

Uvod u biotehnologiju

Prof. dr. sc. Anita Slavica

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (1)

. pojmovi, definicije, primjeri

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (2)

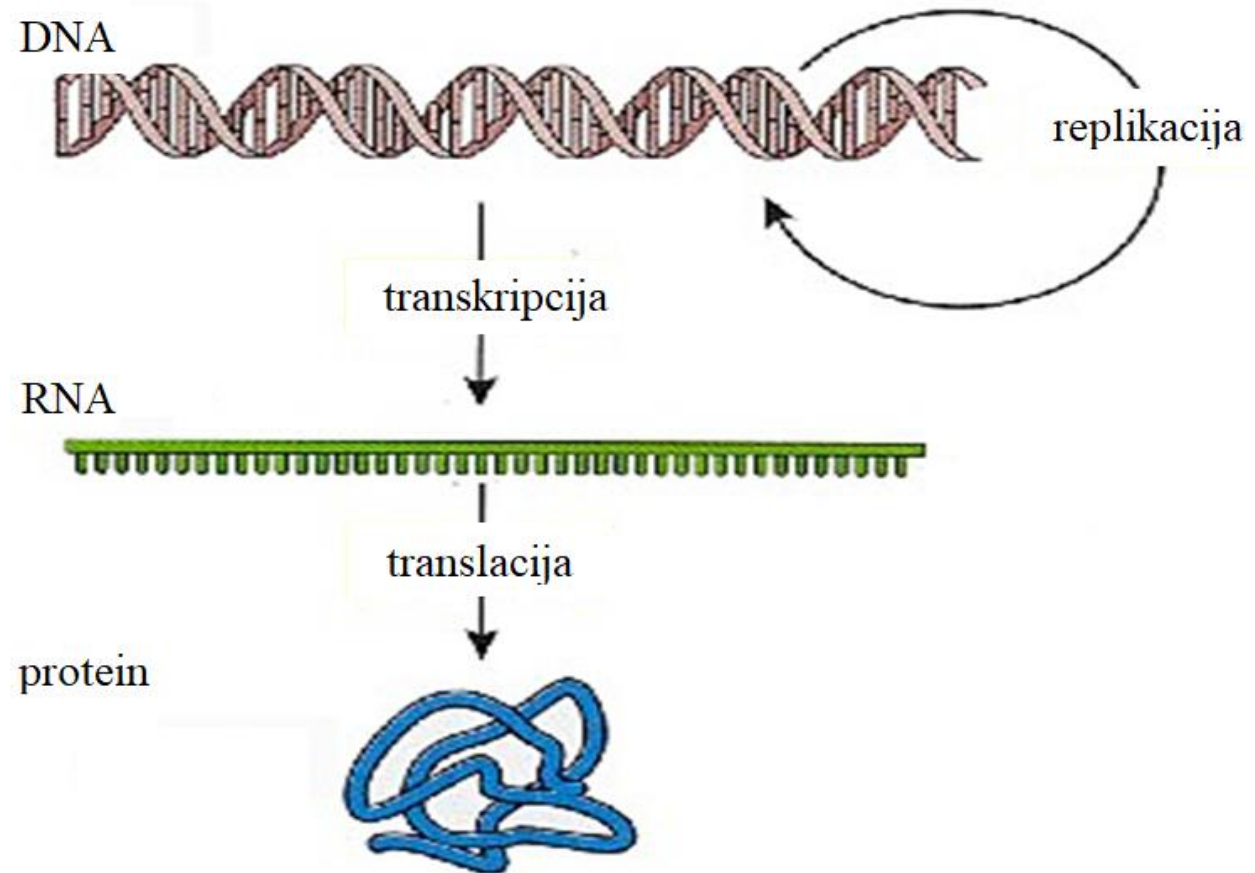
Genetika je biološka znanost koja istražuje nasljeđivanje i raznolikost genetičke informacije.

Istražuje kako se prenose svojstva roditelja na potomstvo, zbog čega nasljedna svojstva kod jedinki istih roditelja variraju, koji faktori određuju ta svojstva, na koji se način svojstva mijenjaju i stječu nova te kako se rezultati tih istraživanja mogu iskoristiti u medicini, stočarstvu, poljoprivredi, farmaceutskoj industriji.

Molekularna genetika je područje genetike koje istražuje **nasljedni materijal** i nasljedne procese na razini molekule, ponajprije gena, odnosno molekule **deoksiribonukleinske kiseline (DNA)**.

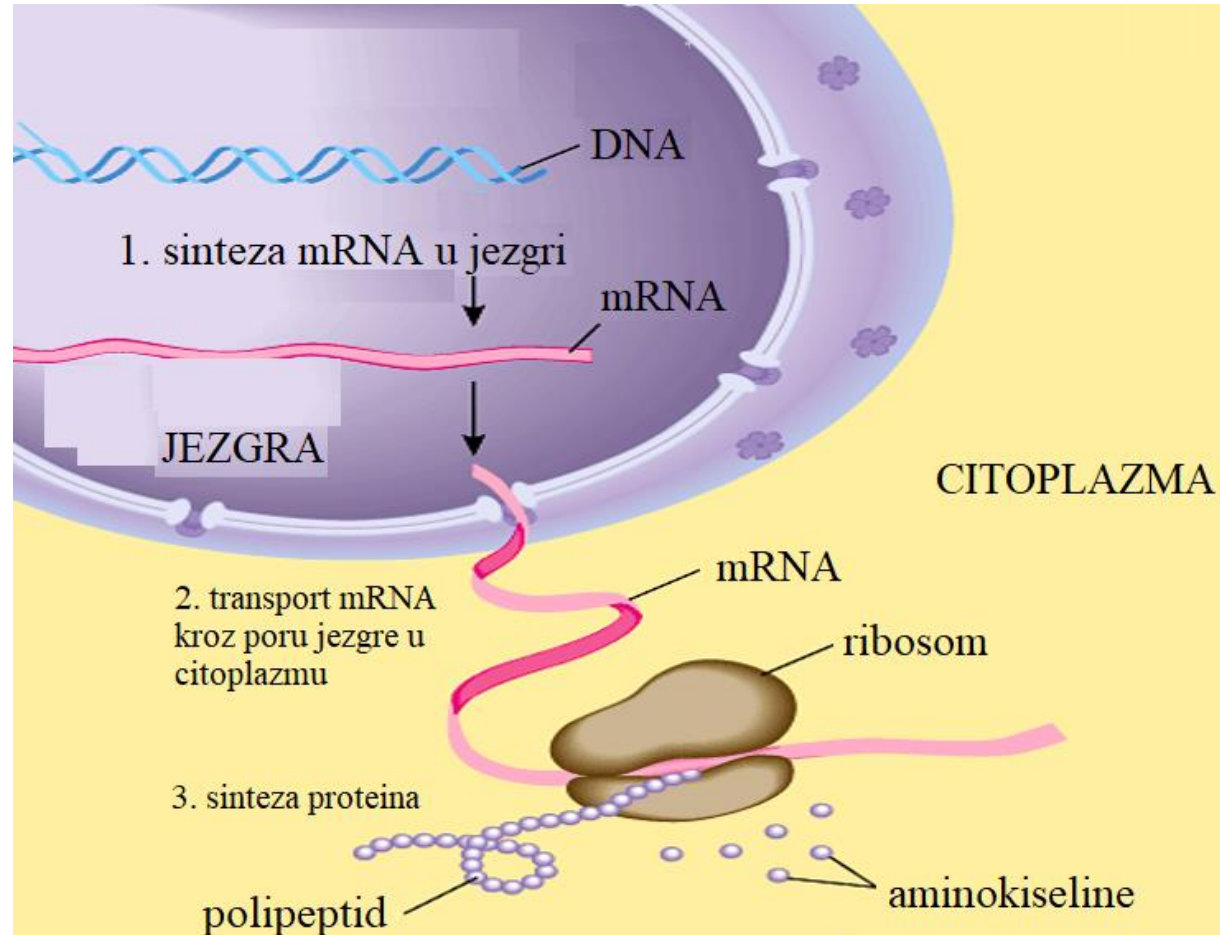
molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (4)

tijek genetičke informacije - centralna dogma



molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (5)

tijek genetičke informacije - centralna dogma



Genetičko inženjerstvo je svaka promjena u genetičkoj konstituciji živog organizma, koja se uobičajeno ne bi pojavila u prirodi, dobivena umjetnim pokusnim metodama; unošenje gena iz drugog organizma.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Pristupljeno 08.11.2022. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=41591>

Genetičko inženjerstvo je niz laboratorijskih postupaka i tehnika, koje omogućavaju izdvajanje ili sintezu točno određenoga gena ili odsječka gena, njegovu analizu i preinačivanje (modifikaciju) te ponovno uvođenje i ekspresiju gena u istom ili nekom drugom organizmu ili stanici.

Autor: V. Delić, V. Godinić Mikulčić, S. Jelaska, D. Lejak Levanić; Objavljeno: 17. svibnja 2021.; Ažurirano: 31. svibnja 2022. Hrvatska tehnička enciklopedija. Pristupljeno 08.11.2022. <https://tehnika.lzmk.hr/geneticko-inzenjerstvo/>

Sekvenciranje DNA je jedna od metoda genetičkog inženjerstva kojom se pronalazi točan redoslijed nukleotida u DNA.

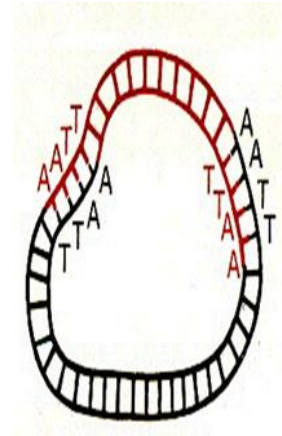
Tehnologija rekombinantne DNA (rDNA) je sinonim za genetičko inženjerstvo.

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (8)

Restriksijske endonukleaze - enzimi za izdvajanje gena ().

DNA-ligaze - enzimi za spajanje krajeva DNA ().

Spajanjem DNA fragmenata različitog porijekla (npr. iz bakterije i kvasca) dobije se **hibridna (kimerna) DNA** .



Hibridna (kimerna) DNA se pomoću tzv. **vektora (plazmida ili virusa) kao prenositelja odsječka DNA** od interesa može ugraditi u genom stanice domaćina.

Genom je sveukupna deoksiribonukleinska kiselina (DNA) nekog organizma. Pod strukturom genoma podrazumijeva se točan redosljed nukleotida u nekom genomu. (Ljudski genom se sastoji od oko $3 \cdot 10^9$ pb u svakome setu kromosoma.)

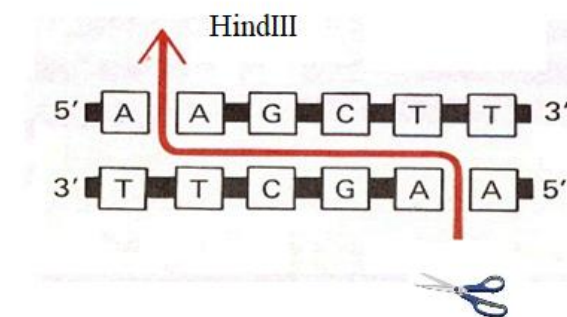
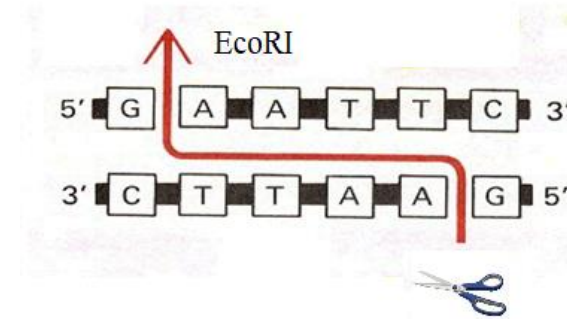
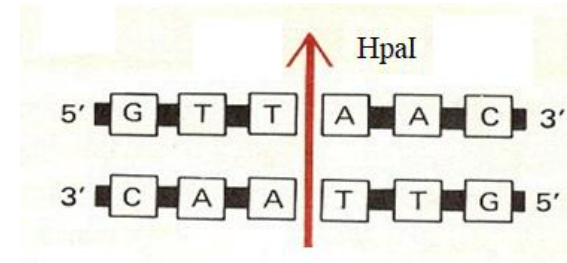
molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (9)

Restriksijske endonukleaze - enzimi za izdvajanje gena ().

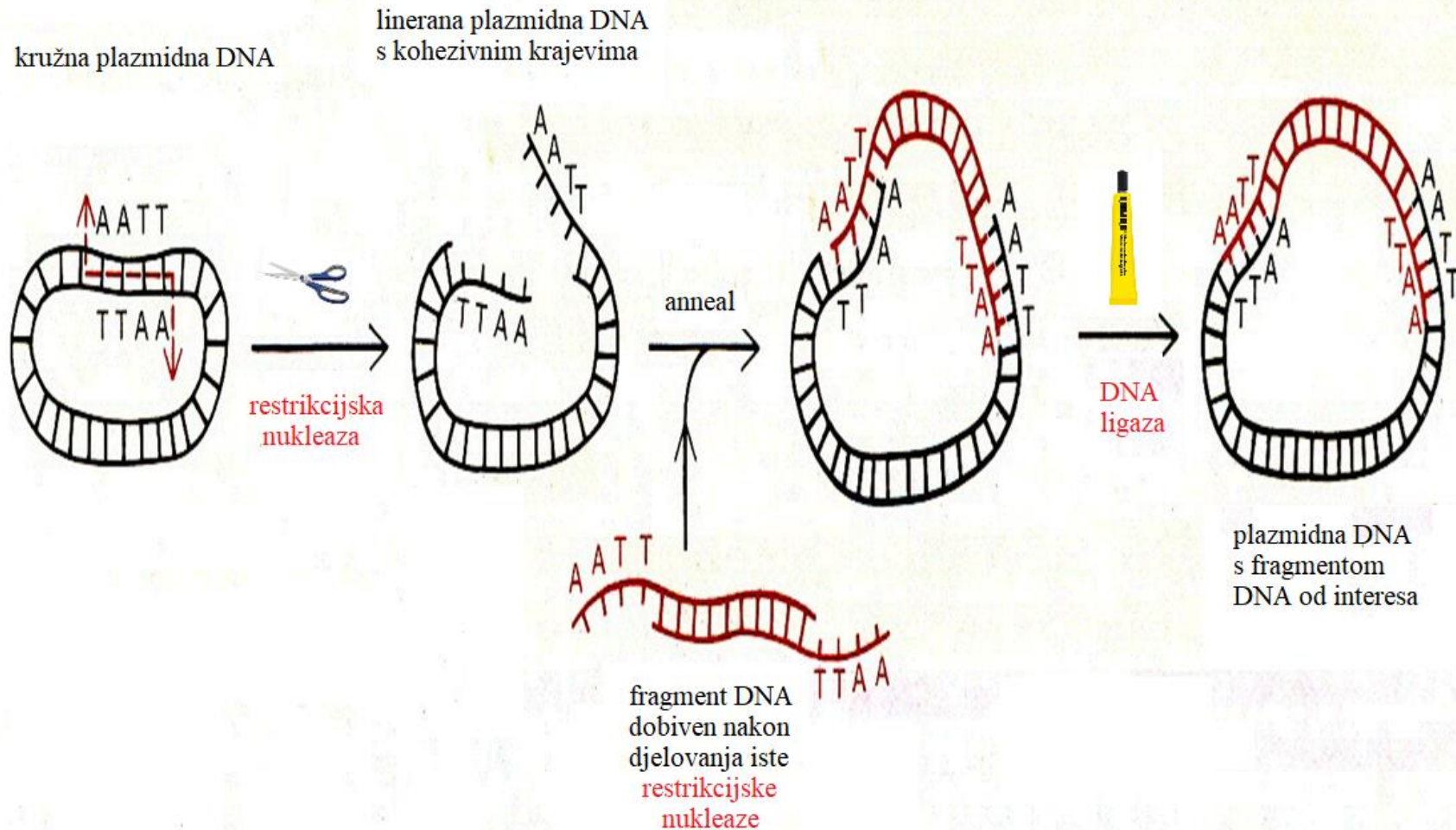
HpaI (*Hemophylus parainfluenzae*)

EcoRI (*Escherichia coli*)

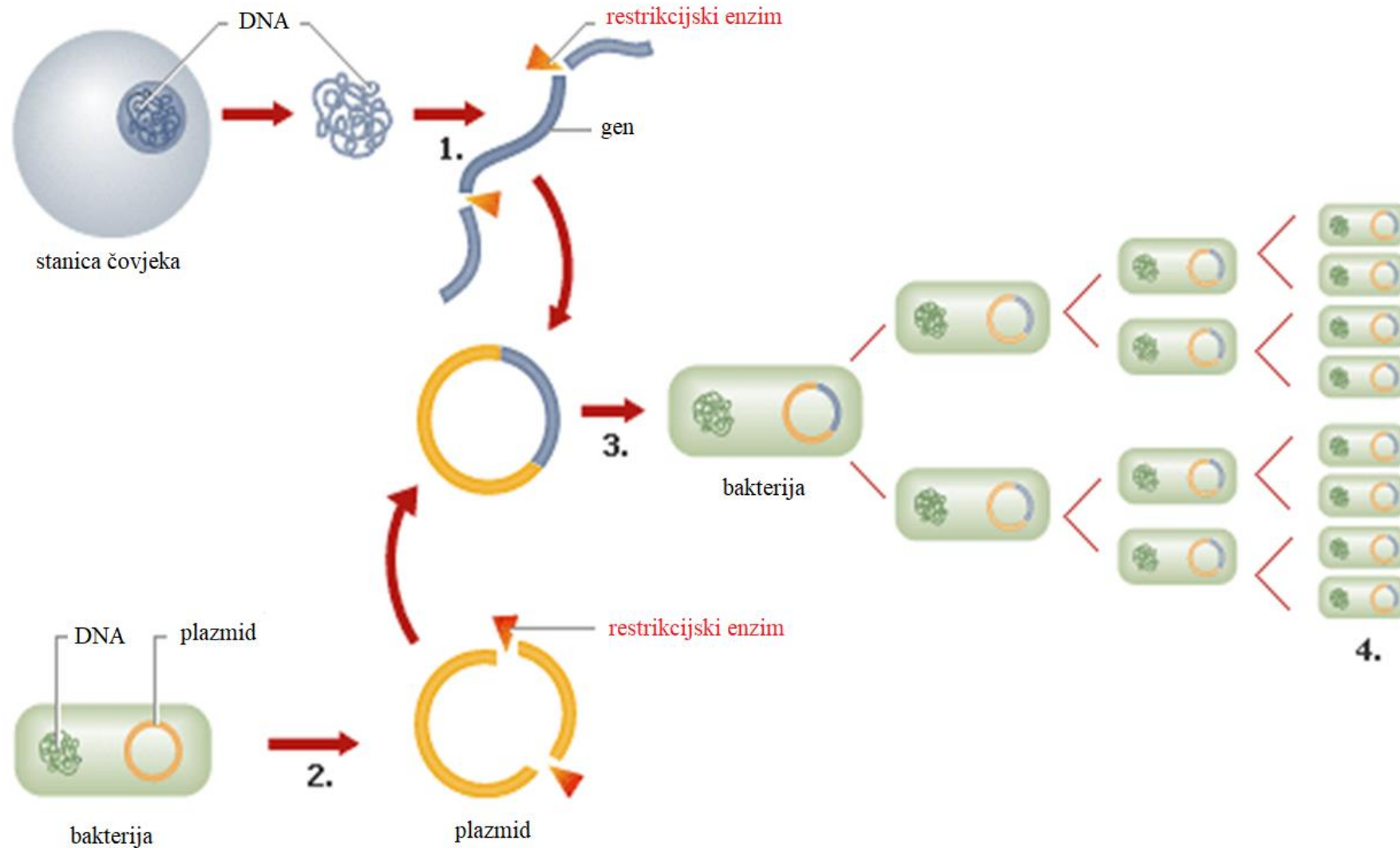
HindIII (*Hemophylus influenzae*)



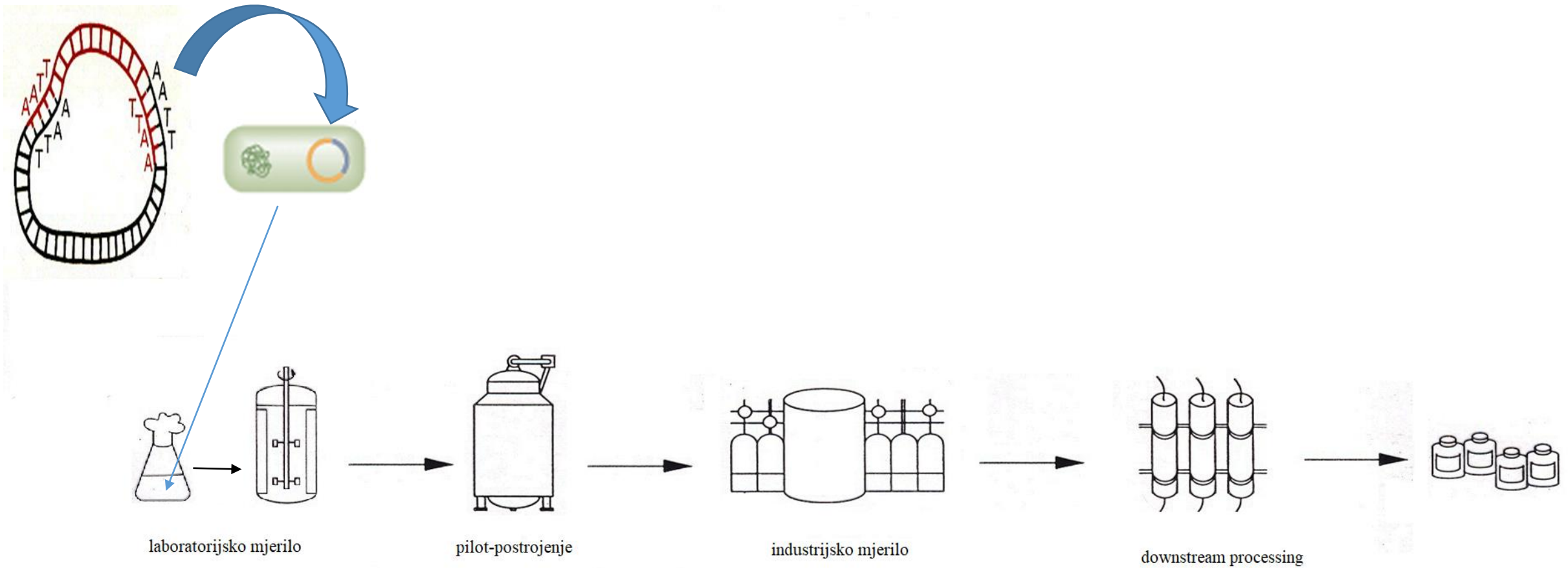
molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (10)



molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (11)



molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (12)

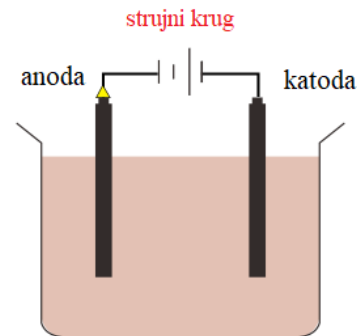


molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (13)

- . stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. bioelectrochemical fuel cells)
- . medicinska biotehnologija
- . biotehnološka primjena ekstremofilnih biokatalizatora, protozoa, cijanobakterija i (mikro)algi
- . „anorganska” biotehnologija
- . biotehnološka proizvodnja vitamina, zasebnih skupina aromatskih spojeva i biorazgradljivih polimera
- . biotehnologija mora, bioraznolikost, nanotehnologija, biotehnološka analitika, novi biotehnološki proizvodi i usluge
- . biotehnologija svemira
- ...

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (14)

- . stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. bioelectrochemical fuel cells) – od 1960-tih, NASA (National Aeronautics and Space Administration, USA), zatvoreni sustavi, kako proizvesti električnu energiju iz „otpadnog materijala”?
(zašto bioteknolozi trebaju znati kemiju i fiziku i ...)
- . neregenerirajući izvori energije: ugljen, nafta i prirodni plin (energetski izvori formirani metabolizmom stanica; Osteroth 1989)
- . kako koristiti redukcijsko-oksidacijske reakcije / nizove reakcija, koje kataliziraju cjelovite stanice (mikro)organizama ili enzimi?
- . reducirani spoj (izvor elektrona, e^-) / anoda \longrightarrow O_2 (oksidirani spoj, akceptor elektrona) / katoda



- . konverzija kemijske energije u električnu energiju - primijenjena elektrokemija (biosenzori, bioelektrokemijska sinteza, bioelektronika)

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (15)

. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. bioelectrochemical fuel cells)

(zašto bioteknolozi trebaju znati kemiju i fiziku i ...)

. reducirani spoj (izvor elektrona, e^-) / anoda \longrightarrow O_2 (oksidirani spoj, akceptor elektrona) / katoda

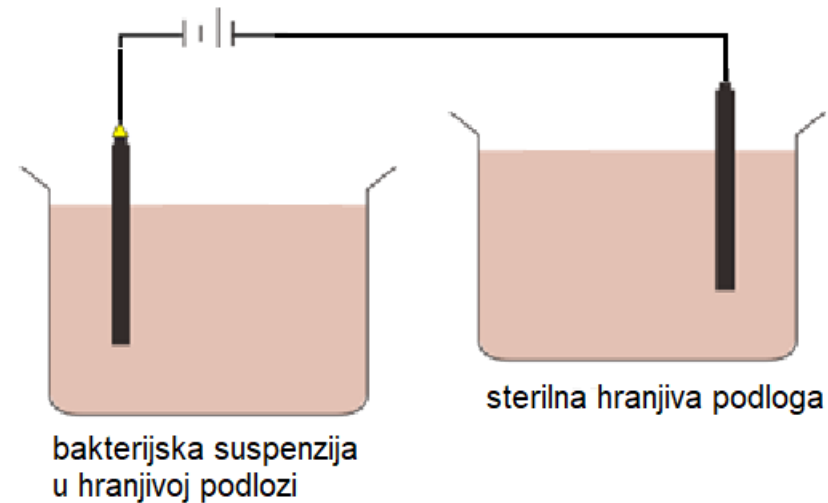
. široki raspon (an)organskih supstrata (S)

. stanice posjeduju set visoko specifičnih enzima za visokoučinkovitu kontroliranu oksidaciju supstrata (S) i prijenos elektrona do krajnjeg akceptora elektrona (O_2 u aerobnim uvjetima)

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (16)

. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. bioelectrochemical fuel cells)

(zašto biotehnolozi trebaju znati kemiju i fiziku i ...)



. Potter, 1911 – „mikrobiološka baterija” (0,5 – 1 V, 10^{-5} - 10^{-6} A)

. Cohen, 1931

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (17)

. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. bioelectrochemical fuel cells)

(zašto biotehnolozi trebaju znati kemiju i fiziku i ...)

. postojanje cijele Zemljine biosfere ovisi o izvanzemaljskom izvoru energije - radijacije Sunca

. ipak, svi oblici života ne mogu koristiti sunčevu energiju

. konverzija elektromagnetske radijacije Sunca u elektrokemijsku tj. kemijsku energiju u živim (mikro)organizmima (Renger, 1983)

. **FOTOSINTEZA** (foto + sinteza) je proces stvaranja organskih tvari iz ugljikova dioksida (CO_2) i vode (H_2O) s pomoću svjetlosne energije i klorofila uz istodobno izlučivanje kisika (O_2)

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (18)

. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. bioelectrochemical fuel cells)

(zašto biotehnolozi trebaju znati kemiju i fiziku i ...)

. FOTOSINTEZA

. kvalitativno najvažniji biokemijski proces na Zemlji

. fotosintezom se apsorbirana Sunčeva energija i ugrađuje u energijom bogate kemijske veze organskih spojeva, stvara se kisik* i susprati* / hrana za sve heterotrofne organizme (životinje, biljke bez klorofila, bakterije i gljive)

. fotosinteza je i u kvantitativnome smislu presudan proces - svake godine više od 200 mlrd. t ugljika konvertira u 500 mlrd. t organskih spojeva pri čemu se oslobađa kisika potrebnog za disanje

. svako zagađivanje atmosfere ugrožava fotosintetske organizme, a time i život na Zemlji.

