

Utjecaj hidrolizata proteina industrijske konoplje na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije

Damjanović, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:980547>

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

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Anja Damjanović

1311/MB

**UTJECAJ HIDROLIZATA
PROTEINA INDUSTRIJSKE
KONOPLJE NA RAST,
PRODUKTIVNOST I
METABOLIZAM CHO DP-12
STANIČNE LINIJE**

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

Diplomski rad je izrađen u sklopu projekta „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogače lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica“ (šifra projekta: IP-2016-06-3848) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ).

Zahvaljujem se svom mentoru, izv. prof. dr. sc. Igoru Slivcu, na posvećenom vremenu, prenesenom znanju i prijateljskom pristupu prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Veliko hvala i Marijanu Logarušiću, mag. ing., na pruženoj pomoći prilikom izrade eksperimenta, kao i na uloženom vremenu za sva moja pitanja.

Od srca se zahvaljujem i ostalim zaposlenicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacija na susretljivosti i uvijek ugodnoj radnoj atmosferi.

Hvala mojoj sestri Tei, prijateljima i kolegama za svaki savjet, podršku i prijateljstvo.

Hvala Ivanu na ljubavi i strpljenju.

Naposljetku, ovaj uspjeh najviše dugujem svojim roditeljima, Dariji i Darku, koji su mi svojim radom i trudom omogućili sretno i bezbrižno studiranje. Beskrajno sam im zahvalna na tome!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

UTJECAJ HIDROLIZATA PROTEINA INDUSTRIJSKE KONOPLJE NA RAST, PRODUKTIVNOST I METABOLIZAM CHO DP-12 STANIČNE LINIJE

Anja Damjanović, 1311/MB

Sažetak: CHO stanična linija je najkorišteniji ekspresijski sustav u biotehnološkoj proizvodnji terapeutika. Jedan od parametara optimizacije te proizvodnje je i odabir hranjivog medija za uzgoj čija formulacija ima veliki utjecaj na ponašanje stanica u kulturi. Budući da obogaćivanje medija serumom životinjskog podrijetla nije u skladu sa zahtjevima dobre proizvođačke prakse, kao alternativni dodaci mediju intenzivno se istražuju biljni proteinski hidrolizati. Tijekom ovog rada, ispitano je djelovanje proteina izoliranih iz industrijske konoplje na stanični rast i produktivnost. Stoga su, hranjivom mediju za uzgoj dodavani nefrakcionirani hidrolizati i frakcije proteina veličina ispod 10 i 1 kDa dobiveni pomoću tri mikrobne proteaze: *Alcalase*, *Neutralse* i *Protamex* u dvije različite koncentracije. Istraživanje je pokazalo da nefrakcionirani hidrolizati dobiveni alkalazom u većoj koncentraciji djeluju citostatično na stanice, dok frakcije proteina dobivenih hidrolizom pomoću neutrase i protamexa mogu imati pozitivan utjecaj na rast i produktivnost CHO DP-12 stanica.

Ključne riječi: brašno uljne pogače konoplje, CHO DP-12 stanična linija, protutijelo IgG, proteinski hidrolizati

Rad sadrži: 61 stranicu, 23 slike, 7 tablica, 53 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: *Marijan Logarušić, mag. ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. *Kristina Radošević*
2. izv. prof. dr. sc. *Igor Slivac*
3. doc. dr. sc. *Andreja Leboš Pavunc*
4. prof. dr. sc. *Ksenija Durgo* (zamjena)

Datum obrane: 24. rujana, 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

THE IMPACT OF HEMPSEED PROTEIN HYDROLYSATE ON GROWTH, PRODUCTIVITY, AND METABOLISM OF CHO DP-12 CELL LINE

Anja Damjanović, 1311/MB

Abstract: CHO cells represent the most frequently used mammalian production host when it comes to the production of therapeutics in biotechnology. One of the optimisation parameters of that production is media formulation which has a major impact on cell behavior in culture. Since media supplementation with animal-derived serum does not fall upon demands of good manufacturing practice, plant protein hydrolysates are being considered as an alternative media supplement. During the study, the impact of proteins isolated from industrial hempseed on cell growth and productivity was evaluated. Therefore, media was supplemented with crude hydrolysate as well as protein fractions of low molecular weight (<10 and <1 kDa) obtained by enzymatic hydrolysis with three different proteases (*Alcalase*, *Neutrase*, *Protamex*) in two different concentrations. Research has shown that crude hydrolysate gained from alcalase in higher concentrations act as a cytostatic while protein fractions attained with hydrolysis using neutrase and protamex can have a positive impact on the growth and productivity of CHO DP-12 cells.

Keywords: hempseed cake, CHO DP-12 cell line, IgG antibody, protein hydrolysate

Thesis contains: 61 pages, 23 figures, 7 tables, 53 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Igor Slivac, Associate professor*

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

Reviewers:

1. PhD. *Kristina Radošević*, Associate professor
2. PhD. *Igor Slivac*, Associate professor
3. PhD. *Andreja Leboš Pavunc*, Assistant professor
4. PhD. *Ksenija Durgo*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 24 September 2021

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA | 3 |
| 2.1.1. Razvoj tehnologije kulture životinjskih stanica..... | 3 |
| 2.1.2. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica u kulturi | 4 |
| 2.1.3. Faze staničnog rasta..... | 5 |
| 2.2. PROIZVODNE STANIČNE LINIJE | 6 |
| 2.2.1. CHO stanična linija | 7 |
| 2.2.1.1. CHO stanični metabolizam | 8 |
| 2.3. HRANJIVI MEDIJ ZA UZGOJ STANICA | 10 |
| 2.3.1. Serum | 12 |
| 2.3.2. Hidrolizati proteina kao dodatak mediju bez seruma | 12 |
| 2.4. UPOTREBA I SASTAV INDUSTRIJSKE KONOPLJE..... | 14 |
| 2.4.1. Uljna pogača sjemenki konoplje..... | 15 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 17 |
| 3.1. MATERIJALI..... | 17 |
| 3.1.1. Kemikalije | 17 |
| 3.1.2. Otopine i puferi | 18 |
| 3.1.3. Uređaji i oprema | 21 |
| 3.1.4. Stanična linija CHO DP-12 | 22 |
| 3.2. METODE RADA | 23 |
| 3.2.1. Izolacija proteina konoplje | 23 |
| 3.2.2. Hidroliza proteinskog izolata konoplje..... | 24 |
| 3.2.3. Frakcioniranje i ugušćivanje hidrolizata proteina konoplje..... | 24 |
| 3.2.4. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u | 26 |
| 3.2.5. Određivanje stupnja hidrolize..... | 27 |
| 3.2.6. SDS-PAGE elektroforeza proteinskih hidrolizata konoplje | 27 |
| 3.2.7. Uzgoj stanične linije CHO DP-12 u suspenziji | 28 |
| 3.2.8. Uzgoj CHO DP-12 stanične linije u mediju s dodatkom proteina konoplje | 28 |
| 3.2.10. Određivanje koncentracije glukoze u hranjivom mediju | 30 |
| 3.2.11. Određivanje koncentracije laktata u hranjivom mediju | 30 |
| 3.2.12. Određivanje koncentracije amonijaka u hranjivom mediju | 31 |
| 3.2.13. Određivanje koncentracije protutijela IgG | 32 |
| 3.2.14. Izračun procesnih parametara rasta stanične linije CHO-DP12..... | 33 |
| 3.2.15. Statistička obrada podataka | 34 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 35 |
| 4.1. ODREĐIVANJE STUPNJA HIDROLIZE I KARAKTERIZACIJA PROTEINSKOG HIDROLIZATA BRAŠNA KONOPLJE SDS-PAGE ELEKTROFOREZOM..... | 36 |
| 4.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA BRAŠNA KONOPLJE METODOM PO LOWRY-U IZ UZORAKA UKUPNIH HIDROLIZATA I FRAKCIJA | 38 |
| 4.3. UTJECAJ PROTEINSKOG HIDROLIZATA I NJEGOVIH PEPTIDNIH FRAKCIJA NA RAST, PRODUKTIVNOST I METABOLIZAM CHO DP-12 STANICA | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3.1. Utjecaj proteinskih hidrolizata enzima <i>Alcalase</i> na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije..... | 40 |
| 4.3.2. Utjecaj proteinskih hidrolizata enzima <i>Neutralse</i> na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije..... | 45 |
| 4.3.3. Utjecaj proteinskih hidrolizata enzima <i>Protamex</i> na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije..... | 50 |
| 5. ZAKLJUČCI | 55 |
| 6. LITERATURA | 56 |

1. UVOD

Proizvodnja terapeutika poput monoklonskih protutijela, rekombinantnih proteina, hormona, imunomodulatora, virusnih cjepiva i dr. se sve češće temelji na tehnologiji kulture životinjskih stanica. Kultura životinjskih stanica je *in vitro* uzgoj stanica izoliranih iz različitih tkiva životinja u strogo kontroliranim fizikalno-kemijskim uvjetima. Kontrolirani se uvjeti postižu upotrebom odgovarajućeg hranjivog medija. Hranjivi medij stanicama osigurava povoljan mikrokoliš kako bi se što bolje ispunili zahtjevi slični onima koje pogoduju *in vivo* staničnom rastu i proliferaciji. Stoga je nužno da hranjivi medij sadrži komponente poput ugljikohidrata, aminokiselina, anorganskih soli, lipida, vitamina, hormona i ostalih elemenata potrebnih stanicama.

Mediju se često dodaje serum životinjskog podrijetla jer sadrži specifične nutrijente, poput hormona i faktora rasta, koji potiču proliferaciju i druge brojne stanične funkcije. Najčešće se koristi fetalni goveđi serum jer sastavom pogoduje rastu velikog broja različitih kultura staničnih linija (Moraes i sur., 2008). Unatoč tome, korištenje seruma životinjskog porijekla problematično je iz više razloga. Upotreba seruma iziskuje žrtvu velikog broja životinja, čija se krv koristi za proizvodnju seruma, što posljedično znatno povećava cijenu medija za uzgoj. Osim toga, serum je potencijalni izvor kontaminacija kao što su bakterije, virusi, mikoplazme i prioni. Također, formulacija seruma nije kemijski definirana, čime se ne postiže stupanj standardizacije koji je nužan prilikom proizvodnje terapeutika za ljudsku upotrebu.

Kako bi se izbjegli navedeni problemi, počelo se raditi na oblikovanju kemijskih definiranih medija koji bi isključivali upotrebu seruma (engl. *serum-free media*, SFM). Međutim, istraživanja su pokazala da su stanice, uzgajane na kemijski definiranom mediju bez seruma, manje produktivne te da slabije rastu u odnosu na stanice uzgajane na mediju s dodatkom seruma (Kim i Lee, 2009). Stoga se počela razmatrati upotreba proteinskih hidrolizata iz različitih izvora kako bi se kompenzirao utjecaj makromolekula i nutrijenata koje serum pruža stanicama. Hidrolizati su peptidni fragmenti koji nastaju procesom kemijske, mikrobne ili enzimske hidrolize proteina iz biljaka, kvasaca ili životinjskog tkiva (Lobo-Alfonso i sur., 2008). Proteinski hidrolizati biljnog porijekla su se pokazali kao dobra alternativa serumu jer svojim nutritivnim sastavom odgovaraju povećanju rasta i produktivnosti životinjskih stanica u kulturi. Smjese proteina biljnih hidrolizata mogu biti kompleksnog sastava te osim aminokiselina i oligopeptida sadržavati tvari poput fenolnih spojeva i vlakana.

U tom slučaju potrebni su dodatni koraci pročišćavanja i frakcioniranja prije dodatka hranjivom mediju. Osim toga, učinak biljnih proteinskih hidrolizata ovisi o čimbenicima poput izvora biljnog proteina, procesu provedbe hidrolize, koncentraciji korištenog hidrolizata i formulaciji bazalnog medija koji se koristi (Babcock i sur., 2010). Kao izvor biljnih hidrolizata mogu se koristiti nusproizvodi prehrambene industrije koji su po svom sastavu bogati proteinima. Uljne pogače su jeftin i lako dostupan nusproizvod ekstrakcije jestivih ulja iz sjemenki te imaju bogat nutritivni sastav sa sadržajem proteina u rasponu od 15 do 50 %. Ne samo da bi se korištenjem takvih sirovina prilikom optimizacije medija s dodatkom biljnih proteinskih hidrolizata smanjila ukupna cijena, nego bi se uspješnom eliminacijom sastavnica životinjskog porijekla prilikom uzgoja poboljšala i kvaliteta proizvodnog procesa.

Prilikom izrade ovog rada korišteni su proteinski izolati uljne pogače sjemenki konoplje. Hidrolizom izolata pomoću tri komercijalno dostupne mikrobne proteaze – *Alcalase*, *Neutrase* i *Protamex* dobiveni su proteinski hidrolizati koji su potom frakcionirani. Hidrolizati proteina konoplje i frakcije hidrolizata različitih veličina dodavane su hranjivom mediju bez seruma kako bi se ispitao njihov utjecaj na rast i produktivnost industrijske stanične linije CHO DP-12 koja proizvodi rekombinantno humano protutijelo.

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 (Jayapal i sur., 2007). Osim u terapijske svrhe, stanice u kulturi se mogu koristiti i kao gotov proizvod, u svrhu istraživanja stanične fiziologije i biokemijskih puteva, te kao alternativa živim organizmima prilikom provedbe raznih toksikoloških ispitivanja.

2.1.1. Razvoj tehnologije 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 je potrebno 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). Takve karakteristike nisu pogodne za njihovo širu upotrebu u industrijske ili istraživačke svrhe. 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 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 transformacije. Transformacija stanica u kulturi podrazumijeva pojavu trajne promjene fenotipa koja nastaje zbog induciranih promjena nasljednog materijala i ekspresije gena. Transformirane stanice imaju izmijenjenu morfologiju, smanjeno vrijeme duplikacije, manje su ovisne o faktorima rasta te su genetički nestabilne (Leo 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, transformirane 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. Transformacija 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 jedna od temeljnih pristupa u modernoj biotehnologiji i farmaceutskoj industriji.

2.1.2. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica u kulturi

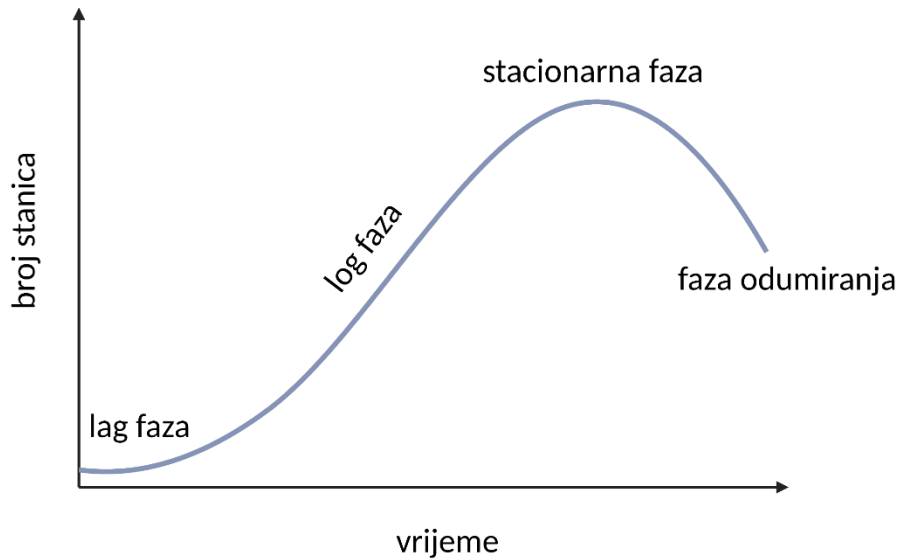
Osim o fizikalno-kemijskom sastavu medija, koncentraciji hranjivih tvari, hormona ili faktora rasta, uspješnost rasta i proliferacije stanica u kulturi ovisi i o pravilnom održavanju procesnih parametara uzgoja. Što je mikrokoliš bolje prilagođen stanicama to će više doći do izražaja njihove specijalizirane 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 koje imaju puno kraće vrijeme udvostručavanja pa 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 kisele čime se zakiseljava sredina u kojoj stanice rastu. Kako bi se to izbjeglo, medij je potrebno puferirati. Za to se koristi anorganski

puffer poput natrijevog bikarbonata koji je jeftin i ne šteti staničnom rastu. S druge strane, postoji opasnost od povišenja pH vrijednosti jer stanice ne proizvode dovoljne količine ugljikovog dioksida u početnoj fazi rasta. Uzgojem stanica u CO₂ inkubatoru ostvaruje se optimalni sastav atmosfere koji čini 95 % zrak i 5 % CO₂. 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⁻¹ i 320 mOsm kg⁻¹. S obzirom na to da se radi o uzgoju stanica aerobnih organizama, potrebno 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 % jer kisik u prevelikim koncentracijama može biti toksičan za stanice.

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 dodatka određenih komponenti hranjivom mediju i sl. 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 tome u kojoj su koncentraciji i iz koje faze rasta nacijepijene stanice inokuluma (Leo i sur., 2008). Zatim 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 inhibitorno 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 u bioreaktoru.



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

2.2. PROIZVODNE STANIČNE LINIJE

Prilikom proizvodnje kompleksnih rekombinantnih proteina preferira se korištenje ekspresijskog sustava životinjskih stanica zbog njihove mogućnosti post-translacijskih modifikacija. Post-translacijske modifikacije poput glikozilacije, karboksilacije i sl. važne su zbog pravilnog smatanja proteina, njegove funkcionalnosti i aktivnosti. Za dobivanje visokovrijednih terapeutika korištenjem tehnologije kulture životinjskih stanica nužno je uspostaviti stabilnu proizvodnu staničnu liniju. Tijekom godina uspostavljeno je nekoliko proizvodnih staničnih linija, a neke od najpoznatijih su nastale iz epitelnih stanice ovarija kineskog hrčka (CHO), fibroblastnih stanica bubrega ljudskog embrija (HEK-293) i bubrega mladog hrčka (BHK-12) te epitelnih stanica izoliranih iz karcinoma grlića maternice (HeLa).

2.2.1. CHO stanična linija

CHO stanična linija najkorišteniji je ekspresijski sustav za proizvodnju rekombinantnih proteinskih terapeutika (Zhu i sur., 2017). Među njima su najvažnija monoklonska protutijela jer na njih otpada gotovo polovica ukupne proizvodnje biofarmaceutika. Međutim, puno je vremena trebalo proći kako bi se uspostavile brzo rastuće CHO stanične linije čija produktivnost može doseći između 20 i 70 pg stanica⁻¹ dan⁻¹ (Li i sur., 2010) kakve se koriste u proizvodnji.

Dr. Theodore T. Puck je 1956. prvi uspostavio CHO stanice iz tkiva jajnika kineskog hrčka. Primarne stanice su bile fibroblastne i pokazivale su neznatne promjene u diploidnom karakteru. Mjesecima nakon uzastopnih subkultivacija došlo je do morfoloških promjena u epitelni tip stanica, nastupila je spontana imortalizacija i poboljšale su se vrijednosti brzine rasta u adherentnim uvjetima. Od tada pa do danas postoji niz različitih CHO staničnih sojeva poboljšanih karakteristika za uspješniju provedbu proizvodnog procesa. CHO stanice prilagodile su se suspenzijskom rastu (Wurm, 2013) 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. Osim toga, većina patogenih virusa nema mogućnost replikacije u CHO stanicama pa su siguran izbor prilikom produkcije terapeutika za ljudsku upotrebu (Lai i sur., 2013). Proizvedeni rekombinantni proteini u CHO stanicama se sekretornim putevima izlučuju u hranjivi medij. Zahvaljujući tome, olakšani su tzv. nizvodni tehnološki postupci (engl. *down-stream*) izolacije i pročišćavanja. 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. Tijekom dužeg perioda kultivacije CHO stanice nakupljaju promjene vidljive u genotipu i fenotipu te se stoga ne uspijeva zadržati potrebna stabilnost proizvodnog procesa 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 (Bailey i sur., 2012). Osim kvantitete, zahtjevi tzv. dobre proizvođačke prakse (engl. *Good Manufacturing Practice*, GMP) podrazumijevaju i visoku kvalitetu proizvoda dobivenih pomoću kulture životinjskih stanica. Tome pridonosi činjenica da su post-translacijske modifikacije proteina CHO stanica vrlo slične

onima kod ljudi, pogotovo kada je riječ o glikozilaciji (Kim i sur., 2011). Na taj je način osigurana bolja aktivnost i imunogenost terapeutika prilikom primjene.

