

## D-Alluloz Üretim Yöntemleri

Erva Parıldı , Osman Kola  Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği  
Bölümü, 01250, Adana

Geliş Tarihi (Received): 28.05.2021, Kabul Tarihi (Accepted): 18.06.2022

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): : eparildi@atu.edu.tr (E. Parıldı)

☎ 0 322 455 0000 📠 0 322 455 0002

### ÖZ

Nadir şekerler, alternatif tatlandırıcılar olarak sağlık açısından oldukça faydalı olmaları ve endüstriyel açıdan ekonomik değerlerinin yüksek olmaları sebebiyle büyük ilgi görmektedir. Nadir şekerlerin doğada çok sınırlı miktarlarda bulunması, bitkilerden elde edilen yaygın şekerlerin enzimatik, kimyasal veya diğer yollarla nadir şekerlere dönüştürülmesine yönelik çalışmaları teşvik etmiştir. Nadir şekerler arasında çok önemli bir yere sahip olan D-alluloz, sakkarozaya çok yakın bir tatlılığa sahip olması ve düşük kalorisi ile dikkat çeken bir şekerdir. Kandaki glikoz seviyesini düşürme, insülin direncini iyileştirme, vücuttaki yağ birikimini azaltma ve ateş düşürme gibi birçok biyolojik fonksiyonu düzenleme özelliğine sahip olması, bunun yanı sıra, yüksek çözünürlüğe ve gıda dokusu üzerinde olumlu etkilere sahip olması, bu şekerin gıda işlemede kullanımını daha cazip hale getirmektedir. D-alluloz "sindirilemeyen karbonhidrat" olarak bilinmektedir. Birçok meyve ve içecek ve bazı tahıl ürünlerinde doğal olarak bulunmaktadır. Günümüzde D-alluloz, bitkiden ekstraksiyon, kimyasal sentez, enzimatik dönüşüm gibi birçok yöntemle üretilebilmekte ve bazı gıda maddelerinin üretiminde güvenle kullanılabilir. Bu derlemede, günümüze kadar geliştirilmiş ve uygulanmış olan D-alluloz üretim yöntemleri açıklanmış, bu yöntemler arasındaki farklar ve birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları tartışılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** D-alluloz, Nadir şeker, Üretim yöntemleri, Enzimatik dönüşüm

### Production Methods of D-Allulose

#### ABSTRACT

Rare sugars are of great interest as alternative sweeteners because they are beneficial for human health and have a high industrial value. The existence of rare sugars in nature in very limited quantities has encouraged studies to convert common sugars obtained from plants into rare sugars by enzymatic, chemical or other methods. D-allulose, which has a very important place among rare sugars, is a sugar that stands out with its low calorie and sweetness very close to sucrose. It has the ability to regulate many biological functions such as lowering blood glucose level, improving insulin resistance, reducing fat accumulation in the body and reducing fever, as well as having high solubility and positive effects on food tissue, making the use of this sugar more efficient in food processing. D-allulose is known as "indigestible carbohydrate". It occurs naturally in many fruits and beverages and some cereal products. Today, D-allulose can be produced in many ways such as plant extraction, chemical synthesis, enzymatic conversion and can be safely used in the production of some foodstuffs. In this review, D-allulose production methods are presented, differences in these methods and their advantages and disadvantages are compared to each other.

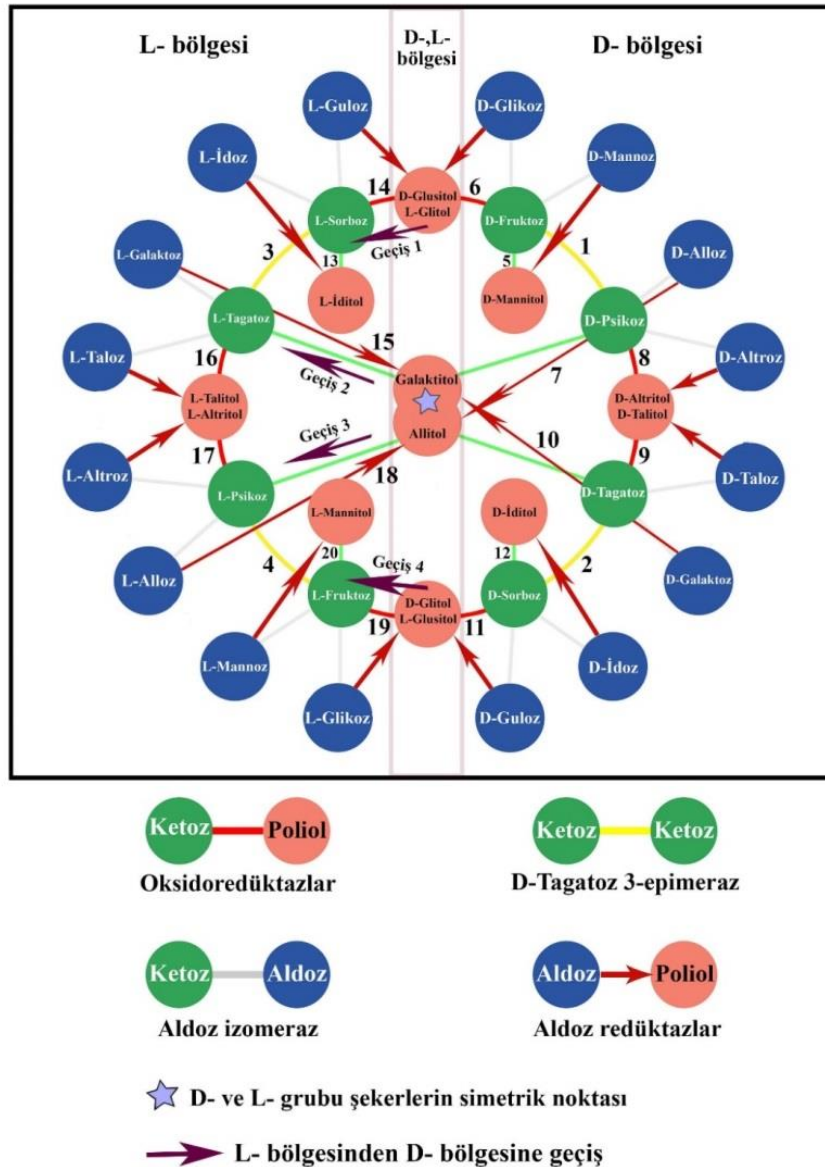
**Keywords:** D-alluloz, Rare sugar, Production methods, Enzymatic conversion

