



**D-TAGATOZ 3-EPİMERAZ ENZİMİ ÜRETİMİ VE FRUKTOZDAN
ALLULOZ (PSİKOZ) ELDESİ**

ERVA PARILDI



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKES BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

D-TAGATOZ 3-EPİMERAZ ENZİMİ ÜRETİMİ VE FRUKTOZDAN
ALLULOZ (PSİKOZ) ELDESİ

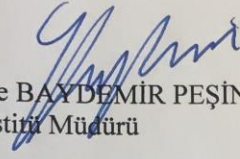
ERVA PARILDI
YÜKSEK LİSANS


DANIŞMAN
PROF. DR. OSMAN KOLA

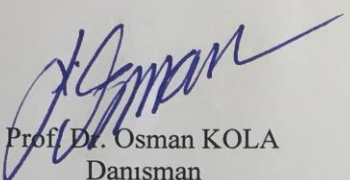
ADANA 2019

**D-TAGATOZ 3-EPİMERAZ ENZİMİ ÜRETİMİ VE FRUKTOZDAN ALLULOZ
(PSİKOZ) ELDESİ**

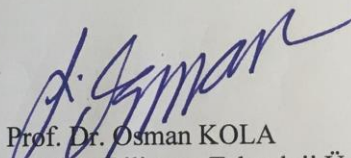
**Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda
Mühendisliği Anabilim Dalında Erva PARILDI tarafından tamamlanan Yüksek Lisans
Tezi onaylanmıştır.**

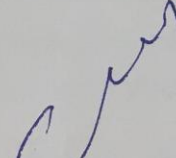

Doç. Dr. Gözde BAYDEMİR PEŞİNT
Enstitü Müdürü

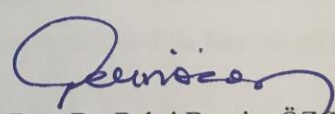

Prof. Dr. Haşim KELEBEK
Anabilim Dalı Başkanı


Prof. Dr. Osman KOLA
Danışman

Tez Jürisi


Prof. Dr. Osman KOLA
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi

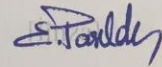

Prof. Dr. Mehmet Sertaç ÖZER
Çukurova Üniversitesi


Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN
Çukurova Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi

02/08/2019

Bu tezde yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışa uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde bu çalışmaya özgün olmayan tüm bilgiler için atıf verdiğimi ve kaynak gösterdiğimi beyan ederim.



Erva PARILDI

ÖZET

D-TAGATOZ 3-EPİMERAZ ENZİMİ ÜRETİMİ VE FRUKTOZDAN ALLULOZ (PSİKOZ) ELDESİ

Erva PARILDI

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Osman KOLA

Ağustos 2019, 72 sayfa

Bu çalışmada rekombinant DNA teknolojisiyle D-Tagatoz 3-Epimeraz enzimi üretilmiş ve bu enzim kullanılarak fruktoz nadir bir şeker olan alluloz (psikoz)'a dönüştürülmüştür. D-Tagatoz 3-Epimeraz enzim geni *Escherichia coli* JM109'dan izole edilip PCR ile çoğaltılmıştır. Konakçı hücre olarak da *Escherichia coli* JM109 kullanılmış ve enzim geni plazmid yardımıyla bu mikroorganizmaya aktarılmıştır. Gen aktarımı yapılan konak hücre uygun süre ve sıcaklıkta bekletilerek enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen enzim saflaştırma kolonu yardımıyla saflaştırılmış ve saf enzim elde edilmiştir.

Enzim üretiminden sonra %50'lik fruktoz çözeltisi hazırlanmış ve üretilen enzim fruktoz çözeltisi üzerine belirli bir oranda ilave edilmiştir. Karışım 5 farklı tüpe bölünerek 24 saat boyunca 20°C, 40°C, 60°C, 70°C ve 80°C'de etüvde bekletilmiş ve 8. saate kadar her 2 saatte bir HPLC cihazında analiz yapılmıştır. Sekizinci saatten sonra 24 saate kadar bekletilmiş ve 24 saatin sonunda yine her bir sıcaklıkta tutulan enzim/fruktoz karışımından örnek alınarak HPLC ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda fruktozun alluloza dönüşümü için en uygun sıcaklığın 60°C olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: alluloz, psikoz, fruktoz, nadir şeker, enzim üretimi

ABSTRACT

D-TAGATOSE 3-EPIMERASE ENZYME PRODUCTION AND PRODUCING ALLULOSE FROM FRUCTOSE

Erva PARILDI

Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Osman KOLA

August 2019, 72 pages

In this study, D-Tagatose 3-Epimerase enzyme was produced by recombinant DNA technology and fructose was converted to a rare sugar, allulose (psicose) by using this enzyme. D-Tagatose 3-Epimerase enzyme gene was isolated from *Escherichia coli* JM109 and amplified by PCR. *Escherichia coli* JM109 was also used as host cell and enzyme gene was transferred to this microorganism with the help of plasmid. Enzyme production was carried out by incubating the host cell at the appropriate time and temperature. The produced enzyme was purified by means of purification column and pure enzyme was obtained.

After enzyme production, a fructose solution (50%) was prepared and the enzyme was added into this solution in a certain ratio. The mixture was transferred into 5 different tubes and incubated at 20°C, 40°C, 60°C, 70°C and 80°C. These solutions were analyzed by HPLC every 2 hours for 8 hours. After the 8th hour, the tubes were kept for 24 hours and at the end of 24 hours the sample from each tube was taken and analyzed by HPLC. As a result of the analysis, the optimum temperature for the conversion of fructose into allulose was found to be 60°C.

Keywords: allulose, psicose, fructose, rare sugar, enzyme production



Bu tezi sevgili anneme, babama ve kardeşime ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde yardımlarını ve desteğini her an gördüğüm, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, akademik hayatıma ışık tutan danışman hocam sayın Prof. Dr. Osman KOLA'ya,

Tez çalışmam boyunca benden yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli bölüm hocalarımız sayın Dr. Öğr. Üyesi Murat Reis AKKAYA ve sayın Dr. Öğr. Üyesi Ali Emrah ÇETİN'e,

Çalışmamın başından sonuna kadar her aşamasında her konuda bilgi ve birikimlerinden yararlandığım ve birlikte çalıştığım, bu süreçte bana çok şey öğreten Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü hocalarından sayın Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN'a ve biyolog Elif DİKKAYA'ya,

Çalışmamın son kısmında değerli katkılarını ve yardımlarını her daim gördüğüm, okulumuz Biyomühendislik Bölümü hocalarından sayın Dr. Öğr. Üyesi Özgür Cem ERKİN'E,

Yardıma ihtiyacım olan her an benim için değerli vakitlerini ayıran ve çalışmalarına çok önemli katkıları olan Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a ve doktora öğrencisi Başak BEDİR BAYKARA'ya,

Laboratuvar çalışmalarımnda ve sosyal hayatta bana her zaman her konuda destek olan, hayatımdaki yerleri benim için her zaman ayrı olan sevgili arkadaşlarım Özlem UĞURLU, Nazmiye BİLİR, Hatice Kübra ŞAŞMAZ ve Türkan UZLAŞIR'a,

Tez çalışmam boyunca benden hiçbir yardımını ve desteğini esirgemeyen bölümümüz öğretim görevlisi Nurten CENGİZ'e,

Manevi desteğini ve samimi dostluğunu her daim hissettiğim, tez çalışmamda ve her anlamda her zaman yanımda olduğunu bildiğim sevgili arkadaşım Gamze SORKULU'ya,

Hayatımın her aşamasında her konuda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Erva PARILDI

Ağustos 2019

Bu tez “TAGEM-18/AR-GE/30” projesi numarası ile TAGEM (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Karbonhidratlar	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.2. Nadir Şekerler.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.2.1. Başlıca Nadir Şekerler	6
2.2.2. Nadir Şekerlerin Tarihçesi	6
2.2.3. Nadir Şekerlerin Üretim Yöntemleri.....	7
2.2.3.1. Izumoring Stratejisi	8
2.2.3.2. Nadir Şeker Üretiminde Kullanılan Enzimler	10
2.2.3.3. Nadir Şekerlerin Fonksiyonel Özellikleri.....	10
2.3. Alluloz ve Üretimi.....	11
2.3.1. Allulozun Kimyasal Yapısı	13
2.3.2. Allulozun Elde Edildiği Kaynaklar.....	14
2.3.3. Alluloz Üretimi	16
2.3.3.1. Allulozun Kimyasal Yolla Üretimi.....	17
2.3.3.2. Allulozun Enzimatik Yolla Üretimi	17
2.3.4. Allulozun Sağlık Üzerine Etkileri	19
2.3.5. Allulozla İlgili Yasal Düzenlemeler.....	21
2.3.6. Allulozun Kullanım Alanları.....	22
3. MALZEME VE YÖNTEM	25
3.1. Malzeme	25
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Mikrobiyolojik Analizler	25
3.2.2. Genomik DNA İzolasyonu	25
3.2.3. DNA'nın rep-PCR Tekniğiyle Amplifiye Edilmesi.....	28
3.2.4. PCR Ürünü DNA'nın Elektroforezi	30
3.2.5. Plazmid DNA İzolasyonu	31

3.2.6.	Plazmid DNA'nın Kesilmesi	33
3.2.7.	Agaroz Jelden DNA Saflaştırma	34
3.2.8.	Ligasyon	35
3.2.9.	Kompetent Bakteri Hazırlama ve Transformasyon.....	36
3.2.10.	D-tagatoz 3-epimeraz Enziminin Saflaştırılması.....	38
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	40
4.1.	DNA'nın rep-PCR Tekniği İle Amplifiye Edilmesi	40
4.2.	PCR Ürünü DNA'nın Elektroforezi.....	40
4.3.	Plazmid DNA İzolasyonu	41
4.4.	Plazmid DNA'nın Kesilmesi.....	42
4.5.	Agaroz Jelden DNA Saflaştırma	42
4.6.	Kompetent Bakteri Hazırlama ve Transformasyon	43
4.7.	Fruktozun Alluloza Dönüşümü	45
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	50
	KAYNAKLAR.....	51
	ÖZGEÇMİŞ	58

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Doğada Yaygın Bulunan Bazı Mono ve Disakkaritler	5
Şekil 2. Doğada bulunan nadir şekerler	6
Şekil 3. Izumoring şeması	9
Şekil 4. D-alluloz (D-psikoz)	Hata! Yer işareti tanımlanmamış. 4

Şekil tablosu ögesi bulunamadı.Şekil 6. Genomik DNA izolasyonu için kullanılan hazır kit	27
Şekil 7. PCR reaksiyonu ve kullanılan termal döngü cihazı	29
Şekil 8. Son PCR reaksiyonu ve kullanılan termal döngü cihazı	Hata! Yer işareti tanımlanmamış. 0

Şekil tablosu ögesi bulunamadı.

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Tatlandırıcı olarak allulozun biyolojik ve kimyasal özellikleri	Hata! Yer işareti tanımlanmamış. 4
Tablo 2. Bazı gıdaların D-alluloz içeriği	Hata! Yer işareti tanımlanmamış. 5
Tablo 3. Allulozun kullanılabileceği gıdalar ve maksimum kullanım seviyeleri	21

KISALTMALAR

DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DTE	: D-Tagatoz 3-Epimeraz
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GRAS	: Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen
EC	: Enzim Komisyonu
LD	: Öldürücü Doz
NOAEL	: Olumsuz Etki Tespit Edilemeyen Doz
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
LB	: Luria-Bertani
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez

1. GİRİŞ

Beslenme ve sağlık arasındaki ilişkinin 6nemi eski çağlardan beri bilinmektedir. Hipokrat'ın 2500 yıl 6nce s6ylediği “Gıdanız ilacınız, ilacınız gıdanız olsun” s6z6 bu ilişkinin ciddiyetini açıkça ortaya koymaktadır. Gıda t6kretiminin asıl amacı beslenme gereksinimini karşılamak ve enerji sağlamak olsa da, doğru ve dengeli bir diyet sayesinde v6cutta gıda kaynaklı patojenlerin çoğalmasının ciddi oranda 6nlenebileceği, yaşlanma s6recinin yavaşlatılabileceği ve hayat şartlarının iyileştirip insan 6mr6n6n uzatılabileceği unutulmamalıdır. Besin maddeleri, bağırsak mikrobiyotası ve konakçı metabolizması arasındaki etkileşimler 6zerinde yapılan araştırmalar, geleneksel beslenmenin sağlık ve yaşlanma 6zerindeki olumlu ve olumsuz etkilerinin altında yatan molek6ler mekanizmaları açığa çıkarmakta ve insanoğlunun belirli ihtiyaçlarını hedef alan, yenilikçi gıdaların tasarımı için faydalı bilgiler sağlamaktadır. Bu araştırmalar 6zellikle yaşlı yetişkinler için daha b6y6k 6nem arz etmektedir. İnsanoğlu yaşlandıkça giderek artan glikoz intoleransının ortaya çıkmasına karşın, karbonhidratlar her yaşta diyetteki ana enerji kaynağı olarak kullanılmaya devam etmektedir, 6nk6 g6nl6k enerji ihtiyacının en az %50'si karbonhidratlardan sağlanmaktadır. Yaşlandıkça tat alma duyusunda gerçekleşen genel d6ř6ře rağmen, çiğnenmesinin kolay olması ve ağızda bıraktığı keyif ve haz veren şekerli tat sebebiyle, y6ksek karbonhidratlı yiyecekler yaşlılar tarafından sıkça tercih edilmektedir. Bununla birlikte, yaşlanma, artan ins6lin direnci, metabolik sendrom ve diyabet riskini de beraberinde getirdiğinden dolayı bu yaşlarda beslenme konusunda daha dikkatli olunması gerekmektedir (Ajmone Marsan et al., 2014).

İnsanoğlu her g6n farkında olmadan fazla miktarda şeker t6kietmektedir. şekerler esas olarak yaşamak, enerji elde etmek ve gıdalara daha iyi bir tat kazandırmak gibi çok 6nemli işlemlere sahip olsa da, çok fazla şeker t6kietimi sağlık açısından çeşitli riskler oluşturmaktadır (Hashii et al., 2015). şekerler arasında 6zellikle fruktozun y6ksek miktarda alımının obezite, ins6lin direnci, hipertansiyon gibi hastalıklarla doğrudan ilişkisi olduğu, bu hastalıkların ise tip 2 diyabet oluşumu riskini artırdığı bilinmektedir (S. E. Kim, Kim, Kim, & Sung, 2017; Seraphim et al., 2017). G6n6m6zde giderek artan kalp krizi olaylarının hareketsiz yaşam tarzı ve yoğun şeker içerikli, 6zellikle de fruktoz içerikli beslenme ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Putakala et al., 2017). Ayrıca metabolik sendromun oluşmasında gıdalarla alınan fruktozun b6y6k bir etken olduğu bilinmektedir (Jim6nez-Maldonado, Ying, Byun, & Gomez-Pinilla, 2018). Bu olumsuzlukları 6nlemek için şeker alımını azaltmak gereklidir. Bununla

birlikte, şeker ve/veya şeker içeren yiyecek ve içeceklerin alımını sıkı bir şekilde kontrol etmek mümkün değildir. Bu noktada şekerle tatlandırılmış ürünler yerine, tatlı bir tada sahip olan fakat daha az kalori sağlayan yapay tatlandırıcılarla üretilen ürünlerin tüketilmesi yararlı olabilecek bir yaklaşımdır (K. Itoh et al., 2015). Yapay tatlandırıcılar, kalorisiz bir şekilde tatlılık sağlayabilmeleri sebebiyle diyabet ve obezite hastaları için bir çıkış yolu olarak görünse de diyabet kontrolünde bir fayda sağlamamakta, hatta diyabet riskini artırmaktadır. Bunun yanında kanser riski gibi diğer sağlık problemlerine de sebep olabilmektedir. Yapılan birçok çalışmada yapay tatlandırıcıların tip 2 diyabet riski ile ilişkili olduğu ve bu nedenle şekerle tatlandırılmış ürünler için sağlıklı bir alternatif olamayacağı tespit edilmiştir. Çeşitli yapay tatlandırıcıların kronik yorgunluk, beyinde tümör oluşumu, DNA hasarı gibi birçok ciddi probleme yol açabileceği tespit edilmiştir (Temps, 2018).

Bütün bu olumsuzluklar ve sağlık tehditlerinden dolayı, son yıllarda bu şekerler yerine, daha sağlıklı ve kalorisiz olan, birçok fonksiyonel özelliği bulunan nadir şekerlerin tüketimine ilgi artmıştır (S.-E. Kim, Kim, Kim, & Sung, 2017). 2010'lu yılların başına kadar fareler üzerinde yapılan deneylerle allulozun metabolizması ve kalori değeri test edilmiş, fakat insan vücuduna olan etkisiyle ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır (Iida et al., 2010). 2010'lu yılların sonuna doğru ise yapılan birkaç çalışma ile birlikte allulozun insan metabolizması üzerindeki etkileri de araştırılmaya başlanmıştır (Han et al., 2018).

Hem nadir şekerlerin bu çeşitli fonksiyonel özelliklerinden dolayı, hem de vücuda çok fazla yaygın şeker alınması durumunda iç organlarının yağlanması, obezite riski, metabolik değişimler ve tip 2 diyabet riskinin artması gibi durumlarla karşılaşıldığından dolayı, yaygın şekerlerin alımını azaltmak amacıyla, bu şekerlerin yerini nadir şekerler almaya başlamıştır (S. Kim et al., 2017).

Nadir şekerler arasında çok önemli bir yere sahip olan D-alluloz, kalorisiz bir tatlandırıcı olmasının yanında, kandaki glikoz seviyesini düşürme, insülin direncini iyileştirme, vücuttaki yağ birikimini azaltma ve ateş düşürme gibi birçok biyolojik fonksiyonu düzenleme özelliğine de sahiptir (O'Charoen, Hayakawa, Matsumoto, & Ogawa, 2014; A. Yoshihara et al., 2017; W. Zhang, Yu, Zhang, Jiang, & Mu, 2016). Sadece 0.39 kcal'lik bir enerjiye sahip olması ve yaşam kalitesini etkileyen birçok hastalığı engellemesi sebebiyle D-alluloz gıda endüstrisinde sağlıklı bir tatlandırıcı olarak kullanılmaya başlanmıştır (Hadipernata & Ogawa, 2016; Ushijima, 2014).

Bu çalışmanın amacı, kolay bulunabilen, yaygın ve çok ucuz bir şeker olan fruktozdan enzimatik yolla nadir bir şeker olan ve her üründe rahatlıkla şeker yerine kullanılabilen allulozun üretilmesidir. Bu amaçla, rekombinant DNA teknolojisiyle önce D-tagatoz 3-epimeraz (DTE) enziminin üretimi gerçekleştirilmiş ve bu enzim kullanılarak kalori değeri yüksek olan fruktozun düşük kalorili tatlandırıcı ve dolgu maddesi olarak kullanılabilen alluloz (psikoz)'a dönüştürülmesi ile gıda katkı maddesi üretimi gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca bu çalışmada alluloz üretimi için gerekli olan ve dünyada ticari olarak üretimi ve satışı bulunmayan DTE enziminin ülkemizde ilk kez üretimi gerçekleştirilmiştir.

Yapılan bu çalışma ile günümüzde sağlık açısından olumsuz etkileri ve zararları sıkça tartışılan fruktozun alımını azaltmak, bunun yerine fonksiyonel birçok özelliği ve geniş kullanım alanları bulunan, doğal olarak çok zor bulunabilen değerli bir şeker olan D-allulozun kullanımının yaygınlaşmasını sağlamak amaçlanmıştır.

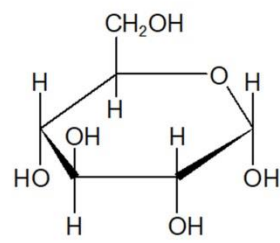
Gerçekleştirilen alluloz üretimiyle, hem çok ucuz bir hammadde olan fruktoz ekonomik değeri yüksek olan alluloza dönüştürülerek ekonomiye katkı sağlanacak, hem de yüksek fruktozlu mısır şurubu tüketiminde karşılaşılan birçok sağlık sorununun önüne geçilecektir. Üretilen alluloz düşük kalorili tatlandırıcı ve dolgu maddesi olarak gıda maddelerinin üretiminde güvenle kullanılabilir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

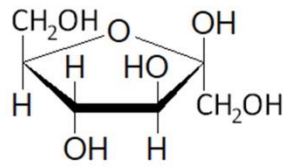
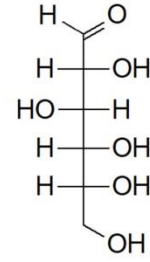
2.1. Karbonhidratlar

İnsan beslenmesinde rol alan temel gıda bileşenlerinden biri olan karbonhidratlar, doğada çok yaygın ve bol bulunabilen, insan vücudunda asıl enerji kaynağı olarak kullanılan organik bileşikler olarak bilinirler (Gil-Campos, San José González, & Díaz Martín, 2015). Karbonhidratlar sadece insanoğlu için değil, var olan bütün canlı organizmaların yaşamını sürdürebilmesi için elzemdir. Yapısal öge ve enerji kaynağı olarak kullanılmalarının yanı sıra, aromatik aminoasitler gibi önemli yapıtaşlarının biyosentezinin başlatılmasında da kullanılırlar. Ayrıca, gıda endüstrisinde tatlandırıcı olarak ve fermantasyon için hammadde olarak kullanılırlar (Allard, Giraud, & Naismith, 2001). Yapıları, kendilerine özgü tatları ve yüksek besinsel lif içeriğiyle karbonhidratlar bazı gıdaların daha lezzetli bir hale gelmesini, daha çok iştah açıcı olmasını ve daha doyurucu bir forma ulaşmasını sağlarlar. Karbonhidratlar en yaygın ismiyle “şeker” olarak bilinirler. Bu şekerler gıdalara tatlılık vermeleri ve aromayı iyileştirmelerinin yanında, donma ve kaynama noktalarını modifiye etmek, gıdalara doğal yolla renk vermek ve gıdaları muhafaza etmek amacıyla da kullanılırlar (Gil-Campos et al., 2015).

