

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Iva BOLTAR

PRIDOBIVANJE BIOLOŠKIH UČINKOVIN IZ KOKOŠJIH JAJC

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

ACQUIRING BIOLOGICAL COMPOUNDS FROM HEN EGGS

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija kmetijstvo – zootehnika. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij oddelka za zootehniko je za mentorco diplomskega dela imenovala prof. dr. Mojco Narat in za somentorico prof. dr. Antonijo Holcman.

Recenzentka: doc. dr. Tanja Kunej

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: prof. dr. Ivan ŠTUHEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- Članica: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- Članica: prof. dr. Antonija HOLCMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- Članica: doc. dr. Tanja KUNEJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Iva BOLTAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 637.4(043.2)=163.6
KG	perutnina/kokoši/jajca/biološke učinkovine/genetske tehnike
KK	AGRIS Q04/9610
AV	BOLTAR, Iva
SA	NARAT, Mojca (mentorica)/HOLCMAN, Antonija (somentorica)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2009
IN	PRIDOBIVANJE BIOLOŠKIH UČINKOVIN IZ KOKOŠJIH JAJC
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 92 str., 6 pregl., 11 sl., 137 vir
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	V zadnjem času dokazujejo, da kokošje jajce ni le vir koristnih prehranskih substanc, ampak tudi medij za pridobivanje bioloških učinkovin, uporabnih v prehranske in neprehranske namene. Nekatere bi lahko uporabili tudi v medicini. V diplomski nalogi smo se v prvem delu osredotočili na opis naravno prisotnih substanc v jajcu, ki se jih uporablja še v druge, ne izključno prehranske namene. V drugem delu pa opisujemo možnosti pridobivanja tujih proteinov iz jajca z uporabo genetskih tehnik. Poznavanja fiziologije nalaganja snovi v rumenjak in beljak ter nove biotehnološke metode, so omogočile realizacijo ideje, da bi se v jajce nalagala zelena zdravilna učinkovina, ki v njem ni naravno prisotna.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 637.4(043.2)=163.6
CX Poultry/laying hens/eggs/biological compounds/genetic techniques
CC AGRIS Q04/9610
AU BOLTAR, Iva
AA NARAT, Mojca (supervisor)/HOLCMAN, Antonija (co-supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY 2009
TI ACQUIRING BIOLOGICAL COMPOUNDS FROM HEN EGGS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 92 p., 6 tab., 11 ann., 137 ref.
LA sl
AL sl/en
AB According to the recent research a chicken egg is not only a source of useful nutrients but also a means of acquiring biologically active substances that can be used not only for nutritional but also for non-nutritional purposes, some of which can also be used for medicinal purposes. The first part of this graduation thesis focuses on the substances naturally present in an egg which can be used for other non-nutritional purposes. In the second part the possibilities of extracting foreign proteins from an egg with the use of genetic techniques is described. By understanding the physiology of how substances naturally deposit into the yolk and white of an egg as well as the new biotechnological methods may enable the realisation of the idea to deposit desired medicinal substances into an egg which are not naturally occurring there.

KAZALO VSEBINE

str.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGRADBA JAJCA	3
2.1.1 Zgradba rumenjaka	3
2.1.2 Zgradba beljaka.....	4
2.1.3 Zgradba lupine.....	5
2.2 HRANILNE SNOVI V JAJCU	7
2.2.1 Hranilne snovi v rumenjaku.....	7
2.2.2 Hranilne snovi v beljaku	11
2.2.3 Sestava lupine.....	12
2.3 NASTANEK JAJCA	13
2.3.1 Nastanek rumenjaka	17
2.3.2 Nastanek beljaka	21
2.4 BIOLOŠKE UČINKOVINE V KOKOŠJEM JAJCU IN NJIHOVE LASTNOSTI	23
2.4.1 Biološke učinkovine v beljaku in njihove lastnosti.....	24
2.4.1.1 Lizocim.....	24
2.4.1.2 Ovalbumin	26
2.4.1.3 Ovotransferin	27
2.4.1.4 Ovomucin	28
2.4.1.5 Ovomukoid	29

2.4.1.6	Ovoinhibitor	29
2.4.1.7	Cistatin.....	30
2.4.1.8	Avidin.....	31
2.4.1.9	Ovostatin (ovomakroglobulin)	31
2.4.1.10	Ovoflavoprotein.....	32
2.4.1.11	Ovoglikoprotein.....	32
2.4.1.12	Ovoglobulin.....	35
2.4.1.13	Proteini beljaka v manjši količini	35
2.4.2	Biološke učinkovine v rumenjaku in njihove lastnosti.....	36
2.4.2.1	IgY	36
2.4.2.2	Fosvitin	37
2.4.2.3	Salicilna kislina	38
2.4.2.4	Saliloligosaharidi	39
2.4.2.5	Lipoproteini nizke gostote (LDL)	39
2.4.2.6	Lipidi rumenjaka	40
2.5	PRIDOBIVANJE NARAVNO PRISOTNIH BIOLOŠKIH UČINKOVIN IZ KOKOŠJEGA JAJCA	41
2.5.1	Pridobivanje naravno prisotnih bioloških učinkovin iz rumenjaka	42
2.5.2	Pridobivanje naravno prisotnih bioloških učinkovin iz beljaka	43
2.6	BIOTEHNOLOŠKI PRISTOPI ZA PRIDOBIVANJE UČINKOVIN IZ JAJCA...	46
2.6.1	Transgena kokoš kot ekspresijski sistem za pridobivanje bioloških učinkovin iz jajc	49
2.6.1.1	Prednosti pridobivanja bioloških učinkovin v jajcu transgenih kokoši...	50
2.6.1.2	Metode pridobivanja transgenih kokoši	52
2.6.1.3	Tkivno specifično izražanje vnešenih genov	61
2.6.1.4	Izolacija terapevtskih proteinov iz jajc	63
2.6.1.5	Obeti za prihodnost uporabe jajc v biotehnologiji.....	63
2.6.2	Druge metode pridobivanja učinkovin iz kokošjega jajca	64
2.6.3	Proizvedene učinkovine v jajcu s pomočjo biotehnologije	66
2.6.4	Proizvajalci bioloških učinkovin iz kokošjih jajc s pomočjo tehnologije transgeneze.....	68
3	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	70

3.1	RAZPRAVA.....	70
3.2	SKLEPI.....	73
4	POVZETEK.....	75
5	VIRI	76
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Vsebnost maščobnih kislin (MK) v rumenjaku	9
Preglednica 2: Proteini rumenjaka in njihov izvor (Moran, 1986: 613).....	19
Preglednica 3: Učinkovine v beljaku in nekatere njihove biološke aktivnosti.....	34
Preglednica 4: Biološke aktivnosti rumenjaka in njegovih snovi (Kovacs-Nolan in sod., 2005: 8425)	36
Preglednica 5: V jajcu transgenih kokoši naložene učinkovine in njihove vsebnosti	67
Preglednica 6: V transgenih kokoših pridobljeni terapevtski proteini, ki jih razvijajo različne družbe (Goven in sod., 2008)	69

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Zgradba jajca (prirejeno po Contents ..., 2009).....	4
Slika 2: Shema zgradba lupine, stranski prerez (prirejeno po Simons, 1971, cit. po Roberts in Brackpool, 1994: 247)	5
Slika 3: Pore na površini lupine (Eggs ..., 2009).....	7
Slika 4: Jajčnik in jajcevod dozorele kokoši (Holcman, 2004a: 71)	14
Slika 5: Nastajanje jajca v posameznem delu jajcevoda (prirejeno po Roberts in Brackpool, 1994: 246).....	17
Slika 6: Prečni prerez stene folikla in zgradba rumenjaka (prirejeno po Moran, 1986: 613).....	18
Slika 7: Sinteza proteinov rumenjaka in njihov prenos v rumenjak (prirejeno po Matsuda 1998, cit. po Mine, 2008: 189)	19
Slika 8: Prikaz sprememb v celicah magnuma in nalaganje beljaka (prirejeno po Etches, 1996: 172).....	21
Slika 9: Pridobivanje cepiv v kokošjem jajcu (Vaccine ..., 2009).....	48
Slika 10: Pridobivanje transgenih kokoši z metodo virusnih vektorjev (prirejeno po Pettite in Mozdziak, 2007: 1740)	54
Slika 11: Vnos genskega materiala v zneseno jajce (prirejeno po Ivarie, 2006: 15).....	58

1 UVOD

Slovar slovenskega knjižnega jezika (1993) definira, da je jajce z lupino obdana spolna celica z veliko hranilnimi snovmi, iz katere se po oploditvi razvije nov organizem. V človeški prehrani je jajce prisotno že tisočletja, čeprav je primarna vloga jajca namenjena razvoju novega življenja, piščanca. Zarodku jajce nudi popolno hrano, ki vsebuje snovi, potrebne za razvoj živega bitja. Zato je jajce v prehrani človeka pomembno živilo z visoko biološko vrednostjo. Kot je znano, je aminokislinsko razmerje v jajcu skoraj idealno za človekove prehranske potrebe (McNamara in Thesmar, 2005). Jajce je tudi funkcionalna hrana s snovmi, ki ugodno vplivajo na zdravje, izboljšujejo naše zdravje ali preprečujejo nastanek nekaterih bolezni.

V diplomski nalogi se bomo predvsem posvetili jajcu kot viru ali mediju za pridobivanje bioloških učinkovin, ki so uporabne v »neprehranske« namene. Pridevnik biološki se nanaša na žive organizme. Učinkovina je snov, ki učinkuje zdravilno (Slovar ..., 1993). Biološko učinkovino bi tako razložili kot snov, ki s svojimi lastnostmi deluje zdravilno ter jo dobimo s pomočjo živih organizmov.

Predvsem v zadnjem času dokazujejo in raziskujejo, da je jajce vir bioloških učinkovin. Te bi lahko uporabili za medicinske namene (za zdravljenje ali preprečevanje nekaterih bolezni). Učinkovine v jajcu namreč povezujejo z raznimi biološkimi aktivnostmi (Mine in Kovacs-Nolan, 2004).

V zadnjih dvajsetih letih se je povečala potreba po bioloških zdravilih, pridobljenih iz gensko spremenjenih organizmov, hkrati so se razvile nove metode v biotehnologiji. Poznavanje fiziologije naganja snovi v rumenjaki in beljak ter (nove) biotehnološke metode so omogočile realizacijo ideje, da bi se tudi v jajce nalagala želeni zdravilni učinkovina, ki v njem ni naravno prisotna. Raziskave so vodile do proizvodnje kokoši kot »bioreaktorja« ali biološkega sistema za pridobivanje eksogenih snovi. Uporaba kokoši v ta namen naj bi imela prednosti v primerjavi z ostalimi, že uporabljenimi organizmi (Harvey in Ivarie, 2003; Lillico in sod., 2005; Huopalahti in sod., 2007).

Nekateri ljudje imajo še vedno napačno predstavo o škodljivosti jajca zaradi visoke vsebnosti holesterola v rumenjaku in njegovega vpliva na razvoj srčno-žilnih bolezni. Res je, da se v rumenjaku nahaja 211-213 mg holesterola in da ga lahko dnevno zaužijemo do 300 mg. Dokazano je bilo, da holesterol, ki ga zaužijemo, zelo malo vpliva na nivo holesterola v krvi. Večina študij tudi navaja, da nasičene maščobe, ki jih najdemo v hrani, bolj vplivajo na nivo plazemskega holesterola, kot pa holesterol, ki ga zaužijemo s hrano (McNamara in Thesmar, 2005; King, 2009). V številnih študijah pišejo, da ni direktne povezave med uživanjem jajc in srčno-žilnimi boleznimi (King, 2009). Poleg tega je nekatere ljudi strah, da se bodo okužili z bakterijo *Salmonelo*, če bodo jedli jajca. To je po eni strani res. Vendar, če z jajcem pravilno rokujemo (higiena, kuhanje), do tega ne pride. Ker si ljudje radi ustvarimo napačno mnenje o nepoznanem je prav, da kokošje jajce pogledamo širše in ga bolje spoznamo. Predvsem je potrebno vedeti katere pozitivne lastnosti skriva in teh ni malo.

Cilji diplomske naloge so, da poiščemo in preštudiramo literaturo o zgradbi in sestavi jajca. Drugi cilj je, da poiščemo in preštudiramo literaturo o bioloških učinkovinah v jajcu. Zanima nas predvsem kokošje jajce, kot vir ali medij za pridobivanje zdravilnih učinkovin. Za tretji cilj smo si določili, da na kratko predstavimo biotehnološke pristope pridobivanja učinkovin iz kokošnjega jajca.

Z našim delom bi radi zbrali in pridobili informacije, s katerimi bi predstavili jajce kot pomemben vir različnih snovi, ki imajo pozitivne lastnosti. Jajce bi prikazali kot »multifunkcionalno« zdravilo oziroma, da vsebuje učinkovine, ki lahko delujejo zdravilno v človeškem telesu na različna bolezenska stanja. To pomeni, da je pomemben vir različnih snovi, ki imajo pozitivne lastnosti in je potencialno uporabno tudi v biotehnoloških postopkih za pridobivanje drugih, ne izključno prehranskih snovi. S takim prikazom kokošnjega jajca bi dosegli, da bi imeli bolj pozitiven odnos do njega.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGRADBA JAJCA

Slovar slovenskega knjižnega jezika (1993) navaja, da je jajce z lupino obdana spolna celica z veliko hranilnih snovi, iz katere se po oploditvi razvije nov organizem.

Jajce vsebuje vsa hranila, ki so potrebna za normalno rast in razvoj zarodka. Je kompleksna in zelo diferencirana reproduktivna celica. V notranjosti jajca se nahaja rumenjaki, ki ga obdaja beljak, nato sledita dve membrani, natančneje notranja lupinina membrana in zunanja lupinina membrana. Vse skupaj obdaja lupina (Stadelman, 2003; Stadelman in Cotterill, 1990). Zaščitni sloj, ki obdaja jajčno lupino, je kutikula (Zorko, 1996). (Slika 1)

Povprečna masa kokošnjega jajca je 55-60 g (Zorko, 1996; Cotterill in Stadelman, 1965, cit. po Nakai in Powrie, 1990; Burley, 1989, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Podatek za maso jajca belega leghorna znaša od 50 do 63 g (Yamamoto in sod., 1996). Glede na maso jajca je 10 % lupine, 60 % beljaka in 30 % rumenjaka (McNamara in Thesmar, 2005). Podobne podatke o deležu posameznih delov jajca navajajo tudi nekateri drugi avtorji in se ne razlikujejo za več kot 0,5 do 3 % (Stadelman, 2003; Lillico in sod., 2005; Yamamoto in sod., 1996; Cotterill in Geiger, 1977, cit. po Kovacs-Nolan in sod., 2005).

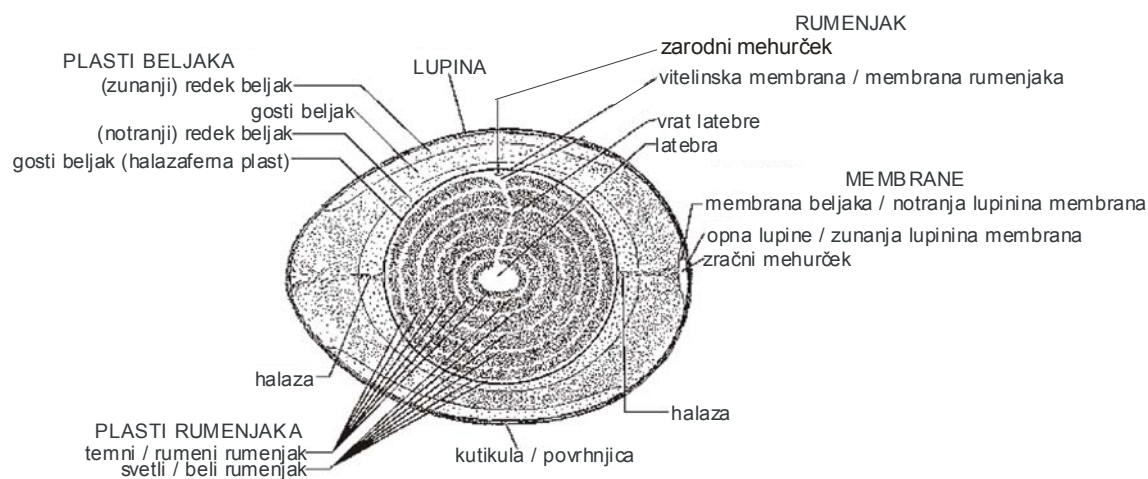
2.1.1 Zgradba rumenjaka

Kokoši imajo razvit samo en jajčnik in sicer na levi strani. Jajčnik dozorele kokoši sestavljajo rumenjaki, ki varujejo zarodno jajčno celico. V znesenem jajcu jo v rumenjaku vidimo kot svetlo pego. Če pride do oploditve, se začne v jajcu razvijati zarodek (Ločniškar in sod., 1991; Holcman, 2004a).

Latebra je bela, steklenici z dolgim vratom podobna tvorba. Latebra v latinščini pomeni skrivališče. Širši del latebre je v centru rumenjaka, ožji del pa skriva in drži na površini rumenjaka zarodno celico v zarodnem mehurčku (Ločniškar in sod., 1991; Zorko, 1996; Yamamoto in sod., 1996).

Svetlejšo plast imenujejo tudi tvorni rumenjaki, temnejšo plast pa hranilni rumenjaki (Zorko, 1996). Rumenjaki so obdani s polprepustno vitelinsko membrano (Stadelman, 2003), ki je iz treh plasti (Yamamoto in sod., 1996).

Rumenjak obarvajo v maščobi topna barvila, ki se nahajajo v zaužiti krmi. Ta barvila so karotenoidi, vsebujejo jih nekatere rastline (Stadelman, 2003).



Slika 1: Zgradba jajca (prirejeno po Contents ..., 2009)

2.1.2 Zgradba beljaka

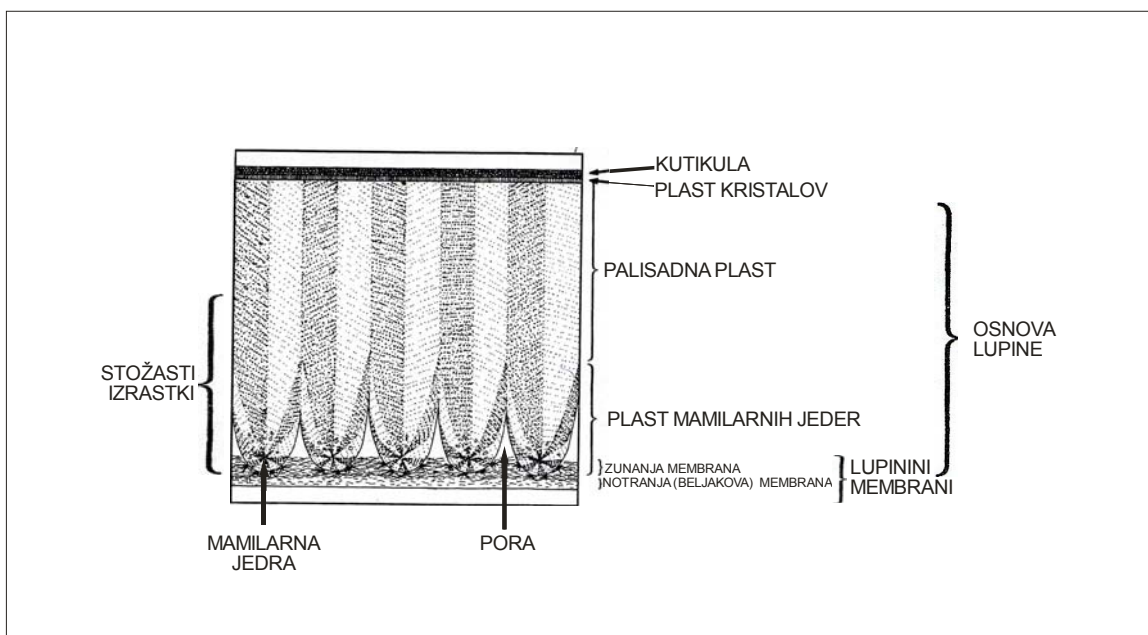
Beljak je sestavljen iz štirih slojev. Prva, notranja gosta ali halaziferna plast beljaka se dotika rumenjake vitelinske membrane. Naslednja, druga plast beljaka je notranji redek beljak. Ta je obdan s tretjo plastjo, ki je (zunanji) gosti oziroma čvrsti beljak. Četrta plast beljaka je zunanji redek beljak. Na dveh mestih izhajajo iz prve plasti proti lupini vezi beljaka ali halaze. To so med sabo spiralno zavite proteinske niti in segajo preko vseh štirih plasti beljaka. Spiralno zvite halaze pritrdijo in držijo rumenjak v centru (Holcman, 2004b; Zorko, 1996; Stadelman in Cotterill, 1990; Yamamoto in sod., 1996).

Viskoznost gostega beljaka je večja zaradi večje vsebnosti proteina ovomucina. S staranjem postaja beljak bolj redek (Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

Beljak vsebuje hranilne snovi ter snovi, ki ščitijo zarodek pred vdorom mikroorganizmov. Med nastajanjem jajca je beljak šablona za nalaganje lupininih membran (Solomon, 1991, cit. po Roberts in Brackpool, 1994).

2.1.3 Zgradba lupine

Lupina je sestavljena iz šestih plasti (Slika 2). Na notranji površini lupine sta dve plasti vlaknastih lupininih membran, ki obdajata beljak (Parsons, 1982, cit. po Yamamoto in sod., 1996). Zunanja lupinina membrana se povezuje s tretjo plastjo, ki se imenuje plast mamilarnih jeder. Zaradi oblike jo tudi imenujejo stožčasta plast. Nad to leži četrta plast, palisadna plast. Radialno na palisadno plast se nahaja tanka plast kristalov ali kristalna plast. Zunanjo površino lupine obdaja šesta plast, to je kutikula (Simons, 1971, cit. po Roberts in Brackpool, 1994; Parson, 1982, cit. po Yamamoto in sod., 1996). Palisadna in kristalna plast tvorita skupaj porozno plast (Stadelman, 2003). Skupna debelina vseh plasti lupine je 375 μm (Etches, 1996).



Slika 2: Shema zgradba lupine, stranski prerez (prirejeno po Simons, 1971, cit. po Roberts in Brackpool, 1994: 247)

Membrani sta sestavljeni iz proteinskih niti, ki so pričvrščene tako, da tvorijo polprepustno membrano (Stadelman, 2003). Notranja membrana (20 μm) se stika z beljakom, zato se imenuje tudi beljakova membrana. Zunanja membrana (50 μm) pa se stika z lupino, zato se imenuje tudi lupinina membrana. (Solomon, 1991, cit. po Nys in Gautron, 2007). Organska vlakna segajo globoko v lupino. Lupinina membrana je organska osnova, v katero se zasidra lupina (Zorko, 1996). Membrani se tesno stikata, razmakneta se na topem delu jajca. Sem se po znesenju jajca vrine zračni mehurček (Holcman, 2004a). Takoj po znesenju jajca ima zračni mehurček obliko leče, premer 13,2 mm in višino do 2 mm (Zorko, 1996).

Osnovo lupine ali matriks gradijo proteinska vlakna in kalcijevi kristali. Matriks tvorita mamilarna in palisadna plast. Mamilarna plast je sestavljena iz številnih nepravilnih stožčastih izrastkov ali stožcev, ki so oblikovani in postavljeni tako, da tvorijo prostorčke ali pore (Stadelman, 1990) (Slika 3). Del mamilarne plasti (mamilarna jedra) je spojen s proteinskimi vlakni zunanje lupinine membrane. Palisadna plast se začne, ko se stožci mamilarne plasti na vrhu zlepijo in tvorijo kompaktno lupino. Palisadna plast je iz kalcijevih kristalov in predstavlja (200 μm) dve tretjini skupne debeline lupine (Nys in Gautron, 2007).

Število por v lupini je različno, 70 do 150 na cm^2 (Stadelman in Cotterill, 1990). Jajce naj bi vsebovalo 10.000 do 17.000 por (Yamamoto in sod., 1996; Board in Tranter, 1990) (Slika 3). Povprečen premer por znaša 17 μm (Etches, 1996) oziroma od 10 do 30 μm (Yamamoto in sod., 1996). Proti notranjosti jajca se premer pore manjša. Tako imajo pore obliko lijaka (Simkiss in Taylor, 1971). Običajno ima jajce večje število por na širšem oziroma topem delu jajca, kjer je lociran zračni mehurček. Manj por je v ekvatorialnem delu, še manj pa na koničastem delu. Lupina prepušča svetlobo, zaradi te lastnosti lahko opravljajo nekatere preiskave s presvetljevanjem jajc (Stadelman in Cotterill, 1990; Zorko, 1996). Pore dovoljujejo prehod vlage, vendar ne tekoče vode (Yamamoto in sod., 1996). Omogočajo prehod plinov in izmenjavo plinov skozi lupino. To je pomembno pri valilnem jajcu za razvoj zarodka (Stadelman, 2003).



Slika 3: Pore na površini lupine (Eggs ..., 2009)

Kutikula je debela 10 μm (Nys in sod., 1991, cit. po Nys in Gautron, 2007). Maši pore v lupini ter tako preprečuje vdor mikroorganizmov v notranjost jajca (Yamamoto in sod., 1996).

Kutikula in lupina, vključno z njenima membranama, nudijo zaščito jajčni vsebini. Ta kompleksna struktura regulira izmenjavo plinov in vode ter preskrbi razvijajočemu zarodku kalcij (Huopalahti in sod., 2007).

Prehod vlage in plinov preko por poteka v glavnem na podlagi osmoze in difuzije. Membrana je ena izmed prvih ovir, ki preprečujejo vdor mikroorganizmov v jajčno vsebino (Stadelman, 2003). Struktura membrane je kot nekakšna mreža v katero se ujamejo mikroorganizmi (Yamamoto in sod., 1996).

2.2 HRANILNE SNOVI V JAJCU

Glavne komponente v jajcu so voda (72,8-75,6 %), proteini (12,0-13,4 %) in lipidi (10,5-12,0 %). Poleg tega vsebuje jajce še minerale (0,8-1,0 %) in ogljikove hidrate (0,3-1,0 %). Ogljikovi hidrati, ki jih je v jajcu najmanj, so v prosti obliki ali vezani na proteine in lipide (Li-Chan in sod., 1995, cit. po Stadelman, 2003; Sugino, 1997, cit. po Kovacs-Nolan in sod., 2005; Yamamoto in sod., 1996). Podatki o vsebnosti hranilnih snovi v jajcu se med avtorji bistveno ne razlikujejo. Proteinov je nekoliko več kot lipidov. Delež ogljikovih hidratov in mineralov je približno enak.

2.2.1 Hranilne snovi v rumenjaku

Rumenjak vsebuje 48,2 % vode, 15,7-16,6 % proteinov, 31,8-35,5 % lipidov, 1,1 % mineralov ter 0,2-1,0 % ogljikovih hidratov (Holcman, 2004b). V 17 g rumenjaku je 8,89 g vode, 2,70 g proteinov, 4,51 g lipidov, 0,29 g mineralov ter 0,61 g ogljikovih hidratov.

Energijska vrednost 17 g rumenjaka je 54 kcal kar ustreza 225 kJ, v 100 gramih je to 317 kcal/1325 kJ (Nutrient ..., 2008).

Rumenjak je oljno vodna emulzija (Leskanich in Noble, 1997, cit. po Zadravec, 1999). Glavna komponenta v suhi snovi rumenjaka so lipidi, ki jih je 65 % (Anton, 2007). Jajce vsebuje od lipidov trigliceride (65 %), fosfolipide (25 %) in holesterol (5 %) (Leskanich in Noble, 1997, cit. po Zadravec, 1999). V rumenjaku so lipidi prisotni kot lipoproteinski kompleksi, oziroma so povezani v lipoproteine (Leskanich in Noble, 1997, cit. po Zadravec, 1999; McNamara in Thesmar, 2005).

Od vseh fosfolipidov je največ fosfatidilholina (84,3 %), fosfatidiletanolamina (11,9 %) ter lecitina (12,0 %) (Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Prisotni so še: sfingomielin, lizofosfatidiletanolamin, plazmalogen, inositol (McNamara in Thesmar, 2005; Stadelman, 2003). King (2009) omenja še kefalin, lecitinu podoben fosfolipid.

Maščobokislinska sestava rumenjaka je odvisna od količine maščobnih kislin (MK) v prehrani kokoši. Na osnovi standardne prehrane je v rumenjaku 30-35 % nasičenih maščobnih kislin (NMK), 40-45 % enkrat nenasičenih maščobnih kislin (ENMK) ter 20-25 % večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK) (Kuksis, 1992, cit. po Anton, 2007; Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Vsebnost (g) MK v rumenjaku je prikazana v preglednici 1.

