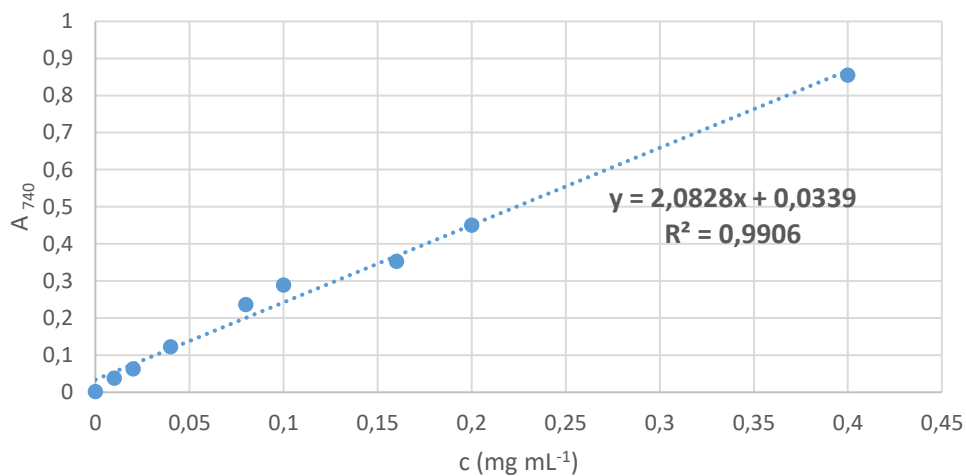
Lowry metoda za određivanje koncentracije proteina se temelji na reakciji bakrenih iona vezanih na amino skupine peptidnih veza i fenolne skupine bočnog ogranka aminokiseline tirozin u proteinu s Folin-Ciocalteu reagensom, pri čemu nastaje kompleks plavo-ljubičastog obojenja sa aporspcijskim maksimumom pri 740 nm.

Folin-Ciocalteu reagens sadrži fosfovolframatnu i fosfomolibdensku kiselinu koje bakreni ioni, koordinirano vezani na amino skupinu peptidne veze i fenolna skupina tirozina reduciraju u volfram i molibden plavilo.

Kako bi se odredila nepoznata koncentracija proteina i uzoraka prvo je potrebno konstruirati baždarni dijagram. Baždarni dijagram je konstruiran pripremom otopina različitih koncentracija BSA (Bovine Serum Albumin) iz ishodišne otopine, $\gamma(\text{BSA}) = 1 \text{ mg mL}^{-1}$. Pripremljeno je po 1 mL standardnih otopina (tablica 2.), te je konstruiran baždarni dijagram (slika 4.)

Tablica 2. Priprema standardnog niza otopina BSA.

Uzorak	Koncentracija (mg mL ⁻¹)	Volumen BSA (mL)	Volumen vode (mL)
S0	0,00	0,00	1,00
S1	0,01	0,01	0,99
S2	0,02	0,02	0,98
S3	0,04	0,04	0,96
S4	0,08	0,08	0,94
S5	0,10	0,10	0,90
S6	0,16	0,16	0,84
S7	0,20	0,20	0,80
S8	0,40	0,40	0,60



Slika 4. Bažadarni dijagram za određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u.

U epruvetu je pipetirano po 1 mL reagensa C te je dodano 200 μ L otopina standardnog niza i uzorka (medij s dodatkom hidrolizata), nakon čega je smjesa promiješana na vortex miješalici. Nakon 15 minuta na sobnoj temperaturi, u svaku epruvetu dodano je i brzo promiješano 100 μ L smjese Folin-Ciocalteu reagensa i dH₂O (1:2) te je smjesa ostavljena 45 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon termostatiranja očitana je apsorbancija standardnog niza i uzoraka pri valnoj duljini od 740 nm, uz slijepu probu (S0).

3.2.5. Određivanje stupnja hidrolize

Stupanj hidrolize (DH, *degree of hydrolysis*) izražava se kao postotni udio topljivih proteina u 0.22 M otopini trikloroctene kiseline (TCA) u odnosu na ukupnu količinu proteina u uzorku. Ukupna količina proteina u uzorku određuje se metodom po Lowry-u opisanoj u poglavlju 3.2.4. Topljivi proteini u otopini TCA određivani su tako da je uzorak hidrolizata proteina pomiješan s 0,44 M otopinom TCA u omjeru 1:1, smjesa je zatim inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je slijedilo centrifugiranje smjese 10 minuta pri 10000 rpm. Nakon centrifugiranja, izdvojen je supernatant u kojem je određena količina topljivih proteina metodom po Lowry-u. Iz dobivenih vrijednosti, stupanj hidrolize izračunat je prema matematičkom izrazu [1].

$$DH(\%) = \frac{\text{koncentracija topljivih proteina (g L}^{-1}\text{) u 0.22 M TCA}}{\text{koncentracija ukupnih proteina (g L}^{-1}\text{)}} \times 100 \quad [1]$$

3.2.6. SDS-PAGE elektroforeza proteina iz uzoraka proteinskih hidrolizata lana

SDS-PAGE elektroforeza korištena je u svrhu povjere učinkovitosti prethodno provedene hidrolize i postupka frakcioniranja. Pomoću elektroforeze razdvojeni su proteini prisutni u uzorcima ukupnih proteinskih hidrolizata te dobivenih frakcija manjih od 10 i 1 kDa. Također su na gel stavljeni uzorci uzeti tijekom provođenja hidrolize kako bi se vizualizirao tijek postupka provođenja hidrolize proteina lana pomoću različitih enzima. Uzeto je 12 μL svakog uzorka i pomiješano s 3 μL Laemmli pufera za uzorke nakon čega je smjesa ostavljena 3 minute u vodi zagrižanoj na 100 °C. Zatim su uzorci naneseni na komercijalni Bio-rad gel (10 μL uzorka po jažici), zajedno sa smjesom standardnih proteina (5 μL). Elektroforeza je provedena u SDS-puferu za elektroforezu 50 minuta, pri naponu od 180 V. Nakon završetka, gel je obojen otopinom *Comassie* plavo tijekom jednog sata kako bi se vizualizirale proteinske vrpce, odbojavanje gela provedeno je pomoću 7 %-tne otopine octene kiseline.

3.2.7. Uzgoj CHO DP-12 stanica u Erlenmeyerovim tikvicama za uzgoj stanica

Uzgoj stanica započinje odmrzavanjem ampule iz radne banke stanica s $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ naglim uranjanjem u vodenu kupelj zagrijanu na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ampule su volumena od 1 mL i koncentracije 1×10^7 stanica mL^{-1} . Odmrznuti sadržaj ampule prenesen je u Erlenmeyerovu tikvicu za uzgoj u koju je prethodno dodano 20 mL medija za uzgoj (PowerCHO®-2 CD). U medij se dodaje 1 % antibiotika, 4 % glutamax-a, 0.25 % AC-s (anticlumping agens) te inzulin (0.02 %) i MTX 0.009 % (seleksijski reagens). Stanice su zatim stavljene u inkubator na tresilicu pri temperaturi od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz odgovarajuću atmosferu (95 % zraka + 5 % CO_2). Stanice su uzgajane pri brzini miješanja od 160 rpm do koncentracije 4×10^6 stanica mL^{-1} , nakon čega se stanice precjepljuju u svježi hranjivi medij na početnu koncentraciju od 250 000 stanica mL^{-1} . Potrebno je pratiti zamućenje medija jer ukoliko dođe do promjene, to ukazuje na pojavu kontaminacija u kulturi.

3.2.8. Utjecaj dodatka hidrolizata i frakcija proteina iz uljne pogače lana na rast i produktivnost CHO DP-12 stanica

Stanice su nacijepljene u Erlenmeyerove tikvice za uzgoj u početnoj koncentraciji od 250 000 stanica mL^{-1} u ukupnom volumenu od 20 mL. 20 mL čine medij, stanična suspenzija te potrebni volumeni hidrolizata i njihovih frakcija. Hidrolizati proteina, odnosno frakcije dodane su u koncentracijama od 0.5 g L^{-1} te 2 g L^{-1} . Nakon što je izračunat potreban volumen stanične suspenzije za željenu početnu koncentraciju stanica te volumen hidrolizata i frakcija proteina željene koncentracije, dodaje se ostatak medija do krajnjeg volumena od 20 mL. Kao kontrola korišten je medij s navedenim dodacima, bez dodataka hidrolizata proteina ili frakcija. Dinamika rasta stanica praćena je svakodnevno brojanjem dok stanice nisu ušle u fazu odumiranja, stanice su brojane pomoću Neubauerove komorice uz dodatak boje tripan-plavo. Tijekom procesa brojanja stanica, izuzeta je suspenzija koja se sastoji od hranjivog medija i stanica, centrifugiranjem suspenzije dobiva se supernatant kojeg čini hranjivi medij koji je spremljen u Eppendorf kivete na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ radi daljnje obrade i analiza.

3.2.9. Određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*

Za određivanje broja stanica koristi se metoda tripan-plavo. Uzorak za brojanje pripremljen je tako da je izuzeto 0.2 mL suspenzije stanica iz Erlenmeyerovih tikvica koje smo prethodno malo promiješali kako bi uzorak bio reprezentativan. Izuzeta suspenzija stanica je resuspendirana te je odvojeno 10 μ L i pomiješano s 10 μ L tripan-plavo bojila. Od tako pripremljenog uzorka uzet je alikvot od 10 μ L i nanesen na Neubauerovu komoricu. Ona se sastoji od 9 kvadrata površine 0,0025 mm² i dubine 0,1 mm (slika 5). Stanice se broje u 4 kvadrata koji se nalaze u kutevima velikog kvadrata. Kvadrati u kojima se broje stanice, podijeljeni su na 16 (4x4) manjih kvadrata. Kod ove metode, mrtve se stanice razlikuju od živih po tome što će biti obojene plavo zbog oštećene membrane, za razliku od živih stanica koje neće biti obojene. Broj stanica se računa prema formuli [2]:

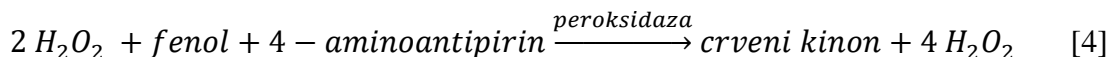
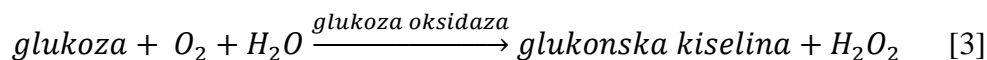
$$\text{broj stanica mL}^{-1} \text{ suspenzije} = \text{broj stanica izbrojenih u sva 4 kvadrata} \times 5000 \times \text{faktor razrjeđenja} \quad [2]$$



Slika 5. Prikaz Neuebaureove komorice za brojanje stanica. (Anonymus 2, 2021)

3.2.10. Određivanje koncentracije glukoze u uzorcima hranjivog medija za uzgoj

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



Standard: glukoza 5,55 mmol/ L

Uvjeti određivanja:

T: 37°C

Valna duljina: 500 nm

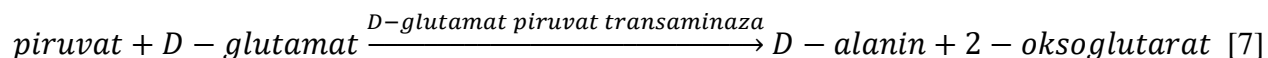
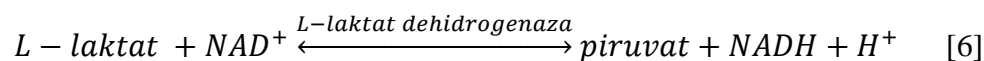
Reakcija: porast apsorbancije

Uzorak za mjerenje apsorbancije je pripremljen na način da je u epruvetu uzeto 10 µL uzorka medija za uzgoj, standarda glukoze ukoliko se priprema uzorak standarda ili 10 µL destilirane vode ukoliko se priprema uzorak slijepe probe, te 1 mL Glucose GOD-PAP reagensa. Uzorci su zatim inkubirani na temperaturi od 37 °C kroz 10-15 minuta. Koncentracija glukoze proporcionalna je koncentraciji crvenog kinona koja se određuje spektrofotometrijski na temelju intenziteta obojenja njegove otopine. Mjerenje se provodi pri valnoj duljini od 500 nm. Koncentracija glukoze u mediju za uzgoj izračunata je prema formuli:

$$c_{\text{glukoza}} [\text{mmol L}^{-1}] = \frac{A_{\text{uzorak}}}{A_{\text{standard}}} \times c_{\text{standard}} \times \text{faktor razrjeđenja} \quad [5]$$

3.2.11. Određivanje koncentracije laktata u uzorcima hranjivog mediju za uzgoj

Laktat u uzorcima hranjivog medija za uzgoj određen je pomoću komercijalnog Megazyme testa. Koncentracija laktata u uzorcima hranjivog medija za uzgoj određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 340 nm. Megazyme test temelji se na sljedećim enzimskim reakcijama:



U prvoj reakciji se djelovanjem L-laktat dehidrogenaze, L-laktat oksidira do piruvata pri čemu nastaje NADH. Prva reakcija je reverzibilna te je potrebno pomaknuti ravnotežu u smjeru sinteze piruvata. U drugoj reakciji nastali piruvat se u prisutnosti D-glutamata, kataliziran D-glutamat-piruvat transaminazom, prevodi u D-alanin i 2-oksoglutarat. Koncentracija nastalog NADH proporcionalna je koncentraciji laktata, a NADH se mjeri na temelju povećanja apsorbancije pri 340 nm. Uzorci se pripremaju prema uputama proizvođača, Volumeni svih otopina navedenih u protokolu umanjani su $\frac{3}{4}$ što je prikazano u tablici 3.