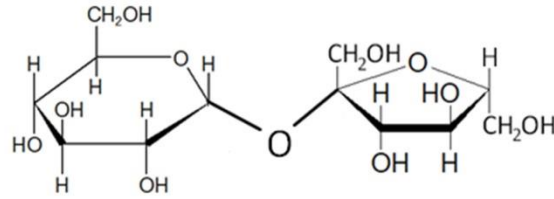
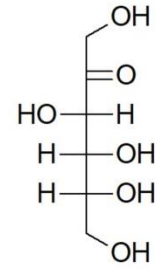
Glikoz, sakkaroz ve fruktoz gibi tatlı mono ve disakkaritler (Şekil 1) doğada çok yaygındır ve doğal olarak birçok meyve ve sebze de mevcuttur. Kaynakları ve miktarları değişse de bu şekerler her zaman insan diyetinin bir parçası olmuştur (Edwards, Rossi, Corpe, Butterworth, & Ellis, 2016). Karbonhidratlar gıdalarla birlikte alındıktan sonra metabolizma tarafından sindirilir ve glikoza ayrıştırılır. Daha sonra vücut tarafından absorblanır ve enerji ihtiyacı için kullanılır. Sakkaroz, maltoz ve fruktoz gibi birçok şeker çeşidi bulunmaktadır, fakat bunlardan en çok bilineni glikozdur. Glikoz insan beyni tarafından enerji kaynağı olarak kullanılır (Hashii et al., 2015).



Glikoz



Fruktoz



Sakkaroz

Şekil 1. Doğada Yaygın Bulunan Bazı Mono ve Disakkaritler

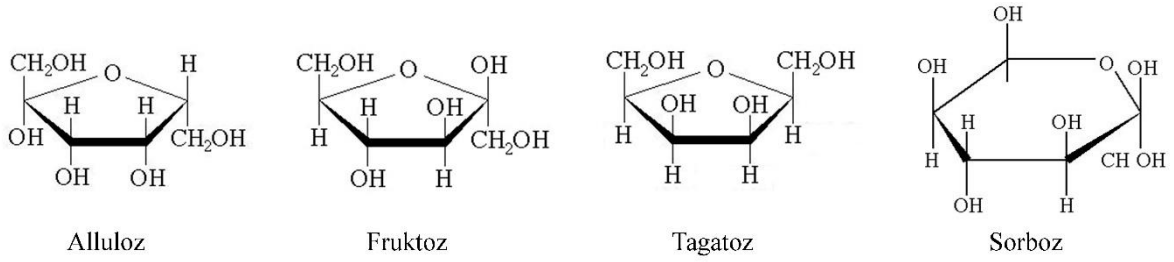
2.2. Nadir Şekerler

Kişinin bir gün içerisindeki toplam şeker tüketim miktarını tam olarak tespit etmek çok zordur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre harcanan toplam enerjinin en fazla %10'u şeker ile sağlanmalıdır. İdeal olanı ise %5'lik bir orandır. Bu oran günlük 25 g şekerle denk gelmektedir. Yani sadece bir şişe maden suyu içildiğinde bile alınması gereken günlük şeker miktarının üzerine çıkmış olmaktadır. Buna rağmen, insanoğlunun meyve suyundan veya diğer tatlı yiyecek ve içeceklerden tamamen uzak durması mümkün değildir. İşte bu noktada, bu problemin çözümü olabilecek sağlıklı bir şeker ihtiyacımız vardır ve bu şeker "nadir şeker" olarak isimlendirilmektedir (Hashii et al., 2015).

Uluslararası Nadir Şekerler Örgütü nadir şekerleri “doğada çok az bulunan monosakkaritler ve onların türevleridir.” şeklinde tanımlamıştır (Muniruzzaman, McIntosh, Hossain, Izumori, & Bhattacharjee, 2016).

2.2.1. Başlıca Nadir Şekerler

Tüm heksoz ve pentozlar içerisinde sadece yedi tanesi (D-glikoz, D-galaktoz, D-mannoz, D-fruktoz, D-ksiloz, D-riboz ve D-arabinoz) doğada bol miktarlarda bulunmaktadır (Tang, 2012; W. Zhang, Li, Jiang, Zhang, & Mu, 2017). Bilinen en yaygın ketoheksozlar D- ve L-izomerleri bulunan tagatoz, alluloz, sorboz ve fruktozdur. Bu sekiz şeker içerisinde D-tagatoz, D-alluloz, D-sorboz, L-tagatoz ve L-fruktoz doğada çok az bulunmalarından dolayı nadir şekerler (Şekil 2) olarak kabul edilir (Li, Gao, Nakanishi, Gao, & Cai, 2013; Nagata, Mizuta, Kanasaki, & Tanaka, 2018).



Şekil 2. Doğada bulunan nadir şekerler

2.2.2. Nadir Şekerlerin Tarihçesi

Nadir şekerler hakkında bilinen ilk çalışmalar 1970 yılında, Kagawa Üniversitesi'nde Ken Izumori adında bir profesör tarafından yapılmaya başlanmıştır. Izumori'nin nadir şekerler konusunda ilk çalışması allulozdan daha çok tagatoz üretimi üzerine olmuştur. Bu ilk çalışmada tagatoz sütte bulunan galaktozdan elde edilmiştir (Hashii et al., 2015).

1991 yılında, Ken Izumori fruktozu D-alluloza dönüştürebilen bir mikroorganizma keşfetmiş ve aynı zamanda D-allulozun sadece zuina isimli bir bitkide bulunduğunu tespit edip bu bitkiyi çoğaltma işlemlerine başlamıştır (Ushijima, 2014).

Nadir şeker kullanılarak üretilen bir şurubun piyasaya çıkması, D-allulose'un ticarileşmeye doğru attığı ilk adım olmuştur. Japonya'da büyük üreticilerin bu şurubu kullanarak ürettikleri

ürünleri piyasaya sürmelerine bağlı olarak, nadir şekerler ilk olarak Japonya’da adını duyurmaya başlamıştır (Ushijima, 2014).

Nadir şekerler son yıllarda düşük kalorili tatlandırıcı ve dolgu maddesi olarak kullanım açısından da yoğun bir ilgi görmektedir. Buna rağmen bu şekerlerin biyolojik fonksiyonları ve fiziksel etkileri ile ilgili çalışmalar çok sınırlıdır (Takata et al., 2005). Nadir şekerlerin bulunmalarının zor olması, bulduklarında ise çok sınırlı miktarda bulunması ve çok pahalı olması uygulama alanlarını kısıtlamaktadır ve kimyasal sentezi zor olduğu için, üretimi artan talebi karşılayamamaktadır (Li, Gao, Nakanishi, Gao, & Cai, 2013; Muniruzzaman et al., 2016; K. Yoshihara, Shinohara, Hirotsu, & Izumori, 2003).

Nadir şekerlerin çeşitli alanlarda kullanımıyla ilgili hala yeterli bilgi bulunmamakta ve bu konuda geniş çaplı araştırmalar yapılması gerekmektedir. Buna bağlı olarak, son yıllarda nadir şekerlerle ilgili çalışmaların giderek arttığı görülmektedir (Muniruzzaman et al., 2016). Bu mevcut duruma bakılarak, yeni ve ekonomik nadir şeker üretim metodlarının geliştirilmesi gerektiği görülmektedir (K. Yoshihara, Shinohara, Hirotsu, & Izumori, 2006).

2.2.3. Nadir Şekerlerin Üretim Yöntemleri

Nadir şekerler çok sınırlı miktarda buldukları için doğal kaynaklardan ekstrakte edilememektedir. Bu sebeple, nadir şekerlerin yaygın şekerlerden sentezlenmesi amacıyla birçok kimyasal ve enzimatik metod geliştirilmiştir (Wen et al., 2016).

Yeni nadir şeker üretim metodları keşfedilmeden önce nadir şekerlerin oldukça pahalı olduğu, alluloz’un gramının 40000-50000 yen arasında olduğu bilinmektedir. O dönemde bilim adamları nadir şekerlerin potansiyellerini tam olarak bilmedikleri için bu konuda yok denecek kadar az çalışma vardır (Hashii et al., 2015).

Yeni bir nadir şeker üretim yöntemi geliştirmek isteyen bir grup araştırmacı *Enterobacter aerogenes* kullanılarak allitolü alluloza dönüştürmeyi denemişler ve çalışma sonunda allitolün %10’unun alluloza dönüştüğünü analitik yöntemlerle tespit etmişlerdir (Gullapalli et al., 2007).

Bakteriler enzimler aracılığıyla nadir şeker üretebilmektedir. 1970’li yıllarda Izumori ve ekibi bu bilgiden yola çıkarak nadir şeker üretebilecek bir bakteri arayışına girmişlerdir. Bunun için birçok farklı bölgeden toprak örnekleri toplamışlardır. Sonunda istedikleri bakteriyi Kagawa Üniversitesi Ziraat Fakültesi’nden aldıkları topraktan izole etmeyi başaran ekip, daha sonra bu

bakterinin gelişebileceği ve seri bir şekilde nadir şeker üretiminin sağlanabileceği bir cihaz geliştirmişlerdir. Böylece, 1994 yılında ilk kez, çok pahalı ve çok az miktarda bulunan nadir şekerlerin ucuz ve seri bir şekilde üretimini sağlamışlardır. Profesör Izumori bütün nadir şekerlerin enzimler aracılığıyla birbirine dönüştürülebileceğini de böylece keşfetmiştir (Hashii et al., 2015).

2001 yılında ise Kagawa Üniversitesi'nde Nadir Şeker Araştırma Merkezi kurulmuş ve burası dünya üzerinde birçok nadir şekerin seri üretiminin yapıldığı tek yer olma özelliğine sahip olmuştur (Hashii et al., 2015).

2.2.3.1. Izumoring Stratejisi

Nadir şekerlerin ve bunların içinde de allulozun üretimi için Ken Izumori tarafından "Izumoring stratejisi" denilen ve birçok nadir monosakkaritin geniş çapta üretimini mümkün kılan bir strateji geliştirilmiştir. Bu stratejiye göre, mikrobiyal ve enzimatik dönüşümlerle üretilmesi istenen nadir şekerin sentezi kolayca kurgulanabilmektedir (Muniruzzaman et al., 2016; Tang, 2012).

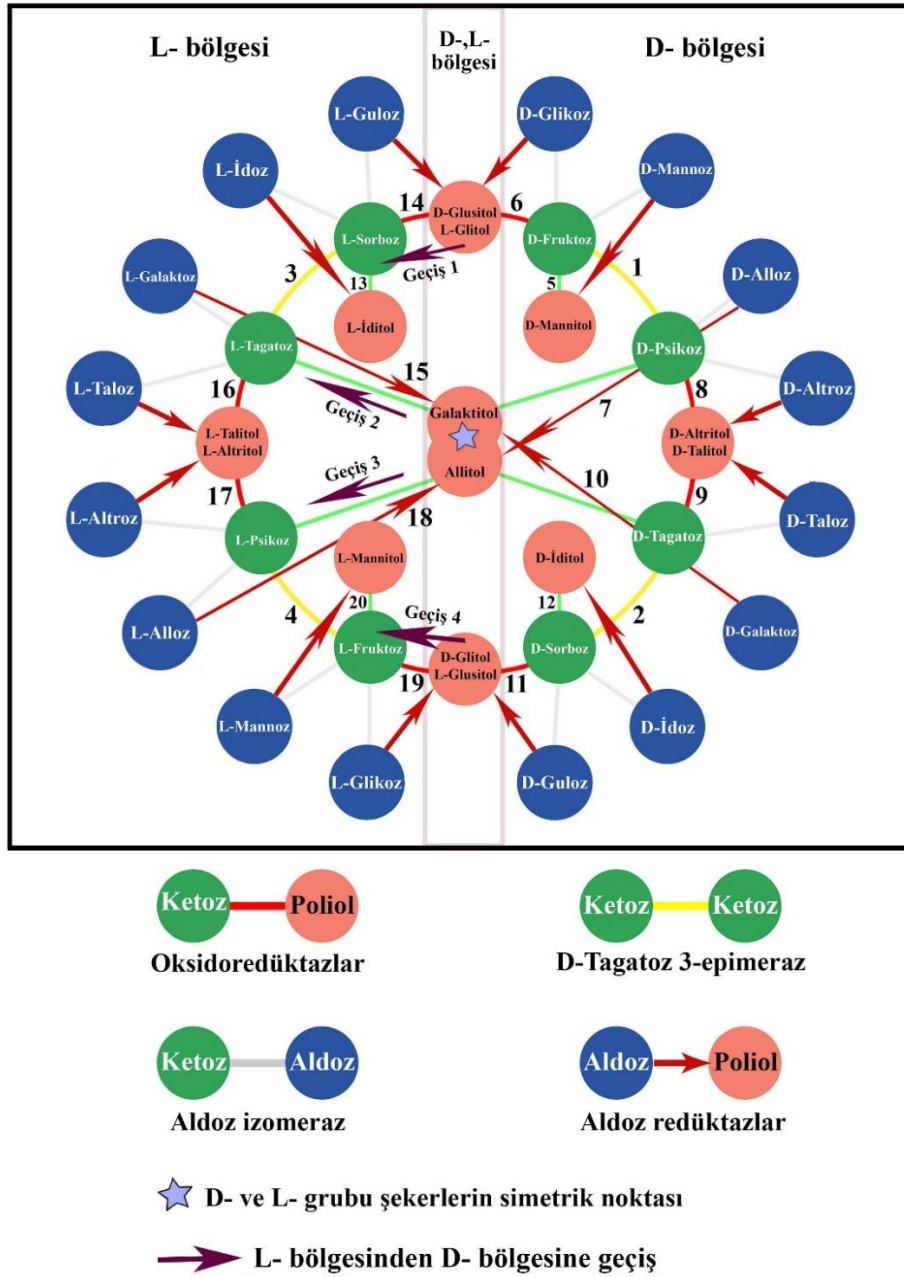
Izumoring şeması (Şekil 3), yapılan çalışmalara dayanarak nadir şekerlerin üretimin yollarını gösteren bir şemadır. Bu şemada görüldüğü gibi, birbirine dönüşebilen 34 çeşit şeker çizgilerle birbirine bağlanmıştır. İki şeker arasındaki bu çizgiler, söz konusu iki şekerin birbirine dönüşmesini sağlayan enzimi temsil etmektedir. Böylece, ucuz ve bol miktarda bulunan D-glikoz ve D-fruktoz gibi şekerlerin, D-alluloz gibi değerli ve zor bulunan şekerlere dönüşmesinin mümkün olduğu görülmektedir. Burada yer alan tüm şekerler monosakkaritler grubundandır. Bununla birlikte maltoz ve laktoz gibi ucuz disakkaritler kullanılarak da nadir şeker üretimi için yöntem geliştirme çalışmaları yapılmaktadır. Bu disakkaritlerin modifiye edildikten sonra enzimlerle kendini oluşturan monosakkaritlere parçalanıp, bu monosakkaritler aracılığıyla nadir şekerlere dönüştürülmesi planlanmaktadır (Hashii et al., 2015). Alluloz, Izumoring stratejisinde anahtar şekerdir (K. Yoshihara et al., 2006).

Izumoring stratejisinde monosakaritlerin karşılıklı dönüşümü oksidoredüktazlar, aldoz izomerazlar, D-tagatoz 3-epimeraz ve aldoz redüktazlarla gerçekleştirilir (K. Kim, Kim, Oh, Cha, & Rhee, 2006; Tang, 2012).

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 tekrar kullanılabilmesi, son ürünün kolayca elde edilip saflaştırılabilmesi ve immobilizasyon işlemiyle enzimin bazı özelliklerinin (aktivite, stabilite, vb.) geliştirilebilmesi gibi özelliklerdir (Li et al., 2013).

Günümüzde "Izumoring" stratejisi ile mikrobiyal ve enzimatik dönüşümler aracılığıyla birçok nadir şekerin büyük miktarlarda üretimi mümkündür (Muniruzzaman et al., 2016).



Şekil 3. Izumoring şeması

2.2.3.2. Nadir Şeker Üretiminde Kullanılan Enzimler

2000'li yılların başına kadar, D-fruktozun D-alluloza dönüştürülmesinde sadece üç bakteri kullanılmış ve bunların *Pseudomonas cichorii*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Sinorhizobium* sp. olduğu tespit edilmiştir. 2009 yılında ise Zhang ve ark. tarafından *Rhodobacter sphaeroides* kullanılarak alluloz üretimi gerçekleştirilmiştir (L. Zhang, Mu, Jiang, & Zhang, 2009).

Bugüne kadar *Pseudomonas* sp. ST-24, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodobacter sphaeroides* SK011, *Clostridium cellulolyticum* H10, *Clostridium scindens* 35704, *Clostridium bolteae*, *Treponema primitia*, *Ruminococcus* sp., *Mesorhizobium loti*, *Desmospora* sp. ve *Clostridium* sp.'den 11 tane DTEase tanımlanmış ve alluloz üretimi için kullanılmıştır. Alluloz için yüksek substrat özgülüğü gösterdiğinden dolayı, *Agrobacterium tumefaciens*, *Clostridium cellulolyticum* H10, *Clostridium scindens* 35704, *Clostridium bolteae*, *Treponema primitia*, *Ruminococcus* sp., *Desmospora* sp. ve *Clostridium* sp.'den izole edilen DTEase'lar genellikle D-psicose 3-epimerase (DPEase) olarak adlandırılmıştır (Ishida, Kamiya, Itoh, Kimura, & Izumori, 1997; H. Itoh et al., 1994; K. Kim et al., 2006; Li et al., 2015; Tseng et al., 2018).

2.2.3.3. Nadir Şekerlerin Fonksiyonel Özellikleri

Monosakkaritler doğada bulunma şekillerine göre doğal ve nadir şekerler olarak iki gruba ayrılabilir (Muniruzzaman et al., 2016). Doğada yaygın bulunan monosakkaritler insan vücudunda herhangi bir fiziksel aktivite göstermezler. Bu şekerler genellikle hücrede enerji üretimi için kullanılırlar (Morimoto, Yoshihara, Furumoto, & Takata, 2015). Aksine, nadir şekerler doğada çok az miktarda bulunmalarına rağmen, bilinen birçok biyolojik fonksiyonlara ve eczacılık, farmakoloji, kozmetik, gıda sanayi, aroma endüstrisi ve diğer birçok endüstriyel alanda büyük bir kullanım potansiyeline sahiptir (Li et al., 2013; Tang, 2012). Birbirlerinin sentezi için öncü maddeler olarak kullanılan değerli kaynaklardır (K. Kim et al., 2006). Ayrıca birçok doğal ürünün de başlangıç materyali olarak kullanılırlar (Lee et al., 2017; Li et al., 2013). Nadir şekerler potansiyel birer antiviral ve antikanser ilaç ikamesi oldukları için tıpta her geçen gün daha çok ilgi çekmektedirler (Li et al., 2013).

Yüksek maliyet ve zor bulunma gibi problemlerden dolayı nadir şekerlerin pratikteki uygulamaları ve kullanım alanları henüz tam olarak araştırılamamıştır. Nadir şekerlerin fiziksel etkileriyle ilgili bilgiler de oldukça kısıtlıdır. (Muniruzzaman et al., 2016). Maliyeti ve

bulunma zorluğuna rağmen nadir şekerler gıda katkısı, diyet şeker, antioksidan, antiviral ve antikanser ajan, glikozit inhibitörü ve nükleozid analogları olarak kullanım potansiyellerinden dolayı çok önemli bir yere sahiptir (Muniruzzaman et al., 2016).

Nadir şekerler sağlık açısından da oldukça önemlidir. Bilim adamları nadir şekerleri ilaç hammaddesi olarak kullanmaktadırlar (Hashii et al., 2015).

Nadir şekerler aynı zamanda tarımsal bitkilerin zararlı böceklerle karşı dayanıklı olmasında ve bu bitkilerin gelişiminin kontrol altına alınmasında kullanılmaktadır. Kagawa Üniversitesi'nden araştırmacılar, nadir şekerleri kullanarak tarım kimyasalları ve gübre üretmişler ve bunu bitkiler üzerinde denemişlerdir. Araştırmalar sonucunda nadir şekerlerin bitkilerin hormonları üzerinde etkili olduğunu keşfetmişlerdir. Kullanılan nadir şekerin yoğunluğuna bağlı olarak bitki gelişiminin hızlandırabilmenin veya durdurabilmenin mümkün olduğunu gözlemlemişlerdir. Alluloz veya D-alloz gibi nadir şekerlerin absorpsiyonuyla, bitki genlerinin çeşitli hastalıklara dayanıklı hale geldiğini görmüşlerdir. Dolayısıyla nadir şekerler doğal ve zararsız, insan ve çevre için güvenli tarım kimyasalı olarak kullanım imkanı bakımından büyük potansiyele sahiptir (Hashii et al., 2015).

