

Możliwości zastosowań, potencjalne źródła oraz ewolucja technologiczna sposobu otrzymywania trehalozy ze szczególnym uwzględnieniem enzymu syntazy trehalozy [EC 5.4.99.16]

1. Wprowadzenie

Trehaloza ze względu na swoje specyficzne właściwości może znaleźć znacznie szersze niż obecnie zastosowanie w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym i innych. Badania dotyczące przydatności trehalozy nie są zakończone i wciąż poszukiwane są nowe możliwości zastosowania tego cukru. Podstawowym czynnikiem ograniczającym stosowanie trehalozy jest cena wynikająca między innymi ze stosowanych do tej pory technologii otrzymywania. Dlatego jednym z warunków dalszego rozpowszechniania zastosowania i produkcji trehalozy jest obniżenie kosztu jej produkcji oraz uproszczenie procesu produkcji. Opracowanie nowych, bardziej wydajnych oraz tańszych metod otrzymywania trehalozy przyczyniłoby się do szerszego jej zastosowania. Szlaki biosyntezy trehalozy są różne w zależności od stosowanego mikroorganizmu. Pierwsze przemysłowe metody otrzymywania trehalozy charakteryzowały się niską wydajnością i wysokimi kosztami produkcji. Poszukiwanie nowych źródeł enzymów zdolnych do biosyntezy tego disacharydu doprowadziło do nowych, bardziej wydajnych sposobów otrzymywania. Obecnie najbardziej obiecującymi są metody produkcji trehalozy z wykorzystaniem enzymów rekombinantowych. Ponadto stało się możliwe zapewnienie ciągłości procesu poprzez zastosowanie enzymów immobilizowanych, których zaletą jest możliwość łatwego usunięcia ze środowiska reakcji po jej zakończeniu. Co więcej, można je wielokrotnie wykorzystywać w kolejnych szarżach produkcyjnych oraz wyeliminować konieczność inaktywacji enzymu po uzyskaniu danego stopnia konwersji substratu lub enzymów degradujących produkt [1, 2].

2. Potencjalne źródła enzymów biosyntetyzujących trehalozę

W początkowym stadium badań nad trehalozą, uważano że disacharyd ten rzadko występuje w organizmach żywych, a spotykany jest głównie u drożdży lub larw niektórych owadów. Jego obecność stwierdzono u wielu gatunków organizmów [3]. Trehaloza jest wykrywana głównie u anhydrobiontów. Te niezwykle organizmy, takie jak: krewetki, cysty niektórych małży, poczwarki owadów, drożdże piekarskie czy rośliny wskrzeszone, są zdolne przetrwać przez wiele lat w stanie odwodnienia.

¹ pawel.filipkowski@pg.edu.pl, Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, <http://pg.edu.pl>

W sytuacji, gdy z organizmu zostaje usunięte 99% całkowitej zawartości wody, anhydrobionty mogą kontynuować czynności życiowe niezwłocznie po rehydratacji. Obecność trehalozy została również stwierdzona w niewielkich ilościach w surowcach i produktach spożywczych takich jak: białe wino, grzyby jadalne, miód, słonecznik. Występuje także w pieczywie, piwie oraz occie winnym.

Początkowo sądzono także, że trehaloza spełnia funkcje głównie magazynu energii wspólnie z glikogenem, ale wykazano, że bierze ona także udział na przykład w odpowiedzi na stres środowiskowy [4].

Trehaloza jest produkowana przez organizmy żywe w odpowiedzi na zmiany parametrów środowiskowych, na skutek gwałtownych zmian temperatury (zarówno wzrost jak i obniżenie się), pod wpływem stresu wywołanego zmianą ciśnienia osmotycznego i zawartości tlenu w środowisku lub wprowadzenia substancji toksycznych [5].

Próby otrzymywania trehalozy (jak w większości przypadków w biotechnologii) polegały na poszukiwaniu organizmów wytwarzających ten dwucukier lub akumulujących go w odpowiednio wysokich ilościach, a następnie jego izolacji. Poniżej przedstawiono kilka przykładów organizmów, które brano pod uwagę w trakcie takiej próby wyselekcjonowania szerepu produkcyjnego.

Disacharyd ten występuje w różnych organizmach takich jak: drożdże, grzyby, owady, bakterie, i niektóre rośliny. U grzybów *Neurospora crassa* disacharyd ten stanowi do 14 % suchej masy komórkowej [6]. U grzybów strzępkowych i drożdży trehaloza znajduje się w sporach i sklerocjach. Jest ona gromadzona podczas niedostatku pożywienia i sporulacji, a wykorzystywana w okresie kiełkowania spor [7].

Stwierdzono, że bakterie propionowe zwiększają akumulację trehalozy pod wpływem stresu środowiskowego, takiego jak na przykład: niska temperatura, zmiany pH, wysokie ciśnienie osmotyczne. Ilość wytworzonej trehalozy przez propionibakterie zależy od szczepu i warunków hodowli. Na przykład w hodowli szczepu *P. acidipropionici* ATCC4875 uzyskano 1,52 g/l trehalozy. Z kolei szczep *P. Freudenreichii* ssp. *Shermanii* NCIM 5137 jest zdolny do akumulacji trehalozy w ilościach 0,4 g/g suchej masy [8-12].

W przypadku *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* oraz halofilnych sinic cukier ten bierze udział w procesach związanych z osmoadaptacją, co można zauważyć poprzez akumulację trehalozy w warunkach na przykład stresu osmotycznego. Podczas niedoboru cholicy, betainy oraz proliny w środowisku życia *E. coli*, trehaloza zalewnia tolerancję osmotyczną [13].

W organizmach ekstremofilnych takich jak *Deinococcus radiodurans* czy *Deinococcus geothermalis* mechanizm wytwarzania trehalozy koegzystuje wraz z innymi mechanizmami zapewniającymi przeżycie, takimi jak na przykład tworzenie białek chroniących DNA [14-19].

Disacharyd ten w wielu przypadkach jest tak istotny że wykazano, iż często istnieje więcej niż tylko jeden mechanizm wytwarzania trehalozy w komórkach.

Pewne ilości trehalozy pochodzącej z drożdży znajdują się w takich produktach spożywczych jak: chleb (1,2-1,5 g/kg s.m.), piwo (45-200 mg/l), wino (44-129 mg/l)



i miód (0,1-2,3 g/100 g). Grzyby jadalne zawierają 2-12 g trehalozy/100 g s.m. Około 7% trehalozy występuje w mianie używanej jako słodzik do kawy przez Beduinów w północnym Iraku. *Nota bene* sugeruje się iż ten „odpad” powstający w trakcie fazy rozwojowej chrząszczy ma jakiś związek z biblijną „trehalą manna”-„manna z nieba”. Krew homarów *Homarus americanus* i krabów *Carcinus macenus* zawiera cukier ten w stężeniach 2,5 i 1,5 mg/100 ml [20].

Trehaloza jest rzadko spotykana w roślinach wyższych. Jedynie w prymitywnych gromadach roślin naczyniowych oraz w roślinach u których zidentyfikowano zjawisko mikoryzy, jak również w brodawkach roślin motylkowatych obserwuje się jej obecność. Rośliny pomimo braku trehalozy wytwarzają trehalazę, enzymem degradujący wymieniony cukier [21].

Dobrym źródłem tego cukru są drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Są one zdolne do syntezy trehalozy w ilościach atrakcyjnych do wykorzystania na skalę przemysłową, lecz niestety także do efektywnej jej hydrolizy do glukozy, (dzięki czemu mogą szybko przechodzić ze stanu anabiozy do stanu pełnej aktywności metabolicznej) [21]. Szok termiczny bądź niektóre składniki środowiska takie jak utleniacze, metale ciężkie albo rozpuszczalniki organiczne powodują akumulację trehalozy w drożdżach *S. cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* [22]. Zawartość tego cukru w komórkach drożdży wzrasta, gdy podczas hodowli podda się je działaniu etanolu, NaCl, siarczaniu miedzi czy nadtlenku wodoru. Substancje te w odróżnieniu od oranżu akrydyny, bromku etydyliny czy glukozy indukują wytwarzanie trehalozy [23].

Drożdże stanowiły pierwsze wykorzystywane na skalę przemysłową źródło trehalozy co zostanie opisane w dalszej części pracy.

3. Biosynteza trehalozy w organizmach żywych

Obecnie znanych jest siedem dróg biosyntezy trehalozy. Według ilości etapów koniecznych do wytworzenia trehalozy dzieli się je na jednostopniowe i dwustopniowe [24].

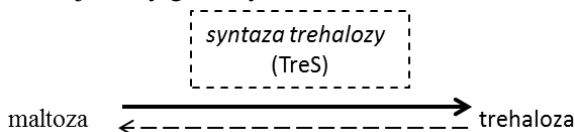
3.1. Jednoetapowe drogi biosyntezy trehalozy

Pierwsza z nich stanowi główny przedmiot zainteresowań autora opracowania i polega na izomeryzacji wiązania α -(1,4) w maltozie do wiązania α -(1,1), w wyniku czego powstaje trehaloza (rys. 1). Enzymem odpowiedzialnym za przebieg tej reakcji jest syntaza trehalozy (TreS), który powinien prawidłowo być nazywany α -D-glukozylotransferazą maltozy lub też α -D-glukozyłomutazą maltozy (EC 5.4.99.16).

