

## Biyokütle Kaynaklarından Bazı Platform Kimyasallarının Birlikte Üretimi

Abdulkadir GÜL<sup>1\*</sup>, Muhammet Şaban TANYILDIZI<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup> Firat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölü, Elazığ, Türkiye

<sup>\*1</sup> a.gul@firat.edu.tr, <sup>2</sup> mtanyildizi@firat.edu.tr

(Geliş/Received: 09/08/2022;

Kabul/Accepted: 04/09/2022)

**Öz:** Günümüzde fosil kaynaklar, özellikle kimya ve yakıt endüstrileri için hala en önemli kimyasal karbon iskeleti kaynağıdır ve giderek azalmaktadır. Bu durum araştırmacıları yenilenebilir kaynakların çeşitli yakıtlara, kimyasallara ve malzemelere dönüştürülmesi için yeni ekonomik süreçler geliştirmeye zorlamıştır. Son dönemlerdeki araştırmalara bakıldığında, biyo-temelli hammaddelerden bazı platform kimyasallarının birlikte üretiminin girdi maliyetlerinin düşürülmesi bakımından büyük önem arz ettiği görülmektedir. Platform kimyasallarının içerisinde özellikle Glukonik asit (GA) ve 5-hidroksimetilfurfural (HMF)'in birlikte üretimi gelecekte sürdürülebilir bir kimya endüstrisi için büyük önem taşımaktadır. GA, glükozun oksidasyonu sonucu açığa çıkan, ticari olarak en fazla üretilen organik asitlerden biridir. Kimya, farmasötik, yiyecek, içecek, tekstil ve deterjan endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. HMF, gelecek vaat eden biyoyakıtların yanı sıra farklı faydalı kimyasallara dönüştürülebilir önemli bir başlangıç maddesidir. Ayrıca, polimerler, farmasötikler, kimyasallar ve yakıtlar için kullanılan çok yönlü ve işlevsel bir ara maddedir. Bu derleme, halihazırda farklı tesis ve hammaddelerle üretilen GA ve HMF'nin aynı biyokütle kaynağından daha düşük maliyetlerle tek proseste birlikte üretim çalışmalarının incelenmesinin yanında kimya endüstrisindeki önemi, özellikleri ve uygulamaları hakkında bir inceleme sunmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Biyokütle, glukonik asit, 5-hidroksimetilfurfural, platform kimyasalı.

### Co-production of Some Platform Chemicals from Biomass Sources

**Abstract:** Today, fossil resources are still the most important source of chemical carbon skeletons, especially for the chemical and fuel industries, and they are gradually decreasing. This situation has forced researchers to develop new economic processes for the conversion of renewable resources into various fuels, chemicals and materials. Considering to recent research, it is seen that the co-production of some platform chemicals from bio-based raw materials is of great importance in terms of reducing the input costs. Among platform chemicals the co-production of especially Gluconic acid (GA) and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) is of great importance for a sustainable chemical industry in the future. GA is one of the most commercially produced organic acids, which is released as a result of the oxidation of glucose. It is widely used in chemical, pharmaceutical, food, beverage, textile and detergent industries. HMF is an important starting material that can be converted into different useful chemicals as well as promising biofuels. It is also a versatile and functional intermediate used for polymers, pharmaceuticals, chemicals and fuels. This review provides an overview of the importance, characteristics and applications of GA and HMF in the chemical industry, as well as an examination of the co-production activities of GA and HMF, which are currently produced with different plants and raw materials, in a single process at lower costs than the same biomass source.

**Key words:** Biomass, gluconic acid, 5-hydroxymethylfurfural, platform chemical.

### 1. Giriş

Büyük ölçekte üretim yapan endüstriler için ekonomik değeri olan ürünlerin aynı biyokütle kaynağından birlikte üretimi maliyetlerin düşürülmesi bakımından önemli bir yaklaşımdır. Literatürde bu amaçla yapılan çalışmalar giderek önem kazanmaktadır. Sodyum glukonat, inşaat endüstrisinde çimento hamurunun priz süresini geciktirmek için kullanılan başlıca çimento katkı maddesidir [1]. Sodyum ksilonat ise çimento granüllerini ayrıştırarak daha iyi akışkanlık için kullanılan bir çimento katkı maddesidir [2]. Bir çalışmada ekonomik değeri olan bu ürünlerin *Gluconobacter oxydans* kullanılarak mısır sapından birlikte üretimi araştırılmıştır. Belirli şartlarda gerçekleştirilen mikrobiyal fermantasyon ile sodyum glukonat (132,46 g/L) ve sodyum ksilonat (38,86 g/L) elde edilmiştir. Elde edilen sodyum glukonat ve ksilonat ürünleri çimento geciktirici olarak test edilmiş, ticari sodyum glukonattan daha iyi bir performans gösterdiği ve daha ekonomik olduğu ifade edilmiştir [3]. Değerli ürünlerin birlikte üretimine yönelik yapılan başka bir çalışmada, ksilooligosakkaritlerin (XOS) ve GA'nın birlikte üretilmesi için entegre ve yeşil süreç, şeker kamışı küspesi kullanılarak geliştirilmiştir. Hammadde olarak 1 kg kurutulmuş şeker kamışı küspesinden yaklaşık 105 g XOS ve 340 g GA, birlikte üretilmiştir. Bu nedenle, katma

\* Sorumlu yazar: [a.gul@firat.edu.tr](mailto:a.gul@firat.edu.tr). Yazarların ORCID Numarası: <sup>1</sup> 0000-0003-4879-6194, <sup>2</sup> 0000-0001-6456-1593

değerli ürünlerin (GA ve XOS) birlikte üretilmesi için şeker kamışı küspesinin kapsamlı kullanımı için uygun maliyetli bir seçenek olduğunu göstermiştir [4]. Son yapılan çalışmalarda ise birlikte üretilen ürünler içerisinde organik asitler ve bazı platform kimyasallarının üretimine yoğunlaşıldığı ve birçok araştırmanın yürütüldüğü görülmektedir. Biyokütle kaynağından çıkılarak en çok üretilen organik asitlerden biri olan ve önemli bir platform kimyasalı olarak da kabul edilen Glukonik Asit (GA)'tir [5]. GA, glikozun 1. karbon atomu üzerindeki aldehit grubunun karboksil grubuna oksidasyonu ile elde edilir [6]. GA ve tuzları, gıda katkı maddesi, beton için bir bileşen, ilaçlar ve polimerler için hammadde olarak kullanılır. Ayrıca, biyolojik olarak uyumlu ve kolayca parçalanabilen kimyasallardır [7]. GA, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gibi gıda katkı maddelerinde uzman komiteler tarafından onaylandığı üzere, genel olarak güvenli (GRAS) olarak kabul edilmektedir [8, 9]. GA üretiminde mikrobiyal fermantasyon, enzimatik kataliz, kimyasal ve elektrokimyasal gibi çeşitli üretim yöntemleri bulunmaktadır [10]. Mikrobiyal fermantasyon yöntemiyle GA üretimi, ucuz ve bol miktarda karbon kaynağı temini, hafif çalışma şartları, yan ürün oluşumunun az miktarda olması ve zararsız atıklar oluşturması ve düşük enerji gerektirmesi gibi avantajlarından dolayı diğer yöntemlere göre endüstriyel olarak etkili ve baskın bir yöntemdir [11]. Glikoz genellikle GA'nın mikrobiyal üretimi için ana karbon kaynağı olarak kullanılır. Bununla birlikte, glikoz yüksek maliyeti nedeniyle genellikle nişasta veya selülozdan uygun teknolojilerle üretilmektedir [12].

Günümüzde kimyasal ürünler ve yakıt üretmek için mevcut kaynakların büyük çoğunluğunu fosil kaynaklar oluşturmaktadır. Bununla birlikte, fosil kaynaklı ürünlerin tükenmesi ve bu ürünlerin doğaya verdiği zararlar nedeniyle araştırmacılar yenilenebilir enerji kaynaklarına yönelmişlerdir. Bu bağlamda biyokütle kaynaklı 6 karbonlu karbonhidratların dehidrasyonundan üretilen 5-Hidroksimetil Furfural (HMF) gelecek neslin kimyasal ve yakıt ihtiyaçlarını karşılamak için önemli platform kimyasalı olarak ortaya çıkmıştır [13]. HMF'nin katalitik oksidasyonu, 2,5-diformilfuran (DFF), 5-hidroksimetil-2-furankarboksilik asit (HFCA), 5-formil-2-furankarboksilik asit (FFCA) ve 2,5 furandikarboksilik asit (FDCA) dahil olmak üzere çeşitli katma değerli kimyasalların üretimini sağlamıştır [7]. HMF, glikoz, fruktoz, sakaroz, nişasta ve selüloz gibi her türlü monomerik veya polimerik biyokütleden üretilebilir [14]. Günümüzde HMF üretimi için en yüksek verimi sağlayan biyokütle kaynağı fruktozdur. Fruktoz, bifazik ve monofazik sistemlerde farklı katalizörlerin kullanıldığı reaksiyon ortamlarında HMF'ye dönüştürülebilir iyi bir başlangıç malzemesidir. Ancak, HMF ortamda hammadde olarak glikoz gibi heksozun dehidrasyonu ile de üretilir. Doğal furanoz yapısı nedeniyle fruktoz, hemen hemen tüm çözücü sistemlerinde glikozdan daha yüksek bir katalitik verime sahiptir. Bununla birlikte, HMF'nin endüstriyel üretiminde genellikle hammadde olarak glikozun kullanılması fazladan maliyet oluşturmaktadır. Çünkü üretim glikozun iki aşamalı katalitik bir dönüşümle yani önce glikozun fruktoza izomerizasyonu ve daha sonra fruktozun HMF'ye dönüştürülmesi şeklinde gerçekleşir. Bu işlemler de fazladan maliyet ve enerji kaybına yol açmaktadır [15].

