

# Funkcje fizjologiczne i możliwości zastosowań trehalozy

ANNA ZDZIEBŁO, JÓZEF SYNOWIECKI

Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej,  
ul. Gabriela Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

Zdziebło A., Synowiecki J.

## Physiological functions and unusual possibilities of trehalose applications

### Summary

Trehalose is a naturally occurring, non reducing disaccharide formed by a 1.1 linkage of two D-glucose residues. With its unusual ability to protect proteins and biological membranes against freezing, dehydration and increased temperatures, this sugar plays a key role in the survival of some organisms in unfavorable environmental conditions. For this reason trehalose can also be used in medicine, veterinary medicine, pharmacy and food processing, e.g. as a stabilizer of different proteins, pharmaceutical preparations and organs for transplantation.

**Keywords:** trehalose, disaccharide applications

$\alpha,\alpha$ -Trehaloza ( $\alpha$ -D-glukopiranozylo-1,1- $\alpha$ -glukopiranozyd) jest disacharydem zbudowanym z reszt glukozy połączonych dość rzadko spotykanym wiązaniem  $\alpha$ -1,1-glikozydowym. Lokalizacja i energia tego wiązania zapewnia trehalozie właściwości cukru nieredukującego o dużej stabilności termicznej i odporności na hydrolizę w kwaśnym środowisku. Wymienione w tab. 1 właściwości trehalozy, zdolność tworzenia niehigroskopijnego „szkliwa”, a szczególnie brak wiązań wodorowych utrudniających zmiany konformacji czas-

teczek cukru są przyczyną spełniania przez trehalozę dość istotnych funkcji fizjologicznych oraz stwarzają możliwość wielu zastosowań, między innymi w: medycynie, farmacji, weterynarii, kosmetyce, przetwórstwie żywności oraz jako konserwanta organów przeznaczonych do przeszczepów. Trehaloza znajduje się w organizmach owadów oraz w wielu roślinach naczyniowych, brodawkach roślin motylkowych, nicieniach, algach, grzybach, drożdżach i bakteriach. Najbardziej rozpowszechniony jest izomer  $\alpha,\alpha$ -, natomiast izomery  $\alpha,\beta$ - (neotrehaloza) i  $\beta,\beta$ - (izotrehaloza) są rzadko spotykane w przyrodzie.

Do niedawna trehaloza nie spełniała istotnej roli w żywieniu człowieka i zwierząt ze względu na ograniczone jej występowanie w surowcach i produktach żywnościowych. Cukier ten znajduje się, między innymi, w słoneczniku i niektórych innych nasionach, miodzie (0,1-1,9%), białym winie (10-391 mg/l), grzybach jadalnych (8-17% suchej masy), drożdżach piekarniczych i paszowych (15-20% suchej masy) i produktach wytwarzanych z udziałem drożdży (pieczywo, piwo, ocet winny) oraz w krwi homarów, krabów i ślimaków (1, 2, 18). Przyczyną wzrostu spożycia trehalozy w ostatnim okresie jest jej coraz częstsze stosowanie jako zamiennika cukrozy w produkcji wyrobów cukierniczych, napojów, przetworów owocowo-warzywnych, konserw, pieczywa i mrożonek. Dotychczasowe badania nie wykazały żadnych zagrożeń związanych ze zwiększonym spożyciem trehalozy (1, 15). Cukier ten, podobnie jak maltoza, cukroza lub laktoza, nie przedostaje się do krwi w niezmienionej formie lecz jest hydrolizowany wydzielaną w jelicie cienkim trehalazą z wytworzeniem łatwo adsorbowanej glukozy. Bardzo rzadko występujący zupełny za-

Tab. 1. Niektóre właściwości trehalozy i cukrozy

Cecha	Trehaloza	Cukroza
Jednostki strukturalne	Glc-Glc	Glc-Fru
Rodzaj wiązania glikozydowego	$\alpha,\alpha$ -1,1	$\alpha,\beta$ -1,2
Właściwości redukujące	brak	brak
Liczba wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych	0	1
Możliwość zmian przestrzennego ułożenia reszt glukozy	bardzo duża	ograniczona
Temperatura topnienia (K)	370 (476)	433-459
Pozostałość (%) po 24 h inkubacji w 373 K przy pH w zakresie od 3,5 do 10	99	
Nierozłożona pozostałość (%) po 90 min inkubacji w 393 K	99	
Higroskopijność (%) w 298 K przy wilgotności względnej 94%	1,0	75,0
Względna słodkość 10% roztworu	45	100
Skręcalność właściwa $[\alpha]_D^{20}$	+178°	+66°