Szlak ten został zidentyfikowany u bakterii *Pimelobacter sp.* R48 oraz *Pseudomonas putida* H242 i niektórych szczepach *Thermus*. Reakcja ta zachodzi niezależnie od obecności trehalozo-6-fosforanu i glukozo-6-fosforanu, które stanowią substraty dla drugiego często spotykanego równocześnie w komórkach enzymu: fosfatazy trehalozo-6-fosforanu i fosforylasy trehalozy [25]. Szczepy *Thermus aquaticus* i *Thermus caldophilus* GK24 wytwarzają enzymy katalizujące konwersję trehalozy w maltozę lub reakcję odwrotną tj. przemianę maltozy w trehalozę [26-28]. Zarówno z biochemicznego punktu widzenia jak i ze względu na potencjał aplikacyjny szlak ten jest

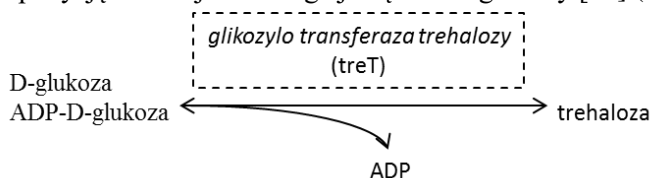


najprostszym i najbardziej pożądanym. Między innymi dlatego, że nie wymaga jako substratu ufosforylowanej formy glukozy.



Rysunek 1. Schemat biosyntezy trehalozy z maltozy z udziałem TreS; identyfikowany głównie u *Eubacteriaceae* [26]

Kolejny szlak biosyntezy trehalozy odnotowano u archeonów *Thermococcus litoralis* oraz *Pyrococcus horikoshi*. Enzymem odpowiedzialnym za jego przebieg jest glikozylotransferaza trehalozy (TreT). Przenosi ona resztę glukozy z ADP-glukozy i przyłącza ją w pozycję numer jeden drugiej cząsteczki glukozy [29] (rys. 2).



Rysunek 2. Biosynteza trehalozy, w której substrat stanowi ADP glukoza, przebiegająca np. u *Thermococcus litoralis* [30]; identyfikowany głównie u bakterii i archeonów [29]

Ostatni, jednoetapowy szlak biosyntezy trehalozy odkryto u *Thermoproteus tenax*. Jest on analogiczny do szlaku typowego dla *T. litoralis* (opisanego powyżej), jednakże preferowanym substratem dla enzymu jest UDP-glukoza (a nie ADP-glukoza) oraz reakcja katalizowana jest wyłącznie jednokierunkowo [31].

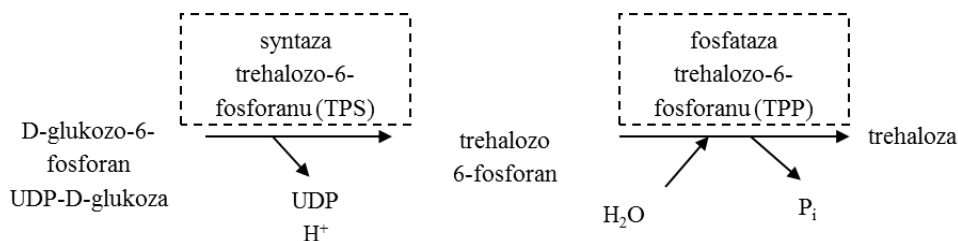
3.2. Dwuetapowe drogi syntezy trehalozy

Otrzymywanie trehalozy przez organizmy w dwóch etapach łączy występowanie produktu pośredniego jakim jest trehalozo-6-fosforan z wyjątkiem ostatniego opisanego poniżej, gdzie cząsteczki disacharydu są niejako „odcinane” bezpośrednio z dłuższego polimeru glukozy jakim są maltooligosacharydy.

Pierwszą odkrytą drogą syntezy tego dwucukru, zaobserwowaną u archea, eubakterii (*E. coli*), grzybów i drożdży (*S. cerevisiae*), owadów i niektórych roślin, była dwustopniowa enzymatyczna kataliza przeprowadzana przez syntazę trehalozo-6-fosforanu (TPS) i fosfatazę trehalozo-6-fosforanu (TPP).

TPS (EC 2.4.1.15) stanowi transferazę, katalizującą przeniesienie cząsteczki glukozy z UDP-glukozy na glukozo-6-fosforan, w wyniku czego powstaje trehalozo-6-fosforan i wolne UDP.

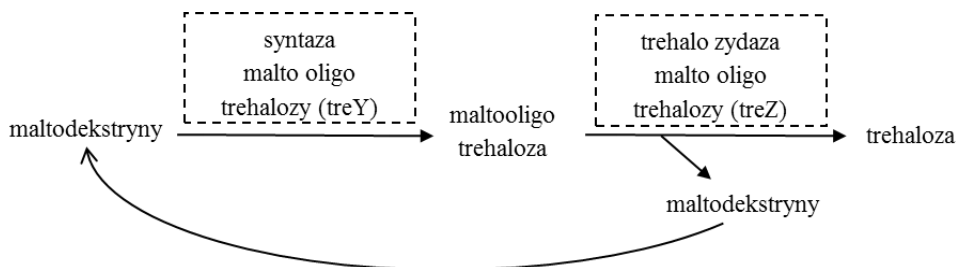
W drugim etapie zachodzi defosforylacja trehalozo-6-fosforanu przy udziale fosfatazy trehalozo-6-fosforanu TPP (EC 3.1.3.12) z utworzeniem trehalozy i nieorganicznego fosforanu [32] (rys. 3).



Rysunek 3. Biosynteza trehalozy z UDP-glukozy[32]

Kolejne dwie dwuetapowe drogi biosyntezy trehalozy przypominają tę opisaną powyżej, z tą różnicą, że jednym z substratów jest ADP-glukoza lub GDP-glukoza i odpowiednia syntaza w pierwszym etapie. Tego typu biosynteza trehalozy występuje głównie grzybów *Streptomyces hygroscopicus* i zmutowanych szczepów *S. cerevisiae* S288c [29].

Następnie, u niektórych szczepów mezofilnych bakterii, takich jak np. *Arthrobacter* sp. Q36, *Brevibacterium*, *Micrococcus* i *Rhizobium* oraz u hipertermofilnych archeonów: *Sulfolobus shibatae* DMS 5389, *Sulfolobus solfataricus* i *Sulfolobus acidocaldarius* trehaloza jest wytwarzana w specyficzny sposób z maltooligosacharydów. Nie zachodzi tu synteza, a raczej swego rodzaju „odcinanie” dwuglukozowej cząsteczki od polimeru glukozy. W pierwszym etapie syntaza maltooligosacharydów trehalozowych (MTS) przekształca od nieredukującego końca cząsteczki substratu wiązanie α -1,4- na wiązanie α -1,1-glikozydowe w procesie wewnątrzcząsteczkowej transglikozyzacji. Wytworzona maltooligozylotrehaloza jest następnie hydrolizowana przy udziale trehalohydrolazy maltooligozylotrehalozy (MTH) do trehalozy i maltooligosacharydu o cząsteczce zmniejszonej o dwie reszty glukozowe. Wymienione powyżej enzymy są kodowane przez geny treY (syntaza malto oligo trehalozy) oraz treZ (trehalozydaza malto oligo trehalozy). Aktualnie na skalę przemysłową jest to metoda dzięki której wytwarza się najwięcej trehalozy. Cały etap jest poprzedzony działaniem izo-amylazy na skrobię [33-36] (rys. 4).



Rysunek 4. Biosynteza trehalozy z maltodekstryn, mająca miejsce np. u *Sulfolobus acidocaldarius* [34, 35]

4. Charakterystyka syntazy trehalozy

Trehaloza syntetyzowana przy udziale syntazy trehalozy powstaje na skutek transformacji maltozy, przeprowadzanej przy udziale jednego tylko enzymu.

Największymi zaletami biosyntezy trehalozy powyższą drogą są [1, 18, 19]:

- jednoetapowość reakcji konwersji maltozy,
- duża wydajność procesu,
- dostępność substratów w postaci ogólnodostępnych i stosunkowo tanich syropów maltozowych.

Z uwagi na szereg zalet enzym syntazy trehalozy cieszy się coraz większym zainteresowaniem [37-44].

Właściwości enzymu biorącego udział w jednoetapowej biosyntezie trehalozy są zależne od rodzaju mikroorganizmu, z jakiego został wyizolowany (tab. 1.)

Głównym przedstawicielem mezofili produkujących syntazę trehalozy jest *Pseudomonas sp. F1*. Białko to jest tetramerem o masie cząsteczkowej 250 kDa i pI 5,8. Maksymalną aktywność enzymatyczną wykazuje w temperaturze 45°C, przy pH wynoszącym 7,0 [45].

Syntazę trehalozy charakteryzującą się termostabilnością uzyskano z bakterii rodzaju *Thermus* (*T. aquaticus*, *T. thermophilus*, *T. caldophilus*). *T. aquaticus* ATCC 33923 wytwarza enzym o masie cząsteczkowej 105 kDa i pI 4,3 oraz optimum działania w temperaturze 65°C i pH 6,6. Enzym katalizuje konwersję maltozy do trehalozy, ale uwalnia również niewielką ilość glukozy, gdyż przeprowadza też reakcję odwrotną.

Znanymi inhibitorami syntazy trehalozy są również kationy Cu^{2+} , Zn^{2+} i Hg^{2+} [27, 28].

