

Uzgoj i permeabilizacija stanica *Ralstonia eutropha* H16

Krog, Korina

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:400701>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Korina Krog
0058222190

UZGOJ I PERMEABILIZACIJA STANICA *RALSTONIA EUTROPHA* H16

ZAVRŠNI RAD

Znanstveno-istraživački projekt: Integrirani mikrosustav za enzimatsku proizvodnju biovodika (HRZZ, IP-2022-10-2175)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek

Zagreb, 2024.

Najveće hvala željela bih uputiti mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Jurinjak Tušek na odličnom vodstvu, volji, strpljenju, brojnim savjetima, izdvojenom vremenu te na najboljoj radnoj atmosferi!

Također veliko hvala doc. dr. sc. Aniti Šalić koja je bila spremna pomoći na svakom koraku i s kojom je bilo jako lijepo raditi.

Hvala Željki Ćuric i Sari Anđelović na suradnji i druženju tijekom eksperimentalnog dijela.

Zahvalu upućujem i djelatnicima Laboratorija za mjerenje, regulaciju i automatizaciju , Laboratorija za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda te Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na svakom upućenom savjetu i na omogućenom radnom mjestu te korištenju potrebne opreme.

Hvala djelatnicima Zavoda za industrijsku ekologiju te dr. sc. Ivanu Karlu Cingesaru s Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije na pomoći u provedbi pokusa!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Uzgoj i permeabilizacija stanica *Ralstonia eutropha* H16

Korina Krog, 0058222190

Sažetak: Kako bi se smanjila upotreba fosilnih goriva kao izvora energije, potiče se primjena zelenih alternativnih goriva, poput vodika. Posebno je zanimljiva proizvodnja biovodika koja se temelji na razgradnji organskih tvari (npr. organski otpad) primjenom mikroorganizama. U ovom radu analiziran je utjecaj sastava hranjive podloge (udio fruktoze i glicerola) na rast bakterijskog soja *Ralstonia eutropha* H16 koji metabolički proizvodi četiri hidrogenaze, obećavajuće biokatalizatore u proizvodnji biovodika. Također je analizirana učinkovitost šest različitih sredstava (EDTA, Triton X-100, SDS, CTAB, PEG i BSA) na permeabilizaciju stanica *R. eutropha* H16 kako bi se u što većoj koncentraciji oslobodili poželjni enzimi hidrogenaze. Rezultati pokazuju da je najveći prinos koncentracije biomase, od $0,470 \pm 0,134$ g/L, postignut u eksperimentu s 4 g/L otopine glicerola u hranjivoj podlozi. Nadalje, najveća koncentracija proteina, od $25,536 \pm 1,102$ mg/mL, oslobođena je koristeći CTAB kao sredstva za permeabilizaciju. Permeabilizat dobiven primjenom Triton X-100 pokazao je najveću enzimsku aktivnost zbog specifičnog načina interakcije s površinskim strukturama stanica.

Ključne riječi: biovodik, *Ralstonia eutropha* H16, permeabilizacija

Rad sadrži: 33 stranica, 14 slika, 2 tablice, 45 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek

Komentor: doc. dr. sc. Anita Šalić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Datum obrane: 16. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Process Engineering
Laboratory for Measurement, Regulation and Automation

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Cultivation and permeabilization of *Ralstonia eutropha* H16 cells

Korina Krog, 0058222190

Abstract: In order to reduce the use of fossil fuels as an energy source, the use of green alternative fuels, such as hydrogen, is being promoted. Of particular interest is the production of biohydrogen, which is based on the decomposition of organic substances (e.g. organic waste) by microorganisms. In this work, the influence of the composition of the culture medium (proportion of fructose and glycerol) on the growth of the bacterial strain *Ralstonia eutropha* H16, which produces four hydrogenases, promising biocatalysts for the production of biohydrogen, was analyzed. The efficacy of six different agents (EDTA, Triton X-100, SDS, CTAB, PEG and BSA) on the permeabilization of *R. eutropha* H16 cells was also analyzed to release the desired hydrogenase enzymes at the highest possible concentration. The results show that the highest biomass concentration of 0.470 ± 0.134 g/L was achieved in the experiment with 4 g/L glycerol solution in the culture medium. In addition, the highest protein concentration of 25.536 ± 1.102 mg/ml was released when CTAB was used as a permeabilizing agent. The permeabilizate obtained with Triton X-100 showed the highest enzymatic activity due to the specific nature of the interaction with the surface structures of the cells.

Keywords: biohydrogen, *Ralstonia eutropha* H16, permeabilization

Thesis contains: 33 pages, 14 figures, 2 tables, 45 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ana Jurinjak Tušek, PhD, Associate professor

Co-mentor: Anita Šalić, PhD, Assistant professor, University of Zagreb Faculty of Chemical Engineering and Technology

Thesis defended: July 16, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. VODIK	2
2.1.1. BOJE VODIKA.....	2
2.2. BIOVODIK	3
2.3. <i>RALSTONIA EUTROPHA</i> H16.....	4
2.3.1. HIDROGENAZE IZ <i>RALSTONIA EUTROPHA</i> H16.....	4
2.4. PERMEABILIZACIJA STANICA	6
2.4.1. FIZIKALNE METODE PERMEABILIZACIJE STANICA	6
2.4.2. KEMIJSKE METODE PERMEABILIZACIJE STANICA.....	7
2.4.3. ENZIMSKE METODE PERMEABILIZACIJE	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. MATERIJALI	10
3.1.1. KEMIKALIJE.....	10
3.1.2. OPREMA.....	11
3.1.3. LABORATORIJSKI PRIBOR	12
3.1.4. MIKROORGANIZAM	12
3.2. METODE	12
3.2.1. PRIPREMA OTOPINA.....	12
3.2.1.1. Priprema natrij/kalij fosfatnog pufera pH 7	12
3.2.1.2. Priprema otopine elemenata u tragovima (SL-6 otopina) .. Fehler! Textmarke nicht definiert.	
3.2.1.3. Priprema 50 mmol/L kalij/kalij fosfatnog pufer pH 7 za ispiranje stanica.....	12
3.2.1.4. Priprema 50 mmol/L Tris/HCl pufera pH 8.....	13
3.2.1.5. Priprema 50 mmol/L natrij fosfatnog pufera pH 7	13
3.2.1.6. Priprema DNS reagensa.....	13
3.2.1.7. Priprema Bradford reagensa.....	13
3.2.2. UZGOJ BAKTERIJE <i>RALSTONIA EUTROPHA</i> H16 NA HRANJIVIM MEDIJIMA	13
3.2.3. PERMEABILIZACIJA STANICA <i>R. EUTROPHA</i> H16.....	15
3.2.4. ULTRAZVUČNO RAZBIJANJE STANICE.....	15
3.2.5. BOJENJE STANICA PO GRAMU	15
3.2.6. MORFOLOŠKA ANALIZA UZORAKA.....	15
3.2.7. ANALITIČKE METODE	16
3.2.7.1. Mjerenje optičke gustoće i određivanje koncentracije biomase	16
3.2.7.2. Mjerenje koncentracije fruktoze	16

3.2.7.3. Mjerenje koncentracije glicerola.....	17
3.2.7.4. Mjerenje koncentracije proteina	17
3.2.7.5. Mjerenje aktivnosti enzima glicerol dehidrogenaza (GDH) u permeabilizatima stanica	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. UZGOJ BAKTERIJE <i>RALSTONIA EUTROPHA</i> H16 NA RAZLIČITIM HRANJIVIM PODLOGAMA.....	20
4.2. MIKROSKOPIRANJE OBOJENIH STANICA NAKON UZGOJA.....	23
4.3. MORFOLOŠKA ANALIZA UZORAKA.....	25
4.4. PERMEABILIZACIJA STANICA.....	26
5. ZAKLJUČCI	28
6. POPIS LITERATURE.....	29

1. UVOD

U skladu s rastućim interesom i potrebom za razvijanjem procesa kojima će se smanjiti negativan utjecaj na okoliš, sve veća pažnja pridaje se zelenim alternativama fosilnih goriva. Vodik je prepoznat kao učinkovito alternativno gorivo zahvaljujući brojnim prednostima kao što su ekološka prihvatljivost, visoka energetska učinkovitost, raznovrsna primjena i ekonomska isplativost.

Poseban interes usmjeren je prema biovodu koji se može proizvesti iz biomase primjenom odgovarajućih mikroorganizma i različitih bioloških procesa. Važno je istaknuti da se biovodik može dobiti iz organskih otpada, poput poljoprivrednih ostataka, otpadnih voda i drugih biomaterijala, čime se smanjuje količina otpada koji bi inače bio odbačen na deponije ili spaljen. Jedan od ključnih enzima u enzimatskoj proizvodnji biovodika je hidrogenaza. U organizmima kao što su bakterije, alge i biljke mogu se pronaći različite vrste hidrogenaza, pri čemu su najzastupljenije [FeFe]-hidrogenaze i [NiFe]-hidrogenaze. U stanicama bakterije *R. eutropha* H16 prisutne su četiri različite [NiFe]-hidrogenazu tolerantne na kisik uključene u transport vodika što ovu bakteriju čini izvrsnim izvorom hidrogenaza. Konvencionalne metode za dobivanje intracelularnih proizvoda često se oslanjaju na procese razbijanja stanica (mehaničke i nemehaničke), koji mogu ugroziti integritet i održivost stanice. Kao alternativa, metode stanične permeabilizacije nude obećavajući pristup budući da olakšavaju selektivno otpuštanje unutarstaničnih produkata dok u većoj mjeri čuvaju stanični integritet.

U ovom radu korištena su različita sredstva za povećanje propusnosti kako bi se poboljšala ekstrakcija enzima iz stanica *R. eutropha* H16. Sredstva kao što su EDTA, Triton X-100, SDS, CTAB, PEG i BSA procijenjena su na temelju učinkovitosti u povećanju propusnosti stanične membrane, čime se poboljšava učinkovitost ekstrakcije enzima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. VODIK

U današnje vrijeme raste interes i potreba za razvojem procesa kojima se smanjuju negativni utjecaji na okoliš. Jedan od najvećih izazova je zamjena sagorijevanja fosilnih goriva procesima koji su ekološki prihvatljiviji. Fosilna goriva, ne samo što negativno pridonose klimatskim promjenama, već su i neodrživa s obzirom na to da se njihove zalihe postupno iscrpljuju. Vodik se ističe kao zelena alternativa fosilnim gorivima prije svega zbog velike specifične energije vodika (143 kJ/g) (Di Paola i sur., 2015). Osim toga, njegovim sagorijevanjem kao produkt nastaje samo voda, što ga čini jednom od najzanimljivijih zamjena za fosilna goriva.

Vodik je najzastupljeniji element u svemiru, ali zbog svoje reaktivnosti u prirodi se ne pojavljuje u slobodnom obliku nego u spojevima, kao što su npr. voda i organski materijali. Radi se o bezbojnom, lako zapaljivom plinu bez mirisa, što otežava rukovanje s njime, pa su najveći izazovi povezani s njegovim skladištenjem i transportom.

Postoji niz razloga zbog kojih se vodik sve više uvodi kao alternativno energetska rješenje. Osim spomenute velike specifične energije, ostvaruju se i druge prednosti u odnosu na fosilna goriva, upotreba kojih je jedan od glavnih razloga povećanih emisija CO₂ i drugih po okoliš štetnih plinova kao što su CO, NO_x, SO_x, itd. Primjena vodika omogućuje brzo punjenje različitih vrsta električnih vozila s gorivnim člancima te se može lako integrirati u postojeću mrežu za distribuciju i korištenje goriva uz minimalne prilagodbe sustava. Podržava ključne industrijske procese osiguravajući bitnu kemijsku sirovinu ili redukcijsko sredstvo, te omogućava proizvodnju topline izgaranjem bez emitiranja CO_x, SO_x ili čestica, čime poboljšava energetska sigurnost i promovira lokalnu proizvodnju goriva iz obnovljivih izvora energije i vode (Newborough i Cooley, 2020). Procesima kojima se može proizvesti vodik su različiti i brojni, a u svrhu što većeg smanjivanja emisije CO₂, stalno se razvijaju novi (Osman i sur., 2022). Osim što je održivi energent, vodik je i vrijedna industrijska kemikalija koja se danas najviše koristi u procesima proizvodnje metanola, amonijaka i čelika. Kako bi vodik smatrali istinski zelenim energentom, vodik se mora proizvoditi iz čistih, pristupačnih, pouzdanih i obnovljivih izvora na energetska i ekonomski prihvatljiv način (Acar i sur., 2018).