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (19)

. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. bioelectrochemical fuel cells)

(zašto biotehnolozi trebaju znati kemiju i fiziku i ...)

. FOTOSINTEZA - FOTOAUTOTROFNI (MIKRO)ORGANIZMI

. koriste svjetlost valne duljine (λ) 400-800 nm (Ziegler, 1983)

. fotoautotrofi - cijanobakterije - proizvodnja kisika iz vode (fotoliza H_2O) i prijelaz Zemljine biosfere iz anaerobne u aerobnu

. KEMOORGANOTROFI - ne mogu koristiti elektromagnetsku radijaciju Sunca direktno kao energiju, koriste tzv. egzogene supstrate*, iz kojih pridobivaju energiju (prijenos elektrona), i kisik*, s pomoću kojeg se supstrati* oksidiraju (načine reaktivnijim) i „uzimaju” im se elektroni (supstrati se oksidiraju)

. HETEROTROFI (hetero- + -trofi) - koriste gotove organske tvari kao susprate

. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. bioelectrochemical fuel cells)

(zašto biotehnolozi trebaju znati kemiju i fiziku i ...)

. KEMOORGANOTROFI - usporedba anaerobnih / mikroaerofilnih i aerobnih bioprocasa

stanice kvasca, anaerobni / mikroaerofilni uvjeti bioprocasa

glukoza \longrightarrow etanol + CO₂ + energija (197 kJ mol⁻¹)

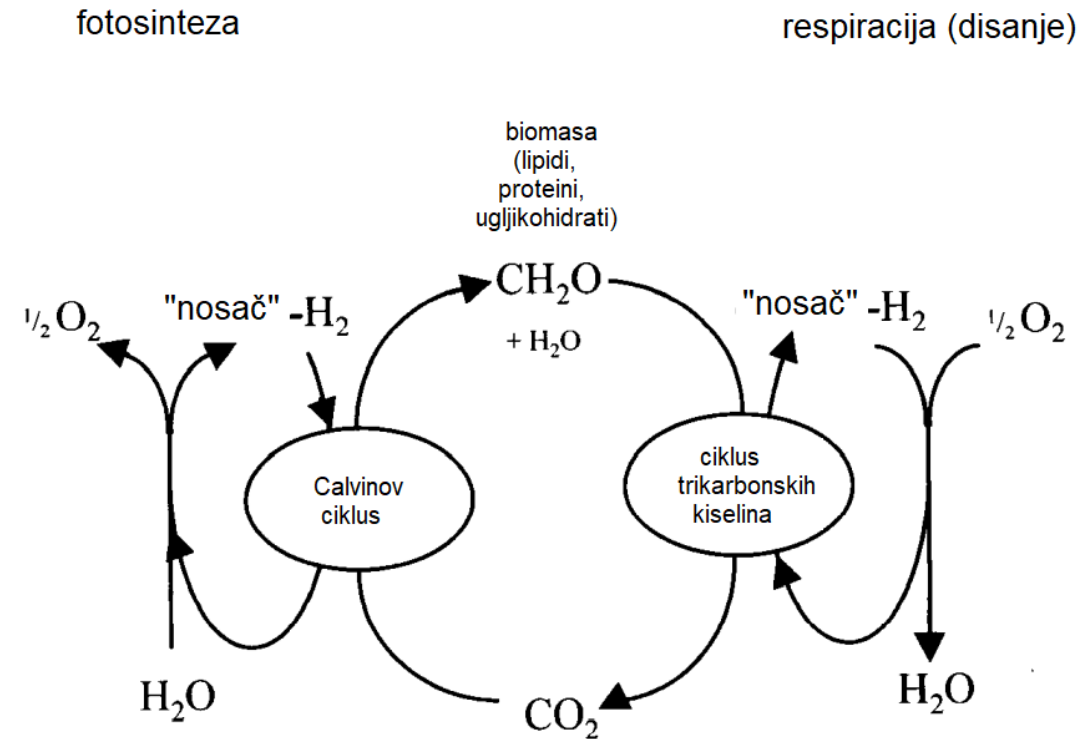
stanice kvasca, aerobni uvjeti bioprocasa (O₂)

glukoza \longrightarrow CO₂ + H₂O + energija (2874 kJ mol⁻¹)

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (21)

. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. bioelectrochemical fuel cells)

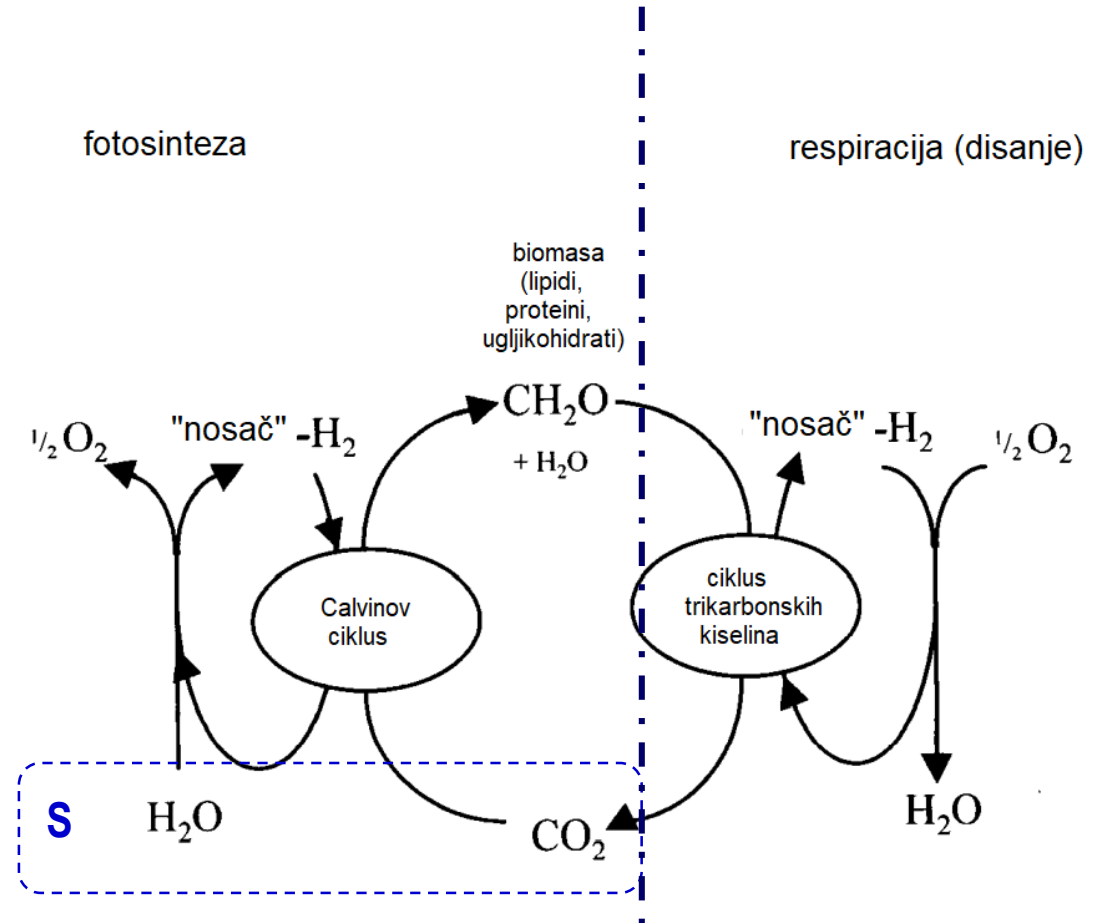
. FOTOTROFI I KEMOORGANOTROFI



molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (21)

. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. bioelectrochemical fuel cells)

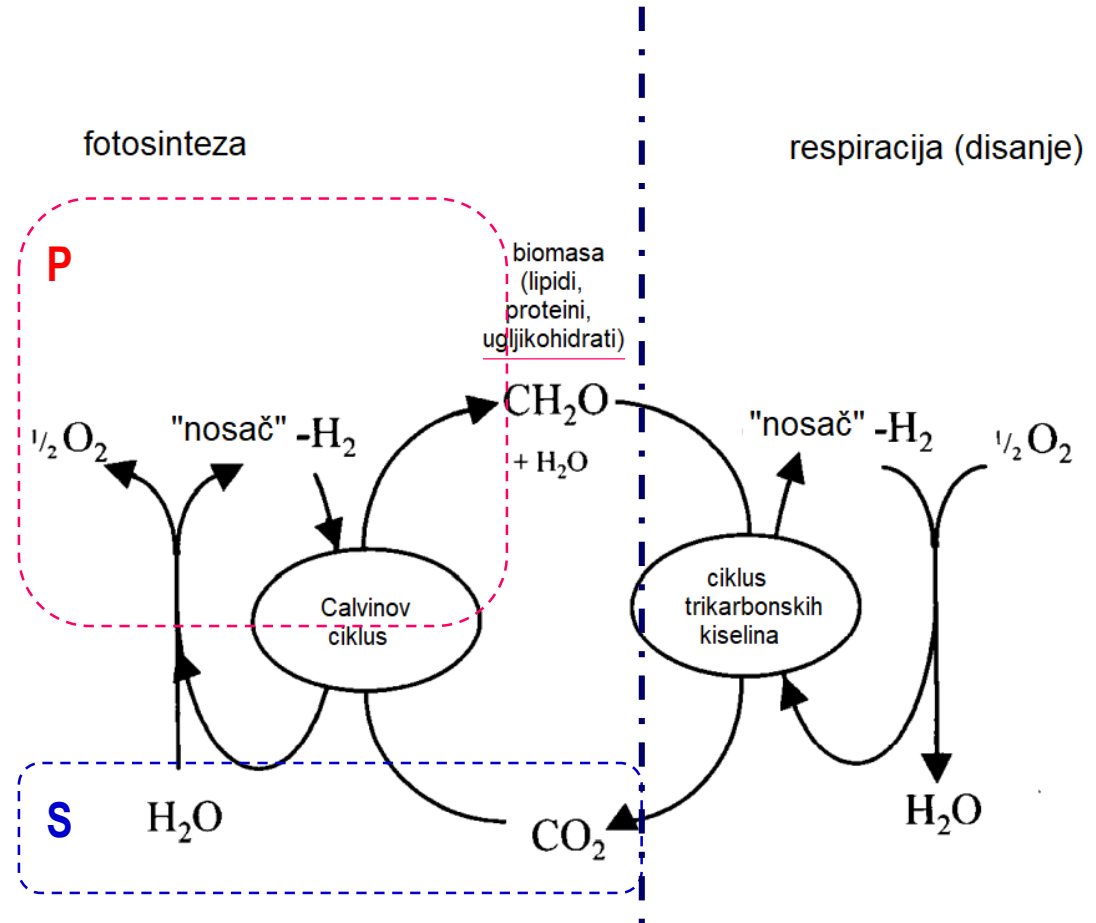
. FOTOTROFI i KEMOORGANOTROFI



molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (21)

. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. bioelectrochemical fuel cells)

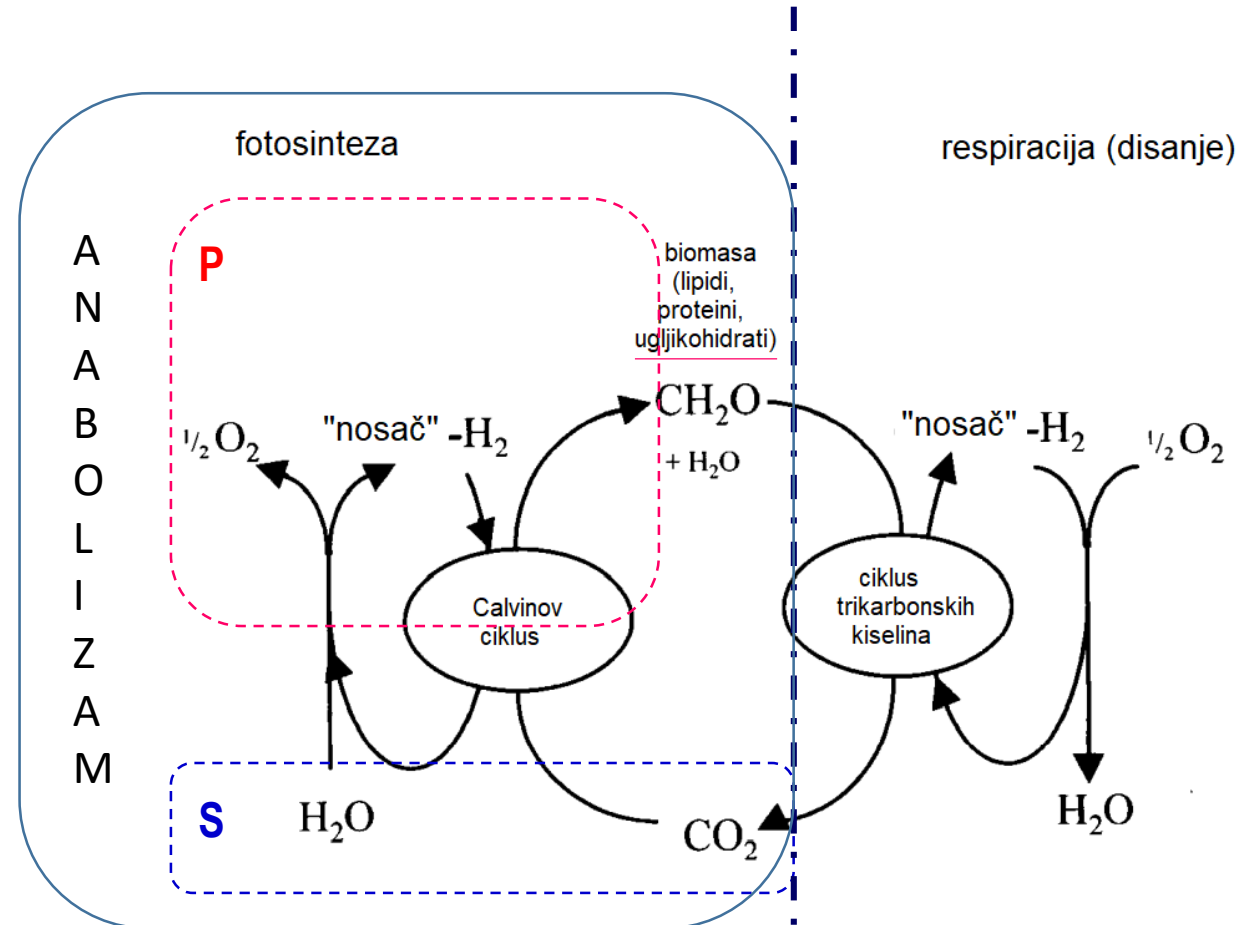
. FOTOTROFI i KEMOORGANOTROFI



molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (21)

. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. bioelectrochemical fuel cells)

. FOTOTROFI i KEMOORGANOTROFI



. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. bioelectrochemical fuel cells)

. FOTOTROFI i KEMOORGANOTROFI

. **Calvinov ciklus** je ciklus enzimskih reakcija potrebnih da se šest molekula atmosferskog ugljičnog dioksida (CO_2) prevede u molekulu glukoze ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) tijekom fotosinteze uz pomoć energije apsorbirane svjetlosti.

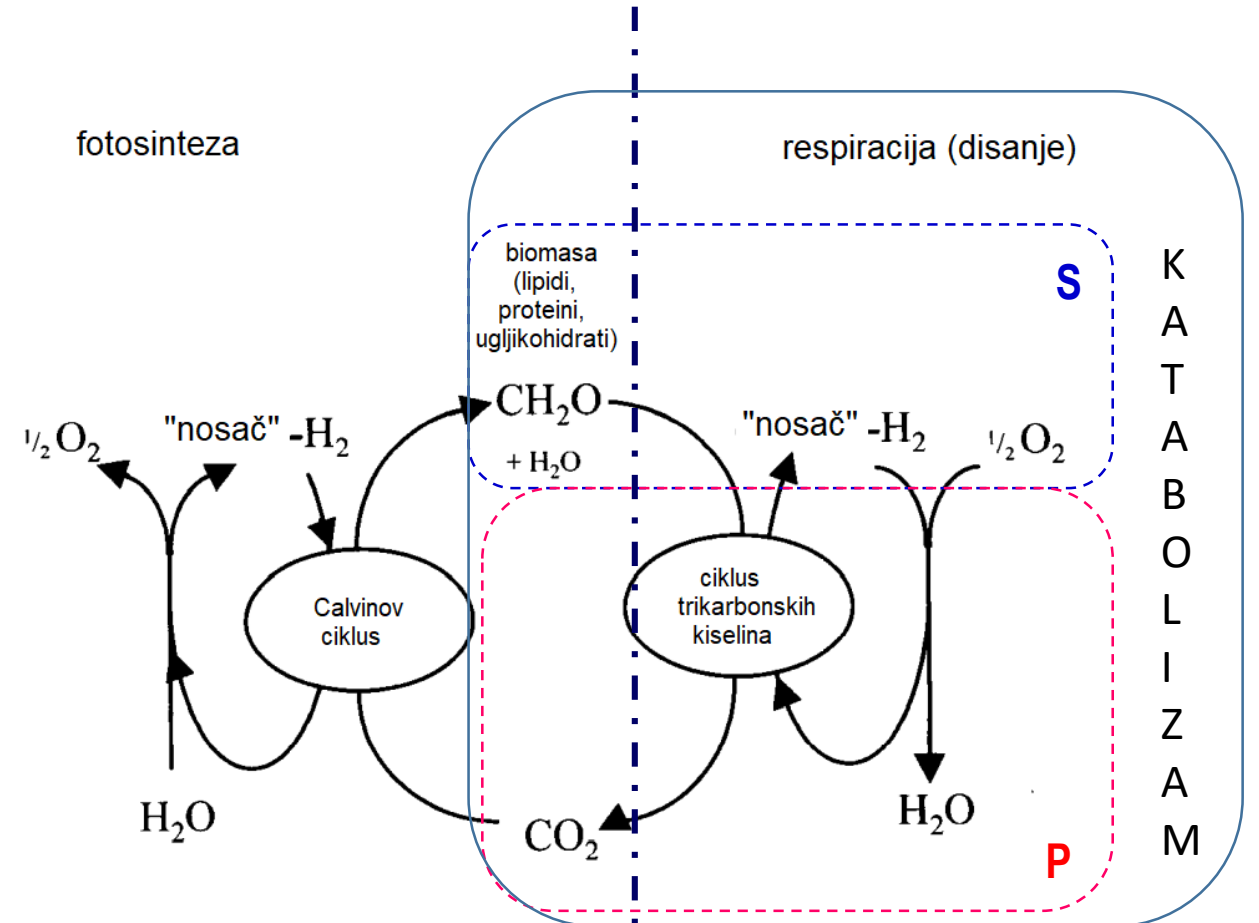
. **Anabolizam** ili biosinteza je proces kojim u živom organizmu složene biološke molekule nastaju iz jednostavnijih preteča (prekursora) uz utrošak energije.

. **Katabolizam** (lat. catabolismus: razlaganje, prema grč. καταβάλλειν: odbacivati) (disimilacija), skup procesa razgradnje tvari u okviru mijene tvari (metabolizma). Katabolit, supstancija koja je produkt katabolizma. Suprotno: anabolizam.

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (23)

. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. bioelectrochemical fuel cells)

. FOTOTROFI i KEMOORGANOTROFI



. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. bioelectrochemical fuel cells)

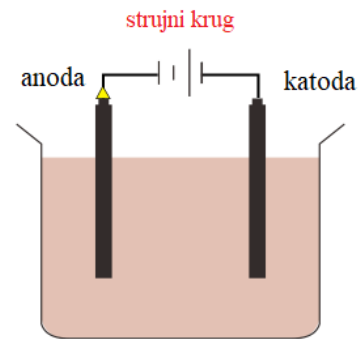
. mogu biti FOTOTROFI i HETEROTROFI

. (procjena) 200-300 Gt (10^9 t) ugljika se godišnje foto/heterotrofno konvertira, kvantitativno najizdašniji bioproces na Zemljinoj površini (Krieb, 1981)

. samo se oko 0.12% energije Sunca iskoristi i akumulira 170 Gt biomase, koja je formirana fotosintezom

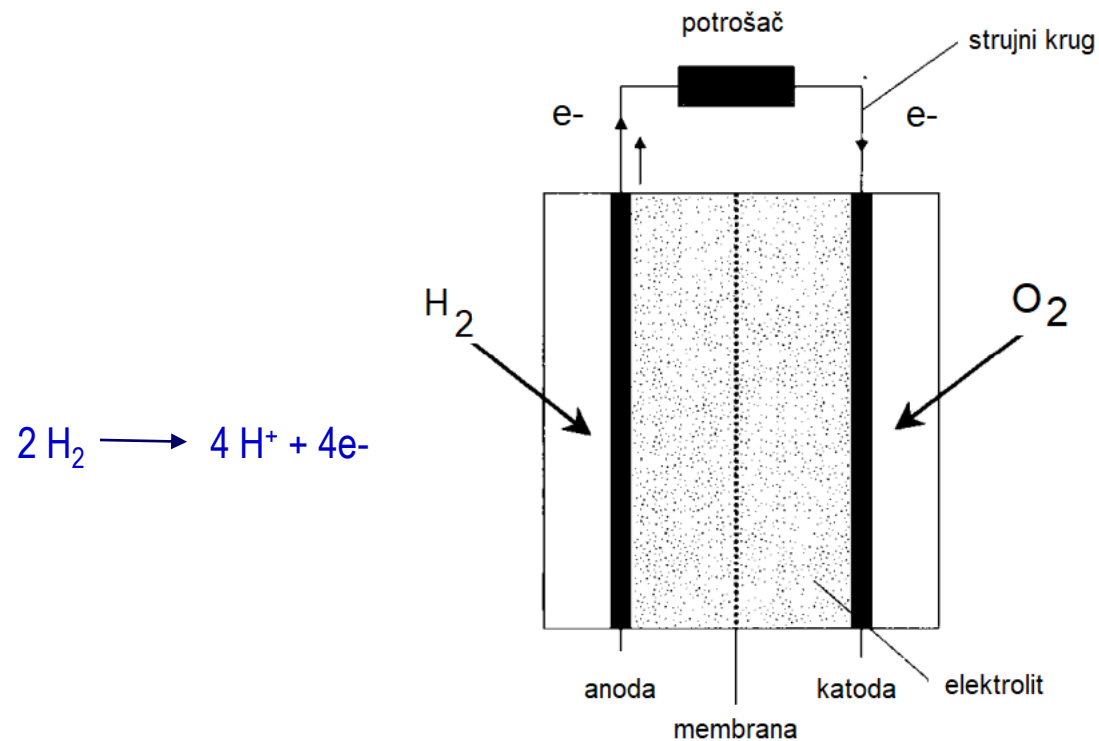
. energetska vrijednost ove biomase (170 Gt) iznosi 3000 Exa J ($3 \cdot 10^{21}$ J) ili **10 puta više energije** nego čovjek potroši tijekom jedne godine (Grathwohl, 1983)

- . stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. bioelectrochemical fuel cells)
 - . fuel cell - sustav / uređaj za konverziju kemijske energije u električnu energiju
 - . sastoji se od anode, katode, elektrolita (koji spaja dvije elektrode) i (vanjskog) strujnog kruga (kako bi se električna energija mogla koristiti)



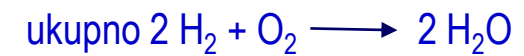
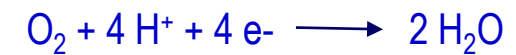
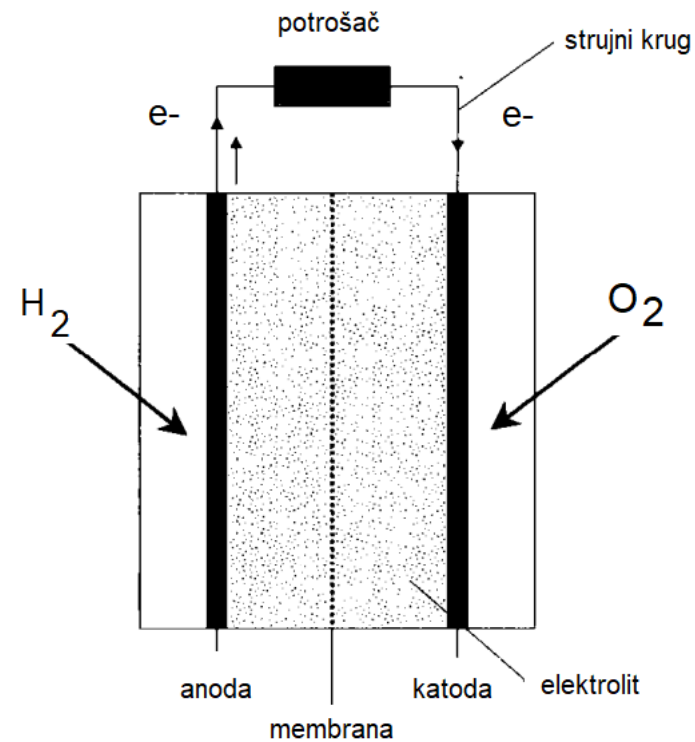
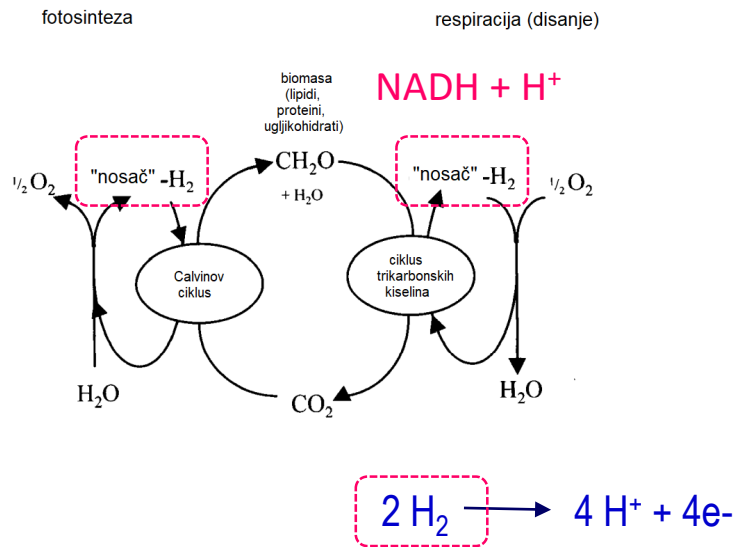
. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. bioelectrochemical fuel cells)

. **vodik-kisik fuel cell** - najjednostavnija fuel cell s vodikom kao najreaktivnijim gorivom u uporabi



molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (27)

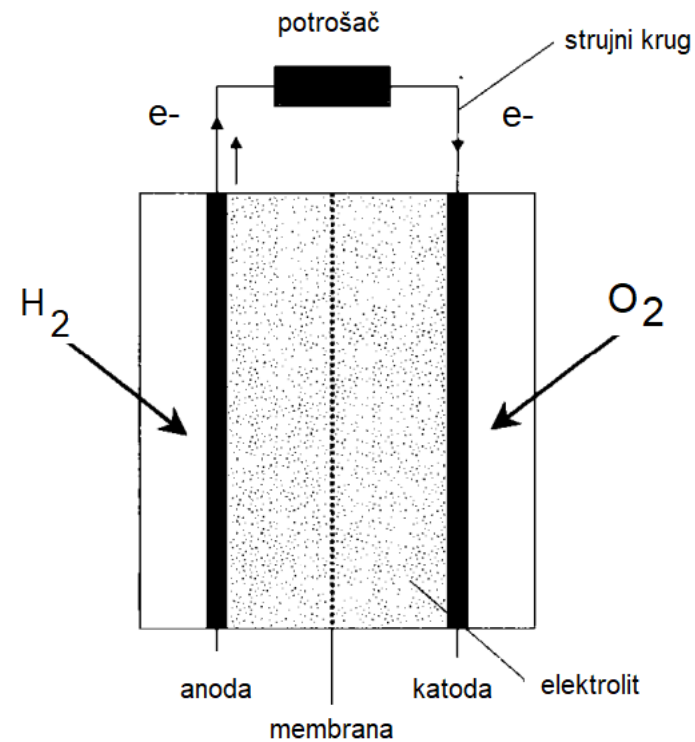
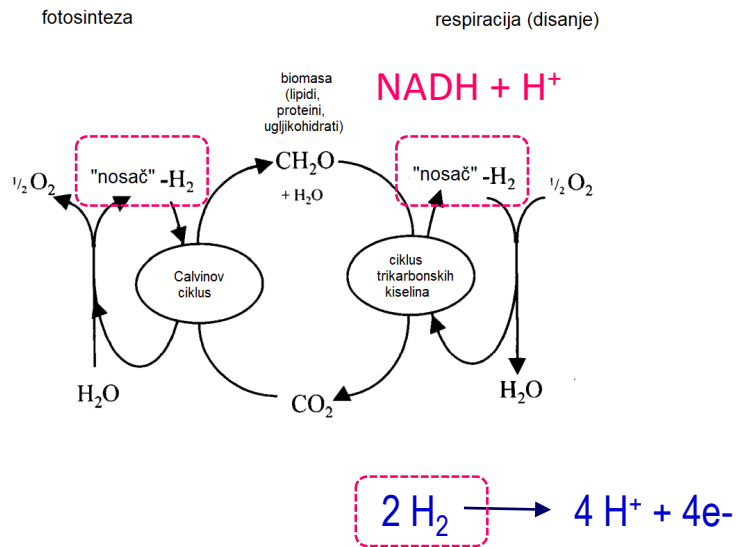
. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. **bioelectrochemical fuel cells**)



$$\Delta E^0 = 1.14 \text{ V}$$

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (28)