Tablica 3. Postupak pripreme uzoraka i mjerenja koncentracije L-laktata.

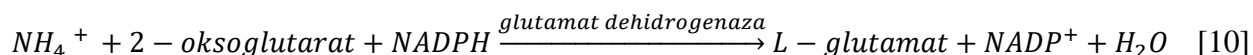
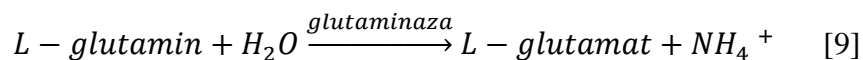
	Slijepa proba (μL)	Uzorak (μL)
Destilirana voda (25°C)	400	375
Uzorak	-	25
Otopina 1	125	125
Otopina 2	25	25
Suspnczija 3	5	5
Promiješati, izmjeriti A1 nakon otprilike 3 minute		
Suspnczija 4	5	5
Promiješati, izmjeriti A2 na kraju reakcije, nakon 10 minuta		

Nakon izmjerenih apsorbancija, odredi se razlika apsorbancija (A2-A1) za slijepu probu i uzorak, te se od razlike apsorbancija uzorka oduzme razlika apsorbancija slijepe probe čime se dobije ΔA_{laktat} . Koncentracija laktata zatim se računa prema sljedećoj formuli:

$$c_{laktat} [mmol L^{-1}] = 0.3204 \times \Delta A_{laktat} \times 11.1 \times faktor\ razrjeđenja \quad [8]$$

3.2.12. Određivanje koncentracije amonijaka u uzorcima hranjivog medija za uzgoj

Amonijak u uzorcima hranjivog medija za uzgoj određen je pomoću komercijalnog Megazyme testa. Koncentracija amonijaka određena je spektrofotometrijski prema sljedećim specifičnim reakcijama:



Količina formiranog NADP⁺ proporcionalna je količini amonijaka, a konzumacija NADPH mjeri se spektrofotometrijski smanjenjem apsorbancije pri 340 nm. Uzorci su pripremljeni prema protokolu navedenom u uputama proizvođača. Svi volumeni umanjeni su za ¾ kako bi se povećala iskoristivost kita što je prikazano u tablici 4.

Tablica 4. Postupak pripreme uzoraka i mjerenja koncentracije amonijaka.

	Slijepa proba (µL)	Uzorak (µL)
Otopina 1 (pufer)	-	-
Uzorak	-	25
Suspencija 4	-	-
Promiješati, inkubirati 5 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim dodati:		
Destilirana voda (25 °C)	455	430
Otopina 2	75	75
Otopina 3	50	50
Promiješati, izmjeriti A1 na kraju reakcije, nakon otprilike 4 minute		
Suspencija 5	5	5
Promiješati, izmjeriti A2 na kraju reakcije, nakon otprilike 5 minuta		

Koncentracija amonijaka određena je prema sljedećim formulama:

$$\Delta A_{\text{amonijak}} = (A1 - A2)_{\text{uzorak}} - (A1 - A2)_{\text{slijepa proba}} \quad [11]$$

$$c_{\text{amonijak}} [mmol L^{-1}] = 0.06325 \times \Delta A_{\text{amonijak}} \times 58.72 \times \text{faktor razrjeđenja} \quad [12]$$

3.2.13. Određivanje koncentracije IgG u hranjivom mediju za uzgoj

Koncentracija proizvedenog IgG-a u hranjivom mediju za uzgoj određena je pomoću imunodetekcijskog kita *Turbidex*® IgG-2 testa koji služi za kvantitativnu detekciju IgG-a u humanom serumu, plazmi i cerebrospinalnoj tekućini. Uzorci su pripremljeni prema protokolu navedenom u uputama proizvođača. Kao slijepa proba korišten je početni medij za uzgoj stanica, te su svi volumeni navedeni u protokolu umanjeni za 1/3 kako bi se povećala iskoristivost kita kao što je prikazano u tablici 5.

Tablica 5. Postupak pripreme uzoraka i mjerenja koncentracije IgG-a.

	Slijepa proba (μL)	Uzorak (μL)
Reagens 1	500	500
Uzorak	-	20
Medij	20	-
Promiještai, inkubirati 5 minuta na 37 °C te očitati A1 pri 340 nm.		
Reagens 2	40	40
Destilirana voda	60	60
Promiještai, inkubirati 5 minuta na 37 °C te očitati A2 pri 340 nm.		

Koncentracija nastalog IgG-a računa se kao ΔA ($A_2 - A_1$) te se vrijednost očitava pomoću prethodno konstruiranog baždarnog dijagrama s poznatim koncentracijama protutijela.

3.2.14. Izračunavanje parametara rasta CHO DP-12 stanica

3.2.14.1. Određivanje najveće specifične brzine rasta stanica (μ_{max})

Najveća specifična brzina rasta stanica u eksponencijalnoj fazi rasta šaržnog uzgoja računa se prema jednadžbi:

$$\mu_{max} = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt} \quad [13]$$

gdje je:

N-broj stanica

dN- povećanje broja stanica

dt- vremenski interval

Integracijom gornje jednadžbe, dobiva se izraz jednadžbe pravca koja se dobije određivanjem broja stanica u kulturi u ovisnosti o vremenu:

$$\ln N = \ln N_0 + \mu(t - t_0) \quad [14]$$

Nagib pravca, odnosno njegov koeficijent smjera predstavlja najveću specifičnu brzinu rasta stanica:

$$\mu_{max} = \frac{\ln N - \ln N_0}{\Delta t} \quad [15]$$

N- broj stanica u 1 mL na kraju eksponencijalne faze

N₀- broj stanica u 1 mL na početku eksponencijalne faze

Δt- vremenski interval eksponencijalne faze (dan)

3.2.14.2. Određivanje specifične produktivnosti (Q_p)

$$Q = \frac{c}{\Delta t \times \Delta N} \quad [16]$$

ΔN = N_{kraj} eksponencijalne faze – N_{početak} eksponencijalne faze (stanica mL⁻¹)

Δt = t_{kraj} eksponencijalne faze – t_{početak} eksponencijalne faze (dan)

c- koncentracija protutijela (mg mL⁻¹)

3.2.14.3. Određivanje volumetrijske produktivnosti

$$\text{Volumetrijska produktivnost} = \frac{c}{t} \quad [17]$$

c- koncentracija protutijela (mg mL⁻¹)

t- trajanje uzgoja (dan)

3.2.15. Statistička obrada podataka

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

$$x_{sr} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [18]$$

s pripadajućim standardnim devijacijama (s):

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - x_{sr})^2} \quad [19]$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kulture životinjskih stanica veoma su važne za proizvodnju velikog broja terapeutika poput hormona, protutijela, interferona, faktora zgrušavanja i cjepiva. Vrlo je bitno optimizirati uvjete uzgoja kako bi se dobile veće količine visoko kvalitetnog proizvoda s najvećom ekonomskom isplativosti. Kako bi se postigli što bolji uvjeti uzgoja, potrebno je obratiti veliku pozornost hranjivom mediju kao najvažnijoj komponenti u uzgoju stanica, a kao bitan sastojak hranjivog medija, ističe se serum. Serum, osim što je bogat proteinima, bitan je izvor faktora rasta i hormona koji potiču rast i proliferaciju stanica, međutim, korištenje životinjskog seruma nosi brojne probleme poput visoke cijene, neujednačenog sastava, povećanog rizika od kontaminacije te otežanog pročišćavanja. (Merten, 1999) Zbog navedenih nedostataka, nastoje se naći prigodne zamjene serumu koje trebaju imati jednak ili bolji utjecaj na rast i produktivnost kultura životinjskih stanica. Biljni hidrolizati se u navedenu svrhu proučavaju već nekoliko desetljeća

Projekt Hrvatske zaklade za znanost „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj“ u sklopu kojeg je izrađen ovaj diplomski rad, istražuje upravo utjecaj biljnih hidrolizata lana i konoplje kao zamjene serumu i dodatku hranjivom mediju za uzgoj. U prijašnjim eksperimentima ispitan je, među ostalim, utjecaj hidrolizata ukupnih proteina lana na rast i produktivnost adherentne stanične linije CHO DP-12. Ovim radom nastojao se ispitati utjecaj hidrolizata ukupnog sadržaja peptida, ali i peptidnih frakcija ispod 10 i ispod 1 kDa na rast i produktivnost suspenzijske stanične linije CHO DP-12 kako bi se dobio bolji uvid u djelovanje lanenih hidrolizata kod uzgoja kultura životinjskih stanica te jesu li dostojna zamjena serumu.

Hidrolizati ukupnih proteina i njihove frakcije dobivene su djelovanjem tri proteolitička enzima, *Alcalase*, *Neutralse* i *Protamex*, te je ispitan njihov utjecaj na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije u dvije različite koncentracije. Rast stanične linije praćen je Trypan-plavo metodom, dok je produktivnost, odnosno koncentracija proizvedenog rekombinantnog proteina mjerena pomoću komercijalnog *Turbidex* kita. Istražen je i utjecaj dodataka hidrolizata na metabolizam stanične linije. Praćena je potrošnja glukoze kao glavnog izvora energije kod uzgoja životinjskih stanica kao i nastanak laktata, nusprodukta koji u velikim količinama nastaje upravom metabolizmom glukoze, a ima negativan učinak na rast i produktivnost stanica u koncentracijama iznad 20 mmol L⁻¹ (Tayi i Butler, 2014). Osim laktata, praćena je i

promjena koncentracije amonijaka, nusprodukta koji nastaje metabolizmom glutamina kao i spontanom termalnom degradacijom navedene aminokiseline pri 37 °C (Amable i Butler, 2008).

4.1. ODREĐIVANJE STUPNJA HIDROLIZE PROTEINSKOG IZOLATA ULJNE POGAČE LANA DJELOVANJEM PROTEAZA *ALCALASE*, *NEUTRASE* I *PROTAMEX*

Proteinski izolati uljne pogače lana hidrolizirani su djelovanjem proteolitičkih enzima *Alcalase*, *Neutrase* i *Protamex* u 3 zasebna eksperimenta. Enzimi su dodani 5 % (w/v) u odnosu na supstrat te je hidroliza provođena 240 minuta. Uzorci za određivanje stupnja hidrolize uzeti su prije dodatka enzima te u 240'. Stupanj hidrolize izračunat je prema izrazu [1] te su dobiveni rezultati prikazani u tablici 6.

Tablica 6. Prikaz vrijednosti stupnja hidrolize (DH) proteinskog izolata uljne pogače lana djelovanjem proteolitičkih enzima *Alcalase*, *Neutrase* i *Protamex*.

	DH (%)
<i>Alcalase</i>	56,61
<i>Neutrase</i>	44,63
<i>Protamex</i>	47,92

Iz rezultata je vidljivo kako se najviši stupanj i učinkovitost hidrolize proteinskog izolata uljne pogače lana postiže djelovanjem enzima *Alcalase* i iznosi 56,61 %. Tome slijedi djelovanje enzima *Protamex* kojim je postignut stupanj hidrolize od 47,92 % dok je najniži stupanj hidrolize postignut djelovanjem enzima *Neutrase* (44.63 %). Učinkovitost hidrolize ovisi o uvjetima u kojima se provodi hidroliza, temperaturi, pH vrijednosti, omjeru enzim/supstrat, vremenu i vrsti enzima. Dobiveni rezultati slažu se s prijašnje provedenim eksperimentima (Logarušić i sur., 2020; Logarušić i sur., 2021) hidrolize lana korištenjem navedenih proteolitičkih enzima koji su također dodani u koncentraciji od 5 % (w/v) prema supstratu gdje je najviši stupanj hidrolize postignut djelovanjem enzima *Alcalase*, zatim *Protamex*, te je najniži stupanj hidrolize dobiven djelovanjem enzima *Neutrase*.

