

AGNIESZKA DROŹDŹYŃSKA, DARIA SZYMANOWSKA,  
KATARZYNA CZACZYK

## OPTIMALIZACJA PROCESU EKSTRAKCJI TREHALOZY Z KOMÓREK DROŹDŹY I OKREŚLENIE PARAMETRÓW JEJ OZNACZANIA TECHNIKĄ HPLC

### Streszczenie

Wykorzystano technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej do oznaczania trehalozy w próbach mogących zawierać inne disacharydy (maltozę, sacharozę). Przetestowano dwie kolumny i różne składy eluentów pod względem efektywności rozdzielania. Wyznaczono granice wykrywalności, oznaczalności, zakres liniowości oraz precyzję wytypowanych metod. Ponadto wykonano optymalizację procesu ekstrakcji trehalozy z komórek drożdży pod względem substancji dezintegrującej, temperatury oraz czasu trwania ekstrakcji.

**Słowa kluczowe:** trehaloza, HPLC, *Saccharomyces cerevisiae*

### Wprowadzenie

Trehaloza ( $\alpha$ -D-glukopiranozylo-1- $\beta$ -D-glukopiranozyd) jest cukrem nieredukującym, zbudowanym z dwóch cząsteczek glukozy połączonych nietypowym wiązaniem  $\alpha$ -1,1-glikozydowym [1, 3, 6]. Trehaloza łatwo ulega hydrolizie do glukozy i może pełnić w komórce rezerwę tego cukru. Enzymami rozkładającymi trehalozę są trehalazy (neutralna i kwaśna), których wytwarzanie przez *Saccharomyces cerevisiae* kodowane jest przez geny *NTH1* oraz *ATH1* [22].

Występowanie trehalozy stwierdzono w komórkach grzybów, bakterii, nicieni, owadów oraz niektórych roślin [3, 9, 21]. Do niedawna ten disacharyd uważany był tylko za substancję zapasową w żywych komórkach. Liczne badania dowiodły ścisłego związku obecności tej substancji z występowaniem stresów środowiskowych. Dziś trehaloza uważana jest za jeden z głównych markerów opisujących odpowiedź komór-

rek drożdży na stresy metaboliczne (cieplny, osmotyczny, etanolowy oraz w mniejszym stopniu na stres toksyczny) [6, 9, 19, 20, 21].

Trehaloza, jako związek osmotycznie czynny, pełni przede wszystkim funkcję zabezpieczającą integralność struktur komórkowych, w szczególności błon biologicznych. Jej działanie polega na zabezpieczaniu struktury białek poprzez wytwarzanie wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi cukrów a polarnymi grupami białek. Ponadto trehaloza, jako cukier nieredukujący, nie uczestniczy w reakcjach Maillarda, w których cukry redukujące (np. glukoza) reagują z grupami aminowymi białek, podczas ich odwodnienia [6, 9].

Badania dowiodły, że drożdże zmniejszają aktywność trehalazy, dążąc do utrzymania wysokiego stężenia trehalozy w komórce w celu jej zabezpieczenia przed stresem osmotycznym lub cieplnym. Już w temp. 30 °C produkcja trehalozy przez drożdże z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* wzrasta (i rośnie wraz z dalszym wzrostem temperatury), a jej poziom jest zróżnicowany w zależności od szczepu [6, 20]. Dzięki temu trehaloza może być stosowana jako marker odpowiedzi metabolicznej komórek drożdży na stresy środowiskowe w celu wyodrębnienia ras najlepiej przystosowanych do trudnych warunków przemysłowych. Wiadomo także, że pojawienie się dodatkowo białek szoku cieplnego (przede wszystkim *hsp104*) wzmacnia tolerancję na stres termiczny [1]. Ponadto trehaloza może pełnić funkcję krioprotektanta m.in. w ogrodnictwie (np. kondycjonowanie roślin), jak również w medycynie (np. przechowywanie embrionów ssaków). Obecność trehalozy podczas suszenia *in vitro* np. enzymów restrykcyjnych lub enzymów modyfikujących DNA umożliwia ich przechowywanie w temperaturze pokojowej bez utraty aktywności [9, 22].

Jedną z nowoczesnych metod otrzymywania bioetanolu jest proces jednoczesnej hydrolizy i fermentacji natywnej skrobi [12]. W procesie tym stosuje się wysokie stężenia substratu i podwyższoną temperaturę (optimum działania enzymów), stąd powstają duże ilości etanolu. Komórki drożdży wykorzystywane w tych procesach narażone są na szereg stresów metabolicznych (stres osmotyczny, cieplny, etanolowy), w efekcie czego syntetyzują trehalozę. Poznanie mechanizmów odpowiedzi komórki na wystąpienie poszczególnych stresów i ich interakcje krzyżowe może ułatwić takie kierowanie procesem fermentacji, aby zredukować do minimum negatywne skutki stresów i tym samym usprawnić przebieg procesu fermentacji. Zwykle reakcja komórki na wystąpienie czynników stresowych jest wielokierunkowa i objawia się istotnymi zmianami metabolicznymi. Podkreśla to znaczenie określenia właściwych kryteriów do wyboru odpornych szczepów, przydatnych w warunkach przemysłowych [6].