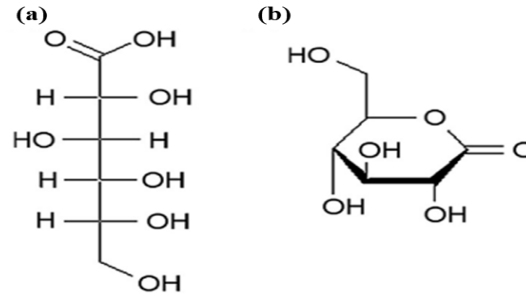
Sonuç olarak, iklim değişiklikleri, petrol gibi yenilenemeyen fosil kaynaklarının hızla tükenmesi ve arz-talep dengesizliğinin neden olduğu ham petrol fiyatındaki yüksek değişiklikler, küresel ekonomi üzerinde büyük baskı yaratmıştır. Böylece, fosil olmayan karbon kaynaklarından kimyasal ve yakıt üretmek için çevresel ve ekonomik olarak uygun sentetik yolların ve ilgili teknolojilerin geliştirilmesi son yıllarda yeniden büyük önem kazanmış, platform kimyasallarına olan ilgiyi arttırmıştır. Endüstriyel olarak değerli platform kimyasallarından GA ve HMF'nin farklı tesis ve biyokütle kaynaklarıyla üretilmektedir ancak bu durum üretim maliyetini ve enerji ihtiyacını arttırmaktadır. Bu nedenle, GA ve HMF'nin düşük maliyetli her iki üründe başlangıç maddesini ihtiva eden biyokütle kaynaklarından birlikte üretimi ekonomik açıdan büyük önem arz etmektedir ve bu yöndeki çalışmalar incelendiği çalışma sayısının sınırlı olduğu görülmektedir. Halihazırda farklı tesisler, mekanizmalar ve hammaddelerle üretilen bu değerli platform kimyasallarının özellikleri, üretim yöntemleri, kullanım alanları ve aynı biyokütle kaynağından birlikte üretiminin ve birbirinden ayırımının incelenmesi bu derleme makalenin hedefini oluşturmaktadır.

## 2. Glukonik Asit (GA)

GA (penta-hidroksi-kaproik asit), glikozun 1. karbon molekülünde bulunan aldehid grubunun bakterilerde glikoz dehidrogenaz (GDH), funguslarda ise glikoz oksidaz (GO) enzimi yardımıyla karboksil grubuna oksidasyonu ile türetilir (Şekil 1a). GA, aşındırıcı, uçucu ve toksik olmayan hafif bir organik asittir [11]. Beyaz ve kokusuz olan katı GA, kristal bir tozdur ancak serbest GA'nın kristal formda hazırlanması zordur. GA'nın erime noktası 120-131°C arasındadır. Erime noktası aralığının genişlemesinin sebebi molekül içi anhidritlerin oluşumunun erime noktasını düşürmesidir. GA, suda serbestçe çözünürken, eter ve diğer birçok organik solventte çözünmez. GA, 1,82 pH ve 1,23 g/cm<sup>3</sup> yoğunlukta %50 sulu çözelti formunda ticari olarak mevcuttur. GA'nın 50 °C'nin üzerinde ısıtılması lakton (Şekil 1b) oluşumuna yol açar [16]. Şarap ve meyve suları gibi birçok gıda

maddesine ferahlatıcı ekşi bir tat verir. Biyolojik olarak kolayca parçalanabilir (48 saatte %98). GA bitkilerde, meyvelerde ve pirinç, et, süt ürünleri, şarap (% 0,25'e kadar), bal (% 1'e kadar) ve sirke gibi diğer gıda maddelerinde bol miktarda bulunur. GA, *Pseudomonas ovalis*, *Acetobacter methanolicus*, *Zymomonas mobilis*, *Gluconobacter oxydans* ve *Gluconobacter suboxydans* gibi bakteriler, *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium variable* gibi küfler ve *Aureobasidium pullulans* gibi mayaları içeren farklı mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir [9].

GA pazarı, geçmiş yıllardan beri önemli derecede büyümektedir. Bu büyüme, ev deterjanları, endüstriyel temizleyiciler, kişisel bakım ürünleri ve tarım kimyasalları endüstrilerindeki artan ürün talebine bağlanmaktadır. En yaygın olarak pazarlanan GA türevi olan sodyum glukonat, üretiminin %80'inden fazlasını oluşturmaktadır. Küresel GA Pazar Araştırma Raporlarına göre, GA pazarının 2022-2028 döneminde tahmini %3,1'lik bir bileşik yıllık büyüme oranında (CAGR) büyüyerek 2028 yılına kadar 185 milyon dolara ulaşması beklenmektedir [17]. Dünya genelinde her yıl ortalama 100.000-ton GA üretimi gerçekleştirilmektedir [18].



Şekil 1. (a) GA ve (b) glukono-δ-laktonun moleküler yapıları [16]

## 2.1. GA üretimi

GA üretiminde mikrobiyal fermantasyon, enzimatik kataliz, kimyasal ve elektrokimyasal gibi çeşitli üretim yöntemleri mevcut olmasına rağmen bu yöntemleri temel olarak kimyasal ve enzimatik kataliz olarak ikiye ayırmak mümkündür [10, 19]. Glikozun GA'ya kimyasal katalizi, alkali bir glikoz çözeltisi (pH 8-11, tercihen 9) içerisinde platin veya paladyum gibi soy metallerin katalizör olarak kullanılması ile gerçekleştirilir. Aktif kömür, alüminyum oksit gibi taşıyıcıların ilavesi ile de oksidasyondan sonra bu katalizörler ortamdaki uzaklaştırılır. Başka bir yöntemde ise GA üretimi, 1-2 mol/L konsantrasyondaki yine alkali bir glikoz çözeltisinin oksidasyonu ile gerçekleştirilir. Reaksiyon boyunca yükseltgenme işlemi yüksek sıcaklık ve basınçta, oksijen, ozon ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi oksidantlar kullanılarak sağlanır [20]. Elektrokimyasal kataliz yöntemiyle GA üretiminde, bromür içeren glikoz çözeltisi (glikozun molce yaklaşık %10'u) 1-20 A/dm<sup>2</sup> akım yoğunluğunda elektroliz edilir. Enzimatik yöntemlere göre daha masraflı ve dönüşüm verimlerinin (%60-80) daha düşük olması nedeniyle kimyasal kataliz yöntemlerinin endüstriyel uygulaması bulunmamaktadır [21, 16]. Geleneksel fermantasyon yöntemlerine göre enzimatik katalizle yürütülen proseslerde reaksiyonlar daha hızlı gerçekleşir ve ürün oluşum verimi neredeyse %100'dür. GA'nın enzimatik olarak üretimi GO enzimi (EC 1.1.3.4) kullanılarak belirli sıcaklık ve pH'da gerçekleştirilmektedir. Ancak, büyük miktarlarda endüstriyel GA üretiminde glikozun GA'ya oksidasyon reaksiyonunu katalizleyen GO enziminin yüksek maliyeti nedeniyle kullanımı hemen hemen yoktur [22].

