

Proteinski hidrolizat uljne pogače lana kao dodatak mediju za uzgoj CHO stanica

Larva, Mirna

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:509418>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-12**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Mirna Larva

7217/BT

**PROTEINSKI HIDROLIZAT ULJNE POGAČE LANA KAO
DODATAK MEDIJU ZA UZGOJ CHO STANICA**

ZAVRŠNI RAD

MODUL : Tehnologija vitamina i hormona

MENTOR: izv. prof. dr. sc. Igor Slivac

Zagreb, 2019.

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

Zahvaljujem se svom mentoru izv. prof. dr. sc. Igoru Slivcu i mag. ing. Marijanu Logarušiću na vodstvu, trudu, strpljenju i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Velika hvala mojim roditeljima, obitelji i prijateljima na strpljenu i neiscrpnju podršku tijekom školovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Proteinski hidrolizat uljne pogače lana kao dodatak mediju za uzgoj CHO stanica Mirna Larva, 0058208679

Sažetak: Posljednjih nekoliko desetljeća pokušavaju se pronaći alternative korištenju seruma animalnog podrijetla u tehnologiji životinjskih stanica zbog određenih nedostataka poput pojave mogućih kontaminacija i povećanih troškova procesa pročišćavanja. Biljni proteinski hidrolizati koriste se stoga kao djelomična ili potpuna zamjena za serum budući da sadrže mnoge hranjive tvari i komponente nužne za uspješan rast i proliferaciju kulture životinjskih stanica. Cilj ovog rada je istražiti i ispitati učinak proteinskog hidrolizata uljne pogače lana dobivenog pomoću tri enzima: *Alcalase*, *Neutrased* i *Protamex* na rast i produktivnost CHO-DP 12 stanične linije u kemijski definiranom mediju bez seruma. Ispitani su učinci hidrolizata dodanih u medij u dvije različite koncentracije: 2 g L⁻¹ i 0.5 g L⁻¹. Istraživanje pokazuje da dodatak hidrolizata dobivenih *Protamexom* i *Neutrasedom* u koncentraciji od 2 i 0,5 g L⁻¹ povoljno utječe na rast, ali i na produktivnost CHO-DP12 stanica u odnosu na stanice uzgajane u mediju bez dodatka hidrolizata. Hidrolizati dobiveni hidrolizom pomoću enzima *Alcalase*, dodani u obje ispitivane koncentracije, uzrokuju smrt stanične linije.

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

Rad sadrži: 33 stranica, 9 slika, 3 tablice, 46 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

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

Pomoć pri izradi: mag. ing. Marijan Logarušić

Datum obrane: rujan, 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Bioengineering
Laboratory for Cell Technology and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Flaxseed protein hydrolysate as addition to medium for cultivation of CHO cells

Mirna Larva, 0058208679

Abstract: Numerous researches have been done during the last few decades in order to find alternatives for using the animal origin serum due to several deficits like possible contaminations or additional costs for purification. Plant derived protein hydrolysates are therefore used as a partial or complete substitute because of containing various nutrients and similar components needed for a successful growth and proliferation of an animal cell culture. The aim of this paper is to find and test the effect of the protein hydrolysate of flaxseed oil cake obtained by three enzymes, *Alcalase*, *Neutrase* and *Protamex* on cell growth and productivity of CHO DP-12 cell line in a chemically defined medium without serum. Moreover, the effect of the examined hydrolysate in media has been analysed in two different concentrations: 2 g L⁻¹ and 0,5 g L⁻¹. This research shows that the addition of two hydrolysates, which are obtained by *Protamex* and *Neutrase* in the 2 and 0,5 g L⁻¹ concentration, has a positive impact on the growth and productivity of CHO-DP12 cells compared to the cells in a hydrolysate-free medium. Nevertheless, the hydrolysates obtained by *Alcalase* causes the starvation of cell lines in both examined concentrations.

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

Thesis contains: 33 pages, 9 figures, 3 tables, 46 references

Original in: Croatian

Thesis is printed and electronic form deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ph.D. Igor Slivac, Assistant Professor

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

Defence date: September, 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kultura životinjskih stanica.....	2
2.1.1 Faze rasta životinjskih stanica.....	3
2.1.2 Uvjeti uzgoja.....	4
2.1.3 CHO stanična linija.....	4
2.2. Hranjivi medij za uzgoj stanica.....	5
2.2.1 Biljni hidrolizati proteina kao dodatak mediju.....	7
2.3. Lan.....	8
2.3.1 Uljna pogača lana.....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. Materijali.....	10
3.1.1 Priprava proteinskog hidrolizata lana.....	10
3.1.2 CHO stanična linija.....	10
3.1.3 Kemijakalije.....	10
3.1.4 Otopine i puferi.....	11
3.1.5 Uređaji i oprema.....	13
3.2. Metode rada.....	14
3.2.1 Uzgoj CHO stanične linije u suspenziji.....	14
3.2.2 Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u.....	14
3.2.3 Dodatak proteinskog hidrolizata uljne pogače lana u medij za uzgoj stanica.....	16
3.2.4 Određivanje broja stanica metodom <i>Trypan-Blue</i>	16
3.2.5 Određivanje koncentracije glukoze u hranjivom mediju.....	17

3.2.6	Određivanje koncentracije laktata u hranjivom mediju.....	18
3.2.7	Određivanje koncentracije Imunoglobulina G u hranjivom mediju.....	19
3.2.8	Određivanje parametara rasta CHO DP-12 stanica.....	20
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	21
4.1	Učinak dodatka proteinskog hidrolizata uljne pogače lana u koncentraciji 2 g L ⁻¹ na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije.....	22
4.2	Učinak dodatka proteinskog hidrolizata uljne pogače lana u koncentraciji 0,5 g L ⁻¹ na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije.....	25
5.	ZAKLJUČAK.....	28
6.	LITERATURA.....	29

1. UVOD

Posljednjih nekoliko desetljeća tehnologija kulture životinjskih stanica predstavlja glavno sredstvo proizvodnje mnogih terapeutika i cjepiva za liječenje postojećih bolesti te poboljšavanje kvalitete života.

Kultura životinjskih stanica dobiva se izolacijom stanica iz različitih tkiva životinja i uspostavljanjem kulture u umjetnom hranjivom mediju. Uspostavljena kultura stanica u suspenziji pokazuje relativno jednostavan i neograničen rast u kontroliranim uvjetima zbog čega je omogućen uzgoj u većim radnim volumenima (*scale-up*).

Jedan od glavnih preuvjeta proizvodnje rekombinantnih proteina od kliničke ili dijagnostičke važnosti pomoću kulture životinjskih stanica je optimizacija medija za uzgoj (Hesse i Wagner, 2000). Dugi niz godina se kao standardni dodatak medijima koristio fetalni teleći serum (*fetal bovine serum*, FBS) koji sadrži mnoge esencijalne nutritivne tvari, izvor je hormona, faktora rasta, veznih proteina te igra ulogu u zaštiti stanica od mehaničkih oštećenja (Froud, 1999). Korištenje seruma za uzgoj stanica ima određene nedostatke budući da je životinjskog podrijetla. Serum je kemijski nedefiniran zbog čega tijekom uzgoja može doći do odsupanja kvalitete proizvoda te su potencijalni izvor kontaminacije virusima, prionima i mikoplazmama (Van der Valket i sur., 2004). Također, procesi pročišćavanja i obrade konačnog proizvoda, kompleksniji su i skuplji zbog velike količine proteina u serumu.

Zbog navedenih nedostataka životinjskog seruma, kao njegova alternativa sve više se koriste suplementi biljnog podrijetla kao jeftina i adekvatna sirovina za uzgoj kulture životinjskih stanica. Biljni hidrolizati smatraju se koncentriranim smjesama nutritivnih tvari koje će djelomično ili u potpunosti zamijeniti korištenje seruma u hranjivom mediju. Potencijalan su izvor metabolizirajućih komponenti poput aminokiselina, oligopeptida, soli željeza i elemenata u tragovima. Posljednjih nekoliko godina hidrolizati biljnog podrijetla postali su komercijalno dostupni te su se pokazali vrlo korisnim u proizvodnji terapeutika za ljudsku upotrebu čime se djelomično eliminira uporaba seruma (Franek i sur. 2000).

Cilj ovog rada bio je ispitati učinak proteinskih hidrolizata uljne pogače lana, dobivenih hidrolizom pomoću tri proteaze: *Alcalase*, *Neutrase* i *Protamexa*, na rast i produktivnost suspenzijske stanične linije CHO DP-12 uzgajane u mediju bez dodatka seruma.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA

Kultura životinjskih stanica definira se kao tip stanične kulture koja može rasti i reproducirati se izvan tijela domaćina kao stanični monosloj ili u suspenziji. Stanice se uzgajaju *in-vitro* tehnikama u laboratorijskim uvjetima gdje su osigurani izvori hranjivih tvari, faktori rasta te ostali okolišni uvjeti nužni za rast, razvoj i proliferaciju.

Krajem 19. stoljeća bilo je mnogo pokušaja kultivacije životinjskih stanica, no jedan od prvih napredaka bio je 1882. godine kada je Sydney Ringer proizveo otopinu soli pomoću koje je omogućio rad srca žabe nakon što ga je izvadio iz tijela domaćina. Nedugo nakon, veliki uspjeh doživljava Alexis Carrel koji je demonstrirao dugotrajnu kultivaciju stanica pilećeg fetusa koristeći plazmu pileće krvi kao medij i ekstrakt embrija kao dodatak koji je uvelike ubrzao rast stanica. Danas kultura životinjskih stanica predstavlja jednu od osnovnih tehnologija za proizvodnju lijekova, cijepiva i ostalih terapeutika za ljudsku upotrebu (Rodriguez-Hernandez i sur. 2014).

Primarna stanična kultura se može definirati kao kultivirane stanice tkiva životinje domaćina koje se dobivaju direktno mehaničkim putem ili indirektno enzimskom razgradnjom. Uspostavljena primarna kultura se subkultivira u novom mediju čime dobivamo sekundarnu staničnu kulturu tj. staničnu liniju. Subkultivacijom prevladavaju stanice s najvećim kapacitetom rasta, što rezultira stupnjem genotipske i fenotipske uniformnosti u populaciji (Khanal, 2017). Stanične linije mogu biti konačne ili besmrtnne. Konačne stanične linije imaju određen broj ciklusa reprodukcije nakon čega se više ne mogu dijeliti i umiru, dok besmrtnne stanične linije su bržerastuće, mogu rasti pri većim gustoćama, lakše se održavaju u hranjivom mediju, mogu rasti u suspenziji te nemaju limitirani broj staničnih dijeljenja. Jednom uspostavljena kultura se može uzgajati sve dok ne bude limitirana jednim od parametara uzgoja.