Glavne MK v rumenjaku so: palmitinska, palmitooleinska, stearinska, oleinska, linolna, linolenska, arahidonska in dokozaheksaenojska kislina. Palmitinska (C18:0) in stearinska kislina (C16:0) sta NMK in predstavljata kar 30-38 % od vseh MK v rumenjaku. Med ENMK je največ oleinske kisline (C18:1). K ENMK spada tudi palmitooleinska MK (16:1, n-7) (Zadravec, 1999).

Preglednica 1: Vsebnost maščobnih kislin (MK) v rumenjaku

	MK v 53,6 g jajcu (Yannakopoulos, 2007)	MK v večjem jajcu (McNamara in Thesmar, 2005) ⁴	MK v 17 g rumenjaku (Nutrient ..., 2008) ⁴
NMK ¹	1,5 g	1,5 g	1,6 g
ENMK ²	2,1 g	1,9 g	2,0 g
VNMK ³	0,9 g	0,7 g	0,7 g

¹NMK-nasičene maščobne kisline, ²ENMK-enkrat nenasičene maščobne kisline, ³VNMK-večkrat nenasičene maščobne kisline, ⁴Podatki iz virov so zaokroženi na 1 decimalno mesto.

Med VNMK sta dve skupini, omega-6 (n-6) in omega-3 (n-3). Od n-3 MK se v jajcu nahajata dokozaheksaenojska kislina (DHK), (22:6, n-3) in njen prekurzor, ki je α -linolenska kislina (18:3 n-3). V skupino n-6 maščobnih kislin sodi linolna kislina (18:2, n-6), ki se pretvori v arahidonsko kislino (20:4, n-6) (Kuksis, 1992, cit. po Anton, 2007; Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

Holesterol je sterol, ki sodi v skupino nenasičenih policikličnih alkoholov (Slovar medicinskih ..., 2008). Njegova vsebnost je deloma odvisna od prehrane, deloma pa od sinteze v jetrih (Bitman in Wood, 1980, cit. po Anton, 2007). V rumenjaku je 210-226 mg holesterola (Nutrient ..., 2008; McNamara in Thesmar, 2005; Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Vaghefi (2002) navaja 200 mg kot povprečno vrednost holesterola v jajcu. V literaturi so opisani različni postopki, s katerimi so skušali zmanjšati vsebnost holesterola v rumenjaku. To so: vključevanje probiotikov, česnovega prahu in zelenega čaja v prehrano kokoši (Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

Barva rumenjaka je posledica barvil topnih v maščobah, ki se nahajajo v zaužiti krmi (Stadelman, 2003). Naravni pigmenti v jajčnem rumenjaku so karotenoidi (Anton, 2006) in so topni v maščobah. Kokoš karotenoidov ne more sama sintetizirati (Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Karotenoidi so odgovorni za rumeno barvo, ki je lahko od svetlo rumene do temno oranžne. Barva je tudi ekonomsko pomembna lastnost (Kuksis, 1992, cit. po Anton, 2007). Med karotenoidi so v večji količini prisotni ksantofili (lutein, β -kriptoksantin,

zeaksantin) in karoteni (od teh β -karoten) (Kuksis, 1992, cit. po Anton, 2007; Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

V rumenjaku je približno 43 % vseh proteinov jajčne vsebine, preračunano po Nutrient (2008). Od proteinov se v rumenjaku nahajajo lipoproteini in sicer lipoproteini majhne gostote (LDL), lipoproteine velike gostote (HDL) ter lipoproteini zelo majhne gostote (VLDL). Od drugih proteinov so v rumenjaku še: fosfoglikoproteini (fosvitin), livetin, encimi ter tudi salilglikopeptidi (Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

V rumenjaku od proteinov prevladujejo LDL (68 %). V večjem deležu se nahajajo še naslednji: HDL (16 %), 10% globularnih proteinov (livetini), 4 % fosfoproteinov ter 2 % manjših proteinov (Anton, 2006; Powrie in Nakai 1986, cit. po Anton, 2006).

Rumenjak vsebuje zelo malo ogljikovih hidratov. Predstavljajo 3,59 % mase rumenjaka oziroma je v 17 g rumenjaku 0,61 g ogljikovih hidratov (Nutrient ..., 2008). Večina ogljikovih hidratov je vezana v glikolipide in v glikoproteine. Približno 0,3 % je prostih ogljikovih hidratov. Sem sodi tudi glukoza (Li-Chan in Hyun-Och, 2008), ki jo je 0,03 g. V manjšem obsegu je še prisotna fruktoza, manoza, laktoza in galaktoza (Nutrient ..., 2008).

V rumenjaku je mineralov približno toliko kot ogljikovih hidratov (1 %). Med minerali je največ fosforja (66 mg) (Nutrient ..., 2008). Watkins (1995) navaja, da je v rumenjaku 102 mg P oziroma 61 % od vseh mineralov rumenjaka. Po vsebnosti mu sledita še kalcij (22,0-25,2 mg) in kalij (17-19 mg) (Nutrient ..., 2008; Watkins, 1995). Poleg teh se nahajajo tudi magnezij, natrij, cink, baker, mangan, selen, jod in železo. Železa je v rumenjaku 0,46 mg (Nutrient ..., 2008) oziroma 1,02 mg (Watkins, 1995).

V rumenjaku so vsi v maščobah topni vitamini. Vsebuje tudi večjo vsebnost vodotopnih vitaminov (B_1 , riboflavin- B_2 , nikotinska kislina ali niacin- B_3 , B_6 , pantotenska kislina, B_{12}) kot beljak. Jajce ne vsebuje vitamina C (McNamara in Thesmar, 2005).

2.2.2 Hranilne snovi v beljaku

Beljak vsebuje 88,0 % vode, 9,7-10,6 % proteinov, 0,03 % maščob, 0,5-0,6 % mineralov ter 0,4-0,9 ogljikovih hidratov (Holcman, 2004b). Masa beljaka v 50 g jajcu je 33 g (Nutrient ..., 2008), od tega je 28,9 g vode, 3,6 g beljakovin, 0,06 g lipidov, 0,21 g mineralov ter 0,24 g ogljikovih hidratov. Energijska vrednost takega beljaka je 16 kcal oziroma 66 kJ. Beljak vsebuje manj lipidov in več vode, zato je energijska vrednost beljaka več kot šestkrat manjša kot energijska vrednost rumenjaka.

Glavna komponenta v suhi snovi beljaka so proteini (Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Od vseh proteinov jajčne vsebine jih je približno 57 % v beljaku (Nutrient ..., 2008).

Beljak je kot proteinski sistem, ki je sestavljen iz vlaken ovomucina in globularnih proteinov v vodni raztopini. Redek in gosti beljak se razlikujeta le v vsebnosti glikoproteina ovomucina (Stadelman in Cotterill, 2005). Izraz albumen se nanaša na beljakovinsko sestavo beljaka (Veliki ..., 2002), ki ima uravnoteženo razmerje esencialnih aminokislin in ima zato tudi veliko prehransko vrednost. Beljak je kompleksna mešanica približno 40 različnih vrst proteinov (McNamara in Thesmar, 2005), po drugih podatkih celo 78 različnih proteinov (Mann, 2007). Največji delež je ovalbumina (54%), sledijo mu ovotransferin (12%) in ovomukoid (11%) (McNamara in Thesmar, 2005). Proteinska frakcija beljaka vsebuje tudi lizocim, ovomucin, avidin, ovoglobuline in flavoprotein (Stadelman, 2003). Lillico in sod. (2005) navajajo, da devet različnih proteinov predstavlja 87% celotne proteinske mase. Med njimi prevladujejo ovalbumin, ovotransferin in ovomukoid. Palmiter (1972), piše, da ovalbumin, ovotransferin, ovomukoid in lizocim prispevajo skupaj od 85 do 90 % vseh proteinov v beljaku. V nasprotju z rumenjakom, ki vsebuje le IgY, se od protiteles v beljaku nahajata tudi IgA in IgM (Rose in sod., 1974, cit. po Rejc in sod., 2000).

Vsebnost lipidov v beljaku je zelo majhna oziroma zanemarljiva. Med maščobnimi kislinami so glavne palmitinska, oleinska, linolna, arahidonska in stearinska maščobna kislina (Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

Ogljikovi hidrati, ki jih je 0,4-0,9 %, se nahajajo v prosti in vezani obliki s proteini (glikoproteini) (Nakai in Powrie, 1990). V beljaku je prisotna tudi glukoza (Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

Od vitaminov se v beljaku nahajajo samo vodotopni vitamini, vendar so še ti v manjši količini. Večina vitaminov je v beljaku vezanih s proteini (Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

Glavni minerali v beljaku so žveplo (62 mg), kalij (57 mg), natrij (63 mg) in klor (66,1 mg). Fosfor (8 mg), kalcij (3,8 mg) in magnezij (4,15 mg) so v manjši količini, ostali minerali (Cu, I, Fe, Mn, Zn) so v sledovih (Watkins, 1995, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008; Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Stadelman (2003) navaja, da v nasprotju z rumenjakom, beljak ne vsebuje cinka.

2.2.3 Sestava lupine

Lupina je sestavljena iz anorganske (95 %) in organske snovi (5 %). Anorganska snov, kalcijev karbonat je običajno v obliki kalcita (Solomon, 1991, cit. po Roberts in Brackpool, 1994). K snovem, ki so prisotne v lupini, spada še voda (1,6 %) in proteini 3,3 % (Parson, 1982, cit. po Yamamoto in sod., 1996).

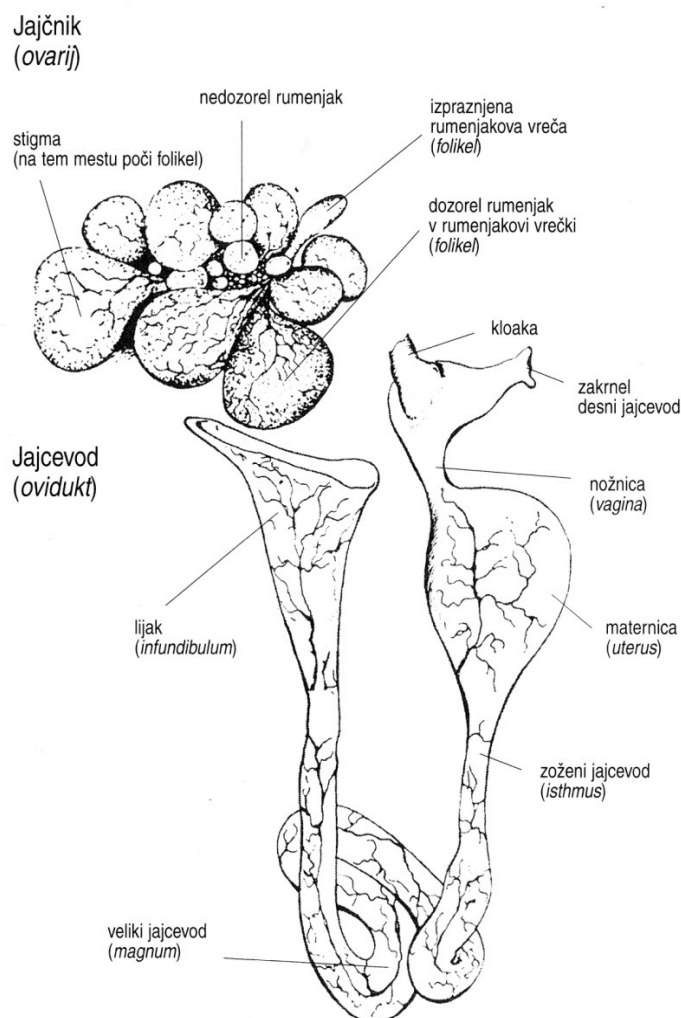
Na površini lupine je povoščena kutikula. V njej so naloženi pigmenti: porfirin, biliverdin, cinkovi kelati (Stadelman in Cotterill, 1990; Burley in Vadehra, 1989, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Na notranjem delu kutikule je tanek film kristalov hidroksiapatita (Dennis in sod., 1996, cit. po Nys in Gautron, 2007). Hidroksiapatit je kalcijev fosfat s hidroksilno skupino. Kutikula vsebuje poleg mucina še nekatere druge proteine, polisaharide in lipide (Johnson, 1986., cit. po Roberts in Brackpool, 1994; Stadelman, 2003). Od proteinov se v lupini nahajajo tudi proteini beljaka (lizocim, ovotransferin) ter specifični proteini lupine (Hincke in sod., 2008).

Največ je proteinov v kutikuli, 90 % (Cooke in Balch, 1970, cit. po Parsons, 1982). Mineralov je 3 %, ogljikovih hidratov pa 5 % (Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

2.3 NASTANEK JAJCA

Reproduktivni trakt pri spolno zreli kokoši predstavlja levi ovarij ali jajčnik in ovidukt ali jajcevod. Ovarij pri spolno zreli kokoši vsebuje hierarhično razvijajoče folikle oziroma rumenjake (Johnson 1986, cit. po Roberts in Brackpool, 1994), v katerih je zarodna jajčna celica. Tvorba jajca v 50-75 cm dolgem jajcevodu traja 20-24 ur. Za vsakim ovuliranim rumenjacom sledi nastajanje beljaka in nato lupine (Burley, in Vadehra, 1989, cit. po Lillico in sod., 2005).

Jajcevod je morfološko in funkcionalno razdeljen v šest regij: infundibulum ali lijak, magnum ali veliki jajcevod, isthmus ali zoženi jajcevod, uterus ali maternica ter vagina ali nožnica (Solomon, 1983, cit. po Roberts in Brackpool, 1994; Solomon, 1991, cit. po Roberts in Brackpool, 1994) (Slika 4). Deli jajcevoda so naštet v vrstnem redu kot potuje jajce med nastajanjem. Shematski prikaz nastajanje jajca v posameznem delu jajcevoda je prikazan na sliki 5.



Slika 4: Jajčnik in jajcevod dozorele kokoši (Holcman, 2004a: 71)

Ovarij kokoši sestavljajo rumenjaki, ki varujejo zarodno jajčno celico. Rumenjak je zavrt v močno prekrvavljeno opno, ki se s popkovino drži jajčnika. Taki v opno zaviti tvorbi pravimo folikel, opni pa folikularna membrana. Neprekrvavljeno mesto na folikularni membrani se imenuje stigma. Tik pred ovulacijo se stigma skrči in izstisne kri iz okoliških krvnih žil. Nato se rumenjak z zrelim jajčecem sprosti in pade v lijak jajcevoda. Za ovulacijo sledi tvorba beljaka, lupininih membran ter lupine (Stadelman, 2003).

Primarna vloga lijaka je, da sprejme rumenjak in ga usmeri v glavni del jajcevoda ter sodeluje pri tvorbi membrane rumenjaka in halaz (Solomon 1991, cit. po Roberts in Brackpool, 1994). V lijaku lahko pride do oploditve jajčne celice. Poleg tega je to tudi

mesto, kjer nastane tanka plast beljaka ali halaziferna plast (prvi beljak). Ta plast se naloži okrog rumenjaka po oploditvi. Rumenjak oziroma nastajajoče jajce se v lijaku zadrži do pol ure (Johnson 1986, cit. po. Roberts in Brackpool, 1994; Tullett 1987, cit. po Roberts in Brackpool, 1994). V zadnjem delu lijaka, se okrog njega naloži prvi beljak, ki je bogat z vlakni mucina. Med nastajanjem jajce rotira in tako zvija vlakna mucina (Stadelman, 2003).

Nastajajoče jajce potuje nato v veliki jajcevod, ki je najdaljši in najobsežnejši del jajcevoda, dolg je približno 33 cm. Ta del je tudi zelo žlezast. V njem nastane večina beljaka. Beljak je v velikemu jajcevodu v koncentrirani obliki, saj ga je le polovico volumna kot v sveže znesenem jajcu. Gostemu beljaku, ki se tu naloži, se kasneje v maternici doda tekočina z glukozo in elektroliti. V velikem jajcevodu se še doda večina proteinov beljaka (Stadelman, 2003). Jajce se giba skozi veliki jajcevod zaradi njegove peristaltike in se v njem zadrži 2-3 h (Johnson, 1986, cit. po Roberts in Brackpool, 1994; Solomon, 1991 cit. po Roberts in Brackpool, 1994; Tullett 1987 cit. po Roberts in Brackpool, 1994).

Jajce nato potuje v isthmus ali zoženi jajcevod, kjer v krajšem času nastaneta notranja (beljakova) in zunanja (lupinina) membrana. V zoženem jajcevodu se jajce zadrži 1 uro (Stadelman, 2003). Ta del jajcevoda je ožji od velikega jajcevoda in ima debelejši obročkasti sloj mišičevja (Tullett, 1987, cit. po Roberts in Brackpool, 1994; Trepka 1963, cit. po Roberts in Brackpool, 1994; Simons 1971, cit. po Roberts in Brackpool, 1994).

Jajce pride nato v predel maternice, ki je odgovorna za začetni prenos kalcijevih soli na membranska vlakna (Solomon 1991, cit. po Roberts in Brackpool, 1994).

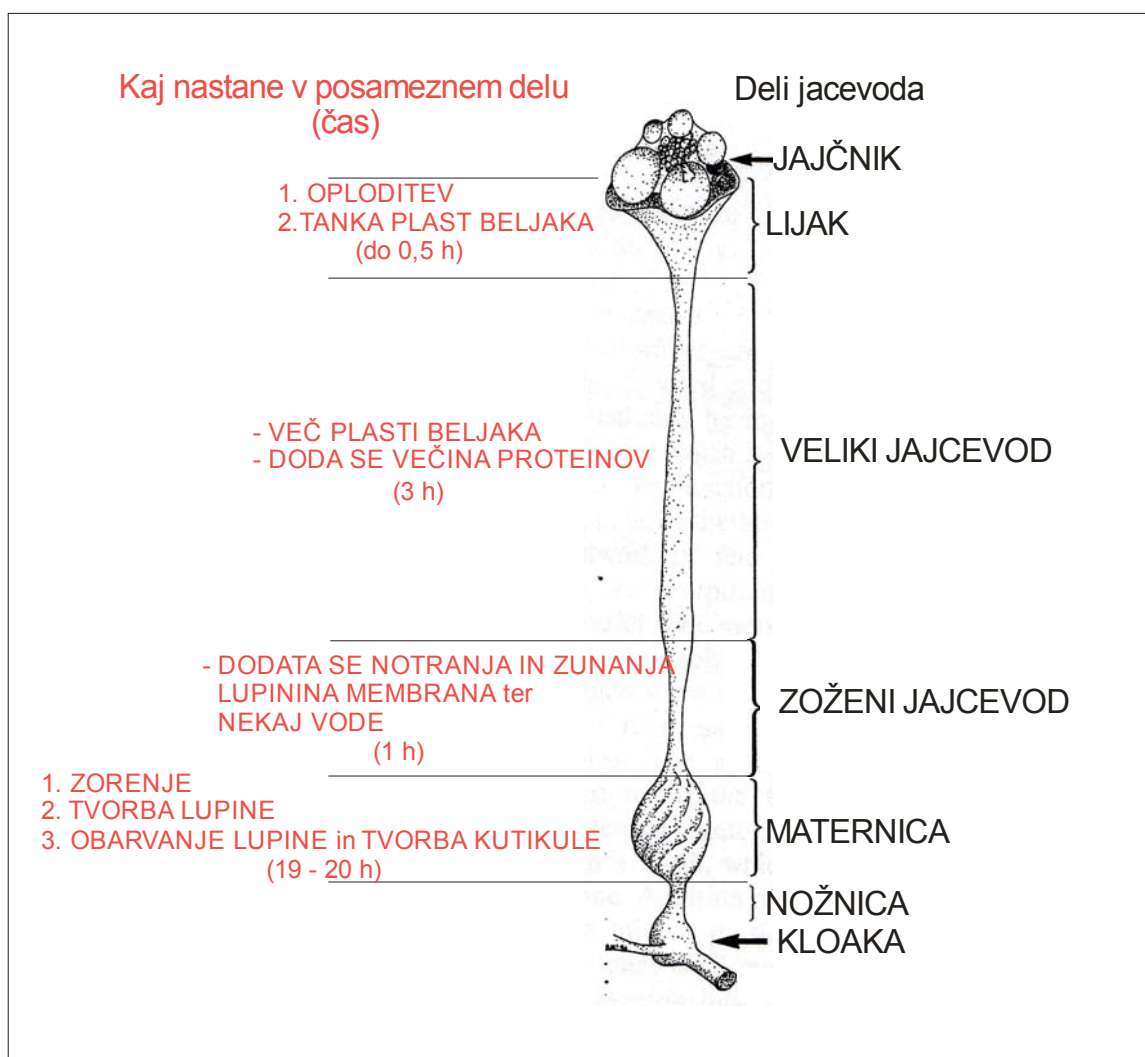
V maternici se v prvih štirih urah spontano zgodi počasna kalcifikacija ter dodajanje vode, soli in glukoze v beljak. Snovi se verjetno izločajo iz tubularnih žlez. Ta proces se imenuje zorenje. V maternici se preko tega mehanizma absorbira voda skozi lupinine membrane v beljak, kar povzroči povečanje njegovega volumna Stadelman (2003). Poleg tega se začneta raztezati lupinini membrani. To raztezanje stimulira začetek tvorbe lupine (Roberts in Brackpool, 1994).

Kalcij, potreben za tvorbo lupine, pride v celoti iz krvi, ker maternica ali lupinina žleza ne shranjuje mineralov (Simkiss in Taylor, 1971). Izločanje kalcija v jajcevod je značilno le za razvito maternico in je pri spolno nezreli kokoši dejansko neopazno (Eastin in Spaziani, 1978, cit. po Roberts in Brackpool, 1994).

Pri nastanku jajca z obarvano lupino se v zadnjem delu maternice naložijo na površino lupine pigmenti (Stadelman, 2003). Nalaganje pigmentov se zgodi v zadnji uri in pol pred znesenjem jajca (Hincke in sod., 2008).

Čas tvorbe lupine traja približno 20 ur (Simkiss 1961, cit. po Roberts in Brackpool, 1994). Tvorbo lupine bi lahko razdelili v začetek tvorbe (5 h), rast (12 h) in končevanje (1,5 h) mineralizacije lupine (Hincke in sod., 2008).

Med ovipozicijo se jajce hitro premakne (iz jajcevoda) preko nožnice in kloake navzven (Johnson, 1986, cit. po Roberts in Brackpool, 1994; Solomon, 1991, cit. po Roberts in Brackpool, 1994). Cel proces od ovulacije do ovipozicije traja pri kokoših 24-25 ur (Stadelman, 2003).



Slika 5: Nastajanje jajca v posameznem delu jajcevoda (prirejeno po Roberts in Brackpool, 1994: 246)

2.3.1 Nastanek rumenjaka

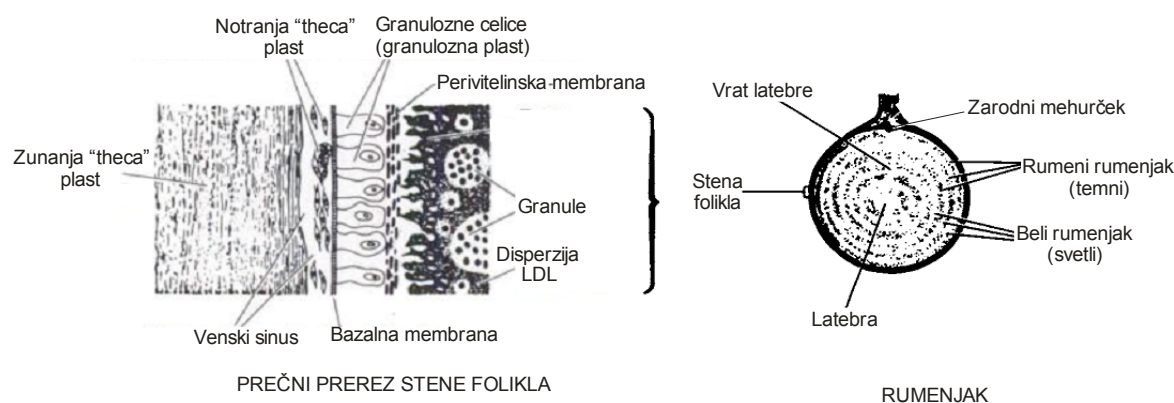
V jajčniku kokoši so rumenjaki, ki varujejo oocito ali zarodno jajčno celico. Rumenjake obdaja prekrvavljena opna, imenovana folikularna membrana. Skupni tvorbi pa pravimo folikel (Holcman, 2004a).

V jajčniku je zelo veliko foliklov različne velikosti (Holcman, 2004a). Folikli se v ovarijih razvijajo hierarhično (Moran, 1986). Rast folikla bi lahko razdelili v tri faze. Pri starosti dveh mesecev najprej nastane rumenjak s podolgovato obliko, to je prvi pravi rumenjak imenovan tudi latebra. Ko je premer folikla 1 mm je prva faza razvoja končana (Ločniškar in sod., 1991).

V drugi fazi se začnejo okoli latebre v koncentričnih krogih nabirati izmenično plasti rumenjaka. Ponoči se nalaga svetlejša ali bela plast rumenjaka. Temnejša rumena plast, ki se tvori podnevi, vsebuje barvila iz krme (Burley in Vadehra, 1989, cit. po Mine in Kovacs-Nolan, 2004; Moran, 1986). Shen in sod. (1992) imenujejo to fazo, faza počasne rasti. Navajajo, da naj bi se folikel povečal na 6-8 mm.

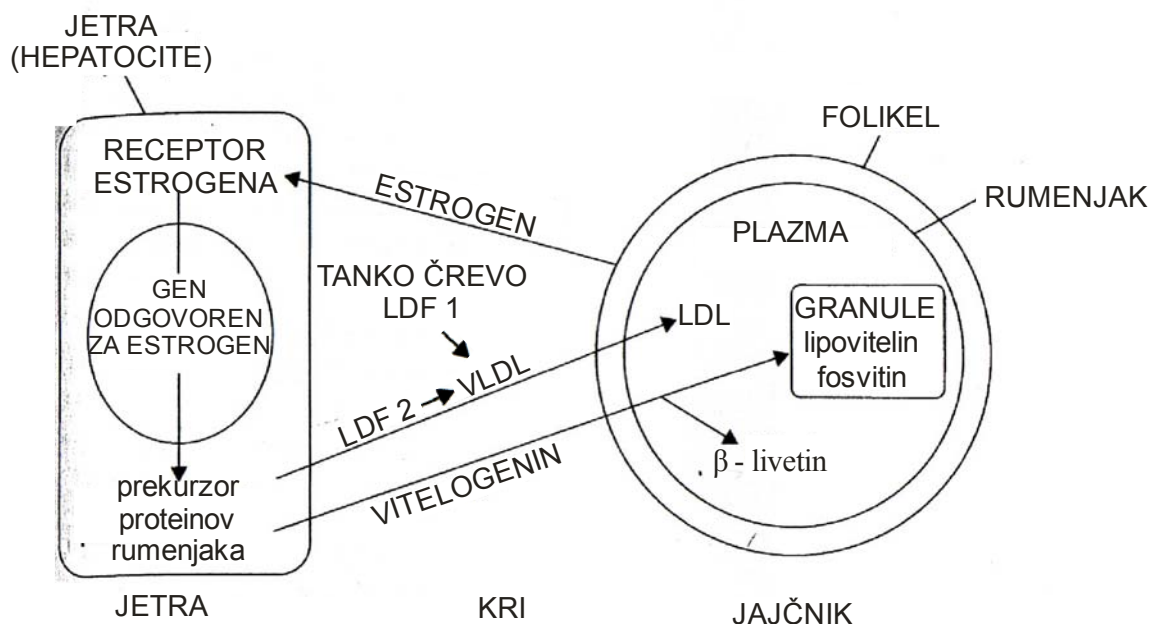
Pred ovulacijo se zgodi hiter razvoj folikla. Tretja, zadnja faza, poteka 6-7 dni pred ovulacijo. Premer folikla se poveča iz 6 mm na 35 mm. Zadnjo fazo imenujejo tudi faza hitre rasti (Shen in sod., 1992). V tem času naj bi se masa rumenjaka povečala iz 0,5 na 19 g. Zorenje razvijajočega folikla, ki se začne v jajčnikih, se konča v jajcevodu (Gilbert, 1971).

Folikularna membrana je dobro prekrvavljena. V jetrih sintetizirane snovi se tako lahko preko nje prenašajo v jajčnik (Etches, 1996).



Slika 6: Prečni prerez stene folikla in zgradba rumenjaka (prirejeno po Moran, 1986: 613)

Jetra so glavno mesto sinteze proteinov rumenjaka (Deeley in sod., 1975), po krvnem obtoku se prenesejo v nastajajoči folikel. Zato se je razvil izpopolnjen mehanizem prenosa in prehoda snovi iz krvi do rumenjaka preko stene folikla (Burley in sod., 1993). Pri tem so pomembni receptorji in njihova prerazporeditev med zadnjo fazo rasti folikla (Shen in sod., 1992). Transport snovi vključuje prehod skozi venski sinus, »theca« plast, skozi luknje bazalne membrane, granulozo in perivitelinsko plast. Stena folikla je organizirana tako, da zbere lipoproteine, ki krožijo po krvnem obtoku in jih nato prenese v rumenjak (Burley in Vadehra, 1989, cit. po Mine in Kovacs-Nolan, 2004; Moran, 1986) (Slika 6).



