

# Primjena proteinskih hidrolizata biljnog porijekla u kulturi životinjskih stanica

---

Ursić, Tino

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:165730>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2020.

Tino Ursić  
1322/MB

**PRIMJENA PROTEINSKIH  
HIDROLIZATA BILJNOG  
PORIJEKLA U KULTURI  
ŽIVOTINJSKIH STANICA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Višnje Gaurina Srček, te uz pomoć Marijana Logarušića, mag. ing.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu HRZZ projekta IP-2016-06-3848 „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Višnje Gaurina Srček.

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. Višnji Gaurina Srček na uloženom vremenu, trudu i prenesenom znanju tijekom izrade diplomskog rada. Želio bih se zahvaliti Marijanu Logarušiću, mag. ing. na velikoj pomoći, te svim ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na pomoći, pristupačnosti i ljubaznosti.*

*Posebnu zahvalu upućujem svojoj obitelji, ponajviše roditeljima i bratu, te prijateljima na pruženoj podršci tijekom studiranja.*

## 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

### PRIMJENA PROTEINSKIH HIDROLIZATA BILJNOG PORIJEKLA U KULTURI ŽIVOTINJSKIH STANICA

*Tino Ursić, 1322/MB*

**Sažetak:** U poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji nastaje velika količina biljnih nusproizvoda koji se mogu iskoristiti za proizvodnju različitih vrijednih proizvoda. Jedan od tih proizvoda su i proteinski hidrolizati koji imaju primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji te biotehnologiji. Često se kao sirovine za proizvodnju proteinskih hidrolizata koriste sjemenke uljarica i njihovi derivati u koje spadaju i uljne pogače. Ovaj diplomski rad donosi pregled dosadašnjih spoznaja o različitim biljnim proteinskim hidrolizatima, strategijama njihove pripreme i biološkom djelovanju. Poseban naglasak je stavljen na primjenu biljnih proteinskih hidrolizata u tehnologiji životinjskih stanica gdje se koriste kao dodatak hranjivom mediju za uzgoj stanica i predstavljaju potencijalnu zamjenu za serum.

**Ključne riječi:** proteinski hidrolizati, tehnologija životinjskih stanica, biopeptidi, biofarmaceutici

**Rad sadrži:** 53 stranice, 21 sliku, 7 tablica, 85 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

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

**Datum obrane:** 6. studenog 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### PLANT-DERIVED PROTEIN HYDROLYSATES AND ITS USE IN ANIMAL CELL TECHNOLOGY

*Tino Ursić, 1322/MB*

**Abstract:** The agricultural and food industries generate a large amount of by-products of plant origin that can be used for production of other valuable products. Such products are protein hydrolysates that can be used in the food, pharmaceutical and cosmetic industry and biotechnology. The most common raw materials for the production of protein hydrolysates are oil-plant seeds or their derivatives called oil cakes. This thesis provides an overview of known facts about various plant protein hydrolysates, their preparation strategies and biological activity, focusing on the application of plant protein hydrolysates in animal cell technology where they are used as nutritional supplement of cell culture medium and can potentially replace serum.

**Keywords:** protein hydrolysates, animal cell technology, biopeptides, biopharmaceuticals

**Thesis contains:** 53 pages, 21 figures, 7 tables, 85 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD.* Višnja Gaurina Srček, Full Professor

**Technical support and assistance:** *BSc* Marijan Logarušić, Scientific Assistant

**Reviewers:**

1. *PhD.* Igor Slivac, Associate professor
2. *PhD.* Višnja Gaurina Srček, Full professor
3. *PhD.* Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor
4. *PhD.* Jasna Novak, Full professor

**Thesis defended:** 6 November 2020



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	1
2.1. PROTEINSKI HIDROLIZATI I NJIHOVA PRIPRAVA .....	2
2.1.1. Priprava hidrolizata fermentacijom pomoću bakterija .....	3
2.1.2. Enzimska hidroliza .....	4
2.1.3. Kemijska hidroliza .....	5
2.1.4. Metode frakcioniranja proteinskih hidrolizata .....	6
2.2. IZVORI PROTEINSKIH HIDROLIZATA.....	7
2.2.1. Biološko djelovanje proteinskih hidrolizata .....	10
2.2.1.1. Antioksidacijsko djelovanje .....	10
2.2.1.2. ACE inhibirajuće djelovanje .....	11
2.2.1.3. Imunomodulirajuće djelovanje.....	12
2.2.1.4. Antimikrobno djelovanje .....	13
2.2.1.5. Antitumorsko djelovanje .....	13
2.2.1.6. Hipokolesterolemično djelovanje .....	14
2.2.2. Primjena proteinskih hidrolizata .....	15
2.3. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA .....	16
2.3.1. Primarne kulture, stanične linije i stanični sojevi .....	16
2.3.2. Primjena tehnologije životinjskih stanica .....	19
2.3.3. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica u kulturi .....	21
2.3.4. Medij za uzgoj životinjskih stanica.....	23
2.4. BILJNI PROTEINSKI HIDROLIZATI U KULTURI ŽIVOTINJSKIH STANICA.....	26
<b>3. ZAKLJUČAK</b> .....	44
<b>4. LITERATURA</b> .....	45

# 1. UVOD

Proteinski hidrolizati se definiraju kao kompleksne smjese oligopeptida, peptida i slobodnih aminokiselina dobivenih djelomičnom ili potpunom hidrolizom proteinskog supstrata. Proizvode se iz proteinima bogatim sirovinama procesom kontrolirane hidrolize pomoću komercijalnih enzima, a što potencijalno rezultira smanjenjem njihove alergnosti, poboljšanom topljivošću, probavljivošću i funkcionalnošću (Marson i sur., 2020).

Bioaktivni peptidi sadržani u proteinskim hidrolizatima zanimljivi su zbog svojeg potencijalnog farmaceutskog i nutraceutičkog doprinosa. Također, bioaktivni peptidi dobiveni iz nus-proizvoda prehrambene industrije pokazuju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje na način da posjeduju antibiotsko, antitrombolitičko, antioksidacijsko i imunomodulirajuće djelovanje te smanjuju razinu kolesterola u krvi i pospješuju apsorpciju elemenata u tragovima (Maestri i sur., 2016).

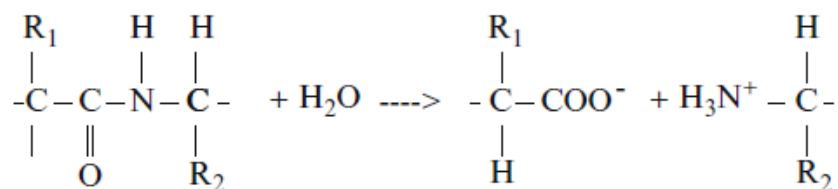
Na rast stanica u kulturi, njihovu produktivnost i kvalitetu proizvedenih proteina veliki utjecaj ima stanični okoliš, posebice medij za uzgoj stanica koji u zadnje vrijeme doživljava promjene kako bi se smanjila upotreba seruma kao dodatka mediju za uzgoj. Suvremeni proizvodni procesi koji se vode s kulturama životinjskih stanica sve češće koriste medije bez dodatka seruma i komponenti animalnoga podrijetla zbog potencijalne opasnosti od kontaminacija mikrobima i virusima koji su u njima prisutni (Ritacco i sur., 2018). Umjesto seruma, u medij se dodaju egzogeni peptidi pa su tako biljni proteinski hidrolizati svoju primjenu pronašli i u tehnologiji životinjskih stanica. Smatraju se jednim od sigurnijih dodataka mediju za uzgoj i pozitivno utječu na rast životinjskih stanica i njihovu produktivnost. Također, time utječu na povećanu biosigurnost, smanjuju ukupne troškove bioprocasa, omogućuju jednostavnije pročišćavanje proizvoda i dr. (Burteau i sur., 2003).

Ovaj diplomski rad donosi pregled najzastupljenijih biljnih proteinskih hidrolizata i postupaka njihove pripreme kao i opis biološkog djelovanja te primjenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Poseban naglasak je na primjeni hidrolizata u tehnologiji životinjskih stanica gdje se koriste kao dodatak hranjivim podlogama za uzgoj i pokazuju pozitivne učinke na rast, vijabilnost i produktivnost različitih staničnih linija.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PROTEINSKI HIDROLIZATI I NJIHOVA PRIPRAVA

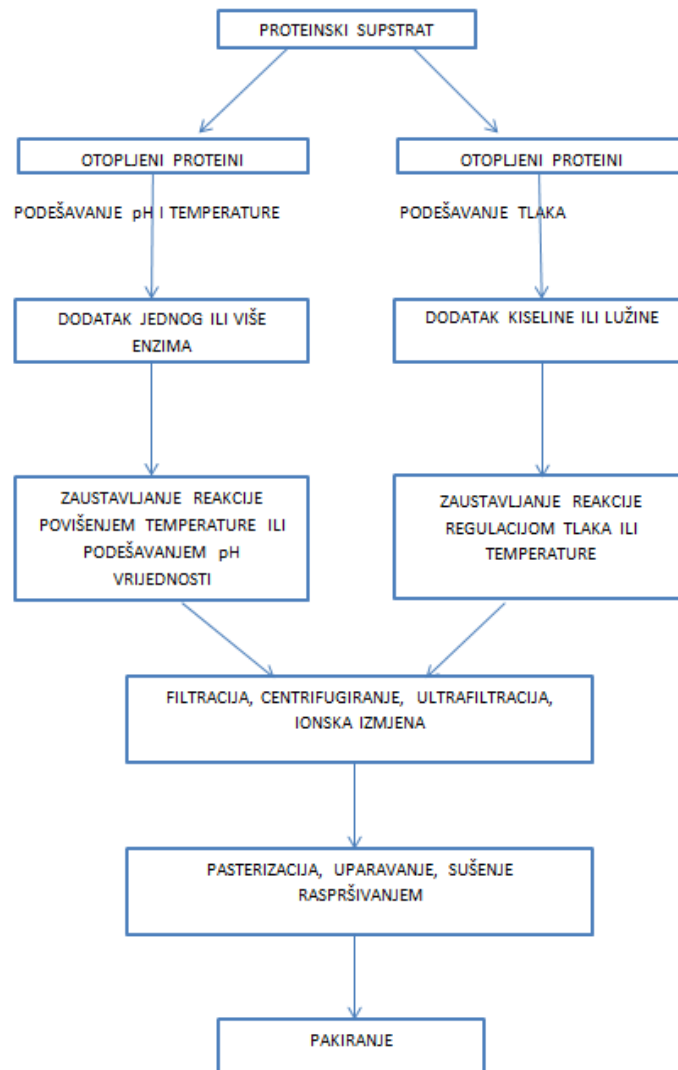
Proteinski hidrolizat je proizvod koji se dobiva hidrolizom proteina pomoću kiseline, lužine, enzima ili mikrobnom fermentacijom. Hidrolizom biljnih proizvoda ili životinjskog tkiva nastaje više različitih spojeva kao što su peptidi, aminokiseline, minerali, ugljikohidrati i lipidi ukoliko su prisutni u supstratu. Proteinski hidrolizati su karakterizirani stupnjem hidrolize koji je definiran omjerom broja pocijepanih peptidnih veza i ukupnog broja peptidnih veza u proteinu pomnoženo sa 100 (slika 1). Broj pocijepanih peptidnih veza može se odrediti različitim metodama kao što su: pH-stat metoda, titracijska Formol metoda, pomoću *o*-ftalaldehida (OPA), pomoću trinitrobenzen sulfonske kiseline (TNBS), trikloroctene kiseline (TCA). pH-stat je neizravna metoda za određivanje stupnja hidrolize ujedno najjednostavnija i najkorištenija metoda od svih navedenih (Rutherford, 2010).



Slika 1. Kemijska reakcija hidrolize peptidne veze (Pasupuleti i sur., 2008)

Peptidi su molekule koje u svom sastavu sadrže od dvije do 50 aminokiselina, dok se proteinima smatraju lanci s više od 50 aminokiselina. Jednom odvojeni od matičnog proteina, peptidi pridonose fizikalno-kemijskim, biološkim i organoleptičkim svojstvima supstrata u kojem se nalaze.

Proteinski hidrolizati mogu se dobiti iz proteinskih supstrata pomoću kemijske hidrolize, hidrolizom pomoću proteolitičkih enzima ili mikrobnom fermentacijom pomoću proteolitičkih bakterija (slika 2).



Slika 2. Postupak pripreve proteinskih hidrolizata (Pasupuleti i Braun, 2008)

Odabir postupka pripreve proteinskih hidrolizata ovisi o porijeklu proteina pa se tako proteini iz pera, rogova, kljuna ili vune zbog visokog udjela keratina hidroliziraju pomoću kiselina, lužina ili bakterijske keratinaze. Kazein, sirutka i životinjsko meso, kao i biljne komponente (soja, pšenica, riža, grašak, pamuk) hidroliziraju se pomoću enzima ili mikroba (Hou i sur., 2017).

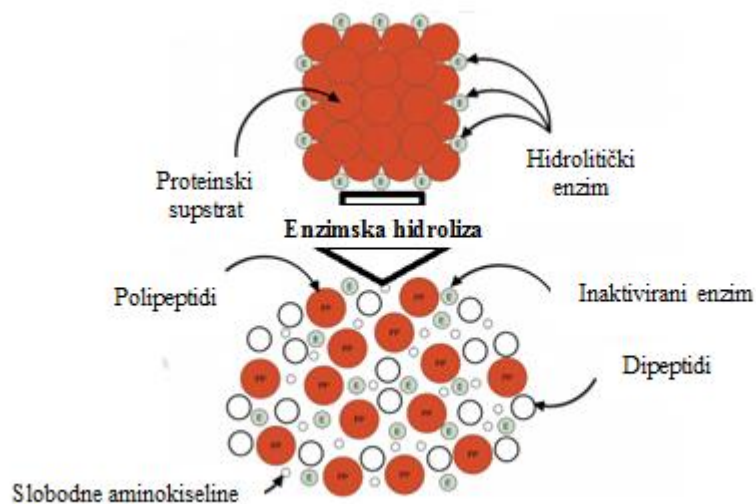
### 2.1.1. Priprava hidrolizata fermentacijom pomoću bakterija

Mnogi mikroorganizmi koji se koriste u industrijskoj proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda pokazuju veliku proteolitičku aktivnost pa mogu proizvesti bioaktivne peptide tijekom fermentacije. Fermentacija proteina pomoću proteolitičkih bakterija jedan je od načina proizvodnje proteinskih hidrolizata u industrijskom mjerilu. Nedostatak proizvodnje

proteinskih hidrolizata postupkom fermentacije je nizak prinos proizvedenih peptida. Tijekom fermentacije radni će mikroorganizam dio proizvedenih peptida i aminokiselina koristiti kao izvor ugljika ili dušika (Nasri, 2017).

### 2.1.2. Enzimska hidroliza

Proteaze su enzimi koji se koriste za hidrolizu proteina budući cijepaju peptidnu vezu između dviju aminokiselina. Daljnjim cijepanjem proteina nastaju produkti manje molekulske mase poput peptona, peptida i aminokiselina (slika 3). Da bi se provela enzimska hidroliza, supstrat se mora samljjeti, homogenizirati u vodi ili puferu, a prije dodatka enzima potrebno je podesiti optimalne vrijednosti temperature i pH za njegovu aktivnost. Po završetku hidrolize enzim se mora inaktivirati zagrijavanjem ili promjenom pH vrijednosti. Za hidrolizu se mogu koristiti i kontinuirani bioreaktori s membranom koji omogućuju kontinuiranu reciklaciju enzima, zaustavljanje reakcije i smanjenje troškova. Korištenje pogodnog enzima, dobra kontrola reakcije i njezinih parametara (pH, temperatura, vrijeme trajanja i broj obrtaja) kritični su za proizvodnju proteinskog hidrolizata željenih svojstava. Specifičnost enzima korištenog za hidrolizu od iznimne je važnosti. Enzim utječe na veličinu nastalih peptida, sastav i redoslijed aminokiselina u peptidu, a navedeno utječe na biološka i funkcionalna svojstva hidrolizata.



Slika 3. Shematski prikaz promjena tijekom enzimske hidrolize proteinskog supstrata (Saadi i sur., 2015)

Za pripremu proteinskih hidrolizata najčešće se koriste proteaze iz mikroorganizama (*Alkalaza*, *Neutraza*, *Flavourzyme*, *Protamex*), životinja (PTN, pepsin, tripsin,  $\alpha$ -kimotripsin,

pankreatin) i biljaka (papain, bromelin) (Hajfathalian i sur., 2017). Alkalaza je endoproteaza koja ima široku primjenu u proizvodnji proteinskih hidrolizata, a izolirana je iz *Bacillus licheniformis*. Neutraza je endoproteaza izolirana iz *Bacillus amyloliquefaciens*. *Flavourzyme* sadrži smjesu proteaza i peptidaza izoliranih iz *Aspergillus oryzae* (Nasri, 2017). Komercijalni pripravci uglavnom sadrže endopeptidaze, a mogu sadržavati i kombinaciju endo- i egzopeptidaza. Za proizvodnju jednog proteinskog hidrolizata može se koristiti više proteaza koje mogu biti dodane istovremeno ili u vremenskim razmacima (Hajfathalian i sur., 2017).

Tripsin specifično cijepa proteine i peptide na karboksilnoj strani arginina i lizina, kimotripsin cijepa peptidnu vezu s karboksilne strane aromatskih ili većih hidrofobnih aminokiselina (fenilalanin, tirozin, triptofan). Pepsin A izoliran iz svinjskog želudca cijepa peptidnu vezu na karboksilnoj strani fenilalanina, leucina i glutamata. Alkalaza pokazuje malu specifičnost, ali preferira cijepanje peptidne veze na C-terminusu hidrofobnih aminokiselinskih ostataka (Nasri, 2017).

### 2.1.3. Kemijska hidroliza

Kiselinsku hidrolizu proteina pri povišenoj temperaturi prvi je 1920. godine izveo francuski kemičar Braconnot. Potpuna hidroliza proteina postignuta je pomoću  $6 \text{ mol l}^{-1}$  HCl pri  $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$  kroz 24 h. Za proizvodnju peptida potrebno je znatno kraće vrijeme (2-6 h). Nakon hidrolize proizvod se upari, pasterizira i osuši raspršivanjem. Kiselinska hidroliza proteina je jeftina metoda, a nedostaci ove metode su što dolazi do razaranja triptofana, djelomičnog gubitka metionina, prijelaza glutamina u glutamat i asparagina u aspartat.

Za potpunu hidrolizu proteina mogu se koristiti lužine kao što su kalcijev, natrijev i kalijev hidroksid u koncentraciji  $4 \text{ mol l}^{-1}$ , pri temperaturi  $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$  kroz 20 h. Alkalna hidroliza je jeftina i može se postići 100 % obnova triptofana, a nedostatak je što rezultira potpunim uništenjem većine aminokiselina (Hou i sur., 2017).

Nedostatak kemijske hidrolize leži u tome što mogu nastati toksični nusprodukti, troši se velika količina energije i nastaje ugljikov dioksid, a sve kao rezultat agresivnih reakcijskih uvjeta. Proizvodnja proteinskih hidrolizata enzimskom hidrolizom odvija se u relativno blagim reakcijskim uvjetima (temperatura i pH) čime je izbjegnuto nastajanje toksičnih produkata.