2.2.1.1. CHO stanični metabolizam

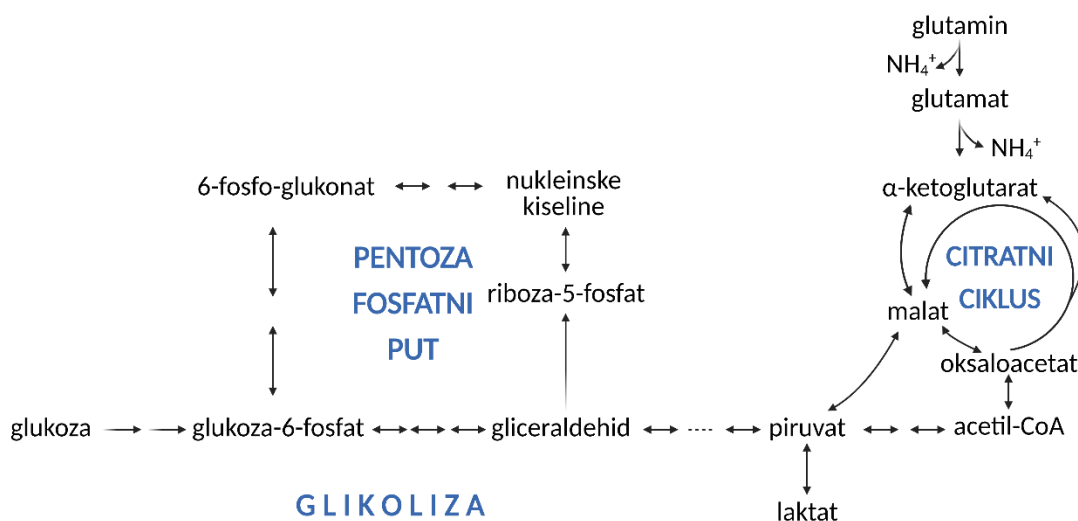
Za bolje razumijevanje mehanizama CHO stanica tijekom bioprocesa ili stanične kultivacije potrebno je poznavati njihove metaboličke puteve (slika 2). Potrošnja supstrata i nastanak nusprodukata, posebice onih toksičnih, znatno utječe na rast i produktivnost stanične linije zbog čega je metabolizam stanica u kulturi u određenoj mjeri izmijenjen u odnosu na metabolizam stanica koje su dio višestaničnog organizma (Lai i sur., 2013; Lao i Toth, 1997).

Osim što je glavni izvor energije životinjskim stanicama, glukoza služi i kao intermedijer brojnim molekulama u biokemijskim reakcijama metabolizma. Glikolizom se razgrađuje do piruvata, a pentoza fosfatnim putem do molekula riboze, koje su prekursori za nukleinske kiseline, i molekula NADPH koje su nužne za anaboličke reakcije redukcije. Piruvat se u aerobnim uvjetima razgrađuje reakcijama citratnog ciklusa i oksidativne fosforilacije kako bi se stanici priskrbila energija sačuvana u fosfoanhidridnim vezama molekula ATP-a. Reakcijama citratnog ciklusa se generira većina stanične energije, ali nastaju i prekursorske molekule za stanični anabolizam. Međutim, zbog nepravilne regulacije metabolizma stanica u kulturi, dolazi do nepotpune oksidacije glukoze (Amable i Butler, 2008). Analiza metaboličkih puteva je pokazala da CHO stanice u eksponencijalnoj fazi rasta energiju generiraju putem tzv. aerobne glikolize (Zagari i sur., 2013) i proizvode laktat neovisno o koncentraciji kisika, dok stanice u stacionarnoj fazi većinom provode oksidativnu fosforilaciju i potrošnju laktata (Young, 2013). Visoke koncentracije glukoze u mediju na početku uzgoja stanica dovode do prekomjerne ekspresije transportnih proteina za molekule glukoze. Stanice troše glukozu više nego je potrebno što rezultira naglim porastom brzine rasta. Piruvat se nakuplja u velikim koncentracijama i reducira u laktat zbog pojačane aktivnosti laktat dehidrogenaze (Amable i Butler, 2008) što rezultira nakupljanjem velike količine laktata u podlozi. No, zabilježeno je da CHO stanice mogu prijeći s produkcije na potrošnju laktata kako bi se u određenoj mjeri neutralizirali toksični učinci prevelike koncentracije laktata u mediju na stanični rast (Toussaint i sur., 2016). Međutim, ne samo što se akumuliraju velike količine nepoželjnog nusprodukta, nego si stanica ovim metaboličkim putem ne opskrbljuje dovoljno energije.

Kako bi se nadoknadila ta energija, stanica koristi glutamin iz hranjivog medija. Glutamin se kroz dvije biokemijske reakcije deaminacije pomoću enzima glutaminaze i glutamat-dehidrogenaze prevodi do alfa-ketoglutarata. Alfa-ketoglutarat je intermedijer u

reakcijama citratnog ciklusa koji se sada može normalno odvijati. Tim putem stanica generira dovoljno energije i koenzima potrebnih za reakcije anabolizma te zadovoljava potrebe za masnim kiselinama. Međutim, metabolička razgradnja glutamina na spomenuti način rezultira nastankom amonijaka koji se nakuplja u mediju i toksičan je za stanice u koncentracijama od 5 do 8 mM (Lai i sur., 2013; Schneider i sur., 1996). Nakupljanje amonijaka negativno utječe na brzinu rasta, produktivnost, pH medija i glikozilacijski profil čime se u konačnici smanjuje kvaliteta produkta (Ahn i Antoniewicz, 2012). Postoji i sekundarni put pretvorbe glutamina do piruvata aktivacijom transaminaza kako bi se smanjila količina nastalog amonijaka, no tim putem si stanica opskrbljuje znatno manju količinu energije. Osim što služi kao dodatni izvor energije, glutamin je važan izvor dušika za metabolizam aminokiselina. Prekursor je za sintezu purina, pirimidina i asparagina.

Slično kao kod glukoze, stanice troše više glutamina ako je prisutan u koncentracijama većim nego što je potrebno za održavanje stanične vijabilnosti. Osim toga, glutamin se može i spontano raspadati pri temperaturi od 37 °C čime se dodatno povećava koncentracija amonijaka u mediju.



Slika 2. Glavni metabolički putevi u životinjskim stanicama (vlastita ilustracija izrađena pomoću programa BioRender.com)

2.3. 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⁻¹, ovisno o zahtjevima stanica i tipu uzgoja. Iako se pokazalo da smanjenje koncentracije glukoze u mediju do 0,22 g L⁻¹ ne utječe značajno na stopu staničnog rasta, koncentraciju ATP i metabolizam aminokiselina, svejedno je poželjno da se razina glukoze održava u većim koncentracijama zbog brzog rasta CHO stanica i potrošnje nutrijenata prilikom procesa proizvodnje protutijela (Lu i sur., 2005; Dowd i sur., 2001). 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

(Xu i sur., 2014). Nedostatak glutamina dovodi do kasnijeg ulaska stanica u eksponencijalni fazu rasta (Bort i sur., 2010). 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 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} i 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 μM . 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 njihovog citotoksičnog učinka na stanice, ali i smanjenja pojave antibiotske rezistencije.

Osim toga, medij može biti obogaćen određenim suplementima kako bi se povećali prinosi proizvodnje. U početku su se mediju dodavale komponente koje se prirodno nalaze u živim organizmima kao što su tkivni ekstrakti, limfa, plazma i sl. Danas je u upotrebi nekoliko tipova medija: medij s dodatkom seruma, medij bez seruma, kemijski definirani medij i medij bez proteina. Odabir tipa medija ovisi o tome za koju svrhu će se uzgajati stanice u *in vitro* uvjetima. Medij s dodatkom seruma sastavom zadovoljava potrebe stanica u kulturi i lako se može prilagoditi rastu i proliferaciji različitih tipova stanica (Moraes i sur., 2008). Unatoč tome, kompozicija seruma je nepoznata i promjenjiva što stvara probleme prilikom postizanja reproducibilnosti rezultata, ako se koristi u istraživanjima. Suprotno tome, SF medij ima točno definirani sastav koji se prilagođava rastu i potrebama određene stanične linije. Time se povećavaju zahtjevi njegove formulacije i proizvodnje te se osiguravaju stabilnost i reproducibilnost kulture kako bi se postigli što bolji proizvodni prinosi i zadovoljili uvjeti dobre proizvođačke prakse. Faktori rasta utječu na stanični rast, proliferaciju, otpornost i diferencijaciju, a najčešće su to peptidi, manji proteini i hormoni (Ritacco i sur., 2018). S obzirom na to da je serum najveći izvor faktora rasta u SF medij se dodaju samo određeni,

specifični faktori rasta, kako bi se smanjila sveukupna kompleksnost prilikom formulacije medija. Inzulin i njegovi analozi su najčešće korišteni faktori rasta u komercijalno dostupnim SF medijima.

2.3.1. Serum

Krvni serum je tekuća krvna komponenta koja se dobije kada se odstrane bijele i crvene krvne stanice i faktor zgrušavanja, fibrin. Serum sadrži brojne nutrijente te komponente poput hormona, faktora rasta i proteina koji djeluju stimulirajuće na stanični rast, zatim vitamine, minerale i lipide koji stanicama pružaju zaštitu od mehaničkih oštećenja, oksidativnog stresa i neutraliziraju djelovanje toksina (Yao i Asayama, 2017).

Zbog visoke koncentracije faktora rasta i niske količine γ -globulina, koji inhibiraju stanični rast, fetalni goveđi serum najčešće se koristio kao dodatak bazalnom mediju (Moraes i sur., 2008). Dodatkom seruma u koncentracijama od 5-20 % (v/v) postizale su se optimalne vrijednosti staničnog rasta. Međutim, današnji zahtjevi dobre proizvođačke prakse predlažu izbjegavanje upotrebe seruma prilikom formulacije medija zbog njegovog izrazito kompleksnog i nedefiniranog sastava čime je gotovo nemoguće postići određeni stupanj standardizacije u proizvodnji. Osim toga, kompleksnost sastava i prisutnost velikog broja proteina u serumu otežava tzv. nizvodne tehnološke postupke, tj. izolaciju i pročišćavanje proizvoda, što znatno podiže cijenu cjelokupnog proizvodnog procesa. Serum je i potencijalni izvor mikrobnih kontaminacija poput virusa, priona i bakterija, a može biti citotoksičan i sadržavati proteine koji bi mogli djelovati inhibitorno na proizvodnu staničnu liniju. Uz sve spomenuto, serum je i najskuplja komponenta medija.

2.3.2. Hidrolizati proteina kao dodatak mediju bez seruma

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 zbog svoje visoke cijene često predstavljaju ograničavajući faktor, pogotovo ako se uzme u obzir količina medija potrebna prilikom proizvodnje u industrijskom mjerilu. 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). No, s obzirom na to da su bilo kakve komponente medija koje dolaze iz životinjskog organizma nepoželjne prilikom proizvodnje biofarmaceutika zbog opasnosti od kontaminacija patogenom, hidrolizati biljnog podrijetla su se počeli intenzivno proučavati kao oblik suplementacije SF mediju.

Biljni proteinski hidrolizati izvor su kratkolančanih peptida čija svojstva mogu pozitivno djelovati na životinjske stanice u kulturi. Do sada je pokazano kako peptidi iz riže, pšenice i soje, osim što nutritivno obogaćuju hranjivi medij, pojačavaju stopu staničnog rasta, smanjuju vjerojatnost apoptoze i poboljšavaju kvalitetu produkta tako što djeluju kao inhibitori ekstracelularnih proteaza koje mogu oštetiti konačni produkt (Mols i sur., 2005; Burteau i sur., 2003). 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 (Logarušić i sur., 2021), prije dodatka mediju potrebno je provesti dodatne procese pročišćavanja i frakcioniranja. Frakcioniranjem se dobivaju mješavine manjih peptida različite veličine, naboja i hidrofobnosti. Biološka aktivnosti peptida u proteinskim hidrolizatima ovisit će o njihovim fizikalno-kemijskim karakteristikama (Franek i sur., 2000). Farges-Haddani i suradnici su u svom istraživanju koristili hidrolizate uljne repice, kako bi pokazali koliku važnost proces dobivanja hidrolizata iz početne sirovine ima na konačne učinke u kulturi stanica. Pokazalo se da određeni hidrolizati poboljšavaju stanični rast, održavaju vijabilnost stanica tijekom dužeg vremena, smanjuju stopu stanične smrti i pomažu bržoj prilagodbi stanica na medij bez seruma. Osim toga, potvrdili su važnost frakcioniranja i dobivanja mješavine hidrolizata u određenom rasponu molekularnih veličina i koncentracije u kojoj se hidrolizat dodaje bazalnom mediju (Farges-Haddani i sur., 2006). Negativna strana korištenja biljnih hidrolizata je razlika u sastavu i kvaliteti od šarže do šarže prilikom pripreve što može utjecati na cjelokupan 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.

2.4. UPOTREBA I SASTAV INDUSTRIJSKE KONOPLJE

Konoplja (*Cannabis Sativa L.*) je jednogodišnja, dvodomna biljka iz porodice *Cannabaceae*, a poznata je po svom kemijskom sastavu radi kojeg ima psihoaktivna svojstva. Kanabinoidi su biološki aktivni spojevi koji se nalaze u biljci konoplje. Dva glavna predstavnika su tetrahidrokanabinol (THC) i kanabidiol (CBD) zbog kojeg su prepoznata ljekovita svojstva konoplje. Međutim, količina suhe tvari psihoaktivnog THC-a u cvatovima konoplje koja se koristi u industrijske svrhe ne bi trebala prelaziti 0,2 % (Kriese i sur., 2004). No, kako se količina THC-a mijenja tijekom različitih razvojnih stadija i životnog ciklusa konoplje, u obzir se uzima omjer spomenutih kanabinoida u biljci. Industrijska konoplja ima puno veći udio kanabidiola ($THC/CBD < 1$) za razliku od medicinske (indijske) konoplje koja je bogata tetrahidrokanabinol ($THC/CBD > 1$). Primjena konoplje je raznolika jer se gotovo svaki dio biljke može iskoristiti u industrijske svrhe. Sjeme konoplje (slika 3) 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).



Slika 3. Sjeme industrijske konoplje (Anonymous 1, 2021)

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. Osim toga, prerađeni proizvodi kao što su oljušteno sjeme ili brašno konoplje koje zaostaje nakon dobivanja uljnih frakcija mogu imati povećan sadržaj proteina. S obzirom na to da se proteini uglavnom nalaze u unutarnjem sloju sjemena, povećani sadržaj proteina posljedica je koncentriranja proteina i do 1,5 puta nakon uklanjanja komponenti sjemena kojim nedostaju proteini, poput ljuske (House i sur., 2010). Dva glavna proteina sjemenki konoplje su albumin i edestin (Tang i sur., 2009). Edestin pripada leguminima, proteinima koji su najbliži kazeinu iz mlijeka. Edestin čini oko 82 % ukupnog sadržaja proteina konoplje što ga čini najzastupljenijom proteinskom komponentom. Edestin je heksamer veličine 300 kDa u kojem su podjedinice povezane disulfidnom vezom. Otprilike 13 % proteina konoplje čine albumini, točnije 2S albumin. 2S albumini su proteini niske molekularne mase (između 18 i 24 kDa), a zbog svoje primarne strukture posjeduju visoku razinu polimorfizma te mogu biti prisutni u mnogim izoformama. Oba proteina sadrže značajnu količinu esencijalnih aminokiselina, posebice arginina kojeg prema nekim izvorima ima 3,10 g na 100 g proteina i glutaminske kiseline koje ima 4,58 g na 100 g proteina. 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).

2.4.1. Uljna pogača sjemenki konoplje

Uljne pogače su nusprodukt koji zaostaje nakon ekstrakcije ulja iz sjemenki biljaka koje se koriste u prehrambenoj industriji. Bogatog su nutritivnog sastava koji može varirati ovisno o vrsti, uvjetima uzgoja i metodi ekstrakcije koja se koristi za dobivanje ulja. Zbog visoke koncentracije proteina koje sadrže (između 15 % i 50 %) najčešće se koriste kao hrana za životinje. Ulje konoplje dobiva se postupkom hladnog prešanja sjemenki biljke korištenjem

hidrauličke preše. Hladnim prešanjem se izbjegava upotreba konvencionalnih organskih otapala ili topline prilikom ekstrakcije kako bi se zadržale bioaktivne komponente koje se nalaze u sjemenki biljke (Teh i Birch, 2013). Nakon mehaničkog prešanja sjemenki, kao otpad ostaje tzv. uljna pogača koja se daljnjim postupcima mljevenja i prosijavanja prerađuje kako bi se dobilo brašno. Sastav brašna sjemenki konoplje (tablica 1) razlikuje se ovisno o kvaliteti i vrsti početne sirovine, uvjetima uzgoja, okolišnim čimbenicima, itd. Proces dobivanja uljnih pogači je relativno jeftin. Njihova daljnja obrada i korištenje u prehrambene ili druge svrhe povoljna je ne samo s ekonomske, nego i ekološke strane jer se ne bi odbacivale kao nusprodukt bez vrijednosti.