4.2. ANALIZA PROTEINSKIH HIDROLIZATA I PEPTIDNIH FRAKCIJA

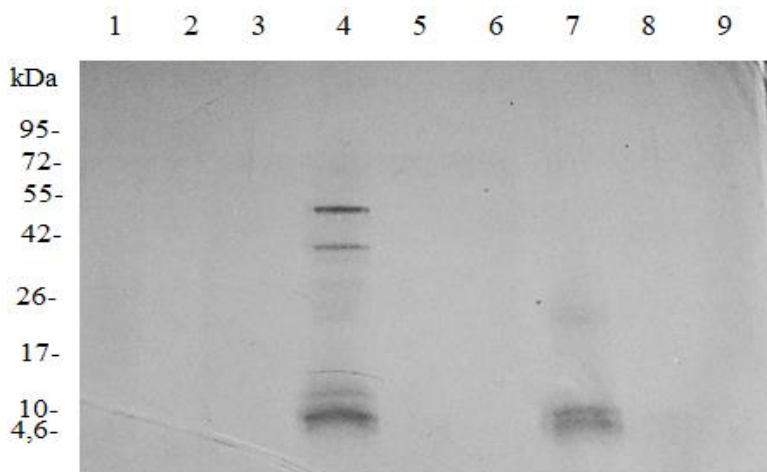
Nakon provedene hidrolize proteinskog izolata uljne pogače lana proteolitičkim enzimima te frakcioniranja dobivenih hidrolizata (postupak opisan u 3.2.3.), uzeti su uzorci koji su korišteni za određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u. Kako bi se mogla odrediti koncentracija proteina u uzorcima, prvo je konstruiran baždarni dijagram s poznatim koncentracijama (slika 4.).

Tablica 7. Prikaz vrijednosti koncentracije proteina izmjerenih u ukupnim hidrolizatima i frakcijama hidrolizata proteina uljne pogače lana.

Ukupni hidrolizat proteina	c (g L ⁻¹)
HLA	69,002
HLN	62,840
HLP	70,202
<10 kDa	
HLA	70,602
HLN	53,638
HLP	60,039
<1 kDa	
HLA	46,036
HLN	18,749
HLP	32,19

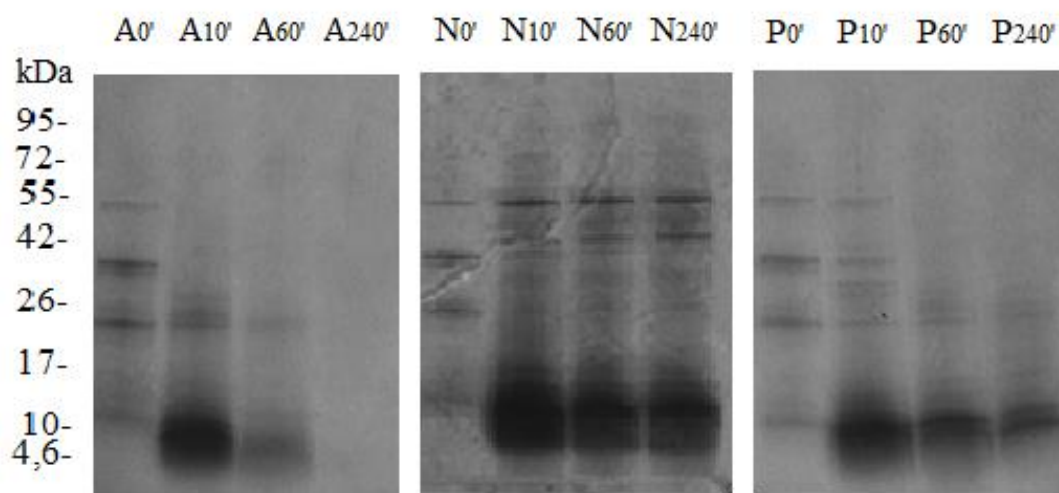
U tablici 7. prikazane su vrijednosti dobivenih koncentracija proteina određenih u uzorcima ukupnih hidrolizata (UH) i frakcija hidrolizata (FH) proteina uljne pogače lana. Iz dobivenih vrijednosti vidljivo je kako je najviša koncentracija proteina u uzorcima UH te se ona smanjuje sa stupnjevima frakcioniranja, što je očekivano s obzirom na to da su određeni proteini u postupku frakcioniranja eliminirani veličinom pora filtera. Koncentracija proteina u uzorcima frakcija ispod 10 kDa ne razlikuje se puno od uzoraka UH što možemo pripisati tome da dolazi do blagog ukoncentriravanja uzoraka s obzirom na to da volumen uzorka uzet za frakcioniranje nije u potpunosti centrifugiran već je malen udio zadržan iznad filtera, drugi razlog je uspješnost hidrolize proteinskog izolata što dovodi do malenog udjela proteina u uzorcima UH koji su veličine iznad

10 kDa zbog čega su uspješno filtrirani. Smanjenje koncentracije proteina kod uzoraka ispod 1 kDa u odnosu na uzorke ispod 10 kDa govori kako postoji određena količina proteina koji se nalaze u rasponu veličina od 1 do 10 kDa. Koncentracija proteina ispod 10 kDa, a pogotovo ispod 1 kDa najniža je kod *Neutralse* što se slaže s dobivenim stupnjem hidrolize, koji je najmanji te se također poklapa s rezultatima SDS PAGE gel elektroforeze na slici 6. gdje su u uzorku ukupnog hidrolizata proteina *Neutralse* (uzorak 4) vidljiviji bendovi nepocijepanih proteina. Također se na prikazu tijekom hidrolize (slika 7., uzorci 'N') vidi najmanja učinkovitost hidrolize djelovanjem enzima *Neutralse*. Isto tako, na prikazu gela nešto su slabije vidljivi bendovi kod uzorka ukupnog hidrolizata dobivenih enzimom *Protamex* (slika 6., uzorak 7), međutim vidljivi su u odnosu na uzorke dobivene enzimom *Alcalase* što se poklapa s rezultatom stupnja hidrolize gdje je *Protamex* na drugom mjestu po učinkovitosti. Isto tako, na prikazu tijekom hidrolize pomoću SDS PAGE gel elektroforeze (slika 7) uzorci enzima *Protamex*, 'P', odnosno bendovi, vidljiviji su nego kod uzoraka enzima *Alcalase*, 'A'.



Slika 6. Prikaz gela nakon provedene SDS elektroforeze. Prikazani su uzorci redom: ukupan hidrolizat proteina nakon djelovanja enzima *Alcalase* (1) te frakcija ispod 10 kDa (2) i ispod 1 kDa(3), ukupan hidrolizat proteina nakon djelovanja enzima *Neutralse* (4) te frakcija ispod 10 kDa (5) i ispod 1 kDa (6), ukupan hidrolizat proteina nakon djelovanja enzima *Protamex* (7) te frakcija ispod 10 kDa (8) i ispod 1 kDa (9).

Iz slike 6. vidljivo je kako se rezultati stupnja hidrolize podudaraju s rezultati SDS PAGE gel elektroforeze gdje je enzim *Alcalase* proveo najučinkovitiju hidrolizu (uzorci 1-3), *Protamex* koji ima nešto manji stupanj hidrolize pokazuje bendove u uzorku ukupnog hidrolizata (7) te najvidljivije bendove ima UH dobiven djelovanjem enzima *Neutrased* koji ujedno ima najmanji stupanj hidrolize. Frakcije veličine ispod 1 kDa nisu vidljive na gelu što znači da je frakcioniranje uspješno provedeno. Svi uzorci na gelu razrijeđeni su 10x.

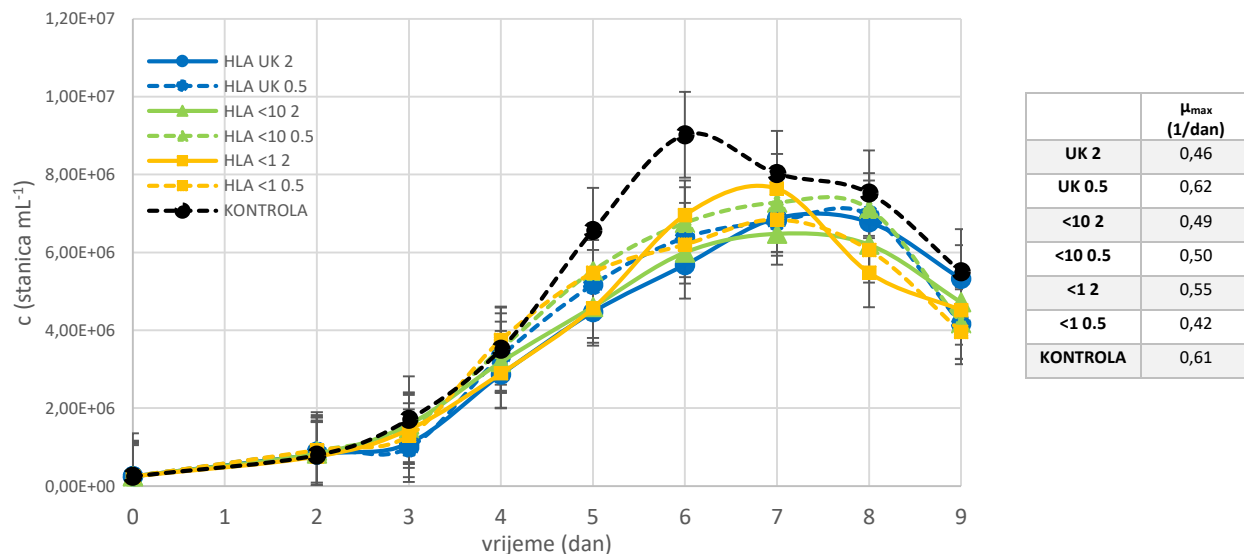


Slika 7. Prikaza tijeka hidrolize proteinskog izolata brašna uljne pogače lana tijekom 240 minuta djelovanjem proteolitičkih enzima *Alcalase*, *Neutrased* i *Protamex* ('A', 'N' i 'P' redom na slici).

Potrebno je napomenuti kako su svi uzorci razrijeđeni 10x, osim uzorka 'N0' koji je razrijeđen 100x. Rezultati prikaza tijeka hidrolize slažu se sa stupnjevima hidrolize gdje je najučinkovitije djelovanje imao enzim *Alcalase*. Vidljivo je kako se s duljim vremenom djelovanja enzima smanjuje broj i vidljivost bendova, što je najvidljivije u uzorcima *Alcalase* i *Protamex*. Na prikazanom gelu, također je vidljivo kako nema prevelike razlike u uzorcima uzorkovanim u 60' i 240' što znači da se većina peptidnih veza cijepala u prvih sat vremena hidrolize što odgovara rezultatima istraživanja koje su proveli Tang i sur. (2009) gdje je provedena hidroliza izolata konoplje sa šest različitih proteaza.

4.3. UČINAK PROTEINSKOG HIDROLIZATA I NJEGOVIH FRAKCIJA DOBIVENIH ENZIMOM *ALCALASE* NA RAST, PRODUKTIVNOST I METABOLIZAM CHO DP-12 STANICA.