Wśród różnych technik oznaczania trehalozy, do najczęściej stosowanych należą metody kolorymetryczne, enzymatyczne i chromatograficzne. Pierwsza z wyżej wymienionych procedur, opisana przez Brinna [2] polega na reakcji trehalozy z cyklicznym węglowodorem - antronem (ang. anthrone), a następnie oznaczeniu zmiany barwy

mieszaniny poreakcyjnej. Ze względu na wysoką reaktywność antronu z innymi cukrami (m.in. z celulozą, dekstranem, a także heksozami i pentozami) jest to metoda mało charakterystyczna i może być stosowana do prób zawierających tylko trehalozę [4]. Dużą specyficznością charakteryzują się metody enzymatyczne, jednak wiążą się one z koniecznością zakupu drogich enzymów (trehalazy, oksydazy glukozowej i/lub peroksydazy) i utrzymania ściśle kontrolowanych warunków reakcji (pH, temperatura) [4, 24]. W ostatnich latach powszechnie stosowaną metodą oznaczania trehalozy jest HPLC. Do oznaczeń tego związku używano różnych kolumn m.in.: CarboPac PA1 (Dionex) stosowany z 100 mM NaOH jako fazą ruchomą i detekcją amperometryczną lub elektrochemiczną [7, 8], Sugar-Pak (Waters) wykorzystujący bufor boranowy jako eluent i detektor elektrochemiczny [15] oraz szereg kolumn wykorzystujących detekcję refraktometryczną oraz fazę ruchomą w postaci wodnych roztworów acetonitrylu: Shodex SUGAR SZ5532 (Shodex) [14], Zorbax-NH2 (Agilent) [23], Supelcosil LC-NH2 (Supelco) [10], LiChrosphere NH2 (Merck) [4, 5].

Znaczenie trehalozy w metabolizmie komórkowym oraz możliwości jej zastosowania w przemyśle i medycynie wymagają opracowania nowych, szybkich i efektywnych metod jej oznaczania i pozyskiwania.

Celem niniejszych badań była optymalizacja procesu ekstrakcji trehalozy z komórek drożdży wykorzystywanych w procesie fermentacji etanolowej natywnej skrobi oraz opracowanie metody chromatograficznej cechującej się dobrą selektywnością i wartością granicy wykrywalności oznaczania trehalozy w komórkach drożdży w próbach zawierających inne disacharydy (np. maltozę).

## **Material i metody badań**

W celu opracowania efektywnej procedury oznaczania trehalozy techniką HPLC użyto materiału badawczego w postaci roztworów wzorcowych cukrów (trehalozy, maltozy, sacharozy, SIGMA). W eksperymentach optymalizacji procesu ekstrakcji trehalozy materiał badawczy stanowiły drożdże gorzelnicze z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* (nazwa handlowa Ethanol Red, producent firma LeSaffre). Drobnoustroje te wykorzystywano w procesie jednoczesnej hydrolizy i fermentacji natywnej skrobi. Hydrolizę mąki kukurydzianej (młyn Biocorn Ziębice) prowadzono za pomocą preparatów enzymatycznych STARGEN 001 (Genencor) oraz kwaśnej proteazy – GC106 (Genencor), jako enzymu wspomagającego hydrolizę. Proces prowadzono przy użyciu bioreaktora o objętości maksymalnej 5 l, firmy New Brunswick (USA), stosując zacier z mąki kukurydzianej (25 % s.m.). Parametry pracy bioreaktora były następujące: temp. 35 °C, pH 5,0 (korekta pH przy użyciu kwasu siarkowego lub zasady sodowej), szybkość mieszania 200 obr/min.

Fermentację etanolową prowadzono przez 72 h. Po tym czasie pobierano 200 ml próby i odstawiano na 30 min w celu oddzielenia drożdży od mąki kukurydzianej poprzez sedymentację. 5 ml supernatantu wirowano (3000 g, 5 min) by uzyskać osad drożdży, który następnie płukano 5 ml wody destylowanej. Z tak przygotowanego osadu ekstrahowano trehalozę trzema różnymi metodami. W pierwszej metodzie osad drożdży inkubowano z 5 ml alkoholu etylowego (95 %) w różnej temperaturze: 30, 60 oraz 90 °C. Z każdego wariantu doświadczenia pobierano próby po 30, 60 oraz 90 min inkubacji, a następnie usuwano etanol w wyparce próżniowej lub poprzez odparowanie w temp. 105 °C (metoda druga). Trzecia metoda ekstrakcji polegała na inkubacji osadu drożdży z 1 ml roztworu o składzie acetonitryl (ACN) : metanol (MeOH) : woda (H<sub>2</sub>O) w stosunku objętościowym 60 : 15 : 25. Zastosowano takie same parametry procesu ekstrakcji (temperatura i czas), jak w poprzednich metodach. Przed analizą chromatograficzną próby filtrowano (0,45 µm, Millex-LG, Millipore).