#### 2.1.4. Metode frakcioniranja proteinskih hidrolizata

Metode koje se najčešće koriste za obogaćivanje frakcija bioaktivnim peptidima su ultrafiltracija, kromatografija isključenja po veličini i ionsko-izmjenjivačka kromatografija. Membranski postupci filtracije su najbolja tehnologija za obogaćivanje frakcija peptidima specifične molekulske mase. Najčešće korišteni takav postupak filtracije je ultrafiltracija s membranama koje propuštaju polipeptide i peptide molekule mase manje od 100, 20, 10, 5, 3 i 1 kDa. Kontinuirani enzimski procesi koji koriste membrane u svrhu proizvodnje peptida, poboljšanih nutritivnih i funkcionalnih svojstava, počeli su se koristiti tijekom 1990-ih. Reaktori s membranom za ultrafiltraciju imaju bolju učinkovitost, povećani prinos proizvoda i lakše se prevode u veće mjerilo. Ultrafiltracija s membranama malih pora korisna je za razdvajanje peptida male molekulske mase od proteina i enzima (Nasri, 2017; Korhonen i Pihlanto, 2006).

Supernatant dobiven centrifugiranjem proteinskog hidrolizata podvrgne se ultrafiltraciji, te se frakcionira i koncentrira na temelju molekulske mase. Mnoge studije su pokazale značaj primjene ultrafiltracije za frakcioniranje proteinskih hidrolizata graška (Li i sur., 2011), hidrolizata ovomucina jajeta (Sun i sur., 2016), proteinskog hidrolizata lanenih sjemenki (Nwachukwu i Aluko, 2018) i hidrolizata keratina iz pilećeg pera (Yeo i sur., 2018). Izazove primjene ultrafiltracije u svrhu frakcioniranja predstavljaju interakcije između hidrofobnih peptida i polupropusne membrane, te raspodjela pora različitih veličina u membrani što rezultira filtracijom većih molekula osobito kada je koncentracija hidrolizata visoka. Elektrodijaliza s filtracijskom membranom (EDFM) omogućava istodobno odvijanje hidrolize i razdvajanje nastalih peptida slične molekulske mase na temelju njihovog neto naboja. Međutim, primjena EDMF u industrijskom mjerilu još je nedovoljno istražena.

Među različitim kromatografskim metodama, kromatografija isključenja po veličini (*eng. Size Exclusion Chromatography*, SEC) je najpovoljniji izbor za razdvajanje molekula na temelju razlike u njihovoj veličini. Matrica (čvrsta faza) sadrži pore u koje mogu ulaziti manje molekule što za posljedicu ima duže putovanje takvih molekula kroz mediji, dok veće molekule ne ulaze u pore i imaju kraće vrijeme zadržavanja. Kromatografija isključenja po veličini i ultrafiltracija se često primjenjuju kao prva faza frakcioniranja proteinskih hidrolizata. SEC je brži i ima bolju razlučivost nego ultrafiltracija (Acquah i sur., 2019).

Ionsko-izmjenjivačka kromatografija se pokazala kao perspektivna metoda za obogaćivanje peptidnih frakcija proteinskih hidrolizata. Ova se metoda osniva na razdvajanju komponenti smjese (peptida) na temelju njihove razlike u naboju u odgovarajućem otapalu. Proteini se

moгу otopiti u kromatografskom mediju i *in situ* hidrolizirati odgovarajućim enzimom. Zatim se provede ionska izmjena pri čemu bioaktivni peptidi zaostanu na stacionarnoj fazi odnosno izmjenjivaču, ostali peptidi se isperu, a onda se i bioaktivni peptidi eluiraju, najčešće promjenom pH, kako bi se dobila obogaćena frakcija (Korhonen i Pihlanto, 2006). Ionska izmjena često je uključena kao posljednji korak frakcioniranja koje se provodi u više stupnjeva pomoću više različitih metoda.

Tekućinska kromatografija obrnutih faza (RP-HPLC) koristi hidrofobnu stacionarnu i hidrofilnu mobilnu fazu. Ova se metoda koristi kod jednostupanjskog i višestupanjskog frakcioniranja. Peptidi manje molekulske mase i hidrofobnosti kraće se zadržavaju u koloni pa se brže eluiraju. Tijekom prolaska kroz kolonu uslijed interakcije peptida sa stacionarnom i mobilnom fazom može doći do promjena u njegovoj strukturi.

Kako bi se pospješilo razdvajanje kompleksnih smjesa i postigla bolja razlučivost, umjesto frakcioniranja u jednoj dimenziji koristi se frakcioniranje u više dimenzija. Za razdvajanje bioaktivnih peptida najčešće se koristi kombinacija ultrafiltracije (prvi stupanj) i RP-HPLC (drugi stupanj) (Acquah i sur., 2019).

## 2.2. IZVORI PROTEINSKIH HIDROLIZATA

Proteini iz biljnog i životinjskog tkiva, jaja, mlijeka i mikroorganizama koriste se za proizvodnju bioaktivnih proteinskih hidrolizata. Sastav i primarni redoslijed aminokiselina u proteinskom supstratu predstavljaju ključne čimbenike u proizvodnji proteinskih hidrolizata s biološkom aktivnošću (Nasri, 2017).

Proteini iz morskih organizama predstavljaju važan izvor bioaktivnih peptida budući da se njihov sastav i redoslijed aminokiselina razlikuje od proteina životinjskog i biljnog porijekla. Velika količina nusproizvoda iz prerade ribe se baca ili koristi za pripremu proizvoda niske vrijednosti. Upravo ovi nusproizvodi predstavljaju veliki potencijal za pripremu proizvoda visoke dodane vrijednosti za ljudsku potrošnju. Za pripremu ribljih proteinskih hidrolizata koriste se otpaci zaostali nakon prerade ribe poput ribljih mišića, kostiju, ljuski, kože, peraja i iznutrica (Muzaifa i sur., 2012). Riblji mišići dobar su izvor hranjivih i lako probavljivih proteina, a imaju i izvrstan aminokiselinski sastav. Međutim, riba se lako kvari pa se zbog toga riblje sirovine ne koriste često za proizvodnju proteinskih hidrolizata. Mišići kopnenih životinja uglavnom sadrže proteine sličnog aminokiselinskog sastava.



Proteinski sastav ribljih mišića i mišića kopnenih životinja razlikuju se prvenstveno zato što ribe žive u vodi i drugačije se kreću. Zbog toga riblji mišići imaju manje vezivnog tkiva pa su finije strukture, a različit je i raspored mišićnih vlakana u odnosu na kopnene životinje. Također, ribe su uglavnom hladnokrvne životinje pa u odnosu na toplokrvne životinje imaju drugačija biokemijska svojstva. Riblji proteini su osjetljiviji i skloniji denaturaciji (Kristinsson i Rasco, 2000).

Dobar izvor proteina za proizvodnju hidrolizata predstavlja i pivski kvasac koji zaostaje nakon proizvodnje piva. Njega se u pivarskoj industriji godišnje proizvede oko 400 000 tona. Prednost potrošenog pivskog kvasca je što ima GRAS (Generally Regarded as Safe) status te se smatra sigurnim dodatkom hrani, lijekovima i kozmetici i zaobilazi uobičajene procedure vezane uz dodatak aditiva u navedenim proizvodima. Potrošeni pivski kvasac sadrži visoki udio proteina (45-60 %), ugljikohidrata (35-15 %), vitamina B skupine, minerala, prehrambenih vlakana i RNA (Marson i sur., 2020).

Sirutka je nusproizvod koji zaostaje kod proizvodnje sira i predstavlja vrijednu prehrambenu sirovinu. Iz mlijeka koje se koristi za proizvodnju sira, na kraju procesa dobije se 85-90 % sirutke. Komercijalno dostupni proteini sirutke imaju GRAS status. Proteini sirutke sadrže visoki udio aminokiselina sa sumporom koje su odgovorne za antioksidacijsko djelovanje. Hidrolizirani proteini sirutke osnovni su sastojak pripravaka koji se daju novorođenčadi koja je intolerantna na proteine iz kravljeg mlijeka (Sinha i sur., 2007). Konzumiranje hidroliziranih proteina sirutke nakon tjelovježbe ubrzava oporavak mišića. Ostaje još istražiti mehanizam kojim peptidi iz hidrolizata sirutke utječu na oporavak mišića (Buckley i sur., 2010).

Otpad iz agroindustrije predstavlja dobar izvor vrijednih sastojaka, među njima i proteina pa može postati održiva alternativa s ciljem smanjenja pothranjenosti i gladi u zemljama u razvoju. Velika količina nusproizvoda se godišnje stvara preradom mikroalgi, sojinog brašna, maslina, trešanja, uljane repice i sl. Obično sadrže znatan udio proteina, peptida i aminokiselina. Proizvodnja bioaktivnih peptida iz tih nusproizvoda nije bitno različita od proizvodnje istih iz povrća, a u tu se svrhu često koristi enzimska hidroliza (Montesano i sur., 2020).

Soja (*Glycine max*) je važna poljoprivreda kultura, a sjeme soje sadrži visoku koncentraciju proteina i ulja. Sojino brašno ima visoku koncentraciju S-aminokiselina- metionina i cisteina. 70 % proteina u sjemenu soje čine rezervni proteini glicinin i  $\beta$ -konglicinin. Glicinin ima udio

S-aminokiselina između 3 i 4,5 %. Zbog toga se 98 % proizvedenog sojinog bašna koristi kao hrana za stoku i u akvakulturi. Prehrambeni proizvodi na bazi soje alternativni su izvor proteina populaciji koja ne jede hranu životinjskog podrijetla odnosno veganima. Godine 2008. u svijetu se proizvelo 230 milijuna tona soje (Rizzo i Baroni, 2018; Hartman i sur., 2011).

Sjeme biljke *Cannabis sativa* L., poznate kao industrijska konoplja, izvrstan je izvor hranjivih sastojaka. Sjeme konoplje sadrži preko 30 % ulja i oko 25 % visoko kvalitetnih proteina. Konopljino ulje bogato je polinezasićenim masnim kiselinama, linolnom ( $\omega$ -6) i  $\alpha$ -liolenskom ( $\omega$ -3), a rezervni protein bogat je esencijalnim aminokiselinama. Koncentracija većine esencijalnih aminokiselina u konopljinom rezervnom proteinu zadovoljava preporučene vrijednosti unosa od strane Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) i Organizacije za prehranu i poljoprivredu (FAO) za novorođenčad i djecu. Rezervni proteini konoplje su edestin i albumin. Tang i sur. (2009) su potvrdili kako su proteini konoplje, posebno edestin, lako probavljivi i pogodni za ljudsku prehranu. Pogača konopljinih sjemenki, nusproizvod hladnog prešanja kod proizvodnje ulja, posebno je nutritivno vrijedna.

Kvinoja (*Chenopodium quinoa*) je hrana visoke hranjive vrijednosti budući da sadrži visoki udio proteina, vitamina i minerala. Proteini kvinoje bogati su aminokiselinama lizinom, treoninom i metioninom kojih obično nedostaje u žitaricama i njihove su vrijednosti blizu onima koje preporuča FAO (Montesano i sur., 2020).

Pšenične klice (*Triticum*) sadrže oko 10 % ulja pa se često koriste u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Glavni nusproizvod ekstrakcije ulja je odmašćena pogača pšeničnih klica u kojoj je udio proteina čak 30 %. Zbog toga je brašno pšeničnih klica jedan od najatraktivnijih izvora biljnih proteina (Zhu i sur., 2006).

Laneno sjeme (*Linum usitatissimum*) dugo se koristi kao sirovina za proizvodnju ulja, boja i drugih industrijskih proizvoda. Laneno sjeme zbog svojeg sastava koji uključuje lignan, vlakna, omega-3 masne kiseline, linolensku kiselinu ima pozitivan utjecaj na kardiovaskularni sustav i zdravlje čovjeka i sve je zanimljivija sirovina u prehrambenoj industriji. Kao nusproizvod ekstrakcije ulja zaostaje laneno brašno u kojem je udio proteina između 19,4 i 30,8 % (Udenigwe i sur., 2009).

Uljana repica (porodica *Cruciferae*) jedna je od najvažnijih uljarica na svijetu. Godišnja proizvodnja uljane repice u Kini prelazi 12 milijuna tona. Uljana repica sadrži 38-46 % visoko

kvalitetnog ulja, 20-30 % proteina i druge komponente kao što su glukozinolati, fenoli i fitinska kiselina. Dva glavna proizvoda iz uljane repice su ulje i brašno koje se koristi kao stočna hrana ili gnojivo (Zhang i sur., 2007).

Slatki krumpir ili batat (*Ipomoea batatas*) je poljoprivredna kultura koja se najviše uzgaja u Kini, a suha tvar batata sadrži 1,73-9,4 % proteina. Protein sporamin čini 80 % ukupnih proteina korijena slatkog krumpira. Sporamin se sastoji od monomera, sporamina A i B. U usporedbi s većinom biljnih proteina, proteini slatkog krumpira sadrže veći udio esencijalnih masnih kiselina (Zhang i sur., 2014).

Mahunarke (porodica *Fabaceae*) (grašak, leća, slanutak, lupin, grah) se smatraju hranom koja je pogodna za zdravlje i nutritivno su dobar izvor ugljikohidrata (vlakna, škrob, oligosaharidi), proteina, vitamina i minerala. Redoviti unos mahunarki može biti povezan sa smanjenim rizikom od nekih bolesti kao što su dijabetes, karcinom i kardiovaskularne bolesti (Barbana i Boye, 2010).

Riža (*Oryza sativa*) je glavni izvor hrane za otprilike polovinu svjetske populacije. Uz to što opskrbljuje tijelo energijom, riža je izvor osnovnih i jedinstvenih mikronutrijenata kao što su vitamini, minerali i fenolni antioksidanti. Riža je bogata flavonoidima za koje je utvrđeno da imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala i inhibiraju oksidaciju kolesterola *in vitro*. Riža ima relativno nizak udio proteina, ali su njeni proteini bogati esencijalnom aminokiselinom lizinom (Zhou i sur., 2013). Udio proteina u riži je 5-7 %, a prisutni proteini su glutelin (80 %), globulin (4-15 %), albumin (1-5 %) i prolamin (2-8 %) (Ishikawa i sur., 2015).

### 2.2.1. Biološko djelovanje proteinskih hidrolizata

Funkcionalna i biološka svojstva hidrolizata posljedica su različitih faktora poput uvjeta hidrolize, korištenog proteinskog supstrata, redosljeda aminokiselina i aminokiselinskog sastava, molekulske mase, naboja i sl. Bioaktivni peptidi mogu pokazivati različite učinke i djelovanje koji su opisani u sljedećim poglavljima.

#### 2.2.1.1. Antioksidacijsko djelovanje

Test koji se temelji na inhibiciji peroksidacije linoleinske kiseline pokazao je kako peptidi dobiveni hidrolizom proteina soje pokazuju antioksidacijsko djelovanje i kako ono ovisi o strukturi peptida. Peptidi koji su sadržavali dva tirozinska ostatka imali su veće

antioksidacijsko djelovanje nego peptid s dva histidinska ostatka, dok je peptid tirozin-(histidin-leucin-arginin)-tirozin pokazao najveće antioksidacijsko djelovanje. Aminokiselinski ostaci triptofana, tirozina, metionina, lizina, histidin-tirozin-prolin, prolina, alanina i cisteina, također su odgovorni za antioksidacijska svojstva peptida. Aromatske aminokiseline (triptofan i fenilalanin) hvatači su slobodnih radikala, a tirozin se zahvaljujući fenolnoj skupini ponaša kao donor vodika (Karami i Akbari-Adergani, 2019). Većina peptida s antioksidacijskim djelovanjem sadrži dva do deset aminokiselinskih ostataka u strukturi (Nasri, 2017).

Peptidi s antioksidacijskim djelovanjem mogu se podijeliti u dvije skupine: endogene i egzogene peptide. Endogeni su oni peptidi koji su prirodno prisutni u stanici, a neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih vrsta. Primjeri takvih peptida su glutation, karnozin, ciklo(His-Pro) i humani tripeptid GHK. Egzogeni peptidi s antioksidativnim djelovanjem potječu iz hrane koja ima dobar antioksidacijski potencijal.

Tijekom izolacije, proteini mogu ostati vezani za druge stanične komponente (npr. lignin) i membrane biljnih stanica što otežava izolaciju proteina iz biljnog materijala. Specifičnost strukture biljnih tkiva (nabijenost) otežava pristup proteazama biomasi i ometa hidrolizu proteina. Kako su peptidi s antioksidacijskim djelovanjem uglavnom hidrofobni, smanjena je topljivost takvih peptida u vodenom mediju što otežava njihovo pročišćavanje. Kako bi se zaobišli takvi problemi, hidroliza proteina može biti potpomognuta djelovanjem mikrovalova ili ultrazvuka. Tretman ultrazvukom povećava osjetljivost proteina kada se za hidrolizu koriste pepsin, tripsin i alkalaza (Wong i sur., 2020).

Autohtone bakterije mliječne kiseline fermentacijom su tj. hidrolizom nativnih proteina kvinoje proizvele peptid s antioksidacijskim djelovanjem, a njegova je aktivnost ispitana na staničnoj liniji humanih keratinocita NCTC 2544. Fermentacijom kvinojinog brašna pomoću pomno odabranih starter kultura može se proizvesti funkcionalna hrana, dodaci hrani ili dodaci farmakološkim pripravcima (Montesano i sur., 2020).

#### *2.2.1.2. ACE inhibirajuće djelovanje*

Angiotenzin-konvertirajući enzim (ACE) igra ključnu ulogu u regulaciji krvnoga tlaka budući da katalizira prijelaz angiotenzina I u angiotenzin II (vazokonstriktor) i inaktivira vazodilatator bradikinin. ACE-inhibirajući spojevi se koriste za snižavanje krvnog tlaka kod pacijenata s hipertenzijom. Sintetski ACE-inhibitori izazivaju brojne nuspojave poput dijareje, kašlja, alergija, poremećaja okusa, osip, a nekad i ekstremno nizak krvni tlak. Stoga se

krenulo u potragu za prirodnim spojevima kao što su peptidi koji djeluju kao ACE-inhibitori. Iako njihova učinkovitost nije ista kao i ona sintetskih lijekova, mogu prevenirati bolest kod osoba s blagom hipertenzijom. ACE-inhibitorno djelovanje ovisi o afinitetu aminokiselina na C- i N-terminusu prema aktivnom mjestu ACE. Poznato je kako su di- i tri peptidi s prolinom ili hidroksil prolinom na C-terminusu otporni na degradaciju probavnim enzimima i apsorbiraju se brže nego slobodne aminokiseline. Peptidi manje molekulske mase pokazuju veću bioaktivnost budući je povećana vjerojatnost njihove apsorpcije u intestinalnom traktu i ulaska u stanicu. Peptidi s antioksidativnim i ACE-inhibitorskim djelovanjem su obično bogatiji hidrofobnim aminokiselinskim ostacima koji im omogućuju bolju apsorpciju i interakciju s ciljnim enzimima i slobodnim radikalima (Karami i Akbari-Adergani, 2019).