Bazı nadir şekerler tatlı bir tada sahiptir ve metabolize olmaları zordur. Bu sebeple düşük kalorili tatlandırıcı olarak kullanılırlar. D-tagatoz ve eritritol üzerine yapılan araştırmalar, diğer nadir şekerlere göre daha ileri düzeydedir ve bunların enerji değerleri sırasıyla 6.3 ve 1.7 kJ/g'dır. Allulozun ağız yoluyla alındığı bir çalışmada idrar ile atılımı %15 ila %25 arasında değişmiştir, bu da allulozun ince bağırsak tarafından emilebileceğini düşündürmektedir. Bir başka çalışmada, damardan uygulanan allulozun yaklaşık% 98'inin 6 saat içinde idrarla atıldığı bildirilmiştir. Bu bulgular, ince bağırsakta absorbe edilen allulozun kan dolaşımına geçebileceğini ve önemli ölçüde metabolize edilmeden idrarla atılabileceğini göstermektedir (Iida et al., 2010; Iwasaki et al., 2018).

2.3. Alluloz ve Üretimi

Bilinen birçok özelliklerinin yanında, şekerin insan sağlığına olumsuz etkileri uzun yıllardan beri hem halk arasında hem de bilimsel anlamda önemli bir mesele olmuştur (Malik & Hu, 2015). şeker, ilk çağlardan beri insan beslenmesinde temel besin maddelerinden biri olarak bilinmesine rağmen, yüksek miktarda şeker tüketiminin obezite de dahil olmak üzere kalp hastalıkları, diyabet, karaciğer hastalıkları gibi birçok hastalık riskini artırdığı bilinmektedir (K. Itoh et al., 2015).

Fruktoz, meyve ve meyve sularında doğal olarak bulunan, gıda ve içeceklerde sıklıkla yapay tatlandırıcı olarak kullanılan bir monosakkarittir (Batt et al., 2017).

İştah kontrolünde ve gıda tüketimi ve vücut ağırlığının düzenlenmesinde görev alan leptin ve adiponektin gibi hormonların salgılanması üzerinde fruktoz tüketiminin büyük etkisinin olduğu bilinmektedir. Leptin, gıda tüketimini azaltmada etkili olan sitokinler ve kemokinlerin üretimini artıran bir hormondur (S. Kim et al., 2017). Glikozun aksine fruktoz, bu hormonların salgılanmasını uyaramadığından, hormon eksikliği ile iştah kontrolünün tam olarak gerçekleştirilemediği, dolayısıyla normal sınırdan daha fazla gıda alımıyla birlikte obezite ve kilo artışı gibi durumlarla karşılaşıldığı tespit edilmiştir (Seraphim et al., 2017).

Son yıllarda gösterdiği artış sebebiyle obezite dünya çapında önemli bir halk problemi olmaya başlamıştır. Obezite, aşırı kilolu olma durumu olarak tanımlanan, temel olarak vücuttaki fazla yağ oranıyla ve çok sayıda sağlık sorunuyla ilişkili olan, yaygın bir beslenme bozukluğudur. Obezite çoğunlukla sebep olduğu insülin direncinin bir sonucu olarak tip 2 diyabetle ilişkilendirilmiştir. 2011 verilerine göre nüfusunun obezite yüzdesi en düşük olan ülke %4.1 ile Japonya iken, bu oranın %36.5 ile en fazla olduğu ülke Amerika olmuştur (K. Itoh et al., 2015). Özellikle, şekerle tatlandırılmış içeceklerin, şekerlemelerin ve yüksek oranda glikoz ve fruktoz içeren tatlıların tüketimindeki artışın, son zamanlarda obezitenin yaygınlaşmasına önemli bir katkı sağladığı tespit edilmiştir (K. Itoh et al., 2015). Ana bileşeni fruktoz olan kola gibi gazlı içecekler, yağ içeriği yüksek fast food tarzı gıdalarla birlikte sıklıkla tüketilmektedir. Böylece aynı anda vücuda hem yağ hem de fruktoz alımı, karaciğer yağlanmasını çok daha hızlı bir şekilde gerçekleştirmektedir. Sürekli olarak fruktoz alımının metabolik bozuklukları ve kalp hastalıklarını tetiklediği, vasküler fonksiyonda değişikliğe sebep olduğundan dolayı hipertansiyona yol açtığı, beyin fonksiyonları açısından ciddi bir tehdit oluşturduğu ve alkole bağlı karaciğer hastalıklarını tetiklediği tespit edilmiştir (Jiménez-Maldonado et al., 2018; Li, Cai, Qi, & Wang, 2011; Sousa et al., 2017; Thomes et al., 2017).

Son yıllarda sakkaroz ve yüksek fruktozlu mısır şurubu tüketiminin artmasına bağlı olarak fruktoz tüketimi de önemli seviyede artış göstermiştir (Jensen et al., 2018).

Nadir şekerler dünya çapında her geçen gün adını daha fazla duyurmaktadır. Bu şekerlerden biri olan D-alluloz ise insanoğlu için nadir şekerlerin odak noktası olmuştur (Hashii et al., 2015).

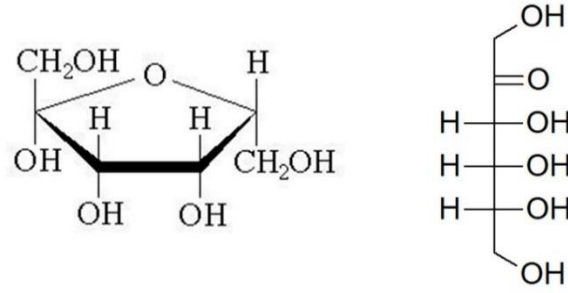
Alluloz, ideal bir sakkaroz ve yüksek fruktozlu mısır şurubu ikamesidir (W. Zhang, Li, Jiang, Zhang, & Mu, 2017). Sakkarozun %70'i kadar tatlılığa sahip olmasına rağmen, hepatik lipojenik enzimlere karşı gösterdiği inhibisyon etkisine bağlı olarak kalori değeri sıfıra çok yakın (0.2 kcal/g) bir şekerdir (Iwasaki et al., 2018; O'Charoen et al., 2014; Yingling, 2013). Sakkarozun yalnızca %0.3'ü kadar bir enerjiye sahiptir (Chan et al., 2012). Bu özelliğinden dolayı alluloz sindirilemeyen karbonhidratlar grubuna girer. bir şekerdir (Fahey, 2011).

Alluloz, üretildiğinde beyaz, kokusuz bir toz şeklindedir ve suda kolayca çözünür. İndirgen bir şeker olarak, gıdalardaki amino asit, peptid ve proteinlerle ısıtma işlemi tabii tutulduğunda, D-glukoz ve D-fruktoza göre daha düşük seviyede maillard reaksiyonu gerçekleşir. Bu maillard reaksiyonu ürünleri antioksidan aktiviteye sahiptir ve jel kuvveti, su tutma kapasitesi gibi jelleşme özelliklerini iyileştirir (Hossain et al., 2015; Tseng et al., 2018). Allulozun, gıdanın tekstürü ve ağızda bıraktığı his gibi kalite kriterlerini ve gıda maddesinin depolanma stabilitesini iyileştirdiği tespit edilmiştir (Patel et al., 2016). Ayrıca gıdalara hoş bir aroma kazandırdığı ve işleme sırasında oluşan maillard reaksiyonu boyunca gerçekleşen oksidasyon süresini de kısalttığı bilinmektedir (W. Zhang et al., 2016).

Alluloz sentezinde kullanılan en yaygın metod, fruktozun D-tagatoz 3-epimeraz enzim grubu tarafından C-3 pozisyonunda izomerizasyonuna dayanmaktadır (Li et al., 2015). D-allulozun seri üretim metodunun oluşturulmasında ve D-alluloz kullanarak ürün üretiminin geliştirilmesinde her geçen gün ilerleme kaydedilmektedir (Ushijima, 2014).

2.3.1. Allulozun Kimyasal Yapısı

D-fruktozun karbon-3 epimeri olan D-alluloz fonksiyonel bir nadir şekerdir (Lim et al., 2009; Zhang et al. 2016). Bu şeker pseudo-fruktoz adıyla da bilinmektedir (Fahey, 2011). Moleküler formülü $C_6H_{12}O_6$, molekül ağırlığı ise 180.16 g/mol'dür. Alluloz (Şekil 4) bir keton grubuna sahiptir ve indirgeyici bir D-ketoz gibi davranır. Bu şeker Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından "D-ribo-2-hexulose" olarak adlandırılmıştır (W. Zhang et al., 2016). Uluslararası nadir şekerler örgütü tarafından 2014 yılındaki nadir şeker sempozyumunda D-psikozun adlandırılması konusu ele alınmış ve "D-psikoz" yerine "D-alluloz" isminin kullanılması önerilmiştir (Morimoto et al., 2015). Literatürde ise bu şeker çoğunlukla "D-psikoz" olarak geçer. Bu isim, D-psikozun izole edildiği psikofuranin antibiyotiklerinden gelmektedir (He et al., 2015; W. Zhang et al., 2016). Allulozun bazı özellikleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 1).



Şekil 4. D-alluloz (D-psikoz)

Tablo 1. Tatlandırıcı olarak allulozun biyolojik ve kimyasal özellikleri (Mu, Zhang, Feng, Jiang, & Zhou, 2012)

Kimyasal sınıf	Karbonhidrat ketoz monosakkarit, D-fruktozun 3-epimeri
CAS No.	551-68-8
Moleküler formülü	C ₆ H ₁₂ O ₆
Molekül ağırlığı	180.156 g/mol
Fiziksel form	Katı beyaz kristal
Koku	Yok
Erime sıcaklığı	96 °C
Optik çevirme	[α] ²⁰ /D= -85° (c=1, H ₂ O)
Çözünürlük	%74 w/w (25 °C) ve %83 w/w (50°C)
Göreceli tatlılık	%10 (w/w) solüsyonda %70
Isıl etki	0.007 kcal/g (fare deneyleriyle)
Maillard reaksiyonu	Evet
Toksisite	Hayır (fare deneyleriyle)
Düzenleme durumu	Şeker ikamelerinde GRAS bir bileşen olarak onaylanmıştır

2.3.2. Allulozun Elde Edildiği Kaynaklar

Alluloz, şeker kamışında fermente olmayan kısım olarak, buğdayda ise serbest şeker olarak bulunmaktadır (Lim et al., 2009). Bunun dışında, pancar kökünden elde edilen pekmezde, buğdayda ve psikofuranin antibiyotiğinde az miktarda mevcuttur (Gullapalli et al., 2007).

Belirli bazı bakterilerde, meyve suyu ve kola gibi içeceklerde çok az miktarda bulunur (Hossain et al., 2015; Kimura et al., 2017). Meyveli kahvaltılık gevreklerde de doğal olarak bulunan allulozun, ısıtma işlemleri sırasında D-fruktozun dönüşümüyle oluştuğu tespit edilmiştir (Matsuo et al., 2011). Çay bitkisinde de çok az miktarda alluloz bulunmaktadır (Al-Baarri, Legowo, Pramono, Sari, & Pangestika, 2018).

Itea adı verilen bir süs bitkisinde de belirli bir miktarda alluloz bulunmaktadır (Gullapalli et al., 2007). *Itea* bitkisinin gövde ve yapraklarında yapılan araştırmalarda baskın şekerin her zaman alluloz olduğu ve gövdede yaz kış maksimum seviyede bulunduğu tespit edilmiştir. Bu bitki 6 gün boyunca karanlık ortamda bekletilmiş ve karbonhidrat içeriğindeki değişim incelenmiştir. Bu süre içinde tüm çözünebilir karbonhidratların neredeyse tamamı yok olurken alluloz miktarında önemli bir azalma gözlenmemiştir. Diğer bitki türlerinde nişastanın üstlendiği depolama fonksiyonunu *Itea* bitkisinde allulozun üstlendiği düşünülmektedir (Kull & Baitinger-Haardt, 1977).

Dünya üzerindeki 230.000 çeşit bitkiden biri olan ve Japonya’da yetişen *Zunia* bitkisi alluloz içeren ve üretebilen tek bitkidir. Bu sebeple, *Zunia* bitkisi “nadir şeker ağacı” olarak da bilinmektedir (Hashii et al., 2015).

Çeşitli gıdalar her 100 gramda 0.5-130.6 miligrama kadar alluloz bulundurabilir. Meyve suları 21.5 mg, kola 38.3 mg alluloz içerir. İnsan vücudunun günlük alluloz alım miktarı yaklaşık 0.2 gramdır (Kimura et al., 2017). Oshima et al., 2006 tarafından yapılan bir çalışmada bazı gıda örneklerinin D-alluloz içeriği araştırılmış ve sonuçlar tablo halinde verilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Bazı gıdaların alluloz içeriği

Gıda Maddesi	Alluloz içeriği (mg/100 g)
Kola	38.3
Kahve	0.5
Meyve suyu	21.5
Domates suyu	2.4
Kurutulmuş incir	29.6
Kurutulmuş kivi	9.4
Kuru üzüm	38.7

Şeftali konservesi	1.5
Mandalina konservesi	8.4
Kiraz konservesi	2.0
Mısır çerezi	47.0
Mısır gevreği	2.2
Karamel sos	83.0
Kahverengi şeker	71.1
Kıymalı sos	15.8
Akçaağaç şurubu	57.9
Ketçap	39.8
Damla çikolatalı kurabiye	6.4
<i>Kasutera</i> (sünger kek)	11.0
<i>Yo-kan</i> (sert kaplamalı jelibon)	11.2
<i>Kawarassenbei</i> (pirinç krakeri)	27.3
<i>Kurokarintou</i> (kızartılmış hamur tatlısı)	95.6
Soya sosu ile ızgaralanmış balık	39.1
Fermente soya fasulyesi	7.8

2.3.3. Alluloz Üretimi

Alluloz üretimi, yaygın olarak mikroorganizmalar tarafından enzim üretilmesi ve bu enzimlerin etkisi ile fruktozun biyo dönüşüme uğratılması yoluyla gerçekleştirilir (W. Zhang et al., 2016). Ancak, bu amaçla üretilmiş ticari bir enzim preparatı günümüzde bulunmamaktadır. Bu nedenle, alluloz üretimi çok sınırlı düzeyde kalmaktadır. Mevcut yapıda ise ABD’de alluloz üretiminde FDA-GRAS onayı almış 3 firma bulunmaktadır (Matsutani, SamYang, CJ CheilJedang) (FDA, 2016). Ticari enzim preparatının bulunmaması ve kısıtlı üretim olanakları nedeniyle, allulose üretiminde kullanılacak enzim üretimi ve bu amaçla kullanılacak mikrobiyal kaynaklar üzerinde gerek bilimsel gerekse ticari çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir.

Allulozun enzimatik üretimi dışında doğrudan bakteri hücreleri ilavesiyle de üretilebildiği görülmüştür. 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 *E. 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 (Park et al., 2016).

2.3.3.1. Allulozun Kimyasal Yolla Üretimi

Alluloz, önceki yıllarda farklı metodlar ve farklı hammaddeler kullanılarak üretilmeye çalışılmış ve her bir yöntemin verimliliği analiz edilmiştir. Bunlardan biri olan kimyasal sentez yönteminde, sulu ve asidik bir çözeltide molibdat iyonlarının katalitik etkisiyle D-fruktozdan alluloz üretilmiştir (Bilik & Tihlárík, 1973). Yine D-fruktoz, etanol ve trietilamin içerisinde kaynatılarak alluloza dönüştürülmüştür (Doner, 1979). Bunun gibi diğer birçok kimyasal sentez çalışmasında üretimin çok zahmetli olduğu ve geniş çaplı üretim yapılmak istendiği durumlarda bu metodların yetersiz kaldığı tespit edilmiştir (Takeshita, Suga, Takada, & Izumori, 2000). 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 (Takeshita et al., 2000; Wen et al., 2016; W. Zhang et al., 2016).

Bu sebeple çoğu zaman enzim kullanılarak fruktozdan biyo dönüşüm yoluyla sentezlenmesi tercih edilmiştir (K. Yoshihara et al., 2006).

2.3.3.2. Allulozun Enzimatik Yolla Üretimi

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 (Beerens, Desmet, & Soetaert, 2012). 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 (Allard et al., 2001).

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 (DTE), birçok ketozun C3 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 (Beerens et al., 2012).

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 (Lim et al., 2009).

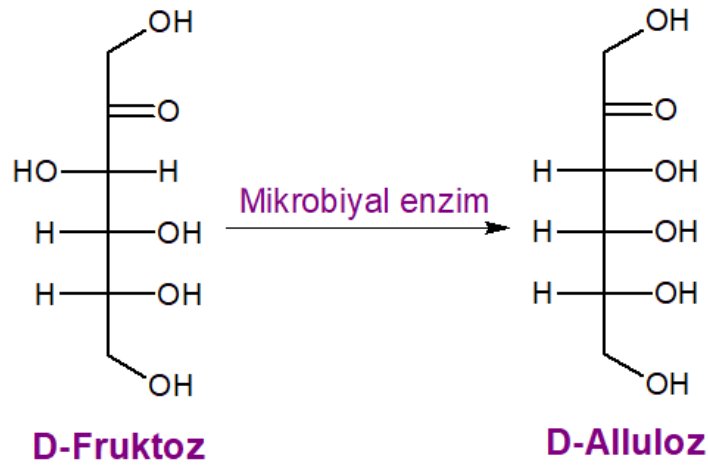
Izumori ve ekibi D-tagatoz 3-epimeraz enzimini ilk olarak *Pseudomonas* sp. ST-24'ten izole etmişler ve bu enzimi alluloz üretiminde kullanmışlardır. Bu mikroorganizmayı kullanarak 500 g D-fruktozdan 10 gün içerisinde 90 g alluloz üretilmiştir (Li et al., 2013). Bununla birlikte, Takeshita ve arkadaşları 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 (Takeshita et al., 2000).

Ketose 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 (W. Zhang et al., 2016).

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 (W. Zhang et al., 2016).

Üretimde immobilize enzim kullanımı, serbest ve çözünür enzim kullanımına göre birçok açıdan üstündür. İmmobilize enzim tekrar tekrar kullanılabilir ve enzimatik proses sürekli ve kolayca kontrol edilebilir. Ayrıca proses sonunda elde edilen ürünler kolayca ayrıştırılıp saflaştırılabilir. İmmobilizasyon ile enzim aktivitesi ve stabilitesi gibi bazı özellikler imkanlar dahilinde iyileştirilebilmektedir (Li et al., 2013).

Alluloz sentezi yaygın olarak, D-tagatose 3-epimerase enzim grubu (DTEase, EC 5.1.3.-) tarafından katalizlenen D-fruktozun C-3 pozisyonunda epimerizasyonu ile gerçekleştirilir (Şekil 5). Ayrıca, D-xylose isomerase ve D-psicose 3-epimerase enzimlerinin beraber kullanılmasıyla D-glikozdan da alluloz üretimi gerçekleştirilebilmektedir (Li et al., 2015). 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 (Izumori, 2002).



Şekil 5. Fruktozun alluloza dönüşümü

2.3.4. Allulozun Sağlık Üzerine Etkileri

Nadir bir şeker olan allulozun insanda tokluk kan şekerinin yükselmesinin önlenmesi gibi sağlığa olan pek çok olumlu etkileri önceki yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Kimoto-Nira et al., 2017).

Dünyada birçok ülkede, şekerli ürünlere şeker yerine alluloz ilave edilerek özellikle diyabet ve daha birçok şeker kaynaklı hastalık riskinin önemli oranda azaltılabileceği düşünülmektedir (Hashii et al., 2015). 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 yardımcı bir şekerdir (Gullapalli et al., 2007; W. Zhang et al., 2016).

Alluloz kilo kontrolünde ve yağ birikimini engellemede büyük ölçüde etkili olsa da kilo almayı ve yağ birikimini engelleme mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (S.-E. Kim et al., 2017).

Alluloz, insan vücudunda antidiyabetik olması, obezite ve damar sertleşmesini engellemesi ve diğer birçok özelliğiyle yaygın şekerlerden ayrılmaktadır. Allulozun bu aktivitesinden dolayı, alluloz içeren oligosakkaritlerin de aynı özellikleri gösterebileceği tahmin edilmektedir (Morimoto et al., 2015).

Matsuo ve İzumori (2009) ise fareler üzerinde yaptıkları bir çalışma sonucunda, insan metabolizmasında sakkaroz ve maltoz içeren gıdalar sindirildiğinde, diyabet hastalarında tokluk sonrası hipergliseminin önlenmesinde allulozun faydalı olabileceğini belirtmişlerdir .

Matsuo ve İzumori (2006) yine fareler üzerinde bir çalışma yapmışlar ve bu çalışmada diyetle ilave allulozun plazma glikoz ve insülin konsantrasyonları üzerindeki günlük değişimi incelenmiştir. Bunun için 80 adet fare 4 gruba ayrılmış, bu gruplardan üçü fruktozla, allulozla ve ikisinin karışımıyla ayrı ayrı beslenmiştir. Diğer grup ise kontrol grubu olarak seçilmiştir. Allulozla beslenen farelerde sakkarozla beslenen farelere kıyasla plazma glikoz ve insülin konsantrasyonları daha düşük bulunmuştur. Allulozla beslenen gruptaki kilo artışının diğerlerine göre gözle görülür biçimde düşük olduğu tespit edilmiştir .

Yapılan bir çalışmada araştırmacılar allulozun insan metabolizmasında yemekten sonra meydana gelen kan şekeri artışını engellediğini bildirmişlerdir (Iida et al., 2008).

