

Izolacija i pročišćavanje enzima hidrogenaze porijeklom iz *Ralstonia eutropha* H16

Anđelović, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:264854>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Sara Anđelović

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja **Sara Anđelović**

Predala je izrađen diplomski rad dana: 20. rujna 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

Doc. dr. sc. Anita Šalić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Prof. dr. sc. Bruno Zelić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek, Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Prof. dr. sc. Domagoj Vrsaljko, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 25. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Sara Anđelović

IZOLACIJA I PROČIŠĆAVANJE ENZIMA HIDROGENAZE PORIJEKLOM IZ
RALSTONIA EUTROPHA H16
DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Anita Šalić

Neposredni voditelj: izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. doc. dr. sc. Anita Šalić
2. izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek
3. prof. dr. sc. Domagoj Vrsaljko

Zagreb, rujan 2024.



Istraživanje je provedeno u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost Integrirani mikrosustav za enzimatsku proizvodnju biovodika (IP-2022-10-2175) voditelja prof. dr. sc. Brune Zelića

Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Aniti Šalić na strpljenju, savjetima i vodstvu pri izradi ovoga rada. Također, želim se zahvaliti i za sve zajedničke suradnje proteklih godina, koje su moje akademsko iskustvo obogatile na poseban način. Bila mi je čast i veliko zadovoljstvo.

Zahvaljujem i izv. prof. dr. sc. Ani Jurinjak Tušek na pomoći, razumijevanju i vrijednim savjetima tijekom provedbe eksperimentalnog dijela rada kao i pisanja rada. Također, zahvaljujem se i cijelom Prehrambeno – biotehnološkom fakultetu, posebno djelatnicima Laboratorija za mjerenje, regulaciju i automatizaciju, Laboratorija za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda te Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, koji su uvijek bili na raspolaganju.

SAŽETAK

Jedan od ključnih enzima u enzimatskoj proizvodnji biovodika je enzim 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 *Ralstonia eutropha* H16 prisutne su tri različite [NiFe]-hidrogenaze tolerantne na kisik uključene u transport H₂ što ovu bakteriju čini izvrsnim izvorom hidrogenaza.

Cilj ovog istraživanja bio je heterotrofno uzgojiti stanice *R. eutropha* H16 na četiri različite sintetske podloge. Tijekom uzgoja praćene su promjene koncentracije biomase i supstrata, a najbolji rast stanica zabilježen je na sintetskoj podlozi koja je sadržavala 4 g/L fruktoze. Nakon uzgoja stanica, provedena je optimizacija ultrazvučnog razbijanja stanica korištenjem Box-Behnken dizajna eksperimenta s tri varijable (amplituda ultrazvuka, koncentracija stanica i vrijeme razbijanja) na tri razine s ciljem oslobađanja što veće koncentracije proteina. Kada je proces proveden pri optimalnim procesnim uvjetima (amplituda ultrazvuka 40 %, vrijeme razbijanja 25 min i koncentracija stanica 3 mg/mL) dobivena maksimalna koncentracija proteina u uzorku iznosila je $2,483 \pm 0,110$ mg/mL.

Ključne riječi: enzim hidrogenaza, biovodik, *Ralstonia eutropha* H16, optimizacija razbijanja stanica

SUMMARY

One of the key enzymes in the enzymatic production of biohydrogen is the enzyme hydrogenase. Various types of hydrogenases are found in organisms such as bacteria, algae and plants, with [FeFe]-hydrogenases and [NiFe]-hydrogenases being the most abundant. In the cells of the bacterium *Ralstonia eutropha* H16, there are three different oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenases involved in H₂ transport, which makes this bacterium an excellent source of hydrogenases.

The aim of this research was to heterotrophically grow *R. eutropha* H16 cells on four different synthetic substrates. During cultivation, changes in the concentration of biomass and substrate were monitored, and the best cell growth was recorded on a synthetic medium containing 4 g/L fructose. After cell cultivation, optimization of ultrasonic cell disruption (ultrasound amplitude, cell concentration and disruption time) was performed using a three-level experimental Box-Behnken design with three variables with the aim of releasing the highest possible protein concentration. When the process was carried out under optimal process conditions (ultrasound amplitude 40%, disruption time 25 min and cell concentration 3 mg/mL), the maximum protein concentration obtained in the sample was 2.483 ± 0.110 mg/mL.

Key words: hydrogenase enzyme, biohydrogen, *Ralstonia eutropha* H16, cell disruption optimization

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO.....	2
2.1.	Vodik.....	2
2.2.	Boje vodika.....	3
2.3.	Biovodik.....	4
2.3.1.	Izravna (direktna) biofotoliza	5
2.3.2.	Neizravna (indirektna) biofotoliza	6
2.3.3.	Tamna fermentacija	7
2.3.4.	Foto(heterotrofna) fermentacija	7
2.3.5.	Mikrobna elektroliza.....	8
2.4.	Enzimatska proizvodnja biovodika	9
2.4.1.	<i>Ralstonia eutropha</i> H16	10
2.4.2.	Enzim hidrogenaza.....	12
2.5.	Metode razbijanja stanica	14
2.5.1.	Mehaničke metode.....	14
2.5.2.	Fizikalne metode.....	14
2.5.3.	Kemijske i enzimatske metode	15
2.6.	Optimizacija procesa.....	15
2.6.1.	Metoda odzivne površine	16
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1.	Materijali.....	19
3.1.1.	Kemikalije	19
3.1.2.	Aparatura.....	20
3.1.3.	Priprema otopina.....	21
3.1.4.	Priprema osnovnog medija za uzgoj bakterije <i>R. eutropha</i> H16	24
3.2.	Metode	25

3.2.1.	Uzgoj bakterije <i>R. eutropha</i> H16.....	25
3.2.2.	Ultrazvučno razbijanje suspenzije stanica.....	26
3.2.3.	Mjerenje optičke gustoće i određivanje koncentracije biomase	27
3.2.4.	Određivanje koncentracije fruktoze.....	27
3.2.5.	Određivanje koncentracije glicerola.....	27
3.2.6.	Određivanje koncentracije proteina.....	28
3.2.7.	Mjerenje aktivnosti enzima glukoza hidrogenaza.....	28
3.2.8.	Elektroforeza.....	29
3.2.9.	Morfološka analiza uzorka	30
3.2.10.	Obrada podataka.....	31
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	32
4.1.	Uzgoj bakterijske kulture <i>R. eutropha</i> H16	32
4.2.	Morfološka analiza uzorka	35
4.3.	Ultrazvučno razbijanje stanica	37
4.4.	Elektroforeza.....	43
5.	ZAKLJUČAK.....	45
6.	POPIS SIMBOLA I KRATICA	46
7.	LITERATURA.....	47
8.	PRILOZI.....	55

1. UVOD

Trenutna proizvodnja energije koja se oslanja na fosilna goriva omogućila je značajan industrijski razvoj, ali je rezultirala zabrinjavajućim iscrpljivanjem prirodnih resursa te ozbiljnim negativnim utjecajima na globalnu klimu, prvenstveno zbog emisija stakleničkih plinova. Kao odgovor na ove izazove, sve više istraživanja fokusirano je na prijelaz prema obnovljivim izvorima energije, s ciljem stvaranja održivijeg energetskeg sustava. Kao perspektivno alternativno rješenje ističe se biovodik (bioH_2), čisti nositelj energije s visokim energetskeg potencijalom. Prilikom izgaranja vodika, jedini nusprodukt je voda (H_2O), što ga čini izuzetno ekološki prihvatljivim rješenjem [1]. U proteklih nekoliko desetljeća razvijeni su različiti biološki procesi za proizvodnju biovodika, koji su predmet intenzivnih istraživanja s ciljem optimizacije i povećanja učinkovitosti tog procesa.

Jedan od ključnih enzima u enzimatskoj proizvodnji biovodika je enzim hidrogenaza. Hidrogenaze su široko rasprostranjene u prirodi, a prisutne su u bakterijama, arhejama i nekim eukariotskim organizmima, te se mogu klasificirati prema sastavu metalnih iona u njihovim aktivnim mjestima u [NiFe], [FeFe] i [Fe]-hidrogenaze [2]. U stanicama bakterije *Ralstonia eutropha* H16 mogu se pronaći čak tri različite [NiFe]-hidrogenaze tolerantne na kisik uključene u transport H_2 što ovu bakteriju čini izvrsnim izvorom hidrogenaza [3]. Osim toga, *R. eutropha* H16 pokazuje izuzetnu sposobnost iskorištavanja velikog broja jednostavnih i složenih ugljikovih spojeva, što je čini ključnim mikroorganizmom, ne samo u procesu proizvodnje biovodika, nego i mnogim drugim biotehnološkim procesima.

Cilj ovog rada bio je heterotrofno uzgojiti stanice *R. eutropha* H16 na različitim sintetskim medijima te iz dobivenih bakterijskih stanica izolirati enzim hidrogenazu. Nakon uzgoja na sintetskom mediju, stanice su odijeljene od medija i resuspendirane u puferu. Suspenzija stanica razbijena je pomoću ultrazvuka pri čemu su određeni optimalni uvjeti potrebni za učinkovito razbijanje stanica.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Vodik

Vodik, H_2 , je najjednostavniji i najlakši kemijski element u svemiru, čiji je atom sastavljen od jednog protona i jednog elektrona. Iako je veoma jednostavne strukture ima složenu i raznovrsnu primjenu u različitim industrijama. Vodik se smatra jednim od najperspektivnijih energetske rješenja budućnosti prije svega zbog velike specifične energije vodika (143 kJ/g) [4]. Kako se u gorivim ćelijama koje koriste vodik kao energent, uz energiju, kao sporedni produkt dobiva samo voda, jasno je da se njegovim korištenjem ostvaruje i druga ključna prednost u odnosu na fosilna goriva, čijom upotrebom dolazi do povećanih emisija CO_2 i drugih po okoliš štetnih plinova kao što su CO , NO_x , SO_x , itd. [5, 6].

Iako je vodik najzastupljeniji element u prirodi, rijetko se nalazi u čistom obliku, tj. obično je vezan u spojevima poput vode ili organskih spojeva i kiselina, ali se može proizvesti kemijskim i biološkim metodama. Kemijske metode najčešće uključuju parno reformiranje metana (engl. *Steam Methane Reforming*, SMR), parcijalnu oksidaciju metana, te autotermalno rafiniranje (engl. *Autothermal Reforming Technology*, ATR) odnosno kombinaciju dva prethodna procesa. Osim toga, vodik se može proizvesti i iz ugljena putem različitih postupaka rasplinjavanja što je ujedno i najstarija metoda proizvodnje vodika [7]. Osim spomenutih metoda, vodik se može proizvesti i elektrolizom vode, fotoelektrolizom, rasplinjavanjem biomase itd. Glavni nedostaci spomenutih kemijskih metoda proizvodnje vodika su veliki investicijski i ukupni troškovi, velika specifična potrošnja i niska učinkovitost procesa.

Kako bi se prevladali navedeni problemi te ekološki i ekonomski opravdao i unaprijedio proces proizvodnje vodika, intenzivno se radi na poboljšanju postojećih i razvoju novih tehnologija i procesa, pri čemu biološki procesi postaju sve zastupljenija alternativa kemijskim procesima. Nekoliko je procesa koji se koriste za proizvodnju biovodika, kao što su anaerobna fermentacija (tamna fermentacija), fotofermentacija i mikrobna elektroliza. Ove napredne metode koriste mikroorganizme u proizvodnji biovodika iz organskih materijala, nudeći rješenja koja su ekonomski isplativa i održiva, te doprinose smanjenju troškova i povećanju dostupnosti vodika kao čistog izvora energije [8]. Učinkovitost tih procesa najvećim dijelom ovisi o metaboličkim putevima, stoga je odabir odgovarajućih mikroorganizma i supstrata za proizvodnju biovodika od presudne važnosti.

2.2. Boje vodika

Kao što je navedeno, vodik se može proizvesti iz različitih izvora korištenjem različitih procesa. Kako bi lakše razlikovali dobiveni vodik, uvedena je klasifikacija vodika po bojama. Klasifikacija se temelji na tipu proizvodnog procesa, vrsti sirovine koja se koristi te emisiji stakleničkih plinova koja nastaje tijekom procesa proizvodnje. Osim toga, klasifikacija omogućuje jasnije razlikovanje između tradicionalnih metoda proizvodnje vodika (crni/smeđi, sivi, plavi, tirkizni vodik) i vodika dobivenog iz obnovljivih izvora energije (zeleni vodik), čime pridonosi boljem razumijevanju vodikovog potencijala u smanjenju emisija štetnih plinova i postizanje klimatskih ciljeva.

Crni/smeđi vodik proizvodi se iz fosilnih goriva tj. ugljena procesom rasplinjavanja [7]. Proces se provodi pri vrlo visokim temperaturama (oko 900 °C) pri čemu ugljen izgara, miješa se s parom, a u endotermnoj reakciji nastaje sintezni plin tj. smjesa vodika i CO. Sintezni plin se koristi u mnogim industrijskim procesima uključujući proizvodnju metanola, amonijaka, sintetičkih goriva i drugih kemikalija, ali i u proizvodnji čistog vodika. Ova metoda proizvodnje vodika smatra se najmanje ekološki prihvatljivom metodom jer se ovim procesom oslobađa > 20 kg CO₂ za svaki kg proizvedenog vodika. S obzirom da je ugljen trenutno vrlo raširena sirovina u mnogim dijelovima svijeta, ova metoda se vrlo često koristi u proizvodnji vodika [9].

Sivi vodik proizvodi se parnim reformiranjem prirodnog plina, najčešće metana. Proces uključuje endotermnu reakciju metana i vodene pare pri visokim temperaturama (od 700 do 950 °C) i tlaku (od 15 do 40 bar) pri čemu i u ovom procesu nastaje sintezni plin tj. smjesa vodika, CO i CO₂ [9]. S obzirom da se tijekom ovog procesa proizvodnje, CO₂ koji nastaje ne hvata i ne pohranjuje, proizvodnja rezultira s 11,1 – 13,7 kg CO₂ za svaki kg proizvedenog vodika što znači da i ovaj proces ostavlja značajan ugljični otisak [10].

Plavi vodik proizvodi se na isti način kao i sivi vodik uz jednu ključnu razliku – oko 90% CO₂ koji nastaje tijekom procesa proizvodnje se hvata i pohranjuje ili ponovno koristi u procesu proizvodnje (engl. *Carbon Capture and Sequestration*, CCS) [11]. Upotreba ove tehnologije smanjuje emisiju stakleničkih plinova na oko 0,8 – 1,2 kg CO₂ za svaki kg proizvedenog vodika, čineći plavi vodik ekološki prihvatljivijim od sivog vodika [6]. Međutim, učinkovitost koja i dalje nije blizu 100% te ekonomska (ne)opravdanost CCS tehnologije predmet su rasprave kada se govori o potencijalu plavog vodika u budućnosti.

Tirkizni vodik proizvodi se pirolizom metana, procesom koji razdvaja metan na vodik i čvrsti ugljik [12]. Prednost ovog procesa je nastanak niske količine CO₂ odnosno, u ovom

procesu nastaje 0,03 – 0,37 kg CO₂ za svaki kg proizvedenog vodika. Smatra se da će u budućnosti emisija biti još niža kada se u procesu budu koristili obnovljivi izvori energije, a kompletan CO₂ koji nastaje, pohranjivao ili ponovno koristio. Tirkizni je vodik još uvijek u fazi istraživanja i razvoja [6].

Zeleni vodik proizvodi se elektrolizom vode upotrebom električne energije iz obnovljivih izvora energije. Elektrolizom vode nastaju kisik i vodik, a cjelokupan proces proizvodi zanemarive količine CO₂ [13]. Ovaj vodik smatra se najodrživijim i ključnim za postizanje globalne energetske tranzicije prema niskougljičnom gospodarstvu [6].

Osim navedenih boja, u literaturi se spominju još i žuti vodik koji se proizvodi elektrolizom vode koristeći električnu energiju koja se dobiva iz različitih izvora energije koji uključuju fosilna goriva, nuklearnu energiju i obnovljive izvore [9]. Ako je značajan dio električne energije dobiven iz obnovljivih izvora, žuti vodik može imati niži ugljični otisak. Osim žutog, spominje se i rozi vodik koji se također proizvodi elektrolizom vode, ali uz korištenje nuklearne energije kao izvora električne energije [14]. Prednost ove metode je stalna i pouzdana opskrba energijom, što je često ograničavajući faktor povezan s obnovljivim izvorima energije. Korištenje nuklearne energije također rezultira vrlo niskom emisijom stakleničkih plinova, što čini rozi vodik niskougljičnim rješenjem, premda postoje problemi vezani uz sigurnost i gospodarenje nuklearnim otpadom [15].

Osim spomenutih vodika, postoji i vodik kojem još nije dodijeljena boja jer je njegov istraživanje tek u začetcima, a to je vodik dobiven biološkim procesima tj. biovodik.

2.3. Biovodik

Biovodik se ističe kao jedno od najperspektivnijih rješenja za budućnost održivih izvora energije, zahvaljujući svojoj obnovljivoj prirodi i značajnim prednostima u usporedbi s fosilnim gorivima. Njegova visoka energetska gustoća i čistoća prilikom izgaranja omogućuju njegovo učinkovito korištenje bez problema koji su tradicionalno povezani s izgaranjem fosilnih goriva tj. bez emisije štetnih stakleničkih plinova (CO₂, NO_x, SO_x) i drugih toksičnih komponenti [16].

Proizvodnja biovodika temelji se na biološkim procesima iz različitih sirovina, uključujući i otpadne materijale, pri blagim procesnim uvjetima (niske temperature i tlakovi) [17], a mogu se podijeliti na:

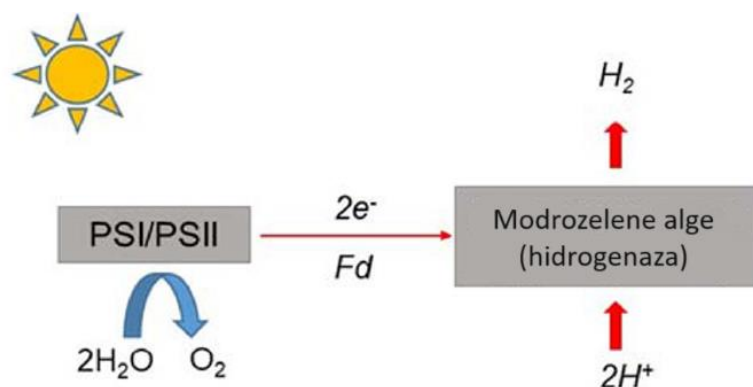
- (i) izravnu (direktnu) biofotolizu,
- (ii) neizravnu (indirektnu) biofotolizu,
- (iii) tamnu fermentaciju,
- (iv) foto(heterotrofnu) fermentaciju,
- (v) kombinaciju tamne fermentacije i fotofermentacije te
- (vi) mikrobnu elektrolizu.

