

# Učinci obogaćivanja hranjivoga medija proteinskim hidrolizatima sjemenki lana i konoplje na rast i produktivnost biotehnoški značajnih životinjskih staničnih linija

---

Logarušić, Marijan

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:864925>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-09**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Marijan Logarušić

**UČINCI OBOGAĆIVANJA HRANJIVOGA  
MEDIJA PROTEINSKIM HIDROLIZATIMA  
SJEMENKI LANA I KONOPLJE NA RAST  
I PRODUKTIVNOST BIOTEHNOLOŠKI  
ZNAČAJNIH ŽIVOTINJSKIH STANIČNIH  
LINIJA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Marijan Logarušić

**UČINCI OBOGAĆIVANJA HRANJIVOGA  
MEDIJA PROTEINSKIM HIDROLIZATIMA  
SJEMENKI LANA I KONOPLJE NA RAST  
I PRODUKTIVNOST BIOTEHNOLOŠKI  
ZNAČAJNIH ŽIVOTINJSKIH STANIČNIH  
LINIJA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:  
dr. sc. Igor Slivac, red. prof.

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND  
BIOTECHNOLOGY

Marijan Logarušić

**EFFECTS OF GROWTH MEDIA  
SUPPLEMENTATION WITH FLAXSEED  
AND HEMPSEED PROTEIN  
HYDROLYSATES ON GROWTH AND  
PRODUCTIVITY OF  
BIOTECHNOLOGICALLY RELEVANT  
ANIMAL CELL LINES**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:  
PhD Igor Slivac, Full Professor

Zagreb, 2023.

Ovaj doktorski rada izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Igora Slivca u skopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogače lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica“ (šifra projekta: IP-2016-06-3848) pod vodstvom prof. dr. sc. Višnje Gaurina Srček.

**Mentor:** dr. sc. Igor Slivac, redoviti profesor na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

## ŽIVOTOPIS MENTORA

Prof. dr. sc. Igor Slivac diplomirao je 2003. g. na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i stekao akademski stupanj diplomiranog inženjera biotehnologije, smjer biokemijsko-mikrobiološki. Zaposlen je kao znanstveni novak na izradi doktorata u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije PBF-a 2004. godine, a sljedeće godine izabran je u suradničko zvanje asistent. Doktorski studij smjera Biotehnologija - bioproceno inženjerstvo završio je na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a 30. rujna 2008. godine obranio disertaciju stekavši akademski stupanj doktora biotehničkih znanosti. U veljači 2009. godine prof. dr. sc. Igor Slivac izabran je u znanstveno zvanje viši asistent, a u svibnju iste godine u znanstveno-nastavno zvanje docent. U znanstveno zvanje viši znanstveni suradnik, je izabran 2016. godine, a 2017. u znanstveno-nastavno zvanje izvanredni profesor. U znanstveno zvanje znanstveni savjetnik izabran 2021. godine, a sljedeće godine u znanstveno-nastavno zvanje redoviti profesor. Nedugo nakon izrade doktorata odlazi na poslijedoktorsko usavršavanje iz područja tehnologije životinjskih stanica u *National Research Center* u Montrealu (Kanada) (2010.-2012.). Usavršavanje nastavlja na *Universite Laval* u Quebecu (Kanada) (2012.-2014.), te poslije na Federalnom Sveučilištu u Rio de Janerio-u (Brazil) (2014./2015.).

Područje znanstveno-istraživačke djelatnosti prof. dr. sc. Igora Slivca vezano je za tehnologiju i primjenu životinjskih stanica u proizvodnji biološki aktivnih spojeva te primjenu *in vitro* sustava za praćenje učinaka tvari iz okoliša. Njegova recentna istraživanja vezana su za valorizaciju biljnih proteina u hranjivim medijima za uzgoj životinjskih stanica te ispitivanje sintetskih i prirodnih materijala kao nosača za stanice. Bio je suradnik na znanstveno-istraživačkom projektu financiranog od strane MZOS RH kao i dva projekta financiranog od strane HRZZ. Voditelj je bilateralnog projekta MZO RH s N. R. Kinom. Rezultati njegovog znanstveno-istraživačkog rada prikazani su u 32 znanstvena i stručna rada od kojih je 22 izvornih znanstvenih radova iz A skupine. Prema podacima *Web of Science Core Collection* njegovi radovi citirani su 331 put, a h-indeks iznosi deset. Prof. dr. sc. Igor Slivac sudjelovao je s 32 priopćenja na domaćim i

međunarodnim znanstvenim skupovima. Održao je pozvana predavanja na dva međunarodna skupa te je bio član organizacijskog odbora jednog međunarodnog skupa.

Tijekom dosadašnjeg rada u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije PBF-a, uključen je u nastavni proces na svim razinama studija i to na kolegijima: Tehnologija životinjskih i biljnih stanica, Osnove tkivnog inženjerstva, Biotehnologija 4, Tehnologija vitamina i hormona, Interakcije molekula i receptora te Biotehnološka primjena i tehnologija stanica sisavaca. U posljednjih pet godina bio je mentor devet diplomskih radova i tri završna rada.

U proteklom razdoblju obnašao je dužnost pročelnika Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije PBF-a (2017.-2019.) te ECTS koordinatora PBF-a (2017. -). Bio je član Odbora za diplomske i završne radove te Odbora za međunarodnu suradnju PBF-a (2015.-2019.). Član je Hrvatskog društva za biotehnologiju i *European Society for Animal Cell Technology* (ESACT). Dobitnik je plakete ARCA 2005. i 2006. godine iz područja inovacija u tehnologiji uzgoja životinjskih stanica.

## *Zahvala*

*Kao prvo, htio bih se zahvaliti mentoru, prof. dr. sc. Igoru Slivcu na konstantnom i neumornom vođenju, podršci i bodrenju tijekom mog doktorskog studija. Hvala na svakom profesionalnom, ali i prijateljskom savjetu. Hvala što ste vjerovali u mene.*

*Također, želim reći hvala i ostalim kolegama iz Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije: prof. dr. sc. Višnji Gaurini Srček, izv. prof. dr. sc. Kristini Radošević, prof. dr. sc. Ivani Radojčić Redovniković, izv.prof. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo, Manueli, Mii, Martini i Anji na nebrojenim savjetima i riječima ohrabrenja kao i uvijek prisutnoj podršci. Hvala vam na svim lijepim i veselim trenucima koje smo proveli zajedno u našoj maloj kućici.*

*Veliko hvala i mojim roditeljima, bratu i sestri koji su me neumorno bodrili i vjerovali u mene.*

*Na kraju htio bih se zahvaliti i svojoj supruzi Lei što mi je bila oslonac i nesebična podrška kako u dobrim tako i u teškim trenucima tijekom ovog mog puta. Neizmjereno ti hvala.*



Tema doktorskog rada prihvaćena je na 1. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za akademsku godinu 2020./2021. održanoj dana 28. listopada 2020. godine u Zagrebu, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija 15. prosinca 2020. godine na 3. redovitoj sjednici u 352. akademskoj godini (ak. god. 2020./2021.).

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Disertacija

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Poslijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK: 602.64:658.567.1:676.034.24:677.11(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### UČINCI OBOGAĆIVANJA HRANJIVOGA MEDIJA PROTEINSKIM HIDROLIZATIMA SJEMENKI LANA I KONOPLJE NA RAST I PRODUKTIVNOST BIOTEHNOLOŠKI ZNAČAJNIH ŽIVOTINJSKIH STANIČNIH LINIJA

*Marijan Logarušić, mag. ing. biotechn.*

**Rad je izrađen** u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

**Mentor:** dr. sc. Igor Slivac, red. prof.

**Kratki sažetak disertacije:** Cilj održivog gospodarstva je što učinkovitije iskoristiti organske ostatke nastale preradom sirovina iz različitih grana poljoprivrede i proizvodnje hrane. Primjeri takvih organskih ostataka su i uljane pogače koje zaostaju nakon ekstrakcije ulja iz sjemenki uljarica poput lana i konoplje. Zbog udjela i sastava proteina, uljane pogače imaju potencijal biti iskorištene kao sekundarne sirovine u tehnologiji životinjskih stanica čiji su proizvodi visokovrijedni spojevi poput rekombinantnih proteina i cjepiva. Tijekom ovog istraživanja izolirani su proteini iz uljanih pogača lana i konoplje te su podvrgnuti zasebnim hidrolizama pomoću tri različita mikroba enzima. Pripravljene hidrolizate su kvantitativno i kvalitativno analizirani te korišteni kao dodatak mediju za uzgoj životinjskih stanica, uz pretpostavku da će pozitivno utjecati na stanični rast i produktivnost. Glavnina istraživanja provedena je na proizvodnoj staničnoj liniji CHO DP-12 koja stabilno proizvodi rekombinantno monoklonsko protutijelo. Utvrđeno je da je učinak hidrolizata dvojak, tj. da poboljšanje staničnog rasta i/ili produktivnosti ovisi o vrsti enzima kojim su hidrolizati pripremljeni, veličini peptidne frakcije hidrolizata te koncentraciji hidrolizata u mediju. Sličan ishod dobiven je pri uzgoju stanica HEK293T i još je ustanovljeno da prisutnost hidrolizata u mediju nepovoljno djeluje na staničnu transfekciju. Istraživanje antioksidacijskog potencijala i antiproliferacijskog djelovanja hidrolizata na tumorskim (HeLa) i normalnim (HaCaT) staničnim linijama također nije dalo jednoznačne rezultate. Nešto povoljnije proliferacijsko djelovanje pokazali su hidrolizati lana dok je antitumorsko djelovanje bilo izraženije kod hidrolizata konoplje.

**Broj stranica:** 186

**Broj slika:** 46

**Broj tablica:** 20

**Broj literaturnih navoda:** 129

**Broj priloga:** 5

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** sjemenke lana i konoplje, uljana pogača, proteinski hidrolizat, antioksidacijski potencijal, hranjivi medij, životinjske stanične linije, stanični rast, stanična produktivnost, transfekcija

**Datum obrane:** 28. veljače 2023.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. dr.sc. Višnja Gaurina Srček, red. prof.
2. dr.sc. Marko Obranović, doc.
3. dr.sc. Ana Butorac, znanstvena suradnica
4. dr.sc. Kristina Radošević, izv. prof. (zamjena)

**Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23. i u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb. i Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Ph.D. thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate University Doctoral Study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

UDK: 602.64:658.567.1:676.034.24:677.11(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Biotechnology

### EFFECTS OF GROWTH MEDIA SUPPLEMENTATION WITH FLAXSEED AND HEMPSEED PROTEIN HYDROLYSATES ON GROWTH AND PRODUCTIVITY OF BIOTECHNOLOGICALLY RELEVANT ANIMAL CELL LINES

*Marijan Logarušić, MSc*

**Thesis performed at** Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformations, Department of Biochemical Engineering, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb

**Supervisor:** PhD Igor Slivac, Full Professor

**Short abstract:** The goal of sustainable economy is to efficiently exploit organic residues resulting from the processing of raw materials from various domains of agriculture and food manufacturing. Examples of such organic residues are oil cakes remained after extraction of oil from flaxseeds and hempseeds. Due to their protein content and composition, oil cakes have the potential to be used as secondary raw material in animal cell culture technology, the products of which are high-value compounds such as recombinant proteins and vaccines. In this research, proteins were isolated from flaxseed and hempseed oil cakes and were subjected to three independent hydrolyses using three microbial enzymes. The produced hydrolysates were quantitatively and qualitatively analyzed and applied as supplements in cell growth media, with the assumption that they will have a positive effect on cell growth and productivity. Most of the research was performed with CHO DP-12 cells producing recombinant monoclonal antibody. It was found that the effect of hydrolysates is ambiguous, i.e. that the improvement of cell growth and/or productivity depends on the type of enzyme used for protein digestion, the peptide size in hydrolysate fraction and the concentration of the hydrolysate applied in the cell growth media. Similar results were obtained during the cultivation of HEK293T cells and where the presence of hydrolysates had adverse impact on cell transfection. The investigation of the antioxidative potential and antiproliferative effect of the hydrolysates on tumor (HeLa) and normal (HaCaT) cell lines respectively, showed somewhat disparate results. However, the hempseed hydrolysates showed more favorable antitumor activity, while the flaxseed hydrolysates were more proliferative.

**Number of pages:** 186

**Number of figures:** 46

**Number of tables:** 20

**Number of references:** 129

**Number of supplements:** 5

**Original in:** Croatian

**Key words:** flaxseed, hempseed, oil cake, protein hydrolysates, antioxidative potential, growth medium, animal cell lines, cell growth, cell productivity, transfection

**Date of the thesis defense:** 28<sup>th</sup> February, 2023

**Reviewers:**

1. PhD. Višnja Gaurina Srček, Full Professor
2. PhD. Marko Obranović, Assistant Professor
3. PhD. Ana Butorac, Scientific Associate
4. PhD. Kristina Radošević, Associate Professor (substitute)

**Thesis deposited in:** Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23. and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb. and University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

## SAŽETAK

Iskorištenjem organskih ostataka nastalih preradom prirodnih sirovina u proizvodnji hrane ostvaruju se ciljevi kružnog gospodarstva. Primjer takvih organskih ostataka su i uljane pogače lana i konoplje, koje zaostaju nakon ekstrakcije ulja iz sjemenki navedenih uljarica. Zbog visokog udjela i sastava proteina one predstavljaju potencijalne sirovine za primjenu u tehnologiji životinjskih stanica bilo kao zamjena za krvni serum ili kao nutritivni dodatak (suplement) hranjivom mediju. Hidrolizom proteina nastaje složena smjesa peptida čija funkcionalna i biološka svojstva ovise o vrsti korištenog enzima, veličini nastalih peptida, te sastavu i slijedu aminokiselina. Stoga su ciljevi ovog rada bili: (i) pripremiti i karakterizirati proteinske hidrolizate iz uljanih pogača lana i konoplje, (ii) ispitati biološki učinak hidrolizata na tumorskim (HeLa) i normalnim (HaCaT) stanicama, (iii) u postupku proizvodnje rekombinantnog proteina, poboljšati rast proizvodnih stanica (CHO), kao i titar samog rekombinantnog proteina, dodatkom hidrolizata i njihovih frakcija u medij za uzgoj stanica. U ovom doktorskom radu uspješno je proveden postupak proteinske izolacije iz uljanih pogača lana i konoplje pri čemu je izdvojeno oko 75% ukupnih proteina. Ovisno o vrsti korištenih mikrobnih proteaza (alkalaza, neutraza i protameks) pripremljeni su proteinski hidrolizati različitih peptidnih profila i karakteristika. Proteinski hidrolizati lana i konoplje pokazali su da posjeduju antioksidacijski potencijal kao i antiproliferativan učinak na tumorskim HeLa stanicama. Kod uzgoja HEK293T stanica hidrolizati su se potvrdili kao učinkovit djelomični nadomjestak za goveđi serum, koji se unatoč nizu ograničenja, još uvijek često dodaje kao suplement. Pritom su isti hidrolizati imali nepovoljan učinak na DNA transfekciju spomenutih stanica. Nadalje, pripremljeni hidrolizati lana mogu poslužiti kao djelomična zamjena za serum u standardnom mediju za uzgoj CHO DP-12 stanica čime se prevladavaju nedostaci primjene seruma životinjskog podrijetla u kulturi adherentnih stanica. Također, dodatak hidrolizata uljanih pogača lana i konoplje u kemijski definirani medij pokazao je pozitivan učinak na rast i/ili produktivnost CHO DP-12-S stanica. Shodno tome hidrolizati se potencijalno mogu primjeniti u oblikovanju medija bez seruma za uzgoj ostalih biotehnoški značajnih staničnih linija. Opći je zaključak ovog rada da učinci ispitivanih proteinskih hidrolizata na stanice ovise o vrsti enzima kojim su hidrolizati dobiveni, veličini peptida u hidrolizatu te koncentraciji kojom su stanice tretirane.

**Ključne riječi:** sjemenke lana i konoplje, uljana pogača, proteinski hidrolizat, antioksidacijski potencijal, hranjivi medij, životinjske stanične linije, stanični rast, stanična produktivnost, transfekcija

## EXTENDED ABSTRACT

The most important application of animal cell culture is the production of a large number of high-value products which are used for diagnostic, therapeutic and preparative purposes. The majority of these products are either recombinant proteins or vaccines. The advantage of using cells is their ability to perform adequate post-translational modifications that affect the biological activity of the synthesised proteins. However, compared to yeasts and prokaryotes, the overall cellular productivity of animal cells is lower. Therefore, one of the objectives of animal cell cultivation is to increase the yield of the desired product in order to achieve economic profitability of the production process. For the successful cell growth, maintenance and productivity during that process it is necessary to provide a microenvironment that enables cell growth in *in vitro* conditions. With parameters like the appropriate temperature, pH and composition of the air, the cells also need a suitable growth medium. The growth medium must contain sugars, aminoacids, salts, vitamins, hormones, growth factors, and the most complex of these compounds are often disputably supplemented with fetal animal serum. Changing the formulation of cell culture media is one of the strategies that can ensure high productivity and cell proliferation. In recent decades, problems have been observed related to the application of the serum in processes with animal cells, which are manifested in the risks of transmission of viruses, prions and mycoplasmas, economic profitability, difficult isolation of the final product and ethical problems. Due to the negative aspects of using serum in animal cell technology, the main goal is to completely or partially replace the serum in the growth media. For this purpose, media without the addition of serum (*serum-free*), media without animal components (*animal-free*) as well as chemically defined medium have been developed. As an alternative to serum, these media contain plant hydrolysates obtained from various plants such as soy, wheat, rice, peas, etc. Plant hydrolysates contain amino acids, oligopeptides, carbohydrates, lipids, vitamins and other undefined compounds that promote cell proliferation and productivity in culture. One of the main sources for the preparation of plant hydrolysates are the by-products of the food industry. Examples of such organic residues are oil cakes remained after extraction of oil from flaxseeds and hempseeds. Oil cakes from flaxseeds and hempseeds contain significant concentrations of protein (15-50%) and biologically active compounds, and therefore, they can be considered as substitutes for serum or as a

supplement to the growth media in animal cell technology. Therefore, the objectives of the proposed study are as follows:

1. Preparation and characterization of protein hydrolysate from flaxseed and hempseed oil cakes
2. To examine the biological effect of hydrolysates on tumor (HeLa) and normal (HaCaT) cell lines
3. Improving the growth and monoclonal antibody (mAb) production of CHO cells by modifying the growth media composition with flaxseed and hempseed hydrolysates and their fractions.

The research included: (i) preparation and characterization of protein isolates and hydrolysates from flaxseed and hempseed oil cakes (ii) testing the effect of protein hydrolysates in the growth media on biotechnologically relevant animal cell lines.

(i)

- The process of protein isolation from flaxseed and hempseed oil cakes was done by alkaline extraction (pH 10-12), and isoelectric precipitation (pH 3.5-4). At the end of the isolation, in order to remove small unwanted molecules (salts), the mixture was dialyzed through a membrane with a pore size of 10 kDa.
- Isolated proteins were subjected to three independent hydrolyses using three microbial endopeptidases (Alcalase, Neutrase and Protamex). Degree of hydrolysis was determined by TCA. Amicon Ultra centrifugal filters were used for the fractionation of protein hydrolysates.
- Concentration of soluble proteins in the isolates and hydrolysates was determined using the Lowry method on a spectrophotometer, while the protein profile was determined using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).
- Ratio of amino acid (free and total) composition of prepared hydrolysates was measured using the high-performance liquid chromatography (HPLC). Furthermore, the size exclusion chromatography (SEC) was used for determination of peptide size profiles.

(ii)

- The (anti)proliferative effects of the tested hydrolysates were determined by the colorimetric MTS method. The antioxidant potential of the protein hydrolysates was determined by the ORAC method.
- The efficiency of cell transfection and transgene expression in medium with hydrolysates on HEK293T was tested. Fluorescent marker-labelled plasmid DNA was used for cell transfection, and the transfection efficiency was determined with fluorescent cell detector device CellDrop-FL.
- For CHO DP-12 cell cultivation in 24 well plates, protein hydrolysates were used as a partial replacement for serum in a DMEM culture medium. During CHO DP-12-S cultivation in shake flasks as a nutritional supplement in a chemically defined PowerCHO<sup>®</sup>-2 CD medium, protein hydrolysates and their fractions were used. Cell growth was monitored using a hemocytometer. Changes in the composition of metabolites (glucose, lactate and ammonia) were determined using commercial kits using standard spectrophotometric methods. The IgG titer was determined by HPLC using Protein A affinity chromatography column.

The proteins were successfully isolated from the flaxseed and hempseed oil cake flours using alkaline extraction and isoelectric precipitation, whereby approximately 75% of the protein was obtained. Depending on the type of microbial proteases used (Alcalase, Neutrase and Protamex), protein hydrolysates with different peptide profiles and characteristics were prepared. Flaxseed and hempseed protein hydrolysates have shown antioxidant potential as well as antiproliferative effect on tumor HeLa cells. During HEK293T cell cultivation in serum supplemented media, the hydrolysates proved as partial substitute for the serum. At the same time, they had an unfavorable effect on transfection of these cells. Furthermore, prepared flaxseed hydrolysates can serve as a partial substitute for fetal serum in basal culture media during CHO DP-12 cell cultivation, which overcomes the contradictory benefits of serum application in cell culture. The addition of flaxseed and hempseed oil cake hydrolysates to a chemically defined medium showed a positive effect on the growth and/or mAb productivity of CHO DP-12-S cells. Accordingly, they can be used for formulation of serum-free media for other industrially relevant cell lines. The general conclusion of this thesis is that the outcome of cell growth media supplementation with the oilseed protein hydrolysates



depends on the type of enzyme used for protein digestion, the peptide size in hydrolysate fraction and the hydrolysate concentration applied in cell culture.

The results of this doctoral thesis contribute to the development of new, competitive and economical methods of recombinant protein production with animal cells by using side-products of the food industry. At the same time, it adds value to the side-products and increases process sustainability.

## SADRŽAJ

|                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. UVOD .....                                                                                           | 1         |
| 2. TEORIJSKI DIO .....                                                                                  | 3         |
| <b>2.1. Kultura životinjskih stanica .....</b>                                                          | <b>3</b>  |
| 2.1.1. Uspostava kulture životinjskih stanica .....                                                     | 3         |
| 2.1.2. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica u kulturi .....                                               | 5         |
| 2.1.3. Faze staničnog rasta .....                                                                       | 5         |
| 2.1.4. Metabolizam u kulturi životinjskih stanica .....                                                 | 7         |
| 2.1.5. Oksidacijski stres u stanicama .....                                                             | 8         |
| 2.1.6. Transfekcija stanica .....                                                                       | 10        |
| 2.1.6.1. Plazmid pGFP-C1 .....                                                                          | 12        |
| 2.1.7. Proizvodne stanične linije .....                                                                 | 12        |
| 2.1.7.1. CHO stanična linija .....                                                                      | 13        |
| <b>2.2. Hranjivi medij za uzgoj stanica .....</b>                                                       | <b>14</b> |
| 2.2.1. Vrste hranjivih medija .....                                                                     | 16        |
| 2.2.2. Hranjivi medij bez seruma .....                                                                  | 17        |
| 2.2.3. Hidrolizati proteina kao dodatak mediju bez serum .....                                          | 18        |
| <b>2.3. Lan .....</b>                                                                                   | <b>21</b> |
| <b>2.4. Konoplja .....</b>                                                                              | <b>22</b> |
| 3. MATERIJALI I METODE .....                                                                            | 24        |
| <b>3.1. Materijali .....</b>                                                                            | <b>24</b> |
| 3.1.1. Kemikalije .....                                                                                 | 24        |
| 3.1.2. Sirovina .....                                                                                   | 25        |
| 3.1.3. Stanične linije .....                                                                            | 25        |
| 3.1.3.1. CHO DP-12 .....                                                                                | 26        |
| 3.1.3.2. CHO DP-12-S .....                                                                              | 26        |
| 3.1.3.3. HEK293T .....                                                                                  | 26        |
| 3.1.3.4. HeLa .....                                                                                     | 26        |
| 3.1.3.5. HaCaT .....                                                                                    | 26        |
| 3.1.4. Enzimi .....                                                                                     | 27        |
| 3.1.5. Otopine i puferi .....                                                                           | 27        |
| 3.1.6. Aparatura i oprema .....                                                                         | 30        |
| <b>3.2. Metode .....</b>                                                                                | <b>32</b> |
| 3.2.1. Postupak pripreve i karakterizacije hidrolizata proteina iz uljanih pogača lana i konoplje ..... | 32        |
| 3.2.1.1. Određivanje topljivosti proteina .....                                                         | 32        |
| 3.2.1.2. Izolacija proteina iz uljane pogače lana .....                                                 | 33        |

|                                                                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.1.3. Izolacija proteina iz uljane pogače konoplje .....                                                                                        | 33        |
| 3.2.1.4. Hidroliza proteinskih izolata iz uljanih pogača lana i konoplje .....                                                                     | 34        |
| 3.2.1.5. Postupak frakcioniranja pripremljenih proteinskih hidrolizata lana i konoplje... 34                                                       |           |
| 3.2.1.6. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u.....                                                                                | 35        |
| 3.2.1.7. Određivanje stupnja hidrolize .....                                                                                                       | 36        |
| 3.2.1.8. SDS-PAGE.....                                                                                                                             | 36        |
| 3.2.1.9. Kromatografija isključenjem po veličini .....                                                                                             | 36        |
| 3.2.1.10. Određivanje antioksidacijskog potencijala proteinskih hidrolizata lana i konoplje metodom ORAC.....                                      | 37        |
| 3.2.1.11. Određivanje slobodnih aminokiselina u proteinskim hidrolizatima lana i konoplje.....                                                     | 38        |
| 3.2.1.12. Određivanje ukupnih aminokiselina u proteinskim hidrolizatima lana i konoplje .....                                                      | 40        |
| 3.2.2. Ispitivanje učinka proteinskog hidrolizata u hranjivom mediju na tehnološki značajnim staničnim linijama .....                              | 41        |
| 3.2.2.1. Uzgoj adherentnih staničnih linija (CHO DP-12, HEK293T, HeLa, HaCaT) ...                                                                  | 41        |
| 3.2.2.2. Određivanje učinka hidrolizata proteina lana i konoplje na proliferaciju HeLa i HaCaT staničnih linija metodom MTS .....                  | 41        |
| 3.2.2.3. Određivanje učinka proteinskih hidrolizata lana i konoplje na inducirani oksidacijski stres u HeLa i HaCaT stanicama metodom DCF-DA ..... | 42        |
| 3.2.2.4. Uzgoj adherentnih CHO DP-12 i HEK293T staničnih linija u mediju s dodatkom proteinskog hidrolizata lana ili konoplje .....                | 43        |
| 3.2.2.5. Transfekcija HEK293T stanične linije plazmidom pEGFP-C1 .....                                                                             | 45        |
| 3.2.2.6. Uzgoj suspenzijskih CHO DP-12-S stanica .....                                                                                             | 47        |
| 3.2.2.7. Uzgoj CHO DP-12-S stanične linije u mediju s dodatkom proteinskih hidrolizata i peptidnih frakcija lana ili konoplje.....                 | 47        |
| 3.2.2.8. Određivanje broja stanica i vijabilnosti kulture metodom tripan-plavo .....                                                               | 51        |
| 3.2.2.9. Određivanje koncentracije glukoze u hranjivom mediju.....                                                                                 | 51        |
| 3.2.2.10. Određivanje koncentracije laktata u hranjivom mediju.....                                                                                | 51        |
| 3.2.2.11. Određivanje koncentracije amonijaka u hranjivom mediju.....                                                                              | 52        |
| 3.2.2.12. Određivanje koncentracije monoklonskog protutijela IgG u hranjivom mediju za uzgoj .....                                                 | 52        |
| 3.2.2.13. Izračun procesnih parametara rasta korištenih staničnih linija.....                                                                      | 54        |
| 3.2.2.14. Obrada podataka.....                                                                                                                     | 54        |
| <b>4. REZULTATI .....</b>                                                                                                                          | <b>55</b> |
| <b>4.1. Izolacija i hidroliza proteina iz uljane pogače lana .....</b>                                                                             | <b>55</b> |
| 4.1.1. Topljivost brašna i proteinskog izolata uljane pogače lana.....                                                                             | 55        |
| 4.1.2. Proteinski izolat uljane pogače lana .....                                                                                                  | 56        |
| 4.1.3. Hidroliza proteinskog izolata lana.....                                                                                                     | 57        |
| 4.1.3.1. Proteinski hidrolizat lana dobiven enzimom alkalaza .....                                                                                 | 57        |

|                                                                                                                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1.3.2. Proteinski hidrolizat lana dobiven enzimom neutraza.....                                                                                                                   | 60        |
| 4.1.3.3. Proteinski hidrolizat lana dobiven enzimom protameks .....                                                                                                                 | 63        |
| <b>4.2. Izolacija i hidroliza proteina iz uljane pogače konoplje .....</b>                                                                                                          | <b>66</b> |
| 4.2.1. Topljivost brašna i proteinskog izolata uljane pogače konoplje .....                                                                                                         | 66        |
| 4.2.2. Proteinski izolat uljane pogače konoplje.....                                                                                                                                | 67        |
| 4.2.3. Hidroliza proteinskog izolata konoplje .....                                                                                                                                 | 68        |
| 4.2.3.1. Proteinski hidrolizat konoplje dobiven enzimom alkalaza.....                                                                                                               | 69        |
| 4.2.3.2. Proteinski hidrolizat konoplje dobiven enzimom neutraza .....                                                                                                              | 72        |
| 4.2.3.3. Proteinski hidrolizat konoplje dobiven enzimom protameks .....                                                                                                             | 75        |
| <b>4.3. Proteinski hidrolizat uljane pogače lana .....</b>                                                                                                                          | <b>79</b> |
| 4.3.1. Biološki potencijal proteinskih hidrolizata uljane pogače lana, dobivenih enzimima alkalaza, neutraza i protameks.....                                                       | 79        |
| 4.3.1.1. Antioksidacijski potencijal proteinskog hidrolizata lana .....                                                                                                             | 79        |
| 4.3.1.2. Učinak proteinskog hidrolizata lana na proliferaciju HeLa i HaCaT staničnih linija.....                                                                                    | 80        |
| 4.3.1.3. Protektivni učinak proteinskog hidrolizata lana na H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -inducirani oksidacijski stres u HaCaT stanicama.....                                     | 82        |
| 4.3.2. Učinak proteinskog hidrolizata uljane pogače lana na HEK293T staničnu liniju.....                                                                                            | 83        |
| 4.3.2.1. Učinak proteinskog hidrolizata lana, dobivenog enzimom alkalaza, na rast i transfekciju HEK293T stanične linije .....                                                      | 83        |
| 4.3.2.2. Učinak proteinskog hidrolizata lana, dobivenog enzimom neutraza, na rast i transfekciju HEK293T stanične linije .....                                                      | 85        |
| 4.3.2.3. Učinak proteinskog hidrolizata lana, dobivenog enzimom protameks, na rast i transfekciju HEK293T stanične linije .....                                                     | 87        |
| 4.3.3. Učinak proteinskih hidrolizata uljane pogače lana na CHO DP-12 staničnu liniju ..                                                                                            | 89        |
| 4.3.3.1. Učinak proteinskog hidrolizata lana, dobivenog enzimom alkalaza, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije.....                                       | 89        |
| 4.3.3.2. Učinak proteinskog hidrolizata lana, dobivenog enzimom neutraza, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije.....                                       | 91        |
| 4.3.3.3. Učinak proteinskog hidrolizata lana, dobivenog enzimom protameks, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije.....                                      | 93        |
| 4.3.4. Učinak proteinskih hidrolizata i peptidnih frakcija uljane pogače lana na CHO DP-12-S staničnu liniju.....                                                                   | 95        |
| 4.3.4.1. Učinak proteinskog hidrolizata i peptidnih frakcija uljane pogače lana, dobivenih enzimom alkalaza, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12-S stanične linije ..... | 96        |
| 4.3.4.1.1. Učinak proteinskog hidrolizata lana dobivenog enzimom alkalaza .....                                                                                                     | 96        |
| 4.3.4.1.2. Učinak peptidnih frakcija hidrolizata lana dobivenog enzimom alkalaza... ..                                                                                              | 98        |
| 4.3.4.2. Učinak proteinskog hidrolizata i peptidnih frakcija uljane pogače lana, dobivenih enzimom neutraza, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12-S stanične linije ..... | 100       |

|                                                                                                                                                                                         |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.4.2.1. Učinak proteinskog hidrolizata lana dobivenog enzimom neutraza.....                                                                                                          | 100        |
| 4.3.4.2.2. Učinak peptidnih frakcija hidrolizata lana dobivenog enzimom neutraza                                                                                                        | 102        |
| 4.3.4.3. Učinak proteinskog hidrolizata i peptidnih frakcija uljane pogače lana, dobivenih enzimom protameks, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12-S stanične linije .....    | 104        |
| 4.3.4.3.1. Učinak proteinskog hidrolizata lana dobivenog enzimom protameks.....                                                                                                         | 104        |
| 4.3.4.3.2. Učinak peptidnih frakcija hidrolizata lana dobivenog enzimom protameks .....                                                                                                 | 106        |
| <b>4.4. Proteinski hidrolizat uljane pogače konoplje .....</b>                                                                                                                          | <b>108</b> |
| 4.4.1. Biološki potencijal proteinskih hidrolizata uljane pogače konoplje dobivenih djelovanjem enzima alkalaza, neutraza i protameks .....                                             | 108        |
| 4.4.1.1. Antioksidacijski potencijal proteinskog hidrolizata konoplje .....                                                                                                             | 108        |
| 4.4.1.2. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje na proliferaciju HeLa i HaCaT staničnih linija .....                                                                                   | 109        |
| 4.4.1.3. Protektivan učinak proteinskog hidrolizata konoplje na H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -inducirani oksidacijski stres u HaCaT stanicama .....                                    | 111        |
| 4.4.2. Učinak proteinskih hidrolizata uljane pogače konoplje na HEK293T staničnu liniju .....                                                                                           | 112        |
| 4.4.2.1. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje, dobivenog enzimom alkalaza, na rast i transfekciju HEK293T stanične linije .....                                                      | 112        |
| 4.4.2.2. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje, dobivenog enzimom neutraza, na rast i transfekciju HEK293T stanične linije .....                                                      | 114        |
| 4.4.2.3. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje, dobivenog enzimom protameks, na rast i transfekciju HEK293T stanične linije.....                                                      | 116        |
| 4.4.3. Učinak proteinskih hidrolizata uljane pogače konoplje na CHO DP-12 staničnu liniju .....                                                                                         | 118        |
| 4.4.3.1. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje, dobivenog enzimom alkalaza, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije.....                                       | 118        |
| 4.4.3.2. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje, dobivenog enzimom neutraza, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije.....                                       | 120        |
| 4.4.3.3. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje, dobivenog enzimom protameks, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije.....                                      | 122        |
| 4.4.4. Učinak proteinskih hidrolizata i peptidnih frakcija uljane pogače konoplje na CHO DP-12-S staničnu liniju .....                                                                  | 124        |
| 4.4.4.1. Učinak proteinskog hidrolizata i peptidnih frakcija uljane pogače konoplje, dobivenih enzimom alkalaza, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12-S stanične linije ..... | 125        |
| 4.4.4.1.1. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje dobivenog enzimom alkalaza...                                                                                                        | 125        |
| 4.4.4.1.2. Učinak peptidnih frakcija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom alkalaza .....                                                                                              | 127        |
| 4.4.4.2. Učinak proteinskog hidrolizata i peptidnih frakcija uljane pogače konoplje, dobivenih enzimom neutraza, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12-S stanične linije ..... | 129        |

|                                                                                                                                                                                          |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.4.4.2.1. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje dobivenog enzimom neutraza ..                                                                                                         | 129        |
| 4.4.4.2.2. Učinak peptidnih frakcija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom neutraza .....                                                                                               | 131        |
| 4.4.4.3. Učinak proteinskih hidrolizata i peptidnih frakcija uljane pogače konoplje, dobivenih enzimom protameks, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12-S stanične linije ..... | 133        |
| 4.4.4.3.1. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje dobivenog enzimom protameks                                                                                                           | 133        |
| 4.4.4.3.2. Učinak peptidnih frakcija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom protamkes .....                                                                                              | 135        |
| <b>5. RASPRAVA .....</b>                                                                                                                                                                 | <b>137</b> |
| <b>5.1. Izolacija i hidroliza proteina iz uljane pogače lana i konoplje .....</b>                                                                                                        | <b>137</b> |
| 5.1.1. Topljivost brašna i izolata uljane pogače lana i konoplje.....                                                                                                                    | 137        |
| 5.1.2. Proteinski izolat uljane pogače lana i konoplje .....                                                                                                                             | 138        |
| 5.1.3. Proteinski hidrolizat uljane pogače lana i konoplje.....                                                                                                                          | 140        |
| <b>5.2. Učinak proteinskih hidrolizata lana i konoplje u hranjivom mediju na tehnološki značajnim staničnim linijama .....</b>                                                           | <b>146</b> |
| 5.2.1 Biološka aktivnost proteinskog hidrolizata uljanih pogača lana i konoplje .....                                                                                                    | 146        |
| 5.2.1.1 Antioksidacijski potencijal .....                                                                                                                                                | 146        |
| 5.2.1.2 Učinak hidrolizata na proliferaciju HaCaT i HeLa stanica .....                                                                                                                   | 147        |
| 5.2.1.3. Protektivan učinak proteinskog hidrolizata lana i konoplje na H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -inducirani oksidacijski stres u HaCaT stanicama .....                              | 149        |
| 5.2.2. Rast i transfekcija HEK293T stanične linije u hranjivim medijima s dodatkom proteinskih hidrolizata uljane pogače lana i konoplje .....                                           | 150        |
| 5.2.3. Učinak proteinskih hidrolizata lana i konoplje na rast i produktivnost CHO stanične linije.....                                                                                   | 152        |
| 5.2.3.1. Primjena proteinskih hidrolizata lana i konoplje kao djelomična zamjena za fetalni goveđi serum .....                                                                           | 152        |
| 5.2.3.2. Primjena proteinskih hidrolizata lana i njihovih frakcija kao dodatka kemijski definiranom mediju .....                                                                         | 155        |
| <b>6. ZAKLJUČCI .....</b>                                                                                                                                                                | <b>160</b> |
| <b>7. LITERATURA .....</b>                                                                                                                                                               | <b>162</b> |
| <b>8. PRILOZI .....</b>                                                                                                                                                                  | <b>175</b> |
| <b>9. POPIS KRATICA.....</b>                                                                                                                                                             | <b>181</b> |
| <b>9. ŽIVOTOPIS DOKTORANDA .....</b>                                                                                                                                                     | <b>184</b> |

## 1. UVOD

Najvažnija primjena kulture životinjskih stanica je proizvodnja velikog broja visokovrijednih proizvoda koji se koriste u dijagnostičke, terapijske i preparativne svrhe. Većinu tih proizvoda čine rekombinantni proteini i cjepiva. Prednost korištenja životinjskih stanica njihova je sposobnost provođenja odgovarajućih posttranslacijskih modifikacija koje utječu na biološku aktivnost sintetiziranih proteina. Međutim, u usporedbi s kvascima i prokariotima, ukupna stanična produktivnost životinjskih stanica je manja. Stoga je jedan od ciljeva uzgoja životinjskih stanica povećanje prinosa željenog proizvoda kako bi se postigla ekonomska isplativost proizvodnog procesa. Za uspješan rast, održavanje i produktivnost stanica potrebno je osigurati mikrokoliš koji omogućuje rast životinjskih stanica u *in vitro* uvjetima. Uz parametre poput odgovarajuće temperature, pH i sastava zraka, stanicama je za rast potreban i odgovarajući hranjivi medij. Medij za uzgoj mora sadržavati ugljikohidrate, aminokiseline, soli, vitamine, hormone, faktore rasta te sastavom najsloženiji, često sporni fetalni goveđi serum. Promjena formulacije medija za uzgoj stanica jedna od strategija koja može osigurati visoku produktivnost i proliferaciju stanica. Posljednjih desetljeća uočeni su problemi vezani za primjenu seruma u procesima sa životinjskim stanica, a koji se očituju u rizicima prijenosa virusa, priona i mikoplazmi, ekonomskoj isplativosti, otežanoj izolaciji konačnog proizvoda te etičkim problemima. Zbog negativnih strana korištenja seruma u tehnologiji životinjskih stanica, glavni cilj je potpuna ili djelomična zamjena seruma u hranjivom mediju. U tu svrhu razvijeni su mediji bez dodatka seruma (engl. *serum-free*), mediji bez komponenti životinjskog podrijetla (engl. *animal-free*) kao i kemijski definirani mediji (engl. *chemically defined medium*). Kao alternativa serumu, ovi mediji sadrže biljne hidrolizate dobivene iz različitih biljaka kao što su soja, pšenica, riža, grašak, itd. Biljni hidrolizati sadrže aminokiseline, oligopeptide, ugljikohidrate, lipide, vitamine i druge nedefinirane spojeve koji potiču staničnu proliferaciju i produktivnost u kulturi. Jedni od glavnih izvora za pripravu biljnih hidrolizata su nusproizvodi prehrambene industrije. Primjer takvih organskih ostataka su uljane pogače zaostale nakon ekstrakcije ulja iz sjemenki lana i konoplje. Uljane pogače sjemenki lana i konoplje sadrže značajne koncentracije proteina (15-50%) i biološki aktivnih spojeva te se stoga mogu smatrati zamjenom za serum ili dodatkom hranjivom mediju u tehnologiji životinjskih stanica. Stoga su ciljevi ovog rada sljedeći:

- (i) priprava i karakterizacija proteinskog hidrolizata iz uljanih pogača lana i konoplje,
- (ii) ispitivanje biološkog učinka hidrolizata na tumorskim (HeLa) i normalnim (HaCaT) stanicama,
- (iii) poboljšanje rasta i proizvodnje monoklonskog protutijela CHO DP-12(-S) stanica dodatkom hidrolizata sjemenki lana i konoplje i njihovih frakcija u medij za uzgoj stanica.

Rezultati ovog doktorskog rada predstavljat će doprinos razvoju novih, konkurentnih i ekonomičnijih postupaka proizvodnje terapijskih proteina primjenom nusproizvoda iz prehrambene industrije. Istovremeno, pozitivan učinak koji pokazuju hidrolizati sjemenki lana i konoplje u biotehnoškoj primjeni stanica može poslužiti kao smjernica za isplativije iskorištenje (otpadnih) sirovina biljnog porijekla te doprinijeti održivosti poljoprivredne proizvodnje.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Kultura životinjskih stanica

Primjena kulture životinjskih stanica u biotehnologiji obuhvaća kontrolirani uzgoj genetički modificiranih, klonalnih staničnih linija dobivenih selekcijom pojedinačnih stanica prethodno izoliranih iz životinjskog tkiva, najčešće radi proizvodnje visokovrijednih proizvoda kao što su cjepiva, rekombinantni proteini, monoklonska protutijela, hormoni i imunomodulatori. Godine istraživanja i rada na optimizaciji proizvodnog procesa rezultirali su time da se životinjske stanice koriste kao ekspresijski sustav prilikom proizvodnje do oko 70 % trenutno dostupnih biofarmaceutika na tržištu (Fischer i sur., 2015). Osim u terapijske svrhe, stanice u kulturi mogu se koristiti i kao gotov proizvod, u svrhu istraživanja stanične fiziologije, biokemijskih puteva, staničnog ciklusa te kao alternativa živim organizmima prilikom provedbe raznih toksikoloških ispitivanja (Gupta i sur., 2017).

#### 2.1.1. Uspostava kulture životinjskih stanica

Izdvajanjem pojedinačnih stanica iz tkiva ili organa različitih životinjskih organizama dolazi do uspostave primarne stanične linije. Kako bi se dobile pojedinačne stanice, uzorak izoliranog tkiva potrebno je razgraditi proteolitičkim enzimima ili mehaničkim usitnjavanjem. Nacjepeljivanje takvih stanica na hranjivu podlogu, uz odgovarajuće parametre uzgoja, rezultirat će njihovim rastom *in vitro* kroz određeni vremenski period. Primarne stanične linije rastu relativno sporo, proliferacija im je vremenski ograničena te su fenotipski heterogene (Alves i sur., 2008). Zbog tih karakteristika, često nisu pogodne za širu upotrebu u industrijske ili istraživačke svrhe. Subkultivacijom (precjepeljivanjem) stanica primarne kulture kroz nekoliko generacija uslijed selektivnog pritiska postupno dolazi do prevladavanja jednog tipa stanica da bi se na kraju razvila stanična linija. Stanična linija predstavlja homogenu populaciju genetički identičnih stanica (klonovi) čijom subkultivacijom nastaje kultura stanica. Međutim, prilikom uspostave staničnih linija dolazi do gubitka određenih staničnih karakteristika i funkcija koje su bile svojstvene tkivu iz kojeg je izolirana početna masa stanica. Narušeni su mehanizmi staničnog rasta jer pojedinačne stanice više nisu uklopljene u trodimenzionalnu mrežu interakcija susjednih stanica i izvanstaničnog matriksa tkiva. Proces prilagodbe u umjetno stvorenoj okolini rezultira dediferencijacijom stanica, ostavljajući ih pritom bez visokospecijaliziranih svojstva koje su imale u uvjetima *in vivo* (Freshney, 2010).

Stanične linije mogu biti konačne (smrtne) ili kontinuirane (besmrtne). Konačne stanične linije imaju ograničen broj subkultivacija nakon čega umiru, dok se kontinuirane stanične linije mogu dijeliti neograničen broj puta. Besmrtnost stanične linije postiže se procesom imortalizacije. Imortalizacija stanica u kulturi podrazumijeva pojavu trajne promjene fenotipa koja nastaje zbog induciranih promjena nasljednog materijala i ekspresije gena. Imortalizirane stanice imaju izmijenjenu morfologiju, smanjeno vrijeme duplikacije, manje su ovisne o faktorima rasta te su genetički nestabilne (Léo i sur., 2008). Stanice izolirane iz višestaničnog organizma obično zahtijevaju čvrstu podlogu za prihvaćanje kako bi mogle započeti proliferaciju *in vitro*. Takve su adherentne stanične linije i njihov je uzgoj ovisan o stupnju kontakta s ostalim stanicama u kulturi. Međutim, imortalizirane stanice karakterizira suspenzijski rast jer zbog promjene fenotipa mogu samostalno rasti bez potrebe za prihvaćanjem. Zbog toga se mogu lakše održavati u hranjivom mediju, pa je i sam proces uzgoja stanica u kulturi pojednostavljen. Imortalizacija stanice može biti potpomognuta tretmanom fizikalnim ili kemijskim agensima, virusima, tehnikama genetičkog inženjerstva ili se u rijetkim slučajevima može desiti i spontano (Alves i sur., 2008).

Zahvaljujući postignutim svojstvima klonalnosti i besmrtnosti tehnologija životinjskih stanica postala je jedan od temeljnih stupova u modernoj biotehnologiji i farmaceutskoj industriji. Kultura životinjskih stanica koristi se u različitim područjima, od temeljnih 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 (Gupta i sur., 2017).

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

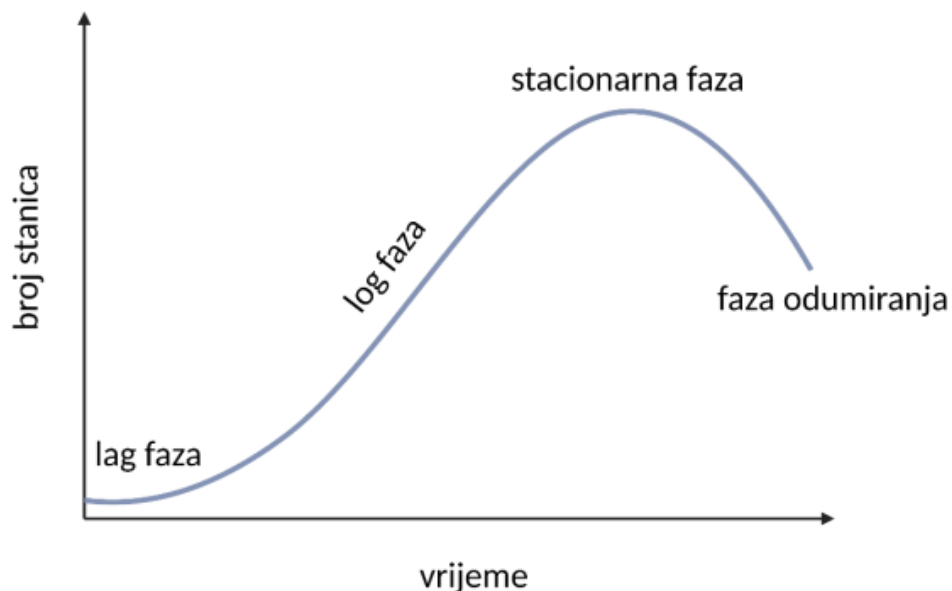
### 2.1.2. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica u kulturi

Osim o fizikalno-kemijskom sastavu medija, koncentraciji hranjivih tvari, hormona ili faktora rasta, uspješnost rasta i proliferacije stanica u kulturi ovisi i o pravilnom održavanju procesnih parametara uzgoja. Što je mikrookoliš bolje prilagođen stanicama to će više doći do izražaja njihove specijalizirane funkcije inače prisutne *in vivo*. Male promjene u vrijednostima pH, temperature ili koncentracije plinova mogu znatno narušiti staničnu fiziologiju, a time i proizvodni proces. Rad sa životinjskim stanicama zahtjeva strogo aseptične uvjete kako ne bi došlo do mikrobnih kontaminacija. Mikroorganizmi imaju puno kraće vrijeme udvostručavanja stoga mogu relativno brzo prerasti hranjivu podlogu. Većina životinjskih stanica u kulturi za optimalan rast zahtjevan raspon pH vrijednosti između 7,0 i 7,4. Tijekom normalnog staničnog metabolizma dolazi do proizvodnje ugljikovog dioksida i mliječne kiseline čime se zakiseljava sredina u kojoj stanice rastu. Kako bi se to izbjeglo, medij je potrebno puferirati. Za puferiranje sustava koristi se anorganski pufer poput natrijevog bikarbonata koji je jeftin i ne šteti staničnom rastu. S druge strane, postoji opasnost od povišenja pH vrijednosti, obzirom da stanice ne proizvode dovoljne količine ugljikovog dioksida u početnoj fazi rasta. Uzgojem stanica u CO<sub>2</sub> inkubatoru ostvaruje se optimalni sastav atmosfere koji čini 95% zrak i 5% CO<sub>2</sub>. Osim toga, inkubator služi kako bi se održavala optimalna razine temperature i vlažnosti. Za rast stanica sisavaca optimalna razina temperature je između 34 i 37 °C. Takvi temperaturni uvjeti omogućavaju i adekvatnu topljivost tvari i plinova u hranjivom mediju. Vlažnost staničnog okoliša važna je za održavanje razine osmolarnosti kako se ne bi narušio protok tvari unutar i iz stanica. Prihvatljive vrijednosti osmolarnosti kreću se između 260 mOsm kg<sup>-1</sup> i 320 mOsm kg<sup>-1</sup>. S obzirom da stanice optimalno rastu pri aerobnim uvjetima, potrebno im je osigurati i pravilnu dobavu kisika. Razina parcijalnog tlaka kisika treba biti nešto niža od atmosferskog tlaka kako bi se koncentracija otopljenog kisika u mediju održala između 30 do 60%, nadalje kisik u većim koncentracijama može biti toksičan za stanice (Léo i sur., 2008).

### 2.1.3. Faze staničnog rasta

Šaržni uzgoj stanica u kulturi prati sigmoidalni profil krivulje rasta (Slika 1) koji je karakterističan za svaku staničnu liniju. Poznavanje profila rasta omogućava praćenje staničnog odgovora na promjene u njihovom okolišu koje mogu nastupiti prilikom promjene parametara uzgoja ili dodatkom određenih komponenti hranjivom mediju.

Osim toga, pravilnim praćenjem staničnog rasta može se postići bolja optimizacija proizvodnog procesa i ostvariti veći prinosi proizvodnje (Verma i sur., 2020). Krivulja rasta odražava uspješnost prilagodbe stanica novonastalim uvjetima. Uzgoj stanica započinje inokulacijom hranjivog medija nakon čega stanice ulaze u prvu, lag fazu rasta. Lag faza predstavlja period adaptacije tijekom kojeg se stanice ne dijele ili se dijele relativno sporo. Trajanje ove faze ovisi o koncentraciji stanica te fazi rasta inokuluma. Nakon lag faze slijedi eksponencijalna ili log faza koju karakterizira udvostručavanje broja stanica stalnom brzinom. Log faza traje sve dok stanice ne iscrpe nutrijente iz hranjivog medija ili dok nusproizvodi metabolizma ne počnu djelovati inhibitory na njihov rast. Nakon toga stanice postepeno ulaze u stacionarnu fazu u kojoj rastu sporije i dolazi do izjednačavanja broja živih i mrtvih stanica. U toj fazi prikupljaju se produkti proizvodnog procesa. S vremenom će se stanice potpuno prestati dijeliti i kultura će ući u fazu odumiranja. Smrt stanice uzrokovana je mehanizmom programirane stanične smrti, tj. apoptozom ili nekrozom kao posljedica nedostatka nutrijenata, akumuliranja toksičnih nusprodukata, promjena u procesnim parametrima ili zbog nekog drugog mehaničkog oštećenja prilikom rasta (Léo i sur., 2008).



Slika 1. Krivulja rasta stanica tijekom šaržnog uzgoja (vlastita ilustracija izrađena pomoću programa BioRender.com).

#### 2.1.4. 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 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 na dva procesa, ovisno o tipu reakcije, na katabolizam i anabolizam. U anabolizmu se troši energija za sintezu makromolekula i biopolimera, dok se u katabolizmu cijepanjem istih molekula u manje, energija oslobađa (Judge i Dodd, 2020). Stanice izolirane iz životinjskog tkiva ili organa, rastu ako im se osiguraju nutrijenti i faktori rasta koji omogućuju 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 (Amable i Butler, 2008).

Glukoza je glavni izvor ugljika za uzgoj životinjskih stanica, obzirom da transporteri heksoza imaju visok afinitet za glukozu. Od drugih šećera, mogu se koristiti i galaktoza, fruktoza i manoza. 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 nastaju dvije molekule piruvata, dvije molekule ATP i dvije molekule NADH te velik broj prekursora za biosintezu. U aerobnim uvjetima, proizvedeni piruvat transportira se u mitohondrij i potpuno će oksidirati do  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  procesom zvanim ciklus limunske kiseline. Potpuna oksidacija dvije molekule piruvata u mitohondriju rezultira dobivanjem 36 molekula ATP. Prilikom nepotpune oksidacije glukoze, odnosno u anaerobnim uvjetima, piruvat prevodi u laktat čime se regenerira molekula  $\text{NAD}^+$  i tada se oslobađaju samo dvije molekule ATP. Koncentracija nutrijenta u hranjivom mediju tijekom uzgoja *in vitro* je viša nego što je potrebno za zadovoljavanje potrebe stanica za prekursorima i energijom. Obzirom da stanice ne mogu u potpunosti oksidirati visoke koncentracije glukoze u mediju, velika količina nastalog piruvata ne ulazi u citratni ciklus već nastaju velike količine laktata. 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 koncentracija glukoze je 10-25 mM, a kako bi se smanjila proizvodnja laktata,

glukoza se može postepeno dodavati tijekom odvijanja procesa (Amable i Butler, 2008). Pokazalo se da koncentracija laktata iznad 20 mmol L<sup>-1</sup> 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. Nakupljanje 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<sup>+</sup>/NADH omjer, aktivnost različitih enzima te komponente medija za uzgoj (Tayi i Butler, 2014).

Glutamin je važan izvor ugljika i dušika za životinjske stanice. Procesom glutaminolize dolazi do potpune oksidacije glutamina do CO<sub>2</sub> čime se oslobađaju 24 molekule ATP i 3 molekule NADPH. Ovaj metabolički put je posebice važan kada glukoza ne može zadovoljiti potrebe stanice 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 kao izvora ugljika je nastanak amonijaka koji se nakuplja u kulturi stanica, a koji već u koncentraciji 2-4 mM može inhibirati rast stanica. Također, pri 37 °C može doći do spontane razgradnje glutamina što dovodi do nakupljanja amonijaka u mediju (Amable i Butler, 2008). Taj se problem može umanjiti postupnim dodavanje glutamina tijekom uzgoja. Amonijak ima jači negativan utjecaj od laktata jer već pri puno nižim koncentracijama djeluje negativno na stanični rast (Tayi i Butler, 2014). 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).

#### 2.1.5. Oksidacijski stres u stanicama

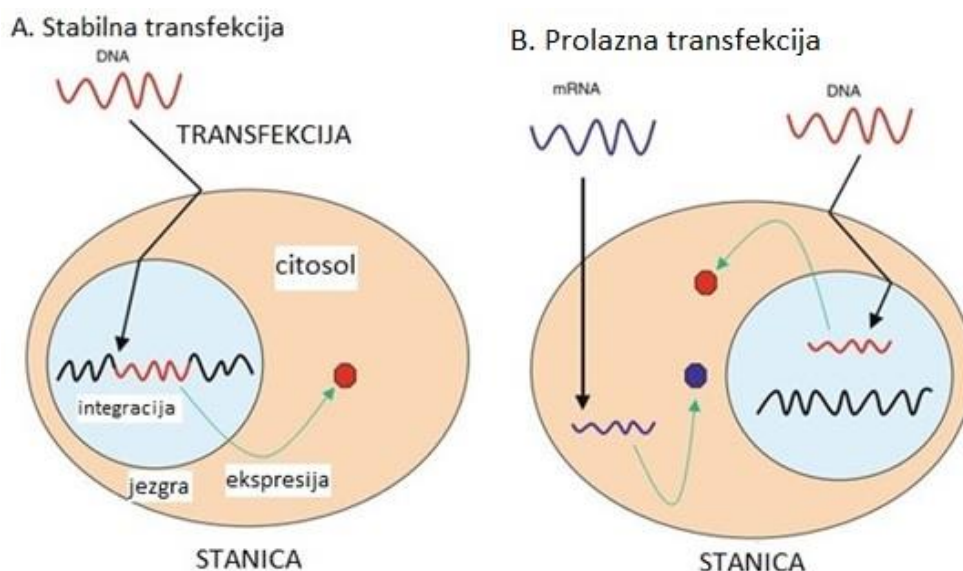
Reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS), neovisno o tome nastaju li kao produkt normalnih staničnih funkcija ili su im pak stanice izložene iz nekih drugih izvora, predstavljaju opasnost za stanice koje se nalaze u aeorbnom okruženju jer izazivaju oštećenja DNA, proteina ili lipida. Reaktivne kisikove vrste uključuju širok spektar djelomično reduciranih kisikovih metabolita, kao što su superoksidni anion, vodikov peroksid, hidroksilni radikali i drugi. Navedeni spojevi nastaju kao nusproizvod metabolizma aerobnih organizama ili kao molekule uključene u prijenos signala unutar stanice (Palmieri i Sblendorio, 2007). Ljudski organizam ima kompleksan sustav koji

uključuje enzimске i ne-enzimске mehanizme obrane od oksidansa kojima je svakodnevno izložen. Ipak, navedeni mehanizmi nisu uvijek dostatni za učinkovitu zaštitu od ROS-a, što rezultira stanjem oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres definira se kao znatna neravnoteža između nastanka reaktivnih vrsta i sposobnosti obrane stanice od istih. Visoka razina oštećenja uzrokovanih oksidacijom ne rezultira samo oksidacijskim stresom, već i nefunkcionalnošću sustava za popravak ili zamjenu oštećenih molekula. Na staničnoj razini, oštećenja izazvana reaktivnim kisikovim vrstama izazivaju širok spektar odgovora, od proliferacije stanica, preko zaustavljanja staničnog ciklusa te naposljetku do stanične smrti. Koji će se efekt ispoljiti ovisi o tipu stanice, primijenjenom agensu, dozi te trajanju izloženosti (Pizzino i sur., 2017). Slobodni su radikali odgovorni za razvoj mnogih bolesti uključujući tumore, kardiovaskularna oboljenja, neuralne poremećaje, Alzheimerovu bolest, Parkinsonovu bolest i mnoge druge (Halliwell, 2007).

Mnogi dokazi upućuju na to da hrana koja sadrži antioksidanse ili nutrijente s antioksidacijskim djelovanjem može imati ključnu ulogu u sprječavanju bolesti uzrokovanih prisutnošću reaktivnih kisikovih vrsta (Alam i sur., 2013). Antioksidacijski spojevi prisutni su u hrani, a istraživanje takvih spojeva interesantno je ne samo zbog pozitivnih učinaka na zdravlje, već i zbog njihove povezanosti s organoleptičkim svojstvima hrane. Oksidacija lipida posredovana slobodnim radikalima uzrokuje užegao okus, gubitak boje hrane te joj skraćuje rok trajanja. Dodatak sintetskih spojeva s antioksidacijskim svojstvima tijekom obrade hrane postao je uobičajena praksa kako bi se izbjegli navedeni problemi. Zbog mogućih štetnih posljedica sintetskih antioksidansa na ljudsko zdravlje, brojna su istraživanja orijentirana na pronalazak prirodnih antioksidanasa koji mogu zaštititi ljudski organizam, ali i hranu od slobodnih radikala i na taj način usporiti njihovo djelovanje (Sánchez i Vázquez, 2011). Jedni od takvih antioksidanasa su i proteinski hidrolizati biljnog podrijetla. Antioksidacijska svojstva proteinskih hidrolizata očituju se u uklanjanju ili suzbijanju reaktivnih kisikovih vrsta i slobodnih radikala te u inhibiciji oksidacije bioloških molekula inducirane reaktivnim kisikovim vrstama (Udenigwe i Aluko, 2012).

## 2.1.6. Transfekcija stanica

Transfekcija je postupak uvođenja strane (egzogene) DNA u jezgru eukariotskih stanica. One stanice kod kojih je postupak uspješno proveden zovu se transfektanti. Transfektanti mogu biti stabilni ili prolazni (Slika 2). Stabilni su oni transfektanti kod kojih je DNA integrirana u genom stanice domaćina i gdje je gen od interesa dugoročno ekspimiran. Kod prolazne transfekcije, strana DNA postoji kao ekstrakromosomska jedinica unutar jezgre (epizom) i ekspresija gena od interesa u tom slučaju je privremena te traje svega nekoliko dana. Broj kopija strane DNA koji transfekcijom dospije u jezgru je jedan od kritičnih parametara prolazne transfekcije i određuje uspješnost samog postupka. Ekspresija epizomalnog gena od interesa u stanicama prolaznih transfektanata opada s vremenom bilo zbog stanične diobe i nejednolike distribucije epizoma u stanice kćeri ili zbog razgradnje strane DNA djelovanjem nukleaza. Iz razloga kratkotrajne učinkovitosti, prolazna transfekcija se najčešće koristi kad je potrebno proizvesti manje količine željenog proteina radi proučavanja njegovih svojstava i djelovanja. U tehnologiji životinjskih stanica zastupljena su oba tipa transfekcije, iako se uspostava stabilnih staničnih linija preferira za potrebe proizvodnje terapijskih proteina tijekom složenih tehnoloških procesa (Kim i Eberwine, 2010).



Slika 2. Shematski prikaz a) stabilne i b) prolazne transfekcije (prilagođeno prema: Kim i Eberwine, 2010).



Stanice predviđene za transfekciju moraju biti visoke vijabilnosti (>90%) u logaritamskoj fazi rasta i održavane u mediju koji sadrži sve za rast potrebne komponente. Eksponencijalni rast, točnije učestala mitotička razgradnja jezgrine membrane koja se pritom javlja, osigurava veću vjerojatnost ulaska i zadržavanja strane DNA u jezgri. Transfektirati se mogu i adherentne i suspenzijske stanične kulture. Koncentracija suspenzijskih stanica (tj. konfluentnost adherentnih) pritom ne smije bit prevelika kako stanice ne bi bile inhibirane nedostatkom nutrijenata ili kontaktnom inhibicijom. DNA molekule koje se koriste za transfekciju moraju biti slobodne od proteina i RNA, otopljene u sterilnoj vodi ili odgovarajućem puferu. Količina DNA za transfekciju ovisi o tipu i broju stanica te odabranom načinu trasnfekcije (Anonymus 1, 2022)

Najveći izazov prilikom transfekcije je prijenos strane DNA u stanice. Metode transfekcije dijele se ovisno o načinu na koji se strana DNA unosi u stanice. One mogu biti kemijske, biološke ili fizikalne. Kemijski i biološki postupci su oni u kojima je unošenje DNA u stanicu posredovano česticama koje vežu ili upakiraju plazmidnu DNA. Kod fizikalnih postupaka nametnute fizikalne sile privremeno mijenjaju strukturu stanične membrane i omogućuju ulazak „gole“ DNA (Chong i sur., 2021).

Prijenos DNA putem virusa daje vrlo dobre rezultate, ali nedostaci ove metode su citotoksičnost i imunogenost koje se javljaju zbog nasumične ugradnje transgena u genom domaćina (Kim i Eberwine, 2010). Kod fizikalnih metoda transfekcije (elektroporacija, mikroinjektiranje) koriste se fizikalne sile kojima se destabilizira stanična membrana što omogućuje ekstracelularnoj DNA ulazak u stanicu. Metode su često invazivne i stoga je preživljavanje stanica vrlo kritičan parameter. Metode prijenosa strane DNA koje podrazumijevaju primjenu kationskih lipida ili (ne)razgranatih polimera kao transfekcijskih sredstava su odlična alternativa. Sam postupak zasniva se na sponatnoj interakciji molekula DNA s česticama odabranim za transfekciju te njihovom međusobnom povezivanju u komplekse pozitivnog neto naboja. Rezultat dopremanja strane DNA u jezgri je proizvodnja proteina koja započinje transkripcijom epizoma u jezgri stanice (Rinkenauer i sur., 2015).

Kationski lipidi su kompleksne molekule koje imaju pozitivno nabijenu polarnu glavu vezanu za nepolarnu hidrofobnu grupu koja se najčešće sastoji od dva nezasićena alkilna lanca. Elektrostatske interakcije između pozitivno nabijenih grupa na lipidnoj glavi i negativno nabijenih fosfatnih grupa na plazmidnoj DNA, osnova su za spontano

vezanje strane DNA i kationskih lipida. Formirani kompleks (lipopleks) zbog sličnosti sa staničnom membranom olakšano ulazi u stanicu (Paecharoenchai i sur., 2012). Jedno od takvih sredstava je i transfekcijsko sredstvo *FuGene 6* koje je dokazano efikasno u postupcima transfekcije s više od 700 vrsta stanica. Može se koristiti u medijima bez i sa serumom, a njegova niska citotoksičnost ima i ekonomsku korist jer nije nužno mijenjati medij nakon transfekcije ovim sredstvom. Također, ima minimalan učinak na fiziologiju stanice stoga njegova primjena daje vrijedne rezultate uz minimalne popratne pojave (Nagy i Watzele, 2006).

#### 2.1.6.1. Plazmid pGFP-C1

Plazmid pEGFP-C1 (Slika 5) dobiven je optimizacijom GFP plazmida divljeg tipa na način da svjetlije fluorescira i da se u većoj mjeri eksprimira u stanicama sisavaca. Sadrži gen koji kodira za varijantu proteina GFPmut1 koja sadrži dvostruku aminokiselinsku supstituciju pri čemu je Phe-64 zamijenjen s Leu, a Ser-65 s Thr. Sekvence koje okružuju gen *egfp* pretvorene su u Kozak konsenzusno mjesto za inicijaciju translacije kako bi se dodatno povećala učinkovitost translacije u eukariotskim stanicama. Restriksijsko mjesto za kloniranje se u pEGFP-C1 nalazi između *egfp* kodirajućih sekvenci i *sv40* poli A. SV40 poliadenilacijski signali nizvodno od *egfp* gena usmjeravaju pravilnu obradu 3' kraja *egfp* mRNA. Ciljni gen treba biti kloniran u pEGFP-C1 tako da bude u okviru sa sekvencama koje kodiraju za EGFP, bez intervenirajućih stop kodona unutar okvira čitanja. Rekombinantni EGFP vektor može se transfecirati u stanice sisavaca korištenjem bilo koje standardne metode transfekcije. Plazmid pEGFP-C1 također se može koristiti za ekspresiju EGFP u staničnoj liniji od interesa (npr. kao marker transfekcije) (Anonymus 2, 2002).

