

TJEDAN EU FONDOVA





BIOPROSPECTING JADRANSKOG MORA

Znanstveni centar izvrsnosti za bioprospecting mora
BIOPROCRO



<http://bioprocro.zci.hr/>

Voditeljica
Dr. sc. Rozelindra Čož-Rakovac

**Platforma: Znanstveni centar izvrsnosti za bioprospecting mora
BIOPROCRO (studeni, 2015)**

**TJEDAN
EU FONDOVA**

**Projekt: Prijava na ograničeni poziv za ZCI projekte – ERDF-EU fond:
Bioprospecting Jadranskog mora**

(Odluka o financiranju 20. 09.2017.; Ugovor o dodjeli bespovratnih sredstava stupio na snagu 05.10 2017.; provedba projekta 1.11.2017.)

**Odobren iznos bespovratnih sredstava: 36,941.965,46 kn (predujam
11,082.589, 64 kn)**

- **Horizon 2020: PerformFISH: odobren – ožujak, 2017**

Call H2020-SFS-2016-2017, RIA

Sustainable Food Security – Resilient and resource- efficient value chains

WP - Boosting Fish Health at all Life Cycles Stages (Diagnostic Techniques and Challenges; Medicines, Biocides and Bioactive Substances)

- **INTERREG-ADRION 2014-2020: BIO-ECOonomy Research Driven Inovation – BIOECO-RDI: odobren 2017.**

potpora razvoju inovacijskog sustava, međunarodno umrežavanje u cilju razvoja inovacijskih procesa, kreiranje strateških pravaca razvoja regionalne bioekonomije - Jadransko-Jonska regija

Partneri/Istraživačke skupine

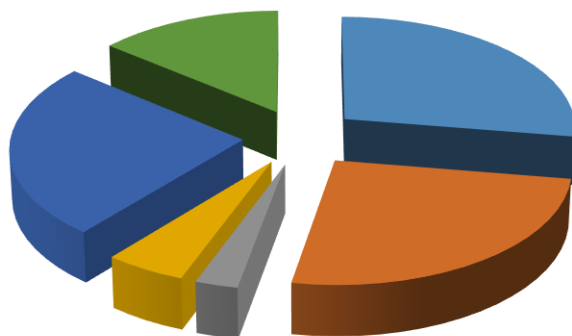


ZCI – BioProCro platforma okuplja hrvatske istraživačke skupine koje istražuju bioaktivne spojeve izolirane iz morskih organizama u hrvatskom dijelu Jadrana

Projektni partneri:

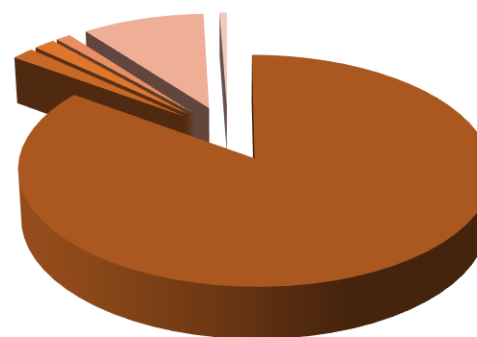
- ✓ **Institut Ruđer Bošković - Zavod za kemiju materijala, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Zavod za molekularnu biologiju**
 - ✓ **Sveučilište u Rijeci - Odjel za biotehnologiju**
 - ✓ **Sveučilište u Zagrebu - Prehrambeno biotehnološki fakultet**
 - ✓ **Sveučilište u Splitu - Kemijsko tehnološki fakultet**
 - ✓ **Sveučilište u Osijeku - Prehrambeno tehnološki fakultet**
-

Element1: Provođenje vrhunskih/graničnih istraživanja u području plave biotehnologije- Bioprospectinga (cca 33 mil kn)



- OPREMA: cca 9mil kn
- POTROŠNI MATERIJAL: cca 8,3 mil kn
- UGOVORNA ISTRAŽIVANJA: cca 0,9 mil kn
- STALNO ZAPOSLENI: cca 1,7 mil kn
- NOVOZAPOSLENI: cca 8,2 mil kn
- DISEMINACIJA REZULTATA: cca 4,6 mil kn

**Ukupni troškovi element 1-7
cca 37 mil kn**



- ELEMENT 1: VRHUNSKA ISTRAŽIVANJA
- ELEMENT 2: SURADNJA
- ELEMENT 3: IZOBRAZBA I USAVRŠAVANJE
- ELEMENT 4: TRANSFER ZNANJA I TEHNOLOGIJE
- ELEMENT PROJEKTA PM
- ELEMENT PROJEKTA V

Bioprospecting – istraživanje i razvoj znanja o održivom korištenju i upravljanju biološkim resursima.

**TJEDAN
EU FONDOVA**



Preduvjeti

1. Biološki resursi

Jadransko more - raznolikost morskog sustava, bogatstvo bioaktivnih molekula - proteini, peptidi, enzimi, sekundarni metaboliti (spužve, plaštenjaci, žarnjaci), polisaharidi (bakterije, alge), masne kiseline, lipidi (alge).

Morski sustavi – daleko veća biološka raznolikost od kopnenih sustava

2. Potrebe

Industrija: prehrambena, farmaceutska, kozmetička

3. Infrastrukturni i ljudski kapaciteti

- Interdisciplinarna platforma istraživanja morskih prirodnih resursa - strukturirani i organizirani pristup resursima morskog sustava
 - Stručnjaci: biologija/molekularna biologija, biomedicina, kemija, biokemijsko inženjerstvo, bioprocena tehnologija, “big data”, računarstvo, modelni skrining
 - Korištenje postojeće opreme, stečenih znanja, kompetentnosti, ljudskih resursa
-

Ciljani organizmi

TJEDAN
EU FONDOVA



Alge - preko 25.000 vrsta, fotosintetski autotrofni organizmi (od jednostaničnih do mnogostaničnih) - morske /slatkovodne alge; mikro/makroalge

Zelene alge (Chlorophyceae); Smeđe alge (Phaeophyceae); Crvene alge (Rhodophyceae); Modrozelenne alge (Cyanophyceae)