2.1.1. Boje vodika

Kao što je rečeno, postoje različiti procesi kojima se danas proizvodi vodik. Kako bi razlikovali vodik dobiven korištenjem različitih tehnologija i s obzirom na ukupnu emisiju štetnih plinova koja nastaje u procesu, vodik se dijeli/opisuje prema bojama (Tablica 1). Boje koje se najčešće koriste su siva, plava, tirkizna i zelena. Sivim vodikom smatra se vodik koji je proizveden iz

fosilnih goriva ili ugljena pri čemu nastaju značajne emisije CO₂. Plavi vodik također se proizvodi iz fosilnih goriva, ali u kombinaciji s postupkom hvatanja i skladištenja CO₂ čime se smanjuje emisija stakleničkih plinova. Tirkizni vodik proizvodi se iz fosilnih goriva ili pirolizom, pri čemu je glavni nusprodukt kruti ugljik (Ajanović i sur., 2022). Zeleni vodik proizvede se elektrolizom vode pri čemu nema oslobađanja stakleničkih plinova (Hermesmann i Müller, 2022). Ako se kao izvor električne energije u proizvodnji vodika koriste obnovljivi izvori energije tada tako dobiveni vodik ima najmanje negativan utjecaj na okoliš.

Tablica 1. Boje vodika

Vodik	Tehnologija proizvodnje	Izvor električne energije	Ugljični otisak
Zeleni vodik	Elektroliza	Obnovljivi izvori energije	Minimalan
Plavi vodik	Reformiranje prirodnog plina	Prirodni plin/Ugljen	Nizak
Tirkizni vodik	Piroliza	Prirodni plin	Umjeren
Sivi vodik	Reformiranje prirodnog plina		Umjeren

2.2. BIOVODIK

Osim spomenutih vrsta vodika, danas se sve više istražuje i biovodik, koji se smatra čistim izvorom energije, a moguće ga je proizvesti iz biomase. S obzirom na to da se radi o novoj tehnologiji, ovom vodiku još nije dodijeljena boja.

Biološki procesi koji se koriste za proizvodnju biovodika su foto-fermentacija (izravna fotoliza, neizravna fotoliza i foto-fermentacija), mikroba elektroliza i anaerobna fermentacija (tamna fermentacija), a uključuju različite mikroorganizme, poput bakterija tamne fermentacije, fotosintetskih bakterija, cijanobakterija i zelenih mikroalgi. Među spomenutim mikroorganizmima, mikroalge pokazuju izuzetno dobra svojstva u proizvodnji biovodika kao što su visoki prinos biomase i lipida, visoka bioremedijacija plinova (CO₂ i NO_x), te prilagodljivosti različitim izvorima vode, pa i otpadnih (Li i sur., 2022). Sve spomenute metode smatraju se ekološki prihvatljivima (Šalić i Zelić, 2022).

Iako je biovodik obećavajući izvor energije, njegova primjena je trenutno ograničena zbog izazova poput distribucije, hvatanja, skladištenja, visoke cijene proizvodnje, niske konverzije supstrata, niskog iskorištenja na produktu te niske produktivnosti (Li i sur., 2022). Učinkovitost procesa proizvodnje biovodika uglavnom ovisi o metaboličkim putevima, što čini odabir prikladnih mikroorganizama ključnim za uspjeh. *Ralstonia eutropha* H16 je bakterijski soj koji se ističe po svojoj sposobnosti proizvodnje vodika kao nusprodukta svog metabolizma.

2.3. RALSTONIA EUTROPHA H16

R. eutropha H16 je gram-negativna, fakultativna, kemolitoautotrofna bakterija. Štapićastog je oblika, nepatogena, ne stvara spore, a optimalna temperatura rasta joj je 30 °C. *R. eutropha* se u prirodi može pronaći u tlu i slatkim vodama i dobro je prilagođena okolišu koji se stalno mijenja. Prije se ova bakterija nazivala *Hydrogenomonas eutropha* zbog sposobnosti iskorištavanja molekularnog vodika (H₂) i ugljikovog dioksida (CO₂) kao jedinih izvora energije i ugljika. Dvije promjene naziva, *Wautersia eutropha* i *Cupriviadus necator*, predloženi su u vrlo kratkim razdobljima, ali su rijetko prihvaćeni. Ovaj organizam asimilira CO₂ tijekom autotrofnog rasta putem Calvin Benson-Basham ciklusa (CBB) (Bowien i Kusian, 2002), ali također može rasti heterotrofno koristeći fruktozu, glukonsku kiselinu, razne druge organske kiseline, pa čak i aromatske spojeve kao izvore ugljika (Cram, 2009). U odsustvu kisika, *R. eutropha* H16 prelazi na anaerobni metabolizam (Pohlmann i sur., 2006), a ako je količina kisika ograničena, sintetiziraju se tipični enzimi fermentacije poput laktat dehidrogenaze ili alkohol dehidrogenaze. Divlji tip ne može iskoristiti ugljikohidrate poput glukoze, laktoze i galaktoze zbog odsustva odgovarajućih enzimatskih puteva, ali upotrebom tehnologije rekombinantne DNA i ti su nedostaci prevladani (Raberg i sur., 2018).

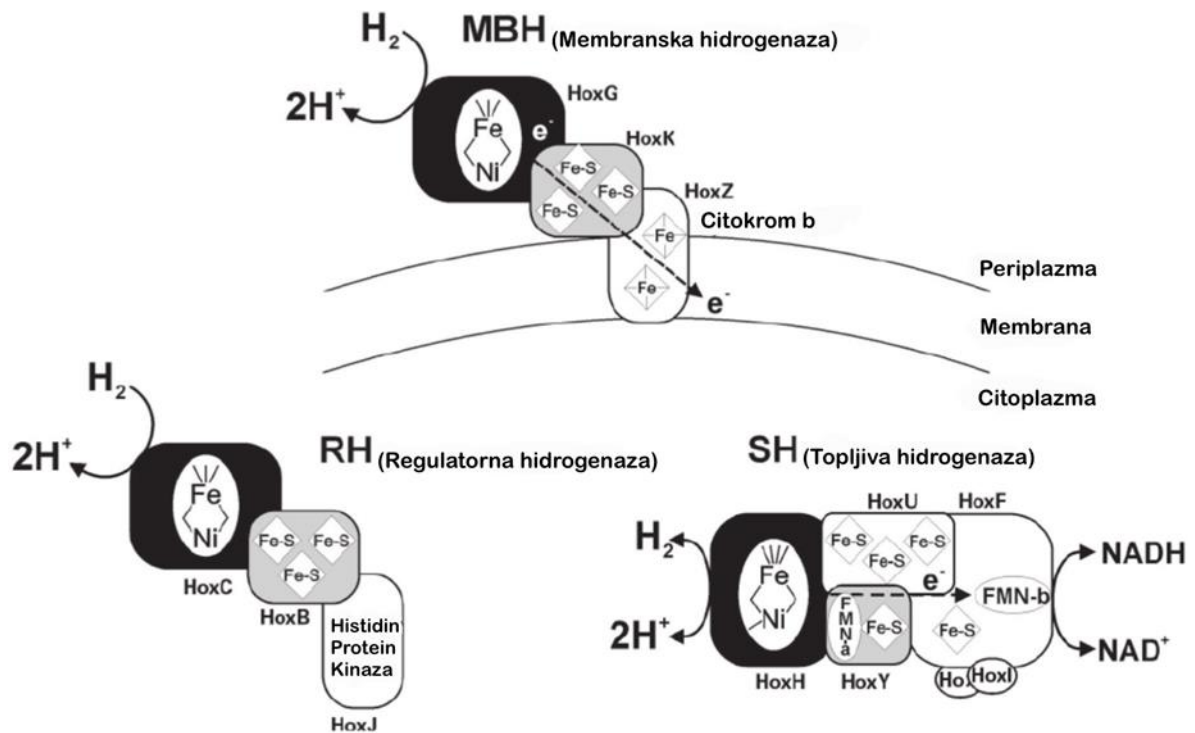
Metabolička svestranost ovog mikroorganizma dovela je do toga da se koristi u proizvodnji vodika te u sintezi bioplastike, poli-3-hidroksibutirata (Volodina i sur., 2015), ali i u proizvodnji drugih metabolita i proteina (Barnard i sur., 2005, Andersson i sur., 1994). Jedan od ključnih enzima u proizvodnji biovodika je hidrogenaza. U stanicama bakterije *R. eutropha* H16 prisutne su četiri različite [NiFe]-hidrogenazu tolerantne na kisik uključene u transport vodika što ovu bakteriju čini izvrsnim izvorom hidrogenaza.

2.3.1. Hidrogenaze iz *Ralstonia eutropha* H16

U *R. eutropha* H16 prisutne su četiri [NiFe]-hidrogenaze koje su se pokazale kao izvrsni biokatalizatori u proizvodnji vodika zbog čega se pojavio velik interes za njihovom proizvodnjom (Burgdorf i sur., 2005). Hidrogenaze prisutne u *R. eutropha* H16 dijele se na (prema Fan i sur., 2021):

- (i) hidrogenaza vezana za membranu (*engl.* membrane-bound hydrogenase, MBH),
- (ii) topljiva hidrogenaza (*engl.* soluble hydrogenase, SH)
- (iii) regulatorna hidrogenaza (*engl.* regulatory hydrogenase, RH) i
- (iv) hidrogenaza slična aktinobakterijama (*engl.* actinobacterial-like hydrogenase, AH).

Shematski prikaz struktura hidrogenaza iz *R. eutropha* H16 dan je na slici 1.



Slika 1. Hidrogenaze prisutne u *R. eutropha* H16 (prema Burgdorf i sur., 2005)

Budući da korištenje vodika uključuje prijelazne metale i elektrone niskog potencijala, većina hidrogenaza je vrlo osjetljiva na prisutnost kisika, koji ih deaktivira bilo reverzibilno ili ireverzibilno (Fontecilla-Camps i sur., 2007). Hidrogenaze koje se mogu pronaći u *R. eutropha* H16 pripadaju porodici [NiFe]-hidrogenaza koje su tolerantne na kisik što im daje prednost u odnosu na ostale hidrogenaze (Lauterbach i Lenz, 2013). Sposobnost hidrogenaza *R. eutropha* da nadvladaju inhibicijski učinak kisika je vrlo složen, jedinstven i još uvijek nedovoljno shvaćen metabolički proces. MBH omogućuje *R. eutropha* aerobni rast koristeći vodik kao izvor energije i kisik kao krajnji akceptor elektrona. Aktivno mjesto i klaster značajno se razlikuju od ostalih [NiFe]-hidrogenaza. SH je dvosmjerna citoplazmatska hidrogenaza i djeluje kao redoks ventil za sprječavanje prekomjerne redukcije lanca prijenosa elektrona. SH se sastoji od heterodimera s dvije podjedinice. Složene je strukture koja omogućuje najprije oksidaciju vodika, zatim sakupljanje elektronskog potencijala za redukciju NAD⁺ (nikotinamid adenin dinukleotid) do NADH, i na kraju redukciju NADP⁺ (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) do NADPH. ATP (adenozin trifosfat) generiran preko MBH, uz ekvivalente za redukciju NADPH generiranih kroz SH, zajedno podržavaju vrlo energetska vezanja ugljika. Nadalje, [NiFe] aktivno mjesto SH sadrži dva dodatna cijanovodična liganda koordinirana na niklu (Ni), a pokazalo se da uklanjanje takvih skupina rezultira pojavom osjetljivosti hidrogenaze na molekularni kisik (Lu i sur., 2016, Fritsch i sur., 2013). Jednostavna građa *R. eutropha* u usporedbi s drugim mikroorganizmima omogućila joj je da postane modelni sustav

za razvijanje procesa proizvodnje [NiFe]-hidrogenaza (Fan i sur., 2021). Osim toga, korištenje hidrogenaza u elektrokemijskim člancima umjesto plemenitih metala kao anoda, značajno smanjuje troškove, otvara nove mogućnosti za dizajn i razvoj novih procesa proizvodnje energije (Lu i sur., 2016). U svom radu Goldet i sur. (2008) istražili su mogućnost korištenja MBH iz *Ralstonia sp.* za proizvodnju vodika, ali su primijetili inhibiciju produktom. Međutim, spomenuti nedostatak se može prevladati adsorpcijom enzima na grafitnoj elektrodi, te kontinuiranom odvodnjom produkta.