2.3.1. Izravna (direktna) biofotoliza

Izravna (direktna) biofotoliza je proces u kojem fotosintetski mikroorganizami, poput algi i cijanobakterija, razgrađuju molekulu vode u biovodik i kisik pomoću sunčeve energije prema kemijskoj reakciji koja se može opisati jednadžbom (1).



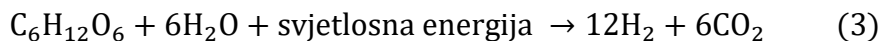
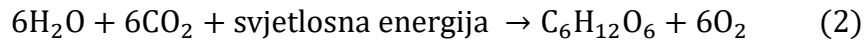
Izravna (direktna) biofotoliza uključuje fotosintezu, u kojoj alge (npr. *Chlamydomonas reinhardtii*) i cijanobakterije razlažu vodu na biovodik i kisik (Slika 1.). Fotosustav I (PSI) i fotosustav II (PSII) u kloroplastima apsorbiraju fotone kako bi proizveli jaki oksidans ključan za cijepanje vode u kisik, elektrone i protone. U prisutnosti enzima hidrogenaza, biovodik nastaje redukcijom protona s elektronom. S obzirom da se u ovom procesu koriste samo voda i sunčeva energija, ovaj proces je vrlo interesantan sa stanovišta proizvodnje biovodika, međutim enzim hidrogenaza, koja je prisutna u algama i cijanobakterijama, vrlo je osjetljiva na prisutnost kisika te proces često rezultira s niskim prinosima biovodika [16, 18, 19].



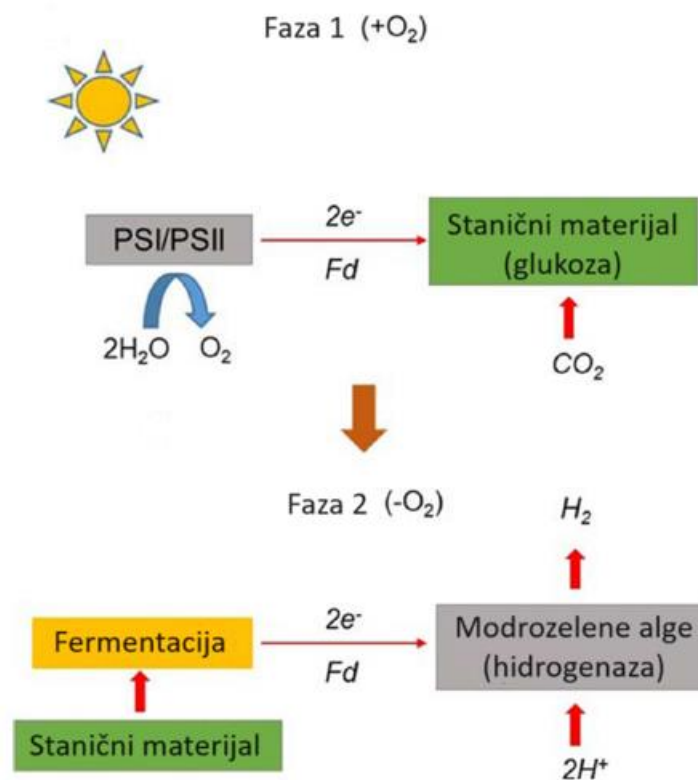
Slika 1. Shematski prikaz izravne (direktne) biofotolize za proizvodnju biovodika (PSI – fotosustav I, PSII – fotosustav II) [18]

2.3.2. Neizravna (indirektna) biofotoliza

Neizravna (indirektna) biofotoliza je varijanta izravne biofotolize, a cilj joj je smanjiti inhibiciju kisikom. Proces se sastoji se od dvije faze [20]; faza vezanja CO₂ fotosintezom u ugljikohidrate te faza razgradnje ugljikohidrata na biovodik i CO₂ u procesu tamne fermentacije (Jednadžbe (2) i (3)).



U prvoj fazi cijanobakterije rastu u aerobnim uvjetima, pri čemu sintetiziraju lipide, ugljikohidrate i druge organske molekule koristeći sunčevu energiju i fiksaciju CO₂ (Jednadžba (2)). Kada se količina kisika smanji, započinje druga faza tj. anaerobna faza u kojoj enzim hidrogenaza proizvodi biovodik (Jednadžba (3)) (Slika 2.) [18]. Ovim procesom cijanobakterije i mikroalge mogu proizvesti biovodik iz nakupljenih ugljikohidrata, pri čemu je riješen problem osjetljivosti na kisik razdvajanjem proizvodnje biovodika i kisika.

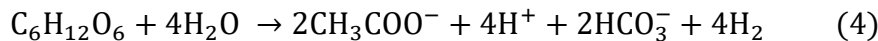


Slika 2. Shematski prikaz neizravne (indirektne) biofotolize za proizvodnju biovodika (PSI – fotosustav I, PSII – fotosustav II) [18]

2.3.3. Tamna fermentacija

Proizvodnja biovodika postupkom tamne fermentacije uključuje korištenje anaerobnih (npr. *Clostridia*) ili fakultativno anaerobnih bakterija (npr. *Enterobacter*, *Escherichia coli* i *Citrobacter*), čistih ili miješanih kultura, prilikom čega se kao sirovine koriste ugljikohidrati, proteini, šećeri i lipidi. Tamna fermentacija je brz proces [21].

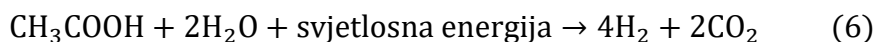
Proces koji se najčešće koristi u procesu proizvodnje biovodika tamnom fermentacijom je anaerobna fermentacija glukoze u octenu kiselinu jer u tom procesu nastaje najviše biovodika tj. 4 mol H₂/mol glukoze (Jednadžba (4)). Biovodik je moguće dobiti i u drugim procesima kao npr. procesom u kojem iz glukoze nastaje maslačna kiselina, međutim u tom procesu nastaju 2 mol H₂/mol glukoze (Jednadžba (5)) čineći ovaj proces manje učinkovitim.



Osim toga, kao sirovine mogu se koristiti i otpad iz prehrambene industrije, otpadna voda, otpadni mulj itd., pri čemu je kod kompleksnih sirovina, kao npr. lignoceluloze, potrebno uključiti i predtretman kako bi se oslobodili jednostavni šećeri. I dok je proces biofotolize ograničen s dostupnošću sunčeve svjetlosti, u procesu tamne fermentacije biovodik je moguće proizvoditi cijeli dan što ovaj proces čini ekonomičnijim.

2.3.4. Foto(heterotrofna) fermentacija

Kao i kod tamne fermentacije, foto(heterotrofna) fermentacija u anaerobnim i anoksičnim uvjetima pretvara organski supstrat u biovodik uz nastanak CO₂ (Jednadžba (6)) [18].



Za proces su najčešće odgovorne ljubičaste nesumporne fotosintetske bakterije koje uključuju vrste *Rhodobium*, *Rhodobacter*, *Rhodospirillum* i *Rhodopseudomonas*, a kao supstrat najpoželjnije su kratkolančane organske kiseline kao što su octena, mliječna ili maslačna kiselina. U ovom procesu, nastanak biovodika kataliziran je enzimom nitrogenazom u uvjetima limitacije dušikom. Glavni nedostatak enzima nitrogenaze je niska katalitička aktivnost, supresija njihove ekspresije u prisutnosti izvora dušika te niža fotokemijska učinkovitost.

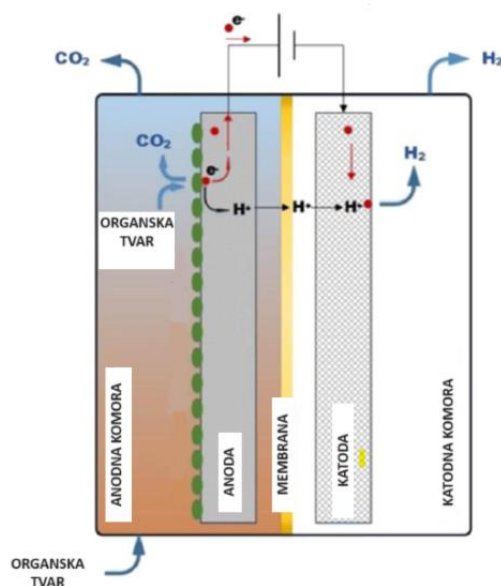
Teoretski, u ovom procesu se može proizvesti 4 mol H₂/mol octene kiseline (Jednadžba (6)). Međutim, ova vrijednost se ne postiže u praksi jer se dio octene kiseline također troši za proizvodnju (rast) biomase. [1]

Glavni nedostatak foto(heterotrofne) fermentacije je niska fotokemijska učinkovitost procesa, koja posljedično zahtijeva korištenje velikih površina za prikupljanje dovoljne količine svjetlosne energije. Osim toga, potreba za svjetlom uzrokuje prirodni ciklus dan-noć, što rezultira diskontinuiranom proizvodnjom biovodika.

Kako bi se prevladali nedostaci tamne i foto(heterotrofne) fermentacije, predložen je dvostupanjski proces koji kombinira oba procesa. U prvom dijelu procesa tijekom tamne fermentacije, fermentacijom glukoze dolazi do nastanka biovodika i organskih kiselina. Biovodik se odvodi, a nastale organske kiseline se u drugom dijelu procesa (foto(heterotrofna) fermentacija) prevode do biovodika i CO₂. Teoretski, u ovom procesu može nastati 12 mol H₂/mol glukoze [22].

2.3.5. Mikrobna elektroliza

Mikrobna elektroliza (ME) je inovativna biotehnološka metoda koja koristi mikroorganizme za proizvodnju biovodika iz organskih materijala. Tehnologija se temelji na kombinaciji mikrobne elektrokemije i konvencionalne elektrolize, te na taj način predstavlja obećavajuću alternativu za održivu proizvodnju biovodika. U ovom procesu, mikroorganizmi na anodi oksidiraju organski materijal, kao što je otpadna voda ili biomasa proizvodeći pri tome elektrone i protone [23, 24]. Elektroni se transportiraju kroz vanjski krug do katode, dok protoni prolaze kroz membranu koja razdvaja anodnu i katodnu komoru. Na katodi, uz prisustvo vanjskog napona, nastaje biovodik (Slika 3.) [25].



Slika 3. Shematski prikaz proizvodnje biovodika procesom mikrobne elektrolize [26]

Ključna prednost korištenja ME je mogućnost korištenja otpadnih sirovina što može pomoći u rješavanju problema zbrinjavanja otpada uz istovremenu proizvodnju energije [26, 27]. Osim toga, ME za svoj rad koristi niski napon, čime se smanjuje potreba za visokim energetske unosom karakterističnim za konvencionalnu elektrolizu vode [28].

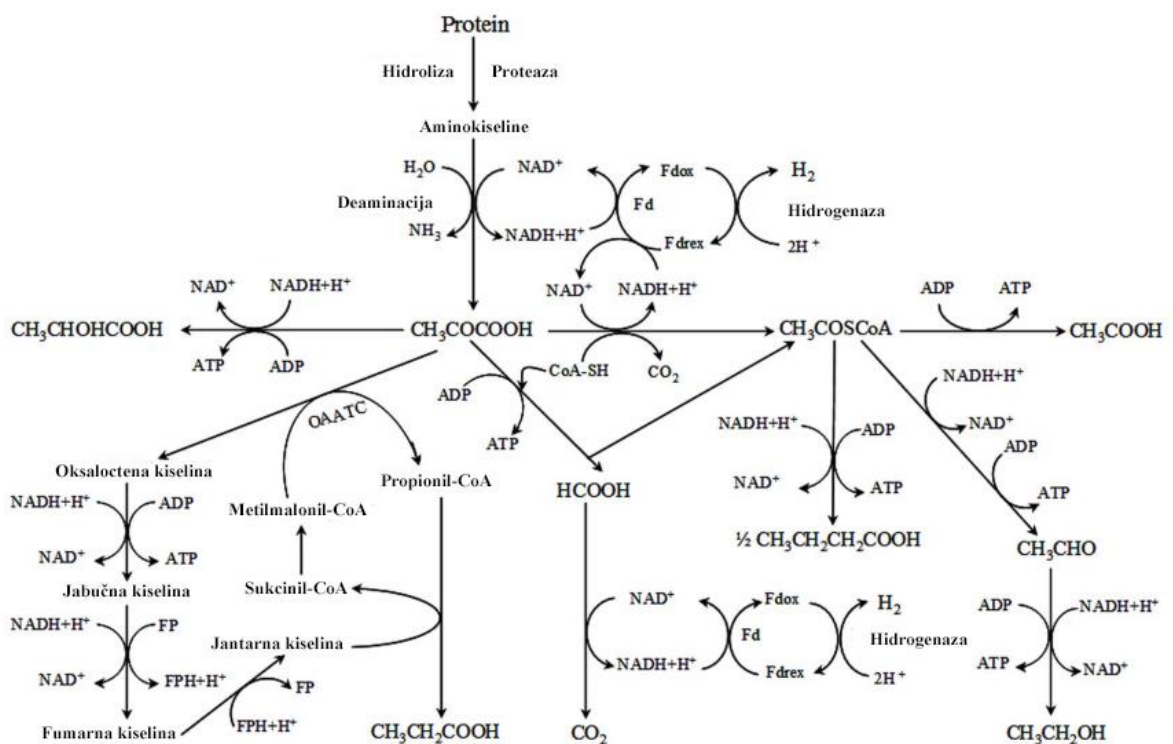
Unatoč brojnim prednostima, nekoliko je ključnih izazova prilikom korištenja ME. Jedan od njih je potreba za visokoučinkovitim i stabilnim mikroorganizmima koji mogu učinkovito koristiti različite supstrate [29]. Osim toga, cijena i trajnost elektroda značajno utječu na ekonomsku održivost cijelog procesa. Naime, kako bi se osigurala učinkovita, kontinuirana proizvodnja biovodika, za njihovu izradu koriste se skupi materijali poput platine [30, 31].

2.4. Enzimatska proizvodnja biovodika

Enzimatska proizvodnja biovodika predstavlja inovativan pristup u području obnovljivih izvora energije, koristeći enzime kao biokatalizatore za proizvodnju biovodika putem različitih biokemijskih reakcija inspiriranih prirodnim metaboličkim putevima mikroorganizama.

Kao što je već prethodno spomenuto, dvije vrste metaloenzima, tj. hidrogenaza i nitrogenaza, ključni su katalizatori u različitim mehanizmima i reakcijama za proizvodnju biovodika [32]. Hidrogenaza katalizira reverzibilnu reakciju stvaranja biovodika iz protona i

oksidacije biovodika u protone. S druge strane, nitrogenaza je ireverzibilni katalizator i može reducirati dušik u amonijak i proizvesti biovodik kao nusproizvod u anaerobnim uvjetima i uvjetima s limitacijom dušika. Strukture, katalitički mehanizmi i fiziološke funkcije ovih enzima opsežno su proučavane dugi niz godina, a posljednjih godina postignut je veliki napredak. Međutim, budući da ti enzimi imaju složene strukture koje uključuju zamršene metalne klastere i kofaktore, teško je postići temeljito razumijevanje mehanizma proizvodnje biovodika i racionalan dizajn genetički modificiranih mikroorganizama za učinkovitiju proizvodnju biovodika [33, 34]. Jedan od potencijalnih puteva za enzimatsku proizvodnju biovodika iz proteina prikazan je na Slici 4.



Slika 4. Metabolički put za anaerobnu proizvodnju biovodika iz proteina [35]

2.4.1. *Ralstonia eutropha* H16

Ralstonia eutropha H16, gram-negativna bakterija poznata po svojoj sposobnosti razgradnje organskih spojeva i visokoj prilagodljivosti različitim okolišnim uvjetima, raste litoautotrofno. Svoju primjenu pronašla je u biotehnologiji zbog svoje uloge u proizvodnji biovodika, bioplastike i drugih biotehnoloških proizvoda [36]. Ključna karakteristika *R. eutropha* H16 je njezina sposobnost korištenja različitih hidrogenaza za proizvodnju biovodika. Ove hidrogenaze kataliziraju reverzibilnu reakciju oksidacije vodika, omogućujući bakteriji

proizvodnju i potrošnju vodika kao izvora energije u anaerobnim uvjetima, čime se doprinosi razvoju održivih energetske rješenja [37, 38, 39].

Stanični metabolizam *R. eutropha* H16 u potpunosti se oslanja na fiksaciju CO₂, što predstavlja izrazito energetski zahtjevan proces. Kako bi takav proces bio moguć, *R. eutropha* H16 sadrži tri hidrogenaze: membranski vezanu hidrogenazu (MBH), slobodnu hidrogenazu (SH) i regulatornu hidrogenazu (RH), koje pripadaju skupini [NiFe]-hidrogenaza [36]. U većini organizama, kisik će inhibirati pa čak i deaktivirati hidrogenaze [2]. Ono po čemu se hidrogenaze prisutne u *R. eutropha* H16 razlikuju je njihova tolerantnost na kisik što značajno proširuje njihovu primjenu. Kako bi spomenute hidrogenaze uspješno koristili u enzimskoj sintezi vodika, potrebno je uzgojiti bakterije i iz njih izolirati enzime.

Bakteriju *R. eutropha* H16 moguće je izolirati iz različitih okoliša bogatih organskim materijalima. Najnovija istraživanja ukazuju na prisutnost ovog mikroorganizma u različitim prirodnim i antropogenim sredinama, uključujući tla, vodene ekosustave, industrijske otpadne vode te područja kontaminirana teškim metalima i naftnim derivatima [40]. Izolacija *R. eutropha* H16 iz prirodnog okoliša često je usmjerena na istraživanje njezinog biotehnološkog potencijala, uključujući bioremedijaciju i proizvodnju biovodika.