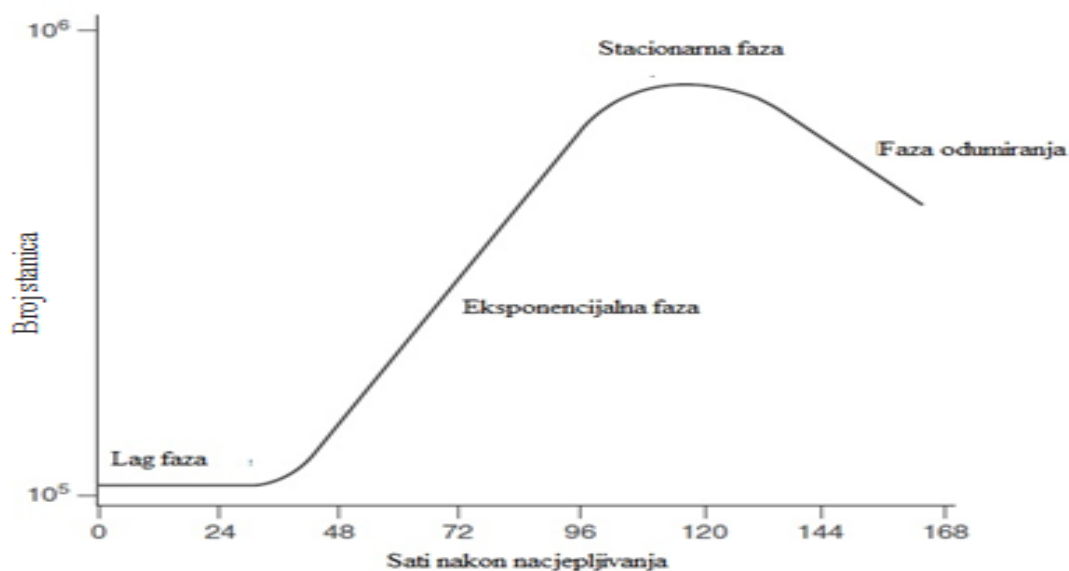
Adherentne stanice stvaraju staničnu populaciju u monosloju na čvrstoj površini. Moraju biti vezane na čvrstu površinu kako bi bio omogućen rast i proliferacija (Supriya, 2017). Adherentne stanice ispunjavaju cjelokupnu površinu spremnika te međusobno inhibiraju rast pomoću kemijskih signala kako nebi došlo do pretjeranog rasta i time umiranje stanica kada se formira monosloj.

Za razliku od adherentnih stanica, suspenzijske stanice ne trebaju biti prihvaćene za čvrstu podlogu kako bi rasle. Stanicama koje se uzgajaju u suspenziji se onemogućava vezanje za

površinu miješanjem i različitim reagensima. Suspenzijske kulture brže rastu od adherentnih, kratka im je lag faza rasta te nisu potrebni dodatni koraci za disocijaciju stanica sa čvrste površine. Iz industrijskog aspekta proizvodnje, poželjna je adaptacija stanica na suspenzijski uzgoj kako bi se mogli koristiti veliki bioreaktori s mješalom te time povećala produktivnost i smanjili troškovi.

2.1.1 FAZE RASTA ŽIVOTINJSKIH STANICA

Jedan od važnih aspekata u provođenju eksperimenata pomoću kulture životinjskih stanica je praćenje faza rasta kulture. Nakon naciepljivanja stanica, stanicama je potrebno određeno razdoblje (2-24h) u kojemu se prilagođavaju na novi medij te se ta faza rasta naziva lag fazom. U lag fazi stanice sintetiziraju potrebne enzime i intermedijere kako bi se pripremile za diobu, povećavaju svoj volumen te im se broj značajnije ne mijenja (Marić i Šantek, 2009). Stanice potom prelaze u eksponencijalnu fazu rasta ili period najbržeg rasta (log faza) u kojoj im se broj kontinuirano udvostručuje. Rastu konstantnom specifičnom brzinom sve dok ne potroše jednu od limitirajućih komponenti, odnosno dok ne dođe do prevelikog nakupljanja toksičnih proizvoda metabolizma. Stanice tada prelaze u stacionarnu fazu rasta, u kojoj starije stanice počinju umirati, a mlađe se nastavljaju razmnožavati smanjenom brzinom. (Marić i Šantek, 2009). Konačno, ulaze u fazu odumiranja kada stanice umiru brže nego što se razmnožavaju te se koncentracija živih stanica naglo smanjuje.



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

2.1.2 UVJETI UZGOJA

Za uspješan rast kulture stanica u *in vitro* uvjetima, potrebno je osigurati mnoge komponente, koje zamijenjuju *in vivo* uvjete kako bi stanice rastle u što prirodnijem okolišu. Moraju se osigurati fizikalno-kemijski parametri pogodni za uzgoj kulture stanica.

pH – za većinu kultura stanica, povoljan pH iznosi 7.2-7.4, međutim to može značajno varirati u transformiranim stanicama (Chaundhry, 2009). Ukoliko pH medija bude previsok ili prenizak, dolazi do denaturacije proteinskih komponenti te ima sveukupni loš utjecaj na kulturu. Najveće promijene u pH mediju uzrokovane su oslobađanjem CO₂ kao posljedica metabolizma kulture. CO₂ – regulacija pH vrijednosti ovisi o količini CO₂ budući da pH vrijednost medija ovisi o ravnoteži između otopljenog ugljičnog dioksida i bikarbonata. Znanstvenici najčešće upotrebljuju 5-7% CO₂.

Temperatura – održavanje idealne temperature životinje podrijetla nužno je za pravilan rast kulture budući da je cilj održavati prirodne uvjete. Povoljna temperature za kulturu životinjskih stanica iznosi oko 37°C. Pregrijavanje ili pothlađivanje temperature može uzrokovati mnoge komplikacije prilikom uzgoja.

Osmotski tlak - stanicama je potreban izotoničan okoliš kako bi preživjele u *in vitro* uvjetima. U suprotnom dolazi do puknuća stanica zbog prevelikog tlaka ili do pretjeranog izlaska vode iz stanica što također uzrokuje smrt stanica. Za kulturu većinu životinjskih stanica, povoljan je osmotski tlak od 260-320 mOsm/kg uz varijacije do ±10 mOsm/kg (Freshney, 2010).

2.1.3 CHO STANIČNA LINIJA

Kineski hrčci su se prvi puta počeli koristiti u laboratoriju 1919. godine umjesto miševa. Sredinom 20. stoljeća uspostavljeno je da zbog malog broja kromosoma, kineski hrčci predstavljaju idealan model u studijama kultura stanica. Godine 1957. dr. Theodore T. Puck je uspostavio staničnu liniju ovarija kineskog hrčka, nakon čega se utvrđuje da su stanice vrlo otporne, imaju kratko generacijsko vrijeme te da se jednostavno uspostavlja stanična kultura *in vitro*.

Stanična linija CHO (eng. *Chinese Hamster Ovary*) jedne su od glavnih stanica koje se koriste kao adherentne, ali i kao suspenzijske stanice zbog dobrog rasta. Podložne su genetičkim

modifikacijama, ekspimiraju veliku količinu proteina od interesa, diktiraju smatanje proteina i posttranslacijske modifikacije čime poboljšavaju topljivost, stabilnost, biološku aktivnost i vrijeme zadržavanja proteina u tijelu ljudi (Jayapal i sur. 2007). S gledišta sigurnosti prolaze sve testove tako što onemogućuju replikaciju 44 humanih patogenih virusa te mogu rasti u suspenzijama pri velikoj gustoći zbog čega su postale modelni organizam u proizvodnji rekombinantnih proteina.

Tijekom posljednjih desetljeća, znanstvenici su uspostavili nekoliko različitih CHO sojeva kako bi poboljšali njihove performance u procesu proizvodnje te zadovoljili zahtjeve tržišta no najveći problem predstavlja produktivnost u usporedbi s mikrobnim stanicama. Zbog velike raznolikosti u proizvodnji različitih proteina, za svaki novi terapeutik potreban je tim znanstvenika koji će razviti i optimizirati procesa (Kim i Lee, 2009).

2.2 HRANJIVI MEDIJ ZA UZGOJ STANICA

U tehnologiji staničnih kultura, jedan od najvažnijih faktora je upravo sastav hranjivog medija za uzgoj. Njegova funkcija je da osigura sve hranjive tvari i ostale dodatke potrebne stanicama za njihov rast, razvoj, proliferaciju i stanične funkcije (Yao i Asayama, 2017). Kvaliteta medija time utječe na produktivnost i konačan proizvod. Sastav medija je vrlo kompleksan budući da mora zadovoljiti zahtjeve stanica koji variraju od kulture do kulture te mora osigurati esencijalne nutrijente, vitamine, kofaktore, metaboličke supstrate, aminokiseline, anorganske ione te elemente u tragovima potrebne za normalno funkcioniranje i razvoj novih stanica

Dodatak aminokiselina nužan je kako bi stanice pomoću njih sintetizirale proteine. Za rast stanica, potrebno im je 12 esencijalnih aminokiselina koje stanice ne mogu same sintetizirati: arginin, cistein, izoleucin, leucin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan, histidine, valin, tirozin i lizin. Važanu aminokiselinu predstavlja L-glutamin kao izvor dušika za NAD, NADPH te za nukleotide. Mediju se mogu dodati i neesencijalne kiseline kako bi nadomjestile one koje su se potrošile tijekom rasta te se na taj način potiče rast i produžuje viabilnost stanica.

Monosaharidi predstavljaju glavni izvor ugljika kojeg stanice kontinuirano troše. Osim izvora energije, heksoze se prevode i koriste za sintezu nekih aminokiselina, masti i nuklinskih kiselina različitim metaboličkim putevima. Najveći afinitet imaju prema glukozu, a najmanji prema galatozi. Glukozu sadrže većina medija kao glavni izvor energije.

Vitamini služe kao bitni koenzimi i prostetičke skupine u mnogim metaboličkim putevima stanica. Stanice ih ne mogu sintetizirati u dovoljnim količinama zbog čega vitamini B skupine biotin, nikotinamid, pantotenska kiselina, piridoksin, tiamin, cijanokobalamin, folatna kiselina i riboflavin čine uobičajene komponente medija za uzgoj kulture stanica.

Osim osnovnih mineralnih tvari poput sumpora, fosfora, magnezija, dušika i kalcija, za rast stanica potrebni su i elementi u tragovima poput vanadija, cinka, bakra, mangana i selenija (Arora, 2013). Elementi u tragovima su esencijalni za mnoge biološke procese poput održavanja enzimске aktivnosti.