W celu określenia wpływu mąki kukurydzianej, obecnej w próbce, na proces ekstrakcji trehalozy zmodyfikowano nieznacznie sposób dezintegracji. Próbę pobraną z bioreaktora (5 ml) wirowano (3000 g, 5 min) osad przemywano wodą destylowaną. Ekstrakcję prowadzono poprzez inkubację osadu (drożdży i mąki) z 2 ml mieszaniny o składzie ACN : MeOH : H<sub>2</sub>O (60 : 15 : 25) w temp. 60 °C przez 1 h. Po tym czasie próbę filtrowano (0,45 µm, Millex-LG, Millipore).

Oznaczenia chromatograficzne prowadzono w chromatografii cieczowym HEWLETT-PACKARD 1050 wyposażonym w automatyczny podajnik prób, pompę oraz detektor RI. Analizy wykonywano w dwóch rodzajach kolumn: Carbohydrate Analysis Column (Waters) oraz Nucleosil NH<sub>2</sub> (Macherey-Nagel). Podstawowe parametry używanych kolumn przedstawiono w tab. 1. W zależności od zastosowanej kolumny stosowano różne fazy ruchome i różne szybkości ich przepływu. W tab. 2. wyszczególniono skład eluentów używanych do analiz. Oznaczenia wykonywano w układzie izokratycznym, w temp. 25 °C. Do kolumny chromatografu cieczowego wprowadzano 50 µl próby.

Tabela 1

Podstawowe parametry testowanych kolumn.  
Basic parameters of tested columns.

Kolumna Column	Długość Length [mm]	Średnica wewnętrzna Inner diameter [mm]	Wielkość ziarna Particle size [µm]	Wielkość porów Pore size [Å]	Matryca Matrix	Grupa funkcyjna Functional group
Carbohydrate Analysis Column (WATERS)	300	3,9	10	125	Krzemionka Silica	NH <sub>2</sub>
Nucleosil NH <sub>2</sub> (MACHEREY-NAGEL)	250	4,6	5	100	Krzemionka Silica	NH <sub>2</sub>

Analizę chromatograficzną wykonywano z zastosowaniem standardu zewnętrznego, wykorzystując powierzchnie pików (pomiar i integracja komputerowa z zastosowaniem programu ChemStation for LC Agilent Technologies).

W celu wskazania najlepszej metody oznaczania trehalozy w przypadku każdej kolumny, wyznaczano wartości współczynnika odpowiedzi dla trehalozy oraz zdolność rozdzielczą kolumny w odniesieniu do trehalozy i maltozy. Współczynnik odpowiedzi  $R_f$  obliczano jako iloraz wysokości pików ( $H$ ) i stężenia trehalozy ( $c$ ) [11]. Zdolność rozdzielczą kolumny  $R_s$  wyznaczano z równania [18]:

$$R_s = 2 \frac{t_{Rt} - t_{Rm}}{w_t + w_m} \quad (1)$$

gdzie:  $t_{Rt}$  – czas retencji trehalozy,  
 $t_{Rm}$  – czas retencji maltozy,  
 $w_t$  – szerokość pików trehalozy mierzona przy podstawie,  
 $w_m$  – szerokość pików maltozy mierzona przy podstawie.

Tabela 2

Stosowane fazy ruchome i prędkości ich przepływu.  
 Mobile phases applied and their flow rates.

Kolumna Column	Acetonitryl Acetonitrile [%]	Metanol Methanol [%]	Woda Water [%]	Szybkość przepływu Flow rate [ml/min]
Carbohydrate Analysis Column (WATERS)	<b>80</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>2</b>
	70	0	30	2
	75	0	25	2
	75	5	20	2
	60	10	30	2
	60	15	25	2
Nucleosil NH <sub>2</sub> (MECHEREY-NAGEL)	<b>75</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>1</b>
	80	0	20	1
	70	10	20	1
	70	15	15	1
	65	20	15	1
	65	25	10	1

Objaśnienia:/ Explanatory notes:

Czcionką pogrubioną przedstawiono standardowe warunki rozdzielania w wymienionych kolumnach / The bold font was used to show standard separation conditions in the columns listed.

Wyznaczano granicę wykrywalności, zakres liniowości oraz precyzję najlepszej wybranej metody.

Granice wykrywalności (ang. *Limit of Detection* – LOD) wyznaczano metodą graficzną. Wykonano po 6 równoległych oznaczeń dla 3 poziomów stężeń (c) trehalozy. Z każdej serii pomiarów obliczano wartość odchylenia standardowego (s) i wyznaczano zależność liniową  $s = f(c)$ . Z wykresu odczytywano wartość wyrazu wolnego  $s_0$  i wyznaczano wartość granicy wykrywalności zgodnie z zależnością [13]:

$$\text{LOD} = 3s_0 \quad (2)$$

Granice oznaczalności (ang. *Limit of Quantification* - LOQ) wyznaczano na podstawie zależności [13]:

$$\text{LOQ} = 3\text{LOD} \quad (3)$$

Zakres liniowości wyznaczano z wykresów krzywych wzorcowych, a za koniec zakresu liniowego przyjęto punkt, w którym odchylenie od prostoliniowości wynosiło 3 %. Natomiast za dolną granicę liniowości wskazań przyjęto granicę oznaczalności [18]:

Precyzję obliczono zgodnie ze wzorem:

$$CV = \frac{s}{x_{\text{sr}}} \cdot 100 [\%] \quad (4)$$

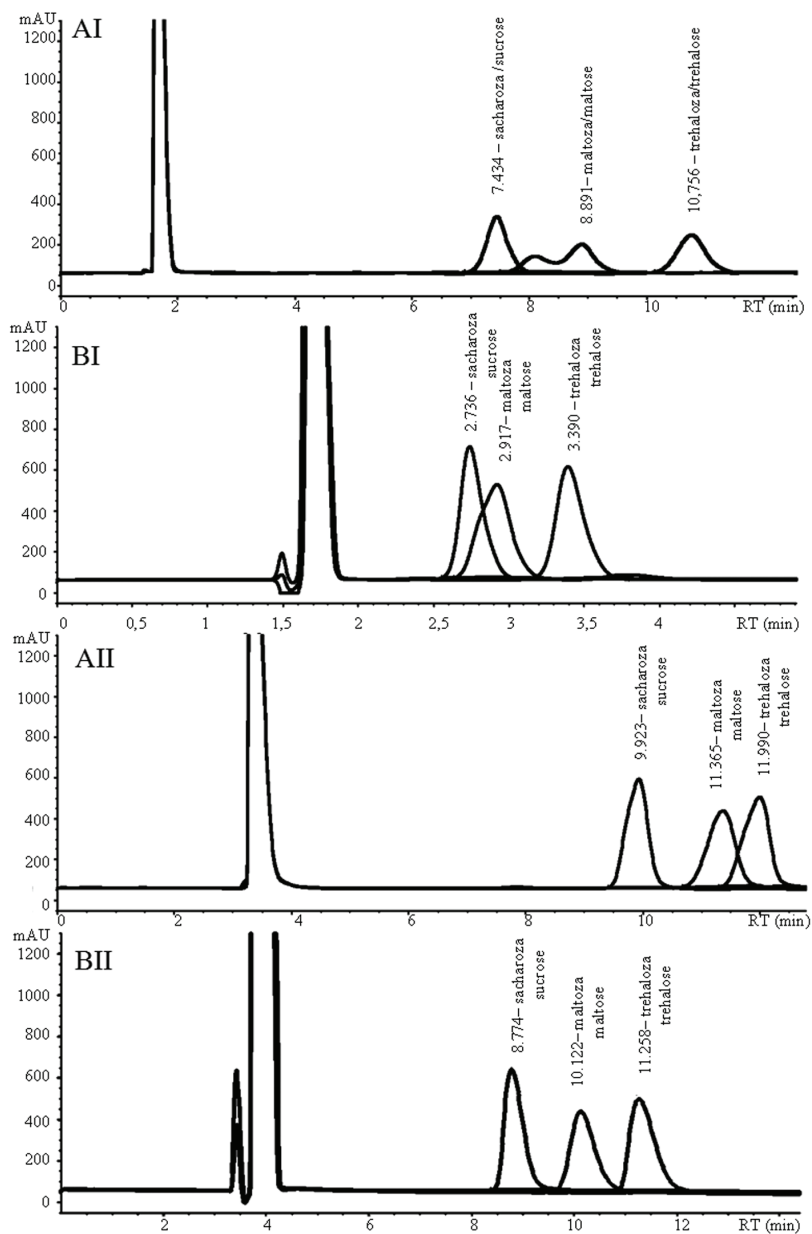
gdzie: CV – współczynnik zmienności (ang. *Coefficient of Variation*),

$x_{\text{sr}}$  – wartość średnia powierzchni pików z 10 powtórzeń w odniesieniu do roztworu wzorcowego trehalozy [1g/l],

s – odchylenie standardowe.

## Wyniki i dyskusja

Na rys. 1. przedstawiono chromatogramy rozdzielania trehalozy, sacharozy i maltozy na kolumnach Carbohydrate Analysis Column oraz Nucleosil NH<sub>2</sub>. Analiza w kolumnie firmy Waters z zastosowaniem 80 % acetonitrylu jako eluentu zapewniała całkowity rozdział trehalozy od pozostałych disacharydów, jednak uzyskane współczynniki odpowiedzi były bardzo niskie (rys. 1 AI). Rozdział tej samej próby przy użyciu kolumny firmy Macherey-Nagel umożliwił uzyskanie zadowalających współczynników odpowiedzi badanych cukrów, ale nie umożliwił całkowitego rozdzielenia pików trehalozy od pików maltozy (rys. 1 AII). Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że wraz ze wzrostem zawartości acetonitrylu w eluencie wzrastała zdolność rozdzielcza kolumny Carbohydrate Analysis Column (Waters), jednak malała wartość współczynnika odpowiedzi. Przy zastosowaniu dwuskładnikowej fazy ruchomej (ACN i H<sub>2</sub>O) otrzymanie satysfakcjonującego rozdziału nie było możliwe. Całkowite rozdzielanie pików trehalozy od pików maltozy ( $R_s = 1$ ) uzyskano w przypadku 79 % ACN, dla którego wartość współczynnika odpowiedzi  $R_f$  wyniosła 49,3 (rys. 2). Dodatek metanolu do fazy ruchomej polepszał jakość analiz chromatograficznych. Podobnie jak



Rys. 1. Chromatografy rozdziálu trehalozy, maltozy i sacharozy w kolumnie Carbohydrate Analysis Kolumn – Waters (I) oraz Nucleosil NH<sub>2</sub> –Macherey Nagle (II) w warunkach standardowo stosowanych dla tych kolumn (A) oraz opracowanych w ramach niniejszych badań (B).