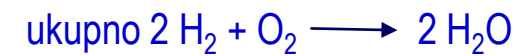
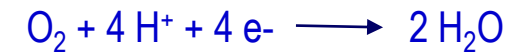
. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. **bioelectrochemical fuel cells**)



mitohondriji odraslog čovjeka u mirovanju

$$I = 80 - 100 \text{ A}$$

$$N = 100 \text{ W}$$



$$\Delta E^0 = 1.14 \text{ V}$$

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (29)

- . stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. **bioelectrochemical fuel cells**)
 - . indirektne bioelectrochemical fuel cells
 - . visokoenergetski spojevi s „puno elektrona” (ugljikohidrati, proteini, lipidi, ...) nisu elektro-aktivni tj. ne mogu se direktno oksidirati na elektrodi (kao npr. H_2)
 - . ali, ovi se visokoenergetski spojevi mogu biotehnološkim procesima razgraditi i tako se mogu proizvesti međuspojevi i/ili drugi (reducirani) spojevi (npr. $NADH + H^+$), koji se mogu oksidirati na elektrodi tj. koji su elektro-aktivni
 - . još: neki proizvodi biotehnoloških procesa, npr. C_2H_5OH , NH_4^+ , H_2S , H_2 i sl., su elektro-aktivni i mogu se oksidirati na elektrodi
 - . pri tome biotehnološki procesi, kao izvori visokoenergetskih spojeva - donora elektrona, ne moraju fizički biti u kontaktu (bioreaktor) s elektrodom tj. fuel cell
 - . važno: mikroorganizmi mogu konvertirati visokoenergetske spojeve u elektro-aktivne spojeve pri vrlo blagim uvjetima, mnogo blažim nego je to slučaj u tehničkim fuel cells

. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. **bioelectrochemical fuel cells**)

. indirektne bioelectrochemical fuel cells

. primjeri

konverzija uree u NH_4^+ s pomoću ureaze i oksidacija NH_4^+ (all in fuel cell; Brake i sur., 1963)

proizvodnja H_2 pomoću fotosintetskih bakterija i algi i oksidacija H_2 (bioreaktor + fuel cell; Berk i Canfield, 1964)

razgradnja „otpadne” vode iz proizvodnje etanola bakterijom *Clostridium butyricum* i proizvodnja H_2 u prokapsnom bioreктору s čvrstim slojem, proizvodnja električne energije jakosti 13-15 mA kroz 20 dana u vodik-kisik fuel cell (Suzuki i Karube, 1983)

- . stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. **bioelectrochemical fuel cells**)
 - . direktne bioelectrochemical fuel cells
 - . redukcijско-oksidacijske reakcije, koje kataliziraju stanice mikroorganizama ili specifični enzimi, odvijaju se u blizini anode
 - . oksidacija glukoze do glukonolaktone pomoću glukoza oksidaze i direktan prijenos elektrona na anodu (Rohrback i sur., 1962)
 - . oksidacija supstrata s pomoću različitih mikroorganizama - manja učinkovitost (Wingard i sur., 1982)
 - . primjena medijatora - respiratorni lanac

. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. **bioelectrochemical fuel cells**)

. primjena bioelectrochemical fuel cells u biosenzorima i bioelektronici

. **biosenzor** je uređaj za preuzimanje i mjerenje biosignala, uzrokovanih životnim procesima u živim bićima, pretvorbom neelektričnih bioloških veličina u električne signale.

Biosenzor u užem smislu mjerni je uređaj za selektivnu bioanalizu na temelju fizikalno-kemijskih promjena nastalih specifičnim biokemijskim reakcijama.

. **bioelektronika** je znanstvena disciplina koja se bavi prijenosom elektrona u živim sustavima / organizmima.

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (33)

. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. **bioelectrochemical fuel cells**)

. primjena bioelectrochemical fuel cells u biosenzorima i bioelektronici

Substrate	Biocatalyst
Organic waste	algae, fecal bacteria
Humus, sugar waste, wastewater	microbial consortia
Urea	<i>Bacillus pasteurii</i>
Complex organic medium	various bacteria
Glucose	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Glucose	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Dextrose	yeast
Sucrose	<i>Proteus vulgaris</i>
Lactate	<i>Shewanella putrifaciens</i>
Maltose, glucose, succinate	various bacteria
Lactose wastes	<i>Escherichia coli</i>
Hydrogen	<i>Clostridium butyricum</i>
(from fermentation processes)	
Hydrogen	<i>Enterobacter aerogenes</i>
(from fermentation processes)	
Cellulosic wastes	<i>Bacillus</i> sp.
C ₁ -Compounds	methanol- and formate- dehydrogenase
Amino acids, ethanol	amino acid oxidase, alcohol dehydrogenase
Ethanol	alcohol dehydrogenase
Various	NAD(P) ⁺ -dependent dehydrogenases
Light	marine algae and <i>Rhodospirillum rubrum</i>
Light	<i>Anabaena variabilis</i>
Light	<i>Synechococcus</i> sp.
Light	<i>Anabaena variabilis</i>

Biocatalyst	Measurement Parameter
<i>Clostridium butyricum</i>	biological oxygen demand
<i>Pseudomonas ovalis</i>	glucose
<i>Clostridium butyricum</i>	formic acid
Methanol dehydrogenase	methanol
<i>Escherichia coli</i>	glucose
<i>Escherichia coli</i>	lactose
Alcohol dehydrogenase	primary alcohols
<i>Anabaena variabilis</i>	CO ₂
<i>Lactobacillus fermenti</i>	vitamin B ₁
<i>Proteus vulgaris</i>	glucose
<i>Hansenula anomala</i>	lactate
<i>Methylomonas methylovora</i>	ethanol, methanol
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	cell number
<i>Pseudomonas</i> sp.	methanol, ethanol
Various	cell number
<i>Synechococcus</i> sp.	herbicides
<i>Escherichia coli</i>	toxicity testing
Sewage sludge	metabolic activity during wastewater treatment

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (34)

. stanice (mikro)organizama - proizvođači energije (eng. **bioelectrochemical fuel cells**)

. Chen et al., Nature Materials, 2022 (za one koji žele više naučiti, znati, istraživati, ...)

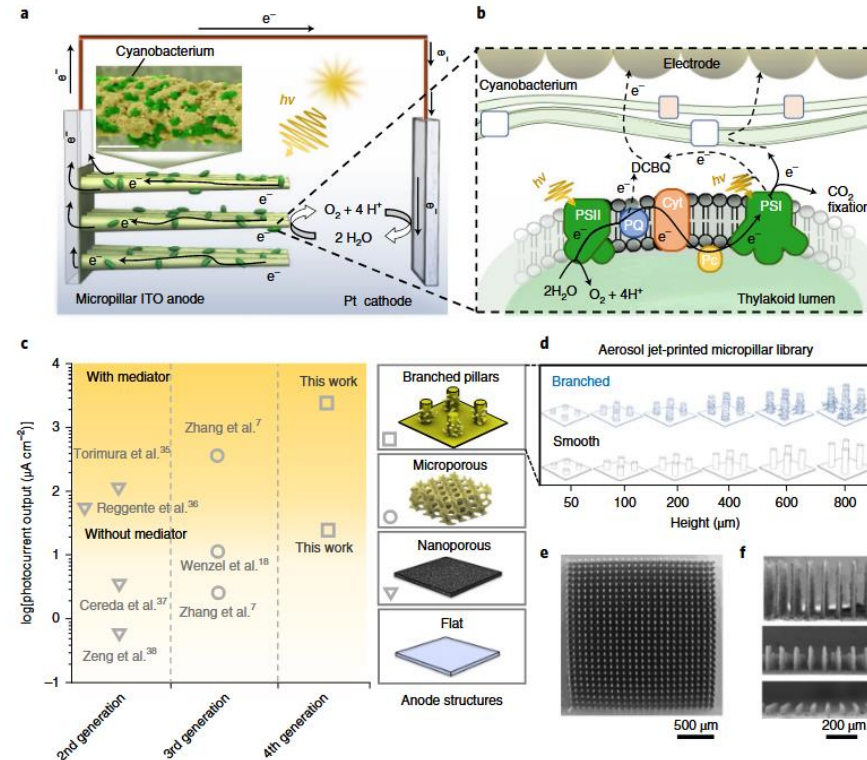


Fig. 1 | Next-generation electrodes for biophotoelectrochemistry. **a**, Schematic of a biophotoelectrochemical cell performing biological solar electricity generation using photosynthetic biofilms as photocatalysts. Electron flux originating from photosynthetic water oxidation is collected at the anode and transferred to a cathode, which reduces oxygen back to H_2O .

- . medicinska biotehnologija - primjena kultura biljnih i životinjskih stanica, tkiva, organoida, ...
 - . **stanična kultura** (kultura stanica), uzgoj živih stanica izvan organizma, u odgovarajućoj hranjivoj podlozi radi istraživanja i dobivanja biotehnoloških proizvoda.
 - . **kultura životinjskih stanica** podrazumijeva uzgoj stanica izoliranih iz različitih tkiva životinja i ljudi. Stanične kulture pripravljene iz tkiva ili organa uzetih neposredno iz organizma nazivaju se **primarnim kulturama**, koje se supkultiviranjem i postupcima imortalizacije mogu prevesti u **staničnu liniju**, u kojoj se stanice pri odgovarajućim uvjetima mogu beskonačno umnožavati.
 - . proizvodi: glikozilirani proteini (monoklonska protutijela, hormoni, imunomodulatori, krvni proteini, faktori rasta), virusna cjepiva, te stanice kao proizvodi koji se dalje primjenjuju za biomedicinska istraživanja, dijagnostičke, preparativne i terapijske svrhe (genska terapija, regenerativna medicina - tkivno inženjerstvo).

. medicinska biotehnologija - primjena kultura biljnih i životinjskih stanica, tkiva, organoida, ...

. **kultura biljnih stanica i tkiva** je aseptičan *in vitro* uzgoj svih dijelova biljke, bilo da je riječ o protoplastu, jednoj stanici, tkivu, organu ili cijeloj biljci.

. uzgoj biljne kulture pod određenim uvjetima može rezultirati umnažanjem stanica, regeneracijom pojedinih organa ili cijele biljke. Razvoj kulture biljnih stanica temelji se na **totipotentnosti** diferenciranih stanica, tj. sposobnosti da se specijalizirane biljne stanice, bez obzira na svoju zrelost, mogu razviti u cijelu biljku.

. proizvodi: berberin, paklitaksel, ginseng, biljni polisaharidi te rekombinantni proteini.

- . medicinska biotehnologija - primjena kultura biljnih i životinjskih stanica, tkiva, organoida, ...
 - . održavanje staničnih linija i formiranje banke
 - . očuvanje staničnih linija
 - . kontrola kvalitete
 - . sigurnost i regulatorne odrednice

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (38)

. medicinska biotehnologija - primjena kultura biljnih i životinjskih stanica, tkiva, organoida, ...

. culture collections

Country	Acronym	Animal Cells	Plant Cells	Internet Site
Bulgaria	NBIMCC	+	-	
France	CNCM	+	-	
Germany	DSMZ	+	+	http://www.dsmz.de
Italy	ICLC	+	-	http://www.biotech.ist.unige.it/interlab/iclc/
Japan	Riken Gene Bank	+	+	http://rtcs.riken.go.jp
Russia	RCCC	+	+	
Turkey	HÜKÜK	+	-	http://www.ahis.gov.tr
United Kingdom	ECACC	+	-	http://www.camr.org.uk/ecacc.htm
United States of America	ATCC	+	-	http://www.atcc.org

. ekstremofilni biokatalizatori

. iz različitih staništa s tzv. (nama) ekstremnim uvjetima mogu se izolirati mikroorganizmi (biokatalizatori) s izuzetno vrijednom primjenom u biotehnološkoj proizvodnji

. **staništa s temperaturom ledišta vode** (psihrofili i psihrotolerantni: bakterije, kvasci, jednostanične alge, fungi)

Ledište je temperatura pri kojoj neka tvar prelazi iz tekućega u čvrsto agregatno stanje. Ovisi o tlaku, ali se u tablicama za pojedine tvari obično navode vrijednosti ledišta kod normalnoga tlaka (101 325 Pa). Pod većim tlakom ledište se snižava, a pod manjim povišuje.

. staništa: mora Arktika i Antarktika, morske dubine, glečeri, planinska područja, tlo

. primjena cjelovitih stanica ili njihovih dijelova (membrane, polisaharidi, enzimi,...)

. enzimi koji imaju optimalnu aktivnost pri ovim temperaturama, npr. alkohol dehidrogenaza, citrat sintaza,

neke proteaze, trioza fosfat izomeraze,...brzo gube aktivnost primjenom povišene temperature kroz vrlo kratko vrijeme

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (40)

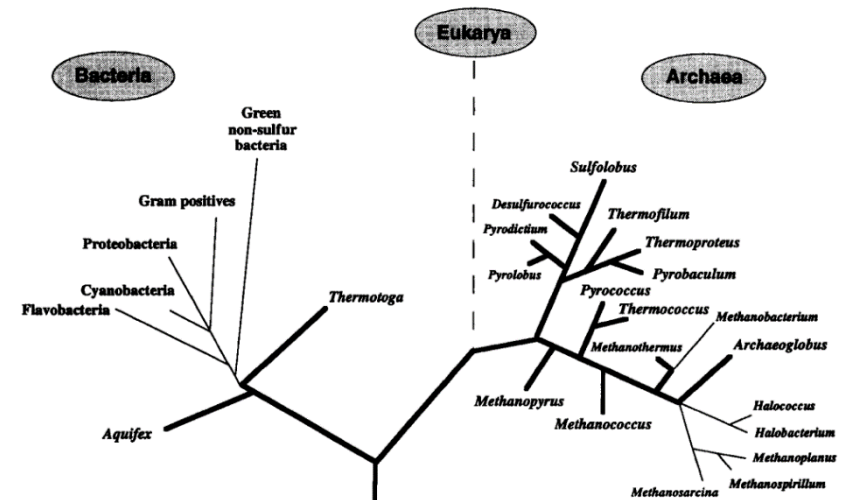
. ekstremofilni biokatalizatori

. iz različitih staništa s tzv. (nama) ekstremnim uvjetima mogu se izolirati mikroorganizmi (biokatalizatori) s izuzetno vrijednom primjenom u biotehnološkoj proizvodnji

. **staništa s temperaturom vrelišta vode** [(hiper)termofili: prokarioti i eukarioti]

Vrelište je temperatura na kojoj istodobno u cijelom volumenu tvar prelazi iz tekućega u plinovito agregatno stanje, tj. najviša temperatura na koju se pri određenom tlaku može zagrijati tekućina. S povećanjem tlaka vrelište se povećava, a sa smanjenjem smanjuje; obično se navodi vrijednost pri normiranom atmosferskom tlaku (101 325 Pa).

. staništa: vulkani, geotermalni izvori, mora i tlo



. ekstremofilni biokatalizatori

. iz različitih staništa s tzv. (nama) ekstremnim uvjetima mogu se izolirati mikroorganizmi (biokatalizatori) s izuzetno vrijednom primjenom u biotehnološkoj proizvodnji

. **staništa s niskim/visokim pH vrijednostima** (acidofili / alkalofili)

. staništa: jezera, mora, tlo

. detergents

. ekstremofilni biokatalizatori

. iz različitih staništa s tzv. (nama) ekstremnim uvjetima mogu se izolirati mikroorganizmi (biokatalizatori) s izuzetno vrijednom primjenom u biotehnološkoj proizvodnji

. **halofilni mikroorganizmi**

. koncentracija NaCl > 0,6 mol L⁻¹ (~ 2 mol L⁻¹)

. staništa: slana jezera, mora i tlo

- . ekstremofilni biokatalizatori

- . iz različitih staništa s tzv. (nama) ekstremnim uvjetima mogu se izolirati mikroorganizmi (biokatalizatori) s izuzetno vrijednom primjenom u biotehnološkoj proizvodnji

- . kako ih izolirati?

- . kako ih uzgojiti?

- . kako ih primijeniti u biotehnološkoj proizvodnji?

- . primjenjeni ekstremofilni biokatalizatori: termostabilne amilaze i glukoamilaze (razgradnja škroba i škrobnih sirovina)

- termostabilne α -glukozidaze

- termostabilne pululanaze

- celulaze, ksilanaze, enzimi za razgradnju hitina, proteaze

- enzimi koji iskazuju aktivnost prema DNA (PCR, sekvenciranje, ...)

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (44)

- . cijanobakterije i (mikro)alge
 - . alge su izuzetno velika i heterogena grupa (mikro)organizama, koji se razlikuju po morfologiji, fiziologiji i staništu, a provode fotosintezu
 - . makroalge (deseci metara duljine) i mikroalge (μm)
 - . mikroalge - fotosintetske prokariotske cijanobakterije
 - . **crvene**, plave, **zelene - cijanobakterije**, smeđe
 - . staništa: priobalna i morska područja
 - . visok $Y_{x/s}$ i Pr (Richmond, 1986)
 - . hrana: mikroalga *Spirulina (Arthrospira)* i makroalga *Porphyra* (Nori)

- . cijanobakterije i (mikro)alge

- . mikroalge pripadaju među najstarije i najvarijabilnije grupe mikroorganizama na Zemlji, nastavaju skoro sva poznata staništa

- najvažniji potrošači CO₂

- najvažniji proizvođači O₂

- početna karika hranidbenog lanca u oceanima

- najvažniji primarni proizvođači

- . različite vrste prilagodile rast i aktivnost u širokim rasponima temperature, intenziteta svjetlosti (fotosinteza) i pH vrijednosti

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (46)

. cijanobakterije i (mikro)alge – proizvodi (Pulz i Scheibenbogen, 1998)

	Product	US\$ kg ⁻¹
Biomass	health food	15–28
	functional food	25–52
	feed additive	10–130
	aquaculture	50–150
	soil conditioners	> 10
Coloring substances	astaxanthin	> 3,000
	phycocyanin	> 500
	phycoerythrin	> 10,000
Antioxidants	β -carotene	> 750
	superoxide dismutase	> 1,000
	tocopherol	30–40
	AO-extracts	20–35
PUFA	ARA	
	EPA	
	DHA	
	PUFA extracts	30–80
Special products	toxins	
	isotopes	

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (47)

. cijanobakterije i (mikro)alge - usporedba uvjeta u staništima i fotobioreaktorima

	Dimension	Nature	Photobioreactor
Cell density	cells m L ⁻¹	10 ³	10 ⁸
Cell distance	μm	1,350	50
Cell distance	n cell diameter	250	10
Displacement	m s ⁻¹	10 ⁻⁴	0.3–1.5
Light	μE · m ⁻² s ⁻¹	10–300	10–1,800
Light fluctuations		diurnal	ultrashort
Shear stress		low	high
Mineral supply		limited	surplus
CO ₂ supply		limited	surplus
O ₂ concentration	mg L ⁻¹	7–9	10–45
pH value		stable	variable
Temperature		stable	variable

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (48)

- . cijanobakterije i (mikro)alge – fotobioreaktori
 - . prirodni / otvoreni (jezera; Myanmar, *Spirulina*)
 - . poluzatvoreni i zatvoreni vanjski
 - . cijevni
 - . pločasti



(intenzitet svijetla; dostupnost i topljivost supstrata i proizvoda, npr. CO₂; nakupljanje algi; homogenost suspenzije...)

- . cijanobakterije i (mikro)alge - proizvodi i primjena u skoroj budućnosti
 - . biomasa (hrana za ljude i životinje, akvakultura, biofertilizatori)
 - . visokovrijedni spojevi (polinezasićene masne kiseline, polisaharidi, antioksidansi, boje, toksini i drugi spojevi koji imaju biološku aktivnost, stabilni izotopi)
 - . ekološka primjena (proizvodnja ribe, *life support systems*, sorpcija i akumulacija teških metala)

. „anorganska” biotehnologija - biotehnologija ugljena

- . ugljen je najprisutniji fosilni izvor energije formiran iz biljne biomase, načinjen od C, H, O (S i N)
- . korištenje ugljenakao izvora energije u industrijskoj proizvodnji ima izuzetno negativan učinak na prirodu
- . kao izvor ugljika i energije ugljen mogu koristiti
 - neke bakterije (*Pseudomonas fluorescens*)
 - fungi (*Coprinus sclerotigenis*)
- . u depolimerizaciji ugljena i njegovoj pripremi za primjenu u biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji koriste se i različiti enzimi
- . uklanjanje anorganskog i organskog sumpora iz ugljena

. izluživanje metala

- . otpuštanje metala iz njihova mineralnog izvora s pomoću odgovarajućih mikroorganizama (Atlas i Bartha, 1997)
- . biooksidacija (Hansford i Miller, 1983)
- . bioizluživanje - konverzija metala u njihovu topljivu formu s pomoću mikroorganizama

- . Gaius Plinius Secundus (23-79), Georgius Agricola (1494-1555) - izluživanje bakra
- . mikrobiološka oksidacija reduciranog sumpora u sumpornu kiselinu (Winogradsky, 1887)
- . mikrobiološka oksidacija cinkovog sulfida u cinkov sulfat (Rudolfs i Helbronner, 1922)

. izluživanje metala

. mehanizmi (Furrer i Stumm, 1986)

(1) formiranje (an)organskih kiselina (protona) (npr. H_2SO_4 , *Thiobacillus* sp.)

(2) oksido-redukcijske reakcije

(3) formiranje i sekrecija kompleksa s metalnim ionima (npr. oksalati, malonati, kelati)

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (53)

. izluživanje metala

. primjeri

Country	Locality, Designation	Metal	Mineral Source	Technology	Capacity [t d ⁻¹]	Metal Yield [t y ⁻¹]
Australia	Harbour Lights	Au	flotation concentrate	tank leaching (160 m ³)	40	
	Girilambone	Cu	chalcocite	heap leaching	16,000	14,000
	Gunpowder	Cu	chalcocite, bornite	<i>in situ</i> leaching		13,000
	Maggie Hays	Ni	concentrate	tank leaching (pilot plant)		7
	Wiluna	Au	flotation concentrate	tank leaching (480 m ³)	115	
	Youanmi	Au	flotation concentrate	tank leaching (6·480 m ³)	120	
Brasil	Sao Bento	Au	flotation concentrate	tank leaching (550 m ³)	150	
Canada	Goldbridge	Au	pyrite, markasite, arsenopyrite	tank leaching (225 m ³)	75	
Chile	Andacollo	Cu	chalcocite	heap leaching	10,000	
	Cerro Colorado	Cu	chalcocite	heap leaching	16,000	60,000
	Dos Amigos	Cu	chalcocite	heap leaching	3,000	
	Quebrada Blanca	Cu	chalcocite	heap leaching	17,300	75,000
	Zaldivar	Cu	chalcocite	heap leaching	20,000	
Ghana	Ashanti	Au	flotation concentrate	tank leaching (6·900 m ³)	960	
India	Malanjkhand	Cu	malachite, chalcocite, bornite, covellite	heap leaching	2.5	
Peru	Tamborque	Au, Ag	arsenopyrite from zinc flotation	tank leaching (pilot plant 1 m ³)		
South Africa	Fairview	Au	flotation concentrate	tank leaching (90 m ³)	35	
Uganda	Kasese	Co	flotation concentrate	tank leaching (4·1,350 m ³)		1,000
USA	Carlin	Au	Au-containing sulfidic ore	heap leaching	10,000	
	Chino	Cu	chalcocite, chrysokolla	heap leaching		55,000
	San Manuel	Cu	chalcocite	<i>in situ</i> leaching		20,000

- . vitamini i srodni spojevi

- . vitamini su organski spojevi koji su u malim količinama nužni za normalno funkcioniranje ljudskog i životinjskog organizma. Naziv je uveo poljski biokemičar Casimir Funk (1884–1967), koji je 1911. sintetizirao tiamin; smatrajući ga vitalno važnim aminom, nazvao ga je vitaminom. Iako se poslije ustanovilo da mnogi vitamini nisu amini, taj se naziv zadržao do danas.

- . većina vitamina je neophodna za odvijanje metabolizma u stanicama, sisavci ih ne mogu sintetizirati, ali ih sintetiziraju biljke i mikroorganizmi.

- . brojni koenzimi se sintetiziraju iz vitamina

- . koenzimi ili prostetske grupe su spojevi niske molekulske mase, koji se vežu na apoenzime i tako se postiže aktivna forma enzima;

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (55)

. vitamini i srodni spojevi

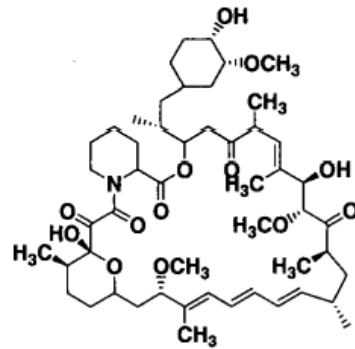
Compound	Production Method			Use
	Biotechno- logical	Chem- ical	Extrac- tion	
Thiamin (B ₁)		+		food, pharmaceutical
Riboflavin (B ₂)	+			feed, pharmaceutical
FAD	+	+		pharmaceutical
Nicotinic acid, nicotinamide	+	+		feed, food, pharmaceutical
NAD, NADP	+			technical
Pantothenic acid	+ ^c	+		feed, food, pharmaceutical
Coenzyme A	+			technical, nutraceutical
Pyridoxine (B ₆)		+		feed, food, pharmaceutical
Biotin	(+) ^d	+		feed, pharmaceutical
Folic acid		+		feed, food, pharmaceutical
Vitamin B ₁₂	+			feed, food, pharmaceutical
Vitamin C	+ ^c			feed, food, pharmaceutical
ATP	+			pharmaceutical, technical
S-Adenosyl- methionine	+			pharmaceutical, nutraceutical
Lipoic acid		+		pharmaceutical
Pyrroloquinoline quinone	+	+		technical
Vitamin A		+		feed, food, pharmaceutical
β-Carotene	+		+	feed, food
Ergosterol	+			feed, food
Vitamin D ₃		+	+	feed, food
α-Tocopherol (E)	(+) ^d	+	+	feed, food, pharmaceutical, nutraceutical
PUFAs ^e	+		+	feed, food, pharmaceutical, nutraceutical
Phylloquinone (K ₁)		+		pharmaceutical
Menaquinone (K ₂)		+		pharmaceutical
Ubiquinone-10	+			feed, food, pharmaceutical

^a Values were taken from FLORENT (1986).

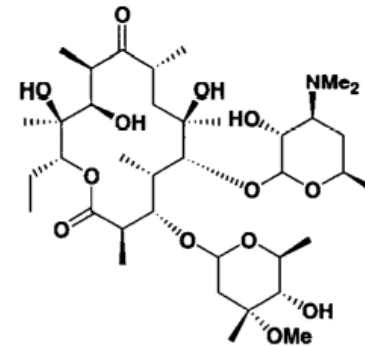
^b Values were taken from EGGERSDORFER et al. (1996).