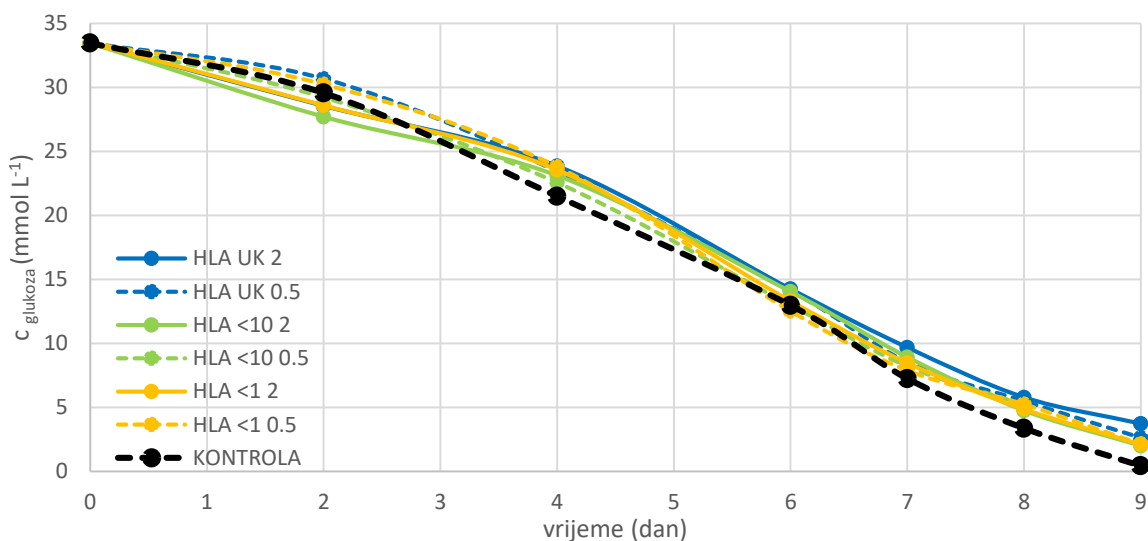
Hranjivi medij je, umjesto serumom, supstituiran ukupnim hidrolizatima i frakcijama proteina uljne pogače lana dobivenih djelovanjem proteolitičkog enzima *Alcalase*. Medij je supstituiran ukupnim hidrolizatima (HLA UK), frakcijama proteina ispod 10 kDa (HLA <10) te frakcijama ispod 1 kDa (HLA <1). Ispitan je dodatak hidrolizata i frakcija u dvije koncentracije, 2 g L⁻¹ i 0.5 g L⁻¹. Praćenjem krivulje rasta, potrošnje glukoze te nakupljanja laktata i amonijaka može se dobiti uvid u ponašanje stanične linije tijekom uzgoja.



Slika 8. Krivulja rasta CHO DP-12 stanica tijekom 9 dana uzgoja u hranjivom mediju (kontrola) i hranjivom mediju s dodatkom hidrolizata i frakcija uljne pogače lana dobivenih djelovanjem enzima *Alcalase*. Desno se nalazi prikaz vrijednosti najvećih specifičnih brzina rasta (μ_{\max}) za pojedini uzorak.

Iz krivulje rasta vidljivo je kako dodani hidrolizati lana dobiveni djelovanjem *Alcalase* imaju blago negativan utjecaj na rast stanične linije CHO DP-12. Najbolji rast ostvaren je u kontroli, odnosno SFM bez dodatka hidrolizata dok su ostali uzorci imali nešto slabiji rast, međutim nema puno razlike među njihovim krivuljama rasta. Kod većine uzoraka faza prilagodbe

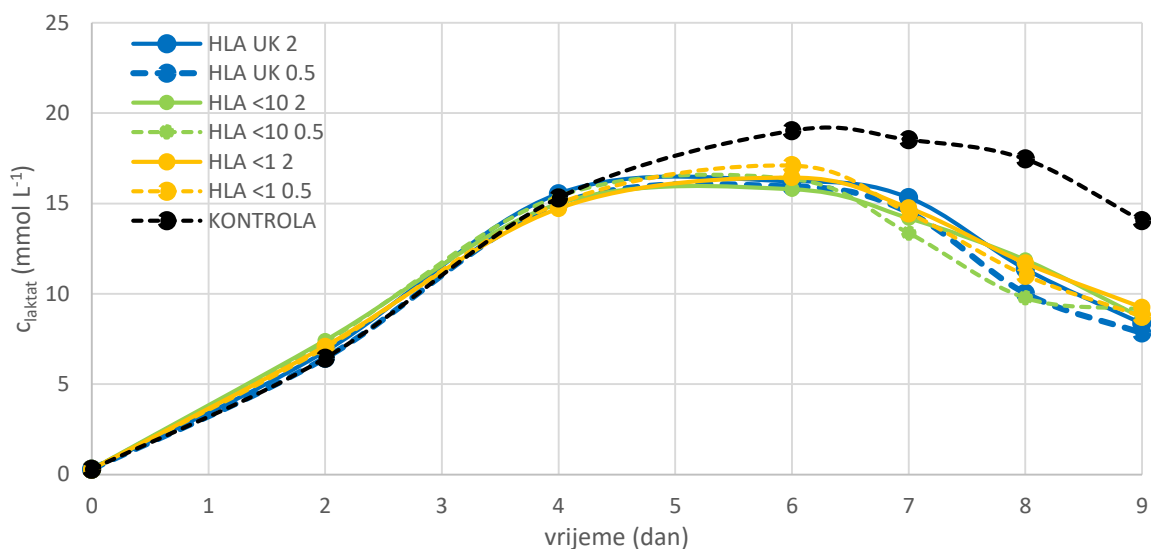
(lag faza) trajala je 3 dana, nakon čega su stanice ušle u eksponencijalnu fazu rasta. Kraj te faze bio je za većinu uzoraka 6.dan, nakon čega su stanice ušle u stacionarnu fazu i fazu odumiranja. Prva dva dana uzgoja nema razlike u rastu među svih sedam uzoraka, zatim kontrola i uzorci HLA <10 u obje koncentracije te HLA <1 u koncentraciji 2 g L⁻¹ ulaze u eksponencijalnu fazu, ostatak uzoraka ušao je u eksponencijalnu fazu dan kasnije. Od četvrtog dana postaje vidljivija razlika u krivulji rasta uzoraka s hidrolizatima u odnosu na kontrolu koja pokazuje bolji rast, ostatak uzorak je dosta sličan gdje uzorci s manjom koncentracijom od 0.5 g L⁻¹ pokazuju nešto bolji rast od 3. do 5.dana, nakon čega krivulje rasta postaju opet sličnije. Uzorak HLA <1 2 g L⁻¹ pokazuje najvišu koncentraciju stanica 7.dan nakon čega ulazi u fazu odumiranja te ima veći pad broja stanica u odnosu na druge uzorke. Vrijednosti najvećih specifičnih brzina rasta podudaraju se s krivuljama rasta gdje kontrola ima veću vrijednost u odnosu na ostale uzorke (0.61 dan⁻¹), uzorak UK 0.5 pokazuje vrijednost sličnu kontroli (0.62 dan⁻¹), razlog tome je, iako je koncentracija stanica niža nego kod kontrole, eksponencijalna faza je kod navedenog uzroka trajala kraće.



Slika 9. Prikaz promjene koncentracije glukoze u hranjivom mediju tijekom uzgoja stanica.

Na grafičkom prikazu vidljiva je podjednaka potrošnja glukoze za vrijeme uzgoja tijekom 9 dana. Kontrola ima najveću krajnju potrošnju glukoze koja se slaže s najvišom koncentracijom stanica postignutom u tom uzorku, također na kraju uzgoja kontrola ima najvišu koncentraciju

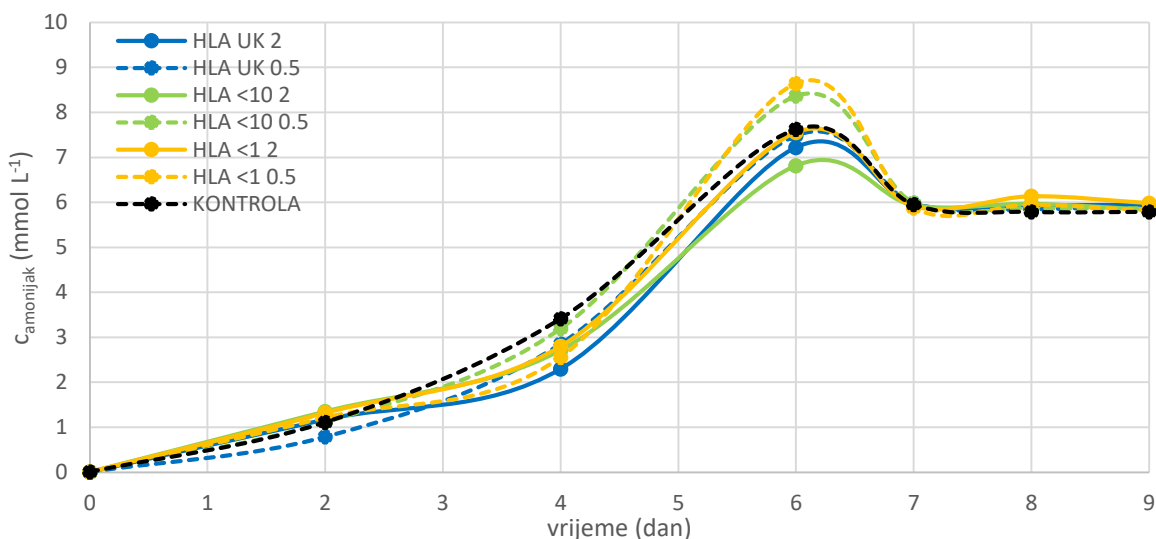
stanica ($5.5 \cdot 10^6$ stanica mL^{-1}) te najnižu koncentraciju glukoze ($0,41625 \text{ mmol L}^{-1}$). Ostatak uzoraka ima nešto manju potrošnju glukoze što se slaže s krivuljom rasta (slika 8.) gdje je vidljiv malo slabiji rast u odnosu na kontrolni uzorak. Krivulja potrošnje glukoze potvrđuje očekivanja, a to je njena konstantna potrošnja kao hranjive tvari za rast i staničnu diobu.



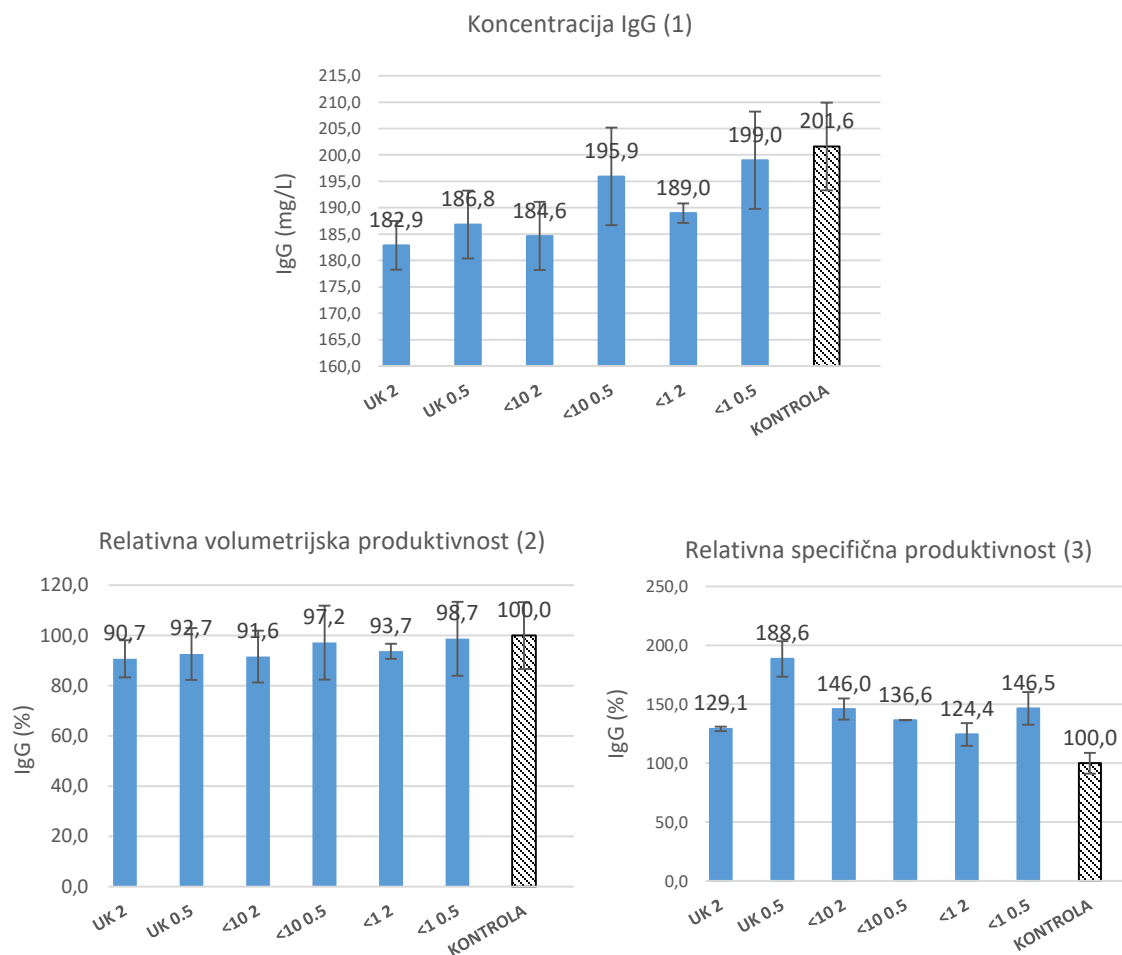
Slika 10. Prikaz promjene koncentracije laktata u hranjivom mediju tijekom uzgoja stanica.