### *2.2.1.3. Imunomodulirajuće djelovanje*

Peptidi s imunomodulirajućim djelovanjem pomažu domaćinu u borbi protiv patogena, ali ne dolaze u izravnu interakciju s patogenom. Takvi peptidi pospješuju proliferaciju i sazrijevanje stanica nositeljica imunog odgovora, stimuliraju aktivnost prirodno ubilačkih stanica (NK stanice) i makrofaga, potiču sintezu antitijela, kemokina i citokina, te inaktiviraju upalne spojeve. Peptid sojmetid, dobiven iz sojinog proteina  $\beta$ -konglicinina, stupa u interakcije s receptorima na površini stanica makrofaga i neutrofila te oponaša signal imunološkog sustava sličan signalu koji nastaje kao rezultat bakterijske infekcije. Još jedan peptid iz soje pokazuje imunomodulirajuće djelovanje, a radi se o lunazinu koji sadži 43 aminokiselinska ostatka. Lunazin se u krvi i jetri sisavaca nalazi u intaktnom obliku i inhibira acetilaciju histona u jezgri. U interakciji s endogenim citokinima regulira odnosno aktivira ekspresiju gena u NK stanicama. Lunazin inhibira upalne reakcije i sprječava transformaciju stanica induciranu karcinogenima i virusnim onkogenima. Peptidi iz soje i riže potiču stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta kao dio nespecifičnog odgovora domaćina na stresne uvjete. Identificirani su hidrolizati uljane repice koji inhibiraju aktivnost rekombinantne HIV proteaze (Maestri i sur., 2016).

Peptidi s imunomodulirajućim djelovanjem najčešće sadrže od dvije do deset aminokiselinskih ostataka i hidrofobnog su karaktera. Uglavnom sadrže aminokiselinske ostatke glicina, valina, leucina, prolina, fenilalanina, negativno nabijeni aminokiselinski ostatak glutamat i aromatski ostatak tirozina. Također je pokazano kako hidrofobni aminokiselinski ostaci zajedno s jednim ili više ostataka glutamina, glutamata, tirozina, triptofana, cisteina, asparagina i aspartata pridonose imunomodulirajućem djelovanju peptida. Hidrolizati proteina mlijeka, sirutke, jaja, ribljih jajašaca, soje, pšenice, graška i žutog graška,

zelenih mikroalgi i jestivih morskih algi pokazuju imunomodulirajuće djelovanje. Proteinski hidrolizati pripremljeni iz soje i amaranta značajno su utišali ekspresiju upalnih markera NO, iNOS, PGE2, COX-2 i TNF- $\alpha$  u lipopolisaharidim induciranim (LPS) RAW 264.7 makrofagima. Proteinski hidrolizati kazeina i graška pokazali su protuupalno djelovanje utišavajući LPS induciranu ekspresiju pro upalnih gena u THP-1 makrofagima. Primjenom proteinskog hidrolizata pšeničnog glutena kod zdravih volontera se značajno povećala aktivnost NK stanica bez ozbiljnih nuspojava. Međutim, još se jako malo zna o povezanosti strukture peptida i imunomodulacijskog djelovanja, malo je identificiranih peptida poznate strukture, mali je broj istraživanja provedenih *in vivo* i potrebno je dodatno istražiti toksični utjecaj takvih peptida (Chalamaiah i sur., 2018).

#### 2.2.1.4. Antimikrobno djelovanje

Biljke proizvode spojeve koji ih brane od štetocina i patogena. Antimikrobni peptidi predstavljaju prvu liniju obrane od bakterija, gljivica i virusa kod biljaka i životinja, a djeluju na stanične membrane patogena. U urođenu imunost su uglavnom uključeni hidrofobni peptidi i peptidi s pozitivnim nabojem (kationi), a sadrže između 15 i 40 aminokiselinskih ostataka. Antimikrobni proteini i peptidi iz biljaka koji djeluju na patogene mogu se podijeliti u nekoliko skupina. To su kitinaze,  $\beta$ -1,3-glukanaze, proteini slični taumatinu, inhibitori proteaza, endoproteaze, peroksidaze, proteini slični ribonukleazama,  $\gamma$ -tionin, biljni defenzini, oksalat oksidaze i sl.

Inhibitori proteaza su prisutni u gomolju i sjemenkama biljaka. Pokazano je kako inhibitori proteaza sudjeluju u odgovoru biljke na ranjavanje uzrokovano štetocinama ili patogenima. U zadnje vrijeme inhibitori proteaza su sve zanimljiviji zbog mogućnosti preveniranja karcinogeneze u *in vitro* i *in vivo* sustavima. Inhibitori serinskih proteaza izolirani iz krumpira i drugih biljaka djeluju inhibirajuće i na rast tumorskih stanica. Da bi inhibitore proteaza mogli koristiti ljudi, oni ne smiju biti toksični. Za prevenciju proteazom induciranog perianalnog dermatitisa komercijalno su dostupni inhibitori iz sjemena ječma i lišća kupusa. U istu bi se svrhu mogli koristiti inhibitorni proteini i peptidi iz gomolja krumpira (Kim i sur., 2009).

#### 2.2.1.5. Antitumorsko djelovanje

Više proteinskih hidrolizata koji se unose hranom ili izoliranih peptida pokazuju antikancerogenu aktivnost na stanicama u kulturi i životinjskim modelima. Mehanizmi kojima ti peptidi djeluju su induciranje apoptoze, zaustavljanje staničnog ciklusa, oštećenje stanične

membrane, inhibicija adhezije stanica, topoizomeraza, modulacija imunskog odgovora i inhibicija unutarstanične signalizacije. Aminokiselinski ostaci prolina, leucina, glicina, alanina, lizina, arginina, serina, glutamata, treonina i tirozina igraju ulogu u aktivnosti antikancerogenih peptida. Peptid Met-Leu-Pro-Ser-Tyr-Ser-Pro-Tyr izoliran iz proteinskog hidrolizata soje hidroliziranog termoazom pokazuje citotoksični učinak na P388D1 staničnoj liniji. Peptid zaustavlja stanični ciklus spomenute stanične linije u G2/M fazi. Iz proteinskog izolata soje hidroliziranog pepsinom i pankreatinom izolirana su tri peptida, Phe-Glu-Ile-Thr-Pro-Glu-Lys-Asn-Pro-Glu, Ile-Glu-Thr-Trp-Asn-Pro-Asn-Asn-Lys-Pro i Val-Phe-Asp-Gly-Glu-Leu, s inhibitornim učinkom na topoizomerazu II. Topoizomeraza II je ciljna molekula na koju djeluje više antikancerogenih agenasa budući njena inhibicija ometa proliferaciju stanica i diferencijaciju tijekom karcinogeneze. Pentapeptid Glu-Gln-Arg-Pro-Arg izoliran iz zrna riže inhibira rast stanica raka debelog crijeva (Caco-2, HCT-116) 84 %, stanica raka dojke (MCF-7, MDA-MB-231) 80 % i stanica raka jetre (HepG-2) 84 % u dozi 600-700  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Chalamaiah i sur., 2018).

#### *2.2.1.6. Hipokolesterolemično djelovanje*

Više je studija pokazalo kako prehrambeni proteini mogu poboljšati lipidni profil krvi. Za riblje proteine i proteine soje i sirutke se pokazalo kako imaju hipokolesterolemična svojstva odnosno mijenjaju profil plazme iz aterogenog u kardioprotektivni. Proteini i peptidi koji imaju mali udio aminokiselina metionin i glicin odnosno lizin i arginin (riblji i sojini proteini) pokazuju hipokolesterolemični učinak. Proteini soje u zadnje su vrijeme privukli pozornost i predloženi su neki od mehanizama kojim smanjuju razinu kolesterola u plazmi. To su indukcija ekspresije LDL receptora, pojačana sinteza žučne kiseline, izlučivanje i smanjena apsorpcija steroida u crijevima, promjena u omjeru koncentracija inzulina/glukagon i koncentracije tiroidnih hormona. Proteini iz hidrolizata soje učinkovitije smanjuju razinu kolesterola od intaktnih proteina soje. Peptid Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg dobiven iz sojinog proteina glicinina smanjuje razinu kolesterola i strukturno je sličan endogenom peptidu enterostatinu koji ima hipokolesterolemični učinak. Još jedan peptid dobiven iz glicinina, Ile-Ala-Val-Pro-Gly-Glu-Val-Ala, iskazuje sličan učinak. Oba sojina peptida inhibiraju 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktazu (HMGR), ključni enzim u biosintezi kolesterola. Hidrofobnost peptida i prisutnost prolina u strukturi (osim na N-terminusu) nužni su za iskazivanje hipokolesterolemičnog učinka (Karami i Akbari-Adergani, 2019).

### 2.2.2. Primjena proteinskih hidrolizata

Proteini i peptidi iz biljaka i životinja osim nutritivne uloge pokazuju specifičnu fiziološku i biokemijsku aktivnost. Digestijom proteina *in vivo* i *in vitro* oslobađaju se peptidi i aminokiseline koje ulaze u krvotok i djeluju kao signalne molekule, neurotransmiteri, utječu na krvni tlak, san, koncentraciju, seksualno ponašanje, apetit. Proteini su izvor bioaktivnih peptida koji su unutar strukture prekursorskog proteina inaktivni, a oslobađaju se hidrolizom (Dhaval i sur., 2016).

Za razliku od lijekova, proteinski hidrolizati i biopeptidi iz proteinima bogatih namirnica pružaju određene prednosti kao što su visoka biološka aktivnost i široki spektar terapijskih djelovanja i sigurniji su za potrošača. Proteinski hidrolizati i peptidi manje su alergeni od proteina od kojih su nastali. Njihova primjena u različitim formulacijama je sve zanimljivija, a već je izviješteno o poboljšanim nutritivnim i funkcionalnim svojstvima hrane u koju su dodani proteinski hidrolizati. Dodatkom proteinskog hidrolizata sjemenki čije, dobivenog hidrolizom pomoću Alcalase® i Flavourzuma®, u bijeli kruh i kremu od mrkve dobiveni su proizvodi s povišenom ACE-inhibirajućom i antioksidativnom aktivnošću bez da je narušena kvaliteta proizvoda (Segura-Campos i sur., 2013).

Colla i sur. (2013) u svom su istraživanju pokazali kako komercijalni biostimulans Trainer (proteinski hidrolizat mahunarki) pozitivno utječe na rast kukuruza i salate. Korištenjem ovog biostimulanta mogla bi se smanjiti potreba za gnojivom i posljedično smanjiti zagađenje okoliša.

Komercijalno su dostupni proizvodi odnosno pića koja sadrže peptide biljnoga porijekla. Jedan sadrži peptid, cistein-serin-prolin-histidin-prolin, iz soje koji ima hipokolesterolemični učinak, a drugi peptid, leucin-valin-tirozin, iz sezama s antihipertenzivnim učinkom. Proteinski hidrolizati se koriste i za postizanje nutritivnog statusa osoba koje ga ne mogu zadovoljiti unosom konvencionalne hrane, a koriste se ih i sportaši kao visokoenergetski dodatak svojoj prehrani budući povećavaju anabolizam proteina u mišićima (Nasri, 2017).

Proteinski hidrolizati životinjskog podrijetla s najčešćom primjenom u biotehnologiji su hidrolizati kazeina, sirutke i hidrolizati dobiveni iz različitih životinjskih organa. Od biljnih proteinskih hidrolizata najviše se primjenjuju hidrolizati soje, pšenice, a od nedavno hidrolizati riže, graška i sjemenki pamuka (Pasupuleti i sur., 2008).



*Yeastolate* je filtrirani vodeni ekstrakt dobiven autolizom pivskog ili pekarskog kvasca. To je smjesa peptida, aminokiselina, polisaharida, minerala i vitamina. *Yeastolate* se već desetljećima koristi kao ključni dodatak mediju za uzgoj mikroorganizama koji se koriste za proizvodnju vrijednih biotehnoloških proizvoda i rekombinantnih proteina (Shen i sur., 2007).

Bacto Soytone je hidrolizat soje dobiven hidrolizom pomoću enzima izoliranog iz svinje. Sadrži visoke koncentracije vitamina i ugljikohidrata pa je odličan dodatak mediju za uzgoj stanica sisavaca i mikroorganizama u industrijskim bioprocima.

Nusproizvodi iz industrije obrade mesa, nusproizvodi iz pivarske industrije i biljni supstrati podvrgavaju se hidrolizi kako bi se dobili peptidi koji služe kao dodatak hrani za stoku. Sojino brašno je glavni izvor proteina u hrani za stoku, međutim sadrži određene alergene pa se njegova upotreba pokušava smanjiti (Hou i sur., 2017).

### 2.3. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA

#### 2.3.1. Primarne kulture, stanične linije i stanični sojevi

Biljne ili životinjske, stanice uklonjene iz tkiva, mogu se uzgojiti u laboratoriju ako im se osiguraju svi potrebni hranjivi sastojci i ostali uvjeti rasta. Tako *in vitro* uzgojene stanice nazivaju se stanice u kulturi. Stanice u kulturi rastu neovisno jedna o drugoj, slično kao što se ponašaju mikroorganizmi poput bakterija, plijesni i kvasaca (Anonymous 1, 2004).

Stanice i tkiva u kulturi se moraju uzgajati danima ili tjednima kako bi se postigao zadovoljavajući broj stanica. Stoga je važno poznavati aseptične tehnike rada kako bi se stanice sačuvale od kontaminacija, a radnici u laboratoriju zaštitili od infekcija. Pri rukovanju sa stanicama potrebno je nositi zaštitnu opremu poput rukavica, laboratorijsku kutu i zaštitne naočale. Kontaminacije se mogu pojaviti u svakom koraku uzgoja stanica. Laboratorijsko posuđe koje se koristi za uzgoj stanica u kulturi, kao što su pipete, tipsevi, Petrijeve zdjelice i tikvice, potrebno je održavati sterilnima (Phelan i May, 2015).

Primarna kultura su stanice izolirane direktno iz tkiva. Kako bi se stanice odvojile od tkiva, koriste se enzimске metode koje podrazumijevaju upotrebu proteolitičkih enzima poput tripsina ili kolagenaze, kemijske metode i mehaničke metode koje podrazumijevaju mljevenje tkiva i cijepanje kirurškim noževima. Stanice se zatim više puta uzastopno razrjeđuju i centrifugiraju, te prenose u posude za uzgoj. Stanice se lijepe za stjenke posude, a nezalijepljene stanice i ostaci moraju se ukloniti iz okoliša. Stanice primarne kulture su

značajne jer su njihove karakteristike najbližnje karakteristikama stanica *in vivo* (Uysal i sur., 2018).

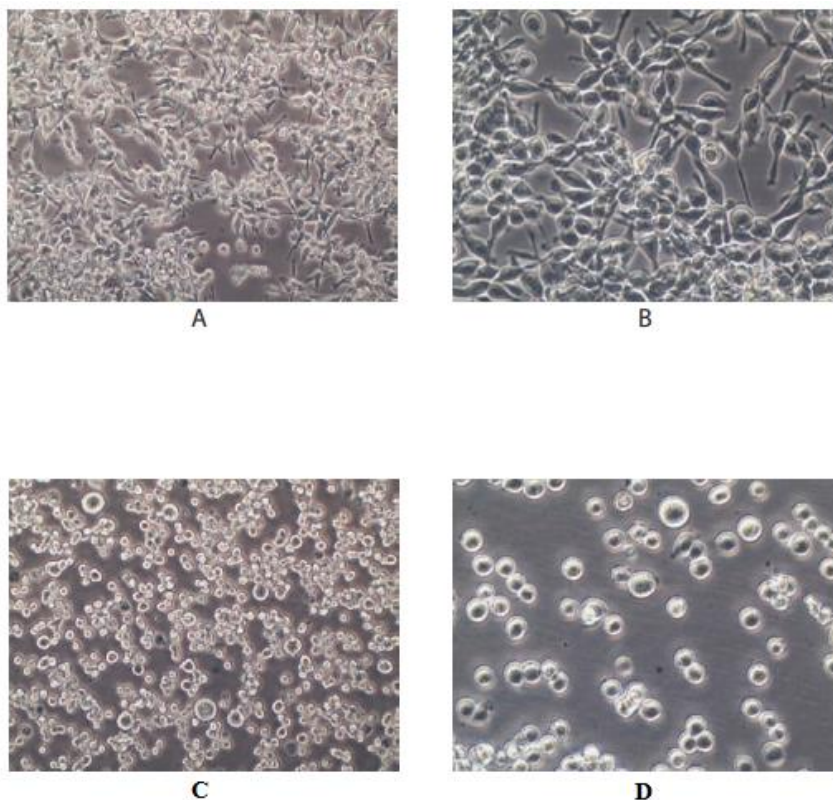
Stanične linije mogu se razmnožavati generacijama, a nekad su i beskonačne (kontinuirane). Kontinuirane stanične linije nastaju iz primarnih kultura postupkom imortalizacije. Imortalizacija se osniva na modifikaciji autolognih gena staničnog ciklusa ili uvođenjem onkogena. Vrlo rijetko imortalizacija se postiže višestrukim subkultiviranjem odnosno precjepeljivanjem. Ne mogu sve primarne kulture dati stanične linije, već stanice nekih primarnih kultura odumiru nakon određenog broja dioba. Takve stanice nazivaju se konačne stanične linije. Besmrtnost se najviše proučava na staničnim linijama sisavaca kako bi se istražili mehanizmi razvoja tumorskih stanica (Bols i sur., 2011).

Kontinuirane stanične linije mogu se uspostaviti:

- a. spontanom mutacijama,
- b. tretmanom stanica kemijskim ili fizikalnim agensima- upotreba radioaktivnog zračenja ili mutagenih sredstava,
- c. stvaranjem hibridnih stanica fuzijom konačnih somatskih stanica s besmrtnim tumorskim stanicama,
- d. transfekcijom viralnim genima ili transdukcijom virusima i
- e. overekspresijom gena regulatora staničnog ciklusa (Slivac i sur., 2016).

Ako se subpopulacija stanične linije dobije pozitivnom selekcijom iz kulture kloniranjem ili nekom drugom metodom nastaje stanični soj (Freshney, 2010). Stanični sojevi su stanice dobivene iz primarne kulture ili iza samo jedne stanice koja se naziva klon, a posjeduju specifična svojstva poput nekog specifičnog markera, antigena ili posjeduju rezistenciju na virus. Stanični sojevi se ne mogu razmnožavati beskonačno, već odumiru nakon određenog broja dioba (AMOSS, 2020).

S obzirom na način rasta, razlikuju se dvije osnovne vrste staničnih kultura. Stanice mogu rasti pričvršćene za površinu (adherentne stanice) ili mogu rasti neovisno o površini (suspenzijske stanice) (slika 4). Većina stanica izoliranih iz kralježnjaka rastu pričvršćene za površinu s izuzetkom hematopoetskih staničnih linija. Ipak, mnoge se stanične linije mogu prilagoditi rastu u suspenziji. Stanice koje se uzgajaju u suspenziji zahtijevaju miješanje kako bi se omogućila adekvatna razmjena metabolita, tj. plinova i hranjivih sastojaka, a to se obično postiže primjenom miješala ili uzgojem na tresilici (Anonymous 2, 2020).