#### 2.1.7. Proizvodne stanične linije

Primjena životinjskih stanica u tehnološkoj proizvodnji terapeutika započinje 50-tih godina prošlog stoljeća proizvodnjom virusa za izradu cjepiva te se u sljedećih 30 godina razvijaju postupci izrade cjepiva protiv dječje paralize, ospice, rubeole, hepatitisa B, herpesa kao i nekih bolesti životinja. Do sredine sedamdesetih godina prošlog stoljeća proizvodnja rekombinantnih terapeutskih proteina pomoću životinjskih stanica bila je neisplativa. Tek uspostavom kontinuiranih staničnih linija i poboljšanjem uvjeta uzgoja stanica započinje era proizvodnje rekombinantnih proteina (protutijela, hormona i krvnih proteina) te se taj put nastavlja sve do današnjih dana (Léo i sur., 2008). Tehnološki

postupci proizvodnje prilagođeni su zahtjevima stanica kao i prirodi samog proizvoda kako bi se očuvala njegova stabilnost. Proizvodni proces za proizvodnju rekombinantnih terapijskih proteina zahtijeva odabir:

- a) sustava za ekspresiju
- b) procesa proizvodnje
- c) tehnika pročišćavanja
- d) analitičkih metoda za određivanje čistoće i kvalitete proizvoda

Sve ove faze moraju biti kompatibilne kako bi se zadovoljili zahtjevi tržišta te se proizveo proizvod zadane kvalitete i u potrebnoj količini (Wurm, 2004). Terapijski proteini uglavnom se proizvode u staničnim linijama sisavaca (60% svjetske proizvodnje) kao što je NS0 (mišja mijelomska stanična linija), PER.C6 (humana stanična linija retinoblastoma), BHK (stanice bubrega mladunca hrčka) te CHO (stanice ovarija kineskog hrčka) stanična linija. Među njima, stanična linija CHO najkorišteniji je ekspresijski sustav za proizvodnju rekombinantnih proteinskih terapeutika (Zhu, 2012).

#### 2.1.7.1. CHO stanična linija

CHO stanice (engl. *Chinese hamster ovary*) izolirane iz ovarija kineskog hrčka, postale su kontinuiranom staničnom linijom 1950-ih godina pa se aktivno koriste već preko 70 godina. Postoji niz različitih CHO staničnih sojeva poboljšanih karakteristika koje se koriste za učinkovitiju provedbu proizvodnog procesa. Razne "OMICS" tehnologije, ponajprije genomika, proteomika, metabolomika i transkriptomika, doprinjele su poboljšanju značajki CHO stanične linije (Kim i sur., 2012). Tako je na temelju "OMICS" istraživanja, raznim metodama genetičkog inženjerstva, povećana specifična stanična produktivnost CHO stanica, produljen im je životni vijek u kulturi, povećana im je učinkovitost metabolizma kao i kvaliteta konačnog proizvoda (Hamdi i sur., 2020).

CHO stanice prilagođene su na suspenzijski rast čime je omogućena provedba procesa u velikom mjerilu. Za uzgoj CHO stanica postoje brojni komercijalno dostupni hranjivi mediji bez seruma kao i kemijski definirani mediji koji podupiru njihov rast čime se osigurava reproducibilnost između šarži. Proizvedeni rekombinantni proteini u CHO

stanicama se sekretornim putevima izlučuju u hranjivi medij. Zahvaljujući tome, olakšani su tzv. nizvodni tehnološki postupci (engl. *downstream*) izolacije i pročišćavanja (Lai i sur., 2013). Tehnikama genetičkog inženjerstva omogućena je relativno jednostavna transfekcija CHO stanica. Uz postizanje stabilne ekspresije gena od interesa uspostavljeni su i mehanizmi selekcije i amplifikacije sojeva kako bi se postigli visoki prinosi proizvodnog procesa. Kao posljedica kontinuiranog preuređenja genske strukture i rasta u različitim uvjetima, CHO stanice karakterizira visok stupanj genske raznolikosti (Kim i sur., 2012). Tijekom dužeg perioda kultivacije CHO stanice nakupljaju promjene vidljive u genotipu i fenotipu te se stoga ne uspijeva zadržati potrebna stabilnost proizvodnog procesa koja je potrebna kako bi se u konačnici dobio proizvod visoke sigurnosti i kvalitete. Zbog toga se proizvodna linija smatra stabilnom ako se tijekom 60 generacija zadrži 70 % početnih proizvodnih vrijednosti (Wurm i Wurm, 2017). Osim kvantitete, zahtjevi tzv. dobre proizvođačke prakse (engl. *Good Manufacturing Practice*) podrazumijevaju i visoku kvalitetu proizvoda dobivenih pomoću kulture životinjskih stanica. Većina patogenih humanih virusa nema mogućnost replikacije u CHO stanicama pa su siguran izbor prilikom proizvodnje terapeutika za ljudsku upotrebu. Također, posttranslacijske modifikacije proteina CHO stanica vrlo su slične onima kod ljudi, pogotovo kada je riječ o glikozilaciji. Na taj je način osigurana bolja aktivnost i imunogenost terapeutika prilikom njihove primjene (Pereira i sur., 2018).

## **2.2. Hranjivi medij za uzgoj stanica**

Hranjivi medij čini skup različitih nutrijenata i kemijskih tvari kojima je uloga zadovoljiti potrebe nužne za rast i održavanje životinjskih stanica u *in vitro* uvjetima. Hranjivi medij treba biti formuliran tako da omogućava postizanje visoke gustoće stanice istovremeno stimulirajući sintezu i ekstracelularni transport konačnog produkta (Ritacco i sur., 2018). O kvaliteti i sastavu medija ovisi rast, proliferacija i ostale stanične funkcije koje pridonose učinkovitosti proizvodne stanične linije. Osnovne komponente svakog hranjivog medija su: voda, molekule ugljikohidrata, aminokiseline, anorganske soli, vitamini, lipidi, proteini, hormoni i minerali. Voda koja se koristi prilikom pripreme medija mora biti izrazito velike kvalitete i čistoće kako bi se izbjegli mogući kontaminanti koji negativno utječu na stanični rast. Glukoza se koristi kao glavni izvor ugljika i energije, a dodaje se u koncentracijama od 0,9 do 10 g L<sup>-1</sup>, ovisno o zahtjevima stanica i tipu uzgoja. Poželjno je da se razina glukoze održava u većim koncentracijama zbog

brzog rasta CHO stanica i potrošnje nutrijenata prilikom procesa proizvodnje protutijela (Lu i sur., 2005, Vergara i sur., 2018). Aminokiseline su ključan dodatak mediju za uzgoj CHO stanica. Male promjene u aminokiselinskom sastavu medija mogu promijeniti krivulju staničnog rasta, koncentraciju titra protutijela te mogu utjecati i na glikozilacijski profil konačnog produkta (Fan i sur., 2015). Za razliku od neesencijalnih aminokiselina koje životinjske stanice mogu sintetizirati, esencijalne aminokiseline se dodaju kao komponenta medija za rast stanica. Oba tipa aminokiselina imaju značajan učinak na stanični rast te je stoga nužno optimirati koncentraciju esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina prilikom formulacije medija. Histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan i valin su esencijalne aminokiseline i potrebno ih je dodati u većim koncentracijama u medij jer ih stanice troše u relativno velikim količinama. Neesencijalne aminokiseline alanin, arginin, asparagin, aspartat, cistein, glutamin, glutamat, glicin, prolin, serin i tirozin se također dodaju većini hranjivih medija jer utječu na stanični proces i proizvodnju. Zasebno se dodaju mediju u koncentracijama od 0,1 do 1 mM. Najvažnija aminokiselina je glutamin, budući da služi kao izvor ugljika, dušika i energije zbog čega se dodaje u nešto višim koncentracijama, od 1 do 5 mM. Glutamin poboljšava staničnu vijabilnost, reducira proizvodnju nepoželjnog nusprodukta laktata i povećava produktivnost stanične linije, no istovremeno dovodi do nastanka amonijaka koji može negativno utjecati na staničnu kulturu (Xu i sur., 2014). Lipidi, osim što su glavna sastavnica membrana, služe kao signalne molekule i dodatan izvor energije, ali nisu nužan dodatak mediju jer se pokazalo da medij bez lipida ne narušava proliferaciju i produktivnost CHO stanica (Ritacco i sur., 2018). Međutim, dodatak lipida pozitivno utječe na glikozilaciju i održavanja stanične vijabilnosti (Jenkins i sur., 1994). Lipidi se dodaju u obliku fosfatidilne ili lizofosfatidilne kiseline, kolina te analoga i prekursora masnih kiselina i kolesterola. Vitamini se dodaju mediju kao koenzimi, kofaktori signalnih puteva, prostetske skupine, inhibitori ili aktivatori enzima. Većina komercijalno dostupnih medija sadrži vitamine B skupine jer se pokazalo da utječu na povećanje prinosa protutijela i do tri puta (Takagi i sur., 2001). Obzirom da su vitamini nestabilni u prisutnosti topline, svjetla ili dugotrajne izloženosti zraku, pravilna pohrana i pažljivo rukovanje medijem je nužno za njegovu trajnost. Ioni anorganskih soli poput  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  i  $\text{HCO}_3^-$  služe za održavanje osmotskog tlaka i pH vrijednosti, ali i kao kofaktori. Elementi u tragovima poput Fe, Cu, Zn, Mn, Mo i Se dodaju se u koncentracijama ne većim od 5  $\mu\text{M}$ . Ponekad se mediju dodaju antibiotici poput penicilina, streptomicina i amfotericina B kako bi se spriječio neželjeni mikrobn

rast. Poželjno je međutim upotrebu antibiotika svesti na minimalne koncentracije zbog citotoksičnog učinka na stanice, ali i pojave antibiotske rezistencije. Osim toga, medij može biti obogaćen određenim suplementima koji poboljšavaju stanični rast i proliferaciju poput seruma životinjskog podrijetla. Dodatkom seruma mediju za uzgoj dodaju se osnovni nutrijenti (proteini, aminokiseline, minerali, i dr.), vezni proteini (albumin, tansferin), hormoni, faktori prihvatanja i širenja stanice, faktori rasta, faktori zaštite od mehaničkog oštećenja, inhibitori proteaza, i sl. (Yao i Asayama, 2017).

### 2.2.1. Vrste hranjivih medija

Hranjivi medij najvažniji je faktor u kulturi stanica, zbog čega kvaliteta istoga izravno utječe na rezultate istraživanja. Stoga je nužno odabrati hranjivi medij prikladan za potrebe njihova istraživanja, pritom poznajući svojstva i sastav korištenog medija (Yao i Asayama, 2017). Životinjske stanice mogu se uzgajati u potpuno prirodnim hranjivim medijima, koji sadrže isključivo biološke tekućine prirodno prisutne u organizmu, no već dugi niz godina one se prvenstveno uzgajaju u sintetskim hranjivim medijima, uz dodatak pojedinih prirodnih produkata (Arora, 2013). Sintetski hranjivi mediji mogu se podijeliti u nekoliko kategorija, koje su navedene i opisane u tablici 1. U prirodne medije spadaju biološke tekućine (npr. plazma, serum, limfa i dr.), ekstrakti raznih tkiva (npr. jetre, slezene i koštane srži) te razni koagulansi ili ugrušci (plazma odvojena od heparinizirane krvi, seruma i fibrinogena) (Yao i Asayama, 2017). Prirodni mediji su vrlo korisni i prikladni za širok spektar kultura životinjskih stanica, no njihov glavni nedostatak je slaba reproducibilnost rezultata zbog nepoznavanja točnog sastava takvog hranjivog medija (Arora, 2013). Nadalje, kompleksna i nedefinirana priroda bioloških tvari sadržanih u prirodnim hranjivim medijima u većini slučajeva rezultira velikom varijabilnošću od šarže do šarže, povećanim rizikom od kontaminacije te nemogućnošću određivanja minimalnih količina specifičnih hranjivih sastojaka potrebnih za rast stanica u takvom mediju (Ritacco i sur., 2018). Upravo zbog navedenih nedostataka prirodnih hranjivih medija, s vremenom su razvijeni sintetski mediji, koji su pripremljeni dodatkom organskih i anorganskih hranjivih tvari, vitamina, soli, kisika i ugljikova dioksida, proteina seruma, ugljikohidrata, kofaktora i dr., u količinama ovisno o vrsti stanica koje se uzgajaju i svrsi njihova uzgoja (Arora, 2013).

Tablica 1. Vrste sintetskih hranjivih medija za uzgoj životinjskih stanica (Yao i Asayama, 2017).

|                                                                                                                                  | <b>Vrsta</b>                                                | <b>Dodane komponente</b>                                                                                                                                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sintetski hranjivi mediji:<br>sastavljeni su od osnovnog (bazalnog) medija i dodataka, kao što su serum, faktori rasta i hormoni | hranjivi medij sa serumom                                   | dodatak humanog, goveđeg, konjskog ili nekog drugog seruma                                                                                                                 |
|                                                                                                                                  | hranjivi medij bez seruma<br>(engl. <i>serum-free</i> )     | dodatak sirovih proteinskih frakcija, kao na primjer goveđeg serum albumina, ili $\alpha$ - ili $\beta$ - globulina                                                        |
|                                                                                                                                  | hranjivi medij bez proteina<br>(engl. <i>protein-free</i> ) | dodatak nedefiniranih komponenti, kao na primjer peptidnih frakcija (proteinskih hidrolizata)                                                                              |
|                                                                                                                                  | kemijski definirani hranjivi medij                          | umjesto nedefiniranih komponenti (npr. sirovih proteinskih frakcija, hidrolizata i ekstrakata tkiva), dodaju se visoko pročišćene komponente (npr. rekombinantni proteini) |

### 2.2.2. Hranjivi medij bez seruma

Serum je kompleksna biološka smjesa, koja se u hranjive medije obično dodaje u koncentraciji od 1 do 5 g L<sup>-1</sup>, a služi kao izvor aminokiselina, proteina (npr. albumina, transferina, fibronektina i dr.), lipida, ugljikohidrata, vitamina (osobito onih topljivih u mastima), hormona, faktora rasta, minerala (npr. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> i dr.) i elemenata u tragovima. Naime, komponente seruma služe brojnim funkcijama u hranjivim podlogama: faktori rasta i hormoni iz seruma potiču rast stanica u kulturi, faktori adhezije zaslužni su za vezanje stanica i njihovo širenje po podlozi, pojedine komponente seruma reguliraju transport molekula u stanice, a inhibitori proteaza štite stanicu od proteolize. Osim navedenih karakteristika, serum također povećava viskoznost hranjivog medija, što

štiti stanice od nastanka mehaničkih oštećenja uslijed miješanja suspenzijskih kultura i pipetiranja, te poboljšava puferirajući kapacitet hranjivog medija (Arora, 2013). Danas se najviše koristi fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*, FBS), a osim njega i fetalni teleći serum (engl. *fetal calf serum*, FCS) te konjski serum (engl. *horse serum*, HS) (Yao i Asayama, 2017). Međutim, unatoč mnogim nabrojenim prednostima uporabe seruma u hranjivim podlogama, serum ima i brojne negativne karakteristike. Naime, serum nema ujednačeni sastav, predstavlja potencijalan izvor kontaminacije (virusi, prioni, mikoplazme) te njegova prisutnost u hranjivom mediju može znatno otežati, produljiti i poskupjeti nizvodni tehnološki proces, tj. proces izolacije i pročišćavanja proizvoda stanične kulture (Arora, 2013). Nadalje, serum ima i ograničenu dostupnost te visoku cijenu, zbog čega se serum danas sve više smatra nepoželjnim za uporabu u industrijskoj primjeni staničnih kultura, i s procesnog i s regulatornog stajališta (Ritacco i sur., 2018).

Potaknuti nedostacima uporabe seruma u hranjivim medijima za uzgoj staničnih kultura, razvijau se hranjivi medij bez seruma (engl. *serum-free media*). Međutim, glavni izazov kod pripreme takvih medija je pronalazak serumu ekvivalentnih komponenti za promoviranje rasta i produktivnosti stanica, budući da potreba za takvim komponentama značajno varira između staničnih linija. Stoga još uvijek nije komercijalno dostupan, niti je vjerojatno da će uskoro biti, univerzalni medij bez seruma, koji bi bio primjenjiv za sve stanične linije (Butler, 2013). Dakle, u slučajevima kada primjena seruma u hranjivim medijima nije prikladna ili poželjna za uzgoj staničnih kultura, znanstvenicima su na korištenju dostupne postojeće zamjene za serum poput: ekstrakata seruma i tkiva, hidrolizata, hormona, faktore rasta, proteinskih nosača, vitamina, adhezijskih faktora, lipida i drugih. Međutim, odabir i kombiniranje tih zamjenskih komponenti predstavlja problem prilikom formulacije medija bez seruma jer iziskuju veliki trud, veliki trošak i puno vremena (Yao i Asayama, 2017).

### 2.2.3. Hidrolizati proteina kao dodatak mediju bez serum

Upotreba medija bez seruma često može rezultirati smanjenjem specifične produktivnosti stanične linije i narušiti kvalitetu konačnog produkta (Heidemann i sur., 2000). Danas postoje pažljivo formulirani kemijski definirani medij koji stimuliraju rast, održavaju staničnu vijabilnost i visok prinos proizvodnog procesa. Međutim, dosadašnja praksa je pokazala da primjena takvih vrlo skupih, „po mjeri“ izrađenih medija još uvijek daje slabiji rast i produktivnost u usporedbi s medijima koji sadrže serum. Zbog toga su



se počeli razmatrati alternativni dodaci bazalnom mediju. Kao dobra zamjena za fetalni goveđi serum pokazali su se proteinski hidrolizati dobiveni iz životinjskog tkiva, mliječnih proteina, mikrobne ili kvaščeve biomase. Hidrolizati su zapravo peptidni fragmenti dobiveni postupkom kiselinske, enzimske ili mikrobne hidrolize, a sadrže aminokiseline u formi oligopeptida, lipide, vitamine i druge tvari niske molekularne mase (Deparis i sur., 2003; Ho i sur., 2021). No, s obzirom na to da su bilo kakve komponente životinjskog podrijetla u medija nepoželjne prilikom proizvodnje biofarmaceutika zbog opasnosti od kontaminacija patogenom, hidrolizati biljnog podrijetla su se počeli intenzivno proučavati kao oblik suplementacije medija bez seruma. Biljni proteinski hidrolizati jeftin su izvor kratkolančanih peptida, aminokiselina, lipida, vitamina i drugih bioaktivnih spojeva čija svojstva mogu pozitivno djelovati na životinjske stanice u kulturi. Dokazano je da peptidi iz riže, pšenice i soje, osim što nutritivno obogaćuju hranjivi medij, poboljšavaju stanični rast, smanjuju vjerojatnost pojave apoptoze i poboljšavaju kvalitetu produkta tako što djeluju kao inhibitori ekstracelularnih proteaza koje mogu oštetiti konačni produkt (Burteau i sur., 2003; Mols i sur., 2005). Biljni proteinski hidrolizati koji se, u kombinaciji s drugim dodacima ili samostalno, koriste kao dodatak hranjivom mediju za poboljšanje rasta i produktivnosti biotehnoški značajnih staničnih linija prikazani su u tablici 2.

Učinak proteinskih hidrolizata na cjelokupni proizvodni proces ovisi o staničnoj liniji koja se uzgaja, početnoj sirovini i procesu nastajanja samog hidrolizata, koncentraciji u kojoj se dodaje te sastavu bazalnog medija (Babcock i sur., 2010). Ponekad se dogodi da se iste komponente nalaze u bazalnom mediju i hidrolizatima što može imati negativan učinak na proces jer prevelike koncentracije određenih sastavnica mogu djelovati inhibirajuće. S obzirom na to da proteinski hidrolizati često predstavljaju kombinaciju peptida, slobodnih aminokiselina, zaostalih tragova ulja, minerala i drugih komponenti nepoznate aktivnosti, prije dodatka mediju potrebno je provesti dodatne procese pročišćavanja i frakcioniranja (Logarušić i sur., 2021). Frakcioniranjem se dobivaju mješavine manjih peptida različite veličine, naboja i hidrofobnosti. Biološka aktivnosti peptida u proteinskim hidrolizatima ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim karakteristikama. Najveći nedostatak korištenja biljnih hidrolizata je razlika u njihovom sastavu i kvaliteti od šarže do šarže što može utjecati na ujednačenost proces proizvodnje. Kako bi se to izbjeglo potrebno je provesti detaljniju karakterizaciju i pobliže odrediti

sastav hidrolizata i komponente koje pozitivno utječu na stanični rast i produktivnost (Franek i sur., 2000).

Tablica 2. Biljni proteinski hidrolizati korišteni za poboljšanje rasta i produktivnosti biotehnološki značajnih staničnih linija (Gaurina Srček i sur., 2022).

| <b>Proteinski hidrolizat</b> | <b>Stanična linija</b> | <b>Proizvođač hidrolizata</b> | <b>Učinak na stanice</b>                                              |
|------------------------------|------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Grašak                       | Vero                   | Kerry Bioscience              | Poboljšan rast                                                        |
| Lan                          | CHO-DP12               | Vlastita proizvodnja          | Povećanje produktivnosti (IgG)                                        |
| Pamuk                        | CHO-320                | Quest International           | Poboljšani rast i produktivnost (interferon- $\gamma$ )               |
|                              | Hibridoma              | Vlastita proizvodnja          | Poboljšano preživljenje i rast                                        |
|                              | CHO                    | Kerry Bioscience              | Poboljšan rast i produktivnost (t-PA)                                 |
|                              | CHO                    | Kerry group                   | Povećanje produktivnosti (mAb)                                        |
|                              | CHO                    | Friesland-Campina             | Djelovanje na signalne puteve i regulaciju gena                       |
| Pšenica                      | BHK                    | Quest International           | Povećanje produktivnosti (interferon)                                 |
|                              | Vero                   | Kerry Bioscience              | Poboljšan rast                                                        |
|                              | CHO                    | Kerry Bioscience              | Poboljšani rast i produktivnost (t-PA)                                |
|                              | CHO                    | Difco i Kerry Bioscience      | Poboljšan rast i produktivnost (mAb)                                  |
| Riža                         | BHK                    | Quest International           | Povećanje produktivnosti (interferon)                                 |
|                              | CHO-320                | Quest International           | Poboljšan rast i produktivnost (interferon- $\gamma$ )                |
|                              | Vero                   | Kerry Bioscience              | Poboljšan rast                                                        |
| Soja                         | BHK                    | Quest International           | Povećanje produktivnosti, očuvana glikozilacijaproizvoda (interferon) |
|                              | CHO-320                | Quest International           | Poboljšani rast i produktivnost (interferon- $\gamma$ )               |
|                              | Sp2/0                  | Kerry Bioscience              | Poboljšani rast i produktivnost (IgG)                                 |
|                              | CHO                    | LucraTone i Hyclone           | Poboljšan rast                                                        |
|                              | Vero                   | Kerry Bioscience              | Poboljšan rast                                                        |
|                              | CHO                    | Difco i Kerry Bioscience      | Povećanje produktivnosti ( $\beta$ -INF)                              |
|                              | CHO                    | Nije navedeno                 | Stabilni markeri metaboličke produktivnosti (mAb)                     |
| Uljana repica                | Sf9                    | Vlastita proizvodnja          | Poboljšan rast                                                        |
|                              | CHO                    | Vlastita proizvodnja          | Povećanje produktivnosti ( $\gamma$ -INF)                             |
|                              | CHO-C5                 | Vlastita proizvodnja          | Poboljšan rast                                                        |

### 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. Sjemenke lana izvor su visoko kvalitetnih proteina, topivih vlakana te visokog udjela  $\alpha$ -linolenske kiseline vrlo korisne za ljudsko zdravlje (Lan i sur., 2020), fenolnih spojeva s naglaskom na lignane i fenolne kiseline koji imaju antioksidativno, antimikrobno i antikancerogeno djelovanje (Landate, 2011). Prosječno, lipidi čine 30-40% sastava sjemenki lana, proteini 20-25%, vlaga 4-8%, pepeo 3-4% i vlakna 20-25%, od kojih su 10% topiva vlakna. Najzastupljeniji minerali u sjemenkama lana su kalcij, mangan, fosfor i kalij. Lanene sjemenke, kao i mnoge druge sjemenke, imaju visok udio globulina (~80%) i sadrže protein sličan albuminu koji čini (~20%) ukupnih proteina. Proteini lana su bogati argininom, asparaginom i glutaminom, dok su limitirane aminokiseline lizin, metionin i cistein (Gutiérrez 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).

Svo laneno ulje na hrvatskom tržištu namijenjeno prehrani, prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima, spada pod kategoriju hladno prešanih ulja. Hladno prešana jestiva ulja su proizvodi koji se dobivaju iz odgovarajućih sirovina, prešanjem na temperaturi do 50 °C kako bi se sačuvala nutritivna i bioaktivna svojstva komponenti koje se nalaze u sjemenci biljke. Laneno ulje se može proizvesti i uz upotrebu temperature iznad 50 °C čime dolazi u kategoriju nerafiniranih ulja ili kao rafinirano ulje nakon ekstrakcije sjemena organskim otapalima te se dalje koriste u proizvodnji boje i lakova (Pravilnik, NN 41//2012). Kao nusprodukt hladnog prešanja sjemenki zaostaju tzv. uljane pogače.

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. Pogača lana se uglavnom koristi kao stočna hrana te kao aditiv u pekarskim proizvodima, a ima i veliki potencijal u ljudskoj prehrani 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 (Mikolaj, 2017). 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).

## 2.4. Konoplja

Konoplja (lat. *Cannabis Sativa L.*) je jednogodišnja, dvodomna biljka iz porodice Cannabinaceae. Primjena konoplje je raznolika jer se gotovo svaki dio biljke može iskoristiti u industrijske svrhe. Sjeme konoplje se koristi u prehrambenoj industriji u obliku sjemenki, ulja, brašna te kao nutritivni i funkcionalni dodatak prehrambenim proizvodima. Stabljika služi kao izvor vlakana koja se koriste za izradu papira i tekstila. Zbog svog razgranatog izgleda, korijen konoplje je pogodan za fitoremedijaciju tla od teških metala. Cvijet se koristi u kozmetičke i farmakološke svrhe zbog visokog udjela biološki aktivnih spojeva (Farinon i sur., 2020). Kanabinoidi (CBD, THC) su najviše zastupljeni u ženskim cvjetovima i lišću, a manje u ostalim dijelovima biljke, dok ih sjeme i pogača uopće ne sadrže te tamo mogu dospjeti samo u slučaju kontaminacije prilikom žetve, skladištenja ili prerade (Ameri, 1999).

Kako se industrijska konoplja prvotno uzgajala radi proizvodnje vlakana, njeno sjeme se tretiralo kao nusprodukt i koristilo isključivo kao stočna hrana. Međutim, unazad nekoliko godina sjemenke konoplje se počinju sve češće koristiti u prehrambenoj industriji zbog vrlo povoljnog nutritivnog sastava. Sjeme industrijske konoplje sadrži 25-35% lipida koji predstavljaju jedinstven i za ljudsko zdravlje optimalan omjer masnih kiselina, 20-25% lako probavljivih biljnih proteina bogatih esencijalnim aminokiselinama, 20-30% ugljikohidrata, 10-15% vlakana, vitamina i minerala (Callaway, 2004). Uz to sjeme je bogato i antioksidansima i drugim bioaktivnim spojevima poput fenola, tokoferola, karotenoida, fitosterola i sl. Sadržaj proteina konoplje može varirati ovisno o sorti i okolišnim čimbenicima. Dva glavna proteina sjemenki konoplje su albumin i edestin (Tang i sur., 2009). Usporedba aminokiselinskog sastava proteina konoplje s dva najpoznatija izvora visokokvalitetnih biljnih i životinjskih proteina, sojom i kazeinom, pokazala je da su proteini konoplje bogatiji aminokiselinama koje sadrže sumpor. Udio esencijalnih aminokiselina u proteinima konoplje prema

ukupnim aminokiselinama je sličan onome u kazeinu, ali veći u usporedbi s proteinima soje (Farinon i sur., 2020).

Ulje konoplje, baš kao i ulje lana dobiva se postupkom hladnog prešanja sjemenki biljke korištenjem hidrauličke preše do 50°C. Hladnim prešanjem izbjegava se upotreba konvencionalnih organskih otapala ili topline prilikom ekstrakcije kako bi se zadržale bioaktivne komponente koje se nalaze u sjemenci biljke. Nakon mehaničkog prešanja sjemenki, kao otpad ostaje tzv. uljana pogača koja se daljnjim postupcima mljevenja i prosijavanja prerađuje kako bi se dobilo brašno (Teh i Birch, 2013). Uljane pogače bogatog su nutritivnog sastava koji može varirati ovisno o uvjetima uzgoja i metodi ekstrakcije koja se koristi za dobivanje ulja. Tako se uljana pogača konoplje sastoji od 28 % proteina, 12% lipida, 1,5% ugljikohidrata, 17,5% vlakana 7% pepela i 8% vlage. Zbog svog sastava uljane pogače imaju potencijal u formulaciji prehrambenih proizvoda namjenjenih poboljšanju ljudskog zdravlja (Pojić i sur. 2014).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

- 2, 2'-azobis(2-metilpropionamid)-dihidroklorid (AAPH), Acros Organics, SAD
- 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel, Bio-Rad, SAD
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetraetilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich, Njemačka
- β-merkaptotanol, LKB, Švedska
- Acetonitril, Honeywell, Njemačka
- Ala - Gln 200mM, Sigma-Aldrich, Austrija
- Antibiotic Antimycotic Solution (100×), Sigma-Aldrich, SAD
- Anti-Clumping Agent, Gibco Invitrogen Corporation, SAD
- Bakrov sulfat pentahidrat, Kemika, Hrvatska
- Bromfenol plavo, Kemika, Hrvatska
- CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS test), Promega Corporation, SAD
- Commassie prah R250, Fisher Scientific, Velika Britanija
- Destilirana voda, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Hrvatska
- Dimetil sulfoksid (DMSO), Carlo-Erba Reagens, Italija
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- DMEM-High Glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Capricorn Scientific, Njemačka
- Elementi u tragovima A, Corning, SAD
- Elementi u tragovima B, Corning, SAD
- EDTA-Na<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O (Kompleksal III), Kemika, Hrvatska
- Fetalni goveđi serum (FBS), Sigma-Aldrich, SAD
- Fluorescein, Sigma-Aldrich, SAD
- Folin-Ciocalteu-ov reagens, Sigma-Aldrich, SAD
- FuGene 6 Transfection Reagent, Promega, SAD
- Gel filtration standards, Bio-Rad, SAD
- Glicerol, Kemika, Zagreb
- Glicin, Fisher Scientific, Velika Britanija

- Goveđi serumski albumin (BSA), Sigma-Aldrich, SAD
- Insulin solution human, Sigma-Aldrich, SAD
- Kalijev natrijev tartarat, Kemika, Hrvatska
- Klorovodična kiselina , Kemika, Hrvatska
- Metanol, Kemika, Hrvatska
- Metotreksat (MTX), Cerilliant, SAD
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Merck, SAD
- Natrijev dodecil-sulfat (SDS), LKB, Švedska
- Natrijev hidroksid, Kemika, Hrvatska
- Natrijev karbonat, Kemika, Hrvatska
- Natrijev klorid, Honeywell Fluka, Švicarska
- Octena kiselina, Kemika, Hrvatska
- Phosphate Buffered Saline (PBS), Sigma-Aldrich, Velika Britanija
- Plazmid pEGFP-C1, donacija Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković, Hrvatska
- PowerCHO®-2 CD Chemically Defined Selective Medium, Lonza, Belgija
- ProSieve™ QuadColor™ Protein Marker, Lonza, SAD
- Ribonukleaza A, Roche, Švicarska
- Trikloroctena kiselina (TCA), Fisher Scientific, Velika Britanija
- Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, SAD
- Tripsin-EDTA, Sigma-Aldrich SAD
- TRIS [Tris(hidroksimetil)aminometan], Sigma-Aldrich, SAD
- Turbofect Transfection Reagent, Thermo Scientific, SAD

### 3.1.2. Sirovina

- Brašno uljane pogače konoplje, *Bio Hemp Protein Powder*, Soul Food, Hrvatska
- Brašno uljane pogače lana, *Laneno brašno*, Nutrimedica, Hrvatska

### 3.1.3. Stanične linije

Sve stanične linije uzgajane su u inkubatoru na temperaturi od 37 °C uz odgovarajući stupanj vlažnosti i sastava atmosfere (95 % zraka + 5 % CO<sub>2</sub>).

#### 3.1.3.1. CHO DP-12

CHO DP-12, klon #1934 (ATCC<sup>®</sup> CRL 12444<sup>TM</sup>) (Virginia, SAD), je adherentna stanična linija fibroblasta ovarija kineskog hrčka sa sposobnošću proizvodnje rekombinantnog humanog monoklonskog protutijela anti-IL-8, izotip IgG1. Za uzgoj adherentnih CHO DP-12 stanica korišten je hranjivi medij DMEM u koji su po uputama ATCC-a dodane sljedeće komponente potrebne za optimalan rast stanica: 0,002 mg mL<sup>-1</sup> rekombinantnog humanog inzulina, 200 nM metotreksata, 0,1 % (v/v) elemenata u tragovima A, 0,1 % (v/v) elemenata u tragovima, 10 % (v/v) FBS i 1 % (v/v) antibiotika.

#### 3.1.3.2. CHO DP-12-S

CHO DP-12-S stanična je linija nastala prilagodbom CHO DP-12 adherentne stanične linije na rast u suspenziji i mediju bez seruma u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Zavoda za biokemijsko inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. CHO DP-12-S stanice proizvodne rekombinantno humano monoklonsko protutijelo anti-IL-8, izotip IgG1. Ove stanice uzgajane su na kružnoj mješalici pri brzini 160 o min<sup>-1</sup>, u mediju PowerCHO<sup>®</sup>-2 CD s dodatkom 0,002 mg mL<sup>-1</sup> rekombinantnog humanog inzulina, 200 nM metotreksata, 0,25 % (v/v) anti-clumping reagensa, 4 % (v/v) smjese alanina i glutamina te 1 % (v/v) antibiotika.

#### 3.1.3.3. HEK293T

HEK293T (ATCC<sup>®</sup> CRL-3216<sup>TM</sup>) je visoko transfektabilna, adherentna stanična linija izolirana iz bubrega humanog embrija. Za uzgoj HEK293T korišten je hranjivi medij DMEM s dodatkom 10% (v/v) FBS i 1% (v/v) antibiotika.

#### 3.1.3.4. HeLa

HeLa (ATCC<sup>®</sup> CCL-2<sup>TM</sup>) je humana, tumorska stanična linija izolirana iz karcinoma grlića vrata maternice. Uzgoj HeLa stanica vršen je u hranjivom mediju DMEM s dodatkom 10% (v/v) FBS i 1% (v/v) antibiotika.

#### 3.1.3.5. HaCaT

HaCaT (CLS #300493) je spontano imortalizirana, adherentna stanična linija humanih keratinocita. Za uzgoj HaCaT stanica korišten je hranjivi medij DMEM s dodatkom 10% (v/v) FBS i 1% (v/v) antibiotika.



### 3.1.4. Enzimi

- ❖ Alcalase<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, SAD
  - Proteaza izolirana iz *Bacillus licheniformis*
  - Endopeptidaza serinskog tipa specifične aktivnosti  $\geq 2.4 \text{ U g}^{-1}$
  - Optimalan pH: 6,5-8,5
- ❖ Neutrase<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, SAD
  - Proteaza izolirana iz *Bacillus amyloliquefaciens*
  - metaloendopeptidaza specifične aktivnosti  $\geq 0.8 \text{ U g}^{-1}$
  - Optimalan pH: 7,0
- ❖ Protamex<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, SAD
  - mješavina proteaza iz *Bacillus sp.*
  - Endopeptidaza enzimske aktivnosti  $> 1.5 \text{ AU-N g}^{-1}$
  - Optimalan pH: 6,5-8,5
- ❖ Celulase<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, SAD
  - Izolirana iz *Aspergillus niger*
  - Specifične aktivnosti  $\sim 0.8 \text{ U mg}^{-1}$

### 3.1.5. Otopine i puferi

- Natrijev-fosfatni pufer (0,1 M; pH 7,4; V = 0,5 L; kalibriranje kolone)

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O | 10,11 g |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O   | 1,70 g  |
| Destilirana voda                                      | 500 mL  |

- Natrijev-fosfatni pufer (50 mM; pH 7,55; V = 0,7 L; pufer za vezanje/ ispiranje)

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| Natrijev-fosfatni pufer 0,1 M | 350 mL |
| Destilirana voda              | 350 mL |

- Limunska kiselina (0,1 M; pH 2,73; V = 1,0 L; pufer za eluciju)

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| Natrijev-citrat dihidrat     | 2,76 g  |
| Limunska kiselina monohidrat | 17,41 g |
| Destilirana voda             | 1 L     |

|                                                                                                                   |             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>TRIS pufer (20 mM; pH 7,4; V = 0,1 L)</u></li> </ul>                  |             |
| Tris                                                                                                              | 242,28 mg   |
| HCl 2 M                                                                                                           | 900 $\mu$ L |
| Destilirana voda                                                                                                  | 99 mL       |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Pufer za dugotrajno čuvanje kolone (pH 7,4; V = 0,1 L)</u></li> </ul> |             |
| Etanol (96 %)                                                                                                     | 20 mL       |
| TRIS pufer (20 mM; pH 7,4)                                                                                        | 80 mL       |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Reagens A</u></li> </ul>                                              |             |
| Natrijev hidroksid                                                                                                | 2 g         |
| Natrijev karbonat                                                                                                 | 10 g        |
| Destilirana voda                                                                                                  | 500 mL      |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Reagens B1</u></li> </ul>                                             |             |
| Bakrov sulfat pentahidrat                                                                                         | 1 g         |
| Destilirana voda                                                                                                  | 100 mL      |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Reagens B2</u></li> </ul>                                             |             |
| Kalijev natrijev tartarat                                                                                         | 2 g         |
| Destilirana voda                                                                                                  | 100 mL      |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Reagens C</u></li> </ul>                                              |             |
| Reagens A                                                                                                         | 50 mL       |
| Reagens B1                                                                                                        | 0,5 mL      |
| Reagens B2                                                                                                        | 0,5 mL      |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Otopina TCA (0,44 mol L<sup>-1</sup>)</u></li> </ul>                  |             |
| Trikloroctena kiseline                                                                                            | 7,19 g      |
| Destilirana voda                                                                                                  | 100 mL      |

|                                                   |                   |
|---------------------------------------------------|-------------------|
| • <u>Coomassie otopina za bojanje gelova</u>      |                   |
| Commassie prah R250                               | 0,1 g             |
| Metanol                                           | 50 mL             |
| Octena kiselina                                   | 7 mL              |
| Destilirana voda                                  | 43 mL             |
| • <u>Pufer za elektroforezu (10x)</u>             |                   |
| Tris                                              | 30 g              |
| Glicin                                            | 144 g             |
| SDS                                               | 10 g              |
| Destilirana voda                                  | 1 L               |
| • <u>Laemmlijev pufer za uзорke (5x)</u>          |                   |
| Tris                                              | 1,5 g             |
| Kompleksal III (EDTA)                             | 0,19 g            |
| Klorovodična kiselina                             | pH do 6,8 u 10 mL |
| SDS                                               | 5 g               |
| β-merkaptoetanol                                  | 12,5 mL           |
| Glicerol                                          | 20 mL             |
| Bromfenol plavo                                   | 5 mg              |
| • <u>Fosfatni pufer (0,2 M; pH=7,0; V=200 mL)</u> |                   |
| Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat                | 0,968 g           |
| Dinatrijev hidrogenfosfat                         | 1,735 g           |
| Destilirana voda                                  | 200 mL            |
| • <u>Fosfatni pufer (0,075 M, pH=7; V=200 mL)</u> |                   |
| Fosfatni pufer (0,2 M, pH=7,0)                    | 75 mL             |
| Destilirana voda                                  | 125 mL            |

- Otopina fluoresceina
  - Ishodna otopina 1:

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Fluorescein                      | 15 mg  |
| Fosfatni pufer (0,075 M; pH=7,0) | 100 mL |

    - Ishodna otopina 2:

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Ishodna otopina 1                | 100 µL |
| Fosfatni pufer (0,075 M; pH=7,0) | 10 mL  |

      - Ishodna otopina 3:

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| Ishodna otopina 2                | 50 µL |
| Fosfatni pufer (0,075 M; pH=7,0) | 50 mL |
- Otopina 2, 2'-azobis(2-metilpropionamid)-dihidroklorid (AAPH)

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| AAPH                             | 0,414 g |
| Fosfatni pufer (0,075 M; pH=7,0) | 10 mL   |
- Otopina Trolox-a (50 µM)

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Trolox                           | 6,26 g |
| Fosfatni pufer (0,075 M; pH=7,0) | 50 mL  |

### 3.1.6. Aparatura i oprema

- Amicon® Stirred Cell 50 ml, EMD Millipore Corporation, SAD
- Amicon® Ultra Centrifugal Filters – 10K, 50K, Merck Millipore Ltd., Irska
- Cary Eclipse Fluorescence Spectrofotometar s čitačem mikrotitarskih ploča, Varian, Australija
- CellDrop-FL automatski brojač stanica, Denovix, SAD
- Centrifuga, ECEN-205, MRC Lab, Izrael
- Centrifuga, Falcon 6/300, MSE, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Centrifuga, Z 446 K, HERMLE Labortechnik GmbH, Njemačka
- Čitač mikrotitarskih pločica, Tecan, Švicarska
- Electrophoresis Power Supply EPS 3500, Pharmacia Biotech, Švedska

- Erlenmeyerove tikvice za uzgoj volumena 125 mL, Corning, SAD
- Filter za špricu, CHROMADIL® CA-20/25 (S), Macherey-Nagel, Njemačka
- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Hladnjak (-80 °C), DF 290, NUVE, Turska
- HPLC uređaj Agilent 1260 Infinity, Agilent Technologies, SAD
- HPLC uređaj Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS sustav, Agilent Technologies, SAD
- IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, SAD
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO<sub>2</sub>, Memmert, Njemačka
- Kolona AccQ-Tag for Hydrolysate Amino Acid Analysis, Waters, SAD
- Kolona Bio-Monolith Protein A, Agilent technologies, SAD
- Kolona BIO SEC-3 (4,6 mm × 300 mm), Agilent Technologies, SAD
- Kolona Synergy 4 μm Polar-RP 80Å LC, Phenomenex, SAD
- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Laboratorijska vaga, Boeco, Njemačka
- Liofilizator Alpha 1-2 LDplus, Martin Christ, Njemačka
- Mehanička pipeta P2, P20, P200, P1000, Gilson, SAD
- Membrana za dijalizu - SnakeSkin® Dialysis Tubing 10K MWCO, Thermo Scientific, SAD
- MF-Millipore® Membranski Filteri 0,22 μm, Sigma-Aldrich, Švicarska
- Mini-PROTEAN 2D Electrophoresis Cell, BIO-RAD, SAD
- Neubaerova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright - Line, Njemačka
- Ploče s 24 jažice, Corning, SAD
- Ploče s 96 jažica, Corning, SAD
- Serološke pipete 5 mL, 10 mL, 25 mL, LP Italiana, Italija
- SevenCompact pH/Ion, Mettler-Toledo, SAD
- sistem za vertikalnu elektroforezu Mini-PROTEAN 2D Electrophoresis Cell, Bio-Rad, SAD
- Spektrofotometar Thermo Scientific Genesys 10 S UV/VIS, SAD
- Stericup® Quick Release Durapore®, 0.22 μm PVDF sistem za sterilnu vakuum filtraciju, 500 mL, Merck, SAD
- Tresilica Biosan shaker PSU-10i, Biosan, Latvija

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

### 3.2. Metode

3.2.1. Postupak pripreve i karakterizacije hidrolizata proteina iz uljanih pogača lana i konoplje

#### 3.2.1.1. Određivanje topljivosti proteina

Uzorak brašna/proteinskog izolata uljane pogače dodan je u destiliranu vodu (5 % w/v) određene temperature. Topljivost proteina iz brašna lana i konoplje ispitana je pri temperaturama od 25 °C i 37 °C, dok je topljivost proteina u izolatu ispitana pri temperaturi 54 °C (Tablica 3). pH smjese podešen je u rasponu od 7,0 do 12,0 dodatkom 2 M NaOH te od 6,0 do 2,0 dodatkom 2 M HCl. Smjesa je, nakon što joj je podešen željeni pH, mješana na magnetskoj mješalici 20 minuta tijekom čega su vrijednosti temperature i pH održavane stalnim. Iz smjese je izuzet uzorak koji je centrifugiran (10 000 o min<sup>-1</sup>, 10 min). Koncentracija otopljenih proteina pri svakoj ispitanoj pH vrijednosti određena je iz supernatna metodom po Lowryu (Poglavlje 3.2.1.6.). Za određivanje ukupne koncentracije topljivih proteina u testiranim uzorcima, ponovljen je opisan postupak izuzev toga što je umjesto destilirane vode dodana 0,1 M otopina NaOH.

Topljivost proteina se izražava kao postotni omjer koncentracije otopljenih proteina u destiliranoj vodi u odnosu na ukupnu koncentraciju topljivih proteina u 0,1 M otopini NaOH pri testiranim uvjetima:

$$\text{Topljivost proteina (\%)} = \frac{\text{konc. otopljenih proteina u destiliranoj vodi}}{\text{ukupna konc. topljivih proteina u 0,1 M NaOH}} \times 100 \quad [1]$$

Tablica 3. Popis uzoraka čija se topljivost proteina ispitivala pri određenim temperaturama.

|   |                                                  |
|---|--------------------------------------------------|
| 1 | Brašno uljane pogače lana (25 °C)                |
| 2 | Brašno uljane pogače lana (37 °C)                |
| 3 | Proteinski izolat uljane pogače lana (54 °C)     |
| 4 | Brašno uljane pogače konoplje (25 °C)            |
| 5 | Brašno uljane pogače konoplje (37 °C)            |
| 6 | Proteinski izolat uljane pogače konoplje (54 °C) |

### 3.2.1.2. Izolacija proteina iz uljane pogače lana

Za pripremu proteinskog izolata lana prema protokolu Udenigwe i sur. (2009) korišteno je brašno uljane pogače lana. Brašno uljane pogače lana dodano je u deioniziranu vodu (5% w/v) temperature 37 °C nakon čega je pH vrijednost smjese podešena na 5,0 pomoću 2 M HCl. U smjesu je dodan enzim *Celulase* (1% w/v) kako bi započela hidroliza celuloze. Temperatura i pH vrijednost smjese su održavane stalnim. Nakon 4 sata mješanja na magnetskoj miješalici, smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu (21 °C) te je pH vrijednost smjese podešena na 10,0 pomoću 2 M NaOH. Smjesa je potom mješana 1h te centrifugirana (8000 × g, 30 min, 10 °C). Izuzetom supernatantu pH vrijednost je podešena na 4,0 pomoću 2 M NaOH. Nakon 30 min mješanja, smjesa je ponovno centrifugirana (8000 × g, 30 min, 10 °C) te je izdvojeni talog ispran sa zakiseljenom vodom (pH 4,0) i centrifugiran (8000 × g, 30 min, 10°C) dva puta. Dobiveni proteinski talog resuspendiran je u deioniziranoj vodi te nakon što je smjesa homogenizirana, podešena joj je pH vrijednost na 7,0 s 2 M NaOH. Prije liofilizacije, suspenzija je dijalizirana pomoću SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 10K MWCO tijekom noći na 4 °C. Odvagani proteinski izolati su nakon liofilizacije pohranjeni i čuvani na 4 °C do korištenja. Koncentracija proteinskog izolata lana određena je metodom po Lowryu.

### 3.2.1.3. Izolacija proteina iz uljane pogače konoplje

Proteini konoplje izolirani su prema protokolu Tang i sur. (2006) iz brašna uljane pogače konoplje. Izolacija proteina konoplje započela je dodavanjem brašna uljane pogače konoplje u destiliranu vodu (5% w/v) temperature 37°C te je pH vrijednost smjese podešena na 10,0 dodatkom 2 M NaOH. Smjesa je mješana na magnetnoj miješalici 1 sat nakon čega je centrifugirana (8000 × g, 1 h, 10 °C). Nastali talog je odbačen, a pH vrijednost supernatanta je podešena na 5,0 dodatkom 2 M HCl uz konstantno miješanje tijekom 30 minuta. Nakon toga smjesa je centrifugirana (8000 × g, 1 h, 10 °C) te je nastali talog resuspendiran i homogeniziran s dodatkom deionizirane vode. pH vrijednost suspenzije podešena je na 7,0 pomoću 2 M NaOH. Prije liofilizacije, suspenzija je dijalizirana pomoću SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 10K MWCO tijekom noći na 4 °C. Odvagani proteinski izolati su nakon liofilizacije pohranjeni i čuvani na 4 °C do korištenja. Koncentracija proteinskog izolata konoplje određena je metodom po Lowryu.

#### *3.2.1.4. Hidroliza proteinskih izolata iz uljanih pogača lana i konoplje*

Za dobivanje proteinskih hidrolizata lana/konoplje korištene su tri komercijalne mikrobne endopeptidaze: alkalaza, neutraza i protameks koje kataliziraju reakciju razgradnje proteina hidrolizom peptidne veze. Prije početka hidrolize osigurani su optimalni uvjeti temperature i pH vrijednosti za djelovanje enzima. Za alkalazu optimalni uvjeti su pH 8,5 i 55 °C, neutrazi pH 7,0 i 55 °C i protameks pH 7,7 i 50 °C.

Liofilizirani proteinski izolat lana/konoplje otopljen je u destiliranoj vodi 5% (w/v), a nakon što su podešeni optimalni uvjeti smjese za pojedini enzim, dodano je 5% (v/w) enzima prema supstratu. Hidroliza je provedena tijekom 240 minuta. Neposredno prije dodatka enzima (0 min) i za vrijeme trajanja hidrolize (10, 60 i 240 min) uzeti su uzorci radi praćenja dinamike i stupnja hidrolize. Nakon uzimanja uzorka, a s ciljem zaustavljanja reakcije, enzimi su deaktivirani uranjanjem uzorka u vodu temperature 100°C na 10 minuta. Po završetku hidrolize, smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu radi podešavanja pH vrijednosti na 7,4 dodatkom 1 M NaOH ili 1 M HCl. Smjesa je potom centrifugirana na  $7500 \times g$  tijekom 30 minuta kako bi se otklonili netopivi ostaci. Dobiveni supernatant je steriliziran propuštanjem kroz filter pora veličine 0,22  $\mu\text{m}$  te spremljen na -80 °C. Koncentracija proteina u sterilnom hidrolizatu određena je metodom po Lowry-u.

#### *3.2.1.5. Postupak frakcioniranja pripremljenih proteinskih hidrolizata lana i konoplje*

Proces frakcioniranja pripremljenih proteinskih hidrolizata proveden je radi dobivanja peptida veličina manjih od 10 kDa i 1 kDa. Dio smjese ukupnih hidrolizata, dobivenih nakon enzimske reakcije alkalaze, neutraze i protameksa, je sačuvan, dok je preostali volumen frakcioniran pomoću Amicon® tuba za ultracentrifugiranje s filterima veličine pora 50 kDa centrifugiranjem na  $4500 \times g$  u periodima od 15 minuta. Nakon što je dobiven maksimalni mogući volumen frakcije peptida manjih od 50 kDa, smjesa je dalje centrifugirana na jednak način koristeći Amicon® tube za ultracentrifugiranje s filterima veličine pora 10 kDa. Dio dobivene frakcije peptida manjih od 10 kDa sačuvan je, dok je drugi dio korišten za dobivanje peptidnih frakcija veličina manjih od 1 kDa. Da bi se dobile frakcije peptida manje od 1 kDa, korišten je Amicon® Stirred Cell, uređaj za filtraciju pod tlakom (4,5 bar) te filter veličine pora 1 kDa. Koncentracija proteina u dobivenim frakcijama određena je metodom po Lowry-u.

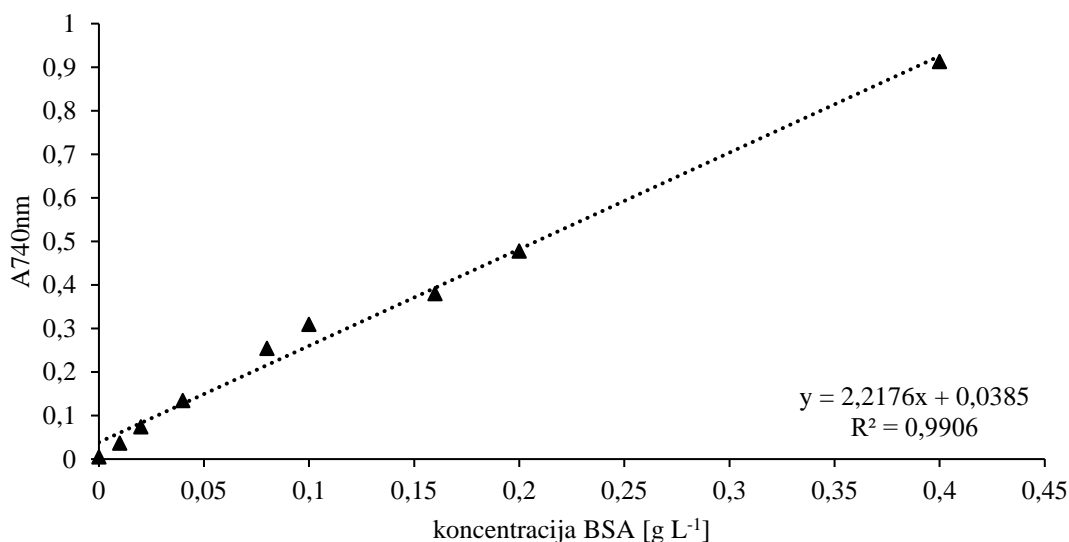


Dobivene frakcije peptida manjih od 10 kDa i 1 kDa su ukoncentrirane na način da su raspodijeljene u Petrijeve zdjelice nakon čega su smrznute na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 4 h te liofilizirane. Dobiveni liofilizati su homogenizirani u izračunatim volumenima vode visoke kvalitete kako bi se dobile željene koncentracije peptida ( $\sim 70\text{ g L}^{-1}$ ). Nakon što su liofilizati homogenizirani, sterilno su filtrirani pomoću filtera veličine pora  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  te spremljeni na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Koncentracija proteina u ukoncentriranim frakcijama određena je metodom po Lowry-u.

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

U epruvetu je otpipetirano  $1000\text{ }\mu\text{L}$  Reagensa C i  $200\text{ }\mu\text{L}$  uzorka kojem želimo odrediti koncentraciju proteina. Smjesa je promješana na vrtložnoj mješalici te inkubirana 15 min na sobnoj temperaturi. Zatim je u epruvetu naglo dodano  $100\text{ }\mu\text{L}$  smjese Folin-Ciocalteu reagensa i destilirane vode (omjer 1:2) uz neprekidno mješanje na vrtložnoj mješalici. Reakcijska smjesa je inkubirana 45 min na sobnoj temperaturi u mraku. Po završetku inkubacije, apsorbancija uzorka je očitana na spektrofotometru pri valjnoj duljini od  $740\text{ nm}$ . Kao slijepa proba korištena je destilirana voda.

Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija izračunate su koncentracije proteina u pojedinim uzorcima pomoću jednadžbe baždarnog pravca (Slika 3). Baždarni pravac dobiven je mjerenjem apsorbancija 8 standardnih otopina, poznatih koncentracija u rasponu  $0-0,4\text{ g L}^{-1}$ , dobivenih iz ishodišne otopine BSA,  $\gamma(\text{BSA}) = 1\text{ g L}^{-1}$ .



Slika 3. Baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri  $740\text{ nm}$  o koncentraciji proteina BSA.

### 3.2.1.7. Određivanje stupnja hidrolize

Prije određivanja stupnja hidrolize, uzorak proteinski hidrolizat je centrifugiran na  $10000 \times g$ , 5 min. Alikvot proteinskog hidrolizata pomiješan je s 0,44 M otopinom trikloroetene kiseline (TCA) u omjeru 1:1 (v/v). Smjesa je inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi nakon čega je slijedilo centrifugiranje 10 min pri  $10000 \times g$ . Koncentracija otopljenih proteina u 0,22 M TCA kao i koncentracija ukupnih proteina u uzorku hidrolizata određena je metodom po Lowryu (poglavlje 3.2.1.6.). Stupanj hidrolize predstavlja postotni udio koncentracije otopljenih proteina u 0,22 M otopini trikloroetene kiseline u odnosu na koncentraciju ukupnih proteina u hidrolizatu [2].

$$\text{Stupanj hidrolize (\%)} = \frac{\text{koncentracija topljivih proteina (g L}^{-1}\text{) u 0,22 M TCA}}{\text{koncentracija ukupnih proteina (g L}^{-1}\text{) u hidrolizatu}} \times 100 \quad [2]$$

### 3.2.1.8. SDS-PAGE

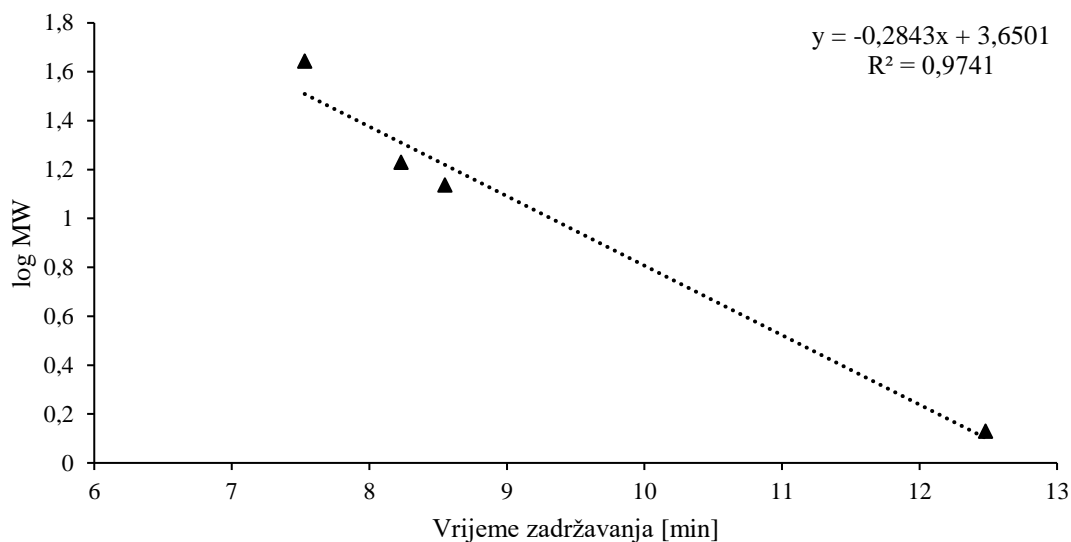
Prije početka elektroforeze, uzorci su centrifugirani ( $7000 \times g$ , 10 min) te po potrebi razrijeđeni destiliranom vodom. 12  $\mu\text{L}$  uzorka pomiješano je s 3  $\mu\text{L}$  5  $\times$  Laemmlijevog pufera za uzorke nakon čega je smjesa 3 minute grijana u vodenoj kupelji ( $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Za elektroforezu su korišteni 4–20% Mini-PROTEAN® TGX gel (BIO-RAD, SAD), Mini-PROTEAN 2D Electrophoresis Cell (BIO-RAD, SAD) i Electrophoresis Power Supply EPS 3500 (Pharmacia Biotech, Švedska). Spremnik i prostor između gelova napunjeni su 1x puferom za elektroforezu. U jednu jažicu dodano je 5  $\mu\text{L}$  proteinskog standarda (ProSieve™ QuadColor™ Protein Marker), dok je u ostale jažice nanoseno 10  $\mu\text{L}$  denaturiranih uzoraka. U prazne jažice dodano je 3  $\mu\text{L}$  5  $\times$  Laemmlijevog pufera za uzorke. Elektroforeza je provedena pri naponu od 180 V u trajanju od 50 minuta. Po završetku, gel je obojan otopinom Coomassie plavo tijekom jednog sata, a odbojavanje gelova je provedeno pomoću 7 %-tne otopine octene kiseline.

### 3.2.1.9. Kromatografija isključenjem po veličini

Za uvid u raspodjelu veličina peptida u uzorcima nakon hidrolize provedena je kromatografija isključenjem po veličini (engl. *Size Exclusion Chromatography*, SEC) na uređaju Agilent 1260 Infinity HPLC sa sakupljačem frakcija. Korištena je Agilent Technologies BIO SEC-3 kolona ( $4,6 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$ ) te je valna duljina detektora podešena na 215 nm. Kao mobilna otopina korišten je 150 mM natrijev dihidrogenfosfat dihidrat ( $\text{pH} = 7,0$ ), protoka  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ .

Za izradu kalibracijskog pravca korištena je mješavina standardnih proteina (BioRad Gel Filtration Standards) i ribonukleaza A (RNAza A) poznatih molekulskih

masa: ovalbumin (MW = 44 kDa), mioglobin (MW = 17 kDa), RNAza A (MW = 13,7 kDa) i vitamin B12 (MW = 1,35 kDa). Prema dobivenim rezultatima SEC-a standarada konstruiran je baždarni pravac koji prikazuje ovisnost logaritma molekulske mase proteina (log MW) o vremenu zadržavanja. Baždarni pravac s pripadajućom jednadžbom prikazan je na slici 4.



Slika 4. Baždarni pravac ovisnosti logaritma molekulske mase o vremenu zadržavanja.

Uzorci su razrijeđeni 10x mobilnom otopinom, centrifugirani 10 min na  $10000 \times g$  pri  $5^\circ\text{C}$  te prebačeni u viala s insertom. Volumen injektiranja uzoraka iznosio je  $5 \mu\text{L}$ , a standarada  $1 \mu\text{L}$ . U skladu sa željenim rasponima masa ( $<1 \text{ kDa}$ ,  $1\text{-}10 \text{ kDa}$ ,  $>10 \text{ kDa}$ ) izračunata su vremena zadržavanja prema kojima su integrirani kromatogrami. Tako integriranim kromatogramima određena je površina, tj. udio (%) odabranih raspona masa.

#### 3.2.1.10. Određivanje antioksidacijskog potencijala proteinskih hidrolizata lana i konoplje metodom ORAC

Uzorci za mjerenja pripremljeni su tako da je u kivete za mjerenje dodano 2,25 mL otopine fluoresceina i 0,375 mL uzoraka proteinskih hidrolizata lana/konoplje. Zbog visoke koncentracije proteina, hidrolizati su po potrebi razrijeđeni. Kivete su termostahirane na  $37^\circ\text{C}$  tijekom 30 minuta. Potom je dodano 0,375 mL otopine AAPH te je provedeno mjerenje fluorescencije pomoću Cary Eclipse Fluorescence Spectrofotometra pri  $37^\circ\text{C}$  tijekom 30 minuta. Valna duljina ekscitacije iznosila je 485 nm, a valna duljina emisije 520 nm. Standard je pripremljena na isti način, uz iznimku da je umjesto 0,375 mL uzorka dodano 0,375 mL  $50 \mu\text{M}$  Trolox-a. Za pripremu slijepe

probe, u kivetu za mjerenje dodano je 0,375 mL fosfatnog pufera (0,075 M) umjesto uzorka.

Relativna se ORAC vrijednost računa prema sljedećim formulama:

$$AUC = 0,5 + \left(\frac{R2}{R1}\right) + \left(\frac{R3}{R1}\right) + \dots + \left(\frac{Rn}{R1}\right) \quad [3]$$

*Relativna ORAC vrijednost=*

$$\left(\frac{AUC_u - AUC_{sp}}{AUC_{trx} - AUC_{sp}}\right) \times k \times \alpha \times h \text{ [\mu M Trolox ekvivalent g}^{-1} \text{ uzorka]} \quad [4]$$

Pri čemu je:

- AUC<sub>u</sub> = antioksidacijski kapacitet uzorka
- AUC<sub>sp</sub> = antioksidacijski kapacitet slijepa probe
- AUC<sub>trx</sub> = antioksidacijski kapacitet Troloxa
- k = faktor razrijeđenja
- α = molarna koncentracija Troloxa

$$- h = \frac{V_{ekstrakt}}{g_{uzorka}} \quad [5]$$

Dobivene vrijednosti apsorbancije uzorka zatim su preračunate u relativne apsorbancije dijeljenjem svake dobivene vrijednosti s onom početnom. Suma relativnih vrijednosti apsorbancija zbrojena je sa 0,5 te je kao rezultat dobivena vrijednost antioksidacijskog kapaciteta uzorka (AUC vrijednost) koja je korištena prilikom izračuna relativne vrijednosti ORAC.

### 3.2.1.11. Određivanje slobodnih aminokiselina u proteinskim hidrolizatima lana i konoplje

Koncentracija slobodnih aminokiselina određena je pomoću sustava Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS. Za separaciju korištena je kolona Synergy 4 μm Polar-RP 80Å LC Column. Pripremljena je komercijalna mješavina standarada u rasponu 0,1-10 pmol za izradu baždarnih pravaca. Uzorci su razrijeđeni na koncentraciju 1 mg mL<sup>-1</sup> te su pomješani s metanolom u omjeru 1:5 (v/v). Nakon sat vremena inkubacije pri -20 °C, uzorci su centrifugirani 10 min i 10 000 o min<sup>-1</sup>, 8 °C. U 49 μL 0,1% mravlje kiseline dodano je 1 μL supernatanta te je smjesa promiješana. Tako pripravljeni uzorak analiziran

je metodom praćenja višestrukih reakcija, (engl. *Multiple Reaction Monitoring, MRM*) koristeći parametre prikazane u tablici 4. Volumen injektiranja iznosio je 20  $\mu\text{L}$  za uzorke i 1  $\mu\text{L}$  za standarde. Mobilne faze korištene tijekom analize su bile 0,1% mravlja kiselina u vodi te 0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu. Gradijentalno ispiranje opisano je u tablici 5. Protok mobilne faze iznosio je 0,4  $\text{mL min}^{-1}$  tijekom cijele analize. Uvjeti ionskog izvora bili su postavljeni kako slijedi: temperatura plina 250  $^{\circ}\text{C}$ , protok plina 7  $\text{L min}^{-1}$ , tlak nebulizer 25 psi, temperatura engl. *Sheat Gas Heater* 300  $^{\circ}\text{C}$ , protok engl. *Sheat Gas Flow* 10  $\text{L min}^{-1}$ , voltaža kapilare 2500V. Cistein i triptofan se ne određuju pomoću ove metode. Limit detekcije u analizi je 0,05 pmol. Aminokiseline čije su vrijednosti ispod limita detekcije označene su s <RL.