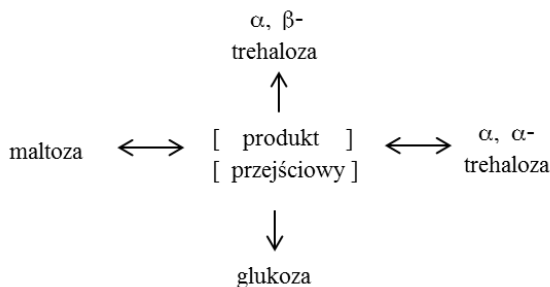
Tabela 1. Porównanie wybranych właściwości syntazy trehalozy pochodzącej z różnych mikroorganizmów

Szczep Syntaza trehalozy	<i>D. radiodurans</i>	<i>D. geothermalis</i>	<i>Pimelobacter sp. R48</i>	<i>Pseudomonas sp. F1</i>	<i>M. ruber</i>	<i>T. aquaticus</i>	<i>T. thermophilus</i>
Masa cząsteczkowa (kDa)	61	65	62	67	110	105	106
Punkt izoelektryczny	4,9	4,9	4,6	5,8	bd	4,3	5,7
Temperatura optymalna (°C)	15	40	20	45	50	65	65
Optymalne pH	6,5	7,6	7,5	7	6,5	6,5	6,5
Stabilność termiczna	Poniżej 40°C (2h)	Poniżej 55°C (4h)	Poniżej 30°C (2h)	Poniżej 55°C (2h)	Poniżej 60°C (2h)	Poniżej 80°C (2h)	Poniżej 80°C (2h)
Stabilność w pH	5,0-8,0 (2h)	6,5-9,0 (1h)	6,0-9,0 (1h)	7,0-9,0 (1h)	4,0-8,0 (1h)	5,5-9,5 (1h)	6,0-9,0 (2h)
Literatura	Filipkowski i in., 2012	Filipkowski i in., 2012	Nishimoto i in., 1996	Oghuchi i in., 1997	Zhu i in., 2010	Nishimoto i in., 1996	Wang i in., 2007

Źródło: Opracowanie własne na podstawie pozycji literaturowych przedstawionych w tabeli



Maksymalne wydajności otrzymywania trehalozy z maltozy przy zastosowaniu enzymu syntazy trehalozy wynoszące około 80%, notuje się aktualnie dla mikroorganizmów z rodzaju *Thermus*. Niestety poza koniecznością stosowania podwyższonej temperatury oczyszczony enzym katalizuje konwersję maltozy w trehalozę oraz reakcję odwrotną trehalozy w maltozę uwalniając z obydwu substratów produktu uboczny w postaci glukozy. Dodatkowo w przypadku *T. caldophilus* zanotowano oprócz glukozy powstawanie niewielkiej ilości α, β - trehalozy. Ilość powstających produktów ubocznych wzrasta w podwyższonej temperaturze (rys. 5)[28].



Rysunek 5. Schemat konwersji maltozy w trehalozę i trehalozy w maltozę z otrzymywanymi produktami ubocznymi [28].

5. Szlaki anaboliczne trehalozy

Degradacja trehalozy zachodzi przy udziale różnych enzymów o budowie i właściwościach zależnych od rodzaju drobnoustroju. Zasadniczo enzymem degradującym ten disacharyd jest trehalaza. *Euglena* i *Pichia fermentas* hydrolizują ten cukier przy udziale trehalozo-fosfotazy (EC 2.4.1.64). Hydrolaza trehalozo-fosforanu (EC 3.2.1.93) występuje u *Bacillus popillae* i *E. coli*. U innych bakterii, roślin, grzybów i zwierząt trehaloza jest hydrolizowana z udziałem innych trehalaz (EC 3.2.1.28). Ich miejsce występowania i koegzystencja w komórkach może mieć regulacyjny wpływ i podlegać wpływom czynników zewnętrznych [21].

Z aplikacyjnego punktu widzenia sposób trawienia trehalozy przez człowieka znajduje znaczenie w diecie sportowców i osób z cukrzycą. Kaloryczność trehalozy nie różni się od popularnej sacharozy, jednakże jej spożywanie powoduje zanotowanie innego profilu metabolicznego. U sportowców, którym podawano trehalozę i poddanych wysiłkowi fizycznemu obserwowany inny w czasie wyrzut insuliny do krwi i niższy indeks glikemiczny. Związane to było z trudniejszą „przyswajalnością” trehalozy przez nasz organizm objawiający się zredukowanym i przesuniętym w czasie obserwowanym plikiem glukozy we krwi sportowców oraz zaobserwowanym bardziej korzystnym profilem utleniania lipidów. W kontekście ostatnich badań nad przepuszczalnością jelit i mikrobiotą naszego przewodu pokarmowego nieznaną jest długofalowy wpływ przyjmowania trehalozy w diecie na naszą mikroflorę pokarmową [48, 49].



6. Regulacje prawne dotyczące stosowania trehalozy

W 1994 roku w Japonii firmie Hayashibara udało się po raz pierwszy wyprodukować trehalozę zaaprobowaną rok później jako dodatek do żywności. Wyprodukowano ją z wykorzystaniem enzymów MTS, MTH opisanych powyżej. Od tego czasu jest stosowana bez ograniczeń w setkach japońskich produktów takich jak: wyroby cukiernicze, napoje, przetworzone warzywa i owoce, wyroby piekarnicze oraz mrożonki.

W Japonii, Europie oraz w USA trehaloza jest także używana w przemyśle kosmetycznym oraz w produktach higieny osobistej. W 1991 roku w Wielkiej Brytanii trehaloza została dopuszczona do użycia w przemyśle jako środek ochronny do żywności liofilizowanej w stężeniach nie większych od 5% produktu. W Korei i Tajwanie w 1998 roku została dopuszczona bez ograniczeń jako składnik żywności. W USA w 2000 roku została uznana za bezpieczny składnik żywności (ang. generally recognized as safe – GRAS), a w 2001 roku osiągnęła ten sam status w krajach Unii Europejskiej (EC 258/97 EU oraz 2001/721/EC). Obecnie użycie trehalozy w przemyśle żywnościowym jest ograniczone tylko Dobrą praktyką przemysłową (ang. Good Manufacturing Practice – GMP). Z powyższego wynika, że obowiązujące na świecie regulacje prawne dopuszczają dodatek trehalozy do żywności, a jej dzienne spożycie nie jest dotychczas ograniczone [4].

7. Zastosowania trehalozy

Aktualne i potencjalne możliwości wykorzystania trehalozy związane są z jej specyficznymi właściwościami.

Ze względu na brak występowania wiązania wodorowego pomiędzy tlenem pierścienia glikozydowego, a grupą hydroksylową sąsiedniej jednostki strukturalnej, możliwe są w cząsteczce trehalozy duże zmiany położenia reszt glukozy względem wiązania glikozydowego. Zapewnia to dostosowanie kształtu cząsteczki disacharydu do konformacji makrocząsteczki, z którą tworzy kompleks.

Cukier ten pełni funkcje ochronne komórek i makrocząsteczek. Zapobiega ich rozrywaniu przez rosnące kryształki lodu podczas zamrażania, a także chroni przed utratą wody i wysychaniem. Funkcje te tłumaczy się między innymi zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy tym disacharydem, a polarnymi grupowaniami białek.

Trehaloza może przyjmować formę ciekłokrystaliczną, dzięki czemu tworzy niehigroskopijne szkliwo, zapewniając jednocześnie płynność i dynamiczność błon komórkowych [5].

7.1. Przemysł spożywczy i paszowy

Disacharyd ten obecnie bywa stosowany jako zamiennik sacharozy w przemyśle spożywczym, w produkcji wyrobów cukierniczych, napojów, mrożonek, przetworów owocowo-warzywnych lub konserw.

Trehaloza nie ulega reakcji Maillarda, w związku z czym nie powoduje brunatnienia produktów żywnościowych. Dodatkowo jej termostabilność i odporność na



środowisko kwaśne, pozwoliła wykorzystać ją jako dodatek do mleka suszonego rozpyłowo. Poza tym trehaloza ogranicza zmiany lepkości, przebiegające podczas przechowywania przetworów owocowo-warzywnych [3, 37].

Trehaloza zastępuje często sacharozę, stosowaną w produktach spożywczych jako zagęstnik, konserwant czy regulator. Dodatek cukrozy powoduje nadmierną słodkość produktu. Zastosowanie trehalozy, wykazującej 45% słodkości sacharozy, gwarantuje uzyskanie odpowiednich walorów smakowych i charakterystycznych cech danego produktu, ważnych z punktu widzenia producenta.

Przysmaki typowe dla krajów azjatyckich (surimi, kamaboko) zawierają dodatek trehalozy, co gwarantuje dłuższą przydatność produktów do spożycia oraz ich sprężystość i elastyczność, pomimo zachodzących procesów zamrażania i liofilizacji [1].

Trehaloza może być stosowana jako dodatek do pasz dla zwierząt.

Shi (2013) jest autorem zgłoszenia patentowego w którym trehaloza jest alternatywą dla konwencjonalnych antybiotyków w paszy [50].

Wykazano także, że disacharyd ten hamuje wzrost szkodliwych bakterii jelitowych, chroniąc błonę śluzową jelit i wspierając prawidłowy wzrost zwierząt. Trehalozę użyto także do enkapsulacji innych związków, (w tym przypadku enzymów). Okazało się iż w takiej formie wykazują one większą aktywność po ekspozycji na podwyższoną temperaturę w trakcie procesu produkcji paszy dla zwierząt [40].

