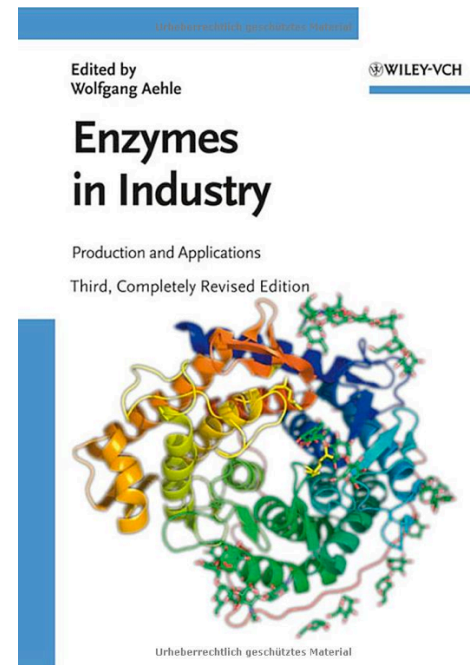


- prof. dr. Brigita Lenarčič
FKKT
Katedra za biokemijo
Cesta v Mestni log 88A
brigita.lenarcic@fkkt.uni-lj.si
01 2419 484
- Enzymes in Industry:
Production and application
Wolfgang Aehle
2007, 3rd ed.
- Izpit
 - pisni izpit (36 %)
 - 60 % → 60 % pisni izpit, 40 % seminarji
 - seminar (24 %)
 - seminar iz patenta
 - ustanovitev lastnega podjetja
 - vaje (40%)



UVOD: Encimatika

- encimi naravni katalizatorji
- zapletene biološke reakcije pri milih pogojih
- prisotni v vseh organizmih
- locirani v celicah in zunaj nje
- regulirani na različne načine

- strukturne in funkcijske značilnosti encimov:
 - ena/več polipeptidnih verig
 - aopencim/holoencim
 - prisotnost neproteinskim molekul (kofaktor)
 - prostetska skupina
 - kosubstrat
 - kovinski ion

- Če jih želimo uporabiti v komercialne namene jih moramo dobro poznati.

UVOD: industrijski encimi

- uporaba “encimskega delovanja” že od začetka civilizacije
 - priprava hrane in napitkov
 - preparacija kože
- v 19. stoletju začetki encimov
 - 1833 opis amilolitične substance (Payen in Persoz)
 - 1835 izraz kataliza – kot substanca, ki pospeši reakcijo (Berzelius)
 - 1835 odkrit prebavni encim pepsin (Schwann)
 - 1877 izraz encim (Kuhne)
 - 1897 encim substanca zunaj celice (Buchner)
 - v letih po 1870 prvi industrijski encim “renet” – sestavina želodčkov mladih živali za proizvodnjo sira (Hansen)
- 20. stoletje
 - razvoj tehnik izolacije in analize
 - najpomembnejše za preboj encimske industrije
 - komercializacija glukoamilaze (produkcija glukoze iz škroba)
 - detergent z encimom
 - razvoj tehnik genskega inženirstva po 1980
 - napredek v določevanju 3D struktur
 - analiza genomov
 - bioinformatika
 - racionalna modifikacija encimov

UVOD: izvor encimov

- izvori encimov
 - kvasovke in glive (1/2)
 - bakterije (1/3)
 - živali
 - rastline
- večina mikrobioloških encimov
 - *Aspergillus*
 - *Bacillus*
 - *Kluyveromyces*

ENCIM	E.C. ŠTEVILO	IZVOR	INTRA/ EKSTRACELULARNO	KOLIČINA PROIZVODNJE
ENCIMI ŽIVALSKEGA IZVORA				
katalaza	1.11.1.6	jetra	I	-
kimotripsin	3.4.21.1	pankreas	E	-
lipaza	3.1.1.3	pankreas	E	-
renet	3.4.23.4	siriščnik	E	+
tripsin	3.4.21.4	pankreas	E	-

+++ > 100 ton/leto
++ > 10 ton/leto
+ > 1 ton/leto
- < 1 ton/leto

ENCIM	E.C. ŠTEVILO	IZVOR	INTRA/ EKSTRACELULARNO	KOLIČINA PROIZVODNJE
ENCIMI RASTLINSKEGA IZVORA				
papain	3.4.22.2	lateks papaje	E	++
aktinidin	3.4.22.14	kivi	E	-
bromelain	3.4.22.4	ananas	E	-
ficin	3.4.22.3	lateks fig	E	-
lipoksisgenaza	1.13.11.12	soja	I	-
α -amilaza	3.2.1.1	ječmenov slad	E	+++
β -amilaza	3.2.1.2	ječmenov slad	E	+++
β -glukanaza	3.2.1.6	ječmenov slad	E	++

UVOD: izvor encimov

- izvori encimov
 - kvasovke in glive (1/2)
 - bakterije (1/3)
 - živali
 - rastline

- večina mikrobioloških encimov

- *Aspergillus*
- *Bacillus*
- *Kluyveromyces*

ENCIM	E.C. ŠTEVILO	IZVOR	INTRA/ EKSTRACELULARNO	KOLIČINA PROIZVODNJE
ENCIMI IZ KVASOVK				
invertaza	3.2.1.26	<i>Saccharomyces</i>	I/E	-
laktaza	3.2.1.23	<i>Kluyveromyces</i>	I/E	-
lipaza	3.1.1.3	<i>Candida</i>	E	-
rafinaza	3.2.1.22	<i>Saccharomyces</i>	I	-

+++ > 100 ton/leto
++ > 10 ton/leto
+ > 1 ton/leto
- < 1 ton/leto

ENCIM	E.C. ŠTEVILO	IZVOR	INTRA/ EKSTRACELULARNO	KOLIČINA PROIZVODNJE
BAKTERIJSKI ENCIMI				
α -amilaza	3.2.1.1	<i>Bacillus</i>	E	+++
β -amilaza	3.2.1.2	<i>Bacillus</i>	E	+
asparaginaza	3.5.1.1	<i>E. coli</i>	I	-
glukoza-izomeraza	5.3.1.5	<i>Bacillus</i>	I	++
penicilin-amidaza	3.5.1.11	<i>Bacillus</i>	I	-
proteaze	3.4.21.14	<i>Bacillus</i>	E	+++
pululanaze	3.2.1.41	<i>Klebsiella</i>	E	-

UVOD: izvor encimov

- izvori encimov
 - kvasovke in glive (1/2)
 - bakterije (1/3)
 - živali
 - rastline
- večina mikrobioloških encimov
 - *Aspergillus*
 - *Bacillus*
 - *Kluyveromyces*
- prednosti encimov mikrobnega izvora
 - cenejša proizvodnja
 - lažja kontrola vsebnosti encima
 - enostavnejše vzdrževanje
 - možnost priprave grobega materiala
 - manjša toksičnost rekombinantnega proteina

ENCIM	E.C. ŠTEVILO	IZVOR	INTRA/ EKSTRACELULARNO	KOLIČINA PROIZVODNJE
ENCIMI IZ GLIV				
α -amilaza	3.2.1.1	<i>Aspergillus</i>	E	++
aminoacilaza	3.5.1.14	<i>Aspergillus</i>	I	-
glukoamilaza	3.2.1.3	<i>Aspergillus</i>	E	+++
katalaza	1.11.1.6	<i>Aspergillus</i>	I	-
celulaza	3.2.1.4	<i>Trichoderma</i>	E	-
dekstranaza	3.2.1.11	<i>Penicillium</i>	E	-
glukoza-oksidaža	1.1.3.4	<i>Aspergillus</i>	I	-
laktaza	3.2.1.23	<i>Aspergillus</i>	E	-
lipaza	3.1.1.3	<i>Rhizopus</i>	E	-
renet	3.4.23.6	<i>Mucor</i>	E	++
pektinaza	3.2.1.15	<i>Aspergillus</i>	E	++
pektin-liaza	4.2.2.10	<i>Aspergillus</i>	E	-
proteaza	3.4.23.6	<i>Aspergillus</i>	E	+
rafinaza	3.2.1.22	<i>Mortierella</i>	I	-