Slika 7: Sinteza proteinov rumenjaka in njihov prenos v rumenjak (prirejeno po Matsuda, 1998, cit. po Mine, 2008: 189)

Proteini v rumenjaku so v večini združeni z lipidi. To so VLDL, večji VLDL (LDF-1) izvira iz tankega črevesja, »manjši« VLDL (LDF-2) izvira iz jeter. Vitelogenin, ki je prekurzor lipovitelina in fosvitina, proizvedejo celice jeter. Te celice sintetizirajo tudi α -livetin in β -livetin. γ -livetin proizvedejo B-limfociti, ki se nahajajo v kostnem mozgu (Moran, 1986). Izvor proteinov rumenjaka opisuje preglednica 2. Sinteza rumenjakovih proteinov (Slika 7) poteka v jetrih pod vplivom estrogenih hormonov (Gilbert, 1971).

Preglednica 2: Proteini rumenjaka in njihov izvor (Moran, 1986: 613)

Proteini		Mesto nastanka
VLDL	LDF-1	tanko črevesje (enterociti)
	LDF-2	jetra (hepatociti)
VITELOGENIN – prekurzor lipovitelina in fosvitina		jetra (hepatociti)
LIVETINI	α -livetin	jetra (hepatociti)
	β -livetin	jetra (hepatociti)
	γ -livetin	kostni mozeg (B-limfociti)

Voda pride v rumenjak iz krvi. Lipidi v rumenjaku izvirajo iz krme. Njihov prenos v krvnem obtoku je omogočen v obliki lipoproteinov (Burley in sod., 1984, cit. po Burley in sod., 1993).

Rumenjakove granule so netopni delci rumenjaka, vsebujejo predvsem lipovitelin ter fosvitin. Lipovitelin je lipoprotein visoke gostote. Fosvitin pa je fosfoprotein. Prekurzor za lipovitelin in protein fosvitin je vitelogenin, ki se sintetizira v jetrih pod vplivom hormona estradiola. Z endocitozo najprej prehaja skozi krvne kapilare, ki obdajajo jajčni folikel. Nato prehaja z receptorsko posredovano endocitozo preko jajčne ovojnice. V ovojnici, natančneje v obloženih brazdah, se nahajajo specifični receptorji. Ti omogočajo prehod vitelogenina v rumenjak. Vsebina brazd se neprenehoma izpraznjuje s pomočjo endocitoze. Brazde so obdane z membrano, ki jo fibrilni encim klatrin, formira v vezikle. Ti nato prehajajo v rumenjak. Vezikli izgubijo svoj plašč in receptorje. Na določeni stopnji prehoda se vitelogenin encimsko razcepi na fragmenta lipovitelin ter fosvitin. Ta dva se nato skupaj oborita v granule. Tudi ostale snovi se verjetno v granule vnesejo med obarjanjem (Burley in sod., 1993).

Livetin, ki je glikoprotein, je tudi ena izmed makromolekul in je tudi esencialen krvni protein. Nahaja se v topni fazi rumenjaka (Burley in sod., 1993). V skupino livetinov spadata α - in β -livetin, ki se sintetizirata v jetrih. Med tem ko se γ -livetin sintetizira v kostnem mozgu (McIndae in Cubert, 1979, cit. po Burley in sod., 1993). Njihov prenos v rumenjak ni popolnoma jasan. Po nekaterih podatkih naj bi se nalagali v rumenjak z endocitozo s pomočjo določenih receptorjev. Navajajo tudi, da se nekateri livetini med prehodom spremenijo (Burley in sod., 1993).

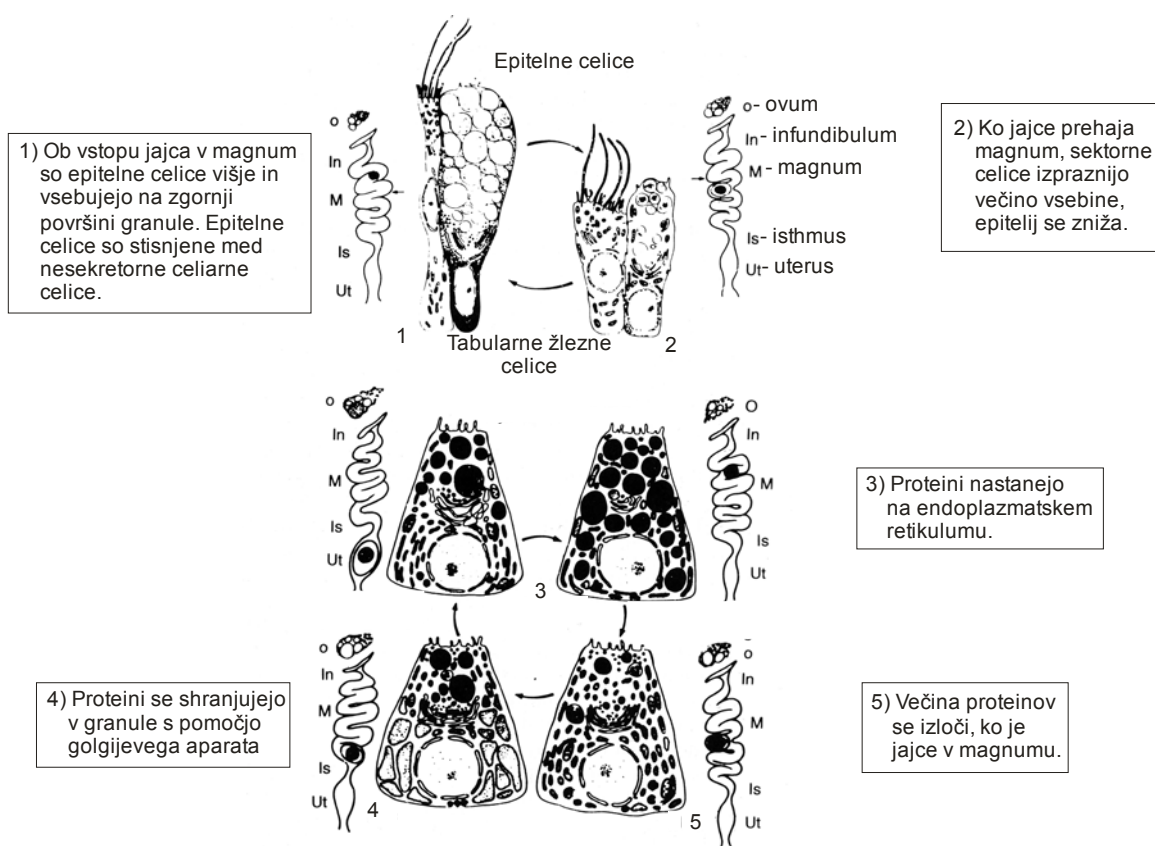
Lipoproteini majhne gostote (low density lipoprotein - LDL) so glavni del rumenjaka, saj predstavljajo 60% suhe snovi. Sintetizirani in sestavljeni so v jetrih in sicer kot modificirani lipoproteini zelo nizke gostote (very low density lipoprotein - VLDL). Prekurzor VLDL prehaja skozi krvne kapilare folikla, skozi bazalno membrano in nato skozi prostorčke med granularnimi celicami, ki obkrožajo rumenjak. Tako kot zgoraj omenjeni vitelogenin vstopi VLDL v rumenjak z endocitozo in se nato encimsko razcepi

(Burley in sod., 1993). VLDL ima tudi vlogo prenosa triacilglicerolov, fosfolipidov ter holesterola (Shen in sod., 1992).

Protitelesa se izločajo le v zrel jajčni folikel (Patterson in sod., 1962, cit. po Sim in sod., 20030). Protitelo IgY se prenese v rumenjak z receptorsko posredovanim procesom (Morrison in sod., cit. po Huopalahti in sod., 2007). Receptorji za prenos se nahajajo v membrani. Protitelo se prenese iz krvnega obtoka kokoši v rumenjak (Scade in Chacana, 2007).

2.3.2 Nastanek beljaka

Proteini beljaka se sintetizirajo v tkivu jajcevoda. Največji vir snovi beljaka je tako jajcevod (Gilbert, 1971), natančneje je to veliki jajcevod ali magnum. Izločanje beljaka je stimulirano, ko pade rumenjak v jajcevod (Lillico in sod., 2005).



Slika 8: Prikaz sprememb v celicah magnuma in nalaganje beljaka (prirejeno po Etches, 1996: 172)

V magnumu sta dve vrsti sekretornih celic v katerih nastajajo proteini beljaka: tubularne žlezne celice in epitelne celice. V tubularnih žleznih celicah se sintetizira večina proteinov, med njimi tudi ovalbumin. Manj proteinov beljaka pa sintetizirajo sekretorne epitelne celice. Prikaz sprememb epitelnih celic, ki se nahajajo v zgornjem delu magnuma in v tubularnih žleznih celicah magnuma, je prikazan na sliki 8. Poleg sekretornih celic se v magnumu nahajajo tudi neseekretorne, ciliarne celice. Proteini beljaka nastanejo v zrnatem endoplazmatskem retikulumu (ER) sekretornih celic. Sinteza proteinov beljaka poteka neprestano in je obsežnejša, ko se nastajajoče jajce zadržuje v magnumu. Proteini beljaka se shranjujejo s pomočjo golgijevega aparata (GA) v sekretorne granule znotraj obeh vrst celic, tubularnih in epitelnih. Sekretornih granul je največ, ko vstopi nastajajoče jajce v magnum (Etches, 1996). Preden vstopi rumenjak v magnum, tubularne žlezne celice in epitelne celice že vsebujejo rezervo proteinov beljaka. Teh je po količini več kot za eno jajce (Etches, 2008). Ko potuje rumenjak s peristaltiko skozi magnum (Moran, 1986), se iz sekretornih granul sprostijo proteini beljaka in naložijo kot želirna masa okrog rumenjaka (Etches, 2008).

Beljak nastane v treh fazah: sinteza in shranjevanje proteinov beljaka pred ovulacijo, sekrecija proteinov med pasažo jajca skozi jajcevod in dodajanje vode (Donoghue in Hairston, 2000).

V magnumu se v beljak dodajo ioni, med njimi še posebej Na^+ , Mg^{2+} in Ca^{2+} ter voda in ogljikovi hidrati. Medtem ko potuje rumenjak skozi magnum, se dodaja beljak koncentrično po plasteh (Gilbert, 1971). Na vzdrževanje sinteze proteinov vplivajo steroidni hormoni gonad (estrogen, progesteron in testosteron). Normalno se proteini ne morejo sintetizirati, dokler kokoš ne doseže spolne zrelosti. Takrat začnejo gonade proizvajati in izločati steroide. Za proteine, ki so v beljaku v večjem obsegu, so odkrili, da se nahajajo v tubularnih celicah magnuma. Hiramoto in sod. (1990) navajajo, da hormon estrogen poveča sintezo ovalbumina, konalbumina, ovomukoida in lizocima. Progesteron naj bi induciral sintezo proteina avidina. Nekaj ur po ovulaciji se zgodi močna hormonska indukcija sinteze proteinov v jajcevodu. Sintezo proteinov stimulirata tudi hormon inzulin in trijodtironin (Muramatsu in sod., 1994) ter tudi deksametazon (Saxenaa in Tayyab, 1997). Deksametazon je eden izmed glukokortikoidov (Lackie in Dow, 1999).

V isthmusu (zoženem jajcevodu) se beljaku doda membrana in nekaj vode. Ko prispe nastajajoče jajce v maternico, postane vidna slojevitost beljaka. Ta faza se pojavi 5-10 ur po ovulaciji, traja pa 5 h. Zaradi rotacije, ki jo povzročijo gube kavdalnega ovidukta, se vlakna halaziferne plasti zvijejo v halaze. Med tvorbo halaz se tekočina beljaka iztisne, tako da se notranja plast beljaka zgosti in nastane notranji gosti beljak. V fazi zorenja, ki tudi poteka v maternici, se beljaku doda še voda. Tako se beljak loči še naprej na srednji redek beljak in zunanji gosti beljak. Membrana beljaka je propustna, zato se v beljak lahko naložijo še glukoza in ostali ioni (Gilbert, 1971).

2.4 BIOLOŠKE UČINKOVINE V KOKOŠJEM JAJCU IN NJIHOVE LASTNOSTI

Pridevnik biološki se nanaša na življenje organizmov. Učinkovina je snov, ki učinkuje zdravilno (Slovar ..., 1993). Biološko učinkovino bi tako obrazložili kot snov, ki s svojimi lastnostmi deluje zdravilno in jo dobimo s pomočjo živih organizmov.

Jajce ni samo vir hranilnih snovi. Dokazano je, da je tudi vir biološko aktivnih učinkovin, ki bi jih lahko izolirali. Te ugodno vplivajo na zdravje, izboljšujejo naše zdravje ali preprečujejo nastanek nekaterih bolezni. Učinkovine v jajcu imajo razne biološke aktivnosti, kot so antibakterijska, antivirusna aktivnost, imunomodulacijska aktivnost (vpliva na imunski odgovor), antikancerogena aktivnost (preprečuje rakotvornost), antioksidativnost, antihipertenzivnost (preprečevanje zviševanja krvnega pritiska). Uporabne bi lahko bile v preventivi in zdravljenju raznih bolezni. Nekatere sestavine oziroma učinkovine, kot so lizocim beljaka, avidin, IgY in lecitin (fosfolipidi) v rumenjaku že industrijsko pridobivajo. Vključujejo jih v preventivo in zdravljenje raznih bolezenskih stanj (Mine in Kovacs-Nolan, 2004). Aro (2007) navaja, da se le malo učinkovin iz kokošnjega jajca vključuje v prehrano, farmacevtsko in kozmetično industrijo. Navedel je IgY, lizocim in fosfolipide rumenjaka.

Informacij o lastnostih bioloških učinkovin, izoliranih iz kokošnjega jajca, je zelo veliko. Posamezno učinkovino vključujejo v številne raziskave in pri tem ugotavljajo njeno uporabnost, predvsem v zdravstvu. V glavnem te učinkovine uporabljajo v raziskovalne namene. Nekatere lastnosti in uporabnost učinkovin iz kokošnjega jajca še dokazujejo.

2.4.1 Biološke učinkovine v beljaku in njihove lastnosti

Beljak poleg esencialnih hranilnih snovi priskrbi zarodku tudi zaščito pred bakterijami. Vsebuje številne proteine, ki imajo poleg hranilne vrednosti tudi antibakterijske lastnosti. Posamezni proteini beljaka imajo še druge lastnosti (Preglednica 3). Jajce sodi tudi med živila, ki so pogosti povzročitelji alergij. Alergeni se nahajajo predvsem v beljaku. Ovalbumin je eden od važnejših alergenov. Poleg tega povzročajo alergije tudi naslednji proteini beljaka: ovomukoid, ovotransferin in lizocim (McNamara in Thesmar, 2005).

V literaturi ponavadi navajajo le 13 proteinov beljaka. Med dobro poznane proteine sodijo lizocim, ovalbumin, avidin, ovotransferin in flavoprotein. Guérin-Dubiard in sod. (2006) so iz beljaka ločil 69 proteinskih snovi, od tega je identificiral 16 proteinov. Mann (2007) je identificiral kar 78 proteinov, 54 jih je opisal prvič. Največ je ovalbumina in sicer več kot 50 %. Proteini imajo zelo različno molekulsko maso (od 12,7 do 8000 kDa) in različne izoelektrične točke (pI) (od 4-10,5).

V tem poglavju sem navedla in opisala predvsem proteine beljaka, ki se v njem nahajajo v večjem obsegu. V pregledani literaturi, kjer so opisane biološke učinkovine iz beljaka, se le te nanašajo na proteine. Zlasti njim pripisujejo številne pozitivne učinke na zdravje. Za posamezno učinkovino beljaka (protein) sem poiskala podatke o vsebnosti proteina, nekaterih fizikalno-kemičnih lastnostih (masa, izoelektrična točka, temperatura denaturacije) in o bioloških lastnosti, ki so že bile dokazane v poskusih.

2.4.1.1 Lizocim

Jajčni beljak je še posebej bogat z lizocimom. Njegov delež je 3,5 % vseh proteinov beljaka. V povprečju ga je v beljaku 0,126 g (preračunano po navedenih podatkih o deležu in s predpostavko, da je v 33 g beljaku 3,6 g proteinov (Nutrient ..., 2008)). Gilbert, (1971), piše, da vsebuje 58 gramskem jajce 0,13 g lizocima. Harvey in Ivarie, (2003) pa navajata, da je v 60 g jajcu 0,15 g lizocima. Lizocim ima različne koristne lastnosti (Lesnierowski in Kijowski, 2007). Najbolj so se osredotočili na njegove protimikrobne lastnosti (Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

Lizocim je skupaj z ovotransferinom omenjen kot važnejši protein beljaka, ki ima antibakterijski učinek. Učinkovit naj bi bil predvsem pri lizi *Gram+* bakterij (Kovacs-Nolan in Mine, 2006), med katere sodijo številni patogeni mikroorganizmi v prehrani (Lesnierowski in Kijowski, 2007). Dokazali so bakteriostatično, bakteriolitično in bakteriocidno aktivnost lizocima proti *Gram+* bakterijam. Manj učinkovito deluje proti *Gram-* bakterijam (Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Ibrahim in sod. (cit. po Kovacs-Nolan in sod., 2005) so dokazali, da lizocimu lahko izrazito povečajo protibakterijsko aktivnost proti *Gram+* bakteriji - *Staphylococcus aureus* in *Gram-* bakteriji - *E.coli*, če so mu dodali perillaldehid, ki je naravna oblika fenolnega aldehida.

Lizocim ima poleg antimikrobne aktivnosti tudi protivirusno aktivnost. Oralne in lokalne aplikacije lizocima so imele pozitivno vlogo pri preprečevanju in blaženju različnih virusnih kožnih okužb, kot na primer pri okužbi z virusom herpes simpleks ali virusom noric (Sava, 1996, cit. po Kovacs-Nolan in Mine, 2006). Poleg tega so Lee-Huang in sod. (1999, cit. po Kovacs-Nolan in Mine, 2006) ugotovili, da lizocimi iz beljaka delujejo zaviralno proti virusu HIV tipa 1. Pripisujejo mu tudi protivnetno delovanje (Sava, 1996, cit. po Mine in Kovacs-Nolan, 2004).

V raznih virih navajajo za lizocim in za nekatere njegove peptide, da deluje proti raku. Ima tudi antioksidativno lastnost in imunomodulacijsko aktivnost (Mine, 2008).

Lizocim, dodan prehranskim izdelkom, učinkuje kot konzervans in je v prehrani primeren kot varna sestavina (Lesnierowski in Kijowski, 2007). Glavni vir lizocima za industrijske namene je prav jajce.

Med številnimi uporabami lizocima v prehrani kot protimikrobnega sredstva so ga dodali tudi v zobno pasto, žvečilni gumi ter ustno vodo kot zaščita pred okužbam v ustih (Sava, 1996, cit. po Mine in Kovacs-Nolan, 2004).

Lizocim je hidrolaza, ki cepi β -1-4 glikozidno vez v polisaharidih. Ti gradijo celično steno bakterij. Znan je tudi kot muramidaza. Sestavljen je iz 129 aminokislin. Molekularna masa je 14,3 kDa oziroma 14,4 kDa (Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Je zelo bazičen protein z

izoelektrično točko 10-11 oziroma v bližini 10,7. Za lizocim je tudi značilno, da veže kovine (Cu, Zn) (Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

Štiri disulfidne vezi na eni polipeptidni verigi naredijo lizocim zelo stabilen. Vezi omogočajo, da encim ohrani aktivnost tudi po 1-2 minutah na 100 °C (Tomizawa in sod., 1994). Najbolj aktiven je pri temperaturi med 40 in 45 °C ter pri pH 3,5-7. Sicer pa je še aktiven nad 62 °C ter pri pH 2-10 (Lizocim, 2009). Po določenem času nastane v jajcu tudi ireverzibilna dimera lizocima, ki ima tudi antibakterijske lastnosti (Lesnierowski in Kijowski, 2007). Delna denaturacija lizocima se zgodi pri 80 °C za 20 minut. Pri pH 6 doseže močan protibakterijski učinek proti *Gram+* in *Gram-* bakterijam (Ibrahim, 1996a,b cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Masschalck in sod., (2001, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008) navajajo, da delna toplotna denaturacija razširi spekter aktivnosti lizocima. Masuda in sod (2001, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008) pa pišejo, da se encimska aktivnost lizocima izgubi pri segrevanju na 95°C za 18 ur.

2.4.1.2 Ovalbumin

Ovalbumin je prevladujoč protein v beljaku, njegov delež je 54 % vseh proteinov beljaka. Njegova vsebnost je ocenjena na 1,944 g (preračunano po navedenih podatkih o deležu in s predpostavko, da je v 33 g beljaku, 3,6 g proteinov (Nutrient ..., 2008)) oziroma 2,05 g v 58 gramskem Gilbert (1971) ali 2,20 g ovalbumina v 60 g jajcu (Harvey in Ivarie (2003).

Med biološkimi aktivnostmi zanj omenjajo, da ima antibakterijsko, imunomodulacijsko in antikancerogeno aktivnost. Nekateri peptidi ovalbumina imajo sposobnost zniževanja krvnega tlaka (Kovacs-Nolan in sod., 2005). Ovalbumin je sicer tudi eden najvažnejših alergenov v jajcu (Li-Chan in Hyun-Och, 2008; Kovacs-Nolan in sod., 2005). Določeni peptidi ovalbumina delujejo kot oksidanti (Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

Ovalbumin sodi med fosfoglikoproteine. Njegova molekularna masa znaša 45 kDa oziroma 46 (Gilbert, 1971) in obsega 386 aminokislin (Huntington in Stein, 2001). Ovalbumin je edini protein beljaka, ki ima proste SH skupine in ima 4 mesta glikolizirana. Zanj je značilno, da inhibira proteaze. Odkrili so, da se ovalbumin pod določenimi pogoji

spremeni v S-ovalbumin, ki naj bi bil bolj toplotno stabilen. Srednja vrednost temperature denaturacije ovalbumina znaša 78 do 86 °C (Huntington in Stein, 2001).

2.4.1.3 Ovotransferin

Ovotransferin je odgovoren za prenos Fe ionov iz jajcevoda do razvijajočega zarodka (Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Zato ima verjetno tudi tako ime. V jajcu zavzema delež 12 % od vseh proteinov beljaka. Njegova vsebnost je ocenjena 0,432 g (preračunano po navedenih podatkih o deležu in s predpostavko, da je v 33 g beljaku, 3,6 g proteinov (Nutrient ..., 2008)) oziroma 0,49 g v 58 gramskem jajcu (Gilbert, 1971) ali 0,50 g v 60 g jajcu (Harvey in Ivarie, 2003).

Ibrahim in sod. (1998, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008) so identificirali peptid ovotransferina in sicer OTAP92, ki ima protimikrobno lastnost. Sposoben je uničiti *Gram*-bakterije tako, da prehaja skozi njihovo zunanjo membrano in uniči funkcijo nepropustnosti citoplazmatske membrane. Giansanti (2005, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008) poročajo, da nekateri ostali fragmenti ovotransferina delujejo protivirusno, proti virusu Marekove bolezni. Izolirali so tudi peptid, ki inhibira angiotenzin-konvertazo (ACE) (Lee in sod., 2006, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008) in s tem zniža krvni tlak. ACE pretvarja angiotenzin I v angiotenzin II in s tem povzroči zvišan krvni tlak (Kus in sod., 2002). Ovotransferin naj bi imel tudi imunomodulacijsko aktivnost (Mine, 2008). Sposoben je vezave 2 Fe ionov na molekulo. Kompleks ovotransferina in Fe ionov inhibira rast mikroorganizmov, ki potrebujejo za svojo rast Fe. Ovotransferin sodi med antimikrobne sestavine beljaka (Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Ima tudi protivirusne učinke (Superti in sod., 2007).

Jajčni transferin se od serumskega transferina razlikuje le po vezavi ogljika in po izoelektrični točki (Mason in sod., 1983, cit. po Superti in sod., 2007). *In vitro* je bilo ugotovljeno, da ima ovotransferin iz beljaka nižjo afiniteto za železo kot pa serumski transferin (Abdallah in Chahine, 1998, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

Ovotransferin vsebuje 686 aminokislin (Superti in sod., 2007; Mizutani in sod., 2006). Terminalna konca (N- in C-) z močno vezjo lahko vežeta vsak po en Fe ion. Poleg Fe iona

lahko veže tudi ostale kovinske ione. Ovotransferin z dvema ionoma Fe se denaturira pri 80°C, medtem ko se oblika brez Fe ionov denaturira pri 60-70°C (Lin in sod., 1994, cit. po Mizutani in sod., 2006; Li-Chan in Nakai, 1989).

2.4.1.4 Ovomucin

Odgovoren je za želirno lastnost beljaka. Je iz topne in netopne frakcije (Yamamoto in sod., 1996). Netopen ovomucin je glavna komponenta želeju podobne netopne frakcije gostega beljaka. Topen ovomucin je glavna komponenta notranjega in zunanjega beljaka. Nahaja se tudi v halazah in v zunanji plasti vitelinske membrane. Predstavlja približno 2-4 % vseh proteinov jajčnega beljaka (Sato in Kato, 1980, cit. po Hiidenhovi, 2007; Itoh in sod., 1987, cit. po Hiidenhovi, 2007; Black in sod., 1982 cit. po Hiidenhovi, 2007; Debruyne in Stockx, 1982, cit. po Hiidenhovi, 2007). Njegova vsebnost znaša 0,108 g (preračunano po navedenih podatkih o deležu in s predpostavko, da je v 33 g beljaku, 3,6 g proteinov (Nutrient ..., 2008)) oziroma 0,06-0,12 g v 58 gramskem jajcu (Gilbert, 1971).

Ovomucin je glikoprotein z visoko molekulsko maso, ki znaša 230,9 kDa. Sestavljen je iz 2087 aminokislin (Tsuge in sod., 1997, cit. po Hiidenhovi, 2007).

Ob proučevanju bioloških aktivnosti so ugotovili, da ima protein oziroma nekateri njegovi peptidi protitumorsko delovanje (Hiidenhovi, 2007). Tsuge (1996, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008) piše, da deluje kot inhibitor hemaglutinacije (zaviralec zlepljanja eritrocitov) proti govejim rotavirusom in virusu Newcastle. Newcastle je virus iz rodu Paramyxovirus, ki povzroča bolezen pri perutnini, izjemoma tudi konjunktivitis (vnetje očesne veznice) pri človeku (Kus in sod., 2002). Za ovomucin tudi navajajo, da je imunomodulator (Hiidenhovi, 2007), lahko učinkuje kot stimulator aktivnosti makrofagov. Deluje tudi antibakterijsko in zavira absorpcijo holesterola (Hiidenhovi, 2007). O učinkih ovomucina na holesterol piše tudi Nagaoka (2003, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008) in sicer, da ovomucin inhibira absorpcijo holesterola v človeških črevesnih celicah (Caco-2). Določeni glikopeptidi ovomucina imajo sposobnost, da vežejo enterohemoragično *E. Coli*. To je ena izmed *E.coli*, ki povzroča manjše notranje krvavitve (Kobayashy in sod., 2004, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

Ovomucin so označili kot vir biološko aktivnih sestavin in kot novost v funkcionalni hrani (Hiidenhovi, 2007). Je tudi dober vir N-acetilglukozamina in salicilne kisline, ki sta uporabna v farmaciji (Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

2.4.1.5 Ovomukoid

Ovomukoid zavzema delež 10-11 % od vseh proteinov v beljaku (Doi in Kitabatake, 1997; Gilbert, 1971; Li-Chan in Nakai, 1989). Njegova vsebnost znaša 0,36-0,396 (preračunano po navedenih podatkih o deležu in s predpostavko, da je v 33 g beljaku, 3,6 g proteinov (Nutrient ..., 2008)) oziroma 0,42 g ovomukoida v 58 gramskem jajcu (Gilbert, 1971) ali 0,50 g v 60 gramskem jajcu (Harvey in Ivarie, 2003). Ovomukoidu pripisujejo imunomodulacijsko aktivnost. Dokazali so, da je primeren prenašalec zdravil in biospecifičen ligand (Kovacs-Nolan in sod., 2005).

Ovomukoid je poleg ovalbumina važnejši alergen v beljaku. Z določeno metodo se ga da tudi odstraniti (Mine in Zhang, 2001). Alergijski potencial ovomukoida naj bi se nanašal na njegovo obstojnost na toplotno obdelavo in na prebavo (Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Zaradi lastnosti alergena je njegova uporaba v bioloških in medicinskih aplikacijah omejena (Mine in Kovacs-Nolan, 2004).