Mješinci (Radiata, Coelenterata) - najniži mnogostanični organizmi, žive isključivo u vodi/morskoj vodi; obuhvaćaju dva koljena: žarnjake (Cnidaria) i rebraše (Ctenophora)

Mahovnjaci (Bryozoa, ponekad i Ectoprocta) - mnogostanični organizmi koji žive u morskoj i slatkoj vodi, mikroskopske veličine, kolonije vidljive, poznato oko 4.000 vrsta

Mekušci (Mollusca) - oko 50.000 vrsta mekušaca (školjkaši, puževi, glavonošci, hitoni)

Plaštenjaci (Tunicata, Urochordata) - morske životinje iz koljena svitkovaca 1600 vrsta (u Jadranu 30 vrsta)

Spužve (Porifera) - odjeljak Parazoa; u Jadranu oko 205 vrsta spužvi

Veliki biotehnološki
potencijal - prirodni
spojevi iz oceana i
mora -70% zemljine
površine

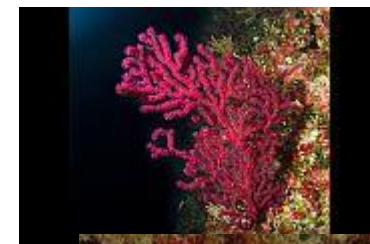


Coelenterates



Bryozoans

Tunicates



Phyllidiidae



Algæ





Zašto morski organizmi ?

Borba za opstanak i pritisak okoliša



Biološka raznolikost



Obrana
Napad
Signalizacija



Kemijska raznolikost



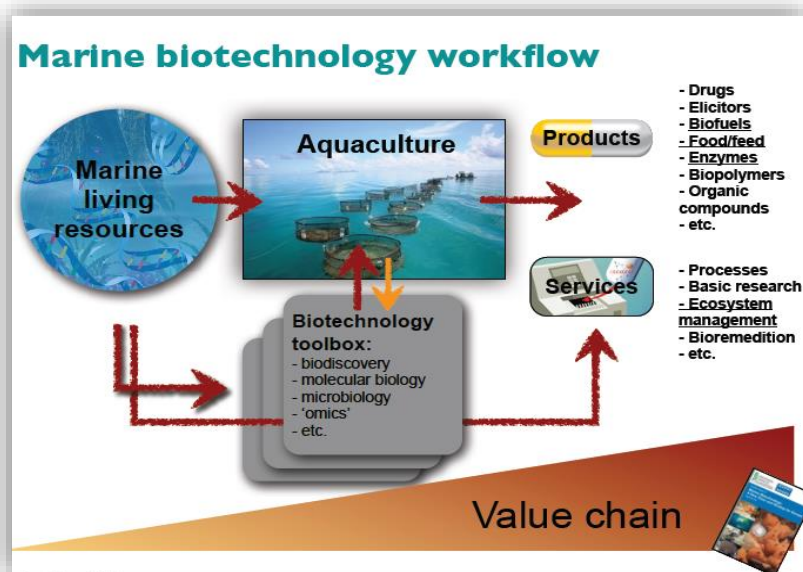
Biotehnološki potencijal

Opći cilj: Jačanje kapaciteta Centra izvrsnosti za Bioprospecting mora kroz provođenje vrhunskih interdisciplinarnih istraživanja u području biotehnologije mora s ciljem dobivanja biološki aktivnih molekula poželjnih svojstava za primjenu u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji

Pretraga **novih izvora** ➡ Razvoj **novih produkata**

Specifični ciljevi:

- Selekcija staništa, procjena biološke i kemijske raznolikosti (Nacionalna genomska, genska i proteomska baza Jadranskog mora, Nacionalna banka prirodnih spojeva)
- Razvoj novih protokola za ekstrakciju, izolaciju, pročišćavanje i obogaćivanje biomolekula
- Screening biološkog potencijala - procjena djelotvornosti i primjenjivosti ekstrahiranih molekula u potencijalnim industrijama
- Scale-up optimizacija - od laboratorija u pilot skali do procesa industrijskih razmjera; unaprijediti i poboljšati sustave u kultiviranju različitih morskih vrsta, (spužvi, algi, bakterije...)



Sigurnost - rješavanje pravnih pitanja vezanih za sigurnost pristupa morskim resursima,

Suradnja/sinergija - između istraživačkih institucija i biotehnoloških tvrtki

Stimuliranje timova za nalaženje dodatnih izvora financiranja

Stručna razmjena znanja kroz poticanje radionica, skupova, patenti, publikacije

Procjena uspješnosti provedbe projekta



Pokazatelji:

- broj CC publikacija
 - broj uključenih istraživača
 - gostujući istraživači
 - ostvarne znanstvene suradnje na nacionalnoj i međunarodnoj razini
 - prijenos znanja/tehnologija, patentne prijave
 - broj novih projekata

 - 22 novo zaposlenih stručnjaka – partneri i voditelj
 - 10 doktoranada
 - 10 poslijedoktoranada
 - 2 administratora