S obzirom na dodane suplemente, sintetski mediji se mogu dijeliti na one koji sadržavaju serum, medije bez seruma (*serum-free* medij), medije bez proteina i kemijski definirane medije. Osnovni medij za uzgoj (MEM, minimum essential medium) sadrži oko 20 supstanci koje osiguravaju stanični rast. Sastoji se od 12 neesencijalnih aminokiselina, glutamina, 8 vitamina i nekih osnovnih anorganskih soli. Modificirani MEM, nazvan DMEM (Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium) sadrži 4 puta više aminokiselina, vitamina i glukoze zbog čega se puno češće upotrebljava.

Kao dodatak mediju najčešće se koristi serum životinjskog podrijetla. Serum dobiven iz plazme služi kao izvor aminokiselina, proteina, vitamina, ugljikohidrata, lipida, vezanih proteina, hormona, faktora rasta, faktora prihvaćanja i širenja stanica, anorganskih soli i elemenata u tragovima (Yao i Asayama, 2017). Dugi niz godina koristi se fetalni goveđi serum (*Fetal Bovine Serum*, FBS) te u određenim situacijama fetalni teleći serum (*Fetal Calf Serum*, FCS) i konjski serum. Za industrijsku proizvodnju u velikim mjerilima upotreba seruma životinjskog podrijetla nije poželjna budući da korištenje seruma povećava rizik od kontaminacija, infektivnih agenasa poput mikoplazme, virusa i priona, otežava postupak pročišćavanja te povećava troškove.

Serum-free mediji osiguravaju uzgoj i rast stanica u kontroliranim uvjetima kako bi se provodila različita istraživanja. Omogućuju lakše pročišćavanje i daljnju obradu te stanice pokazuju konzistentnije performance. Sadrže definiranu količinu pročišćenih faktora rasta, lipoprotein, ali i ostalih proteina koji su inače osigurani dodatkom seruma. Neki od nedostataka su osjetljivost kulture na ekstremne pH, osmotske tlakove, temperature te na mehaničke i enzimске tretmane.

Kemijski definirani mediji sadrže anorganske i organske tvari poznatog sastava. Mogu sadržavati određene proteine i faktore rasta dobivene pomoću bakterija i kvasaca upotrebom genetičkog inženjerstva kao i kemijski sintetizirane tvari (McGillicuddy i sur., 2017). Usprkos mnogim prednostima u poznavanju točnog sastava medija, gotovo uvijek uzrokuju smanjen rast i produktivnost u usporedbi s medijima koji sadrže serum. Teško se proizvode i prilagođavaju pojedinačnim staničnim linijama zbog kompleksnih nutritivnih zahtjeva životinjskih stanica.

Proteinski hidrolizati kao dodatak mediju za uzgoj kultura životinjskih stanica osiguravaju povećan rast i produktivnost stanica (Davami i sur., 2015). Koriste se kao alternativa koja djelomično ili u potpunosti zamjenjuje serum budući da osiguravaju sve potrebne hranjive komponente. Dobivaju se hidrolizom biološkog materijala izoliranog iz biljnog tkiva, mikroorganizama ili mliječnih proizvoda koji sadrže aminokiseline, peptide, mineralne tvari, vitamine, lipide te mnoge druge nedefinirane tvari. Franek i sur. (2000) navode da dodani biljni peptidi oponašaju čimbenike rasta ili preživljavanja čime smanjuju apoptozu i moduliraju različite parametre stanica poput produktivnosti. Hidrolizati također pokazuju svojstvo inhibicije apoptoze stanica, zaštitu rekombinantnih proteina od inhibicije i ekstracelularnih proteolitičkih enzima.

2.2.1 BILJNI HIDROLIZATI PROTEINA KAO DODATAK MEDIJU

Biljni proteinski hidrolizati često se koriste kao dodatak osnovnom mediju kako bi potaknuli rast i produktivnost stanične kulture u svrhu reduciranja ili potpune zamjene seruma. Prije samog dodatka hidrolizata, nužno je eksperimentalno odrediti prikladnu dozu kako bi se postigao željeni efekt poboljšanog rasta, viabilnost i ukupne proizvodnje proteina od interesa. Budući da se osnovni medij bez dodatka seruma i proteinski hidrolizati sastoje od mnogih istih tvari, mora se pažljivo dozirati količina hidrolizata za određenu staničnu kulturu kako ne bi došlo do nenamjerne inhibicije supstratom (Babcock i sur., 2010).

Biljni hidrolizati se sastoje od peptida, aminokiselina, ugljikohidrata, lipida te od mnogih nedefiniranih komponenata koje utječu na sveukupnu biološku aktivnost stanične kulture. Dobivaju se enzimskom ili kiselinskom razgradnjom različitih biljnih izvora poput lana, soje, pšenice, uljne repice, konoplje i pamuka (Babcock i sur., 2010). Jedan od mogućih izvora biljnih hidrolizata su uljne pogače koje čine nusprodukt u prešanju sjemenki i proizvodnji ulja čime im

se stvara dodatna vrijednost. Hidrolizati biljnog podrijetla predstavljaju velik potencijal u uzgoju kultura životinjskih stanica zbog količine nutritivnih tvari i niske cijene sirovina.

Zbog unaprijeđenja u dobivanju proteinskih hidrolizata kao što su automatizacija, poboljšana obrada i pročišćavanje konačnog proizvoda sve više raste potražnja i prodaja hidrolizata. Danas, šest od deset proizvođača lijekova tvrde da aktivno koriste proteinske hidrolizate kao dodatak mediju.

2.3 LAN

Lan je jednogodišnja biljka iz obitelji *Linaceae* koja uključuje deset rodova i više od 150 vrsta. Raste do visine od 0,3 do 1 metra te se uzgaja za proizvodnju tekstilnih vlakana i ulja. Poznat kao jedan od najstarijih usjeva još od samih početaka civilizacije. Do 90-ih godina prošlog stoljeća, koristio se u proizvodnji odjeće te su njegova ulja i nusprodukti korišteni kao hrana za životinje. U posljednja dva desetljeća sve je više pažnje posvećeno lanu zbog njegovih bogatih nutritivnih karakteristika kao i zbog mogućih liječenja kardiovaskularnih bolesti, smanjuje rizik od nastajanja raka te smanjuje utjecaje menopauze. Najbogatiji je izvor omega-3 masnim kiselinama i α -linolenskom kiselinom (Gebauer i sur., 2006). Sadrže ulja, proteine, topljiva i netopljiva vlakna, topljive polisaharide, fenolne tvari, vitamine (A,C,F i E) i minerale (P, Mg, K, Na, Fe, Cu, Mn, i Zn). Iako je prirodno bogat antioksidansima poput tokoferola i β -karotena, ulje nakon ekstrakcije i pročišćavanja vrlo brzo oksidira (Holstun i Zetocha, 1994).

Lan sadrži 20-30% proteina od kojih 80% čine globulin i 20% glutelin (Hall i sur., 2006). Sastav aminokiselina vrlo je sličan kao sastavu u soji te ne sadrži gluten. Bogat je izvor glutamina, arginina, valina, leucina, tirozina i fenilalanina. Sastav dušika je 3.25g na 100g sjemenki lana (Kajla i sur., 2015).

2.3.1 ULJNA POGAČA LANA

U posljednjih nekoliko desetljeća prisutno je povećano iskorištavanje organskih ostataka iz prerade proizvoda iz različitih sektora poljoprivrede i industrije. Organski ostatci poput mekinja i uljnih pogača smatraju se otpadom te se u najboljem slučaju koriste kao stočna hrana i gnojivo (Ramachandran i sur., 2006). Kako bi se smanjili troškovi industrijskih procesa i dalo na vrijednosti

agroindustrijskim ostacima, uljne pogače kao idealan izvor mnogih hranjivih tvari imaju velik potencijal u biotehnološkim procesima poput tehnologije životinjskih stanica.

Pogača lana nusprodukt je hladnog prešanja sjemenki tijekom proizvodnje ulja. Nutritivna svojstva pogače ovise o kvaliteti sjemenki te o metodi ekstrakcije ulja, skladištenju, transportu itd. Prema kemijskom sastavu pogača lana sadrži 10,65 % vode, 27,78 % proteina, 29,37% lipida, 7,02% vlakna, 21,78 ekstrahiranih tvari bez dušika te 3,4 pepela (Gutiérrez i sur., 2010). Smatra se potencijalnim izvorom proteinskih izolata i hidrolizata određenih svojstava koja omogućuju njihovu upotrebu kao funkcionalnih komponenata hrane ili terapijskih proizvoda (Omoni i Aluko, 2006).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1 Proteinski hidrolizati uljne pogače lana

Tijekom izrade rada, korišteni su proteinski hidrolizati uljne pogače lana dobiveni standardnim postupcima u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije. Proteinski hidrolizati dobiveni su enzimskom hidrolizom, iz proteinskog izolata uljne pogače lana, pomoću mikrobnih proteaza *Alcalase*, *Neutralse* i *Protamex*.

3.1.2 CHO stanična linija

U ovom istraživanju korištena je CH DP-12 stanična adherentna linija fibroblasta ovarija kineskog hrčka koja ima upotrebu u proizvodnji terapijskih antitijela. Klon stanične linije CHO DP-12 eksprimira anti-IL8 rekombinantno humano monoklonsko protutijelo, izotopa IgG. Pohranjena je u *American Type Cell Collection* (ATCC) banci 8 Manassas, Virginia, SAD pod oznakom (ATCC®CRL 12444™).