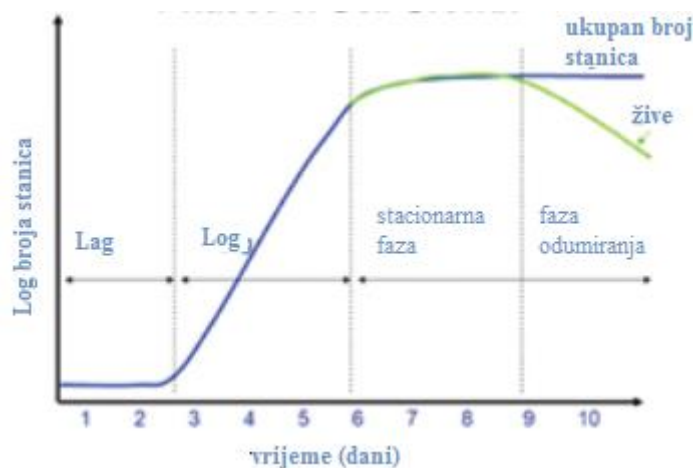
Slika 4. Mikroskopski prikaz adherentnih stanica bubrega ljudskog embrija (HEK) pod povećanje od 10X i 20X (A, B) i istih stanica koje rastu u suspenziji pod povećanjem od 10X i 20X (C, D) (Anonymous 2, 2020)

Za uzgoj adherentnih stanica koriste se različiti materijali koji ne smiju biti toksični za stanice i moraju stanicama pružiti mehaničku sigurnost. To su uglavnom plastični materijali (polietilen, polistiren, polikarbonat, PVC) često premazani polilizinom, drugi čvrsti materijali poput stakla ili metala obloženi želatinom, dekstranom ili celulozom. Adherentne stanice se za precjepljivanje ili trajno spremanje moraju odvojiti od podloge djelovanjem proteolitičkog enzima tripsina (tzv. tripsinizacija) ili mehanički (Freshney, 2010).

Stanice se prije korištenja u eksperimentu moraju analizirati pod mikroskopom. Promjene poput pojave granula oko jezgre, prisutnost vakuola u citoplazmi ili neke druge morfološke promjene, mogu biti znak mikrobne kontaminacije, neadekvatnog sastava seruma/medija za uzgoj, prisutnost toksičnih sastojaka u istom ili je došlo do starenja stanične linije (Anonymous 3, 2013).

Važno je poznavati obilježja rasta stanične linije koja se koristi u eksperimentu, kao što su vijabilnost i brzina rasta, kako bi se stanice lakše pratile tijekom uzgoja. Tipična krivulja rasta stanica u kulturi ima sigmoidalni oblik i može se uočiti nekoliko faza rasta (slika 5). Tijekom

lag faze rasta stanice se ne dijele, nego se prilagođavaju na uvjete u okolišu. Duljina lag faze ovisi o tome u kojoj su fazi rasta stanice bile kada su se precijepile i o brzini razrjeđenja kulture. U eksponencijalnoj ili log fazi rasta stanice se aktivno dijele i njihov broj se povećava eksponencijalno s vremenom. U eksponencijalnoj fazi stanice su najvijabilnije. Pod optimalnim uvjetima rasta različite stanice imaju različitu kinetiku proliferacije. Stanice se obično precijepuju kada su u kasnoj eksponencijalnoj fazi. U stacionarnoj fazi rasta proliferacija se usporava jer su stanice postale konfluentne (kontaktna inhibicija). Manje od 10 % stanica se aktivno dijeli u ovoj fazi rasta. U fazi odumiranja dolazi do značajnog smanjenja broja vijabilnih stanica (Anonymous 3, 2013).



Slika 5. Krivulja rasta stanica (Anonymous 3, 2013)

### 2.3.2. Primjena tehnologije životinjskih stanica

Životinjske stanice koje se najčešće koriste u proizvodnji biofarmaceutika su stanice ovarija kineskog hrčka (CHO), stanice bubrega mladunca hrčka (BHK-21) i modificirane mišje mijeloma stanice (NS0 i Sp2/0). Humane stanice s najčešćom primjenom u proizvodnji su stanice bubrega ljudskog embrija (HEK293) i stanice fibrosarkoma (HT-1080) (Dumont i sur., 2016).

Tehnologija životinjskih stanica ima 70 godina dugu povijest i u tom je razdoblju postala prepoznatljiva s primjenom u industriji, prvenstveno zahvaljujući napretku molekularne i stanične biologije, genetičkog inženjerstva i bioinženjerstva. Početak uspona ove tehnologije bio je pedesetih godina prošlog stoljeća u proizvodnji virusnih cjepiva (cjepivo protiv dječje

paralize). Prvi primjer suspenzijskog uzgoja u velikom mjerilu seže u 1963. godinu, 1975. godine počinje proizvodnja monoklonskih protutijela pomoću stanica sisavaca u kulturi, a u devedesetim godinama prošloga stoljeća kreće se s proizvodnjom pomoću genetički modificiranih životinjskih stanica u industrijskom mjerilu.

Danas se životinjske stanice koriste za proizvodnju različitih proizvoda koji se primjenjuju u terapijske, dijagnostičke i preparativne svrhe. U njih se ubrajaju monoklonska protutijela, citokini, hormoni, signalni proteini, matične stanice za terapijske svrhe i virusne čestice. Također, životinjske stanice svoju su primjenu pronašle u farmakološkim istraživanjima, odnosno u testovima toksičnosti, koriste se kao *in vitro* modeli i igraju veliku ulogu u pronalasku novih lijekova i utvrđivanju njihovog mehanizma djelovanja. Ljudske stanice mogu se uzgajati u svrhu stvaranja umjetnih tkiva i to je područje biotehnologije poznato pod nazivom tkivno inženjerstvo (Anonymous 1, 2004).

Primjena kulture životinjskih stanica:

- ❖ Stanične kulture služe kao modelni sustavi za proučavanje biologije i biokemije stanica, interakcija između stanica, procesa starenja i ispitivanje utjecaja lijekova.
- ❖ Normalne životinjske stanice se djelovanjem radijacije, kemijskih sredstava ili onkogeni mogu transformirati u tumorske stanice i na taj način se mogu proučavati uzroci i mehanizmi nastanka tumora. Također, stanične kulture se koriste kako bi se pronašli lijekovi koji specifično uništavaju samo tumorske stanice (citostatici).
- ❖ Životinjske stanice se koriste za umnažanje virusnih čestica za potrebe proizvodnje cjepiva umjesto da se za to koriste čitavi životinjski organizmi. Cjepiva protiv smrtonosnih virusnih bolesti, dječje paralize, bjesnoće, kozica, ospica i hepatitisa B, se proizvode pomoću kulture životinjskih stanica.
- ❖ Životinjske stanične kulture se koriste u testovima toksičnosti kako bi se ispitivao utjecaj novih lijekova i kemikalija na različite tipove stanica, osobito na stanice jetre i bubrega. Pomoću staničnih kultura se određuje i maksimalna dopuštena doza novog lijeka (Freshney, 2010).

Puno veći broj biotehnoloških proizvoda ipak se i dalje proizvodi pomoću mikrobnih stanica jer životinjske stanice zahtijevaju puno strože uvjete rasta i uzgoja (Hu i Aunins, 1997).

Životinjske stanice u kulturi su osjetljive na kontaminacije bakterijama, kvascima, virusima, mikoplazmama i drugim stanicama budući imaju malu brzinu rasta i relativno dugo generacijsko vrijeme. Pored životinjskih stanica u kulturi, za proizvodnju biofarmaceutika, se

koriste različiti mikroorganizmi kao što su bakterije (najčešće *Escherichia coli*), kvasci (najčešće *Saccharomyces cerevisiae*) i plijesni. Bakterija *E. coli* ima široku primjenu zbog svoje velike specifične brzine rasta, može se uzgajati kontinuirano, relativno su niski troškovi održavanja i daje visoku produktivnost ( $\text{g ml}^{-1}$ ). Međutim, korištenje mikroorganizama za proizvodnju biofarmaceutika koji su po kemijskom sastavu proteini ima određene nedostatke. Bakterija *E. coli* ne može obavljati post-translacijske modifikacije proteina, kao što su N- i O-glikozilacija, ne može katalizirati nastajanje disulfidnih mostova i fosforilaciju. Takve su modifikacije nužne za potpunu funkcionalnost biofarmaceutika. Nedostatak takvih modifikacija utječe na strukturu, funkciju i stabilnost, a samim time i na biološku aktivnost rekombinantnih proteina. Za razliku od *E. coli*, kvasci mogu glikozilirati proteine, ali glikozilacija nije identična onoj u stanicama sisavaca (Gupta, 2015).

### 2.3.3. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica u kulturi

S obzirom da stanice imaju porijeklo iz složenog višestaničnog sustava (organizma) onda su i uvjeti za njihovo održavanje u kulturi *in vitro* prilično zahtjevni. Za većinu životinjskih staničnih linija optimalni pH je oko 7,4 i za održavanje te pH vrijednosti često se koristi HEPES pufer (10-20 mM). Stanice kukaca najbolje rastu pri pH 6,2 (Anonymous 4, 2020). Humane stanice i stanice sisavaca za optimalni rast zahtijevaju temperaturu 36-37 °C. Stanice kukaca se uzgajaju na temperaturi od 27 °C. Iznad 30 °C dolazi do značajnog pada vijabilnosti stanica kukaca, a vraćanjem na 27 °C ne dolazi do povrata vijabilnost. Ptičje stanice optimalni rast postižu pri temperaturi 38,5 °C, mogu se održavati i na 37 °C, ali rastu znatno sporije. Stanice hladnokrvnih životinja rastu pri temperaturama 15-26 °C. Važno je obratiti pažnju da odstupanje od optimalne temperature ne bude veće od  $\pm 0,5$  °C kako bi se osigurala ponovljivost rezultata (Anonymous 3, 2013).

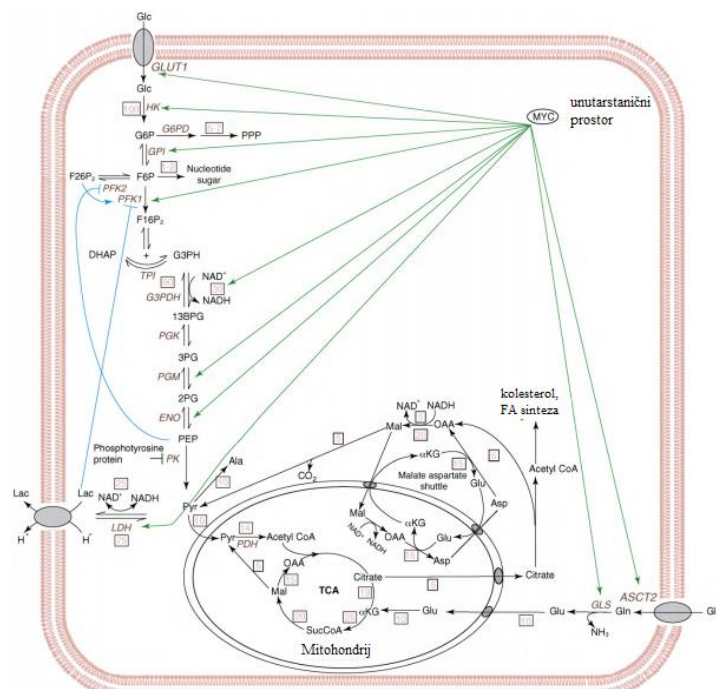
Većina stanica podnosi široki raspon osmolarnosti. Kako je osmolarnost krvne plazme čovjeka  $290 \text{ mosmol kg}^{-1}$ , za očekivati je da humane stanice najbolje rastu pri toj vrijednosti. Optimalna vrijednost osmolarnosti za druge vrste može se razlikovati pa tako optimalna vrijednost za mišje stanice iznosi  $310 \text{ mosmol kg}^{-1}$ . U praksi se pokazalo kako su vrijednosti osmolarnosti između 260 i  $320 \text{ mosmol kg}^{-1}$  prihvatljive za rast većine stanica, a vrijednost koja se odabere na početku za vrijeme uzgoja ne bi smjela odstupati više od  $\pm 10 \text{ mosmol kg}^{-1}$  (Freshney, 2010).

S obzirom na potrebu za kisikom zahtjevi su različiti, ali većina stanica zahtjeva atmosfersku ili manju koncentraciju kisika (Anonymous 1, 2004).

Glukoza i glutamin su dva glavna izvora ugljika za životinjske stanice u kulturi (Butler i sur., 1991). Glukoza je primarni izvor energije za životinjske stanice. Energija oslobođena metabolizmom glukoze ostaje sačuvana u obliku ATP-a ili nekog drugog nukleotid trifosfata i koenzima NAD(P)H. Metabolički putovi u kojima se ta energija stvara ili koristi su: glikoliza, put pentoza-fosfata, aspartat/malat shuttle, glicerol/fosfat shuttle, ciklus limunske kiseline i lanac prijenosa elektrona (Anonymous 5, 2020).

Glukoza se uglavnom metabolizira do piruvata, a piruvat se može prevesti u laktat ili acetoacetat koji ulazi u ciklus limunske kiseline (TCA) i oksidira se do CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O (slika 6).

Kada rastu pri niskim koncentracijama kisika, životinjske stanice prestaju oksidativnim putem metabolizirati glukozu i započinje anaerobna razgradnja velikih količina glukoze do laktata.



Slika 6. Fluks metabolita u životinjskim stanicama (Mulukutla i sur., 2010)

Warburg je primjetio kako tumorske stanice čak i pri normalnim koncentracijama kisika metaboliziraju glukozu na ranije opisani način. Budući je većina staničnih linija koje se koriste u kulturi stanica kontinuirana i ponašaju se slično kao tumorske stanice, one 90 % glukoze prevode do laktata pri normalnim uvjetima rasta. Laktat se nakuplja u staničnom okolišu, toksičan je za stanice pa utječe na njihov rast, produktivnost i vijabilnost (Mulukutla i sur., 2010). Ostatak glukoze odlazi u reakcije puta pentoza-fosfata. Nakupljanje laktata u mediju onemogućuje odvijanje TCA ciklusa kao u *in vivo* uvjetima, a pokazano je kako se ugljik za TCA ciklus uglavnom pribavlja iz glutamina, a manje iz glukoze. Stoga, neke

stanične linije imaju povećanu potrebu za glutaminom ili glutamatom (Freshney, 2010). Koncentracija glutamina u mediju za uzgoj znatno je veća od koncentracije ostalih aminokiselina i obično iznosi 2-4 mM. Stanice glutamin koriste za sintezu proteina, nukleotida i lipida (Butler i sur., 1991). Metabolizmom glutamina nastaje amonijak koji se nakuplja u staničnom okolišu i negativno utječe na rast i produktivnost stanica (Elias i sur., 2003).

Monoseptičnost kulture, često pogrešno nazivana sterilnost, jedan je od glavnih preduvjeta uspješnog postupka uzgoja. To podrazumijeva da prostor u kojem se manipulira stanicama bude najviše moguće aseptičan (sterilan) kako bi se izbjegla kontaminacija drugim staničnim kulturama ili mikrobima. Za tu svrhu laboratoriji su opremljeni posebnim komorama tzv. laminarima u kojem je kontrolirano strujanje zraka kroz filter koji zadržava sitne čestice i mikroorganizme. Laminar ima ugrađenu UV lampu kojom se sterilizira radna površina neposredno prije korištenja uređaja (Philippeos i sur., 2012).

Za održavanje konstantne temperature, koncentracije CO<sub>2</sub> i vlažnosti tijekom uzgoja stanica koristi se CO<sub>2</sub> inkubator. Inkubator bi trebao biti smješten blizu komore za sterilan rad kako bi se smanjile oscilacije u temperaturi i tako izbjegao negativan utjecaj na staničnu kulturu (Slivac i sur., 2016).

#### 2.3.4. Medij za uzgoj životinjskih stanica

Medij za uzgoj stanica je smjesa glukoze, aminokiselina, soli, vitamina, i drugih nutrijenata, a komercijalno je dostupan u praškastom ili tekućem obliku.

Ugljikohidrati u obliku šećera glavni su izvor energije za stanice. Većina medija sadržava glukozu i galaktozu, a neki mediji sadrže maltozu i fruktozu.

pH vrijednost može se regulirati pomoću plinovitog CO<sub>2</sub> koji održava ravnotežu između CO<sub>3</sub><sup>-</sup> /HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> u mediju. To se postiže uzgojem stanica u CO<sub>2</sub> inkubatoru s atmosferom CO<sub>2</sub> 5-10 %. Za održavanje pH koristi se i HEPES, zwitterion, koji ima puferski kapacitet u pH području između 7,2 i 7,4.

Za praćenje pH vrijednosti tijekom uzgoja u medij se dodaje fenol crveno. pH vrijednost medija mijenja se tijekom uzgoja stanica zbog nakupljanja metabolita. Kada pH vrijednost medija padne fenol crveno mijenja boju u žutu, a kada pH vrijednost medija poraste fenol crveno mijenja boju u ljubičastu. Međutim, primjena fenol crvenog ima i neke nedostatke jer



se ponaša slično hormonu estrogenu, u mediju bez dodatka seruma utječe na natrij-kalij ravnotežu i otežava analize koje se provode pomoću protočnog citometra (Arora, 2013).

Pri molekularnim istraživanjima i radu s virusima najčešće se koriste Eagleov minimalni esencijalni medij (EMEM), Dulbeccova modifikacija Eagleovog medija (DMEM) i Roswell Park Institute medij (RPMI 1640). Kod proizvodnih procesa više se koriste selektivni mediji (Philippeos i sur., 2012).

Faktori rasta poput EGF, FGF, IGF, NGF, PDGF i TGF prisutni su u niskim koncentracijama i omogućuju proliferaciju stanica, diferencijaciju, migraciju, sekreciju i unos tvari. Većina stanica zahtijeva dodatak faktora rasta kada se uzgajaju u serum free mediju. Dodaju se hormon rasta, inzulin, hidrokortizon, trijodtironin, estrogen, androgeni, progesteron, prolaktin i sl. Hormon rasta i inzulin poboljšavaju proliferaciju stanica.

Vitamini se dijele na one topljive u mastima (A, D, E i K) i one topljive u vodi (vitamini B skupine i vitamin C). Vitamini su neophodni za odvijanje staničnog ciklusa i rast jer su prekursori brojnih kofaktora.

Od prijelaznih metala najčešće se dodaju Fe, Zn, Cu, Cr, Co, Se, Mn i Mo. Ovi elementi lako podliježu reakcijama prijenosa elektrona pa djeluju u aktivnom mjestu enzima. Se ima antioksidativnu aktivnost u formi selenoproteina poput glutation peroksidaze i tioredoksin reduktaze (Yao i Asayama, 2017).

Anorganske soli dodaju se u medij radi održavanja osmotske ravnoteže i regulacije membranskog potencijala, a dodaju se u obliku iona natrija, kalija i kalcija.

Antibiotici nisu nužni za rast stanica, ali se dodaju u medij zbog kontrole rasta kontaminanata, bakterija i plijesni. Međutim, rutinska upotreba antibiotika se ne preporučuje zbog pojave rezistentnih bakterija.

Aminokiseline su građevne jedinice proteina, stoga su obavezan dodatak svakom mediju za uzgoj stanica. Esencijalne aminokiseline moraju se dodati u medij jer ih stanice ne mogu same sintetizirati. Neesencijalne aminokiseline se dodaju u medij kako bi nadoknadile aminokiseline potrošene tijekom rasta. Dodatak neesencijalnih aminokiselina potiče rast stanica i produljuje njihovu vijabilnost (Arora, 2013).

Životinjski serum je kompleksna smjesa velikog broja komponenti različite molekulske mase koje promoviraju rast stanica ili ga inhibiraju (Brunner i sur., 2010). U kulturi stanica se

koriste serum odraslog konja, humani serum, a najčešće teleći serum (CS) i fetalni goveđi serum (FBS) (Freshney, 2010). Serum osigurava hormone koji stimuliraju rast stanica, proliferaciju i diferencijaciju, proteine koji služe kao prijenosnici hormona (transkordin), minerale, elemente u tragovima, lipide, faktore pričvršćivanja, inhibitore proteaza ( $\alpha$ -antitripsin i  $\alpha$ 2-makroglobulin) i sl. FBS se u medij uglavnom dodaje u koncentraciji 10 % (v/v) (Brunner i sur., 2010). Serum sadrži visoki udio albumina koji služi kao nosač mikronutrijenata i štiti stanice od nepoželjnih promjena pH vrijednosti.