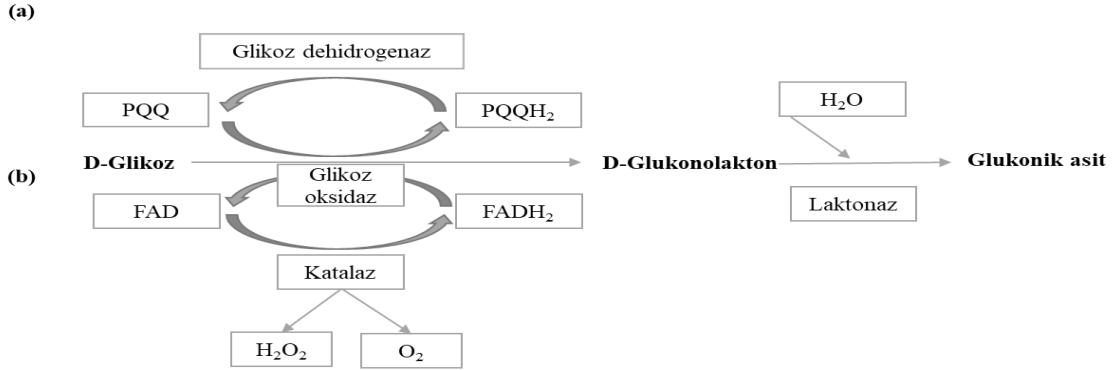
Mikrobiyal fermantasyon yöntemiyle GA üretimi, ucuz ve bol miktarda karbon kaynağı temini, hafif çalışma şartları, yan ürün oluşumunun az miktarda olması, zararsız atıklar oluşturması ve düşük enerji gerektirmesi gibi avantajlarından dolayı diğer yöntemlere göre endüstriyel olarak etkili ve baskın bir yöntemdir [16]. GA'nın mikrobiyal üretimi için temel karbon kaynağı olarak genellikle glikoz kullanılmaktadır. Özellikle iplikli funguslar başta olmak üzere geniş bir mikroorganizma grubu GA üretim yeteneğine sahiptir. Günümüzde mikrobiyal fermantasyonla GA üretiminde kullanılan ana mikroorganizmalar funguslardır [23]. Mikrobiyal fermantasyon proseslerinde *A. niger*, *A. terreus*, *Penicillium*, *Gliocadium*, *Scopulariopsis* ve *Gonatabotrys* küfleri kullanılarak GA üretimi birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir [24]. *A. niger* suşunun GA üretiminde yaygın olarak kullanılması yanında diğer *Aspergillus* türleri de benzer bir GA üretme potansiyeline sahip olduğu ifade edilmektedir [25]. *A. niger* suşu GA üretimi için gerekli olan temel enzimleri (GO, katalaz, laktonaz ve mutarotaz) içermektedir. Endüstriyel olarak GA üretiminde *A. niger*'in kullanıldığı fermantasyonlarda optimum verim için ortam şartları 4,5-5,5 civarında pH, 100-250 g/L glikoz, çok düşük konsantrasyonlarda (20 mM) azot ve fosfor kaynağı, 30 g/L Manganez (II) sülfat ( $MnSO_4$ ) olarak belirlenmiştir [26]. Funguslarda özellikle *A. niger*'in kullanıldığı GA üretiminde, Şekil 2'de görüldüğü gibi GO enzimine bağlı koenzim olarak flavin adenin dinükleotit

(FAD) ve ortamdaki oksijenle  $FADH_2$ 'deki hidrojen iyonlarının tepkimesi sonucu oluşan  $H_2O_2$ 'i hidrolize eden katalaz enzimi rol almaktadır. Bunun yanı sıra glikoza fosfat bağlanmasını sağlayan mutarotaz ve glukon- $\delta$ -laktonu GA'ya dönüştüren laktonaz enzimleri de üretim ortamında bulunabilmektedir [9]. Literatürde funguslar ile GA üretimi, katı, yarı katı ve derin fermantasyon yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır [27]. Singh vd. [28] yaptıkları bir çalışmada, *A. niger* suşu kullanılarak çeşitli fermantasyon şekilleriyle glikozdan GA üretim verimini incelenmişlerdir. Çalışmada katı hal fermantasyonu, yarı-katı hal fermantasyonu, derin fermantasyon ve yüzey fermantasyonu yöntemleri GA üretimi için karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. İnokulum oranı %2, pH 6,6, sıcaklık 30 °C ve glikoz konsantrasyonu için 120 g/L olarak optimum şartlar belirlenmiştir. Bu şartlarda gerçekleştirilen denemeler sonucunda GA üretim veriminin katı hal fermantasyonunda 106,5 g/L, yarı-katı hal fermantasyonda 86 g/L, derin fermantasyonda 85,9 g/L ve yüzey fermantasyonunda 62 g/L olduğu ifade edilmiştir. *A. niger* için optimal GA üretiminde %90 dan fazla hava doygunluğunun olması istenir. Ancak, funguslar kullanılarak yürütülen fermantasyonlarda mikroorganizmasının hifli yapısı, ortam reolojisini ve enerji tüketimini etkilemektedir. Bu durum özellikle endüstriyel üretimlerde maliyet ve ortamda çözünmüş oksijen konsantrasyonu açısından sorun oluşturabilmektedir. Bakterilerde glikozdan GA'ya oksidasyon reaksiyonu GDH enzimiyle katalizlenmektedir. Bakterilerde de funguslarda olduğu gibi glikoz oksidasyonu büyük ölçüde ortam pH'sına bağlıdır [29]. Funguslarda optimum üretim için pH 4,5-5,5 civarındayken, bakteriyel üretimde ortam pH'sının 3,5-4,0 arasında olması istenmektedir. Endüstriyel üretimlerde bu pH değerlerinde glikozdan 2-ketoglukonik asit (2-KGA)'e dönüşümün daha yüksek olduğu (yaklaşık %87) bilinmektedir [30]. Ortamda GA'nın birikimini sağlamak için glikoz konsantrasyonun 15 mM'ın üstünde ve pH değeri 3,5'in altında tutularak keto-asitlerin oluşumu baskılanır. Dönüşümün son aşamasında 2-KGA dehidrogenaz enzimi ile 2,5-diketoglukonik asit elde edilmektedir [20].

Yapılan çalışmalar incelendiğinde çeşitli kaynaklardan GA üretimi için fungusların yaygın bir şekilde kullanıldığı görülse de bakterilerin GA üretimi için kullanıldığı önemli çalışmalar da bulunmaktadır [9]. *G. oxydans* bakterisi, uygun şartlarda glikozu GA'ya ve ardından 2-keto-D-glukonik aside (2-KGA) ve 5-keto-D-glukonik aside (5-KGA) dönüştürmektedir. Bu bakteri tarafından GA üretimi gerçekleştirilen bir çalışmada, pH kontrolü yapılmadan sıcaklık 32 °C, havalandırma hızı 2 vvm ve 1000 rpm karıştırma hızı koşulları altında maksimum dönüşüm %90,4 olarak elde edilmiştir. Maksimum spesifik büyüme hızı 0,39  $st^{-1}$  ve hacimsel verimlilik 53 mmol/st olarak bulunmuştur [29]. *Pseudomonas fluorescens* AR4 suşu kullanılarak 20 L hacimli mekanik karıştırmalı bir reaktörde mısır nişastası hidrolizatının kullanıldığı bir çalışmada ise 2-KGA üretimi araştırılmıştır. Kesikli olarak gerçekleşen fermantasyonda %2 inokulum miktarı, pH 5,0-6,5, 30°C sıcaklık ve glikoz konsantrasyonu 180 g/L olarak belirlenen optimum şartlarda 16 saat sonunda 135,92 g/L konsantrasyonunda ve 8,83 g/L.st hacimsel verimlilikle üretim verimliliğinin 0,95 g KGA/g glikoz olduğu bildirilmiştir [31]. Bununla birlikte, bakteriler ile yapılan üretimlerde GA'nın daha ileri seviyelerde oksidasyonu endüstriyel üretimi sınırlandırmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisindeki ilerlemeler, fermantasyon üretim proseslerinde bu sorunun aşılmasında önemli gelişmelerden biri olmuştur. Tanyıldızı vd. [22] tarafından yapılan bir çalışmada yabani tip *E. coli* Waksman suşları GA üretimi için apo-GDH enzimini sentezleyebilirken enzimin aktif forma (holoenzim) dönüşümünü sağlayan PQQ'yu sentezleyemediği görülmüştür. Bu tür mikroorganizmalara eksojen PQQ ilavesi, apo-GDH enzimini holoenzim (holo-GDH) yapısına dönüştürerek GA üretimi için aktif forma dönüştürülebileceği öne sürülmüştür. Bu amaçla holo-GDH enziminin sentezlenmesi için *Klebsiella pneumoniae* bakterisindeki altı gen içeren bütün *pqq* operonu ilgili hücreye aktarılmıştır. Böylece GA üretim yoluyla açılarak elde edilmiş olan *E. coli* W *pqq*<sup>+</sup> rekombinant suşu ile 150 g/L glikoz, 1,5 g/L  $Na_2HPO_4$ , 7,5 g/L, yeast ekstrakt ve 30 g/L  $CaCO_3$  bileşenlerini içeren sentetik biyoreaktör ortamında GA verimliliği 0,031 g GA/g glikoz.st olarak bulunmuştur. Bu çalışmanın en dikkat çekici tarafı rekombinant suşların herhangi bir ileri seviye oksidasyon enzimine sahip olmadığından ortamda sadece GA'nın üretilmesidir. Ayrıca, GA üretiminde rekombinant *E. coli* W *pqq*<sup>+</sup> suşunun hif yapılı funguslara göre daha uygun ortam reolojisi, daha kısa fermantasyon süresi, havalandırma kolaylığı ve daha yüksek verimlilik gibi ekonomik avantajlara sahip olduğu da görülmüştür.

Funguslarda D-glukonolakton elde etmek için glikozun oksijen ile oksidasyonu, GO enzimi tarafından katalize edilir. Genellikle hücre içi olan bu enzim, özellikle *Aspergillus* ve *Penicillium*'da, belirli filamentli fungusların membranı ile kısmen hücre dışına salgılanır veya hücre dışı olarak tutulur. Daha sonra D-glukonolakton kendiliğinden glukonata hidroliz edilir ve yukarıda bahsedilen funguslarda bulunan katalaz enziminin etkisiyle ayrıştırılan  $H_2O_2$  açığa çıkar. Bakteriyel GDH enzimi pirolokinolin kinon (PQQ) ile birlikte sitoplazmik zarın dış yüzeyinde bulunurlar. GDH enzimi sitoplazmada yer alan NADP-bağımlı bir proteindir [32]. Membrana bağlı bir enzim olan GDH, koenzim olarak PQQ'yu kullanır ve glikozu GA oluşturmak için hidrolize uğrayacak D-glukonolaktone dönüştürür. Bununla birlikte, fungusların kullanıldığı üretimlerde glikoz, GO tarafından oksitlenerek D-glukonolaktone dönüştürülür ve daha sonra kendiliğinden veya laktonaz enzimi ile GA'ya

dönüştürülür. *G. suboxidans* (bakteri) ve *A. niger* (fungus) mikroorganizmalarındaki GA oluşumu için enzimatik reaksiyonlar Şekil 2’de gösterilmektedir [33].