Iz krivulje promjene koncentracije laktata vidljivo je kako prva četiri dana sve krivulje prate isti trend proizvodnje laktata, nakon čega kontrolni uzorak postiže veću proizvodnju laktata što se slaže s krivuljom rasta (slika 8.) gdje stanice u kontroli tada počinju bolje rasti te postižu veću koncentraciju stanica od ostalih uzoraka. Koncentracija laktata u kontroli najviša je 6.dan što se slaže s koncentracijom stanica koja je tada najviša, međutim koncentracija laktata kod ostalih uzoraka počinje stagnirati od 4. dana što nije očekivano s obzirom na to da su uzorci s dodanim hidrolizatima proteina tada i dalje u eksponencijalnoj fazi rasta. Na kraju uzgoja, kontrolni uzorak ima najvišu koncentraciju laktata od $14,05 \text{ mmol L}^{-1}$. Pad koncentracije laktata pri kraju uzgoja poklapa se s literaturnim navodima jer je moguće da dolazi do promjene u metabolizmu te stanice počinju koristiti laktat kao izvor energije (Mulukutla i sur., 2012). Konzumacija laktata događa se kada je njegova koncentracija visoka dok je koncentracija glukoze niska kao i brzina njene potrošnje.

Osim laktata, kao nusprodukt tijekom uzgoja stanica, nastaje i amonijak. Prikaz promjene koncentracije amonijaka u mediju za vrijeme uzgoja CHO DP-12 stanica s dodanim hidrolizatima lana i kontrolnim uzorkom prikazan je na slici 11. Sve krivulje prate isti trend, amonijak je podjednako nastajao u svim uzorcima te je dostigao najvišu koncentraciju 6. dan, nakon čega koncentracija počinje padati te od 7. dana stagnira, što se ne podudara s literaturnim navodima. Pokazano je kako koncentracija amonijaka iznad 3 mM L^{-1} inhibira stanični rast (Tayi i Butler, 2014), navedena koncentracija postignuta je otprilike četvrtog dana međutim gledajući krivulju rasta (slika 8) nije vidljiva inhibicija rasta u tim danima s obzirom na to da su tada svi uzorci bili u eksponencijalnoj fazi rasta. Nešto viša koncentracija amonijaka nastala je u uzorcima s dodanom koncentracijom hidrolizata i frakcija od 0.5 g L^{-1} za razliku od onih s dodanom koncentracijom od 2 g L^{-1} . Stagnirajuća koncentracija amonijaka od otprilike 6 mM L^{-1} imala je negativan utjecaj na rast kada je vidljiv pad koncentracije stanica te ulazak u fazu odumiranja (slika 8).



Slika 11. Prikaz promjene koncentracije amonijaka u hranjivom mediju tijekom uzgoja stanica.

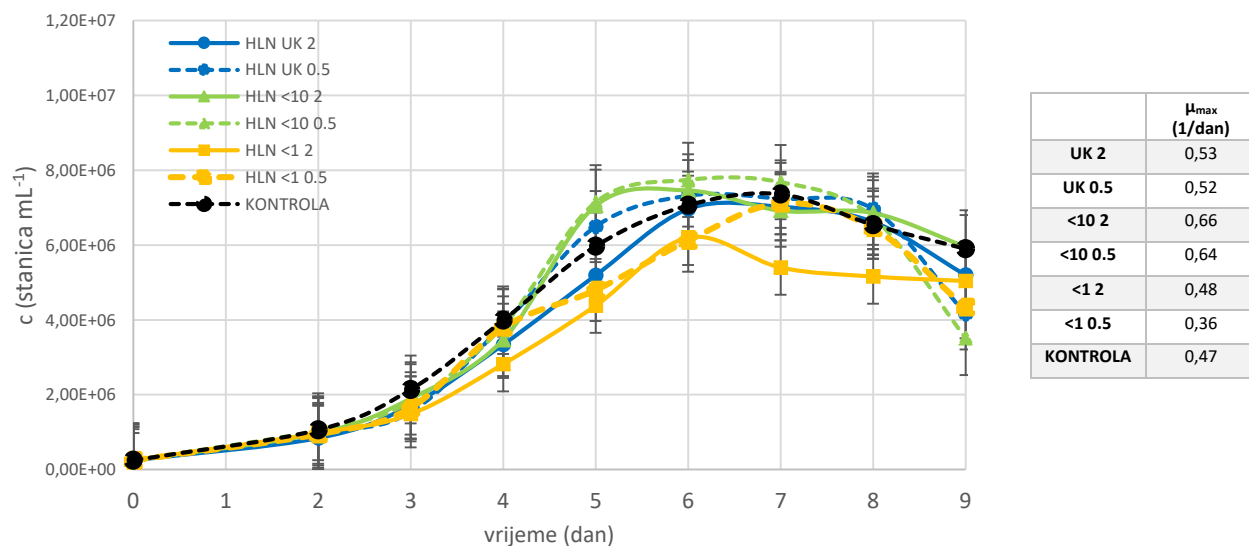


Slika 12. Prikaz koncentracije proizvedenog protutijela (1), relativne volumetrijske produktivnosti (2) i relativne specifične produktivnosti (3) CHO DP-12 stanične linije u uzorcima hranjivog medija s dodatkom hidrolizata i njegovih frakcija dobivenih djelovanjem enzima *Alcalase*.

Koncentracija IgG-a mjerena je na kraju uzgoja, iz uzoraka uzetih devetog dana. Iz prikazanih rezultata (1) vidljivo je kako je kontrola postigla najvišu koncentraciju proizvedenog protutijela od 201,6 mg L⁻¹ što je i očekivano s obzirom na to da je brojnost stanica bila najviša u tom uzorku. Nešto niža koncentracija postignuta je u uzorcima gdje su dodane frakcija hidrolizata ispod 10 kDa i ispod 1 kDa u koncentraciji od 0.5 g L⁻¹. Kada se uzme u obzir trajanje uzgoja, dobiju se vrijednosti volumetrijske produktivnosti. Kod prikaza grafa relativne volumetrijske produktivnosti (2) vidljivo je kako je produktivnost svih uzoraka manja od kontrole. Uzimajući u obzir koncentraciju stanica i trajanje eksponencijalne faze rasta, dobivene su vrijednosti specifične

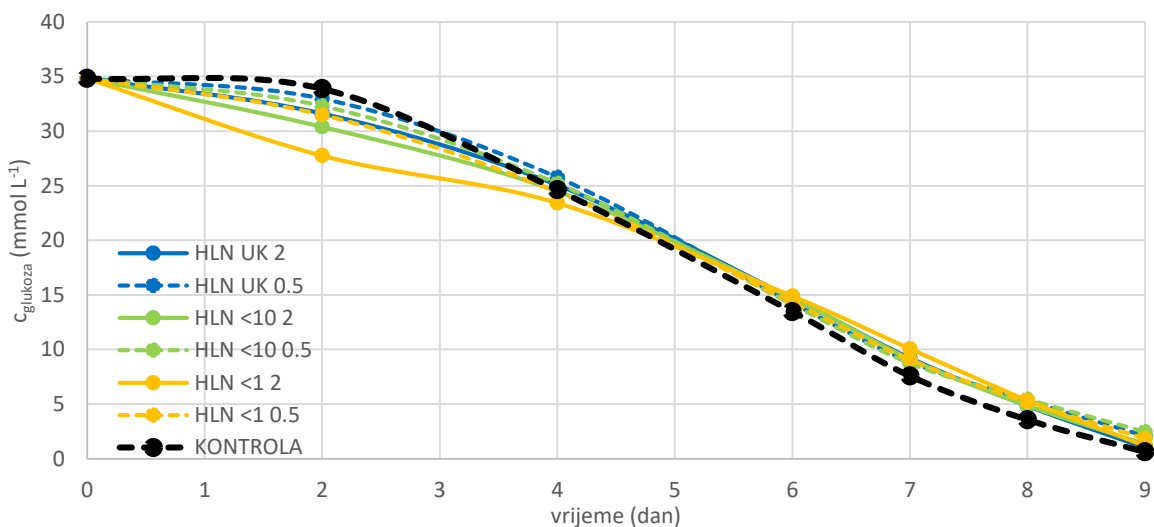
produktivnosti. Na grafu relativne specifične produktivnosti (3) vidljivo je kako najmanju specifičnu produktivnost ima kontrola, dok najvišu ima uzorak ukupnog hidrolizata, koncentracije 0.5 g L^{-1} (UK 0.5) gdje je postignuta skoro 2x veća specifična produktivnost u odnosu na kontrolu. Iz rezultata možemo vidjeti da je najveća koncentracija protutijela postignuta u kontrolnom uzorku, za što je zaslužna postignuta visoka koncentracija stanica, dok je vidljivo kako svaka stanica zasebno proizvodi više protutijela u uzorcima s dodanim hidrolizatima i frakcijama nego stanice u kontroli. Dakle, hidrolizati dobiveni djelovanjem enzima *Alcalase* imaju pozitivan utjecaj na produktivnost CHO DP-12 stanične linije.

4.4. UČINAK PROTEINSKOG HIDROLIZATA I NJEGOVIH FRAKCIJA DOBIVENIH ENZIMOM *NEUTRASE* NA RAST, PRODUKTIVNOST I METABOLIZAM CHO DP-12 STANICA



Slika 13. Krivulja rasta CHO DP-12 stanica tijekom 9 dana uzgoja u hranjivom mediju (kontrola) i hranjivom mediju s dodatkom hidrolizata i frakcija uljne pogače lana dobivenih djelovanjem enzima *Neutrased*. Desno se nalazi prikaz vrijednosti najvećih specifičnih brzina rasta (μ_{\max}) za pojedini uzorak.

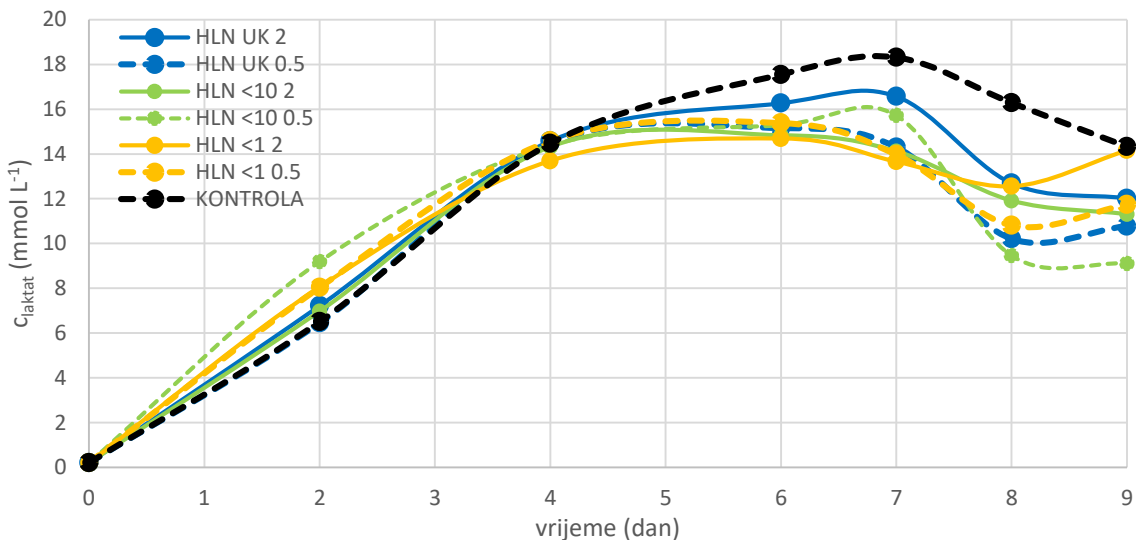
Iz krivulje rasta (slika 13.) vidljivo je kako nema prevelikih razlika među uzorcima s dodacima hidrolizata proteina dobivenih djelovanjem enzima *Neutrase u* odnosu na krivulju rasta kontrolnog uzorka. Stanice su kod svih uzoraka prva dva dana bile u lag fazi, nakon čega stanice kreću u eksponencijalnu fazu rasta. Kod uzoraka s frakcijama manjih od 1 kDa u obje koncentracije te u uzorku s ukupnim hidrolizatom, koncentracije 0.5 g L⁻¹, stanice kreću s eksponencijalnom fazom dan kasnije. Uzorci s frakcijama ispod 10 kDa u obje koncentracije te uzorak HLN UK 0.5 imaju nešto bolji rast u odnosu na druge uzorke i kontrolu, međutim većina uzoraka postiže sličnu maksimalnu koncentraciju stanica. Najniža koncentracija stanica postignuta je dodatkom frakcija <1 kDa u koncentraciji od 2 g L⁻¹, navedeni uzorak je također najranije ušao u fazu odumiranja. Stanice su uzgajane 9 dana. Iz vrijednosti najvećih specifičnih brzina rasta (μ_{\max}) vidljivo je kako krivulje frakcija ispod 10 kDa koje pokazuju najbolji rast, imaju i najviše vrijednosti μ_{\max} . Uzorak frakcija ispod 1 kDa, koncentracije 0.5 g L⁻¹ ima najnižu vrijednost μ_{\max} , razlog tome je produljeno vrijeme eksponencijalne faze.