Unatoč svemu navedenom, primjena seruma ima svoje nedostatke zbog sljedećeg:

- ❖ cijena i dostupnost - serum može činiti i do 95 % troškova medija za uzgoj, a njegova dostupnost je promjenjiva,
- ❖ etička pitanja - postupak kojim se serum dobiva iz goveđeg fetusa uzrokuje patnju životinje,
- ❖ varijacije u sastavu - od šarže do šarže sastav seruma se može razlikovati i isti nije definiran što može uzrokovati neujednačen rast stanica i produktivnost. Sastav seruma ovisi o prehrani goveda i njegovom stanju,
- ❖ visoki udio proteina u serumu otežava pročišćavanje proizvoda, posebice ako se radi o monoklonskim protutijelima,
- ❖ izvor kontaminacija- serum može sadržavati viruse, mikoplazme i prione koji mogu kontaminirati proizvod (Butler, 2013).

Mediji za uzgoj se mogu podijeliti u nekoliko različitih grupa (Yao i Asayama, 2017):

- ❖ medij s dodatkom seruma,
- ❖ medij bez dodanih proteina (često samo s proteinskim hidrolizatima),
- ❖ kemijski definirani medij (s preciznim proteinskim sastavom).

Nedostaci primjene seruma u kulturi stanica zahtijevaju razvoj formulacija medija bez dodatka seruma (SFM). Formulacije bez dodatka seruma trebale bi osigurati manje varijacija u sastavu od šarže do šarže i dosljednost u izvedbi. Ti su faktori posebno važni kada je riječ o proizvodnji u velikom mjerilu. Još jedna bitna prednost SFM je što bi se kontaminacije konačnog biofarmaceutskog proizvoda prionima i virusima svele na minimum. Regulatorna tijela zahtijevaju primjenu SFM u proizvodnji biofarmaceutika kad god je to moguće. Kako bi se formirao SFM moraju se nadomjestiti faktori rasta. Različite stanice zahtijevaju različite biokativne komponente stoga nije moguće osmisliti jedinstveni SFM pogodan za sve stanične linije. Čak i različite (klonalne) kulture iste stanične linije mogu imati različite zahtjeve za

optimalan rast. Medij bez dodanih komponenti animalnog podrijetla (*eng. animal derived component free*, ADCF) može sadržavati rekombinantne proteine i proteinske hidrolizate dobivene iz ne-animalnih izvora. Medij bez dodanih proteina (*eng. protein free*, PF) sadrži komponente manje molekulske mase poput peptida, hormona i anorganskih soli. Mnogi komercijalno dostupni mediji koji su označeni kao PF sadrže minimalne količine rekombinantnih proteina. Peptidni hidrolizati biljnog ili mikrobnog podrijetla korišteni u prehrambenoj industriji postali su vrijedan izvor ne-animalnih komponenti koje promoviraju rast stanica sisavaca. Važno je identificirati te komponente kako bi postale dio kemijski definiranog medija. U medij za uzgoj stanica često se dodaju hidrolizati soje, pšeničnog glutena i hidrolizat kvasca (Butler, 2013).

#### 2.4. BILJNI PROTEINSKI HIDROLIZATI U KULTURI ŽIVOTINJSKIH STANICA

Kao što je ranije spomenuto, tehnologija životinjskih stanica iznimno je važna jer se koristi za proizvodnju različitih biofarmaceutika koji kada se proizvode pomoću drugih mikroorganizama ne pokazuju željenu biološku aktivnost. Kako bi se smanjila upotreba seruma i postigao bolji rast i produktivnost životinjskih stanica u kulturi, sve se češće kao dodatak hranjivom mediju za uzgoj stanica dodaju biljni proteinski hidrolizati. Proteinski hidrolizati nastaju hidrolizom proteina iz biljnog i animalnog tkiva, mlijeka ili mikroorganizama različitim postupcima (kemijska ili enzimaska hidroliza, mikroba fermentacija) pri čemu se dobiju kompleksne smjese peptida, aminokiselina, lipida i elemenata u tragovima.

Kada se proteinski hidrolizati razvijaju i koriste u kulturi stanica, važno je u obzir uzeti koriste li se peptidi izravno kao izvor aminokiselina, neizravno kao stimulatori rasta stanica sisavaca ili stimulatori njihove produktivnosti, ili za zaštitu stanica od stresa. Kada se peptidi koriste kao zamjena za slobodne aminokiseline, važan je udio kratkih peptida jer di- i tri-peptidi mogu prolaziti kroz staničnu membranu i onda se u lizosomima dalje razgrađivati na slobodne aminokiseline. Ako se peptidi koriste za indirektnu stimulaciju rasta, važni su redoslijed aminokiselina, njihova konfiguracija i 3D konformacija. Kako bi se razumjelo djelovanje biljnih proteinskih hidrolizata, odnosno mogu li proteinski hidrolizati zamijeniti dodatak slobodnih aminokiselina u standardnom mediju za uzgoj stanica ili imaju i druga funkcionalna svojstva, razvijeni su proteinski hidrolizati s različitim udjelom slobodnih aminokiselina i peptida različitih molekulskih masa (Siemensma i sur., 2010).

Stanice ovarija kineskog hrčka najkorištenije su stanice za proizvodnju rekombinantnih proteina u biofarmaceutici, jer je dokazano da su sigurne, vrše pravilnu glikozilaciju proteina i prilagođene su suspenzijskom rastu pri velikoj koncentraciji stanica u bioreaktorima velikog volumena. Kako industrijski procesi sve više zahtijevaju primjenu medija bez dodatka seruma i komponenti animalnog podrijetla, koriste se peptoni, u vodi topljivi proteinski hidrolizati, koji sadrže peptide, aminokiseline, anorganske soli, lipide, vitamine i šećere. Različita istraživanja su pokazala kako peptoni iz biljaka poboljšavaju rast stanica, povećavaju specifičnu produktivnost ( $\mu\text{g}$  proteina stanica<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>) i volumetrijsku produktivnost (koncentracija proteina u mediju). Učinak jednog proteinskog hidrolizata ne mora biti isti za sve stanične linije i klonove pa se bioproces s dodanim peptonima mora optimirati za konkretnu staničnu liniju (Davami i sur., 2014).

Davami i sur. (2014) su ispitali učinak komercijalno dostupnih peptona čiji je sastav prikazan u tablici 1. Učinak peptona su pratili analizom rasta i produktivnosti rekombinantnih CHO klonova tijekom šaržnog uzgoja. Korištena su dva stabilna klona CHO DG44 stanične linije koja eksprimiraju IgG.

Tablica 1. Prikaz sadržaja aminokiselina i distribucije peptida različite molekulske mase u peptonima korištenim u istraživanju (Davami i sur., 2014)

Pepton	Izvor	Ime	Ukupni sadržaj aminokiselina [g (100 g <sup>-1</sup> )]	Prosječna Mr peptida (Da)	Udio peptida Mr < 0,3 kDa (%)	Udio peptida Mr 0,3 - 1 kDa (%)	Udio peptida Mr 1 - 10 kDa (%)	Udio peptida Mr > 10 kDa (%)
1	kazein	<i>Casein Peptone Plus</i>	85,1	491	38,5	53,0	8,5	0
2	pšenica	<i>Wheat Peptone E1</i>	78,5	474	18,1	79,4	2,5	0
3	soja	<i>Soy Peptone A3 SC</i>	55,2	227	56,0	41,4	2,6	0
4	kazein	<i>Casein Peptone N1</i>	80,5	681	21,6	60,0	1,4	0
5	soja	<i>Soy Peptone A2 SC</i>	53,8	503	30,6	60,8	8,6	0

6	kazein	<i>Casein Peptone E1</i>	82,4	840	23,5	48,6	2,8	0,1
7	kazein	<i>Tryptone NI</i>	81,6	490	31,7	60,1	8,2	0
8	soja	<i>Soy Peptone E 110</i>	49,4	1206	31,1	48,7	18,5	1,9

Klon 1 i 2 su uzgajani u RPMI 160 i LBTC-CDM mediju u koje su dodani peptoni koncentracije 2 g l<sup>-1</sup>. Dodatak peptona imao je pozitivan učinak na akumulaciju biomase oba klona, a kod klona 1 je taj učinak bio izraženiji pa je ovaj klon korišten za daljnje eksperimente. Dodatak peptona 3 i 5 na početku uzgoja i peptona 7 i 8 drugi dan uzgoja imao je veći učinak na prinos IgG. Kada su peptoni u medij dodani u koncentraciji 1 g l<sup>-1</sup> nije zapažen značajan učinak na volumetrijsku produktivnost, a kada su dodani u koncentracijama 2 i 4 g l<sup>-1</sup>, dodatak većine peptona je imao pozitivan učinak na volumetrijsku produktivnost. Dodatak peptona koncentracija većih od 5 g l<sup>-1</sup> imao je inhibitorno djelovanje na rast stanica. Pepton 2 (pšenica) ima najmanji udio lizina, aspartata i triptofana, a najveći udio glutamata, glicina i prolina u formi peptida. Kada je pepton 2 u medij dodan individualno imao je negativan ili slab utjecaj na produktivnost, a u kombinaciji s drugim peptonima pokazao se kao vrlo učinkovit. Peptoni 1, 3, 7 i 8 koji su se zasebno pokazali najučinkovitijima, kada su se koristili u kombinaciji s drugim peptonima nisu bili više učinkoviti. Optimalna koncentracija koju je potrebno dodati u medij varira ovisno o korištenim peptonima, a utjecaj više peptona zajedno ne može se pretpostaviti temeljem rezultata dobivenih za neki pepton korišten zasebno.

Burteau i sur. (2003) su ispitali utjecaj nekoliko biljnih proteinskih hidrolizata na CHO 320 stanicama koje proizvode interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) u suspenziji i mediju bez dodanih proteina. Preliminarni rezultati ukazuju kako podrijetlo hidrolizata ne utječe značajno na specifičnu brzinu rasta stanica, primijećeni su blago pozitivni ili negativni učinci na maksimalnu vijabilnost (značajan pozitivan učinak pokazao je samo hidrolizat pamuka). U odnosu na kontrolu produktivnost se kretala u rasponu 85-137 %, a specifična produktivnost 57-179 %. Pepton pšenice pokazao je negativan učinak na proizvodnju INF- $\gamma$ , a pepton pamuka iznimno pozitivan učinak na koncentraciju vijabilnih stanica i proizvodnju INF- $\gamma$ . Rezultati ukazuju kako visoki udio glutamina i prolina ne utječe na CHO stanice u kulturi u bazalnom kemijski definiranom mediju. Utjecaj sastava slobodnih aminokiselina u peptonima ostao je nepoznat;

smanjena proizvodnja INF- $\gamma$  uočena je u mediju s dodanim peptonom pšenice 1 (28 % slobodnih aminokiselina), a hidrolizat soje 1 (13 % slobodnih aminokiselina) ne pokazuje sličan učinak. Broj vijabilnih stanica i proizvodnja INF- $\gamma$  postignuti su uz dodatak peptona pamuka koji ima visoki udio oligopeptida velike molekulske mase (tablica 2). Nadalje, dodatak peptona pšenice 2 značajno je povećao specifičnu brzinu rasta i koncentraciju (vijabilnih) stanica, a za 28 % je povećana proizvodnja INF- $\gamma$  u odnosu na kontrolu (PF-BDM bez dodatka peptona). Specifična produktivnost CHO 320 stanica povećana je za 21 % uz dodatak peptona graška iako isti pepton nije pozitivno utjecao na parametre rasta stanica (tablica 3). Ispitan je i utjecaj koncentracije biljnih peptona. Nije ispitan utjecaj koncentracija većih od 2 mg ml<sup>-1</sup> zbog potencijalnog štetnog učinka na stanice uslijed nakupljanja amonijaka. Broj vijabilnih stanica raste kao funkcija koncentracije peptona pšenice. Pozitivan utjecaj uočen je i tijekom eksponencijalne i tijekom stacionarne faze rasta. Sličan pozitivan utjecaj nije uočen kada je umjesto peptona pšenice dodana smjesa različitih nutrijenata što sugerira kako utjecaj peptona nije samo nutritivnog karaktera. Zaključili su kako dodatak peptona može poboljšati parametre produktivnosti stanica u kulturi. Značajan porast produktivnosti i koncentracije stanica postignut je uz dodatak samo nekih peptona kojima je zajedničko prisustvo velikih oligopeptida za koje se pretpostavlja da djeluju slično faktorima rasta ili pokazuju antiapoptičko djelovanje.

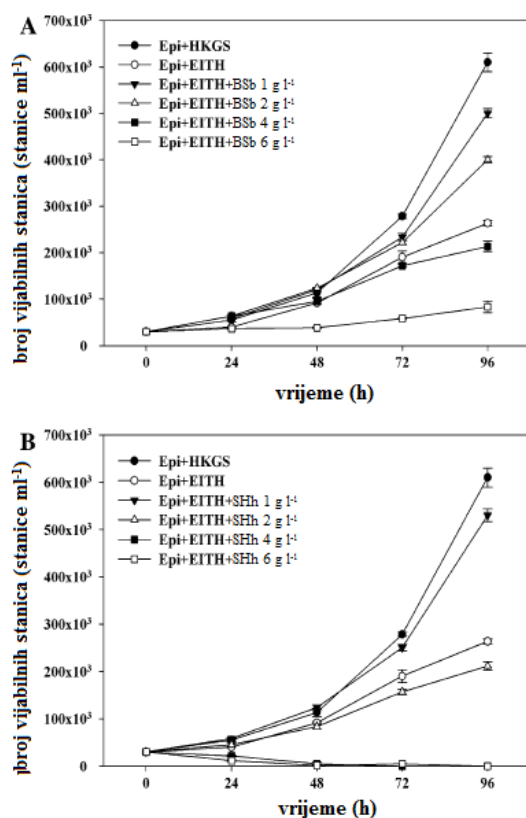
Tablica 2. Prikaz preliminarnih rezultata ispitivanja utjecaja biljnih peptona na rast i produktivnost CHO stanica (Burteau i sur., 2003)

Biljni pepton	Specifična brzina rasta (% kontrole)	Najveći broj vijabilnih stanica (% kontrole)	Proizvodnja INF- $\gamma$ (% kontrole)	Specifična produktivnost (% kontrole)
riža 1 (kontrola)	100	100	100	100
pšenica 1	108 $\pm$ 37	114 $\pm$ 24	85 $\pm$ 9	57 $\pm$ 13
soja 1	99 $\pm$ 5	106 $\pm$ 10	108 $\pm$ 22	129 $\pm$ 72
soja 2	99 $\pm$ 4	96 $\pm$ 8	101 $\pm$ 18	104 $\pm$ 11
pamuk	100 $\pm$ 7	111 $\pm$ 4	137 $\pm$ 26	179 $\pm$ 52
riža 2	95 $\pm$ 0,5	89 $\pm$ 9	85 $\pm$ 42	81 $\pm$ 43

Tablica 3. Rezultati utjecaja biljnih peptona na rast i produktivnost CHO stanica (Burteau i sur., 2003)

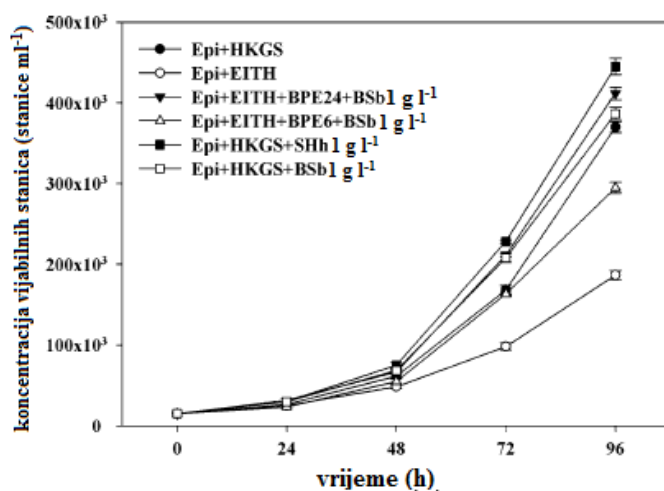
Dodani hidrolizat	Specifična brzina rasta ( $\text{h}^{-1}$ )	Maksimalni broj vijabilnih stanica ( $10^6$ stanica $\text{ml}^{-1}$ )	Produktivnost INF- $\gamma$ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Specifična produktivnost INF- $\gamma$ ( $10^{-8}$ $\mu\text{g stanica}^{-1}\text{h}^{-1}$ )
bez dodanog hidrolizata	$0,0321 \pm 0,0010$	$5,670 \pm 0,371$	$3,24 \pm 0,27$	$1,27 \pm 0,14$
riža 1	$0,0324 \pm 0,0011$	$5,367 \pm 0,470$	$3,47 \pm 0,41$	$1,25 \pm 0,22$
grašak	$0,0313 \pm 0,0007$	$5,142 \pm 0,491$	$3,92 \pm 0,31$	$1,48 \pm 0,15$
pšenica 2	$0,0345 \pm 0,0011$	$6,273 \pm 0,434$	$3,92 \pm 0,62$	$1,43 \pm 0,22$

Humani keratinociti su prevladavajući tip stanica višeslojne epiderme koja čini vanjski sloj kože. Keratinociti koji se nalaze u bazalnom sloju se morfološki i biokemijski razlikuju od onih koji se nalaze u površinskom sloju zbog diferencijacije. Samo keratinociti iz bazalnog sloja imaju sposobnost sinteze DNA i mitoze. Keratinociti se u kulturi uzgajaju adherentno i primjenjuju se za liječenje opekline, rana, poremećaja poput vitiliga, a na keratinocitima se istražuje diferencijacija stanica. Lee i sur. (2008) su ispitali utjecaj biljnih proteinskih hidrolizata na humanim keratinocitima dobivenim iz primarne kulture stanica prepucija uzetih od dječaka starih između 10 i 15 godina. Korištena su dva proteinska hidrolizata soje, Bacto Soytone (BSb1) i hidrolizat soje 1 (SHh1). Ispitan je utjecaj različitih koncentracija hidrolizata na rast stanica u različitim medijima bez dodatka seruma. Najveći broj vijabilnih stanica nakon 96 sati uzgoja porastao je u EpiLife mediju uz dodatak suplementa za rast humanih keratinocita (HKGS) i ekstrakta goveđe hipofize (BPE). Pola od tog broja stanica poraslo je kada su stanice uzgajane u EpiLife mediju uz dodatak EITH i bez dodatka BPE. Kada je u EpiLife i EITH dodano  $1 \text{ g l}^{-1}$  BSb1 ili SHh1, broj poraslih stanica nakon 96 sati iznosio je 189 odnosno 201 % u odnosu na broj stanica poraslih u EpiLife uz dodatak EITH, a u odnosu na broj stanica poraslih u EpiLife uz dodatak HKGS iznosio je 82 odnosno 89 % (slika 7). Ovi rezultati ukazuju na to da BSb1 i SHh1 mogu barem djelomično zamijeniti dodatak BPE.