Şekil 2. (a)Bakteri ve (b)Funguslardaki GA üretimi için metabolik yollar [33]

Glikozdan yüksek dönüşümlerle gerçekleşen GA üretim verimini etkileyen en önemli iki değişken fermantasyon ortamı pH’sı ve çözünmüş oksijen konsantrasyonudur [9]. GA üretimi oksidasyonu sağlayan enzimin etkinliğine bağlı olduğundan ortamdaki asitliğin artması sonucu GA üretim reaksiyonunu katalizleyen enzim inaktif hale gelmekte ve oksidasyon mekanizması bozulmaktadır. Fermantasyon ortamının pH’sının artmasıyla oluşan asidik ortam problemi uygulamaya bağlı olarak kalsiyum karbonat (CaCO<sub>3</sub>) veya sodyum hidroksit (NaOH) gibi kimyasal nötrale edici ajanların ortama eklenmesiyle çözülebilmektedir. Ortama bu nötrale edici ajanlarının katılmasıyla da sodyum veya kalsiyum glukonat tuzlarının üretimi gerçekleşmektedir. Ancak, ortama katılan bu ajanların belirli konsantrasyonlarının GA üretimi için indükleyici bir etki de yarattığı bilinmektedir. GA üretilen fermantasyon ortamının çözünmüş oksijen konsantrasyonunu arttırmak için ise ortama oksijence zengin hava beslenilmesi veya basınçlı fermentörlerin (4-6 bar) kullanılması gerekmektedir [22].

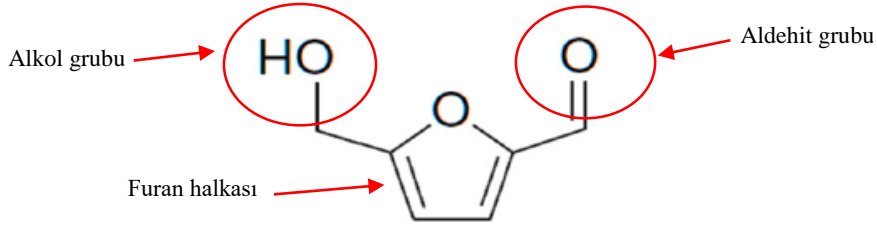
## 2.2. GA kullanım alanları

GA ve türevleri (tuzlar veya esterler) gıda, ilaç ve kozmetiklerin formülasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır [16]. Et ve süt ürünleri ile özellikle unlu mamüllerde önceden mayalanmış ürünler için kabartma ajanlarının bir bileşeni olarak kullanılır. Ayrıca GA, süt endüstrisinde metal temizleme işlemlerinde, yüzey temizliği için deterjanlarda, metalürji endüstrisinde alkali pas giderme işlemlerinde ve tekstil endüstrisinde demir birikimini önleme işlemlerinde bir bileşen ve şelatlama maddesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [34].

Sodyum glukonat, kireç oluşumunun önlenmesine ve camdan uzaklaştırılmasına yardımcı olduğu için şişe yıkama formülasyonlarında deterjan görevi görür. Poliester ve poliamid kumaşların haşıl sökülmesinde de kullanılır. Metalurjide sodyum glukonat, alkali pas giderme, boyalı duvarların yıkanması ve metal karbonat çökeltilerinin korozyona neden olmadan uzaklaştırılması için kullanılır. Çimentoya katkı maddesi olarak kullanılıp çimentonun mukavemetini ve su direncini artırarak donma ve çatlama direncinin artmasına yardımcı olur. Diğer uygulamaları, kağıt endüstrisinde su arıtmayı içerir. GA’nın kalsiyum ve demir tuzları, sırasıyla kalsiyum eksikliğini ve anemiyi önlemek için takviye besin maddesi olarak kullanılır. Kalsiyum glukonat ayrıca hayvan beslenmesinde de uygulama alanı bulur. Demir glukonat ve demir fosfolglukonat demir tedavisinde kullanılmaktadır. Çinko glukonat, çinko eksikliklerinin tedavisinde uygulama bulur [16].

## 3. 5-Hidroksimetil Furfural (HMF)

HMF, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> molekül formülüne sahip sarı renkli düşük erime noktalı bir katıdır ve su, metanol, etanol, benzen ve etil asetat gibi bir dizi çözücüde çözünürlüğü vardır. Hem aldehit hem de alkol fonksiyonel grupları içeren bir furan halkasından oluşur (Şekil 3). Papatya çiçeği kokusuna sahip olan HMF molekülü, 114-116 °C/1 mmHg (lit.) arasında bir kaynama noktasına ve 25 °C’de 1,2 g/cm<sup>3</sup> yoğunluğa sahiptir [35]. Son yıllarda kimya endüstrisinde yükselen bir hammadde olan HMF, polimerler, farmasötikler, reçineler, çözücüler, fungusitler ve yakıtların üretimi için çok yönlü bir platform kimyasalı olarak tanımlanmıştır. HMF, ABD Enerji Bakanlığı (DOE) tarafından umut vaat eden ilk 12 yapı taşından biri olarak kabul edilmiştir. Bu bakımdan ilerleyen süreçlerde HMF üretiminin endüstride çok büyük bir ilgiye sahip olması beklenmektedir [36].

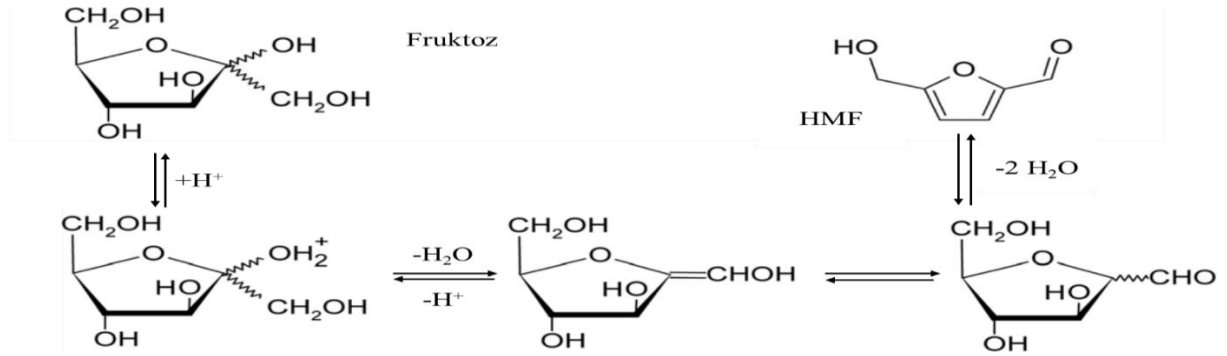


Şekil 3. HMF'nin kimyasal yapısı [37]

Nişasta, sakkaroz, inülin, selüloz, glikoz ve fruktoz gibi biyokütlelerden elde edilen HMF, gelecekte kimyasal ve yakıt ihtiyacını karşılama potansiyeline sahip önemli platform kimyasalı olarak dikkat çekmektedir. HMF oluşumuna uygun doğal furanoz yapısı nedeniyle fruktoz, HMF üretiminde en iyi başlangıç maddesidir. Bununla birlikte, fiyatı büyük ölçekli HMF üretiminde uygulanamayacak kadar yüksektir [14]. Fruktoz maliyeti HMF fiyatında baskın faktör olduğundan HMF fiyatının rekabetçi olması için daha verimli süreçlerin geliştirilmesinin yanı sıra daha düşük fruktoz maliyetlerinin gerekli olduğu görülmüştür [38]. HMF için küresel pazarın 2016'da yaklaşık 117 milyon dolardan 2022'ye kadar yaklaşık 123 milyon dolara ulaşması beklenmektedir. HMF'nin şu an üretilen teknoloji ile üretim maliyeti fosil kaynaklı dökme kimyasallardan 3 kat daha fazla olduğu bilinmektedir [5]. Bununla birlikte HMF'nin endüstriyel ölçekte üretim maliyetinin 1 dolar/kg seviyelerinde olması durumunda beklenen orandan (500-1500 dolar/kg) daha rekabetçi bir ürün olacağı belirtilmektedir [39].