Tablica 1. Sastav brašna sjemenki konoplje (Pojić i sur., 2014)

| Sastav | % |
|----------------|------|
| proteini | 27,9 |
| lipidi | 11,8 |
| ugljikohidrati | 1,49 |
| vlakna | 17,3 |
| vlaga | 7,88 |
| pepeo | 6,74 |

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Brašno uljne pogače konoplje – *Bio Hemp Protein Powder, Soul Food*

3.1.1. Kemikalije

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

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

Anti-Clumping Agent, Gibco, SAD

Bakrov sulfat pentahidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Bromfenol plavo, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat, Sigma-Aldrich Handels GmbH, Beč, Austrija

EDTA (Kompleksal III), Kemika, Zagreb, Hrvatska

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

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

Glicerol, Kemika, Zagreb

Glicin, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka

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

Kalij natrij tetrahidrat, Kemika, Hrvatska

Klorovodična kiselina, Kemika, Hrvatska

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

Metotreksat (MTX), Cerilliant, SAD

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

Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Sigma-Aldrich Handels GmbH, Beč, Austrija

Natrijev hidroksid, Kemika, Hrvatska

Natrijev karbonat, Kemika, Hrvatska

Natrijev klorid, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka

Octena kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Protein Markers, Lonza Rockland, Maine, SAD

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

SDS (natrijev dodecilsulfat), LKB, Bromma, Švedska

Trikloroctena kiselina (TCA), Fisher Scientific, Leicestera, Velika Britanija

Tripan-plavo, Sigma, St. Louis, SAD

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

β -merkaptoetanol, LKB, Bromma, Švedska

3.1.2. Otopine i pufferi

Reagens A

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

Reagens B1

| | |
|---------------------------|-----------|
| Bakrov sulfat pentahidrat | 1 g |
| Destilirana voda | do 100 mL |

Reagens B2

| | |
|-----------------------|-----------|
| Kalij natrij tartarat | 2 g |
| Destilirana voda | do 100 mL |

Reagens C

| | |
|------------|--------|
| Reagens A | 50 mL |
| Reagens B1 | 0,5 mL |
| Reagens B2 | 0,5 mL |

Otopina TCA ($0,44 \text{ mol L}^{-1}$)

| | |
|------------------------|---------|
| Trikloroctena kiseline | 7,189 g |
| Destilirana voda | 100 mL |

Pufer za uzorke za SDS-elektroforezu

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

Pufer za proteinsku elektroforezu

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

Coomassie otopina za bojanje gelova

0,25 % Coomassie plavo boja
10 % ledena octena kiselina
50 % glicerol
destilirana voda

50 mM natrij-fosfatni pufer pH 7

| | |
|------------------------------------|---------|
| Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat | 4,43 g |
| Dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat | 12,74 g |
| Natrijev klorid | 17,53 g |
| Destilirana voda | do 2 L |

100 mM glicinski pufer pH 2,5

| | |
|------------------|--------|
| Glicin | 7,5 g |
| Destilirana voda | do 1 L |

Standard za određivanje glukoze

glukoza 100 mg dL⁻¹ (5,55 mmol L⁻¹)

Reagens za određivanje glukoze (Glucose GOD-PAP, BIOLABO, Maizy, Francuska)

fosfatni pufer (pH 7,5) 0,150 mol L⁻¹
klor-4-fenol 2 mmol L⁻¹
4-aminoantripin (PAP) 0,8 mmol L⁻¹
glukozaoksidaza (GOD) ≥ 20 kU L⁻¹
peroksidaza (POD) ≥ 1,0 kU L⁻¹

Reagensi za određivanje laktata (L-Lactic Acid Assay Kit, Megazyme, Bray, Irska)

R1: pufer (pH 10)
D-glutamat
NaN₃
R2: NAD⁺/PVP
R3: D-glutamat transaminaza
R4: L-laktat dehidrogenaza

Standard za određivanje laktata

mliječna kiselina 0,15 mg mL⁻¹

Reagensi za određivanje amonijaka (L-Glutamine/Ammonia Assay Kit (Rapid), Megazyme, Bray, Irska)

R1: pufer (pH 8,0)
R2: NADPH
R3: glutamat-dehidrogenaza

Standard za određivanje amonijaka

amonijak 0,04 mg mL⁻¹

3.1.3. Uređaji i oprema

Amicon[®] Stirred Cell 50 ml, EMD Millipore Corporation, Billerica, SAD

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

Centrifuga, ECEN-205, MRC Lab, Israel

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

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

Digitalna magnetna miješalica Model 682/1

Erlenmeyerove tikvice za uzgoj od 125 mL, Corning, New York, 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 1220 Infinity LC, SAD

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Memmert, Njemačka

Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka

Komora za sterilni rad (*laminar flow cabinet*), Kambič, Slovenija

Laboratorijska vaga, Boeco, Njemačka

Laboratorijski pribor (pipete, laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, kivete, epruvete)

Liofilizator Alpha 1-2 LDplus, Martin Christ, Njemačka

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

MF-Millipore[®] Membranski Filteri, 0,22 µm veličina pora, Sigma-Aldrich GmbH, Švicarska

Neubaerova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright - Line, Njemačka

Ploče s jažicama, Corning, SAD

SevenCompact pH/Ion, Mettler-Toledo

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

Spektrofotometar Thermo Scientific Genesys 10 S UV/VIS, SAD

Stericup Quick Release-GP sistem za sterilnu vakuum filtraciju, 500 mL, 0,22 µm, Merck, SAD

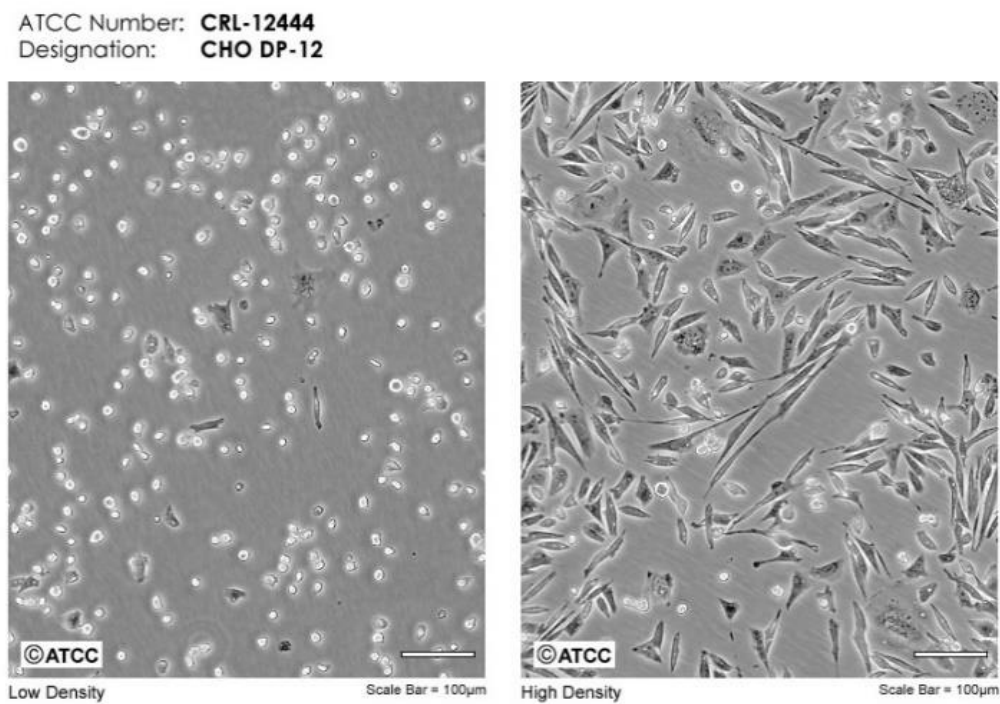
Sustav napajanja za elektroforezu, Consort, Turnhout, Belgija

Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

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

3.1.4. Stanična linija CHO DP-12

Za potrebe ovog rada, korištena je životinjska stanična linija CHO DP-12. CHO DP-12 je adherentna stanična linija fibroblasta ovarija kineskog hrčka adaptirana na suspenzijski rast u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Zavoda za biokemijsko inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnoškome fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Proizvodi rekombinantno humano protutijelo anti-IL8, koje je izotop IgG. Pohranjena je u banci stanica *American Type Cell Collection* (ATCC) Manassas, Virginia, SAD kao stanična linija ATCC®CRL 12444™ (slika 4).

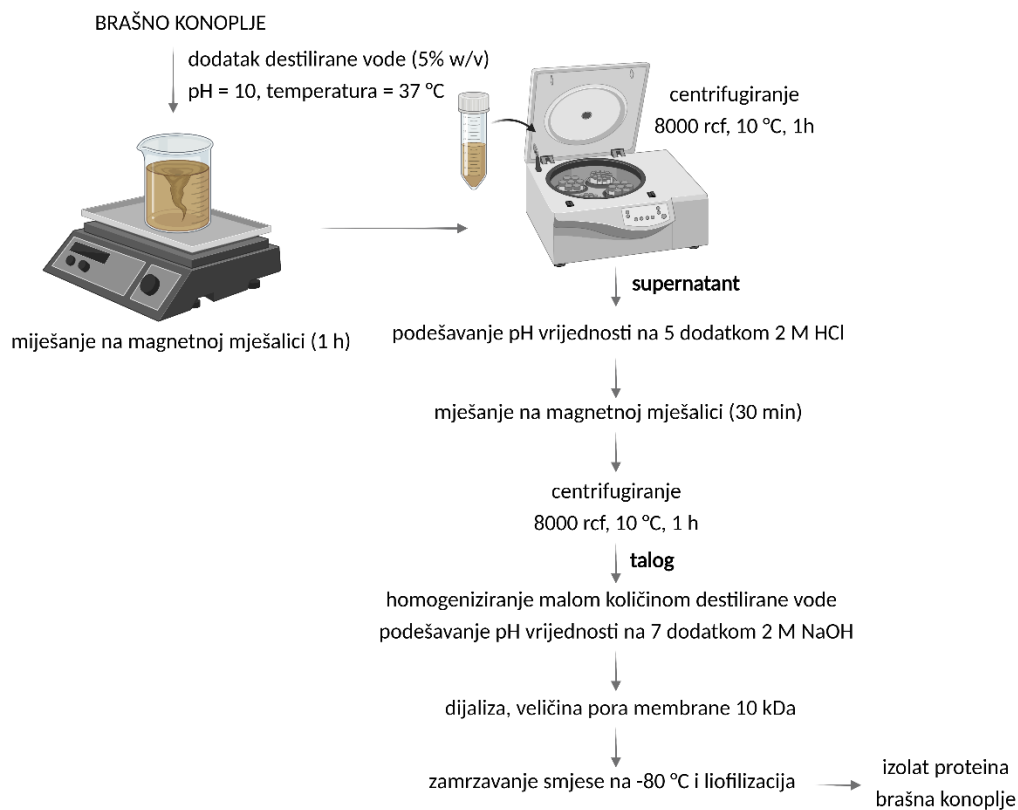


Slika 4. Stanična linija CHO DP-12 (ATCC, 2021)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Izolacija proteina konoplje

Izolacija proteina konoplje (slika 5) započela je otapanjem brašna uljne pogače konoplje u destiliranoj vodi (5 % w/v) pri temperaturi od 37 °C. Nakon podešavanja pH vrijednosti na 10 dodatkom 2 M NaOH smjesa se miješala na magnetnoj miješalici 1 sat. Za vrijeme trajanja ekstrakcije vrijednosti pH i temperature se održavaju stalnim. Smjesa je zatim centrifugirana na 8000 rcf tijekom 1 sata pri 10 °C. Talog koji je nastao je odbačen, a pH vrijednost supernatanta je podešena na 5 dodatkom 2 M HCl uz konstantno miješanje tijekom 30 minuta. Nakon toga smjesa je još jednom centrifugirana pod istim uvjetima. Supernatant je odbačen, a talog, koji je svjetlosmeđe boje, je dalje resuspendiran i homogeniziran s dodatkom male količine destilirane vode. pH vrijednost suspenzije je podešena na 7 pomoću 2 M NaOH te je takva suspenzija dijalizirana tijekom 24 sata na temperaturi od 4 °C. Veličina pora membrane za dijalizu bila je 10 kDa, a tijekom procesa je tri do četiri puta promijenjena voda u sustavu. Dijalizirana suspenzija je zamrznuta na -80 °C nakon čega je liofilizirana. Odvagani proteinski izolati su nakon liofilizacije pohranjeni i čuvani na 4 °C do korištenja.



Slika 5. Shematski prikaz izolacije proteina iz brašna uljne pogače konoplje (vlastita ilustracija izrađena pomoću programa BioRender.com)

3.2.2. Hidroliza proteinskog izolata konoplje

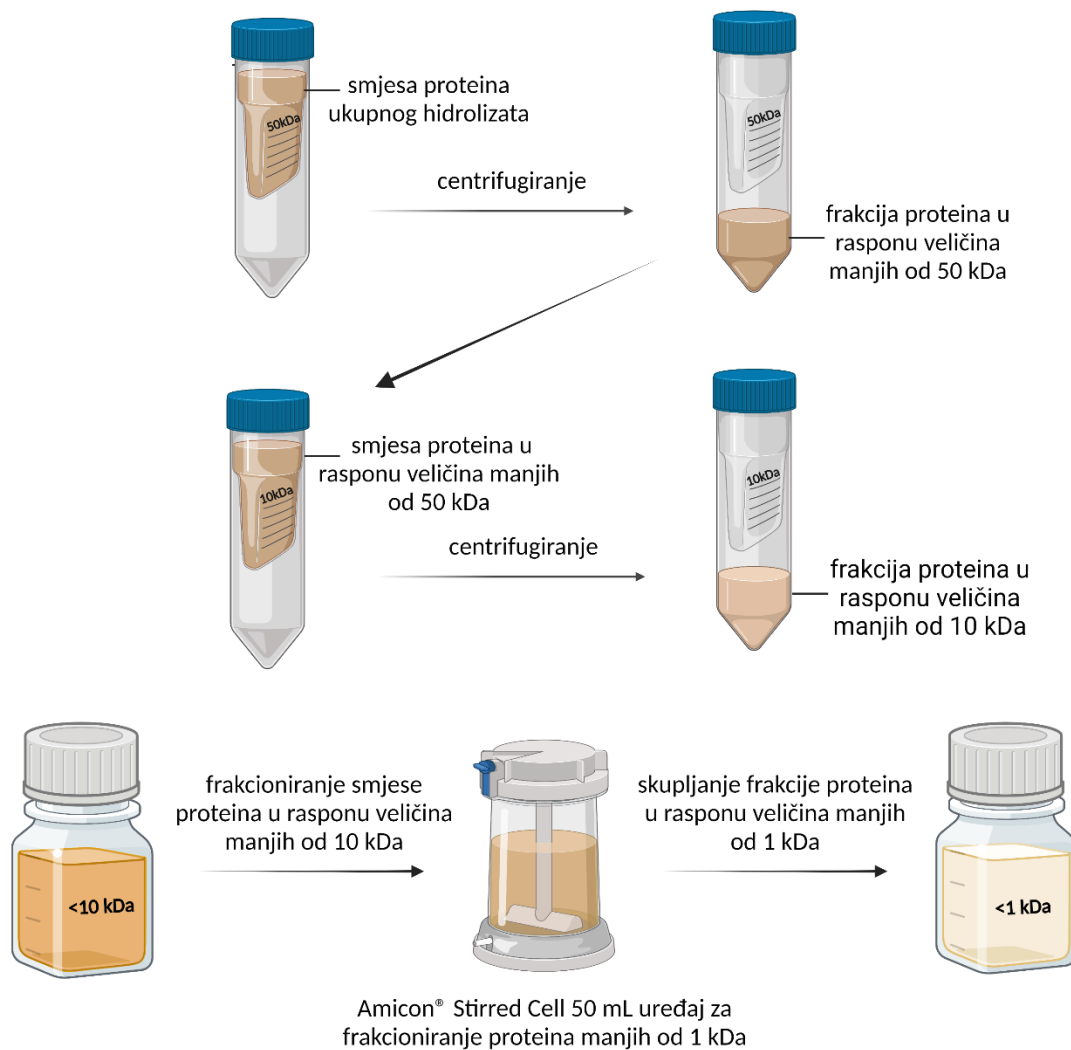
Za dobivanje proteinskih hidrolizata konoplje korištene su tri komercijalne mikrobnе endopeptidaze (*Alcalase*, *Neutrase* i *Protamex*) koje kataliziraju reakciju razgradnje proteina hidrolizom peptidne veze. Prije početka hidrolize potrebno je osigurati optimalne uvjete temperature i pH vrijednosti za djelovanje enzima. Kod alkalaze to je pH 8,5 i 55 °C, neutrase pH 7,0 i 55 °C i protamexa pH 7,7 i 50 °C.

Liofilizirani proteinski izolat konoplje otopljen je u destiliranoj vodi 5 % (w/v), a nakon podešavanja reakcijskih uvjeta, dodano je 10 % (w/v) enzima prema supstratu. Hidroliza je trajala 240 minuta, a neposredno prije dodatka enzima i za vrijeme trajanja hidrolize uzeti su uzorci u 0., 10., 30., 60., 120., 180. i 240. minuti za praćenje stupnja hidrolize. Nakon uzimanja uzorka enzimi su deaktivirani uranjanjem epruvete u kipuću vodu na 10 minuta. Kada je hidroliza završena i enzimi deaktivirani, smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu radi podešavanja pH vrijednosti na 7,4 dodatkom 1 M NaOH ili 1 M HCl. Smjesa je potom centrifugira na 7500 rcf tijekom 30 minuta kako bi se otklonili netopivi ostaci. Dobiveni supernatant je sterilno profiltriran kroz pore filtera veličine 0,22 µm i spremljen na -80 °C kako bi se spriječio rast kontaminanata i nakupljanje njihovih metabolita.

3.2.3. Frakcioniranje i ugušćivanje hidrolizata proteina konoplje

Nakon djelovanja proteolitičkih enzima dobivene su smjese hidrolizata proteina brašna konoplje. U takvim smjesama osim aminokiselina i oligopeptida različitih veličina i svojstava, mogu biti prisutne i neke druge molekule u tragovima. Kako bi se dobila što konzistentnija smjesa proteina koja će se dodavati hranjivom mediju za uzgoj, proteini ukupnog hidrolizata su frakcionirani pomoću membranskih filtera koji propuštaju samo proteine određenih veličina (slika 6). Dio proteina ukupnog hidrolizata je sačuvan, dok je preostali volumen frakcioniran na način da je smjesa najprije raspoređena u Amicon® tube za ultracentrifugiranje s filterima veličine 50 kDa te su hidrolizati centrifugirani na 4500 rcf u periodima od 15 minuta. Nakon što je dobiven maksimalni mogući volumen hidrolizata frakcije proteina u rasponu veličina manjih od 50 kDa, smjesa je dalje centrifugirana na jednak način koristeći filtere veličine 10 kDa. Dobiveni volumeni frakcija proteina u rasponu veličina manjih od 10 kDa su raspoređeni tako da je dio spremljen na -80 °C i sačuvan do uzgoja, a dio je korišten kako bi se pomoću Amicon®

Stirred Cell uređaja za filtraciju pod tlakom (4,5 bar) frakcionirali peptidi hidrolizata konoplje veličine manje od 1 kDa.



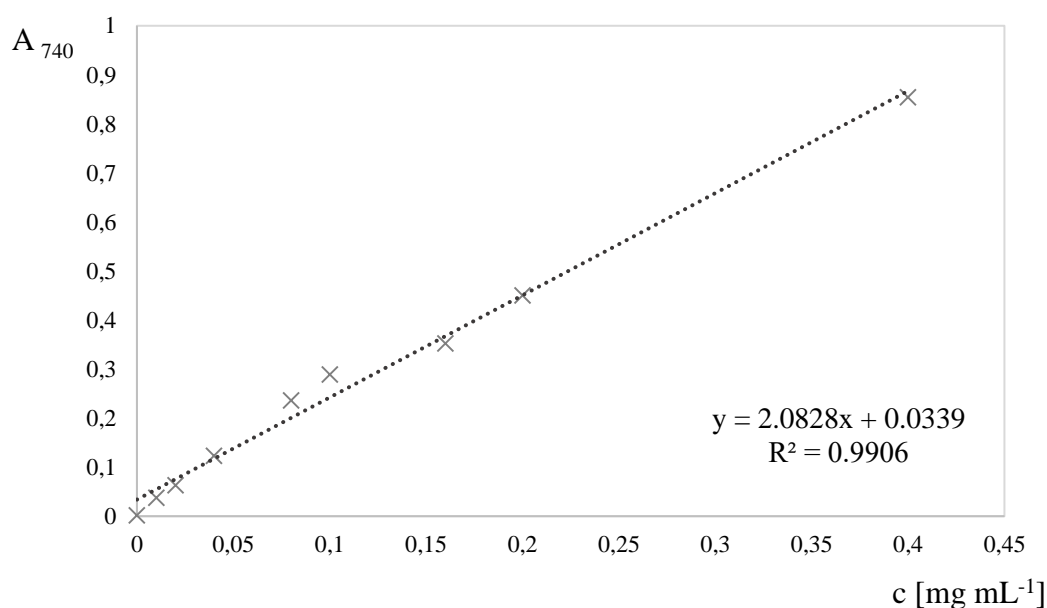
Slika 6. Shematski prikaz postupka frakcioniranja hidrolizata proteina brašna konoplje (vlastita ilustracija izrađena pomoću programa BioRender.com)

Nakon što je završeno frakcioniranje, dobivene frakcije proteina manjih od 10 kDa i 1 kDa su ugušćeni na koncentraciju od približno 70 g L^{-1} . Proteini su koncentrirani tako da su podjednaki volumeni frakcija raspodijeljeni u Petrijeve zdjelice nakon čega su smjese smrznute na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ i liofilizirane. Dobiveni liofilizati su homogenizirani u izračunatom volumenu vode visoke kvalitete kako bi se dobile željene koncentracije. Nakon što su liofilizati homogenizirani, uzeti su alikvoti za analizu, a ostatak je sterilno profiltriran i spremljen na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.4. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u

Određivanje koncentracije proteina hidrolizata u uzorku metodom po Lowry-u bazira se na kemijskoj reakciji redukcije Cu^{2+} s dušikovim atomima četiri peptidne veze u lužnatom mediju pri čemu nastaje kompleks između Cu^+ i proteina. Dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa, koji reagira s nastalim kompleksom i bočnim ograncima određenih aminokiselinama, nastaje najprije nestabilan kompleks koji se polako reducira pri čemu se razvija plavo-ljubičasto obojenje s apsorpcijskim maksimumom pri 740 nm. Intenzitet obojenja proporcionalan je koncentraciji proteina u rasponu koncentracija 5 – 2000 mg mL^{-1} .