3.1.3 Kemikalije

EX-CELL® CD CHO Serum-Free Medium for CHO cells, Chemically Defined, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Natrijev hidroksid, Kemika, Hrvatska

Natrijev karbonat, Kemika, Hrvatska

Kalij natrij tetrahidrat, Kemika, Hrvatska

Folin-Ciocalteu reagens, Kemika, Hrvatska

D-glukoza, Kemika, Zagreb

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

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

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

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

Metotreksat (MTX), Cerilliant, SAD

GlutaMAX™, Gibco, SAD 4%

Anti-Clumping Agent, Gibco, SAD

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

3.1.4 Otopine i puferi

Reagens A

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

Reagens B1

Bakrov sulfat pentahidrat	1 g
Destilirana voda do	100 mL

Reagens B2

Kalij natrij tartarat	2 g
Destilirana voda	do 100 mL

Reagens C

Reagens A	50 ml
Reagens B1	0,5 ml

Reagens za određivanje glukoze

fosfatni pufer (pH 7.5)	0,1 mol L ⁻¹
fenol	0,75 mmol L ⁻¹
4-Aminoantipirin	0,25 mmol L ⁻¹
glukozaoksidaza (GOD)	≥ 15 kU L ⁻¹
peroksidaza (POD)	≥ 1,5 kU L ⁻¹

Standard za određivanje glukoze

Glukoza	100 mg dL ⁻¹ (5,55 mmol L ⁻¹)
---------	--

Reagens za određivanje laktata

R1:	pufer (pH 10)
	D-glutamat
	NaN ₃
R2:	NAD ⁺ /PVP
R3:	otopina D-glutamat transaminaze
R4:	otopina L-laktat dehidrogenaze

Standard za određivanje laktata

L-laktat	0,15 mg mL ⁻¹
----------	--------------------------

Reagensi za određivanje Imunoglobulina G2

R1:	
	Tris pufer (pH 7.8)
	200 mmol L ⁻¹
	NaCl
	85 mmol L ⁻¹
	Polietilenglikol
	3,5 %
	Konzervans
	< 0,1 %
R2:	

Anti-human IgG antitijelo (koza)

TRIS pufer (pH 7.8) 200 mmol L⁻¹

NaCl 400 mmol L⁻¹

Konzervans < 0,1 %

3.1.5 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
- ploče s jažicama, Corning, SAD
- laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, kivete, epruvete)
- hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- hladnjak (-80 °C), TT 80 FRYKA, Njemačka
- vrtložna mješalica, IKA, Njemačka
- spektrofotometar Thermo Scientific Genesys 10 S UV/VIS, SAD
- SevenCompact pH/Ion, Mettler-Toledo
- centrifuga, Centric 322A, Tehnica Železniki, Slovenija
- Erlenmeyer tikvice za uzgoj stanica, Corning, SAD

3.2 Metode rada

3.2.1 Uzgoj CHO stanične linije u suspenziji

Postupak započinje odmrzavanjem stanica koje se čuvaju u mediju za zamrzavanje pri -80°C . Zamrznute stanice u ampulama u koncentraciji od $1 \cdot 10^7$ st mL^{-1} podvrgnu se naglom odmrzavanju uranjanjem u vodenu kupelj temperature od 37°C . Stanice se prenesu u sterilnu kivetu s 5-10 mL medija za uzgoj, potom se sadržaj centrifugira i pažljivo se dekantira supernatant. Talog kojeg čine stanice se resuspendira u mediju u kojem se žele uzgojiti stanice. Tijekom ovog eksperimenta CHO-DP12 stanice su uzgajane u Ex-Cell[®] CD CHO *serum-free* mediju s dodatkom sljedećih komponenti: rh-inzulin, MTX, GlutaMAX, *Anti-Clumping* te antibiotik. Sadržaj se prenese u Erlenmeyer tikvicu s medijem koju stavljamo na tresilicu pri 170 rpm kako ne bi došlo do stvaranja agregata, taloženja ili vezanja stanica na površinu tikvice te se uzgoj odvija u inkubatoru pri 37°C . Tijekom uzgoja se svakodnevno prati broj stanica pomoću svjetlosnog mikroskopa te koncentracija glukoze i laktata u mediju, dok se stanje stanica i njihova morfologija prate pod inverznim mikroskopom.

3.2.2 Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u

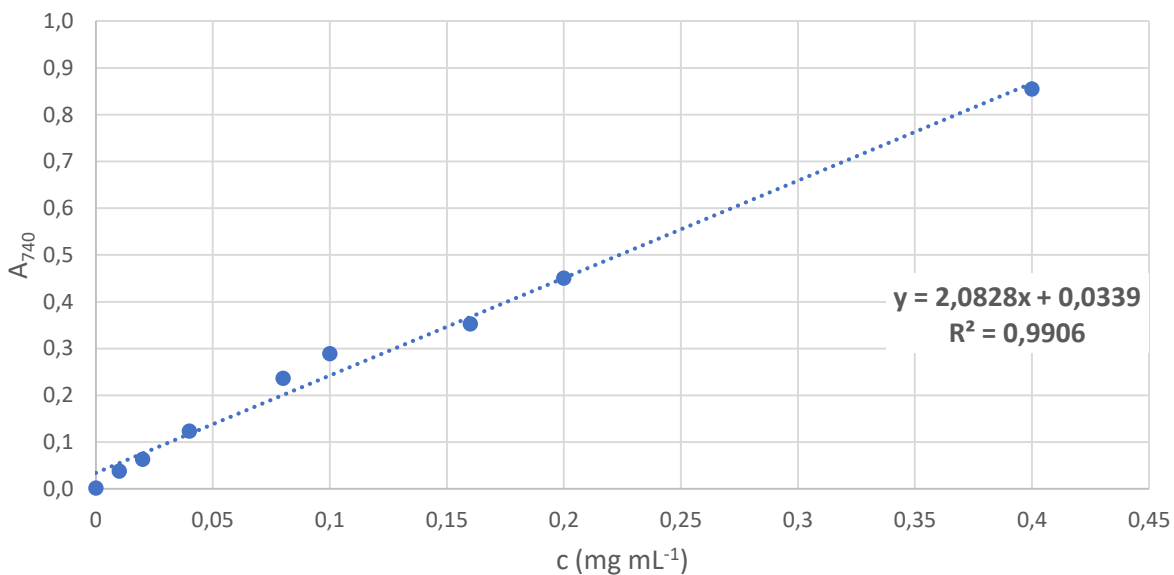
Metoda po Lowry-u koja se koristi za određivanje koncentracije proteina, temelji se na reakciji bakrenih iona vezanih na amino skupine peptidne veze i fenolne skupine bočnog ogranka aminokiseline tirozin (Tyr) u proteinu s Folin-Ciocalteu reagensom. Reakcijom dolazi do nastanka kompleksa plavo-ljubičastog obojenja čija se apsorbancija mjeri pri 740nm.

Bakreni ioni koordinirano vezani na amino skupine peptidne veze i fenolna skupina Tyr reduciraju fosfovolframatnu i fosfomolibdensku kiselinu koju sadrži Folin-CioCalteau reagens u volfram i molibden plavilo.

Baždarni dijagram se konstruira kako bi se mogle odrediti koncentracije proteina iz uzoraka nepoznatih koncentracija. U tu svrhu se iz ishodišne otopine BSA (*Bovine Serum Albumin*), $\gamma(\text{BSA}) = 1 \text{ mg mL}^{-1}$, pripremi po 1 mL standardnih otopina BSA različitih koncentracija (Tablica 1.) te se pomoću izmjerenih apsorbancija konstruira baždarni dijagram (slika 2.).

Tablica 1. Priprema standardnih otopina BSA

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



Slika 2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina po Lowryu.

U epruvete je dodano 1 mL reagensa C te 200 μ L uzorka (hidrolizat lana/standard/dH₂O/standardni niz razrjeđenja) uz mješanje na vrtložnoj mješalici, nakon čega je smjesa inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim se naglo u svaku epruvetu na vortex-

u dodaje 100 μ L Folin-Ciocalteu reagensa te je smjesa inkubirana pri sobnoj temperaturi u mraku 45 minuta. Apsorbancije uzoraka očitana je pri valnoj duljini od 740 nm.

3.2.3 Dodatak proteinskog hidrolizata uljne pogače lana u medij za uzgoj stanica

Prilikom provođenja istraživanja pratio se uzgoj, rast i produktivnost CHO-DP12 stanične linije uzgajane u suspenzijama s dvije različite koncentracije dodanih hidrolizata u usporedbi s kontrolom koju čini medij bez dodatka hidrolizata. U Ex-Cell[®] CD CHO *serum-free* medij dodani su biljni proteinski hidrolizati dobiveni razgradnjom pomoću proteaza *Alcalase*, *Neutrase* i *Protamex*. Metodom po Lowry-u odredili smo ukupnu koncentraciju proteina na temelju koje se izračunava volumen potrebnog hidrolizata kako bi se u ukupnom volumenu suspenzije postigle željene koncentracije od 2 i 0,5 g L⁻¹ proteinskog hidrolizata lana.

Račun za određivanje potrebnog volumena biljnog proteinskog hidrolizata:

Volumen potrebnog hidrolizata (mL)= (željena konc. hidrolizata u suspenziji * volumen suspenzije)/ konc. pripremljenog biljnog hidrolizata [1]

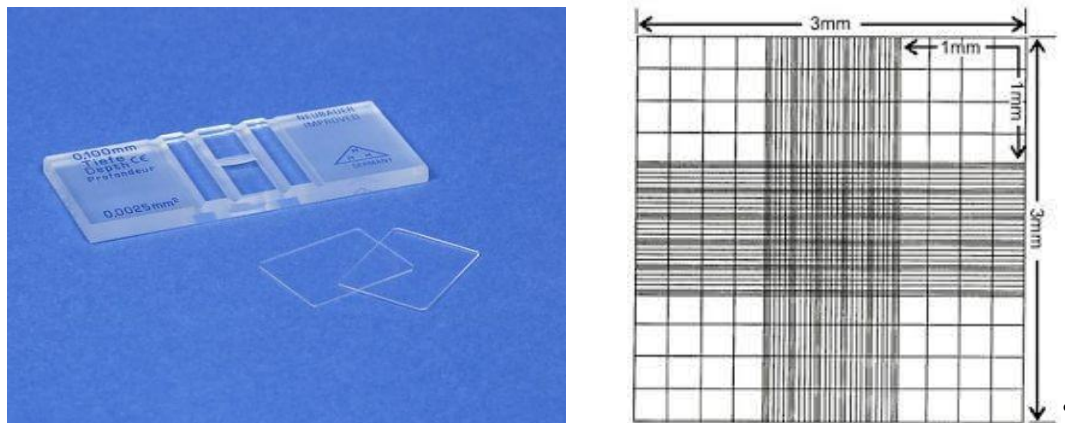
3.2.4 Određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*

Metoda bojanja tripan plavo koristi se za razlikovanje živih od mrtvih stanica te za određivanje broja živih stanica u staničnoj suspenziji. Metoda se temelji na principu da mrtve stanice imaju oštećenu staničnu membranu zbog čega tripan plavo difundira u stanicu te se ona boji u plavo. Žive stanice posjeduju netaknutu membranu te ne poprimaju plavo obojenje zbog čega se pod svjetlosnim mikroskopom vizualno uočava razlika između stanica, na temelju čega se određuje viabilnost stanične kulture u suspenziji.

Metoda započinje uzorkovanjem suspenzija nakon čega se sadržaj resuspendira pomoću pipetmana. Volumen od 10 μ L pomiješa s 10 μ L tripan plavo otopine nakon čega se 10 μ L obojene suspenzije nanosi na Neubauerovoj komoricu. Komorica služi za olakšano i što točnije brojanje stanica, a sastoji se od 4 velika kvadrata od kojih je svaki podijeljen na 16 manjih kvadrata. Nakon brojanja svih kvadrata, pomoću računske formule se određuje ukupan broj živih stanica po mililitru u suspenziji.

