



Universidad del Mar

Campus Puerto Ángel

**Polimerización de lignina extraída de un consorcio de
Sargassum spp. mediante una enzima lacasa producida
por la microalga *Tetraselmis gracilis***

Tesis

Que para obtener el Título Profesional de

Ingeniero Ambiental

Presenta

Marlo Sayeg Herrera Bulnes

Director

Dr. Edson Edinho Robles Gómez

Puerto Ángel, Oaxaca, a enero de 2020.

Resumen

En la última década, las costas mexicanas han recibido una enorme afluencia de especies de macroalgas, produciendo serias preocupaciones ambientales y de salud pública. En este trabajo se desarrolló una metodología verde para generar un nuevo polímero a partir de la lignina contenida en macroalgas marinas (*Sargassum* spp.). Esta metodología consiste en la extracción de lignina mediante ebullición y posterior polimerización empleando una enzima tipo lacasa obtenida a partir del alga verde *Tetraselmis gracilis* (Tg-lacasa). La identificación del monómero de lignina por espectrometría de masas reveló la presencia de guayacilo (G), p-hidroxifenilo (H) y alcohol sinápico como los monolignoles principales. El proceso de polimerización de monómeros de lignina se registró a través de ¹H-RMN, FTIR, SEC-FPLC y UV-Vis. Estas técnicas registraron los siguientes cambios a medida que la polimerización transcurría: 1) Disminución en el número de grupos fenólicos, 2) Pérdida de protones aromáticos, 3) Cambios de la longitud de onda, 4) Un aumento en el tamaño de la cadena de lignina, y 5) Un mayor estiramiento del grupo carbonilo. El análisis de estos datos proporciona evidencia concluyente de que la lacasa Tg puede realizar una polimerización oxidativa de la lignina contenida en las macroalgas. Esta metodología podría ser prometedora en el desarrollo de un nuevo polímero a base de lignina y abre una nueva dirección para el manejo ambiental de las macroalgas en las playas mexicanas.

Palabras claves: *Lacasa*, *lignina*, *Sargassum* spp., *Tetraselmis gracilis*, *método verde*.

Abstract

In the past decade, Mexican coasts have received an enormous influx of macroalgae species, producing serious environmental and public health concerns. In this work a green methodology was developed to generate a new polymer from the lignin contained in the macroalgae (*Sargassum* spp.). The methodology consists in lignin extraction-by-boiling and its subsequent polymerization with a laccase-like enzyme from the green algae *Tetraselmis gracilis* (Tg-laccase). The lignin-monomer identification by mass spectrometry revealed the presence of guaiacyl (G), p-hydroxyphenyl (H), and sinapyl alcohol as the main monolignols. The characterization of the lignin-based polymer was obtained using ¹H-NMR, FTIR, SEC-FPLC, and UV-Vis and showed: 1) A decrease in the number of phenolic groups, 2) The loss of aromatic protons, 3) Wavelength changes during polymerization, 4) An increase in the size of the lignin chain, and 5) A greater carbonyl group stretching. The analysis of these results provides conclusive evidence that the Tg-laccase can perform oxidative polymerization of the lignin contained in the macroalgae. This methodology could be promising in the development of a new lignin-based polymer and would open a new direction for the environmental management of the macroalgae on the Mexican beaches.

Keywords: *Laccase, lignin, Sargassum* spp., *Tetraselmis gracilis*, *green method*.

Dedicatoria

En primer lugar, y como soy hombre de fe quiero agradecerle a Dios por todas las bendiciones que me ha dado y permitirme cumplir esta meta personal.

A mis padres, Celso e Idolina, a mis hermanos, Jonas y Massiel, por todo su cariño, y, principalmente por darme esa gran lección de vida, de que no importa que tan dolorosa puede ser una enfermedad, o que tan hiriente pueden llegar a ser las personas, siempre tenemos que ver el lado bueno de esta vida, para así lograr ser plenamente felices. A mis sobrinos, Amarelis y Zeus, quienes me iluminan en momentos de tristeza y/o estrés, cuando no todo iba bien en la escuela. Todos ellos siempre me apoyaron, este logro es de ustedes también.

A la señorita Natividad, gracias por tu paciencia, por tu comprensión, por creer en mí, por apoyarme y motivarme a seguir adelante, y sobre todo gracias por su amor.

A mi tío Marcos y a su esposa Lisa, por haberme ayudado y apoyado durante la carrera, sin su ayuda no hubiera podido cumplir esta meta.

A mis abuelos, Aurelio y Alicia, porque gran parte de lo que soy se lo debo a ellos, gracias por sus consejos, por sus regaños, por sus enseñanzas y gracias por su amor. A mis tíos, tías, primos y primas, que siempre me brindaron su ayuda, y, que, sin el apoyo de ellos, esto no hubiera sido posible.

A mis amigos, Nataly Mentado, Michelle Ruiz, Laura Y. Vásquez, Luis y Fernando Sánchez, por su amistad incondicional y por motivarme a seguir adelante. Gracias también por todos los momentos que compartimos, por todas las alegrías y por su cariño. A mis compañeros del “Hormiguero”, gracias por su amistad y por brindarme su ayuda en los momentos en que la necesité.

Y, por último, a la Dra. María del Rosario Enríquez, gracias por su tiempo y por tener siempre una puerta abierta cuando necesité un consejo o una asesoría de alguna materia, y también, por su infinita paciencia.