Fig. 1. Chromatograms of separation of trehalose, maltose, and sucrose on the Carbohydrate Analysis Column – Waters (I) and Nucleosil NH<sub>2</sub> Macherey-Nagel Column (II) under both the standard operating conditions applied to those columns and the conditions developed for this study (B).

acetonitryl, wpływał on na wartość współczynnika odpowiedzi i zdolność rozdzielczą kolumny. Zastosowanie trójskładnikowej fazy ruchomej (ACN : MeOH : H<sub>2</sub>O) umożliwiło otrzymanie rozdzielców chromatograficznych cechujących się zarówno wysokim współczynnikiem odpowiedzi, jak również dobrą zdolnością rozdzielczą kolumny. Najlepszym eluentem okazała się mieszanina ACN : MeOH : H<sub>2</sub>O (60 : 15 : 25). Umożliwił on całkowity rozdział trehalozy od pozostałych disacharydów obecnych w próbce ( $R_s = 1$ ) i blisko trzykrotnie zwiększył się współczynnik odpowiedzi trehalozy -  $R_f = 120$  (rys. 1 BI) w porównaniu z eluentem standardowo stosowanym w tej kolumnie (80 % ACN). Zastosowanie tej fazy ruchomej pozwoliło na wykrycie trehalozy na poziomie 3,5 mg/l (tab. 3). Czas analizy przy zastosowaniu wyżej wymienionych parametrów chromatograficznych wynosił ok. 4 min.

W przypadku kolumny Nucleosil NH<sub>2</sub> Macherey-Nagel najefektywniejszym eluentem był ACN : MeOH : H<sub>2</sub>O (70 : 15 : 15), umożliwiający całkowity rozdział wszystkich badanych cukrów przy zachowaniu wysokiej wartości współczynnika odpowiedzi w porównaniu z eluentem standardowo stosowanym dla tej kolumny – 75 % ACN (rys. 1 BII). Zastosowanie takich parametrów pozwoliło na wykrycie trehalozy na poziomie 13,6 mg/l (tab. 3). Czas analizy wynosił 13 min.

Istotną rolę odgrywała także rozpuszczalność trehalozy w eluencie, która ograniczała górną granicę zakresu liniowości w przypadku obu badanych metod (tab. 3).

Tabela 3

Wartości liczbowe granic wykrywalności, oznaczalności, zakresów liniowości oraz precyzji wybranych metod.

Numerical values of detection and quantification limits, of linearity ranges, and of precision of the methods selected.

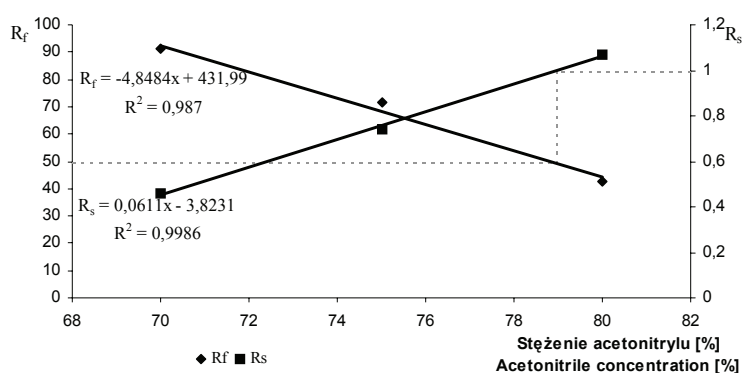
Kolumna/metoda Column/method	Granica wykrywalności Limit of detection [mg/l]	Granica oznaczalności Limit of quantification [mg/l]	Zakres liniowości Range of linearity [g/l]	Precyzja Precision CV [%]
Carbohydrate Analysis Column (60%ACN:15% MeOH:25%H <sub>2</sub> O)	3,5	10,5	0,01 - 9,7*	0,23
Nucleosil NH <sub>2</sub> (70%ACN: 15% MeOH:15%H <sub>2</sub> O)	13,6	40,9	0,04 - 5,2*	1,3

Objaśnienia:/ Explanatory notes: \* Górna granica zakresu liniowości jest ograniczona rozpuszczalnością trehalozy /\*The upper limit of linearity is limited by the trehalose solubility.

