

NADİR BİR ŞEKER OLAN D-ALLÜLOZUN BESLENMEDE KULLANIM İMKANLARI VE ÜRETİM YÖNTEMLERİ

Hazal Özhanlı¹, Duygu Gizem Bilgin¹, Ceren Mutlu^{1,2}, Mustafa Erbaş^{1*}

¹Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya, Türkiye

²Balıkesir Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Balıkesir, Türkiye

Geliş / Received: 30.12.2020; Kabul / Accepted: 05.05.2021; Online baskı / Published online: 15.06.2021

Özhanlı, H., Bilgin, D.G., Mutlu, C., Erbaş, M. (2021). Nadir bir şeker olan D-allülozün beslenme kullanım imkanları ve üretim yöntemleri. *GIDA* (2021) 46 (4) 925-938 doi: 10.15237/gida. GD21010.

Özhanlı, H., Bilgin, D.G., Mutlu, C., Erbaş, M. (2021). *D-allulose, a rare sugar, and its usage possibilities in nutrition and production methods. GIDA* (2021) 46 (4) 925-938 doi: 10.15237/gida. GD21010.

ÖZ

Şekerler; duyuşsal olarak tatlı tada sahip, suda çözünürlüğü yüksek ve moleköl ağırlıkları düşük karbonhidratlar olarak tanımlanabilir. Doğada yüksek miktarda bulunan şekerler yaygın şekerler ve düşük miktarda bulunan şekerler ise nadir şekerler olarak adlandırılırlar. Nadir bir şeker olan D-allüloz, D-fruktozun 3. karbondan epimerik izomeridir. D-allüloz aynı zamanda D-glikoza eşdeğer tatlı tada, oldukça düşük enerji içeriğine ve glisemik indeks değerine sahip olması gibi özellikleri ile de gıda teknolojisinde kullanım potansiyeline sahip bir bileşendir. D-allülozün diğler endüstriyel şekerlere alternatif bir bileşen olarak kullanımını için doğal kaynakları yetersizdir. Bu nedenle D-allülozün diğler yaygın heksoz şekerlerden üretilmesi gerekmektedir. D-allülozün en genel üretim yöntemi; D-fruktozun, D-tagatoz 3-epimeraz veya D-allüloz 3-epimeraz enzimleri ile D-allüloza dönüştürülmesidir. Bu çalışmada; D-allülozün bazı özellikleri, sağık üzerine etkileri, üretim yöntemleri ve gıdalarda kullanım potansiyeli derlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Şeker, nadir şeker, D-allüloz, D-psikoz, D-tagatoz 3-epimeraz

D-ALLULOSE, A RARE SUGAR, AND ITS USAGE POSSIBILITIES IN NUTRITION AND PRODUCTION METHODS

ABSTRACT

Sugars are defined as carbohydrates with a sweet taste, high water solubility, and low molecular weight. Sugars found in high amounts in nature are classified as common sugars, sugars found in low amounts are classified as rare sugars. D-allulose, a rare sugar, is the C-3 epimeric isomer of D-fructose. D-allulose is also an ingredient having the potential for usage in food technology with its properties such as sweet taste equivalent to D-glucose, very low energy content and glycemic index value. Natural resources are insufficient for D-allulose to be used as an alternative ingredient to other industrial sugars. Therefore, D-allulose must be produced from other common hexose sugars. The most common production method of D-allulose is the conversion of D-fructose to D-allulose by D-tagatose 3-epimerase or D-allulose 3-epimerase enzymes. In this study; some properties, effects on health, production methods and potential usage in foods of D-allulose are reviewed.

Keywords: Sugar, rare sugar, D-allulose, D-psicose, D-tagatose 3-epimerase

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: erbas@akdeniz.edu.tr

☎: (+90) 242 310 6575

☎: (+90) 242 310 6306

Hazal Özhanlı; ORCID no: 0000-0002-9825-3916

Duygu Gizem Bilgin; ORCID no: 0000-0003-4162-1412

Ceren Mutlu; ORCID no: 0000-0003-4943-2798

Mustafa Erbaş; ORCID no: 0000-0002-9485-2356

GİRİŞ

Karbonhidratlar, temel olarak karbon başına bir molekül suyun bağlanmasıyla oluşan organik hidrattır. Ayrıca karbonhidratlar polihidroksi alkollerin aldehit veya keton türevleri olan bileşiklerin monomerik, oligomerik veya polimerik formları olarak da tanımlanabilir. İnsan beslenmesinde temel enerji kaynağı olan karbonhidratlar, glikanlar veya sakkaritler isimleriyle de bilinirler (Gil-Campos vd., 2015).

Şekerler ise; çoğunlukla 3 ila 6 arasında karbon atomuna sahip trioz, tetroz, pentoz ve heksoz grubu monosakkaritlerden veya bu monosakkaritlerin birkaçının glikozidik bağ ile birbirlerine bağlanması sonucu ortaya çıkan oligosakkaritlerden oluşan tatlı karbonhidratlar grubuna verilen genel bir isimdir. Ayrıca şekerler duyuşal olarak tatlı tada sahip, suda çözünürlüğü yüksek ve molekül ağırlıkları düşük karbonhidratlar olarak da tanımlanabilir.

Doğada bulunan 36 adet pentoz ve heksoz formundaki monosakkaritlerden; D-glikoz, D-galaktoz, D-mannoz, D-fruktoz, D-ksiloz, D-riboz ve L-arabinoz doğal kaynaklarda yüksek miktarlarda bulunmaları nedeniyle yaygın monosakkaritler olarak adlandırılırken, diğerleri ise doğada oldukça az miktarlarda bulunmaları nedeniyle nadir monosakkaritler veya şekerler olarak adlandırılmaktadırlar.

Nadir şekerler, Uluslararası Nadir Şekerler Derneği (ISRS) tarafından, doğada yaygın olmayan ve az miktarda bulunan monosakkaritler veya türevleri olarak tanımlanmaktadır (Zhang vd., 2017). Doğada iz miktarda bulunan D-alloz, D-allüloz, D-tagatoz, L-fruktoz ve L-sorboz gibi monosakkaritler en çok bilinen nadir şekerlerken bazı kaynaklar izomaltoz, izomaltuloz, trehaloz ve kojibioz gibi disakkaritleri de nadir şekerler arasında sınıflandırmaktadır (Van Laar vd., 2020).

Şekerler gıda endüstrisinde gıda maddelerinin tatlandırılması, donma veya erime noktalarının değiştirilmesi, renklendirilmesi ve korunması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda özellikle işlenmiş gıdalar ile aşırı şeker tüketiminin obezite ve diyabet gibi hastalıklara neden

olduğunun anlaşılması ile birlikte şekerlerin tüketimlerinin azaltılması veya ikame edilmesi yönünde araştırmalara ihtiyaç duyulmuştur (Gil-Campos vd., 2015). Nadir şekerler glikoz ve fruktoz gibi yaygın şekerler kadar duyuşal tatlılığa sahip olmalarına rağmen enerji içerikleri yaygın şekerlere kıyasla oldukça düşük ve fizyolojik faydaları da yüksektir. Bu nedenlerle nadir şekerler gıda sektöründe kullanılan yaygın şekerlere ikame bileşenler olarak kabul edilmeye ve kullanılmaya başlanmıştır. Nadir şeker doğal kaynaklarının yetersiz olması nedeniyle nadir şekerlerin ticari üretimleri için çeşitli kimyasal, enzimatik ve mikrobiyolojik yöntemler kullanılmakta ve nadir şekerlerin üretimi hakkında gerçekleştirilen çalışmalar gittikçe artmaktadır (Mu vd., 2018).

Bu çalışmada nadir şekerlerden biri olan allülozun; genel özellikleri, vücutta metabolizasyonu, fizyolojik faydaları, gıdalarda kullanım potansiyeli ve üretim yöntemleri derlenmiştir.