Wykazano również związek pomiędzy suplementacją diety krów trehalozą, a jakością mleka uzyskiwanego od krów mlecznych [41].

7.2. Przemysł kosmetyczny

Trehaloza pułapkuje i redukuje nieprzyjemny zapach emitowany przez ludzką skórę nawet o 70%. Właściwość ta czyni ten disacharyd użytecznym dodatkiem do kremów oraz dezodorantów [3].

Zapach wydzielany przez skórę, charakterystyczny dla ludzi w wieku powyżej 55 lat, związany jest z obecnością nienasyconych aldehydów, takich jak 2-nonenal i 2-oktenal. Związki te powstają przez degradację nienasyconych kwasów tłuszczowych (głównie kwas oleopalmitynowy). Badania polegające na rozpyleniu na skórę osób starszych 2% roztworu trehalozy wykazały, że disacharyd ten powoduje uwięzienie nienasyconych aldehydów, co związane jest ze spadkiem przykrego zapachu o ok. 70% [51].

Trehaloza zastąpiła kwas hialuronowy w kroplach do oczu stosowanych u pacjentów cierpiących na zespół suchego oka [52].

Kale i współpracownicy w 2016 opracowali monooleinian trehalozy, który doskonale sprawdzał się jako czynnik zapobiegający agregacji zarówno w środowiskach wodnych jak i hydrofobowych [42].

7.3. Zastosowania medyczne

Dzięki temu, że trehaloza zapobiega agregacji czy powstawaniu niewłaściwych form białek, próbuje się ją wykorzystywać do walki z takimi chorobami jak: amyloidoza, choroba Creutzfelda-Jakoba, Huntingtona, mukowiscydoza [53]. Ponadto wy-



kazano, że wzbogacenie trehalozą diety myszy cierpiących na osteoporozę spowodowało, zahamowanie ubytku beleczek kostnych [8, 51].

Odkrycie funkcji trehalozy polegającej na zapobieganiu zmianom konformacyjnym białek, pozwoliło naukowcom wysunąć wnioski co do ewentualnego wykorzystania trehalozy do liofilizowanych szczepionek i wszelkich płynów do iniekcji, zabezpieczając je przed utratą aktywności biologicznej.

Ochrona struktur komórkowych przed niekorzystnymi skutkami zamrażania czy rozmrażania spowodowana tworzeniem kompleksów trehaloza-makromolekuła, przyczyniła się do zastosowania trehalozy w medycynie i weterynarii, m.in. dla wydłużenia przydatności organów przeznaczonych do przeszczepu lub przeżywalności embrionów [52].

Pochodne trehalozy (estry) z kwasem mykolowym znalazły zastosowanie jako czynniki immunostymulujące, aktywujące makrofagi i zwiększające odporność na infekcje bakteryjne i pasożytnicze (poprzez podwyższenie poziomu interleukiny, interferonu). Podawane doustnie i dożylnie powodują regresję guzów nowotworowych [52].

7.4. Inne zastosowania

Stwierdzono przedłużenie trwałości ściętych tulipanów oraz gladioli podczas przechowywania w wodzie zawierającej dodatek trehalozy w ilości 50 - 100 mM [3].

Gen *attps1* z *A. thaliana* koduje enzym syntazę trehalozo-6-fosforanu, który warunkuje niewrażliwość nasion na glukozę zawartą w podłożu. Właściwość ta wykorzystywana jest podczas uprawiania transgenicznych roślin w warunkach aseptycznych. Kiełkowanie i różnicowanie u dzikich odmian roślin jest zahamowane przez glukozę, zatem *attps1* stanowi marker selektywny w czasie procesu transformacji roślin z użyciem glukozy jako czynnika selekcyjnego [3]

Duże znaczenie mogą mieć podjęte już próby wprowadzenia do genomu roślin genów odpowiedzialnych za biosyntezę trehalozy. Celem tych prac jest uzyskanie transgenicznych roślin o zwiększonej odporności na suszę i przymrozki [54].

Estry trehalozy wykorzystywane są do większego i wydajniejszego pozyskiwania ropy naftowej z pokładów piaskowcowych. W przypadku wylewów ropy do środowiska stosuje się emulsje trehalozo-lipidowe, które zmniejszają efekt skażenia środowiska [1].

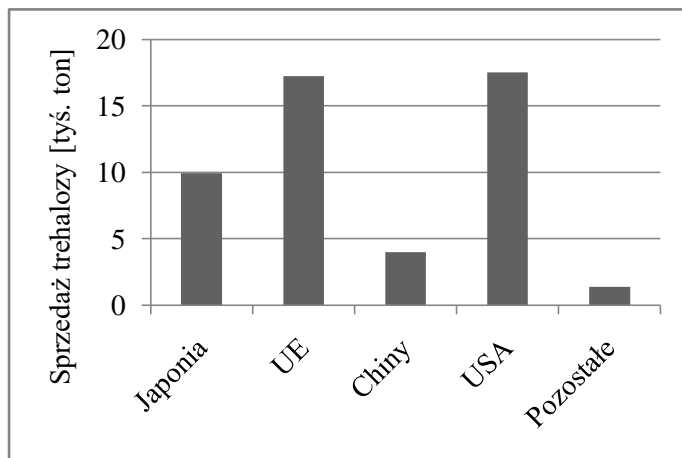
Podsumowując, aktualne i potencjalne możliwości zastosowań trehalozy to:

- substytut sacharozy,
- środek zabezpieczający i stabilizujący (głównie białka) oraz zabezpieczający przed odwodnieniem i zamrażaniem,
- zastosowanie w profilaktyce i leczeniu chorób – przede wszystkim związanych z nieprawidłowym formowaniem białek u człowieka,
- przemysł kosmetyczny,
- przemysł paszowy,
- wzmocnienie/uodpornienie roślin transgenicznych na wysychanie.



8. Otrzymywanie trehalozy na skalę przemysłową

Wielkość sprzedaży trehalozy w ostatnich latach na globalnych rynkach wzrosła dzięki poznaniu szerokiej gamy właściwości tego dwucukru oraz obniżeniu kosztów produkcji (rys. 6).



Rysunek 6. Wielkość sprzedaży trehalozy w roku 2014 (opracowanie własne w oparciu o dane statystyczne)

Aktualnie światowa produkcja trehalozy wynosi około 50 tys ton rocznie i rok do roku notuje się nieznacznie, ale coraz wyższe poziomy produkcji. O potencjale świadczy chociażby podpisanie umowy między światowym potentatem, jakim jest firma Cargill, z oddziałem japońskiego producenta w 2014 roku.

Cukier ten jest wytwarzany przez komórki podczas szoku termicznego (gwałtowny wzrost lub spadek temperatury), a także pod wpływem stresu związanego z nagłą zmianą ciśnienia i zawartości tlenu w środowisku lub wprowadzenia substancji toksycznych. Zjawisko to wykorzystano w pierwszym okresie produkcji trehalozy na skalę przemysłową z zastosowaniem drożdży *S. cerevisiae*.

Koleją zbadaną fizjologiczną rolą trehalozy jest jej udział w procesach Osmoadaptacji mikroorganizmów. W warunkach stresu osmotycznego obserwuje się akumulację tego disacharydu u *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Cyanobacterium sp.*, *Rhodospirillum*. Osmolarność środowiska ma wpływ na wytwarzanie trehalozy przez mikroorganizmy. Wysoka osmolarność indukuje akumulację trehalozy poprzez aktywację enzymów katalizujących syntezę tego cukru. [21].

Dzięki trehalozie drożdże są w stanie przeżyć w temperaturach od 30°C do 40°C. Szok termiczny i innego rodzaju stresy indukują akumulację trehalozy w drożdżach [55, 56]. Wykazuje ona ochronną funkcję, i podobnie jak białka szoku termicznego, jest wytwarzana w odpowiedzi na stres. Drożdże *S. cerevisiae* w odpowiedzi na stres syntetyzują duże ilości trehalozy, która stabilizuje białka oraz zapobiega ich denaturacji. Niestety po ustąpieniu szoku termicznego zawartość trehalozy w komórkach drożdży szybko się obniża [57, 58]. Właściwość ta mocno utrudniała produkcję

trehalozy z zastosowaniem drożdży. Nie bez wpływu na odstąpienie od tej metody produkcji była także obecność trudnej do dezintegracji ściany komórkowej drożdży oraz wysoce kosztowny i energochłonny proces biosyntezy drożdży na skalę przemysłową w specyficznych warunkach.

W tabeli 2 przedstawiono zawartość trehalozy w komórkach drożdży w zależności od fazy rozwoju [59].

Tabela 2. Zawartość trehalozy (% s.m.) w aktywnych fizjologicznie komórkach drożdży i w odwodnionym preparacie handlowym [59].

Rodzaj drożdży i faza wzrostu	Ilość trehalozy [% s.m.]
Logarytmiczny wzrost szczepu <i>S. cerevisiae</i>	0,45
Logarytmiczny wzrost drożdży handlowych	0,41
Odwodniony preparat drożdży handlowych	11,96

Źródło: [59]

W drożdżach *S. cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* ilość disacharydu można również zwiększać poprzez dodanie do hodowli związków chemicznych, takich jak etanol, nadtlenek wodoru, siarczan miedzi lub chlorek sodu [23].