Tablica 4. Lista tranzicija i retencijskih vremena (RT) korištenih za analizu i kvantifikaciju slobodnih aminokiselina (AK).

| AK  | Precursor ion (Da) | Fragment ion (Da) | Dwell | Fragmentor (V) | CE (V) | Polarnost | RT   |
|-----|--------------------|-------------------|-------|----------------|--------|-----------|------|
| Cys | 241,2              | 152,1             | 20    | 70             | 8      | Pozitiv   | 4,1  |
| Tyr | 182,1              | 165,2             | 20    | 60             | 4      | Pozitiv   | 6,7  |
| Arg | 175,2              | 70,0              | 20    | 70             | 24     | Pozitiv   | 3,9  |
| Phe | 166,1              | 103,0             | 20    | 60             | 30     | Pozitiv   | 10,0 |
| His | 156,1              | 110,0             | 20    | 80             | 10     | Pozitiv   | 3,9  |
| Met | 150,2              | 104,0             | 20    | 70             | 4      | Pozitiv   | 5,7  |
| Glu | 148,1              | 84,0              | 20    | 60             | 14     | Pozitiv   | 4,3  |
| Lys | 147,1              | 84,0              | 20    | 60             | 14     | Pozitiv   | 3,7  |
| Asp | 134,1              | 74,0              | 20    | 60             | 10     | Pozitiv   | 4,2  |
| Leu | 132,1              | 86,0              | 20    | 60             | 6      | Pozitiv   | 6,2  |
| Ile | 132,1              | 69,0              | 20    | 60             | 14     | Pozitiv   | 6,1  |
| Thr | 120,1              | 103,2             | 20    | 140            | 16     | Pozitiv   | 10,0 |
| Val | 118,1              | 55,0              | 20    | 70             | 20     | Pozitiv   | 4,9  |
| Pro | 116,1              | 70,0              | 20    | 90             | 14     | Pozitiv   | 4,7  |
| Ser | 106,1              | 60,0              | 20    | 110            | 8      | Pozitiv   | 4,1  |
| Ala | 90,1               | 44,0              | 20    | 50             | 8      | Pozitiv   | 4,2  |
| Gly | 76,1               | 30,0              | 20    | 50             | 4      | Pozitiv   | 4,1  |

Tablica 5. Gradijent mobilnih faza A (mqH<sub>2</sub>O + 0,1% mravlja kiselina) i B (acetonitril + 0,1% mravlje kiseline) tijekom analize slobodnih aminokiselina.

| Vrijeme (min) | A (%) | B (%) | Protok (mL min <sup>-1</sup> ) |
|---------------|-------|-------|--------------------------------|
| 1,0           | 98    | 2     | 0,4                            |
| 7,0           | 93    | 7     | 0,4                            |
| 9,0           | 20    | 80    | 0,4                            |
| 10,0          | 20    | 80    | 0,4                            |
| 10,1          | 98    | 2     | 0,4                            |
| 15,0          | 98    | 2     | 0,4                            |

### 3.2.1.12. Određivanje ukupnih aminokiselina u proteinskim hidrolizatima lana i konoplje

Koncentracija ukupnih aminokiselina u proteinskim hidrolizatima lana i konoplje određena je pomoću uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) Agilent Technologies 1260 Infinity. Priprema i analiza uzoraka i standarada provedena je po protokolu Waters AccQ-Tag Chemistry Package kako slijedi. Uzorci supernatanta su razrijeđeni tako da količina proteina iznosi 1 µg. Pripremljena je 6 M otopina HCl s 3% (w/v) fenola. 10 µL pripremljenog uzorka je pomješano s 190 µL pripremljene 6 M HCl s 3% (w/v) fenola te je epruveta 3x vakumirana s dušikom. Uzorci su potom hidrolizirani u termobloku pri 114 °C tijekom 24 h. Nakon završetka hidrolize, uzorci su osušeni u vakuum centrifugi te potom resuspendirani dodatkom 20 µL 20 mM otopine HCl uz konstantno mješanje. S ciljem derivatizacije, uzorcima je dodano 60 µL AccQ-Tag Borat pufera te su epruvete promješane. Potom je dodano i 20 µL AccQ-Tag Fluor reagensa uz konstantno mješanje tijekom nekoliko sekundi. Uzorci su inkubirani tijekom 10 minuta pri 55 °C. Separacija i analiza aminokiselina provedena je na koloni AccQ-Tag for Hydrolysate Amino Acid Analysis, 3,9 x 150 mm. Volumen injektiranja iznosio je 1 µL. Kao mobilne faze korišteni su AccQ-Tag pufer i 60%-tni acetonitril u mqH<sub>2</sub>O pri protoku od 1 mL min<sup>-1</sup> (Tablica 6). Ukupno trajanje analize iznosilo je 52 min. Prisutne aminokiseline detektirane su pomoću fluorescentnog detektora pri valnoj duljini ekscitacije od 250 nm te valnoj duljini emisije od 395 nm. Cistein i triptofan se ne mogu odrediti pomoću ove metode.

Tablica 6. Gradijent mobilnih faza A (AccQ-Tag pufer) i B (60%-tni acetonitril) tijekom analize ukupnih aminokiselina.

| Vrijeme (min) | A (%) | B (%) |
|---------------|-------|-------|
| 0,00          | 98,0  | 2,0   |
| 0,50          | 98,0  | 2,0   |
| 15,00         | 93,0  | 7,0   |
| 19,00         | 90,0  | 10,0  |
| 28,00         | 74,0  | 26,0  |
| 35,00         | 67,0  | 33,0  |
| 36,00         | 67,0  | 33,0  |
| 37,00         | 0,0   | 100,0 |
| 45,00         | 0,0   | 100,0 |
| 46,00         | 98,0  | 2,0   |
| 52,00         | 98,0  | 2,0   |

### 3.2.2. Ispitivanje učinka proteinskog hidrolizata u hranjivom mediju na tehnološki značajnim staničnim linijama

#### 3.2.2.1. Uzgoj adherentnih staničnih linija (*CHO DP-12*, *HEK293T*, *HeLa*, *HaCaT*)

Ampula sa zamrznutim stanicama (1 mL) u koncentraciji od  $5 \times 10^6$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  odmrznuta je naglim uranjanjem u vodenu kupelj na 37 °C. Sadržaj ampule dodan je u Petrijevu zdjelicu s hranjivim medijem. Za uzgoj adherentnih stanica korišten je hranjivi medij DMEM u koji su, ovisno o korištenoj staničnoj liniji, dodane komponente potrebne za njihov optimalan rast (Poglavlje 3.1.3). Nakon 24 h uzgoja, iz Petrijeve zdjelice uklonjen je hranjivi medij te zamijenjen svježim s ciljem odstranjivanja neprihvaćenih stanica te ostataka medija za smrzavanje koji sadrži po stanice štetnu komponentu dimetil sulfoksid (DMSO).

Pod svjetlosnim mikroskopom svakodnevno se vršila provjera morfologije stanica, njihove konfluentnosti te općeg stanja kulture. Stanice su uzgajane u Petrijevoj zdjelicu do konfluentnosti od 70-90% nakon čega su subkultivirane (precjepljene). Subkultiviranje je provedeno otprilike svaka 4 dana, tj. ovisno o brzini rasta pojedine stanične kulture.

#### 3.2.2.2. Određivanje učinka hidrolizata proteina lana i konoplje na proliferaciju *HeLa* i *HaCaT* staničnih linija metodom MTS

*HeLa* i *HaCaT* stanice naciepljene su u ploču s 96 jažica, radnog volumena 100  $\mu\text{L}$ , u koncentraciji  $5 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  u mediju DMEM. Nakon 24 h uzgoja, stanice su tretirane proteinskim hidrolizatima lana i konoplje u koncentracijama 1  $\text{g L}^{-1}$ , 2  $\text{g L}^{-1}$ , 5  $\text{g L}^{-1}$ .

L<sup>-1</sup> i 10 g L<sup>-1</sup> (Tablica 7). 72 h nakon tretmana, u svaku je jažicu dodano 10 µL MTS-a. Tijekom 4h inkubacije, žive stanice su konvertirale MTS u ljubičasto obojeni formazan. Količina formazana određena je mjerenjem apsorbancije pri 492 nm na čitaču ploča te je direktno proporcionalna broju živih stanica u kulturi. Viabilnost stanica izražena je kao postotni udio apsorbancije tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrolnih stanica.

$$vijabilnost (\%) = \frac{A_{492} tretiranih stanica}{A_{492} kontrolnih stanica} \times 100 \quad [6]$$

Tablica 7. Popis koncentracija hidrolizata proteina lana i konoplje u mediju DMEM s ciljem ispitivanja njihovog učinka na proliferaciju HeLa i HaCaT staničnih linija.

| Testirani hidrolizati                                  | Kratice | Testirane koncentracije                                                                   |
|--------------------------------------------------------|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hidrolizat proteina lana dobiven enzimom alkalaza      | HLA     | 1 g L <sup>-1</sup><br>2 g L <sup>-1</sup><br>5 g L <sup>-1</sup><br>10 g L <sup>-1</sup> |
| Hidrolizat proteina lana dobiven enzimom neutraza      | HLN     |                                                                                           |
| Hidrolizat proteina lana dobiven enzimom protameks     | HLP     |                                                                                           |
| Hidrolizat proteina konoplje dobiven enzimom alkalaza  | HKA     |                                                                                           |
| Hidrolizat proteina konoplje dobiven enzimom neutraza  | HKN     |                                                                                           |
| Hidrolizat proteina konoplje dobiven enzimom protameks | HKP     |                                                                                           |

### 3.2.2.3. Određivanje učinka proteinskih hidrolizata lana i konoplje na inducirani oksidacijski stres u HeLa i HaCaT stanicama metodom DCF-DA

HeLa i HaCaT stanice nacjepljene su u ploču s 96 jažica s crnim dnom, radnog volumena 100 µL, u koncentraciji 1×10<sup>5</sup> stanica mL<sup>-1</sup>. 24 h od nacjepljivanja, stanice su tretirane s HLA i HKN u koncentracijama 0,5, 1 i 2 g L<sup>-1</sup>. Nakon što je od tretmana prošlo 20 h, oksidacijski stres u stanicama induciran je dodatkom 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kroz 4 h. Stanice su potom isprane PBS-om nakon čega je dodano 100 µL 50 µM DCF-DA u svaku jažicu. Ploča s jažicama inkubirana je u mraku na 37 °C tijekom 30 min te je nastanak reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) određen mjerenjem fluorescencije pomoću Cary Eclipse Fluorescence Spectrofotometra s čitačem mikrotitarskih ploča pri valnoj duljini ekscitacije od 485±10 nm i valnoj duljini emisije od 530±12 nm.



#### *3.2.2.4. Uzgoj adherentnih CHO DP-12 i HEK293T staničnih linija u mediju s dodatkom proteinskog hidrolizata lana ili konoplje*

Kako bi se ispitaio učinak proteinskih hidrolizata na rast i produktivnost stanica, stanice prethodno uzgajane u Petrijevoj zdjelici (Poglavlje 3.2.2.1.) naciepljene su u koncentraciji  $2,5 \times 10^4$  st  $\text{mL}^{-1}$  u ploče s 24 jažice radnog volumena  $500 \mu\text{L}$ . Uobičajena koncentracija proteina dodanih serumom u hranjivi medij iznosi  $5 \text{ g L}^{-1}$ . Kako se ne bi prekoračila standardna količina proteina te time dovelo do zasićenja stanične kulture određenim komponentama, stanice su uzgajane u mediju DMEM s dodatkom  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  FBS te  $0,5$  ili  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  proteinskog hidrolizata lana/konoplje. Stanice uzgajane u mediju DMEM s  $2,5$  i  $5 \text{ g L}^{-1}$  FBS, bez dodatka hidrolizata, služile su kao kontrole. Testirani sastavi medija prikazani su u tablici 8. Stanice su, u danim uvjetima, uzgajane do ulaska u fazu odmiranja.

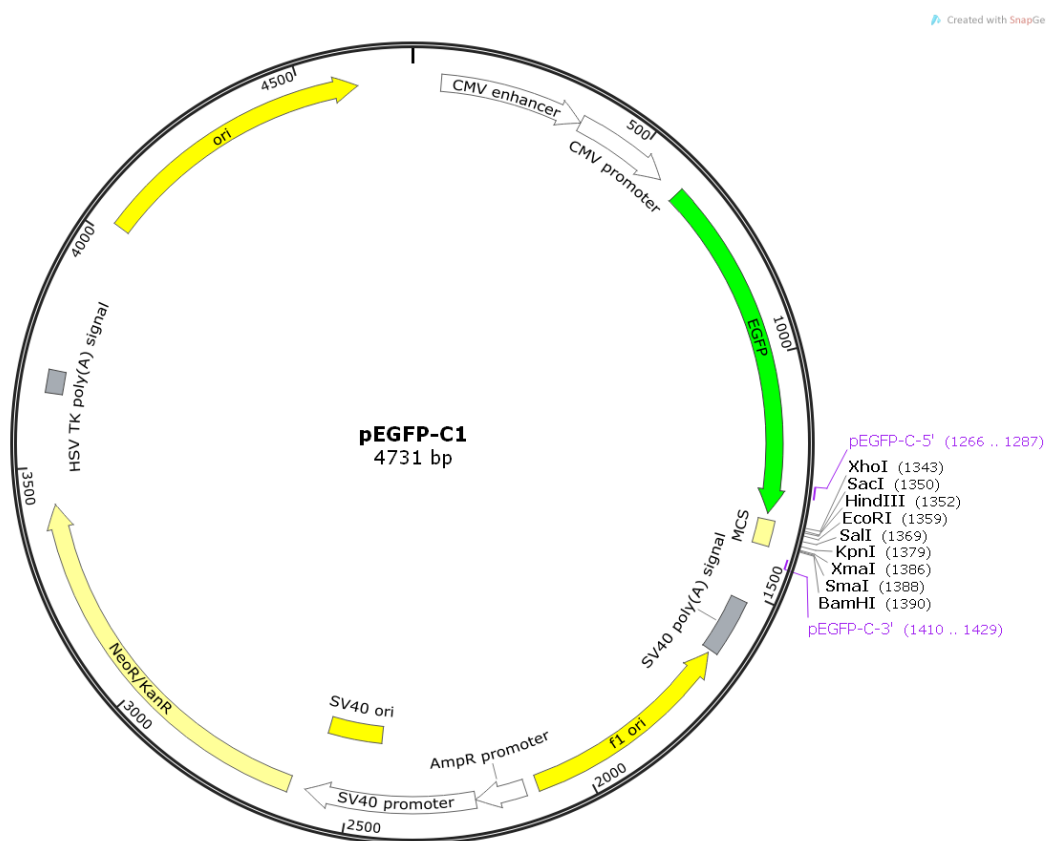
Provjera morfologije stanica te općeg stanja kulture obavljena je pomoću svjetlosnog mikroskopa. Tijekom uzgoja svakodnevno je praćen rast kulture brojanjem stanica pomoću metode tripan-plavo (Poglavlje 3.2.2.8.). Alikvoti korištenog medija su izuzeti te su nakon centrifugiranja ( $5000 \times g$ , 5 min) spremljeni na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  radi daljnjih analiza. Sakupljenim alikvotima određena je koncentracija glukoze (Poglavlje 3.2.2.9.) i laktata (Poglavlje 3.2.2.10.). Koncentracija rekombinantnog IgG, proizvedenog pomoću CHO DP-12 stanica, u uzorcima medija izuzetih zadnjeg dana uzgoja, određena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (Poglavlje 3.2.2.12.).

Tablica 8. Prikaz sastava medija za uzgoj CHO DP-12 i HEK293T stanične linije

| <b>Dodaci hranjivom mediju DMEM</b>                                                            |                       |                                                                                                    |                       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>LAN</b>                                                                                     | <b>Kratica medija</b> | <b>KONOPLJA</b>                                                                                    | <b>Kratica medija</b> |
| 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 2,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata lana dobivenog enzimom alkalaza  | ALA1                  | 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 2,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata konoplje dobivenog enzimom alkalaza  | AKA1                  |
| 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 0,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata lana dobivenog enzimom alkalaza  | ALA2                  | 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 0,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata konoplje dobivenog enzimom alkalaza  | AKA2                  |
| 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 2,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata lana dobivenog enzimom neutraza  | ALN1                  | 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 2,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata konoplje dobivenog enzimom neutraza  | AKN1                  |
| 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 0,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata lana dobivenog enzimom neutraza  | ALN2                  | 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 0,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata konoplje dobivenog enzimom neutraza  | AKN2                  |
| 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 2,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata lana dobivenog enzimom protameks | ALP1                  | 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 2,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata konoplje dobivenog enzimom protameks | AKP1                  |
| 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 0,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata lana dobivenog enzimom protameks | ALP2                  | 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 0,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata konoplje dobivenog enzimom protameks | AKP2                  |
| 5,0 g L <sup>-1</sup> FBS                                                                      | ALC1                  | 5,0 g L <sup>-1</sup> FBS                                                                          | AKC1                  |
| 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS                                                                      | ALC2                  | 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS                                                                          | AKC2                  |

### 3.2.2.5. Transfekcija HEK293T stanične linije plazmidom pEGFP-C1

HEK293T stanice naciepljene su u koncentraciji  $1,5 \times 10^5$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  u ploče s 24 jažice radnog volumena  $500 \mu\text{L}$ . Stanice su uzgajane u mediju DMEM s  $5 \text{ g L}^{-1}$  FBS te bez dodatka antibiotika. Nakon 24 h, odnosno nakon što su se stanice prihvatile za podlogu, zamijenjen je medij u jažicama s medijem DMEM u koji je dodano  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  FBS te hidrolizat lana/konoplje u koncentraciji  $0,5$  ili  $2,5 \text{ g L}^{-1}$ . Pripravljene mediji u kojima se željela testirati učinkovitost transfekcije HEK293T stanica plazmidom pEGFP-C1 (Slika 5), pomoću *FuGene 6* transfekcijskog sredstva (kationski lipid), prikazani su u tablici 9. Stanice transfecirane u medijima DMEM s  $2,5$  i  $5 \text{ g L}^{-1}$  FBS, bez dodatka hidrolizata, predstavljale su kontrole.



Slika 5. Mapa plazmida pEGFP-C1 s ozančenim dijelovima ključnim za njegovo umnožavanje i ekspresiju EGFP gena (Anonymus 3, 2022).

Tablica 9. Prikaz sastava medija korištenih pri transfekciji HEK293T stanične linije

| <b>Dodaci hranjivom mediju DMEM</b>                                                            |                       |                                                                                                    |                       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>LAN</b>                                                                                     | <b>Kratica medija</b> | <b>KONOPLJA</b>                                                                                    | <b>Kratica medija</b> |
| 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 0,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata lana dobivenog enzimom alkalaza  | ALA2                  | 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 0,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata konoplje dobivenog enzimom alkalaza  | AKA2                  |
| 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 2,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata lana dobivenog enzimom neutraza  | ALN1                  | 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 2,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata konoplje dobivenog enzimom neutraza  | AKN1                  |
| 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 0,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata lana dobivenog enzimom neutraza  | ALN2                  | 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 0,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata konoplje dobivenog enzimom neutraza  | AKN2                  |
| 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 0,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata lana dobivenog enzimom protameks | ALP2                  | 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS + 0,5 g L <sup>-1</sup> hidrolizata konoplje dobivenog enzimom protameks | AKP2                  |
| 5,0 g L <sup>-1</sup> FBS                                                                      | ALC1                  | 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS                                                                          | AKC1                  |
| 2,5 g L <sup>-1</sup> FBS                                                                      | ALC2                  | 5,0 g L <sup>-1</sup> FBS                                                                          | AKC2                  |

Nakon što su stanice u testiranom mediju bile 6 sati, u svaku jažicu dodano je 50 µL transfekcijske smjese s 0,5 µg plazmida pEGFP-C1. Za pripremu transfekcijske smjese u otopinu PBS-a dodano je transfekcijsko sredstvo *FuGene6*. Smjesa PBS-*FuGene6* je resuspendirana i inkubirana 5 min na sobnoj temepraturi. Dodatkom DNA (C<sub>plazmid pEGFP-C1</sub>=0,65 µg µL<sup>-1</sup>) u PBS-*FuGene6* smjesu, pripravljena je transfekcijska smjesa koja je resuspendirana i inkubirana 15 min na sobnoj temperaturi prije dodatka u jažice. Ispitani su sljedeći omjeri DNA i transfekcijskog sredstva (T.S.) na učinkovitost transfekcije:

1. DNA (µg) : T.S. (µL) = 1 : 2
2. DNA (µg) : T.S. (µL) = 1 : 4
3. DNA (µg) : T.S. (µL) = 1 : 6
4. DNA (µg) : T.S. (µL) = 1 : 8

Nakon prvih 24 h od početka transfekcije, jažice su ponovno ispražnjene te su u njih dodani testirani mediji bez transfekcijske smjese. Po završetku drugih 24 h, učinkovitost transfekcije izmjerena je pomoću uređaja CellDrop-FL. Učinkovita transfekcija smatra se ona u kojoj je HEK293T stanična linija uspješno transfecirana plazmidom pEGFP-C1 te u kojoj je došlo do ekspresije transgena čije je koncentracije moguće kvantificirati.

#### *3.2.2.6. Uzgoj suspenzijskih CHO DP-12-S stanica*

Ampula sa zamrznutim stanicama (1 mL), u koncentraciji od  $1 \times 10^7$  stanica  $\text{mL}^{-1}$ , odmrznuta je naglim uranjanjem u vodenu kupelj na 37 °C. Odmrznuta stanična suspenzija inokulirana je u Erlenmeyerovu tikvicu za uzgoj volumena 125 mL s hranjivim medijem. Za uzgoj CHO DP-12-S stanica korišten je medij PowerCHO<sup>®</sup>-2 CD s dodatkom komponenti potrebnih za njihov učinkoviti rast i produktivnost (Poglavlje 3.1.3.2.). Nakon što su stanice dostigle koncentraciju  $2,5\text{-}3,5 \times 10^6$  stanica  $\text{mL}^{-1}$ , precjepljene su na početnu koncentraciju  $2,5 \times 10^5$  stanica  $\text{mL}^{-1}$ . CHO-DP-12-S stanice subkultivirane su otprilike svaka 4 dana, ovisno o brzini rasta i stanju stanica.

#### *3.2.2.7. Uzgoj CHO DP-12-S stanične linije u mediju s dodatkom proteinskih hidrolizata i peptidnih frakcija lana ili konoplje*

U Erlenmeyerovu tikvicu za uzgoj volumena 125 mL nacjepljene su CHO DP-12-S stanice (Poglavlje 3.2.2.6.) u koncentraciji  $2,5 \times 10^5$  stanica  $\text{mL}^{-1}$ . Stanice su uzgajane u mediju PowerCHO<sup>®</sup>-2 CD s dodatkom proteinskih hidrolizata i peptidnih frakcija lana/konoplje u koncentracijama  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  i  $2 \text{ g L}^{-1}$ . U kontrolnoj tikvici stanice su uzgajane u mediju bez dodatka proteinskog hidrolizata i peptidnih frakcija. Testirani sastavi medija prikazani su u tablici 10. Uzgoj je prekinut nakon što su stanice počele odumirati, odnosno kada je vijabilnost kulture pala ispod 80 %.

Alikvot suspenzije stanica svakodnevno je uziman te je praćena koncentracija i vijabilnost kulture metodom tripan-plavo (Poglavlje 3.2.2.8.). Nakon centrifugiranja alikvota ( $5000 \times \text{g}$ , 5 min), supernatant je čuvan za daljne analize na -20 °C. Koncentracije glukoze (Poglavlje 3.2.2.9.), laktata (Poglavlje 3.2.2.10.) i amonijaka (Poglavlje 3.2.2.11.) izmjerena su u sakupljenim alikvotima hranjivog medija. Sastav slobodnih aminokiselina u suspenziji na početku i na kraju uzgoja određen je pomoću HPLC uređaja (Poglavlje 3.2.1.11.). Ukupna koncentracija proizvedenog rekombinantnog monoklonskog protutijela IgG izmjerena je iz alikvota, izuzetog zadnjeg dana uzgoja, tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (Poglavlje 3.2.2.12.).

Tablica 10. Popis testiranih hidrolizata proteina lana i konoplje te njihovih peptidnih frakcija dodanih mediju PowerCHO®-2 CD.

| <b>Dodatak mediju PowerCHO®-2 CD</b>                                                                                |                       |                                                                                                                         |                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>LAN</b>                                                                                                          | <b>Kratica medija</b> | <b>KONOPLJA</b>                                                                                                         | <b>Kratica medija</b> |
| Ukupan hidrolizat lana dobiven enzimom alkalaza u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>                              | <b>SLA1</b>           | Ukupan hidrolizat konoplje dobiven enzimom alkalaza u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>                              | <b>SKA1</b>           |
| Ukupan hidrolizat lana dobiven enzimom alkalaza u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup>                            | <b>SLA2</b>           | Ukupan hidrolizat konoplje dobiven enzimom alkalaza u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup>                            | <b>SKA2</b>           |
| Frakcija hidrolizata lana dobivenog enzimom alkalaza veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>   | <b>SLAF1</b>          | Frakcija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom alkalaza veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>   | <b>SKAF1</b>          |
| Frakcija hidrolizata lana dobivenog enzimom alkalaza veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup> | <b>SLAF2</b>          | Frakcija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom alkalaza veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup> | <b>SKAF2</b>          |
| Frakcija hidrolizata lana dobivenog enzimom alkalaza veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>    | <b>SLAF3</b>          | Frakcija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom alkalaza veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>    | <b>SKAF3</b>          |
| Frakcija hidrolizata lana dobivenog enzimom alkalaza veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup>  | <b>SLAF4</b>          | Frakcija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom alkalaza veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup>  | <b>SKAF4</b>          |

|                                                                                                                    |              |                                                                                                                        |              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Ukupan hidrolizat lana dobiven enzimom neutraza u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>                             | <b>SLN1</b>  | Ukupan hidrolizat konoplje dobiven enzimom neutraza u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>                             | <b>SKN1</b>  |
| Ukupan hidrolizat lana dobiven enzimom neutraza u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup>                           | <b>SLN2</b>  | Ukupan hidrolizat konoplje dobiven enzimom neutraza u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup>                           | <b>SKN2</b>  |
| Fracija hidrolizata lana dobivenog enzimom neutraza veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>   | <b>SLNF1</b> | Fracija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom neutraza veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>   | <b>SKNF1</b> |
| Fracija hidrolizata lana dobivenog enzimom neutraza veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup> | <b>SLNF2</b> | Fracija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom neutraza veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup> | <b>SKNF2</b> |
| Fracija hidrolizata lana dobivenog enzimom neutraza veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>    | <b>SLNF3</b> | Fracija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom neutraza veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>    | <b>SKNF3</b> |
| Fracija hidrolizata lana dobivenog enzimom neutraza veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup>  | <b>SLNF4</b> | Fracija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom neutraza veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup>  | <b>SKNF4</b> |
| Ukupan hidrolizat lana dobiven enzimom protameks u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>                            | <b>SLP1</b>  | Ukupan hidrolizat konoplje dobiven enzimom protameks u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>                            | <b>SKP1</b>  |

|                                                                                                                     |              |                                                                                                                         |              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Ukupan hidrolizat lana dobiven enzimom protameks u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup>                           | <b>SLP2</b>  | Ukupan hidrolizat konoplje dobiven enzimom protameks u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup>                           | <b>SKP2</b>  |
| Fracija hidrolizata lana dobivenog enzimom protameks veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>   | <b>SLPF1</b> | Fracija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom protameks veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>   | <b>SKPF1</b> |
| Fracija hidrolizata lana dobivenog enzimom protameks veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup> | <b>SLPF2</b> | Fracija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom protameks veličine ispod 10 kDa u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup> | <b>SKPF2</b> |
| Fracija hidrolizata lana dobivenog enzimom protameks veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>    | <b>SLPF3</b> | Fracija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom protameks veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 2 g L <sup>-1</sup>    | <b>SKPF3</b> |
| Fracija hidrolizata lana dobivenog enzimom protameks veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup>  | <b>SLPF4</b> | Fracija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom protameks veličine ispod 1 kDa u koncentraciji od 0,5 g L <sup>-1</sup>  | <b>SKPF4</b> |
| Medij bez dodatka hidrolizata i frakcija                                                                            | <b>SLC</b>   | Medij bez dodatka hidrolizata i frakcija                                                                                | <b>SKC</b>   |



### 3.2.2.8. Određivanje broja stanica i vijabilnosti kulture metodom tripan-plavo

Koncentracija i vijabilnost stanica u kulturi određivana je brojanjem pod svjetlosnim mikroskopom pomoću Neubauerove komorice uz dodatak boje tripan-plavo. Zbog narušenog integriteta membrane mrtvih stanica, boja će difundirati u citosol i vezat će se za intracelularne proteine te će takve stanice pod mikroskopom biti plavo obojene, dok će žive stanice ostati neobojene. Uzorak stanične kulture pomiješa se s bojom tripan-plavo u omjeru 1:1 nakon čega se 10  $\mu\text{L}$  tako pripremljenog uzorka nanese ispod pokrovnice na Neubauerovoj komorici. Stanice se pod svjetlosnim mikroskopom broje u 4 velika kvadrata. Koncentracija stanica i vijabilnost kulture računaju se pomoću formula:

$\text{broj stanica mL}^{-1} = \text{broj stanica u 4 kvadrata} \times 5000 \times \text{faktor razrjeđenja}$

$$\text{vijabilnost (\%)} = \frac{\text{broj živih stanica mL}^{-1}}{\text{ukupan broj stanica mL}^{-1}} \times 100 \quad [7]$$

### 3.2.2.9. Određivanje koncentracije glukoze u hranjivom mediju

Za određivanje *in vitro* koncentracije glukoze u mediju korišten je komercijalni test proizvođača BIOLABO koji se bazira na kolorimetrijsko-enzimskoj PAP metodi. Uzorci su pripremljeni prema uputama proizvođača kako slijedi. 10  $\mu\text{L}$  uzorka hranjivog medija otpipetirano je i pomiješano s 1 mL BIOLABO reagensa te je smjesa potom inkubirana na temperaturi od 37 °C tijekom 10 minuta. U slijepu probu je umjesto uzorka dodano 10  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Nakon što se razvilo obojenje, izmjerena je apsorbancija uzorka pomoću Genesys 10 S UV/VIS spektrofotometra pri valnoj duljini od 500 nm. Na isti način izmjerena je i apsorbancija standarda glukoze koncentracije 5,5 mM. Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija uzorka i standarda određena je koncentracija glukoze prema formuli:

$$c_{\text{glukoze}} [\text{mmolL}^{-1}] = \frac{A_{500\text{uzorka}}}{A_{500\text{standarda}}} \times c_{\text{standarda}} \times \text{faktor razrjeđenja} \quad [8]$$

### 3.2.2.10. Određivanje koncentracije laktata u hranjivom mediju

Koncentracija laktata u hranjivom mediju određena je pomoću komercijalnog Megazyme testa. Uzorci su pripremljeni prema uputama proizvođača, s razlikom da su volumeni svih otopina navedenih u protokolu umanjeni za 3/4. U 375  $\mu\text{L}$  destilirane vode temperature 25 °C dodano je 25  $\mu\text{L}$  uzorka hranjivog medija, 125  $\mu\text{L}$  smjese pufera pH 10 i D-glutamata, 25  $\mu\text{L}$  otopine  $\text{NAD}^+$ /PVP i 5  $\mu\text{L}$  enzima glutamat-piruvat-transaminaze. U slijepu probu, umjesto uzorka dodan je isti volumen destilirane vode.

Reakcijska smjesa je inkubirana na sobnoj temperaturi tijekom 3 minute nakon čega je izmjerena apsorbancija (A1) pri valnoj duljini od 350 nm na Genesys 10 S UV/VIS spektrofotometru. Zatim je u smjesu dodano 5  $\mu\text{L}$  enzima L-laktat-dehidrogenaze te je nakon 10 minuta izmjerena vrijednost apsorbancije (A2) pri istoj valnoj duljini. Nakon izmjerenih apsorbancija, odredi se razlika apsorbancija (A2-A1) za uzorak i slijepu probu te se od razlike apsorbancija uzorka oduzme razlika apsorbancija slijepe probe čime se dobije  $\Delta A_{laktat}$ . Koncentracija laktata zatim se računa prema sljedećoj formuli:

$$\Delta A_{laktat} = (A2 - A1)_{uzorka} - (A2 - A1)_{slijepe\ probe} \quad [9]$$

$$c_{laktat} [\text{mmol L}^{-1}] = 0,3204 \times \Delta A_{laktata} \times 11,1 \times \text{faktor razrjeđenja} \quad [10]$$

### 3.2.2.11. Određivanje koncentracije amonijaka u hranjivom mediju

Amonijak u hranjivom mediju za uzgoj određen je pomoću komercijalnog Megazyme testa. Uzorci su pripremljeni prema uputama proizvođača, s razlikom da su volumeni svih otopina navedenih u protokolu umanjeni za 3/4. U 430  $\mu\text{L}$  destilirane vode dodano je 25  $\mu\text{L}$  uzorka, 75  $\mu\text{L}$  pufera pH 8,0 te 50  $\mu\text{L}$  otopine koenzima NADPH. Reakcijska smjesa inkubirana je na sobnoj temperaturi tijekom 4 minute nakon čega je na Genesys 10 S UV/VIS spektrofotometru izmjerena apsorbancija (A1) pri 340 nm. Zatim je u smjesu dodano 5  $\mu\text{L}$  enzima glutamat dehidrogenaze te je nakon 5 minuta izmjeren pad vrijednosti apsorbancije (A2). Isti postupak napravljen je i za slijepu probu u koju je umjesto uzorka hranjivog medija dodano 25  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Koncentracija amonijaka određena je prema sljedećim formulama:

$$\Delta A_{amonijaka} = (A1 - A2)_{uzorka} - (A1 - A2)_{slijepe\ probe} \quad [11]$$

$$c_{amonijak} [\text{mmol L}^{-1}] = 0,06325 \times \Delta A_{amonijak} \times 58,72 \times \text{faktor razrjeđenja} \quad [12]$$

### 3.2.2.12. Određivanje koncentracije monoklonskog protutijela IgG u hranjivom mediju za uzgoj

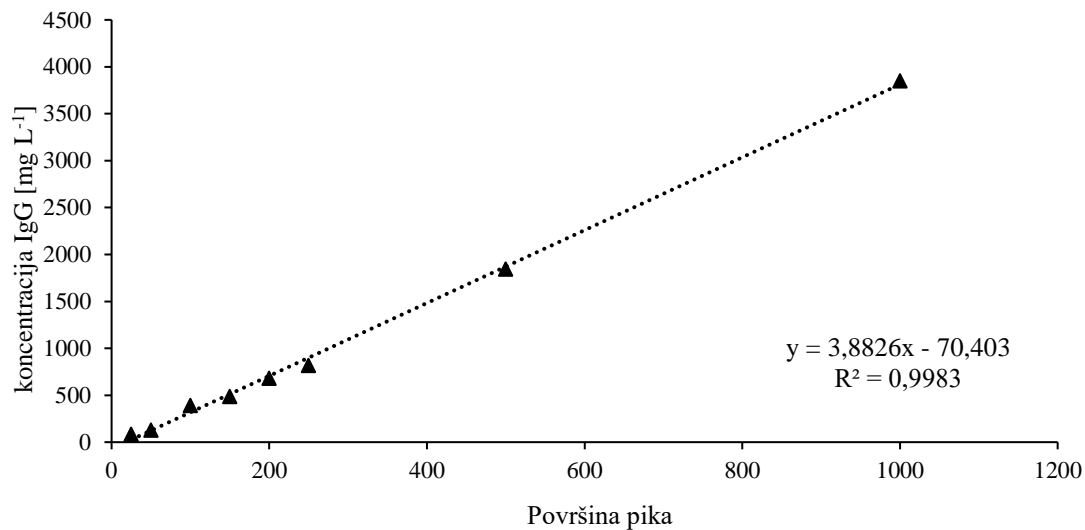
Koncentracija monoklonskog protutijela IgG određena je pomoću HPLC uređaja Agilent 1260 Infinit II pri čemu je korištena Bio-Monolith Protein A kolona. Uzorci supernatanta hranjivog medija su prije stavljanja na kolonu centrifugirani ( $7000 \times g$ , 5 min) te filtrirani kroz filter veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$  kako bi se uklonili stanični ostaci. Zatim je na kolonu injektirano 50  $\mu\text{L}$  uzorka, a protok je tokom 4,2 minute analize održavan na 1,0  $\text{mL min}^{-1}$  pri temperaturi od 25  $^{\circ}\text{C}$ . Kao mobilne faze korišteni su 50 mM natrij-fosfatni pufer (pH = 7,55) za vezanje i 0,1 M limunska kiselina (pH = 2,73) za

eluaciju protutijela. Parametri razdvajanja protutijela na Protein A koloni, djelovanjem različitih udjela mobilnih faza, prikazani su u tablici 11. Eluirano protutijelo detektirano je pomoću UV/VIS detektora HPLC uređaja pri valnoj duljini od 280 nm.

Tablica 11. Parametri razdvajanja protutijela IgG na Protein A koloni djelovanjem mobilnih faza A (pufer za vezanje) i B (pufer za eluciju).

| Vrijeme (min) | A (%) | B (%) | Protok (mL min <sup>-1</sup> ) |
|---------------|-------|-------|--------------------------------|
| 0,0           | 100   | 0     | 1,0                            |
| 0,5           | 100   | 0     | 1,0                            |
| 0,6           | 0     | 100   | 1,0                            |
| 2,0           | 0     | 100   | 1,0                            |
| 2,1           | 100   | 0     | 1,0                            |
| 4,2           | 100   | 0     | 1,0                            |

Preko površine dobivenog pika na kromatogramu, izračunata je koncentracija IgG u uzorcima pomoću jednadžbe pravca baždarnog dijagrama (Slika 6). Baždarni dijagram napravljen je analizom 8 standardnih otopina IgG poznatih koncentracija u rasponu 25 – 1000 mg L<sup>-1</sup>.



Slika 6. Baždarni dijagram ovisnosti koncentracije IgG o površini pika.

### 3.2.2.13. Izračun procesnih parametara rasta korištenih staničnih linija

- Najveća specifična brzina rasta stanica ( $\mu_{max}$ )

$$\mu_{max} = \frac{\ln N - \ln N_0}{\Delta t} \quad [h^{-1}] \quad [13]$$

N- koncentracija živih stanica (st mL<sup>-1</sup>) na kraju eksponencijalne faze

N<sub>0</sub>- koncentracija živih stanica (st mL<sup>-1</sup>) na početku eksponencijalne faze

$\Delta t$ - trajanje eksponencijalne faze (dan)

- Integral (površina ispod krivulje) koncentracije živih stanica (IVCD)

$$IVCD_t = \frac{1}{2} \times (x_t + x_{t_0}) \times \Delta t + IVCD_{t_0} \quad [14]$$

x- koncentracija živih stanica (st mL<sup>-1</sup>)

t- vrijeme trajanja uzgoja (dan)

t<sub>0</sub>- početno vrijeme uzgoja (dan)

$\Delta t$ - vremenski interval uzgoja (dan)

- Specifična stanična produktivnost (qP)

$$qP = \frac{\text{koncentracija IgG [mg L}^{-1}\text{]}}{IVCD} \quad [pg \text{ st dan}^{-1}] \quad [15]$$

- Specifična stanična potrošnja glukoze

$$qGlc = \frac{\text{koncentracija Glc [mM]}}{IVCD} \quad [pmoL \text{ st dan}^{-1}] \quad [16]$$

### 3.2.2.14. Obrada podataka

Svi dobiveni rezultati obrađeni su koristeći Microsoft Excel 2016 i software Statistica 8. Podaci prikazani u tekstu, slikama i tablicama su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija ( $\pm$ SD). Trake pogreške (engl. *error bars*) na slikama prikazuju SD. Razlike u srednjim vrijednostima su analizirane pomoću testa ANOVA te *post-hoc* Tukeyevim HSD testom. Da se nešto statistički značajno razlikuje smatrano je pri *p* vrijednosti  $< 0,05$ .

## 4. REZULTATI

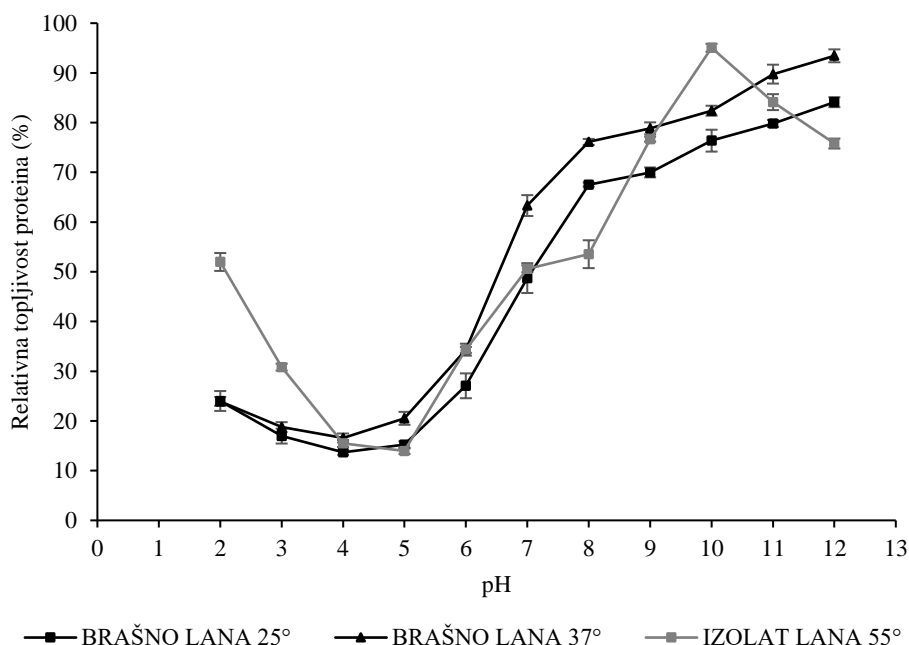
### 4.1. Izolacija i hidroliza proteina iz uljane pogače lana

#### 4.1.1. Topljivost brašna i proteinskog izolata uljane pogače lana

U ovom poglavlju opisan je profil topljivosti brašna uljane pogače lana te proteina izoliranih iz brašna (proteinski izolat) pri različitim pH vrijednostima (Poglavlje 3.2.1.1.). Temperature pri kojima je određivana topljivost proteina odabrane su na temelju literature po kojoj je rađen postupak izolacije i hidrolize.

Pri pH vrijednostima većim od 3,0, topljivost proteina brašna lana značajno je veća pri 37 °C u odnosu na topljivost pri 25 °C. Topljivost proteina brašna lana pri pH 7,0 i temperaturi 25 °C iznosi 48,7%, dok pri 37 °C ona iznosi 63,4%. Topljivost proteina brašna najmanja je u pH rasponu 3,0-5,0 (<2 0% relativne topljivosti) te postupno raste pri pH vrijednostima većim od 5,0. Najveće topljivosti proteina brašna lana postižu se pri pH vrijednostima većim od 8,0 (>70% relativne topljivosti) (Slika 7.).

Topljivost proteina izolata pri temperaturi od 55 °C najmanja je pri pH 5,0 (14% relativne topljivosti). Pri pH vrijednostima manjim od 4,0 i većim od 5,0, topljivost postupno raste. Postotak otopljenih proteina pri pH 7,0 iznosi 50,6%. Najveća topljivost proteina izolata postiže se pri pH 10,0 te iznosi 95,1% (Slika 7.).



Slika 7. Prikaz ovisnosti relativne topljivosti (%) proteina brašna i izolata lana, pri određenim temperaturama, o pH vrijednosti.

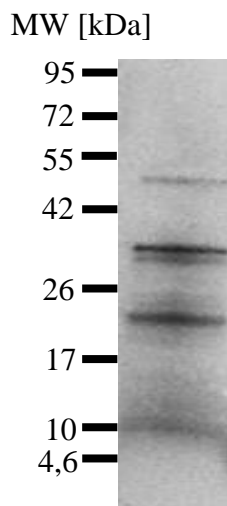
#### 4.1.2. Proteinski izolat uljane pogače lana

Nakon postupka izolacije proteina (Poglavlje 3.2.1.2.), iz početne mase brašna uljane pogače lana dobiveno je 13,4% proteinskog izolata. Budući da brašno pogače lana sadrži 50,0% proteina, udio dobivene mase proteinskog izolata u odnosu na masu proteina u pogači iznosi 26,7% dok ukupan udio proteina u izolatu lana iznosi 79,1%. Sve vrijednosti prikazane su u tablici 12.

Tablica 12. Prikaz udjela mase i proteina u izolatu lana.

|                                                                                                |                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Udio dobivene mase proteinskog izolata lana u odnosu na masu brašna lana [%]</b>            | <b>13,4±0,7</b> |
| <b>Udio dobivene mase proteinskog izolata lana u odnosu na masu proteina u brašnu lana [%]</b> | <b>26,7±1,4</b> |
| <b>Udio proteina u proteinskom izolatu lana [%]</b>                                            | <b>79,1±8,7</b> |

U cilju određivanja molekulskih masa proteina prisutnih u izolatu lana uzorci su analizirani pomoću SDS-PAGE. Na dobivenom gelu (Slika 8) vidljive su vrpce pri sljedećim molekulskim masama: 48 kDa, 30-35 kDa, 20-21 kDa i 10 kDa.



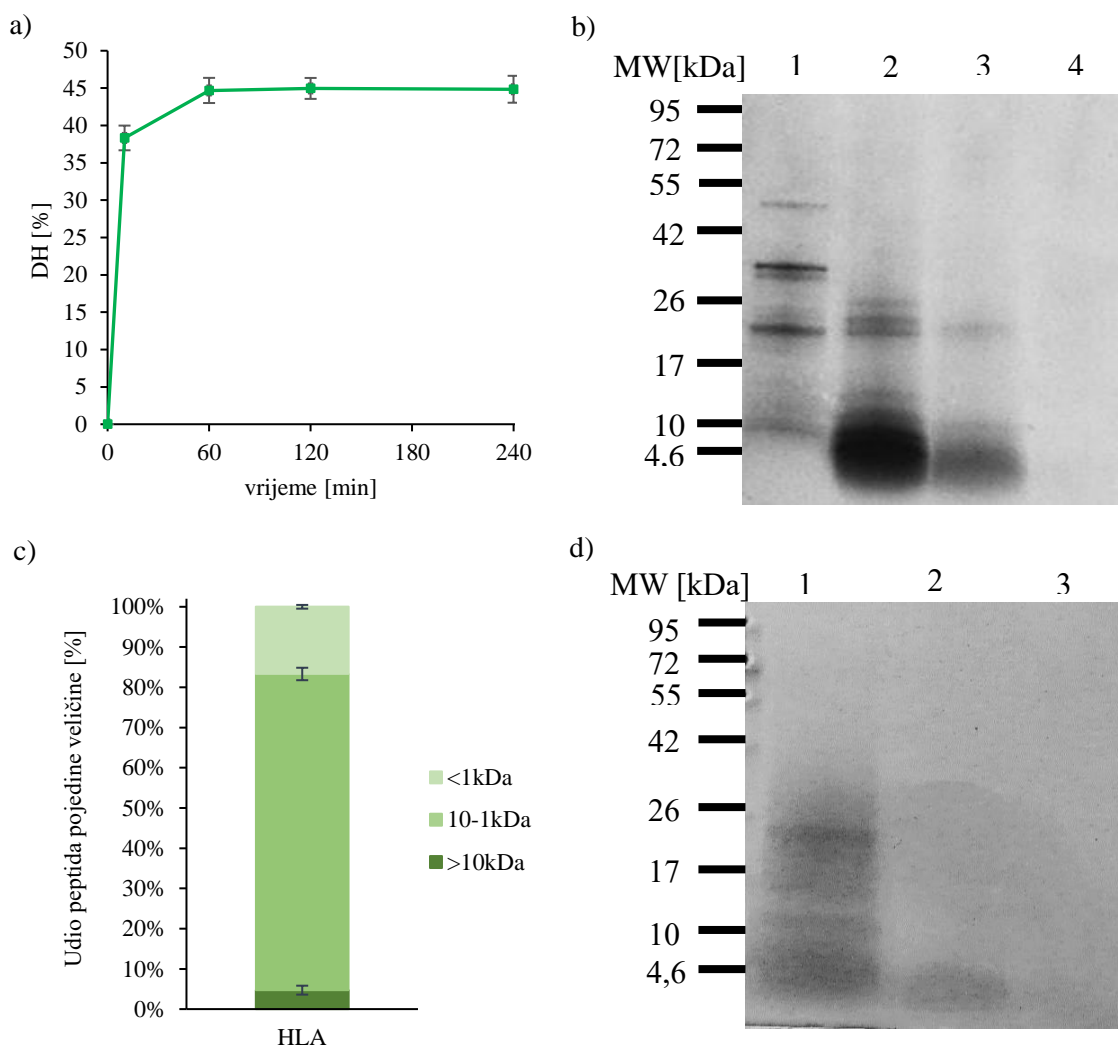
Slika 8. Prikaz molekulskih masa (MW) proteina prisutnih u izolatu lana dobiven pomoću SDS-PAGE (uzorak razrjeđen 100x).

#### 4.1.3. Hidroliza proteinskog izolata lana

U ovom dijelu cilj je bio pripremiti i karakterizirati hidrolizate dobivene hidrolizom proteinskog izolata lana pomoću tri mikrobnih enzima: alkalaza, neutraza i protameks (Poglavlje 3.2.1.4.). Uzorcima je određen stupanj hidrolize (Poglavlje 3.2.1.7.) dok je dinamika hidrolize praćena pomoću SDS-PAGE (Poglavlje 3.2.1.8.). Također, s ciljem dobivanja raspodjele veličina peptida u uzorcima nakon hidrolize provedena je kromatografija isključenjem po veličini (SEC) (Poglavlje 3.2.1.9.). Udio slobodnih aminokiselina pripremljenim hidrolizatima određen je pomoću metode MRM, a ukupnih aminokiselina u pripremljenim hidrolizatima određen je pomoću HPLC uređaja (Poglavlja 3.2.1.11. i 3.2.1.12.). Kako bi se dobile frakcije peptida <10 i <1 kDa, hidrolizati su frakcionirani na način opisan u Poglavlje 3.2.1.5.. Pripremljenim hidrolizatima te dobivenim frakcijama određena je koncentracija proteina metodom po Lowryu (Tablica 20).

##### 4.1.3.1. Proteinski hidrolizat lana dobiven enzimom alkalaza

Na slici 9.a vidi se da već nakon 10 min djelovanja enzima alkalaza, stupanj hidrolize (DH) iznosi oko 38,0%. Nakon 60 min DH doseže 44,0% te se do kraja hidrolize značajno ne mijenja. Iz SDS-PAGE (Slika 9.b) vidljivo je da tijekom 240 min hidrolize, enzim alkalaza kontinuirano cijepa proteine na sve manje peptide. Na kraju hidrolize većina peptida je veličina manjih od 4,6 kDa. Potvrda toga su nam i rezultati dobiveni analizom SEC pomoću koje se dobije raspodjela veličina peptida u uzorcima nakon hidrolize. Najveći udio dobivenih peptida je veličina između 1 i 10 kDa koji iznosi 78,6%, potom slijede peptidi <1 kDa s udjelom od 16,7% te preostali udio od 4,7% otpada na peptide >10 kDa (Slika 9.c). Frakcioniranje peptida na veličine <10 kDa i <1 kDa provedeno je uspješno budući da se na gelu ne vide bendovi većih molekularnih masa od željenih (Slika 9.d). Prikaz postotnog sastava slobodnih i ukupnih aminokiselina u proteinskom hidrolizatu lana dobivenog enzimom alkalaza prikazan je u tablici 13. Također, u tablici su prikazani udjeli aromatskih aminokiselina (AAA-Phe, Trp, Tyr), aminokiselina s razgranatim lancima (BCAA-Leu, Ile, Val) te hidrofobnih aminokiselina (HAA-Ala, Val, Ile, Leu, Tyr, Phe, Trp, Pro, Met, Cys).



Slika 9. a) Stupanj hidrolize (DH) proteinskog izolata lana tijekom 240 min enzimske hidrolize provedene proteazom alkalaza. b) Prikaz dinamike hidrolize, provedene proteazom alkalaza, tijekom 240 min pomoću SDS-PAGE: 1- proteini prije dodatka enzima (100x), 2- proteini nakon 10 min hidrolize (10x), 3- proteini nakon 60 min hidrolize (10x), 4- proteini nakon 240 min hidrolize (10x). c) Udjeli (%) peptida veličina <1 kDa, 1-10 kDa te >10 kDa, nakon 240min hidrolize enzimom alkalaza, dobiveni pomoću analize SEC. d) Prikaz peptida različitih veličina prisutnih u hidrolizatu prije frakcioniranja (1) te peptida veličina <10 kDa (2) i <1 kDa (3) nakon frakcioniranja pomoću SDS-PAGE. Količina proteina po jažici iznosi 200 µg.

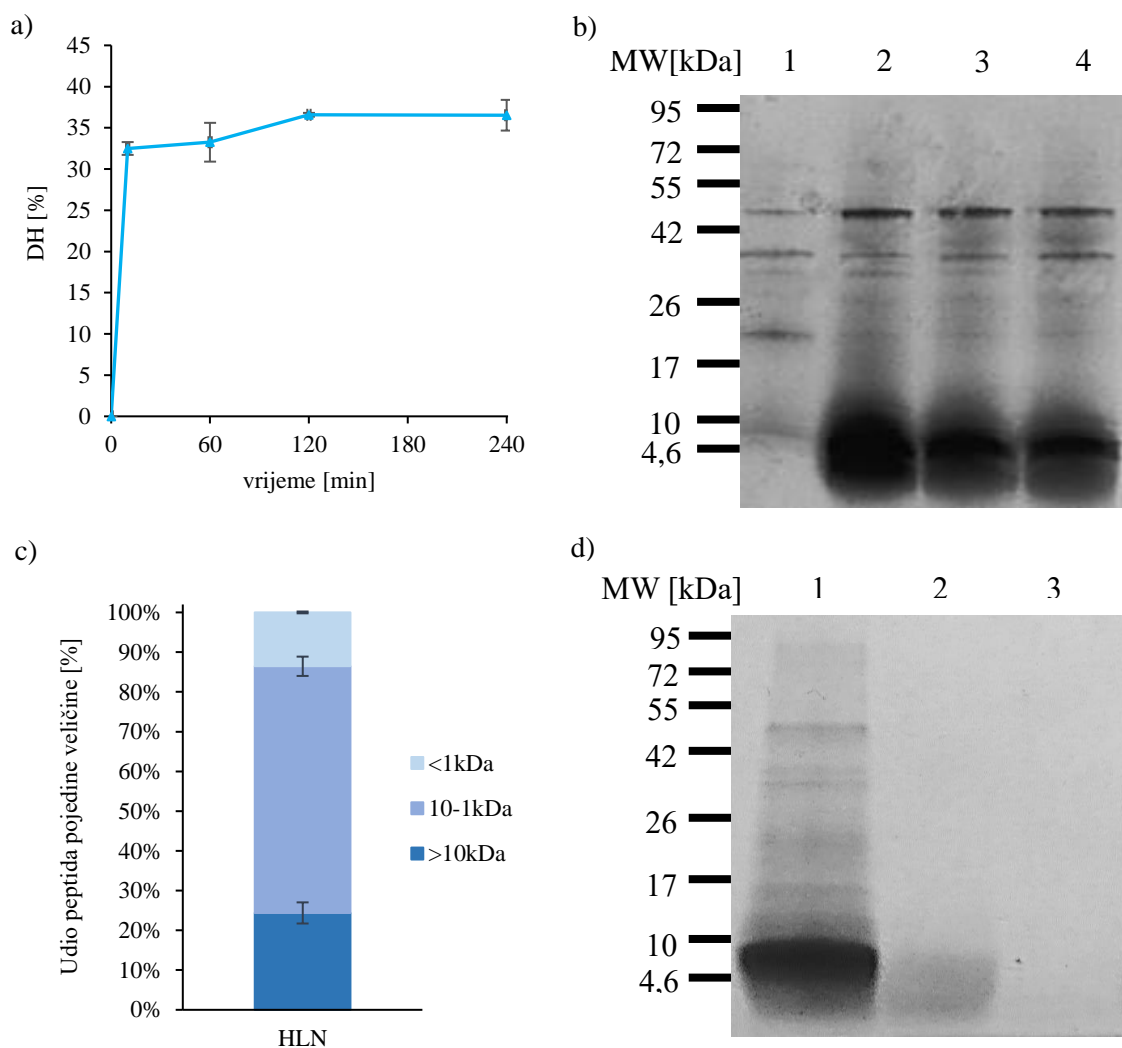


Tablica 13. Sastav slobodnih i ukupnih aminokiselina u proteinskom hidrolizatu lana dobivenog enzimom alkalaza.

| HLA     | Slobodne aminokiseline [%] | Ukupne aminokiseline [%] |
|---------|----------------------------|--------------------------|
| Ala     | 12,3 ± 1,6                 | 7,2 ± 0,5                |
| Arg     | 5,1 ± 1,0                  | 8,2 ± 0,4                |
| Asp/Asn | 2,4 ± 1,3                  | 11,3 ± 0,6               |
| Glu/Gln | 9,2 ± 1,3                  | 19,2 ± 0,9               |
| Gly     | 5,6 ± 2,0                  | 10,4 ± 0,2               |
| His     | 3,8 ± 0,0                  | 2,1 ± 0,3                |
| Ile     | 2,1 ± 0,4                  | 4,0 ± 0,2                |
| Leu     | 12,3 ± 1,3                 | 5,5 ± 0,1                |
| Lys     | 2,5 ± 1,1                  | 2,7 ± 0,1                |
| Met     | 3,5 ± 0,8                  | 1,4 ± 0,4                |
| Phe     | 8,1 ± 0,6                  | 4,1 ± 0,1                |
| Pro     | 1,3 ± 0,1                  | 4,3 ± 0,1                |
| Ser     | 13,4 ± 2,0                 | 7,0 ± 0,3                |
| Thr     | 12,3 ± 1,3                 | 4,3 ± 0,0                |
| Tyr     | 3,5 ± 1,0                  | 2,3 ± 0,2                |
| Val     | 3,4 ± 1,0                  | 6,0 ± 0,3                |
| AAA     |                            | 6,4 ± 0,2                |
| BCAA    |                            | 15,7 ± 0,3               |
| HAA     |                            | 34,9 ± 0,2               |

#### 4.1.3.2. *Proteinski hidrolizat lana dobiven enzimom neutraza*

Nakon 10 min od početka hidrolize enzimom neutraza DH iznosi 32,0%, nakon čega blago raste te u 60. min iznosi 33,3%. Do kraja uzgoja DH se statistički značajno ne povećava te u 240. min postiže vrijednost od 36,5% (Slika 10.a). Na temelju izgleda gela (Slika 10.b) može se uočiti da enzim neutraza cijepa pojedine proteine na manje peptide jer se intenzitet vrpce smanjuje (pogotovo vrpca veličine 22 kDa). No, tijekom 240min hidrolize, enzim ne uspjeva pocjepati sve prisutne proteine u izolatu, a što nam potvrđuju i rezultati analize SEC. Najveći udio dobivenih peptida je veličina između 1 i 10 kDa koji iznosi 62,1%. Udio peptida većih od 10 kDa iznosi 24,4%, dok je udio najmanjih peptida, tj. peptida <1 kDa, 13,6% (Slika 10.c). Uspješno je provedeno frakcioniranje peptida na veličine <10 kDa i <1 kDa budući da se na gelu ne vide vrpce većih molekulskih masa od željenih (Slika 10.d). Prikaz postotnog sastava slobodnih i ukupnih aminokiselina u proteinskom hidrolizatu lana dobivenog enzimom neutraza prikazan je u tablici 14.



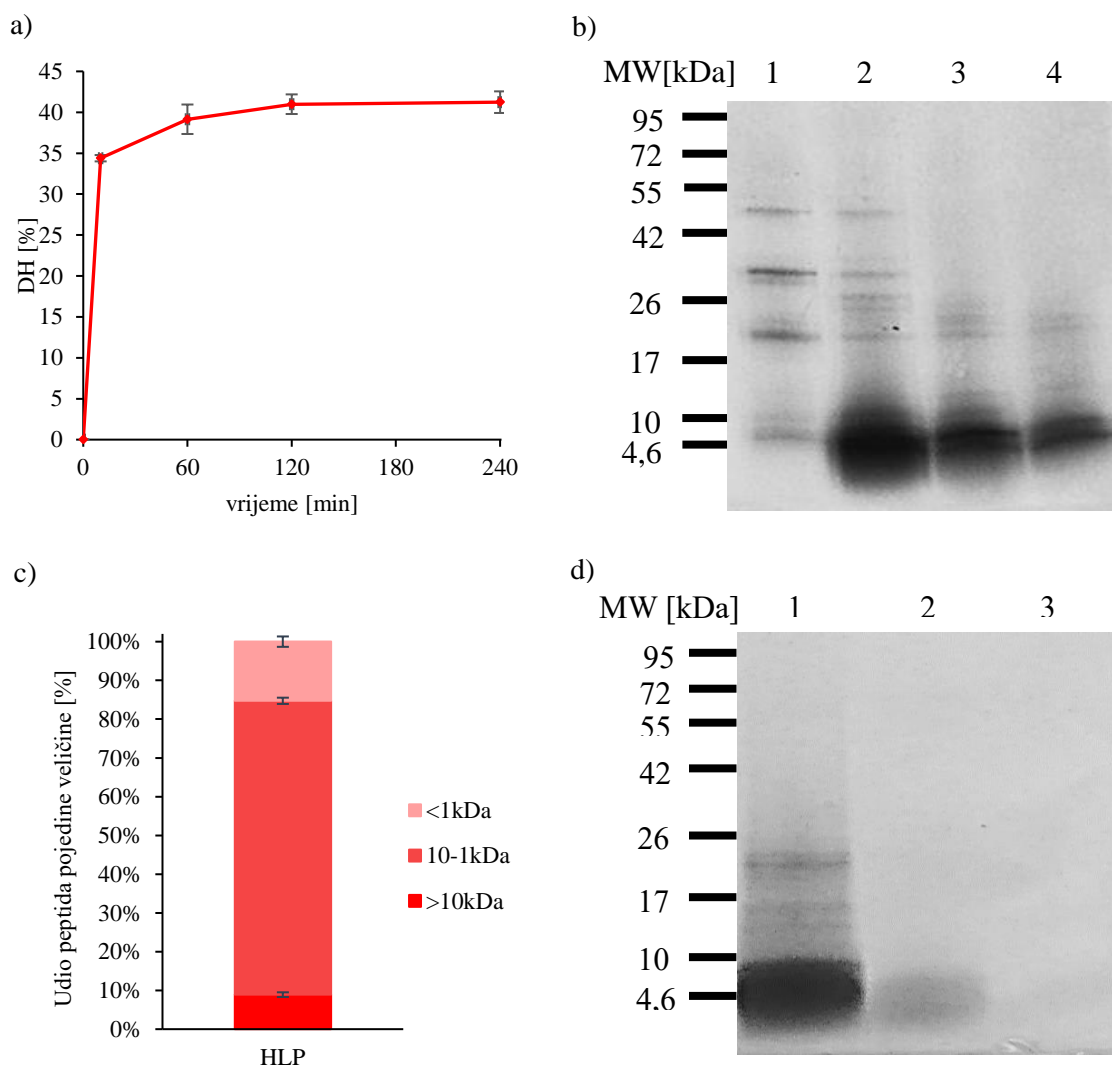
Slika 10. a) Stupanj hidrolize (DH) proteinskog izolata lana tijekom 240 min enzimske hidrolize provedene proteazom neutraza. b) Prikaz dinamike hidrolize, provedene proteazom neutraza, tijekom 240 min pomoću SDS-PAGE: 1-proteini prije dodatka enzima (100x), 2- proteini nakon 10 min hidrolize (10x), 3- proteini nakon 60 min hidrolize (10x), 4- proteini nakon 240 min hidrolize (10x). c) Udjeli (%) peptida veličina <1 kDa, 1-10 kDa te >10 kDa, nakon 240min hidrolize enzimom neutraza, dobiveni pomoću analize SEC. d) Prikaz peptida različitih veličina prisutnih u hidrolizatu prije frakcioniranja (1) te peptida nakon frakcioniranja veličina <10 kDa (2) i <1 kDa (3) pomoću SDS-PAGE. Količina proteina po jažici iznosi 200 µg.

Tablica 14. Sastav slobodnih i ukupnih aminokiselina u proteinskom hidrolizatu lana dobivenog enzimom neutraza.

| HLN     | Slobodne aminokiseline [%] | Ukupne aminokiseline [%] |
|---------|----------------------------|--------------------------|
| Ala     | 7,5 ± 1,8                  | 7,0 ± 0,6                |
| Arg     | 6,6 ± 0,1                  | 9,4 ± 0,5                |
| Asp/Asn | 3,1 ± 1,4                  | 11,5 ± 0,5               |
| Glu/Gln | 1,8 ± 0,1                  | 18,9 ± 0,7               |
| Gly     | 8,1 ± 2,6                  | 10,1 ± 0,6               |
| His     | 1,8 ± 0,2                  | 2,3 ± 0,5                |
| Ile     | 4,6 ± 1,2                  | 4,0 ± 0,3                |
| Leu     | 8,8 ± 1,5                  | 5,9 ± 0,5                |
| Lys     | 2,5 ± 0,9                  | 2,8 ± 0,7                |
| Met     | 3,2 ± 0,3                  | 0,7 ± 0,3                |
| Phe     | 8,1 ± 3,2                  | 4,3 ± 0,4                |
| Pro     | 1,6 ± 0,2                  | 4,5 ± 0,6                |
| Ser     | 14,8 ± 1,9                 | 6,6 ± 0,3                |
| Thr     | 12,8 ± 2,3                 | 4,1 ± 0,4                |
| Tyr     | 5,0 ± 1,6                  | 2,1 ± 0,3                |
| Val     | 5,9 ± 0,1                  | 5,9 ± 0,2                |
| AAA     |                            | 6,4 ± 0,3                |
| BCAA    |                            | 15,8 ± 0,3               |
| HAA     |                            | 34,3 ± 0,4               |

#### 4.1.3.3. Proteinski hidrolizat lana dobiven enzimom protameks

U prvih 10 min djelovanja enzima protameks, stupanj hidrolize naglo raste te iznosi oko 34,4%. Sat vremena od početka hidrolize, DH doseže vrijednost od 39,2% te do kraja hidrolize ne raste značajno te iznosi 41,2% (Slika 11.a). Prateći dinamiku hidrolize na SDS gelu (Slika 11.b) može se uočiti kako se tijekom vremena proteini molekulskih masa većih od 30 kDa razgrađuju na manje peptide. Nakon 240 min hidrolize i dalje su prisutne vrpce veličina oko 22 kDa, ali puno manjeg intenziteta nego na početku hidrolize. Na kraju hidrolize većina peptida je veličina manjih od 10 kDa, što je potvrđeno i analizom SEC. Najveći udio dobivenih peptida je veličina između 1 i 10 kDa koji iznosi 75,8%, potom slijede peptidi <1 kDa s udjelom od 15,3% te preostali udio od 8,9% se odnosi na peptide >10 kDa (Slika 11.c). Promatrajući jažice 2 i 3 na gelu (Slika 11.d) vidljivo je da prisutni peptidi u uzorcima nisu veći od 10 kDa, odnosno od 1 kDa. Prikaz postotnog sastava slobodnih i ukupnih aminokiselina u proteinskom hidrolizatu lana dobivenog enzimom protameks prikazan je u tablici 15.



Slika 11. a) Stupanj hidrolize (DH) proteinskog izolata lana tijekom 240 min enzimske hidrolize provedene proteazom protameks. b) Prikaz dinamike hidrolize, provedene proteazom protameks, tijekom 240 min pomoću SDS-PAGE: 1-proteini prije dodatka enzima (100x), 2- proteini nakon 10 min hidrolize (10x), 3- proteini nakon 60 min hidrolize (10x), 4- proteini nakon 240 min hidrolize (10x). c) Udjeli (%) peptida veličina <1 kDa, 1-10 kDa te >10 kDa, nakon 240 min hidrolize enzimom protameks, dobiveni pomoću analize SEC. d) Prikaz peptida različitih veličina prisutnih u hidrolizatu prije frakcioniranja (1) te peptida nakon frakcioniranja veličina <10 kDa (2) i <1 kDa (3) pomoću SDS-PAGE. Količina proteina po jažici iznosi 200 µg.