ALLÜLOZ VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Allüloz, $C_6H_{12}O_6$ kapalı formülüne sahip bir ketoheksozdur. Eski adıyla psikoz olarak da bilinen D-allüloz, D-fruktozun karbon-3 epimeridir. CAS Numarası 551-68-8 ve molekül ağırlığı 180.156 g/mol olan D-allüloz; beyaz, kristal, katı formda ve kokusuz bir bileşiktir. Sakkarozun %70 eşdeğer tatlılığında olan allüloz, indirgen bir monosakkarit olduğu için gıdalarda enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarına katılabilmektedir (Patel vd., 2016; O'Charoen vd., 2015).

Uluslararası Nadir Şekerler Derneği tarafından 2014 yılında düzenlenen Nadir Şekerler Sempozyumu'nda kimyasal adı D-ribo-2-heksüloz olan bu ketoheksozun, D-allozun izomeri olması ve D-allitolün bir oksit ürünü olması nedeniyle isimlendirmede D-psikoz yerine D-allüloz isminin tercih edilmesi önerilmiştir (Yoshihara vd., 2017). Yine 2014 yılında allüloz, Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından Genel Olarak Güvenilir (GRAS) kategorisinde kabul edilmiş ve bir gıda bileşeni veya gıda takviyesi olarak kullanılması onaylanmıştır (FDA, 2017).

ALLÜLOZUN BULUNDUĞU KAYNAKLAR

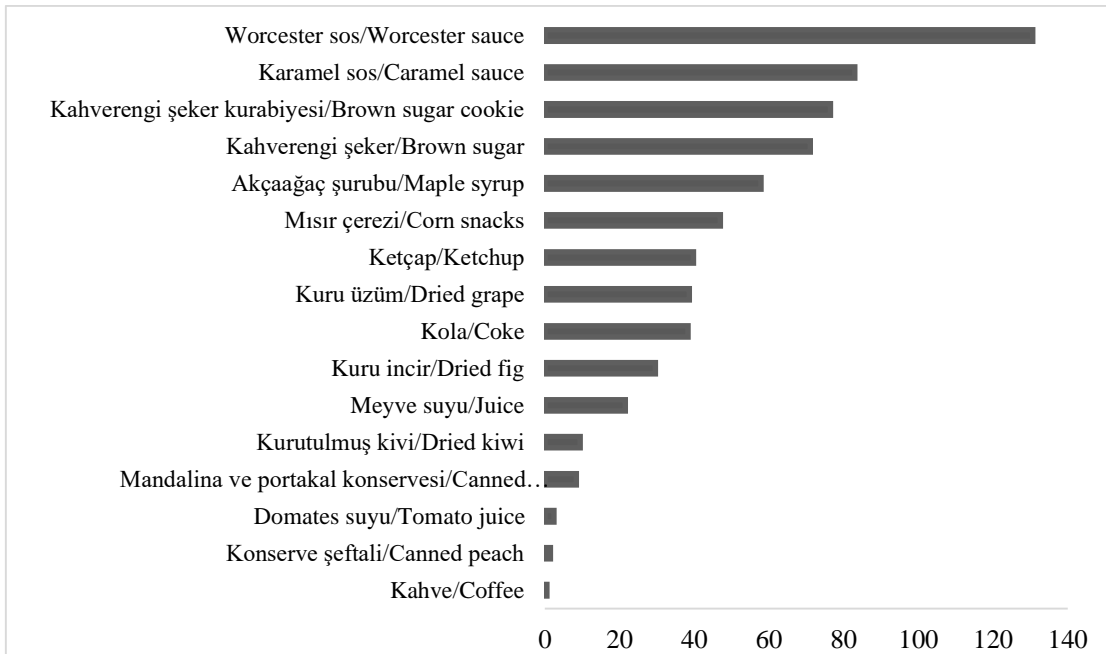
Allüloz doğal bir bileşen olarak yalnızca *Itea* cinsine ait bitki türlerinde ve az miktarda buğdayda tespit edilmiştir (Oshima vd., 2006). Zeng vd., (2015) gerçekleştirdikleri bir çalışmada *Itea virginica* bitkisinin taze yapraklarında 82.3 mg/g D-allüloz ve 21.2 mg/g allitol bulunduğunu, *Itea oblonga* Hand.-Mazz. ve *Itea yunnanensis* Franch bitkilerinin ise yaprak ekstraktlarında sırasıyla 38.4 mg/g ve 12.2 mg/g D-allüloz olduğunu bildirmişlerdir. Yine Japonya'da Zuina ismiyle bilinen *Itea japonica* Oliver bitkisi de doğal bir bileşen olarak allüloz içerip, üretebilmekte ve bu nedenle Zuina bitkisi, Japonya'da "Nadir Şeker Ağacı" olarak da isimlendirilmektedir (Hashii vd., 2015).

Allüloz *Itea* cinsine ait bitkilerin yanı sıra şeker pancarı melası ile işlenmiş şeker kamışında, esmer şekerde, akçaağaç şurubunda, kurutulmuş meyvelerde ve meyve sularında bulunabilmektedir (Oshima vd., 2006).

Sakkarozun hidrolizinden veya glikozun izomerizasyonundan elde edilen ticari D-glikoz ve D-fruktoz karışımlarında da D-allüloz az miktarlarda bulunabilmektedir (Han vd., 2018).

D-allüloz içeren nadir şeker şurubu, fonksiyonel bir tatlandırıcı olarak kabul edilmekte ve endüstriyel ölçekte yüksek fruktozlu mısır şurubunun alkali izomerizasyonu ile üretilmektedir. Nadir şeker şurubu, %5 oranında D-allüloz içermekte ve bu şurubun anti-obezite ve anti-diyabetik etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Shintani vd., 2017).

Şekil 1'de verilen bazı gıda ürünlerinin ihtiva ettikleri allüloz miktarları (FDA, 2017; Oshima vd., 2006) incelendiğinde sıcaklık uygulamasının ürünlerin allüloz içeriği üzerinde etkili olduğu anlaşılmaktadır. İşlenmiş gıda ürünlerindeki allüloz miktarının, gıdanın başlangıçtaki fruktoz veya hidrolize uğrayan sakkaroz konsantrasyonu ve gıdanın işlenmesi esnasında uygulanan ısı işlem süre ve sıcaklığı ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Gıda ürünlerinin içerdiği fruktoz uzun süreli sıcaklık uygulaması ile allüloza epimerize olabilmektedir. Şeker kamışı suyu üzerinde yapılmış olan bir çalışmada 4 saatlik bir ısı işlem sonrası şeker kamışı suyunun D-allüloz içeriğinin 0.1 mg/100 mL miktarından 2.9 mg/100 mL miktarına yükseldiği bildirilmiştir (Oshima vd., 2006).



Şekil 1. Bazı gıda ürünlerinin içerdiği allüloz miktarı (mg/100 g)

ALLÜLOZUN METABOLİZASYONU VE TOKSİSİTESİ

D-allüloz oldukça düşük kalori içeriğine (<0.2 kcal/g) ve glisemik indeks değerine sahip olduğu için, ideal bir sakkaroz ikamesi olarak gıdalarda kullanılmaya potansiyeline sahiptir (Wee vd., 2018).

Iida vd., (2010) insanlarda allülozun metabolizması üzerine yaptıkları çalışmada, bireylerde allülozun %70 kadarının ince bağırsaktan absorbe edilip kan dolaşımına geçtiğini ve daha sonra metabolize edilmeden idrar ile uzaklaştırdığını belirlemişlerdir. İnce bağırsak tarafından absorbe edilmeyen kısmının ise kalın bağırsakta, bağırsak bakterileri tarafından ihmal edilebilecek kadar düşük miktarda fermente edildiğini ve kalan allülozun ise dışkı ile uzaklaştığını tespit etmişlerdir.