Po hodowli trehaloza była ekstrahowana z komórek drożdży (lub innych organizmów) za pomocą etanolu lub kwasu trichlorooctowego. Wadą metody była skomplikowana procedura deproteinizacji, potrzeba zagęszczania ekstraktu oraz konieczność dezaktywacji endogennej trehalazy, która powodowała hydrolizę produktu.

Do odbiałczania stosowano siarczan rtęci, siarczan cynku lub kwas trichlorooctowy (TCA) [60, 61]. Zanieczyszczenia końcowego produktu niebezpiecznymi substancjami, wysokie koszty i stosunkowo niska wydajność oraz technologia nie sprzyjająca ochronie środowiska hamowały pełniejsze wykorzystywanie trehalozy. Pod koniec ubiegłego wieku koszt jednego kilograma trehalozy ekstrahowanej z komórek drożdży wynosił ponad 100 USD [62, 63].

Ze względu na liczne wady metody, koszt końcowego produktu oraz rozwój nauki, pojawiły się nowe, bardziej skuteczne sposoby produkcji [53].

Aktualnie firma Cargill sprzedaje około 30 tys ton trehalozy rocznie uzyskanej przy pomocy syntazy maltooligozylotrehalazy (MTS) oraz trehalohydrolazy maltooligozylotrehalazy (MTH), wyizolowanych z bakterii *Arthobacter ramosus Q36* (początkowo stosowano *Brevibacterium helvolum*).

Jako substrat stosuje się skrobię ziemniaczaną lub też skrobię z kukurydzy i/lub manioka. Uplynniana jest ona z wykorzystaniem endogennej, termostabilnej α -amylazy z *B. licheniformis*. Reakcję prowadzi się w 40°C, a ilość otrzymanej trehalozy wynosiła początkowo około 66% całkowitej objętości roztworu użytego w reakcji.

Dodatkowo, jako produkty oboczne, powstały oligosacharydy, glukotrehaloza, glukoza oraz pozostawał substrat w postaci maltozy.

Dopiero połączenie aktywności rekombinantowych enzymów wraz z α -amylazą z *Bacillus subtilis*, która pomogła w rozkładaniu łańcuchów bocznych skrobi oraz izoamylazy z *Pseudomonas amyloclavata* oraz glukotransferazy cyklomaltodekstryn



pochodzącej z *Bacillus stearothermophilus*, a także glukoamylazy z *Aspergillus niger* zapewniające rozłożenie pozostałości oligosacharydów i maltozy do glukozy poprawiło możliwości produkcji trehalozy z naturalnych źródeł i stanowiło kolejny „krok milowy” w usprawnieniu stosowanej technologii [34, 64, 65].

Równolegle trwały prace nad wykorzystaniem glukotransferazy oraz α -amylazy uzyskanych z *S. solfataricus*. Optymalny o stosunek między enzymami wynosi 1:1, a konwersja następuje niestety w temperaturze 60°C. Substratem były różne rodzaje maltooligosacharydów, a końcowy wynik dawał 36–67% wydajności. W celu zwiększenia efektywności procesu, jako alternatywnego substratu użyto amylozy o wyższej polimeryzacji, co zwiększyło stopień konwersji do trehalozy, ale nie pozostawało bez wpływu na koszt końcowy [33, 66].

Po etapie konwersji maltozy do trehalozy następuje zazwyczaj odbarwianie na węglu aktywnym, sączenie przez ziemię okrzemkową i/lub perlity, dejonizowanie na żywicach jonowymiennych oraz zagęszczanie roztworu i ostatecznie krystalizacja trehalozy.

Końcowy produkt zawiera około 98% trehalozy, 0,5% glukozy, 0,3% α -D-izomaltozylo- α -D-glukozyltrehalozy i 0,1% glukopiranozydu.

Wdrożenie technologii opartej o MTS i MTH pozwoliło na obniżenie kosztu wytwarzania trehalozy do około 5 USD za kilogram przy czystości pozwalającej na jej zastosowanie w przemyśle spożywczym [67]. Jest to w tej chwili głównie wykorzystywana metoda produkcji trehalozy na dużą skalę.

Aktualnie prace mające na celu udoskonalenie technologii, polegają na otrzymywaniu trehalozy z wykorzystaniem rekombinantowych enzymów immobilizowanych. Pierwszym przykładem może być wykorzystanie fosforylasy trehalozy z *Schizophyllum commune* BT2115 wraz z fosforylazą skrobi z *Corynebacterium callunae* DSM20147. Obydwa enzymy są unieruchamiane wskutek adsorpcji. Substratami są maltodekstryny, glukoza oraz fosforany. Wydajność wynosi 2,6 g/l*h przez 72 godziny procesu [68].

Obiecujące są także prace z zastosowaniem syntazy trehalozy pochodzącej z *D. geothermalis* pozwalające w reakcji ciągłej z enzymem immobilizowanym uzyskać 65% wydajność konwersji [18, 19].

Innym przykładem wykorzystania immobilizacji enzymów jest produkcja z użyciem syntazy trehalozy uzyskanej z grzyba żagwicy listkowej (*Grifola frondosa*). Trehaloza jest produkowana z szybkością 18 mmol/h [69].

W 2016 Li i wsp. zaproponowali alternatywną strategię otrzymywania trehalozy z wykorzystaniem rekombinantowego szczepu *Yarrowia lipolytica* i wtransformowanego genu kodującego syntazę trehalozy z *Picrophilus toroidus* z równoczesną hodowlą *S. cerevisiae* utylizującą do etanolu pozostałą maltozę i produkt uboczny w postaci glukozy. Problemem pozostaje aktywność hydrolizujących główny produkt trehalozydaz w obu szczepach drożdży [43].

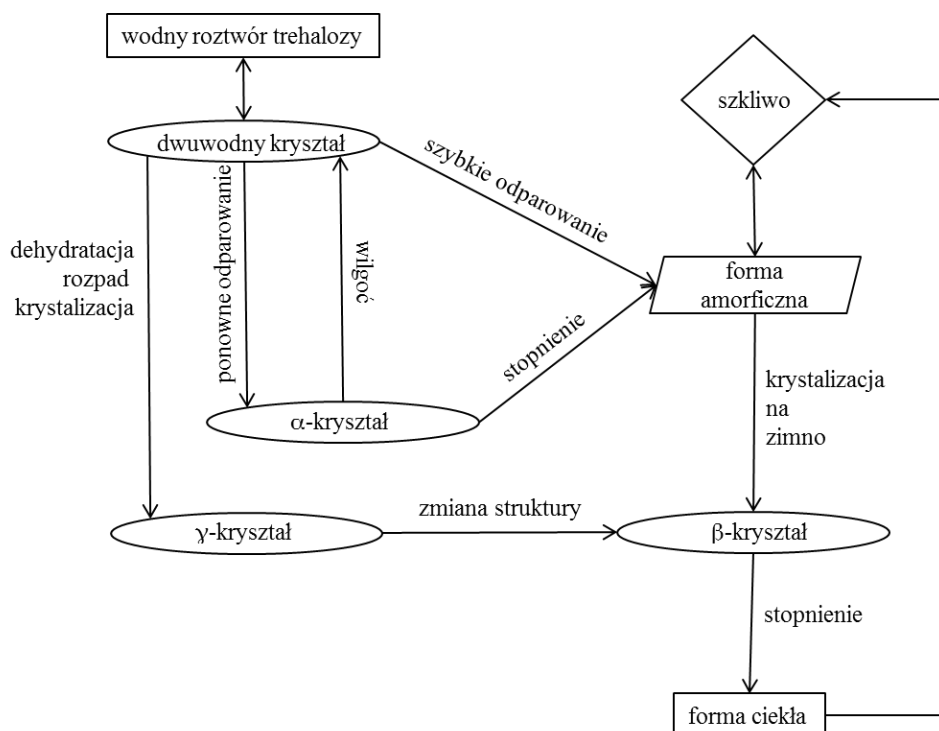
Jeszcze inne podejście zaprezentowali Zheng i inni (2015). Wykorzystali zintegrowany z *E. coli* gen kodujący syntazę trehalozy pochodzącą z *Pseudomonas stutzeri* A1501. Równocześnie na gospodarzu ekspresyjnym wymusili stałą, niezagrażającą



funkcjonowaniu komórki gospodarza eksperyjnego permeabilizację ściany komórkowej. Pozwoliło to praktycznie na wyeliminowanie produktu ubocznego jakim jest glukoza [44].

Podsumowując: technologia pozyskiwania/wytwarzania trehalozy z początkowej ekstrakcji z roślin lub drożdży, jak większość procesów w biotechnologii, aktualnie opiera się o wykorzystanie enzymów rekombinantowych (także do pozbycia się pozostałości substratu i produktów ubocznych) po właściwym procesie. Obecne prace dotyczą immobilizacji tych enzymów i wykorzystania w procesie ciągłym.

Osobnym problemem do rozwiązania w technologii otrzymywania tego disacharydu jest jego krystalizacja z roztworu. Jednym z najważniejszych powodów, dla którego trehaloza pełni unikalną rolę w ochronie materiałów biologicznych, jest jej występowanie w szeregu odmian polimorficznych, zarówno w postaci krystalicznej, jak i amorficznej. Są znane co najmniej dwie postacie krystaliczne i kilka postaci pośrednich między nimi, a formą amorficzną. Do najczęściej występujących kryształów zalicza się stabilny w temperaturze pokojowej dihydrat trehalozy. Powolne odwodnienie dihydratu powoduje nieodwracalne powstanie bezwodnego kryształu. Podgrzewanie, do temperatury około 85°C, powoduje powstanie kolejnej postaci. Tak uzyskaną formę można z powrotem uwodnić do postaci dihydratu, bez utraty integralności struktury krystalicznej. Uważa się, że jest to spowodowane absorbowaniem wilgoci. Możliwość takiej transformacji bez zmian trójwymiarowej struktury disacharydu ma duże znaczenie dla jego działania ochronnego (rys. 7) [70].