Reakcija započinje u epruveti miješanjem 1 ml reagensa C s 200 μL razrijeđenog uzorka proteinskog hidrolizata konoplje s destiliranom vodom (1:500) nakon čega je smjesa inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je u epruvetu naglo dodano 100 μL smjese Folin-Ciocalteu reagensa i vode (1:2) te je smjesa ostavljena u mraku, na sobnoj temperaturi 45 do 55 minuta. Nakon toga očitane su vrijednost apsorbancije proteinskih hidrolizata i slijepe probe pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 740 nm. Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija izračunate su koncentracije proteina u pojedinim uzorcima pomoću jednadžbe pravca baždarnog dijagrama (slika 7). Baždarni dijagram dobiven je izradom niza standarda iz otopine BSA, $\gamma(\text{BSA}) = 1 \text{ mg mL}^{-1}$.



Slika 7. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u

3.2.5. Određivanje stupnja hidrolize

Stupanj hidrolize se definira kao omjer broja hidroliziranih peptidnih veza i ukupnog broja peptidnih veza prisutnih u uzorku proteina. Za potrebe ovog rada, korištenja je TCA metoda koje ne određuje izravno stupanj hidrolize nego udio topljivih peptida u 0,22 M otopini trikloroctene kiseline (TCA) prema formuli [1]. Metoda je bazirana na pretpostavci da će se u trikloroctenoj otopini samo pojedinačne aminokiseline i mali peptidi.

Alikvot od 100 μL proteinskog hidrolizata pomiješan je sa 100 μL 0,44 M TCA tako da nastane 0,22 M otopina TCA. Smjesa je inkubirana na sobnoj temperaturi pola sata nakon čega je centrifugirana na 10000 rcf tijekom 10 minuta. Talog u kojem se nalazi netopiva frakcija proteina je bačen, a supernatant je razrijeđen s destiliranom vodom (1:250) kako bi se odredila koncentracija topljivih proteina u 0,22 M otopini TCA i ukupnih proteina iz uzorka hidrolizata pomoću ranije opisane metode po Lowry-u.

$$DH(\%) = \frac{\text{koncentracija topivih proteina } [g L^{-1}] \text{ u } 0,22 \text{ M otopini TCA}}{\text{koncentracija ukupnih proteina } [g L^{-1}]} \cdot 100 \quad [1]$$

3.2.6. SDS-PAGE elektroforeza proteinskih hidrolizata konoplje

SDS-PAGE elektroforeza korištena je kako bi se provjerila uspješnost postupka hidrolize i frakcioniranja proteina konoplje razdvajanjem na gelu smjese uzoraka hidrolizata i njegovih frakcija veličina manjih od 10 kDa i 1 kDa. Na gel su stavljeni alikvoti uzeti u različitim vremenima trajanja hidrolize radi praćenja i vizualizacije tijekom hidrolize proteina konoplje pomoću mikrobnih proteaza. Uzorci volumena 12 μL su pomiješani s 3 μL Laemmli pufera za uzorke te su ostavljeni 3 minute u vodi zagrijanoj na 100 °C. Zatim je nanoseno 10 μL uzoraka i 5 μL smjese standardnih proteina u jažice komercijalnog *Bio-rad* gela. Elektroforeza se provodila u SDS-puferu za elektroforezu pri naponu od 180 V u trajanju od 50 minuta. Po završetku, gel je obojan otopinom *Coomassie blue* tijekom jednog sata kako bi se vizualizirali proteinski bendovi, a odbojavanje gelova je provedeno pomoću 7 %-tne otopine octene kiseline.

3.2.7. Uzgoj stanične linije CHO DP-12 u suspenziji

Uzgoj stanične linije CHO DP-12 započeo je odmrzavanjem ampule volumena 1 mL i koncentracije $1 \cdot 10^7$ stanica mL^{-1} iz radne banke stanica pohranjene na -80°C naglim uranjanjem ampule u vodenu kupelj zagrijanu na 37°C . Odmrznuta stanična suspenzija prebačena je u Erlenmeyerovu tikvicu za uzgoj volumena 125 mL u koju je prethodno dodan hranjivi medij tako da je ukupni radni volumen bio 21 mL s početnom staničnom koncentracijom $0,5 \cdot 10^6$ stanica mL^{-1} . Stanice su uzgajane na tresilici pri 160 rpm u inkubatoru na temperaturi od 37°C , u atmosferi s 5% CO_2 do koncentracije od $4 \cdot 10^6$ stanica mL^{-1} . Za uzgoj stanica korišten je kemijski definirani hranjivi medij *PowerCHO* kojemu su naknadno dodane određene komponente: rekombinantni humani inzulin (0,02 % v/v) za stimulaciju rasta i proliferacije stanica, metotreksat (0,01% v/v) za amplifikaciju stanica, *anti-clumping* reagens (0,25 % v/v) koji sprječava nastanak staničnih agregata, antibiotik (1 % v/v) te smjesa glutamina i alanina (4 % v/v) kao dodatni izvor energije stanicama. Prije početka šaržnog uzgoja stanice su pasažirane 4 puta kao što je prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Priprema stanica za inokulaciju

| | 1. pasažiranje | 2. pasažiranje | 3. pasažiranje | 4. pasažiranje |
|------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Vrijeme [dan] | 4 | 3 | 2 | 2 |
| Volumen [mL] | 21 | 22 | 21 | 2 · 20 |
| c_0 [st mL^{-1}] | $0,5 \cdot 10^6$ | $0,7 \cdot 10^6$ | $0,5 \cdot 10^6$ | $0,8 \cdot 10^6$ |

3.2.8. Uzgoj CHO DP-12 stanične linije u mediju s dodatkom proteina konoplje

U 18 Erlenmeyerovih tikvica za uzgoj volumena 125 mL dodano je 20 mL kemijski definiranog medija *PowerCHO* zajedno s već spomenutim dodacima te su nacijspljene stanice u koncentraciji $2,5 \cdot 10^5$ st mL^{-1} uzgojene na način koji je opisan u prethodnom poglavlju. Zatim su u pojedinačne tikvice za uzgoj dodavani redom ukupni hidrolizati i frakcije proteina konoplje, dobiveni djelovanjem tri endopeptidaze, u koncentracijama od $0,5 \text{ g L}^{-1}$ i 2 g L^{-1} . U kontrolnoj tikvici stanice su uzgajane u mediju bez dodatka proteinskog hidrolizata. Tikvice za uzgoj su stavljene na tresilicu pri 160 rpm u inkubator na temperaturi od 37°C i atmosferu 5 % CO_2 , a uzgoj je trajao do pada vijabilnosti kulture ispod 70 %. Svakodnevno je sterilno uziman alikvot medija sa stanicama kako bi se pratila dinamika rasta kulture te kako bi se sačuvao

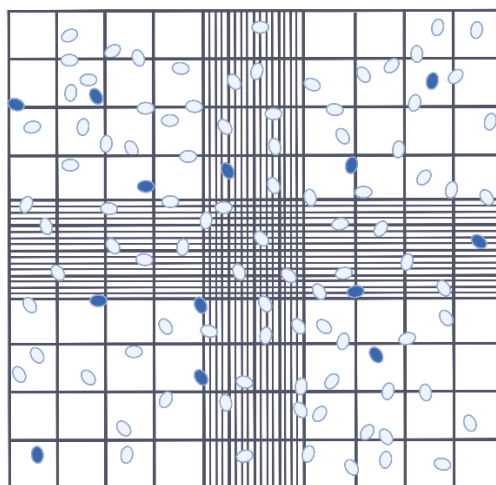
supernatant za daljnje postupke analize metabolizma i produktivnosti. Alikvot medija sa stanicama je centrifugiran na 25000 rpm tijekom 4 minute kako bi se uklonio stanični pelet, a supernatant je spremljen na -20 °C.

3.2.9. Određivanje broja stanica i vijabilnosti kulture

Dinamika rasta kulture praćena je određivanjem koncentracije stanica brojanjem pod svjetlosnim mikroskopom pomoću Neubauerove komorice uz dodatak boje tripan-plavo. Boja se dodaje kako bi se pratila vijabilnost kulture. 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. Stanična suspenzija volumena 10 μL pomiješana je s 10 μL boje nakon čega je 10 μL tako pripremljenog uzorka nanoseno na Neubauerovu komoricu. Stanice se pod svjetlosnim mikroskopom broje u 4 velika kvadrata smještena u kutovima komorice i podijeljena na 16 manjih kvadrata (slika 8). Raspon koncentracija stanica za brojanje pomoću Neubauerove komorice kreće se između $0,25 \cdot 10^6$ st mL^{-1} i $2,5 \cdot 10^6$ st mL^{-1} te su sukladno tome uzorci razrjeđivani s destiliranom vodom prije brojanja kako bi se izbjegle pogreške. Koncentracija živih stanica i vijabilnost kulture računaju se pomoću formula:

$$\text{broj stanica } mL^{-1} = \text{broj stanica u sva 4 kvadrata} \cdot 5000 \cdot \text{faktor rarjeđenja} \quad [2]$$

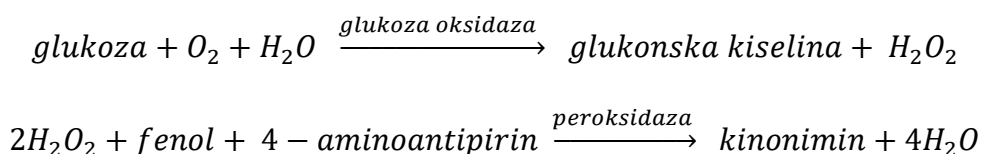
$$\text{vijabilnost (\%)} = \frac{\text{ukupan broj stanica stanica } mL^{-1}}{\text{broj mrtvih stanica } mL^{-1}} \cdot 100 \quad [3]$$



Slika 8. Shematski prikaz brojanja stanica pod svjetlosnim mikroskopom pomoću Neubauerove komorice (vlastita ilustracija izrađena pomoću programa BioRender.com)

3.2.10. 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. Oksidacijom glukoze iz uzorka pomoću enzima glukoza-oksidadaze nastaje glukonska kiselina i vodikov peroksid. Enzim peroksidaza će dalje katalizirati reakciju između nastalog vodikovog peroksida, fenola i 4-aminoantipirina kako bi nastao produkt koji daje crveno obojenje proporcionalno koncentraciji glukoze u uzorku medija:

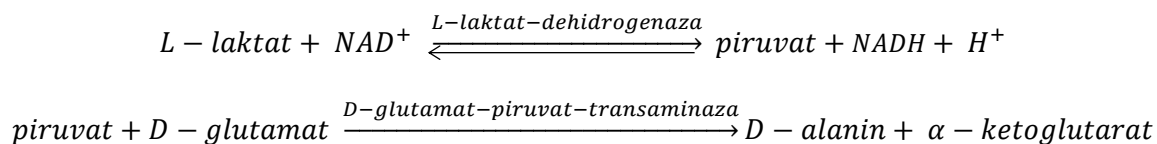


Uzorci za mjerenje su pripremljeni tako da je volumen od 10 μL uzorka hranjivog medija ili standarda glukoze koncentracije 5,5 mM otpipetiran i pomiješan s 1 mL reagensa te je smjesa potom inkubirana na temperaturi od 37 $^\circ\text{C}$ tijekom 10 minuta. Pripremljena je i slijepa proba koja je umjesto uzorka sadržavala isti volumen destilirane vode. Nakon što se razvilo obojenje, izmjerena je apsorbancija pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 500 nm, a iz dobivenih vrijednosti određena je koncentracija glukoze prema formuli:

$$\text{koncentracija glukoze } \text{mmol L}^{-1} = \frac{A_{\text{uzorak}}}{A_{\text{standard}}} \cdot c_{\text{standard}} \quad [4]$$

3.2.11. Određivanje koncentracije laktata u hranjivom mediju

Koncentracija laktata u hranjivom mediju određena je pomoću komercijalnog testa koji se temelji na principu dvije enzimске reakcije pretvorbe laktata. Enzim laktat-dehidrogenaza prvo katalizira reverzibilnu reakciju oksidacije laktata do piruvata uz redukciju koenzima NAD^+ u NADH . NADH je proporcionalan je količini laktata u uzorku, a određuje se tako da se mjeri pomak apsorpcijskog maksimuma na valnoj duljini od 340 nm. Međutim, ravnoteža kemijske reakcije laktat-dehidrogenaze pomaknuta je prema nastanku laktata i NAD^+ zbog čega se u reakcijsku smjesu dodaje glutamat u suvišku kako bi se osigurala potrošnja piruvata pomoću enzima glutamat-piruvat-transaminaze i time spriječila reverzibilna reakcija redukcije piruvata u laktat:



Uzorci su pripremljeni prema uputama proizvođača tako da je u 375 μL destilirane vode temperature 25 $^{\circ}\text{C}$ dodano 25 μL uzorka hranjivog medija ili standardne otopine mliječne kiseline, 125 μL smjese pufera pH 10 i D-glutamata, 25 μL otopine NAD^+/PVP i 5 μL enzima glutamat-piruvat-transaminaze. U otopinu slijepe probe umjesto uzorka dodan je isti volumen destilirane vode. Reakcijska smjesa je inkubirana na sobnoj temperaturi tijekom 3 minute nakon čega je izmjerena apsorbancija (A_1) pri valnoj duljini od 350 nm na spektrofotometru. Zatim je u smjesu dodano 5 μL enzima L-laktat-dehidrogenaze kako bi započela reakcija pretvorbe laktata u piruvat te je nakon 10 minuta izmjeren pomak vrijednosti apsorbancije (A_2) pri istoj valnoj duljini. Koncentracija laktat računa se prema formuli:

$$c_{\text{laktat}} [\text{mmol L}^{-1}] = \frac{V \cdot M}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta A \cdot 11.1 \quad [5]$$

gdje je:

V – ukupni volumen [mL]

M – molarna masa mliječne kiseline [g mol^{-1}]

ε – molarni apsorpcijski koeficijent NADH pri 340 nm [$6300 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

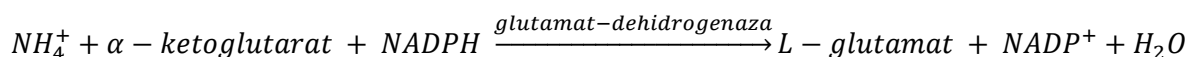
d – debljina kivete [cm]

v – volumen uzorka [mL]

$\Delta A = A_2 - A_1$

3.2.12. Određivanje koncentracije amonijaka u hranjivom mediju

Koncentracija amonijaka u hranjivom mediju određena je pomoću komercijalnog testa koji se bazira na enzimskoj reakciji pretvorbe NH_4^+ iona i α -ketoglutarata pomoću glutamat-dehidrogenaze uz oksidaciju koenzima NADPH do NADP^+ :



Koenzim u reduciranom obliku u stehiometrijskom je omjeru s amonijakom iz uzorka hranjivog medija. Mjerenjem pada apsorbancije na spektrofotometru pri valnoj duljini od 340 nm uslijed potrošnje NADPH određuje se koncentracija amonijaka prema formuli:

$$c_{\text{amonijak}} [\text{mmol L}^{-1}] = \frac{V \cdot M}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta A \cdot 58.72 \quad [6]$$

gdje je:

V – ukupni volumen [mL]

M – molarna masa amonijaka [g mol⁻¹]

ε – molarni apsorpcijski koeficijent NADPH pri 340 nm [6300 L mol⁻¹ cm⁻¹]

d – debljina kivete [cm]

v – volumen uzorka [mL]

$$\Delta A = (A_1 - A_2)_{\text{uzorak}} - (A_1 - A_2)_{\text{slijepa proba}}$$

Uzorci su pripremljeni prema uputama proizvođača i to tako da je u 430 μL destilirane vode dodano 25 μL uzorka, 75 μL pufera pH 8,0 te 50 μL otopine koenzima NADPH. Reakcijska smjesa inkubirana je na sobnoj temperaturi tijekom 4 minute nakon čeka je na spektrofotometri izmjerena apsorbancija (A₁). Zatim je u smjesu dodan 5 μL enzima glutamat dehidrogenaze te je nakon 5 minute izmjeren pad vrijednosti apsorbancije (A₂). Isti postupak napravljen je i za slijepu probu u koju je umjesto uzorka hranjivog medija dodano 25 μL destilirane vode.

3.2.13. Određivanje koncentracije protutijela IgG

Koncentracija monoklonskog protutijela IgG određena je pomoću uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti - HPLC. Molekule IgG razdvojene su od ostatka sadržaja hranjivog medija na Protein A koloni prema principu afinitetne kromatografije. Protein A je imobilizirani ligand koji može reverzibilno vezati proteine, posebice imunoglobuline G koji se preko Fc regije teškog lanca vežu na jednu od pet imunoglobulin-vezujućih domena liganda. Prije stavljanja na kolonu uzorci supernatanta hranjivog medija filtrirani su pomoću filtera pora 0,2 μm kako bi se uklonili stanični ostaci. Na kolonu je injektirano 50 μL uzorka pri protoku od 2,5 mL min⁻¹ i temperaturi 25 °C. Za analizu jednog uzorka potrebno je 2,5 minute kao što je prikazano u tablici 3. Razdvajanje je započelo vezanjem molekula protutijela iz uzorka na

kolonu - stacionarna faza. Kao mobilne faze korišteni su 50 mM natrij-fosfatni pufer pH 7,4 za vezanje i glicinski pufer pH 2,5 za eluciju. Do elucije dolazi promjenom pH mobilne faze uslijed čega se kidaju interakcije između liganda i ciljane molekule. Razdvojeno protutijelo detektirano je pomoću UV/VIS detektora HPLC uređaja pri valnoj duljini od 280 nm. Pikovi kromatograma su analizirani te je kvantifikacija provedena pomoću jednadžbe pravca baždarnog dijagrama.

