

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**FRUKTOZDAN 5-HİDROKSİMETİLFURFURAL
(HMF) ÜRETİMİ VE ANTİKANSEROJEN ETKİSİNİN
İN VİTRO İNCELENMESİ**

Sadiye Kübra BAŞKAYA

Yüksek Lisans Tezi
Anabilim Dalı: Biyomühendislik
Danışman: Doç. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI

EYLÜL-2017

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FRUKTOZDAN 5-HİDROKSİMETİLFURFURAL ÜRETİMİ VE
ANTİKANSEROJEN ETKİSİNİN İN VİTRO İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Sadiye Kübra BAŞKAYA
141132110

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 15.08.2017

Tezin Savunulduğu Tarih: 06.09.2017

Tez Danışmanı: Doç. Dr. M. Şaban TANYILDIZI (Fırat Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. H. Soner ALTUNDOĞAN (Fırat Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Harun ÇİFTÇİ (Ahi Evran Üniversitesi)

AĞUSTOS-2017

ÖNSÖZ

Bu tez konusu TÜBİTAK tarafından 2210-C programı ile desteklenmiştir. Deneysel çalışmalar FÜBAP MF.16.27 nolu proje ile yürütülmüştür.

Bu tez çalışması süresince engin bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim, yol gösterip rehberlik eden danışman hocam Sayın Doç. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI'na,

Ayrıca laboratuvar çalışmalarında yardımını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Veyis SELEN'e,

Deneysel çalışmalarım esnasında destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Soner ALTUNDOĞAN'a,

Tez çalışmamdaki toksisite testinin yapılması aşamasında bizleri yalnız bırakmayan, yardım ve desteklerini esirgemeyen Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ'a,

Hayatım boyunca maddi ve manevi olarak destekleyen ve her zaman yanımda hissettiğim değerli aileme

Ve sonsuzluğa uğurlamanın hüznünü yaşadığımız, tez konumun belirlenmesini ve planlanmasını sağlayan ilk danışmanım merhum Yrd. Doç. Dr. Sayın Serhat ELÇİÇEK'e

Teşekkürlerimi arz ederim.

Sadiye Kübra BAŞKAYA
ELAZIĞ-2017

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET.....	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VII
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
EKLER LİSTESİ	IX
SİMGELER LİSTESİ.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. HİDROKSİMETİLFURFURAL (HMF) ÜRETİMİ HAKKINDA GENEL BİLGİ	2
2.1. HMF'nin Kimyası	2
2.1.1. Hidroksimetil Gruplarının Reaksiyonları.....	2
2.1.2. Formil Gruplarının Reaksiyonları	4
2.1.3. Furan Halkasının Reaksiyonları	5
2.2. HMF'nin Kullanım Alanları.....	6
2.3. HMF Üretimi.....	9
2.3.1. Reaksiyon Mekanizması	12
2.3.2. Homojen Katalizörler	15
2.3.3. Heterojen Katalizörler ile HMF Üretimi	16
2.3.4. Sulu Çözeltilerde HMF Sentezi.....	17
2.3.5. Diğer Çözücüler İle HMF Sentezi.....	18
3. MATERYAL VE METOT	20
3.1. Materyaller	20
3.2. HMF Üretimine Yönelik Deneylerin Yapılışı.....	20
3.2.1. Ön Denemeler	23
3.2.2. HMF Üretimine Optimizasyonuna Yönelik Deneysel Tasarım.....	23
3.2.3. Analizler	25
3.3. DMSO'nun ve Reçinenin Geri Kazanımına İlişkin Çalışmalar	25
3.4. Toksisite Çalışması	26

4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	29
4.1.	Ön Denemelere Ait Sonuçlar	29
4.2.	Optimizasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar	30
4.3.	Reçine ve DMSO'nun Geri Kazanımı	40
4.4.	Toksisite Çalışmasına Ait Sonuçlar	41
5.	SONUÇLAR	43
6.	ÖNERİLER.....	45
	KAYNAKLAR.....	46
	EKLER.....	56
	ÖZGEÇMİŞ.....	58



ÖZET

Bu çalışmada, fruktozdan 5-Hidroksimetilfurfural (HMF) üretimi ve antikanserojen etkisi araştırılmıştır. Fruktozdan HMF üretimi karıştırmalı basınç reaktöründe gerçekleştirilmiş ve deneysel şartlar, cevap yüzey yöntemi (RSM) kullanılarak optimize edilmiştir. Basınç reaktörü kullanılarak fruktozdan HMF üretimi için optimum şartlar 50 g/l fruktoz konsantrasyonu, 40 g/l katyonik iyon değiştirici reçine (Amberlysts 15 hydrogen form) miktarı, 120 °C sıcaklık ve 104 dk süre olarak belirlenmiş olup bu şartlarda HMF verimliliğinin % 59.9 olacağı bulunmuştur. Fruktoz konsantrasyonunun ise optimum olarak belirlenen konsantrasyonunun üstündeki noktalarda yan ürün oluşumunun artışına sebep olarak HMF üretimini olumsuz yönde etkilemiştir. Aynı şekilde iyon değiştirici reçine miktarı da optimum noktaya kadar HMF oluşumunu artırmış ve daha sonra HMF üretimini etkilememiştir. Fruktozun HMF'ye dehidrasyonu için katalizör olarak kullanılan iyon değiştirici reçinelerin önemli olduğu görülmüştür. Fruktozdan HMF üretimi için çözücü olarak kullanılan dimetilsülfoksit (DMSO) vakumlu evaporatör yardımıyla yüksek oranda geri kazanılmıştır. Böylelikle, çözücü olarak kullanılan DMSO'nun yüksek oranda geri kazanımı HMF üretim yönteminin ekonomikliğı açısından önemlidir. Ayrıca reaksiyon sonrasında reçine geri kazanımı da test edilmiş ve kullanılan reçinenin de geri kazanılabileceğı ortaya konulmuştur. HMF'nin antikanserojen etkisi hem sağlıklı hücrelerde hem de kanser hücrelerinde incelenmiş ve antikanserojen etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fruktoz, DMSO, 5-Hidroksimetilfurfural (HMF), Karıştırmalı Basınç Reaktörü.

SUMMARY

5-HYDROXYMETHYLFURFURAL (HMF) PRODUCTION FROM FRUCTOSE AND IN VITRO INVESTIGATION OF ANTICANCER EFFECT

In this study, fructose 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) production and anticancer effect of HMF were investigated. HMF production from fructose was carried out in a stirred pressure reactor and optimized the experimental conditions using response surface method (RSM). Optimum conditions for HMF production were determined as 50 g/l fructose concentration, 40 g/l cationic ion exchange resin (Amberlysts 15 hydrogen form) amount, 120 °C temperature and 104 min time and the HMF efficiency was found to be 59.9 under these conditions. When the fructose concentration is higher than optimum value, the production of HMF is affected in negative because of increase in side product amounts. The amounts of ion exchange resin increased HMF production until optimum value and then the production is not affected. The use of ion exchange resin as catalyst for dehydration of fructose to HMF is important. DMSO which is used as solvent for dehydration of fructose to HMF is recovered by evaporation. Thus recovered DMSO is economically important for production of HMF. Moreover it was also shown that the used resin can be recovered from the process. The anticancer effect of HMF has been studied in both healthy and cancer cells and has been shown to have anticarcinogenic effect.

Keywords: Fructose, DMSO, 5-Hydroxymethylfurfural (HMF), Stirred Pressure Reactor.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. 5-HMF'deki hidroksimetil grubunun reaksiyonları	3
Şekil 2.2. 5-HMF'deki formil gruplarının reaksiyonları	5
Şekil 2.3. 5-HMF'deki furan halkasının reaksiyonları	5
Şekil 2.4. HMF oksidasyon ürünleri	7
Şekil 2.5. HMF redüksiyon ürünleri	8
Şekil 2.6. Hidroksimetilfurfural anahtar kelimesinin bir makalenin ya da patentin başlığında (Web of Science arama motorunda) ya da özetlerinde (Espacenet.org arama motorunda) yıllara göre dağılımı	10
Şekil 2.7. Selülozdan 5-HMF'ye dönüşüm reaksiyon mekanizması	13
Şekil 2.8. Glikozdan 2 farklı 5-HMF üretim yolu	14
Şekil 2.9. D-fruktozun 4 tautomerik formu	14
Şekil 2.10. 5-HMF sentez prosesinde yan reaksiyon mekanizması ve ara ürün oluşumu	15
Şekil 2.11. Glikozun fruktoza izomerizasyonunda [EMIM] [Cl]-CrCl ₂ 'nin etkisi... ..	16
Şekil 2.12. Amberlyst 15 ve hidrotalsit katalizörleri ile glikozdan 5- HMF sentezi .	17
Şekil 2.13. D-fruktozun 5-HMF'ye dehidrasyonu için önerilen mekanizma.	19
Şekil 3.1. Karıştırmalı Basınç Reaktörünün şematik gösterimi	21
Şekil 3.2. Kullanılan basınç reaktörü sisteminin görünümü	22
Şekil 3.3. Vakumlu evaporatör düzeneğinin görünümü	26
Şekil 4.1. Teorik olarak hesaplanan HMF verimliliği ile deneysel olarak bulunan HMF verimliliği değerlerin dağılımı.	35
Şekil 4.2. Reçine miktarı- Sıcaklık	36
Şekil 4.3. Reçine miktarı-reaksiyon süresi	37
Şekil 4.4. Fruktoz konsantrasyon-Reaksiyon süresi	37
Şekil 4.5. Sıcaklık-reaksiyon süresi	38
Şekil 4.6. Fruktoz konsantrasyonu-sıcaklık	38
Şekil 4.7. Fruktoz konsantrasyonu-reçine miktarı	39
Şekil 4.8. L929 hücrelerindeki antikanser etkisi.....	41
Şekil 4.9. Gastrik kanser hücrelerindeki toksisite etkisi	42

TABLolar LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. HMF'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri	2
Tablo 3.1. Merkez Kompozit Dizayn deney tablosunda bulunan değişkenler ve incelenen aralıklar	24
Tablo 3.2. CCD Dizayn Matrisine ait veriler	24
Tablo 4.1. Ön denemelere ait sonuçlar	29
Tablo 4.2. CCD dizayn matrisi şartlarında yapılan deney sonuçları	31
Tablo 4.3. Farklı matematiksel modellerle deneysel sonuçların uyumu	32
Tablo 4.4. Fruktozdan HMF Üretimi için CCD ile elde edilen ikinci derece denklemin ANOVA sonuçları	33
Tablo 4.5. Fruktozdan HMF üretimi için önerilen ikinci derece modele ait istatistikler	34
Tablo 4.6. Önerilen şartlarda yapılan deney sonuçları	40
Tablo 4.7. Reçine geri kazanımı ile ilgili sonuçlar	40

EKLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Ek 1. HPLC Analizleri İçin Kromatogram Görüntüsü	56
Ek 2. HMF Kalibrasyon Grafiği	56
Ek 3. Levülinik asit kromatogram görüntüsü.	57
Ek 4. Formik asit kromatogram.	57



SİMGELER LİSTESİ

[ASBI][Tf]	: 3-allil-1-(4-sülfobütil)imidazolyum triflormetansülfonat
[BMIM][BF₄]	: 1-bütil-3-metil-imidazolyum tetraflorborat
[BMIM]Cl	: 1-bütil-3-metilimidazolyum klorit
ChoCl-	: Kolin Klorit
DCF	: 2,5-dikarboksifuran
DCM	: Diklorometan
DFE	: 2,5-diformilfuran
DHMF	: 2,5-Bis(hidroksimetil)furan
DMF	: 2,5-Dimetilfuran
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
[EMIM][Cl]	: 1-etil-3-metilimidazolyum klorit
FBS	: Fetal Bovine Serum
FDC	: 2,5-furandikarbaldehit
FDCA	: Furandikarboksilik Asit
HMF	: 5-Hidroksimetil furfural
[HMIM]Cl	: 1-Heksil-3-metil-imidazolyum klorit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
MIBK	: Metil izobütil keton
[NMM][CH₃SO₃]	: N-metilmorfolinyum metil sülfonat
PBT	: Poli (bütilen tereftalat)
PET	: Polietilen Tereftalat
RBC	: Kırmızı Kan Hücreleri
SCD	: Orak Hücreli Anemi
THF	: Tetrahidrofuran

1. GİRİŞ

Petrol bazlı ürünlerin gün geçtikçe petrol rezervlerindeki azalmaya paralel olarak azalacak olması ve bu ürünlerin doğaya verdiği zararlar nedeniyle araştırmacılar yenilenebilir enerji kaynaklarına yönelmişlerdir (Twidell ve Weir, 2015). Bu sebeple, HMF gibi furan türevlerinin gelecekte en önemli yenilenebilir enerji kaynaklarından birisi olması beklenmektedir. Amerika Birleşik Devletleri Enerji Departmanı (US DOE) tarafından petrol türevli ürünlerin yerini alabilecek ümit vadeden 10 biyokütle tabanlı ürün arasında 5-Hidroksimetil furfural (HMF) ve onun oksidasyon ürünü olan furandikarboksilik asit (FDCA) önemli bir yere sahiptir (Kazi vd., 2011). Ayrıca, Avantium isimli Alman firması şekerlerden elde edilen furan bileşiklerini furanikler olarak adlandırıp, uyuyan dev olarak nitelendirilen bu bileşiklerin gelecekte petrol türevli plastik ve yakıtların yerini alacağını belirtmektedir (de Jong vd., 2012).

HMF; glikoz, fruktoz ve ksiloz gibi şekerlerin asit katalizli dehidrasyonu ile elde edilmektedir. HMF üretiminde sükroz, inülin, selüloz veya sellobiyoz gibi disakkarit ya da polisakkaritler de kullanılabilir. Ancak polisakkaritlerden HMF üretimi için öncelikle polisakkaritlerin monosakkaritlere hidroliz edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle monosakkaritlerin başlangıç maddesi olarak kullanılması daha avantajlıdır. HMF'nin biyobozunur plastik üretiminden sıvı yakıt üretimine kadar geniş bir kullanım alanına sahip olması nedeniyle dünyanın birçok yerinde endüstriyel olarak fruktozdan üretilmektedir. Ayrıca fruktozun HMF'ye dönüşüm oranı diğer şekerlerden daha yüksektir (Rosatella vd., 2011).

Bu çalışmada, değerli bir kimyasal bileşik olan HMF'nin karıştırılmalı basınç reaktöründe iyon değiştirici reçineler katalizörlüğünde fruktozdan üretilmesi ve antikanserojen etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Fruktozdan HMF üretimi ısıtıcılı ve karıştırılmalı basınç reaktöründe farklı sıcaklık ve farklı sürelerde incelenmiştir. Çalışma sonucunda, katyonik iyon değiştirici reçinelerin katalizörlüğünde yapılan deneylerde daha iyi sonuç elde edildiği görülmüştür. Gerçekleştirilen bu çalışmada iyonik çözücü olarak kullanılan DMSO'nun vakumlu evaporatör yardımı ile yüksek oranda geri kazanımı HMF üretim yönteminin ekonomik yönden önemli olduğunu göstermektedir. HMF'nin endüstride geniş kullanım alanına sahip olduğu düşünüldüğünde HMF üretimi büyük önem taşımaktadır.

2. HİDROKSİMETİLFURFURAL (HMF) ÜRETİMİ HAKKINDA GENEL BİLGİ

Molekül formülü $C_6H_6O_3$ olan 5-Hidroksimetilfurfural (HMF) bazı şekerlerin (glukoz, fruktoz, ksiloz vb.) dehidrasyonu ile elde edilen organik bir bileşiktir. HMF, sarı renkli ve düşük erime noktalı bir katıdır ve hem suda hem de organik çözücülerde oldukça iyi çözünür. Molekül hem aldehit hem de alkol fonksiyonel grupları içeren bir furan halkasından oluşmaktadır (NO). HMF ve türevleri, çeşitli gıda kaynaklarında özellikle işlenmiş gıdalarda yaygın olarak mevcuttur. Tablo 2.1.'de HMF'nin kimyasal ve fiziksel özellikleri gösterilmiştir.

Tablo 2.1. HMF'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri (van Putten, 2015)

Kimyasal Adı	5-(Hidroksimetil)-2-furankarboksialdehit
Eşanlamlıları	5-(Hidroksimetil)-2-furaldehit; HMF; 5-(Hidroksimetil) -2- furankarbonal; 5-(Hidroksimetil)-2-furfural; 5-(Hidroksimetil)-2-formilfuran; 5-Oksimetilfurfural; Hidroksimetil furfuraldehit
Molekül Formülü	$C_6H_6O_3$
Molekül Ağırlığı	126,11 g/mol
Tanımlama	Sarı toz halindedir ve papatya çiçeği kokusundadır.
Kaynama Noktası	114-116°C
Erime Sıcaklığı	31,5 °C
Çözünürlük	Su, metanol, etanol, aseton, etil asetat, dimetilformamit içerisinde serbestçe çözünebilir; eter, benzen klorofomda çözünebilir; karbontetrakloritte çözünür; petrol eterinde daha az çözünür.
Yoğunluk	1,243 g/cm ³

2.1. HMF'nin Kimyası (Pan, 2010'dan derlenmiştir.)

2.1.1. Hidroksimetil Gruplarının Reaksiyonları

5-HMF'de bulunan hidroksimetil grupları, aromatik kısmı ile birlikte tipik bir alkol grubu olarak düşünülebilir. Benzil ya da furfuril alkole benzer şekilde davranırlar ve reaksiyona girerler. Şekil 2.1.'de gösterildiği gibi 5-HMF'deki hidroksimetil gruplarının 4 tip reaksiyonu vardır.

Esterlerin Oluşumu

Asetik asit ve 5-HMF'nin asetilleştirilmesi ile hem monoasetatlar hem de triasetatlar oluşur. 5-HMF ve asetik anhidrit reaksiyonu 5-asetoksimetilfurfural oluşturur (Fenton ve Gostling, 1901). Ayrıca sodyum hidroksit ile katalizlenen benzoil klorit ve 5-HMF reaksiyonunda 5-benzoloksimetilfurfural oluşumu bildirilmiştir (Lewkowski, 2001).

Eterlerin Oluşumu

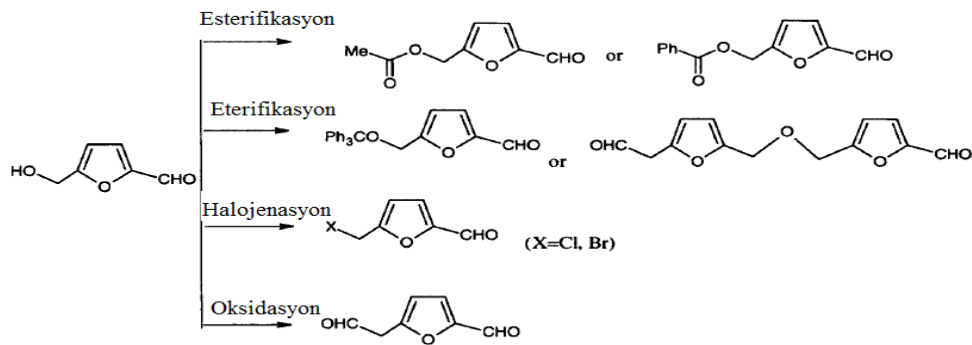
5-HMF asidik ortamda furan eterleri oluşturmak üzere kendiliğinden yoğunlaşabilir veya diğer alkollerle tepkimeye girer. Çözücü olarak DMSO kullanımı sonucunda 5,5-diformilfurfuril eter kolayca elde edilebilir (Chundury ve Szmant, 1981). Dahası piridinde 5-HMF ile tritil klorit reaksiyonunda, 5-(trifenilmetoksi)metilfurfural oluşmuştur (Bredereck, 1932).

Halojenürlerin Oluşumu

Hidroksil grubu halojen atomu ile ikame edilebilir. 5-HMF, hidrojen klorit ve hidrojen bromit ile sırasıyla cholormetilfurfural ve 5-biromometilfurfural oluşturmak için halojenizasyona maruz kalır (Middendorp, 1919). Diğer halojenlenmiş bileşiklere benzer şekilde halometilfurfurallar reaktif ara maddelerdir ve 5-HMF türevlerinin sentezi için çok önemlidir. Bu halojenlenmiş türevler hidroliz ile 5-HMF'ye dönüşmekle kalmaz ayrıca 5-metoksimetilfurfural, 5-benzilfurfural ya da 5-metilfurfural ve benzerlerini de üretebilirler (Middendorp, 1919; Fenton ve Robinson 1909; Fenton ve Gostling ,1901).

Oksidasyon

5-HMF'nin, 2,5-furandikarbaldehit (FDC) oksidasyonu uzun zamandır araştırılmaktadır. Bazı araştırmacılar çeşitli katalizörler ve çözücüler kullanarak 5-HMF'nin 2,5-furandikarbaldehite oksidasyonunu incelemişlerdir (Cottier vd., 1995).



Şekil 2.1. 5-HMF'deki hidroksimetil grubunun reaksiyonları

2.1.2. Formil Gruplarının Reaksiyonları

Redüksiyon

5-HMF'deki formil grupları, alkol ya da metil gruplarına indirgenebilmektedir. 2,5-bis-(hidroksimetil) furan; reçineler, polimerler ve buna benzer alanlarda uygulanan çok yönlü bir bileşiktir ve metal ya da metal oksitler ile katalizlenen 5-HMF'nin redüksiyonu ile üretilirler. İlaveten 5-HMF, hidrazin varlığında 5-hidroksimetil-2-metilfurana indirgenir (Reichstein ve Zschokke, 1932).