Tablica 15. Sastav slobodnih i ukupnih aminokiselina u proteinskom hidrolizatu lana dobivenog enzimom protameks.

| HLP     | Slobodne aminokiseline [%] | Ukupne aminokiseline [%] |
|---------|----------------------------|--------------------------|
| Ala     | 11,7 ± 1,7                 | 6,9 ± 0,5                |
| Arg     | <RL                        | 8,6 ± 0,5                |
| Asp/Asn | 4,3 ± 0,1                  | 11,4 ± 0,7               |
| Glu/Gln | 4,8 ± 1,3                  | 18,8 ± 0,7               |
| Gly     | 10,0 ± 2,6                 | 10,1 ± 0,5               |
| His     | 2,3 ± 0,4                  | 2,1 ± 0,2                |
| Ile     | 3,4 ± 0,1                  | 4,1 ± 0,4                |
| Leu     | 16,1 ± 3,2                 | 5,8 ± 0,4                |
| Lys     | 2,6 ± 0,5                  | 2,7 ± 0,1                |
| Met     | 2,2 ± 0,8                  | 1,3 ± 0,5                |
| Phe     | 6,7 ± 1,2                  | 4,4 ± 0,6                |
| Pro     | 1,8 ± 0,1                  | 4,4 ± 0,4                |
| Ser     | 14,8 ± 2,3                 | 6,9 ± 0,3                |
| Thr     | 9,6 ± 1,7                  | 4,2 ± 0,1                |
| Tyr     | 3,9 ± 0,6                  | 2,2 ± 0,2                |
| Val     | 4,5 ± 0,6                  | 6,1 ± 0,4                |
| AAA     |                            | 6,5 ± 0,4                |
| BCAA    |                            | 15,9 ± 0,4               |
| HAA     |                            | 35,0 ± 0,4               |

## **4.2. Izolacija i hidroliza proteina iz uljane pogače konoplje**

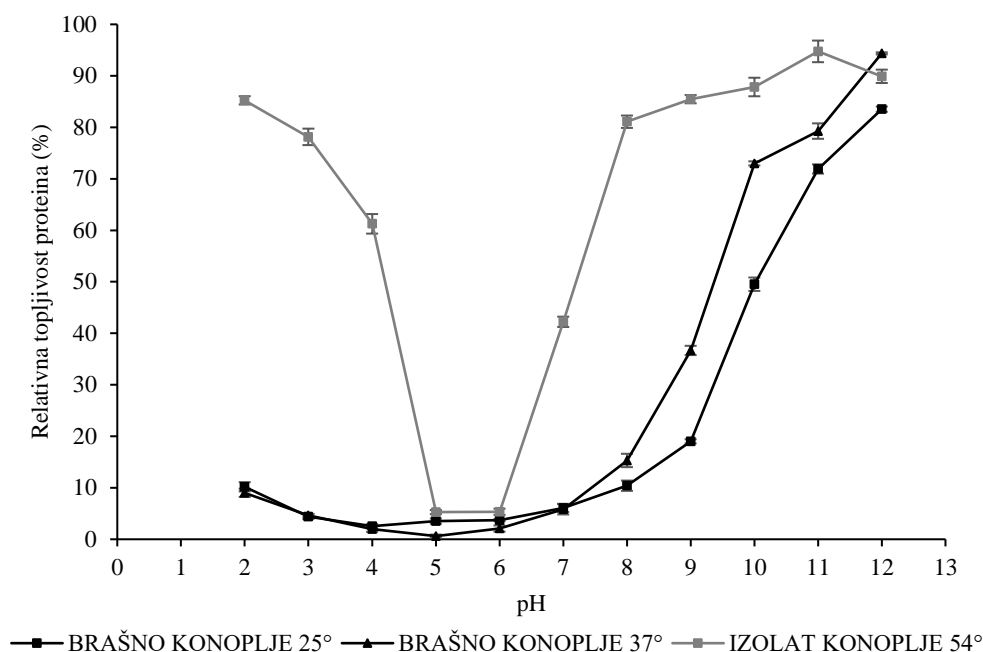
### **4.2.1. Topljivost brašna i proteinskog izolata uljane pogače konoplje**

U ovom poglavlju opisan je profil topljivosti brašna uljane pogače konoplje te proteina izoliranih iz brašna (proteinski izolat) pri različitim pH vrijednostima (Poglavlje 3.2.1.1.). Na temelju literature po kojoj je rađen postupak izolacije i hidrolize, odabrane su temperature pri kojima je određivana topljivost proteina.

U pH rasponu 2,0-7,0 topljivost proteina brašna konoplje izrazito je mala te ne prelazi 10%. Najmanja topljivost proteina brašna konoplje od 0,6% postiže se na 37 °C pri pH 5,0. Topljivost proteina brašna pri pH 7,0, za obje testirane temperature, iznosi 5,8%. Pri pH vrijednostima većim od 8, topljivost proteina brašna konoplje značajno je veća pri 37 °C nego pri 25 °C. Tako se topljivost proteina brašna veća od 70% pri 37 °C postiže pri pH 10,0, dok se pri temperaturi od 25 °C ta topljivost postiže pri pH 11,0 (Slika 12).

Topljivost proteina izolata pri temperaturi od 55 °C najmanja je pri pH između 5,0 i 6,0 (5,3% relativne topljivosti). Pri pH vrijednostima manjim od 5,0 i većim od 6,0, topljivost intenzivno raste te krivulja poprima U oblik. Postotak otopljenih proteina pri pH 7,0 iznosi 42,2%. Najveće topljivosti proteina izolata postižu se pri pH vrijednostima većim od 7,0 (>80% topljivosti) (Slika 12).





Slika 12. Prikaz ovisnosti relativne topljivosti proteina (%) brašna i izolata konoplje, pri određenim temperaturama, o pH vrijednosti.

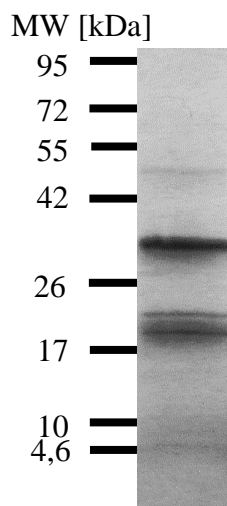
#### 4.2.2. Proteinski izolat uljane pogače konoplje

Nakon postupka izolacije proteina (Poglavlje 3.2.1.3.), iz početne mase brašna uljane pogače konoplje dobiveno je 24,3% proteinskog izolata. Budući da brašno pogače konoplje sadrži 50,0% proteina, udio dobivene mase proteinskog izolata u odnosu na masu proteina u pogači iznosi 48,6% dok ukupan udio proteina u izolatu konoplje iznosi 79,5%. Sve vrijednosti prikazane su u tablici 16.

Tablica 16. Prikaz udjela mase i proteina u izolatu konoplje.

|                                                                                                        |                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Udio dobivene mase proteinskog izolata konoplje u odnosu na masu brašna konoplje [%]</b>            | <b>24,3±1,5</b> |
| <b>Udio dobivene mase proteinskog izolata konoplje u odnosu na masu proteina u brašnu konoplje [%]</b> | <b>48,6±3,0</b> |
| <b>Udio proteina u proteinskom izolatu konoplje [%]</b>                                                | <b>79,5±3,9</b> |

Kako bi se odredile molekulske mase proteina prisutnih u izolatu konoplje uzorci su analizirani pomoću SDS-PAGE. Na dobivenom gelu (Slika 13) vidljive su vrpce pri sljedećim molekulskim masama: 48 kDa, 34 kDa, 20 kDa, 18 kDa i <10 kDa.



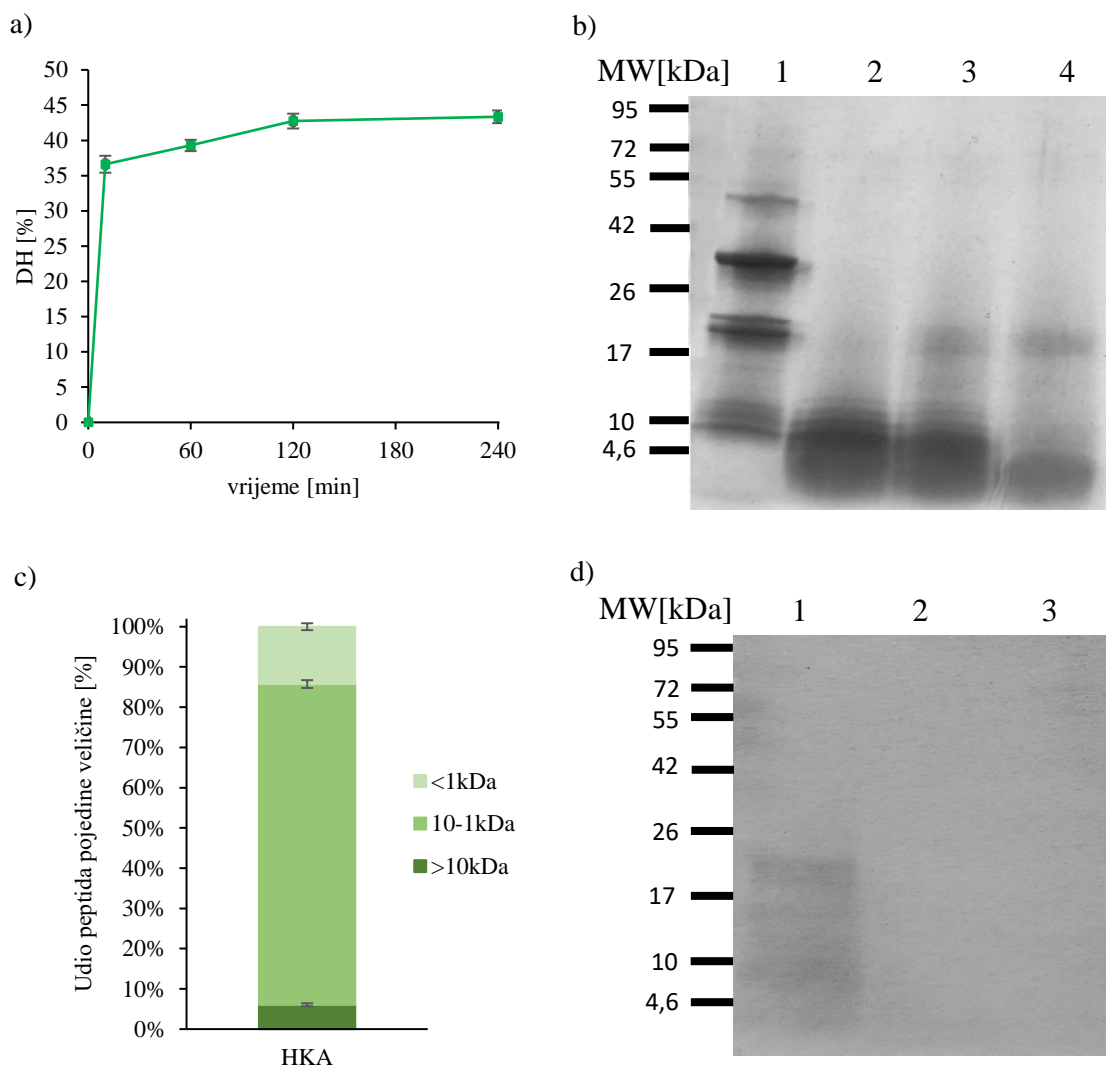
Slika 13. Prikaz molekularskih masa (MW) proteina prisutnih u izolatu konoplje dobiven pomoću SDS-PAGE (uzorak razrjeđen 100x).

#### 4.2.3. Hidroliza proteinskog izolata konoplje

Cilj ovog poglavlja bio je pripremiti i okarakterizirati hidrolizate dobivene hidrolizom proteinskog izolata konoplje pomoću tri proteaze mikrobnog podrijetla: alkalaza, neutraza i protameks (Poglavlje 3.2.1.4.). Uzorcima je određen stupanj hidrolize (Poglavlje 3.2.1.7.) dok je njena dinamika praćena pomoću SDS-PAGE (Poglavlje 3.2.1.8.). Također, da bi se dobila raspodjela veličine peptida u uzorcima nakon hidrolize provedena je analiza SEC (Poglavlje 3.2.1.9.). Udio slobodnih aminokiselina pripremljenim hidrolizatima određen je pomoću metode MRM, a ukupnih aminokiselina u pripremljenim hidrolizatima određen je pomoću HPLC uređaja (Poglavlje 3.2.1.11. i 3.2.1.12.). Kako bi se dobile frakcije peptida <10 i <1 kDa, hidrolizati su frakcionirani na način opisan u Poglavlje 3.2.1.5.. Pripremljenim hidrolizatima te dobivenim frakcijama određena je koncentracija proteina metodom po Lowryu (Tablica 20).

#### *4.2.3.1. Proteinski hidrolizat konoplje dobiven enzimom alkalaza*

Nakon 10 min od početka hidrolize dodatkom enzima alkalaza u smjesu, stupanj hidrolize iznosio je oko 36,6%. Do kraja hidrolize DH je postupno rastao te je na kraju iznosio 43,3% (Slika 14.a). Iz SDS-PAGE (Slika 14.b) vidljivo je da već nakon 10 min enzim alkalaza cijepa gotovo sve proteine veće od 26 kDa. Do kraja hidrolize alkalaza kontinuirano cijepa proteine na manje peptide. Također može se uočiti da dolazi do agregacije dijela manjih peptida u polipeptide veće molekulske mase od otprilike 20 kDa. Pomoću analize SEC dobivena je raspodjela veličina peptida u uzorcima nakon hidrolize. Nakon 240 min hidrolize najveći udio dobivenih peptida je veličina između 1 i 10 kDa te iznosi 79,7%, potom slijede peptidi <1 kDa s udjelom od 14,3% te preostali udio od 6,0% otpada na peptide >10 kDa (Slika 14.c). Uspješno je provedeno frakcioniranje peptida na veličine <10 kDa i <1 kDa budući da se na gelu ne vide vrpce većih molekulskih masa od željenih (Slika 14.d). Prikaz postotnog sastava slobodnih i ukupnih aminokiselina u proteinskom hidrolizatu konoplje dobivenog enzimom alkalaza prikazan je u tablici 17.



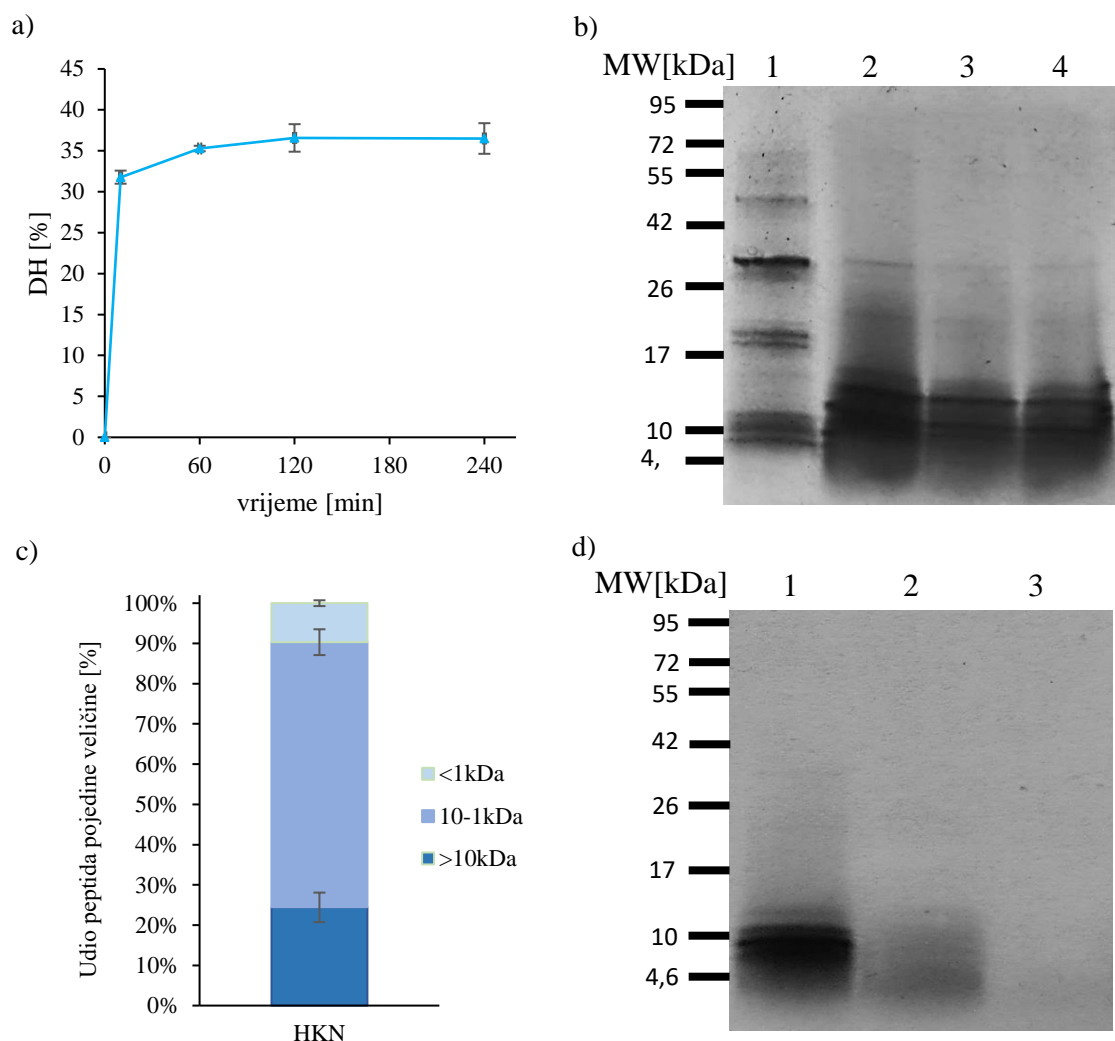
Slika 14. a) Stupanj hidrolize (DH) proteinskog izolata konoplje tijekom 240 min enzimske hidrolize provedene proteazom alkalaza. b) Prikaz dinamike hidrolize, provedene proteazom alkalaza, tijekom 240 min pomoću SDS-PAGE: 1-proteini prije dodatka enzima (100x), 2- proteini nakon 10 min hidrolize (10x), 3- proteini nakon 60 min hidrolize (10x), 4- proteini nakon 240 min hidrolize (10x). c) Udjeli (%) peptida veličina <1 kDa, 1-10 kDa te >10 kDa, nakon 240min hidrolize enzimom alkalaza, dobiveni pomoću analize SEC. d) Prikaz peptida različitih veličina prisutnih u hidrolizatu prije frakcioniranja (1) te peptida nakon frakcioniranja veličina <10 kDa (2) i <1 kDa (3) pomoću SDS-PAGE. Količina proteina po jažici iznosi 50 µg.

Tablica 17. Sastav slobodnih i ukupnih aminokiselina u proteinskom hidrolizatu konoplje dobivenog enzimom alkalaza.

| HKA     | Slobodne aminokiseline [%] | Ukupne aminokiseline [%] |
|---------|----------------------------|--------------------------|
| Ala     | 9,2 ± 1,2                  | 6,5 ± 0,3                |
| Arg     | 3,4 ± 1,2                  | 12,0 ± 0,2               |
| Asp/Asn | 2,8 ± 0,9                  | 11,8 ± 0,5               |
| Glu/Gln | 15,0 ± 2,0                 | 17,9 ± 0,7               |
| Gly     | 11,0 ± 1,6                 | 8,1 ± 0,2                |
| His     | 1,0 ± 0,2                  | 2,5 ± 0,1                |
| Ile     | 1,8 ± 0,1                  | 3,7 ± 0,2                |
| Leu     | 20,3 ± 1,7                 | 6,7 ± 0,3                |
| Lys     | 2,0 ± 0,5                  | 2,7 ± 0,2                |
| Met     | 3,3 ± 0,1                  | 0,9 ± 0,4                |
| Phe     | 2,8 ± 0,5                  | 3,6 ± 0,1                |
| Pro     | 1,2 ± 0,2                  | 4,4 ± 0,2                |
| Ser     | 14,4 ± 1,9                 | 6,9 ± 0,7                |
| Thr     | 2,9 ± 0,4                  | 4,1 ± 0,0                |
| Tyr     | 4,7 ± 0,7                  | 2,7 ± 0,1                |
| Val     | 4,1 ± 0,4                  | 5,5 ± 0,2                |
| AAA     |                            | 6,4 ± 0,1                |
| BCAA    |                            | 16,0 ± 0,2               |
| HAA     |                            | 34,1 ± 0,2               |

#### 4.2.3.2. *Proteinski hidrolizat konoplje dobiven enzimom neutraza*

Unutar prvih 10 min djelovanja enzima neutraza stupanj hidrolize naglo raste te dostiže 31,8%. U 120 min hidrolize DH iznosi 36,5% te se do kraja ne mijenja (Slika 15.a). Intenzitet vrpce na gelu (Slika 15.b) se tijekom hidrolize smanjuje djelovanjem enzima neutraza što ukazuje da enzim uspješno cijepa pojedine proteine na manje peptide. No, tijekom 240 min hidrolize, enzim ne uspjeva pocijepati sve prisutne proteine u izolatu što potvrđuju i rezultati analize SEC. Prema rezultatima SEC-a (Slika 15.c) najmanji udio dobivenih peptida je veličina <1 kDa te iznosi 9,7%. Postotak peptida većih od 10 kDa iznosi 24,4%, dok je udio peptida veličina između 1 i 10 kDa 65,9% te je ujedno i najveći od svih udjela. Frakcioniranje peptida na veličine <10 kDa i <1 kDa provedeno je uspješno budući da se na gelu ne vide vrpce većih molekulskih masa od željenih (Slika 15.d). Prikaz postotnog sastava slobodnih i ukupnih aminokiselina u proteinskom hidrolizatu konoplje dobivenog enzimom neutraza prikazan je u tablici 18.



Slika 15. a) Stupanj hidrolize (DH) proteinskog izolata konoplje tijekom 240 min enzimске hidrolize provedene proteazom neutraza. b) Prikaz dinamike hidrolize, provedene proteazom neutraza, tijekom 240 min pomoću SDS-PAGE: 1-proteini prije dodatka enzima (100x), 2- proteini nakon 10 min hidrolize (10x), 3- proteini nakon 60 min hidrolize (10x), 4- proteini nakon 240 min hidrolize (10x). c) Udjeli (%) peptida veličina <1 kDa, 1-10 kDa te >10 kDa, nakon 240min hidrolize enzimom neutraza, dobiveni pomoću analize SEC. d) Prikaz peptida različitih veličina prisutnih u hidrolizatu prije frakcioniranja (1) te peptida nakon frakcioniranja veličina <10 kDa (2) i <1 kDa (3) pomoću SDS-PAGE. Količina proteina po jažici iznosi 50  $\mu$ g.

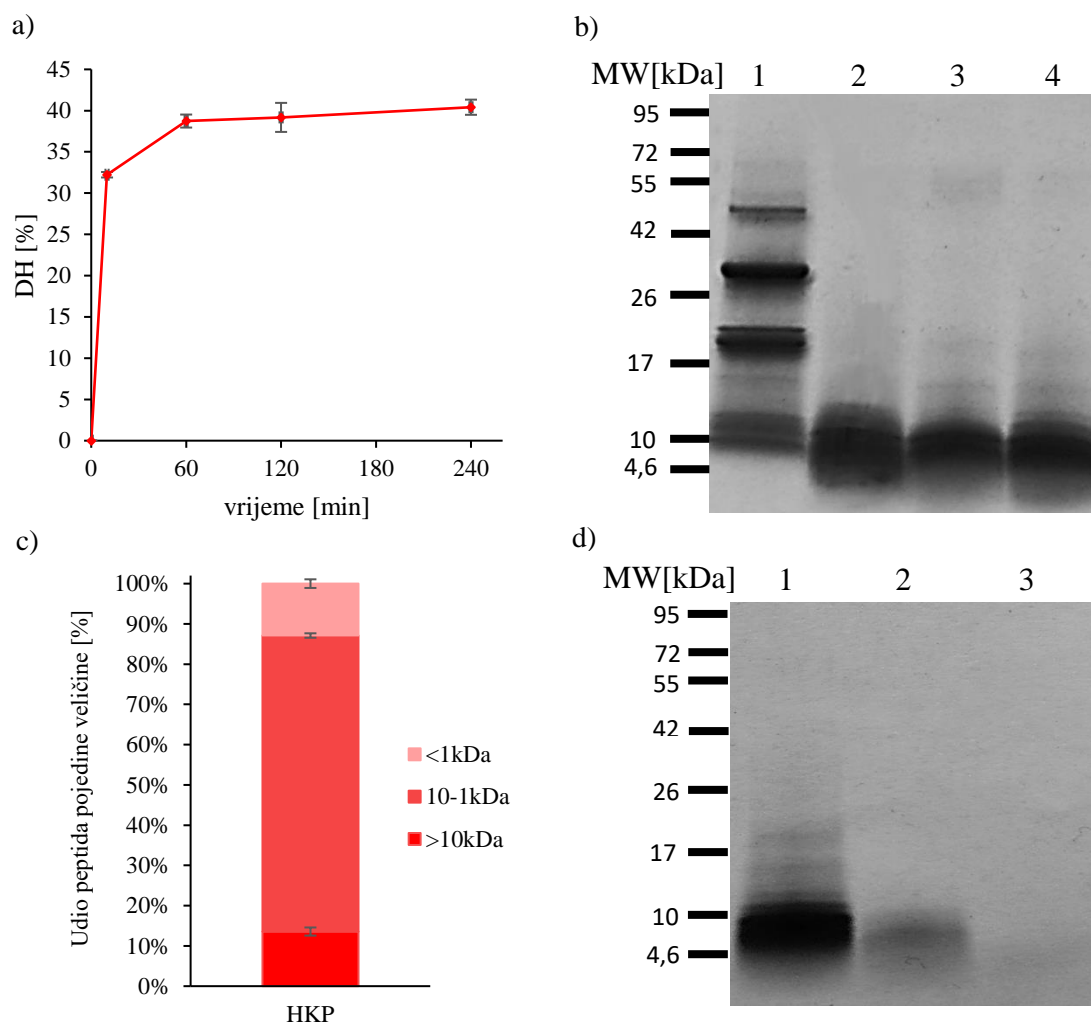
Tablica 18. Sastav slobodnih i ukupnih aminokiselina u proteinskom hidrolizatu konoplje dobivenog enzimom neutraza.

| HKN     | Slobodne aminokiseline [%] | Ukupne aminokiseline [%] |
|---------|----------------------------|--------------------------|
| Ala     | 7,1 ± 0,3                  | 6,2 ± 0,5                |
| Arg     | 6,0 ± 1,0                  | 12,3 ± 0,8               |
| Asp/Asn | 5,0 ± 0,2                  | 11,6 ± 0,4               |
| Glu/Gln | 7,2 ± 0,2                  | 18,5 ± 0,5               |
| Gly     | 13,0 ± 2,7                 | 7,8 ± 0,1                |
| His     | <RL                        | 2,6 ± 0,1                |
| Ile     | 4,0 ± 0,3                  | 3,5 ± 0,3                |
| Leu     | 10,8 ± 1,1                 | 6,4 ± 0,3                |
| Lys     | 2,1 ± 0,5                  | 3,0 ± 0,1                |
| Met     | 2,4 ± 0,1                  | 1,2 ± 0,5                |
| Phe     | 5,8 ± 0,7                  | 3,4 ± 0,1                |
| Pro     | 4,5 ± 0,8                  | 4,5 ± 0,0                |
| Ser     | 14,1 ± 0,5                 | 7,1 ± 0,8                |
| Thr     | 9,0 ± 1,0                  | 4,2 ± 0,3                |
| Tyr     | 3,6 ± 0,4                  | 2,7 ± 0,1                |
| Val     | 5,3 ± 0,2                  | 5,0 ± 0,3                |
| AAA     |                            | 6,1 ± 0,1                |
| BCAA    |                            | 15,0 ± 0,3               |
| HAA     |                            | 32,9 ± 0,3               |



#### 4.2.3.3. *Proteinski hidrolizat konoplje dobiven enzimom protameks*

Djelovanjem enzima protameks, stupanj hidrolize nakon 10 min naglo raste te postiže vrijednost od 32,2%. U narednih 230 min, stupanj hidrolize se postupno povećava te dostiže najveću vrijednost koja iznosi 40,4% (Slika 16.a). Promatrajući dinamiku hidrolize na SDS gelu (Slika 16.b) uočljivo je da se tijekom vremena proteini molekulskih masa većih od 26 kDa potpuno razgrađuju na manje peptide. Nakon 240 min hidrolize i dalje su prisutne vrpce veličina oko 20 i 15 kDa, ali puno manjeg intenziteta nego na početku. Na kraju hidrolize većina peptida je veličina manjih od 10 kDa. Ovi rezultati su potvrđeni i SEC analizom. Najveći udio dobivenih peptida je veličina između 1 i 10 kDa koji iznosi 73,5%, potom slijede peptidi <1 kDa s udjelom od 12,9% te preostali udio od 13,6% otpada na peptide >10 kDa (Slika 16.c). Postupak frakcioniranja peptida na veličine <10 kDa i <1 kDa proveden je uspješno budući da se na gelu ne vide bendovi većih molekulskih masa od željenih (Slika 16.d). Prikaz postotnog sastava slobodnih i ukupnih aminokiselina u proteinskom hidrolizatu konoplje dobivenog enzimom protameks prikazan je u tablici 19.



Slika 16. a) Stupanj hidrolize (DH) proteinskog izolata konoplje tijekom 240 min enzimске hidrolize provedene proteazom protameks. b) Prikaz dinamike hidrolize, provedene proteazom protameks, tijekom 240 min pomoću SDS-PAGE: 1-proteini prije dodatka enzima (100x), 2- proteini nakon 10 min hidrolize (10x), 3- proteini nakon 60 min hidrolize (10x), 4- proteini nakon 240 min hidrolize (10x). c) Udjeli (%) peptida veličina <1 kDa, 1-10 kDa te >10 kDa, nakon 240min hidrolize enzimom protameks, dobiveni pomoću analize SEC. d) Prikaz peptida različitih veličina prisutnih u hidrolizatu prije frakcioniranja (1) te peptida nakon frakcioniranja veličina <10 kDa (2) i <1 kDa (3) pomoću SDS-PAGE. Količina proteina po jažici iznosi 50 µg.

Tablica 19. Sastav slobodnih i ukupnih aminokiselina u proteinskom hidrolizatu konoplje dobivenog enzimom protameks

| HKP     | Slobodne aminokiseline [%] | Ukupne aminokiseline [%] |
|---------|----------------------------|--------------------------|
| Ala     | 8,5 ± 1,8                  | 6,3 ± 0,4                |
| Arg     | 4,1 ± 1,3                  | 12,4 ± 0,6               |
| Asp/Asn | 6,3 ± 1,5                  | 11,6 ± 0,2               |
| Glu/Gln | 12,1 ± 1,8                 | 19,3 ± 0,6               |
| Gly     | 16,9 ± 2,5                 | 8,0 ± 0,2                |
| His     | <RL                        | 2,6 ± 0,1                |
| Ile     | 2,4 ± 0,7                  | 3,5 ± 0,3                |
| Leu     | 18,5 ± 2,9                 | 6,1 ± 0,4                |
| Lys     | 1,7 ± 0,4                  | 2,8 ± 0,2                |
| Met     | 2,3 ± 0,7                  | 1,0 ± 0,3                |
| Phe     | 3,0 ± 1,0                  | 3,3 ± 0,0                |
| Pro     | 2,6 ± 0,8                  | 4,3 ± 0,2                |
| Ser     | 12,7 ± 2,3                 | 7,2 ± 0,9                |
| Thr     | 3,3 ± 0,8                  | 4,0 ± 0,1                |
| Tyr     | 2,6 ± 1,6                  | 2,6 ± 0,0                |
| Val     | 3,1 ± 0,8                  | 5,0 ± 0,3                |
| AAA     |                            | 5,9 ± 0,1                |
| BCAA    |                            | 14,5 ± 0,3               |
| HAA     |                            | 31,9 ± 0,2               |

Tablica 20. Koncentracije proteina u pripremljenim hidrolizatima i frakcijama (<10 kDa i <1 kDa) lana i konoplje.

| <b>LAN</b>                                                                  | <b>Koncentracija<br/>[g L<sup>-1</sup>]</b> | <b>KONOPLJA</b>                                                                 | <b>Koncentracija<br/>[g L<sup>-1</sup>]</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Ukupan hidrolizat lana dobiven enzimom alkalaza                             | 70,0 ± 1,0                                  | Ukupan hidrolizat konoplje dobiven enzimom alkalaza                             | 85,0 ± 3,5                                  |
| Frakcija hidrolizata lana dobivenog enzimom alkalaza veličine ispod 10 kDa  | 69,5 ± 1,5                                  | Frakcija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom alkalaza veličine ispod 10 kDa  | 76,5 ± 2,5                                  |
| Frakcija hidrolizata lana dobivenog enzimom alkalaza veličine ispod 1 kDa   | 62,5 ± 2,0                                  | Frakcija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom alkalaza veličine ispod 1 kDa   | 68,0 ± 0,5                                  |
| Ukupan hidrolizat lana dobiven enzimom neutraza                             | 66,0 ± 1,5                                  | Ukupan hidrolizat konoplje dobiven enzimom neutraza                             | 43,0 ± 0,5                                  |
| Frakcija hidrolizata lana dobivenog enzimom neutraza veličine ispod 10 kDa  | 71,0 ± 3,0                                  | Frakcija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom neutraza veličine ispod 10 kDa  | 69,5 ± 2,0                                  |
| Frakcija hidrolizata lana dobivenog enzimom neutraza veličine ispod 1 kDa   | 62,5 ± 2,0                                  | Frakcija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom neutraza veličine ispod 1 kDa   | 93,5 ± 3,0                                  |
| Ukupan hidrolizat lana dobiven enzimom protameks                            | 63,0 ± 2,0                                  | Ukupan hidrolizat konoplje dobiven enzimom protameks                            | 56,0 ± 0,5                                  |
| Frakcija hidrolizata lana dobivenog enzimom protameks veličine ispod 10 kDa | 68,0 ± 3,0                                  | Frakcija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom protameks veličine ispod 10 kDa | 69,0 ± 2,5                                  |
| Frakcija hidrolizata lana dobivenog enzimom protameks veličine ispod 1 kDa  | 58,5 ± 1,5                                  | Frakcija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom protameks veličine ispod 1 kDa  | 64,5 ± 0,5                                  |

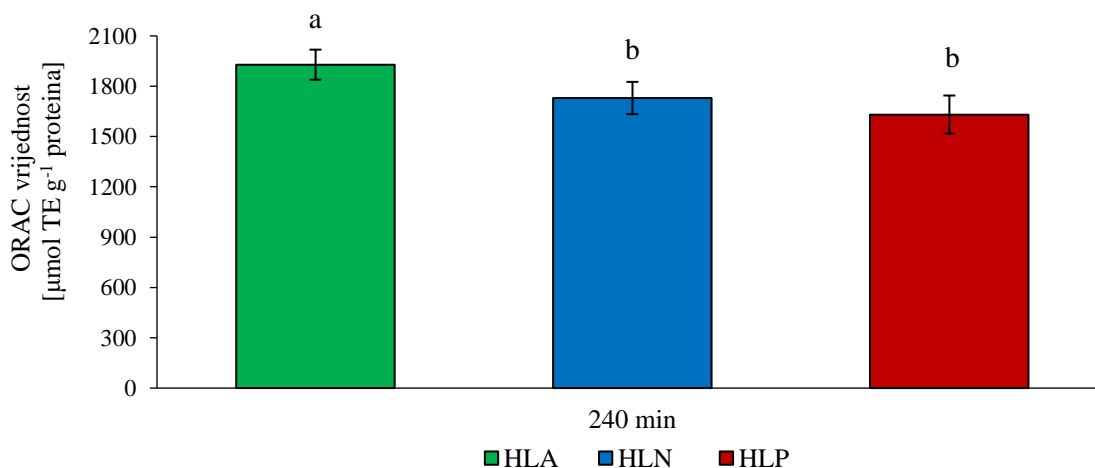
### 4.3. Proteinski hidrolizat uljane pogače lana

4.3.1. Biološki potencijal proteinskih hidrolizata uljane pogače lana, dobivenih enzimima alkalaza, neutraza i protameks

Cilj ovog dijela istraživanja bio je ispitati biološki potencijal proteinskog hidrolizata lana (HL) dobivenog djelovanjem tri mikrobne proteaze: alkalaza, neutraza i protameks. Određivanje biološkog potencijala uključivalo je mjerenje antioksidativnog kapaciteta hidrolizata metodom ORAC (Poglavlje 3.2.1.10.), dok je proliferacijski učinak pripremljenih hidrolizata određen na normalnim (HaCaT) i tumorskim (HeLa) stanicama pomoću MTS metode (Poglavlje 3.2.2.2.). HaCaT stanice korištene su i za ispitivanje protektivnog učinka hidrolizata lana s najvećim antioksidacijskim kapacitetom na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-inducirani oksidacijski stres (Poglavlje 3.2.2.3.).

#### 4.3.1.1. Antioksidacijski potencijal proteinskog hidrolizata lana

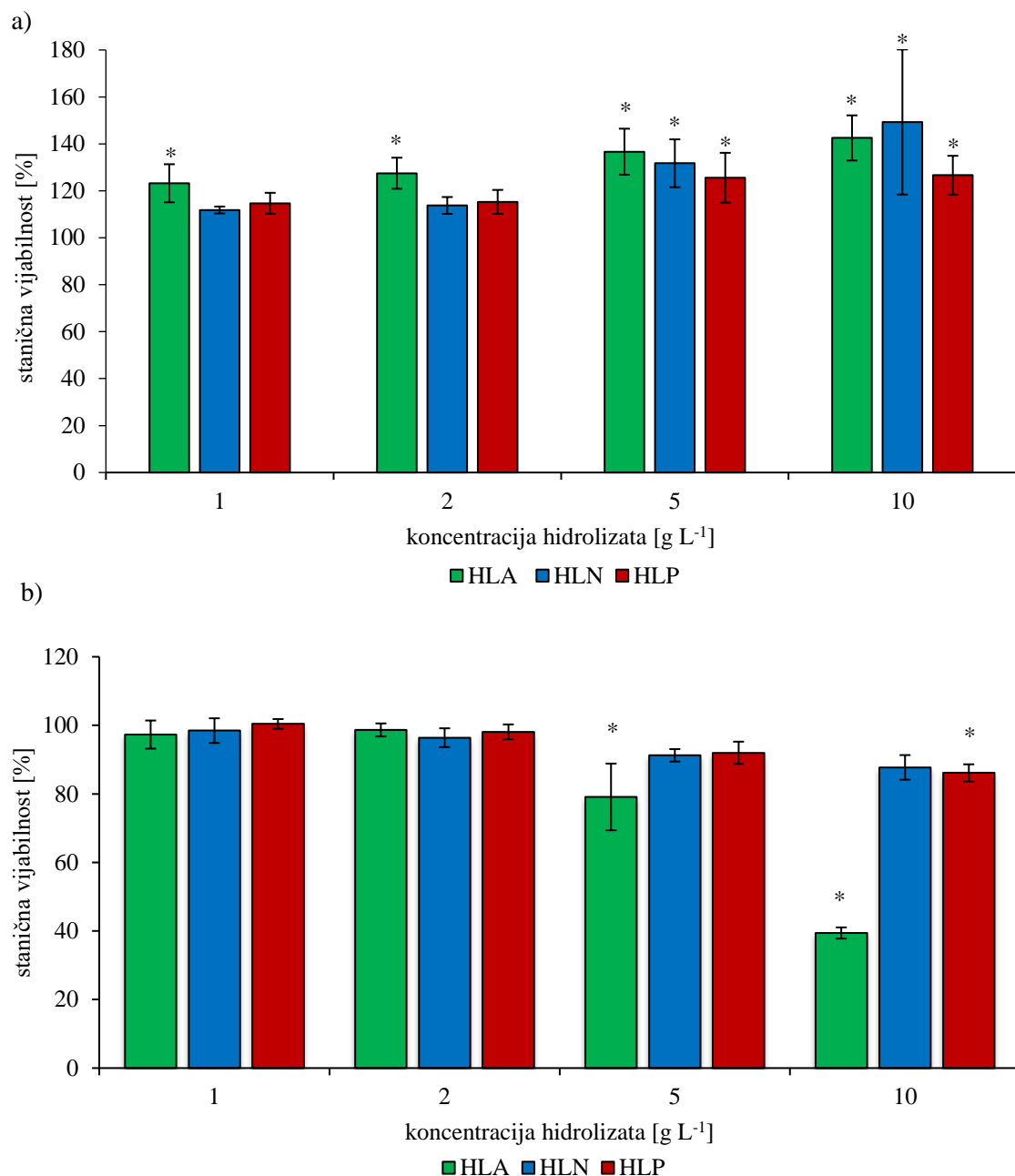
Na slici 17. prikazane su vrijednosti ORAC pripremljenih proteinskih hidrolizata lana nakon 240 min hidrolize. Najveću vrijednost ORAC, odnosno antioksidacijski potencijal, ima HLA (1928,4  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  proteina) te se statistički značajno razlikuje od vrijednosti HLN (1729,6  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  proteina) i HLP (1631,0  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  proteina).



Slika 17. Vrijednosti ORAC ( $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  proteina) pripremljenih proteinskih hidrolizata lana, dobivenih enzimima alkalaza (HLA), neutraza (HLN) i protameks (HLP) nakon 240 min hidrolize. Vrijednosti ORAC prikazane su kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. (n=3). Prikazane vrijednosti označene su različitim malim slovima (a-b) se međusobno značajno razlikuju jedne od drugih ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

#### 4.3.1.2. Učinak proteinskog hidrolizata lana na proliferaciju HeLa i HaCaT staničnih linija

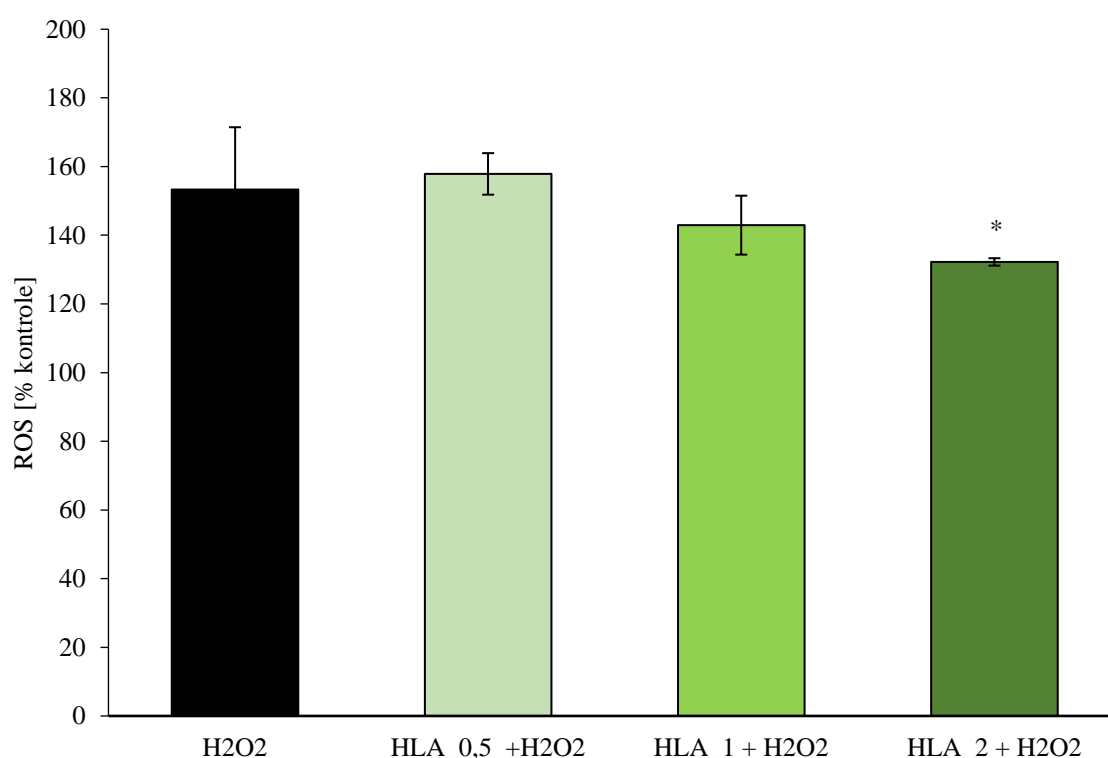
Proliferacijski učinak pripremljenih proteinskih hidrolizata lana pri različitim koncentracijama ispitan je *in vitro* na normalnoj (HaCaT) i tumorskoj (HeLa) staničnoj liniji. Tretman s proteinskim hidrolizatom lana nije pokazao antiproliferativno djelovanje na HaCaT stanice (Slika 18.a). Dapače, dodatak hidrolizata lana, u koncentracijama 5 i 10 g L<sup>-1</sup>, doveo je do značajnog stimulirajućeg efekta na HaCaT staničnu proliferaciju u rasponu od 21-49% u odnosu na kontrolu. U usporedbi s ostalim hidrolizatima, HLA je pokazao najveći proliferativan učinak na proliferaciju HaCaT stanica. HeLa stanice, tretirane s koncentracijama 1 i 2 g L<sup>-1</sup> HLA, HLN i HLP, nisu pokazale značajno smanjenje stanične proliferacije. Tretman HeLa stanica s 10 g L<sup>-1</sup> HLN i HLP doveo je do blagog citostatičnog učinka (88% i 86% vijabilnosti kontrole). Najveći citostatičan učinak (79% i 39% vijabilnosti kontrole) vidljiv je pri tretmanu HeLa stanica s većim koncentracijama HLA, 5 i 10 g L<sup>-1</sup> (Slika 18.b)



Slika 18. Učinak različitih koncentracija (1, 2, 5 i 10 g L<sup>-1</sup>) proteinskih hidrolizata lana, dobivenih enzimima alkalaza (HLA), neutraza (HLN) i protameks (HLP), na proliferaciju a) HaCAT i b) HeLa stanica, određen MTS metodom. Vijabilnost stanica (%) izražena je kao postotak tretiranih stanica u odnosu na kontrolu, tj. netretirane stanice, a podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± S.D. (n=3). Prikazane vrijednosti označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

#### 4.3.1.3. *Protektivni učinak proteinskog hidrolizata lana na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-inducirani oksidacijski stres u HaCaT stanicama*

Zbog toga što HLA posjeduje najveći antioksidacijski potencijal (Poglavlje 4.3.1.1.), odlučeno je ispitati njegov protektivni učinak na formaciju ROS-ova u HaCaT stanicama tijekom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induciranog oksidacijskog stresa. Uspoređujući nastajanje ROS-ova u HaCaT stanicama predtretiranim s HLA (0,5-2 g L<sup>-1</sup>) i u onima bez predtretmana, vidljivo je da HLA ima protektivni učinak budući da se smanjilo nastajanje ROS-ova u rasponu od 10 do 21% ovisno o dodanoj koncentraciji (Slika 19). Statistički značajno smanjenje nastalih ROS-ova postignuto je predtretmanom HaCaT stanica s 2 g L<sup>-1</sup> HLA.



Slika 19. Učinak HLA (0,5, 1 i 2 g L<sup>-1</sup>) na nastanak unutarstaničnog ROS-a u HaCaT stanicama tijekom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induciranog oksidativnog stresa, određen DCF-DA metodom. Rezultati su izraženi kao postotak kontrolnih stanica ± S.D. (n=3). Prikazane vrijednosti označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.



#### 4.3.2. Učinak proteinskog hidrolizata uljane pogače lana na HEK293T staničnu liniju

U ovom poglavlju ispitan je učinak proteinskih hidrolizata lana (HLA, HLN i HLP) na rast HEK293T stanične linije. Stanice su uzgajane u hranjivom mediju DMEM s  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  FBS te s dodatkom  $0,5$  i  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  HL. Kontrolne stanice su uzgajane u mediju DMEM s  $2,5$  i  $5 \text{ g L}^{-1}$  FBS bez dodatka hidrolizata (Poglavlje 3.2.2.4.). Na temelju dobivenih rezultata, ispitana je učinkovitost transfekcije HEK293T stanica plazmidom pEGFP-C1 i ekspresije transgena u mediju DMEM s proteinskim hidrolizatima lana koji nisu pokazali negativno djelovanje na stanični rast. Učinkovitost transfekcije HEK293T stanica izmjerena je na uređaju CellDrop-FL (Poglavlje 3.2.2.5.).

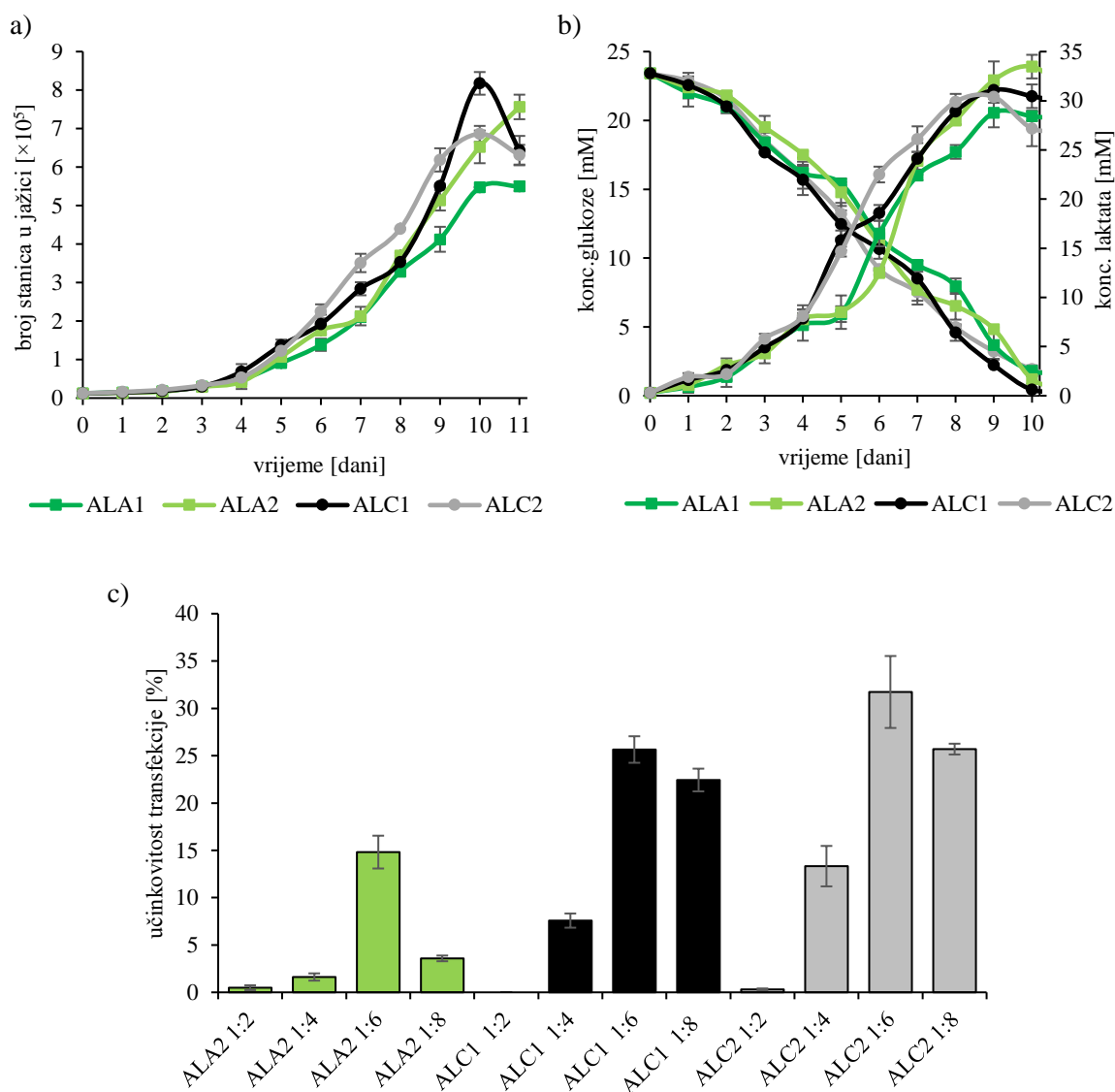
Kontrolne stanice su iste za cijelo Poglavlje 4.3.2.. Stanice uzgajane u kontrolnom mediju ALC2 postižu značajno manji najveći broj vijabilnih stanica (NBVS) u jažici ( $6,9 \times 10^5$  st jažici<sup>-1</sup>) od stanica uzgajanih u kontrolnom hranjivom mediju ALC1 ( $8,2 \times 10^5$  st jažici<sup>-1</sup>).  $\mu_{\max}$  kontrolnih stanica se značajno ne razlikuju (Prilog 1.). U obje kontrole najveća učinkovitost transfekcije postignuta je pri omjeru DNA i transfekcijskog sredstva 1:6. Pri tom omjeru, značajno veći postotak učinkovitosti transfekcije stanica postignut je u mediju ALC2 (31,7%) nego u mediju ALC1 (25,7%).

##### 4.3.2.1. Učinak proteinskog hidrolizata lana, dobivnog enzimom alkalaza, na rast i transfekciju HEK293T stanične linije

Dodatak  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  HLA u hranjivi medij ima negativan učinak na stanični rast u odnosu na kontrole, budući da postiže značajno manji NBVS ( $5,5 \times 10^5$  st jažica<sup>-1</sup>) (Slika 20.a). Stanice uzgajane u mediju ALA2 dosegle su veći NBVS ( $7,6 \times 10^5$  st jažica<sup>-1</sup>) u odnosu na kontrolu ALC2, ali manji u odnosu na kontrolu ALC1. Stanice u medijima ALA1 i ALA2 imale su značajno manji  $\mu_{\max}$  u usporedbi s kontrolnim stanicama (Prilog 1). Tijekom rasta stanice su konzumirale glukozu čija je koncentracija do kraja uzgoja pala na ispod  $2 \text{ mM}$ . S konzumacijom glukoze, kao nusprodukt metabolizma stanica, nastao je laktat čija je koncentracija do kraja uzgoja dosegla između  $28$  i  $30 \text{ mM}$  (Slika 20.b).

S obzirom da dodatak  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  HLA dijelu negativno na stanični rast, odlučeno je ispitati samo učinak dodatka  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  HLA u hranjivom mediju na učinkovitost transfekcije HEK293T stanica plazmidom pEGFP-C1. Iz slike 20.c vidljivo je da stanice najveću učinkovitost transfekcije postižu pri testiranom omjeru DNA i transfekcijskog sredstva 1:6. Učinkovitost transfekcije HEK293T stanica u ispitivanom ALA2 mediju

(14,8%) značajno je manja u odnosu na učinkovitost transfekcije stanica u kontrolnim medijima.

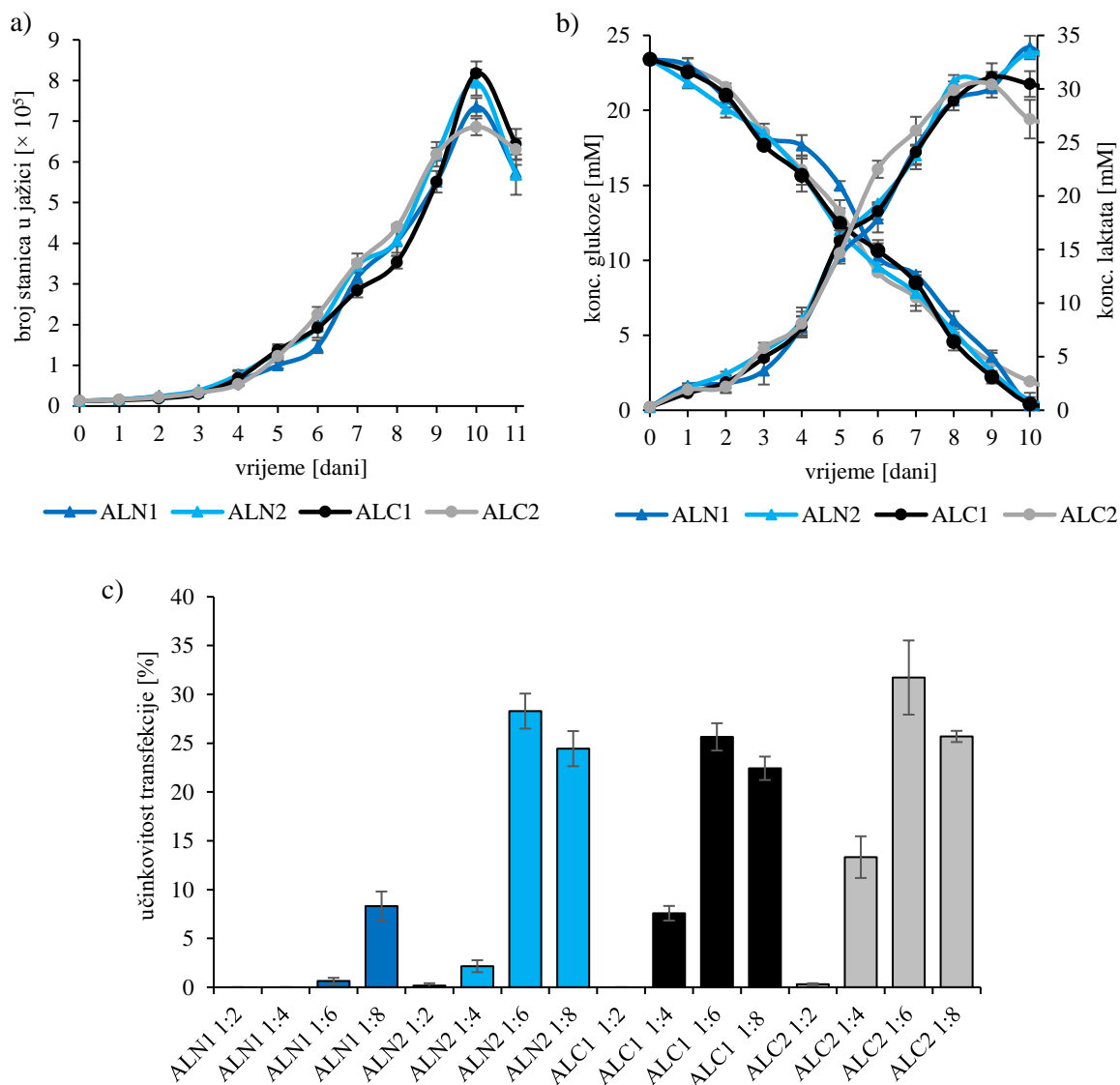


Slika 20. a) Krivulja rasta te b) koncentracija glukoze i laktata tijekom uzgoja HEK293T stanica u medijima ALA1, ALA2, ALC1 i ALC2. Stanice uzgajane u medijima ALC1 i ALC2 predstavljaju kontrole. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. (n=2). c) Učinkovitost transfekcije HEK293T stanica, pri različitim omjerima DNA i transfekcijskog sredstva (1:2, 1:4, 1:6, 1:8), uzgajanih u mediju ALA2 te u kontrolnim medijima ALC1 i ALC2. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. (n=3).

#### *4.3.2.2. Učinak proteinskog hidrolizata lana, dobivnog enzimom neutraza, na rast i transfekciju HEK293T stanične linije*

Iz krivulje rasta prikazane na slici 21.a i vrijednosti u prilogu 1. može se uočiti da HEK293T stanice uzgajane u ispitivanim medijima ALN1 ( $7,4 \times 10^5$  st jažica<sup>-1</sup>) i ALN2 ( $8,0 \times 10^5$  st jažica<sup>-1</sup>) dosežu značajno veći broj stanica u odnosu na stanice u kontrolnom mediju ALC2. NBVS postignut tijekom uzgoja u mediju ALN2 neznatno je manji od NBVS u ALN1 i kontrolnom mediju ALC1.  $\mu_{\max}$  u medijima ALN1 i ALN2 je značajno manja u odnosu  $\mu_{\max}$  u kontrolnim medija (Prilog 1) Koncentracija glukoze je do kraja uzgoja pala na vrijednosti ispod 2 mM. Istovremeno s potrošnjom glukoze, stanice su proizvodile laktat čija je koncentracija do kraja uzgoja dosegla između 29 i 32 mM (Slika 21.b).

U svim testiranim medijima najveća učinkovitost transfekcije postignuta je pri omjeru DNA i transfekcijskog sredstva 1:6, izuzev stanica uzgojenih u mediju ALN1 gdje se omjer 1:8 pokazao kao najbolji. Najveće učinkovitosti transfekcija u kontrolnim medijima i u mediju ALN2 (28,3%) neznatno se razlikuju (Slika 21.c).

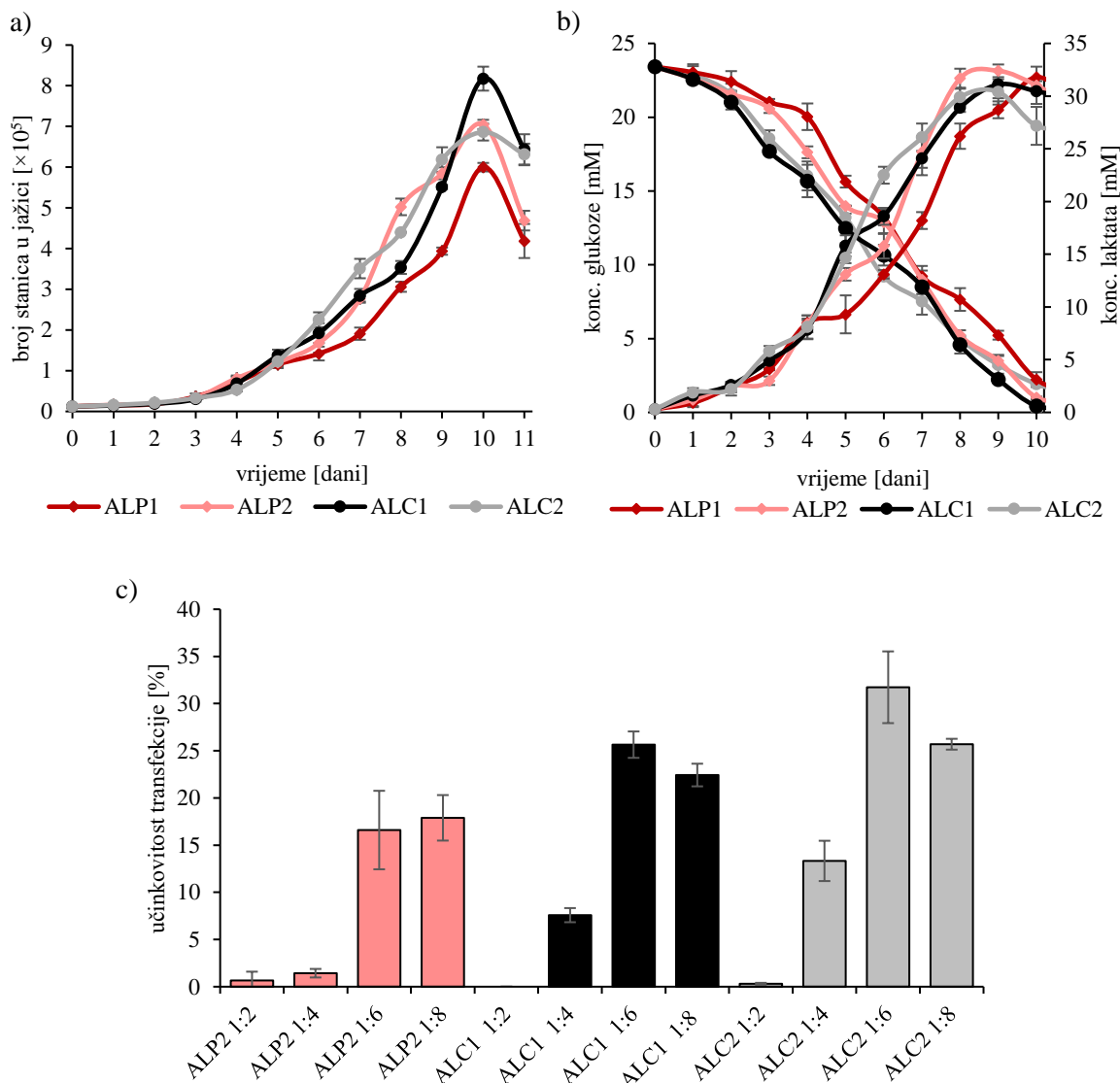


Slika 21. a) Krivulja rasta te b) koncentracija glukoze i laktata tijekom uzgoja HEK293T stanica u medijima ALN1, ALN2, ALC1 i ALC2. Stanice uzgajane u medijima ALC1 i ALC2 predstavljaju kontrole. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=2$ ). c) Učinkovitost transfekcije HEK293T stanica, pri različitim omjerima DNA i transfekcijskog sredstva (1:2, 1:4, 1:6, 1:8), uzgajanih u medijima ALN1 i ALN2 te u kontrolnim medijima ALC1 i ALC2. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ).

#### *4.3.2.3. Učinak proteinskog hidrolizata lana, dobivnog enzimom protameks, na rast i transfekciju HEK293T stanične linije*

Dodatak HLP u koncentraciji  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  u hranjivi medij dovodi do značajno manjeg NBVS ( $6,0 \times 10^5 \text{ st jažici}^{-1}$ ) te  $\mu_{\text{max}}$  ( $0,0183 \text{ h}^{-1}$ ) u usporedbi s ostalim uvjetima. Stanice uzgajane u mediju ALP2 postižu gotovo isti NBVS i  $\mu_{\text{max}}$  kao stanice uzgajane u mediju ALC2 (Slika 22.a, Prilog 1). Stanice su tijekom uzgoja trošile glukozu te je glukoze na kraju ostalo manje od 2 mM. Kao nusprodukt staničnog metabolizma, tijekom uzgoja je nastajao laktat čija je koncentracija zadnjeg dana dosegla koncentraciju između 27-30 mM (Slika 22.b).

Budući da dodatak  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  HLP dovodi do lošijeg staničnog rasta u usporedbi s kontrolnim stanicama, odlučeno je ispitati uspješnost transfekcije samo stanica uzgajanih u mediju ALP2. Najveći postotak uspješno transfeciranih stanica uzgajanih u mediju ALP2, postignut pri omjerima DNA i transfekcijskog sredstva 1:6 (16,6%) i 1:8 (17,9%), je značajno manji u usporedbi s najvećim postotkom učinkovitosti transfekcije kontrolnih stanica (Slika 22.c).



Slika 22. a) Krivulja rasta te b) koncentracija glukoze i laktata tijekom uzgoja HEK293T stanica u medijima ALP1, APL2, ALC1 i ALC2. Stanice uzgajane u medijima ALC1 i ALC2 predstavljaju kontrole. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. (n=2). c) Učinkovitost transfekcije HEK293T stanica, pri različitim omjerima DNA i transfekcijskog sredstva (1:2, 1:4, 1:6, 1:8), uzgajanih u mediju ALP2 te u kontrolnim medijima ALC1 i ALC2. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. (n=3).