 - nova srednja i mala oprema – cca 9 mil kn
-

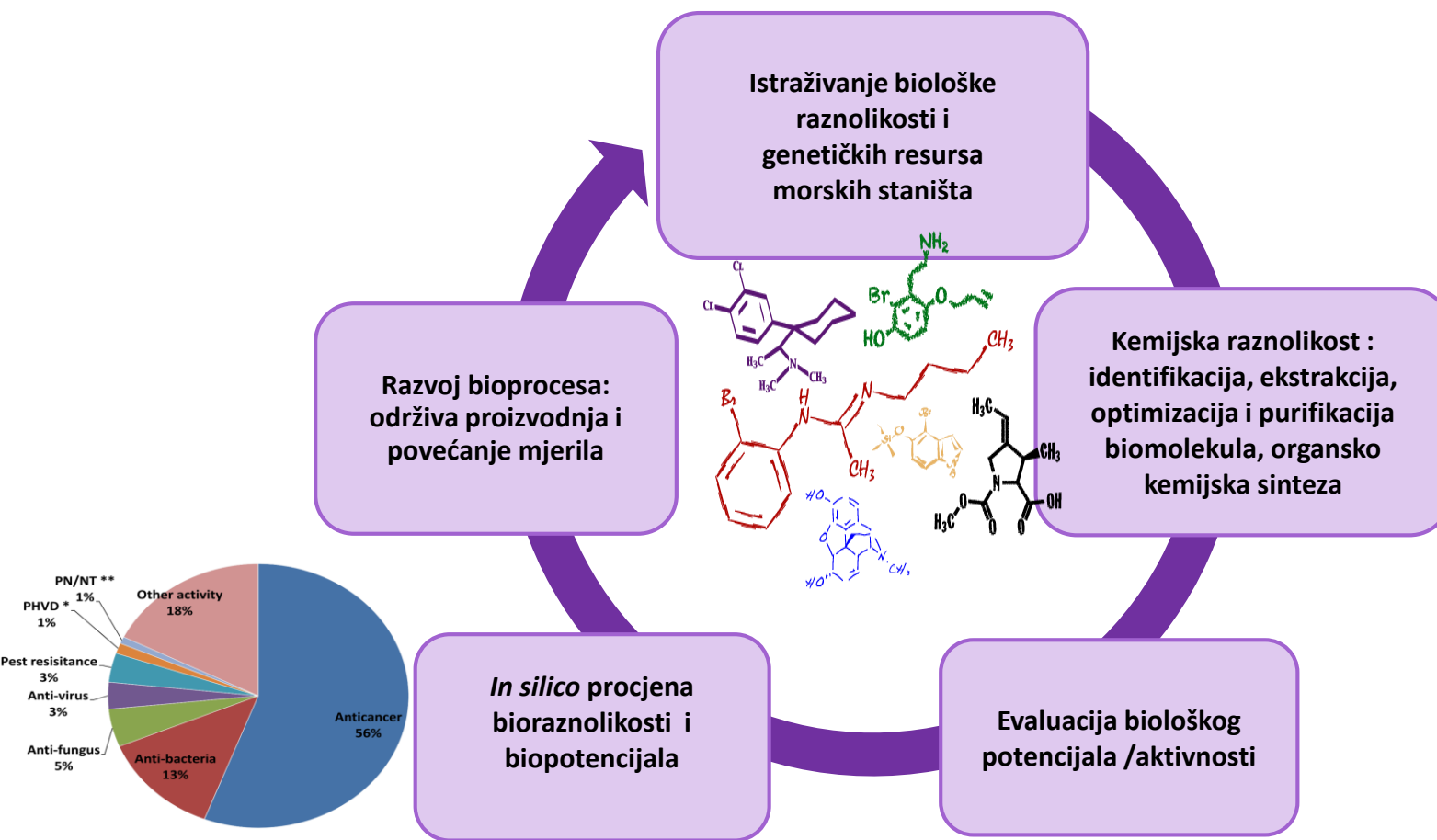
1.	Sustavi za uzgoj i održavanje modelnih organizama ("racks", mrijestilica)
1.	Sustav za pripremu vode - destilirana, redestilirana
1.	Homogenizator
1.	Sustav za hlađenje uzoraka sa ledomatom za pohranu
1.	RT-PCR
1.	Kapilarna elektroforeza
1.	Sustav za Western Blotting i imunohistokemiju
1.	Računalna i softverska podrška sustava za vizualizaciju i mikročitač
1.	Uređaj za liofilizaciju
1.	Bioreaktor s mješalom
1.	Tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti s DAD i RI detektorima
1.	Speedvac uparivač
1.	Nadogradnja GC kromatografa s auto samplerom
1.	Nadogradnja sustava pumpi za kiralnu analitiku
1.	Uređaj za flash-kromatografiju
1.	Uređaj za pripremu demineralizirane vode
1.	Laboratorijska centrifuga
1.	Laboratorijska tresilica
1.	Uređaj za liofilizaciju
1.	Tresilica s hlađenjem
1.	Inkubator s hlađenjem
1.	Spremnici za tekući dušik s držačima za odvojeno držanje uzoraka
1.	Mali laboratorijski autoklav
1.	Akvarij
1.	Gradijent PCR
1.	Spray dryer za vodena i organska otapala
1.	Enkapsulator
1.	Vakuum koncentrator





1.	Sustav za post-kolonsku derivatizaciju
1.	Zamrzivač na -20 °C
1.	Mikrovalni uređaj za ekstrakciju i sintezu
1.	Uređaj za usitnjavanje uzoraka
1.	Ultrafreezer -86 °C
1.	Uređaj za kaspuliranje tekućih ekstrakata
1.	Autoklav
1.	Centrifuga s hlađenjem
1.	Laboratorijski sušionik
1.	Vodena kupelj s tresilicom
1.	Bioreaktor s mješalom
1.	Victor X3, čitač mikrotitarskih pločica
1.	UPLC uređaj s odgovarajućim detektorom
1.	UV/VIS spektrofotometar sa termostatiranom komorom
1.	Tresilica
1.	Višenamjenski sustav za automatsko injektiranje i pripremu uzoraka za vezani sustav plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC-MS)
1.	Koncentrator "purge and trap"
1.	Nadogradnja GC-MS s plameno-ionizacijskim detektorom
1.	Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija s DAD i RID detektorom
1.	Zamrzivač na -20 oC
1.	Mini cluster + GPU
1.	Server AS
1.	Radna računala
1.	Laptopi
1.	NAS (network attached storage)

5 ISTRAŽIVAČKIH AKTIVNOSTI:



Aktivnost 1: Istraživanje biološke raznolikosti i genetičkih resursa morskih staništa (IRB)



Profiliranje bioraznolikosti

- **Odabir ekoloških niša**

(geografska blizina- istražiti bioraznolikost i genetički potencijal u prirodno očuvanim ili područjima pod jakim antropogenim utjecajima)

