

**UNIVERSITATEA POLITEHNICA TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE CHIMIE INDUSTRIALĂ ȘI INGINERIA  
MEDIULUI**

**Ing. Ionița Firuța FIȚIGĂU**

**TEZA DE DOCTORAT  
REZUMAT**

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

**Conducător științific:**

**Prof.dr.ing. Francisc PETER**

**2014**

# CUPRINS

	<b>Introducere</b>	
	<b>Abrevieri</b>	
<b>1.</b>	<b>STUDIUL DE LITERATURĂ</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Importanța temei și principalele obiective ale tezei</b>	<b>1</b>
<b>1.2.</b>	<b>Lignina și fracțiunile de lignină</b>	<b>3</b>
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	14
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)	15
1.2.3.6.	Explozia cu aburi	15
1.2.4.	Depolimerizarea ligninei	15
1.2.4.1.	Ruperea legăturilor lignină-carbohidrați	15
1.2.4.2.	Depolimerizarea biologică a ligninei	16
1.2.4.3.	Depolimerizarea chimică a ligninei	16
1.2.5.	Aplicații potențiale ale ligninei	17
<b>1.3.</b>	<b>Enzime care degradează lignina.</b>	<b>19</b>
1.3.1.	Peroxidazele	22
1.3.1.1.	Lignin peroxidaza (LiP)	22
1.3.1.2.	Mangan peroxidaza (MnP)	23
1.3.2.	Lacaza	23
1.3.2.1.	Modul de acțiune al lacazei	24
1.3.2.2.	Sistemul mediator al lacazei	27
1.3.2.3.	Aplicații ale lacazelor	27
<b>1.4.</b>	<b>Reacțiile de oxidare a compușilor model din lignină și a ligninei în prezența lacazei</b>	<b>29</b>
1.4.1.	Compuși model ai ligninei de tipul monomerului siringil	30
1.4.2.	Compuși model ai ligninei de tipul monomerului guaiacil	32
1.4.3.	Compuși model din lignină de tipul dimerilor siringil	33
1.4.4.	Compuși model condensați care se găsesc în lignina izolată prin procedeul Kraft	34
1.4.5.	Oxidarea ligninei cu lacază	35
1.4.6.	Reacții catalizate de lacază în solvenți organici	36
<b>1.5.</b>	<b>Compuși cu utilizare potențială pentru funcționalizarea ligninei</b>	<b>37</b>
1.5.1.	Glucosamina	37
1.5.2.	Peptidele	38
1.5.3.	Chitosanul	41
1.5.4.	Esterii aromatici ai alcoolilor derivați din zaharuri.	43
<b>2.</b>	<b>CONTRIBUȚII ORIGINALE</b>	<b>45</b>

	Introducere	45
<b>2.1.</b>	<b>Caracterizarea ligninelor utilizate</b>	<b>46</b>
2.1.1.	Analiza FT-IR a ligninelor	47
2.1.2.	Analiza grupărilor funcționale din lignină cu ajutorul spectroscopiei <sup>31</sup> P-RMN	49
2.1.3.	Distribuția masei moleculare în probele de lignină	51
2.1.4.	Concluzii parțiale	52
<b>2.2.</b>	<b>Studiul solubilității ligninelor în solvenți de diferite polarități</b>	<b>53</b>
2.2.1.	Calculul parametrilor de solubilitate pentru lignină și solvenți	53
2.2.2.	Solubilitatea ligninelor	55
2.2.3.	Distribuția masei moleculare și conținutul de grupări funcționale a fracțiunilor de lignină	57
2.2.4.	Analiza FT-IR și disimilaritatea fracțiunilor de lignină	61
2.2.5.	Predicția cantitativă a conținutului de grupări funcționale din lignină	65
2.2.6.	Concluzii parțiale	67
<b>2.3.</b>	<b>Alegerea biocatalizatorului</b>	<b>67</b>
2.3.1.	Influența concentrației de solvent organic asupra eficienței catalitice a enzimelor lignolitice	68
2.3.2.	Caracterizarea lacazei prin electroforeza pe gel de poliacrilamidă	69
2.3.3.	Studiul cinetic al reacției de oxidare enzimatică folosind siringaldazina ca și substrat	70
2.3.4.	Concluzii parțiale	71
<b>2.4.</b>	<b>Studiul reacțiilor de polimerizare a ligninelor catalizate de lacază în amestec de acetonă-apă</b>	<b>72</b>
2.4.1.	Distribuția maselor moleculare a ligninelor modificate cu lacază	72
2.4.2.	Modificările structurale fracțiunilor de lignină pe baza analizei spectrale FT-IR	73
2.4.3.	Compoziția grupărilor funcționale în ligninele modificate cu lacază	75
2.4.4.	Reactivitatea ligninelor în reacțiile de oxidare catalizate de lacază	77
2.4.5.	Concluzii parțiale	78
<b>2.5.</b>	<b>Modificarea enzimatică a ligninelor prin cuplare oxidativă cu compuși cu caracter hidrofil</b>	<b>79</b>
2.5.1.	Studiul reacțiilor de cuplare covalentă a ligninelor cu glucozamină	79
2.5.1.1.	Studiul reacțiilor de oxidare enzimatică cu ajutorul voltametriei ciclice	81
2.5.1.1.1.	Studiul electrochimic al reacției de cuplare oxidativă a siringaldazinei cu glucozamina	81
2.5.1.1.2.	Studiul electrochimic al reacției de cuplare oxidativă a ligninelor cu glucozamina	85
2.5.1.1.3.	Influența concentrației de lignină asupra reacțiilor de cuplare enzimatică a a ligninelor cu glucozamina	89
2.5.1.1.4.	Influența raportului OH fenolic total / glucozamină asupra	91