Tablica 3. Parametri razdvajanja protutijela IgG pomoću Protein A kolone djelovanjem mobilnih faza A (pufer za vezanje) i B (pufer za eluciju)

| Vrijeme [min] | A [%] | B [%] | Protok [mL min ⁻¹] | Max. tlak [bar] |
|---------------|-------|-------|--------------------------------|-----------------|
| 0,00 | 100,0 | 0,0 | 2,500 | 170,00 |
| 0,40 | 100,0 | 0,0 | 2,500 | 170,00 |
| 0,41 | 0,0 | 100,0 | 2,500 | 170,00 |
| 1,21 | 0,0 | 100,0 | 2,500 | 170,00 |
| 1,22 | 100,0 | 0,0 | 2,500 | 170,00 |
| 2,50 | 100,0 | 0,0 | 2,500 | 170,00 |

3.2.14. Izračun procesnih parametara rasta stanične linije CHO-DP12

Najveća specifična brzina rasta stanica (μ_{max})

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

$$\mu_{max} = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt} \quad [7]$$

gdje je:

dN – povećanje broja stanica

dt – vremenski interval

N – broj stanica

Integracijom gornje jednadžbe dobiva se izraz za jednadžbu pravca koja se dobije tako da se tijekom uzgoja određuje broj stanica u kulturi u ovisnosti o vremenu:

$$\ln N = \ln N_0 + \mu(t - t_0) \quad [8]$$

Nagib pravca, tj. koeficijent smjera predstavlja najveću specifičnu brzinu rasta stanica:

$$\mu_{max} = \frac{\ln N - \ln N_0}{\Delta t} \quad [9]$$

gdje je:

N – broj stanica u 1 mL na kraju eksponencijalne faze

N_0 – broj stanica u 1 mL na početku eksponencijalne faze

Δt – trajanje eksponencijalne faze (dan)

Specifična produktivnost (Q_p) i volumetrijska produktivnost (V_p)

$$Q_p = \frac{c}{\Delta t \cdot \Delta N} \quad [10]$$

$$V_p = \frac{c}{t} \quad [11]$$

c – koncentracija protutijela (mg IgG L⁻¹)

Δt – vremenski interval trajanja eksponencijalne faze (dan)

ΔN – broj stanica na kraju i na početku eksponencijalne faze (stanica mL⁻¹)

t – vrijeme trajanja uzgoja (dan)

3.2.15. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (\bar{x}) uzoraka u skupni:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [12]$$

s pripadajućim standardnim devijacijama (s):

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad [13]$$

gdje n predstavlja ukupan broj uzoraka u skupini, a x_i pojedinačnu vrijednost uzorka.

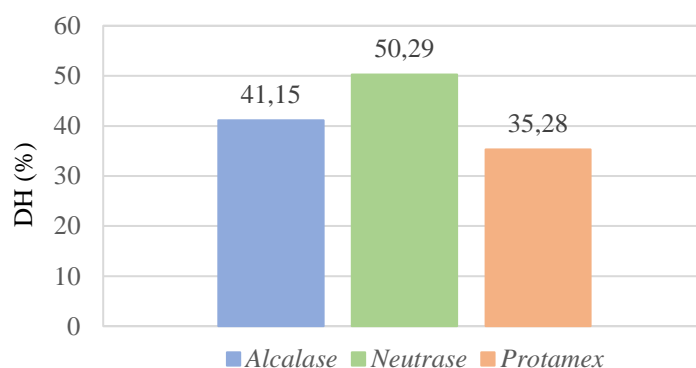
4. REZULTATI I RASPRAVA

Monoklonska protutijela su jedan od najčešćih visokovrijednih proizvoda tehnologije životinjskih stanica. Kao ekspresijski sustav za njihovu proizvodnju uglavnom se koristi CHO stanična linija. Osim što se sve češće koriste u terapijske svrhe, monoklonska protutijela svoju primjenu imaju i u analitici, dijagnostici i pročišćavanju proizvoda. Biotehnoška proizvodnja monoklonskih protutijela u industrijskom mjerilu podrazumijeva visoku produktivnost i proliferaciju stanične linije zbog čega je vrlo važno osigurati optimalne uvjete proizvodnog procesa. Najvažniju ulogu u tome ima formulacija hranjivog medija koji se koristi za uzgoj CHO stanica. Kako je upotreba seruma životinjskog podrijetla nepoželjna zbog brojnih nedostataka koji nisu u skladu sa zahtjevima dobre proizvođačke prakse, potrebno je pronaći alternativne načine suplementacije hranjivog medija, a da se ne narušava kvaliteta i produktivnost procesa. Uz učinkovitost proizvodnje važna je ekonomska održivost jer cijena konačnog proizvoda ovisi o visini troškova cjelokupnog procesa proizvodnje. Kao alternativa serumu mogu poslužiti prerađevine biljnog podrijetla posebice otpadni biljni materijali koji, ne samo da su cjenovno pristupačniji, nego njihovo korištenje pridonosi trendovima održive proizvodnje. Primjer toga su nusproizvodi poput pogača ili brašna koja zaostaju nakon ekstrakcija ulja iz sjemenki biljaka uljarica. Zbog visoke koncentracije proteina koje sadrže idealan su kandidat za potencijalni dodatak SF mediju za uzgoj. Ranija istraživanja su pokazala da suplementacija proteinima biljnog podrijetla potiče rast stanica u SF mediju osiguravanjem potrebnih nutrijenata. Osim toga pozitivno utječu i na produktivnost CHO stanične linije te se sve više koriste u optimizaciji medija za uzgoj kultura životinjskih stanica (Babcock i sur., 2010; Chabanon i sur., 2008; Chun i sur., 2007; Frages-Haddani i sur., 2006). Cilj ovog rada bio je ispitati djelovanje proteina izoliranih iz uljne pogače sjemenki industrijske konoplje na rast i produktivnost CHO DP-12 stanične linije koja proizvodi rekombinantno humano protutijelo. Stoga je za izolaciju proteina korišteno brašno dobiveno mljevenjem i prosijavanjem uljne pogače konoplje. Izolirani proteini su podvrgnuti enzimskoj hidrolizi korištenjem tri različite mikrobne proteaze. Dobiveni proteinski hidrolizati sadržavali su peptide koji se razlikuju po veličini, biološkoj aktivnosti i aminokiselinskim sekvencama. S obzirom na to da je od ranije poznato kako proteinski hidrolizati soje manjih molekulskih masa pozitivno djeluju na rast CHO stanica (Chun i sur., 2007) te da peptidi soje i pamuka u rasponu veličina između 1 i 10 kDa povećavaju vrijednosti specifične produktivnosti (Burteau i sur., 2003) kada su dodani mediju, provedeno je frakcioniranje hidrolizata konoplje. Frakcije manje od 1 i 10 kDa kao i nefrakcionirani hidrolizati korišteni su kao dodatak SF mediju. Osim toga,

frakcioniranje je poslužilo i kao dodatni korak pročišćavanja proteina kako bi se dobile smjese hidrolizata ujednačenijeg sastava uklanjanjem komponenata nedefinirane biološke aktivnosti koje mogu negativno djelovati na stanice prilikom uzgoja (Spearman i sur., 2014). Zatim je proveden šaržni uzgoj u laboratorijskom mjerilu te su praćeni parametri rasta i produktivnosti stanica kako bi se u konačnosti evaluirao utjecaj dodatka proteinskih hidrolizata konoplje mediju bez seruma.

4.1. ODREĐIVANJE STUPNJA HIDROLIZE I KARAKTERIZACIJA PROTEINSKOG HIDROLIZATA BRAŠNA KONOPLJE SDS-PAGE ELEKTROFOREZOM

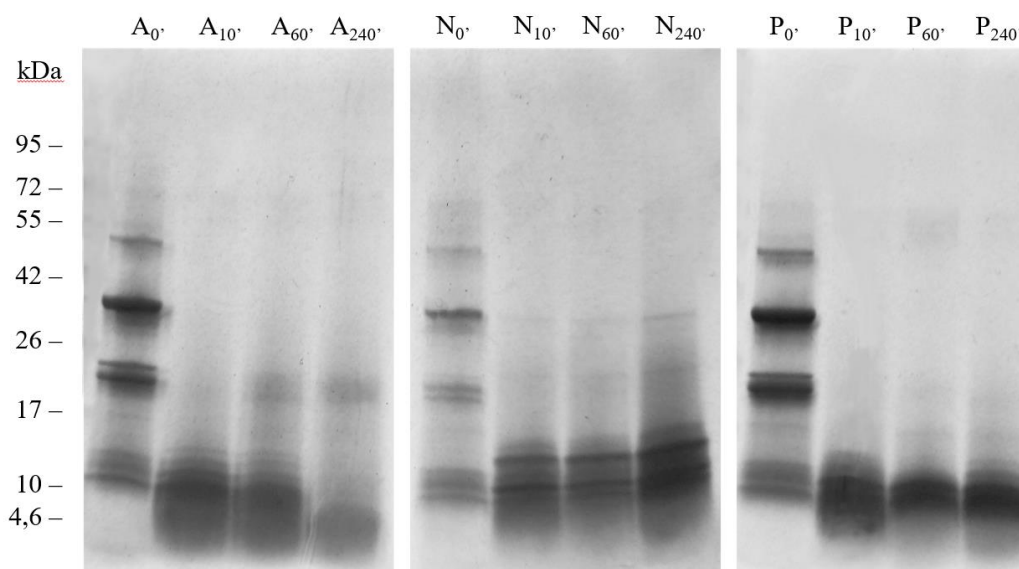
Nakon što je iz 70 g brašna industrijske konoplje dobiveno 23,92 g proteinskog izolata provedena je hidroliza pomoću tri proteolitička enzima *Alcalase*, *Neutrased* i *Protamex*. Vrijeme provođenja hidrolize bilo je 240 minuta, a stupanj hidrolize određen je za 0' i 240' uzorak hidrolizata za svaki od tri korištena enzima. Stupanj hidrolize ovdje zapravo predstavlja postotni udio topljivih proteina u otopini 10 %-tne trikloroctene kiseline u odnosu na ukupnu količinu proteina u hidrolizatu. Rezultati određivanja stupnja hidrolize su prikazani grafički na slici 9, a vrijednosti su dobivene prema izrazu [1].



Slika 9. Stupanj hidrolize (DH) proteina izoliranih iz uljane pogače konoplje pomoću proteolitičkih enzima *Alcalase*, *Neutrased* i *Protamex*

Specifičnost enzima prema supstratu, reakcijski uvjeti i duljina trajanja reakcije najvažniji su čimbenici koji utječu na ishod hidrolize. Ovisno o tome razlikovat će se sastav dobivenih hidrolizata. Prilikom provedbe hidrolize podešeni su uvjeti optimalni za djelovanje svakog pojedinog enzima te je svaki od njih dodan u jednakoj količini s obzirom na supstrat. Iz prikaza na slici 9 je vidljivo kako se djelovanjem enzima *Neutrased* na proteinski izolat postiže

najveći stupanj hidrolize od 50,29 % u periodu od 240 minuta. Nešto slabije proteolitičko djelovanje na supstrat pokazao je enzim *Alcalase* kod kojeg je stupanj hidrolize 41,15 %, dok je najslabije djelovao *Protamex* sa stupnjem hidrolize od samo 35,28 %. Dobiveni rezultati nisu u skladu s prijašnje dobivenim vrijednostima stupnja hidrolize prema kojima najveće proteolitičko djelovanje pokazuje alkalaza, zatim protamex, pa neutraza (Tang i sur., 2009). Međutim, kako je korištena metoda određivanja stupnja hidrolize neizravna, proteolitičko djelovanje praćeno je i korištenjem SDS PAGE elektroforeze te se dobiveni rezultati na gelu podudaraju s vrijednostima stupnja hidrolize dobivenih u prijašnjim eksperimentima.



Slika 10. Gelovi proteinske elektroforeze (SDS-PAGE) s prikazom razgradnje proteina pomoću proteaza *Alcalase* (A), *Neutrase* (N) i *Protamex* (P) tijekom trajanja hidrolize u 0., 10., 60. i 240. minuti

SDS-PAGE elektroforezom na gelu su razdvojeni hidrolizati iz uzoraka uzetih u različitim vremenima trajanja hidrolize. Slika 10 prikazuje razliku u proteinskim profilima izolata (0' - prije dodatka enzima) i hidrolizata konoplje (10', 60', 240' – trajanje hidrolize). Smanjenje broja proteinskih bendova s vremenom dokaz je proteolitičkog djelovanje enzima. U sva tri eksperimenta je većina proteina pocijepana na veličine od oko 10 kDa što bi značilo da su uspješno dobiveni proteini manjih molekulskih masa. Za vrijeme i nakon hidrolize su kod sva tri enzima ostali vidljivi bendovi veličine između 15 i 18 kDa, što bi mogle biti komponente albumina, dok su kod alkalaze i neutraze vidljivi i bendovi od 20 kDa koji po veličini odgovaraju bazičnoj podjedinici proteina edestina (Potin i sur., 2019). U uzorcima izolata (0') bendovi koji odgovaraju standardima veličine 35 i 20 kDa najvjerojatnije predstavljaju kiselu i baznu podjedinicu proteina edestina, a bendovi manji od 18 kDa su vjerojatno peptidne

komponente albumina (Malomo i Aluko, 2015). Gledajući profil proteina na gelu u 240', čini se kako je enzim alkalaza najviše pocijepao proteine konoplje jer je intenzitet bendova tu najmanji, što bi značilo da je ostalo manje nepocijepanih proteina. Nešto slabije djelovanje pokazao je protamex kod kojega je intenzitet bendova izraženiji jer je ostalo više nepocijepanih proteina veličine oko 10 kDa. Neutraza je pokazala najslabije proteolitičko djelovanje jer je najviše bendova proteina različitih veličina ostalo vidljivo na gelu nakon završetka hidrolize.

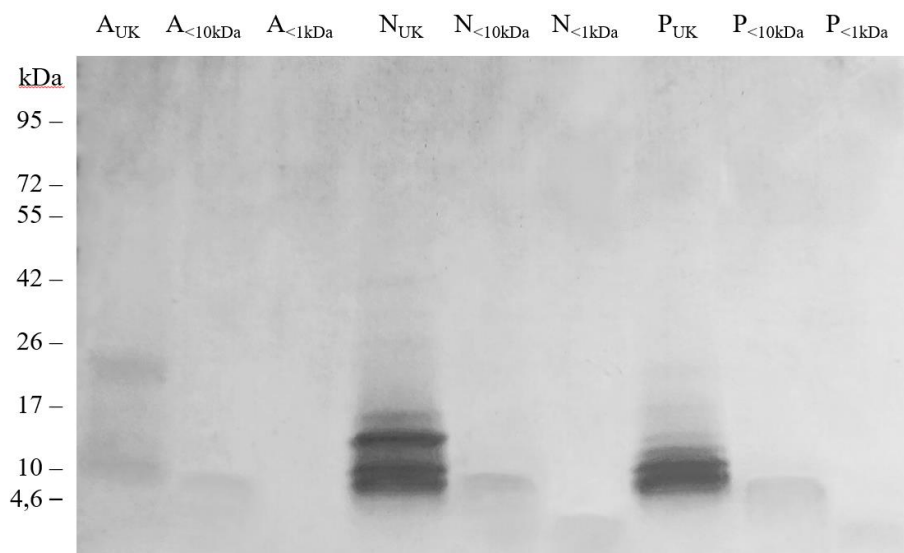
4.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA BRAŠNA KONOPLJE METODOM PO LOWRY-U IZ UZORAKA UKUPNIH HIDROLIZATA I FRAKCIJA

Smjesi ukupnih hidrolizata proteina brašna konoplje dobivenih djelovanjem proteolitičkih enzima, kao i frakcijama proteina manjih od 10 i 1 kDa su nakon sterilne filtracije, a prije dodatka hranjivom mediju za uzgoj, određene koncentracije proteina metodom po Lowry-ju kako je opisano u poglavlju 3.2.4. Izmjerene koncentracije kao i dobiveni volumeni ukupnog hidrolizata i frakcija prikazani su tablici 4A. Očekivano, koncentracije proteina ukupnih hidrolizata su u sva tri slučaja veće od koncentracija proteinskih frakcija jer se u svakom koraku frakcioniranja odbacuje dio smjese proteina koji zaostaje na membrani filtera. S obzirom na to da se dobivene koncentracije proteina međusobno razlikuju provedeno je ugušćivanje ili koncentriranje proteinskih frakcija kako bi se dobile koncentracije slične vrijednostima koncentracija proteina ukupnih hidrolizata (tablica 4B). Na taj način se sprječava razrjeđivanje hranjivog medija za uzgoj, jer će se dodavanjem manje količine hidrolizata radni volumeni u tikvicama za uzgoj biti konzistentniji za svaki pojedini eksperiment.

Tablica 4. Koncentracije proteina ukupnih hidrolizata i njegovih frakcija prije (A) i nakon ugušćivanja (B)

| A | ALKALAZA | | NEUTRAZA | | PROTAMEX | |
|------------------|---|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|
| | Koncentracija [mg mL ⁻¹] | Volumen [mL] | Koncentracija [mg mL ⁻¹] | Volumen [mL] | Koncentracija [mg mL ⁻¹] | Volumen [mL] |
| ukupni | 67,88 | 115 | 49,16 | 80 | 53,72 | 70 |
| frakcija <10 kDa | 56,08 | 22 | 17,55 | 23 | 32,11 | 21 |
| frakcija <1 kDa | 37,03 | 20 | 9,87 | 21 | 23,19 | 19 |

| B HIDROLIZATI | ALKALAZA | | NEUTRAZA | | PROTAMEX | |
|------------------|---|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|
| | Koncentracija [mg mL ⁻¹] | Volumen [mL] | Koncentracija [mg mL ⁻¹] | Volumen [mL] | Koncentracija [mg mL ⁻¹] | Volumen [mL] |
| frakcija <10 kDa | 69,32 | 15 | 67,32 | 4,5 | 64,28 | 8,2 |
| frakcija <1 kDa | 67,24 | 9,2 | 58,20 | 2,5 | 64,76 | 5,2 |



Slika 10. Uzorci hidrolizata i frakcija proteina konoplje dobivenih pomoću proteaza *Alcalase* (A), *Neutralse* (N) i *Protamex* (P) prikazani na gelu nakon proteinske elektroforeze (SDS-PAGE)

Uspješnost frakcioniranja provjerena je na gelu pomoću proteinske elektroforeze (SDS-PAGE). Na slici 11 vidljivo je kako najviše bendova imaju uzorci proteina ukupnih hidrolizata što je u skladu s očekivanjima. Proteinski bendovi slabijeg intenziteta vidljivi su između bendova koji odgovaraju veličinama standarda od 10 i 4,6 kDa i predstavljaju frakciju proteina manjih od 10 kDa. Frakcije proteina manjih od 1 kDa se ne bi trebale vidjeti na gelu što je dobiveno kod proteina hidroliziranih alkalazom koja je pokazala najbolje proteolitičko djelovanje.