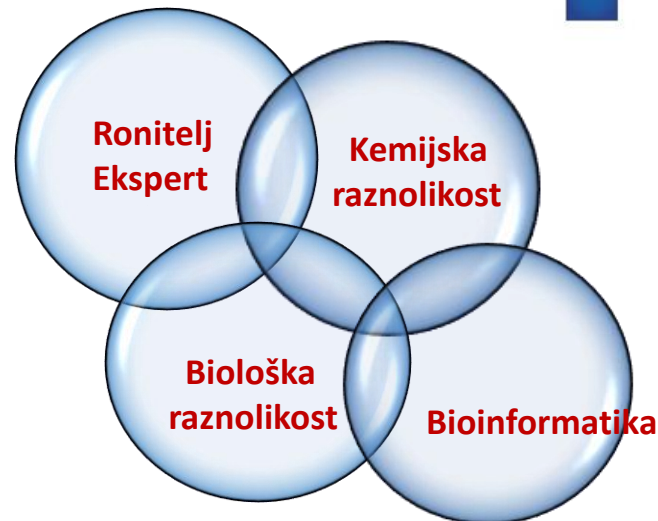
- **Istraživanja na razini DNA**

- Izolacija ukupne DNA

- Umnožavanje genetičkih biljega – NGS

- (i) standardni - za filogenske analize

- (ii) specifični - za pronalaženje specifičnih gena od biotehnološkog značaja

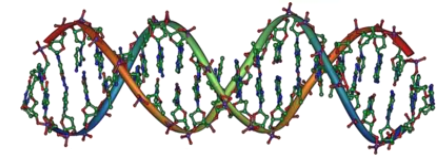
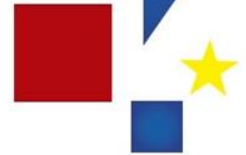


Stvaranje zbirke (repozitorija) DNA (ili kultivirajućih mikroorganizama) prema filogenetskim kategorijama i biotehnološkom potencijalu

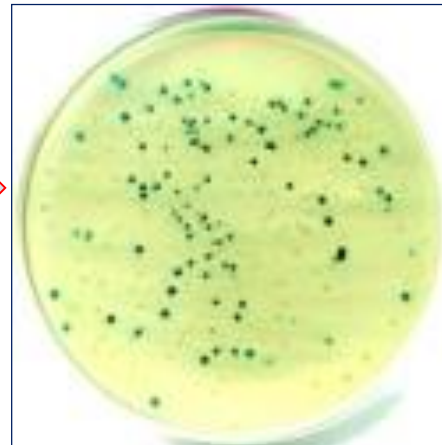
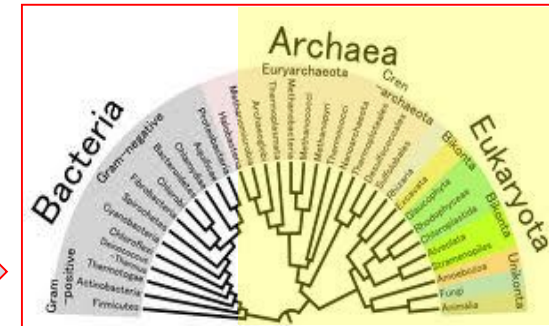


Metagenomika

**TJEDAN
EU FONDOVA**



IDENTIFICATION



PCR

- DNA izolacija
- Umnožavanje 16S rRNA, ili ciljnih specifičnih gena ili kloniranje

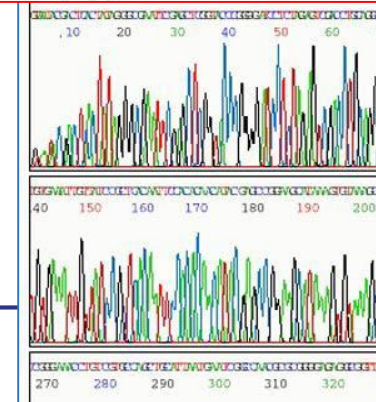
Klon

- Sekvenciranje DNA novim generacijama sekvencatora (NGS)

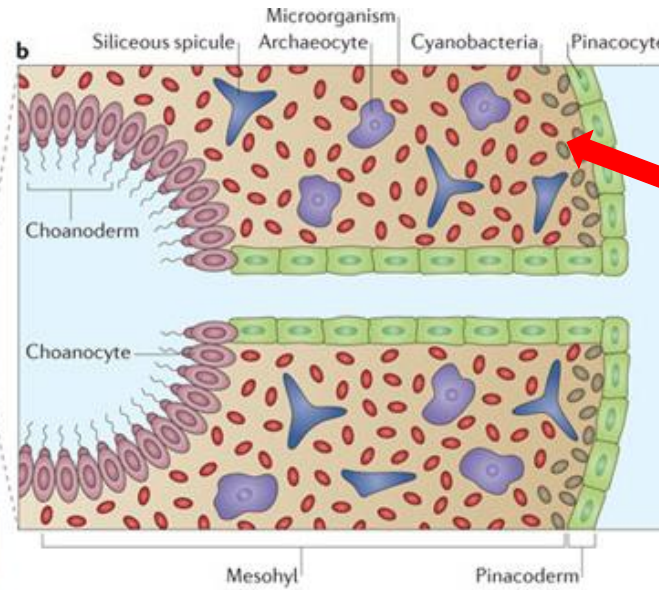
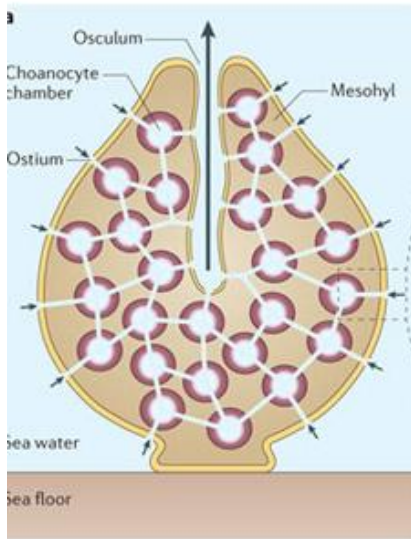
ANALIZA

- Filogenetske analize, izolacija gena od interesa

- Abella J, et al, EPR, Integron diversity in marine environments, 2015, 20(22): 15215-15229
- Duran R, et al. Exploring Actinobacteria assemblages in coastal marine sediments under contrasted Human influences in the West Istria Sea, Croatia (2015) Environ Sci Pollut Res Int. 20(22): 15360-15369