Başka bir çalışmada ise sınır diyabeti olan insanlar üzerinde, alluloz alımının tokluk sonrası kan şekeri artışını engellediği tespit edilmiştir. D-glukozun ince bağırsaktan emiliminin engellenmesi, bu durumun olası sebebi olarak görülmektedir (Hayashi et al., 2010).

Toksisite testleri allulozun gıda katkısı olarak kullanımının güvenli olduğunu göstermiştir. Buna örnek olarak, insanlar üzerinde yapılan ve aralıksız 12 hafta süren bir çalışmada,

günde 3 öğün gıdalarla birlikte 5 g alluloz alımının olağandışı bir etkiye veya klinik bir probleme sebep olmadığı bildirilmiştir (Hayashi et al., 2010).

Ayrıca, diğer bir çalışmada allulozun vücuda alınan diğer karbonhidratların etkisini bloke ettiği anlaşılmıştır. Yaklaşık 5 g allulozun vücuda alınan 75 g karbonhidrat üzerinde etkili olduğu ve alınan bu karbonhidratın vücutta kan şekeri seviyesini artırma etkisini engellediği tespit edilmiştir (Hayashi et al., 2010).

2.3.5. Allulozla İlgili Yasal Düzenlemeler

2000’li yılların başında yapılan çalışmalarda, allulozun kalori alımını azaltmasından dolayı yararlı bir tatlandırıcı olduğu, fakat beslenmede uzun süre alluloz tüketiminin insan sağlığına etkileri ile ilgili bilgilerin çok sınırlı olduğu bildirilmiştir (Matsuo, 2001; Oshima et al., 2006). Yine o yıllarda, allulozun gıda katkısı olarak kullanımının güvenilirliği henüz test edilmemiş olsa da, bu şeker FDA tarafından 2014 yılında GRAS listesine alınmış, çeşitli gıdalara katılmasına ve gıda takviyesi olarak kullanılmasına izin verilmiştir (Hadipernata & Ogawa, 2016; Hossain et al., 2015; Oshima et al., 2006; W. Zhang et al., 2016).

Allulozun LD₅₀ değeri 15.9-16.3 g/kg iken fruktozda bu değer 14.7 g/kg, eritritolde ise 15.3 g/kg’dir. Fruktoz ve eritritole göre yüksek olan bu değer in sofr a tuzuna (3.0 g/kg) göre çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Alluloz sahip olduğu bu LD₅₀ değeri (15 g/kg ve üzeri) ile Dünya Sağlık Örgütü toksisite derecelendirme kriterlerine göre “nispeten zararsız” (en düşük toksisiteye sahip madde) kategorisine dahil olmuştur. Bu nedenle allulozun yiyecek veya içeceklerde kullanımının bir sağlık tehlikesi oluşturmayacağı bildirilmiştir. Allulozun kullanılabil eceği gıdalar ve maksimum kullanım seviyeleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 3) (Fahey, 2011).

Tablo 3. Allulozun kullanılabil eceği gıdalar ve maksimum kullanım seviyeleri (Fahey, 2011)

Gıda grubu	Maksimum kullanım, %
Sandviç ekmeği, kek, pasta, kurabiye, diyetetik veya düşük kalorili gıdalar	10
Sakız	50
Yağ bazlı krema	10
Sert şekerlemeler	70
Dondurulmuş sütlü tatlılar (dondurma vb.)	5
Gazlı içecekler	2.1
Gazsız içecekler	2.1

Yumuşak şekerlemeler	25
Yoğurt (normal ve donmuş)	5
Özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	15
Kahvaltılık hazır gevrekler	10
Kahve karışımları	30

Alluloz, metabolizması, enerji değeri ve toksisite testi sonuçları bakımından GRAS listesine dahil bir tatlandırıcı olan eritritol ile çok benzerlik göstermektedir. Her ikisi de 0.2 kcal/g değerinde enerjiye sahiptir. Alluloz ve eritritol benzer niteliklere sahip olduğu için şeker ikamesi olarak ikisi de gıda formülasyonlarında rahatlıkla kullanılabilir (Fahey, 2011).

Allulozun üretiminde kullanılan enzimlerin de toksik veya patolojik bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Akut toksisite çalışmaları enzimin NOAEL (olumsuz etki tespit edilemeyen doz) değerinin 2000 mg/kg/gün olduğunu göstermiştir. *S. typhimium* (TA 98, 100, 1535 ve 1357; 5000 µg/petri) ve *E. coli* WP2uvrA üzerinde yapılan kromozomal sapma ve mutasyon testlerinde herhangi bir anormallik gözlenmemiştir. Farelerde yapılan subakut ve subkronik toksisite testlerine göre diyetin% 20'sine kadar alluloz kullanımının herhangi bir olumsuz etki göstermediği tespit edilmiştir (Fahey, 2011). Son ürün olan allulozun üretiminde çok fazla işlem basamağı olduğu için ve sonuçta yüksek saflıkta bir ürün elde edildiği için herhangi bir toksik yan ürün oluşma ihtimalinin de olmadığı bildirilmiştir (Yingling, 2013). Bu özelliklerinden dolayı allulozun diyetetik ve düşük kalorili yiyecek ve içeceklerde katkı maddesi olarak kullanımının uygun ve güvenli olduğu bildirilmiştir (Fahey, 2011).

2.3.6. Allulozun Kullanım Alanları

Herhangi bir şeker ısıtıldığında allulozun da dahil olduğu birçok nadir şekere dönüşmektedir ve buna bağlı olarak her gün eser miktarda alluloz tüketimi gerçekleşmektedir. Yine de bu tüketilen miktar vücuda herhangi bir fayda sağlamak için yeterli değildir (Hashii et al., 2015).

Nadir şekerlerin en kolay kullanım şekli gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmasıdır. Nadir şekerler bütün gıdalarda rahatlıkla kullanılabilir ve gıdaya herhangi bir yabancı veya baskın bir tat vermez. Pasta kekine sakkaroz yerine alluloz ilave edildiğinde kekin daha yumuşak ve oksidasyona daha dayanıklı olduğu, ayrıca karışımda bulunan yumurtanın kokusunu da baskıladığı bildirilmiştir. Depolama stabilitesi yüksek olduğundan ve çoğu prosese uygun olduğundan birçok uygulama alanına sahiptir (Hashii et al., 2015).

Tatlandırıcı maddeler, duyuşsal olarak keyif veren gıda ve içeceklerin retilbilmesi için kullanılması Őart olan maddelerdir. Bunun yanında bazı tatlandırıcılar tatlılık verme eŐiŐinin altında kullanıldıŐı zaman aroma düzenleyici etki gösterir. Bu tatlandırıcılardan eritritoln %1'in altında kullanıldıŐı zaman aydaki ve üzüm suyundaki buruk tadı azalttıŐı bilinmektedir. Bunlardan bir diŐeri olan alluloz da aynı Şekilde tatlılık verme eŐiŐi olan %2.7'nin altındaki miktarlarda gıda bileşeni olarak kullanıldıŐında, katıldıŐı gıdanın aromasını düzenleyici ve iyileŐtirici etki göstermektedir (Smythe, Fletcher, & Kolberg, 2017). Hepatik lipojenik enzim aktivitesini baskıladıŐı ve enerji üretimine katkıda bulunmadıŐı için bu Şeker potansiyel düşük kalorili bir tatlandırıcı olarak nitelendirilmiŐtir (Lim et al., 2009; L. Zhang et al., 2009).

Alluloz aynı zamanda D-alloz ve D-altroz gibi Şekerlerin retiminde de çok önemlidir (Poonperm et al., 2007). Ayrıca, nadir Şeker içeren oligosakkaritler ve glikozidlerin fonksiyonlarını öğrenmek amacıyla, çeşitli disakkaritlerin hazırlanmasında da kullanılabilir (Li et al., 2013). Aynı zamanda, tarımda patojenik bakterilerin geliŐmesini engelleyici ve bu bakterilere karşı baŐıŐıklık sistemini güçlendirici olarak kullanılabilir. Bu sebeple, alluloz sadece bir gıda bileşeni olarak deŐil, gelecek yıllarda tarım kimyasalı olarak da kullanılma potansiyeline sahiptir (A. Yoshihara et al., 2017). Ayrıca alluloz modifiye yumurta beyazı proteiniyle birlikte kullanıldıŐında ısı etkisiyle jelleşme özelliklerini iyileŐtirdiŐi görülmüştür (Gullapalli et al., 2007).

Alluloz fermente gıdalarda da kullanılabilir. Alluloz laktik asit bakterilerinin fonksiyonlarını etkileyerek ürünün olgunluğunu artırırken asitliği azaltır. Alluloz aynı zamanda mayaların da fonksiyonunu etkiler ve fermente gıdalarda maya fonksiyonlarının daha etkili olmasını sağlar (Hashii et al., 2015).

Araştırmacılar gıdalardaki potansiyel uygulamaları araŐtırmaya devam ettikçe, allulozun diŐer önemli özelliklerini de keŐfetmeye baŐlamıŐlardır. allulozun soya sütü ile birlikte içilebilir yoğurda eklendiŐi bir deneyde yoğurdun daha katı olduğu, tadının daha yumuşak ve daha az ekŐi olduğu görülmüştür. Hastalığa karşı direnci artırması gibi başka yararlı etkileri vardır (Ushijima, 2014).

Allulozun toksik özelliği olmadığı ve fonksiyonel gıdalarda hacim artırıcı dolgu maddesi olarak kullanımının uygun olduğu bildirilmiştir (L. Zhang et al., 2009). Ayrıca alluloz içeren gıdaların yüksek antioksidan aktivite gsterdiŐi tespit edilmiştir. Yine sakkaroz yerine alluloz

kullanıldığında gıdanın renginde ve yapısında iyileşme olduğu gözlemlenmiştir (O'Charoen et al., 2014).

Yapılan bir çalışmada, yeni ve fonksiyonel bir tatlı üretmek için krem karamelle şeker olarak sakkaroz yerine alluloz ilave etmişler ve ürettikleri tatlının antioksidan aktivitesini demir indirgeyici antioksidan gücü, ABTS ve DPPH radikal süpürme kapasitesi gibi çeşitli metodlarla araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda, alluloz içeren ürünün etanolla hazırlanan ekstraktının sakkaroz ve fruktoz içeren çeşitlere göre kayda değer oranda antioksidan aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir (Sun, Hayakawa, Ogawa, & Izumori, 2007).



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Malzeme

Bu çalışmada genomik DNA kaynağı ve konak hücre olarak *Escherichia coli* JM109 (DSM 3423) kullanılmıştır (He et al., 2015). Bu mikroorganizma DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH isimli bir Alman mikroorganizma ve kültür koleksiyonu firmasından liyofilize olarak temin edilmiştir. Bu türden izole edilen genin daha çok sayıda ve daha hızlı çoğalmasını sağlamak amacıyla kullanılan plazmid (pUC18) Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü'nden temin edilmiştir. PCR aşamasında kullanılan primerler ise Sentromer DNA Teknolojileri (İstanbul) tarafından sentezlenmiştir. Alluloz üretiminde hammadde olarak kullanılacak kristal haldeki fruktoz Merck'ten temin edilmiştir. DNA izolasyonu ve diğer aşamalarda kullanılan hazır kitler ise Thermo Scientific'ten temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikrobiyolojik Analizler

Liyofilize olarak laboratuvara gelen *Escherichia coli* JM109 için Luria Bertani sıvı besiyeri (Acumedia LB Broth, Lennox) kullanılmıştır. Hazırlanan sıvı besiyerinde 37°C'de, aerobik ortamda, 24 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde geliştirilen koloniler santrifüjlenmiş ve dibe çöken kısım bir sonraki aşamada kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Genomik DNA İzolasyonu

Yeterli miktarda ve uygun besiyerinde geliştirilmiş olan bakterilerden DNA izolasyonu PCR temelli yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *Escherichia coli* JM109 için DNA izolasyonu ticari izolasyon kiti (ThermoFisher Scientific, GeneJET Genomic DNA Purification Kit) kullanılarak gerçekleştirilmiş (Şekil 6) ve Gram negatif bakteriler için DNA izolasyonu aşamaları kitte belirtildiği şekilde uygulanmıştır (K. Kim et al., 2006). İşlemler sonucu elde edilen DNA'dan bir miktar PCR tüplerine alınıp gerekli PCR karışımı oluşturularak, uygun sıcaklık ve sürede termal döngü cihazında bekletilmiş ve istenen gen bölgelerinin çoğalması sağlanmıştır (He et al., 2015).

DNA izolasyonu aşamaları ise aşağıdaki gibidir:

1. Her bir bakteri için 4 ya da 5 eppendorf tüpüne sıvı besiyerinde gelişmiş taze bakteri kültürlerinden 2'şer ml aktarılmış ve tüpler 5000 ρ 'de 10 dk santrifüjlenerek bakteri hücreleri tüpün alt kısmında toplanmıştır.
2. Süpernatant atılarak her bir tüpteki çökelti üzerine 180 μ l digestion buffer ilave edilmiştir.
3. Tüplere 20 μ l Proteinase K ilave edilerek homojen hale gelene kadar vortekslenmiştir.
4. İnkübasyon sonunda örnekler 10000 g 'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Karışım 56°C'ye ayarlanmış su banyosunda çalkalanarak 30 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
6. Karışım, üzerine 20 μ l RNase A ilave edilerek homojen hale gelene kadar vortekslenmiş ve 10 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
7. İnkübasyon sonunda tüplere 200 μ l lysis solution eklenmiş ve homojen hale gelene kadar 15 sn vortekslenmiştir.
8. Tüplere 400 μ l %50'lik etanol ilave edilip tekrar vortekslenmiştir.
9. Oluşan karışım kolonlu eppendorf tüplerine aktarılmış ve 6000 ρ 'de 1 dk santrifüjlenmiştir.
10. Santrifüj sonunda altta kalan tüp atılmış ve kolon kısmı yeni bir eppendorf tüpüne yerleştirilmiştir.
11. Kolona 500 μ l wash buffer 1 eklenmiş ve 8000 ρ 'de 1 dk santrifüjlenmiştir.
12. Santrifüjden sonra altta kalan kısım boşaltılmış ve kolona 500 μ l wash buffer 2 ilave edilerek 15000 ρ 'de 3 dk santrifüjlenmiştir.
13. Alttaki kısım döküldükten sonra tüpler boş olarak bir kez daha 15000 ρ 'de 1 dk santrifüjlenmiştir.
14. Santrifüj sonunda altta kalan tüp atılmış ve kolon kısmı yeni bir eppendorf tüpüne yerleştirilmiştir.
15. Kolonun tam ortasına 200 μ l elution buffer ilave edilmiş ve 2 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

16. İnkübasyon sonunda tüpler 8000 ρ 'de 1 dk santrifüjlenerek istenen saf DNA tüpün alt kısmında elde edilmiştir.

17. Elde edilen DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20°C 'de muhafaza edilmiştir.



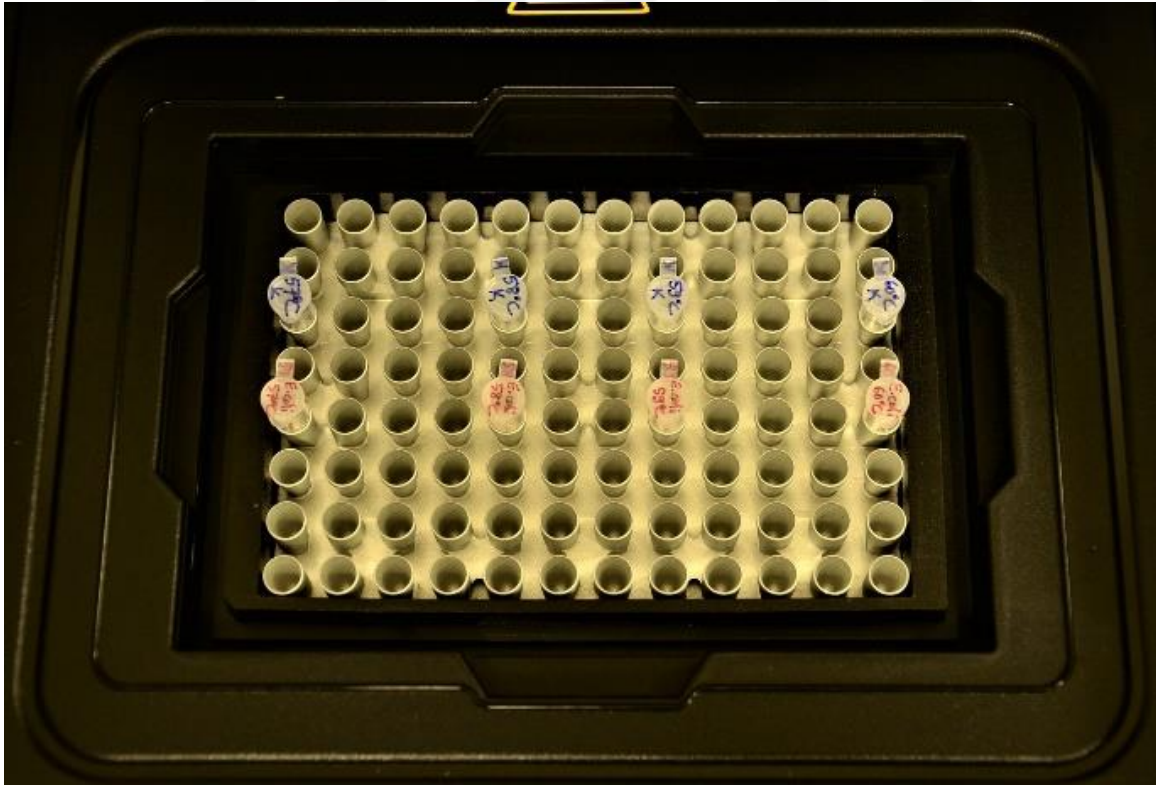
Şekil 6. Genomik DNA izolasyonu için kullanılan hazır kit

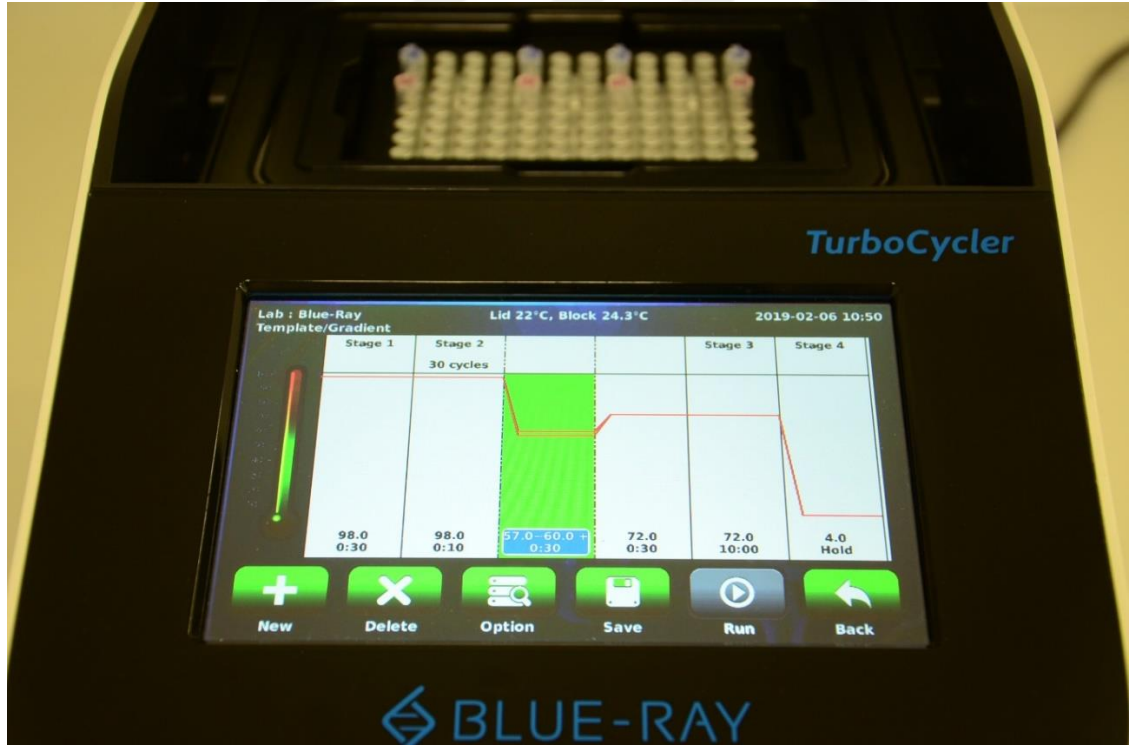
3.2.3. DNA'nın rep-PCR Tekniğiyle Amplifiye Edilmesi

E.coli JM109'dan elde edilen DNA'lar PCR ile çoğaltılmıştır. Bu işlem için hazır kit (Thermo-Phusion High-Fidelity PCR Kit) kullanılmıştır. PCR karışımı aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

- | | |
|--------------------------|--------------|
| - 5x Phusion HF buffer | 10 μ l |
| - 10mM dNTPs | 1 μ l |
| - Primer 1 (ECF) | 1 μ l |
| - Primer 2 (ECF) | 1 μ l |
| - Bakteri DNA'sı | 2 μ l |
| - Phusion DNA polymerase | 0.5 μ l |
| - Distile su | 34.5 μ l |

Primerlerin DNA zincirlerine en iyi bağlanma sıcaklıklarını tespit etmek amacıyla ilk aşamada dört farklı sıcaklık (57°C, 58°C, 59°C, 60°C) uygulanarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (şekil 7).



