

C VİTAMİNİNİN 2-KETO-L-GULONİK ASİT MOLEKÜLÜNDEN ÜRETİMİ İÇİN FARKLI METOTLARIN ARAŞTIRILMASI

Ceren MUTLU^{1*}, Cihadiye CANDAL USLU², Mustafa ERBAŞ³

¹Balikesir Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Balıkesir, Türkiye

²Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Kütahya, Türkiye

³Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya, Türkiye

Geliş/ Received 09.12.2022; Kabul/ Accepted : 27.02.2023; /Online baskı: Published online 08.03.2023

Mutlu, C., Candal Uslu, C., Erbaş, M. (2023). C vitamininin 2-keto-L-gulonik asit molekülünden üretimi için farklı metotların araştırılması. GIDA (2023) 48 (2) 394-404 doi: 10.15237/ gida.GD22126

Mutlu, C., Candal Uslu, C., Erbaş, M. (2023). Investigation of different methods for production of vitamin C from 2-keto-L-gulonic acid molecule. GIDA (2023) 48 (2) 394-404 doi: 10.15237/ gida.GD22126

ÖZ

Araştırmada farklı metotlar kullanılarak 2-keto-L-gulonik asit molekülünün esterifikasyonu ve laktonizasyonu ile ülkemizde ilk defa C vitamini üretiminin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda C vitamininin üretimi için dört metot, C vitamininin sodyum tuzunun üretimi için dört metot ve C vitamininin potasyum tuzunun üretimi için ise bir metot olmak üzere toplamda dokuz farklı metot kullanılarak denemeler yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre; doğrudan C vitamini üretimi için %36.07 verim ile Metot-I'in, C vitamininin sodyum tuzu üretimi için %58.56 verim ile Metot-VIII'in ve C vitamininin potasyum tuzu üretimi için ise %28.22 verim ile Metot-IX'un kullanılabilmesi değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: 2-keto-L-gulonik asit, C vitamini, esterifikasyon, laktonizasyon

INVESTIGATION OF DIFFERENT METHODS FOR PRODUCTION OF VITAMIN C FROM 2-KETO-L-GULONIC ACID MOLECULE

ABSTRACT

In the study, it was aimed to produce vitamin C for the first time in our country by esterification and lactonization of 2-keto-L-gulonic acid molecule using different methods. For this purpose, experiments were carried out using a total of nine different methods as four methods to produce vitamin C, four methods to produce the sodium salt of vitamin C, and one method to produce the potassium salt of vitamin C. According to the obtained results, it was evaluated that Method-I with a yield of 36.07% for the direct production of vitamin C, Method-VIII with a yield of 58.56% for the production of vitamin C sodium salt, and Method-IX with a yield of 28.22% for the production of vitamin C potassium salt could be used.

Keywords: 2-keto-L-gulonic acid, vitamin C, esterification, lactonization

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: ceren.mutlu@balikesir.edu.tr

☎: (+90) 266 612 6319

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

Cihadiye Candal Uslu; ORCID no: 0000-0002-5945-6649

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

GİRİŞ

C vitamini (L-askorbik asit) insanlar, primatlar ve diğer bazı hayvanlar için metabolik açıdan oldukça önemli olup, küresel pazarda en büyük paya sahip vitamin olarak bilinmektedir. Keşfedildiği 1912 yılının ardından bitkilerden izole edilmesi ve biyokimyasal olarak sentezlenmesi ile ilaç, gıda, içecek, kozmetik ve yem endüstrilerinde sıklıkla kullanılan bir madde haline gelmiştir (Wang vd., 2018).

C vitamini vücutta redoks reaksiyonlarına katılması, toksik serbest radikaller için indirgeyici olması, metaller ve proteinlerle kompleksler oluşturması, bağ dokusu kolajenindeki prolin kalıntılarının 4-hidroksiprolin kalıntısına dönüştürüldüğü enzimatik hidrosilasyon reaksiyonunun kofaktörü olması, fenilalanin ve tirozin metabolizmalarına katılması gibi farklı fonksiyonlara sahip olup, insanlar tarafından sentezlenemediği için günlük olarak dışarıdan alınması zorunlu olan bir vitamindir (Lavrenov ve Preobrazhenskaya, 2005). Günlük C vitamini ihtiyacı vücut ağırlığına, sigara kullanımına, yaşam tarzına, fiziksel aktiviteye, sağlık durumuna ve genetik faktörlere bağlı olarak farklılık göstermekte olup (Nowak, 2021), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) yetişkinler için 45 mg/gün C vitamini alımını tavsiye ederken, Gıda ve Beslenme Kurulu ve Tıp Enstitüsü C vitamini tüketimini sağlıklı yetişkin erkek ve kadınlar için sırasıyla 90 ve 75 mg/gün olarak önermektedir (Abbas vd., 2012).

İnsan sağlığı açısından birçok faydası bulunan C vitamini gıda sektöründe de antioksidan olması ve dengeleyici özellikleri nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. Üretilen C vitamininin %25 kadarı gıda ve %15 kadarı ise içecek endüstrisi tarafından değerlendirilmektedir (Bremus vd., 2006). Günümüzde C vitamininden türetilen sodyum askorbat, kalsiyum askorbat, potasyum askorbat ve askorbik asidin yağ asidi esterleri (askorbil palmitat ve askorbil stearat) gibi katkı maddeleri veya doğrudan C vitamininin kendisi farklı birçok ticari üründe bulunmaktadır (Varvara vd., 2016). C vitamini temel olarak protein içeriği ve kalitesi zayıf unlardan üretilen ekmeklerin kalitesini artırmak (Dinani vd., 2023) ve lipit

içeriği yüksek olan gıdalarda oksidasyonu engellemek (Uluata vd., 2015) gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Ayrıca *o*-kinonları koyu renk oluşturmadan önce fenolik bileşiklere indirgeme kabiliyeti nedeniyle esmerleşme önleyici ajan olarak da gıda endüstrisinde kullanılan önemli bir katkı maddesidir (Xu vd., 2020).

