



PREGLEDNI RAD / REVIEW

Biljni proteinski hidrolizati kao dodatak medijima za uzgoj životinjskih stanica

Plant protein hydrolysates as animal cell culture media supplement

Višnja Gaurina Srček, Tino Ursić, Marijan Logarušić, Kristina Radošević, Igor Slivac*

Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Corresponding author: islivac@pbf.unizg.hr

Sažetak:

U procesima s kulturama životinjskih stanica koristi se medij za uzgoj koji sadrži osnovne nutrijente poput glukoze, amino-kiselina, soli te hormone i faktore rasta iz seruma životinjskog porijekla. Zbog nedostataka primjene seruma u procesima s kulturama stanica (npr. rizik prijenosa virusa, varijacije u sastavu, otežana izolacija proizvoda) pristupilo se razvoju medija bez seruma u koje se često dodaju i hidrolizati proteina biljnog porijekla. Hidrolizati sadrže aminokiseline, oligopeptide, lipide, vitamine i ostale spojeve koji potiču proliferaciju i produktivnost stanica u kulturi. U ovom radu dan je kratak pregled pripreme i najvažnijih bioloških svojstava proteinskih hidrolizata s naglaskom na primjenu biljnih hidrolizata kao sastojaka medija za uzgoj životinjskih stanica u proizvodnji biofarmaceutika.

Ključne riječi: biofarmaceutici, biopeptidi, proteinski hidrolizati, produktivnost

Abstract

Culture media containing essential nutrients like glucose, amino-acids and salts, as well as hormones, growth factors added by animal blood serum is required for bioprocesses with animal cells. Due to the disadvantages of serum use (e.g. risk of virus transmission, variation in composition, complex product isolation), the development of serum-free media supplemented with plant protein hydrolysates took place about two decades ago. The hydrolysates contain amino acids, oligopeptides, lipids, vitamins and other compounds that promote cell culture proliferation and productivity. This paper gives a brief overview of the preparation and the most important biological properties of protein hydrolysates with emphasis on the use of plant hydrolysates as components of animal cell culture media in the production of biopharmaceuticals.

Keywords: biopharmaceuticals, biopeptides, protein hydrolysates, productivity

Uvod

Za uspješan rast, održavanje i produktivnost kultura životinjskih stanica potrebno je osigurati mikrookoliš koji omogućuje optimalan rast stanica u in vitro uvjetima. Stoga medij za uzgoj stanica mora sadržavati hranjive tvari i soli te hormone, faktore rasta i druge biološki aktivne molekule dodane najčešće serumom životinjskog porijekla. Tijekom zadnjih desetljeća, uočeni su ozbiljni rizici vezani uz uporabu sastojaka životinjskog ili humanog porijekla u proizvodnji terapeutika, a uglavnom su povezani s prijenosom infektivnih supstancija poput virusa i priona te otežanom izolacijom proizvoda (van der Valk i sur., 2010). Naime, serum koji se koristi u proizvodnji biofarmaceutika zapravo su nedefinirane smjese seruma individualnih donora, te njihov sastav varira od šarže do šarže. Ova varijabilnost zahtijeva dodatne postupke osiguranja kvalitete proizvodnog procesa, a između ostalog utječe i na troškove proizvodnog procesa s kulturama životinjskih stanica (Xu i sur., 2020).

Kako bi se prevladali nedostaci uporabe seruma, pristupa se oblikovanju medija bez seruma kao i formuliranju potpuno kemijski definiranih medija. No, mediji bez seruma općenito su specifičniji i skuplji nego oni sa serumom pa se uglavnom razvijaju za pojedine tipove stanica i pojedine proizvode (van der Valk i sur., 2004; Grillberger i sur., 2009).

Razvoj medija bez seruma potaknuo je interes za primjenom hidrolizata proteina dobivenih iz tkiva životinja, mlijeka, kvasaca te biljaka poput soje, pšenice, riže i graška (Farges-Haddani i sur., 2006). Njihovim dodatkom nadomještaju se proteini sadržani u serumu, a kako regulatorni zahtjevi nalažu uklanjanje tvari animalnog porijekla iz medija za uzgoj stanica, prednost u primjeni imaju upravo biljni hidrolizati. Općenito, hidrolizati proteina dobivaju se enzimskom ili mikrobnom fermentacijom biološkog materijala, a sadrže različite hranjive tvari kao što su aminokiseline, oligopeptidi, lipidi, elementi u tragovima, vitamini i minerali te ostale spojeve koji potiču proliferaciju i utječu na povećanje aktivnosti stanica (Kwon i sur., 2005; Ho i sur. 2021).

U ovom radu dan je kratak pregled pripreme i najvažnijih bioloških svojstava proteinskih hidrolizata s naglaskom na primjenu biljnih hidrolizata kao sastojaka medija za uzgoj životinjskih stanica u proizvodnji biofarmaceutika.

Postupci pripreve hidrolizata

Proteinski hidrolizati dobivaju se hidrolizom proteina pomoću kiseline, lužine, enzima ili mikrobnom fermentacijom. Glavni postupak dobivanja proteinskih hidrolizata za biotehnošku primjenu je hidroliza enzimima. Hidrolizom biljnih sirovina ili životinjskog tkiva nastaje proizvod koji sadrži različite spojeve poput peptida, aminokiselina, minerala, ugljikohidrata i lipida ukoliko su prisutni u početnom supstratu (Marson i sur., 2019; Si i sur., 2020). Uobičajeni postupak pripreve proteinskih hidrolizata prikazan je na slici 1.

Kiselinska hidroliza proteina najčešće se odvija uz dodatak klorovodične kiseline i provodi se u tankovima koji podnose visoke temperature i tlak. Ključni parametri za kiselinsku hidrolizu su: odabir i koncentracija kiseline, temperatura (121-138 °C), tlak (32-45 psi) i trajanje hidrolize (2-8 h), a svaki od parametara zasebno ili u kombinaciji utječe na kvalitetu dobivenog hidrolizata (Pasupuleti i Braun, 2008). Nakon provedene kiselinske hidrolize, dobiveni proizvod se uparava, pasterizira i suši raspršivanjem. Kiselinska hidroliza proteina jeftina je metoda pripreve hidrolizata, a njen glavni nedostatak je razgradnja triptofana, djelomičan gubitak metionina te prijelaz glutamina u glutamat i asparagina u aspartat. Ovom metodom komercijalno se proizvode hidrolizati kazeina i soje koji se koriste u fermentacijskim postupcima te za dijagnostičke svrhe.