### 3.1. HMF üretimi

HMF, fruktoz, glikoz, sakkaroz, nişasta, inülin ve selüloz gibi monomerik veya polimerik karbonhidratlar dahil olmak üzere her türlü 6 karbonlu karbonhidratlardan 3 molekül suyun ayrıldığı dehidrasyon reaksiyonları ile üretilir (Şekil 4) [40]. Ancak polisakkaritlerden direkt olarak HMF üretimi için öncelikle polisakkaritlerin monosakkaritlere hidroliz edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle monosakkaritlerin başlangıç maddesi olarak kullanılması daha avantajlıdır. Yapısında bulundurduğu furan halkasından dolayı fruktoz verim ve seçicilik açısından HMF üretimi için en çok tercih edilen substrat olmakla birlikte yüksek maliyeti nedeniyle endüstriyel üretimlerde pek fazla kullanılmamaktadır [41]. HMF'nin glikoz ve fruktoz gibi monosakkaritler ve inülin, nişasta ve selüloz gibi polisakkaritlerden üretilbilmesine yönelik yapılan birçok bilimsel araştırmalar sonucunda en iyi HMF veriminin fruktozun dehidrasyonu ile elde edildiği görülmüştür [37]. Fruktozun HMF'ye dönüşümü %100 iken glikoz ve sakkarozun HMF'ye dönüşümü %60-70 arasında olduğu ifade edilmiştir [42].



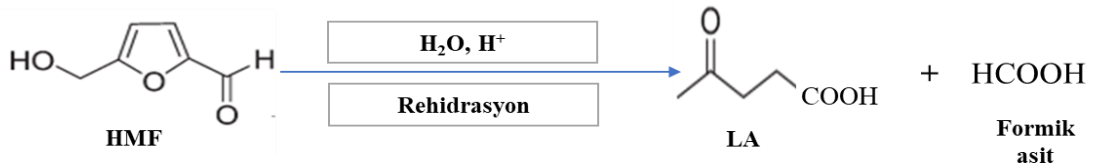
Şekil 4. Fruktozdan HMF'nin dehidrasyon ile üretilmesi [40]

HMF üretimi organik asitler, mineral asitler, Lewis asitleri ve iyon değiştirici reçine gibi çeşitli asit katalizörler ile gerçekleştirilebilir. 1950'lerden 1980'lere kadar, karbonhidratlardan HMF üretimi için etkili yöntemlerin geliştirilmesine yönelik araştırmalar tamamen su bazlı mineral asitle katalize edilen sistemler üzerine olmuştur [41]. Geleneksel karbonhidrat kimyası için ortak bir çözücü olarak kullanılan su, bu süreçte HMF üretiminde de yaygın olarak kullanılmıştır. İlerleyen dönemlerde, HMF üretiminde mineral asit veya organik asit katalizörleri ile fruktoz, glikoz ve polisakkaritler (mısır nişastası vb.) gibi karbonhidratlar farklı koşullarda test edilmiştir. Bu çalışmalarda reaksiyon sıcaklığı 100°C ile 300 °C ve reaksiyon süresi saniye ile saat aralığında

değişmiştir. Bununla birlikte, sulu sistemin HMF üretimine etkisi düşük seçicilik ile sonuçlanmıştır. Fruktozdan HMF verimi % 50'den daha az olarak elde edilmiştir. Daha sonra HMF'nin asidik koşullar altında sulu ortamda stabil olmadığı anlaşılmıştır [43]. Ayrıca daha sonra çeşitli katı asit katalizörlerin bifazik sistemlerde karbonhidrat dehidrasyonu için yapılan çalışmalar da incelenmiştir. Fruktoz dehidrasyonu için Lewatitt SPC 108 (%61 mol) katalizörü, 15 saat boyunca 88 °C'de %56 HMF verimi, H-form zeolit (ağırlıkça % 29) katalizörü ile de 1 saat boyunca 165 °C'de %69 HMF verimi elde edilmiştir [41]. Glikozun dehidrasyonundan HMF üretiminde, niyobyum fosfat katalizör olarak incelendiği çalışmada maksimum %45 verime ulaşılmıştır. Aynı çalışmada fruktozun dehidrasyonundan maksimum HMF verimi Amberlyst 36 katalizörlüğünde %60, niyobyum fosfat katalizörlüğünde %53 olduğu ifade edilmektedir [44].

Organik asitlerin 6 karbonlu karbonhidratları HMF'ye katalize ettiği bildirilmişse de, düşük  $H^+$  iyonizasyonlarından (yüksek  $pK_{a1}$  değerleri) dolayı tatmin edici katalitik verimlerde elde edilememiştir. Örneğin, katalizör olarak oksalik asit ( $pK_{a1}= 1,22$ ) kullanıldığında sadece %27'lik bir HMF verimi elde edilmiştir. Formik asit ( $pK_{a1}= 3,75$ ), asetik asit ( $pK_{a1}= 4,76$ ) ve sitrik asit ( $pK_{a1}= 3,13$ ) gibi diğer organik asitler de fruktoz dehidrasyonunu katalize etmede tatmin edici sonuçlar sağlayamamıştır. Bununla birlikte, sıcaklık ve tuz etkisi gibi faktörler zayıf asitlerin ayrışma derecesini düzenleyebilir ve HMF verimini arttırabilir. Organik asitlerin fermantasyon, enzimatik veya kimyasal oksidasyon ortamında *in situ* olarak oluşabilmeleri gibi önemli bir avantajı da vardır. Bu endojen asitler, dehidrasyon reaksiyonlarını katalize edebiliyorlarsa, eksojen protonik asitlerin eklenmesi azaltılmış hatta önlenmiş olacaktır [45]. Organik asitlerin katalizör olarak kullanıldığı bir çalışmada, HMF'nin oksidasyonu ( $\gamma$ -valerolakton (GVL)/ $H_2O$ ) bifazik ortamdan filtre edilerek ayrılabilen bir organik asit olan FDCA'nın ( $pK_{a1}= 2,76$ ) çok az bir miktarı kullanılarak gerçekleştirilen fruktoz dehidrasyonunun yüksek verimde (% 70) HMF'ye dönüştüğü ve tüm süreçte korozif asitlerin kullanım ihtiyacının ortadan kaldırıldığı ifade edilmiştir [46].

Fruktoz dehidrasyonu için kullanılan çözücü sistemleri temel olarak monofazik sistemlere ve bifazik (iki fazlı) sistemlere ayrılabilir. Monofazik sistemler arasında dimetil sülfoksit (DMSO) şimdiye kadar yüksek HMF verimleri ile yüksek fruktoz dönüşümleri ve huminler de dahil olmak üzere nispeten daha düşük yan ürün içeriği sağlamıştır. Ayrıca, tetrahidrofuran (THF), aseton ve izopropil alkol gibi diğer düşük kaynama noktalı solventler de kullanılmıştır [47]. Su kullanılan monofazik sistemlerde HMF üretimi düşük verimde olup furan halkasının açılma ürünleri olan levulinik asit (LA) ve formik aside hızlı rehidrasyonu nedeniyle uygun bir reaksiyon ortamı değildir (Şekil 5). Bunlar asidik sulu sistemdeki HMF'nin düşük seçiciliğinin ana nedenleridir. HMF'nin sulu ortam içinde rehidrasyonu, oluşturulduğu sırada reaksiyon karışımından HMF'nin uzaklaştırılmasıyla azaltılabilir. Bu amaçla, sulu faz ile karışmayan ve tercihen suya göre HMF için daha yüksek bir dağılım katsayısına sahip olan bir ekstraksiyon fazı (organik faz) kullanılabilir. Daha sonra HMF organik fazdan geri kazanılır. Böyle bir sisteme bifazik sistem denir. Fazlar arasındaki dağılım katsayısı oldukça önemlidir, çünkü düşük bir değer büyük miktarlarda organik solventin kullanılmasını ve HMF geri kazanımı için büyük miktarlarda enerji harcanmasını gerektirecektir. Metil izobütül keton (MIBK), 2-metil tetrahidrofuran (2-MeTHF), diklorometan (DCM) ve saf-butanol gibi organik solventlerin ekstrakte edici solvent olarak etkili olduğu kanıtlanmıştır [48].



Şekil 5. Su ile HMF'nin rehidrasyonu [13]

Bifazik sistemlerde karbonhidratlardan HMF üretimi ilk olarak 1956 yılında Peniston tarafından yapılmıştır. Bu çalışma, 0,05 M sulu sülfürik asit ( $H_2SO_4$ ) içinde ağırlıkça %2 fruktoz bulunduran sulu ortamla aynı miktarda n-butanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 170 °C'de 8 dakika sonra %68 HMF verimi elde edildiği bildirilmiştir [49]. Bifazik sistemde HMF üretiminin en eski örneğini temsil eden bu deneysel çalışmadan sonra 1977'de Kuster ve Van der Steen, fruktozdan HMF üretimi için MIBK/su oranının 7,5 olarak seçildiği bifazik sistemler üzerinde çalışmışlardır. Reaksiyon, sürekli karıştırılmalı bir tank reaktöründe (CSTR) gerçekleştirilmiş ve 5 dakika boyunca 190 °C'de 1 M fruktoz ve 0,1 M fosforik asit ( $H_3PO_4$ ) içeren ortamda %69'luk HMF verimi elde edilmiştir. Bu sonuçlar, HMF'nin organik faza sürekli olarak taşınmasının HMF seçiciliğini arttırdığını göstermiştir [41]. Başka bir üretim sistemi de katı katalizör olarak SPC-108 ve reaksiyon ortamı olarak su-MIBK iki fazlı bir çözücü sistemi ile tasarlanmıştır. Bu sistem çeşitli karbonhidratların dehidrasyonu için test edilmiştir. 78 °C'de fruktozdan %72

ve glikozdan %10'dan daha az bir HMF verimi elde edilmiştir. Bu sistem ayrıca inülin'den %67 verim, sakkarozdan %41 verim ve rafinozdan %27 verim ile HMF üretilmiştir [13].