+++ > 100 ton/leto

++ > 10 ton/leto

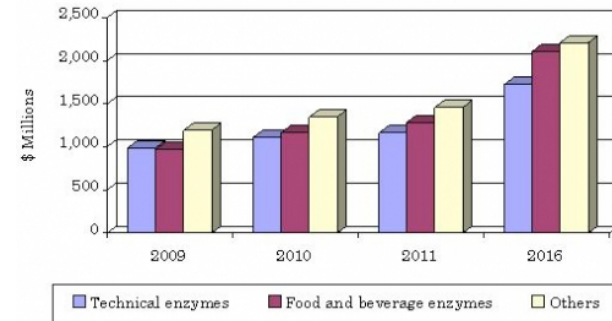
+ > 1 ton/leto

- < 1 ton/leto

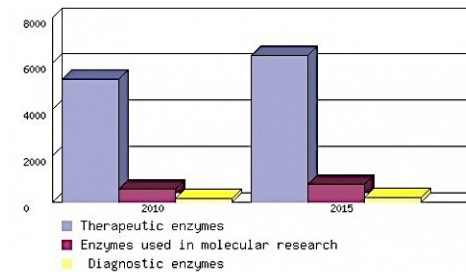
UVOD: encimi za industrijske namene

- encimi so široko uporabni v:
 - prehrani
 - detergentih
 - tekstilni ind.
 - papirni ind.
 - predelavi odpadkov
- encimi v terapevtske namene:
 - encimi za pripravo učinkovin
 - semisintetski penicilin
 - steroidi
 - kiralne spojine
 - direktna uporaba
 - asparaginaza-levkemija
 - ribonukleaza-določene oblike raka
 - pankreasna insuficienca
 - nadomestna terapija pri pomanjkanju določenega encima
 - obravnava rane
 - odstranjevanje toksinov iz krvi
- razvoj novih/zanimivih encimov za posebne namene
- biogorivo
 - amilaze, celulaze
- Trg encimske industrije je eden najbolj skrivnostnih.
 - <http://www.biocatalysts.com/>
 - <http://www.novozymes.com/>
 - <http://www.mapsenzymes.com/>

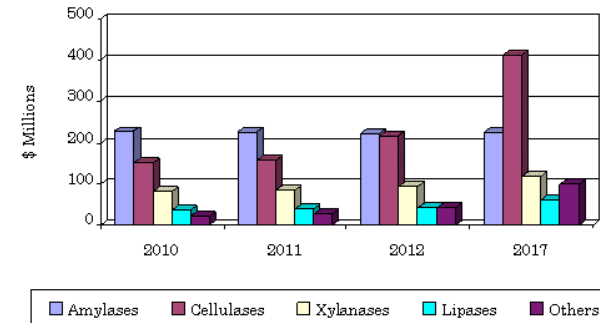
SUMMARY FIGURE
GLOBAL REVENUE OF INDUSTRIAL ENZYMES MARKET,
2009-2016 (\$ MILLIONS)



WORLDWIDE REVENUE OF MEDICAL ENZYMES MARKET 2010
and 2015 (\$ MILLIONS)



GLOBAL MARKET FOR BIOFUEL ENZYMES,
2010-2017 (\$ MILLIONS)



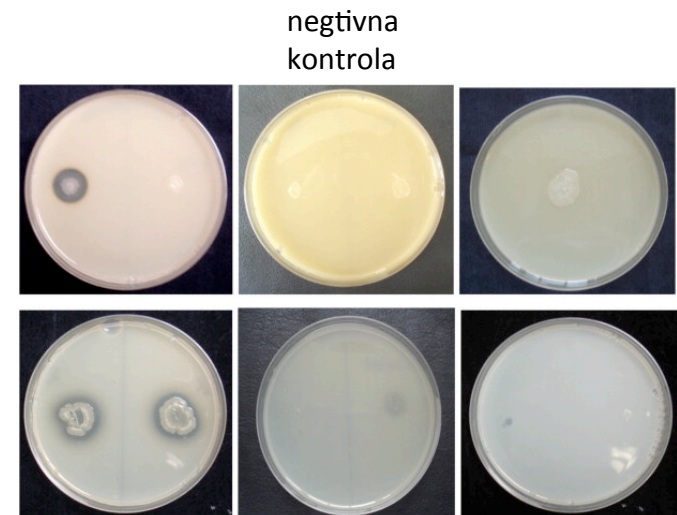
UVOD: razvoj komercialnih encimov

- **Stopnja 1**
 - preučitev same ideje
 - ocena tržišča
 - potencialni uporabniki
 - stroškovna shema
- **Stopnja 2**
 - proučitev izvora
- **Stopnja 3**
 - določitev encimskih lastnosti
 - kinetične lastnosti
 - T, pH stabilnost, optimum
 - inhibicija
 - struktura
- **Stopnja 4**
 - način priprave / izolacije (ind. merilo)
 - čistost
 - sprejemljivost za oblast

- Stopnja 2
 - proučitev izvora
 - komercialni pripravki
 - proučevanje mikrobov
 - razvijanje novih encimov
 - sistematično iskanje novih encimov
 - presejanje iz naravnih virov
 - molekulsko presejanje
 - presejanje genov iz okolja
 - presejanje proteoma
 - proteinski inženiring

UVOD: razvoj komerc. encimov – stopnja 2

- presejanje iz naravnih virov
 - rastlina
 - žival
 - mikroorganizmi
 - prokarioti (bakterije, arheje)
 - evkarioti (glive, kvasovke)
- klasično iskanje po m.o.
 - temelji na naključju
 - izbor glede na okolje v katerem živi
 - alkalno okolje, encimi s pH optimumom v alkalnem
 - pri proučevanju m.o. iz okolice → mešanica m.o.
 - selekcija na osnovi vrst m.o.
 - sušenje neugodno za g (-) bakterije
 - hitro segrevanje preživijo samo sevi *Bacillus*
 - inkorporacija antibiotikov v medij → neugodna za g (+) bakterije
 - gojenje na agarni plošči z inkorporiranim substratom
 - kazein (vir C), substrat za proteolizne encime
 - indikator lipazne aktivnosti, ki zazna padec pH po hidrolizi m.k.
 - izbira m.o. je subjektivna, težko oceniti razlike na agarni plošči
 - najpogostejši viri komercialnih encimov:
 - *Aspergillus* in *Trichoderma* (glive)
 - *Bacillus* in *Pseudomonas* (bakterije)



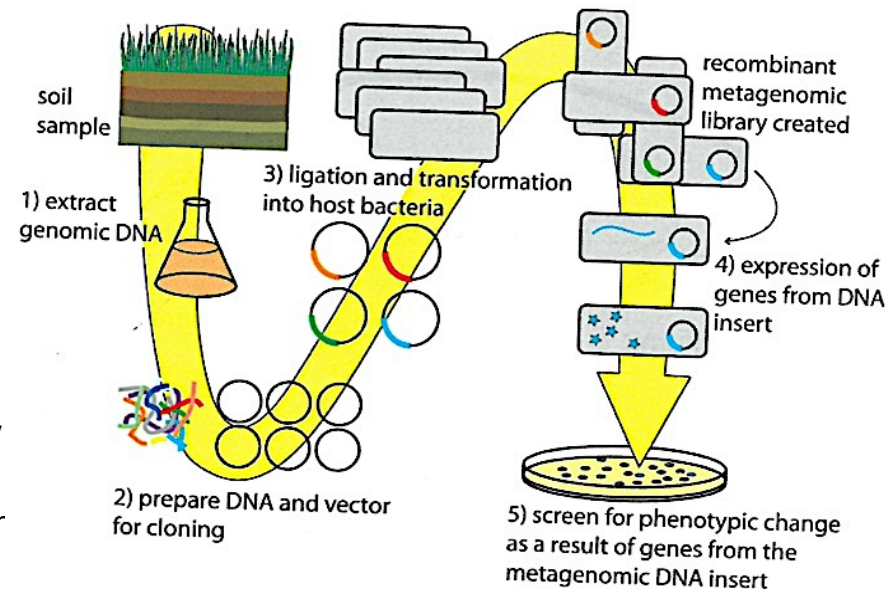
- molekularno presejanje
 - odkrit ustreznih encimov v m.o.
 - iskanje homolognih encimov sorodnih vrst
 - nukleotidne sonde za ak. zaporedje (15-20 nt)
 - PCR reakcije
 - prenos v *E. coli*
 - optimizacija izražanja

UVOD: razvoj komerc. encimov – stopnja 2

- **presejanje genov iz okolja**
 - na zemlji okoli 12.000 vrst
 - plankton še dodatni vir
 - ~ 1% vseh m.o. izoliranih, še manj pa opisanih in karakteriziranih
 - ~ 25% vseh mikrobov bi lahko gojili v laboratorijih
- če na licu mesta odvezamemo genom v določenem okolju imamo **metagenom**
 - težave pri prenosu vseh m.o. v laboratorij
 - postavijo se v stanje mirovanja
 - se poškodujejo
 - ne preživijo
 - neugodni pogoji za rast v laboratoriju