W celu optymalizacji procesu dezintegracji komórek drożdży i ekstrakcji z nich trehalozy w pierwszej kolejności poszukiwano najlepszej substancji dezintegrującej komórki. Znanych jest kilka metod ekstrakcji trehalozy, wśród których wymienić moż-



na dezintegrację komórek poprzez gotowanie w etanolu o różnym stężeniu [4, 14, 16], inkubację w wodzie destylowanej o wysokiej temperaturze [15] czy też dezintegrację za pomocą kulek szklanych [17]. Większość badaczy dezintegrując komórki stosuje etanol i wysoką temperaturę, dlatego też testując różne substancje pod względem efektywności dezintegrującej, posłużono się oprócz roztworu o składzie (ACN : MeOH : H<sub>2</sub>O – 60 : 15 : 25), etanolem. Na rys. 3. przedstawiono zależność ilości wyekstrahowanej trehalozy od zastosowanej substancji i sposobu postępowania. Najbardziej efektywną substancją okazał się eluent. Dlatego też w kolejnych doświadczeniach dezintegrację komórek wykonywano poprzez inkubację w mieszaninie rozpuszczalników o składzie ACN : MeOH : H<sub>2</sub>O (60 : 15 : 25). Taki sposób postępowania znacznie upraszcza przygotowanie prób i oszczędza czas. Jak wynika z badań również sposób odparowania etanolu istotnie wpływa na ilość wyekstrahowanej trehalozy. Odparowanie etanolu w temp. 105 °C nie wpłynęło w sposób statystycznie istotny na wynik, w porównaniu z ekstrakcją z wykorzystaniem mieszaniny rozpuszczalników bez odparowania, jednak cechowało się mniejszą powtarzalnością (współczynnik zmienności wynosił odpowiednio 6,3 i 0,9 %).

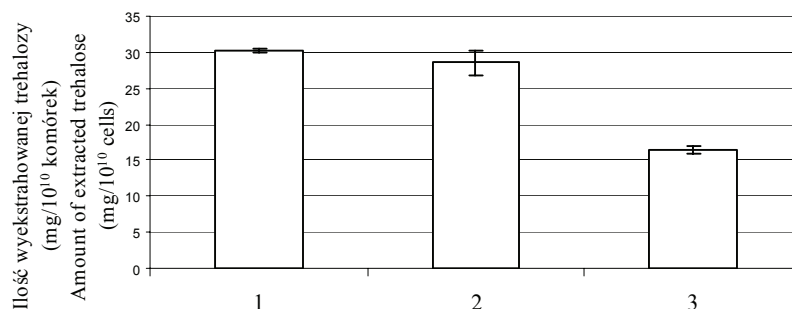


Rys. 2. Zależność współczynnika odpowiedzi  $R_f$  oraz zdolności rozdzielczej kolumny  $R_s$  od procentowego udziału acetonitrylu w eluencie (Carbohydrate Analysis Kolumn – Waters).

Fig. 2. Dependence between the response factor  $R_f$  and resolving power of  $R_s$  column and the per cent rate of content of acetonitrile in eluent (Carbohydrate Analysis Column – Waters).

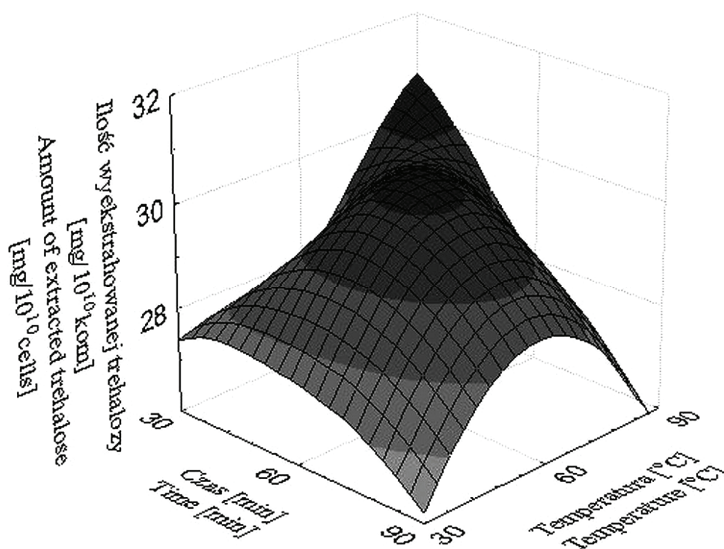
W kolejnym etapie sprawdzano wpływ temperatury i czasu trwania dezintegracji na efektywność ekstrakcji trehalozy z komórek drożdży. Najefektywniejsza ekstrakcja zachodziła w temp. 60 °C przez 60 min oraz w temp. 90 °C przez 30 min (rys. 4). Różnice w ilości wyekstrahowanej trehalozy z zastosowaniem wyżej wymienionych parametrów nie były statystycznie istotne ( $p > 0,999$ ; ANOVA dla układów czynnikowych, test Tukeya, Statistica 6.1). Za optymalną temperaturę i czas trwania dezintegracji przyjęto 60 °C i 60 min. Ponadto w temp. 90 °C parowanie eluentu podczas dezintegracji było znaczne, co wymuszało jego uzupełnienie do określonej objętości po za-

kończeniu tego procesu. Stosując temp. 60 °C, taka konieczność nie występowała, gdyż parowanie eluentu było ograniczone. Wpływało to na powtarzalność wyników, która była dwukrotnie większa w przypadku zastosowania temp. 60 °C (współczynnik zmienności wyniósł odpowiednio 0,94 i 1,81 % w przypadku procesu ekstrakcji w 60 °C oraz 90 °C).