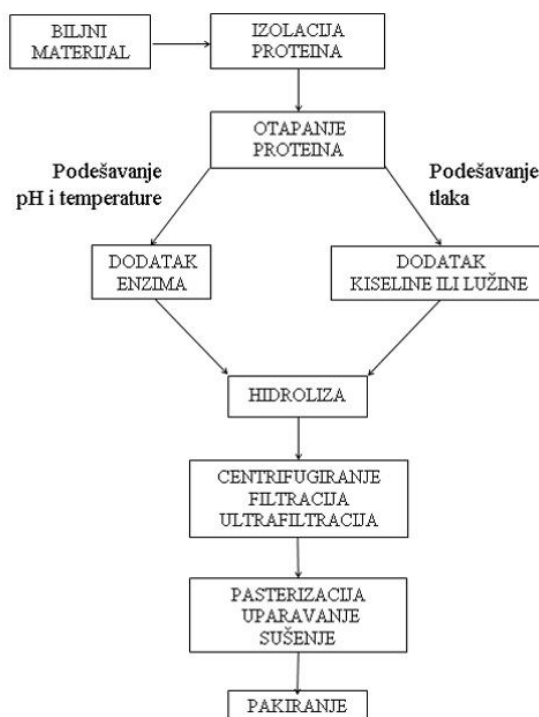
Za potpunu hidrolizu proteina mogu se koristiti i lužine kao što su kalcijev, natrijev i kalijev hidroksid određene koncentracije (npr. 4 mol L⁻¹) pri temperaturi od 105 °C kroz 20 h (Hou i sur., 2017). Alkalna hidroliza je isto tako jeftina metoda, a u usporedbi s kiselinskom hidrolizom njome se može postići 100 % obnova triptofana. Glavni nedostatak ove metode je da dolazi do potpunog uništavanja većeg broja aminokiselina. Općenito, glavni nedostatak kiselinske i lužnate hidrolize proteina leži u tome što mogu nastati toksični nusprodukti, troši se velika količina energije i nastaje ugljikov dioksid, a sve kao rezultat agresivnih reakcijskih uvjeta.

Enzimska hidroliza proteina provodi se enzimima proteazama koje cijepaju peptidnu vezu između dviju aminokiselina. Daljnjim cijepanjem proteina nastaju produkti manje molekulske mase poput peptona, peptida

i aminokiselina (slika 2).

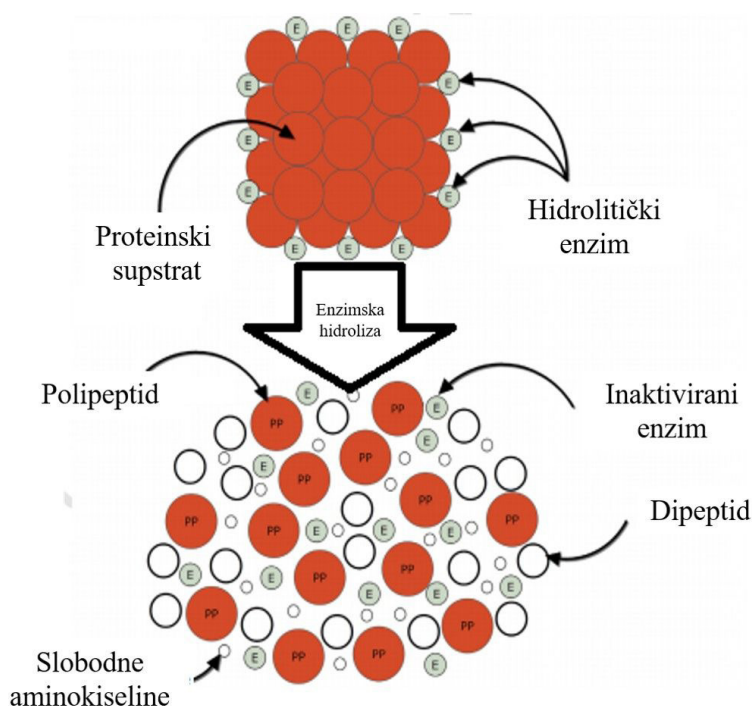
Da bi se provela enzimska hidroliza, supstrat se mora usitniti, homogenizirati u vodi ili puferu, a prije dodatka enzima potrebno je podesiti temperaturu i pH otopine na vrijednosti specifične za djelovanje odabranog enzima. Po završetku hidrolize enzim se mora inaktivirati, najčešće zagrijavanjem ili promjenom pH vrijednosti. Korištenje pogodnog enzima, dobra kontrola reakcije i njezinih parametara (pH, temperatura, vrijeme trajanja i brzina miješanja) kritični su za proizvodnju proteinskog hidrolizata željenih svojstava. Isto tako, od iznimne je važnosti i specifičnost enzima koji se koristi u hidrolizi odabrane sirovine. Odabir enzima utječe na veličinu nastalih peptida, sastav i redoslijed aminokiselina u peptidu, a koji pak utječu na biološka i funkcionalna svojstva hidrolizata. Za pripremu proteinskih hidrolizata najčešće se koriste proteaze izolirane iz mikroorganizama (npr. Alkalaza, Neutraza, Flavourzyme, Protamex), životinja (pepsin, tripsin, α-kimotripsin, pankreatin) i biljaka (papain, bromelin) (Hajfathalian i sur., 2018). 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., 2018). 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).

Fermentacijom proteina pomoću proteolitičkih bakterija (npr. iz proizvodnje fermentiranih mliječnih proizvoda) mogu se proizvesti proteinski hidrolizati u industrijskom mjerilu. Prednost ovog



Slika 1. Uobičajeni postupak pripreve proteinskih hidrolizata (prilagođeno prema Pasupuleti i Braun, 2008).

Figure 1 Typical manufacturing of protein hydrolysates (adapted from Pasupuleti and Braun, 2008)



Slika 2. Prikaz promjena proteinskog supstrata tijekom enzimske hidrolize (prilagođeno prema Saadi i sur., 2015).