2.4. PERMEABILIZACIJA STANICA

U biotehnološkim procesima kao biokatalizatori mogu se koristiti cijele stanice i pročišćeni enzimi. Pročišćeni enzimi najčešće se odlikuju višom volumnom produktivnosti u odnosu na cijele stanice, ali pročišćavanje je često vrlo zahtjevno, skupo i prilikom pročišćavanja može doći do smanjenja stabilnosti samog enzima (Goldberg i sur., 2007). S druge strane, izolirani enzimi nisu pogodni katalizatori za sve reakcije. Na primjer, ako je u reakciji potreban enzim koji je u stanici dio višekomponentnog enzimskog sustava vezan za membranu ili neodvojiv od stanice tada takve enzime neće biti moguće izolirati i koristiti kao katalizatore (Woodley, 2006). S druge strane, upotreba cijelih stanica ne zahtijeva procese izolacije i pročišćavanja, čime su takvi biokatalizatori jeftiniji, a stabilnost enzima ostaje očuvana. Glavni nedostatak korištenja cijelih stanica je vrlo spori transport u i iz stanice. Upravo je iz tog razloga bitan proces permeabilizacije stanica. Proces podrazumijeva oštećenje stanične membrane tako da je omogućena difuzija molekula malih molekulske mase, a da morfologija stanice ostane očuvana. Permeabilizacija može biti problematična s obzirom na činjenicu da svaka stanica zahtijeva različite uvjete kako bi se postigli optimalni rezultati. To osobito vrijedi za Gram-pozitivne bakterije koje imaju staničnu stjenku veće debljine (Furukawa i sur., 2006). Općenito metode permeabilizacije stanica mogu se podijeliti na fizikalne, kemijske i enzimatske metode.

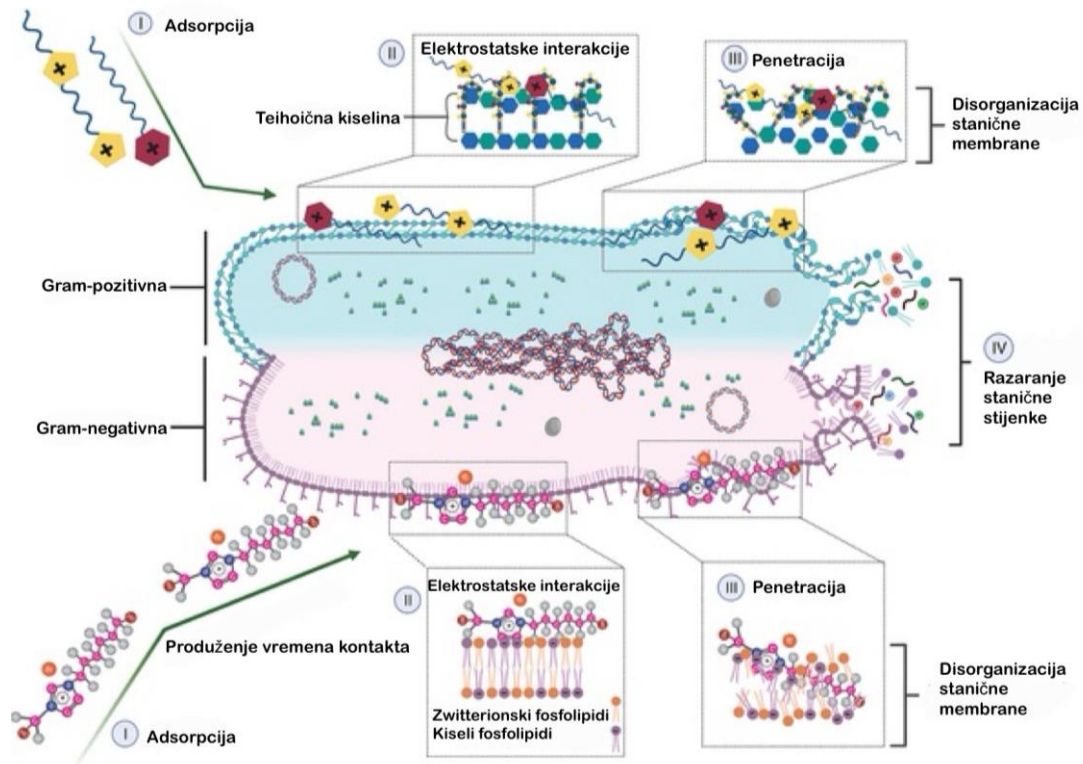
2.4.1. Fizikalne metode permeabilizacije stanica

Danas su dostupne brojne fizikalne metode permeabilizacije (Banfalvi, 2016). Jedna od njih je elektroporacija koja podrazumijeva primjenu kontroliranih električnih pulseva određenog intenziteta koji dovodi do indukcije transmembranskog potencijala i reverzibilnog raspada stanične membrane. Kao rezultat nastaju pore koje omogućuju prolazak makromolekula kroz staničnu membranu. Zbog dobrih karakteristika ove metode poput niske toksičnosti, dobre ponovljivosti i učinkovitosti, ona se široko upotrebljava u svrhu permeabilizacije stanica. Druga metoda je elektroinjektiranje tijekom kojeg se koristi staklena kapilara pričvršćena na mikropipetu kojom se injektiraju molekule u stanicu. Mana ove vrlo učinkovite metode je to što ovaj postupak zahtijeva stručno rukovanje, a primjenjiva je samo na određen broj stanica. Sljedeća metoda je mikroinjektiranje koja koristi dva mikromanipulatora, od kojih jedan drži

mikropipetu, a drugi mikropilaru. Ova metoda je isto tako primjenjiva na samo određene stanice, a zahtijeva skupe instrumente i visoku razinu stručnosti (Banflavi, 2016). Dekompresija se također može primijeniti za permeabilizaciju stanice. Prilikom dekompresije plin se uvodi pod tlakom u stanice što rezultira puknućem stijenke nakon otpuštanja hidrostatskog tlaka ekspanzijom (Liu i sur., 2016). Često korištena, a relativno jednostavna metoda je zamrzavanje-odmrzavanje. Prilikom korištenja te metode, dolazi do formiranja kristala leda unutar stanice koji su odgovorne za njeno mehaničko oštećenje. Osmotski šok ili termoliza također su učinkovite u permeabilizaciji stanica, a upotreba visokog osmotskog tlaka, odnosno topline, uzrokuje oštećenje na stijenci (Gauterio i sur., 2023).

2.4.2. Kemijske metode permeabilizacije stanica

Kemijske metode permeabilizacije stanica uključuju korištenje različitih kemikalija poput organskih otapala, ionskih tekućina, kiselina, lužina, eutektičkih otapala i detergenata (Gauterio i sur., 2023; Zhang i sur., 2020; Banfalvi, 2016). Odabir kemikalije značajno ovisi o vrsti stanica koje se permeabiliziraju. Najveći nedostatak primjene ove metode je to što je većina kemikalija, poput hlapljivih organskih spojeva (npr. dimetil sulfoksid, aceton), štetna i za ljude koji s njima rade i za okoliš. Upravo se zato sve više ulaže u istraživanja i razvoj održivih i učinkovitih sredstva za ekstrakciju, a veliki potencijal pokazuju ionske tekućine i eutektička otapala (Musaggy i sur., 2022). Primjer mogućih mehanizama oštećenja stanične stijenke bakterija upotrebom ionskim tekućina prikazan je na slici 2.



Slika 2. Mehanizam oštećenja stanične stijenke bakterija upotrebom ionskih tekućina (prema Nickfarjam i sur., 2021)

2.4.3. Enzimske metode permeabilizacije

Velika prednost upotrebe enzima u svrhu permeabilizacije je što se ovaj proces odvija u blagim uvjetima temperature i tlaka, njihova visoka selektivnost, ali i mogućnost integracije s ostalim fizikalnim ili kemijskim metodama (Gomes i sur., 2020). Glavni nedostatak široke primjene ove metode je cijena i dostupne količine enzima. Osim toga, potrebno je pažljivo kontrolirati uvjete kako bi se postigla optimalna aktivnost enzima. Enzimi koji se najčešće koriste u permeabilizaciji su enzimi poput proteaza, lipaza, glukonaza, glukozidaza, manaza i celulaza koji sinergistički djeluju u lizi stanice, ili neki endogeni enzimi ako se radi o autolizi (Gauterio i sur., 2023). U tablici 2 dan je prikaz nekih uspješno provedenih enzimskih metoda permeabilizacije.

Tablica 2. Primjeri uspješno provedenih enzimskih metoda permeabilizacije

Organizam	Korišteni enzimi	Dobiveni proizvod i opis	Referenca
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Proteaza i lipaza	β -glukan - procesom je dobiveno 18 % (w/w) β -glukana s čistoćom od 79,0 %	Borchani i sur., (2014)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Proteaze	Hidrolizati proteina - povećan sadržaj sirovih proteina (50 %), prinos proteina (83 %) i antioksidativna svojstva (63 %)	Marson i sur., (2019)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Glukanaza, manaza, hitinaza, proteaza	Lipidi - srednja sposobnost oporavka lipida u usporedbi s tretmanima kiselinom (93,4 %) i HTH (75,0 %) što je rezultiralo maksimalnim oporavkom lipida od 69,3 %	Kruger i sur., (2018)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Tijekom eksperimentalnog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- β -nikotin adenin dinukleotid, NAD⁺ (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- 3,5-dinitrosalicilna kiselina, DNS (Sigma-Aldrich, SAD)
- Amonijev klorid (Gram-Mol, Hrvatska)
- Bakrov sulfat pentahidrat (Gram-Mol, Hrvatska)
- Borna kiselina (Gram-Mol, Hrvatska)
- Cetrimonij bromid, CTAB (BDH Prolabo, Njemačka)
- Cinkov sulfat heptahidrat (Gram-Mol, Hrvatska)
- D-fruktoza (Lach Ner d.o.o., Češka)
- Etanol (Gram-Mol, Hrvatska)
- Etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (Kemika, Hrvatska)
- Fosfatna kiselina (Kemika, Hrvatska)
- Glicerol (Gram-Mol, Hrvatska)
- Goveđi serum albumin, BSA (Sigma-Aldrich, SAD)
- Kalcijev klorid dihidrat (Gram-Mol, Hrvatska)
- Kalijev dihidrogenfosfat (Gram-Mol, Hrvatska)
- Kalijev hidrogenfosfat (Gram-Mol, Hrvatska)
- Kalijev natrijev tartarat tetrahidrat (Sigma-Aldrich, SAD)
- Klorovodična kiselina (Fisher Chemical, Francuska)
- Kobaltov(II) klorid heksahidrat (BDH Prolabo, Njemačka)
- Kristal violet (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Lugolova otopina (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Magnezijev sulfat heptahidrat (Gram-mol, Hrvatska)
- Manganov(II) klorid tetrahidrat (BDH Prolabo, Njemačka)
- Mesni agar (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Natrij dodecil sulfat, SDS (BDH Prolabo, Njemačka)
- Natrijev dihidrogenfosfat monohidrat (BDH Prolabo, Njemačka)
- Natrijev hidrogenfosfat heptahidrat (BDH Prolabo, Njemačka)
- Natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat (BDH Prolabo, Njemačka)
- Natrijev hidroksid (CARLO ERBA Reagents, Italija)

- Natrijev molibdat dihidrat (BDH Prolabo, Njemačka)
- Niklov(II) klorid (Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Njemačka)
- Niklov(II) klorid heksahidrat (Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Njemačka)
- Pepton (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Polietilen glikol $M_r = 20\ 0000$ g/mol, PEG (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Safranin (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Toluena (Kemika, Hrvatska)
- Tris(hidroksimetil) aminometan (BDH Prolabo, Ujedinjeno kraljevstvo)
- Triton X-100 (Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Njemačka)
- Željezov(III) klorid heksahidrat (BDH Prolabo, Njemačka)

3.1.2. Oprema

Tijekom eksperimentalnog rada korištena je sljedeća oprema:

- Analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka)
- Autoklav (InkoLab, Hrvatska)
- Centrifuga (EBA 8, Hettich, Njemačka)
- Centrifuga (Megafuge ST1 Plus Centrifuge Series, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Homogenizator (MS2, Ika Works, Inc., SAD)
- Homogenizator (SONOPLUS HD 2200, Bandelin electronics, Njemačka)
- Kromatograf s FID detektorom (GC-2014, Shimadzu, Japan)
- Liofilizator (FreeZone 1, Labconco Co., Kansas City, SAD)
- Magnetska miješalica (SB 162-3, Stuart, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Mikroskop (Olympus BX50, Evident, Japan)
- pH metar (914, Metrohm, Švicarska)
- Plinski kromatograf s plamenim ionizacijskim (FID) detektorom (GC-2014, Shimadzu, Japan)
- Skenirajući elektronski mikroskop (Vega III Easyprobe, Tescan, Češka)
- Spektrofotometar (Libra S11, Biochrom, SAD)
- Termoblok (Dri-Block DB100/2, Techne, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Termostat (561-08/2, InkoLab, Hrvatska)
- Ultrazvučni homogenizator (SONOPLUS HD 2200, Bandelin electronics, Njemačka)
- Uljna-vodena kupelj s integriranom mješalicom (HBR 4 digital, IKA-Werke, Njemačka)
- Vodena kupelj s tresilicom (WNB 14, Memmert, Njemačka)

3.1.3. Laboratorijski pribor

Tijekom eksperimentalnog rada korišten je sljedeći laboratorijski pribor:

- automatske pipete
- Eppendorf epruvete od 1,5 mL i 2 mL
- Erlenmeyerove tikvice volumena 250 mL
- falkon epruvete od 15 mL i 50 mL
- filter (Chromafil Xtra RC-45/25, 0,45 μm , Mocherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka)
- filteri (Chromafil Xtra H-PTFE-20/25, 0,45 μm , Mocherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka)
- kvarcna kiveta volumena 1 mL
- menzure volumena 10 mL, 100 mL i 200 mL
- metalne špatulice za vaganje
- nastavci za automatske pipete
- odmjerne tikvice volumena 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL i 1000 mL
- plastične posudice za vaganje
- Schott-ove boce od 250 mL
- staklene čaše volumena 50 mL, 100 mL, 200 mL i 250 mL

3.1.4. Mikroorganizam

Tijekom eksperimentalnog rada korišten je sljedeći mikroorganizam:

- *Ralstonia eutropha* H16 (DSMZ, Njemačka)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema otopina

3.2.1.1. Priprema natrij/kalij fosfatnog pufera pH 7

Natrij/kalij fosfatni pufer pH 7 pripremljen je otapanjem 90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ i 15 g KH_2PO_4 u 1 L ultračiste vode. Željeni pH podešen je dodajući fosfatnu kiselinu.