- **analiza metagenoma**
 - liza celic-ekstrakcija vseh DNA
 - priprava knjižnice
 - sekvenčna analiza (iskanje homologov)
 - funkcionalna analiza 10^6 klonov (vnos v gostitelja)

- **pomankljivost:**
 - *E.coli* ni vedno prijazna do zelo drugačnih proteinov
 - pomankljivost morebitni kofaktorjev
 - pomanjkanje regulatornih elementov pri prepisovanju
 - ne prepoznavanju promotorskih mest
 - identifikacija



UVOD: razvoj komerc. encimov – stopnja 2

- presejanje genov iz okolja
- podatki genomov so deponirani v bazah podatkov-javno dostopni
- genomi ekstremofilov
- bioinformatična analiza genomov v pomoč
- iskanje:
 - homologni gen
 - specifična domena
 - predikcija funkcije
- 25 % genov
 - ni uvrščenih
 - brez pripisane funkcije
 - edinstveni → novosti

Contact: Genomesonline	Last Update: April 1, 2006	Location www.genomesonline.org
361 Published Complete Genomes	Search GOLD: 2012 genome projects	43 Metagenomes
58 Archaeal Ongoing Genomes	950 Bacterial Ongoing Genomes	600 Eukaryotic Ongoing Genomes

Contact: Genomesonline	Last Update: February 3, 2008	Location www.genomesonline.org
716 Published Complete Genomes	Search GOLD: 3591 genome projects	115 Metagenomes
92 Archaeal Ongoing Genomes	1763 Bacterial Ongoing Genomes	901 Eukaryotic Ongoing Genomes

GOLD Projects	
Category	Count
Published Complete	1860
Bacterial Ongoing	6672
Archaeal Ongoing	206
Eukaryotic Ongoing	2007
Metagenome	299

- presejanje proteoma
- funkcionalna genomika – informacija o funkciji proteina
- metoda zahteva izražanje proteina in analizo
- množica genov v ustrezen vektor
 - pomembna strategija kloniranja
 - oznake za enostavnejše čiščenje
- kvasovka → 6000 genov
 - izrazili kot fuzijski protein s GST (glutation S-transferazo)
 - selekcionirali poznane od nepoznanih
 - pripravili proteinske čipe (težava v obstojnosti proteinov)

- proteinski inženiring
- izbrani protein
- strukturno-funkcijska analiza proteina
 - zamenjava ak
 - izmenjava setov homolognih genov (gene shuffling)
 - usmerjena evolucija
 - izražanje na fagu → enostavno testiranje množice variant

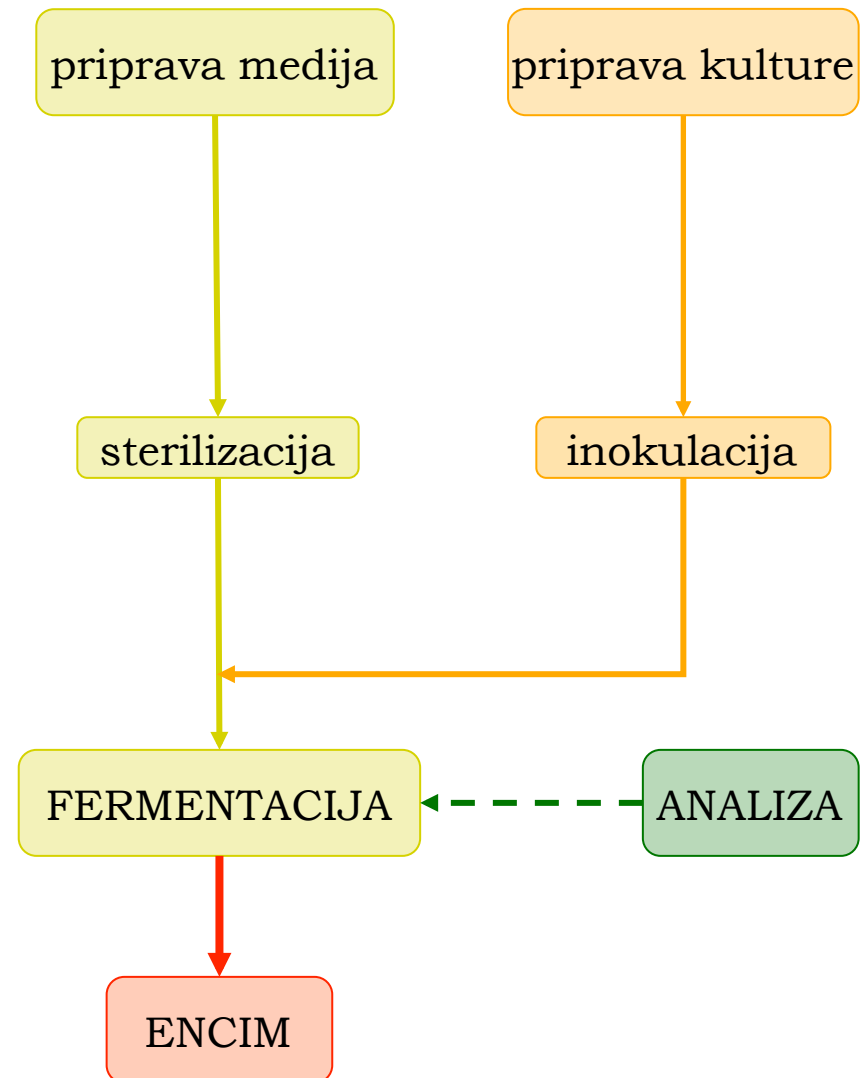
- **določitev encimskih lastnosti**
 - kinetične lastnosti
 - T in pH stabilnost
 - T in pH optimum
 - inhibicija
 - struktura
- neprimerne lastnosti → iskanje naprej
- sprejemljive lastnosti encima → izboljšanje s proteinskim načrtovanjem (angl.: “protein design”)
 - časovno dolgotrajno in drago

UVOD: razvoj komerc. encimov – stopnja 4

- **način priprave**
 - industrijsko merilo
 - prosti/imobilizirani encim
- **čistost**
 - različne stopnje čistosti
 - industrijski encimi niso čisti
- **sprejemljivost za oblasti**
 - ključna sprejemljivost m.o.
 - iskanje drugega organizma
 - prekloniranje v sprejemljivi organizem
- **Intelektualna lastnina**
 - firme: patentiranje
 - encim
 - metoda
 - postopek priprave
 - akademski krogi: objave

Produkcija proteinov v m.o.

- priprava proteinov v velikih količinah - fermentacija
- industrijski proces produkcije
 - ključna je optimizacija sistema
 - medij
 - poslovna skrivnost
 - organizmi
 - paleta m.o.
 - bakterije
 - kvasovke
 - celične kulture
 - insektne celice
 - kompleksni sistemi z metabolnimi reakcijami
 - “obdelani” organizmi
 - dodatki DNA elementov za povečano sintezo mRNA
 - variranje št. plazmidov
 - zamenjava promotorjev



Produkcija proteinov v m.o. - fermentacija

- različni m.o. različno obnašanje v fermentorju
- dva parametra se spremljata za optimizacijo sinteze encima

- hitrost encimske sinteze

$$v_e = q_e \cdot c_x$$

v_e hitrost encimske sinteze [L/h]
 q_e specifična encimska sinteza [U/g/h]
 c_x koncentracija biomase [g/L]

- hitrost rasti biomase

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_s}{K_s + c_s}$$

μ specifična hitrost rasti
 μ_{\max} največja hitrost rasti v 1 uri
 K_s saturacija
 c_s koncentracija substrata

- optimizacija sistema pomeni, da se najde najvišja specifična sinteza encima za določeno količino mase
- obširne raziskave glede optimizacije sistema