Račun za određivanje broja stanica po mililitru suspenzije:

Broj stanica po mL suspenzije = zbroj stanica u sva četiri velika kvadrata * 5 * 10³ [2]

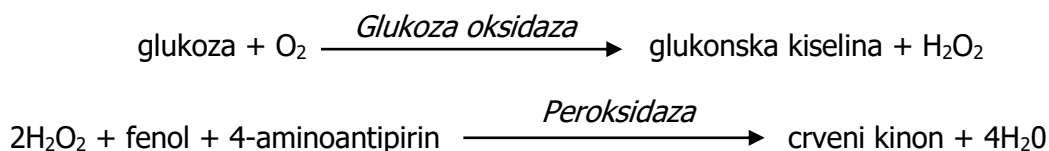


Slika 3. Neubarova komorica za brojanje stanica (Anonymous 1, 2019.)

3.2.5 Određivanje koncentracije glukoze u hranjivom mediju

Glukožu smo određivali komercijalnim *Glucose (GOD-PAP)* testom. Nakon uzorkovanja i određivanja broja živih stanica metodom tripan plavo, sadržaj Eppendorf kiveta smo centrifugirali 5 minuta pri 1500rpm kako bi odvojili stanice od hranjivog medija. Supernatant se pažljivo odvoji pomoću pipetmana te se u njemu određuje glukoza. Postupak se temelji na enzimatsko kolorimetrijskom određivanju glukoze pri čemu se dobivaju otopine različitog intenziteta obojenja, koje je proporcijalno koncentraciji glukoze, kojima se spektrofotometrijski mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 500nm.

Kolorimetrijska reakcija:



Uzorak za mjerenje apsorbancije se priprema tako da se u jažicu dodaje 10 μL uzorka i 1 mL reagensa. Slijepa proba je umjesto uzorka sadržavala destiliranu vodu. Također pripremamo standard kojeg priređujemo tako da se u 1 mL reagensa dodaje 10 μL standarda u 3 paralele

kako bi dobili što preciznije rezultate. Nakon pripreme slijepa probe, standarda i uzoraka, epruvete inkubiramo 10 minuta pri 37°C nakon čega im određujemo apsorbanciju.

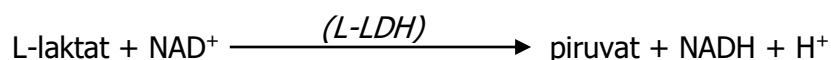
Račun za određivanje koncentracije glukoze u uzorcima:

Koncentracija glukoze (mmol L^{-1}) = $\{A_{500}(\text{uzorak})/A_{500}(\text{standard})\} \times \text{koncentracija standarda (5,56 mmol L}^{-1})$ [3]

3.2.6 Određivanje koncentracije laktata u hranjivom mediju

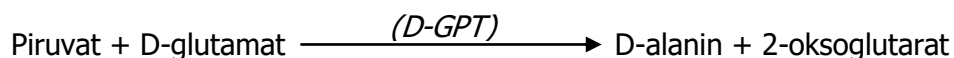
Kvantitativno određivanje laktata u hranjivom mediju provedeno pomoću © *Megazyme* kita te zahtijeva dvije enzimске reakcije. U prvoj reakciji kataliziranoj pomoću L-laktat dehidrogenaze (L-LDH), laktat oksidira do piruvata pri čemu dolazi do redukcije NAD^+ u NADH.

Reakcija oksidacije laktata:



Budući da ravnoteža reakcije ide u smjeru nastajanja laktata i NAD^+ , sljedeća je reakcija nužna za zadržavanje piruvata i NADH. To se postiže konverzijom piruvata do D-alanina i 2-oksoglutarata pomoću katalize D-glutamat-piruvat transaminaze (D-GPT) u prisustvu suviška D-glutamata. Količina dobivenog NADH u prvoj reakciji je stehiometrijski proporcijalna količini laktata u uzorku te joj se mjeri povećanje apsorbancije pri valnoj duljini od 340nm.

Reakcija zadržavanja količine NADH:



Postupak određivanja koncentracije proveden je prema protokolu navedenom u uputama proizvođača. Svi volumeni navedeni u protokolu su umanjeni za 1/4 kako bi se povećala iskoristivost kita. Uzorak za mjerenje apsorbancija se priprema tako da se u kivetu dodaje 375 μL deionizirane vode, 25 μL uzorka, 375 μL otopine pufera (pH 10), 25 μL otopine NAD^+ /PVP i 5 μL otopine D-glutamat-piruvat-transaminaze. Slijepu probu pripremamo tako da se umjesto uzorka dodaje veća količina deionizirane vode tj. 400 μL . Sadržaj kiveta oprezno se promiješa, te nakon 3 minute se očitaju apsorbancije (A1). Reakciju započinjemo dodatkom 5 μL L-laktat dehidrogenaze te laganim miješanjem, a apsorbancije (A2) očitavamo pri završetku reakcije nakon 10 minuta.

Račun za određivanje koncentracije laktata u uzorcima:

$$\text{Razlika apsorbancija (uzorci i slijepa proba, } \Delta A) = A_{2340} - A_{1340} \quad [4]$$

$$\text{Koncentracija laktata (g L}^{-1}\text{)} = 0,3240 * \Delta A_{340} \quad [5]$$

Kako bi smo rezultate dobili u obliku SI jedinica (mmol L⁻¹), rezultate proračuna množimo:

$$\text{Laktat (g L}^{-1}\text{)} * 11,1 = \text{Laktat (mmol L}^{-1}\text{)} \quad [6]$$

3.2.7 Određivanje koncentracije imunoglobulina G u hranjivom mediju

Određivanje imunoglobulina G temelji se na reakciji anti-IgG antitijela s antigenom u uzorku čime nastaje antitijelo-antigen kompleks te posljedično dolazi do aglutinacije koja se mjeri turbidimetrijski. Koncentraciju određujemo spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 340nm.

Koncentracija proizvedenog IgG određena je pomoću imunodetekcijskog kita *Turbidex*[®] IgG-2 testa. Postupak određivanja koncentracije proveden je prema protokolu navedenom u uputama proizvođača. Svi volumeni navedeni u protokolu su umanjeni za 1/3 kako bi se povećala iskoristivost kita, a kao slijepa proba korišten je početni medij za uzgoj stanica. Uzorke i slijepu probu pripremamo tako da u kivetu dodajemo 500 μL reagensa 1 i po 20 μL uzorka te sve lagano promiješamo. Reakcijska smjesa se inkubira 5 minuta pri 37°C te se odredi apsorbancija (A1) pri valnoj duljini od 340nm. Zatim se doda 40 μL reagensa 2 čime započinje reakcija te 60 μL destilirane vode. Smjesa se ponovno promješa te inkubira 5 minuta pri 37°C. Potom se ponovno očitava apsorbancija (A2) pri valnoj duljini od 340nm. Koncentracija IgG-a u uzorku se očitava pomoću baždarnog dijagrama pripremljenog u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, iz razlike apsorbancija (A2-A1).

3.2.8 Određivanje specifične brzine rasta CHO-DP12 stanica

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad [7]$$

x-masa stanica

dx- povećanje biomase stanica

dt - vremenski interval

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

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad [8]$$

Obzirom da je masa proporcionalna broju stanica, tada je :

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{\Delta t}$$

N - broj stanica u 1 mL na kraju log faze

N₀ - broj stanica u 1 mL na početku log faze

Δt - vremenski interval (h)

4. REZULTATI I RASPRAVA

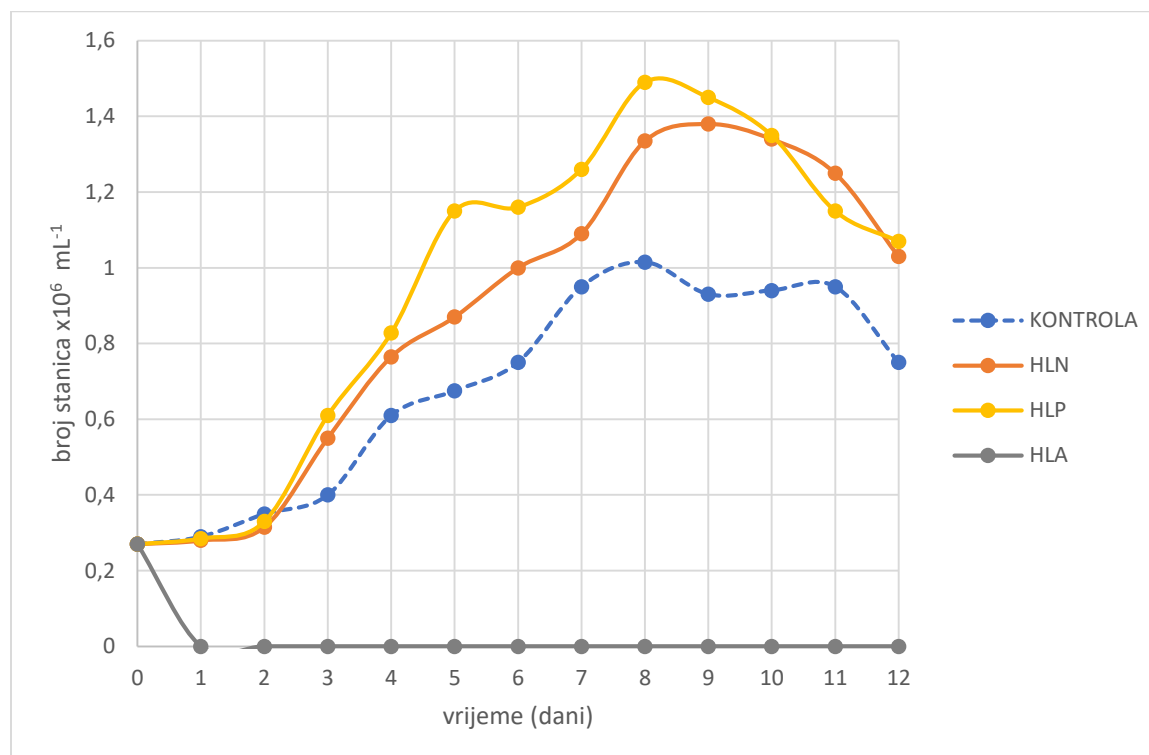
Djelotvoran učinak biljnih proteinskih hidrolizata na rast životinjskih staničnih kultura, poznat je već više od dva desetljeća te proizvodi dobiveni pomoću njih sve više preuzimaju tržište za zaštitu zdravlja. Biofarmaceutska industrija pokušava pronaći rješenja kako bi smanjili troškove proizvodnje i istovremeno optimizirali uzgoj stanica u svrhu redukcije korištenja ili potupne zamijene seruma (Kim i Lee, 2009). Tradicionalno, optimalan rast kultura životinjskih stanica uz maksimalnu produktivnost postizao se dodatkom seruma animalnog podrijetla (FBS) u koncentraciji 5-10% u osnovni medij. Uz mnoge pozitivne učinke nedefiniranih komponentata seruma, njegovo korištenje je poželjno svesti na minimum zbog mogućih kontaminacija i visokih cijena pročišćavanja konačnog proizvoda (Babcock i sur., 2010).