Objaśnienie: liczba w nawiasie oznacza temperaturę topnienia bezwodnej trehalozy

nik lub znaczne zmniejszenie sekrecji wymienionego enzymu może jednak powodować zaburzenia pokarmowe o symptomach podobnych jak w przypadku nietolerancji laktozy, które mogą też wystąpić przy spożyciu trehalozy przekraczającym 50 g dziennie (15, 19). Obowiązujące w Japonii, USA, Anglii, Korei, Tajwanie i innych krajach regulacje prawne dopuszczają dodatek trehalozy do produktów żywnościowych, a jej dzienne spożycie nie jest dotychczas ograniczone (15). Cukier ten uznano też za bezpieczny składnik żywności w krajach Unii Europejskiej.

### Znaczenie fizjologiczne

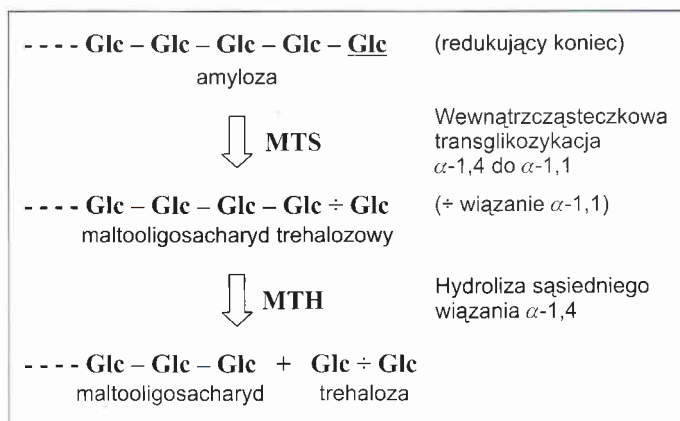
Funkcje fizjologiczne i zawartość trehalozy zależą w dużym stopniu od gatunku, etapu rozwoju i warunków życia syntetyzujących ją organizmów. Dla owadów trehaloza jest źródłem energii zużywanej podczas lotu oraz zmian morfologicznych zachodzących w różnych stadiach rozwoju. Może też stanowić rezerwę glukozy uwalnianej podczas hydrolizy katalizowanej trehalazą ( $\alpha, \alpha$ -trehalozo-glukanohydrolaza, EC 3.2.1.28). Enzym ten występuje w wielu bakteriach, grzybach i roślinach, a nawet w jelicie cienkim, korze nerkowej, wątrobie i osoczu krwi człowieka oraz niektórych ssaków (15). Inhibitory trehaloz, takie jak np. trehazolina lub trehazoloamina hamują rozwój larw owadów i są przydatne jako insektycydy (1, 13, 23). Trehaloza pełni też niekiedy funkcję elementu budulcowego wchodząc np. w skład glikolipidów ściany komórkowej *Mycobacterium* i niektórych innych drobnoustrojów. Jedną z najbardziej istotnych funkcji fizjologicznych jest niewątpliwie oddziaływanie trehalozy jako czynnika zabezpieczającego integralność błon biologicznych i struktur białek komórkowych podczas odwadniania, zamrażania lub szoku termicznego. Rośliny wskrzeszane, jak np. *Selaginella lepidophylla* zawierająca w suchej masie 12,5% trehalozy i 1,5% cukrozy, nawet po 50-letnim okresie prawie całkowitego wysuszenia zaczynają się intensywnie rozwijać już po kilku godzinach od nawilżenia. Zdolność powrotu do życia po okresie odwodnienia wykazują też drożdże, poczwarki owadów oraz cysty wielu małży i krewetek (16, 23). Przyczyną wymienionego oddziaływania trehalozy jest wspomaganie lub nawet zastępowanie stabilizującego makrocząsteczki wpływu struktur wodnych otaczających białka lub błony biologiczne. Występująca w postaci dwuhydratu trehaloza tworzy wiązania wodorowe z otaczającymi dipolami wody, ograniczając spowodowane odwodnieniem lub zamrażaniem niekorzystne zmiany warstwy hydratacyjnej. Trehaloza stabilizuje makrocząsteczki nawet w przypadku znacznego odwodnienia lub podwyższenia temperatury, grożącego nieodwracalnymi zmianami struktur biologicznych. Jest to możliwe dzięki asocjacji cząsteczek cukru na białkach lub dwuwarstwowych błonach lipidowych za pośrednictwem wiązań wodorowych utworzonych pomiędzy grupami hydroksylowymi trehalozy a polarnymi resztami aminokwasowymi białek lub fosfolipidami błonowymi. Ich