## GİRİŞ

Nadir şekerler Uluslararası Nadir Şekerler Derneği (ISRS) tarafından "doğada çok nadir bulunan monosakkaritler ve bunların türevleridir" şeklinde tanımlanmıştır [1]. Nadir şekerler doğada çok az miktarlarda bulunmalarına rağmen, ilaç, farmakoloji, kozmetik, gıda endüstrisi, aroma endüstrisi ve diğer birçok endüstriyel alanda çok fazla biyolojik fonksiyona ve büyük kullanım potansiyeline sahiptir [2]. Nadir şekerler, güçlü bir antiviral ve antikanser ilaç ikamesidir ve anti-tümör, anti-enflamatuar, anti-hipertansif etkiler, obezite ve diyabeti önleme gibi çeşitli faydalı fizyolojik fonksiyonlara sahip olması sebebiyle tıpta gün geçtikçe daha fazla ilgi görmektedir [3]. Bilim adamları, nadir şekerleri farmasötik hammadde olarak kullanmaktadırlar. Şimdiye kadar doğada bulunan 50'ye yakın nadir şeker çeşidi vardır [4]. Nadir şekerler doğal ve zararsız, insan ve çevre için güvenli tarım kimyasalı

olarak kullanım imkanı bakımından büyük potansiyele sahiptir [5].

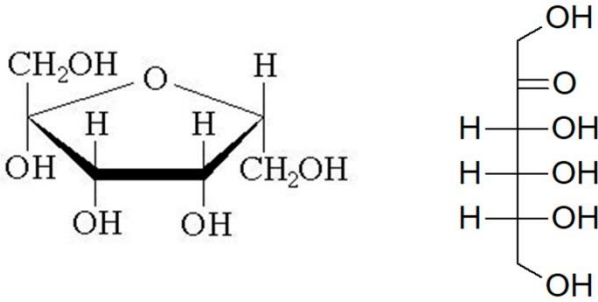
Nadir şekerler ve D-allulozun üretiminde Ken Izumori tarafından geliştirilmiş olan "Izumoring stratejisi" (Şekil 1) denilen ve birçok nadir monosakkaritin geniş çapta üretimini mümkün kılan bir yöntem kullanılmaktadır. Bu stratejiye göre, mikrobiyal ve enzimatik dönüşümlerle üretilmesi istenen nadir şekerin sentezi kolayca kurgulanabilmektedir [6]. Izumoring stratejisine göre mikrobiyal dönüşümler daha ucuz gerçekleştirilebilirken, enzimatik dönüşümler ise hem ölçeklendirilebilir hem de daha kolay kontrol edilebilir bir yöntemdir. İmmobilize enzim kullanımı ise serbest ve çözünebilir enzime göre birçok üstünlüğe sahiptir. Bunlar; immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilmesi, son ürünün kolayca elde edilip saflaştırılabilmesi ve immobilizasyon işlemiyle enzimin bazı özelliklerinin (aktivite, stabilite, vb.) geliştirilebilmesi gibi özelliklerdir [7].



Şekil 1. İzumori stratejisine göre heksozların üretimi [8]  
Figure 1. Production of hexoses according to the Izumori strategy [8]

## D-ALLULOZ

D-alluloz (Şekil 2), doğada nadiren bulunan bir C-3 D-fruktoz epimeridir. Nadir bulunmasına rağmen, ultra düşük kalorili fonksiyonel bir tatlandırıcı olarak kullanmaya oldukça elverişli olması sebebiyle her geçen gün daha çok ilgi çekmektedir. D-alluloz, sakkarozun tatlılığının yaklaşık % 70'ine sahiptir. Yaklaşık 0.2 kcal/g'lik önemli ölçüde düşük kalori içeriği nedeniyle gıda üretimi için çekici bir sakkaroz ikamesidir. Gıdanın jelleşme özelliklerini geliştirir, gıda işlemede Maillard reaksiyonu yoluyla oksidasyonu azaltır ve gıda aromasını daha iyi korur [9].