Figure 2 Changes in protein substrate during enzymatic hydrolysis (adapted from Saadi et al. 2015),

postupka proizvodnje hidrolizata leži u činjenici da hidrolizu provode proteaze mikroorganizma te nema potrebe za daljnjim pročišćavanjem. Nedostatak ove metode u odnosu na enzimsku hidrolizu je relativno nizak prinos proizvedenih peptida, budući da neke iz supstrata fermentacijom oslobođene biopeptide i aminokiseline radni mikroorganizam može koristiti kao izvor ugljika ili dušika za vlastiti rast (Nasri, 2017).

Sastav proizvedenih hidrolizata varira ovisno o korištenom postupku hidrolize (enzimska, kiselinska/lužnata), trajanju postupka, temperaturi i ishodnoj sirovini te je potrebno odrediti optimalne uvjete hidrolize kako bi se dobio proizvod željenog sastava proteina i peptida. Raspon molekularskih masa peptida u pripremljenim hidrolizatima od iznimne je važnosti za njihovu primjenu u specifične svrhe pa se stoga stupanj hidrolize i peptidni sastav treba pažljivo pratiti tijekom hidrolize. Metode koje se najčešće koriste za dobivanje frakcija hidrolizata i obogaćivanje bioaktivnim peptidima uključuju ultrafiltraciju, kromatografiju islučenja po veličini (engl. Size Exclusion Chromatography, SEC), ionsko-izmjenjivačku kromatografiju (engl. Ion-Exchange Chromatography, IEC) te tekućinsku kromatografiju obrnutih faza (engl. Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC). 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).

Biološka svojstva 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 sadržani u hidrolizatima mogu pokazivati različite učinke i djelovanje na biološke procese koji mogu doprinijeti razumijevanju njihovog djelovanja kao sastojka medija za uzgoj stanica. Antioksidacijsko djelovanje proteinskih hidrolizata

Antioksidacijska svojstva proteinskih hidrolizata očituju se u uklanjanju ili suzbijanju reaktivnih kisikovih vrsta i slobodnih radikala te u inhibiciji oksidacije bioloških molekula potaknute prisutnošću reaktivnih kisikovih vrsta. Različiti faktori utječu na antioksidacijsku

aktivnost proteinskih hidrolizata, uključujući proteazu korištenu za pripremu hidrolizata, stupanj hidrolize te svojstva nastalih peptida kao što su molekularna masa, hidrofobnost i aminokiselinski sastav (Logarušić i sur. 2019; Logarušić i sur., 2020). Povećani udio histidina, cisteina, prolina, metionina i aminokiselina s aromatskim pobočnim ograncima u peptidima pridonosi povećanoj antioksidacijskoj aktivnosti peptida. Histidinski pobočni ogranak može kelirati metalne ione i neutralizirati djelovanje reaktivnih kisikovih vrsta, uključujući hidroksilni radikal. Ta se svojstva pripisuju imidazolnoj skupini u pobočnom ogranku histidina koja može sudjelovati u reakcijama prijenosa vodikova atoma i prijenosa jednog elektrona. Peptidi s većim udjelom hidrofobnih aminokiselinskih ogranka pokazuju veće antioksidacijsko djelovanje zbog toga jer stupaju u kontakt s hidrofobnim molekulama u stanici kao što su polinezasićeni lanci masnih kiselina. Nadalje, aromatski prsteni visoke gustoće elektrona koji su sastavni dio fenilalanina, tirozina i triptofana pokazuju sposobnost keliranja metalnih iona, dok fenilalanin na sebe veže ·OH radikale što rezultira formiranjem stabilnijih hidroksiliranih derivata. Stoga, specifični doprinos svake pojedine aminokiseline u peptidu uvelike ovisi o prirodni reaktivnih kisikovih vrsta i slobodnih radikala te o reakcijskom mediju (Udenigwe i Aluko, 2012).

Antitumorsko djelovanje proteinskih hidrolizata

Antitumorska aktivnost peptida zasnovana je na njihovim strukturnim karakteristikama kao što su aminokiselinski sastav, sekvenca, dužina, ukupni naboj i hidrofobnost. Hidrofobne aminokiseline povećavaju interakcije između peptida s antitumorskim djelovanjem i vanjske membrane tumorskih stanica što rezultira selektivnim i jačim citotoksičnim učinkom na tumorske stanice. Pokazano je da prisutnost nabijenih (glutaminska kiselina) i heterocikličkih aminokiselina (prolin) može pridonijeti antitumorskoj aktivnosti peptida. Prema istraživanjima, peptidi manjih molekularskih masa i većih udjela hidrofobnih aminokiselina pokazuju veću antitumorsku aktivnost (Chalamaiah i sur., 2018). Također, istraživanja provedena na kulturama tumorskih stanica (HeLa, MCF-7, Caco-2, HepG2, HCT15, LNCaP i dr.) pokazuju da proteinski hidrolizati antitumorsku aktivnost iskazuju kroz sljedeće mehanizme: stimulacija apoptoze, zaustavljanje staničnog ciklusa, oštećenje stanične membrane, inhibicija stanične adhezije, modulacija

imunskog odgovora i inhibicija međustanične komunikacije (Slika 3). Iako je točan mehanizam antitumorskog djelovanja proteinskih hidrolizata iz hrane i dalje nepoznat, zna se da neke aminokiseline kao što su prolin, leucin, glicin, alanin, lizin, serin, treonin, glutamat i tirozin imaju ključnu ulogu u antitumorskom djelovanju proteinskih hidrolizata (Chalamaiah i sur., 2018).



Slika 3. Mehanizam antitumorskog djelovanja proteinskih hidrolizata (prilagođeno prema Chalamaiah i sur., 2018).

Figure 3 Antitumor activity of protein hydrolysates (adapted from Chalamaiah et al. 2018).

Imunomodulacijsko i protuupalno djelovanje proteinskih hidrolizata

Imunomodulacijski peptidi mogu biti izolirani iz proteinskih hidrolizata različitih izvora hrane, uključujući soju, rižu i lan. Proteinski hidrolizati s najizraženijim imunomodulacijskim učinkom sačinjeni su od deset hidrofobnih aminokiselina.