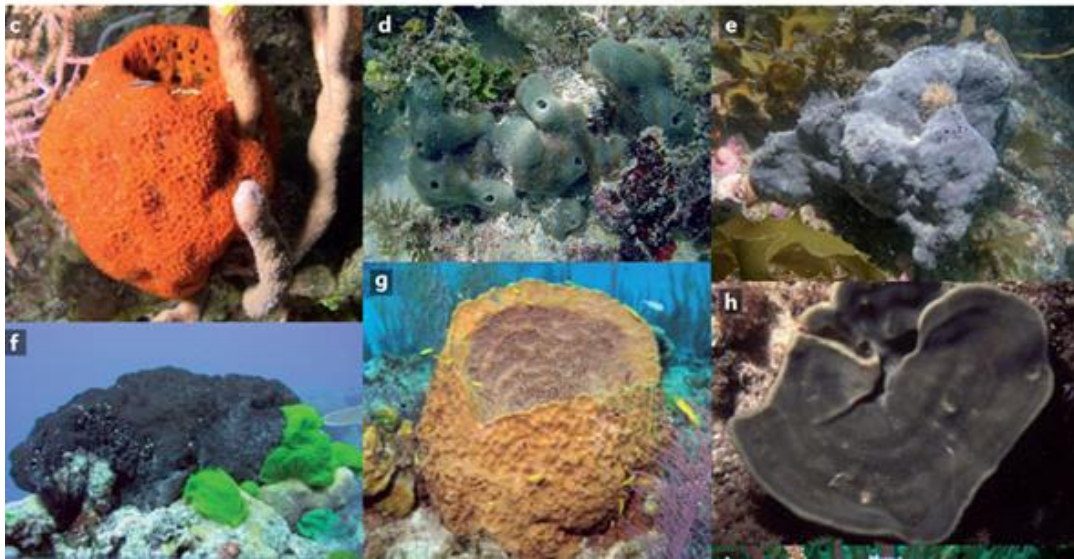
Spužve i simbionti



TJEDAN
EU FONDOVA

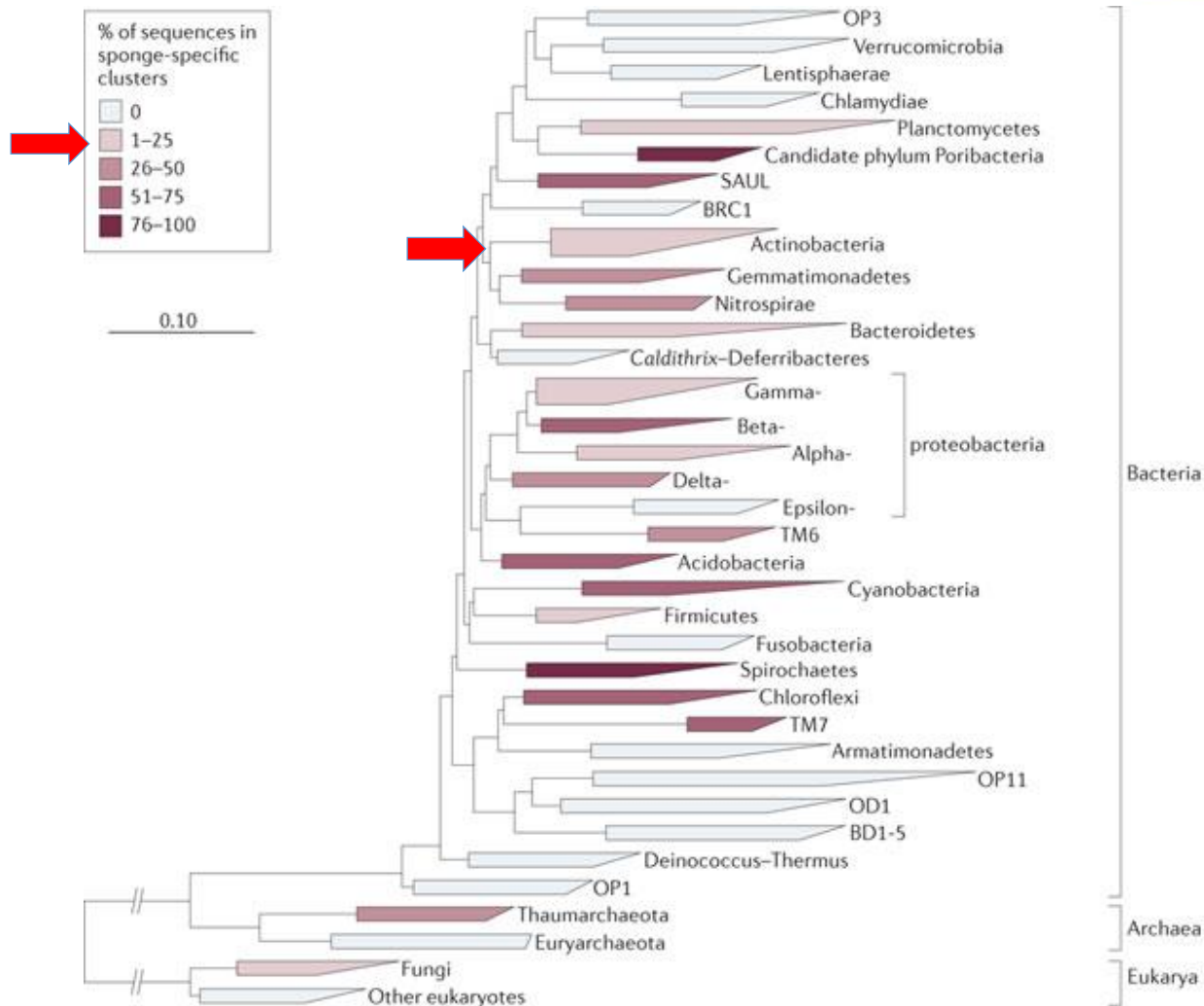


**Mnogobrojne
simbiotske
bakterije**



**Različite vrste
spužvi**

Aktinobakterije su poznate po sintezi (~ 60%) antibiotika od komercijalnog značaja - npr. kod morskih spužvi do 25% simbionata su aktinobakterije





Aktivnost 2: Istraživanje kemijske raznolikosti: identifikacija, ekstrakcija, purifikacija, organsko-kemijska sinteza (IRB, PBF, PTF, KTF)