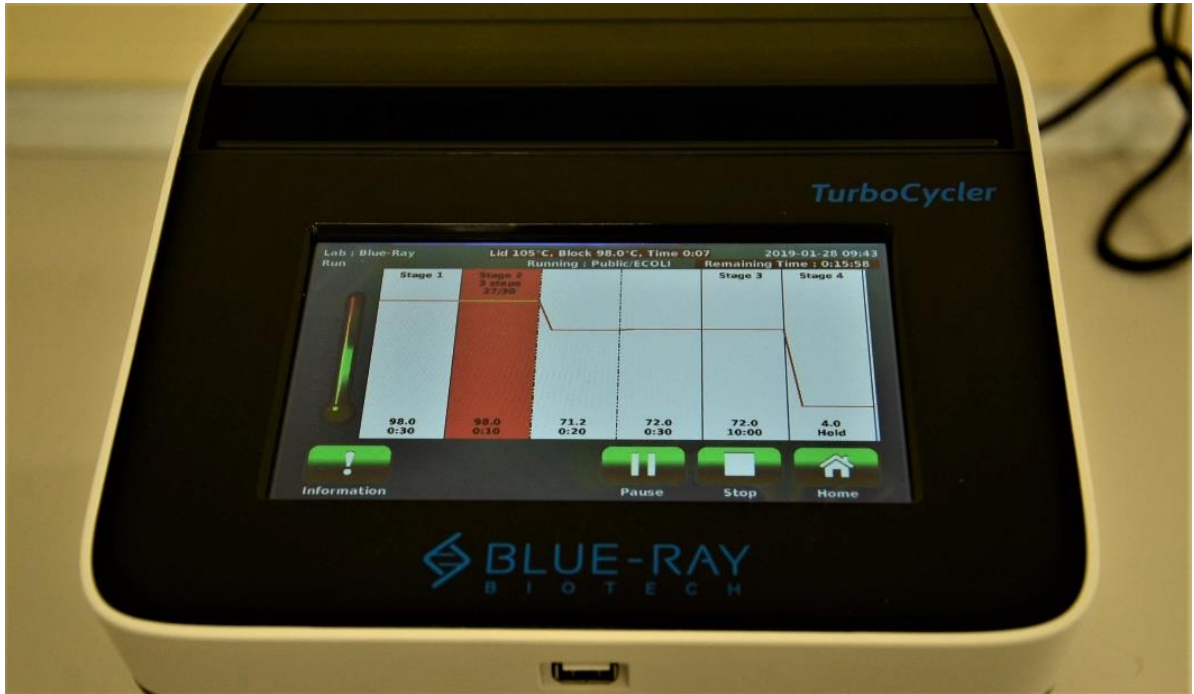


Şekil 7. PCR reaksiyonu ve kullanılan termal döngü cihazı

Bu aşamadan sonra bağlanma sıcaklığı 71.2°C'ye ayarlanıp ikinci bir PCR reaksiyonu daha gerçekleştirilmiştir.

Cihazda PCR şartları son aşamada şu şekilde ayarlanmıştır (Şekil 8):

- Başlangıç denatürasyonu 98°C'de 30 saniye
- Denatürasyon 98°C'de 10 saniye
- Bağlanma 71.2°C'de 20 saniye
- Uzama 72°C'de 30 saniye
- Son uzama 72°C'de 10 dakika



Şekil 8. Son PCR reaksiyonu ve kullanılan termal döngü cihazı

3.2.4. PCR Ürünü DNA'nın Elektroforezi

PCR sonucu çoğaltılan gen bölgelerinin doğru gen bölgesi olup olmadığını kontrol etmek amacıyla PCR ürünleri agaroz jel elektroforez sistemi ile ayrıldıktan sonra oluşan DNA bantlar jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenmiştir.

Bu işlem için önce %0.8'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Bir behere 0.24 g agaroz tartılmış ve üzerine 30 ml TBE Buffer 1X ilave edilmiştir. Bu karışım mikrodalga fırında orta ayarda 1-2 dakika bekletilmiş ve tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Mikrodalgadan çıkan sıcak karışımın

üzerine 3 µl GelRed jel görüntüleme boyası eklenmiştir. Daha sonra bu karışım hava kabarcığı olmayacak şekilde biraz karıştırıldıktan sonra elektroforez tankına dökülüp soğuması ve tamamen katılaşması beklenmiştir. Tamamen katılaştıktan sonra 6 tüpte elde edilen her bir PCR ürününden 8 µl alınıp üzerine 2 µl bromfenol blue-xylene cyanol yükleme boyası eklenmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra PCR ürünleri jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. 70 V'de 1 saat jelde yürütüldükten sonra oluşan bantlar jel görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

Görüntüleme işlemi için SYBR Green ve GelRed isimli iki farklı boya denenmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Jel görüntüleme için kullanılan boyalar

3.2.5. Plazmid DNA İzolasyonu

PCR ile çoğaltılan enzim geninin bağlanması için plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. Bunun için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır:

- 1- Önceden sıvı besiyerinde geliştirilmiş, plazmid içeren *E.coli* JM109 hücreleri iki deney tüpüne eşit miktarda bölünmüş ve 4900 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir.
- 2- Süpernatant atılmış ve çökelti üzerine 5 ml soğuk TNE buffer eklenmiştir. Daha sonra bu karışım homojen hale gelene kadar vortekslenmiştir.
- 3- Bu karışım 4950 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır.

- 4- Kalan çözelti üzerine 200 µl lizozim solüsyonu eklenmiş ve pipetle çekip bırakılarak iyice karıştırılmıştır.
- 5- 400 µl SDS ve hemen arkasından hızlıca 300 µl Na-asetat (pH 4.8) eklenmiş ve hafifçe karıştırılmıştır.
- 6- Karışım 15 dk buzda bekletilmiş ve 15 dk sonunda 2 tüpteki karışım 4 ayrı eppendorf tüpüne eşit şekilde paylaştırılmıştır.
- 7- Eppendorf tüpleri 15000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlenmiş ve santrifüj sonunda üstteki sıvı kısım yeni eppendorf tüplerine alınmıştır.
- 8- Tüplerin her birine içindeki sıvı miktarı kadar fenol kloroform eklenmiştir. Tüpler iyice karıştırılmış ve 15000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir.
- 9- Santrifüj sonunda tüplerdeki sıvı 2 faza ayrılmıştır. Üst fazda içinde plazmid olan kısım, alt fazda ise fenol kloroform ve istenmeyen kısımlar toplanmıştır.
- 10- Üst faz dikkatli bir şekilde alınıp yeni eppendorf tüplerine aktarılmış ve her birine 3'er µl RNase eklenmiştir. Daha sonra bu karışım hafifçe karıştırılmıştır.
- 11- Karışım 37°C'de 1 saat bekletilmiştir. 1 saatin sonunda üzerlerine 300 µl kloroform (kloroform:izoamil alkol, 24:1) eklenmiştir ve iyice karıştırılmıştır.
- 12- Karışım 15000rpm'de 5 dk santrifüjlenmiş ve santrifüj sonunda kloroform altta plazmid içeren kısım üstte kalmıştır.
- 13- Üst faz dikkatli bir şekilde alınıp yeni tüplere aktarılmış ve tüplerdeki her bir sıvı miktarının 2 katı kadar üzerlerine %96-100'lük soğuk etanol ilave edilmiştir.
- 14- Karışım vortekslenmiş ve -70°C'de 5 dk bekletilmiştir (-18°C'de 2 saat de bekletilebilir).
- 15- Dondurucudan çıkan tüpler 16000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir.
- 16- Santrifüj sonunda plazmid beyaz nokta halinde altta toplanmış ve süpernatant atılmıştır.
- 17- Tüplerin kuruması için 10-15 dk beklenmiş ve kuruduktan sonra tüplere 15'er µl TE buffer ilave edilmiştir.

Tüpler vortekslenmeden +4°C'ye koyulmuş ve 1 gün bekletilmiştir.

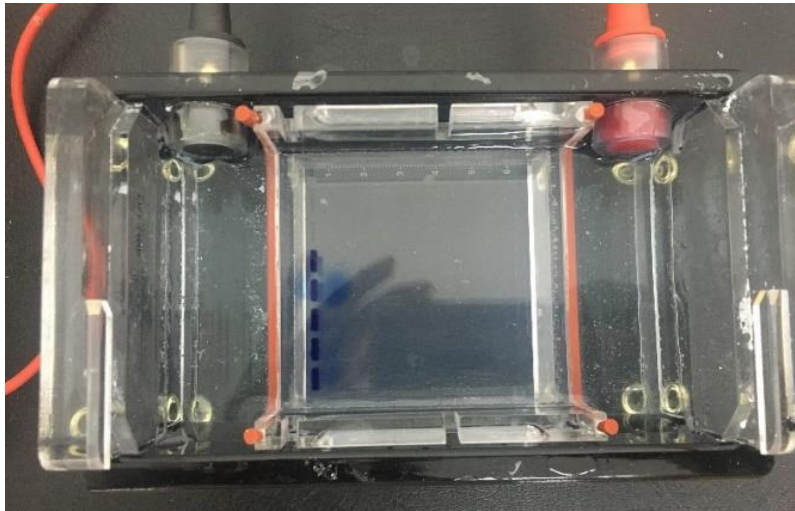
3.2.6. Plazmid DNA'nın Kesilmesi

Enzim genini plazmide yerleştirmek amacıyla, izole edilen plazmid DNA kesim enzimleriyle küt uç oluşturacak şekilde kesilmiştir. Bu işlem için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

- Plazmid DNA (1 μ l)
- Kesim enzimi (SmaI ve HincII) (1.5 μ l)
- Kesim enzimi buffer'ı (2 μ l)
- Distile su (15.5 μ l)

Bir nceki aşamada 4 ayrı tpde elde edilen plazmidler için ayrı ayrı kesim reaksiyonu oluşturulmuştur. 2 tpde SmaI, diğer 2 tpde HincII kullanılmıştır. Yukarıdaki karışım önce distile su, ikinci olarak plazmid DNA, daha sonra kesim enzimi buffer'ı ve en son kesim enzimi olacak şekilde eppendorf tüplerine sırasıyla koyulmuştur.

Karışım 37°C'de su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. 1 saatin sonunda 20 μ l örnek bulunan eppendorf tüplerine doğrudan 4 μ l boya ilave edilmiş ve bu karışım içerisinden 10 μ l alınarak agaroz jele yüklenmiştir. Aynı agaroz jele enzim genini içeren PCR ürünü 100 μ l örnek üzerine 20 μ l boya olacak şekilde 5-6 kuyucuğa bitene kadar paylaştırılarak yüklenmiştir (şekil 10).

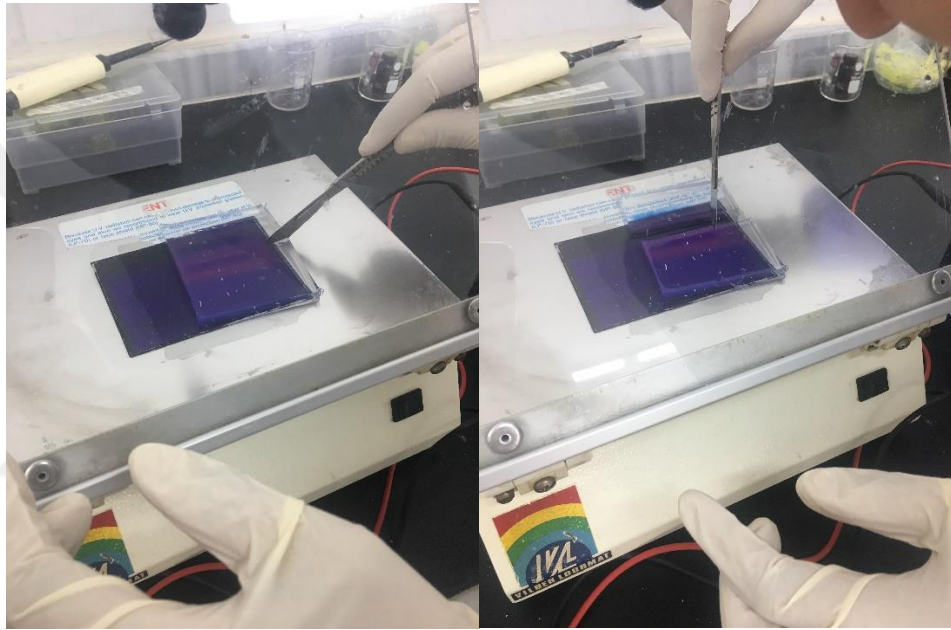


şekil 10. Kesimi yapılan plazmid DNA'nın agaroz jelde yürütülmesi

3.2.7. Agaroz Jelden DNA Saflaştırma

Bu işlem hazır kit (Thermo) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Santrifüjle ekstraksiyon aşamaları kitte belirtildiği gibi aşağıdaki işlem sırasına göre uygulanmıştır:

- 1- Jelde yürütülen pUC18 plazmid DNA'lar, aynı kesim enzimiyle kesilenler bir arada olacak şekilde jelden kesilip ayrılmış (Şekil 11) ve 2 eppendorf tüpüne alınmıştır. *E.coli* JM109 DNA'ları ise yine 2 eppendorf tüpüne paylaşılacak şekilde jelden kesilip alınmıştır.



Şekil 11. Plazmid DNA'nın jelden kesilip ayrılması

- 2- Her bir tüpteki jelin ağırlığı tartılarak tüpün üzerine yazılmıştır.
- 3- Tüplere içindeki jelin ağırlığı kadar Binding Buffer eklenmiştir.
- 4- Tüpler 50-55°C'de su banyosunda 10 dk bekletilmiştir.
- 5- Erimiş olan karışımlar kitin içinden çıkan saflaştırma kolonlarına aktarılmış ve 15000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiştir.
- 6- Santrifüj sonunda alttaki toplama tüpleri boşaltılıp tekrar kolona takılmıştır.
- 7- Kolonlara 700 µl Wash Buffer eklenmiş ve tekrar 15000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiştir.
- 8- Toplama tüpleri atılıp kolon kısmı 1.5 ml'lik kapaklı eppendorf tüplerine yerleştirilmiştir.
- 9- Kolonun tam ortasına gelecek şekilde 50 µl Elution Buffer eklenmiştir.

10- Tüpler oda sıcaklığında 1 dk bekletilmiş ve 15000 rpm’de 1 dk santrifüjlenmiştir.

11- Bu şekilde saflaştırılmış olan DNA’lar kullanılıncaya kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

İşlem sonunda enzim geni ve plazmid DNA saf bir şekilde elde edilmiştir.

3.2.8. Ligasyon

Kesilmiş olan plazmid ve PCR ürünü enzim geninin birleştirilmesi için aşağıdaki karışım verilen sıraya uyularak hazırlanmıştır.

- Distile su (13.1 µl)
- E.coli JM109 DNA (1.5 µl)
- pUC18 (HincII ile kesilmiş olan) (0.4 µl)
- PEG 4000 solution (2 µl)
- T4 DNA Ligase Buffer (2 µl)
- Enzim (T4 DNA Ligase) (1 µl)

Bunlardan pUC18 ve *E.coli* JM109 DNA’sı kullanılmadan önce çok hafifçe karıştırılmıştır. PEG 4000 solution ve T4 DNA Ligase Buffer ise vortekslenip iyice karıştırılmıştır. T4 DNA Ligase enzimi de hafifçe vortekslenmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. Ligasyon için kullanılan enzim ve solüsyonlar

Bu karışım çok hafif bir şekilde karıştırılmış ve 22°C’de 1 saat bekletilmiştir. 1 saatin sonunda ligasyon işlemi tamamlanmıştır, fakat plazmid ve enzim geninin daha sıkı birleşmesi için bu karışım kullanılmadan önce +4°C’de 1 gece bekletilmiştir.

3.2.9. Kompetent Bakteri Hazırlama ve Transformasyon

Ligasyon işleminden sonra elde edilen ürünün *E.coli* içerisine aktarılması için *E.coli* serbest DNA'yı içine alabilecek hale getirilmiş ve transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır. Bütün aşamalarda tüpler buz üzerinde tutulmuştur.

- 1- Önceden ekimi yapılmış ve çoğaltılmış olan *E.coli* JM109 bakterisinden 750 µl alınıp 75 ml’lik LB besiyerine aktarılmış ve 37°C’de 2 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 13).



Şekil 13. Yeterli düzeyde gelişen *E.coli* JM109 hücreleri

- 2- Yeterli gelişmenin olup olmadığını kontrol etmek amacıyla spektrofotometrede 500 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır (Uygun sonuç 0.4’tür) (Şekil 14). (Kör olarak otoklavlanmış LB sıvı besiyeri kullanılmıştır. Sonuç 0.4086 çıkmıştır.)

Simple Reads Report

Collection Time: 4/25/2019 1:54:57 PM
Method:
Version 5.0.0.999
Instrument: Cary 60

Ave Time (sec) 1.0000

Read	Abs	nm
Zero	(0.1880)	500.0
Zero	(0.1882)	500.0
1	0.4086	500.0

Şekil 14. Gelişen *E.coli* JM109 için 500 nm’de ölçülen spektrofotometre değeri

- 3- Gelişen bakteriler 10 ml’lik iki tüpe bölünmüş ve 4500 rpm’de 10 dk santrifüjlenmiştir.
- 4- Santrifüj sonunda süpernatant atılmış ve çökelti üzerine 4’er ml soğuk MgCl₂ (0.1 M) ilave edilmiştir. İyice vortekslenmiş ve homojen hale getirilmiştir.
- 5- Daha sonra bu karışım 4500 rpm’de 10 dk santrifüjlenmiştir.
- 6- Süpernatant atılmış ve her iki tüpe 4’er ml soğuk CaCl₂ (0.1 M) ilave edilmiştir. İyice vortekslenmiş ve homojen hale getirilmiştir.
- 7- Karışım 20 dk boyunca buzun üzerinde bekletilmiş ve daha sonra 4500 rpm’de 10 dk santrifüjlenmiştir.
- 8- Süpernatant atılmış ve çökelti üzerine 400 µl CaCl₂ (0.1 M) ilave edilmiştir. Burada CaCl₂ hacmi az olduğu için çeperele yapışma riskine karşı vortekslenmemiş, pipetle çekip bırakılarak hafifçe karıştırılmıştır. Böylece kompetent (serbest geni almaya hazır) bakteri elde edilmiştir.
- 9- Hazırlanan kompetent bakteri eppendorf tüplerine 200’er µl olacak şekilde paylaştırılmıştır.
- 10- Bakteri farklı 3 eppendorf tüpüne paylaştırılmış ve üzerlerine aşağıdaki gibi isimleri yazılmıştır.
 - pUC18 kontrol:** 200 µl bakteri üzerine kesilmemiş pUC18 plazmidinden 3 µl eklenmiştir.
 - pUC18/HincII+DTE:** 200 µl bakteri üzerine bir önceki aşamada ligasyon yapılmış olan karışımdan 7 µl eklenmiştir.
 - Kontrol:** 200 µl bakteri üzerine hiçbir şey ilave edilmemiştir.

- 11- Bu 3 tüp elde hafifçe karıştırılmış ve 20 dk buz üzerinde bekletilmiştir.
- 12- 20 dk sonunda hemen 42°C'ye ayarlanmış su banyosuna alınmış ve 90 saniye su banyosunda bekletilmiştir.
- 13- 90 saniye sonra tekrar hemen buz üzerine alınıp 3-4 dk bekletilmiştir. Bu şekilde ani sıcaklık değişimleriyle kompetent bakterinin plazmidi hücre içerisine alması sağlanmıştır.
- 14- Önceden otoklavlanmış 3 adet 25 ml'lik boş erlenin içerisine 1 ml LB sıvı besiyeri ilave edilmiştir.
- 15- Buzun üzerinde 3-4 dk bekleyen eppendorf tüpleri bu süre sonunda besiyeri ilave edilmiş erlenlere aktarılmış ve 37 °C'de 1 saat bekletilmiştir.
- 16- 1 saat sonunda her bir erlenden 100'er µl gelişmiş koloni alınarak kontrol amaçlı hem antibiyotikli hem de antibiyotiksiz petrilere aktarılmıştır.
- Bu aşamada antibiyotikli LB agar hazırlamak için Ampicillin (50 µg/ml) ve Xgal (20 µg/ml) saf suyla hazırlanmış stok solüsyonları kullanılmıştır. 200 ml hacminde hazırlanıp otoklavlanan LB agar besiyeri sterilizasyon sonunda otoklavdan çıkartılıp biraz soğutulduktan sonra içerisine 200 µl ampicillin ve 400 µl Xgal ilave edilmiştir. Besiyeri petrilere dökülmüş ve katılaşması beklenmiştir.
- 17- Antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerine ekimi yapılan gelişmiş koloniler petrilere yayılmış ve 37 °C'de 1 gün bekletilmiştir.
- 18- 1 gün sonunda antibiyotikli besiyerine ekilen pUC18/HincII+DTE enzim genini içeren kolonilerin gelişimi incelenmiştir. Petride mavi ve beyaz koloni gelişimi gözlenmiştir. Bu kolonilerden mavi olanların enzim genini içine almamış pUC18/HincII olduğu, beyaz kolonilerinse pUC18/HincII+DTE enzim genini içeren koloniler olduğu tespit edilmiştir.
- 19- DTE enzim genini içeren koloniler ikinci kez petride saf bir şekilde geliştirildikten sonra daha çok miktarda hücre elde etmek amacıyla 2000 ml LB sıvı besiyerine ekim yapılmış ve 1 gün boyunca 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 160 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.10. D-tagatoz 3-epimeraz Enziminin Saflaştırılması

LB sıvı besiyerine ekim yapılan DTE enzim genini içeren kolonilerin gelişimini gözlemlemek amacıyla saatte bir spektrofotometre cihazında 600 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. OD600 değeri 0.6-0.8 değerlerine geldiğinde, enzim üretimini hızlandırmak amacıyla 2000 ml

besiyerine 0.1 mM olacak şekilde IPTG ilave edilmiştir. IPTG ilave edildikten sonra besiyeri 18°C'ye alınmış ve 1 gece boyunca 18°C'de 150 rpm'de gelişmeye bırakılmıştır.