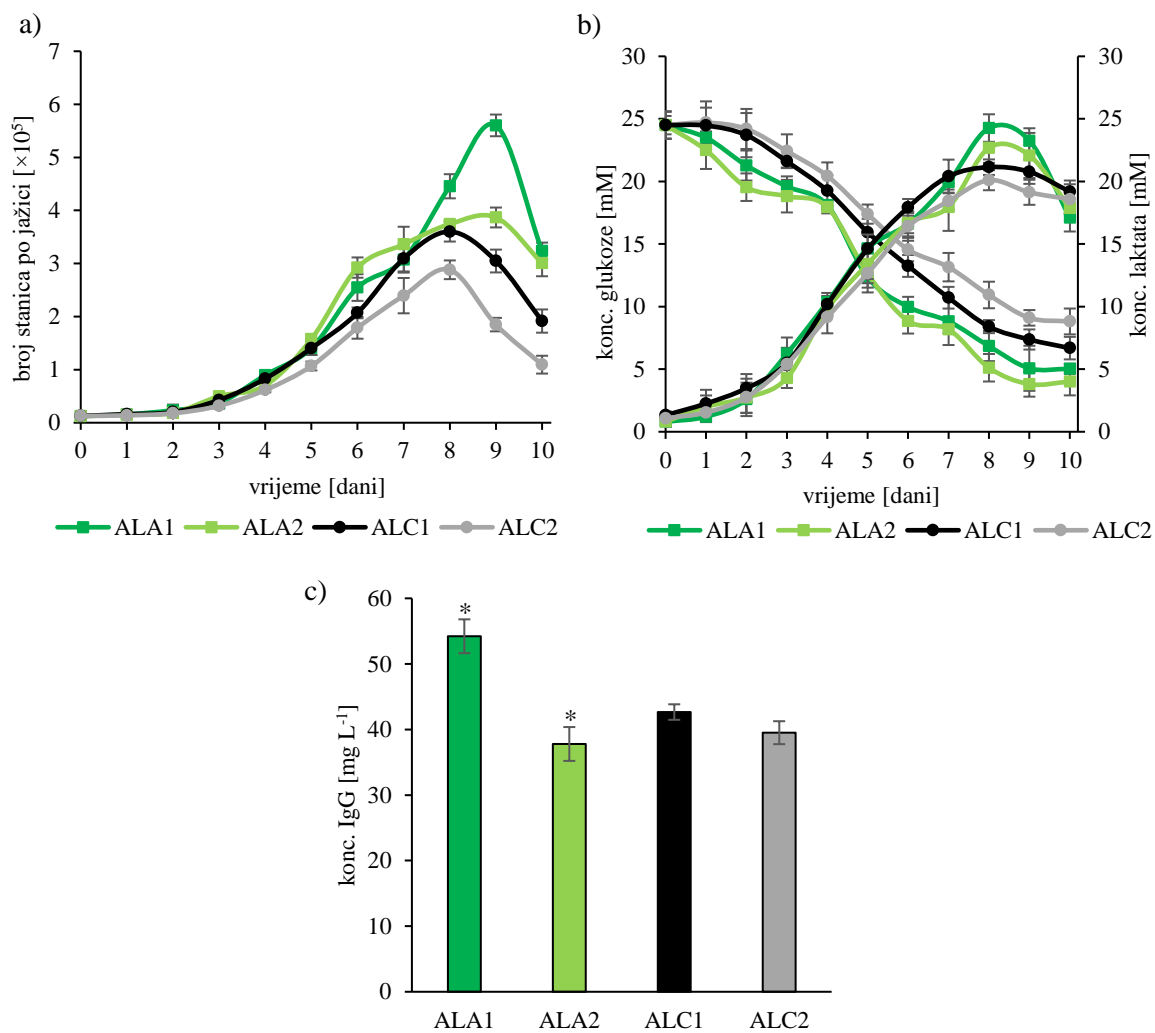
#### 4.3.3. Učinak proteinskih hidrolizata uljane pogače lana na CHO DP-12 staničnu liniju

Kako bi se ispitalo djelovanje proteinskih hidrolizata lana, na rast, produktivnost (IgG) i metabolizam (glukoza, laktat) adherentnih CHO DP-12 stanica, u hranjivom mediju DMEM sa smanjenom koncentracijom FBS ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ), stanice su uzgajane u pripremljenim medijima ALA1, ALA2, ALN1, ALN2, ALP1 i ALP2 (Poglavlje 3.2.2.4.). Kontrolne stanice uzgajane su u hranjivim medijima ALC1 i ALC2.

Kroz cijelo Poglavlje 4.3.3. prikazane su iste kontrolne stanice. Stanice u kontrolnom ALA1 mediju postižu značajno veći NBVS,  $\mu_{\max}$  i titar ( $3,6 \times 10^5 \text{ st jažici}^{-1}$ ;  $0,0228 \text{ h}^{-1}$ ;  $42,7 \text{ mg L}^{-1}$ ) od kontrolnih stanica u ALC2 mediju ( $2,9 \times 10^5 \text{ st jažici}^{-1}$ ;  $0,0217 \text{ h}^{-1}$ ;  $39,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Prilog 2). qP stanica u mediju ALC2 ( $33,36 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) veći je za 20% od qP stanica u ALC1 mediju ( $26,91 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ), dok im se qGlc međusobno značajno ne razlikuju (Prilog 2) Na kraju uzgoja u medijima ALC1 i ALC2 zaostalo je oko  $7,5 \text{ mM}$  glukoze. Tijekom uzgoja najveća koncentracija laktata u kontrolnim medijima iznosila je oko  $20,5 \text{ mM}$ .

##### *4.3.3.1. Učinak proteinskog hidrolizata lana, dobivenog enzimom alkalaza, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije*

Dodatkom  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  HLA u hranjivi medij stanice postižu značajno veći NBVS i titar IgG ( $5,6 \times 10^5 \text{ st jažici}^{-1}$ ;  $77,45 \text{ mg L}^{-1}$ ), isti qP ( $26,55 \text{ pg stanica}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) te manji  $\mu_{\max}$  ( $0,0199 \text{ h}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolne stanice u ALC1 mediju. Iako stanice u medijima ALA2 i ALC1 dosežu isti NBVS, stanice u mediju ALA2 postižu značajno veći  $\mu_{\max}$  ( $0,0247 \text{ h}^{-1}$ ), ali značajno manji titar IgG ( $53,98 \text{ mg L}^{-1}$ ) i qP ( $20,34 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) (Slika 23.a i c, Prilog 2.). Stanice u mediju ALA1 imaju značajno niži qGlc ( $9,53 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolne stanice. Na kraju staničnog uzgoja, u medijima ALA1 i ALA2 ostalo je manje glukoze ( $4,5 \text{ mM}$ ) nego u kontrolnim medijima ( $7,5 \text{ mM}$ ). Kao nusprodukt staničnog metabolizma nastaje laktat, čija koncentracija u mediju raste do  $20\text{-}24 \text{ mM}$ , nakon čega počinje opadati (Slika 23.b).

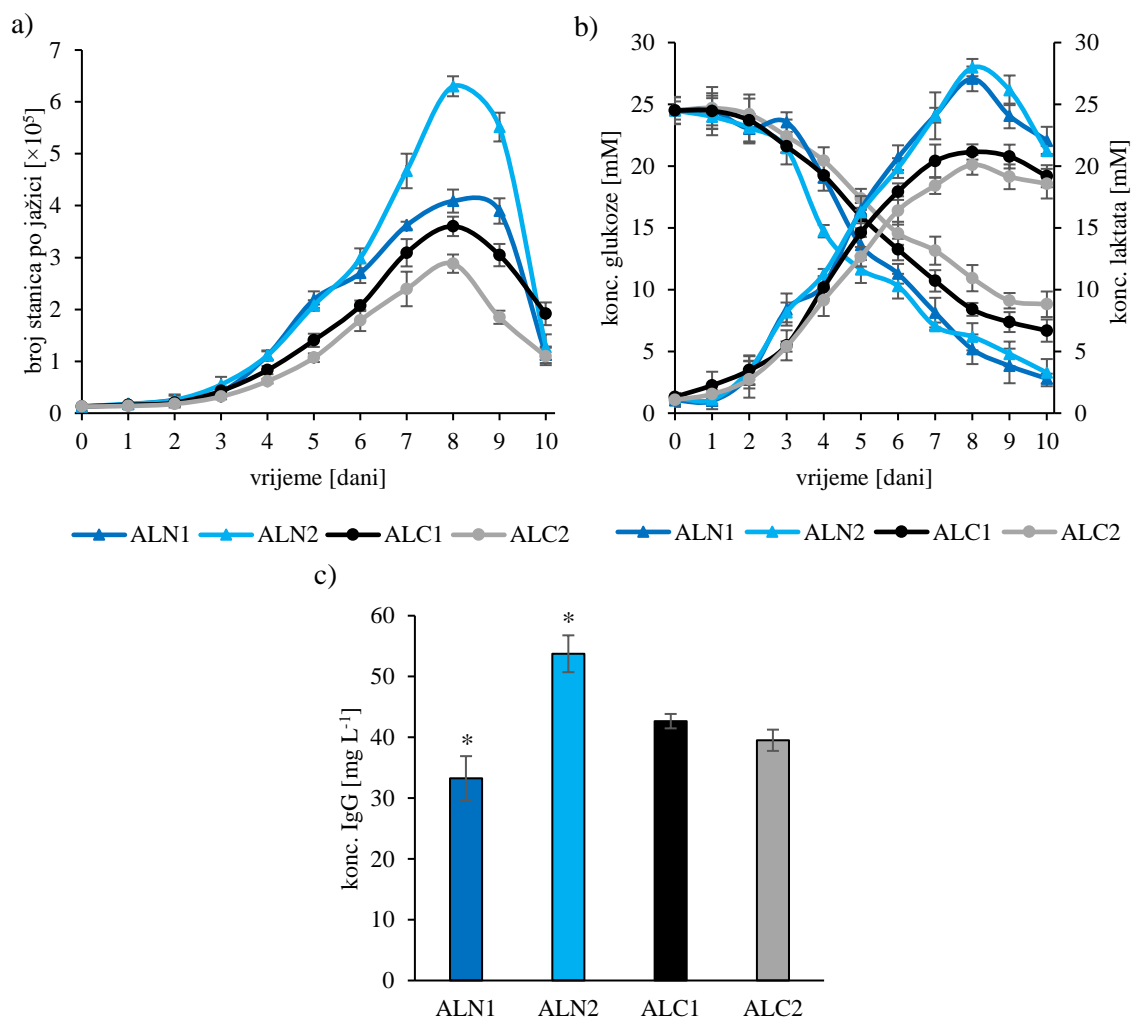


Slika 23. a) Krivulja rasta te b) koncentracija glukoze i laktata tijekom uzgoja CHO DP-12 stanične linije u medijima ALA1, ALA2, ALC1 i ALC2. c) Koncentracija IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja CHO DP-12 stanica. Stanice uzgajane u medijima ALC1 i ALC2 predstavljaju kontrole. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Prikazane vrijednosti koncentracija IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrol ALC1 ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.



#### *4.3.3.2. Učinak proteinskog hidrolizata lana, dobivenog enzimom neutraza, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije*

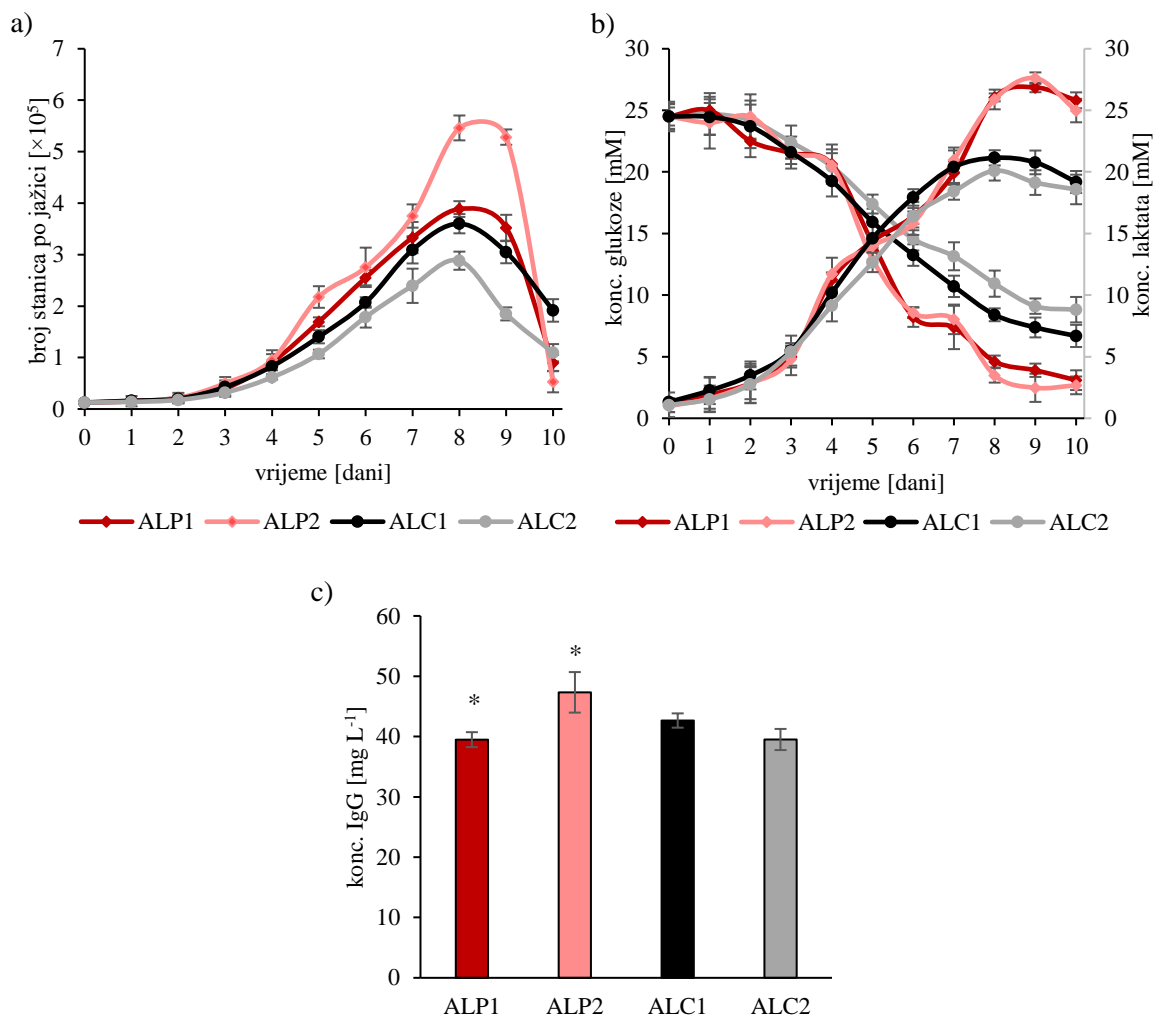
Stanice uzgajane u mediju ALN2 postižu veći NBVS ( $6,3 \times 10^5$  st jažica<sup>-1</sup>) i titar IgG ( $53,7 \text{ mg L}^{-1}$ ) u odnosu na stanice u mediju ALN1 i kontrolne stanice (Slika 24.a i c). Iako i stanice u mediju ALN1 rastu do značajno većeg NBVS ( $4,1 \times 10^5$  st jažica<sup>-1</sup>) u usporedbi s kontrolama, titar IgG im je značajno manji ( $33,3 \text{ mg L}^{-1}$ ). Stanice uzgajane u medijima s hidrolizatima imaju značajno manji qP u odnosu na kontrolne stanice (Prilog 2).  $\mu_{\max}$  stanica u medijima ALN1 i ALN2 nalazi se unutar  $\mu_{\max}$  raspona kontrolnih stanica. (Prilog 2). U medijima s dodatkom hidrolizata stanice konzumiraju više glukoze u odnosu na kontrolne stanice, što se vidi i iz slike 22.b gdje je u medijima ALN1 i ALN2 na kraju uzgoja ostalo oko 3 mM glukoze, dok je u kontrolama ta koncentracija iznosila oko 7,5 mM. Posljedično tome, u medijima s dodatkom hidrolizata nastaje više laktata (28 mM) nego u medijima ALC1 i ALC2 (Slika 24.b).



Slika 24. a) Krivulja rasta te b) koncentracija glukoze i laktata tijekom uzgoja CHO DP-12 stanične linije u medijima ALN1, ALN2, ALC1 i ALC2. c) Koncentracija IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja CHO DP-12 stanica. Stanice uzgajane u medijima ALC1 i ALC2 predstavljaju kontrole. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. (n=3). Prikazane vrijednosti koncentracije IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrolu ALC1 ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

#### *4.3.3.3. Učinak proteinskog hidrolizata lana, dobiveog enzimom protameks, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije*

Na slici 25.a vidljivo je da dodatak  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  HLP u hranjivi medij pozitivno utječe na stanični rast. Te stanice, uzgajane u mediju ALP2, postižu značajno veći NBVS ( $5,5 \text{ st jažici}^{-1}$ ) te veći titar IgG ( $47,3 \text{ mg L}^{-1}$ ) u usporedbi sa stanicama uzgajanim u medijima ALP1, ALC1 i ALC2 (Slika 25.c, Prilog 2).  $\mu_{\max}$  stanica u medijima s dodatkom hidrolizata nalazi se unutar  $\mu_{\max}$  raspona kontrolnih stanica. (Prilog 2). qP vrijednosti stanica u medijima ALP1 i ALP2 ( $23,00 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ;  $21,94 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) značajno su manji od qP vrijednosti kontrolnih stanica. Koncentracija glukoze u medijima ALP1 i ALP2 ( $2,5 \text{ mM}$ ) na kraju uzgoja je niža nego koncentracija glukoze u kontrolnim medijima ( $7,5 \text{ mM}$ ). U medijima s dodatkom hidrolizata tijekom uzgoja stanica nakupilo se  $27,5 \text{ mM}$  laktata, što je  $37,5\%$  više nego u kontrolnim medijima (Slika 25.b).



Slika 25. a) Krivulja rasta te b) koncentracija glukoze i laktata tijekom uzgoja CHO DP-12 stanične linije u medijima ALP1, ALP2, ALC1 i ALC2. c) Koncentracija IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja CHO DP-12 stanica. Stanice uzgajane u medijima ALC1 i ALC2 predstavljaju kontrole. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Prikazane vrijednosti koncentracija IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrolu ALC1 ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

#### 4.3.4. Učinak proteinskih hidrolizata i peptidnih frakcija uljane pogače lana na CHO DP-12-S staničnu liniju

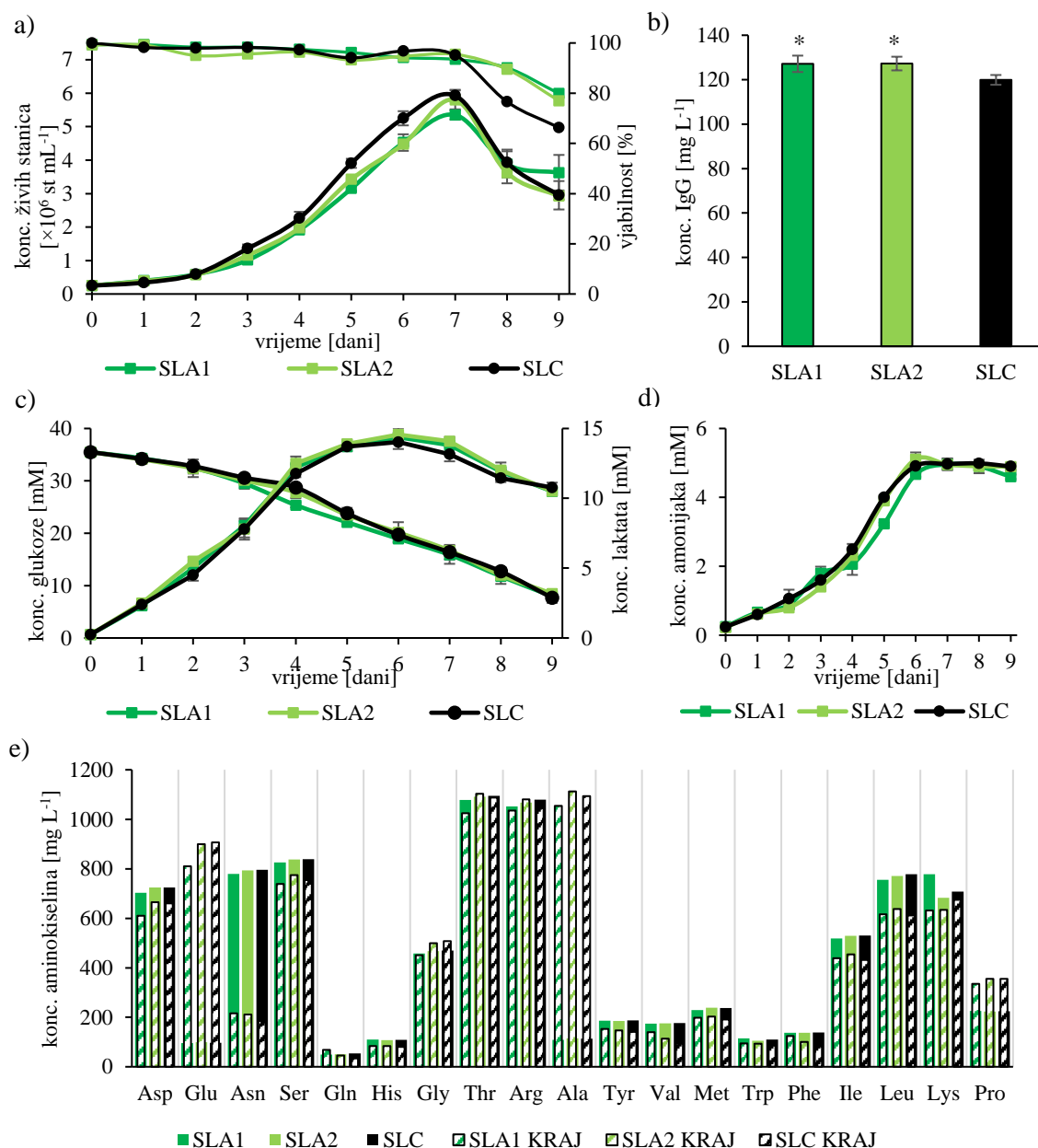
U ovom poglavlju cilj je bio istražiti kako dodatak hidrolizata i peptidnih frakcija proteina uljane pogače lana u medij PowerCHO<sup>®</sup>-2 CD, djeluje na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12-S stanica. Navedeni medij ne sadrži serum, a redoviti dodatak su mu inzulin, metotreksat, L-glutamin i antibiotik. U prvom koraku ispitani su učinci ukupnih hidrolizata lana u dvije testirane koncentracije, 0,5 i 2 g L<sup>-1</sup>. U drugom koraku, u istim koncentracijama, ispitani su učinci pripremljenih peptidnih frakcija, <10 kDa i <1 kDa (Poglavlje 3.2.2.7.).

Kao kontrola poslužile su nam stanice uzgajane u PowerCHO<sup>®</sup>-2 CD mediju bez dodatka hidrolizata. Ove stanice postižu najveću koncentraciju vijabilnih stanica (NKVS) od  $5,9 \times 10^6$  st mL<sup>-1</sup> te koncentraciju IgG u hranjivom mediju od 119,9 mg L<sup>-1</sup>.  $\mu_{\max}$  kontrolnih stanica iznosi 0,0228 h<sup>-1</sup>, dok im qP iznosi 4,71 pg st<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup> (Prilog 3.a). Stanice nisu potrošile svu glukozu te je na kraju uzgoja u mediju ostalo 7,6 mM. Tijekom uzgoja koncentracija laktata u hranjivom mediju dosegla je najveću vrijednost od 14 mM, a amonijaka 5 mM. Ova kontrola ista je za cijelo poglavlje 4.3.4.

#### *4.3.4.1. Učinak proteinskog hidrolizata i peptidnih frakcija uljane pogače lana, dobivenih enzimom alkalaza, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12-S stanične linije*

##### *4.3.4.1.1. Učinak proteinskog hidrolizata lana dobivenog enzimom alkalaza*

Stanice uzgajane u mediju SLA1 postižu značajno manju NKVS ( $5,4 \times 10^6$  st mL<sup>-1</sup>) u odnosu na kontrolu (Slika 26.a). Nakon 7. dana uzgoja dolazi do značajnog smanjenja stanične vijabilnosti u svim testiranim medijima. Ukupna koncentracija IgG na kraju uzgoja značajno je veća u medijima SLA1 (127,1 mg L<sup>-1</sup>) i SLA2 (127,3 mg L<sup>-1</sup>) nego u kontrolnom mediju (Slika 26.b). Kontrolne stanice postižu značajno veći  $\mu_{\max}$  u usporedbi sa stanicama uzgajanim u mediju SLA1 i SLA2 (0,0203 h<sup>-1</sup> i 0,0204 h<sup>-1</sup>), no značajno manji qP (Prilog 3.a). qGlc je ista u sva tri medija te stanice glukozu ravnomjerno troše do kraja uzgoja gdje je u hranjivim medijima zadnjeg dana zaostaje 7,5 mM. S potrošnjom glukoze i rastom stanica, kao nusprodukti staničnog metabolizma nastaju laktat i amonijak. Koncentracija laktata tijekom rasta stanica doseže 14-15 mM, te do kraja uzgoja blago opada (Slika 26.c). Amonijak u hranjivim medijima za pet ili šest dana doseže koncentraciju 4,5-5 mM koja zatim stagnira do završetka uzgoja (Slika 26.d). Na slici 28.e vidimo aminokiselinske sastave medija na početku i na kraju uzgoja. Može se uočiti da mediji SLA1 i SLA2 na početku uzgoja imaju gotovo identičan aminokiselinski sastav kao kontrolni medij SLC. Po koncentraciji aminokiselina na kraju uzgoja, vidljivo je da je konzumacija aminokiselina u sva tri testirana medija vrlo slična. Dok se većini aminokiselina koncentracija tijekom uzgoja smanjivala, zbog stanične konzumacije istih, u mediju se na kraju uzgoja povećala koncentracija glutaminske kiseline, alanina i prolina.

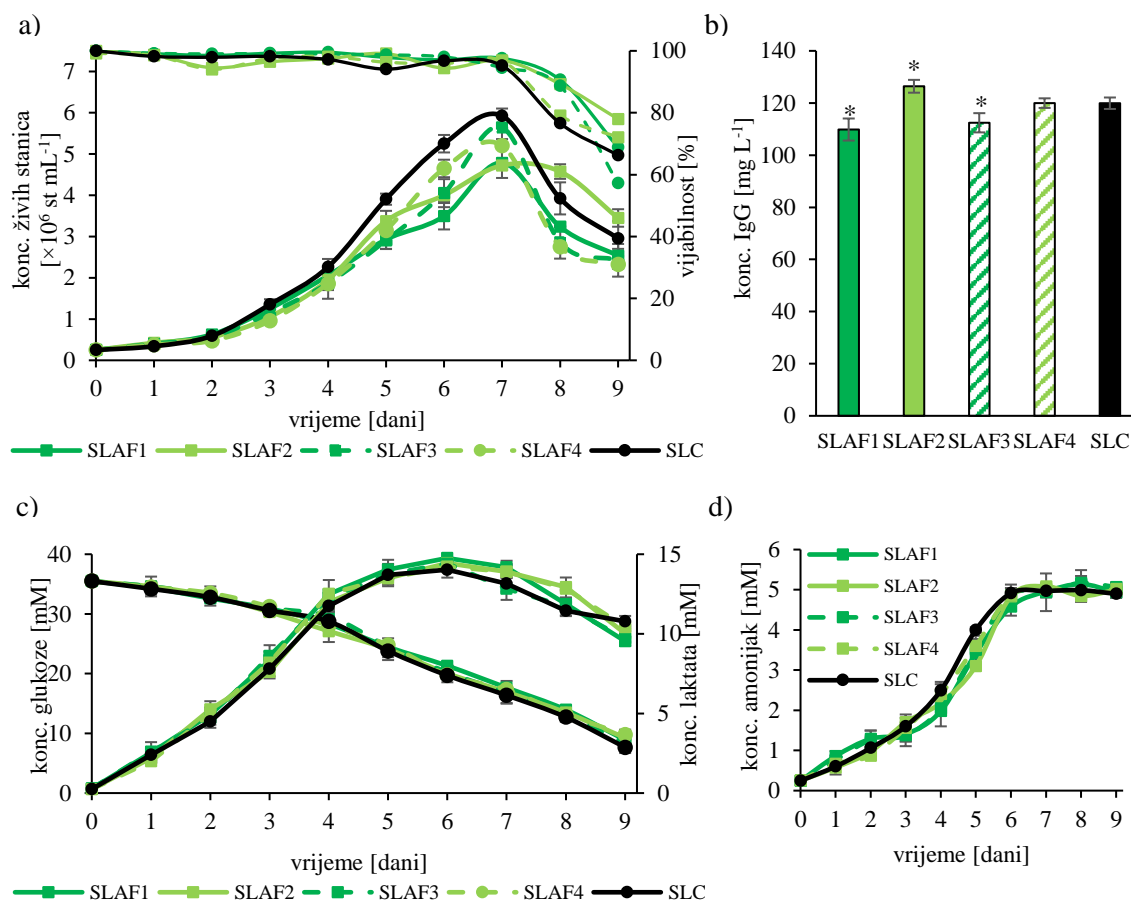


Slika 26. Učinci uzgoja CHO DP-12-S stanica u medijima SLA1, SLA2 i SLC na a) rast i vijabilnosti stanica, b) koncentraciju IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja, c) koncentraciju glukoze i laktata, d) koncentraciju amonijaka te d) koncentraciju slobodnih aminokiselina na početku i na kraju uzgoja. Stanice uzgajane u mediju SLC predstavljaju kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Prikazane vrijednosti koncentracija IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

#### 4.3.4.1.2. Učinak peptidnih frakcija hidrolizata lana dobivenog enzimom alkalaza

NKVS u mediju SLAF3 statistički je jednaka koncentraciji stanica u kontroli. Stanice uzgajane u ostalim medijima, u usporedbi s kontrolom, postižu značajno manji NKVS (Slika 27.a).  $\mu_{\max}$  kontrolnih stanica veći je od  $\mu_{\max}$  stanica u medijima s dodatkom peptidnih frakcija (Prilog 3.a). Vijabilnost stanica značajno je pala nakon 7. dana uzgoja. Tijekom uzgoja u SLAF2 mediju stanice su postigle značajno veću koncentraciju IgG ( $126,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) u usporedbi s titrom u kontrolnom mediju. Titar IgG postignut u SLAF1 ( $109,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) i SLAF3 ( $112,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) medijima značajno je manji od titra postignutog u kontroli (Slika 27.b). qP svih ispitivanih stanica veći je od qP kontrole između 14,8% i 23% (Prilog 3.a). Stanice ravnomjerno troše glukozu tijekom uzgoja do konačne koncentracije od 7-10 mM. Stanice uzgajane u medijima SLAF1, SLAF3 i SLAF4 imaju veći qGlc od kontrolnih stanica. Koncentracija nusprodukata laktata tijekom uzgoja je rasla, dosegla najveću koncentraciju od 14,5 mM, no do kraja uzgoja koncentracija je blago pala (Slika 27.c). Koncentracija amonijaka, nakon što dosegne vrijednost od otprilike 5 mM, više se značajno ne mijenja (Slika 27.d).



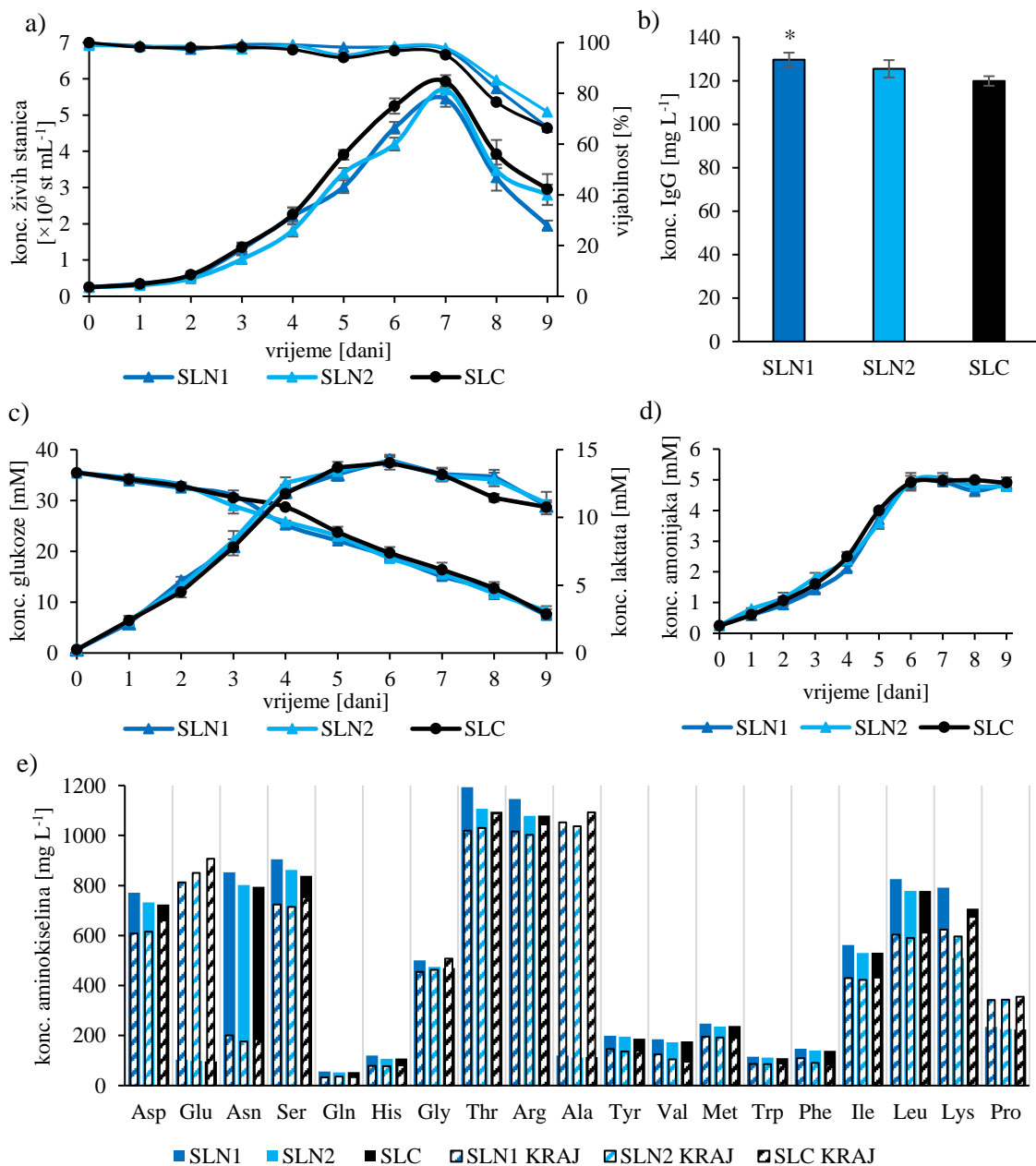


Slika 27. Učinci uzgoja CHO DP-12-S stanica u medijima SLAF1, SLAF2, SLAF3, SLAF4 i SLC na a) rast i vijabilnosti stanica, b) koncentraciju IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja, c) koncentraciju glukoze i laktata te d) koncentraciju amonijaka. Stanice uzgajane u mediju SLC predstavljaju kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Prikazane vrijednosti koncentracija IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

*4.3.4.2. Učinak proteinskog hidrolizata i peptidnih frakcija uljane pogače lana, dobivenih enzimom neutraza, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12-S stanične linije*

*4.3.4.2.1. Učinak proteinskog hidrolizata lana dobivenog enzimom neutraza*

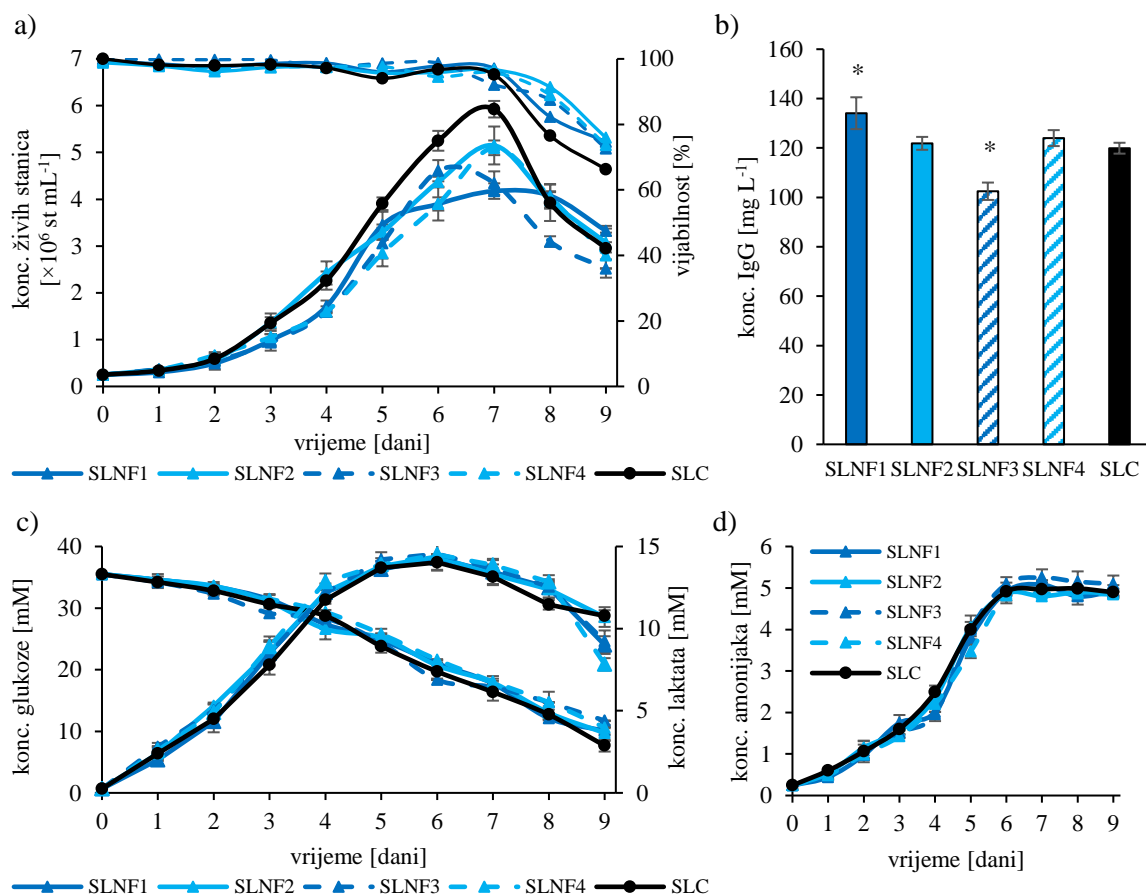
Stanice uzgajane u kontrolnom mediju te u medijima SLN1 i SLN2 postižu gotovo istu NKVS i  $\mu_{\max}$ . Vijabilost stanica je do 7. dana uzgoja iznad 90 %, nakon čega dolazi do naglog pada (Slika 28.a). Koncentracija IgG u SLN1 mediju ( $129,7 \text{ mg L}^{-1}$ ) značajno je veća u usporedbi s koncentracijom u mediju SLC (Slika 28.b). Vrijednosti qP i qGlc stanica, uzgajanih u medijima s dodatkom proteinskog hidrolizata lana, veće su od qP i qGlc kontrolnih stanica (Prilog 3.a). Zadnjeg dana uzgoja u hranjivim medijima ostalo je između 7,5 i 8,5 mM glukoze. Kao nusprodukti staničnog metabolizma, u hranjivim medijima se tijekom uzgoja nakupljaju laktat i amonijak do koncentracije 14,5 mM, odnosno 5 mM (Slika 28.c i d). Na slici 28.e vidi se da je u mediju SLN1 početna koncentracija većine aminokiselina veća u usporedbi s koncentracijama aminokiselina u medijima SLN2 i SLC. Također, stanice u mediju SLN1 na kraju uzgoja imaju nižu koncentraciju aminokiselina u odnosu na kontrolu, što sugerira da je potrošnja tih stanica veća. Na kraju uzgoja u mediju se povećala koncentracija glutamina, alanina i prolina. U kontrolnom mediju došlo je do značajnije akumulacije glutaminske kiseline i alanina u odnosu na medije SLN1 i SLN2.



Slika 28. Učinci uzgoja CHO DP-12-S stanica u medijima SLN1, SLN2 i SLC na a) rast i vijabilnosti stanica, b) koncentraciju IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja, c) koncentraciju glukoze i laktata, d) koncentraciju amonijaka te d) koncentraciju slobodnih aminokiselina na početku i na kraju uzgoja. Stanice uzgajane u mediju SLC predstavljaju kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Prikazane vrijednosti koncentracija IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

#### 4.3.4.2.2. Učinak peptidnih frakcija hidrolizata lana dobivenog enzimom neutraza

Prema slici 29.a vidljivo je da dodatak peptidnih frakcija uljane pogače, veličina  $<10$  kDa i  $<1$  kDa, negativno utječu na rast, budući da stanice uzgajane u medijima SLNF1, SLNF2, SLNF3 i SLNF4 tijekom rasta postižu značajno niži NKVS u usporedbi s kontrolom (12-39% niži od kontrole). Udio živih stanica u kulturi se nakon 7. dana uzgoja počeo smanjivati u svim medijima. Najveći  $\mu_{\max}$  ( $0,0253 \text{ h}^{-1}$ ), titar IgG ( $134,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) te qP ( $6,42 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) imaju stanice uzgajane u SLFN1 mediju. Također, stanice uzgajane i u ostalim medijima imaju značajno veći qP u usporedbi s kontrolom (Prilog 3.a). Tijekom uzgoja, stanice su u ispitivanim medijima trošile glukozu specifičnom brzinom istom kao stanice u kontrolnom mediju. Zadnjeg dana uzgoja, u hranjivim medijima s dodatkom peptidnih frakcija ostalo je 30-60% više glukoze nego u kontroli. Laktat se akumulira u hranjivom mediju do koncentracije  $14,5 \text{ mM}$ , nakon čega dolazi do blagog opadanja njegove ukupne koncentracije (Slika 29.c). Koncentracija amonijaka je rasla do  $5 \text{ mM}$  nakon čega je do kraja uzgoja bila nepromjenjena (Slika 29.d).

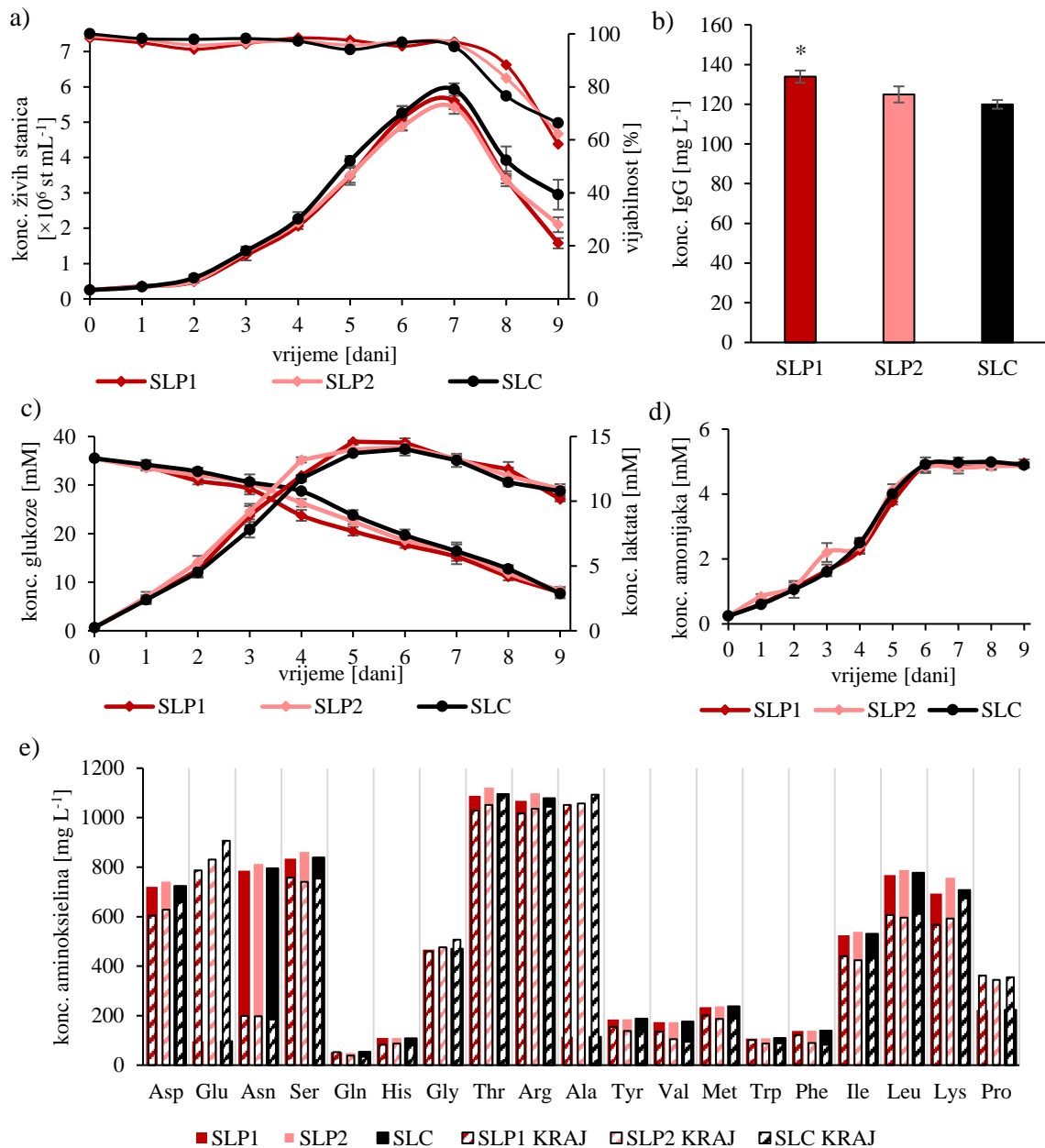


Slika 29. Učinci uzgoja CHO DP-12-S stanica u medijima SLNF1, SLNF2, SLNF3, SLNF4 i SLC na a) rast i vijabilnosti stanica, b) koncentraciju IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja, c) koncentraciju glukoze i laktata te d) koncentraciju amonijaka. Stanice uzgajane u mediju SLC predstavljaju kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Prikazane vrijednosti koncentracija IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrole ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

*4.3.4.3. Učinak proteinskog hidrolizata i peptidnih frakcija uljane pogače lana, dobivenih enzimom protameks, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12-S stanične linije*

*4.3.4.3.1. Učinak proteinskog hidrolizata lana dobivenog enzimom protameks*

Iz krivulje rasta na slici 30.a može se uočiti da stanice uzgajane u mediju SLP2 rastu do značajno niže NKVS ( $5,4 \times 10^6$  st mL<sup>-1</sup>) nego kontrola. U oba ispitivana medija, stanice postižu isti  $\mu_{\max}$  kao i stanice u kontroli. Nakon 7. dana uzgoja udio živih stanica pada ispod 90% te stanice ulaze u fazu odumiranja. Koncentracija IgG u SLP1 hranjivom mediju je za 11,7% veća u odnosu na koncentraciju u kontrolnom mediju (Slika 30.b). Vrijednost qP i qglc kontrolnih stanica značajno su manje od qP i qglc stanica uzgajanih u medijima SLP1 i SLP2 (Prilog 3.a). Glukoza se tijekom staničnog uzgoja ravnomjerno troši te je između 7,5-8 mM ostaje neiskorišteno na kraju uzgoja. Nakon što koncentracija laktata dosegne oko 14,5 mM, započinje blagi pad iste do kraja uzgoja. (Slika 30.c). Amonijak se akumulira u hranjivim medijima do koncentracije od 5 mM, nakon čega se ona više ne mijenja (Slika 30.d). Koncentracija pojedinih aminokiselina u mediju SLP2 na početku uzgoja neznatno je veća od koncentracije tih aminokiselina u mediju SLP1 i SLC. U sva tri testirana medija koncentracija preostalih aminokiselina na kraju uzgoja im je vrlo slična (Slika 30.e). Na kraju uzgoja došlo je do porasta koncentracije glutaminske kiseline, alanina i prolina baš kao i u poglavlju 4.3.4.2.1.

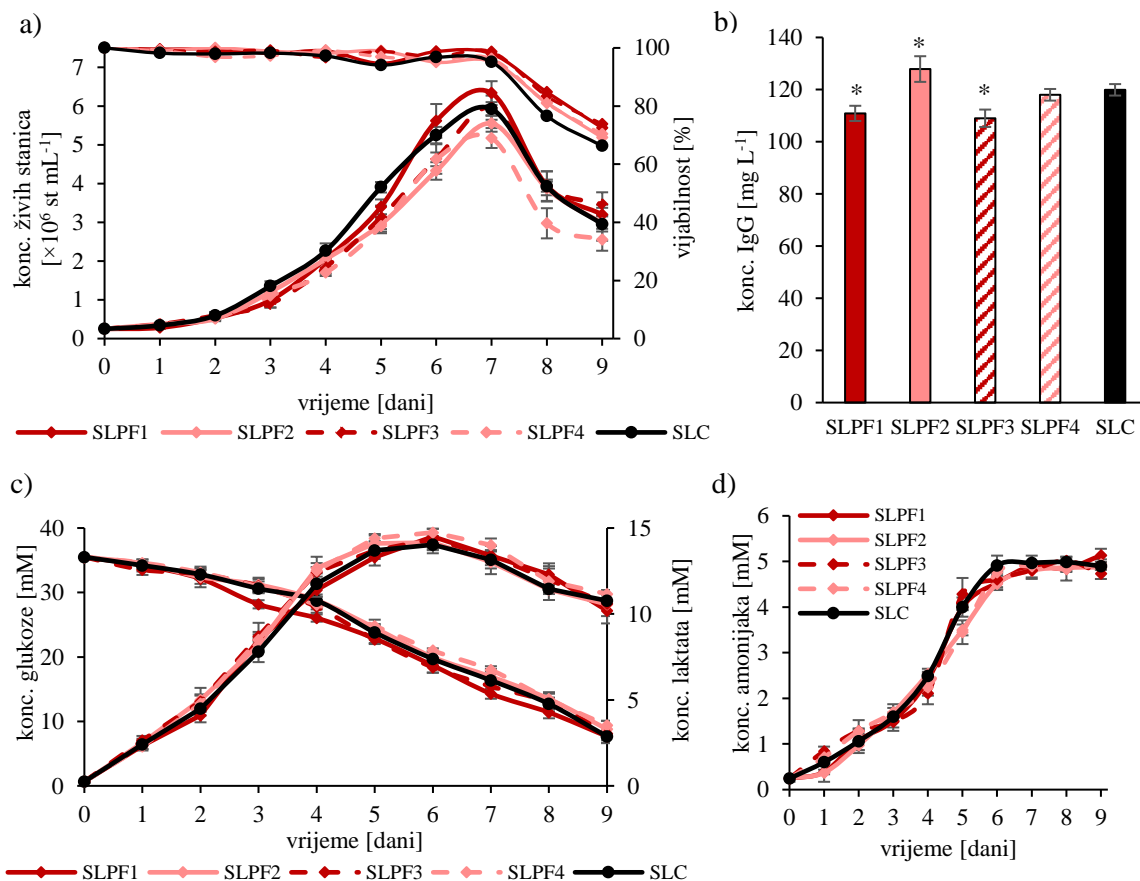


Slika 30. Učinci uzgoja CHO DP-12-S stanica u medijima SLP1, SLP2 i SLC na a) rast i vijabilnosti stanica, b) koncentraciju IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja, c) koncentraciju glukoze (glc) i laktata (lac), d) koncentraciju amonijaka te d) koncentraciju slobodnih aminokiselina na početku (0) i na kraju ( ) uzgoja. Stanice uzgajane u mediju SLC predstavljaju kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. (n=3). Prikazane vrijednosti koncentracija IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

#### *4.3.4.3.2. Učinak peptidnih frakcija hidrolizata lana dobivenog enzimom protameks*

Iz slike 31.a može se uočiti da jedino stanice u mediju SLPF4 postižu značajnu manju NKVS ( $5,2 \times 10^6$  st mL<sup>-1</sup>) u odnosu na stanice u mediju SLC. Dok je  $\mu_{\max}$  stanica u medijima SLPF2, SLPF3 i SLPF4 značajno manji,  $\mu_{\max}$  stanica u mediju SLPF1 (0,0249 h<sup>-1</sup>) značajno je veći od  $\mu_{\max}$  kontrolnih stanica (Prilog 3.a). Kao i u poglavlju 4.3.4.3.2. vijabilnost stanica naglo opada nakon 7. dana uzgoja. Najveća koncentracija IgG postignuta je u mediju SLPF2 (127,9 mg L<sup>-1</sup>), dok je najmanja koncentracija postignuta u medijima SLPF1 i SLPF3 (Slika 31.b). Iz priloga 3.a je vidljivo da najmanji qP imaju stanice uzgajane u mediju SLPF1, dok značajno veći qP od kontrole imaju stanice uzgajane u mediju SLPF2 i SLPF3. Glukoza, laktat i amonijak se ponašaju kao u poglavlju 4.3.4.3.1.





Slika 31. Učinci uzgoja CHO DP-12-S stanica u medijima SLPF1, SLNP2, SLPF3, SLPF4 i SLC na a) rast i vijabilnosti stanica, b) koncentraciju IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja, c) koncentraciju glukoze i laktata te d) koncentraciju amonijaka. Stanice uzgajane u mediju SLC predstavljaju kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± S.D. (n=3). Prikazane vrijednosti koncentracija IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

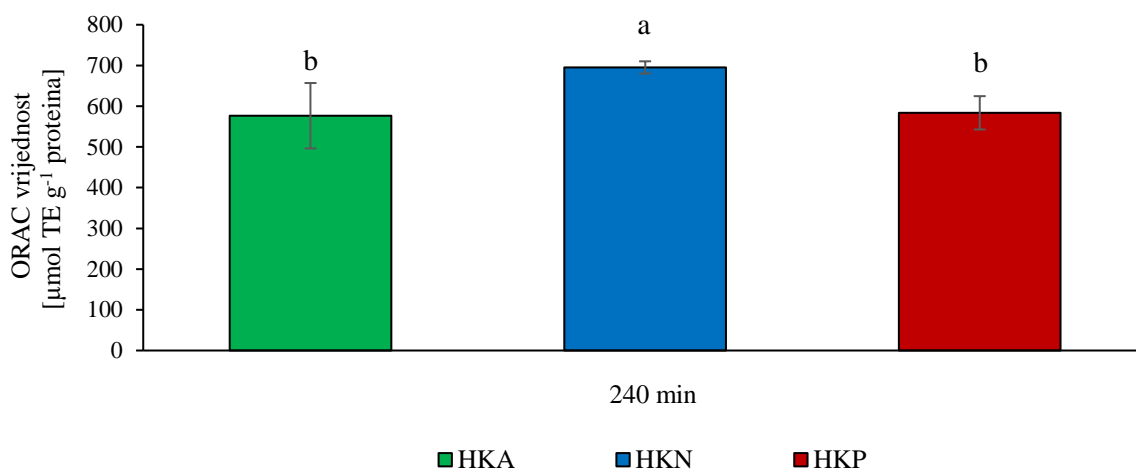
#### 4.4. Proteinski hidrolizat uljane pogače konoplje

4.4.1. Biološki potencijal proteinskih hidrolizata uljane pogače konoplje dobivenih djelovanjem enzima alkalaza, neutraza i protameks

Cilj ovog dijela istraživanja bio je ispitati biološki potencijal proteinskog hidrolizata konoplje (HK) dobivenog djelovanjem tri proteaze mikrobnog podrijetla: alkalaza, neutraza i protameks. Kako bi se odredio biološki potencijala izmjeren je antioksidativni kapacitet hidrolizata metodom ORAC (Poglavlje 3.2.1.10.), dok je proliferacijski učinak pripremljenih hidrolizata određen na normalnim (HaCaT) i tumorskim (HeLa) stanicama pomoću MTS metode (Poglavlje 3.2.2.2.). Ispitan je i protektivan učinak hidrolizata konoplje s najvećim antioksidacijskim kapacitetom na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-inducirani oksidacijski stres u HaCaT stanicama (Poglavlje 3.2.2.3.).

##### 4.4.1.1. Antioksidacijski potencijal proteinskog hidrolizata konoplje

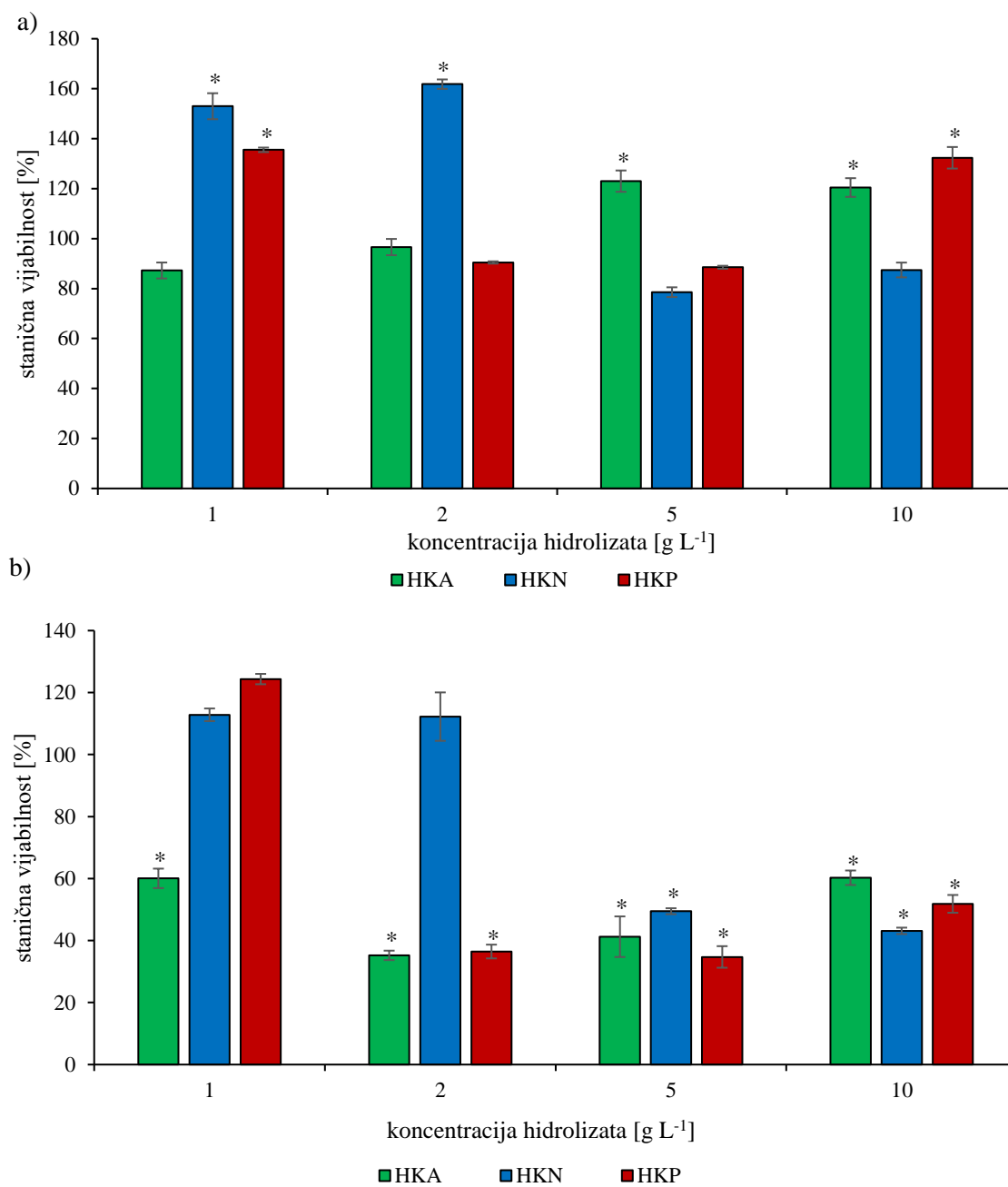
Na slici 32. prikazane su vrijednosti ORAC pripremljenih proteinskih hidrolizata konoplje nakon 240 min hidrolize. Najveću vrijednost ORAC, odnosno antioksidacijski potencijal, ima HKN (695,2  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  proteina) te se statistički značajno razlikuje od HKA (576,5  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  proteina) i HKP (583,7  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  proteina) vrijednosti.



Slika 32. Vrijednosti ORAC ( $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  proteina) pripremljenih proteinskih hidrolizata konoplje dobivenih djelovanjem enzima alkalaza (HKA), neutraza (HKN) i protameks (HKP), nakon 240 min. Vrijednosti ORAC su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Prikazane vrijednosti označene su različitim malim slovima (a-b) se međusobno značajno razlikuju jedne od drugih ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

#### 4.4.1.2. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje na proliferaciju HeLa i HaCaT staničnih linija

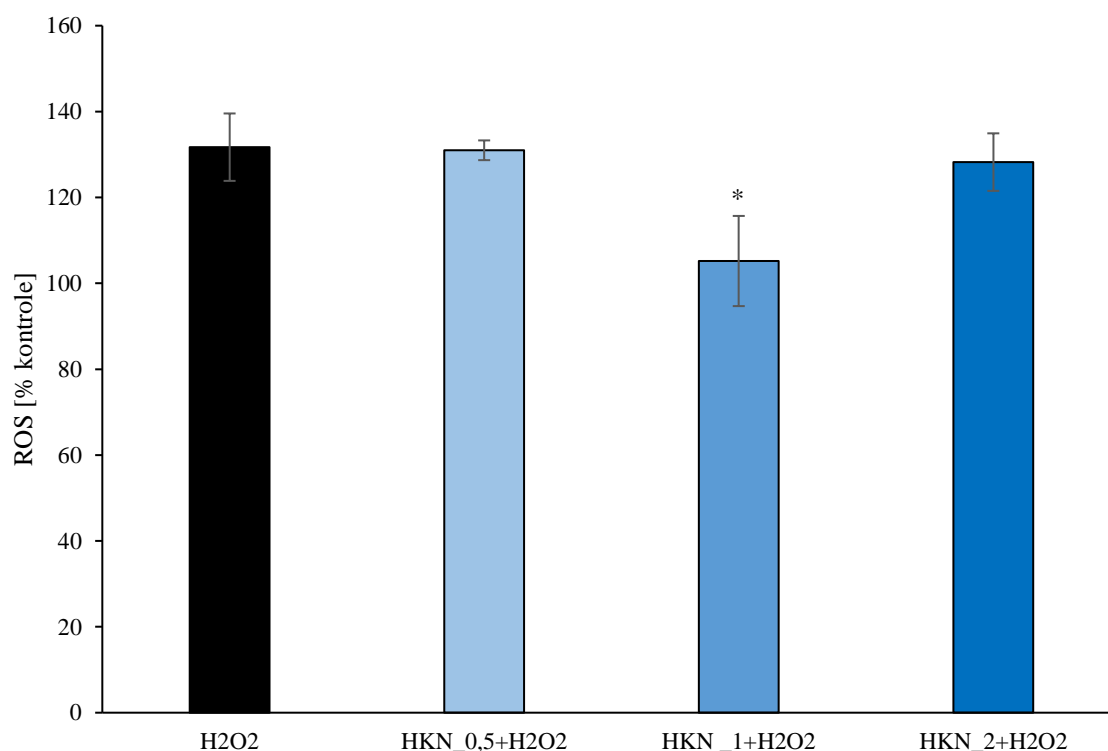
Proliferacijski učinak pri različitim koncentracijama pripremljenih proteinskih hidrolizata konoplje ispitan je *in vitro* na normalnoj (HaCaT) i tumorskoj (HeLa) staničnoj liniji. Kao što je vidljivo iz slike 33.a tretiranje HaCaT stanica s  $1 \text{ g L}^{-1}$  HKA,  $5$  i  $10 \text{ g L}^{-1}$  HKN te  $2$  i  $5 \text{ g L}^{-1}$  HKP dovodi do blagog antiproliferativnog učinka. S druge pak strane, izlaganje HaCaT stanica ostalim testiranim koncentracijama hidrolizata, izuzev  $2 \text{ g L}^{-1}$  HKA, dovelo do značajnog stimulirajućeg efekta na staničnu proliferaciju. Dodatak  $1$  i  $2 \text{ g L}^{-1}$  HKN pokazao je najveći pozitivan učinak na staničnu proliferaciju ( $53\%$  i  $62\%$  veća vijabilnost u odnosu na kontrolu). Iz slike 33.b može se zaključiti da izlaganje HeLa stanica proteinskom hidrolizatu konoplje, određenih koncentracija, dovodi do citostatičnog učinka. Tako dodatak HKA u svim koncentracijama, HKP u koncentracijama  $>1 \text{ g L}^{-1}$  te veće koncentracije HKN ( $5$  i  $10 \text{ g L}^{-1}$ ) izazivaju značajan citostatičan učinak na HeLa stanice ( $60\text{-}35\%$  vijabilnosti kontrolnih stanica).



Slika 33. Učinak različitih koncentracija proteinskog hidrolizata konoplje (1, 2, 5 i 10 g L<sup>-1</sup>) na proliferaciju a) HaCAT i b) HeLa stanica određen MTS metodom. Vijabilnost stanica (%) izražena je kao postotak tretiranih stanica u odnosu na kontrolnu, tj. netretirane stanice, a podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± S.D. (n=3). Prikazane vrijednosti označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

#### 4.4.1.3. *Protektivni učinak proteinskog hidrolizata konoplje na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-inducirani oksidacijski stres u HaCaT stanicama*

Budući da HKN posjeduje najveći antioksidacijski potencijal (Poglavlje 4.4.1.1.), odlučeno je ispitati njegov protektivni učinak na formaciju ROS-ova u HaCaT stanicama tijekom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induciranog oksidacijskog stresa. Uspoređujući nastajanje ROS-ova u HaCaT stanicama predtretiranim s HKN (0,5-2 g L<sup>-1</sup>) i u onima bez predtretmana, vidljivo je da HKN, u koncentraciji 1 g L<sup>-1</sup>, ima značajan protektivni učinak budući da se postotak nastalih ROS-ova smanjio za 27% (Slika 34).



Slika 34. Učinak HKN (0,5-2 g L<sup>-1</sup>) na nastanak unutarstaničnog ROS-a u HaCaT stanicama tijekom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induciranog oksidativnog stresa određen DCF-DA metodom. Rezultati su izraženi kao postotak kontrolnih stanica ± S.D. (n=3). Prikazane vrijednosti označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

#### 4.4.2. Učinak proteinskih hidrolizata uljane pogače konoplje na HEK293T staničnu liniju

Cilj ovog poglavlja bio je ispitati je učinak proteinskih hidrolizata konoplje (HKA, HKN i HKP) na rast HEK293T stanične linije. Stanice su uzgajane u hranjivom mediju DMEM s 2,5 g L<sup>-1</sup> FBS te s dodatkom 0,5 i 2,5 g L<sup>-1</sup> HK (Poglavlje 3.2.2.4). Kontrolne stanice su uzgajane u mediju DMEM s 2,5 i 5 g L<sup>-1</sup> FBS bez dodatka hidrolizata. Na temelju dobivenih rezultata, ispitana je učinkovitost transfekcije HEK293T stanica plazmidom pEGFP-C1 i ekspresije transgena u mediju DMEM s proteinskim hidrolizatima konoplje koji nisu pokazali negativno djelovanje na stanični rast. Učinkovitost transfekcije HEK293 stanica izmjerena je na uređaju CellDrop-FL (Poglavlje 3.2.2.5.).