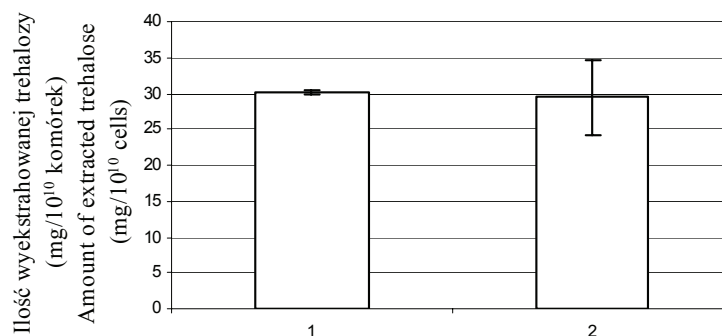
Rys. 3. Wpływ sposobu dezintegracji komórek na ilość wyekstrahowanej trehalozy (1- dezintegracja w 1 ml elentu, bez odparowywania; 2 – dezintegracja w 5ml etanolu i jego odparowanie w 105°C; 3 – dezintegracja w 5ml etanolu i jego odparowanie na wyparce próżniowej)

Fig. 3. Impact of cell disintegration scheme on the amount of extracted trehalose (1 – disintegration in 1 ml of eluent with no evaporation; 2 – disintegration in 5ml of ethanol and its evaporation at 105°C; 3 – disintegration in 5ml of ethanol and its evaporation using vacuum evaporator).



Rys. 4. Wydajność ekstrakcji trehalozy z komórek drożdży w zależności od temperatury i czasu trwania procesu dezintegracji.

Fig. 4. Efficiency of trehalose extraction from yeast cells depending on temperature and duration time of disintegration process



Rys. 5. Ekstrakcja trehalozy z komórek drożdży (1) oraz prób zawierających komórki drożdży i mąkę kukurydzianą (2).

Fig. 5. Trehalose extraction from yeast cells (1) and from samples containing yeast cells and cornstarch flour (2).

W kolejnym etapie doświadczeń badano wpływ obecności mąki kukurydzianej na proces ekstrakcji. W tym celu dezintegracji poddano próbę pobraną z bioreaktora (zawierającą mąkę kukurydzianą). Nie zaobserwowano kleikowania skrobi kukurydzianej obecnej w próbce podczas dezintegracji komórek drożdży z zastosowaniem wytypowanych parametrów (temp. 60 °C przez 60 min). Ilość wyekstrahowanej trehalozy nie różniła się w sposób statystycznie istotny od ilości trehalozy wyekstrahowanej z samych komórek (rys. 5.) i pozwoliła na znaczne skrócenie czasu przygotowania prób.

### Wnioski

1. Wytypowane metody oznaczania trehalozy techniką HPLC mogą być wykorzystane do analizy trehalozy w próbach zawierających inne disacharydy (np. maltozę czy sacharozę), umożliwiają jej wykrycie na niskim poziomie (LOD < 1 µg) i cechują się dobrą precyzją (CV < 2 %).
2. Zastosowanie kolumny Carbohydrate Analysis Column (Waters) i eluentu o składzie ACN : MeOH : H<sub>2</sub>O (60 : 15 : 25) umożliwiło wykrycie trehalozy na poziomie 0,175 µg, zapewniło oddzielenie trehalozy od pozostałych disacharydów, jednak nie pozwoliło na całkowity rozdział maltozy od sacharozy.
3. Zastosowanie kolumny Nucleosil NH<sub>2</sub> (Machery-Nagel) i eluentu o składzie ACN : MeOH : H<sub>2</sub>O (70 : 15 : 15) umożliwiło całkowity rozdział wszystkich badanych cukrów (trehaloza, sacharoza, maltoza). Była to jednak metoda, która umożliwiła wykrycie trehalozy dopiero na poziomie 0,681 µg i charakteryzowała się mniejszą precyzją.

4. Metoda dezintegracji w obecności mieszaniny ACN : MeOH : H<sub>2</sub>O (60 : 15 : 25) może z powodzeniem zastąpić metody ekstrakcji z wykorzystaniem etanolu, co znacznie upraszcza proces przygotowywania prób do analizy (brak konieczności użycia wyparki).
5. Wytypowano temperaturę 60 °C i czas 60 min jako najlepsze parametry procesu ekstrakcji trehalozy z komórek drożdży.