Şekil 2. D-Alluloz'un Haworth ve Fischer formülleri [8]  
Figure 2. Haworth and Fischer formulas of D-Allulose [8]

Neredeyse sıfır kalorili olarak kabul edilen bu şeker vücutta çok düşük seviyede metabolize olur ve buna bağlı olarak sakkarozla kıyasla çok daha az enerji sağlar. Glisemik indeksi oldukça düşük olduğundan diyabet hastalarının bile allulozu güvenle kullanabileceği öngörülmektedir. Alluloz üretim sürecinde enzim kullanımından dolayı molekülün yapısı değişir ve bu durum allulozun büyük bir kısmının sindirim sisteminde emilmesine rağmen, vücut tarafından kalori olarak kullanılmadan atılmasına sebep olur. Başka bir ifadeyle, kullanılan enzim allulozun içerdiği kaloriyi bir bakıma kapsüllemiş olur ve vücut tarafından kullanılmasını engeller [10]. Allulozun insanda tokluk kan şekerinin yükselmesinin önlenmesi gibi sağlığa olan pek çok olumlu etkileri önceki yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Alluloz, insan vücudunda antidiyabetik olması, obezite ve damar sertleşmesini engellemesi ve diğer birçok özelliğiyle yaygın şekerlerden ayrılmaktadır [11]. Dünyada birçok ülkede, şekerli ürünlere şeker yerine alluloz ilave edilerek özellikle diyabet ve daha birçok şeker kaynaklı hastalık riskinin önemli oranda azaltılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu şeker sindirim sisteminde çok az emilime uğradığından ve yaklaşık %70'i enerjiye çevrilmeden ince bağırsak tarafından absorbe edilip 24 saat içerisinde vücuttan atıldığından dolayı kilo vermeye de yardımcı bir şekerdir [12]. D-alluloz, 2014 yılında GRAS listesine alınmış, çeşitli gıdalara katılmasına ve gıda takviyesi olarak kullanılmasına izin verilmiştir [13]. Allulozun, gıdanın tekstürü ve ağızda bıraktığı his gibi kalite kriterlerini ve gıda maddesinin depolanma stabilitesini iyileştirdiği tespit edilmiştir [14].

Çeşitli gıdalar her 100 gramda 0.5-130.6 miligram kadar alluloz bulundurabilir. Meyve suları 21.5 mg, kola

38.3 mg alluloz içerir. İnsan vücudunun günlük alluloz alım miktarı yaklaşık 0.2 gramdır [15].

## D-ALLULOZ ÜRETİM YÖNTEMLERİ

D-allulozun ilk seri üretimi, Ken Izumori adlı bir profesör ve ekibi tarafından Kagawa Üniversitesi'nde gerçekleştirilmiştir [16]. D-alluloz üretimi genellikle özel enzimler üreten bazı mikroorganizmalar tarafından, fruktozun biyodönüşümü uğratılmasıyla gerçekleştirilir [16, 17]. Bu amaçla kullanılacak herhangi bir ticari enzim preparatı günümüzde mevcut olmadığından, D-alluloz üretimi hala çok sınırlıdır. Mevcut yapıda ABD'de alluloz üretimi için GRAS onayı almış 3 firma bulunmaktadır. Bunlar; Matsutani, SamYang ve CJ CheilJedang firmalarıdır [19].

Geçmiş yıllarda D-alluloz, farklı yöntemler ve farklı hammaddeler kullanılarak üretilmeye çalışılmıştır. Her yöntemin verimliliği analiz edilmiştir. Bu yöntemlerden birinde kimyasal sentez yöntemi olan D-alluloz, sulu ve asidik bir çözelti içinde molibdat iyonlarının katalitik etkisi ile D-fruktozun biyo-dönüşümü ile üretilmiştir [20]. Başka bir çalışmada ise, D-fruktoz, etanol ve trietilamin içinde kaynatılarak D-alluloza dönüştürülmüştür [21]. Bu kimyasal yöntemler elverişsiz ve pahalıdır. Ayrıca sürecin bir sonucu olarak bazı atık ürünler ortaya çıkmaktadır. Bu yöntemlerde koruyucuların kullanılmasını nedeniyle bu koruyucuların üretim sonrası uzaklaştırılması, karmaşık ve uzun arıtma aşamaları gerektiren kimyasal yöntemler tercih edilmemektedir [21, 22, 23]. Alluloz doğrudan bakteri hücreleri ilavesiyle de üretilmektedir. Hücreler, enzimlere göre daha stabil ve çevresel şartlara daha dirençli olacağı ve hücre kullanımı ile saflaştırma, hücre parçalama, çöktürme, ayırıştırma gibi birçok proses aşaması elimine edilebileceği için, üretimin ticari olarak daha uygun bir hale geleceği düşünülmüştür. Bu işlem için rekombinant *Escherichia coli* hücrelerinin, diğerlerine kıyasla alluloz üretimi için çok uygun ve verimli olduğu, fakat GRAS bir mikroorganizma olmadığı için *E. coli* tarafından üretilen allulozun gıdalarda katkı maddesi olarak kullanımının sakıncalı olacağı bildirilmiştir [25].

Bütün bu yöntemler dışında, son yıllarda nişastadan tek aşamalı fermantasyon ile alluloz üretim çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle son ürün verimi artırılırken, üretim ve saflaştırma maliyeti önemli oranda azaltılmıştır [26].

Geçmişten günümüze, alluloz üretimi için kullanılan ve hala kullanılmakta olan farklı üretim yöntemleri aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

## ALLULOZUN BİTKİDEN EKSTRAKSİYONU

*Itea* adı verilen bir süs bitkisinde de belirli bir miktarda alluloz bulunmaktadır. *Itea* bitkisinin gövde ve yapraklarında yapılan araştırmalarda baskın şekerin her zaman alluloz olduğu ve gövdede yaz kış maksimum seviyede bulunduğu tespit edilmiştir [17].

*Itea* yapraklarından alluloz ekstraksiyonu yapılan bir çalışmada, *Itea virginica* bitki yaprakları kaynayan

metanol içinde ekstrakte edilmiş, elde edilen ekstrakt buharlaştırılmış ve bir şurup elde edilmiştir. Bu şurup 10 ml su ile seyreltilmiş ve eter kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Son çözelti iyon değiştirme reçinesinden geçirilerek konsantrite doğal şurup elde edilmiştir. Daha sonra yapılan kağıt kromatografisi ile bu şurupta sakkaroz, allitol, glikoz, fruktoz, alluloz bulunduğu tespit edilmiştir. Çözeltideki alluloz, aseton-bakır ve sülfat-sülfürik asit kullanılarak izole edilmiştir [27].