Slika 7. Utjecaj različitih koncentracija proteinskih hidrolizata soje na rast keratinocita (Lee i sur., 2008)

Zatim je ispitan utjecaj dodatka različitih kombinacija proteinskih hidrolizata i BPE te je pokazano kako je rast stanica u prisustvu BPE povećan uz dodatak proteinskih hidrolizata soje uspoređujući ga s rastom u prisustvu BPE (slika 8). Međutim, dodatak samo proteinskih hidrolizata u kulturu ne bi u potpunosti zamijenio komponente prisutne u BPE.

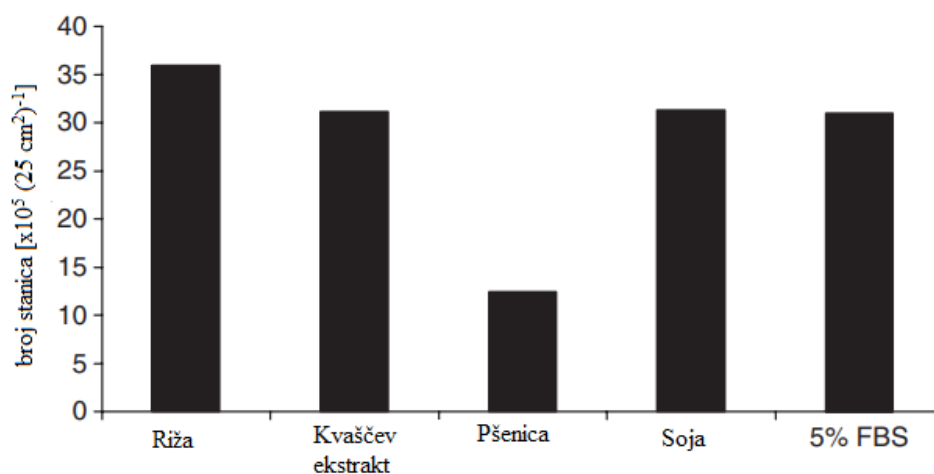


Slika 8. Utjecaj različitih kombinacija dodataka mediju za uzgoj na rast keratinocita (Lee i sur., 2008)



Potrošnja glutamina i proizvodnja glutamata bili su slični u svim ispitanim kombinacijama dodanog suplementa i BPE. 40 % više glukoze je potrošeno za rast stanica u tri kombinacije medija (EpiLife+EITH+BPE, EpiLife+HKGS+SHh i EpiLife+HKGS+BSb) nego kod kontrole (EpiLife+HKGS), vjerojatno zbog poboljšanog rasta stanica uslijed dodane kombinacije suplementa i BPE.

Lobo-Alfonso i sur. (2008) su ispitali učinak prototipa medija bez dodatka seruma uz dodatak biljnih proteinskih hidrolizata na rast Vero stanica sa svrhom proizvodnje virusa. Rast je uspoređen s rastom stanica u Eagleovom minimalnom esencijalnom mediju uz dodatak 5 % (v/v) FBS (kontrola). Broj stanica koje su porasle u mediju uz dodatak proteinskog hidrolizata soje bio je gotovo isti kao kod kontrole, a broj stanica koje su porasle uz dodatak proteinskog hidrolizata riže bio je veći nego kod kontrole (slika 9). Broj stanica poraslih u mediju uz dodatak proteinskog hidrolizata pšenice bio je znatno manji nego kod kontrole što nije iznenađujuće budući je u ranijim istraživanjima pokazano kako proteinski hidrolizat pšeničnog glutena i hidrolizati s visokim udjelom slobodnih aminokiselina iskazuju toksičan učinak na neke stanice i inhibiraju sintezu proteina.



Slika 9. Usporedba utjecaja različitih proteinskih hidrolizata na rast VERO stanica (Lobo-Alfonso i sur., 2008)

Franěk i sur. (2000) su u svom istraživanju pripremili proteinske hidrolizate soje i pšenice, te odredili njihov utjecaj na rast i produktivnost mišjih hibridoma stanica ME-750. Korištene stanice producenti su imunoglobulina. Dva proteinska hidrolizata soje, SO-PA (nefrakcionirani) i SO-PA a 24, su imala pozitivan utjecaj i na rast stanica i na prinos imunoglobulina u odnosu na kontrolu (bez dodatka proteinskih hidrolizata) (tablica 4). Tri proteinska hidrolizata pšenice, HY-TRIT a 1, HY-TRIT a 21 i HY-TRIT a 22, su imala

pozitivan utjecaj na rast stanica i prinos imunoglobulina u odnosu na kontrolu (tablica 5). Dodatak HY-TRIT a 21 frakcije u šaržno uzgajanu kulturu mišjih hibridoma stanica u koncentraciji 0,1 % imao je snažan učinak na porast ukupnog broja stanica i na njihovu vijabilnost. Konačni prinos imunoglobulina bio je 2,27 puta veći u odnosu na kontrolu (slika 10). Zaključili su kako proteinski hidrolizati ne služe samo kao izvor aminokiselina, već u njima prisutni peptidi oponašaju djelovanje faktora rasta i faktora preživljenja.

Tablica 4. Utjecaj SO-PA frakcija na rast i produktivnost stanica (Franěk i sur., 2000)

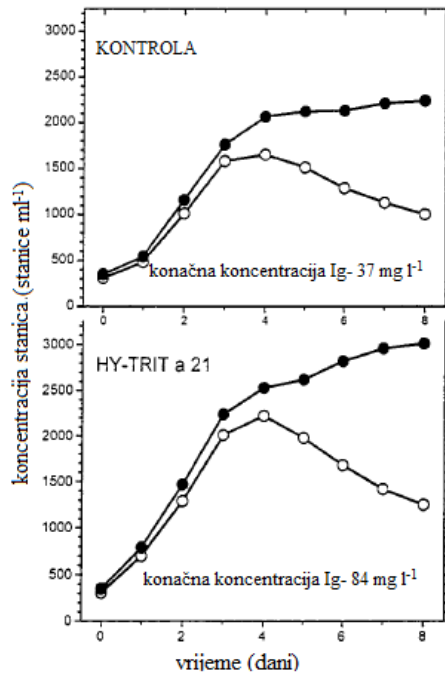
Dodano	Koncentracija vijabilnih stanica		Koncentracija imunoglobulina	
	stanica ml <sup>-1</sup> (*10 <sup>3</sup> )	% kontrola	mg ml <sup>-1</sup>	% kontrola
0 (kontrola)	1190	100	41	100
SO-PA (nefrakcionirano)	1270	107	46	112
SO-PA a 2	1490	125	40	98
SO-PA a 23	1120	94	36	88
SO-PA a 24	1790	150	98	239
SO-PA a 25	1070	90	47	115

\*vrijednosti su određene šesti dan uzgoja

Tablica 5. Utjecaj HY-TRIT frakcija na rast i produktivnost stanica (Franěk i sur., 2000)

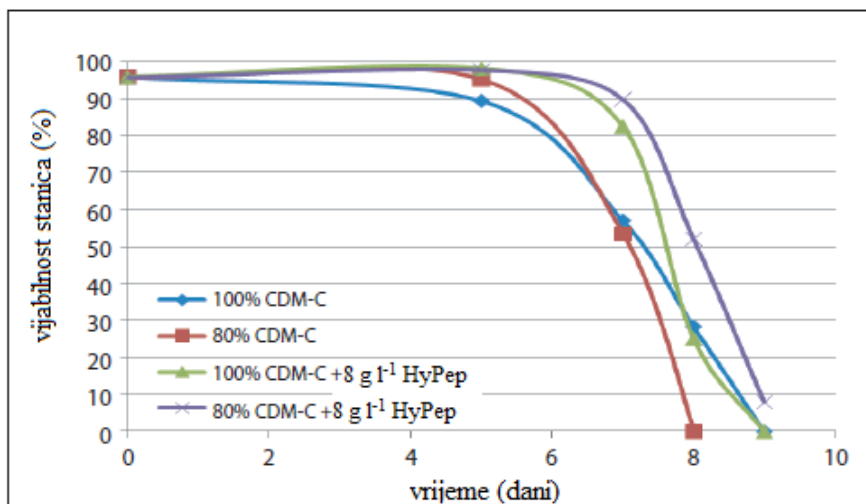
Dodano	Koncentracija vijabilnih stanica		Koncentracija imunoglobulina	
	stanice ml <sup>-1</sup> (*10 <sup>3</sup> )	% kontrola	mg ml <sup>-1</sup>	% kontrola
0 (kontrola)	1220	100	64	100
HY-TRIT (nefrakcionirano)	1810	148	120	188
HY-TRIT a 1	1860	152	119	186
HY-TRIT a 21	2200	180	150	234
HY-TRIT a 22	1700	139	108	169
HY-TRIT a 23	1590	130	72	113

\*vrijednosti su određene šesti dan uzgoja



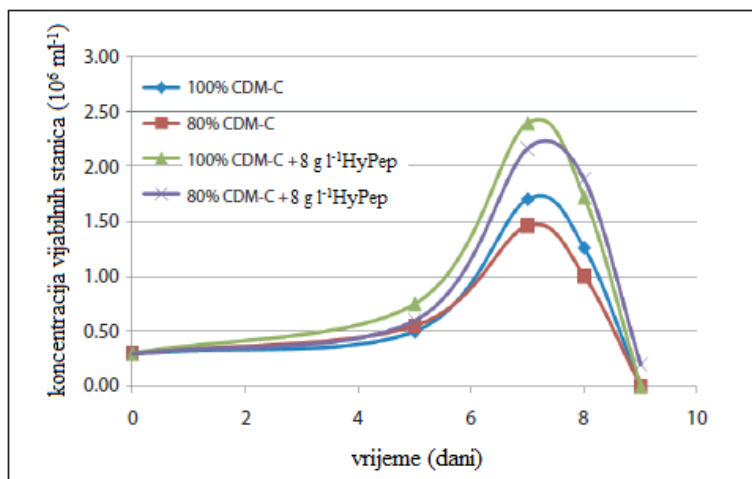
Slika 10. Prikaz ukupnog broja stanica (●) i broja vijabilnih stanica (○) poraslih u kontroli i mediju s 0,1 % HY-TRIT a 21 (Franěk i sur., 2000)

Babcock i sur. (2010) ispitali su utjecaj proteinskih hidrolizata soje, pšenice i pamuka na rast i produktivnost CHO stanica. Nisu svi proteinski hidrolizati imali pozitivan utjecaj na stanice korištene u eksperimentu (CHO i SP2/0 hibridoma stanice). Osobito zanimljivi rezultati dobiveni su korištenjem proteinskog hidrolizata sjemena pamuka (HyPep 7504). HyPep 7504 je, u komercijalno dostupan kemijski definirani mediji (CDM) (koncentrirani i 80 %-tni), dodan u koncentraciji 8 g l<sup>-1</sup>. U oba je slučaja produžena vijabilnost CHO stanica u odnosu na kontrolu u koju nije dodan proteinski hidrolizat (slika 11).



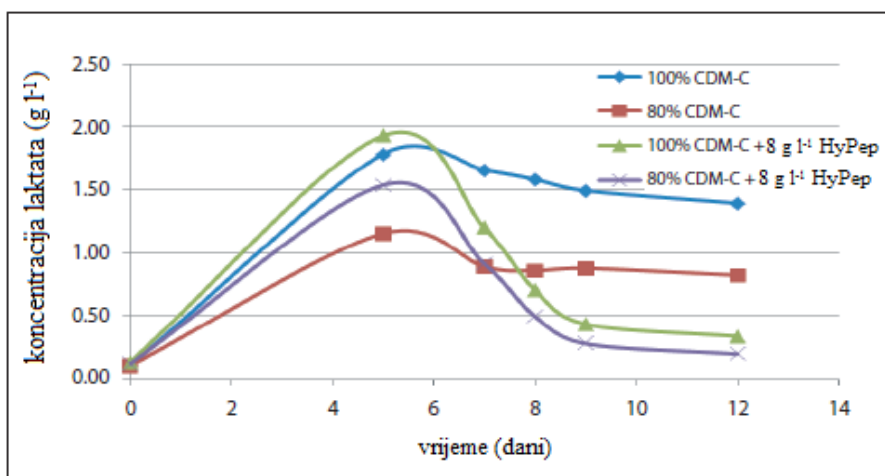
Slika 11. Vijabilnost CHO stanica u kemijski definiranom mediju sa i bez dodatka HyPEP 7504 (Babcock i sur., 2010)

Dodatkom HyPep 7504 u koncentrirani CDM značajno je povećana najveća koncentracija CHO stanica u odnosu na kontrolu (100 %-tni CDM) (slika 12). CHO stanice su pokazale poboljšani rast, vijabilnost i produktivnost u mediju s dodanim HyPep 7504 u odnosu na kontrolu (slika 12).



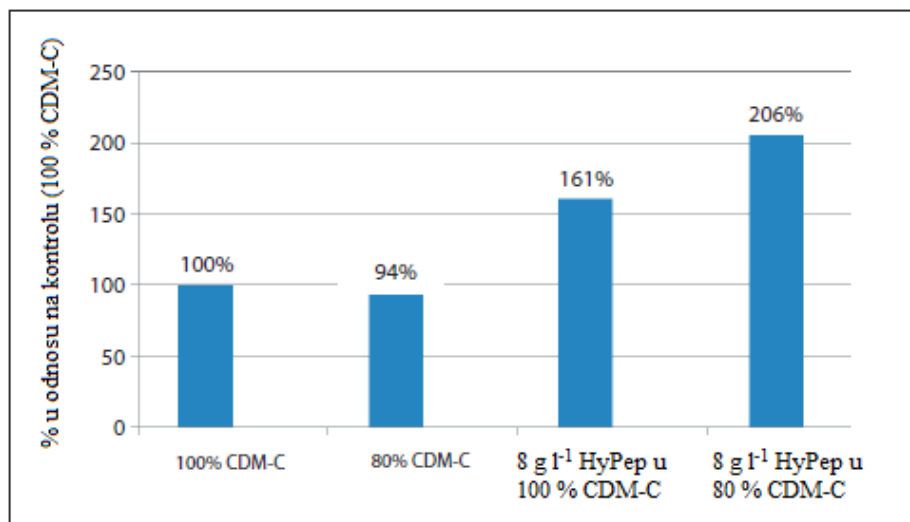
Slika 12. Rast CHO stanica uzgajanih u kemijski definiranom mediju sa i bez dodatka HyPep 7504 (Babcock i sur., 2010)

Određena je i koncentracija laktata u mediju sa i bez dodatka proteinskog hidrolizata sjemenki pamuka HyPep7504. Dodatak HyPep 7504 u medij za uzgoj stanica rezultirao je promjenama u metabolizmu što je dovelo do smanjenja proizvodnje laktata nakon petog dana uzgoja (slika 13).



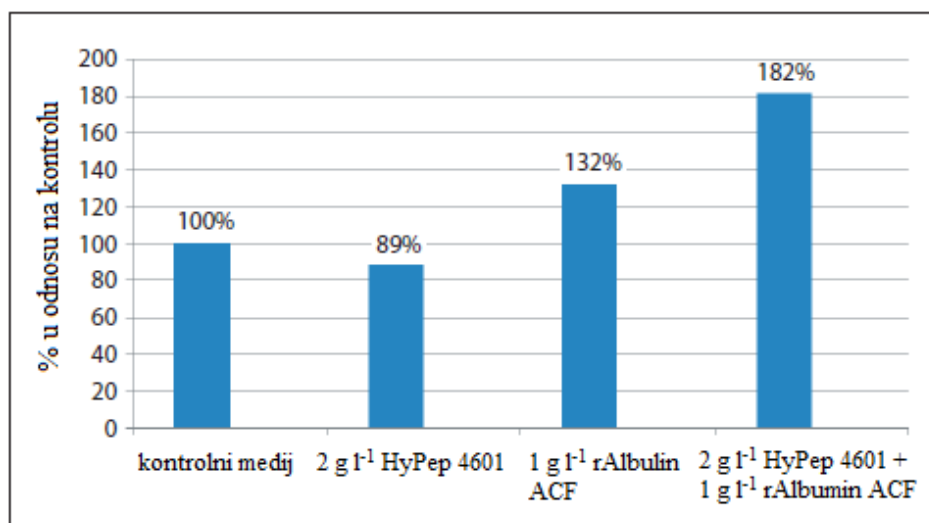
Slika 13. Proizvodnja laktata u kemijski definiranom mediju sa i bez dodatka HyPep 7504 (Babcock i sur., 2010)

Dodatak HyPep 7504 u kemijski definirani medij je pokazao značajan pozitivan utjecaj na proizvodnju tzv. reporter-proteina SEAP (*eng. secreted embryonic alkaline phosphate*) u CHO stanicama (slika 14).



Slika 14. Proizvodnja SEAP u CHO stanicama u mediju sa i bez dodatka HyPep 7504 (Babcock i sur., 2010)

Iako dodatak proteinskog hidrolizata pšenice (HyPep 4601) u medij za uzgoj nije pokazao pozitivan utjecaj na rast CHO stanica, kada je HyPep 4601 dodan u medij u kombinaciji s rekombinantnim albuminom iz humanog seruma (rHSA) produktivnost SP2/0 hibridoma stanica odnosno titar imunoglobulina G (IgG) bio je 30 % veći u odnosu na kulturu uzgajanu uz dodatak samo rHSA i 80 % veći u odnosu na kontrolu (slika 15).



Slika 15. Prinos IgG u SP2/0 stanicama (Babcock i sur., 2010)

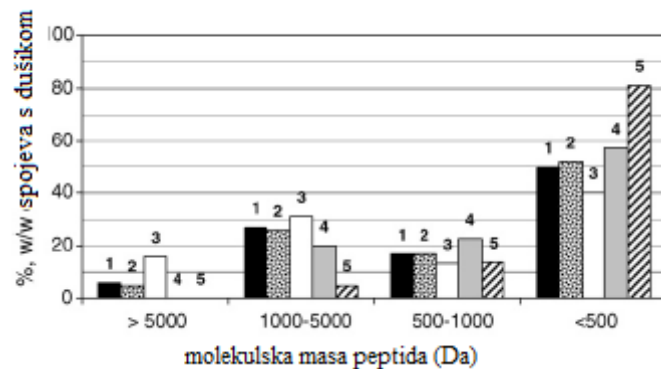
Farges-Haddani i sur. (2006) su ispitali utjecaj peptidnih frakcija proteinskog hidrolizata uljane repice na rast i produktivnost CHO C5 stanične linije koja proizvodi rekombinantni interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). CHO stanice su uzgojene na ploči s 96 jažica u koje je dodan jednostavni medij bez dodatka seruma (RPMI) sa ili bez dodatka peptidnih frakcija čija je koncentracija  $4 \text{ g l}^{-1}$ . Dodatak peptidnih frakcija različitog sastava (tablica 6) imao je različit utjecaj na stanice. Dodatkom frakcije 4 postignuta je najveća koncentracija stanica i ta vrijednost je iznosila  $6 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ . Kada je u medij dodana frakcija 5 koncentracija stanica bila je slična referentnoj vrijednosti, tj. kontroli ( $4,2 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ) i iznosila je  $3,7 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ . Dodatak frakcija 1 i 2 nije imao niti pozitivan niti negativan utjecaj na rast CHO stanica, dok je dodatkom frakcije 3 značajno inhibiran rast stanica. To pokazuje kako peptidne frakcije mogu imati različit utjecaj na rast stanica u kulturi, ovisno o metodi korištenoj za frakcioniranje. Citotoksični učinak frakcije 3 može se objasniti niskom čistoćom budući je udio dušika 50 % (w/w), te prisutnošću neproteinskih molekula poput lipida i polifenola velike molekulske mase.