tworzenie ułatwia brak występującego w obrębie cząsteczek innych cukrów wiązania wodorowego pomiędzy tlenem pierścienia glikozydowego a grupą hydroksylową sąsiedniej jednostki strukturalnej. Możliwe są wskutek tego dość duże zmiany położenia reszt glukozy względem wiązania glikozydowego, zapewniające dostosowanie kształtu cząsteczek trehalozy do konformacji makrocząsteczek, z którymi tworzą kompleks.

Inną przyczyną oddziaływania stabilizującego jest unikatowa zdolność roztworów trehalozy do tworzenia po odwodnieniu amorficznego, niehigroskopijnego szkliwa okcludującego makrocząsteczki bez zmian ich natywnej struktury, niszczonej w przypadku stosowania innych cukrów wskutek krystalizacji (16). Szczególną zdolność do zabezpieczania enzymów i innych białek przed skutkami odwodnienia lub podwyższenia temperatury wykazują cukry pozbawione właściwości redukujących, do których należy trehaloza i cukroza. Pozostałe sacharydy reagują w tych warunkach z grupami aminowymi białek, co jest przyczyną zmian ich konformacji, a w konsekwencji zaniku lub zmniejszenia aktywności fizjologicznej.

Zawartość trehalozy w komórkach drożdży i innych wytwarzających ten cukier mikroorganizmów ulega dużym zmianom i znacznie wzrasta w przypadku odwodnienia, zmian osmolarności, szybkiego przekroczenia optymalnej temperatury rozwoju lub pojawienia się w środowisku substancji o toksycznym oddziaływanym. Biosyntezę trehalozy zapewniają szlaki metaboliczne, zróżnicowane w zależności od rodzaju drobnoustroju. W komórkach drożdży, grzybów i niektórych bakterii biosyntezę trehalozy rozpoczyna przyłączenie glukozy uwolnionej z urydynodifosfoglukozy do glukozo-6-fosforanu. Produktem tej reakcji katalizowanej syntazą trehalozo-6-fosforanu (EC 2.4.1.15) jest trehalozo-6-fosforan i urydynodifosforan. W kolejnym etapie syntezy uczestniczy fosfataza trehalozo-6-fosforanu (EC 3.1.3.12), przekształcająca trehalozo-6-fosforan w trehalozę i nieorganiczny fosforan (5, 14).

Niektóre mezofilne bakterie, jak np. *Arthrobacter sp.*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* i *Rhizobium* oraz hipertermofilne archeony: *Sulfolobus shibatae* i *Sulfolobus solfataricus* wytwarzają trehalozę z maltooligosacharydów w cyklu reakcji przedstawionych na ryc. 1. W pierwszym etapie syntaza maltooligosacharydów trehalozowych (MTS) przekształca wiązanie  $\alpha$ -1,4-przy nieredukującym końcu cząsteczki substratu na wiązanie  $\alpha$ -1,1-glikozydowe. Wytworzona maltooligozylotrehaloza jest następnie hydrolizowana w katalizowanej trehalohydrolazą maltooligozylotrehalozy (MTH) reakcji, której produktami są trehaloza i maltooligosacharyd o cząsteczce zmniejszonej o dwie reszty glukozowe. Oligosacharyd ten jest ponownie izomeryzowany przez MTS i cykl wymienionych reakcji powtarza się, aż do prawie zupełnej degradacji cząsteczki substratu (3, 7, 10, 12). Nagromadzeniu się w środowisku reakcji cząsteczek maltozy zapobiega



Ryc. 1. Schemat biosyntezy trehalozy w bakteriiach *Arthrobacter sp.*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* oraz hipertermofilnych archeonach *Sulfolobus shibatae* i *Sulfolobus solfataricus*

glukanohydrolaza cyklomaltodekstryn wytwarzająca z glukozy i maltozy oligosacharydy będące substratem dla MTS (12).