	reacțiilor de cuplare enzimatică	
2.5.1.2.	Studiul reactivității lacazei în reacțiile de cuplare enzimatică a ligninelor cu glucozamina.	93
2.5.2.	Studiul reacțiilor de cuplare covalentă a ligninelor cu tripeptida glicil-tirosil-glicina (GYG)	94
2.5.3.	Studiul reacțiilor de cuplare covalentă a ligninei provenită din lemn de esență tare cu chitosanul	96
2.5.4.	Studiul reacțiilor de cuplare covalentă a ligninei OHL cu mono- și di-esterii acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul.	99
2.5.5.	Concluzii parțiale	104
<b>3.</b>	<b>PARTEA EXPERIMENTALĂ</b>	<b>105</b>
<b>3.1.</b>	<b>Materiale</b>	<b>105</b>
<b>3.2.</b>	<b>Rețete de lucru</b>	<b>106</b>
3.2.1.	Fracționarea ligninelor în amestecuri de acetonă-apă și acetat de etil	106
3.2.2.	Determinarea activității enzimelor	106
3.2.2.1.	Determinarea activității lacazei în amestec de acetonă-apă	106
3.2.2.2.	Determinarea activității lignin peroxidazei în prezența acetonei	107
3.2.2.3.	Determinarea activității peroxidazei din hrean în prezența acetonei	107
3.2.3.	Reacțiile de polimerizare ale ligninelor cu lacaza	108
3.2.4.	Reacțiile de cuplare covalentă a ligninei cu glucozamina.	108
3.2.5.	Reacția de cuplare covalentă a ligninei cu tripeptida glicil-tirosil-glicina.	108
3.2.6.	Reacția de cuplare covalentă a ligninei cu chitosan	109
3.2.7.	Reacțiile de obținerea mono- și di-esterului acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul.	109
3.2.7.1.	Reacția de cuplare covalentă a ligninei cu monoesterul acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul	110
3.2.7.2.	Reacția de cuplare covalentă a ligninei cu diesterul acidului 3-(4-hidroxifenil)-propionic cu sorbitolul	110
<b>3.3.</b>	<b>Metode de analiză</b>	<b>110</b>
3.3.1.	Spectroscopia FT-IR	110
3.3.2.	Cromatografia de permeație prin gel (GPC)	111
3.3.3.	Analiza RMN ( Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară)	112
3.3.4.	Electroforeza proteinelor pe gel de poliacrilamidă	113
3.3.5.	Calcululele de prelucrare statistică a datelor	114
3.3.6.	Măsurarea consumului de oxigen dizolvat.	116
3.3.7.	Studii de voltametrie ciclică.	116
<b>4.</b>	<b>CONCLUZII FINALE</b>	<b>118</b>
	<b>BIBLIOGRAFIE</b>	<b>123</b>
	<b>ANEXE</b>	<b>131</b>
	<b>LISTA DE LUCRĂRI</b>	<b>140</b>

## Problema abordată

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. 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. Datorită gradului de conștientizare cu privire la valorificarea acestor produși au devenit atractive aplicațiile care utilizează microorganisme 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.