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (56)

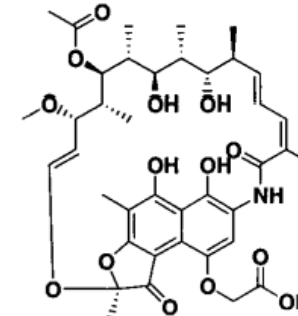
. poliketidi - sekundarni metaboliti raznovrsne strukture i funkcije



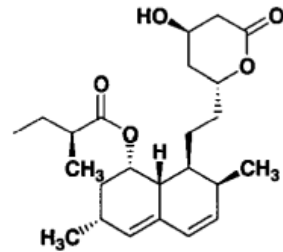
rapamycin
(immunosuppressant)



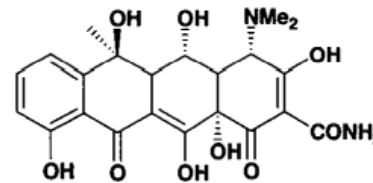
erythromycin A
(antibacterial)



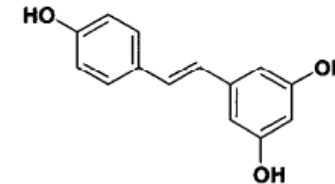
rifamycin B
(antituberculosis)



lovastatin
(anticholesterol)



oxytetracycline
(antibacterial)



resveratrol
(antioxidant)

- . terpenoidi i drugi mirisni spojevi
 - . terpenoidi su derivati terpenskih ugljikovodika
 - . pojačivači okusa i mirisni spojevi
 - . terpenoidi se biotehnološki proizvode (Luckner, 1990) i tako proizvedeni nazivaju „prirodnim”
 - . fungi mogu *de novo* sintetizirati terpenoide, a brojne vrste bakterija pregraditi / razgraditi ove spojeve
- . cedrol, geraniol, mentol, kamfor, pačuolol, pinen, ...

. polimeri i ko-polimeri

. mliječna kiseina (PLA)

. 1,3-propandiol

. sukcinat

. adipat (nylon)

. polihidroksialkanoati (PHA) - *Alcaligenes latus*, *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas oleovorans*, ..., transgene biljke (*Zea mays*, *Nicotiana tabacum*)

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (59)

- . biotehnologija mora
 - . primjena morskih (mikro)organizama i/ili njihovih dijelova u kontroliranim uvjetima u cilju proizvodnje različitih proizvoda i usluga (Attaway i Zaborski, 1993)
 - . više od 70% površine Zemlje pripada morima i oceanima - najrasprostranjenije stanište
- . glavni fokus biotehnologije mora (Zaborsky, 1999) zapravo obuhvaća svaki aspekt našega načina života:
 - . prirodni proizvodi morskih (mikro)organizama s primjenom u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, industriji biopolimera i drugih materijala
 - . bioremedijacija morskim (mikro)organizmima
 - . proizvodnja energije
 - . akvakultura

. biotehnologija mora

- . bioraznolikost - mora i oceani pripadaju najraznovrsnijem dijelu biosfere (od mikroorganizama do sisavaca)
- . uvjeti: temperatura (-20°C do 350°C), tlak (1-1000 atm), koncentracija supstrata (i O₂, izuzetno raznolika), intenzitet svjetla
- . (mikroo)organizmi obitavaju u različitim zajednicama - proizvodnja sekundarnih metabolita
- . moderne potentene (analitičke) metode potrebne za identifikaciju potencijalnih biokatalizatora

- . biotehnologija mora
 - . morski mikroorganizmi (bakterije, fungi, protisti) – planktonski, komenzalni, simbiotski (Lindequist i sur., 1999)
 - . morske biljke (primarno alge)
 - . morske životinje (spužve, mekušci, ribe, školjkaši, ...)
- . postupak istraživanja i primjene u biotehnološkoj proizvodnji
 - . prikupljanje i identifikacija morskih (mikro)organizama
 - . ekstrakcija spojeva / proizvoda od interesa
 - . *screening*
 - . izolacija i identifikacija (i proizvodnja) prepoznatih spojeva

- . biotehnologija mora

- . uzgoj morskih (mikro)organizama - specifične hranjive podloge (npr. NaCl, Na⁺) i parametri uzgoja (pH, temperatura, p , $h\nu$, združene / mješovite kulture, ...)
- . specifični bioprocesi
- . izolacija i pročišćavanje proizvoda

. biotehnologija mora

- . proizvodi:
 - farmaceutici: citostatski / antitumorski spojevi (halomon, dolastatin, ...)
 - antiinflamatorni spojevi (pseudopterozini)
 - antimikrobni spojevi
 - drugi biološki aktivni spojevi (toksini, neuroekscitatori)
 - nadomjesci kostiju (skeleton koralja i grebenastih algi)
 - enzimi (većina terestrijalnim mezofilnih enzima može se zamijeniti *cold-adapted marine* enzimima)
 - nutraceutici
 - biomasa
 - dodaci prehrambenim proizvodima (PUFA, vitamini, pigmenti, ...)
 - biopolimeri (polisaharidi, alginati, ...)
 - ...

. biotehnologija mora

- . proizvodnja H₂
- . obnovljivi izvor energije, pri korištenju se ne proizvodi CO₂
- . proizvod metabolizma nekih fotosintetskih morskih (mikro)organizama (Nandi i Sengupta, 1998) – cijanobakterije i alge

- . fototrofna bakterija *Rhodobacter shaeroides* RV (Tsi-Gankov i sur., 1993) - proizvodi CO₂:



. biotehnologija svemira

- . na sve procese koji se događaju na Zemlji utječe gravitacijska sila
- . gravitacija se može moderirati u cilju istraživanja bioprocasa od interesa pri različitoj sili gravitacije (Kordyum, 1997)

simulirana „mikrogravitacija (brza rotacija, 50-120 rpm)

promijenjena gravitacija (usljed djelovanja centrifugalne sile)

stvarna „mikrogravitacija” (putovanje u svemir)

. biotehnologija svemira

. kako mikrogravitacija (μg) utječe na neke industrijski važne (mikro)organizme

Escherichia coli - bez mutacija i gubitka plazmida (Menningmann i Heise, 1995)

Bacillus subtilis - bez mutacija (Menningmann i Heise, 1995)

Saccharomyces cerevisiae - izmijenjena respiracija (Donhauser i sur., 1995)

Pimpinella anisum (anis) - izmijenjena diferencijacija stanice (Theimer i sur., 1986)

...

divlja mrkva, zob, suncokret - abnormalnosti kromosoma (delecije, translokacije; Krikorian i sur., 1996)

...

transport iona (Ca^{2+}) kroz fosfolipidni dvosloj (citoplazmatsku membranu) stanica (Häder, 1999)

primanje i provođenje signala u stanicama biljaka (kako pozicionirati korijen i pohraniti zalihe škroba?)



molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (67)

. biotehnologija svemira

. egzobiologija i radijacijska biologija

egzobiologija (astrobiologija, kozmobiologija, ksenobiologija) je grana biologije koja se bavi istraživanjem mogućnosti postojanja života na drugim nebeskim tijelima.

Pojam je skovao američki genetičar Joshua Lederberg. S područja spekulacije egzobiologija je, slanjem svemirskih brodova na Mjesec i automatskih svemirskih sonde na Mars i Veneru, zakoračila u fazu egzaktnog istraživanja. Egzobiologija nastoji odgovoriti postoje li bilo kakvi oblici izvanzemaljskoga života i postoje li izvanzemaljska razumna bića. S obzirom na planete Sunčeva sustava, odgovor je na drugo pitanje, zasada, negativan, a dobri su izgledi da se dobije odgovor na prvo pitanje, zbog automatskih svemirskih sonde u koje su ugrađeni aparati za biološku analizu uzoraka tla. Ne traga se samo za organizmima, već i za organskim molekulama, tzv. prebiološkim molekulama, koje bi, ako se nađu, upozoravale na kemijske procese koji bi mogli dovesti do pojave života. Poznato je da takve molekule postoje čak i izvan Sunčeva sustava. Godine 1969. kraj Melbournea, u Australiji, pao je meteorit na kojem su nađeni tragovi 18 različitih aminokiselina, od kojih je 12 bilo nepoznato na Zemlji.

- . biotehnologija svemira

- . egzobiologija i radijacijska biologija

radiobiologija je grana biofizike koja proučava djelovanje različitih vrsta zračenja na žive sustave, od subcelularne i celularne razine sve do cijelog organizma ili populacije.

- . utjecaj radijacije na spore bakterije *Bacillus subtilis* imobilizirane na polimernu membranu (Horneck i sur., 1996) tijekom misije

. industrijska proizvodnja enzima

. **enzimi** (en- + grč. ζύμη: kvasac) (u starijoj literaturi fermenti), biološki katalizatori, tvari koje enormno ubrzavaju biokemijske procese u živim organizmima.

Enzimi su proizvodi žive stanice, a po kemijskoj su naravi bjelančevine, iako među njima ima i katalitičkih ribonukleinskih kiselina (ribozimi).

enzimi. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Pristupljeno 11. 12. 2022. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=18053>>

. industrijska proizvodnja enzima

. prema tipu reakcija koje kataliziraju, enzimi se svrstavaju u šest skupina:

oksidoreduktaze (reakcije oksidacije i redukcije),

transferaze (prijenos skupina),

hidrolaze (hidrolitičke reakcije) - **75% proizvedenih enzima**,

liaze (eliminacija skupina uz nastanak dvostruke veze),

izomeraze (reakcije izomerizacije) i

ligaze (reakcije formiranja kovalentne veze uz istodobnu hidrolizu adenozin-trifosfata).

Unutar svake skupine enzimi se dijele po decimalnoj enzimskoj klasifikaciji u tri dodatne razine (EC).

. industrijska proizvodnja enzima

. primjena enzima i drugih biokatalizatora gotovo je u cjelosti zamijenila sve kemijske procese i postupke, zbog:

brzine reakcija, koje kataliziraju

ekonomskog učinka

utjecaja na okoliš.

. industrijska proizvodnja enzima

. velike tvrtke proizvođači enzima: Novozymes, Dupont, DSM, Roche

. (mikro)organizmi proizvođači enzima:

fungi (60%)

bakterije (24%)

kvasci (4%)

biljne i životinjske stanice (12%)

. industrijska proizvodnja enzima

. velike tvrtke proizvođači enzima: Novozymes, Dupont, DSM, Roche

. (mikro)organizmi proizvođači enzima:

fungi (60%)

bakterije (24%)

kvasci (4%)

biljne i životinjske stanice (12%)

eksponencijalni rast mikroorganizama proizvođača,
jeftine hranjive podloge,
jednostavna optimizacija bioprocasa i poboljšanja vrsta/sojeva;
visoki prinosi i aktivnost enzima,
visoka ponovljivost bioprocasa,
ekonomska isplativost

- . industrijska proizvodnja enzima

- . 90% enzima u uporabi je *engineered* - dizajnirano i optimirano koristeći se znanstvenim principima
- . poboljšani *downstream processing* (izolacija i pročišćavanje) i imobilizacija enzima u cilju unaprjeđenja njihove:
 - čistoće
 - stabilnosti
 - ponovnog korištenja
- . izolacija i karakterizacija „novih” enzima, *in silico* analiza

. industrijska proizvodnja enzima

. **metagenomika**

Metagenomics is the study of the structure and function of entire nucleotide sequences isolated and analyzed from all the organisms (typically microbes) in a bulk sample.

Metagenomics is often used to study a specific community of microorganisms, such as those residing on human skin, in the soil or in a water sample.

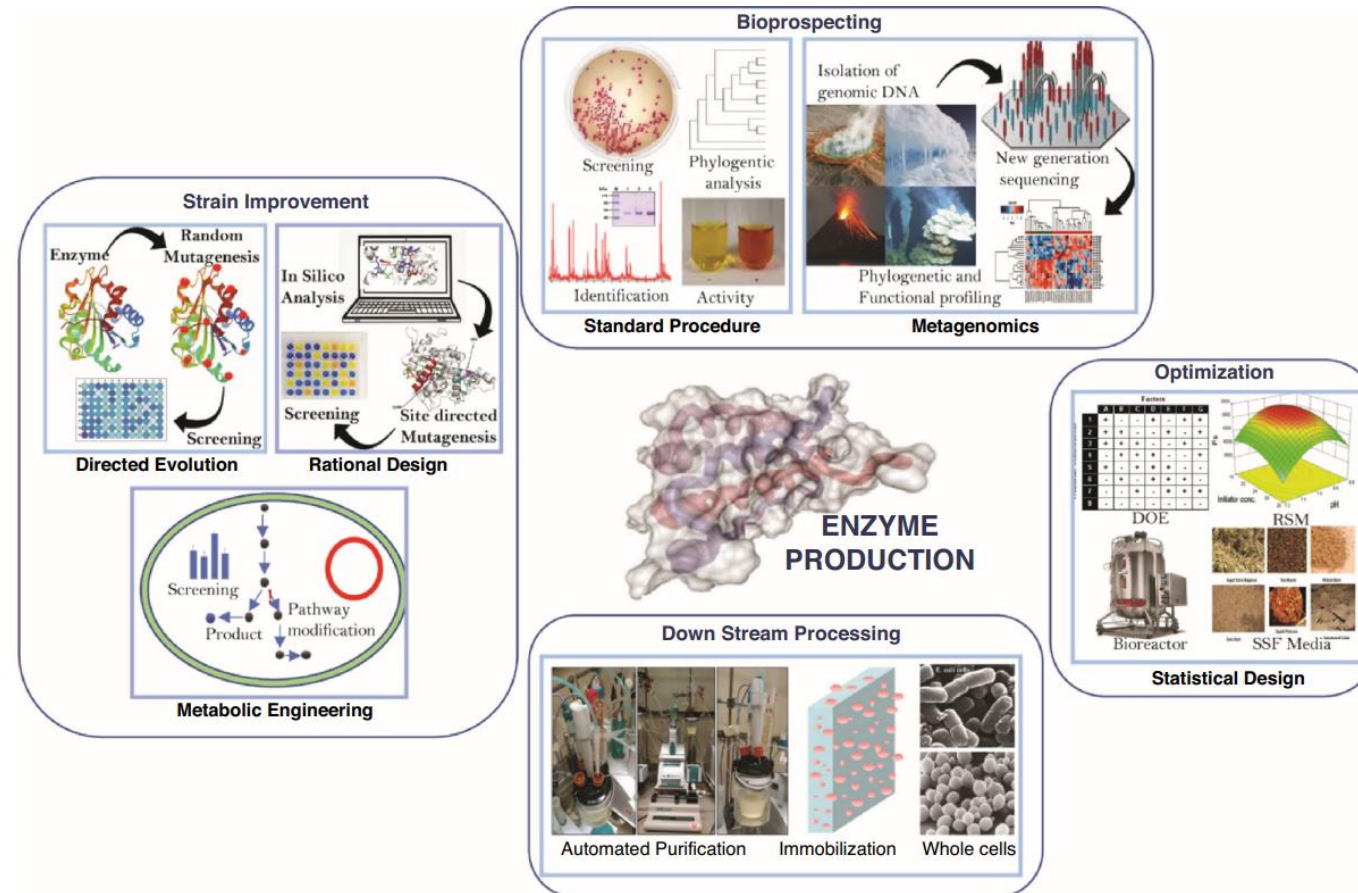
(National Human Genome Research Institute; <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Metagenomics>)

Metagenomika je istraživanje strukture i funkcije cjelokupne nukleotidne sekvence, koja je izolirana i analizirana iz svih organizama (obično mikroorganizama) iz uzorka određenog staništa.

Metagenomika se učestalo koristi u istraživanjima specifičnih zajednica mikroorganizama, kao što su npr, zajednice koje obitavaju na koži čovjeka, u tlu ili uzorcima vode.

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (77)

. industrijska proizvodnja enzima



molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (78)

. industrijska proizvodnja enzima

. baze podataka (data mining): genomi, metabolički putevi, regulacija metabolizma, ekspresija gena u različitim uvjetima, karakteristike proteina/enzima, ...

. BioCyc Pathway/Genome Database Collection (www.biocyc.org)

. MBGD: Microbial Genome Database for Comparative Analysis (<http://mbgd.genome.ad.jp/>)

. the Carbohydrate-Active enZymes Database (www.cazy.org)

...



molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (79)

. industrijska proizvodnja enzima

. hidrolaze - 75% proizvedenih enzima

Hydrolytic enzymes			
Industry	Enzyme	Source	Function
FOOD	Lysozyme, Inulinase, Lipase, Galactosidase, Amylase, Glucoamylase, Fructofuranosidase, Phenylalanine ammonia lyase, Acrylamidase, Urease, Invertase, Lactase	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Kluyveromyces</i> sp., Yeast	Bread softening, increasing shelf life, making fructose syrup, conversion of starch to glucose.
DAIRY	Proteinase, Lipase, Lactase, Aminopeptidase, Catalase, Transglutaminase	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Kluyveromyces</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp.	Milk coagulation, cheese ripening, flavoring, lactose reduction, protein crosslinker, protein hydrolysis.
BEVERAGE	Pectinase, Cellulase, Amylase, Glucanase, Protease, Pullulanase, Naringinase, Limoninase, Aminopeptidase	<i>Bacillus</i> sp., <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Klebsiella</i> sp.	Depectinization, starch hydrolysis and saccharification, debittering, liquefaction, juice clarification
AGRICULTURE	Phytase, Xylanase, Glucanase, Phosphatase, Dehydrogenase, and Sulfatase.	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Trichoderma reesei</i> ,	Hydrolysis, silage fermentation, processing of crops, crop residues, fibers, and production of animal feed supplements
BIOFUEL	Amylase, Cellulase, Xylanase, Monooxygenase, Lipase, Hydrogenase.	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Phanerochaete</i> sp., <i>Coprothermobacter</i> , <i>Hydrogenoanaero- bacterium</i> , <i>Cellulosimicrobium</i>	Ethanol, oil drilling, viscosity reduction
PHARMACEUTICAL	Cysteine proteinase, Asparaginase, Hyaluronidase, Deoxyribonuclease I, Pegademase, Glucocerebrosidase, Collagenase, Prolactozyme.	<i>Bacillus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Clostridium histolyticum</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.	Break down of blood clots, healing burn wounds, efficient drug delivery, hydrolysis, treatment of cystic fibrosis, treating lactose intolerance, treating malabsorption, treating SCID, and act as inhibitors.
DETERGENT	Protease, Amylase, Cellulase, Lipase, Mannase.	<i>Bacillus</i> sp., <i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium</i> sp.	Carbohydrate, protein, and fat stain removal, wash treatment.
TEXTILE	Amylase, Cellulase, Pectinase, Subtilisin, Papain, Transglutaminase, Lipase, Esterase, Cutinase, Nitrilase, Laccase, Catalase	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Pseudomans</i> sp., <i>Fusarium</i> , <i>Sstreptomyces</i>	Desizing, cotton processing for dyeing, softening, finishing, wash treatment, pilling and fuzz fiber removal, degumming of silk, surface modification of polyacrylonitrile
PAPER AND PULP	Cellulase, Xylanase, Laccase, Lipase, Amylase, Pectinase, Hemicellulase, Lignin peroxidase, Mn-preoxidase	<i>Candida antarctica</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Aspergillus niger</i>	Lignin removal, pitch control, biofilm removal, deinking, bleaching.
LEATHER	Lipase, Keratinase, Protease, Transglutaminase, Tannase	<i>Bacillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Alcaligenes faecalis</i> etc	Soaking, dehairing, bating, degreasing, fibre splitting, tannery effluent treatment.

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (80)

. industrijska proizvodnja enzima

- . hidrolaze (EC3) kataliziraju pregradnju velikih (polimernih) molekula na njihove podjedinice u prisutnosti vode
- . npr. razgradnja lignoceluloze do fermentabilnih supstrata

List of commercially marketed hydrolytic enzymes				
Enzyme	Trade Names	Source	Features	Companies
Proteases	MAXIREN®	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Optimum activity at 42.5 °C and pH 6.6	DSM food specialties Ltd.
	NEUTRASE®	<i>Bacillus. amyloliquefaciens</i>	Optimum activity around pH 5.5–7.5 and 30–55 °C.	
	ALCALASE®	<i>Bacillus. licheniformis</i>	Active between pH 6.5 and 8.5 and 60 °C	
Lipases	LIPOLASE®	<i>Humicola Languinosa</i>	Optimum and stable at Alkaline pH and 60°C	Novozymes Ltd.
	NOVOZYM435®	<i>Candida antarctica</i>	Immobilized on silica nanoparticles	Novo Nordisk Ltd.
	LIPOZYM TL IM®	<i>Thermomyces. Lanuginosus</i>	Immobilized lipase on silicate	Novozymes Ltd.
	LIPOZYM RM IM®	<i>Rhizomucor miehei</i>	Immobilized lipase on Duolite ES 562	Novozymes Ltd.
Amylases	MAXAMYL WL®	<i>Bacillus. lichemiformis</i>	–	GBiosciences Ltd.
	TERMAMYL®	<i>Bacillus. licheniformis</i>	Thermostable up to 90°C	
	AMG®	<i>Aspergillus niger</i>	Thermostable up to 80°C	
	VALIDASE GX®	<i>Aspergillus niger</i>	Optimum pH 4.5 and 65°C	
Invertases	INVERTZYME®	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Optimum activity at 60 °C. Its optimum pH is 4.5	Biocon Ltd.
Glucanases	NOVOZYM234®	<i>Aspergillus niger</i>	Thermostable lipase immobilized on acrylic resin	Novozymes Ltd.
	CEREFLO®	<i>Bacillus sub tills</i>	–	
Pectinases	PECTINEX®	<i>Aspergillus niger</i>	Optimum activity around pH 4.5, and at 50°C	Novozymes Ltd.
	NOVOSHAPE®	<i>Aspergillus oryzae</i>	Maximum activity around pH 4.8, and 50°C.	
	PECTINEX ULTRA SP®	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Active at 50°C temperature	
	NOVOZYM280®	<i>Aspergillus niger</i>	–	
Xylanases	RAPIDASE®	<i>Aspergillus niger</i>	Active from 10 to 50°C and acidic pH	Novozymes Ltd.
	–	–	–	DSM food specialties Ltd.
Cellulases	–	CELLULOCLAST®	<i>Trichoderma reesei</i>	pH and temperature range pH 4.5–6.0, and 50–60°C
Novozymes Ltd. Glucose Isomerases	SWEETZYME®	<i>Sterptomyces murinus</i>	Immobilized enzyme with activity at pH 7.5 and 50–60°C temperature.	Novozymes Ltd.
Phospholipase A	LECITASE®	<i>Fusarium oxysporum</i>	A chimeric enzyme where lipase gene from <i>T. lanuginosus</i> is fused with the phospholipase A1 gene from <i>Fusarium oxysporum</i> .	Novo Nordisk Ltd.
Catalases	CATAZYME	<i>Aspergillus niger</i>	Optimum at pH 6 and temperature up to 60 °C.	Novozymes Ltd.
Multi Enzyme complexes of Carbohydrases	VISCOZYM	<i>Aspergillus aculeatus</i>	pH and temperature range of 3.3–5.5, 25–55°C.	Novozymes
	ACCELLERASE	<i>Trichoderma reesei</i>	pH 5 and 50°C temperature.	Dupont
	CEREMIX	<i>Bacillus. amyloliquefaciens</i>	produced by blending standard enzymes produced by separate fermentations	Novozymes

. industrijska proizvodnja enzima - **perspektiva**

- . nedovoljno istražen i primijenjen potencijal (prirodnih) enzima / biokatalizatora
- . tehnologija rDNA, računalna biologija, biostatistika, znanja o polimerima, ...169 milijardi USD (2014)
- . mikroorganizmi, koje je teško uzgojiti; robusni enzimi (bioproceni parametri); preusmjeravanje metabolizma u stanicama; imobilizacija enzima i cjelovitih stanica kao biokatalizatora

. industrijska proizvodnja enzima

. *Escherichia coli* - domaćin za ekspresiju rekombinantnih proteina / enzima tijekom istraživanja i u industrijskoj proizvodnji

. terapijski proteini

. inzulin, 1978 (1982, Humulin; Eli Lilly)

Generic/Brand name	Clinical indications	Approved date and innovator
Ranibizumab (Lucentis)	Macular degeneration	2006 (US), 2007 (EU) –Genentech
Somatropin (Accretropin)	Growth hormone deficiency	2008 (US)-Cangene
Certolizumab pegol (Cimzia)	Crohn's disease	2008 (US), 2009 (EU)- UCB
PEG interferon α -2b (PegIntron)	Chronic hepatitis C infection	2008 (US)-Schering-Plough
Interferon β -1b (Extavia)	Multiple sclerosis	2008 (EU), 2009 (US)-Novartis
Pegloticase (Krystexxa)	Chronic gout	2010 (US)-Savient Pharma

. industrijska proizvodnja enzima

. *Escherichia coli* - domaćin za ekspresiju rekombinantnih proteina / enzima tijekom istraživanja i u industrijskoj proizvodnji

. drugi industrijski rekombinantni proteini / enzimi

Product type	Product name
Microbial enzymes	Enterokinase, amylases, invertase, cellulase, xylanase, etc.
Therapeutic proteins	Antibody fragments, TPA, growth factors, interferons, Insulin, etc.
Therapeutic enzymes	L-Asparaginase, streptokinase
Molecular biology enzymes	Restriction enzymes, DNA-modifying enzymes, that is, ligases, DNA polymerase

. industrijska proizvodnja enzima

. *Escherichia coli* - domaćin za ekspresiju rekombinantnih proteina / enzima tijekom istraživanja i u industrijskoj proizvodnji

. glikozilira i transportira rekombinantne proteine van stanice (< 100 mg/L, glikozilacija)

. industrijska proizvodnja enzima

. fungi - domaćini za proizvodnju rekombinantnih proteina / enzima

. fungi - jednostanični eukarioti (kvasci) i višestanični eukarioti (filamentozni fungi)

. industrijska proizvodnja enzima

. fungi - domaćini za proizvodnju rekombinantnih proteina / enzima

Enzyme activity	Production microorganism	Host organism
Aminopeptidase	<i>Aspergillus niger</i>	Fungal
Aminopeptidase (leucyl)	<i>Aspergillus oryzae</i>	Fungal
AMP deaminase	<i>Aspergillus melleus</i>	Fungal
Arabinofuranosidase	<i>Aspergillus niger</i>	Fungal
Catalase	<i>Aspergillus niger</i>	Fungal
Cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	Fungal
Cellulase	<i>Penicillium funiculosum</i>	Fungal
Cellulase	<i>Trichoderma reesei</i>	Fungal
Dextranase	<i>Chaetomium erraticum</i>	Fungal
Glucanase (endo-beta)	<i>Aspergillus niger</i>	Fungal
Glucanase (exo-beta)	<i>Aspergillus niger</i>	Fungal
Glucanase (exo-beta)	<i>Trichoderma reesei</i>	Fungal
Glucanase (beta)	<i>Aspergillus niger</i>	Fungal
Glucanase (beta)	<i>Talaromyces emersonii</i>	Fungal
Glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>	Fungal
Glucose oxidase	<i>Aspergillus niger</i>	Fungal
Lactase or galactosidase (beta)	<i>Aspergillus niger</i>	Fungal
Lipase triacylglycerol	<i>Candida rugosa</i>	Fungal
Lipase triacylglycerol	<i>Rhizopus niveus</i>	Fungal
Lipase triacylglycerol	<i>Rhizopus oryzae</i>	Fungal
Lysophospholipase	<i>Aspergillus niger</i>	Fungal
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i>	Fungal
Protease (exopeptidase)	<i>Aspergillus melleus</i>	Fungal
Protease	<i>Aspergillus oryzae</i>	Fungal
Protease (mucorpepsin)	<i>Rhizomucor miehei</i>	Fungal
Ribonuclease	<i>Penicillium citrinum</i>	Fungal
Tannase	<i>Aspergillus oryzae</i>	Fungal
Xylanase	<i>Aspergillus niger</i>	Fungal
Glucanase (beta)	<i>Humicola insolens</i>	Fungal
Xylanase	<i>Humicola insolens</i>	Fungal
Xylanase	<i>Trichoderma reesei</i>	Fungal