## ALLULOZUN KİMYASAL YOLLA ÜRETİMİ

Alluloz, önceki yıllarda farklı metodlar ve farklı ham maddeler kullanılarak üretilmeye çalışılmış ve her bir yöntemin verimliliği analiz edilmiştir. Bunlardan biri olan kimyasal sentez yönteminde (Şekil 3), sulu ve asidik bir çözeltide molibdat iyonlarının katalitik etkisiyle D-fruktozdan alluloz üretilmiştir [20]. Yine D-fruktoz, etanol ve trietilamin içerisinde kaynatılarak alluloza dönüştürülmüştür [21]. Bunun gibi diğer birçok kimyasal sentez çalışmasında üretimin çok zahmetli olduğu ve geniş çaplı üretim yapılmak istendiği durumlarda bu metodların yetersiz kaldığı tespit edilmiştir [28]. Ayrıca, kimyasal sentez çalışmalarının zahmetli ve pahalı olması, uzun ve karmaşık saflaştırma prosesleri gerektirmesi, koruyucu kullanımı ve bu koruyucuların üretimden sonra uzaklaştırılması ihtiyacı ve kullanılan kimyasalların yan ürün oluşturması gibi bazı dezavantajlarının olduğu görülmüştür. Bunlara ek olarak sonuçta çok az miktarda ürün elde edilmesi sebebiyle pek tercih edilmemektedir [22, 23, 27]. Bu sebeple çoğu zaman enzim kullanılarak fruktozdan biyodönüşüm yoluyla sentezlenmesi tercih edilmiştir [29].



Şekil 3. Kimyasal yöntemle fruktozdan alluloz üretimi akış şeması [21]

Figure 3. Flow chart of allulose production from fructose by chemical method [21]

## ALLULOZUN ENZİMATİK YOLLA ÜRETİMİ

Monosakkaritlerin birbirine dönüşümü için temel olarak 3 enzim grubu kullanılmaktadır. Bunlardan ikisi izomerazlar grubuna dahil olan keto-aldol izomerazlar (EC 5.3.1) ve karbonhidrat epimerazlar (EC 5.1.3)'dür. Üçüncü grup ise oksidoredüktazlardır. Bu üç gruptaki enzimlerin tamamı nadir şeker üretiminde kullanılmaktadır, fakat her birinin kendine has avantajları ve dezavantajları vardır. Bu üç grup arasında epimerazlar, nadir şekerlerin üretimi için potansiyel olarak en kullanışlı biyokatalizörlerdir [30]. Sadece bir karbon atomundaki konfigürasyonları farklı olan monosakkaritlerin birbirine dönüşmesi olayına epimerizasyon denir. Tanımı basit olmakla birlikte, böyle bir dönüşüm kimyasal açıdan oldukça karmaşıktır. Karbonhidratlar son derece kararlı olduğundan epimerizasyon olayı kendiliğinden kolayca gerçekleşmez. Bununla birlikte, bir karbonhidratın hemen hemen her stereojenik merkezi bir enzim tarafından epimerizasyona uğratılabilir [30].

Epimerazlar C1 ve C2 pozisyonlarının modifikasyonları ile sınırlı diğer iki enzim sınıfının aksine geniş bir yapı yelpazesine erişebilirler. Fakat, ne yazık ki epimerazların çoğu, bir fosfat veya nükleotit grubuna sahip şekerler üzerinde aktiftir ve bu özellikleri üretim maliyetlerini büyük ölçüde artırır. Bununla birlikte son zamanlarda ortaya çıkan D-tagatoz 3-epimeraz, ucuz bir substrat olan fruktozdan alluloz üretimini mümkün kılarak bu durumun dışında kalmış ve dikkat çeken bir istisna olmuştur. D-tagatoz 3-epimerazın (D-TE), birçok ketozun C-3 pozisyonunda epimerizasyonunu katalize ettiği ve nadir şeker üretimi için çok kullanışlı bir enzim olduğu tespit edilmiştir. Bu enzim hem tekli hem de çoklu enzim reaksiyonlarında, çeşitli karbonhidratların sentezi için kullanılmakla birlikte, laboratuvar ölçeğinde tüm olası ketoheksozları üretmek için de kullanılmıştır [30].

Fruktozun C-3 pozisyonunda epimerizasyonu ile alluloza dönüştürülmesi şimdiye kadar sadece iki enzimle gerçekleştirilmiştir. Bunlar; *Pseudomonas cichorii*'den elde edilen D-tagatoz 3-epimeraz ve *Agrobacterium tumefaciens*'den izole edilen D-psikoz 3-epimeraz (ketoz 3-epimeraz)'dır. Her iki enzim de ketoz 3-epimeraz grubundan olmasına rağmen, *Pseudomonas cichorii*'den elde edilen D-tagatoz 3-epimeraz enzimi substrat olarak tagatoz üzerinde, *Agrobacterium tumefaciens*'den izole edilen D-psikoz 3-epimeraz enzimi ise fruktoz üzerinde daha yüksek aktivite göstermektedir [31].