Jednom kada se ova bakterija izolira, optimalni rast u kontroliranim uvjetima postiže se korištenjem mineralnog medija obogaćenog različitim izvorima ugljika. Uzgojni mediji često sadrže komponente poput: K₂HPO₄, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O i FeSO₄·7H₂O, uz dodatak 1 % (w/v) glukoze [41]. Kod različitih biotehnoloških procesa koriste se aerobni i anaerobni uvjeti, gdje se za proizvodnju biovodika preferiraju anaerobni uvjeti [42].

Uzgoj *R. eutropha* H16 može se suočiti s nekoliko ključnih izazova:

- **Kontrola pH vrijednosti:** Jedan od značajnijih problema prilikom uzgoja *R. eutropha* H16 je održavanje stabilne pH vrijednosti u mediju za uzgoj. Do promjene pH vrijednosti medija može doći zbog proizvodnje različitih metaboličkih nusprodukata, što može negativno utjecati na rast bakterije. Održavanje stabilne pH vrijednosti provodi se redovnom kontrolom i prilagodbom pH tijekom trajanja uzgoja [43, 44].
- **Nastanak nusprodukata fermentacije:** Prilikom procesa uzgoja, *R. eutropha* H16 proizvodi različite nusprodukte koji mogu inhibirati rast bakterija. Nusprodukti uključuju organske kiseline, alkohole i druge spojeve koji mogu imati negativan učinak na rast [45]. Uklanjanje ili smanjenje količine proizvedenih nusprodukata

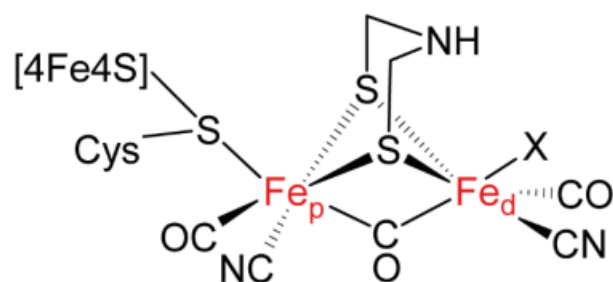
predstavlja veliki izazov. Mogući pristupi uključuju genetičko inženjerstvo za poboljšanje otpornosti bakterija na te spojeve, te razvoj sustava za kontinuirano uklanjanje nusprodukata iz medija.

- **Dostupnost hranjivih tvari:** Nedostatak hranjivih tvari može usporiti i ograničiti brzinu rasta i produktivnost *R. eutropha* H16. Medij za uzgoj mora osigurati sve potrebne nutrijente u ispravnim omjerima kako bi se osigurao maksimalan rast. Nedostatak bitnih elemenata kao što su dušik, fosfor i željezo može značajno usporiti metabolizam bakterije [46].

2.4.2. Enzim hidrogenaza

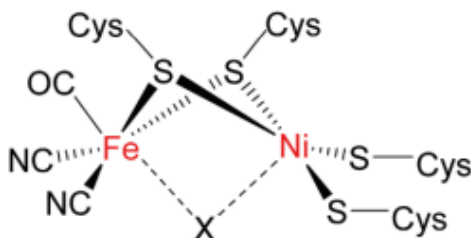
Kao što je već nekoliko puta naglašeno, hidrogenaze su enzimi koji igraju ključnu ulogu u biološkoj proizvodnji biovodika [47]. Klasificiraju se na temelju metala prisutnih u centru njihovog aktivnog mjesta. [FeFe]-hidrogenaze sadrže dva atoma željeza, dok [NiFe]-hidrogenaze sadrže po jedan atom željeza i nikla u centru. [Fe]-hidrogenaze, poznate i kao Hmd hidrogenaze, sadrže jedinstveni željezni centar u kombinaciji s ligandima koji sadrže sumpor [3].

[FeFe]-hidrogenaze su poznate po svojoj visokoj aktivnosti prilikom proizvodnje biovodika. Aktivno mjesto ovog enzima, poznato kao H-klaster, osim spomenutih željeznih atoma sadrži i CO i cijanidne (CN⁻) ligande (Slika 5.) [48]. Strukturalna karakterizacija [FeFe]-hidrogenaza pokazala je da su ti enzimi posebno prilagođeni za brz i učinkovit prijenos elektrona [49].



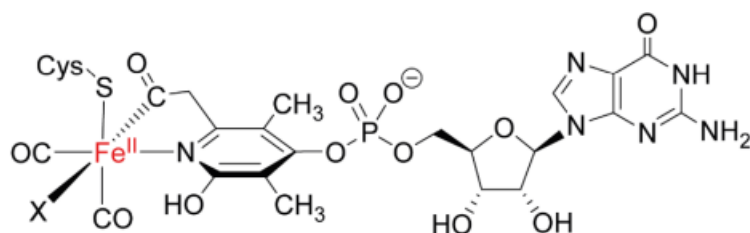
Slika 5. Molekularna struktura iona kofaktora [FeFe]-hidrogenaze [50]

[NiFe]-hidrogenaze obično su manje aktivne od [FeFe]-hidrogenaza, ali su termodinamički stabilnije i tolerantnije na kisik [3]. Aktivni centar ovih enzima također je okružen ligandima koji uključuju ugljikov monoksid i cijanid (Slika 6.) [51].



Slika 6. Molekularna struktura iona kofaktora [NiFe]-hidrogenaze [50]

[Fe]-hidrogenaze ili Hmd hidrogenaze, sadrže jedinstveni željezni centar i nisu ovisne o niklu (Slika 7.) [52].



Slika 7. Molekularna struktura iona kofaktora [Fe]-hidrogenaze [50]

Mehanizam djelovanja hidrogenaza uključuje višestupnjeviti proces koji započinje vezanjem molekularnog vodika na aktivno mjesto enzima. Nakon vezanja, H_2 se dijeli na dva protona i dva elektrona kroz heterolitičku ili homolitičku raspodjelu [48]. Elektroni se zatim transportiraju kroz niz kofaktora unutar enzima do konačnog akceptora elektrona, dok se protoni oslobađaju u okolinu [3]. Proces može biti i reverzibilan pri čemu nastaje biovodik.

Iako je istraživanje hidrogenaza znatno napredovalo, njihova široka primjena suočava se s određenim izazovima. Stabilnost ovih enzima značajno je ovisna o prisutnosti kisika i temperaturi, što ograničava njihovu učinkovitost i upotrebu u industrijskim procesima [52]. Stoga je razvoj novih metoda za sintezu i modifikaciju hidrogenaza ključan za njihovu komercijalnu primjenu i integraciju u održive energetske sustave [49].

2.5. Metode razbijanja stanica

Razbijanje stanica važan je korak u biotehnološkim istraživanjima, kao i industrijskim procesima. Omogućava pristup intracelularnim komponentama, poput proteina, nukleinskih kiselina i drugih biomolekula koje su bitne za provedbu daljnjih analiza. Učinkovito razbijanje stanica mora biti dobro kontrolirano kako bi se izbjegla degradacija molekula i kako bi se maksimizirala njihova izolacija. Metode razbijanja stanica moguće je podijeliti u tri glavne skupine: (i) mehaničke, (ii) fizikalne te (iii) kemijske i enzimatske metode.

2.5.1. Mehaničke metode

Mehaničke metode su one metode koje koriste fizičku silu za razbijanje staničnih membrana. Ove metode veoma su učinkovite i mogu se primijeniti za različite tipove stanica uključujući bakterije, kvasce te životinjske i biljne stanice. Najčešće korištene mehaničke metode su:

- **Razbijanje stanice upotrebom homogenizatora:** Najčešće korištena mehanička metoda kod koje se stanice izlažu visokim silama. Naime, homogenizatori, uz pomoć klipova ili rotirajućih noževa stvaraju velike smične sile koje uzrokuju razbijanje stanica [53].
- **Razbijanje stanica upotrebom kugličnog mlina:** Kuglični mlin je uređaji koji korist male kuglice često napravljene od stakla ili keramike. Vrlo brzom rotacijom kuglice stvaraju veliku mehaničku silu koja razbija stanične membrane, što je posebno važno kod tvrdih stanica kao što su bakterije [54].
- **Razbijanje stranica upotrebom ultrazvuka:** Radi se o veoma učinkovitoj metodi razbijanja stanica koja koristi ultrazvučne valove za stvaranje kavitacijskih mjehurića u tekućini. Kolabiranjem kavitacijskih mjehurića stvaraju se lokalizirane sile koje razbijaju stanične membrane. Ultrazvučno razbijanje stanica prikladno je za manje količine uzorka i osjetljivije stanice [55].

2.5.2. Fizikalne metode

Fizikalne metode razbijanja stanica koriste različite fizikalne procese, kao što su toplinska i osmotska promjena. Ove metode su manje invazivne od ostalih metoda i mogu biti vrlo specifične za određene tipove stanica. Neke od najčešće korištenih metoda su:

- **Razbijanje stanica cikličkim zamrzavanjem i odmrzavanjem:** Ova metoda koristi cikluse zamrzavanja i odmrzavanja kako bi došlo do stvaranja leda unutar stanica. Kristali probijaju stanične membrane prilikom formiranja i topljenja, čime se postiže razbijanje stanica [56].
- **Razbijanje stanica osmotskim šokom:** Radi se o metodi koja koristi brze promjene osmotskog tlaka za razbijanje stanica. Promjena osmotskih tlakova, uzrokuje ulazak i izlazak vode iz stanica te dovodi do razbijanja staničnih membrana. Ova metoda učinkovita je za bakterije i jednostanične eukariote [57].

2.5.3. Kemijske i enzimatske metode

Kemijske i enzimatske metode uključuju korištenje kemikalija ili enzima za razaranje specifičnih staničnih komponenti. To su vrlo specifične metode koje mogu omogućiti očuvanje biološke aktivnosti izoliranih molekula.

- **Kemijske metode:** Koriste detergente ili otapala koja destabiliziraju stanične stijenke/membrane. Jedan od primjera je anionski deterdžent natrij dodecil sulfat (SDS) koji učinkovito razara stanične membrane te se iz istog razloga veoma često koristi u različitim laboratorijskim procesima [58].
- **Enzimatske metode:** Metode koje koriste specifične enzime za razgradnju staničnih stijenki/membrana. Na primjer, enzim lizozim učinkovit je za razgradnju bakterijskih stanica, dok se celulaza koristi za razgradnju biljnih stanica [59].

2.6. Optimizacija procesa

Cilj optimizacije je poboljšati performanse sustava, postupka ili proizvoda kako bi se osigurala maksimalna učinkovitost [60]. Optimizacija se temelji na razvoju matematičkih modela koji omogućavaju analizu procjene relevantnosti, statističke značajnosti varijabli i učinka interakcije između varijabli. Najjednostavniji pristup u optimizaciji proces je jednoparametarska optimizacija. Postupak se provodi tako da se analizira utjecaj jedne varijable na eksperimentalni odgovor, pri čemu se ostale varijable ne mijenjaju. Nedostatci jednoparametarske optimizacije uključuju zanemarivanje interakcija između varijabli, što ne prikazuje cjelovite učinke varijabli na odgovor sustava te povećava broj potrebnih pokusa, čime rastu troškovi, vrijeme te potrošnja reagensa i materijala [61]. Kako bi se ti problemi prevladali,

optimizacija analitičkih postupaka provodi se korištenjem višeparametarske optimizacije. Višeparametarska optimizacija uključuje dizajn eksperimenta u kojem se istodobno mijenjaju razine svih varijabli, proučavajući utjecaj promjena većeg broja varijabli na proces [61, 62]. Među najvažnijom metodom/tehnikom koja se koristi pri višeparametarskoj optimizaciji, je metoda odzivne površine (engl. *Response Surface Methodology*, RSM).

2.6.1. Metoda odzivne površine

Metoda odzivne površine obuhvaća skup statističkih i matematičkih tehnika korisnih za razvoj, poboljšanje i optimizaciju procesa. Ima značajnu primjenu u dizajnu, razvoju i formuliranju novih proizvoda, kao i u poboljšanju postojećih. Najopsežnija primjena metode odzivne površine je u industriji, posebno u situacijama kada više ulaznih varijabli može utjecati na izvedbu ili kvalitativne karakteristike proizvoda ili procesa.

Metoda odzivne površine definira vezu između izlaznih (zavisnih) i ulaznih (nezavisnih) varijabli. Odnos između izlaznih i ulaznih varijabli prikazan je sljedećom jednačbom (Jednačba (7)):

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n) + \varepsilon \quad (7)$$

gdje su y izlazna varijabla, f nepoznata funkcija odgovora, x_1, x_2, \dots, x_n nezavisne varijable, n broj nezavisnih varijabli i ε statistička pogreška.

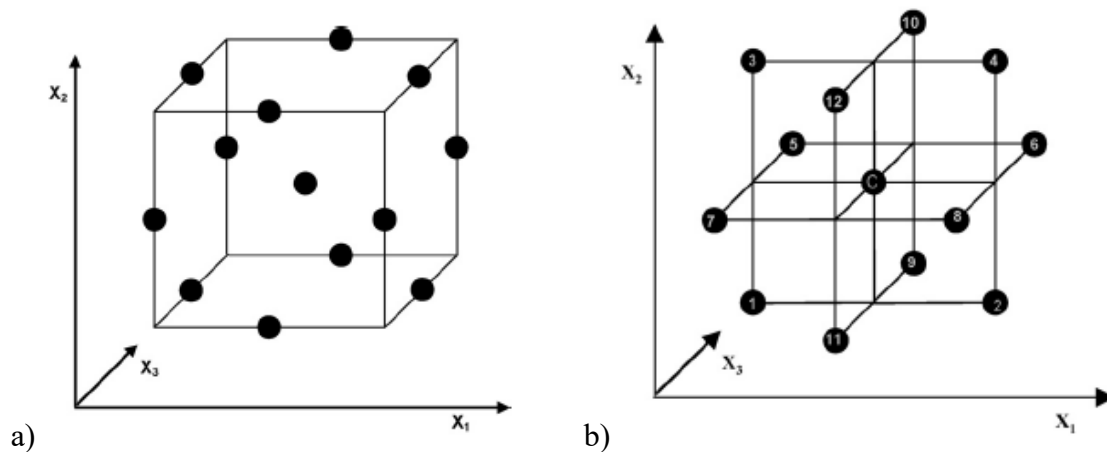
Optimizacija metodom odzivne površine može se podijeliti u nekoliko faza. U prvoj fazi, na temelju preliminarnih istraživanja, odabiru se nezavisne varijable koje značajno utječu na proces. U sljedećoj fazi, utjecaj odabranih nezavisnih varijabli analizira se primjenom dizajna eksperimenta. Zatim se dobiveni eksperimentalni podaci matematički obrađuju primjenom polinomskih funkcija. Na kraju se provodi procjena prihvatljivosti modela te se određuju optimalne vrijednosti svake proučavane varijable [60].

Najčešće korišten model u metodi odzivne površine je model drugog reda (Jednačba (8)):

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j \quad (8)$$

gdje su $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$ regresijski koeficijenti, x_i i x_j nezavisne varijable, a y odziv [62].

Za procjenu parametara u jednadžbi (8), eksperimentalni dizajn mora obuhvatiti sve varijable na najmanje tri razine. Poznati eksperimentalni dizajni na tri razine uključuju Box-Behnken dizajn i Doehletov dizajn. Ovi dizajni se razlikuju po izboru eksperimentalnih točaka, broju razina i broju izvođenja [60]. Box-Behnken dizajn koristi se za višeparametarsku optimizaciju i definira se kao statistička metoda eksperimentalnog dizajna koja se koristi za procjenu kvadratnih i interakcijskih učinaka varijabli u optimizaciji procesa, omogućujući učinkovitu analizu s minimalnim brojem pokusa. Za tri varijable, grafički prikaz Box-Behnken dizajna može se predstaviti kao kocka koja se sastoji od centralne točke i srednjih točaka bridova (Slika 8a.) ili kao dizajn s tri povezane 2^2 varijable i centralnom točkom (Slika 8b.).



Slika 8. Grafički prikaz Box-Behnken dizajna – a) oblik kocke i b) dizajn za optimizaciju tri varijable [61]

Broj eksperimenata (N) potreban za razvoj Box-Behnken dizajna definiran je sljedećom jednadžbom (Jednadžba (9)):

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \quad (9)$$

gdje je k broj nezavisnih varijabli, a C_0 broj centralnih točaka.

Nakon prikupljanja podataka za svaku eksperimentalnu točku, rezultati se opisuju matematičkim izrazom koji definira ponašanje odziva prema razinama proučavanih varijabli. Koeficijenti polinoma izračunavaju se višestrukom regresijom, metodom najmanjih kvadrata (engl. *Method of Least Squares*, MLS). Pretpostavka metode najmanjih kvadrata je da su najbolji parametri oni za koje je suma kvadrata odstupanja (engl. *Sum of the Squares of the*

Errors, SSE) između eksperimentalno izmjerenih i modelom predviđenih vrijednosti minimalna, što možemo izračunati prema sljedećoj jednadžbi (Jednadžba (10)):

$$SSE = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (10)$$

gdje je ε_i ostatak, y_i eksperimentalno određen odziv, a \hat{y}_i izračunati odziv.

Ponekad matematički model ne može adekvatno opisati eksperimentalne podatke. Pouzdana metoda za procjenu kvalitete modela je analiza varijance (engl. *Analysis of Variance*, ANOVA). Ovim pristupom se procjenjuju varijacije nastale promjenom kombinacija razina varijabli i slučajnih pogrešaka. Ako je model zadovoljavajući, podaci su normalno raspodijeljeni kao posljedica slučajne pogreške, dok loš model pokazuje preklapanje eksperimentalnih podataka.

Vizualizacija modela može se postići prikazivanjem odzivnih površina i kontura. Trodimenzionalni prikaz odnosa između odziva i nezavisnih varijabli naziva se odzivna površina, dok je dvodimenzionalni prikaz kontura. Konture pomažu u vizualizaciji oblika odzivne površine, gdje elipse ili krugovi označavaju točke maksimalnog ili minimalnog odziva, a hiperbolički ili parabolički prikazi ukazuju na sedlo, odnosno točku bez maksimalne ili minimalne vrijednosti. Optimalni uvjeti procesa odgovaraju izračunatim vrijednostima nezavisnih varijabli koje daju najveći ili najmanji odziv [62].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U svrhu provedbe uzgoja bakterije *Ralstonia eutropha* H16 odabrana su četiri medija, od kojih je svaki sadržavao različite koncentracije glicerola i fruktoze. Nakon provedenog uzgoja proveden je niz od 17 eksperimenata ultrazvučnog razbijanja stanica u svrhu optimizacije procesa izolacije proteina.