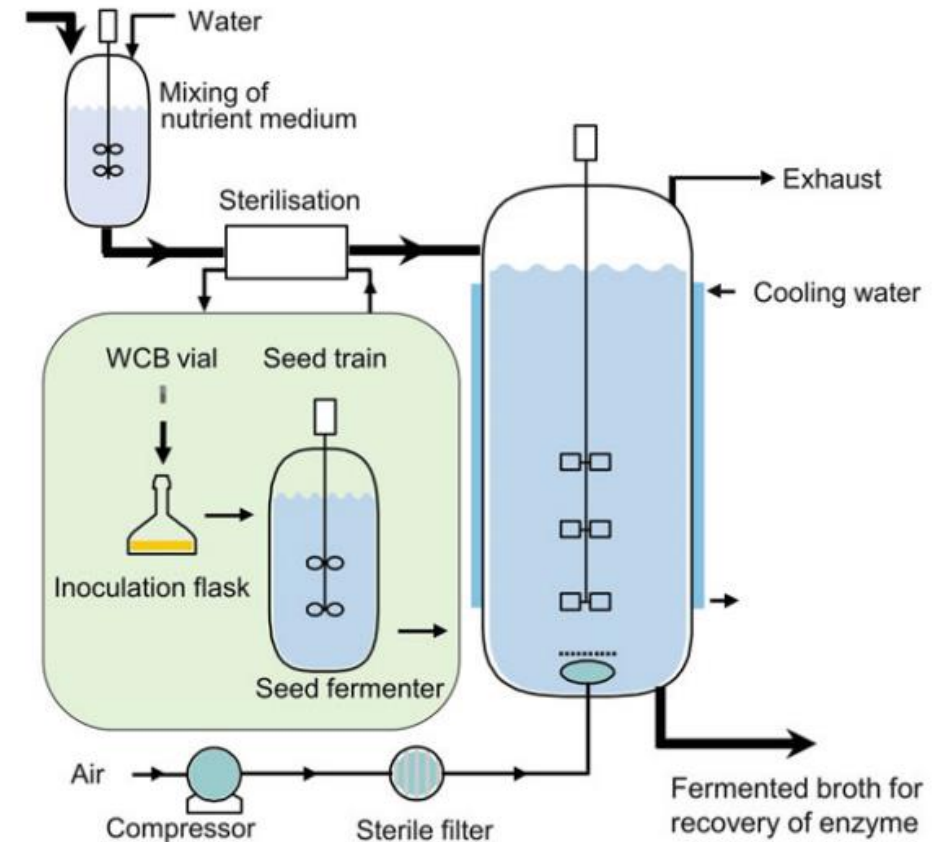
molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (87)

. industrijska proizvodnja enzima

. fungi - domaćini za proizvodnju rekombinantnih proteina / enzima

. primjena metoda genetičkog inženjerstva

. bioproces za proizvodnju enzima



Typically, a defined medium is used and sterilized. A vial of the production strain is used for cultivation in an inoculation flask. Spores or cells are harvested after 5–10 days depending on the host and used to inoculate a seed fermenter. After 1–4 days, the culture is used to inoculate a larger tank where induction of enzyme production occurs by, e.g., feeding with an inducer. Both medium pH and temperature are controlled, the latter by, e.g., cooling water

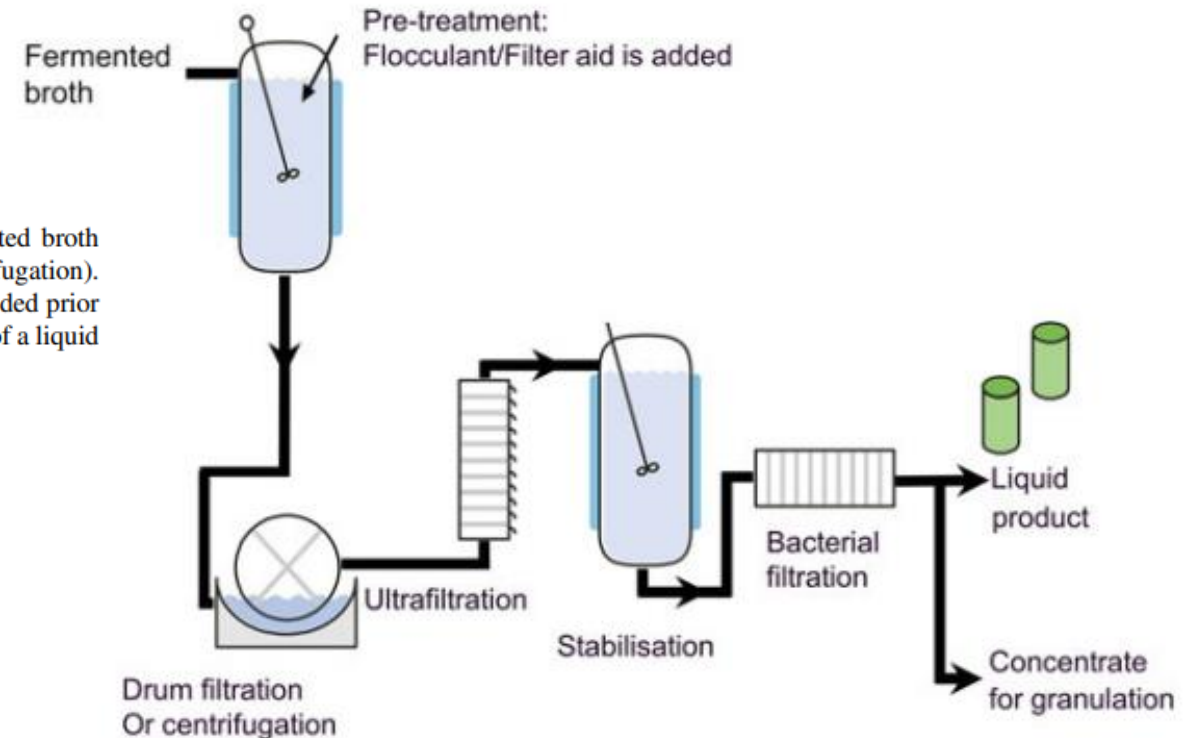
molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (88)

. industrijska proizvodnja enzima

. fungi - domaćini za proizvodnju rekombinantnih proteina / enzima

. *downstream processing*

Overview of a generic recovery process for enzyme production. The fermented broth undergoes different steps to remove the cellular debris (flocculation, filtration, or centrifugation). Subsequently the product can be concentrated by ultrafiltration. Product stabilizers are added prior to filter sterilization (bacterial filtration). The enzyme preparation is used for formulation of a liquid or a solid (granulate) enzyme product



- . industrijska proizvodnja enzima

- . fungi / kvasci - domaćini za proizvodnju rekombinantnih proteina / enzima

- Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*,
Yarrowia lipolytica, *Arxula adenivorans*, *Pichia methanolica*, *Shizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces bailii*,
Zygosaccharomyces rouxii, *Pichia stipitis*,...

- . prednosti (s obzirom na stanice viših organizama)

- . jednostanični mikroorganizmi (genetičke manipulacije, rast i uzgoj)

- . smatanje proteina i post-translacijske kovalentne preinake proteina kao kod eukariota

- . nemaju endotoksine

- . nemaju onkogeni ili viralnu DNA

. industrijska proizvodnja enzima

. fungi / kvasci - domaćini za proizvodnju rekombinantnih proteina / enzima – podjela

ne-metilotrofni

metilotrofni

<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. polymorpha</i>
<i>K. lactis</i>	<i>P. pastoris</i>
<i>Y. lipolytica</i>	<i>P. methanolica</i>
<i>Z. rouxii</i>	<i>C. boidinii</i>
<i>Z. bailii</i>	<i>O. minuta</i>
<i>S. occidentalis</i>	
<i>P. stipitis</i>	
<i>A. adeninivorans</i>	
<i>K. marxianus</i>	

metilotrofi - raznovrsna grupa mikroorganizama koji mogu koristiti reducirane spojeve s jednim ugljikovim atomom, npr metan i metanol, kao izvor ugljika i energije (supstrat, S).

. industrijska proizvodnja enzima

. fungi / kvasci - domaćini za proizvodnju rekombinantnih proteina / enzima

Saccharomyces cerevisiae

. od 1980-tih

. GRAS status (the American Food and Drug Administration, FDA)

. fermentativni metabolizam (etanol) i niska produktivnost proizvodnje rekombinantnih proteina

. prekomjerna glikozilacija proteina i njihovo zadržavanje u periplazmatskom odjeljku stanice s djelomičnom razgradnjom

. industrijska proizvodnja enzima

. fungi / kvasci - domaćini za proizvodnju rekombinantnih proteina / enzima

. učinkovita biotehnološka proizvodnja:

. uspješna transkripcija, translacija i lokalizacija proizvedenog proteina

. optimizirana fiziologija stanice domaćina, koja podržava proizvodnju proteina

. brz, učinkovit i ponovljiv uzgoj stanica

. brz i jeftin *downstream processing*

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (93)

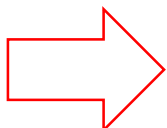
. industrijska proizvodnja enzima

. fungi / kvasci - domaćini za proizvodnju rekombinantnih proteina / enzima

. učinkovita biotehnološka proizvodnja:

. brz i jeftin *downstream processing* (DP) - usporedba udjela koštanja DP-a (%) u ukupnoj cijeni bioproizvoda

bioproizvod	(%)
Single cell protein/biomass	1–5
Organic acids	10–50
Extracellular enzymes	10–30
Antibiotics	20–50
Recombinant proteins	70–95



- . industrijska proizvodnja enzima

- . enzimi iz morskih polarnih područja - *cold-adapted enzymes*

- . jedinstvena svojstva

- . veća katalitička učinkovitost

- . veća fleksibilnost molekula

- . manja termostabilnost

- . limitirana dostupnost enzima

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (95)

. industrijska proizvodnja enzima

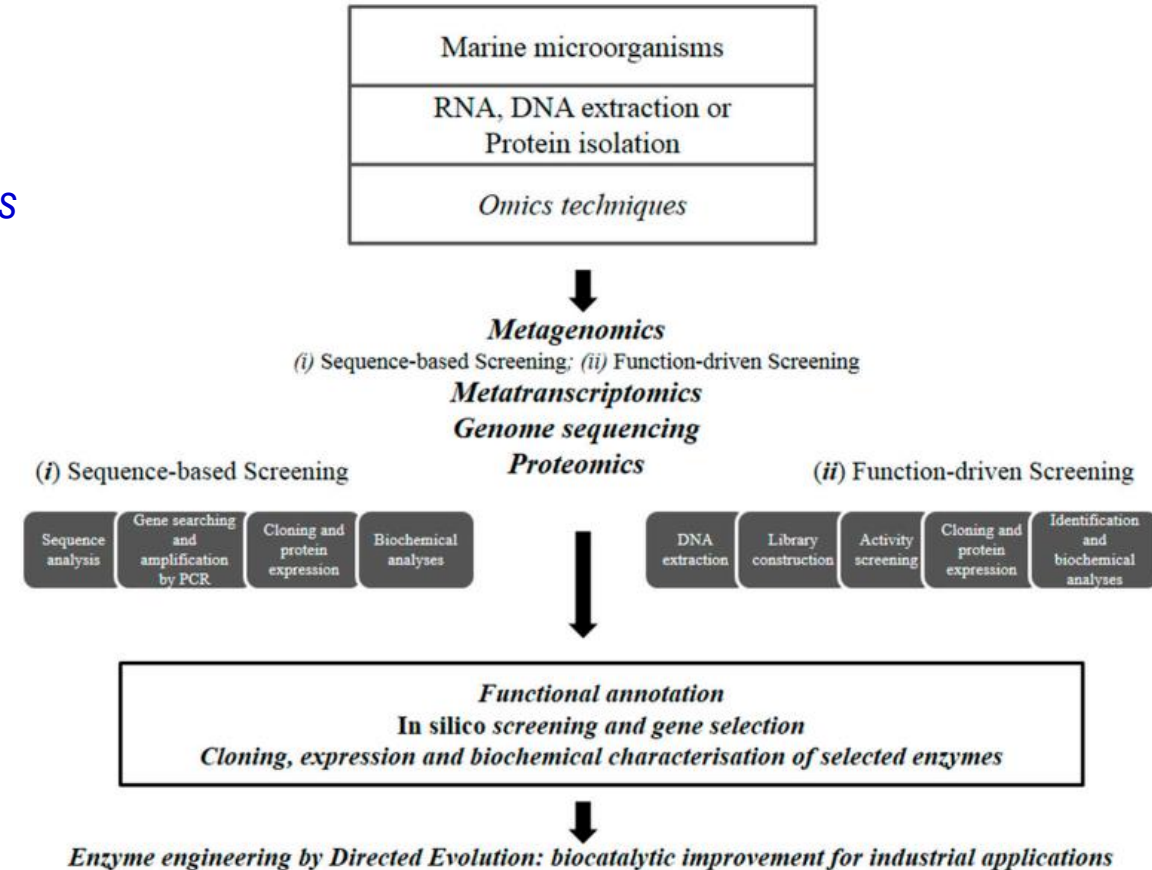
. enzimi iz morskih polarnih područja - *cold-adapted enzymes*

. identifikacija novih enzima - *omics* pristup

. FP7:

MACUMBA, Marine Microorganisms: Cultivation Methods for Improving their Biotechnological Applications

PHARMASEA (Increasing Value and Flow in the Marine Biodiscovery Pipeline)



. industrijska proizvodnja enzima

. enzimi iz morskih polarnih područja - *cold-adapted enzymes*

. prednosti primjene ovih enzima:

- potrebne manje koncentracije aktivnih enzima (veća katalitička učinkovitost)
- kataliziraju reakcije pri temperaturama pri kojima su nepoželjne / kompetitivne reakcije zanemarive (prehrambena ind., termolabilne komponente)
- bakterijska kontaminacija pri ovim temperaturama (10-15°C) je bitno reducirana
- mogu se brzo i jednostavno inaktivirati (kratko zagrijavanje, bez primjene kemijskih reagensa)

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (97)

. industrijska proizvodnja enzima

. enzimi iz morskih polarnih područja - *cold-adapted enzymes*

. fleksibilnost strukture ovih enzima

Molecular Adaptation	Effect
Decreased number of hydrogen bonds and salt bridges	Increased flexibility
Reduced proline and arginine content	Increased molecular entropy
Increased surface charged residues	Increased conformational flexibility
Reduced frequency of surface, inter-domain and inter-subunit ionic linkages and ion-network	Increased conformational flexibility and reduced enthalpic contribution to stability
Reduced core hydrophobicity/increased surface hydrophobicity	Reduced hydrophobic effect/ entropic destabilization
Increased accessibility of active site	Increased flexibility for substrate and cofactor binding
Loop extensions	Reduced stability

. industrijska proizvodnja enzima

. enzimi iz morskih polarnih područja - *cold-adapted enzymes* - primjena (1)

Table 2. Polar-active enzymes isolated from Antarctic and Arctic marine polar environments.

Marine Polar-Active Enzymes	Reaction	Organism Source	Origin of Sample	Applications/Potential Uses
HYDROLASES: EC 3 (Type of reaction: Hydrolytic cleavage AB + H₂O → AOH + BH)				
β-galactosidase	Hydrolysis of lactose into its constituent monosaccharides	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 22b	Alimentary tract of Antarctic krill <i>Thysanoessa macrura</i>	Candidates for lactose removal from dairy products at low temperatures
β-galactosidase		<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> TAE 79	Antarctic seawater	
β-galactosidase		<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> LMG P-19143	Antarctic seawater	
β-galactosidase		<i>Guehomyces pullulans</i>	Antarctic sea sediment	
β-galactosidase		<i>Enterobacter ludwigii</i>	Sediment samples of Kongsford, Arctic	
β-galactosidase		<i>Alkalilactibacillus ikkense</i>	Ikka columns in South-West Greenland	
α-Amylase	Cleavage of α-1,4-glycosidic linkages in starch molecules to generate smaller polymers of glucose units	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. M175	Antarctic sea-ice	Detergent additive for its stain removal efficiency
α-Amylase§		<i>Glaciozyma antarctica</i> PI12	Antarctic sea-ice	Additives in processed food, in detergents for cold washing, in waste-water treatment, in bioremediation in cold climates and in molecular biology applications
α-Amylase		Bacterial strains	Sediment samples from Midtre Lovénbreen Arctic glacier	
α-Amylase		<i>Alteromonas</i> sp. TAC 240B	Antarctic seawater	
α-Amylase		<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> *	Antarctic seawater	
Xylanase	Hydrolysis of the main chain of xylan to oligosaccharides, which in turn are degraded to xylose	<i>Cladosporium</i> sp.	Antarctic marine sponges	Additives in textile and food industries, and bioremediation
Xylanase		<i>Flavobacterium frigidarium</i> sp.	Antarctic shallow-water marine sediment	

molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (99)

. industrijska proizvodnja enzima

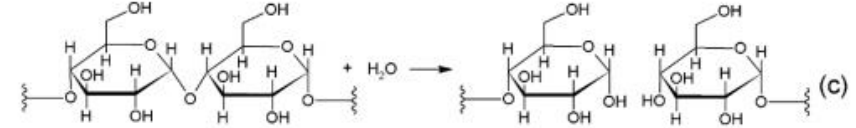
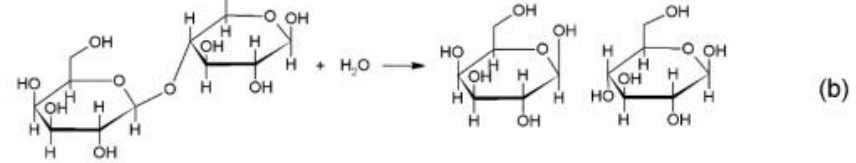
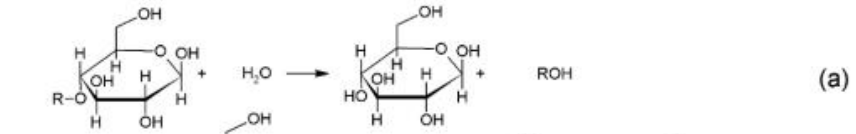
. enzimi iz morskih polarnih područja - *cold-adapted enzymes* - primjena (2) ...

Marine Polar-Active Enzymes	Reaction	Organism Source	Origin of Sample	Applications/Potential Uses
HYDROLASES: EC 3 (Type of reaction: Hydrolytic cleavage AB + H₂O → AOH + BH)				
Serine protease (Subtilisin)	Cleavage of peptide bonds	<i>Bacillus</i> TA39	Antarctic seawater	Additives in low-temperature food processing, food and textile industries, leather processing, detergent industry
Serine protease (Subtilisin)		<i>Bacillus</i> TA41	Antarctic seawater	
Serine protease		<i>Colwellia</i> sp. NJ341	Antarctic sea-ice	
Serine alkaline protease		<i>Shewanella</i> sp. Ac10u	Antarctic seawater	
Acid protease		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> L7	Antarctic marine alga	
Subtilisin-like serine protease		<i>Pseudoalteromonas</i> sp., <i>Marinobacter</i> sp., <i>Psychrobacter</i> sp., <i>Polaribacter</i> sp.	Antarctic seawater and thorax, abdomen and head of krill (<i>Euphausia superba</i> Dana)	
Protease		<i>Pseudoalteromonas</i> sp. NJ276	Antarctic sea-ice	
Subtilisin-like Serine proteinase		<i>Leucosporidium antarcticum</i> 171	Antarctic sub-glacial waters	
Aminopeptidase		<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> TAC125	Antarctic seawater	
Aminopeptidase		<i>Colwellia psychrerythraea</i> 34H	Greenland continental shelf sediment samples	
Serine peptidase		<i>Lysobacter</i> sp. A03	Penguin feathers in Antarctica	
Serine peptidase		<i>Serratia</i> sp.	Coastal seawater in Northern Norway	
Metalloprotease		<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SM495	Arctic sea-ice (Canadian Basin)	
Metalloprotease		<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Stomach of Antarctic krill, <i>Euphausia superba</i> Dana	
Metalloprotease		<i>Psychrobacter proteolyticus</i> sp.	Stomach of Antarctic krill <i>Euphausia superba</i> Dana	
Endopeptidase	Microbial source	Arctic marine microbial source	Candidate for molecular biology application: digestion of chromatin (ArcticZymes)	

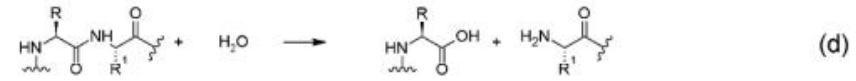
molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (100)

. industrijska proizvodnja enzima

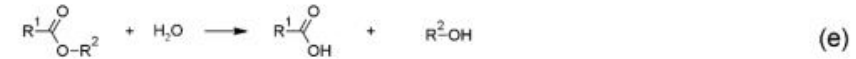
. enzimi iz morskih polarnih područja – reakcije



(a) glikozid hidrolaze

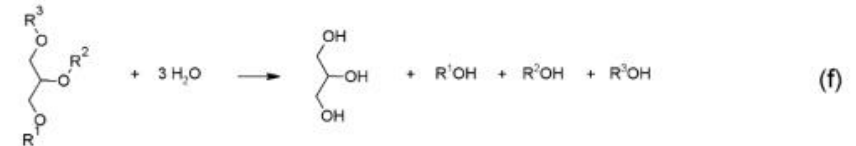


(b) laktaze



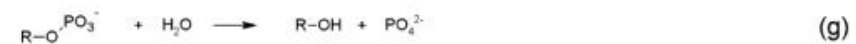
(c) amilaze

(d) proteaze



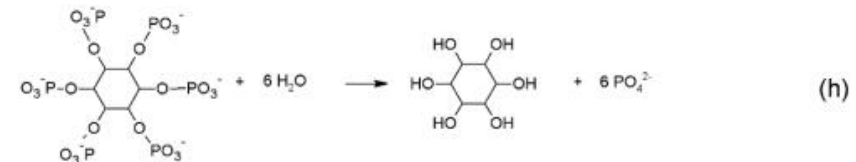
(e) esteraze

(f) lipaze



(g) fosfataze

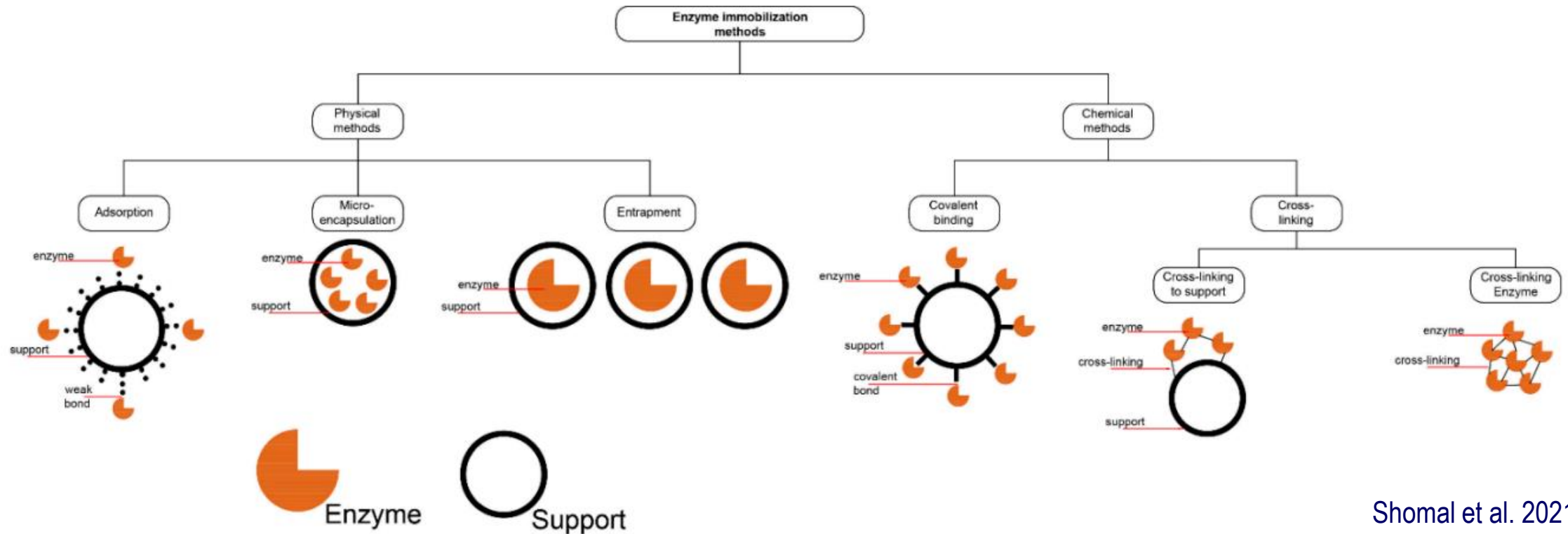
(h) fitaze



molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (101)

. industrijska proizvodnja enzima

. imobilizacija enzima



molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (102)

. industrijska proizvodnja enzima

. Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products (AMFEP; <https://amfep.org/>), founded in 1977

. the European Food Safety Authority (EFSA)

under the EU FIAP

(Food Improvement Agents Package)

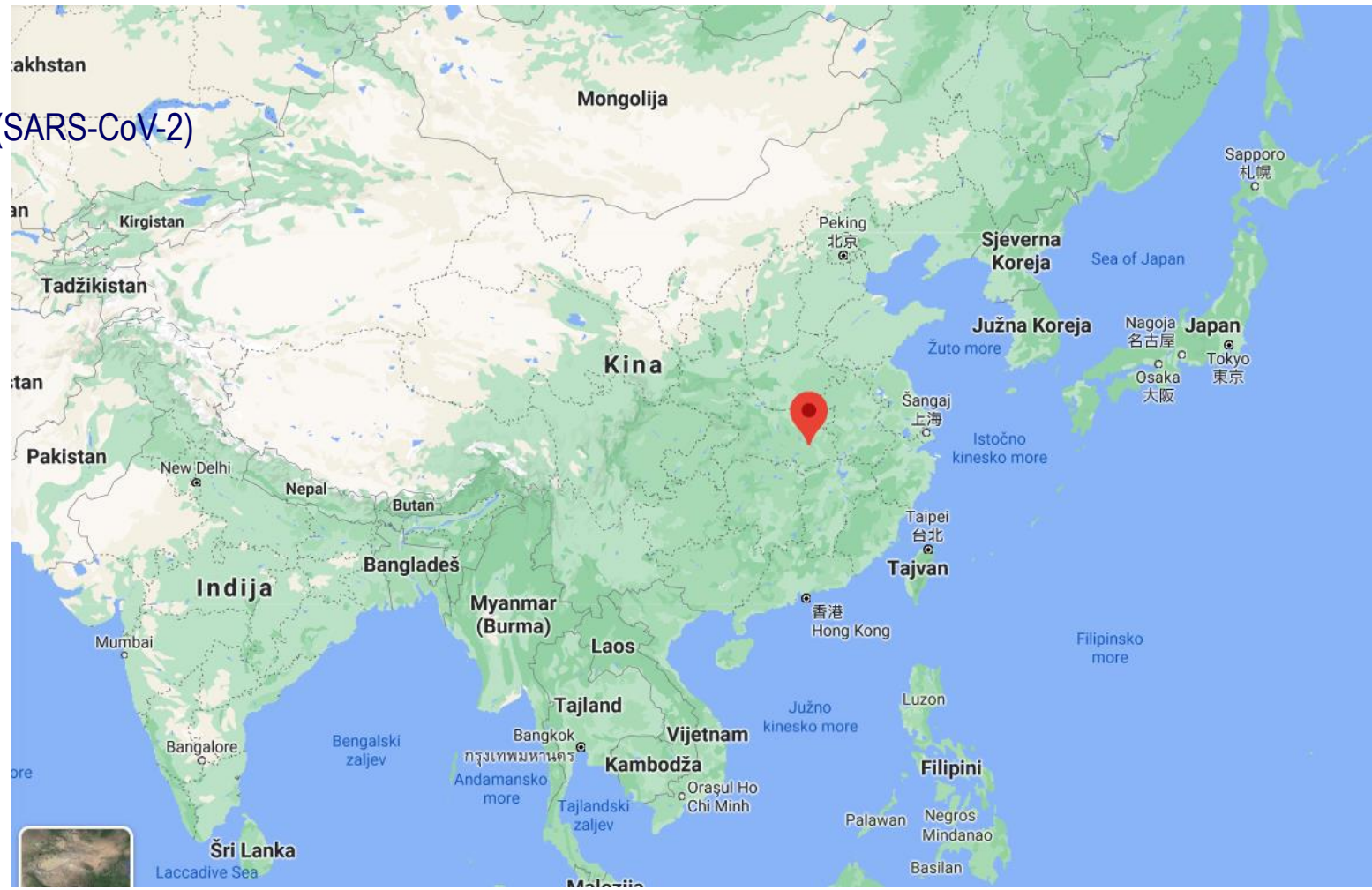
regulatory frame



molekularna genetika, genetičko inženjerstvo i moderna biotehnologija (103)