Matsuo vd., (2002) gerçekleştirdikleri bir çalışmada farelere 14 gün boyunca tek doz halinde 8, 11, 14, 17 ve 20 g/kg vücut ağırlığı miktarlarında D-allüloz uygulamışlar ve tüm farelerde bu dozların diyareye neden olduğunu ve yüksek dozda allüloz alımının bağırsak sistemi için zararlı olabileceğini bildirmişlerdir. Fareler üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise 10 hafta uygulanmış bir diyetle günlük 2 g/kg vücut ağırlığı kadar allüloz uygulamasının, allüloz uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla fareler üzerinde olumsuz bir etki göstermediği belirlenmiştir (Kim vd., 2019).

Fruktoz için 14.7 ve eritritol için ise 15.3 g/kg olan LD₅₀ değeri, D-allüloz için fare deneyleriyle 16.3 g/kg olarak belirlenmiştir (Matsuo vd., 2002). FDA'nın toksisite derecelendirme çizelgesine göre, en düşük toksisite derecesi olan nispeten zararsız kategorisinde olması nedeniyle D-allüloz gıda ürünlerine sakkaroz ikamesi olarak farklı miktarlarda eklenebilmektedir (Bilal vd., 2018).

FDA 2019 yılında D-allülozu; kalori içeriğinin çok düşük olması, insan vücudunda metabolize edilememesi ve glisemik indeks değerinin düşük olması nedenleriyle diğer şekerlerden farklı olduğu için gıda etiketlerinde şekerler kategorisinde sınıflandırılmayacağını açıklamıştır (FDA, 2019).

ALLÜLOZUN SAĞLIK ÜZERİNE ETKİLERİ

D-fruktozun 3. karbonundan epimeri olan D-allüloz, sağlık üzerinde olumlu etkileri olan bir monosakkarittir. D-allüloz kan şekeri düzeyini yükseltmemesinin yanı sıra düşürücü bir etkiye de sahiptir (Iwasaki vd., 2018). D-allülozun kan şekeri düzeyini düşürücü etkisi iki mekanizma ile açıklanabilmektedir. Birinci mekanizmaya göre; in vitro ve in vivo çalışmalarla gösterilmiştir ki D-allüloz ince bağırsakta α -glukozidazın aktivitesini inhibe ederek, glikoz emiliminin azalmasını sağlamaktadır. İkinci mekanizmaya göre ise; kandaki glikozun karaciğerdeki glikojene dönüşümünü teşvik eden glikokinaz enziminin faaliyetini destekleyerek kan şekeri seviyesini düşürmektedir (Shintani vd., 2017). Gerçekleştirilen bir çalışmada 8 hafta boyunca D-allülozla beslenen farelerde, D-allülozun karaciğer glikojenini arttırdığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda allülozla beslenen farelerin, kontrol grubuna kıyasla kan şekeri düzeylerinin düşük olduğu ve insülin konsantrasyonunun ise allülozla beslenen farelerde anlamlı bir şekilde yüksek olduğu bildirilmiştir (Matsuo ve Izumori, 2006).

Ayrıca D-allülozun, yapı benzerliği nedeniyle D-glikoz ve D-fruktozun sindirim kanalında taşınmasında rol alan proteinlere bağlanarak onların emilimini indirekt olarak azaltıcı bir etkiye sahip olduğu ve bu yolla da insan vücudunda glisemik indeksin azalmasına katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Hossain vd., 2015). Bazı araştırmalarda da D-allülozun diğer karbonhidratlara kıyasla besin alımını baskılayıcı etkide olduğu ve vücutta yağ birikimini azalttığı bildirilmiştir (Kimura vd., 2017; Matsuo ve Izumori, 2006).

Çeşitli çalışmalar D-allülozun anti-hiperlipidemik aktiviteye sahip olduğunu doğrulamıştır. D-allülozun lipid metabolizması üzerine etkilerinin belirlendiği bir çalışmada fareler 4 hafta boyunca öğün miktarının %3'ü kadar D-allüloz içeren ve içermeyen mısır nişastası ile beslenmiştir. Çalışma ile D-allüloz diyetinin lipogenezde rol alan karaciğer enzimi aktivitesini baskıladığı, yağ asidi oksidasyonunu ve 24 saatlik enerji harcamasını ise arttırdığı tespit edildiğinden kilo yönetimini

kontrol etmede uygun olduğu bildirilmiştir (Nagata vd., 2015). Yine farelerde yapılan bir çalışmada 16 hafta boyunca uygulanan yüksek yağlı diyetle sakkaroz ikame olarak öğünde ağırlıkça %5 D-allüloz takviyesinin ince bağırsakta yağ emilimini azalttığı ve yağ kullanımını artırdığı belirlenmiştir (Han vd., 2016).

D-allüloz takviyesinin, yüksek yağlı bir diyetin lipid metabolizması üzerindeki etkilerini hafifletip hafifletmediğini belirlemek üzere yapılan bir araştırmada, 8 hafta boyunca farelere D-allüloz takviyesi olan ve olmayan diyetler uygulanmıştır. Allüloz içeren diyet grubunun vücut yağ dokusunun, karaciğer ağırlıklarının ve açlık kan glikoz seviyesinin kontrol grubuna göre daha düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar D-allülozün genel lipid metabolizmasını geliştirebildiğini ve vücutta yağ birikmesini önlemek için fonksiyonel bir gıda bileşeni olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Do vd., 2019).

Allülozün gıdalarla tüketiminin insan sağlığı üzerine etkileri hakkında 121 yetişkin bireye yapılan bir çalışmada ise 12 hafta boyunca günde 2 öğün uygulanan diyetle 4 ve 7 g allüloz alımının deneklerde anormal bir etkiye veya klinik bir soruna neden olmadığı tespit edilmiştir (Han vd., 2018). Özgür ve Uçar, (2019) tarafından karbonhidrat ve yağ metabolizmasının bozulduğu bazı endokrin hastalıklarında alternatif bir tedavi seçeneği olarak diyetle D-allülozün kullanılabilmesi ve bu nedenle de D-allüloz içeren gıda ürünlerinin geliştirilerek, tüketime sunulmasının yararlı olacağı bildirilmiştir.

ALLÜLOZUN GIDALARDA KULLANIMI
D-allüloz genel olarak fırıncılık ürünleri, alkolsüz içecekler, dondurma, yoğurt, çorba ve soslarda kullanılmasının yanı sıra kıvam artırıcı ve stabilize edici bir ajan olarak işlenmiş et ürünlerinde ve tıbbi ilaçlarda da kullanılmaktadır (FDA, 2017; Jiang vd., 2020). Tatlı tadı, düşük kalorisi, yüksek higroskopisitesi, çok düşük glikemik indeksi, anti-karyojenik etkisi ve diyareye neden olmayışı gibi özellikleriyle D-allüloz çeşitli şekerleme ürünlerine de ilave edilebilmektedir (Barkalow vd., 2018).

D-allülozün gıda endüstrisinde kullanımı üzerine yapılmış çeşitli çalışmalarda, ilave edildiği gıdada retrogradasyonu geciktirici ve jel oluşumunu destekleyici etkide bulunduğu ve ısı işlem gören gıdalarda D-fruktoz ve D-glikoza göre Maillard reaksiyonuna daha düşük düzeyde katıldığı tespit edilmiştir (Hossain vd., 2015; İlhan vd., 2020). Allüloz, puding gibi jel gıdalara ilave edildiğinde gıdanın viskoelastik yapısını ve kırılma direncini geliştirip, jelde proteinlerin çapraz bağlanmasını teşvik etmektedir (Hadipernata vd., 2017).