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

U provedbi eksperimenata korištene su sljedeće kemikalije:

- 3,5-dinitrosalicilna kiselina (DNS), Sigma-Aldrich, USA
- akrilamid, Acros Organics, SAD
- amonijev klorid, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- amonijev peroksidisulfat, Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Njemačka
- bakrov(II) sulfat pentahidrat, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- borna kiselina, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- bromfenol plavo, Fisher Scientific, Belgija
- cinkov sulfat heptahidrat, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Commassie Brilliant Blue G-250, Sigma-Aldrich, Ujedinjeno Kraljevstvo
- D-fruktoza, Lach Ner d.o.o., Češka
- di-natrijev hidrogen fosfat dodekahidrat, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo
- etanol, Kemika, Hrvatska
- fosfatna kiselina, Kemika, Hrvatska
- glicerol, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- glicin, Sigma-Aldrich, USA
- goveđi serumski albumin, Sigma-Aldrich, USA
- kalcijev klorid dihidrat, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- kalijev dihidrogen fosfat, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- kalijev hidrogen fosfat, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- kalijev natrijev tartarat tetrahidrat, Sigma-Aldrich, USA
- klorovodična kiselina, Fischer Chemicals, Francuska
- kobalt(II) klorid heksahidrat, BDH Prolabo, Njemačka

- magnezijev sulfat heptahidrat, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- mangan(II) klorid tetrahidrat, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo
- mesni agar, Sigma-Aldrich, Njemačka
- metanol, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo
- *N,N,N',N'*-tetrametil-etilendiamin, TCI Europe N.V., Belgija
- *N,N'*-metilbisakrilamid, TCI Europe N.V., Belgija
- natrijev dodecil sulfat, Sigma-Aldrich, USA
- natrijev hidroksid, CARLO ERBA Reagents, Italija
- natrijev molibdat dihidrat, BDH Prolabo, Njemačka
- niklov(II) klorid heksahidrat, Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Njemačka
- niklov(II) klorid, Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Njemačka
- nikotinamid adenin dinukleotid, reducirani (NADH), Sigma-Aldrich, USA
- octena kiselina, Kemika, Hrvatska
- ortofosforna kiselina, Lach Ner d.o.o., Češka
- Pageruler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Thermo Scientific, SAD
- Pepton, Sigma-Aldrich, Njemačka
- TRIS (hidroksimetil) aminometan, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo
- željezo(III) klorid heksahidrat, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo
- β -merkptoetanol, Sigma-Aldrich, USA

Bakterija *R. eutropha* H16 (DSMZ, Njemačka) propagirana je na $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.

3.1.2. Aparatura

Za provedbu eksperimenata korištena je sljedeća aparatura:

- analitička vaga, Sartorius TE214-S0CE, Njemačka
- autoklav, InkoLab, Hrvatska
- centrifuga, EBA 8, Hettich, Njemačka
- centrifuga, Megafuge ST1 Plus Centrifuge Series, Thermo Fisher Scientific, SAD

- digestor, PC150960, Flores Valles, Španjolska
- homogenizator, MS2, Ika Works Inc., SAD
- liofilizator, FreeZone 1, Labconco Co., Kansas City, SAD
- pH metar, 914, Metrohm, Švicarska
- plinski kromatograf, Shimadzu GC-2014, Japan; s FID detektorom i Zebron ZB-Wax GC kapilarnom kolonom (dužina 30 m, ID 0,53 mm i debljina filma 1,00 μm) Phenomenex, SAD
- skenirajući elektronski mikroskop, Vega III Easyprobe, Tescan, Češka
- spektrofotometar, Libra S11, Biochrom, SAD
- termostat za kivete, Dri-Block DB 100/2, Techne, Ujedinjeno Kraljevstvo
- ultrazvučni homogenizator, Sonopuls HD 2200, Bandelin electronics, Njemačka
- uljna-vodena kupelj s integriranom miješalicom, HBR 4 digital, IKA-Werke, Njemačka
- vertikalna jedinica za elektroforezu, SE260 Mighty Small II Deluxe, Hoefer, SAD
- vodena kupelj s tresilicom, WNB 14, Memmert, Njemačka

3.1.3. Priprema otopina

- ***Priprema 0,5 mol/L natrij/kalij fosfatnog pufera pH 7***

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

- ***Priprema 50 mmol/L kalij/kalij fosfatnog pufer 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 dodavanjem fosfatne kiseline.

- ***Priprema 50 mmol/L natrij fosfatnog pufera pH 7***

Natrij fosfatni pufer pripremljen je otapanjem 7,744 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i 2,913 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ u 1 L destilirane vode. Željeni pH podešen je dodavanjem 1 mol/L NaOH.

- ***Priprema 1,5 mol/L TRIS pufera pH-vrijednosti 8,8***

Otopina 1,5 mol/L TRIS pufera pripremljena je otapanjem 9,09 g TRIS-a u 50 mL ultračiste vode te je pH otopine podešena dodatkom 1 mol/L otopine HCl.

- ***Priprema 0,5 mol/L TRIS pufer pH-vrijednosti 6,8***

Otopina 0,5 mol/L TRIS pufera pripravljena otapanjem 3,03 g TRIS-a u 50 mL ultračiste vode te je pH otopine podešana dodatkom 1 mol/L otopine HCl.

- ***Priprema pufera za provedbu elektroforeze***

Otopina pufera za provedbu elektroforeze pripravljena je otapanjem 30,285 g TRIS-a, 144,134 g glicina i 10,000 g SDS-a u 1 L ultračiste vode uz miješanje na magnetskoj miješalici pri 400 okr/min. Dobivena temeljna otopina pufera razrijeđena je 10 puta prije korištenja.

- ***Priprema pufera za uzorke***

Otopina pufera za uzorke pripravljena je miješanjem 1,25 mL 0,5 mol/L TRIS-a pH 6,8, 2,50 mL glicerola, 2,00 mL 10 %-tne vodene otopine SDS-a, 0,20 mL 10 %-tne vodene otopine BPB-a i 3,55 mL ultračiste vode.

- ***Priprema otopine elemenata u tragovima (SL-6 otopina)***

Otopina elemenata u tragovima pripravljena 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 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$.

- ***Priprema 40 %-tne vodene otopine fruktoze***

Otopina fruktoze pripravljena je otapanjem 20 g fruktoze u 50 mL ultračiste vode.

- ***Priprema 40 %-tne vodene otopine glicerola***

Otopina glicerola pripravljena je otapanjem 20 g glicerola u 50 mL ultračiste vode.

- ***Priprema 30 %-tne otopine akrilamida***

Otopina akrilamida pripravljena je otapanjem 8,7 g akrilamida i 0,3 g *N,N'*-metilbisakrilamida u 30 mL ultračiste vode uz miješanje na magnetskoj miješalici pri 400 okr/min te uz zagrijavanje (do $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$) do potpunog otapanja. Otopina je zatim profiltrirana korištenjem RC-45 filtera (CHROMAFIL Xtra jednokratni filter RC-45/13). Priprema otopine provedena je u digestoru.

- ***Priprema 10 %-tne otopine natrijevog dodecil sulfata (SDS)***

Otopina natrijevog dodecil sulfata pripravljena je otapanjem 0,1 g natrijevog dodecil sulfata u 1 mL ultračiste vode. Prilikom pripreme otopine voda je natrijevom dodecil sulfatu dodavana postepeno, kap po kap s pipetom ili kapaljkom, a otopinu nije preporučeno miješati radi jakog pjenjenja. Pripremljena otopina čuva se u hladnjaku na $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- ***Priprema 10 %-tne otopine amonijevog peroksodisulfat (APS)***

Otopina amonijevog peroksodisulfat pripravljena je otapanjem 0,1 g amonijevog peroksodisulfata u 1 mL ultračiste vode. Otopina se priprema neposredno prije upotrebe jer je vrlo nestabilna pri sobnoj temperaturi ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$), ali se može čuvati u hladnjaku ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) do 12 h nakon pripreme.

- ***Priprema 10 %-tne vodene otopine bromfenolplavo (BPB)***

Otopina bromfenolplavo pripravljena je otapanjem 0,1 g bromfenolplavog u 1 mL ultračiste vode.

- ***Priprema otopine za bojanje***

Otopina za bojanje pripravljena je otapanjem 0,1 g Commassie Brilliant Blue G-250 bojila u 50 mL metanola, 7 mL 10 %-tne otopine octene kiseline i 43 mL ultračiste vode.

- ***Priprema 3,5-dinitrosalicilna kiselina (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 $T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) te je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Reagens je čuvan u tamnoj boci.

- ***Priprema Bradfordovog reagensa***

U smjesi 50 mL 95 %-tnog etanola i 100 mL 85 %-tne ortofosforne kiseline otopljeno je 100 mg bojila Commassie Brilliant Blue G-250. Tako pripravljena otopina nadopunjena je ultračistom vodom do ukupnog volumena od 1 L. Dobiveni reagens je potom filtriran korištenjem RC-45 filtera (Chromafil Xtra RC-45/25 0,45 μm , Macherey-Nagel, Njemačka). Ovako pripravljena otopina čuvana je na $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, a prije upotrebe zagrijana je na sobnu temperaturu ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

- **Priprema gelova za elektroforezu**

Za provedbu elektroforeze potrebno je pripremiti gel za razdvajanje i gel za sabijanje. Gelovi su pripremljeni miješanjem određenih volumena pripremljenih otopina kao što je navedeno u Tablici 1.

Tablica 1. Volumeni otopina potrebni za pripremu gelova

Otopina	Gel za razdvajanje		Gel za sabijanje	
	-	V, mL	-	V, mL
H ₂ O	0,3350	3,350	0,6020	3,050
1,5 mol/L TRIS pH 8,8	0,2500	2,500	-	
0,5 mol/L TRIS pH 6,8	-	-	0,2470	1,250
Akrilamid 30 %	0,4000	4,000	0,1300	0,660
Natrijev dodecil sulfat (SDS) 10 %	0,0100	0,100	0,0099	0,050
Amonijev peroksidisulfat (APS) 10 %	0,0050	0,050	0,0099	0,050
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-stilendiamin	0,0005	0,007	0,0010	0,007

3.1.4. Priprema osnovnog medija za uzgoj bakterije *R. eutropha* H16

Za pripremu osnovnog medija za uzgoj bakterije pomiješano je 100 mL 10X H16 pufera i 850 mL ultračiste vode te je tako pripremljena otopina autoklavirana 15 min na 130 °C. U autoklaviranu smjesu zatim je dodano 10 mL 20 % (w/v) NH₄Cl (prethodno autoklavirana), 1 mL 20 % (w/v) MgSO₄·7 H₂O (prethodno autoklavirana otopina), 1 mL 1 % (w/v) CaCl₂·2 H₂O (prethodno autoklavirana otopina), 1 mL 0,5 % (w/v) FeCl₃·6 H₂O otopljenog u 0,1 mol/L HCl (prethodno sterilizirana filtracijom – 0,2 µm filtri, CHROMAFIL Xtra jednokratni filter RC-45/13), 1 mL 0,02 % (w/v) NiCl₂ (prethodno autoklavirana otopina) i 25 mL Sl-6 otopine elemenata u tragovima (prethodno autoklavirana).

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj bakterije *R. eutropha* H16

Za uzgoj bakterije *R. eutropha* H16 korištena su četiri medija:

- (i) FN medij (*engl.* Fructose–Nitrogen),
- (ii) FGN medij (*engl.* Fructose–Glycerol–Nitrogen),
- (iii) GN medij (*engl.* Glycerol–Nitrogen),
- (iv) GFN medij (*engl.* Glycerol–Fructose–Nitrogen).

Sva četiri medija pripravljena su miješanjem 200 mL osnovnog medija i različitih koncentracija glicerola i fruktoze (Tablica 2). Uzgoj je započeo dodavanjem stanica bakterije (1,5 % predkulture (v/v)). Tijekom uzgoja stanice su inkubirane na $T = 30\text{ °C}$ i 120 okr/min. Eksperimenti su provedeni u dvije paralele.

Tablica 2. Volumeni te početne koncentracije fruktoze i glicerola korištenih za provedbu uzgoja bakterije *R. eutropha* H16

Medij			V (fruktoza), mL	γ (fruktoza), g/L	V (glicerol), mL	γ (glicerol), g/L
FN	Eksperiment 1	Tikvica 1	2	4	-	-
		Tikvica 2				
FGN	Eksperiment 2	Tikvica 3	1	2	1	2
		Tikvica 4				
GN	Eksperiment 3	Tikvica 5	-	-	2	4
		Tikvica 6				
GFN	Eksperiment 4	Tikvica 7	0,5	1	2	4
		Tikvica 8				

Tijekom uzgoja kontinuirano je praćena koncentracija fruktoze i glicerola u podlozi kao i pH. Osim toga, mjerena je optička gustoća stanica na 436 nm i 600 nm. Kada su stanice ušle u stacionarnu fazu rasta (optička gustoća se nije mijenjala s vremenom) uzgoj je prekinut. Stanice su odvojene od podloge centrifugiranjem (4300 okr/min, 4 °C, 20 min). Nakon centrifugiranja, tekući medij za uzgoj je uklonjen, a talog/stanice ispran s 50 mmol/L kalij/kalij fosfatnim puferom pH 7. Stanice su pohranjene na $T = -4\text{ °C}$ do provedbe daljnjih analiza.

3.2.2. Ultrazvučno razbijanje suspenzije stanica

Nakon uzgoja i odvajanja stanica provedena je optimizacija ultrazvučnog razbijanja suspenzije stanica. Provedeno je 17 eksperimenata pri čemu je ispitan utjecaj amplitude ultrazvuka, vremena razbijanja i koncentracije stanica (Tablica 3). Stanice su u zadanim koncentracijama resuspendirane u 2 mL 50 mmol/L kalij/kalij fosfatnog pufera. Nakon izlaganja ultrazvuku supernatant je odvojen centrifugiranjem (6000 okr/min, 25 °C, 10 min). Za određivanje koncentracije proteina u dobivenim uzorcima korišten je linearizirani Bradford test.

Tablica 3. Eksperimentalni uvjeti provedbe ultrazvučnog razbijanja stanica

Pokus	Amplituda, %	<i>t</i>, min	γ(stanica), mg/mL
1	40	10	2
2	70	10	2
3	40	30	2
4	70	30	2
5	40	20	1
6	70	20	1
7	40	20	3
8	70	20	3
9	55	10	1
10	55	30	1
11	55	10	3
12	55	30	3
13	55	20	2
14	55	20	2
15	55	20	2
16	55	20	2
17	55	20	2

3.2.3. Mjerenje optičke gustoće i određivanje koncentracije biomase

Mjerenje optičke gustoće uzoraka tijekom uzgoja stanica provedeno je mjerenjem apsorbancije na valnim duljinama $\lambda = 436 \text{ nm}$ i $\lambda = 600 \text{ nm}$.

Nakon završetka uzgoja, koncentracija biomase određena je gravimetrijskom metodom i potom korelirana s izmjerenim optičkim gustoćama. Dobivene su sljedeće jednadžbe pravaca:

- eksperiment 1: $\gamma = 8 \cdot \text{OD}_{436(\text{ili } 600)}$,
- eksperiment 2: $\gamma = 7,8049 \cdot \text{OD}_{436(\text{ili } 600)}$,
- eksperiment 3: $\gamma = 6,266 \cdot \text{OD}_{436(\text{ili } 600)}$ i
- eksperiment 4: $\gamma = 4,386 \cdot \text{OD}_{436(\text{ili } 600)}$.

Koncentracija biomase za svaki eksperiment izračunata je pomoću odgovarajućih jednadžbi pravaca.

3.2.4. Određivanje koncentracije fruktoze

Za određivanje koncentracije fruktoze u uzorku bilo je potrebno izraditi baždarni dijagram za fruktozu. Za izradu baždarnog dijagrama korištena je standardna otopina fruktoze koncentracije 5,550 mmol/L koja je zatim razrijeđena u *Eppendorf* epruvetama na šest otopina koncentracija u rasponu od 0,173 – 5,550 mmol/L. U epruvetu je dodano 1,2 mL DNS reagensa, 0,4 mL otopine fruktoze i 0,4 mL destilirane vode. Smjesa je zagrijavana 15 minuta u termostatu za kivete na 100 °C te je zatim ohlađena u hladnoj vodenoj kupelji na sobnoj temperaturi ($T = 25 \text{ °C}$) tijekom 15 minuta. Nakon što se uzorak ohladio, izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini $\lambda = 757 \text{ nm}$. Na temelju dobivenih apsorbancija i pripadajućih koncentracija izrađen je baždarni pravac (Prilog 1.) pomoću kojeg su određene koncentracije fruktoze u nepoznatim uzorcima. Prije određivanja koncentracije uzorci su profiltrirani korištenjem H-PTFE-20 filtera (CHROMAFIL Xtra H-PTFE-20/25, Macherey-Nagel, Njemačka).

3.2.5. Određivanje koncentracije glicerola

Koncentracija glicerola određena je na kromatografu s FID detektorom i kapilarnom kolonom (dužina 30 m, unutarnji promjer 0,53 mm i debljina filma 1,00 μm). Kolona se zagrijava brzinom od 5 °C/min počevši s temperaturom 180 °C uz završetak na 230 °C, dok FID detektor radi na 240 °C. Ukupno trajanje analize za svaki uzorak je 15 min, a kao plin nosilac korišten je dušik čiji je protok 1,97 mL/min. Uzorci za analizu razrijeđeni su 100 puta kako bi

koncentracije bile u području baždarnih dijagrama, a kao otapalo za pripremu uzoraka korišten je etanol. Nakon homogenizacije, uzorak je filtriran, prenesen u vijale i analiziran u triplikatima. Vremena zadržavanja za glicerol je iznosilo 9,02 min, a koncentracija glicerola u uzorcima određene su na temelju baždarnih dijagrama (Prilog 2.).