Tablica 6. Sastav proteinskih hidrolizata (Farges-Haddani i sur., 2006)

Sirovina/Hidrolizat	Ukupni udio dušika (%, w/w, ukupna masa)	Slobodne aminokiseline (%, w/w, ukupne mase dušika)	Fenolne komponente (%, w/w, ukupne mase)
uljana repica 1	76	4	1
uljana repica 2	80	4	0,9
uljana repica 3	50	4	1,7
uljana repica 4	90	3	0,9
uljana repica 5	85	9	0,6
soja	53	13	/
pšenica	74	1,9	/
grašak	71	0,7	/

Frakcija 5 se od frakcije 4 razlikuje po tome što sadrži veći udio slobodnih aminokiselina i malih peptida molekulske mase manje od 500 Da, ne sadrži veće peptide i manji je udio fenolnih komponenti. Frakcije 1 i 2 nisu imale stimulirajući utjecaj na rast stanica, vjerojatno zbog većeg udjela soli s natrijem i klorom buduće te dvije frakcije nisu frakcionirane

membranskim procesom. Frakcije 1, 2 i 5 su pokazale sličan utjecaj na rast stanica što sugerira kako nutritivni doprinos peptida male molekulske mase nije jedini faktor koji utječe na aktivnost frakcija. Veći broj stanica koje su rasle uz dodatak frakcije 4 sugerira kako peptidi veće molekulske mase prisutni u toj frakciji oponašaju djelovanje faktora rasta i preživljenja (slika 16).

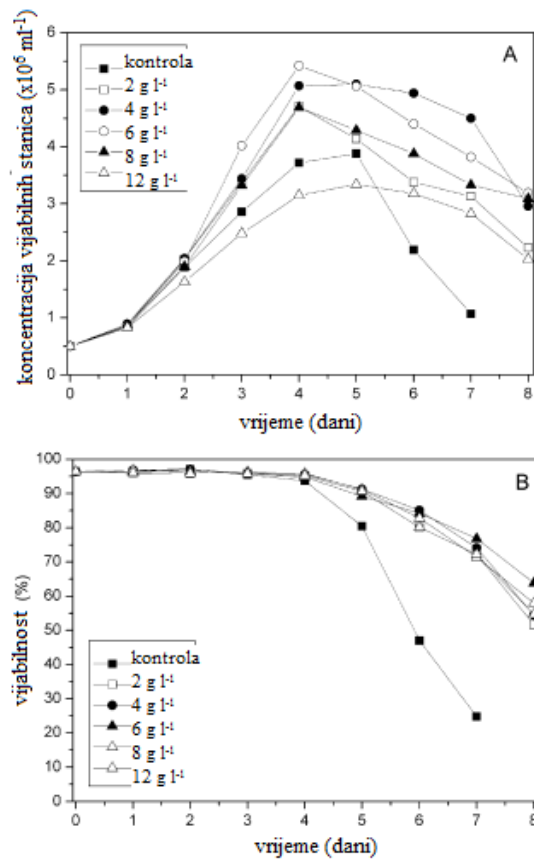


Slika 16. Distribucija peptida različite molekulske mase u pet frakcija proteinskog hidrolizata uljane repice (Farges-Haddani i sur., 2006)

Prema Pasupuleti i sur. (2008) kod proizvodnje Hib/Hep B (Comvax), Hep B (Recombivax) i Pneumococcal (Prevnar) cjepiva u SAD-u se u medij za uzgoj dodaju ili kao adjuvanti koriste proteinski hidrolizati soje.

Rast CHO 320 stanica, klonova CHO K1 stanične linije genetički modificirane kako bi proizvodile humani interferon- $\gamma$  i prilagođene suspenzijskom rastu, znatno je poboljšan u mediju bez dodatka seruma uz dodatak proteinskog hidrolizata riže (Sheffield<sup>TM</sup> Bio-Science) nego što je bio u mediju bez dodatka seruma. Rast CHO 320 stanica i njihova produktivnost bili su jednaki onima u mediju sa dodatkom seruma (Siemensma i sur., 2010).

Chun i sur. (2007) su ispitali utjecaj različitih neanimalnih proteinskih hidrolizata na CHO staničnoj liniji. Svaki od hidrolizata zasebno je dodan u CDM za uzgoj CHO stanica kako bi se usporedio njihov rast. Maksimalna koncentracija stanica u kulturi uzgajanoj šaržno kretala se između 106 i 144 % u odnosu na kontrolu u koju nije dodan hidrolizat. Specifična brzina rasta stanica iznosila je između 99 i 129 % u odnosu na kontrolu. Proteinski hidrolizat soje imao je pozitivniji utjecaj na rast, vijabilnost i dugovječnost CHO stanica nego ijedan drugi proteinski hidrolizat. Koncentracija stanica se povećavala s povećanjem koncentracije proteinskog hidrolizata soje do koncentracije od 6 g l<sup>-1</sup>, a nakon toga je opadala (slika 17).

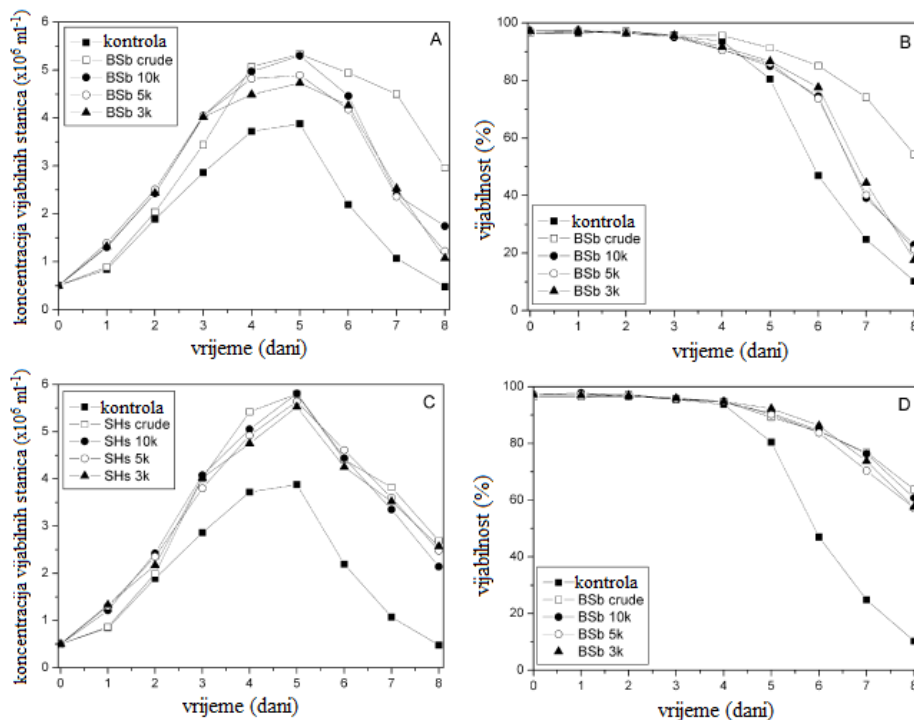


Slika 17. Utjecaj različitih koncentracija proteinskog hidrolizata soje na rast CHO stanica (A) i vijabilnost (B) (Chun i sur., 2007)

Visoke koncentracije hidrolizata inhibiraju stanični rast vjerojatno zbog poremećaja nutritivne ravnoteže uslijed visoke koncentracije aminokiselina i oligopeptida. Vijabilnost stanica bila je veća od 50 % tijekom osam dana uzgoja bez obzira na koncentraciju hidrolizata što sugerira kako pravilna upotreba hidrolizata može povećati koncentraciju stanica održavajući visokom vijabilnost stanica.

Ispitan je i utjecaj frakcija proteinskih hidrolizata soje dobivenih ultrafiltracijom da bi se odredilo kako proteini različite molekulske mase djeluju na rast stanica. Stanice koje su rasle uz dodatak sirovog *bacto soytone* (BSb) imale su nešto nižu koncentraciju vijabilnih stanica prvih pet dana uzgoja nego stanice koje su rasle uz dodatak triju frakcija BSb, ali je poslije petog dana koncentracija stanica uz dodatak sirovog BSb bila veća. CHO stanice uzgajane uz dodatak sirovog BSb su imale veću koncentraciju nakon četiri dana uzgoja nego stanice uzgajane uz dodatak ostale 3 frakcije BSb. Nasuprot tome, CHO stanice koje su rasle uz dodatak sirovog hidrolizata soje (SHs) kao i stanice rasle uz dodatak tri frakcije tog hidrolizata imale su sličan profil rasta i vijabilnosti (slika 18).





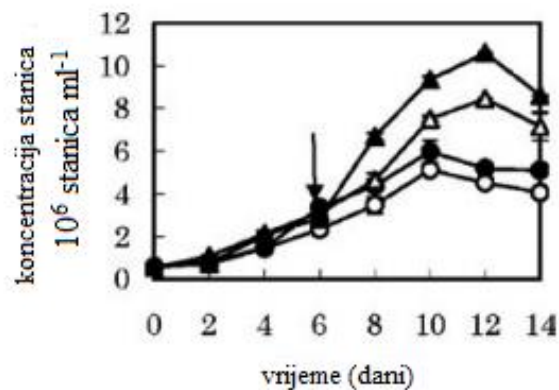
Slika 18. Profil rasta CHO stanica u kemijski definiranom mediju bez dodanih proteina uz dodatak različitih frakcija dvaju proteinskih hidrolizata, BSb i SHs. Koncentracija frakcija je 6 g l<sup>-1</sup> (Chun i sur., 2007)

Stanice kukaca zbog jednostavne genetičke manipulacije i sposobnosti vršenja post-translacijskih modifikacija predstavljaju dobre domaćine za proizvodnju humanih proteina. Nedostaci korištenja seruma ili komponenti seruma za poboljšanje rasta stanica su visoka cijena i rizik od kontaminacije. Kako bi se osigurala sigurnost biofarmaceutika proizvedenih pomoću stanica kukaca u kulturi za terapijske svrhe i cjepiva, razvoj medija bez dodatka seruma uz dodatak proteinskih hidrolizata postao je važan izazov u tehnologiji stanica kukaca (Kwon i sur., 2005).

Kwon i sur. (2005) su ispitali utjecaj različitih proteinskih hidrolizata na rast dviju staničnih linija dudovog svilca (*Bombyx mori*), BmN4 i Bm5. Stanične linije su inficirane rekombinantnim Ac-BmNPV hibridnim virusom koji je fuzioniran s genom za β-galaktozidazu. Korišteni biljni proteinski hidrolizati su HyPep 1510, Baco Soytone i Polypeptone S. Kako bi odredili optimalnu koncentraciju proteinskog hidrolizata za rast Bm5 stanica u Sf-900 II SFM, provedeni su eksperimenti s koncentracijama između 0 i 2 % (w/v). Koncentracija hidrolizata 0,5 % se pokazala netoksičnom i dovoljnom za povećanje rasta Bm5 stanica. Dodatak 4 % FBS se pokazao dovoljnim za stabilan rast stanica. Koncentracija

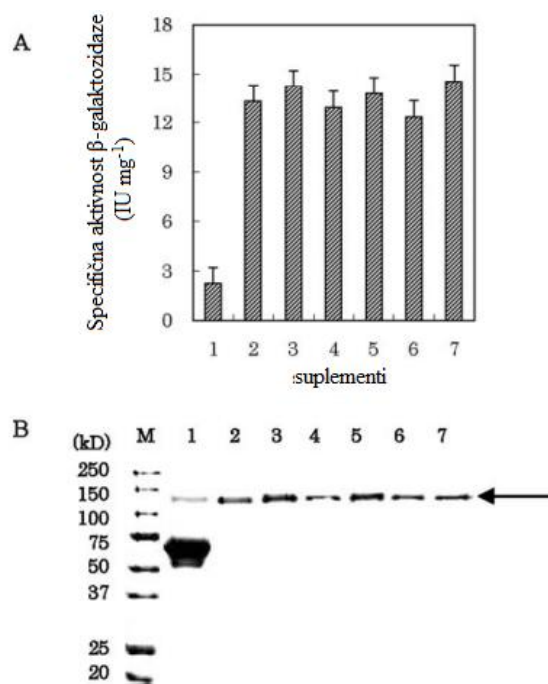
Bm5 stanica u Sf-900 II SFM uz dodatak HyPep 1510 bila je više od 1,5 puta veća nego Sf-900 II SFM uz dodatak FBS i iznosila je  $5,88 \times 10^6$  st ml<sup>-1</sup>. Koncentracija BmN4 stanica u Sf-900 II SFM uz dodatak FBS bila je  $4,85 \times 10^6$  st ml<sup>-1</sup>, a u SFM uz dodatak 0,5 % Bacto Soytone  $5,79 \times 10^6$  st ml<sup>-1</sup>. Specifična brzina rasta Bm5 stanica uz dodatak HyPep 1510 bila je 0,36 dan<sup>-1</sup> odnosno veća nego uz dodatak bilo kojeg drugog ispitanog proteinskog hidrolizata. Specifična brzina rasta BmN4 stanica uz dodatak HyPep 1510 iznosila je 0,37 dan<sup>-1</sup> i bila je slična vrijednosti specifične brzine rasta stanica uzgajanih u Sf-900 II SFM uz dodatak FBS.

Kako bi se unaprijedio rast Bm5 stanica, šesti dan uzgoja Sf-900 II SFM je medij zamijenjen svježim medijem. Kada je zamijenjen s 4 % FBS koncentracija stanica je bila slična onoj u Sf-900 II SFM. Međutim, kada je Sf-900 II SFM zamijenjen s 0,5 % polypeptone ili HyPep 1510, koncentracija stanica je iznosila  $8,46 \times 10^6$  odnosno  $10,6 \times 10^6$  stanica ml<sup>-1</sup>. Navedene vrijednosti su 1,5 i 1,8 puta veće nego vrijednost koncentracije stanica u Sf-900 II SFM (slika 19).



Slika 19. Krivulje rasta Bm5 stanica nakon zamjene Sf-900 II SFM svježim medijem bez ili sa dodanim suplementima. Medij bez dodanog suplementa (○), sa dodanim 4 % FBS (●), sa 0,5 % polypeptone (△), sa 0,5 % HyPep 1510 (▲). Strelica ukazuje na vrijeme zamjene medija (Kwon i sur., 2005)

Aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze u Bm5 stanicama uzgajanim uz dodatak proteinskih hidrolizata bila je oko pet puta veća nego kod Bm5 stanica uzgajanih uz dodatak FBS. Samo je  $\beta$ -galaktozidaza bila detektirana na SDS/PAGE gelu što ukazuje kako je olakšano pročišćavanje rekombinantnih proteina proizvedenih pomoću stanica *B. mori* u mediju uz dodatak biljnih proteinskih hidrolizata (slika 20).



Slika 21. Specifična aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze u stanicama *B. mori* četvrti dan poslije infekcije (A) i slika SDS/PAGE gela s pročišćenom  $\beta$ -galaktozidazom (B). Uzorci od 1 do 7 su redom s dodanim 4 % FBS, 0,5 % Primatone RL, 0,5 % polipeptone, 0,5 % HyPep 7455 Dev, 0,5 % HyPep 1510, 0,5 % Bacto-Soytone i 0,5 % polypeptone S (Kwon i sur., 2005)

U tablici 7. prikazan je popis nekih od značajnijih radova o biljnim proteinskim hidrolizatima testiranim na životinjskim stanicama u posljednjih dvadeset godina. U tom je razdoblju najviše istraživanja provedeno s proteinskim hidrolizatima soje. Proteini soje široko se koriste u prehrambenoj industriji i iskazuju različita biološka djelovanja koja su dobro poznata. U zadnje vrijeme sve veći interes znanstvenika privlače proteinski hidrolizati industrijske konoplje. Od kako su sorte s niskim udjelom  $\Delta 9$ -tetrahidrokanabinola (THC) ponovno dostupne i mogu se uzgajati, širi se svjetsko tržište industrijske konoplje. Industrijska konoplja važan je izvor nutrijenata, vlakana i bioaktivnih sastojaka. Sjeme konoplje vrijedna je poljoprivredna kultura budući ne zahtijeva upotrebu gnojiva, pesticida i herbicida. Zanimljiv je i sastav sjemena industrijske konoplje koje sadrži 25-35 % ulja, 20-30 % ugljikohidrata, 20-25 % proteina, a preostali udio čine vlakna, vitamini i minerali. Proteini iz konoplje sadrže veći udio aminokiselina sa sumporom (metionin i cistein) u usporedbi sa proteinima soje. Proteini sjemena industrijske konoplje su lako probavljivi, sadrže zadovoljavajući udio esencijalnih aminokiselina i posjeduju dobra tehnološko-funkcionalna svojstva (Logarušić i sur., 2019; Rodriguez-Martin i sur., 2019).

Tablica 7. Popis nekih od značajnijih radova o proteinskim hidrolizatima biljnog porijekla ispitanih na životinjskim stanicama

Sirovina/Hidrolizat	Proizvođač	Stanična linija	Učinak	Referenca
Grašak	<i>Kerry Bioscience</i>	Vero	Rast stanica	Rourou i sur. (2009)
Konoplja	Vlastita proizvodnja	Primarni humani monociti	Protuupalni	Rodriguez-Martin i sur. (2020)
	Vlastita proizvodnja	BV-2	Neuroprotektivni	Rodriguez-Martin i sur. (2019)
	Vlastita proizvodnja	HaCaT i HeLa	Antioksidacijski i antiproliferacijski	Logarušić i sur. (2019)
Lan	Vlastita proizvodnja	HaCaT i HeLa	Antioksidacijski i proliferacijski	Logarušić i sur. (2020)
	Vlastita proizvodnja	L6 mioblasti	Antidiabetički i antihipertenzivni	Doyen i sur. (2014)
	Vlastita proizvodnja	RAW 264.7 makrofagi	Antioksidacijski	Udenigwe i sur. (2009)
Pamuk	<i>Kerry Bioscience</i>	CHO	Rast stanica	Kim i sur. (2012)
Pšenica	<i>Difco i Kerry Bioscience</i>	CHO	Proizvodnja $\beta$ -INF	Spearman i sur. (2014)
	<i>Kerry Bioscience</i>	CHO	Rast stanica	Kim i sur. (2012)
	<i>Kerry Bioscience</i>	Vero	Rast stanica	Rourou i sur. (2009)
	<i>Quest International</i>	BHK	Proizvodnja INF	Heidemann i sur. (2000)
Riža	Vlastita proizvodnja	Mezangijske stanice miša	Antihiperглиkemijski	Boonloh i sur. (2018)
	<i>Kerry Bioscience</i>	Vero	Rast stanica	Rourou i sur. (2009)
	<i>Quest International</i>	BHK	Proizvodnja INF	Heidemann i sur. (2000)
Soja	<i>Kerry Bioscience</i>	Sp2/0	Rast stanica i proizvodnja IgG	Lu i sur. (2007)
	<i>Kerry Bioscience</i>	CHO	Rast stanica	Kim i sur. (2012)
	<i>Difco i Kerry Bioscience</i>	CHO	Proizvodnja $\beta$ -INF	Spearman i sur. (2014)
	<i>Kerry Bioscience</i>	Vero	Rast stanica	Rourou i sur. (2009)
	<i>Quest International</i>	BHK	Proizvodnja INF	Heidemann i sur. (2000)
Uljana repica	Vlastita proizvodnja	HepG2, MCF-7 i HeLa	Antitumorski	Wang i sur. (2016)
	Vlastita proizvodnja	CHO	Rast stanica	Chabanon i sur. (2008)
	Vlastita proizvodnja	CHO	Proizvodnja $\gamma$ -INF	Farges-Haddani i sur. (2006)
	Vlastita proizvodnja	Sf9	Rast stanica	Deparis i sur. (2003)

### 3. ZAKLJUČAK

Svake se godine, u različitim industrijama, stvara velika količina nusproizvoda nastala preradom biljnih sirovina. Ti su nusproizvodi bogati proteinima i imaju kvalitetan nutritivni sastav pa se mogu dalje koristiti za proizvodnju biljnih proteinskih hidrolizata. Hidrolizom biljnih pogača i različitih biljnih tkiva dobiju se biljni proteinski hidrolizati bogati peptidima i biopeptidima, slobodnim aminokiselinama i različitim drugim spojevima poput minerala, lipida i ugljikohidrata. Biopeptidi imaju funkcionalna i biološka svojstva, odnosno iskazuju antioksidacijski, antiinflamatorni, antitumorski, antimikrobni, ACE-inhibirajući, hipokolesterolemični učinak i tako mogu pozitivno djelovati na zdravlje čovjeka. Biljni proteinski hidrolizati svoju su primjenu pronašli u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj industriji i biotehnologiji. U biotehnologiji se najčešće koriste u tehnologiji životinjskih stanica kao dodatak mediju za uzgoj stanica kako bi se smanjila upotreba seruma zbog svih njegovih nedostataka (cijena, varijacije u sastavu, izvor kontaminacija i etička pitanja). Peptidi prisutni u biljnim proteinskim hidrolizatima izvor su nutrijenata odnosno aminokiselina. Osim toga, proteinski hidrolizati izvor su peptida veće molekulske mase koji oponašaju animalne proteine koji djeluju kao faktori rasta, faktori pričvršćenja i faktori preživljenja. Ove su komponente nužne za rast stanica u kulturi pa frakcije biljnih proteinskih hidrolizata koje sadrže veći udio peptida veće molekulske mase imaju značajniji pozitivan učinak na rast stanica, njihovu vijabilnost i produktivnost.