Ciljna mjesta i rezultati djelovanja imunomodulacijskih proteinskih hidrolizata ili peptida dobivenih iz hrane prikazani su na Slici 4. Iako još uvijek nije poznat točan mehanizam njihova djelovanja, poznato je da se djelovanje imunomodulacijskih proteinskih hidrolizata ili peptida očituje kroz aktivaciju makrofaga, stimulaciju fagocitoze, povećanje broja leukocita, indukciju citokina, dušikovog (II) oksida (NO) i imunoglobulina te stimulaciju prirodno ubilačkih stanica (engl. Natural Killer, NK) (Chalamaiah i sur., 2018). Protuupalna svojstva proteinskih hidrolizata većinom se očituju u modulaciji proinflammatory odgovora makrofaga izazvanih endotoksinima. Tako npr. peptid lunasin prisutan u soji i drugim žitaricama te njemu slični peptidi djeluju protuupalno tako što smanjuju produkciju reaktivnih kisikovih vrsta i razinu tumorskog faktora nekroze α (engl. Tumor Necrosis Factor- TNF- α) interleukina 6 i 1β (engl. Interleukin 6 i 1β , IL-6 i IL- 1β) te faktora nekroze κ B (engl. Necrosis Factor κ B) (Udenigwe i Aluko, 2011).

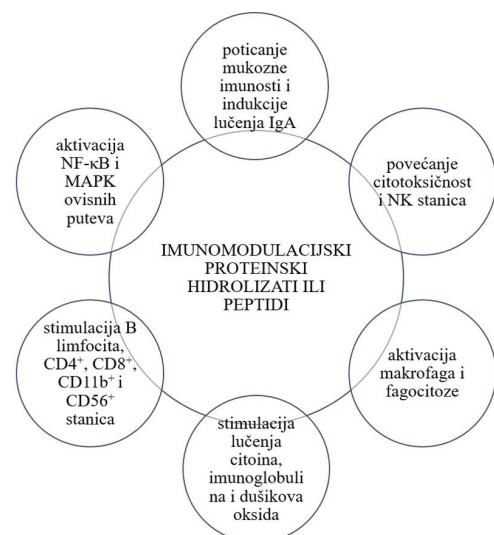
Antimikrobno djelovanje proteinskih hidrolizata

Peptidi s antimikrobnim djelovanjem kod biljaka i životinja predstavljaju prvu liniju obrane od bakterija, gljivica i virusa s primarnim djelovanjem na stanične membrane patogena. Antimikrobno djelovanje hidrolizata povezano je s prisutnošću hidrofobnih peptida i peptida s pozitivnim nabojem (kationi) koji sadrže između 15 i 40 aminokiselinskih ostataka. Tako npr. peptidi prisutni u hidrolizatima pamuka posjeduju antimikrobna svojstva i imaju potencijal u prevladavanju problema bakterijske rezistencije na antibiotike (Song i sur., 2020). Slična antimikrobna svojstva pokazuju hidrolizati izolirani iz chia sjemenki koji sadrže peptide s kationskim i hidrofobnim aminokiselinama (Aguilar-Toala i sur., 2020) ili pak hidrolizati pripremljeni iz jaja (Al-Mohmmadi i sur., 2020) i sirutke devina mlijeka (Wang i sur., 2020). Uzevši u obzir navedeno, određeni hidrolizati iz biljnih i životinjskih izvora posjeduju potencijal primjene kao antimikrobni agensi u proizvodnji hrane ili za terapijsku primjenu.

Primjena proteinskih hidrolizata u medijima za uzgoj životinjskih stanica

Rast kultura životinjskih stanica odvija se u složenim medijima za uzgoj koji se pripravlja kombinacijom hranjivih tvari poput soli, aminokiselina, vitamina, glukoze te dodatka seruma. Serum, među ostalim i onaj fetalnog porijekla (engl. Fetal Bovine Serum, FBS), najskuplja je komponenta medija za uzgoj životinjskih stanica, a omogućava rast stanica u kulturi na način da opskrbljuje stanice faktorima rasta i hranjivim tvarima koje nisu uvijek kemijski karakterizirane ili imaju previsoku cijenu kada se koriste u čistom obliku. Osim navedenog, primjena seruma ima i negativne strane kao što su varijacije u sastavu između pojedinih šarži, mogućnost prijenosa životinjskih virusa i priona, teškoće pri izolaciji i pročišćavanju proizvoda (van der Valk i sur., 2010). Stoga se korištenje seruma nastoji svesti na najmanju moguću mjeru ili ga se nastoji u potpunosti izbjeći korištenjem medija bez seruma, pri čemu je krajnji cilj uzgajati stanice u potpuno kemijski definiranom mediju za uzgoj (Butler, 2013). Taj zahtjev nije uvijek jednostavno osigurati budući da se stanična linija prethodno mora prilagoditi na rast u mediju bez dodatka seruma što je zahtjevan i ne nužno uspješan proces. U tu svrhu razvijen je veliki broj medija bez dodatka seruma (engl. Serum Free Media, SFM) koji uključuju medije bez dodatka tvari životinjskog porijekla te kemijski definirane medije (engl. Chemically Defined Media, CDM) u koje se dodaju faktori rasta ili biljni proteini kako bi se omogućio uspješan rast stanica i proizvodnja rekombinantnog proizvoda (Rittaco i sur., 2018).