### 3.2. HMF kullanım alanları

Bir furan halkasına bağlı aldehit ve hidroksil gruplarının varlığı nedeniyle HMF, çeşitli katma değerli kimyasalları sentezlemek için uygun başlangıç moleküllerinden biridir [50]. HMF biyoyakıt hammaddesi olarak kullanılan 2,5-dimetilfuran (DMF) ve diğer moleküllerin üretimi için sadece ara madde olarak değil, aynı zamanda levulinik asit (LA), 2,5-furandikarboksilik asit (FDCA), 2,5-diformilfuran (DFF), 2,5-dihidroksimetilfuran (DHMF) gibi yakıt ve polimer alanında yüksek potansiyele sahip önemli moleküller için de çok yararlı bir kimyasal maddedir [42]. HMF, biyokütle kaynakları ve biyokimyasallar arasındaki boşluğu kapatmak için anahtar bir araçtır. Örneğin, FDCA şu anda, polietilen tereftalat (PET) ile karşılaştırıldığında üstün bariyer özelliklerine sahip yeni polimer poli (etilen furanoat) (PEF) üretimi için tereftalik aside (TPA) alternatif bir monomer olarak geliştirilmektedir [47]. HMF'den türetilen DMF, etanol (23 MJ<sup>-1</sup>)'den daha yüksek ve benzene (35 MJ L<sup>-1</sup>) yakın bir enerjiye sahiptir [51]. Ayrıca, HMF türevi bazı plastik malzemelerin genellikle biyo-bozunur olması yeşil ve düşük karbonlu ekonomiler üzerinde büyük öneme sahiptir [41]. Tablo 2'de HMF'den üretilen kimyasallar ve bu kimyasalların kullanım alanları özetlenmiştir.

**Tablo 2.** HMF'den üretilen kimyasallar ve uygulamaları [38]

Kimyasal	Potansiyel Pazarı/Uygulama Alanları
Formik asit	Hammadde kimyasalı Tekstil Katalizörler
2,5-Furandikarboksilik asit (FDCA)	Polimerler İlaçlar
2,5-di (Hidroksimetil) furan (DHMF)	Solventler Polimerler
2,5-Dimetilfuran (DMF)	Biyoyakıtlar
2,5-Diformilfuran (DFF)	İlaçlar Fungus ilaçları
2,5-di (Hidroksimetil) tetrahidrofuran (DHM-THF)	Solventler
2,5-Furandikarboksiyaldehit (FDC)	Polimerler Reçineler

### 4. GA ve HMF'nin Birlikte Üretimi

GA ve HMF farklı tesis, metot, hammadde ve maliyetlerle üretilebilen küresel ekonomide ticari değeri olan iki platform kimyasalıdır. Bu iki kimyasalın üretimi çok eski zamanlardan beri büyük ilgi görmüştür ve farklı biyokütle kaynakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yeni substrat kaynaklarının (peynir altı suyu, mısır nişastası, konserve melası vb.) araştırılmasına yönelik yapılan araştırmalara rağmen yüksek verimlilikte GA üretimi için karbon kaynağı olarak genellikle glikoz kullanıldığı görülmektedir [52]. Benzer şekilde HMF üretmek için ucuz hammaddeler araştırılmakla birlikte en uygun başlangıç materyali olarak furanoz yapısı nedeniyle fruktoz olduğu bilinmektedir. Fruktozun hammadde olarak kullanıldığı çalışmalarda daha yüksek reaksiyon hızına ve seçiciliğine ulaşıldığı görülmektedir. Bununla birlikte, fiyatı büyük ölçekli ticari HMF üretiminde uygulanamayacak kadar yüksektir [40]. Fruktoz ile karşılaştırıldığında glikoz daha bol ve ucuz bir heksozdur. Fakat, glikozun piranoz halka yapısının kararlı doğası nedeniyle, yan reaksiyonları önlemek ve HMF verimini arttırmak için zor reaksiyon koşulları ve çeşitli katalizörler gereklidir [14].

GA ve HMF'nin birlikte üretiminde her iki ürününde başlangıç maddesini (GA'nın başlangıç maddesi olan glikoz ve HMF'nin başlangıç maddesi olan fruktoz) ihtiva eden biyokütle kaynaklarının kullanımı da son zamanlarda araştırılmaktadır. Bu biyokütle kaynaklarından biri şekerin kristalizasyonu sonucu oluşan bir yan ürün olan melastır. Melas, ucuz olması ve yüksek oranda sakkaroz (%48-51) içermesi gibi nedenlerden dolayı GA ve HMF'nin birlikte üretiminde kullanılabilecek karbon kaynaklarından biridir [53]. Bununla birlikte, içerdiği ağır



metaller ve renk bileşenleri fermantasyon çalışması sırasında ortam pH'sını etkileme, enzimleri inaktif hale getirme ve mikrobiyal gelişimi inhibe etme gibi önemli problemlere yol açmaktadır. Bu nedenle bazı kimyasal ve fiziksel ön işlemlere tabii tutularak biyoteknolojik üretim öncesi kullanıma uygun hale getirilir [54, 55]. Uygulanacak ön işlemler fazladan maliyet ve verim kaybına yol açmaktadır. Ayrıca, melasla taşınan şeker dışı bileşenlerin safsızlık oluşturması son ürüne bağlı olarak ayırma ve saflaştırma aşamalarında sorunlar oluşturabilmektedir. GA ve HMF'nin birlikte üretiminde yüksek fruktoz mısır şurubunu (HFCS) ve türevlerinin (HFCS-42 ve HFCS-55) kullanımı da üretim maliyetlerinin düşürülmesi bakımından dikkat çekmektedir. HFCS-42, yaklaşık %42 fruktoz, %53 glikoz içerirken, HFCS-55 yaklaşık %55 fruktoz, %41 glikoz içermektedir [56]. GA ve HMF'nin biyokütle kaynağı olarak HFCS-55'den birlikte üretimini amaçlayan bir çalışmada, HMF üretiminde enzimatik yolla üretilen GA'nın katalizör olarak kullanımı incelenmiştir. 2-MeTHF organik solventi ve ağırlıkça %2'lik  $\text{CaCl}_2$  içeren fruktoz-GA çözeltisinden 200 W mikrodalga sistemi yardımıyla (10 dakika boyunca 150 °C'de) elde edilen HMF'nin verimi yaklaşık olarak %45 olarak bulunmuştur. Ortama eklenen  $\text{CaCl}_2$  ilavesi ile GA'nın katalizör olarak kullanımının çok daha etkin olduğu (HMF verimi %85) bildirilmiştir [45].

GA ve HMF'nin birlikte üretiminde kullanılabilir diğer bir biyokütle kaynağı olan sakkaroz, ucuz ve yeryüzünde bol bulunan glikoz ve fruktoz birimlerinden oluşan bir disakkarittir. Birlikte üretimde diğer karbon kaynakları da kullanılabilirle beraber, sakkaroz düşük fiyatı nedeniyle oldukça cazip bir hammadde haline gelmektedir (Tablo 1). Ayrıca, sakkaroz hücrelerin ve protein yapısının oksidasyon, ısı ve asit gibi çevresel streslerden korunması üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir, bu nedenle biyo-ürün oluşumunu artırmak için uygun bir karbon kaynağı olmaktadır [57]. Son zamanlarda sakkarozun bu özellikleri bilim insanlarının dikkatini çekmiştir. Platform kimyasallarının daha düşük maliyetlerle elde edilmesinde sakkaroz hidrolizatından (glikoz-fruktoz çözeltisi) tek proste birlikte üretim çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Wu vd. [14] tarafından gerçekleştirilen sakkaroz hidrolizatıyla GA ve HMF'nin birlikte üretimin incelendiği çalışmada, ilk olarak enzimatik oksidasyon yardımıyla glikozdan (GO/katalaz:1/4) GA elde edilmiştir. Ardından içerisinde GA ile birlikte fruktoz bulunan ortama ilave edilen  $\text{H}_2\text{SO}_4$  katalizörlüğünde HMF üretimini incelenmiştir. Çalışma sonunda %73,8 HMF verimi elde edilirken fermantasyon sonrası elde edilen GA'nın %95'inin bozunmadan kaldığı ifade edilmiştir. Çalışmada, GA'nın üretildiği sulu faz ile uygun dağılım katsayısına sahip organik solventler ile bifazik sistem oluşturulmuştur. Bifazik ortamda GA'nın varlığı fruktoz dehidrasyonundan etkilenmeyerek sulu fazda kalmıştır. Dehidrasyon reaksiyonundan sonra, HMF organik faza geçeceğinden GA'dan ayrılması yüksek oranlarda gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, glikozun GA'ya fermantasyonu sonrası ortamda kalan fruktozdan da HMF'nin tek proste birlikte üretimi maliyetlerin düşürülmesini sağlamaktadır. Aynı biyokütle kaynağından bu değerli platform kimyasallarının üretimi ile ilgili çalışmaların oldukça sınırlı olduğu ve bu alanda yapılan çalışmaların devam ettiği görülmektedir.