3.2.1.2. Priprema 50 mmol/L kalij/kalij fosfatnog pufera pH 7 za ispiranje stanica

Kalij/kalij fosfatni pufer za ispiranje stanica pripremljen je otapanjem 21,1 mL 1 mol/L KH_2PO_4 i 28,9 mL 1 mol/L K_2HPO_4 u 1 L ultračiste vode. Željeni pH podešen je dodajući fosfatnu kiselinu.

3.2.1.3. Priprema 50 mmol/L Tris/HCl pufera pH 8

Tris/HCl pufer pH 8 pripremljen je otapanjem 6,06 g Tris-a u 800 mL destilirane vode i postepeno je dodana koncentrirana klorovodična kiselina sve dok se nije postigao željeni pH. Tikvica je potom dopunjena destiliranom vodom do volumena od 1 L.

3.2.1.4. Priprema 50 mmol/L natrij fosfatnog pufera pH 7

Natrij fosfatni pufer pripremljen je otapanjem 7,744 g natrijeva hidrogenfosfata heptahidrata i 2,913 g natrijeva dihidrogenfosfata monohidrata u 1 L destilirane vode. Željeni pH podešen je dodajući 1 mol/L NaOH.

3.2.1.5. Priprema otopine elemenata u tragovima (SL-6 otopina)

Otopina elemenata u tragovima pripremljena je otapanjem sljedećih kemikalija u 1 L ultračiste vode: 100 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 300 mg H_3BO_3 , 200 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 15 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 20 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 30 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

3.2.1.6. Priprema DNS reagensa

U odmjernoj tikvici volumena 200 mL postepenim otapanjem otopljeno je 4,36 g DNS u 160 mL otopine natrijeva hidroksida koncentracije 0,5 mol/L. Otapanje je provedeno uz konstantno miješanje u vodenoj kupelji na $T = 70^\circ\text{C}$. Nakon potpunog otapanja DNS, postepeno je dodano 60 g kalijeva natrijeva tartarata tetrahidrata uz konstanto miješanje. Nakon potpunog otapanja, dobiveni DNS reagens je ohlađen na sobnu temperaturu ($T = 25^\circ\text{C}$) te je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Reagens je čuvan u tamnoj boci.

3.2.1.7. Priprema Bradford reagensa

Bradford reagens za određivanje koncentracije proteina pripremljen je otapanjem 100 mg bojila Commassie Brilliant Blue G250 u mješavini 50 mL etanola i 100 mL fosforne kiseline te dopunjen ultračistom vodom do volumena od 1 L. Ovako pripremljena otopina čuvana je na 4°C , a prije upotrebe zagrijana je na sobnu temperaturu.

3.2.2. Uzgoj bakterije *Ralstonia eutropha* H16 na hranjivim medijima

Propagacija *R. eutropha* H16 provedena je na $T = 37^\circ\text{C}$ u termostatiranoj laboratorijskoj tresilici na tekućem mediju koji je sadržavao 5 g peptona i 3 g mesnog agara otopljenog u 1 L destilirane vode pH 7. U eksponencijalnoj fazi rasta, homogena tekuća podloga sa stanicama prenesena je u različite hranjive medije.

Osnovni medij za uzgoj stanica (Jugder i sur., 2016) pripremljen je miješanjem 100 mL natrij/kalij fosfatnog pufera pH 7 s 850 mL ultračiste vode. Pripremljena otopina je autoklavirana 15 min na 130°C . U otopinu su nakon toga dodane pojedinačno autoklavirane otopine: 10 mL 20 % (w/v) otopine NH_4Cl , 1 mL 20 % (w/v) otopine $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mL 1 %

(w/v) otopine $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mL 0,02 % (w/v) otopine NiCl_2 te 1 mL 0,5 % (w/v) otopine $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pripremljene u 0,1 mol/L HCl koja je prethodno sterilizirana filtracijom. Na kraju je u medij dodano 25 mL autoklavirane SL-6 otopine.

Za uzgoj bakterije *R. eutropha* H16 korištena su četiri medija koja su pripremljena miješanjem osnovnog medija i različitih koncentracija glicerola i fruktoze:

- (i) FN medij (*engl.* Fructose–Nitrogen) pripremljen dodavanjem 4 g/L fruktoze u osnovni medij (Eksperiment 1, Tikvice 1 i 2)
- (ii) FGN medij (*engl.* Fructose–Glycerol–Nitrogen) pripremljen dodavanjem 2 g/L fruktoze i 2 g/L glicerola u osnovni medij (Eksperiment 2, Tikvice 3 i 4)
- (iii) GN medij (*engl.* Glycerol–Nitrogen) pripremljen dodavanjem 4 g/L glicerola u osnovni medij (Eksperiment 3, Tikvice 5 i 6)
- (iv) GFN medij (*engl.* Glycerol–Fructose–Nitrogen) pripremljen dodavanjem 4 g/L glicerola i 0,5 g/L fruktoze u osnovni medij (Eksperiment 4, Tikvice 7 i 8)

Sterilne tikvice za uzgoj napunjene su s oko 80 % volumena sterilnog medija (2 paralele za svaki medij) i inokulirale stanicama (1,5 % v/v propagiranih stanica). Uzgoj je proveden na laboratorijskoj tresilici na 30 °C i 120 rpm brzine miješanja (slika 3). Tijekom uzgoja mjerena je pH vrijednost koja je održavana konstantnom između pH 6 i 7 dodavanjem po potrebi 0,1 mol/L NaOH ili 0,1 mol/L HCl.



Slika 3. Uzgoj *R. eutropha* H16 na laboratorijskoj tresilici

Uzorci smjese uzimani su sterilno u prethodno definiranim vremenskim intervalima te su u uzorcima određene koncentracije fruktoze, biomase, glicerola te pH. Kada su stanice ušle u stacionarnu fazu rasta uzgoj je prekinut, a stanice su sakupljene centrifugiranjem (4300 rpm,

4 °C, 20 min). Supernatant je uklonjen, a dobivene stanice su isprane s 50 mmol/L kalij/kalij fosfatnim puferom pH 7. Stanice su pohranjene na $T = -4$ °C do korištenja.

3.2.3. Permeabilizacija stanica *R. eutropha* H16

Permeabilizacija stanica *R. eutropha* H16 provedena je korištenjem 5 mmol/L EDTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (v/v) SDS, 2 % (v/v) CTAB, 20 % (w/v) PEG i 5 % (w/v) BSA (Rundbäck i sur., 2012). Pripremljena je suspenzija stanica *R. eutropha* H16 koncentracije 25 mg/mL u 50 mmol/L Tris/HCl puferu pH 8 u koji je dodan toluen u koncentraciji 2 % (v/v) te jedno od odabranih permeabilizirajućih sredstava. Smjesa je inkubira na $T = 25$ °C uz konstantno miješanje na magnetnoj miješalici 30 min na sobnoj temperaturi te još 30 min na $T = 4$ °C. Supernatant je od taloga odvojen centrifugiranjem na 14 000 rpm kroz 15 min. U dobivenom supernatantu je izmjerena aktivnost enzima te ukupna koncentracija proteina.

3.2.4. Ultrazvučno razbijanje stanice

Pripremljena je suspenzija stanica *R. eutropha* H16 koncentracije 25 mg/mL u 50 mmol/L Tris/HCl puferu pH 8. Razbijanje stanica provedeno je primjenom ultrazvučnog homogenizatora kroz 30 min primjenom amplitude snage 60 % uz konstantno hlađenje kako bi se smanjila mogućnost deaktivacije enzima. Nakon razbijanja, supernatant je odvojen centrifugiranjem na 14 000 rpm kroz 15 min. U dobivenom supernatantu je izmjerena aktivnost enzima te ukupna koncentracija proteina.

3.2.5. Bojenje stanica po Gramu

Nakon uzgoja, stanice su bojane po Gramu (Tripathri i Sapa, 2023). Za početak je pripremljen razmaz stanica na predmetnom stakalcu s minimalnom količinom kulture. Predmetno staklo je osušeno na zraku kako bi se kultura stanica fiksirala. Preko fiksirane kulture dodana je kristal ljubičasta boja. Nakon 60 sekundi boja je izlivena, a ostatak je ispran vodom pazeći da se ne isperu stanice. Potom je nanjena Lugolova otopina (otopina joda) u vremenu od 60 sekundi kako bi se kristal ljubičasta boja dodatno fiksirala. Otopina joda je izlivena, a predmetno staklo isprano s vodom. Višak vode s površine je uklonjen staničevinom. Na predmetno stakalce je dodano nekoliko kapi otopine etanola i acetona kako bi se višak bolje uklonio. Predmetno staklo isprano je s vodom 5 sekundi. Stanice su potom kontrastno obojene safraninom 60 sekundi. Otopina safranina isprana je vodom, a višak vode je uklonjen staničevinom. Tako pripremljeni uzorci promatrani su pod svjetlosnim mikroskopom na povećanju od 1000 puta.

3.2.6. Morfološka analiza uzoraka

Kako bi se analizirala morfologija stanica korišten je skenirajući elektronski mikroskop (SEM). Dobiveni uzorci stanica prvo su ohlađeni u zamrzivaču pri temperaturi $T = -69$ °C, a zatim su

stavljani u liofilizator, gdje su sušeni u trajanju od 72 sata pri temperaturi $T = -45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ustaljeni tlak na kraju liofilizacije iznosio je 0,04 mbar. Prije snimanja uzoraka na SEM-u, uzorci su uronjeni u argon plazmu sa zlatnim/platinskim konduktivnim premazom u vremenu od 90 sekundi (eksperiment 3) i 150 sekundi (eksperiment 1, 2 i 4). Uzorci su analizirani na povećanjima 333x, 1350x, 2670x i 6670x. Uz SEM korišten je sekundarni detektor elektrona (SE) uz napon od 10 kV.