Danas su komercijalno prisutni vrlo kvalitetni, visokoučinkoviti i nutritivno bogati kemijski definirani mediji u svrhu dobivanja terapijskih proizvoda s nedostatkom teško pristupačnih cijena. Kako bi poboljšali performanse mnogih biofarmaceutskih proizvodnih sustava, biljni proteinski hidrolizati se rutinski koriste kao suplementi pri uzgoju kultura životinjskih stanica u kombinaciji s drugim tvarima kako bi se optimizirao proces. Burteau i sur. (2003) su pokazali da biljni hidrolizati poput pšenice su povoljan dodatak za promicanje rasta i produktivnosti CHO stanične linije uzgajane u suspenziji. Jedan od izvora biljnih sirovina su uljne pogače koje predstavljaju značajan potencijal zbog visokog udjela nutritivnih tvari, nedefiniranih komponenti koji pozitivno utječu na rast te zbog pristupačnih cijena. Uljne pogače su nusprodukti u proizvodnji ulja sjemenki te upotrebom u biotehnološkim procesima nekadašnja stočna hrana dobiva na većoj vrijednosti (Ramachandran i sur., 2007). Koristeći hidrolizate biljnog podrijetla kao suplemente pri uzgoju, nekoliko biofarmaceutskih proizvoda već je izašlo na tržište dok su mnogi još uvijek u procesu unaprijeđnja.

Potaknuti dosadašnjim istraživanjima u svrhu izbjegavanja dodataka seruma životinjskog podrijetla, cilj rada bio je ispitati utjecaj proteinskih hidrolizata uljne pogače lana dobivenih pomoću, proteaza *Alcalase*, *Neutralse* i *Protamex*, na rast i produktivnost stanične linije CHO DP-12.

4.1 Učinak dodatka proteinskog hidrolizata uljne pogače lana u koncentraciji 2 g L⁻¹ na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije

Kako bi smo ispitali učinak proteinskih hidrolizata uljne pogače lana, dobivenih hidrolizom pomoću mikrobni proteaza *Alcalase*, *Neutralse* ili *Protamexa*, na rast i produktivnost CHO DP-12 stanica, pripremljeni su hranjivi mediji s dodatkom 2 g L⁻¹ pojedinog hidrolizata. Stanice uzgajane u *serum-free* mediju bez dodatka proteinskih hidrolizata predstavljaju kontrolu.

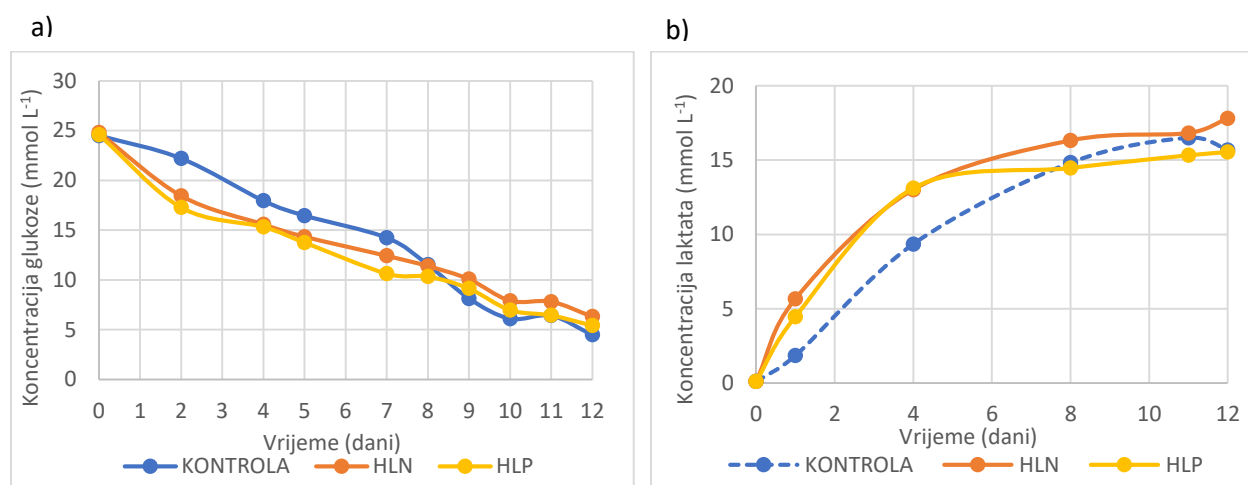


Slika 4. Prikaz ovisnosti broja CHO DP-12 stanica o vremenu (dani) tijekom uzgoja stanica u mediju s dodatkom 2 g L⁻¹ proteinskog hidrolizata uljne pogače lana: dobivenog pomoću enzima *Alcalase* (HLA), dobivenog pomoću enzima *Neutralse* (HLN) i dobivenog pomoću enzima *Protamex* (HLP).

Tablica 2. Specifična brzina rasta μ (h⁻¹) CHO DP-12 stanica u mediju s dodatkom 2 g L⁻¹ proteinskog hidrolizata uljne pogače lana: dobivenog pomoću enzima *Neutralse* (HLN) i dobivenog pomoću enzima *Protamex* (HLP).

Konc. hidrolizata	$\mu_{\text{KONTROLA}}(\text{h}^{-1})$	$\mu_{\text{HLN}}(\text{h}^{-1})$	$\mu_{\text{HLP}}(\text{h}^{-1})$
2 g L ⁻¹	0,0074	0,0100	0,0105

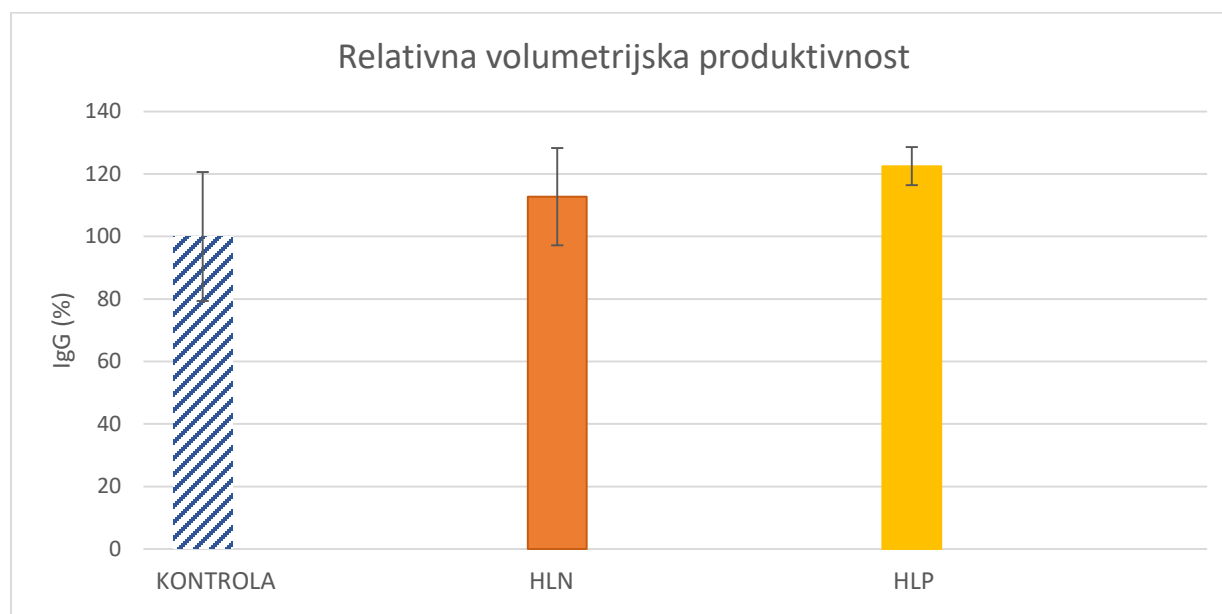
Promatrajući krivulju rasta (slika 4.) može se uočiti da stanice uzgajane u kemijski definiranom mediju bez dodatka hidrolizata pokazuju slabiji rast u odnosu na stanice uzgajane u mediju s dodatkom hidrolizata (HLN i HLP). Najbolji, ali i najbrži rast pokazale su stanice uzgajane u mediju s dodatkom HLP (tablica 2). S druge strane, stanice uzgajane u mediju s dodatkom HLA umiru već nakon prvog dana stoga za te stanice nismo određivali metabolite niti njihovu produktivnost. Različiti sastavi, nutritivne tvari i koncentracije peptida, mogući su razlog drugačijih utjecaja hidrolizata na rast i produktivnost iste stanične linije (Kim i Lee, 2009). Istraživanja su pokazala da sastav medija i dodane komponente mogu utjecati na rast stanica i produktivnost, ekspresiju gena, kvalitetu konačnog proizvoda te na metabolizam laktata (Altamirano i sur., 2012).



Slika 5. Metabolizam CHO DP-12 stanica; potrošnja glukoze kroz vrijeme (a) te proizvodnja laktata kroz vrijeme (b) u medijima s dodatkom 2 g L⁻¹ proteinskog hidrolizata uljne pogače lana: dobivenog pomoću enzima *Neutrase* (HLN) i dobivenog pomoću enzima *Protamexa* (HLP).

Glukoza služi kao jedan od glavnih izvora ugljika i energije za CHO stanice (Zamorano i sur., 2010). Stopa potrošnje glukoze često se koristi kao pokazatelj aktivnosti stanične kulture za vođenje strategija prihrane. Kao glavni izvor ugljika, stanice tijekom rasta, razvoja i reprodukcije koriste glukozu koja se s vremenom troši što je vidljivo iz slike 5. a). Tada postaje jedan od mogućih limitirajućih faktora koji dovode do smrti stanica. Stanice proizvode laktate kao produkte svog metabolizma. Laktati najčešće predstavljaju jednu od tvari metabolizma koja u većim koncentracijama ima toksično djelovanje na staničnu liniju. Tijekom vremena kako dolazi do rasta stanica tako dolazi i do povećanja koncentracije laktata što se može uočiti na grafičkom prikazu (slika 5. b). U prvim danima uzgoja koncentracija je vrlo niska nakon čega naglo raste prateći

eksponencijalni rast stanične linije. Potom stanice prelaze u stacionarnu fazu kada se koncentracija laktata značajnije ne mijenja.