Gelişim tamamlandıktan sonra, enzimin hücreden ayrılıp saflaştırılması için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır:

- 1- Gelişen koloniler 8000 rpm'de 4°C'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve süpernatant atılarak çökelti bir falcon tüpünde toplanmıştır.
- 2- Çökelti iki kez %0.85'lik NaCl ile yıkanmıştır.
- 3- NaCl ile yıkanmış çökelti 20 ml bağlayıcı tampon (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 7.4) içerisinde çözündürülmüştür.
- 4- Daha sonra enzimatik lizis işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla son konsantrasyonda 0.2 mg/ml lizozim, 20 µg/ml DNase I, 1 mM MgCl₂, 10 µl/ml Protease Inhibitor Coctail olacak şekilde bu maddeler ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 30 dk karıştırılmıştır.
- 5- Karışım 4°C'de 15 dk süreyle sonikasyona tabi tutulmuş ve sonikasyondan sonra karışımın pH'sı 7.4'e ayarlanmıştır.
- 6- pH'sı ayarlanan çözelti 13000 ρ'de 4°C'de 30 dk santrifüjlenmiştir.
- 7- Süpernatant His GraviTrap HP affinity chromatography column (Ni Sepharose 6 Fast Flow) ile saflaştırılmıştır.
- 8- Saflaştırma işlemi için His GraviTrap HP affinity chromatography kolonunun alt ucu kesilmiş ve içerisindeki sıvı üst taraftan boşaltılmıştır.
- 9- Kolon workmate üzerine yerleştirilip kolondan 10 ml bağlayıcı tampon (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 7.4) geçirilmiştir.
- 10- Bu işlemden sonra süpernatant kolondan geçirilmiş ve takiben kolon 10 ml bağlayıcı tampon ile yıkanmıştır.
- 11- Bağlayıcı tampon kolondan tamamen geçtikten sonra 3 ml elüsyon tamponu (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 7.4) geçirilmiş ve elüsyon toplanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

D-Tagatoz 3-Epimeraz enzimi kullanılarak fruktozdan alluloz üretimi amacıyla yapılan çalışmada elde edilen bulgular bu kısımda incelenmiştir.

4.1. DNA'nın rep-PCR Tekniği İle Amplifiye Edilmesi

Primerlerin DNA zincirlerine en iyi bağlanma sıcaklıklarını tespit etmek amacıyla denenmiş olan dört farklı sıcaklık (57°C, 58°C, 59°C, 60°C) değerinden hiç birinde primerlerin çok iyi bağlanamadığı tespit edilmiştir.

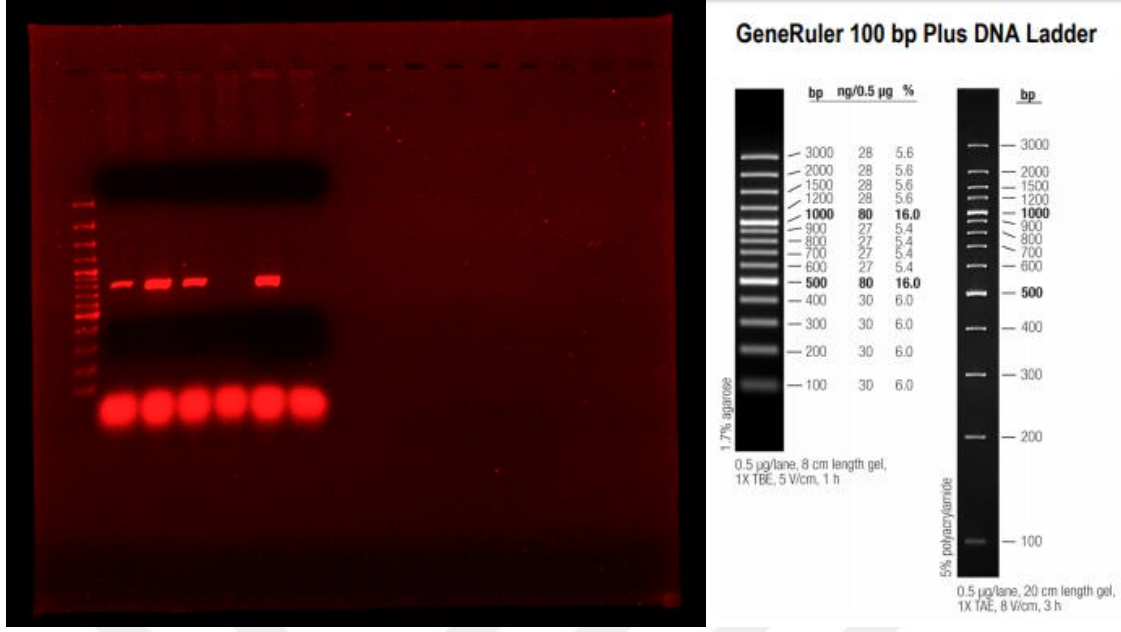
71.2°C bağlanma sıcaklığı kullanılarak gerçekleştirilen ikinci reaksiyonda ise PCR sonucunda *E.coli* JM109'daki D-tagatose 3-epimerase enzim genini içeren bölgenin başarılı bir şekilde çoğaltıldığı tespit edilmiştir.

4.2. PCR Ürünü DNA'nın Elektroforezi

SYBR Green isimli görüntüleme boyası ile hazırlanmış olan %0.8'lik agaroz jel üzerinde yürütülen PCR ürününden elektroforez sonunda herhangi bir jel görüntüsü alınamamış, daha sonra denenmiş olan GelRed görüntüleme boyası ile hazırlanmış olan %0.8'lik agaroz jelden istenen görüntü elde edilmiştir.

Jel görüntüleme sonucu 6 tüpten dördünde PCR ürünü olduğu tespit edilmiş ve bu bantların *E.coli* JM109'a ait D-tagatose 3-epimerase gen bölgesi olup olmadığını kontrol etmek amacıyla, kullanılan marker'ın molekül ağırlık skalasına bakılarak bantların molekül ağırlıkları tespit edilmiştir (Şekil 15).

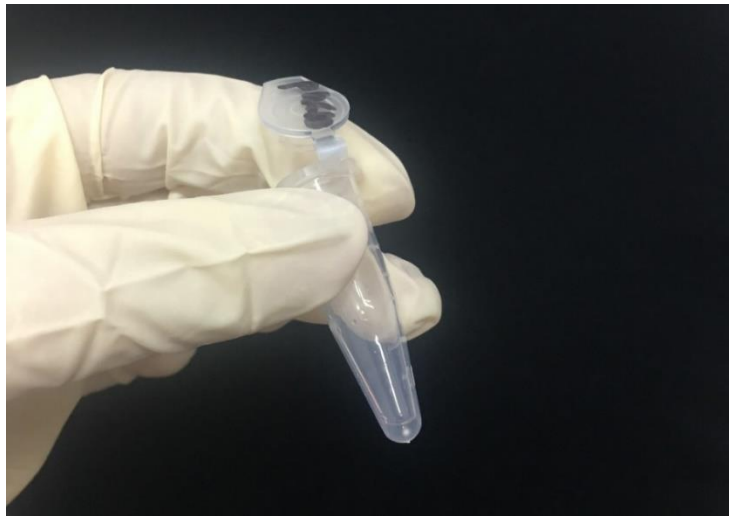
D-tagatose 3-epimerase enzim geninin molekül ağırlığının 789 bp olduğu bilindiğinden (He et al., 2015) ve kullanılan marker'la karşılaştırıldığında genin bulunduğu bantta 800 bp'ye yakın bir değer okunduğundan çoğaltılan gen bölgesinin DTE enzimine ait olduğu kesinleştirilmiştir.



Şekil 15. DTE enzim geninin agaroz jel görüntüsü ve kullanılan marker

4.3. Plazmid DNA İzolasyonu

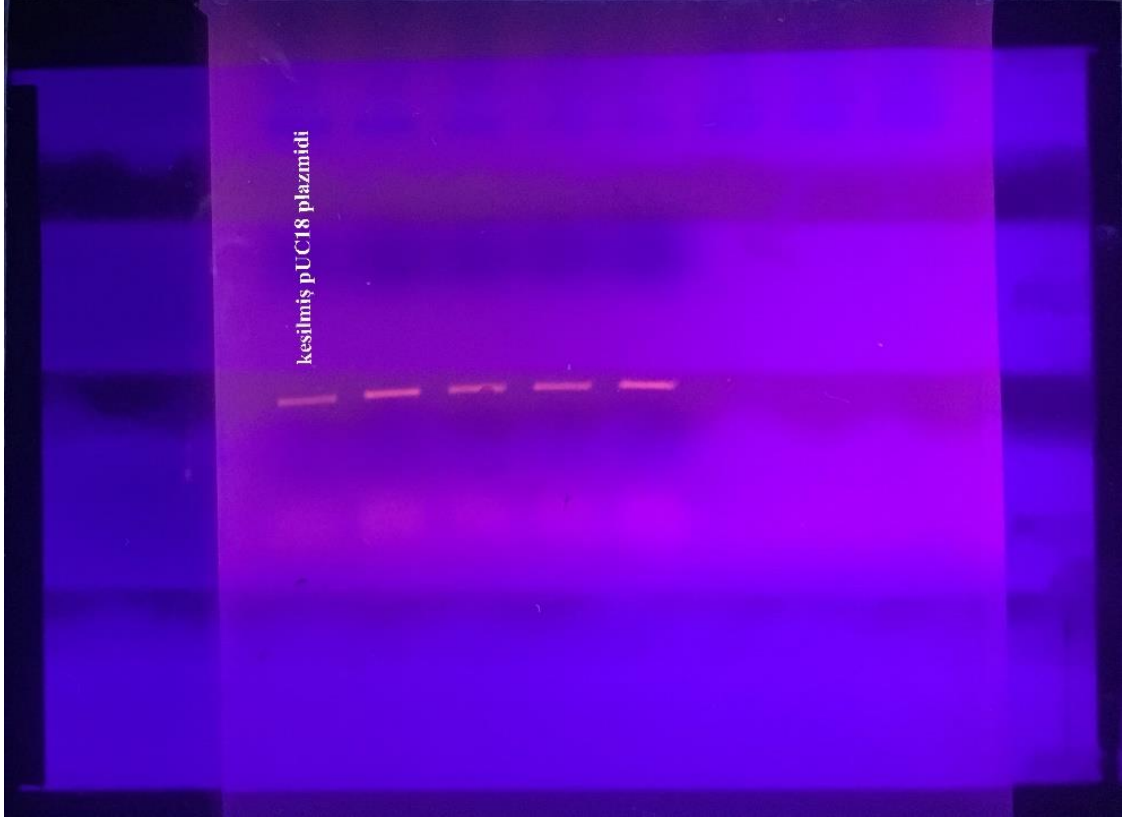
Plazmid DNA izolasyonu için gerekli işlemler tamamlandıktan sonra, plazmid eppendorf tüpünün alt kısmında beyaz bir nokta şeklinde toplanmıştır (Şekil 16). Süpernatant atılıp tüpler kuruduktan sonra tüplere 15'er µl TE buffer ilave edilmiştir. Tüpler vortekslenmeden +4°C'ye koyulmuş ve 1 gün bekletilmiştir. 1 gün sonunda +4°C'den çıkarılan tüpler vortekslenmiş ve plazmid bir sonraki aşama olan kesme işlemi için hazır hale getirilmiştir.



Şekil 16. Elde edilen plazmid DNA

4.4. Plazmid DNA'nın Kesilmesi

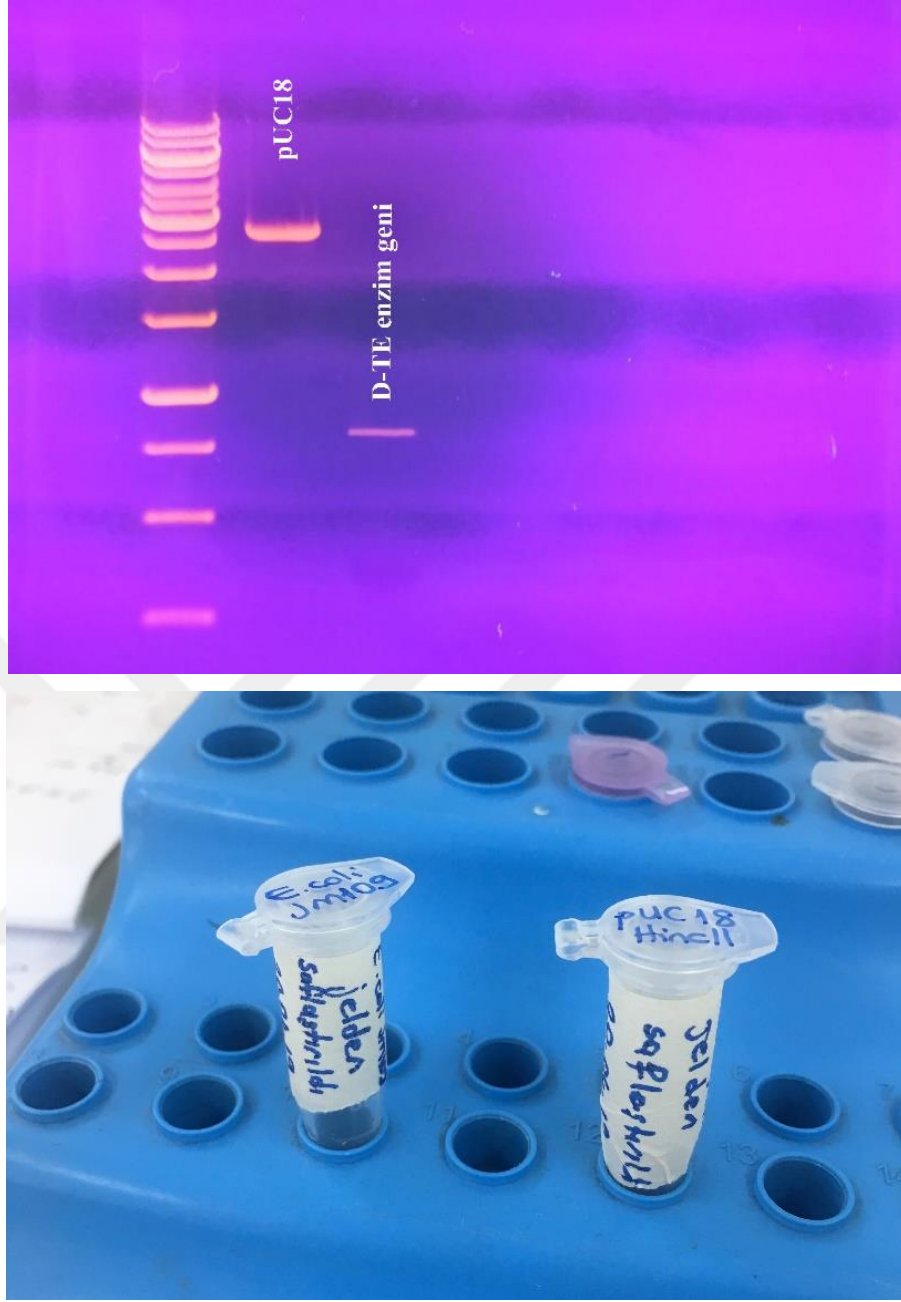
Plazmid DNA'nın kesilmesi için gerekli işlemler tamamlandıktan sonra, kesilmiş olan plazmid DNA'lar agaroz jelde 70 V'de 1 saat yürütülmüş ve jel görüntüleme cihazında görüntülenmiştir (Şekil 17).



Şekil 17. Kesilmiş plazmidin jel görüntüsü

4.5. Agaroz Jelden DNA Saflaştırma

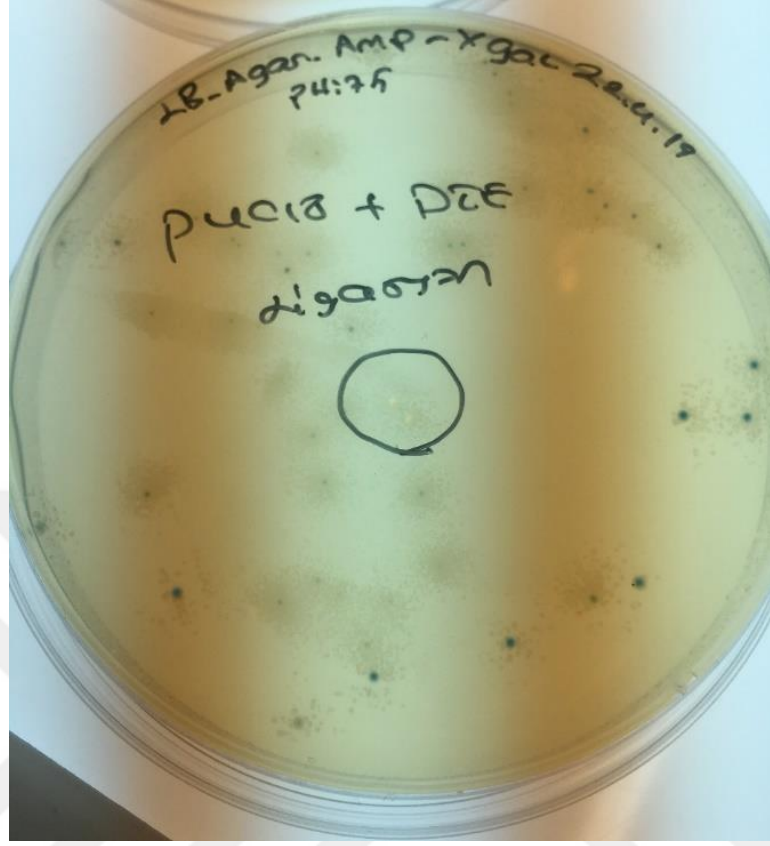
Önceki aşamalarda agaroz jelde yürütülen kesilmiş plazmid DNA ve DTE enzim geni aynı jel üzerinde yürütülmüş ve tek bant olacak şekilde görüntü vermelerinden yola çıkılarak tamamen saflaştırıldığına karar verilmiştir. Jelden ayrılıp saflaştırılan pUC18 ve DTE enzim geni ayrı ayrı eppendorf tüplerine alınmıştır (Şekil 18).