COVID-19 (1)

- koronavirus bolest 2019 (COVID-19)
- Severe Acute Respiratory Sndrome CoronaVirus 2 (SARS-CoV-2)
- Wuhan, PR China, late december 2019

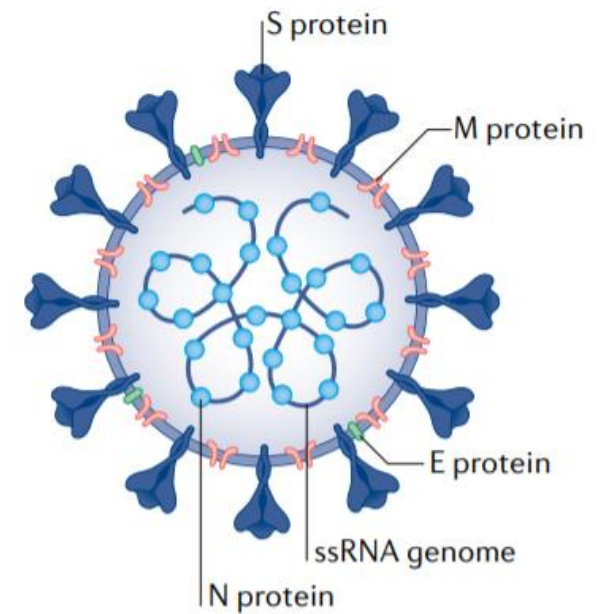


COVID-19 (2)

- prvi slučaj SARS epidemije 2002.-2003., SARS-CoV
- drugi pandemijski slučaj 2012.-2013. MERS-CoV (Middle East Respiratory Sindrome CoV)
- prirodni rezervoari koronavirusa - šišmiši



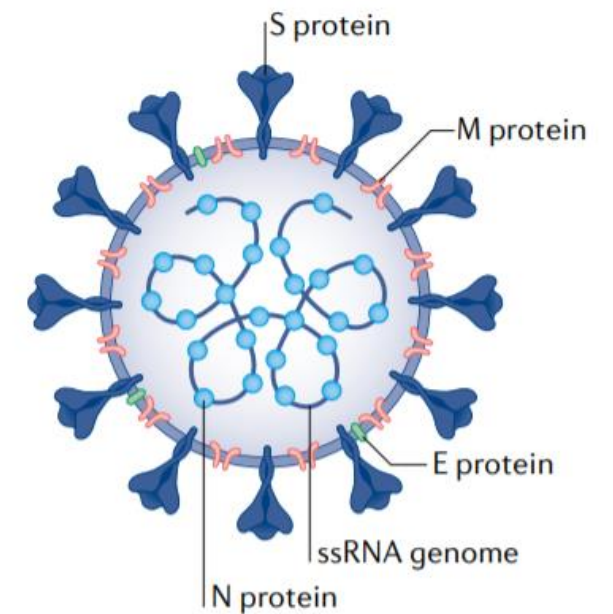
- koronavirusi su velika grupa jednolančanih RNA virusa



Nishiga et al., Nature Reviews (2020), 17, 543-558

COVID-19 (3)

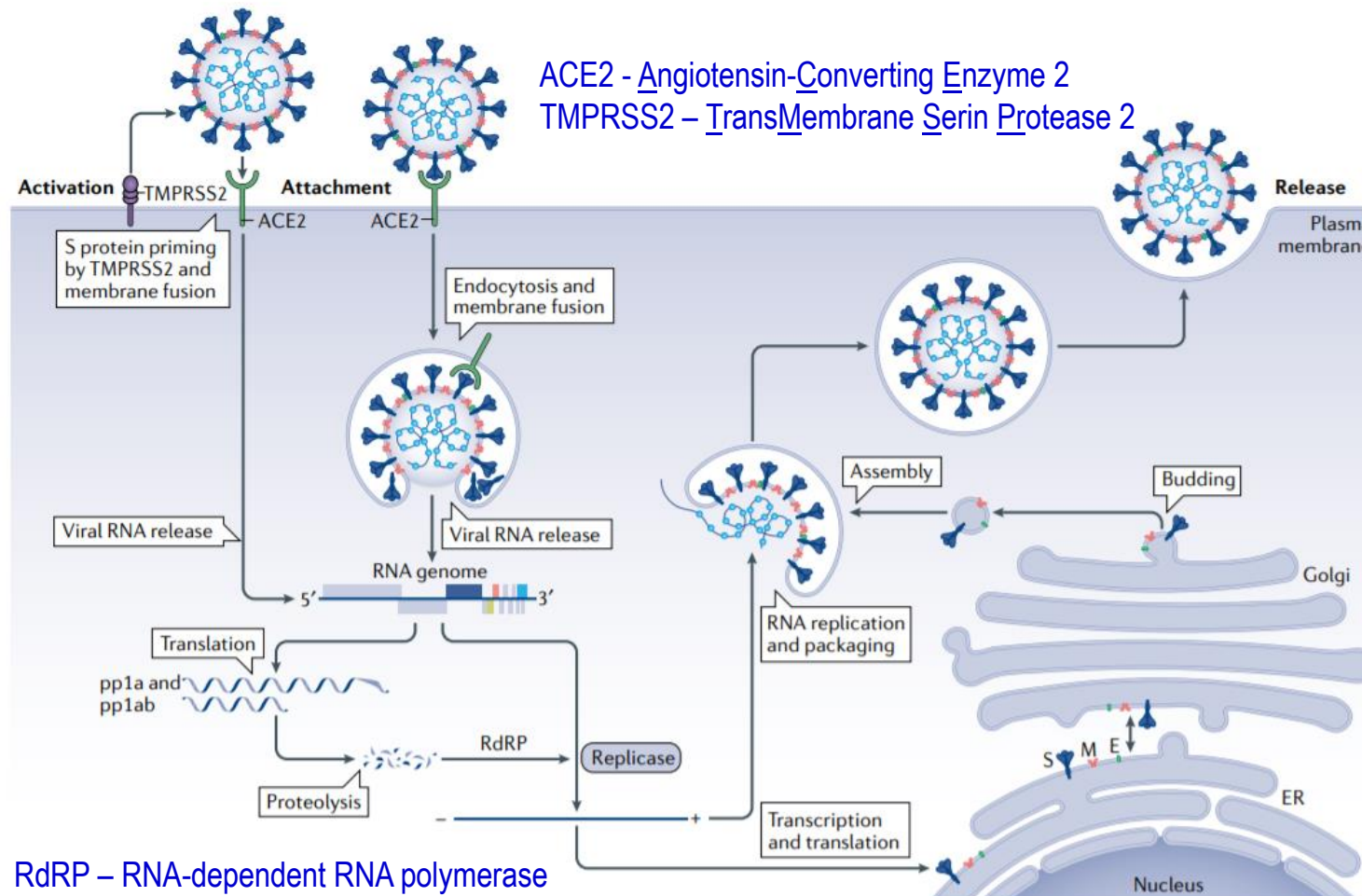
- α , β , γ i δ rodovi koronavirusa
- respiratorna (epitelna?) infekcija
- *pneumonia* i Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)
- *cytokine storm* (tumor necrosis factor- α , IL-1 β , IL-6) and multiorgan damage
- *coagulation abnormalities* (thromboembolics)
- *cardiovascular diseases* (CVD)
- *comorbidity: diabetes, hypertension, CVDs*
- *children: hyperinflammatory shock, Kawasaki disease, CVD*



Nishiga et al., Nature Reviews (2020), 17, 543-558

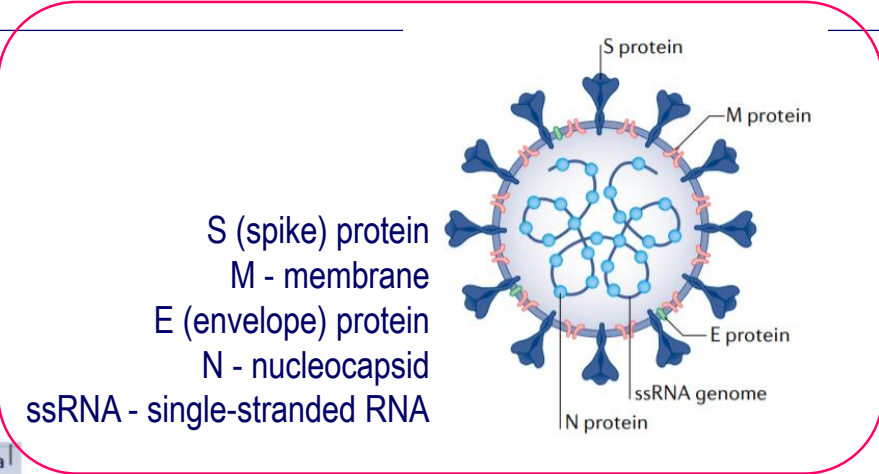
COVID-19 (4)

- struktura i životni vijek SARS-CoV-2



ACE2 - Angiotensin-Converting Enzyme 2
 TMPRSS2 - TransMembrane Serin Protease 2

RdRP – RNA-dependent RNA polymerase



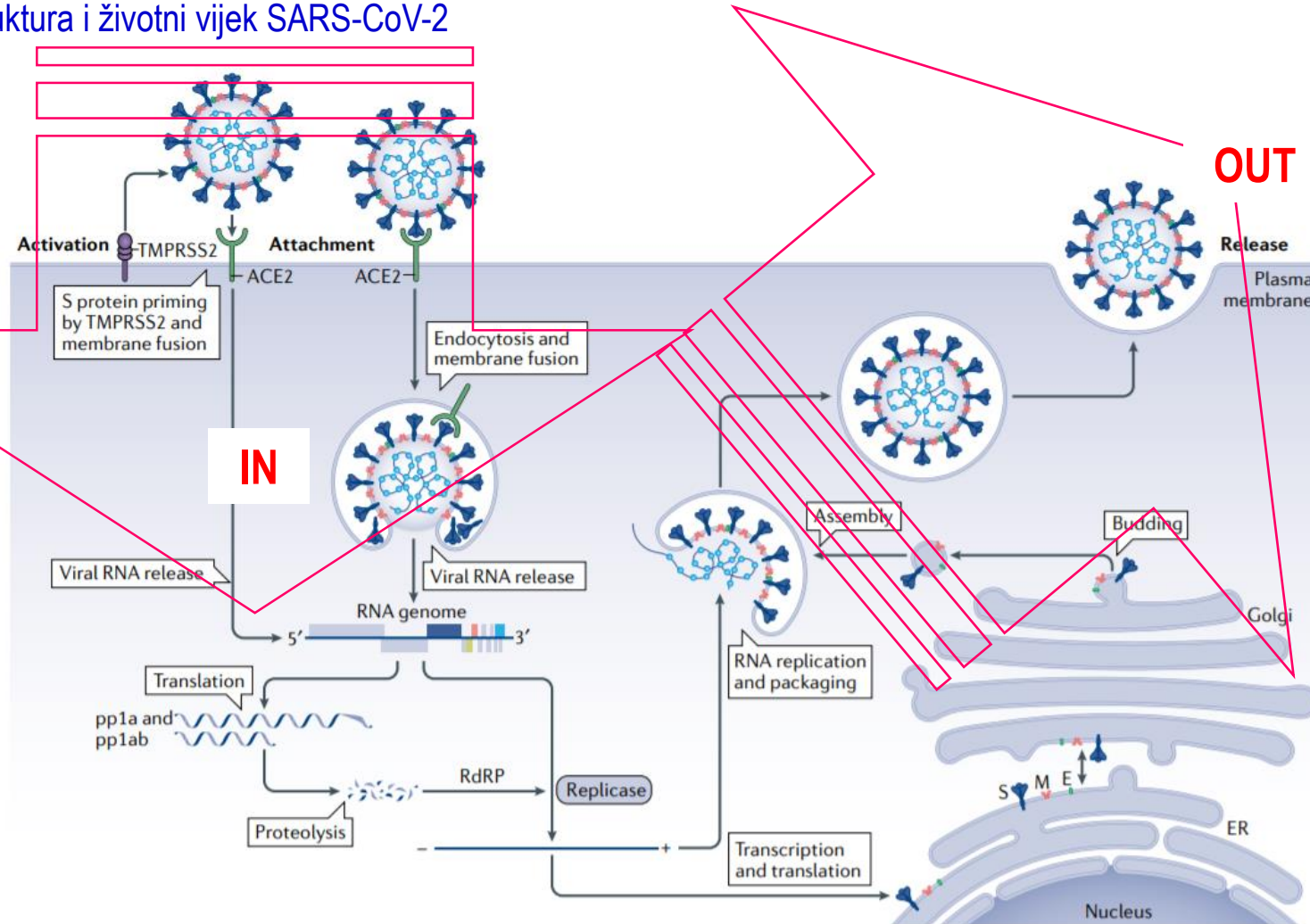
S (spike) protein
 M - membrane
 E (envelope) protein
 N - nucleocapsid
 ssRNA - single-stranded RNA

ER – endoplasmic reticulum

Nishiga et al., Nature Reviews (2020), 17, 543-558

COVID-19 (4)

- struktura i životni vijek SARS-CoV-2



COVID-19



The effect of the coronavirus on society and the global economy is unprecedented and it will need to trigger extraordinary research efforts.

The aim of this page is to allow the monitoring of the research landscape on Coronavirus. It relies on datasets containing scientific publications, patents, and EU-funded R&D projects. The interactive tool allows the user to navigate the data and customise the visualisation using filters, showing cumulated values, bar charts, etc..

BIONTECH

Intelektualno vlasništvo

- case study 1: PhD ocjene, Rigorosum, Doktorin der technischen Wissenschaften [Doctor technicae (dr. techn.)] i dr. sc.



Name: Anita Slavica Karte-Nr.: F 08800 Matr.-Nr.: 0231151

Nachstehende Lehrveranstaltungen wurden gemäß des Studienplanes für das Doktorstudium der technischen Wissenschaften (studF 1987) von Studierenden im Einverständnis mit dem Betreuer der Dissertation nach fachlichen Gesichtspunkten ausgeführt:

LV-Nr.	Lehrveranstaltungsbezeichnung	SWS	Typ	Note	Datum
542.204	Privatseminar 1 BCR	3,0	L	1	03.05.2006
542.209	Privatseminar 2 BCR	3,0	L	1	03.05.2006
542.205	Fluoreszenzspektroskopie	2,0	L	1	05.05.2006
629.279	Angewandte Massenspektroskopie	1,0	L	1	24.04.2006
629.278	Angewandte Massenspektroskopie	2,0	L	2	24.04.2006
542.206	Fluoreszenzspektroskopie	1,0	L	1	15.07.2003
Summe:					12,8

Beleg: Alle Zeugnisse und Bescheide die noch nicht elektronisch erfasst wurden.

30.6.2006 Datum

Anita Slavica
Unterschrift des Studierenden



Zeugnis über die Beurteilung der Dissertation

Personen-Nr. (Vorname) Slavica, Anita Geburtsdatum: 08.05.1970
 Studienrichtung: Dr.-Studium der technischen Wissenschaften Technische Chemie
 Thema der Dissertation: Oxidative protein modification and enzyme inactivation: insights from a structure-function study of Trigonopsis variabilis D-amino acid oxidase
 mit Bescheid vom 27.08.2006 verliehen
 Sie hat im ordnungsgemäßen Promotionsverfahren durch ihre Dissertation
 die Doktorwürde erlangt.
 Die Dissertation ist in der Bibliothek der Technischen Universität Graz aufbewahrt.
 Die Dissertation ist in der Bibliothek der Technischen Universität Graz aufbewahrt.
 Die Dissertation ist in der Bibliothek der Technischen Universität Graz aufbewahrt.

Beurteilung: Sehr gut (1), Gut (2), Befriedigend (3), Genügend (4), Nicht genügend (5)

Dieses Zeugnis wurde automatisch erstellt und ist ohne Unterschrift und Siegel gültig.
 DVN 0081533

PROMOTIONSURKUNDE
 Technische Universität Graz (Erläuterung-Johanne-Universität)
 Frau
SLAVICA Anita
 geboren am 08.05.1970, Knaflten
 wurde der akademische Grad
Doktorin der technischen Wissenschaften (Dr.techn.)
 mit Bescheid vom 27.08.2006 verliehen.
 Sie hat im ordnungsgemäßen Promotionsverfahren durch ihre Dissertation
oxidative protein modification and enzyme inactivation: insights from a structure-function study of Trigonopsis variabilis D-amino acid oxidase
 und durch das mit Auszeichnung bestandene Rigorosum ihre wissenschaftliche Befähigung bewiesen.
 Graz, am 14.07.2006
 Dekan: Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Hans Stelzer
 Rektor: Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Hans Stelzer



REPUBLIKA HRVATSKA AGENCIJA ZA ZNANOST I VISOKO OBRAZOVANJE

KLASA: UPII-602-06/06-02/0778 URBROJ: 533-07-06-04

Zagreb, 25. rujna 2006. godine

Temeljem članka 14. Zakona o priznavanju inozemnih obrazovnih kvalifikacija («Narodne novine» br. 158/03, 198/03) Agencija za znanost i visoko obrazovanje, u postupku koji se vodi temeljem zahtjeva Anite Slavice za stručno priznavanje inozemne visokoškolske kvalifikacije, donosi

RJEŠENJE

1. U cijelosti se priznaje visokoškolska kvalifikacija Doktorin der technischen Wissenschaften (Dr. techn.) koju je Anita Slavica, rođena dana 8. svibnja 1970. godine u Šibeniku, Hrvatska, modification and enzyme inactivation: insights from a structure-function study of Trigonopsis variabilis D-amino acid oxidase na Technischen Universität Graz, Republika Austrija, Graz.
 2. Navedena inozemna visokoškolska kvalifikacija u Republici Hrvatskoj izjednačena je u pravima s diplomom poslijediplomskog sveučilišnog studija čijm se završetkom stječe akademski stupanj doktor tehničkih znanosti – tehnička kemija (dr. sc.).

Obrazloženje

Ministarstvu znanosti, obrazovanja i športa je dana 17. srpnja 2006. godine, u skladu s člankom 115. stavkom 6. Zakona o znanstvenoj djelatnosti i visokom obrazovanju («Narodne novine» br. 123/03, 198/03, 105/04 i 174/04), podnesen zahtjev Anite Slavice za stručno priznavanje inozemne visokoškolske kvalifikacije, KLASA: UPII-602-06/06-02/0778, URBROJ: 0015-06-001. Inozemna visokoškolska kvalifikacija Doktorin der technischen Wissenschaften (Dr. techn.) stečena je na Technischen Universität Graz, Republika Austrija, Graz, obranom doktorske disertacije Oxidative protein modification and enzyme inactivation: insights from a structure-function study of Trigonopsis variabilis D-amino acid oxidase, dana 27. lipnja 2006. godine.

Zahtjev je osnovan.

U postupku je utvrđeno da je visoko učilište Technische Universität Graz, Republika Austrija, Graz, koje je dodijelilo kvalifikaciju priznato kao dio visokoškolskog sustava države u kojoj je ona stečena te da je program poslijediplomskog sveučilišnog studija tehničkih znanosti priznat kao dio visokoškolskog sustava.

Ovlašteno Stručno tijelo provelo je vrednovanje visokoškolske kvalifikacije.

Navedenim vrednovanjem utvrđeno je da se u cijelosti priznaje visokoškolska kvalifikacija Doktorin der technischen Wissenschaften (Dr. techn.) koju je Anita Slavica stekla dana 27. lipnja 2006. godine obranom doktorske disertacije Oxidative protein modification and enzyme inactivation: insights from a structure-function study of Trigonopsis variabilis D-amino acid oxidase na Technischen Universität Graz, Republika Austrija, Graz, kao diplomu poslijediplomskog sveučilišnog studija koji traje 3 godine uz izradu i javnu obranu doktorskog rada.

Imajući u vidu Kriterije za vrednovanje inozemnih visokoškolskih kvalifikacija Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa od dana 3. siječnja 2005. godine, temeljem Zakona o znanstvenoj djelatnosti i visokom obrazovanju (N.N. 123/03, 198/03 i 105/04), inozemna visokoškolska kvalifikacija čije se priznavanje traži vrednuje se kao kvalifikacija koja je izjednačena u pravima s diplomom poslijediplomskog sveučilišnog studija čijm se završetkom stječe akademski stupanj doktor tehničkih znanosti – tehnička kemija (dr. sc.).

Nadalje, Nacionalni ENIC/NARIC ured je temeljem dostavljenog vrednovanja i zaprimljene dokumentacije, dana 18. rujna 2006. godine, donio Preporuku o priznavanju visokoškolske kvalifikacije, KLASA: UPII-602-06/06-02/0778, URBROJ: 533-07-06-03, koja je upućena Agenciji za znanost i visoko obrazovanje.

Rješenje je oslobođeno od plaćanja upravne pristojbe sukladno članku 7. Zakona o upravnim pristojbama («Narodne novine» br. 8/96, 77/96, 95/97, 131/97, 68/98, 66/99, 145/99, 30/00, 116/00, 163/03 i 17/04).

Pouka o pravnom lijeku:

Protiv ovog rješenja stranka može podnijeti žalbu Ministarstvu znanosti, obrazovanja i športa, Trg hrvatskih velikana 6, Zagreb, u roku od 15 dana od dana dostave ovog Rješenja.

vršiteljica dužnosti ravnateljica

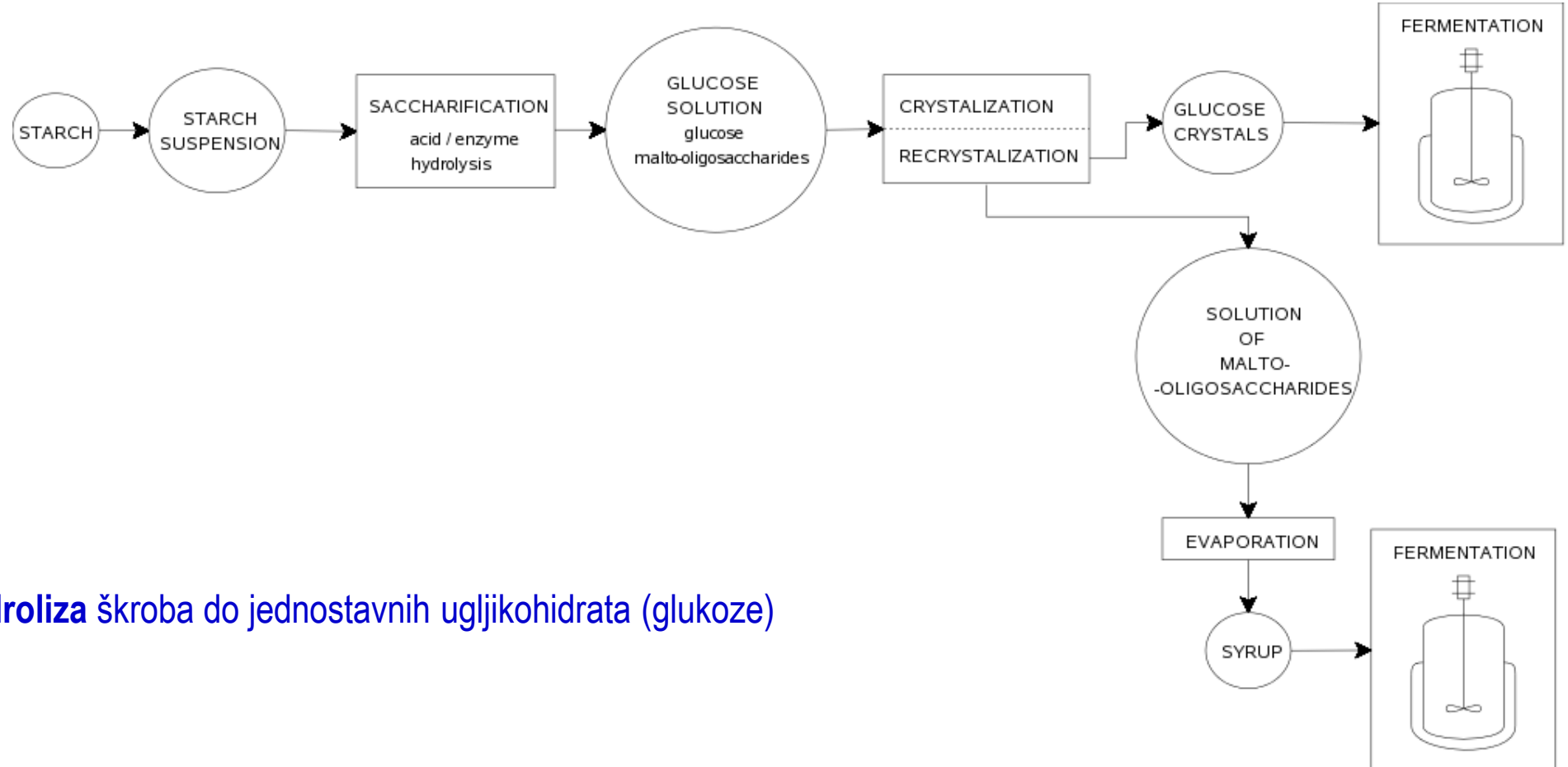
prof. dr. sc. Jasmina Havranek
 REPUBLIKA HRVATSKA
 AGENCIJA ZA ZNANOST I VISOKO OBRAZOVANJE

Dostaviti:

- Anita Slavica, Prislavje 8, 10 000 Zagreb
- Nacionalni ENIC/NARIC ured (original i kopija)
- Pismohrana, ovdje

Intelektualno vlasništvo

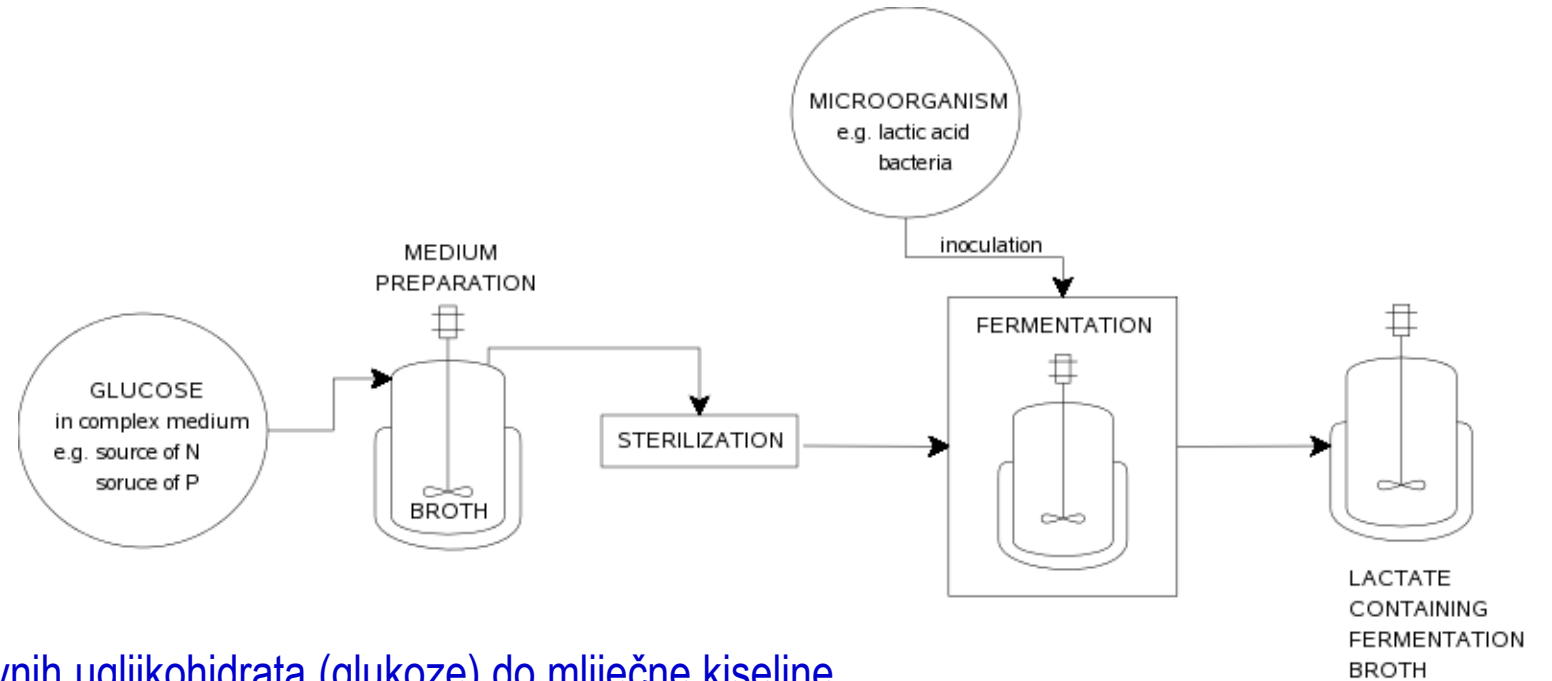
- case study 2:
state of the art (1)



hidroliza škroba do jednostavnih ugljikohidrata (glukoze)