**Tablo 1.** Güncel bazı biyokütle kaynakları ve fiyatları (cent (¢) / kg) [58]

Biyokütle	Fiyat (¢/kg)
Sakkaroz	50,59
Glikoz	90,39
HFCS-42	79,19
HFCS-55	93,76

## 5. Ürünlerin (HMF ve GA) Ayrılması ve Saflaştırılması

Son zamanlarda birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen, HMF'nin yüksek üretim maliyeti ticari ölçekte halen önemli bir sorundur. Yüksek hammadde maliyeti, düşük ürün seçiciliği ve yüksek saflaştırma maliyeti başlıca kısıtlamalardır. Bu dezavantajları önlemek için, reaktif fazda (sulu faz) oluşumundan hemen sonra bir organik faza (ekstraksiyon fazı) HMF'nin eş zamanlı ekstraksiyonu için bifazik sistemler kullanılmaya başlanmıştır. Bifazik sistemin organik katmanı, reaktif fazda oluşumundan hemen sonra organik fazda sürekli HMF birikimi için bir ekstraksiyon fazı görevi görür. Bunlar, sulu ortamda oluşan çözünür polimerler veya huminler gibi yan ürünlerin oluşumunu önleyerek HMF'nin üretim verimini arttırabilirler. Ayrıca bu yöntem, harcama homojen veya heterojen katalizörleri içeren sulu fazdan kolayca ayrılmasına ve yeniden kullanılabilirliğine izin verir. Etkili ekstraksiyonun belirlenmesinde organik solventlerin seçimi oldukça önemlidir çünkü organik ve sulu faz arasındaki partiyon (dağılım) katsayısı uygun oranda olması gerekmektedir. Bu problem, etkili ekstraksiyon çözümleri olduğu bildirilen MIBK, DCM, etil asetat, THF, dietil eter ve aseton gibi organik çözümlerin kullanılmasıyla aşılmıştır [42]. HMF'nin bifazik sistemlerden saflaştırılması, esas olarak sulu

fazın organik fazdan izolasyonunu ve ardından HMF'yi organik fazdan ayırmak için organik fazın distilasyonunu gerektirir. Bir çalışmada, fruktozu HMF'ye dönüştürmek için formik asit katalizörü içeren sulu faz kullanılmış ve oluşan HMF, kendiliğinden organik faza (1-butanol) aktarılmıştır. Daha sonra, saflaştırılmış HMF üretmek için HMF damıtılmıştır. HMF'nin saflaştırılmasıyla bağlantılı damıtma maliyetini azaltmak için, daha düşük kaynama noktasına sahip organik çözücülerin kullanılması gerektiği ifade edilmiştir. Bu solventlerin HMF verimini arttırmasının yanı sıra düşük kaynama noktalarına sahip olmaları distilasyon işlemlerinde onları daha kullanışlı ve ekonomik yapmaktadır [59].

GA'nın fermantasyon ortamından saflaştırılması hem fungus hem de bakteri sistemlerinde benzerdir ve büyük ölçüde kullanılan karbon kaynağı türlerine ve fermantasyon ortamının nötralizasyonu için izlenen yöntemlere bağlıdır. Geri kazanım süreci GA, glukono-d-lakton, kalsiyum glukonat ve sodyum glukonat gibi ürünlerin türüne göre farklılık gösterebilir. Örneğin ortamda sodyum glukonat elde etmek için, fermantasyondan sıvısı filtre edilir, daha sonra aktif karbon kolonu kullanılarak rengi giderilir, vakumlu kurutucu altında konsantre edilir. Sodyum glukonat elde edilene kadar NaOH ile pH 7,5'e nötrleştirilir. Daha sonra sprey veya tamburlu kurutucu kullanılarak kurutulur [27]. Fermantasyon sıvısından GA ekstraksiyonu için iyon değiştirme yöntemleri de kullanılmaktadır [60].

## 6. Sonuç

Biyokütle kaynaklarından değerli ürünlerin birlikte üretilmesi üretim maliyetlerinin düşürülmesi bakımından önemlidir. Farklı metotlarla üretilen değerli ürünlerin birlikte üretilmesine yönelik araştırmalar, yeni alternatif üretim yöntemleri arasında görülmektedir. Birçok uygulama alanına sahip olan HMF ve GA, farklı prosesler ile üretilen biyokütle kaynaklı gelecek vaat eden önemli platform kimyasallarıdır. Fruktoz, HMF oluşumuna faydalı olan doğal furanoz yapısı nedeniyle HMF hazırlanmasında kullanılan en iyi hammaddedir. Bununla birlikte, fiyatı büyük ölçekli HMF üretiminde uygulanamayacak kadar yüksektir. Diğer platform kimyasalı olan GA üretimi mikrobiyal fermantasyon, enzimatik kataliz, kimyasal ve elektrokimyasal gibi çeşitli yöntemler ile gerçekleşen basit bir oksidasyon işlemi olmasına rağmen, ticari olarak GA üretiminde ana hammadde kaynağı olan glikozun kullanılması prosesin maliyetini arttırmaktadır. Ayrıca, halihazırda üretimleri farklı tesis ve metotlarla gerçekleştiğinden bu durum üretim maliyetini ve enerji ihtiyacını daha da arttırmaktadır. Bunların ekonomik bir şekilde ticarileştirilebilmesi için nispeten daha düşük maliyetli biyokütle kaynaklarından yüksek verimler elde edilerek birlikte üretilmeleri önemli bir alternatif yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. Farklı mekanizmalar ve hammaddelerle üretilen bu değerli platform kimyasallarını tek bir prosesle sakkarozdan başlayarak üretilmesi, farklı metotlarla üretilmelerine kıyasla düşük maliyetlerle ve daha sürdürülebilir bir yöntem olacaktır. Bu yönde yapılacak çalışmaların GA ve HMF'nin farklı sistemlerden üretildikleri maliyetin altında elde edilmelerinin yakıt, kimyasal maddeler ve polimer endüstrileri gibi ekonomilere katkı sağlayacağı açıktır.

## Kaynaklar

- [1] Ma S, Li W, Zhang, S, Ge D, Yu J, Shen, X. Influence of sodium gluconate on the performance and hydration of Portland cement. *Constr Build Mater* 2015; 91, 138–144.
- [2] Chun B, Dair B, Macuch P, Wiebe D, Porteneuve C, Jeknavorian A. The development of cement and concrete additive: based on xylonic acid derived via bioconversion of xylose. *Appl Biochem Biotechnol* 2006; 131, 645–658.
- [3] Zhang H, Liu G, Zhang J, and Bao J. Fermentative production of high titer gluconic and xylonic acids from corn stover feedstock by *Gluconobacter oxydans* and techno-economic analysis. *Bioresource Technology* 2016; 219, 123-131.
- [4] Zhou X, and Xu Y. Integrative process for sugarcane bagasse biorefinery to co-produce xylooligosaccharides and gluconic acid. *Bioresource technology* 2019; 282, 81-87.
- [5] Mika LT, Csefalvay E, and Nemeth A. Catalytic conversion of carbohydrates to initial platform chemicals: chemistry and sustainability. *Chemical reviews* 2018; 118(2): 505-613.
- [6] Singh OV, and Kumar R. Biotechnological production of gluconic acid: future implications. *Applied microbiology and biotechnology* 2007; 75(4): 713-722.
- [7] Zhang Z, and Huber GW. Catalytic oxidation of carbohydrates into organic acids and furan chemicals. *Chemical Society Reviews* 2018; 47(4): 1351-1390.
- [8] Kirimura K and Yoshioka I. Gluconic and itaconic acids (2019).
- [9] Ramachandran S, Fontanille P, Pandey A, Larroche C. Gluconic acid: Properties, applications and microbial production. *Food Technology and Biotechnology* 2006; 44(2): 185-195.
- [10] Roehr M, Kubicek CP, Komínek J. Gluconic acid. *Biotechnology: Products of Primary Metabolism* 1996; 347-362.
- [11] Hustede H, Haberstroth HJ, Schinzig E. Gluconic acid. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 1989; 449–56.
- [12] Gehring M, Vogel D, Tennhardt L, Weltin D, and Bilitewski B. Bisphenol A contamination of wastepaper, cellulose and recycled paper products. *WIT Transactions on Ecology and the Environment* 2004; 78.