Şekil 18. Jelden saflaştırılan DTE enzim geni ve plazmid DNA'sı

4.6. Kompetent Bakteri Hazırlama ve Transformasyon

Ligasyon işlemi sonunda *E.coli* hücrelerine aktarılan ve antibiyotik içeren LB agar besiyerine ekilen pUC18/HincII+DTE enzim genini içeren kolonilerin gelişimi incelenmiştir. Petride mavi ve beyaz koloni gelişimi gözlenmiştir. Bu kolonilerden mavi olanların enzim genini içine almamış pUC18/HincII olduğu, beyaz kolonilerinse pUC18/HincII+DTE enzim genini içeren koloniler olduğu tespit edilmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. Plazmide birleştirilmiş DTE enzim genini içeren koloniler

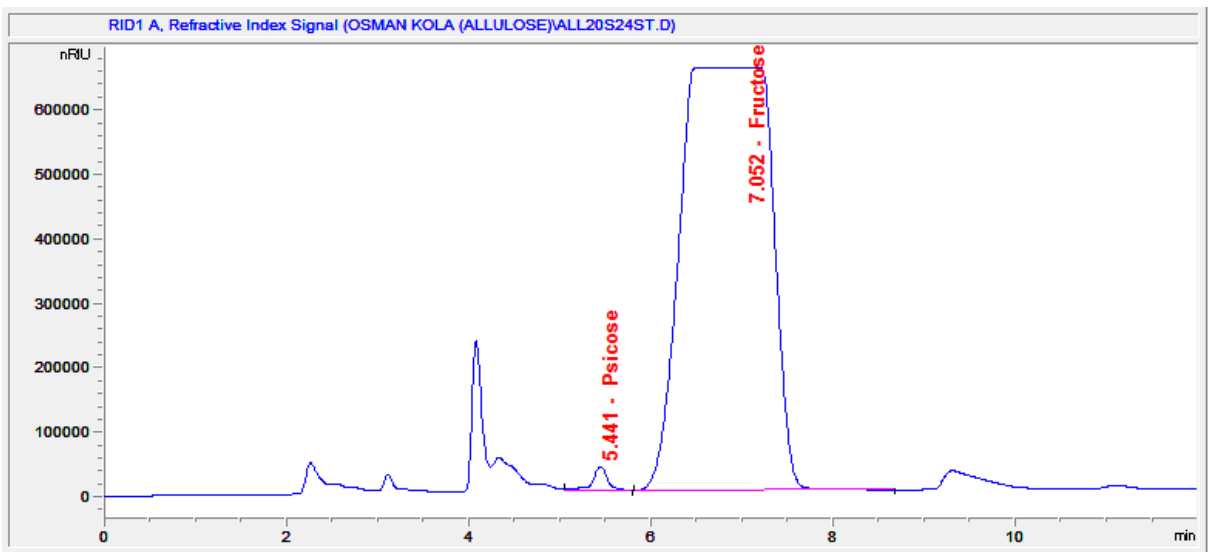
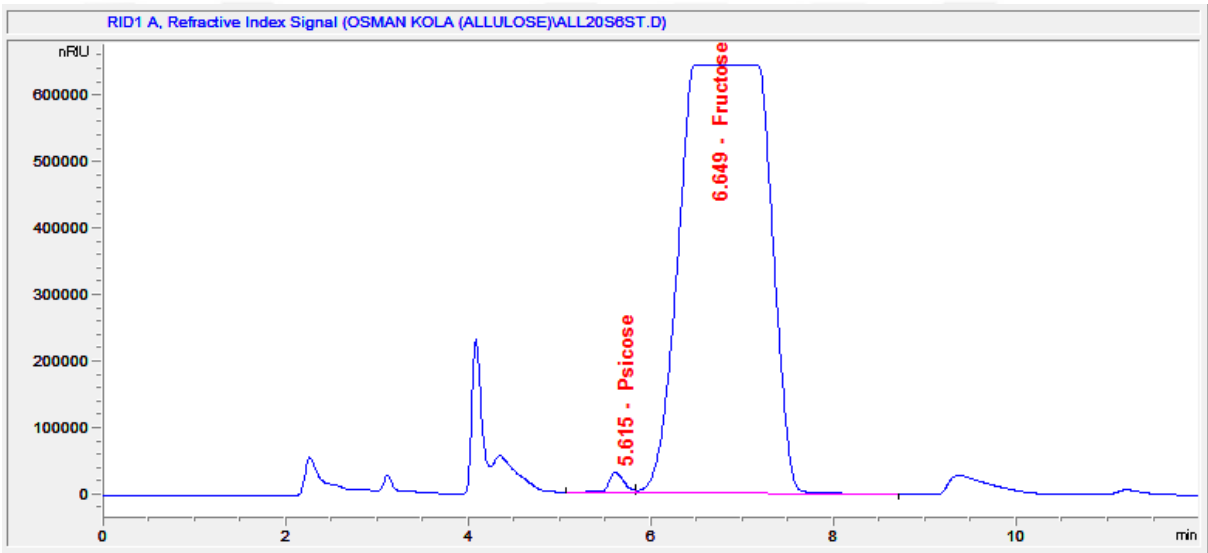
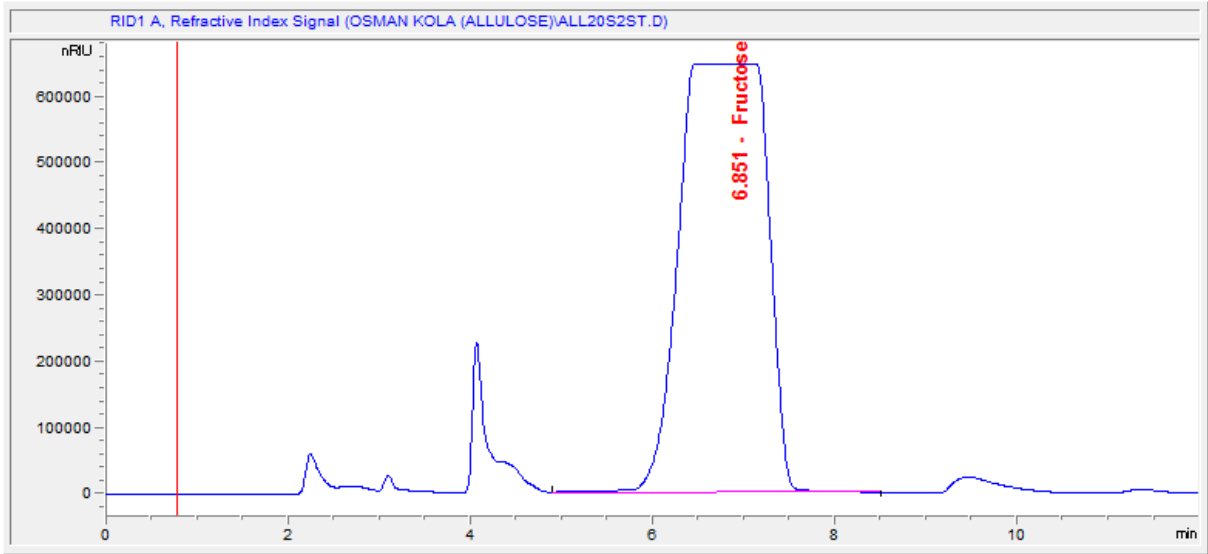
Petriden birkaç beyaz koloni dikkatli bir şekilde metal öze yardımıyla steril şartlarda alınmış ve yeni bir antibiyotikli LB agara ekim yapılmıştır. Petriler 1 gün boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda istenen beyaz koloniler biraz daha çoğaltılmış ve gelişmiş olarak elde edilmiştir (Şekil 20).

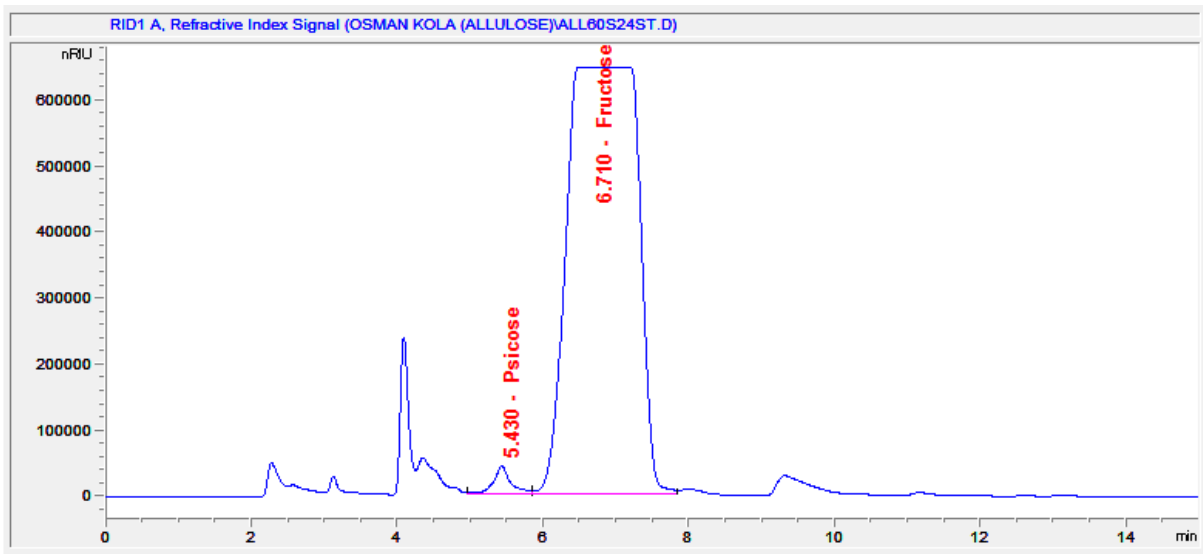
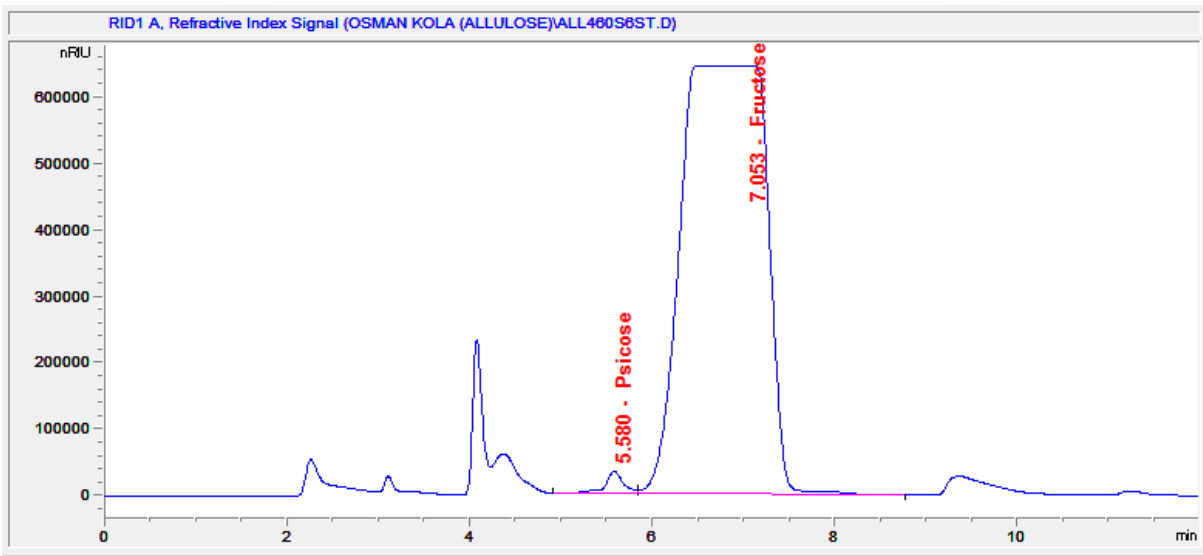
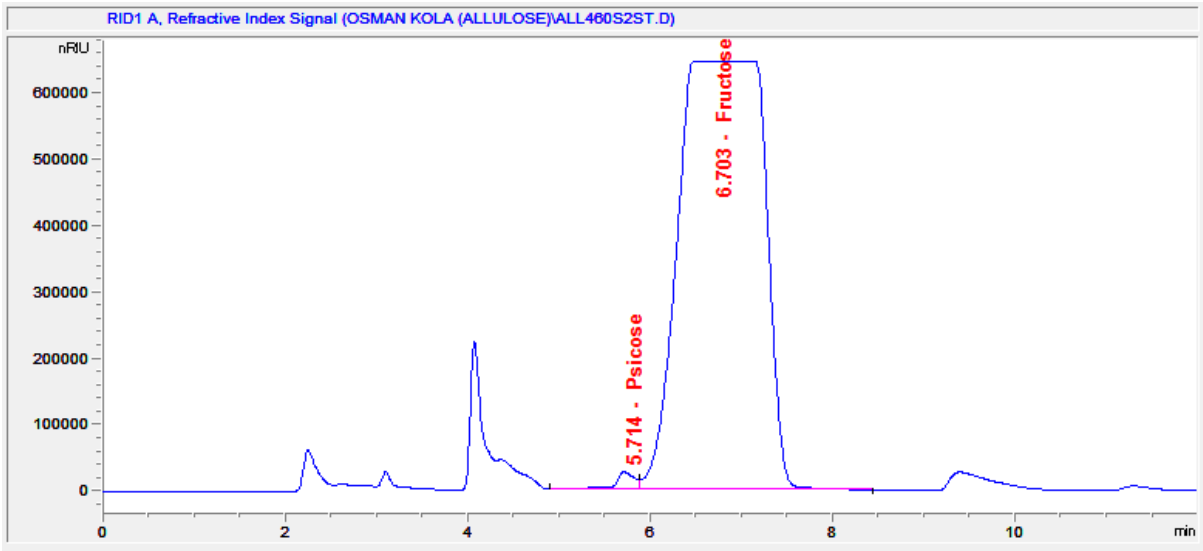


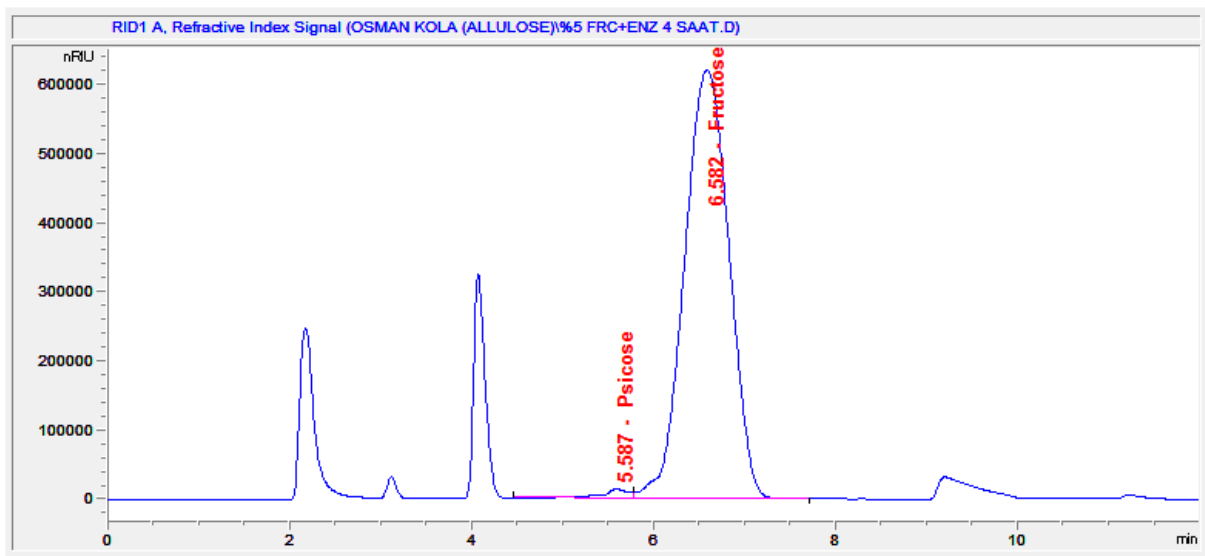
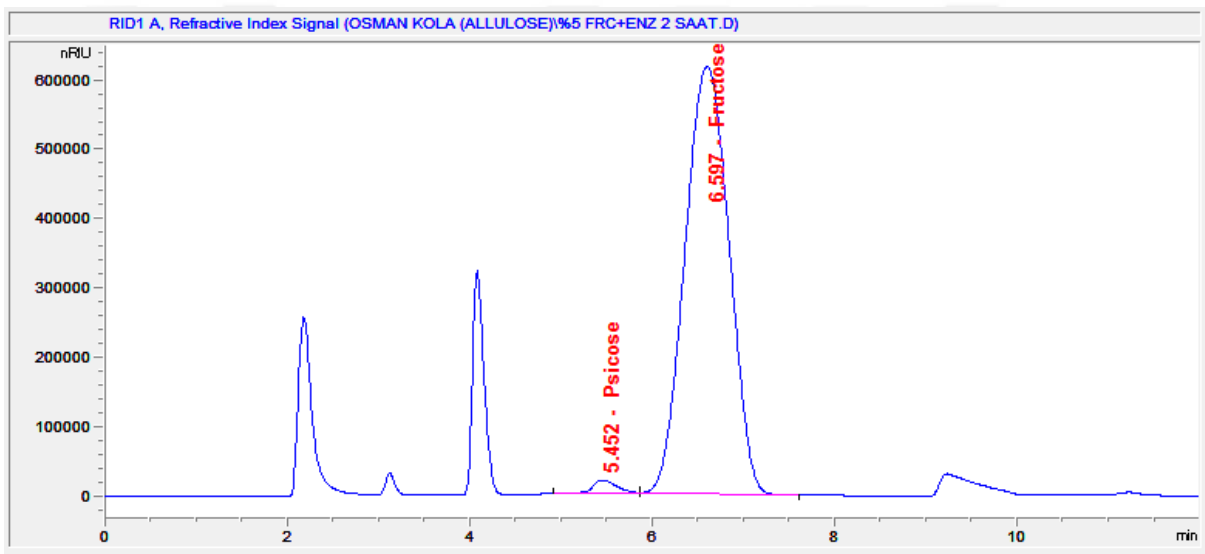
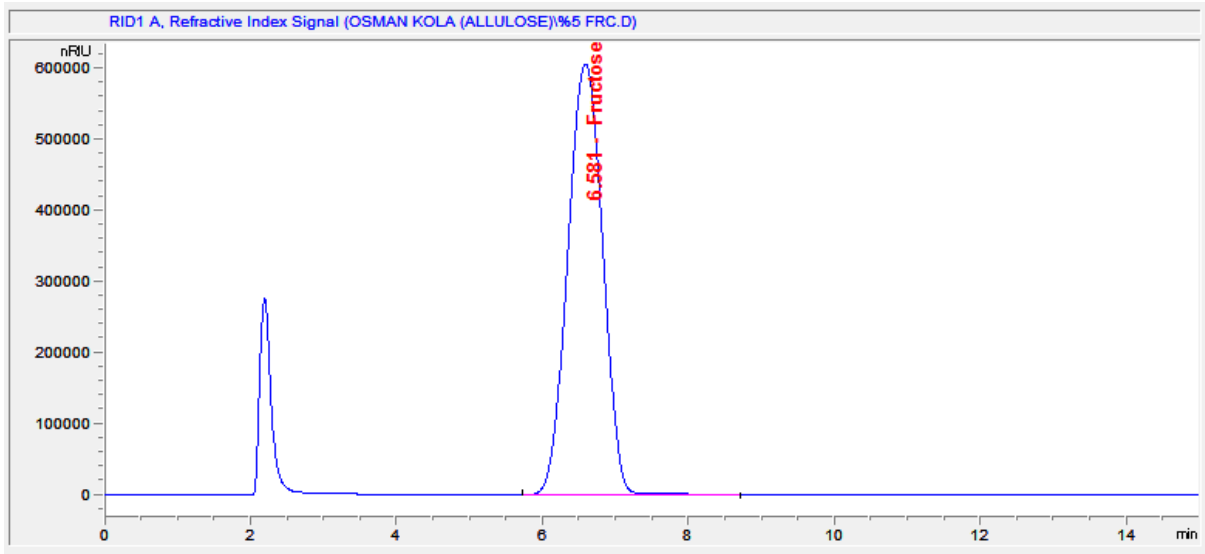
Şekil 20. Aranan kolonilerin besiyerinde çoğaltılması

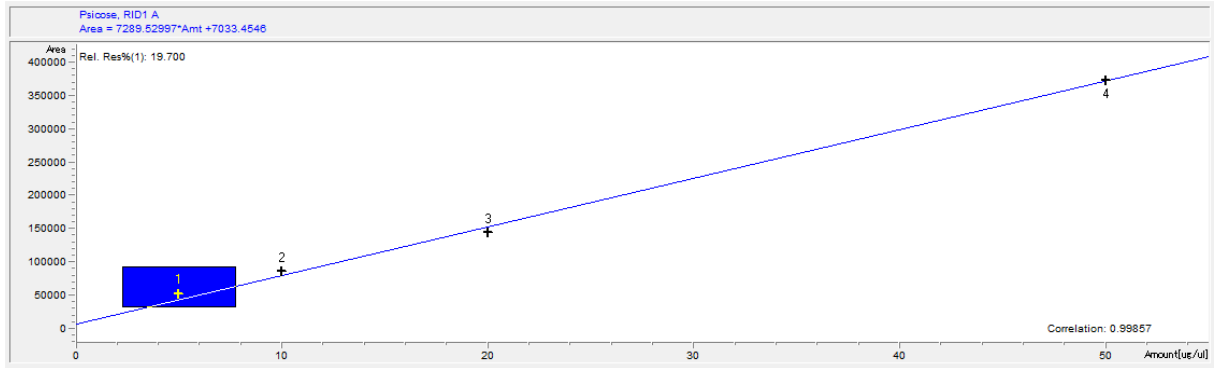
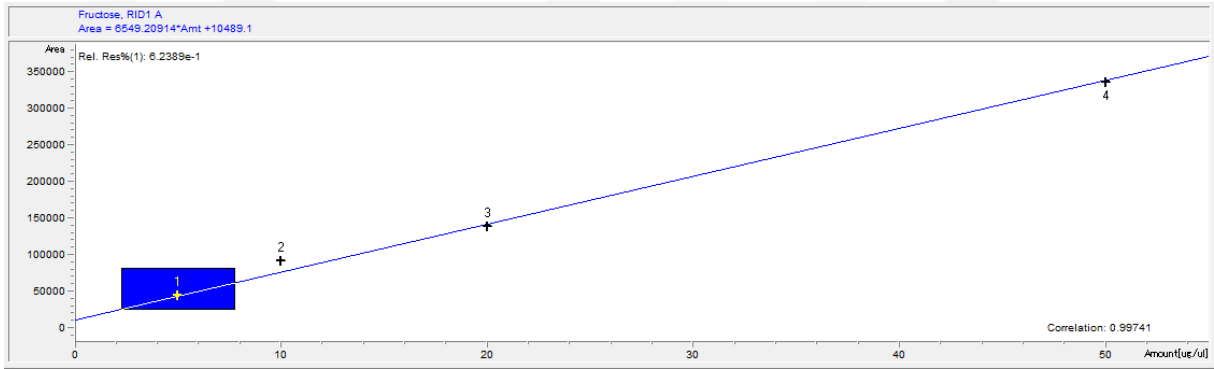
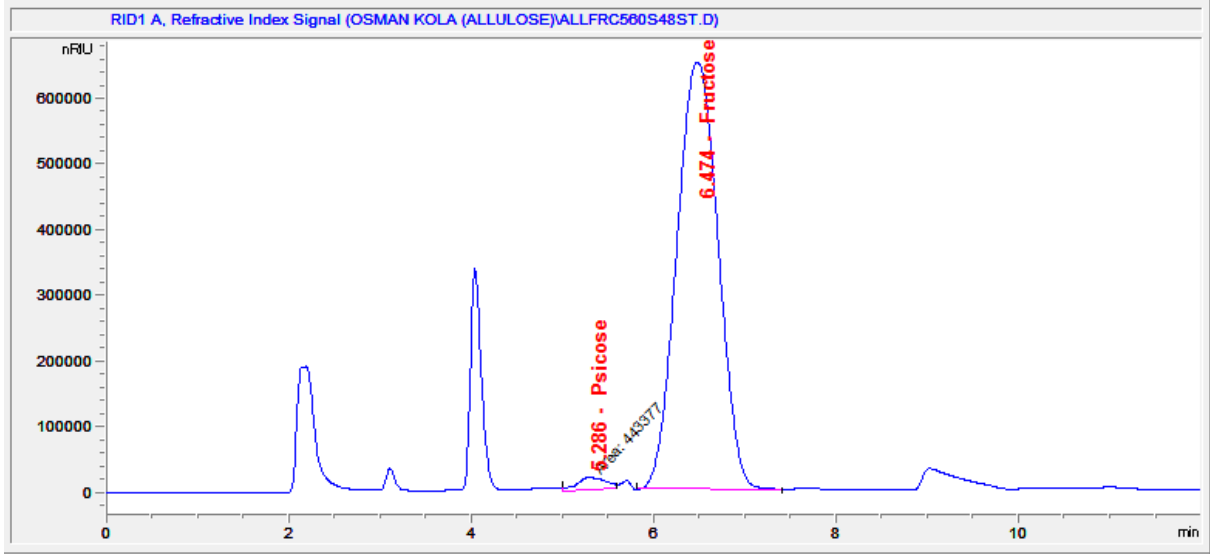
4.7. Fruktozun Alluloza Dönüşümü

Enzim saflaştırma işlemi sonucu elde edilen saf enzim %50'lik fruktoz çözeltisi üzerine belirli bir konsantrasyonda eklenip 10 ml'lik tüplerde 20°C, 40°C, 60°C, 70°C ve 80°C'de bekletilmiştir. Bu karışımların her birinden sekizinci saate kadar her 2 saatte bir 1'er ml örnek alınarak HPLC cihazına verilmiş ve analiz yapılmıştır. Sekizinci saatten sonra örneklerin 24 saati tamamlaması beklenmiş ve 24 saat sonunda yine her bir sıcaklıkta tutulan enzim/fruktoz karışımından 1'er ml örnek alınarak HPLC ile analiz edilmiştir. Sıcaklık ve süreye bağlı olarak fruktozun alluloza dönüşüm oranları aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 21).