Slika 14. Prikaz promjene koncentracije glukoze u hranjivom mediju tijekom uzgoja stanica.

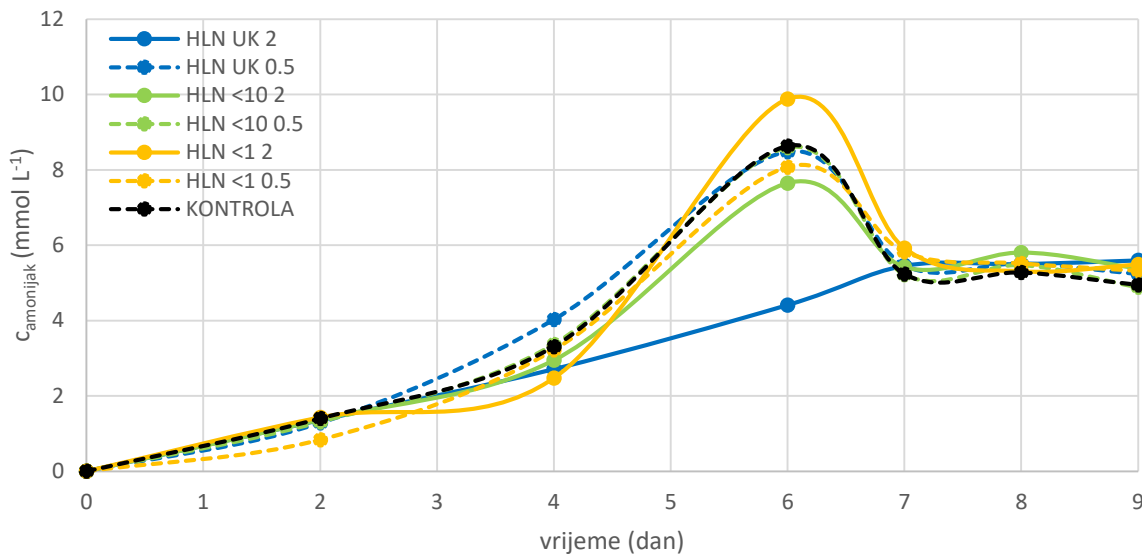
Iz krivulje potrošnje glukoze (slika 14.) vidljivo je kako svi uzorci prate isti trend, koncentracija glukoze pada s vremenom provedbe eksperimenta. Svi uzorci imaju slične krivulje, vidljivo je kako u prva četiri dana trajanja uzgoja, uzorak HLN <1 2 ima nešto višu potrošnju

glukoze od ostalih uzoraka što se ne slaže s krivuljom rasta s obzirom na to da je vidljivo kako navedeni uzorak postiže najnižu koncentraciju stanica. Od 4. dana pa do kraja uzgoja svi uzorci imaju veoma slične vrijednosti koncentracije glukoze.



Slika 15. Prikaz promjene koncentracije laktata u hranjivom mediju tijekom uzgoja stanica.

Na slici 15. prikazana je promjena koncentracije laktata u uzorcima tijekom 9 dana uzgoja. Prva četiri dana uzgoja nema razlike u koncentraciji laktata među uzorcima, nakon čega je vidljivo kako u kontrolnom uzorku nastaje nešto više laktata do 7. dana, nakon čega koncentracija laktata počinje padati uslijed njegove konzumacije. Ostatak uzoraka većinski stagnira od 4. do 6., ponegdje 7. dana nakon čega koncentracija laktata također pada. Od 8. dana kod svih uzoraka s dodacima hidrolizata ponovno dolazi do povećanja koncentracije laktata, mogući je razlog odumiranje stanica koje više nisu u mogućnosti konzumirati laktat, te također zbog raspada membrane stanica dolazi do otpuštanja laktata u okolni medij. Iako u uzorcima nije dostignuta kritična koncentracija laktata od 20 mmol L⁻¹, pokazano je kako laktat pri nižoj koncentraciji, već od 12 mmol L⁻¹ zajedno s amonijakom u koncentracijama od 1 do 4 mmol L⁻¹ sinergistički djeluju na stanice te inhibiraju njihov rast (Hassell i sur., 1991).

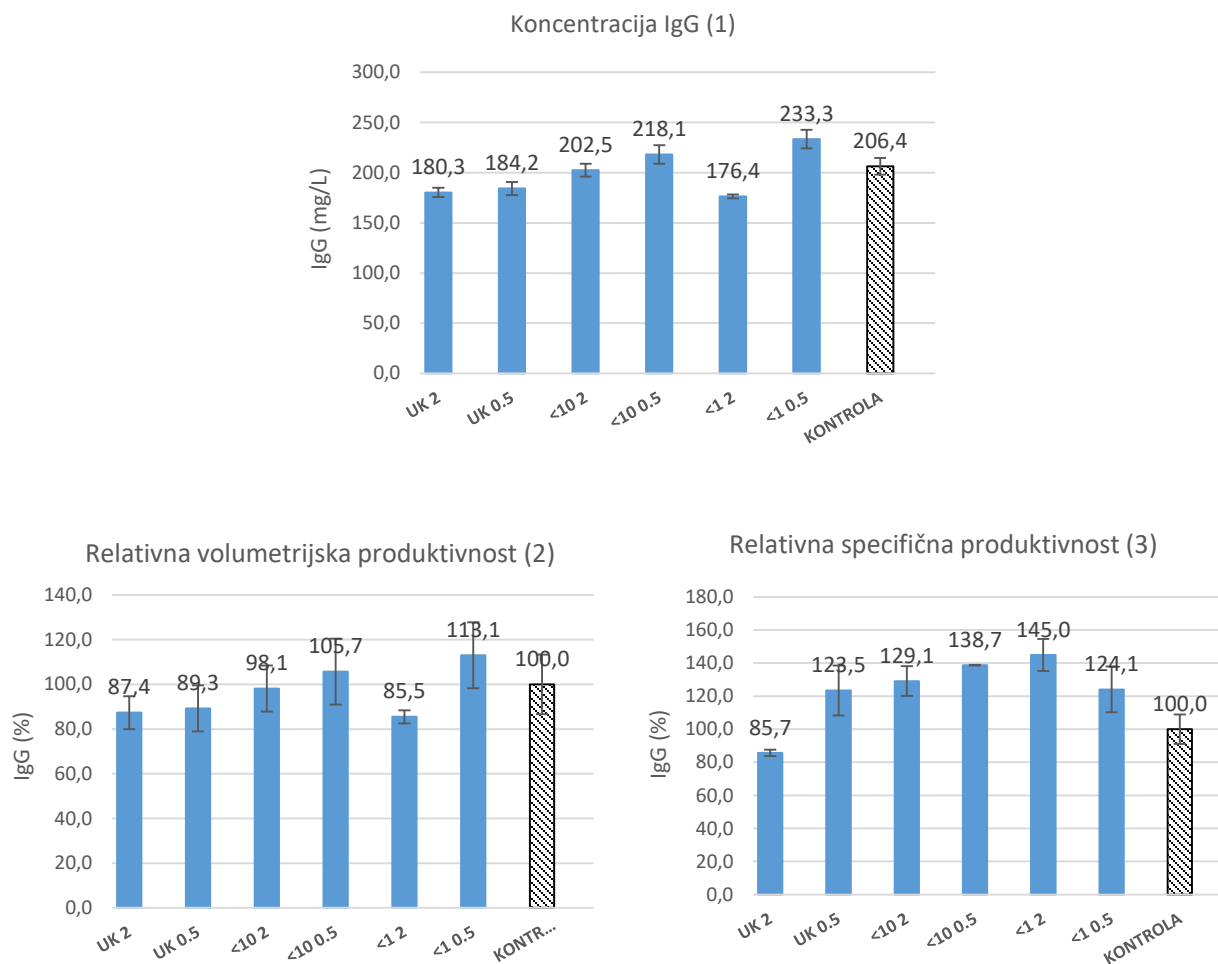


Slika 16. Prikaz promjene koncentracije amonijaka u hranjivom mediju tijekom uzgoja stanica.

Na grafičkom prikazu promjene koncentracije amonijaka tijekom uzgoja stanica vidljivo je kako sve krivulje prate isti trend osim uzorka HLN UK 2 gdje koncentracija amonijaka postupno raste do 7.dana nakon čega ulazi u fazu stagnacije. Vidljivo je kako je uzorak HLN <1 2 proizveo najvišu koncentraciju amonijaka, koja je dostigla vrhunac 6.dan, što je negativno utjecalo na rast stanica koje su tada počele odumirati (slika 13.). Stagnirajuća koncentracija amonijaka od 7.dana negativno je utjecala na stanice koje su ušle u stacionarnu fazu te fazu odumiranja.

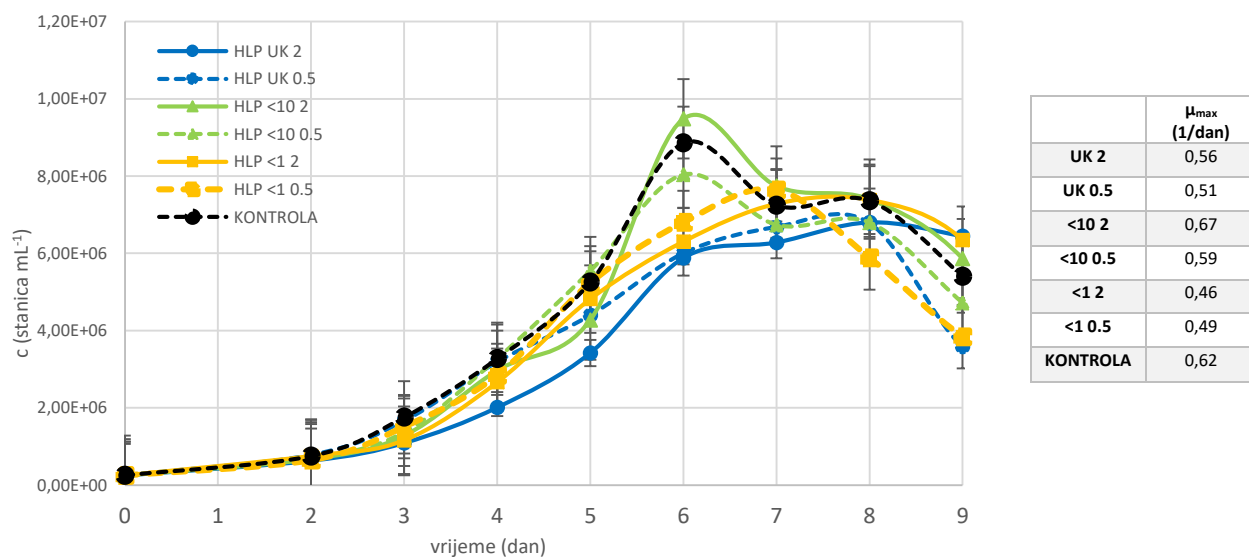
Iz prikaza dobivenih vrijednosti koncentracije IgG-a na kraju uzgoja (slika 17., 1), najviše proizvedenog protutijela imao je uzorak s dodanim frakcijama hidrolizata ispod 1 kDa u koncentraciji od 0.5 g L^{-1} , nešto niža koncentracija protutijela izmjerena je u uzorku s dodanim frakcijama hidrolizata ispod 10 kDa u istoj koncentraciji. U navedenim uzorcima su i vrijednosti relativne volumetrijske produktivnosti (2) bile bolje jer je u obzir uzet broj dana uzgoja. Uzorci s dodanim ukupnim hidrolizatima u obje koncentracije, dodanim frakcijama ispod 10 kDa u koncentraciji 2 g L^{-1} te frakcijama ispod 1 kDa u koncentraciji 2 g L^{-1} imaju niži titar od kontrolnog uzorka. Iz vrijednosti relativne specifične produktivnosti vidljivo je kako svi uzorci osim UK 2 imaju bolju specifičnu produktivnost u odnosu na kontrolu. Iz dobivenih vrijednosti može se zaključiti kako hidrolizati proteina dodani u navedenim uzorcima imaju pozitivan utjecaj na produktivnost stanične linije CHO DP -12, dok uzorak UK 2 ima negativan utjecaj na

produktivnost. Uzorak HLN <1 2 postigao je najnižu koncentraciju stanica (slika 13) međutim ima najveću specifičnu produktivnost što može značiti da navedeni hidrolizat ima negativan utjecaj na rast stanične linije, ali pozitivan utjecaj na produktivnost.



