



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Evaluación del rendimiento de producción de celulosa bacteriana usando microalgas como fuente sustentable de oxígeno”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Diego Esteban Sandoval Vargas

Director del Seminario de Título: Dr. Franck Quero
Co-director del Seminario de Título: Dra. Daniela Fuentes
Patrocinante del Seminario de Título: Dra. Claudia Stange

Mayo 2017
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Diego Esteban Sandoval Vargas**

“Evaluación del rendimiento de producción de celulosa bacteriana usando microalgas como fuente sustentable de oxígeno”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

-Dr. Franck Quero

Director Seminario de Título:

-Dra. Daniela Fuentes Flores

Co-Director Seminario de Título:

-Dra. Claudia Stange Klein

Prof. Patrocinante del Seminario:

Comisión Revisora y Evaluadora

-Dr. Michael Handford

Presidente Comisión:

-Dra. Jennifer Alcaino Gorman

Evaluador:

Santiago de Chile, Mayo 2017



Mi nombre es Diego Sandoval Vargas y tengo 27 años. Vivo en Santiago con mi familia que está compuesta por mis padres y mi perro llamado Sawyer. Ellos han sido un pilar fundamental en mi vida, junto a mis tías y primos.

Siempre me interesó la ciencia, pero no me di cuenta hasta que estuve un año en Bachillerato UChile que fue donde tomé la decisión de seguir una carrera científica. Entré primero a Biología, donde cursé dos años y luego me transferí a Ingeniería en Biotecnología Molecular, un camino largo que termino ahora.

Me siento feliz de poder terminar el camino universitario, ya que por el esfuerzo de mis padres soy el primer profesional de mi familia, cumpliendo así el sueño de ellos y el propio, ya que siempre quise estudiar en esta casa universitaria.

A mi familia,

Núcleo central de mi vida

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a muchas personas que me han apoyado durante todo este camino.

Primero quiero agradecer a mi mamá Gloria que es la persona más importante de mi vida. Sin ella, literalmente soy nada. Gracias por estar siempre conmigo y espero que sean muchos años más los que te tenga a mi lado. Gracias también, por ser mi amiga y una de las personas que me hacen sonreír a pesar de ser el día más cansador o agotador que haya tenido. Te amo mamá.

En segundo lugar, quiero agradecer a mi hermana Conny. Ella ha sido fundamental siempre, desde que éramos pequeños hasta ahora, ya que su compañía y consejos son siempre certeros. Eres mi bastón en esta vida junto a mi madre. Te amo hermanita mía.

En tercer lugar, quiero agradecer a mi familia, partiendo por mi padre que, a pesar de no ser muy comunicativo, sé que cuento con tu apoyo siempre. A mi segunda madre Patty, que es la tía más cariñosa, la que siempre está dispuesta a ayudar en todo, decirle que gracias por todo y que la quiero mucho. Al resto de mis tías, tíos y primos, que siempre han estado pendiente de todo lo que me sucede, les quiero dar las gracias y que siempre cuenten conmigo.

Quiero agradecer a mis tutores Franck y Daniela, que han sido fundamentales en este proceso. Ambos siempre con muy buena disposición para ayudar y aconsejar en lo que necesitaba. Espero seguir en contacto con uds por mucho tiempo más.

También quiero darles las gracias a mis profesores de la Facultad como la Dra Stange, el Dr Handford y la Dra Alcaino, los cuales me ayudaron a que finalizara este proceso con éxito.

Además, quiero agradecer a mis amigos que quiero mucho: Amanda por ser mi partner durante la U, a mis amigos ambientales: Joachim, Vane, Joce, Noé, por hacerme reír siempre, a Lucas que es mi partner en los videojuegos y en el día a día, a Daniel que siempre es un gran apoyo. Además, gracias a esta tesis conocí a personas increíbles: Darlyn, Marjorie, Nathy, Esteban, Eduardo y Caro que fueron un apoyo fundamental en el día a día del laboratorio. Con ellos siempre lo pasé muy bien yendo a trabajar, ya que teníamos tiempo para trabajar a full, pero también para reírnos, apoyarnos, opinar y orientar nuestras investigaciones.

Finalmente darles las gracias al Programa de Estímulo a la Excelencia Institucional (PEEI) de la Universidad de Chile que entregó el financiamiento, haciendo posible este trabajo.