Najmniej skomplikowana jest synteza trehalozy w bakteriiach *Pimelobacter sp.* oraz *Pseudomonas putida* i niektórych szczepach *Thermus*. Wymienione drobnoustroje wytwarzają trehalozę izomeryzując występujące w maltozie wiązanie  $\alpha$ -1,4-glikozydowe. Katalizująca tę reakcję syntaza trehalozy (TreS) może być wykorzystana do przemysłowego wytwarzania trehalozy z syropów maltozowych (8, 14, 20).

Natomiast po zaniku czynników wywołujących stres zbędny nadmiar trehalozy jest dość szybko katabolizowany z udziałem rozmaitych trehalaz, trehalozo-fosfataz lub trehalozoglukohydrolaz o budowie i właściwościach zależnych od rodzaju drobnoustroju (23).

### Możliwości zastosowań

Na przydatność trehalozy wpływa w dużym stopniu zapobieganie niekorzystnym zmianom białek umożliwiające jej zastosowanie do stabilizacji i konserwacji niektórych leków, żywności i kosmetyków oraz do ewentualnego leczenia schorzeń wynikających z agregacji i przekształceń struktury białek. Spowodowana tworzeniem kompleksów z trehalozą ochrona struktur biologicznych przed skutkami zamrażania, rozmrażania i innymi przemianami może być wykorzystana w medycynie i weterynarii zarówno w celu zwiększenia przeżywalności embrionów i kultur tkankowych zakonserwowanych w niskich temperaturach, jak też do wydłużenia o kilka godzin okresu przydatności do przeszczepu przechowywanych chłodniczo nerek, płuc, skóry i innych organów oraz tkanek przeznaczonych do transplantacji. Według niektórych hipotez, wprowadzenie trehalozy do cytosolu komórek powinno ułatwić leczenie mukowiscydozy i zespołu Creutzfelda-Jakoba. Przyczyną tych schorzeń są niepożądane przekształcenia białka tworzącego kanały chlorkowe (mukowiscydoza) lub białka prionowego przybierającego strukturę amyloidu (zespół Creutzfelda-Jakoba). Zmianom tym można przypuszczalnie zapobiec, wykorzystując stabilizujące oddziaływanie trehalozy (18).

Trehaloza jest też doskonałym stabilizatorem wielu przydatnych w lecznictwie preparatów. Zabezpieczone tym cukrem liofilizowane szczepionki przez długi czas nie tracą aktywności fizjologicznej w temperaturze pokojowej. Trehaloza zapobiega także skutecznie zmniejszeniu aktywności enzymów i przeciwciał stosowanych do oznaczania grup krwi oraz trombocytów, które powinny być przechowywane w przeciwdziałającej ich agregacji temperaturze ponad 293 K, powodującej jednak zagrożenie rozwojem drobnoustrojów (4). Stosowany jako konserwant trombocytów paraformaldehyd wywiera toksyczne oddziaływanie i musi być usunięty poprzez wielokrotne i czasochłonne przemywanie. Niedogodności tej zapobiega liofilizacja płytek krwi z dodatkiem trehalozy, która zapewnia po ich rehydratacji prawie całkowite odzyskanie pierwotnej aktywności fizjologicznej (21, 22). Trehalozę można także stosować jako składnik tabletek stabilizujący leki o dużej labilności oraz jako komponent substytutu łoża dla pacjentów cierpiących na „zespół suchego oka”. Preparaty zawierające tylko metylocelulozę, hialuroniany i sól fizjologiczną zapobiegają wprawdzie wysuszeniu rogówki, ale nie przeciwdziałają nadmieremu złuszczeniu komórek nabłonkowych (11). Trehaloza jest także przydatna w technice PCR do ochrony polimerazy DNA przed oddziaływaniem podwyższonej temperatury niezbędnej do rozplecenia dwuniciowej helisy DNA (9). Jest to szczególnie istotne w przypadku matryc bogatych w pary G-C, wymagających wydłużenia czasu i dodatkowego podwyższenia temperatury denaturacji.