Primjena hidrolizata u medijima za uzgoj životinjskih stanica datira još iz 50-ih godina prošlog stoljeća. Hidrolizati su tada pripremljeni uglavnom enzimskom digestijom goveđeg ili svinjskog tkiva. Rafiniranje dijalizom i kromatografijom Bacto-peptona, hidrolizata životinjskog porijekla, te korištenje dobivenih frakcija u kulturi stanica prvi opisuju Taylor i sur. (1972). U narednim desetljećima sirovine za izradu hidrolizata kao dodatka mediju za uzgoj stanica uključuju, pored mesa, i proteine mlijeka, algi, kvasca te biljaka (Hou i sur., 2017). Njihova glavna uloga je potpuna ili djelomična zamjena proteina seruma kako bi se poboljšao rast kultura te povećao titar i kvaliteta rekombinantnog proizvoda (npr. glikozilacijski profil). Primjena hidrolizata porijeklom iz životinjskih izvora slično kao i primjena seruma povećava rizik unosa nepoželjnih



Slika 4. Mehanizam djelovanja imunomodulacijskih proteinskih hidrolizata ili peptida dobivenih iz hrane (prilagođeno prema Chalamaiah i sur., 2018)

Figure 4 Mechanisms of immunomodulatory action of protein hydrolysates or peptides from food proteins (adapted from Chalamaiah et al. 2018)



kontaminanata (virusa, priona) pa im je šira primjena u bioprocima ograničena (Butler, 2013). Ova činjenica je potaknula interes za razvojem i primjenom biljnih proteinskih hidrolizata koji se mogu pripremiti iz različitih izvora te se, u kombinaciji s drugim dodacima ili samostalno, koristiti za obogaćivanje medija za uzgoj ili poboljšanje gustoće stanica, vijabilnosti i produktivnosti (Tablica 1).

Kada se proteinski hidrolizati proizvode i koriste u kulturi stanica, važno je u obzir uzeti koriste li se peptidi izravno kao izvor aminokiselina, neizravno kao stimulatori rasta stanica ili njihove produktivnosti, ili za zaštitu stanica od stresa. Tako dodatak hidrolizata npr. utječe na glikozilaciju proteina u kvalitativnom i kvantitativnom smislu što u konačnici ima utjecaj i na terapijski učinak proizvedenih protutijela (O'Flaherty i sur., 2020; Obaidi i sur., 2021). 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 razjasnilo 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 oligopeptida molekularskih masa u rasponu od 1-10 kDa (Siemensma i

sur., 2010).

Stanice ovarija kineskog hrčka (CHO) najkorištenije su stanice za proizvodnju rekombinantnih proteina u biofarmaceutskoj industriji, jer su se pokazale sigurnima, provode pravilnu glikozilaciju proteina, mogu se prilagoditi na suspenzijski rast pri visokoj koncentraciji stanica uz omogućavanje visoke volumetrijske produktivnosti rekombinantnog proizvoda (Obaidi i sur., 2021). Kako industrijski procesi s CHO stanicama zahtijevaju primjenu medija bez dodatka seruma i komponenti animalnog porijekla, kao izvor proteina koriste se u vodi topljivi proteinski hidrolizati, koji sadrže peptide, aminokiseline, anorganske soli, lipide, vitamine i šećere. Jedan od komercijalno najranije korištenih biljnih hidrolizata je hidrolizat soje, prisutan na tržištu od 2006., a proizveden je u nizu kontroliranih enzimskih koraka kako bi se smanjile varijacije u sastavu između pojedinih šarži (Siemensma i sur., 2010). Literaturni podaci navode pozitivan učinak hidrolizata soje na rast CHO stanica koje proizvode IFN- β (engl. Interferone β , IFN- β), ali bez istovremenog učinka na produktivnost (Spearman i sur., 2014); na rast i produktivnost mišjih hibridoma stanica ME-750 (Franěk i sur., 2000); stabilne klonove CHO DG44 stanične linije koja eksprimira IgG (Davami i sur., 2014); CHO 320 stanice proizvođače IFN- γ u suspenziji i mediju bez dodanih proteina (Burteau i sur., 2003), četiri različite CHO stanične linije koje proizvode monoklonska protutijela (Obaidi i sur., 2021) te Sp2/0 stanice koje proizvode monoklonsko protutijelo (Djemal i sur., 2021). Na temelju njihovih rezultata i pregleda dostupne

Tablica 1. Biljni proteinski hidrolizati korišteni za poboljšanje rasta i produktivnosti biotehnoški značajnih staničnih linija

Table 1. Plant protein hydrolysates used for growth and productivity improvement of important cell lines

Proteinski hidrolizat	Stanična linija	Proizvođač hidrolizata	Učinak na stanice	Referenca
Grašak	Vero	Kerry Bioscience	Poboljšan rast	Rourou i sur. (2009)
Lan	CHO-DP12	Vlastita proizvodnja	Povećanje produktivnosti (IgG)	Logarušić i sur. (2021)
Pamuk	CHO-320	Quest International	Poboljšani rast i produktivnost (interferon- γ)	Burteau i sur. (2003)
	Hibridoma	Vlastita proizvodnja	Poboljšano preživljenje i rast	Franěk (2004)
	CHO	Kerry Bioscience	Poboljšan rast i produktivnost (t-PA)	Kim i sur. (2013)
	CHO	Kerry group	Povećanje produktivnosti (mAb)	Obaidi i sur. (2021)
	CHO	Friesland-Campina	Djelovanje na signalne puteve i regulaciju gena	Kumar i sur. (2021)
Pšenica	BHK	Quest International	Povećanje produktivnosti (interferon)	Heidemann i sur. (2000)
	Vero	Kerry Bioscience	Poboljšan rast	Rourou i sur. (2009)
	CHO	Kerry Bioscience	Poboljšani rast i produktivnost (t-PA)	Kim i sur. (2013)
	CHO	Difco i Kerry Bioscience	Poboljšan rast i produktivnost (mAb)	Spearman i sur. (2014)
Riža	BHK	Quest International	Povećanje produktivnosti (interferon)	Heidemann i sur. (2000)
	CHO-320	Quest International	Poboljšan rast i produktivnost (interferon- γ)	Mols i sur. (2004)
	Vero	Kerry Bioscience	Poboljšan rast	Rourou i sur. (2009)
Soja	BHK	Quest International	Povećanje produktivnosti, očuvana glikozilacija proizvoda (interferon)	Heidemann i sur. (2000)
	CHO-320	Quest International	Poboljšani rast i produktivnost (interferon- γ)	Burteau i sur. (2003)
	Sp2/0	Kerry Bioscience	Poboljšani rast i produktivnost (IgG)	Lu i sur. (2007)
	CHO	LucraTone i Hyclone	Poboljšan rast	Lee i sur. (2009)
	Vero	Kerry Bioscience	Poboljšan rast	Rourou i sur. (2009)
	CHO	Difco i Kerry Bioscience	Povećanje produktivnosti (β -INF)	Spearman i sur. (2014)
	CHO	Nije navedeno	Stabilni markeri metaboličke produktivnosti (mAb)	Richardson i Shah (2015)
Uljana repica	Sf9	Vlastita proizvodnja	Poboljšan rast	Deparis i sur. (2003)
	CHO	Vlastita proizvodnja	Povećanje produktivnosti (γ -INF)	Farges-Haddani i sur. (2006)
	CHO-C5	Vlastita proizvodnja	Poboljšan rast	Chabanon i sur. (2008)

