

MODIFICAREA ENZIMATICĂ A LIGNINEI ȘI A FRAȚIUNILOR DE LIGNINĂ OBȚINUTE ÎN URMA PRETRATAMENTULUI BIOMASEI LIGNOCELULOZICE

Teză destinată obținerii
titlului științific de doctor inginer
la
Universitatea Politehnica Timișoara
în domeniul INGINERIE CHIMICĂ
de către

Ing. Firuța Ionița Fițigău

Conducător științific:
Referenți științifici:

prof.univ.dr.ing. Francisc Péter
prof.univ.dr. Carmen Gabriela Boeriu
prof.univ.dr.ing. Gheorghe Maria
conf.univ.dr.ing. Lucian Mircea Rusnac

Ziua susținerii tezei: 31.01.2014

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- | | |
|---|--|
| 1. Automatică | 9. Inginerie Mecanică |
| 2. Chimie | 10. Știința Calculatoarelor |
| 3. Energetică | 11. Știința și Ingineria Materialelor |
| 4. Ingineria Chimică | 12. Ingineria sistemelor |
| 5. Inginerie Civilă | 13. Inginerie energetică |
| 6. Inginerie Electrică | 14. Calculatoare și tehnologia informației |
| 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații | 15. Ingineria materialelor |
| 8. Inginerie Industrială | 16. Inginerie și Management |

Universitatea Politehnica Timișoara a inițiat seriile de mai sus în scopul diseminării expertizei, cunoștințelor și rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul Școlii doctorale a universității. Seriile conțin, potrivit H.B.Ex.S Nr. 14 / 14.07.2006, tezele de doctorat susținute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2013

Această publicație este supusă prevederilor legii dreptului de autor. Multiplicarea acestei publicații, în mod integral sau în parte, traducerea, tipărirea, reutilizarea ilustrațiilor, expunerea, radiodifuzarea, reproducerea pe microfilme sau în orice altă formă este permisă numai cu respectarea prevederilor Legii române a dreptului de autor în vigoare și permisiunea pentru utilizare obținută în scris din partea Universității Politehnica Timișoara. Toate încălcările acestor drepturi vor fi penalizate potrivit Legii române a drepturilor de autor.

România, 300159 Timișoara, Bd. Republicii 9,
Tel./fax 0256 403823
e-mail: editura@edipol.upt.ro

Cuvânt înainte

Teza de doctorat a fost elaborată pe parcursul activității desfășurate în perioada stagiului de doctorat cu frecvență în cadrul Departamentului de Chimie Aplicată și Ingineria Compușilor Organici și Naturali, Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului a Universității Politehnica Timișoara.

Mulțumiri deosebite și întreaga mea recunoștință se cuvin conducătorului științific, domnului Prof. Dr. Ing. Francisc Peter pentru oportunitatea pe care mi-a oferit-o, sprijinul constant, și pentru îndrumările și încurajările profesionale de care am avut parte pe parcursul întregii perioade de cercetare și elaborare a prezentei teze de doctorat. Datorită sfaturilor dânsului, m-am îndreptat înspre acest domeniu de cercetare iar finalizarea acestei lucrări nu ar fi fost posibilă fără suportul științific și moral de care m-am bucurat în mod constant din partea dânsului.

Sunt profund îndatorată și doresc să mulțumesc doamnei Prof. Dr. Ing. Carmen Boeriu, pentru îndrumarea științifică și sprijinul moral oferite pe toată perioada stagiului de doctorat, o persoana cu o deosebită competență profesională și științifică, căreia îi mulțumesc pentru indicațiile profesionale acordate, pentru încredere, pentru ambiția pe care mi-a insuflat-o în a aborda lucrurile cu un profesionalism desăvârșit și pentru tot ce m-a învățat.

Îmi exprim întreaga considerație față de distinșii membrii ai comisiei de doctorat, domnului președinte al comisiei Prof. Dr. Ing. Teodor Todinca, de la Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului din Timișoara, doamnei Prof. Dr. Ing. Carmen Boeriu de la Universitatea din Wageningen, domnului Prof. Dr. Ing. Gheorghe Maria de la Universitatea Politehnica din București și domnului Prof. Dr. Ing. Lucian Mircea Rusnac de la Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului din Timișoara cărora le mulțumesc pentru că au acceptat propunerea de a face parte din comisia de analiză a tezei, pentru răbdarea cu care au analizat lucrarea de față și pentru sugestiile formulate.

I would like to express my thanks to the research group from Wageningen University and Research Center, especially to Guus Frissen, Richard Gosselink and Jacinta van der Putten for their help in the analysis of samples by IR, NMR and GPC, and to Marinella van Leeuwen for her help and friendship.

Doresc să mulțumesc de asemenea colegilor mei de la departamentul CAICON, în special lui Ana, Ramona, Miha, Adinela, Livia, Anca și d-nei Asist. Dr. Ing. Cristina Paul pentru tot sprijinul acordat de-a lungul elaborării tezei de doctorat, pentru sprijinul moral și înțelegerea de care au dat dovadă în acești ani.

Mulțumesc conducerii Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Electrochimie și Materie Condensată, INCEMC, Timișoara, precum și colegilor mei de aici, pentru înțelegerea și sprijinul acordat pe perioada doctoratului.

Finalizarea tezei de doctorat nu ar fi fost posibilă fără sprijinul, înțelegerea, încrederea, încurajările permanente și mai ales dragostea familiei mele și a soțului meu, Ovidiu, căruia îi dedic această reușită și îi mulțumesc.

Timișoara, Ianuarie 2014

Firuța Ionița Fițișău

Soțului meu Ovidiu

Fițigău, Firuța Ionița

Modificarea enzimatică a ligninei și a fracțiunilor de lignină obținute în urma pretratamentului biomasei lignocelulozice

Teze de doctorat ale UPT, Seria 4, Nr. 75, Editura Politehnica, 2014, 148 pagini, 76 figuri, 22 tabele.

ISSN: 1842-8223

ISBN: 978-606-554-766-7

Cuvinte cheie: lignină, fracționare, lacază, polimerizare enzimatică, cuplare oxidativă

Rezumat:

La ora actuală, lignina reprezintă alături de celuloză, biopolimerul cel mai răspândit în natură, iar produșii de descompunere ai acesteia sunt reprezentați de cantități imense de produși secundari rezultați în industria celulozei și a hârtiei. Obiectivul principal al acestei teze a fost creșterea hirofilicității ligninei prin grefarea pe cale enzimatică a unor grupări funcționale adecvate în vederea obținerii de produși cu proprietăți noi. Scopul modificării enzimatică a ligninei a fost îmbunătățirea compatibilității polimerului precum și îmbunătățirea reactivității acesteia. Astfel, s-a investigat influența structurii chimice și moleculare a cinci tipuri diferite de lignine asupra solubilității acestora în solvenți de diferite polarități. Fracțiunile solubile și insolubile izolate au fost caracterizate prin determinarea compoziției chimice prin FT-IR și ³¹P-NMR, a maselor moleculare și polidispersităților, iar asemănările și deosebirile dintre fracțiunile și ligninele de bază au fost analizate cu ajutorul unor metode statistico-matematice (PCA, PLS). Datorită insolubilității ligninelor în medii apoase, s-a testat activitatea de oxidare în amestec de solvent organic – apă a trei tipuri de enzime cunoscute că degradează lignina. În urma acestor studii, lacaza a fost selectată pentru realizarea reacțiilor de modificare enzimatică a ligninelor în mediu acetonă – apă. Modificarea fracțiunilor de lignină prin cuplare oxidativă cu glucozamina, tripeptide, esteri aromatici ai alcoolilor derivați din zaharuri sau oligomeri de chitosan a fost realizată în amestec de 50% acetonă în apă, amestec favorabil atât stabilității lacazei cât și solubilității substraturilor. Caracterizarea produșilor de reacție a fost realizată folosind metodele FT-IR, ³¹P-RMN, GPC iar reactivitatea enzimei a fost urmărită cu ajutorul voltametriei ciclice și determinării conținutului de oxigen dizolvat consumat în urma reacției de oxidare.

Teza de doctorat a fost realizată cu sprijin parțial din grantul strategic POSDRU 07/1.5/S, ID77265, cofinanțat din Fondul Social European "Investește în oameni", în cadrul Programului Operațional Sectorial Dezvoltare Resurse Umane 2007-2013.

Adresez mulțumiri deosebite Universității din Wageningen pentru posibilitatea de a efectua o parte din experimentele din cadrul tezei de doctorat la Wageningen UR Food & Biobased Research.

CUPRINS

	Introducere	
	Abrevieri	
1.	STUDIU DE LITERATURĂ	1
1.1.	Importanța temei și principalele obiective ale tezei	1
1.2.	Lignina și fracțiunile de lignină	3
1.2.1.	Noțiuni generale despre lignină	5
1.2.2.	Structura ligninei	7
1.2.3.	Lignine tehnice obținute prin delignificarea materiilor lignocelulozice	13
1.2.3.1.	Delignificarea de tip Kraft	13
1.2.3.2.	Delignificarea cu sulfit	13
1.2.3.3.	Delignificarea cu soluții alcaline	14
1.2.3.4.	Procedeul „organosolv” și/sau procesul de fracționare	14
1.2.3.5.	Pretratamentul și conversia biomasei (biorafinărie)	14
1.2.3.6.	Explozia cu aburi	14
1.2.4.	Depolimerizarea ligninei	15
1.2.4.1.	Ruperea legăturilor lignină-carbohidrați	15
1.2.4.2.	Depolimerizarea biologică a ligninei	15
1.2.4.3.	Depolimerizarea chimică a ligninei	16
1.2.5.	Aplicații potențiale ale ligninei	17
1.3.	Enzime care degradează lignina.	18
1.3.1.	Peroxidazele	21
1.3.1.1.	Lignin peroxidaza (LiP)	21
1.3.1.2.	Mangan peroxidaza (MnP)	22
1.3.2.	Lacaza	22
1.3.2.1.	Modul de acțiune al lacazei	23
1.3.2.2.	Sistemul mediator al lacazei	26
1.3.2.3.	Aplicații ale lacazelor	26
1.4.	Reacțiile de oxidare a compușilor model din lignină și a ligninei în prezența lacazei	28
1.4.1.	Compuși model ai ligninei de tipul monomerului siringil	28
1.4.2.	Compuși model ai ligninei de tipul monomerului guaiacil	31
1.4.3.	Compuși model din lignină de tipul dimerilor siringil	32
1.4.4.	Compuși model condensați care se găsesc în lignina izolată prin procedeul Kraft	33
1.4.5.	Oxidarea ligninei cu lacază	33
1.4.6.	Reacții catalizate de lacază în solvenți organici	34
1.5.	Compuși cu utilizare potențială pentru funcționalizarea ligninei	35
1.5.1.	Glucozamina	35
1.5.2.	Peptidele	36
1.5.3.	Chitosanul	39
1.5.4.	Esterii aromatici ai alcoolilor derivați din zaharuri.	41

2.	CONTRIBUȚII ORIGINALE	43
	Introducere	43
2.1.	Caracterizarea ligninelor utilizate	44
2.1.1.	Analiza FT-IR a ligninelor	44
2.1.2.	Analiza grupărilor funcționale din lignină cu ajutorul spectroscopiei ³¹ P-RMN	46
2.1.3.	Distribuția masei moleculare în probele de lignină	48
2.1.4.	Concluzii parțiale	49
2.2.	Studiul solubilității ligninelor în solvenți de diferite polarități	50
2.2.1.	Calculul parametrilor de solubilitate pentru lignină și solvenți	50
2.2.2.	Solubilitatea ligninelor	52
2.2.3.	Distribuția masei moleculare și conținutul de grupări funcționale a fracțiunilor de lignină	54
2.2.4.	Analiza FT-IR și disimilaritatea fracțiunilor de lignină	58
2.2.5.	Predicția cantitativă a conținutului de grupări funcționale din lignină	62
2.2.6.	Concluzii parțiale	64
2.3.	Alegerea biocatalizatorului	64
2.3.1.	Influența concentrației de solvent organic asupra eficienței catalitice a enzimelor lignolitice	65
2.3.2.	Caracterizarea lacazei prin electroforeza pe gel de poliacrilamidă	66
2.3.3.	Studiul cinetic al reacției de oxidare enzimatică folosind siringaldazina ca și substrat	67
2.3.4.	Concluzii parțiale	68
2.4.	Studiul reacțiilor de polimerizare a ligninelor catalizate de lacază în amestec de acetonă-apă	68
2.4.1.	Distribuția maselor moleculare a ligninelor modificate cu lacază	69
2.4.2.	Modificările structurale fracțiunilor de lignină pe baza analizei spectrale FT-IR	70
2.4.3.	Compoziția grupărilor funcționale în ligninele modificate cu lacază	72
2.4.4.	Reactivitatea ligninelor în reacțiile de oxidare catalizate de lacază	74
2.4.5.	Concluzii parțiale	75
2.5.	Modificarea enzimatică a ligninelor prin cuplare oxidativă cu compuși cu caracter hidrofil	76
2.5.1.	Studiul reacțiilor de cuplare covalentă a ligninelor cu glucozamină	76
2.5.1.1.	Studiul reacțiilor de oxidare enzimatică cu ajutorul voltametriei ciclice	77
2.5.1.1.1.	Studiul electrochimic al reacției de cuplare oxidativă a siringaldazinei cu glucozamina	78
2.5.1.1.2.	Studiul electrochimic al reacției de cuplare oxidativă a ligninelor cu glucozamina	81

2.5.1.1.3.	Influența concentrației de lignină asupra reacțiilor de cuplare enzimatică a a ligninelor cu glucozamina	85
2.5.1.1.4.	Influența raportului OH fenolic total / glucozamină asupra reacțiilor de cuplare enzimatică	87
2.5.1.2.	Studiul reactivității lacazei în reacțiile de cuplare enzimatică a ligninelor cu glucozamina.	89
2.5.2.	Studiul reacțiilor de cuplare covalentă a ligninelor cu tripeptida glicil-tirosil-glicina (GYG)	90
2.5.3.	Studiul reacțiilor de cuplare covalentă a ligninei provenită din lemn de esență tare cu chitosanul	91
2.5.4.	Studiul reacțiilor de cuplare covalentă a ligninei OHL cu mono- și di-esterii acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul.	93
2.5.5.	Concluzii parțiale	98
3.	PARTEA EXPERIMENTALĂ	99
3.1.	Materiale	99
3.2.	Rețete de lucru	100
3.2.1.	Fracționarea ligninelor în amestecuri de acetonă-apă și acetat de etil	100
3.2.2.	Determinarea activității enzimelor	100
3.2.2.1.	Determinarea activității lacazei în amestec de acetonă-apă	100
3.2.2.2.	Determinarea activității lignin peroxidazei în prezența acetonei	101
3.2.2.3.	Determinarea activității peroxidazei din hrean în prezența acetonei	101
3.2.3.	Reacțiile de polimerizare ale ligninelor cu lacaza	102
3.2.4.	Reacțiile de cuplare covalentă a ligninei cu glucozamina.	102
3.2.5.	Reacția de cuplare covalentă a ligninei cu tripeptida glicil-tirosil-glicina.	102
3.2.6.	Reacția de cuplare covalentă a ligninei cu chitosan	103
3.2.7.	Reacțiile de obținerea mono- și di-esterului acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul.	103
3.2.7.1.	Reacția de cuplare covalentă a ligninei cu monoesterul acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul	104
3.2.7.2.	Reacția de cuplare covalentă a ligninei cu diesterul acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul	104
3.3.	Metode de analiză	104
3.3.1.	Spectroscopia FT-IR	104
3.3.2.	Cromatografia de permeație prin gel (GPC)	105
3.3.3.	Analiza RMN (Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară)	106
3.3.4.	Electroforeza proteinelor pe gel de poli(acrilamidă)	107
3.3.5.	Calculul de prelucrare statistică a datelor	108
3.3.6.	Măsurarea consumului de oxigen dizolvat.	110
3.3.7.	Studii de voltametrie ciclică.	110

VIII Cuprins

4.	CONCLUZII FINALE	112
	BIBLIOGRAFIE	117
	ANEXE	125
	LISTA DE LUCRĂRI	134

INTRODUCERE

Producerea unor cantități mari de lignină ca și produs secundar de valoare inferioară în industria celulozei și a hârtiei precum și ipoteza creșterii pe viitor a disponibilității acesteia datorită dezvoltării și implementării unor tehnologii noi de obținere de combustibili și de substanțe chimice din biomasă lignocelulozice, au determinat căutarea intensă a unor metode de valorificare a acesteia. Lignina pare a fi un material multilateral pentru multe aplicații fiind determinate o serie de potențiale utilizări ale acesteia și anume în producerea de energie, combustibil și gaz de sinteză, în producerea de macromolecule precum și în obținerea de compuși aromatici.

Atât disponibilitatea cât și conținutul mare de subunități fenolice fac din lignină o resursă atractivă în obținerea de chimicale care la ora actuală sunt produse doar prin procese petrochimice. Astfel, lignina ca și material brut are marele avantaj că are în constituție structuri aromatice iar acest lucru poate fi un punct de plecare în sinteza altor compuși importanți. Marea provocare în acest sens este ruperea polimerului de lignină în subunități monolignolice care mai apoi pot fi utilizate în obținerea de produși cu valoare adăugată în industria chimică și farmaceutică. Solvenții organici sunt foarte eficienți în fracționarea chimică a ligninei pentru a obține lignine cu omogenitate mare pentru a-și putea impune utilizarea biotehnologică fiind materiale potențiale de inițiere a reacțiilor de biotransformare. Frațiunile de lignină pot avea de asemenea un număr mare de proprietăți importante, cum ar fi caracterul antioxidant, iar grefarea mai multor molecule poate induce noi funcțiuni și proprietăți.

Studiile și cercetările în domeniul obținerii de noi derivați de lignină cu structuri și morfologii complexe și stabilirea domeniilor de aplicații ale acestora este de foarte mare actualitate în vederea creșterii performanțelor ligninei și a compatibilității acesteia cu alți polimeri.

Interesul pentru modificarea fibrelor celulozice și implicit a ligninei în special cu ajutorul enzimelor au captat atenția în ultimii ani din moment ce o varietate mare de enzime sunt cunoscute a fi capabile să acționeze asupra fibrelor lignocelulozice. Comparativ cu tratamentele chimice care necesită condiții de reacție dure, pierderea unor componenți doriți și utilizarea unor reactivi toxici, tratamentul enzimatic are loc în condiții blânde mai puțin distructive pentru fibre și este mai ecologic.

În contextul actual al tendințelor cercetărilor privind conversia ligninei în produse industriale cu valoare economică, teza de doctorat intitulată: '**Modificarea enzimatică a ligninei și a fracțiunilor de lignină obținute în urma pretratamentului biomasei lignocelulozice**' aduce o serie de contribuții originale cu privire la studiul creșterii hidrofilicității ligninei prin grefarea pe cale enzimatică a unor grupări funcționale adecvate în vederea obținerii de produși cu proprietăți noi.

În acest context, strategia de cercetare a vizat parcurgerea următoarelor obiective științifice:

- Caracterizarea ligninelor utilizate prin spectroscopie de infraroșu (FT-IR), cromatografie de permeație în gel (GPC), spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară (^{31}P -RMN) pentru a evidenția asemănările și deosebirile dintre lignine în ceea ce privește structura și

X Introducere

reactivitatea acestora precum și relația lor cu proprietățile funcționale necesare pentru anumite aplicații iar rezultatele au fost relaționate cu originea și metodele de izolare diferite ale acestora.

- Fraționarea ligninelor cu solvenți organici și caracterizarea fracțiunilor obținute.
- Selecția celui mai eficient biocatalizator pentru reacția de modificarea enzimatică a ligninelor.
- Polimerizarea ligninelor cu lacază în amestec de acetonă-apă.
- Cuplarea enzimatică a ligninelor cu glucozamina, glicil-tirozil-glicina, chitosan și esteri ai sorbitolului.

Teza de doctorat este structurată în patru părți:

- **1. Studiu de literatură** - în care este detaliat stadiul actual al cunoașterii în domeniul modificărilor enzimatică ale ligninei, importanța temei, structura și proprietățile fizico-chimice ale ligninelor, metode folosite pentru extracția ligninelor, degradarea ligninei cu ajutorul enzimelor, aplicațiile industriale ale noilor procese bazate pe modificarea ligninelor din diferite surse.
- **2. Contribuții originale** - detaliază rezultatele obținute pe parcursul cercetărilor experimentale, cuprinzând caracterizarea ligninelor utilizate pentru a evidenția asemănările și deosebirile dintre lignine în ceea ce privește structura și reactivitatea acestora precum și relația lor cu proprietățile funcționale necesare pentru anumite aplicații iar rezultatele au fost relaționate cu originea și metodele de izolare diferite ale acestora, fracționarea ligninelor în amestecuri de acetonă-apă și acetat de etil iar fracțiunile de lignină obținute au fost caracterizate în vederea modificării enzimatică, conceptul de parametru de solubilitate și analiza statistică a datelor fiind aplicate pentru a explica efectul solvenților asupra proprietăților ligninelor, selecția biocatalizatorului pentru reacția de modificare enzimatică în mediu de solvent organic-apă, polimerizarea ligninelor din diferite surse cu lacază în amestec de acetonă-apă, reacțiile de cuplare enzimatică a ligninelor cu glucozamină, cu tripeptida glicil-tirozil-glicina, chitosan și esteri ai sorbitolului.
- **3. Partea experimentală** - prezintă procedurile experimentale folosite la fracționarea ligninelor în medii de solvent organic, în reacțiile de polimerizarea oxidativă a ligninelor, în reacțiile cu cuplare covalentă a ligninelor cu compuși hidrofili precum și metodele de analiză folosite.
- **4. Concluzii finale** - rezultate din studiile experimentale în conformitate cu obiectivele stabilite.

Teza de doctorat a fost realizată cu sprijin parțial din grantul strategic POSDRU 107/1.5/S, ID77265, cofinanțat din Fondul Social European "Investește în oameni", în cadrul Programului Operațional Sectorial Dezvoltare Resurse Umane 2007-2013.

Adresez mulțumiri deosebite Universității din Wageningen pentru posibilitatea de a efectua o parte din experimentele din cadrul tezei de doctorat la Wageningen UR Food & Biobased Research.

ABREVIERI

OHL	lignina din lemn de esență tare extrasă prin procedeul „Organosolv”
SGWL	lignina din amestec de iarbă de tip Sarkanda și paie de grâu extrasă prin procedeul „Soda”
SWL	lignină din paie de grâu extrasă prin procedeul „Soda”
AWL	lignina din paie de grâu extrasă prin procedeul de tip „Soda” supusă ulterior unui pretratament alcalin
KSL	lignina din lemn de esență moale extrasă prin procedeul de tip „Kraft”
S	Siringil
G	Guaiacil
H	p-hidroxifenil
δ	parametrul de solubilitate Hildebrand
Mw	masa moleculară gravimetrică medie
Mn	masa moleculară numerică medie
PD	polidispersitatea (Mw/Mn)
A/W	acetona/apă
PCA	analiza componentelor principale
PLS	modele de regresie liniară
SEM	microscopie electronică de baleiaj
OHL-Lac	lignina OHL tratată cu lacază
SGWL-Lac	lignina SGWL tratată cu lacază
SWL-Lac	lignina SWL tratată cu lacază
AWL-Lac	lignina AWL tratată cu lacază
KSL-Lac	lignina KSL tratată cu lacază
K_M	constantă Michaelis-Menten
V_{max}	viteza maximă a reacției enzimatică
GluNH ₂	glucozamină
GYG	tripeptida glicil-tirosil-glicina
HPPA	acid 3,4-hidroxifenil propionic
ME	monoesterul sorbitolului cu HPPA
DE	diesterul sorbitolului cu HPPA
S-azina	siringaldazină
E	potențialul electrochimic
Ip	curentul de pic

1. STUDIU DE LITERATURĂ

1.1. Importanța temei și principalele obiective ale tezei

Lignina constituie unul din cei trei compuși majoritari din biomasa lignocelulozică alături de celuloză și hemiceluloză, fiind un polimer amorf tridimensional format din structuri de fenilpropan metoxilate. În pereții celulari ai plantelor, lignina umple spațiile dintre celuloză și hemiceluloză comportându-se ca o rășină care ține unită matricea lignocelulozică. Înrețelarea cu polimeri carbohidrați conferă sistemului forță și rigiditate. Cu toate că producția mondială de lignină ca și produs secundar în industria hârtiei a ajuns la 50×10^6 tone pe an, până în prezent, s-au găsit puține utilizări comerciale ale acesteia, devenind chiar o sursă de probleme ecologice. Degradarea ligninei este principala problemă în ciclul de carbon al pământului, deoarece majoritatea carbonului regenerabil este fie în lignină fie în compuși protejați de lignină în urma degradării enzimatică (celuloză și hemiceluloză). Biodegradarea ligninei este de asemenea responsabilă de multitudinea distrugerilor naturale care au loc la prelucrarea lemnului și poate să aibă un rol important în patogeneza plantelor. Pe de altă parte, au devenit atractive potențialele aplicații utilizând organisme care degradează lignina precum și enzimele acestora, deoarece acestea pot duce la realizarea unor tehnologii ecologice în industria celulozei și a hârtiei precum și în tratarea mai multor compuși xenobiotici, a unor vopsele și coloranți [1,2].

În ultimii ani au fost realizate o serie de cercetări în ceea ce privește lignina, nu doar legate de îmbunătățirea proceselor de extracție ale acesteia ci și pentru elucidarea structurii ligninelor, caracterizarea reactivității chimice și a proprietăților funcționale, dezvoltarea de noi aplicații. S-a arătat ca lignina este o moleculă versatilă care are mai multe proprietăți cum ar fi proprietăți antioxidante, adsorbție UV, este antifungică și prezintă activitate antibiotică și anticancerigenă. În afară de principalele utilități ale ligninei, aceea de sursă de energie și în tăbăcărie, aceasta mai prezintă aplicații în armarea polimerilor, ca și pesticide, dispersanți, emulgatori sau antioxidanți. În industria alimentară ligninele mai pot fi utilizate ca și stabilizatori datorită proprietăților antioxidante și antifungice pe care le prezintă [3].

Celuloza și lignina sunt cei mai răspândiți biopolimeri de pe Pământ. Ca și component majoritar în pereții celulari ai plantelor, lignina are un impact mare asupra agriculturii, industriei și mediului. De exemplu, în industria hârtiei lignina trebuie îndepărtată din bucățile de lemn în timpul procesului de fierbere pentru a se obține o hârtie de calitate bună. Lignina de asemenea reduce calitatea și digestibilitatea culturilor furajere cum ar fi culturile de lucernă. Pe baza seminificației sale economice în aceste industrii, lignina a fost un subiect foarte studiat în biochimia plantelor [4].

Interesul pentru modificarea fibrelor celulozice cu ajutorul enzimelor este unul de foarte mare actualitate. O varietate mare de enzime sunt capabile să acționeze asupra fibrelor lignocelulozice. Comparativ cu tratamentele chimice care necesită condiții de reacție dure care conduc la pierderea unor componenți doriți și utilizează reactivi toxici, tratamentul enzimatic are loc în condiții blânde mai puțin distructive pentru fibre și este mai ecologic.

Deoarece lignina este un polimer insolubil în soluții apoase, prima etapă în biodegradarea acesteia trebuie să fie extracelulară. Dovezi chimice și fiziologice arată că degradarea ligninei, precum și biosinteza acesteia, este predominant oxidativă, dar pot avea loc și reacții de reducere. Prin oxidarea ligninelor care conțin grupări fenolice libere este de așteptat să aibă loc și alte polimerizări, acest lucru fiind cel mai ușor de demonstrat *in vitro*.

Atât disponibilitatea cât și conținutul mare de subunități fenolice fac din lignină o resursă atractivă în obținerea de chimicale care la ora actuală sunt produse doar prin procese petrochimice. Astfel, lignina ca și material brut are marele avantaj că are în constituție structuri aromatice iar acest lucru poate fi un punct de plecare în sinteza altor compuși importanți. Marea provocare în acest sens o constituie ruperea polimerului de lignină în subunități monolignolice care să poată fi utilizate la obținerea de produși cu valoare adăugată în industria chimică și farmaceutică. În plus, delignificarea biomasei lemnoase poate îmbunătăți accesul către celuloză și hemiceluloză. Valorificarea ligninei se realizează prin izolarea acesteia din materialul lignocelulozic brut, urmată de ruperea acesteia în unități mai mici și separarea acestor fracțiuni. Există mai multe metode de fracționare chimică a ligninei lignine cu omogenitate mare, pentru a favoriza utilizarea biotehnologică. Solvenții organici sunt foarte eficienți în realizarea unor asemenea fracționări. Fracțiunile de lignină cu masa moleculară mică sunt materiale potențiale de inițiere a reacțiilor de biotransformare. A fost demonstrat că fracțiunile de lignină pot avea de asemenea un număr mare de proprietăți importante, cum ar fi caracterul antioxidant, iar grefarea mai multor molecule poate induce noi funcțiuni și proprietăți. În natură, degradarea ligninei are loc în timpul descompunerii biomasei.

În ultimii ani, studiul enzimelor care au capacitatea de a degrada lignina s-a bucurat de un interes deosebit, o serie de saprofite, în special din clasa fungiilor, fiind capabile să degradeze oxidativ lignina. Reacțiile catalizate de enzime, în afară de a fi ecologice, pot fi foarte eficiente în transformarea substraturilor specifice datorită selectivității lor ridicate. Ca rezultat, procesele biocatalitice au apărut ca alternative fezabile la mai multe procese chimice tradiționale, chiar și la scară industrială. În industria forestieră au fost aplicate o gamă largă de procese enzimatic [5,6], unele dintre cele mai utilizate enzime făcând parte din familia lacazelor [7]. Lacazele sunt enzime din clasa oxidoreductazelor care pot să oxideze o serie de compuși fenolici, inclusiv pe cei care se găsesc în compoziția ligninei [8].

Aceste enzime au o capacitate mare de a modifica proprietățile fizico-chimice ale ligninei, de exemplu modificarea solubilității și a hidrofobității polimerului prin intermediul reacțiilor de oxidare. Printre potențialele opțiuni de creștere a valorii ligninelor izolate sunt incluse adăugarea unor funcțiuni cheie sau a unor molecule direct la lignină, crescând astfel versatilitatea acesteia. Activitatea lacazelor pe compuși model cu molecule mici proveniți din lignină a fost raportată în mai multe publicații [9,10,11].

S-a demonstrat că lacazele sunt eficiente în modificarea ligninei și a fracțiunilor ligninei prin transformarea grupărilor funcționale specifice. În mod particular, lacaza poate cataliza oxidarea mai multor substraturi, incluzând fenoli, difenoli, aminofenoli, polifenoli, poliamine și alte molecule înrudite cu lignina [12].

Au fost realizate multe studii în căutarea unor tehnologii „ecologice” și simple pentru prelucrarea ligninei, în domeniul tratamentului enzimatic și a utilizării solvenților organici [13], dar se cunosc puține lucruri despre tratamentul și modificarea enzimatică a ligninelor în solvenți organici. Una dintre problemele cel mai des întâlnite a fost inactivarea enzimei în solvenți organici și găsirea unui mediu de reacție potrivit atât pentru solubilizarea ligninei cât și pentru păstrarea activității

catalitice a enzimei. Majoritatea ligninelor industriale sunt amestecuri eterogene cu o distribuție largă a masei moleculare, acest lucru având impact mare atât asupra proprietăților polimerului, cum ar fi solubilitatea și proprietățile mecanice, cât și asupra aplicațiilor industriale [14]. Fraționarea ligninelor prin extracție cu solvenți a dus la obținerea unor fracțiuni de lignine mai omogene, cu distribuție definită a masei moleculare și grupări chimice funcționale care pot fi modificate în continuare prin tratamente chimice sau enzimatică în vederea obținerii de derivați de lignină cu funcționalități noi [15,16]. Mattinen și colaboratorii au raportat modificarea funcționalității ligninei prin cuplare oxidativă cu molecule mici, utilizând lacaze în mediu apos. Cu toate acestea, la fel ca și alți polimeri hidrofobi, lignina nu este solubilă în apă, fapt care limitează amploarea posibilelor modificări enzimatică [17]. Precipitarea produșilor de polimerizare poate de asemenea să limiteze polimerizarea oxidativă a ligninei [18].

Bazat pe aceste argumente, utilizarea de solvenți organici miscibili cu apa în vederea creșterii solubilității substratului și produșilor reprezintă o temă de mare interes, pentru a implementa în practică modificarea enzimatică a ligninelor.

Cercetările efectuate în cadrul tezei de doctorat au urmărit fracționarea diferitelor tipuri de lignină cu solvenți organici miscibili cu apa în vederea creșterii solubilității substratului și produșilor pentru a spori modificarea enzimatică a ligninelor, selecția biocatalizatorului potrivit pentru reacțiile de cuplare enzimatică a ligninelor cu diferiți compuși hidrofilii precum și caracterizarea ligninelor și a produșilor obținuți în urma tratamentului enzimatic.

1.2. Lignina și fracțiunile de lignină

Valorificarea ligninei este un domeniu foarte studiat, această tematică prezentând un mare interes în domeniul biorafinării și economiei produselor biologice. Opțiunile de valorificare a ligninei vor fi decrișe pe larg în cele ce urmează, după o prezentare a ligninei ca și biopolimer și o discuție a proprietăților sale versatilitate și surprinzătoare. La ora actuală utilizăm în activitățile curente energie, materiale plastice, diferite chimicale, precum și combustibili pentru transport. Aceste produse de consum sunt originare în cea mai mare parte din resurse fosile, care mai devreme sau mai târziu vor fi epuizate și contribuie la creșterea emisiilor de CO₂ și la schimbarea climei. Drept urmare, se caută soluții alternative cu emisii scăzute de carbon, printre care vântul, energia solară și biomasa din plante. În timp ce energia poate fi produsă de vânt, sisteme solare și biomasă, celelalte produse de consum pot fi obținute numai din biomasă. Biomasa din plante poate fi o sursă alternativă potrivită și pentru a asigura necesarul de energie, a cărei aprovizionare a devenit nesigură datorită instabilității politice din unele țări producătoare și creșterii neașteptate a necesarului de petrol pentru economiile emergente.

Această resursă sustenabilă de biomasă este potrivită pentru utilizarea în cadrul economiei bazată pe produse „bio”, care în următorii ani se așteaptă să ia un avânt considerabil comparativ cu economia bazată pe resurse fosile. Acest tip de economie nu constă numai în implementarea de tehnologii inovative utilizând resurse regenerabile ci reprezintă o tranziție reală, cu un impact mare asupra societății la diferite nivele.

Biomasa lignocelulozică oferă multe posibilități pentru materii prime atât în ce privește producerea de energie cât și pentru industria chimică datorită compoziției sale chimice, disponibilității din abundență și costurilor relativ reduse atunci când transformarea acesteia în produși poate fi realizată într-un mod

4 Studiu de literatură - 1

economic și durabil. Această disponibilitate a biomasei este suportată de cantitățile mari de biomasă lignocelulozică produse anual în toată lumea, care se cifrează la aproximativ 200 miliarde de tone [19], comparativ cu 0,3 miliarde tone de produse chimice organice produse anual de către industria chimică [20].

Alte avantaje ale biomasei ca și materie primă sunt reducerea cererii de hidrocarburi brute și o dependență mai mică față de țările exportatoare de petrol, instabile din punct de vedere politic. În plus, criteriul de durabilitate și fixarea CO₂ atmosferic sunt argumente importante pentru utilizarea resurselor de biomasă.

Dezavantajele (sau provocările) în ce privește utilizarea biomasei sunt necesitatea de pământ arabil fertil și sisteme de colectare și depozitare mai complicate în manipularea acestui material organic cu densitate mai mică în comparație cu petrolul brut. Cum biomasa este în general un material heterogen și are o compoziție diferită față de resursele fosile, sunt necesare și condiții de procesare diferite. Conținutul de carbohidrați, proteine și compuși fenolici din biomasă oferă noi oportunități de a produce chimicale funcționalizate și diverse materiale. În contrast cu resursele petrochimice care trebuie cracate, descompuse și funcționalizate, biomasa necesită de obicei o defuncționalizare parțială.

Soluția cheie în utilizarea eficientă a biomasei este construirea unei biorafinării adecvate pentru separarea biomasei în compuşii săi majoritari, generând fracțiuni cu valoare adăugată mare. Schematic o biorafinărie agro-biocombustibili-biomateriale-bioputere care utilizează tehnologii durabile este dată în Figura 1.1. [21].

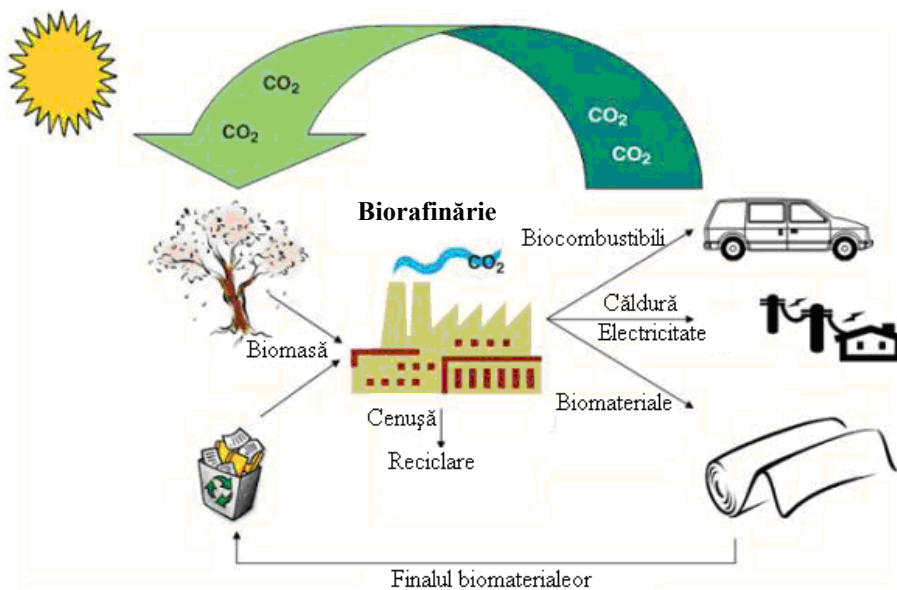


Figura 1.1. Ciclul complet agro-combustibili-biomateriale-bioputere pentru tehnologii durabile [21].

1.2.1. Noțiuni generale despre lignină

Termenul 'lignină' este derivat din latinescul 'lignum' care înseamnă lemn. Lignina este constituentul majoritar din structura pereților celulari ai tuturor plantelor cu vascularitate mare. Structura sa polifenolică este responsabilă pentru rolul său în biomasa lemnoasă și anume conferă rezistență la degradarea biologică și chimică. Acest lucru se întâmplă datorită naturii sale hidrofobe și insolubilității în sisteme apoase, prevenind accesul microorganismelor și substanțelor chimice degradante. Unitățile monomere de fenilpropan prezente în polimerii de lignină sunt legate între ele într-o rețea complexă prin intermediul diferitelor tipuri de legături eterice și esterice precum și prin legături carbon-carbon. Lignina care se găsește în pereții celulari ai plantelor este de obicei asociată cu structura polizaharidică a celulozei și hemicelulozei (Figura 1.2.) [22]. Lemnul și alte resurse lignocelulozice sunt folosite în extracția fibrelor de celuloză pentru confecționarea hârtiei sau în producția de celuloză în formă lichidă. Pentru îndepărtarea sau dizolvarea ligninei hidrofobe aceasta este degradată chimic sau modificată în condiții alcaline. Licoarea reziduală de culoare neagră care conține fracțiunile de lignină este cel mai des utilizată ca și materie primă pentru combustibilul utilizat în operarea utilajelor. În acest fel o mare parte (aprox. 40%) din carbonul fotosintetic fixat de plante este ineficient utilizat și eliberat în ecosistem sub formă de CO₂.

Mecanismele naturale de descompunere a ligninei includ biodegradarea cu ajutorul enzimelor microbiene și iradiere cu lumină provenită de la soare precum și fragmentarea la temperaturi ridicate sau sub presiune cu forfecare mecanică. Lignina este cunoscută pentru structura sa chimică complexă care este complicată și mai mult prin ruperea și rearanjarea necontrolată a legăturilor datorită reacțiilor de inițiere. Biodegradarea ligninei este un proces care poate avea loc în condiții aerobe sau anaerobe, cum ar fi în soluri de turbă și compost unde s-a găsit că ar fi stabilă pentru o perioadă de timp mai îndelungată. În știința solurilor aceste reziduuri de lignină au fost denumite ca humus insolubil sau acizi humici.

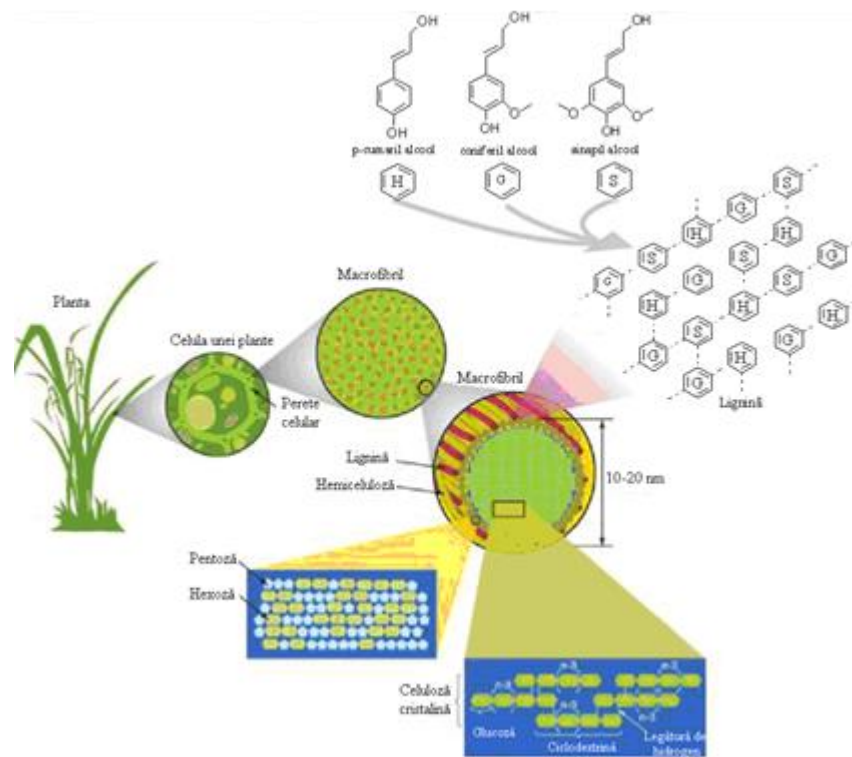


Figura 1.2. Structura biomasei lignocelulozice [21].

Pe lângă rezidul de lignină (leșie neagră), în industria celulozei și a hârtiei, a fost produs mai nou și un alt tip de reziduu de lignină. Odată cu dezvoltarea de biorafinării pentru transformarea biomasei lignocelulozice în zaharuri monomere în vederea fabricării de combustibili de generația a doua (2G) și de alți bioproduși, cum ar fi substanțe chimice "ecologice" și biopolimeri, va fi generată în lichidul de fermentație și o fracțiune reziduală nefermentabilă [20]. Această fracțiune provine în cea mai mare parte din lignină. Deoarece producția de fenoli rezultați în urma degradării ligninei pot să inhibe procesul de fermentare a etanolului [23], este recomandată îndepărtarea ligninei prin metode (bio)-chimice înainte ca procesele de zaharificare să aibă loc, contribuind astfel la creșterea producției de biocombustibili din materiale lignocelulozice [24].

În procesele de degradare a materialelor lignocelulozice este foarte bine cunoscută recalcitranta structurii polimerice a ligninei. Depolimerizarea acidă sau alcalină a ligninei va avea loc prin ruperea legăturilor esterice și a unor legături eterice, dar reactivitatea fragmentelor eliberate poate fi afectată de noi rearanjări sau chiar mai multe condensări ale structurii polimerice (Figura 1.3.). Astfel, condițiile de extracție aplicate materialelor lignocelulozice afectează substanțial structura și proprietățile ligninei (tehnice) obținute.

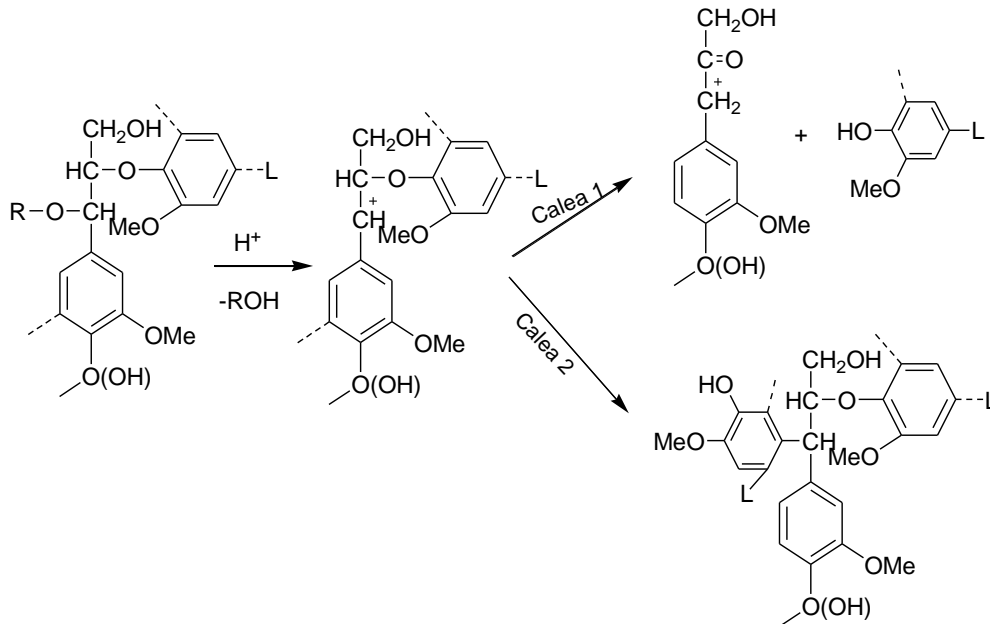


Figura 1.3. Schema de reacție în care este evidențiată competiția dintre depolimerizarea structurii β -O-4 (Calea 1) și repolimerizarea care implică o structură a ligninei (Calea 2) [24].

1.2.2. Structura ligninei

Lignina se găsește în lamelele mijlocii și pereții celulari secundari ai plantelor superioare și joacă un rol cheie în țesuturile constructive ca și material de construcție, conferind prin puterea și rigiditatea sa rezistență la tensiunile din mediu [25]. Conținutul de lignină poate să varieze în lemnul de esență moale între 24 - 33%, în lemnul de esență tare din zonele temperate între 19 - 28%, iar în lemnul de esență tare tropical între 26 - 35% [26]. În culturile de fibre nelemnoase conținutul de lignină este în general mai mic, de sub 3% în bumbac și de aprox. 11-15% în sisal și iută [3]. În ierburi sau în paiele de cereale conținutul de lignină variază între 15 - 25 % [27]. Comparativ cu lignina din materiale lemnoase, ligninele din culturile anuale, cum ar fi lignina din ierburi, s-au găsit a fi mai puțin condensate [28]. Câteva exemple de aceste lignine, cum ar fi lignina din paie de grâu și lignina extrasă din iarba Sarkanda, au fost studiate în această teză.

Pe lângă alte proprietăți importante ale ligninei în pereții celulari, descrise anterior, rolul său funcțional major în țesuturile lemnoase este că poate fi considerată o componentă structurală. Bio-compozitele sunt compuse dintr-o matrice tridimensională legată prin încrucișare (foarte similară cu rășinile termorigide cum ar fi rășinile de fenol-formaldehidă) armate cu fibre celulozice făcând legătura între celulele individuale. Înafară de rigiditatea sa, matricea de lignină necesită o flexibilitate mare atunci când forțele fizico-mecanice din exterior acționează asupra ei ducând la forfecare și deformare. Rearanjarea legăturilor din rețeaua de lignină, în condiții de stres externe, duce la polimeri mai condensati (cum au fost observați în compresia lemnului).

Mecanismele de auto-reparare din pereții celulari pot duce ușor la demetilare și demetoxilare, precum și la formarea de legături noi C-C și structuri aromatice. Acest fenomen este observat și atunci când fragmentele de lignină extrase au fost manipulate sau analizate. Moleculele tind să coaguleze în anumite condiții, fapt care complică substanțial manipularea ligninei.

Din punct de vedere chimic, ligninele sunt considerate polifenoli complecși și în ciuda multor eforturi de cercetare, chimia, biosinteza și biologia moleculară a acestora nu a fost complet înțeleasă [25,28]. Drept rezultat, structura ligninei nu este complet definită, deși mulți cercetători au publicat reprezentări promitente ale substructurilor ligninei. Au fost propuse mai multe modele pentru structura moleculei de lignină din diferite surse, dar datorită naturii foarte complicate a ligninei și a dificultăților întâmpinate în analizarea probelor de lignină ea nu a fost încă identificată complet. Modelele sunt doar reprezentări rezultate pe baza analizelor unor proporții relative a fiecărui tip de unitate din lignină și a fiecărui tip de legături găsite. (Figura 1.4) [30,31].

În ligninele din paie de cereale și ierburi prezența alcoolului cumarilic este tipică și duce la structuri de *p*-hidroxifenilpropan. Acești monolignoli sunt polimerizați prin procesul de cuplare radicalică care presupune legarea lor prin legături carbon-carbon sau eterice. Formarea unei asemenea legături poate avea loc în diferite locații, pe fiecare unitate fenolică, acest lucru permițând ca și alte tipuri de legături să fie posibile. Cel mai des întâlnite tipuri de legături găsite în molecula de lignină sunt $\beta - O - 4$, $\square - O - 4$, $\beta - 5$, $5 - 5$, $4 - O - 5$, $\beta - 1$ și $\beta - \beta$ (Tabelul 1.1.) [30]. Deși acestea sunt legăturile dominante în structura ligninei, cel puțin alte 20 de tipuri de legături au mai fost identificate [32]. Legăturile eterice sunt cunoscute ca fiind dominante în lignina nativă, estimându-se că aproximativ jumătate până la două treimi din numărul total al legăturilor prezente în lignină sunt de acest tip. Monolignolii pot fi legați trifuncțional, formând puncte de ramificații în polimer și conferindu-i o structură asemănătoare cu o rețea. Ținând cont de varietatea de legături care se pot forma, moleculele de lignină nu pot fi descrise ca o serie de unități repetitive regulate și bine definite cum sunt polimerii tradiționali. Din contră, lignina este un complex polimeric foarte neregulat [30].

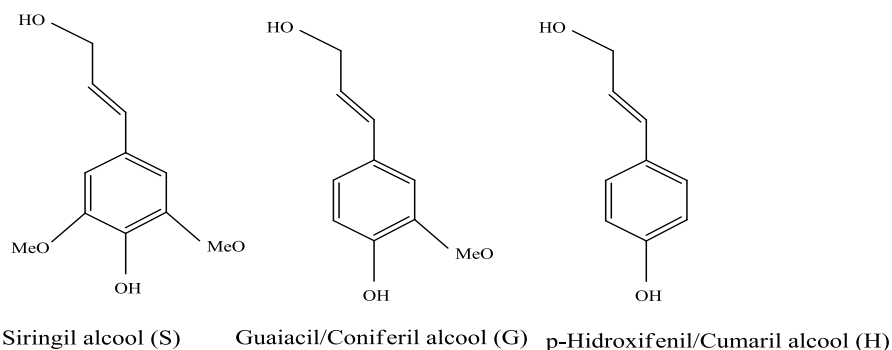


Figura 1.5. Cele trei structuri importante din lignină, Siringil (S), Guaiacil (G) și 4-Hidroxifenil (H).

Lignina conține o gamă largă de grupări chimice funcționale, care sunt parțial datorate metodei de extracție aplicate. Grupările principale în ligninele nemodificate sunt grupări hidroxil (aromatic și alifatic), metoxi, carbonil și carboxil (vezi Figura 1.7.). Solubilitatea ligninei este afectată de proporțiile acestor grupări funcționale; majoritatea ligninelor sunt solubile în soluții alcaline datorită ionizării grupărilor hidroxil și carboxil. Comportamentul ligninei în timpul procedurilor chimice și analitice, cum ar fi determinarea masei moleculare și a volumului hidrodinamic, poate fi atribuit modului de aranjare a inelelor aromatice ale elementelor structurale prezente în lignină, care pot cauza asocieri ne-covalente și interacțiuni de suprafață cu alți polimeri cum ar fi celuloza [33]. Gradul de metoxilare este asociat cu gradul de compactare al ligninei, datorită abilităților legăturilor β -O-4 de a permite aranjarea inelelor aromatice atunci când au loc mai multe substituții la grupările metoxi. Pe lângă gradul de compactare și gradul de flexibilitate ar fi de asemenea mai mare [34]. Mecanismele biochimice de polimerizare a protoligninei la rețele tridimensionale complexe cu masă moleculară mare sunt în mare parte nedezvăluite. Datorită implicării reacțiilor radicalice în timpul polimerizării dehidrogenative, metodele de legare chimică par a fi aleatorii și nu prezintă stereospecificitate, fapt excepțional pentru biopolimeri.

Un anumit grad de regio-specificitate și preferințe în formarea legăturilor β -O-4 a fost raportată și a fost sugerat și îndelung dezbătut faptul că proteinele dirigente joacă un rol de șablon în asamblarea ligninei [25].

Majoritatea legăturilor chimice (aproximativ două treimi) din rețeaua polimerică de lignină sunt de obicei legături eterice C - O - C, dintre unitățile fenilpropanoice predominante fiind legăturile β - O - 4, în timp ce aproximativ o treime este alcătuită din legături C - C între aceste unități (Tabelul 1.1. și Figura 1.6.). Tabelul 1.1. arată de asemenea diferențele considerabile dintre legăturile existente în ligninele care provin din lemn de esență tare și lemn de esență moale. În plus, lignina conține și structuri ramificate și încrucișate. Cu cât lignina este mai condensată cu atât este mai dificil de a o degrada și de a o dizolva în procesele de fracționare și delignificare. Lignina este separată de celelalte părți lignocelulozice din plante prin metode fizice și/sau chimice. Structura ligninei nu este influențată doar de sursa botanică a acesteia ci și de procesul de delignificare, procedurile de extracție, de puritate și proprietăți. În timpul procesului de delignificare a biomasei legăturile eterice și esterice vor fi în mare măsură rupte, iar fragmentele de lignină vor fi dizolvate. Lignina tehnică rezultată va fi semnificativ diferită comparativ cu lignina originală din biomasă. Diferențele dintre lignina nativă și ligninele tehnice au fost studiate și prezentate în capitolul de contribuții originale.

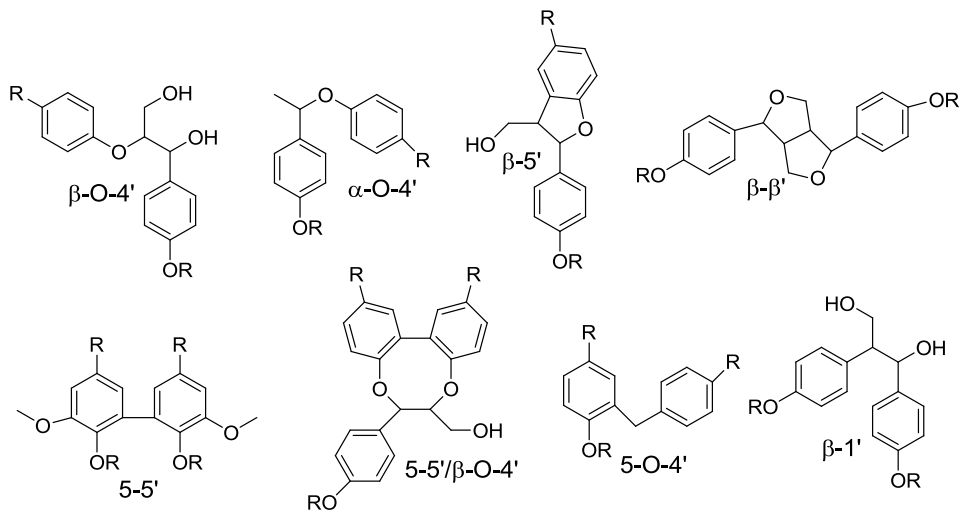
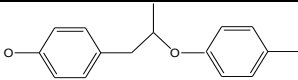
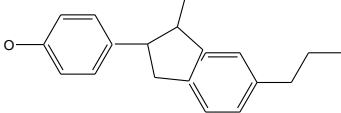
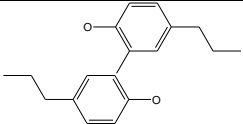
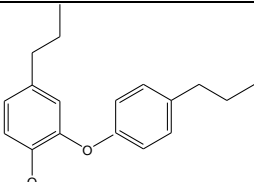
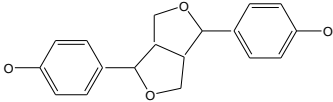
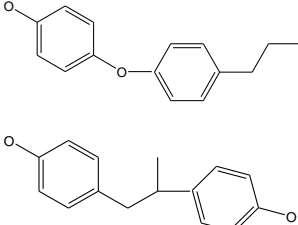


Figura 1.6. Legăturile chimice cele mai des întâlnite în structura ligninelor.

Tabelul 1.1. Frecvența (procente) diferitelor tipuri de legături prezente în ligninele extrase din lemn de esență moale și lemn de esență tare.

Nume	Structura	Lemn moale	Lemn tare
β -O-4		40-50	50-60
β -5		10-12	3
5-5		13	3
4-O-5		3	3
β - β		3	3
Legături în poziția 1		1-3	3

Complicând și mai mult imaginea moleculară a ligninei, chimia acesteia poate să varieze în funcție de originea sa. Speciile din care provin plantele, tipul de țesut și mediul extern au toate un rol în determinarea chimiei unei probe specifice de lignină. Lignina din diferite familii de plante este derivată din monolignoli diferiți, iar lignina este cel mai adesea clasificată în funcție de originea sa botanică. Două importante clasificări includ lignina extrasă din gimnosperme, derivată în cea mai mare parte din monolignoli ai alcoolului coniferilic, și lignina extrasă din angiosperme, derivată atât din monolignoli ai alcoolului coniferilic cât și ai alcoolului sinapilic [32]. Fiecare tip mai conține și proporții mici de unități de *p*-cumaril iar ligninele din materiale ne-lemnoase conțin o cantitate mai mare de unități de *p*-cumaril decât ligninele extrase din materiale lemnoase [35]. Sunt și excepții de la regulă, cum ar fi cazuri în care s-a găsit o cantitate mai mare de unități de alcool sinapilic în ligninele din gimnosperme sau mai multe unități coniferilice în ligninele

din angiosperme. Au fost identificați și alți monolignoli fenolici, dar în general aceștia se găsesc în cantități foarte mici în molecula de lignină [32]. Lignina este izolată din biomasa din plante prin proceduri care pe bazează pe depolimerizarea sau derivatizarea ligninei. Astfel, chimia ligninei este inevitabil schimbată de procedura de izolare și de proprietățile polimerice ale ligninei native, cum ar fi masa moleculară și temperatura de vitrifiere (T_g) care sunt dificil de măsurat. Masa moleculară gravimetrică medie (M_w) a ligninelor izolate se aseamănă foarte mult cu cea a ligninelor native, pentru ligninele extrase din lemn de esență moale fiind estimată la 20000, în timp ce pentru lignina din lemn de esență tare a fost găsită puțin mai mică [36].

1.2.3. Lignine tehnice obținute prin delignificarea materiilor lignocelulozice

Variabilitatea structurilor ligninelor tehnice este parțial cauzată de originea botanică a polifenolilor dar la fel de importante sunt și metodele de extracție folosite [35, 37]. Procesele de delignificare cel mai des utilizate în extracția ligninei din materialele lignocelulozice pentru producerea hârtiei vor fi descrise în continuare.

1.2.3.1. Delignificarea de tip Kraft

Cel mai des utilizat proces de fierbere chimică a lemnului este procesul de fierbere sulfat sau kraft, proces care utilizează sulfură de sodiu în condiții alcaline. Lignina este parțial scindată, iar grupările tiolice sunt introduse în poziția β a lanțului lateral de propan (Figura 1.7.). La ora actuală o singură companie produce lignină de tip Kraft comercială la o scală de aproximativ 60 kt/an [37].

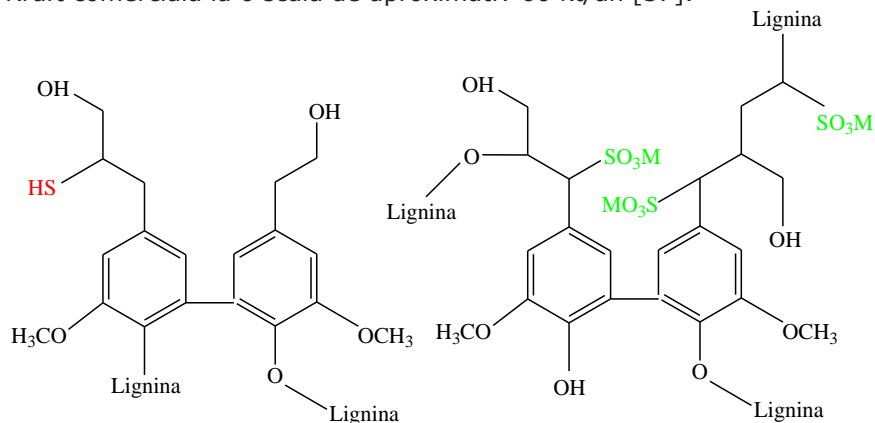


Figura 1.7. Structura simplificată a ligninei de tip Kraft cu grupări tiol introduse (în stânga) și a ligninei sulfonat (în dreapta) [38].

1.2.3.2. Delignificarea cu sulfit

După procedeul Kraft, delignificarea cu sulfit este cel mai des aplicată. În acest proces se utilizează o soluție apoasă de dioxid de sulf de diferite pH-uri. Grupările sulfonice sunt introduse în structura ligninei în poziția α a lanțului lateral de propan formându-se așa numiții lignosulfonați (Figura 1.7). Datorită grupărilor sulfonice majoritatea lignosulfonaților sunt solubili în apă diferențind aceste lignine

de ligninele obținute prin alte procedee de delignificare. Delignificarea cu sulfite nu îndepărtează selectiv lignina și carbohidrații care par să fie legați chimic de fragmentele lignosulfonice. În unele cazuri, ligninele purificate se obțin prin îndepărtarea impurităților de carbohidrați prin fermentare, îndepărtare chimică, ultrafiltrare sau precipitare selectivă. La ora actuală sunt produse aproximativ 1 Mt/an de lignosulfonați de diferite companii [38].

1.2.3.3. Delignificarea cu soluții alcaline

Acest proces utilizează hidroxid de sodiu în loc de sulfite pentru dizolvarea ligninei din materialele lignocelulozice, cum ar fi culturi de cânepă sau paie, și lemn. Lignina de tip „soda” este recuperată printr-un proces alternativ prin precipitare cu acid, maturare și filtrare ducând la obținerea de tipuri noi de lignină care nu conține sulf [39, 40, 41].

1.2.3.4. Procedeele „organosolv” și/sau procesul de fracționare

Utilizarea solvenților organici, de exemplu etanolul, permit evitarea formării de produși secundari cu sulf. Procesul „organosolv” sau fracționarea permit producerea de celuloză și lignină de înaltă calitate. Ligninele organosolv insolubile în apă sunt mai pure și conțin un procent mare de lignină. Cele mai utilizate procese „organosolv” sunt următoarele:

- Procesul „lignol”, bazat pe procesul de extracție de tip Alcell cu etanol/apă;
- Procesul „ASAM”, delignificare cu amestec Alcalin-Sulfite-Antrachinon Metanol;
- Procesul „organocel”, delignificare cu metanol urmată de delignificare cu amestec antrachinonă /NaOH;
- „Acetosolv”, cu amestec acid acetic / acid clorhidric;
- „Milox”, delignificare cu amestec de acid formic / apă oxigenată;
- „Avidel”, delignificare cu amestec de acid formic / acid acetic.

Aceste procese nu sunt comerciale încă, dar au fost demonstrate la scală pilot. Delignificarea organosolv sau fracționarea biomasei lignocelulozice este la ora actuală unul dintre pretratamentele des utilizate pentru producerea de celuloză de calitate mare în obținerea hârtiei și/sau a combustibililor precum și a ligninei de calitate mare în obținerea de materiale și chimicale. Compania canadiană „Lignol” [40] și compania franceză CIMV (proces de tip Avidel), [41] utilizează o metodă de fracționare de tip organosolv.

1.2.3.5. Pretratamentul și conversia biomasei (biorafinărie)

Câteva exemple de procese de transformare și pretratere a biomasei sunt pretraterea biomasei lignocelulozice cu lichide ionice, cu acid tare sau diluat, urmate de hidroliza enzimatică a carbohidraților [130, 167]. Frațiunile de lignină rezultate conțin o cantitate considerabilă de carbohidrați [42].

1.2.3.6. Explozia cu aburi

Biomasa lemnoasă este pretratăată cu abur la temperatură și presiune mare, urmată de o eliberare rapidă a presiunii.

Rețeaua fibroasă este distrusă formându-se mănunchiuri de fibre. În acest proces (autocatalitic), lignina hidrolizată cu acid poate fi extrasă din biomasă cu soluție alcalină sau solvenți organici [43]. Lignina rezultată după explozia cu abur are un conținut scăzut de carbohidrați și impurități extrase din lemn. Se aseamănă cu lignina nativă mai mult decât celelalte lignine tehnice obținute, deoarece schimbările în structura chimică sunt limitate la condițiile procesului.

1.2.4. Depolimerizarea ligninei

Obținerea de compuși chimici aromatici, care în mod obișnuit sunt obținuți din petrol rafinat, poate fi realizată din fracțiuni de lignină prin intermediul mai multor procese. Ruperea controlată a diferitelor tipuri de legături din lignină necesită informații legate de stabilitatea acelor legături în diferite condiții precum și cunoașterea mecanismului de descompunere al ligninei. Legăturile cel mai ușor hidrolizabile din lignină sunt legăturile esterice și eterice. Lignina poate fi degradată de lumina soarelui (UV), pe cale biologică cu ajutorul microorganismelor, precum și pe cale chimică în diferite condiții.

1.2.4.1. Ruperea legăturilor lignină-carbohidrați

În funcție de tipul de biomasă, în timpul procesului de pretratare/fracționare fracțiunile de lignină obținute pot fi contaminate cu diferite cantități de carbohidrați. Reziduurile de carbohidrați sunt de obicei persistente în lignine atunci când în timpul procesului de pretratare legăturile lignină-carbohidrat nu sunt complet distruse. Legăturile covalente dintre lignină și carbohidrați au fost studiate în diferite specii de plante, stabilindu-se că în complexul lignină-carbohidrat (LCC) se găsesc mai multe tipuri de legături. Lignina reziduală din pin obținută prin procedeul Kraft de delignificare este predominant legată de hemiceluloză și de polizaharide [44]. Legăturile LCC sunt de exemplu în *Ginkgo biloba* L. de tip eteric, esteric și acetal, cel mai adesea legate de C α din structura ligninei [45,46].

În ierburi acizii fenolici sunt prezenți sub forma acizilor ferulic și *p*-cumaric, care sunt esterificați adesea cu hemiceluloze și lignină. Esterii ferulat polizaharidici sunt implicați în cuplarea radicalică la obținerea moleculei de lignină [46].

1.2.4.2. Depolimerizarea biologică a ligninei

Degradarea biologică a biomasei lignocelulozice este esențială în închiderea ciclului de carbon. Degradarea microbiană a biomasei duce la formarea de humus (acizi humici) derivați din descompunerea incompletă a reziduurilor de lignină. Mușcăiurile albe sunt specializate în descompunerea ligninei din lemn pentru a se obține accesul la carbohidrații din pereții celulari. Degradarea lemnului cu ajutorul funghiilor duce la ruperea legăturilor din lignină de către enzime asistate și de alte influențe din mediul înconjurător (lumină, variații de temperatură, erodarea de către apă) care au loc în timpul putrezirii lemnului [47]. Microorganismele nu utilizează carbonul din lignină ca și sursă de energie, dar depind de valoarea nutrițională a carbohidraților. Enzimele lignolitice cel mai des utilizate (lacazele, peroxidazele) acționează prin generarea de radicali liberi care inițiază ruperea legăturilor din lignină.

1.2.4.3. Depolimerizarea chimică a ligninei

Depolimerizarea ligninei cu catalizatori bazici (BCD)

Cele mai multe studii cu privire la procesele de depolimerizare alcalină provin din industria celulozei și hârtiei, unde sunt folosite pentru a depolimeriza (hidroliza) și a extrage lignina din matricea lignocelulozică producând așa numitele „fibre lemnoase fără celuloză”. În timpul depolimerizării cu catalizatori bazici, pe lângă ruperea legăturilor β -O-4 din lignină mai are loc și scăderea conținutului de grupări metoxi în condiții alcaline severe.

Cu toate acestea, poate avea loc și repolimerizarea fragmentelor de lignină prin formarea de legături noi, cu obținere de produși de condensare [48]. Studiile cinetice realizate pe compuși model ai ligninei indică faptul că modul în care are loc substituția pe inelul aromatic afectează puternic viteza de hidroliză alcalină a legăturilor β -O-4 [49].

Depolimerizarea Ligninei Alcell organosolv în mediu alcalin are ca rezultat trecerea a 7-30% din produs în faza lichidă. Concentrația maximă de fenoli obținută a fost de 4,4%, în cea mai mare parte siringol (2,4%), urmată de o cantitate limitată de guaiacol când au fost aplicate condiții mai puțin severe. Catecolul a fost găsit la pH și temperatură mai mare. În lignina de tip Kraft disocierea grupelor fenolice a scăzut la temperaturi ridicate în soluție apoasă-alcalină. Recent s-a studiat degradarea catalitică bazică a ligninei Kraft cu formare de oligomeri în soluție de etanol-apă la 220-300 °C, cu fenol ca agent de reducere. În condițiile aplicate, lignina nu fost degradată complet la monomeri [50].

Depolimerizarea ligninei cu catalizatori acizi

Hidroliza compușilor model de lignină în condiții acide a demonstrat că în urma reacțiilor de eliminare a α -esterului rezultă produși intermediari benzilici care se rearanjează rapid în diferite cetone și produși de condensare [51]. Depolimerizarea ligninei Alcell folosind acid Lewis, catalizatori NiCl_2 și FeCl_3 , generează gaze, produse lichide și solide, formându-se inclusiv monomeri solubili în eter. Ambii catalizatori favorizează reacții de condensare ce conduc la reziduuri insolubile. S-au obținut randamente scăzute în monomeri organici, în special fenoli, urmați de cetone și aldehide [52].

Depolimerizarea oxidativă

În general, depolimerizarea oxidativă a ligninei este efectuată pentru a produce compuși aromatici cu o pondere mai mare de grupări care conțin oxigen, în majoritate aldehide. Producția de vanilină prin depolimerizarea oxidativă a ligninei din lichidul negru cu sulfit este bine cunoscută și se efectuează în general la 160-175 °C în mediu alcalin, folosind catalizator de cupru. Din lignina din lemn de esență moale rezultă cantități mari de vanilină comparativ cu lignina din lemn de esență tare, de unde se poate preleva în schimb siringaldehidă în cantități mai mari [53]. Utilizarea unui proces oxidativ umed alcalin pentru paie de grâu la temperatura de 195 °C și o presiune a oxigenului de 12 bari a condus la îndepărtarea unei cantități mari de lignină din celuloză, dar randamentele de fenoli monomerici au fost mici. În același proces, au fost recuperați doar acizi cu greutate moleculară mică [54].

1.2.5. Aplicații potențiale ale ligninei

Lignina pare a fi un material multifuncțional, potrivit pentru o mare diversitate de aplicații. Oportunitățile și provocările pentru biorafinăria ligninei au fost descrise extensiv, potențialele utilizări fiind următoarele [38]:

1. Obținerea de energie, combustibil și gaz de sinteză;
2. Obținerea de compuși macromoleculari;
3. Obținerea de compuși aromatici.

Aceste utilizări pot fi de asemenea grupate în trei categorii de obiective și anume (1) aplicații curente sau pe termen apropiat, (2) aplicații pe termen mediu și (3) aplicații pe termen lung.

Conform primului obiectiv, lignina este utilizată ca și sursă de carbon pentru producerea de energie sau este convertită în purtători de energie cum ar fi gazul de sinteză. Al doilea obiectiv utilizează natura macromoleculară a ligninei pentru aplicații ce necesită masă moleculară mare, cum ar fi adezivi pentru lemn (liantji), fibre de carbon și polimeri sub formă de spume poliuretanică [55,56]. Al treilea obiectiv grupează tehnologiile de scindare a structurii ligninei în monomeri, fără sacrificarea inelelor aromatice, pentru producția de blocuri de polimeri, monomeri aromatici cum ar fi benzenul, toluenul și xilenul (BTX), fenol și vanilină.



Figura 1.8. Aplicațiile potențiale ale ligninei.

Mulți cercetători au încercat în ultimii ani să dezvolte posibilele utilizări ale ligninei astfel încât să se poată profita de multitudinea de atribute pozitive pe care le are. Principalele elemente care stau la baza utilizării ligninei sunt [57]:

- Este disponibilă în cantități mari;
- Dacă este eliminată ca deșeu, leșia neagră poate fi un factor de risc serios în poluarea mediului;
- Valoarea energetică mare, datorită nucleelor aromatice;
- Un număr mare de grupări reactive prezente pe scheletul de carbon pot fi utilizate într-o gamă largă de reacții de substituție și aditie;
- Compatibilitate bună cu diferite substanțe chimice de bază;

- Are proprietăți coloidale și reologice excelente, în special în cazul acizilor lignosulfonici;
- Este un bun adsorbent și schimbător de ioni și prezintă proprietăți adezive;
- Este o sursă directă de diferiți compuși aromatici și fenolici.

În ciuda eforturilor făcute, doar câteva aplicații ale ligninei au fost realizate la scală industrială. Acest lucru este datorat în mare parte neomogenității ligninei, care este rezultatul variabilității naturale precum și metodelor neperformante de separare utilizate de industrie. La ora actuală, cea mai mare parte din lignina extrasă prin procese industriale este arsă ca biocombustibil pentru recuperarea energiei. Doar aproximativ 1 până la 2 % din lignina produsă comercial este utilizată în alte aplicații [58]. Cercetări pentru a găsi noi aplicabilități ale ligninei continuă în condițiile în care a crescut nevoia de a găsi alternative durabile la materiile prime industriale utilizate la ora actuală.

Au fost dezvoltate o serie de strategii pentru cercetările privitoare la utilizarea ligninei. O cale este de a înțelege proprietățile fiecărui tip de lignină industrială și de a le adapta la diferite aplicații specifice. O altă strategie este degradarea ligninei pentru a se obține compuși chimici care pot fi utilizați în diferite scopuri. O a treia posibilitate este să se profite de numeroasele grupări active de pe catena laterală a ligninei care pot da reacții chimice și de a gestiona proprietățile ligninei prin modificări chimice. Fiecare dintre aceste strategii au dus la rezultate promițătoare la scală de laborator și în unele cazuri ele au fost transpuse și la scală industrială.

1.3. Enzime care degradează lignina

Reacțiile chimice care au loc în organismele vii sunt mediate de biocatalizatori cu proprietăți remarcabile, cunoscuți sub denumirea de enzime. Capacitatea enzimelor de a crește de până la 10^7 ori viteza unei reacții, condițiile blânde de acțiune, specificitatea, selectivitatea și posibilitatea de reglare a activității, constituie avantaje majore ale acestora, comparativ cu catalizatorii chimici. Fiecare dintre reacțiile biochimice ale metabolismului celular sunt catalizate de câte o enzimă specifică. Enzimele sunt molecule proteice care funcționează eficient în condiții blânde necesare pentru menținerea funcționalității și integrității sistemelor biologice. Astfel, acestea sunt adaptate în mod natural pentru a funcționa în condiții fiziologice.

Datorită structurii sale foarte complexe și relativ aleatoare, lignina este foarte rezistentă la degradare [59]. Sistemele enzimatice de degradare a macromoleculei de lignină se confruntă cu diferite provocări. Substratul este un polimer heterogen cu masă moleculară mare care necesită atacul unor enzime extracelulare sau a unor agenți. Lignina nu conține legături hidrolizabile, prin urmare enzimele trebuie să fie oxidative. Structura stereochemic neregulată a ligninei necesită de asemenea un atac enzimatic nespecific comparativ cu alți polimeri naturali. Degradarea ligninei se realizează prin acțiunea sinergetică a unor oxidoreductaze, enzimele ligninolitice. Aceste enzime acționează printr-un mecanism de depolimerizare prin radicali liberi cu reactivitate ridicată. În Figura 1.9. este redat procesul de degradare a ligninei din materialele lignocelulozice pe cale enzimatică și pe cale chimică [60].

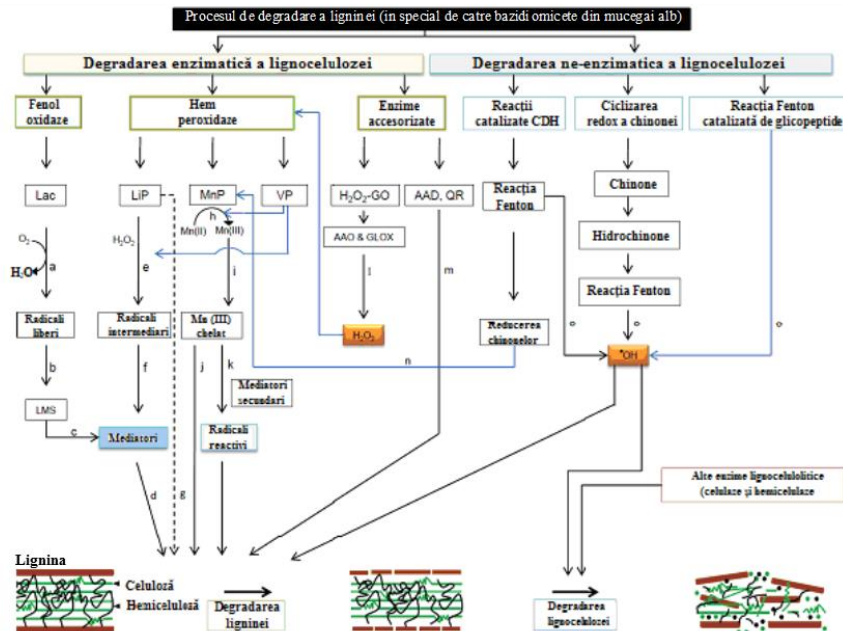


Figura 1.9. Procesul de degradare a ligninei [60].

În funcție de gradul de cristalinitate al ligninei, enzimele pot rupe diferite legături specifice existente în structura ligninei, variind în eficacitate, fiecare enzimă fiind specifică unei anumite legături chimice. Varietatea de legături chimice care se găsesc în lignină fac dificilă acțiunea specifică a centrului activ din enzimă necesitând astfel mai multe enzime pentru degradare, fiecare având un centru activ specific. Enzimele extracelulare implicate în degradarea ligninei sunt lignin peroxidazele (LiP, ligninaze, EC.1.11.1.14), manganperoxidazele (MnP, peroxidaze Mn - dependente, EC 1.11.1.13) precum și lacazele (benzendiol : oxigen oxidoreductaze, EC 1.10.3.2). Pe lângă acestea se mai găsesc câteva enzime implicate în producerea de peroxid de hidrogen și anume glioal oxidaza (GLOX) și aril alcool oxidaza (AAO) (EC 1.1.3.7).

În Tabelul 1.2. este prezentată o descriere generală a cofactorilor principali sau a substraturilor precum și principalele efecte sau reacții date de fiecare enzimă.

Tabelul 1.2. Enzime implicate în degradarea ligninei și în alte reacții principale.

Activitatea enzimei, abreviere	Cofactor sau substrat, mediator	Efectul principal al reacției
Lignin peroxidaza, Lip	H ₂ O ₂ , alcool veratrilic	Inel aromatic oxidat la radical cation
Mangan peroxidaza, Mnp	H ₂ O ₂ , Mn, acid organic ca și chelator, tioli, lipide nesaturate	Mn (II) oxidat la Mn(III), Mn(III) chelat oxidează compușii fenolici la radicali fenoxi; alte reacții în prezența compușilor adiționali.
Lacaza, Lacc	O ₂ ; mediatori hidroxi-benzotriazol sau ABTS	Fenolii oxidați la radicali fenoxi; alte reacții în prezența mediatorilor.
Glioxal oxidaza, GLOX	Glioxal, metil glioxal	Glioxalul oxidat la acid glioxalic; producere de H ₂ O ₂
Aril alcool oxidaza, AAO	Alcooli aromatici (alcool anisilic, veratrilic)	Alcooli aromatici oxidați la aldehide; producere de H ₂ O ₂
Alte enzime producătoare de H ₂ O ₂	Majoritatea compușilor organici	O ₂ redus la H ₂ O ₂

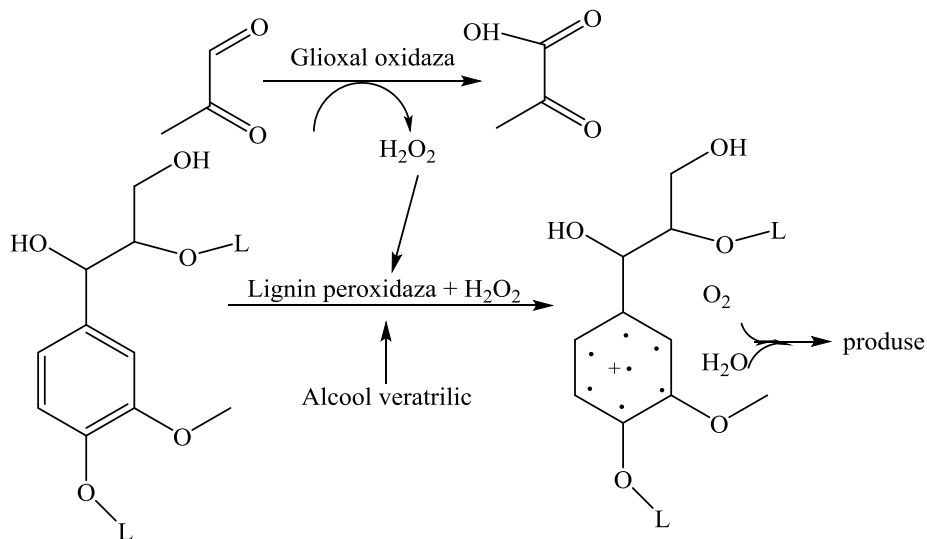


Figura 1.10a. Reacțiile simplificate catalizate de lignin peroxidază și glioxal oxidază

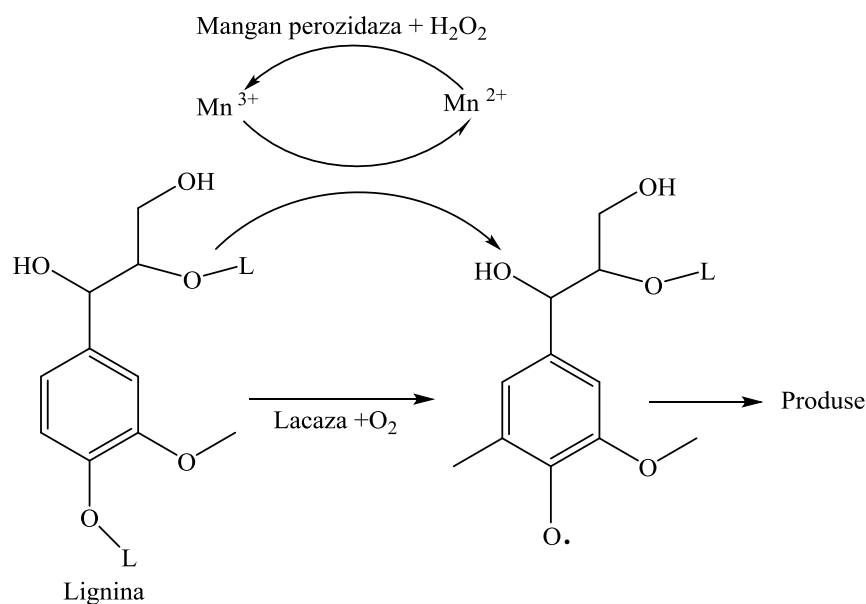


Figura 1.10b. Reacțiile simplificate catalizate de mangan peroxidază și lacază

1.3.1. Peroxidazele

1.3.1.1. Lignin peroxidaza (LiP)

Peroxidazele (E.C.1.11.1.7) sunt enzime care catalizează o serie de reacții de oxidare și hidroxilare, utilizând peroxid de hidrogen (H₂O₂) ca și acceptor de electroni [59].

Lignin peroxidaza este o glicoproteină care conține complexul fier (III) - protoporfirină IX ca și grupare prostetică cu un rest de histidină (His 173) coordonată la atomul de fier, diferind de celelalte hem peroxidaze prin abilitatea sa de a oxida cu potențial redox relativ mare subunitățile aromatice nefenolice din lignină (de exemplu legăturile arilglicerol-β-aril-eterice) [61]. Lignin peroxidazele oxidează substraturile prin transfer de electroni în mai multe etape, formând radicali intermediari cum ar fi radicalii fenoxi și cationii radical ai alcoolului veratrilic. Acești radicali intermediari participă la reacții non-enzimatice cum ar fi cele de cuplare radicalică și polimerizare, rupere a catenei laterale, demetilare și adiție intramoleculară. Spre deosebire de alte peroxidaze cum ar fi manganperoxidaza, LiP este capabilă să oxideze substraturile aromatice nefenolice și nu necesită participarea unor mediatori, datorită potențialului său redox neobișnuit de mare [62].

1.3.1.2. Mangan peroxidaza (MnP)

Mangan peroxidazele se găsesc în majoritatea mucegaiurilor albe și sunt similare cu peroxidazele convenționale, exceptând faptul că Mn(II) este în mod obligatoriu donor de electron pentru radicalul complexului Fe(IV)-oxo porfirină format în etapa anterioară de legare a H₂O₂ în centrul activ al enzimei, rezultând astfel Mn (III). Această reacție necesită prezența unor agenți chelatori cum ar fi glicolat sau oxalat, care stabilizează Mn (III) și ajută la eliberarea sa din enzimă. Chelatorii de Mn (III) rezultați sunt agenți de oxidare cu molecule mici, difuzibili, care pot să acționeze la o anumită distanță de centrul activ al MnP. MnP nu este un oxidant puternic și prin urmare aceste enzime sunt în imposibilitatea de a ataca structurile nefenolice recalcitrante predominante în lignină. Cu toate acestea chelatorii de Mn (III) oxidează structurile fenolice mai reactive care alcătuiesc aproximativ 10% din lignină. Aceste reacții au ca rezultat un grad limitat de lignoliză prin ruperea legăturii Ca arilice și alte reacții degradative. Chelatorii de Mn (III) pot să penetreze lemnul în profunzime datorită dimensiunilor mici și să inițieze delignificarea pentru a facilita mai târziu atacul LiP care este un oxidant mai puternic și mai voluminos [63].

1.3.2. Lacaza

Lacaza (benzendiol : oxigen reductaza, EC 1.10.3.2) aparține unui grup mic de enzime numite proteine de cupru sau oxidaze de cupru de culoare albastră, alături de oxidaze din plante de tip ascorbat și proteine plasmatică din mamifere numite ceruloplasmine [64,65]. Aceste proteine sunt caracterizate prin faptul că au în componența lor patru atomi de cupru cu rol catalitic. Un atom de cupru este plasat în locul T1 unde se leagă substratul reducător și este responsabil de culoarea caracteristică albastru-spre-verde în faza de oxidare la Cu²⁺ [64, 66]. Ceilalți trei atomi de cupru sunt grupați în locul numit T2/T3, unde are loc legarea oxigenului molecular.

Lacaza este în mare măsură răspândită în plantele superioare și ciuperci [67], dar a mai fost găsită și în insecte și bacterii. Recent, o nouă polifenol oxidază cu activitate asemănătoare cu cea a lacazei a fost extrasă din microflora rumenului de la bovine [68].

Yoshida a descris pentru prima dată lacaza în 1883, când a extras-o din exudatele unui copac japonez numit *Rhus vernicifera* [64, 69, 70]. În 1896, Bertrand și Laborte au demonstrat pentru prima dată că lacaza este prezentă și în fungi [64, 69]. De atunci, lacazele au mai fost găsite în *Ascomycete*, *Deuteromycete* și *Basidiomycete*, găsindu-se din abundență în multe ciuperci care sunt implicate în metabolismul ligninei [71, 72]. Lacazele din ciuperci au potențial redox mai mare decât cele din plante și bacterii (mai mare de +800 mV), iar acțiunea lor pare să fie relevantă în natură, având de asemenea aplicații importante în biotehnologie. Astfel, lacazele din ciuperci sunt implicate în degradarea ligninei sau în îndepărtarea fenolilor cu potențial toxic care rezultă în timpul degradării ligninei [64].

Referitor la utilizările lor în domeniul biotehnologic, lacazele extrase din ciuperci au foarte multe aplicații, de la eluenți de decolorare și detoxifiere până la agenți de înălbire a hârtiei, îndepărtarea fenolilor din vinuri, în sinteze organice, pentru biosenzori, la sinteza unor medicamente și coloranți, în detergenți și prafuri pentru spălare [73]. Utilizările biotehnologice ale lacazei au fost extinse prin introducerea de mediatori ai lacazei, care sunt capabili să oxideze compuși

nefenolici care altfel nu pot fi oxidați sau sunt greu de oxidat de către enzima singură.

1.3.2.1. Modul de acțiune al lacazei

Lacazele conțin 4 atomi de cupru numiți Cu T1 (unde are loc reducerea substratului) și grupul trinuclear de cupru T2/T3 (unde se leagă oxigenul și este redus la apă). Figura 1.11. care prezintă structura lacazei din *Trametes versicolor*.

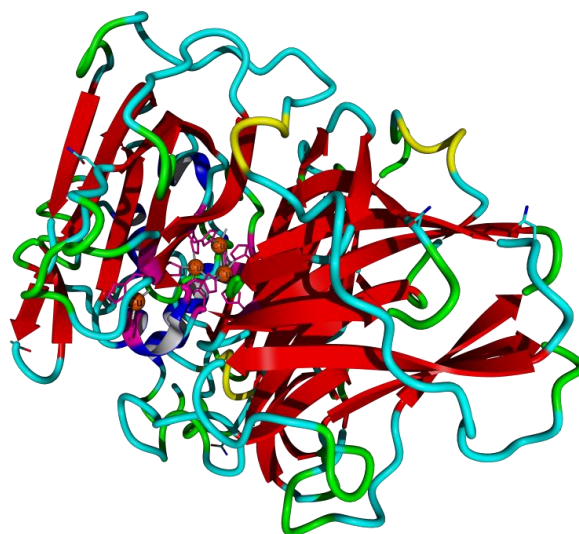


Figura 1.11. Structura lacazei din *Trametes versicolor*.

Cum oxidarea unui electron din substrat este cuplată cu reducerea a patru electroni de oxigen, mecanismul de reacție nu este simplu. Lacaza poate astfel să opereze ca o baterie, captând electroni din reacțiile de oxidare pentru a reduce oxigenul molecular. Astfel, este necesară oxidarea a patru molecule reducătoare din substrat pentru reducerea completă a oxigenului molecular la apă. În termeni generali, oxidarea substratului de către lacază este o reacție a unui singur electron, generând un radical liber.

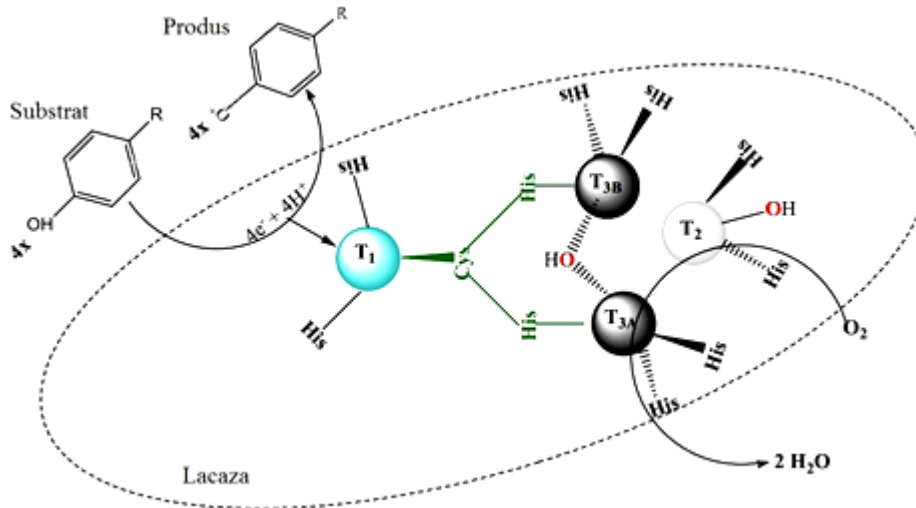


Figura 1.12. Reducerea cuprului monomolecular T1 din lacază.

Produsul inițial este instabil, putând avea loc o a doua reacție de oxidare catalizată de enzimă sau o reacție ne-enzimatică cum ar fi o reacție de hidratare, disproporționare sau polimerizare. Legăturile substratului natural, în cazul nostru lignina, care sunt scindate de lacază sunt modificate prin oxidare la $C\alpha$, ruperea legăturilor $C\alpha - C\beta$ și aril-alchil (Figura 1.13.). Lacazele sunt similare altor enzime fenol-oxidative, care polimerizează lignina prin cuplarea radicalilor fenoxi formați după oxidarea grupărilor fenolice din lignină [71]. Datorită acestei specificități pentru subunitățile fenolice din lignină și accesului său restrâns la lignina din pereții fibroși, lacaza are efect limitat în procedeul de albire a hârtiei dacă nu se folosesc mediatori redox (de exemplu acid 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) (ABTS)) (Figura 1.14.) [74].

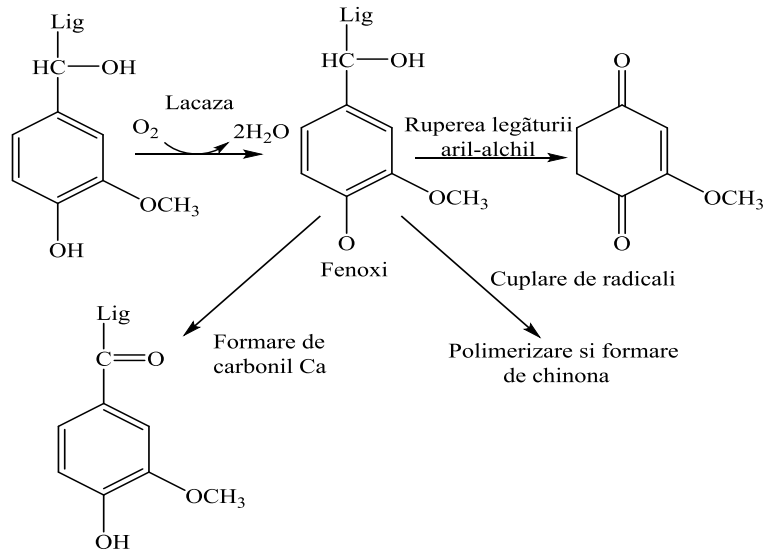


Figura 1.13. Căi de reacție posibile la oxidarea cu lacază a subunităților fenolice din lignină.

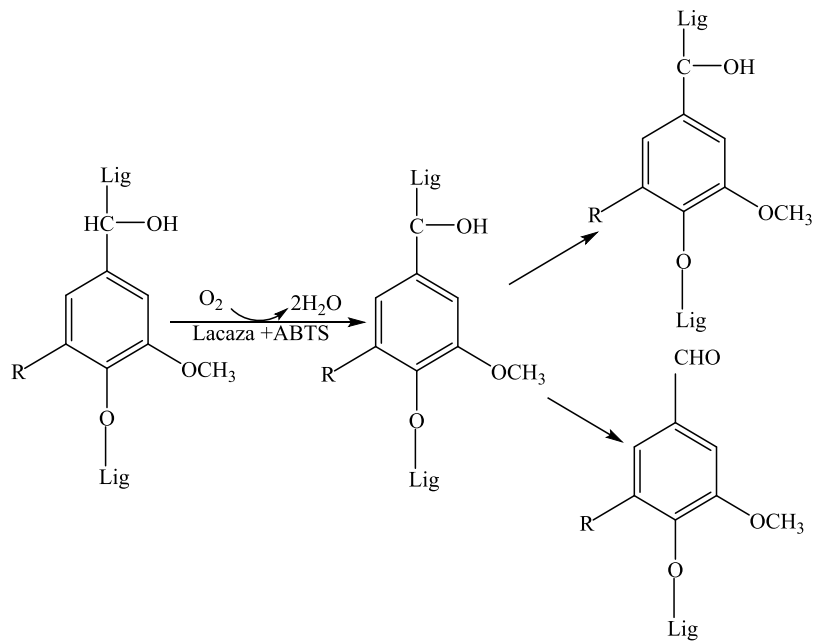


Figura 1.14. Oxidarea subunităților non-fenolice a compușilor model din lignină prin sistemul mediator al lacazei.

1.3.2.2. Sistemul mediator al lacazei

Spre deosebire de celelalte enzime lignolitice, lacaza poate să oxideze doar fragmentele fenolice din lignină datorită naturii polimerice aleatoare a ligninei și a potențialului redox scăzut al lacazei. Compușii cu masă moleculară mică și cu potențial redox mai mare decât al lacazei (> 900 mV) numiți mediatori pot fi utilizați la oxidarea părților nefenolice din lignină [75] (Figura 1.14.).

Mediatorii sunt molecule mici care acționează ca un fel de „electron oscilant”: odată ce este oxidat de către enzimă, mediatorul generează un intermediar puternic oxidant, co-mediator (mediator oxidat), care difuzează departe de centrul enzimatic oxidând în schimb orice substrat care datorită mărimii sale nu se încadrează în centrul activ. Mai mult, utilizarea mediatorilor permite oxidarea polimerilor, înlăturând problemele inerente de împiedicare sterică (enzima și polimerul nu trebuie să interacționeze într-o manieră directă) (Figura 1.15.) [76].

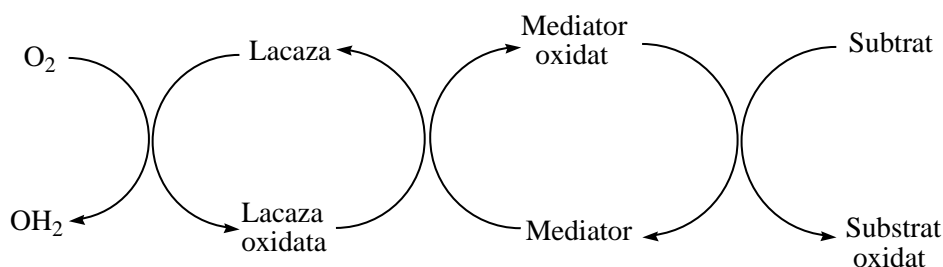


Figura 1.15. Ciclul sistemului catalitic mediator de oxidare al lacazei [74].

Alternativ, mediatorul oxidat se poate baza pe un mecanism de oxidare care nu este valabil pentru enzimă, extinzând astfel gama de substraturi accesibile [77]. Prin urmare, este foarte important să se înțeleagă natura mecanismului de reacție care are loc la oxidarea substratului de către mediatorul oxidat derivat din mediatorii corespunzători studiați. În oxidarea substraturilor ne-fenolice dependente de lacază, există dovezi care atestă mecanismul de transfer al unui electron prin intermediul mediatorului ABTS în substraturi care au potențial scăzut de oxidare. Alternativ, calea de transfer a unui radical de hidrogen poate fi realizată cu mediatorii de tipul N – OH, dacă în substrat se găsesc legături C – H slabe [60].

1.3.2.3. Aplicații ale lacazelor

Industria alimentară

În industria alimentară lacazele pot fi aplicate în cazul anumitor procese/proceduri care îmbunătățesc/scot în evidență și/sau modifică culoarea alimentelor și a băuturilor. O aplicație interesantă a lacazelor, în această domeniu, este eliminarea fenolilor nedorți, responsabili pentru maronirea, încheșurarea și formarea turbidității în sucurile de fructe, bere și vin. Actualmente lacazele prezintă interes în domenii cum ar fi cel de panificație datorită abilității acestora de a [78] între ele biopolimerii. Tot în această categorie, lacaza din *Trametes hirsuta*, crește rezistența maximă a aluatului și micșorează extensibilitatea în cazurile de aluat cu făină sau gluten.

S-a mai menționat o potențială aplicație a lacazelor în diversele ramuri a industriei alimentare, cum ar fi bioremedierea, procesarea băuturilor, determinarea acidului ascorbic, formarea de geluri din pectina rezultată din sfeclade zahăr, coacere/prăjire și ca și biosenzor. Dar este nevoie de studierea tehnicilor cu cost scăzut a obținerii și a imobilizării lacazelor pentru a mări spectrul de aplicabilitate a acestor enzime[79].

Industria hârtiei și a fibrelor lignocelulozice.

Prepararea industrială a hârtiei necesită separarea și degradarea ligninei din fibrele de lemn. Din considerente de poluare a mediului înconjurător se grăbește înlocuirea delignificării convenționale care se bazează pe folosirea clorului și a înălbitorilor. Din 1997 s-a introdus delignificarea cu oxigen dar pretratarea fibrelor lemnoase cu enzime lignolitice s-ar putea dovedi a fi procedee mai blânde și mai curate și deasemenea păstrează integritatea celulozei [80]. Cu toate că s-au studiat intens sistemele de bio-înălbirea, deocamdată doar câteva tratamente enzimatic prezintă capacități de delignificare/înălbire comparativ cu tehnicile clasice chimice.

Capacitatea lacazelor de a forma radicali reactivi în lignină, poate fi folosită pentru a atinge anumite modificări a fibrelor de lemn. Lacazele pot fi folosite în lipirea/adeziunea enzimatică a fibrelor, devenind utile în fabricarea materialelor compozite bazate pe lignoceluloză cum ar fi plăcile din fibre. Deasemenea, s-a propus folosirea lacazelor pentru activarea ligninei și a legăturilor dintre fibre în cursul procesului de fabricație a compozitelor, rezultând ca și produse plăci cu proprietăți mecanice bune fără folosirea unor substanțe adezive toxice. Tot în această ordine de idei, pentru îmbunătățirea proprietăților mecanice și chimice a plăcilor prin folosirea lacazelor pentru funcționalizarea fibrelor lignocelulozice. Studii preliminare au arătat capacitatea lacazelor de a grefa/adăuga derivați fenolici (acizi) pe suprafața fibrelor. Această capacitate poate fi folosită pentru a adăuga diverși compuși chimici pe suprafața fibrelor, rezultând materiale cu proprietăți complet noi, cum ar fi hidrofobitate sau încărcare electrică [81].

Industria textilă

Industria textilă folosește aproximativ 67% din totalul pieței de coloranți, consumând volume mari de apă și chimicale pentru procesarea textilelor. O parte dintre chimicalele, aditivii și coloranții folosiți sunt fabricate din substanțe cancerigene cum ar fi benzidine și compuși aromatici. Din acest motiv, tratarea apelor reziduale rezultate din procesele industriei textile prezintă probleme majore. Lacazele au capacitatea de a degrada coloranții cu diferite structuri chimice, inclusiv cele sintetice, fiind aplicate pentru epurarea apelor. Alte posibile utilizări în această ramură a industriei pot fi înălbirea textilelor și chiar sinteza coloranților.

Din 1996, în Danemarca există prima linie de finisare/înălbire a textilelor denumite "Denim", care folosește un proces bazat pe lacaze cu ajutorul unei molecule mediatoare, prin care s-a obținut degradarea colorantului indigo într-un fel specific. Produsul/procesul se numește Zylite [82].

Nano-bio-tehnologii

Lacazele fiind capabile să catalizeze reacții cu transfer de electroni fără factori adiționali, s-a studiat folosirea lor ca biosenzori pentru detectarea compușilor fenolici, a oxigenului sau azidelor, ca detectori pentru morfină și codeină, catecolamină și pentru electroiluminescență [83].

Bio-remedierea solului

Proprietățile catalitice a lacazelor sunt capabile să descompună hidrocarburile aromatice policiclice, care reprezintă o sursă de poluare pentru sol. Detoxifierea solului de reziduri de muniție este posibilă prin medierea de către o lacază a reacției de cuplare a metaboliților reduși a TNT-ului la o matrice organică a solului [84].

Chimia sintetică

În chimia de sinteză lacazele pot fi utilizate în reacții de deprotezare oxidativă și producerea de polimeri complecși și compuși cu rol medical [85].

Industria cosmeticelor

Prin înlocuirea apei oxigenate în procesul de formulare a coloranților folosiți în vopselele de păr rezultă un produs mai puțin iritant. Cu ajutorul lacazelor s-au obținut de asemenea cosmetice și produse dermatologice cu conținut de proteine, folosite pentru albirea pielii.

Cel mai mare obstacol în calea aplicabilității comerciale a lacazelor sunt stocurile insuficiente de enzime și costul mediatorilor redox. Au fost deja efectuate demersuri importante în această privință și se așteaptă ca lacazele să fie capabile să concureze cu proceduri chimice consacrate, cum este înălbirea cu clor [79].

1.4. Reacțiile de oxidare a compușilor model din lignină și a ligninei în prezența lacazei

A fost demonstrat faptul că lacaza catalizează oxidarea fenolului, iar radicalul fenoxi rezultat participă mai departe în reacții ne-enzimatice. Astfel, producții rezultați din reacțiile de oxidare a compușilor model din lignină catalizate de lacază depind în mare măsură de structura chimică a moleculei reducătoare.

Lignina poate fi polimerizată cu ajutorul lacazei, obținându-se polimeri cu masă moleculară mare și structură chimică complexă. Lacazele au demonstrat de asemenea capacitatea de a activa fibrele de lignină, acestea putând fi modificate prin grefarea de diferite molecule pe suprafața acestora [86, 87]. În continuare, vor fi prezentate câteva reacții de oxidare ale diferiților compuși model din lignină cu ajutorul lacazei, pentru a înțelege mai bine modificările care pot avea loc în urma polimerizărilor oxidative ale ligninelor.

1.4.1. Compuși model ai ligninei de tipul monomerului siringil

Monomerii de tip siringil au în compoziția lor două grupări de tip metoxi, care împiedică realizarea reacțiilor de cuplare în pozițiile 3- și 5-. Reacțiile de cuplare pot avea loc în poziția 4- și 1-, atunci când acestea nu conțin substituenți

sau când aceștia sunt grupări care pot fi înlocuite cu ușurință. Mai mulți monomeri siringilici cum ar fi 2,6-dimetoxifenol, acidul siringic, alcoolul siringilic și alcoolul α -metilsiringilic pot lua parte la reacții de cuplare cu formare de produși oligomeri sau polimeri de forma 1-O-4'. Acești compuși sunt de asemenea oxidați cu formare de produși noi, în funcție de structura catenei laterale (Figura 1.16.) iar distribuția produșilor este dependentă de pH, proveniența lacazei neafectând această distribuție. Produsul principal obținut din 2,6-dimetoxifenol, pe lângă cel obținut prin adăugare de tip 1-O-4', a fost produsul obținut prin cuplare în poziția 4-4' și anume 2,2',6,6'-tetrametoxi-1,1'-dichinona, care a rezultat în urma formării unei legături C-C [88, 89, 90].

Un alt produs minoritar care se poate forma în urma reacției 2,6-dimetoxifenolului cu lacază este forma demetilată a dimerului 4-4'. Cuplarea monomerilor de tip siringil poate de asemenea să aibă loc prin intermediul unei catene laterale adecvate. Compusul model 4-metilsiringol este oxidat de lacază și formează produși de tipul α - α' și α -O-4' (Figura 1.17.) [90]. Produsul α - α' poate fi oxidat în continuare cu formarea unui produs cu structură asemănătoare cu cea a stilbenului, care și acesta reacționează mai departe cu compuşii nucleofili din mediul de reacție.

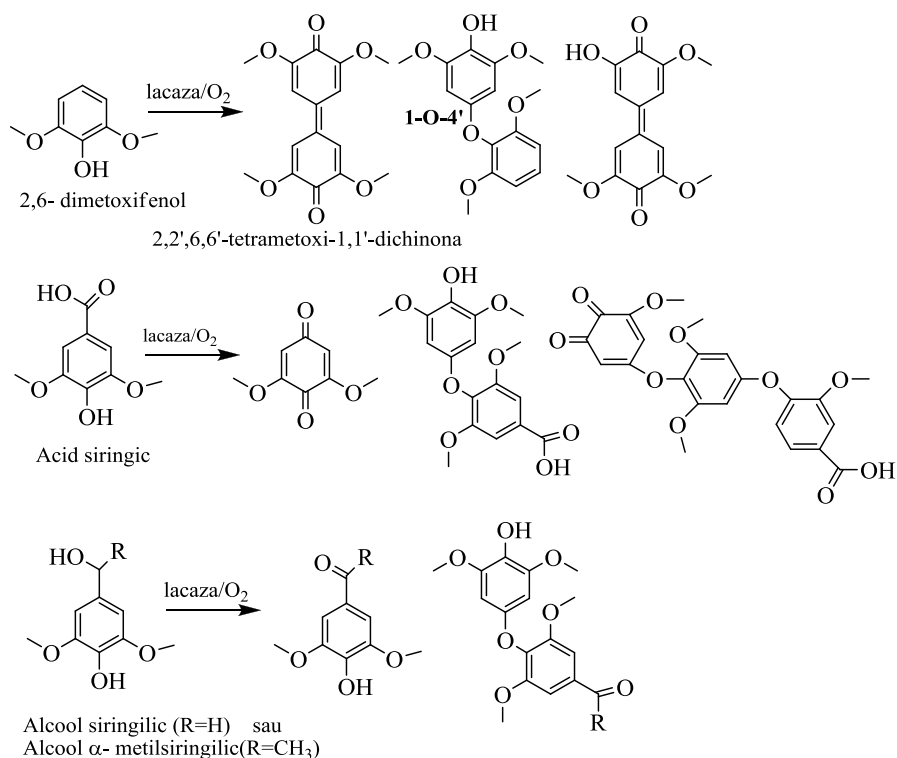


Figura 1.16. Produșii de reacție care se formează în reacțiile catalizate de lacază ale 2,6-dimetoxifenolului, acidului siringic, alcoolului siringilic și a alcoolului metilsiringilic [89, 90].

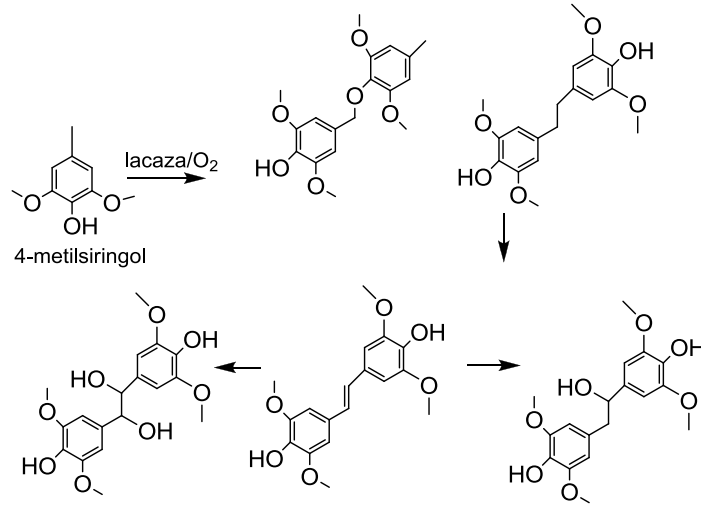


Figura 1.17. Producții care se formează din 4-metilsiringol în reacția catalizată de lacază [90]

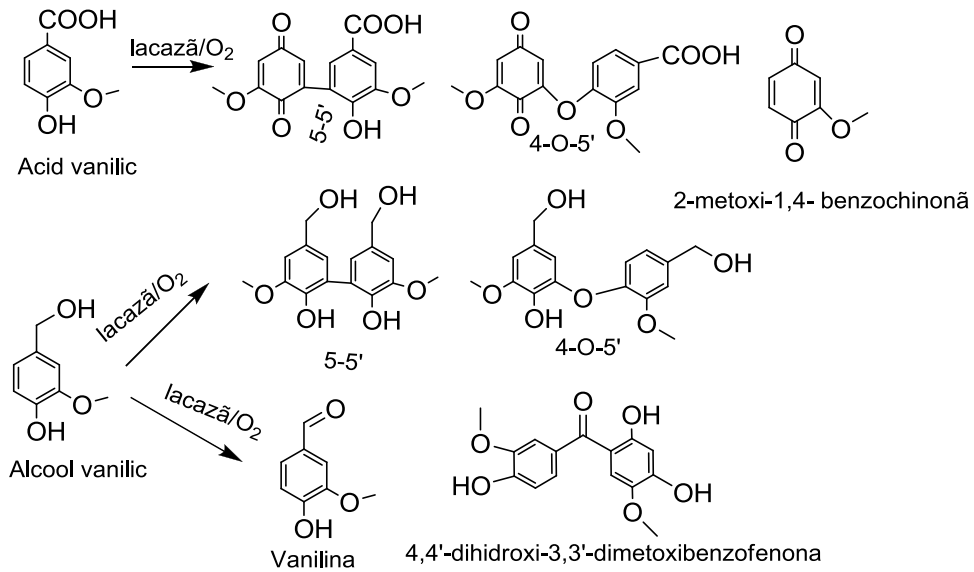


Figura 1.18. Producții de reacție care se formează în urma reacțiilor catalizate de lacază a acidului vanilic și vanilin alcoolului [88].

1.4.2. Compuși model ai ligninei de tipul monomerului guaiacil

Spre deosebire de compușii siringilici, la monomerii de tip guaiacil pot să aibă loc reacții de cuplare în poziția 5 a scheletului aromatic. Alcoolul vanilic și acidul vanilic pot participa în reacții de cuplare în prezența lacazei ca și catalizator, cu formare de produși în pozițiile 5-5' și 4-O-5' (Figura 1.18.) [88, 89, 90]. În aceste reacții s-a observat de asemenea că distribuția produșilor nu a fost afectată de originea lacazei, o contribuție mare având pH-ul mediului de reacție în care s-a lucrat. Oxidarea acidului vanilic de către lacază a dus la obținerea de 2-metoxi-1,4-benzochinonă atunci când s-a lucrat la un pH acid [89]. În cazul alcoolului vanilic, la pH mai scăzut a fost favorizată formarea produsului 5-5'. Interesant a fost că Areskog și colaboratorii (2010) și Crestini și colaboratorii (2003) [87, 90, 91, 92] au găsit un set de produși complet diferiți în urma oxidării alcoolului vanilic în prezența lacazei și anume produși 5-5' și 4-O-5' în primul studiu, respectiv vanilină și 4,4'-dihidroxi-3,3'-dimetoxibenzofenonă în cel de-al doilea (Figura 1.18.). Alcoolul coniferilic, care este monolignolul din care se formează unitatea de tip guaiacil (G) în lignină, poate fi oxidat de către lacază cu formare de structuri tipice de dehidropolimer și anume β -O-4', β -5, β - β' și 5-5' [93].

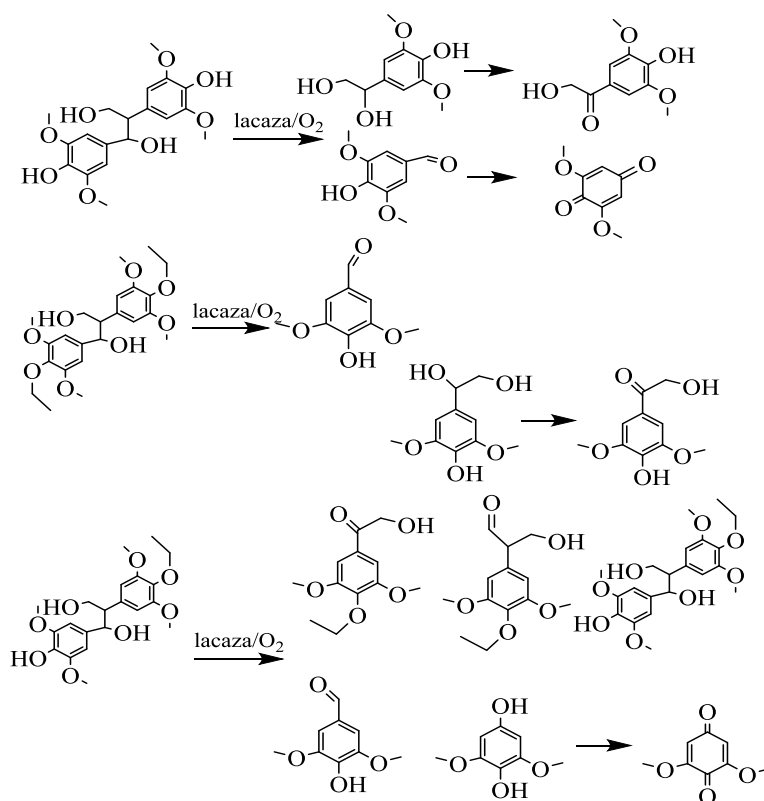


Figura 1.19. Producții de reacție din compușii model de tipul dimerilor siringil β -1'

1.4.3. Compuși model din lignină de tipul dimerilor siringil

Compușii model de tipul dimerilor siringil, β -1' și β -O-4', au fost de asemenea degradați prin oxidare cu lacază. De exemplu, s-au obținut dimeri β -1' formați doar din unități de tip siringil și grupări hidroxil fenolice la unul sau ambele capete [94, 95]. Producții respectivi au rezultat în urma oxidării în poziția α și în urma ruperii legăturilor $C\alpha$ - $C\beta$ (Figura 1.19.).

Reacțiile catalizate de lacază a compușilor model de tipul β -O-4' au fost exemplificate pentru doi dimeri diferiți care conțin radicalul siringil la capătul fenolic și anume siringilglicol β -guaiacil eter și siringilglicerol β -guaiacil eter [96, 97]. În fiecare caz s-a observat că producții de degradare formați au rezultat în urma oxidării în poziția α (Figura 1.20.).

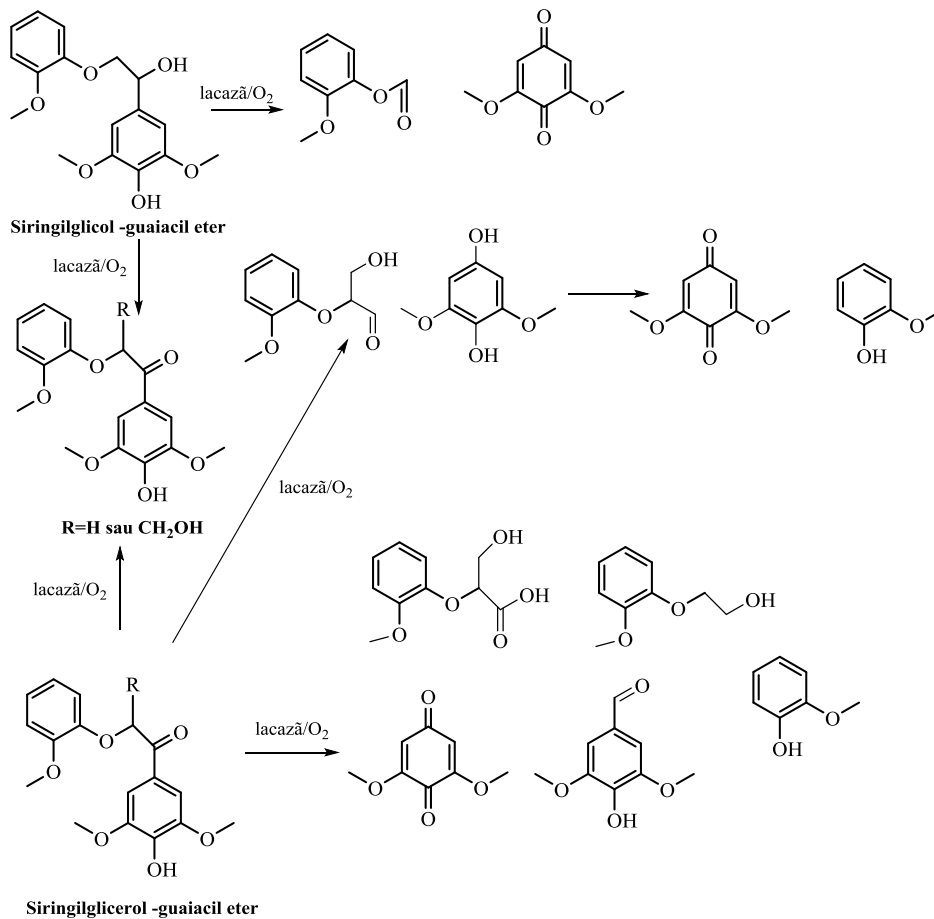


Figura 1.20. Producții de reacție rezultați din dimerii siringilici β -O-4'

1.4.4. Compuși model condensați care se găsesc în lignina izolată prin procedeul Kraft

Prođușii de reacție rezultați din diferiți compuși model condensați care se găsesc în structura ligninei de tip Kraft au fost obținuți în urma reacțiilor specifice ale lacazei și anume oxidarea radicalului benzil, demetilare și hidroxilare (Figura 1.21.)

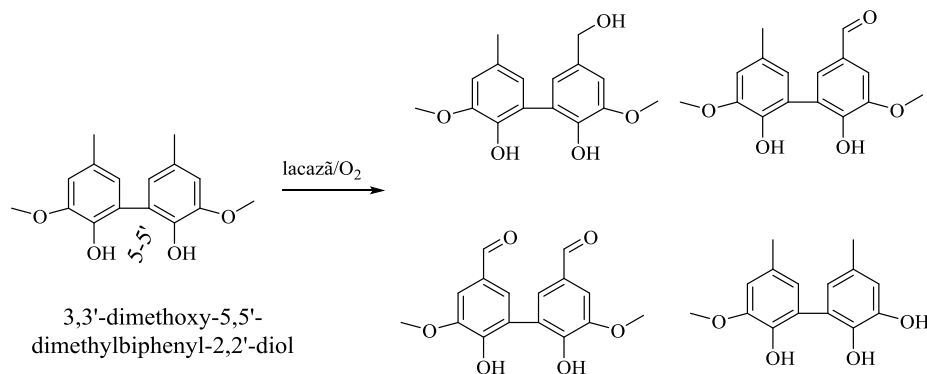


Figura 1.21. Prođușii formați în urma oxidării cu lacază a compușilor model condensați de tipul 5-5' [91]

1.4.5. Oxidarea ligninei cu lacază

Se cunosc relativ puține aspecte despre tratamentul cu lacază a ligninelor rezultate în urma proceselor de obținere a celulozei sau izolate prin diferite procedee de extracție, lucru care poate fi datorat mediului în care a fost izolată lignina, întrucât ea nu este solubilă în apă în timp ce lacazele prezintă activitate optimă în medii apoase [98]. Reacția lacazei cu lignina în suspensie este inefficientă comparativ cu activitatea enzimei cu lignina dizolvată, datorită accesului la substratul din soluție. Cu toate acestea, au fost realizate o serie de studii care implică lignină izolată din lemn, lignine din leșie neagră, lignosilfonați și lignină extrasă prin procedeul „organosolv”. Pe lângă dorința de a descoperi efectele lacazei asupra substraturilor de lignină, aceste experimente au fost realizate și cu scopul de a găsi potențiale aplicații ale deșeurilor de lignină rezultate la fabricarea celulozei și a hârtiei.

Konishi și colaboratorii [99] au tratat lignina extrasă din lemn cu lacaza din *T. versicolor*, ajungând la concluzia că tratamentele cu lacază au crescut solubilitatea în apă a ligninei din lemn prin creșterea numărului de grupări carboxil, ceea ce confirmă faptul că în urma tratamentului cu lacază grupările hidroxil fenolice din lignină sunt oxidate la grupări carboxil. Nu au fost însă analizate și celelalte modificări care pot apărea în structura ligninei alături de creșterea numărului grupărilor carboxil.

Ishihara și Miyazaki [100] au tratat lignina extrasă din lemn cu lacază și au descoperit o creștere a masei moleculare a produsului obținut datorită reacțiilor de polimerizare care au loc. Pe lângă polimerizare, o fracțiune mică de lignină a fost de asemenea degradată cu formare de chinone cu masă moleculară mică. S-a ajuns la

concluzia că sub acțiunea lacazei pot avea loc atât reacții de polimerizare cât și de depolimerizare, dominante fiind reacțiile de polimerizare a ligninei.

O altă dovadă în favoarea polimerizării ligninei de către lacază a fost creșterea masei moleculare a ligninei insolubile în apă.

1.4.6. Reacții catalizate de lacază în solvenți organici

Cât timp utilizarea biocatalitică a enzimelor a fost limitată numai la mediul lor natural apos ea nu a dat rezultate spectaculoase, din mai multe motive:

- multe substraturi de interes nu sunt solubile în apă;
- prezența apei poate duce la reacții secundare nedorite și o serie de compuși organici se pot degrada în prezența apei;
- echilibrul termodinamic al multor reacții este nefavorabil în prezența apei;
- recuperarea produsului de reacție din mediul apos poate fi dificilă.

În principiu, majoritatea acestor dificultăți pot fi depășite dacă reacția enzimatică se realizează în mediu de solvent organic. Problema principală în acest sens a fost că multă vreme solvenții organici au fost considerați toxici pentru enzime, în sensul că aceștia și-ar pierde ireversibil activitatea în asemenea medii [101]. La ora actuală, este un fapt demonstrat că un mare număr de enzime rămân active în medii organice și, în plus, ele pot dobândi o serie de proprietăți noi și utile lucru care nu ar fi de așteptat într-un mediu aparent ostil. Există pe de altă parte o serie de enzime care își mențin activitatea în medii apos-organice între anumite limite și aceste enzime pot fi folosite în asemenea sisteme de reacție. Adăugarea unei cantități moderate de solvent organic determină creșterea solubilității substraturilor hidrofobe, reacțiile fiind astfel posibile. Se pot utiliza atât solvenți miscibili cu apa cât și nemiscibili. Distribuția reactanților între cele două faze ale sistemului (apă-solvent organic) poate fi controlată prin alegerea solventului corepunzător și într-o oarecare măsură prin controlul fazei apoase, de exemplu prin modificarea pH-ului (care trebuie să fie potrivit și pentru enzimă) [102]. Prezența unui solvent organic reprezintă întotdeauna un risc pentru inactivarea enzimei. Multe studii au avut ca temă modul în care substanțele organice interacționează cu moleculele de enzimă și influența lor asupra stabilității enzimatică. La influența solvenților miscibili cu apa în concentrații mici nu s-a observat nici un efect negativ asupra enzimei. Adăugarea unor cantități mai mari, necesare uneori pentru dizolvarea substraturilor, a determinat deseori inactivarea enzimei. Gradul de inactivare depinde de tipul solventului folosit și pentru fiecare solvent inactivarea se produce cu atât mai rapid cu cât concentrația apei scade mai mult sub o anumită valoare [103].

Mattinen și colaboratorii [17] au testat stabilitatea și activitatea lacazei cu potențial redox scăzut din *Melanocarpus albomyces* în mai mulți solvenți organici cum ar fi acetonă, etanol, propilen glicol, dietilen glicol monometil eter, utilizând diferiți compuși model din lignină. Aceștia au arătat că lacaza prezintă stabilitate și reactivitate bună pe compușii model aleși, propilen glicolul și dietilen glicol monometil eterul având cea mai mică influență asupra activității acesteia. În alte studii, Maijala și colaboratorii [178] au testat reactivitatea a cinci tipuri diferite de lacaze din mai multe specii *Trametes hirsuta*, *Melanocarpus albomyces*, *Thielavia arenaria* (două lacaze) și *Chaetomium thermophilum*, în soluții apoase de etanol și propilen glicol tot pe compuși fenolici model cu moleculă mică care se găsesc în lignină. Aceștia au arătat că toate enzimele testate și-au pierdut activitatea catalitică atunci când concentrația de solvent organic din amestec a fost mai mare de 25%.

Din cele prezentate se poate observa originalitatea cercetărilor din această teză prin realizarea reacțiilor enzimatică cu lacaza din *Trametes versicolor* în prezență de 50% solvent organic în apă, în care să se folosească lignina ca și substrat și nu compuși model ai acesteia.

1.5. Compuși cu utilizare potențială pentru funcționalizarea ligninei

1.5.1. Glucozamina

Glucozamina este o monozaharidă care se formează endogen în mod natural în corpul uman prin metabolismul celular al glucozei. Glucozamina este un element cheie pentru mai multe polizaharide esențiale corpului uman. Aceste polizaharide includ glucozaminoglicani și proteoglicani, care sunt componente ale structurii cartilajului. Pe lângă acestea intervine în formarea acidului hialuronic, cheratan sulfatului și heparanului.

Clorhidratul de glucozamină a fost utilizat pe scară largă ca supliment alimentar atât simplu cât și în combinație cu chondroitin sulfat și/sau alte produse. S-a mai folosit la scară largă pentru efectul terapeutic contra durerilor articulare și rigidității în domeniul medicinei veterinare.

Glucozamina se găsește de obicei în una din cele trei forme primare: D-glucozamină, sulfat de D-glucozamină și N-acetil-D-glucozamină. Clorhidratul de glucozamină este considerat a fi mai stabil decât sulfatul de glucozamină, deoarece nu necesită adăugarea de sodiu pentru stabilizarea produsului, ca în cazul sulfatului [104].

Clorhidratul de glucozamină este uneori menționat simplu ca glucozamină, dar denumirea de glucozamină se poate referi și la alte forme comune ale glucozaminei. Printre denumirile formale și sinonime utilizate pentru clorhidratul de glucozamină se pot menționa următoarele: clorhidrat de 2-amino-2-deoxi-D-glucoză, 2-amino-2-deoxi-beta-D-glucopiranoza clorhidrat, clorhidrat de alfa-D-glucozamină, D-glucoză-2-amino-2-deoxi-clorhidrat, D-glucozamin clorhidrat, D-glucozamină, chitozamină. Formula moleculară a glucozaminei este $C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl$, iar masa moleculară 215,63.

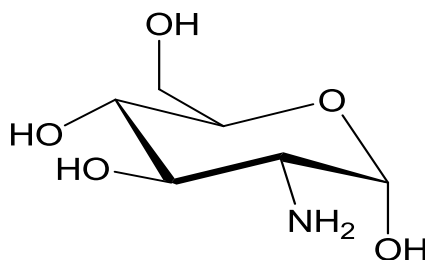


Figura 1.22. Formula structurală a glucozaminei.

Glucozamina este o substanță care poate fi obținută din chitină, un biopolimer care se găsește în carapacea moluștelor, în cuticulele insectelor și în pereții celulari ai unor microorganisme. Clorhidratul de glucozamină este derivat

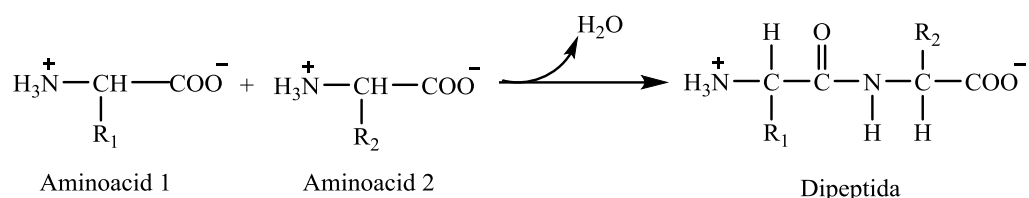
dintr-un microorganism vegetativ sau din exoscheletele crustaceelor. Pot exista variații mici în compoziția preparatelor din crustacee.

Astfel de variații pot fi atribuite componentelor reziduale ale crustaceelor, de exemplu, potențiali alergeni sau contaminanți.

Glucosamina este o moleculă de amino-zahar cu un singur centru chiral. Aceasta este de obicei un produs alb cristalin, cu miros slab și cu gust ușor amar. Glucosamina se descompune la 190-194 °C. Solubilitatea în apă, la 20 °C este de aproximativ 24% și este ușor solubilă în alcool [105].

1.5.2. Peptidele

În natură au fost descoperiți peste 700 aminoacizi, majoritatea dintre aceștia fiind α -aminoacizi. Bacteriile, funghiile, algele și unele plante furnizează acești compuși fie în formă liberă, fie legate în molecule mari (constituenți ai peptidelor și proteinelor, compuși alchilați și esterificați). Cei 20 de aminoacizi folosiți de către celulele vii pentru sinteza proteinelor reprezintă o categorie specială, fiind compuși fundamentali pentru toate formele de viață, unități structurale de bază pentru peptide și proteine. Peptidele și proteinele joacă un rol important în organismele vii și prezintă o gamă largă de proprietăți (de la activitatea hormonală a unor peptide mici, la suportul structural și protecția organismului, în cazul proteinelor). Importanța fiziologică a α -aminoacizilor asigură un interes susținut pentru chimia acestora, în particular în industria farmaceutică pentru obținerea de noi medicamente. α -Aminoacizii sunt de asemenea utilizați ca structuri de bază în biosinteza din plante, fungi și bacterii. Astfel, majoritatea alcaloizilor sunt derivați de fenilalanină și tirozină. Hofmeister și Fischer au demonstrat în 1902 pentru prima dată că în structura proteinelor, aminoacizii sunt uniți prin legături amidice secundare numite legături peptidice, constituite teoretic prin eliminarea unei molecule de apă dintre hidroxilul grupării carboxil al unui aminoacid și hidrogenul aminic al unui aminoacid vecin:



Structura care conține două resturi de aminoacizi se numește dipeptidă, cea care conține trei resturi tripeptidă, etc. Nomenclatura peptidelor se face pornind de la restul de aminoacid cu gruparea amino liberă (aminoacidul N-terminal) spre restul de la capătul carboxil terminal (Figura 1.23.).

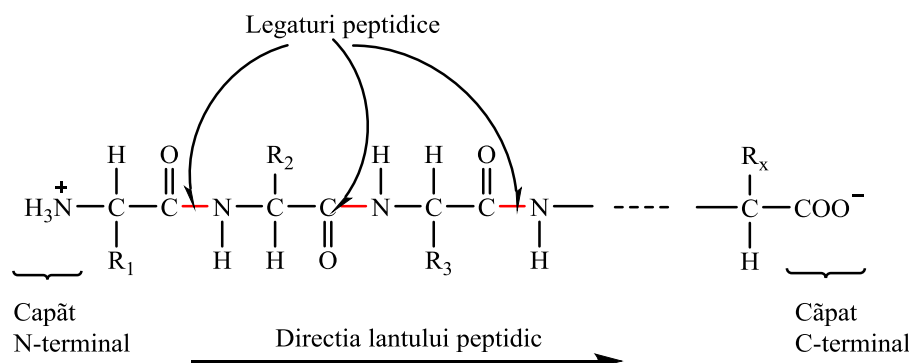


Figura 1.23. Fragment de peptidă. Legături peptidice și direcția lanțului peptidic (capăt N-terminal → capăt C-terminal)

Legătura peptidică are o serie de caracteristici care permit punerea ei în evidență. Substanța numită biuret $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ dă o reacție de culoare cu CuSO_4 în mediu alcalin (reacția biuretelui), reacție pe care o dau toate substanțele care conțin legături peptidice. Proteinele sunt caracterizate de benzi de absorbție în infraroșu și ultraviolet îndepărtat (180-220 nm) specifice datorită legăturilor peptidice [106].

Studiile de cristalografie cu raze X ale unor polipeptide cristalizate au permis măsurători ale distanțelor interatomice într-o catenă polipeptidică, stabilind că lungimea legăturii C-O este de 1,24 Å, iar cea a legăturii C-N este de 1,32 Å, așa cum este prezentat și în Figura 1.24.

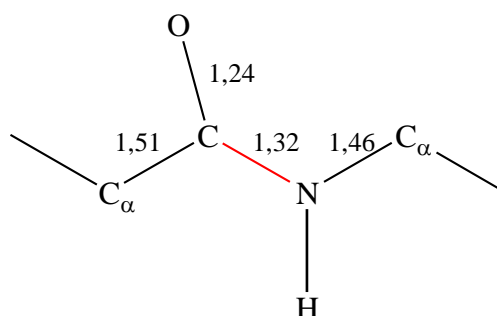


Figura 1.24. Schema legăturii peptidice

Deoarece lungimea normală a legăturii duble C-O este de 1,22 Å, iar cea a legăturii simple C-N 1,45 Å, rezultă că ambele legături sunt de fapt intermediare între legătura simplă și cea dublă. Linus Pauling a fost cel care a explicat această aparentă anomalie prin existența unor structuri de rezonanță (datorită stabilizării energiei de rezonanță formată din interacțiunea perechii de electroni a atomului de azot cu electronii π ai legăturii carbonil), sistemul de electroni π fiind de fapt delocalizat pe toți cei trei atomi O-C-N, așa cum se observă și din Figura 1.25.

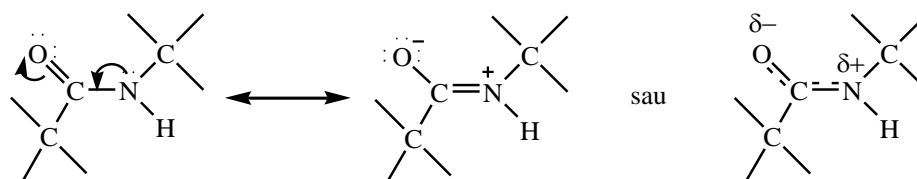


Figura 1.25. Structurile de rezonanță ale legăturii peptidice

Se poate afirma că legătura peptidică are în proporție de 60% caracter C=O și în proporție de 40% caracter C=N. Caracterul de 40% legătură dublă a legăturii carbon-azot din scheletul principal al lanțului polipeptidic înseamnă o stabilitate mai mare datorită unei energii de rezonanță cu 20 kcal/mol mai mici și o împiedicare semnificativă a liberei rotații în jurul acestei legături.

Datorită prezenței acestui fenomen de conjugare a dublei legături, cei șase atomi ai unei unități peptidice vor trebui să se găsească în același plan (să fie coplanari), ceea ce limitează configurațiile posibile pe care catena polipeptidică le poate adopta. O altă consecință a acestei planarități este existența a doi izomeri: cis, în care atomul de oxigen carbonilic și atomul de hidrogen legat de azot se găsesc de aceeași parte a axei legăturii C–N și trans, în care se găsesc de o parte și de alta a acestei axe. Din considerente termodinamice, practic toate legăturile peptidice care se întâlnesc în enzime se găsesc în configurație trans [107].

Peptidele biologic active constituie un grup divers (de la dipeptide simple la structuri complexe liniare sau ciclice), cu proprietăți fiziologic active, antibiotice și antivirale, neuroactive, imunoactive, inhibitori de enzimă și hormoni [108]. În ultimii ani, au fost izolate și caracterizate un număr impresionant de peptide biologic active provenite din bacterii, fungi, plante și animale. Tehnologia enzimatică a fost aplicată cu succes în sinteza unui număr mare de peptide cum ar fi aspartamul, kiotorfina, angiotensina, encefalina și dinorfina.

În ultimele decenii s-a demonstrat că peptidele biologic active posedă anumite biofuncționalități care le conferă rolul de agenți terapeutici în organism [109, 110]. Acestea oferă o serie de avantaje comparativ cu alte moleculele mici bioactive datorită bioactivității și biospecificității orientate către ținte, spectrului larg de acțiune terapeutică, toxicității scăzute, diversității structurale și absenței acumulării în țesuturi [111].

Peptidele antimicrobiene cu caracter cationic reprezintă acea clasă a peptidelor care diferă prin secvența de aminoacizi și structura secundară. Principalele caracteristici comune sunt determinate de numărul de aminoacizi din structura lanțului polipeptidic (cuprins între 12 și 50) și de masa moleculară care nu depășește 10000 Da. Aceste molecule au sarcină totală pozitivă determinată de resturile de arginină, activitate antimicrobiană, anticancerigenă și de vindecare a rănilor. Pe baza analizelor relaționale structură-activitate s-a demonstrat că activitatea antimicrobiană a acestor peptide este determinată de sarcina pozitivă și caracterul amfipatic indus [112]. Această proprietate le permite să interacționeze simultan cu lipidele și moleculele încărcate negativ prin intermediul grupărilor cationice, atașându-se astfel de membranele microbiene. Activitatea antimicrobiană poate fi asociată cu structura secundară și numărul resturilor de arginină din structura peptidei. Lesmes și colaboratorii [113] au demonstrat că fragmentele peptidice derivate din protamină au activitate diferită comparativ cu secvența parentală. Aceste fragmente păstrează un domeniu bogat în resturi de arginină (RRRR), care se poate asocia cu activitatea antimicrobiană, în special asupra

bacteriilor gram-negative. Această proprietate poate fi asociată și cu structura secundară, conform analizelor de dicroism circular.

O importanță deosebită o reprezintă subclasa peptidelor bogate în resturi de arginină și triptofan, de exemplu indolicidina și tripticina. Prin proprietățile chimice ale acestor aminoacizi, devin componente adecvate peptidelor antimicrobiene. Triptofanul are o preferință distinctă pentru regiunea aflată la interfața straturilor bistratificate ale lipidelor, în timp ce arginina conferă sarcina cationică și determină formarea legăturilor de hidrogen necesare pentru interacțiunea cu componentele anionice ale membranelor bacteriene. Împreună, aceste două reziduuri sunt capabile să participe la interacțiuni π -cationice, îmbunătățind astfel interacțiunile peptidă-membrană [114].

1.5.3. Chitosanul

Chitosanul provine dintr-un produs natural, chitina, care se găsește în exoscheletul (carapacea) crustaceelor marine (crabi roșii, creveți, homari etc.) și în structura internă a altor nevertebrate (moluște); chitosanul este o chitină parțial dezacetilată, adică un produs obținut printr-un proces de dezacetilare a chitinei. Chitina, o polizaharidă naturală cu structură liniară și masă moleculară mare, este al doilea polimer biodegradabil care se găsește preponderent în natură, după celuloză.

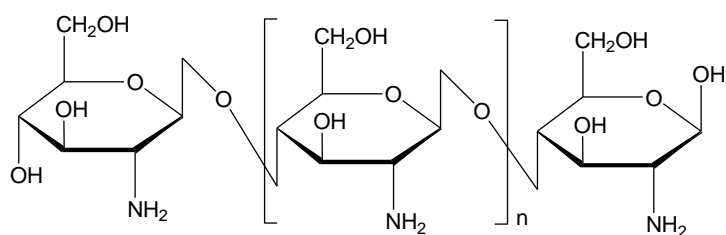


Figura 1.26. Structura chimică a chitosanului

Chitosanul poate fi considerat un copolimer compus din glucozamină și N-acetilglucozamină deoarece dezacetilarea chitinei este incompletă (Figura 1.27.). Ca urmare, chitosanul nu are o structură bine definită și poate varia ca masă moleculară, grad de dezacetilare și secvență (resturile de N-acetilglucozamină sunt distribuite dezordonat de-a lungul lanțului polimeric). Un aspect structural important al chitosanului este prezența unei grupe amine primare la C-2 (Figura 1.27.), ceea ce îi conferă proprietăți funcționale importante care pot fi folosite pentru fabricarea de biomateriale [115].

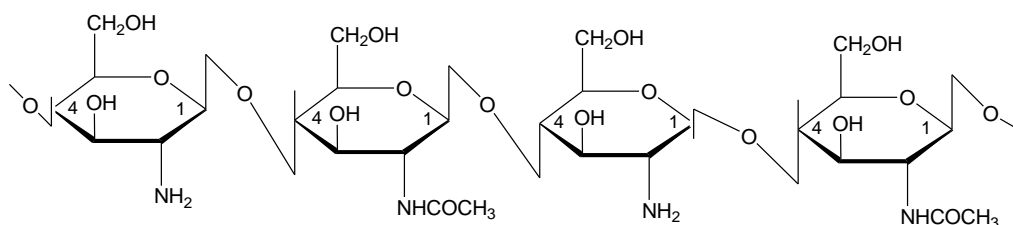


Figura 1.27. Structura chimică a chitosanului format din resturi de β -(1-4)-D-glucozamină, legate cu un număr variabil de grupări N-acetil-glucozamină localizate dezordonat.

Chitina este formată dintr-un lanț liniar de grupări de acetilglucozamină, iar chitosanul se obține înlăturând destule grupări acetyl, astfel ca molecula să fie solubilă în majoritatea acizilor diluați. Acest proces, numit dezacetilare, eliberează grupările amino (NH_2), ceea ce îi dă chitosanului caracteristici cationice. Acest lucru este important, având în vedere faptul că în mediu acid majoritatea polizaharidelor sunt neutre sau încărcate negativ.

Chitina în sine are doar câteva utilizări, spre deosebire de chitosan ale cărui calități chimice și biologice excepționale sunt utile în aplicațiile sale industriale și medicale. Chitosanul este caracterizat de 2 factori principali: vâscozitatea și gradul de dezacetilare. Cu cât este mai mare gradul de înlăturare a grupării acetyl, cu atât produsul este mai activ și mai eficient. Un grad mai mare de dezacetilare este corelat cu un număr mai mare de grupări amino libere care pot fi încărcate pozitiv în mediu acid. Chitosanul posedă grupări reactive hidroxil și grupări aminice primare în concentrație mare, care permit transformarea ușoară în diferiți derivați sau atașarea la alte grupări bioactive. La pH acid, în formă protonată, se asociază cu anioni (metale grele, coloranți, bacterii etc.). Prezența perechii de electroni liberi de la atomul de azot din grupa amino permite formarea de cationi [116].

Chitina, chitosanul și derivații lor au multiple aplicații ca aditivi alimentari, agenți pentru ambalaje și adjuvanți pentru băuturi și alimente. Utilizarea chitosanului este foarte variată, acesta având aplicații în agricultură ca îngrășământ și biopesticid, în procesul de filtrare a apei, în industrie pentru crearea de suprafețe cu proprietăți de autoreparare la expunere solară, ca polimer, datorită greutatei moleculare, în industria hârtiei și industria textilă.

În lumea științifică chitosanul a fost denumit al 6-lea element vital, după proteine, grăsimi, hidrocarburi, minerale și vitamine. Japonezii îl mai numesc și "cel mai nou element al longevității". Descoperirea lui a adus o contribuție uriașă la sănătatea omenirii. Datorită proprietăților biologice deosebite, a biodegradabilității și biocompatibilității sale, chitosanul este larg folosit în industria farmaceutică, industria alimentară, medicină și în biotehnologii. În medicină, spectrul de utilizare a chitosanului este la fel de vast, el fiind aprobat în USA ca material hemostatic datorită proprietăților sale procoagulante. De asemenea, preparatele care conțin chitosan sunt comercializate pentru utilizarea cu scop de slăbire, datorită capacității sale de fixare a grăsimilor.

Abilitatea moleculei de chitosan de a lega moleculele de grăsime și de colesterol în sistemul digestiv are implicații semnificative pentru utilizarea chitosanului ca aditiv alimentar și ca adjuvant în tratamentul diverselor afecțiuni. Alimentele care conțin colesterol, aditivate cu chitosan nu mai sunt periculoase pentru a genera boli de nutriție, de exemplu obezitate, arteroscleroză sau cancer de colon. Moleculele de chitosan fragmentate în molecule mai mici acetilate (chitină microcristalină) au utilizări ca aditiv alimentar, pentru că îmbunătățesc gustul și mirosul alimentelor rotisate [117]. Filmele de chitosan au două caracteristici foarte importante în industria alimentară: sunt biodegradabile și sunt foarte puțin permeabile pentru oxigen. În același timp caracterul antiseptic al chitosanului și posibilitatea copolimerizării acestuia pentru a-i mări rezistența specifică dau posibilitatea folosirii filmelor de chitosan pentru ambalaje, în special pentru fructe și legume. În același timp chitosanul are utilizări ca potențial absorbant al mirosurilor neplăcute din apele uzate, mai ales pentru apele reziduale care provin din industria alimentară [118].

1.5.4. Esterii aromatici ai alcoolilor derivați din zaharuri.

Carbohidrații sunt molecule organice chirale, disponibile din resurse naturale și regenerabile la preț relativ redus. Ei joacă un rol important în multe procese biologice, cum sunt recunoașterea biologică și căile metabolice și sunt utilizați în industria farmaceutică și alimentară [119]. Recent, epuizarea treptată a rezervelor de resurse fosile a dus la dezvoltarea de procese noi și eficiente de transformare a materiilor prime regenerabile, printre care se numără și o serie de zaharuri și polizaharide, în produși utili [120].

Polizaharidele reprezintă de departe cele mai mari cantități de biomasă regenerabile care se produc anual, dar utilizarea lor în scopuri nealimentare se limitează deocamdată la industria textilă, a hârtiei și peliculelor, fie în forma nativă, fie ca esteri simpli. Utilizarea ca materii prime organice de bază pentru industria chimică se bazează pe recunoașterea faptului că monozaharidele componente ale acestora: glucoza, fructoza, xiloza, etc., respectiv dizaharidele, pot fi supuse ușor unor modificări chimice directe pentru obținerea de produși cu aplicații industriale specifice [121].

Aldozele și cetozele pot fi ușor dehidrogenate la alditoli, cu generarea unei grupări alcoolice noi din funcțiunea carbonilică, numele lor derivând din aldoza respectivă prin înlocuirea sufixului "oză" cu "itol". Astfel, prin reducerea D-glucozei se obține D-glucitolul (numit și sorbitol). Esterii de zaharuri pot avea o varietate mare de aplicații. Astfel, amestecurile de regioizomeri precum și mono-, di- și trimerii sunt utilizați ca și emulgatori, iar proprietățile fizico-chimice ale esterilor rezultați depind de gradul de substituție și lungimea lanțurilor acizilor grași. Ei sunt folosiți ca și surfactanți neionici, agenți de înălbire și aditivi alimentari. Esterii de zaharuri ai acizilor grași cu grad mic de substituție pot fi utilizați ca emulgatori în alimente și cosmetice [122, 123]. De asemenea, poliesterii de zaharuri pot avea aplicații ca înlocuitori de grăsimi.

Sinteza esterilor de zaharuri poate fi realizată pe cale chimică sau pe cale enzimatică. Modificarea regioselectivă a carbohidraților s-a dovedit a fi o mare provocare, datorită prezenței grupării hidroxil multiple.

În ultimii ani a existat un mare interes în dezvoltarea antioxidanților naturali, care se presupune că sunt mai siguri decât cei sintetici. Pe lângă multitudinea de proprietăți pe care le au aceștia în sistemele biologice, cum ar fi activități antiinflamatorii și anticancerigene, majoritatea acizilor fenolici, precum și derivați ai acestora, sunt cunoscuți ca antioxidanți foarte puternici [124]. Mai mult, esterii zaharurilor cu diferiți acizi fenolici, izolați din plante sau sintetizați sub forma esterilor fenolici de alchilglucozide, sunt compuși activi din punct de vedere farmaceutic, cu acțiune antimicrobiană, antivirală, antiinflamatoare și antitumorală demonstrată [125, 126, 127]. Utilizarea esterilor de zaharuri ai acizilor carboxilici aromatici în tratarea tumorilor a fost demonstrată [128] în timp ce glucozidele fenolice sunt cunoscute pentru activitățile lor antimicrobiene, antivirale și antiinflamatorii. Combinând esterii aromatici de glucoză și glicozidele fenolice s-au obținut noi esteri aromatici de arilglucozide cu activitate farmaceutică [129]. Utilizarea esterilor naturali ai acizilor aromatici cu polioli este restricționată de disponibilitatea lor redusă, drept consecință a dificultății de izolare a acestora din plante și complexității sintezei lor (necesitatea utilizării grupărilor protective), cât și a formării produșilor secundari atunci când se utilizează acid clorhidric și anhidride [130]. Sinteza chimică a esterilor acizilor fenolici este dificilă și datorită sensibilității termice și posibilității de oxidare în anumite condiții de pH a acizilor fenolici [131].

Esterii zaharurilor și derivaților acestora sunt tot mai mult utilizați ca biosurfactanți în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică. Totuși, potențialul acestor compuși nu a fost pe deplin explorat deoarece obținerea oligoesterilor de zaharuri este o problemă dificilă în chimia organică datorită prezenței multiplelor grupări hidroxil în molecula de zahar și reactivității similare a acestora. Utilizarea lipazelor ca și biocatalizatori pentru producerea la scară industrială a esterilor de zaharuri și derivaților acestora poate fi de mare interes, datorită specificității de substrat, regioselectivității, eficienței catalitice în condiții blânde de reacție și cantității reduse de deșeuri. Ținând cont de avantajele utilizării enzimelor comparativ cu procesele chimice tradiționale, esterificarea și transesterificarea regioselectivă catalizată de lipaze este de departe mecanismul preferat pentru sinteza esterilor zaharurilor și derivaților acestora [132].

2. CONTRIBUȚII ORIGINALE

La ora actuală, lignina reprezintă alături de celuloză, biopolimerul cel mai răspândit în natură, iar produșii de descompunere ai acesteia sunt reprezentați de cantități imense de produși secundari rezultați în industria celulozei și a hârtiei. Datorită gradului de conștientizare cu privire la valorificarea acestor produși au devenit atractive aplicațiile care utilizează microorganismele ce degradează lignina deoarece acestea pot duce la obținerea unor tehnologii ecologice în industria celulozei și a hârtiei precum și în tratarea mai multor compuși xenobiotici, a unor vopsele și coloranți [133]. Subunitățile fenolice naturale prezente în lignină pot să reacționeze cu lacaza prin oxidarea unui singur electron urmată de alte reacții enzimatică sau ne-enzimatică ale radicalului format. Acest lucru face ca lignina să fie un candidat excelent la reacția de cuplare enzimatică a grupărilor fenolice cu ajutorul lacazei. Faptul că lignina este un polimer heterogen influențează reactivitatea chimică, comportamentul termic, accesibilitatea la solvenți și compatibilitatea acesteia cu alți polimeri și materiale. Din acest motiv, obiectivul principal al acestei teze a fost creșterea hidrofilicității ligninei prin grefarea pe cale enzimatică a unor grupări funcționale adecvate în vederea obținerii de produși cu proprietăți noi. Sursele de lignină din biomasa lignocelulozică sunt o alternativă promițătoare în obținerea multor compuși aromatici și polimeri care sunt utilizați ca și componente în rășini și materiale plastice. Lignina obținută ca și produs secundar în urma procesării materialelor lemnoase, de exemplu din procedeele de obținere a hârtiei sau producerea de bioetanol lignocelulozic mai poate fi folosită și la obținerea unor petrochimicale dar trebuie mai întâi rafinată și modificată din punct de vedere funcțional pentru a atinge proprietățile dorite. Natura chimică a ligninei obținută din procesarea lemnului este afectată de sursa materialului lignocelulozic și de modul în care au fost procesate fibrele [134].

Astfel că pentru a stimula aplicații de înaltă valoare ale ligninei, este importantă găsirea unor metode de reducere a heterogenității acesteia. Fraționarea prin extracție cu solvenți organici joacă un rol important în producerea unor fracțiuni de lignină mai omogene, cu distribuție moleculară și grupări chimice cu funcționalități definite, care pot fi modificate în continuare prin tratamente chimice sau enzimatică pentru a obține derivați noi de lignină.

Scopul modificării enzimatică a ligninei a fost îmbunătățirea compatibilității polimerului precum și îmbunătățirea reactivității acesteia. Grupările hidroxil prezente în moleculele de lignină sunt reactive iar centrii locali de polaritate ridicată sunt capabili să realizeze legături de hidrogen.

Astfel, s-a investigat influența structurii chimice și moleculare a cinci tipuri de lignine obținute din diferite surse și prin diferite procedee de extracție asupra solubilității acestora în solvenți organici. Conceptul de parametru de solubilitate a fost aplicat pentru a explica diferența de solubilitate a ligninelor în diferite amestecuri de acetonă – apă și acetat de etil. Frajeciunile solubile și insolubile izolate au fost caracterizate prin determinarea compoziției chimice prin FT-IR și ³¹P-NMR, maselor moleculare și polidispersităților, iar asemănările și deosebirile dintre fracjeciunile și ligninele de bază au fost analizate cu ajutorul analizei componențelor principali (PCA), pe baza datelor obținute la FT-IR. Potențiala utilizare a modelelor cantitative pentru a prezice grupările funcționale din lignină pe baza datelor

spectrale din infraroșu a fost considerată o metodă analitică simplă și rapidă în dezvoltarea și exploatarea proceselor pentru fracționarea selectivă a ligninei.

Datorită insolubilității ligninelor în medii apoase, principala dificultate a fost găsirea unui mediu de reacție adecvat pentru realizarea modificării enzimaticice și pentru creșterea solubilității substratului și produșilor. Astfel, s-a testat activitatea de oxidare în amestec de solvent organic – apă a trei tipuri de enzime cunoscute că degradează lignina (Lignin peroxidaza, Peroxidaza din hrean și Lacaza). În urma acestui studiu lacaza a fost selectată pentru realizarea reacțiilor de modificare enzimatică a ligninelor în mediu acetonă – apă.

Modificarea fracțiunilor de lignină prin cuplare oxidativă cu glucozamina, tripeptide, esteri aromatici ai alcoolilor derivați din zaharuri sau oligomeri de chitosan în vederea obținerii unor produși cu proprietăți noi a fost realizată în amestec de 50% acetonă în apă, amestec favorabil atât stabilității lacazei cât și solubilității substraturilor.

Reactivitatea enzimei a fost urmărită cu ajutorul voltametriei ciclice și determinării conținutului de oxigen dizolvat consumat în urma reacției de oxidare, iar caracterizarea produșilor de reacție a fost realizată folosind aceleași tehnici fizico-chimice ca și în cazul fracțiunilor de lignină: spectroscopia de infraroșu, spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară, cromatografia de permeație în gel.

2.1. Caracterizarea ligninelor utilizate

Ligninele tehnice sunt foarte diverse în ceea ce privește masa lor moleculară, structura, reactivitatea și compoziția chimică a acestora, fiind o consecință a originii și a diferitelor metode de extracție folosite în izolarea lor din materialele lignocelulozice. Compoziția chimică a ligninei este afectată de metodele de procesare a fibrelor lignocelulozice, presupunându-se că lignina poate fi fracționată în unități mai mici în funcție de grupările funcționale pe care le conține și anume guaiacil, siringil, grupări fenolice condensate sau oxidate.

Caracterizarea structurală a ligninelor este necesară deoarece furnizează informații valoroase în ceea ce privește modificările sau aplicațiile ulterioare ale acestora. Lignina se prezintă ca o masă amorfă, brună, insolubilă în apă, având mase moleculare cuprinse între 700-100.000 [135].

2.1.1. Analiza FT-IR a ligninelor

Spectroscopia FT-IR este o metodă de analiză foarte utilizată, care furnizează informații importante legate de conformația moleculară și legăturile care au loc. Analiza benzilor caracteristice din structura ligninei a fost realizată în conformitate cu datele din literatură [3, 136].

Din cauza caracterului amorf al ligninelor și a structurii complicate și diverse a unităților sale structurale este imposibilă utilizarea de metode teoretice în interpretarea spectrelor. Astfel benzile sunt atribuite pe baza datelor spectrale ale compușilor model și în special a preparatelor de lignină. Spectrele ligninelor sunt foarte complicate și majoritatea benzilor observate sunt produse prin suprapunerea mai multor tipuri de vibrații ale diferitelor grupări funcționale. În cazul mai multor benzi atribuirea este posibilă numai în aproximarea contribuției predominante a anumitor grupări atomice. Intensitățile caracteristice pentru principalele benzi de absorbție în infraroșu din structura ligninelor studiate sunt redată în Figura 2.1.,

fiind atribuite după cum urmează: benzile de absorbție de la $830 \pm 7 \text{ cm}^{-1}$ legăturilor $\gamma=\text{CH}$ din inelul aromatic, respectiv din guaiacil-siringil; $1030 \pm 3 \text{ cm}^{-1}$ legăturilor $\delta_{\text{C-H}}$ din inelul aromatic al unității repetitive guaiacil și $\delta_{\text{C-OH}}$ corespunzătoare alcoolului primar; $1115 \pm 6 \text{ cm}^{-1}$ legăturilor $\delta_{\text{C-O}}$ din inelul aromatic al unității repetitive siringil precum și deformațiilor legăturilor C-H din planul unității siringilice; $1220 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ legăturilor $\nu_{\text{s C-O}}$ corespunzătoare inelului aromatic din siringil; $1265 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$ legăturilor ν_{s} din inelul aromatic din guaiacil precum și legăturilor $\nu_{\text{asC-O-C}}$; $1330 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ legăturilor ν_{s} din inelul siringilic; 1420 ± 5 vibrațiilor scheletului aromatic; $1510 \pm 8 \text{ cm}^{-1}$ legăturilor $\nu_{\text{C=C}}$ din inelul aromatic siringil-guaiacil; $1605 \pm 7 \text{ cm}^{-1}$ legăturilor C=C din inelele aromatice; 1703 ± 7 vibrațiilor carbonil/carboxil; 2850 ± 1 legăturilor ν_{sCH_2} , guaiacil- siringil; 2920 ± 5 legăturilor ν_{asCH_2} , guaiacil- siringil) [137, 138, 139, 140].

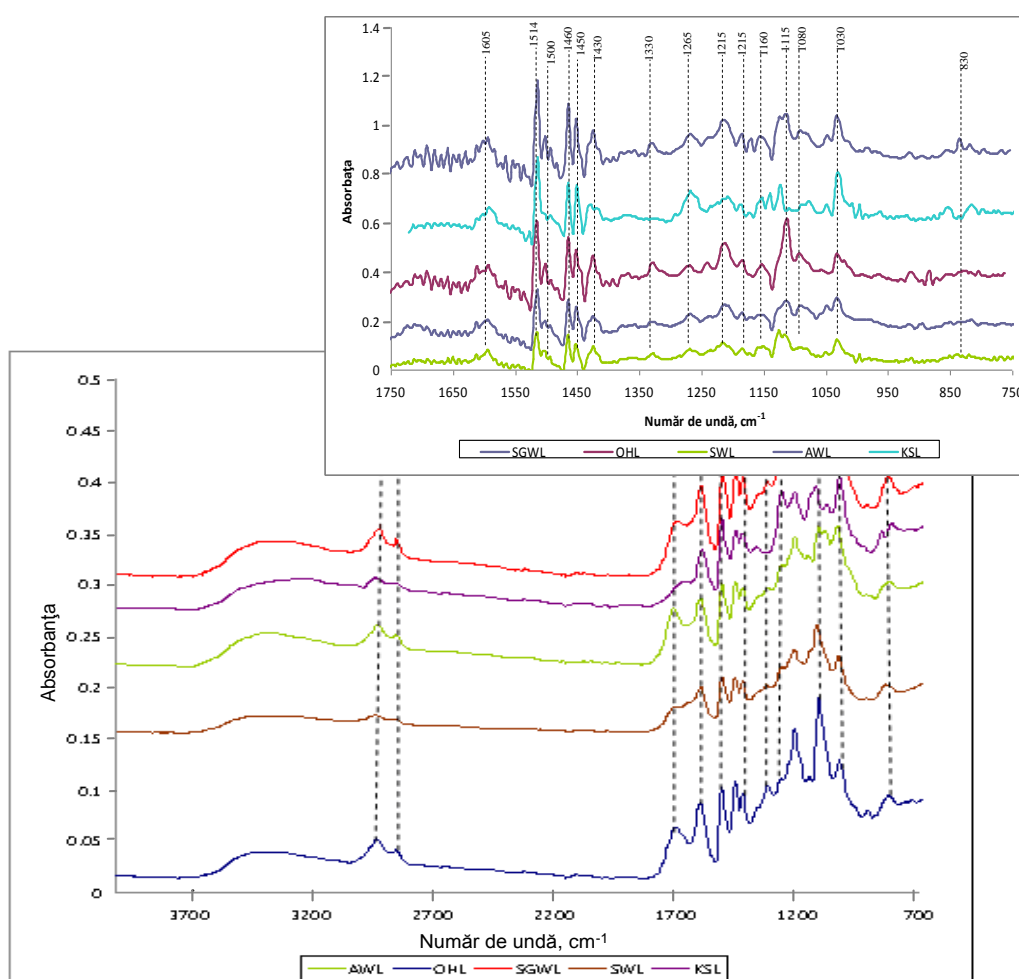


Figura 2.1. Spectrele FT-IR ale ligninelor AWL, OHL, SGWL, SWL, KSL. Inset: spectrele FT-IR deconvolute în regiunea $750 - 1750 \text{ cm}^{-1}$.

Din Figura 2.1. se poate observa că toate ligninele prezintă o bandă largă la 3410–3460 cm^{-1} atribuită grupărilor hidroxil din structurile fenolice și alifatic și două benzi centrate la aproximativ 2920 și 2850 cm^{-1} datorate vibrațiilor C-H din grupările metoxil aromatice și grupările metil și metilen din catenele laterale. În regiunea corespunzătoare vibrațiilor grupărilor carbonil/carboxil, este prezentă o bandă la aproximativ 1710 cm^{-1} datorată vibrațiilor carbonil/carboxil neconjugate, bandă care este mai pronunțată la ligninele AWL și OHL. Vibrațiile specifice nucleului aromatic de la 1605, 1514 și 1420 cm^{-1} precum și vibrațiile de deformare C-H combinate cu vibrațiile scheletului aromatic de la 1450 cm^{-1} sunt comune pentru toate ligninele, deși intensitatea benzilor poate fi diferită. Regiunea spectrală la numere de undă mai mici de 1400 cm^{-1} este mai dificilă de analizat deoarece majoritatea benzilor sunt complexe, putând avea contribuții de la mai multe tipuri de vibrații. Cu toate acestea, această regiune conține vibrații specifice unităților de monolignol și permite caracterizarea structurală a ligninelor. Toate probele de lignină prezintă vibrații specifice unităților guaiacol (la aproximativ 1265 cm^{-1} vibrații ale inelului G și vibrații C=O; la 1150 cm^{-1} deformații C-H în plan; la 830 and 915 cm^{-1} , vibrații C-H în afara planului în pozițiile 2, 5 și 6 a unităților de tip G) dar intensitățile benzilor variază semnificativ între probe. Unitățile S și G mai sunt detectate și prin vibrațiile corespunzătoare scheletului aromatic, la 1605 și 1330 cm^{-1} (S), 1514 și 1265 cm^{-1} (G), precum și de prin vibrațiile C-H aromatice din interiorul planului, la 1115 (S) și 1030 cm^{-1} (G). Banda de la 1030 cm^{-1} poate apărea și ca un complex de vibrații asociate cu legăturile C–O, C–C și C–OH din polizaharide. Vibrațiile caracteristice urmelor de carbohidrați din probele de lignine mai pot fi asociate și cu alte benzi din regiunea spectrală 1000 – 1300 cm^{-1} .

2.1.2. Analiza grupărilor funcționale din lignină cu ajutorul spectroscopiei ^{31}P -RMN

Metoda ^{31}P -RMN a fost mai întâi aplicată pentru o serie de substraturi cum ar fi cărbune, derivați de cărbune și lignină, constând în fosforilarea grupelor hidroxil prezente în substrat folosind un agent de fosforilare urmată de analiza cantitativă prin ^{31}P -RMN. Pentru lignină și derivați ai acesteia, agentul de fosforilare cel mai utilizat este 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxofosfolanul (TMDP). TMDP reacționează cu grupările hidroxil care provin din grupările alifatic, fenolice și acizi carboxilici, în prezența unei baze organice cum ar fi piridina, pentru obținerea de produși fosforilați. Piridina este aleasă ca și bază în amestecul de reacție pentru a capta acidul clorhidric eliberat în reacție și pentru a conduce reacția de fosforilare care este ușor exotermă la o conversie totală [141].

Grupările hidroxil fosforilate pot fi analizate cantitativ folosind un standard intern care demonstrează o stabilitate adecvată și o rezoluție bună în regiunea hidroxilică a ligninei din spectrul ^{31}P -RMN. În Figura 2.2. este redat spectrul ^{31}P -RMN al ligninei de tip SGWL derivatizată cu TMDP utilizând ciclohexanol ca și standard intern [142].

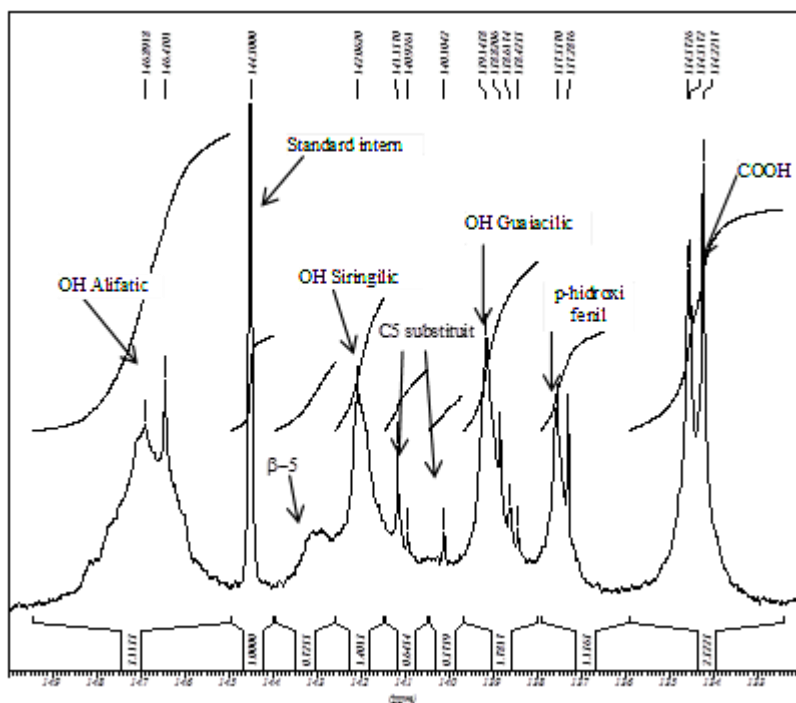


Figura 2.2. Spectrul ^{31}P -RMN a ligninei de tip SGWL utilizând ciclohexanol ca și standard intern

Tabelul 2.1. Însurează rezultatele analizei cantitative ^{31}P -RMN ale probelor de lignină izolate din diferite surse (lemn de esență moale, lemn de esență tare și ierburi). Dintre grupările hidroxil prezente în lignină, semnalul dat de hidroxilul alifatic este predominant cantitativ. În lignina extrasă din lemn de esență moale (KSL) hidroxilul fenolic majoritar este cel caracteristic unității guaiacil, fiind prezente și cantități mici de p-hidroxiifenil. În această lignină hidroxilul siringilic lipsește, motiv pentru care și raportul S/G este nul. Acest rezultat este în concordanță cu datele din literatură [143]. Lignina KSL are în schimb conținutul cel mai mare de OH fenolic condensat dintre ligninele studiate.

Tabel 2.1. Conținutul de grupări hidroxil al probelor de lignină determinat prin analiza ^{31}P -RMN.

Lignina	Grupări funcționale (mmol/g)						S/G	OH fenolic total
	OH Alifatic	OH fenolic cond.	OH Siringil (S)	OH Guaiacil (G)	OH p-hidroxi-fenil (H)	COOH		
OHL	1.08	0.76	1.05	0.70	0.20	0.30	1.50	2.70
SGWL	1.76	0.77	0.60	0.76	0.50	1.11	0.80	2.62
SWL	2.01	0.99	0.77	0.96	0.43	1.04	0.80	3.15
AWL	1.07	0.76	0.58	0.72	0.28	0.91	0.81	2.34
KSL	2.35	1.36	0	1.88	0.22	0.49	0	3.46

Lignina de tip OHL este o lignină de tip SGH iar datorită conținutului mare de unități siringil prezintă raportul S/G cel mai mare dintre cele cinci lignine, confirmând faptul că ligninele din lemn de esență tare au valorile raportului S/G cele mai mari, urmate de ligninele din ierburi și de cele din lemn de esență moale. Ligninele din paie de grâu (SGWL, SWL și AWL) conțin și ele toate cele trei unități repetitive S, G, H, având conținutul cel mai mare de grupări carboxil [179].

2.1.3. Distribuția maselor moleculare în probele de lignină

Una dintre proprietățile structurale importante ale ligninei este masa moleculară a acesteia, distribuția masei moleculare având influență mare asupra reactivității și proprietăților sale fizico-chimice. Distribuția maselor moleculare a ligninelor a fost obținută cu ajutorul analizei GPC și este dată în principal de către derivații fenolici din lignină, deoarece detectorul UV are sensibilitate ridicată față de acești compuși.

Ligninele tehnice pot să conțină diferite impurități cum ar fi carbohidrați, proteine sau substanțe anorganice, care pot să provină din materia primă sau din procesul de delignificare. Acești compuși au o influență nesemnificativă asupra distribuției masei moleculare. Cromatografia de exluziune sterică (SEC) denumită și cromatografie de permeație în gel (GPC) se bazează pe diferențele de mărime și structură ale biomoleculilor. Moleculele mici intră în porii matricei fiind reținute în faza staționară, în timp ce moleculele mari trec prin coloană cu viteze diferite în funcție de greutatea moleculară și structura lor.

În Tabelul 2.2. sunt redată masele moleculare medii gravimetrice (M_w), masele moleculare medii numerice (M_n) și indicii de polidispersitate (M_w/M_n) ai ligninelor studiate.

Tabel 2.2. Masele moleculare Mw, Mn și polidispersitățile ligninelor

Lignină	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)	Mw/Mn
OHL	4217	603	7
SGWL	4622	597	7.7
SWL	5671	829	6.8
AWL	6638	895	7.4
KSL	4879	580	8.4

Ligninele studiate prezintă mase moleculare cuprinse în domeniul $4200 \div 6700$ g/mol, lignina de tip AWL având masele moleculare medii Mw și Mn cele mai mari. În cazul tuturor ligninelor polidispersitățile au fost mari ($6,8 \div 8,4$) arătând o distribuție largă a maselor moleculare. Diferențele între masele moleculare pot fi explicate prin diferențele structurale existente între ligninele studiate. Pe lângă legăturile eterice (α -O-4, β -O-4, 4-O-5) ligninele conțin și un număr mare de legături C-C între unitățile fenilpropanoice. Cele mai multe legături C-C în molecula de lignină sunt acelea în poziția C5 a nucleului aromatic. Unitățile de tip guaiacil pot să formeze acest tip de legături, în timp ce unitățile siringilice nu au această capacitate din cauza faptului că au poziția C5 ocupată cu o grupare metoxi [144]. Legăturile C-C în unitățile de tip guaiacil nu pot fi rupte în timpul extracției din biomasa lignocelulozică din cauza stabilității ridicate a acestora. În consecință, este de așteptat ca ligninele de tip G să aibă mase moleculare mai mari decât cele care au mai multe unități siringil în moleculă. Dintre ligninele studiate lignina AWL are masa moleculară cea mai mare, deși, lignina de tip KSL are conținutul cel mai mare de unități de tip guaiacil. Acest lucru poate fi explicat prin faptul că masa moleculară a ligninelor este influențată de condițiile de izolare folosite, originea ligninei și structura acesteia, lignina KSL având molecula cea mai condensată, cu conținutul cel mai mare de grupări fenolice condensate și de grupări OH alifactice (Tabel 2.1.).

2.1.4. Concluzii parțiale

Cele cinci tipuri de lignină utilizate în studiu au fost caracterizate din punct de vedere fizico – chimic iar rezultatele au fost corelate cu originea și metodele de izolare diferite ale acestora. Din spectrele FT-IR au fost identificate benzile de adsorbție caracteristice ale ligninelor reflectând structura chimică și puritatea acestora precum și diferențele structurale care pot fi induse de tipul de lignină și procesul prin care a fost izolată.

Analiza ^{31}P -RMN s-a dovedit a fi o metodă precisă și rapidă în analiza cantitativă a diferitelor grupări hidroxil prezente în lignină. Dintre ligninele studiate lignina KSL s-a dovedit a avea conținutul cel mai mare de grupări hidroxil alifactice și fenolice totale, grupările fenolice majoritare fiind reprezentate de cele care provin din unitățile guaiacil. Lignina de tip OHL are masa moleculară cea mai mică dintre lignine și este compusă în principal din unități siringil.

Prin analiza rezultatelor obținute se pot evidenția asemănările și deosebirile dintre lignine în ceea ce privește structura acestora precum și relația dintre

elementele structurale și caracteristicile funcționale necesare pentru anumite aplicații.

2.2. Studiul fracționării ligninelor cu solvenți de diferite polarități

În acest studiu s-a propus fracționarea ligninei cu solvenți organici de diferite polarități în vederea obținerii unor fracțiuni cu puritate ridicată și proprietăți structurale bine definite. Solubilitatea ligninelor a fost asociată cu polaritatea și legăturile de hidrogen caracteristice solvenților organici. Studiile anterioare au demonstrat că heterogenitatea ligninei influențează reactivitatea chimică, comportamentul termic, accesibilitatea la solvenți și compatibilitatea cu alte materiale [145, 146]. Prin urmare, pentru a stimula aplicații de înaltă valoare ligninei, este importantă găsirea unor metode de reducere a heterogenității acesteia.

S-a realizat astfel fracționarea celor cinci tipuri de lignine studiate în amestecuri de acetonă-apă și acetat de etil. Conceptul de parametru de solubilitate a fost aplicat pentru a explica efectul solvenților folosiți asupra solubilității ligninelor [147].

Fracțiunile solubile și insolubile izolate au fost caracterizate în privința compoziției lor chimice, cu ajutorul FT-IR, ^{31}P -RMN, distribuție moleculară și polidispersitate, iar asemănările și deosebirile dintre fracțiuni și ligninele nefracționate au fost analizate cu ajutorul analizei componentelor principali (PCA) pe baza datelor obținute la analizele FT-IR. Potențiala utilizare a modelelor cantitative pentru a prezice grupările funcționale din lignină pe baza datelor spectrale din infraroșu a fost considerată drept o metodă simplă și rapidă pentru dezvoltarea și exploatarea proceselor de fracționare selectivă a ligninei [148].

2.2.1. Calculul parametrilor de solubilitate pentru lignină și solvenți

Pentru acest studiu s-a utilizat lipaza din *Pseudomonas fluorescens*, care a fost supusă imobilizării prin metoda de entrapare în sol-gel, utilizând amestecuri de doi și respectiv trei silani precursori în diferite rapoarte molare și anume tetrametoxisilan și unul sau doi trimetoxisilani cu formula generală $\text{R-Si}(\text{OCH}_3)_3$, R fiind o grupare alchil sau aril nehidrolizabilă. A fost de asemenea testată eficiența structurii lichidelor ionice utilizate ca aditivi de imobilizare. Au fost investigate lichide ionice cu cation de imidazoliu cu diferite hidrofobicități și anioni organici și anorganici. Parametrul δ a unui polimer și implicit al ligninelor poate fi calculat pe baza contribuțiilor grupărilor funcționale și atomice atunci când se cunoaște structura unităților repetitive din polimerul respectiv. În principiu, fenilpropanul este principala unitate repetitivă în structura ligninei, astfel că parametrul de solubilitate Hildebrand [147] al ligninelor a fost calculat pe baza energiei de vaporizare (E) și a volumului molar (V) al acestor unități cu ajutorul ecuației 1.

$$\delta = (E/V)^{1/2} \quad (1)$$

Energiile de vaporizare și volumele molare au fost calculate cu ajutorul relațiilor $E = \sum \Delta e_i$ and $V = \sum \Delta v_i$, unde Δe_i și Δv_i sunt contribuțiile grupărilor

funcționale și atomice la energia de vaporizare respectiv la volumul molar și se găsesc în literatură [149, 150]. Valorile calculate E și V pentru unitățile S, G și H sunt redată în Tabelul 1 (Anexe). Valorile parametrului δ au fost calculate pe baza rapoartelor molare dintre unitățile S, G, H din lignine, determinate cu ajutorul datelor obținute prin analiza ^{31}P -NMR și au fost redată în Tabelul 2.1. Structurile acestor unități sunt redată în Figura 2.3.

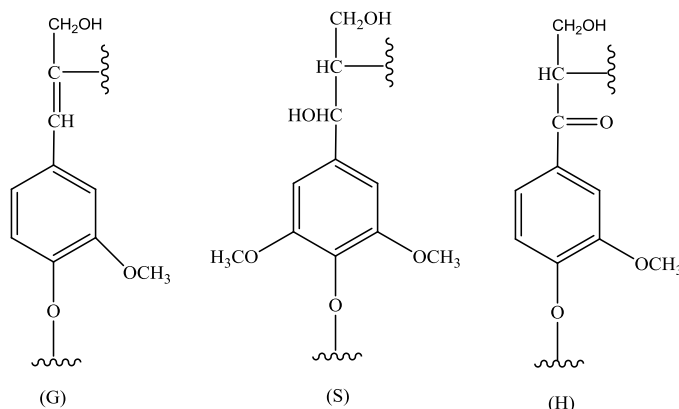


Figura 2.3. Unitățile repetitive din structura ligninei

Tabel 2.3. Valorile calculate ale parametrului de solubilitate Hildebrand (valoarea δ) pentru lignine și solvenți

Parametrii de solubilitate ai ligninelor					Parametrii de solubilitate ai solvenților	
Lignina	Raport molar S : G : H	$\Sigma \Delta e_i$ (cal/mol)	$\Sigma \Delta v_i$ (cm ³ /mol)	δ (cal/cm ³) ^{1/2}	Acetonă/Apă (v\v)	δ (cal/cm ³) ^{1/2}
OHL	5.25 : 3.5 : 1	244382.5	1246.9	13.99	90/10	12.01
SGWL	1.2 : 1.5 : 1	84545.5	435.83	13.93	70/30	15.75
SWL	1.79 : 2.23 : 1	116824.8	603.15	13.92	50/50	18.8
AWL	2.07 : 2.57 : 1	132011.7	681.84	13.91	30/70	21.11
KSL	0 : 8.55 : 1	193897.8	1052.25	13.57	10/90	22.75
					Acetat de etil	7.62

Factorul de solubilitate pentru amestecurile de acetonă – apă și acetat de etil poate fi calculat cu ajutorul ecuației 2.

$$\text{Factorul } \delta = [(\Delta H - RT) \times \rho / \text{Mw}]^{1/2} \quad (2)$$

Unde ΔH este caldura de vaporizare în cal/mol; T, este temperatura de fierbere în K; ρ este densitatea în g/cm³; Mw este masa moleculară în g/mol redată în Tabelul 2.2. Valorile ΔH , T și ρ , necesare calculării factorului δ au fost găsite din

literatură [151, 152, 153, 154] și sunt redată în Tabelul 2 (Anexe). Valorile parametrilor de solubilitate δ ai solvenților sunt redată în Tabelul 2.3.

2.2.2. Solubilitatea ligninelor

Efectul concentrației de acetonă și a acetatului de etil asupra solubilității ligninelor a fost mai întâi investigat la o concentrație de lignină de 1 % pentru a observa diferențele de solubilitate dintre cele cinci tipuri de lignine studiate.

Din Figura 2.4. se poate observa că solubilitatea ligninelor este dependentă de concentrația de acetonă crescând puternic odată cu creșterea concentrației acesteia în amestec. La concentrații mici de acetonă (10%, 30%) toate ligninele au prezentat solubilitate scăzută, o cantitate mică de material fiind solubil în aceste amestecuri. Solubilitatea maximă a fost observată în cazul tuturor ligninelor la o concentrație de 70% (v/v) acetonă menținându-se constantă și la concentrații mai mari de acetonă în amestec (90% (v/v)). Din Figura 2.4. se mai poate observa că solubilitatea crește gradual până la o concentrație de 50 % (v/v) acetonă, creștere care este apoi mai puțin pronunțată până la atingerea maximumului de solubilitate, fenomen ce poate fi explicat cu ajutorul teoriei parametrului de solubilitate (valoarea δ).

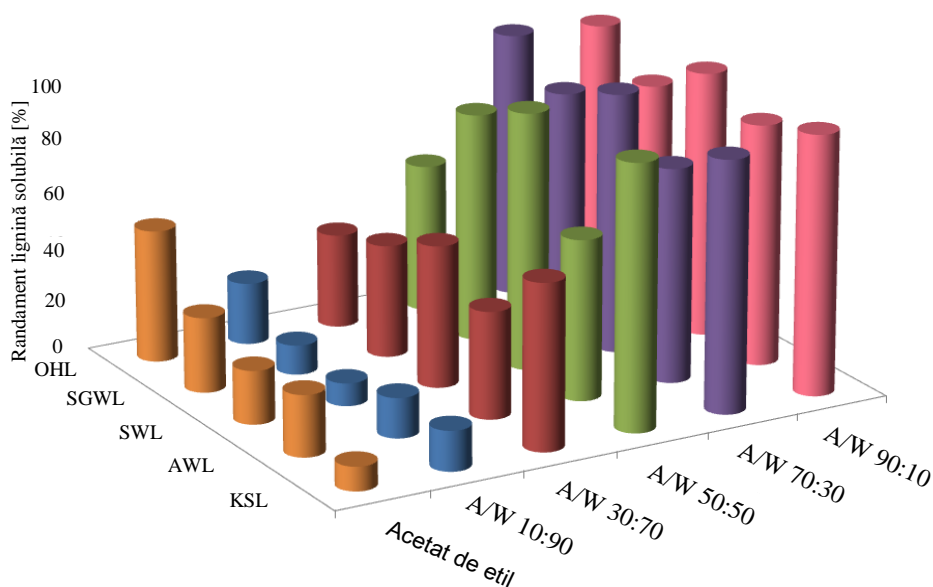


Figura 2.4. Solubilitatea ligninelor în amestec de acetonă-apă și acetat de etil

Ca și alți polimeri, lignina prezintă maximumul de solubilitate în solvenți care au factorul de solubilitate apropiat cu al lor. Pe baza teoriei factorului de solubilitate ligninele prezintă solubilitate maximă în solvenți organici atunci când au factorul de solubilitate cel mai apropiat de al acestora [$\sim 14 \text{ (cal/cm}^3)^{1/2}$]. Cu cât este mai mare diferența dintre cele două valori δ , cu atât solubilitatea va fi mai mică. Din datele prezentate în Tabelul 2.3. se poate observa că valorile cele mai apropiate au fost obținute atunci când concentrația de acetonă din amestec a fost de 70 % (v/v) urmată de 90 % (v/v). acetonă. Toate ligninele prezintă solubilitate scăzută în

acetat de etil fapt care poate fi explicat prin diferențele mari dintre valorile factorilor de solubilitate.

Pentru a confirma observațiile prezentate s-au realizat studii cu concentrații mai mari de lignină de până la 40 g/100 mL până la atingerea limitei de solubilitate.

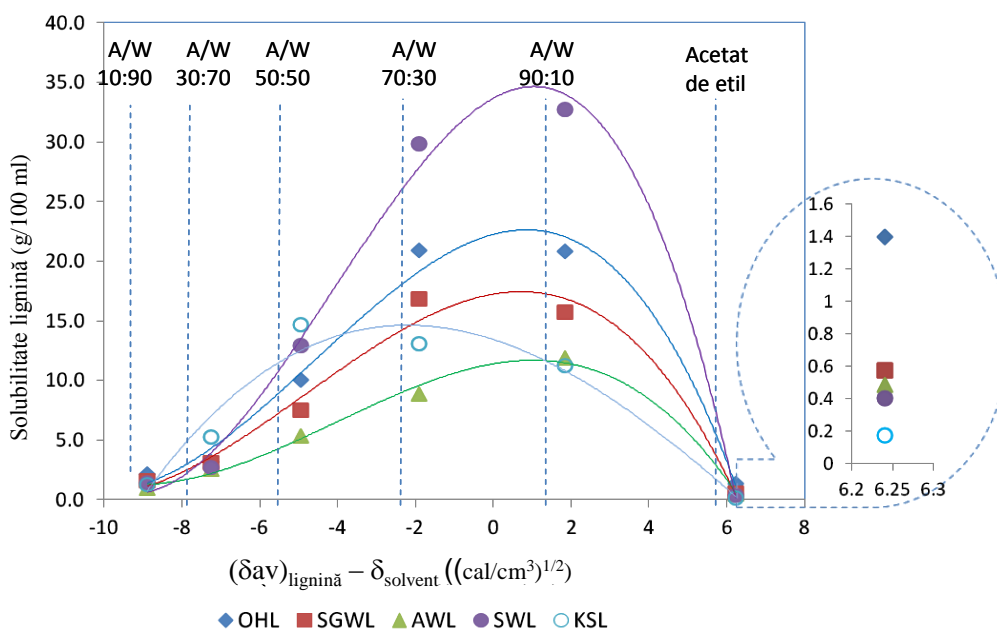


Figura 2.5. Solubilitate ligninelor în amestecuri de acetonă - apă și acetat de etil, în funcție de diferențele dintre valoarea medie a parametrului de solubilitate al ligninelor (δ_{av})_{lignină} și parametrul de solubilitate al solvenților ($\delta_{solvent}$).

Din Figura 2.5. se observă că solubilitatea ligninelor în amestec de acetonă - apă crește cu atât mai mult cu cât valoarea δ este mai aproape de zero. La valori ale lui δ în domeniul $-2 \div 2 (\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2}$ corespunzătoare amestecurilor de 70/30 și 90/10 (v/v) acetona - apă s-au observat cele mai mari solubilități estimându-se ca maximum de solubilitate este atins în soluții care conțin 75 - 80 % acetonă (v/v) în amestec. La concentrația optimă de solvent, lignina de tip SWL are solubilitatea cea mai mare urmată de OHL, SGWL și AWL. Surprinzător, cele două lignine din paie de grâu, SWL și AWL, deși amândouă au fost izolate prin procedeul Soda, sunt destul de diferite în ceea ce privește solubilitatea. Această diferență apare, cel mai probabil datorită condițiilor de izolare folosite, lignina AWL fiind izolată utilizând un tratament alcalin mai blând astfel are un conținut mai mic de grupări hidroxil fenolice și alifatic (vezi Tabelul 2.1.) și masă moleculară mai mare (vezi Tabel 2.2.) lucru care poate explica solubilitatea mai scăzută a acesteia. În afara domeniului optim al valorilor δ , solubilitatea ligninelor scade odată cu creșterea lui δ fiind mai pronunțată spre valori pozitive ale lui δ (acetat de etil) decât spre valori negative (scăderea concentrației de acetonă) fenomen explicat prin capacitatea mai mare a acetonei de a forma legături de hidrogen, element esențial în dizolvarea ligninelor [155]. Lignina OHL este cel mai solubilă în acetat de etil (1,4%) în timp ce lignina KSL are solubilitatea cea mai mică (0,2%). Deoarece acetatul de etil este ușor hidrofob putem presupune că interacțiunile hidrofobe dintre solvent și lignină favorizează

dizolvarea și că hidrofobicitatea ligninelor este corelată cu conținutul de grupări metoxi, care este mai mare în ligninele bogate în unități siringil cum este și lignina OHL. Solubilitatea ligninei KSL care este o lignină de tip G, crește de asemenea înspre valori 0 apropiate de zero dar maximul de solubilitate a fost atins la valori negative ale parametrului de solubilitate care corespund amestecurilor de 50/50 și 70/30 (v/v) acetonă-apă. Comparativ cu celelalte lignine testate, lignina KSL are conținutul cel mai mare de grupări hidroxil libere (de exemplu guaiacil, grupări fenolice din unitățile repetitive condensate, p-hidroxifenilpropan și grupări OH-alifatic) și cel mai scăzut conținut de siringil (Tabel 2.1.) făcând ca această lignină să aibă polaritate mai ridicată cu capacitate mai mare de formare de legături de hidrogen, favorizând o solubilitate mai mare la concentrații mai mici de acetonă. În plus, lignina Kraft conține de asemenea grupări sulfit care pot de asemenea să-i influențeze solubilitatea. Rezultatele prezentate arată încă o dată că solubilitatea ligninei în solvenți organici este un fenomen complex care nu este încă pe deplin înțeles.

2.2.3. Distribuția masei moleculare și conținutul de grupări funcționale a fracțiunilor de lignină

În acest studiu s-a urmărit influența solventului organic asupra proprietăților fizico-chimice ale ligninelor pentru a înțelege mai bine heterogenitatea acestora. Fracțiunile de lignină solubile și insolubile au fost izolate și caracterizate pentru a se determina distribuția masei moleculare a acestora, precum și conținutul de grupări funcționale cu ajutorul analizei ^{31}P -RMN (Figurile 2.6.A, 2.6.B și Tabelul 2.4.).

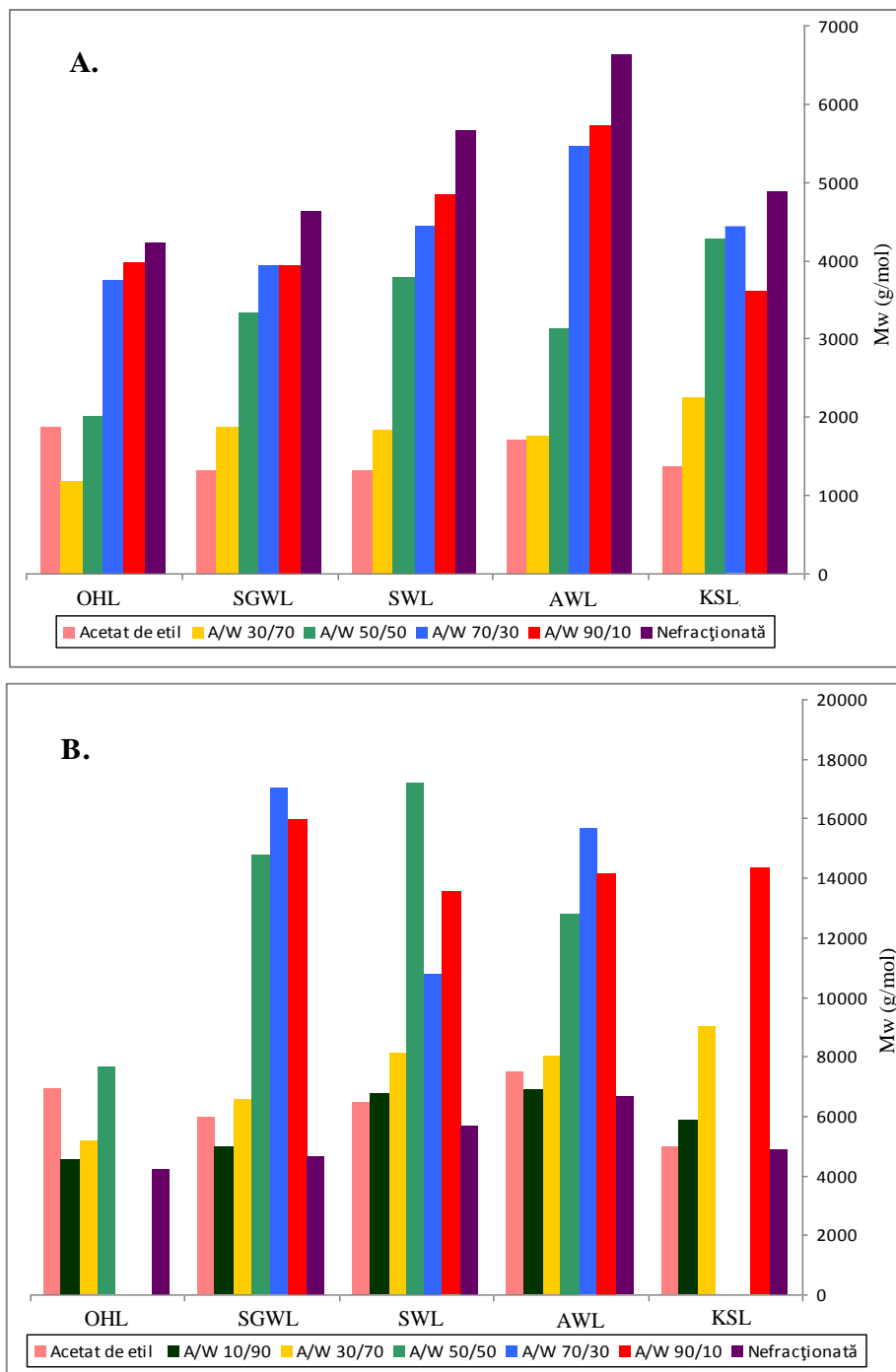


Figura 2.6. Masele moleculare (Mw) a ligninelor și a fracțiilor de lignine : A) fracțiuni solubile; B) fracțiuni insolubile.

Tabel 2.4. Conținutul de grupări hidroxil al fracțiunilor solubile de lignină determinat prin analiza ^{31}P -RMN.

Lignina	Grupări funcționale (mmol/g)							S/G	Aril OH ^{a)} /OH Alifatic
	OH Alifatic	OH fenolic cond.	S	G	H	COOH	OH fenolic total		
OHL									
Nativă	1.08	0.76	1.05	0.70	0.20	0.30	2.70	1.50	2.50
A/W 50:50	1.12	0.90	1.27	0.84	0.23	0.37	3.23	1.51	2.89
A/W 70:30	1.26	1.02	1.30	0.87	0.24	0.38	3.43	1.49	2.73
SGWL									
Nativă	1.76	0.77	0.60	0.76	0.50	1.11	2.62	0.80	1.49
A/W 50:50	1.56	0.90	0.72	0.91	0.58	1.19	3.11	0.79	1.95
A/W 70:30	1.61	0.83	0.66	0.83	0.54	1.19	2.86	0.80	1.78
SWL									
Nativă	2.01	0.99	0.77	0.96	0.43	1.04	3.15	0.80	1.60
A/W 50:50	1.60	0.86	0.66	0.84	0.37	0.91	2.70	0.79	1.69
A/W 70:30	1.85	0.81	0.61	0.79	0.36	0.90	2.58	0.78	1.40
AWL									
Nativă	1.07	0.76	0.58	0.72	0.28	0.91	2.34	0.81	2.19
A/W 50:50	1.15	0.89	0.73	0.93	0.35	1.07	2.90	0.79	2.52
A/W 70:30	1.15	0.90	0.70	0.88	0.35	1.07	2.84	0.80	2.46
KSL									
Nativă	2.35	1.36	0	1.88	0.22	0.49	3.46	0	1.47
A/W 50:50	2.12	1.03	0.35	1.71	0.29	0.49	3.37	0.20	1.59
A/W 70:30	1.93	0.99	0.31	1.77	0.29	0.44	3.36	0.18	1.74

^{a)} Aril-OH este abrevierea pentru "OH fenolic total"

Extracția cu acetat de etil și soluții de acetonă-apă are ca rezultat separarea fracțiunilor de lignină cu o distribuție mai definită a masei moleculare. Fracțiunile izolate din SGWL, SWL și KSL în amestec de 50/50 acetonă-apă precum și fracțiunile ligninelor extrase în amestecuri de 70/30 și 90/10 (v/v) acetonă-apă au mase moleculare apropiate de cele ale ligninelor native, dar prezintă polidispersități mai mici (Figura 2.6.A). De asemenea s-au observat diferențe mici între compoziția grupărilor funcționale ale fracțiunilor și cele ale materialului de la care s-a plecat (Tabel 2.6.). Totuși, o creștere a grupărilor OH fenolice totale (cu excepția SWL) precum și o ușoară scădere a conținutului de OH alifatic au fost observate pentru ligninele derivate din ierburi. O creștere semnificativă a conținutului de siringil OH a fost observată pentru lignina KSL după fracționarea în amestecuri de acetonă-apă. Deși conținutul de S în lignina KSL nativă este aproape de zero (sub limita de detecție a metodei folosite) este general acceptat că în ligninele care provin din lemn de esență moale conținutul de unități S este mai mic de 0.1% din totalul de unități fenilpropanoice [143]. În acest studiu am observat o concentrație mai mare de unități S în toate fracțiunile solubile extrase din lignina KSL și anume de aproximativ 10% din hidroxilul fenolic total al probelor, aceste observații fiind asociate cu puritatea mult mai mare a fracțiunilor extrase. Fracțiunile insolubile izolate au fost găsite în cantități mici dar conțin lignină cu masă moleculară mult mai mare decât cea a ligninelor native (de până la 17000 g/mol) (Figura 2.6.B.). Fracțiunile solubile în 50/50 (v/v) acetonă apă izolate din ligninele AWL și OHL au mase moleculare și polidispersități mai mici (AWL: 3120 g/mol și 4.8, OHL: 2010

g/mol și 4,6) decât fracțiunile solubile în 70/30 și 90/10 (v/v) acetonă-apă, dar grupările funcționale sunt comparabile. Frațiuni distincte cu mase moleculare și polidispersități mici au fost obținute din toate ligninele extrase cu acetat de etil ($1300 < M_w < 1900$) și 30/70 (v/v) acetonă-apă ($1100 < M_w < 2200$), cu randamente cuprinse între 60% (OHL) și 9% (KSL) pentru acetat de etil și 35% (OHL) și 62% (KSL) pentru 30/70 acetonă-apă. Cantitatea de lignină din paie de grâu (SWL și AWL) și amestec de iarbă cu paie de grâu (SGWL) solubilă în acetat de etil este mică dar de aproximativ două ori mai mare comparativ cu amestecul mai polar care conține 10% (v/v) acetonă în amestec.

Așa cum este arătat și în profilele de eluție ale ligninei SGWL (Figura 2.7.) în urma analizei SEC a fracțiunilor de lignină se observă un pic distinct cu intensitate mai mare comparativ cu lignina nativă. În cazul fracțiunilor solubile în acetat de etil și 30/70 (v/v) acetonă-apă se observă o deplasare a picului spre mase moleculare mai mici în timp ce pentru fracțiunile solubile la concentrații mai mari de acetonă picul se deplasează înapoi aproape de cel al ligninei native (Figura 2.7.a). Frațiunile SGWL insolubile prezintă două picuri și arată o distribuție mai largă a picului molecular comparativ cu fracțiunile solubile. Intensitatea primului pic (Figura 2.7.b) care corespunde maselor moleculare mai mari crește odată cu creșterea masei moleculare, M_w .

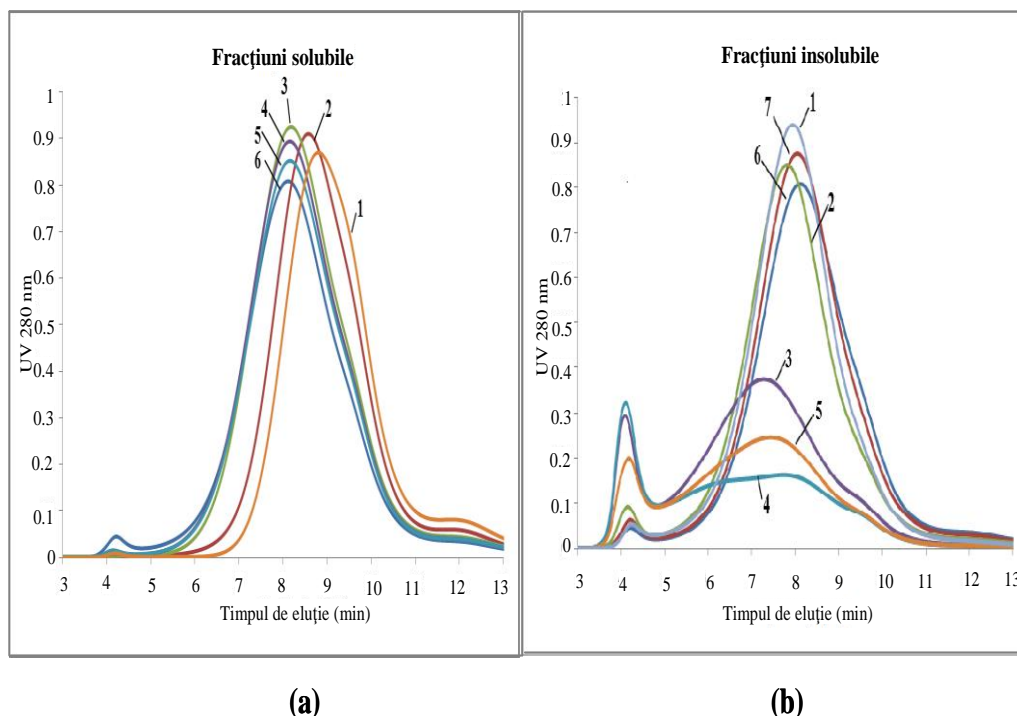


Figura 2.7. Distribuția SEC a masei moleculare ale fracțiunilor de lignină SGWL solubile (a) și insolubile (b) în acetat de etil și amestec acetonă-apă; 1 – Acetat de etil, 2 – A/W 30/70 (v/v), 3 – A/W 50/50 (v/v), 4 – A/W 70/30 (v/v), 5 – A/W 90/10 (v/v), 6 – SGWL nativă, 7- A/W 10/90 (v/v).

Pe baza rezultatelor prezentate putem afirma ca o regulă generală privitoare la extracția ligninelor în amestecuri de acetonă-apă că (i) randamentul fracțiunilor solubile precum și masele moleculare și polidispersitățile fracțiunilor solubile și insolubile, cresc odată cu creșterea concentrației de acetonă din amestec și (ii) randamentul fracțiunilor insolubile scade odată cu creșterea concentrației de acetonă. Dacă extracția în soluții de acetonă-apă cu concentrații mari de acetonă de aproximativ 70-80 % este potrivită pentru izolarea ligninei din biomasă, soluțiile care conțin între 30 și 50% acetonă ar putea fi utilizate pentru fracționarea secvențială a ligninei în combinație cu solvenți mai puțin polari cum ar fi acetatul de etil.

2.2.4. Analiza FT-IR și disimilaritatea fracțiunilor de lignină

Spectroscopia IR a fost utilizată în studiul modificărilor structurale ale probelor de lignină cu scopul de a elucida diferențele care pot apărea în urma fracționării cu solvenți organici. Caracteristicile spectrale ale ligninelor au fost identificate și în spectrele fracțiunilor de lignină (Figurile 1, 2, 3, 4, 5 din Anexe) și anume în regiunea mai jos de 900 cm^{-1} caracteristică substituțiilor la inelul aromatic, au fost identificate două picuri în spectrul ligninei KSL și anume la 815 cm^{-1} respectiv la 850 cm^{-1} , atribuite unităților G, în timp ce în spectrul ligninelor de tip GSH apare un pic suprapus la 835 cm^{-1} care este mai intens la lignina OHL (cu un raport S/G de 1.5) decât la ligninele extrase din ierburi care prezintă un raport S/G în jur de 0.8. Diferențele în cantitatea totală de grupări OH fenolice libere sunt vizibile la 1365 cm^{-1} în timp ce scăderea grupărilor OH alifatică este ilustrată de absorbția de la 1030 cm^{-1} . Diferențe semnificative sunt vizibile de asemenea în zona 1658 cm^{-1} și 1710 cm^{-1} , zonă specifică grupărilor C=O conjugate respectiv ne-conjugate. În spectrele corespunzătoare ligninelor KSL și SWL se poate observa o bandă de absorbție clară la 1658 cm^{-1} în timp ce la lignina AWL un pic evident asociat grupării C=O ne-conjugate a fost observat la 1710 cm^{-1} [148].

Pentru analiza calitativă și cantitativă a fracțiunilor de lignină obținute s-au utilizat datele spectrale din regiunea de interes. Benzile selectate pentru clasificarea probelor și cuantificarea funcțiilor chimice au fost: $830 \pm 7\text{ cm}^{-1}$ (γ_{CH} din inelul aromatic, guaiacil-siringil), $1030 \pm 3\text{ cm}^{-1}$ ($\delta_{\text{C-H}}$ din inelul aromatic guaiacil și $\delta_{\text{C-OH}}$ alcool primar), $1115 \pm 6\text{ cm}^{-1}$ ($\delta_{\text{C-O}}$ din inelul aromatic siringil; deformațiile C-H în plan corespunzătoare unităților siringil), $1265 \pm 4\text{ cm}^{-1}$ (ν_{s} din inelul aromatic din guaiacil, $\nu_{\text{asC-O-C}}$), $1330 \pm 2\text{ cm}^{-1}$ (legăturile ν_{s} siringil), $1510 \pm 8\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{C=C}}$ din inelul aromatic, siringil-guaiacil), $1710 \pm 5\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{C=O}}$ din grupări carbonil ne-conjugate și grupări carboxil), $2850 \pm 1\text{ cm}^{-1}$ (ν_{sCH_2} , guaiacil- siringil), $2920 \pm 5\text{ cm}^{-1}$ (ν_{asCH_2} , guaiacil- siringil). Pentru a minimiza posibilele erori care pot apărea datorită pregătirii probelor, spectrele au fost normalizate cu intensitatea picului de la 1510 cm^{-1} . Intensitățile picurilor normalizate din regiunea de interes din spectru sunt redate în Tabelul 2.5.

Analiza componentelor principali (PCA) a fost utilizată pentru a găsi asemănările și deosebirile dintre fracțiunile solubile și ligninele nefracționate cu ajutorul rapoartelor între intensitățile benzilor specifice redate în Tabelul 2.5.

Tabel 2.5. Rapoartele relative dintre absorbanțele benzilor FT-IR cele mai relevante (rapoartele dintre intensitățile picurilor spectrale și intensitatea benzii de la 1510 cm^{-1}) din probele de lignină și fracțiunile solubile; raportul siringil/guaiacil ($S/G = 1330/1265$)

Denumirea probei	Rapoartele intensităților relative								S/G
	I_{835}/I_{1510}	I_{1030}/I_{1510}	I_{1115}/I_{1510}	I_{1265}/I_{1510}	I_{1330}/I_{1510}	I_{1710}/I_{1510}	I_{2850}/I_{1510}	I_{2920}/I_{1510}	
OHL									
Nativă	0.34	0.57	1.02	0.41	0.45	0.20	0.13	0.17	1.10
A/W 50:50	0.46	0.68	1.08	0.51	0.56	0.39	0.19	0.23	1.10
A/W 70:30	0.53	0.83	1.46	0.67	0.69	0.42	0.19	0.24	1.03
A/W 90:10	0.38	0.62	1.05	0.44	0.49	0.33	0.16	0.22	1.12
Acetat de etil	0.35	0.55	1.10	0.42	0.45	0.32	0.23	0.27	1.07
SGWL									
Nativă	0.38	0.63	0.64	0.43	0.33	0.25	0.12	0.15	0.76
A/W 50:50	0.48	0.68	0.78	0.49	0.45	0.30	0.15	0.19	0.91
A/W 70:30	0.47	0.63	0.75	0.47	0.39	0.22	0.13	0.16	0.83
A/W 90:10	0.48	0.66	0.77	0.51	0.41	0.31	0.21	0.25	0.80
Acetat de etil	0.42	0.47	0.68	0.41	0.33	0.28	0.15	0.20	0.82
SWL									
Nativă	0.46	0.80	1.04	0.55	0.42	0.27	0.12	0.15	0.76
A/W 50:50	0.47	0.82	0.86	0.64	0.45	0.31	0.17	0.20	0.69
A/W 70:30	0.33	0.82	0.82	0.55	0.33	0.19	0.12	0.15	0.60
A/W 90:10	0.54	0.89	0.92	0.61	0.50	0.42	0.20	0.25	0.82
AWL									
Nativă	0.45	0.86	0.80	0.56	0.43	0.38	0.18	0.22	0.76
A/W 50:50	0.42	0.71	0.78	0.51	0.40	0.33	0.15	0.19	0.78
A/W 70:30	0.45	0.74	0.80	0.54	0.42	0.36	0.17	0.21	0.77
A/W 90:10	0.45	0.72	0.80	0.55	0.42	0.39	0.18	0.23	0.76
KSL									
Nativă	0.39	0.81	0.64	0.56	0.21	0.13	0.15	0.15	0.37
A/W 50:50	0.42	0.78	0.66	0.57	0.25	0.15	0.15	0.15	0.40
A/W 70:30	0.40	0.77	0.63	0.56	0.21	0.15	0.14	0.14	0.38
A/W 90:10	0.35	0.66	0.52	0.48	0.17	0.12	0.13	0.13	0.35

Astfel, a fost dezvoltat un model cu două componente principale (PC) care explică 91% din varianța totală. Fiecare component principal este asociat unui set de „încărcări” care sunt corelate direct cu rapoartele intensităților relative (variabilele X). Fiecare spectru este „marcat” în funcție de gradul de corelare cu încărcarea fiecărui component principal. Prin urmare datele care au valori similare vor apărea grupate în reprezentarea grafică a scorurilor PCA, arătând ca ele posedă caracteristici spectrale similare, compoziție chimică similară și prin urmare structură similară. Primele două componente PC1 și PC2 explică 91% din varianța totală după cum este arătat în Figura 2.8.A. Valorile ridicate ale încărcărilor pe PC1 sunt asociate cu unitățile S (raportul I_{1115}/I_{1510}) în timp ce PC2 este dominat la valori pozitive de rapoartele intensităților asociate grupărilor OH alifaticice și C-O-C eterice (conjugate) și anume I_{1030}/I_{1510} și I_{1265}/I_{1510} asociate unităților G. Patru grupuri distincte au fost observate în reprezentarea grafică a variabilelor (Figura 2.8.B) care scot în evidență asemănările/deosebiriile dintre probe prin aceea că probele care se aseamănă tind să formeze grupuri iar cele care se diferențiază se găsesc la distanțe mai mari pe grafic. Probele sunt grupate în principal pe baza conținutului lor de unități S reflectând proveniența lor botanică și procesul de extracție utilizat. Unul dintre grupurile formate este reprezentat de probele OHL care au conținut mare de S și o cantitate mai mică de grupări OH alifaticice. Frațiunile solubile extrase cu 50/70 și 90/10 (v/v) acetonă-apă aparțin acestui grup, dar acestea au un conținut mare de grupări OH alifaticice și guaiacil, și sunt deplasate în sus dealungul PC2. Frațiunea solubilă în acetat de etil este apropiată de cea a ligninei OHL nefracționate. Ligninele AWL și SWL se găsesc și ele grupate și sunt distribuite dealungul PC2, în principal datorită diferențelor dintre grupările OH alifaticice și fenolice condensate. Probele SWL-70 și AWL-50, extrase în amestecuri de acetonă-apă 70/30 respectiv 50/50 sunt deplasate spre valori negative pe PC1 iar atât PC1 cât și PC2 au indicat modificări în conținutul de unități S și G. Proba SWL-70 este apropiată de grupul reprezentat de ligninele KSL (KSL, KSL-50, KSL-70), caracterizate prin conținut mare de G și foarte scăzut de S. Cel de-al patrulea grup este reprezentat de lignina SGWL care diferă de celelalte lignine din ierburi prin conținut mai scăzut de grupări OH fenolice totale și de grupări OH alifaticice. Două dintre fracțiuni, lignina OHL solubilă în acetat de etil și fracțiunea KSL izolată în soluție cu 90% acetonă, nu se găsesc în nici unul dintre cele patru grupuri deși nu au fost identificate ca fiind eronate.

Din această analiză, putem concluziona că diferențele discrete dintre conținuturile de grupări funcționale prezente în lignine după extracția în diferiți solvenți organici sunt reflectate în spectrele FT-IR ale acestora. Aceste rezultate preliminare arată că prin analiza PCA se pot face comparații între fracțiunile solubile din lignină precum și o clasificare a acestora între grupuri posibile, lucru care deschide perspective noi în aplicarea acestei metode în controlul calității și identificarea probelor necunoscute în aplicațiile industriale.

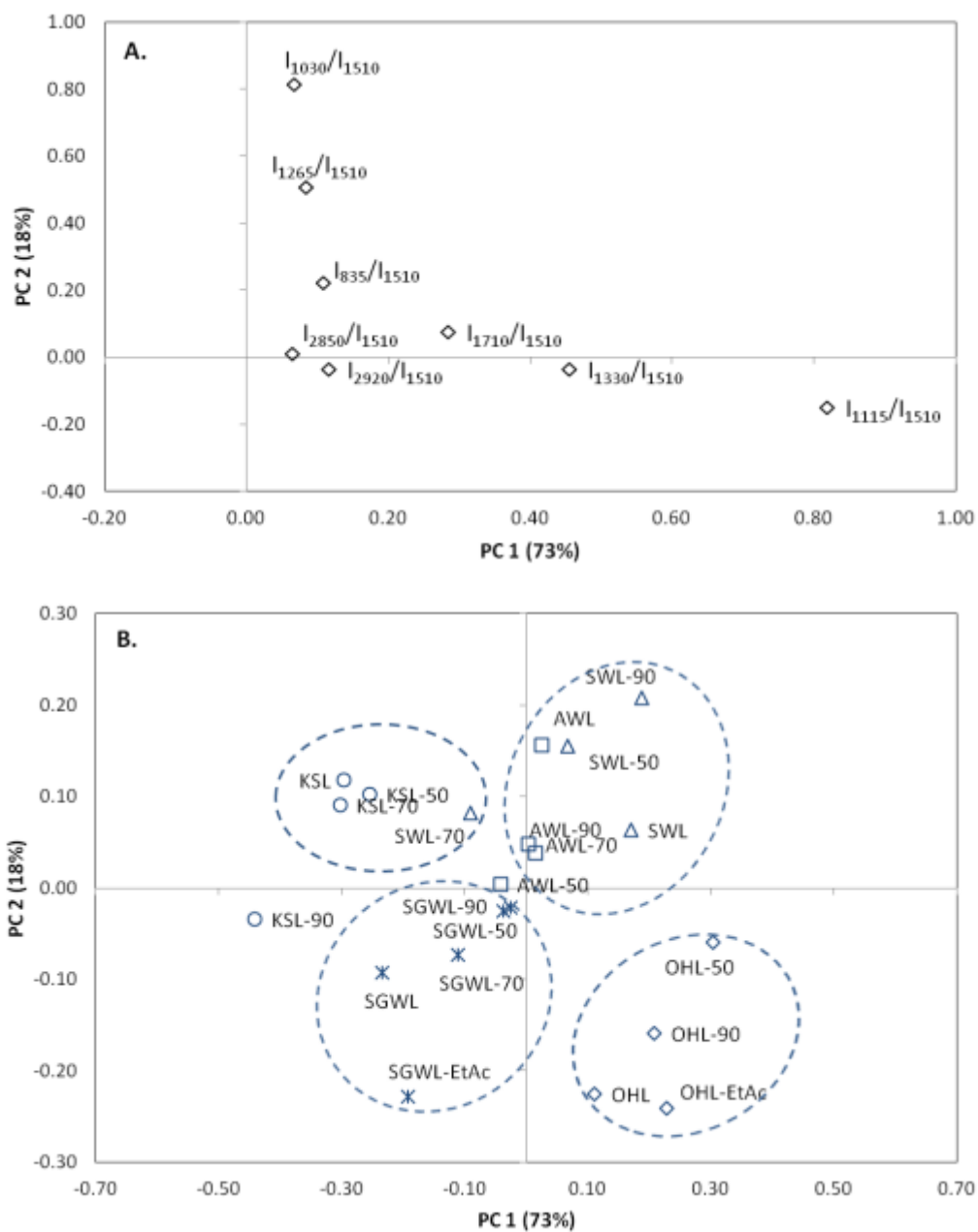


Figura 2.8. A) Reprezentarea frecvențelor IR în conformitate cu PC1 respectiv PC2; B) Corelația variabilelor în funcție de primul și al doilea component principal, PC1 și PC2

2.2.5. Predicția cantitativă a conținutului de grupări funcționale din lignină

Analiza ^{31}P -RMN este o metodă precisă de determinare a conținutului de grupări funcționale prezente în lignină, dar este laborioasă și costisitoare necesitând echipamente performante și tehnicieni foarte bine instruiți. Pe de altă parte, analiza în infraroșu este simplă, rapidă și mai ușor disponibilă în analiza compușilor organici, care a fost dovedită a fi utilă în analizele cantitative a diferitor compuși în combinație cu metode statistico-matematice (analiza multivariată). Acest studiu a urmărit dezvoltarea unor modele de regresie liniară (PLS) utilizând rapoartele intensităților redade în Tabelul 2.5. (variabile X) pentru a prezice conținutul de grupări funcționale (variabile Y) ale ligninelor studiate și respectiv ale fracțiunilor extrase. Pentru analiza statistică au fost alese grupările OH-alifatic, S, G, H, COOH și raportul S/G. Modelele de calibrare PLS1 au fost construite cu ajutorul unui set de calibrare constituit din 15 probe de referință folosind metoda de validare încrucișată pentru măsurarea acurateții rezultatelor. Rezultatele statistice ale modelelor de calibrare PLS sunt readate în Tabelul 2.6.

Tabel 2.6. Rezultatele regresiei liniare (PLS) dintre compoziția chimică a ligninelor determinată cu ^{31}P -RMN și rapoartele dintre intensitățile benzilor relevante din FT-IR

Informații statistice	OH Alifatic	S	G	H	COOH	S/G
Domeniu	1 – 2.4	0 – 1.3	0.7 – 2.0	0.2 – 0.6	0.3 – 1.3	0 – 1.6
Scopul analizei:						
Calibrare						
R_{calib}^2	0.85	0.94	0.94	0.93	0.94	0.97
$\text{RMSEP}_{\text{calib}}$	0.108	0.076	0.03	0.031	0.08	0.072
Calibrare încrucișată						
R_{valid}^2	0.72	0.90	0.8	0.87	0.83	0.93
$\text{RMSEP}_{\text{valid}}$	0.122	0.106	0.190	0.043	0.168	0.113
Numărul de PC	3	3	6	3	6	3
Valori extreme	-	-	-	1	-	-
RAA (%)	6.8	11.6	8.1	8.9	13.5	8.9

R_{calib}^2 and R_{valid}^2 sunt pătratele coeficienților de corelație pentru calibrare și respectiv validare; $\text{RMSEP}_{\text{calib}}$ și $\text{RMSEP}_{\text{valid}}$ sunt erorile pătratice medii ale predicției pentru calibrare și validare; Valori extreme: numărul de probe care deviază de la model și care au fost eliminate din modelul final; RAA este precizia analitică relativă, calculată ca și $(\text{RMSEP} / \text{valoarea medie de măsurare}) \times 100$. Modelele PLS1: Numărul de probe din setul de calibrare: 15; Variabilele X: rapoartele absorbantelor relative ale benzilor FT-IR de interes, după cum sunt redade și în Tabelul 2.5. Variabilele Y: compoziția chimică a ligninelor determinată cu ajutorul ^{31}P -RMN. Numărul de probe în setul de predicție: 7.

Pentru a obține modele cu R^2 mare sunt necesari un număr mic de factori (de exemplu componente principale), care variază între 0.85 (pentru grupările OH-alifatic) și 0.97 (pentru S/G) și care explică 85% respectiv 97% din varianța Y. Eroarea pătratică medie a modelului, exprimată ca și RMSEP, este acceptabilă din punct de vedere analitic pentru predicția datelor dorite și corespunde unei precizii analitice relative (RAA) mai mică de 10% pentru majoritatea variabilelor (Tabel

2.6.). Pentru a ilustra capacitatea de predicție a modelelor, au fost date exemple ale liniilor de regresie ale modelelor validate pentru S, H și OH alifatic (Figura 2.9.)

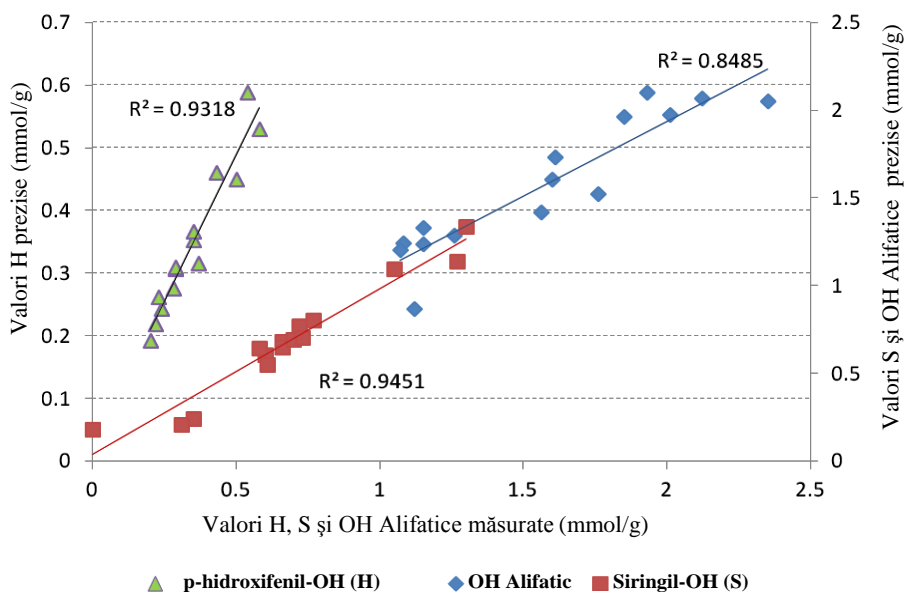


Figura 2.9. Liniile de regresie pentru (▲) p-hidroxifenil-OH (■) Siringil-OH și (◆) OH-Alifatic.

Tabel 2.7. Conținutul de grupări funcționale (mmol/g) în fracțiunile solubile de lignină precise cu ajutorul modelelor PLS pe baza datelor din infraroșu

Fracțiuni solubile	Valori precise		
	OH-Alifatic	S	S/G
OHL A/W 90:10	0.84	1.14	1.55
OHL Acetat de etil	*	1.11	1.64
SGWL A/W 90:10	0.96	0.66	0.78
SGWL Acetat de etil	1.12	0.70	0.98
SWL A/W 90:10	1.20	0.74	0.72
AWL A/W 90:10	1.07	0.71	0.87
KSL A/W 90:10	1.97	0.17	0.26

* Valori precise cu o deviație mai mare de 2,5 ori decât precizia analitică relativă (RAA) a modelului

Modelele au fost testate pentru predicția unui set nou de date constând din fracțiunile solubile ale tuturor ligninelor solubile în 90% acetonă și două dintre fracțiunile care au avut solubilitate mai mare în acetat de etil (OHL și SGWL). Valorile precise pentru probele testate sunt redată în Tabelul 2.7.

Aceste rezultate indică faptul că modelele PLS pe baza intensităților normalizate ale benzilor semnificante din regiunea IR de interes a ligninelor pot fi utilizate pentru caracterizarea cantitativă a ligninelor și a fracțiunilor acestora separate în urma extracției cu solvent. Modelele dezvoltate se bazează pe un număr mic de probe și prin urmare, trebuie să fie considerate ca o testare preliminară a acestui concept.

Extinderea modelelor de calibrare la un set mai mare de probe ar acoperi o gamă mai largă a variației compoziției chimice a probelor, însă este necesară cunoașterea tipului de lignină și a condițiilor de fracționare selectivă, pentru a dezvolta modele de calibrare robuste.

2.2.6. Concluzii parțiale

Extracția selectivă cu solvenți organici este potrivită pentru fracționarea ligninelor industriale în funcție de masa lor moleculară. În urma fracționării cu amestecuri de acetonă-apă și acetat de etil s-au obținut fracțiuni care au o distribuție precisă a masei moleculare și conținut definit de grupări funcționale.

Analiza PCA permite clasificarea ligninelor native și a fracțiunilor lor solubile pe baza unui număr redus de absorbții ale benzilor relevante din spectrul IR și furnizează informații cu privire la modificările discrete care pot apărea între conținutul de grupări funcționale, în urma extracției cu solvenți.

Modelele PLS dezvoltate permit o estimare precisă a conținutului de siringil, p-hidroxifenil și grupări hidroxil alifatic, lucru care crează premisele de a utiliza această abordare pentru predicția simplă, exactă și rapidă a informațiilor structurale și chimice ale ligninelor prin utilizarea analizei FT-IR și a metodelor chemometrice.

2.3. Alegerea biocatalizatorului

Obiectivul acestui studiu a fost selectarea celui mai eficient biocatalizator pentru reacția de cuplare enzimatică a ligninelor în mediu de solvent organic.

Datorită caracterului heterogen a ligninei și a solubilității scăzute a acesteia în medii înalte apoase a fost testată influența solventului organic asupra activității catalitice a trei enzime oxidative, cunoscute că oxidează grupările fenolice din lignină, și anume lacaza, lignin peroxidaza și peroxidazea din hrean. Studiile anterioare au demonstrat că ligninele prezintă solubilitate ridicată la concentrații ridicate de acetonă astfel că în vederea modificării enzimatică s-a ales enzima care prezintă activitatea cea mai mare la o concentrație de acetonă la care și lignina să prezinte solubilitate cât mai mare.

Lacaza și peroxidazele oxidează substraturile fenolice, inclusiv lignina, la radicali fenoxil cu reducerea concomitentă a oxigenului, respectiv a apei oxigenate. Radicalii fenoxil generați in situ sunt instabili și pot avea loc reacții de polimerizare și depolimerizare. Mulți fenoli sunt oxidați pe cale enzimatică la homopolimeri, dar în prezența ligninei sau a altor agenți de cuplare este favorizată reacția de cuplare dintre grupările fenolice.

2.3.1. Influența concentrației de solvent organic asupra eficienței catalitice a enzimelor lignolitice

Deoarece solvenții organici, folosiți ca și cosolvenți miscibili cu apa, inactivează în general enzimele, o serie de experimente au fost realizate la diferite concentrații de acetonă în mediul de reacție, în intervalul 40-70% (vol.) în care s-a demonstrat anterior că fracțiunile de lignină au solubilitate ridicată. Pentru acest studiu s-a urmărit protocolul reacțiilor de oxidare descris la punctul 3.2.2.

În acest context, pentru a evita fenomenul de inactivare a enzimei, s-a urmărit stabilirea concentrației minime de acetonă necesară solubilizării substratului la care activitatea enzimei să fie maximă.

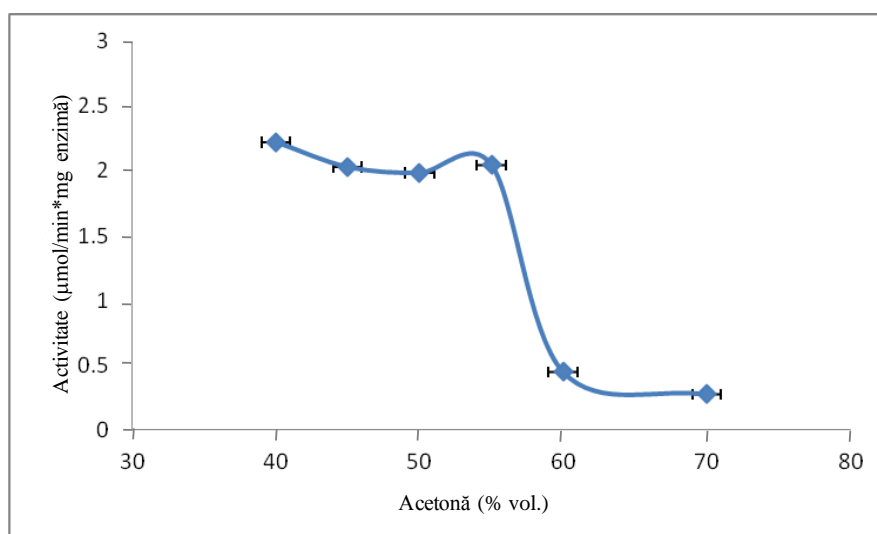


Figura 2.10. Influența concentrației de acetonă asupra activității enzimatice a lacazei în reacția de oxidare siringaldazinei

În Figura 2.10. este reprezentată influența solventului organic asupra activității hidrolitice a lacazei, calculată în primele momente ale reacției utilizându-se siringaldazină ca și substrat. Se poate observa că la mai mult de 55% vol. acetonă în amestecul de reacție activitatea catalitică a lacazei a scăzut dramatic datorită efectului inactivant al solventului organic. Din cercetările anterioare a rezultat că la concentrații de acetonă de 50% (vol.) ligninele studiate au avut o solubilitate bună, obținându-se fracțiuni cu conținut însemnat de grupări funcționale și mase moleculare bine definite. Prin urmare, concentrația de 50% (vol.) acetonă în mediul de reacție asigură atât menținerea activității enzimei cât și solubilizarea adecvată a substratului.

În cazul lignin peroxidazei și peroxidazei din hrean, activitatea catalitică a fost măsurată spectrofotometric, utilizând alcool veratrilic respectiv alcool coniferilic ca și substraturi (capitolul 3.2.2. in partea experimentală). În timp ce lacaza a fost catalitic activă la concentrații de acetonă de până la 55% (vol.), cele două peroxidaze nu au prezentat activitate catalitică nici la concentrații mici de acetonă în mediul de reacție (10%, vol.).

Din acest motiv utilizarea acestor enzime în reacțiile de cuplare enzimatică a ligninelor cu diferiți compuși nu a fost posibilă, optându-se pentru utilizarea lacazei.

2.3.2. Caracterizarea lacazei prin electroforeza pe gel de poliacrilamidă

Dezvoltarea tehnicilor de separare și caracterizare a proteinelor din ultima jumătate a secolului XX-lea a dus la posibilitatea de a investiga mai îndeaproape compoziția diferitelor fracțiuni proteice ale unui extract provenit din tesuturi animale, plante sau din culturi microbiene. Electroforeza în gel de poliacrilamidă este un procedeu care se folosește pentru a monitoriza complexitatea unui amestec de proteine, prin separarea proteinelor într-un gel de poliacrilamidă pe baza diferențelor de sarcină sub influența câmpului electric. Gelul permite o separare completă, pe baza aceluiași principiu de separare utilizat în cromatografia cu schimb de ioni. Proteinele cu greutatea moleculară cea mai mică vor fi cele care vor migra cel mai repede în gelul de poliacrilamidă, datorită mobilității mai crescute prin pori.

Utilizând geluri de poliacrilamidă pentru electroforeză în condiții denaturante de tipul NuPAGE® NOVEX® Bis-Tris Mini Gels furnizate de Invitrogen™ și protocolul de colorare cu Coomassie Brilliant Blue, s-a obținut aspectul general al fracțiunilor proteice din compoziția lacazei din *Trametes versicolor*.

Interpretarea rezultatelor s-a realizat prin simpla analiză a gelurilor și notarea prezenței sau absenței benzilor corespunzătoare diferitelor proteine conținute în sistemul enzimatic testat (Figura 2.11.).

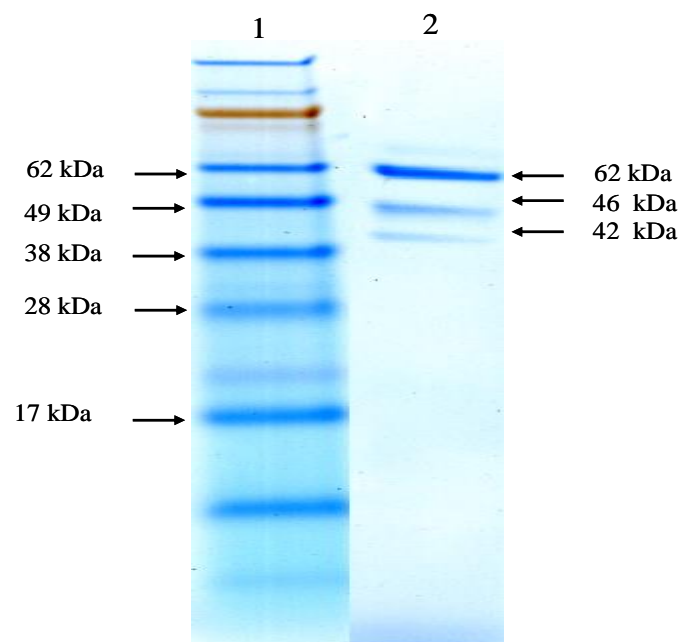


Figura 2.11. Aspectul fracțiunilor proteice separate prin SDS-PAGE din lacază. Linia 1, marker conținând proteine standard; linia 2, lacază din *Trametes versicolor*

Sunt vizibile pe gel trei fracțiuni mai importante cantitativ dintre care fracțiunea proteică de la 62 kDa este cea mai intensă în lacază.

2.3.3. Studiul cinetic al reacției de oxidare enzimatică folosind siringaldazina ca și substrat

Complexitatea structurii biocatalizatorilor precum și complexitatea mecanismului intim de reacție au făcut ca studiul cineticii reacțiilor enzimatiche să fie mult mai dificil comparativ cu cinetica reacțiilor chimice în general. Studiul cineticii enzimatiche, ca și în cinetica chimică, se bazează pe măsurarea vitezei de reacție în condiții standard (care se asigură în așa fel încât să fie cât mai apropiate posibil de condițiile existente *in vivo*) și în diferite condiții particulare create într-un anumit scop.

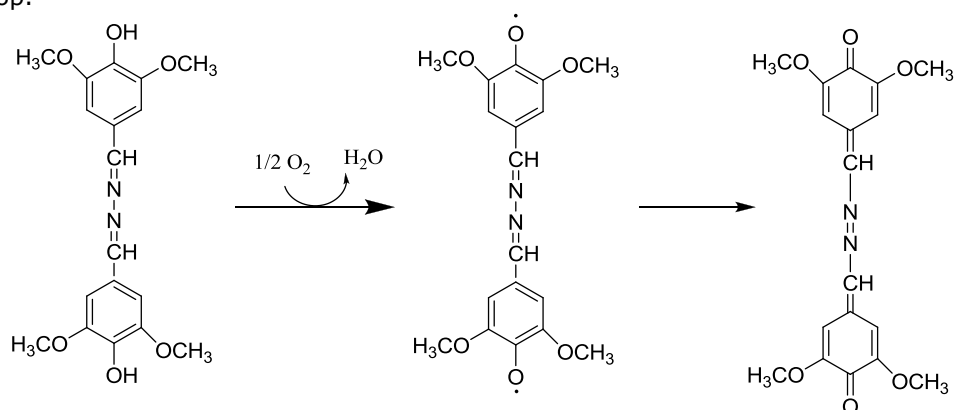


Figura 2.12. Reacția de oxidare a siringaldazinei la chinona corespunzătoare cu ajutorul lacazei

În Figura 2.12. este redat mecanismul de oxidare a siringaldazinei {denumirea chimică 4,4'-[azinobis(metanililiden)]bis(2,6-dimetoxifenol)} la chinona corespunzătoare {4,4'-[azinobis(metanililiden)]bis(2,6-dimetoxiciclohexa-2,5-dien-1-onă)}.

Pentru a înțelege mai bine efectul acetonei asupra cineticii reacției de oxidare catalizată de lacază s-au realizat o serie de experimente cu diferite concentrații de siringaldazină. S-a stabilit anterior că amestecul de acetonă-apă 50% vol. este optim în ceea ce privește stabilitatea lacazei, astfel că cinetica reacției a fost realizată la această concentrație de solvent. Valorile constantei Michaelis - Menten (K_M) și a vitezei maxime (V_{max}) au fost obținute pe baza diagramelor Lineweaver - Burk și au fost determinate cu ajutorul vitezelor inițiale de reacție, calculate pentru fiecare concentrație de substrat.

Studiile cinetice au fost efectuate în mediu de acetonă-apă 50% (vol.), la 25 °C, la concentrații de substrat cuprinse între 10 ÷ 90 μM menținând constantă concentrația de biocatalizator la 0.5 μg/mL.

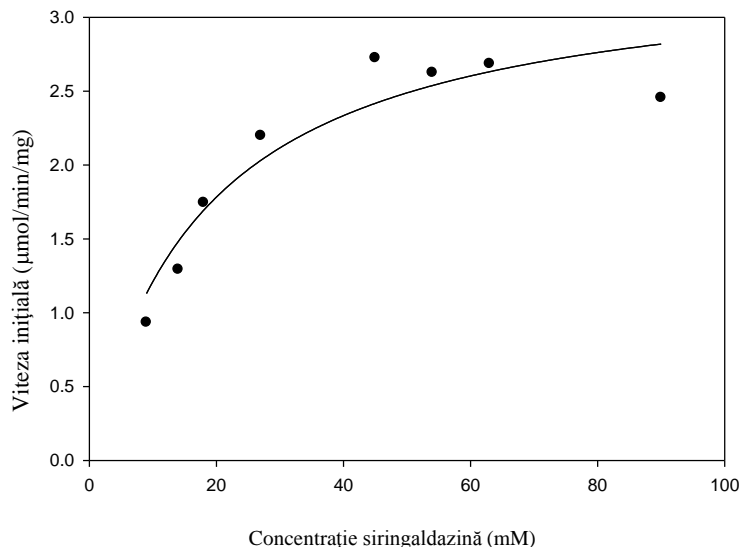


Figura 2.13. Curba de cinetică Michaelis-Menten a lacazei în reacția de oxidare a siringaldazinei

Din curba de cinetică Michaelis-Menten (Figura 2.13.) se poate observa că inhibiția de substrat a enzimei nu se produce până la o concentrație de 90 μM . Valoarea K_m poate fi înțeleasă ca o măsurare a afinității substratului cu enzima și a fost găsită ca având valoarea de 17.93 μM pe când V_{\max} este de 3.38 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

2.3.4. Concluzii parțiale

Dintre cele trei enzime testate, lacaza din *Trametes versicolor* a demonstrat activitate catalitică ridicată la concentrații mari de acetonă (55%, vol.) în mediul de reacție, în timp ce pentru lignin peroxidază și peroxidaza din hrean prezența solventului organic a avut efect inactivant puternic.

S-a analizat puritatea lacazei comerciale utilizate în studiu cu ajutorul tehnicii de electroforeză pe gel de poliacrilamidă, relevând prezența a trei fracțiuni proteice, proteina cea mai activă având masa moleculară de 62 kDa.

Studiul cinetic a arătat că reacția de oxidare a siringaldazinei are loc cu viteză mare, enzima prezentând afinitate ridicată față de substratul folosit.

2.4. Studiul reacțiilor de polimerizare a ligninelor catalizate de lacază în amestec de acetonă-apă

În acest studiu au fost investigate modificările structurale care au loc ca urmare a tratamentului cu lacază a celor cinci lignine (OHL, SGWL, SWL, AWL, KSL), în mediu de amestec acetonă-apă 50/50 (v/v). Studiile anterioare au demonstrat că lacaza este un catalizator excelent în reacțiile de oxidoreducere a compușilor fenolici în medii care conțin până la 55% (vol.) acetonă și că toate ligninele studiate prezintă solubilitate ridicată în amestec de 50/50 (v/v) acetonă-apă.

Fracțiunile solubile în acest amestec au fost utilizate pentru a determina influența lacazei asupra ligninei din diferite surse în reacția de polimerizarea enzimatică [156].

Pentru toate ligninele, cu excepția KSL, în timpul reacțiilor catalizate de lacază a fost observată formarea unui precipitat din cauza solubilității scăzute a unora din polimerii formați în urma tratamentului enzimatic, precipitat care a reprezentat aproximativ 10% din cantitatea totală de lignină introdusă în reacție. Produsul majoritar, solubil în mediul de reacție, a fost separat prin precipitare cu acid și a fost caracterizat în vederea determinării schimbărilor în compoziția grupărilor funcționale și a maselor moleculare, care apar în urma tratamentului enzimatic. Analiza precipitatului „solid” format nu a fost posibilă cu ajutorul tehnicii ^{31}P -RMN datorită insolubilității în amestecul de solvenți folosit pentru analiză [157].

2.4.1. Distribuția maselor moleculare a ligninelor modificate cu lacază

Rezultatele analizei HPLC de permeație în gel au confirmat polimerizarea tuturor ligninelor (Tabelul 2.8.), prin creșterea M_w a ligninelor polimerizate.

O creștere semnificativă a M_w a fost observată pentru toate ligninele modificate cu lacază, excepție făcând lignina KSL. Această lignină reprezintă un caz particular, deoarece produsul de polimerizare a fost doar parțial solubil în soluția de NaOH 0.5 M utilizată ca și solvent pentru prepararea probei în analiza SEC. Din acest motiv, masa moleculară redată în Tabelul 2.8. se referă doar la fracțiunea de produs solubilă în NaOH. Gradul de polimerizare cel mai ridicat a fost obținut la oxidarea ligninei AWL (16017 g mol^{-1} pentru lignina "solidă" și 17359 g mol^{-1} pentru lignina solubilă), M_w crescând de aproximativ cinci ori în comparație cu lignina netratată.

Tabel 2.8. Masele moleculare ale ligninelor fracționate înainte și după polimerizarea cu lacază.

Nr.crt.	Proba		Mw (g mol ⁻¹)	Mn (g mol ⁻¹)	Mw/Mn	Creșterea masei
1	OHL-50		2010	437	4.6	
2	OHL-Lac	solubil	5708	714	8.0	2.8
3		insolubil	7219	1063	6.8	3.6
4	SGWL-50		3325	1007	3.3	
5	SGWL-Lac	solubil	12780	989	12.9	3.8
6		insolubil*	14130	1496	9.4	4.2
7	SWL-50		3777	590	6.4	
8	SWL-Lac	solubil	15118	1060	14.3	4.0
9		insolubil	18647	1758	10.6	4.9
10	AWL-50		3123	651	4.8	
11	AWL-Lac	solubil	17359	1303	13.3	5.6
12		insolubil	16017	1930	8.3	5.1
13	KSL-50		4279	1223	3.5	
14	KSL-Lac	solubil*	3580	534	6.7	0.8
15		insolubil	ND	ND	ND	ND

* Dizolvat parțial în 0.5 M NaOH. Creșterea masei – reprezintă raportul dintre Mw a produsului solubil/insolubil rezultat în urma polimerizării cu lacază și Mw a fracțiunilor de la care s-a pornit reacția

În cazul ligninelor SWL și SGWL, polimerizarea a fost similară, Mw a produsului solubil crescând de aproximativ patru ori în timp ce pentru lignina OHL masa moleculară a crescut de aproximativ trei ori comparativ fracțiunea OHL-50.

În general, cea mai mare creștere a Mw a fost observată pentru produșii insolubili, demonstrând că în timpul procesului de polimerizare au loc rearanjamente structurale extinse.

2.4.2. Modificările structurale fracțiunilor de lignină pe baza analizei spectrale FT-IR

Spectrele FT-IR ale tuturor probelor de lignină, adică ale ligninelor netratate, ale polimerilor de lignină izolați din soluție și ai produșilor minoritari care au precipitat în timpul reacției cu lacaza, prezintă toate caracteristicile spectrale specifice ligninelor, cu benzi la 1605, 1510 și 1425 cm⁻¹ (vibrații ale inelului aromatic din unitățile fenilpropanoice), 3400 cm⁻¹ (vibrații de valență ale grupărilor OH aromatice și alifatic), la 2960, 2925, 2850 și 1460 cm⁻¹ (vibrații CH ale grupărilor CH₂ și CH₃) și 1703 cm⁻¹ (carboxil/carboxil neconjugate). Probele KSL prezintă benzi de tip G (1265, 1125, 855 și 815 cm⁻¹), în timp ce ligninele extrase din lemn de esență tare și ligninele extrase din ierburi, prezintă benzi care

corespund inelelor de tip S (1330, 1115 și 835 cm^{-1}). Cu toate acestea, după tratamentul enzimatic apar diferențe vizibile între proporțiile relative ale grupărilor funcționale din lignine comparativ cu probele netratate, care pot fi identificate prin comparații cantitative ale intensităților benzilor caracteristice din structura ligninei care pot fi alterate în urma tratamentului cu lacază.

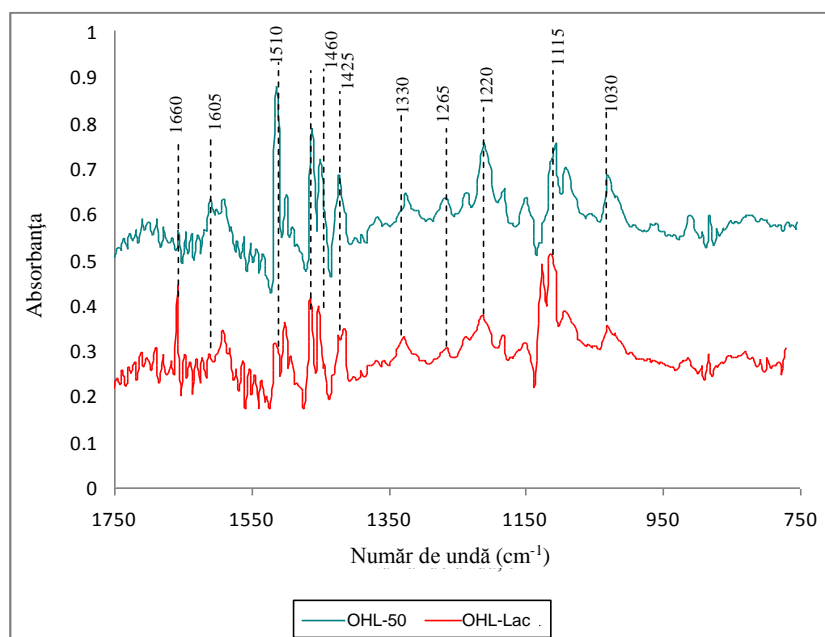


Figura 2.14. Spectrele FT-IR ale ligninei din lemn de esență tare, nemodificată (OHL-50) și modificată cu lacază (OHL-Lac).

În acest context, s-au observat diferențe între intensitățile benzilor de la 1330 și 1265 cm^{-1} atribuite unităților S și G, datorate degradării enzimatică a ligninelor (exemplificate în Figura 2.14. pentru lignina OHL). O scădere a intensității benzii de la 1460 cm^{-1} poate fi datorată demetilării inelelor aromatice de tip S după tratamentul cu lacază. O creștere semnificativă a benzilor la 1660 cm^{-1} atribuită legăturii C=O a fost observată în spectrele tuturor ligninelor modificate (Figurile 6, 7, 8, 9 Anexe), datorită oxidării catenei laterale a ligninelor în timpul tratamentului enzimatic și formării unor structuri condensate prin oxidare. Degradarea oxidativă a catenelor laterale ale ligninelor în timpul oxidării biocatalitice a ligninei a fost demonstrată și de Camarero și colaboratorii săi [158]. Formarea unor structuri cu un grad de condensare mai mare a fost evidențiată de asemenea prin creșterea intensității benzii de la 1115 cm^{-1} , care denotă contribuția deformărilor C-O în legăturile C-O-C condensate. Rezultate similare au fost obținute și prin analiza ^{31}P -RMN și vor fi discutate în detaliu în capitolul următor.

2.4.3. Compoziția de grupări funcționale în ligninele modificate cu lacază

Compoziția de grupări funcționale în ligninele nemodificate și în cele modificate cu lacază a fost determinată cu ajutorul analizei cantitative ^{31}P -RMN, rezultatele fiind prezentate în Tabelul 2.9. Spectrele ^{31}P -RMN ale ligninelor obținute în urma tratantului cu lacază au arătat modificări calitative și cantitative, care pot fi asociate atât proceselor de oxidare ale catenei laterale (rezultate prin scăderea grupărilor OH alifaticice în catena laterală a ligninei) cât și a proceselor de cuplare oxidativă. În cazul tuturor ligninelor modificate, a fost observată o scădere a grupărilor fenolice totale, care corespunde cu formarea unor structuri mai condensate ca urmare a polimerizării oxidative. Această scădere a grupărilor hidroxil aromatice a fost asociată cu scăderea conținutului de unități S și a raportului S/G în ligninele tratate, lucru care evidențiază o degradare mai ușoară a unităților siringil care sunt mai puțin condensate decât unitățile G, probabil din cauză că substructurile de tip S sunt mai sensibile decât cele de tip G la ruperea oxidativă a legăturilor C α și C β din lignine [159, 160]. Demetilarea unităților S poate de asemenea să aibă loc în urma tratamentului cu lacază [161]. Pe de altă parte, în urma reacțiilor de polimerizare s-a observat o creștere a grupărilor p-hidroxifenilice (H) pentru toate ligninele studiate, cea mai mare creștere fiind în cazul ligninelor de tip SGH (SGWL, AWL, SWL). În mod similar, a fost observată o creștere a grupărilor OH fenolice condensate calculate în raport cu grupările OH fenolice totale, dovedind de asemenea că au avut loc reacții de cuplare oxidativă induse prin tratamentul cu lacază. Cea mai mare creștere a grupărilor OH fenolice condensate a fost înregistrată pentru ligninele OHL și AWL.

A fost observată de asemenea scăderea grupărilor OH alifaticice, în concordanță cu observațiile recente asupra oxidării catenelor laterale și a fragmentării unor compuși model, în timpul unor tratamente cu lacază în care s-au folosit mediatori enzimatici [162, 163]. Alți cercetători au demonstrat că lacaza oxidează fenolii la radicali fenoxi în prezența oxigenului cu rearanjări ulterioare în diverși produși de condensare, semichinone și chinone [164], dar oxidarea grupelor hidroxil alifaticice cu lacaza a fost raportată numai în prezența unui mediator [165, 166]. Rezultatele noastre au demonstrat scăderea conținutului de grupări hidroxil alifaticice în toate ligninele studiate după tratamentul cu lacază, arătând că oxidarea catenelor laterale poate fi realizată și fără utilizarea de sisteme mediatore sau de fragmente mici de lignină care pot juca rolul de mediatori în aceste reacții. Conținutul de grupări COOH a scăzut pentru toate probele de lignină după tratamentul cu enzimă, ordinea fiind SGWL-Lac > AWL-Lac > SWL-Lac > OHL-Lac. Scăderea mai redusă a grupărilor COOH înregistrată pentru ligninele OHL și SWL ar putea indica faptul că acestea au fost mai puțin modificate în urma reacțiilor de polimerizare cu lacază [157].

Rezultatele acestui studiu sunt în concordanță cu rapoarte anterioare, care arată că structurile condensate din lignine sunt degradate de către lacază, în principal prin oxidarea catenei laterale, prin demetilare și prin reacții de hidroxilare. Aceste transformări pot ajuta la îmbunătățirea proceselor de delignificare, deoarece accentuează caracterul hidrofil al radicalilor de lignină. În mod semnificativ, astfel de reacții introduc situsuri active pe lignină.

Tabel 2.9. Analiza ^{31}P -RMN a probelor de lignină înainte și după polimerizarea cu lacază

Denumirea probei	OH Alifatic (mmol g ⁻¹)	OH Aromatic (mmol g ⁻¹ /%)				COOH (mmol g ⁻¹)	OH Fenolic Total	S/G
		OH Cond.	S - OH	G - OH	H - OH			
OHL-50 OHL-Lac	1.12 0.98	0.90 / 27 0.74 / 40	1.27 / 39 0.52 / 28	0.84 / 26 0.41 / 22	0.23 / 7 0.18 / 10	0.37 0.33	3.23 1.85	1.51 1.27
SGWL-50 SGWL-Lac	1.56 0.92	0.90 / 28 0.37 / 35	0.72 / 23 0.17 / 16	0.91 / 29 0.24 / 23	0.58 / 19 0.26 / 25	1.19 0.66	3.11 1.04	0.79 0.71
SWL-50 SWL-Lac	1.60 1.16	0.86 / 32 0.60 / 36	0.66 / 24 0.28 / 17	0.84 / 30 0.42 / 26	0.37 / 14 0.34 / 21	0.91 0.79	2.70 1.64	0.79 0.66
AWL-50 AWL-Lac	1.15 0.98	0.89 / 31 0.36 / 41	0.73 / 25 0.14 / 16	0.93 / 32 0.21 / 24	0.35 / 12 0.17 / 19	1.07 0.60	2.90 0.88	0.79 0.66
KSL-50 KSL-Lac*	2.12 ND	1.03 / 31 ND	0.35 / 10 ND	1.71 / 51 ND	0.29 / 8 ND	0.49 ND	3.37 ND	0.20 ND

*Parțial dizolvată în solvenul folosit la analiza RMN; (%) reprezintă procentul din totalul de grupări OH fenolice totale; ND – valori nedeterminate.

2.4.4. Reactivitatea ligninelor în reacțiile de oxidare catalizate de lacază

Faptul că lacaza utilizează oxigen ca și agent de oxidare sugerează importanța concentrației oxigenului dizolvat în reacțiile diferitelor lignine catalizate de lacază. La adăugarea de lacază în mediul de reacție are loc reducerea oxigenului din soluție cu eliberarea unei molecule de apă și prin urmare cantitatea de oxigen dizolvat scade odată cu creșterea activității enzimei drept urmare măsurarea consumului de oxigen reprezintă o modalitate atractivă de analiză a efectului lacazei asupra heteropolimerilor de lignină. Prin urmare, reacțiile de oxidare a ligninelor OHL, SGWL, SWL, AWL și KSL în mediu de acetonă-apă 50/50 (v/v), au fost monitorizate prin măsurarea oxigenului consumat în reacție conform protocolului descris la punctul 3.3.6., curbele corespunzătoare fiind prezentate în Figura 2.15.

Din figură se poate observa că gradul de oxidare a ligninelor a scăzut în ordinea OHL > KSL > AWL > SWL > SGWL.

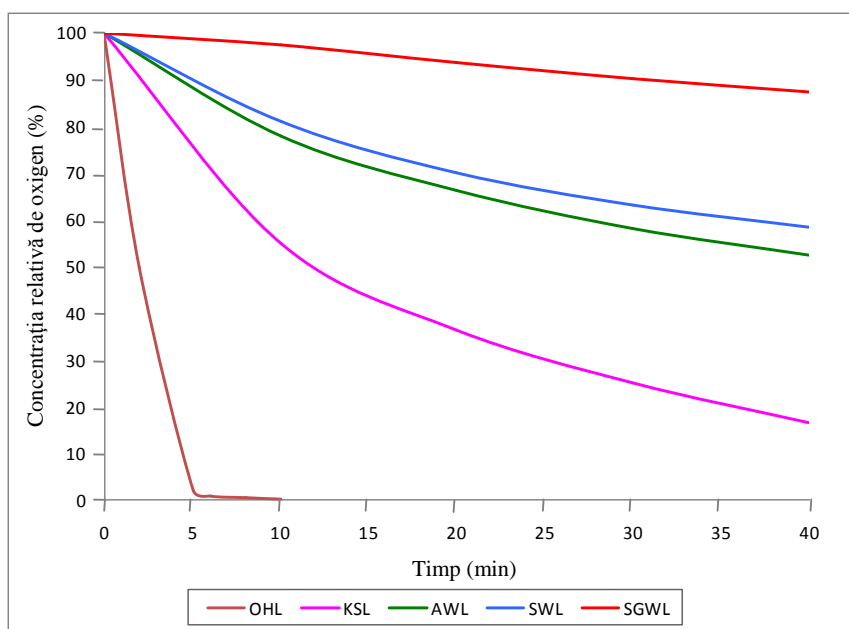


Figura 2.15. Consumul de oxigen în raport cu timpul în reacțiile catalizate de lacaza ale ligninelor OHL, KSL, AWL, SWL și SGWL

Cel mai mare consum de oxigen ($19.66 \mu\text{M min}^{-1}$) în urma tratamentului cu lacaza a fost observat în cazul ligninei OHL care este o lignină de tip SGH și în cazul căreia în aproximativ 5 minute a avut loc oxidarea completă. În cazul ligninei de tip guaiacil, KSL, viteza inițială de oxidare a fost cu aproximativ 60 % mai mică decât cea a ligninei OHL, fiind în concordanță cu polimerizarea mai ușoară a ligninelor extrase din lemn de esență tare comparativ cu cele din lemn de esență moale. Dintre ligninele din paie de grâu, lignina AWL a fost cea mai reactivă, dar comparativ cu OHL a avut o viteză inițială de oxidare mult mai mică ($5,3 \mu\text{M min}^{-1}$).

Oxidarea ligninei SWL de către lacază a avut loc cu viteză ceva mai mică decât cea a ligninei AWL demonstrând că metodele de pretratate folosite influențează viteza de oxidare a ligninelor extrase din paie de grâu, rezultate care pot fi corelate și cu proprietățile moleculare diferite ale acestor lignine. Din studiile anterioare s-a contatat că lignina OHL are masa moleculară cea mai mică (Tabel 2.8.), are structura cel mai puțin condensată (conținutul cel mai mic de grupări fenolice condensate și grupări OH alifatic) și este cel mai hidrofobă dintre lignine având cel mai mic conținut de grupări carboxil (Tabel 2.9.), elemente care favorizează interacțiunile cu lacaza și duc la obținerea unor viteze inițiale de reacție mari [168].

Cu toate că OHL este cea mai reactivă, creșterea cea mai mare a masei moleculare, cele mai mari schimbări ale conținutului de grupări funcționale precum și formarea celor mai condensate structuri, au fost observate în cazul ligninei AWL. Raportat la acești parametri, ordinea de polimerizare între ligninele studiate a fost AWL > SGWL > SWL > OHL, lignina OHL fiind cea mai puțin reactivă. Aceste date sugerează că formarea de polimeri este determinată de reactivitatea și accesibilitatea grupărilor reactive din structurile polimerice intermediare obținute în etapa inițială a reacției, fiind favorizată de conținutul scăzut de grupări siringil și conținutul mare de grupări p-hidroxifenil, ca în cazul ligninelor din ierburi (AWL, SGWL și SWL). Lignina OHL a avut raportul S/G cel mai mare și un conținut foarte mic de unități H (mai mic de 10%), generând polimerii cu masa moleculară cea mai mică în urma reacțiilor de polimerizare cu lacază. În schimb, ligninele din ierburi, au prezentat cel mai mare conținut de unități H cu poziții orto- libere în inelul fenolic, fiind mai susceptibile condensărilor prin reacții de cuplare de tipul C-C și C-O-C în timpul etapei de polimerizare și ducând la formarea de polimeri cu mase moleculare ridicate.

2.4.5. Concluzii parțiale

Interacțiunile ligninelor din diferite surse și lacaza din *Trametes versicolor* au fost analizate în mediu de acetonă-apă. Stabilitatea bună a lacazei la concentrații ridicate de acetonă face din aceasta un potențial candidat pentru aplicații industriale. Toate fracțiunile de lignină utilizate au fost oxidate cu ajutorul lacazei, gradul de oxidare depinzând de cantitatea de grupări funcționale disponibile pentru reacțiile de polimerizare.

Rezultatele SEC și ^{31}P -RMN au arătat că oxidarea ligninelor în amestec de acetonă-apă 50/50 (v/v) a avut loc în ordinea AWL > SGWL > SWL > OHL. Proprietățile structurale ale ligninelor au avut o influență importantă asupra reactivității lacazei, aceasta fiind mai eficientă în polimerizarea ligninelor din paie de grâu decât a ligninei extrasă din lemn de esență tare. Reacțiile de polimerizare au avut loc cu eficiență ridicată la concentrații mari de solvent organic (50% vol. acetonă), care de obicei are efect inhibitor asupra activității catalitice a oxidazelor.

Aceste constatări deschid noi posibilități de utilizare a lacazelor în domenii în care solubilitatea reactanților sau a produșilor este limitată. Solubilitatea ligninei în amestecul de reacție reprezintă un factor cheie al reactivității în procesele catalizate de lacază, rezultatele indicând posibilități noi de valorificare a ligninei pe cale enzimatică. Ligninele provenite din diverse materiale vegetale sau procese de delignificare sunt o sursă importantă de materii prime care pot fi transformate în produși cu valoare adăugată însemnată prin reacții mediate de lacază.

2.5. Modificarea enzimatică a ligninelor prin cuplare oxidativă cu compuși cu caracter hidrofil

În acest studiu s-a urmărit obținerea de compuși noi prin cuplarea covalentă a diferitelor tipuri de lignină cu grupări funcționale adecvate, în vederea creșterii hidrofilicității acestora. Glucozamina, esteri ai sorbitolului cu acidul 3-(4-hidroxifenil) propionic, chitosanul și tripeptida glicil-tirosil-glicina au fost alese ca și co-substraturi în reacțiile de modificare catalizate de lacază în vederea creșterii solubilității ligninei și pentru a se obține produși cu proprietăți speciale.

2.5.1. Studiul reacțiilor de cuplare covalentă a ligninelor cu glucozamină

Pe baza rezultatelor prezentate în Capitolul 2.4. este evident faptul că lacaza generează structuri chinonice reactive în molecula de lignină, care în continuare pot fi cuplate cu compuși cu funcțiuni adecvate. Sub acțiunea catalitică a lacazei, glucozamina ar trebui să se lege relativ ușor de molecula de lignină, prin adăugarea de tip Michael a aminei. Acest lucru se datorează formării în prezența lacazei a unei structuri chinonice intermediare astfel adăugarea nucleofilă a grupării amino având loc în poziția β față de dubla legătură chinonică, așa cum este redat în schema de reacție propusă în Figura 2.16.

Modificarea moleculelor de lignină cu glucozamina prin utilizarea de lacază a fost realizată în amestec de 50/50 (v/v) acetonă-apă, iar reacțiile au fost monitorizate cu ajutorul analizelor GPC, FT-IR și ^{31}P -RMN. Influența co-substratului asupra reactivității lacazei a fost urmărită cu ajutorul voltametriei ciclice și a oxigenului dizolvat consumat în urma reacției de oxidare. Pentru comparație, s-au realizat trei experimente control în care s-au introdus doar lignină și glucozamină, lignină și lacază, respectiv fracțiunea obținută în amestecul de 50/50 (v/v) acetonă-apă. Rezultatele obținute în urma cuplărilor oxidative ale ligninelor studiate cu glucozamina sunt prezentate în Tabelul 2.10. Datorită grupărilor hidroxil alifatic din structura glucozaminei era de așteptat ca în urma reacțiilor de cuplare să aibă loc o creștere a grupărilor OH alifatic totale în structurile produșilor obținuți. Această creștere a fost demonstrată pe baza analizelor ^{31}P -RMN calculându-se raporturile molare $\text{OH}_{\text{alifatic}}/\text{OH}_{\text{Ar}}$, rezultate care au fost susținute și de datele FT-IR (Figurile 10-14 din Anexe).

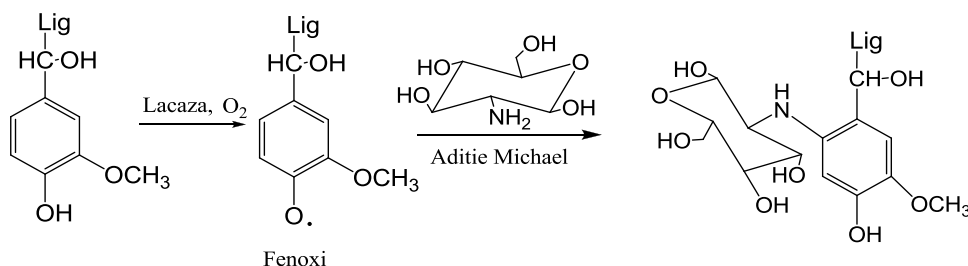


Figura 2.16. Mecanismul de reacție propus pentru reacția de cuplare enzimatică a ligninei cu glucozamina

Tabel 2.10. Caracterizarea produșilor obținuți în urma cuplării covalente cu glucozamina.

Denumirea probei	Mw (g/mol)	Mw/Mn	OHalif / OHar (RMN/IR)
OHL-50	2010	4.6	0.35/0.30
OHL-50/GluNH ₂	2045	4.8	0.36/0.30
OHL-50/Lac	5708	8.0	0.42/0.53
OHL-50/Lac/GluNH ₂	2450	8.4	0.43/0.45
SGWL-50	3325	3.3	0.51/0.40
SGWL-50/GluNH ₂	3490	3.5	0.63/0.55
SGWL-50/Lac	12780	12.9	0.89/0.75
SGWL-50/Lac/GluNH ₂	3470	10.3	0.56/0.50
SWL-50	4300	6.4	0.63/0.53
SWL-50/GluNH ₂	4461	6.8	0.64/0.50
SWL-50/Lac	15118	14.3	0.70/0.61
SWL-50/Lac/GluNH ₂	4398	8.5	0.66/0.51
AWL-50	3123	4.8	0.39/0.35
AWL-50/GluNH ₂	2980	4.8	0.30/0.25
AWL-50/Lac	17359	13.3	1.11/0.95
AWL-50/Lac/GluNH ₂	3137	3.1	0.40/0.36
KSL-50	4279	3.5	0.63/0.54
KSL-50/GluNH ₂	3950	3.7	0.63/0.55
KSL-50/Lac*	3580	6.7	ND/0.75
KSL-50/Lac/GluNH ₂ *	ND	ND	ND/0.90

* Dizolvat parțial în 0.5 M NaOH și solvenții folosiți la analiza ³¹P-RMN

O bună corelare a fost observată între datele obținute prin analiza FT-IR (3390 cm⁻¹/1605 cm⁻¹) și ³¹P-RMN în ceea ce privește raportul dintre OH total alifatic/OH total aromatic. Din datele prezentate în Tabelul 2.10. se observă că reacția de cuplare enzimatică cu glucozamină a avut loc numai în cazul ligninelor OHL și AWL, în cazul acestor lignine observându-se creșteri ale maselor moleculare comparativ cu controlul în care am avut numai lignină și glucozamină (OHL-50/ GluNH₂ și AWL-50/GluNH₂) și fracțiunile de la care s-a plecat. O altă dovadă că reacția de cuplare a avut loc este creșterea raportului OH alifatic/OH aromatic în cazul ligninelor de tip AWL și OHL. Comparând însă valorile maselor moleculare și ale rapoartelor OH alifatic/OH aromatic cu cele ale controalelor în care am avut numai lignină și lacază, se observă ca acestea sunt mult mai mici decât în probele în care a avut și glucozamina ca și cosubstrat. Acest lucru poate fi explicat prin faptul ca glucozamina poate avea efect inhibitor asupra enzimei, reacția având loc cu viteză mai mică. Această constatare va fi explicată în subcapitolele următoare cu ajutorul analizelor de voltametrie ciclică și de determinare a oxigenului dizolvat.

2.5.1.1. Studiul reacțiilor de oxidare enzimatică cu ajutorul voltametriei ciclice

În acest studiu au fost investigate reacțiile de cuplare enzimatică a ligninelor cu glucozamina prin înregistrarea proceselor electrochimice care au loc în timpul reacțiilor de oxidare. Trasarea voltamogramelor a fost realizată cu enzima adsorbită pe electrodul de lucru (electrod de grafit) față de electrodul de referință (electrodul

de calomel) în amestec de 50% acetonă în apă. Pentru a asigura conducerea curentului electric prin soluție s-a folosit tampon tartrat de sodiu 50 mM de pH = 4 ca și electrolit suport. Cum compușii fenolici realizează de obicei procese electrolice, obiectivul acestui studiu a fost investigarea reacțiilor de cuplare oxidativă a ligninelor cu glucozamina în amestec de acetonă-apă prin monitorizarea modificărilor care au loc la trecerea de curent electric prin amestecul de reacție. A fost investigată de asemenea și influența unor parametri de reacție precum concentrația de lignină și concentrația de glucozamină, asupra reacțiilor de oxidare cu lacază.

2.5.1.1.1. Studiul electrochimic al reacției de cuplare oxidativă a siringaldazinei cu glucozamina

Monitorizarea reacțiilor mediate de lacază poate fi ușor efectuată prin înregistrarea proceselor redox suferite de substraturile folosite. Pentru a înțelege mai bine mecanismul de oxidare a ligninelor s-au studiat mai întâi efectele electrochimice care apar în reacția de cuplare cu glucozamina a unui compus model din lignină utilizând lacaza ca și catalizator.

Proprietățile de oxidare înregistrate pentru reacția siringaldazinei cu glucozamina, au fost determinate cu ajutorul voltametriei ciclice, viteza de reacție în reacțiile catalizate de lacază fiind considerată a fi proporțională cu diferențele de potențial redox dintre substrat și lacază [169].

Experimentele au fost realizate cu enzima adsorbită pe electrodul de lucru (electrod de grafit), unde are loc reducerea bioelectrocatalitică a oxigenului, fiind observată o scădere a densității de curent cauzată de transferul direct de electroni de pe suprafața electrodului la lacaza adsorbită și mai apoi la oxigenul molecular din soluție. În acest mecanism donorul de electroni, în cazul nostru siringaldazina, pătrunde în situsul activ al enzimei unde este oxidat într-o singură etapă de oxidare, generând un compus activ din punct de vedere electrochimic (posibil un radical) care la rândul lui poate fi re-redus la suprafața electrodului.

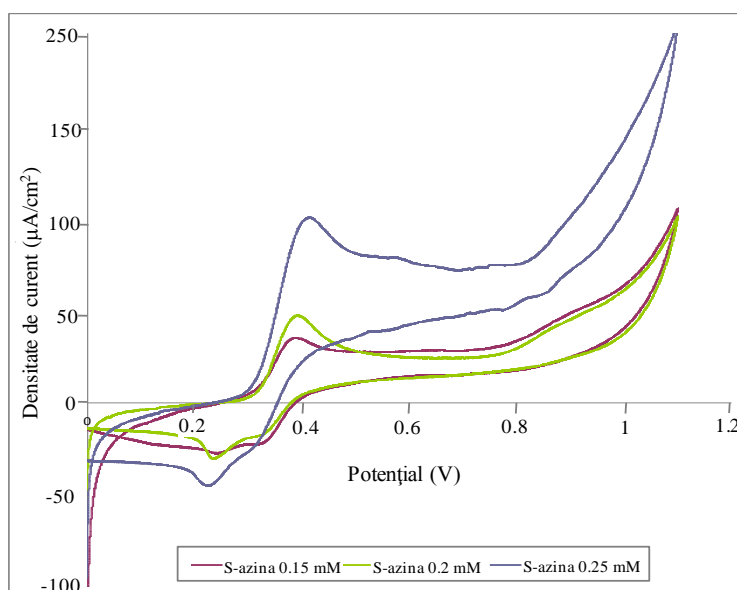


Figura 2.17. Voltamogramele ciclice ale siringaldazinei la diferite concentrații (0.15 mM, 0.2 mM, 0.25 mM) în absența lacazei

La trasarea voltamogramelor ciclice a siringaldazinei la diferite concentrații în amestec de 50% (vol.) acetonă în apă (Figura 2.17.) se observă că are loc o scădere a densității de curent odată cu creșterea concentrației putându-se deduce că reacția de oxidare poate avea loc la suprafața electrodului și numai la trecerea de curent electric fără adăugare de enzimă. Voltamogramele înregistrate pentru siringaldazină arată că a avut loc un proces aproape reversibil (I_a/I_c) cu un potențial de aprox. 0.4 V față de electrodul de referință (electrodul de calomel). Parametrii electrochimici observați pentru picurile anodice și catodice din voltamogramele obținute la diferite concentrații de siringaldazină sunt redați în Tabelul 2.11. Pentru procesele anodice înregistrate se poate observa că potențialul de pic (E_a) crește ușor odată cu creșterea concentrației de siringaldazină, aceeași tendință observându-se și pentru curenții de pic (i_{p_a}). În cazul proceselor catodice potențialul de pic (E_c) scade ușor odată cu creșterea concentrației de siringaldazină la fel și curenții de pic înregistrați pentru cele două procese catodice care au loc ($i_{p_{c1}}$, $i_{p_{c2}}$), excepție făcând $i_{p_{c1}}$ la care nu se observă o dependență de concentrația de siringaldazină.

Tabel 2.11. Parametrii electrochimici ai siringaldazinei la diferite concentrații

Concentrație [mM]	i_{p_a} [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	E_a [V]	$i_{p_{c1}}$ [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	E_{c1} [V]	$i_{p_{c2}}$ [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	E_{c2} [V]
0.15	34.87	0.386	-22.49	0.323	-27.97	0.242
0.20	47.04	0.391	-17.70	0.324	-30.60	0.234
0.25	100.2	0.412	-27.06	0.299	-45.44	0.224

E reprezintă potențialul picului anodic (E_a) respectiv catodic (E_c) iar ip reprezintă curenții de pic anodici (i_{p_a}) respectiv catodici (i_{p_c})

După adăugarea enzimei reacția a decurs mult mai repede, având loc o scădere a densității de curent a picului anodic comparativ cu cea înregistrată pentru reacția în care nu am avut enzimă, după cum se poate vedea din Figura 2.18.

Reacția de cuplare a siringaldazinei cu glucozamina a fost realizată la un raport molar siringaldazină/ glucozamină de 1 : 2, conform metodei descrise la punctul 3.3.6. iar procesele electrochimice înregistrate sunt redată în Tabelul 2.12.

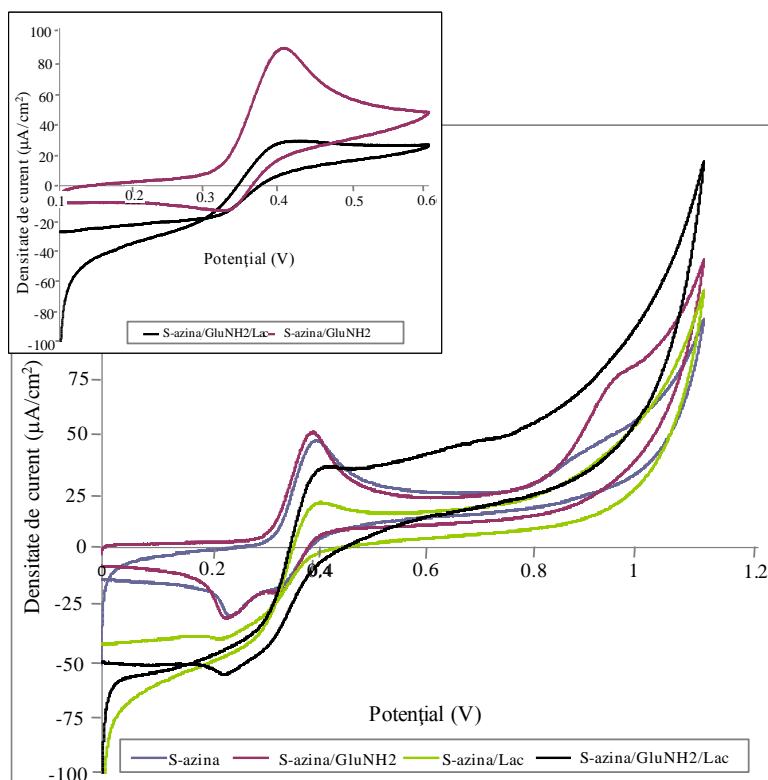


Figura 2.18. Voltamogramele ciclice înregistrate în reacțiile de oxidare a siringaldazinei cu glucozamina (raport molar 1 : 2) utilizând lacaza ca și catalizator. Inset: voltamogramele ciclice înregistrate pentru reacțiile dintre siringaldazină și glucozamină cu sau fără lacază ca și catalizator

Pentru procesele anodice se poate observa că E_{a1} rămâne aprox. constant pentru toate reacțiile, în timp ce i_{pa1} scade în prezența enzimei, scăderea fiind mai accentuată în cazul reacției control în care am avut doar siringaldazină și lacază adsorbită pe electrod (Tabel 1.12.). În lipsa enzimei, la adăugarea de glucozamină se observă o ușoară creștere a i_{pa1} comparativ cu reacția control în care avem numai siringaldazina. Se mai observă un proces anodic în jurul valorii de potențial de 0.9 V, bine conturat în cazul controlului cu glucozamină, excepție făcând reacția dintre substrat și lacază unde nu a fost observat nici un proces anodic la aceasta valoare de potențial. În voltamogramele înregistrate pentru siringaldazină și pentru reacția acesteia cu glucozamina în prezența lacazei densitatea de pic înregistrată la acest potențial este foarte mică, picul este aplatizat observându-se o ușoară „undă”

semn că oxidarea la suprafața electrodului are loc diferit. În cazul proceselor care au loc la catod, în absența enzimei parametri electrochimici corespunzători primului pic catodic au aproximativ aceleasi valori, iar la adăugarea de enzimă în reacție $i_{p_{c1}}$ scade puternic pentru reacția cu glucozamină catalizată de lacază, dipărând total în controlul siringaldazină/lacază, datorită reducerii radicalului format. Valorile densităților de curent $i_{p_{c2}}$ scad în reacțiile catalizate de lacază, scădere care este de asemenea mai pronunțată în lipsa glucozaminei în reacția cu lacază.

Table 2.12. Parametrii electrochimici a reacției de cuplare a siringaldazinei cu glucozamina folosind lacaza ca și catalizator

Denumirea probei	$i_{p_{a1}}$ [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	E_{a1} [V]	$i_{p_{a2}}$ [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	E_{a2} [V]	$i_{p_{c1}}$ [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	E_{c1} [V]	$i_{p_{c2}}$ [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	E_{c2} [V]
S-azina	47.14	0.40	undă	*	-17.7	0.32	-30.6	0.23
S-azina/GluNH ₂	48.99	0.39	77.53	0.95	-17.1	0.32	-28.41	0.21
S-azina/ GluNH ₂ /Lac	34.97	0.40	undă	*	-46.28	0.29	-40.59	0.21
S-azina/Lac	19.60	0.40	*	*	undă	*	-55.56	0.21

* Nu au avut loc procese electrochimice.

2.5.1.1.2. Studiul electrochimic al reacției de cuplare oxidativă a ligninelor cu glucozamina

Lignina, prin grupările fenolice pe care le conține este considerată a fi un donor de electroni eficient în reducerea oxigenului la apă în prezența lacazei. Oxidarea electrochimică a fenolului are loc în principal prin transferul unui singur electron cu formarea de produși polimerici care se depun pe suprafața electrodului. Procesul de polimerizare a ligninei pe suprafața electrodului a fost demonstrat prin scăderea curentului de oxidare înregistrat în aceeași soluție, în timpul celei de-a doua scanări (Figura 2.19.).

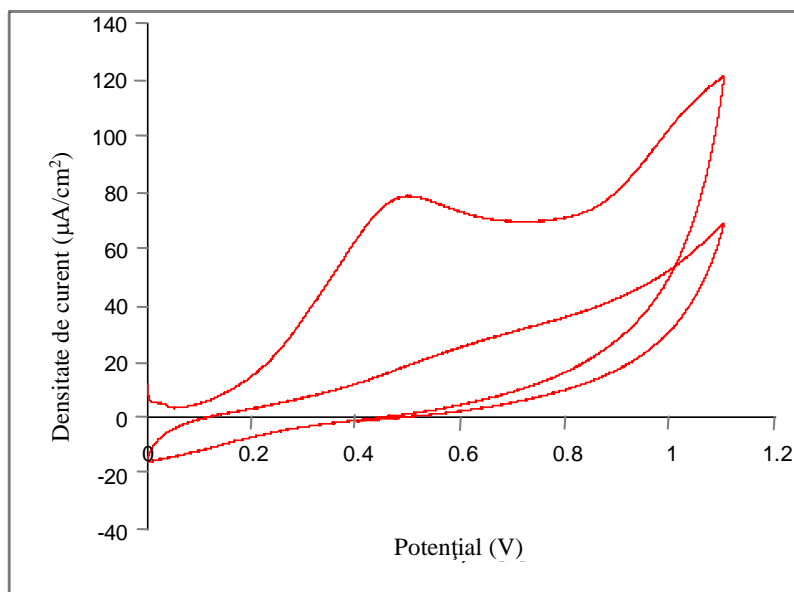


Figura 2.19. Voltamograma ciclică a ligninei de tip OHL în amestec de acetona-apă 50/50 (v/v) (două scanări)

În prezența lacazei, voltamogramele ciclice ale ligninelor OHL, SGWL, SWL și KSL arată o scădere importantă a picului anodic, după cum se poate vedea în Figurile 2.20, 2.21, 2.22, 2.23. Odată cu adăugarea glucozaminei în soluție, picul anodic a înregistrat o scădere mai puțin accentuată decât în cazul în care reacția a fost realizată numai în prezența lacazei. În toate cazurile enzima a fost adsorbită pe suprafața electrodului iar electrodul a fost curățat înainte de fiecare utilizare pentru a preveni formarea de film polimeric pe suprafața acestuia care să împiedice trecerea curentului electric în soluție.

În cazul tuturor ligninelor se observă absența picurilor catodice, care erau foarte bine conturate în cazul siringaldazinei lucru care indică faptul că procesul de oxidare este urmat de o reacție chimică care îndepărtează rapid produsul generat, având loc reacțiile de cuplare. Voltamogramele ciclice au fost înregistrate în aceleași condiții pentru toate ligninele studiate cu excepția ligninei AWL. Din moment ce procesele electrichimice înregistrate au fost similare pentru toate celelalte patru lignine putem trage concluzia că și în cazul ligninei AWL reacțiile de oxidare au decurs similar din punct de vedere electrochimic.

Trebuie amintit că potențialele picurilor anodice nu sunt strict aceleași cu potențialele de oxidare însă acestea furnizează informații suficiente despre proprietăților redox ale ligninelor pentru a putea determina reactivitatea acestora în reacțiile de cuplare enzimatică.

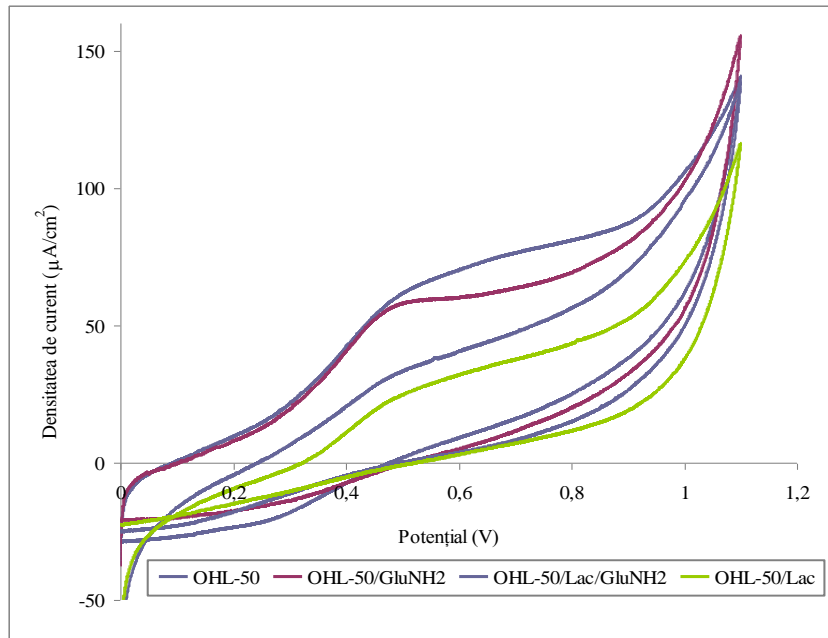


Figura 2.20. Voltamogramele ciclice ale reacției de cuplare enzimatică a ligninei OHL cu glucozamina (raport molar OH fenolic total/glucozamină 1:2.8) utilizând lacaza ca și catalizator

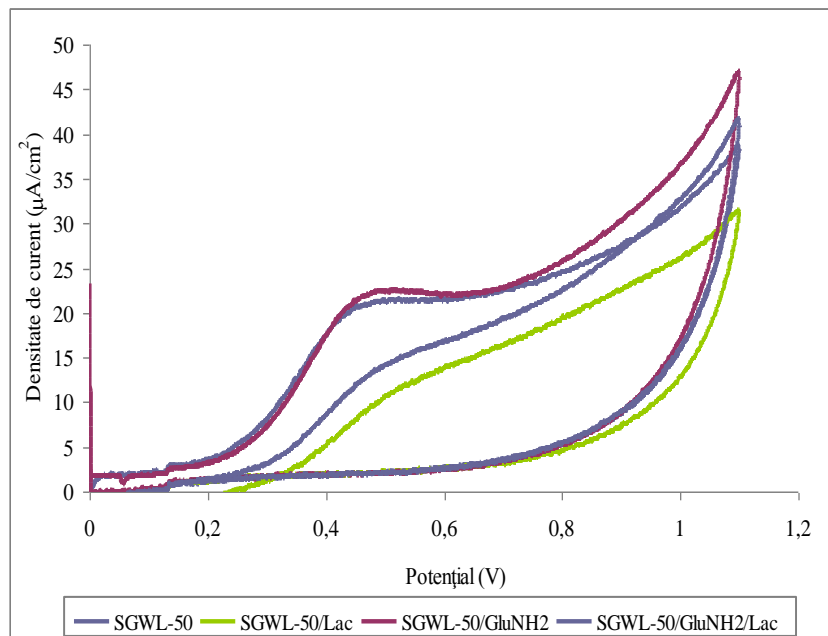


Figura 2.21. Voltamogramele ciclice ale reacției de cuplare enzimatică a ligninei SGWL cu glucozamina (raport molar OH fenolic total/glucozamină 1:2.8) utilizând lacaza ca și catalizator

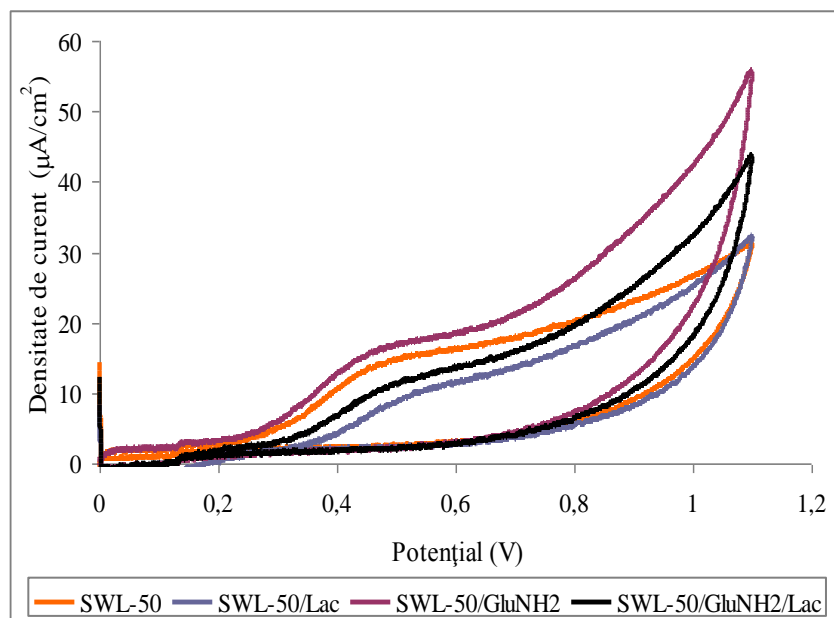


Figura 2.22. Voltamogramele ciclice ale reacției de cuplare enzimatică a ligninei SWL cu glucozamina (raport molar OH fenolic total/glucozamină 1:2.8) utilizând lacaza ca și catalizator

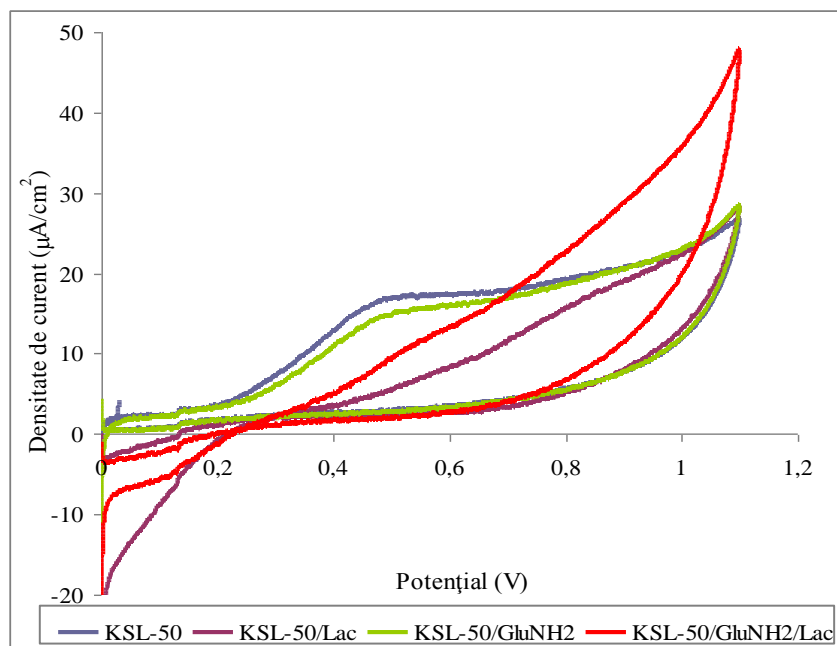


Figura 2.23. Voltamogramele ciclice ale reacției de cuplare enzimatică a ligninei KSL cu glucozamina (raport molar OH fenolic total/glucozamină 1:2.8) utilizând lacaza ca și catalizator

Cum curenții pic au legătură cu concentrația de lignină folosită în reacție, atunci când are loc oxidarea acesteia de către lacază se înregistrează o scădere a densității de curent datorită consumului de substrat prezent la suprafața electrodului. Toate ligninele prezintă un potențial redox la aproximativ 0.48 V, potențial care nu se modifică după tratamentul enzimatic. După cum era de așteptat intensitatea picului anodic a scăzut la adăugarea de lacază în reacție, datorită oxidării grupărilor fenolice din lignină, densitatea de curent fiind de două ori mai mică decât cea înregistrată atunci când am avut doar lignina în soluție. În cazul reacției cu glucozamina se observă că reacția decurge diferit pe suprafața electrodului densitatea de curent anodic fiind mai mare decât în cazul controlului cu lacază, lucru care poate fi datorat unei ușoare inhibiții a lacazei la adăugarea de glucozamină. În cazul celorlalte lignine s-au observat aceleași tendințe electrochimice, semn că oxidarea cu lacază a acestora în prezența glucozaminei a avut loc la suprafața electrodului.

Deși a fost demonstrat anterior (în subcapitolul 2.5.1) că din cele cinci lignine studiate doar ligninele OHL și AWL au suferit modificări structurale și de masă în reacțiile de cuplare enzimatică prin legare covalentă cu glucozamina, prin studiile de voltametrie ciclică a fost dovedit că la suprafața electrodului reacțiile au loc diferit apărând diferențe între curenții de pic anodici și în cazul ligninelor SGWL, SWL și KSL semn că oxidarea a avut loc. Această tendință s-ar putea datora faptului că atât enzima cât și trecerea curentului electric la interfața electrod de grafit – lacază adsorbită / amestec de reacție, au efect sinergic asupra oxidării tuturor ligninelor studiate.

2.5.1.1.3. Influența concentrației de lignină asupra reacțiilor de cuplare enzimatică a a ligninelor cu glucozamina

Concentrația de lignină are un efect important asupra reacțiilor electrochimice influențând atât densitatea de curent cât și viteza de reacție. Datorită faptului că lacazele oxidează substraturile fenolice cu formare de radicali insabili care pot fi mai apoi cuplați prin legături covalente cu glucozamina, au fost realizate o serie de experimente cu diferite concentrații de lignină (1, 3, 5 mg/ml) menținându-se constantă concentrația de glucozamină (4,8 mg/ml) conform metodei descrise la punctul 3.3.6., pentru a investiga parametrii electrochimici și diferențele care apar în reacțiile ligninelor OHL, SGWL, SWL, AWL cu glucozamina. La concentrații de lignină mai mari de 5mg/ml a fost observată formarea unui film pe suprafața electrodului de grafit blocând trecerea curentului prin soluție.

Din Figura 2.24. se poate observa că în cazul ligninei de tip OHL, densitatea curentului de pic crește odată cu creșterea concentrației de lignină atât în cazul reacției cu glucozamina (OHL/Lac/GluNH₂) cât și în reacțiile control. La concentrații mai mari de lignină (3, 5 mg/ml) s-au observat mici modificări ale curenților de pic în reacțiile control care conțin și glucozamină (OHL/GluNH₂) comparativ cu cele înregistrate pentru OHL, observându-se o ușoară creștere a i_{p_a} pentru OHL/GluNH₂ la o concentrație de lignină de 3 mg/ml respectiv o ușoară scădere a i_{p_a} atunci când concentrația de lignină a fost cea mai mare (5 mg/ml).

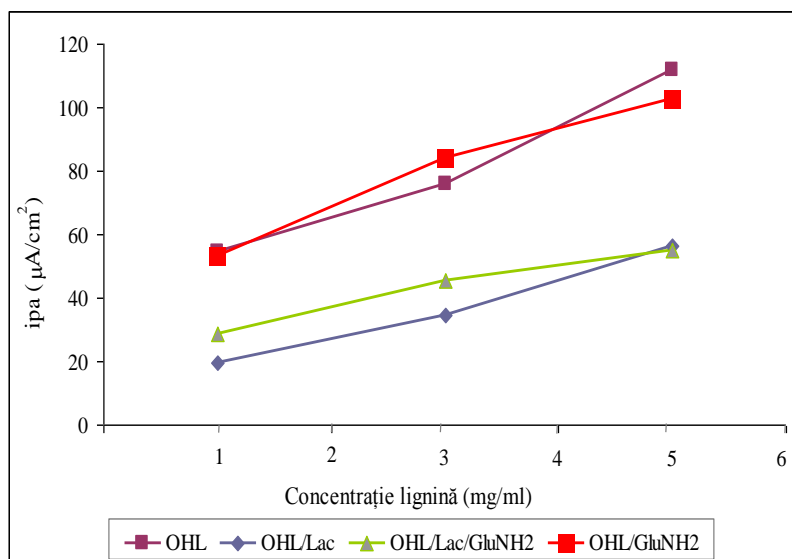


Figura 2.24. Dependența curentului anodic de pic de concentrația de lignină în reacția de cuplare enzimatică a ligninei OHL cu glucozamina.

Aceleași tendințe au fost observate și în cazul ligninelor SGWL, SWL și KSL la adăugarea de glucozamină în amestec după cum se poate observa și din parametrii electrochimici redați în Tabelul 2.13. Acest lucru care poate fi explicat prin faptul că deoarece în reacție avem glucozamină și lignină în concentrații mari, aceasta se poate adsorbi pe electrod astfel blocând trecerea curentului prin soluție. În reacțiile în care s-a adăugat și lacază ca și catalizator (OHL/Lac), la concentrații de 1 respectiv 3 mg/ml de lignina OHL, se observă că densitățile de curent sunt mult mai mici comparativ cu reacțiile în care avem și glucozamina (OHL/Lac/GluNH₂) semn că reacția de oxidare are loc cu viteză mai mare astfel consumându-se din substrat și formându-se produs de reacție. În cazul în care lignina OHL a fost adăugată în concentrația cea mai mare (5 mg/ml), reacția a decurs mult mai bine, intensitățile de curent fiind foarte apropiate de reacția control OHL/Lac (Figura 2.24.). Pentru celelalte lignine tendințele observate sunt total opuse celor găsite pentru lignina OHL și anume, la concentrații de 1 mg/ml valorile i_{pa} pentru reacțiile SWL/Lac/GluNH₂, SGWL/Lac/GluNH₂ respectiv KSL/Lac/GluNH₂, sunt aproape identice cu cele ale controalelor în care am avut numai lacază iar concentrații mai mari reacțiile au decurs mai încet, densitățile de curent înregistrate fiind mai mari decât a reacțiilor control cu lacază. Ligninele studiate se comportă diferit în reacțiile de cuplare oxidativă lucru datorat originii acestora și metodelor de extracție diferite.

Tabel 2.13. Parametrii electrochimici a reacției de cuplare a ligninelor SGWL, SWL, KSL cu glucozamina folosind lacaza ca și catalizator

Denumirea probei	i_{p_a} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)			E_a (mV)
	Concentrație lignină (mg/ml)			
	1	3	5	
SGWL	10,02	15,87	21,12	480
SGWL/GluNH ₂	9,88	16,22	21,01	
SGWL/Lac	4,03	6,95	9,83	
SGWL/Lac/GluNH ₂	4,03	7,95	13,41	
SWL	10,35	14,32	19,58	480
SWL/GluNH ₂	10,48	16,62	19,48	
SWL/Lac	4,52	8,25	6,40	
SWL/Lac/GluNH ₂	4,52	10,76	9,25	
KSL	11,37	16,68	26,18	480
KSL/GluNH ₂	11,11	16,92	25,66	
KSL/Lac	4,45	5,18	6,09	
KSL/Lac/GluNH ₂	4,45	8,68	13,42	

2.5.1.1.4. Influența raportului OH fenolic total / glucozamină asupra reacțiilor de cuplare enzimatică

Datorită potențialului redox scăzut al lacazelor acestea au nevoie pentru inițierea reacțiilor de oxidare de grupări fenolice libere pe scheletul aromatic din lignină lucru care în mod normal îi îngreșează aplicațiile în biotehnologie deoarece în ligninele naturale majoritatea grupărilor fenolice sunt substituite în timpul reacțiilor radicalice care au loc la sinteza acestora [170]. Astfel, datorită faptului că reactivitatea lacazei este dată de grupările fenolice prezente în molecula de lignină, raportul molar dintre grupările OH aromatice totale și glucozamină are o influență importantă asupra conversiei și asupra compoziției produsului obținut. Cantități echivalente de substraturi ar simplifica prelucrarea amestecului de reacție deși excesul de glucozamină față de grupările fenolice totale din lignină ar putea conduce la conversii îmbunătățite. În acest studiu s-a lucrat cu diferite rapoarte molare OH_{Ar}total / glucozamină (1 : 1,4; 1 : 2,8; 1 : 4,2) menținându-se constantă concentrația de lignină la 1 mg/ml conform protocolului descris la punctul 3.3.6. Din voltamogramele ciclice înregistrate au fost determinate variațiile densităților de curent în reacțiilor oxidative ale ligninelor OHL, SGWL, SWL, KSL cu glucozamina în diferite rapoarte molare comparativ cu reacțiile control în care nu a fost adăugată glucozamina (Tabel 2.14.). Pentru toate ligninele studiate se observă o ușoară creștere a densității curentului de pic la adăugarea de glucozamină (Lignină/GluNH₂), înaintea inițierii reacției de oxidare cu lacază. Această creștere a i_{p_a} este mai accentuată cu creșterea concentrației de glucozamină, excepție făcând lignina SWL când la concentrații mici de glucozamină (Raport molar OH_{Ar} total : GluNH₂ 1 : 1,4) s-a obținut valoarea cea mai mare (i_{p_a} SWL/ GluNH₂ = 18.2 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$). Comparând densitățile de pic înregistrate pentru lignine înaintea reacțiilor enzimatică se poate observa că lignina OHL are valoarea i_{p_a} cea mai mare (75.88 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$), celelalte lignine având densități de curent asemănătoare. Cum potențialul redox a ligninelor depinde de structura chimică a acestora, valoarea mare a i_{p_a} găsită pentru lignina OHL poate fi explicată și prin faptul că aceasta are conținutul

cel mai mare de unități siringil și prin urmare cele mai multe grupări metoxil care au fost găsite ca fiind donori puternici de electroni care cresc densitatea electronică a grupărilor fenoxil astfel făcându-le mai ușor oxidabile [171].

În cazul reacțiilor de modificare enzimatică a ligninelor cu glucozamina din datele prezentate în Tabelul 2.14. se poate observa că oxidarea compușilor fenolici din moleculele de lignină în prezență de glucozamină în diferite rapoarte molare, are loc diferit, lucru demonstrat prin scăderea densităților de curent față de reacțiile control (Lignină/Lac). Pentru toate ligninele se observă o scădere a i_{p_a} în reacțiile Lignină/Lac/GluNH₂ comparativ cu reacțiile control în care am avut numai Lignină/GluNH₂, scădere care este mai puțin accentuată odată cu creșterea raportului OH_{Ar} total / GluNH₂. Reacțiile de cuplare oxidativă au mers cel mai bine la concentrații mici de glucozamină (OH_{Ar} total / GluNH₂ = 1 : 1,4) pentru toate ligninele scăderile densităților de curent fiind aproape identice cu cele înregistrate în reacțiile în care nu am avut glucozamină (Lignină/Lac), excepție făcând lignina SGWL care și la OH_{Ar} total / GluNH₂ = 1 : 2,8 a înregistrat o scădere a valorii i_{p_a} de 2.22 ori mai mică decât SGWL/GluNH₂, valoare apropiată de cea a controlului SGWL/Lac (2,28 ori mai mică decât pentru SGWL). Prin urmare reacțiile de modificare enzimatică a ligninelor cu glucozamina decurg cel mai bine când raportul OH_{Ar} total : GluNH₂ a fost de aproximativ 1 : 1, odată cu creșterea concentrației de glucozamină reacțiile decurgând mai încet probabil datorită efectului inhibitor al acesteia asupra lacazei.

Tabel 2.14. Influența raportului molar OH_{Ar} total : GluNH₂ asupra densității de curent în reacțiile de cuplare enzimatică a ligninelor cu glucozamina

Denumirea probei	i_{p_a} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) / Scădere i_{p_a}			
	Raport molar OH _{Ar} total : GluNH ₂			
	1 : 1,4	1 : 2,8	1 : 4,2	Fără GluNH ₂
OHL	-	-	-	75.88
OHL/Lac	-	-	-	34.69 / 2.18
OHL/GluNH ₂	79.00	84.18	93.37	-
OHL/Lac/GluNH ₂	40.96 / 1.92	45.25 / 1.86	55,84 / 1.67	-
SGWL	-	-	-	15,87
SGWL/Lac	-	-	-	6,95 / 2.28
SGWL/GluNH ₂	15,48	16,22	21,31	-
SGWL/Lac/GluNH ₂	6,95 / 2.22	6,95 / 2.33	13,15 / 1.62	-
SWL	-	-	-	15,32
SWL/Lac	-	-	-	8,25 / 1.86
SWL/GluNH ₂	18,20	17,62	17,53	-
SWL/Lac/GluNH ₂	9,76 / 1.86	10,76 / 1.64	10,75 / 1.63	-
KSL	-	-	-	16,68
KSL/Lac	-	-	-	7,18 / 2.32
KSL/GluNH ₂	16,80	16,69	17,85	-
KSL/Lac/GluNH ₂	10,47 / 1.60	10,68 / 1.56	12,86 / 1.38	-

Scăderea i_{p_a} - reprezintă raportul dintre valorile i_{p_a} înregistrate pentru controalele fără lacază și cele găsite pentru reacțiile în care s-a folosit lacaza ca și catalizator.

2.5.1.2. Studiul reactivității lacazei în reacțiile de cuplare enzimatică a ligninelor cu glucozamina

În acest studiu s-a urmărit reactivitatea lacazei *Trametes versicolor* în amestec de acetonă-apă 50/50 (v/v), în reacțiile de cuplare enzimatică a ligninelor studiate cu glucozamina prin măsurarea consumului de oxigen dizolvat. În capitolul 2.4.4. a fost arătat că reactivitatea lacazei în reacțiile de polimerizare a celor cinci lignine în mediu de solvent organic-apă a scăzut în ordinea OHL > KSL > AWL > SWL > SGWL cel mai mare consum de oxigen fiind observat în cazul ligninelor de tip SGH. În Figura 2.25. este redată reactivitatea ligninei de tip OHL în reacția de cuplare enzimatică la adăugarea de glucozamină în diferite rapoarte molare OH_{Ar} total lignină / glucozamină.

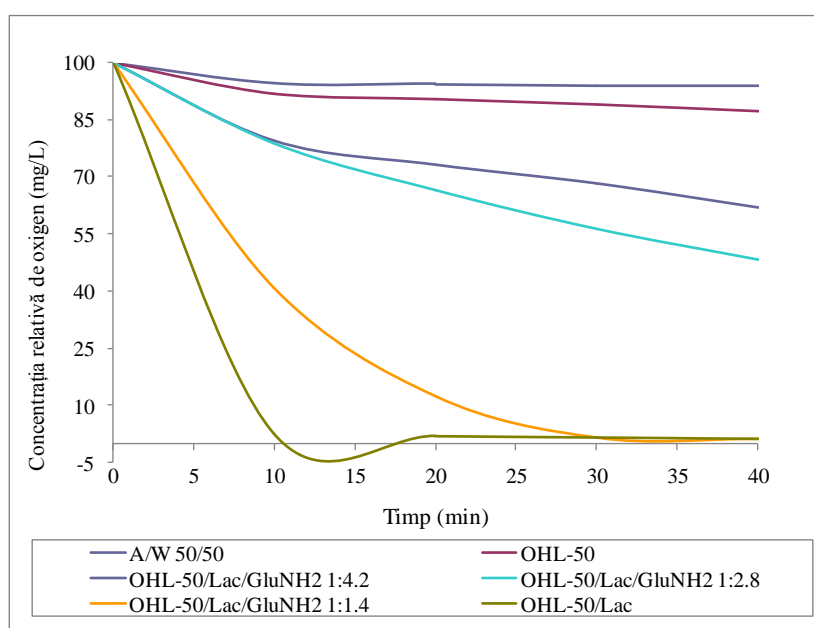


Figura 2.25. Consumul de oxigen în raport cu timpul în reacțiile de cuplare enzimatică a ligninei OHL cu glucozamina în diferite rapoarte OH_{Ar} Total/glucozamină

Pe baza rezultatelor prezentate în figură putem observa că cel mai mare consum de oxigen a fost înregistrat atunci când glucozamina a fost adăugată în raportul molar cel mai mic relativ la totalul de grupări OH aromatice din lignină (OH_{Ar} total:glucozamină = 1:1,4). Alura curbei este asemănătoare cu cea a reacției control în care am avut doar lignină și lacază dar în acest caz oxidarea completă a fost observată mai târziu, la aproximativ 30 de minute de la inițierea reacției. Când în amestecul de reacție s-a introdus un exces de glucozamină de două până la trei ori mai mare (1:2.8 respectiv 1:4.8) viteza inițială de oxidare a scăzut cu aproximativ 50% ca urmare a scăderii activității enzimei.

2.5.2. Studiul reacțiilor de cuplare covalentă a ligninelor cu tripeptida glicil-tirosil-glicina (GYG)

Prin aplicarea tratamentului enzimatic se dorește păstrarea proprietăților funcționale ale ligninei și ale co-substratului precum și dobândirea unor proprietăți noi determinate de structura rețelei polimerice produse. În Figura 2.26. este redată formula structurală a tripeptidei glicil-tirosil-glicina care poate avea și rol de mediator al lacazei în reacția de degradare enzimatică prin prezența restului de tirozină.

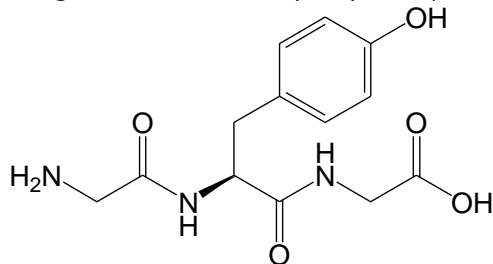


Figura 2.26. Formula structurală a tripeptidei glicil-tirozil-glicina

În cazul reacției de cuplare a ligninelor cu tripeptida glicil-tirozil-glicina doar ligninele de tip OHL și AWL au arătat modificări structurale semnificative. Spectrele FT-IR date spre exemplificare în Figura 2.27. prezintă comparativ diferențele între benzile de adsorbție ale produsilor rezultați în urma modificării enzimatică a ligninei AWL cu cele ale reacțiilor control (AWL-50/GYG și AWL-50/Lac în care am avut numai fracțiunea obținută în 50% acetonă, de la care s-a pornit și cosubstratul GYG respectiv lacaza). În spectrul AWL-50/Lac/GYG, obținut pentru produsul de reacție, fost observă apariția unei benzi noi la 1660 cm^{-1} corespunzătoare grupării amidice, bandă care în reacțiile control nu este vizibilă.

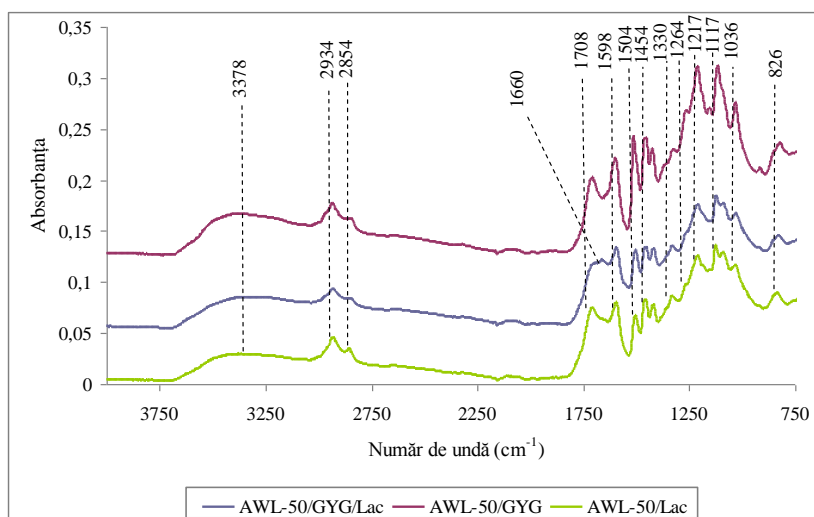


Figura 2.27. Spectrul FT-IR al reacțiilor de oxidare enzimatică a ligninei din paie de grâu (AWL) pretratate cu tripeptida glicil-tirozil-glicina

Generarea unei noi legături C-N precum și creșterea conținutului total de grupări hidroxil fenolic a fost evidențiată și prin calcularea raportului amidă/guaiacil din intensitățile benzilor FT-IR specifice acestor grupări (1660 cm^{-1} corespunzătoare grupării amidice și 1265 cm^{-1} pentru guaiacil) precum și a raportului OH aromatic total/ conținut de guaiacil cu ajutorul datelor obținute prin analiza ^{31}P -RMN a produșilor obținuți. Rezultatele care atestă că a avut loc reacția de cuplare enzimatică a ligninelor OHL și AWL cu tripeptida GYG, sunt redate în Tabelul 2.15.

Tabelul 2.15. Caracterizarea produșilor de reacție rezultați în urma reacției de oxidare enzimatică a ligninei cu tripeptida GYG.

Denumirea probei	Mw (g/mol)	Mw/Mn	Amidă/G (IR)	OH _{Ar} /G
OHL-50	2346	8.9	0.35	3.85 (RMN)
OHL-50/GYG	2423	8.2	0.36	3.85 (RMN)
OHL-50/Lac	18587	8.0	0.8	4.00 (RMN)
OHL-50/Lac/GYG	5708	14.8	0.4	4.4 (RMN)
AWL-50	3123	4.8	0.6	0.30 (IR)
AWL-50/GYG	3759	7.4	0.5	0.27 (IR)
AWL -50/Lac	17359	13.3	0.8	0.28 (IR)
AWL-50/Lac/GYG	13214	8.5	1.0	0.4 (IR)

Din datele prezentate în tabel se poate observa o creștere a masei moleculare a produșilor rezultați în urma reacției de oxidare comparativ cu controlul fără enzimă și cu lignina de la care s-a pornit (fracțiunile obținute în amestec de 50 % vol. acetonă-apă) demonstrând de asemenea ca reacția de cuplare a avut loc.

Datorită prezenței unei grupări fenolice în molecula tripeptidei era de așteptat o creștere a conținutului de grupări hidroxil fenolice din compoziția ligninei fapt ce a fost demonstrat prin creșterea raportului OH aromatic total/guaiacil. Se observă și în acest caz că masele moleculare ale produșilor obținuți în reacțiile în care s-a utilizat ca și cosubstrat tripeptida GYG sunt mult mai scăzute decât celea în care s-a folosit numai lignină și lacază.

2.5.3. Studiul reacțiilor de cuplare covalentă a ligninei provenită din lemn de esență tare cu chitosanul

Chitosanul a atras atenția ca fiind un agent antimicrobian inofensiv pentru om. Este derivatul deacetilat al chitinei, componentul principal în cochiliile crustaceelor. Mecanismul antimicrobian al chitosanului nu este încă pe deplin înțeles dar este în general acceptat că grupările amino primare oferă sarcini pozitive care interacționează cu reziduurile încărcate negativ de pe suprafața microbilor. Obținerea de conjugați lignină-chitosan pe cale enzimatică este foarte provocatoare având un impact mare asupra aplicațiilor chitosanului. Conjugații de lignină cu

chitosanul pot aduce îmbunătățiri proprietăților chitosanului și anume creșterea proprietățile antimicrobiene ale acestuia având utilizări în hidrogeluri antimicrobiene sau în ambalaje precum și îmbunătățirea răspunsul optic putând fi utilizați ca și pigmenți în materiale sau ca și aditivi în lacuri și vopsele. Lacaza acționează ca un factor cheie în prima etapă a procesului, oxidând compușii fenolici prezenți în lignină lucru care va contribui la o legare mai bună a chitosanului la molecula de lignină. Produsul obținut este multifuncțional dobândind atât proprietăți multifuncționale cât și antimicrobiene cu un nivel acceptabil de durabilitate.

Din cauza faptului ca lignina și chitosanul au solubilități diferite în solvenți organici, chitosanul fiind foarte solubil în medii acide pe când lignina are solubilitate mare în soluții alcaline, reacția de cuplare enzimatică a fost realizată cu chitosanul suspendat în amestecul de reacție urmărind protocolul descris în secțiunea 3.2.6. S-a ales utilizarea ligninei de tip OHL în această reacție datorită conținutului mare de grupări fenolice precum și datorită masei moleculare mici a acesteia. Reacția a fost realizată în amestec de 50/50 (v/v) acetonă-apă iar după 24 de ore reacția a fost stopată, particulele de chitosan au fost filtrate și spălate de nenumărate ori cu acetonă pentru îndepărtarea ligninei adsorbite la suprafața chitosanului. Atât supernatantul cât și faza solidă au fost analizate, rezultatele fiind redate în Tabelul 2.16. și Figura 2.28.

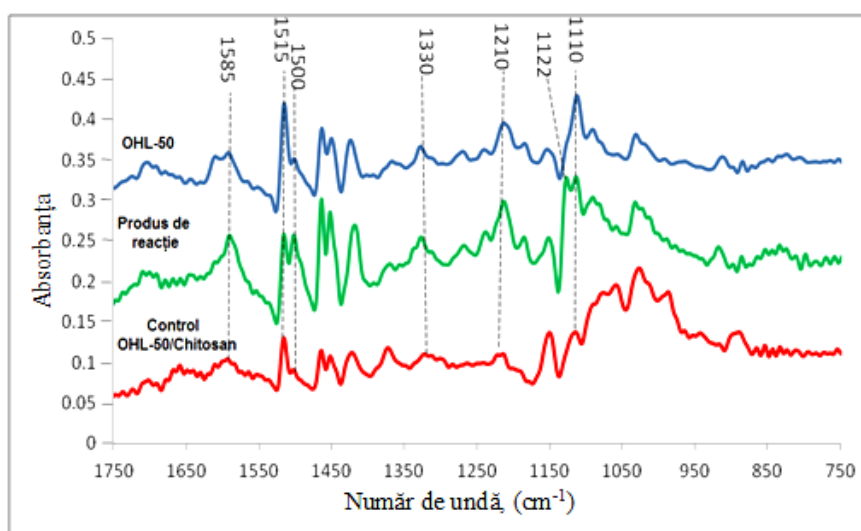


Figura 2.28. Comparații între spectrele FT-IR deconvolute ale produsului de reacție rezultat la modificarea enzimatică a ligninei cu chitosanul, lignina de la care s-a pornit (OHL-50) și controlul fără lacază (OHL-50/Chitosan)

Din spectrul deconvoluat al fazei solide (chitosanului suspendat în reacție) se observă apariția unei benzi de absorbție la 1122 cm^{-1} precum și o creștere a intensității benzii de la 1500 cm^{-1} comparativ cu OHL-50 și controlul fără enzimă. De asemenea în timpul reacției de cuplare chitosanul a căpătat o culoare brună, culoare care s-a menținut și după spălarea repetată cu acetonă.

Tabel 2.16. Distribuția masei moleculare a produșilor rezultați în urma reacției de cuplare a ligninei cu chitosan

Denumirea probei	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)	Mw/Mn
OHL-50	2346	264	8.9
OHL50/Chitosan	2330	282	8.3
OHL-50/Lac	5708	714	8.0
OHL-50/Lac/Chitosan	10091	858	11.8

Prin analiza SEC (Tabelul 2.16.) a produșilor care s-au dizolvat în mediul de reacție (supernatant) se observă că masa moleculară precum și polidispersitatea cresc semnificativ în cazul produsului de reacție comparativ cu controalele cu sau fără enzimă și cu fracțiunea OHL-50. Din cauza problemelor de solubilizare s-au întâmpinat probleme în caracterizarea produsului de reacție cu ajutorul altor analize (RMN). Rezultatele obținute ne încurajează la mai multe investigații în ceea ce privește reacția de cuplare enzimatică dintre lignină și chitosan pentru optimizarea condițiilor de reacție și caracterizarea produșilor formați.

2.5.4. Studiul reacțiilor de cuplare covalentă a ligninei OHL cu mono- și di-esterii acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul

Esterii de oligo- și polizaharide (esteri de polizaharide cu grupări alchil sau alchil-aril) formează o clasă de polimeri cu proprietăți excepționale. Aceștia funcționează ca surfactanți polimerici păstrând majoritatea proprietăților materialelor polimerice inițiale și anume proprietatea de a forma emulsii, geluri, filme, combinată cu solubilitatea parțială în apă sau permeabilitatea. Proprietățile lor funcționale pot fi modificate prin ajustarea raportului dintre partea hidrofilă (carbohidratul polimeric sau oligomeric) și partea hidrofobă (cantitatea și lungimea catenei restului alchil) [132].

În acest studiu s-a propus modificarea enzimatică a ligninei OHL cu mono- (ME) și di-esterul (DE) acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul în vederea obținerii unor produși cu proprietăți noi. Sinteza enzimatică a esterilor aromatici ai sorbitolului a fost realizată în mediu de *terț*-butanol apă utilizând ca și biocatalizator lipaza din *Candida antarctica B* imobilizată pe rășină acrilică macroporoasă (Novozyme 435) (Figura 2.29) [132].

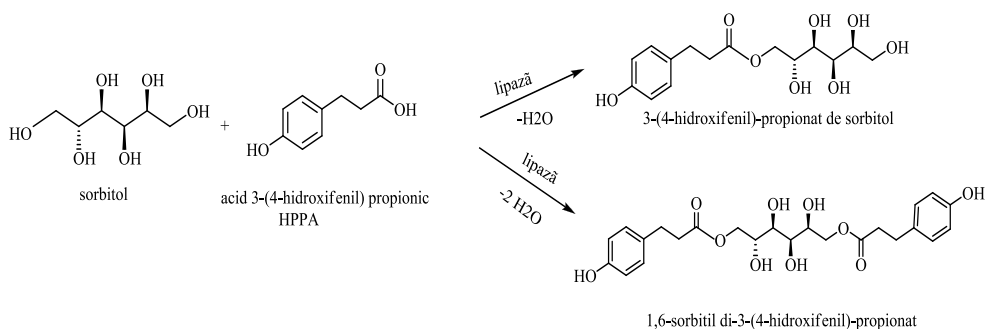


Figura 2.29. Reacția de obținere a mono- și di-esterii acidului 3-(4-hidroxiifenil)-propionic cu sorbitolul, catalizată de lipaze.

Structurile esterilor utilizați în acest studiu sunt similare cu capetele fenolice ale unităților din lignină astfel că în reacțiile de cuplare covalentă lacaza catalizează nu doar lignina cu formare de radicali fenoxi ci poate să catalizeze și esterii cu formare de radicali, aceștia având rol de mediatori ai reacției. Astfel, când lignina este modificată cu lacază și mono- respectiv di-ester, radicalii esterilor formați pot să se cupleze cu radicalii ligninei și să formeze complexe ester-lignină crescând astfel masa moleculară a ligninei conform mecanismului de reacție propus în Figura 2.30. Producții obținute au fost caracterizate cu ajutorul cromatografiei de permeație în gel și ^{31}P -RMN.

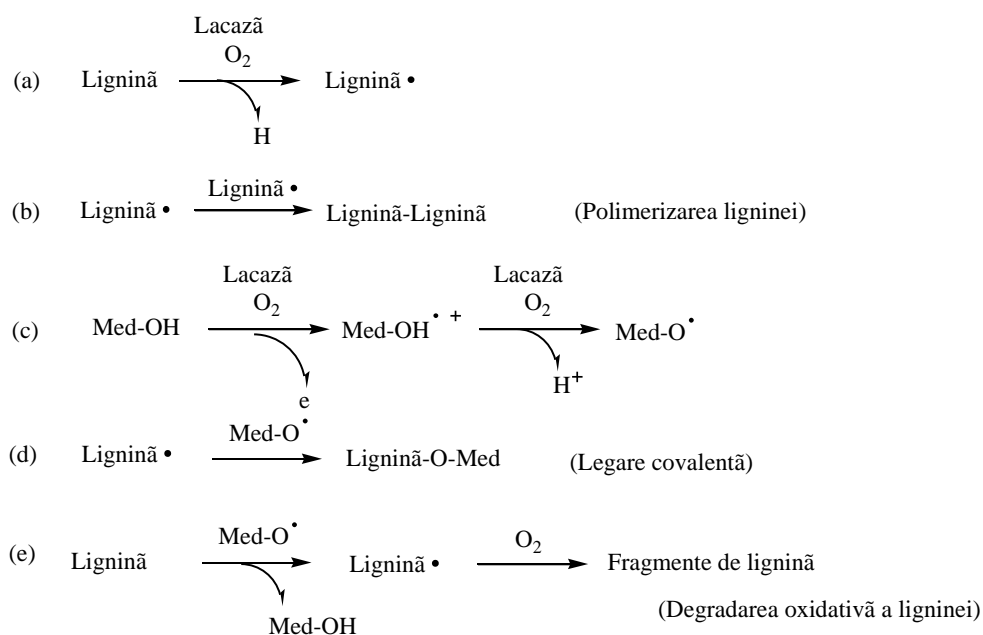


Figura 2.30. Procesele chimice care pot avea loc la modificarea cu lacază ligninei cu esterii sorbitolului. Med-OH reprezintă mono- sau di-esterul acidului 3-(4-hidroxiifenil)-propionic cu sorbitolul care poate avea rol de mediator al reacției.

Tabel 2.17. Distribuția maselor moleculare a produșilor rezultați în urma reacției de cuplare a ligninei cu mono- (ME) sau di-esterul (DE) acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul.

Denumirea probei	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)	Mw/Mn
OHL-50	623	2860	5
OHL-50/Lac	702	3272	4.7
OHL-50/ME	698	3291	4.7
OHL-50/ME/Lac	3218	42101	13.1
OHL-50	623	2860	5
OHL-50/Lac	1433	8405	5.9
OHL-50/DE	877	3897	4.4
OHL-50/DE/Lac	1900	6173	3.2

Din Tabelul 2.17 se poate observa o creștere a masei moleculare a produșilor rezultați în urma reacțiilor ligninei OHL cu mono- sau di-esterul acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul, masă care este de aproximativ cinci ori mai mare în cazul reacției OHL-50/ME/Lacază comparativ cu reacțiile control OHL-50/ME respectiv de aproximativ două ori mai mare în cazul reacțiilor cu DE. Din spectrele FT-IR (Figura 2.31.) se observă o modificare a benzilor de la 1120 cm^{-1} în cazul reacțiilor cu ME respectiv 1200 cm^{-1} pentru reacția ligninei OHL cu DE comparativ cu reacțiile control, benzi care ar putea fi atribuite vibrațiilor asociate cu legăturile C-O din resturile de sorbitol.

Deși s-au observat aceste modificări ale meselor moleculare și ale spectrelor FT-IR, din rezultatele analizelor ^{31}P -RMN (Tabel 2.18.) nu s-au detectat modificări semnificative în ceea ce privește compoziția grupărilor OH în urma reacțiilor cu ME și DE.

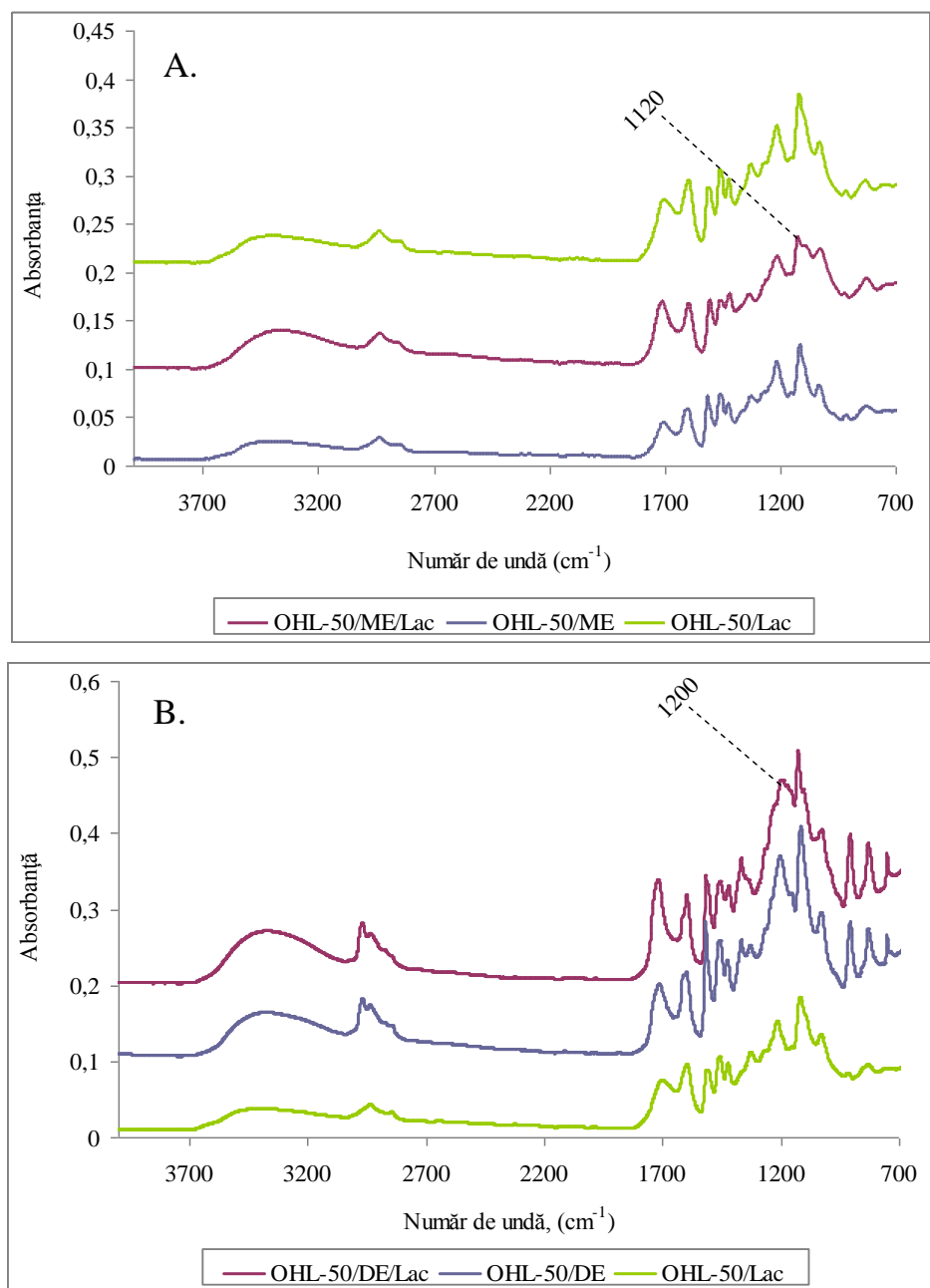


Figura 2.31. Comparații între spectrele FT-IR ale produsului de reacție rezultat la modificarea enzimatică a ligninei OHL cu mono- (A) și di-esterul (b) acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul și reacțiile control ale ligninei cu lacază (OHL-50/Lac) și cu glucozamină (OHL-50/ester).

Tabel 2.18. Analiza ^{31}P -RMN a probelor de lignină înainte și după reacțiile de cuplare oxidativă cu mono- (ME) sau di-esterul (DE) acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul.

Denumirea probei	OH Alifatic (mmol g ⁻¹)	OH Aromatic (mmol g ⁻¹)				COOH (mmol g ⁻¹)	OH _{Ar} Total	OH _{Alif} / OH _{Ar}
		OH Cond.	S - OH	G - OH	H - OH			
OHL-50	1.12	0.90	1.27	0.84	0.23	0.37	3.23	0,35
OHL-Lac	0.98	0.74	0.52	0.41	0.18	0.33	1.85	0,53
OHL-/ME	0,52	1,14	1,26	0,79	0,27	0,46	3,46	0,15
OHL50/ME/Lac	0,52	1,13	1,15	0,81	0,26	0,47	3,35	0,15
OHL-50/DE	1,11	0,90	1,93	0,60	0,79	0,34	4,22	0,26
OHL50/DE/Lac	1,09	0,93	1,43	0,68	0,87	0,38	3,91	0,28

2.5.5. Concluzii parțiale

Dintre cele cinci lignine studiate doar cele de tip OHL și AWL au arătat a fi modificate cu succes în reacțiile de cuplare enzimatică cu glucozamină, observându-se creșteri semnificative ale maselor și ale rapoartelor OH alifatic/OH aromatic determinate cu ajutorul analizei ^{31}P -RMN. Studiile electrochimice cuplate cu cele de determinare ale oxigenului dizolvat au indicat că lacaza este capabilă să catalizeze oxidările tuturor ligninelor în soluție de acetonă-apă 50/50 (v/v) și să realizeze cuplarea covalentă a acestora cu glucozamina. Prin studiile de voltametrie ciclică și de măsurare a oxigenului consumat s-a realizat optimizarea parametrilor care influențează reacțiile de cuplare ale ligninelor cu glucozamina : concentrația de lignină, raportul molar OH aromatic total/glucozamină observându-se o ușoară inhibiție a lacazei la concentrații mari de glucozamină respectiv lignină.

La ligninele de tip OHL și AWL se observă modificări semnificative ale masei moleculare precum și a conținutului de grupări fenolice totale în cazul reacției cu tripeptida glicil-tirozil-glicina. În reacția de modificare enzimatică a ligninei OHL cu chitosan utilizând lacază ca și catalizator se observă de asemenea că au avut loc modificări structurale obținându-se rezultate promițătoare.

S-au observat creșteri ale maselor moleculare ale produșilor formați în urma reacțiilor de cuplare cu mono- și di-esterul acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul însă din analizele FT-IR și ^{31}P -RMN nu au fost observate modificări structurale.

Confirmarea formării de produși prin spectroscopiei FT-IR, cromatografiei de permeație în gel și spectroscopiei RMN, demonstrează valabilitatea metodei enzimatice elaborate pentru modificarea ligninelor prin reacții de cuplare enzimatică cu carbohidrați și peptide.

3. PARTEA EXPERIMENTALĂ

3.1. Materiale

Pentru realizarea studiilor s-au utilizat următorii reactivi: clorhidrat de glucozamină 98% (Sigma Aldrich), tripeptida glicil-tirozil-glicina (Bachem), siringaldazina (Sigma Aldrich), alcool veratrilic (Sigma Aldrich), alcool coniferilic (Sigma Aldrich), chitosan (Flonac C, M=100000), acetonă (Merck), acetat de etil (Merck), Sorbitol (Acros Organics), acid 3-(4-hidroxifenil) propionic (Aldrich), *Candida antarctica B* (Novozymes), *tert*-butanol (Sigma Aldrich), dimetilsulfoxid (Fluka), site moleculare (Sigma Aldrich), cloroform (Merck), metanol (Merck).

Sursa de lignine

În studiul nostru am folosit cinci tipuri de lignine care provin din surse diferite și anume:

- lignina de tip Indulin AT (KSL) - a fost extrasă din lemn de esență moale prin procedeul de tip Kraft care utilizează ca și solvenți de extracție un amestec de hidroxid de sodiu și sulfid de sodiu, furnizată de MeadWestvaco, USA;
- lignina P1000 (SGWL) care este o lignină de tip „soda” fiind extrasă printr-un procedeu de extracție alcalin dintr-un amestec de iarbă de tip Sarkanda și paie de grâu, furnizată de Granit, Elveția;
- lignina de tip Alcell (OHL) este extrasă prin procedeul „organosolv” care utilizează solvenți organici pentru extracția acesteia dintr-un amestec de lemn de esență tare fiind furnizată de Repap Technologies, Canada;
- lignina extrasă din paie de grâu (SWL) prin procedeul de tip „soda” fiind furnizată de Granit, Elveția;
- lignina din paie de grâu (AWL) extrasă prin procedeul de tip „soda” care a fost supusă ulterior unui pretratament alcalin.

Enzime

Lacaza de tip *Trametes versicolor* (activitate de 30.6 U/mg) a fost achiziționată de la Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Activitatea enzimatică a lacazei a fost măsurată în unități (U), 1U fiind definită ca și cantitatea de enzimă care oxidează 1 μmol de siringaldazină într-un minut în amestec de acetonă-apă 50 % vol. la 25 °C. Formarea produsului de reacție a fost urmărită spectrofotometric în timp la 530 nm iar activitatea catalitică a fost determinată din viteza inițială utilizând $\epsilon_{\text{siringaldazină}} = 65 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Peroxidaza din hrean de Tip II (HRP, activitate de 181 Purpurogallin unități/mg) a fost achiziționată de la Sigma Chemical St. Louis, MO. Activitatea catalitică a acesteia a fost testată în tampon de acetat de sodiu trihidrat 0.1M, pH 5 și 25 °C utilizând alcool coniferilic ca și substrat. Consumarea substratului a fost urmărită spectrofotometric la 262 nm iar activitatea catalitică a fost determinată din viteza inițială utilizând $\epsilon_{\text{alcool coniferilic}} = 14000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Lignin peroxidaza cu activitate de 0.18 U/mg a fost achiziționată de la Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Activitatea catalitică a fost testată în tampon fosfat-citrat de sodiu 100 mM, pH 3 și 25 °C utilizând alcool veratrilic ca și substrat. Oxidarea alcoolului veratrilic a fost urmărită la 310 nm și activitatea catalitică a fost determinată din viteza inițială utilizând $\epsilon_{\text{alcool veratrilic}} = 9.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.2. Rețete de lucru

3.2.1. Fraționarea ligninelor în amestecuri de acetonă-apă și acetat de etil

Ligninele au fost suspendate în 10 ml soluții de acetonă-apă sau acetat de etil la o concentrație de 1 respectiv 4% (w/v) iar amestecurile au fost menținute sub agitare la 20°C timp de 24 de ore. Frațiile insolubile au fost separate pe frită (G4) și uscate până la greutate constant în etuvă la 105°C. Cantitatea de lignină din filtrat a fost determinată spectrofotometric prin diluarea probei cu soluție de NaOH 1% (w/w) pe baza curbelor de calibrare obținute pentru fiecare lignină la următoarele lungimi de undă: 290 nm pentru lignina de tip Kraft (KSL) și Alcell (OHL), 287 nm pentru AWL și SGWL, și 285 nm pentru SWL. Extractele au fost apoi evaporate la sec la presiune redusă și uscate în etuvă până la greutate constant și cântărit. Factorul de solubilitate a fost calculat pe baza raportului de masă dintre fracțiunea solubilă și lignin nefracționată adăugată în reacție. Experimentele au fost realizate în duplicat iar bilanțul de masă au fost în domeniul 98%-99%.

3.2.2. Determinarea activității enzimelor

3.2.2.1. Determinarea activității lacazei în amestec de acetonă-apă

Materiale și aparatură

În reacțiile de oxidare cu lacază s-au folosit: siringaldazină (Sigma Aldrich), acetonă (Merck) iar ca și catalizator lacaza din *Trametes versicolor* (Sigma-Aldrich). Determinările experimentale au fost realizate prin metoda colorimetrică folosindu-se spectrofotometrul UV-VIS (UV-1201 series, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

Mod de lucru

Într-o cuvă de sticlă de 1 ml s-au adăugat 0,9 ml siringaldazină 30 μM dizolvată în amestecuri care conțin 40 %, 45%, 50%, 55%, 60% vol. acetonă în apă (saturată cu aer) după care reacția a fost inițiată prin adăugarea a 0,1 ml soluție de lacază (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). S-a urmărit creșterea în absorbanță la 530 nm și 25°C timp de 1 min față de un martor care conține aceeași concentrație de substrat dar în care nu s-a adăugat enzima. Activitatea enzimatică a fost determinată pe baza vitezei inițiale de reacție conform următoarei relații:

$$\text{Activitatea} = (\Delta A) \cdot V \cdot 10^{-3} / t \cdot \epsilon \cdot m \quad (\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{enzimă}})$$

unde:

$\Delta A/t$ - viteza inițială de reacție (A.u./min)

ε - coeficientul molar de extincție al siringaldazinei ($65 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

V - volumul de reacție (ml)

m - cantitatea de enzimă (mg)

Pentru studiile cinetice au fost utilizate diferite concentrații de siringaldazină (10 - 90 μM), ca o cantitate constantă de lacază (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) în mediu de acetonă-apă 50 % (vol.), la 25°C. Valorile constantei Michaelis - Menten (K_M) și a vitezei maxime (V_{max}) au fost obținute pe baza diagramelor Lineweaver - Burk și au fost determinate cu ajutorul vitezelor inițiale de reacție, calculate pentru fiecare concentrație de substrat.

3.2.2.2. Determinarea activității lignin peroxidazei în prezența acetonei

Materiale și aparatură

În reacția de oxidare cu lignin peroxidază s-au folosit: alcool veratrilic (Sigma Aldrich), soluție tampon citrat-fosfat de sodiu (100 mM, pH 3), apă oxigenată (Sigma Aldrich), acetonă (Merck) iar ca și catalizator lignin peroxidaza (Sigma-Aldrich). Determinările experimentale au fost realizate prin metoda colorimetrică folosindu-se spectrofotometrul UV-VIS (UV-1201 series, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

Mod de lucru

Într-o cuvă de sticlă de 1 ml s-au adăugat 0,550 ml alcool veratrilic 10 mM dizolvat în soluție tampon citrat-fosfat de sodiu 100 mM, 0.05 ml H_2O_2 20 mM, 0.1 ml acetonă iar reacția a fost inițiată prin adăugarea a 0,3 ml soluție de lignin peroxidază (1 mg/ml). Oxidarea alcoolului veratrilic, $\varepsilon = 9.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a fost urmărită la 310 nm și 25°C timp de 1 min față de un martor care conține aceeași concentrație de substrat dar în care nu s-a adăugat enzima.

3.2.2.3. Determinarea activității peroxidazei din hrean în prezența acetonei

Materiale și aparatură

În reacția de oxidare peroxidază din hrean s-au folosit: alcool coniferilic (Sigma Aldrich), soluție tampon de acetat de sodiu trihidrat (0.1M, pH 5), apă oxigenată (Sigma Aldrich), acetonă (Merck) iar ca și catalizator peroxidaza din hrean de Tip II (HRP, activitate de 181 Purpurogallin unități/mg) (Sigma-Aldrich). Determinările experimentale au fost realizate prin metoda colorimetrică folosindu-se spectrofotometrul UV-VIS (UV-1201 series, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

Mod de lucru

Într-o cuvă de sticlă de 1 ml s-au adăugat 0,865 ml alcool coniferilic 0.2 mM dizolvat în soluție tampon de acetat de sodiu trihidrat 0.1M, 0.1 ml acetonă, 0.01 ml soluție de peroxidază din hrean (0.1 mg/ml) iar reacția a fost inițiată prin adăugarea a 0,025 ml H_2O_2 10 mM.

Oxidarea alcoolului coniferilic, $\epsilon = 14000 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a fost urmărită la 262 nm și 25°C timp de 1 min față de un martor care conține aceleași cantități de substrat, acetonă și enzimă dar în care nu s-a adăugat H_2O_2 .

3.2.3. Reacțiile de polimerizare ale ligninelor cu lacaza

Fracțiunile de lignină au fost solubilizate la concentrații de 10 mg/ml în amestec de 50/50 (v/v) acetonă- apă (saturată cu aer). Reacțiile au fost inițiate prin adăugarea soluției de lacază (0.24 mg/ml) iar amestecul de reacție a fost menținut sub agitare timp de 24 ore la 20°C. O reacție control fără enzimă a fost realizată în aceleași condiții. În timpul reacțiilor de polimerizare s-a observat formarea unui precipitat în cazul tuturor ligninelor cu excepția celei de tip KSL. Precipitatul obținut a fost separat pe un filtru de sticlă și caracterizat. Reacțiile au fost finalizate prin adăugarea a 50 ml apă deionizată la fracțiunile rămase solubile în amestecul de reacție și precipitare prin scăderea pH-ului la 1.0 cu soluție de HCl 1M. Producții de reacție au fost separați pe frită (G4) și uscați peste noapte în etuvă la 60°C. Toate experimentele au fost efectuate cel puțin în duplicat.

3.2.4. Reacțiile de cuplare covalentă a ligninei cu glucozamina

Reacțiile au fost realizate în amestec acetonă-apă 50:50 (v/v) apa fiind în prealabil saturată cu aer. Condițiile de reacție au fost următoarele: 100 mg lignină obținută în urma fracționării ligninei în amestec de acetonă - apă 50:50 (v/v) a fost solubilizată în 10 ml amestec peste care s-a adăugat clorhidrat de glucozamină (raportul molar OH fenolic din lignină : co-substrat fiind de aprox. 1 : 2). Reacțiile au fost inițiate prin adăugarea a 0,4 mL soluție de lacază (6 mg/ml) iar amestecul de reacție a fost menținut sub agitare timp de 24 ore la 20°C. Pentru comparație au fost realizate concomitent 2 reacții control una care conține lignină și glucozamina iar cea de-a doua lignina și enzima. După 24 de ore de reacție acetona este îndepărtată prin evaporare sub presiune iar lignina este precipitată prin ajustarea pH-ului la pH=1 cu HCl. Solidul rămas a fost spălat de mai multe ori cu apă pentru îndepărtarea glucozaminei nereacționate, uscat și analizat.

3.2.5. Reacția de cuplare covalentă a ligninei cu tripeptida glicil-tirosil-glicina

Reacțiile au fost realizate în amestec acetonă-apă 50:50 (v/v) apa fiind în prealabil saturată cu aer. Condițiile de reacție au fost următoarele: 50 mg lignină obținută în urma fracționării ligninei în amestec de acetonă - apă 50:50 (v/v) a fost solubilizată în 5 ml amestec peste care s-au adăugat 6,66 mg glicil-tirosil-glicina. Reacțiile au fost inițiate prin adăugarea a 0,2 mL soluție de lacază (6 mg/ml) iar amestecul de reacție a fost menținut sub agitare timp de 24 ore la 20°C. Pentru comparație au fost realizate concomitent 2 reacții control una care conține lignină și tripeptida iar cea de-a doua lignina și enzima. După 24 de ore de reacție acetona este îndepărtată prin evaporare sub presiune iar lignina este precipitată prin ajustarea pH-ului la pH=1 cu HCl. Solidul rămas a fost spălat de mai multe ori cu apă pentru îndepărtarea tripeptidei nereacționate, uscat și analizat.

3.2.6. Reacția de cuplare covalentă a ligninei cu chitosan

Reacțiile au fost realizate în amestec acetonă-apă 50:50 (v/v) cu apa fiind în prealabil saturată cu aer. Condițiile de reacție au fost următoarele: 100 mg lignină obținută în urma fracționării ligninei în amestec de acetonă - apă 50:50 (vol.) a fost solubilizată în 10 ml amestec peste care s-au adăugat în suspensie 200 mg chitosan Flonac C. Reacțiile au fost inițiate prin adăugarea a 0,4 mL soluție de lacază (6 mg/ml) iar amestecul de reacție a fost menținut sub agitare timp de 24 ore la 20°C.

Pentru comparație au fost realizate concomitent 2 reacții control una care conține lignina și chitosan iar cea de-a doua lignina și enzima. După 24 de ore amestecul de reacție este centrifugat, supernatantul este adus la pH = 1 cu HCl pentru precipitarea ligninei iar rezidul este spălat de mai multe ori cu acetonă pentru îndepărtarea ligninei adsorbite pe chitosan.

3.2.7. Reacțiile de obținerea mono- și di-esterului acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul.

Materiale și aparatură

În reacțiile de esterificare a sorbitolului cu acidul 3-(4-hidroxifenil)-propionic (HPPA) s-au folosit: sorbitol (Acros Organics), acid 3-(4-hidroxifenil) propionic (Aldrich), *Candida antarctica B* (Novozymes), *terț*-butanol (Sigma Aldrich), dimetilsulfoxid (Fluka), site moleculare (Sigma Aldrich), acetat de etil (Merck), cloroform (Merck), metanol (Merck).

Mod de lucru

5.49 mmoli sorbitol, 16.47 mmoli acid 3-(4-hidroxifenil) propionic, 1 g site moleculare de 4 Å activate și 84 mL *terț*-butanol au fost introduse într-un balon de sticlă de 100 mL după care s-a adăugat 1g Novozyme 435. Amestecul de reacție a fost introdus într-un incubator (ILW 115 STD, Pol-Eko-Aparatura, Polonia) echipat cu un agitator orbital (MIR-S100, Sanyo, Japonia) la 300 rpm și temperatura optimă de 60 °C. Evoluția reacției de esterificare a fost monitorizată cu ajutorul cromatografiei de lichide (cromatograf Jasco). Probele prelevate pentru analiza cromatografică au fost diluate cu metanol. Conversiile au fost calculate pe baza curbei de etalonare a acidului aromatic iar randamentele de ester au fost calculate pe baza curbelor de calibrare ale esterilor puri izolați și purificați. După ce întreaga cantitate de sorbitol a fost consumată complet (aprox. 4 zile de reacție) reacția a fost stopată, biocatalizatorul și sitele moleculare au fost separate prin filtrare, *terț*-butanolul a fost evaporat iar siropul rezultat a fost eluat pe coloana cromatografică cu silicagel. Pentru separarea acidului aromatic nereacționat s-a utilizat un sistem de eluenți format din acetat de etil:cloroform = 1 : 1, continuând cu acetat de etil : cloroform : metanol = 5 : 5 : 1 pentru eluarea diesterului și cu acetat de etil : cloroform : metanol = 2 : 2 : 1 pentru eluarea monoesterului. Mono- și di-esterul purificați au fost obținuți sub forma unor solide de culoare albă și au fost utilizați în reacțiile de cuplare enzimatică cu lignina.

3.2.7.1. Reacția de cuplare covalentă a ligninei cu monoesterul acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul

Cuplarea covalentă a ligninei de tip OHL cu monoesterul 1-sorbitil 3-(4-hidroxifenil)-propionat ($M=331$ g/mol) a fost realizată în amestec de acetonă - apă 50/50 (v/v) utilizând lacază ca și catalizator. Condițiile de reacție au fost următoarele: 43 mg monoester a fost solubilizat în 5 ml amestec peste care s-au adăugat 50 mg lignină OHL obținută în urma fracționării ligninei în amestec de acetonă - apă 50:50 (v/v). După dizolvarea totală a ligninei reacția au fost inițiată prin adăugarea a 0,2 mL soluție de lacază (6 mg/ml) iar amestecul de reacție a fost menținut sub agitare timp de 24 ore la 20°C.

Pentru comparație au fost realizate concomitent 2 reacții control una care conține lignina și monoester iar cea de-a doua lignina și enzima. După 24 de ore de reacție acetona este îndepărtată prin evaporare sub presiune iar lignina este precipitată prin ajustarea pH-ului la $\text{pH}=1$ cu HCl. Solidul rămas a fost spălat de mai multe ori cu apă pentru îndepărtarea monoesterului nereacționat, uscat și analizat.

3.2.7.2. Reacția de cuplare covalentă a ligninei cu diesterul acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul

Cuplarea covalentă a ligninei de tip OHL cu diesterul 1,6-sorbitil di-3-(4-hidroxifenil)-propionat ($M=495,7$ g/mol) a fost realizată în amestec de acetonă - apă 50/50 (v/v) utilizând lacază ca și catalizator. Condițiile de reacție au fost următoarele: 100 mg diester a fost solubilizat în 5 ml amestec peste care s-au adăugat 50 mg lignină OHL obținută în urma fracționării ligninei în amestec de acetonă - apă 50:50 (v/v). După dizolvarea totală a ligninei reacția au fost inițiată prin adăugarea a 0,2 mL soluție de lacază (6 mg/ml) iar amestecul de reacție a fost menținut sub agitare timp de 24 ore la 20°C.

Pentru comparație au fost realizate concomitent 2 reacții control una care conține lignina și diesterul iar cea de-a doua lignina și enzima. După 24 de ore de reacție acetona este îndepărtată prin evaporare sub presiune iar lignina este precipitată prin ajustarea pH-ului la $\text{pH}=1$ cu HCl. Solidul rămas a fost spălat de mai multe ori cu terț-butanol pentru îndepărtarea diesterului nereacționat, uscat și analizat.

3.3. Metode de analiză

3.3.1. Spectroscopia FT-IR

Spectrele FT-IR a ligninelor și produșilor de reacție au fost înregistrate au fost obținute utilizând metoda reflexiei difuze (ATR) pe un spectrofotometru FT-IR de tip Varian Scimitar 1000 echipat cu detector DTSG PIKE MIRacle ATR cu diamant cu lentilă w/ZnSe cu o singură placă de reflecție. Spectrele au fost înregistrate în domeniul $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ cu o rezoluție de 4 cm^{-1} cu 128 de scanări. Liniile de bază ale spectrelor au fost corectate și normalizate cu banda de la 1510 cm^{-1} pentru comparații cantitative fracțiunile de lignine obținute în amestecuri de acetonă-apă și acetat de etil. Umerle și benzile complexe din spectre au fost deconvolute pentru o mai bună atribuire.

3.3.2. Cromatografia de permeație prin gel (GPC)

Cromatografia de excluziune (SEC) este denumită și cromatografie pe gel (GPC), în care fenomenul principal este difuzia, iar separarea se face în funcție de mărimea efectivă a moleculelor componentelor. Cromatografia de excluziune (SEC) este folosită pentru separarea moleculelor în soluție pe baza maselor moleculare ale acestora. Această metodă este aplicată în general moleculelor mari, cum ar fi proteine și polimeri industriali. Atunci când faza mobilă este o soluție apoasă, această tehnică este numită cromatografie de filtrare pe gel.

Mod de lucru

Distribuția masei moleculare a ligninelor a fost analizată cu ajutorul analizei alcaline SEC utilizând un sistem cromatografic de tip Waters cu detector de UV și de indice de refracție diferențial (RI) și cu un dispozitiv de injecție automată. Probele de lignină se dizolvă în NaOH 0.5 M (1 mg/mL) și sunt injectate într-o coloană împachetată manual (4.6 mm x 30 cm) cu un copolimer de etilen glicolmetacrilat TSK Toyopearl HW-55F. Analizele au fost realizate la 30°C utilizând NaOH 0.5 M ca și eluent, cu un debit de 1 mL min⁻¹ și detecție la 280 nm. Sistemul GPC a fost calibrat cu standarde de polistiren cu masă moleculară de cuprinsă între 891 – 1.02 × 10⁶ mol⁻¹. Probele au fost injectate fiecare de 2 ori pentru eliminarea erorilor de măsură, iar în calcul s-a luat media determinărilor ariilor respective. S-a reprezentat grafic logaritmul maselor moleculare (Log M) corespunzătoare standardelor de polistiren în funcție de timpii de retenție (Figura 3.1.). O bază de date Empower Pro (Waters) a fost utilizată pentru procesarea datelor în vederea calculării masei picului molecular (Mp), masa moleculară medie numerică (Mn), masa moleculara medie gravimetrică (Mw) și indicele de polidispersitate (Mw/Mn).

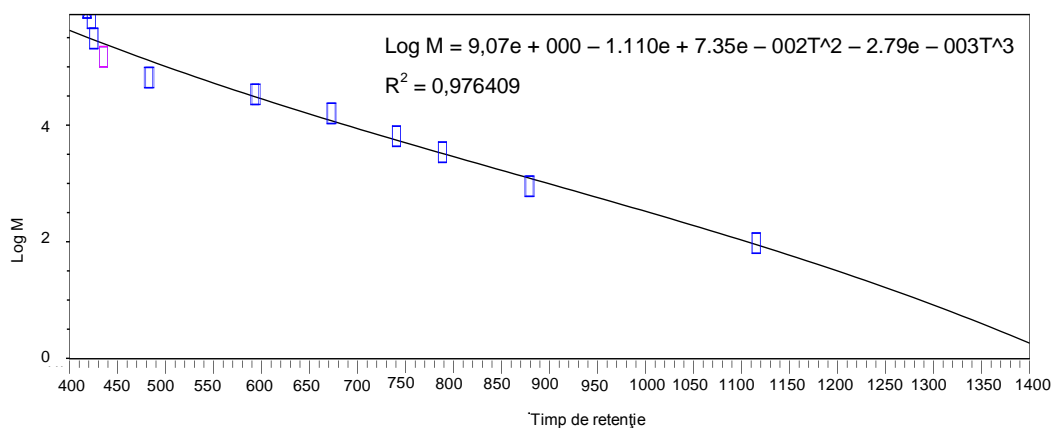


Figura 3.1. Caracteristica de etalonare a standardelor de polistiren realizată prin cromatografie de excluziune

3.3.3. Analiza RMN (Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară)

Analiza ^{31}P -RMN folosită pentru determinarea cantitativă a grupărilor hidroxil din lignină a fost aplicată pe scară largă pentru ligninele izolate în diferite procese industriale cum ar fi industria celulozei și a hârtiei. Având în vedere importanța și necesitatea unei analize directe de determinare a structurii fundamentale a ligninei și a chimiei transformării biomasei lignocelulozice în biocombustibili, analiza ^{31}P -RMN a început să aibă aplicații mari în chimia biomasei lemnoase, biocombustibililor pe bază de lignină și în cercetările precursorilor de biocombustibili.

Metoda ^{31}P -RMN a fost mai întâi aplicată pentru o serie de substraturi cum ar fi cărbune, derivați de cărbune și lignină incluzând fosforilarea grupelor hidroxil prezente în substrat utilizând un agent de fosforilare urmată de analiza cantitativă ^{31}P -RMN. Pentru lignină și derivați ai acesteia, agentul de fosforilare cel mai utilizat este 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxofosfolanul (TMDP). TMDP reacționează cu grupările hidroxil care provin din drupările alifaticе, fenolice și acizi carboxilici în prezența unei baze organice, cum ar fi piridina pentru obținerea de produși fosforilați (Figura 3.2) [172]. Piridina este aleasă ca și bază în amestecul de reacție pentru a capta acidul clorhidric eliberat în reacție și pentru a conduce reacția de fosforilare care este ușor exotermă la o conversie totală. Grupările hidroxil fosforilate pot fi atunci comparate cantitativ cu un standard intern care demonstrează o stabilitate adecvată și o rezoluție bună în regiunea hidroxilică a ligninei din spectrul ^{31}P -RMN [173].

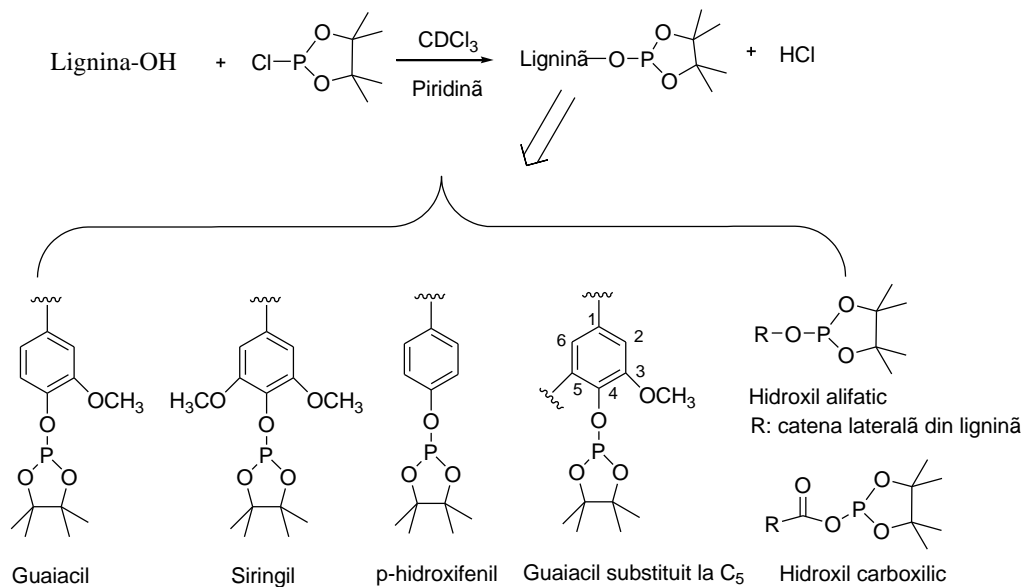


Figura 3.2. Fosforilarea grupărilor hidroxil din structura ligninei cu 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxofosfolanul (TMDP)

Mod de lucru

Spectrele ^{31}P -NMR au fost înregistrate folosind spectrofotometrul Bruker Avance II, la o frecvență de 400 MHz după derivatizarea cu 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxafosfolan. Probele de lignină (30 mg) se amestecă cu 100 μl DMF/piridină (1:1 v/v) și 100 μl de soluție de standard intern care conține 15 mg/mL ciclohexanol (standard intern) și 2.5 mg/mL acetilacetone de crom (III) în piridină. Această suspensie se agită timp de 4-16 ore la temperatura camerei. 100 μl agent de derivatizare (2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxafosfolan) se amestecă cu 400 μl de CDCl_3 (cloroform deuterat) chiar înainte adăugării în soluția de lignină. Lignina derivatizată este stabilă timp de aproximativ 4 ore. Atribuirea semnalelor a fost realizată după cum a fost descris de către Granata și Argyropoulos [141]. În Figura 3.3. este redat spectrul ^{31}P -RMN al ligninei de tip SGWL derivatizată cu TMDP utilizând ciclohexanol ca și standard intern.

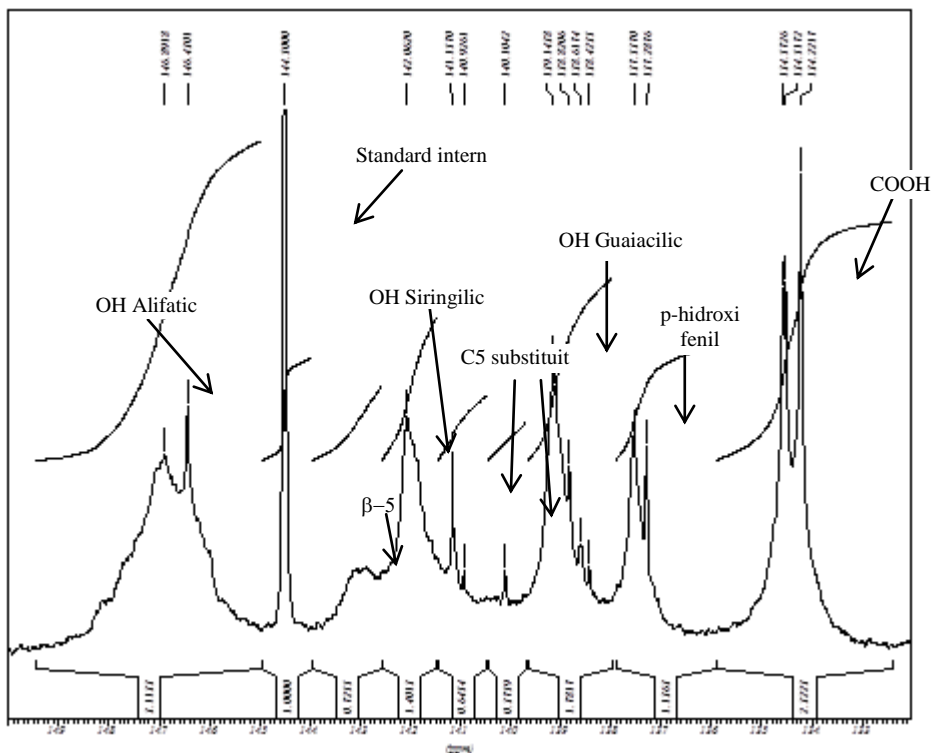


Figura 3.3. Spectrul ^{31}P -RMN a ligninei SGWL utilizând ciclohexanol ca și standard intern

3.3.4. Electroforeza proteinelor pe gel de poli(acrilamidă)

Electroforeza se folosește pentru a estima gradul de dizolvare a unei proteine în gradient, pe o coloană cu schimb de ioni, pentru a stabili numărul proteinelor prezente într-un amestec sau pentru a le separa pe baza mărimii și greutatei moleculare, folosind geluri SDS (dodecilsulfat de sodiu).

SDS îmbracă proteina în așa fel încât atunci când aceasta este încălzită și denaturată, polipeptida va fi complet îmbrăcată de SDS și nu mai are sarcină electrică naturală. Toate proteinele migrează cu aceeași rată cu excepția situației în care gelul are pori de dimensiune mică, care restricționează migrarea acestor molecule, în așa fel încât ele se vor separa pe baza mărimii lor și nu a sarcinii electrice. Electroforeza în gel de poli(acrilamidă), în condiții denaturante (în prezența dodecilsulfatului de sodiu, SDS, 0,1%) este o tehnică de separare a proteinelor pe baza masei lor moleculare. Astfel, moleculele de mărimi diferite se vor separa formând benzi distincte în interiorul gelului.

Mod de lucru

Electroforeza pe gel de poli(acrilamidă) (PAGE) a fost realizată în sistem continuu cu SDS, în plan vertical. Pentru electroforeză s-au utilizat geluri prefabricate de poli(acrilamidă) de tipul NuPAGE® NOVEX® Bis-Tris Mini Gels (10%) furnizate de Invitrogen™. Tamponul folosit pentru migrarea moleculelor a fost preparat prin adăugarea a 40 ml tampon NuPAGE MES (acid 2-(N-morfolino)-etansulfonic) și 760 ml apă deionizată. Prepararea probelor a fost realizată în tuburi eppendorf de 1,5 ml în care s-au adăugat 6,5 μ l probă, 2,5 μ l tampon NuPAGE LDS (dodecilsulfat de litiu) și 1 μ l NuPAGE agent reducător (2-mercaptoetanol). Probele au fost centrifugate câteva secunde pentru omogenizare și incubate timp de 10 minute la 95°C. În camera interioară a sistemului de electroforeză s-au adăugat 200 ml tampon NuPAGE SDS, iar în cea exterioară 600 ml din același tampon. Condițiile de migrare au constat în aplicarea unui voltaj de 200 V timp de 35 de minute. Sistemul de electroforeză utilizat în ambele cazuri a constat dintr-un aparat de electroforeză vertical. Evidențierea proteinelor în geluri s-a realizat prin colorare cu Coomassie Brilliant Blue R-250, protocolul folosit fiind o adaptare a celui utilizat de Novex sau prin colorare argentică („silver staining”)[174].

3.3.5. Calculele de prelucrare statistică a datelor

Analiza de componente principale (PCA) reprezintă un caz particular al unei tehnici de analiză statistică cunoscută sub numele de *analiză de factori* al căror scop final constă în evidențierea unor structuri preexistente într-o mulțime de date multivariabile. Aceste structuri în general sunt exprimate prin intermediul varianței și covarianței variabilelor ca și al similarităților și disimilarităților dintre obiecte.

În diferitele ei variante, analiza de factori este realizată calculând, într-o primă etapă, valorile proprii și vectorii proprii ai unei matrici pătrate obținută din înmulțirea matrici datelor (obiectelor) cu transpusa acesteia, procedură relativ comună în cadrul calculului matriceal.

Analiza de factori, ca și analiza de cluster, poate fi efectuată atât în mod *R*, caz în care este investigată interacția dintre variabile, analiza făcându-se pe cazuri, cât și în mod *Q*, situație în care este investigată interacția dintre cazuri, în această situație analiza făcându-se pe variabile. În cazul analizei în mod *Q*, procedura de analiză constă în principal în extragerea valorilor proprii și ale vectorilor proprii dintr-o matrice ce exprimă similaritățile dintre toate perechile posibile de obiecte, similarități exprimate prin intermediul valorilor numerice ale variabilelor. În cazul analizei în mod *R*, obiectele sunt considerate ca făcând parte dintr-o populație mult mai mare astfel încât în final acest tip de analiză permite caracterizarea atât a proprietăților ca și a comportamentului variabilelor.

În ambele cazuri, prima etapă a analizei de factori constă în înmulțirea matricii X a datelor cu transpusa sa, ceea ce conduce la generarea unei matrici pătratice și simetrice ce exprimă, în funcție de ordinea în care este efectuat produsul dintre matrici, fie interrelația dintre variabile, fie cea dintre obiecte.

Considerând că datele experimentale sunt exprimate sub forma unei matrici compusă din n cazuri caracterizate printr-un număr de m variabile, prin multiplicare se pot forma două tipuri de matrici pătratice notate convențional cu R și Q conform relațiilor:

$$R = XX'$$

$$Q = X'X$$

Unde X' este transpusa matricii X .

În primul caz, matricea R este de ordinul m (m coloane x m rânduri) în timp ce matricea Q este de ordinul n (n coloane x n rânduri).

Analiza de componente principale constă din transformarea liniară a setului inițial de m variabile ce descriu un masiv de date experimentale într-un set de m noi variabile, fiecare nouă variabilă reprezentând o combinație liniară a vechilor variabile. Procedura se desfășoară astfel încât fiecare nouă variabilă să contribuie cât mai mult la variația masivului de date, întreaga varianță a sistemului fiind descrisă de noile variabile. Din acest motiv, analiza de componente principale aparține aceleiași categorii de tehnici de analiză statistică ca și analiza de cluster ce estimează gradul de intercorelare numai prin procesarea adecvată a datelor fără a considera vre-un model fizic al sistemului investigat.

În prima etapa a analizei de componente principale, este calculată pentru cele n cazuri a datelor analizate matricea S varianță-covarianță ce este o matrice pătratică având numărul de coloane (și implicit numărul de linii) egal cu numărul de variabile, notat conform convenției cu m . De asemenea trebuie subliniat faptul că matricea S este o matrice simetrică. Matricea varianță-covarianță S poate fi interpretată ca descriind un set de m vectori într-un spațiu cu m dimensiuni, fiecare linie conținând coordonatele vârfului unui vector. Acești vectori definesc o elipsă în cazul a două variabile, un elipsoid în cazul a trei variabile sau un hiper-elipsoid în cazul în care $m > 3$, numit în general elipsoidul varianței sistemului. Rezolvând ecuația seculară corespunzătoare matricii varianță-covarianță și calculând vectorii proprii corespunzători (datorită faptului că matricea S este o matrice simetrică, vectorii proprii sunt reciproc ortogonali iar valorile proprii sunt totdeauna pozitive), aceștia vor reprezenta axele principale ale elipsoidului varianței sistemului definit de matricea S a sistemului studiat, semilungimea acestora fiind egală valorile proprii corespunzătoare. În felul aceste, valorile proprii și vectorii proprii ai matricii S definesc complet elipsoidul sistemului.

În esență, analiza de componente principale constă în găsirea acestor axe și determinarea valorilor lor numerice. În această reprezentare, trebuie remarcat că din proprietățile generale ale ecuațiilor seculare, suma valorilor proprii ale unei matrici este egală cu urma matricii, împărțind fiecare valoare proprie la urma matricii, deci la suma lor, rapoartele pot fi interpretate ca măsura în care axele principale conțin fracțiuni din varianța totală a sistemului. Cu alte cuvinte, dacă este măsurată varianța totală a sistemului în lungul axelor principale ale elipsoidului varianței sistemului rezultă o ierarhizare a varianțelor acestora, iar cum în general elipsoidul varianței este departe de o sferă, cel puțin o axă va corespunde varianței maxime și alta varianței minime.

În a doua etapa a analizei de componente principale este realizată corespondența directă dintre vectorii proprii, valorile proprii și valorile numerice experimentale, exprimate prin componentele variabilelor, adică prin valorile numerice corespunzătoare fiecărui caz, ceea ce reprezintă de fapt calculul scorurilor și al încărcărilor fiecărei variabile [175].

Mod de calcul

Analiza componentelor principale (PCA) și analizele de regresie liniară (PLS) au fost realizate cu ajutorul programului Unscrambler® 7.6 (Camo, Norvegia) pe baza datelor spectrale rezultate din analiza FT-IR a probelor și pe baza caracteristicilor cantitative a celor cinci lignine fracționate prin extracție cu solvent organic.

Analizele PCA și PLS sunt instrumente puternice în analiza datelor spectral FT-IR în vederea determinării asemănărilor și deosebirilor minore sau majore care au loc între spectre reflectând astfel diferențele care apar în structura chimică și compoziția probelor. Analiza PCA a fost aplicată în studiul nostru pentru a obține informații despre disimilaritățile dintre fracțiunile de lignină.

Analiza PLS a fost aplicată pentru a corela datele FT-IR cu compoziția chimică a fracțiunilor de lignină determinată cu ajutorul analizei ^{31}P -RMN și pentru a construi un model de calibrare care să permită predicția parametrilor importanți în caracterizarea ligninelor. Validitatea acestor modele a fost indicată prin determinarea coeficienților de corelare (R^2) a probelor și erorile pătratice medii ale predicției (RMSEP). Atât modelele PLS cât și cele PCA au fost validate cu ajutorul metodei de validare încrucișată.

3.3.6. Măsurarea consumului de oxigen dizolvat

Consumul de oxigen dizolvat a fost cu ajutorul instrumentului SympHony SB90M5 (Thermo Orion) cu o limită de detecție de 0.1 g/L. Experimentele au avut loc sub agitare continuă într-un flacon de sticlă de 15 ml complet sigilat pentru a preveni contactul amestecului de reacție cu oxigenul din exterior în timpul experimentelor. Ligninele fracționate au fost dizolvate în amestec de 50:50 (v/v) acetonă-apă la o concentrație de 1 mg/ml. Măsurătorile (realizate în duplicat) au fost realizate sub agitare continuă utilizând un agitator magnetic la 250 rpm. Monitorizarea reacțiilor de degradare a fost efectuată după adăugarea a 150 μl lacază (0.06 mg/ml) iar concentrația de oxigen dizolvat a fost monitorizată continuu timp de 40 min. Răspunsurile înregistrate au fost corectate prin scăderea valorilor obținute pentru probele în care am avut numai amestec de acetonă-apă.

3.3.7. Studii de voltametrie ciclică

Voltametria aparține unei categorii de metode electro-analitice, prin care informația despre o specie este obținută prin schimbarea continuă a potențialului și înregistrarea curentului rezultat. Există numeroase modalități de a varia un potențial, de asemenea există și mai multe forme de voltametrie, cum ar fi: polarografia, puls normal, puls invers, puls diferențial etc. [176].

Voltametria ciclică este una dintre formele cele mai utilizate pe scară largă a tehnicilor voltametrice și este utilă în obținerea informațiilor cu privire la potențialul redox și al reacțiilor electrochimice în soluțiile speciilor detectate.

În voltametria ciclică, potențialul electrodului de lucru este baleiat continuu în timp, cu o viteză definită (viteză de baleiaj), ciclic între potențialul de pornire și de comutare, curentul generat fiind înregistrat și analizat. Dintre toate metodele disponibile utilizate în studierea proceselor de electrod cele mai folosite sunt metodele de baleire a potențialului. Metoda voltametriei ciclice constă în aplicarea unui semnal triunghiular de potențial și înregistrarea în timp a răspunsului sistemului, respectiv a curentului datorat proceselor electrochimice ce au loc în sistem. Prin voltametrie ciclică se pot obține informații privind mecanismul de desfășurare a reacției electrochimice, identificarea speciilor prezente în soluție, determinarea coeficienților de difuzie a speciilor electroactive; noile metode de analiză și simulare a curbelor voltametrice permit determinarea cu mai mare acuratețe a constantelor de viteză. Cel mai simplu mecanism posibil este oxidarea sau reducerea cu transfer de un electron între speciile din soluție și electrodul de lucru (reacția reversibilă $O + e \leftrightarrow R$). Potențialul la care începe înregistrarea voltamogramei se alege astfel încât prin celulă să nu circule nici un curent când circuitul este închis. Procesele de reducere și cele de oxidare sunt suficient de rapide încât se mențin condițiile de echilbru la suprafața electrodului [177].

Mod de lucru

Experimentele de voltametrie ciclică au fost realizate pe un potențostat de tip Voltalab 80 PGZ402(Radiometer Analytical, Copenhaga) controlat de un Soft de tipul Voltmaster 4, versiunea 7.08. Toate măsurătorile au fost realizate într-o celulă termostată tricompartimentată, de 50 ml, modelul BEC/EDI.

Un electrod de grafit (GCE) cu suprafața de 2.8 mm, a fost utilizat ca și electrod de lucru împreună cu un electrod auxiliar de platină și electrodul saturat de calomel ca și referință (SCE), achiziționate de la Radiometer. Înaintea fiecărui experiment, suprafața electrodului de carbon a fost curățată pe un prin polisare cu pasta diamantată urmată de spălare cu apă distilată și acetonă.

Ca și electrolit suport s-a folosit tampon tartrat de sodiu 50 mM de pH=4 adăugat în amestecul de reacție. Pentru experimentele cu lacază s-au adăugat în picături 10 μ l de lacază (30.6 U/mg) de concentrație 6 mg/ml dizolvată în apă saturată cu aer pe suprafața polisată a electrodului de carbon vitros și s-a lăsat să se usuce timp de 30 min la temperatura camerei. Măsurătorile au fost realizate cu agitare continuă într-un volum de 10 ml 50:50 (v/v) acetonă-apă. Pentru toate experimentele ligninele respectiv siringaldazina au fost dizolvate în volumul de 5 ml acetonă peste care s-a adăugat glucozamina dizolvată în restul de 5 ml apă și tampon tartrat de sodiu pH=4 care a fost utilizat ca și electrolit suport. Voltamogramele ciclice au fost înregistrate la o viteză de scanare de 5 mV/s.

4. CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII ORIGINALE

Obiectivul principal al acestei teze de doctorat a fost modificarea hidrofilității ligninelor din diferite surse în vederea obținerii de produși noi prin grefarea pe cale enzimatică a unor compuși cu diferite funcționalități, care pot genera proprietăți noi. Compușii testați au fost glucozamina, tripeptida glicil-tirozil-glicină, oligomeri de chitosan și esteri ai sorbitolului cu acidul 3-(4-hidroxifenil)-propionic.

În prima parte a tezei este prezentat un studiu de literatură cu privire la structura și proprietățile fizico-chimice ale ligninelor, metodele prin care acestea pot fi izolate din biomasa lignocelulozică, precum și posibilitățile de modificare enzimatică a structurii ligninei. Acest studiu a reprezentat fundamentul științific pentru realizarea obiectivelor care au fost urmărite în partea de cercetări experimentale.

Din studiile experimentale, efectuate în conformitate cu obiectivele stabilite, au rezultat următoarele concluzii:

Caracterizarea ligninelor utilizate în vederea modificării enzimaticice cu lacază

Cele cinci tipuri de lignină utilizate în studiu au fost caracterizate din punct de vedere fizico – chimic, iar rezultatele au fost corelate cu originea și metodele de izolare diferite ale acestora. Din spectrele FT-IR au fost identificate benzile de adsorbție caracteristice ale ligninelor, reflectând structura chimică și puritatea acestora, precum și diferențele structurale care pot fi induse de tipul de lignină și procesul prin care aceasta a fost izolată.

Analiza ³¹P-RMN s-a dovedit a fi o metodă precisă și rapidă în analiza cantitativă a diferitelor grupări hidroxil prezente în lignină. Dintre ligninele studiate lignina extrasă din lemn de esență moale (KSL) s-a dovedit a avea conținutul cel mai mare de grupări hidroxil alifatic și fenolice totale, grupările fenolice majoritare fiind reprezentate de cele care provin din unitățile guaiacil. Lignina din lemn de esență tare (OHL) are masa moleculară cea mai mică dintre lignine și este compusă în principal din unități siringil.

Prin analiza rezultatelor obținute se pot evidenția asemănările și deosebirile dintre lignine în ceea ce privește structura și reactivitatea acestora, precum și relația lor cu proprietățile funcționale necesare pentru anumite aplicații.

Studiul solubilității ligninelor în solvenți de diferite polarități

Extracția selectivă cu solvenți organici este potrivită pentru fracționarea ligninelor industriale în funcție de masa lor moleculară. În urma fracționării cu amestecuri de acetonă-apă și acetat de etil s-au obținut fracțiuni care au o distribuție precisă a masei moleculare și conținut definit de grupări funcționale.

Analiza PCA a permis clasificarea ligninelor native și a fracțiunilor lor solubile pe baza unui număr redus de absorbții ale benzilor relevante din spectrul de IR și a furnizat informații utile privind modificările discrete ale conținutului de grupări funcționale rezultate în urma extracției cu solvenți.

Modelele PLS dezvoltate au permis o estimare precisă a conținutului de unități siringil, p-hidroxifenil și grupări hidroxil alifatic, fapt care creează premisele utilizării acestei abordări pentru predicția simplă, exactă și rapidă a unor informații structurale și chimice caracteristice ligninelor prin utilizarea analizei FT-IR și a metodelor chemometrice.

Alegerea biocatalizatorului

Dintre cele trei enzime testate, lacaza din *Trametes versicolor* a demonstrat activitate catalitică ridicată la concentrații mari de acetonă (55%, vol.) în mediul de reacție, în timp ce asupra lignin peroxidazei și peroxidazei din hrean prezența solventului organic a avut efect inactivant.

S-a analizat puritatea lacazei comerciale utilizate în studiu cu ajutorul tehnicii de electroforeză pe gel de poliacrilamidă, relevându-se prezența a trei fracțiuni proteice, dintre care proteina cea mai activă a avut masa moleculară de 62 kDa.

Studiile cinetice efectuate au arătat că reacția de oxidare catalizată de lacază a siringaldazinei a avut loc cu viteză mare, enzima prezentând afinitate ridicată față de substratul folosit.

Studiul reacțiilor de polimerizare a ligninelor catalizate de lacază în mediu de acetonă-apă

Toate fracțiunile de lignină utilizate au fost oxidate cu ajutorul lacazei, gradul de oxidare depinzând de cantitatea de grupări funcționale disponibile pentru reacțiile de polimerizare.

Rezultatele SEC și ³¹P-RMN au arătat că oxidarea ligninelor în amestec de acetonă-apă 50/50 (v/v) a avut loc în ordinea AWL > SGWL > SWL > OHL. Proprietățile structurale ale ligninelor au avut o influență importantă asupra activității lacazei, aceasta fiind mai eficientă în polimerizarea ligninelor din paie de grâu decât a ligninei extrasă din lemn de esență tare. Reacțiile de polimerizare au avut loc cu eficiență ridicată la un conținut relativ ridicat de solvent organic în sistemul de reacție (50% vol. acetonă), care de obicei are efect inhibitor asupra activității catalitice a oxidazelor.

Aceste constatări deschid noi posibilități de utilizare a lacazelor în domenii în care solubilitatea reactanților sau a produșilor este limitată. Solubilitatea ligninei în amestecul de reacție reprezintă un factor cheie al reactivității în procesele catalizate de lacază, rezultatele indicând posibilități noi de valorificare a ligninei pe cale enzimatică. Ligninele provenite din diverse materiale vegetale sau din procese de delignificare reprezintă o sursă importantă de materii prime care pot fi transformate în produși cu valoare adăugată, utilizând potențialul catalitic al lacazelor.

Modificarea enzimatică a ligninelor prin cuplare oxidativă cu compuși cu caracter hidrofili

Două dintre cele cinci lignine studiate, cele de tip OHL și AWL, au fost modificate cu succes în reacțiile de cuplare enzimatică cu glucozamină, observându-se creșteri semnificative ale masei și ale rapoartelor OH alifatic/OH aromatic determinate cu ajutorul analizei ^{31}P -RMN. Studiile electrochimice cuplate cu cele de determinare ale oxigenului dizolvat au indicat că lacaza este capabilă să catalizeze oxidările tuturor ligninelor în mediu acetonă-apă 50/50 (v/v) și să realizeze cuplarea covalentă a acestora cu glucozamina. Prin studiile de voltametrie ciclică și de măsurare a oxigenului consumat s-a realizat optimizarea parametrilor care influențează reacțiile de cuplare ale ligninelor cu glucozamina: concentrația de lignină, raportul molar OH Aromatic total/glucozamină, observându-se o ușoară inhibiție a lacazei la concentrații mari de glucozamină, respectiv lignină.

La ligninele de tip OHL și AWL s-au observat modificări semnificative ale masei moleculare și a conținutului de grupări fenolice totale în cazul reacției cu tripeptida glicil-tirozil-glicină. De asemenea, reacția de modificare enzimatică a ligninei OHL cu chitosan utilizând lacază ca și catalizator a determinat modificări structurale care s-au manifestat prin creșterea masei moleculare și apariția benzii amidice în spectrul de IR.

S-au observat creșteri ale masei moleculare și în cazul produșilor formați în urma reacțiilor de cuplare cu mono- și diesterul acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul, însă analizele FT-IR și ^{31}P -RMN nu au evidențiat modificări structurale.

Confirmarea formării de produși prin spectrofotometrie FT-IR, cromatografie de permeație în gel și spectroscopie RMN a demonstrat valabilitatea metodei enzimatică elaborate pentru modificarea ligninelor prin reacții de cuplare enzimatică cu carbohidrați și peptide.

Contribuții originale

Valorificarea complexă a ligninei, un material provenit din biomasă și disponibil în cantități mari la un preț convenabil, reprezintă o tematică prioritară în cadrul cercetărilor din întreaga lume. Modificarea chimică controlată a ligninei reprezintă însă o sarcină foarte dificilă datorită structurii sale complexe, motiv pentru care cercetările în această direcție sunt încă în fază de studii de laborator. Cercetările experimentale efectuate în cadrul acestei teze au dus la o serie de rezultate originale în domeniul caracterizării fracțiunilor din lignină de diferite proveniențe și modificării enzimatică a acestora, cât și în ce privește determinarea eficienței catalitice a unor oxidaze față de substraturi de tip lignină sau compuși model ai ligninei. Principalele rezultate științifice originale obținute, în conformitate cu obiectivele tezei, pot fi însumate după cum urmează:

1. Analiza calitativă și cantitativă prin metode spectrometrice a unui număr de cinci lignine tehnice de diferite proveniențe a permis identificarea principalelor grupări funcționale prezente și stabilirea diferențelor structurale dintre acestea, care au fost asociate cu biomasa din care provine lignina și procesul utilizat pentru izolarea ei. Astfel, lignina KSL obținută din lemn de esență moale prin procedeul Kraft a avut conținutul cel mai mare de grupări guaiacil, rezultând o structură mai condensată, reflectată printr-un conținut ridicat de grupări fenolice condensate și grupări OH alifactice.

Aceste rezultate au reprezentat baza de plecare pentru studiile de fracționare, deoarece elementele structurale inițiale sunt cele care definesc comportarea ligninelor în ce privește atât accesibilitatea față de solvenți organici, cât și reactivitatea lor, considerată în sens mai larg.

2. A fost elaborată o metodă originală de fracționare a ligninelor prin extracție selectivă în solvenți organici, bazată pe polaritatea ligninei și a solventului. Solvenții studiați au fost acetatul de etil și amestecuri acetonă : apă în diferite rapoarte. Parametrul de solubilitate Hildebrand a fost considerat cel mai important element care caracterizează polaritatea ligninelor, demonstrându-se că ligninele prezintă maxim de solubilitate în solvenți care au valori ale acestui parametru apropiate de al lor. Solubilitatea cea mai mare s-a înregistrat în soluții acetonă/apă care au conținut în jur de 80% acetonă, dar solubilitatea individuală a fost determinată de factori structurali, în special conținutul de grupări OH libere, capabile să formeze legături de hidrogen.

3. Fracționarea ligninelor în solvenți organici reprezintă o modalitate importantă de reducere a heterogenității acestora, în scopul izolării de fracțiuni bine caracterizate, adecvate unor transformări ulterioare. În acest scop, s-a stabilit distribuția maselor moleculare și s-a determinat conținutul de grupări funcționale din fracțiunile de lignină solubile și insolubile rezultate după extracția selectivă cu solvenți organici. Un asemenea studiu nu a fost realizat până la această dată. Analiza componentelor principale (PCA), realizată pe baza absorbțiilor caracteristice din spectrele FT-IR, a relevat faptul că fracțiunile izolate pot fi clasificate în mai multe grupuri pe baza similarității unor elemente structurale prezente în molecula lor, care stau la baza solubilității lor în solvenți organici și influențează în mare măsură reactivitatea. Prin dezvoltarea acestui model și aplicarea lui va fi posibilă stabilirea posibilelor căi de valorificare pentru probe de lignină necunoscute.

4. S-a elaborat o metodă simplă și rapidă pentru a prezice conținutul de grupări funcționale esențiale din lignină pe baza analizei FT-IR, în condițiile în care analiza prin spectrometrie ^{31}P -RMN este mult mai scumpă și mai laborioasă. S-a utilizat analiza statistică pe baza unor modele de regresie liniară (PLS), fiind selectate anumite rapoarte de intensități spectrale din benzile FT-IR, alese astfel încât să permită caracterizarea cantitativă a ligninelor și fracțiunilor de lignină extrase. Chiar dacă numărul relativ mic de probe studiate nu a permis elaborarea unei metodologii cu aplicabilitate generală, rezultatele obținute sunt de natură să justifice continuarea cercetărilor și în această direcție.

5. S-a stabilit că, dintre mai multe enzime care pot fi luate în considerare pentru funcționalizarea pe cale oxidativă a ligninei, doar lacaza din *Trametes versicolor* a avut activitate în reacția de oxidare a unui substrat model în mediu acetonă/apă. S-a demonstrat că lacaza păstrează o eficiență catalitică ridicată în acest mediu la concentrații de acetonă de 50% la care solubilitatea ligninelor a fost ridicată, fiind astfel depășit cel mai mare obstacol în calea realizării de biotransformări enzimatică ale ligninelor, insolubilitatea lor în apă și inactivarea enzimelor în mediul organic în care lignina este mai solubilă.

6. S-a realizat, în premieră, un studiu al reacțiilor de polimerizare a ligninelor tehnice, catalizate de lacază în mediu acetonă/apă (50/50, vol.). Prin analiză FT-IR și RMN s-au determinat principalele modificări structurale care au avut

loc și modul în care proveniența ligninei influențează acest proces. Un rezultat științific foarte important a fost demonstrarea faptului că oxidarea catenelor laterale din lignine poate avea loc în prezența lacazei și fără utilizarea de sisteme mediatore sau de fragmente mici de lignină care pot juca rol de mediator. Oxidarea catenelor laterale prin reacții de demetilare și hidroxilare determină creșterea caracterului hidrofil al compușilor rezultați și poate avea ca rezultat apariția de situsuri active, importante în perspectiva grefării de diferite grupări funcționale.

7. Cuplarea oxidativă covalentă pe cale enzimatică a ligninelor și fracțiilor de lignine cu diferiți derivați de zaharuri și peptide a fost realizată de asemenea în premieră, fără mediatori, toți compușii obținuți fiind noi. Studiul cel mai complet a fost realizat cu glucozamină, unde s-a stabilit și raportul OH aromatic/glucozamină optim. Un alt element original a fost monitorizarea acestor reacții de oxidare pe care electrochimică, prin voltametrie ciclică. Pe lângă creșterea masei moleculare, modificările structurale care au avut loc au fost demonstrate cu ajutorul datelor spectrale IR și RMN. Deși realizarea acestor procese întâmpină dificultăți mari datorită insolubilității materiilor prime și produșilor, instabilității enzimei în condițiile de reacție și dificultății caracterizării produșilor, putem considera că s-a deschis o cale importantă pentru valorificarea superioară a ligninelor pentru obținerea de noi materiale, cu posibile aplicații într-o serie de domenii.

Contribuțiile originale ale tezei au fost diseminate în trei articole publicate sau în curs de publicare în reviste internaționale cu vizibilitate științifică ridicată (*Process Biochemistry*, *Acta Biochimica Polonica*, *Industrial Crops and Products*), o lucrare publicată într-o revistă internațională indexată în bazele de date importante și patru comunicări la conferințe internaționale de prestigiu din țară și străinătate.

BIBLIOGRAFIE

- [1]. Mai C., Milstein O., Huëttermann A., *Appl Microbiol Biotechnol*, **1999**, 51, 527-531.
- [2]. Call, H.P., Mücke I., *J. Biotechnol*, **1997**, 53, 163-202.
- [3]. Boeriu C.G., Bravo D., Gosselink R.J.A., Van Dam J.E.G., *Industrial Crops and Products*, **2004**, 20, 205-218.
- [4]. Li X., Weng J-K., Chapple C., *The Plant Journal*, **2008**, 54, 569-581.
- [5]. Moldes D., Vidal T., *Process Biochem*, **2011**, 46, 656-660.
- [6]. Kudanga T., Prasetyo E.N., Sipilä J., Nousiainen P., Widsten P., Kandelbauer A., Nyanhongo G.S., Guebitz G., *Eng. Life Sci.*, **2008**, 8, 297-302.
- [7]. Widsten P., Kandelbauer A., *Enzyme Microb. Technol.*, **2008b**, 42, 293-307.
- [8]. Kunamneni A., Plou F.J., Ballesteros A., Alcalde M., *Recent Pat Biotechnol*, **2008**, 2, 10-24.
- [9]. Lahtinen M., Kruus K., Heinonen P., Sipilä J., *J Agric Food Chem.*, **2009**, 23,57,8357-65.
- [10]. Kudanga T., Prasetyo E.N., Sipilä J., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M., *Enzyme Microb. Technol.*, **2010** 46, 272-280.
- [11]. Kudanga T., Prasetyo E.N., Widsten P., Kandelbauer A., Jury S., Heathcote C., Sipilä J., Weber H., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M., *Biosource Technol.* , **2010**,101, 2793-2799.
- [12]. Pu Y., Jiang N., Ragauskas A.J., *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **2007**, 27, 23-33.
- [13]. Gosselink R.J.A., Van Dam J. E.G., De Jong E., Scott E. L., Sanders J. P.M., Li J., Gellerstedt G., *Holzforschung*, **2010**,64, 193-200.
- [14]. Crestini C., Crucianelli M., Orlandi M., Saladino R., *Catal. Today*, **2010**, 156, 8-22
- [15]. Gouveia S., Fernandez-Costas C., Moldes D., Sanromán M.A., *Bioresour. Technol.*, **2012**, 121, 131-138.
- [16]. Ropponen J., Räsänen L., Rovio S., Ohra-aho T., Liitiä T., Mikkonen H., Van de Pas D., Tamminen T., *Holzforschung*, 2011, 65, 543-549.
- [17]. Mattinen M.L., Maijala P, Nousiainen P, Smeds A, Kontro J, Sipilä J, Tamminen T, Willför S, Viikari L. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* , **2011**,72, 122-129.
- [18]. Buchert J., Mustranta A., Tamminen T., Spetz P., Holmbom B., *Holzforschung*, **2002**,56, 579-584.
- [19]. Zhang, Y.H.P., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* ,**2008**, 35, 367-375
- [20]. Haveren J.V., Scott E.L., Sanders J.P.M., *Biofuels Bioprod. Bioref.* ,**2008**, 2, 41-57.
- [21]. Ragauskas A.J., Williams C.K., Davison B.H., Britovsek G., Cairney J., Eckert C.A., Frederick W.J., Hallett J.P., Leak D.J., Liotta C.L., Mielenz J.R., Murphy R., Templer R., Tschaplinski T., *Science*, **2006**, 311(5760), 484-489.
- [22]. Rubin E.M., *Nature.* ,**2008**, 454(7206), 841-845.
- [23]. Klinke H.B., Thomsen A.B., Ahring B.K., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2004**, 66(1), 10-26.

- [24]. Weng J.-K., Li X., Bonawitz N.D., Chapple C., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2008**, 19(2), 166-172.
- [25]. Ralph J., Brunow G., Boerjan W., **2007**, *Lignins*. John Wiley & Sons, Ltd
- [26]. Pla F., *Light Scattering*. In: *Methods in lignin chemistry*, Eds. Lin, S. Y. Dence, C. W. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **1992a**, 498-507.
- [27]. Boudet, A.-M., *Plant Physiology and Biochemistry*, **2000**, 38(1-2), 81-96.
- [28]. Boudet, A.-M., *Trends in Plant Science*, **1998**, 3(2), 67-71.
- [29]. Boerjan W., Ralph J., Baucher M., *Lignin Biosynthesis*. Annual Rev. Plant Biol. , **2003**, 54, 519-546.
- [30]. Dence C.W., Lin S.Y , Sjöström E., *Wood Chemistry Fundamentals and Applications* (2nd edition) **1993** . San Diego, CA: Academic Press, Inc.
- [31]. Adler E., *Wood Science and Technology* , **1977**, 11, 169-218.
- [32]. Whetten R.W., MacKay J.J., Sederoff, R.R., *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* , **1998**, 49(1), 585-609.
- [33]. Besombes S., Mazeau K., *Plant Phys. Biochem* , **2005**, 43(3), 277-286.
- [34]. Russell W.R., Forrester A.R., Chesson A., *Holzforschung*, **2000**, 54(5), 505-510.
- [35]. Lora J. H., *Characteristics, industrial sources, and utilization of lignins from nonwood plants*. In "Chemical, Modification, Properties, and Usage of Lignin" (T. Q. Hu, ed.), **2002**, 267-282. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- [36]. Glasser W. G., *Classification of lignin according to chemical and molecular structure*. In "Lignin: Historical, Biological, and Materials Perspectives" (Glasser W. G., Northey R.A., Schultz T. P., eds.), **2000**, 216-238. ACS Symposium Series No.742. American Chemical Society, Washington, D.C.
- [37]. Lora J., Naceur B.M., Gandini A. *Industrial Commercial Lignins: Sources, Properties and Applications*. In: *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, Eds. Naceur, B.M., Gandini, A. Elsevier, Amsterdam, **2008**, 225-241.
- [38]. Holladay J.E., Bozell J.J., White J.F., Johnson D. *Top value added chemicals from biomass, volume II – results of screening for potential candidates from biorefinery lignin*. Pacific Northwest National Laboratory and the National Renewable Energy Laboratory, **2007**. Prepared for the US Department of Energy under contract number DE- ACOS-76RL01830.
- [39]. Abächerli A., Doppenberg F., *Method for preparing alkaline solutions containing aromatic polymers*. **1998**, Patent WO42912.
- [40]. Hallberg C., O'Connor D., Rushton M., Pye E.K., Gjennstad G. *Continuous counter-current organosolv processing of lignocellulosic feedstocks*. **2010** Patent WO060183.
- [41]. Delmas, M., *Vegetal Refining and Agrichemistry*. Chem. Eng. Technol. **2008**, 5, 792-797.
- [42]. Vishtal A., Kraslawski A., *Challenges in industrial applications of technical lignins*. Bioresources. **2011**, 6(3), 1-22.
- [43]. Gellerstedt G., Henriksson G., Lignins: Major Sources, Structure and Properties. In: *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, Eds. Belgacem M.N., Gandini A., Elsevier. Amsterdam, **2008**, 201-224.
- [44]. Minor J.L., *J. Wood Chem. Technol.*, **1986**, 6(2), 185 – 201.
- [45]. Xie Y., Yusuda S., Wu H., Liu H., *Analysis of the structure of lignin – carbohydrate complexes by the specific 13C tracer method*. J. Wood Sci., **2000**, 46, 130-136.

- [46]. Ralph J., Grabber J.H., Hatfield R.D., *Carb. Res.*, **1995**, 275(1), 167-178.
- [47]. Hammel K.E., *Fungal degradation of lignin. In: Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition*, Eds. Cadisch G., Giller K.E., CAB International, **1997**, 33-45.
- [48]. Thring R.W., Chornet E., Bouchard J., Vidal P.F., Overend R.P., *Can. J. Chem.*, **1990**, 68(1), 82-89.
- [49]. Hubbard T.F., Schultz T.P., Fisher T.H. *Holzforschung*, **1992**, 46(4), 315-320.
- [50]. Thring R.W., *Biomass Bioenergy*, **1994**, 7(1-6), 125-130.
- [51]. Gierer, J., *Wood Sci. Technol*, **1985**, 19(4), 289-312.
- [52]. Hepditch M.M., Thring R.W., *Can. J. Chem. Eng.*, **2000**, 78(1), 226-231.
- [53]. Evju H., *Process for preparation of 3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde*. **1979**, Patent US4,151,207.
- [54]. Klinker H.B., Ahring B.K., Schmidt A.S., Thomsen A.B., *Bioresour. Technol*, **2002**, 82(1), 15-26.
- [55]. Gandini A., Belgacem M.N., *Lignins as Components of Macromolecular Materials. In: Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, Eds. Belgacem M.N., Gandini A., Elsevier. Amsterdam., **2008**, 243-271.
- [56]. Abe A., Dusek K., Kobayashi S., Hatakeyama H., Hatakeyama T. *Lignin Structure, Properties, and Applications. In: Biopolymers, Vol. 232*, Springer Berlin / Heidelberg, **2010**, 1-63.
- [57]. Lindberg J. J., Kuusela T. A., Levon K. *Specialty polymers from lignin. In "Lignin: Properties and Materials"* (W. G. Glasser and S. Sarkanen, eds.), **1989** 190-204. ACS Symposium Series No. 397. American Chemical Society, Washington, D.C.
- [58]. Lora J., Glasser W. G., *J. Polym. Environm*, **2002**, 10(1/2), 39-48.
- [59]. Ralph K., *Advances in Applied Microbiology*, **2005**, 58, 125-168.
- [60]. Cantarella G., Galli C., Gentili P., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2003**, 22, 135.
- [61]. Liers C., Arnstadt T., *Fems Microbiology Ecology*, **2011**, 78(1), 91-102)
- [62]. Dashtban M., Schraft H., *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **2010**, 1(1), 36-50).
- [63]. Hammel K. E., *New Journal of Chemistry*, **1996**, 20(2), 195-198.)
- [64]. Thurston C.F., *Microbiology*, **1994**, 140, 19.
- [65]. Xu F., *Biochemistry*, **1996**, 35, 7608.
- [66]. M. Alcalde: *Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications. In Industrial enzymes* (Ed. J. Polaina and A.P. MacCabe, Springer, Heidelberg, 2007), **1994**, 461-476.
- [67]. Messerschmidt A., Huber R., *European Journal of Biochemistry*, **1990**, 187, 341.
- [68]. Beloqui A., Pita M., Polaina J., Martinez-Arias A., Golyshina O.V., Zumarraga M., Yakimov M.M., Garcia H.- Arellano, Alcalde M., Fernandez V.M., Elborough K., Andreu J.M., Ballesteros A., Plou F.J., Timmis K.N., Ferrer M., Golyshin P.N., *Journal of Biological Chemistry*, **2006**, 281, 22933.
- [69]. Levine W.G., *Laccase, a review, In: The biochemistry of copper*, Academic Press Inc., **1994**, New York.
- [70]. Yoschida, *Tokyo Journ. Chem. Soc.* 1883, 43. 472.
- [71]. Bourbonnais R., Paice M., Reid I., Lanthier P., Yaguchi M., *Applied and Environmental Microbiology*, **1995**, 61, 1876 .

- [72]. Leontievsky A., Myasoedova N., Pozdnyakova N., Golovleva L., *FEBS Letters*, **1997**, 413, 446.
- [73]. Yaver D.S., Berka R.M., Brown S.H., Xu F., The presymposium on recent advances in lignin biodegradation and biosynthesis, Vikki Biocentre, University of Helsinki, Finland, 3-4 June **2001**, pp.40.
- [74]. Bourbonnais R., Paice M.G., *Tappi Journal*, **1996**, 79, 199.
- [75]. Eggert C., Temp U., Erikson K-E.L., *Applied and Environmental Microbiology*, **1996**, 62, 1151.
- [76]. Banci L., Ciofi-Baffoni S., Tien M., *Biochemistry*, **1999**, 38, 3205.
- [77]. Hildén L., Johansson G., Pettersson G., Li J., Ljungquist P., Henriksson G., *FEBS Letters*, **2000**, 477, 79.
- [78]. Selinheimo E, Kruus K, Buchert J, Hopia A, Autio K., *J Cereal Sci.* **2006**, 43, 152-9.
- [79]. Minussi RC, Pastore GM, Durán N., *Trends Food Sci Technol.*, **2002**, 13, 205-16.
- [80]. Kuhad RC, Singh A, Eriksson KEL. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell wall. In: Eriksson KEL, editor. *Biotechnology in the Pulp and paper industry. Advances in biochemical engineering biotechnology*. Berlin: Springer Verlag; **1997**. Chapter 2.
- [81]. Hüttermann A, Mai C, Kharazipour A., *Appl Microbiol Biotechnol*, **2001**, 55, 387-94.
- [82]. Rodríguez Couto S., Toca Herrera J. L., *Biotechnology Advances*, **2006**, 24, 500-513.
- [83]. Haghghi B., Gorton L., Ruzgas T., Jönsson L.J., *Anal Chim Acta*, **2003**, 487, 314.
- [84]. Durán N, Esposito E., *Appl Catal B Environ*, **2000**, 28, 83-99.
- [85]. Nicotra S., Cramarossa M.R., Mucci A., Pagnoni U.M., Riva S., Forti L., *Tetrahedron*, **2004**, 60, 595-600.
- [86]. Areskogh D., Li J., Gellerstedt G., G. Henriksson, *Ind. Crops Prod.*, **2010**, 32, 458-466.
- [87]. Areskogh D., Li J., Gellerstedt G., Henriksson G., *Biomacromolecules*, **2010**, 11, 904-910.
- [88]. Leonowicz A., Edgehill R. U., Bollag J.M., *Arch. Microbiol.*, **1984**, 137, 89-96;
- [89]. Marjasvaara A., Torvinen M., Kinnunen H., Vainiotalo P., *Biomacromolecules*, **2006**, 7, 1604-1609.
- [90]. Areskogh D., Li J., Nousiainen P., Gellerstedt G., Sipilä J., Henriksson G., *Holzforchung*, **2010**, 64, 21-34.
- [91]. Crestini C., Jurasek L., Argyropoulos D. S., *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 5371-5378.
- [92]. Lahtinen M., Heinonen P., Oivanen M., Karhunen P., Kruus K., Sipilä J., *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11, 5454-5464.
- [93]. Shiba T., Xiao L., Miyakoshi T., Chen C.L., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2000**, 10, 605-615.
- [94]. Kawai S., Umezawa T., Shimada M., Higuchi T., Koide K., Nishida T., Morohoshi N., Haraguchi T., Gakkaishi M., **1987**, 33, 792-797;
- [95]. Kawai S., Umezawa T., Higuchi T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1988**, 262, 99-110.
- [96]. Wariishi H., Morohoshi N., Haraguchi T., Gakkaishi M., **1987**, 33, 892-898

- [97]. Kawai S., Higuchi T., Nabeta K., Okuyama H., in *Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture*, eds. T. K. Kirk and H.-M. Chang, Butterworth-Heinemann, USA, **1990**, 359-365.
- [98]. Chakar F.S., Ragauskas A.J., Laccase-Lignin Reactions, in *Sixth European Workshop on Lignocellulosics and Pulp*. **2000**. Brodeaux, France. p.53-56.
- [99]. Konishi K., Inoue Y., Higuchi T., Decomposition of Lignin by *Coriolus versicolor*. V. Formation of Carboxyl Groups in the Lignin Treated with Fungal Laccase. Ed. Mokuzai Gakkaishi, **1974**, 20(1), 26-30.
- [100]. Ishihara T., Miyazaki M., Oxidation of Milled Wood Lignin by Fungal Laccase. Ed. Mokuzai Gakkaishi, **1972**. 18(8), 415-419.
- [101]. Klibanov A.M., *Nature*, **2001**, 409, 241-246.
- [102]. Aldercreutz P., Modes of using enzymes in organic media, *Enzymatic reactions in organic media (Koskinen A.M.P., Klibanov A.M., Eds)*, Chapman & Hall, London, **1996**, 9-42.
- [103]. Khmel'nitsky Z.L., Levashov A., Klzachko N., Martinek K., *Enz. Microb. Technol.*, **1987**, 10, 710-724).
- [104]. Institute of Medicine. *Safety review: Draft 3 prototype monograph on glucosamine.*, National Academy of Sciences, **2003**, 1-84. Washington, DC.
- [105]. *Gras Notification for REGENASURE Glucosamine Hydrochloride*. Submitted by: Cargil Incorporated 15407 McGinty Road West Wayzata, MN 55391, April 6, **2004**.
- [106]. Dumitru I. F., Iordăchescu D., *Introducere în Enzimologie*, **1981**, Editura Medicală, București.
- [107]. Péter F., *Biotransformări enzimatică*, **2005**, Editura Politehnică.
- [108]. Gill I., Fandino R. L., Jobra X., Vulfson E. N., *Enzyme and Microbial Technology*, **1996**, 18, 162-183.
- [109]. Huang S. M., Chen K. N., Chen Y. P., Hong W. S., Chen M. J., *International Journal of Food Science & Technology*, **2010**, 45(5), 1061-7.
- [110]. Kim S. -K., Wijesekara I., *Journal of Functional Foods*, **2010**, 2(1), 1-9.
- [111]. Marx V., *Chemical & Engineering News*, **2005**, 83(11), 17-24.
- [112]. Powers J. P. S., Hancock R. E. W., *Peptides*, **2003**, 24, 1681-1691.
- [113]. Lesmes L. P., Bohorquez M. Y., Carreno L. F., Patarroyo M. E., Lozano J. M., *Peptides*, **2009**, 30, 2150-2160.
- [114]. Chan D. I., Prenner E. J., Vogel H. J., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2006**, 1758, 1184-1202.
- [115]. Chan D. I., Prenner E. J., Vogel H. J., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2006**, 1758, 1184-1202.
- [116]. Duan B., Chang C., Zhang L., *Inc. J. Appl. Polym. Sci.*, **2014**, 131 (4), 39538 (1-7).
- [117]. Yogeshkumar G. N., Gurav Atul S., Yadav Adhikrao V., Chitosan and Its Applications: A Review of Literature, *IJRPBS*, **2013**, 4 (1), 312-331.
- [118]. Li X., Min M., Du N., Gu Y., Hode T., Naylor M., Chen D., Nordquist R. E., Chen W. R., *Clinical and Developmental Immunology*, **2013**, 387023, 1-8.
- [119]. Rosatella A. A., Branco L. C., Afonso C. A. M., *Green Chemistry*, **2009**, 11, 1406-1413.
- [120]. Lichtenthaler F. W., Peters S., *Comptes Rendus Chimie*, **2004**, 7, 65 - 90.
- [121]. Lichtenthaler F. W., Mondel S., *Pure and Applied Chemistry*, **1997**, 69 (9), 853 - 1866 .
- [122]. Tawata, S.; Taira, S.; Kobamoto, N.; Zhu, J.; Ishihara, M.; Toyama, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, 60, 909-910.

- [123]. Chen, X.; Martin, B. D.; Neubauer, T. K.; Linhardt, R.F.; Dordick, J. S.; Rethwisch, D. G. *Carbohydr. Polym.* **1995**, *28*, 15–21.
- [124]. Ravichandran K, Ahmed AR, Knorr D, Smetanska I., *Food Res Int*, **2012**; *48*(1), 16–20.
- [125]. Stamatis H., Sereti V., Kolisis F. N., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2001**, *11*, 323 – 328;
- [126]. Vafiadi C., Topakas E., Wong K. K. Y., Suckling I. D., Christakopoulos P., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, *16*, 373 – 379;
- [127]. Chen J. H., Ho C. T., *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **1997**, *45*, 2374 – 2378.
- [128]. Bernhaus A., Fritzer-Szekeres M., Grusch M., Saiko P., Krupitza G., Venkateswarlu S., Trimurtulu G., Jaeger W., Szekeres T., *Cancer Lett*, **2009**; *274*(2), 299–304.
- [129]. Cheenpracha S., Park E.J., Yoshida W.Y., Barit C., Wali M., Pezzuto J.M., Chang L.C., *Bioorg Med Chem*, **2010**, *18*(17), 6598–602.
- [130]. Hung T.M., Dang N.H., Kim J.C., Choi J.S., Lee H.K., Min B.S., *Chem Lett*, **2009**, *19*(15), 4389–93.
- [131]. Otto R. T., Scheib H., Bornscheuer U. T., Pleiss J., Sylđatk C., Schmid R. D., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2000**, *8*, 201 – 211.
- [132]. Croitoru R., Fiřigău F., van den Broek L.A.M, Frissen A.E., Davidescu C.M., Boeriu C.G., Peter F., *Process Biochemistry*, **2012**, *47*, 1894–1902.
- [133]. Allen B.R., Michael J.C., Pierce G.E., Pretreatment methods for the degradation of lignin. Battelle, Columbus Laboratories, Columbus, Ohio, **1980**, 105–153.
- [134]. Van de Pas D., Hickson A., Donaldson L., Lloyd-Jones G., Tamminem T., Fernvrough A., Mattinen M.L., *BioResources*, **2011**, *6*(2), 1105–1121.
- [135]. Fiřigău I.F., Peter F., Boeriu C.G., "Structural Analysis of Lignins from Different Sources", *International Conference on Chemical Engineering and Technology*, Veneřia, Italia, **2013**, pp. 227.
- [136]. Faix O., *Fourier transformed infrared spectroscopy. In: Methods in Lignin Chemistry*, Lin S.Y., Dence C.W. (Eds.), Springer, Berlin-Heidelberg, **1992**, 458–464.
- [137]. Bermello A., Del Valle M., Orea U., Carballo L. R., *International Journal of Polymeric Materials*, **2002**, *51*, 557–566.
- [138]. Popescu C. M., Popescu M.C., Singurel G., Vasile C., Argyropoulos D. S., Willfor S., *Applied Spectroscopy*, **2007**, *61* (11), 1168–1177.
- [139]. Casas A., Alonso, M. V., Oliet M., Rojo E., Rodriguez F., *J Chem Technol Biotechnol*, **2012**, *87*, 472–480.
- [140]. Rummyantseva Yu. I., Zhibankov R. G., Marhevka R., Rataiczak H., *Journal of Applied Spectroscopy*, **1994**, *61* (5-6), 699–703.
- [141]. Granata A., Argyropoulos D. S., Agric J., *Food Chem.*, **1995**, *43*, 1538–1544.
- [142]. Fiřigău I.F., Peter F., Boeriu C.G., *World Academy of Science Engineering and Technology*, **2013**, *4* (76), 227–232.
- [143]. Obst J.R., Landucci L.L., *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **1986**, *6*(3), 311–327
- [144]. Brunow G, Lundquist K, Gellersted G. *Lignin*, In: Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Paper-making. Sjöström E, Alén R, editors. Vol. 1. Springer-Verlag; Berlin: **1999**, 77–124.
- [145]. Thring R.W., Griffin S.L., *Canadian Journal of Chemistry*, **1994**, *73*, 629–634;

- [146]. Thring, R.W., Vanderlaan M.N., Griffin S.L., *Journal of wood chemistry and technology*, **1996**, 16(2), 139-154.
- [147]. Hildebrand J.H., Scott R.L., *The Solubility of Nonelectrolytes*, third ed. Rheinhold, 1950, New York.
- [148]. I.F. Fițigău, R.J.A. Gosselink, A. E. Frissen, J. Stoutjesdijk, F. Peter, C.G. Boeriu, *Ind. Crops Products*, 2014, în curs de evaluare.
- [149]. Ni Y., Hu Q., *J. Appl. Polym. Sci.*, **1995**, 57, 1441-1446.
- [150]. Quesada-Medina J., Lopez-Cremades F.J., Olivares-Carrillo P., *Bioresource Technology*, **2010**, 101(21), 8252-8260.
- [151]. Kurtz Jr. S. S., Wikingsson A. E., Camin Sun Oil Co. D. L., Marcus Hook, Pa, *Journal of chemical and engineering data*, VOL. 10, No. 4, OCTOBER **1965**.
- [152]. Stein F. P., Martin J. J., *Chem. Eng. Prog. Svmp. Ser.* **1963**, 59(44), 112.
- [153]. Thomas K. T., McAllister R. A., *A.I.Ch.E. Journal*, **1957**, 3, 2, 161-164.
- [154]. NIST Standard Reference Database 69: NIST Chemistry WebBook, J. H. Perry, Ed., *Chemical Engineer Handbook*, 4th ed., McGraw-Hill, New York, 3-87, 3-112.
- [155]. Schuerch C., *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 74, 501;
- [156]. Fițigău F. I., Peter F., Boeriu C. G., "Oxidative polymerization of lignins by laccase in water-organic solvent system", 5th edition of the *EUROBIOTECH 2013 Congress, Cracovia*, **2013**, pp. 29.
- [157]. Fițigău F. I., Peter F., Boeriu C. G., *Acta Biochimica Polonica*, **2013**, 60, 817-822
- [158]. Camarero S., Galletti G.C., Martinez A.T., *Rapid Commun Mass Spectrom*, **1997**, 11(4), 331-334.
- [159]. Ke J, Laskar DD, Chen S., *Paranthrene robiniae (Hy. Edwards). Biomacromolecules*, **2011**, 12, 1610- 1620.
- [160]. Tai D., Terazawa M., Chen C.L., Chang H.M., *Holzforschung*, **1990**, 44,185-190.
- [161]. Crestini C, Argyropoulos DS ,*Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **1998**, 6, 2161-2169.
- [162]. Freudenreich J, Amann M, Fritz-Langhals E, Stohrer J., *International Pulp Bleaching Conference Proceedings*, Helsinki, Finland, **1998**, 71-76.
- [163]. Liu Y., Wang Z., Wang J., Yang G., Huang F., Lucia L., *Bioresources*, **2012**, 7(3),4284-4293.
- [164]. Brown B. R., In Taylor W. I., Eat-Tersby A. R., *Oxidative Coupling of Phenols*,. Dekker, New York **1967**, 167.
- [165]. Bourbonnais R., Paice M.G., Freiermuth B., Bodie E., Borneman S., *Appl. Environ. Microbial.*, **1997**, 63, 4627-4632.
- [166]. Potthast A., Rosenau T., Chen C.L., Gratzl J.S., *J Mol Catal A*, **1996**, 108, 5-9.
- [167]. Ungurean M., Fitigau F., Paul C., Ursoiu A., Peter F., *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **2011**, 52, 387-391.
- [168]. Fițigău I. F., Gosselink R.J.A., Frissen A.E., Peter F., Boeriu C.G., "Enzymatic modification of lignins from different sources", *13th EDITION OF ACADEMIC DAYS TIMISOARA*, , Timișoara, ROMÂNIA, **2013**, pp. 28.
- [169]. Lahtinen M., Kruus K., Boer H., Kemell M., Andberg M., Viikari L., Sipilä J., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2009**, 57, 204-210.
- [170]. Rochefort D., Leech D., Bourbonnais R., *Green Chem*, **2004**, 6, 14-24.
- [171]. Xu F., *Biochemistry*, **1996**, 35, 7608-7614.

- [172]. Argyropoulos D. S., in *Lignin & Lignans: Advances in Chemistry*, ed. Heitner C., Dimmel D. and Schmidt J. A., CRC Press, Boca Raton, FL, **2010**, 245–265.
- [173]. Pu Y., Cao S., Ragauskas A. J., *Energy Environ. Sci.*, **2011**, 4, 3154–3166.
- [174]. Celis J. E., Carter N., Hunter T., Simons K., Small J. V., Shotton D., *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 3th Edition, **2006**, Elsevier, Academic Press.
- [175]. Jolliffe I. T., *Principal Component Analysis.*, **1986**, Springer-Verlag. 487.
- [176]. Speiser B., In *Encyclopedia of Electrochemistry*; Bard, A. J., Stratmann, M., Eds.; Wiley-VCH: WeinheimInstrumentation and Electroanalytical Chemistry, 2003, 3, 1-104.
- [177]. Kissinger P. T., Heineman W. R., *J. Chem. Educ.*, 1983, 60 (9), 702.
- [178]. Maijala P., Mattinen M.L., Nousiainen P., Kontro J., Asikkala J., Sipilä J., Viikari L., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2012**, 76, 59– 67.
- [179]. Fitigău I.F., R.J.A. Gosselink, A.E. Frissen, C.G. Boeriu, F. Peter, "Structural analysis of lignin fractions from different sources", *The XIVth International Symposium "Young People and Multidisciplinary Research"*, Timișoara, Abstract Book, **2012**, p. 17.

ANEXE

Tabel 1. Calculul parametrului de solubilitate al unităților G, S și H din lignină.

Atom sau grupare	Δe_i (cal/mol)	Δv_i (cm ³ /mol)
<i>Unitatea repetitivă G</i>		
OH	7120	10.0
CH	820	-1.0
CH ₂	1180	16.1
CH ₃	1125	33.5
C =	1030	-5.5
2 × O	2 × 800	2 × 3.8
Fenil (trisubstituit)	7630	33.4
Δv_i^*		$\Delta v_i = 2 \times n = 2 \times 9 = 18$
Total	20505	112.1
<i>Unitatea repetitivă S</i>		
2 × OH	2 × 7120	2 × 10.0
2 × CH	2 × 820	2 × (-1)
CH ₂	1180	16.1
2 × CH ₃	2 × 1125	2 × 33.5
3 × O	3 × 800	3 × 3.8
Fenil (tetrasubstituit)	7630	14.4
Δv_i^*		$\Delta v_i = 2 \times n = 2 \times 9 = 18$
Total	29340	144.9
<i>Unitatea repetitivă H</i>		
OH	7120	10.0
CH ₂	1180	16.1
CH	820	-1.0
C =	1030	-5.5
Fenilen (p)	7630	52.4
2 × O	2 × 800	2 × 3.8
Δv_i^*		$\Delta v_i = 2 \times n = 2 \times 9 = 18$
Total	19380	97.6

* Factorul de corecție pentru divergențele dintre valorile v [149].

Tabel 2. Calculul parametrului de solubilitate pentru acetatul de etil și amestecurile de acetonă-apă

Solvent	ΔH^* (cal/mol)	T (K)	ρ^* (g/cm ³)	Mw(g/mol)	δ (cal/cm ³) ^{1/2}
Acetonă/Apă (v\v)					
90/10	7883	331.81	0.8287	45.07	12.01
70/30	9091	333.4	0.8894	32.52	15.75
50/50	9766	336.65	0.9335	25.72	18.8
30/70	10005	339.72	0.9654	21.6	21.11
10/90	9982	359.5	0.9884	19.00	22.75
Acetat de etil	8600	350	0.901	88.11	7.62

*Valori obținute la 20°C.

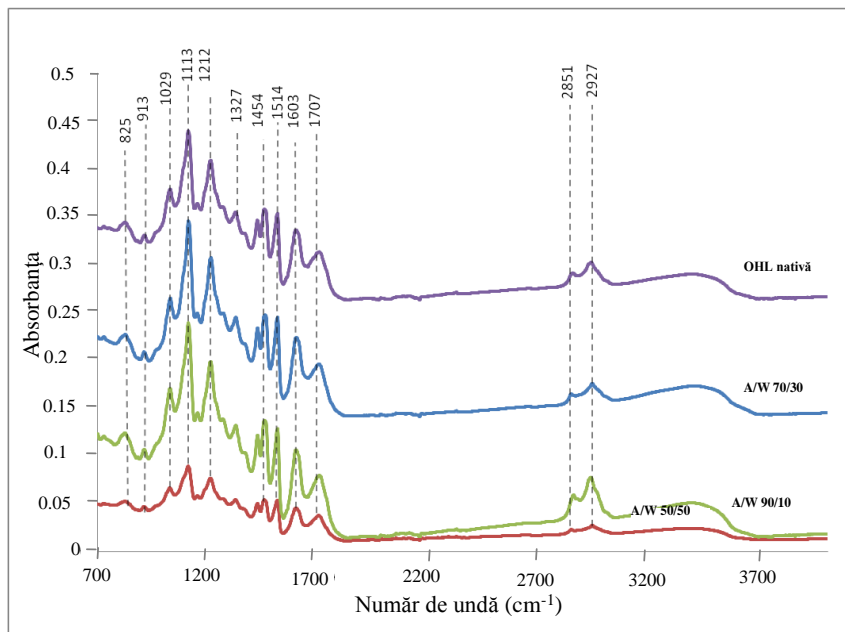


Figura 1. Spectrul FT-IR a ligninei OHL nativă și fracționată cu amestec de acetonă-apă.

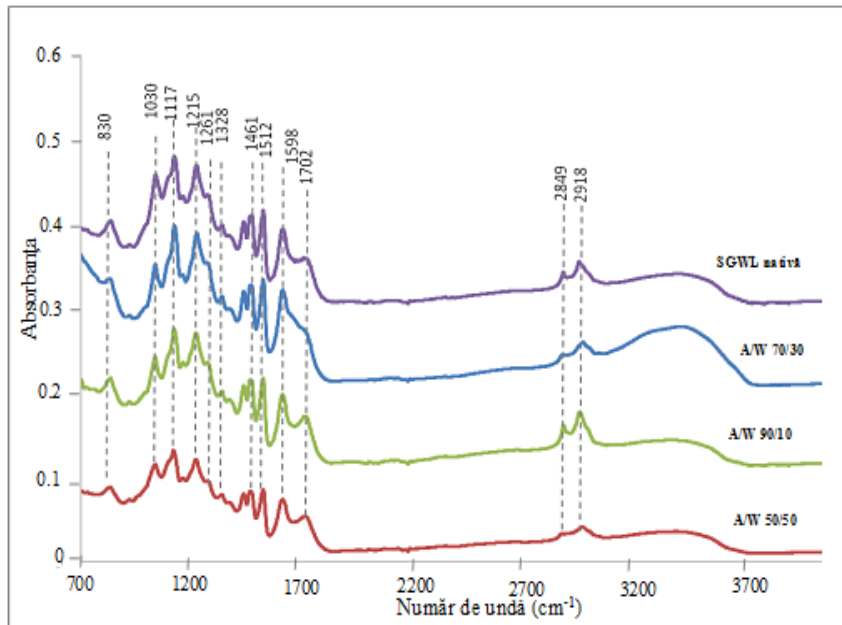


Figura 2. Spectrul FT-IR a ligninei SGWL nativă și fracționată cu amestec de acetonă-apă.

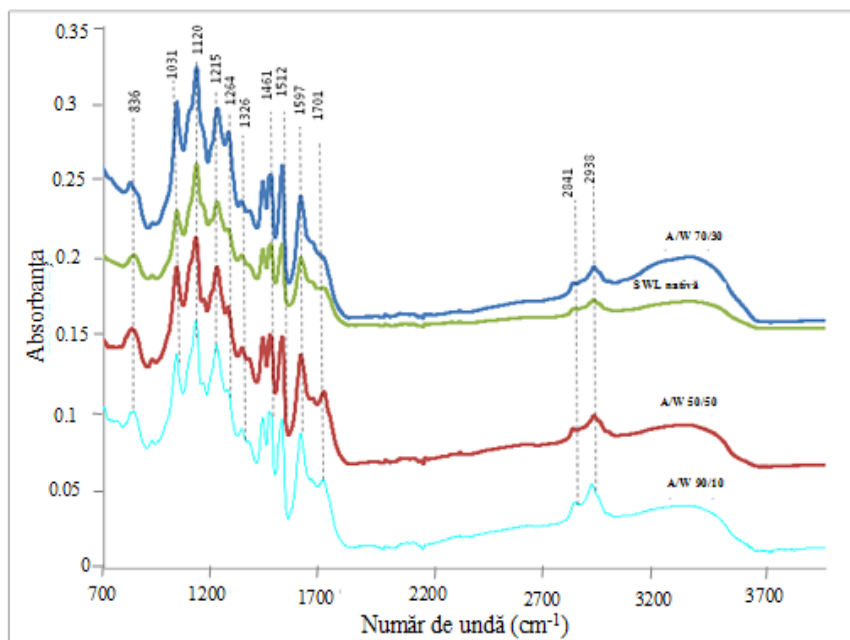


Figura 3. Spectrul FT-IR a ligninei SWL nativă și fracționată cu amestec de acetonă-apă.

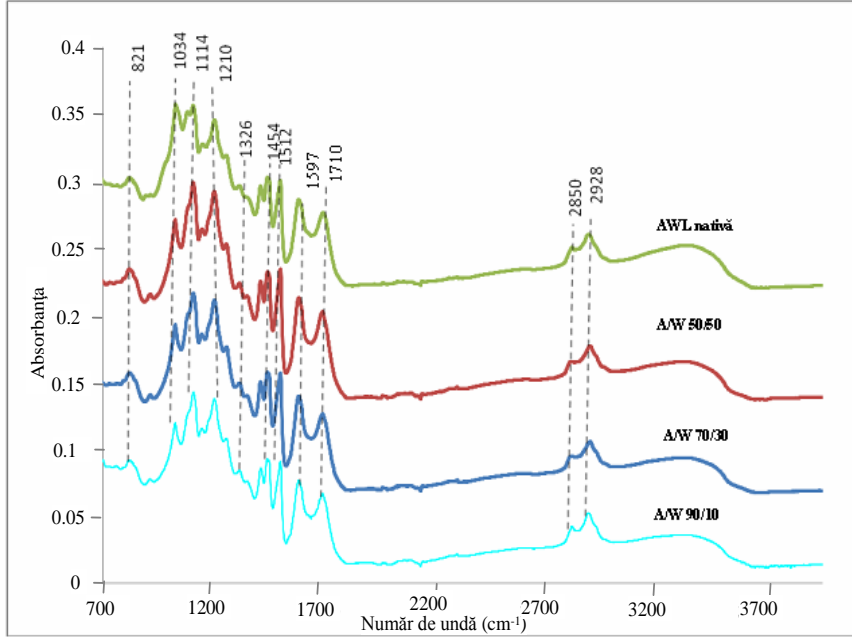


Figura 4. Spectrul FT-IR a ligninei AWL nativă și fracționată cu amestec de acetonă-apă.

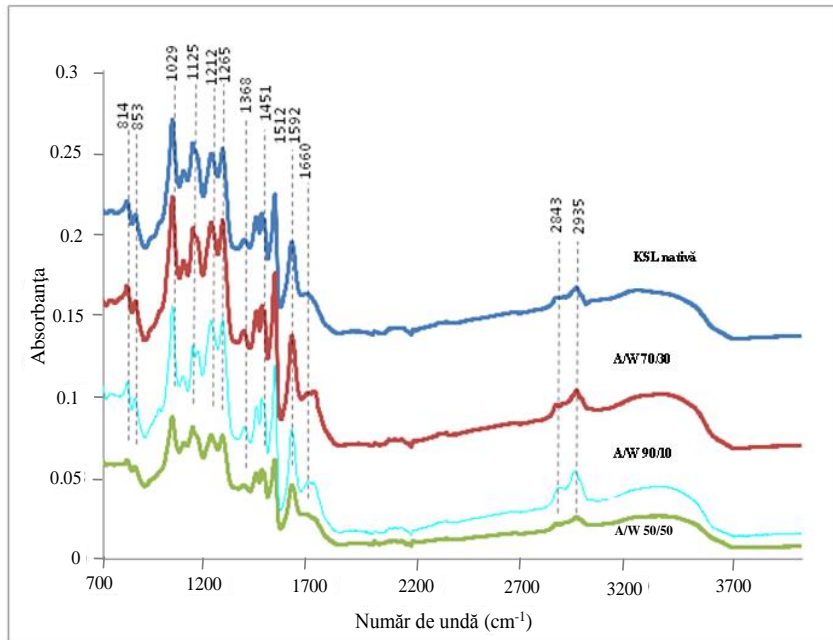


Figura 5. Spectrul FT-IR a ligninei KSL nativă și fracționată cu amestec de acetonă-apă.

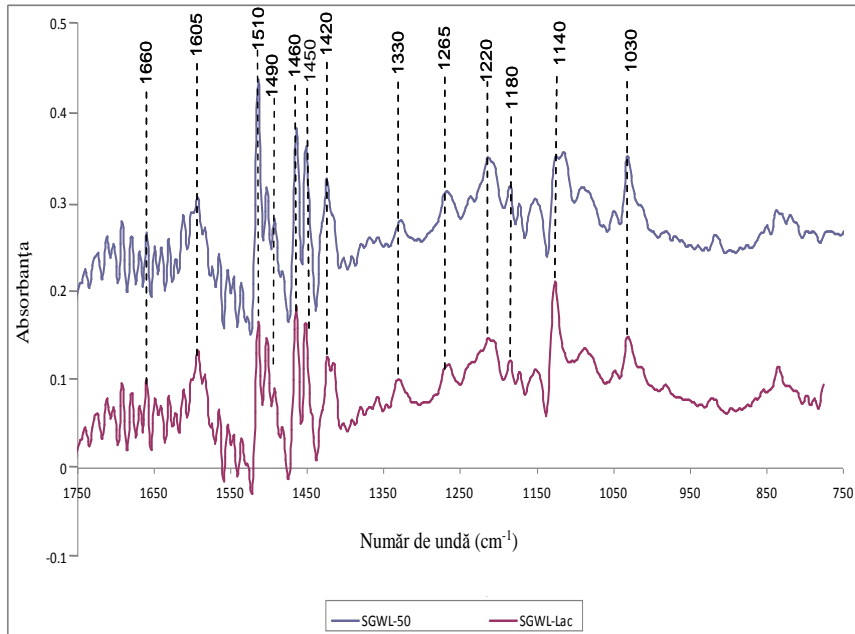


Figura 6. Spectrele FT-IR ale ligninei SGWL, nemodificată (SGWL-50) și modificată cu lacază (SGWL-Lac).

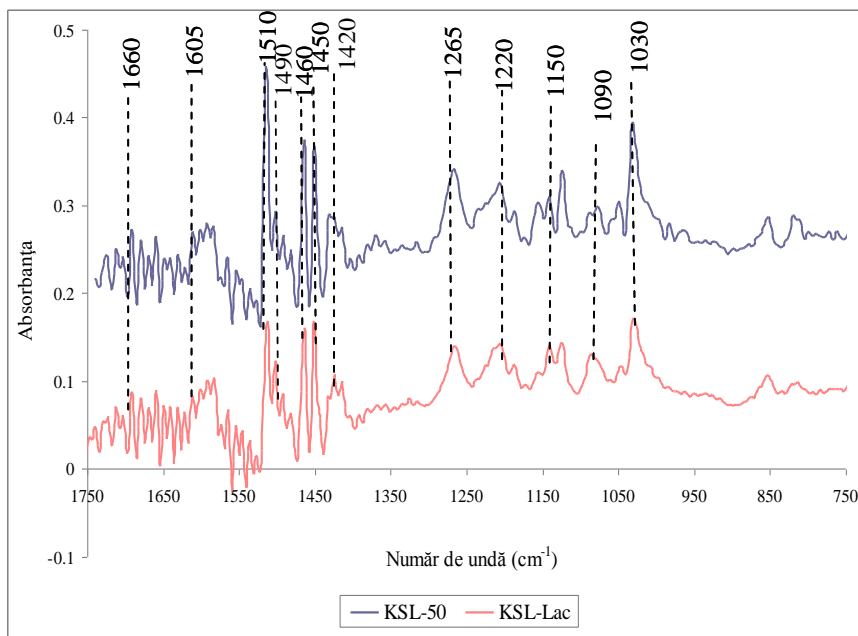


Figura 7. Spectrele FT-IR ale ligninei KSL, nemodificată (KSL-50) și modificată cu lacază (KSL-Lac).

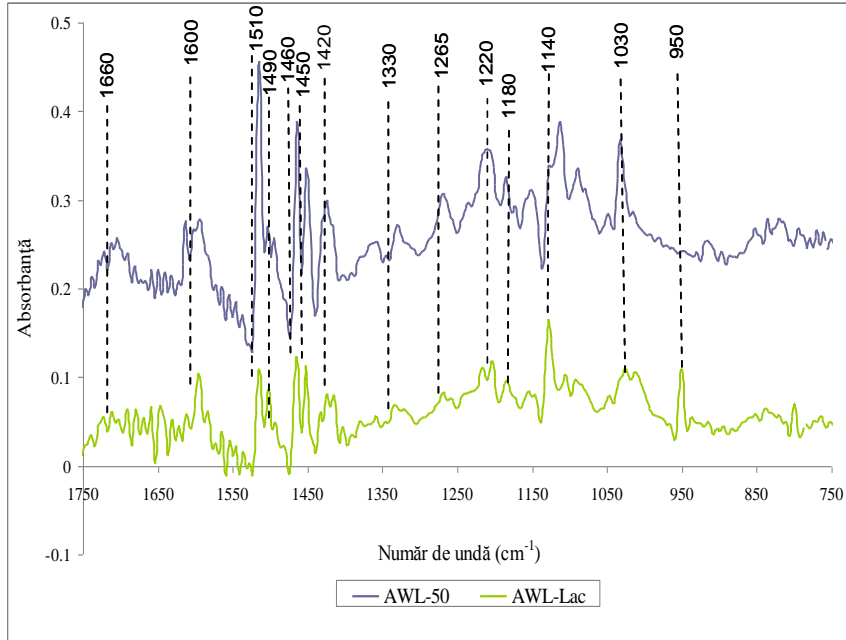


Figura 8. Spectrele FT-IR ale ligninei AWL, nemodificată (AWL-50) și modificată cu lacază (AWL-Lac).

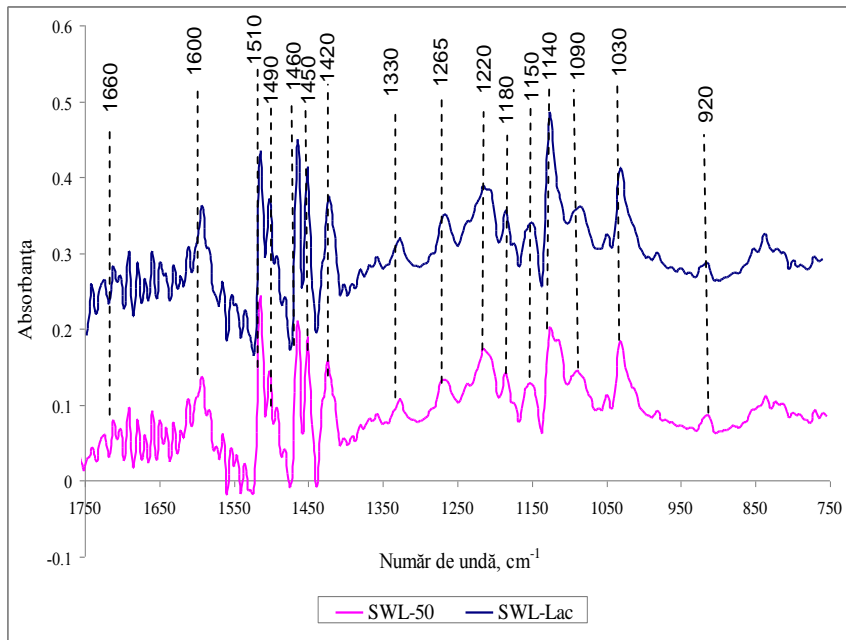


Figura 9. Spectrele FT-IR ale ligninei SWL, nemodificată (SWL-50) și modificată cu lacază (SWL-Lac).

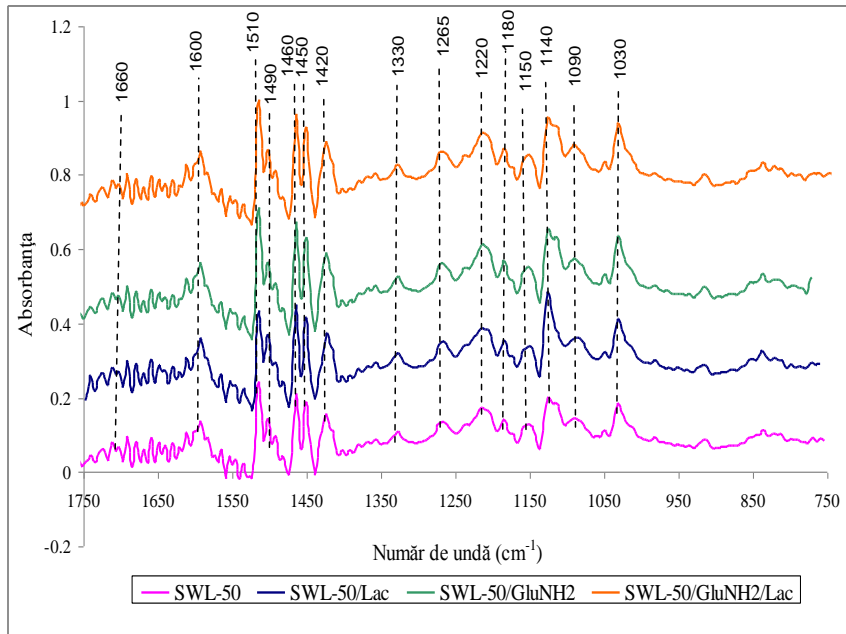


Figura 10. Spectrul FT-IR al reacțiilor de oxidare enzimatică a ligninei SWL cu glucozamina

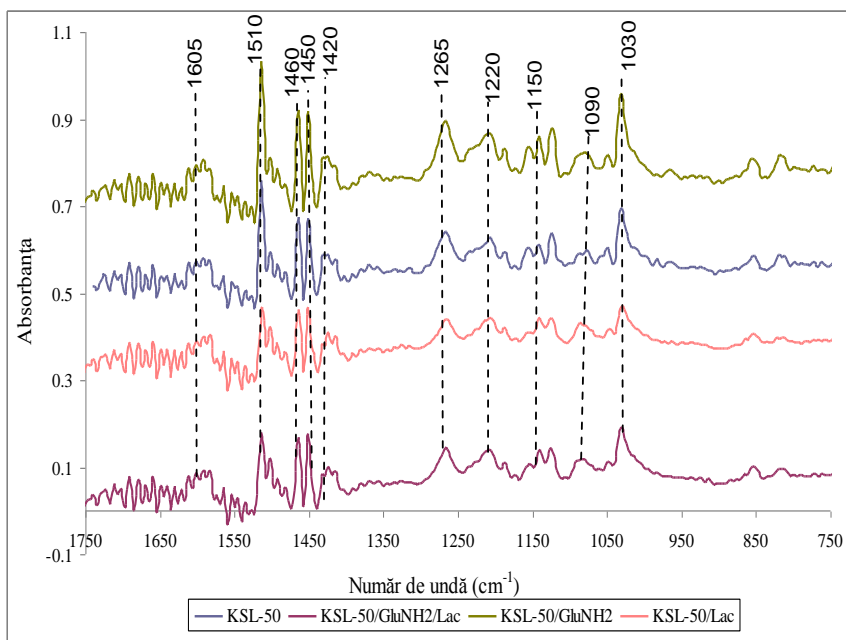


Figura 11. Spectrul FT-IR al reacțiilor de oxidare enzimatică a ligninei KSL cu glucozamina

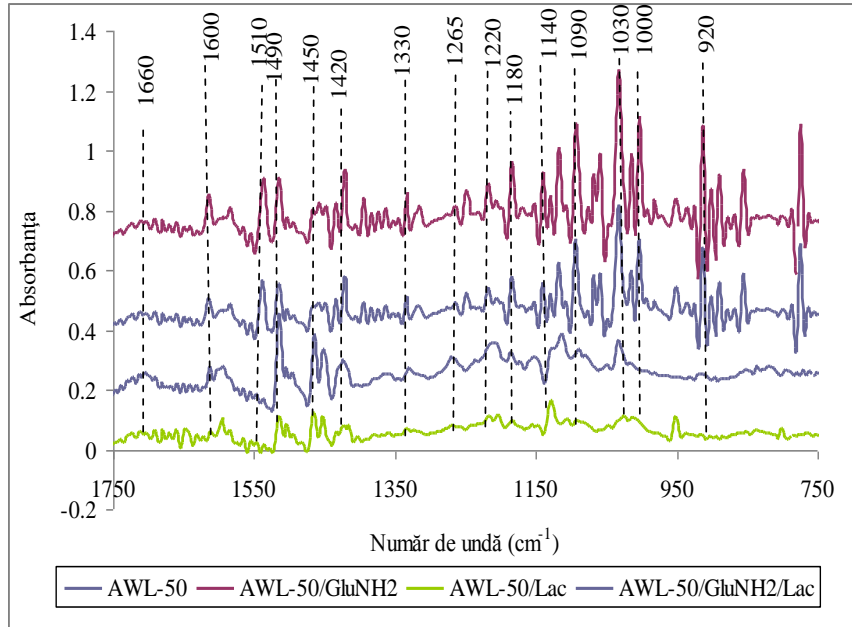


Figura 12. Spectrul FT-IR al reacțiilor de oxidare enzimatică a ligninei AWL cu glucozamina

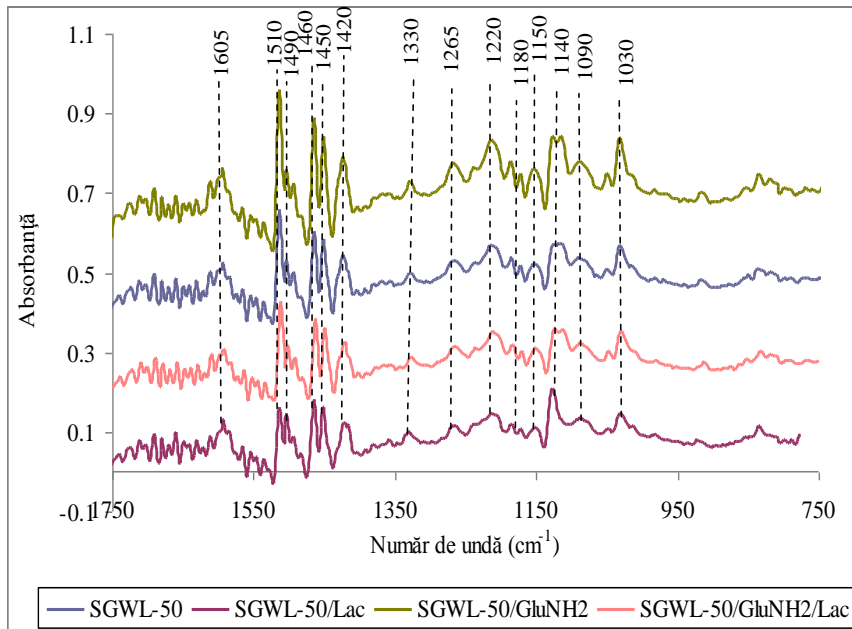


Figura 13. Spectrul FT-IR al reacțiilor de oxidare enzimatică a ligninei SGWL cu glucozamina

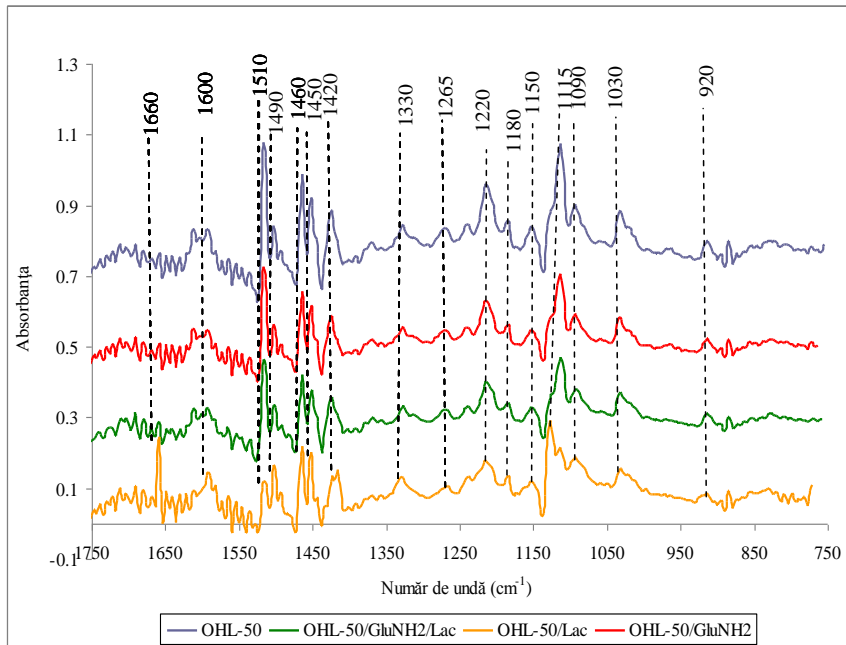


Figura 14. Spectrul FT-IR al reacțiilor de oxidare enzimatică a ligninei OHL cu glucozamina

LISTA DE LUCRĂRI

Lucrări publicate în tematica de cercetare a tezei

1. R. Croitoru, **I.F. Fitigău**, L. A. M. van den Broek, A. E. Frissen, F. Peter, C. M. Davidescu, C.G. Boeriu, "Biocatalytic acylation of sugar alcohols by 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid", *Process Biochemistry*, 2012, 47, 1894-1902 (F.I. 2,414).
2. **I.F. Fitigău**, F. Peter, C.G. Boeriu, "Structural Analysis of Lignins from Different Sources", *World Academy of Science Engineering and Technology*, 2013, 76, 98-103.
3. M. Ungurean, **I.F. Fitigău**, C. Paul, A. Ursoiu, F. Peter, "Ionic Liquid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Wood Biomass", *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 52, 344-348 (indexată SCOPUS).
4. **I. F. Fitigău**, F. Peter, C. G. Boeriu, "Oxidative polymerization of lignins by laccase in water-acetone mixture", *Acta Biochimica Polonica*, 2013, 60, 817-822 (F.I. 1,185).
5. **I.F. Fitigău**, R.J.A. Gosselink, A. E. Frissen, J. Stoutjesdijk, F. Peter, C.G. Boeriu, "Fractionation of five technical lignins by selective extraction in green solvents and characterisation of the isolated fractions", *Industrial Crops and Products*, 2014, lucrare în curs de evaluare (F.I. 2,468).

Lucrări comunicate

1. **I. F. Fitigău**, R.J.A. Gosselink, A.E. Frissen, C.G. Boeriu, F. Peter, "Structural analysis of lignin fractions from different sources", *The XIVth International Symposium "Young People and Multidisciplinary Research"*, Timișoara, Abstract Book, 2012, pp. 17.
2. **I. F. Fitigău**, R.J.A. Gosselink, A.E. Frissen,, F. Peter, C.G. Boeriu, "Enzymatic modification of lignins from different sources", *13th Edition of Academic Days*, Timișoara, Abstract Book, 2013, pp. 28.
3. **I. F. Fitigău**, F. Peter, C.G. Boeriu, "Oxidative polymerization of lignins by laccase in water-organic solvent system", *5th Edition of the EUROBIOTECH 2013 Congress*, Cracovia, Abstract book, 2013, pp. 29.
4. **I.F.Fitigău**, F. Peter, C.G. Boeriu, "Structural Analysis of Lignins from Different Sources", *International Conference on Chemical Engineering and Technology*, Veneția, Abstract Book, 2013, pp. 227.