Dość istotną zaletą stosowania trehalozy zamiast cukru jest prawie całkowite wyeliminowanie wpływu reakcji Maillarda zainicjowanych przyłączeniem aldoz do białek lub aminokwasów i powodujących powstanie niepożądanych brunatnych produktów. Cukroza jest wprawdzie, podobnie jak trehaloza, cukrem nieredukującym ale przejawia mniejszą odporność na oddziaływanie kwaśnego środowiska i podwyższonej temperatury. Wytworzone wskutek hydrolizy cukru glukoza i fruktoza mają silne właściwości redukujące i łatwo reagują z grupami aminowymi białek. Wyjątkowa stabilność cząsteczek trehalozy znacznie ogranicza możliwość wytworzenia produktów hydrolizy o właściwościach redukujących. Z tego powodu trehaloza może być stosowana jako składnik płynów do iniekcji wzbogaconych aminokwasami oraz jako dodatek do suszonego rozpyłowo mleka i serwatki oraz produktów wykazujących skłonność do karmelizacji lub brunatnienia podczas obróbki cieplnej. Stabilność trehalozy w kwaśnym środowisku ogranicza też zmiany lepkości podczas przechowywania przetworów owocowo-warzywnych.

Zdolność trehalozy do ograniczenia przemiany nienasyconych kwasów tłuszczowych w aldehydy o nieprzyjemnym zapachu jest wykorzystywana w produkcji dezodorantów szczególnie przydatnych dla ludzi w starszym wieku. Nacieranie skóry preparatami za-



wierającymi 2% trehalozy redukuje w około 70% zapach potu wywołany nienasyconymi aldehydami (6).

Mała higroskopijność i formowanie hydrofilowego, nie ulegającego krystalizacji szkliwa ogranicza resorpcję wody w suszonych produktach, zapobiega stratom lotnych substancji zapachowych oraz umożliwia wytwarzanie polew zabezpieczających wyroby cukiernicze przed zawilgoceniem. Zawierające dodatek trehalozy przeciery z bananów, malin, truskawek, jabłek i awokado nie zmieniały barwy po wysuszeniu w temperaturze do 50°C i po rekonstytucji przez dodanie wody odzyskiwały pierwotną teksturę, lepkość i zapach (16). Unikutowa zdolność „konservowania” zapachu jest spowodowana amorficznością i hydrofilowością tworzonego przez trehalozę szkliwa, które przed całkowitym wysuszeniem łatwo przepuszcza ulatniającą się z produktu wodę, ale zatrzymuje hydrofobowe cząsteczki substancji zapachowych. W przeciwieństwie do innych cukrów, szkliwo to traci po pełnym wysuszeniu zdolność do adsorpcji pary wodnej z atmosfery o ile wilgotność względna nie przekracza 90% (1, 16).

Do niektórych produktów żywnościowych dodaje się niekiedy cukrę lub inne cukry pełniące funkcję konserwantów oraz regulatorów rozmaitych właściwości funkcjonalnych. Spełnienie tych funkcji jest możliwe przy zawartości cukru powodującej zazwyczaj nadmierną słodkość wyrobów, maskującą ich naturalny smak i zapach. Dla poprawy jakości wyrobów pożądane jest więc zastosowanie trehalozy o mniej intensywnym od cukrozy smaku. Dodatkową korzyścią wynikającą z zastosowania trehalozy jest ograniczenie rozwoju próchnicy zębów spowodowane mniejszym od cukrozy wpływem na kwasowość jamy ustnej (1). W Japonii trehaloza jest już powszechnie używana jako krioprotektant przy produkcji surimi, kamaboko, past rybnych, zawierających żelatynę mrożonych deserów, lodów i wielu innych produktów. Cukier ten jest też stosowany zamiast wielofosforanów, które przy nadmiernym spożyciu zakłócają przyswajanie wapnia, przyczyniając się do rozwoju osteoporozy i innych schorzeń. Trehaloza przeciwdziała także niepożądanym zmianom tekstury i właściwości sensorycznych niektórych produktów. Przyczyną tego jest, między innymi, zdolność do ograniczania wzrostu kryształów lodu podczas zamrażania żywności, efektywniejsze od cukrozy zapobieganie retrogradacji skrobi oraz hamowanie tworzenia się nadtlenuków i lotnych aldehydów powstających wskutek autooksydacji lipidów.