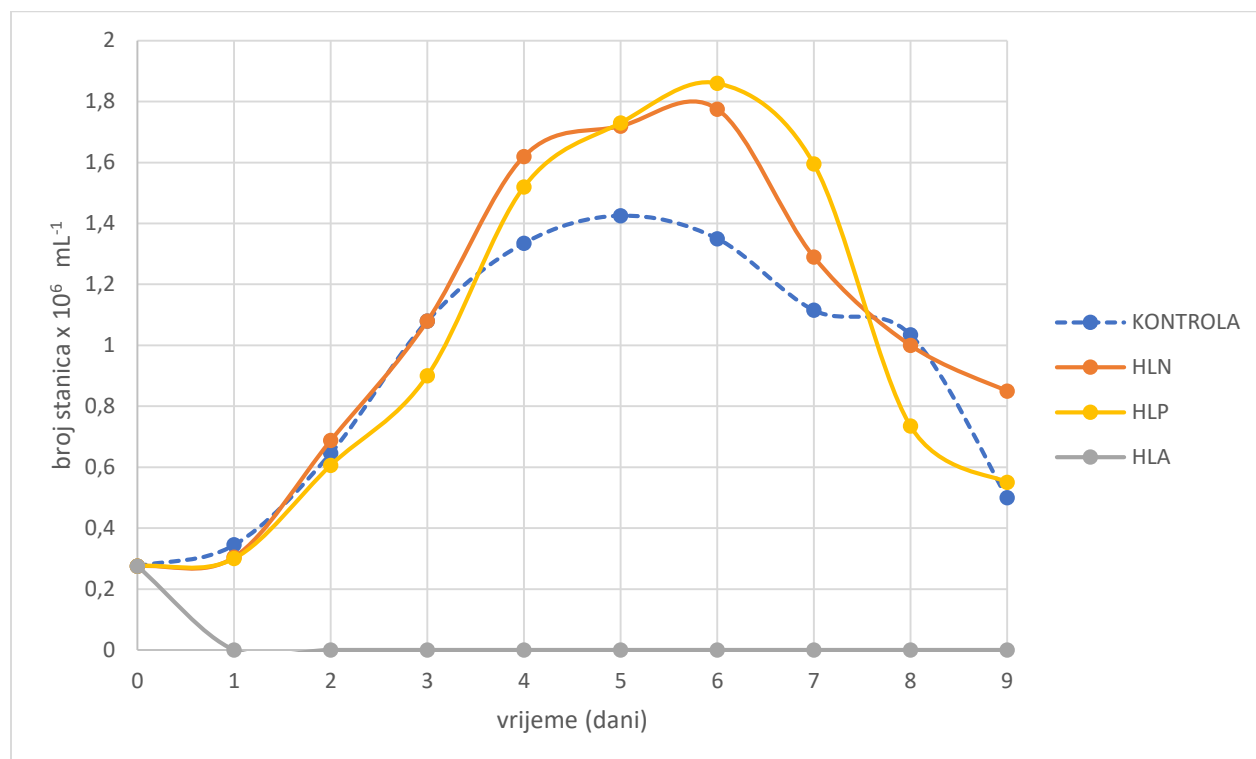


Slika 6. Relativna volumetrijska produktivnost IgG CHO DP-12 stanica u medijima s dodatkom 2 g L⁻¹ proteinskog hidrolizata uljne pogače lana: dobivenog pomoću enzima *Neutrase* (HLN) i dobivenog pomoću enzima *Protamexa* (HLP).

Na slici 6. može se uočiti da u usporedbi s kontrolom, stanice uzgajane u medijima u koje su dodani proteinski hidrolizati HLN i HLP pokazuju veću volumetrijsku produktivnost za 13% i 22% IgG. Stoga se da zaključiti da proteinski hidrolizati dobiveni cijepanjem ovih enzima pozitivno utječu na produktivnost CHO DP-12 stanica budući da provođenjem sličnog istraživanja s proteinskim hidrolizatima soje i pšenice, Franek i sur. (2000) su došli do pretpostavke da hidrolizati mogu osigurati peptide koji imaju specifične pozitivne učinke na uzgojene životinjske stanice.

4.2 Učinak dodatka proteinskog hidrolizata uljne pogače lana u koncentracij 0,5 g L⁻¹ na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije

Kao i u prethodnom eksperimentu, CHO stanična linija naciepljena je u 4 tikvice s Excell medijem za uzgoj u suspenziji pri čemu je jedna tikvica služila kao kontrola i u nju nisu dodani nikakvi suplementi za poticanje rasta. U ostale tikvice je dodano tri proteinska hidrolizata u nižoj koncentraciji nego u prethodnom eksperimentu tj. u koncentraciji od 0,5 g L⁻¹.

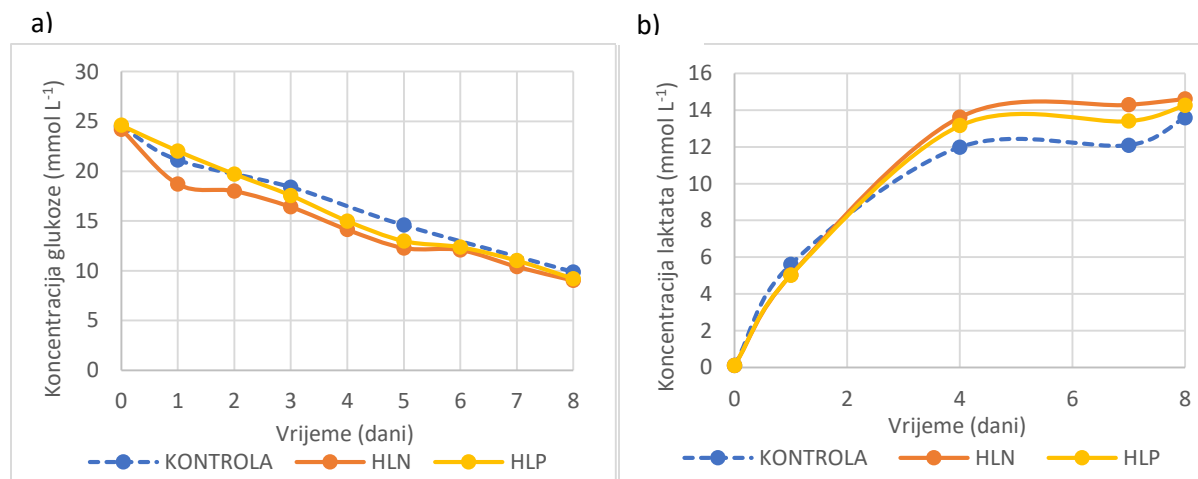


Slika 7. Prikaz ovisnosti broja CHO DP-12 stanica o vremenu (dani) tijekom uzgoja stanica u mediju s dodatkom 0,5 g L⁻¹ proteinskog hidrolizata uljne pogače lana: dobivenog pomoću enzima *Alcalase* (HLA), dobivenog pomoću enzima *Neutrase* (HLN) i dobivenog pomoću enzima *Protamex* (HLP).

Tablica 3. Specifična brzina rasta $\mu(\text{h}^{-1})$ CHO DP 12 stanica u mediju s dodatkom $0,5 \text{ g L}^{-1}$ proteinskog hidrolizata uljne pogače lana: dobivenog pomoću enzima *Neutrased* (HLN) i dobivenog pomoću enzima *Protamex* (HLP).

Konc. hidrolizata	$\mu_{\text{KONTROLA}}(\text{h}^{-1})$	$\mu_{\text{HLN}}(\text{h}^{-1})$	$\mu_{\text{HLP}}(\text{h}^{-1})$
$0,5 \text{ g L}^{-1}$	0,0148	0,0148	0,0152

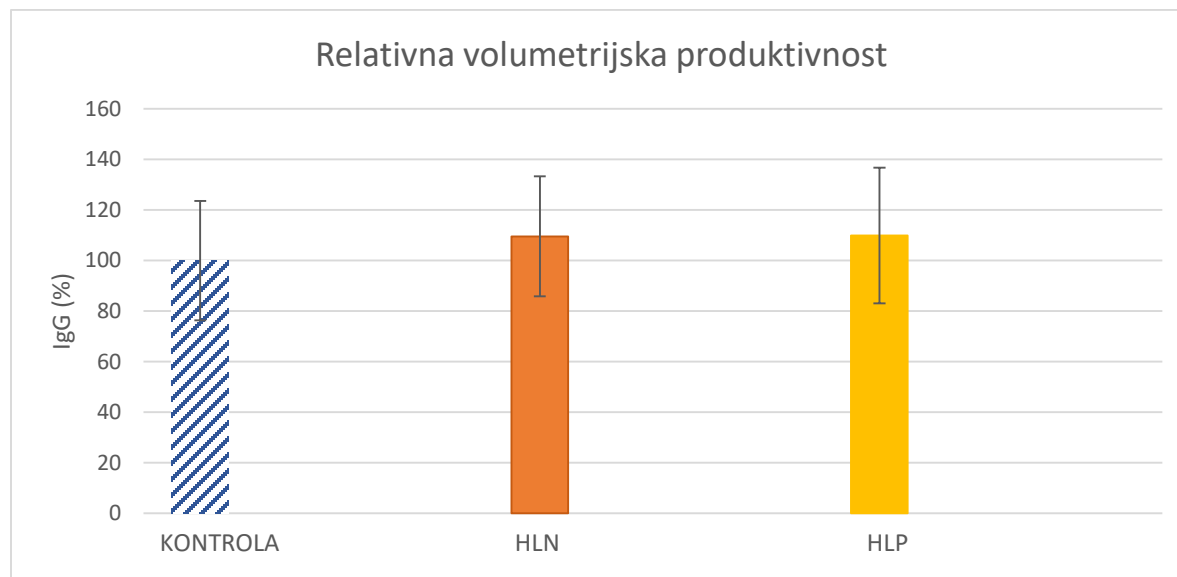
Dodatak $0,5 \text{ g L}^{-1}$ proteinskog hidrolizata HLN i HLP pokazuje pozitivan učinak na rast stanica u odnosu na kontrolu (slika 7.). Najveću specifičnu brzinu rasta posjeduju stanice uzgajane u mediju s dodatkom HLP (tablica 3.). Smanjenje koncentracije HLA nije pozitivno djelovalo na stanice, koje su kao i stanice uzgajane s dodatkom 2 g L^{-1} HLA, umrle nakon prvog dana. Rezultati sličnog istraživanja pokazali su da bi se susstitucija proteina u mediju s hidrolizatima uljane repice činila obećavajućom alternativom za poboljšanje rasta stanica u mediju bez dodatka seruma (Chabanon i sur., 2008).



Slika 8. Metabolizam CHO DP-12 stanica; potrošnja glukoze kroz vrijeme (a) te proizvodnja laktata kroz vrijeme (b) u medijima s dodatkom $0,5 \text{ g L}^{-1}$ proteinskog hidrolizata uljne pogače lana: dobivenog pomoću enzima *Neutrased* (HLN) i dobivenog pomoću enzima *Protamexa* (HLP).