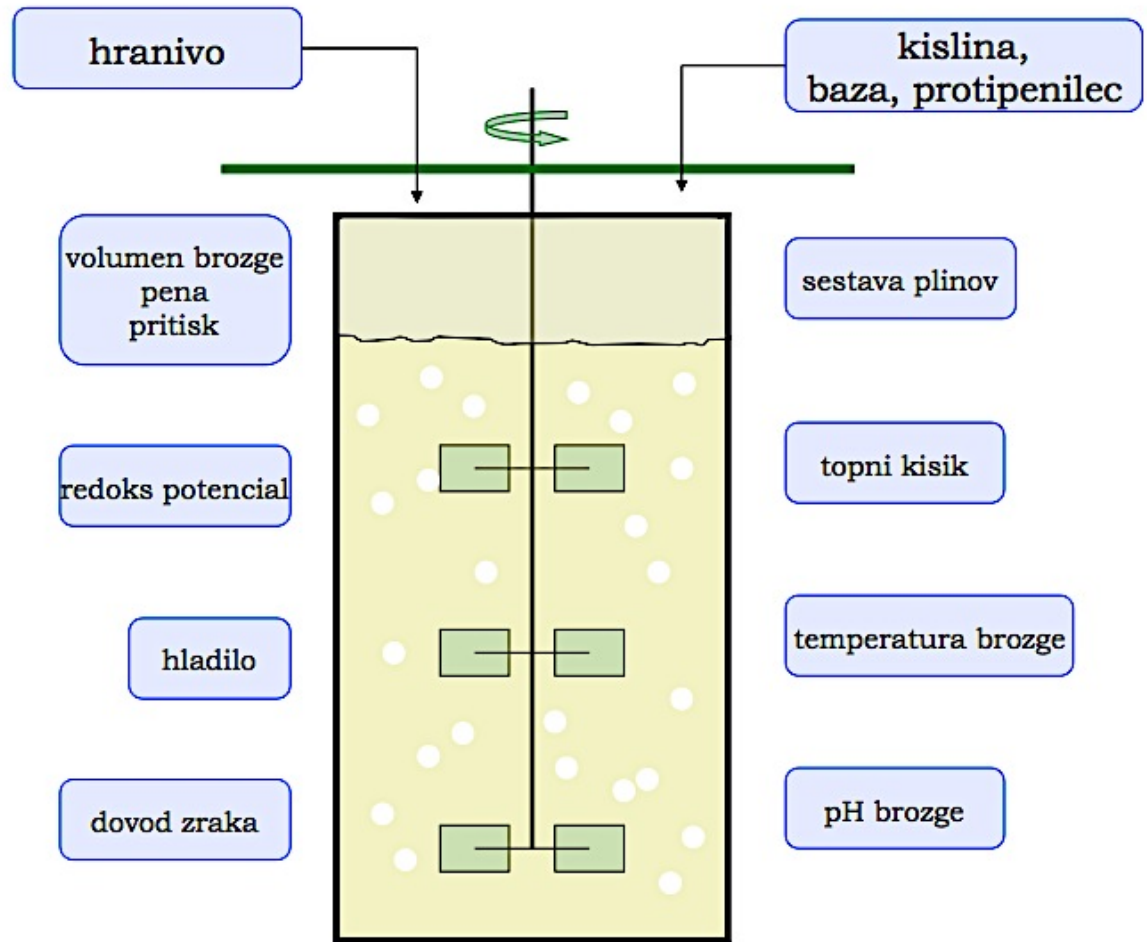
Produkcija proteinov v m.o. - fermentor



laboratorijski fermentor
(3-20 L)

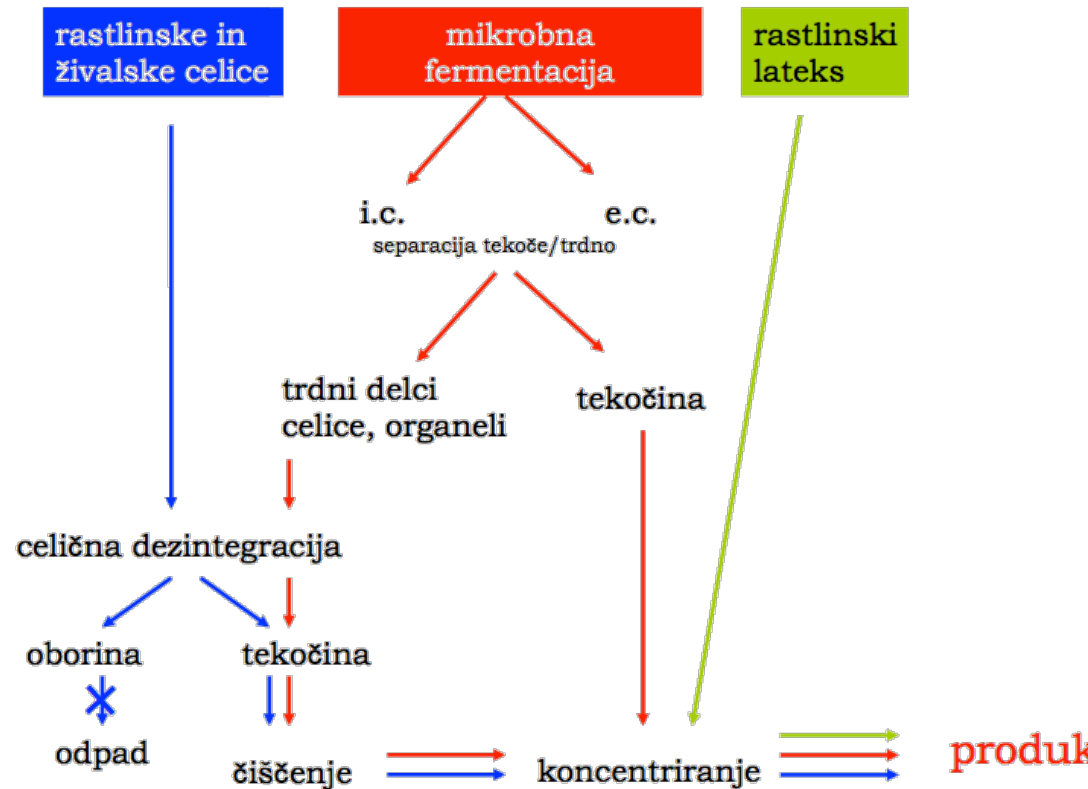


industrijski fermentor, 200 L



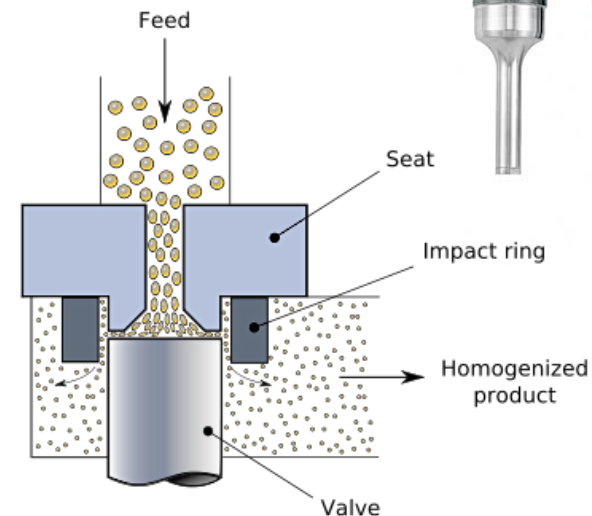
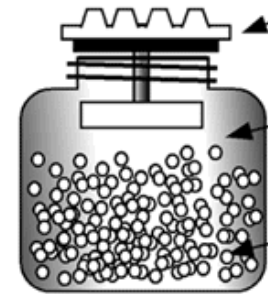
Čiščenje encimov:

- ne glede na izhodni vir so začetni postopki podobni
- glavne operacije
 - razbijanje celic
 - centrifugiranje
 - filtriranje
 - koncentriranje
 - kromatografije