*Badania wykonano w ramach grantu MNiSW 0619/P01/2007/02.*

### Literatura

- [1] Argüelles J.C.: Heat – shock response in a yeast *tps1* mutant deficient in trehalose synthesis. FEMS Yeast Res., 1994, **6**, 120-128.
- [2] Brinn M.: Transketolase: clinical aspects. Methods in Enzymology, ed. Colowick S.P., Kaplan N.O., Academic Press, 1966, pp. 506-514.
- [3] Dong Y., Yang Q., Jia S., Cio C.: Effects of high pressure on the accumulation of trehalose and glutathione in the *Saccharomyces cerevisiae* cells. Biochem. J., 2007, **37**, 226-230.
- [4] Ferreira J.C., Paschoalin V.M.F., Panek A.D., Trugo L.C.: Comparison of three different methods for trehalose determination in yeast extracts. Food Chem., 1997, **2**, 251-254.
- [5] Ferreira J.C., Thevelein J.M., Hohmann S., Paschoalin V.M., Trugo L.C., Panek A.D.: Trehalose accumulation in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deleted in the UDPG-dependent trehalose synthase-phosphatase complex. Biochim. Biophys. Acta, 1997, **1335**, 40-50.
- [6] Grajek W., Szymanowska D.: Stresy środowiskowe działające na drożdże *Saccharomyces cerevisiae* w procesie fermentacji etanolowej. Biotechnologia, 2008, **3 (82)**, 46-63.
- [7] Hallsworth J.E., Magan N.: A rapid HPLC protocol for detection of polyols and trehalose. J. Microbiol. Meth., 1997, **29**, 7-13.
- [8] Hallsworth J.E., Magan N.: Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. Appl. Environ. Microbiol., 1996, **62 (7)**, 2435-2442.
- [9] Higashiyama T.: Novel functions and applications of trehalose. Pure Appl. Chem., 2002, **74**, 1263-1266.
- [10] Holovati J.L., Acker J.P.: Spectrofotometric measurement of intraliposomal trehalose. Cryobiol., 2007, **55**, 98-107.
- [11] <http://www.pg.gda.pl/chem/Dydaktyka/Analityczna/ProfKaminski/3/11.pdf>: Oznaczanie ilościowe w HPLC.
- [12] Kadar Z., Szengyel Z., Reczey K.: Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. Ind. Crops and Products, 2004, **20**, 103-110.
- [13] Konieczka P., Namieśnik J.: Walidacja procedur analitycznych. W: Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych. WNT, Warszawa 2007, s. 275-276.
- [14] Miyazaki J.-I., Miyagawa K.-I., Sugiyama Y.: Trehalose accumulation by a basidiomycotinous yeast, *Filobasidium floriforme*. J. Ferment. Bioeng., 1996, **4**, 315-319.
- [15] Murray D.B., Hayashida Y., Nishimura K.: Trehalose analysis using ion exchange HPLC coupled with electrochemical detection. Biotech. Techniq., 1997, **11 (4)**, 269-270.
- [16] Page-Sharp M., Behm C.A., Smith G.D.: Involvement of the compatible solutes trehalose and sucrose in the response to salt stress of cyanobacterial *Scytonema* species isolated from desert soils. Biochim. Biophys. Acta, 1999, **1472**, 519-528.

- [17] Rao R.S., Jyothi Ch.P., Prakasham R.Sh., Rao Ch.C., Sarma P. N., Rao L.V.: Strain improvement of *Candida tropicalis* for the production of xylitol: biochemical and physiological characterisation of wild-type and mutant strain CT-OMV5. *J. Microbiol.*, 2006, **1**, 113-120.
- [18] Szczepaniak W.: Wysokosprawna chromatografia cieczowa. W: Metody instrumentalne w analizie chemicznej. PWN, Warszawa 2002, s. 258-259.
- [19] Tracey M. S., Watson K.: Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1998, **169**, 191-197.
- [20] Vianna C.R., Silva C.L.C., Neves M.J., Rosa C.A.: *Saccharomyces cerevisiae* strains from traditional fermentations of Brazilian cachaca: trehalose metabolism, heat and ethanol resistance. *Antonie van Leeuwenhoek. Int. J. Gen. Mol. Microb.*, 2008, **93**, 205-217.
- [21] Wera S., Schrijver de E., Geyskens I., Nwaka S., Thevelein J.M.: Opposite roles of trehalase activity in heat-shock recovery and heat-shock survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, 1999, **343**, 621-626.
- [22] Wolska-Mitaszko B.: Trehaloza – substancja przedziwna. Właściwości, występowanie, zastosowanie. *Biotechnologia*, 2001, **53**, 36-53.
- [23] Zhou Y., Yuan Q., Gao H., Ma R.Y.: Production of trehalose by permeabilized *Micrococcus QS412* cells. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2006, **43**, 137-141.
- [24] Zimmermann, F.K., Eaton N.R.: Genetics of induction of catabolic repression of maltose synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gener. Genet.*, 1974, **134**, 165-275.

#### OPTIMIZING THE PROCESS OF EXTRACTING TREHALOSE FROM YEAST CELLS AND SPECIFYING PARAMETERS OF ITS DETERMINATION BY HPLC TECHNIQUE

##### S u m m a r y

A technique of High Performance Liquid Chromatography was applied to determine trehalose in the samples, which could contain other disaccharides (maltose, sucrose). Two columns and various mobile phases of eluents were tested as regards the efficiency of resolution. The limits of detection and determination were estimated as were the range of linearity and the precision of the selected methods. Moreover, the process of extracting trehalose from yeast cells was as regards the disintegrating substance, temperature, and extraction duration time).

**Key words:** trehalose, HPLC, *Saccharomyces cerevisiae* ☒