literature može se zaključiti da učinak proteinskog hidrolizata, u ovom slučaju hidrolizata soje, nije jednak za sve stanične linije i klonove pa se stoga medij za uzgoj s dodatkom hidrolizata mora optimirati za svaku pojedinačnu staničnu liniju (Davami i sur., 2014). Također je bitno odrediti i optimalnu koncentraciju hidrolizata koja u kombinaciji s medijem za uzgoj doprinosi rastu stanica, vijabilnosti i povećanoj proizvodnji proteina budući da visoke koncentracije hidrolizata mogu imati inhibitoran utjecaj na rast stanica zbog narušavanja ravnoteže hranjivih tvari u mediju uslijed vrlo visoke koncentracije aminokiselina i oligopeptida (Chun i sur., 2007).

Burteau i sur. (2003) usporedili su djelovanja hidrolizata soje, riže, pšenice i sjemena pamuka na rast i produktivnost CHO-320 stanica u kemijski definiranom mediju. Dobiveni rezultati su pokazali kako dodatak hidrolizata pšenice (s 1% slobodnih aminokiselina) poboljšava rast stanica za 30% i proizvodnju IFN- γ za 60% u odnosu na kontrolne stanice koje su rasle uz dodatak 10% seruma. Istovremeno, dodatak hidrolizata iz sjemena pamuka imao je najbolji učinak na vijabilnost stanica. Rezultate o učinku hidrolizata pamuka na rast i produktivnost CHO stanica koje proizvode monoklonska protutijela objavili su i Obaidi i sur. (2021). Autori su pokazali kako dodatak hidrolizata pamuka značajno utječe na povećanje broja stanica ($\times 1.1$) te još važnije utječe na povećanje specifične produktivnosti monoklonskih protutijela ($\times 1.5$) sugerirajući kako se hidrolizat pamuka može smatrati vrijednim dodatkom mediju koji ne sadrži komponente životinjskog porijekla. Kumar i sur. (2021) odredili su i transkripcijski profil CHO stanica koje proizvode IgG u prisustvu hidrolizata pamuka kako bi utvrdili ključne signalne puteve i pritom regulirane gene, a sve s ciljem određivanja mogućeg mehanizma djelovanja dodanog hidrolizata. U radu Logarušić i sur. (2021) ispitan je učinak hidrolizata pripremljenih s tri različita enzima iz pogače lane na rast i produktivnost adherentnih CHO-DP12 stanica u mediju sa smanjenim udjelom seruma. Stanice koje su rasle uz dodatak hidrolizata imale su bolji rast i produktivnost IgG, a dobiveni rezultati ukazuju na potencijal primjene i valorizaciju uljnih pogača koje zaostaju nakon proizvodnje ulja. Djelovanje hidrolizata slanutka na rast dvije humane stanične linije THP-1 i Caco-2 opisano je u radu Girón-Calle i sur. (2008) pri čemu je uočen pozitivan učinak na rast THP-1 stanica i naznačena mogućnost njegova korištenja umjesto seruma. U nekim slučajevima kombinacija suplemenata koji se dodaju u kemijski definirani medij može dati bolji rezultat od pojedinačnih komponenti. Primjer je dodatak pšeničnog hidrolizata i rekombinantnog humanog albumina što je rezultiralo 80% povećanom proizvodnjom IgG pomoću CHO stanica u usporedbi kada je dodan sam rekombinantni humani albumin (Babcock i sur., 2010). Pristup u kojem se ispituje dodatak ovakvih sastojaka koji djeluju sinergistički postaje sve popularniji u razvoju i optimizaciji upstream procesa.

Jedan od pristupa u korištenju hidrolizata proteina u medijima bez seruma je primjena frakcija biljnih hidrolizata (pripremljenih ultrafiltracijom) umjesto primjene cjelovitih/nefrakcioniranih hidrolizata. Naime, svaki hidrolizat sadrži stotine peptida različitih duljina i sekvenci aminokiselina što identifikaciju učinkovitog peptida čini gotovo pa nemogućim postupkom. Frakcioniranje hidrolizata može suziti raspon duljina peptida pri čemu će svaka frakcija i dalje sadržavati mnoštvo peptida, a ispitivanje utjecaja frakcija na rast stanica predstavlja brz i praktičan indikator razlikovanja njihovih potencijala u stimulaciji rasta stanica. Ultrafiltrati hidrolizata pokazuju brojne pozitivne učinke na kulture stanica (Franěk i sur., 2000; Sung i sur., 2004), a činjenica je i da ograničena prisutnost proteina visokih molekularnih masa olakšava postupke izolacije proizvoda. Chun i sur. (2007) ispitali su učinke frakcija hidrolizata soje na rast i vijabilnost CHO stanica u kemijski definiranom mediju, ističući kako je potrebno optimizirati rast i vijabilnost stanica u prisustvu frakcija hidrolizata. Farges-Haddani i sur. (2006) ispitali su utjecaj peptidnih frakcija proteinskog hidrolizata uljane repice na rast i produktivnost CHO C5 stanične linije koja proizvodi rekombinantni INF- γ . Dobiveni rezultati pokazali su kako frakcije hidrolizata različitih molekularnih masa različito utječu na rast i produktivnost stanica, a frakcije koje su sadržavale veći udio slobodnih aminokiselina i malih

peptida (molekulske mase manje od 500 Da) pokazale su značajan utjecaj na rast i produktivnost. Na temelju dostupne literature trenutne spoznaje ne mogu u potpunosti odgovoriti na pitanje javlja li se pozitivan učinak hidrolizata na rast i produktivnost stanica zbog prisustva malih peptidnih frakcija ili velikih peptida. Jako mali peptidi i slobodne masne kiseline pridonose nutritivnoj vrijednosti medija, dok oni veći mogu djelovati kao signalne molekule oponašajući faktore rasta i preživljavanja.