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.

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.

## Obiectivele tezei și structura

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 (<sup>31</sup>P-RMN) 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.
- 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 esterii 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 esterii ai sorbitolului.
- **3. Partea experimentală** - prezintă procedurile experimentale folosite la fracționarea ligninelor în medii de solvent organic, în reacțiile de polimerizare oxidativă a ligninelor, în reacțiile cu cuplare covalentă a ligninelor cu compuși hidrofilici precum și metodele de analiză folosite.
- **4. Concluzii finale** - rezultate din studiile experimentale în conformitate cu obiectivele stabilite.

## 1. Date de literatură

Lignina constituie unul din cei trei compuși majoritari din biomasa lignocelulozică alături de celuloză și hemiceluloză fiind un polimer amorf tridimensional care constă 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  $50 \times 10^6$  tone pe an s-au găsit puține utilizări comerciale ale acesteia devenind o adevărată 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 patogeniza plantelor. Pe de altă parte, au devenit atractive potențialele aplicații utilizând organisme care degradează lignina precum și enzimele acestora, 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. 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 că 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 utilitatea principală a ligninei, aceea de sursă de energie și în tăbăcăriile pielii, aceasta mai prezintă aplicații în armarea polimerilor, ca și pesticide, dispersanți, emulgatori sau antioxidanți. Ligninele mai pot fi utilizate ca și stabilizatori în diferite mâncăruri datorită proprietăților lor antioxidante și antifungice.

În ultimii ani, un interes foarte mare a reprezentat studierea enzimelor care au capacitatea de a degrada lignina, o serie de saprofite, în special din clasa funghiilor, 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 enzimatică, unele dintre cele mai des aplicate enzime facând parte din familia lacazelor. Lacazele sunt enzime din clasa oxidoreductazelor care pot să oxideze o serie de compuși fenolici inclusiv cei care se găsesc în compoziția ligninei.

Aceste enzime au o capacitate mare de a modifica proprietățile fizico-chimice ale ligninei, de exemplu modificarea solubilității și a hidrofobicității 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. Una dintre problemele care au fost 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, precum și asupra aplicațiilor industriale. Fraționarea ligninelor prin extracție cu solvent a dus la obținerea unor fracțiuni de lignine mai omogene cu distribuție definită a masei moleculare și grupări chimice funcționale care pot fi mai

departe modificate prin tratamente chimice sau enzimatiche în vederea obținerii de derivați noi de lignină cu funcționalități noi.

## 2. Contribuții originale

Teza de doctorat este consacrată modificării mai multor tipuri de lignine prin reacții de cuplare covalentă cu grupări funcționale adecvate, în mediu de solvent organic, utilizând lacaza ca și biocatalizator. Rezultatele sunt prezentate și discutate în cele 5 subcapitole cuprinse în partea de contribuții originale.

### 2.1. Caracterizarea ligninelor utilizate

În cadrul cercetărilor experimentale s-a lucrat cu cinci tipuri de lignine care provin din surse diferite și anume: lignina de tip Indulin AT extrasă din lemn de esență moale prin procedeul de tip Kraft și pentru care s-a folosit în text codul de prescurtare KSL, 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, 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, lignina extrasă din paie de grâu (SWL) prin procedeul de tip „soda”, lignina din paie de grâu (AWL) extrasă prin procedeul de tip „soda” și care a fost supusă ulterior unui pretratament alcalin. 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. Este necesar să se caracterizeze structura complexă a ligninelor deoarece furnizează informații de bază 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 700-100000. 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. 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 impunerea mai multor tipuri de vibrații ale diferitelor grupări funcționale. Astfel atribuirea mai multor benzi este posibilă numai în aproximarea contribuției predominante a anumitor grupări atomice. Metoda  $^{31}\text{P}$ -RMN a fost mai întâi aplicată pentru caracterizarea ligninelor și care prevede fosforilarea grupelor hidroxil prezente în substrat utilizând un agent de fosforilare urmată de analiza cantitativă  $^{31}\text{P}$ -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). Una dintre proprietățile structurale importante ale ligninei este masa moleculară a acesteia, distribuția masei moleculare guvernând parțial reactivitatea și proprietățile sale fizico-chimice. Distribuția maselor moleculare a ligninelor a fost obținută cu ajutorul analizei GPC și este dată în principal de către compușii fenolici derivați din lignină, deoarece acești compuși au o sensibilitate foarte mare în detectorul UV. Ligninele studiate prezintă mase moleculare cuprinse în domeniul  $4200 \div 6700$  g/mol, lignina de tip AWL având masele moleculare medii  $M_w$  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 ( $\alpha$ -O-4,  $\beta$ -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.

## 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. 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. Frațiunile solubile și insolubile izolate au fost caracterizate în privința compoziției lor chimice, cu ajutorul FT-IR,  $^{31}\text{P}$ -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. Efectul concentrației de acetonă și a acetatului de etil asupra solubilității ligninelor a fost mai întâi investigat pentru a observa diferențele de solubilitate dintre cele cinci tipuri de lignine studiate observându-se că solubilitatea ligninelor este dependentă de concentrația de acetonă crescând puternic odată cu creșterea concentrației acesteia în amestec. S-a investigat de asemenea influența solventului organic asupra proprietăților fizico-chimice ale ligninelor pentru a înțelege mai bine heterogenitatea acestora. Frațiunile 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  $^{31}\text{P}$ -RMN. 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. 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. 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:  $830 \pm 7 \text{ cm}^{-1}$  ( $\gamma$ -CH din inelul aromatic, guaiacil-siringil),  $1030 \pm 3 \text{ cm}^{-1}$  ( $\delta$ C-H din inelul aromatic guaiacil și  $\delta$ C-OH alcool primar),  $1115 \pm 6 \text{ cm}^{-1}$  ( $\delta$ C-O din inelul aromatic siringil; deformațiile C-H în plan corespunzătoare unităților siringil),  $1265 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$  (vs din inelul aromatic din guaiacil, vasC-O-C),  $1330 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$  (legăturile vs siringil),  $1510 \pm 8 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$ C=C din inelul aromatic, siringil-guaiacil),  $1710 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$ C=O din grupări carbonil ne-conjugate și grupări carboxil),  $2850 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$  (vsCH<sub>2</sub>, guaiacil-siringil),  $2920 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$  (vasCH<sub>2</sub>, guaiacil-siringil). Pentru a minimiza posibilele erori care pot apărea datorită pregătirii probelor, spectrele au fost normalizate cu intensitatea picului de la  $1510 \text{ cm}^{-1}$ . 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 fiind dezvoltat un model cu două componente principale (PC) care

explică 91% din varianța totală. 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. Analiza  $^{31}\text{P}$ -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 benzilor FT-IR. Rezultatele găsite 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. Pe baza rezultatelor prezentate în acest capitol se poate 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.

### 2.3. Alegerea biocatalizatorului

Datorită caracterului heterogen a ligninei și a solubilității scăzute a acesteia în medii înalt 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. În conexiune cu capitolul precedent (2.2) s-a studiat efectul concentrației de acetonă asupra activității enzimelor. Studiile anterioare au demonstrat ca 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. 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 poli(acrilamidă), 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 cadrul acestui capitol 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). În capitolul precedent (2.3) a fost 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. Frațiunile solubile în acest amestec au fost utilizate pentru a determina influența lacazei asupra ligninei din diferite surse în reacția de polimerizare enzimatică. 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 <sup>31</sup>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, esterii 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.

Monitorizarea reacțiilor mediate de lacază a fost efectuată prin înregistrarea proceselor redox suferite de lignine cu ajutorul studiilor de Voltametrie Ciclică. 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. 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. Reactivitatea lacazei *Trametes versicolor* în amestec de acetonă-apă 50/50 (v/v), în

reacțiile de cuplare enzimatică a ligninelor studiate cu glucosamina a fost investigată prin măsurarea consumului de oxigen dizolvat, lignina din lemn de esență tare (OHL) înregistrând cel mai mare consum de oxigen, fiind astfel cel mai reactivă. 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 glucosamină, observându-se creșteri semnificative ale maselor și ale rapoartelor OH alifatic/OH aromatic determinate cu ajutorul analizei  $^{31}\text{P}$ -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 glucosamina. Prin studiile de voltametrie ciclică și de măsurare a oxigenului consumat s-a realizat optimizarea parametrilor care influențează reacțiile de cuplare ale ligninelor cu glucosamina: concentrația de lignină, raportul molar OH aromatic total/glucozamină observându-se o ușoară inhibiție a lacazei la concentrații mari de glucosamină 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  $^{31}\text{P}$ -RMN nu au fost observate modificări structurale.

### 3. Partea experimentală

În acest capitol sunt prezentate metodele de analiză și protocoalele de lucru utilizate în realizarea experimentelor. Această parte conține și ea o serie de contribuții originale în sensul îmbunătățirii metodologiei de cercetare în acest domeniu, iar pe de altă parte oferă o imagine despre complexitatea și volumul foarte mare al activităților experimentale care au fost necesare. O parte dintre metodele de analiză folosite au fost îmbunătățite sau modificate, iar o serie de protocoale experimentale au fost utilizate pentru prima oară în această teză.

### 4. Concluzii finale

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 relaționate 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  $^{31}\text{P}$ -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 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 permite clasificarea ligninelor native și a fracțiunilor lor solubile pe baza unui număr redus de absorbții ale benzilor relevante din spectru 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 alifatică, 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.

#### *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 pentru lignin peroxidază și peroxidaza din hrean prezența solventului organic a avut efect inactivant asupra activității.

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

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

#### *Studiul reacțiilor de polimerizare a ligninelor catalizate de lacază în amestec 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 <sup>31</sup>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 fiind mai eficientă în polimerizarea ligninelor din paie de grâu decât a ligninei extrasă din lemn de esență tare. Reacțiile de polimerizare au fost eficiente 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 lacaza, 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 utilizând reacții mediate de lacază.

#### *Modificarea enzimatică a ligninelor prin cuplare oxidativă cu compuși cu caracter hidrofîl*

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 masei și ale rapoartelor OH alifatic/OH aromatic determinate cu ajutorul analizei <sup>31</sup>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 masei 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 <sup>31</sup>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.

#### **Bibliografie selectivă**

- [1]. 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
- [2]. Crestini C., Crucianelli M., Orlandi M., Saladino R., *Catal. Today*, **2010**, 156, 8–22
- [3]. Gouveia S., Fernandez-Costas C., Moldes D., Sanromán M.A., *Bioresour. Technol.*, **2012**, 121, 131–138.
- [4]. Ungurean M., **Fitigau F.**, Paul C., Ursoiu A., Peter F., *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **2011**, 52, 387-391
- [5]. Croitoru R., **Fitigău F.**, van den Broek L.A.M, Frissen A.E., Davidescu C.M., Boeriu C.G., Peter F., *Process Biochemistry*, **2012**, 47, 1894–1902.
- [6]. Boeriu C.G., Bravo D., Gosselink R.J.A., Van Dam J.E.G., *Industrial Crops and Products*, **2004**, 20, 205–218.
- [7]. 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.
- [8]. Lahtinen M., Heinonen P., Oivanen M., Karhunen P., Kruus K., Sipilä J., *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11, 5454–5464.
- [9]. **Fitigău I.F.**, Peter F., Boeriu C.G., *World Academy of Science Engineering and Technology*, **2013**, 4 (76), 227-232

- [10]. Boeriu C.G., **Fitigău F.I.**, Frissen A.E., Stoutjesdijk J., Peter F., Gosselink R.J.A., *Ind. Crops Products*, **2014**, în curs de evaluare
- [11]. **Fitigău I.F.**, Peter F., Boeriu C.G., “Structural Analysis of Lignins from Different Sources”, *International Conference on Chemical Engineering and Technology*, Veneția, Italia, **2013**, p. 227.
- [12]. **Fitigău I.F.**, 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**, p. 29.
- [13]. **Fitigău 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**, p. 28
- [14]. **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
- [15]. **Fitigău F. I.**, Peter F., Boeriu C. G., *Acta Biochimica Polonica*, **2013**, 60, 817-822
- [16]. Duan B., Chang C., Zhang L., *Inc. J. Appl. Polym. Sci.*, **2014**, 131 (4), 39538 (1-7).
- [17]. 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
- [18]. Pu Y., Cao S., Ragauskas A. J., *Energy Environ. Sci.*, **2011**, 4, 3154–3166
- [19]. Areskog D., Li J., Gellerstedt G., G. Henriksson, *Ind. Crops Prod.*, **2010**, 32, 458-466.
- [20]. 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.

## 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. C.G. Boeriu, **I. F. Fitigău**, A.E. Frissen, J. Stoutjesdijk, F. Peter, R.J.A. Gosselink, “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”, *5<sup>th</sup> 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.