## 4. LITERATURA

Acquah, C., Chan, Y. W., Pan, S., Agyei, D., Udenigwe, C. C. (2019) Structure-informed separation of bioactive peptides. *J. Food Biochem.* **43**, 1-10.

AMOSS (2020) Cell strain, cell line. AMOS - Australian manual of scientific style, <<https://www.sciencestyle.com.au/cell-strain-cell-line>>. Pristupljeno 5. kolovoza 2020.

Anonymous 1 (2004) Cell Culture, <<https://www.scq.ubc.ca/cell-culture/>>. Pristupljeno 2. kolovoza 2020.

Anonymous 2 (2020) Cell culture basics, <<https://www.vanderbilt.edu/vibre/CellCultureBasicsEU.pdf>>. Pristupljeno 3. kolovoza 2020.

Anonymous 3 (2013) Cell culture basics handbook, <<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1563-PJT1267-COL31122-Gibco-Cell-Culture-Basics-Handbook-Global-FLR.pdf>>. Pristupljeno 3. kolovoza 2020.

Anonymous 4 (2020) Culture and monitoring of animal cells: Basic techniques, <<https://www.aceabio.com/wp-content/uploads/Culture-and-Monitoring-of-Animal-Cells-Basic-Techniques.pdf>>. Pristupljeno 2. kolovoza 2020.

Anonymous 5 (2020) Glucose in Cell Culture, <<https://www.sigmaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-expert/glucose.html>>. Pristupljeno 6. kolovoza 2020.

Arora, M. (2013) Cell Culture Media: A Review. *Mater Methods.* **3**, 175-204.

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

Barbana, C., Boye, J. I. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. *Food Res. Int.* **43**, 1642-1649.

Bols, N. C., Kawano, A., Lee, L. E. J. (2011) Cellular, molecular, genomics, and biomedical approaches. U: Encyclopedia of Fish Physiology, (Farrell, A., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 1965-1970.

- Boonloh, K., Lee, E. S., Kim, H. M., Kwon, M. H., Kim, Y. M., Pannangpetch, P., Kongyingyoes, B., Kukongviriyapan, U., Thawornchinsombut, S., Lee, E. Y., Kukongviriyapan, V., Chung, C. H. (2018) Rice bran protein hydrolysates attenuate diabetic nephropathy in diabetic animal model. *Eur. J. Nutr.* **57**, 761-772.
- Brunner, D., Frank, J., Appl, H., Schöffl, H., Pfaller, W., Gstraunthaler, G. (2010) Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media Interactive Online Database. *Altex.* **27**, 53-62.
- Buckley, J. D., Thomson, R. L., Coates, A. M., Howe, P. R. C., DeNichilo, M. O., Rowney, M. K. (2010) Supplementation with a whey protein hydrolysate enhances recovery of muscle force-generating capacity following eccentric exercise. *J. Sci. Med. Sport.* **13**, 178-181.
- Burteau, C. C., Verhoeve, F. R., Mols, J. F., Ballez, J.-S., Agathos, S. N., Schneider, Y.-J. (2003) Fortification of a Protein-Free Cell Culture Medium with Plant Peptones Improves Cultivation and Productivity of an Interferon- $\gamma$ -producing CHO Cell Line. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **39**, 291-296.
- Butler, M. (2013) Serum-free media: standardizing cell culture system. *Pharm. Bioprocess.* **1**, 315-318.
- Butler, M., Hassell, T., Doyle, C., Gleave, S., Jennings, P. (1991) The Effect of Metabolic By-products on Animal Cells in Culture. U: Production of Biologicals from Animal Cells in Culture (Spier, R.E., Griffiths, J.B., Meignier, B., ured.), Butterworth-Heinemann, Oxford, str. 226-228.
- Chabanon, G., Alves da Costa, L., Farges, B., Harscoat, C., Chenu, S., Goergen, J.-L., Marc, A., Marc, I., Chevalot, I. (2008) Influence of the rapeseed protein hydrolysis process on CHO cell growth. *Bioresource Technol.* **99**, 7143-7151.
- Chalamaiah, M., Yu, W., Wu, J. (2018) Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chem.* **245**, 205-222.
- Chun, B.-H., Kim, J.-H., Lee, H.-J., Chung, N. (2007) Usability of size-excluded fractions of soy protein hydrolysates for growth and viability of Chinese hamster ovary cells in protein-free suspension culture. *Bioresource Technol.* **98**, 1000-1005.

- Colla, G., Svecová, E., Cardarelli, M., Roupael, Y., Reynaud, H., Canaguier, R., Planques, B. (2013) Effectiveness of a Plant-derived Protein Hydrolysates to Improve Crop Performances Under Different Growing Conditions. *Acta Hort.* **1009**, 175-179.
- Davami, F., Baldi, L., Rajendra, Y., Wurm, F. M. (2014) Peptone Supplementation of Culture Medium Has Variable Effects on the Productivity of CHO Cells. *Int. J. Mol. Cell Med.* **3**, 146-156.
- 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.
- Dhaval, A., Yadav, N., Purwar, S. (2016) Potential Applications of Food Derived Bioactive Peptides in Management of Health. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **22**, 377-398.
- Doyen, A., Udenigwe, C. C., Mitchell, P. L., Marette, A., Aluko, R. E., Bazinet, L. (2014) Anti-diabetic and antihypertensive activities of two flaxseed protein hydrolysate fractions revealed following their simultaneous separation by electro dialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chem.* **145**, 66-76.
- Dumont, J., Ewart, D., Mei, B., Estes, S., Kshirsagar, R. (2015) Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 1110-1122.
- Elias, C. B., Carpentier, E., Durocher, Y., Bisson, L., Wagner, R., Kamen, A. (2003) Improving Glucose and Glutamine Metabolism of Human HEK 293 and *Trichoplusia ni* Insect Cells Engineered To Express a Cytosolic Pyruvate Carboxylase Enzyme. *Biotechnol. Progr.* **19**, 90-97.
- 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.
- Franěk, F., Hohenwarter, O., Katinger, H. (2000) Plant protein hydrolysates: Preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotech. Progress.* **16**, 688-692.



- Freshney, R. I. (2010) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 6. izd., John Wiley & Sons Inc., Hoboken, str. 115-128.
- Gupta, A. J. (2015) Correlating composition and functionality of soy protein hydrolysates used in animal cell cultures. *Disertacija*, Wageningen University, Nizozemska.
- Hajfathalian, M., Ghelichi, S., García-Moreno, P. J., Moltke Sørensen, A.-D., Jacobsen, C. (2017) Peptides: Production, bioactivity, functionality, and applications. *Crit. Rev. Food. Sci.* **58**, 3097-3129.
- Hartman, G. L., West, E. D., Herman, T. K. (2011) Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Secur.* **3**, 5-17.
- Heidemann, R., Zhang, C., Qi, H., Larrick Rule, J., Rozales, C., Park, S., Chuppa, S., Ray, M., Michaels, J., Kostantinov, 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.
- Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, G., Wu, G. (2017) Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **8**, 24-37.
- Hu, W.-S., Aunins, J. G. (1997) Large-scale mammalian cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 148-53.
- Ishikawa, Y., Hira, T., Inoue, D., Harada, Y., Hashimoto, H., Fujii, M., Kadowaki, M., Hara, H. (2015) Rice protein hydrolysates stimulate GLP-1 secretion, reduce GLP-1 degradation, and lower the glycemic response in rats. *Food Funct.* **6**, 2525-2534.
- Karami, Z., Akbari-Adergani, B. (2019) Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *J. Food Sci. Technol.* **56**, 535-547.
- Kim, D. Y., Chaudhry, M. A., Kennard, M. L., Jardon, M. A., Braasch, K., Dionne, B., Butler, M., Piret, J. M. (2012) Fed-batch CHO cell t-PA production and feed glutamine replacement to reduce ammonia production. *Biotechnol. Prog.* **29**, 165-175.

- Kim, J.-Y., Park, S.-C., Hwang, I., Cheong, H., Nah, J.-W., Hahm, K.-S., Park, Y. (2009) Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 2860-2872.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2006) Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.* **16**, 945-960.
- Kristinsson, H. G., Rasco, B. A. (2000) Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Crit. Rev. Food. Sci.* **40**, 43-81.
- Kwon, M. S., Dojima, T., Park, E. Y. (2005) Use of plant-derived protein hydrolysates for enhancing growth of *Bombyx mori* (silkworm) insect cells in suspension culture. *Biotechnol. Appl. Bioc.* **42**, 1-7.
- Lee, Y.K., Kim, S.Y., Kim, K.H., Chun, B.-K., Lee, K.-H., Oh, D. J., Chung, N. (2008) Use of soybean protein hydrolysates for promoting proliferation of human keratinocytes in serum-free medium. *Biotechnol. Lett.* **30**, 1931-1936.
- Li, H., Prairie, N., Udenigwe, C. C., Adebisi, A. P., Tappia, P. S., Aukema, H. M., Jones, P. J. H., Aluko, R. E. (2011) Blood pressure lowering effect of a pea protein hydrolysate in hypertensive rats and humans. *J. Agr. Food Chem.* **59**, 9854-9860.
- 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. K., Demain, A. L., ured.), Springer, Dordrecht, str. 55-78.
- Logarušić, M., Radošević, K., Bis, A., Panić, M., Slivac, I., Gaurina Srček, V. (2020) Biological Potential of Flaxseed Protein Hydrolysates Obtained by Different Proteases. *Plant Foods Hum. Nutr.* doi: 10.1007/s11130-020-00841-z
- Logarušić, M., Slivac, I., Radošević, K., Bagović, M., Radojčić Redovniković, I., Gaurina Srček, V. (2019) Hempseed protein hydrolysates' effects on the proliferation and induced oxidative stress in normal and cancer cell lines. *Mol. Biol. Rep.* **46**, 6079-6085.
- Lu, C., Gonzalez, C., Gleason, J., Gangi, J., Yang, J.-D. (2007) A T-flask based screening platform for evaluating and identifying plant hydrolysates for a fed-batch cell culture process. *Cytotechnology.* **55**, 15-29.

- Maestri, E., Marmiroli, M., Marmiroli, N. (2016) Bioactive peptides in plant-derived foodstuffs. *J. Proteomics*. **147**, 140-155.
- Marson, G. V., de Castro, R. J. S., da Costa Machado, M. T., da Silva Zandonadi, F., de Freitas Queiroz Barros, H. D., Maróstica Júnior, M. R., Hubinger, M. D. (2020) Proteolytic enzymes positively modulated the physicochemical and antioxidant properties of spent yeast protein hydrolysates. *Process Biochem*. **91**, 34-45.
- Montesano, D., Gallo, M., Blasi, F., Cossignani, L. (2020) Biopeptides from vegetable proteins: new scientific evidences. *Curr. Opin. Food Sci*. **31**, 31-37.
- Mulukutla, B. C., Khan, S., Lange, A., Hu, W.-S. (2010) Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways. *Trends Biotechnol*. **28**, 476-484.
- Muzaifa, M., Safriani, N., Zakaria, F. (2012) Production of protein hydrolysates from fish by-product prepared by enzymatic hydrolysis. *Aquac. Aquar. Conserv. Legis*. **5**, 36-39.
- Nasri, M. (2017) Protein Hydrolysates and Biopeptides Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review. *Adv. Food Nutr. Res*. **81**, 109-159.
- Nwachukwu, I. D., Aluko, R. E. (2018) Antioxidant properties of flax-seed protein hydrolysates: Influence of hydrolytic enzyme concentration and peptide size. *J. Am. Oil Chem. Soc*. **95**, 1105-1118.
- Pasupuleti, V. K., Braun, S. (2008) State of Art Manufacturing of Protein Hydrolysates. U: *Protein Hydrolysates in Biotechnology*, (Pasupuleti, V. K., Demain, A. L., ured.), Springer, Dordrecht str. 10-32.
- Pasupuleti, V. K., Holmes, C., Demain, A. L. (2008) Applications of Protein Hydrolysates in Biotechnology. U: *Protein Hydrolysates in Biotechnology*, (Pasupuleti, V. K., Demain, A. L., ured.), Springer, Dordrecht, str. 1-9.
- Phelan, K., May, K. M. (2015) Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture. *Curr. Protoc. Cell Biol*. **66**, 1-22.
- Philippeos C., Hughes R. D., Dhawan A., Mitry R. R. (2012) Introduction to Cell Culture. U: *Human Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (Mitry R., Hughes R., ured.), Humana Press, Totowa, str. 1-13.

- Ritacco, F. V., Wu, Y., Khetan, A. (2018) Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies. *Biotechnol. Progr.* **34**, 1407-1426.
- Rizzo, G., Baroni, L. (2018) Soy, Soy Foods and Their Role in Vegetarian Diets. *Nutrients.* **10**, 43-93.
- Rodriguez-Martin, N. M., Montserrat-de la Paz, S., Toscano, R., Grao-Cruces, E., Villanueva, A., Pedroche, J., Millan, F., Millan-Linares, M. C. (2020) Hemp (*Cannabis sativa* L.) Protein Hydrolysates Promote Anti-Inflammatory Response in Primary Human Monocytes. *Biomolecules.* **10**, 803-814.
- Rodriguez-Martin, N. M., Toscano, R., Villanueva Lazo, A., Pedroche, J., Millán Rodríguez, F., Montserrat-de la Paz, S., Millán-Linares, M. del C. (2019) Neuroprotective protein hydrolysates from hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds. *Food Funct.* **10**, 6732-6739.
- Rourou, S., van der Ark, A., van der Velden, T., Kallel, H. (2009) Development of an animal-component free medium for vero cells culture. *Biotechnol. Prog.* **25**, 1752-1761.
- Rutherford, S. M. (2010) Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in Hydrolysates: A Review. *J. AOAC Int.* **93**, 1515-1522.
- Saadi, S., Saari, N., Anwar, F., Abdul Hamid, A., Ghazali, H. M. (2015) Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnol. Adv.* **33**, 80-116.
- Segura-Campos, M. R., Salazar-Vega, I. M., Chel-Guerrero, L. A., Betancur-Ancona, D. A. (2013) Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *LWT-Food Sci. Technol.* **50**, 723-731.
- Shen, C. F., Kiyota, T., Jardin, B., Konishi, Y., Kamen, A. (2007) Characterization of yeastolate fractions that promote insect cell growth and recombinant protein production. *Cytotechnology.* **54**, 25-34.
- Siemensma A., Babcock J., Wilcox C., Huttinga H. (2008) Towards an Understanding of How Protein Hydrolysates Stimulate More Efficient Biosynthesis in Cultured Cells. U: *Protein Hydrolysates in Biotechnology* (Pasupuleti V. K., Demain A. L., ured.), Springer, Dordrecht, str. 33-54.

- Sinha, R., Radha, C., Prakash, J., Kaul, P. (2007) Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chem.* **101**, 1484-1491.
- Slivac, I., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2016) Osnove tehnologije životinjskih stanica. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu.
- 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.
- Sun, X., Chakrabarti, S., Fang, J., Yin, Y., Wu, J. (2016). Low-molecular-weight fractions of Alcalase hydrolyzed egg ovomucin extract exert anti-inflammatory activity in human dermal fibroblasts through the inhibition of tumor necrosis factor-mediated nuclear factor  $\kappa$ B pathway. *Nutr. Res.* **36**, 648-657.
- Tang, C.-H., Wang, X.-S., Yang, X.-Q. (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.
- Udenigwe, C. C., Lu, Y.-L., Han, C.-H., Hou, W.-C., Aluko, R. E. (2009) Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages. *Food Chem.* **116**, 277-284.
- Uysal, O., Sevimli, T., Sevimli, M., Gunes, S., Eker Sariboyaci, A. (2018) Cell and Tissue Culture. U: *Omics Technologies and Bio-Engineering: Towards Improving Quality of Life*, (Barh, D., Azevedo, V., ured.), Academic press, Cambridge, str. 391-429.
- Wang, L., Zhang, J., Yuan, Q., Xie, H., Shi, J., Ju, X. (2016) Separation and purification of anti-tumor peptide from rapeseed (*Brassica campestris* L.) and the effect on cell apoptosis. *Food Funct.* **7**, 2239-2248.
- Wong, F.-C., Xiao, J., Wang, S., Ee, K.-Y., Chai, T.-T. (2020) Advances on the antioxidant peptides from edible plant sources. *Trends Food Sci. Tech.* **99**, 44-57.
- Yao, T., Asayama, Y. (2017) Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod. Med. Biol.* **16**, 99-117.

- Yeo, I., Lee, Y.-J., Song, K., Jin, H.-S., Lee, J.-E., Kim, D., Lee, D.-W., Kang, N. J. (2018) Low-molecular weight keratins with anti-skin aging activity produced by anaerobic digestion of poultry feathers with *Fervidobacterium islandicum* AW-1. *J. Biotechnol.* **271**, 17-25.
- Zhang, M., Mu, T.-H., Sun, M.-J. (2014) Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase. *J. Funct. Food.* **7**, 191-200.
- Zhang, S. B., Wang, Z., Xu, S. Y. (2007) Optimization of the Aqueous Enzymatic Extraction of Rapeseed Oil and Protein Hydrolysates. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **84**, 97-105.
- Zhou, K., Canning, C., Sun, S. (2013) Effects of rice protein hydrolysates prepared by microbial proteases and ultrafiltration on free radicals and meat lipid oxidation. *LWT - Food Sci. Technol.* **50**, 331-335.
- Zhu, K., Zhou, H., Qian, H. (2006) Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochem.* **41**, 1296-1302.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Handwritten signature of Tino Ursić in blue ink, written over a horizontal line.

Tino Ursić