- [13] Saha B, and Abu-Omar M. Advances in 5-hydroxymethylfurfural production from biomass in biphasic solvents. *Green Chemistry* 2014; 16(1): 24-38.
- [14] Wu H, Huang T, Cao F, Zou Q, Wei P, Ouyang P. Co-production of HMF and gluconic acid from sucrose by chemo-enzymatic method. *Chemical Engineering Journal* 2017; 327, 228-234.
- [15] Ishag OAO, Mohammed AM, Ali MM, Omer AB. Catalytic Conversion of Sugarcane Bagasse into 5-Hydroxymethylfurfural. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry* 2019; 1-9.
- [16] Ramachandran S, Nair S, Larroche C, Pandey A. Gluconic Acid. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* 2017; 577-599.
- [17] Gluconic Acid Market Size. <https://www.marketwatch.com/press-release/global-gluconic-acid-market-size-2022-analysis-by-recent-development-geographical-regions-trends-and-forecast-to-2028-research-report-by-absolute-reports-15.05.2022>
- [18] Canete-Rodriguez AM, Santos-Duenas IM, Jimenez-Hornero JE, Ehrenreich A, Liebl W, Garcia-Garcia I. Gluconic acid: properties, production methods and applications-an excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste biovalorization. *Process Biochemistry* 2016; 51(12): 1891-1903.
- [19] Bankar SB, Bule MV, Singhal RS, and Ananthanarayan L. Glucose oxidase-an overview. *Biotechnology advances* 2009; 27(4): 489-501.
- [20] Deller K, Krause H, Peldszus E, Despeyroux B. U.S. Patent No. 5,132,452. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office 1992.
- [21] Schinzing E, Hustede H. and Haberstroth H. Gluconic acid. *ULLMANN'S Encyclopedia of Industrial Chemistry* 1989; 449, 456.
- [22] Tanyıldızı MŞ, Altundoğan, HS ve Çelik V. Glukonik asit üretim yolağı aktifleştirilmiş ve endojenik oksijen kaynağı sağlanmış rekombinant suşlar kullanılarak glukonik asit üretimi. TUBİTAK 1001 Ar-Ge Projesi Sonuç Raporu (117R003) 2020; Fırat Üniversitesi, Elazığ.
- [23] Lockwood LB. Organic acid production of acids. *Filamentous fungi* 1975; 1, 140-157.
- [24] Purane NK, Sharma SK, Salunkhe PD, Labade DS, Tondlikar MM. Gluconic acid production from golden syrup by *Aspergillus niger* strain using semiautomatic stirred-tank fermenter. *J Microb Biochem Technol* 2012; 4, 92-95.
- [25] Ahmed K, Valeem EE, Mahmood T. Optimal cultural conditions for industrial enzyme production by using shaken flask technique of submerged fermentation. *Journal of Biology* 2015; 5(1): 21-26.
- [26] Roehr M, Kubicek CP, and Kominek J. Gluconic acid. *Biotechnology: Products of Primary Metabolism* 1983; 347-362.
- [27] Pal P, Kumar R, and Banerjee S. Manufacture of gluconic acid: A review towards process intensification for green production. *Chemical Engineering and Processing Process Intensification* 2016; 104, 160-171.
- [28] Singh OV, Jain RK, Singh RP. Gluconic acid production under varying fermentation conditions by *Aspergillus niger*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology: International Research in Process, Environmental and Clean Technology* 2003; 78(2-3): 208-212.
- [29] Velizarov S, and Beschkov V. Production of free gluconic acid by cells of *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnology Letters* 1994; 16 (7): 715-720.
- [30] Ano Y, Shinagawa E, Adachi O, Toyama H, Yakushi T, Matsushita K. Selective, high conversion of d-glucose to 5-keto-d-gluconate by *Gluconobacter suboxydans*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2011; 75(3): 586-589.
- [31] Sun WJ, Yun QQ, Zhou YZ, Cui FJ, Yu SL, Zhou Q, Sun L. Continuous 2-keto-gluconic acid (2KGA) production from corn starch hydrolysate by *Pseudomonas fluorescens* AR4. *Biochemical engineering journal* 2013; 77, 97-102.
- [32] Klasen R, Bringer-Meyer S, Sahm H. Biochemical characterization and sequence analysis of the gluconate: NADP 5-oxidoreductase gene from *Gluconobacter oxydans*. *Journal of bacteriology* 1995; 177(10): 2637-2643.
- [33] Cardenas LZ, and Cardenas BZ. Production of organic acids via fermentation of sugars generated from lignocellulosic biomass. *Lignocellulosic Biorefining Technologies* 2020; 203-246.
- [34] Tarekegn F, and Jabasingh SA. Gluconic acid production from cane molasses using *Aspergillus carneus*. *Emerging Trends in Chemical Engineering* 2019; 6(3): 37-44.
- [35] Chatterjee S, Gangopadhyay S, Patra S, Chowdhury SP. An overview of different approaches for sustainable production and convertibility of hydroxymethylfurfural. *IJRET* 2016; 5(1): 45-52.
- [36] Zhang Z, O'Hara IM, Rackemann DW, and Doherty WO. Low temperature pretreatment of sugarcane bagasse at atmospheric pressure using mixtures of ethylene carbonate and ethylene glycol. *Green Chemistry* 2013; 15(1): 255-264.
- [37] Menegazzo F, Ghedini E, Signoreto M. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) production from real biomasses. *Molecules* 2018; 23(9): 2201.
- [38] Mukherjee A, Dumont MJ, Raghavan V. Sustainable production of hydroxymethylfurfural and levulinic acid: Challenges and opportunities. *Biomass and Bioenergy* 2015; 72, 143-183.
- [39] Kong QS, Li XL, Xu HJ, and Fu Y. Conversion of 5-hydroxymethylfurfural to chemicals: A review of catalytic routes and product applications. *Fuel Processing Technology* 2020; 209, 106528.
- [40] Steinbach D, Kruse A, Sauer J. Pretreatment technologies of lignocellulosic biomass in water in view of furfural and 5-hydroxymethylfurfural production-a review. *Biomass Conversion and Biorefinery* 2017; 7(2): 247-274.
- [41] Teong SP, Yi G, Zhang Y. Hydroxymethylfurfural production from bioresources: past, present and future. *Green Chemistry* 2014; 16(4): 2015-2026.
- [42] Rosatella AA, Simeonov SP, Frade RF, and Afonso CA. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) as a building block platform: Biological properties, synthesis and synthetic applications. *Green Chemistry* 2011; 13(4): 754-793.

- [43] van Putten RJ, Van Der Waal JC, De Jong ED, Rasrendra CB, Heeres HJ, de Vries JG. Hydroxymethylfurfural, a versatile platform chemical made from renewable resources. *Chemical reviews* 2013; 113(3): 1499-1597.
- [44] Souzanchi S. Catalytic conversion of fructose, glucose and industrial grade sugar syrups to 5-hydroxymethylfurfural, a platform for fuels and chemicals. *Electronic Thesis and Dissertation Repository* 2016; 4070.
- [45] Lin C, Wu H, Wang J, Huang J, Cao F, Zhuang W, and Ouyang P. preparation of 5-hydroxymethylfurfural from high fructose corn syrup using organic weak acid in situ as catalyst. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 2020; 59(10): 4358-4366.
- [46] Motagamwala AH, Won W, Sener C, Alonso DM, Maravelias CT, and Dumesic JA. Toward biomass-derived renewable plastics: Production of 2, 5-furandicarboxylic acid from fructose. *Science advances* 2018; 4(1): 9722.
- [47] Pyo SH, Sayed M, Hatti-Kaul R. Batch and continuous flow production of 5-hydroxymethylfurfural from a high concentration of fructose using an acidic ion exchange catalyst. *Organic Process Research and Development* 2019; 23(5): 952-960.
- [48] Sweygens N, Alewaters N, Dewil R, Appels L. Microwave effects in the dilute acid hydrolysis of cellulose to 5-hydroxymethylfurfural. *Scientific reports* 2018; 8(1): 1-11.
- [49] Peniston QP. U.S. Patent No. 2,750,394. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office 1956.
- [50] Zou X, Zhu C, Wang Q, Yang G. Catalytic dehydration of hexose sugars to 5-hydroxymethylfural. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2019; 13(1): 153-173.
- [51] Shamsul NS, Kamarudin SK, Rahman NA. Study on the physical and chemical composition of agro wastes for the production of 5-hydroxymethylfurfural. *Bioresource technology* 2018; 247, 821-828.
- [52] Sirianuntapiboon S, Phothilangka P, Ohmomo S. Decolorization of molasses wastewater by a strain No. BP103 of acetogenic bacteria. *Bioresource Technology* 2004; 92(1): 31-39.
- [53] Arimi MM, Zhang Y, Götz G, Kiriamiti K, Geißen SU. Antimicrobial colorants in molasses distillery wastewater and their removal Technologies. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2014; 87, 34-43.
- [54] Küçükaşık F, Kazak H, Güney D, Finore I, Poli A, Yenigün O, Öner ET. Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011; 89(6): 1729– 1740.
- [55] Roukas T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. *Process Biochemistry* 1998; 33(8): 805–810.
- [56] Khorshidian N, Shadnoush M, Zabihzadeh Khajavi M, Sohrabvandi S, Yousefi M, and Mortazavian AM. Fructose and high fructose corn syrup: are they a two-edged sword. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2021; 72(5): 592-614.
- [57] Akdağ B, Investigation of thermostable recombinant glucose isomerase production by sucrose utilizing *Escherichia coli*. M. Sc. Thesis, Middle East Technical University, 2013.
- [58] Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA). Şeker ve Tatlandırıcılar Yıllığı Tabloları. <https://www.ers.usda.gov/data-products/sugar-and-sweeteners-yearbook-tables/> 10.06.2022.
- [59] Dashtban M, Gilbert A, and Fatehi P. Recent advancements in the production of hydroxymethylfurfural. *Rsc Advances* 2014; 4(4): 2037-2050.
- [60] Kumar R, Vikramachakravarthi D, and Pal P. Production and purification of glutamic acid: A critical review towards process intensification. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 2014; 81, 59-71.