4.3. UTJECAJ PROTEINSKOG HIDROLIZATA I NJегоVIH PEPTIDNIH FRAKCIJA NA RAST, PRODUKTIVNOST I METABOLIZAM CHO DP-12 STANICA

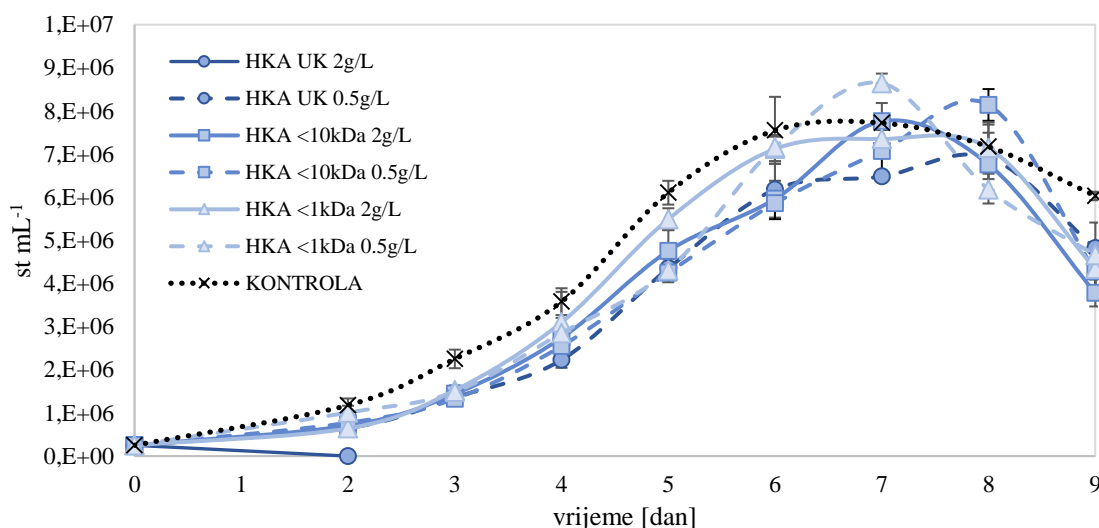
Utjecaj djelovanja hidrolizata proteina izoliranih iz brašna konoplje na rast, produktivnost i metabolizam stanične linije CHO DP-12 ispitan je tako da su u SF hranjivi

medij dodani proteini ukupnih hidrolizata i frakcija proteina dobiveni hidrolizom pomoću komercijalnih mikrobnih proteaza *Alcalase*, *Neutralse* i *Protamex* u dvije različite koncentracije (2 g L^{-1} i $0,5 \text{ g L}^{-1}$). Nacijepljena je početna koncentracija od $0,25 \cdot 10^6 \text{ st mL}^{-1}$ te su tijekom 9 dana trajanja uzgoja praćeni dinamika rasta, produktivnost i promjene u metabolizmu odabrane stanične linije. Kao kontrola uzgajane su stanice bez dodatka proteinskih hidrolizata konoplje u SF mediju. Dinamika rasta prikazana je pomoću krivulje rasta koja pokazuje ovisnost broja CHO DP-12 stanica o vremenu trajanja uzgoja te pomoću vrijednosti najveće specifične brzine rasta. Produktivnost je određena mjerenjem koncentracije izotopa protutijela IgG kojeg proizvodi korištena stanična linija. Koncentracija protutijela izmjerena je iz uzorka zadnjeg dana uzgoja, a rezultati su prikazani pomoću relativne specifične i volumetrijske produktivnosti u odnosu na kontrolu. Promjene u metabolizmu praćene su mjerenjem potrošnje glukoze kao glavnog izvora energije te mjerenjem nastanka dva najznačajnija toksična nusprodukta, laktata i amonijaka.

4.3.1. Utjecaj proteinskih hidrolizata enzima *Alcalase* na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije

Krivulja rasta na slici 12 prikazuje djelovanje hidrolizata proteina konoplje dobivenih pomoću alkalaze na rast CHO DP-12 stanica. Iz krivulje je vidljivo da dodatak od 2 g L^{-1} UK HKA hranjivom mediju ima nepovoljan učinak jer su stanice već nakon dva dana uzgoja prestale rasti. Profil krivulje rasta uglavnom prati ponašanje stanica u kontroli – faza prilagodbe (lag) trajala je do 2. dana uzgoja, nakon čega stanice ulaze u eksponencijalnu (log) fazu koja je trajala do 7. dana, a zatim im polako opada vijabilnost i ulaze u fazu odumiranja. Osim u slučaju uzgoja u mediju s dodatkom $0,5 \text{ g L}^{-1}$ frakcije $<10 \text{ kDa}$ HKA gdje su stanice rasle do 8. dana i nakon toga počele odumirati. Iz vrijednosti najvećih specifičnih brzina rasta prikazanih u tablici 5 vidljivo je kako su najsporije rasle stanice s dodatkom od $0,5 \text{ g L}^{-1}$ UK HKA. Zbog toga bi se moglo zaključiti da manja koncentracija nefrakcioniranih hidrolizata konoplje inhibira stanični rast, dok je 4 puta veća koncentracija dovoljna da potpuno zaustavi rast stanica u vrlo kratkom vremenu. Djelovanje hidrolizata dobivenih alkalazom je i u prijašnjim istraživanjima pokazalo negativan učinak na stanični rast (Logarušić i sur., 2021). Najbrži rast, nakon kontrole, pokazuju stanice uzgajane u mediju s $0,5 \text{ g L}^{-1}$ frakcije $<1 \text{ kDa}$ HKA te je u tom uzorku dosegnut i najveći broj stanica od čak $8,64 \cdot 10^6 \text{ st mL}^{-1}$. S obzirom na to da svi ostali dodaci mediju pokazuju sporiji rast od stanica uzgajanih bez dodataka u kontroli, što je vidljivo i iz krivulje rasta, može se

zaključiti da ukupni hidrolizat proteina konoplje kao i proteinske frakcije dobivene enzimom *Alcalase* dodane u odabranim koncentracijama ne utječu na poboljšanje brzine rasta CHO DP-12 stanične linije.



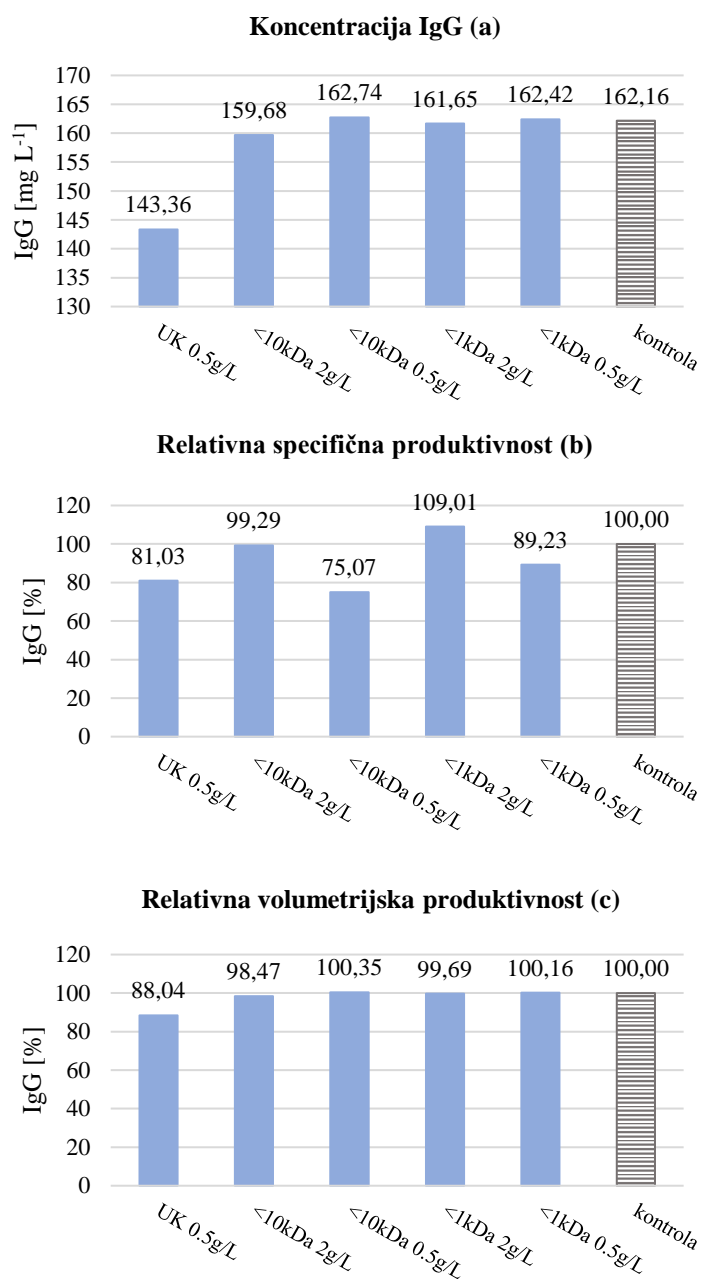
Slika 12. Rast CHO DP-12 stanica u SF mediju s ukupnim proteinskim hidrolizatom (HK UK) i frakcijama peptida iz hidrolizata (<10 kDa) i <1 kDa) dobivenih pomoću mikrobne proteaze *Alcalase* (A) u koncentraciji od 2 g L⁻¹ i 0,5 g L⁻¹

Tablica 5. Najveća specifična brzina rasta μ_{\max} [dan⁻¹] CHO DP-12 u SF mediju s dodacima hidrolizata konoplje dobivenih pomoću enzima *Alcalase* i kontroli

| koncentracija | najveća specifična brzina rasta, μ_{\max} [dan ⁻¹] | | | |
|-----------------------|--|------------------|-----------------|----------|
| | UKUPNI HIDROLIZAT | FRAKCIJA <10 kDa | FRAKCIJA <1 kDa | KONTROLA |
| 2 g L ⁻¹ | 0 | 0,42 | 0,39 | 0,46 |
| 0,5 g L ⁻¹ | 0,33 | 0,36 | 0,44 | |

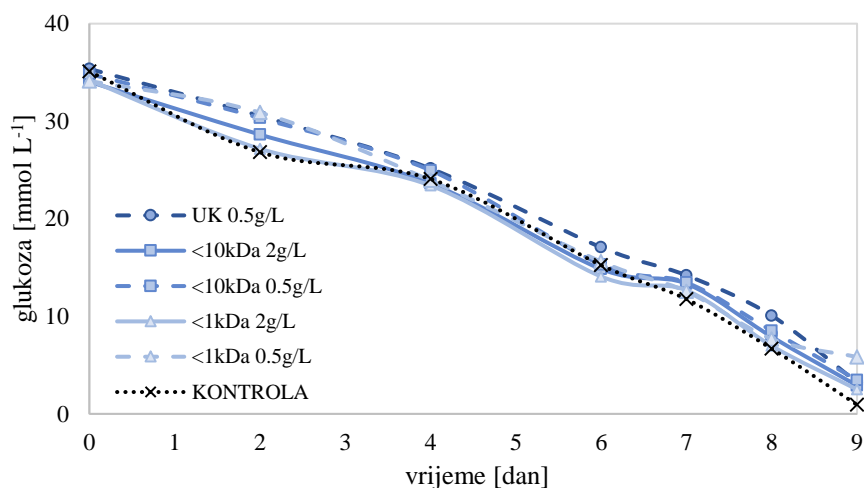
Najmanja koncentracija protutijela IgG izmjerena je kod stanica koje su pokazale najslabiji rast (UK HKA 0,5 g L⁻¹), gdje su posljedično izračunate i najmanje vrijednosti relativne specifične i volumetrijske produktivnosti. Stanice uzgajane s dodatkom frakcija <10 kDa i <1 kDa u obje koncentracije, su proizvele sličnu količinu protutijela (slika 13a) kao i stanice u kontroli. Najbolju vrijednosti relativne specifične produktivnosti (slika 12b) pokazuju stanice uzgajane u mediju s dodatkom 2 g L⁻¹ frakcije <1 kDa HKA što bi značilo da su proizvodile nešto više protutijela po danu nego stanice u kontroli. Relativna volumetrijska produktivnost pokazuje koliko je protutijela proizvedeno po volumenu medija pa je iz

vrijednosti prikazanih na slici 13c vidljivo kako nema značajne razlike u odnosu na kontrolu, osim kod već spomenutog slučaja 0,5 g L⁻¹ UK HKA koji pokazuje najniže vrijednosti za sva tri parametra produktivnosti. Prema tome, može se zaključiti kako hidrolizati proteina brašna konoplje dobiveni pomoću enzima *Alcalase* imaju zanemariv ili nikakav značaj na povećanje produktivnosti korištene stanične linije.



Slika 13. Koncentracija protutijela IgG (a), relativna specifična (b) i volumetrijska (c) produktivnost CHO DP-12 stanica uzgajanih u SF hranjivom mediju s dodacima ukupnih proteinskih hidrolizata (UK) i njegovih frakcija (<10 i <1 kDa) dobivenih pomoću mikrobne proteaze *Alcalase*

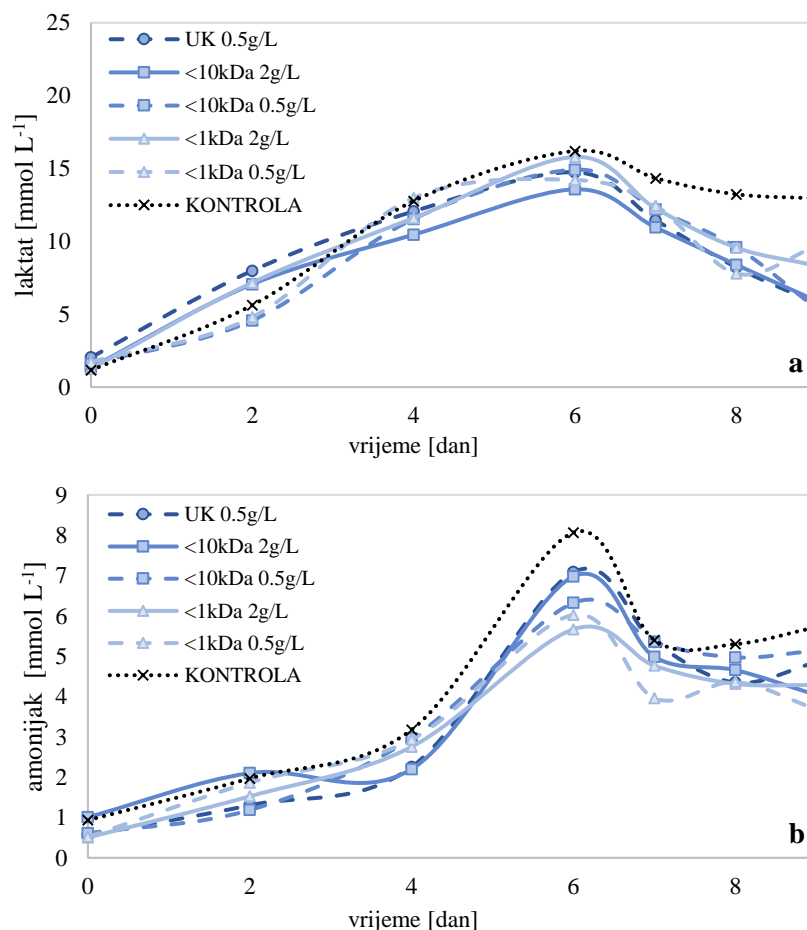
Značajnih promjena u metabolizmu glukoze kod stanica uzgajanih u SF mediju, s dodacima hidrolizata dobivenih pomoću enzima *Alcalase*, nije bilo. Očekivano, koncentracija glukoze se smanjivala tijekom vremena uzgoja jer ju stanice troše kao glavni izvor ugljika za potrebe rasta i proliferacije. Iz slike 14 je vidljivo kako je kontrola imala malo veću potrošnju glukoze što ne iznenađuje s obzirom na to da su stanice u kontroli najbrže rasle pa je i potreba za glukozom bila veća.



Slika 14. Koncentracija glukoze u SF hranjivom mediju tijekom uzgoja stanica CHO DP-12 s dodacima ukupnih proteinskih hidrolizata (UK) i njegovih frakcija (<10 i <1 kDa) dobivenih pomoću mikrobne proteaze *Alcalase*

Tijekom uzgoja praćeno je nakupljanje nusprodukta laktata, koji je u koncentraciji većoj od 20 mmol L⁻¹ toksičan za stanice, a nastaje u eksponencijalnoj fazi rasta kao posljedica deregulacije metabolizma glukoze. Kao što je vidljivo na slici 15a koncentracija laktata u stalnom je porastu što je i očekivano s obzirom na potrošnju glukoze. Nešto veća koncentracija laktata u odnosu na kontrolu tijekom prva dva dana uzgoja izmjerena je u mediju s dodatkom 0,5 g L⁻¹ UK HKA i 2 g L⁻¹ frakcija <10 kDa i <1 kDa HKA. S obzirom na to da se radi o jednom nefrakcioniranom uzorku i uzorcima dodanim u većoj koncentraciji hidrolizata moguće je da stanice na početku prolaze kroz proces prilagodbe pa je pritisak na metabolizam veći te posljedično dolazi do inhibicije ili aktivacije određenih metaboličkih puteva što rezultira povećanom proizvodnjom laktata. Nakon šestog dana uzgoja, koncentracija laktata opada u svim uzorcima pa i kontroli. Postoji mogućnost da stanice tu počinju trošiti laktat kao izvor energije u sklopu metabolizma glukoze. Prijelaz s proizvodnje na potrošnju laktata već je uočen kod CHO stanica kao pokušaj da se neutralizira toksično djelovanje laktata (Toussaint i sur.,

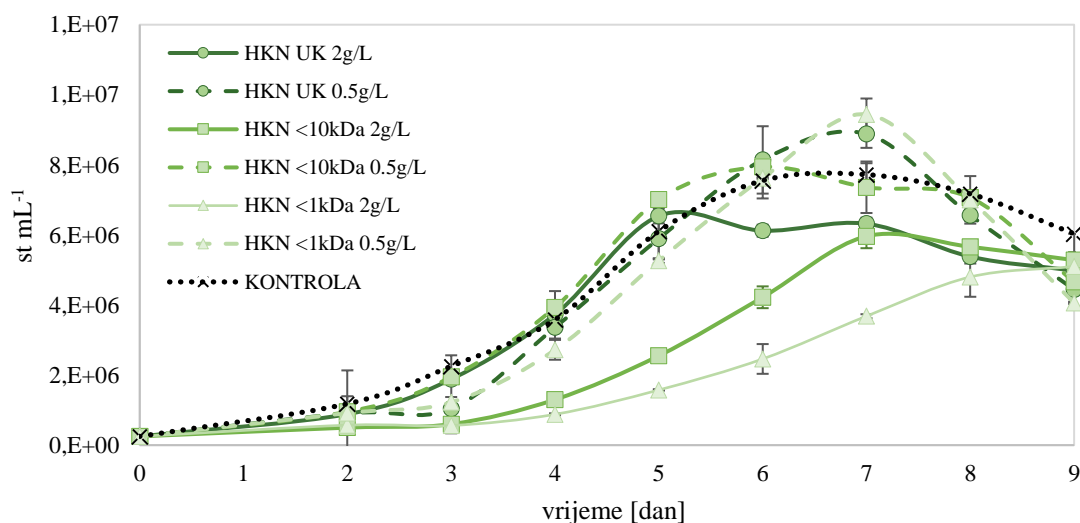
2016). Osim laktata, kao nusprodukt metabolizma aminokiselina nastaje amonijak te je njegovo povećanje također praćeno tijekom uzgoja jer već niske koncentracije mogu naštetiti staničnom rastu i kvaliteti nastalog produkta (Ahn i Antoniewicz, 2012). Iz grafa na slici 15b je vidljivo kako se koncentracija amonijaka povećava u mediju s dodatkom hidrolizata i prati ponašanje kontrole. Međutim, nakon šestog dana uzgoja koncentracija amonijaka počinje opadati što nije u skladu s prijašnjim literaturnim podacima. Stanice u tom periodu ulaze u stacionarnu fazu u kojoj se smanjuje brzina rasta stanica te one manje troše izvore ugljike poput glutamina pa bi se očekivala stagnacija u izmjerenoj koncentraciji amonijaka u mediju. Izmjereni pad u koncentraciji amonijaka moguć je uslijed ugradnje amonijaka u neke druge spojeve ili je prilikom uzgoja stanica ili čuvanja uzoraka ishlapila određena količina amonijaka. Na samom kraju uzgoja vidljiv je blagi porast koncentracije amonijaka u mediju, što se može očekivati zbog toga što su u tom periodu stanice već u fazi odumiranja. Narušen je integritet stanične membrane pa se povećane količine amonijaka mogu detektirati u mediju.