Intelektualno vlasništvo

- *case study 2:*
state of the art (2)

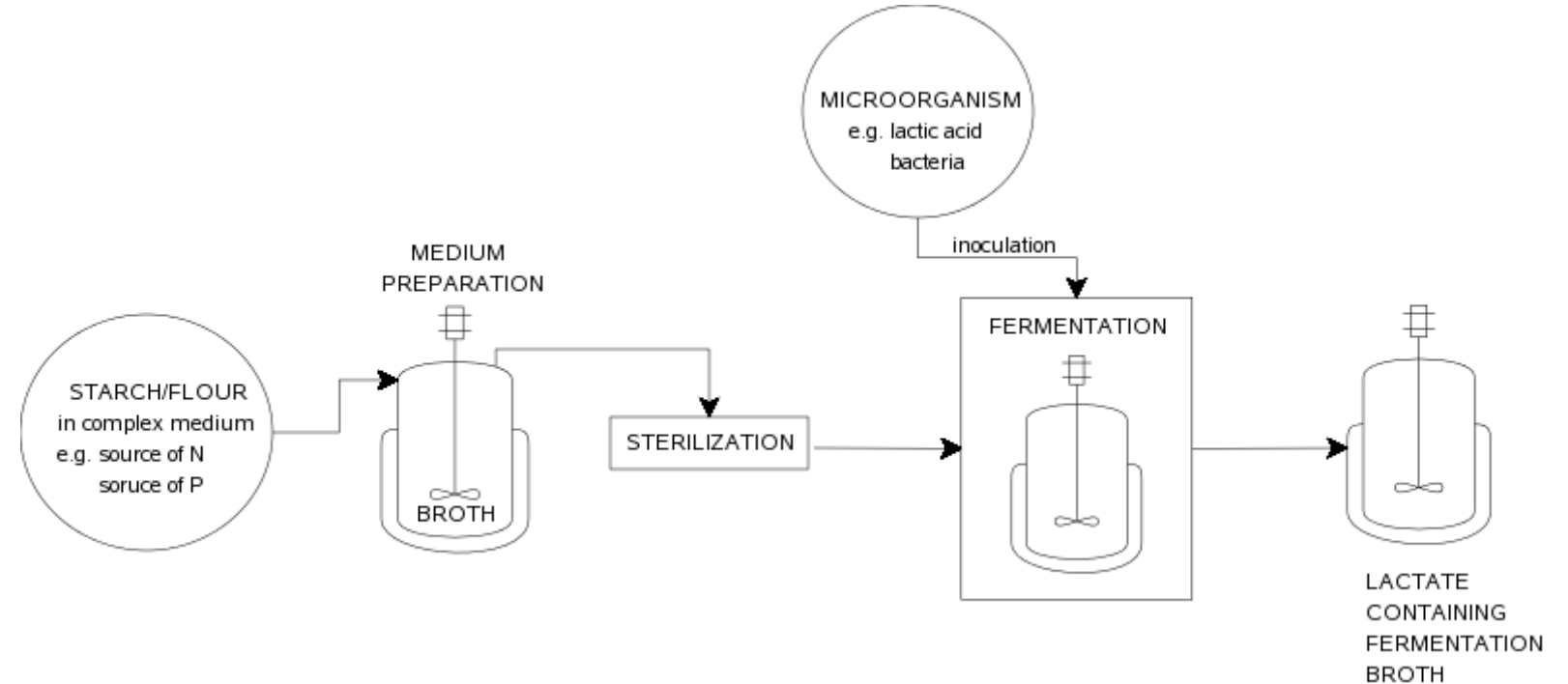


fermentacija jednostavnih ugljikohidrata (glukoze) do mliječne kiseline

Intelektualno vlasništvo

- *case study 2*: proizvodnja mliječne kiseline iz škrobnih sirovina s pomoću amilolitičke bakterije mliječne kiseline

the invention (1)



hidroliza i fermentacija



Intelektualno vlasništvo

- case study 2:

Sveučilište u Zagrebu

Ured za transfer tehnologije

Obrazac za provjeru prava na rezultat

istraživačkog i stručnog rada (1)

Obrazac za provjeru prava na rezultat istraživačkog i stručnog rada

Ovaj obrazac ispunjava svaka osoba koja je doprinijela stvaranju rezultata koji su predmet Prijave za provođenje postupka pravne zaštite (registracije) i postupka komercijalizacije rezultata istraživačkog i stručnog rada (dalje u tekstu: Prijava) bez obzira da li je osoba navedena kao podnositelj Prijave ili ne.

Ovaj obrazac služi kako bi Ured za transfer tehnologije Sveučilišta u Zagrebu utvrdio kome pripadaju prava intelektualnog vlasništva i druga prava na rezultat istraživačkog i stručnog rada koji je predmet Prijave (dalje u tekstu: Rezultat), te postoje li treće osobe koje polažu ili bi mogle polagati bilo kakva prava po bilo kojoj osnovi na Rezultat.

Ti podatci su značajni kako bi se u potpunosti utvrdile sve činjenice te obaveze koje bi mogle utjecati na zaštitu i slobodno raspolaganje Rezultatom, uključujući komercijalizaciju. Stoga Vas molimo da, ukoliko niste sigurni da li je neki podatak značajan ili ne, da ga svakako priopćite putem ovog Obrasca.

1. Naslov Prijave za provođenje postupka pravne zaštite (registracije) i postupka komercijalizacije rezultata istraživačkog i stručnog rada
Proizvodnja mliječne kiseline na škrobnim sirovinama s pomoću amiloitičke bakterije mliječne kiseline
Broj Prijave (popunjava Ured za transfer tehnologije)
0001

2. Ime, prezime i titula
Doc. dr. sc. Anita Slavica

3. Vremensko razdoblje provedbe istraživanja/stručnog rada unutar kojeg je nastao Rezultat	
Od: 07.07.2008.	Do: 19.12.2008.

4. Za vrijeme vremenskog razdoblja pod 3. bili ste (zaokružite SVE što se odnosi na Vašu situaciju):
1. zaposleni pri sastavnici Sveučilišta ili Sveučilištu u Zagrebu (ugovor o radu)
DA
Naziv sastavnice: Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Šifra radnika (s liste za plaću): (nemamo šifru na platnoj listi)
Kontakt podatci poslodavca: Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, HR-10000 Zagreb, tel.: 01 4836 047, 01 4605 000; faks: 01 4836 083; e-pošta: dekan@pbf.hr
Promjene (Navedi ako se status ili okolnosti zaposlenja mijenjao za vrijeme trajanja istraživanja/stručnog rada (npr. promjena poslodavca, radnog mjesta, upućivanje na rad u inozemstvo, rad na izdvojenom radnom mjestu i sl.):

Sveučilište u Zagrebu

Intelektualno vlasništvo

- case study 2:

Sveučilište u Zagrebu

Ured za transfer tehnologije

Obrazac za provjeru prava na rezultat

istraživačkog i stručnog rada (2)

2. obavljali istraživački/stručni rad koji je doveo do nastanka Rezultata temeljem nekog drugog ugovora (zaokružite)

- ugovor o djelu
- ugovor o stvaranju autorskog djela po narudžbi (ugovor o autorskom djelu)
- nešto drugo:

Naziv sastavnice/organizacije s kojom imate potpisan ugovor:
Kontakt podatci sastavnice/organizacije:
Broj ugovora:
Datum ugovora:
Ako postoji, naziv organizacije u kojoj ste zaposleni:
Kontakt podatci poslodavca:

3. student
Naziv sastavnice/škole na kojoj studirate:
Tip studija (npr. preddiplomski, diplomski, doktorski):
Naziv studija:
Navedite ugovore ili propise o studiranju (npr. izjave, pravilnici o studiju, ugovori o financiranju studija i/ili eksperimentalnog dijela studija):
Mentor:
Voditelj studija:
Okolnosti pod kojima ste sudjelovali u istraživačkom/stručnom radu koji je doveo do nastanka Rezultata (navesti ime odgovorne osobe za izvođenje istraživačkog/stručnog rada):

Ako postoji, naziv organizacije u kojoj ste zaposleni:
Kontakt podatci poslodavca:

4. nešto drugo
Navedite što:
Okolnosti pod kojima ste sudjelovali u istraživačkom/stručnom radu koji je doveo do nastanka Rezultata:

Naziv sastavnice na kojoj ste provodili istraživanje/stručni rad:
Ako postoji, naziv organizacije u kojoj ste zaposleni:
Kontakt podatci poslodavca:

5. Navedite sve izvore financiranja istraživanja/stručnog rada koje je doveo do nastanka Rezultata u vremenskom razdoblju pod 3. Financiranje je moglo biti korišteno na plaće ili naknade suradnika, nabavku opreme, kemikalija ili potrošnog materijala.

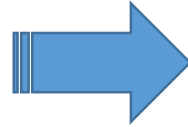
Mogući izvori financiranja su na primjer: MZOŠ, NZZ, UKF, HIT, BICRO, FP7 ili drugi EU projekti, NIH, programi drugih zaklada, te privatni sektor.

Izvor financiranja	Vrijeme financiranja (prema ugovoru)	Datum i broj ugovora (ako postoji)
1. MZOŠ-Ugovor o suradnji radi provedbe znanstvenog projekta	2. siječnja 2007.- na 5 godina;	058-0581990-1997
2. MZOŠ-Ugovor o novčanoj potpori kapitalne znanstvene opreme (s PBF-om)	Ugovor potpisan: 16. svibnja 2006.	URbroj (MZOŠ): 533-08-06-005 URBROJ (PBF): 01-1094/2006
3. novački ugovor (A. Trontel)		

Sveučilište u Zagrebu

Intelektualno vlasništvo

- *case study 2:*
Sveučilište u Zagrebu
Ured za transfer tehnologije
Obrazac za provjeru prava na rezultat
istraživačkog i stručnog rada (3)



6. Da li ste Vi (bili) osoba odgovorna (npr. glavni istraživač projekta, voditelj projekta) za sve izvore financiranja navedene pod 5.

DA NE

Ako NE, molimo navedite tko je (bio) glavni istraživač ili odgovorna osoba za svaki izvor financiranja:

1. Srdan Novak, je glavni istraživač, potpisao i Vladimir Mrša, Dekan PBF
2. Vladimir Mrša, Dekan PBF

7. Da li je istraživanje/stručni rad vezan uz nastanak Rezultata uključivalo bilo kakvu potporu u naravi od trećih osoba (fizičke osobe ili organizacije)? Na primjer korištenje opreme, uzoraka, materijala, kemikalija, softvera...

DA NE

Ako DA, molimo navedite podatke o tipu i izvoru potpore:

8. Da li su Rezultati na bilo koji način povezani s predmetom nekog drugog istraživanja ili stručnim uslugama, konzultantskim uslugama, ugovorima o korištenju materijala (material transfer agreement) koji nisu naprijed navedeni, bilo da su oni postojeći, završeni ili planirani u budućnosti?

DA NE

Ako DA, molimo navedite podatke o takvim aktivnostima i ugovorima:

9. Da li su prilikom istraživanja i nastanka Rezultata bili korišteni uzorci ili materijal ljudskog porijekla?

DA NE

Ako DA, molimo navedite te priložite dokaz o potpisanim izjavama o informiranom pristanku koje uključuju komercijalno raspolaganje rezultatima?

10. Molimo navedite sve osobe za koje smatrate da su značajno pridonijele nastanku prijavljenih Rezultata, te da se njihov doprinos može identificirati.

Napominjemo da sve ovdje navedene osobe neće nužno biti navedene kao izumitelji na eventualnim patentnim prijavama koje se odnose na Rezultat. Uvrštenje osobe u patentnu prijavu kao izumitelja ovisit će o tome zadovoljava li njezin doprinos u nastanku Rezultata kriterije za izumitelja predviđene odgovarajućim propisima, što se utvrđuje u svakom pojedinom slučaju.

Intelektualno vlasništvo

- *case study 2:*

Sveučilište u Zagrebu

Ured za transfer tehnologije

Obrazac za provjeru prava na rezultat

istraživačkog i stručnog rada (4)

Ime i prezime	Podatci za kontakt
Srdan Novak	Navedeni u obrascu za Prijavu
Antonija Trontel	Navedeni u obrascu za Prijavu
Božidar Šantek	Navedeni u obrascu za Prijavu

Izjavljujem da su informacije iznesene u ovom Obrascu točne, istinite i potpune prema mojem najboljem znanju i uvjerenju.

Dopuštam da Ured za transfer tehnologije Sveučilišta u Zagrebu bez ikakvog mog daljnjeg odobrenja zatraži i izvrši uvid u ugovore/sporazume koje sam naveo u ovom Obrascu a čiji sam potpisnik.

Važna napomena:

Ovaj obrazac služi kako bi Ured za transfer tehnologije Sveučilišta u Zagrebu utvrdio kome pripadaju prava intelektualnog vlasništva i druga prava na rezultat istraživačkog i stručnog rada koji je predmet Prijave (dalje u tekstu: Rezultat), te postoje li treće osobe koje polažu ili bi mogle polagati bilo kakva prava po bilo kojoj osnovi na Rezultat.

Navođenje netočnih i/ili nepotpunih podataka može ugroziti ostvarenje pravne zaštite Rezultata, te slobodno raspolaganje Rezultatima, uključujući komercijalizaciju. Posljedice mogu uključivati ništavost patenta, kaznenu odgovornost, sudske tužbe i/ili gubitak prihoda od komercijalizacije.

Ime i prezime (isto kao pod Z):	
Anita Slavica	
Potpis:	Mjesto i datum:
	Zagreb, 15.06.2009.

Intelektualno vlasništvo

- case study 2: WO2011098843 A2

<https://www.google.com/patents/>

WO2011098843A2?cl=en

Lactic acid production from starch-based materials by amylolytic lactic acid bacteria

Abstract

The invention pertains to a procedure for producing lactic acid or its salts. The procedure describes a simultaneously conducted saccharification of starch from a starch material and fermentation of sugars thereof into lactic acid by selected bacterium that produce amylolytic enzymes, which eliminates the need for the use of commercial enzymes as normally practiced in prior art.

Classifications

C12P7/56 Lactic acid

WO2011098843A2
WIPO (PCT)

Download PDF Find Prior Art Similar

Other languages: French

Inventor: Anita Slavica, Srdan Novak, Antonija Trontelj, Božidar SANTEK

Worldwide applications
2011 - WO

Application PCT/HR2011/000001 events ©

2010-02-10 • Priority to HR201000074
2010-02-10 • Priority to HRP20100074A
2011-01-07 • Application filed by Sveučilište u Zagrebu
2011-08-18 • Publication of WO2011098843A2
2011-10-20 • Publication of WO2011098843A3

Info: Patent citations (6), Non-patent citations (35), Cited by (3), Legal events, Similar documents, Priority and Related Applications

External links: Espacenet, Global Dossier, PatentScope, Discuss

Patents English French

Find prior art Show this application

Lactic acid production from starch-based materials by amylolytic lactic acid bacteria WO 2011098843 A2

ABSTRACT

The invention pertains to a procedure for producing lactic acid or its salts. The procedure describes a simultaneously conducted saccharification of starch from a starch material and fermentation of sugars thereof into lactic acid by selected bacterium that produce amylolytic enzymes, which eliminates the need for the use of commercial enzymes as normally practiced in prior art.

DESCRIPTION (OCR text may contain errors)

Lactic acid production from starch-based materials

by amylolytic lactic acid bacteria

Invention description

According to the International Patent Classification, the present invention belongs to Class C012P7/56 or Subclass C12R.

This invention pertains to a process for the production of lactic acid or salts thereof. The process describes simultaneous saccharification of starch from starch-based materials and the fermentation of sugars thereof to lactic acid by a selected bacterial strain that produces amylolytic enzymes, which thus makes the hitherto established practice of utilizing commercial enzymes superfluous.

In bioprocesses various species of microorganisms are used to obtain many different products of commercial interest. Bioprocesses are used in the production of rather simple compounds such as alcohols (ethanol, butanol), organic acids (citric, itaconic, gluconic, lactic acids) and amino acids (glutamic acid, lysine), and also in the production of more complex compounds such as antibiotics (penicillin, tetracycline), enzymes, vitamins (riboflavin, B 12, β-carotene) and hormones, so in such processes the bioprocess production successfully competes with the chemical synthesis. The production of lactic acid by sugar fermentation by lactic acid bacteria is a long known process.

The term lactic acid bacteria (LAB) means a specific group of similar non-sporogenous Gram-positive bacteria that produce lactic acid as a final product of metabolism. Most of these bacteria can ferment only simple sugars (mainly some mono- and di-hexoses) and are unable to ferment starch. The existing processes of lactic acid production from starch as basic material require some extra processes of starch degradation into fermentable sugars. These starch degradation processes precede fermentation and represent a significant item in the overall process costs. Described in prior art are also some attempts to combine the starch degradation process (so-called saccharification) and the fermentation process within a single production phase, i.e., in the same reaction vessel, so these processes are labeled SSF (abbrev. of Simultaneous Saccharification and Fermentation).

The term fermentation means a process of microbial conversion of carbon sources via different metabolic pathways in the cells of various microorganisms to a certain product in anaerobic or microaerophilic conditions, therefore, virtually without oxygen. For an unimpeded course of fermentation it is necessary to supply these microorganisms with all needed nutritive substances. Such substances include a carbon source, as well as the sources of nitrogen, phosphorus, and other biogenic elements, plus the growth factors.

The term carbon source means organic matter that is derived by

Publication number	WO2011098843 A2
Publication type	Application
Application number	PCT/HR2011/000001
Publication date	Aug 18, 2011
Filing date	Jan 7, 2011
Priority date	Feb 10, 2010
Also published as	WO2011098843A3
Investors	Anita Slavica, Srdan Novak, Antonija Trontelj, Božidar SANTEK
Applicant	Sveučilište u Zagrebu
Expert Citation	BIBTeX, EndNote, RefMan
Patent Citations (6), Non-Patent Citations (35), Referenced by (1), Classifications (3), Legal Events (3)	
External Links: Patentscope, Espacenet	

CLAIMS (OCR text may contain errors)

PATENT CLAIMS

1. The lactic acid production procedure, characterized in that it includes the following steps:

- a) simultaneous saccharification and fermentation, specifically simultaneous saccharification and fermentation of semi-solid substrate in the bioreactor by only one species of amylolytic lactic acid bacteria
- b) separation of lactic acid from the fermentation medium
- c) purification of lactic acid

2. The lactic acid production procedure, according to Claim 1, characterized in that it includes the following steps:

- a) simultaneous saccharification and fermentation, specifically simultaneous saccharification and fermentation of semi-solid substrate in the bioreactor by only one species of amylolytic lactic acid bacteria
- b) separation of lactic acid from the fermentation medium
- c) purification of lactic acid

where in step a) no amylolytic enzymes are added and nutritive substances are added in a concentration of 0 g L⁻¹ to 75 g L⁻¹.

3. The lactic acid production procedure, according to Claim 2, characterized in that it includes the following steps:

- a) simultaneous saccharification and fermentation, specifically simultaneous saccharification and fermentation of semi-solid substrate in the bioreactor by only one species of amylolytic lactic acid bacteria
- b) separation of lactic acid from the fermentation medium
- c) purification of lactic acid

where in step a) neither the amylolytic enzymes nor the inorganic nutritive substances are added, whereas nutritive substances are added in a concentration of up to 60 g L⁻¹.

Intelektualno vlasništvo

- case study 2:

raskid Ugovora između SuZ i sastavnice

Sveučilište u Zagrebu, Trg maršala Tita 14, Zagreb, kojeg zastupa rektor prof.dr.sc. Vesna Bjeliš (dalje Sveučilište), s jedne strane

te

prof.dr.sc. Anita Slavica, Prisavije 8, 10000 Zagreb,
prof.dr.sc. Srdan Novak, Turanjska 3F, 10020 Zagreb-Novi Zagreb,
Antonija Trontel dipl.iag., Trg mladosti 6, 10290 Zaprešić,
prof.dr.sc. Božidar Šantek, Purgarija 18, Kerestince, 10431 Sveta Nedjelja,

(dalje Istraživači)

i

Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 5, Zagreb, kojeg zastupa dekanica prof.dr.sc. Mirjana Hruškar (dalje Fakultet), s druge strane,

u Zagrebu, dana 20. veljače 2012. godine

RASKIDAJU

Ugovor o prijenosu prava intelektualnog vlasništva
na rezultatu istraživačkog i stručnog rada od 19. lipnja 2009. godine

Članak 1.

Stranke suglasno utvrđuju:

- da su dana 19. lipnja 2009. godine sklopile u Zagrebu Ugovor o prijenosu prava intelektualnog vlasništva na rezultatu istraživačkog i stručnog rada (dalje RIS) opisanom u Prijavi za provođenje postupka pravne zaštite (registracije) i postupka komercijalizacije rezultata istraživačkog i stručnog rada naslova **Proizvodnja mliječne kiseline na škrobnim sirovinama s pomoću amilolitičke bakterije mliječne kiseline** (ur. broj: 380-02/40-09-3; klasifikacijska oznaka: 641-01/09-01/19);
- da je na temelju članka 3. toga Ugovora Sveučilište steklo prava industrijskog vlasništva na RIS;
- da je na temelju članka 4. toga Ugovora Sveučilište steklo autorska i srodna prava iskorištavanja koja postoje u odnosu na RIS.

Članak 2.

Stranke suglasno utvrđuju da je u sklopu postupka pravne zaštite (registracije) i komercijalizacije RIS-a Sveučilište o svom trošku izvršilo sljedeće radnje:

Intelektualno vlasništvo

- *case study 2:*
punomoć sastavnice
patentnom odvjetniku

PUNOMOĆ
AUTHORIZATION

Reg. br. zastupnika: 135
Representative Ref. No

Ja/Mi
I/We

Ime(na) / Name(s): Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Adresa / Address
Ulica i broj / Street and house No: Piorottijeva 6
Mjesto i pošt. br. / City and postal code: 10000 Zagreb
Država / Country: Hrvatska
Telefaks / Telefax:

o p u n o m o ć u j e m (o)
do hereby authorize

Zastupnika / Representative: Tihomir Dragun

Adresa za korespondenciju / Address for correspondence
Ulica i broj / Street and house No: Milivoja Matošeca 2
Mjesto i pošt. br. / City and postal code: 10000 Zagreb
Država / Country:
Telefon i telefaks / Telephone / Telefax:

da me/nas zastupa kod Državnog zavoda RH za intelektualno vlasništvo **to represent me/us before the State Intellectual Property Office of Croatia**

u svim postupcima koji su vezani na prijavu(e) patenta/validaciju EPO patenta(ata)/priznatog(ih) patenta(ata) u Republici Hrvatskoj (HR):

in all proceedings related patent application(s)/validation of granted EPO patent(s)/granted patent(s) in the Republic of Croatia (HR):

P20100074A

Opunomoćeni je ovlašten da uloži prijavu(e) i poboljšanja, da plaća i prima sve pristojbe, da prima obavijesti i ostale dokumente, te poduzme sve drugo za zaštitu svojih/naših prava u cjelosti za vrijeme njihovog trajanja. Sa time prestaje važnost punomoći dosadašnjim zastupnicima.

Said Attorney is authorized to file the application(s) and improvements, to pay and receive fees, to receive notices and other documents, as well as to take any measures in order to protect my/our rights during the entire period of validity thereof. Appointment of the existing representative is herewith cancelled.

Punomoć se može prenositi / Sub-authorization da / may be given ne / may not be given

Potpis(i) / Signature(s):

Mjesto i datum / Place and date
Potpis / Signature
Ime potpisane osobe i funkcija / Name of person(s) signing and capacity: dr.sc. Damir Ježek, dekan


Intelektualno vlasništvo

- case study 2:

HR PK20100074 B3

Rješenje o priznanju

konzenzualnog patenta (1)


REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA INTELKTUALNO VLASNIŠTVO

KLASA: UP/1-381-03/10-010/0074
URBROJ: 559-03/2-15-036-009
Broj konzenzualnog patenta: PK20100074
Zagreb, 16. prosinca 2015.

KLASA: UP/1-381-03/10-010/0074
URBROJ: 559-03/2-15-036-009
18 -01- 2016

Državni zavod za intelektualno vlasništvo na temelju članka 15. stavka 1. Zakona o patentu ("Narodne novine", broj 173/03., 87/05., 76/07., 30/09., 128/10., 49/11. i 76/13.), povodom prijave patenta podnosioca: Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, zastupanog po: Tihomir Dragun, Milivoja Matošeca 2, 10000 Zagreb, radi priznanja konzenzualnog patenta, donosi

R J E Š E N J E

1. Usvaja se zahtjev za priznanje konzenzualnog patenta po prijavi broj P20100074A, podnesenoj dana 10. veljače 2010. godine, za izum pod nazivom: PROIZVODNJA MLJEČNE KISELINE IZ ŠKROBNIH SIROVINA S POMOĆU AMILOLITIČKE BAKTERIJE MLJEČNE KISELINE, prema opisu, nacrtu i patentnim zahtjevima navedenim u spisu konzenzualnog patenta broj PK20100074.

Priznato pravo upisuje se u registar патената Državnog zavoda za intelektualno vlasništvo pod brojem

PK20100074

nositelj konzenzualnog patenta: **Prehrambeno-biotehnoški fakultet,**
Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, HR

s oznakom MKP: **C12P 7:56 (2006.01)**

izumitelji naznačeni u prijavi: **Anita Slavica,**

REPUBLIC OF CROATIA
STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

NTD3800

Ulica glavnog Vukovara 70, 100 000 Zagreb, Hrvatska/Croatia. Tel.: (+385 1) 8106 188 (Centralni Centar), 8 106 410 (Prigovorni i posredni/mediating Office); 8 109 826 (Informacijski/Information Center - IIC/38074). Fax: (+385 1) 8112 017. E-pošta/E-mail: info@zivo.hr

Intelektualno vlasništvo

- *case study 2:*

HR PK20100074 B3

Rješenje o priznanju

konsenzualnog patenta (2)

2. Podaci o priznatom konsenzualnom patentu iz točke 1. ovoga rješenja bit će objavljeni u Hrvatskom glasniku intelektualnog vlasništva broj 1/2016., dana 1. siječnja 2016. uz patentni zahijev br. 1.

O b r a z l o ž e n j e

Podnositelj zahtjeva za priznanje patenta: Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, podnio je putem zastupnika, dana 10. veljače 2010. godine prijavu pod brojem: P20100074A, za izum pod nazivom: PROIZVODNJA MLIJEČNE KISELINE IZ ŠKROBNIH SIROVINA S POMOĆU AMILOLITIČKE BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE. Prijava patenta pod brojem P20100074A objavljena je u Hrvatskom glasniku intelektualnog vlasništva broj 8/12, dana 31. kolovoza 2012.

Na temelju članka 36. stavka 1. točka 2. Zakona o patentu, 26. siječnja 2012. podnositelj prijave podnio je zahtjev za priznanje konsenzualnog patenta, koji je objavljen u Hrvatskom glasniku intelektualnog vlasništva broj 2/2015. Kako u zakonskom roku od 6 mjeseci od datuma objave zahtjeva za priznanje konsenzualnog patenta nije podnesen prigovor iz članka 43. stavka 1. Zakona o patentu, ispunjeni su uvjeti za priznanje konsenzualnog patenta.

Slijedom navedenog, a primjenom odredbi članka 48. stavka 1. točka 2. te stavka 7. kao i članka 49. stavka 1. citiranoga Zakona, odlučeno je kao u izreci ovoga rješenja.