Izumori ve ekibi D-tagatoz 3-epimeraz enzimini ilk olarak *Pseudomonas* sp. ST-24'ten izole etmişler ve bu enzimi alluloz üretiminde kullanmışlardır. Bu mikroorganizmayı kullanarak 500 g D-fruktozdan 10 gün içerisinde 90 g alluloz üretmişlerdir [32]. Bununla birlikte, Takeshita ve ark. [28] tarafından immobilize D-tagatoz 3-epimeraz kullanılarak, D-fruktozun sürekli epimerizasyonu ile allulozun seri üretimini sağlayan yeni bir metod geliştirilmiş ve bu metod sayesinde nadir şeker çalışmaları ilerleme kaydetmeye başlamıştır. Parıldı yaptığı çalışmada, rekombinant DNA teknolojisi ile D-Tagatoz 3-Epimeraz (D-TE) enzim üretimini



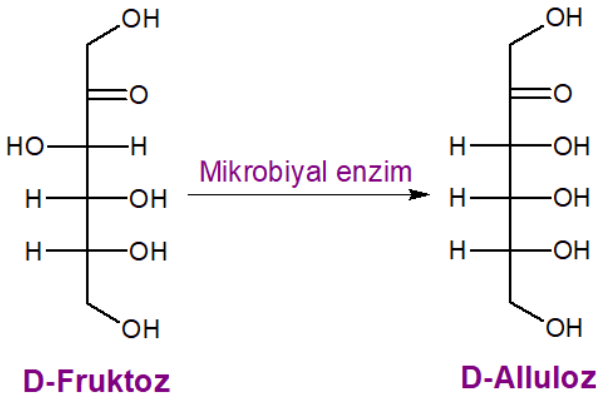
gerçekleştirmiş ve bu enzimi kullanarak fruktozu nadir bir şeker olan alluloz (psikoz)'a dönüştürmüştür. Çalışmada D-TE enzim aktivitesi için en uygun sıcaklığın 60 °C olduğu ve bu sıcaklık derecesinde bekletilen %50'lik fruktoz çözeltisine ait örneklerde 2., 4., 6., 8. ve 24. saatlerde yapılan HPLC analizleri sonucu fruktozun alluloza dönüşüm oranının sırasıyla %10.32, 12.66, 15.32, 15.78 ve 20.76 olduğu belirlenmiştir [8].

Ketoz 3-epimerase enzimi, tüm nadir şekerlerin biyolojik üretiminin şematize edildiği Izumoring stratejisinde çok önemli bir pozisyonda bulunmaktadır ve allulozun biyolojik üretiminde yeri doldurulamaz bir enzimdir. Alluloz ve D-fruktoz arasındaki C-3 pozisyonunda geri dönüşümlü epimerizasyonu katalize eder [24].

Ketose-3-epimerase ham halde, kısmen ve tamamen saflaştırılmış olarak, rekombinant veya immobilize formda çeşitli mikroorganizmalardan izole edilmiştir. Bu enzimin şimdiye kadar sadece 12 cins mikroorganizmadan üretilip tanımlandığı bilinmektedir [24].

Üretimde immobilize enzim kullanımı, serbest ve çözünür enzim kullanımına göre birçok açıdan üstündür. Immobilize enzim tekrar tekrar kullanılabilir ve enzimatik proses sürekli ve kolayca kontrol edilebilir. Ayrıca proses sonunda elde edilen ürünler kolayca ayrıştırılıp saflaştırılabilir. Immobilizasyon ile enzim aktivitesi ve stabilitesi gibi bazı özellikler imkanlar dahilinde iyileştirilebilmektedir [32].

Alluloz sentezi yaygın olarak, D-tagatoz 3-epimeraz enzim grubu (D-TEase, EC 5.1.3.-) tarafından katalizlenen D-fruktozun C-3 pozisyonunda epimerizasyonu ile gerçekleştirilir (Şekil 4). Ayrıca, D-xylose isomerase ve D-psikoz 3-epimeraz enzimlerinin beraber kullanılmasıyla D-glikozdan da alluloz üretimi gerçekleştirilebilmektedir [33]. D-fruktoz ve D-glikoz gibi doğal ve ucuz şekerlerin başlangıç materyali olarak kullanılması, hem nadir şekerlerin seri üretimi hem de uygulanan biyokimyasal metodun yüksek verimli olması bakımından avantajlıdır [16].

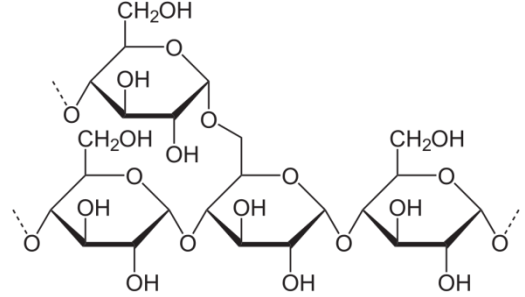


Şekil 4. Fruktozun enzimatik yolla alluloza dönüşümü [8]  
Figure 4. Enzymatic conversion of fructose to allulose [8]

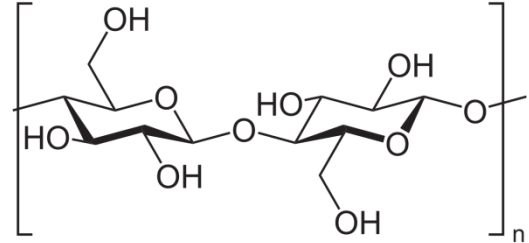
## NİŞASTADAN ALLULOZ ÜRETİMİ

Önceki yıllarda alluloz üretimi enzimatik yolla, fruktoz kullanılarak gerçekleştirilmekteydi, fakat, alluloz-fruktoz ayrımının yüksek maliyetli olması ve düşük miktarda son ürün oluşumu gibi problemler nedeniyle daha düşük maliyetli ve daha verimli proses uygulamalarına ihtiyaç duyulmaya başlanmıştır. Ayrıca, prosesin tek bir reaktör içinde başlayıp bitecek şekilde uygulanması da önemlidir. Fosfatın geri dönüştürülebildiği ve/veya proste fosfat kaynağı olarak ATP kullanılmasının gerekmediği, nispeten düşük fosfat konsantrasyonunda gerçekleştirilebilen bir alluloz üretim işlemine ihtiyaç vardır. Ayrıca, herhangi bir aşamada maliyeti yüksek olan NADH koenzimi kullanımını da gerektirmeyecek bir proses uygulanmalıdır [26].