Birçok alanda kullanım ihtiyacı bulunan C vitamininin endüstriyel üretimi ilk kez D-glikozu C vitaminine dönüştüren ve kimyasal ve biyokimyasal süreçleri içeren Reichstein sentezi ile gerçekleştirilmiştir. Bu süreçlerin ilk aşamasında D-glikoz indirgenerek D-sorbitole dönüştürülür. D-sorbitol bakteriyel fermantasyon ile gerçekleştirilen oksidasyon sonucunda L-sorboza ve L-sorboz ise daha sonra kimyasal olarak 2-keto-L-gulonata oksitlenir. Son aşamada ise 2-keto-L-gulonat bileşiği C vitaminine laktonize edilir. Günümüzde ise C vitamini üretimi için baskın endüstriyel süreç iki aşamalı fermantasyon yöntemidir. Bu yöntemin ilk adımında D-sorbitol, *Gluconobacter oxydans* mikroorganizması kullanılarak L-sorboz bileşiğine oksitlenir. İkinci adımda ise *Ketogulonigenium vulgare* ve *Bacillus megaterium* mikroorganizmalarının kombinasyonu ile gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda L-sorboz, 2-keto-L-gulonik aside (2-KLG) dönüştürüldükten sonra laktonizasyon ile C vitamini elde edilir (Kuivanen vd., 2015). C vitamininin öncü maddesi olan 2-KLG, esterleştirme ve laktonizasyon adımları kullanılarak C vitaminine dönüştürülür (Kaswurm vd., 2013).

C vitamininin dünyada yıllık üretim miktarı yaklaşık olarak 110.000 ton ve toplam ekonomik büyüklüğü ise 500-650 milyon \$ kadardır (Bhand ve Patwardhan, 2015). Dış ticaret verilerine ait raporlarda ülkemizin; 2016 yılı itibari ile kullandığı tüm C vitaminini ithal ettiği, bunun için yaklaşık 8.50 milyon \$ döviz ödemesi yaptığı (Anonim, 2016) ve bu ürünün dış satım potansiyeli de dikkate alındığında 30 milyon \$ kadar bir toplam ticari kapasiteye sahip olduğu değerlendirilmiştir. 2019 yılı verilerine göre ise ülkemizin 12.50 milyon \$ değerinde C vitamini ithal ettiği ve bu nedenle ülkemizdeki toplam C vitamini pazarının 30 milyon \$ hacmini de geçtiği düşünülmektedir

(Anonim, 2021). D-sorbitol ve C vitamini gıda, kimya, ilaç ve kozmetik sektörlerinde geniş kullanım alanları bulunan ve katma değeri yüksek iki ticari üründür. Bu ticari ürünler D-glikoz kullanılarak bir seri kimyasal ve biyokimyasal dönüşüm reaksiyonları dizisi ile bazı yabancı ülkelerde üretilmekte ve pazarlanmaktadır.

Ülkemiz kendi kaynaklarını kullanarak yıllardır D-glikoz üretebilirken, D-glikozun hidrojenizasyonu ile elde edilen D-sorbitolün üretimi ülkemizde ancak birkaç yıl önce başlamış olup, D-sorbitolden C vitamini üretimi ile ilgili ise herhangi bir ticari girişime ve bilimsel çalışmaya rastlanılmamıştır. Belirtilen nedenle ülkemizde C vitamini üretimini ilk kez konu alan bu araştırma ile; birçok alanda kullanım imkânı bulunan ve

değerli bir ticari ürün olan C vitamininin üretim yöntemlerinin araştırılmasının hem daha sonraki bilimsel çalışmalara hem de bu alanda faaliyet göstermek isteyen sanayi kuruluşlarına katkıda bulunacağı ve bu faaliyetlerin bir sonucu olarak da C vitamini açısından dışa bağımlılığın azaltılabileceği değerlendirilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Farklı metotlar için kullanılan materyaller Çizelge 1'de verilmiştir. Kimyasallar işlemin niteliğine uygun olarak analitik saflıkta Merck (Almanya), Isolab Laborgeräte GmbH (Almanya), Sigma-Aldrich (Almanya) ve Haihang Industry (Çin) firmalarından temin edilerek kullanılmıştır.

Çizelge 1. 2-KLG molekülünden C vitamini üretimi için kullanılan kimyasallar

Table 1. Chemicals used for the production of vitamin C from 2-KLG molecule

| Metotlar/Methods | Kullanılan Kimyasallar/Used Chemicals |
|---|--|
| Metot-I/Method-I | 2-KLG, Toluen ve HCl |
| Metot-II/Method-II | 2-KLG, Toluen, n-bütanol, HCl |
| Metot-III/Method-III | 2-KLG ve HCl |
| Metot-IV/Method-IV | 2-KLG ve H ₂ SO ₄ |
| Metot-V ve Metot-VI/Method-V and /Method-VI | 2-KLG, Metanol, H ₂ SO ₄ , NaHCO ₃ |
| Metot-VII//Method-VII | 2-KLG, Metanol, H ₂ SO ₄ , Na ₂ CO ₃ |
| Metot-VIII/Method-VIII | 2-KLG, Metanol, H ₂ SO ₄ ve NaOH |
| Metot-IX/Method-IX | 2-KLG, Metanol, H ₂ SO ₄ ve KOH |

Metotlar

Araştırmada; 2-KLG bileşiğinin metil alkol ile esterifikasyonu ve laktonizasyonu ile C vitamini üretilmesi çalışmaları yapılmış ve bu amaçla aşağıda belirtilen 9 farklı metot uygulanmıştır. Uygulanan metotlarla C vitamini ve C vitamininin sodyum ve potasyum tuzlarının üretimleri gerçekleştirilmiştir.

C vitamini üretim metotları

Metot-I

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-I için; 250 mL hacmindeki amber bir cam şişe içerisinde bulunan 20 g 2-KLG bileşiği üzerine sırasıyla 20 mL toluen ve 1008 µL HCl eklenmiştir. Ortamda bulunan oksijenin uzaklaştırılması amacıyla şişe içerisine 30 saniye süresince azot gazı verilmiş ve şişe sızdırmaz bir şekilde kapatılmıştır. Bu karışım, karışımın

sıcaklığı 70°C olacak şekilde 300 dakika süresince 500 rpm hızla karanlık bir ortamda manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Süre sonunda elde edilen heterojen karışım oda sıcaklığına soğutulmuştur. Elde edilen katı kısım ayrılarak 40°C sıcaklıkta ve 25 mbar vakum basıncında 48 saat süresince kurutulmuş ve analiz edilmiştir (Nadtochi ve Melent'eva, 2001).

Metot-II

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-II'de, Metot-I'e modifikasyon yapılmıştır. Bu amaçla; 250 mL hacmindeki amber bir cam şişe içerisindeki 20 g 2-KLG bileşiği üzerine sırasıyla 20 mL n-bütanol:toluen (%37.5:62.5) ve 1008 µL HCl eklenmiştir. Diğer aşamalar ise Metot-I'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir (Nadtochi ve Melent'eva, 2001; Gholap vd., 2017).