Tavuk sosisine %2.5 oranında sakkaroz ikamesi olarak ilave edilen allülozün, kontrol örneğine göre; sosis viskozitesini %10 arttırdığı, dondurulmuş çözölmüş sosların reolojik özelliklerinin %19 daha iyi olduğu ve ürünün su tutma kapasitesini ve elastikiyetini koruduğu belirlenmiştir (Hadipernata vd., 2016). Allülozün dondurulmuş çözölmüş soslerdeki hasar önleyici bu etkileri dondurulmuş gıdalara uygulanmasının faydalı olabileceğini göstermektedir.

Ayrıca allüloz bitki koruma alanında da bakteriyel yanma gibi ekin hastalıklarına karşı direnç sağlayıcı olarak kullanılabilir (Mao vd., 2020; Yoshihara vd., 2017).

ALLÜLOZUN ÜRETİMİ

Allülozün Kimyasal Üretimi

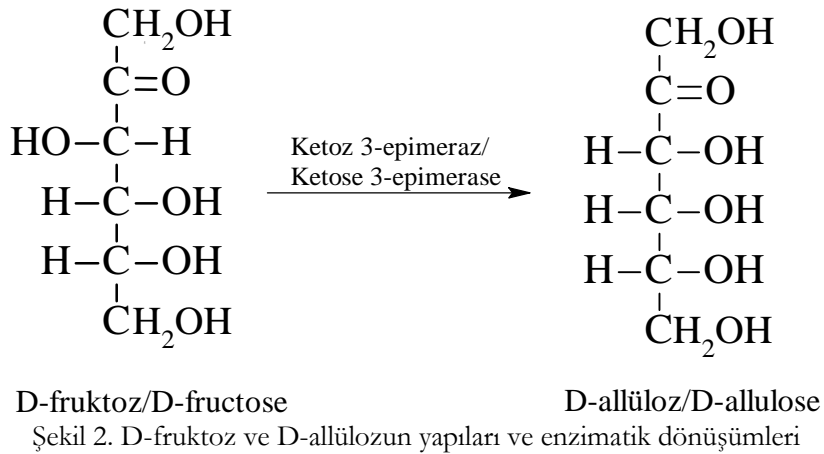
Allüloz doğada nadir bulunan bir şeker olması nedeniyle kimyasal olarak yaygın bulunan şekerlerden allülozün üretilmesi için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri; D-fruktozu molibdat iyonlarının katalitik etkisi altında asidik çözeltide D-allüloza epimerize etmektir (Bilik ve Tihlárík, 1973). McDonald (1967) tarafından gerçekleştirilen başka bir yöntemde ise; 3 kimyasal aşamada 1,2:4,5-di-O-isopropiliden- β -D-fruktopiranozdan allüloz sentezlenmiştir. Diğer bir kimyasal üretimde ise; D-fruktoz, etanol ve trietilamin içerisinde kaynatılarak D-allüloz elde edilmiştir (Doner, 1979). Fakat tüm bu üretim yöntemlerinin karmaşık saflaştırma aşamaları gerektirmesi, kimyasal atık ve yan ürün oluşumu gibi dezavantajlarının olması nedenleriyle D-allülozün büyük ölçekli üretimi maliyetli ve düşük verimli olmaktadır.

Allülozun Mikrobiyolojik ve Enzimatik Üretimi

Son zamanlarda allüloz gibi nadir şekerlerin fizyolojik etkileri ve faydalarına dair yapılan çalışmalar artmış ve bu durum doğada az miktarda rastlanan bu şekerlerin seri üretim yöntemlerinin araştırılmasına yol açmıştır. Allülozun mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak üretiminin, kimyasal sentez yöntemlerine göre daha çevre dostu olduğu ve kullanılan enzimatik tekniklerin orta yoğunlukta reaksiyon şartları, yüksek verimlilik, spesifiklik ve sürdürülebilirlik gibi birçok avantaj sağladığı tespit edilmiştir (Zhang vd., 2017).

Nadir şekerlerin üretimi için geliştirilmiş bir yöntem ile uygun biyokatalizörler kullanılarak D-

glukoz ve D-fruktoz gibi doğal ve ucuz heksozlardan, diğer tüm heksozların eldesi gerçekleştirilebilmektedir. Izumoring Stratejisi adı verilen bu yöntem, özellikle allülozun da dahil olduğu nadir ketoheksozların enzimatik üretiminde öncü bir yöntem haline gelmiştir. Bu yöntemde kullanılan biyokatalizörlerden ketoz 3-epimeraz enzim grupları, serbest halde bulunan ketoheksozların 3. karbonunun geri dönüşümlü epimerizasyonunu katalize etmekte ve ketoheksozların enzimatik dönüşümünde oldukça kritik bir role sahip olmaktadır (Li vd., 2015; Mu vd., 2015). D-allülozun, D-fruktozdan ketoz 3-epimeraz enzimleri aracılığı ile dönüşümü Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. D-fruktoz ve D-allülozun yapıları ve enzimatik dönüşümleri

D-fruktozun D-allüloza epimerizasyonunu katalize edebilen D-tagatoz 3-epimeraz (DTEaz, EC 5.1.3.31) ve D-allüloz 3-epimeraz (DAEaz, EC 5.1.3.30) enzimleri çeşitli mikroorganizmalardan kısmen veya tamamen saflaştırılmış, rekombinant veya immobilize formda izole edilmiştir. 1993 yılında D-fruktozun C-3 konumunda D-allüloza epimerizasyonunu gerçekleştirebilen bir ketoz 3-epimeraz enzimi *Pseudomonas cichorii* ST-24 suşu kullanılarak karakterize edilmiş ve ilk defa rapor edilen bu enzimin seçici substratı D-tagatoz olduğu için D-tagatoz 3-epimeraz olarak isimlendirilmiştir (Itoh vd., 1994). Daha sonra *Rhodobacter sphaeroides* (Qi vd., 2017), *Caballeronia fortuita* (Li vd., 2019) ve *Sinorhizobium* sp. (Zhu vd., 2019) gibi çeşitli

mikroorganizmalarda da DTEaz enzimi belirlenmiştir.

D-fruktozdan D-allüloz epimerizasyonunu katalize edebilen bir başka enzim olan D-allüloz 3-epimeraz ise ilk defa *Agrobacterium tumefaciens* mikroorganizmasından elde edilip, tanımlanmış ve bu enzimin seçici substratı D-allüloz olduğu için D-tagatoz 3-epimeraz yerine D-allüloz 3-epimeraz olarak isimlendirilmiştir (Kim vd., 2006). Devam eden araştırmalarda ise; *Clostridium cellulolyticum* (Mu vd., 2011), *Ruminococcus* sp. (Zhu vd., 2012), *Clostridium scindens* (Zhang vd., 2013a), *Desmospora* sp. (Zhang vd., 2013b), *Clostridium* sp. (Mu vd., 2013), *Clostridium boltae* (Jia vd., 2014), *Treponema primitia* (Zhang vd., 2016), *Flavonifractor plautii* (Park vd., 2016), *Arthrobacter globiformis*

(Yoshihara vd., 2017), *Agrobacterium* sp. (Tseng vd., 2018), *Dorea* sp. (Zhang vd., 2015; Zhang vd., 2018), *Sinorhizobium* sp. (Zhu vd., 2019) gibi mikroorganizmalardan da DAEaz enzimi karakterize edilip, tanımlanmıştır. D-fruktozdan

D-allüloz üretiminde farklı suşlardan izole edilerek kullanılan bazı DTEaz ve DAEaz enzimlerinin biyokimyasal özellikleri karşılaştırmalı olarak Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Allüloz üretiminde kullanılan enzimlerin biyokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması

Ketoz 3-epimeraz	Optimum Sıcaklık (°C)	Optimum pH	Aktivatör	Denge oranı ^a	Referanslar
<i>Agrobacterium</i> sp. DAEaz	55-60	7.5-8.0	Co ⁺²	30:70	(Tseng vd., 2018)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> DAEaz	50	8.0	Mn ⁺²	33:67	(Kim vd., 2006)
<i>Clostridium bolteae</i> DAEaz	55	7.0	Co ⁺²	32:68	(Jia vd., 2014)
<i>Clostridium cellulolyticum</i> DAEaz	55	8.0	Co ⁺²	32:68	(Mu vd., 2011)
<i>Clostridium scindens</i> DAEaz	60	7.5	Mn ⁺²	28:72	(Zhang vd., 2013a)
<i>Clostridium</i> sp. DAEaz	65	8.0	Co ⁺²	28:72	(Mu vd., 2013)
<i>Desmospora</i> sp. DAEaz	60	7.5	Co ⁺²	30:70	(Zhang vd., 2013b)
<i>Dorea</i> sp. DAEaz	70	6.0	Co ⁺²	30:70	(Zhang vd., 2015)
<i>Ruminococcus</i> sp. DAEaz	60	7.5-8.0	Mn ⁺²	28:72	(Zhu vd., 2012)
<i>Treponema primitia</i> DAEaz	70	8.0	Co ⁺²	28:72	(Zhang vd., 2016)
<i>Caballeronia fortuita</i> DTEaz	60	7.5	Co ⁺²	37.5:62.5	(Li vd., 2019)
<i>Pseudomonas cichorii</i> DTEaz	60	7.5	-	20:80	(Itoh vd., 1994)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> DTEaz	40	9.0	Mn ⁺²	23:77	(Zhang vd., 2009)

^a Sırasıyla D-allüloz ve D-fruktoz oranları

Allüloz üretiminde kullanılan enzimlerin D-allüloz ve D-fruktoz arasındaki denge oranları, endüstriyel epimerizasyon uygulaması bakımından oldukça önemli bir parametre olup bu denge oranı kullanılan enzimlere göre farklılık göstermektedir (Jia vd., 2014; Kim vd., 2006; Li vd., 2019; Mu vd., 2011). DTEaz ve DAEaz enzimlerinin genel olarak aktivite gösterdikleri optimum sıcaklıklar 50-70°C ve optimum pH değerleri 7.0-9.0 arasında değişmektedir. Enzimlerin moleküler ağırlıklarının ise; monomerik yapıdaki enzimler için yaklaşık 33

kDa, dimerik enzimler için yaklaşık 64 kDa ve tetramerik enzimler için ise 130-139 kDa arasında olduğu bildirilmiştir (Jia vd., 2014; Li vd., 2019; Mu vd., 2013; Zhang vd., 2018). Çizelge 1'de verilen DAEaz enzimlerinin tamamı D-allüloz için en iyi substrat seçiciliği gösterirken, *P. cichorii* DTEaz ve *C. fortuita* DTEaz D-tagatoz için ve *R. sphaeroides* DTEaz ise D-fruktoz için en yüksek substrat seçiciliğini göstermektedir (Itoh vd., 1994; Li vd., 2019; Zhang vd., 2009).

D-fruktozun D-allüloza izomerizasyonunda DTEaz ve DAEaz enzimlerinin aktivitesi Co^{+2} ve Mn^{+2} gibi metal iyonlarının varlığında önemli derecede artmaktadır. D-fruktozdan D-allüloz eldesinde *A. tumefaciens* DAEaz ve *R. sphaeroides* DTEaz enzimleri sistemde metal iyonu olmadan aktivite gösterebilirken, sisteme Mn^{+2} iyonu ilave edildiğinde enzimlerin aktiviteleri kayda değer şekilde artmaktadır (Kim vd., 2006; Zhang vd., 2009). *C. cellulolyticum* DAEaz ve *C. scindens* DTEaz ortamda sırasıyla Co^{+2} ve Mn^{+2} iyonu olmadan aktivite gösterememektedir (Mu vd., 2011; Zhang vd., 2013a). *P. cichorii*'den elde edilen DTEaz enzimi ise aktivite için herhangi bir metal iyonuna ihtiyaç duymamaktadır (Itoh vd., 1994).

D-allüloz eldesinde doğal mikrobiyal kaynaklardan izole edilen enzim, enzimin yarılanma ömrünün kısa olması, düşük stabiliteye sahip olması, uygulama sonrası enzim geri kazanımının zor olması ve yeniden kullanımında aktivite kaybı gözlenmesi gibi nedenlerle endüstriyel uygulama için yeterli olmamaktadır (Dedania vd., 2020; Ran vd., 2019). Bu nedenle araştırmalar çoğunlukla DTEaz enzim ailesinin tanımlanıp, izole edildiği doğal suşlar yerine gen ekspresyonu ile elde edilen rekombinant suşlar ile yapılmıştır. Takeshita vd., (2000) *P. cichorii*'den DTEaz enzimini kodlayan genin farklı bir konak olan rekombinant *Escherichia coli*'ye eksprese edilmesi yoluyla üretilip, saflaştırdıkları DTEaz enzimini D-fruktozdan D-allüloz üretiminde immobilize şekilde kullanarak 60 gün sonunda 20 kg saf D-allüloz ürettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca rekombinant *E. coli* tarafından üretilen enzim miktarının, *P. cichorii* ST-24'ten elde edilen enzim miktarının yaklaşık 100 katı olduğu belirlenmiştir.

Son zamanlarda D-allüloz üretiminde DTEaz enzimlerini eksprese etmek için *E. coli* yerine *Bacillus subtilis* veya çeşitli mayaların kullanımı araştırılmıştır (Chen vd., 2016; Yang vd., 2018). Yang vd., (2018) *A. tumefaciens* DAEaz genini *Kluyveromyces marxianus*'a eksprese ederek gerçekleştirdikleri araştırmada 55°C sıcaklıkta 12 saatte 750 g/L D-fruktozdan, 190 g/L D-allüloz elde etmişlerdir. Zhang vd., (2020) *Rhodospirellula baltica* SH 1 suşundan klonladıkları DTEaz

kodlayan geni, *B. subtilis*'e eksprese ederek elde ettikleri DTEaz enzimi ile D-fruktozdan %56.26 oranıyla D-allüloz üretmişlerdir. Aynı zamanda rekombinant DTEaz enzimi, elma posası hidrolizatına uygulanarak ağırlıkça %25.86 dönüşüm oranı ile D-allüloz eldesi sağlanmıştır. Rekombinant DTEaz ve DAEaz enzimleri ile D-allüloz üretiminde hammadde olarak meyve-sebze atıkları kullanılabileceği gibi şeker pancarı melası veya mısır gibi gıda maddeleri de kullanılabilmektedir (Juneja vd., 2019; Patel vd., 2016; Patel vd., 2018; Song vd., 2017a; Song vd., 2017b)

Enzimlerin immobilizasyon ile kullanılması; enzimlerin tekrar kullanımı, stabilitesi ve aktivitesi açısından serbest olarak kullanımlarına göre çok daha etkili bir yöntemdir (Dedania vd., 2017). Rekombinant *A. tumefaciens* DAEaz enziminin serbest halde kullanımı ile D-allülozun D-fruktozdan üretiminde elde edilen D-allüloz ve D-fruktoz denge oranı sırasıyla 33:67 iken, *A. tumefaciens* DAEaz enzimi titanyum dioksit yüzeyinde immobilize halde kullanıldığında bu oran 36:64 olarak belirlenmiş ve enzimin yarılanma ömrünün ise immobilize halde kullanıldığında arttığı bildirilmiştir (Dedania vd., 2020; Kim vd., 2006).