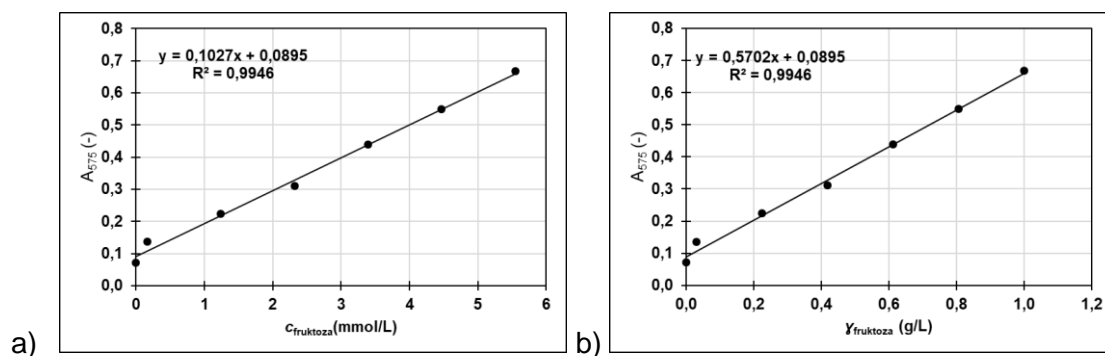
3.2.7. Analitičke metode

3.2.7.1. Mjerenje optičke gustoće i određivanje koncentracije biomase

Tijekom uzgoja stanica praćena je optička gustoća mjerenjem apsorbancije koristeći spektrofotometar (Libra S11, Biochrom, SAD) na valnim duljinama od $\lambda = 436\text{ nm}$ i $\lambda = 600\text{ nm}$. Koncentracija biomase određena je gravimetrijski na kraju uzgoja te je korelirana s izmjerenim optičkim gustoćama. Kako bi se odredila koncentracija biomase, korištene su odgovarajuće jednadžbe pravca za svaki eksperiment. Za eksperiment 1: $\gamma = 8 \cdot \text{OD}_{436(\text{ili } 600)}$, za eksperiment 2: $\gamma = 7,8049 \cdot \text{OD}_{436(\text{ili } 600)}$, za eksperiment 3: $\gamma = 6,266 \cdot \text{OD}_{436(\text{ili } 600)}$ i za eksperiment 4: $\gamma = 4,386 \cdot \text{OD}_{436(\text{ili } 600)}$.

3.2.7.2. Mjerenje koncentracije fruktoze

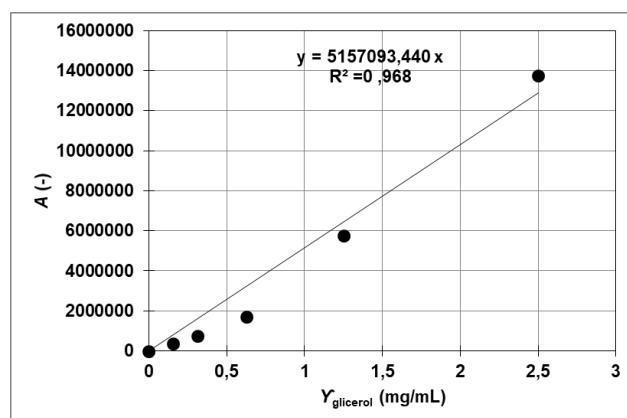
Koncentracija fruktoze određena je prema izrađenom baždarnom pravcu. Za pripremu baždarnog pravca pripremljena je standardna otopina fruktoze koncentracije $c = 5,550\text{ mmol/L}$ koja je razrijeđena u Eppendorf epruvetama na šest otopina koncentracija u rasponu 0,173 – 5,550 mmol/L. U epruvetu je dodano 1,5 mL DNS reagensa, 0,5 mL otopine fruktoze i 0,5 mL destilirane vode. Smjesa je zagrijavana 15 minuta u vodenoj kupelji na $T = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ te je zatim ohlađena u hladnoj vodenoj kupelji na sobnu temperaturu ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) kroz 15 minuta. Nakon što je uzorak ohlađen, izmjerena mu je apsorbancija na valnoj duljini $\lambda = 575\text{ nm}$. Baždarni dijagrami predstavljaju ovisnost apsorbancije o poznatoj koncentraciji fruktoze, a dobiveni dijagrami s pripadajućim jednadžbama pravca prikazani su na slici 4:



Slika 4. Baždarni dijagrami za određivanje a) molarne i b) masene koncentracije fruktoze

3.2.7.3. Mjerenje koncentracije glicerola

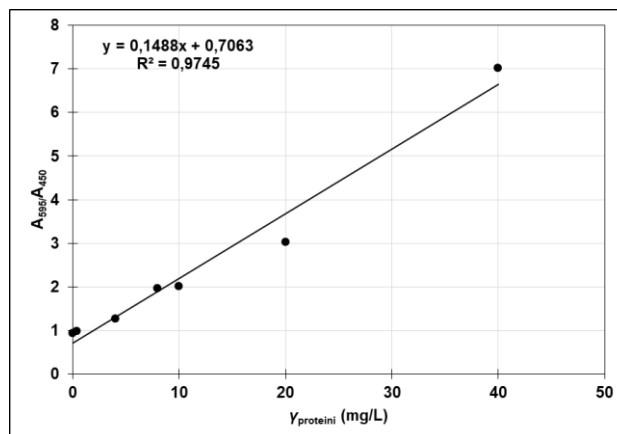
Koncentracija glicerola određena je na plinskom kromatografu. U radu je korišten plinski kromatograf Shimadzu GC-2014 s FID detektorom i kapilarna kolona Zebron ZB Wax ($L = 30$ m, I.D. = 0,53 mm, $d = 1,00$ μm). Kao plin nosač korišten je dušik. Uzorak podloge je prije analize razrijeđen 100 puta s etanolom i profiltriran filtrom Chromafil Extra RC-45/25 promjera pora 0,45 μm . Nepoznata koncentracija glicerola izračunata je iz kromatograma pomoću prethodno napravljenog baždarnog dijagrama. Za izradu baždarnog dijagrama pripremljene su otopine glicerola u etanolu sljedećih koncentracija: 0, 0,3, 0,6, 0,75, 1,0, 1,5, 2,5 i 3,0 mg/mL. Dobiveni dijagram s pripadajućom jednačinom pravca prikazan je na slici 5:



Slika 5. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glicerola

3.2.7.4. Mjerenje koncentracije proteina

Koncentracija proteina mjerena je metodom po Bradfordu koja se temelji na vezanju boje Coomassie Blue G250 na proteine. Temelji se na pomaku maksimuma apsorbancije boje Coomassie Brilliant BlueG-250 s 465 na 595 nm nakon vezanja na denaturirane proteine u otopini (Kielkopf i sur., 2020). U plastičnu kivetu dodano je 500 μL uzorka i 500 μL Bradford reagensa te je otopina homogenizirana. Nakon točno 5 min spektrofotometrijski se izmjeri apsorbancija pri $\lambda = 595$ nm i $\lambda = 450$ nm. Koncentracija proteina u uzorku dobiva se iz baždarnog dijagrama koji je izrađen korištenjem otopine BSA u rasponu koncentracija od 0 do 40 mg/L. Dobiveni dijagram s pripadajućom jednačinom pravca prikazan je na slici 6.



Slika 6. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina

3.2.7.5. Mjerenje aktivnosti enzima glicerol dehidrogenaza (GDH) u permeabiliziranim stanicama

Aktivnost enzima GDH određena je spektrofotometrijskim testom koji se temelji na reakciji oksidacije glicerola u dihidroksiaceton provedenoj u 50 mmol/L natrij fosfatnom puferu pH 7. Metoda se temelji na slijedećoj jednadžbi kemijske reakcije (jednadžba 1):



Spektrofotometrijski je mjerena promjena apsorbancije nastalog NADH pri valnoj duljini $\lambda = 340 \text{ nm}$ u vremenu od 60 sekundi jer reducirani nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) apsorbira maksimalnu količinu svjetla te valne duljine, dok njegov oksidirani oblik (NAD^+) u valnom području 300 – 400 nm ne apsorbira svjetlo. Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti GDH sastojala se od 700 μL 50 mmol/L natrij fosfatnog pufera, 100 μL otopine glicerola (100 mmol/L), 100 μL NAD^+ (4 mmol/L) te 100 μL uzorka koji sadržava enzim pomiješanih u kiveti volumena 1 mL. Slijepa proba pripremljena je miješanjem istih otopina osim otopine enzima umjesto koje je dodatno dodatnih 100 μL pufera. Enzimska aktivnost izračunala se na temelju jednadžbe 2:

$$V \cdot A = \frac{(\Delta A_{340}(\text{uzorak}) - \Delta A_{340}(\text{slijepa proba})) \cdot V_u \cdot f}{\epsilon_{340} \cdot V_E \cdot d} \quad \left[\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right] \quad (2)$$

gdje su: f – faktor razrjeđenja, V_E – volumen enzima (mL), V_u – ukupni volumen (mL), ϵ_{340} – ekstincijski koeficijent ($\text{cm}^2/\mu\text{m}$) koji za β -NADPH iznosi $6,22 \text{ cm}^2/\mu\text{m}$ na $\lambda = 340 \text{ nm}$, d – promjer kivete (cm).

Volumna aktivnost je izražena u međunarodnoj jedinici enzimске aktivnosti U po jedinici volumena pri čemu je 1 U količina supstrata u μmol koja se potroši u 60 sekundi. Aktivnosti

enzima u pripremljenim permeabilizatima stanica izražene su kao postotak aktivnosti u usporedbi s aktivnosti izmjerenoj nakon ultrazvučnog razbijanja stanica.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju analiziran je utjecaj četiri različita hranjiva medija na rast bakterije *R. eutropha* H16 s ciljem definiranja optimalnog sastava hranjivog medija. Nadalje analiziran je utjecaj različitih sredstva (EDTA, Triton X-100, SDS, CTAB, PEG i BSA) za povećanje propusnosti kako bi se poboljšala ekstrakcija enzima iz stanica *R. eutropha* H16. Analiziran je utjecaj spomenutih sredstva na temelju njihove učinkovitosti u povećanju propusnosti stanične membrane.

4.1. UZGOJ BAKTERIJE *RALSTONIA EUTROPHA* H16 NA RAZLIČITIM HRANJIVIM PODLOGAMA

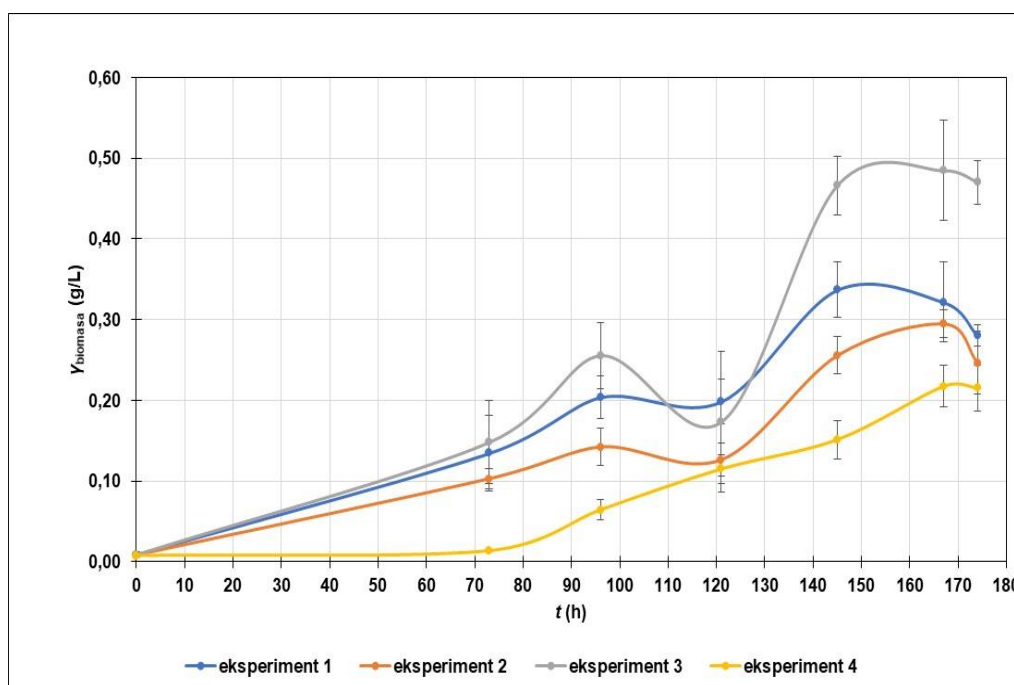
U prvom dijelu istraživanja proveden je uzgoj bakterijske kulture *R. eutropha* H16 na četiri različita medija (u dvije paralele) na laboratorijskoj tresilici na $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Osnovni cilj ovog dijela istraživanja bio je pronaći sastav podloge na kojem će stanice najbolje rasti. Testirane podloge su se razlikovale po početnoj koncentraciji fruktoze, odnosno glicerola. Rast stanica je praćen kroz 174 h. Na slici 7 prikazana je usporedba tikvica prije i nakon završetka uzgoja. Vidljiva su značajna zamućenja u prvih 6 tikvica, odnosno u prva tri eksperimenta, dok je zamućenje u četvrtom eksperimentu značajno manje.



Slika 7. Usporedba tikvica a) na početku i b) na kraju uzgoja

Vodeći se pretpostavkom da je intenzitet zamućenja u korelaciji s koncentracijom stanica koje su narasle, promjena koncentracije biomase tijekom uzgoja izračunala se na temelju izmjerenih optičkih gustoća. Mjerenja optičke gustoće provedena su otprilike svakih 24 sata.