Slika 17. Prikaz koncentracije proizvedenog protutijela (1), relativne volumetrijske produktivnosti (2) i relativne specifične produktivnosti (3) CHO DP-12 stanične linije u uzorcima hranjivog medija s dodatkom hidrolizata i njegovih frakcija dobivenih djelovanjem enzima *Neutrase*.

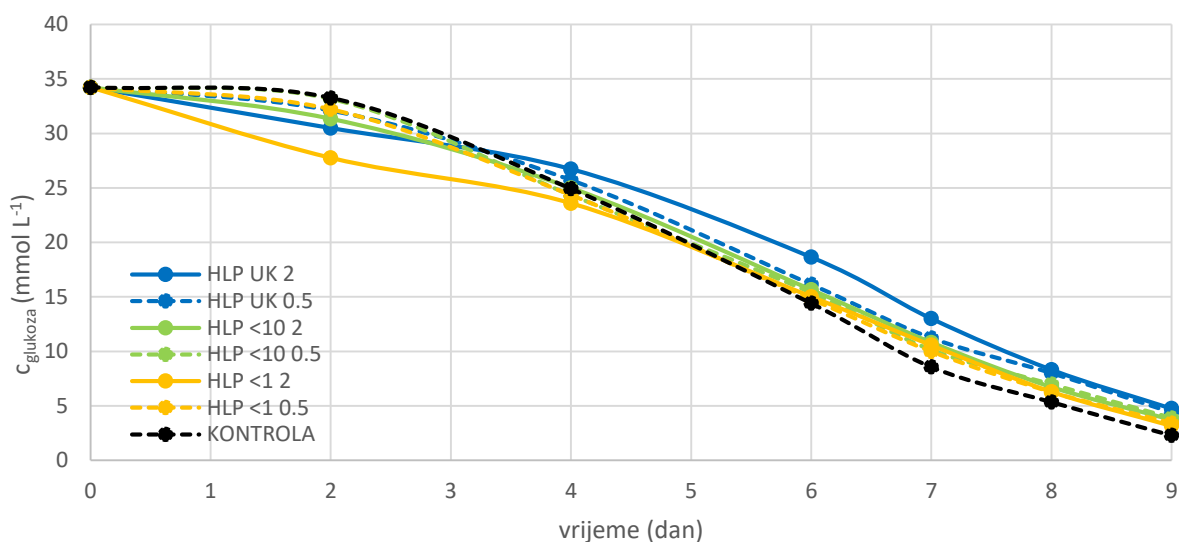
4.5. UČINAK PROTEINSKOG HIDROLIZATA I NJEGOVIH FRAKCIJA DOBIVENIH ENZIMOM *PROTAMEX* NA RAST, PRODUKTIVNOST I METABOLIZAM CHO DP-12 STANICA



Slika 18. Krivulja rasta CHO DP-12 stanica tijekom 9 dana uzgoja u hranjivom mediju (kontrola) i hranjivom mediju s dodatkom hidrolizata i frakcija uljne pogače lana dobivenih djelovanjem enzima *Protamex*. Desno se nalazi prikaz vrijednosti najvećih specifičnih brzina rasta (μ_{\max}) za pojedini uzorak.

Iz krivulje rasta (slika 18.) vidljivo je kako su svi uzorci prva dva dana bili u lag fazi, nakon čega kontrolni uzorak, HLP UK 0.5 te HLP <1 0.5 kreću u eksponencijalnu fazu, ostatak uzoraka kreće s eksponencijalnom fazom dan kasnije. Uzorci HLP <10 u obje koncentracije, zajedno s kontrolom pokazuju najbolji rast te najviše postignute koncentracije stanica u kojoj prednjači uzorak HLP <10 2. Navedeni uzorci postižu maksimalnu koncentraciju stanica 6.dan nakon čega imaju blagi pad koncentracije te ulaze u fazu odumiranja. Uzorci s dodanim frakcijama ispod 1 kDa imaju nešto slabiji rast od uzoraka s frakcijama ispod 10 kDa, međutim bolji rast od uzoraka s dodanim ukupnim hidrolizatima. Vidljivo je kako uzorak HLP UK 2 ima najslabiji rast te je moguće da je dodatak navedenih hidrolizata negativno utjecao na rast stanica. Uzgoj je trajao 9

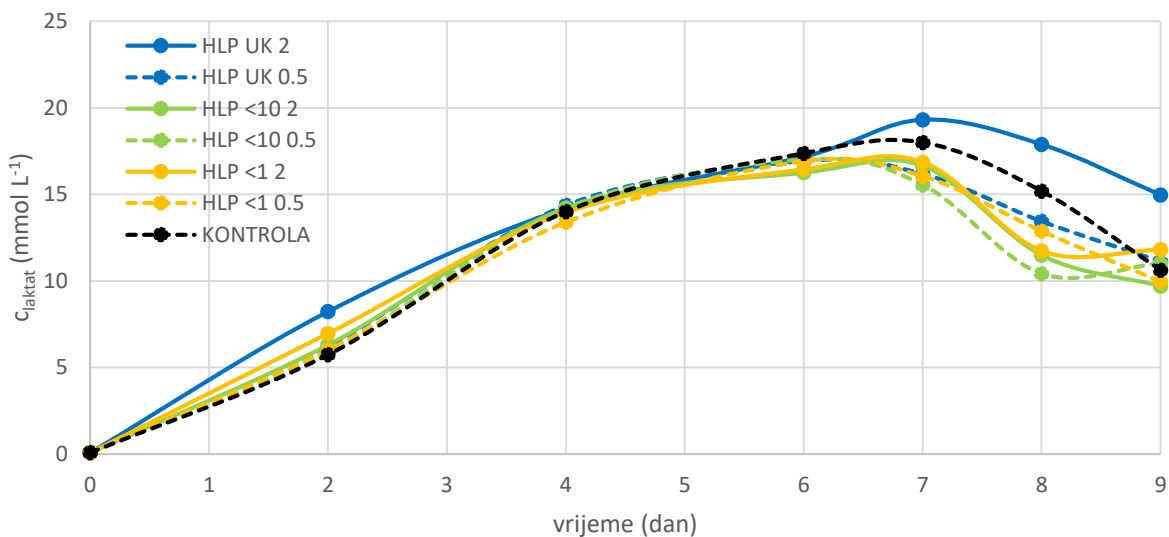
dana. Vrijednosti najvećih specifičnih brzina rasta poklapaju se s prikazanim krivuljama rasta, uzorci frakcija ispod 10 kDa te kontrola pokazuju najviše vrijednosti specifičnih brzina rasta kao i najbolji rast na grafičkom prikazu. Kod ostalih uzoraka nije zabilježen posebno negativan utjecaj na brzinu rasta.



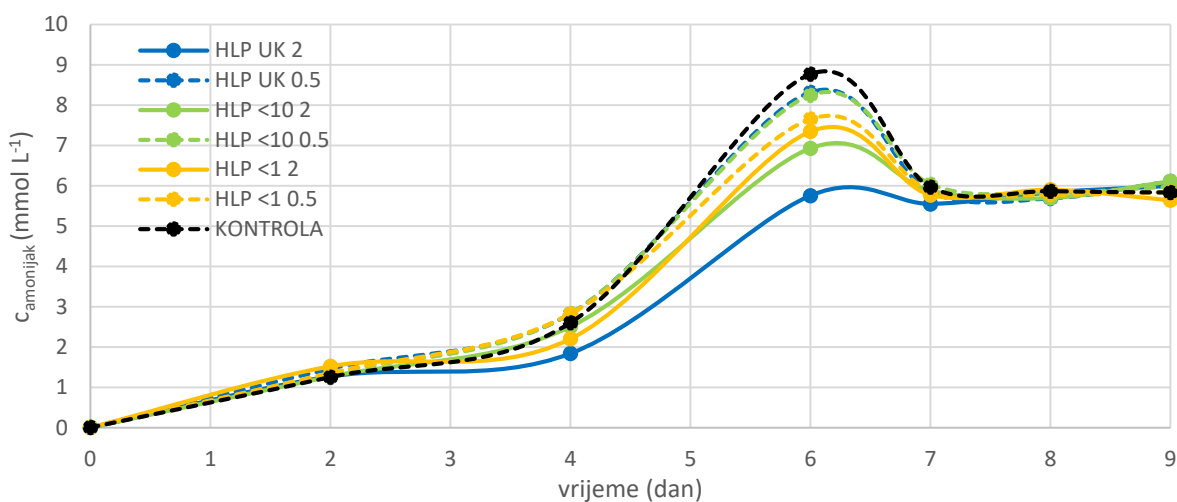
Slika 19. Prikaz promjene koncentracije glukoze u hranjivom mediju tijekom uzgoja stanica.

Iz prikazanog grafa potrošnje glukoze, vidljivo je kako sve krivulje imaju sličan trend potrošnje glukoze koji se slaže s očekivanim. Vidljivo je kako krivulja HLP UK 2 ima nešto manju potrošnju glukoze te je na kraju uzgoja koncentracija glukoze najviša u navedenom uzorku, rezultati se slažu s krivuljom rasta gdje je vidljivo kako navedeni uzorak ima najslabiji rast u eksponencijalnoj fazi (slika 18.).

Krivulja promjene koncentracije laktata (slika 20.) prati sličan trend kao i kod prethodna dva enzima. Sve krivulje stagniraju do 7. dana nakon čega dolazi do pada koncentracije laktata što prati opet stagnacija ili blagi porast koncentracije laktata. Vidljivo je kako krivulja HLP UK 2 malo odstupa, u navedenom uzorku dolazi do najviše koncentracije proizvedenog laktata što je moguće negativno utjecalo na rast stanica u navedenom uzorku.



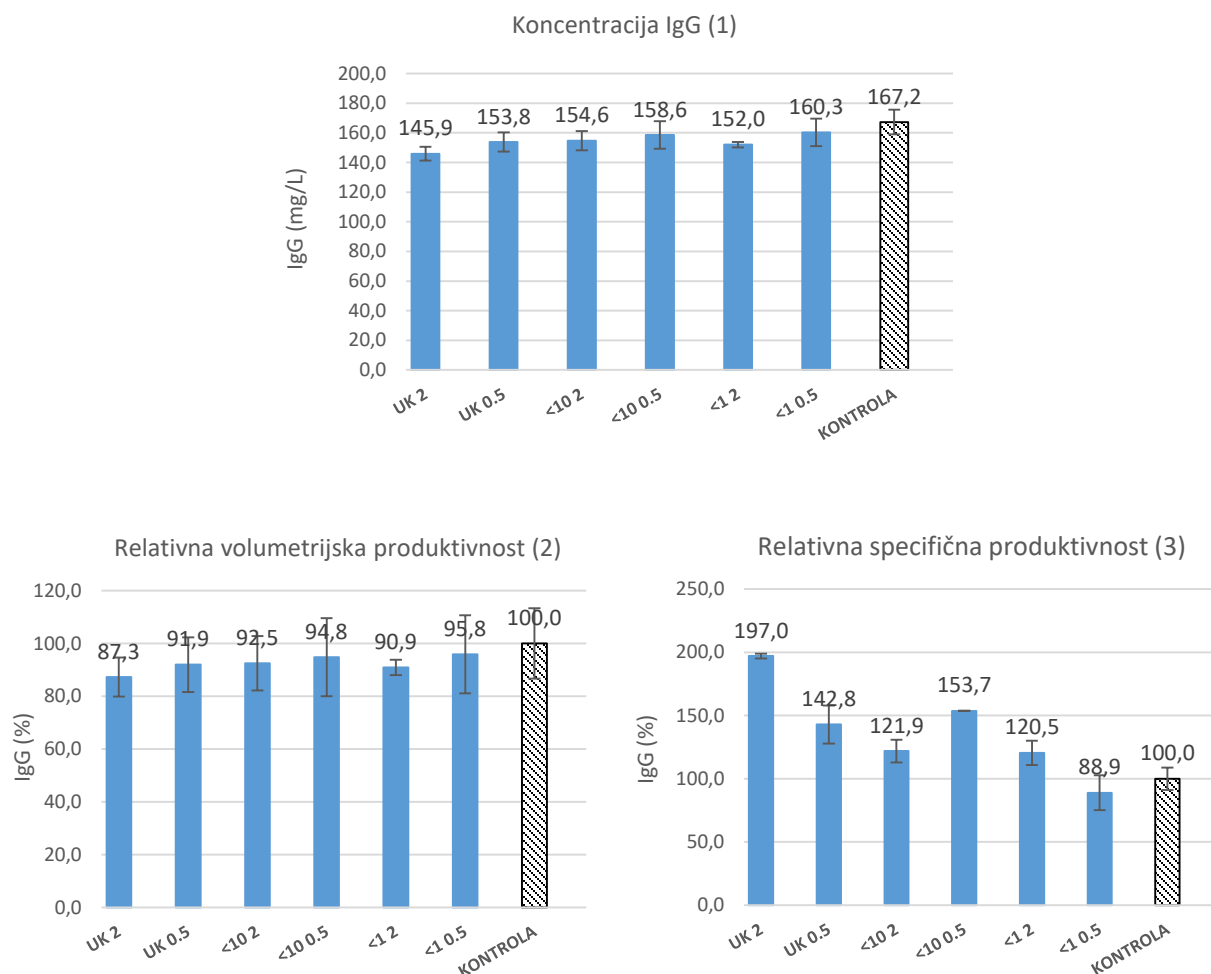
Slika 20. Prikaz promjene koncentracije laktata u hranjivom mediju tijekom uzgoja stanica.