Izumoring Stratejisine göre D-allüloz doğrudan D-glikoz çözeltisine DTEaz enzimi ve D-glikoz izomeraz (DGIaz, EC 5.3.1.5) enziminin birleştirilerek uygulanması ile ara basamak ile oluşturulan D-fruktoz kullanılarak da üretilebilmektedir (Li vd., 2015). Chen vd., (2017) gerçekleştirdikleri bir çalışmada DGIaz ve *A. tumefaciens* DAEaz genlerini *E. coli* MG1665 suşuna eksprese ederek elde ettikleri enzimi 40°C sıcaklıkta 24.5 g/L D-glikoz içeren selüloz hidrolizatına ve 26.4 g/L D-glikoz içeren mikroalg hidrolizatına uygulamışlar ve sırasıyla 1.42 ve 1.69 g/L konsantrasyonlarında D-allüloz üretimi gerçekleştirmişlerdir.

ALLÜLOZUN SAFLAŞTIRILMASI

Yapılan çalışmalarda D-allülozun izolasyonu ve saflaştırılması için genellikle iki farklı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerden biri olan iyon değiştirici reçine matrisi ve simüle edilmiş

hareketli yatak kromatografisi kullanımı üretim verimliliği yüksek olmasına rağmen, maliyetli bir yöntem olması ve karmaşık ekipman gerektirmesi gibi dezavantajları bulunan bir teknolojidir. Li vd., (2018b) yaptıkları bir çalışmada rekombinant DAEaz enziminin katalizörlüğünde elde edilen D-fruktoz ve D-allüloz karışımını simüle edilmiş hareketli yatak kromatografisinden geçirerek %98.5 saflık oranında D-allüloz üretimi sağlamışlardır. Gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise D-allüloz ve D-fruktoz çözeltisi, glikoz oksidaz ve glikoz izomeraz enzimlerini içeren sürekli karıştırılmalı bir reaktöre alınarak D-fruktoz glukonik aside dönüştürülmüş ve anyon değişim reçinesi kullanılarak da glukonik asit uzaklaştırılmış ve %91.2 saflıkta D-allüloz elde edilmiştir (Li vd., 2018a).

D-allülozun izolasyonu ve saflaştırılması için kullanılan ikinci yöntem ise D-fruktoz ve D-allülozun karışım halinde bulunduğu sisteme maya ilavesi ile fruktozun etanole dönüştürülüp, buharlaştırılarak ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Takeshita vd., (2000) D-allüloz ve D-fruktozdan oluşan karışımı aerobik şartlarda fırıncı mayası ile fermantasyona tabi tutarak D-fruktozun tüketimini etanol üretimi ile sağlamışlardır. Fermantasyon sonucu oluşan etanol buharlaştırma işlemi ile uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen şurup, tekrar etanole kaynatılarak D-allülozun kristal olarak ayrılması sağlanmıştır. Bu saflaştırma işleminin zaman ve maliyet bakımından önemli avantajları olmasının yanı sıra şuruptan D-allüloz üretim veriminin %85 olduğu bildirilmiştir. Bu yöntemin avantajları arasında düşük hammadde maliyeti, atık oluşumunun azaltılması, enerji tüketiminin düşürülmesi, şeker veriminin iyileştirilmesi ve iyon değişim reçinesi uygulamasına göre daha çevre dostu bir uygulama olması sayılabilir.

SONUÇ

Dünyada kısıtlı bir miktarda üretilen ve üzerinde az sayıda araştırma yapılmış olan D-allülozun ülkemizde üretimi olmayıp, üzerinde yapılan araştırmalar ise oldukça sınırlıdır. Günümüzde enzimatik yöntemlerle üretilmekte olan D-allüloz, üretiminde kullanılan enzimlerin yetersiz aktivitesi ve geri kazanımının zor olması gibi nedenlerle

üretim maliyeti yüksek, verimliliği ise oldukça düşük bir nadir şekerdir. Bu nedenlerle D-allülozun endüstriyel üretiminin geliştirilmesi için yeni fiziksel, kimyasal, biyokimyasal ve mikrobiyolojik yöntemlerin araştırılması ve mevcut üretimde kullanılan yöntemlerin geliştirilerek optimize edilmesine yönelik araştırmaların yapılması önemlidir.

Bu çalışma ile; D-allülozun düşük enerji içeriğine ve vücutta olumlu fizyolojik etkilere sahip olduğu ve bu yönleriyle de yaygın şeker ve yapay tatlandırıcılara önemli bir alternatif oluşturduğu ortaya konmuştur. Bu nedenle de gıda ve ilaç endüstrisinde düşük enerji içerikleri ve olumlu fizyolojik etkileriyle yüksek bir kullanım potansiyeline sahip olan nadir şekerlerin ve özellikle de D-allülozun üretim ve kullanımına yönelik araştırmaların artırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Bu makale ile ilgili olarak yazarların, başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

Tüm yazarlar makalenin yapılmasında, yazılmasında ve yayınlanmasında eşit katkı sağlamışlardır. Makalenin hazırlanmasında başka kişi ve/veya kurumların katkısı yoktur.

KAYNAKLAR

Barkalow, D.G., Hsu, C., Haseleu, A., Stawski, B.Z. (2018). Confections containing allulose. Patent US-20180271112-A1.

Bilal, M., Iqbal, H.M.N., Hu, H., Wang, W., Zhang, X. (2018). Metabolic engineering pathways for rare sugars biosynthesis, physiological functionalities, and applications-a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 58(16), 2768–2778. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1341385>

Bilik, V., Tihlárík, K. (1973). Reactions of saccharides catalyzed by molybdate ions. IX.* Epimerization of ketohexoses. *Chemické Zvesti*, 28(1), 106–109.

- Chen, J., Zhu, Y., Fu, G., Song, Y., Jin, Z., Sun, Y., Zhang, D. (2016). High-level intra- and extracellular production of d-psicose 3-epimerase via a modified xylose-inducible expression system in *Bacillus subtilis*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 43(11), 1577–1591. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1819-6>
- Chen, X., Wang, W., Xu, J., Yuan, Z., Yuan, T., Zhang, Y., Liang, C., He, M., Guo, Y. (2017). Production of D-psicose from D-glucose by co-expression of D-psicose 3-epimerase and xylose isomerase. *Enzyme Microb Technol*, 105: 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.06.003>
- Dedania, S.R., Patel, M.J., Patel, D.M., Akhiani, R.C., Patel, D.H. (2017). Immobilization on graphene oxide improves the thermal stability and bioconversion efficiency of D-psicose 3-epimerase for rare sugar production. *Enzyme Microb Technol*, 107: 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.08.003>
- Dedania, S.R., Patel, V.K., Soni, S.S., Patel, D.H. (2020). Immobilization of *Agrobacterium tumefaciens* D-psicose 3-epimerase onto titanium dioxide for bioconversion of rare sugar. *Enzyme Microb Technol*, 140: 109605. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109605>
- Do, G.Y., Kwon, E.Y., Kim, Y.J., Han, Y., Kim, S.B., Kim, Y.H., Choi, M.S. (2019). Supplementation of non-dairy creamer-enriched high-fat diet with d-allulose ameliorated blood glucose and body fat accumulation in C57BL/6J mice. *Appl Sci*, 9(13): 2750. <https://doi.org/10.3390/app9132750>
- Doner, L.W. (1979). Isomerization of D-fructose by base: Liquid-chromatographic evaluation and the isolation of D-psicose. *Carbohydr Res*, 70(2): 209–216.
- FDA. (2017). GRAS Notice (GRN) No. 693. *Encyclopedia of Toxicology*, (693), 417–420. <https://doi.org/10.1016/b0-12-369400-0/00448-8>
- FDA. (2019). The declaration of allulose and calories from allulose on nutrition and supplement facts labels: guidance for industry. www.fda.gov/media/123342/download (Accessed: 10 December 2020).
- Gil-Campos, M., San José González, M.A., Díaz Martín, J.J. (2015). Use of sugars and sweeteners in children's diets. Recommendations of the Nutrition Committee of the Spanish Association of Paediatrics. *Anales de Pediatría (English Edition)*, 83(5), 353.e1-353.e7. <https://doi.org/10.1016/j.anpede.2015.10.002>
- Hadipernata, M., Ogawa, M., Hayakawa, S. (2016). Effect of D-allulose on rheological properties of chicken breast sausage. *Poult Sci*, 95(9): 2120–2128. <https://doi.org/10.3382/ps/pew143>
- Hadipernata, M., Ogawa, M., Hayakawa, S. (2017). Improved rheological properties of chicken egg frozen gels fortified by D-ketohexoses. *J Food Process Preservation*, 41(5). <https://doi.org/10.1111/jfpp.13184>
- Han, Y., Han, H. J., Kim, A.H., Choi, J.Y., Cho, S.J., Park, Y.B., Jung, U.J., Choi, M. S. (2016). D-allulose supplementation normalized the body weight and fat-pad mass in diet-induced obese mice via the regulation of lipid metabolism under isocaloric fed condition. *Mol Nutr Food Res*, 60(7): 1695–1706. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500771>
- Han, Y., Kwon, E.Y., Yu, M.K., Lee, S.J., Kim, H.J., Kim, S.B., Kim, Y.H., Choi, M.S. (2018). A preliminary study for evaluating the dose-dependent effect of D-allulose for fat mass reduction in adult humans: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrients*, 10(2): 160-174. <https://doi.org/10.3390/nu10020160>
- Hashii, K., Hasegawa, T., Idegami, N., Kadota, M., Taniguchi, M., Toyama, T., Toyonaga, D. (2015). Rare Sugar. *Discover Kagawa through English and Science*, 40.
- 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. *Pharm Ther*, 155: 45-49.