Slika 15. Koncentracija laktata (a) i amonijaka (b) u SF hranjivom mediju tijekom uzgoja stanica CHO DP-12 s dodacima ukupnih proteinskih hidrolizata (UK) i njegovih frakcija (<10 i <1 kDa) dobivenih pomoću mikrobne proteaze *Alcalase*

4.3.2. Utjecaj proteinskih hidrolizata enzima *Neutrase* na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije

Krivulja rasta na slici 16 prikazuje djelovanje hidrolizata proteina konoplje dobivenih pomoću enzime *Neutrase* na rast CHO DP-12 stanica. Profil krivulje rasta stanica s dodacima hidrolizata pokazuje malo slabiji rast u odnosu na kontrolu tijekom prvih tri dana uzgoja nakon čega stanice ulaze u eksponencijalnu fazu rasta. Stanice u uzorcima ukupnih hidrolizata i frakcija u koncentraciji od $0,5 \text{ g L}^{-1}$ u eksponencijalnoj fazi prate rast stanica u kontroli, osim u slučaju 7. dana uzgoja kada broj stanica u uzorcima HKN UK i $<1 \text{ kDa}$ premašuje broj stanica u kontroli. Osim toga, izmjerene vrijednosti najveće specifične brzine rasta (tablica 6) u navedenim uzorcima su veće nego u kontroli. Stanicama koje su rasle u mediju s dodatkom UK HKN 2 g L^{-1} , koncentracija počinje padati već 5. dana uzgoja, pa je zbog najkraće eksponencijalne faze u tom uzorku izmjerena najveća vrijednost brzine rasta. Stanice u uzorcima s dodatkom HKN $<10 \text{ kDa}$ i $<1 \text{ kDa}$ 2 g L^{-1} su tijekom svih devet dana uzgoja rasle u punoj manjoj koncentraciji u odnosu na kontrolu. Unatoč tome, vrijednost najveće specifične brzine raste kod stanica u uzorku s dodatkom frakcije $<10 \text{ kDa}$ HKN 2 g L^{-1} veća je nego u kontroli. Stanice su u tom uzorku prošle kroz nešto duži period prilagodbe, zbog čega ih je brojčano bilo manje nego stanica u kontroli. Potom su stanice, ulaskom u eksponencijalnu fazu, ostvarile brži rast u odnosu na stanice u kontroli.

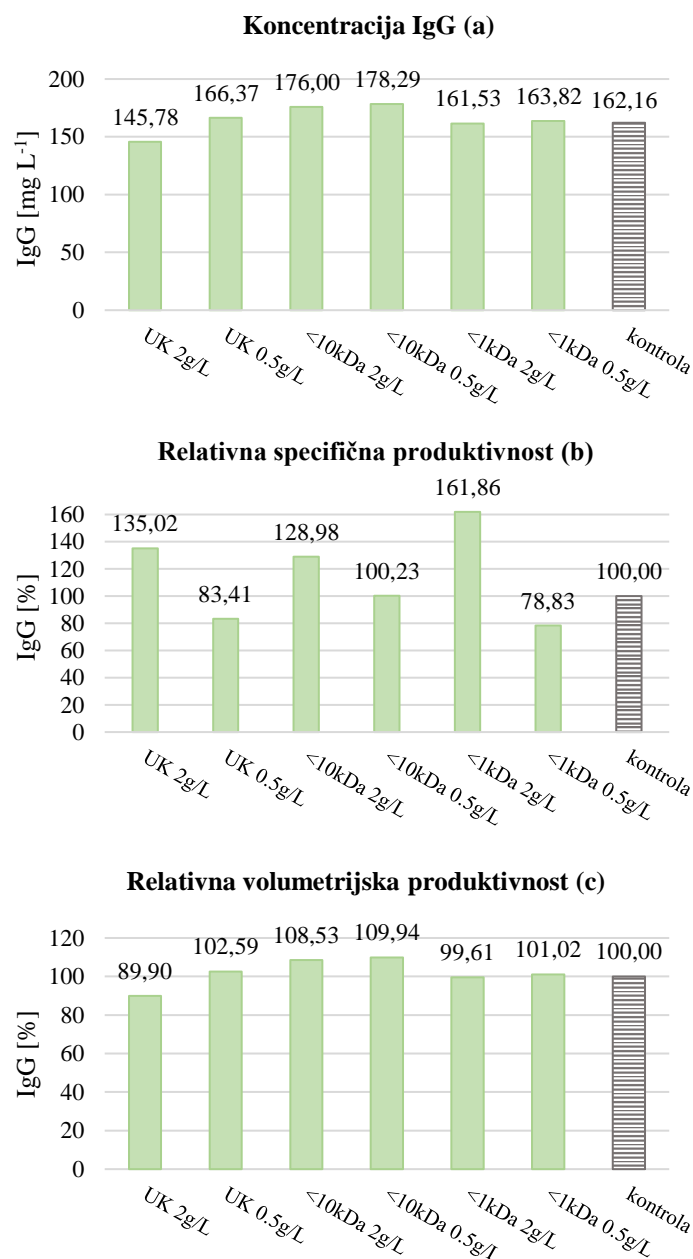


Slika 16. Rast CHO DP-12 stanica u SF mediju s ukupnim proteinskim hidrolizatom (HK UK) i frakcijama peptida iz hidrolizata ($<10 \text{ kDa}$) i $<1 \text{ kDa}$) dobivenih pomoću mikrobne proteaze *Neutrase* (N) u koncentraciji od 2 g L^{-1} i $0,5 \text{ g L}^{-1}$

Tablica 6. Najveća specifična brzina rasta μ_{\max} [dan^{-1}] CHO DP-12 u SF mediju s dodacima hidrolizata konoplje dobivenih pomoću enzima *Neutralse* i kontroli

| koncentracija | najveća specifična brzina rasta, μ_{\max} [dan^{-1}] | | | |
|-----------------------|---|------------------|-----------------|----------|
| | UKUPNI HIDROLIZAT | FRAKCIJA <10 kDa | FRAKCIJA <1 kDa | KONTROLA |
| 2 g L ⁻¹ | 0,67 | 0,57 | 0,42 | 0,46 |
| 0,5 g L ⁻¹ | 0,53 | 0,53 | 0,51 | |

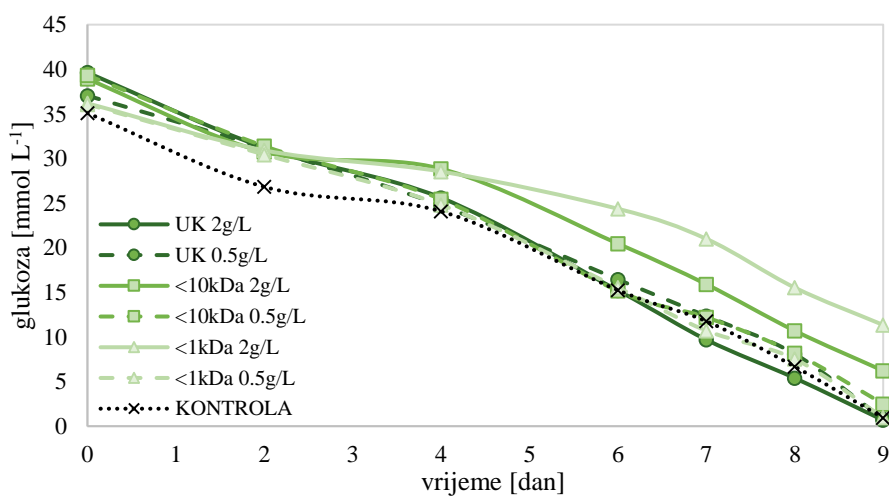
Izmjerena koncentracija protutijela IgG (slika 17a) bila je najmanja u uzorku u kojemu su stanice provele najkraće vremena u ekspanzionalnoj fazi. Unatoč tome, vrijednost relativne specifične produktivnosti veća je nego u kontroli jer su stanice u kraćem periodu uspjele proizvesti dovoljno protutijela. Kod uzoraka u kojima su stanicama dodani frakcionirani hidrolizati u koncentraciji od 2 g L⁻¹, vrijednosti relativne specifične produktivnosti (slika 17b) su također bile veće u odnosu na stanice u kontroli. Istovremeno, u spomenutim je uzorcima zabilježena najmanja koncentracija stanica tijekom trajanja uzgoja. Moguće da je došlo do preusmjerenja metabolizma na nastanak produkta, zbog čega su stanice posljedično manje energije trošile na rast i udvostručavanje. Obrnuti slučaj, u kojem su stanice rasle bolje od kontrole, no specifična produktivnost im je bila slabija, vidljiv je uzorcima ukupnog hidrolizata i obje frakcije HKN dodanih u koncentraciji od 0,5 L⁻¹. Dakle, gledajući specifičnu produktivnost može se reći da frakcije <10 kDa i <1 kDa HKN u koncentraciji od 2 g L⁻¹ djeluju pozitivno na produktivnost CHO DP-12 stanične linije jer je manji broj stanica proizveo veće vrijednosti koncentracije protutijela IgG. Pozitivan utjecaj dodatka peptidnih frakcija manjih molekularskih masa hranjivom mediju na stanice u kulturi zabilježen je i u prijašnjim istraživanjima za hidrolizate uljane repice (Chabanon i sur., 2008). Vrijednosti relativne volumetrijske produktivnosti (slika 17c) ne razlikuju se znatno od kontrole, a najveće su kod stanica u uzorcima frakcija <10 kDa za obje koncentracije, što je i očekivano s obzirom na to da su tu izmjerene i najveće vrijednosti titra protutijela.



Slika 17. Koncentracija protutijela IgG (a), relativna specifična (b) i volumetrijska (c) produktivnost CHO DP-12 stanica uzgajanih u SF hranjivom mediju s dodacima ukupnih proteinskih hidrolizata (UK) i njegovih frakcija (<10 i <1 kDa) dobivenih pomoću mikrobne proteaze *Neutrase*

Potrošnja glukoze tijekom uzgoja (slika 18) bila je podjednaka kontroli u većini uzoraka s dodatkom hidrolizata dobivenih pomoću neutrase. Jedino je u uzorcima s dodatkom 2 g L⁻¹ frakcija hidrolizata <10 kDa i <1 kDa potrošnja glukoze bila smanjena tijekom prva četiri dana s obzirom na to da su u tom periodu stanice rasle sporije. Dodaci hidrolizata proteina konoplje

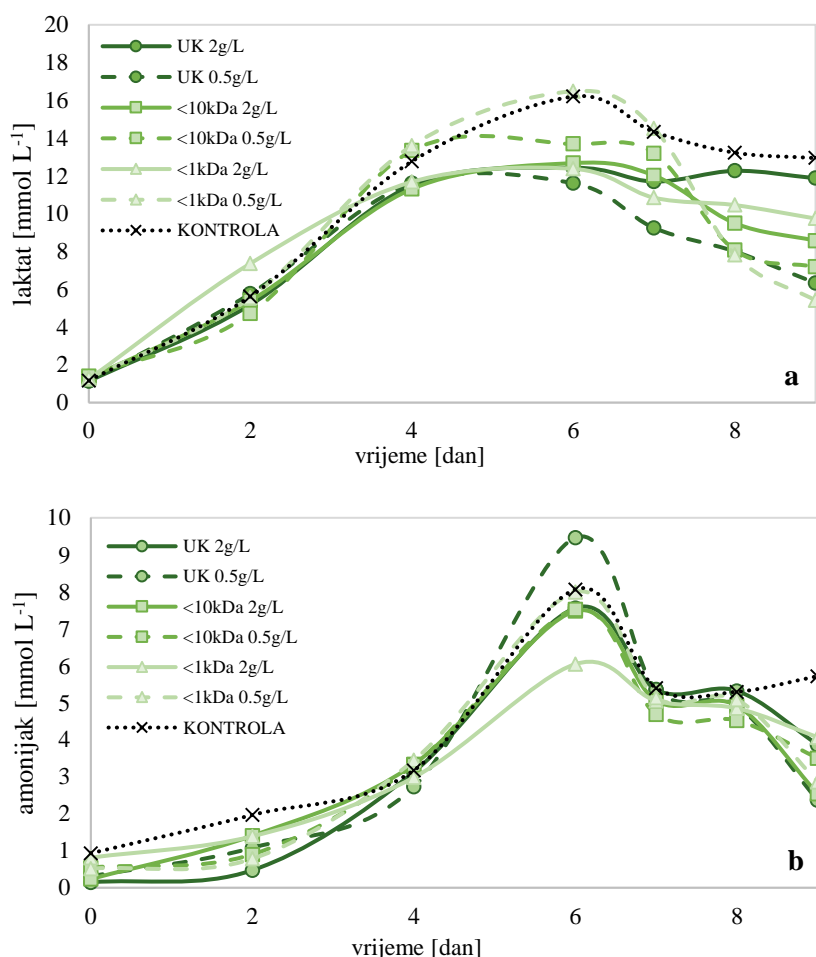
ne utječu izravno na metabolizam glukoze nego promjene u radu metabolizma mogu biti posljedica slabijeg rasta stanica u mediju s dodanim hidrolizatima spomenutih frakcija. Sporiji rast na početku uzgoja rezultirao je kasnijim ulaskom u eksponencijalnu fazu što se vidi i iz koncentracije glukoze koja je počela intenzivnije padati tek nakon 4. dana uzgoja. Također, zadnji dan uzgoja koncentracija glukoze je bila najviša upravo u tim uzorcima jer je i vijabilnost tih stanica bila preko 80 % te bi one mogle preživjeti kroz nešto dulji period da uzgoj nije bio prekinut zbog pada vijabilnosti stanica u ostalim uzorcima. To bi moglo značiti da hidrolizati, u određenim uvjetima, mogu imati i anti-apoptotska svojstva te produžiti vijabilnost stanične linije (Franek i sur., 2000).



Slika 18. Koncentracija glukoze u SF hranjivom mediju tijekom uzgoja stanica CHO DP-12 s dodacima ukupnih proteinskih hidrolizata (UK) i njegovih frakcija (<10 i <1 kDa) dobivenih pomoću mikrobne proteaze *Neutrase*

Koncentracija nastalog laktata (slika 19a) u mediju s dodacima hidrolizata proteina konoplje dobivenih pomoću neutrase podjednaka je kontroli tijekom prvih dana uzgoja. Nakon završetka eksponencijalne faze smanjuje se koncentracija izmjenjenog laktata u mediju. To može biti zbog toga što stanice u stacionarnoj fazi većinom provode oksidativnu fosforilaciju i potrošnju laktata (Young, 2013). Također, koncentracija laktata se između 6. i 7. dana počinje smanjivati intenzivnije u uzorcima s hidrolizatima nego u kontroli što bi moglo značiti da hidrolizati aktiviraju enzime ciklusa limunske kiseline zbog čega posljedično nastaje manje nusprodukta laktata u stacionarnoj fazi rasta. Dakako, ove bi pretpostavke trebalo dodatno istražiti detaljnijim analizama utjecaja hidrolizata na metabolizam laktata. Povećanje koncentracije amonijaka (slika 19a) vidljivo je tijekom prvih šest dana uzgoja. U uzorcima s dodacima hidrolizata koncentracija nastalog nusprodukta bila je nešto niža nego u kontroli,

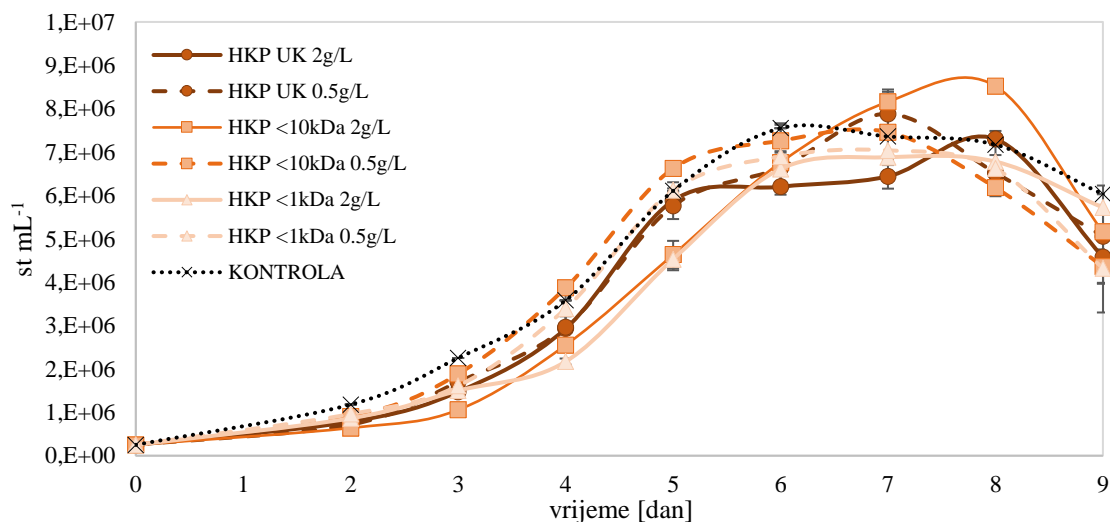
posebice u uzorku s dodatkom 2 g L⁻¹ frakcije proteina <1 kDa, što ne iznenađuje jer se radi o uzorku s najnižom maksimalnom specifičnom brzinom rasta. U mediju s dodatkom 0,5 g L⁻¹ UK HKN izmjerena je najveća koncentracija amonijaka u koncentraciji od skoro 10 mmol L⁻¹ što prelazi granice toksičnosti amonijaka za stanice koje se prema literaturi kreću između 5 i 8 mmol L⁻¹ (Lai i sur., 2013; Schneider i sur., 1996). Nakon šestog dana dolazi do pada koncentracije amonijaka u mediju umjesto stagnacije. Moguće je da je došlo do ugradnje amonijaka u neke druge spojeve ili djelomičnog ishlapljivanja amonijaka, bilo tijekom uzgoja stanica ili čuvanja uzoraka. Mjerenje amonijaka bi trebalo ponoviti drugom metodom, poželjno tzv. *real-time* pristupom.



Slika 19. Koncentracija laktata (a) i amonijaka (b) u SF hranjivom mediju tijekom uzgoja stanica CHO DP-12 s dodacima ukupnih proteinskih hidrolizata (UK) i njegovih frakcija (<10 i <1 kDa) dobivenih pomoću mikrobne proteaze *Neutrase*

4.3.3. Utjecaj proteinskih hidrolizata enzima *Protamex* na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije

Profil rasta stanica u mediju s dodacima proteina ukupnog hidrolizata i frakcija dobivenih hidrolizom pomoću enzima *Protamex* prati profil krivulje rasta stanica u kontroli što se vidi iz prikaza na slici 20. Stanice u uzorku s dodatkom frakcije proteina <10 kDa u koncentraciji od 2 g L⁻¹ su postigle veći broj stanica tijekom 7. i 8. dana uzgoja te je postignuta nešto bolja vrijednost najveće specifične brzine rasta u odnosu na kontrolu. Najviša vrijednost najveće specifične brzine rasta izmjerena je uzorku UK HKP 2 g L⁻¹ (tablica 7). Međutim, iz krivulje rasta je vidljivo kako su u tom slučaju stanice bile najkraće u eksponencijalnoj fazi i već su nakon 4. dana ušle u stacionarnu fazu. Stanice u ostalim uzorcima su pokazale slabiji rast u odnosu na kontrolu, osim u uzorcima frakcije <10 kDa HKP 2 g L⁻¹ i ukupnog hidrolizata u koncentraciji 0,5 g L⁻¹ gdje su izmjerene nešto veće vrijednosti maksimalne specifične brzine rasta.