3.2.6. Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina korišten je linearizirani Bradford test. Linearizirani Bradford test temelji se na vezanju boje Commassie Brilliant Blue G-250 sadržane u reagensu na proteine te je vrlo brz, jednostavan i osjetljiv. Linearno područje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina u baždarnom dijagramu pojavljuje se u vrlo uskom rasponu koncentracija, od 2-10 mg/L, što može stvarati probleme tijekom analize. Iz tog razloga korišteni Bradfordov test je modificiran, odnosno lineariziran prema protokolu opisanom u radu Ernst i sur. [63].

Baždarni dijagram izrađen je korištenjem vodene otopine goveđeg serumskog albumina (BSA) koncentracije 1 mg/mL, što odgovara apsorbanciji od 0,660 pri valnoj duljini od $\lambda = 280$ nm. Nakon pripreme otopine BSA apsorbancija je izmjerena u kvarcnoj kivetu. Otopina je potom razrijeđena 10 puta, te je dobivena temeljna otopina koncentracije 0,1 mg/mL. Zatim je u kivetama pripremljeno 500 μ L otopina koncentracije BSA od 0, 1, 5, 10, 15, 20 mg/L te je u svaku kivetu dodano 500 μ L Bradford reagensa s razmakom od 10 sekundi. Kiveta je homogeniziran par sekundi nakon dodavanja reagensa i nakon 10 minuta spektrofotometrijski je izmjerena apsorbancija pri valnim duljinama od $\lambda = 595$ nm i $\lambda = 450$ nm. Za sve uzorke napravljena su tri paralelna mjerenja. Na temelju dobivenih apsorbancija i pripadajućih koncentracija izrađen je baždarni pravac (Prilog 3.) pomoću kojeg su određene koncentracije proteina u uzorcima nakon provedenog ultrazvučnog razbijanja stanica.

3.2.7. Mjerenje aktivnosti enzima glukoza hidrogenaza

Aktivnost enzima hidrogenaza mjerena je spektrofotometrijski pri $\lambda = 340$ nm mjerenjem promjene apsorbancije NADH. Za test je bilo potrebno u kvarcnu kivetu otpipetirati 1 mL 50 mmol/L natrij fosfatnog pufera pH 7 u koji je potom dodano 100 μ L NADH (2 mmol/L). Otopina je potom propuhana s vodikom 5-10 min nakon čega je u dotopinu dodano 100 μ L enzima. Promjena apsorbancije u vremenskom razdoblju od 60 s praćena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini $\lambda = 340$ nm. Iz promjene apsorbancije u vremenu

računaju se volumna (Jednadžba (11)) i specifična (Jednadžba (12)) aktivnost enzima hidrogenaza.

$$V. A. = \frac{V_r}{\epsilon_{340} \cdot d \cdot V_{Hyd}} \cdot \frac{dA}{dt} \quad (11)$$

$$S. A. = \frac{V. A.}{\gamma_{Hid}} \quad (12)$$

gdje je V. A. volumna aktivnost enzima hidrogenaza [U/mL], V_r ukupni volumen uzorka [mL], V_E volumen enzima hidrogenaza. dodanog u uzorak [mL], d je promjer kivete [cm], ϵ_{340} je molarni ekstinkcijski koeficijent NADH [6,22 mL/(μ mol \cdot cm)], dA/dt je promjena apsorbancije u vremenu [1/min], S. A. specifična aktivnost enzima hidrogenaza [U/mg], a γ_{Hid} koncentracija enzima hidrogenaza [mg/mL].

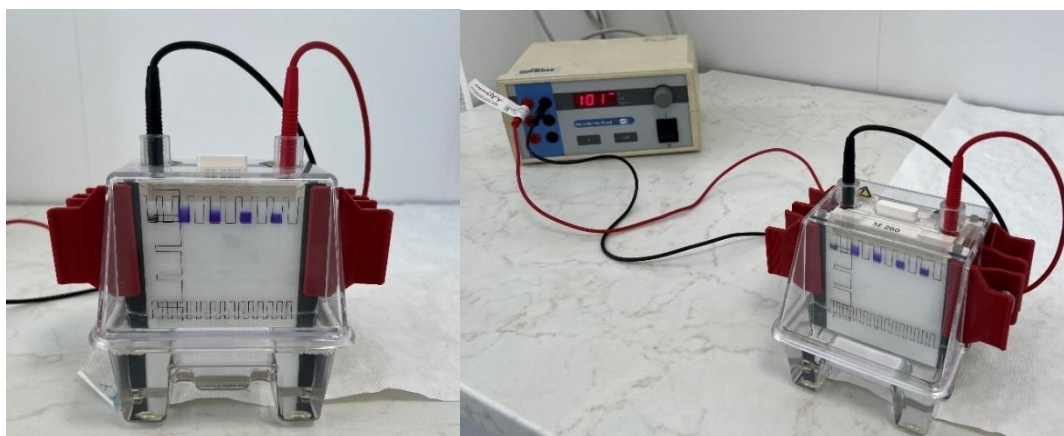
Volumna aktivnost je izražena u međunarodnoj jedinici enzimatske aktivnosti U po jedinici volumena pri čemu je 1 U = 1 μ mol/min, odnosno 1 U enzima će oksidirati 1 μ mol vodika po minuti pri pH 7 u prisutnosti NADH.

3.2.8. Elektroforeza

Nakon pripreme otopina sastavljena je jedinica za elektroforezu, pomoću koje se najprije pripremaju gelovi. Između stakla koji se postavljaju na držače kao sendvič najprije je pipetom nanesen gel za razdvajanje do približno 3 cm ispod ruba stakla. Gel za razdvajanje ostavljen je da polimerizira oko 30 minuta, nakon čega je nanesen gel za sabijanje do vrha stakla te se u njega uranja češljic koji stvara jažice u koje se kasnije nanose uzorci proteina. Prostor iznad gela, uključujući jažice, napunjen je puferom za provedbu elektroforeze. Pufer za provedbu elektroforeze dodaje se i u komoru za pufer i to približno 75 mL po jednoj komori.

U digestoru je miješanjem 950 μ L pufera za uzorke i 5 μ L β -merkaptetanola pripremljena otopina potrebna za pripremu uzoraka. Uzorak enzima pomiješan je s pripremljenom otopinom u omjeru 1:1 (10 μ L uzorka + 10 μ L otopine). Uzorci enzima centrifugirani su 1 min, zatim su stavljeni 10 min u sušionik na 95 °C, te ponovno centrifugirani 1 min. Tako pripremljeni uzorci spremni su za punjenje jažica.

Prva jažica napunjena je s 5 μL page rulera-a, a ostale s 10 μL uzorka pomoću injekcijske igle. Nakon što su jažice napunjene sa svim uzorcima, donja komora za pufer napunjena je s približno 250 mL pufera za provedbu elektroforeze. Jedinica za elektroforezu zatvorena je poklopcem i priključena na izvor istosmjerne struje (Slika 9.). Prvih 10 minuta elektroforeza gelova se provodi pri konstantnom naponu od 100 V, a nakon toga pri naponu od 200 V. Elektroforeza se provodi približno 45 minuta, odnosno sve dok se crta s uzorcima nije spustila skoro do dna stakalaca. Nakon završetka elektroforeze, gel se odvajava od stakalaca te se provodi njegovo bojanje. Bojanje se provodi u digestoru u kojem je orbitalna tresilica namještena na 100 okr/min. Uzorak se uroni u otopinu za bojanje u kojoj se boji 1 h. Nakon završetka bojanja gela, isti je potrebno odbojati. Gel se odbojava u 10 %-tnoj otopini octene kiseline na način da prekrije cjelokupnu površinu gela. Pri istim uvjetima korištenim pri bojanju, uzorak je ostavljen na tresilici da se odbojava 1 h, uz izmjenu 10 %-tne octene kiseline.



Slika 9. Aparatura za provedbu elektroforeze

3.2.9. Morfološka analiza uzorka

Za provedbu analize morfologije stanica korišten je skenirajući elektronski mikroskop (engl. *Scanning Electron Microscope*, SEM). Uzorci stanica prvo su hlađeni u zamrzivaču na temperaturi od $T = -69\text{ }^{\circ}\text{C}$, a zatim su sušeni u liofilizatoru 72 h pri temperaturi od $T = -45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ustaljeni tlak iznosio je 0,04 mbar. Prije snimanja na SEM-u, uzorci su premazani konduktivnim slojem zlata/platine uronjenjem u argon plazmu; uzorci iz eksperimenta 3 bili su premazivani 90 s, dok su uzorci iz eksperimenata 1, 2 i 4 premazivani 150 s. Analiza uzoraka provedena je pri povećanjima od 667x, 2000x, 6670x i 10000x. Uz SEM korišten je sekundarni detektor elektrona (SE) uz napon od 10 kV.

3.2.10. Obrada podataka

Osnovna statistička analiza koja je uključivala proračun srednjih vrijednosti i standardnih devijacija provedena je u programskom paketu Statistica 14.0 (Tibco Software Inc., SAD).

U svrhu optimizacije procesa ekstrakcije proteina, provedeni su pokusi ultrazvučnog razbijanja stanica kako je opisano u poglavlju 3.2.2., prema Box-Behnken dizajnu eksperimenta. Ispitan je utjecaj amplitude ultrazvuka, vremena razbijanja i koncentracije stanica na koncentraciju proteina. Veza između ulazni varijabli i koncentracije proteina opisana je polinomom drugog stupnja. (Jednadžba (9)). Parametri modela polinoma drugog stupnja procijenjeni su primjenom Levenberg-Marquardtova algoritama implementiranog u programskom paketu Statistica 14.0 (Tibco Software Inc., SAD). Algoritam traži numerička rješenja u prostoru parametara funkcije koristeći metodu najmanjih kvadrata. Procjena vrijednosti parametra modela polinoma drugog stupnja je provedena u 50 iteracija s parametrom konvergencije 10^{-6} i 95 %-tnim intervalom pouzadnosti [64].

Optimalni uvjeti procesa ekstrakcije procijeni su primjenom funkcije poželjnosti na temelju modela odzivne površine u programskom paketu Statistica 14.0 (Tibco Software Inc., SAD). Primijenjena je skala poželjnosti u rasponu od 0 (nepoželjno) do 1 (vrlo poželjno).

4. REZULTATI I RASPRAVA

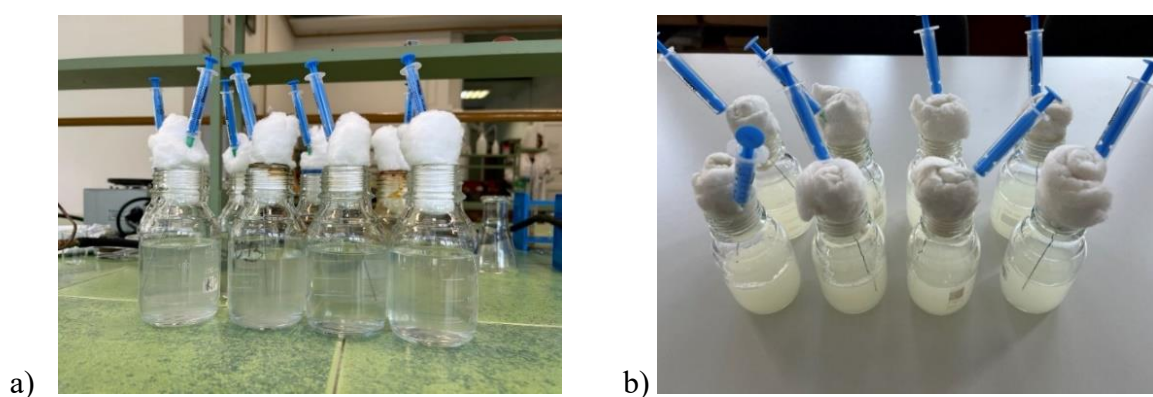
U ovom radu proveden je uzgoj bakterije *R. eutropha* H16 na različitim izvorima ugljika (fruktoza i glicerol). Tijekom uzgoja praćena je promjena koncentracije biomase, fruktoze, glicerola i pH. Nakon uzgoja, provedena je morfološka karakterizacija površine stanica korištenjem SEM-a kako bi se ispitaio utjecaj uzgoja na izgled stanica. Na temelju provedenih analiza i dobivenih rezultata, za daljnji rad odabran je medij koji je sadržavao 4 g/L fruktoze jer je uzgojem na toj podlozi dobivena najveća koncentracija biomase. Nakon što je definiran najbolji sintetski medij za uzgoj, provedena je optimizacija ultrazvučnog razbijanja stanica korištenjem Box-Behnken dizajna eksperimenta s tri varijable (amplituda ultrazvuka, koncentracija stanica i vrijeme razbijanja) na tri razine s ciljem oslobađanja što veće koncentracije proteina. Pri optimalnim uvjetima procesa uzgoja i razbijanja stanica postignut je sadržaj proteina od 80 % ukupne mase suhih stanica. Na kraju, pomoću gel elektroforeze, provedena je analiza sirovog ekstrakta, kako bi se provjerila prisutnost enzima hidrogenaza.

4.1. Uzgoj bakterijske kulture *R. eutropha* H16

Prema literaturi, različiti izvori ugljika, kao što su šećeri, masne kiseline, aminokiseline, alkoholi i aromatski spojevi [65], kao i jeftini izvori ugljika, npr. organski otpad [66, 67], mogu se koristiti za heterotrofni rast/uzgoj bakterije *R. eutropha* H16 [68, 69]. Među organskim otpadom posebno se ističu glicerol [70], nusprodukt proizvodnje biodizela, te lignocelulozna biomasa [71]. Hidrolizom lignocelulozne biomase dobiva se sirovina bogata pentoznim i heksoznim šećerima, kiselinama, aromatskim spojevima, kao i (mikro)elementima, kao što su natrij, kalij, kalcij, magnezij, željezo, mangan, bakar, cink, aluminijski, barij, stroncij, fosfor, sumpor, krom i silicij [72, 73]. Sve to čini lignocelulozu vrlo bogatim supstratom. Ipak, u svom radu, Judger i sur. [74], navode da su za proizvodnju enzima hidrogenaza iz bakterije *R. eutropha* H16 najbolji mediji koji sadrže fruktozu i glicerol. Korištenjem ovih supstrata osiguravaju se optimalni uvjeti za sintezu enzima hidrogenaza [75]. Naime, fruktoza se uglavnom prenosi u stanicu putem ABC transportera (membranski proteini) [69], te se katabolizira Entner–Doudoroffovim putem. Glicerol u stanice ulazi putem olakšane difuzije. Podržava vrlo spor rast *R. eutropha* H16, koji, međutim, dovodi do jake ekspresije gena za hidrogenazu i enzime Calvin–Benson–Basshama (CBB) ciklusa [66, 67].

Stoga je, na temelju literaturnih podataka, uzgoj bakterijske kulture *R. eutropha* H16 proveden na sintetskim medijima s fruktozom, glicerolom i dušikom na laboratorijskoj tresilici

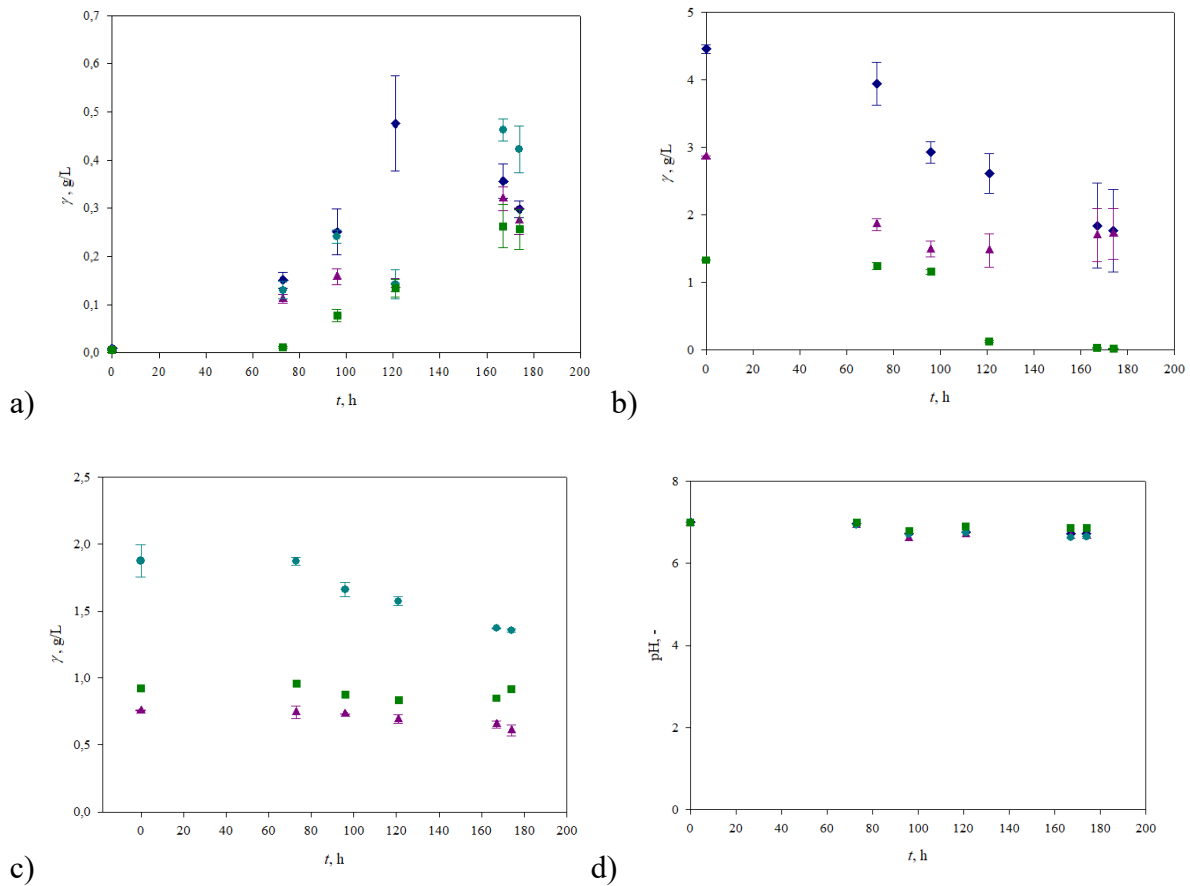
pri $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, a cijeli proces praćen je 174 h. Kao što je već ranije spomenuto u Tablici 2, uzgoj je proveden u osam tikvica, tj. provedena su četiri eksperimenta u dvije paralele s različitim početnim koncentracijama fruktoze, odnosno glicerola u hranjivoj podlozi. Ove promjene u početnim koncentracijama i vrstama supstrata omogućile su istraživanje utjecaja različitih uvjeta na rast bakterijske kulture *R. eutropha* H16. Kako bi se osiguralo kontinuirano praćenje rasta, uzorkovanje se provodilo približno svakih 24 h. Tijekom uzgoja, osim koncentracije supstrata, pažljivo je praćena koncentracija biomase. Na ovaj način bilo je moguće precizno pratiti dinamiku rasta *R. eutropha* H16, čime su dobiveni vrijedni podaci o učinku fruktoze i glicerola kao izvora ugljika. Na Slici 10 prikazane su boce prije i nakon završetka uzgoja, što vizualno ilustrira razlike u biomasi nastale tijekom eksperimenta.