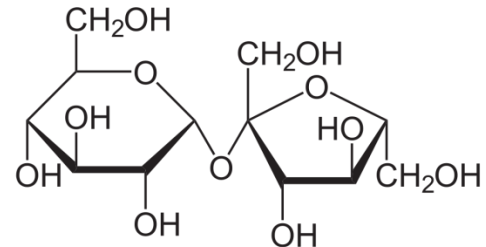
Üretim için nişasta (Şekil 5) veya nişasta türevleri (amiloz, amilopektin, çözünebilir nişasta, amilodekstrin, maltodekstrin, maltoz, glikoz), selüloz (Şekil 6) veya türevleri ve sakkaroz (Şekil 7) tercih edilebilir.



Şekil 5. Nişastanın kimyasal yapısı [34]  
Figure 5. Chemical structure of starch [34]



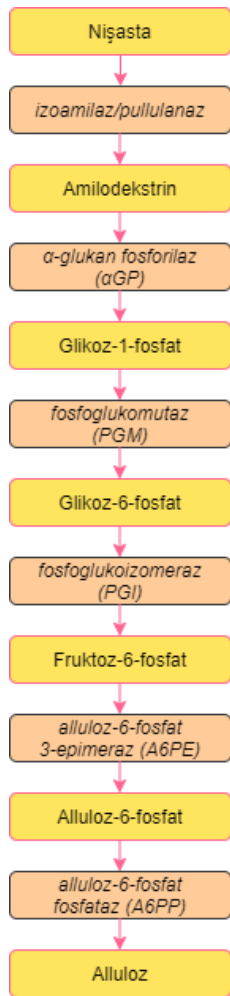
Şekil 6. Selülozun kimyasal yapısı [35]  
Figure 6. Chemical structure of cellulose [35]



Şekil 7. Sakkarozun kimyasal yapısı [36]  
Figure 7. Chemical structure of sucrose [36]

Nişasta kullanılarak gerçekleştirilen üretimde, nişasta önce enzimatik hidrolizle veya asit hidroliziyle nişasta türevlerine parçalanır. Enzimatik hidroliz için izoamilaz, pullulanaz, alfa amilaz veya bu enzimlerin karışımı kullanılır. Bazı durumlarda 4-glukan transferaz da ilave

edilebilir. Alluloz üretiminde ATP-free, NAD(H)-free, düşük fosfat konsantrasyonu içeren ve fosfatın geri dönüştürülebildiği ve en az bir aşamasının enerjik olarak uygun kimyasal reaksiyon içerdiği bir proses tercih edilmelidir. Bu proseste son ürün verimi artırılırken, ürün üretim ve saflaştırma maliyetinin düşürülmesi hedeflenmiştir. Şekil 8'de nişastadan alluloz üretimi basamaklarında da görüldüğü gibi, nişasta veya nişasta türevi sakkaritler 1 veya daha fazla enzim kullanılarak glikoz-1 fosfata dönüştürülmüş, sonra fosfoglikomutaz (EC 5.4.2.2) kullanılarak glikoz-1 fosfat glikoz-6 fosfata dönüştürülmüş, daha sonra fosfoglikoizomeraz (EC 5.3.1.9) kullanılarak glikoz-6 fosfat fruktoz-6 fosfata dönüştürülmüş, alluloz-6-fosfat 3-epimeraz kullanılarak fruktoz-6-fosfat alluloz-6-fosfata dönüştürülmüştür. Son olarak, alluloz-6-fosfat alluloz-6-fosfat fosfataz ile alluloza dönüştürülmüştür [26].



Şekil 8. Nişastadan enzimatik yolla alluloz üretimi akış şeması [26]

Figure 8. Flow chart of allulose production from starch enzymatically [26]

Bu proseste kullanılan enzimlerin oranı 1:1:1:1:1 ( $\alpha$ GP: PGM: PGI: A6PE: A6PP) olacak şekilde ayarlanacaktır. Ürün verimini optimize etmek için bu oran değiştirilebilir. Mesela, 3:1:1:1:1 oranı, fosforlanmış ara ürünlerin konsantrasyonunu maksimize etmek için kullanılabilir. Bunun tam tersi olan 1:1:1:1:3 oranı  $\alpha$ GP için güçlü bir

fosfat kaynağı sağlamak için kullanılabilir, bu da  $\alpha$ -1,4-glikozidik bağların daha verimli fosforolitik kırılmasına neden olur. Enzimler 3:1:1:1:3 oranında kullanıldığında ise reaksiyon hızı artar. Bu yolla üretimin önemli bir avantajı, tüm aşamaların tek bir biyoreaktör içinde gerçekleştirilebilmesidir.

Bir sakkaritin (disakkarit, oligosakkarit veya polisakkarit) glikoz-1-fosfata dönüşümü için  $\alpha$ -glukan fosforilaz (EC 2.4.1.1), maltoz fosforilaz (EC 2.4.1.8), sellodekstrin fosforilaz (EC 2.4.1.49), sellobiyoz fosforilaz (EC 2.4.1.20), selüloz fosforilaz, sükroz fosforilaz (EC 2.4.1.7) ve bunların kombinasyonları kullanılabilir. Doğru enzimin seçimi, reaksiyonda kullanılacak sakkarite göre yapılmalıdır. Bu sakkaritler nişasta, nişasta türevleri, selüloz, selüloz türevleri, sakkaroz, sakkaroz türevleri ve bunların kombinasyonları olabilir.