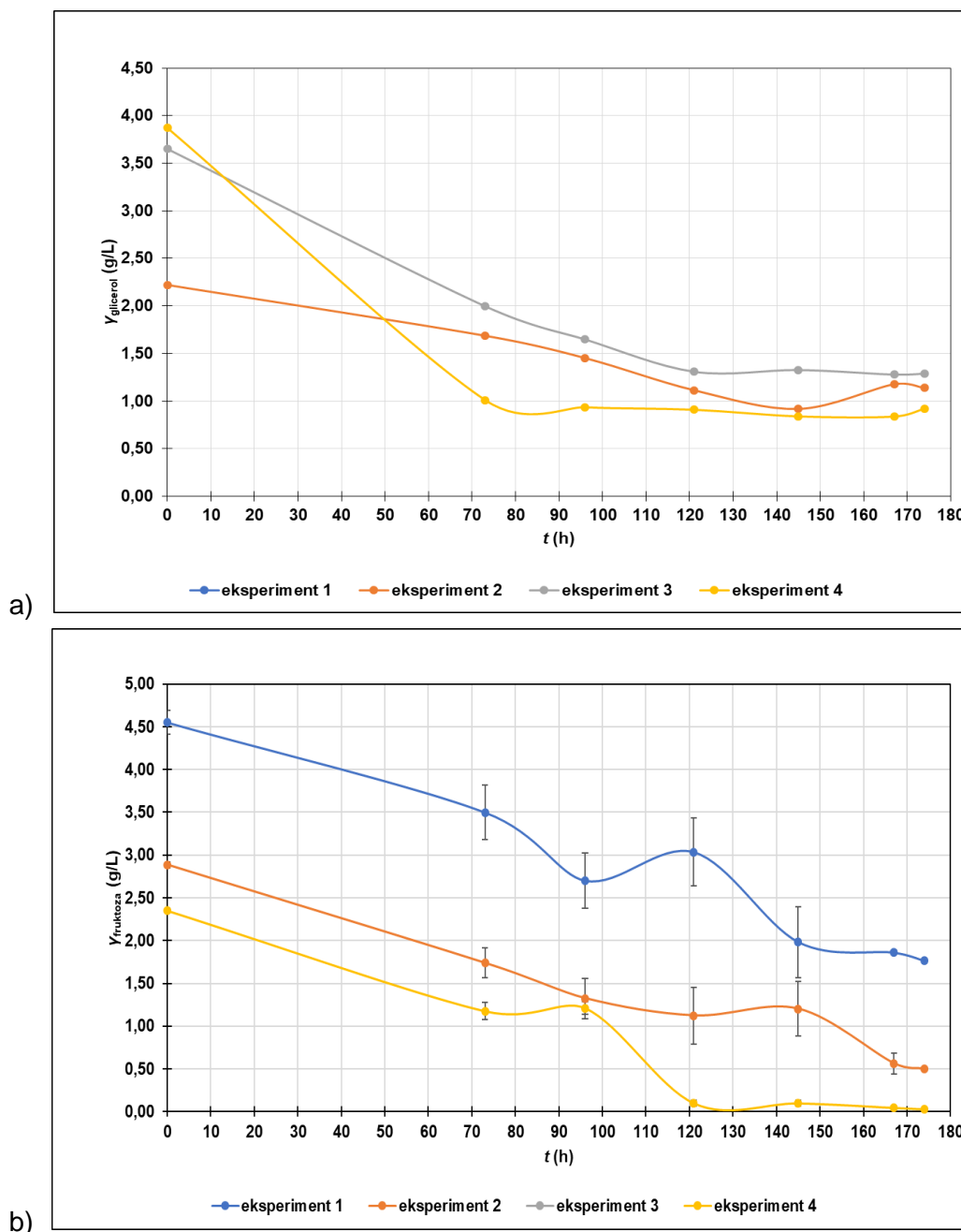
Na slici 8 vidljiva je promjena koncentracije biomase o vremenu eksperimenta. Eksperiment 3 u koji je dodana otopina glicerola ($\gamma = 4$ g/L) pokazao je najveći prinos koncentracije biomase od $0,470 \pm 0,134$ g/L. Nešto manja koncentracija biomase od $0,280 \pm 0,051$ g/L dobivena je u eksperimentu 1 u kojeg je dodana otopina fruktoze (4 g/L), te u eksperimentu 2 (koncentracija biomase $0,246 \pm 0,039$ g/L) koji je sadržao 2 g/L otopine fruktoze te 2 g/L otopine glicerola. Najmanja koncentracija od $0,215 \pm 0,029$ g/L postignuta je u eksperimentu 4 koji je sadržavao 0,5 g/L fruktoze i 4 g/L glicerola. U prethodnim rezultatima koje su opisali Poladyan i sur. (2018) najveća koncentracija biomase postignuta je kad je u podlogu dodana kombinacija otopina fruktoze i glicerola, a u podlozi koja je sadržavala samo glicerol koncentracija biomase bila je neznatna. Činjenica da se rezultati razlikuju upućuje na to da rast ovisi o soju mikroorganizma te na važnost optimiranja sastava hranjive podloge kod svakog uzgoja.



Slika 8. Promjena koncentracije biomase tijekom uzgoja bakterije *R. eutropha* H16 u četiri nezavisna eksperimenta

Na slici 9 prikazana je ovisnost koncentracije fruktoze i glicerola o trajanju uzgoja. Ona se može povezati s rastom biomase. U eksperimentu 1 najintenzivniji rast biomase vidljiv je između 96. i 145. sata uzgoja, kad je se može uočiti i najveća potrošnja fruktoze. U

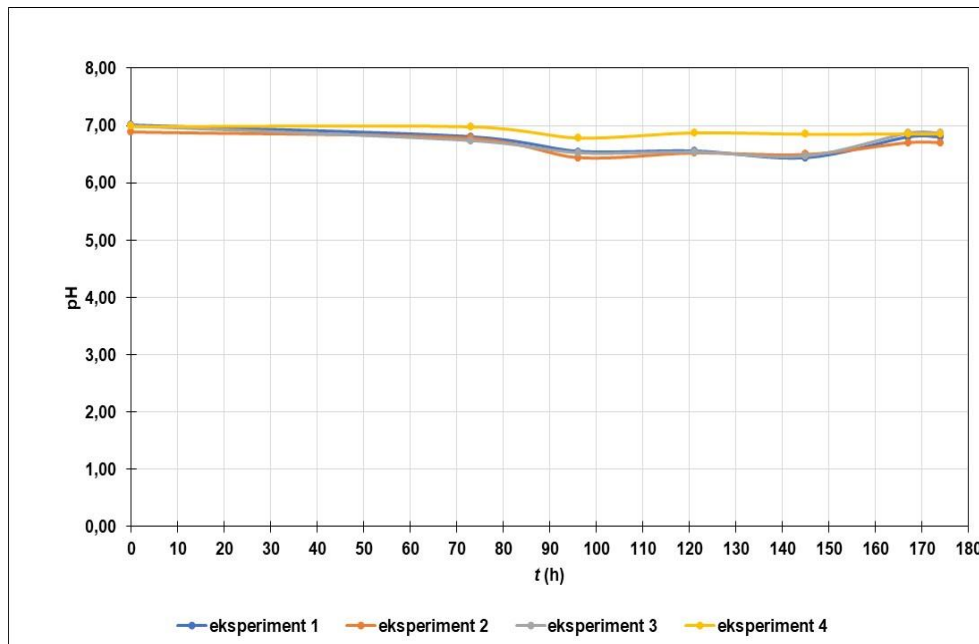
eksperimentu 2 rast je do 121. sata bio nešto sporiji, a poslije brži isto kao i potrošnja fruktoze i glicerola. U eksperimentu 3 glicerol se počeo brže trošiti nakon 73. sata kad je i uočen prvi brži rast biomase. U eksperimentu 4 fruktoza se trošila do 73. sata, nakon čega promjena njene koncentracije nije više značajna, a tad se počeo trošiti glicerol i vidljiv je porast koncentracije biomase.



Slika 9. Promjena a) koncentracije fruktoze i b) koncentracije glicerola tijekom uzgoja bakterije *R. eutropha* H16 u četiri nezavisna eksperimenta

Osim toga praćena je promjena pH vrijednosti, a rezultati su vidljivi na slici 10. Najveći pad od 0,2 jedinice može se uočiti u eksperimentu 1 i 2. U eksperimentu 3 uočen je pad od

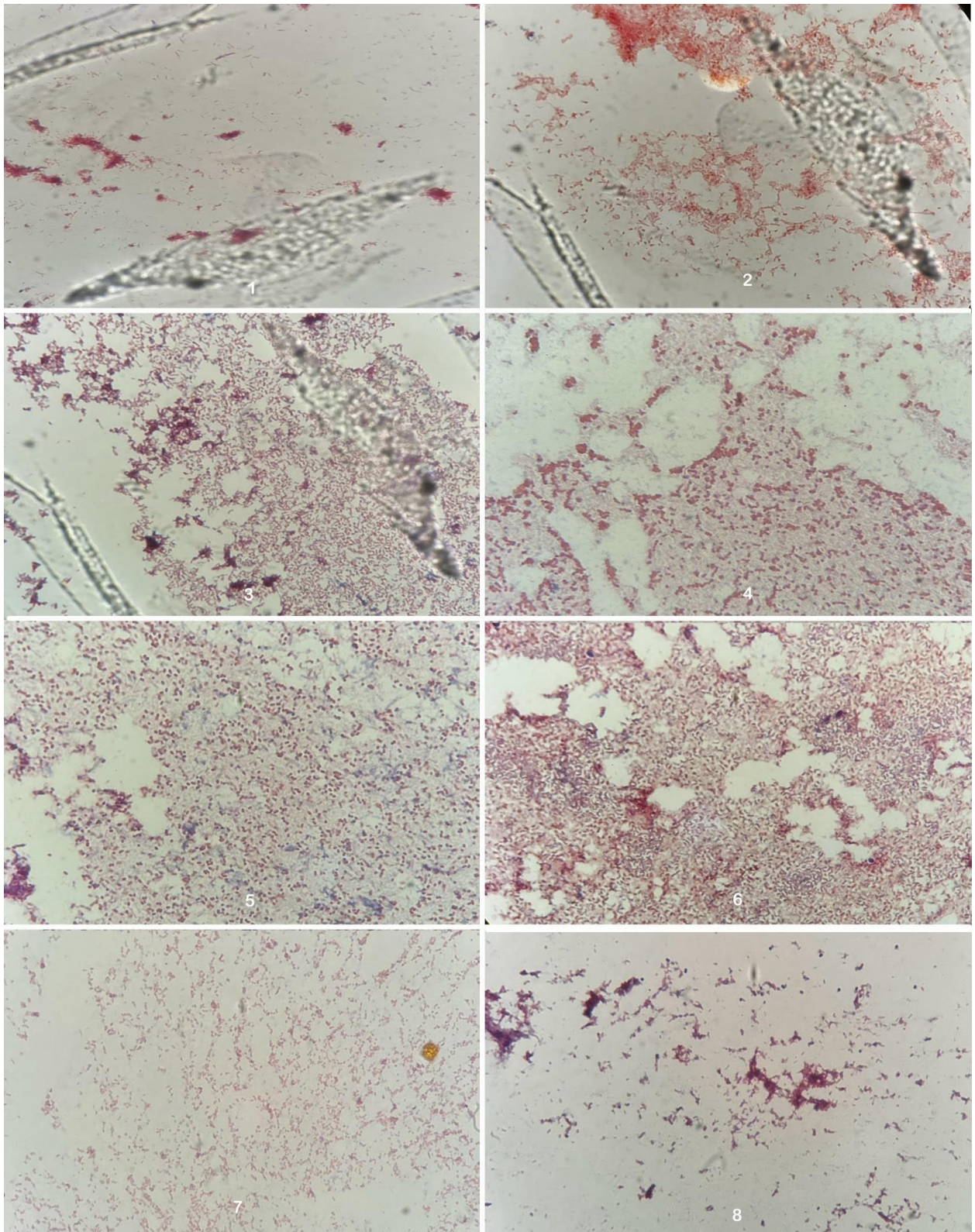
0,12, a sva tri eksperimenta pokazala su najveći pad nakon 73. sata uzgoja dok je nakon 145. sata pH vrijednost porasla. Eksperiment 4 pokazao je isto pad od 0,12 jedinica kao eksperiment 3, no kod njega nije uočljiv tako nagli pad vrijednosti nakon 73. sata i rast nakon 145. sata kao kod ostalih eksperimenata. Rezultati su u skladu s rezultatima Iskandaryan i sur. (2023) koji su pokazali da tijekom uzgoja nema značajne promjene pH vrijednosti.