Uputa o pravnom lijeku:

Protiv ovog upravnog akta može se izjaviti žalba Žalbenom vijeću u području prava industrijskog vlasništva, u roku od 30 dana od dana primitka ovoga akta. Žalba se predaje Državnom zavodu za intelektualno vlasništvo neposredno ili se šalje poštom. Za podnošenje žalbe plaća se 100,00 kuna upravne pristojbe po tar. br. 8.5. Tarife upravnih pristojbi koja je sastavni dio Zakona o upravnim pristojbama u području prava intelektualnog vlasništva ("Narodne novine", broj 64/00., 160/04., 62/08., 30/09. i 49/11.) i 7 800,00 kuna naknade troškova postupka prema stavku 1. članka 18. Uredbe o naknadama za posebne troškove i troškove za pružanje informacijskih usluga Državnog zavoda za intelektualno vlasništvo ("Narodne novine", broj 109/11. i 96/13.).

DOSTAVITI: nositelju konsenzualnog patenta putem zastupnika
- Tihomir Dragun, Milivoja Matošeca 2, Zagreb

Načelnica Sektora
Jasminka Adamović, dipl. inž.



- case study 2:

HR PK20100074 B3

isprava o konsenzualnom patentu



Objava konsenzualnih patenata



Intelektualno vlasništvo

- case study 2:

([http://it-app.dziv.hr/Glacnici/pdfPrikaz.aspx?](http://it-app.dziv.hr/Glacnici/pdfPrikaz.aspx?hgiv=01_2016)

[hgiv=01_2016](#), str. 12 – 404 file or directory not found)

HR P20140186 B3

(81) MKP	(10)	
A61K 35/02 (2015.01)		
A61P 13/00 (2006.01)		
A61P 17/02 (2006.01)		
(11) PK20140186	(46)	01.01.2016.
(21) P20140186A	(22)	27.02.2014.
	(43)	16.01.2015.

(84) LIJEKOVITI PRIPRAVAK, GLINENA MASA, ZA LIJEČENJE VELIKIH OPEKLINA IRANA
HEALTH PREPARATION CONTAINING CLAY, FOR THE TREATMENT OF BURNS AND SORES

(73/72) Dragan M. Dimitrijević, Ana Katarina Zrnska 11, 33520 Slatina, HR

(72) Bogdanica Dimitrijević, Vjena: Ivana Meštrovića 1/G, 31000 Osijek, HR

Hrđorag Dimitrijević, Ana Katarina Zrnska 11, 33520 Slatina, HR

(57) Lijekoviti pripravak, glinena masa, kojim se rješavaju posljedice velikih opekлина, rana i čirna drugih patničkih poremećaja kod ljudi, naznačena time da se koristi kao univerzalno sredstvo koje u relativno kratkom vremenu rješava zdravstvene tegobe zahvaćujući velikoj apsorpcijskoj čvrstoći glinice i biološki ljekovitih biljaka, a čija masa od mijenja nakon što je došlo do sušenja iste, svakih 1 do 2 sata dok rana ne zaraste; u postupku zarastanja rana manji je postotak vode tako da se u zadnjoj fazi glinena masa priprema samo sa ljekovitim biljem a ljekoviti komponenta sastoji se od biljaka:

1) AchilleaMillefolium - uzima se gornja trećina biljke u cvatu, osuši se u hladu i usitni za spremanje u karbonske utijele, a kod spravljanja čajeva može se koristiti i svježa biljka, 2) CalendulaOfficinalis - uzima se svježi ili suhi dio biljke u cvatu, cvijet i lišće, koje se usitni za spremanje čaja 3) SymphytumOfficinale - uzima se korijen biljke, koji se vad uješen, prođe, nakon što se očisti od zemlje i opere, usitni se te se može koristiti svježi ili osušiti.

Patent sadrži još 1 patentni zahtjev.

HR P20130243 B3

(81) MKP	(10)	
B67D 3/02 (2006.01)		
(11) PK20130243	(46)	01.01.2016.
(21) P20130243A	(22)	20.03.2013.
	(43)	13.03.2015.

(84) UNIVERZALNI ADAPTOR ZA DOZATOR PIĆA
UNIVERSAL ADAPTOR FOR BEVERAGE DISPENSER

(73/72) Dražer Sitar, Kamerlith svatova 37, 10298 Donja Bistra, HR

(74) Željko Bihar, Zagreb, HR

(57) Univerzalni adaptor za dozator pića koji se sastoji od kućišta ležišta dozatora (1) sa cilindričnim ležištem dozatora (6) za prihvat dozatora, kućišta ležišta zaštićenog gna boce (2) sa elementom ležišta zaštićenog gna boce (4) utvrđenog montažnim prstenom (5) za kućište ležišta zaštićenog gna boce (2) gdje se unutar elementa ležišta zaštićenog gna boce (4) nalazi cilindrično ležište zaštićenog gna boce (7) za prihvat gna boce; gdje je kućište ležišta dozatora (1) čvrsto spojeno svojim dnom za vrh kućišta ležišta zaštićenog gna boce (2) u dijelu u kojem isto ulazi u kućište ležišta dozatora (1); naznačen time da se pregrada komore rezervne tekućine (3) nalazi smještena između gornjeg dijela elementa ležišta zaštićenog gna boce (4) i sušenja izvedenog na vrhu kućišta ležišta zaštićenog gna boce (2) na mjestu gdje dijelom ulazi u kućište ležišta dozatora (1), formirajući time komoru sa rezervnom tekućinom (3) između ojeva pregrade komore rezervne tekućine (3) i unutarnje stijenke kućišta ležišta dozatora (1); gdje navedena rezervna tekućina koja se zadržava pri radu s dozatorom pospješuje rad dozatora piće simulirajući isisavanje kao da je boca uvijek puna.

Patent sadrži još 3 patentna zahtjeva.

HR P20100074 R3

(81) MKP	(10)	
C12P 7/56 (2006.01)		
(11) PK20100074	(46)	01.01.2016.
(21) P20100074A	(22)	10.02.2010.
	(43)	31.08.2012.

(84) PROIZVODNJA MILIFONNE KISLINE IZ ŠKROBNIH SIROVINA S POMOĆU AMILOLITIČKE BAKTERIJE MLJEČNE KISELINE
LACTIC ACID PRODUCTION FROM STARCH-CONTAINING RAW MATERIALS BY AMYLOLYTIC LACTIC ACID BACTERIA

(73) Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Pienitljeva 6, 10000 Zagreb, HR

(72) Anita Slavica, Prisađe 8, 10000 Zagreb, HR
Srđan Novak, Turanjska 3F, 10020 Zagreb, HR

Antonija Trontić, Trg mladosti 6, 10200 Zaprešić, HR
Božidar Šanbak, Purgarja 18, Kerestinec, 10431 Sveta Nedelja, HR

(74) Tihomir Dragun, Zagreb, HR

(57) Postupak dobivanja mlječne kiseline, naznačen time da sadrži slijedeće korake:

simultane coharifikacije i fermentacije i to kao simultane coharifikacije i fermentacije polučvrstog supstrata u bioreaktoru pomoću samo jedne vrste amilolitičke bakterije mlječne kiseline izdvajanja mlječne kiseline iz prevrele hranjive podloge pročišćavanja mlječne kiseline.

Patent sadrži još 19 patentnih zahtjeva.

HR P20130152 B3

(81) MKP	(10)	
C25B 9/00 (2006.01)		
C25B 1/08 (2006.01)		
(11) PK20130152	(46)	01.01.2016.
(21) P20130152A	(22)	25.02.2013.
	(43)	29.08.2014.

(84) GENERATOR ZA PROIZVODNJU ORTOVODIKA
GENERATOR FOR PRODUCING ORTHO-HYDROGEN

(73/72) Petar Jončić, Lipnička 10 10000 Zagreb, HR
Dinko Jakušić, Načika 6, 10000 Zagreb, HR

(57) Generator za proizvodnju ortovodika sastavljen od naznjenično namizanih brtvi i elektroda te omeđen rubnim pločama naznačen time da obuhvata sklop brtvi osnovne ćelije sastavljen od naznjenično prislonjenih brtvi pri čemu je uz brtvu s granličnikom i umetnutom elektrodom (10) prislonjena brtva s granličnikom (20), na koju je zatim prislonjena potporna brtva s granličnikom (40), na koju je zatim prislonjena brtva bez granličnika i umetnutim rubnicima kanalice (30), na koju je zatim prislonjena potporna brtva s granličnikom (40), na koju je zatim prislonjena brtva s granličnikom (20), na koju je zatim prislonjena brtva s granličnikom i umetnutom elektrodom (10); i da je na navedeni sklop brtvi osnovne ćelije prislonjen sklop duće ćelije sastavljen od naznjenično prislonjenih brtvi pri čemu je uz brtvu s granličnikom (20), prislonjena potporna brtva s granličnikom (40), na koju je zatim prislonjena brtva bez granličnika i umetnutim rubnicima kanalice (30), na koju je zatim prislonjena potporna brtva s granličnikom (40), na koju je zatim prislonjena brtva s granličnikom (20), na koju je zatim prislonjena brtva s granličnikom i umetnutom elektrodom (10); i da su sklopovi ćelija s obje strane omeđeni završnim sklopom brtvi sastavljenim od naznjenično prislonjenih brtvi ploča, pri čemu je na rubnu ploču c otvora za dovod i odvod (50) prislonjena brtva s granličnikom (20), na koju je zatim prislonjena potporna brtva s granličnikom (40), na koju je zatim prislonjena brtva bez granličnika i umetnutim rubnicima kanalice (30), na koju je zatim prislonjena potporna brtva s granličnikom (40), na koju je zatim prislonjena brtva s granličnikom (20).

Patent sadrži još 4 patentna zahtjeva.

Intelektualno vlasništvo

- *case study 2:*

HR PK20100074 B3

spis konsenzualnog patenta (1-9)


(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(10) Identifikator
dokumenta:

HR PK20100074 B3

(12) **SPIS**
KONSENZUALNOG PATENTA

(isključivo za provjeru i korekciju podataka)

(51) MKP:
C12P 7/56 (2006.01)

(45) Datum objavlivanja konsenzualnog patenta:

(21) Broj prijave patenta: P20100074A

(22) Datum podnošenja prijave patenta: 10.02.2010.

(43) Datum objavlivanja prijave patenta: 31.08.2012.

(73) Nositelj konsenzualnog patenta: **Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, HR**

(72) Izumitelji:
**Anita Slavica, Pri
Srđan Novak, Tur
Antonija Trontel,
Božidar Šantek, f**

(74) Zastupnik:
Tihomir Dragun, N

(54) Naziv izuma:
**PROIZVODNJA MLJEČNE KISELINE IZ SKROBNIH SIROVINA S POMOCU AMILOLITICKE
BAKTERIJE MLJEČNE KISELINE**

HR PK20100074 B3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PCT-009-VOZ	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/HR2011/000001	International filing date (day/month/year) 07/01/2011	(Earliest Priority Date (day/month/year)) 10/02/2010
Applicant SVEUCILISTE U ZAGREBU		
<p>This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 19. A copy is being transmitted to the International Bureau.</p> <p>This international search report consists of a total of <u>5</u> sheets.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.</p>		
<p>1. Basis of the report</p> <p>a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> the international application in the language in which it was filed</p> <p><input type="checkbox"/> a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))</p> <p>b. <input type="checkbox"/> This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).</p> <p>c. <input type="checkbox"/> With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Unity of invention is lacking (see Box No. III)</p> <p>4. With regard to the title,</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> the text is approved as submitted by the applicant</p> <p><input type="checkbox"/> the text has been established by this Authority to read as follows:</p> <p>5. With regard to the abstract,</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> the text is approved as submitted by the applicant</p> <p><input type="checkbox"/> the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority</p> <p>6. With regard to the drawings,</p> <p>a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____</p> <p><input type="checkbox"/> as suggested by the applicant</p> <p><input type="checkbox"/> as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure</p> <p><input type="checkbox"/> as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention</p> <p>b. <input type="checkbox"/> none of the figures is to be published with the abstract</p>		

Form PCT/ISA/210 (first sheet) (July 2009)



Intelektualno vlasništvo

- case study 2: WO2011098843 A2

HR PK20100074 B3



Intelektualno vlasništvo

- case study 2: WO2011098843 A2
HR PK20100074 B3

X – document of particular relevance;

the claimed invention cannot be considered novel
or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

Y – document of particular relevance; the claimed
invention cannot be considered to involve an
inventive step when the document is combined
with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled
in the art

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12P7/56 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, FSTA, COMPENDEX, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHATTERJEE M ET AL: "Production of lactic acid by direct fermentation of starchy wastes by an amylase-producing Lactobacillus.", BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 19, no. 9, 1997, page 873, XP000002656901, DOI: 10.1023/A:1018337604225	1-6, 9-11,13, 17
Y	abstract; figures 1-4 page 873, left-hand column, paragraph 2 - page 874, left-hand column, paragraph 1 ----- -/-	12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 August 2011		Date of mailing of the international search report 26/08/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. Box 5618 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schröder, Gunnar

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2009)



Intelektualno vlasništvo

- case study 2: WO2011098843 A2

HR PK20100074 B3

diplomski/magistarski rad (crosbi)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OHKOUCHI Y ET AL: "Direct production of l(+)-lactic acid from starch and food wastes using <i>Lactobacillus manihotivorans</i> LMG18011", BIORESOURCE TECHNOLOGY, ELSEVIER BV, GB, vol. 97, no. 13, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 1554-1562, XP025105945, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2005.06.004 [retrieved on 2006-09-01]	1-6, 10, 11, 13-17, 19
Y	abstract; figures 1-7; tables 1-4 paragraphs [02.2], [03.5]	12
X	Grzunov, Tomislav: "Semi-solid state fermentation bioprocess for production of lactic acid by amylolytic bacterium <i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531T (graduate thesis)", Croatian scientific bibliography (CROSBI), 461317, 12 November 2009 (2009-11-12), XP000002656902, Retrieved from the Internet: URL:https://bib.irb.hr/prikazi-rad?rad=461317&table=disertacija&lang=EN%20Croatian%20Scientific%20Bibliography%20CROSBI&print=true [retrieved on 2011-08-15]	1-11, 13, 17, 18
Y	abstract	12
X	MERCIER P ET AL: "Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by <i>Lactobacillus amylophilus</i> ", JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 55, no. 2, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 111-121, XP009129731, ISSN: 0268-2575, DOI: 10.1002/JCTB.280550204	1-6, 9-11, 13, 17-20
Y	cited in the application abstract paragraphs [02.1], [2.2.2], [02.3], [2.4.2] - [02.6], [03.1]; figures 5, 6	12



Intelektualno vlasništvo

- case study 2: WO2011098843 A2

HR PK20100074 B3

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XIAODONG W ET AL: "Direct fermentative production of lactic acid on cassava and other starch substrates", BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 19, no. 9, 1997, pages 841-843, XP000002656903, ISSN: 0141-5492 cited in the application abstract; figures 1-3 page 841, right-hand column, paragraph 2 - page 842, right-hand column, paragraph 2	1,2, 6-11, 14-16
X	CHENG P ET AL: "LACTIC ACID PRODUCTION FROM ENZYME-THINNED CORN STARCH USING LACTOBACILLUS AMYLOVORUS", JOURNAL FOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, SOCIETY FOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, UK, vol. 7, 1 January 1991 (1991-01-01), pages 27-34, XP008028809, ISSN: 0169-4146, DOI: 10.1007/BF01575599 cited in the application abstract; figures 1-7; tables 1-3 page 28, left-hand column, paragraph 2 - page 29, right-hand column, paragraph 1 page 30, left-hand column, paragraph 2 - page 33, right-hand column, paragraph 1	1,6-11, 13-16
X	ZHANG D X ET AL: "DIRECT FERMENTATION OF STARCH TO LACTIC ACID BY LACTOBACILLUS-AMYLOVORUS", BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 13, no. 10, 1991, pages 733-738, XP000002656904, ISSN: 0141-5492 cited in the application abstract; figure 3 page 734, paragraph 1-3 page 735, paragraph 2	1,2, 6-11,14
X	YOKOTA Y ET AL: "Production of L-lactic Acid by Direct Fermentation of Potato", KAGAKU KOGAKU RONBUNSHU, vol. 24, no. 5, 10 September 1998 (1998-09-10), pages 722-725, XP000002656905, ISSN: 0386-216X, DOI: 10.1252/kakoronbunshu.24.722 English abstract; page 725; figures 1-3; tables 1, 2	1,2,6, 10, 13-17,19
	-/--	



Intelektualno vlasništvo

- case study 2: WO2011098843 A2

HR PK20100074 B3

znanstveni rad objavljen 2006.

u CABEQ-u

G(Continuation): DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOHN R P ET AL: "Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, vol. 27, no. 2, 1 March 2009 (2009-03-01), pages 145-152, XP025873360, ISSN: 0734-9750, DOI: 10.1016/J.BIOTECHADV.2008.10.004 [retrieved on 2008-10-31] paragraphs [005.], [5.1.]; tables 1, 2	1,2,6-8, 10,14-17
Y	SANTEK B ET AL: "Horizontal tubular bioreactors in biotechnology", CHEMICAL AND BIOCHEMICAL ENGINEERING QUARTERLY, vol. 20, no. 4, December 2006 (2006-12), pages 389-399, XP000002656906, ISSN: 0352-9568 cited in the application page 391, right-hand column, paragraph 2 - page 993, right-hand column, paragraph 2; figures 2-4	12



Intelektualno vlasništvo

- case study 2: WO2011098843 A2

HR PK20100074 B3

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: see form PCT/ISA220		PCT	
		WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)	
		Date of mailing (day/month/year) see form PCT/ISA210 (second sheet)	
Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA220		FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below	
International application No. PCT/HR2011.000001	International filing date (day/month/year) 07.01.2011	Priority date (day/month/year) 10.02.2010	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC INV. C12P756			
Applicant SVEUCILISTE U ZAGREBU			
<p>1. This opinion contains indications relating to the following items:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. I Basis of the opinion <input checked="" type="checkbox"/> Box No. II Priority <input type="checkbox"/> Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability <input type="checkbox"/> Box No. IV Lack of unity of invention <input checked="" type="checkbox"/> Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement <input type="checkbox"/> Box No. VI Certain documents cited <input type="checkbox"/> Box No. VII Certain defects in the international application <input checked="" type="checkbox"/> Box No. VIII Certain observations on the international application</p> <p>2. FURTHER ACTION</p> <p>If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.</p> <p>If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.</p> <p>For further options, see Form PCT/ISA220.</p> <p>3. For further details, see notes to Form PCT/ISA220.</p>			
Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office Gitschiner Str. 103 D-10958 Berlin Tel. +49 30 25901 - 0 Fax: +49 30 25901 - 840		Date of completion of this opinion see form PCT/ISA210	Authorized Officer Schröder, Gunnar  Telephone No. +49 30 25901-326

Form PCT/ISA237 (Cover Sheet) (July 2009)

Intelektualno vlasništvo

- case study 2: WO2011098843 A2

HR PK20100074 B3

Box No. I Basis of the opinion

- With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - the international application in the language in which it was filed
 - a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
- This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
- With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - (means)
 - on paper
 - in electronic form
 - (time)
 - in the international application as filed
 - together with the international application in electronic form
 - subsequently to this Authority for the purposes of search
- In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
- Additional comments:

Box No. II Priority

- The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
- This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
- Additional observations, if necessary:

Intelektualno vlasništvo

- case study 2: WO2011098843 A2

HR PK20100074 B3

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/HR2011/000001

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>12</u>
	No: Claims	<u>1-11, 13-20</u>

Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-20</u>

Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-20</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Intelektualno vlasništvo

- *case study 2: WO2011098843 A2*
HR PK20100074 B3

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

- D1 CHATTERJEE M ET AL, BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 19, no. 9, 1997, page 873
- D2 OHKOUCHI Y ET AL, BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 97, no. 13, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 1554-1562
- D3 Grzunov, Tomislav, Croatian scientific bibliography (CROSBI), 461317, 12 November 2009 (2009-11-12)
- D4 MERCIER P ET AL, JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 55, no. 2, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 111-121
- D5 XIAODONG W ET AL, BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 19, no. 9, 1997, pages 841-843
- D6 CHENG P ET AL, JOURNAL FOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, vol. 7, 1 January 1991 (1991-01-01), pages 27-34
- D7 ZHANG D X ET AL, BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 13, no. 10, 1991, pages 733-738
- D8 YOKOTA Y ET AL, KAGAKU KOGAKU RONBUNSHU, vol. 24, no. 5, 10 September 1998 (1998-09-10), pages 722-725
- D9 JOHN R P ET AL, BIOTECHNOLOGY ADVANCES, vol. 27, no. 2, 1 March 2009 (2009-03-01), pages 145-152
- D10 SANTEK B ET AL, CHEMICAL AND BIOCHEMICAL ENGINEERING QUARTERLY, vol. 20, no. 4, December 2006 (2006-12), pages 389-399

- 1 Novelty
- 1.1 The present application does not meet the criteria of Article 33(2) PCT, because the subject-matter of claims 1-11 and 13-20 is not new.

Intelektualno vlasništvo

- case study 2: WO2011098843 A2

HR PK20100074 B3

1.1.1 The document D1 discloses (abstract):

The production of lactic acid by direct fermentation of waste potato mash by the amylase-producing bacterium *Lactobacillus cellobiosus*. No other nutrients or salts are added to the growth medium. Optionally, the fermentation is pH-controlled by addition of CaCO_3 . It is noted that "waste potato mash" is viewed as being a "semi-solid material" in the common sense.

Separation and purification of lactic acid are implicit features of the process. Other process features are disclosed in the indicated passages (page 873, left-hand column, paragraph 2 - page 874, left-hand column, paragraph 1).

Document D1 therefore anticipates the subject-matter of claims 1-6, 9-11, 13, 17.

1.1.2 Document D2 discloses (abstract; figures 1-7; tables 1-4; paragraphs [02.2], [03.5]):

Lactic acid production from starch and food wastes by *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011, and optimum conditions for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) using soluble starch and food wastes as substrates. No other nutrients or salts are added to the growth medium containing the food waste. Optionally, the fermentation is pH-controlled by addition of NaOH. Product yields ($Y_{L/S}$) as high as 1.11 g/g are obtained (see Table 4). Bacterial cultures are prepared using a modified MRS medium containing a carbon source (glucose or starch, see paragraphs 2.2, 2.5, 2.6). It is implicit that these cultures are used to inoculate the food waste substrate, and that the final fermentation medium thus also comprises ingredients of MRS-medium.

Document D2 therefore anticipates the subject-matter of claims 1-6, 10, 11, 13-17, 19.

1.1.3 Document D3 discloses (abstract):

SSF with *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T using a semi-solid substrate "solid particles of wet corn flour" (automatic translation from Croatian: "čvrstim viažnim česticama kukuruznog brašna"), which is supposedly corn grits. No other nutrients or salts are added to the growth medium.

Document D3 therefore destroys the novelty of claims 1-8, 10, 11, 17, 18.

1.1.4 The document D4 discloses (abstract; paragraphs [02.1], [2.2.2], [02.3], [2.4.2] - [02.6], [03.1]; figures 5, 6):

Intelektualno vlasništvo

- case study 2: WO2011098843 A2
HR PK20100074 B3

SSF with *Lactobacillus amylophilus* on 4.5% mashed corn. No other nutrients or salts are added to the growth medium (see paragraph 2.2.2). A 10% (v/v) inoculum is used in the fermentation (page 114, left column, lines 2-3), which inoculum comprises bacteria grown in MRS (+starch) medium. It is thus implicit that the final fermentation medium also comprises ingredients of the MRS-medium. "Mashed corn" is a raw material which is different from corn starch, and which is viewed as a "semi-solid material" in the common sense. Since there exists no precise limitation concerning the definition of "corn grits" (= coarsely ground corn) in claim 18, it is assumed that mashed corn (containing grains of starch and germ, which grains of starch are destroyed during sterilization of the material, see paragraph 2.2.2), containing solubles as well as insolubles, falls under this definition.

Document D4 therefore destroys the novelty of claims 1-6, 10, 11, 13, 17-20.

- 1.1.5 Documents D5-D9 (passages cited in the search report) disclose further processes wherein starch substrates are converted by SSF using amylolytic lactic acid bacteria.

Document D5 discloses fermentation of raw corn, rice or wheat starch. Lactate production is e.g. 10.1 g/L with initial starch conc. of 10 g/l (see p. 842).

Document D6 discloses fermentation of enzyme-thinned corn starch. Lactate production is e.g. 1.04 g per g of starch (100 g/L lactic acid from 103.8 g/L starch, see page 30, left-hand-column, last paragraph).

Document D7 discloses the fermentation of raw corn starch. Lactate production is e.g. 87 g/L with initial starch conc. of 100 g/l, which corresponds to 0.87 g/g (see Fig. 3).

Document D8 discloses a process wherein potato is fermented. 90% conversion of starch into lactic acid is obtained (see discussion of document D8 in document D2, page 1559). The fermentation medium also contains MRS medium ingredients.

Document D9 is a recent review on the topic and cites some of the documents discussed hereabove.

2 Inventive step

- 2.1 The present application does not meet the criteria of Article 33(3) PCT, because the subject-matter of claims 12 does not involve an inventive step.



Intelektualno vlasništvo

- case study 2: WO2011098843 A2

HR PK20100074 B3

- 2.2 Horizontal rotating tubular bioreactors (HRTBs) have already been employed in similar processes for the same purpose (see document D10, page 391, right-hand column, paragraph 2 - page 993, right-hand column, paragraph 2; figures 2-4). It would be obvious to the person skilled in the art, namely when the same result is to be achieved, to use such a reactor, with corresponding effect to a process according to any of documents D1-D9, thereby arriving at a process according to claim 12.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

- 1 Clarity
- 1.1 The application does not meet the requirements of Article 6 PCT, because claim 1 is not clear.
- It is not clear whether, under point a), the feature "only one species of amylolytic lactic acid bacteria" belongs to the generally claimed or to the specific (optional) embodiment (enclosed by the sentence "specifically ..."). Hence, it is not clear whether *any* SSF is meant, or only an SSF using an amylolytic lactic acid bacterium. For the purpose of the search for prior art, the Examiner assumed that only such SSF comprising the use of amylolytic lactic acid bacteria have been meant to be covered by the claim.
- Independently, it is noted that the feature "specifically simultaneous saccharification and fermentation of semi-solid substrate" is not limiting the scope of the claim, since this is only an optional feature.
- Further limitations concerning the definition of semi-solid state fermentation, such as on page 3, paragraph 5 of the description, need to be explicitly named in the claim if it is intended to restrict the claim to such kind of fermentations.
- 1.2 In claims 14-16 an attempt is made to define the method by reference to a result to be achieved. Article 6 in conjunction with Rule 6.3 (a) requires that all the essential features of the claimed invention have to be indicated in the claim in technical terms. Claims which attempt to define the invention by a result to be achieved should not be allowed, in particular if they only amount to claiming the underlying technical problem. Hence, the essential technical features necessary for arriving to the claimed product yield coefficients should rather be named (or the claims should be deleted).



Intelektualno vlasništvo

- *case study 2: WO2011098843 A2*
HR PK20100074 B3

1.3 Minor comments:

Claims 2-5 are not concise (Article 6 PCT) since the dependent claims should not repeat the features of the main claim (Rule 6.4 PCT).

Claim 3 seems to contain an error: it is assumed that it was meant to read "whereas organic nutritive substances are added...".

Claim 9 seems to contain a redundancy: "separation" is already a feature of main claim 1.

The feature of claim 10 seems to be an inherent feature of *any* SSF process since the process must be *simultaneous*.

Claims 19 and 20 are not clear since the term "MRS-medium ingredients" has no *precise* meaning (the components of MRS medium need to be specified in order for the claim to be clear).

Intelektualno vlasništvo

- *case study 3, 4...*

Dear Anita,

thanks for the additional input and information! As far as I understood, the patent is only active in Croatia, is it?

Depending on what you think is more likely (someone buying the patent or a license or a project),

we could go for either one, but if the patent is active only in Croatia, a project offer would probably make more sense.

However, we would have to more clearly define what the company would have to contribute and what they would get out of it

(especially in view of the patent, but if they can commercially use the technology without the patent, except for Croatia,

this should not be such a huge problem).

Please take a look at my suggestion and give me your feedback!

Best regards,

X