Metot-III

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-III için; 3 M HCl kullanılarak %10 konsantrasyonunda 2-KLG içeren çözelti amber bir cam şişe içerisinde hazırlanmıştır. Ortamda bulunan oksijenin uzaklaştırılması amacıyla şişe içerisine 30 saniye süresince azot gazı verilmiş ve şişe sızdırmaz bir şekilde kapatılmıştır. Bu karışım 90°C sıcaklıkta 70 dakika süresince 500 rpm hızla karıştırılmıştır. Süre sonunda karışım oda sıcaklığına soğutulmuştur. Elde edilen katı kısım 40°C sıcaklıkta ve 25 mbar vakum basıncında 48 saat süresince kurutulmuş ve analiz edilmiştir (Anonim, 2002).

Metot-IV

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-IV için; 2 M H₂SO₄ kullanılarak %10 konsantrasyonunda 2-KLG içeren çözelti amber bir cam şişe içerisinde hazırlanmıştır. Ortamda bulunan oksijenin uzaklaştırılması amacıyla şişe içerisine 30 saniye süresince azot gazı verilmiş ve şişe sızdırmaz bir şekilde kapatılmıştır. Bu karışım 80°C sıcaklıkta 240 dakika süresince 500 rpm hızla karıştırılmıştır. Süre sonunda karışım oda sıcaklığına soğutulmuştur. Elde edilen katı kısım 40°C sıcaklıkta ve 25 mbar vakum basıncında 48 saat süresince kurutulmuş ve analiz edilmiştir (Anonim, 2002).

C vitamini sodyum tuzu üretim metotları

Metot-V

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-V için; 20 g 2-KLG bileşiği üzerine sırasıyla 60 mL metanol ve 900 µL H₂SO₄ eklenmiştir. Bu karışım reaktörün teflon kabı içerisine alınmış ve sistem kapatılarak ortamda bulunan oksijenin uzaklaştırılması amacıyla sistem içerisine 30 saniye süresince karbondioksit gazı verilmiştir. Bu karışım, karışımın sıcaklığı 67-68°C olacak şekilde 30 dakika süresince 250 rpm hızla karıştırılarak 2-KLG bileşiğinin metil esterini oluşturmak amacıyla esterifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Süre sonunda sistem açılarak karışım içerisine 2.5 g sodyum bikarbonat eklenmiş ve sistem yeniden kapatılarak içerisine 30 saniye süresince karbondioksit gazı verilmiştir. Karışım 60°C sıcaklıkta 120 dakika süresince 250 rpm hızla

karıştırılmıştır. Süre sonunda sistem yeniden açılmış ve elde edilen karışım oda sıcaklığına soğutulduktan sonra filtre edilmiştir. Elde edilen birinci katı kısım ayrılmış ve süzöntü ise bir sonraki aşama için üzerine 2.5 g sodyum bikarbonat eklenerek yeniden reaktöre konulmuştur. Sistem kapatılarak içerisine 30 saniye süresince karbondioksit gazı verilmiştir. Karışım 60°C sıcaklıkta 120 dakika süresince 250 rpm hızla karıştırılmış ve böylece 2-KLG-metil esterinin laktonlaşarak ve sodyum ile bağlanarak C vitamininin sodyum tuzuna dönüşmesi sağlanmıştır. Süre sonunda sistem tekrar açılmış ve karışım oda sıcaklığına soğutulmuştur. Soğutulan karışım filtre kağıdından geçirilmiş ve filtre üstü materyal ayrılarak 40°C sıcaklıkta ve 25 mbar vakum basıncında 48 saat süresince kurutulmuş ve analiz edilmiştir (Anonim, 1992).

Metot-VI

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-VI'da, Metot-V'e modifikasyon yapılmıştır. Bu amaçla; 20 g 2-KLG bileşiği üzerine sırasıyla 60 mL metanol ve 900 µL H₂SO₄ eklenmiştir. Bu karışım reaktörün teflon kabı içerisine alınmış ve sistem kapatılarak ortamda bulunan oksijenin uzaklaştırılması amacıyla sistem içerisine 30 saniye süresince karbondioksit gazı verilmiştir. Bu karışım, karışımın sıcaklığı 67-68°C olacak şekilde 180 dakika süresince 250 rpm hızla karıştırılarak 2-KLG bileşiğinin metil esterini oluşturmak amacıyla esterifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Diğer aşamalar ise Metot-V'te belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir (Anonim, 1992).

Metot-VII

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-VII için; 26 g 2-KLG bileşiği üzerine sırasıyla 200 mL metanol ve 546 µL H₂SO₄ eklenmiştir. Bu karışım reaktörün teflon kabı içerisine alınmış ve sistem kapatılarak ortamda bulunan oksijenin uzaklaştırılması amacıyla sistem içerisine 30 saniye süresince karbondioksit gazı verilmiştir. Bu karışım, karışımın sıcaklığı 65°C olacak şekilde 180 dakika süresince 250 rpm hızla karıştırılarak 2-KLG bileşiğinin metil esterini oluşturmak amacıyla esterifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Süre sonunda sistem açılarak karışım içerisine 7.4 g

sodyum karbonat eklenmiş ve sistem yeniden kapatılarak içerisine 30 saniye süresince karbondioksit gazı verilmiştir. Karışım 65°C sıcaklıkta 150 dakika süresince 250 rpm hızla karıştırılmış ve böylece 2-KLG-metil esterinin laktonlaşarak ve sodyum ile bağlanarak C vitamininin sodyum tuzuna dönüşmesi sağlanmıştır. Süre sonunda sistem yeniden açılmış ve karışım oda sıcaklığına soğutularak filtre edilmiştir. Elde edilen katı kısım 40°C sıcaklıkta ve 25 mbar vakum basıncında 48 saat süresince kurutulmuş ve analiz edilmiştir (Wang vd., 2012).