Agradecimientos

A la Universidad del Mar (UMAR) y Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por brindarme las condiciones necesarias para llevar a cabo parte de este proyecto. Particularmente al laboratorio de Orgánica de Ingeniería Ambiental y al laboratorio de Bio-Macromoléculas del Instituto de Química de la UNAM.

Al Dr. Edson Edinho Robles Gómez, por haberme aceptado como su tesista, y brindarme sus ideas y consejos que fueron fundamentales para la realización de este trabajo.

A la M. en C. Alejandra Torres Ariño de la UMAR quien propuso y cultivó la *Tetraselmis gracilis* fundamental en este trabajo, y también por ser una de mis sinodales.

A la M. en C. María del Rocío, al M. en C. Cervando y al M. en C. Cristóbal, gracias por sus observaciones y correcciones, y por formar parte de mis sinodales.

A la Dra. Erika Antunez y Dr. Manuel Soriano de la UNAM, quienes participaron activamente en el desarrollo, ejecución y análisis de datos que desarrollo en este trabajo de tesis, tales como FTIR, RMN y DRFC.

A la Q.F.B. Coral Mirón quien siempre colaboró con toda la paciencia necesaria que un estudiante que inicia un proyecto de investigación requiere.

A las estudiantes Laura e Ixchel, la primera quien me acompañó en las clases donde este proyecto inició y la segunda en la recolección de sargazo.

Tabla de contenido

1. Introducción	1
2. Marco Teórico	2
2.1. Enzimas.....	2
2.1.1. ¿Qué es una enzima?.....	2
2.1.2. Clasificación	3
2.1.3. ¿Cómo funcionan las enzimas?.....	4
2.2. Enzimas lacasas	4
2.2.1. Estructura de las lacasas.....	5
2.2.2. Mecanismo de reacción de las lacasas	6
2.2.3. Sistema lacasa-mediador.....	8
2.3. Lignina	8
2.4. <i>Tetraselmis gracilis</i> (Kylin) Butcher 1959	10
2.5. <i>Sargassum</i> spp.	10
3. Antecedentes.....	11
4. Justificación.....	13
5. Hipótesis.....	14
6. Objetivos.....	15
6.1. Objetivo General.....	15
6.2. Objetivos Específicos.....	15
6.3. Objetivos Metodológicos	15
7. Metodología	16
7.1. Recolección del <i>Sargassum</i> spp.....	17
7.2. Obtención de la lignina	18
7.3. DFRC (por sus siglas en inglés, Derivatization followed by reductive cleavage).....	18
7.4. Cromatografía líquida de alta eficacia-Espectrometría de Masas (HPLC-MS, por sus siglas en inglés).....	19
7.5. Cromatografía de Gases-Espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés)	20
7.6. Lignina soluble.....	20

7.7.	Cultivo de <i>T. gracilis</i>	21
7.8.	Purificación de enzimas tipo lacasa presentes en la <i>T. gracilis</i>	21
7.9.	Ensayo de actividad de lacasa	22
7.10.	Polimerización enzimática de la lignina	22
7.11.	Determinación del tamaño molecular mediante Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC, por sus siglas en inglés)	22
7.12.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés).....	23
8.	Resultados.....	23
8.1.	Caracterización de la biomasa del consorcio de <i>Sargassum</i> spp.	23
8.2.	Purificación de la enzima tipo lacasa de <i>T. gracilis</i>	26
8.3.	Caracterización física de la polimerización enzimática asistida	28
8.4.	Polimerización enzimática asistida de la lignina de macroalgas.....	30
9.	Discusión	32
10.	Conclusiones	34
11.	Recomendaciones	34
12.	Referencias.....	35

Índice de figuras

Figura 1. Modelo de encaje inducido.....	4
Figura 2. Representación del sitio activo de la enzima lacasa, donde se muestra el flujo de electrones, oxígeno y sustrato.....	6
Figura 3. Representación del mecanismo molecular de reducción del oxígeno a agua catalizado por lacasas.....	7
Figura 4. Representación esquemática de la actividad catalítica de un sistema lacasa-mediado.....	8
Figura 5. Modelo estructural de la lignina.....	9
Figura 6. Principales monómeros presentes en la lignina.....	9
Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología.....	16
Figura 8. Representación geoespacial de los puntos de muestreo.....	17
Figura 9. Análisis de DFCR.....	24
Figura 10. Cromatograma GC-MS que muestra la presencia de unidades H y G.....	25
Figura 11. Patrón de fragmentación espectral de masas del ensayo ESI-MS para las unidades H.....	25
Figura 12. Patrón de fragmentación espectral de masas del ensayo ESI-MS para las unidades G.....	26
Figura 13. Cromatograma de intercambio iónico.....	27
Figura 14. Estabilidad dependiente del tiempo de la Tg-lacasa de <i>T. gracilis</i>	28
Figura 15. Cromatograma de exclusión molecular.....	29
Figura 16. Cambio de color de la lignina.....	29
Figura 17. Espectros de ¹ H-RMN.....	31
Figura 18. Espectro FTIR.....	31
Figura 19. Mecanismo de polimerización hipotético.....	30

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación internacional de las enzima.....	3
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>T. gracilis</i>	10
Tabla 3. Coordenadas de los puntos de donde se recolectó el <i>Sargassum</i> spp.....	17
Tabla 4. Compuestos presentes en la muestra recolectada en San Agustínillo.....	24
Tabla 5. Pasos para la purificación de la lacasa de <i>T. gracilis</i>	27