Ovomukoid je glikoprotein vsebuje 20-25 % ogljikovih hidratov. Je iz 3 domen in ima devet disulfidnih vezi. Njegova molekulska masa je 28 kDa (Doi in Kitabatake, 1997). Ta protein sodi v skupino antiproteinaz (Réhault, 2007). Dokazali so, da inhibira tripsin (Réhault, 2007; Yamamoto in sod., 1996) in himotripsin (Kojima, 1999, cit. po Réhault, 2007). Je toplotno stabilen glikoprotein (Li-Chan in Nakai, 1989). Dokazano je bilo, da izgubi biološko aktivnost šele pri segrevanju na 100°C, za 60 min (Doi in Kitabatake, 1997). Li-Chan in Nakai (1989) navajata zanj temperaturo denaturacije 72,5-73,5°C.

2.4.1.6 Ovoinhibitor

V beljaku ga je le od 0,1 do 1 % (Gilbert, 1971). Ovoinhibitorja je od vseh proteinov beljaka 1,5 % (Li-Chan in Hyun-Och, 2008; Stevens, 1991). Njegova vsebnost je 0,0036-0,054 g (preračunano po navedenih podatkih o deležu in s predpostavko, da je v 33 g beljaku, 3,6 g proteinov (Nutrient ..., 2008)) oziroma 0,004-0,06 g v 58 gramskem jajcu

(Gilbert, 1971). Pripisujejo mu antivirusno aktivnost (Kovacs-Nolan in sod., 2005) in protivnetno delovanje (Frenkel in sod., 1987, cit. po Mine in Kovacs-Nolan, 2004).

Glikoprotein ovoinhibitor ima 21 disulfidnih vezi (Scott in sod., 1987, cit. po Réhault, 2007). Tri mesta so glikozilirana (Yet in Wold, 1990, cit. po Saxenaa in Tayyab, 1997). Vsebuje heksozamin (2,7 %) in heksozo (3,5 %) (Gilbert, 1971). Njegova molekulska masa znaša 46-49 kDa (Gilbert, 1971; Stevens, 1991). Inhibira številne serinske proteaze (tripsin, himotripsin, elastaze) (Gertler in Ben-Valid, 1980, cit. po Réhault, 2007). Serinske proteaze so skupina prebavnih encimov, ki imajo serin v aktivnem centru (Ločniškar, 1999). Ena molekula ovoinhibitorja lahko inhibira dve molekuli tripsina in dve molekuli himotripsina (Zahneley, 1974, cit. po Stevens, 1991).

2.4.1.7 Cistatin

V beljaku ga je približno 0,01% (Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Vsebnost cistatina je 0,00036 g (preračunano po navedenih podatkih o deležu in s predpostavko, da je v 33 g beljaku, 3,6 g proteinov (Nutrient ..., 2008)).

Cistatin je cisteinski inhibitor proteaz (Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Inhibira številne proteaze: fibrin, papin, katepsin B, katepsin H, katepsin L (Anastasi in sod., 1983, cit. po Stevens, 1991). Poleg te aktivnosti mu pripisujejo tudi, da ima protimikrobno aktivnost, imunomodulacijsko aktivnost ter da deluje kot zaviralec degradacije kosti (Kovacs-Nolan in sod., 2005). Navajajo, da ima tudi antikancerogeno aktivnost (Cegnar in sod., 2004, cit. po Mine, 2008). Nakai, (2000, cit. po Mine in Kovacs-Nolan, 2004) trdi, da ima cistatin manj stranskih učinkov kot druge sintetične antiproteaze, ki jih uporabljajo v medicini. Z antibakterijsko aktivnostjo deluje tudi proti bakteriji *Porphyromonas gingivalis*, ki povzroča pordontozo (Blankenvoorde in sod., 1996, cit. po Mine in Kovacs-Nolan, 2004).

Protein cistatin ne vsebuje ogljikovih hidratov (Kovacs-Nolan in sod., 2005). Njegova molekulska masa je približno 13 kDa (Li-Chan in Nakai, 1989). Cistatin je toplotno zelo stabilen, svojo aktivnost ne izgubi tudi pri vrenju za 30 minut (Saxenaa in Tayyab, 1997).

2.4.1.8 Avidin

Avidina je v beljaku do 0,05% (Nau in sod., 2007). Njegova vsebnost znaša 0,0018 g (preračunano po navedenih podatkih o deležu in s predpostavko, da je v 33 g beljaku, 3,6 g proteinov (Nutrient ..., 2008) oziroma 0,002 g v 58 gramskem jajcu.

Sestavljen je iz štirih podenot. Vsaka od podenot lahko veže vodotopni vitamin biotin, to je vitamin H (Nau in sod., 2007). Dokazano je bilo, da s to lastnostjo inhibira rast bakterij in gliv, ki potrebujejo biotin za svojo rast (Banks in sod., 1986, cit. po Mine in Kovacs-Nolan, 2004). Avidinu pripisujejo, da je biospecifičen ligand (Kovacs-Nolan in sod., 2005). Mine in Kovacs-Nolan (2004) navajata, da je lahko primeren za prenašalca zdravil, ki preprečujejo nastanek raka in bi bil tudi uporaben v imunoterapiji. Predlagan je kot prenašalec zdravil, toksinov ali terapevtskih genov. Avidin je zelo široko uporaben v raznih poskusih (Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Avidin naj bi deloval tudi kot insekticid (Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Dokazali so njegovo bakteriostatičnost proti bakteriji *Salmoneli typhimurium*, to je Salmonela, ki povzroča tifus (Klasing, 2002, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

Avidin je bazičen tetrameričen glikoprotein (Bayer in Wilchek, 1994, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Vsebuje 10 % ogljikovih hidratov, med katerimi sta manoza in N-acetilglukozamin (Nau in sod., 2007). Njegova molekulska masa je približno 14 kDa. Biotin vezan na avidin omogoča, da je ta kompleks biotin-avidin stabilen tudi pri višji temperaturi. Kompleks ostane stabilen tudi pri temperaturi 120 °C za 15 min. Sam avidin je pri 100 °C labilen. Donovan in Ross (1973) za avidin navajata temperaturo denaturacije 85 °C.

2.4.1.9 Ovostatin (ovomakroglobulin)

Ovostatin, znan tudi kot ovomakroglobulin, ima večjo molekulsko maso v primerjavi z drugimi proteini beljaka in sicer Mr 780 kDa. V beljaku predstavlja 0,5 % vseh proteinov. Njegova vsebnost znaša 0,018 g (preračunano po navedenih podatkih o deležu in s predpostavko, da je v 33 g beljaku, 3,6 g proteinov (Nutrient ..., 2008)) oziroma 0,02 g v 58 gramskem jajcu Gilbert, (1971). Pripisujejo mu antibakterijsko delovanje. Inhibira številne tipe proteaz (Mine in Kovacs-Nolan, 2004). Ovostatin ima tudi antikolagenazno

aktivnost (Li-Chan in Nakai, 1989). Zavira kolagenazo, to je encim, ki razgrajuje protein kolagen (Kus in sod., 2002). Dokazali so tudi, da pospešuje zdravljenje ran (Miyagawa in sod., cit. po Mine in Kovacs-Nolan, 2004). Je glikoprotein z 5,8 % vsebnostjo ogljikovih hidratov. Njegova struktura je tetraedrična (Stevens, 1991), saj je sestavljena iz 4 podenot. Disulfidni vezi povezujeta podenote v dimere (Kitamoto in sod., 1982, cit. po Mine in Kovacs-Nolan, 2004).

2.4.1.10 Oboflavoprotein

Oboflavoprotein je protein, ki veže riboflavin, vitamin B2. Nahaja se v beljaku in rumenjaku (Vieira, 2007). Od proteinov beljaka ga je 0,8 %. Njegova vsebnost znaša 0,0288 g (preračunano po navedenih podatkih o deležu in s predpostavko, da je v 33 g beljaku, 3,6 g proteinov (Nutrient ..., 2008)) oziroma 0,03 g v 58 gramskem jajcu (Gilbert, 1971). V beljaku ima funkcijo kot čistilec vitamina riboflavina, ker ga veže in prenaša. Zarodek naj bi ščitil pred napadom mikroorganizmov, ki potrebujejo riboflavin. S tem vzdržuje rast in razvoj zarodka (Croguennec in sod., 2007).

Oboflavoprotein je monomeren globularen fosfoglikoprotein (Croguennec in sod., 2007). Ima disulfidne vezi (Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Med vsemi proteini beljaka ima največjo vsebnost selena (1800 ng/g) (Rao in sod., 1997, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

2.4.1.11 Ovoglikoprotein

Njegova vsebnost v 58 g jajcu znaša 0,02-0,04 g (Gilbert, 1971). Ovoglikoprotein sodi med bolj kisle proteine (Hangika in sod., 2000, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008), njegova izoelektrična točka je 3,9 (Gilbert, 1971). Molekulska masa je od 21,40 do 30 kDa (Hangika in sod., 2000, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

Ovoglikoprotein se predvsem uporablja kot kiralni katalizator za ločevanje enantiomer zdravil (Guérin-Dubiard in sod., 2006), saj ima kiralna prepoznavna mesta (Haginaka, 2000). Enantiomere so snovi, ki kažejo zrcalno izomerijo (Ločniškar, 1999). Po kemijski sestavi so to enake spojine, le da imajo enantiomeri zelo različne fiziološke učinke. Z metodo ločevanja enantiomer želijo priti do zaželene enantiomerno čiste spojine. S

pomočjo kiralnih katalizatorjev je mogoče pridobivati le želeno enantiomero (Kočar in Bohinc, 2005).

Dokazali so tudi inhibitorno aktivnost proti bakteriji *Helicobacter pylori*. Zato bi lahko bil ta protein tudi uporaben pri preventivi ali zdravljenju rane na želodcu (Kimura, 2004, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008).

Preglednica 3: Učinkovine v beljaku in nekatere njihove biološke aktivnosti (povzeto po poglavju 2.4.1)

Učinkovina	Biološke aktivnosti, delovanje učinkovine						
	Anti-bakterijsko	Anti-virusno	Anti-kancerogeno	Anti-O ₂ ¹	IM ²	Anti HT ³	Ostalo
Lizocim	+	+	+	+	+		-protivnetno delovanje
Ovalbumin	+		+	+	+	+	-antioksidant -alergen
Ovotransferin	+	+			+	+	-veže Fe -inhibira rast mikroorganizmov odvisnih od Fe
Ovomucin	+	+	+		+		-zavira absorpcijo holesterola
Ovomukoid					+		-prenašalec zdravil in biospecifični ligand -alergen
Ovoinhibitor		+					-protivnetno delovanje
Cistatin	+		+		+		-zaviralec degradacije kosti
Avidin	+				+		-insekticid -biospecifičen ligand, prenašalec zdravil, toksinov ali terapevtskih genov -široko uporaben v raznih poskusih -veže vitamin biotin (vitamin H) -inhibira rast bakterij in gliv, ki potrebujejo biotin
Ovostatin	+						-zavira kolagenazo
Ovoflavoprotein							-veže in prenaša vitamin riboflavin (B2) -zarodek ščitil pred napadom mikroorganizmov, ki potrebujejo B2
Ovoglikoprotein	+						-primeren za ločevanje enantiomer zdravil

¹ Anti O₂-antioksidativno, ²IM-imunomodulacijsko, ³Anti HT-antihipertenzivno

2.4.1.12 Ovoglobulin

Ovoglobulin G2 in G3 sta odgovorna za penast videz beljaka (Nakamura in sod. 1980, cit. po Mine, 2008). Delež ovoglobulina G2, kot tudi G3 je 4 %. Molekulska masa G2 je 30-35 kDa (Li-Chan in sod, 1995).

2.4.1.13 Proteini v manjši količini

Strukturo in funkcijo proteinov, ki jih najdemo v beljaku le v manjši količini, je malo znana. Vključeni so v številne skupine proteinov z različnimi biološkimi funkcijami (Guérin-Dubiard in Nau, 2007).

Lipokalini so skupina majhnih, zunajceličnih proteinov. Imajo sposobnost, da vežejo majhne hidrofobne molekule (lipide, steroidne hormone) (Guérin-Dubiard in Nau, 2007). Za protein Ch21, ki spada v to skupino, Gentili (2005, cit. po Guérin-Dubiard in Nau, 2007) navaja, da naj bi imel vlogo čistilcev maščobnih kislin. V skupino lipokalinov spada tudi ovoglikoprotein (podrobneje opisan v poglavju 5.1.1.11) in protein CAL- γ (Guérin-Dubiard in Nau, 2007).

Klusterin, prisoten v beljaku, se nahaja tudi v raznih bioloških tekočinah, na primer v človeški plazmi in urinu (Mehon in sod., 1999, cit. po Guérin-Dubiard in Nau, 2007). Klusterin spada v skupino proteinov šaperonov, ki sodelujejo pri zvijanju proteinov ter preprečujejo njihovo obarjanje (Guérin-Dubiard in Nau, 2007). Poona in sod., (2002), tudi pišejo, da klusterin preprečuje počasno agregacijo proteinov, ki so pogosto povezani z Alzheimerjevo bolezenijo, Creutzfeldt-Jakobovo boleznijo in Parkinsonovo boleznijo.

Biološke funkcije proteina **HEP21** še ni možno točno napovedati, saj ima multifunkcionalna skupina, v katero spada, zelo širok spekter aktivnosti (Guérin-Dubiard in Nau, 2007).

Protein **Tenp** naj bi imel antibakterijsko aktivnost (Guérin-Dubiard in sod., 2006).

2.4.2 Biološke učinkovine v rumenjaku in njihove lastnosti

Glavne komponente rumenjaka so lipidi in proteini, ki so predvsem prisotni v vezani obliki kot lipoproteini. V preglednici 4 so našteje biološke aktivnosti rumenjaka in rumenjakovih snovi.

Preglednica 4: Biološke aktivnosti rumenjaka in njegovih snovi (Kovacs-Nolan in sod., 2005: 8425)

Snov		Biološka aktivnost
rumenjak		antiadhezivnost
IgY		protimikrobna
fosvitin		antibakterijsko delovanje, antioksidativnost, poveča topnost Ca
saliloligosaharidi, salilglikopeptidi		antiadhezivnost
lipidi rumenjaka	lipoproteini	antibakterijsko delovanje
	maščobne kisline	antibakterijsko delovanje
	fosfolipidi	vloga v razvoju in funkciji možganov, zniževanje holesterola
	holesterol	sestavina celičnih membran

2.4.2.1 IgY

Imunoglobulin Y (IgY) je vodotopni globularni protein (Hatta in sod., 2008). Sintetizira se iz γ -livetina (Naidu, 2000). Črka Y pri IgY prihaja iz angleške besede yolk, kar pomeni rumenjak, kjer je koncentracija IgY najvišja. Funkcionalno je podoben največjemu serumskemu protitelesu pri sesalcih, IgG. IgY se od IgG razlikuje v strukturi in nekaterih imunoloških lastnostih. Fc regija IgY je večja kot pri IgG, IgY je bolj hidrofoben, ima omejeno upogljivost na predelu težkih verig (Kovacs-Nolan in sod., 2005; Narat, 2003). Molekulska masa znaša 180 kDa (Williams in sod., 1962, cit. po Hatta in sod., 2008). Toplotna denaturacija IgY se zgodi pri 73,9°C (Hatta in sod., 1997, cit. po Hatta in sod., 2008).

Jajce je dober vir IgY. Ena nesnica lahko letno proizvede tudi do 20 g IgY (Carlander in sod., 2000). Mine in Kovacs-Nolan (2002) navajata, da vsebuje en rumenjak 100-150 mg IgY, Naidu, (2000) pa navaja 136-349 mg IgY. V primerjavi z glodalci proizvedejo kokoši večjo količino protiteles (Narat, 2003).

IgY se pridobi na neinvaziven način, saj se protitelesa prenesejo iz krvi v rumenjaki. Specifična IgY protitelesa lahko pridobimo z imunizacijo kokoši s tarčnim antigenom in nato iz rumenjaka izoliramo protitelesa (Kovacs-Nolan in sod., 2005). Očiščena IgY protitelesa uporabljajo tudi v diagnostičnih metodah in celo za zdravljenje nekaterih okužb pri ljudeh. Ker se nekoliko razlikujejo od mišjih protiteles, ki so najpogosteje vključene v teste, imajo določene prednosti (Narat, 2003). IgY ne veže človeških Fc receptorjev (Carlander in sod., 2000) in ne aktivira komplementa (Kovacs-Nolan in sod., 2005).

Po podatkih, ki jih navajata Mine in Kovacs-Nolan (2002), so bila v nekaterih poskusih protitelesa rumenjaka učinkovita proti gastrointestinalnim patogenom, npr. proti *Helicobacter pylori* (Etches, 2008) ali rotavirusom in proti zobnemu kariesu. Uporaba IgY se kaže kot učinkovita alternativa antibiotikom (Hatta in sod., 2008). Predlagajo tudi uporabo IgY pri rakavih obolenjih, kot prenašalce anti-tumorskih zdravil (Yang in sod., 1997, cit. po Mine in Kovacs-Nolan, 2004), v peroralni imunoterapiji (Carlander in sod., 2000).

2.4.2.2 Fosvitin

Fosvitin je fosfoglikoprotein, ki se nahaja v granulah rumenjaka (Hatta in sod., 2008). Predstavlja 4 % suhe snovi v rumenjaku (Clark 1985, cit. po Anton in sod., 2006). Je najvišje fosforiliziran v naravi prisoten protein, vsebuje 10 % fosforja. Poleg fosforja vsebuje še heksoze, heksozamin, salicilno kislino. V nasprotju z ostalimi proteini rumenjaka ne vsebuje lipidov (Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Fosvitin predstavlja 11 % proteinov rumenjaka, je mešanica α -fosvitina (160 kDa) in β -fosvitina (190 kDa) (Itoh in Fuji, 1983, cit. po Huopalahti in sod., 2007). Poznanih je več oblik fosvitina (B, C, E1, E2, F) z različnimi molekulskimi masami (od 13 do 40 kDa) (Wallance in Morgan, 1986, cit. po Hatta in sod., 2008). Fosvitin vsebuje 6,5 % ogljikovih hidratov (Kovacs-Nolan in sod., 2005). Od aminokislin je največ serina (30-50%) (Hatta in sod., 2008).

Fosvitin ima fosfatno skupino in veže kovinske ione (Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Fosvitin lahko veže bivalentne kovinske ione, npr. zelo močna vez je med njim in Fe (Hatta in sod., 2008). Castellania in sod. (2003) navajajo, da lahko fosvitin pod določenimi pogoji (npr. pH), veže 115 μg Fe/mg fosvitina. Od vsega Fe, ki se nahaja v rumenjaku, je

95 % vezanega prav na ta protein (Greengard in sod., 1964, cit. po Mine in Kovacs-Nolan, 2004).

V rumenjaku deluje kot antioksidant, saj ima sposobnost zaviranja z železom katalizirano oksidacijo lipidov (Ishikawa in sod., 2004). Zaradi te lastnosti ima antioksidativno vlogo v preprečevanju nekaterih bolezni. Dokazujejo tudi njegovo uporabnost kot antioksidanta v prehrani. Negativno deluje predvsem na bakterije, ki potrebujejo Fe (Choi in sod., 2004, cit. po Hatta in sod., 2008). Tudi Ishikawa in sod. (2004) v svoji študiji pišejo, da bi lahko bil fosvitin uporaben za preprečevanje bolezni, ki jih povzročijo z železom katalizirane oksidacije, na primer rak na debelem črevesju. Ugotavljajo, da bi lahko zaščitil tudi DNA pred oksidacijo.

Zaradi svojih kemičnih lastnosti je dobro topen v vodi in odporen na toplotno denaturacijo (Anton in sod. 2006) ter proteolitsko razgradnjo (Juneja in Kim, 1997, cit. po Li-Chan in Hyun-Och, 2008). Celo pri segrevanju na 90°C ne izgubi sposobnost vezave železa. Hartmann in Wilhelmson (2001) navajata, da se pri kuhanju fosvitin denaturira. Segrevanje na 110°C za 29 in 40 minut ne povzroči sprostitve železa iz fosvitina, kar kaže na njegovo vlogo naravnega antioksidanta v hrani (Anton in sod., 2006).

2.4.2.3 Salicilna kislina

Salicilna kislina je glikokonjugat, vsebuje glikoproteine in glikolipide (Hatta in sod., 2008). Salicilna kislina se nahaja tudi v človeškem telesu, v različnih živalskih in človeških celicah ter telesnih tekočinah (Huttunem, 1999, cit. po Hatta in sod., 2008). Kokošje jajce priporočajo kot prehranski vir salicilne kisline. Salicilna kislina je generično ime za več kot 30 derivatov nuraminske kisline (Hatta in sod., 2008), ki imajo acetilno skupino na dušiku v aminoskupini. Edina od oblik salicilne kisline, ki se nahaja v rumenjaku je N-acetilnevraminska kislina. Ta kislina je tudi sicer v naravi najbolj razširjena oblika salicilne kisline (Hartmann in Wilhelmson, 2001). V jajcu je prisotna tudi v halazah, največ pa jo je prav v rumenjaku (0,95 g/kg) (Hatta in sod., 2008).

Pripisujejo ji naslednje biološke funkcije: receptor za mikroorganizme, toksine in hormone. Deluje protivnetno (Mine in Kovacs-Nolan, 2004) in inhibira rotaviruse (Hartmann in Wilhelmson, 2001).

2.4.2.4 Saliloligosaharidi

Oligosaharide, ki vsebujejo najmanj en ostanek salicilne kisline imenujemo saliloligosaharidi. Salilglikonjugati, med katere sodijo tudi saliloligosaharidi, imajo pomembno vlogo v celičnem tkivu živali in ljudi. Pomembni so v raznih bioloških procesih, kot so celična adhezija, preprečevanje virusnih okužb in nevtralizacija toksinov. Ugotavljajo, da bi kot ligandi lahko sodelovali tudi v vnetnih odgovorih (Hatta in sod., 2008).

Rezultati študij tudi kažejo na to, da so prav saliloligosaharidi iz rumenjaka učinkoviti pri inhibiranju rotavirusov (Hatta in sod., 2008). Koketsu (1995) je v svojem poskusu dokazal, da imajo saliloligosaharidi rumenjaka antiadhezivni učinek pri virusni okužbi in da zavirajo rotavirusne okužbe. Tudi Sugita-Konishi in sod. (2004, cit. po Mine in Kovacs-Nolan, 2005) dokazujejo da saliloligosaharidi zavirajo adhezijo na črevesne celice. Na ta način preprečujejo okužbo z nekaterimi bakterijami, med njimi tudi s *Salmonelo* in *E.coli*. Raziskujejo tudi njihovo vključevanje v funkcionalno hrano in farmacevtiko (Hatta in sod., 2008).

2.4.2.5 Lipoproteini nizke gostote (LDL)

Nekateri LDL poimenujejo kar lipovitelin. Drugi uporabijo ta izraz za opis proteinskega dela LDL po ekstrakciji z etrom. LDL vsebujejo kar 83-89 % lipidov in le 11-17 % proteinov. Od lipidov je 74 % nevtralnih lipidov, ostalo so fosfolipidi (Anton in sod., 2006)

Za LDL so dokazali imunomodulacijsko aktivnost (Mine in Kovacs-Nolan, 2004). Povečajo produkcijo protiteles IgM, poleg tega naj bi spodbujali tvorbo monocit in povečevanje števila levkocitov pri človeku (Hatta in sod., 2008). Struktura LDL je občutljiva, saj se poruši že pri segrevanju za 10 minut na 75°C in visokem pritisku (Huopalahti in sod., 2007).

2.4.2.6 Lipidi rumenjaka

Glavne komponente lipidov rumenjaka so trigliceridi, holesterol in fosfolipidi (fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin, sfingomielin, lizofosfatidilholin,...) (McNamara in Thesmar, 2005). Za fosfolipide rumenjaka omenjajo številne biološke lastnosti. Poimenujejo jih tudi lecitin, čeprav se med fosfolipidi rumenjaka nahaja tudi »pravi« lecitin. Rumenjak vsebuje trikrat več fosfolipidov kot sojin lecitin (Hatta in sod., 2008). Zaradi visoke vsebnosti fosfatidilholina (300 mg) se obeta njihova uporaba biomedicini in kozmetični industriji. Fosfatidilholin je prekursor holina. Holin se nahaja v celičnih membranah, pomemben pa je tudi kot izhodna spojina za biosintezo živčnega prenašalca acetilholina. V večjem jajcu je 125 mg holina (McNamara in Thesmar, 2005). Priporočen dnevni vnos holina (za odraslega človeka) mora znašati 425–550 mg (Holin, 2009). Holin ima pomembno vlogo pri razvoju možganov in centrov spomina za razvijajoči se zarodek in za novorojenčka (McNamara in Thesmar, 2005; Etches, 2008). Poleg tega naj bi imel funkcijo pri delovanju jeter in preprečevanju raka (Gutierrez in sod., cit. po Anton, 2007; Etches, 2008).

Fosfolipidi so uporabni tudi kot biosurfaktanti. Zaradi sposobnosti emulzifikacije in vzdrževanja vlage so lipidi (fosfolipidi) primerni za emulgatorje v hrani in kozmetiki. Uporabljajo jih tudi v farmacevtski industriji, ker imajo tudi lastnosti stabilizatorja. Fosfolipidi rumenjaka imajo tudi lastnost antioksidativnosti. Primerni so kot liposomi v farmacevtski industriji, za prenos zdravil (Hatta in sod., 2008). Dokazano je bilo tudi, da uporaba fosfolipidov rumenjaka blaži simptome Alzheimerjeve bolezni (Juneja, 1997, cit. Anton in sod., 2006). Lecitin rumenjaka komercialno uporabljajo v različnih produktih v kozmetiki, prehranski industriji, farmaciji oziroma medicini (Etches, 2008). Lipide rumenjaka že več desetletij vključujejo v razne prehranske dodatke. Kot emulgator v prehrani se pojavlja pod oznako E322. V eni od študij so ugotovili, da lipidi rumenjaka povečajo imunoreaktivnost levkocitov (Hatta in sod., 2008).

Rumenjak je vir dokozaheksaenojske in arahidonske kisline, ki sta pomembni za razvoj živčnih celic in očesne mrežnice (Hatta in sod., 2008). Zaradi njune vsebnosti v rumenjaku, bi lahko lipide rumenjaka vključevali v mlečne formule za dojenčke. Oleinska

kislina, ki jo je v rumenjaku 1,819 g (Nutrient ..., 2008), naj bi zniževala nivo serumskega holesterola (Hatta in sod., 2008).

Dokazano je bilo, da holesterol, ki ga zaužijemo, zelo malo vpliva na nivo holesterola v krvi. Večina študij tudi navaja, da nasičene maščobe, ki jih najdemo v hrani bolj vplivajo na nivo plazemskega holesterola, kot pa holesterol, ki ga zaužijemo s hrano (McNamara in Thesmar, 2005). V eni izmed študij so ugotovili, da se ljudem, ki so za določen čas vsak dan zaužili jajce, se nivo holesterola ni zvišal (McNamara in Donald, 1999).

2.5 PRIDOBIVANJE NARAVNO PRISOTNIH BIOLOŠKIH UČINKOVIN IZ KOKOŠJEGA JAJCA

Znanost o funkcionalni hrani (Functional ..., 2006) definira funkcionalno hrano kot živila, ki imajo poleg osnovnega prehranskega učinka še druge funkcije. To pomeni, da ima funkcionalna hrana koristen učinek na eno ali več funkcij v človeškem organizmu. Z drugimi besedami, izboljša splošno in fizično stanje ter posledično zmanjša tveganje za nastanek določene bolezni. Funkcionalna hrana lahko vsebuje tudi naravno prisotne snovi v povečani koncentraciji ali pa snovi, ki so ji dodane.

Nekatere študije so pokazale, da ima jajce lastnosti funkcionalne hrane, predvsem zaradi visokih koncentracij peptidov v beljaku (Etches, 2008), ti pa imajo pozitivne učinke na zdravje. Je relativno bogato z maščobnimi kislinami in s snovmi, topnimi v maščobah (npr. vitamini A, D, E in K). Na tržišču se že pojavljajo jajca bogata z omega-3 (n-3) maščobnimi kislinami (MK). Jajca obogatijo tudi z antioksidanti (npr. selen) ali vitamini (vitamin D, E, B12, B9) (Siróa in sod., 2008). Na slovenskih policah najdemo jajca imenovana »zlata jajca« (Zlato ..., 2008). Ta jajca so obogatena z vitamini (A, B skupina, D3 in E), minerali (magnezij, jod, selen) in n-3 MK. Vsebnost določene snovi v jajcu povečajo z izbrano krmo. Na primer: za višjo koncentracijo n-3 MK vključijo v krmo kokoši nesnic ribje olje ali laneno seme, ki sta bogat vir teh MK (Yannakopoulos, 2007).

Jajce je bogat vir določenih učinkovin, predvsem proteinov, ki so uporabni tudi za neprehranske namene (npr. v medicini, farmaciji). Snovi so v jajcu prisotne v različni

koncentraciji in obliki. Zato se njihove fizikalno-kemijske lastnosti med seboj razlikujejo. Te lastnosti s pridom izrabijo pri njihovi izolaciji.