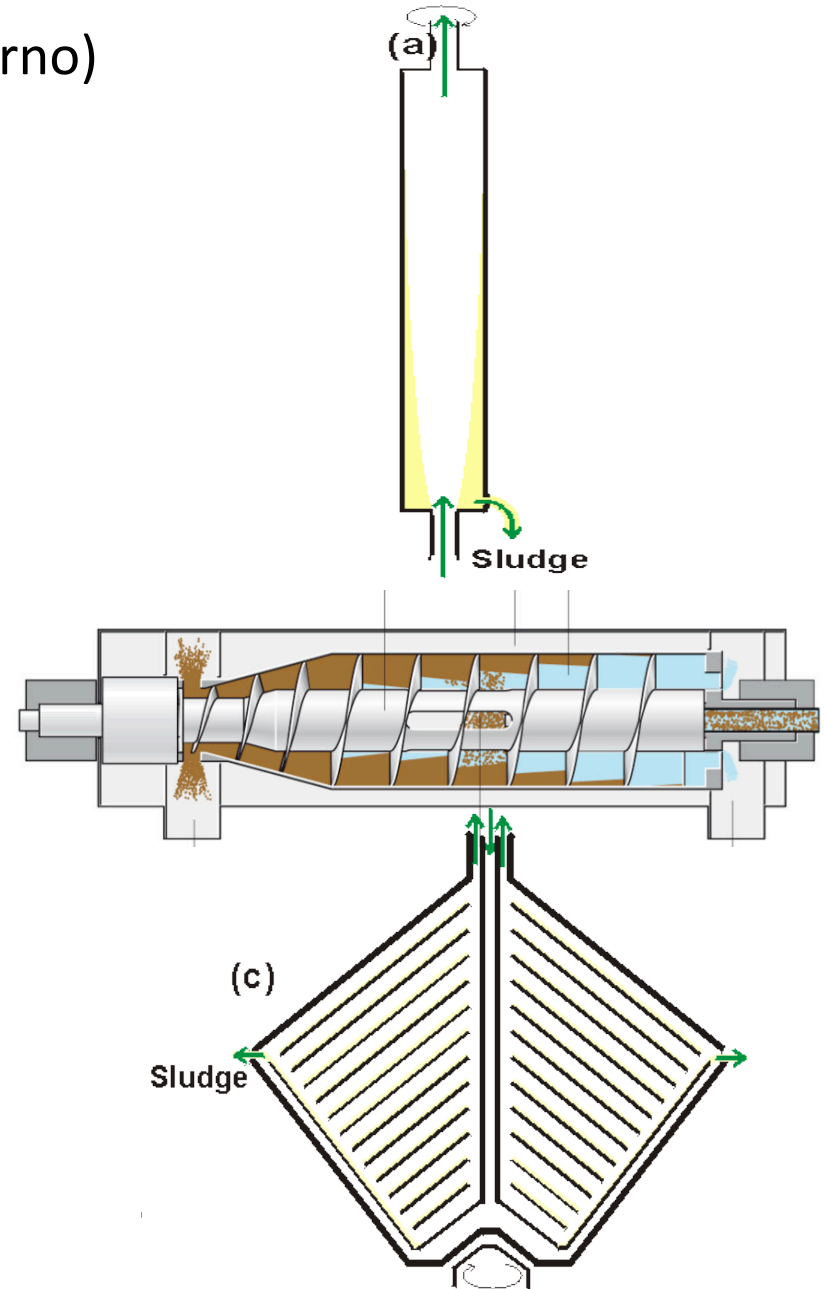
Čiščenje encimov: razbijanje celic

- izbira metode je odvisna od
 - od vrste in števila celic
 - stabilnosti encima
 - vrste naslednje stopnje
- **v laboratorijskem merilu**
 - encimska liza (cena)
 - lizocim, proteaze, glikanaze...
 - uporaba kroglic
 - steklene/jeklene (0,2-1mm)
 - 20 kg bakterij/200 kg kvasovk
 - slabost: povišana T
 - ultrazvočno razbijanje-sonikacija
 - 20-50 kHz
 - metalna glava z visoko frekvenco ustvari podtlak
 - slabost: povišana T, hrup, nastanek radikalov. konformacijske spremembe
 - kemijska liza
 - detergent, kaotropi (soli), GnCl
 - osmotski šok
- **v industrijskem merilu**
 - homogenizacija pod visokim pritiskom
 - 12 % celična suspenzija pod pritiskom ($150 \text{ Mpa} = 2 \text{ t/cm}^2$) skozi ventil
 - pretok 10.000 L/h
 - regulacija razdalje glede na tip celic



Čiščenje encimov: centrifugiranje

- industrijsko centrifugiranje (kontinuirno)
- tubularna centrifuga
 - dolga pot
 - primerno za bistrenje
 - do 16 kg (akumulacija do 5 kg)
- kontinuirna centrifuga
 - primerna za zbiranje velikih delcev
 - horizontalne spirale
 - do 5 kg
- večprostorna centrifuga
 - paralelni diski
 - za separacijo kremastih mas
 - do 8 kg

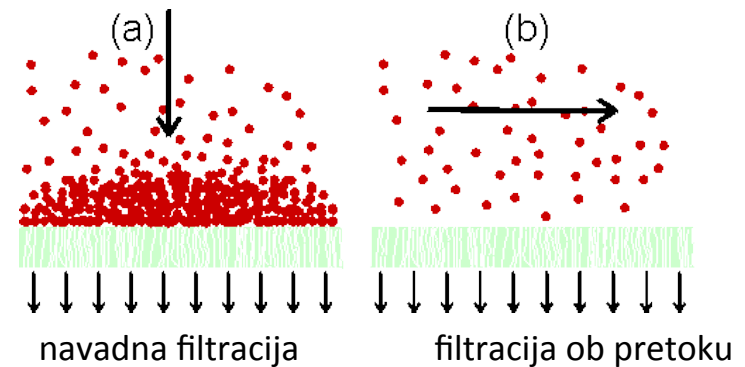
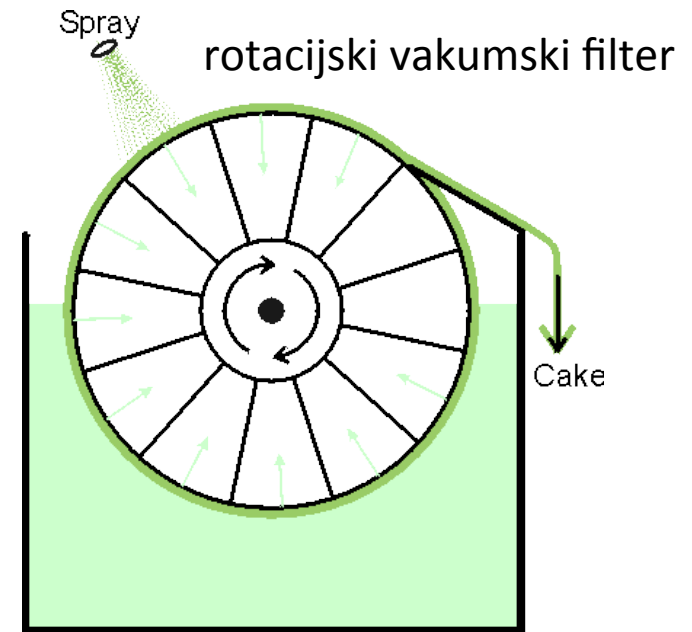


Čiščenje encimov: filtriranje

- ločevanje delcev na osnovi velikosti
- efektivnost filtriranja je odvisna od:
 - oblike in stisljivosti delcev
 - viskoznosti tekočine
 - maksimalnega pritiska
 - poroznosti membrane

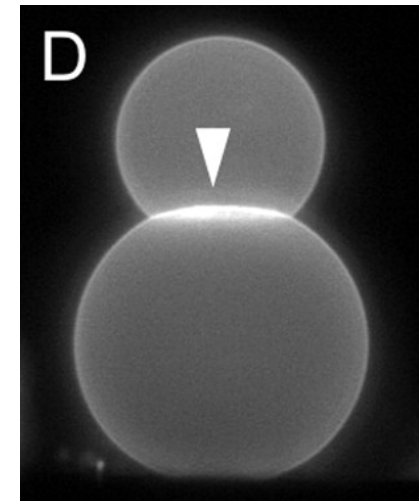
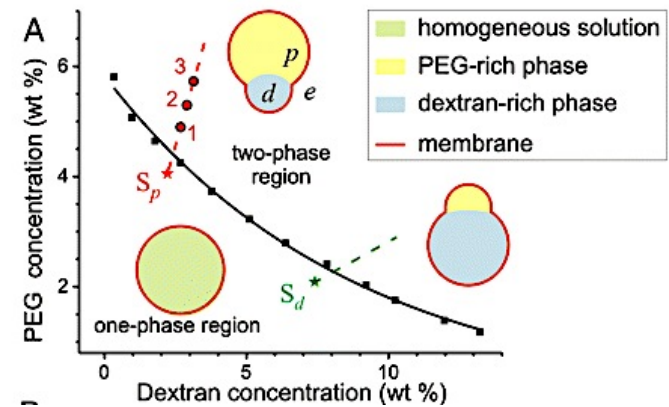
$$\phi = \frac{kPA_f}{\mu D_F}$$

- Φ prehod skozi filter
 k konstanta proporcionalnosti
odvisna od velikosti delcev
 P pritisk
 A_f površina filtra
 D_F debelina pogače
 μ viskoznost



Čiščenje encimov: dvofazni vodni sistemi

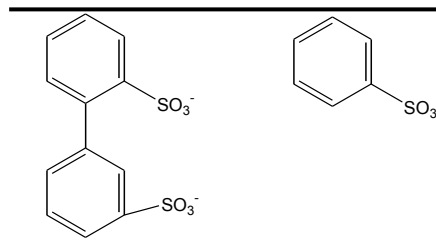
- učinkovit ločevalni sistem:
 - dekstran (2 % T500) - hidrofилna faza
 - polietilen glikol (10 % PEG 400) - hidrogobna faza
- poceni sistem
- lastnosti dvofaznih sistemov
 - omogoča enostavno separacijo biološkega materiala
 - tenzija med obema fazama je majhna (400x manjša kot med H₂O in org. topilom)
 - dobro mešanje obeh faz
 - polimeri delujejo stabilizirajoče na proteine – ni denaturacije
 - vpliv pH, soli na porazdelitev proteinov med faze
 - dodatek afinitetnih ligandov