Glavni nedostatak značajnije primjene biljnih proteinskih hidrolizata u bioprocima s kulturama životinjskih stanica je varijabilnost pojedinih šarži s obzirom na ishodnu sirovinu, a što u konačnici ima utjecaja na rast i produktivnost različitih staničnih linija. Tako je objavljeno da su različite šarže istog proizvođača hidrolizata soje pokazale različite učinke na proizvodnju IgG s CHO stanicama (Richardson i Shah, 2015), a što se dovodi u vezu s visokim razinama adenoza i arginina. Nasuprot tome, šarže koje su sadržavale visoke razine ornitina i citulina pozitivno su korelirale s koncentracijom proizvedenog IgG. Isto tako, u istraživanju koje su proveli Djemal i sur. (2021) uspoređeno je 37 šarži hidrolizata soje istog proizvođača gdje su utvrđene razlike u sastavu elemenata u tragovima (uglavnom željeza) koje također potencijalno mogu utjecati na rast stanica te titar i kvalitetu proizvedenog protutijela.

Zaključci

Budući da su prednosti i pozitivni učinci različitih biljnih hidrolizata na rast i produktivnost brojnih staničnih linija neosporni, u daljnjim istraživanjima trebalo bi se usredotočiti na identifikaciju bioaktivnih komponenti hidrolizata odgovornih za pozitivne učinke. Te spoznaje uz primjenu dostupnih sofisticiranih analitičkih metoda (primarno kromatografskih tehnika i naprednih metoda proteomike i metabolomike) mogu doprinijeti preciznijem definiranju sastava biljnih hidrolizata. Sve navedeno doprinijet će razumijevanju povezanosti pojedinih komponenti hidrolizata i njihova djelovanja što je nužno kako bi se hidrolizati ili njihove frakcije mogle koristiti kao sastojak kemijski definiranih medija sa ciljem poboljšanja rasta i produktivnosti industrijski značajnih staničnih linija.

Pozitivan učinak koji imaju navedeni hidrolizati u biotehnoškoj primjeni stanica može poslužiti kao smjernica za isplativije iskorištenje (otpadnih) sirovina biljnog porijekla te doprinijeti održivosti agrarne proizvodnje. Međutim, pritom treba voditi računa o sljedećem. U praksi, svaka značajna promjena u tehnološkom postupku zahtjeva novu optimizaciju tog postupka. Posljedično, jedan od bitnih preduvjeta tehnološke primjene biljnih proteinskih hidrolizata je razvoj jasne sljedivosti izvora i obrade korištenih biljnih sirovina. Time se umanjuju odstupanja od očekivanih ishoda, tj. izbjegavaju učestale valorizacije i optimizacije tehnoloških postupaka.

Zahvala

Zahvaljujemo Hrvatskoj zakladi za znanost za financiranje ovog istraživanja kroz projekt IP-2016-06-3848.

Literatura

- Acquah C., Chan Y.W., Pan S., Agyei D., Udenigwe C.C. (2019) Structure-informed separation of bioactive peptides. *Journal of Food Biochemistry*, 43 (1) e12765.
- Aguilar-Toala J.E., Deering A.J., Liceaga A.M. (2020) New insights into the antimicrobial properties of hydrolysates and peptide fractions derived from chia seed (*Salvia hispanica* L.). *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12 (4) 1571-1581.
- Al-Mohammadi A.R., Osman A., Enan G., Abdel-Shafi S., El-Nemer M., Sitohy M., Taha M.A. (2020) Powerful antibacterial peptides from egg albumin hydrolysates. *Antibiotics*, 9 (12) 901.
- Babcock J., Wilcox C.I., Huttinga H. (2010) Partial replacement of