Slika 10. Usporedba medija za kultivaciju a) prije i b) nakon uzgoja

Na Slici 11a prikazana je promjena koncentracije biomase u ovisnosti o vremenu trajanja uzgoja. Najveća postignuta koncentracija biomase iznosila je $0,476 \pm 0,099\text{ g/L}$, a dobivena je u eksperimentu 1, gdje je hranjivoj podlozi dodana otopina fruktoze u koncentraciji 4 g/L . U eksperimentu 3 ovog istraživanja, u kojem je hranjivoj podlozi dodana otopina glicerola u koncentraciji 4 g/L , dobivena je nešto manja koncentracija biomase od $0,462 \pm 0,022\text{ g/L}$. Zatim je ispitan uzgoj na dva supstrata, u eksperimentu 2, gdje je u hranjivu podlogu dodana otopina fruktoze u koncentraciji 2 g/L i otopina glicerola u koncentraciji od 2 g/L , dobivena je koncentracija biomase od $0,320 \pm 0,025\text{ g/L}$. Najmanji prinos koncentracije biomase od $0,263 \pm 0,045\text{ g/L}$ dobiven je eksperimentom 4, u kojem je hranjivoj podlozi dodana otopina fruktoze u koncentraciji od 1 g/L i otopina glicerola u koncentraciji od 4 g/L . Konačne koncentracije biomase dobivene u ovom istraživanju, razlikuju se od rezultata koje su opisali Poladyan i sur. [76]. Spomenuti autori dobili su značajno veće količine biomase, a osim toga,

zaključuju da je najbolji medij za uzgoj FNG medij koji osigurava bolji rast zbog prisutnosti oba izvora ugljika. Razlika u dobivenim rezultatima je vjerojatno posljedica različitih uvjeta uzgoja i prilagodbi bakterije na izvore ugljika, te se iz njih može zaključiti koliko je važna optimizacija uvjeta uzgoja i specifičnost genotipskih varijacija sojeva *R. eutropha* H16 korištenih u istraživanjima.



Slika 11. Promjena koncentracije a) biomase, b) fruktoze, c) glicerola i d) pH tijekom uzgoja bakterije *R. eutropha* H16

(◆ **Eksperiment 1** – $\gamma_{\text{fruktoza},0} = 4 \text{ g/L}$, ▲ **Eksperiment 2** – $\gamma_{\text{fruktoza},0} = 2 \text{ g/L}$ i $\gamma_{\text{glicerol},0} = 2 \text{ g/L}$,

● **Eksperiment 3** – $\gamma_{\text{glicerol},0} = 4 \text{ g/L}$, ■ **Eksperiment 4** – $\gamma_{\text{fruktoza},0} = 1 \text{ g/L}$ i $\gamma_{\text{glicerol},0} = 4 \text{ g/L}$)

Na Slici 11b prikazana je promjena koncentracije fruktoze u ovisnosti o trajanju uzgoja. U eksperimentu 1, najintenzivniji rast biomase zabilježen je između 96. i 121. sata, što se podudara s potrošnjom fruktoze. U eksperimentu 2, najintenzivniji rast biomase uočen je između 121. i 167. sata, dok potrošnja fruktoze postepeno raste tijekom cijelog uzgoja. U eksperimentu 4, najintenzivniji rast biomase primijećen je između 121. i 167. sata, što se također podudara s velikom potrošnjom fruktoze. Kao što je već napomenuto, prema literaturi [65, 67], za proizvodnju enzima hidrogenaza iz bakterije *R. eutropha* H16 najbolji su mediji koji sadrže fruktozu i glicerol pa je i rast na ovim podlogama bio očekivan.

Na Slici 11c prikazana je promjena koncentracije glicerola u ovisnosti o trajanju uzgoja. U eksperimentu 2, najintenzivniji rast biomase zabilježen je između 121. i 167. sata, dok potrošnja glicerola neznatno raste tijekom uzgoja. U eksperimentu 3, porast potrošnje glicerola započinje nakon 73. sata, što se podudara s bržim rastom biomase. U eksperimentu 4, također nakon 73. sata, dolazi do povećanja potrošnje glicerola, što se može povezati s konstantnim porastom koncentracije biomase tijekom uzgoja.

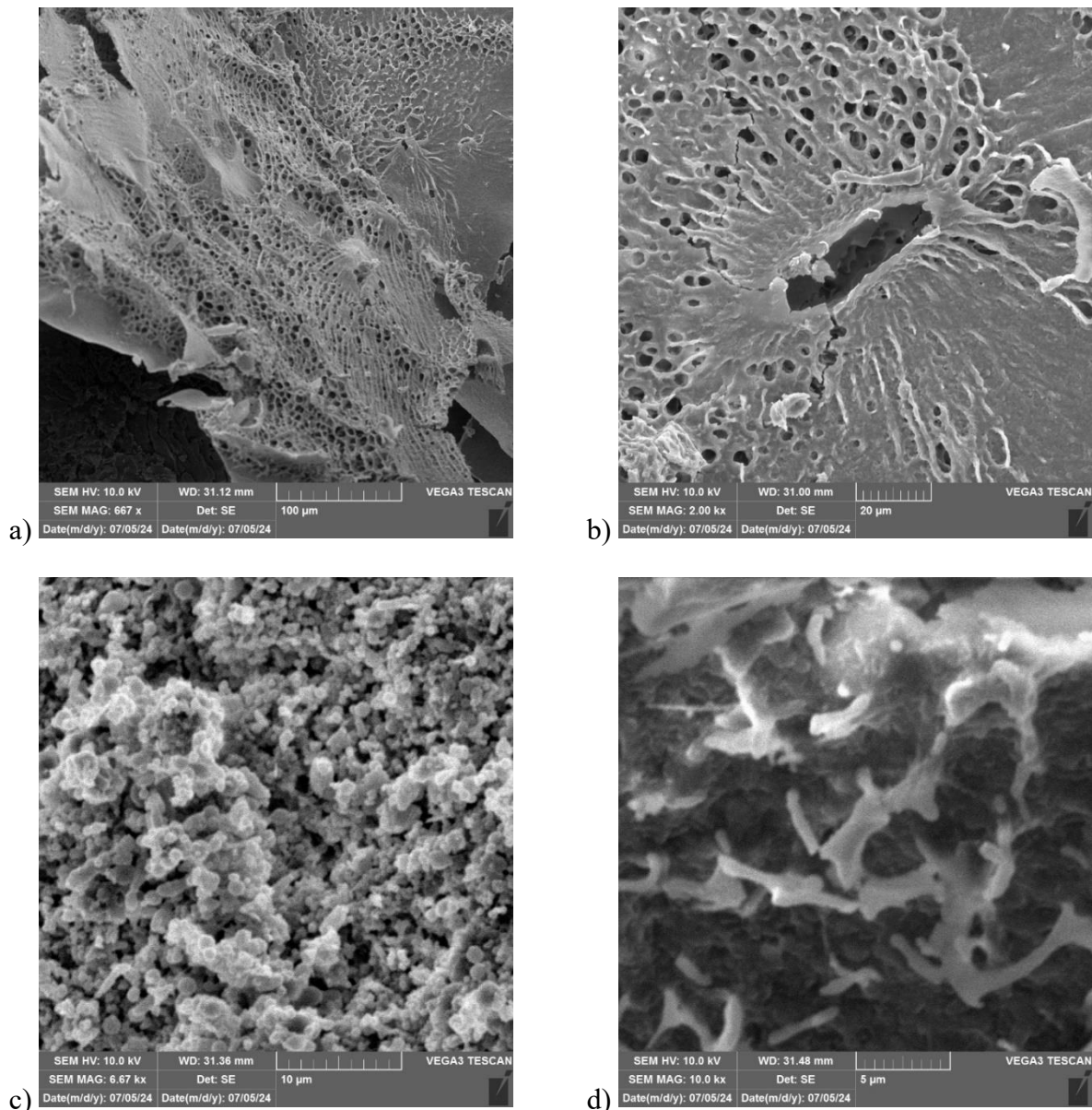
Na Slici 11d prikazana je promjena pH vrijednosti u ovisnosti o trajanju uzgoja. Tijekom uzgoja nije zabilježena značajna promjena pH vrijednosti, što je potvrđeno rezultatima prijašnjih istraživanja koje su opisali Poladyan i sur. [76] i Iskandaryan i sur. [77]. U eksperimentu 2 zabilježen je pad pH vrijednosti od 0,32 jedinica, dok je u eksperimentu 1 pad iznosio 0,23 jedinica. U oba eksperimenta došlo je do neznatnog pada pH vrijednosti nakon 73. sata uzgoja, a porast pH vrijednosti uočen je nakon 145. sata. Razlog promjene pH vrijednosti može biti proizvodnja različitih metaboličkih nusprodukata, što može utjecati na rast bakterije stoga je veoma bitno tijekom uzgoja održavati pH vrijednost stabilnom. U eksperimentu 3 zabilježen je manji pad pH vrijednosti od 0,22 jedinica, dok je u eksperimentu 4 pad iznosio 0,19 jedinica. Nakon pada vrijednosti u ta dva eksperimenta, pH je bio stabilan do kraja provedbe pokusa.

4.2.Morfološka analiza uzorka

Kako bi se ispitaio utjecaj uzgoja na izgled stanica, provedena je morfološka karakterizacija površinski uzgojenih stanica korištenjem elektronskog mikroskopa.

Na Slici 12 prikazana su četiri mikrofotograma pri različitim uvećanjima pružajući uvid u morfološke karakteristike stanica bakterija. Kao što se može uočiti, mnoge stanice nisu zadržale svoju strukturu; došlo je do pucanja stanične stijenke, odnosno do oštećenja

staničnih membrana i gubitka staničnog integriteta. Prisutnost većih kanala i pukotina, velikih pora te granulirana površina koja ukazuje na stvaranje biofilma, mogu biti posljedica ulaska u fazu odumiranja. Ova faza, koja je zabilježena i u literaturi Flemming i sur. [78] te Jeremy i sur. [79], nije detektirana radi metodologije određivanja biomase koja se temelji na mjerenju optičke gustoće, a ne živih stanica. Alternativno, ova pojava može biti i rezultat nedovoljnog miješanja tijekom uzgoja, pri čemu su bakterije formirale biofilm, tj. nisu rastle kao zasebne kolonije.



Slika 12. SEM analiza površinske strukture bakterije *R. eutropha* H16 pri različitim uvećanjima: a) uvećanje – 667x, veličina skale – 100 μm; b) uvećanje – 2000x, veličina skale – 20 μm; c) uvećanje – 6670x, veličina skale – 10 μm; d) uvećanje – 10000x, veličina skale – 5 μm

4.3. Ultrazvučno razbijanje stanica

Nakon uzgoja stanica, provedeno je njihovo razbijanje. Kao što je rečeno u teorijskom dijelu, razbijanje stanica omogućava pristup intracelularnim komponentama, poput proteina, nukleinskih kiselina i drugih biomolekula koje su bitne za mnoge procese. Učinkovito razbijanje stanica mora biti dobro kontrolirano kako bi se izbjegla degradacija molekula i kako bi se maksimizirala njihova izolacija. Metode razbijanja stanica moguće je podijeliti u tri glavne skupine: mehaničke, fizikalne te kemijske i enzimatske metode. Prema Gomez i sur. [80] zbog svoje jednostavnosti, učinkovitosti i mogućnosti primijene za različite tipove stanica uključujući bakterije, kvasce te životinjske i biljne stanice, najčešće korištene metode su mehaničke metode. Jedna od mehaničkih metoda je i razbijanje stanica upotrebom ultrazvuka. Korištenje ultrazvuka, u razbijanju stanica ima brojne prednosti, osobito kada je cilj izolacija proteina. Ultrazvuk koristi visoko-frekventne zvučne valove za stvaranje mikromjehurića u tekućini, koji se zatim urušavaju kroz proces poznat kao kavitacija. Ovaj proces stvara visoko-energijske udare koji učinkovito razbijaju stanične membrane, oslobađajući proteine i druge biomolekule. Jedna od glavnih prednosti ultrazvučnog razbijanja je njezina učinkovitost. Proces je vrlo brz i obično traje samo nekoliko minuta, što minimizira izlaganje proteina nepovoljnim uvjetima kao što su promjene temperature ili pH. Osim toga, ultrazvučno razbijanje omogućuje preciznu kontrolu nad intenzitetom i trajanjem procesa, što pomaže u optimizaciji uvjeta za specifične vrste stanica i proteina, čime se smanjuje rizik od denaturacije ili degradacije proteina. Ultrazvučno razbijanje stanica također rezultira visokim prinosima proteina, što je osobito korisno kada su proteini prisutni u niskim koncentracijama. Još jedna značajna prednost ultrazvuka je ta što ne zahtijeva dodavanje kemikalija ili enzima, čime se smanjuje rizik od kontaminacije uzoraka i omogućava dobivanje čistih proteina [55].

Zbog svega navedenog, u ovom istraživanju, korištenjem ultrazvuka, razbijene su stanice bakterije *R. eutropha* H16. Kako bi se u procesu postigla maksimalna učinkovitost, analiziran je utjecaj amplitude ultrazvuka, vremena razbijanja i koncentracije stanica na temelju Box-Behnken dizajna eksperimenta s tri spomenute varijable na tri razine (Tablica 3). Nakon provedbe eksperimenata ultrazvučnog razbijanja stanica svi uzorci analizirani te su dobiveni rezultati koncentracije proteina prikazani u Tablici 4.

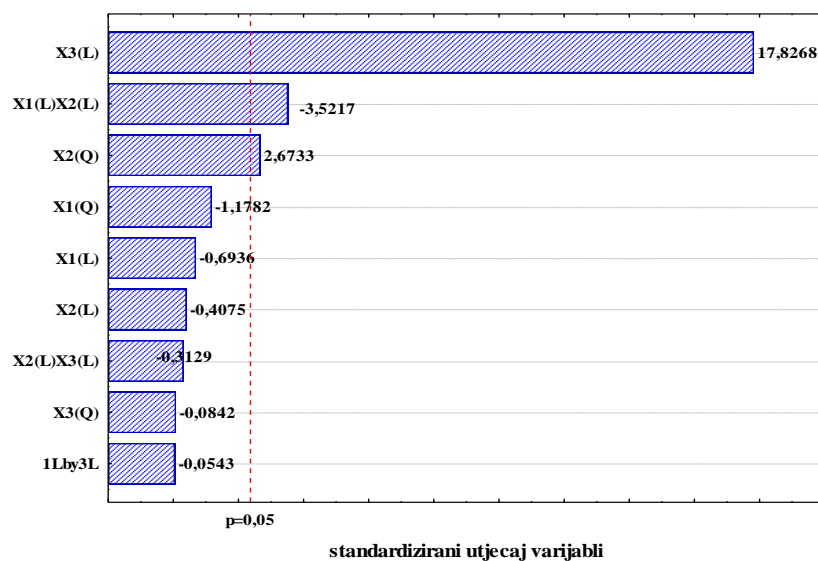
Tablica 4. Rezultati ultrazvučnog razbijanja stanica u točkama eksperimentalnog plana prema Box-Behnken dizajnu

Pokus	Amplituda, %	<i>t</i>, min	γ(stanica), mg/mL	γ(proteina), mg/mL
1	40	10	2	1,510 ± 0,091
2	70	10	2	1,783 ± 0,341
3	40	30	2	1,814 ± 0,256
4	70	30	2	1,150 ± 0,286
5	40	20	1	0,799 ± 0,152
6	70	20	1	0,871 ± 0,246
7	40	20	3	2,623 ± 0,246
8	70	20	3	2,680 ± 0,166
9	55	10	1	0,659 ± 0,016
10	55	30	1	0,789 ± 0,258
11	55	10	3	2,239 ± 0,124
12	55	30	3	2,285 ± 0,402
13	55	20	2	1,741 ± 0,340
14	55	20	2	1,714 ± 0,419
15	55	20	2	1,638 ± 0,412
16	55	20	2	1,562 ± 0,472
17	55	20	2	1,651 ± 0,284

Analiza rezultata dobivenih prema Box-Behnken dizajnu provedena je u programskom paketu Statistica 14.0. Analizom su određeni koeficijenti modela koji opisuje utjecaj ulaznih varijabli (X_1 – amplituda ultrazvuka, X_2 – vrijeme razbijanja i X_3 – koncentracija stanica) na odzivnu varijablu (učinkovitost ekstrakcije proteina). Za opisivanje utjecaja odabranih procesnih veličina na učinkovitost ekstrakcije odabran je polinom drugog reda kojim su opisani linearni i kvadratni utjecaji pojedine varijable te njihova međusobna ovisnost. Provedena je statistička analiza vrijednosti dobivenih eksperimentom i vrijednosti dobivenih simulacijom modela kako bi se mogla provesti ocjena valjanosti definiranog polinomnog modela te ga upotrijebiti za određivanje optimuma procesa.