Metot-VIII

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-VIII için; 15 g 2-KLG bileşiği üzerine 81.2 mL metanol eklenmiş ve karışım amber bir cam şişe içerisinde tamamen çözününceye kadar 500 rpm hızla manyetik karıştırıcı üzerinde 65°C sıcaklıkta karıştırılmıştır. Çözünme tamamlandıktan sonra karışım üzerine 80 µL H₂SO₄ eklenmiştir. Ortamda bulunan oksijenin uzaklaştırılması amacıyla şişe içerisine 30 saniye süresince azot gazı verilmiş ve şişe sızdırmaz bir şekilde kapatılmıştır. Bu karışım, karışımın sıcaklığı 65°C olacak şekilde 270 dakika süresince 500 rpm hızla karıştırılarak 2-KLG bileşiğinin metil esterini oluşturmak amacıyla esterifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Süre sonunda şişe kapağı üzerinde oluşturulan sistem yardımıyla şişe içerisine metanol ile hazırlanmış 3.7 N NaOH çözeltisi ilave edilmiştir. NaOH çözeltisinin sisteme ilave edilmesi işlemi; 148 dakika süresince 5 dakikada bir 655 µL ve 18 dakika süresince ise 5 dakikada bir 445 µL NaOH ekleme şeklinde gerçekleştirilmiş ve böylece 2-KLG-metil esterinin laktonlaşması ve sodyum ile bağlanarak C vitamininin sodyum tuzuna dönüşmesi sağlanmıştır. Süre sonunda elde edilen heterojen karışım oda sıcaklığına soğutularak süzülmüştür. Elde edilen katı kısım üç kez 7.5 mL metanol ile yıkanmış ve 40°C sıcaklıkta ve 25 mbar vakum basıncında 48 saat süresince kurutularak analiz edilmiştir (Anonim, 1995).

C vitamini potasyum tuzu üretim metodu

Metot-IX

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-IX için Metot-VIII'de kullanılan

3.7 N NaOH çözeltisi yerine aynı konsantrasyondaki KOH çözeltisi kullanılmış ve böylece C vitamininin potasyum tuzunun üretilmesi sağlanmıştır. Diğer işlemler ise Metot-VIII'e benzer şekilde uygulanmıştır (Anonim, 1995).

D-glikozdan C vitamini üretimi

Ayrıca araştırmada D-glikozdan C vitamini üretimi için; D-glikozdan D-sorbitol rutenyum katalizörü varlığında 153°C sıcaklık, 60 bar H₂ gazı basıncı ve 1 saat reaksiyon süresince %93.30 verim ile üretilmiştir. Üretilen D-sorbitolden biyoreaktörde L-sorboz; 127.58 g/L D-sorbitol konsantrasyonu, 5.0 başlangıç pH değeri, 35°C sıcaklık, 700 rpm karıştırma hızı ve 1.5 vvm hava akım hızı şartlarında %99.21 verim ile elde edilmiştir. L-sorbozdan oksidasyon ile 2-KLG üretimi; 41.30°C sıcaklık, 8.23 pH değeri ve 195 dakika reaksiyon süresince ortalama %43.70 verim ile gerçekleştirilmiştir. Son olarak ise 2-KLG bileşiğinin belirtilen metotlar ile C vitamini ve sodyum ve potasyum askorbata dönüşümü sağlanmıştır.

Analiz metotları

HPLC-RID sistemi ile 2-KLG ve C vitamini analizi

2-KLG ve C vitamininin sodyum ve potasyum tuzlarının analizinde, yukarıdaki metotlar kullanılarak elde edilen katılar uygun oranda ultra saf su ile seyreltilmiş ve HPLC-RID (1260 Infinity II Agilent, ABD) sistemine enjekte edilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz 75°C kolon ve 30°C dedektör sıcaklıklarında, Hi-Plex-Ca (Agilent, ABD) kolon kullanılarak ve akış hızı 0.6 mL/dk olan ultra saf su mobil fazı varlığında 10 µL örneğin enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir (Zhu vd., 2012).

LC-MS sistemi ile 2-KLG ve C vitamini analizi

2-KLG, C vitamini ve C vitamininin sodyum ve potasyum tuzlarının analizinde, yukarıdaki metotlar kullanılarak elde edilen katılar uygun oranda ultra saf su ile seyreltilmiş, LC-MS (UltiMate 3000 UHPLC ve TSQ Fortis Triple Quadrupole MS dedektör, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) sistemine enjekte edilmiş ve Thermo Hypersil Gold C₁₈ kolon (50 mm x 2.1 mm x 1.9 µm) kullanılarak analiz

gerçekleştirilmiştir. Mobil faz A olarak su:metanol (%95:5), %0.1 formik asit ve 4 mM amonyum asetat karışımı ve mobil faz B olarak ise su:metanol (%5:95), %0.1 formik asit ve 4 mM amonyum asetat karışımı kullanılmıştır. Mobil fazların gradiyent akış programı Çizelge 2'de verilmiştir. Enjeksiyon hacmi 10 µL, kolon sıcaklığı 40°C, akış hızı 0.25 mL/dk ve toplam

analiz süresi ise 4 dakika olarak ayarlanmıştır. Ayrıca kapiller sıcaklığı 280°C, MS dedektör sıcaklığı 230°C ve sprey voltaj ±3500 V olarak uygulanmıştır (Doğan vd., 2019). Örneklerdeki 2-KLG ve C vitamini miktarları ise farklı konsantrasyonlardaki (0.01-1.00 g/kg) standart maddelerle hazırlanan kurveler yardımıyla belirlenmiştir.

Çizelge 2. Mobil fazların gradiyent akış programı
Table 2. Gradient flow program of mobile phases

| Zaman (dk) | Mobil faz akış hızı (mL/dk) | Mobil faz A (%) | Mobil faz B (%) |
|------------|---------------------------------|--------------------|--------------------|
| Time (min) | Mobile phase flow rate (mL/min) | Mobile phase A (%) | Mobile phase B (%) |
| 0 | 0.25 | 100 | 0 |
| 0.4 | 0.25 | 100 | 0 |
| 1.2 | 0.25 | 50 | 50 |
| 2.0 | 0.25 | 0 | 100 |
| 3.0 | 0.25 | 0 | 100 |
| 3.5 | 0.25 | 100 | 0 |
| 4.0 | 0.25 | 100 | 0 |