Rysunek 7. Ścieżka transformacji form polimorficznych trehalozy; na podstawie [70]

Mechanizm otrzymywania trehalozy z niedrogiego i szeroko dostępnego substratu maltozowego metodami opisanymi powyżej, wiąże się z koniecznością oczyszczania mieszaniny poreakcyjnej, która oprócz trehalozy zawiera również nieprzereagowaną część maltozy oraz produkt uboczny jakim jest glukoza. Mimo wysokiej efektywności metody, reakcja konwersji maltozy do trehalozy nie jest w pełni wydajna. W celu otrzymania preparatu trehalozy o wysokim stopniu czystości niezbędne jest przeprowadzenie ekstrakcji, oczyszczania i krystalizacji trehalozy z mieszaniny poreakcyjnej. Najprecyzyjniejszą metodą rozdzielania wymienionych wyżej węglowodanów jest stosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej z zastosowaniem eluentu, w którego skład wchodzi acetonitryl, metanol i woda. W kontekście produkcji trehalozy o jakości spożywczej lub medycznej szczególnie niepożądanym, nawet w śladowych ilościach w produkcie końcowym jakim ma być trehaloza jest acetonitryl. Wymagania dotyczące wysokiej czystości trehalozy stawiane przez przemysł żywnościowy, a zwłaszcza farmaceutyczno-medyczny wymagają znalezienia dróg alternatywnych ograniczających koszty procesu, a przede wszystkim zapewniających bezpieczeństwo produktu końcowego.

W literaturze możemy znaleźć kilka metod krystalizacji pozwalające na wyizolowanie trehalozy z mieszaniny poreakcyjnej zawierającej jako główny składnik trehalozę oraz towarzyszące jej maltozę i glukozę, jako produkty uboczne reakcji. Główną różnicą pomiędzy nimi jest obecność lub brak wstępnego oczyszczania roztworu oraz



różnica w sposobie suszenia uzyskanych kryształów. Uzyskaną mieszaninę poreakcyjną zawierającą trehalozę, maltozę oraz glukozę zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem za pomocą wyparki. W celu uzyskania kryształów, dodaje się etanolu w proporcjach 80% v/v i pozostawia w temperaturze 4°C na 12 godzin. Po tym czasie uzyskane kryształy oddziela się za pomocą technik filtracyjnych i rozpuszcza w niewielkiej objętości wody destylowanej. Następnym etapem jest powtórzenie czynności wykonywanych z rozpuszczalnikiem w celu wykrystalizowania całego cukru. Suszenie kryształów wykonuje się w temperaturze 60°C przez 5 godzin [71].

Przykładowe drogi postępowania w celu wyizolowania trehalozy z mieszaniny poreakcyjnej opisane są np. w patentach i publikacjach Kizawy [71,72].

W literaturze można również znaleźć metody krystalizacji poprzedzone wstępnym oczyszczaniem. Jednym ze sposobów jest użycie chromatografii kolumnowej z węglem aktywowanym jako wypełnieniem. Wymywanie ma charakter elucji gradientowej z użyciem mieszaniny wody i etanolu jako eluentu. Zbierane są frakcje o stężeniu etanolu 10-15%. Następnie otrzymana mieszanina jest zagęszczana za pomocą wyparki. Kolejne etapy są identyczne jak w akapicie powyżej [71]. Zastosowanie enzymów jako biokatalizatora ma tę przewagę w stosunku do ekstrakcji z drożdży, że ten etap można pominąć.

W celu usunięcia niechcianych pozostałości substratu, można dodać do mieszaniny enzymy hydrolizujące odpowiednie wiązania glikozydowe. Przykładowo, dodatek α -glukozydazy powoduje hydrolizę wiązań α -1,4-glikozydowych i rozpad cząsteczek maltozy do glukozy. Następnie uzyskaną mieszaninę rozdziela się na kolumnie [73].

Kryształy trehalozy mogą być otrzymane również w efekcie suszenia poprzez liofilizację. W doświadczeniu wykazano, że podczas suszenia sublimacyjnego przy o temperaturze -40°C roztwór wodny trehalozy nie ulegał krystalizacji. Jednak przy dłuższym traktowaniu temperaturą -18°C uzyskano kryształy w postaci dihydratu trehalozy, które później przeszły w krystaliczną formę amorficzną. Przewaga liofilizacji polega na znacznym przyspieszeniu procesu oczyszczania jednakże wymaga dodatkowej energii, a kryształy trehalozy uzyskiwane tą metoda są mniejsze co ma swoje wady i zalety [74].

9. Podsumowanie

Trehaloza ze względu na swoje specyficzne właściwości może znaleźć znacznie szersze niż obecnie zastosowanie w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym i innych. Badania dotyczące przydatności trehalozy nie są zakończone i wciąż poszukiwane są nowe możliwości zastosowania tego cukru.

Warunkiem dalszego rozpowszechniania tego disacharydu jest uproszczenie całego procesu produkcji, wyeliminowanie produktu ubocznego jakim jest glukoza i pozostałości substratu – maltozy.

Obecnie najbardziej obiecującymi są metody produkcji trehalozy z wykorzystaniem enzymów rekombinantowych. Ponadto stało się możliwe zapewnienie ciągłości procesu poprzez zastosowanie enzymów immobilizowanych, których zaletą jest możliwość łatwego usunięcia ze środowiska reakcji po jej zakończeniu.

Po erze ekstrakcji z drożdży i optymalizacji składu pożywki oraz warunków stresogennych wszystko wskazuje na to, że to właśnie wykorzystanie syntazy trehalozy

konwertującej maltozę do trehalozy w jednoetapowej reakcji ma największe szanse się upowszechnić na skalę przemysłową. Dodatkowo na korzyść tego enzymu przemawia wysoka wydajność procesu oraz dostępność substratów w postaci popularnych i stosunkowo tanich syropów maltozowych.

Dzięki badaniom dotyczącym enzymów możliwych do zastosowania przy produkcji trehalozy zidentyfikowano biokatalizatory o obniżonej temperaturze reakcji, szerszym zakresie tolerancji na zmienne pH, czy z ograniczonym wpływem jonów i odczynników chemicznych.

Rośnie także liczba rzeczywistych, a nie tylko potencjalnych aplikacji trehalozy i to od prostego przedłużenia trwałości ciętych kwiatów po istotne zastosowania medyczne w profilaktyce i leczeniu trudnych do kuracji chorób. Coraz częściej docenia ją także przemysł kosmetyczny – a co za tym idzie rośnie też i zapotrzebowanie na samą trehalozę.

Duże znaczenie dla ludzkości może mieć w przyszłości także integracja genów odpowiedzialnych za wytwarzanie trehalozy w powszechnie uprawianych w krajach uboższych, wrażliwych na zmiany klimatyczne, roślinach uprawnych takich jak na przykład ryż.

Zmiany technologii polegające na wykorzystaniu enzymów rekombinantowych pozwoliły, poza obniżeniem kosztów, na stosowanie bardziej przyjaznych środowisku odczynników.

Osobnym problemem pozostaje wciąż kwestia usprawnienia samego procesu krystalizacji cukru z uniknięciem tworzenia trudnego do obróbki niehigroskopijnego szkliwa i form amorficznych oraz wyeliminowanie kolejnych etapów i niebezpiecznych, bądź po prostu drogich rozpuszczalników.

Wynalazcy wykazują także dużo inwencji w sposobie podejścia do prób pozbycia się (lub wręcz niewytworzenia) produktu ubocznego jakim w tej reakcji enzymatycznej jest glukoza.

Podziękowania

Dziękuję Współpracownikom i Dyplomantom, którzy pośrednio przyczynili się do powstania tego opracowania.

Literatura

1. Synowiecki J., Zdziebło A. *Funkcje fizjologiczne i możliwości zastosowań trehalozy*, Medycyna Weterynaryjna., 61(1) (2005), s. 31-34.
2. Nowak B.A., Maciąg M. *Enzymologia w obliczu wyzwań i możliwości XXI wieku*, pod red., Wydawnictwo TYGIEL (2017).
3. Itturiaga G., Suarez R., Nova-Franco B. *Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling*, International Journal of Molecular Science., 10 (2009), s. 3793-3810.
4. Richards A.B., Krakowka S., Dexter L.B., Schmid H., Wolterbeek A.P.M., Waalkens-Berendsen D.H., Arai S., Kurimoto M. *Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies*, Food and Chemical Toxicology., 40 (2002), s. 871-898.
5. Singer M.A., Lindquist S. *Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo*, Molecular Cell., 1 (1998), s. 639-648.