Slika 21. Prikaz promjene koncentracije amonijaka u hranjivom mediju tijekom uzgoja stanica.

Na prikazanoj krivulji promjene koncentracije amonijaka (slika 21.) tijekom 9 dana uzgoja vidljivo je kako je amonijak dostigao najvišu koncentraciju 6. dan nakon čega njegova koncentracija pada te od 7. dana stagnira. Najmanja koncentracija amonijaka postignuta je u uzorku HLP UK 2 što se može pripisati najslabijem rastu stanica u navedenom uzorku. Nakon stabilizacije

koncentracije amonijaka vidljiv je negativan utjecaj na stanice i ulazak u fazu odumiranja što je prikazano na slici 18.



Slika 22. Prikaz koncentracije proizvedenog protutijela (1), relativne volumetrijske produktivnosti (2) i relativne specifične produktivnosti (3) CHO DP-12 stanične linije u uzorcima hranjivog medija s dodatkom hidrolizata i njegovih frakcija dobivenih djelovanjem enzima *Protamex*.

Najveća koncentracija nastalog protutijela zabilježena je u kontrolnom uzorku (1) dok se kod uzoraka s dodanim hidrolizatima ne vidi posebno negativan, ali ni pozitivan utjecaj na koncentraciju proizvedenog protutijela. Najniža koncentracija zabilježena je u uzorku UK 2 što se slaže s rezultatima krivulje rasta jer je navedeni uzorak imao najslabiji rast (slika 18). Međutim, na

prikazu relativne specifične produktivnosti (3) je vidljivo kako, iako uzorak UK 2 ima najslabiju koncentraciju proizvedenog protutijela zbog slabog rasta stanica u navedenom uzorku, specifična produktivnost je najviša te gotovo 2x veća od kontrolnog uzorka. Iz navedenog se može zaključiti kako dodatak hidrolizata u uzorku UK 2 ima negativan utjecaj na rast stanica, ali vrlo pozitivan utjecaj na produktivnost. Navedena pojava spomenuta je u radu koji su proveli Kumar i sur. (2007) gdje određene promjene u metabolizmu stanica dovode do inhibicije rasta, a posljedično do povećane specifične produktivnosti. Na grafu 3 vidljiv je pozitivan utjecaj dodanih hidrolizata i u ostalim uzorcima osim kod uzorka <1 0.5 gdje je vidljiv negativan utjecaj na produktivnost. Na grafu relativne volumetrijske produktivnosti (2) vidljiv je odnos proizvedenog protutijela po danu uzgoja u odnosu na kontrolni uzorak koji pokazuje najbolju produktivnost.

Analizom rezultata, vidljiv je različit utjecaj hidrolizata dobivenih enzimima *Alcalase*, *Neutrase* i *Protamex* na rast i produktivnost stanica. Što potvrđuje rezultate istraživanje koje su proveli Chabanon i sur. (2008) da iako se radi o frakcijama jednakih veličina peptida i istog aminokiselinskog sastava, hidrolizati ne pokazuju istu učinkovitost u pogledu rasta stanica i produktivnosti, što ukazuje na važnost specifičnosti korištenih enzima i sastava dobivenih hidrolizata.

5. ZAKLJUČCI

1. Rezultati provedene hidrolize s tri proteolitička enzima, *Alcalase*, *Neutrased* i *Protamex* podudaraju se s dosadašnjim literaturnim navodima gdje je najučinkovitija hidroliza provedena djelovanjem enzima *Alcalase*, dok je najmanje učinkovit enzim *Neutrased*. Rezultati prikazani pomoću SDS PAGE gel elektroforeze potvrđuju rezultate dobivenih stupnjeva hidrolize.

2. Proteinski hidrolizati uljne pogače lana dobiveni pomoću enzima *Alcalase*, *Neutrased* i *Protamex*, kao i peptidne frakcije hidrolizata, dodani u medij za uzgoj stanica u koncentraciji od 2 i 0.5 g L⁻¹, nemaju značajan utjecaj na rast stanične linije CHO DP-12.

3. Proteinski hidrolizat i njegove frakcija, dobiveni pomoću enzima *Alcalase* imaju pozitivan utjecaj na produktivnost CHO DP-12 stanične linije, dok imaju blago negativan utjecaj na rast stanica.

4. Frakcije dobivene pomoću enzima *Neutrased* u koncentracijama 2 i 0.5 g L⁻¹, kao i hidrolizat u koncentraciji 0.5 g L⁻¹ pozitivno su utjecali na produktivnost CHO DP-12 stanične linije. Frakcija hidrolizata <1 kDa nepovoljno je djelovala na rast stanica pri koncentraciji od 2 g L⁻¹.

5. Hidrolizat proteina dobiven pomoću enzima *Protamex*, kao i njegove frakcije veličine <10 kDa u obje koncentracije te frakcija <1 kDa u koncentraciji 2 g L⁻¹, pozitivno su utjecali na produktivnost CHO DP-12 stanica. Pritom je dodatak hidrolizata u koncentraciji 2 g L⁻¹, gdje je vidljivo skoro 100 %-tno povećanje specifične produktivnosti, istovremeno usporio rast stanica što je moguće pozitivno utjecalo na brzinu biosinteze rekombinantnog protutijela.

6. LITERATURA

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

Amable, P., Butler, M. (2008) Cell metabolism and its control in culture. 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. 75-104.

Anonymus 1 (2021) <<https://www.nccih.nih.gov/health/flaxseed-and-flaxseed-oil>>. Pristupljeno 29. kolovoza 2021.

Anonymus 2 (2021) <https://www.researchgate.net/figure/Neubauer-chamber_fig1_274063071>. Pristupljeno 31. srpnja 2021.

Anonymus 3 (2013) *Cell Culture Basics Handbook*, <<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1563-PJT1267-COL31122-Gibco-Cell-Culture-Basics-Handbook-Global-FLR.pdf>>. Pristupljeno 2. srpnja 2021.

ATCC (2021) <<https://www.atcc.org/-/media/product-assets/images/micrographs/cell-biology/crl-12444.jpg?rev=8f1e03677dd347898fb0194499da3753>>. Pristupljeno 25. srpnja 2021.

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.

Buršić V. (2018) Apoptoza i ne-apoptotičke vrste stanične smrti prilikom tumorigenze (završni rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

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

Chen, P., Harcum, S. W. (2005) Effects of amino acid additions on ammonium stressed CHO cells. *J Biotechnol*. **117**, 277-286.

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

- Franek, F., Hohenwarter, O., Katinger, H. (2000) Plant Protein Hydrolysates: Preparation of Defined Peptide Fractions Promoting Growth and Production in Animal Cells Cultures. *Biotechnol. Prog.* **16**, 688-692.
- Freshney, R. I. (2005) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5.izd, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, str. 129-143.
- Gutiérrez, 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.
- Hassell, T., Gleave, S., Butler, M. (1991) Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. *Appl Biochem Biotechnol.* **30**, 29-41.
- Ho, S. C. L., Nian, R., Woen, S., Chng, J., Zhang, P., Yang, Y. (2016) Impact of hydrolysates on monoclonal antibody productivity, purification and quality in Chinese hamster ovary cells. *J Biosci Bioeng.* **122**, 499-506.
- Kim J. Y., Kim Y., Lee, G. M. (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* **93**, 917-930.
- Judge, A., Dodd, M. S. (2020) Metabolism. *Essays Biochem.* **64**, 607-647.
- Karnieli, O., Friedner, O. M., Allickson, J. G., Zhang, N., Jung, S., Fiorentini, D., Abraham, E., Eaker, S. S., Yong, T. K., Chan, A., Griffiths, S., When, A. K., Oh, S., Karnieli, O. (2016) A consensus introduction to serum replacement and serum-free media for cellular therapies. *Cytotherapy.* **19**, 155-169.
- Kumar, N., Gammel, P., Clyness, M. (2007) Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. A summary of recent methods employed and the effects of proliferation control in product secreting CHO cell lines. *Cytotechnology.* **53**, 33-46.
- Kumar, N., Gammell, P., Meleady, P., Henry, M., Clynes, M. (2008) Differential protein expression following low temperature culture of suspension CHO-K1 cells. *BMC Biotechnol.* **8**, 42.

Lee, J. Y., Chun, B., Lee, Y. K., Lee, J. H., Ahn, J., Chung, N. (2009) Influence of Mixed Protein Hydrolysates on the Growth and Viability of Chinese Hamster Ovary Cells. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **52**, 607-612.

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.

Logarušić, M., Slivac, I., Radošević, K., Srček, V. G. (2019) Učinak proteina iz uljne pogače lana na rast i produktivnost CHO-E i HEK-293T stanica. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, **14**, 98-104.

Logarušić, M., Radošević, K., Bis, A., Paić, M., Slivac, I., Srček, V.G. (2020) Biological Potential of Flaxseed Protein Hydrolysates Obtained by Different Proteases. *Plant Foods Hum Nutr.* **75**, 518-524.

Logarušić, M., Srček, V. G., Berljevac, S., Pavunc, A. L., Radošević, K., Slivac, I. (2021) Protein Hydrolysates from Flaxseed Oil Cake as a Media Supplement in CHO Cell Culture. *Resources.* **10**, 59.

Merten, O. (1999) Safety issues of animal products used in serum-free media. *Dev Biol Stand.* **99**, 167-180.

Mikolaj, E. (2017) Ekstrakcija lignana i fenolnih kiselina iz pogače lana (završni rad). Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Moraes, A. M., Mendonca, R. Z., Suazo, C. A. T. (2008) Culture media for animal cells. 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.

Mulukutla, B. C., Gramer, M., Hu, W. (2012) On metabolic shift to lactate consumption in fed-batch culture of mammalian cells. *Metab Eng.* **14**, 138-149.

Nwachukwu, 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.* **95**, 1105-1118. DOI: 10.1002/aocs.12042.

Oyeleye O. O., Ogundeji S., Ola S. I., Omitogun O. G. (2016) Basics of animal cell culture: Foundation for modern science. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* **11**, 6-16.

Park, S. Y., Lee, J., Baek, H., Lee, H. G. (2010) Purification and characterization of antioxidant peptides from soy protein hydrolysate. *J. Food Biochem.* **34**, 120-132. DOI:10.1111/j.1745-4514.2009.00313.x

Price, P. J. (2017) Best practices for media selection for mammalian cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **53**, 673-681.

Slivac, I., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2016) Osnove tehnologije životinjskih stanica. Interna skripta Prehrambeno-biotehnoškog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu.

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.

Tayi, V., Butler, M. (2014). Physiology and Metabolism of Animal Cells for Production U: Animal Cell Biotechnology In Biologics Production (Hauser, H., Wagner, R., ured.) De Gruyter, Berlin, str 301-326.

Tihany, B., Nyitray, L. (2021) Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug Discov Today: Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.02.003>.

Verma, A., Verma, M., Singh, A. (2020) Animal tissue culture principles and applications. U: Animal Biotechnology (Verma, A. S., Singh, A. ured.), Elsevier Inc. Amsterdam, str. 269-293.

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.

Marija Cavrić

Ime i prezime studenta