Nişasta türevleri nişastanın enzimatik hidroliziyle veya asit hidroliziyle elde edilebilir. Nişastanın enzimatik hidrolizi  $\alpha$ -1,6-glikozidik bağları hidrolize eden izoamilaz (EC 3.2.1.68) veya pullulanaz (EC 3.2.1.41), kısa maltooligosakkaritlerin transglikolizasyonunu katalizleyen ve daha uzun maltooligosakkarit oluşumunu sağlayan 4- $\alpha$ -glukanotransferaz (EC 2.4.1.25) veya  $\alpha$ -1,4-glikozidik bağları kıran  $\alpha$ -amilaz (EC 3.2.1.1) ile gerçekleştirilir.

## SONUÇ

D-alluloz doğrudan bitkisel yapılardan ekstraksiyonla, kimyasal yolla ya da enzimatik yolla üretilmektedir. Kimyasal sentez ve bitkilerden ekstraksiyon yöntemlerinin pahalı olması, işlem sonucunda ortaya çıkan atık problemi ve verimli olmamaları nedeniyle, günümüzde alluloz üretimi için farklı yöntemler tercih edilmektedir. Bu yöntemlerden en yaygın ve ekonomik olan yöntem enzimatik yöntemdir. Bu yöntemle, fruktoz ya da nişasta ve türevlerinden, rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilen enzimler kullanılarak alluloz üretilmektedir. Enzimatik yöntem hem allulozun seri üretimini mümkün kılması hem de üretim veriminin yüksek olması bakımından avantajlıdır. Son yıllarda, alluloz üretimi için daha az maliyetli ve tek bir reaktör içinde başlayıp bitecek bir yöntem arayışına girilmiş ve yapılan çalışmalar sonucunda nişastadan tek aşamada alluloz üretimi gerçekleştirilmiştir. Hammadde olarak nişasta veya nişasta türevleri (amiloz, amilopektin, çözünebilir nişasta, amilodekstrin, maltodekstrin, maltoz, glikoz), selüloz veya türevleri ve sakkaroz tercih edilmiştir. Nişastadan alluloz üretiminde son ürün veriminin diğer yöntemlere göre oldukça yüksek olacağı, ürün üretim ve saflaştırma maliyetinin de ciddi oranda azalacağı öngörülmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Namli, S., Sumnu, S.G., Oztop, M.H. (2021). Microwave glycation of soy protein isolate with rare sugar (D-allulose), fructose and glucose. *Food Bioscience*, 40, 100897.
- [2] de Sousa, M., Silva Gurgel, B., Pessela, B.C., Gonçalves, L.R.B. (2020). Preparation of CLEAs and magnetic CLEAs of a recombinant L-arabinose