Ekstrakcija bioaktivnih molekula – konvencionalnim i novim tehnikama

Optimizacija postupaka ekstrakcije/izolacije

Mikroenkapsulacija bioaktivnih molekula tehnikom sušenja raspršivanjem

Bioaktivne molekule - baza za proizvodnju dodataka prehrani i/ili funkcionalnih proizvoda

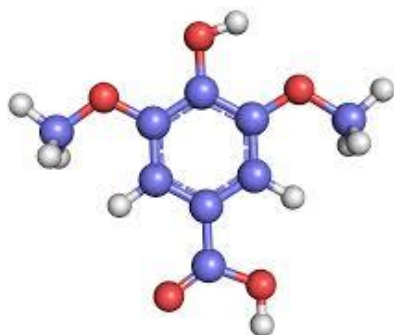
EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH MOLEKULA IZ MORSKIH ORGANIZAMA

TJEDAN
EU FONDOVA



KONVENCIONALNE TEHNIKE

Soxlet, maceracija, digestija, perkolacija



NOVE TEHNIKE

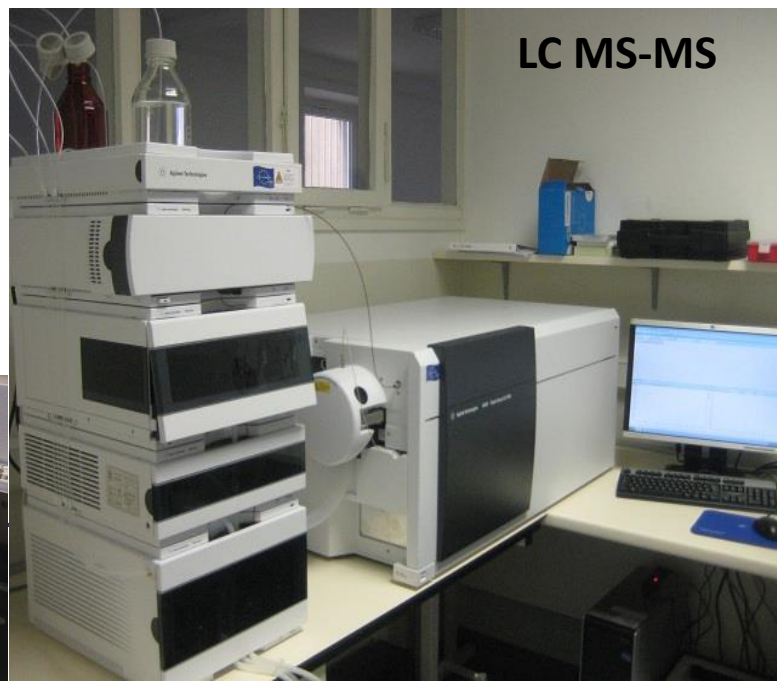
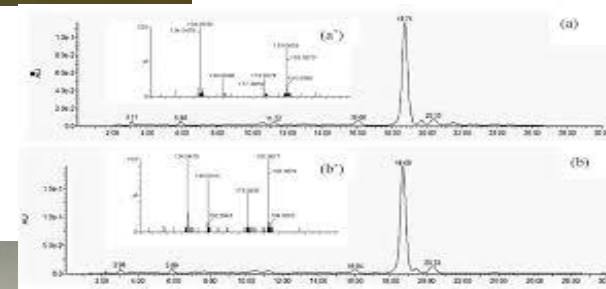
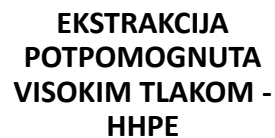
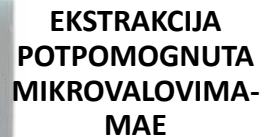
Ekstrakcija
superkritičnim
fluidima - SFE

Ubrzana
ekstrakcija
otapalima-
ASE

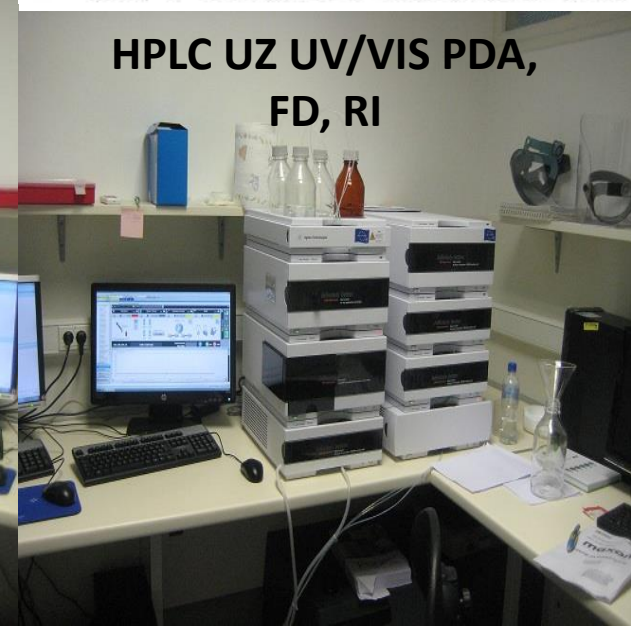
Ekstrakcija
potpomognuta
visokim tlakom
-HHPE

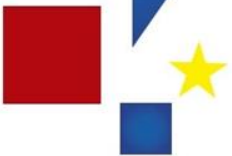
Ekstrakcija
potpomognuta
mikrovalovima-
MAE

Ekstrakcija
potpomognuta
hladnom
plazmom-HVED



**HPLC UZ UV/VIS PDA,
FD, RI**





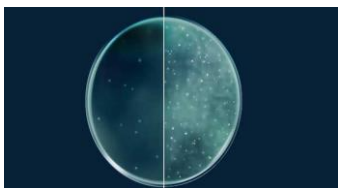
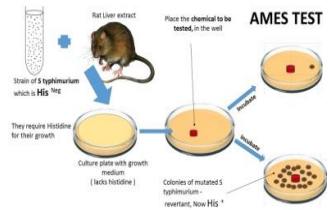
Aktivnost 3: Evaluacija biološkog potencijala/aktivnost (IRB, UNIRI)