Nekatere endogene proteine v jajcu so že izolirali za industrijske namene (Sang, 1994). Predvsem lizocim in avidin rutinsko izolirajo za potrebe farmacevtske industrije, biomedicinskih raziskavah ter prehrabene industrije (Burley in Vadehra, 1989, cit. po Etches, 2008).

Poleg beljaka in rumenjaka predstavlja tudi lupina dober vir koristnih učinkovin, predvsem kalcija. Kot potencialna učinkovina se kažejo tudi proteini v lupini, ki naj bi bili učinkoviti pri inhibiciji nekaterih bakterij (Froning, 2008).

2.5.1 Pridobivanje naravno prisotnih bioloških učinkovin iz rumenjaka

Glavne komponente rumenjaka so lipidi in proteini. Skupaj so predvsem prisotni v obliki lipoproteinov. Te se lahko loči v granule in plazmo rumenjaka (Huopalahti in sod., 2007). Granule vsebujejo α - in β - lipoproteine (HDL), fosvitin in LDL (Burley in Cook, 1961, cit. po Kovacs-Nolan in sod., 2005). Plazma se lahko loči v frakcijo LDL in vodotopno frakcijo. Ta vsebuje livetine, med katere spada tudi IgY (Li-Chan in Powrie, 1995).

V nasprotju z beljakom, vsebuje rumenjak več učinkovin, topnih v maščobi. Pri ekstrakciji lipidov se uporablja organska topila (acetone, etanol, ...). Izolacija snovi, ki niso topne v maščobah in so prisotne v rumenjaku, je otežena. V maščobi netopne snovi so prisotne v manjši koncentraciji glede na maščobne kisline. Potrebno je odstraniti maščobne kisline, ki bi motile analizo teh snovi. Ta dodaten postopek se imenuje delipizacija oziroma odstranitev lipidov (Hatta in sod., 2008).

IgY

Postopek pridobivanja IgY je nekoliko dolgotrajnejši. Pri ločevanju uporabljajo ultracentrifugiranje lipoproteinov (Kim in Nakai, 1998, cit. po Hatta in sod., 2008) in odmaščevanje na osnovi organske topnosti (Sevendsen in sod., 1995, cit. po Hatta in sod., 2008). Temu nato sledi ekstrakcija IgY (Hatta in sod., 2008).

FOSVITIN

Novejše metode čiščenja fosvitina vključujejo ekstrakcijo na podlagi netopnosti fosvitina v obliki Mg/fosvitinove soli ali s pomočjo ionsko-izmenjalne kromatografije (Castellani in sod., 2004, cit. po Huopalahti in sod., 2007).

SALICILNA KISLINA

Objavljenih je več metod za izolacijo salicilne kisline iz rumenjaka. Pri eni izmed preprostejših metod najprej ekstrahirajo s pomočjo etanola. Sledijo še druge faze: filtracija, segrevanje, nevtralizacija, ponovna filtracija in na koncu elektrodializa. Ta metoda omogoča izolacijo kisline v zelo čisti obliki (Koketsu, 1992, cit. po Hatta in sod., 2008).

LDL

Ekstrakcija LDL z ultracentrifugacijo ni tako učinkovita. Poleg nizkega izkoristka, je to tudi dolgotrajna metoda (Moussa in sod., 2002, cit. po Huopalahti in sod., 2007). Učinkovitejša ekstrakcija je obarjanje z amonijevim sulfatom. Ta omogoči odstranitev livetinske frakcije in nadaljnji postopek obarjanja LDL (Anton in sod., 2001, cit. po Huopalahti in sod., 2007). Čistost ekstrakcije lahko povečajo z gelsko filtracijsko kromatografijo (Huopalahti in sod., 2007).

FOSFOLIPIDI

Fosfolipide se v splošnem pridobi z ekstrakcijo v organska topila. Sim (1994, cit. po Hartmann in Wilhelmson, 2001) je vzel vodno raztopino etanola. Glede na to, da je etanol polarno topilo in da se fosfolipidi zaradi svoje narave topijo v njem, postopku ekstrakcije sledijo še drugi postopki ločevanja. Juneja in sod. (1994, Hartmann in Wilhelmson, 2001) je poleg etanola uporabil tudi aceton.

2.5.2 Pridobivanje naravno prisotnih bioloških učinkovin iz beljaka

Proteine iz beljaka pridobivajo s pomočjo ionske izmenjalne kromatografije (Guérin-Dubiard in sod., 2005; Yuan in sod., 2006). Ta metoda separacije temelji na ločevanju na osnovi razlik v naboju spojin. Učinkovita je, ker ima nizek učinek na denaturacijo proteinov. Z njo lahko dosežejo visoko čistost proteinov, ki jih nato v glavnem uporabljajo

v bioloških, biokemijskih ter biofizikalnih študijah. Pri ionski kromatografiji je potrebno iz beljaka prej odstraniti protein ovomucin (Guérin-Dubiard in sod., 2005).

LIZOCIM

Lizocim je edini protein, ki se ga za komercialne namene že rutinsko izolira iz beljaka. Uporablja se ga kot konzervans in v nekaterih farmacevtskih pripravkih (Etches, 2008). Obstaja več metod izolacije lizocima iz beljaka: direktna kristalizacija (obarjanje) (Alderton in Fevold, 1946, cit. po Lesnierowski in Kijowski, 2007), direktna membranska filtracija (Kijowski, 1998, cit. po Lesnierowski in Kijowski, 2007), afinitetna kromatografija (Chiang in sod., 1993, cit. po Lesnierowski in Kijowski, 2007) ter ionska izmenjevalna kromatografija (Guérin-Dubiard in sod., 2005).

OVOTRANSFERIN

Za čiščenje uporabljajo tekočinsko kromatografijo ali izmenjalno kromatografijo (Superti in sod., 2007). V večini procedur, kjer čistijo proteine iz družine transferinov, uporabljajo tekočinsko kromatografijo. S tem se izognejo denaturaciji. Pri čiščenju ovotransferina se lahko uporabi kationski ali anionski izmenjevalec (Etches, 2008). Guérin-Dubaird in sod., (2005) so uporabili tri-stopenjsko izmenjalno kromatografijo s katero so dosegli visoko stopnjo čistosti.

OVOMUCIN

Ovomucin iz beljaka pogosto izolirajo s pomočjo precipitacijskih metod (Hiidenhovi, 2007). Alternativa precipitacijski metodi je gelska filtracijska kromatografija. Ovomucin so z uporabo afinitetne kromatografije in ionske izmenjalne kromatografije ločili na α - in β -ovomucin podenoti (Hiidenhovi, 2007). Ovomucin je bil izoliran tudi s pomočjo centrifugiranja pri visokih obratih (Sleigh in sod., 1973, cit. po Hiidenhovi, 2007).

OVOMUKOID

Metodo izolacije ovomukoida sta opisala že Lineweaver in Murray (1947, cit. po Saxenaa in Tayyab, 1997). Obarjala sta ga s pomočjo TCA-acetona. Novejše metode vključujejo

gelsko filtracijo in afinitetno kromatografijo (Kato in sod., 1978, cit. po Saxenaa in Tayyab, 1997).

OVOINHIBITOR

Ovoinh inhibitor očistijo z obarjanjem s pomočjo amonijevega sulfata (Réhault, 2007). Izolacija poteka tako, da z metodo po Lineweaver in Murray najprej pridobijo ovomukoid. Nato iz njega z gelsko filtracijo in ionsko izmenjalno kromatografijo izolirajo ovoinh inhibitor. Po tej metodi iz 1 l beljaka pridobijo 0,6-0,7 g ovoinh inhibitorja (Saxenaa in Tayyab, 1997).

CISTATIN

Za izoliranje tega proteina iz beljaka navajajo tristopenjsko čiščenje, ki vključuje obarjanje ovomucina, afinitetno kromatografijo in kromatofokusiranje. Zadnji postopek lahko zamenja tudi kromatografija (Lindahl in sod., 1988, cit. po Réhault, 2007).

Terziszka in sod. (2004, cit. po vir Réhault, 2007) poročajo, da so pri izolaciji uporabili precipitacijo in afinitetno kromatografijo ali tekočinsko kromatografijo na reverzni fazi. Z metodo po Turk in sod. (1983, cit. po Saxenaa in Tayyab, cit. po Réhault, 2007) za izolacijo cistatina pripravijo raztopino beljaka s pH 12. Nato segrevajo na 62°C. Temu sledi ionska izmenjalna kromatografija.

AVIDIN

Protein avidin izolirajo s pomočjo ionske izmenjalne kromatografije (Nau in sod., 2007). S to metodo je možno avidin istočasno izolirati z lizocimom (Etches, 2008).

OVOFLAVOPROTEIN

Izolirajo ga z ionsko izmenjalno kromatografijo (Guérin-Dubiard in sod., 1989, cit. po Croguennec in sod., 2007), ki je lahko alternativa afinitetni kromatografiji (Rao in sod., 1997, cit. po Croguennec in sod., 2007).

OVOSTATIN ali OVOMAKROGLOBULIN

Za čiščenje najpogosteje uporabljajo postopek, ki vključuje obarjanje s polietilen glikolom 8000, ultragelsko kromatografijo, anionsko izmenjalno kromatografijo (z DEAE-celulozo)

in na koncu čiščenje z gelsko elektroforezo na osnovi SDS-PAGE (Natrijev dodecil sulfat poliakrilamidni gel za elektroforezo) (Nagase in Harris, 1983).

2.6 BIOTEHNOLOŠKI PRISTOPI ZA PRIDOBIVANJE UČINKOVIN IZ JAJCA

Biotehnologija je veda, ki združuje področje biologije, kemije in tehnologije. Torej povezuje naravoslovne (molekularne-biološke) in inženirske znanosti. Uporablja različne biološke sisteme: žive organizme, celice in njihove dele v industriji, v kmetijstvu, medicini, veterini in varovanju okolja. Eno izmed področji biotehnologije je tudi pridobivanje zdravilnih bioloških učinkovin. Te učinkovine so predvsem biološka zdravila, ki so večinoma proteinskega izvora. Biološka zdravila se od klasičnih zdravil razlikujejo po tem, da so proizvedena s pomočjo živih organizmov. Biotehnologija vključuje tudi tehniko genskega inženirstva, kjer lahko rekombiniramo gene oziroma spremenimo kombinacijo genov ali segmentov med filogensko bližnjimi ali daljnimi vrstami (Štrukelj in Kos, 2007).

Pri genskem inženirstvu se poslužujejo metode manipulacije DNK, katere namen je izdelati nove kombinacije genov ali spremeniti sekvence (Ločniškar, 1999). Genski inženiring zajema številne metode in tehnike, s katerimi premeščamo gene. Ta pojem posebej vključuje osamitev dedne informacije iz enega organizma, njen prenos in pogosto tudi vključitev na natančno določeno mesto v kromosom drugega organizma. Genski inženiring je bolj splošen pojem, ki pove, da gre za spreminjanje genoma.

V biotehnologijo sodi tudi transgeneza (Horvat, 2008b). Transgeneza je bolj specifičen pojem od genskega inženiringa, saj pove, da gre za spreminjanje oziroma aktivno poseganje v genom živali. Transgeneza je torej ena od metod genskega inženiringa. Navadno gre za vnos genov ali genskih konstruktov. Vnos gena je najboljši v zgodnji razvojni fazi zarodka, ker je tako omogočen vnos transgena v vsa tkiva (Pandel-Mikuš in Jevšnik, 2004). Z metodo transgeneze pridobimo žival z želeno spremembo genoma, ki se deduje (Horvat, 2008b).

Pridobljena transgena žival ima novo lastnost, običajno je v biotehnologiji to lastnost, da žival sintetizira in izloča novo eksogeno učinkovino. Učinkovine, ki jih pridobijo s

pomočjo transgenih živali, se nanašajo predvsem na proteine. Če potem te uporabljajo v medicini in farmaciji, jih imenujejo terapevtske učinkovine. Transgene živali bi lahko bile predvsem uporabne za izražanje človeških rekombinantnih proteinov (Štrukelj in Kos, 2007). Rekombinantni proteini so rezultat izražanja genov, ki so bili tako ali drugače manipulirani z metodami genske tehnologije.

Za izražanje tujih genov v izbranem gostitelju so pomembni naslednji koraki: izbira vektorja s katerimi bomo vnesli gen v gostitelja in metoda, s katero bomo gen vključili v vektor ter vnos celega transgenega konstrukta v gostitelja. Končni koraki so biosinteza želenega terapevtskega proteina ter izolacija in čiščenja tega proteina (Novak-Štagoj in Podobnik, 2006; Lillico in sod., 2005).

Obstajajo različni biološki ekspresijski sistemi za pridobivanje terapevtskih proteinov. Med temi sistemi so bakterije, kvasovke, celice insektov, živalske celične linije (npr. ovarijske celice kitajskega hrčka - celice CHO), ter transgene rastline in živali (Houdebine, 2009). Transgene živali naj bi imele nekatere prednosti za pridobivanje terapevtskih proteinov. Te prednosti se kažejo v količini, ceni, kakovosti terapevtskih proteinov ter učinkovitejši izolaciji (Rožman in Jež, 2009). Živali, ki producirajo določeno želeno učinkovino, imenujejo tudi bioreaktorji (Harvey in Ivarie, 2003). Ta izraz se sicer nanaša predvsem na reakcijsko posodo ali reaktor, v katerem poteka proces metabolizma in biosinteze produktov, kataliziranih z vrsto encimov znotraj celice mikroorganizma (Berovič, 1996). Transgene živali ponujajo tudi možnost širitve proizvodnje transgenih proteinov s pomočjo klasičnih rejskih metod in možnosti tkivno specifične sinteze proteinov ter njihovo izločanje v izbrane izločke ali tkiva (Štrukelj in Kos, 2007). Celice CHO so sicer danes najpogostejše uporabljen ekspresijski sistem za industrijsko produkcijo rekombinantnih proteinov.

Visoka produkcija proteinov se nanaša na primeren gostiteljski organizem, ki je sposoben visoke produkcije izbranega proteina. Nekateri proteini morajo biti za svojo biološko aktivnost postranslacijsko modificirani. To pomeni, da se morajo po sintezi polipeptidnih verig zgoditi določene spremembe. Med najbolj pogoste posttranslacijske modifikacije proteinov in hkrati najbolj kompleksne sodi glikozilacija. To je vezava določenega

sladkorja na določen protein (Novak-Štagoj in Podobnik, 2006; Kus in sod., 2002). Posttranslacijska modifikacija številnih proteinov je nujna za njihovo funkcijo. Če protein ni ustrezno modificiran, ima lahko krajši razpolovni čas v pacientu in slabšo terapevtsko učinkovitost. Odsotnost specifične glikozilacije lahko sproži imunsko reakcijo (Lillico in sod., 2005).

Kokošja jajca so uporabljali za produkcijo vakcin že pred 30 leti (Alison, 2007), po drugih podatkih pa že pred 50 leti in jih za ta namen uporabljajo še danes. Virus vnesejo v 9-12 dni star zarodek v znesenem jajcu (Slika 9). Sledi inkubacija, da se virus namnoži. Nato virus izolirajo iz jajca (Vaccine ..., 2009; Flu ..., 2009; Pandemic ..., 2009). Predvsem imajo dobro prakso pri pridobivanju cepiva proti ošpicam. Prav to naj bi tudi vodilo v raziskovanje proizvodnje biofarmaceutikov v kokošjih jajcih (Harvey in Ivarie, 2003).

Prve spremembe kokošjega genoma so predstavili in predlagali že 1994 (Sang, 1994). Kasneje izpopolnjene tehnike so privedle do možnosti pridobivanja transgene kokoši, ki v jajce nalaga eksogeno terapevtsko učinkovino, na primer rekombinantna biološka zdravila (Ivarie, 2006).



Slika 9: Pridobivanje cepiv v kokošjem jajcu (Vaccine ..., 2009)

2.6.1 Transgena kokoš kot ekspresijski sistem za pridobivanje bioloških učinkovin iz jajc

Genski inženiring je odprl pot do produkcije terapevtskih proteinov na osnovi rekombinantne tehnologije (Štrukelj in Kos, 2007; Lillico in sod., 2005). Vprašajmo se, zakaj so v večini biološka zdravila po kemijski zgradbi proteinske molekule.

V celici, v dednem materialu so shranjena navodila, zapis, katere beljakovine oziroma proteini se bodo sintetizirali in kdaj se bodo sintetizirali. Osnovni gradniki proteinov so aminokisline. Posamezno aminokislino pa določa zaporedje treh nukleotidov v DNK. Zaporedje treh nukleotidov na DNK imenujemo kodogen. Zaporedje kodogenov na DNK, ki predstavlja zapis za sintezo enega peptida imenujemo gen. Beljakovina je polipeptid, sestavljen iz velikega števila aminokislin. DNK nadzoruje sintezo proteinov. Kateri protein bo nastal, je odvisno od zaporedja nukleotidov na molekuli DNK. Za sintezo ustreznih peptidov ali proteinov se morajo kodirana navodila najprej prenesti do ribosomov in dekodirati (Ločniškar, 1999; Stušek in sod., 1998; Štrukelj in Kos, 2007). Če posplošimo, proteini so rezultat izražanja genov, ki so shranjeni v dednem materialu, to je DNK. DNK pa lahko tudi spreminjamo. Tako lahko pridobimo transgeno žival s spremenjeno DNK, na kateri je vnesen gen, ki kodira nov protein. V naravi igrajo proteini pomembno vlogo, poleg prehranske vrednosti imajo proteini številne biološke funkcije.

Transgene živali lahko učinkovito proizvajajo terapevtske proteine, ki jih uporabljajo v terapevtske namene pri človeku (Horvat, 2008b). Uporaba transgenih živali za sintezo terapevtskih proteinov je bila predlagana že pred več kot dvajsetimi leti, kmalu po razvoju prvih metod genetske modifikacije miši (Lillico in sod., 2005). Razvoj prve metode za generacijo transgenih miši je bil opisan 1980, nekatere od teh metod so tudi primerne pri perutnini (Sang, 1993, cit. po Sang, 1994). Prvi rekombinantni protein, ki se je pred 25 leti pojavil na ameriškem tržišču, je bil inzulin, pridobljen v bakteriji *E. coli* (Novak-Štagoj in Podobnik, 2006).

Kokoš, naj bi bila odličen kandidat za učinkovito pridobivanje terapevtskih proteinov, ki bi bili uporabni v farmacevtski industriji (Zajchowski in Etches, 2000). Cilj nekaterih

raziskav je pridobiti učinkovino oziroma želen stabilen biološko aktiven eksogeni protein, ki bi se nalagal v jajce (predvsem beljak) transgenih kokoši (Harvey in sod., 2002). V primerjavi s sintezo rekombinantnih terapevtskih proteinov v ostalih ekspresijskih sistemih, so v kokošjem jajcu predpostavljene številne prednosti takšnega pridobivanja (Lillico in sod., 2005). Zato razvijajo metode, kako bi proizvedli gensko spremenjeno kokoš, ki bi v jajce nalagala zeleno biološko učinkovino. Ta bi bila stabilen biološko aktiven eksogeni protein in terapevtik. Prva poročila o postopkih transgeneze v perutnini za pridobivanje tujih proteinov v kokošjih jajcih, so prišla z inštituta Roslin in segajo v leto 1994 (Sang, 1994).

Jajce, predvsem jajčni beljak, je poleg mleka primeren živalski produkt za produkcijo bioloških učinkovin, npr. farmacevtskih protiteles (Houdebine, 2009).

Pred razvojem transgenih kokoši za produkcijo proteinov v jajcu, je že obstajala metoda pridobivanja terapevtskih proteinov v mlečni žlezi (Lillico in sod., 2005). Živali s sekrecijskimi organi, kot je mlečna žleza nekaterih sesalcev ali jajcevod kokoši, so še posebej zanimive za pridobivanje učinkovin. S pomočjo transgeneze se pridobi žival, ki izloča določeno (novo) učinkovino v nek zunanji proizvod. Ta se uporablja v prehrani ljudi (mleko, jajce). To je pomembno zato, ker lahko učinkovino izoliramo iz mleka ali jajca, ne da bi transgeno žival ubili ali poškodovali. Pri tem je bila največja tehnična ovira vpeljava večjega DNA konstrukta, ki bi se izražal tkivno specifično in se nalagal v mleko ali jajce (Van de Lavair in sod., 2006, cit. po Etches, 2008).

2.6.1.1 Prednosti pridobivanja bioloških učinkovin v jajcu transgenih kokoši

Metoda pridobivanja bioloških učinkovin oziroma terapevtskih proteinov v jajcu bi lahko imela prednosti v primerjavi z drugimi, že naštetimi, ekspresijskimi sistemi zaradi ustrezne glikozilacije, nižjih stroškov ter hitrejšega pridobivanja (Lillico in sod., 2005).

Pridobivanje terapevtskih rekombinantnih proteinov iz kokošjega jajca olajšuje tudi dokaj enostavna struktura jajčnega beljaka (9 proteinov predstavlja 87 % jajčnega beljaka). Na voljo je veliko izkušenj o izolaciji in obdelavi učinkovin (npr. za lizocim), ki jih uporabljajo v industrijske namene (Lillico in sod., 2005).

Nekatere snovi v jajcu, ki se sintetizirajo v kokošjem telesu, so podobne človeškim snovem. To ponuja dodatne prednosti. Na primer, nekateri oligosaharidni ostanki, ki se vežejo na polipeptidno verigo, so bolj podobni sladkorjem pri človeku, kot sladkorjem pri drugih sesalcih (Rajul in sod. 2002, cit. po Lillico in sod., 2005).

Med raziskavami živalskih vrst so tudi odkrili, da je tako kot pri človeku tudi pri kokoših, v oligosaharide, ki so sestavni deli IgG, vključena N-acetilneuramična kislina (NANA) (Lillico in sod., 2005). To zopet kaže na podobnosti med proteini pri kokoših in človeku. Pridobivanje človeških proteinov v kokošjih jajcih je tudi primerna metoda za nekatere proteine, ki so za sesalce toksične (Lillico in sod., 2005).

Vsebnost v jajcu je sterilna, zato je jajce dober način shranjevanja rekombinantnih proteinov (Ivarie, 2002; Harvey in Ivarie, 2003). Proteini so v jajčnem beljaku tudi stabilni, ker v takem naravnem okolju ne izgubijo aktivnost (Ivarie, 2002). Zaščiteni so namreč pred tem, da bi se njihova aktivnost zaradi denaturacije zmanjšala (Harvey in Ivarie, 2003). Navajajo, da imajo lahko terapevtski proteini v jajčnem beljaku daljši razpolovni čas (Harvey in Ivarie, 2003). Zaradi svoje stabilnosti in kompaktnosti je jajce dober izhodni material za izolacijo in čiščenje proteinov (Zhu in sod. 2005).

Pomembna prednost uporabe kokoši kot »bioreaktorja« je kratek čas razvoja produkcijske jate. Predviden čas, da se pridobi transgeno linijo je približno 5-6 mesecev. V ta čas je vključen čas valjenja (3 tedne) ter starost kokoši ob spolni zrelosti (17-20 tednov) (Mozdziak in Petite, 2003). Zhu in sod. (2005) pišejo, da je interval od prenosa izvornih matičnih celic do produkcije himer samo 8 mesecev.

Kokoš nesnica znese do 300 jajc na leto, vsako jajce pa vsebuje 50 mg novega proteina (Etches, 2008), kar znese letno 15 g. Tudi Lillico in sod., (2005) pišejo, da je proizvodnja proteinov v kokošjem jajcu za določene proteine glede količine učinkovita. Njihov primer je še obetavnejši saj naj bi vsaka kokoš lahko naložila 100 mg terapevtskega proteina v jajce in tako vsako leto proizvedla 30 g protena. Harvey in Ivarie (2003) navajata, da je mogoče v kokošjem jajcu pridobiti večje količine določenega proteina v primerjavi z drugimi sistemi.

Cena razvoja transgene jate za pridobivanje specifičnih proteinov je le približna. Družbe, ki se s tem ukvarjajo, se šele razvijajo. Stroški so vsekakor občutno manjši kot so stroški razvoja transgenega goveda (Lillico in sod., 2005). Med vzroke cenejše reje transgene kokoši navajajo manjši stroške krmljenja (Harvey in Ivarie, 2003) ter enostavnega vzdrževanja. Zaradi omenjenih lastnosti, ki jih ima kokoš, je v zadnjem desetletju postala perutnina ena izmed pogostejših tarč za transgenezo (Han, 2009).

Navajajo, da je produkcija rekombinantnih proteinov v transgenih rastlinah sicer cenejša in da v teh proteinih niso prisotne razne virusne sekvence sesalcev, ki bi lahko izzvale imunsko reakcijo. Slabost tega sistema je, da glikozilacija ne ustreza živalskim oziroma človeškim (Lillico in sod., 2005).

2.6.1.2 Metode pridobivanja transgenih kokoši

Metode za produkcijo transgene perutnine temeljijo na tem, da vstavijo nov genetski material v celice, iz katerih se bodo razvile germinalne celice (Mozdziak in Petitte, 2003).

Za produkcijo transgenih živali, tudi kokoši, je pomembno naslednje:

- I. ustrezen način vnosa genetskega materiala na ciljno mesto (v celice izbranega zarodka) ter
- II. v katero razvojno fazo zarodka (ali sprejemne celice) vnesti genetski material, da se bo ta učinkovito vključil v genski material prejemnika.

Zajchowski in Etches (2000), navajata naslednje predlagane metode transgeneze pri perutnini: okužba zarodka z virusnimi vektorji, ki nosijo vstavljene gene, prenos novih genov s pomočjo spermijev ter mikroinjeciranje DNA v oplojeno jajce. Opisujeta še uporabo embrionalnih izvornih ali matičnih celic (angl. embryonic stem (ES) cells) in primordialnih germinalnih celic (angl. primordial germ (PG) cells), katerim se predhodno vgradi nov gen. Te celice so v poskusih že uporabili za prenos genskega materiala.

Pri vseh metodah transgeneze je treba v laboratoriju najprej pripraviti transgeni konstrukt, ki je sestavljen iz različnih vrst genskih elementov: genski zapis za izbran eksogeni protein

(Horvat, 2008b) in drugih sekvence oziroma regij, ki omogočajo vključitev in izražanje eksogena na določenem mestu.

I. Vnos genov v celice

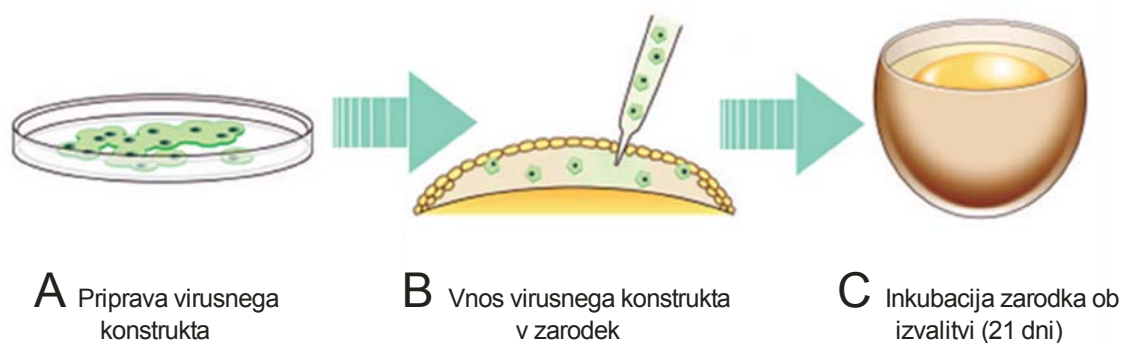
Vektorji so molekule, ki lahko nosijo gene (Ločniškar, 1999). Z njimi lahko prenesejo izbran genski material na določeno ciljno mesto, celice. Poznamo virusne in nevirusne vektorje.

I.I. Metode z virusnimi vektorji

Za eno izmed učinkovitejših uporabljenih metod prenosa genov pri perutnini navajajo uporabo virusnih vektorjev (Lillico in sod., 2005), predvsem pišejo o retrovirusnih vektorjih. Transgeni konstrukt je tu sestavljen iz genskih elementov, ki so vgrajeni v virusnem vektorju (Horvat, 2008a).

Prve gensko modificirane ptiče so pridobili prav z uporabo virusnih vektorjev (Lillico in sod., 2005). Virusu vstavijo želen gen, to je transgeni vključek. Vendar pa je velikost DNA, katero naj bi vključili v virus, omejena na 8 kb ali manj (Etches, 2008). Pri pripravi virusnega vektorja je v večini primerov treba zatreti sposobnost razmnoževanja virusa. Da je vključitev transgena mogoča, je treba odstraniti nekaj elementov virusnega genoma. Navadno že z odstranitvijo virusnih genov, potrebnih za razmnoževanje virusa, pridobimo prostor za vstavitev transgena v virusni genom (Nizka ..., 2006).