- <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.08.004>
- Iida, T., Hayashi, N., Yamada, T., Yoshikawa, Y., Miyazato, S., Kishimoto, Y., Okuma, K., Tokuda, M., Izumori, K. (2010). Failure of D-psicose absorbed in the small intestine to metabolize into energy and its low large intestinal fermentability in humans. *Metab Clin Exp*, 59(2): 206-214. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.07.018>
- Ilhan, E., Pocan, P., Ogawa, M., Oztop, M. H. (2020). Role of 'D-allulose' in a starch based composite gel matrix. *Carbohydr Polym*, 228: 115373. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115373>
- Itoh, H., Okaya, H., Khan, A.R., Tajima, S., Hayakawa, S., Izumori, K. (1994). Purification and characterization of D-tagatose 3-epimerase from *Pseudomonas* sp. ST-24. *Biosci Biotechnol Biochem*, 58(12): 2168-2171. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.2168>
- Iwasaki, Y., Sendo, M., Dezaki, K., Hira, T., Sato, T., Nakata, M., Goswami, C., Aoki, R., Arai, T., Kumari, P., Hayakawa, M., Masuda, C., Okada, T., Hara, H., Drucker, D.J., Yamada, Y., Tokuda, M., Yada, T. (2018). GLP-1 release and vagal afferent activation mediate the beneficial metabolic and chronotherapeutic effects of D-allulose. *Nat Commun*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02488-y>
- Jia, M., Mu, W., Chu, F., Zhang, X., Jiang, B., Zhou, L.L., Zhang, T. (2014). A D-psicose 3-epimerase with neutral pH optimum from *Clostridium boltea* for D-psicose production: Cloning, expression, purification, and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(2): 717-725. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4924-8>
- Jiang, S., Xiao, W., Zhu, X., Yang, P., Zheng, Z., Lu, S., Jiang, S., Zhang, G., Liu, J. (2020). Review on D-Allulose: In vivo metabolism, catalytic mechanism, engineering strain construction, bio-production technology. *Front Bioeng Biotechnol*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00026>
- Juneja, A., Zhang, G., Jin, Y.S., Singh, V. (2019). Bioprocessing and techno-economic feasibility analysis of simultaneous production of D-psicose and ethanol using engineered yeast strain KAM-2GD. *Bioresour Technol*, 275: 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.025>
- Kim, H.J., Hyun, E.K., Kim, Y.S., Lee, Y.J., Oh, D.K. (2006). Characterization of an *Agrobacterium tumefaciens* D-psicose 3-epimerase that converts D-fructose to D-psicose. *Appl Environ Microbiol*, 72(2): 981-985. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.981-985.2006>
- Kim, H., Park, C., Sa, S., Case, I., Li, C., Gao, Y., Wang, H., Tian, J. (2019). A study of D-allulose-associated reproductive toxicity in rats. *Food Chem Toxicol*, 131: 110548. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.05.056>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.06.007>
- Li, C., Zhang, C., Lin, J., Gao, L., Lin, H., Lin, J. (2018a). Enzymatic fructose removal from D-psicose bioproduction model solution and the system modeling and simulation. *J Chem Technol Biotechnol*, 93(5): 1249-1260. https://doi.org/10.11164/jjsps.3.2_349_1
- Li, C., Lin, J., Guo, Q., Zhang, C., Du, K., Lin, H., Lin, J. (2018b). D-psicose 3-epimerase secretory overexpression, immobilization, and d-psicose biotransformation, separation and crystallization. *J Chem Technol Biotechnol*, 93(2): 350-357. <https://doi.org/10.1002/jctb.5360>
- Li, S., Chen, Z., Zhang, W., Guang, C., Mu, W. (2019). Characterization of a D-tagatose 3-epimerase from *Caballeronia fortuita* and its application in rare sugar production. *Int J Biol Macromol*, 138: 536-545. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.112>
- 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. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 42(8): 1117-1128. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1631-8>

- Mao, S., Cheng, X., Zhu, Z., Chen, Y., Li, C., Zhu, M., Liu, X., Lu, F., Qin, H.M. (2020). Engineering a thermostable version of D-allulose 3-epimerase from *Rhodospirillum rubrum* via site-directed mutagenesis based on B-factors analysis. *Enzyme Microb Technol*, 132: 109441. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109441>
- Matsuo, T., Izumori, K. (2006). Effects of dietary D-psi-cose on diurnal variation in plasma glucose and insulin concentrations of rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70(9): 2081–2085. <https://doi.org/10.1271/bbb.60036>
- Matsuo, T., Tanaka, T., Hashiguchi, M., Izumori, K., Suzuki, H. (2002). Effects of oral acute administration and subchronic feeding of several levels of D-psi-cose in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, 48(6): 512–516. <https://doi.org/10.3177/jnsv.48.512>
- McDonald, E.J. (1967). A new synthesis of D-psi-cose (D-ribo-hexulose). *Carbohydr Res*, 5(1): 106–108. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(67\)85014-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(67)85014-6)
- Mu, W., Chu, F., Xing, Q., Yu, S., Zhou, L., Jiang, B. (2011). Cloning, expression, and characterization of a D-psi-cose 3-epimerase from *Clostridium cellulolyticum* H10. *J Agric Food Chem*, 59(14): 7785–7792. <https://doi.org/10.1021/jf201356q>
- Mu, W., Hassanin, H.A.M., Zhou, L., Jiang, B. (2018). Chemistry behind rare sugars and bioprocessing. *J Agric Food Chem*, 66(51): 13343–13345. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06293>
- Mu, W., Yu, L., Zhang, W., Zhang, T., Jiang, B. (2015). Isomerases for biotransformation of D-hexoses. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(16): 6571–6584. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6788-6>
- Mu, W., Zhang, W., Fang, D., Zhou, L., Jiang, B., Zhang, T. (2013). Characterization of a D-psi-cose-producing enzyme, D-psi-cose 3-epimerase, from *Clostridium* sp. *Biotechnol Lett*, 35(9): 1481–1486. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1230-6>
- Nagata, Y., Kanasaki, A., Tamaru, S., Tanaka, K. (2015). D-psi-cose, an epimer of D-fructose, favorably alters lipid metabolism in Sprague-Dawley rats. *J Agric Food Chem*, 63(12): 3168–3176. <https://doi.org/10.1021/jf502535p>
- O’Charoen, S., Hayakawa, S., Ogawa, M. (2015). Food properties of egg white protein modified by rare ketohexoses through Maillard reaction. *Int J Food Sci Technol*, 50(1): 194–202. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12607>
- Oshima, H., Kimura, I., Izumori, K. (2006). Psi-cose contents in various food products and its origin. *Food Sci Technol Res*, 12(2): 137–143. <https://doi.org/10.3136/fstr.12.137>
- Özgür, M., Uçar, A. (2019). Karbonhidrat ve Yağ Metabolizmasında D-alluloz (D-psi-koz). *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(3), 188–195. <https://doi.org/10.33631/duzcesbed.469828>
- 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160044>
- Patel, S.N., Sharma, M., Lata, K., Singh, U., Kumar, V., Sangwan, R.S., Singh, S.P. (2016). Improved operational stability of D-psi-cose 3-epimerase by a novel protein engineering strategy, and d-psi-cose production from fruit and vegetable residues. *Bioresour Technol*, 216: 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.053>
- Patel, S.N., Singh, V., Sharma, M., Sangwan, R.S., Singhal, N.K., Singh, S.P. (2018). Development of a thermo-stable and recyclable magnetic nanobiocatalyst for bioprocessing of fruit processing residues and D-allulose synthesis. *Bioresour Technol*, 247: 633–639. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.112>
- Qi, Z., Zhu, Z., Wang, J.W., Li, S., Guo, Q., Xu, P., Lu, F., Qin, H.M. (2017). Biochemical analysis and the preliminary crystallographic characterization of D-tagatose 3-epimerase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Microb Cell Fact*, 16(1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0808-4>