3.1. Biološko testiranje na modelnim organizmima

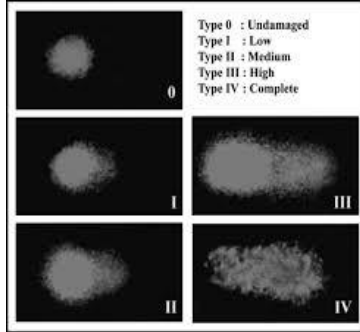
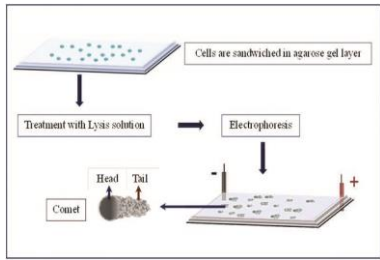
3.1.1. Procjena negativnih učinaka BAM

Procjena genotoksičnosti/mutagenosti:

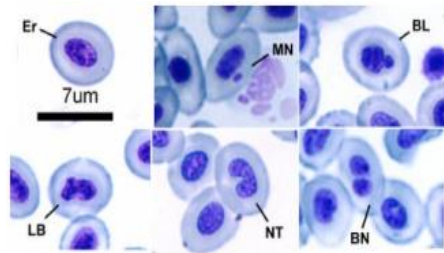
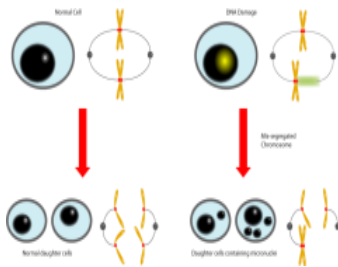
AMES test (ISO 16240:2005) - određivanje mutagenog/kancerogenog potencijala ispitivanog uzorka na *Salmonella typhimurium* (sojevi TA98 i TA100)



Komet test - detekcija oštećenja u molekuli DNA
- na embrijima zebrića (*Danio rerio*)



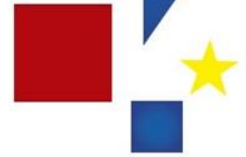
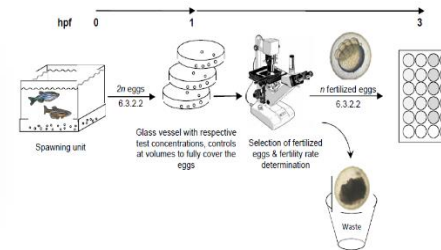
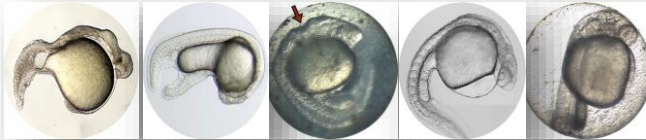
Mikronukleus (MN/ENA) test – na perifernoj krvi odraslih zebrića



Procjena toksičnog i teratogenog potencijala

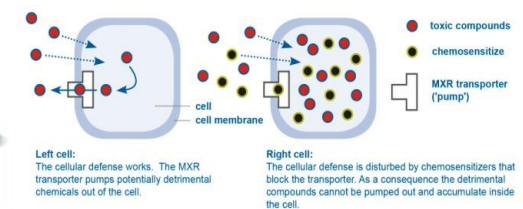
Test embriotoksičnosti na zebricama *Danio rerio*

TJEDAN
EU FONDOVA

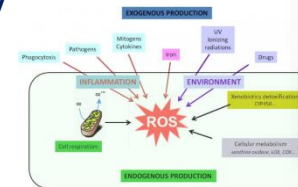


3.1.2. Procjena pozitivnih učinaka BAM

Određivanje multiksenobiotičke otpornosti na vodenim (zebrice) i kopnenim organizmima (gujavice)

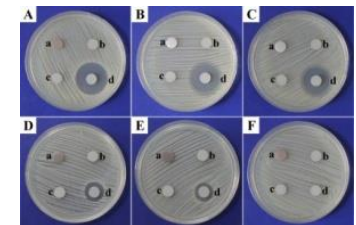


Procjena tkivnog biokemijskog profila i oksidativnog/anitoksidativnog statusa, histoloških promjena



Procjena imunološkog potencijala – procjena nespecifičnog imunološkog sustava molekularnim metodama

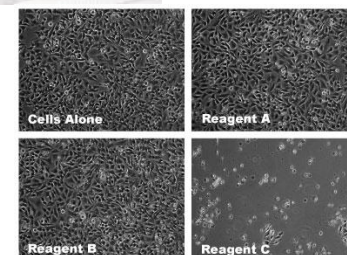
Procjena antimikrobnog potencijala – primjenom disk difuzijske metode (*Kirby-Bauer disk diffusion method*)



3.2. Biološko testiranje na staničnim kulturama



3.2.1. Procjena citotoksičnosti – na staničnim linijama tumora, normalnih fibroblastoma i tkivu leđne moždine



3.2.2. Procjena antiproliferativnog učinka na tumorske adherentne stanice i stanice leukemije

- metabolički testovi (MTT, fluorescentni resorufin) - vijabilnost stanica odnosno mitohondrijska aktivnost
- metode analize staničnog ciklusa, stanične smrti, ekspresije gena
- metode proteomike - metode učinaka (Western blot, pull down, analiza ukupnog ekspresijskog profila uz pomoć metoda LC ESI-MS/MS i 2D MS/MS)

***Aktivnost 4: In silico procjena bioraznolikosti i biopotencijala;
bioinformatička analiza sekvencioniranih organizama; prediktivno
modeliranje i analitika bioaktivnih spojeva (IRB, PBF)***



Fuzija podataka i informacija, modeliranje i karakterizacija

➤ **Bioinformatičke analize sekvencioniranih organizama**

- Razvoj i implementacija bioinformatičkih alata za pretraživanje, otkrivanje i predviđanje genskih skupina
- Određivanje mikrobne bioraznolikosti i biopotencijala uzorkovanih mikrobiomom
- Određivanje taksonomske raznolikosti pojedinog uzorka/staništa temeljem analize 16S rRNA amplikona
- Dizajniranje početnica specifičnih za ciljane genske produkte (geni uključeni u biosintezu)