Če želijo vnesti v virus transgen, morajo virusu odstraniti gen, ki kodira plašč in virusni protein. Na to mesto vstavijo želen novi gen. Vektor (z novim genom) vstavijo v tkivne celice. V njih se prepisuje celoten virusni vektor, skupaj z vnesenim genom, in omogoči kompletno sintezo vnesenega proteina. Nato celice z virusno DNA oziroma virusni konstrukt vnesejo v izbrane celice oziroma zarodek. Spremenjena kopija virusnega genoma obdrži željeno sekvenco za vključitev virusne DNA v celično DNA. Postopek pridobivanja transgenih kokoši z metodo virusnih vektorjev je prikazan na sliki 10. Virusni vektor omogoči prenos gena, ki se nato vključi v kromosom gostitelja. Vključitev je namreč obvezna stopnja v ciklu virusa. Tako omogoči virusni vektor izražanje gena za določen protein v transgenih živalih (Zajchowski in Etches, 2000; Lillico in sod., 2005).



Slika 10: Pridobivanje transgenih kokoši z metodo virusnih vektorjev (prirejeno po Pettite in Mozdziak, 2007: 1740)

Posebna vrsta virusov, ki jih uporabljajo za vektorje so retrovirusni vektorji. Vnos genskega materiala za pridobivanje transgenih kokoši s pomočjo retrovirusov je bil uporabljen že zelo zgodaj (Harvey in sod., 2002).

V skupino retrovirusnih vektorjev, ki so jih že uporabili, sodijo ptičji levkozni virus in retikuloendotelni virus (Lillico in sod., 2005). Prenos genskega materiala v zarodek v znesenem jajcu so poskusili tudi z MoMLV (angl. Moloney murine leukemia virus) (Ivarie, 2006).

Dokazali so, da je lentivirus primernejši za vektor od ptičjega levkoznega virusa (Lillico in sod., 2005) ter tudi od ostalih retrovirusov. Z njim namreč lahko vstavimo genetski material tudi v jedra nedelečih celic (Rožman in Jež, 2009). Rezultati kažejo, da bi lahko s pomočjo lentivirusnih vektorjev učinkovito generirali transgeno linijo kokoši (Houdebine, 2009). Lillico in sod. (2005) tudi pišejo o učinkovitosti uporabe lentivirusnih vektorjev za pridobivanje transgenih kokoši, ki bi nalagale terapevtski protein tako v beljak kot tudi rumenjak. Dosegli so že, da se je s pomočjo lentivirusov določen terapevtski protein nalagal v beljak. V tem poskusu je navedeno, da so uporabili regulatorne regije za protein ovalbumin.

Han (2009) piše, da je vnos retrovirusnih vektorjev v nediferencirane celice zarodka v stanju X (v znesenem jajcu), postala pri kokoši običajna tehnika genske manipulacije.

Predvsem lentivirus se je pokazal za uspešnejši pripomoček prenosa transgena v zarodek v stanju X.

Pri uporabi lentivirusnih in ostalih retrovirusni vektorjev je velikost transgena omejena. Vanje se lahko vključi le majhen del DNA (Etches, 2008). Kljub učinkovitosti nekaterih naštetih virusnih vektorjev pa morajo še razvijati in izboljšati vektorje, da bo ta učinkoviteje izražal transgen (Houdebine, 2009)

I.II. Metode z nevirusnimi vektorji

Opisane so bile tudi številne nevirusne metode za genski vnos v zarodno linijo. Med nevirusne predlagane metode transgeneze pri perutnini navajo mikroinjiciranje DNA v oplojeno jajce, prenos DNA s pomočjo spermijev (Zajchowski in Etches, 2000) in fuzijo genov v oplojeno jajce (Ivarie, 2002).

Mikroinjiciranje DNA je bila uporabljena metoda za vnos genskega materiala v sveže oplojeno jajce (Mozdziak in Petite, 2003), to je v razvijajoči se zarodek v jajcu (Harvey in Ivarie, 2003). Pri tej metodi je potrebno rokovati z jajcem, ki še ni bilo zneseno in se nahaja še v jajcevodu. DNA so direktno injicirali v pronukleus sveže oplojenega jajčeca. Mikroinjiciranje DNA oziroma majhne količine DNA pomeni vnos DNA s pomočjo mikrokirurškega orodja (Komel, 1996). Pettite in Mozdziak, (2007) pišeta, da je bila učinkovitost tega sistema slaba. Za ta način vnosa genskega materiala (tarčne DNA) je poleg slabe učinkovitosti značilna tudi naključna vstavitev DNA v kromosom.

Poskusili so tudi z metodo, pri kateri so uporabili spermije kot vektorje za genski prenos. To metodo še raziskujejo (Zajchowski in Etches, 2000), oziroma še ni bila dokazana kot uspešna (Mozdziak in Petite, 2003). Med nevirusno metodo vnosa gena, ki so jo uporabili za produkcijo mozaika omenjajo tudi fuzijo genov v sveže oplojeno jajce (Ivarie, 2002).

II. Prejemniki vektorjev, genskega materiala

Pri kokoših je možna manipulacija celic oziroma vnos vektorjev v treh različnih stanjih zarodka: v sveže oplojenem jajcu, v sveže znesenem jajcu ter manipulacija po dveh dnevih inkubacije zarodka (Lillico in sod., 2005).

Nekatere metode genske manipulacije, ki jih uporabljajo pri sesalcih, pri pticah niso možne, zaradi posebnosti reprodukcijskega sistema (Sang, 1994). Večina metod genetske modifikacije pri sesalcih, vključuje manipulacijo oocit, oplojenih jajčec ali pa zgodnjega zarodka, ki ga pridobijo iz donorske samice in ga nato prenesejo v receptorsko samico (Lillico in sod., 2005). Pri kokoših prenos jajčec takoj po oploditvi za mikroinjiciranje DNA in poznejša vstavitve v nadomestno mater, ni možna (Sang, 1994).

V fiziologiji reprodukcije perutnine sta dve bistveni razliki v primerjavi z drugimi živalmi, ki jih tudi uporabljajo za pridobivanje rekombinantnih terapevtskih proteinov. Hranila za začetno rast dobi iz jajčnega rumenjaka in beljaka. Kmalu po oploditvi je zarodek zaščiten v trdi lupini in se nato razvija v inkubiranem jajcu, izven materinega telesa (Lillico in sod., 2005). Pri drugih živalih se zarodek razvije v materinem telesu in dobi hranila s krvnim obtokom. Pri kokoših nastopi ovulacija 1-krat na dan. Do oploditve pride kmalu po ovulaciji, ko pade jajčece v lijak, ki je na vrhu jajcevoda (Sang, 1994). Oocita je oplojena približno 15 minut po ovulaciji (Sang, 2004). Medtem, ko nastaja jajce v jajcevodu, poteka zelo hitra delitev celic (Sang, 1994) oziroma aktivno razmnoževanje celic (Han, 2009). Na vrhu rumenjaka, v znesenem jajcu, je zarodek že iz 60.000 celic (Sang, 1994), natančneje iz 40.000 do 60.000 relativno nediferenciranih celic (Han, 2009).

II.I. Genska manipulacija v sveže oplojenem jajcu

Sveže oplojeno jajce iz velikega jajcevoda, je ena izmed potencialnih točk za vnos genov. Posamezna celica zigote se nahaja pod vitelinsko membrano rumenjaka. Prva delitev celic se začne 4 h po oploditvi, diferenciacija celic se začne, preden kokoš znese jajce (Mozdziak in Petite, 2003). Avtorja Zajcchowski in Etches (2000) pišeta, da ko zapusti jajce zoženi del jajcevoda, je organizem sestavljen iz 16 celic. Hitra delitev celic se začne 5 ur po prvi delitvi celic. Prednost metode, kjer manipulirajo z zarodkom v sveže oplojenem jajcu je, da je zarodek v zgodnjem stadiju razvoja. Zato je enostavnejše manipulirati s celicami: vstaviti genski material ter opraviti jedrni prenos (Lillico in sod., 2005). Takoj po oploditvi je nastajajoče jajce še v jajcevodu. Ta metoda ima nekatere prednosti glede velikosti vnosa genskega materiala (Etches, 2008) ter da pronukleusi še niso zlit in so locirani v zarodnem mehurčku (Lillico in sod., 2005).

Slaba stran te metode je, da vnos DNA v genom ne more biti tako precizen, saj je težko identificirati nukleuse in pronukleuse (Etches, 2008). Iz tehničnega vidika je tudi zahtevnejša manipulacija, zaradi krhkosti in velikosti jajca (Lillico in sod., 2005). Slabosti se kažejo tudi pri pridobivanju donorskih kokoši in inkubaciji zarodka v nadomestni lupini (Sang in sod., 1993, cit. po Etches, 2008).

Manipulacija v tem stanju je otežena zaradi kompleksne fiziologije vzdrževanja in zaščite zarodka pred zunanjim okoljem. Poleg tega je potrebno, da se pridobi tako oplojeno jajčno celico, žrtvovati kokoš (Mozdziak in Petitte, 2003). In sicer 2-3 h potem, ko znese predhodno jajce. Nato je potrebno zagotoviti normalen razvoj zarodka z nadomestno lupino in beljakom. Sledi valjenje oziroma inkubacija jajca (Sang, 2004). Nadomestna lupina mora biti med obdobji valjenja tudi prilagojena različnim pogojem (Perry, 1988, cit. po Sang, 1994). Pogoji se nanašajo na temperaturo in vlago.

V tem stanju zarodka, ko se nahaja jajce še v jajcevodu, so že poskusili z metodo mikroinjekcije DNA (Mozdziak in Petitte, 2003). Prvi nevirusni sistem vnosa genske informacije v genom kokoši je bila direktna injekcija DNA v sveže oplojeno jajce (Love in sod., 1994, cit. po Etches, 2008). Harvey in sod. (2002) opisujejo, da vstavijo z inekcijo tujo eksogeno DNA v celični nukleus, ki se nahaja na vrhu rumenjaka. Tudi Mozdziak in Petitte (2003) pišeta, da je možno izvesti z direktno mikroinekcijo DNA v sveže oplojeno jajce. S to metodo so že vnesli eksogen in promotor lizocima ter pridobili mozaik. Sang (2004) piše, da je manipulacija zigote možna, vendar ni učinkovita. Predvidevajo, da bo postala uporabnejša, če bo možno povečati frekvenco integracije mikroinjekciranih genov.

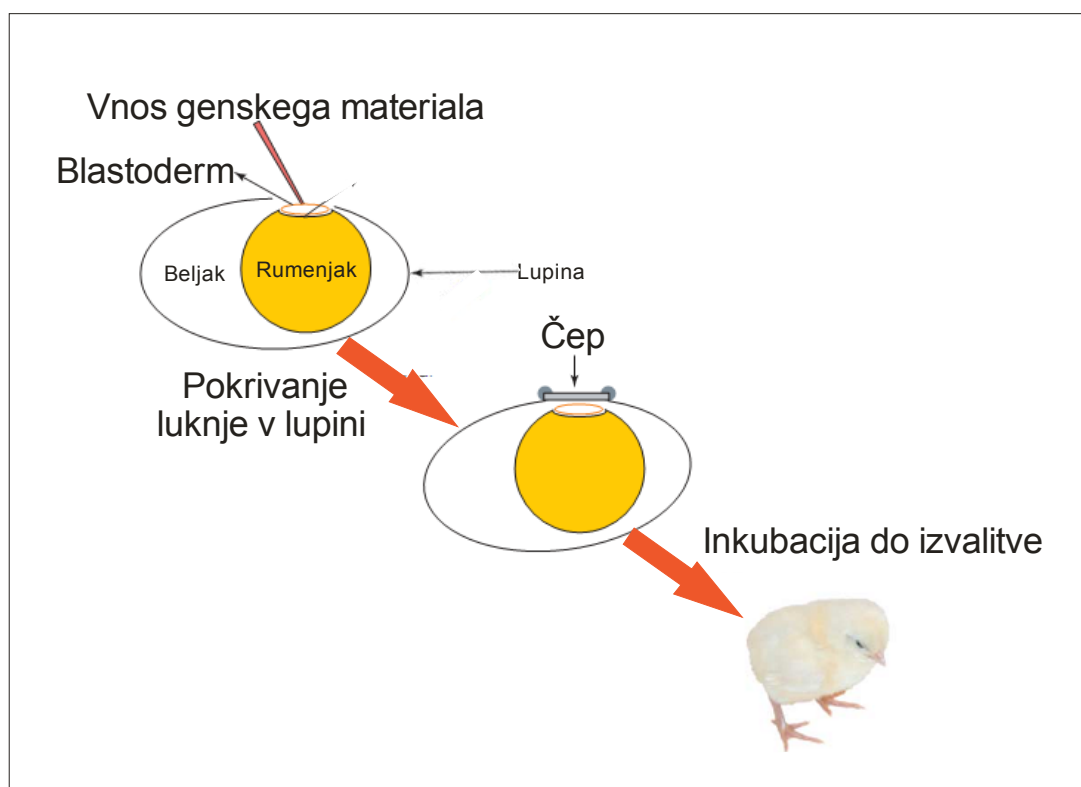
II.II. Genska manipulacija zarodka v znesenem jajcu

Možnih je več metod manipulacije zarodka v znesenem jajcu. Te se razlikujejo glede na starost inkubiranega jajca oziroma zarodka. In sicer v literaturi navajajo uporabo:

- sveže znesenega jajca, ko je zarodek v stanju X (Ivarie, 2006),
- jajca 20 h po znesenju (Ivarie, 2006),
- jajca (zarodka) po 2 dnevih inkubacije (Lillico in sod., 2005),
- jajca po 60 h po znesenju (Ivarie, 2006).

Dostop do piščančjega zarodka v sveže znesenem jajcu je relativno preprost, vendar je zarodek v tem stanju že večceličen (Sang, 1994) in zato je z njimi težje manipulirati. Da spremenijo genski material piščančka v znesenem jajcu, je potrebno vstaviti tuje gene v zarodek skozi luknjo v lupini (Mozdziak in Petite, 2003). Luknjo po vnosu transgena prekrijejo z nekakšnim čepom (Slika 11) iz mlete lupine (Lillico in sod., 2005) ali vročim lepilom (Ivarie, 2006).

Pri manipulaciji zarodka v stanju X, morajo z mikroinjekcijo doseči blastoderm zarodka, natančneje pod blastoderm zarodka (Ivarie, 2006). Blastoderm je sloj celic v zarodku (Ločniškar, 1999). Te celice se nahajajo na vrhu rumenjaka (Ivarie, 2006). Sestavljen je iz 60.000 celic. Blastodermalne celice so takrat v stanju X in so še pluripotentne (Zajchowski in Etches, 2000).



Slika 11: Vnos genskega materiala v zneseno jajce (prirejeno po Ivarie, 2006: 15)

Pri manipulaciji zarodka sveže znesenem jajcu injektirajo transgen s pomočjo virusnih vektorjev (npr. retrovirus) ali pa s pomočjo celic darovalca. Te celice so lahko embrionalne

matične celice (angl. Embryonic stem (ES) cells) ali primordialne germinalne celice (angl. primordial germ (PG) cells). Transgen, ki ga vnesejo s pomočjo vektorja, se integrira v nekatere celice in tako dobimo himero ali mozaik (Ivarie, 2006).

Mozaik je osebek, zgrajen iz genetsko različnih celic, ki izhajajo iz ene same zigote. Himera pa je osebek sestavljen iz genetsko različnih celic, ki izhajajo iz dveh ali več različnih zigot oziroma osebkov (Rožman, 2009; Ločniškar, 1999). S parjenjem himer z živalmi (kokošmi) divjega tipa lahko dobimo v naslednji generaciji heterozigotne potomce (generacija G0) in nato s parjenjem le teh pričakujemo 25 % homozigotov (v generaciji G1). Ustrezna parjenja privedejo do razvoja transgene živali (Horvat, 2008a).

II.II.I. Uporaba embrionalnih matičnih celic (ES celic)

Iz embrionalnih matičnih (ES) celic se kasneje razvijejo vsa telesna tkiva in zarodna linija celic (spolne) (Etches, 2008). Izolirajo jih iz blastodermalnih celic. Sicer uporabijo sveže zneseno oplojeno jajce, ko je zarodek v stanju X. Če bi v izolirane ES celice vnesli nov genetski material, bi po tej metodi tako prišli do himere, ki bi vsebovala genetsko modificirane celice v večini, če ne v vsem telesnem tkivu (Etches, 2008). Sang, (2004) piše, da so za produkcijo himer kokoši uporabili ES celice piščančjega zarodka. Z uporabo ES celic za prenos transgena v zarodek, pridejo do himere. V ES celice vnesejo določen gen. Nato jih vnesejo v subgerminalno votlino zarodka prejemnika (Ivarie, 2002).

Embrionalne matične celice (ES celice) so tudi že uporabili za produkcijo himerne kokoši. Dosegli so, da je taka kokoš nalagala eksogeno učinkovino, eno izmed človeških protiteles, samo v beljak. V ES celice so vstavili gene, ki kodirajo človeško protitelo in regulatorne regije, ki omejijo nalaganje učinkovine samo v beljak. ES celice so nato vstavili v zarodek (Core ..., 2009).

Zhu in sod. (2005) navajajo primer uporabe ES celic v poskusu produkcije himerne kokoši, ki je v svoja jajca nalagala eksogeno monoklonsko protitelo IgG. Najprej so izolirali ES celice iz zarodka v stanju X. Te so genetsko modificirali. Vektor je vseboval znane regulatorne regije gena za ovalbumin, ki so odgovorne za specifično izražanje v jajcevodu. Poleg tega so v vektor vstavili tudi gen za eksogeno monoklonsko protitelo. Genetsko

modificirane ES celice so vstavili v zarodek prejemnik, ki je bil tudi v stanju X. Tubularne žlezne celice v jajcevodu himer so izločale monoklonsko protitelo, ki se je nalagalo v beljak.

Etches (2006b) piše, da kompletnega sistema za produkcijo himere, ki bi učinkovito sintetizirala tuj protein še niso objavili. Poleg tega tudi piše, da še ni bilo dokazano, da bi iz teh ES celic kokoši izvirala zarodna linija. Sicer obstaja tudi patent o uporabi ES celic za produkcijo transgene kokoši, himere, v kateri bi potekala tkivno specifična ekspresija eksogenih proteinov (Etches in sod., 2005).

II.II.II. Uporaba primordialnih germinalnih celic (PG celic)

V produkciji transgenih ptičev je za vnos genskega materiala poleg ES celic možna metoda tudi uporaba PG celic (Zajchowski in Etches, 2000). Shuman in Shoffner (1982, cit. po Etches, 2006b) sta predlagala uporabo PG celic kot pripomoček za prenos genetskih modifikacij v zarodno linijo. Te celice izolirajo iz zarodka v znesenem jajcu (Etches, 2008). Po dveh dnevih inkubacije je možno doseči PG celice in jih izolirati (Lillico in sod., 2005). PG celice pridobijo iz krvi zarodka v stanju 14-17 (Etches, 2006b). Odgovorne so za sestavo zarodne linije (Tajima in sod., 1993, cit. po Sang, 1994). V zgodnjem zarodku samo te celice postanejo spermiji ali jajčeca (Core ..., 2009). Razvoj zarodne linije v zarodku se namreč začne s tvorbo primordialnih germinalnih celic (Mozdziak in Petitte 2003). Izolacija in delno čiščenje PG celic, v navedeni razvojni stopnji (t.j. pred migracijo), je relativno enostavno (Tajima in sod., 1993, cit. po Sang, 1994).

PG celice je možno poleg izolacije tudi genetsko modificirati in vsaviti v zarodek (Core ..., 2009). Ugotavljajo, da bi lahko bile PG celice odlični kandidati za genetske modifikacije, saj so te celice pluripotentne. Najprej te celice izolirajo in jih uporabijo za vnos genskega materiala, nato pa jih vnesejo v zarodek v znesenem jajcu (Zajchowski in Etches, 2000).

Mozdziak in Petitte (2003) opisujeta postopek metode uporabe PG celic za pridobivanje himerne kokoši. PG celice omogočijo, da se tuji geni zasidrajo in nato ponovno izrazijo v naslednji generaciji ter sodelujejo pri razvoju himer transgenih kokoši (Houdebine, 2009).

Metoda uporabe PG celic v transgenezi, je odprla nadaljnje možnosti za komercializacijo tehnologije pridobivanja novih proteinov v kokošjem jajcu. Izražanje genov bi lahko bilo na visokem nivoju in tkivno specifično (Etches, 2008). Poleg tega se celice prenesejo v zarodno linijo in omogočajo vključitev transgena ne glede na velikost genskega materiala (Etches, 2006b).

V enem izmed poskusov so genetsko modificirane PG celice z eksogenom vnesli v prejemnika v stanju 14-17 (van de Lavair in sod., 2006a, cit. po Etches, 2008). Etches (2008) navaja primer, da bodo lahko po tej poti prišli v generaciji G0 do himernega petelina, ki ga bodo uporabili za oploditev kokoši. Kokoš v generaciji G1 bi nalagala v svoja jajca terapevtski protein. Konkretno širšo uporabo PG celic še raziskujejo. Teoretično je genetska modifikacija PG celic ter tudi ES celic najbolj atraktivna, saj je možno genski material vnesti *in vitro*. Čeprav so te prednosti poznali že dolgo nazaj, so v glavnem reševali tehnične probleme uporabe teh celic (Etches, 2008).

2.6.1.3 Tkivno specifično izražanje vnešenih genov

Proteini beljaka nastanejo tubularnih žleznih celicah in epitelnih celicah, ki se nahajajo v zgornjem delu magnuma. Naložijo se okrog rumenjaka, ko ta potuje skozi jajcevod (Sang, 1994). Osnova za nalaganje novega proteina v beljak je, da se identificira sekvenca genov za naravne proteine beljaka in njegove regulatorne regije. Novi geni se vstavijo v bližino le te sekvence tako, da se geni za naravni protein beljaka in vstavljeni gen izražata skupaj. Geni, ki kodirajo proteine beljaka so aktivni v sekretornih celicah magnuma. Zato se lahko njihovi produkti (proteini) naložijo v beljak (Lillico in sod., 2005).

Uporaben je predvsem gen za ovalbumin, ki se izraža le v tubularnih žleznih celicah (Harvey in Ivarie, 2003). Zanimiv podatek o uporabnosti gena za ovalbumin je tudi ta, da ima vsak alel na lokusu ovalbumina sposobnost, da producira 750 mg ovalbumina (Etches, 2008), oziroma 800 mg (Etches, 2006a). Čeprav je ovalbumin najobsežnejši protein beljaka, so preučili tudi druge proteine, ki bi bili primerni za tkivno specifično izražanje vnešenih genov (v tubularnih žleznih celicah) (Etches, 2008). Poleg gena za ovalbumin je bil do podrobnosti proučen tudi lizocim.

Etches (2008) navaja, da so v enem izmed poskusov uporabili regulatorne regije gena za lizocim. *In vivo* to še ni bilo prikazano (Lampared in Verrinder Gibbins, 2002, cit. po Etches, 2008). Tudi ovotransferin in ovomukoid sta bila predlagana kot kandidatna gena za vključevanje transgena pri produkciji terapevtskih proteinov (Ivarie in sod., 2004, cit. po Etches, 2008). Poleg naštetih genov (proteinov) navajajo Ivarie in sod. (2008) še promotor ovomucina.

Pri ekspresiji transgenega terapevtskega proteina je pomembna: dobro proučena regulacija genov (vstavljen gen mora biti pod isto regulatorno regijo kot naravni gen) in posttranslacijske modifikacije (Lillico in sod., 2005).

Za terapevtske proteine je potrebno dobro preučiti regulacijo genov. Regulatorna regija gena omogočajo, da se gen izrazi (Lillico in sod., 2005). Določene regulatorne regije, ki jih tudi vstavijo v vektor in nato vse skupaj v zarodek, omejijo nalaganje učinkovine samo v beljak (Core ..., 2009). Ugotavljajo, da določeni mehanizmi in regije stimulirajo, nekatere pa inhibirajo izražanje proteinov v jajcevodu. Novi proteini se morajo vključiti v ustrezne posttranslacijske modifikacije naravno izraženih proteinov (Lillico in sod., 2005).

Poleg gena, ki ga želijo vstaviti, mora vektor vsebovati tudi promotor ter druge regulatorne regije. Te se povežejo s kodirajočimi regijami za nov terapevtski protein. Regulatorne regije genov za beljak nato tudi poženejo izražanje in izločanje terapevtskega proteina v beljak (Lillico in sod., 2005).

Promotor je regulatorna regija, ki tudi omogoča, da se v jajcevodu izrazi kodirajoča sekvenca za nov protein (Ivarie in sod., 2008). Promotor je tudi spodbujevalec in začetnik prepisovanja in optimizira transgeno ekspresijo (Houdebine, 2009). Raziskujejo predvsem promotorje, ki bi vzpodbudili izločanje novega proteina v večji količini (Harvey in Ivarie, 2003).

Nekateri predlagajo nalaganje transgenega proteina v količini 1g na jajce (Etches, 2006a). Vendar bi taka količina novega proteina lahko bila škodljiva, nezdržljiva z vidika nastajanja jajca.

2.6.1.4 Izolacija terapevtskih proteinov iz jajc

Predhodne izkušnje o izolaciji in natančni opisi o kemiji proteinov so izhodišče za pripravo protokolov o izolaciji proteinov iz jajc transgenih kokoši (Burley in Vadehra, 1989, cit. po Etches, 2008). Obstaja protokol za izolacijo transgenega produkta iz beljaka, ki se nanaša na terapevtsko monoklonsko protitelo (Zhu in sod., 2005).

2.6.1.5 Obeti za prihodnost uporabe jajc v biotehnologiji

Uporabnost jajca za produkcijo terapevtskih proteinov podpira dejstvo, da jajce ne vsebuje proteaz. Te sicer pogosto kontaminirajo produkte med postopki čiščenja in zaradi tega povzročajo pri pacientih imunske reakcije (Zhu in sod., 2005).

Veliko vprašanj v zvezi s produkcijo transgenih kokoši za pridobivanje terapevtskih proteinov v jajcih ostaja nerešenih. Nekatere stvari še raziskujejo, da bi jih izboljšali. To so: nivo pridobivanja proteinov, posttranslacijske modifikacije ter postopki izolacije oziroma čiščenja terapevtskih proteinov iz rumenjaka in beljaka (Lillico in sod., 2005).

Uporaba transgenih kokoši za pridobivanje terapevtskih proteinov mora postati tudi konkurenčna z ostalimi sistemi glede časa pridobivanja, cene in kvalitete proizvoda (Lillico in sod., 2005). Nekateri napovedujejo, da bo tak način pridobivanja izpopolnjen in uporaben čez eno ali dve desetletji (Houdebine, 2009). Eden izmed vodilnih inštitutov na tem področju, Roslin Institute se s projektom transgenih kokoši, ki bi v jajce naložila določeno terapevtsko snov, ukvarja že 15 let. S tem projektom pa se bodo ukvarjali še nadaljnjih 10 let (Anticancer ..., 2007).

Več uporabnih informacij o pridobivanju bioloških učinkovin iz kokošjega jajca lahko pričakujemo v prihodnjih letih. Vendar pa Pettite in Mozdziak (2007) pišeta, da se ne more dejansko napovedati časa komercializacije oziroma širše uporabe te znanosti. Vseeno je pričakovati, da bodo kokoši nudile človeku določene koristi na tem področju. Jajca bi lahko bila vir številnih terapevtskih proteinov, uporabnih v zdravljenju raznih bolezni.

Proizvodnja biološkega zdravila je zelo dolgotrajen proces. Od razvoja in raziskav, do klinične uporabe lahko preteče več let (Štrukelj in Kos, 2007), lahko tudi desetletje. Poleg

tega pridobivanje rekombinantnih proteinov v jajcu transgenih ptičev še ni doseglo take razvojne stopnje, kot pridobivanje v transgenih sesalcih (Ivarie, 2002). Nadalnji razvoj produkcije novih proteinov v kokošjem jajcu, ovira pomankljiva tehnologija vnosa transgena v ptičji genom (Etches, 2008). Veliko informacij o tem, je moč najti tudi v patentih. Na primer, obstaja patent o tkivno specifičnem izražanju eksogenih proteinov in njihovem nalaganju v jajce transgenih kokoši (Etches in sod., 2005). Objavljena sta tudi patenta o pridobivanju IgG (Mohammed in sod., 2005) ter interferona α (Ivarie in sod., 2008) iz jajc transgenih kokoši.

Prav uporaba PG celic naj bi odprla nove možnosti za vnos transgena v zarodno linijo in s tem komercializacijo te tehnologije (Etches, 2008).

Uporaba transgenih živali za produkcijo farmacevtskih proteinov postavlja tudi manjše naravovarstvene in etične pomisleke. Zatrjujejo pa, da je malo verjetno, da bi transgena kokoš »ušla« v naravno okolje. Trdijo tudi, da pri nalaganju izbranih proteinov v jajce, to kokoši ne škoduje (Houdebine, 2009).