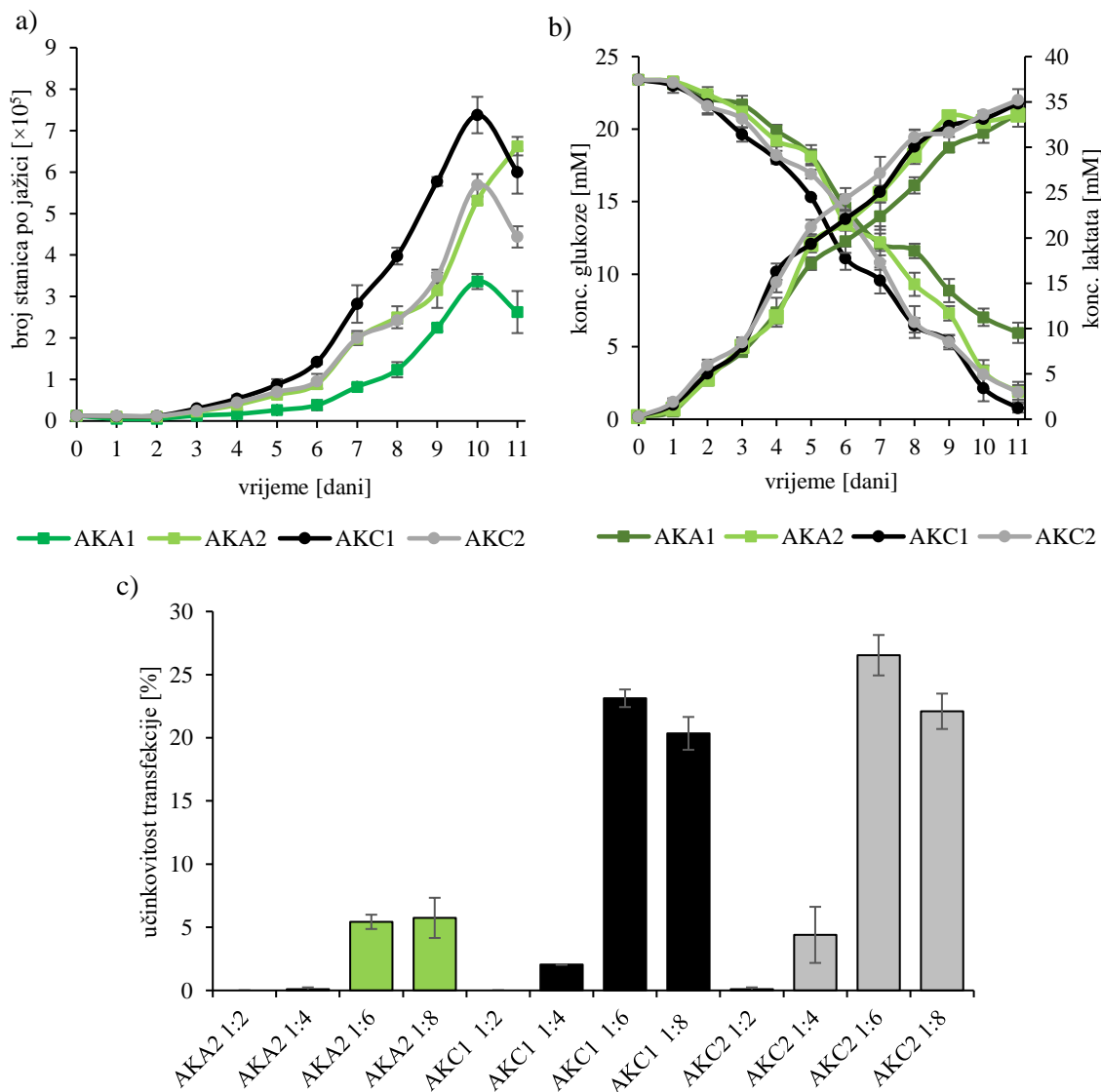
Kontrolne stanice su iste za cijelo poglavlje 4.4.2.. Kontrolne stanice uzgajane u mediju AKC1 postižu značajno veći NBVS ( $7,4 \times 10^5$  st jažici<sup>-1</sup>) od kontrolnih stanica uzgajanih u hranjivom mediju AKC2 ( $5,7 \times 10^5$  st jažici<sup>-1</sup>).  $\mu_{\max}$  kontrolnih stanica se značajno ne razlikuju (Prilog 1). U obje kontrole najveća učinkovitost transfekcije postignuta je pri omjeru DNA i transfekcijskog sredstva 1:6. Pri tom omjeru, značajno veći postotak učinkovitosti transfekcije stanica postignut je u AKC2 mediju (26,5%) nego u mediju AKC1 (23,1%).

##### 4.4.2.1. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje, dobivenog enzimom alkalaza, na rast i transfekciju HEK293T stanične linije

Iz slike 35.a vidljivo je da dodatak 2,5 g L<sup>-1</sup> HKA značajno inhibira stanični rast ( $3,4 \times 10^5$  st jažica<sup>-1</sup>) u odnosu na kontrolne stanice. Stanice uzgajane u mediju AKA2 dosegle su veći NBVS ( $6,6 \times 10^5$  st jažica<sup>-1</sup>) u odnosu na kontrolu AKC2, ali manji u odnosu na kontrolu AKC1. Stanice uzgajane u medijima AKA1 i AKA2 imaju isti  $\mu_{\max}$  kao stanice u medijima AKC1 i AKC2 (Prilog 1). Tijekom uzgoja stanice su konzumirale glukozu čija je koncentracija do kraja uzgoja pala ispod 2 mM, izuzev u mediju AKA1 gdje je zaostalo 6 mM glukoze. S konzumacijom glukoze, kao nusprodukt metabolizma stanica, nastao je laktat čija je koncentracija do kraja uzgoja dosegla između 28 i 30 mM (Slika 35.b).

Na temelju dobivenih rezultata nakon uzgoja stanica, odlučeno je ispitati samo učinak dodatka 0,5 g L<sup>-1</sup> HKA u hranjivom mediju na učinkovitost transfekcije HEK293T stanica plazmidom pEGFP-C1. Iz slike 35.c vidljivo je da stanice u mediju AKA2 najveću

učinkovitost transfekcije postižu pri testiranim omjerima DNA i transfekcijskog sredstva 1:6 i 1:8 (5,5%), no ta je učinkovitost značajno manja u odnosu na učinkovitost transfekcije stanica u kontrolnim medijima.



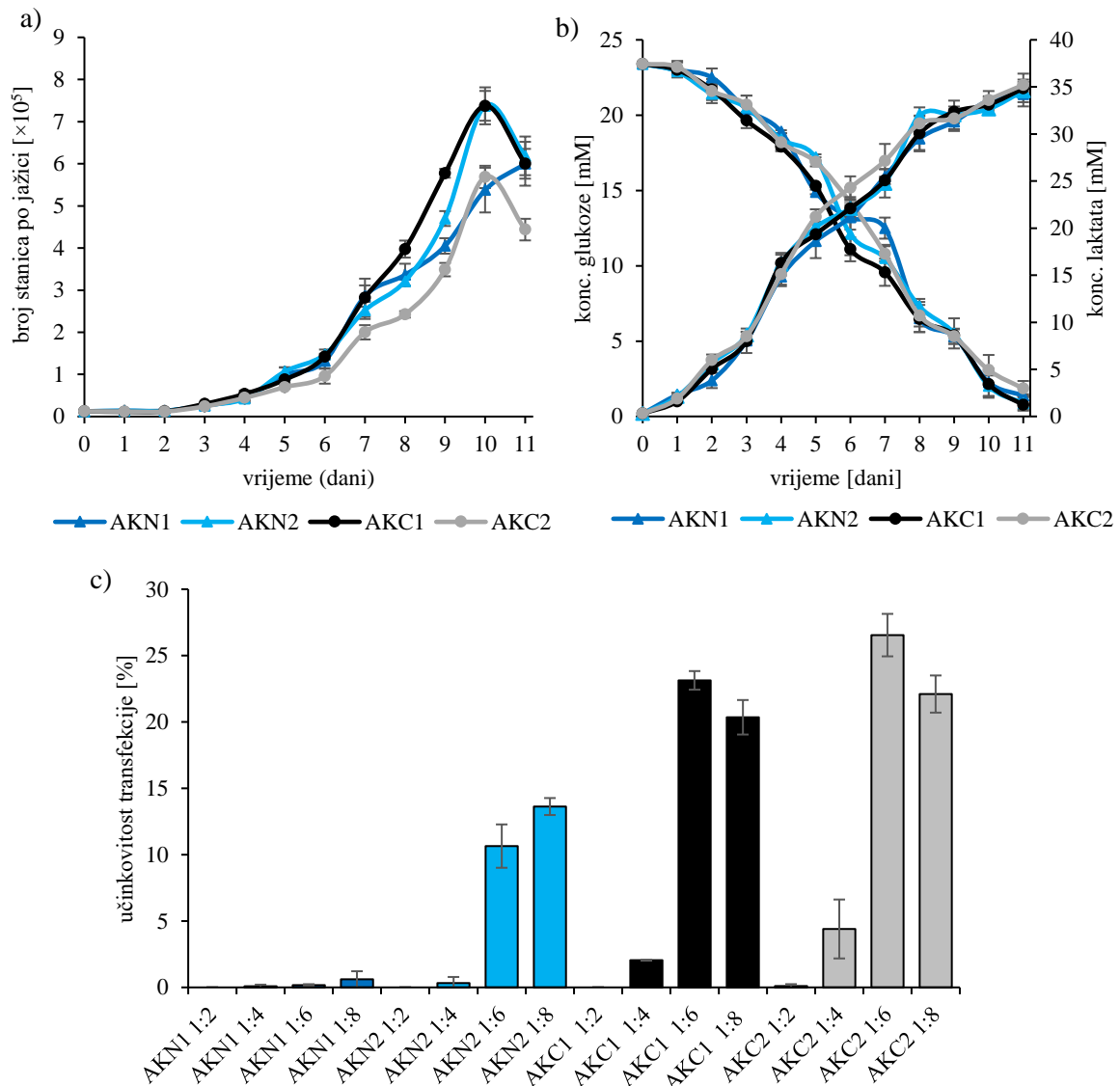
Slika 35. a) Krivulja rasta te b) koncentracija glukoze i laktata tijekom uzgoja HEK293T stanica u medijima AKA1, AKA2, AKC1 i AKC2. Stanice uzgajane u medijima AKC1 i AKC2 predstavljaju kontrole. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=2$ ). c) Učinkovitost transfekcije HEK293T stanica, pri različitim omjerima DNA i transfekcijskog sredstva (1:2, 1:4, 1:6, 1:8), uzgajanih u mediju AKA2 te u kontrolnim medijima AKC1 i AKC2. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ).

#### 4.4.2.2. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje, dobivenog enzimom neutraza, na rast i transfekciju HEK293T stanične linije

Iz krivulje rasta prikazane na slici 36.a i vrijednosti u prilogu 1. može se uočiti da HEK293T stanice uzgajane u ispitivanim medijima AKN2 i AKC1 dosežu isti NBVS ( $7,4 \times 10^5$  st jažica $^{-1}$ ) koji je u usporedbi s NBVS u mediju AKN1 i AKC2 značajno veći.  $\mu_{\max}$  u mediju AKN1 ( $0,0190 \text{ h}^{-1}$ ) je značajno manja u odnosu  $\mu_{\max}$  u kontrolnim medija. Koncentracija glukoze je do kraja uzgoja pala na vrijednosti ispod 2 mM. Istovremeno s potrošnjom glukoze, stanice su proizvodile laktat čija je koncentracija do kraja uzgoja dosegla između 29 i 32 mM (Slika 36.b).

U mediju AKN1 nije došlo do uspješne transfekcije stanica niti u jednom testiranom omjeru DNA i transfekcijskog sredstva. U kontrolnim medijima najveća učinkovitost transfekcije postignuta je pri omjeru DNA i transfekcijskog sredstva 1:6, dok se kod stanica uzgajanih u mediju AKN2 omjer 1:8 pokazao kao najbolji. Najveća učinkovitost transfekcija u mediju AKN2 (13,6%) značajno je manja u odnosu na učinkovitost kontrola (Slika 36.c).



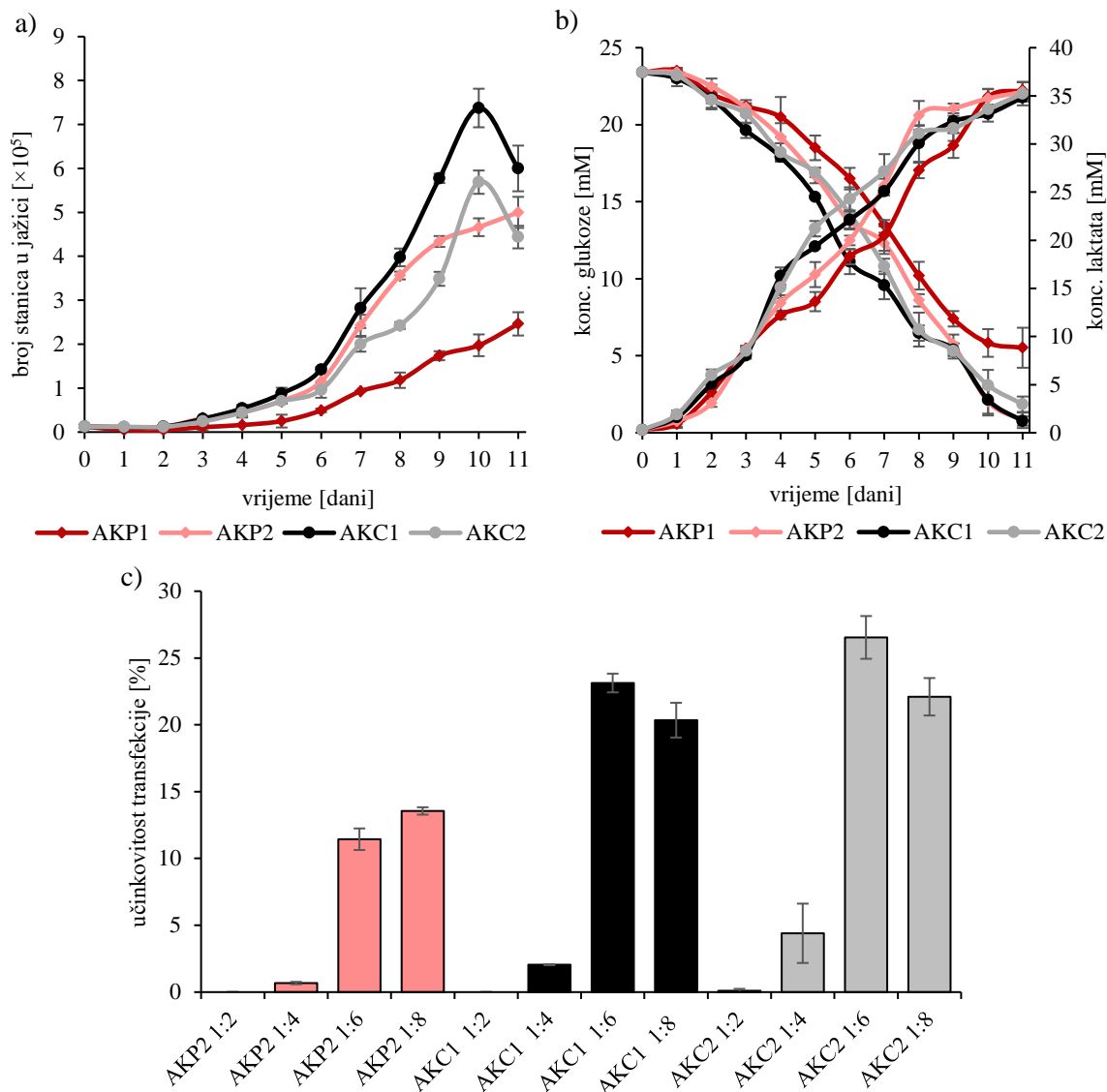


Slika 36. a) Krivulja rasta te b) koncentracija glukoze i laktata tijekom uzgoja HEK293T stanica u medijima AKN1, AKN2, AKC1 i AKC2. Stanice uzgajane u medijima AKC1 i AKC2 predstavljaju kontrole. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=2$ ). c) Učinkovitost transfekcije HEK293T stanica, pri različitim omjerima DNA i transfekcijskog sredstva (1:2, 1:4, 1:6, 1:8), uzgajanih u medijima AKN1 i AKN2 te u kontrolnim medijima AKC1 i AKC2. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ).

#### 4.4.2.3. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje, dobivenog enzimom protameks, na rast i transfekciju HEK293T stanične linije

Dodatak HKP u koncentraciji  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  u hranjivi medij dovodi do značajno manjeg NBVS ( $2,5 \times 10^5$  st jažici  $^{-1}$ ) te  $\mu_{\text{max}}$  ( $0,0102 \text{ h}^{-1}$ ) u usporedbi s ostalim uvjetima. Stanice uzgajane u mediju AKP2 postižu gotovo isti NBVS ( $5,0 \times 10^5$  st jažici  $^{-1}$ ) te  $\mu_{\text{max}}$  ( $0,0200 \text{ h}^{-1}$ ) kao stanice uzgajane u mediju AKC2 (Slika 37.a, Prilog 1). Stanice su tijekom uzgoja trošile glukozu te je koncentracija na kraju uzgoja pala ispod 2 mM, osim u mediju AKP1 gdje je zaostalo 5,5 mM glukoze. Kao nusprodukt staničnog metabolizma, tijekom uzgoja je nastajao laktat čija je koncentracija do kraja uzgoja dosegla koncentraciju između 29-30 mM (Slika 37.b).

Budući da dodatak  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  HKP dovodi do lošijeg staničnog rasta u usporedbi s kontrolama, odlučeno je ispitati samo uspješnost transfekcije stanica uzgajanih u mediju AKP2. Najveći postotak uspješno transfeciranih stanica uzgajanih u mediju AKP2 (13,6%), postignut pri omjeru DNA i transfekcijskog sredstva 1:6, značajno je manji u usporedbi s najvećim postotkom učinkovitosti transfekcije kontrolnih stanica (Slika 37.c).



Slika 37. a) Krivulja rasta te b) koncentracija glukoze i laktata tijekom uzgoja HEK293T stanica u medijima AKP1, AKP2, AKC1 i AKC2. Stanice uzgajane u medijima AKC1 i AKC2 predstavljaju kontrole. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. (n=2). c) Učinkovitost transfekcije HEK293T stanica, pri različitim omjerima DNA i transfekcijskog sredstva (1:2, 1:4, 1:6, 1:8), uzgajanih u mediju AKP2 te u kontrolnim medijima AKC1 i AKC2. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. (n=3).

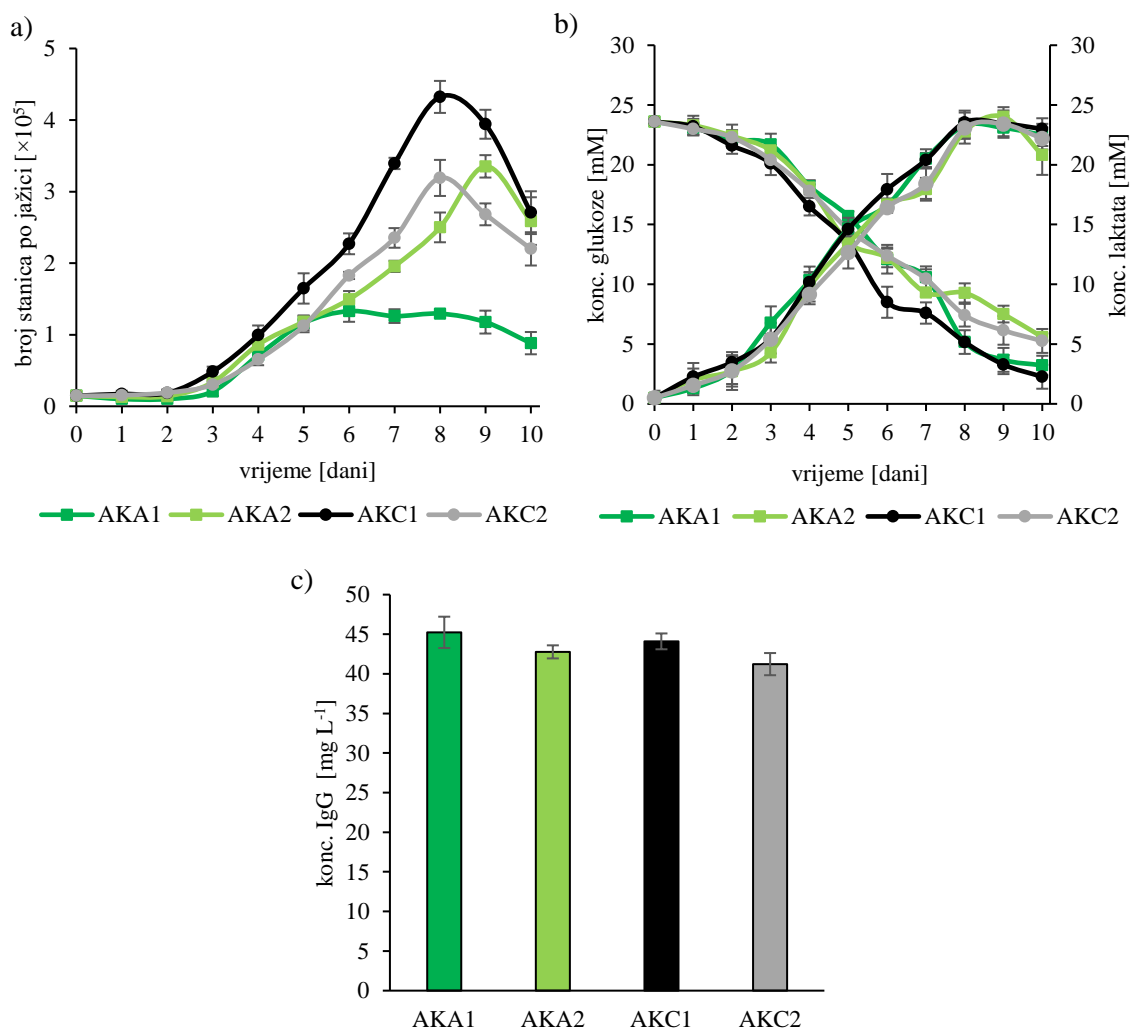
#### 4.4.3. Učinak proteinskih hidrolizata uljane pogače konoplje na CHO DP-12 staničnu liniju

U cilju ispitivanja djelovanja proteinskih hidrolizata konoplje, na rast, produktivnost (IgG) i metabolizam (glukoza, laktat) adherentnih CHO DP-12 stanica, u hranjivom mediju DMEM sa smanjenom koncentracijom FBS ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ), stanice su uzgajane u pripremljenim medijima AKA1, AKA2, AKN1, AKN2, AKP1 i AKP2 (Poglavlje 3.2.2.4.). Kontrolne stanice uzgajane su u hranjivim medijima AKC1 i AKC2.

Kontrolne stanice su iste za cijelo Poglavlje 4.4.3. Stanice uzgajane u mediju ALA1 postižu značajno veći NBVS,  $\mu_{\max}$  i titar IgG ( $4,3 \times 10^5 \text{ st jažici}^{-1}$ ;  $0,0219 \text{ h}^{-1}$ ;  $44,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) od kontrolnih stanica uzgajanih u hranjivom mediju AKC2 ( $3,2 \times 10^5 \text{ st jažici}^{-1}$ ;  $0,0203 \text{ h}^{-1}$ ;  $41,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Slika 38.a i c, Prilog 2). qP stanica u AKC2 mediju ( $33,36 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) značajno je veći od qp stanica u mediju AKC1 ( $26,91 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ), dok im se qglc međusobno značajno ne razlikuju. Na kraju uzgoja u mediju ALC1 zaostalo je  $2,3 \text{ mM}$ , a u mediju ALC2  $5,3 \text{ mM}$  glukoze. Tijekom uzgoja najveća koncentracija laktata u kontrolnim medijima iznosila je oko  $23,5 \text{ mM}$

##### 4.4.3.1. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje, dobivenog enzimom alkalaza, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije

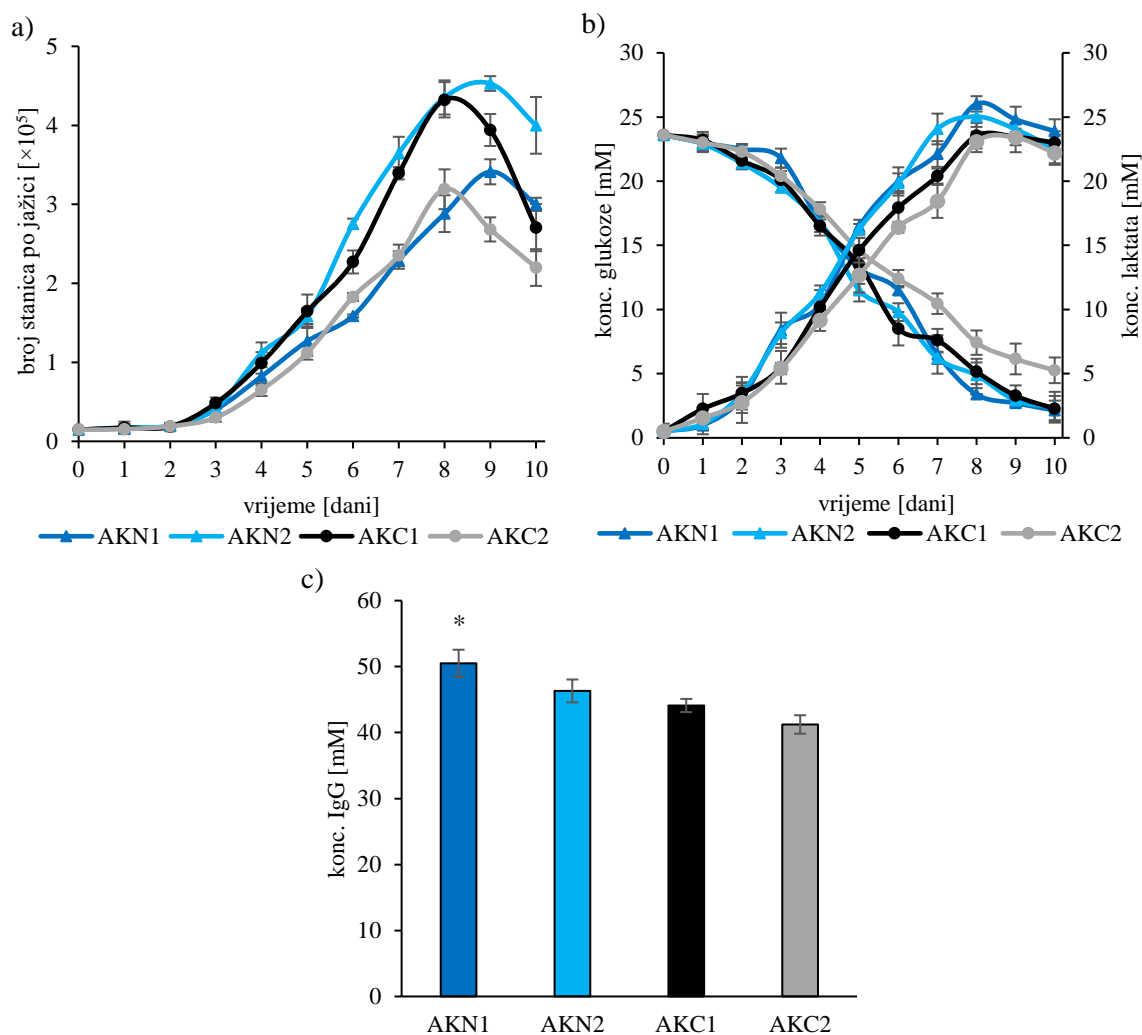
Dodatak  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  HKA u hranjivi medij utječe negativno na rast te stanice imaju najniži NBVS ( $1,3 \times 10^5 \text{ st jažici}^{-1}$ ) (Slika 38.a). S druge pak strane, te stanice, uzgajane u mediju AKA1 ostvaruju najveći  $\mu_{\max}$  ( $0,0339 \text{ h}^{-1}$ ) i qP ( $66,22 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) u usporedbi ostalim testiranim stanicama (Prilog 2). Stanice u AKA2 mediju postižu isti NBVS ( $3,4 \times 10^5 \text{ st jažici}^{-1}$ ) i ukupnu koncentraciju IgG ( $42,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) kao kontrolne stanice u mediju AKC2. Najveći qGlc imaju stanice u mediju AKA1 ( $29,83 \text{ pmol st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) u usporedbi s ostalim stanicama. Koncentracija glukoze na kraju uzgoja u mediju AKA1 iznosi  $3,2 \text{ mM}$ , a u mediju AKA2  $5,6 \text{ mM}$ . Kao nusprodukt staničnog metabolizma nastaje laktat, čija koncentracija u svim testiranim medijima raste do najviše  $23,5 \text{ mM}$ , (Slika 38.b)



Slika 38. a) Krivulja rasta te b) koncentracija glukoze i laktata tijekom uzgoja CHO DP-12 stanične linije u medijima AKA1, AKA2, AKC1 i AKC2. c) Koncentracija IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja CHO DP-12 stanica. Stanice uzgajane u medijima AKC1 i AKC2 predstavljaju kontrole. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Prikazane vrijednosti koncentracije IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrolu AKC1 ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

#### 4.4.3.2. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje, dobivenog enzimom neutraza, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije

Stanice uzgajane u mediju AKN2 postižu statistički isti NBVS ( $4,5 \times 10^5$  st jažica<sup>-1</sup>), titar IgG ( $46,3 \text{ mg L}^{-1}$ ) i qp ( $27,93 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) kao stanice u mediju AKC1 (Slika 39.a i c). U usporedbi s kontrolnim medijima i AKN2 medijem, najveći titar IgG ( $50,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) i qp stanica ( $44,31 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) postiže se u hranjivom mediju AKN1 (Prilog 2.). U medijima s dodatkom hidrolizata stanice imaju statistički isti qGlc kao i kontrolne stanice (Prilog 2). Koncentracija glukoze na kraju uzgoja u medijima AKN1 i AKN2 ista je kao u mediju AKC1 ( $2,3 \text{ mM}$ ) (Slika 39.b). Laktat se nakuplja u hranjivim medijima do koncentracije od najviše  $26 \text{ mM}$ , nakon čega do kraja uzgoja blago opada (Slika 39.b).

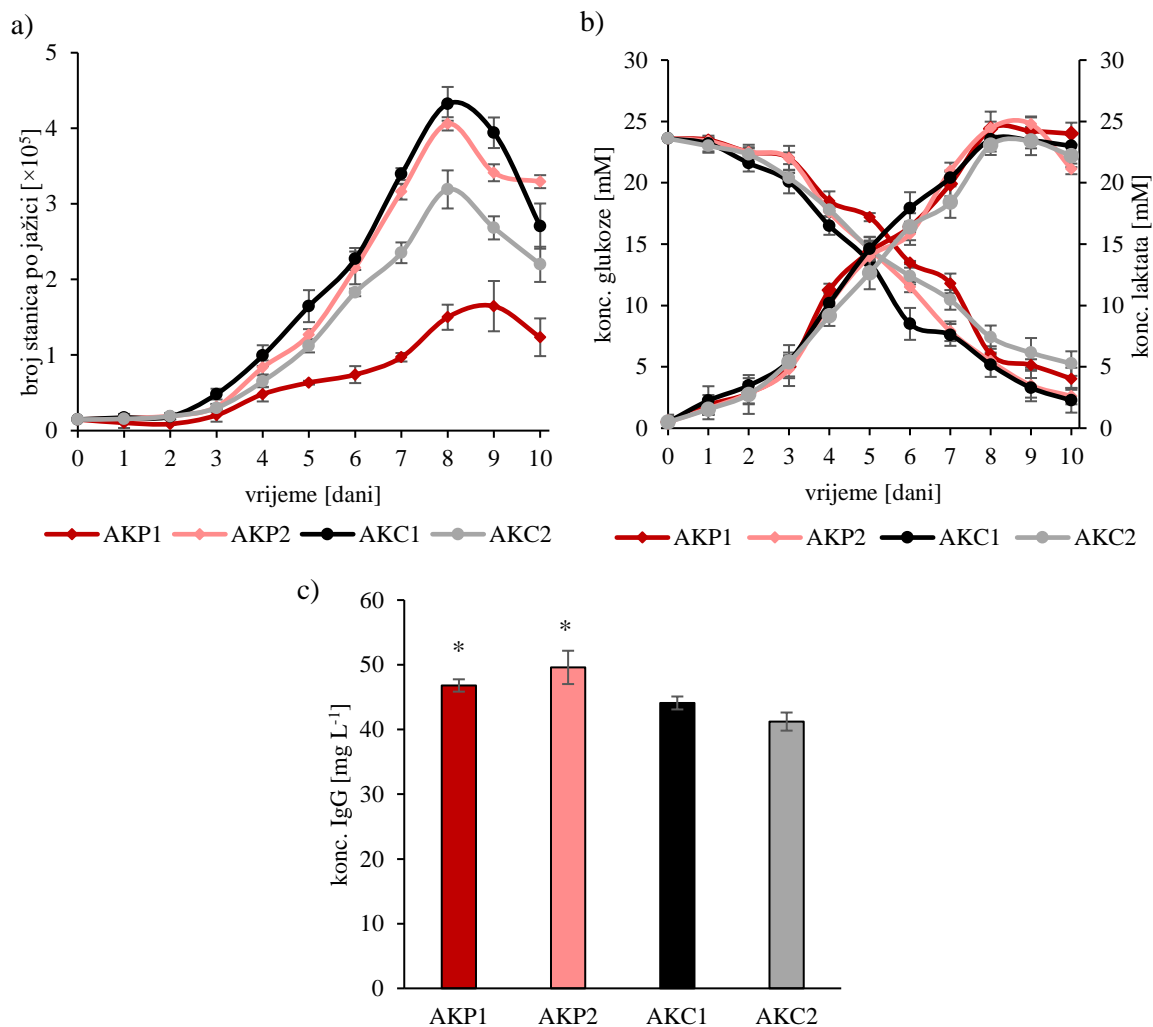


Slika 39. a) Krivulja rasta te b) koncentracija glukoze i laktata tijekom uzgoja CHO DP-12 stanične linije u medijima AKN1, AKN2, AKC1 i AKC2. c) Koncentracija IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja CHO DP-12 stanica. Stanice uzgajane u medijima AKC1 i AKC2 predstavljaju kontrole. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Prikazane vrijednosti koncentracije IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrolu AKC1 ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

#### 4.4.3.3. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje, dobivenog enzimom protameks, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije

Iz slike 40.a vidljivo je da dodatak  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  HKP u hranjivi medij negativno utječe na stanični rast. Te stanice, uzgajane u mediju AKP1, postižu najmanji NBVS ( $1,6 \times 10^5 \text{ st jažica}^{-1}$ ) te  $\mu_{\text{max}}$  ( $0,0102 \text{ h}^{-1}$ ), ali i najveći qP ( $83,27 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) i qGlc ( $34,8 \text{ pmol st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) u usporedbi sa stanicama uzgajanim u ostalim medijima (Slika 40.c, Prilog 2). Stanice u mediju AKP2 ( $4,3 \text{ st mL}^{-1}$ ) imaju isti NBVS kao i kontrolne stanice u mediju AKC1. Koncentracija proizvedenog IgG je značajno veća u medijima AKP1 ( $46,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) i AKP2 ( $49,6 \text{ mg L}^{-1}$ ) nego u kontrolnim medijima (Slika 40.c). Koncentracija preostale glukoze u AKP1, AKP2 i kontrolnim medijima nalazi se unutar raspona 2,3-5,3 mM. U medijima s dodatkom hidrolizata nema značajne razlike u koncentraciji nastalog laktata u odnosu na kontrolne medije, budući da je u svim medijima najveća postignuta koncentracija oko 24 mM (Slika 40.b).





Slika 40. a) Krivulja rasta te b) koncentracija glukoze i laktata tijekom uzgoja CHO DP-12 stanične linije u medijima AKP1, AKP2, AKC1 i AKC2. c) Koncentracija IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja CHO DP-12 stanica. Stanice uzgajane u medijima AKC1 i AKC2 predstavljaju kontrole. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Prikazane vrijednosti koncentracije IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrole ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

#### 4.4.4. Učinak proteinskih hidrolizata i peptidnih frakcija uljane pogače konoplje na CHO DP-12-S staničnu liniju

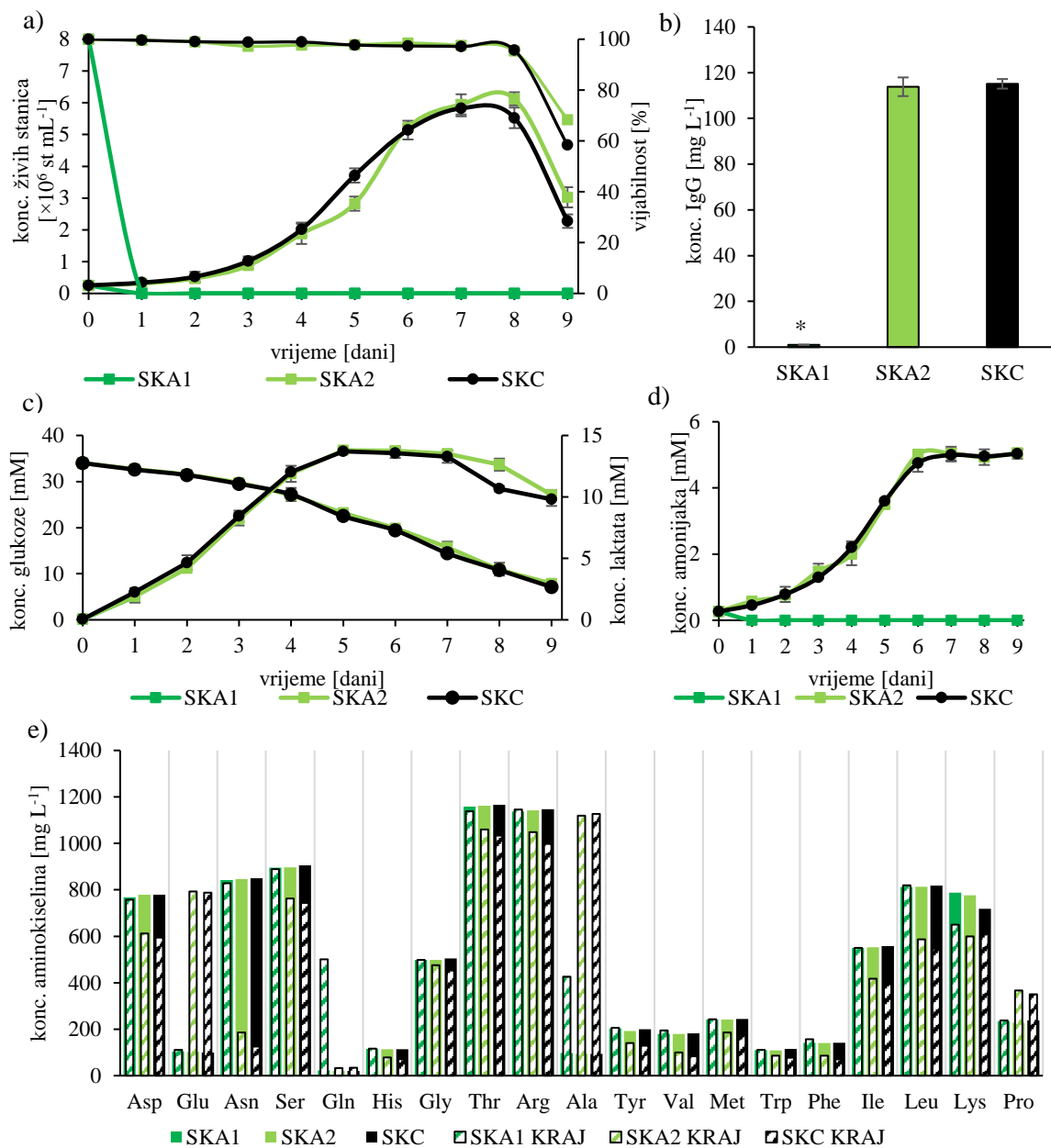
Cilj ovog poglavlja bio je ispitati kako dodatak hidrolizata i peptidnih frakcija proteina uljane pogače konoplje u medij PowerCHO<sup>®</sup>-2 CD, djeluje na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12-S stanica. Navedeni medij ne sadrži serum, a redoviti dodatci su mu inzulin, metotreksat, L-glutamin i antibiotik-antimikotik. U prvom dijelu eksperimenta ispitani su učinci ukupnih hidrolizata konoplje u dvije testirane koncentracije, 0,5 i 2 g L<sup>-1</sup>. U drugom dijelu, u istim koncentracijama, ispitane su pripremljene peptidne frakcije, <10 kDa i <1 kDa (Poglavlje 3.2.2.7.)

Kao kontrola poslužile su nam stanice uzgajane u mediju PowerCHO<sup>®</sup>-2 CD bez dodatka hidrolizata. Ove stanice postižu NKVS od  $5,8 \times 10^6$  st mL<sup>-1</sup> te koncentraciju IgG u hranjivom mediju od 114,1 mg L<sup>-1</sup>.  $\mu_{\max}$  kontrolnih stanica iznosi 0,0226 h<sup>-1</sup>, dok im qP iznosi 4,51 pg st<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup> (Prilog 3.b). Tijekom uzgoja stanice nisu iskoristile svu dostupnu glukozu, koje je na kraju u hranjivom mediju zaostalo 7 mM. Tijekom uzgoja, koncentracija laktata u hranjivom mediju dosegla je najveću vrijednost od 13,5 mM, a amonijaka 5 mM. Kroz cijelo poglavlje 4.4.4. prikazana je ista kontrola.

#### *4.4.4.1. Učinak proteinskog hidrolizata i peptidnih frakcija uljane pogače konoplje, dobivenih enzimom alkalaza, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12-S stanične linije*

##### *4.4.4.1.1. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje dobivenog enzimom alkalaza*

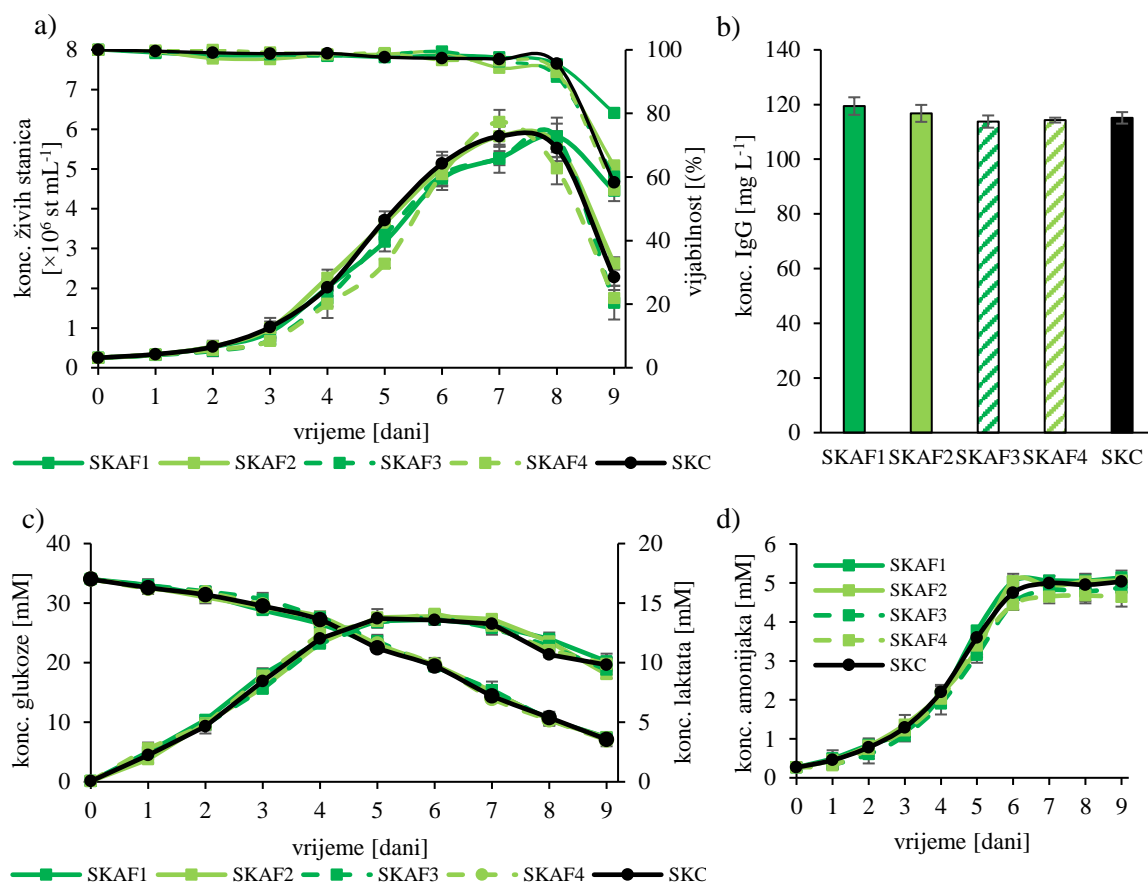
Stanice uzgajane u mediju s dodatkom  $2 \text{ g L}^{-1}$  HKA, tj. mediju SKA1 u potpunosti umiru unutar 24h od nacjepljivanja (Slika 41.a). S druge pak strane, NKVS ( $6,1 \times 10^6 \text{ st mL}^{-1}$ ) i  $\mu_{\text{max}}$  ( $0,0235 \text{ h}^{-1}$ ) u mediju SKA2 statistički su jednaki u usporedbi s kontrolom. Nakon 8. dana uzgoja dolazi do značajnog smanjenja stanične vijabilnosti (<80%). Ukupna koncentracija IgG kao i qP na kraju uzgoja ista je u kontrolnom mediju i SKA2 mediju ( $113,8 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $4,5 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) (Slika 41.b, Prilog 3.b). Tijekom rasta, stanice u mediju SKA2 i SKC konzumiraju glukozu istom specifičnom brzinom te zadnjeg dana uzgoja u medijima zaostaje manje od 8 mM glukoze. Koncentracije laktata tijekom rasta stanica dosežu 13,5 mM, te do kraja uzgoja opadaju (Slika 41.c). U hranjivim se medijima tijekom uzgoja akumulirao amonijak u maksimalnoj koncentraciji od 5 mM (Slika 41.d). Na slici 41.e vidimo aminokiselinske sastave medija na početku i na kraju uzgoja. Može se uočiti da mediji SKA1 i SKA2 na početku uzgoja imaju gotovo identičan aminokiselinski sastav kao kontrolni medij SKC. S obzirom da stanice u mediju SKA1 umiru unutar 24 h od početka uzgoja, vidimo da u tom mediju nije došlo do konzumacije aminokiselina. Uspoređujući koncentracije aminokiselina na kraju uzgoja, vidljivo je da je konzumacija aminokiselina u medijima SKA2 i SKC vrlo slična. Koncentracija većine aminokiselina se tijekom uzgoja smanjivala zbog stanične konzumacije istih, osim glutaminske kiseline, alanina i prolina čija se koncentracija na kraju uzgoja povećala.



Slika 41. Učinci uzgoja CHO DP-12-S stanica u medijima SKA1, SKA2 i SKC na a) rast i vijabilnosti stanica, b) koncentraciju IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja, c) koncentraciju glukoze i laktata, d) koncentraciju amonijaka te d) koncentraciju slobodnih aminokiselina na početku i na kraju uzgoja. Stanice uzgajane u mediju SKC predstavljaju kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Prikazane vrijednosti koncentracije IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrole ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

#### 4.4.4.1.2. Učinak peptidnih frakcija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom alkalaza

NKVS u kontrolnom mediju je ista kao i u ostalim testiranim medijima. Po završetku 8. dana uzgoja stanice ulaze u fazu odumiranja te vijabilnost stanica pada ispod 80 % (Slika 42.a).  $\mu_{\max}$  kontrolnih stanica jednak je  $\mu_{\max}$  stanica u medijima s dodatkom peptidnih frakcija, izuzev  $\mu_{\max}$  stanica u mediju SKAF4 čija je vrijednost značajno niža ( $0,0203 \text{ h}^{-1}$ ) (Prilog 3.b). Koncentracija nastalog IgG u testiranim medijima s peptidnim frakcijama statistički se značajno ne razlikuje od koncentracije IgG u kontroli (Slika 42.b). Najveći qP imaju stanice uzgajane u mediju SKAF4 ( $5,02 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) (Prilog 3.b). Tijekom uzgoja stanice ravnomjerno troše glukozu do konačne koncentracije od 7 mM. Stanice uzgajane u medijima SLAF1, SLAF3 i SLAF4 imaju isti qGlc kao kontrolne stanice (Prilog 3.b). Koncentracija nusprodukata laktata tijekom uzgoja je rasla, dosegla maksimalnu koncentraciju od 13,8 mM, no do kraja uzgoja njegova koncentracija je pala (Slika 42.c). Nakon što u hranjivim medijima dosegne vrijednost od otprilike 5 mM, koncentracija amonijaka se više značajno ne mijenja (Slika 42.d).

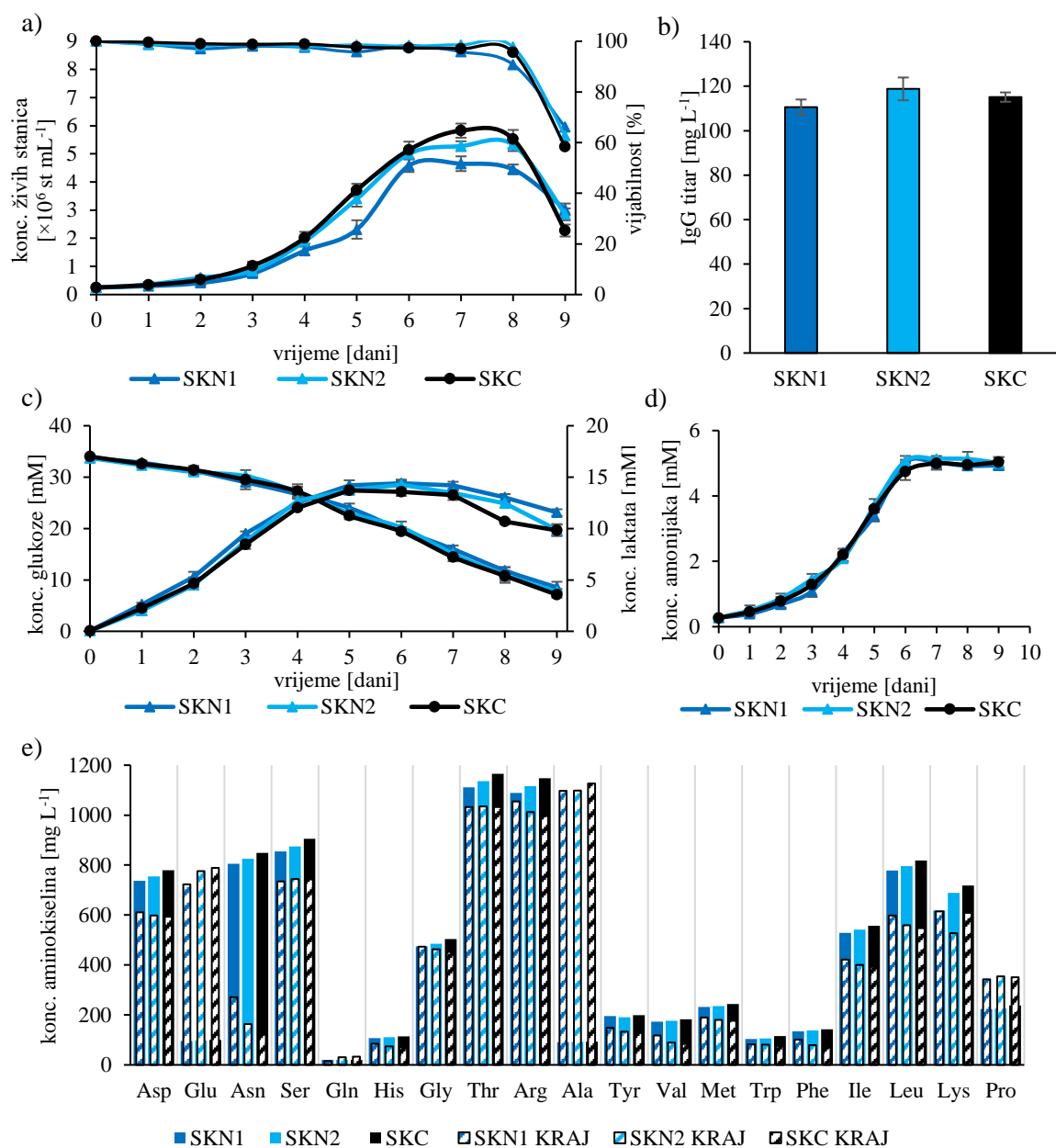


Slika 42. Učinci uzgoja CHO DP-12-S stanica u medijima SKAF1, SKAF2, SKAF3, SKAF4 i SKC na a) rast i vijabilnosti stanica, b) koncentraciju IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja, c) koncentraciju glukoze i laktata te d) koncentraciju amonijaka. Stanice uzgajane u mediju SKC predstavljaju kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Prikazane vrijednosti koncentracije IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrole ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

#### *4.4.4.2. Učinak proteinskog hidrolizata i peptidnih frakcija uljane pogače konoplje, dobivenih enzimom neutraza, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12-S stanične linije*

##### *4.4.4.2.1. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje dobivenog enzimom neutraza*

Stanice uzgajane u kontrolnom mediju postižu značajno veći NKVS u odnosu na NKVS u medijima SKN1 i SKN2 (Slika 43.a). Vijabilost stanica je do 8. dana uzgoja bila iznad 90%, nakon čega dolazi do naglog pada (Slika 43.a). Koncentracije IgG nastale tijekom uzgoja stanica u SKN1 i SKN2 medijima statistički se značajno ne razlikuje od titra IgG u kontrolnom mediju (Slika 43.b). Za razliku od  $\mu_{\max}$  vrijednosti stanica uzgajanih u medijima s hidrolizatima, koje su iste kao u kontroli, njihove qP vrijednosti ( $5,35 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ;  $4,9 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) značajno su veće od qP kontrole (Prilog 3.b). Zadnjeg dana uzgoja u hranjivim medijima ostalo je između 7,5 i 8,5 mM glukoze. Stanice u SKN1 mediju imaju najveći qGlc ( $1,22 \text{ pmol st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) (Prilog 3.b). S rastom stanica u hranjivim se medija nakupljaju laktat i amonijak, nusprodukti staničnog metabolizma (Slika 43.c i d). Koncentracije laktata u hranjivim medijima dosežu koncentracije 14,5 mM, nakon čega dolazi do njenog smanjenja. Koncentracija amonijaka tijekom staničnog uzgoja raste do 5 mM. Početna koncentracija većine aminokiselina u SKC mediju je veća u usporedbi s koncentracijama aminokiselina u SKN1 i SKN2 medijima (Slika 43.e). Također, stanice u SKC mediju na kraju uzgoja uglavnom imaju nižu koncentraciju aminokiselina u odnosu na ostale testirane medije, što sugerira da je potrošnja tih stanica veća. Na kraju uzgoja u svim testiranim medijima se povećala koncentracija glutamina, alanina i prolina.

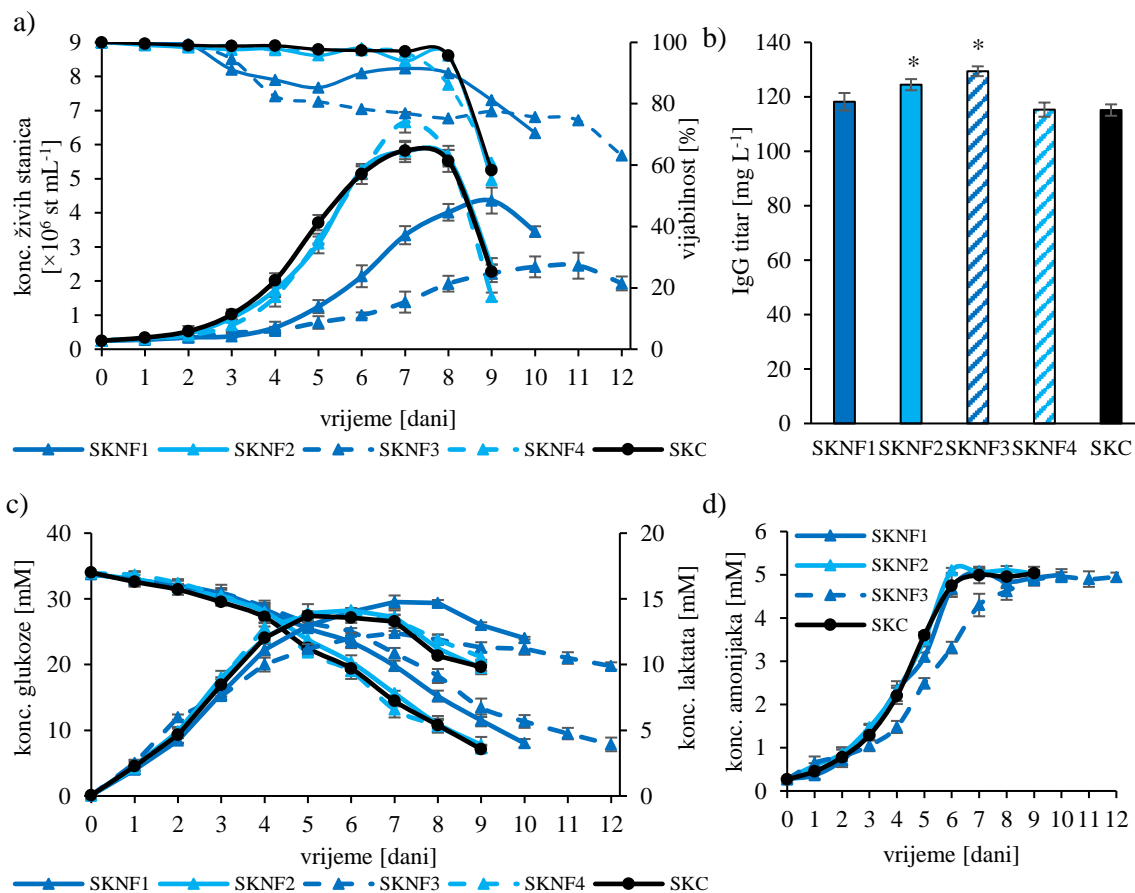


Slika 43. Učinci uzgoja CHO DP-12-S stanica u medijima SKN1, SKN2 i SKC na a) rast i vijabilnosti stanica, b) koncentraciju IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja, c) koncentraciju glukoze i laktata, d) koncentraciju amonijaka te d) koncentraciju aminokiselina na početku i na kraju uzgoja. Stanice uzgajane u mediju SKC predstavljaju kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Prikazane vrijednosti koncentracije IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrole ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.



#### 4.4.4.2.2. Učinak peptidnih frakcija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom neutraza

Na slici 44.a) može se uočiti da stanice uzgajane u mediju SKNF4 dostižu najveću NKVS ( $6,7 \times 10^6$  st  $\text{mL}^{-1}$ ) od svih testiranih medija. Iako uzgoji stanica u medijima SKNF1 i SKNF3 traju jedan odnosno tri dana duže od kontrole, NKVS u tim medijima ( $4,4 \times 10^6$  st  $\text{mL}^{-1}$ ;  $2,5 \times 10^6$  st  $\text{mL}^{-1}$ ) značajno su manje u odnosu na kontrolu. Udio živih stanica tijekom uzgoja u medijima SKNF1 i SKNF3 je manji u usporedbi s vijabilnošću stanica uzgajanih u ostalim medijima (Slika 44.a) Zadnjeg dana uzgoja vijabilnost stanica u svim testiranim medijima je bila  $\leq 70\%$ . Iako stanice u mediju SKNF3 imaju najmanji  $\mu_{\max}$  ( $0,0118 \text{ h}^{-1}$ ), njihov qP ( $8,66 \text{ pg st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) i koncentracija proizvedenog IgG ( $129,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) su najveći u usporedbi s drugim ispitanim medijima (Slika 44.b, Prilog 3.b). Također, stanice uzgajane u medijima SKNF1 i SKNF2 imaju značajno veći qP u odnosu na kontrolu (Prilog 3.b). Tijekom uzgoja, stanice su u medijima SKNF1 i SKNF3 trošile glukozu specifičnom brzinom ( $1,38$  i  $1,73 \text{ pmol st}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) značajno većom od stanica u kontrolnom mediju. Stanice nisu iskoristile svu dostupnu glukozu budući da je u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja ostalo 7-8 mM. Laktat se akumulira u hranjivom mediju do koncentracije 14 mM, nakon čega dolazi do opadanja njegove ukupne koncentracije (Slika 44.c). Koncentracija amonijaka je tijekom staničnog rasta u hranjivim medijima dosegla 5mM nakon čega je do kraja uzgoja bila nepromjenjena (Slika 44.d).

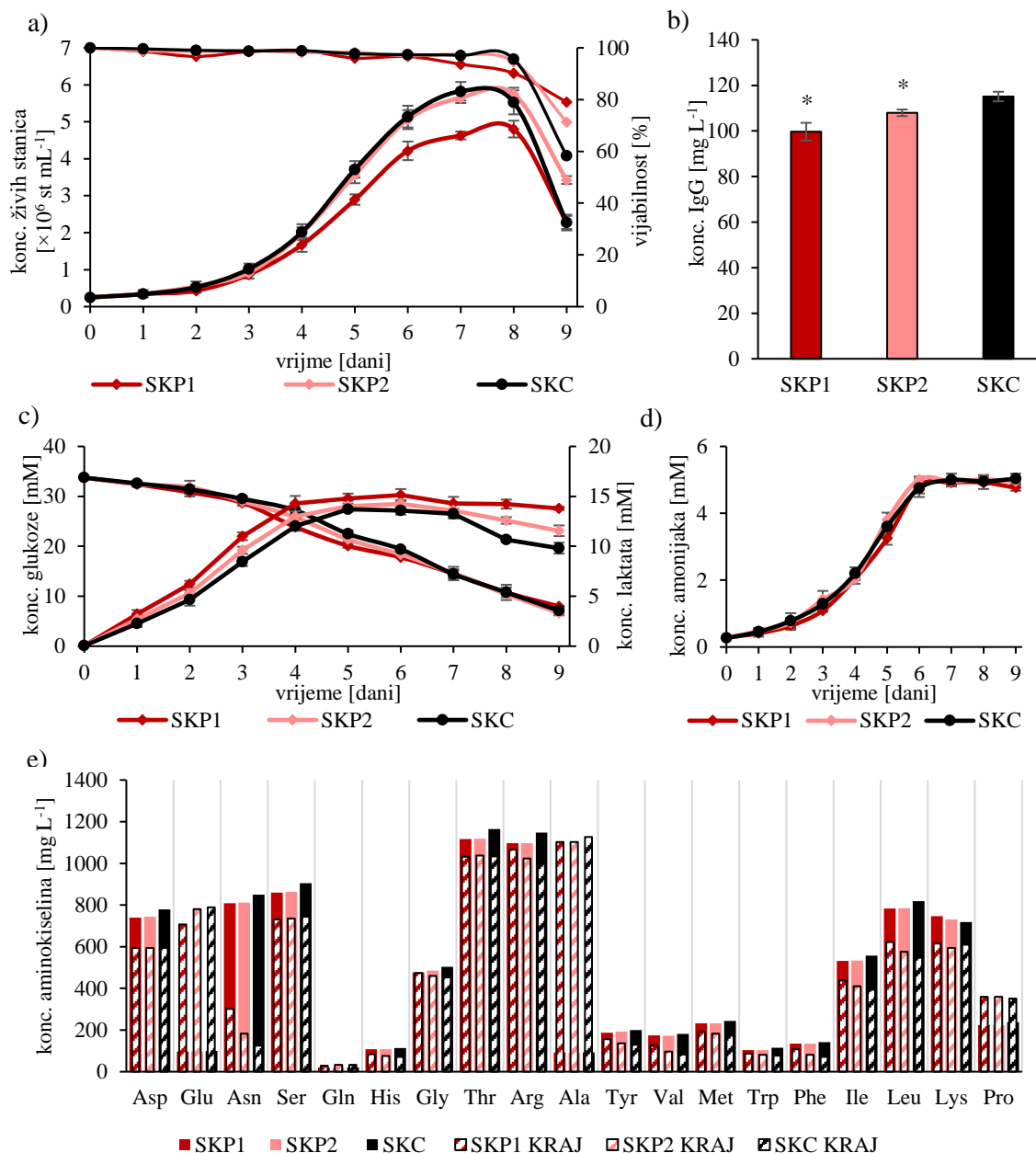


Slika 44. Učinci uzgoja CHO DP-12-S stanica u medijima SKNF1, SKNF2, SKNF3, SKNF4 i SKC na a) rast i vijabilnosti stanica, b) koncentraciju IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja, c) koncentraciju glukoze i laktata te d) koncentraciju amonijaka. Stanice uzgajane u mediju SKC predstavljaju kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Prikazane vrijednosti koncentracije IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrole ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

#### *4.4.4.3. Učinak proteinskih hidrolizata i peptidnih frakcija uljane pogače konoplje, dobivenih enzimom protameks, na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12-S stanične linije*

##### *4.4.4.3.1. Učinak proteinskog hidrolizata konoplje dobivenog enzimom protameks*

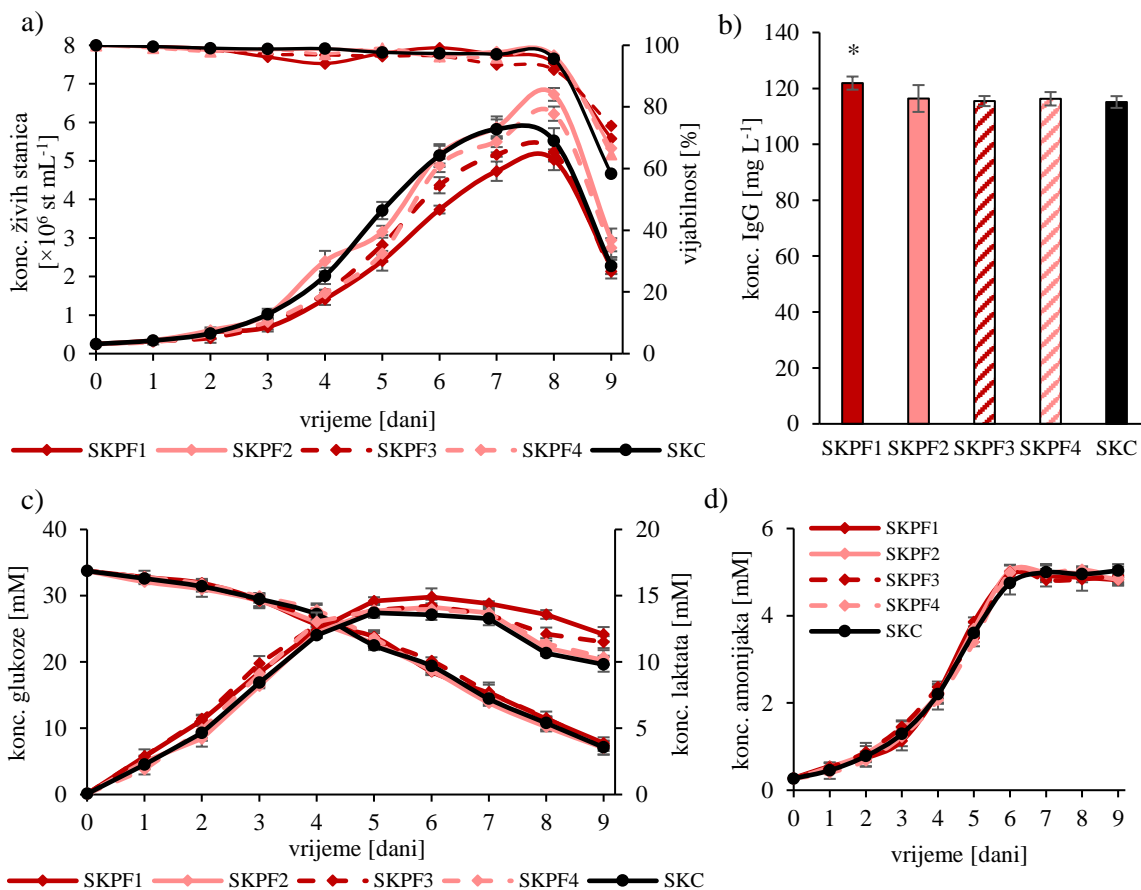
Iz krivulje rasta na slici 45.a vidi se da stanice uzgajane u SKP1 mediju rastu do značajno nižeg NKVS ( $4,8 \times 10^6$  st mL<sup>-1</sup>) te imaju manji  $\mu_{\max}$  (0,0209 h<sup>-1</sup>) u usporedbi sa stanicama u kontroli (Prilog 3.b). Nakon 8.dana uzgoja udio živih stanica se spušta ispod 90% te stanice ulaze u fazu odumiranja. Titar IgG u hranjivim medijima SKP1 i SKP2 (99,7 g L<sup>-1</sup>; 108,0 g L<sup>-1</sup>) značajno je manji u odnosu na titar u kontrolnom mediju (Slika 45.b). Vrijednost qP i qglc kontrolnih stanica značajno su manje od qP i qGlc stanica (4,72 pg st<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>; 1,22 pmol st<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>) uzgajanih u mediju SKP1 (Prilog 3.b). Glukoza se tijekom staničnog uzgoja ravnomjerno troši te je na kraju uzgoja ostaje neistrošeno oko 7 mM. Za razliku od SKP2 i SKC medija, gdje koncentracija laktata naraste do najviše 14 mM, u mediju SKP1 dosegne značajno veću koncentraciju od 15 mM. Pred kraj uzgoja započinje pad koncentracije laktata. (Slika 45.c). Amonijak se akumulira u hranjivim medijima do koncentracije od 15 mM, nakon čega se više ne mijenja (Slika 45.d). Koncentracija pojedinih aminokiselina u mediju SKC na početku uzgoja je veća od koncentracije u medijima SKP1 i SKP2. Stanice u sva tri testirana medija uglavnom podjednako konzumiraju dostupne aminokiseline, budući da im je koncentracija na kraju uzgoja vrlo slična (Slika 45.e). Na kraju uzgoja došlo je do porasta koncentracije glutaminske kiseline, alanina i prolina baš kao i u poglavlju 4.4.4.2.