Slika 10. Promjena pH tijekom uzgoja bakterije *R. eutropha* H16 u četiri nezavisna eksperimenta

4.2. MIKROSKOPIRANJE OBOJENIH STANICA NAKON UZGOJA

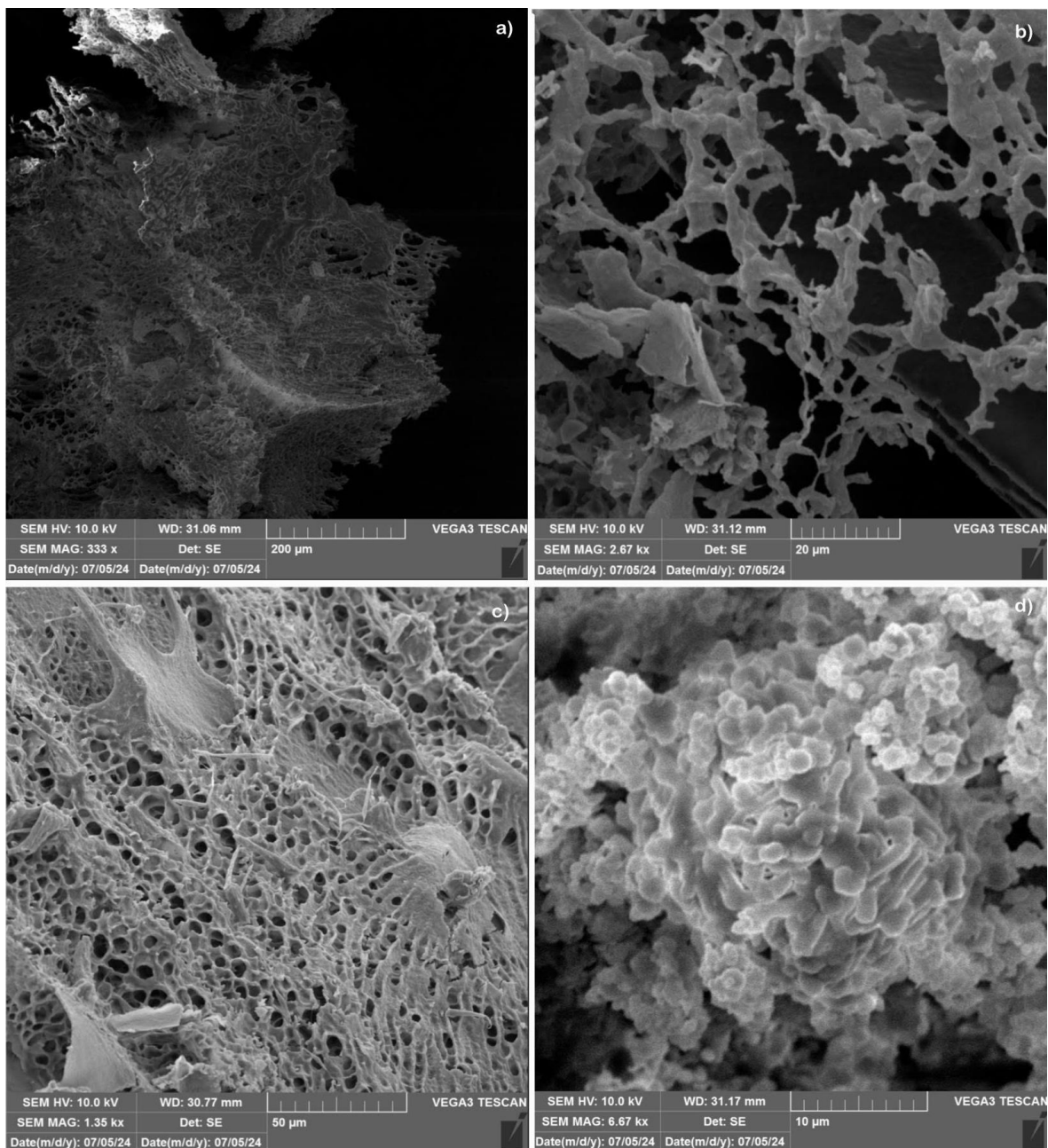
Nakon uspješno provedenog uzgoja uzeti su uzorci iz svake tikvice i stanice su obojene po Gramu te potom mikroskopirane na povećanju 1000x. Na ovaj način napravljena je jednostavna identifikacija stanica te uvid u oblik i sastav stanične stijenke. Vidljivo je da su svi uzorci obojeni crveno što nam govori da se radi o Gram-negativnim bakterijama štapićastog oblika što je u skladu s literaturom (Bowien i Kusian, 2002) te da se stanice ne razlikuju s obzirom o tome u kakvoj su podlozi rastle, odnosno jesu li kao supstrat koristile fruktozu, glicerol ili oboje. Osim toga uočeno je da su bakterije grupirane te da vjerojatno tvore biofilm.



Slika 11. Mikroskopske slike stanica nakon bojenja po Gramu za pojedini eksperiment (1-8) na povećanju 1000x

4.3. MORFOLOŠKA ANALIZA UZORAKA

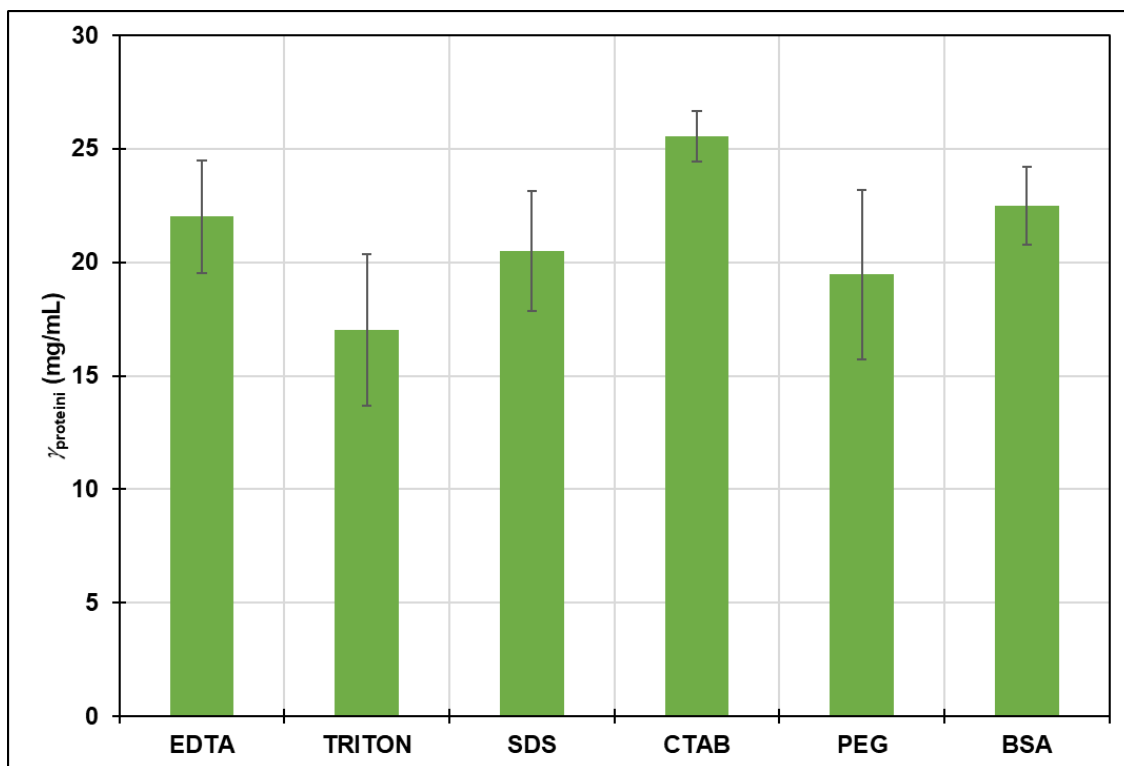
Kako bi se bolje proučila morfološka struktura uzgojenih stanica, provedena je analiza bakterijskih stanica *R. eutropha* H16 skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Na slici 12 prikazani su mikrofotogrami pri različitim povećanjima. Na manjim povećanjima (a, b, c) vidljivo je da u analiziranom uzorku formiran bakterijski biofilm vjerojatno zbog sporog miješanja tijekom uzgoja. Pri većim povećanjima (d) vidljiva je morfologija pojedinačnih bakterijskih stanica.



Slika 12. Fotografije uzoraka iz eksperimenta 3 na skenirajućem elektronskom mikroskopu na različitim povećanjima a) 333x, b) 2670x, c) 1350x, d) 6670x

4.4. PERMEABILIZACIJA STANICA

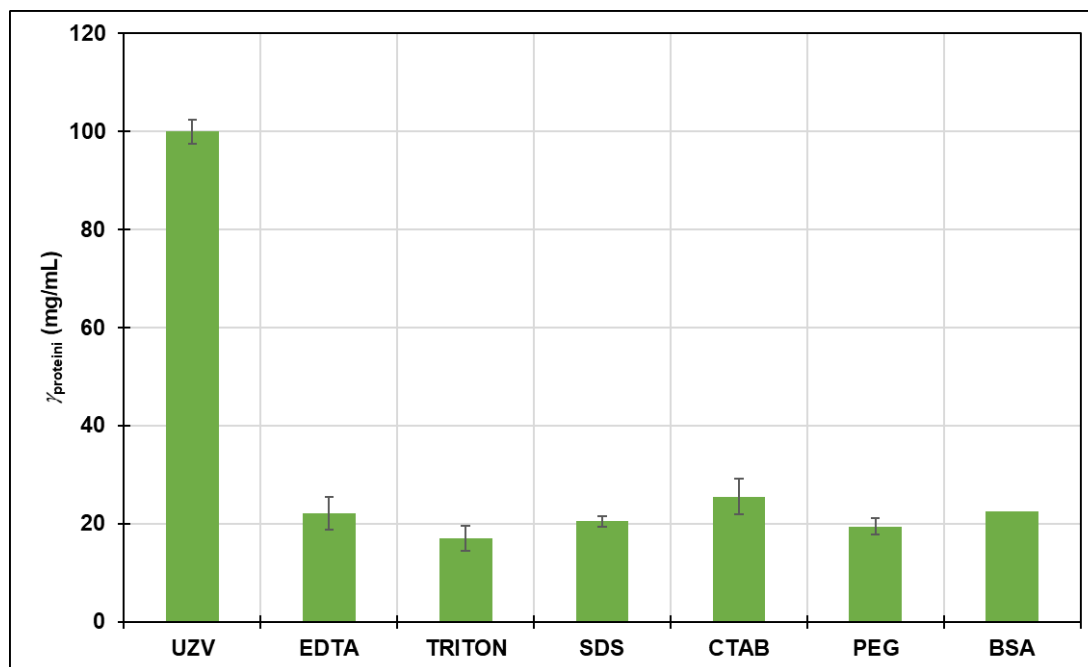
Stanice su nakon uzgoja permeabilizirane različitim sredstvima u svrhu oslobađanja što veće koncentracije unutarstaničnih proteina. Na temelju prikaza na slici 13 vidljivo je da je najveća koncentracija proteina oslobođena koristeći CTAB ($25,536 \pm 1,102$ mg/mL), zatim koristeći BSA ($22,485 \pm 1,705$ mg/mL), EDTA ($22,015 \pm 2,483$ mg/mL), SDS ($20,509 \pm 2,632$ mg/mL), PEG ($19,459 \pm 3,718$ mg/mL), a najmanja koncentracija od $16,999 \pm 3,338$ mg/mL koristeći Triton X-100.



Slika 13. Koncentracija proteina u uzorcima nakon permeabilizacije stanica

Uspoređujući ove rezultate s aktivnosti enzima na slici 14, uočeno je da viša aktivnost nije nužno povezana s koncentracijom oslobođenih enzima. Upravo je u uzorku koji je permeabiliziran s Triton X-100, čije je korištenje rezultiralo najmanjom dobivenom koncentracijom enzima, izmjerena najveća aktivnost (28,6 % u odnosu na aktivnost enzima nakon razbijanja stanica ultrazvukom), zatim BSA (19,3 %), CTAB (18,6 %), EDTA (18,3 %), SDS (14,9 %), a najmanju aktivnost enzima od 14 % pokazao je PEG. Ovakve rezultate moguće je objasniti činjenicom da svaka tvar različito razgrađuje staničnu stijenku što rezultira otpuštanjem većih ili manjih koncentracija proteina. Kaur i Satyanarayana (2010) navode da permeabilizacija stanica s Triton X-100 omogućuje oslobađanje enzima povezanih s površinskim strukturama, dok El-Beyrouthy i sur. (2022) tvrde da CTAB i SDS otkidaju lipide s egzoplazmatskog sloja prije nego što krenu u unutarnji sloj i formiraju pore što bi objasnilo

pojavu veće aktivnosti kod Tritona X-100. Ionski detergentski (PEG, CTAB) uključuju interakcije s nabijenim ostacima na površini proteina i hidrofobne interakcije alkilnih lanaca s nepolarnim amino ostacima. Moguće je da se ovo početno vezanje događa bez značajnih promjena u tercijarnoj strukturi proteina, ali povećanje koncentracije deterdženta dovodi do poboljšanog vezanja (Presečki i Vasić-Rasić, 2005), dok EDTA ulazi u interakciju s dvovalentnim kationima koji doprinose stabilnosti membrane (Alacom i sur., 2006).