Kondenzasyon

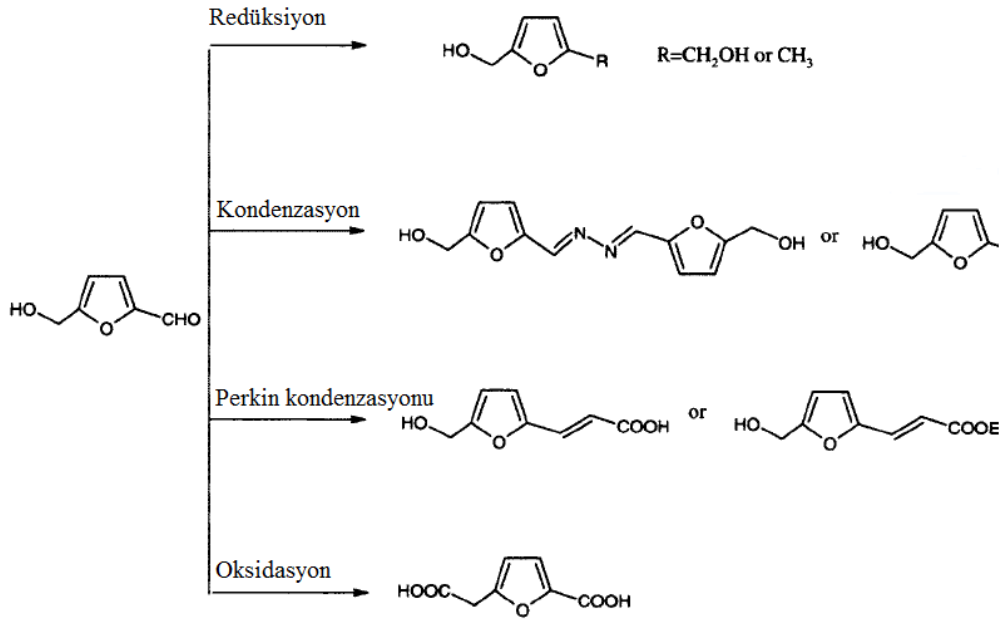
5-HMF, formil gruplarındaki amonyak türevleri ile bir kondenzasyon reaksiyonu gerçekleştirir. Fenton ve ark. tarafından 5-HMF ile hidrazin reaksiyonunun azin oluşturduğu bildirilmiştir (Fenton ve Gostling, 1901).

Perkin Kondenzasyonu

5-HMF aktif metilen grubuna sahip bileşikler ile tepkimeye girer. 5-HMF, piridin içinde malonik asit ile perkin kondenzasyonu reaksiyonuna tabi tutulur (Skowronski vd., 1993).

Oksidasyon

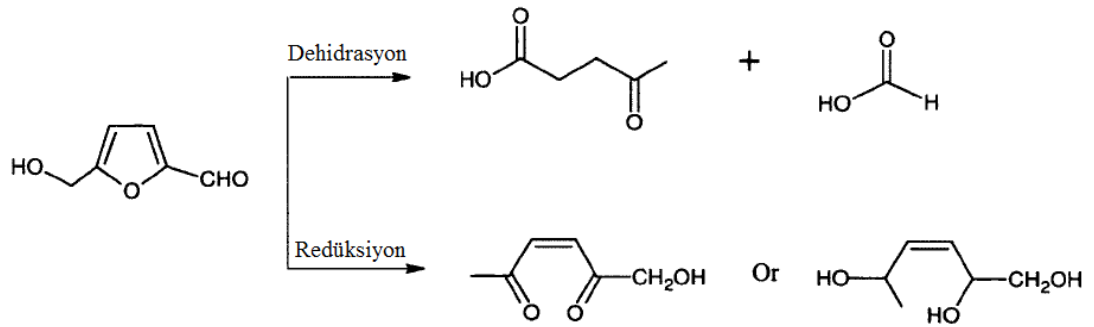
5-HMF'deki formil gruplarının oksidasyonu karboksilik grup oluşturur. Formil grupları oksitlenmeye karşı seçici olduğunda 5-hidroksimetil-2-furankarboksilik asit elde edilmiştir (Reichstein, 1926). Bununla birlikte oksijen ve soy metaller kullanıldığında daha fazla 2,5-furandikarboksilik asit üretilmiştir. Formil gruplarının reaksiyonları Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. 5-HMF'deki formil gruplarının reaksiyonları

2.1.3. Furan Halkasının Reaksiyonları

Şekil 2.3'te gösterildiği gibi 5-HMF dehidrasyonunda asidik ortamda levülinik asit ve formik asit oluşturarak furan halkasına ayrılır (Girisuta vd., 2006). Asidik çözeltilerde (HCl, H_2SO_4) fruktozdan ya da glikozdan 5-HMF üretimi, 5-HMF dehidrasyonuna neden olur. Platin ya da rutenyum ile katalizlenen hidrojen ve 5-HMF'nin redüksiyonu önce 1-hidroksi-2,5-heksendion sonra sırasıyla 1,2,5-heksentriol üretmektedir (Lewkowski, 2001).



Şekil 2.3. 5-HMF'deki furan halkasının reaksiyonları

5-HMF, reçineler (Groke vd., 2003) gibi çözünen ya da çözünmeyen polimerler üretmek için polimerize edilmiştir. Bu reçineler plastikler ya da diğer değerli kimyasalların üretilmesinde kullanılır.

2.2. HMF'nin Kullanım Alanları (Stark, Anastas vd., 2013'ten derlenmiştir.)

Literatürde yapılan çalışmaların çoğunda tereftalik asit gibi substitüe monomerlerin üretimi ile ilgilenilmesine ve daha çok niteliksel yapısının ortaya çıkarılmasına rağmen son yıllarda yapılan çalışmalarda yakıtlar, yakıt katkı maddeleri, farmasötikler ve değerli kimyasalların üretimine odaklanılmıştır (Moser vd., 2007; Groke vd., 2006; Michail vd., 2007). HMF ve türevlerinin uygulama alanları aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

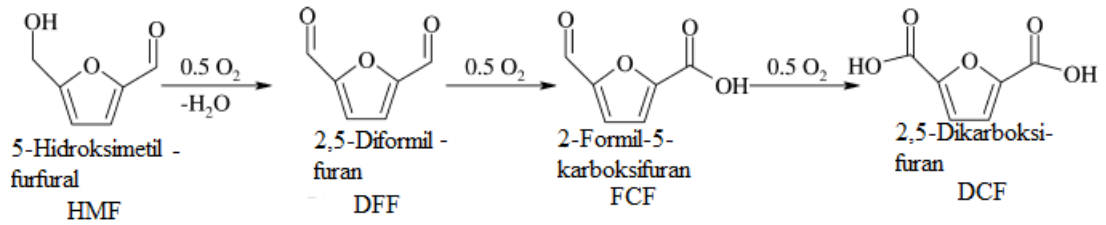
HMF; insanları alkol ve sigaradan uzaklaştırmak için bir içecek katkı maddesi olarak tanımlanmaktadır (Groke vd., 2003; Groke vd., 2005). Deri hastalıklarının tedavisi ve saç büyümesinin geliştirilmesi bağlamında HMF'den bahsedilmektedir (Gardovic, 2003). İnsanlarda ve hayvanlarda oksidatif stresin iyileştirilmesi ile baskılanması için içeceklerin hazırlanmasında ve performans arttırmak için de HMF kullanımı iddia edilmektedir (Moser vd., 2007). Kötü huylu tümörlerin üzerindeki tahrip edici etkisinden dolayı kanser tedavisinde ve oral veya rektal uygulamalarda infüzyon olarak diğer bileşimlerin karışımları ile HMF kullanımı tanımlanmıştır (Groke vd., 2006; Michail vd., 2007). HMF'nin kullanım alanları olduğu gibi HMF'nin türevlerinin de kullanım alanları bulunmaktadır.

HMF türevlerinden olan asetoksimetilfurfural gibi esterler yüksek enerji içeriğine sahiptir ve bu nedenle yakıt ya da yakıt katkı maddeleri olarak kullanılabilirler (Gruter ve Dautzenberg, 2007). HMF ile dikarboksilik asitlerin monoesterleri yapışma, birleştirme, kaplama gibi uygulamalarda reaktif bir çözücü olarak kullanılabilir (Benecke vd., 2007). Aynı zamanda eterler de potansiyel biyoyakıtlar ya da yakıt katkı maddeleri olarak incelenmiştir (Gruter, 2009; Mascal ve Nikitin, 2008). Etoksimetilfurfural, benzin (8.8 kWh/l) ya da dizel yakıtlarınki ile (9.7 kWh/l) karşılaştırılan ve etanolden (6.1 kWh/l) önemli derecede yüksek olan 8.7 kWh/l enerji yoğunluğuna sahiptir (Gruter ve Dautzenberg, 2007). Dahası farmasötik ara maddeler ya da değerli kimyasallar, çözücü ve monomer olarak kullanılabilir (Gruter, 2009).

Asetal, HMF ve gliserin arasında oluşur ve onun türevleri antifiriz katkı maddeleri, monomerler, solventler, reçineler, plastikleştiriciler, kişisel bakım ürünleri katkı maddeleri, kumaş yumuşatıcılar, biyoyakıt katkı maddeleri, kaplamalar, yapıştırıcılar ve sızdırmazlık

maddeleri olarak kullanılabilir (Bonsignore, 2008). Siyanovinil yapıli furan türevleri elektro optik alanlarda uygulama bulurlar örneğini; optik veri kayıt sistemi ya da organik elektron iletici malzemeler veya elektron transfer katalizörleri üretimi için kullanılırlar. HMF nitrojen heterosikliklerin sentezi için bir başlangıç maddesi olarak da kullanılır (Lichtenthaler vd., 2001). Farmasötik taramalarda HMF yüksek oranda işlevselleştirilmiş furan bazlı bloklar oluşturmak için bir iskelet olarak da kullanılır (Gupta vd., 2002).

HMF türevleri antifungal, antitümör ve antiviral aktivite gösteren farmasötikler ve nükleik asitler, organik luminoforların floresan saptanması için kullanılmıştır (Del Poeta vd., 1998). Bitki parazitik nematodların kontrolünde HMF bazlı izotiyosiyanatlar kullanılmıştır. 5-ikameli furfural çeşitlerinin çoğunun (esterler, eterler ve 2,5-diformilfuran (DFF); bakteriyofajlar, riketsiyalar ve protozoaları da kapsayan çok çeşitli virüslere karşı antifungal ve antibakteriyel etkilerinden dolayı patent çalışmaları bulunmaktadır. Ayrıca çeşitli gıdalar, odun, tekstil ve derinin mikrobiyal olarak bozunmasını azaltıcı etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur (Stark vd., 2013). Ranitidine ilacı bir H₂ antihistamin olarak geliştirilmiş olup gastrit ve ülserle karşı farmasötiklerde kullanılmıştır. Bu ilaç büyük ölçekli HMF uygulamalarının olasılığına vurgu yaparak yılda yaklaşık 500 ton üretilmiştir (Glushkov vd., 1990). (S)-Alapyriadin şeker ve aminoasit karışımlarının ısıtılmasıyla doğal olarak oluşur ve örneğini sığır et suyunda bulunabilir. Tadı arttırır özellikle de tatlılarda, umami tatlarda ve tuzlularda etkindir (Soldo vd., 2003). HMF ile L-alenin alkalın koşullar altında reaksiyona girmesiyle rasemik bir karışım olarak ürün oluşturmuştur (Boghani vd., 2007). Son yıllarda hem oksitlenmiş hem de indirgenmiş HMF ürünleri önemli düzeyde ilgi görmüştür. Şekil 2.4. HMF'nin ardışık oksidasyonunu göstermektedir.

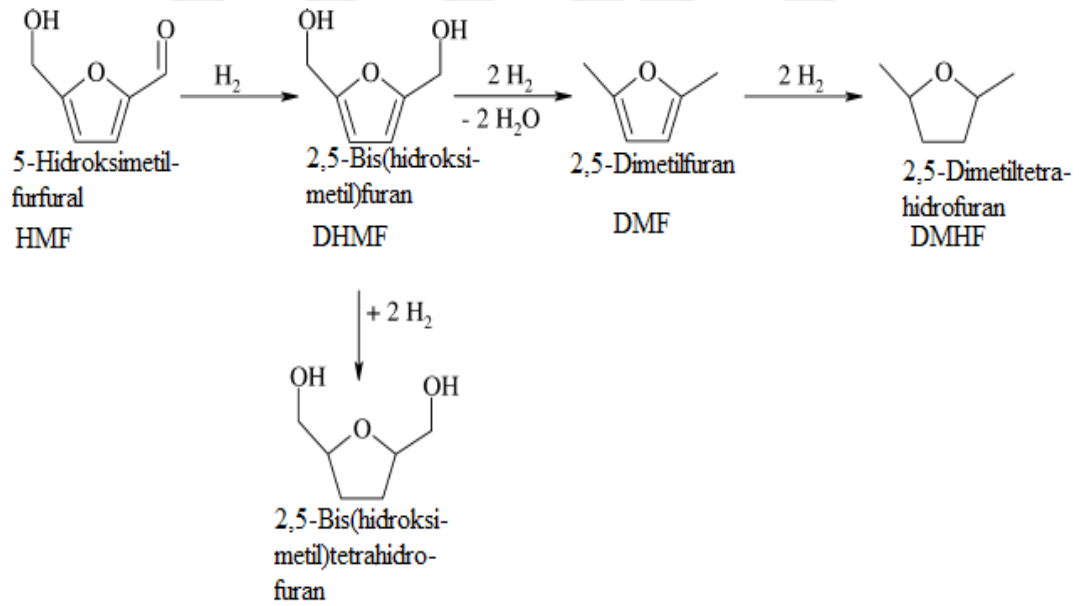


Şekil 2.4. HMF oksidasyon ürünleri

2,5-Diformil-furan (DFF), polipinakoller ve polivinilleri oluşturmak için polimerize edilmiş ve antifungal ajanlar, ilaçlar ve ligandların sentezi için bir başlangıç maddesi olarak kullanılmıştır (Chmielewski vd., 1997). Ayrıca, DFF'nin alkalın pil ayırıcılarda kullanımı

tanımlanmıştır (Sheibley vd., 1983). Pasifik Kuzeybatı Ulusal Laboratuvarı (PNNL) kimyasal ürünlerin piyasa büyüklüğü (yüksek değerlikli ve yüksek hacimli kimyasal pazar) ile poliüretanlar (kalıpsı plastikler, sıvı kristal görüntüler, boyalar, kağıt ürünler ve tekstil) ve polihidroksipoliesterler (boyalar, reçineler, dış kaplama, yalıtım, çimento, kaplamalar, vernikler, alev geciktiriciler, yapıştırıcılar ve halı malzemeleri) için 2,5-dikarboksifuran (DCF)'yi potansiyel bir yapıtaşı olarak seçmiştir (Werpy vd., 2004). DCF' nin PET (polietilen tereftalat) ve poli (bütilen tereftalat) (PBT) gibi çeşitli poliesterlerde kullanılan tereftalik asitin yerine geçebilecek yüksek bir potansiyele sahip olduğu kabul edilmektedir (Partenheimer ve Grushin, 2001). PBT, PET ve naylon pazarının büyüklüğü yılda sırasıyla 0.5×10^9 , 2×10^9 ve 4.5×10^9 kg'a yaklaşırken ürün değerleri 0.283 \$/kg aralığındadır (Werpy vd., 2004). Aynı şekilde hidrojenize HMF ürünlerinin uygulamaları Şekil 2.5.'te gösterilmiştir.

2,5-Bis(hidroksimetil)furan (DHMF) üstün ısı yalıtım özelliğine ve yangın direncine sahip poliüretan köpüklerin ve poliesterlerin üretiminde kullanılmıştır (Correia, 2008).



Şekil 2.5. HMF redüksiyon ürünleri

2,5-Dimetilfuran (DMF) yakıt, yakıt katkı maddesi (vuruntu önleyici bileşikler) ve tetrahidrofurana benzer özellikler ile solvent olarak tanımlanmıştır (Román-Leshkov vd., 2007). DMF' nin enerji içeriği (8.7 kWh/l) benzine benzerdir ve etanolden çok daha büyüktür (Binder ve Raines, 2009).

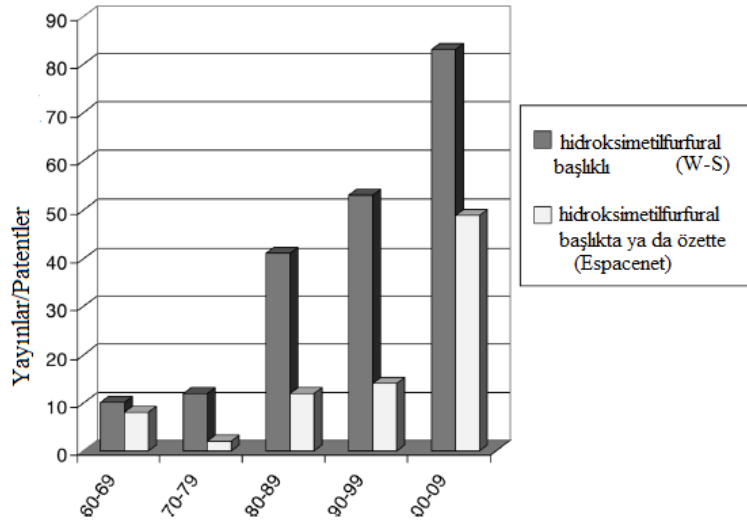
HMF, tıbbi alanlarda da kullanılmaktadır ve bunlardan bazıları şöyledir:

Tıbbi uygulamalarda orak hücreli anemi (SCD) tedavisi, kanser tedavisi ve diğer etkilerin tedavisinde 5-HMF umut verici potansiyel bir bileşik olmuştur. SCD; kırmızı kan hücrelerinde (RBC) sertliğe ve bozunmaya neden olan, hücre içi orak hemoglobin (HbS) polimerizasyonu ile katalizlenen genetik bir hemoglobinopatidir (Okpala, 2006). Orak hücreler çeşitli komplikasyonlara sebep olur ki bazıları ölümle sonuçlanır. Birçok yayında 5-HMF'nin orak hücrelere karşı potansiyel bir ajan olduğu bildirilmektedir (Abdulmalik vd., 2005; Safo vd., 2004; Lin vd., 2008). 5-HMF; SCD için toksik olmayan, doğal olarak oluşabilen cazip terapötik bir ajandır.

Aynı zamanda 5-HMF, kanser hücresine zarar veren umut verici bir ajan olarak da bildirilmiştir. Radikal oluşumu ve rezonans yapılarından dolayı 5-HMF'nin ultra seçici sitostatik aktivite gösterdiği düşünülmektedir (Brustugun vd., 2005).

2.3. HMF Üretimi

HMF üretimi için başlangıç maddesi olarak kullanılabilen yenilenebilir bazı kaynaklar şunlardır: monosakkaritlere (fruktoz, glikoz) ilaveten disakkaritlerden sakkaroz, inülin, nişasta ve selüloz gibi çeşitli polimerik maddeler. Gittikçe daha erişilebilir hale gelen çeşitli hammaddeler bu bileşimleri içerir örneğin; invert şeker ve yüksek fruktoz mısır şurubu (HFCS) (Stark, Anastas vd., 2013). HMF üretimi ve türevleri ile ilgili çeşitli kapsamlı özetler yayımlanmıştır (Fayet ve Gelas, 1983; Cottier ve Descotes, 1994; Lewkowski, 2001; Corma vd., 2007). Şekil 2.6. hem patentte hem de açık literatürlerde HMF'ye olan ilginin hızla arttığını göstermektedir (Rigal ve Gaset, 1983; Musau ve Munavu, 1990; Gandini ve Belgacem, 1997; Moreau vd., 2004).



Şekil 2.6. Hidroksimetilfurfural anahtar kelimesinin bir makalenin ya da patentin başlığında (Web of Science arama motorunda) ya da özetlerinde (Espacenet.org arama motorunda) yıllara göre dağılımı. (Stark, Anastas vd., 2013)

Monosakkaritlerin HMF'ye dönüşümü moleküller arası dönüştürülen monosakkarit molü başına 3 mol suyun açığa çıktığı bir kondenzasyon reaksiyonu şeklindedir. Diğer kondenzasyon reaksiyonlarında olduğu gibi birçok durumda bir asit katalizör gereklidir. Çok güçlü asit katalizörler ya da yüksek reaksiyon sıcaklıklarının birkaç yan ürün oluşturduğu bilinmektedir: levülinik asit ve formik asit ile birlikte kahverengi siyah bileşikler oluşur ki bunlara genel olarak huminler denir (Rapp, 1991). Bunlar daha fazla ürün saflaştırma aşaması gerektirdiğinden dolayı prosesin verimliliğini önemli ölçüde düşürür. İlginç şekilde bu yan ürünlerin oluşumu monosakkarit çözeltilerinin başlangıç konsantrasyonuna bağlıdır ve ne kadar yüksekse oluşum oranı da o kadar yüksektir. Ayrıca sulu ortamda yan ürün oluşumu rehidrasyon reaksiyonları nedeniyle artmıştır (Hales vd., 1963; Kuster ve van der Baan, 1977; Román-Leshkov vd., 2006). Genellikle glikoz çok kararlı bir halka yapısı meydana getirebilir bu yüzden çözelti içinde enolizasyon oranı fruktozdan (daha az kararlı halka yapısı oluşturduğu için) daha düşüktür. Enolizasyon HMF oluşumu için hız belirleyici basamak olduğundan fruktoz glikozdan çok daha hızlı tepkime verecektir. D-glikoz dehidrasyonunun D-fruktozdan 40 kat daha yavaş olduğu bildirilmiştir (Kuster ve van der Baan, 1977). Glikozun reaktivitesi fruktozun reaktivitesinden daha zordur ve bu durum, asiklik fruktoza kıyasla asiklik glikozun miktarının daha düşük olması ile açıklanmıştır. Diğer yandan fruktoz, difruktoz ve dianhidritlerin kararlı karışımlarıyla oluşur ve böylece küçük miktarda yan ürün oluşturan en reaktif gruplar dahi engellenir. Glikoz, reaktif ara

ürünlerin HMF ile çapraz polimerizasyonunun daha büyük bir riskle sonuçlanacağı indirgenmiş reaktif gruplar ihtiva eden oligosakkaritlerden oluşur. Bu nedenle çoğu çalışma fruktoz dönüşümü ile ilgilidir (Stark, Anastas vd., 2013).