Koncentracija glukoze s vremenom se smanjuje budući da ona predstavlja glavni izvor ugljika te ju stanice kontinuirano troše (slika 8 a). Uočen je veći rast koncentracije laktata kod dodatka hidrolizata u usporedbi s kontrolom bez dodanih hidrolizata (slika 8. b). Jedna od glavnih posljedica metabolizma životinjskih stanica uzgojene *in vitro* je pretjerana proizvodnja laktata

(Pan i sur., 2016). Kad pređu određene kritične koncentracije, uzrokuju inhibiciju rasta stanica te smanjenje proizvodnje proteina od interesa (Lao i Toth, 1997).



Slika 9. Relativna volumetrijska produktivnost IgG CHO DP-12 stanica u medijima s dodatkom $0,5 \text{ g L}^{-1}$ proteinskog hidrolizata uljne pogače lana: dobivenog pomoću enzima *Neutralse* (HLN) i dobivenog pomoću enzima *Protamexa* (HLP).

U usporedbi s kontrolom, stanice kojima je dodan hidrolizat pokazuju veću produktivnost za oko 10% (slika 9.). Slične rezultate je pokazalo istraživanje gdje je dodatak hidrolizata soje poboljšao rast stanica te povećao proizvodnju IgG-a u usporedbi sa stanicama uzgojene bez hidrolizata (Gupta, 2015). Nadalje, prisutnost protinskih biljnih hidrolizata omogućila je bolju prilagodbu CHO stanica na medij bez seruma te smanjila smrtnost stanične linije (Siemensma i sur., 2010).

5. ZAKLJUČAK

1. Dodatak 2 g L⁻¹ proteinskog hidrolizata uljne pogače lana, dobivenog pomoću enzima *Neutrase* (HLN) i *Protamex-a* (HLP) u hranjivi medij pozitivno utječe na rast i produktivnost CHO DP-12 stanica
2. Poboľjšani rast i produktivnost CHO DP-12 stanica očituje se pri dodatku 0,5 g L⁻¹ proteinskog hidrolizata uljne pogače lana, dobivenog pomoću enzima *Neutrase* (HLN) i *Protamex-a* (HLP) u hranjivi medij.
3. Dodatak 0,5 g L⁻¹ i 2 g L⁻¹ proteinskog hidrolizata, dobivenog djelovanjem enzima *Alcalase* (HLA), u hranjivi medij uzrokuje smrt CHO DP-12 stanica unutar jednoga dana.
4. U cilju povećanja prinosa i produktivnosti stanica u kulturi, *Neutrase* (HLN) i *Protamex* (HLP) se mogu koristiti kao dodatak kemijski definiranom mediju tijekom uzgoja suspenzijskih CHO DP-12 stanica

6. LITERATURA

Altamirano, C., Berrios, J., Vergara, M., Becerra, S. (2012) Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production, *Electronic Journal of Biotechnology* **16**.

Aluko, R. E. (2012) Food protein-derived peptides: Production, isolation and purification, *Journal of food science* **71**.

Arora, M. (2013) Cell Culture Media: A Review <<https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>> Pristupljeno 4. srpnja 2019.

Anonymous 1 (2019) <<https://www.eduka.com.pl/produkt/komora-do-zliczania-cialek-krwi-wedlug-neubauera/>> Pristupljeno 2. kolovoza 2019.

Babcock, J., Wilcox, C., Huttinga, H. (2010) Partial Replacement of Chemically Defined Media with Plant-Derived Protein Hydrolysates, *BioPharm International* **23**.

Burteau, C. C., Verhoeve, F. R., Mols, J. F., Ballez, J.-S., Agathos, S. N., Schneider, Y.-J. (2003) Fortification of a protein-free cell culture medium with plant peptones improves cultivation and productivity of an interferon- γ -producing CHO cell line, *InVitroCell. Dev. Biol.-Animal* **39**, str. 291-296.

Ballez, J. S., Mols, J., Burteau, C., Agathos, S. N., Schneider, Y. J. (2004) Plant protein hydrolysates support CHO-320 cells proliferation and recombinant IFN- γ production in suspension and inside microcarriers in protein-free media, *Cytotechnology* **44**, str. 103-114.

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

Chabanon, G., Costa, L. A., Farges, B., Harscoat, C., Chenu, S., Goergen, J. L., Marc, A., Marc, I., Chevalot, I. (2008) Influence of the rapeseed protein hydrolysis process on CHO cell growth, *Bioresource Technology*, str. 7143-7151.

Chaundhry, M. A., Boewn, B. D., Piret, J. M. (2009) Culture pH and osmolality influence proliferation and embryoid body yields murine embryonic stem cells, *Biochemical Engineering Journal* **45**, str. 126-135.

Davami, F., Baldi, L., Rajendra, Y., Wurm, F. M. (2014) Peptone Supplementation of Culture Medium Has Variable Effects on the Productivity of CHO Cells, *International Journal of Molecular and Cellular Medicine* **3**, str. 146-156.

Davami, F., Eghbalpour, F., Nematollahi, L., Barkhordari, F., Mahboudi, F. (2015) Effects of Peptone Supplementation in Different Culture Media on Growth, Metabolic Pathway and Productivity of CHO DG44 Cells; a New Insight into Amino Acid Profiles, *Iranian Biomedical Journal*. **19**, str. 194-205.

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, *Biotechnology Progress* **16**, str. 688-692.

Freshney, R. I. (2010) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, izd. 6., Wiley-Blackwell

Froud, S J. (1999) The development, benefits and disadvantages od serum-free media, *Dev. Biol. Stand.* **99**, str. 157-166.

Gebauer, S. K., Psota, T. L., Harris, W. S., Kris-Etherton, P. M. (2006) n-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits, *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, str. 1526-1535.

Goyal, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Gill, S., Sihag, M. (2014) Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food, *Journal of Food Science and Technology* **51**, str. 1633-1653.

Grunsven, W. (2017) CHO Turns 60 – The Hamster That Keeps on Going, Eppendorf Handling Solution, <<https://handling-solutions.eppendorf.com/cell-handling/about-cells-and-culture/detailview/news/cho-turns-60-the-hamster-that-keeps-on-going/>> Pristupljeno 1.

kolovoza 2019.

Gupta, A. J. (2015) Correlating composition and functionality of soy protein hydrolysates used in animal cell cultures, Doktorski rad, Wageningen University, Nizozemska

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, *Journal of soil science and plant nutrition*, str. 454-463.

Hall, C., Tulbek, M. C., Xu, Y. (2006) Flaxseed, *Advances in food and nutrition research* **51**, str. 1-97.

Hesse, F., Wagner, R. (2000) Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures, *Trends in Biotechnology* **18**, str. 173-180.

Heinrich, C., Wolf, T., Kropp, C., Northoff, S., Noll, T. (2011) Growth characterization of CHO DP-12 cell lines with different high passage histories, *BMC Proceedings* **5**.

Holstun, J., Zetocha, D. (1994) An Analysis of Flaxseed Utilization in the Health Food Industry, Institute for Business and Industry Development, North Dakota State University.

Jayapal, K. P., Wlaschin, K. F., Hu, W., Yap, M. G. S. (2007) Recombinant protein Therapeutics from CHO Cells - 20 Years and Counting, Society for Biological Engineering, Special Edition, str. 40-47.

Jedrzejczak-Silicka, M. (2017) History of Cell Culture, New Insights into Cell Culture Technology, *IntechOpen*, str. 1-41.

Kajla, P., Sharma, A., Sood, D. R. (2015) Flaxseed – a potential functional food source, *Journal of Food Science and Technology* **52**, str. 1857-1871.

Khanal, S. (2017) Animal Cell Culture: Introduction, Types, Methods and Applications <<https://microbeonline.com/animal-cell-culture-introduction-types-methods-applications/>>

Pristupljeno 2. srpnja 2019.

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

Lao, M. S., Toth, D. (1997) Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture, *Biotechnology progress*, str. 688-691.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000) *Molecular Cell Biology*, 4. izd., W. H. Freeman. New York, poglavlje 6.2

Marić, V., Šantek, B. (2009) *Biokemijsko inženjerstvo*, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, str. 45-47.

McGillycuddy, N., Floris, P. G., Albrecht, S., Bones, J. (2017) Examining the sources of variability in cell culture media used for biopharmaceutical production, *Biotechnology Letters* **40**.

Mikolaj, E. (2017) Ekstrakcija lignana i fenolnih kiselina iz pogače lana, Završni rad, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska

Omoni, O. A., Aluko, R. E., Effect of cationic flaxseed protein hydrolysate fractions on the *in vitro* structure and activity of calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase, *Molecular Nutrition & Food Research* **50**, str. 958-966.

Pan, X., Streefland, M., Dalm, C., Wijffels, R. H., Martens, D. E. (2016), Selection of chemically defined media for CHO cell fed-batch culture processes, *Cytotechnology* **69**, str. 39-56.

PubChem, National Center for Biotechnology Information, Trypan blue
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6296>> Pristupljeno 15. srpnja 2019.

Ramachandran, S., Singh, S. K., Larroche, C., Soccol, C. R., Pandey, A. (2007) Oil cakes and their biotechnological applications – A review, *Bioresource Technology* **98**, str. 2000-2009.

Rodriguez-Hernandez, C. O., Torres-Garcia, S. E., Olvera-Sandoval, C., Ramirez-Castillo, F. Y., Muro, A. L., Avelar-Gonzalez, F. J., Guerrero-Barrera, A. L. (2014) Cell Culture: History, Development and Prospects, *International Journal of Current Research and Academic Review*, Vol **2**, str. 188-200.

Siemensma, A., Babcock, J., Wilcox, C., Huttinga, H. (2010) *Towards an Understanding of How Protein Hydrolysates Stimulate More Efficient Biosynthesis Cultured Cells*, Protein Hydrolysates in Biotechnology, Springer, str. 33-54.

Strober, W. (2001) Trypan blue Exclusion test of cell viability, Current protocols in immunology <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18432654>> Pristupljeno 15. srpnja 2019.

Supryia, N. (2017) Animal Cell Culture <<https://biologyreader.com/animal-cell-culture.html>> Pristupljeno 2. srpnja 2019.

Van der Walk, J., Brunner, D., De Smet, K., Svernungsen, A. F., Honegger, P., Knudsen, L. E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M. L., Gstraunthaler, G. (2010) Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods, *Toxicology in Vitro* **24**, str- 1053-1063.

Yao, T., Asayama, Y. (2017) Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues, *Reproductive Medicine and Biology* **16**, str. 99-117.

Zamorano, F., Wouwer, A. V., Bastin, G. (2010) A detailed metabolic flux analysis of an underdetermined network of CHO cells, *Journal of Biotechnology* **150**, str. 497-508.

Izjava o izvornosti

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

Mirna Laca

ime i prezime studenta