- chemically defined media with plant-derived protein hydrolysates. *BioPharm International*, 2010 (5) 36-42.
- Burteau C.C., Verhoeve F.R., Mols J.F., Ballez J.S., Agathos S.N., Schneider Y.J. (2003) Fortification of a protein-free cell culture medium with plant peptones improves cultivation and productivity of an interferon- γ -producing CHO cell line. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*, 39 (7) 291-296.
- Butler M. (2013) Serum-free media: standardizing cell culture system. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 1 (4) 315-318.
- Chabanon G., Alves da Costa L., Farges B., Harscoat C., Chenu S., Goergen, J.-L., Marc A., Mar, I., Chevalot I. (2008) Influence of the rapeseed protein hydrolysis process on CHO cell growth. *Bioresource Technology*, 99 (15) 7143-7151.
- Chalamaiah M., Yu W., Wu J. (2018) Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chemistry*, 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 Technology*, 98 (5) 1000-1005.
- Davami F., Baldi L., Rajendra Y., Wurm F.M. (2014) Peptone supplementation of culture medium has variable effects on the productivity of CHO cells. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 3 (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 (2) 75-85.
- Djemal L., von Hagen J., Kolmar H., Deparis V. (2021) Characterization of soy protein hydrolysates and influence of its iron content on monoclonal antibody production by a murine hybridoma cell line. *Biotechnology Progress*, e3147.
- 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. *Process Biochemistry*, 41 (11) 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. *Biotechnology Progress*, 16 (5) 688-692.
- Franěk F. (2004) Gluten of spelt wheat (*Triticum aestivum* subspecies *spelta*) as a source of peptides promoting viability and product yield of mouse hybridoma cell cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (13) 4097-4100.
- Girón-Calle J., Vioque J., Pedroche J., Alaiz M., Yust M.M., Megias C., Millán F. (2008) Chickpea protein hydrolysate as a substitute for serum in cell culture. *Cytotechnology*, 57 (3) 263-272.
- Grillberger L., Kreil, T.R., Nasr, S., Reiter M. (2009) Emerging trends in plasma-free manufacturing of recombinant protein therapeutics expressed in mammalian cells. *Biotechnology Journal*, 4 (2) 186-201.
- Hajfathalian M., Ghelichi S., García-Moreno P.J., Moltke Sørensen A.-D., Jacobsen C. (2018) Peptides: Production, bioactivity, functionality, and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58 (18) 3097-3129.
- 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 (2) 157-167.
- Ho Y.Y., Lu H.K., Sherman Lim Z.F., Lim H.W., Ho Y.S., Ng S.K. (2021) Applications and analysis of hydrolysates in animal cell culture. *Bioresources and Bioprocessing*, 8 93.
- Hou Y., Wu Z., Dai Z., Wang G., Wu G. (2017) Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8 24-36.
- Kim D.Y., Chaudhry M.A., Kennard M.L., Jardon M.A., Braasch K., Dionne B., Butler M., Piret J.M. (2013) Fed-batch CHO cell t-PA production and feed glutamine replacement to reduce ammonia production. *Biotechnology Progress*, 29 (1) 165-175.
- Kumar S., Dhara V.G., Orzolek L.D., Hao H., More A.J., Lau C.E., Betenbaugh M.J. (2021) Elucidating the impact of cottonseed hydrolysates on CHO cell culture performance through transcriptomic analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105 271-285.
- 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. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42 (1) 1-7.
- Lee J.Y., Chun B.-H., Lee Y.K., Lee J.H., Ahn J., Chung N. (2009) Influence of mixed protein hydrolysates on the growth and viability of Chinese hamster ovary cells. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52 (6) 607-612.
- 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. *Molecular Biology Reports*, 46 (6) 6079-6085.
- 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 for Human Nutrition*, 75 (4) 518-524.
- Logarušić M., Gaurina Srček V., Berljavac S., Leboš Pavunc A., Radošević K., Slivac I. (2021) Protein hydrolysates from flaxseed oil cake as a media supplement in CHO cell culture. *Resources (Basel)*, 10 (6) 59.
- 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 (1) 15-29.
- 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 Biochemistry*, 91 35-45.
- Mols J., Peeters-Joris C., Agathos S.N., Schneider Y.-J. (2004) Origin of rice protein hydrolysates added to protein-free media alters secretion and extracellular proteolysis of recombinant interferon- γ as well as CHO-320 cell growth. *Biotechnology Letters*, 26 1043-1046.
- Nasri M. (2017) Protein hydrolysates and biopeptides biopeptides: Production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A review. *Advances in Food and Nutrition Research*, 81 109-159.
- Obaidi I., Mota L.M., Quigly A., Butler M. (2021) The role of protein hydrolysates in prolonging viability and enhancing antibody production of CHO cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105 3115-3129.
- O'Flaherty R., Bergin A., Flampouri E., Mota L.M., Obaidi I., Quigley A., Xie Y., Butler M. (2020) Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. *Biotechnology Advances*, 43 107552.
- Pasupuleti V.K., Braun S. (2008) State of Art Manufacturing of Protein Hydrolysates. U: Pasupuleti V.K., Demain, A.L. (ed): *Protein Hydrolysates in Biotechnology*, str. 10-32. Springer, Dordrecht, USA.
- Richardson J., Shah B. (2015) Metabolomics analysis of soy hydrolysates for the identification of productivity markers of mammalian cells for

- manufacturing therapeutic proteins. *Biotechnology Progress* 31 (2) 522–531.
- Ritacco F.V., Wu Y., Kheta A. (2018) Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: history, key components, and optimization strategies. *Biotechnology Progress*, 34 (6) 1407–1426.
- Rourou S., van der Ark A., van der Velden T., Kallel H. (2009) Development of an animal-component free medium for Vero cells culture. *Biotechnology Progress*, 25 (6) 1752-1761.
- Saadi S., Saari, N. Anwar F., Abdul Hamid A., Ghazali H.M. (2015) Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnology Advances*, 33 (1) 80-116.
- Si D., Shang T., Liu X., Zheng Z., Hu Q., Hu C., Zhang R. (2020) Production and characterization of functional wheat bran hydrolysate rich in reducing sugars, xylooligosaccharides and phenolic acids. *Biotechnology Reports*, 27 e00511
- Siemensma A., Babcock J., Wilcox C., Huttinga H. (2010) Towards an Understanding of How Protein Hydrolysates Stimulate More Efficient Biosynthesis in Cultured Cells. U: Pasupuleti V.K., Demain, A.L. (ed): *Protein Hydrolysates in Biotechnology*, str. 33-54. Springer, Dordrecht, USA.
- Spearman M., Lodewyckx C., Richmond M., Butler M. (2014) The bioactivity and fractionation of peptide hydrolysates in cultures of CHO cells. *Biotechnology Progress*, 30 (3) 584-593.
- Song W., Kong X., Hua Y., Li X., Zhang C., Chen Y. (2020) Antioxidant and antibacterial activity and in vitro digestion stability of cottonseed protein hydrolysates. *LWT*, 118 (10) 108724.
- Sung Y.H., Lim S.W., Chung J.Y., Lee G.M. (2004) Yeast hydrolysate as a low-cost additive to serum-free medium for the production of human thrombopoietin in suspension cultures of Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63 527-536.
- Taylor W.G, Taylor M.J., Pumper R.W., Lewis N.J. (1972) Studies on a serum substitute for mammalian-cells in culture. 1. Biological efficacy of whole and fractionated peptone dialysate. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 139 96
- Udenigwe C.C., Aluko R.E. (2012) Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77 (1) 11-24.
- van der Valk J, Mellor D, Brands R., Fischer R., Gruber, F., Gstraunthaler G., Hellerbrekers L., Hyllner J., Jonker, F.H., Prieto, P., Thalen M., Baumans V. (2004) The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicology in Vitro*, 18 (1) 1-12.
- van der Valk J., Brunner D., De Semt K., Fex Svenningsen A., Honegger P., Knudsen L. E., Lindl T., Noraberg J., Price A., Scarino M. L., Gstraunthaler G. (2010) Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*, 24 (4) 1053-1063.
- Wang R., Han Z., Ji R., Xiao Y., Si R., Guo F., He J., Hai L., Ming L., Yi L. (2020) Antibacterial activity of trypsin-hydrolyzed camel and cow whey and their fractions. *Animals*, 10 (2) 337.
- Xu J., Xu X., Huang C., Angelo J., Oliveira C.L., Xu M., Xu X., Temel D., Ding J., Ghose S., Borys M.C., Jian Li Z. (2020) Biomanufacturing evolution from conventional to intensified processes for productivity improvement: a case study. *mAbs*, 12 (1) 1.