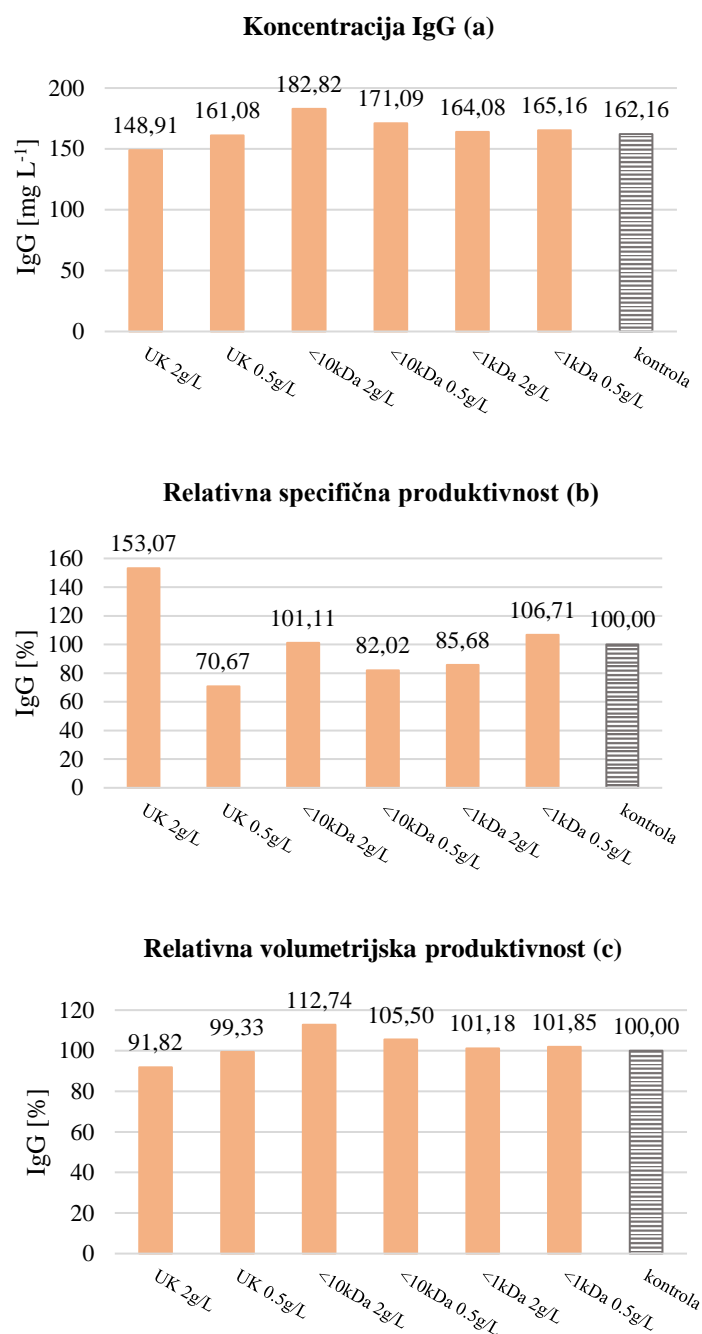


Slika 20. Rast CHO DP-12 stanica u SF mediju s ukupnim proteinskim hidrolizatom (HK UK) i frakcijama peptida iz hidrolizata (<10 kDa) i <1 kDa) dobivenih pomoću mikrobne proteaze *Protamex* (P) u koncentraciji od 2 g L⁻¹ i 0,5 g L⁻¹

Tablica 7. Najveća specifična brzina rasta μ_{\max} [dan⁻¹] CHO DP-12 u SF mediju s dodacima hidrolizata konoplje dobivenih pomoću enzima *Protamex* i kontroli

| koncentracija | najveća specifična brzina rasta, μ_{\max} [dan ⁻¹] | | | |
|-----------------------|--|------------------|-----------------|----------|
| | UKUPNI HIDROLIZAT | FRAKCIJA <10 kDa | FRAKCIJA <1 kDa | KONTROLA |
| 2 g L ⁻¹ | 0,67 | 0,51 | 0,42 | 0,46 |
| 0,5 g L ⁻¹ | 0,48 | 0,42 | 0,40 | |

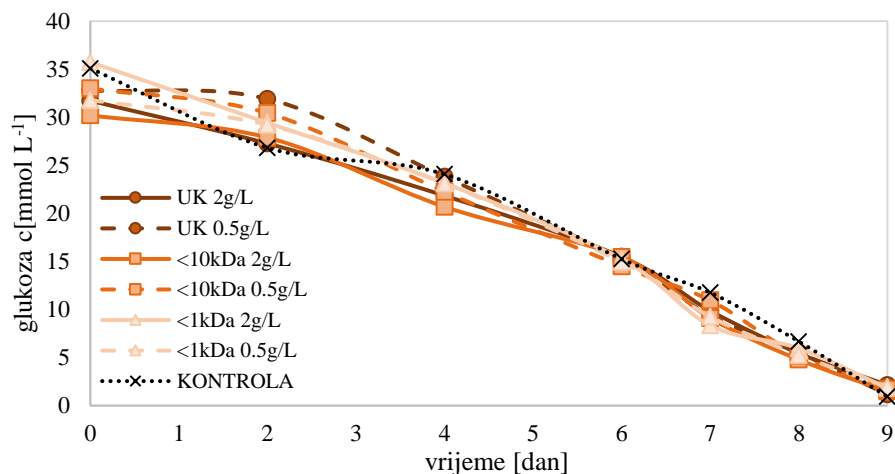
Kod stanica u mediju s dodatkom frakcija proteina HKP <10 kDa u koncentracijama od 0,5 g L⁻¹ i 2 g L⁻¹ izmjerena je najveća koncentracija proizvedenog protutijela IgG (slika 21a). Posljedično su i vrijednosti relativne volumetrijske produktivnosti bile bolje od kontrole. Međutim, vrijednosti relativne specifične produktivnosti najbolje su kod stanice u uzorku medija s dodatkom ukupnog hidrolizata proteina konoplje u koncentraciji od 2 g L⁻¹. Razlog tome je taj da iako su stanice u tom uzorku proizvele nešto nižu koncentraciju protutijela, njihova je eksponencijalna faza trajala najkraće, pa je sukladno tome vrijednost relativne specifične produktivnosti najviša (slika 21b). Također, raniji ulazak u stacionarnu fazu može biti posljedica veće potrošnje energije na rast i produktivnost. Vrijednost relativne volumetrijske produktivnosti (slika 22b) za taj je uzorak posljedično najniža, jer je ukupno proizvedeno najmanje protutijela tijekom 9 dana trajanja uzgoja. Međutim, zbog očitih razlika u fazama rasta u odnosu na stanice u drugim uzorcima i kontroli, trebalo bi ponoviti uzgoj u slučaju dodatka HKP UK u koncentraciji od 2 g L⁻¹ kako bi se moglo konačno zaključiti o utjecaju na produktivnost stanične linije CHO-DP 12.



Slika 21. Koncentracija protutijela IgG (a), relativna specifična (b) i volumetrijska (c) produktivnost CHO DP-12 stanica uzgajanih u SF hranjivom mediju s dodacima ukupnih proteinskih hidrolizata (UK) i njegovih frakcija (<10 i <1 kDa) dobivenih pomoću mikrobne proteaze *Protamex*

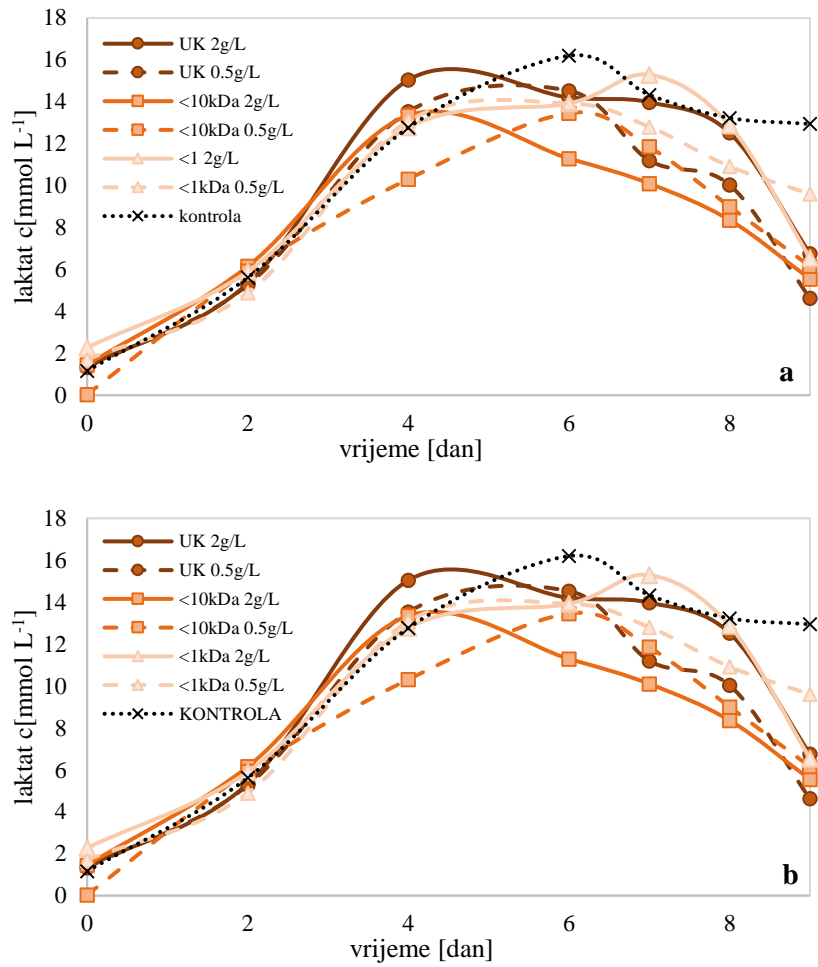
Potrošnja glukoze (slika 22) je u prvim danim uzgoja bila nešto slabija u uzorcima s dodanim hidrolizatima u odnosu na kontrolu, no ta razlika je postala sve manje zamjetna u sljedećim danima uzgoja. Najveća koncentracija zadnjeg dana uzgoja izmjerena je uzorku

ukupnog hidrolizata proteina konoplje u koncentraciji od 2 g L^{-1} što je i očekivanu budući da su u tom uzorku stanice najkraće bile u eksponencijalnoj fazi pa je bilo manje potrebe za potrošnjom glukoze prilikom rasta.



Slika 22. Koncentracija glukoze u SF hranjivom mediju tijekom uzgoja stanica CHO DP-12 s dodacima ukupnih proteinskih hidrolizata (UK) i njegovih frakcija (<10 i <1 kDa) dobivenih pomoću mikrobne proteaze *Protamex*

Hidrolizati dobiveni pomoću enzima *Protamex* nisu značajno utjecali na metabolizam laktata. Iz prikaza na slici 23a je vidljivo kako koncentracija nastalog laktata u uzorcima s dodanim hidrolizatima prati ponašanje metabolizma stanica u kontroli. Pad koncentracije laktata u mediju zabilježen je između 4. i 6. dana uzgoja, ovisno o uzorku. Granične koncentracije u kojima laktat djeluje toksično na stanice nisu izmjerene zbog čega nije zabilježeno negativno djelovanje laktata na stanični rast. Metabolizam nastanka amonijaka također nije izmijenjen djelovanjem hidrolizata jer značajnih razlika u odnosu na ponašanje stanica u kontroli nije bilo. Porast koncentracije nastalog amonijaka zabilježen je do 6. dana uzgoja te tu izmjerene vrijednosti ulaze u raspon koncentracija toksičnih za rast stanica i kvalitetu nastalog produkta. Kod većine stanica je u tom periodu došlo do pada rasta i ulaska u stacionarnu fazu vjerojatno zbog inhibitornog djelovanja nastalog nusprodukta. Kao i u prethodna dva eksperimenta, pojava pada koncentracije amonijaka u mediju na kraju uzgoja može biti posljedica nepravilnosti u čuvanju uzoraka ili nekih popratnih reakcija u metabolizmu amonijaka zbog čega bi se trebale razmotriti alternativne metode praćenja ovog nusprodukta prilikom uzgoja.



Slika 23. Koncentracija laktata (a) i amonijaka (b) u SF hranjivom mediju tijekom uzgoja stanica CHO DP-12 s dodacima ukupnih proteinskih hidrolizata (UK) i njegovih frakcija (<10 i <1 kDa) dobivenih pomoću mikrobne proteaze *Protamex*

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. TCA metoda određivanja stupnja hidrolize proteina (DH) ne podudara se s prikazom veličine i količine peptida dobivenog proteinskom elektroforezom. Rezultat ostvaren elektroforezom poklapa se s literaturnim podacima proizašlim iz izravnijih, tj. titracijskih metoda određivanja DH. Prema njima, a i prema nalazu elektroforeze u ovom radu, najjače proteolitičko djelovanje ima enzim *Alcalase*, a najslabije *Neutrase*.
2. Hidrolizat proteina konoplje, dobiven proteolitičkim djelovanjem enzima *Alcalase*, u koncentraciji od $0,5 \text{ g L}^{-1}$ inhibira rast CHO DP-12 stanica, dok 4 puta veća koncentracija od 2 g L^{-1} djeluje nepovoljno jer potpuno zaustavlja stanični rast. Također, hidrolizati dobiveni djelovanjem *Alcalase* imaju zanemariv ili nikakav značaj na povećanje produktivnosti korištene stanične linije.
3. Hidrolizat proteina konoplje dobiven enzimom *Neutrase* te peptidne frakcije hidrolizata, $<10 \text{ kDa}$ i $<1 \text{ kDa}$, u koncentraciji od $0,5 \text{ g L}^{-1}$, pokazuju pozitivan učinak na rast stanične linije CHO DP-12. Obje frakcije hidrolizata u koncentraciji od 2 g L^{-1} pozitivno djeluju na produktivnost jer je u tim uzorcima izmjerena najveća količina rekombinantnog protutijela IgG s obzirom na broj stanica.
4. Frakcija proteina $<10 \text{ kDa}$ hidrolizata konoplje, dobivena proteolitičkim djelovanjem enzima *Protamex*, u koncentraciji od 2 g L^{-1} pozitivno djeluje na rast i volumetrijsku produktivnost stanične kulture CHO DP-12.
5. Dobiveni rezultati proizlaze iz pojedinačnih uzgoja zbog čega je potrebno ispitati statistički značaj razlika koje su vidljive u odnosu na kontrolu uzgojem u paralelama. Na taj način bi se moglo s većom sigurnošću zaključiti o utjecaju ranije spomenutih hidrolizata na rast i produktivnost stanične linije CHO DP-12.

6. LITERATURA

Ahn, W. S., Antoniewicz, M. R. (2012) Towards dynamic metabolic flux analysis in CHO cell cultures. *Biotechnol. J.* **7**, 61-74.

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.

Amable, P., Butler, M. (2008) Cell metabolism and its control in culture. 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. 75.-83.

Anonymous 1 (2021) Sjemenke industrijske konoplje, <<https://www.agric.wa.gov.au/plant-biosecurity/licensing-industrial-hemp-activities-western-australia>>. Pristupljeno: 3. kolovoza 2021.

ATCC (2021) <<https://www.atcc.org/products/crl-12444>>. Pristupljeno 10. srpnja 2021.

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

Bailey, L. A., Hatton, D., Field, R., Dickson, A. J. (2012) Determination of Chinese hamster ovary cell line stability and recombinant antibody expression during long-term culture. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 2093-2103.

BioRender.com; 2021. Dostupno na: <https://app.biorender.com/>.

Bort, J. A., Stern, B., Borth, N. (2010) CHO-K1 host cells adapted to growth in glutamine-free medium by FACS-assisted evolution. *Biotechnol. J.* **5**, 1090-1097.

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.

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

Chabanon, G., Alves da Costa, L., Farges, B., Harscoat, C., Chenu, S., Goergen, J. L., Marc, A., Marc, I., Chevalot, I. (2008) Influence of the rapeseed protein hydrolysis process on CHO cell growth. *Bioresour. Technol.* **99**, 7143-7151.

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

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.

Dowd, J. E., Kwok, K. E., Piret, J. M. (2001) Glucose-based optimization of CHO-cell perfusion cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **75**, 252-256.

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.

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

House, J. D., Neufeld, J., Leson, G. (2010) Evaluating the Quality of Protein from Hemp Seed (*Cannabis sativa L.*) Products Through the use of the Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score Method. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 11801-11807.

Jayapal, K. P., Wlaschin, K. F., Hu, W. S., Yap, M. G. S. (2007) Recombinant protein therapeutics from CHO Cells - 20 years and counting. *Chem. Eng. Prog.* **103**, 40-47.

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.

Kim, J. Y., Kim, Y., Lee, G. M. (2011) 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**, 639-648.

Kriese U., Schumann E., Weber W. E., Beyer M., Brühl L., Matthäuse B. (2004) Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa L.* genotypes. *Euphytica.* **137**, 339-351.

Lai, T., Yang, Y., Ng, S., K. (2013) Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production. *Pharmaceuticals*. **6**, 579-603.

Lao, M. S., Toth, D. (1997) Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol. Prog.* **13**, 688-691.

Leo, P., Galesi, A. L. L., Suazo, A. T. S., Moraes, A. M. (2008) Animal cells: basic concepts. U: *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy* (Castilho, L. R., Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Butler M., ured.), Taylor & Francis Group, New York, str. 20-27.

Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A. Y., Kiss, R., Amanullah, A. (2010) Cell culture processes for monoclonal antibody production, *MAbs*. **2**, 466-477.

Lobo-Alfonso J., Price P., Jayme D. (2008) Benefits and Limitations of Protein Hydrolysates as Components of Serum-Free Media for Animal Cell Culture Applications. U: *Protein Hydrolysates in Biotechnology* (Pasupuleti V., Demain A., ured.), Springer, Dordrecht, str. 55.-78.

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

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., Aluko, R. E. (2015a) A comparative study of the structural and functional properties of isolated hemp seed (*Cannabis sativa* L.) albumin and globulin fractions. *Food Hydrocoll.* **43**, 743-752.

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.

Moraes, A.M., Mendonca, R. Z., Suazo, C. A. T. (2008) Culture media for animal cells. U: *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy* (Castilho, L., Morales, Â., Augusto, E. F. P., Butler, M., ured.), Taylor & Francis Group, New York, str. 111.-128.

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.

Potin, F., Lubbers, S., Husson, F., Saurel, R. (2019) Hemp (*Cannabis sativa* L.) Protein Extraction Conditions Affect Extraction Yield and Protein Quality. *J. Food Sci.* **84**, 3682-3690.

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.

Schneider, M., Marison, I. W., von Stockar, U. (1996) The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J. Biotechnol.* **46**, 161-185.

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

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

Teh, S.S. Birch., J. (2013) Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *J. Food Compos. Anal.* **30**, 26-31

Toussaint, C., Henry, O., Durocher, Y. (2016) Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures. *J. Biotechnol.* **217**, 122-131.

Verma, A., Verma, M., Singh, A. (2020) Animal tissue culture principles and applications. *Animal Biotechnology*. 269-293. doi: 10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4

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

Xu, P., Dai, XP., 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. Med. Biol.* **16**, 99-117.

Young J. D. (2013) Metabolic flux rewiring in mammalian cell cultures. *Curr. Opin. Biotechnol.* **24**, 1108-1115. doi: 10.1016/j.copbio.2013.04.016

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**, 238-245.

Zhu, M. M., Mollet, M., Hubert, R. S., Kyung, Y. S., Zhang, G. G. (2017) Industrial Production of Therapeutic Proteins: Cell Lines, Cell Culture, and Purification. *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*. 1639-1669. doi: 10.1007/978-3-319-52287-6_29

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Anja Damjanović
Anja Damjanović