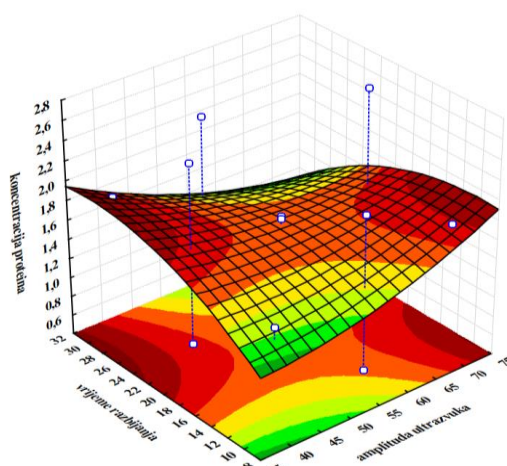
Kao kriterij ocjene utjecaja svake od ispitivanih veličina i njihovih interakcija na učinkovitost ekstrakcije proteina korištene su P -vrijednosti. P -vrijednosti koje su veće u 0,05 ukazuju na to da analizirana procesna veličina ili interakcija nema značajan utjecaj na proces, te ih se stoga može zanemariti u daljnjim analizama. Vrijednost $Xn(L)$ se odnosi na linearni član, a $Xn(Q)$ se odnosi na kvadratni član.

Na Slici 13 prikazana je dobivena analiza ispitivanih procesnih veličina na učinkovitost ekstrakcije proteina. Može se zaključiti kako značajan utjecaj na učinkovitost ekstrakcije imaju amplituda ultrazvuka ($X1(Q)$), vrijeme razbijanja ($X2(Q)$) i interakcija između amplitude ultrazvuka i vremena razbijanja ($X1(L)X2(L)$). Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako nemaju sve analizirane veličine procesa pozitivan utjecaj na ekstrakciju proteina. Pozitivna vrijednost utjecaja označava povećanje te veličine dovodi do povećanja učinkovitosti ekstrakcije. Negativna vrijednost utjecaja rezultira smanjenjem učinkovitosti ekstrakcije.

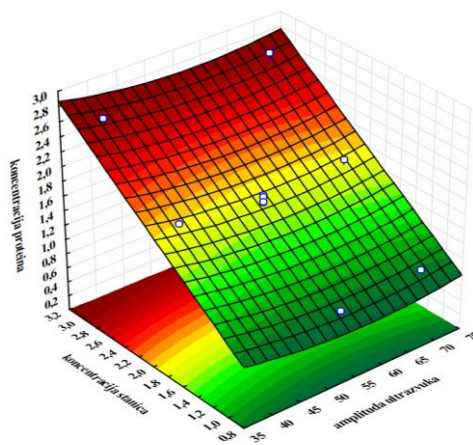


Slika 13. Analiza utjecaja ispitivanih procesnih veličina na učinkovitost ekstrakcije proteina

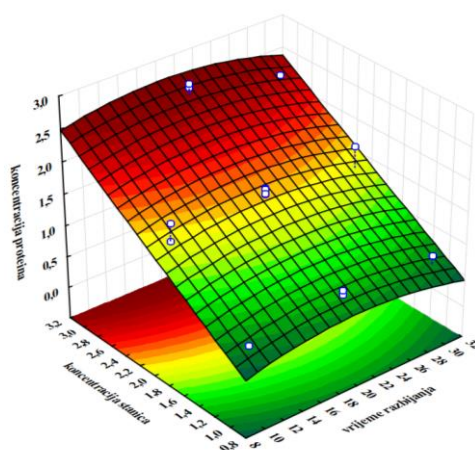
Slika 14 prikazuje trodimenzionalne (3D) grafove odnosa između ulaznih i izlaznih varijabli. Ovi grafovi daju nam mogućnost analize utjecaja različitih ulaznih varijabli (amplitude ultrazvuka, vremena razbijanja i koncentracije stanica) na konačni ishod, odnosno koncentraciju proteina. Različite boje na grafovima predstavljaju različite nivoe koncentracije proteina, gdje crvena predstavlja višu koncentraciju, a zelena nižu koncentraciju. Slika 14– a) prikazuje ovisnost koncentracije proteina o vremenu razbijanja i amplitudi ultrazvuka; analizira se kako promjena vremena razbijanja i amplitude ultrazvuka utječe na koncentraciju proteina. Slika 14 – b) prikazuje ovisnost koncentracije proteina o koncentraciji stanica i amplitudi ultrazvuka; analizira se kako promjena koncentracije stanica i amplitude ultrazvuka utječe na koncentraciju proteina. Slika 14 – c) prikazuje ovisnost koncentracije proteina o koncentraciji stanica i vremenu razbijanja; analizira se kako promjena koncentracije stanica i vremena razbijanja utječe na koncentraciju proteina.



a)



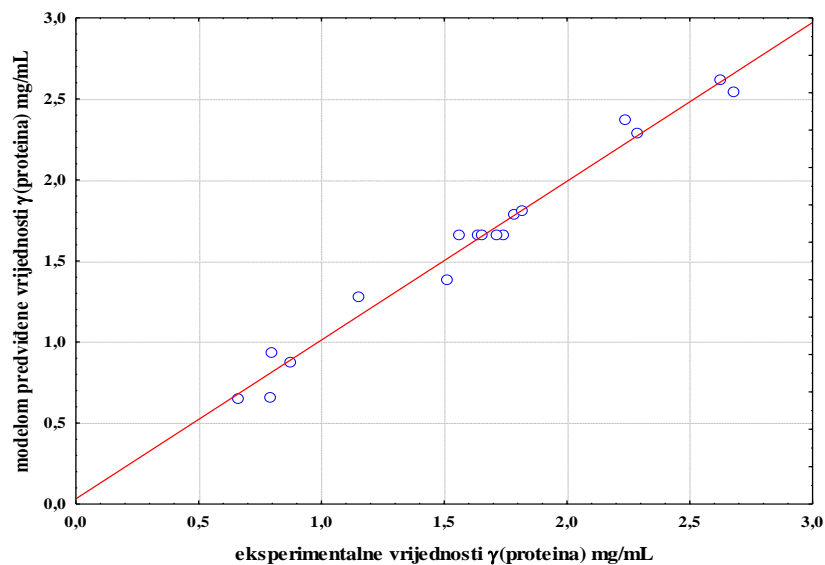
b)



c)

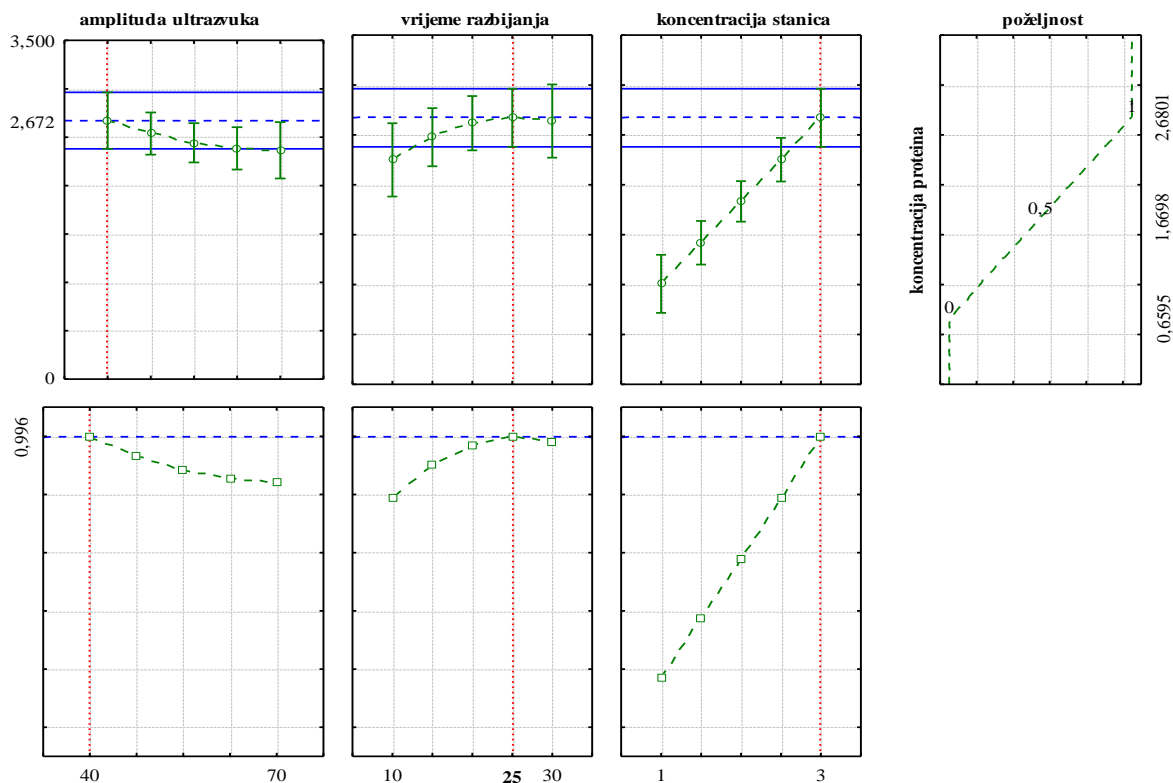
Slika 14. Trodimenzionalni (3D) grafovi koji prikazuju odnose između ulaznih i izlaznih varijabli – a) ovisnost koncentracije proteina o vremenu razbijanja i amplitudi ultrazvuka, b) ovisnost koncentracije proteina o koncentraciji stanica i amplitudi ultrazvuka c) prikazuje ovisnost koncentracije proteina o koncentraciji stanica i vremenu razbijanja

Na Slici 15 prikazana je usporedba eksperimentalnih rezultata i vrijednosti dobivenih simulacijom matematičkog modela procesa na primjeru analize utjecaja amplitude ultrazvuka, vremena razbijanja i koncentraciji stanica na učinkovitost ekstrakcije proteina. Odstupanje između ovih vrijednosti (R^2) iznosi 0,806 što znači da predloženi matematički model zadovoljavajuće opisuje eksperimentalne rezultate te ga se može s dostatnom pouzdanošću koristiti za simulaciju procesa ekstrakcije proteina.



Slika 15. Usporedba eksperimentalnih vrijednosti i vrijednosti dobivenih simulacijom matematičkog modela za ekstrakciju proteina

Optimalni uvjeti procesa ekstrakcije proteina (amplituda ultrazvuka, vrijeme razbijanja i koncentracija stanica) za maksimalnu učinkovitost ekstrakcije proteina određeni su primjenom funkcije poželjnosti na temelju modela odzivne površine. Rezultati optimizacije prikazani su na Slici 16. Kao optimalni procesni uvjeti određeni su amplituda ultrazvuka 40 %, vrijeme razbijanja 25 min i koncentracija stanica 3 mg/mL.



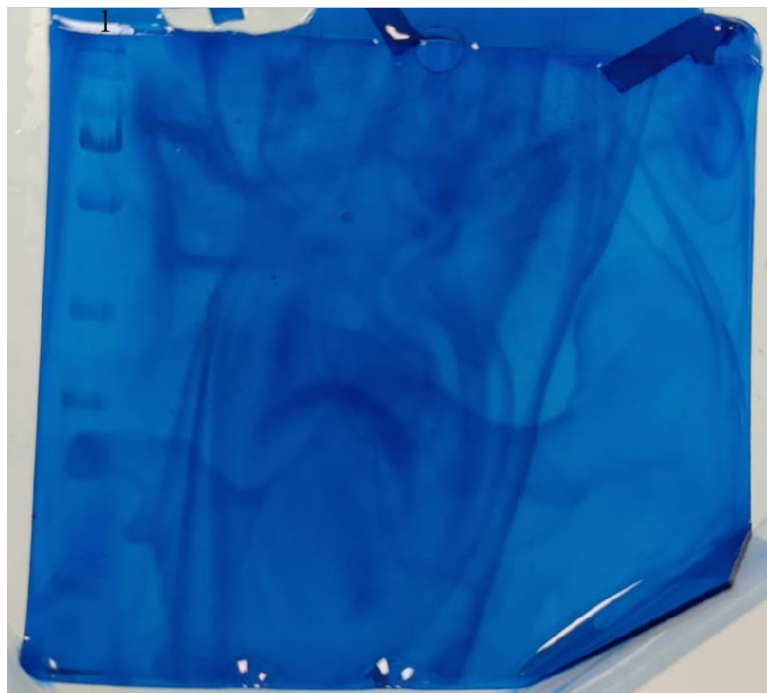
Slika 16. Optimalni uvjeti procesa ekstrakcije proteina (amplituda ultrazvuka, vrijeme razbijanja i koncentracija stanica)

Nakon provedbe optimizacije procesnih uvjeta, provedena je ekstrakcija proteina pri optimalnim uvjetima ultrazvučnim razbijanjem stanica. Dobiveno je $2,483 \pm 0,110$ mg/mL proteina što se slaže se modelom predviđenom vrijednošću koncentracije proteina od $2,672 \pm 0,363$ mg/mL.

4.4. Elektroforeza

Na samom kraju, pomoću gel elektroforeze, provedena je analiza sirovog ekstrakta, kako bi se provjerila prisutnosti enzima hidrogenaza. Za provedbu elektroforeze pripremljena su 4 uzorka različitih koncentracija. Početna koncentracija proteina u uzorku određena je Bradfordovim testom i iznosila je $2,483 \pm 0,110$ mg/mL. Koncentracija proteina u uzorcima korištenim za provedbu elektroforeze iznosila je 1,000 mg/mL, 1,500 mg/mL, 2,000 mg/mL i 2,483 mg/mL. Intenzitet bojanja i debljina dobivenih vrpca trebali su pružiti uvid u relativnu veličinu, odnosno molekularnu masu enzima hidrogenaza.

Prvi stupac gela na Slici 17 prikazuje raspored proteinskih markera na gelu (PagerulerTM Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa). Stupac proteinskog markera služi za određivanje molekulske mase proteina u uzorku. Nažalost, kao što je vidljivo, osim u prvom stupcu, u ostalim stupcima nisu se pojavile karakteristične vrpce koje bi ukazale na prisutnost proteina, odnosno enzima hidrogenaze u uzorku. Razlog tome je vjerojatno pucanje stanica (Slika 12) i oslobađanje unutarstaničnog sadržaja. Kao rezultat toga, prisutne proteaze su vjerojatno razgradile druge proteine u uzorku, što je otežalo odnosno onemogućilo detekciju proteina na gel elektroforezi.



Slika 17. Gel nakon provedene elektroforeze

Iako gel elektroforeza nije dokazala prisutnost enzima, izmjerena je aktivnost enzima hidrogenaza u pripremljenim uzorcima. Aktivnost enzima hidrogenaza nije zabilježena ni u jednom od testiranih uzoraka.

Na temelju dobivenih rezultata, daljnji koraci pročišćavanja enzima hidrogenaza nisu provedeni.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu proveden je uzgoj bakterije *Ralstonia eutropha* H16 na četiri različita sintetska medija, s različitim početnim koncentracijama fruktoze, odnosno glicerola.

S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti:

1. Svi ispitani mediji pogodni su za uzgoj bakterije *R. eutropha* H16. Eksperimenti s različitim kombinacijama početnih koncentracija otopina fruktoze i glicerola pokazali su značajan utjecaj na rast biomase pri čemu je najveća koncentracije biomase od $0,476 \pm 0,099$ g/L dobivena u eksperimentu s početnom koncentracijom fruktoze od 4 g/L.
2. Morfološka analiza stanica nakon uzgoja potvrdila je da stanice tvore biofilm.
3. Eksperimentalni rezultati provedbe optimizacije procesa ultrazvučnog razbijanja stanica pokazali su da su optimalni procesni uvjeti amplituda ultrazvuka 40 %, vrijeme razbijanja 25 min i koncentracija stanica 3 mg/mL. Provedbom ekstrakcije pri optimalnim uvjetima dobiveno je $2,483 \pm 0,110$ mg/mL proteina.
4. Analizom sirovog ekstrakta dobivenog nakon razbijanja stanica pomoću gel elektroforeze s ciljem provjere prisutnosti enzima hidrogenaza kao i mjerenjem aktivnost enzima u uzorcima nije dokazana prisutnost enzima hidrogenaza. Rezultati ukazuju na potrebu za optimizacijom postupaka uzgoja stanica kako bi se izbjeglo oštećenje stanica i osigurala pravilna izolacija proteina.

6. POPIS SIMBOLA I KRATICA

Simboli

V	volumen [mL, L]
γ	masena koncentracija [mg/mL]
t	vrijeme [min]
A	apsorbancija [-]
T	temperatura [°C]

Kratice

SMR	parna reformacija metana
RSM	metoda odzivne površine
MLS	metoda najmanjih kvadrata
SSE	suma kvadrata ostatka
ANOVA	analiza varijance
SEM	skenirajući elektronski mikroskop

7. LITERATURA

- [1] Chandrasekhar, K., Lee, J. Y., Lee, D. W., Biohydrogen production: Strategies to improve process efficiency through microbial routes, *International Journal of Molecular Science*, 16 (2015) 8266-8293.
- [2] Lubitz, W., Ogata, H., Rüdiger, O., Reijerse, E., Hydrogenases, *American Chemical Society*, 114 (2014) 4081-4148. Lu, J., Brigham, C. J., Li, S., Sinskey, A. J., *Ralstonia eutropha* H16 as a platform for the production of biofuels, biodegradable plastics, and fine chemicals from diverse carbon resources, u: Eckert, C. A., Trinh, C. T., *Biotechnology for biofuel production and optimization*, Amsterdam, Elsevier B.V., (2016) 325-351.
- [3] Momirlan, M., Veziroglu, T. N., The properties of hydrogen as fuel tomorrow in sustainable energy system for a cleaner planet, *International Journal of Hydrogen Energy*, 30 (2005) 795-802.
- [5] Global Warming of 1.5°C, Intergovernmental panel on climate change (IPCC) (2022)
URL: <https://www.ipcc.ch/sr15/> (pristup 10.07.2024.)
- [6] Global hydrogen review 2021, International Energy Agency, (2021)
URL: <https://www.iea.org/reports/global-hydrogen-review-2021/executive-summary> (pristup 10.07.2024.)
- [7] The future of hydrogen: Seizing today's opportunities, International Energy Agency, (2019)
URL: <https://www.iea.org/reports/the-future-of-hydrogen> (pristup 10.07.2024.)
- [8] Azwar, M. Y., Hussain, M. A., Abdul-Wahab, A. K., Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31 (2014) 158-173.
- [9] Arcos, J. M. M., Santos, D. M. F., The hydrogen color spectrum: Techno-economic analysis of the available technologies for hydrogen production, *Gases*, 3 (2023) 25–46.
- [10] Dincer, I., Acar, C., Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability, *International Journal of Hydrogen Energy*, 40 (2015) 11094-11111.
- [11] Li, Y., Ren, J., Ma, H., Campbell, A. N., Technical and economic performance assessment of blue hydrogen production using new configuration through modelling and simulation, *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 134 (2024) 104112.