- Ran, G., Tan, D., Zhao, J., Fan, F., Zhang, Q., Wu, X., Fan, P., Fang, X., Lu, X. (2019). Functionalized polyhydroxyalkanoate nano-beads as a stable biocatalyst for cost-effective production of the rare sugar D-allulose. *Bioresour Technol*, 289: 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121673>
- Shintani, T., Yamada, T., Hayashi, N., Iida, T., Nagata, Y., Ozaki, N., Toyoda, Y. (2017). Rare sugar syrup containing D-allulose but not high-fructose corn syrup maintains glucose tolerance and insulin sensitivity partly via hepatic glucokinase translocation in Wistar rats. *J Agric Food Chem*, 65(13): 2888–2894. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05627>
- Song, Y., Nguyen, Q.A., Wi, S.G., Yang, J., Bae, H.J. (2017a). Strategy for dual production of bioethanol and D-psicose as value-added products from cruciferous vegetable residue. *Bioresour Technol*, 223: 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.021>
- Song, Y., Oh, C., Bae, H.J. (2017b). Simultaneous production of bioethanol and value-added D-psicose from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Bioresour Technol*, 244: 1068–1072. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.079>
- 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. *J Biosci Bioeng*, 90(4): 453–455. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80018-9](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80018-9)
- Tseng, W.C., Chen, C.N., Hsu, C.T., Lee, H.C., Fang, H.Y., Wang, M.J., Wu, Y.H., Fang, T.Y. (2018). Characterization of a recombinant D-allulose 3-epimerase from *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 and identification of an important interfacial residue. *Int J Biol Macromol*, 112(400): 767–774. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.036>
- Van Laar, A.D.E., Grootaert, C., Van Camp, J. (2020). Rare mono- and disaccharides as healthy alternative for traditional sugars and sweeteners? *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1–29. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1743966>
- Wee, M., Tan, V., Forde, C. (2018). A comparison of psychophysical dose-response behaviour across 16 sweeteners. *Nutrients*, 10(11), 1–16. <https://doi.org/10.3390/nu10111632>
- Yang, P., Zhu, X., Zheng, Z., Mu, D., Jiang, S., Luo, S., Wu, Y., Du, M. (2018). Cell regeneration and cyclic catalysis of engineered *Kluyveromyces marxianus* of a D-psicose-3-epimerase gene from *Agrobacterium tumefaciens* for D-allulose production. *World J Microbiol Biotechnol*, 34(5). <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2451-6>
- Yoshihara, A., Kozakai, T., Shintani, T., Matsutani, R., Ohtani, K., Iida, T., Akimitsu, K., Izumori, K., Gullapalli, P.K. (2017). Purification and characterization of D-allulose 3-epimerase derived from *Arthrobacter globiformis* M30, a GRAS microorganism. *J Biosci Bioeng*, 123(2): 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.004>
- Zeng, Y., Dou, D., Zhang, Y., Zhang, L., Sun, Y. (2015). Rare sugars and antioxidants in *Itea virginica*, *Itea oblonga* Hand.-Mazz., and *Itea yunnanensis* franch leaves. *In J Food Prop*, 18(11): 2549–2560. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.917099>
- Zhang, J., Xu, C., Chen, X., Ruan, X., Zhang, Y., Xu, H., Guo, Y. (2020). Engineered *Bacillus subtilis* harbouring gene of D-tagatose 3-epimerase for the bioconversion of D-fructose into D-psicose through fermentation. *Enzyme Microb Technol*, 136: 109531. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109531>
- Zhang, L., Mu, W., Jiang, B., Zhang, T. (2009). Characterization of D-tagatose-3-epimerase from *Rhodobacter sphaeroides* that converts D-fructose into D-psicose. *Biotechnol Lett*, 31(6): 857–862. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9942-3>
- Zhang, W., Fang, D., Xing, Q., Zhou, L., Jiang, B., Mu, W. (2013a). Characterization of a novel metal-dependent D-psicose 3-epimerase from *Clostridium scindens* 35704. *PLoS ONE*, 8(4): 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062987>
- Zhang, W., Fang, D., Zhang, T., Zhou, L., Jiang, B., Mu, W. (2013b). Characterization of a metal-

dependent D-psicose 3-epimerase from a novel strain, *Desmospora* sp. 8437. *J Agric Food Chem*, 61(47): 11468–11476. <https://doi.org/10.1021/jf4035817>

Zhang, W., Li, H., Zhang, T., Jiang, B., Zhou, L., Mu, W. (2015). Characterization of a D-psicose 3-epimerase from *Dorea* sp. CAG317 with an acidic pH optimum and a high specific activity. *J Mol Catal B Enzym*, 120: 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.05.018>

Zhang, W., Zhang, T., Jiang, B., Mu, W. (2016). Biochemical characterization of a D-psicose 3-epimerase from *Treponema primitia* ZAS-1 and its application on enzymatic production of D-psicose. *J Sci Food Agric*, 96(1): 49–56. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7187>

Zhang, W., Zhang, T., Jiang, B., Mu, W. (2017). Enzymatic approaches to rare sugar production. *Biotechnol Adv*, 35(2): 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.01.004>

Zhang, W., Zhang, Y., Huang, J., Chen, Z., Zhang, T., Guang, C., Mu, W. (2018). Thermostability improvement of the D-allulose 3-epimerase from *Dorea* sp. CAG317 by site-directed mutagenesis at the interface regions. *J Agric Food Chem*, 66(22): 5593–5601. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01200>

Zhu, Y., Men, Y., Bai, W., Li, X., Zhang, L., Sun, Y., Ma, Y. (2012). Overexpression of D-psicose 3-epimerase from *Ruminococcus* sp. in *Escherichia coli* and its potential application in D-psicose production. *Biotechnol Lett*, 34(10): 1901–1906. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0986-4>

Zhu, Z., Li, C., Liu, X., Gao, D., Wang, X., Tanokura, M., Qin, H.M., Lu, F. (2019). Biochemical characterization and biocatalytic application of a novel D-tagatose 3-epimerase from: *Sinorhizobium* sp. *RSC Advances*, 9(6): 2919–2927. <https://doi.org/10.1039/c8ra10029b>