- isomerase for D-tagatose synthesis. *Enzyme and Microbial Technology*, 138, 109566.
- [3] Onishi, Y., Furushiro, Y., Hirayama, Y., Adachi, S., Kobayashi, T. (2020). Production of tagatose and talose through isomerization of galactose in a buffer solution under subcritical water conditions. *Carbohydrate Research*, 493, 108031.
- [4] Hossain, A., Yamaguchi, F., Matsuo, T., Tsukamoto, I., Toyoda, Y., Ogawa, M., Nagata, Y., Tokuda, M. (2015). Rare sugar d-allulose: Potential role and therapeutic monitoring in maintaining obesity and type 2 diabetes mellitus. *Pharmacology & Therapeutics*, 155, 49-59.
- [5] Hashii, K., Hasegawa, T., Idegami, N., Kadota, M., Taniguchi, M., Toyama, T., Toyonaga, D. (2015). Discover Kagawa through English and Science, Kagawa University Student Development Project Press: Japonya.
- [6] Yang, J., Zhang, T., Tian, C., Zhu, Y., Zeng, Y., Men, Y., Chen, P., Sun, Y., Ma, Y. (2019). Multi-enzyme systems and recombinant cells for synthesis of valuable saccharides: Advances and perspectives. *Biotechnology Advances*, 37(7), 107406.
- [7] Yamamura, Y., Iwagaki, S., Hishida, M., Nagatomo, S., Fukada, K., Saito, K. (2019). Heat capacity and standard thermodynamic functions of three ketohexoses in monosaccharides including rare sugars: D-fructose, D-psicose, and D-tagatose. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 131, 420-430.
- [8] Parıldı, E. (2019). D-tagatoz 3-epimeraz enzimi üretimi ve fruktozdan alluloz (psikoz) eldesi. Yüksek Lisans Tezi. Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [9] Li, C., Li, L., Feng, Z., Guan, L., Lu, F., Qin, H. (2021). Two-step biosynthesis of D-allulose via a multienzyme cascade for the bioconversion of fruit juices. *Food Chemistry*, 359, 1-9, 129746.
- [10] Metabolic Balance (2019). Alüloz. Available online: <https://www.metabolic-balance.com.tr/blog/alueloz>.
- [11] Zhu, P., Zeng, Y., Chen, P., Men, Y., Yang, J., Yue, X., Zhang, J., Zhu, Y., Sun, Y. (2020). A one-pot two-enzyme system on the production of high value-added D-allulose from Jerusalem artichoke tubers. *Process Biochemistry*, 88, 90-96.
- [12] Kanasaki, A., Jiang, Z., Mizokami, T., Shirouchi, B., Iida, T., Nagata, Y., Sato, M. (2019). Dietary D-allulose alters cholesterol metabolism in Golden Syrian hamsters partly by reducing serum PCSK9 levels. *Journal of Functional Foods*, 60, 103429.
- [13] Braunstein, C.R., Noronha, J.C., Khan, T.A., Mejia, S.B., Wolever, T.M., Josse, R.G., Kendall, C.W., Sievenpiper, J.L. (2020). Effect of fructose and its epimers on postprandial carbohydrate metabolism: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Nutrition*, 39, 3308-3318.
- [14] Wang, R., Hartel, R.W. (2020). Effects of moisture content and saccharide distribution on the stickiness of syrups. *Journal of Food Engineering*, 284, 1-13.
- [15] Kimura, T., Kanasaki, A., Hayashi, N., Yamada, T., Iida, T., Nagata, Y., Okuma, K. (2017). D-allulose enhances postprandial fat oxidation in healthy humans. *Nutrition*, 43-44, 16-20.
- [16] Izumori, K. (2002). Bioproduction strategies for rare hexose sugars. *Naturwissenschaften*, 89, 120-124.
- [17] Li, W., Zhu, Y., Jiang, X., Zhang, W., Guang, C., Mu, W. (2020). One-pot production of D-allulose from inulin by a novel identified thermostable exoinulinase from *Aspergillus piperis* and *Dorea* sp. D-allulose 3-epimerase. *Process Biochemistry*, 99, 87-95.
- [18] Zhang, J., Xu, C., Chen, X., Ruan, X., Zhang, Y., Xu, H., Guo, Y., Xu, J., Lv, P., Wang, Z. (2020). Engineered *Bacillus subtilis* harbouring gene of d-tagatose 3-epimerase for the bioconversion of D-fructose into D-psicose through fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 136, 109531.
- [19] FDA (2016). *GRAS Notice (GRN) No. 647*.
- [20] Bilik, V., Tihlárík, K. (1973). Reactions of saccharides catalyzed by molybdate ions. IX.\* Epimerization of ketohexoses. *Chemické Zvesti*, 28, 106-109.
- [21] Doner, L.W. (1979). Isomerization of d-fructose by base: Liquid-chromatographic evaluation and the isolation of d-psicose. *Carbohydrate Research*, 70(2), 209-216.
- [22] Takeshita, K., Suga, A., Takada, G., Izumori, K. (2000). Mass production of D-psicose from D-fructose by a continuous bioreactor system using immobilized D-tagatose 3-epimerase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(4), 453-455.
- [23] Wen, L., Huang, K., Zheng, Y., Fang, J., Kondengaden, S.M., Wang, P.G. (2016). Two-step enzymatic synthesis of 6-deoxy-L-psicose. *Tetrahedron Letters*, 57(34), 3819-3822.
- [24] Zhang, W., Yu, S., Zhang, T., Jiang, B., Mu, W. (2016). Recent advances in d-allulose: Physiological functionalities, applications, and biological production. *Trends in Food Science & Technology*, 54, 127-137.
- [25] Park, C.S., Kim, T., Hong, S.H., Shin, K.C., Kim, K.R., Oh, D.K. (2016). D-allulose production from D-fructose by permeabilized recombinant cells of *Corynebacterium glutamicum* cells expressing D-allulose 3-epimerase *Flavonifactor plautii*. *PLoS One*, 11(7), 1-22.
- [26] Wichelecki, D.J., Rogers, E.O. (2020). Enzymatic Production of D-Allulose. *United States Patent Application Publication*, 1-7.
- [27] Hough, L., Stacey, B.E. (1963). The occurrence of D-ribohexulose in *Itea ilicifolia* *Itea virginica*, and *Itea yunnanensis*. *Phytochemistry*, 2, 315-320.
- [28] Takeshita, K., Suga, A., Takada, G., Izumori, K. (2000). Mass production of D-psicose from D-fructose by a continuous bioreactor system using immobilized D-tagatose 3-epimerase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90, 453-455.
- [29] Yoshihara, K., Shinohara, Y., Hirotsu, T., Izumori, K. (2006). Bioconversion of D-psicose to D-tagatose and D-talitol by *Mucoraceae* fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(3), 219-222.
- [30] Beerens, K., Desmet, T., Soetaert, W. (2012). Enzymes for the biocatalytic production of rare sugars. *Journal of Industrial Microbiology and*

- Biotechnology*, 39, 823-834.
- [31] Lim, B.-C., Kim, H.-J., Oh, D.-K. (2009). A stable immobilized d-psicose 3-epimerase for the production of d-psicose in the presence of borate. *Process Biochemistry*, 44, 822-828.
- [32] Li, Z., Gao, Y., Nakanishi, H., Gao, X., Cai, L. (2013). Biosynthesis of rare hexoses using microorganisms and related enzymes. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 9, 2434-2445.
- [33] Li, Z., Li, Y., Duan, S., Liu, J., Yuan, P., Nakanishi, H., Gao, X.D. (2015). Bioconversion of d-glucose to d-psicose with immobilized d-xylose isomerase and d-psicose 3-epimerase on *Saccharomyces cerevisiae* spores. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(8), 1117-1128.
- [34] Comunale, J. (2021). Starch structure. Available online: <https://study.com/learn/lesson/starch-structure-function-chemical-formula.html>.
- [35] Helmenstine, A.M. (2019). Cellulose chemical structure. Available online: <https://www.thoughtco.com/what-is-cellulose-definition-4777807>.
- [36] Wikipedia (2022). Sucrose structure. Available online: <https://en.wikipedia.org/wiki/Sucrose>.
- 
-