- [12] Sánchez-Bastardo, N., Schlögl, R., Ruland, H., Methane pyrolysis for zero-emission hydrogen production: A potential bridge technology from fossil fuels to a renewable and sustainable hydrogen economy, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 60 (2021) 11855-11881
- [13] Kumar, S. S., Lim, H., An overview of water electrolysis technologies for green hydrogen production, *Energy Reports*, 8 (2022) 13793-13813.
- [14] Nuclear hydrogen production, International Atomic Energy Agency (2020)
URL: <https://www.iaea.org/topics/nuclear-hydrogen-production> (pristup 10.07.2024.)
- [15] Hydrogen production and uses, World Nuclear Association (2021)
URL: <https://world-nuclear.org/information-library/energy-and-the-environment/hydrogen-production-and-uses> (pristup 10.07.2024.)
- [16] Gürtekin, E., Biological hydrogen production methods, *Akademik Platform*, 6 (2014) 472-480.
- [17] Hallenbeck, P. C., Benemann, J. R., Biological hydrogen production: fundamentals and limiting processes, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27 (2002) 1185-1193.
- [18] Hitam, C. N. C., Jalil, A. A., A review on biohydrogen production through photo-fermentation of lignocellulosic biomass, *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13 (2023) 8465-8483.
- [19] Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M. L., Seibert, M., Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiology*, 122 (2000) 127-135.
- [20] Zhang, J., Xue, D., Wang, C., Fang, D., Cao, L., Gong, C., Genetic engineering for biohydrogen production from microalgae, *iScience*, 26 (2023) 107255.
- [21] Samrot, A. V., Rajalakshmi, D., Sathiyasree, M., Saigeetha, S., Kasipandian, K., Valli, N., Jayshree, N., Prakash, P., Shobana, N., A review on biohydrogen sources, production routes, and its application as a fuel cell, *Sustainability*, 15 (2023) 12641.
- [22] Mishra, P., Krishnan, S., Rana, S., Singh, L., Sakinah, M., Ab Wahid, Z., Outlook of fermentative hydrogen production techniques: An overview of dark, photo and integrated dark-photo fermentative approach to biomass, *Energy Strategy Reviews*, 24 (2019) 27-37.

- [23] Call, D., Logan, B. E., Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell lacking a membrane, *Environmental Science Technology*, 42 (2008) 3401-3406.
- [24] Rabaey, K., Verstraete, W., Microbial fuel cells: Novel biotechnology for energy generation, *Trends in Biotechnology*, 23 (2005) 291-298.
- [25] Liu, H., Grot, S., Logan, B. E., Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate, *Environmental Science Technology*, 39 (2005) 4317-4320.
- [26] Escapa, A., Mateos, R., Martínez, E. J., Blanes, J., Microbial electrolysis cells: An emerging technology for wastewater treatment and energy recovery. from laboratory to pilot plant and beyond, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55 (2016) 942-956.
- [27] Pant, D., Van Bogaert, G., Diels, L., Vanbroekhoven, K., A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 1533-1543.
- [28] Rozendal, R. A., Hamelers, H. B. M., Rabaey, K., Keller, J., Buisman, C. J. N., Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment, *Trends in Biotechnology*, 28 (2008) 450-459.
- [29] Torres, C. I., Marcus, A. K., Lee, H. S., Parameswaran, P., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B. E., A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 34 (2010) 3-17.
- [30] Cheng, S., Logan, B. E., Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells, *Electrochemistry Communications*, 9 (2007) 492-496.
- [31] Wang, H., Ren, Z. J., A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology, *Biotechnology Advances*, 31 (2013) 1796-1807.
- [32] Kovács, K. L., Maróti, G., Rákhely, G., A novel approach for biohydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy*, 31 (2006) 1460-1468.
- [33] Leone, L., Sgueglia, G., La Gatta, S., Chino, M., Nastri, F., Lombardi, A., Enzymatic and bioinspired systems for hydrogen production, *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (2023) 8605.
- [34] Ayodele, D. T., Ogunbiyi, O. D., Akamo, D. O., Otun, K. O., Akinpelu, D. A., Adegoke, J. A., Fapojuwo, D. P., Oladoye, P. O., Factors affecting biohydrogen production: Overview and perspectives, *International Journal of Hydrogen Energy*, 48 (2023) 27513-27539.

- [35] Xiao, N., Chen, Y., Chen, A., Feng, L., Enhanced bio-hydrogen production from protein wastewater by altering protein structure and amino acids acidification type, *Science Report*, 4 (2014) 3992.
- [36] Bowien, B., Kusian, B., Genetics and control of CO₂ assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*, *Archives of Microbiology*, 178 (2002) 85-93.
- [37] Fan, Q., Neubauer, P., Lenz, O., Gimpel, M., Heterologous hydrogenase overproduction systems for biotechnology—An overview, *International Journal of Molecular Science* 21 (2020) 5890.
- [38] Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., Esposito, G., A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products, *Applied Energy*, 144 (2015) 73-95.
- [39] Lenz, O., Lauterbach, L., Frielingsdorf, S., O₂-tolerant [NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: Physiology, molecular biology, purification, and biochemical analysis, *Methods in Enzymology*, 613 (2018) 117-151.
- [40] Kumar, A., Park, B. J., Kim, J. R., Recent advances in hydrogen production using *Ralstonia eutropha* H16, *Bioresource Technology*, 218 (2016) 873-877.
- [41] Li, H., Opgenorth, P. H., Wernick, D. G., Rogers, S., Wu, T. Y., Higashide, W., Liao, J. C., Integrated electromicrobial conversion of CO₂ to higher alcohols, *Science*, 335 (2012) 1596-1596.
- [42] Wu, H., Wang, X., Shen, C., Lin, W., Hydrogen production using a membrane-free microbial electrolysis cell with dual gas diffusion electrodes, *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (2012) 13259-13266.
- [43] Schwartz, E., Happe, T., Fritsch, J., Hydrogenases and hydrogen metabolism in *Ralstonia eutropha*. *Hydrogen Science and Engineering: Materials, Processes, Systems and Technology*, 1 (2013) 147-163.
- [44] Fritsch, J., Lenz, O., Friedrich, B., Structure, function and biosynthesis of O₂-tolerant hydrogenases, *Nature Reviews Microbiology*, 11 (2013) 106-114.
- [45] Müller, J., Maciejewska, B., Oelgeschläger, E., Lenz, O., Regulation of membrane-bound oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenases in *Ralstonia eutropha* H16, *Frontiers in Microbiology*, 5 (2014) 27.

- [46] Tremblay, P. L., Zhang, T., Dar, S. A., Leang, C., Lovley, D. R., The *Ralstonia eutropha*-based biohydrogen production system: from fundamentals to practical applications, *Frontiers in Microbiology*, 6 (2015) 201.
- [47] Schuchmann, K., Müller, V., Autotrophy at the thermodynamic limit of life: A model for energy conservation in acetogenic bacteria, *Nature Reviews Microbiology*, 12 (2014) 809-821.
- [48] Peters, H. W., Schut, G. J., Boyd, E. S., Mulder, D. W., Shepard, E. M., Broderick, J. B., King, P. W., Adams, M. W. W., [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1853 (2015) 1350-1369.
- [49] Vignais, P. M., Billoud, B., Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: An overview, *Chemical Reviews*, 107 (2007) 4206-4272.
- [50] Monfort, B. M., Interaction studies between the [FeFe]-hydrogenase maturation enzymes from *Thermoanaerobacter italicus*, University of Southampton, Faculty of Natural and Environmental Sciences, doktorski rad, 2018
- [51] Hoekstra, A. S., Bayley, J. P., The role of complex II in disease, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1827 (2013) 543-551.
- [52] Shima, S., Pilak, O., Vogt, S., Schick, M., Stagni, M. S., Meyer-Klaucke, W., Warkentin, E., Rhauer, R. K., Ermler, U., The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site, *Science*, 321 (2008) 572-575.
- [53] Smith, J., Brown, M., Lee, C., High-pressure homogenization: A mechanical cell disruption method for large-scale applications, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38 (2015) 223-235.
- [54] Schutte, H., Flaschel, E., Friehs, K., Cell disruption using bead mills, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (2014), 8447-8459.
- [55] Jones, S., Smith, K., Ultrasonic cell disintegration: Principles and applications in biotechnology, *Journal of Biotechnology*, 271 (2018) 23-30.
- [56] Williams, T., Garcia, M., Miller, A., Freeze-thaw cycles: A method for cell lysis in biomolecular research, *Journal of Biological Methods*, 4 (2017) 70.
- [57] Lee, C., Kim, J., Park, Y., Osmotic shock: A biophysical approach to cell lysis in bacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (2013) 1335-1343.

- [58] Wang, S., Li, Y., Wei, Y., Anionic surfactants as protein denaturants: mechanisms and applications, *Journal of Colloid and Interface Science*, 504 (2017) 605-621.
- [59] Huang, Y., Li, Y., Hu, Y., Shen, Y., Enzymatic cell lysis for protein extraction and purification, *Biotechnology Advances*, 34 (2016) 620-632.
- [60] Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A., Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, 76 (2008) 965-977.
- [61] Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., dos Santos, W. N. L., Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, *Analytica Chimica Acta*, 597 (2007) 179-186.
- [62] Ba, D., Boyaci, I. H., Modeling and optimization: Usability of response surface methodology', *Journal of Food Engineering*, 78 (2007) 836-845.
- [63] Ernst, O., Zor, T., Linearization of the Bradford protein assay, *Journal of Visualized Experiments*, 38 (2010) 1-7.
- [64] Anđelović, S., Čurić, Ž., Šalić, A., Jurinjak Tušek, A., Kučan, K. Z., Rogošić, M., Radović, M., Cvjetko Bubalo, M., Zelić, B., Deep eutectic solvents for biodiesel purification in a microextractor: Solvent preparation, selection and process optimization, *Bioengineering*, 9 (2022) 665.
- [65] Jugder, B. E., Chen, Z., Oing, D. T., Lebhar, H., Welch, J., Marquis, C. P., An analysis of the changes in soluble hydrogenase and global gene expression in *Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha*) H16 grown in heterotrophic diauxic batch culture, *Microb Cell Factories*, 14 (2015) 42.
- [66] Cavalheiro, J. M. B. T., Raposo, R. S., de Almeida, M. D., Cesario, M. T., Sevrin, C., Grandfils, C., da Fonseca, M. M. R., Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Bioresource Technology*, 111 (2012) 391-397.
- [67] Fukui, T., Mukoyama, M., Orita, I., Nakamura, S., Enhancement of glycerol utilization ability of *Ralstonia eutropha* H16 for production of polyhydroxyalkanoates, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (2014) 7559-7568.

- [68] Grunwald, S., Mottet, A., Grousseau, E., Plassmeier, J. K., Popovic, M. K., Uribe Larrea, J. L., Gorret, N., Guillouet, S. E., Sinskey, A., Kinetic and stoichiometric characterization of organoautotrophic growth of *Ralstonia eutropha* on formic acid in fed-batch and continuous cultures, *Microbial Biotechnology*, 8 (2014) 155–163.
- [69] Pohlmann, A., Fricke, W. F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Pötter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Voss, I., Gottschalk, G., Steinbüchel, A., Friedrich, B., Bowien, B., Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16, *Nature Biotechnology*, 24 (2006) 1257-1262.
- [70] Trchounian, K., Sawers, R. G., Trchounian, A., Improving biohydrogen productivity by microbial dark- and photo fermentations: novel data and future approaches, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80 (2017) 1201-1216.
- [71] Buffington, J., The economic potential of Brewer's Spent Grain (BSG) as a biomass feedstock. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 4 (2014) 308-318.
- [72] Muthusamy, N., Chemical composition of brewers spent grain, *International Journal of Science, Environment and Technology*, 3 (2014) 2109-2112.
- [73] Jönsson, J. L., Martín, C., Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects, *Bioresource Technology*, 199 (2016) 103-112.
- [74] Jugder, B. E., Lebhar, H., Aguey-Zinsou, K. F., Marquis, C. P., Production and purification of a soluble hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 for potential hydrogen fuel cell applications, *MethodsX*, 3 (2016) 242-250.
- [75] Schwartz, E., Voigt, B., Zühlke, D., Pohlmann, A., Lenz, O., Albrecht, D., Schwarze, A., Kohlmann, Y., Krause, C., Hecker, M., Friedrich, B., A proteomic view of the facultatively chemolithoautotrophic lifestyle of *Ralstonia eutropha* H16, *Proteomics*, 9 (2009) 5132-5142.
- [76] Poladyan, A., Blbulyan, S., Sahakyan, M., Lenz, O., Trchounian, A., Growth of the facultative chemolithoautotroph *Ralstonia eutropha* on organic waste materials: growth characteristics, redox regulation and hydrogenase activity, *Microbial Cell Factories*, 18 (2019) 1251-1255.
- [77] Iskandaryan, M., Blbulyan, S., Sahakyan, M., Vassilian, A., Trchounian, K., Poladyan, A., l-amino acids affect the hydrogenase activity and growth of *Ralstonia eutropha* H16, *AMB Express*, 13 (2023) 33.

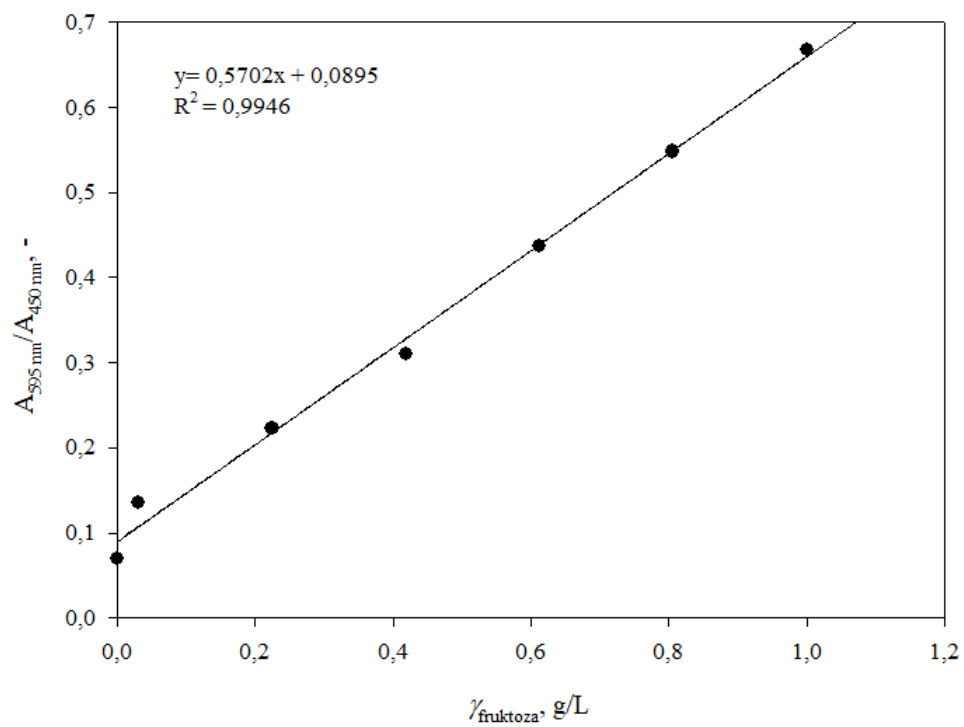
[78] Flemming, H. C., Wingender, J., The biofilm matrix, *Nature Reviews Microbiology*, 8 (2010) 623-633.

[79] Webb, J. S., Thompson, L. S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Kjelleberg, S., Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Journal of Bacteriology*, 185 (2003) 4585–4592.

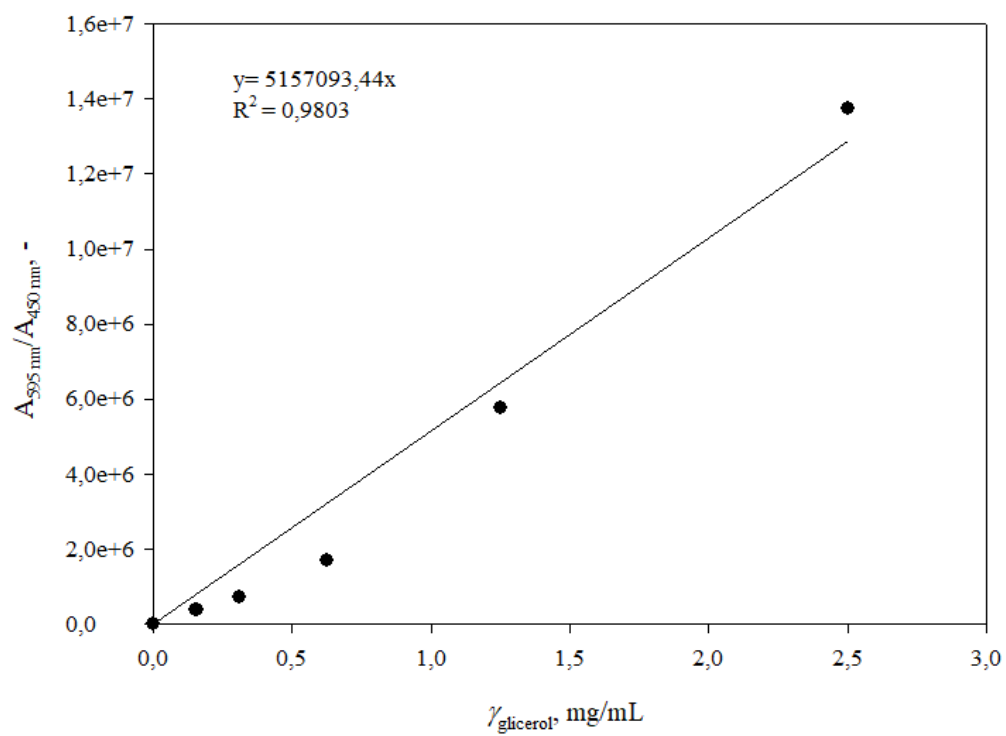
[80] Gomes, T. A., Zanette, C. M., Spier, M. R., An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 50 (2020) 635-654.

8. PRILOZI

Prilog 1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije fruktoze



Prilog 2. Baždarni pravac za određivanje koncentracije glicerola



Prilog 3. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina