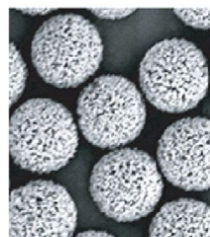
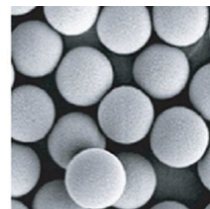
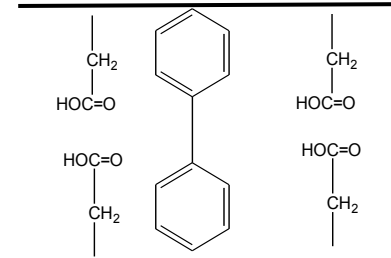
Čiščenje encimov: kromatografije

- principi ločevanja enaki kot za laboratorijsko delo
- ionska kromatografija
 - polistirenski nosilci
 - omogoča kolonsko kromatografijo
 - majhna vezavna kapaciteta
 - celulozni nosilci
 - kromatografija v kadi
 - vezava in elucija z rahlim centrifugiranjem
- afinitetna kromatografija
 - ligandi enaki kot v lab. merilu
 - težava z velikimi količinami
- gelska kromatografija
 - TSK (hidroksiliran metakrilni polimer)
 - prenese visoke pritiske
 - na nosilec se lahko vežejo še druge skupine, ki spremenijo značaj nosilcu in drugo uporabo

stiren-divinilbenzenski nosilec



akrilni divinilbenzenski nosilec



Priprava encima: tabela izkoristka

- encimi se za medicinske namene uporabljajo v čisti obliki
- encimi za tehniške namene v manj čisti obliki

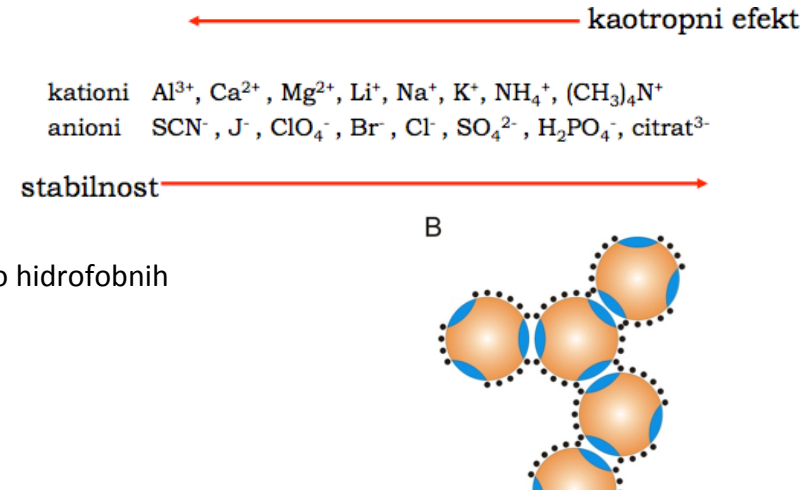
- tabela izkoristka
 - količina encima
 - cena

stopnja	relativna teža	izkoristek	specifična aktivnost	cena	cena/težo	cena/aktivnost
	1.000	100	1	1.00	1	1.00
1	0.250	75	3	1.11	4	1.47
2	0.063	56	9	1.20	19	2.13
3	0.016	42	27	1.30	83	3.08
4	0.004	32	81	1.40	358	4.92
5	0.001	24	243	1.50	1536	6.32

- čisti encimi ↓ izkoristek in ↑ cena
 - encimski preparati pogosto vsebujejo
 - fermentacijsko brozgo
 - aditive za stabilnost encima
 - stroški dodatnega čiščenja
 - opreme
 - človek-delo
 - izguba encimske aktivnosti

Priprava encima za prodajo

- ko je encim primerno očiščen je pripravljen za prodajo
- dodatne aktivnosti za ohranitev stabilnosti in aktivnosti encima (garancija delovanja)
- uporaba aditivov
 - morajo biti kompatibilni z encimom
 - encimi stabilni pri \uparrow koncentracijah
 - pomen soli
 - \uparrow konc soli stabilizirajo proteine
 - tekmujejo s proteini za vodo in stabilizirajo proteine preko hidrofobnih interakcij
 - različne soli različni efekt
 - 20 % NaCl neugodna za rast m.o.
 - nizkomolekularni polioli
 - glicerol, sorbitol, manitol
 - naredijo plašč okoli proteina
 - onemogočajo rast m.o.
 - hidrofilni polimeri
 - polivinil alkohol, polivinil pirolidon
 - ostali aditivi
 - škrob, laktoza, polielektroliti kot zaščita pred sušenjem
 - tioli za redukcijske pogoje
 - inhibitorji
 - antibiotiki
- kovalentne modifikacije
 - kemijske modifikacije na Lys, kot zaščita pred razgradnjo (PEG-ilacija)
 - modifikacije v smislu več solnih mostičkov ali S-S vezi za \uparrow stabilnost
- imobilizacija encimov

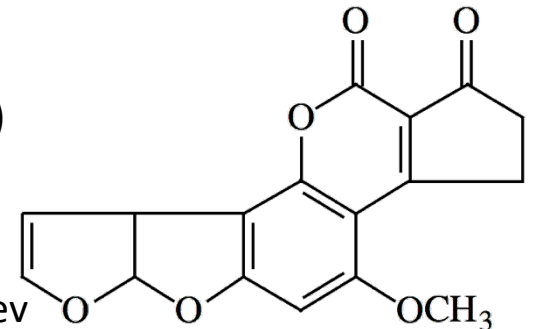


Kontrola encimskih preparatov

- trije nivoji kontrole končnega produkta
 - **QA quality assurance** - zagotavljanje kakovosti
 - kontrola znotraj firme
 - sledi vsem aktivnostim produkta
 - ideja → razvoj → produkcija → servis → dokumentacija
 - prepreči napake in prepreči težave dostavljenega produkta
 - **GMP good manufacture practice** – dobra praksa
 - vse možne informacije o produktu
 - konsistentnost produkta
 - **QC quality control** – kontrola kvalitete
 - ustreznost vsem standardom
 - zanesljivost
 - vzdrževanje in varnost
 - **Odpravljanje težav (troubleshooting)** - najpogostejša vprašanja

Varnostni aspekti uporabe encimov

- Nevarnost uporabe encimov zaradi katalitične aktivnosti?
- nevarnost izvira od:
 - **alergenosti**
 - encimi so proteini in so zato potencialni alergeni
 - imunski odgovor se razvije ob dotiku s kožo ali inhalaciji
 - naslednja reakcija lahko fatalna
 - delo z encimom v suhi obliki se izvaja v zaprtih sistemih
 - granulirani preparati boljša opcija
 - še boljša opcija tekoči preparati (viskozne tekočine)
 - **toksičnosti**
 - toksičnosti v povezavi z aktivnostjo (proteaze)
 - encimi niso toksični, mutageni ali kancerogeni
 - toksičnost izvira od kontaminant (posledica priprave)
 - **rezidualne mikrobiološke aktivnosti**
 - m.o. producirajo toksične anabolite
 - mitotoksini iz plesni (aflatoksini) povzročajo zastrupitev
 - antibiotik



aflatoksin iz *Aspergillus flavus*

- uporabljeni encimi in m.o., iz katerih se morebitno pripravljajo morajo biti sprejeti s strani avtoritet
- Evropa:
 - AMFEP
- ZDA:
 - GRAS
 - FDA
- UK
 - FACC

FAO	United Nations Food and Agriculture Organisation	Italija
WHO	World Health Organisation	Švica
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives	
CCFA	Code Committee on Food Additives	
EEC	European Economic Community	Belgija
GD	General Directorates in EEC	
GD III	Internal market and industry	
GD IV	Agriculture	
GD XII	Science, Research, Technology	
AMFEP	Association of Microbial Food Enzyme Producers	Nemčija, UK, Finska, Belgija, Nizozemska, Francija, Danska, Švica
AMAFE	Association of Manufacturers of Animal Derived Food	Avstrija, Danska, Francija, Nemčija, Nizozemska, Italija, Švedska
FDA	Food and Drug Administration	ZDA
GRAS	Generally Regarded As Safe	ZDA
FACC	Foods Additives and Contaminants Committee	UK

- Ministrstvo za agrikulturo, ribarstvo in prehrano razvrsti encime v prehrani v pet kategorij na osnovi varnosti
- **skupina A**: substance, za katere je poznano, da se jih **lahko uporablja** v prehrani
- **skupina B**: substance, ki so začasno sprejemljive v prehrani; potrebne so **dodatne informacije**
- **skupina C**: substance, za katere **je poznana toksičnost** in se jih ne sme uporabljati v prehrani, dokler se ne dokaže nasprotno
- **skupina D**: substance, ki **so definitivno toksične** in se jih ne sme uporabljati v prehrani
- **skupina E**: substance, za katere **ni podatkov o toksičnosti** in se ne da povedati ali so primerni za uporabo

- AMFEP (Association of Microbial Food Enzyme Procedures)
- **razred A:** mikroorganizmi, ki se tradicionalno uporabljajo v prehrani
 - *Bacillus subtilis* in drugi sevi
 - *Aspergillus niger* in drugi sevi
 - *Aspergillus oryzae* in drugi sevi
 - *Mucor*, *Rhizopus*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*
- **razred B:** mikroorganizmi, ki so sprejeti kot neškodljivi na osnovi toksikoloških testov
 - *Bacillus licheniformis* in drugi sevi
 - *Klebsiella aerogenes*
- **razred C:** mikroorganizmi, ki niso vključeni ne v A ne v B razred
 - *Bacillus cereus* in drugi sevi
 - *Mucor miehei* in drugi sevi
 - *Penicillium emersoni* in drugi sevi
 - *Streptomyces olivaceus* in drugi sevi

- pri razredu B in C se izvedejo še dodatni testi
 - akutna oralna toksičnost pri miših in podganah
 - enkratna/večkratna izpostavljenost
 - običajno v 14 dneh
 - subakutna oralna toksičnost pri podganah
 - 4 tedne
 - oralna toksičnost pri podganah
 - 3 mesece
 - mutagenost
- stroški testov morajo zadovoljiti vse zahteve

- informacija o izvoru (m.o.)
- aktivnost encima (EC številka)
- podatki toksikoloških testov
- metode, ki so bile uporabljene pri proizvodnji in PQC , rezultati testiranja
- informacije, o področju kjer se produkt uporablja in količine, ki so potrebne
- informacije o aktivnosti in stabilnosti produkta
- informacije o kontaminantah (JECEA Joint Expert Committee on Food Additives) priporočila
 - arzenik (ne več kot 3 mg/kg)
 - svinec (ne več kot 10 mg/kg)
 - težke kovine (ne več kot 40 mg/kg)
 - zahteve čistoče glede mikrobov
 - Salmonela ne sme biti prisotna v 25 g vzorca
 - E. coli ne sme biti prisotna v 25 g vzorca
 - bakterije g.i.t. ne smejo presegati 30/g
 - vse žive bakterije 5×10^4 /g
 - mikotoksini $< 10 \mu\text{g}/\text{kg}$
 - antibiotična aktivnost (test mora biti negativen)
 - podatki o mešanici (antioksidanti, stabilizatorji, konzervansi...)

- različne po državah
- UREDBA (ES) št. 1331/2008 EVROPSKEGA PARLAMENTA IN SVETA z dne 16. decembra 2008 o vzpostavitvi skupnega postopka odobritve za aditive za živila, encime za živila in arome za živila.

REPUBLICA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA ZDRAVJE

English
Državne ustanove
RSS | Natisni

DELOVNA PODROČJA MZ ZA VAS ZA IZVAJALCE ZDRAV. STORITEV MEDIJSKO SREDIŠČE **ZAKONODAJA IN DOKUMENTI** O MINISTRSTVU

[WWW.MZ.GOV.SI](#) / [ZAKONODAJA IN DOKUMENTI](#) / [VELJAVNI PREDPISI](#) / ENCIMI

Veljavni predpisi

- Mednarodni politično zavezujoči dokumenti
- Biocidni proizvodi
- Darovanje delov človeškega telesa (organov in tkiv)
- Duševno zdravje
- Igrače
- Ionizirajoče sevanje in neionizirajoče sevanje
- Kemikalije
- Kozmetični proizvodi
- Nalezljive bolezni
- Odškodnine zaradi okužbe z virusom HIV
- Oploditev z biomedicinsko pomočjo, zdravljenje neplodnosti, svobodno odločanje o rojstvu otrok
- Pacientove pravice
- Varnost v prometu

ENCIMI
EU ZAKONODAJA

1. Uredba (ES) št. [1332/2008](#) Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o encimih za živila in spremembi Direktive Sveta 83/417/EGS, Uredbe Sveta (ES) št. 1493/1999, Direktive 2000/13/ES, Direktive Sveta 2001/112/ES in Uredbe (ES) št. 258/97
2. Uredba (ES) št. [1331/2008](#) Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o vzpostavitvi skupnega postopka odobritve za aditive za živila, encime za živila in arome za živila

PATENTI – intelektualna lastnina

- Intelektualna lastnina se nanaša na produkte človeškega intelekta, ki imajo lahko komercialno vrednost in zaslužijo pravno zaščito.

- Vključuje:
 - kreativno delo
 - produkte
 - procese
 - invencije
 - storitve

PR Newswire
A UBM plc company

Connect with Us: [Twitter](#) [Facebook](#) [RSS](#)
Member Sign In >
For Journalists >
For Bloggers >
Global Sites >

Online: Not a Member? [Click Here](#)
Search

PR Newswire Services Knowledge Center Browse News Releases Contact PR Newswire Send

See more news releases in [Biotechnology](#) | [Health Care & Hospitals](#) | [Medical Pharmaceuticals](#)

Patent Awarded for Pancreatic Enzyme Therapy for ADD, ADHD and Autism

[f Share](#) [t](#) [in](#) [g+](#) More

YONKERS, N.Y., Oct. 14 /PRNewswire/ -- The U.S. Patent and Trademark office has awarded Dr. Joan Fallon patent # 6,632,429 entitled Methods for Treating Pervasive Developmental Disorders. The patent covers the use of digestive and pancreatic enzymes as a treatment for children with ADD, ADHD and Autism.

- Zaščita
 - patenti
 - blagovna znamka
 - zakoni poslovne tajnosti

- Intelektualna lastnina prepleta več prekrivajočih se disciplin (zaščita), vsaka s svojo specifičnostjo in terminologijo
 - patentno pravo
 - pravo avtorskih pravic
 - pravo blagovne znamke
 - pravo poslovne skrivnosti

Featured

Bear Naked
Slopes V
Hannah Ke
Hopeful
Challenging
#OneUp!

Bear Naked@
With U.S. Oly
And U.S. Oly
Guidmond, C
Enthusiasts T

PATENTI – intelektualna lastnina – **patentno pravo**

- **Patentno pravo (Patent Law)**

ZDA: <http://www.uspto.gov>

- Tri vrste patentov:

- **Uporabnostni patent (Utility patent)**

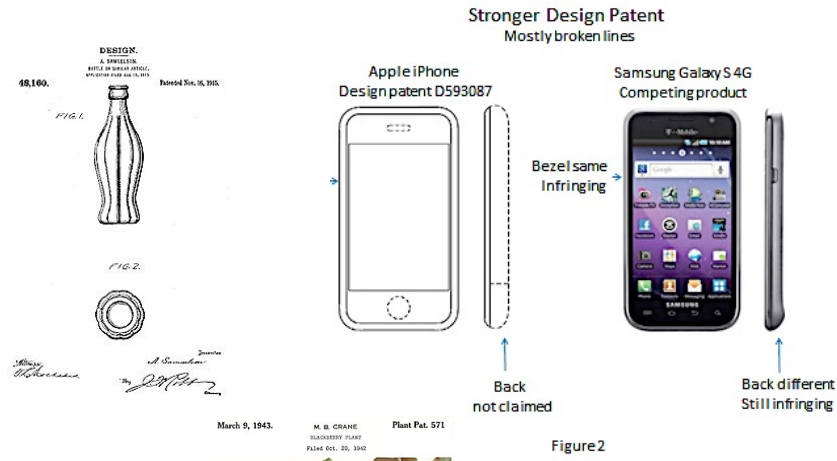
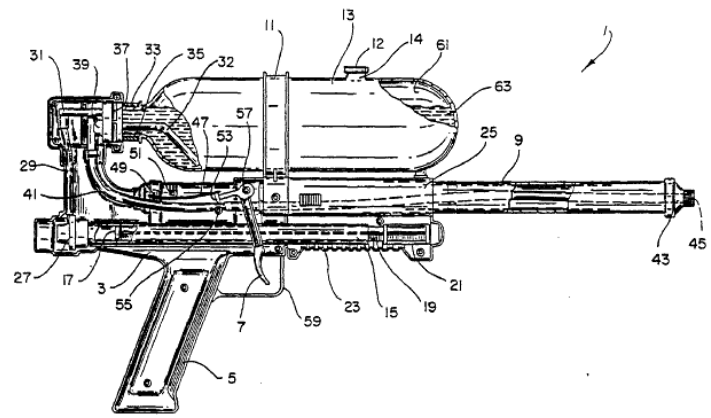
- za nove procese, stroje, proizvodnjo, sestavo materialov in njihovo uporabo
- najpogostejši patent, ki se nanaša na nov izum
- izumitelj ima ekskluzivne pravice izdelave, uporabe in prodaje invencije za omejen čas 17-18 let

- **Patent za oblikovanje (Design patent)**

- dizajn, oblikovanje
- nov a ne vključuje funkcije
 - okrasne
 - estetske dizajne izumov oz. izumljenih produktov
- traja 14 let

- **Patent za rastline (Plant patent):**

- zaščita rastlin, ki se reproducirajo na spolni ali nespolni način
- traja 20 let



- **Pravo avtorskih pravic (Copy right law):**

<http://www.copyright.gov>

- za originalno kreativno izražanje avtorjev, umetnikov, dizajnerjev, programerjev in drugih kreativnih posameznikov
- pesmi, umetniška dela, pisanje, filmi, arhitektura, videoigrice
- avtorske pravice ne ščitijo ideje in dejstva pač pa način kako se vse skupaj izraža
- pravice trajajo več kot 100 let

- **Pravo blagovne znamke (Trademark law)**

- zaščiti trženje imena produkta ali storitve, simbole, logo, oblike, dizajn, zvok, vonj
- gre za zaščito firm z značilnim imenom, dizajnom, logom, in drugih označevalcev, ki identificirajo in razlikujejo njihove produkte in usluge
- zaščita traja vse dokler tovarna uporablja/izdeluje blagovno znamko
(*Coca Cola*, npr že več kot 100 let)

- **Pravo poslovne skrivnosti (Trade secret law):**
 - dizajn, naprave, procesi, sestava, tehnika, formule, informacije, recepti
 - gre za zaupno informacijo, ki da firmi prednost v smislu kompetitivnosti
 - lastnik lahko prepreči drugim uporabo informacije, če je bila pridobljena ilegalno
 - traja toliko časa, dokler dejavnost ohranja skrivnost
- **Prekrivanje zaščit**
 - **Poslovna skrivnost / patent:**
 - možno je opraviti patentno vlogo skupaj z izumom kot poslovna skrivnost vsaj za 18 mesecev (USA)
 - **Avtorsko pravo / blagovna znamka**
 - ta kombinacija je pogosta
 - npr. izrazno umetniško delo in design se lahko zaščiti z avtorskimi pravicami, kot celota pa tudi z blagovno znamko
 - **Patent / blagovna znamka:**
 - npr. dizajner otroških igrač lahko produkt zaščiti kot
 - ime (kot blagovna znamka)
 - kot dizajn (kot patent dizajna)
 - izgled (kot avtorske pravice)
 - novost (kot uporabi patent)

- Kaj je patent?
- Patent je zakonsko zaščitena in izključna pravica gospodarskega izkoriščanja izuma, ki jih dodeli država imetniku patenta za omejeno dobo, po navadi je to za 20 let.
- Pravice so dodeljene prosilcem, v zameno za razkritje njihovih izumov.
- Po tem, ko država nekomu dodeli patent, ne sme nobena druga oseba izdelovati, uporabljati, uvažati/izvažati potrjenega izuma v tej državi, brez dovoljenja imetnika patenta.
- Dovoljenje je po navadi v obliki licence, kjer pogoje določi lastnik patenta:
 - lahko je brezplačno
 - ali v zameno za avtorski honorar
 - ali pa za pavšalno pristojbino

- po naravi so patenti **teritorialni**
 - da obdržijo patent, morajo izumitelji vložiti prošnjo za patent v vsaki državi, v kateri želijo ta patent imeti.
 - če želi prosilec patent obdržati v več državah mora vložiti ločene prošnje v vsaki od držav
- obstaja nekaj regionalnih uradov kot je npr. **Evropski Patentni Urad** (EPO), ki delujejo kot supranacionalna telesa z močjo, da dodeljujejo patente, ki veljajo v državah članicah
- obstaja pa tudi mednarodni postopek za vlaganje ene aplikacije pod okriljem »**Patent Cooperation Treaty**« (TCP), ki daje zaščito patentu v večini držav
- različne države ter različni regionalni uradi imajo **različne standarde** za dodeljevanje patentov.

PATENTI – patentno varstvo v Sloveniji in tujini

- V Sloveniji se nacionalna prijava za podelitev patenta vloži pri
 - Uradu RS za intelektualno lastnino.
 - Slovenski prijavitelj jo lahko vloži sam ali prek zastopnika (UL)
 - patent traja 20 let od datuma vložitve prijave
 - za vzdrževanje patenta je potrebno vsako leto plačevati letne pristojbine

<http://www2.uil-sipo.si/>

<http://www.imamidejo.si/>

<http://maribor.demola.net/>

<http://www.raz.um.si/#!podjetnistvo/c8m6>

- Pridobitev patentnega varstva v drugih državah lahko poteka po treh različnih poteh:
 - nacionalne prijave
 - mednarodna prijava
 - evropska prijava

- **Nacionalna prijava**

- najosnovnejša oblika prijave je nacionalna prijava, ki se vloži pri ustreznem organu države, v kateri želimo varstvo
- prijavitelj, ki ni rezident te države, mora postopek pridobitve patenta praviloma izvesti prek zastopnika, ki je vpisan v register zadevne države

- **Mednarodna prijava**

- je vložitev mednarodne prijave v skladu s Pogodbo o sodelovanju na področju patentov (PCT), ki ima več kot 130 držav članic.
- slovenski prijavitelji lahko vložijo prijavo pri slovenskem uradu v angleškem, francoskem, nemškem ali slovenskem jeziku (kasnejši prevod)
- postopek se nadaljuje pri Svetovni organizaciji za intelekt. lastnino (WIPO) v Ženevi

<http://www.wipo.int/wipolex/en/profile.jsp?code=SI>

- **Evropska prijava**

- Evropski patent trenutno velja v 31 državah članicah Evropske patentne konvencije in v državah, ki imajo z Evropsko patentno organizacijo sklenjene posebne sporazume

http://europa.eu/youreurope/business/competing-through-innovation/protecting-intellectual-property/slovenia/index_sl.htm

- Slovenija je od 1. decembra 2002 polnopravna članica Evropske patentne organizacije.
- Prijavitelj lahko prijavo za evropski patent vloži pri slovenskem uradu v slovenskem jeziku, vendar mora njen prevod v enega od treh uradnih jezikov Evropskega patentnega urada vložiti neposredno pri tem uradu, kjer se postopek tudi nadaljuje.
- Prijavitelj lahko nastopa sam ali prek evropskega patentnega zastopnika. Med evropske patentne zastopnike je vpisanih tudi že več slovenskih patentnih zastopnikov.

PATENTI – pogoji za pridobitev patenta

- **Patent** se lahko dobi za izum, ki izpolnjuje naslednje tri pogoje:
 - **novost**
 - točno tak izum ni bil še nikjer na svetu opisan ali kakorkoli drugače objavljen
 - **inventivnost**
 - točno tak izum sicer še ni poznan
 - hkrati pa povprečen strokovnjak ne bi prišel do njega, če bi izhajal iz najbližjih podobnih izumov
 - **industrijska uporabnost**
 - izum mora biti uporaben v trgovini, industriji ali obrti
- **Izum** je pogosto definiran kot rešitev tehničnega problema
 - umetniška dela, znanstvena odkritja ali teorije niso patentibilna, ker nimajo tehničnega karakterja
 - glede poslovnih postopkov, metod zdravljenja, kirurških ali diagnostičnih posegov ni enotne prakse med posameznimi patentnimi sistemi

<http://www.wipo.int//portal/index.html.en>

<http://www.ipo.gov.uk/gb-espacenet-catch.htm>

<http://ip.com/patfam/en/9943936>

<http://www.wipo.int/wipogold/en/>

<http://www2.uil-sipo.si/dse.htm>

<http://www.google.com/?tbn=pts>

<http://www.uspto.gov/>

http://www.google.com/patents/US6861578?pg=PA1&dq=lenarcic&hl=en&sa=X&ei=vkQyUcGJIu_64QS80IDwAQ&ved=0CDkQ6AEwAQ#v=onepage&q=lenarcic&f=false