Son yıllarda fruktozun HMF'ye dehidrasyonu çeşitli katalizörler ile gerçekleştirilmiştir. Literatürlerde de bildirildiği gibi asidik katalizörler reaksiyon için daha uygundur. Mineral asitler, organik asitler ve Lewis asitleri gibi homojen katalizörler fruktoz dehidrasyonu için kullanıldığında yüksek HMF verimleri elde edilmiştir fakat bu katalizörlerin ekipman için korozyona neden olması, ürün ayırmada zorluklar yaşanması ve insanlarda toksisiteye sebep olması gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Çevrenin öneminin artmasıyla birlikte ürünlerden kolay ayrılması, geri dönüşüm performansının yüksek olması ve ekipman için düşük korozyona sahip olması gibi nedenlerden dolayı fruktoz dehidrasyonu için heterojen katalizörler giderek daha çok tercih edilir hale gelmiştir (Guo vd., 2012). Asidik reçineler ucuz ve uygun heterojen katalizörler olup onlardan bazıları (Dowex-50WX8-100, Amberlyst-15 ve Diaion PK- 216, fruktozun HMF'ye dehidrasyonunda kullanılmıştır (Chheda ve Dumesic, 2007) . Fruktozun dehidrasyonu için kullanılan reçinelerle ilgili tüm çalışmalar, reçineler ile diğer asidik katalizörlerin karşılaştırılması üzerinde yoğunlaşmıştır. İyon değiştirici reçinelerin yapısı ve özelliklerinin fruktozun dehidrasyon aktivitesini nasıl etkilediği ile ilgili olarak bir çalışma yapılmış ve sonuçta reaksiyon aktivitesi üzerinde belirgin bir etki yaptığı görülmüştür (Feng vd., 2010).

Katalizörlerin yanı sıra, çözücüler de fruktozun HMF'ye dehidrasyonu için önemli bir etken olmuştur. Su, organik çözücüler, karışım çözücüler, bifazik çözücüler ve iyonik sıvılar, çözücüler olarak seçilmiştir. Bifazik sulu sistemlerin fruktoz dehidrasyonu için verimsiz olduğu düşünülmektedir. Bunun nedeni HMF'nin asidik sulu ortamda levülinik asit ve formik asite kolayca rehidre olarak düşük HMF verimine sebep olmasıdır. Organik çözücülerde HMF rehidrasyonu baskılanabilir ve yüksek HMF verimi elde edilebilir. İyonik sıvılar; önemsiz buhar basıncına, yanmazlık, yüksek termal ve kimyasal kararlılığa, organik ve inorganik maddeler için ayarlanabilir çözücü gücüne sahip olması gibi nedenlerden dolayı fruktozun HMF'ye dönüşümünde çözücüler olarak yaygın şekilde kullanılmıştır.

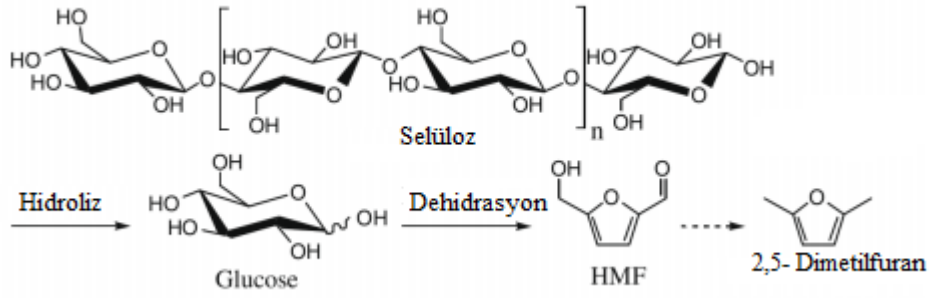
Fruktoz dehidrasyonu üzerinde iyon değiştirici reçinelerin etkisini belirlemek amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalara göre şu sonuçlar görülmüştür: tüm güçlü asit reçineleri arasında, makro gözenekli reçinelerin (D072, D001-cc) katalitik aktiviteleri jel tipi reçinelerden (001×1, 001×7 ve 001×14.5) daha yüksektir. Bu sonuç, reçinelerin yapısından kaynaklanmaktadır. Makro gözenekli reçineler büyük gözenek

apına, çok sayıda açıklıklara, geniş yüzey alanına ve yüksek hızlı iyon değiştirme özelliğine sahiptir. Büyük gözenek çapı ve reçinenin açıklıkları, fruktoz molekülünün reçinelerin içine hızlı bir şekilde erişmesini sağlar ve böylece fruktoz ve reçinelerin daha asidik bölgeler arasındaki etkileşimini artırır. Bu arada, makroforlu reçinenin daha güçlü adsorptivitesi, HMF'nin daha fazla rehidre olmasını önlemek için fruktoz dehidrasyonundan üretilen suyun adsorpsiyonunu artırabilir. Buna karşın, jel reçinesinin küçük yüzey alanı katalitik aktif bölgeleri azaltır; ayrıca jel reçinesinin gözenek çapı fruktoz moleküllerinin reçinenin içine girmesini önlemek için çok küçüktür. Dolayısıyla, fruktoz molekülleri jel reçinenin yüzeyindeki aktif grupla reaksiyona girerek, düşük HMF verimi ile sonuçlanır. Sonuç olarak, makro gözenekli güçlü asit reçinesi daha yüksek bir katalitik aktiviteye sahiptir. HMF verimi, reçinenin azalan parçacık boyutuyla artmaktadır (Li vd., 2013; Zhang ve Weitz, 2012).

2.3.1. Reaksiyon Mekanizması (Liu, 2013'ten derlenmiştir.)

Homojen veya heterojen asit katalizörleri kullanılarak 5-HMF verimi arttırılabilir. 5-HMF sentezi, sulu çözeltelerde, organik çözücülerde ve iyonik sıvılarda gerçekleştirilebilir. Hammade dönüşüm oranı ve 5-HMF seçiciliği, üretim reaksiyonunda çözücü, katalizör ve ısıtma yöntemleri de dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenmiştir. 5-HMF retiminde yer alan, katalizörler, reaksiyon aracıları ve reaksiyon koşulları aşağıda özetlenmiştir.

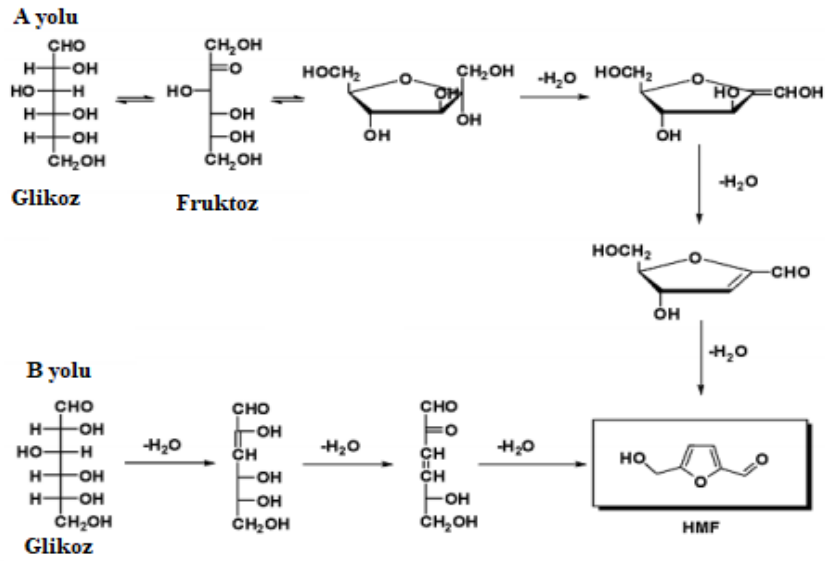
Monosakkaritler doğrudan dehidrasyon reaksiyonuyla 5-HMF'ye dönüştürülebilir; örneğin, 1 molekül fruktoz veya glukoz, 3 molekül H₂O kaybederek 1 molekül 5-HMF'ye dönüşür. Selüloz gibi polisakkaritler ise, ilk olarak dehidrasyon reaksiyonuyla 5-HMF'ye dönüşecek olan monosakkaritlere parçalanırlar. Bu dönüşüm mekanizması şekil 2.7.'de gösterilmiştir (Li vd., 2009).



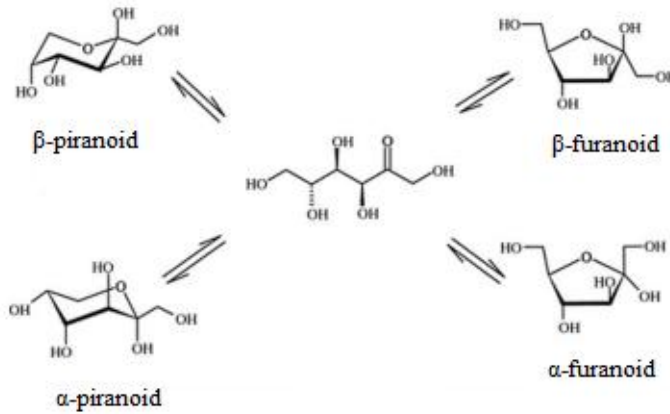
Şekil 2.7. Selülozdan 5-HMF'ye dönüşüm reaksiyon mekanizması (Li vd., 2009)

Monosakkaritlerden 5-HMF'ye farklı dönüşüm mekanizmaları yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Amarasekara vd. tarafından D-fruktoz ve sükrozun 5-HMF'ye dönüşüm yolları araştırılmıştır (Kabyemela vd., 1999; Amarasekara vd., 2008). Bu iki dönüşüm yolu şekil 2.8.'de gösterilmiştir (Rosatella vd., 2011). A yolunda; glikoz ilk aşamada fruktoza dönüşerek, reaksiyonu gerçekleştirmek üzere furan halkası oluşturur. B yolunda ise, glikoz furan halkası oluşturamaz, doğrudan dehidrasyon yoluyla 5-HMF'ye dönüştürülür.

5-HMF oluşumu için hız belirleme adımını tanımlayan bir oran olan enolizasyon oranı solüsyondaki glikozda fruktozdan daha düşük olduğu için, kararlı halka yapısına sahip glikozun, fruktozdan daha düşük reaktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Bhosale vd., 1996). 5-HMF oluşumunun seçiciliği, şeker molekülünün tautomerik formlarından etkilenmektedir. D- fruktoz, furanoid formun 5-HMF üretiminde en yüksek seçicilik sergileyen 4 formuna sahiptir Şekil 2.9.'da gösterilmiştir (Bicker vd., 2005). Bu nedenle, fruktozun furanoid formunun oranını arttırmak, reaksiyondaki 5-HMF'nin seçiciliğini arttırmak için önemli bir seçenektir. Dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde furanoid formun yoğun bir şekilde bulunduğu D-fruktoz tespit edilmiştir ve bu fruktoz, aseton-su karışımında yeniden furanoid formu oluşturabilir (Qi vd., 2008; Bicker vd., 2005). Bu nedenle DMSO, birçok çalışmada reaksiyon ortamı olarak kullanılmaktadır.

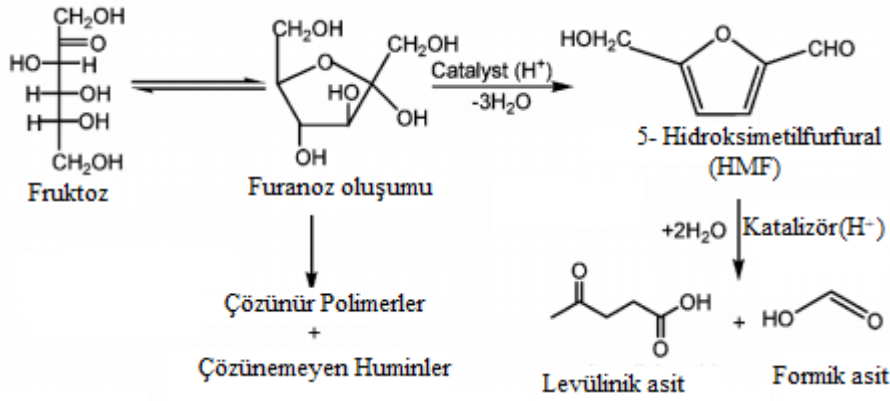


Şekil 2.8. Glikozdan 2 farklı 5-HMF üretim yolu



Şekil 2.9. D-fruktozun 4 tautomerik formu (Bicker vd., 2005)

5-HMF, düşük pH'da ara ürünleri olan levülinik asit ve formik asiti oluşturmak üzere rehidrasyona girerken, yüksek pH'da 5-HMF ve fruktoz arasında bir polimerizasyon reaksiyonu gerçekleşir (Salak Asghari ve Yoshida, 2006). Reaksiyon mekanizması, Şekil 2.10.'da gösterilmiştir (Sidhpuria vd., 2011). Bu yan reaksiyonların gerçekleşmesi ve ara ürünlerin oluşumu 5-HMF verimini düşürür. Bu nedenle, mevcut yapılmış olan ve devam eden çalışmaların çoğu sentez prosesinde 5-HMF rehidrasyonunu ve yan reaksiyonları bastırmayı hedeflemektedir.



Şekil 2.10. 5-HMF sentez prosesinde yan reaksiyon mekanizması ve ara ürün oluşumu (Sidhpuria vd., 2011)

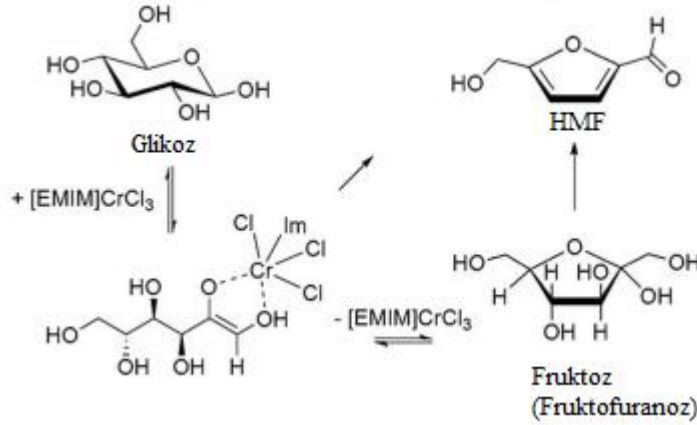
2.3.2. Homojen Katalizörler

Mineral ve organik asitler, homojen asidik katalizörler olarak kullanılmaktadır. HCl, H₂SO₄ ve H₃PO₄ en yaygın olarak kullanılan mineral asitlerdir. Glikozdan üretilen 5-HMF veriminin, H₃PO₄ > H₂SO₄ > HCl sırasıyla arttığı belirlenmiştir. Üründeki levülinik asit verimi ise ters sıralama ile artmıştır (Takeuchi vd., 2008). Sitrik asit, maleik asit, p-toluen sülfonik asit, oksalik asit gibi organik asitlerin katalitik aktivitesi de subkritik suda araştırılmıştır (Antal Jr., ve Mok, 1988; Salak Asghari ve Yoshida, 2006). Düşük pH'da (pH=2), fosforik asitin, 5-HMF üretiminde en uygun katalizör olduğu belirlenmiştir. Nispeten yüksek pH'da (pH=3) ise, HCl daha iyi bir katalitik aktivite göstermiştir. Bir araştırmada, HCl ile katalize edilmiş sürekli bir mikroyerleşim işlemi, 1 dakikada, %54 verim ve %71 fruktoz dönüşümüyle %75 5-HMF seçiciliği ile başarılı bir şekilde sonuçlandırılmıştır (Tuercke vd., 2009).

5-HMF üretiminde fruktoz ve glikozun bozunması sonucu, oluşan organik asitler ortamın pH'ını düşürerek 5-HMF'nin levülinik asite rehidrasyonuna neden olmaktadır. Bu reaksiyonda pH'ı stabilize etmek için fosfat tampon çözeltisinin (PBS) kullanılmasıyla bu sorunun etkin bir şekilde ortadan kaldırıldığı yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir (Yin vd., 2011). Bu çalışmalarda, PBS kullanılarak, selülozdan %35 verimle ve glikozdan %95 verimle 5-HMF üretimi gerçekleştirilmiştir.

Krom, titanyum, zirkonyum ve lantanit gibi metal tuzları homojen katalizör olarak kullanılmaktadır. [EMIM] [Cl]'de katalizör olarak CrCl₂ kullanıldığında 100 °C'de 3 saat

sonunda, glikozdan %62 verimle 5-HMF dönüşümü gerçekleştirilmiştir (Pidko vd., 2010). [EMIM][Cl]- CrCl_2 , glikozun fruktoza izomerizasyonunu kolaylaştırmıştır, ve bu mekanizma Şekil 2.11’de gösterilmiştir (Zhao vd., 2007).



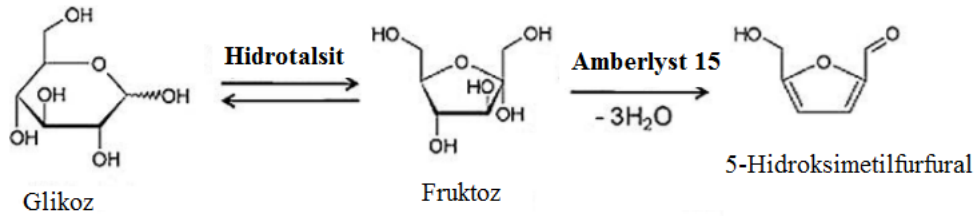
Şekil 2.11. Glikozun fruktoza izomerizasyonunda [EMIM] [Cl]- CrCl_2 ’nin etkisi

Homojen katalizörlerin avantajları sadece reaktör tasarımını basitleştiren tek fazlı işlemi kapsamaktadır. Ayrıca homojen katalizörler hammadde bileşikleri ile katalizörlerin yeterli ve düzenli şekilde etkileşimini sağlarlar. Bununla birlikte homojen asit katalizörlerin uygulaması büyük bir sermaye maliyeti anlamına gelen reaktör korozyonuna neden olmaktadır. Buna ilaveten katalizör geri dönüşümü ve asidik atık uzaklaştırma homojen prosesler için bir problemdir.

2.3.3. Heterojen Katalizörler ile HMF Üretimi

Son yıllarda birçok araştırmacı 5-HMF sentezi üzerine yoğunlaşmıştır. Heterojen katalizör kullanmanın avantajlarından biri ürün ayırımının homojen katalizörlerin kullanıldığı proseslere göre daha kolay olmasıdır. Bazı katı katalizörler düşük sıcaklıklarla nispeten yavaş şartlar altında gerçekleşmesini kolaylaştırır. Bu özellikler reaktörün korozyonunu azaltarak maliyet ve enerji tasarrufu sağlar. Metil izobütil keton ve suyun çözücü karışımındaki katalizör olarak kullanılan H-form zeolitler ve H-form mordenitler üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Moreau vd., 1996). 165°C’de % 90’nın üzerinde seçicilikle ve % 70’ten daha fazla verim ile elde edilmiştir (Moreau vd., 1996; Moreau vd., 1994). Metal oksitler de 5-HMF sentezi için katalizör olarak yaygın şekilde kullanılmıştır. Titanyum

dioksit (TiO_2), Zirkonyum dioksit (ZrO_2) ve Zirkonyum fosfat (ZrP) subkritik su içinde etkili olmuştur (Qi vd., 2008; Asghari ve Yoshida, 2006). 5-HMF'nin rehidrasyonu durdurulmuştur. ZrO_2 ve H_2SO_4 'ün doyurulması ile hazırlanan sülfatlanmış zirkonyum hem sulu hem de aseton-DMSO karışımı çözücülerde 5-HMF sentezi için uygulanmıştır. Aseton-DMSO karışımında % 93.8 fruktoz dönüşüm oranı ile 20 dk reaksiyon süresinde ve 180°C 'de % 72.8 HMF verimi elde edilmiştir (Qi vd., 2009). İnorganik katalizörlerin yanı sıra glikoz ve p-toluen sülfonik asitten kolay ve çevreci bir yaklaşımla elde edilen karbon bazlı katı katalizörler de fruktozun 5-HMF'ye dehidrasyonunu katalize etmek için kullanılır (Wang vd., 2011). 130°C 'de, 1.5 saatte DMSO kullanarak % 91.2 HMF verimi elde edilmiştir. Bu katalizör su kullanılan ortamlar için uygun değildir ve %67'lik dönüşüm oranı ve % 12 seçicilik ile % 8 HMF verimi elde edilmiştir. Bu katalitik prosesin diğer bir dezavantajı ise maliyetli olmasıdır. 5-HMF sentezi için katı asit katalizörlerin yanı sıra bazik katalizörler de kullanılmıştır. Katı asit ve baz katalizörlerin kombinasyonlarının kullanımının 100°C 'nin altındaki sıcaklıklarda 5-HMF sentezi için daha iyi performans gösterdiği bilinmektedir. Hidrotalsit baz katalizör olarak glikozun fruktoza izomerizasyonunu katalize ederken Amberlysts 15 fruktozun 5-HMF'ye dehidrasyonunu katalize etmiştir ve Şekil 2.12.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.12. Amberlyst 15 ve hidrotalsit katalizörleri ile glikozdan 5- HMF sentezi

Diğer karmaşık bileşikler de sentezlenmiştir ve 5-HMF üretiminde kullanılmıştır (Ohara vd., 2010).

2.3.4. Sulu Çözeltilerde HMF Sentezi

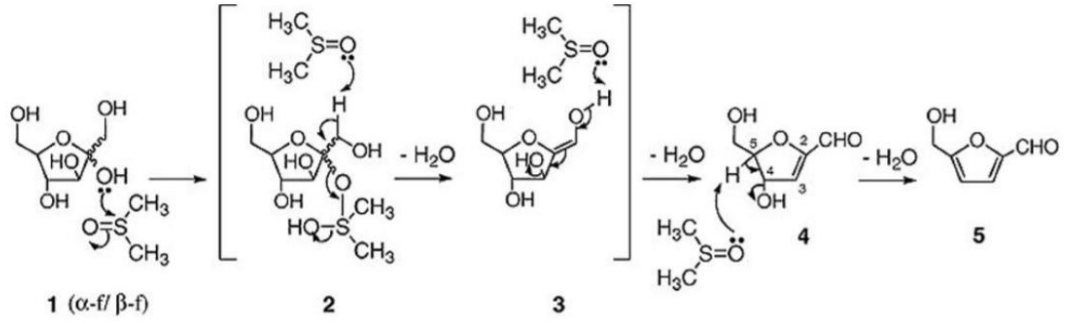
Basınçlı sıcak suda katalizörlü ya da katalizör kullanmadan gerçekleştirilen kimyasal reaksiyon, çalışma sıcaklığının genellikle 250°C ile 450°C arasında değiştiği hidrotermal

dönüşüm olarak tanımlanır (Yin vd., 2011). 5-HMF üretiminde hidrotermal dönüşüm uygulanmasının birçok avantajı vardır. Bu avantajların başında glikoz ve fruktoz gibi yaygın şekilde kullanılan besleme stoğunun diğer organik çözücülere kıyasla suda daha iyi çözünmesidir. Bu da yüksek konsantrasyonda besleme stoğunun işlenebileceği anlamına gelmektedir. İkinci avantajı ise ortam olarak su kullanmak yalnızca çevre dostu olduğu için değil aynı zamanda çözücü maliyetini azalttığından dolayı da kârlı olmaktadır. Üçüncüsü basınçlı sıcak su 5-HMF üretimi için katalitik koşullar sağlamaktadır. Glikoz ve fruktozun dehidrasyonunun mineral asitler ve katı asitler de dahil olmak üzere asit katalizörlerle katalize edildiği bildirilmiştir (Tuercke vd., 2009; Chheda vd., 2007; Shimizu vd., 2009; Chheda ve Dumesic, 2007; Bicker vd., 2003). Çoğu araştırmacı yüksek sıcaklık ve yüksek basınçtaki suyun benzersiz özelliklerinin biyokütlenin hidrotermal dönüşümünde önemli bir rol oynadığına karar vermiştir. Sıcak su; H_2O 'nun kendiliğinden H^+ ve OH^- iyonlarına ayrışmasını artırarak hem asidik hem de bazik reaksiyonları katalize etmektedir (Harvey ve Friend, 2004).

2.3.5. Diğer Çözücüler İle HMF Sentezi

HMF üretiminde organik çözücü uygulanması HMF verimini artırmıştır. En sık kullanılan organik solventler iki gruba ayrılır. Bazıları su ile karışabilir ve DMSO gibi reaksiyon çözeltisini değiştirebilir ya da yardımcı çözücü gibi davranabilir. Diğerleri suda çözünmez ve MIBK, diklorometan (DCM), tetrahidrofuran (THF), 1-bütanol, 2-bütanol gibi sulu çözeltilerden 5-HMF ekstraksiyonunu kolaylaştırmak için bifazik sistem oluşturmak üzere tuz haline getirilebilirler.

DMSO, iki nedenden dolayı 5-HMF üretimi için en uygun yardımcı çözücü olarak görülmüştür. Birincisi levülinik asit ve huminler gibi yan ürünlerin oluşumunu kısmen önlemektedir. İkincisi D-fruktoz moleküllerinin DMSO'da furanoid form olarak sudakinden daha yüksek oranda bulunmasından dolayı hem daha yüksek hammadde dönüşümü hem de yüksek 5-HMF seçiciliği sağlamıştır (Chheda vd., 2007; Tuercke vd., 2009; Yuan vd., 2011). DMSO'da D-fruktozun 5-HMF'ye dehidrasyon mekanizması şekil 2.13.'de gösterilmiştir (Amarasekara vd., 2008). Yardımcı çözücü olarak DMSO kullanmanın dezavantajı organik fazda DMSO bulunmasının 5-HMF'nin saflaştırılmasını zorlaştırmasıdır. Ayrıca DMSO'nun ayrılmasından sonra toksik yan ürünler oluşabilir (Moreau vd., 2004).



Şekil 2.13. D-fruktozun 5-HMF'ye dehidrasyonu için önerilen mekanizma.

“Yeşil solventler” olarak bilinen iyonik sıvılar, birçok sentez reaksiyonu için uygulanan yeni çözücü türleridir. Düşük erime noktası, reaksiyon çözücüsü olarak uygun viskozite, polar bileşikler ve diğer çözücülerin yüksek çözünürlüğü birçok farklı özelliğe sahiptir. 5-HMF sentezi için uygulanan iyonik sıvılar; [BMIM]Cl, [EMIM][Cl], [ASBI][Tf], [HMIM]Cl, [NMM][CH₃SO₃] ve [BMIM][BF₄]'ü kapsamaktadır (Lansalot-Matras ve Moreau, 2003; Zhang ve Zhao, 2010; Li vd., 2009; Zhao vd., 2007; Bao vd., 2008; Yong vd., 2008; Moreau vd., 2006). Kolin klorit (ChoCl-) bazlı iyonik sıvılar gibi biyo yenilenebilir maddelerden oluşan iyonik sıvılar katalizörler kadar iyi olan düşük molekül ağırlıklı organik asitler ile birlikte kullanılmıştır (Hu vd., 2009). İyonik sıvı bir reaksiyon sistemine eklenen DCM ve DMSO, karışmayı kolaylaştırmak için iyonik sıvıların viskozitesini değiştirebilmektedir. İyonik bir sıvıya eklenen diğer çözücüler sudaki 5-HMF yan reaksiyonlarını baskılamak için ürün ayırma işlemini gerçekleştirebilir; bu çözücüler ailesi MIBK, toluen ve dietil eteri kapsamaktadır (Hu vd., 2009; Lima vd., 2009; Yong vd., 2008). İyonik sıvılar birçok organik çözücü ile karışmazlar ve bu özellik ürün ayırma işlemini kolaylaştırır.

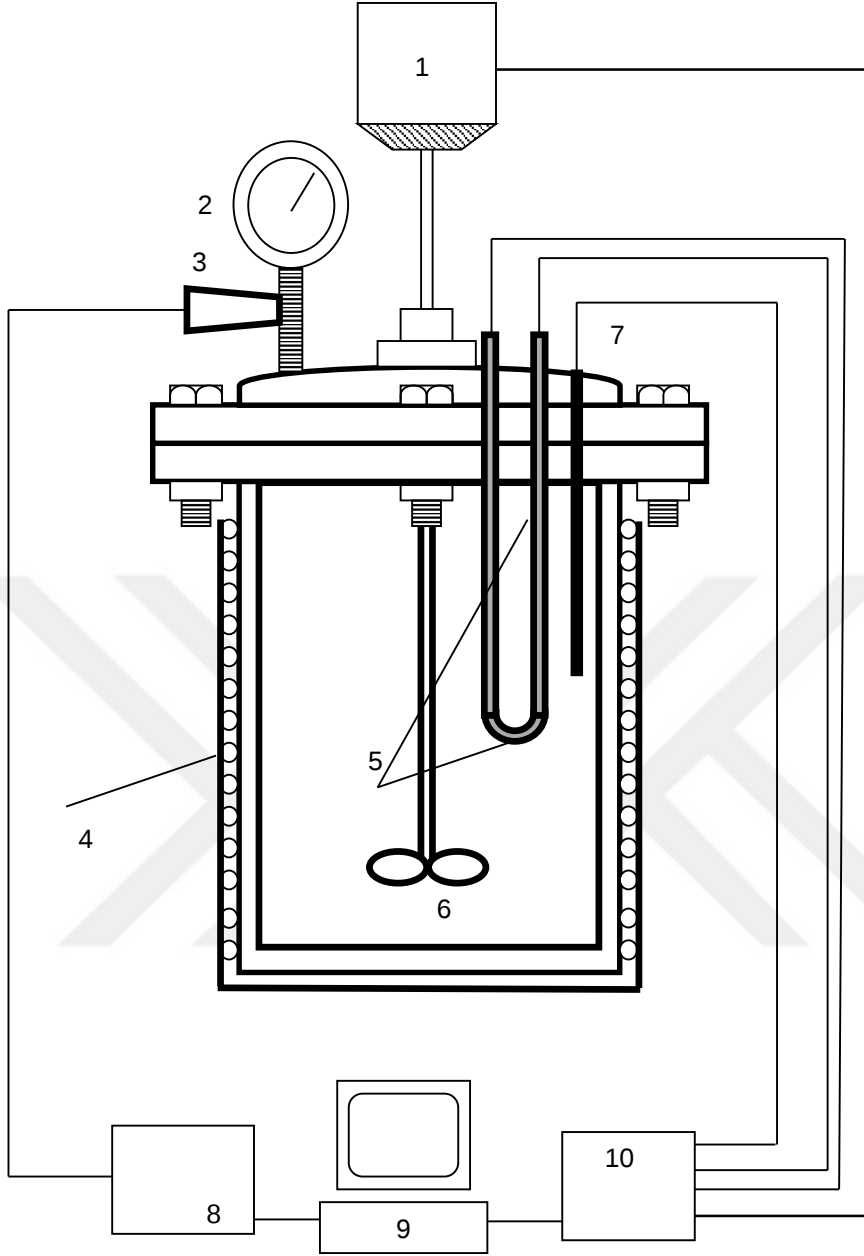
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

Bu çalışmada fruktozdan 5-HMF (hidroksimetilfurfural) üretimi için başlangıç malzemesi olarak (Carl ROTH 4981.4) % 99,5 saflıkta D-fruktoz kullanıldı. Çözücü olarak %99 saflıkta (HPLC saflığında) DMSO (Dimethylsulfoxide; Carlo Erba 445106) kullanıldı. Deneysel çalışmalarda katalizör olarak farklı özelliklerdeki iyon değişirici reçineler kullanılarak HMF oluşumu gözlemlendi. Bunun için Amberlyst 15 hidrojen form (Sigma Aldrich-216380) katyonik iyon değiştirici reçine, Amberjet 1200 Na (ROHM AND HAAS) iyon değiştirici reçine ve Dowex 21K XLT (SUPELCO 70469) anyonik reçine kullanıldı. Fruktozdan HMF üretimi aşaması ısıtıcı ve karıştırıcı (Parr Model No. 4561) basınç reaktöründe farklı sıcaklık ve sürelerde gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışma sonrası HMF, levülinik asit, formik asit ve fruktoz analizleri Shimadzu LC-20AT HPLC cihazı kullanılarak yapıldı. HMF, fruktoz ve organik asitlerin analizleri için Transgenomic Corogel 87H3 kolonu kullanıldı. HPLC analizlerinde mobil faz olarak 0,6 ml/dk akış hızında 5mM H₂SO₄ (Merck) kullanıldı. HPLC analizleri için standart olarak levülinik asit standardı (Sigma-Aldrich 41474), formik asit standardı (Carlo Erba 405792), 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) standardı (Dr. Ehrenstorfer GmbH 107513) ve D-fruktoz standardı (Carl ROTH) kullanıldı. Numunelerin analizi öncesinde uygulanan filtrasyon işlemi için ISOLAB marka PTFE 0,45µm 'lık şırınga filtreler kullanıldı.

3.2. HMF Üretimine Yönelik Deneylerin Yapılışı

Fruktozdan HMF üretimi literatürde yapılan çalışmalar ışığında daha iyi sonuç elde edildiği için tek fazlı sistem üzerinden gerçekleştirildi. Deneylerin tamamı 50 ml çalışma hacminde yürütülmüştür. Reaksiyon öncesinde deney için belirlenen fruktoz miktarı hassas terazi yardımıyla tartıldı. Toplam hacim 50 ml olacak şekilde reaktöre ilave edilen fruktoz DMSO ile çözüldü. Manyetik karıştırıcı ile fruktozun DMSO içerisinde çözündürülmesi sağlandı. Reaksiyon için belirlenen reçine miktarı hassas terazi yardımıyla tartıldı ve fruktoz-DMSO çözeltisine eklendi. Fruktozdan HMF üretimi, şematik gösterimi Şekil 3.1.'de verilen yüksek basınç reaktör sisteminde (Parr Model No: 4561) gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Karıştırılmalı Basınç Reaktörünün şematik gösterimi: 1) Karıştırıcı, 2) Basınç Göstergesi, 3) Basınç Transmitteri, 4) Isı Ceket, 5) Su Soğutma Hattı, 6) Pervane, 7)Termokupl (ısıl çift), 8) Veri Kaydedici, 9) Bilgisayar, 10) Kontrol Ünitesi

Basınç reaktörü sisteminde HMF üretiminin incelendiği tüm deneyler kesikli olarak gerçekleştirildi. Kullanılan basınç reaktörü sisteminin (deneysel düzeneğin) resmi Şekil 3.2.'de verilmiştir. Kullanılan sistem, deney sırasında reaktörden örnek almaya uygun olmakla beraber, örnek alınması sonucu reaktör boşluk hacminin artması ve buna bağlı olarak basınç düşüşlerinin meydana gelmesi söz konusu olduğundan deneyler numune almadan gerçekleştirildi. Bunun için reaktöre konulan çözelti reaktörün kapağı sızdırmazlık sağlanacak şekilde kapatıldıktan sonra, PID kontrolör vasıtasıyla bilgisayara bağlı olan ısıtıcının ve manyetik tahrikli karıştırma sisteminin devreye alınmasını takiben, mevcut yazılım yardımıyla sistem çalıştırıldı. Daha önceden belirlenen sıcaklık ve karıştırma hızı gibi parametrelerin istenen değere ulaştığı an, reaksiyon başlangıcı olarak kabul edildi. Bu andan itibaren ön görülen sürelerde işlem yürütülürken sürekli olarak sıcaklık, basınç ve karıştırma hızı kaydedildi. Ayrıca deneyler boyunca ön görülen sıcaklık değerleri $\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'den daha fazla değişmeyecek şekilde kontrol edildi. Ön görülen sürenin sonunda, karıştırma ve ısıtma işlemi durdurularak, reaktör ısı değiştirici yardımıyla soğutuldu. Reaktör sıcaklığı ortam sıcaklığına yakın bir değere ulaştığında reaktör açılarak içerisindeki karışım, mavi bant süzgeç kağıdından süzüldü. Bu yöntemle hazırlanan çözeltiler, numune kaplarına alınarak analiz edilene kadar $+ 4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Deneylerle fruktozdan iyon değiştirici reçineler kullanılarak HMF üretimi üzerine etkisi olan çeşitli parametreler incelenmiştir. Yapılan deneysel çalışmaları iki farklı aşamaya ayırmak mümkündür. İlk aşamada sistematik olarak ön denemeler gerçekleştirilirken, ikinci bölümde Cevap Yüzey Yöntemi (RSM) kullanılarak yapılan deneylerle optimum şartlar belirlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.2. Kullanılan basınç reaktörü sisteminin görünümü

3.2.1. Ön Denemeler

Bu bölümde yapılan deneylerle esasen basınç reaktöründe fruktozdan iyon değiştirici reçineler katalizörlüğünde HMF üretimi üzerine etki eden parametrelerin hangi aralıklarda incelenmesi gerektiğini ortaya koymak üzere çalışmalar yapıldı. Yapılan ön denemelerde materyal olarak fruktoz, DMSO ve farklı reçineler kullanıldı. Farklı sıcaklık, süre, fruktoz konsantrasyonlarında ve reçine miktarları ile fruktozdan HMF üretimi üzerine etki eden parametreler belirlenmiştir. Yapılan ön denemeler üç farklı iyon değiştirici reçine ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan reçinelerden biri anyonik özelliğe sahip olup diğer ikisi katyonik özelliktedir. Ayrıca farklı özelliklerdeki iyon değiştirici reçineler ile fruktozdan HMF üretimi için en uygun katalizörün hangisi olduğuna karar verilmiştir.

3.2.2. HMF Üretiminin Optimizasyonuna Yönelik Deneysel Tasarım

Karıştırmalı basınç reaktöründe fruktozdan farklı iyon değiştirici reçineler katalizörlüğünde HMF üretimi yapılan ön denemelerle incelenerek özellikle etkin parametrelerin hangi aralıklarda önemli olduğu belirlenmişti. Yapılan ön denemelerle elde edilen veriler, etkin parametrelerin hangi aralıkta incelenmesi gerektiği hususunda önemli fikirler vermiştir. Bu çalışmada Response Surface Methodology (RSM) (Cevap Yüzey Yöntemi) kullanılarak fruktozdan HMF üretimi üzerine etkin parametrelerin eş zamanlı olarak değiştirilerek incelenmesi sağlandı. RSM yöntemleri arasında pek çok model söz konusu olmakla birlikte bu çalışmada CCD (Central Composite Design-Merkez Kompozit Dizaynı) modeli kullanıldı. CCD modeli, incelenen parametre için ağırlıklı bir ortalama değer belirleyerek bunun etrafında diğer değerlerin de incelenmesine olanak sağlayan bir deneysel dizayn yöntemidir.

Bu dizayn yöntemi kullanılarak fruktozdan HMF üretimi üzerine çeşitli parametrelerin etkilerinin incelenmesi için deney dizaynları gerçekleştirilmiştir. Merkezi kompozit dizayn (CCD) deney tablosunda bulunan değişkenler ve incelenen aralıklar Tablo 3.1.'de, CCD matrisine ait veriler Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Merkez Kompozit Dizayn deney tablosunda bulunan değişkenler ve incelenen aralıklar

Değişken	- α	-1	0	+1	+ α
Reaksiyon Sıcaklığı (°C)	100	117,5	135	152,5	170
Reaksiyon süresi (dk)	30	52,5	75	97,5	120
Fruktoz konsantrasyonu (g/l)	50	112,5	175	237,5	300
Reçine konsantrasyonu (g/l)	1	10,75	20,5	30,25	40

Tablo 3.2. CCD Dizayn Matrisine ait veriler

Deney No	Reaktör Sıcaklığı (°C)	Reaksiyon Süresi (dk)	Fruktoz Konsantrasyonu (g/l)	Reçine Konsantrasyonu (g/l)
1	117,5	52,5	112,5	10,75
2	152,5	52,5	112,5	10,75
3	117,5	97,5	112,5	10,75
4	152,5	97,5	112,5	10,75
5	117,5	52,5	237,5	10,75
6	152,5	52,5	237,5	10,75
7	117,5	97,5	237,5	10,75
8	152,5	97,5	237,5	10,75
9	117,5	52,5	112,5	30,25
10	152,5	52,5	112,5	30,25
11	117,5	97,5	112,5	30,25
12	152,5	97,5	112,5	30,25
13	117,5	52,5	237,5	30,25
14	152,5	52,5	237,5	30,25
15	117,5	97,5	237,5	30,25
16	152,5	97,5	237,5	30,25
17	100	75	175	20,5
18	170	75	175	20,5
19	135	30	175	20,5
20	135	120	175	20,5
21	135	75	50	20,5
22	135	75	300	20,5
23	135	75	175	1
24	135	75	175	40
25	135	75	175	20,5
26	135	75	175	20,5
27	135	75	175	20,5
28	135	75	175	20,5
29	135	75	175	20,5
30	135	75	175	20,5

3.2.3. Analizler

Reaksiyon sonlandıktan sonra çözelti önce filtre kağıdından sonra da şırınga filtreden süzülerek analizleri gerçekleştirildi. HPLC analizi yapılmadan önce HMF, levülinik asit, formik asit ve fruktoz standartları hazırlandı. Bunun için ultra saf su kullanılarak uygun seyreltmeler ile 100 g/l'lik HMF standardı stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltiden 2 g/l, 4 g/l, 6 g/l, 8 g/l ve 10 g/l'lik ara konsantrasyonlar hazırlandı. Hazırlanan standartlara göre 5 noktadan oluşan çalışma doğrusu oluşturuldu. Fruktoz standardı laboratuvar ortamında hazırlandı ve hem organik asitler hem de fruktoz için çalışma doğrusu oluşturuldu. HMF ve organik asit analizleri Transgenomic Corogel 87H3 kolonunda 0.6 ml/dk akış hızı, 210 nm dalgaboyu ile UV dedektörde yapılırken fruktoz analizi ise RID (refractive index dedector) dedektör yardımıyla yapıldı. HMF, organik asit ve fruktoz miktarları belirlendikten sonra HMF ve DMSO'nun birbirinden ayrılması ve HMF'nin olabildiğince saf olarak elde edilmesi için vakumlu evaporatör düzeneğinde ayırma işlemi gerçekleştirildi.

3.3. DMSO'nun ve Reçinenin Geri Kazanımına İlişkin Çalışmalar

Dimetil sülfoksit (DMSO) sülfür içeren organik bir bileşiktir. Oda sıcaklığında renksiz, kokusuz ve yanıcı şeffaf sıvı olarak bulunur. Yüksek polarlık ve yüksek kaynama noktasına sahiptir. Ayrıca aprotiktir ve suda çözünme özelliklerine sahiptir. Düşük toksisiteye ve iyi termal kararlılığa sahiptir.

Fruktozdan HMF üretiminde organik çözücü olarak kullanılan DMSO önemli bir çözücü olup deneysel çalışma sonrasında geri kazanılması çalışmanın ekonomik olup olmadığı açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle deneysel çalışma sonucunda elde edilen üründen DMSO'nun geri kazanılması ile ilgili olarak çalışma gerçekleştirildi. Şekil 3.3.'te gösterilen vakumlu evaporatör düzeneği ile 680 mmHg basınçta ve 95 °C sıcaklıkta DMSO ayrılmış ve reaksiyon ortamından geri kazanılmıştır.



Şekil 3.3. Vakumlu evaporatör düzeneğinin görünümü

3.4. Toksisite Çalışması

Çalışmanın bu aşaması Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Yöntem aşağıdaki gibidir.

L929 ve AGS Hücre Kültürünün Yapılması

100 günlük C3H/An erkek farenin bağı dokusunun normal subkutanöz ve yağ dokusundan elde edilmiştir. 1940 yılında W.R. Earle tarafından oluşturulan esas L serisinin alt klonudur ve morfolojik yapısı fibroblast benzeri yapıda tek tabakalı olarak büyüyen hücre serisidir. Toksisite testlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Cheng and Sefton 2009). Deneysel çalışma sonucunda elde edilen HMF'nin toksik etkileri L929 hücre kültüründe incelendi.

Kültürü yapılmak üzere sıvı nitrojen tankından çıkarılan L929 hücreleri 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda hızlıca çözöldükten sonra içinde 5 mL %10 FBS'li DMEM/F12 besiyeri bulunan santrifüj tüpleri içine alınarak, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti 7,5 mL %10 FBS'li DMEM/F12 ile süspanse edilip 25 cm²'lik flaska aktarıldı. Flask, kapağı hafifçe gevşetilerek 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre konularak büyümesi sağlandı.

Kültürde flaskın yüzeyini yeteri kadar kaplamış olan L929 hücreleri üzerindeki besiyeri uzaklaştırılıp fosfat tamponu ile yıkandı. Fosfat tamponu ile seyreltilmiş tripsinden 1,5 mL flaska eklendi. Flask, tripsinin aktivitesini göstermesi için kapağı hafif gevşetilerek

37°C’de, %5 CO₂ içeren inkübatöre bırakıldı ve 5–10 dakika bekletildi. Flaskın yüzeyinden tamamen ayrılan hücrelere 5 mL %10 FBS’ li DMEM-F12 eklendi ve 15 mL’lik santrifüj tüpüne alındı. Oda sıcaklığında 1000 rpm’ de 5 dakika santrifüj edildi ve pelletteki total hücre sayısının hesaplanmasının ardından (eşitlik 3.1’de belirtilen formül ile), %10 FBS içeren DMEM/F12 besiyeri içerisinde 5×10^5 hücre, steril 25 cm²’lik flaska eklendi. Hücre sayımı için 1 µl hücre+ 49 µl tripan blue ile ependorfta karıştırıldı ve daha sonrasında hemositometrik olarak mikroskop altında sayımı yapıldı. Tripsinizasyon sonrası hücreler kültüre alındı (Koç Çakır, 2012).

$$\text{Hücre Sayısı (1 ml'deki)} = \text{Sulandırma katsayısı} \times 10.000 \text{ (thoma lamı katsayısı)} \times \text{Sayılan hücre ortalaması} \quad (3.1)$$

Gastrik Kanser Kökenli AGS Hücre Hattı

XTT 1988 yılında Scudiero ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş bir metot olup, hücre büyümesini ve hücreler üzerine çeşitli maddelerin etkinliğini incelemekte kullanılmaktadır. XTT renksiz veya hafif sarı renkte olup indirgendiğinde parlak turuncuya dönmektedir. Metabolik aktivitesi olan hücreler tarafından indirgenme oluşacağından dolayı bu yöntem sadece canlı hücreleri saptamaktadır. Metabolik aktivite temelli proliferasyon testlerinden biri olan MTT yöntemi çözme adımı gerektirdiğinden XTT yöntemi MTT yöntemine göre daha avantajlıdır. XTT sodyum tuzunun bir diğer avantajı da yüksek hassasiyet ve daha büyük dinamik alana sahip olmasıdır (Roehm vd., 1991).

Çalışmanın bu aşamasında kültürde çoğaltılan gastrik kanser hücreleri kullanılarak HMF’nin toksisitesi XTT yöntemi ile belirlendi. HMF’nin farklı konsantrasyonlarının XTT ölçümü yapılarak IC₅₀ değeri bulundu.

Yöntemde kısaca, 96 kuyucuklu steril düz dipli pleytlerin kuyucuklarına 10⁵ hücre/ml stoktan 100’er µl hücre ilave edildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücrelerin üzerine HMF’nin farklı konsantrasyonları eklenerek 24 saat inkübe edildi. Daha sonra 3 mg fenazin metosülfat (PMS), 1 ml 1× Fosfat tamponu (PBS) içinde çözüldü. Diğer taraftan 4 ml hücre kültür ortamında 4 mg XTT çözüldü ve 10 µl PMS solüsyonuna 4 ml XTT solüsyonu eklenerek her bir kuyucuğa 50 µl hazırlanan solüsyon eklendi. 37°C’ de 4 saat süre inkübe edildi (Scudiero vd., 1988). Daha sonra 450 nm’de absorbans değeri ölçüldü.

MTT Testi

Test, canlı hücrelerde MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] bileşiğinin tetrazolyum halkasının mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşmesi esasına dayanır. Soluk sarı renkli MTT, tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüşür. Canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler mavi-mor renkli formazan ürününü oluştururken, ölü ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş hücreler mavi-mor renkli formazan ürününü oluşturmaz. Oluşan mavi-mor renkli kristaller isopropil alkol veya dimetilsülfoksit ile çözündürülerek oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 590 nm’de ölçülür. Böylece, hücre canlılığındaki değişim formazan miktarında da değişime neden olur ve spektrofotometrik olarak elde edilen değer, %100 canlılığı gösteren değer ile kıyaslanarak test maddesinin sitoksisitesi belirlenir (Alley vd., 1988; Fotakis ve Timbrell, 2006; Mosmann, 1983; Van Meerloo vd., 2011).

XTT Testi

Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan XTT (2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5- sulfopenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid), MTT testinde olduğu gibi metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat tetrazolyum redüktaz enzim sistemi aracılığıyla suda çözünebilir turuncu renkli bir formazan boyaya dönüşür ve elde edilen sonuçlar 450-490 nm’de spektrofotometrede ölçülür. Böylece, hücre canlılığındaki değişim formazan miktarında da değişime neden olur ve spektrofotometrik olarak elde edilen değer, %100 canlılığı gösteren değer ile kıyaslanarak test maddesinin sitoksisitesi belirlenir. MTT testindeki gibi çözündürme aşamasını içermeyen bu test günümüzde hücre çoğalması ve canlılığının belirlenmesinde ve sitotoksosite analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Smith ve Williams, 2001). XTT testi ile maddenin IC50, metabolik toksisite ve solunum zinciri üzerine etkisi hakkında bilgi edinmek mümkündür (ISO-10935).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ön Denemelere Ait Sonuçlar

HMF'nin basınçlı reaktörde üretimi üç farklı iyon değiştirici reçine katalizörlüğünde farklı deney koşullarında incelenmiştir. Elde edilen deney sonuçları Tablo 4.1.'de görülmektedir. HMF dönüşümünde etkin olan parametrelerin farklı değerlerinde yapılan denemeler deneysel tasarımda değişim aralıklarının belirlenmesi için kullanılmıştır. HMF üretiminde kullanılan deney şartları literatürde yapılan çalışmalar dikkate alınarak seçilmiştir. Literatürde hem anyonik hem de katyonik reçine katalizörlüğünde HMF oluşumu görüldüğü ve özellikle de katyonik reçinelerde yüksek dönüşümlerin elde edildiği belirtilmektedir. Ayrıca kullanılan reçinenin yapısı ve özelliklerinin HMF oluşumunu etkilediği bilinmektedir. Seçilen üç reçine içerisinde Amberjet 1200 Na katyonik reçine kullanılarak farklı deney şartlarında HMF üretiminin anyonik reçinelerin kullanıldığı deneyden daha düşük HMF verimliliği değeri elde edilmiştir. Amberlyst 15 katyonik reçinenin kullanıldığı durumda HMF üretiminin kullanılan her iki reçineden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.1. Ön denemelere ait sonuçlar

	Deney Şartları				Deney Sonuçları				
	Sıcaklık, °C	Süre, dk	Fruktoz Kons. g/l	Reçine kons. g/l	HMF kons. g/l	Fruktoz kons. g/L	Lev.Asi t, kons. g/l	Formik Asit kons. g/l	% HMF verim
Dowex 21K XLT Anyonik İyon Değiştirici Reçine	150	60	237,5	10	89,102	1,8	0	3,8	37,51
	135	30	175	20	11,19	34,95	0	2,24	6,39
	135	90	150	20	22,92	81,73	0	2,37	15,28
	135	90	175	20	44,38	56,12	0	2,16	25,36
Amberjet 1200 Na Katyonik Reçine	135	75	175	20	18,46	105,7	0	2,56	10,54
	135	60	175	20	15,5	96,05	0	2,17	8,86
	120	90	50	40	1,12	35,55	0	5,0	2,24
Amberlyst 15 hydrogen form Katyonik Reçine	170	60	300	30	123,56	5,26	21,6	7,46	41,18
	120	60	300	30	95,3	10,3	0	2	31,76
	150	60	300	30	119,2	7,9	7,3	2,9	39,73
	150	150	150	30	85,5	6,4	15,54	4,95	57,00

4.2. Optimizasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar

Design Expert 8.0 yazılımı yardımıyla hazırlanan deneysel matrise uygun şekilde yapılan çalışma programında gerçekleştirilen deney sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.2.'de sunulmuştur. Tablo 4.2.'de HMF konsantrasyonu, muhtemel yan ürünler (levülinik asit, formik asit) ve dönüşmeyen fruktoz miktarları ile HMF miktarı esas alınarak hesaplanan HMF verimliliği ve seçiciliği ile fruktoz dönüşüm oranı görülmektedir. Sonuçların değerlendirilmesi için gerekli hesaplamalar aşağıdaki eşitliklerde belirtilmiştir.

$$\text{Fruktoz Dönüşümü (\%)} = \frac{C_{\text{Giren Fruktoz}} - C_{\text{Çıkan Fruktoz}}}{C_{\text{Giren Fruktoz}}} * 100 \quad (4.1)$$

$$\text{HMF Verimliliği (\%)} = \frac{C_{\text{HMF}}}{C_{\text{Giren Fruktoz}}} * 100 \quad (4.2)$$

$$\text{HMF Seçiciliği (\%)} = \frac{C_{\text{HMF}}}{C_{\text{Giren Fruktoz}} - C_{\text{Çıkan Fruktoz}}} * 100 \quad (4.3)$$

En düşük fruktoz dönüşümü (%83) sıcaklığın, sürenin ve reçine konsantrasyonunun düşük (-1) olduğu şartlarda elde edilmiştir. Fruktozdan HMF oluşumunda teorik verim %70 olmaktadır. Tabloda %50 HMF verimliliğinin üzerinde (9,11,21,24) nolu denemelerde reçine miktarının yüksek veya sıcaklığın yüksek olduğu şartlarda elde edildiği Tablo 4.2.'den görülmektedir.

Tablo 4.2. CCD dizayn matrisi şartlarında yapılan deney sonuçları

Deney No	HMF Kons. (g/l)	Formik Asit Kons. (g/l)	Levülinik Asit Kons.(g/l)	Fruktoz Kons. (g/l)	Fruktoz Dönüşümü (%)	HMF verimliliği (%)	HMF seçiciliği %
1	41,75	2,22	0,000	19,11	83,01	37,11	0,45
2	60,26	4,98	0,000	1,18	98,95	53,56	0,54
3	44,57	2,31	0,000	5,95	94,71	39,62	0,42
4	48,19	3,73	0,000	0,92	99,18	42,84	0,43
5	73,63	0,80	0,000	16,84	92,91	31,00	0,33
6	114,22	1,68	0,421	0,65	99,73	48,09	0,48
7	97,61	0,70	0,000	0,00	100,00	41,10	0,41
8	115,83	1,56	0,113	0,55	99,77	48,77	0,49
9	59,79	2,11	0,000	1,05	99,07	53,15	0,54
10	53,28	4,19	2,198	0,84	99,26	47,36	0,48
11	57,95	2,71	0,000	0,75	99,33	51,51	0,52
12	61,29	4,51	4,001	0,68	99,40	54,48	0,55
13	75,74	0,74	1,034	0,00	100,00	31,89	0,32
14	103,24	1,66	1,527	0,60	99,75	43,47	0,44
15	110,43	0,94	0,000	0,51	99,79	46,50	0,47
16	116,48	2,00	5,706	0,00	100,00	49,04	0,49
17	49,42	1,24	0,000	15,83	90,96	28,24	0,31
18	78,49	3,92	5,843	0,91	99,48	44,85	0,45
19	77,1	1,11	1,023	1,85	98,94	44,06	0,45
20	82,86	2,68	1,029	0,72	99,59	47,35	0,48
21	26,31	8,69	2,800	1,10	97,80	52,62	0,54
22	116,96	1,33	1,133	0,73	99,76	38,99	0,39
23	65,64	1,14	0,000	6,17	96,47	37,51	0,39
24	80,55	3,00	0,000	1,26	99,28	46,03	0,46
25	89,36	2,52	0,000	1,06	99,39	51,06	0,51
26	86,9	2,64	0,000	0,98	99,44	49,66	0,50
27	82,02	2,06	0,000	1,18	99,33	46,87	0,47
28	89,94	2,23	0,000	0,99	99,44	51,39	0,52
29	86	2,06	0,000	0,99	99,44	49,14	0,49
30	89,9	2,23	0,000	0,99	99,44	51,37	0,52

Design Expert 8.0 yazılımı yardımıyla dizayn matrisinden elde edilen deneysel sonuçların istatistiksel analizi yapılmıştır. İncelenen bağımsız değişkenlerin değişim aralıklarında sonuç değişkeni olarak seçilen HMF verimliliği için önerilen modeller ve istatistiksel sonuçları Tablo 4.3.'te verilmiştir. Tabloda görülen düşük p değerleri ve yüksek regresyon katsayısı değerlerine sahip kuadratik (ikinci derece) formdaki denklem önerilmiştir.

Tablo 4.3. Farklı matematiksel modellerle deneysel sonuçların uyumu

Kaynak	Sequential p -value	Uyum eksikliği p -değeri	Adj R^2	Pred R^2	
Lineer	0,0017	0,0063	0,40374	0,248673	
2FI	0,0849	0,0102	0,539613	0,330281	
Kuadratik	0,0018	0,0620	0,802828	0,458965	Önerilen
Kübik	0,6667	0,0164	0,769841	-5,46879	

Önerilen modelin ANOVA testine ait sonuçlar Tablo 4.4.'te verilmiştir. ANOVA test sonucunda elde edilen düşük p değeri ($<0,0001$) modelin %99,999 güven aralığında önemli olduğunu ifade etmektedir. Bağımsız değişkenlerden reaksiyon sıcaklığı (T), reaksiyon süresi (t), fruktoz konsantrasyonu (CF) ve reçine konsantrasyonun (CR) lineer etkilerinin önemli olduğu ($p<0,05$) görülmektedir. Reaksiyon süresi ile fruktoz konsantrasyonunun ve fruktoz konsantrasyonu ile reçine konsantrasyonun etkileşiminin düşük p değerine sahip olduğu, HMF verimliliği üzerine etkisinin önemli olduğu ANOVA sonuçlarından görülmektedir. Bu değişkenlerdeki değişim diğer değişkenin sonuç üzerine etkisini değiştirmektedir. Ayrıca reaksiyon sıcaklığının ve reçine konsantrasyonunun üssel etkisinin önemli olduğu bulunmuştur. Bu değişkenlerdeki küçük değişimler sonuç değişkeni olarak HMF verimliliğini üssel bir şekilde etkilediği ANOVA test sonucundan görülmektedir.

Tablo 4.4. Fruktozdan HMF Üretimi için CCD ile elde edilen ikinci derece denklemin ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F değeri	P Değeri Prob>F	
Model	1259,50	89,96	9,43	<0,0001	Önemli
A-sıcaklık	329,77	329,77	34,58	<0,0001	
B-süre	50,46	50,46	5,29	0,0362	
C-fruktoz	187,19	187,19	19,63	0,0005	
D-reçine	114,16	114,16	11,97	0,0035	
AB	32,86	32,86	3,44	0,0831	
AC	30,34	30,34	3,18	0,0947	
AD	68,58	68,57	7,19	0,0171	
BC	70,95	70,95	7,44	0,0156	
BD	33,38	33,38	3,50	0,0810	
CD	61,74	61,74	6,47	0,0224	
A ²	238,09	238,09	24,96	0,0002	
B ²	11,8387	11,8387	1,2415	0,2827	
C ²	10,9507	10,9507	1,1483	0,3008	
D ²	73,82	73,8214	7,7414	0,0139	
Lack of Fit	127,97	10	12,8	4,25	Önemsiz

HMF verimliliği için önerilen modelin istatistiksel analizi Tablo 4.5’te verilmiştir. Tabloda modele ait regresyon katsayısı (R^2) 0,898 olarak bulunmuştur. Bu sonuç bağımsız değişkenlerin incelenen aralıktaki değişimlerin %90’nını tanımlama kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Bir regresyon modelinin eklenen her bağımsız değişken, bağımlı değişkeni açıklama yeteneği olmasa bile R^2 değerinin büyümesine neden olmaktadır. Bu durum ise modelin açıklayıcılığının iyileştiği gibi yanlış bir sonuç doğurmaktadır. Bu nedenle modele katkısı olmayan değişkenleri dikkate alarak daha gerçekçi bir R^2 değeri hesaplanmakta ve bu değer ayarlanmış/düzeltilmiş R^2 (adjusted R^2) olarak ifade edilmektedir. Yüksek Adj R^2 değeri (%80) modele ilave terimlere ihtiyaç olmadığını göstermektedir.

Tablo 4.5. Fruktozdan HMF üretimi için önerilen ikinci derece modele ait istatistikler

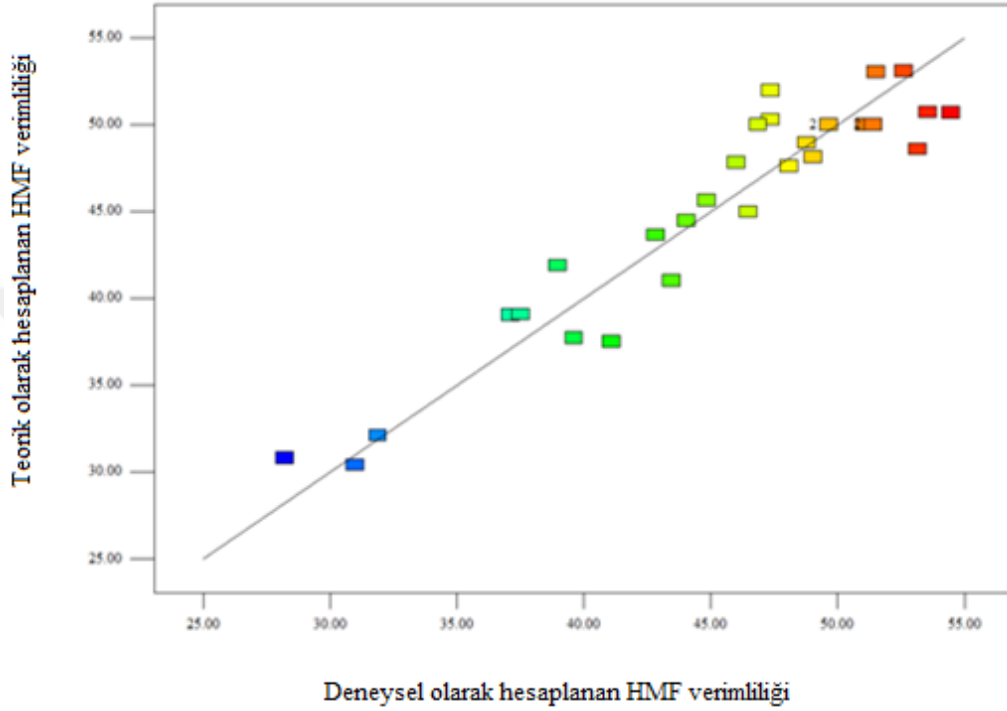
Standart sapma	3,09
Ortalama	45,31
Varyasyon katsayısı (C.V)	6,82
Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (Press)	758,82
R ²	0,8908
Adj R ²	0,8028
Pred R ²	0,459
Adeq Precision	10,369

Yeterli kesinlik (adequate precision), sinyal gürültü oranını gösterir. Sinyal gürültü oranının ise 4'ün üstünde olması beklenir. Bu çalışmada bulunan sinyal gürültü oranı 10,37 yeterli sinyale işaret etmektedir. Uyum eksikliği (lack of fit), regresyonda içerilmeyen noktalarda deneysel kümedeki verileri göstermek için modelin başarısını ölçer. Eşitliğin regresyonundan elde edilen uyum eksikliği anlamlı değildir. Uyum eksikliği *p* değerinin yüksek ve önemsiz olması kontrol edilemeyen diğer parametrelerin sonuç üzerine olan etkileri modeli olumsuz etkilemediğini göstermektedir. R² değerleri aynı olan modellerin değerlendirilmesinde ise “standart hata” büyüklüklerine bakılmaktadır. Bu değer mümkün olduğunca küçük olması istenmektedir. Kararlılığı sorunlu olan HMF üretiminde 3,09 gibi küçük sayılabilecek standart hata modelin uyumunu artırmaktadır. Deneysel çalışmalarda her bir nokta iki tekrar yapılmış ve ortalamaları deneysel matriste kullanılmıştır. Paralel deneylerde %5'ten büyük farklılık içeren değerler tekrarlanmış ve sapan değerler atılmıştır.

İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda önerilen ikinci derece model denklemi eşitlik (4.4)'te verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{HMF verimlilik değeri} = & -197.499 + 3.110 \times T + 0.353 \times t - 0.2043 \times CF + 2.64 \times CR \\ & - 0.00364 \times T \times t + 0.00126 \times T \times CF - 0.01213 \times T \times CR + 0.001497 \times CF \times CR + 0.006585 \\ & \times t \times CR - 0.00322 \times CF \times CR - 0.00962 \times T^2 - 0.0013 \times t^2 - 0.00016 \times CR^2 - 0.0726 \times \\ & CF^2 \end{aligned} \quad (4.4)$$

Önerilen model eşitlikten hesaplanan teorik değerler ile deneysel verilerin dağılımı Şekil 4.1.'de verilmiştir. Deneysel değerlerin doğrunun etrafında dağıldığı şekilden görülmektedir. Deneysel sonuçlarla model sonuçlarının uyumun iyi olduğu şekilden görülmektedir.

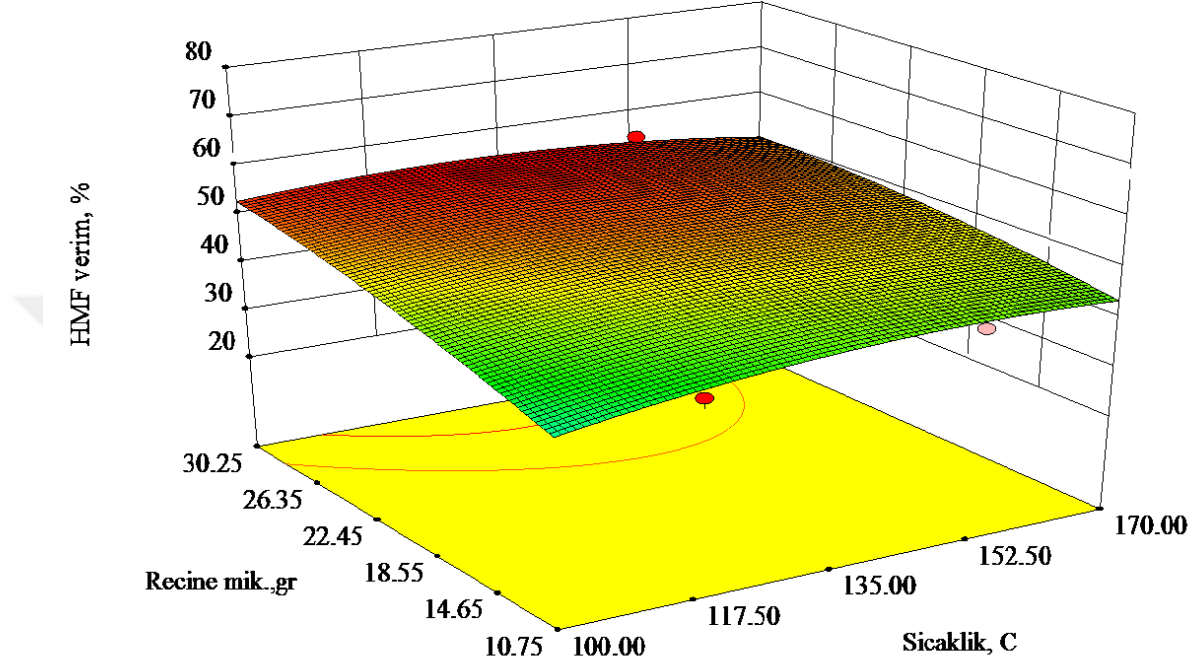


Şekil 4.1. Teorik olarak hesaplanan HMF verimliliği ile deneysel olarak bulunan HMF verimliliği değerlerin dağılımı.

HMF verimliliğinde incelenen bağımsız değişkenlerin etkileşimleri yüzey grafikleriyle (Şekil 4.2-Şekil 4.7) verilmiştir. Grafiklerde değişimi verilen iki bağımsız değişken dışındaki değişkenler maksimum HMF verimliliği sağlayan noktalarda tutulmuştur.

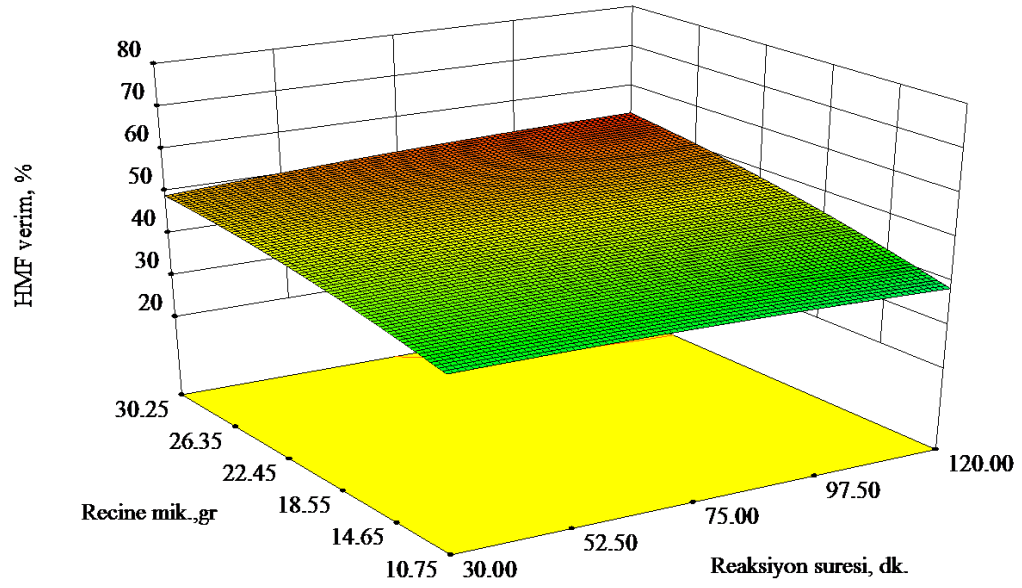
Yüzey grafiklerinde reaksiyon sıcaklığının HMF veriminde bir optimum noktasının olduğu görülmektedir. Reaksiyon sıcaklığının uç noktalarında ($+\alpha$, $-\alpha$) HMF verimliliğinin azaldığı 130 °C civarında en yüksek verimlilik değerine ulaşıldığı görülmektedir.

Reçine miktarındaki artışın düşük reaksiyon sıcaklığında HMF verimliliğini önemli şekilde artırırken yüksek sıcaklıklarda sınırlı kalmaktadır. En yüksek HMF verimliliği değeri reçine miktarının maksimum (40 g/l) reaksiyon sıcaklığının 130 °C civarında olduğu Şekil 4.2’de görülmektedir.



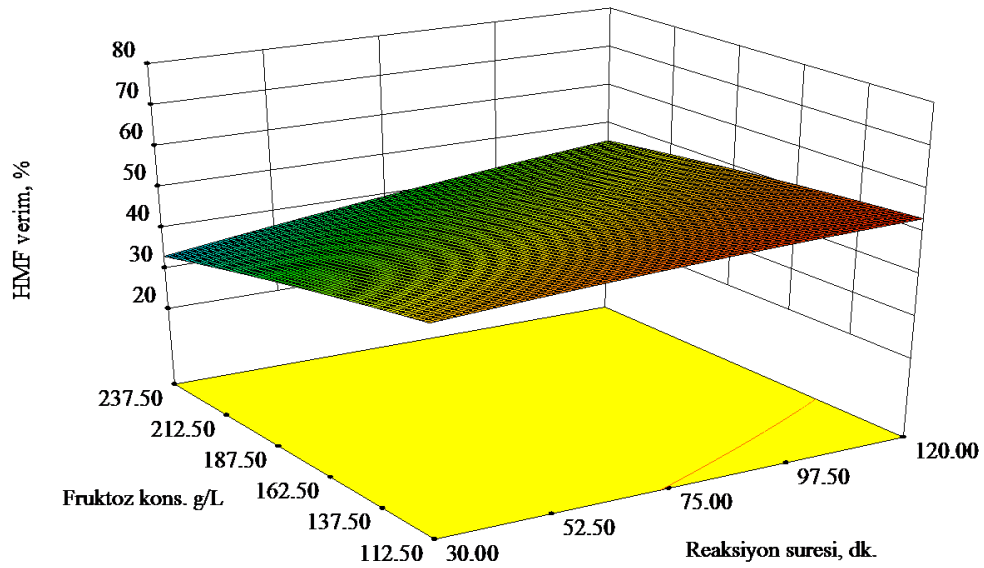
Şekil 4.2. Reçine miktarı- Sıcaklık

Şekil 4.3’te reaksiyon süresi ile reçine miktarı arasındaki etkileşimin HMF verimliliğine etkisinin önemli olduğu görülmektedir. HMF verimliliği düşük reçine konsantrasyonlarında zamanla azalırken yüksek reçine konsantrasyonlarında verimlilik zamanla artmaktadır. Bu durum yetersiz katalizör varlığında yan reaksiyonların gerçekleşmesinden kaynaklanabilir.

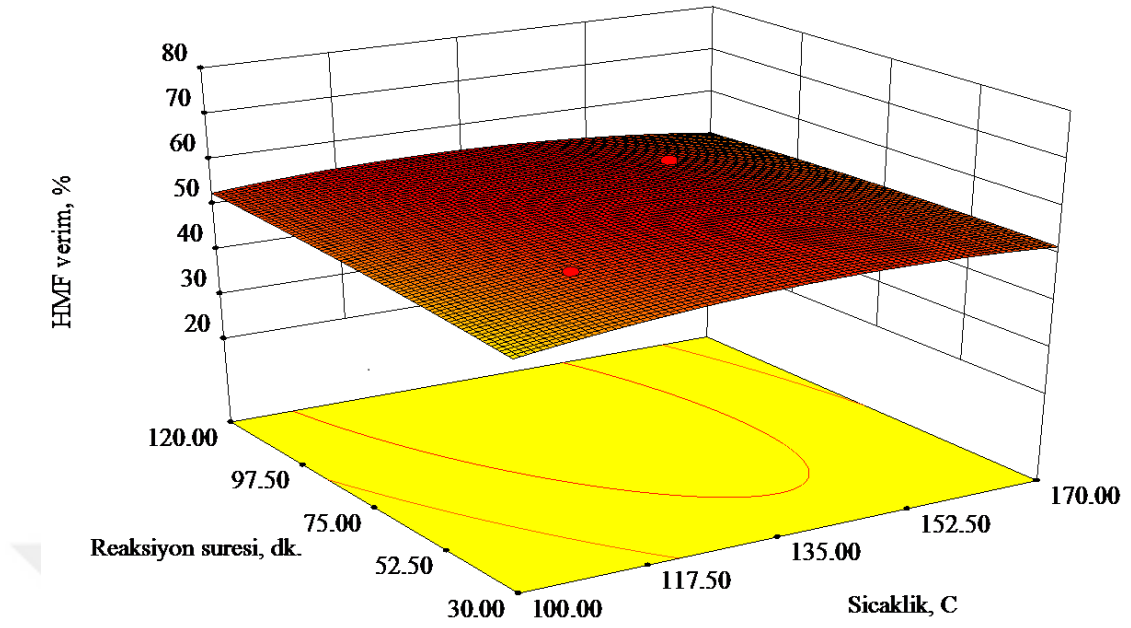


Şekil 4.3. Reçine miktarı-reaksiyon süresi

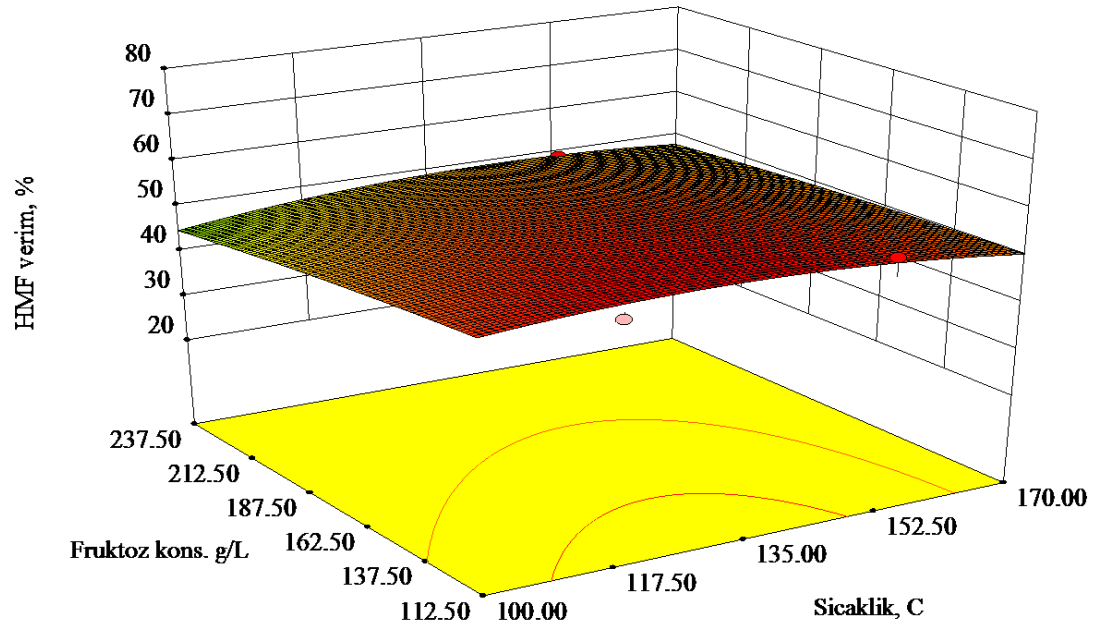
Reaksiyon süresinin katalizör ve reaktan konsantrasyonu ile değişimi incelenen sıcaklık aralığına göre daha etkin olduğu Şekil 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7’ de görülmektedir. Yüksek fruktoz konsantrasyonunda reaksiyon süresiyle HMF verimliliğindeki artış üssel olmaktadır. Benzer bir artış düşük reçine konsantrasyonunda azalan fruktoz konsantrasyonunda gerçekleşmektedir.



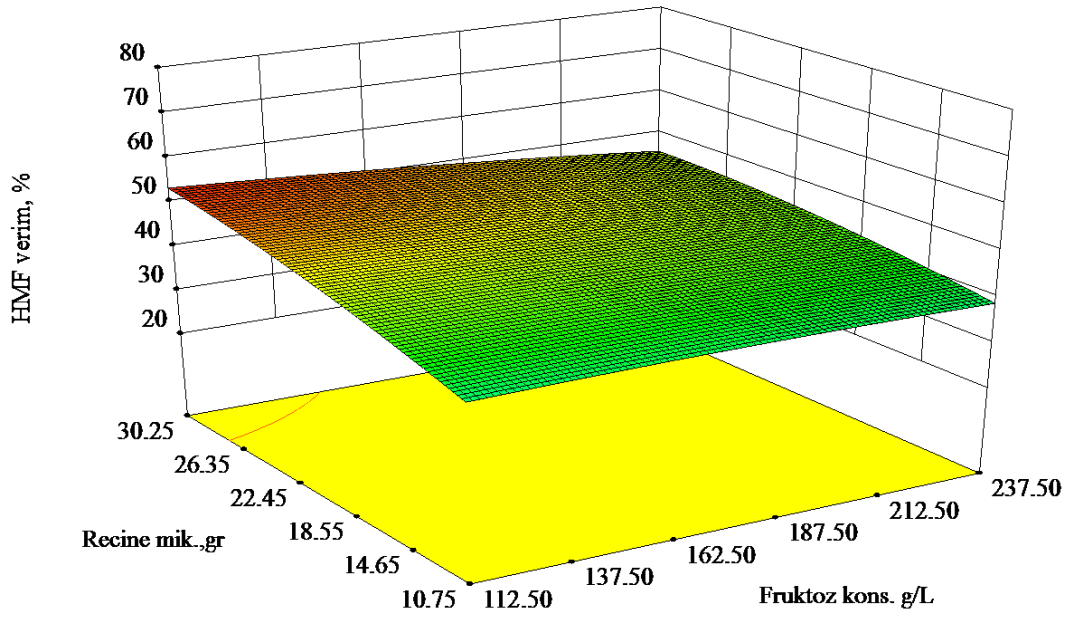
Şekil 4.4. Fruktoz konsantrasyon-Reaksiyon süresi



Şekil 4.5. Sıcaklık-reaksiyon süresi



Şekil 4.6. Fruktöz konsantrasyonu-sıcaklık



Şekil 4.7. Fruktoz konsantrasyonu-reçine miktarı

Farklı reçine konsantrasyonlarında fruktoz konsantrasyonundaki artış HMF verimliliğini etkilemektedir. Düşük reçine konsantrasyonunda yapılan deneylerde artan fruktoz konsantrasyonu ile HMF verimliliği düşmektedir. Artan fruktoz konsantrasyonu yüksek reçine konsantrasyonunda verimliliği artırmaktadır. Burada diğer önemli proses değişkenleri olan reaksiyon süresinin optimum noktada tutulduğu unutulmamalıdır. Bu grafikler reaksiyon süresi ve sıcaklığından bağımsız çizilmektedir.

Myers ve Montgomery'nin önerdiği sayısal optimizasyon yöntemi kullanarak elde edilen model denklemin çözümü Design Expert 8.0 yazılımıyla elde edilmiştir (Myers, Montgomery., 2016). Program tarafından (50 g/l) fruktoz konsantrasyonu, 40 g/l reçine miktarı, 120 °C sıcaklık ve 104 dakika reaksiyon süresi şartlarında HMF verimliliğinin %59,9 olacağı bulunmuştur. Önerilen şartlarda yapılan deney sonuçları Tablo 4.6.'da verilmiştir. Modelin önerdiği sonuçla deneysel sonucun uyumlu olduğu, doğrulama deneyi sonucunda görülmüştür. Çözüm noktasında gerçekleştirilen deneyler sırasında ortamdaki yan ürünler (levülinik asit, formik asit) ve fruktoz da takip edilmiştir. Doğrulama deneyi sonucunda modelin önerdiği HMF verimi değerine yüksek bir oranda yaklaşıldığı görülmüştür.

Tablo 4.6. Önerilen şartlarda yapılan deney sonuçları

	Reak. Sıcaklığı (°C)	Reak. Süresi (dk)	Fruktoz kons. (g/l)	Reçine kons. (g/l)	HMF kons. (g/l)	Fruktoz kons. (g/l)	Formik Asit Kons. (g/l)	Levülinik Asit Kons. (g/l)	HMF verimliliği (%)
Model	119,82	104,01	50,00	40,00	29,73	0,008	6,14	1,18	59,94
Deneyssel	120	104	50	40,00	30,03	0,85	5,6	0	60,06

4.3. Reçine ve DMSO'nun Geri Kazanımı

Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun ve katalizör olarak kullanılan reçinenin tekrar kullanımı incelenmiştir. Bu amaçla reaksiyon ortamından filtre edilerek ayrılan reçine belirlenen optimum şartlarda 4 kez kullanılmıştır. Elde edilen deney sonuçları Tablo 4.7'de verilmiştir. Tekrar kullanımda elde edilen sonuçlarda reçinenin katalizör olarak kullanımında bir değişimin olmadığı tekrar tekrar HMF üretiminde kullanılabileceği görülmüştür. Reçinenin kurutulduktan sonra tekrar kullanılması sonucunda elde edilen HMF konsantrasyonları arasında çok büyük fark olmadığı görülmüştür. Bu durumun reçinenin boyutunda meydana gelen değişim ile alakalı olduğu düşünülebilir. Katalizör olarak kullanılan reçinenin boyutunun küçülmesi reaksiyonun hızını artırmaktadır. Ayrıca reçine miktarındaki artış deney sonucunda oluşan HMF konsantrasyonunu belirli bir noktadan sonra etkilememektedir.

Tablo 4.7. Reçine geri kazanımı ile ilgili sonuçlar

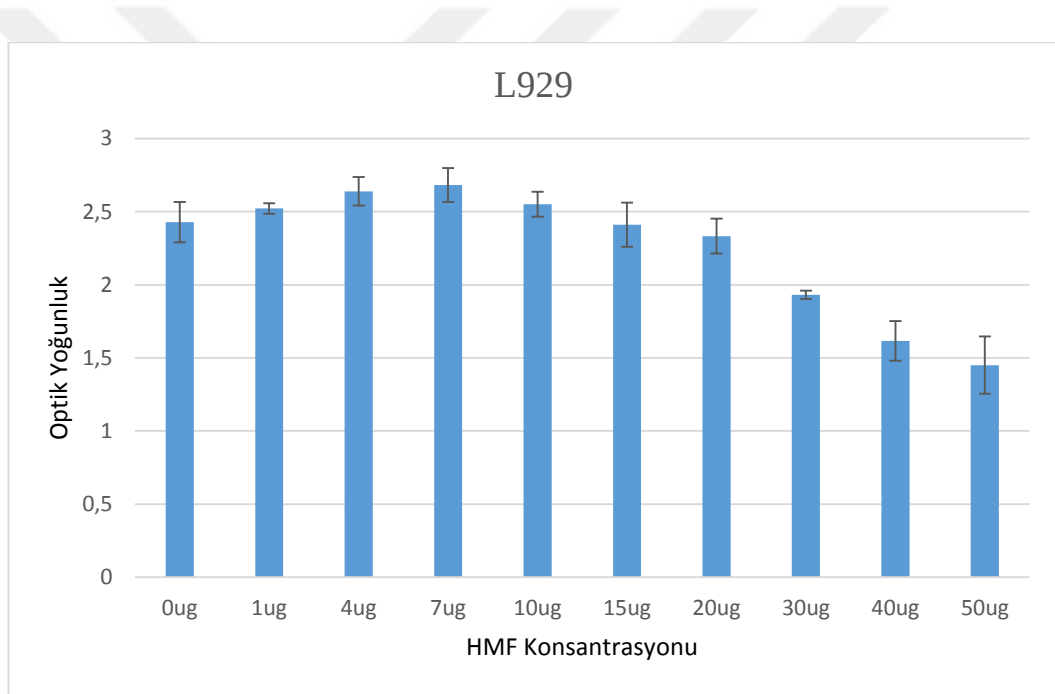
Deney No	HMF Konsantrasyonu (g/l)	HMF Verimi (%)
1	29,3	58,6
2	30,2	60,4
3	31	62
4	29,8	59,6

680 mmHg vakum basıncı ve 95 °C'de geri kazanılan DMSO'nun safsızlıklardan ayrıldığı ve reaksiyon ortamından geri kazanılabildiği görülmüştür. Reaksiyon ortamına eklenen 50 ml DMSO, 35 ml olarak vakumlu evaporatörden geri kazanılmıştır. Vakumlu evaporatörde geri kazanılan DMSO'nun HPLC kromatogramı ekte verilmiştir.

4.4. Toksisite Çalışmasına Ait Sonuçlar

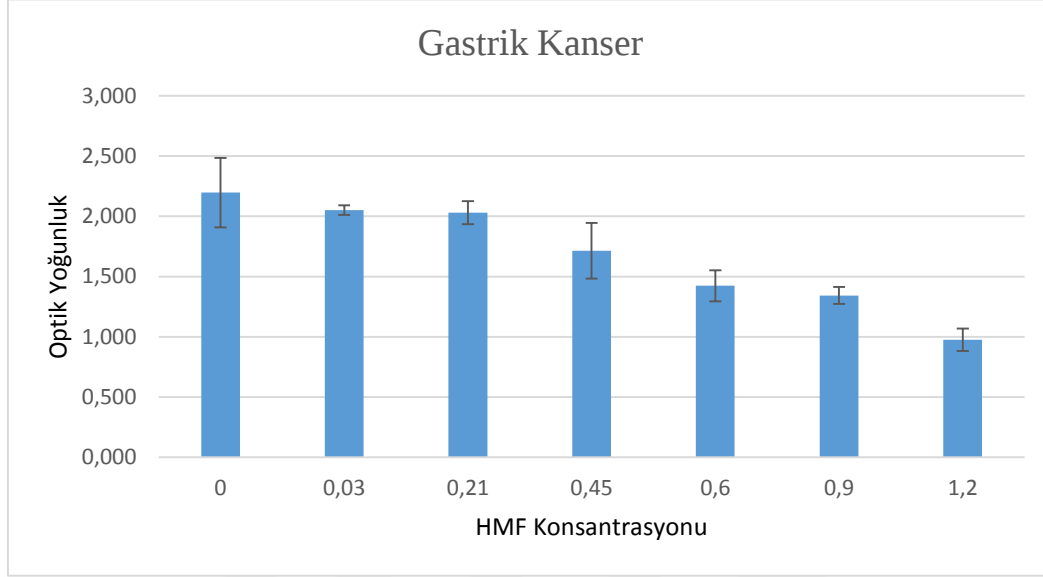
HMF formülasyonları 24 saat boyunca L929 hücrelerine uygulandı ve bu sürenin sonunda hayatta kalan hücre sayısı hesaplanarak incelendi. XTT testi ile yapılan sitotoksite ve anti- kanser etkinlik sonuçlarına göre canlı hücre oranları grafiklerde gösterildi. Normal fibroblast hücrelerindeki toksisite sonuçları kontrol hücresi ile kıyaslandığında 10 µg kadar olan konsantrasyonlarda HMF'nin toksisite oluşturmadığı görüldü.

Şekil 4.8'de L929 sitotoksosite sonuçlarına göre hücre proliferasyonu artıran ve en etkin konsantrasyonun 7 µg'da olduğu görüldü. 15 µg'dan itibaren artan konsantrasyonlar ile beraber hücrelerde toksisitenin oluştuğu görüldü.



Şekil 4.8. L929 hücrelerindeki antikanser etkisi

24 saat boyunca HMF'nin artan konsantrasyonuna bağı olarak anti kanser etkisi Gastrik kanser hücrelerinde incelendi ve etki düzeyleri Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Gastrik kanser hücrelerindeki toksisite etkisi

Test sonuçlarına göre test ortamında kalan canlı hücre oranları Şekil 4.9 ve Şekil 4.8'de gösterilmiştir. L929 hücreleri ile toksisitesi ölçülen HMF'nin Gastrik kanser hücrelerindeki anti kanser etkileri, kontrol hücresi ile kıyaslanarak incelendi. Şekil 4.9'da sonuçlara ait verilmiş olan grafikte gösterildiği üzere artan konsantrasyonlar ile birlikte 0,03 μg 'dan itibaren anti- kanser etkinin olduğu görüldü. En etkin anti kanser etkinliğin 1,2 μg 'da oluşmakta olup Gastrik kanser hücrelerinin yarısından fazlasına etki ettiği görüldü. 1,2 μg 'lık HMF çözeltisine 24 saat süresince maruz tutulan hücrelerin %50'sinin canlılığını kaybettiği gözlemlendi.

5. SONUÇLAR

Fruktozdan HMF üretimi ve antikanserojen etkisinin in vitro incelenmesinin araştırıldığı bu çalışmada elde edilen genel sonuçlar aşağıda önerilmiştir.

1. Fruktozdan HMF üretimi için reaksiyon şartlarının optimize edilmesine yönelik olarak Cevap Yüzey Yöntemi (RSM) kullanıldı. Bu deneysel tasarımda incelenecek parametreler ve aralıklar literatür bilgilerinden ve ön denemelerin sonuçlarından elde edilmiştir.
2. HMF'nin karıştırılmalı basınçlı reaktörde üretimi üç farklı iyon değiştirici reçine katalizörlüğünde farklı deney koşullarında incelendi. Anyonik ve katyonik reçineler katalizörlüğünde HMF oluşumu görüldü ancak katyonik reçinelerde yüksek dönüşümlerin elde edildiği belirlendi.
3. Fruktozdan HMF üretimi üzerine etkili olan parametreler; sıcaklık, süre, fruktoz konsantrasyonu ve reçine miktarı olarak belirlendi. En düşük fruktoz dönüşümünün sıcaklık, süre ve reçine miktarının düşük olduğu şartlarda görüldü.
4. HMF üretimi için yapılan dizayn deneyleri sonunda (50 g/l) fruktoz konsantrasyonu, 40 g/l reçine miktarı, 120 °C sıcaklık ve 104 dakika reaksiyon süresi şartlarında HMF verimliliğinin %59,9 olduğu bulundu.
5. Reaksiyon sıcaklığının HMF veriminde bir optimum noktasının olduğu belirlendi. Reaksiyon sıcaklığının uç noktalarında HMF verimliliğinin azaldığı 130 °C civarında en yüksek verimlilik değerine ulaşıldığı görüldü.
6. Yüksek fruktoz konsantrasyonunda reaksiyon süresiyle HMF verimliliğindeki artış üssel olmaktadır. Benzer bir artış düşük reçine konsantrasyonunda azalan fruktoz konsantrasyonunda gerçekleşmektedir.
7. HMF verimliliği düşük reçine konsantrasyonlarında zamanla azalırken yüksek reçine konsantrasyonlarında verimlilik zamanla artmaktadır. Bu durum yetersiz katalizör varlığında yan reaksiyonların gerçekleşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Farklı reçine konsantrasyonlarında fruktoz konsantrasyonundaki artış HMF verimliliğini etkilemektedir. Düşük reçine konsantrasyonunda yapılan deneylerde artan fruktoz konsantrasyonu ile HMF verimliliği düşmektedir.
8. HMF üretiminde DMSO ve reçinenin geri kazanımı üzerine çalışmalar gerçekleştirildi. Böylece kullandığımız yöntemin ekonomik olduğu sonucuna

varıldı. Bu alışmada HMF retimi üzerine katalizör olarak katyonik reçine kullanımının daha uygun olduğu belirlendi. Deneysel çalışmalarda katyonik reçinenin katalizör olarak kullanılmasının anyonik reçine kullanımından çok daha iyi sonuç verdiği görüldü.

9. Deneysel alışmalar sonrasında elde edilen HMF üzerinde hem sağlıklı hücrelerde hem de gastrik kanser hücresi üzerinde toksisite çalışması yapılmıştır ve antikanser olduğu belirlendi.



6. ÖNERİLER

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda yüksek verimle HMF üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen HMF, HPLC ile kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilmiştir.

- Bu tez çalışması, Türkiye’de HMF üretimi ve antikanserojen etkisinin incelenmesi üzerine yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalardan biridir. Ayrıca “HMF üretimi” ile ilgili yapılacak olan diğer çalışmalara kaynak olabilecek niteliktedir. Bu tez çalışmasında kullandığımız üretim ve analiz yöntemleri, HMF üretim yöntemlerinin optimizasyonu üzerine yapılacak olan çalışmalar için önemli veriler sunmaktadır. Bu tez çalışmasında kullandığımız yöntemin endüstriyel boyutta ölçeklendirilmesiyle, HMF’nin ticari olarak üretimi araştırılması gereken bir konudur.
- HMF üretiminde farklı iyonik çözücüler ve farklı katalizörler kullanılarak verim üzerine etkileri araştırılabilir. Tüm bu öneriler çerçevesinde HMF üretimi ülkemizde biyo tabanlı değerli kimyasalların araştırılması ve ticari olarak üretilmesi hususunda büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

Peter Wasserscheid., Annegret Stark, 2010. "<(Handbook of Green Chemistry", 6) Peter Wasserscheid, Annegret Stark-Handbook of Green Chemistry, Volume 6_ Ionic Liquids-Wiley-VCH (2010).pdf>."

Abdulmalik, Osheiza., Safo, Martin K., Chen, Qiukan., Yang, Jisheng., Brugnara, Carlo., Ohene-Frempong, Kwaku., Abraham, Donald J., Asakura, Toshio, 2005. "5-hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells." British journal of haematology **128**(4): 552-561.

Amarasekara, Ananda S., Williams, LaToya D., Ebede, Chidinma C., 2008. "Mechanism of the dehydration of d-fructose to 5-hydroxymethylfurfural in dimethyl sulfoxide at 150 C: an NMR study." Carbohydrate research **343**(18): 3021-3024.

Antal Jr., Michael Jerry., Mok, William S., 1988. A study of the acid catalyzed dehydration of fructose in near-critical water. Research in Thermochemical Biomass Conversion, Springer: 464-472.

Asghari, Feridoun Salak., Yoshida, Hiroyuki., 2006. "Dehydration of fructose to 5-hydroxymethylfurfural in sub-critical water over heterogeneous zirconium phosphate catalysts." Carbohydrate research **341**(14): 2379-2387.

Bao, Quanxi., Qiao, Kun., Tomida, Daisuke .,Yokoyama, Chiaki., 2008. "Preparation of 5-hydroxymethylfurfural by dehydration of fructose in the presence of acidic ionic liquid." Catalysis Communications **9**(6): 1383-1388.

Benecke, H.P., King, J.L.I., Kawczak, A.W., Zehnder, D.W., Hirschl, E.E., 2007. Esters of 5 -hydroxymethylfurfural and methods for their preparation, Google Patents.

Bhosale, Snehalata H., Rao, Mala B., Deshpande, Vasanti V., 1996. "Molecular and industrial aspects of glucose isomerase." Microbiological reviews **60**(2): 280-300.

Bicker, M, Hirth, J., Vogel, H., 2003. "Dehydration of fructose to 5-hydroxymethylfurfural in sub-and supercritical acetone." Green Chemistry **5**(2): 280-284.

Bicker, M. Kaiser., D. Ott., L.Vogel., H., 2005. "Dehydration of D-fructose to hydroxymethylfurfural in sub-and supercritical fluids." The journal of supercritical fluids **36**(2): 118-126.

Binder, Joseph B., Raines., Ronald T., 2009. "Simple chemical transformation of lignocellulosic biomass into furans for fuels and chemicals." Journal of the American Chemical Society **131**(5): 1979-1985.

Boghani N., Gebreselassie P., Hargreaves C.A., 2007. Taste potentiator compositions and edible confectionery and chewing gum products containing same, Google Patents.

Bonsignore, P.V., 2008. Aceonide of hydroxymethylfurfural and glycerin, Google Patents.

Bredereck, H., 1932. "Zur Molisch-Reaktion (II. Mitteil.)." European Journal of Inorganic Chemistry **65**(7): 1110-1113.

Brustugun, J., 2005. "Formation and reactivity of free radicals in 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde—the effect on isoprenaline photostability." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **79**(2): 109-119.

Cheng, D., ve M. V. Sefton, 2009. "Dual delivery of placental growth factor and vascular endothelial growth factor from poly (hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) microcapsules containing doubly transfected luciferase-expressing L929 cells." Tissue Engineering Part A **15**(8): 1929-1939.

Chheda, J. N., ve J. A. Dumesic, 2007. "An overview of dehydration, aldol-condensation and hydrogenation processes for production of liquid alkanes from biomass-derived carbohydrates." Catalysis Today **123**(1): 59-70.

Chheda, Juben N., Román-Leshkov, Yuriy., Dumesic, James A., 2007. "Production of 5-hydroxymethylfurfural and furfural by dehydration of biomass-derived mono-and poly-saccharides." Green Chemistry **9**(4): 342-350.

Chmielewski, Piotr J., Latos-Grażyński, Lechoslaw., Olmstead, Marilyn M., Balch, Alan L., 1997. "Nickel Complexes of 21-Oxaporphyrin and 21, 23-Dioxaporphyrin." Chemistry-A European Journal **3**(2): 268-278.

Chundury, D., ve H. Szmant, 1981. "Preparation of polymeric building blocks from 5-hydroxymethyl-and 5-chloromethylfurfuraldehyde." Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development **20**(1): 158-163.

Corma, Avelino., Iborra, Sara., Velty, Alexandra, 2007. "Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals." Chemical reviews **107**(6): 2411-2502.

Correia, P., 2008. Liquid biofuels containing dihydroxyfuran, propanol and its production process from polyols originated in agriculture, Google Patents.

Cottier, L., ve G. Descotes, 1994. "5-(Hydroxymethyl) furfural Syntheses and Chemical Transformations." ChemInform **25**(36).

Cottier, Louis., Descotes, Gérard., Lewkowski, Jaroslaw., Skowroński, Romuald., 1995. "ultrasonically accelerated syntheses of furan-2,4-dicarbaldehyde from 5-hydroxymethyl-2-furfural." Organic preparations and procedures international **27**(5): 564-566.

de Jong, Ed., Higson, Adrian., Walsh, Patrick., Wellisch, Maria., 2012. "Bio-based chemicals value added products from biorefineries." IEA Bioenergy, Task42 Biorefinery.

Del Poeta, Maurizio., Schell, Wiley A., Dykstra, Christine C., Jones, Susan., Tidwell, Richard R., Czarny, Agnieszka., Bajic, Miroslav., Bajic, Marina., Kumar, Arvind., Boykin, David., 1998. "Structure-in vitro activity relationships of pentamidine analogues and dication-substituted bis-benzimidazoles as new antifungal agents." Antimicrobial agents and chemotherapy **42**(10): 2495-2502.

Fayet, C., ve J. Gelas, 1983. "Nouvelle methode de preparation du 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde par action de sels d'ammonium ou d'immonium sur les mono-, oligo-et polysaccharides. acces direct aux 5-halogenomethyl-2-furaldehydes." Carbohydrate research **122**(1): 59-68.

Feng, Yaohui., He, Benqiao., Cao, Yuhe., Li, Jianxin., Liu, Meng., Yan, Feng., Liang, Xiaoping., 2010. "Biodiesel production using cation-exchange resin as heterogeneous catalyst." Bioresource technology **101**(5): 1518-1521.

Fenton, H. J. H., ve M. Gostling, 1901. "LXXXV.—Derivatives of methylfurfural." Journal of the Chemical Society, Transactions **79**: 807-816.

Fenton, H. J. H., ve F. Robinson, 1909. "CXLVIII.—Homologues of furfuraldehyde." Journal of the Chemical Society, Transactions **95**: 1334-1340.

Fotakis, G., ve Timbrell, J.A., 2006. "In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride." Toxicology letters **160**(2): 171-177.

Gandini, A., ve M. N. Belgacem, 1997. "Furans in polymer chemistry." Progress in Polymer Science **22**(6): 1203-1379.

Gardovic, M., 2003. Composition for the treatment of skin diseases and for improving hair growth, Google Patents.

Girisuta, B., Janssen, LPBM., Heeres, HJ., 2006. "A kinetic study on the decomposition of 5-hydroxymethylfurfural into levulinic acid." Green Chemistry **8**(8): 701-709.

Glushkov, RG., Adamskaya, EV., Vosyakova, TI., Oleinik, AF, 1990. "Pathways of synthesis of ranitidine." Pharmaceutical Chemistry Journal **24**(5): 369-373.

Groke, K., Groke, I., Groke, V., Groke, P., Herwig, R., Ferdinand, P., 2006. Agent having a destructive effect on malignant tumors and method for the production thereof, Google Patents.

Groke, Karl., Kager, Ernst., Bucher, Christian, 2003. Means for weaning people off smoking and alcohol, Google Patents.

Groke, K., Kager, E., Bucher, C., 2005. Means for weaning people off smoking and alcohol, Google Patents.

Gruter, G. J. M., 2009. 5-(substituted methyl) 2-methylfuran, Google Patents.

Gruter, G. J. M., ve F. Dautzenberg, 2007. Method for the synthesis of 5-alkoxymethyl furfural ethers and their use, Google Patents.

Gruter, G. J. M., ve F. Dautzenberg, 2007. Method for the synthesis of organic acid esters of 5-hydroxymethylfurfural and their use, Google Patents.

Guo, Xingcui., Cao, Quan., Jiang, Yijun., Guan, Jing., Wang, Xiaoyan., Mu, Xindong, 2012. "Selective dehydration of fructose to 5-hydroxymethylfurfural catalyzed by mesoporous SBA-15-SO₃H in ionic liquid BmimCl." Carbohydrate research **351**: 35-41.

Gupta, Priya., Singh, Sanjay K., Pathak, Arunendra., Kundu, Bijoy, 2002. "Template-directed approach to solid-phase combinatorial synthesis of furan-based libraries." Tetrahedron **58**(52): 10469-10474.

Hales, R.A., Le, M.J.W., Orth, J.G.O., 1963. Preparation of hydroxymethyl furfural, Google Patents.

Harvey, A., ve D. Friend, 2004. Physical properties of water, Aqueous systems at elevated temperatures and pressure: Physical chemistry in water, steam and hydrothermal solutions, Elsevier, Amsterdam.

Hu, Suqin., Zhang, Zhaofu., Zhou, Yinxi., Song, Jinliang., Fan, Honglei., Han, Buxing, 2009. "Direct conversion of inulin to 5-hydroxymethylfurfural in biorenewable ionic liquids." Green Chemistry **11**(6): 873-877.

Kabyemela, Bernard M., Adschiri, Tadafumi., Malaluan, Roberto M., Arai, Kunio, 1999. "Glucose and fructose decomposition in subcritical and supercritical water: detailed reaction pathway, mechanisms, and kinetics." Industrial & Engineering Chemistry Research **38**(8): 2888-2895.

Kazi, Feroz Kabir., Patel, Akshay D., Serrano-Ruiz, Juan Carlos., Dumesic, James A., Anex, Robert P., 2011. "Techno-economic analysis of dimethylfuran (DMF) and hydroxymethylfurfural (HMF) production from pure fructose in catalytic processes." Chemical Engineering Journal **169**(1): 329-338.

Koç Çakır, R., 2012. Leishmania parazitlerinden lipofosfoglikan (LPG) saflaştırılması ve aşı modeli olarak LPG-Polimer konjugatının antileishmanial etkinliğinin in vitro ve in vivo incelenmesi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.

Kuster, B. F., ve H. S. van der Baan, 1977. "The influence of the initial and catalyst concentrations on the dehydration of D-fructose." Carbohydrate research **54**(2): 165-176.

Lansalot-Matras, C., ve C. Moreau, 2003. "Dehydration of fructose into 5-hydroxymethylfurfural in the presence of ionic liquids." Catalysis Communications **4**(10): 517-520.

Lewkowski, J., 2001. "Synthesis, chemistry and applications of 5-hydroxymethylfurfural and its derivatives."

Li, Changzhi., Zhang, Zehui., Zhao, Zongbao K., 2009. "Direct conversion of glucose and cellulose to 5-hydroxymethylfurfural in ionic liquid under microwave irradiation." Tetrahedron Letters **50**(38): 5403-5405.

Li, Yuan., Liu, Hui., Song, Changhua., Gu, Xiaomin., Li, Huaming., Zhu, Wenshuai., Yin, Sheng., Han, Changri, 2013. "The dehydration of fructose to 5-hydroxymethylfurfural efficiently catalyzed by acidic ion-exchange resin in ionic liquid." Bioresource technology **133**: 347-353.

Lichtenthaler, Frieder W., Brust, Andreas., Cuny, Eckehard., 2001. "Sugar-derived building blocks. Part 26. Part 25. See ref. 1. Hydrophilic pyrroles, pyridazines and diazepinones from d-fructose and isomaltulose." Green Chemistry **3**(5): 201-209.

Lima, Sergio., Neves, Patrícia., Antunes, Maria M., Pillinger, Martyn., Ignatyev, Nikolai., Valente, Anabela A, 2009. "Conversion of mono/di/polysaccharides into furan compounds using 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids." Applied Catalysis A: General **363**(1): 93-99.

Lin, An-Shen., Qian, Keduo., Usami, Yoshihide., Lin, Li., Itokawa, Hideji., Hsu, Charleson., Morris-Natschke, Susan L., Lee, Kuo-Hsiung, 2008. "5-Hydroxymethyl-2-furfural, a clinical trials agent for sickle cell anemia, and its mono/di-glucosides from classically processed steamed Rehmanniae Radix." Journal of natural medicines **62**(2): 164-167.

Liu, F., 2013. Separation and purification of valuable chemicals from simulated hydrothermal conversion product solution, University of Waterloo.

Mascal, M., ve E. B. Nikitin, 2008. "Direct, High-yield conversion of cellulose into biofuel." Angewandte Chemie **120**(41): 8042-8044.

Michail, K., Matzi, V., Maier, A., Herwig, R., Greilberger, J., Juan, H., Kunert, O., Wintersteiger, R., 2007. "Hydroxymethylfurfural: an enemy or a friendly xenobiotic? A bioanalytical approach." Analytical and bioanalytical chemistry **387**(8): 2801-2814.

Middendorp, J., 1919. "Sur l'oxymethylfurfurol." Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas **38**(1): 1-71.

Moreau, Claude., Belgacem, Mohamed Naceur., Gandini, Alessandro, 2004. "Recent catalytic advances in the chemistry of substituted furans from carbohydrates and in the ensuing polymers." Topics in Catalysis **27**(1): 11-30.

Moreau, Claude., Durand, Robert., Pourcheron, Cécile., Razigade, Sylvie, 1994. "Preparation of 5-hydroxymethylfurfural from fructose and precursors over H-form zeolites." Industrial Crops and Products **3**(1-2): 85-90.

Moreau, Claude., Durand, Robert., Razigade, Sylvie., Duhamet, Jean., Faugeras, Pierre., Rivalier, Patrick., Ros, Pierre., Avignon, Gérard, 1996. "Dehydration of fructose to 5-hydroxymethylfurfural over H-mordenites." Applied Catalysis A: General **145**(1-2): 211-224.

Moreau, Claude., Finiels, Annie., Vanoye, Laurent, 2006). "Dehydration of fructose and sucrose into 5-hydroxymethylfurfural in the presence of 1-H-3-methyl imidazolium chloride acting both as solvent and catalyst." Journal of Molecular Catalysis A: Chemical **253**(1): 165-169.

Moser, P.M., Greilberger, J., Maier, A., Juan, H., Bücherl-Harrer, C., Kager, E., 2007. Use of alpha-ketoglutaric acid and 5-hydroxy-methylfurfural for reducing oxidative stress, Google Patents.

Mosmann, T., 1983. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." Journal of immunological methods **65**(1-2): 55-63.

Musau, R. M., ve R. M. Munavu, 1990. "The conversion of 2-furaldehyde into some potentially useful bifunctional derivatives." Biomass **23**(4): 275-287.

Myers, R.H., Montgomery, D.C., ve Anderson-Cook, C.M., 2016. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments, John Wiley & Sons.

NO, CAS "Prepared for NCI by Technical Resources International, Inc under Contract No. NO1-CP-56019 (12/94)."

Ohara, Mika., Takagaki, Atsushi., Nishimura, Shun., Ebitani, Kohki, 2010. "Syntheses of 5-hydroxymethylfurfural and levoglucosan by selective dehydration of glucose using solid acid and base catalysts." Applied Catalysis A: General **383**(1): 149-155.

Okpala, Iheanyi 2006. "Investigational agents for sickle cell disease." Expert opinion on investigational drugs **15**(8): 833-842.

Pan, Yangling, 2010). Hydrothermal Conversion of Biomass to 5-HMF, University of Calgary, Department of Mechanical and Manufacturing Engoneering.

Partenheimer, W., ve V. V. Grushin, 2001. "Synthesis of 2, 5-Diformylfuran and Furan-2, 5-Dicarboxylic Acid by Catalytic Air-Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural. Unexpectedly Selective Aerobic Oxidation of Benzyl Alcohol to Benzaldehyde with Metal=Bromide Catalysts." Advanced Synthesis & Catalysis **343**(1): 102-111.

Pidko, Evgeny A., Degirmenci, Volkan., van Santen, Rutger A., Hensen, Emiel JM, 2010. "Glucose activation by transient Cr²⁺ dimers." Angewandte Chemie International Edition **49**(14): 2530-2534.

Qi, Xinhua., Watanabe, Masaru., Aida, Taku M., Smith Jr, Richard Lee., 2008. "Catalytic dehydration of fructose into 5-hydroxymethylfurfural by ion-exchange resin in mixed-aqueous system by microwave heating." Green Chemistry **10**(7): 799-805.

Qi, Xinhua., Watanabe, Masaru., Aida, Taku M., Smith, Richard L., 2008. "Catalytical conversion of fructose and glucose into 5-hydroxymethylfurfural in hot compressed water by microwave heating." Catalysis Communications **9**(13): 2244-2249.

Qi, Xinhua., Watanabe, Masaru., Aida, Taku M., Smith, Richard L., 2009. "Sulfated zirconia as a solid acid catalyst for the dehydration of fructose to 5-hydroxymethylfurfural." Catalysis Communications **10**(13): 1771-1775.

Rapp, K. M. D. D. C., 1991. Process for the preparation of 5-hydroxymethylfurfural, including a crystalline product, using exclusively water as solvent, Google Patents.

Reichstein, Tadeus., 1926. "Notiz über 5-Oxymethyl-furfurol." Helvetica Chimica Acta **9**(1): 1066-1068.

Reichstein, T., ve H. Zschokke, 1932. "Über 5-Methyl-furfuryl-chlorid." Helvetica Chimica Acta **15**(1): 249-253.

Rigal, L., ve A. Gaset, 1983. "Direct preparation of 5-hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde from polyholosides: a chemical valorisation of the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.)." Biomass **3**(2): 151-163.

Roehm, Neal W., Rodgers, George H., Hatfield, Stephen M., Glasebrook, Andrew L., 1991. "An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT." Journal of immunological methods **142**(2): 257-265.

Román-Leshkov, Yuriy., Barrett, Christopher J., Liu, Zhen Y., Dumesic, James A., 2007. "Production of dimethylfuran for liquid fuels from biomass-derived carbohydrates." Nature **447**(7147): 982.

Román-Leshkov, Yuriy., Chheda, Juben N., Dumesic, James A., 2006. "Phase modifiers promote efficient production of hydroxymethylfurfural from fructose." Science **312**(5782): 1933-1937.

Rosatella, Andreia A., Simeonov, Svilen P., Frade, Raquel FM., Afonso, Carlos AM., 2011. "5-Hydroxymethylfurfural (HMF) as a building block platform: Biological properties, synthesis and synthetic applications." Green Chemistry **13**(4): 754-793.

Safo, Martin K., Abdulmalik, Osheiza., Danso-Danquah, Richmond., Burnett, James C., Nokuri, Samuel., Joshi, Gajanan S., Musayev, Faik N., Asakura, Toshio., Abraham, Donald J., 2004. "Structural basis for the potent antisickling effect of a novel class of five-membered heterocyclic aldehydic compounds." Journal of medicinal chemistry **47**(19): 4665-4676.

Salak Asghari, F., ve H. Yoshida, 2006. "Acid-catalyzed production of 5-hydroxymethyl furfural from D-fructose in subcritical water." Industrial & Engineering Chemistry Research **45**(7): 2163-2173.

Scudiero, Dominic A., Shoemaker, Robert H., Paull, Kenneth D., Monks, Anne., Tierney, Siobhan., Nofziger, Thomas H., Currens, Michael J., Seniff, Donna., Boyd, Michael R., 1988. "Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines." Cancer research **48**(17): 4827-4833.

Sheibley, Dean W., Manzo, Michelle A., Gonzalez-Sanabria, Olga D., 1983. "Cross-Linked Polyvinyl Alcohol Films as Alkaline Battery Separators." Journal of The Electrochemical Society **130**(2): 255-259.

Shimizu, Ken-ichi., Uozumi, Rie., Satsuma, Atsushi, 2009. "Enhanced production of hydroxymethylfurfural from fructose with solid acid catalysts by simple water removal methods." Catalysis Communications **10**(14): 1849-1853.

Sidhpuria, Kalpesh B., Daniel-da-Silva, Ana L., Trindade, Tito., Coutinho, Joao AP., 2011. "Supported ionic liquid silica nanoparticles (SILnPs) as an efficient and recyclable heterogeneous catalyst for the dehydration of fructose to 5-hydroxymethylfurfural." Green Chemistry **13**(2): 340-349.

Skowronski, Romuald., Grabowski, Grzegorz., Lewkowski, Jaroslaw., Descotes, Géard., Cottier, Louis., Neyret, Claire, 1993. "New chemical conversions of 5-Hydroxymethylfurfural and the electrochemical oxidation of its derivatives." Organic preparations and procedures international **25**(3): 353-355.

Soldo, Tomislav., Blank, Imre., Hofmann, Thomas, 2003. "(+)-(S)-Alapyridaine—A general taste enhancer?" Chemical Senses **28**(5): 371-379.

Stark, Annegret., Anastas, Paul T., Wasserscheid, Peter, 2013. Handbook of Green Chemistry; Volume 6: Green Solvents, Ionic Liquids, Wiley-VCH.

Takeuchi, Yusuke., Jin, Fangming., Tohji, Kazuyuki., Enomoto, Heiji, 2008. "Acid catalytic hydrothermal conversion of carbohydrate biomass into useful substances." Journal of Materials Science **43**(7): 2472-2475.

Tuercke, Tobias., Panic, Slobodan., Loebbecke, Stefan, 2009. "Microreactor Process for the Optimized Synthesis of 5-Hydroxymethylfurfural: A Promising Building Block Obtained by Catalytic Dehydration of Fructose." Chemical engineering & technology **32**(11): 1815-1822.

Twidell, J., ve T. Weir, 2015. Renewable energy resources, Routledge.

van Meerloo, J., Kaspers, G.J., ve Cloos, J., 2011. "Cell sensitivity assays: the MTT assay." Cancer cell culture: methods and protocols: 237-245.

van Putten., Robert-Jan, 2015. Experimental and modelling studies on the synthesis of 5-hydroxymethylfurfural from sugars, University of Groningen.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., ve Holt, R.A., 2001. "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-1351.

Wang, Jianjian., Xu, Wenjie., Ren, Jiawen., Liu, Xiaohui., Lu, Guanzhong., Wang, Yanqin, 2011. "Efficient catalytic conversion of fructose into

hydroxymethylfurfural by a novel carbon-based solid acid." Green Chemistry **13**(10): 2678-2681.

Werpy, Todd., Petersen, Gene., Aden, A., Bozell, J., Holladay, J., White, J., Manheim, Amy., Eliot, D., Lasure, L., Jones, S, 2004. Top value added chemicals from biomass. Volume 1-Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas, Department of Energy Washington DC.

Yin, Sudong., Pan, Yanglin., Tan, Zhongchao, 2011. "Hydrothermal conversion of cellulose to 5-hydroxymethyl furfural." International journal of green energy **8**(2): 234-247.

Yong, Gen., Zhang, Yugen., Ying, Jackie Y., 2008. "Efficient Catalytic System for the Selective Production of 5-Hydroxymethylfurfural from Glucose and Fructose." Angewandte Chemie **120**(48): 9485-9488.

Yuan, Zhongshun., Xu, Chunbao Charles., Cheng, Shuna., Leitch, Mathew, 2011. "Catalytic conversion of glucose to 5-hydroxymethyl furfural using inexpensive co-catalysts and solvents." Carbohydrate research **346**(13): 2019-2023.

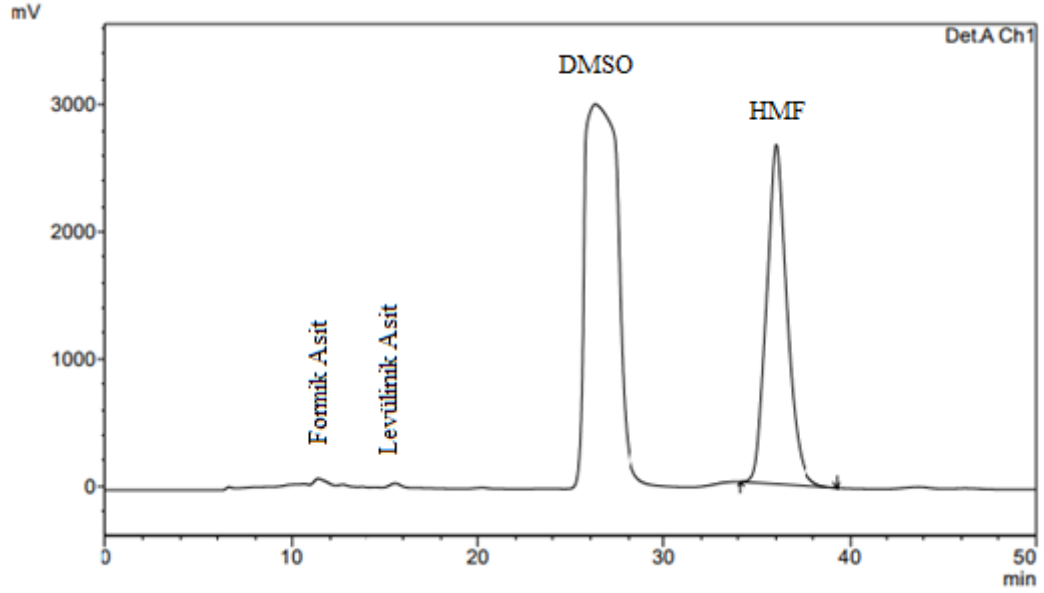
Zhang, J., ve E. Weitz, 2012. "An in situ NMR study of the mechanism for the catalytic conversion of fructose to 5-hydroxymethylfurfural and then to levulinic acid using ¹³C labeled D-fructose." ACS Catalysis **2**(6): 1211-1218.

Zhang, Z., ve Z. K. Zhao, 2010. "Microwave-assisted conversion of lignocellulosic biomass into furans in ionic liquid." Bioresource technology **101**(3): 1111-1114.

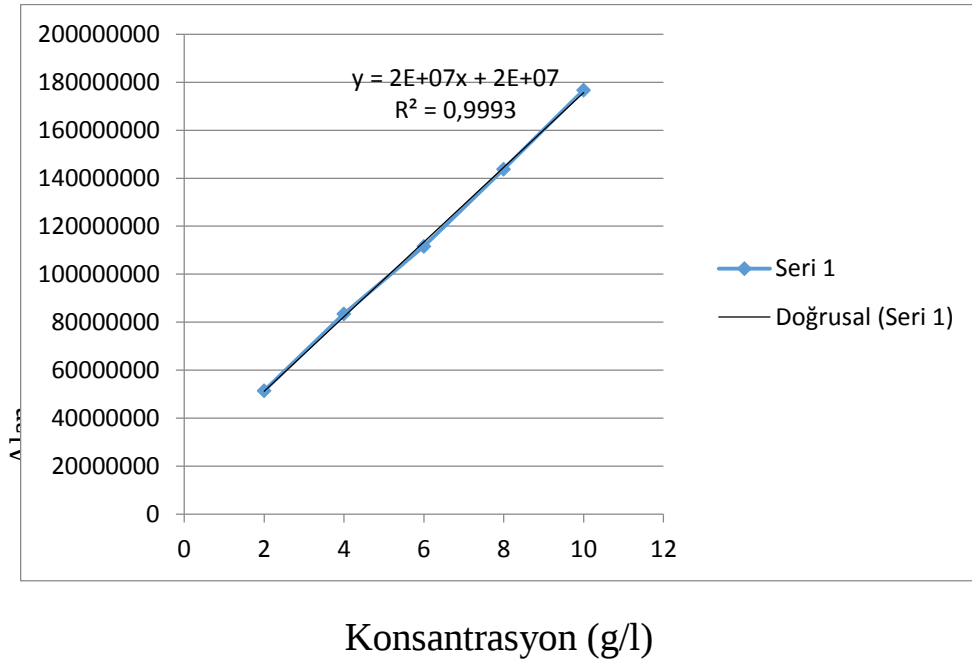
Zhao, Haibo., Holladay, Johnathan E., Brown, Heather., Zhang, Z Conrad, 2007. "Metal chlorides in ionic liquid solvents convert sugars to 5-hydroxymethylfurfural." Science **316**(5831): 1597-1600.

EKLER

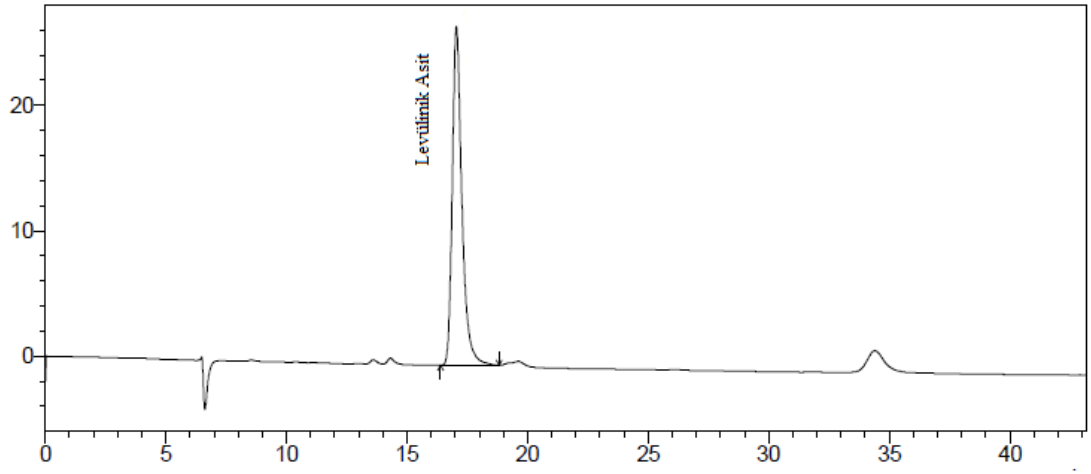
Ek 1. HPLC Analizleri İçin Kromatogram Görüntüsü



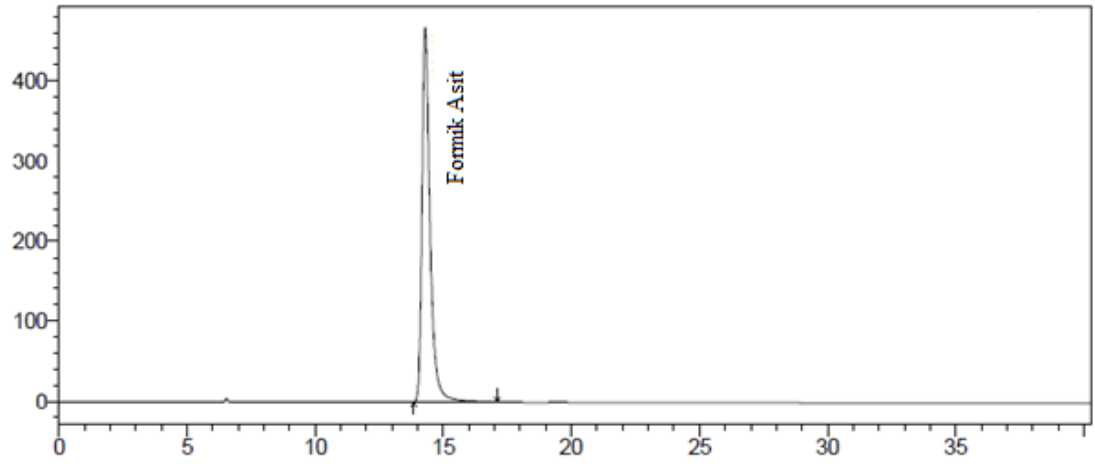
Ek 2. HMF Kalibrasyon Grafiği



Ek 3. Levülinik asit kromatogram görüntüsü.



Ek 4. Formik asit kromatogram.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sadiye Kübra BAŞKAYA

Doğum Yeri : MALATYA/Arapgir

Doğum Tarihi : 08.06.1991

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Arapgir Çok Programlı Lisesi (2005-2009)

Lisans : Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü (2010-2014).

Yüksek Lisans : Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik Anabilim Dalı (2014-2017).