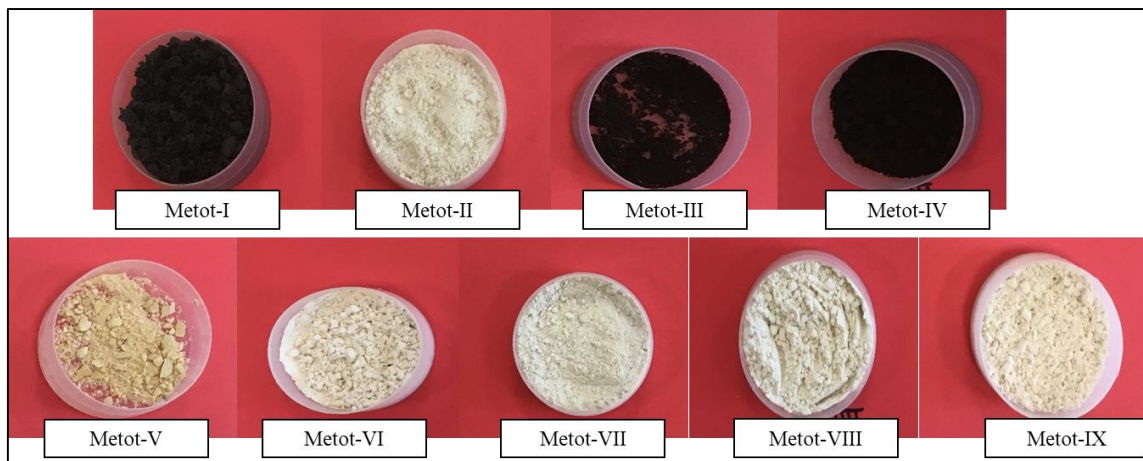
Belirlenen 2-KLG ve C vitamini miktarları kullanılarak aşağıda verilen eşitlik ile üretim verimleri hesaplanmıştır.

$$\text{Üretim verimi (\%)} = \frac{C \text{ vitamini miktarı}}{2\text{-KLG miktarı}} \times 100$$

Eşitlik 1

BULGULAR VE TARTIŞMA

Farklı metotlar ile gerçekleştirilen 2-KLG bileşiğinden C vitamini üretimlerinden elde edilen örnekler için bazı görseller Şekil 1'de ve örneklerde tespit edilen 2-KLG ve C vitamini LC-MS miktar analiz sonuçları ise Çizelge 3'te verilmiştir.



Şekil 1. C vitamini (Metot I-II-III ve IV) ve C vitamini sodyum (Metot V-VI-VII ve VIII) ve potasyum (Metot IX) tuzlarının üretimlerinden elde edilen örnekler için bazı görseller

Figure 1. Some images of the samples obtained from the production of vitamin C (Method I-II-III and IV) and sodium (Method V-VI-VII and VIII) and potassium (Method IX) salts of vitamin C

C vitamini olarak üretilen ve Metot-II ile elde edilen örnek haricindeki örneklerin renkleri siyah olurken, C vitamininin sodyum ve potasyum tuzları olarak üretilen örneklerin renklerinin ise beyazımsı sarı renkte oldukları gözlemlenmiştir. Konsantre asit çözeltisinin 70-75°C sıcaklıkta kullanımının ortamdaki bileşenlerin yanmasına neden olabileceği rapor edilmiştir (Gholap vd., 2017). Buna bağlı olarak Metot I'de konsantre HCl kullanımının ve 300 dakika olan uzun uygulama süresinin, Metot III ve IV'te 80-90°C gibi yüksek sıcaklıklar ile Metot IV'te asidik ortamda 240 dakikalık uzun bir uygulama

süresinin neticesinde ortamdaki karbohidrat türevi bileşiklerin yanması ile siyah renkte bir kalıntı elde edildiği değerlendirilmiştir. Metot II'de ise Metot I'e benzer sıcaklık ve sürelerde üretim yapılmasına rağmen ortama eklenen bütanolün rengi koruyucu bir etki göstermiş olabileceği düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada konsantre HCl uygulamasından sonra koyu renkli viskoz bir sıvının oluştuğu ve bu sıvıdan ayrılan çökeltinin n-bütanol:toluen (%37.5:62.5) karışımı ile yıkanması sonucunda açık gri ham ürün elde edildiği bildirilmiştir (Gholap vd., 2017).

Çizelge 3. 2-KLG molekülünden C vitamini üretimlerine ait LC-MS analiz sonuçları

Table 3. LC-MS analysis results of vitamin C production from 2-KLG molecule

| Metotlar/Methods | 2-KLG (g/kg) | C vitamini/Vitamin C (g/kg) | Verim/Yield (%) |
|------------------------|-----------------|--------------------------------|--------------------|
| Metot-I/Method-I | 536.55 | 360.74 | 36.07 |
| Metot-II/Method-II | 383.16 | 22.81 | 2.28 |
| Metot-III/Method-III | 0.28 | 1.54 | 0.14 |
| Metot-IV/Method-IV | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Metot-V/Method-V | 26.36 | 46.66 | 4.20 |
| Metot-VI/Method-VI | 31.46 | 272.24 | 24.50 |
| Metot-VII/Method-VII | 20.04 | 365.50 | 32.90 |
| Metot-VIII/Method-VIII | 113.29 | 650.69 | 58.56 |
| Metot-IX/Method-IX | 24.26 | 313.60 | 28.22 |

Elde edilen sonuçlara göre doğrudan C vitamini üretim denemelerinden olan Metot I-II-III ve IV karşılaştırıldığında en yüksek üretim miktarı ve veriminin sırasıyla 360.74 g/kg ve %36.07 değerleri olarak Metot-I ile elde edildiği, diğer denemelerde ise üretim verimlerinin çok düşük olduğu ve bu yöntemlerin C vitamini üretimi için uygun olmadığı belirlenmiştir. Metotlar incelendiğinde doğrudan C vitamini üretiminde yalnızca toluen kullanımının; toluen:bütanol çözeltisi, HCl ve H₂SO₄ çözeltileri kullanımından çok daha iyi sonuçlar verdiği değerlendirilmiştir. Metot-I'de belirtilen koşullar ile C vitamini üretiminin yapıldığı bir çalışmada diasetonketogulonik asidin %49.70 verim ile C vitaminine dönüştürülebildiği ve C vitamini üretim veriminin kullanılan HCl konsantrasyonuna ve reaksiyon sıcaklığı ve süresine bağlı olarak değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Nadtochi ve Melent'eva, 2001). Metot-III ve IV, C vitamini üretiminin