Slika 45. Učinci uzgoja CHO DP-12-S stanica u medijima SKP1, SKP2 i SKC na a) rast i vijabilnosti stanica, b) koncentraciju IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja, c) koncentraciju glukoze i laktata, d) koncentraciju amonijaka te d) koncentraciju slobodnih aminokiselina na početku i na kraju uzgoja. Stanice uzgajane u mediju SKC predstavljaju kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. (n=3). Prikazane vrijednosti koncentracije IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrole ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

#### 4.4.4.3.2. Učinak peptidnih frakcija hidrolizata konoplje dobivenog enzimom protamkes

Iz slike 46.a može se uočiti da stanice u SKPF1 mediju ( $5,0 \times 10^6$  st mL<sup>-1</sup>) postižu značajno manji, a stanice u mediju SKPF2 ( $6,7 \times 10^6$  st mL<sup>-1</sup>) veći NKVS u odnosu na stanice u SKC mediju. Vijabilnost stanica naglo opada nakon 7. dana uzgoja te zadnjeg dana iznosi <75% (Slika 46.a). Stanice u mediju SKPF1 osim što imaju najmanji  $\mu_{\max}$  (0,0185 h<sup>-1</sup>), imaju i najveći qP (6,05 pg st<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>) te qGLC (1,29 pmol st<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>) u usporedbi ostalim testiranim medijima (Prilog 3.b). U mediju SKPF1 titar IgG (121,9 mg L<sup>-1</sup>) je značajno veća od koncentracije u kontroli (Slika 46.b). Stanice tijekom rasta nisu potrošile svu glukozu te je konačna koncentracija glukoze u hranjivim medijima iznosila je oko 7 mM. Za vrijeme uzgoja, u hranjivim medijima nakupljaju se nusprodukti staničnog metabolizma, laktat i amonijak. Koncentracija laktata, nakon što dosegne 14-15 mM, opada do kraja uzgoja (Slika 46.c). Amonijak se u hranjivim medijima nakuplja do najviše 5 mM, nakon čega mu se koncentracija značajno ne mijenja (Slika 46.d).



Slika 46. Učinci uzgoja CHO DP-12-S stanica u medijima SKPF1, SKPF2, SKPF3, SKPF4 i SKC na a) rast i vijabilnosti stanica, b) koncentraciju IgG u hranjivim medijima zadnjeg dana uzgoja, c) koncentraciju glukoze i laktata te d) koncentraciju amonijaka. Stanice uzgajane u mediju SKC predstavljaju kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± S.D. (n=3). Prikazane vrijednosti koncentracije IgG označene s \* ukazuju na značajnu razliku u odnosu na kontrole ( $p < 0,05$ ); mjereno *post-hoc* Tukeyevim HSD testom.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Izolacija i hidroliza proteina iz uljane pogače lana i konoplje

#### 5.1.1. Topljivost brašna i izolata uljane pogače lana i konoplje

Topljivost je jedna od najvažnijih funkcionalnih svojstava proteina, budući da može utjecati na druga svojstva poput geliranja, pjenjenja i emulgiranja. Topljivost proteina iz uljanih pogača ovisi o pH vrijednosti otapala, no također zavisi i o omjeru otapala i dodanog brašna uljane pogače, sastavu otapala, koncentraciji soli, toplinskoj obradi, odnosno temperaturi te konformaciji i koncentraciji proteina (Ayad, 2010). Cilj ovog ispitivanja bio je utvrditi profil topljivosti proteina iz brašna lana i konoplje pri vrijednostima pH i temperature navedenim u literaturi iz koje je također korišten i postupak izolacije i hidrolize proteina. Dobiveni rezultati prikazani u krivuljama topljivosti (Slika 7 i 12) korišteni su za određivanje najveće i najmanje topljivosti u cilju dobivanja što većeg prinosa proteina tijekom postupka izolacije.

Topljivost proteina brašna i izolata lana u pH rasponu od 2,0 do 12,0 prikazana je na slici 7. Topljivost brašna lana pri pH >3,0 značajno je veća pri 37 °C nego pri 25 °C. Najmanji udio otopljenih proteina iz brašna i izolata lana je u pH rasponu 4,0-5,0 (<20% relativne topljivosti proteina). Uočena pojava najslabije topljivosti može se objasniti time što se u tom pH rasponu nalazi i izoelektrična točka proteina uljane pogače lana (Lan i sur., 2020). S povećanjem pH vrijednosti postupno se povećava i udio otopljenih proteina brašna i izolata lana. Najveća topljivost proteina lana je pri pH >8,0. Topljivost proteina prisutnih u izolatu lana, za razliku od topljivosti proteina brašna, raste sa smanjem pH ispod 4,0. Dobiveni rezultati topljivosti proteina brašna i izolata lana u korelaciji su s dosadašnjim istraživanjima (Martínez-Flores i sur., 2006; Ayad, 2010; Kaushik i sur., 2016; Elsorady, 2020).

Slika 12. prikazuje profil topljivosti proteina brašna i izolata konoplje u ovisnosti o pH vrijednosti. Promatrajući postotak otopljenih proteina brašna konoplje pri različitim temperaturama značajna razlika uočljiva je tek pri pH vrijednostima većim od 7,0. Wang i sur. (2018) su u svome radu pokazali kako pri povećanju temperature otopine u bazičnim uvjetima (pH >8,0) dolazi do jakog elektrostatskog odbijanja i slabljenja vodikovih veza između polipeptida. Pucanje peptidnih veza također može pridonijeti porastu topljivosti proteina ovisno o temperaturi i vremenu zagrijavanja. Pri pH vrijednostima manjim od 8,0 topljivost proteina brašna pri obje ispitane temperature je izrazito niska te iznosi <6%.

Proteini konoplje općenito pokazuju nisku topljivost u usporedbi s drugim biljkama što se pripisuje agregaciji edestina pri pH ispod 7,0 (Hadnađev i sur., 2018). Krivulja topljivosti proteina izolata konoplje ima karakterističan U oblik. Najmanja topljivost je između pH 5,0 i 6,0, što odgovara njihovoj izoelektričnoj točki (Malomo i sur., 2014). S povećanjem pH vrijednosti iznad 7,0, odnosno smanjem ispod pH 4,0, došlo je do povećanja udjela otopljenih proteina (>80%). Profili topljivosti proteina brašna i izolata konoplje usporedivi su s literaturnim podacima (Tang i sur., 2006; Yin i sur., 2008; Hadnađev i sur., 2018).

### 5.1.2. Proteinski izolat uljane pogače lana i konoplje

Budući da je naglasak ovog rada na primjeni proteinskih hidrolizata, jedan od prvih zadataka bio je provesti uspješnu izolaciju proteina iz uljanih pogača lana i konoplje. Najčešće korišteni postupak za pripremu proteinskih izolata iz uljanih pogača uključuje alkalnu ekstrakciju te izoelektrično taloženje. Nakon otapanja proteinskih komponenti u lužnatoj smjesi, uklanjanje neotopljenog materijala provodi se centrifugiranjem, nakon čega slijedi taloženje proteina iz supernatanta podešavanjem pH na izoelektričnu točku.

Korištenom metodom izolacije proteina (Udenigwe i sur., 2009) iz početne mase brašna uljane pogače lana dobiveno je 13,4% proteinskog izolata (Tablica 12) što je vrlo slično prinosu od 11,5% što su referirali Lan i sur. (2020) tijekom postupka izolacije kombinacijom alkalne ekstrakcije i izoelektričnog taloženja. Prema literaturnim podacima udio proteina u brašnu uljane pogače lana može varirati 25-50% proteina (Krause i sur., 2002; Gutiérrez i sur., 2010; Karamać i sur., 2016). S obzirom da brašno uljane pogače lana korišteno za izolaciju sadrži 50,0% proteina, udio dobivene mase proteinskog izolata u odnosu na masu proteina u brašnu lana iznosi 26,7%. Također tijekom drugih istraživanja dobivene su slične vrijednosti prinosa izolata lana od 30,0% i 24,7% u odnosu na masu proteina u brašnu (Nwachukwu i Aluko, 2018; Lan i sur., 2020). Po završetku postupka izolacije udio proteina u izolatu lana iznosio je 79,1% što je u skladu s literaturnim podacima koji referiraju udio proteina između 78,9% i 90,6% (Udenigwe i sur., 2009; Kaushik i sur., 2016; Nwachukwu i Aluko, 2018).

Albumini i globulini su glavni proteini u sjemenkama lana. Proteini lanenog sjemena sastoje se od 20% albumina, koji je protein male molekulske mase (1,6S i 2S), te 80% globulina, proteina velike molekulske mase (11S i 12S) (Soni i sur., 2016). Profil



molekulskih masa proteina izolata lana analiziran je pomoću SDS-PAGE u reducirajućim uvjetima (Slika 8). Raspon molekulskih masa proteina na gelu kreće se od 10 kDa pa do 50 kDa. Može se pretpostaviti da vrpca pri 10 kDa predstavlja albumin dok vrpca na oko 48 kDa predstavlja globulin. Također, vidljive su i vrpce pri 20-21 kDa i 30-35 kDa koji se mogu identificirati kao bazna ( $\beta$ ) i kisela ( $\alpha$ ) podjedinica 11S globulina. Izuzev prethodno spomenute 4 vrpce, na gelu se može uočiti i nekoliko manjih vrpca molekularnih masa između 15 i 30 kDa koji mogu predstavljati podjedinice globulina. Vidljive vrpce na gelu u skladu su s rezultatima koje su objavili Karamać i sur. (2016) te Lan i sur. (2020) čiji su profili molekularnih masa proteina izolata lana gotovo identični našim dobivenim rezultatima.

Udjeli mase izolata i proteina dobivenih iz brašna uljane pogače konoplje nakon postupka izolacije metodom alkalne ekstrakcije i kiselinskog taloženja prikazani su u tablici 16. Po završetku postupka izolacije dobiveno je 24,3% proteinskog izolata konoplje u odnosu na početnu masu brašna. Budući da korišteno brašno konoplje po deklaraciji sadrži 50,0% proteina, udio dobivene mase proteinskog izolata konoplje u odnosu na masu proteina prisutnu u brašnu iznosi 48,6%. Ovi udjeli su gotovo identični udjelima koji su opisani u radu Hadnađev i sur. (2018) i koji iznose 24,2% i 50,6%, dok su Malomo i sur. (2014) ostvarili nešto malo manje udjele od 16,8% i 37,9%. U usporedbi s drugim istraživanjima gdje je udio proteina prisutnih u izolatu konoplje varirao između 84,0% i 91,4% (Tang i sur., 2006; Wang i sur., 2008; Hadnađev i sur., 2018), u našem slučaju udio je bio nešto manji te je iznosio 79,5%. Razlika u dobivenim rezultatima može se objasniti različitim vrstama konopljinih sjemenki koje su se koristele u istraživanjima budući da na sastav proteina može utjecati kultivar ili sorta konopljinih sjemenki kao i geografski uvjeti prilikom njihovog uzgoja.

Sastav proteina i profil molekularnih masa proteinskog izolata konoplje prikazan je na slici 13. Sjemenke konoplje sadrže uglavnom skladišne proteine albumin (25-37%) i edestin (67-75%). Edestin se sastoji od 6 identičnih podjedinica i svaka podjedinica sadrži kiseli i baznu podjedinicu povezanu jednom disulfidnom vezom. Vrpca veličine 34 kDa može se identificirati kao kisela podjedinica edestina, dok vrpce veličine 20 kDa i 18 kDa predstavljaju heterogenu baznu podjedinicu edestina (Tang i sur., 2006; Wang i sur., 2008). Pri većim molekularnim masama moguće je uočiti vrpca na otprilike 48 kDa koja vjerojatno predstavlja 7S edestin. Proteinske vrpce ispod 17 kDa predstavljaju skladišni protein albumin (Mamone i sur., 2019).

### 5.1.3. Proteinski hidrolizat uljane pogače lana i konoplje

Početni produkt hidrolize naziva se proteinski hidrolizat te sadrži peptide, slobodne aminokiseline, ugljikohidrate, vitamine, lipide i drugo. Peptidi su kratke sekvence koje se međusobno razlikuju po duljini lanca (2-20 aminokiselina), slijedu aminokiselina i bioaktivnosti. Bioaktivni peptidi imaju izvrstan potencijal za stvaranje funkcionalne hrane i/ili nutraceutika. Nekativni su sve dok se ne oslobode iz izvornog proteina proteolitičkom hidrolizom pomoću komercijalnih proteaza ili fermentacijskih mikroorganizama. Vrsta enzima korištenog za hidrolizu ima ključnu ulogu u nastanku i aktivnosti peptida. Zbog specifičnosti enzima, svaka proteaza stvara peptide sa specifičnim strukturnim karakteristikama (Wu i sur., 2019). U ovom radu su korištene tri komercijalne mikrobne proteaze: alkalaza, neutraza i protameks za pripremu proteinskih hidrolizata lana i konoplje. Prema našim dosadašnjim saznanjima, ovo su prva istraživanja u kojima su za dobivanje hidrolizata lana korišteni enzimi neutraza i protameks. Uobičajeno, rafiniranje proteinskih hidrolizata uključuje razdvajanje peptida na različite molekulske veličine korištenjem membranske ultrafiltracije. Tako frakcionirani peptidi, mogu, ali i ne moraju, imati bolja bioaktivna svojstva od izvornog proteinskog hidrolizata (Nwachukwu i Aluko, 2018).

Najveći stupanj hidrolize (DH) proteinskog izolata lana postignut je enzimom alkalaza te iznosi 44,8% (Slika 9.a). Ta vrijednost značajno je veća od DH izolata lana kada se usporedi s literaturnim podacima, a koji iznose između 16 i 20% (Silva i sur., 2013; Karamać i sur., 2016; Silva i sur., 2017). Razlika u dobivenim DH može se objasniti korištenim enzim:supstrat (E:S) omjerom te vremenom trajanja hidrolize. U ovom radu korišten E:S omjer iznosio 5%, a hidroliza je trajala 240 min, dok je u navedenim istraživanjima E:S omjer bio u rasponu od 1 do 3%, a vrijeme hidrolize nije bilo duže od 180 min. Iako će duljina trajanja hidrolize povećati DH, enzimi će imati ograničenu učinkovitost ako u supstratu nema dostupnih mjesta za cijepanje (Wu i sur., 2019). Štoviše, dokazano je da veća koncentracija enzima ili niža koncentracija supstrata rezultira većom proteolizom proteina sjemenki lana (Silva i sur., 2013). Tijekom proteinske hidrolize lana pomoću enzima protameks postignut je DH od 42,4% (Slika 11.a). Najmanji DH ostvaren je djelovanjem enzima neutraza koji iznosi 36,5% (Slika 10.a). Tijek hidrolize proteinskog izolata lana prikazan je na slikama 9.b, 10.b i 11.b. Iako DH nakon 60 min hidrolize nimalo ili vrlo malo raste, promatrajući SDS-PAGE dinamike hidrolize vidljivo je da i dalje dolazi do cijepanja peptidnih veza u proteinima budući da

se intenzitet vrpce s vremenom smanjuje. Iako bismo na temelju uzorka br. 4 na slici 9.b mogli zaključiti da su svi peptidi dobiveni enzimom alkalaza nakon 240 min hidrolize manji od 4,6 kDa, to nije ispravno budući da je u ovom slučaju vidljivost pojedinih vrpce povezana s različitim razrjeđenjem uzorka. Promatrajući uzorak br. 1 na slici 9.d koja predstavlja nefrakcionirani HLA nakon 240 min hidrolize, vidljivo je da su prisutni peptidi i proteini molekularskih masa većih ne samo od 4,6 kDa nego i od 10 kDa budući da je taj uzorak bio oko 3x manje razrijeđen od uzorka u jažici 4 na slici 9.b. Navedeno je potvrđeno i rezultatima analize SEC pri čemu je najveći udio dobivenih peptida veličina između 1 i 10 kDa (78,6%). Udio peptida <1 kDa u proteinskom hidrolizatu lana iznosi 16,7%, dok je udio peptida >10 kDa najmanji te iznosi 4,7%. Na temelju kromatograma SEC zaključeno je da alkalaza do završetka hidrolize digestira gotovo sve prisutne proteine na peptide veličina ispod 7 kDa (Prilog 4). Ovi rezultati su u skladu s rezultatima dosadašnjih istraživanja koja su pokazala da hidrolizom proteinskog izolata lana pomoću enzima alkalaza nastaju peptidi uglavnom manji od 6,5 kDa (Karamać i sur., 2016), odnosno peptidi manji od 4 kDa pri čemu je 70% peptida bilo u rasponu 500-1500 Da (Silva i sur., 2017). Tijekom 240 minuta hidrolize izolata lana, enzim protameks uspješno je pocijepao gotovo sve proteine veće od 22 kDa na manje peptide, dok je određena količina  $\beta$  (21 kDa) i ostalih podjedinice globulina (15-20 kDa) ostala intaktna (Slika 11.b). Udio peptida, odnosno proteina molekularskih masa većih od 10 kDa skoro je dvaput veći u odnosu na udio peptida iste veličine dobiven enzimom alkalaza te iznosi 8,9%. Peptidi <1 kDa čine 15,3%, a oni između 1 i 10 kDa čine 75,8% ukupnog udjela dobivenih peptida (Slika 11.c). Tijekom hidrolize proteinskog izolata lana enzimom neutraza došlo je do cijepanja proteina na peptide što je vidljivo po smanjenu intenziteta vrpce, no enzim ne uspijeva pocijepati sve proteine u izolatu te je znatan dio proteina, pogotovo globulin (48 kDa) i  $\alpha$  podjedinica globulina (35 kDa), ostao intaktan (Slika 10.b). Potvrda navedenog dobivena je i analizom SEC HLN uzoraka (Slika 10.c). Većina nastalih peptida je veličine između 1 i 10 kDa te njihov udio iznosi 62,1%, što u usporedbi s udjelom peptida istih veličina dobivenih enzimima alkalaza i protameks čini najmanji postotak. Udio peptida <1 kDa iznosi 13,6%, dok peptidi >10 kDa čine 24,4%. Na temelju slika 9.d-11.d može se zaključiti da su HLA, HLN i HLP membranskom filtracijom uspješno frakcionirani na peptidne frakcije veličina <1 kDa te 1-10 kDa budući da u uzorcima 2 i 3 nisu uočene vrpce većih molekularskih masa od željenih veličina frakcija.

Promatrajući vrijednosti DH tijekom hidrolize proteinskog izolata konoplje pomoću tri mikrobne proteaze vidljivo je da je najveći DH postignut nakon 240 min djelovanja enzima alkalaza te iznosi 43,3% (Slika 14.a). Nešto manji DH od 40,4%, postignut je enzimom protameks nakon 240 min (Slika 16.a), dok je najmanjih DH od 36,5% ostvaren djelovanjem enzima neutraza (Slika 15.a). Ovi rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjem u kojem su dobivene nešto manje DH vrijednosti tijekom digestije proteina izolata konoplje istim mikrobnim enzimima te pri istim uvjetima kao u ovom radu. Tang i sur. (2009) pokazali su da su DH postignuti enzimima alkalaza, neutraza i protameks tijekom 240 min iznosili 42,0%, 30,0% i 28,0%, pojedinačno. Slike 14., 15. i 16.a prikazuju tipične krivulje hidrolize pri ispitanim uvjetima. Sve krivulje naglo dostižu visoke DH vrijednosti tijekom prvih 10 min hidrolize i do 120 min vidljiv je blagi rast DH vrijednosti, koja se potom do kraja hidrolize više znatnije ne mijenja. Dobiveni podaci sugeriraju da se odabirom vrste proteaze i vremenom hidrolize mogu dobiti hidrolizati s različitim DH vrijednostima. Slike 14.-16.b prikazuju SDS-PAGE profile proteina izolata konoplje nakon proteolitičke digestije od 10 min, 60 min i 240 min. Enzimska hidroliza dovela je do postupne digestije kisele i bazne podjedinice edestina kao i drugih prisutnih proteina i ovisna je o vremenu hidrolize. Međutim, brzina i obrazac digestije podjedinica vidljivo su različiti i ovisni o vrsti korištene proteaze. Već nakon 10 min hidrolize enzimom alkalaza (uzorak 2, Slika 14.b) većina prisutnih proteina je digestirana na peptide <10 kDa. Međutim, oko 60. minute hidrolize pojavljuje se vrpca veličine otprilike 20 kDa koja ostaje priustna do kraja procesa hidrolize. Ta pojava može se pripisati agregaciji nastalih hidrofobnih peptida ili fragmenata koji se oslobađaju tijekom enzimske hidrolize (Wang i sur., 2009). Na temelju rezultate analize SEC (Slika 14.c) može se uočiti da formirani agregat (MW ~20 kDa) kao i eventualno nedigestirani proteini veličine >10 kDa čine samo 6% ukupnih peptida. Najveći udio peptida je veličine između 1 i 10 kDa te iznosi 79,7%, dok je udio peptida < 1kDa 14,3%. Sličan rezultat objavili su Malomo i Aluko (2016) kod kojih je većina peptida dobivenih alkalazom također bila <10 kDa. Iako enzim protameks tijekom hidrolize uspjeva digestirati gotovo sve proteine molekularnih masa >20 kDa, nakon 240 min hidrolize i dalje su vidljive nedigestirane bazne podjedinice edestina (18-20 kDa) (Slika 16.b). Općenito, bazne podjedinice se teže digestiraju od kiselih podjedinica što se može pripisati razlikama u položaju podjedinica u strukturi proteina, a podjedinice smještene u unutrašnjosti molekule obično su nedostupnije katalitičkim mjestima enzima (Tang i sur., 2009). Da je protameks slabije digestirao proteine izolata konoplje od alkalaze, osim manjeg DH,

ukazuje i udio peptida većih od 10 kDa koji je kod HKP za više od dva puta veći nego kod HKA te iznosi 13,6% (Slika 16.c). HKP posjeduje sličan udio peptida <1 kDa kao i HKA (12,9%) dok je najveći udio peptida veličine 1-10 kDa (73,5%). Iz slike 15.b može se uočiti da se djelovanjem neutraze 7S edestin (48 kDa) te kisela (34 kDa) i bazna (18-20 kDa) podjedinica edestina postupno razgrađuju na manje peptide tijekom vremena, no za razliku od 7S edestina (48 kDa), dio kiselih i baznih podjedinica ostaje nepocijepan na kraju hidrolize. To je potvrđeno i na temelju profila SEC (Slike 15.c) gdje udio peptida >10 kDa pripremljenih neutrazom iznosi 24,4% što je najveći udio u usporedbi s udjelom peptida iste veličine dobivenih s druge dvije proteaze. To se najvećim djelom može pripisati prisutnošću nedigestiranih podjedinica proteina konoplje, ali i vjerojatnim nastajanjem peptidnih agregata (Tang i sur., 2009; Wang i sur., 2009). Udio peptida <1 kDa iznosi 9,7%, dok je većina nastalih peptida veličine između 1 i 10 kDa te njihov udio iznosi 65,9%. Da je frakcioniranje HKA, HKN i HKP membranskom filtracijom na peptidne frakcije veličina <1 kDa te 1-10 kDa uspješno provedeno možemo zaključiti na temelju slika 14., 15. i 16.d budući da u uzorcima 2 i 3 nisu uočene vrpce molekularnih masa većih od željenih veličina frakcija.

Dobiveni rezultati raspodjele peptida po veličini u skladu su s vrijednostima DH kao i karakteristikama korištenih enzima. Tako proizvođač enzima tvrdi da alkalaza ( $\geq 2,4$  U g<sup>-1</sup>) i protameks ( $> 1,5$  U g<sup>-1</sup>) provode agresivnu hidrolizu, dok neutraza ( $\geq 0,8$  U g<sup>-1</sup>) provodi blagu hidrolizu. Najveći DH postignut je tijekom pripreme hidrolizata lana i konoplje enzimom alkalaza te je u njemu najveći udio peptida <1 kDa, kao i najmanji udio peptida >10 kDa u usporedbi s hidrolizatima pripremljenim drugim enzimima. Kod hidrolizata dobivenih enzimom neutraza je upravo sve suprotno. Uspješnost hidrolize može se procijeniti iz DH vrijednosti, koje se mogu koristiti kao pokazatelji duljina peptidnog lanca; više vrijednosti DH upućuju na prisutnost peptida kraćih duljine, dok niže vrijednosti DH upućuju na dulje peptide (Malomo i sur., 2015).

### 5.1.3.1. Aminokiselinski sastav proteinskog hidrolizata lana i konoplje

Aminokiseline su vrsta biomolekula koje su neophodne za sintezu proteina, nukleotida i lipida te značajno doprinose stvaranju metaboličke energije. Koncentracija aminokiselina je obično ograničavajući uvjet tijekom staničnog rasta, utječe na preživljavanje stanice i brzinu rasta te može utjecati na sintezu određenih proteina. Preniska koncentracija aminokiselina može rezultirati brzim iscrpljivanjem hranjivog medija, te je stoga "ograničavajuća", dok previsoka koncentracija može biti inhibitorna zbog narušavanja kemijske ravnoteže metaboličkih reakcija. Naročito je važno tijekom uzgoja CHO stanične linije osigurati dovoljne količine esencijalnih aminokiselina (Arg, Cys, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val) kako bi se uspješno odvijao rast i proliferacija (Chen i sur., 2019). U usporedbi sa slobodnim aminokiselinama, mali peptidi imaju bolju nutritivnu vrijednost, zbog svoje sposobnosti transporta više od jedne aminokiseline u stanicu na račun jedne molekule ATP-a (Christians i sur., 2010). Koncentracije slobodnih aminokiselina niže su u usporedbi s količinama prisutnima u obliku vezanom za proteine. Također, biološka aktivnost peptida između ostalog ovisi i o njihovim aminokiselinskim sastavima, tj. o udjelu aminokiselina s razgranatim lancima, hidrofobnim aminokiselinama ili negativno nabijenim kiselinama (Wu i sur., 2019).

Udio slobodnih i ukupnih aminokiselina u hidrolizatu lana prikazan je u tablicama 13, 14, 15. Uočljivo je da nema značajne razlike u udjelu ukupnih aminokiselina između pripremljenih HLA, HLN i HLP što je i očekivano s obzirom da su hidrolizati pripremljeni iz iste početne sirovine. Ukupan aminokiselinski sastav proteinskog hidrolizata lana usporediv je sa sastavom hidrolizata soje, pri čemu oba hidrolizata imaju visoke udjele asparaginske kiseline (11,5%), glutaminske kiseline (19%) i arginina (8,7%) što ukazuje na visok sadržaj amida (Ayad, 2010). Prikazani udjeli ukupnih aminokiselina u pripremljenim hidrolizatima lana u skladu su s literaturnim podacima (Udenigwe i Aluko, 2010; Nwachukwu i sur., 2014; Cecile Urbain Marie i sur., 2019) te sadrže za CHO stanice sve potrebne esencijalne aminokiseline (Cys i Trp nisu određeni zbog ograničenja korištene metode). Poznato je da proteini i hidrolizati lanenog sjemena imaju visoku koncentraciju BCAA (aminokiseline razgranog lanca), koji su se pokazali važnima u inhibiciji ACE aktivnosti. Hidrolizati lana pripremljeni u ovom radu imaju identičan udio BCAA od 15,8% kao i hidrolizati pripremljeni enzimom termoaza-GL30 (Nwachukwu i sur., 2014), te neznato niži udjel BCAA u odnosu na hidrolizat pripremljen enzimima termolizin i pronaza (16,8%) (Udenigwe i Aluko, 2010). Hidrofobne aminokiseline

predstavljaju 34,8% ukupnih aminokiselina, a njihova prisutnost može dovesti do povećanja topljivosti peptida u lipidima i na taj način olakšati bolju interakciju sa slobodnim radikalima (Silva i sur., 2017). Osim navedenog, proteini s nižim omjerom lizina i arginina pokazuju slabije lipidemijske i aterogene učinke, a omjer lizina i arginina pripremljenih hidrolizata iznosi 0,31 što je usporedivo s rezultatima koje su objavili Kaushik i sur. (2016).

Prikazi udjela slobodnih i ukupnih aminokiselina u hidrolizatima konoplje prikazane su u tablicama 17, 18 i 19. Slično kao i kod hidrolizata lana, sastavi ukupnih aminokiselina HKA, HKN i HKP međusobno se neznatno razlikuju budući da su pripremljeni iz iste početne sirovine. Također, aminokiselinski sastavi hidrolizata pripremljenih pomoću različitih proteaza usporedivi su s objavljenim literaturnim podacima (Girgih i sur., 2011; Malomo i sur., 2015). Udio ukupnih aminokiselina u HKA, HKN i HKP također je usporediv s udjelima aminokiselina u hidrolizatima konoplje prikazanim u drugim znanstvenim radovima (Lu i sur., 2010; Malomo i sur., 2015; Malomo i Aluko, 2016). Određene razlike između aminokiselinskog sastava hidrolizata pripremljenih u ovom radu i literaturnih podataka mogu se objasniti različitim podrijetlom i uvjetima pripreme brašna uljane pogače konoplje. Proteinski hidrolizat konoplje sadrži sve esencijalne aminokiseline te uravnoteženi aminokiselinski profil. Također sadrži visok udio arginina (12,3%), glutamina (18,6%) i asparagina (11,7%). Udio arginina od 12% je značajno veći od udjela ( $< 7\%$ ) u proteinima pšenice, riže, soje, uljane repice i sirutke (Callaway, 2004). U ovom radu omjer arginina i lizina u hidrolizatu konoplje iznosi 4,4 što je u korelaciji s dosadašnjim istraživanjima koja su pokazala da se omjer Arg/Lys unutar proteina konoplje kreće između 3,0 i 5,5. Vrijednost omjera Arg/Lys u proteinu konoplje značajno je veća od omjera proteina soje (1,41) i kazeina (0,46) što hidrolizat konoplje čini posebno vrijednim kao prehrambeni i bioaktivni sastojak za formuliranje hrane koja može povoljno djelovati na kardiovaskularno zdravlje (Wang i Xiong, 2019). Visoka razina hidrofobnosti koja se očituje velikim količinama aromatskih (6,1%) i hidrofobnih (33,0%) aminokiselina može poboljšati unos peptida kroz stanični lipidni dvosloj što bi moglo pridonijeti pojačanoj biokativnosti pripremljenih hidrolizata konoplje (Girgih i sur., 2014).

## 5.2. Učinak proteinskih hidrolizata lana i konoplje u hranjivom mediju na tehnološki značajnim staničnim linijama

### 5.2.1 Biološka aktivnost proteinskog hidrolizata uljanih pogača lana i konoplje

#### 5.2.1.1 Antioksidacijski potencijal

Poznato je da različiti faktori utječu na antioksidacijsku aktivnost proteinskih hidrolizata, a jedan od važnih faktora je specifičnost enzima korištenog tijekom proteolize te postignuti stupanj hidrolize. Učinkovitost hidrolizata kao antioksidansa usko je povezana s karakteristikama dobivenih peptida tj. njihovom molekulskom masom, aminokiselinskim sastavom te slijedom aminokiselina (Karamać i sur., 2016).

Antioksidacijski potencijal pripremljenih proteinskih hidrolizata uljane pogače lana određen je metodom ORAC. Najveću vrijednost ORAC od 1928,4  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  proteina posjeduje HLA, dok HLN (1729,6  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  proteina) i HLP (1631,0  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  proteina) posjeduju statistički slične vrijednosti ORAC (Slika 17). U istraživanjima koje su proveli Silva i sur. (2017) antioksidacijska aktivnost peptida dobivenih hidrolizom proteina lana enzimom alkalaza, izražena kao vrijednost ORAC, iznosila je od 930,0 do 3580,0  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  proteina. Nadalje, Karamać i sur. (2016) u svojim istraživanjima utvrdili su da je najveća antioksidacijska aktivnost hidrolizata lana postignuta djelovanjem enzima alkalaza. Razlike u izmjerenim vrijednostima ORAC između hidrolizata pripremljenih u ovom radu mogu se pripisati specifičnostima djelovanja svake pojedine proteaze da tijekom procesa hidrolize oslobode bioaktivne peptidne sekvence iz proteina biljaka (Udenigwe i sur., 2009). Svaki enzim zapravo je hidrolizirao proteine lana na peptide različitih veličina i slobodne aminokiseline. Postizanje većih vrijednosti ORAC manjih peptida može se objasniti njihovom povećanom mogućnošću da reagiraju te doniraju elektrone slobodnim radikalima u usporedbi s peptidima većih molekulskih masa (Onuh i sur., 2014). Također, antioksidacijski potencijal peptida u znatnoj mjeri ovisi o sastavu aminokiselina u proteinskim hidrolizatima. Dokazano je da veća prisutnost hidrofobnih aminokiselina u ukupnom sastavu aminokiselina, a što je slučaj s našim hidrolizatima, može pospješiti topljivost peptida u lipidima te poboljšati interakciju sa slobodnim radikalima. Također aromatske aminokiseline mogu donirati protone radikalima kojima nedostaje elektron te na taj način utjecati na njihovu stabilnost (Silva i sur., 2017). Iako HLA postiže veći DH u odnosu na HLP, oba hidrolizata pokazuju sličan udio manjih peptida (Slika 9.a i c; Slika 11.a i c). Budući da antioksidacijski potencijal ne ovisi isključivo o udjelu peptida malih molekulskih masa, pa čak ni o



aminokiselinskom sastavu, razlika u njihovim vrijednostima ORAC može se pripisati različitim aminokiselinskim sekvencama dobivenih peptida (Chabanon i sur., 2007).

Pojedina istraživanja su pokazala da s povećanjem DH te smanjenjem molekulske mase dobivenih peptida raste i antioksidacijski potencijal pripremljenih hidrolizata (He i sur., 2013; Zheng i sur., 2013), a što je u skladu s rezultatima koji su dobiveni za naš hidrolizat lana. Međutim, navedeno se ne odnosi i na naš hidrolizat konoplje. Tako najveću vrijednost ORAC ima HKN ( $695,2 \mu\text{mol TE g}^{-1}$  proteina) (Slika 32) koji ima najmanji DH, ali i najveći udio peptida većih od 10 kDa (Slika 15.a i c). Girgih i sur. (2013) u svom rad su pokazali da ovisno o uvjetima hidrolize, digestija proteina sjemenki konoplje rezultira peptidima različitog antioksidacijskog djelovanja uz izmjerene vrijednosti ORAC od 402,0 do 1613,0  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  proteina, a što je usporedivo s ovdje dobivenim rezultatima. S druge pak strane, HKA i HKP imaju veći DH kao i udio peptida <10kDa (Slika 14.a i c; Slika 16.a i c), ali manji antioksidacijski potencijal u usporedbi s HKN (Slika 32). Bez obzira na DH i veličinu peptida, HKN ima najveći antioksidacijski potencijal, te na temelju toga možemo pretpostaviti da potencijal HKN prvenstveno ovisi o specifičnosti korištene proteaze kao i o aminokiselinskom sastavu i sekvenci dobivenih peptida (Karamać i sur., 2016). Antioksidacijski potencijal peptida osim o vrsti korištene proteaze ovisan je i o vrsti biljnih proteina (Silva i sur., 2017) čime se mogu objasniti razlike u vrijednostima ORAC hidrolizata lana i konoplje.

#### 5.2.1.2 Učinak hidrolizata na proliferaciju HaCaT i HeLa stanica

Prije ispitivanja antioksidacijskog potencijala spojeva *in vivo*, stanične kulture *in vitro* mogu pružiti informacije o njihovoj biološkoj aktivnosti na staničnoj razini. Za određivanje učinka pripremljenih proteinskih hidrolizata lana i konoplje na staničnu proliferaciju *in vitro*, korištene su normalne stanice ljudskih keratinocita, HaCaT te tumorske stanice vrata maternice, HeLa.

Na temelju dobivenih rezultata izlaganja HaCaT stanica različitim koncentracijama hidrolizata lana (Slika 18.a), vidljivo je da nije došlo do antiproliferativnog učinka. Štoviše, kada su stanice bile izložene HL u koncentraciji 5 i 10  $\text{g L}^{-1}$ , primjećen je značajan stimulirajući učinak na staničnu proliferaciju u rasponu od 26% do 49%. Uspoređujući različite hidrolizate lana, razvidno je da HLA pokazuje najveći pozitivan učinak na proliferaciju HaCaT stanica. Kako je vidljivo i na slici 33.a, antiproliferativan učinak hidrolizata konoplje na HaCaT stanicama uočen je kada su

stanice izložene  $1 \text{ g L}^{-1}$  HKA,  $5$  i  $10 \text{ g L}^{-1}$  HKN te  $2$  i  $5 \text{ g L}^{-1}$  HKP gdje je stanična vijabilnost iznosila od 90% do 78%. Tretiranje HaCaT stanica ostalim ispitanim koncentracijama hidrolizata, izuzev  $2 \text{ g L}^{-1}$  HKA, dovelo je do značajnog stimulirajućeg efekta na staničnu proliferaciju (20-60% veća vijabilnost u odnosu na kontrolu). Biljni proteinski hidrolizati kompleksna su mješavina aminokiselina, oligopeptida, fenolnih i drugih spojeva koji mogu utjecati na *in vitro* stanični rast i metabolizam. Pozitivan učinak proteinskih hidrolizata biljnog podrijetla na rast i produktivnost staničnih linija poput CHO, THP-1 i CCO stanica otprije je poznat (Kim i Lee, 2009; Girón-Calle i sur., 2010; Radošević i sur., 2016). Međutim, također je poznato da biljni proteinski hidrolizati mogu imati inhibitorni učinak na stanični rast i produktivnost, što se može objasniti razlikama u sastavu i koncentraciji peptida prisutnih u hidrolizatima (Kim i Lee, 2009). Ti su učinci bili povezani s varijacijama u sastavu i koncentraciji peptida dobivenih enzimskom hidrolizom. Budući da se može očekivati dvostruki učinak biljnih peptida na staničnu proliferaciju vrlo je važno pažljivo procijeniti njihovo djelovanje *in vivo*, kao i odrediti optimalnu količinu ako se koriste kao dodatak prehrani i/ili nutraceutik. Zaključno, pri normalnim fiziološkim uvjetima nakon ingestije hidrolizata nemoguće je izložiti stanice tkiva (npr. putem krvne plazme) dozama peptida testiranim našim istraživanjima *in vitro* pa je stoga vrlo teško donijeti pravi zaključak o potencijalnim koristima/škodljivosti istih.

Izlaganje HeLa stanica proteinskom hidrolizatu lana u koncentraciji  $1$  i  $2 \text{ g L}^{-1}$  (Slika 18.b) nije dovelo do značajnog smanjenja stanične proliferacije, bez obzira na ispitani hidrolizat. Dodatak  $5 \text{ g L}^{-1}$  HLA u hranjivi medij izazvao je citostatički efekt u HeLa stanicama pri čemu je stanična vijabilnost iznosila 80%. Još veći citostatički učinak HLA primjećen je pri koncentraciji od  $10 \text{ g L}^{-1}$  pri čemu je stanična vijabilnost dosegla vrijednost nešto nižu od 40%. Pri istoj koncentraciji, uočen je i blagi citostatički učinak HLN i HLP na HeLa stanice gdje je vijabilnost stanica iznosila oko 87%. Ovisno o ispitanoj koncentraciji, svi hidrolizati konoplje pokazali su citostatički učinak na tumorskim HeLa stanicama. HKA i HKP su pokazali značajan citostatički učinak u koncentracijama  $>1 \text{ g L}^{-1}$ , dok je isti učinak kod HKN uočen jedino pri većim ispitanim koncentracijama ( $5$  i  $10 \text{ g L}^{-1}$ ) (Slika 33.b). Da je antiproliferacijski učinak hidrolizata ovisan o njihovoj koncentraciji u svom istraživanju su pokazali Wang i sur. (2016) pri čemu su veće koncentracije peptida uljane repice izazvale jači antiproliferacijski učinak na HepG2 stanicama ljudskog karcinoma, MCF-7 stanicama te HeLa stanicama. Udenigwe i sur. (2009) su ispitali učinak peptidnih frakcija proteina lana na stanicama

mišjih makrofaga pri čemu nisu uočili njihov citostatički učinak pri nižim koncentracijama ( $0,2-1 \text{ g L}^{-1}$ ), a što korelira s našim rezultatima gdje koncentracije HL ( $1-2 \text{ g L}^{-1}$ ) nisu pokazale negativan učinak na rast HaCaT i HeLa stanica.

Uspoređujući izmjerene vrijednosti ORAC pripremljenih hidrolizata lana i njihov učinak na staničnu vijabilnost HeLa stanica, vidljivo je da HLA, koji posjeduju najveću vrijednost ORAC, ujedno pokazuje i najveći citostatički učinak. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima prijašnjih istraživanja koja upućuju na vezu između antioksidacijskog i antitumorskog djelovanja peptida dobivenih iz prokljalog sjemena soje i oraha. Pojedine peptidne frakcije soje uz to što pokazuju veliku antioksidacijsku aktivnost, posjeduju i antiproliferacijski učinak na stanice raka dojke i vrata maternice, kao i sposobnost induciranja apoptoze s minimalnim učinkom na normalne stanice (González-Montoya i sur., 2016). Do sličnog zaključka došli su i Jahanbani i sur. (2016) koji su uočili značajnu povezanost između antioksidacijskog i antitumorskog djelovanja peptidnih frakcija oraha. Iako HKA i HKP posjeduju nižu vrijednost ORAC u usporedbi s HKN, svi pripremljeni hidrolizati konoplje pri većim koncentracijama ( $5 \text{ i } 10 \text{ g L}^{-1}$ ) pokazuju sličan antiproliferacijski učinak na HeLa stanice. Istovremeno, različiti profili proteina i peptida u hidrolizatima konoplje, kao i njihove koncentracije, različito utječu i na HeLa stanice.

#### *5.2.1.3. Protektivan učinak proteinskog hidrolizata lana i konoplje na $\text{H}_2\text{O}_2$ -inducirani oksidacijski stres u HaCaT stanicama*

Antioksidacijska aktivnost peptida povezana je s „hvatanjem“ slobodnih radikala i inhibicijom ROS inducirane oksidacije bioloških makromolekula (Udenigwe i Aluko, 2012). U skladu s navedenim, ispitan je protektivan učinak proteinskog hidrolizata lana i konoplje s najvećim vrijednostima ORAC na  $\text{H}_2\text{O}_2$ -inducirani oksidacijski stres u HaCaT stanicama. Kako bi se utvrdilo inhibiraju li HLA i HKN stvaranje ROS-a, HaCaT stanice su tretirane odabranim koncentracijama hidrolizata ( $0,5-2 \text{ g L}^{-1}$ ) te potom izložene djelovanju  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nastanak unutarstaničnog ROS-a određen je pomoću metode DCF-DA. Tretman HaCaT stanica hidrolizatom HLA u koncentracijama  $1 \text{ i } 2 \text{ g L}^{-1}$  pokazuje zaštitni učinak budući da smanjuje nastanak ROS-a, induciranog dodatkom  $\text{H}_2\text{O}_2$ , za 10 do 21% (Slika 19). Statistički značajno smanjenje postotka nastalog ROS-a postignuto je dodatkom  $2 \text{ g L}^{-1}$  HLA. Što se pak tiče hidrolizata konoplje, značajna inhibicija nastanka ROS-a (27% manje u odnosu na kontrolu) uočena je pri tretmanu HaCaT stanica s  $1 \text{ g L}^{-1}$  HKN (Slika 34). Ranija istraživanja također su pokazala protektivan učinak proteinskih

hidrolizata konoplje, sirutke i soje na PC12 i Caco-2 staničnim linijama tijekom induciranog oksidativnog stresa (Lu i sur., 2010; Zhang i sur., 2012; Zhang i sur., 2018). S druge pak strane, Silva i sur. (2013) su ustvrdili da ekstrakti hidrolizata lana, dobiveni enzimom alkalaza, ne štite staničnu liniju ljudskih makrofaga U937 od H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induciranog jednolančanog loma DNA, iako su hidrolizati pokazali visoko antioksidacijsko djelovanje. Razlike u strukturi i veličini peptida, skupinama bočnih lanaca aminokiselina i staničnoj bioraspoloživosti mogu utjecati na interakcije peptida sa slobodnim radikalima i tako utjecati na pojavu zaštitnog učinka (Zhang i sur., 2018).

#### 5.2.2. Rast i transfekcija HEK293T stanične linije u hranjivim medijima s dodatkom proteinskih hidrolizata uljane pogače lana i konoplje

HEK293T stanična linija pokazuje visoku učinkovitost transfekcije, vjernu translaciju i zadovoljavajuće post-translacijske modifikacije. Ove karakteristike, zajedno s veličinom stanica, morfologijom, brzinom rasta, jednostavnošću održavanja kulture, kao i odličnom sposobnošću transgene ekspresije proteina, potvrdile su HEK293T stanice kao izvrsnog domaćina za proučavanje i provedbu prolazne transfekcije u znanstvenim i pretkliničkim istraživanjima (Ooi i sur., 2016). Budući da su HEK293T stanice jedne od najpogodnijih staničnih linija za ispitivanje transfekcije, pristupilo se ispitivanju sposobnosti transfekcije HEK293T stanične linije plazmidom pEGFP-C1 i ekspresije transgena u hranjivom mediju DMEM s dodatkom proteinskih hidrolizata lana i konoplje. No, prije ispitivanja učinka proteinskih hidrolizata na transfekciju HEK293T stanica, bilo je nužno utvrditi učinak navedenih hidrolizata na stanični rast (Poglavlja 4.3.2. i 4.4.2.)

Izuzev medijima u ALN2 i AKN2, niti u jednom ispitanom mediju stanice nisu rasle kao u kontrolnom mediju s 5 g L<sup>-1</sup> seruma. Dapače, uočeno je da dodatak proteinskih hidrolizata lana i konoplje u hranjivi medij, pripremljenih enzimima alkalaza i protameks, u koncentraciji 2,5 g L<sup>-1</sup>, negativno utječu na stanični rast. Shodno tome, odlučeno je da se u tim medijima (ALA1, ALP1, AKA1 i AKP1) neće ispitivati učinkovitost transfekcije. Više o učinku proteinskih hidrolizata na stanični rast opisano je u poglavlju 5.2.3.1..

Utvrđeno je da je za uspješnu transfekciju HEK293T stanica, tj. proizvodnju molekula GFP, u kontrolnim medijima i u medijima s dodatkom hidrolizata lana minimalan omjer DNA i transfekcijskog sredstva *FuGene6* 1:6, dok je u medijima s dodatkom hidrolizata konoplje taj omjer iznosio 1:8. Prisutnost seruma ne utječe

negativno na transfekciju stanica (Anonymus 1, 2022). Međutim, uspoređujući kontrolne uvjete, u ovom slučaju ostvarena je veća učinkovitost transfekcije u mediju DMEM s manjom koncentracijom seruma ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ). Iako su pojedina istraživanja pokazala da dodatak proteinskih hidrolizata iz sirovina biljnog i životinjskog podrijetla u hranjivi medij može pospješiti učinkovitost transfekcije stanica (Pham i sur., 2003; Davami i sur., 2014), u ovom istraživanju to se nije potvrdilo. Naprotiv, dodatak testiranih proteinskih hidrolizata lana i konoplje pokazao je negativno djelovanje na učinkovitost transfekcije HEK293T stanične linije ( $>40\%$  manja učinkovitost transfekcije u odnosu na kontrolu s  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  seruma). Jedina iznimka među testiranim hidrolizatima bio je HLN u koncentraciji  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ , čiji dodatak u hranjivi medij DMEM nije pokazao učinak na učinkovitost transfekcije u usporedbi s kontrolama, ali je zanimljivo da su stanice u tom hranjivom mediju (ALN2) dosegule broj stanica kao u kontrolnom mediju s  $5 \text{ g L}^{-1}$  seruma. Slične rezultate tijekom svojih istraživanja objavili su Alfonso i sur. (2010) te Jäger i sur. (2015) dokazavši da dodatak biljnih proteinskih hidrolizata u hranjivi medij negativno utječe na učinkovitost transfekcije. Zbog toga se primjerice kod proizvodnje rekombinantnih proteina prolaznom transfekcijom preporučuje hidrolizate dodati u medij tek u kasnijoj fazi postupaka, nakon obavljene transfekcije, čime se poboljšava stanična produktivnost (Pham i sur., 2005; Jäger i sur., 2015). Jedan od razloga općenito slabe učinkovitosti transfekcije tijekom ovog istraživanja ( $<35\%$ ) mogao bi biti i odabir transfekcijskog sredstva. Ooi i sur. (2016) proveli su istraživanje s tri različita transfekcijska sredstva: *FuGene*<sup>®</sup>, *Lipofectamine 2000* i *Lipofectamine 3000*. Transfekcija je provedena na HEK293 stanicama u mediju DMEM te se transfekcijsko sredstvo *Lipofectamine 3000* pokazalo najučinkovitijim, dok je *FuGene*<sup>®</sup> s  $50\%$  učinkovitosti transfekcije dao najlošije rezultate. Sličan rezultat objavili su i Rosser i sur. (2015) koji su ispitivali učinak četiri različita transfekcijska sredstva: *DMRIE*, *FuGene*<sup>®</sup>, *Genepoporter* i *Lipofectamine 2000* među kojima se *FuGene*<sup>®</sup> pokazao kao najlošije sredstvo za provođenje transfekcije CHO stanica u mediju bez seruma. Odabir medija, kao i njegov sastav, također mogu imati ulogu u provedbi transfekcije. Tako su Young i sur. (2004) u svome istraživanju pokazali da provedba transfekcije humanih endotelnih stanica u mediju DMEM s manjom koncentracijom glukoze dovodi do poboljšane učinkovitosti transfekcije u usporedbi s transfekcijom u mediju DMEM s većom koncentracijom glukoze. Osim navedenog, na učinkovitost transfekcije utječe i kvaliteta same plazmidne DNA, a plazmid mora biti pročišćen od proteina, RNA i endotoksina što je dio postupka njegove pripreme za transfekciju.

### 5.2.3. Učinak proteinskih hidrolizata lana i konoplje na rast i produktivnost CHO stanične linije

Biljni proteinski hidrolizati imaju primjenu u tehnologiji životinjskih stanica već više od 30 godina kao jedan od najznačajnijih nadomjestaka komponentama životinjskog podrijetla u hranjivim medijima za uzgoj stanica. Hidrolizati osiguravaju važne hranjive tvari za stanicu poput peptida, slobodnih aminokiselina, vitamina, minerala, lipida i mnogih drugih nedefiniranih komponenti. Daleko najvažniji spojevi s gledišta uravnoteženja mase koje hidrolizati opskrbljuju su peptidi i aminokiseline. Međutim, proteinski hidrolizati biljnog podrijetla, osim kao izvor nutrijenata u hranjivim medijima, mogu poslužiti i kao potencijalna zamjena za serum te aktivatori staničnog rasta i produktivnost u medijima bez seruma (Ho i sur., 2021). Stoga su u ovom radu ispitane mogućnosti korištenja:

- (i) proteinskih hidrolizata sjemenki lana i konoplje kao djelomične zamjene za fetalni goveđi serum tijekom uzgoja adherentne CHO DP-12 stanične linije
- (ii) proteinskih hidrolizata sjemenki lana i konoplje i njihovih frakcija kao dodatka mediju bez seruma (*serum-free*) u cilju poticanja rasta i produktivnosti suspenzijske CHO DP-12-S stanične linije.

Prema našim saznanjima ovo je prvo istraživanje u kojem se kao izvor hidrolizata kojim se suplementira hranjivi medij koriste proteini iz uljanih pogača lana i konoplje. Dobiveni rezultati ovog istraživanja dat će uvid u primjenjivost ispitanih sirovina (hidrolizata i njihovih frakcija) u svrhu povećanja prinosa, uglavnom vrlo skupih, biološki aktivnih proizvoda dobivenih tehnologijom životinjskih stanica, a kroz oblikovanje sastava medija za uzgoj.

#### 5.2.3.1. Primjena proteinskih hidrolizata lana i konoplje kao djelomična zamjena za fetalni goveđi serum

Uzgoj CHO staničnih kultura u bazalnom mediju s dodatkom seruma još je uvijek uobičajena praksa u istraživanjima u laboratorijskom mjerilu, posebice u ranim stadijima razvoja biofarmaceutika (van der Valk i sur., 2018). Iako serum sadrži važne proteinske i peptidne komponente poput citokina, hormona, faktora adhezije stanica i sl. njegov sastav je složen te kvalitativno, a još više kvantitativno promjenjiv što može dovesti do razlika između šarži u proizvodnom procesu kao i otežanog proizvodnog (engl. *downstream*) procesa. Nadalje, mogućnost kontaminacije uzročnicima kao što su virusi,

prioni i bakterije, predstavlja ozbiljan rizik za biosigurnost proizvodnog procesa. Kako bi se prevladali navedeni nedostaci, već se dulji niz godina koriste hidrolizati biljnog podrijetla za smanjenje udjela ili potpuno uklanjanje seruma prilikom izrade složenih formulacija medija novije generacije poput: medija bez životinjskih komponenti (*animal component-free media*), medija bez seruma (*serum-free media*), kemijski definiranih medija (*chemically defined media*) te medija bez proteina (*protein-free media*) (Babcock i sur., 2010). Budući da dosad nisu provedena istraživanja s hidrolizatima proteina sjemenki lana i konoplje, u ovom radu je ispitana mogućnost njihove primjene kao zamjene za serum. Uobičajena koncentracija proteina dodanih serumom u hranjivi medij iznosi  $5 \text{ g L}^{-1}$ . Kako se ne bi prekoračila standardna količina proteina te time dovelo do zasićenja stanične kulture određenim komponentama, u medij koji je sadržavao samo  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  seruma dodani su ispitani hidrolizati u koncentracijama  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  i  $2,5 \text{ g L}^{-1}$ . Najmanja koncentracija seruma potrebna za uzgoj ove stanične linije bila je  $2,5 \text{ g L}^{-1}$ , budući da stanice pri nižim koncentracijama seruma nisu rasle čak ni uz dodatak hidrolizata (rezultati nisu prikazani) što ukazuje da dodani hidrolizati lana i konoplje ne mogu u potpunosti zamijeniti serum.

Rezultati dobiveni tijekom istraživanja pokazali su da dodatak pripremljenih hidrolizata lana, pri obje testirane koncentracije, omogućuje rast stanica do broja koji je usporediv s brojem stanica u kontrolnom mediju s  $5 \text{ g L}^{-1}$  seruma (Slika 25.-27.). Među ispitanim hidrolizatima, posebno se ističu HLA, u koncentraciji  $2,5 \text{ g L}^{-1}$ , te HLN i HLP, u koncentraciji  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ , čiji dodatak u hranjivi medij sa smanjenim udjelom seruma dovodi do povećanja broja stanica za 35-45% u odnosu na kontrolu ALC1. Istovremeno, u medijima kod kojih je utvrđen najbolji rast stanica došlo je do značajnog povećanja koncentracije IgG za 10-20%. Povećanje broja stanica i titra IgG nisu proporcionalni, no uzimajući u obzir metabolizam staničnih kultura, pretpostavka je da povećanje broja stanica ne prati i porast specifične stanične produktivnosti (Hamdi i sur., 2020), a što je prikazano i u prilogu 2. S druge pak strane, kod dodatka proteinskog hidrolizata konoplje, jedino stanice koje su bile uzgajane u hranjivom mediju s dodatkom HKP, u koncentraciji  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ , dosegle su broj stanica i koncentraciju IgG kao u kontroli AKC1 (Slika 40). Zanimljivo je da dodatak HKA i HKP u medij pri višoj koncentraciji, dovodi do izrazito slabog staničnog rasta, ali uz povećanje specifične stanične produktivnosti za više od 45% (Prilog 2). Pojava da CHO stanice tijekom slabog rasta imaju izrazito visoku produktivnost u skladu je s navodima iz rada Donaldson i sur. (2021). Na temelju

dobivenih rezultata, može se zaključiti da se samo HLA, u koncentraciji  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  te HLN, HLP i HKP u koncentraciji  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  mogu koristiti kao djelomična zamjena za serum budući da postižu iste ili bolje vrijednosti broja stanica i titra IgG u odnosu na kontrolu uzgajanu u mediju s  $5 \text{ g L}^{-1}$  seruma. Također, HKA i HKP, u koncentraciji  $2,5 \text{ g L}^{-1}$ , bi mogli imati svoju primjenu u tehnologiji životinjskih stanica; npr. tijekom šaržnog uzgoja s prihranjivanjem gdje bi se njihovim dodatkom, nakon što se postigne željena koncentracija stanica, potaknula stanična produktivnost, a usporio stanični rast (Donaldson i sur., 2021). Učinak proteinskih hidrolizata na ukupnu izvedbu stanične linije ovisi o nizu čimbenika poput odabira korištene stanične linije, sirovine i procesa za pripremu hidrolizata, koncentracije hidrolizata te sastav bazalnog medija (Babcock, Wilcox i Huttinga, 2010).

Da isti hidrolizat može imati različite učinke u različitim staničnim kulturama pokazano je i u našem istraživanju gdje je dodatak proteinskog hidrolizata lana različito djelovao na rast stanica HEK293T i stanica CHO DP-12, što opet nije bio slučaj s hidrolizatom konoplje (Poglavlje 5.2.2.). Sličan rezultat objavili su Girón-Calle i sur. (2008) gdje je utvrđeno kako proteinski hidrolizat slanutka može poslužiti kao zamjena za serum tijekom uzgoja stanica monocitne leukemije THP-1, ali ne i tijekom uzgoja stanica humanog karcinoma debelog crijeva, CaCo-2. Različiti učinci istih hidrolizata na različite stanične linije, ali i činjenica da različiti hidrolizati iste sirovine (biljke), vrlo sličnih aminokiselinskih sastava, imaju različite učinke, sugeriraju da hidrolizati nemaju samo anaboličku ulogu, već da pozitivni učinci mogu biti povezani s prisutnošću peptida koji djeluju kao signalne molekule (Chabanon i sur., 2008; Davami i sur., 2015). Kada se uspoređi metabolizam stanica, može se uočiti da nije došlo do odstupanja u krivuljama potrošnje glukoze i nastanka laktata. Stanice koje su imale najslabiji rast (stanice u mediju s dodatkom  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  HKA i HKP) su tijekom uzgoja utrošile istu količinu glukoze kao i kontrolne stanice, što sugerira da se glukoza manjim dijelom trošila na rast i održavanje stanica, a većim dijelom na sintezu prekursora potrebnih za staničnu proizvodnju (Vergara i sur., 2018). Također, primjetno je da u kontrolnom mediju, kao i u medijima s dodatkom većine testiranih hidrolizata dolazi do promjene unutar metabolizma tijekom faze odumiranja u kojoj stanice počinju konzumirati nastali laktat. Babcock i sur. (2010) ovu su pojavu povezali s padom koncentracije glukoze ispod kritičnih razina ili njezinim potpunim iscrpljivanjem iz medija, a što se u našem slučaju nije dogodilo. Pravi razlog



ovoj pojavi ostaje nepoznat budući da se mehanizmi modulacije proizvodnje/potrošnje laktata u staničnoj kulturi još istražuju (Zagari i sur., 2013; Brunner i sur., 2018).

#### *5.2.3.2. Primjena proteinskih hidrolizata lana i njihovih frakcija kao dodatka kemijski definiranom mediju*

Najvažnije područje primjene kultura životinjskih stanica je proizvodnja velikog broja visokovrijednih proizvoda koji se koriste se u dijagnostičke, terapijske i preparativne svrhe, a glavninu tih proizvoda čine rekombinantni proteini i cjepiva. Komercijalna proizvodnja terapijskih proteina sada se uglavnom provodi u medijima bez seruma zbog jednostavnijeg postupka pročišćavanja proteina, izbjegavanja kontaminacije (virusi, prioni, mikoplazme), visoke cijene seruma te iz etičkih i regulatornih razloga (Davami i sur., 2015). Međutim, još uvijek nije dostupan, niti je vjerojatno da će uskoro biti, univerzalni medij bez seruma, koji bi bio primjenjiv za sve stanične linije. Stoga se kod razvoja medija bez seruma potrebno voditi specifičnim potrebama vrste stanica za koju se medij priprema. Zbog svog sastava, takvi mediji često spadaju u kategoriju kemijski definiranih medija. Međutim, dosadašnja praksa je pokazala da primjena takvih „po mjeri“ izrađenih medija još uvijek daje slabiji rast i produktivnost u usporedbi s medijima koji sadrže serum (Kim i Lee, 2009, Ho i sur., 2021). Posljednih godina razvijena su dva pristupa po kojima se stanice uzgajaju ili u mediju s kemijski definiranim dodacima ili u kemijski definiranom mediju s naknadno dodanim biljnim proteinskim hidrolizatima proizvedenim iz soje, riže, pšenice, uljane repice, pamuka, graška (Gupta i sur., 2014). Budući da je dokazano kako dodatak različitih proteinskih hidrolizata biljnog podrijetla može poboljšati stanični rast i/ili produktivnost, pristupilo se istraživanju učinka, po našim saznanjima, dosad neispitanih proteinskih hidrolizata lana i konoplje tijekom uzgoja CHO DP-12-S stanica u kemijski definiranom mediju. U ovoj raspravi naglasak je stavljen na one hidrolizate čiji je dodatak kemijski definiranom mediju doveo do poboljšanja staničnog rasta i/ili produktivnosti za više od 5%, budući da niži porast ne bi bio isplativ, u smislu usporedbe troškova proizvodnje hidrolizata i cijene staničnog proizvoda. Testiranja su provedena s dvije koncentracije ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$  i  $2 \text{ g L}^{-1}$ ) odabrane na temelju podataka iz literature (Christians i sur., 2010; Michiels i sur., 2011; Davami i sur., 2015).

Dodatak proteinskih hidrolizata lana u kemijski definirani medij nije pokazao učinak na stanični rast (Slike 26., 28., 30.), no uočljivo je da je došlo do povećanja

specifične stanične produktivnosti za 17-25% (Prilog 3.a) te u konačnici i povećanja koncentracije IgG od 5 do 11,5% u SLA1, SLA2, SLN1 i SLP1 medijima. Za razliku od dodatka hidrolizata lana, dodatak proteinskog hidrolizata konoplje ne ubrzava stanični rast niti povećava produktivnost (Slike 41., 43., 45.). Razlike u vrsti i sastavu peptida hidrolizata lana i konoplje mogu biti uzrok različitog učinka na rast i produktivnost stanica. Zanimljiva je (ponavljajuća) pojava u kojoj unutar 24 h od dodatka  $2 \text{ g L}^{-1}$  HKA stanice umiru, dok pri nižoj koncentraciji HKA ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) to nije slučaj, dapače te stanice rastu poput kontrolnih. Budući da frakcija HKA  $<10 \text{ kDa}$  (objašnjene dalje u tekstu) u koncentraciji od  $2 \text{ g L}^{-1}$  nije pokazala toksičan učinak na CHO DP-12-S stanice, možemo zaključiti da je u SKA1 mediju došlo do toksičnog učinka na stanicama kao posljedica visoke koncentracije peptida molekulskih masa  $>10 \text{ kDa}$ . Za vrijeme uzgoja stanica nije uočeno odstupanje od uobičajene krivulje potrošnje glukoze te proizvodnje laktata i amonijaka (Slike 26., 28., 30., 41., 43., 45.). Tijekom uzgoja glukoza se niti u jednom testiranom mediju nije u potpunosti potrošila, glutamin je tek zadnjeg dana pao ispod koncentracije od  $0,5 \text{ mM}$ , dok je koncentracija laktata i amonijaka bila ispod inhibitornih koncentracija tj. ispod  $18$  i  $8 \text{ mM}$  (Davami i sur., 2015). To nam sugerira da negativni učinci na stanični rast nisu uzrokovani niti nedostatkom glukoze i glutamina, niti nakupljanjem toksičnih nusproizvoda metabolizma već vjerojatno prisustvom peptida i drugih komponenti prisutnih u hidrolizatu. Kao i kod adherentnih CHO DP-12 stanica, tijekom završne faze uzgoja uočena je promjena u metabolizmu laktata gdje su ga stanice počele trošiti. Ta pojava je u tehnološkim proizvodnim postupcima čak i poželjna jer nakupljeni laktat može ograničiti rast stanica snižavanjem pH vrijednosti i povećanjem osmolalnosti medija (Obaidi i sur., 2021). Promatrajući sastav slobodnih aminokiselina u medijima s i bez dodatka hidrolizata lana i konoplje (Tablice 13-15, 17-19) može se uočiti da među njima općenito nema prevelikih razlika (do najviše 10%). Metabolizam aminokiselina ne odstupa od uobičajenog te je u skladu s literaturnim podacima (Coulet i sur., 2022). Da dodani hidrolizati nemaju samo hranjivu vrijednost potvrđuje nam i činjenica da iako ispitivani mediji imaju vrlo sličan sastav slobodnih aminokiselina, hidrolizati lana i konoplje pokazuju različit učinak na stanični rast i produktivnost kao što je opisano i za hidrolizat slanutka (Farges-Haddani i sur., 2006).