Slika 14. Udio aktivnosti enzima oslobođenih permeabilizacijom u odnosu na aktivnost enzima nakon razbijanja stanica ultrazvukom

5. ZAKLJUČCI

1. Bakterijska kultura *R. eutropha* H16 može se uspješno uzgojiti na mediju s fruktozom, glicerolom i dušikom u različitim koncentracijama pri čemu je najveći prinos koncentracije biomase od $0,470 \pm 0,134$ g/L uočen u eksperimentu 3 koji je sadržavao 4 g/L otopine glicerola.
2. Tijekom uzgoja nema značajnih promjena pH vrijednosti ovisno o tome koji se medij koristi za uzgoj.
3. Bojanjem po Gramu stanica *R. eutropha* H16 uočeno je da se one ne razlikuju s obzirom na to koji je medij korišten za uzgoj.
4. Morfološkom analizom na manjim povećanjima uočeno je formiranje bakterijskog biofilma, a na većim pojedinačne bakterijske stanice u obliku štapića.
5. Stanice *R. eutropha* H16 mogu se uspješno permeabilizirati koristeći CTAB, BSA, EDTA, SDS, PEG i Triton X-100 pri čemu je najveća koncentracija proteina od $25,536 \pm 1,102$ mg/mL oslobođena koristeći CTAB, a najmanja koncentracija od $16,999 \pm 3,338$ mg/mL koristeći Triton X-100.
6. Iako je primjena Triton X-100 rezultirala najmanjom koncentracijom oslobođenih enzima, njegova permeabilizacija stanica pokazala je najveću enzimsku aktivnost zbog specifičnog načina interakcije s površinskim strukturama stanica.

6. POPIS LITERATURE

Ajanovic A, Sayer M, Haas R (2022) The economics and the environmental benignity of different colors of hydrogen. *Int J Hydrogen Energy* **47**, 24136-24154. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.02.094>.

Alakomi HL, Paananen A, Suihko ML, Helander IM, Saarela M (2006) Weakening effect of cell permeabilizers on gram-negative bacteria causing biodeterioration. *Appl Environ Microbiol* **72**, 4695-4703. <https://doi.org/10.1128/AEM.00142-06>

Andersson L, Strandberg L, Haggstrom L, Enfors SO (1994) Modeling of high cell density fed batch cultivation. *FEMS Microbiol Rev* **14**, 39–44. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00070.x>.

Banfalvi, G. (2016) Permeability of Biological Membranes, Springer International Publishing ,Berlin, str. 129–200.

Barnard GC, Mccool JD, Wood DW, Gerngross TU (2005) Integrated recombinant protein expression and purification platform based on *Ralstonia eutropha*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 5735–5742. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.10.5735>.

Borchani C, Fonteyn F, Jamin G, Paquot M, Blecker C, Thonart P (2014) Enzymatic process for the fractionation of baker's yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisiae*). *Food Chem* **163**, 108-113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.086>

Bowien B, Kusian B (2002) Genetics and control of CO₂ assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*. *Arch Microbiol* **178**, 85–93. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0441-3>

Burgdorf T, Lenz O, Buhrke T, van der Linden E, Jones AK, Albracht SP, Friedrich B (2005) [NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: Modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation. *J Mol Microbiol Biotechnol* **10**, 181-196. <https://doi.org/10.1159/000091564>

Cramm R (2009) Genomic view of energy metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *J Mol Microbiol Biotechnol* **16**, 38–52. <http://dx.doi.org/10.1159/000142893>.

Di Paola L, Russo V, Piemonte V (2015) Membrane Reactors for Energy Applications and Basic Chemical Production, Woodhead Publishing, Sawston, 267-286. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-223-5.00009-1>

- El-Beyrouthy J, Makhoul-Mansour MM, Freeman EC (2022) Studying the Mechanics of Membrane Permeabilization through Mechanoelectricity. *ACS Appl Mater Interfaces* **14**, 6120-6130. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c19880>
- Fan Q, Caserta G, Lorent C, Lenz O, Neubauer P, Gimpel M (2021) Optimization of Culture Conditions for Oxygen-Tolerant Regulatory [NiFe]-Hydrogenase Production from *Ralstonia eutropha* H16 in *Escherichia coli*. *Microorganisms* **9**, 1195. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061195>
- Fontecilla-Camps JC, Volbeda A, Cavazza C, Nicolet Y (2007) Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases. *Chem Rev* **107**, 4273-4303. <https://doi.org/10.1021/cr050195z>
- Fritsch J, Lenz O, Friedrich B (2013) Structure, function and biosynthesis of O₂-tolerant hydrogenases. *Nat Rev Microbiol* **11**, 106–114. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2940>
- Furukawa K, Hoshino T, Tsuneda S, Inamori Y (2006) Comprehensive analysis of cell wall-permeabilizing conditions for highly sensitive fluorescence in situ hybridization. *Microbes Environ* **21**, 227-234. <http://www.soc.nii.ac.jp/jsme2/>
- Gautério GV, da Silva RM, Karraz FC, Zarur Coelho MA, Dias Ribeiro B, Lemes AC (2023) Cell disruption and permeabilization methods for obtaining yeast bioproducts. *Clean Chem Eng* **6**, 2772-7823. <https://doi.org/10.1016/j.clce.2023.100112>
- Goldet G, Wait AF, Cracknell JA, Vincent KA, Ludwig M, Lenz O, Friedrich B, Armstrong FA. (2008) Hydrogen production under aerobic conditions by membrane-bound hydrogenases from *Ralstonia* species. *J Am Chem Soc* **130**, 11106-11113. <https://doi.org/10.1021/ja8027668>
- Gomes TA, Zanette CM, Spier MR (2020) An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery. *Prep Biochem Biotechnol* **50**, 635-654. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1728696>
- Hermesmann M, Müller TE (2022) Green, turquoise, blue, or grey? Environmentally friendly hydrogen production in transforming energy systems, progress in energy and combustion. *Science* **90**, <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2022.100996>
- Iskandaryan M, Bbulyan S, Sahakyan M, Vassilian A, Trchounian K, Poladyan A (2023) L-amino acids affect the hydrogenase activity and growth of *Ralstonia eutropha* H16. *AMB Expr* **13**, 33. <https://doi.org/10.1186/s13568-023-01535-w>

- Judger E, Lebhar H, Aguey-Zinsou KF, Marquis CP (2016) Production and purification of a soluble hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 for potential hydrogen fuel cell applications. *MethodsX* **3**, 242-250. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mex.2016.03.005>
- Kaur P, Satyanarayana T (2010) Improvement in cell-bound phytase activity of *Pichia anomala* by permeabilization and applicability of permeabilized cells in soymilk dephytinization. *J Appl Microbiol* **108**, 2041-2049. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04607.x>
- Kielkopf CL., Bauer W, Urbatsch IL (2020) Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harb Protoc* **2020**, 102269.
- Kruger JS, Cleveland NS, Yeap RY, Dong T, Ramirez KJ, Nagle NJ i sur. (2018) Recovery of fuel-precursor lipids from oleaginous yeast. *ACS Sustain Chem Eng* **6**, 2921-2931. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01874>
- Lauterbach L, Lenz O (2013) Catalytic production of hydrogen peroxide and water by oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenase during H₂ cycling in the presence of O₂. *J Am Chem Soc* **135**, 17897–17905. <https://doi.org/10.1021/ja408420d>
- Li S, Li F, Zhu X, Liao Q, Chang JS, Ho SH (2022) Biohydrogen production from microalgae for environmental sustainability. *Chemosphere*. **291**, 132717. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132717>
- Liu D, Ding L, Sun J, Boussetta N, Vorobiev E (2016) Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds — a review. *Innov Food Sci Emerg Technol* **36**, 181-192. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.017>
- Lu J, Brigham CJ, Li S, Sinskey AJ (2016) *Biotechnology for Biofuel Production and Optimization*, Elsevier, Nizozemska, str. 325-351.
- Marson GV, Machado MTdC, Castro RJS, Hubinger MD (2019) Sequential hydrolysis of spent brewer's yeast improved its physico-chemical characteristics and antioxidant properties: a strategy to transform waste into added-value biomolecules. *Process Biochem* **84**, 91-102. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.018>
- Mussagy CU, Santos-Ebinuma VC, Herculano RD, Coutinho JAP, Pereira JFB, Pessoa A (2022) Ionic liquids or eutectic solvents? Identifying the best solvents for the extraction of astaxanthin and β -carotene from *Phaffia rhodozyma* yeast and preparation of biodegradable films. *Green Chem* **24**, 118-123. <https://doi.org/10.1039/D1GC03521E>

Newborough M, Cooley G (2020) Developments in the global hydrogen market: Electrolyser deployment rationale and renewable hydrogen strategies and policies. *Fuel Cells Bull* **2020**, 16-22. [https://doi.org/10.1016/S1464-2859\(20\)30486-7](https://doi.org/10.1016/S1464-2859(20)30486-7)

Nikfarjam N, Ghomi M, Agarwal T, Hassanpour M, Sharifi E, Khorsandi D (2021) Antimicrobial Ionic Liquid-Based Materials for Biomedical Applications. *Adv Funct Mater* **31**, <https://doi.org/10.1002/adfm.202104148>

Onu P, Mbohwa C (2021) Agricultural Waste Diversity and Sustainability Issues: Sub Saharan Africa as Case Study, Academic Press, SAD, str. 97-118.

Osman AI, Mehta N, Elgarahy AM, Hefny M, Al-Hinai A, Al-Muhtase A (2022) Hydrogen production, storage, utilisation and environmental impacts: a review. *Environ Chem Lett* **20**, 153–188. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01322-8>

Pohlmann A, Fricke WF, Reinecke F, Kusian B, Liesegang H, Cramm R i sur. (2006) Genome sequence of the bioplastic-producing Knallgas bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat Biotechnol* **24**, 1257–1262. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1244>.

Poladyan A, Blbulyan S, Sahakyak M, Lenz O, Trchounian A (2019) Growth of the facultative chemolithoautotroph *Ralstonia eutropha* on organic waste materials: growth characteristics, redox regulation and hydrogenase activity. *Microb Cell Fact* **18**, 201. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1251-5>

Presečki AV, Vasić-Rački Đ (2005) Production of L-malic acid by permeabilized cells of commercial *Saccharomyces* sp. strains. *Biotechnol Lett* **27**, 1835–1839. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-3890-3>

Raberg M, Volodina E, Lin K, Steinbüchel A (2018) *Ralstonia eutropha* H16 in progress: Applications beside PHAs and establishment as production platform by advanced genetic tools. *Crit Rev Biotechnol* **38**, 494–510. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1369933>

Rundbäck F, Fidanoska M, Adlercreutz P (2012) Coupling of permeabilized cells of *Gluconobacter oxydans* and *Ralstonia eutropha* for asymmetric ketone reduction using H₂ as reductant. *J Biotechnol* **157**, 154-158. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.09.029>

Salazar O, Asenjo JA (2007) Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnol Lett* **29**, 985–994. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9345-2>

Šalić A, Zelić B (2022) A game changer: Microfluidic technology for enhancing biohydrogen production—small size for great performance. *Energies* **15**, 7065. <https://doi.org/10.3390/en15197065>

Tripathi N, Sapra A (2023) Gram Staining. StatPearls, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>

Volodina E, Raberg M, Steinbüchel A (2016) Engineering the heterotrophic carbon sources utilization range of *Ralstonia eutropha* H16 for applications in biotechnology. *Crit Rev Biotechnol* **36**, 978–991. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1079698>

Woodley JM (2006) Microbial biocatalytic processes and their development. *Adv Appl Microbiol* **60**, 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(06\)60001-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(06)60001-4)

Zhang J, Li Q, Liu J, Lu Y, Wang Y, Wang Y (2020) Astaxanthin overproduction and proteomic analysis of *Phaffia rhodozyma* under the oxidative stress induced by TiO₂. *Bioresour Technol* **311**, 123525. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123525>

Izjava o izvornosti

Ja Korina Krog izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis