

KRAHASIMI I HIDROLIZËS ACIDE DHE ENZIMATIKE TË MATERIALEVE CELULOZIKE

LULJETA PINGULI., ILIRJAN MALOLLARI., HASIME MANAJ.,
ANISA DHROSO., DHURATA PREMTI., XHAKLINA CANI.

Universiteti i Tiranës, Fakulteti i Shkencave të Natyrës,
Departamenti i Kimisë Industriale
e-mail: luljeta.pinguli@fshn.edu.al

Përmbledhje

Ekzistojnë dy rrugë kryesore të cilat përdoren rëndom për shndërrimin e celulozës në glukozë: rruga enzimmatike dhe ajo kimike. Në të dyja fushat që prej shumë vitesh vazhdojnë të bëhen kërkime për optimizimin e procesit. Janë marrë për studim si materiale celulozike: karboksi metil celulozë (CMC), letër filtri, pambuk, blojë e ashpër malti dhe tallash druri. Trajtimi acid është bërë me acid sulfurik dhe klorhidrik të holluar (5%) si dhe acid sulfurik të përqëndruar (deri në 65%). U studiua kinetika e hidrolizës acide në temperatura të ndryshme. Trajtimi enzimmatik u realizua me enzimën celulazë në temperatura dhe kohë të ndryshme qëndrimi. Studimet e kinetikës enzimmatike të hidrolizës së celulozës kanë treguar se ato i përfaqësojnë kinetikën Michaelis-Menten me inhibim nga substrati ose produkti. U bënë dhe trajtime simultane të materialeve celulozike për të studiuar tretshmërinë dhe fermentueshmërinë e sheqerit të përfutur pas trajtimeve të ndryshme. Në temperaturë dhome tretshmëria e celulozës varion nga 5-30% për përqëndrime të acidit sulfurik nga 50-60%. Struktura bëhet gjithmonë e më pak kristaline me rritjen e përqëndrimit. Për një përqëndrim acidi sulfurik mbi 65% ulet ndjeshëm prodhimtaria. Me rritjen e temperaturës, vihet re rritja e tretshmërisë në acid sulfurik ndërkohë që prodhimtaria dhe shkalla e polimerizimit zvogëlohet. Shndërrim më të lartë gjatë trajtimit enzimmatik ka CMC e ndjekur nga bloja, tallashi dhe më pas pambuku. Në rastin e trajtimit enzimmatik rol kryesor luan forma strukturore e celulozës. Në studimet e tjera rekomandohet që paralelisht me trajtimet acide ose enzimmatike të përcaktohet dhe shkalla e depolimerizimit dhe shndërrimi i strukturës së celulozës, kristaliniteti apo amorfiteti i saj.

Fjalëkyçe: Hidroliza acide, hidroliza enzimmatike, tretshmëri, prodhimtari.

Abstract

There exist two main routes for cellulose conversion into glucose: enzymatic and chemical route. Optimization of cellulose hydrolyzes remains still a challenge. There are in the focus of this study as cellulosic materials: carboxymethyl cellulose, filter papers, cotton, coarse malt, fine wood chips. For acidic hydrolyses was used diluted sulfuric and chlorhydric acid 5% and also sulfuric acid 50-65%. Enzymatic hydrolyze was performed by an industrial cellulose with a known enzymatic activity. Conversion rate, solubility, and sugar productivity were evaluated based on kinetic study for different temperatures and different contact time. At room temperature solubility of cellulosic materials varied from 5-30% for sulfuric acid concentration from 50-60%. The cellulose structure becomes less crystalline increasing acid concentration. When the concentration of sulfuric acid was up to 65%, solubility decreases significantly. Increasing the treatment

temperature increase the solubility, mean time productivity and polymerization time is decreased. During enzymatic hydrolyses, higher conversion rate has CMC followed by coarse malt, fine wood chips and cotton. During enzymatic hydrolyses it is very important structural form of cellulose. Its amorphity and crystallinity limited the conversion rate. Based on this fact there were performed also simultaneous treatments, that combine enzymatic and acidic hydrolyses.

Key words: Acidic hydrolyses, enzymatic hydrolyses, solubility, productivity.

Hyrje

Materialet celulozike të marra nga druri, mbetjet agro-bujqësore, mbeturinat e ngurta komunale, etj., përbëjnë burimin më të bollshëm të biomasës në shkallë globale.

Ekzistojnë dy rrugë kryesore të cilat përdoren rëndom për shndërrimin e celulozës në glukozë: rruga enzimatike dhe ajo kimike. Në të dyja fushat që prej shumë vitesh vazhdojnë të bëhen kërkime për optimizimin e procesit. Çdo molekulë celuloze është një polimer i padegëzuar me njësi D-glukoze, të lidhura me lidhje *beta-1,4 glikozidike*. Celulozat me bazë nga burime të ndryshme janë të ngjajshme në nivelin molekular, megjithatë ato ndryshojnë në strukturën kristaline dhe në varësi të lidhjes me përbërës të ndryshëm biokimikë (Gusakov, A. V., *et al.*, 1992).

Ekzistojnë dy tipe lidhjesh hidrogjenore në molekulat e celulozës: lidhje të formuara midis grupeve C_3OH dhe oksigjenit në unazën e piranozës brenda të njëjtës molekulë dhe lidhjet e formuara midis grupeve C_6OH të një molekule dhe oksigjenit të lidhjes glikozidike të molekulës tjetër. Lidhjet *beta-1,4 glikozidike* nuk janë shumë të vështira për t'u prishur, megjithatë si rezultat i këtyre lidhjeve hidrogjenore celuloza mund të formojë një strukturë shumë kristaline. Këto kristale shpesh janë kaq të ngurta sa nuk i penetron dot as uji dhe as enzimat. Në këto raste vetëm *ekzoglukonazat* (një nëngrup i celulazave) janë më efektivet në degradimin e tyre duke prekur drejtpërdrejt lidhjet fundore glikozidike. Nga ana tjetër celuloza amorfe lejon penetrimin nga ana e *endoglukonazave*, (një nëngrup tjetër i celulazave) që katalizon hidrolizën e lidhjeve të brendshme. Shpejtësia e hidrolizës është shumë më e madhe për strukturat amorfe krahasur me hidrolizën në celulozën kristaline. Hidrolizë e celulozës quhet procesi i cili prish lidhjet glikozidike të cilat mbajnë bashkë njësitë ndërtuese të glukozës. Është pikërisht molekula e ujit ajo që duhet zëvendësuar për ta bërë çdo lidhje të prishur joaktive (A.E. Segneanu, *et al.*, 2013).

Përsa i përket celulozës me origjinë bimore difuzioni i enzimave limitohet akoma dhe më shumë si rezultat i veshjes së jashtme nga p.sh. linjina duke përcaktuar kështu dhe shpejtësinë e hidrolizës. Për të larguar hemicelulozën dhe linjinën shpesh copëzat e drurit paratrajtohen me acid në temperaturë $160^{\circ}C$. Prodhimtaria e pritshme e glukozës pas 24 orësh varion nga 20 deri në 70%.

Shndërrimi i celulozës në glukozë sipas rrugës enzimatike zhvillohet në dy stade. Gjatë stadi të parë *beta-1,4 glukanaza* prish lidhjet glukozidike në celobiozë, e cila është një dimer i glukozës me një lidhje beta-1,4. Më pas lidhja *beta-1,4 glukozidike* priset nga *beta-glukozidaza*:



Celulosë -----> Celobiozë -----> Glukozë

Studimet e kinetikës të hidrolizës së celulozës kanë treguar se ato i përafrohen kinetikës Michaelis-Menten me inhibim nga substrati ose produkti. Celulazat prodhohen nga një sërë specimesh mykore dhe bakteriale. Megjithëse ne i referohemi atyre thjesht me termin celulazë, këtu futen më shumë se një enzima të ndryshme (Fan, *et.al*, 1993).

Materiali dhe metodat

Si lëndë të parë për studim u morrën materiale celulozike jo shumë komplekse si karboksimetil celuloza, letër filtri, blojë e ashpër malti, tallash druri dhe pambuk. Me këto materiale celulozike u realizuan eksperimentet e mëposhtme:

- Hidroliza enzimatiqe me celulazë industriale në temperaturë 50°C.
- Hidroliza me acid sulfurik dhe klorhidrik të holluar 5% në temperatura të ndryshme.
- Hidroliza me acid sulfurik të përqëndruar nga 40-65% në temperatura të ndryshme.

1. Hidroliza enzimatiqe me celulazë industriale:

Matja e aktivitetit enzimatik të celulazës u realizua me metodën e letrës së filtrit "FPA" (Ghose, 1987):

FPA = 0,37/përqëndrimin e celulazës për të ciluar 2,0 mg glukozë.

U përdorën temperaturat 20, 40, 50°Celsius. Koha e reaksionit 24 orë, për 16 orët e para u bënë matje çdo një orë. Shkalla e shndërrimit të celulozës me metodën enzimatiqe u njehsua:

$$CD = 100 \left[1 - \left(\frac{W}{W_0} \right) \right]$$

2. Hidroliza me acid sulfurik dhe klorhidrik të holluar 5%

Temperaturat e paraleleve 20, 40 dhe 90°. Koha e reaksionit 24 orë, për katër orët e para u realizuan matje të sheqerit të prodhuar me refraktometri cdo një orë, procesi ndalohet duke përdorur KOH të përqëndruar.

3. Hidroliza me acid sulfurik të përqëndruar 50%, 60% dhe 65%.

Ndikimi i përqëndrimit të acidit sulfurik dhe temperaturës në strukturën dhe karakteristikat e celulozës u realizua vetëm në katër materiale në temperaturë ambiente dhe 45°C. Kusht është që materiali celulozik të jetë në formë sa më të imët. Fillimisht celuloza “fryhet” në ujë dhe me pas shtohet me kujdes acid sulfurik i përqëndruar deri në përqëndrimin e duhur (në të ftohtë). Raporti acid/celulozë duhet të jetë 10. Kampionet mbahen në temperaturë të ndryshme (25-70°C) për 1 orë me përzjerje. Pas trajtimit me acid, përmbajtja kalon në një vëllim 10 herë më të madh të ujit të ftohtë me përzjerje të vazhdueshme. Sedimenti celulozik ndahet nga faza e lëngët me filtrim për 10min dhe me pas kampioni thahet në 60°C gjatë gjithë natës deri në peshë konstante (Ioelovich., 2012).

Prodhimtaria totale e celulozës të trajtuar me acid duke përfshirë dhe prodhimatrin e pjesëzave të patretshme të prodhuara nga ky trajtim në përqindje peshë të thatë, jepet nëpërmjet formulës:

$$Y \% = 100 \frac{W}{W_0} ;$$

dhe tretshmëria:

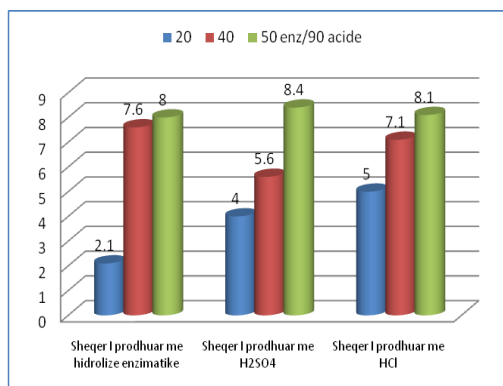
$$S \% = 100 \left[1 - \left(\frac{W}{W_0} \right) \right]$$

Rezultatet

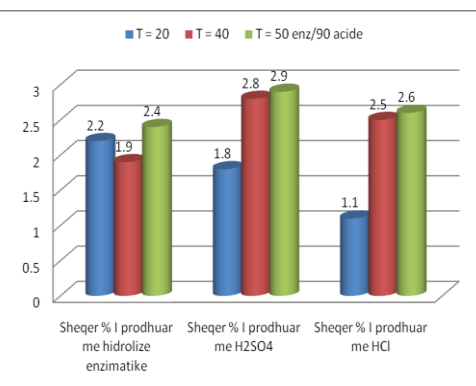
Objekti i studimit

- Studimi i hidrolizës acide dhe enzimatike të materialeve të ndryshme celulozike.
- Krahasimi i efektivitetit të këtyre metodave bazuar mbi shkallën e shndërrimit, tretshmërisë dhe prodhimtarisë.
- Ndikimi i temperaturës dhe përqëndrimit të acideve në efektivitetin e procesit të hidrolizës acide.
- Kombinimi i metodave të ndryshme për të rritur shkallën e shndërrimit të celulozës.

A. KARBOKSIMETIL CELULOZË



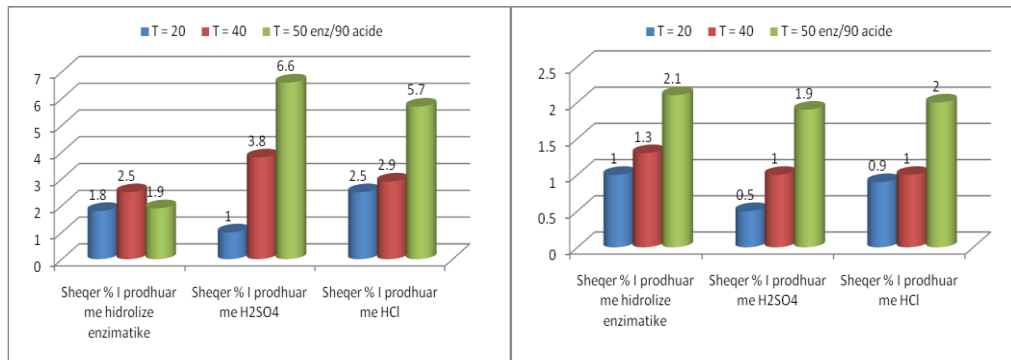
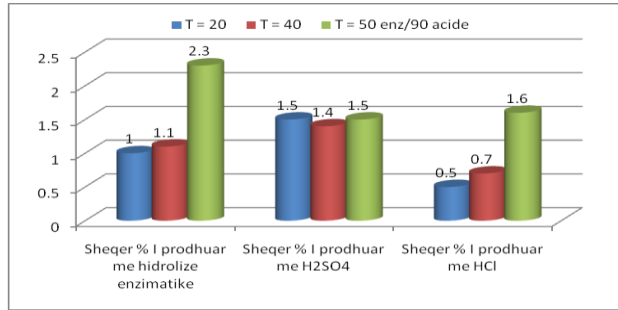
B. BLOJË E ASHPËR MALTI



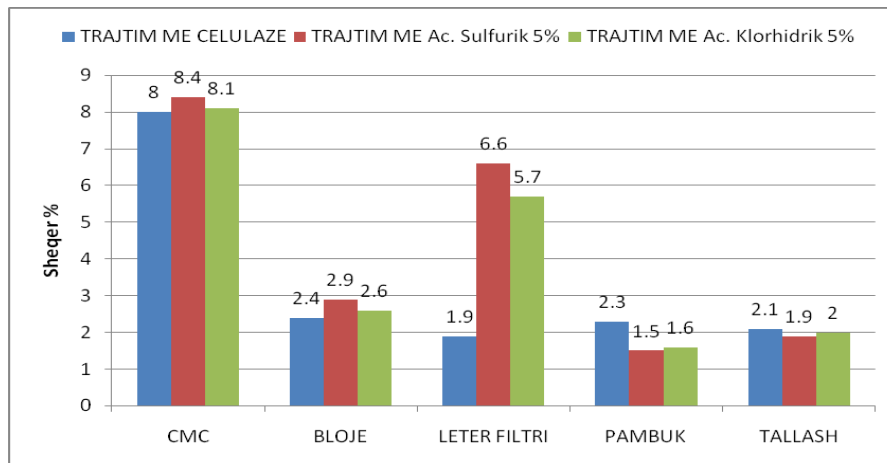
C. LETER FILTRI

D. TALLASH DRURI

E. PAMBUK

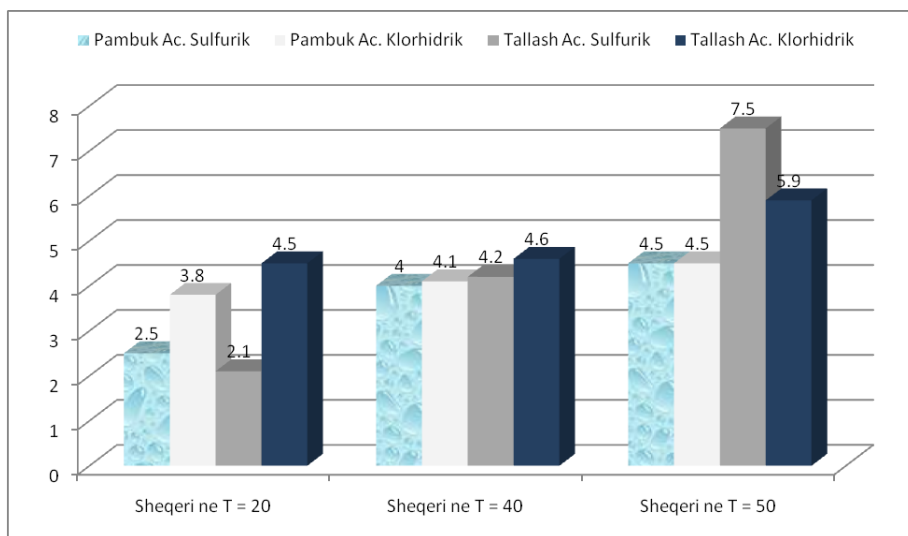


Grafik 1. Krahasimi i sasisë së sheqerit të prodhuar nga hidroliza acide e holluar dhe enzimatike dhe varësia nga temperatura.



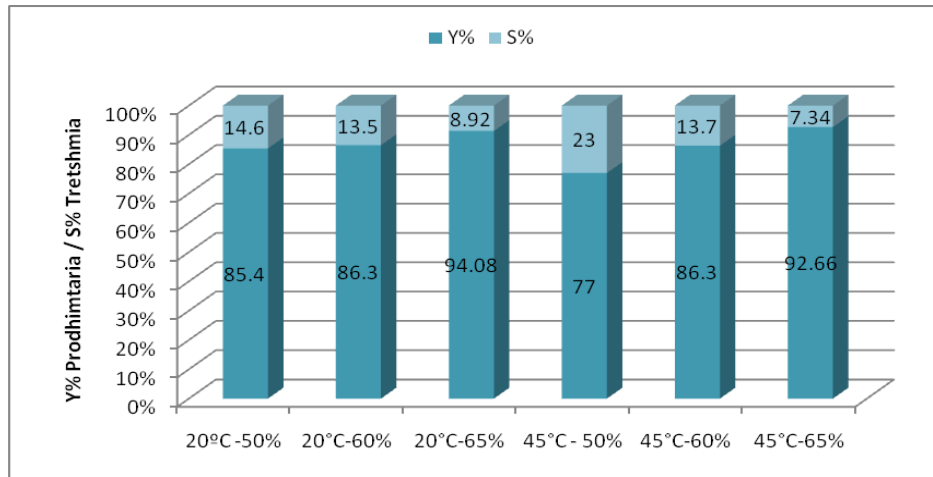
Grafik 2. Krahasimi i hidrolizës acide të holluar dhe enzimatike të të gjitha materialeve celulozike

Nga krahasimi i gjithë materialeve celulozike, duke j'u referuar grafikut 2, arrijmë në konkluzionin që sasi më të madhe sheqeri marrim gjatë trajtimit enzimatik dhe acid të karboksi metil celulozës. Rezultat ky i pritshëm sepse ky është komponent celulozik i pastër me strukturë amorge. Trajtimi me acid sulfurik jep rezultate më të larta krahasuar me acidin klorhidrik dhe veprimin enzimatik në rastin e blajës dhe letrës së filtrit. Tek kjo e fundit (letra) hidroliza acide është shumë më efektive krahasuar me hidrolizën enzimatike. Pambuku dhe tallashi japin vlera të ulta të sheqerit për këtë arsye u trajtuan më pas neutralizimit me KOH dhe me hidrolizë enzimatike.



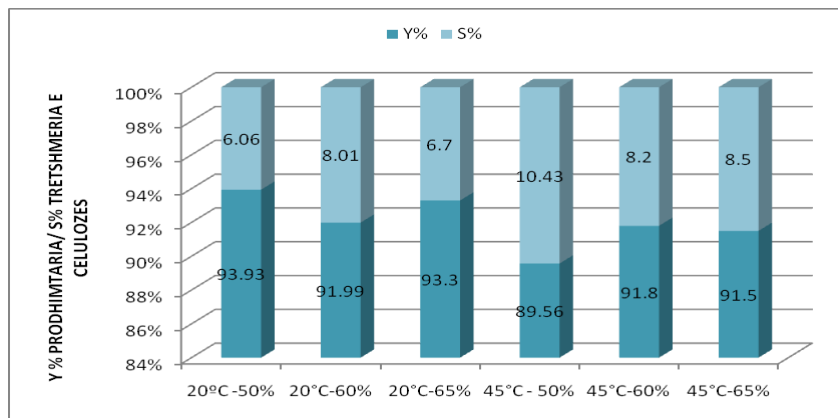
Grafik 3. Grafik krahasues mbi ecuinë e prodhimit të sheqerit pas trajtimit me celulazë të pambukut dhe tallashit të paratrajtuar me hidrolizën acide

Përcaktimi i tretshmërisë të celulozës në Ac.sulfurik të përqëndruar dha këto rezultate:

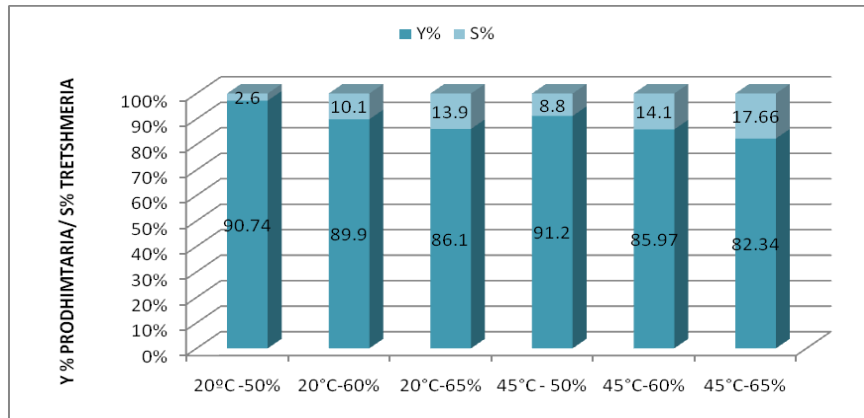


Grafik 4. Ecuria e prodhimitarisë dhe tretshmërisë së celulozës për CMC

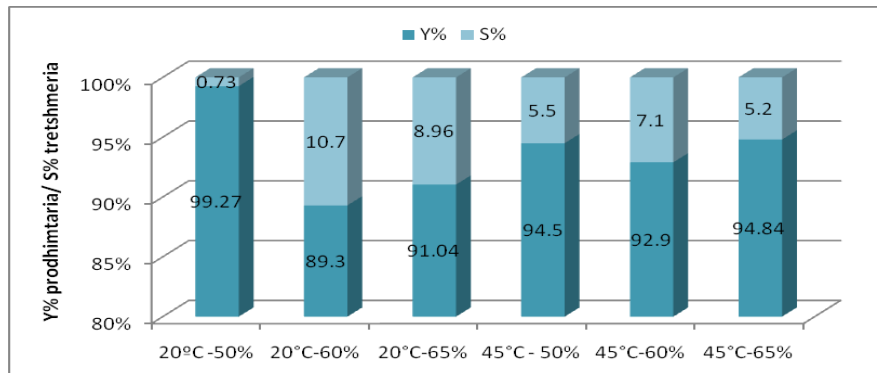
Siç duket nga grafiku 1 prodhimitaria është më e lartë në rastin e trajtimit me acid sulfurik në 65%. Tretshmëria më e lartë sipas grafikut merret pas trajtimit me acid sulfurik në 45°C. Ka një varësi të zhdrejtë të tretshmërisë së celulozës me ritjen e temperaturës kur përdoret acid sulfurik i përqëndruar.



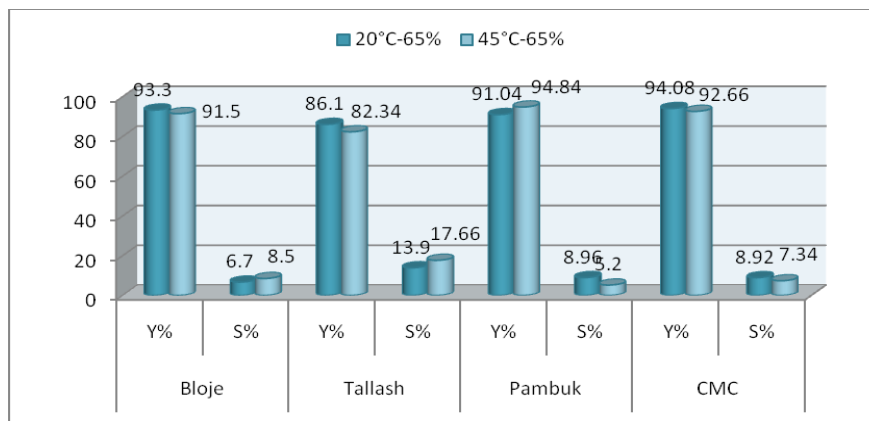
Grafik 5. Ecuria e prodhimitarisë dhe tretshmërisë së celulozës për blojën e maltit



Grafik 6. Ecuria e prodhimitarisë dhe tretshmërisë së celulozës për tallashin e drurit

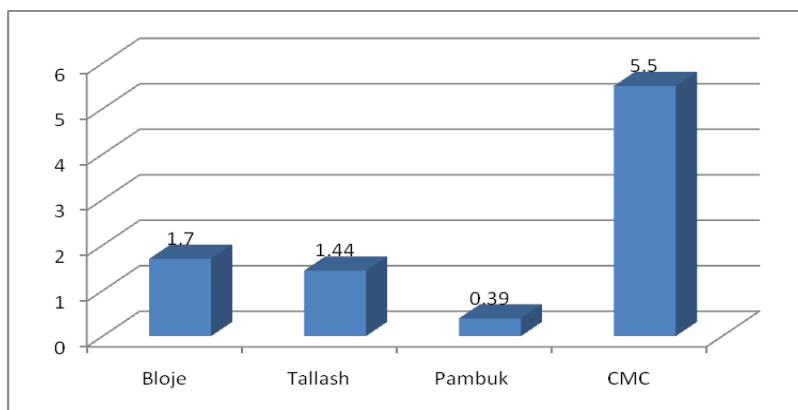


Grafik 7. Ecuria e prodhimitarisë dhe tretshmërisë së celulozës për pambukun



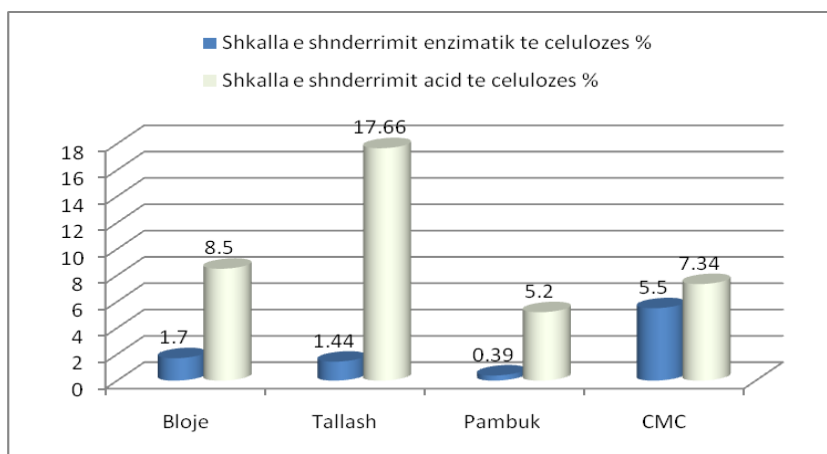
Grafik 8. Krahasimi i prodhimitarive dhe tretshmërisë për përbërës të ndryshëm celulozikë

Nëse krahasonim blojën, tallashin, pambukun dhe CMC me njëra tjetrën vihet re që prodhimi më të lartë meret në rendin zbritës: CMC, blojë, pambuk, tallash. Tretshmëri më e lartë meret sipas rendit zbritës: tallash rreth 17%, blojë, CMC, pambuk.



Grafik 9. Shkalla e shëndërrimit të celulozës me metodën enzimatiqe për komponentët e marrë në konsideratë.

Nga grafiku i mësipërm vëmë re se shndërrim më të lartë gjatë trajtimit enzimatik ka CMC e ndjekur nga bloja, tallashi dhe më pas pambuku. Në rastin e trajtimit enzimatik rol kryesor luan forma strukturore e celulozës. Për në studimet e tjera rekomandohet që paralelisht me trajtimet acide ose enzimatiqe të përcaktohet dhe shkalla e depolimerizimit dhe shndërrimi i strukturës së celulozës, kristaliniteti apo amorfiteti i saj.



Grafik 10. Shkalla e shëndërrimit të celulozës me metodën enzimatiqe dhe acide për komponentët e marrë në konsideratë.

Diskutime dhe përfundime

Teknikat e hidrolizes acide dhe enzimatike per materialet celulozike të marra në konsideratë japin shkallë shndërrimi të ndryshme në funksion të temperaturës dhe kohës së kontaktit. Reaksionet enzimatike me optimum në 50⁰ C kërkojnë 24-48 orë kohë për të marrë maksimumin e prodhimitarisë. Reaksionet me acid të holluar ne 90⁰C kërkojnë maksimumi 2 orë kohë kontakti, 4 deri ne 6 orë në 40⁰C dhe deri ne 12-24 orë në temperaturë dhome.

Renditja e substrateve me hidrolizë acide dhe enzimatike mbi bazën e sasisë së sheqerit të prodhuar është: CMC, letër filtri, blojë , tallash, pambuk. Këto tre të fundit pak a shumë japin shkallë shndërrimi të përafërt me njëra-tjetrën. Trajtimi me acid sulfurik jep rezultate më të larta krahasuar me acidin klorhidrik.

Kombinimi i hidrolizës acide të holluar me atë enzimatike pothuajse trefishon sasinë e sheqerit.

Gjatë trajtimit të materialeve celulozike me acid të përqëndruar u vu re se prodhimtaria është më e lartë në rastin e trajtimit me acid sulfurik në 65%. Tretshmëria më e lartë merret pas trajtimit me acid sulfurik në 45⁰C. Ka një varësi të zhdrejtë të tretshmërisë së celulozës me rritjen e temperaturës kur përdoret acid sulfurik i përqëndruar.

Trajtimi enzimatik i mostrave te paratrajtuaara me acid sulfurik të përqëndruar rrit ndjeshem shkallën e shndërrimit. Kjo tregon se acidi sulfurik ndikon më shume në ndryshimin e strukturës të mostrës celulozike dhe sigurisht pjesërisht dhe në tretshmërinë e tyre. Për këtë arsye rekomandohet të përdoret si metodë paratrajtuese para trajtimit enzimatik.

Prodhimtaria e materialeve celulozike në rendin zbritës është: CMC, blojë, pambuk, tallash. Tretshmëria sipas rendit zbritës: tallash blojë, CMC, pambuk.

Literatura

Fan, L.T., Lee, Y.-H. (1993): Kinetic study of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: Derivation of a mechanistic kinetic model. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 2707-2733.852 *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 41, No. 9, April 15

Ghose, T. K. (1987): Measurements of cellulase activities. *Pure Applied Chemistry.* 59: 257-268

Gusakov, A. V., Sinitsyn, A. P., Manenkova, J. A., Protas, O. V. (1992): Enzymatic saccharification of industrial and agricultural lignocellulosic wastes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 34/35: 543-556

Howell, J. A., Mangat, M. (1978): Enzyme deactivation during cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 20: 847-863

Philippidis, G. P., Spindler, D. D., Wyman, C. W. (1992): Mathematical modeling of cellulose conversion to ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Appl. Biochem. Biotechnol*

Michael Ioelovich., (2012): Study of Cellulose Interaction with Concentrated Solutions of Sulfuric Acid. *International Scholarly Research Network, ISRN Chemical Engineering, Volume 2012, Article ID 428974, 7 pages, doi:10.5402/2012/428974*

A.E. Segneanu, C. Macarie, M. Ungureanu, I. Balcu, V. Gherman, I. Grozescu, (2013): Comparative study on enzymatic hydrolysis of cellulose, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures Vol. 8, No. 3, July - September 2013, 1061 - 1068*