Raziskujejo tudi še številne vplive vključevanja tujih proteinov v rumenjaki ali beljaki. Težko je namreč napovedati vpliv na beljak, rumenjak, stabilnost in enotnost čiščenja tujih proteinov ter sposobnost zarodka za razvoj v jajcu, ki vsebuje heterologne proteine (Sang, 1994). Sicer pa je tudi malo literature o nalaganju tujih proteinov v jajce (Lillico in sod., 2005).

Etches (2008), ki piše o pridobivanju novih proteinov v jajcu, konča eno od poglavij s to mislijo: »Jajce ponujaja edinstveno in potencialno-profitno možnost produkcije novih terapevtskih proteinov«.

2.6.2 Druge metode pridobivanja učinkovin iz kokošjega jajca

V kokošjem jajcu je možno pridobiti specifična protitelesa brez metod transgeneze. S pomočjo IgY tehnologije je mogoče pridobiti protitelesa za številne antigene. IgY se namreč prenese iz seruma imuniziranih kokoši v rumenjak. Ta protitelesa se da izolirati iz jajc (King, 2009). IgY tehnologija vključuje produkcijo in uporabo IgY protiteles. Na leto

lahko pridobijo 17-35 g IgY, ki so specifična za antigen. To je odprlo pot uporabe IgY v imunoprofilaksi (preventivi) in imunoterapiji za številne virusne in bakterijske okužbe na področju veterine in humane medicine. Predvsem v zadnjih letih se je povečala uporaba IgY za pasivno in zaščitno imunizacijo ter tudi kot pripomoček v raziskavah in diagnozah (Huopalahti in sod., 2007). Z IgY tehnologijo so pridobili protitelesa proti *Pseudomonas aeruginosa*, ki so jih uporabili v imunoterapiji za zdravljenja cistične fibroze (Kollberg in sod., 2003, cit. po King, 2009).

S pomočjo okužbe kokoši s proteinom ureaza so v rumenjaku pridobili tudi protitelo IgY proti encimu ureazi, ki ga bakterija proizvaja v veliki količini in ji omogoča, da preživi v kislem okolju. Ureaza bakterijo *Helicobacter pylori* oskrbuje z dušikom in amoniakom, obenem pa nevtralizira želodčno kislino. Protitelo IgY, ki specifično reagira z ureazo, preprečuje, da bi se *H. pylori* vezala na steno črevesja in povzročala rane na želodcu. Na tržišču (na Japonskem, Koreji in Tajvanu) je že jogurt obogaten s protitelesom IgY proti ureazi (Fiore, 2009).

Protitelesa IgY se uspešno uporablja za detekcijo antigenov, virusov, bakterij, rastlin ter ocenitev napada črevesnih parazitov pri domačih živali (Schniering in sod., 1996, cit. po Huopalahti in sod., 2007). Pri živalih (govedu in prašičih) so uspešno uporabili protitelesa IgY za zdravljenje in preprečevanje okužb z *E. coli* in nekaterimi rotavirusi (Mine in Kovacs-Nolan, 2004).

Obeta se uporaba IgY tehnologije za produkcijo protiteles IgY proti patogenim mikroorganizmom (npr. *E. coli*, *Salmonella*, *S.aureus*,...) v prehrani (Sunwoo in Sim, 2003, cit. po Huopalahti in sod., 2007). Predlagajo uporabo IgY tehnologije pri zdravljenju Kronove bolezni in celjakije ter zdravljenju raznih zastrupitev. IgY tehnologija se hitro razvija. Pričakujejo se študije o uporabi IgY protiteles v terapiji ter preventivi v medicini in veterini. Prepričani so, da bo ta nekoč dosegla širšo uporabo kot alternativa drugim snovem v znanosti in medicini (Huopalahti in sod., 2007).

2.6.3 Proizvedene učinkovine v jajcu s pomočjo biotehnologije

Tako gene za proteine rumenjaka kot za proteine beljaka bi lahko modificirali, da bi direktno usmerjali nalaganje heterolognih proteinov (Sang, 1994). Beseda heterologen pomeni, da izhaja iz druge vrste (Ločniškar, 1999). Heterologen protein je protein, ki nastane zaradi genske rekombinacije molekule DNK zaradi vnosa tujega gena v gostiteljsko DNK (Heterologous, 2000). Za direktno vključevanje heterolognih proteinov v beljak, je enostavneje modificirati gene za proteine beljaka. Geni za proteine rumenjaka potrebujejo dodatne prepoznavne sekvence (Sang, 1994). Vitelogenin in nekateri drugi proteini rumenjaka se sintetizirajo že v jetrih (Lillico in sod., 2005).

Struktura beljaka je dokaj enostavna. Za nalaganje in pridobivanje učinkovin (proteinov) v rumenjaku so potrebni zahtevnejši procesi kot za pridobivanje le teh v beljaku. Ta vsebuje malo lipidov, v primerjavi z rumenjacom, ki vsebuje kompleksno mešanico lipidov (Lillico in sod., 2005). Kljub temu ima rumenjak zanimive lastnosti, ki jih bi lahko izkoriščali in uporabili za pridobivanje nekaterih učinkovin. Zanj je značilno, da ima večji koncentracijski gradient nalaganja protiteles. Na primer, iz njega je možno izolirati 400 mg IgY. Rumenjak je zato primeren medij za pridobivanje protiteles. Raziskujejo tudi sintezo specifičnega protitelesa v transgenih kokoših. Rumenjak je tudi primeren naravni vir produkcije človeških protiteles, ki bi jih lahko uporabili v terapevtske namene. Dokazali so že, da se je v rumenjaku naložilo več IgG (Lillico in sod., 2005). Predlagali so tudi produkcijo poliklonskih protiteles v rumenjaku (Etches, 2005a, cit. po Etches, 2008). Zaenkrat pa ni nobenih poročil, ki bi prikazala produkcijo rekombinantnih ali transgenih proteinov v jetrih kokoši in njihovo nalaganje v rumenjak (Etches, 2008).

Kokoš je predvsem primerna za učinkovito pridobivanje terapevtskih (rekombinantnih) proteinov, ki so uporabni v farmacevtski industriji (Harvey in Ivarie, 2003) oziroma medicini. Eksperimentalno so sicer že pridobili nekatere farmacevtske proteine (Preglednica 5). Houdebine, (2009) še posebej poudarja, da bi lahko pridobivali v beljaku transgenih kokoši monoklonska protitelesa in človeški interferon β -1a.

Preglednica 5: V jajcu transgenih kokoši naložene učinkovine in njihove vsebnosti

KAJ	KAKO	KOLIKO	VIR
hIFN α -2b ^{1,6}	z uporabo ⁸ ALV vektorja	200 μ g	Lillico in sod., 2005
miR24 ²	s pomočjo lentivirusnih vektorjev	15-50 μ g/ml beljaka	Lillico in sod., 2007
hIFN β -1a ^{3,6}	s pomočjo lentivirusnih vektorjev	3,5-426 μ g/ml beljaka	Lillico in sod., 2007
hIFN α -2a ^{4,6}	s pomočjo lentivirusnega virusnega vektorja		Core ..., 2009 Third..., 2007
hmIgG ⁵	s pomočjo embrionalnih matičnih celic-ES celic (v zarodek v stanju X)	1-3 mg/jajce	Zhu in sod., 2005 Core ..., 2009
bakterijski encima (β -laktamazo)	s pomočjo virusnega vektorja (ALV)		Harvey in Ivarie, 2003
eritropoetin ⁷			Ivarie in sod., 2008

¹hIFN α -2b¹ - človeški interferon α -2b, je imunoterapevtsko sredstvo, ovira tudi rast rakavih celic. Uporabljajo ga pri zdravljenju raznih boleznih; hepatitisa C, različnih oblik raka (Loignon in sod., 2008).

²miR24 - Monoklonsko protitelo R24, uporabljajo pri zdravljenju malignega melanoma (oblika kožnega raka) (Lillico in sod., 2007) ali limfnov ter pljučnega raka. Pišejo tudi, da je monoklonsko rekombinantno protitelo učinkovit pripomoček pri uničevanju tumorskih celic.

³hINF- β 1a - človeški interferon β -1a je uporaben za zdravljenje multiple skleroze

⁴hIFN α -2a⁴ - človeški interferon α -2a je primeren za zdravljenje kroničnega hepatitisa C, levkemije, Kaposijevega sarkoma pri bolnikih z AIDSom

⁵hmIgG - človeško monoklonsko protitelo (IgG)

⁶interferoni - so citokini in imajo različne terapevtske učinke, ki temeljijo na antivirusnem, antiproliferativno in imunomodulatornimi delovanju (Loignon in sod., 2008)

⁷eritropoetin - je hormon, ki nastaja v ledvicah in spodbuja nastajanje eritrocitov (Ločniškar in sod., 1991)

⁸ALV – ptičji levkozni virus (angl. avian leukosis virus)

Družba Origen Therapeutics se predvsem ukvarja s pridobivanjem terapevtskih poliklonskih protiteles, ki bi jih transgene kokoši nalagale v rumenjak (Core ..., 2009). Družba tudi piše, da bi se lahko v kokošnjem jajcu pridobivalo terapevtska monoklonska protitelesa ceneje in hitreje v primerjavi z ostalimi sistemi (npr. linijami celic sesalcev). Ena družba ima cilj pridobiti transgeno kokoš, ki bi v beljak nalagala človeški faktor VIII. Ta faktor je udeležen pri strjevanju krvi. Odsotnost tega faktorja povzroča hemofilijo.

Možnosti pridobivanja človeških protiteles v jajcu transgenih kokoši naj bi bila še posebej zanimiva, saj pri pticah ne pride do nasprotnega učinka na človeške proteine (Lillico in sod., 2005). Zato ugotavljajo sposobnost nalaganja človeških protiteles v jajce. Mohamed in sod. (1998, cit. po Zajchowski in Etches, 2000) pišejo, da so poskusno izvedli nalaganje človeškega IgG v rumenjak in/ali beljak, in sicer s pomočjo intervenozne injekcije (Zajchowski in Etches, 2000). Intervenozno so injicirali tudi človeški IgA (Mohamed in sod., 1998, cit. po Narat, 2003).

2.6.4 Proizvajalci bioloških učinkovin iz kokošjih jajc s pomočjo tehnologije transgeneze

Nekatere družbe si prizadevajo doseči cilj, da bi razvili transgene kokoši za pridobivanje terapevtskih proteinov (Lillico in sod., 2005). Začetno delo za predstavitev potencialne tehnologije pridobivanja novih učinkovin v kokošnjem jajcu, je bilo narejeno znotraj akademskih krogov. Nadaljnji razvoj se je nato razvil v biotehnološkem sektorju. Vsaj sedem biotehnoloških družb posveča svoje delo tej tehnologiji. Poleg tega sta tudi dve večji farmacevtski podjetji investirali v vpeljavo tehnologije transgeneze za pridobivanje biofarmacevtikov iz kokošjih jajc (Etches, 2008).

Cilj družbe Origen Therapeutics je pridobivanje terapevtskih protiteles s pomočjo tehnologije transgeneze. Imajo svojo tehnologijo za pridobivanje transgenih kokoši, ki bi nalagale določeno učinkovino v jajca. In sicer za vstavitev genskega materiala uporabljajo PG celice. Družba predvsem vodi in razvija tehnologijo produkcije poliklonskih protiteles, uporabljenih za zdravljenje raka, infekcijskih in avtoimunskih bolezni (Core ..., 2009). Origen Therapeutics si želi sodelovanja tudi z drugimi biotehnološkimi in farmacevtskimi

družbami. Sodeluje že z dansko družbo Symphogen (Core ..., 2009), ki je ena vodilnih družb pri razvijanju rekombinantnih poliklonskih protiteles (Product, 2009).

Novozelandska družba Genavia Therapeutics je zaprosila Origen Therapeutics za uporabo njihove tehnologije za pridobivanje človeškega faktorja VIII (Core ..., 2009).

Britanski inštitut Roslin iz Edinburga, se med drugim tudi ukvarja z razvojem transgeneze pri kokoših. S tega inštituta so celo objavili »Sedaj boste jedli kokošja jajca za zdravljenje raka!«. Tudi oni so že proizvedli genetsko spremenjeno kokoš, ki je nalagala v jajce protein, uporaben pri zdravljenju raka (Anticancer ..., 2007).

Ameriška biotehnološka družba Viragen-om, ki je sodelovala z inštitutom Roslin, je prenehala z razvojem sistema OVA (produkcije transgenih pernih živali). Kljub obetajočim rezultatom, so zaradi prevelike razlike med raziskavami in komercializacijo oziroma uporabo v industrijske namene, opustili produkcijo terapevtskih proteinov v jajcih transgenih kokoši (Lewcock, 2007).

Skupaj z Viragen in inštitutom Roslin je že sodelovala tudi Oxford Biomedica, ki se ukvarja s tehnologijo prenosa genov s pomočjo lentivirusnih vektorjev. Njihova ideja je bila, da bi v kokošjem jajcu pridobivali človeške protein interferon β -1a (Third ..., 2007). V preglednici 6 je prikazana aktivnost nekaterih družb pri pridobivanju terapevtskih proteinov.

Preglednica 6: V transgenih kokoših pridobljeni terapevtski proteini, ki jih razvijajo različne družbe (Goven in sod., 2008)

Družba	Predlagan protein	Stopnja razvoja
AviGenics	rekombinantni proteini	klinično
Origen Therapeutics	človeško poli- in monoklonsko protitelo	preklinično
Viragen	interferon	preklinično
Vivalis	rekombinantni proteini	preklinično

3 RAZPRAVA IN SKLEPI

3.1 RAZPRAVA

Pregledani viri navajajo maso kokošjega jajca v razponu 50-63 g (Zorko, 1996; Cotterill in Stadelman, 1965, cit. po Nakai in Powrie, 1990; Burley, 1989 cit. po Lillico in sod., 2005; Yamamoto in sod., 1996). Glavne komponente jajca so lupina (9,5-11 %), beljak (59-63 %) in rumenjak (27,5-30 %) (Stadelman, 2003; Lillico in sod., 2005; Yamamoto in sod., 1996; Cotterill in Geiger, 1977, cit. po Kovacs-Nolan in sod., 2005).

V jajcu je največ vode (72,8-75,6 %). Proteinov (12-13,4 %) je nekoliko več kot lipidov (10,5-12 %). Poleg tega vsebuje jajce še minerale (0,8-1,0 %) in ogljikove hidrate (0,3-1,0 %). Največ mineralov se nahaja v lupini. Ogljikovi hidrati, ki jih je v jajcu najmanj, so prisotni v prost obliki in vezani obliki na proteine ali lipide (Li-Chan in sod., 1995, cit. po Stadelman, 2003; Sugino, 1997, cit. po Kovacs-Nolan in sod., 2005; Yamamoto in sod., 1996). Jajce ne vsebuje vitamina C (McNamara in Thesmar, 2005).

Lupina je sestavljena iz šestih plasti. K tem sodita tudi dve lupinini membrani, ki obdajata beljak (Parsons, 1982, cit. po Yamamoto in sod., 1996). V lupini je 10.000 do 17.000 por (Yamamoto in sod., 1996; Board in Tranter, 1990). Zato mora beljak vsebovati snovi, ki ščitijo zarodek pred vdorom raznih mikroorganizmov skozi pore.

Beljak je sestavljen iz štirih slojev ali plasti: halaziferna plast beljaka, notranji redek beljak, gosta plast beljaka in zunanji redek beljak (Holcman, 2004b; Zorko, 1996; Stadelman in Cotterill, 1990; Yamamoto in sod., 1996).

Beljak je kompleksna mešanica približno 40 različnih vrst proteinov (McNamara in Thesmar, 2005), po nekaterih drugih podatkih pa celo 78 različnih proteinov (Mann, 2007). Lillico in sod. (2005) navajajo, da devet različnih proteinov predstavlja 87% celotne proteinske mase. Največji delež je ovalbumina (54%), sledijo mu ovotransferin (12%) in ovomukoid (11%) in lizocim (3,4 %) (McNamara in Thesmar, 1996). Proteini beljaka nastanejo predvsem v tubularnih žleznih celicah, ki se nahajajo v velikem jajcevodu. V

epitelnih celicah velikega jajcevoda nastane le manjši delež proteinov beljaka (Etches, 1996).

V jajčniku kokoši so rumenjaki, ki varujejo zarodno jajčno celico. Če pride v lijaku jajcevoda do oploditve, se v znesenem jajcu začne razvijati zarodek (Ločniškar in sod., 1999; Holcman, 2004a).

Skoraj vse rumenjakeve snovi se sintetizirajo v jetrih in se nato po krvnem obtoku prenesejo preko prekrvavljene membrane, ki obdaja rumenjak, ko se ta nahaja še v jajčniku (Burley in sod., 1993). Glavna komponenta v suhi snovi rumenjaka so lipidi, ki jih je 65 % (Anton in sod., 2006).

Dokazano je, da je jajce vir bioloških učinkovin, ki jih je možno izolirati. Raziskane in proučene učinkovine v beljaku so v glavnem proteini in peptidi, v rumenjaku pa IgY, fosvitin, saliloligosaharidi, salilglikopeptidi, lipoproteini, maščobne kisline in fosfolipidi. Informacij o lastnostih bioloških učinkovin, izoliranih iz kokošnjega jajca, je zelo veliko. Posamezno učinkovino vključujejo v številne raziskave in pri tem ugotavljajo njeno uporabnost, predvsem v zdravstvu (v preventivi in zdravljenju raznih bolezni). V glavnem te učinkovine uporabljajo v raziskovalne namene. Nekatere lastnosti in uporabnost učinkovin iz kokošnjega jajca še dokazujejo.

Med pogostejše biološke aktivnosti učinkovin navajajo: antibakterijska in antivirusna aktivnost, imunomodulatorna aktivnost, antikancerogena aktivnost, antioksidativnost ter antihipertenzivnost (preprečevanje povišanega krvnega pritiska).

Nekatere učinkovine, lizocim in avidin beljaka, IgY in fosfolipide v rumenjaku, se že pridobiva za širšo uporabo. Vključujejo jih v preventivo in zdravljenje raznih bolezenskih stanj (Mine in Kovacs-Nolan, 2004), v kozmetično in farmacevtsko industrijo ter prehrano (Aro, 2007). Lizocim uporabljajo v prehrani kot protimikrobno sredstvo. Dodali so ga tudi v zobno pasto, žvečilni gumi ter ustno vodo kot zaščito pred okužbami v ustih (Sava, 1996, cit. po Mine in Kovacs-Nolan, 2004). S pomočjo IgY tehnologije so že pridobili protitelo

proti ureazi in s tem tudi proti bakteriji *Helicobacter pylori*. To protitelo dodajajo v jogurt, ki je ponekod (npr. na Japonskem) že na tržišču (Fiore, 2009).

Lizocim in avidin rutinsko izolirajo za potrebe farmacevtske industrije, v biomedicinskih raziskavah ter v prehrambeni industriji (Burley in Vadehra, 1989, cit. po Etches, 2008). V najnovejših objavljenih člankih pišejo, da se proteine izolira iz beljaka s pomočjo ionske izmenjalne kromatografije (Guérin-Dubiard in sod., 2005; Yuan in sod., 2006).

Za ekstrakcijo lipidov iz rumenjaka uporabljajo organska topila. Izolacija snovi, ki niso topne v maščobah in so prisotne v rumenjaku, je otežena. Potrebno je odstraniti maščobne kisline, ki bi motile izolacijo in analizo teh snovi.

Poleg beljaka in rumenjaka predstavlja tudi lupina dober vir koristnih učinkovin, predvsem kalcija in nekaterih proteinov, ki učinkovito delujejo proti nekaterim bakterijam (Etches, 2008).

Kokoš naj bi bila odličen biološki sistem za učinkovito pridobivanje terapevtskih proteinov, ki v jajcu niso naravno prisotni. Te snovi bi pridobivali predvsem v farmacevtski industriji (Zajcchowski in Etches, 2000). Cilj nekaterih raziskav je pridobiti učinkovino oziroma stabilen, biološko aktiven eksogen oziroma tuj protein, ki bi se nalagal v jajce (predvsem beljak) transgenih kokoši (Harvey in sod., 2003). Uporaba kokoši v ta namen naj bi imela prednosti v primerjavi z ostalimi, že uporabljenimi organizmi. Pomemben vidik je dejstvo, da je proizvodnja učinkovin iz kokošjih jajc za žival neinvazivna. Dodatne prednosti so tudi, da imajo kokoši kratek generacijski čas, so visoko produktivne in so učinkovine v jajcu sterilne. Dokazali so tudi podobnosti proteinov pri kokoših in človeku (Harvey in Ivarie, 2003; Lillico in sod., 2005; Huopalahti in sod., 2007).

Uporaba transgenih kokoši za pridobivanje učinkovin, biofarmacevtikov mora postati tudi konkurenčna z ostalimi sistemi glede časa pridobivanja, cene in kakovosti proizvoda (Lillico in sod., 2005). Nekateri napovedujejo, da bo tak način pridobivanja izpopolnjen in uporaben čez eno ali dve desetletji (Houdebine, 2009). Eden izmed vodilnih na tem

področju, inštitut Roslin, je objavil, da se s projektom transgenih kokoši, ki bi v jajce nalagale določeno terapevtsko snov, ukvarjajo že 15 let. S tem projektom pa se bodo ukvarjali nadaljnjih 10 let (Anticancer ..., 2007).

Za vnos genskega materiala izbranega (eksogenega terapevtskega) proteina v piščančji zarodek, so bile opisane in uporabljene virusne in nevirusne metode. Od nevirusnih metod so med drugimi poskusili z mikroinjiciranjem DNA. Pri virusni metodah pa so za vektorje eksogenov že uporabili ptičji levkozni, retikuloendotelni retrovirus ter lentivirus. Med učinkovitejšimi načini prenosa genov so lentivirusni vektorji. Vektor z genskim materialom so predvsem vnašali v zarodek v sveže znesenem jajcu. Za spreminjanje genskega materiala kokošjega zarodka so uporabili tudi embrionalne matične celice ter primordialne germinalne celice. Prav to je odprlo nadaljnje možnosti za komercializacijo tehnologije pridobivanja eksogenih proteinov v kokošjem jajcu (Etches, 2008). Za nalaganje učinkovine v beljak ali rumenjak je potrebno poznati fiziologijo transporta snovi v beljak ali rumenjak. Za tkivno specifično izražanje novega proteina v celicah velikega jajceveda in njegovo nalaganje le v beljak, je predvsem uporaben gen za ovalbumin. Njegova regulatorna regija lahko usmeri tudi nalaganje eksogenih proteinov v beljak (Harvey in Ivarie, 2003).

V jajcih transgenih kokoši so poskusno že pridobili nekatere učinkovine (npr. interferone), ki so uporabne v medicini oziroma farmaciji. Napovedujejo, da bodo učinkovine, pridobljene iz jajc transgenih kokoši, lahko zamenjale druge biološke ekspresijske sisteme, ki se že uporabljajo za pridobivanje teh učinkovin. Določene biotehnološke družbe si prizadevajo doseči cilj, da bi razvili transgene kokoši za pridobivanje terapevtskih proteinov (Lillico in sod., 2005).

3.2 SKLEPI

- Večina bioloških učinkovin, ki so naravno prisotna v kokošjem jajcu, uporabljajo v raziskovalne namene. Proučujejo biološke lastnosti učinkovin, pridobivanje in njihovo uporabnost. Nekatere biološke učinkovine (lizocim, avidin, IgY, fosfolipidi) že uporabljajo v neprehranske namene.
- Transgene kokoši lahko v jajca nalagajo želene terapevtske proteine.

- Z izolacijo terapevtskih proteinov iz jajc transgenih kokoši lahko pridobimo biološka zdravila za različne bolezni.
- Posledice spreminjanja genoma in nalaganje terapevtskega proteina še niso popolnoma znane, zato je treba opraviti še dodatne raziskave.

4 POVZETEK

Kokošje jajce je kompleksen, bogat in dragocen produkt narave. Zarodku nudi vse snovi, ki so potrebne za razvoj. V prehrani človeka je jajce hranilno živilo z visoko biološko vrednostjo. Razen vitamina C ima vse ostale nujno potrebne hranilne snovi. Glede na to, da so snovi, ki jih zaužijemo z jajcem, dostopne in izkoristljive ter v primerni koncentraciji, ima poleg osnovne prehranske vloge tudi zdravstveno vlogo. Zato sodi jajce v funkcionalno hrano.

Raziskujejo in dokazujejo, da je jajce tudi vir bioloških učinkovin, ki bi jih lahko uporabili v medicinske namene, to je za zdravljenje ali preprečevanje nekaterih bolezni. Učinkovinom pripisujejo številne zdravilne lastnosti oziroma biološke aktivnosti. Za posamezno učinkovino pripisujejo več možnih potencialnih uporab v zdravstvene namene. V neprehranske namene pridobivajo le nekatere v jajcu naravno prisotne učinkovine: npr. lizocim, avidin, IgY, fosfolipide rumenjaka.

Kokoš naj bi bila tudi odličen sistem za pridobivanje eksogenih terapevtskih proteinov- učinkovin, ki v jajcu niso naravno prisotne. Uporaba transgenih kokoši za pridobivanje takih učinkovin ponuja številne prednosti. Vendar mora postati konkurenčna z že uporabljenimi možnostmi. Razvoj pridobivanja bioloških zdravil s pomočjo živega organizma je zelo dolgotrajen proces. Nekateri napovedujejo, da bo tak način pridobivanja izpopolnjen čez eno ali dve desetletji. Čeprav so informacije o tem uporabne in smiselne, so razpršene in včasih nejasne. Kokošje jajce je na nek način »multifunkcionalno« zdravilo. Vsebuje učinkovine, ki lahko zdravilno delujejo v človeškem telesu na različna bolezenska stanja. Njihove potencialne vloge bi lahko s primernim postopkom izolacije in pridobivanja dosegle širšo uporabo.

5 VIRI

- Alison L. 2007. UC Davis Transgenic Animal Research. V: Conference VI. California, 12-16 avg. 2007, Transgenic Research. Murray (ed.). Davis, CA, USA. University of California, Department of Animal Science: 839–863
- Anticancer, Antiviral Proteins Produced in Transgenic Chicken Eggs. 2007. Softpedia (15. jan. 2007).
<http://news.softpedia.com/news/Anticancer-Antiviral-Proteins-Produced-in-Transgenic-Chicken-Eggs-44458.shtml> (15. okt. 2009)
- Anton M., Nau F., Nys Y. 2006. Bioactive egg components and their potential uses. *World's Poultry Science Journal*, 62: 429-442
- Anton M. 2007. Composition and structure of hen egg yolk. V: Bioactive egg compounds. Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M., Schade R. (eds.). Berlin, Springer: 1-5
- Aro H. 2007. Extraction of several egg compounds at pilot scale. V: Bioactive egg compounds. Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M., Schade R. (eds.). Berlin, Springer: 241-247
- Berovič M. 1996. Bioreaktor za aerobne procese. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor. P. (ur.). Ljubljana, Bia: 438-459
- Board R.G., Tranter H.S. 1990. The microbiology of eggs. V: Egg science and technology. 3rd edition. Stadelman W.J., Cotterill O.J. (eds.). New York, Food Products Press: 81-104
- Burley R.W., Evans A.J., Pearson J.A. 1993. Molecular aspects of the synthesis and deposition of hens egg-yolk with special reference to low-density-lipoproteins. *Poultry Science*, 72, 5: 850-855

Carlander D., Kollberg H., Wejaker P.E., Larsson A. 2000. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunologic Research*, 21, 1: 1–6.
<http://www.springerlink.com/content/r4275714p6x41g58/fulltext.pdf?page=1> (18. maj 2009)

Castellania O., Gue´rin-Dubiardb C., David-Brianda E., Anton M. 2003. Influence of physicochemical conditions and technological treatments on the iron binding capacity of egg yolk phosvitin. *Food Chemistry*, 85: 569–577.
http://www.sciencedirect.com.nukweb.nuk.uni-lj.si/science?_ob=MImg&_imagekey=B6T6R-49PRGKB-3-D&_cdi=5037&_user=4769578&_orig=search&_coverDate=05%2F31%2F2004&_sk=999149995&view=c&wchp=dGLbVzW-zSkzS&md5=fb84d1181e8806de456bc955d3cf5ea6&ie=/sdarticle.pdf (27. maj 2009)

Contents of chicken egg. 2009. Mississippi State University (4. nov. 2009)
<http://msucares.com/poultry/reproductions/images/eggcont.jpg> (5. nov. 2009)

Core Technology. 2009. Origen Therapeutics.
<http://www.origen therapeutics.com/about-us> (10. nov. 2009)

Croguennec T., Guérin-Dubiard C., Nau F. 2007. Riboflavin-binding protein (flavoprotein). V: *Egg bioscience and biotechnology*. Mine Y. (ed.). New Jersey, John Wiley & Sons: 69-74

Deeley R.G., Mullinix K.P., Wetekam W., Kronenberg H.M., Meyers M., Eldrige J.D., Goldberger R.F. 1975. Vitellogenin synthesis in the avian liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 250: 9060-9066

Doi E., Kitabatake N. 1997. Structure and functionality of egg proteins. V: Food Proteins and Their Applications. Damodaran S., Paraf A. (eds.). New York, Marcel Dekker: 325-340.

http://books.google.com/books?id=PWPKptZ1Z9sC&pg=PA325&dq=denaturation+of+ovomucin&lr=&hl=sl&source=gbs_toc_r&cad=0_0 (4. mar. 2009)

Donoghue D.J., Hairston H. 2000. Food safety implication: certain antibiotics may rapidly contaminate egg albumen during the process of its formation. *British Poultry Science*, 4, 2: 174-177.