Budući da prisutnost peptida HKA većih molekulskih masa u kemijski definiranom mediju vrlo nepovoljno utječe na rast stanica, odlučeno je ispitati peptidne frakcije hidrolizata lana i konoplje molekulskih masa  $<10 \text{ kDa}$  i  $<1 \text{ kDa}$  u

koncentracijama  $2 \text{ g L}^{-1}$  i  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ . Poznato je da biljne peptidne frakcije nižih molekularnih masa potiču rast i produktivnost stanica, produljuju im trajanje u kulturi te olakšavaju nizvodnu izolaciju produkta (Davami i sur., 2014). Dodatak peptidnih frakcija hidrolizata lana  $<10 \text{ kDa}$  i  $<1 \text{ kDa}$  u obje koncentracije ne pokazuje pozitivan učinak na stanični rast (Slike 27., 29., 31.). Dapače, u većini slučajeva dodatkom peptidnih frakcija HLA i HLN u kemijski definirani medij dolazi do smanjenja koncentracije stanica u usporedbi s dodatkom ukupnih HLA i HLN. Međutim, dodatak peptidnih frakcija hidrolizata lana povećava specifičnu staničnu produktivnost za 9 do 35% što je vrlo slično učinku ukupnih hidrolizata. Stoga možemo pretpostaviti da je prisutnost peptida HLA i HLN  $>10 \text{ kDa}$  važna za stanični rast budući da peptidi većih molekularnih masa prisutni u hidrolizatima mogu oponašati djelovanje faktora rasta, faktora preživljavanja ili apoptotičkih faktora (Chabanon i sur., 2008). Iako su stanice u SKNF1 mediju imale slabiji rast, one su pak imale najveću specifičnu produktivnost (35% više u odnosu na kontrolu) kao i najveću koncentraciju proizvedenog IgG (10% više u odnosu na kontrolu). Za razliku od peptidnih frakcija HLA i HLN, fracioniranje hidrolizata HKA, odnosno uklanjanje peptida većih od  $10 \text{ kDa}$ , dovelo je do ujednačavanja rasta stanica u usporedbi s ukupnim HKA te sad ni koncentracija od  $2 \text{ g L}^{-1}$  ne djeluje toksično po stanice (Slika 42). Na temelju krivulje rasta može se uočiti da stanice u mediju SKNF1 rastu izrazito sporije te jedan dan duže od stanica u SKNF2 i kontrolnom mediju, ali i da postižu 30% veću specifičnu produktivnost u usporedbi s njima (Slika 44). Međutim ista pojava, samo sa izraženijim razlikama vidljiva je tijekom dodatka HKN peptidne frakcije  $<1 \text{ kDa}$ . Tako stanice u mediju SKNF4 dostižu najveću koncentraciju od svih testiranih medija s dodatkom lana i konoplje. S druge strane u mediju SKNF3 stanice rastu izrazito sporo i dostižu relativno najmanju koncentraciju te su pritom dosta niske, ali ustaljene vijabilnosti ( $\sim 78\%$ ). Čini se da sve to zajedno kulturi SKNF3 daje neku neuobičajenu trajnost, moguće i znatno dulju od perioda zadatog istraživanjem. Ona ne pokazuje standardnu krivulju s eksponencionalnim rastom i naglim odumiranjem stanica, već stanje nalik mitotičkom mirovanju zasad neodređenog trajanja. Zanimljivo je pritom da ima povećanu specifičnu staničnu produktivnost za 90% u odnosu na kontrolu te postižu najveću koncentraciju IgG u hranjivim medijima s hidrolizatima konoplje ( $129,4 \text{ mg L}^{-1}$ ). Moguće objašnjenje ovoj pojavi moglo bi biti da kombinacija peptida većih od  $1$  i  $10 \text{ kDa}$  u koncentraciji  $2 \text{ g L}^{-1}$  sprječava usporavanje staničnog rasta te preusmjeravanje metabolizma prema produktivnosti stanica potaknuto prisustvom veće koncentracije HKN peptida  $<1 \text{ kDa}$ . Da određeni uvjeti i spojevi dovode do preusmjeravanja

metabolizma stanica prema produktivnosti na račun proliferacije, i obrnuto poznata je pojava (Hamdi i sur., 2020). Farges-Haddani i sur. (2006) napominju da bi prevelika koncentracija malih peptida (<1 kDa) mogla dovesti čak do inhibicije staničnog rasta, dok bi frakcije s peptidima veće molekulske mase mogle djelovati poput faktora rasta ili preživljavanja. Ovakav učinak različitih koncentracija peptida po našim saznanjima dosad nije uočen te ostaje nejasno zašto do njega dolazi no svoju primjenu bi mogao naći u šaržnom uzgoju s prihranjivanjem. Stanice u mediju SKPF1 rastu slabije nego kontrola, no zato imaju 33% veću staničnu produktivnost i za 6,5 % veći titar IgG u mediju (Slika 46). Suprotno od toga, dodatak HKP peptidne frakcije <10 kDa u manjoj koncentraciji djeluje tako da potiče rast te stanice dostižu koncentraciju kao u SKNF4 mediju, ali bez učinka na specifičnu staničnu produktivnost i koncentraciju IgG. Tijekom uzgoja stanica nije bilo odstupanja od uobičajenih profila potrošnje glukoze te proizvodnje laktata i amonijaka (Slike 27., 29., 31., 42., 44., 46.). Glukoza niti u jednom mediju nije potpuno iskorištena, niti su laktat i amonijak dostigli inhibitorne koncentracije. Razlike u vrsti i koncentraciji peptida među hidrolizatima mogu biti razlog različitog učinka na rast stanica i proizvodnju protutijela (Farges-Haddani i sur., 2006; Kim i Lee, 2009). Ovi rezultati ukazali su na važnost specifičnosti korištenih enzima te posljedično sastava oslobođenih peptida tijekom primjene u tehnologiji životinjskih stanica kao dodatak kemijski definiranom mediju.

Primjena hidrolizata kao dodatak kemijski definiranom mediju može dovesti do poboljšanja rasta i/ili produktivnosti stanične kulture, no poželjno je da su u takvom mediju svi dodani sastojci poznati kako bi se uklonile varijacije među različitim šaržama uzgoja. Jedan od pokušaja smanjenja varijabilnost hidrolizata tijekom njihove pripreme bila je uporaba ultrafiltracije koja bi ograničila prisutnost komponenti različitih molekulskih masa u hidrolizatu. Međutim, tako pripravljene frakcije i dalje ostaju složene smjese peptida, aminokiselina, ugljikohidrata, vitamina i drugih biokemijskih komponenti, a koje sve potencijalno mogu utjecati na stanični rast i produktivnost (Spearman i sur., 2014). Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se bolje razumjelo djelovanje peptidnih frakcija na rast i produktivnost stanične kulture, ali i kvalitetu proizvoda. Stoga će se morati provesti identifikacija peptida u različitim frakcijama kako bi se utvrdili veličina i aminokiselinska sekvenca peptida (npr. analizom MALDI-TOF LC-MS/MS) uključenih u ove stimulatívne učinke (Li-Chan, 2015; Silva i sur., 2017). Štoviše, proučavanje unosa i metabolizma peptida u stanicama moglo bi pomoći boljem

razumijevanju njihovih mehanizama djelovanja (Farges-Haddani i sur., 2006). S tim saznanjima bili bismo korak bliže formulaciji kemijski definiranog medija s jednim ili više kemijski proizvedenih peptida, a čiji bi se aminokiselinski sastav temeljio na sastavu aktivnih peptida hidrolizata lana i konoplje.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Referentnim postupkom alkalne ekstrakcije i izoelektričnog taloženja, iz brašna uljanih pogača lana i konoplje može se izolirati do 75% proteina. Analiza izolata proteinskom elektroforezom pokazala je očekivani raspored proteinskih vrpcei.
2. Najpotpunija enzimaska digestija izoliranih proteina lana i konoplje dobivena je nakon 240 minuta hidrolize. Najjače proteolitičko djelovanje ima enzim alkalaza, a najslabije neutraza.
3. Proteinski hidrolizati lana pripravljeni enzimima alkalaza, neutraza i protameks imaju visoki antioksidacijski potencijal, a najveću vrijednost ORAC ima HLA. Isti hidrolizat je, pri višim koncentracijama (5 i 10 g L<sup>-1</sup>), pokazao antiproliferativan učinak na tumorsku staničnu liniju HeLa. Uz to, potvrđeno je da 2 g L<sup>-1</sup> HLA ima protektivan učinak budući da se smanjilo nastajanje ROS-ova u HaCaT stanicama tijekom induciranoeg oksidacijskog stresa. Svi proteinski hidrolizati lana pokazali su proliferativan učinak na staničnu liniju HaCaT, pogotovo pri koncentracijama između 5 i 10 g L<sup>-1</sup>.
4. Svi istraživani proteinski hidrolizati iz uljane pogače konoplje imaju antioksidacijski potencijal. Najveću vrijednost ORAC pokazao je HKN. Navedeni hidrolizat u koncentraciji 1 g L<sup>-1</sup> štiti stanice HaCaT od induciranoeg oksidacijskog stresa. Ovisno o testiranoj dozi, svi hidrolizati konoplje pokazuju proliferativan učinak na HaCaT staničnoj liniji te antiproliferativan učinak na tumorskim HeLa stanicama. HKA je pokazao antiproliferativan učinak na HeLa stanicama u svim testiranim koncentracijama (1-10 g L<sup>-1</sup>).
5. Hidrolizati dobiveni enzimom neutraza (HLN i HKN), pri koncentraciji 0,5 g L<sup>-1</sup>, dodani u bazalni mediji (DMEM) sa smanjenim udjelom seruma (2,5 g L<sup>-1</sup> FBS), pokazali su se kao učinkovita djelomična zamjena za FBS u kulturi HEK293T stanica. Navedne stanice u takvim medijima rastu jednako kao stanice u kulturi s 5 g L<sup>-1</sup> FBS.

6. Prisutnost hidrolizata lana i konoplje u kulturi HEK293T s bazalnim medijem i serumom (DMEM + FBS) negativno ili nikako ne utječe na staničnu transfekciju. Zato se ne preporuča provoditi transfekciju HEK293T stanica u bazalnom mediju u kojem je serum dijelom zamjenjen hidrolizatima.
7. Djelomična zamjena seruma s HLN i HLP ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) te HLA ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ) u bazalnom mediju za uzgoj CHO DP-12 stanica pozitivno djeluje na stanični rast te ukupnu koncentraciju proizvedenog rekombinantnog monoklonskog protutijela. U cilju povećanja broja stanica i titra protutijela, ovi hidrolizati, u definiranim koncentracijama, mogu se koristiti kao djelomična zamjena za serum.
8. Djelovanje hidrolizata i peptidnih frakcija proteina lana i konoplje na rast i/ili produktivnost CHO DP-12-S stanične linije tijekom uzgoja u kemijski definiranom mediju PowerCHO<sup>®</sup> je dvojako, tj. ovisi o vrsti enzima kojim su hidrolizati pripremljeni, veličini peptidne frakcije hidrolizata te koncentraciji hidrolizata u mediju. Tako prisutnost  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  peptidne frakcije hidrolizata konoplje  $<10 \text{ kDa}$  dobivene enzimom protameks i frakcije  $<1 \text{ kDa}$  dobivene enzimom neutraza dodani u medij pospješuje stanični rast. Dodatak  $2 \text{ g L}^{-1}$  peptidne frakcije hidrolizata konoplje  $<1 \text{ kDa}$  dobivene enzimom neutraza u hranjivi medij nepovoljno djeluje na rast i vijabilnost stanica, dok istovremeno daje najveću specifičnu produktivnost kao i najveći titar IgG. Dodatkom  $2 \text{ g L}^{-1}$  HLP ili peptidne frakcije hidrolizata lana  $<10 \text{ kDa}$  dobivenog enzimom neutraza postižu se najveće koncentracije protutijela u hranjivom mediju bez značajnog negativnog učinka na stanični rast.

## 7. LITERATURA

Alam, M. N., Bristi, N. J., Rafiquzzaman, M. (2013) Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm. J.* **21**, 143-152.

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

Anonymus 1 (2022) Factors Influencing Transfection Efficiency, <<https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/factors-influencing-transfection-efficiency.html>>.

Pristupljeno 6. prosinca 2022.

Anonymus 2 (2002) pEGFP-C1 Vector Information, <[https://media.addgene.org/data/plasmids/58/58468/58468-map\\_VNnWVJIIsiRZ.pdf](https://media.addgene.org/data/plasmids/58/58468/58468-map_VNnWVJIIsiRZ.pdf)>. Pristupljeno 11. studenog 2022.

Anonymus 3 (2022) PEGFP- C1 plasmid, <<https://www.lifescience-market.com/plasmid-c-94/pegfp-c1-plasmid-p-63562.html>>. Pristupljeno 11. studenog 2022.

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.

Ameri, A. (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol.* **58**, 315-348.

Arora M (2013) Cell culture media: A review. *Mater Methods.* **3**, 1-29.

Ayad, A.A. (2010) Characterization and properties of flaxseed protein fractions, doktorski rad, McGill University, Kanada

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



- Brunner, M., Doppler, P., Klein, T., Herwig, C., Fricke, J. (2018) Elevated pCO<sub>2</sub> affects the lactate metabolic shift in CHO cell culture processes. *Eng. Life Sci.*, **18**, 204-214.
- 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-gamma-producing CHO cell line. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **39**, 291-296.
- Butler M (2013) Serum-free media: standardizing cell culture system. *Pharm. Bioprocess.* **1**, 1-4.
- Callaway, J.C. (2004) Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* **140** (1–2), 65–72.
- Cecile Urbain Marie, G., Perreault, V., Henaux, L., Carnovale, V., Aluko, R., Marette, A., Doyen, A., Bazinet, L. (2019) Impact of a high hydrostatic pressure pretreatment on the separation of bioactive peptides from flaxseed protein hydrolysates by electro dialysis with ultrafiltration membranes. *Sep. Purif. Technol.* **211**, 242–251.
- Chabanon, G., Chevalot, I., framboisier, X., Chenu, S., Marc, I. (2007) Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochem.* **42** (10), 1419–1428.
- 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** (15), 7143–7151.
- Chen, Y., McConnell, B.O., Dhara, V.G., Naik, H.M., Li, C.T., Antoniewicz, M.R., Betenbaugh, M.J. (2019) An unconventional uptake rate objective function approach enhances applicability of genome-scale models for mammalian cells. *NPJ Syst.Biol. Appl.* **5** (1), 1-11.
- Christians, N., Liu, D. i Unruh, J.B. (2010) The use of protein hydrolysates for weed control, Protein Hydrolysates in Biotechnology. Dostupno na: [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6674-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6674-0_8).
- Chong Z.X., Yeap, S.K., Ho, W.Y. (2021) Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ.* **9**, 11165.

- Coulet, M., Kepp, O., Kroemer, G., Basmaciogullari, S. (2022) Metabolic Profiling of CHO Cells during the Production of Biotherapeutics. *Cells* **11** (12), 1–21.
- Davami, F., Baldi, L., Rajendra, Y., Wurm, F.M. (2014) Peptone Supplementation of Culture Medium Has Variable Effects on the Productivity of CHO Cells. *Int. J. Mol. Cell. Med.* **3** (3), 146–156.
- Davami, F., Eghbaltpour, F., Barkhordari, F., Mahboudi, F. (2014) Effect of peptone feeding on transient gene expression process in CHO DG44. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **6** (3), 147–155.
- Davami, F., Eghbaltpour, 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, *Iran. Biomed. J.* **19** (4), 194–205.
- Deparis, V., Durrieu, C., Schweizer, M., Marc, I., Goergen, J. L., Chevalot, I., Marc, A. (2003) Promoting effect of rapeseed proteins and peptides on Sf9 insect cell growth. *Cytotechnology*, **42**, 75-85.
- Donaldson, J.S., Dale, M.P., Rosser, S.J. (2021) Decoupling Growth and Protein Production in CHO Cells: A Targeted Approach. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **9**, 1–7.
- Elsorady, M.E. (2020) Characterization and functional properties of proteins isolated from flaxseed cake and sesame cake, *Croat. J. Food Sci. Technol.* **12** (1), 77–83.
- Fan Y., Jimenez Del Val, I., Müller, C., Wagtberg Sen, J., Rasmussen, S.,K., Kontoravdi, C., Weilguny, D., Andersen, M.R. (2015) Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation. *Biotechnol. Bioeng.* **112**, 521-35.
- Farges-Haddani, B., Tessier, B., Chenu, S., Chevalot, I., Harscoat, C., Marc, I., Goerge, J. L., Marc, A. (2006) Peptide fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal proteins in CHO cell culture media. *Proc. Biochem.* **41**, 2297-2304.

Farinon, B., Molinari, R., Costantini, L., Merendino, N. (2020) The Seed of Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional Quality and Potential Functionality for Human Health and Nutrition. *Nutrients* **12**, 1935.

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

Gaurina Srček, V., Ursić, T., Logarušić, M., Radošević, K., Slivac, I. (2022) Biljni proteinski hidrolizati kao dodatak medijima za uzgoj životinjskih stanica. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, **17**, 3-10.

Girgih, A.T., Udenigwe, C.C., Aluko, R.E. (2011) In vitro antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions. *JAOCs J. Am. Oil Chem. Soc.* **88** (3), 381–389.

Girgih, A.T., Udenigwe, C.C., Aluko, R.E. (2013) Reverse-phase HPLC Separation of Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Protein Hydrolysate Produced Peptide Fractions with Enhanced Antioxidant Capacity, *Plant Foods Hum. Nutr.* **68** (1), 39–46.

Girgih, A.T., Alashi, A., He, R., Malomo, S., Aluko, R.E. (2014) Preventive and treatment effects of a hemp seed (*Cannabis sativa* L.) meal protein hydrolysate against high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Nutr.* **53** (5), 1237–1246.

Girón-Calle, J., Vioque, J., Pedroche, J., Alaiz, M., Yust, M.M., Megías, C., Millán, F. (2008) Chickpea protein hydrolysate as a substitute for serum in cell culture. *Cytotechnology*, **57** (3), 263–272.

Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J. (2010) Effect of chickpea protein hydrolysates on cell proliferation and in vitro bioavailability. *Food Res. Int.* **43** (5), 1365–1370.

González-Montoya, M., Ramón-Gallegos, E., Robles-Ramírez, M.D.C., Mora-Escobedo, R. (2016) Evaluation of the Antioxidant and Antiproliferative Effects of Three Peptide Fractions of Germinated Soybeans on Breast and Cervical Cancer Cell Lines. *Plant Foods Hum. Nutr.* **71** (4), 368–374.

- Gupta, A.J., Hageman, J.A., Wierenga, P.A., Boots, J.W., Gruppen, H. (2014) Chemometric analysis of soy protein hydrolysates used in animal cell culture for IgG production - An untargeted metabolomics approach. *Process Biochem.* **49** (2), 309–317.
- Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., Tripathy, B.C. (2017) *Animal Cell Culture and Cryopreservation. U: Basic and Applied Aspects of Biotechnology* (Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., Tripathy, B.C., ured.), Springer, Singapore, str. 59-61.
- 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.
- Hadnadev, M., Dapčević-Hadnadev, T., Lazaridou, A., Thomas Moschakis, T., Michaelidou, A.M., Popović, S., Biliaderis, C.G. (2018) Hempseed meal protein isolates prepared by different isolation techniques. Part I. physicochemical properties. *Food Hydrocoll.* **79**, 526–533.
- Halliwell, B. (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. T.* **35**, 1147-1150.
- Hamdi, A., Szélio, D., Ruckerbauer, D.E., Rocha, I., Borth, N., Zanghellini, J. (2020) Key challenges in designing CHO chassis platforms. *Process.* **8** (6), 1–25.
- He, R., Alashi, A., Malomo, S.A., Girgih, A.T., Chao, D., Ju, X., Aluko, R.E. (2013) Antihypertensive and free radical scavenging properties of enzymatic rapeseed protein hydrolysates. *Food Chem.* **141** (1), 153–159.
- Heidemann, R., Zhang, C., Qi, H., Rule, J. L., Rozales, C., Park, S., Chuppa, S., Ray, M., Michaels, J., Konstantinov, K., Naveh, D. (2000) The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnology* **32**, 157-167.
- Ho, Y.Y., Lu, H.K., Sherman Lim, Z.F., Lim, H.W., Ho, Y.S., Ng, S.K. (2021) Applications and analysis of hydrolysates in animal cell culture. *Bioresour. Bioprocess.* **8** (1), 93.

- Jäger, V., Groenewold, J., Krüger, D., Schwarz, D., Vollmer, V. (2015) High-titer expression of recombinant antibodies by transiently transfected HEK 293-6E cell cultures. *BMC Proceedings*. **9**, 4–6.
- Jahanbani, R., Ghaffari, S.M., Salami, M., Vahdati, K., Sepehri, H., Sarvestani, N.N., Sheibani, N., Moosavi-Movahedi, A.A. (2016) Antioxidant and Anticancer Activities of Walnut (*Juglans regia L.*) Protein Hydrolysates Using Different Proteases. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **71** (4), 402–409.
- Fischer, S., Handrick, R., Otte, K. (2015) The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1878-1896.
- Jenkins, N., Castro, P., Menon, S., Ison, A., Bull, A. (1994) Effect of lipid supplements on the production and glycosylation of recombinant interferon-gamma expressed in CHO cells. *Cytotechnology*. **15**, 209-215.
- Judge, A., Dodd, M. S. (2020) Metabolism. *Essays Biochem.* **64**, 607-647.
- Karamać, M., Kosińska-Cagnazzo, A., Kulczyk, A. (2016) Use of different proteases to obtain flaxseed protein hydrolysates with antioxidant activity. *Int. J. Mol. Sci.* **17** (7), 1-13.
- Kaushik, P., Dowling, K., McKnight, S., Barrow, C.J., Wang, B., Adhikari, B. (2016) Preparation, characterization and functional properties of flax seed protein isolate. *Food Chem.* **197**, 212–220.
- 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.
- Kim, S.H., Lee, G.M. (2009) Development of serum-free medium supplemented with hydrolysates for the production of therapeutic antibodies in CHO cell cultures using design of experiments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **83** (4), 639–648.
- Kim, T.K., Eberwine, J.H. (2010) Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 3173–3178.
- Krause, J.P., Schultz, M., Dudek, S. (2002) Effect of extraction conditions on composition, surface activity and rheological properties of protein isolates from flaxseed (*Linum usitatissimum L.*). *J. Sci. Food Agric.* **82** (9), 970–976.

- Lai, T., Yang, Y., Ng, S.K. (2013) Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production. *Pharmaceuticals* **6**, 579-603.
- Lan, Y., Ohm, J.-B., Chen, B., Rao, J. (2020) Physicochemical properties and aroma profiles of flaxseed proteins extracted from whole flaxseed and flaxseed meal. *Food Hydrocoll.* **104**, 105731.
- Landete, J.M. (2011) Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Res. Int.* **46**, 410-424.
- Léo, 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.
- Li-Chan, E.C.Y. (2015) Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Curr. Opin. Food Sci.* **1**, 28-37.
- Logarušić, M., Slivac, I., Radošević, K., Srček, V. G. (2019) Učinak proteina iz uljane pogače lana na rast i produktivnost CHO-E i HEK-293T stanica. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **14**, 98-104.
- Logarušić, M., Srček, V.G., Berljavac, S., Leboš Pavunc, A., Radošević, K., Slivac, I. (2021) Protein Hydrolysates from Flaxseed Oil Cake as a Media Supplement in CHO Cell Culture. *Resources* **10**, 59.
- Lu. R.-R., Qian, P., Sun, Z., Zhou, X.-H., Chen, T.-P., He, J.-F., Zhang, H. (2010) Hempseed protein derived antioxidative peptides: Purification, identification and protection from hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Food Chem.* **123** (4), 1210–1218.
- Lu, S., Sun, X., Zhang, Y. (2005) Insight into metabolism of CHO cells at low glucose concentration on the basis of the determination of intracellular metabolites. *Process Biochem.* **40**, 1917-1921.
- Malomo, S.A., He, R., Aluko, R.E. (2014) Structural and functional properties of hemp seed protein products. *J. Food Sci.* **79** (8), 1512–1521.

- Malomo, S.A., Onuh, J.O., Girgih, A.T., Aluko, R.E. (2015) Structural and antihypertensive properties of enzymatic hemp seed protein hydrolysates. *Nutrients*, **7** (9), 7616–7632.
- Malomo, S.A., Aluko, R.E. (2016) In Vitro Acetylcholinesterase-Inhibitory Properties of Enzymatic Hemp Seed Protein Hydrolysates. *JAOCs J. Am. Oil Chem. Soc.* **93** (3), 411–420.
- Mamone, G., Picariello, G., Ramondo, A., Nicolaim N.A., Ferranti, P. (2019) Production, digestibility and allergenicity of hemp (*Cannabis sativa L.*) protein isolates. *Food Res. Int.* **115**, 562–571.
- Martínez-Flores, H.E., Barrera, E.S., Garnica-Romo, M.G., Penagos, C.J.C., Saavedra, J.P., Macazaga-Alvarez, R. (2006) Functional characteristics of protein flaxseed concentrate obtained applying a response surface methodology. *J. Food Sci.* **71** (8), 495-498.
- Michiels, J.F., Barbau, J., De Boel, S., Dessy, S., Agathos, S.N., Schneider, Y.-J. (2011) Characterisation of beneficial and detrimental effects of a soy peptone, as an additive for CHO cell cultivation. *Process Biochem.* **46** (3), 671–681.
- Mikolaj, E. (2017) Ekstrakcija lignana i fenolnih kiselina iz pogače lana (završni rad). Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Mols, J., Peeters-Joris, C., Wattiez, R., Agathos, S. N., Schneider, Y. J. (2005) Recombinant interferon-gamma secreted by Chinese hamster ovary-320 cells cultivated in suspension in protein-free media is protected against extracellular proteolysis by the expression of natural protease inhibitors and by the addition of plant protein hydrolysates to the culture medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **41**, 83-91.
- Nagy V., Watzele M. (2006) FuGENE® 6 Transfection Reagent: minimizing reagent-dependent side effects as analyzed by gene-expression profiling and cytotoxicity assays. *Nat. Methods*, **3**, 3-5.
- 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.

Nwachukwu, I.D., Girgih, A.T., Malomo, S.A., Onuh, J.O., Aluko, R.E. (2014) Thermoase-derived flaxseed protein hydrolysates and membrane ultrafiltration peptide fractions have systolic blood pressure-lowering effects in spontaneously hypertensive rats. *Int. J. Mol. Sci.* **15** (10), 18131–18147.

Obaidi, I., Martins Mota, L., Quigley, A., Butler, M. (2021) The role of protein hydrolysates in prolonging viability and enhancing antibody production of CHO cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **105** (8), 3115–3129.

Onuh, J.O., Girgih, A.T., Aluko, R.E., Aliani, M. (2014) In vitro antioxidant properties of chicken skin enzymatic protein hydrolysates and membrane fractions. *Food Chem.* **150**, 366–373.

Ooi, A., Wong, A., Esau, L., Lemtiri-Chlieh, F., Gehring, C. (2016) A guide to transient expression of membrane proteins in HEK-293 cells for functional characterization. *Frontiers in Physiology* **7**, 1–15.

Paecharoenchai, O., Niyomtham, N., Apirakaramwong, A., Ngawhirunpat, T., Rojanarata, T., Yingyongnarongkul, B., Opanasopitcorresponding, P. (2012) Structure Relationship of Cationic Lipids on Gene Transfection Mediated by Cationic Liposomes. *AAPS PharmSciTech*, **13** (4), 1302-1308.

Palmieri, B., Sblendorio, V., (2007) Oxidative stress tests: overview of reliability and use. *Eur.Rev. Med. Pharmacol.* **11**, 309-342.

Pereira, S., Kildegaard, H.F., Andersen, M.R. (2018) Impact of CHO Metabolism on Cell Growth and Protein Production: An Overview of Toxic and Inhibiting Metabolites and Nutrients. *Biotechnol. J.* **13**, 1700499.

Pham, P.L., Perret, S., Doan, H.C., Cass, B., St-Laurent, G., Kamen, A., Durocher, Y. (2003) Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: Peptone additives improve cell growth and transfection efficiency. *Biotechnol. Bioeng.* **84** (3), 332–342.

Pham, P.L., Perret, S., Cass, B., Carpentier, E., St-Laurent, G., Bisson, L., Kamen, A., Durocher, Y. (2005) Transient gene expression in HEK293 cells: Peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **90** (3), 332–344.



- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Alessandra Bitto, A. (2017) Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2017**, 1-13.
- Pojić, M., Mišan, A., Sakaš, M., Dapčević Hadnađev, T., Šarić, B., Milovanović, I., Hadnađev, M. (2014) Characterization of Byproducts Originating from Hemp Oil Processing. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 12436-12442.
- Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2012) *Narodne novine* **41**, Zagreb
- Radošević, K., Dukić, B., Andlar, M., Slivac, I., Gaurina Srček, V. (2016) Adaptation and cultivation of permanent fish cell line CCO in serum-free medium and influence of protein hydrolysates on growth performance. *Cytotechnology*, **68** (1), 115–121.
- Rinkenauer A. C., Schubert S., Traeger A., Schubert U.S. (2015) The influence of polymer architecture on in vitro pDNA transfection. *J. Mater. Chem. B.* **3**, 7477-7493.
- Ritacco, F. V., Yongqui, W., Khetan, A. (2018) Cell Culture Media for Recombinant Protein Expression in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells: History, Key Components, and Optimization Strategies. *Biotechnol. Prog.* **34**, 1407-1426.
- Rosser, M.P., Xia, W., Hartsell, S., McCaman, M., Zhu, Y., Wang, S., Harvey, S., Bringmann, P., Cobb, R.R. (2005) Transient transfection of CHO-K1-S using serum-free medium in suspension: A rapid mammalian protein expression system. *Protein Expr. Purif.* **40** (2), 237–243.
- Sánchez, A., Vázquez, A. (2011) Bioactive peptides: A review. *Food Qual. Saf.* **1**, 29-46.
- Silva, F.G.D., O’Callaghan, Y., O’Brien, N.M., Netto, F.M. (2013) Antioxidant Capacity of Flaxseed Products: The Effect of In vitro Digestion. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **68** (1), 24–30.
- Silva, F.G.D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Netto, F.M., Miralles, B. (2017) Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by Alcalase® hydrolysis: Antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* **76**, 140–146.
- Soni, R.P., katoch, M., Kumar, A., Verma, P. (2016) Flaxseed – composition and its health benefits. *Res. Environ. Life Sci.* **9** (3), 310–316.

- Spearman, M., Lodewyks, C., Richmond, M., Butler, M. (2014) The bioactivity and fractionation of peptide hydrolysates in cultures of CHO cells. *Biotechnol. Prog.* **30**(3), 584–593.
- Takagi, M., Hia, H. C., Jang, J. H., Yoshida, T. (2001) Effects of high concentrations of energy sources and metabolites on suspension culture of Chinese hamster ovary cells producing tissue plasminogen activator. *J. Biosci. Bioeng.* **91**, 515-521.
- Tang, C.H., Ten, Z., Wang, X.-S., Yang, X.-Q. (2006) Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa L.*) protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* **54** (23), 8945–8950.
- Tang, C., Wang, X., Yang, X. (2009) Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa L.*) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chem.* **114**, 1484-1490.
- 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.
- Teh, S.S., Birch., J. (2013) Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *J. Food Compos. Anal.* **30**, 26-31.
- Udenigwe, C.C., Lin, Y.-S., Hou, W.-C., Aluko, R.E. (2009) Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by flaxseed protein hydrolysate fractions. *J. Funct. Foods* **1** (2), 199–207.
- Udenigwe, C.C., Lu, Y.-L., Han, C.-H., Hou, W.-C., Aluko, R.E. (2009) Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages. *Food Chem.* **116** (1), 277–284.
- Udenigwe, C.C., Aluko, R.E. (2010) Antioxidant and angiotensin converting enzyme-inhibitory properties of a flaxseed protein-derived high fischer ratio peptide mixture. *J. Agric. Food Chem.* **58** (8), 4762–4768.
- Udenigwe, C.C., Aluko, R.E. (2012) Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *J. Food Sci.* **77** (1), 11-24.

- van der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W.G., Fu, J., Hickman, J.J., Hohensee, C., Kolar, R., Liebsch, M., Pistollato, F., Schulz, M., Thieme, D., Weber, T., Wiest, J., Winkler, S., Gstraunthaler, G. (2018) Fetal Bovine Serum (FBS): Past – Present – Future. *ALTEX*, **35**, 99-118.
- Vergara, M., Torres, M., Müller, A., Avello, V., Acevedo, C., Berrios, J., Reyes, J.G., Valdez-Cruz, N.A., Altamirano, C. (2018) High glucose and low specific cell growth but not mild hypothermia improve specific r-protein productivity in chemostat culture of CHO cells. *PLoS ONE*, **13** (8), e0202098.
- Verma, A., Verma, M., Singh, A. (2020) Animal tissue culture principles and applications. U: Animal Biotechnology (Verma, A.S. i Singh A., ured.), Elsevier, Amsterdam, 269-293.
- Wang, L., Zhang, J., Yuan, Q., Xie, H., Shi, J., Ju, X. (2016) Separation and purification of an anti-tumor peptide from rapeseed (*Brassica campestris* L.) and the effect on cell apoptosis. *Food Funct.*, **7**, 2239-2248.
- Wang, Q., Jin, Y., Xiong, Y.L. (2018) Heating-Aided pH Shifting Modifies Hemp Seed Protein Structure, Cross-Linking, and Emulsifying Properties. *J. Agric. Food Chem.* **66** (41), 10827–10834.
- Wang, Q., Xiong, Y.L. (2019) Processing, Nutrition, and Functionality of Hempseed Protein: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **18**, 936–952.
- Wang, X.-S., Tang, C.-H., Yang, X.-Q., Gao, W.-R. (2008) Characterization, amino acid composition and in vitro digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins. *Food Chem.* **107** (1), 11–18.
- Wang, X.-S., Tang, C.-H., Chen, L., Yang, X.-Q. (2009) Characterization and antioxidant properties of hemp protein hydrolysates obtained with neutrase®. *Food Technol. Biotechnol.* **47** (4), 428–434.
- Wu, S., Wang, X., Qi, W., Guo, Q. (2019) Bioactive protein/peptides of flaxseed: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **92**, 184–193.
- Wurm, F.M. (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **22** (11), 1393–1398.

- Wurm, F.M. i Wurm, M.J. (2017) Cloning of CHO Cells, Productivity and Genetic Stability—A Discussion. *Processes* **5**, 1-13.
- Xu, P., Dai, X.P., Graf, E., Martel, R., Russell, R. (2014) Effects of glutamine and asparagine on recombinant antibody production using CHO-GS cell lines. *Biotechnol. Prog.* **30**, 1457-68.
- Yao T, Asayama Y (2017) Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod. Medicine and Biology.* **16**, 99-117.
- Yin, S.W., Tang, C.-H., Cao, J.-S., Hu, E.-K., Wen, Q.-B., Yang, X.-Q. (2008) Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa L.*) protein isolate. *Food Chem.* **106** (3), 1004–1013.
- Young, A.T.L., Moore, R.B., Murray, A.G., Mullen, J.C., Lakey, J.R.T. (2004) Assessment of Different Transfection Parameters in Efficiency Optimization. *Cell Transplant.* **13** (2), 179–185.
- Zagari, F., Jordan, M., Stettler, M., Broly, H., Wurm, F.M. (2013) Lactate metabolism shift in CHO cell culture: The role of mitochondrial oxidative activity. *N. Biotechnol.* **30** (2), 238–245.
- Zhang, Q., Tong, X., Qi, B., Wang, Z., Li, Y., Sui, X., Jiang, L. (2018) Changes in antioxidant activity of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate under simulated gastrointestinal digestion and transepithelial transport. *J. Funct. Foods* **42**, 298–305.
- Zhang, Q.X., Ling, Y.F., Sun, Z., Zhang, L., Yu, H.X., Kamau, S.M., Lu, R.R. (2012) Protective effect of whey protein hydrolysates against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on PC12 cells. *Biotechnol. Lett.* **34** (11), 2001–2006.
- Zheng, L., Ren, J., Su, G., Yang, B., Zhao, M. (2013) Comparison of in vitro digestion characteristics and antioxidant activity of hot- and cold-pressed peanut meals. *Food Chem.* **141** (4), 4246–4252.
- Zhu J. (2012) Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol. Adv.*, **30**, 1158-1170.

## 8. PRILOZI

Prilog 1. Izlazni parametri uzgoja HEK293T stanica u hranjivim medijima s dodatkom proteinskih hidrolizata lana i konoplje

|          | Uvjet | NBVS<br>[ $\times 10^5$ st jažici $^{-1}$ ] | $\mu_{\max}$ [h $^{-1}$ ] | qGlc         | IVCD<br>[ $10^6 \times \text{st} \times \text{ml}^{-1}$<br>dan $^{-1}$ ] | Dan pika | Vrijeme<br>uzgoja |
|----------|-------|---------------------------------------------|---------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------|----------|-------------------|
| LAN      | ALA1  | 5,5 ± 0,1                                   | 0,0179 ± 0,0005           | 10,22 ± 0,52 | 2,12 ± 0,19                                                              | 10       | 11                |
|          | ALA2  | 7,6 ± 0,3                                   | 0,0190 ± 0,0003           | 9,07 ± 0,39  | 2,52 ± 0,21                                                              | 11       | 11                |
|          | ALN1  | 7,4 ± 0,2                                   | 0,0179 ± 0,0003           | 8,70 ± 0,68  | 2,68 ± 0,14                                                              | 10       | 11                |
|          | ALN2  | 8,0 ± 0,3                                   | 0,0182 ± 0,0005           | 7,89 ± 0,37  | 2,94 ± 0,08                                                              | 10       | 11                |
|          | ALP1  | 6,0 ± 0,1                                   | 0,0183 ± 0,0004           | 10,46 ± 0,35 | 2,11 ± 0,04                                                              | 10       | 11                |
|          | ALP2  | 7,1 ± 0,1                                   | 0,0204 ± 0,0003           | 8,23 ± 0,73  | 2,75 ± 0,12                                                              | 10       | 11                |
|          | ALC1  | 8,2 ± 0,3                                   | 0,0197 ± 0,0003           | 8,23 ± 0,42  | 2,80 ± 0,08                                                              | 10       | 11                |
|          | ALC2  | 6,9 ± 0,2                                   | 0,0200 ± 0,0002           | 7,68 ± 0,28  | 2,89 ± 0,10                                                              | 10       | 11                |
| KONOPLJA | AKA1  | 3,4 ± 0,2                                   | 0,0208 ± 0,0002           | 17,27 ± 1,89 | 1,01 ± 0,22                                                              | 10       | 11                |
|          | AKA2  | 6,6 ± 0,2                                   | 0,0202 ± 0,0005           | 11,53 ± 0,68 | 1,87 ± 0,10                                                              | 11       | 11                |
|          | AKN1  | 6,0 ± 0,4                                   | 0,0190 ± 0,0004           | 10,02 ± 0,32 | 2,20 ± 0,11                                                              | 11       | 11                |
|          | AKN2  | 7,4 ± 0,4                                   | 0,0208 ± 0,0005           | 9,2 ± 0,42   | 2,45 ± 0,03                                                              | 10       | 11                |
|          | AKP1  | 2,5 ± 0,3                                   | 0,0102 ± 0,0010           | 21,75 ± 0,76 | 0,82 ± 0,02                                                              | 11       | 11                |
|          | AKP2  | 5,0 ± 0,4                                   | 0,0200 ± 0,0004           | 11,07 ± 0,55 | 2,04 ± 0,07                                                              | 11       | 11                |
|          | AKC1  | 7,4 ± 0,4                                   | 0,0213 ± 0,0006           | 8,58 ± 0,95  | 2,64 ± 0,16                                                              | 10       | 11                |
|          | AKC2  | 5,7 ± 0,4                                   | 0,0201 ± 0,0007           | 11,67 ± 1,38 | 1,85 ± 0,13                                                              | 10       | 11                |

Prilog 2. Izlazni parametri uzgoja CHO DP-12 stanica u hranjivim medijima s dodatkom proteinskih hidrolizata lana i konoplje

|          | Uvjet | NBVS<br>[ $\times 10^5$ st<br>jažici $^{-1}$ ] | $\mu_{\max}$ [h $^{-1}$ ] | konc. IgG<br>[mg L $^{-1}$ ] | qP<br>[pg stanica $^{-1}$<br>dan $^{-1}$ ] | qGlc<br>[pmol stanica $^{-1}$<br>dan $^{-1}$ ] | IVCD<br>[ $10^6 \times$ st $\times$<br>ml $^{-1}$ dan $^{-1}$ ] | Dan<br>pika | Vrijeme<br>uzgoja |
|----------|-------|------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------|-------------------|
| LAN      | ALA1  | 5,6 $\pm$ 0,2                                  | 0,0199 $\pm$ 0,0005       | 54,2 $\pm$ 2,6               | 26,55 $\pm$ 1,26                           | 9,53 $\pm$ 1,07                                | 2,04 $\pm$ 0,08                                                 | 9           | 10                |
|          | ALA2  | 3,9 $\pm$ 0,2                                  | 0,0247 $\pm$ 0,0007       | 37,8 $\pm$ 2,6               | 20,34 $\pm$ 1,39                           | 11,03 $\pm$ 0,68                               | 1,86 $\pm$ 0,04                                                 | 9           | 10                |
|          | ALN1  | 4,1 $\pm$ 0,2                                  | 0,0232 $\pm$ 0,0006       | 33,3 $\pm$ 3,6               | 17,45 $\pm$ 1,91                           | 11,39 $\pm$ 1,55                               | 1,91 $\pm$ 0,03                                                 | 8           | 10                |
|          | ALN2  | 6,3 $\pm$ 0,2                                  | 0,0212 $\pm$ 0,0005       | 53,7 $\pm$ 3,0               | 22,08 $\pm$ 1,24                           | 8,72 $\pm$ 2,03                                | 2,43 $\pm$ 0,15                                                 | 8           | 10                |
|          | ALP1  | 3,9 $\pm$ 0,2                                  | 0,0228 $\pm$ 0,0002       | 39,5 $\pm$ 1,2               | 23,00 $\pm$ 0,72                           | 12,47 $\pm$ 1,67                               | 1,72 $\pm$ 0,06                                                 | 8           | 10                |
|          | ALP2  | 5,5 $\pm$ 0,2                                  | 0,0213 $\pm$ 0,0003       | 47,3 $\pm$ 3,4               | 21,94 $\pm$ 1,56                           | 10,12 $\pm$ 0,89                               | 2,16 $\pm$ 0,08                                                 | 8           | 10                |
|          | ALC1  | 3,6 $\pm$ 0,2                                  | 0,0228 $\pm$ 0,0005       | 42,7 $\pm$ 1,2               | 26,91 $\pm$ 0,75                           | 11,24 $\pm$ 1,01                               | 1,56 $\pm$ 0,14                                                 | 8           | 10                |
|          | ALC2  | 2,9 $\pm$ 0,2                                  | 0,0217 $\pm$ 0,0003       | 39,5 $\pm$ 1,8               | 33,36 $\pm$ 1,48                           | 13,24 $\pm$ 1,82                               | 1,18 $\pm$ 0,20                                                 | 8           | 10                |
| KONOPLJA | AKA1  | 1,3 $\pm$ 0,1                                  | 0,0339 $\pm$ 0,0009       | 45,2 $\pm$ 2,0               | 66,22 $\pm$ 2,90                           | 29,83 $\pm$ 3,24                               | 0,68 $\pm$ 0,18                                                 | 6           | 10                |
|          | AKA2  | 3,4 $\pm$ 0,2                                  | 0,0188 $\pm$ 0,0006       | 42,8 $\pm$ 0,8               | 41,33 $\pm$ 0,80                           | 17,40 $\pm$ 3,64                               | 1,03 $\pm$ 0,04                                                 | 9           | 10                |
|          | AKN1  | 3,4 $\pm$ 0,2                                  | 0,0187 $\pm$ 0,0005       | 50,5 $\pm$ 2,1               | 44,31 $\pm$ 1,81                           | 18,83 $\pm$ 2,42                               | 1,14 $\pm$ 0,10                                                 | 9           | 10                |
|          | AKN2  | 4,5 $\pm$ 0,1                                  | 0,0242 $\pm$ 0,0007       | 46,3 $\pm$ 1,7               | 27,93 $\pm$ 1,04                           | 12,80 $\pm$ 1,70                               | 1,66 $\pm$ 0,09                                                 | 9           | 10                |
|          | AKP1  | 1,6 $\pm$ 0,3                                  | 0,0102 $\pm$ 0,0013       | 46,8 $\pm$ 1,0               | 83,27 $\pm$ 1,69                           | 34,8 $\pm$ 3,08                                | 0,56 $\pm$ 0,21                                                 | 9           | 10                |
|          | AKP2  | 4,1 $\pm$ 0,1                                  | 0,0211 $\pm$ 0,0005       | 49,6 $\pm$ 2,6               | 35,60 $\pm$ 1,85                           | 15,1 $\pm$ 1,47                                | 1,39 $\pm$ 0,13                                                 | 8           | 10                |
|          | AKC1  | 4,3 $\pm$ 0,2                                  | 0,0219 $\pm$ 0,0006       | 44,1 $\pm$ 1,0               | 28,43 $\pm$ 1,49                           | 13,8 $\pm$ 2,28                                | 1,55 $\pm$ 0,10                                                 | 8           | 10                |
|          | AKC2  | 3,2 $\pm$ 0,3                                  | 0,0203 $\pm$ 0,0005       | 41,2 $\pm$ 1,4               | 36,79 $\pm$ 1,40                           | 16,4 $\pm$ 2,45                                | 1,12 $\pm$ 0,18                                                 | 8           | 10                |

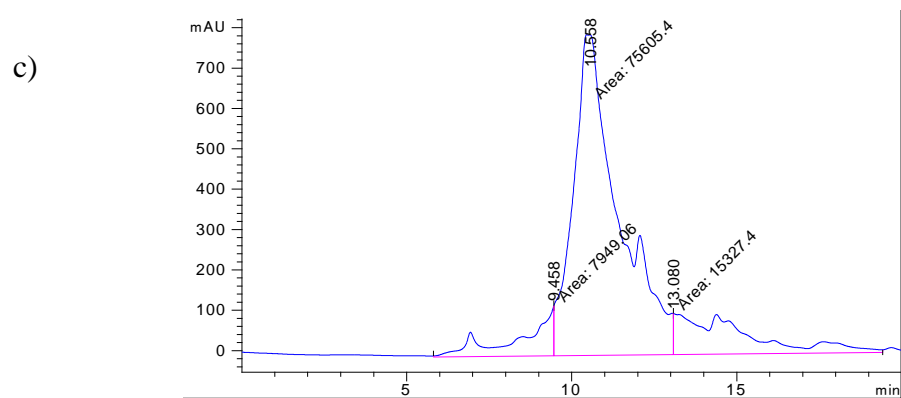
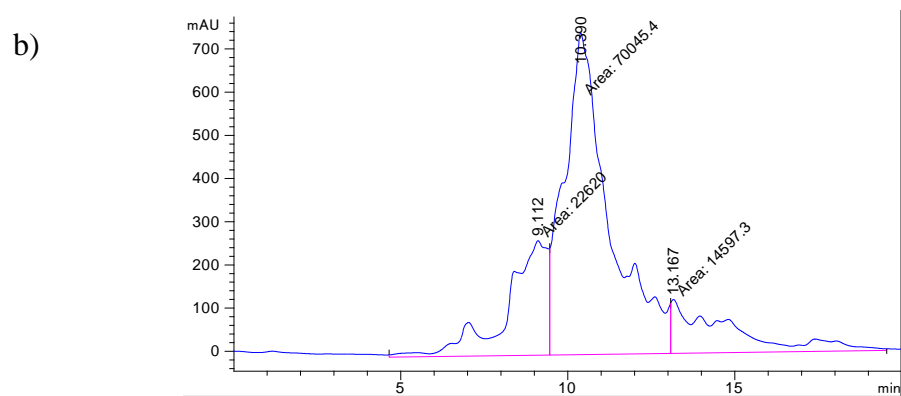
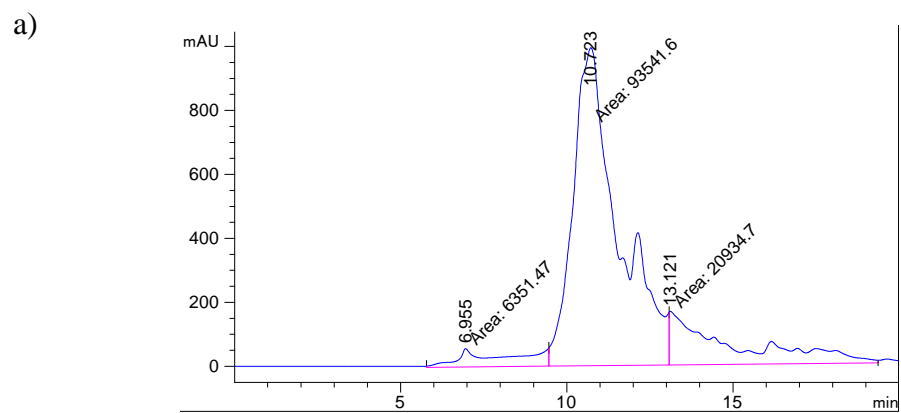
Prilog 3. Izlazni parametri uzgoja CHO DP-12-S stanica u hranjivim medijima s dodatkom proteinskih hidrolizata a) lana i b) konoplje

| a)        | Uvjet | NKVS<br>[ $\times 10^6$ st<br>mL <sup>-1</sup> ] | $\mu_{\max}$ [h <sup>-1</sup> ] | konc. IgG<br>[mg L <sup>-1</sup> ] | qP<br>[pg stanica <sup>-1</sup><br>dan <sup>-1</sup> ] | qGlc<br>[pmol<br>stanica <sup>-1</sup><br>dan <sup>-1</sup> ] | IVCD<br>[10 <sup>6</sup> ×st × ml <sup>-1</sup><br>dan <sup>-1</sup> ] | Dan<br>pika | Vrijeme<br>uzgoja |
|-----------|-------|--------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------------|
| ALKALAZA  | SLA1  | 5,4 ± 0,1                                        | 0,0203 ± 0,0003                 | 127,1 ± 2,7                        | 5,59 ± 0,16                                            | 1,21 ± 0,06                                                   | 2,27 ± 0,04                                                            | 7           | 9                 |
|           | SLA2  | 5,8 ± 0,3                                        | 0,0204 ± 0,0005                 | 127,3 ± 2,1                        | 5,53 ± 0,13                                            | 1,17 ± 0,08                                                   | 2,30 ± 0,08                                                            | 7           | 9                 |
|           | SLAF1 | 4,8 ± 0,4                                        | 0,0172 ± 0,0007                 | 109,8 ± 4,2                        | 5,45 ± 0,21                                            | 1,32 ± 0,12                                                   | 2,02 ± 0,12                                                            | 7           | 9                 |
|           | SLAF2 | 4,7 ± 0,1                                        | 0,0216 ± 0,0002                 | 126,4 ± 2,5                        | 5,61 ± 0,11                                            | 1,17 ± 0,15                                                   | 2,25 ± 0,03                                                            | 7           | 9                 |
|           | SLAF3 | 5,6 ± 0,3                                        | 0,0183 ± 0,0002                 | 112,4 ± 3,7                        | 5,41 ± 0,18                                            | 1,3 ± 0,11                                                    | 2,08 ± 0,09                                                            | 7           | 9                 |
|           | SLAF4 | 5,2 ± 0,1                                        | 0,0209 ± 0,0003                 | 120,0 ± 1,8                        | 5,79 ± 0,09                                            | 1,24 ± 0,06                                                   | 2,07 ± 0,05                                                            | 7           | 9                 |
| NEUTRAZA  | SLN1  | 5,5 ± 0,2                                        | 0,0215 ± 0,0006                 | 129,7 ± 3,2                        | 5,92 ± 0,15                                            | 1,28 ± 0,10                                                   | 2,19 ± 0,01                                                            | 7           | 9                 |
|           | SLN2  | 5,7 ± 0,2                                        | 0,0218 ± 0,0004                 | 125,5 ± 4,0                        | 5,72 ± 0,18                                            | 1,24 ± 0,02                                                   | 2,19 ± 0,05                                                            | 7           | 9                 |
|           | SLNF1 | 4,2 ± 0,2                                        | 0,0253 ± 0,0009                 | 134,1 ± 3,4                        | 6,42 ± 0,27                                            | 1,22 ± 0,07                                                   | 2,09 ± 0,02                                                            | 7           | 9                 |
|           | SLNF2 | 5,2 ± 0,3                                        | 0,0229 ± 0,0006                 | 121,9 ± 2,6                        | 5,25 ± 0,11                                            | 1,11 ± 0,11                                                   | 2,32 ± 0,04                                                            | 7           | 9                 |
|           | SLNF3 | 4,6 ± 0,3                                        | 0,0211 ± 0,0008                 | 102,5 ± 3,5                        | 5,14 ± 0,18                                            | 1,19 ± 0,04                                                   | 2,00 ± 0,10                                                            | 6           | 9                 |
|           | SLNF4 | 5,1 ± 0,2                                        | 0,0199 ± 0,0002                 | 124,0 ± 3,2                        | 5,88 ± 0,15                                            | 1,18 ± 0,05                                                   | 2,11 ± 0,08                                                            | 7           | 9                 |
| PROTAMEKS | SLP1  | 5,6 ± 0,2                                        | 0,0222 ± 0,0002                 | 133,9 ± 3,1                        | 5,91 ± 0,14                                            | 1,22 ± 0,06                                                   | 2,26 ± 0,02                                                            | 7           | 9                 |
|           | SLP2  | 5,4 ± 0,2                                        | 0,0221 ± 0,0006                 | 124,9 ± 4,1                        | 5,51 ± 0,18                                            | 1,2 ± 0,08                                                    | 2,27 ± 0,11                                                            | 7           | 9                 |
|           | SLPF1 | 6,3 ± 0,3                                        | 0,0249 ± 0,0003                 | 110,9 ± 2,9                        | 4,46 ± 0,12                                            | 1,12 ± 0,10                                                   | 2,49 ± 0,08                                                            | 7           | 9                 |
|           | SLPF2 | 5,6 ± 0,2                                        | 0,0187 ± 0,0010                 | 127,9 ± 4,9                        | 5,70 ± 0,22                                            | 1,19 ± 0,06                                                   | 2,25 ± 0,02                                                            | 7           | 9                 |
|           | SLPF3 | 6,0 ± 0,3                                        | 0,0193 ± 0,0005                 | 109,0 ± 3,3                        | 4,70 ± 0,14                                            | 1,18 ± 0,08                                                   | 2,32 ± 0,09                                                            | 7           | 9                 |
|           | SLPF4 | 5,2 ± 0,3                                        | 0,0212 ± 0,0006                 | 118,0 ± 2,2                        | 5,68 ± 0,11                                            | 1,26 ± 0,05                                                   | 2,08 ± 0,07                                                            | 7           | 9                 |
| CTRL      | SLC   | 5,9 ± 0,2                                        | 0,0228 ± 0,0009                 | 119,9 ± 2,2                        | 4,71 ± 0,09                                            | 1,09 ± 0,07                                                   | 2,55 ± 0,13                                                            | 7           | 9                 |

| b)        | Uvjet | NKVS<br>[ $\times 10^6$ st<br>mL <sup>-1</sup> ] | $\mu_{\max}$ [h <sup>-1</sup> ] | konc. IgG<br>[mg L <sup>-1</sup> ] | qP<br>[pg stanica <sup>-1</sup><br>dan <sup>-1</sup> ] | qGlc<br>[pmol<br>stanica <sup>-1</sup><br>dan <sup>-1</sup> ] | IVCD<br>[ $10^6 \times \text{st} \times \text{ml}^{-1}$<br>dan <sup>-1</sup> ] | Dan<br>pika | Vrijeme<br>uzgoja |
|-----------|-------|--------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------------|
| ALKALAZA  | SKA1  | 0,0 ± 0,0                                        | 0,0000 ± 0,0000                 | 2 ± 0,0                            | 0,00 ± 0,00                                            | 0,00 ± 0,00                                                   | 0,00 ± 0,00                                                                    | /           | /                 |
|           | SKA2  | 6,1 ± 0,2                                        | 0,0235 ± 0,0004                 | 113,8 ± 4,1                        | 4,5 ± 0,16                                             | 1,03 ± 0,10                                                   | 2,53 ± 0,06                                                                    | 8           | 9                 |
|           | SKAF1 | 5,8 ± 0,3                                        | 0,0223 ± 0,0004                 | 119,4 ± 3,2                        | 4,75 ± 0,13                                            | 1,05 ± 0,07                                                   | 2,52 ± 0,10                                                                    | 8           | 9                 |
|           | SKAF2 | 5,8 ± 0,3                                        | 0,0226 ± 0,0007                 | 116,8 ± 3,1                        | 4,55 ± 0,12                                            | 1,04 ± 0,04                                                   | 2,57 ± 0,07                                                                    | 7           | 9                 |
|           | SKAF3 | 5,8 ± 0,5                                        | 0,0226 ± 0,0003                 | 113,8 ± 2,2                        | 4,87 ± 0,10                                            | 1,15 ± 0,06                                                   | 2,34 ± 0,01                                                                    | 8           | 9                 |
|           | SKAF4 | 6,2 ± 0,3                                        | 0,0203 ± 0,0003                 | 114,3 ± 0,9                        | 5,02 ± 0,04                                            | 1,19 ± 0,12                                                   | 2,28 ± 0,08                                                                    | 7           | 9                 |
| NEUTRAZA  | SKN1  | 4,7 ± 0,3                                        | 0,0227 ± 0,0006                 | 110,6 ± 3,5                        | 5,35 ± 0,17                                            | 1,22 ± 0,06                                                   | 2,07 ± 0,09                                                                    | 7           | 9                 |
|           | SKN2  | 5,3 ± 0,2                                        | 0,0220 ± 0,0004                 | 118,8 ± 5,1                        | 4,9 ± 0,21                                             | 1,07 ± 0,03                                                   | 2,43 ± 0,04                                                                    | 8           | 9                 |
|           | SKNF1 | 4,4 ± 0,4                                        | 0,0226 ± 0,0004                 | 118,2 ± 3,2                        | 6,35 ± 0,17                                            | 1,38 ± 0,13                                                   | 1,86 ± 0,07                                                                    | 9           | 10                |
|           | SKNF2 | 5,8 ± 0,3                                        | 0,0234 ± 0,0005                 | 124,5 ± 2,0                        | 5,07 ± 0,08                                            | 1,06 ± 0,16                                                   | 2,45 ± 0,06                                                                    | 7           | 9                 |
|           | SKNF3 | 2,5 ± 0,4                                        | 0,0118 ± 0,0010                 | 129,4 ± 1,8                        | 8,66 ± 0,12                                            | 1,73 ± 0,10                                                   | 1,49 ± 0,10                                                                    | 11          | 12                |
|           | SKNF4 | 6,7 ± 0,2                                        | 0,0236 ± 0,0008                 | 115,3 ± 2,6                        | 4,69 ± 0,11                                            | 1,09 ± 0,02                                                   | 2,46 ± 0,15                                                                    | 7           | 9                 |
| PROTAMEKS | SKP1  | 4,8 ± 0,2                                        | 0,0209 ± 0,0007                 | 99,7 ± 3,9                         | 4,72 ± 0,08                                            | 1,22 ± 0,07                                                   | 2,11 ± 0,08                                                                    | 8           | 9                 |
|           | SKP2  | 5,8 ± 0,2                                        | 0,0223 ± 0,0003                 | 108,0 ± 1,5                        | 4,21 ± 0,06                                            | 1,06 ± 0,11                                                   | 2,57 ± 0,04                                                                    | 8           | 9                 |
|           | SKPF1 | 5,0 ± 0,3                                        | 0,0185 ± 0,0004                 | 121,9 ± 2,4                        | 6,05 ± 0,12                                            | 1,29 ± 0,04                                                   | 2,01 ± 0,08                                                                    | 8           | 9                 |
|           | SKPF2 | 6,7 ± 0,2                                        | 0,0225 ± 0,0002                 | 116,4 ± 4,8                        | 4,33 ± 0,18                                            | 0,99 ± 0,12                                                   | 2,69 ± 0,11                                                                    | 8           | 9                 |
|           | SKPF3 | 5,2 ± 0,3                                        | 0,0216 ± 0,0005                 | 115,5 ± 1,8                        | 5,28 ± 0,08                                            | 1,21 ± 0,03                                                   | 2,19 ± 0,09                                                                    | 8           | 9                 |
|           | SKPF4 | 6,2 ± 0,2                                        | 0,0231 ± 0,0005                 | 116,3 ± 2,4                        | 4,87 ± 0,10                                            | 1,11 ± 0,08                                                   | 2,39 ± 0,13                                                                    | 8           | 9                 |
| CTRL      | SKC   | 5,8 ± 0,3                                        | 0,0226 ± 0,0006                 | 114,1 ± 2,1                        | 4,54 ± 0,08                                            | 1,05 ± 0,06                                                   | 2,54 ± 0,09                                                                    | 7           | 9                 |

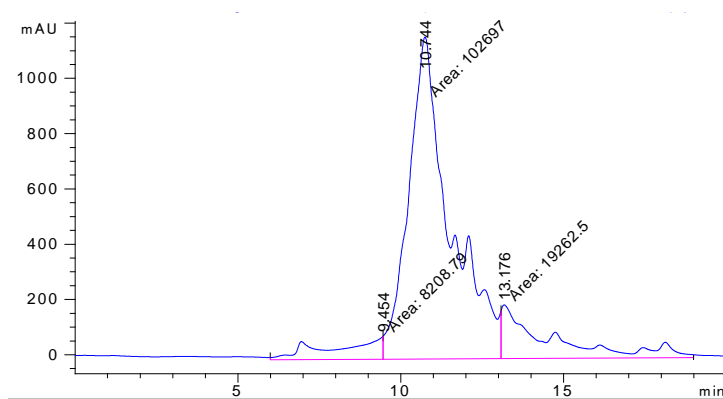


Prilog 4. Prikaz kromatograma SEC proteinskog hidrolizata lana: a) HLA, b) HLN, c) HLP

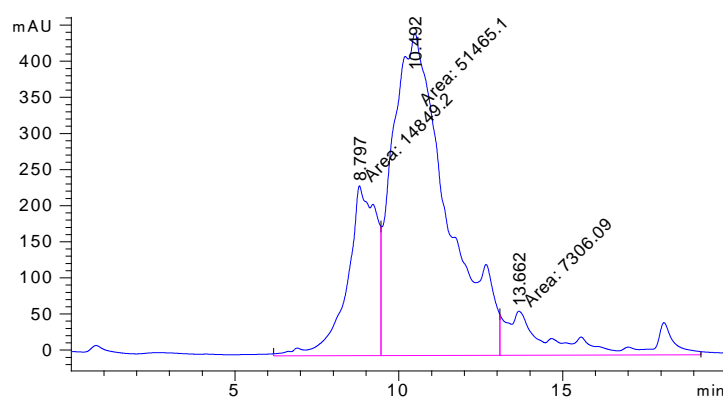


Prilog 5. Prikaz kromatograma SEC proteinskog hidrolizata konoplje: a) HKA, b) HKN, c) HKP

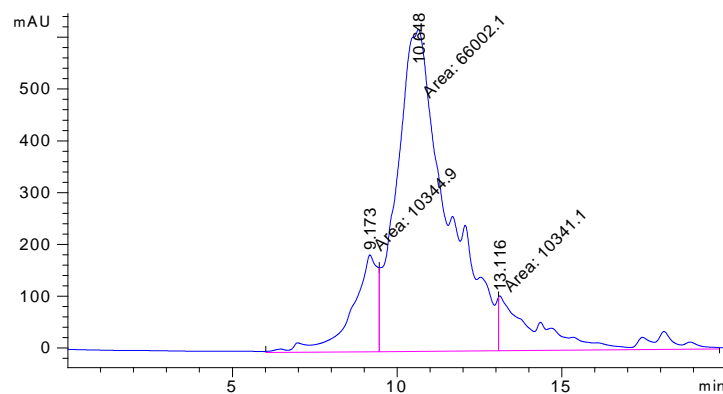
a)



b)



c)



## 9. POPIS KRATICA

$\mu_{\max}$ - najveća specifična brzina rasta stanica

AAA- aromatske aminokiseline

Ala- alanine

ANOVA- analiza varijance

Arg- arginin

Asp/Asn- asparaginska kiselina/asparagin

ATCC- Američka zbirka tipskih kultura (engl. *American Type Culture Collection*)

BCAA- aminokiseline s razgranatim lancima

BSA- goveđi serumski albumin (engl. *Bovine Serum Albumin*)

CHO- stanice ovarija kineskog hrčka (engl. *Chinese Hamster Ovary*)

Cys- cistein

DH- stupanj hidrolize (engl. *Degree of Hydrolysis*)

dH<sub>2</sub>O- destilirana voda

FBS- fetalni goveđi serum

Glu/Gln- glutaminska kiselina/glutamin

Gly- glicin

HAA- hidrofobne aminokiseline

HCl- klorovodična kiselina

His- histidine

HEK293T- stanice bubrega humanog embrija (engl. *Human Embryonic Kidney 293 cells*)

HKA- hidrolizat proteina konoplje dobiven enzimom alkalaza

HKN- hidrolizat proteina konoplje dobiven enzimom neutraza

HKP- hidrolizat proteina konoplje dobiven enzimom protameks

HLA- hidrolizat proteina lana dobiven enzimom alkalaza

HLN- hidrolizat proteina lana dobiven enzimom neutraza

HLP- hidrolizat proteina lana dobiven enzimom protameks

Ile- izoleucin

IVCD- integral (površina ispod krivulje) koncentracije živih stanica

Leu- leucin

Lys- lizin

Met- metionin

mqH<sub>2</sub>O- Milli-Q voda

MW- molekulska masa

NaOH- natrijev hidroksid

NBVS- najveći broj vijabilnih stanica

NKVS- najveća koncentracija vijabilnih stanica

ORAC- (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

Phe- fenilalanin

Pro- prolin

ROS - reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*)

qGlc- specifična stanična potrošnja glukoze

qP- specifična stanična produktivnost

SD- standardna devijacija

SDS-PAGE- natrij dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforeza

SEC- kromatografija isključenjem po veličini (engl. *Size Exclusion Chromatography*)

Ser- serin

SF- bez seruma (engl. *Serum-free*)

TCA- triklor octena kiselina

Thr- treonin

T.S.-transfekcijsko sredstvo

Tyr- tirozin

Val- valin

## 9. ŽIVOTOPIS DOKTORANDA

Marijan Logarušić rođen je 13. svibnja 1993.g u Zagrebu. Godine 2018. završio je diplomski studij Molekularna biotehnologija na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad pod naslovom „Učinak proteinskog izolata iz uljane pogače lana na rast i produktivnost kulture životinjskih stanica“ izradio je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije pod mentorstvom prof. dr. sc. Igora Slivca. Iste godine počinje raditi na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u sklopu projekta HRZZ-a: „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica“ te upisuje doktorski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam. Glavni interesi njegovog znanstvenog istraživanja su priprema proteinskih hidrolizata biljnog podrijetla, rad s biotehnološki značajnim staničnim linijama te optimizacija hranjivog medija. Tijekom svog poslijediplomskog studija proveo je 5 mjeseci u Beču, Austrija kao suradnik na projektu END-2-END provedenog u suradnji Sveučilišta BOKU i tvrtke Bilfinger. Dobitnik je potpore Biotehničke zaklade 2019. godine. Sudjelovao je na 10 međunarodnih i 2 domaća znanstvena skupa. Do sada je objavio 4 a1 rada, 3 a2 rada i 1 a3 rad. Član je Hrvatskog društva za biotehnologiju.

## Popis objavljenih radova:

- **a1**

1. Logarušić, M., Gaurina Srček, V., Berljavac, S., Leboš Pavunc, A., Radošević, K., Slivac, I. (2021) Protein Hydrolysates from Flaxseed Oil Cake as a Media Supplement in CHO Cell Culture. *Resources*, **10** (6), 59-71. IF=4,01 (Q2)
2. Logarušić, M., Radošević, K., Bis, A., Panić, M., Slivac, I., Gaurina Srček, V. (2020) Biological Potential of Flaxseed Protein Hydrolysates Obtained by Different Proteases. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **75**, 518-524. IF=3,83 (Q1)
3. Holjevac Grgurić, T., Mijović, B., Zdraveva, E., Govorčin Bajsić, E., Šlivac, I., Ujčić, M., Dekaris, I., Tominac Trcin, M., Vuković, A., Kuzmić, S., Ledić, A., Čop, M., Logarušić, M. (2020) Electrospinning of PCL/CEFUROXIM® fibrous scaffolds on 3D printed collectors. *J. Text. I.*, **111**, 1288-1299. IF=1,86 (Q2)
4. Logarušić, M., Slivac, I., Radošević, K., Bagović, M., Radojčić Redovniković, I., Gaurina Srček, V. (2019) Hempseed protein hydrolysates' effects on the proliferation and induced oxidative stress in normal and cancer cell lines. *Mol. Biol. Rep.*, **46**, 6079-6085. IF=1,42 (Q4)

- **a2**

1. Gaurina Srček, V., Ursić, T., Logarušić, M., Radošević, K., Slivac, I. (2022) Biljni proteinski hidrolizati kao dodatak medijima za uzgoj životinjskih stanica, *HČPTBN*, **17** (1-2), 3-10. Hrčak ID: 287129
2. Slivac, I., Buljubašić, E., Gaurina Srček, V., Logarušić, M. (2020) Proizvodnja cjepiva protiv gripe - dosezi i izazovi. *HČPTBN*, **15** (3-4), 83-93. Hrčak ID: 248383
3. Logarušić, M., Slivac, I., Radošević, K., Gaurina Srček, V. (2019) Učinak proteina iz uljane pogače lana na rast i produktivnost CHO-E i HEK-293T stanica. *HČPTBN*, **14** (3-4), 98-104. Hrčak ID: 235585

- **a3**

1. Gaurina Srček, V., Slivac, I., Radošević K., Leboš Pavunc, A., Logarušić, M. (2018) Application of proteins from oil cakes in animal cell technology, Proceedings of Natural Resources, Green Technology & Sustainable Development/3 (Radojčić Redovniković, I., Jakovljević, T., Petravić Tominac, V., Panić, M., Stojaković, R., erdec, D., Radošević, K., Gaurina Srček, V., Cvjetko Bubalo, M., ur.) Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska, 2018, str. 95-100, ISBN 978-953-6893-12-6. Natural Resources, Green Technology and Sustainable Development/3-GREEN2018, Zagreb, Hrvatska, 5.-8. lipnja 2018. European Biotechnology Thematic Network Association (EBTNA).