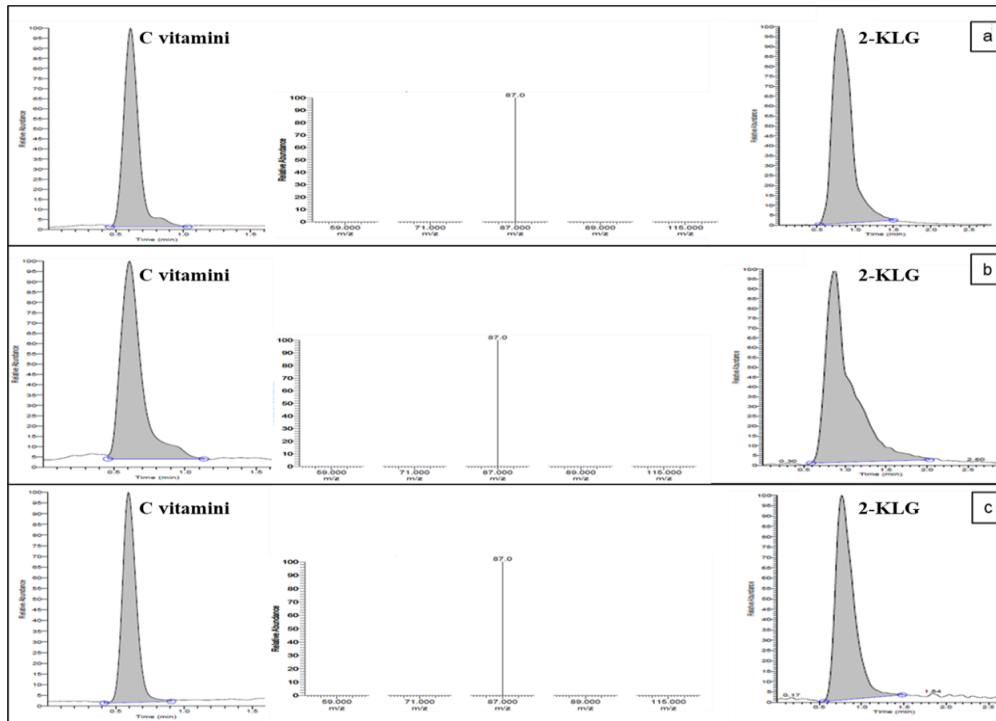
gerçekleştirildiği en eski yöntemler olarak bilinmektedir. Her iki yöntemin kullanıldığı bir çalışmada sırasıyla %65 ve %60 dönüşüm verimleri rapor edilmiştir (Anonim, 2002). Ancak sonuçlar incelendiğinde bu yöntemler ile C vitamini üretiminin gerçekleştirilemediği tespit edilmiştir. Konsantre HCl çözeltisinin 70-75°C sıcaklıkta kullanımının C vitamininin yanmasına yol açabildiği rapor edilmiştir (Gholap vd., 2017). Buradan hareketle üretim sırasında 2-KLG molekülünün miktarında azalma olmasına rağmen C vitamini elde edilememesinin son ürünün reaksiyon sırasında yanma sonucu kaybedilmesi ile ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir.

C vitamininin sodyum tuzunun üretimlerinin gerçekleştirildiği denemelerde (V-VI-VII ve VIII) ise örneklerin C vitamini miktarlarının 46.66-650.69 g/kg aralığında değiştiği ve en yüksek C vitamini üretim veriminin %58.56 olarak Metot-VIII'de elde edildiği tespit edilmiştir. Metotlar

incelendiğinde C vitamininin sodyum tuzunun üretiminde sodyum kaynağı olarak NaOH çözeltisinin kullanımının, sodyum bikarbonat ve sodyum karbonat kullanımından daha yüksek sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Ayrıca Metot-V ve VI arasındaki verim farklılığı incelendiğinde ise esterifikasyon süresinin 30 dakikadan 180 dakikaya uzatılmasının son ürünlerdeki C vitamini verimini yaklaşık 5.80 kat artırdığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte Metot-IX ile C vitamininin potasyum tuzu olarak üretilen örnekteki C vitamini miktar ve veriminin 313.60 g/kg ve %28.22 olduğu belirlenmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda C vitamininin sodyum tuzunun üretim verimlerinin %90 değerinin üzerinde olduğu rapor edilmiştir (Anonim, 1992; Anonim, 1995; Wang vd., 2012). C vitamini oluşum verimini etkileyen temel faktörlerin reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon süresi ve bu reaksiyon sürecinde 2-KLG bileşiğinin metil esterinin sodyum kaynağına olan molar oranı olduğu belirtilmiştir (Wang vd., 2012). Ayrıca reaksiyonun ilk aşamasında 2-KLG molekülünün

metanol ile interaksyonu sonucu gerçekleşen esterleşme düzeyi de C vitamini oluşum verimini etkilemekte ve metil esterinin oluşması C vitamini üretim verimini artırmaktadır (Bommarius ve Riebel-Bommarius, 2004). Endüstride de yaygın olarak kullanılan yöntem, 2-KLG bileşiğinin metanol ile reaksiyona girmesi ile önce metil 2-keto-L-gulonatin üretilmesi ve daha sonra bu bileşiğin alkali katalizör varlığında C vitaminine dönüştürüldüğü ester oluşturma reaksiyonudur (Xu vd., 2008). Belirtilen faktörlere bağlı olarak elde edilen bulguların önceki çalışmalardan farklı olduğu ve Metot-VII ve VIII temel alınarak üretim koşullarının optimize edilmesi ile daha yüksek verimlere ulaşılma potansiyelinin bulunduğu değerlendirilmiştir.

En fazla doğrudan C vitamini üretiminin yapıldığı Metot-I, en fazla C vitamininin sodyum tuzunun üretiminin yapıldığı Metot-VIII ve C vitamininin potasyum tuzunun üretiminin yapıldığı Metot-IX ile üretilen örneklere ait LC-MS kromatogramları ve kütle spektrumları Şekil 2'de verilmiştir.



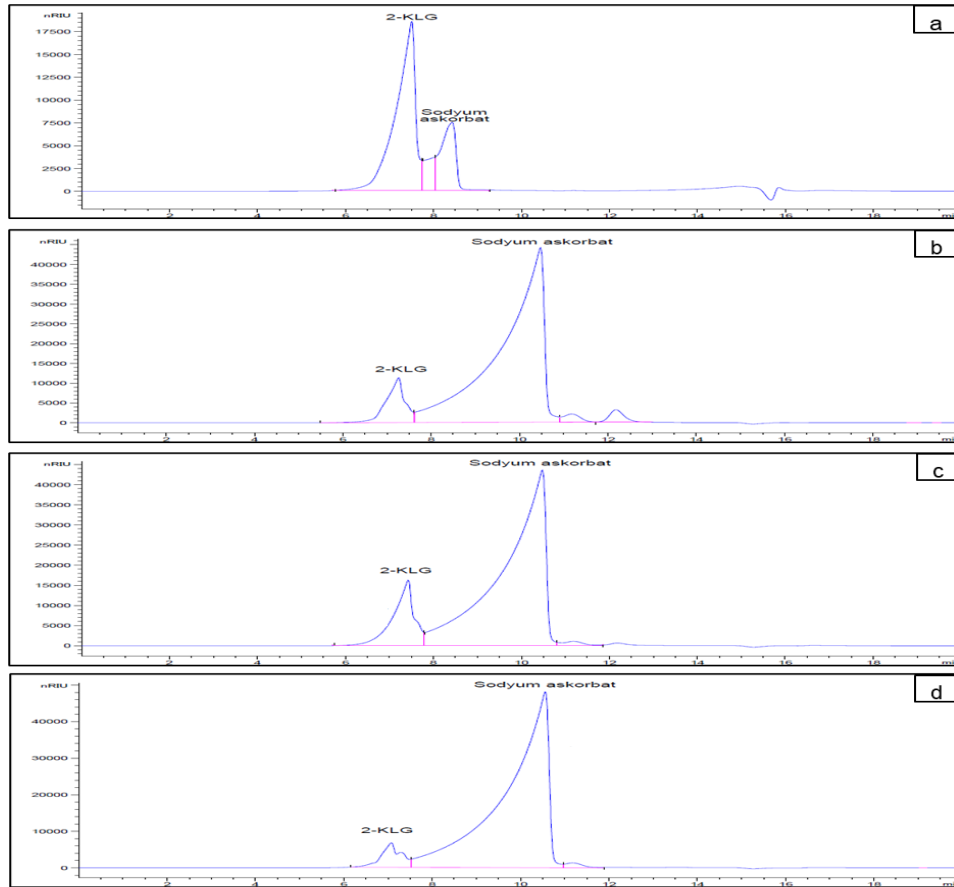
Şekil 2. LC-MS sistemi ile yapılan analizlere ait bazı kromatogramlar (a: C vitamini/Metot-I örneği, b: C vitamini sodyum tuzu/Metot-VIII örneği ve c: C vitamini potasyum tuzu/Metot-IX örneği)

Figure 2. Some chromatograms of the analysis performed with the LC-MS system (a: Vitamin C/Method-I sample, b: Sodium salt of vitamin C/Method-VIII sample, and c: Potassium salt of vitamin C/Method-IX sample)

Yapılan analizde kullanılan C vitamini standardının karakteristik parçalanma ürününe ait m/z oranının 87.00 olduğu belirlenmiştir. 2-KLG standart bileşiği için karakteristik m/z oranının ise 103.00 olduğu tespit edilmiştir. Örneklerdeki incelemelerde C vitamini ve 2-KLG bileşiklerinin varlığı bu m/z oranlarının karşılaştırılmasına ve piklerin alıkonma zamanlarına göre tayin edilmiştir.

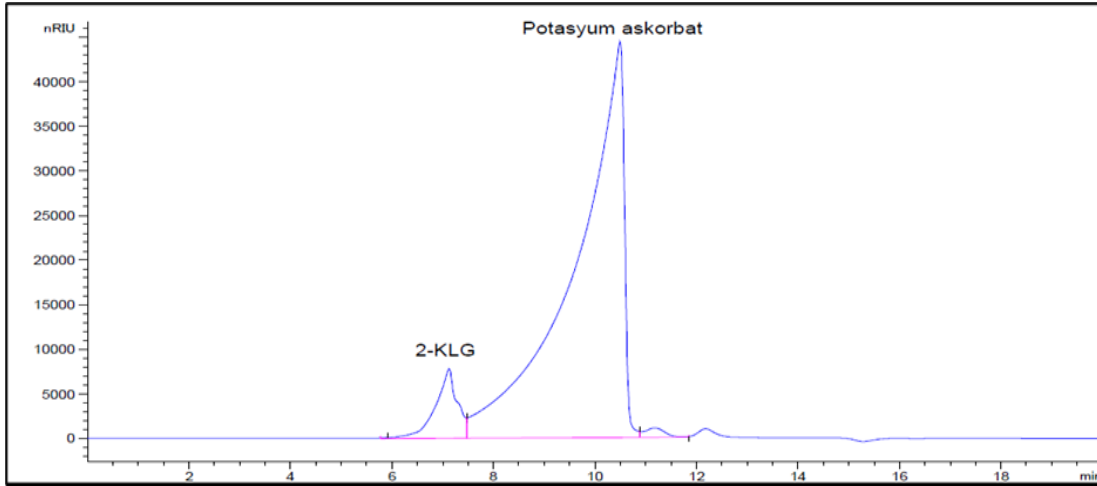
2-KLG bileşiğinden C vitamini sodyum ve potasyum tuzlarının üretimlerinin doğrulanması amacıyla yapılan HPLC analizine ait kromatogramlar ise sırasıyla Şekil 3 ve 4'te verilmiştir. 2-KLG ve C vitamini sodyum tuzu piklerinin alıkonma zamanları ve yapıları referans maddelerle karşılaştırılarak örnek içerisinde bu maddelerin varlığı kontrol edilmiştir. Ayrıca C

vitamini potasyum tuzu bileşiğine ait referans madde temin edilememiş, ancak yine de üretilen bileşiklerin çeşitliliğini sağlamak amacıyla C vitamini sodyum tuzunun üretiminin yapıldığı Metot-VIII yönteminde sodyum kaynağı olarak kullanılan NaOH yerine KOH ilavesi ile modifiye edilerek geliştirilen Metot-IX ile üretilen örneğe ait kromatogram C vitamini sodyum tuzu standart maddesi ile karşılaştırılmış ve her iki pikin aynı alıkonma zamanında geldiği ve yapılarının benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda LC-MS analiz sonuçları da değerlendirildiğinde elde edilen bu örnekte C vitamini bulunduğu ve ortamda tuz oluşturma potansiyeli bulunan tek iyonun K^+ olması nedeniyle bu bileşiğin C vitamini potasyum tuzu olabileceği değerlendirilmiştir.