<http://web.ebscohost.com.nukweb.nuk.uni-lj.si/ehost/pdf?vid=2&hid=6&sid=61051d1f-49f7-4757-8109-5dc709e39b94%40sessionmgr7> (22. jan. 2009)

Donovan J.W., Ross K.D. 1973. Increase in stability of avidin produced by binding of biotin. *Biochemistry*, 12, 3: 512-517.

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00727a024> (17. mar. 2009)

Eggs 101. American Egg Board.

<http://www.incredibleegg.org/egg-facts/eggs-101> (4. dec. 2009)

Etches R.J. 1996. *Reproduction in poultry*. Oxon, Cab International: 318 str.

Etches R.J. 2006a. Response to Ivarie: Competitive bioreactor hens on the horizon. *Trend in Biotechnology*, 24, 3: 101-102

Etches R.J. 2006b. The hard cell(s) of avian transgenesis. *Transgenic Research*, 15: 521-526

Etches R.J., Zhu L., Winters-Digiaco. 2005. Tissue specific expression of exogenous proteins in transgenic chickens. AA01K67027FI. Patentdocs.

<http://www.faqs.org/patents/app/20090165155> (20. okt. 2009)

- Etches. 2008. Production of novel proteins in chicken eggs. V: Egg Bioscience and Biotechnology. Mine Y. (ed.). Hoboken, John Wiley & Sons: 289-306
- Fiore K. 2009. New yogurt fights off H. pylori infection. MedPage Today (23. mar. 2009).
<http://www.medpagetoday.com/PrimaryCare/DietNutrition/13378> (1. dec. 2009)
- Flu Vaccine's Egg-Free Future. 2009. National Public Radio (27. okt. 2007).
http://www.npr.org/blogs/thetwo-way/2009/10/flu_vaccines_eggfrees_future.html (18. nov. 2009)
- Froning. 2008. Egg products industry and future perspective. V: Egg bioscience and biotechnology. Mine Y. (ed.). Hoboken, John Wiley & Sons: 307-326
- Functional foods. 2006. Europe Functional food science. 2006.
<http://www.eufic.org/article/en/page/BARCHIVE/expid/basics-functional-foods>
(20. okt. 2009)
- Gilbert A.B. 1971. The Female Reproductive Effort. V: Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl. Bell D.J., Freeman B.M. (eds.). 3rd edition. London, Academic press: 1153-1162
- Goven J., Hunt L., Shamy D. 2008. Animal Biopharming in New Zealand. Drivers, Scenarios and Practical Implications. V: Constructive Conversations/Kōrero Whakaaetanga (Phase 2): Biopharming, Risk Assessment and Regulation. A research project funded by the Foundation for Research, Science and Technology: 73 str.
www.conversations.canterbury.ac.nz/documents/animalbioreport.pdf (13. okt. 2009)
- Guérin-Dubiard C., Nau F. 2007. Minor proteins. V: Bioactive egg compounds. Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M., Schade R. (eds.). Berlin, Springer: 93-97
- Guérin-Dubiard C., Pasco M., Hietanen A. 2005. Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography. Journal of Chromatography A., 1090: 58-67

- Guérin-Dubiard C., Pasco M., Moll D., Dsert P., Croguennec T., Nau F. 2006. Proteomic analysis of hen egg white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 11: 3901-3910.
<http://pubs.acs.org.nukweb.nuk.uni-lj.si/doi/pdf/10.1021/jf0529969> (7. apr. 2009)
- Haginaka J. 2000. Enantiomer separation of drugs by capillary electrophoresis using proteins as chiral selectors. *Journal of Chromatography A.*, 875: 235–254.
http://www.sciencedirect.com.nukweb.nuk.uni-lj.si/science?_ob=MImg&_imagekey=B6TG8-402K8Y5-C-1W&_cdi=5248&_user=4769578&_orig=search&_coverDate=04%2F14%2F2000&_sk=991249998&view=c&wchp=dGLbVlz-zSkWz&md5=d6242011f625622006425f7ce586e351&ie=/sdarticle.pdf (13. maj 2009)
- Han J.Y. 2009. Germ cells and transgenesis in chickens. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32: 61–80
- Hartmann C., Wilhelmson M. 2001. The hen's egg yolk: a source of biologically active substances. *World's Poultry Science Journal*, 57: 13-25
- Harvey A.J., Ivarie R. 2003. Validating the hen as a bioreactor for the production of exogenous proteins in egg white. *Poultry Science*, 82, 6: 927-930
<http://search.ebscohost.com.nukweb.nuk.uni-lj.si/direct.asp?db=aph&jid=%22QOQ%22&scope=site> (maj 2008)
- Harvey A.J., Speksnijder G., Baugh L.R., Morris J.A., Ivarie R. 2002. Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chicken. *Nature Biotechnology*, 20, 4: 396-405
- Hatta H., Kapoor P.M., Juneja L.R. 2008. Bioactive components in egg yolk. V: *Egg bioscience and biotechnology*. Mine Y. (ed.). Hoboken, John Wiley & Sons: 185-237

Heterologous protein. 2000. Mondofacto (5. mar. 2000).

<http://www.mondofacto.com/facts/dictionary?heterologous+protein> (22. nov. 2009)

Hiidenhovi J. 2007. Ovomucin. V: Bioactive egg compounds. Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M., Schade R. (eds.). Berlin, Springer: 61-66

Hincke M.T., Wellman-Labadie O., McKee. 2008. Biosynthesis and structural assembly of eggshell components. V: Egg bioscience and biotechnology. Yoshinori Mine (ed.). Hoboken, John Wiley and Sons: 97-128

Hiramoto K., Muramatsu T., Okuma J. 1990. Protein synthesis in tissues and in the whole body of laying hens during egg formation. Poultry Science, 69, 2: 264-273

Holcman A. 2004a. Reja kokoši in prireja jajc. V: Reja kokoši v manjših jatah. Slekovec A. (ur.). Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 70-89

Holcman A. 2004b. Kakovost jedilnih jajc. V: Reja kokoši v manjših jatah. Slekovec A. (ur.). Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 99-116

Holin. 2009. Wikipedija (2. mar. 2009).

<http://sl.wikipedia.org/wiki/Holin> (9. jun. 2009)

Horvat. S. 2008a. Transgeneza živali: razlaga osnovnih metod. Proteus, 70, 6: 259-268

Horvat S. 2008b. Transgeneza živali: primeri uporabe, etična vprašanja in zakonodaja. Proteus, 70, 9-10: 401-412

Houdebine L.M. 2009. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 32: 107-121.

<http://www.springerlink.com.nukweb.nuk.uni-lj.si/content/wqlgfrj7tyj9w2a7/fulltext.pdf> (4. maj 2009)

Huntington J.A., Stein P.E. 2001. Structure and properties of ovalbumin. *Journal of Chromatography*, 756, 1-2: 189-198.

http://www.sciencedirect.com.nukweb.nuk.uni-lj.si/science?_ob=MImg&_imagekey=B6TG9-43494NX-R-7&_cdi=5249&_user=4769578&_orig=search&_coverDate=05%2F25%2F2001&_sk=992439998&view=c&wchp=dGLbVlW-zSkWz&md5=76cf8af73703842948a555d7145bd45d&ie=/sdarticle.pdf (27. feb. 2008)

Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M., Schade R. 2007. Bioactive egg compounds. Berlin, Springer: 298 str.

Ishikawa S., Yano Y., Arihara K., Itoh M. 2004. Egg yolk phosvitin inhibits hydroxyl radical formation from the fenton reaction. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 68, 6: 1324-1331.

http://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/68/6/1324/_pdf (27. maj 2009)

Ivarie R. 2002. Avian transgenesis: progress towards the promise. *Trends in Biotechnology*, 21, 1: 14-19

Ivarie R. 2006. Competitive boireactor hens on the horizon. *Trends in Biotechnology*, 24, 3: 99-101.

http://www.sciencedirect.com.nukweb.nuk.uni-lj.si/science?_ob=MImg&_imagekey=B6TCW-4J555P6-2-3&_cdi=5181&_user=4769578&_orig=search&_coverDate=03%2F31%2F2006&_sk=999759996&view=c&wchp=dGLzVzz-zSkWz&md5=91d35d34fdcc311b5a02770a2e8f4abc&ie=/sdarticle.pdf (maj 2008)

Ivarie R.D., Harvey A., Morris J.A. 2008. Glycosylated interferon alpha obtained from a transgenic chicken. United States Patent US 7 338 654 B2

King A.J. 2009. Multidisciplinary uses of chicken egg. *Avian Biology Research*, 2, 3: 107-119

Kočar D., Bohinc N. Kiralnost v industriji. 2005. Slovenski kemijski portal (20. nov. 2005).

<http://www.kemija.org/index.php/kemija-mainmenu-38/24-kemijacat/33-kiralnost-v-industriji> (20. nov. 2009)

Koketsu M. 1995. Sialyloligosaccharides from egg yolk as an inhibitor of rotaviral infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 4: 858-861.

<http://pubs.acs.org.nukweb.nuk.uni-lj.si/doi/pdf/10.1021/jf00052a002> (1. jun. 2009)

Komel R. 1996. Metode tehnologije rekombinantne DNA. V: *Biotehnologija. Osnovna znanja*. Raspor. P. (ur.). Ljubljana, Bia: 332-346

Kovacs-Nolan J., Phillips M., Mine Y. 2005. Advances in value of eggs and egg components for human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 8421-8431

Kovcs-Nolan J., Mine Y. 2006. New insights in biologically active proteins and peptides derived from hen egg. *World's Poultry Science Journal*, 62: 87-95

Kus B., Razinger K., Sket D. 2002. Slovenski medicinski e-slovar. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Lek d. d.

<http://www.lek.si/medicinski-slovar/> (12. jun. 2009)

Lackie JM., Dow JAT. 1999. *The dictionary of the cell and molecular biology*. London, Academic Press.

<http://www.mblab.gla.ac.uk/dictionary/> (12. sep. 2009)

Lesniewski G., Kijowski J. 2007. Lysozyme. V: *Bioactive egg compounds*. Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M., Schade R. (eds.). Berlin, Springer: 33-40

- Lewcock A. 2007. Viragen drops transgenics project. in-Pharma (25. jun. 2007)
<http://www.in-pharmatechnologist.com/Processing-QC/Viragen-drops-transgenics-project> (20. sep. 2009)
- Li-Chan E., Nakai S. 1989. Biochemical basis for the properties of egg white. *Critical Reviews in Poultry Biology*, 2, 1: 21-58
- Li-Chan E.C.Y., Hyun-Och K. 2008. Structure and chemical compositions of eggs. V: *Egg bioscience and biotechnology*. Mine Y. (ed.). Hoboken, John Wiley & Sons: 1-76
- Li-Chan E.C.Y., Powrie W.D. Nakai S. 1995. The chemistry of eggs and egg products. V: *Egg science and technology*. 4th edition. Stadelman W.J., Cotterill O.J. (eds.). New York, Food Products Press: 177-194.
http://books.google.si/books?id=Kw_yfANld1gC&pg=PA105&lpg=PA105&dq=The+chemistry+of+eggs+and+egg+products&source=bl&ots=XyRLnCYGGW&sig=AaDXASLd_h_t7f_T9uUtRWpuH_s&hl=sl&ei=b7ATS7OaAtqN_Aaq8eDjBA&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=2&ved=0CA4Q6AEwAQ#v=onepage&q=The%20chemistry%20of%20eggs%20and%20egg%20products&f=false (okt. 2008)
- Lillico S.G., McGrew M.J., Robertson C.D., Smith J., Haslam C., Bernard Elliot A.A., Sang H.M., Mitrophanous K.A. 2007. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 4, 6: 1771-1776.
<http://www.pnas.org/content/104/6/1771.full.pdf+html> (maj 2008)
- Lillico S.G., McGrew M.J., Sherman A., Sang H.M. 2005. Transgenic chickens as bioreactors for protein based drugs. *Drug Discovery Today*, 10, 3: 191-196.
www.drugdiscoverytoday.com (19. maj 2008)
- Lizocim. 2009. Wikipedia (17. jan. 2009).
<http://sl.wikipedia.org/wiki/Lizocim> (16. feb. 2009)

- Ločniškar F. 1999. Katalog znanj. Splošna živinoreja, biološke osnove, genetika. Domžale, Univerza v Ljubljani, Oddelek za zootehniko: 250 str.
- Ločniškar F., Benčina D., Holcman A., Kmecl A. 1991. Reja perutnine: piščancev in kokoši. Ljubljana, ČŽP Kmečki glas: 188 str.
- Loignon M., Perret S., Kelly J. 2008. Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN α 2b in HEK293 cells. BMC Biotechnology, 8, 65: 1-16.
<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1472-6750-8-65.pdf> (20. nov. 2009)
- Mann K. 2007. The chicken egg white proteome. Proteomic, 7, 19: 3358-3568
- McNamara D.J., Thesmar H.S. 2005. Eggs. V: Encyclopedia of human nutrition. Allen L., Prentice A. (eds.). Oxford, Elsevier: 86-92
- McNamara Ph.D., Donald J. 1999. Eggs are okay, every day. Nutrition. Nutrition News for Health Care Providers, 3, 2: 1-2.
<http://www.enc-online.org/publications/pubs.htm> (nov. 2008)
- Mine Y. 2008. Egg bioscience and biotechnology. Hoboken, John Wiley & Sons: 362 str.
- Mine Y., Kovacs-Nolan J. 2002. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease. Journal of Medicinal Food, 5, 3: 159-169.
<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089%2F10966200260398198> (18. maj 2009)
- Mine Y., Kovacs-Nolan J. 2004. Biologically active hen egg components in human health and disease. The Journal of Poultry Science, 41, 1: 1-29

Mine Y., Kovacs-Nolan J. 2005. Biologically active peptides derived from egg proteins. V: Proceedings of the XVII European Symposium on the Quality of Poultry Meat and XI European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products, Doorwerth, Netherlands, 23-26 May 2005.
<http://www.animalscience.com/uploads/additionalFiles/QualityOfPoultryMeat/14.pdf>
(3. jun. 2005)

Mine Y., Zhang J.W. 2001. The allergenicity of ovomucoid and the effect of its elimination from hen's egg white. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 81: 1540-1546.
<http://www3.interscience.wiley.com.nukweb.nuk.uni-lj.si/cgi-bin/fulltext/86510570/PDFSTART> (4. maj 2009)

Mizutani K., Chen Y., Yamashita H. 2006. Termostabilization of ovotransferrin by anions by pasteurization of liquid egg white. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, 9: 1839-1845

Mohammed M., Etches R.J., Morrison S., Wims L.A., Trinh K.M. 2005. Production of Proteins in Eggs. AA01K67027FI. Patentdocs.
<http://www.faqs.org/patents/app/20090083872> (20. okt. 2009)

Moran E.T. 1986. Protein requirement, egg formation and hen's ovulation cycle. *Journal of Nutrition*, 117, 3: 612-618.
<http://jn.nutrition.org/cgi/reprint/117/3/612> (maj 2009)

Mozdziak P.E., Petite J.N. 2003. Status of transgenic chicken models for development biology. *Developmental Dynamics*, 229: 414-421.
<http://www.cals.ncsu.edu/poultry/UploadedFiles/File/jpetitte/DDReview2004.pdf>
(10. sep. 2009)

Muramatsu T., Hiramatsu H., Okumura J. 1994. Ovalbumin mRNA in the magnum of laying hens changes during egg formation cycle. *British Poultry Science*, 35, 3: 457-461

- Nagase H., Harris E.D. 1983. Ovostatin: a novel proteinase inhibitor from chicken egg white. I. Purification, physicochemical properties, and tissue distribution of ovostatin. *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 12: 7481-7489.
<http://www.jbc.org> (18. mar. 2009)
- Naidu. A. S. 2000. *Natural Food Antimicrobial System*. Boca Raton, CrC Press: 836 str.
http://books.google.com/books?hl=sl&lr=&id=_rmdPO9BNBcC&oi=fnd&pg=PA265&dq=avtor:naidu&ots=8ixHJJFE5k&sig=rCRKyhGPp1tvNjLKobJqyv1Io0w#PPA271,M1 (10. nov. 2008)
- Nakai S., Powrie W. 1990. *The chemistry of eggs and egg product*. V: *Egg science and technology*. 3rd edition. Cotterill O.J., Stadelman W.J. (eds.). New York, Haworth: 105-176
- Narat M. 2003. Production of antibodies in chickens. *Food Technology and Biotechnology*, 41, 3: 259–267.
<http://www.ftb.com.hr/41-259.pdf> (17. maj 2009)
- Nau F., Guérin-Dubiard C., Croguennec T. 2007. Avidin. V: *Bioactive egg compounds*. Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M., Schade R. (eds.). Berlin, Springer: 75-78
- Nizka rast. 2006. Medeno srce (6. jun. 2006).
<http://www.medenosrce.net/tiskaj.asp?id=1023> (15. nov. 2009)
- Novak-Štagoj M., Podobnik M. 2006. Kvasovke – tovarne rekombinantnih proteinov. *Farmacevtski vestnik*, 57, 4: 235-240.
http://www.sfd.si/modules/catalog/products/prodfile/fv4_2006.pdf (19. jun. 2009)
- Nutrient values weights for edible portion. 2008. National agricultural library. USDA National Nutrient Database for Standard Reference (dec. 2008).
http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl (9. dec. 2008)

- Nys Y., Gautron J. 2007. Structure and Formation of the Eggshell. Bioactive egg compounds. Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M., Schade R. (eds.). Berlin, Springer: 99-102
- Palmiter R.D. 1972. Regulation of protein synthesis in chick oviduct. The Journal of Biological Chemistry, 247: 6770-6780
- Pandel-Mikuš R., Jevšnik M. 2004. Gensko spremenjeni organizmi v prehrani. Obzornik zdravstvene nege, 38: 73–80
- Pandemic influenza vaccine manufacturing process and timeline. 2009. WHO (11. avg. 2009).
http://www.thepanamanews.com/pn/v_15/issue_13/nature_04.html (18. nov. 2009)
- Parsons A.H. 1982. Structure of the eggshell. Poultry Science, 61: 2013-2021
- Pettite J.N., Mozdziak P.E. 2007. The incredible, edible, and therapeutic egg. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104, 6: 1739-1740
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1794276/pdf/zpq1739.pdf> (apr. 2009)
- Poona S., Treweeka T.M., Wilson MR., Easterbrook-Smithc S.B., Carver J.A. 2002. Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway. FEBS Letters, 513, 2-3: 259-266.
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T36-45215PX-B-C&_cdi=4938&_user=10&_orig=search&_coverDate=02%2F27%2F2002&_sk=994869997&view=c&wchp=dGLzVlz-zSkWz&md5=0ad6a81010e7d8416ac9e9ed89b98be3&ie=/sdarticle.pdf (14. maj 2009)
- Product. 2009. Symphogen.
<http://www.symphogen.com/web/guest/products> (20. sep. 2009)

- Réhault S. 2007. Antiproteases. V: Bioactive egg compounds. Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M., Schade R. (eds.). Berlin, Springer: 85-89
- Rejc M., Narat M., Benčina D., Habe F. 2000. Priprava s peroksidazo konjugiranih monoklonskih protiteles proti kokošjim imunoglobulinom razreda G (IgY). Zbornik Biotehniške Fakultete, Kmetijstvo (Zootehnika), 76, 2: 143-151.
<http://aas.bf.uni-lj.si/zootehnika/76-2000/PDF/76-2000-2-143-151.pdf> (30. nov. 2009)
- Roberts R.J., Brackpool C.E. 1994. The ultrastructure of avian egg shells. Poultry Science Review, 5: 245-272
- Rožman P. Jež M. 2009. Matična celica in napredno zdravljenje (napredno zdravljenje s celicami, genska terapija in tkivno inženirstvo). Slovar. Društvo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije.
<http://www.ztm.si/res/doc/Slovarcek%20MC-3227.pdf> (18. avg. 2009)
- Sang H. 1994. Transgenic chickens - methods and potential applications. Trends Biotechnology, 12, 10: 415-420
- Sang H. 2004. Prospects for transgeneis in the chick. Mechanisms of Development, 121: 1179-1186
- Saxenaa I., Tayyab S. 1997. Protein proteinase inhibitors from avian egg whites. Cellular and Molecular Life Sciences, 53: 13–23
- Scade R., Chacana P.A. 2007. Livetin fractions. V: Bioactive egg compounds. Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M., Schade R. (eds.). Berlin, Springer: 25-31
- Shen X., Steyrer E., Retzek H., Sanders E.J., Schneider W.J. 1992. Chicken oocyte growth: receptor-mediated yolk deposition. Cell and Tissue Research. 3: 459-471

- Sim J.S., Suonwoo H.H., Lee E.N. 2000. Ovoglobulin IgY. V: Natural Food Antimicrobial System. Naidu A.S. (ed.) Boca Raton. CRC Press: 227-252.
http://books.google.com/books?hl=sl&lr=&id=_rmdPO9BNBcC&oi=fnd&pg=PA227&dq=livetin&ots=8ivKHEJD7f&sig=YkjFzZQ4EVgAigSHufnfjnhYx6M#PPA2,M1 (27. jun. 2008)
- Simkiss K., Taylor T.G. 1971. Shell formation. V: Bell D.J., Freeman B.M. Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl. Bell D.J., Freeman BM (eds.). London, Academic Press: 1331-1343
- Siróa I., Kápolnab E., Kápolnac B., Lugasid A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance. *Appetite*, 51, 3: 456-467.
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WB2-4SNNT1Y-1&user=6232874&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&searchStrId=994481924&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=6232874&md5=bd41e1e6d2a31d2bf0e0c4d90dfa1ff6 (28. avg. 2009)
- Slovar medicinskih izrazov. 2008. Med.Over.Net.
http://med.over.net/za_bolnike/slovarcek_tujk/slovarcek_osh.php#s (1. dec. 2009)
- Slovar slovenskega knjižnega jezika. 1993. 1. izdaja. Ljubljana, DZS: 354
- Stadelman W.J. 2003. Structure and Composition. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Oxford, Elsevier Science: 2005-2008
- Stadelman W.J., Cotterill O.J. 1990. Egg science and technology. V: Egg science and technology. 3rd edition. Cotterill O.J., Stadelman W.J. (eds.). New York, Haworth: 105-176
- Stevens L. 1991. Egg white proteins. Comparative biochemistry and physiology. B. Comparative biochemistry, 100, 1: 1-9

- Stušek P., Podobnik A., Gogala N. 1998. Biologija. 1, Celica. 2. izdaja. Ljubljana, DZS: 122 str.
- Superti F., Ammendolia M.G., Berlutti F., Valenti P. 2007. Ovotransferrin. V: Bioactive egg compounds. Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M., Schade R. (eds.). Berlin, Springer: 43-48
- Štrukelj B., Kos J. 2007. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. 1. izdaja. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 673 str.
- Third protein successfully expressed in transgenic chicken eggs. 2007. In Pharma (29. jan. 2007).
<http://www.in-pharmatechnologist.com/Materials-Formulation/Third-protein-successfully-expressed-in-transgenic-chicken-eggs> (20. sep. 2009)
- Tomizawa H., Yamada H., Imoto T. 1994. The mechanism of irreversible inactivation of lysozyme at pH 4 and 100 degrees C. Biochemistry, 33, 44: 13032–13037.
<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00248a012?cookieSet=1> (feb. 2009)
- Vaccine production is horribly outdated. Here are 3 ways to fix it. 2009. Discover Magazine (27. jul. 2009)
<http://discovermagazine.com/2009/jul-aug/27-vaccine-production-horribly-outdated-3-ways-fix-it> (18. nov. 2009)
- Vaghefi S.B. 2002. Eggs and health: myths and misconceptions. V: Eggs and health promotion. Watson R.R. (ed.). Ames, Iowa State University Press: 202 str.
- Veliki slovar tujk. 2002. 1. izdaja. Ljubljana, Cankarjeva založba: 29
- Vieira SL. 2007. Chicken embryo utilization of egg micronutrients. Brazilian Journal of Poultry Science, 22, 1: 1-8.
<http://www.scielo.br/pdf/rbca/v9n1/a01v9n1.pdf> (7. maj 2009)

- Watkins B.A. 1995. The nutritive value of the egg. V: Egg science and technology. 4th edition. Stadelman W.J., Cotterill O.J. (eds.). New York, Food Products Press: 177-194.
http://books.google.si/books?id=Kw_yfANld1gC&pg=PA177&dq=The+nutritive+value+of+the+egg#v=onepage&q=The%20nutritive%20value%20of%20the%20egg&f=false (okt. 2008)
- Yamamoto T., Juneja L.R., Hatta H., Kim M. 1996. Hen Eggs: Their Basic and Applied Science. Boca Raton, CRC Press: 204 str.
http://books.google.com/books?id=fLmAYGxmTfIC&dq=hen+eggs:The+basic+and+applied+science&lr=&hl=sl&source=gbs_summary_s&cad=0 (15. mar. 2009)
- Yannakopoulos A.L. 2007. Egg enrichment in omega-3 fatty acids. V: Bioactive egg compounds. Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M., Schade R. (eds.). Berlin, Springer: 159-168
- Yuan W., Zhao G.F., Dong X.Y. 2006. High-capacity purification of hen egg-white proteins by ion-exchange electrochromatography with an oscillatory transverse electric field. *Journal of Separation Science*, 29, 15: 2383-2389
- Zadravec D. 1999. Maščobokislinska sestava jajc s povečanim deležem n-3 maščobnih kislin. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 2-17
- Zajchowski L.D., Etches R.J. 2000. Transgenic chickens: Present, past, and future. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 11, 2: 63-80
- Zhu L., Lavoit M.C., Etches R.J. 2005. Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nature Biotechnology*, 23, 9: 1159-1169
- Zlato jajce. 2008. Jata Emona.
http://www.jata-emoni.si/zlato_jajce.html (22. okt. 2009)
- Zorko N. 1996. Proizvodnja jajc in mesa. Maribor, Littera: 11-28

ZAHVALA

Hvala, mentorici prof. dr. Mojci Narat za mentorstvo, napotke, literaturo, spodbude, razlage ter da me je naučila, da je mogoče narediti kdaj kaj več, kot si predstavljamo, da smo sposobni.

Hvala, somentorici prof. dr. Antoniji Holcmanovi, da mi je omogočila pisanje diplomske naloge na to temo in me usmerjala. Hvala za napotke, opozorila, literaturo, spodbude in vedno prijeten pogovor.

Obema hvala za hitro popravljanje in potrpežljivost.

Hvala recenzentki doc. dr. Tanji Kunej za prijaznost in hiter pregled diplomske naloge.

Hvala predsedniku komisije prof. dr. Ivanu Štuhec, da si je med prazniki vzel čas za temeljit pregled diplomske naloge.

Hvala vsem knjižničarkam, za njihovo pomoč in prijaznost pri iskanju člankov, še posebej hvala ga. Cvetki Gerbec.

Hvala dr. Nataši Siard za tehnični pregled in napotke.

Hvala ga. Karmeli Mariji Malinger za pregled in popravek angleškega povzetka diplome.

Hvala ga. Sabini Kneht, ki mi je s prijaznostjo in strokovnosto pomagala pri reševanju raznih administrativnih zadev.

Hvala Andrejki Štruklj dr. med. za pomoč in pri razumevanju člankov v angleškem jeziku.

Hvala cimri Maji za razlago nekaterih problemov iz biotehnologije

Hvala Mitji za pomoč in razlago postopkov izolacije in raznih drugih vprašanj iz kemije.

Hvala Filipu, da je bil vedno pripravljen reševati računalniške zagate in da mi je pomagal pri oblikovanju diplomske naloge.

Hvala prijateljici Mojci ter sošolkam Manci, Tanji in Hani za spodbudo, ko mi je zmanjkovalo moči in volje.

Hvala še tistim, ki so bili z mano nekoliko drugače, predvsem gospe Jožici Ipavec in sestri Štefki Logar.

Hvala staršem, bratu in sorodnikom, ki so mi pomagali na sto in en način.

Boltar I. Pridobivanje bioloških učinkovin iz kokošjih jajc.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Iva BOLTAR

**PRIDOBIVANJE BIOLOŠKIH UČINKOVIN IZ
KOKOŠJIH JAJC**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009