6. Neves J.M., Jorge A.J., Francois M.J., Terenzi F.H. *Effect of heat shock on the level of trehalose and glycogen, and on the induction of thermotolerance in Neurospora crassa*. FEBS Letters., 344 (1991), s. 225-228.
7. Cuber R., Elemtherio E.C.A., Pereira M.D., Panek A.D. *The role of the trehalose transporter during germination*. Biochimica et Biophysica Acta., 1330 (1997), s. 165-171.
8. Pawlicka J., Drożdżyńska A., Kośmider A., Czaczyk K.: *The effect of phosphate buffer on biomass, propionic acid and trehalose production by Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii*. EPISTEME. Czasopismo Naukowo-Kulturalne., 26 (2015), s. 85-93.
9. Deborde C., Corre C., Rolin D.B., Nadal L., De Certaines J.D., Boyaval P. *Trehalose biosynthesis in dairy Propionibacterium*, Journal of Magnetic Resonance Analysis., 2 (1996), s. 297-304.
10. Cardoso F.S., Gaspar P., Hugenholtz J., Ramos A., Santos H. *Enhancement of trehalose production in dairy propionibacteria through manipulation of environmental conditions*, International Journal of Food Microbiology., 91 (2004), s. 195-204 .
11. Ruhul R., Choudhury B. *Use of an osmotically sensitive mutant of Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii for the simultaneous productions of organic acids and trehalose from biodiesel waste based crude glycerol*, Bioresource Technology., 109 (2012), s. 131-139.
12. Jiang L., Cui H., Zhu L., Hu Y., Xu X., Li S., Huang H. *Enhanced propionic acid production from whey lactose with immobilized Propionibacterium acidipropionici and the role of trehalose synthesis in acid tolerance*, Green Chemistry., 17 (2015), s. 250–259.
13. Styrvold B.O., Strøm R.A. *Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed Escherichia coli K-12 strain: influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalose*, Journal of Bacteriology., 173 (1991), s. 1187-1192.
14. Kur J., Olszewski M., Długolecka A., Filipkowski P. *Single-stranded DNA-binding proteins (SSBs) - sources and applications in molecular biology*, Acta Biochimica Polonica., 52 (2005), s. 569-574.
15. Filipkowski P., Duraj-Thatte A., Kur J. *Novel thermostable single-stranded DNA-binding protein (SSB) from Deinococcus geothermalis*, Archives of Microbiology., 186 (2006), s. 129-137.
16. Filipkowski P., Koziątek M., Kur J. *A highly thermostable, homodimeric single-stranded DNA-binding protein from Deinococcus radiopugnans*, Extremophiles., 10 (2006), s. 607-614.
17. Filipkowski P., Kur J. *Identification and properties of the Deinococcus grandis and Deinococcus proteolyticus single-stranded DNA binding proteins (SSB)*, Acta Biochimica Polonica 54 (2007), s. 79-87.
18. Filipkowski P., Panek A., Felczykowska A., Pietrow O., Synowiecki J. *Expression of Deinococcus geothermalis trehalose synthase gene in Escherichia coli and its enzymatic properties*, African Journal of Biotechnology., 11(67) (2012), s. 13131-13139.
19. Filipkowski P., Pietrow O., Panek A., Synowiecki J. *Properties of recombinant trehalose synthase from Deinococcus radiodurans expressed in Escherichia coli*, Acta Biochimica Polonica., 59(3) (2012), s. 425-431.
20. Bär A. *Trehalose produced by a novel enzymatic process*, Bioresco - Bioresearch Management and Consulting Ltd., (2000), s. 1-105.
21. Wolska – Mitaszko B. *Trehaloza – substancja przedziwna. Właściwości, występowanie, zastosowanie*. Biotechnologia., 2 (2001), s. 36-53.
22. Hottiger T., Schmutz P., Wiemken A. *Heat – induced accumulation and futile cycling of trehalose in Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, 169 (1987), s. 5518-5522.
23. Attfield P.V. *Trehalose accumulates in Saccharomyces cerevisiae during exposure to agents that induce heat shock response*. FEBS Letters., 225 (1987), s. 259-263.



24. Schomburg, I., Hofmann, O., Baensch, C., Chang, A., Schomburg, D., *Enzyme data and metabolic information: BRENDA, a resource for research in biology, biochemistry, and medicine*. Gene Function & Disease., 3-4 (2000), s. 109-18.
25. Tsusaki K., Nishimoto T., Nakada T., Kubota M., Chaen H., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M. *Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from Thermus aquaticus ATCC33923*. Biochimica & Biophysica Acta, 1334 (1997), s. 28-32.
26. Nishimoto T., Nakano M., Ikegami S., Chaen H., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M., Tsujisaka Y. *Existence of a Novel Enzyme Converting Maltose into Trehalose*. Bioscience & Biotechnology & Biochemistry, 59 (1995), s. 2189-2190.
27. Nishimoto T., Nakada T., Chaen H., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M., Tsujisaka Y. *Purification and Characterization of a Thermostable Trehalose Synthase from Thermus aquaticus*. Bioscience & Biotechnology & Biochemistry., 60 (1996), s. 835-839.
28. Koh S., Shin H.J., Kim J.S., Lee D.S., Lee S.Y. *Trehalose synthesis from maltose by a thermostable trehalose synthase from Thermus caldophilus*. Biotechnology Letters., 20 (1998), s. 757-761.
29. Avonce N., Mendoza-Vargas A., Morett E., Iturriaga G. *Insights on the evolution of trehalose biosynthesis*. BMC Evolutionary Biology 6:109 (2006), s. 1-15.
30. Qiu hao Q., Sung-Jae L., Winfried B. *TreT, a novel trehalose glycosyltransfering synthase of the hyperthermophilic archaeon Thermococcus litoralis*. Journal of Biological Chemistry., 279:46 (2004), s. 47890-47897.
31. Kouril T., Zaparty M., Marrero J., Brinkmann H., Siebers B. *A novel trehalose synthesizing pathway in the hyperthermophilic Crenarchaeon Thermoproteus tenax: the unidirectional TreT pathway*. Archives of Microbiology 190:3 (2008), s. 355-69.
32. Koen A.L., Smet D., Weston A., Brown I.N., Young D.B., Robertson B.D., *Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria*. Microbiology., 146 (2000), s. 199-208.
33. Kato M., Miura Y., Kettoku M., Shindo K., Iwamatsu A., Kobayashi K. *Reaction mechanism of a new glycosyltrehalose-producing enzyme isolated from the hyperthermophilic archaeum, Sulfolobus solfataricus KMI*. Bioscience & Biotechnology & Biochemistry, 60 (1996), s. 921-924.
34. Maruta K., Mitsuzumi H., Nakada T., Kubota M., Chaen H., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M. *Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from thermophilic archaeobacterium Sulfolobus acidocaldarius*. Biochimica Biophysica Acta, 1291 (1996), s. 177-181.
35. Mukai K., Tabuchi A., Nakada T., Shibuya T., Chaen H., Fukuda S., Kurimoto M., Tsujisaka Y. *Production of trehalose from starch by thermostable enzymes from Sulfolobus acidocaldarius*. Starch/Stärke, 49 (1997), s. 26-30.
36. Di Lernia I., Morana A., Ottombrino A., Fusco S., Rossi M., De Rosa M. *Enzymes from Sulfolobus shibatae for the production of trehalose and glucose from starch*. Extremophiles, 2 (1998), s. 409-416.
37. Sinkiewicz I., Synowiecki J., *Ocena przydatności bakterii Thermus ruber jako źródła syntazy trehalozy*. Biotechnologia 1:80 (2008), s. 168-176.
38. Panek A., Pietrow O., Synowiecki J., Filipkowski P. *Immobilization on magnetic nanoparticles of the recombinant trehalose synthase from Deinococcus geothermalis*, Food and Bioproducts Processing., 91:4 (2013), s. 632-637.
39. Panek A., Pietrow O., Filipkowski P., Synowiecki J., *Effects of the polyhistidine tag on kinetics and other properties of trehalose synthase from Deinococcus geothermalis*. Acta Biochimica Polonica. 60:2 (2013), s. 163-166.
40. Van Dyck S., Coppens B., Somers I., Adams C.A., Kemin Industries, Inc.: *Trehalose encapsulated amylase for enhancing quality of animal feeds*. USA. Zgłoszenie patentowe nr: US 11/546,859.