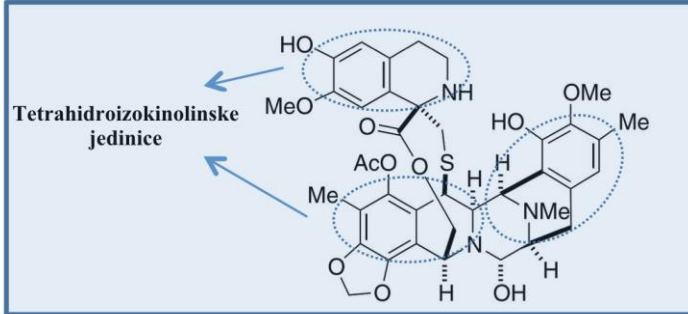
➤ **In silico karakterizacija bioaktivnih spojeva**

- Integracija podataka o aktivnostima spojeva iz relevantnih baza i izvora podataka OpenPHACTS, AntiBaseGO, KEGG, NCI-DTP
 - Modeliranje (QSAR+Docking) i predviđanje aktivnosti novih bioaktivnih molekula
-

Aktivnost 5: Održivi bioprocesi za proizvodnju bioaktivnih supstanci i povećanje njihovog mjerila (PBF)

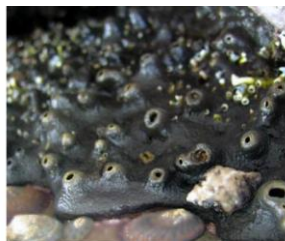
- Priprema, sastavljanje i optimiranje sastava hranjive podloga za uzgoj odabranih vrsta radnih mikroorganizama za proizvodnju bioaktivnih supstanci
 - Odabir bioreaktorskog sustava i načina vođenja bioprocasa (šaržni, šaržni proces s pritokom supstrata, polukontinuirani i kontinuirani) za uzgoj odabranih vrsta radnih mikroorganizama za proizvodnju bioaktivnih suspstanci
 - Odabir adekvatnih tehnoloških operacija za izdvajanje bioaktivnih suspstanci u velikom mjerilu, te formiranje optimalnog sustava za izdvajanje i pročišćavanje odabranih bioaktivnih supstanci
 - Procjena održivosti i formiranje integriranog bioprocenog sustava za proizvodnju i izdvajanje odabranih bioaktivnih supstanci
 - Izrada procedure za povećanje mjerila integriranog bioprocenog sustava na temelju istraživanja provedenih u poluindustrijskom mjerilu
-

Primjeri Bioprospectinga

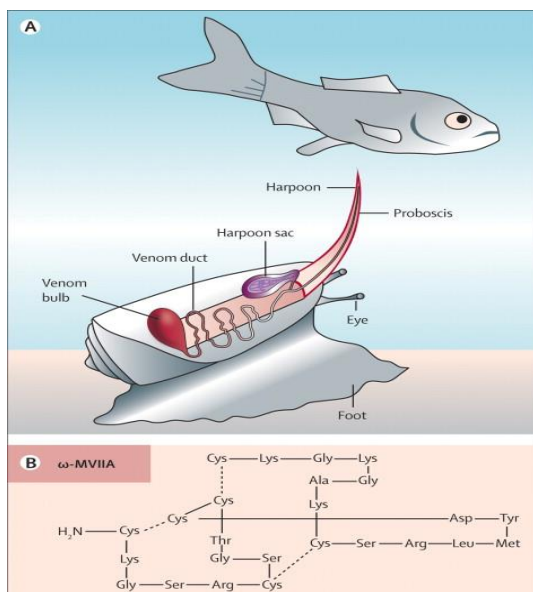


Ecteinascidin 743 (Trabectedin; Yondelis)

izoliran iz karipskog tunikata
Ecteinascidia turbinata
antitumorsko djelovanje

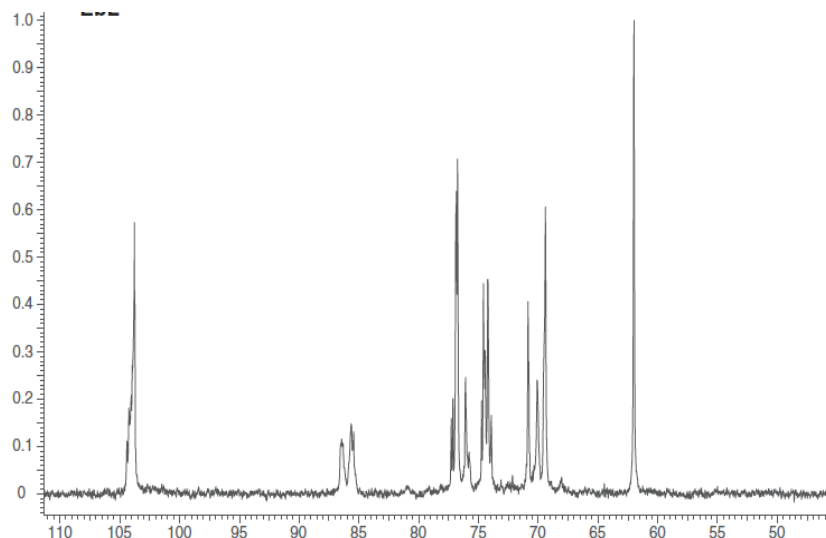


- **Halihondrini i Eribulin**
- japanska morska spužva *Halichondria okadai* (Uemura i sur., 1986)
- nađeni su i u drugim spužvama
- visoko citotoksičan prema stanicama leukemije u miševa



Ziconotide (SNX-111; Prialt®)

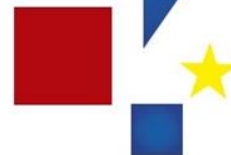
- atipični analgetik za liječenje teške i kronične boli (FDA, 2004)
- ω -konotoksin izoliran iz morskog puža *Conus magnum*



^1H -NMR spektar glukana iz alge *Padina pavonica*

Biološka aktivnost/potencijal:

- *imunostimulirajuće djelovanje (primjena u akvakulturi)*
 - *antioksidativno djelovanje*
 - *antimikrobno djelovanje*
-



**Sadržaj publikacije/emitiranog materijala isključiva je odgovornost Instituta
Ruđer Bošković/Rozelindre Čož-Rakovac.**