Şekil 21. Fruktozun alluloza dönüşümüne ait kromatogramlar

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

D-Tagatoz 3-Epimeraz enzimi üretimi ve fruktozun bu enzim aracılığıyla alluloza dönüşümünün gerçekleştirildiği bu çalışmada elde edilen bulgulara bakıldığında;

- Üretilen enzim %50'lik fruktoz çözeltisine ilave edilmiş ve 20°C, 40°C, 60°C, 70°C ve 80°C olmak üzere 5 farklı sıcaklık değerinde denenmiştir. DTE enziminin 20°C'de 2 saat sonunda hiçbir etki göstermediği ve fruktozu herhangi bir oranda alluloza dönüştüremediği görülmüştür. 20°C'de 6 saat sonra fruktozun alluloza dönüşmeye başladığı ve 24 saat sonunda daha büyük ve belirgin bir alluloz piki olduğu tespit edilmiştir.
- Enzim 60°C'de 2. saatin sonunda fruktozu alluloza dönüştürmeye başlamış, 6 saat sonunda ise daha belirgin bir alluloz piki elde edilmiştir. Bu sıcaklıkta 24 saat sonunda alluloz pikinin alanı biraz daha büyümüş ve fruktozdan tamamen ayrılmıştır. Enzim 48 saate kadar bekletilmiş ve 48 saat sonunda allulozun alanının biraz daha büyüdüğü tespit edilmiştir.
- Enzim daha düşük konsantrasyondaki (%5) fruktoz çözeltisi üzerinde de denenmiş ve 60°C'de 2 saat sonunda net bir alluloz piki oluşmuştur.
- Çalışma pH 7.5 ortamda gerçekleştirilmiştir ve bu değerde istenen sonuca ulaşılmıştır.

Elde edilen bu bulgular ışığında;

- Enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık ve pH değerinin daha hassas tespit edilebilmesi amacıyla birkaç farklı sıcaklık ve pH değeri daha denenebilir.
- Enzimin hangi fruktoz konsantrasyonunda daha etkin olduğunu belirleyebilmek amacıyla birkaç farklı konsantrasyonda daha fruktoz çözeltisi hazırlanarak enzim ilave edilebilir.

KAYNAKLAR

- Ajmone Marsan, P., Cocconcelli, P. S., Masoero, F., Miggiano, G., Morelli, L., Moro, D., ... Trevisi, E. (2014). Food for Healthy Living and Active Ageing. *Studies in Health Technology and Informatics*, 203, 32–43. doi:10.3233/978-1-61499-425-1-32
- Al-Baarri, A. N., Legowo, A. M., Pramono, Y. B., Sari, D. I., & Pangestika, W. (2018). *Glucose and D-Allulose contained medium to support the growth of lactic acid bacteria*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. doi:10.1088/1755-1315/102/1/012058
- Allard, S. T. M., Giraud, M.-F., & Naismith, J. H. (2001). Epimerases: structure, function and mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 58(11), 1650–1665. doi:10.1007/PL00000803
- Batt, C., Fanning, N., Drake, J., Frampton, C., Gearry, R. B., & Stamp, L. K. (2017). Fructose malabsorption in people with and without gout: A case–control study. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 47(2), 257–263. doi:10.1016/j.semarthrit.2017.03.018
- Beerens, K., Desmet, T., & Soetaert, W. (2012). Enzymes for the biocatalytic production of rare sugars. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(6), 823–834. doi:10.1007/s10295-012-1089-x
- Bilik, V., & Tihlárík, K. (1973). Reactions of saccharides catalyzed by molybdate ions. IX.* Epimerization of ketohexoses. *Chemicke Zvesti*, 28(1), 106–109.
- Chan, H. C., Zhu, Y., Hu, Y., Ko, T. P., Huang, C. H., Ren, F., ... Sun, Y. (2012). Crystal structures of d-psicose 3-epimerase from *Clostridium cellulolyticum* H10 and its complex with ketohexose sugars. *Protein and Cell*. doi:10.1007/s13238-012-2026-5
- Doner, L. W. (1979). Isomerization of d-fructose by base: Liquid-chromatographic evaluation and the isolation of d-psicose. *Carbohydrate Research*. doi:10.1016/S0008-6215(00)87101-3
- Edwards, C. H., Rossi, M., Corpe, C. P., Butterworth, P. J., & Ellis, P. R. (2016). The role of sugars and sweeteners in food, diet and health: Alternatives for the future. *Trends in Food Science and Technology*, 56, 158–166. doi:10.1016/j.tifs.2016.07.008
- Fahey, G. (2011). *GRAS Notice 000400: D-psicose*.
- FDA. (2016). *GRAS Notice (GRN) No. 647*. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.01.020>
- 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. doi:10.1016/j.anpede.2015.10.002

- Gullapalli, P., Takata, G., Poonperm, W., Rao, D., Morimoto, K., Akimitsu, K., ... Izumori, K. (2007). Bioproduction of D-Psicose from Allitol with *Enterobacter aerogenes* IK7: A New Frontier in Rare Ketose Production. *Biosci.*, *71*(12), 3048–3054. doi:10.1271/bbb.70450
- Hadipernata, M., & Ogawa, M. (2016). Mass Transfer and Diffusion Coefficient of D-Allulose during Osmotic Dehydration. *Journal of Applied Food Technology*, *3*(2), 6–10. doi:10.17728/jaft.1
- Han, Y., Kwon, E.-Y., Yu, M., Lee, S., Kim, H.-J., Kim, S.-B., ... 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*. doi:10.3390/nu10020160
- Hashii, K., Hasegawa, T., Idegami, N., Kadota, M., Taniguchi, M., Toyama, T., & Toyonaga, D. (2015). *Discover Kagawa through English and Science*. Japonya: Kagawa University Student Development Project Press.
- Hayashi, N., IIDA, T., YAMADA, T., OKUMA, K., TAKEHARA, I., YAMAMOTO, T., ... TOKUDA, M. (2010). Study on the Postprandial Blood Glucose Suppression Effect of D-Psicose in Borderline Diabetes and the Safety of Long-Term Ingestion by Normal Human Subjects. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. doi:10.1271/bbb.90707
- He, X., Zhou, X., Yang, Z., Xu, L., Yu, Y., Jia, L., & Li, G. (2015). Cloning, expression and purification of d-tagatose 3-epimerase gene from *Escherichia coli* JM109. *Protein Expression and Purification*, *114*, 77–81. doi:10.1016/j.pep.2015.06.015
- Hossain, A., Yamaguchi, F., Matsuo, T., Tsukamoto, I., Toyoda, Y., Ogawa, M., ... Tokuda, M. (2015). Rare sugar D-allulose: Potential role and therapeutic monitoring in maintaining obesity and type 2 diabetes mellitus. *Pharmacology and Therapeutics*, *155*, 49–59. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.08.004
- Iida, T., Hayashi, N., Yamada, T., Yoshikawa, Y., Miyazato, S., Kishimoto, Y., ... Izumori, K. (2010). Failure of d-psicose absorbed in the small intestine to metabolize into energy and its low large intestinal fermentability in humans. *Metabolism: Clinical and Experimental*. doi:10.1016/j.metabol.2009.07.018
- Iida, T., Kishimoto, Y., Yoshikawa, Y., Hayashi, N., Okuma, K., Tohi, M., ... Izumori, K. (2008). Acute D-Psicose Administration Decreases the Glycemic Responses to an Oral Maltodextrin Tolerance Test in Normal Adults. *Journal of Nutritional Science and*

- Vitaminology*, 54(6), 511–514. doi:10.3177/jnsv.54.511
- Ishida, Y., Kamiya, T., Itoh, H., Kimura, Y., & Izumori, K. (1997). Cloning and characterization of the D-tagatose 3-epimerase gene from *Pseudomonas cichorii* ST-24. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. doi:10.1016/S0922-338X(97)81132-4
- Itoh, H., Okaya, H., Rahman KHAN, A., Tajima, S., Hayakawa, S., & Izumori, K. (1994). Purification and Characterization of D-Tagatose 3-Epimerase from *Pseudomonas* sp. ST-24. *Biosci. Biotech. Biochem*, 58(12), 2168–2171.
- Itoh, K., Mizuno, S., Hama, S., Oshima, W., Kawamata, M., Hossain, A., ... Tokuda, M. (2015). Beneficial Effects of Supplementation of the Rare Sugar ‘D-allulose’ Against Hepatic Steatosis and Severe Obesity in Lepob/LepobMice. *Journal of Food Science*. doi:10.1111/1750-3841.12908
- Iwasaki, Y., Sendo, M., Dezaki, K., Hira, T., Sato, T., Nakata, M., ... Yada, T. (2018). GLP-1 release and vagal afferent activation mediate the beneficial metabolic and chronotherapeutic effects of D-allulose. *Nature Communications*. doi:10.1038/s41467-017-02488-y
- Izumori, K. (2002). Bioproduction strategies for rare hexose sugars. *Naturwissenschaften*, 89, 120–124. doi:10.1007/s00114-002-0297-z
- Jensen, T., Abdelmalek, M. F., Sullivan, S., Nadeau, K. J., Green, M., Roncal, C., ... Johnson, R. J. (2018). Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 68, 1063–1075. doi:10.1016/j.jhep.2018.01.019
- Jiménez-Maldonado, A., Ying, Z., Byun, H. R., & Gomez-Pinilla, F. (2018). Short-term fructose ingestion affects the brain independently from establishment of metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. doi:10.1016/j.bbadis.2017.10.012
- Kim, K., Kim, H. J., Oh, D. K., Cha, S. S., & Rhee, S. (2006). Crystal Structure of d-Psicose 3-epimerase from *Agrobacterium tumefaciens* and its Complex with True Substrate d-Fructose: A Pivotal Role of Metal in Catalysis, an Active Site for the Non-phosphorylated Substrate, and its Conformational Changes. *Journal of Molecular Biology*, 361(5), 920–931. doi:10.1016/j.jmb.2006.06.069
- Kim, S.-E., Kim, S. J., Kim, H.-J., & Sung, M.-K. (2017). D-Psicose, a sugar substitute, suppresses body fat deposition by altering networks of inflammatory response and lipid metabolism in C57BL/6J-ob/ob mice. doi:10.1016/j.jff.2016.11.029
- Kim, S. E., Kim, S. J., Kim, H. J., & Sung, M. K. (2017). D-Psicose, a sugar substitute,

- suppresses body fat deposition by altering networks of inflammatory response and lipid metabolism in C57BL/6J-ob/ob mice. *Journal of Functional Foods*, 28, 265–274. doi:10.1016/j.jff.2016.11.029
- Kim, S., Lee, A. Y., Kim, H. J., Hong, S. H., Go, R. E., Choi, K. C., ... Cho, M. H. (2017). Exposure to cigarette smoke disturbs adipokines secretion causing intercellular damage and insulin resistance in high fructose diet-induced metabolic disorder mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi:10.1016/j.bbrc.2017.10.121
- Kimoto-Nira, H., Moriya, N., Hayakawa, S., Kuramasu, K., Ohmori, H., Yamasaki, S., & Ogawa, M. (2017). Effects of rare sugar D -allulose on acid production and probiotic activities of dairy lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. doi:10.3168/jds.2016-12214
- 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. doi:10.1016/j.nut.2017.06.007
- Kull, U., & Baitinger-Haardt, C. (1977). Physiology of Ribohexulose (D-Allulose) and Allitol in Itea Plants. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 301–309. doi:10.1016/S0044-328X(77)80205-5
- Lee, S. H., Hong, S. H., An, J. U., Kim, K. R., Kim, D. E., Kang, L. W., & Oh, D. K. (2017). Structure-based prediction and identification of 4-epimerization activity of phosphate sugars in class II aldolases. *Scientific Reports*. doi:10.1038/s41598-017-02211-3
- Li, Z., Cai, L., Qi, Q., & Wang, P. G. (2011). Enzymatic synthesis of d-sorbose and d-psicose with aldolase RhaD: Effect of acceptor configuration on enzyme stereoselectivity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. doi:10.1016/j.bmcl.2011.09.087
- 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*. doi:10.3762/bjoc.9.281
- 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*. doi:10.1007/s10295-015-1631-8
- 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(8), 822–828. doi:10.1016/j.procbio.2009.03.017

- Malik, V. S., & Hu, F. B. (2015). Fructose and Cardiometabolic Health What the Evidence from Sugar-Sweetened Beverages Tells Us. *Journal of the American College of Cardiology*, *66*(14), 1615–1624. doi:10.1016/j.jacc.2015.08.025
- Matsuo, T. (2001). Dietary D-psicose, a C-3 epimer of D-fructose, suppresses the activity of hepatic lipogenic enzymes in rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, *10*(3), 233–237. doi:10.1046/j.1440-6047.2001.00246.x
- Matsuo, T., Ishii, R., & Shirai, Y. (2011). The effects of 90-day feeding of D-psicose syrup in male Wistar rats. *Open Journal of Preventive Medicine*, *1*(2), 66–71. doi:10.4236/ojpm.2011.12010
- Morimoto, K., Yoshihara, A., Furumoto, T., & Takata, G. (2015). Production and application of a rare disaccharide using sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.11.011
- Mu, W., Zhang, W., Feng, Y., Jiang, B., & Zhou, L. (2012). Recent advances on applications and biotechnological production of D-psicose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-012-4093-1
- Muniruzzaman, S., McIntosh, M., Hossain, A., Izumori, K., & Bhattacharjee, P. S. (2016). A novel rare sugar inhibitor of murine herpes simplex keratitis. *Journal of Pharmacological Sciences*, *131*(2), 126–130. doi:10.1016/j.jphs.2016.05.004
- O'Charoen, S., Hayakawa, S., Matsumoto, Y., & Ogawa, M. (2014). Effect of d-Psicose Used as Sucrose Replacer on the Characteristics of Meringue. *Journal of Food Science*. doi:10.1111/1750-3841.12699
- Oshima, H., Kimura, I., & Izumori, K. (2006). Psicose Contents in Various Food Products and its Origin. *Food Science and Technology Research*. doi:10.3136/fstr.12.137
- 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 *Flavonifractor plautii*. *PLoS ONE*. doi: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-psicose 3-epimerase by a novel protein engineering strategy, and d-psicose production from fruit and vegetable residues. *Bioresource Technology*. doi:10.1016/j.biortech.2016.05.053
- Poonperm, W., Takata, G., Ando, Y., Sahachaisaree, V., Lumyong, P., Lumyong, S., & Izumori, K. (2007). Efficient conversion of allitol to d-psicose by *Bacillus pallidus* Y25.

- Journal of Bioscience and Bioengineering*. doi:10.1263/jbb.103.282
- Putakala, M., Gujjala, S., Nukala, S., Bongu, S. B. R., Chintakunta, N., & Desireddy, S. (2017). Cardioprotective effect of *Phyllanthus amarus* against high fructose diet induced myocardial and aortic stress in rat model. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. doi:10.1016/j.biopha.2017.09.054
- Seraphim, D. C. C., Punaro, G. R., Fernandes, T. de O., Ginoza, M., Lopes, G. S., & Higa, E. M. S. (2017). Assessment of fructose overload in the metabolic profile and oxidative/nitrosative stress in the kidney of senescent female rats. *Experimental Gerontology*. doi:10.1016/j.exger.2017.09.011
- Smythe, J. E., Fletcher, J. N., & Kolberg, L. W. (2017). D-Allulose as a flavoring substance with flavor modifying properties. *Global Journal of Food Science and Technology*, 5(4), 258–261. Retrieved from <http://www.globalscienceresearchjournals.org/>
- Sousa, G. J., Oliveira, P. W. C., Nogueira, B. V., Melo, A. F., Faria, T. de O., Meira, E. F., ... Baldo, M. P. (2017). Fructose intake exacerbates the contractile response elicited by norepinephrine in mesenteric vascular bed of rats via increased endothelial prostanoids. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 48, 21–28. doi:10.1016/j.jnutbio.2017.06.005
- Sun, Y., Hayakawa, S., Ogawa, M., & Izumori, K. (2007). Antioxidant properties of custard pudding dessert containing rare hexose, d-psicose. *Food Control*, 18, 220–227. doi:10.1016/j.foodcont.2005.09.019
- Takata, M. K., Yamaguchi, F., Nakanose, K., Watanabe, Y., Hatano, N., Tsukamoto, I., ... Tokuda, M. (2005). Neuroprotective effect of D-Psicose on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(5), 511–516. doi:10.1263/jbb.100.511
- 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*. doi:10.1016/S1389-1723(01)80018-9
- Tang, S.-Y. (2012). Rare Sugars: Applications and Enzymatic Production. *Journal of Biocatalysis & Biotransformation*, 1(2). doi:10.4172/2324-9099.1000e105
- Temps, L. V. (2018). The truth about artificial sweeteners – Are they good for diabetics? *Indian Heart Journal*, 70(1), 197–199. doi:10.1016/j.ihj.2018.01.020
- Thomes, P. G., Benbow, J. H., Brandon-Warner, E., Thompson, K. J., Jacobs, C., Donohue, T. M., & Schrum, L. W. (2017). Dietary fructose augments ethanol-induced liver

- pathology. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 43, 141–150.
doi:10.1016/j.jnutbio.2017.02.008
- Tseng, W. C., Chen, C. N., Hsu, C. T., Lee, H. C., Fang, H. Y., Wang, M. J., ... Fang, T. Y. (2018). Characterization of a recombinant D-allulose 3-epimerase from *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 and identification of an important interfacial residue. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112(400), 767–774.
doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.02.036
- Ushijima, B. (2014). A Rare Sweetness Researching Healthier Forms of Sugar. *SCIENCE & TECHNOLOGY*, 24–25.
- 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*.
doi:10.1016/j.tetlet.2016.07.015
- Yingling, G. L. (2013). GRAS 458 Exemption Claim for D-Allulose, (498).
- Yoshihara, A., Kozakai, T., Shintani, T., Matsutani, R., Ohtani, K., Iida, T., ... Gullapalli, P. K. (2017). Purification and characterization of D-allulose 3-epimerase derived from *Arthrobacter globiformis* M30, a GRAS microorganism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. doi:10.1016/j.jbiosc.2016.09.004
- Yoshihara, K., Shinohara, Y., Hirotsu, T., & Izumori, K. (2003). Chitosan productivity enhancement in *Rhizopus oryzae* YPF-61A by D-psicose. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(3), 293–297. doi:10.1016/S1389-1723(03)80032-4
- 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*. doi:10.1263/jbb.101.219
- 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. *Biotechnology Letters*. doi:10.1007/s10529-009-9942-3
- Zhang, W., Li, H., Jiang, B., Zhang, T., & Mu, W. (2017). Production of d-allulose from d-glucose by *Escherichia coli* transformant cells co-expressing d-glucose isomerase and d-psicose 3-epimerase genes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
doi:10.1002/jsfa.8193
- 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 and Technology*. doi:10.1016/j.tifs.2016.06.004

ÖZGEÇMİŞ

Erva PARILDI 1990 yılında Kayseri’de doğdu. Lise öğrenimini Kayseri İstikbal Lisesi’nde tamamladı. 2008-2012 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünde lisans eğitimi aldı. 2017 yılından bu yana Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde araştırma görevlisi olarak çalışma hayatına devam etmektedir.