41. Aoki N., Furukawa S., Sato K., Kurokawa Y., Kanda S., Takahashi Y., Mitsuzumi H., Itabashi H. *Supplementation of the diet of dairy cows with trehalose results in milk with low lipid peroxide and high antioxidant content.* Journal of Dairy Science. 93:9 (2010), s. 4189-4195.
42. Kale S., Akamanchi K., *Trehalose monooleate: a potential antiaggregation agent for stabilization of proteins.* Molecular Pharmaceutics. 13:12 (2016), s. 4082-4093.
43. Li N., Wang H., Li L., Cheng H., Liu D., Cheng H., Deng Z. *Integrated approach to producing high-purity trehalose from maltose by the yeast Yarrowia lipolytica displaying trehalose synthase (TreS) on the cell surface.* Journal of Agricultural Food Chemistry, 64:31 (2016), s. 6179-6187.
44. Zheng Z., Xu Y., Sun Y., Mei W., Ouyang J. *Biocatalytic production of trehalose from maltose by using whole cells of permeabilized recombinant Escherichia coli.* PLOS ONE 10:10(2015), e0140477.
45. Ohguchi M., Kubota N., Wada T., Yoshinaga K., Uritani M., Yagisawa M., Ohishi K., Yamagishi M., Ohta T. *Purification and properties of trehalose-synthesizing enzyme from pseudomonas sp. F1.* Journal of Fermentation and Bioengineering, 84 (1997), s. 358-360.
46. Zhu Y., Wei D., Zhang J., Wang Y., Xu H., Xing L., Li M. *Overexpression and characterization of a thermostable trehalose synthase from Meiothermus ruber.* Extremophiles., 14:1 (2010), s. 1-8.
47. Wang J.H., Tsai M.Y., Chen J.J., Lee G.C., Shaw J.F. *Role of the C-terminal domain of Thermus thermophilus trehalose synthase in the thermophilicity, thermostability, and efficient production of trehalose.* Journal of Agricultural Food Chemistry, 55:9 (2007), s. 3435-3443.
48. Venables M.C., Brouns F., Jeukendrup A.E. *Oxidation of maltose and trehalose during prolonged moderate-intensity exercise.* Medicine and Science in Sports and Exercise. 40:9 (2008), s. 1653-9.
49. Jentjens R.L., Jeukendrup A.E. *Effects of pre-exercise ingestion of trehalose, galactose and glucose on subsequent metabolism and cycling performance.* European Journal of Applied Physiology. 88:4-5 (2003), s. 459-65.
50. Shi Y. *Novel application of trehalose-montmorillonite nano compound as feed additive.* Chiny. Zgłoszenie patentowe nr: CN 201310215906.
51. Higashiyama T. *Novel functions and applications of trehalose.* Pure Applied Chemistry 74 (2002), s. 1263-1269.
52. Matsuo T. *Trehalose protects corneal epithelial cells from death by drying.* British Journal of Ophthalmology., 85 (2001), s. 610-612.
53. Schiraldi C., Di Lernia I., De Rosa M. *Trehalose production: exploiting novel approaches.* Trends in Biotechnology 20 (2002), s. 420-425.
54. Garg A.K., Kim J.K., Owens T.G., Ranwala A.P., Choi Y.D., Kochian L.V., Wu R.J. *Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses,* PNAS, 99:25 (2002), s. 15898-15903.
55. Hottiger T., Schmutz P., Wiemken A. *Heat – induced accumulation and futile cycling of trehalose in Saccharomyces cerevisiae.* Journal of Bacteriology, 169 (1987), s. 5518-5522.
56. Mackenzie K.F., Singh K.K., Brown A.D. *Water Stress Plating Hypersensitivity of yeasts: protective role of trehalose in Saccharomyces cerevisiae.* Journal of Genetic Microbiology, 134 (1988), s. 1661-1666.
57. Keller F., Schellenberg M., Wiemken A. *Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast (Saccharomyces cerevisiae).* Archives of Microbiology, 131 (1982), s. 298-301.
58. Wiemken A. *Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate.* Antonie van Leeuwenhoek, 58 (1990), s. 209-217.



59. Drywa J. (2002): Przydatność drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae* jako źródła trehalozy. Praca dyplomowa magisterska, promotor J. Synowiecki, Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności.
60. Birch G.G. *Trehalose*, *Advanced Carbohydrate Chemistry*, 18 (1963), s. 201–225.
61. Yoshikawa Y., Matsumoto K., Nagata K., Sato T. *Extraction of trehalose from thermally-treated baker's yeast*, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 58 (1994), s. 1226-1230.
62. Kidd G., Devorak J. *Trehalose is a sweet target for agbiotech*, *Biotechnology*, 12 (1994), s. 1328-1329.
63. Paiva C.L., Panek, A.D. *Biotechnological applications of the disaccharide trehalose*, *Biotechnology Annual Review*, 2 (1996), s. 293-314.
64. Kubota M. *Trehalose-producing enzymes*, *Fine Chemistry*, 37:1 (2008), s. 28-35.
65. Yamamoto T., Maruta K., Watanabe H., Yamashita H., Kubota M., Fukuda S., Kurimoto M. *Trehalose-producing operon treYZ from *Arthrobacter ramosus* S34*, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 65(6) (2001), s. 1419-1423.
66. Kobayashi, K. *Production of trehalose from starch by novel trehalose-producing enzymes from *Sulfolobus solfataricus* Km1*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 83 (1997), s. 296-298.
67. Ohtake S., Wang Y.J. *Trehalose: current use and future applications*, *Journal of Pharmaceutical Science*, 100:6 (2011), s. 2020-2053.
68. *Handbook of Carbohydrate-Modifying Biocatalysts* pod red. Peter Grunwald Pan Stanford Publishing 2016.
69. Klimacek, M. *Continuous production of α , α -trehalose by immobilised fungal trehalose phosphorylase*. *Biotechnology Techniques* 13 (1999), s. 243-248.
70. Nishant K.J., Ipsita R. *Effect of trehalose on protein structure*. *Protein Science*. 18:1 (2009), s. 24-36.
71. Kizawa H., Miyagawa K., Kanegae Y. Sugiyama Y. *Method for the production of trehalose using strains of *Micrococcus* and *Deinococcus**. Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japonia. Opis patentowy, US 5447856, Zgłosz. P. z 10.03.1994. Opubl. 05.10.1995.
72. Kizawa H., Miyagawa K., Sugiyama Y. *Purification and characterization of trehalose phosphorylase from *Micrococcus varians**, *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 59:10 (2014), s. 1908-1912.
73. Nishimoto T., Chaen H., Sugimoto T., Miyake T. *Trehalose and its production and use*. Patent EP 0693558 B1 Jan. 24, 1996.
74. Sundaramurthi P., Suryanarayanan R. *Trehalose crystallization during freeze-drying: Implications on lyoprotection*. *Journal of Physical Chemistry Letter*, 1:2 (2010), s. 510-514.

Możliwości zastosowań, potencjalne źródła oraz ewolucja technologiczna sposobu otrzymywania trehalozy ze szczególnym uwzględnieniem enzymu syntazy trehalozy [EC 5.4.99.16]

Streszczenie

Jedną z wiodących gałęzi współczesnej biotechnologii opiera się na produkcji białek – przede wszystkim enzymów. Są one powszechnie wykorzystywane: od przemysłu chemicznego poprzez przemysł spożywczy aż po medycynę i życie codzienne (czy ktoś wyobraża sobie w dzisiejszych czasach proszek do prania „bez enzymu”). Przed rozwojem nowoczesnych metod biologii molekularnej i inżynierii genetycznej pozyskiwano interesujące substancje z tkanek organizmów żywych. Ze względu na ciągle rosnące zapotrzebowanie, ta droga izolacji/produkcji okazała się niewystarczająca. Zastosowanie technik opartych o modyfikacje DNA umożliwiło masową produkcję prowadzoną w specjalnych systemach ekspresyjnych. Autor w rozdziale opisuje przypadek zmiany sposobu pozyskiwania specyficznego cukru o wielu unikalnych właściwościach jakim jest trehaloza. W bardzo szybkim czasie okazało się, że „klasyczna” metoda izolacji tego cukru z roślin, a następnie także już w procesie biotechnologicznym z zastosowaniem drożdży, nie jest wystarczająco wydajna. Do tego jest obciążona wysokimi kosztami i dużym poziomem



skomplikowania. Zastosowanie podejścia rodem z kolejnej fali rozwoju procesów biotechnologicznych pozwoliło ostatecznie wprowadzić ją na rynek w wystarczającej ilości, a nawet w wyniku sprzężenia zwrotnego (jak i z powodu unikalnych właściwości trehalozy) stale zwiększać na nią zapotrzebowanie.

W opracowaniu można znaleźć syntetyczny opis potencjalnych źródeł enzymów biosyntetyzujących trehalozę, krótki opis szlaków biochemicznych syntezy trehalozy w organizmach żywych, charakterystykę enzymu o największym potencjale aplikacyjnym (według autora – syntazy trehalozy), potencjalne i praktyczne zastosowania samej trehalozy jak i opis zmian w technologii wytwarzania tego cukru na przestrzeni lat, a także pozostałe do rozwiązania problemy.

Słowa kluczowe: trehaloza, syntaza trehalozy, enzymy, biosynteza, węglowodany

Possibility of practical application, sources and technological evolution of trehalose production with particular emphasis on trehalose synthase enzyme [EC 5.4.99.16]

Abstract

One of the leading branches of modern biotechnology is based on the production of proteins - primarily enzymes. They are widely used: from the chemical industry through the food industry to medicine and everyday life (does anyone can imagine washing powder without addition of "coldzymes" nowadays). Prior to the development of modern methods of molecular biology and genetic engineering, interesting substances were obtained usually from the tissues of living organisms. Because of the ever-increasing demand, way of that kind of isolation/production has been insufficient. Use of techniques based on DNA modification has allowed mass production in different expression systems.

Author in this chapter describes the case of changing the way of obtaining specific sugar with many unique properties - trehalose. It quickly became noticeable that the "classical" method of isolating this sugar from plants, and then also in the biotechnology with yeast, was not efficient enough. Moreover it is burdened with high costs and a high level of complexity. Another technology has enabled it to produce and sell on market in sufficient quantity. Moreover in result of feedback (and because of the unique properties of trehalose), demand for this sugar is constantly increasing.

Author present synthetic of potential sources of enzymes biosynthesizing trehalose, short description of biochemical pathways of trehalose synthesis in living organisms, characteristics of the enzyme with the highest application potential (in author opinion - trehalose synthase), potential and practical uses of trehalose as well as description of changes in the production technology of this sugar over the years, and also what more is to solve in this chapter.

Keywords: trehalose, trehalose synthase, enzymes, biosynthesis, carbohydrates