Badania przydatności trehalozy nie są jeszcze zakończone. Duże znaczenie mogą mieć podjęte już próby wprowadzenia do genomu komórek roślin i zwierząt genów enzymów umożliwiających syntezę trehalozy. Celem tych prac jest uzyskanie transgenicznych roślin o zwiększonej odporności na suszę i przymrozki oraz ograniczenie rozwoju niektórych chorób człowieka i zwierząt. Jednym z warunków dalszego rozpowszechnienia zastosowań trehalozy jest obniżenie kosztu jej produkcji do poziomu podobnego jak w przypadku cukrozy. Uzyskano już w tym zakresie znaczny

postęp, bo efektem wdrożenia opracowanych w ostatnim dziesięcioleciu nowych technologii produkcji było zmniejszenie ceny kilograma trehalozy z 700 do około 6 amerykańskich dolarów (17). Dalsze obniżenie kosztu będzie przypuszczalnie możliwe poprzez zastosowanie enzymów umożliwiających wydajne wytwarzanie trehalozy ze skrobi lub maltozy.

## Piśmiennictwo

1. *Bär A.*: Trehalose produced by a novel enzymatic process. Materiały firmowe Bioresco Bioresarch Management and Consulting Ltd., Basel, UK 2000.
2. *Cuber R., Elentherio E. C. A., Pereira M. D., Panek A. D.*: The role of the trehalose transporter during germination. *Biochim. Biophys. Acta* 1997, 1330, 165-171.
3. *Di Lernia I., Morana A., Ottobrino A., Fusco S., Rossi M., De Rosa M.*: Enzymes from *Sulfolobus shibatae* for the production of trehalose and glucose from starch. *Extremophiles* 1998, 2, 409-416.
4. *Esteves M. I., Quintilio W., Sato R. A., Raw I., de Araujo P. S., Da Costa M. H. B.*: Stabilisation of immunoconjugates by trehalose. *Biotechnol. Lett.* 2000, 22, 417-420.
5. *Gueguen Y., Rolland J.-L., Schroeck S., Flament D., Defretin S., Saniez M.-H., Dietrich J.*: Characterization of the maltooligosyl trehalose synthase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001, 194, 201-206.
6. *Higashiyama T.*: Novel functions and applications of trehalose. *Pure Appl. Chem.* 2002, 74, 1263-1269.
7. *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* KM1. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996, 60, 921-924.
8. *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*. *Biotechnol. Lett.* 1998, 20, 757-761.
9. *Louwrier A., Van der Valk A.*: Can sucrose affect polymerase chain reaction product formation. *Biotechnol. Lett.* 2001, 23, 175-178.
10. *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*. *Biochim. Biophys. Acta* 1996, 1291, 177-181.
11. *Matsuo T.*: Trehalose protects corneal epithelial cells from death by drying. *Br. J. Ophthalmol.* 2001, 85, 610-612.
12. *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* 1997, 49, 26-30.
13. *Müller J., Boller T., Wiemken A.*: Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Sci.* 1995, 112, 1-9.
14. *Nishimoto T., Nakano M., Nakada T., Chaen H., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M., Tsujisaka Y.*: Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp. R48. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996, 60, 640-644.
15. *Richards A. B., Krakowska 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 Toxicol.* 2002, 40, 871-898.
16. *Roxer B.*: Trehalose, a new approach to premium dried foods. *Trends Food Sci. Technol.* 1991, 7, 166-169.
17. *Schiraldi C., Di Lernia I., De Rosa M.*: Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends in Biotechnol.* 2002, 20, 420-425.
18. *Singer M. A., Lindquist S.*: Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Molecular Cell* 1998, 1, 639-648.
19. *Synowiecki J., Maciuńska J.*: Laktaza w żywieniu ludzi i zwierząt. *Medycyna Wet.* 1999, 55, 497-500.
20. *Tsuzaki 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. *Biochim. Biophys. Acta* 1997, 1334, 28-32.
21. *Wolkers W. F., Walker N. J., Tablin F., Crowe J. H.*: Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. *Cryobiology* 2001, 42, 79-87.
22. *Wolkers W. F., Tablin F., Crowe J. H.*: From anhydrobiosis to freeze-drying of eukaryotic cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 2002, 131, 535-543.
23. *Wolska-Miaszko B.*: Trehaloza – substancja przedziwna. Właściwości, występowanie, zastosowanie. *Biotechnologia* 2001, 2, 36-53.