Şekil 3. C vitamini sodyum tuzlarının üretimlerinin (a: Metot-V, b: Metot-VI, c: Metot-VII, d: Metot-VIII) doğrulanması amacıyla yapılan HPLC analizine ait kromatogramlar

Figure 3. Chromatograms of HPLC analysis for the verification of vitamin C sodium salts (a: Method-V, b: Method-VI, c: Method-VII, d: Method-VIII) productions



Şekil 4. C vitamini potasyum tuzu üretiminin (Metot-IX) doğrulanması amacıyla yapılan HPLC analizine ait kromatogram

Figure 4. Chromatogram of HPLC analysis for the verification of vitamin C potassium salt (Method-IX) production

SONUÇ

Araştırmada kullanılan dokuz farklı yöntemden yedisinde %2.28-58.56 verim ile C vitamini üretilebildiği tespit edilmiştir. C vitamini üretiminde butanol:toluen karışımı yerine yalnızca toluen kullanılmasının, metil alkol ile esterifikasyon işleminin yapılmasının ve esterifikasyon süresinin 30 dakikadan 180 dakikaya çıkarılmasının 2-KLG bileşiğinin C vitaminine dönüşüm miktar ve verimini artırdığı tespit edilmiştir. 2-KLG bileşiğinin %36.07 verim ile C vitaminine (Metot-I) ve %58.56 verim ile sodyum askorbata (Metot-VIII) dönüşümü sağlanmıştır. Metot-I ve VIII temel alınarak üretim koşullarının optimize edilmesi ile daha yüksek üretim verimlerine ulaşılma potansiyelinin olduğu değerlendirilmiştir. Ayrıca araştırmada D-glikozdan C vitamini üretiminde tüm aşamalara ait verimler birlikte değerlendirildiğinde 100 g D-glikozdan 14.59 g C vitamini ve 23.69 g C vitamini içeren sodyum askorbat elde edilebildiği sonucuna ulaşılmıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların bu araştırma ile ilgili herhangi bir kişi veya kurum ile çıkar çatışması yoktur.

YAZAR KATKILARI

Bu araştırma Mustafa ERBAŞ tarafından yürütülmüş, üretim denemeleri ve analizler Mustafa ERBAŞ, Ceren MUTLU ve Cihadiye

CANDAL USLU tarafından gerçekleştirilmiş ve makale Ceren MUTLU tarafından yazılmıştır.

TEŞEKKÜR

Projeye (1005-Ulusal Yeni Fikirler ve Ürünler Araştırma Destek Programı-Proje No: 118O859) verdikleri destek nedeniyle Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Abbas, S., Da Wei, C., Hayat, K., Xiaoming, Z. (2012). Ascorbic acid: microencapsulation techniques and trends-a review. *Food Reviews International*, 28(4), 343-374.

Anonim. (1992). Process for the production of sodium or potassium L-ascorbate. Patent No: US5128487A, <https://patents.google.com/patent/US5128487A/en> (Erişim tarihi: 25/11/2022).

Anonim. (1995). Process for preparing ascorbic acid. Patent No: US5391770A, <https://patents.google.com/patent/US5391770A/en> (Erişim tarihi: 25/11/2022).

Anonim. (2002). Continuous process for producing L-ascorbic acid. Patent No: WO2002051826A1, <https://patents.google.com/patent/WO2002051826A1/en> (Erişim tarihi: 25/11/2022).

- Anonim. (2016). UN Comtrade Database. <https://comtrade.un.org> (Erişim tarihi: 01/12/2022).
- Anonim. (2021). Trend economy report. https://trendeconomy.com/data/commodity_h2/293627 (Erişim tarihi: 01/12/2022).
- Bhand, D.V., Patwardhan, A.V. (2015). Statistical optimization of L-ascorbic acid production by *Xanthomonas campestris* MTCC 2286 using sucrose as a cheap carbon source. *Journal of Biochemical Technology*, 6(1), 922-928.
- Bommarius, A. S., Riebel-Bommarius, B. R. (2004). Biocatalysis: fundamentals and applications. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, 611 pp.
- Bremus, C., Herrmann, U., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (2006). The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *Journal of Biotechnology*, 124(1), 196-205.
- Dinani, S.T., van der Harst, J.P., Boom, R., van der Goot, A.J. (2023). Effect of L-cysteine and L-ascorbic acid addition on properties of meat analogues. *Food Hydrocolloids*, 134, 108059.
- Dogan, S., Tongur, T., Er kaymaz, T., Erdogan, G., Unal, B., Şık, B., Simsek, T. (2019). Traces of intact paraben molecules in endometrial carcinoma. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 31158-31165.
- Gholap, V., Talekar, V., Gholap, M., Kanawade, A., Phapale, P. (2017). A simple procedure for the one pot synthesis of ascorbic acid as efficiency and recyclable media. National Conference on Research and Developments in Synthetic Organic Chemistry, 39-42 pp.
- Kaswurm, V., van Hecke, W., Kulbe, K. D., Ludwig, R. (2013). Engineering of a bi-enzymatic reaction for efficient production of the ascorbic acid precursor 2-keto-L-gulonic acid. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 104-111.
- Kuivanen, J., Penttilä, M., Richard, P. (2015). Metabolic engineering of the fungal D-galacturonate pathway for L-ascorbic acid production. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1-9.
- Lavrenov, S.N., Preobrazhenskaya, M.N. (2005). L-ascorbic acid: Properties and ways of modification (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 39(5), 251-264.
- Nadtochii, M.A., Melent'eva, T. A. (2001). Synthesis of ascorbic acid from diacetone-2-keto-L-gulonic acid. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 35, 231-233.
- Nowak, D. (2021). Vitamin C in human health and disease. *Nutrients*, 13(5), 1595.
- Uluata, S., McClements, D.J., Decker, E.A. (2015). How the multiple antioxidant properties of ascorbic acid affect lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(6), 1819-1824.
- Varvara, M., Bozzo, G., Celano, G., Disanto, C., Pagliarone, C. N., Celano, G. V. (2016). The use of ascorbic acid as a food additive: technical-legal issues. *Italian Journal of Food Safety*, 5(1), 4313.
- Wang, J. C., Cui, F. X., Li, T. (2012). Optimization of synthesis process for sodium ascorbate. *In Advanced Materials Research*, 550, 10-15.
- Wang, P., Zeng, W., Xu, S., Du, G., Zhou, J., Chen, J. (2018). Current challenges facing one-step production of L-ascorbic acid. *Biotechnology Advances*, 36(7), 1882-1899.
- Xu, B., Zheng, X., Zhang, W., Zhang, X., Zhang, Z., Shang, H. (2008). Kinetics of esterification of 2-keto-L-gulonic acid with methanol catalyzed by cation exchange resin. *Transactions of Tianjin University*, 14(1), 37-42.
- Xu, J., Zhou, L., Miao, J., Yu, W., Zou, L., Zhou, W., Liu, C., Liu, W. (2020). Effect of cinnamon essential oil nanoemulsion combined with ascorbic acid on enzymatic browning of cloudy apple juice. *Food and Bioprocess Technology*, 13(5), 860-870.
- Zhu, Y., Liu, J., Du, G., Zhou, J., Chen, J. (2012). Sporulation and spore stability of *Bacillus megaterium* enhance *Ketogulonigenium vulgare* propagation and 2-keto-L-gulonic acid biosynthesis. *Bioresource Technology*, 107, 399-404.