Muchas gracias a todos

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de contenidos	vi
Índice de tablas	ix
Índice de figuras	x
Lista de abreviatura	xii
Resumen	xiv
Abstract	xvi
I. Introducción	1
1.1 Celulosa	1
1.2 Celulosa bacteriana	3
1.3 Bacteria: <i>Gluconacetobacter xylinus</i>	6
1.4 Microalgas: <i>Chlorella vulgaris</i>	11
II. Hipótesis	13
III. Objetivos	13
3.1 Objetivo general	13
3.2 Objetivos específicos	13
IV. Materiales y Métodos	14
4.1 Caracterizar el crecimiento bacteriano de <i>Gluconacetobacter xylinus</i> y de la formación de celulosa bacteriana (material de referencia).	14
4.2 Caracterizar el crecimiento de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en distintas condiciones de cultivo para optimizar la producción de celulosa bacteriana.	18
4.3 Optimizar la producción de celulosa bacteriana en cultivos estáticos mediante oxigenación llevada a cabo en co-cultivos bacteria-microalga	22

4.4 Optimizar la producción de celulosa bacteriana en cultivos separados, entregando oxigenación controlada desde el cultivo de microalgas hacia el cultivo bacteriano.	24
4.5 Análisis y Procesamiento de Datos.	27
4.6 Resumen de procedimientos realizados.	27
V. Resultados	30
5.1 Caracterizar el crecimiento bacteriano de <i>Gluconacetobacter xylinus</i> y de la formación de celulosa bacteriana (material de referencia).	30
5.2 Caracterizar el crecimiento de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en distintas condiciones de cultivo para optimizar la producción de celulosa bacteriana.	36
5.3 Optimizar la producción de celulosa bacteriana en cultivos estáticos mediante oxigenación llevada a cabo en co-cultivos bacteria-microalga.	52
5.4 Optimizar la producción de celulosa bacteriana en cultivos separados, entregando oxigenación controlada desde el cultivo de microalgas hacia el cultivo bacteriano.	57
VI. Discusión	67
6.1 Caracterizar el crecimiento bacteriano de <i>Gluconacetobacter xylinus</i> y de la formación de celulosa bacteriana (material de referencia).	67
6.2 Caracterizar el crecimiento de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en distintas condiciones de cultivo para optimizar la producción de celulosa bacteriana.	70
6.3. Desarrollo de estrategias de tiempos de adición y conexión de cultivos de microalgas en co-cultivos y cultivo separados.	73
6.4 Optimizar la producción de celulosa bacteriana en cultivos estáticos mediante oxigenación llevada a cabo en co-cultivos bacteria-microalga.	75
6.5 Optimizar la producción de celulosa bacteriana en cultivos separados, entregando oxigenación controlada desde el cultivo de microalgas hacia el cultivo bacteriano.	78

VII. Conclusión	83
VIII. Proyecciones	84
IX. Bibliografía	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Relación entre la densidad óptica medida y el número de células de microalgas adheridas en co-cultivos expuestos a una luz constante.	23
Tabla II. Número de células utilizado en las conexiones a las 30 horas de cultivo bacteriano	26
Tabla III. Número de células de <i>C. vulgaris</i> utilizadas en co-cultivos y resultado en la producción de celulosa bacteriana.	54
Tabla IV. Número de células de <i>C. vulgaris</i> utilizadas en cultivos separados y resultados en la producción de celulosa bacteriana.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de la celulosa.	2
Figura 2. Esquema de las reacciones metabólicas de <i>Gluconacetobacter xylinus</i> hasta la formación de celulosa.	7
Figura 3. Esquema representativo de la extrusión de la celulosa bacteriana producida por <i>Gluconacetobacter xylinus</i> .	8
Figura 4. Esquema del dispositivo experimental de co-cultivos evaluados.	22
Figura 5. Esquema del dispositivo experimental de cultivos separados evaluado.	25
Figura 6. Diagrama de la metodología estudiada para caracterizar el crecimiento de <i>G. xylinus</i> y <i>C. vulgaris</i> .	28
Figura 7. Diagrama de la metodología estudiada para las metodologías de co-cultivo y cultivos separados.	29
Figura 8. Gráficos representativos de las curvas de crecimiento de <i>G. xylinus</i> en función del tiempo en medio HS.	31
Figura 9. Producción típica de celulosa bacteriana por <i>Gluconacetobacter xylinus</i> durante 12 días de cultivo en sistema estático en medio HS.	33
Figura 10. Cultivo de <i>G. xylinus</i> a los 12 días de cultivo estático en medio HS.	34
Figura 11. Celulosas obtenidas a los 12 días de cultivo estático de <i>G. xylinus</i> en medio HS.	35
Figura 12. Fotografías representativas de cultivos de microalga <i>C. vulgaris</i> en medio TAP en agitación con el paso del tiempo.	37
Figura 13. Curvas de crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en medio TAP con agitación, determinadas por densidades ópticas en función del tiempo.	38
Figura 14. Fotografías representativas del crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en medio TAP y HS bajo agitación durante 7 días (168 horas).	40
Figura 15. Curva de crecimiento y rendimiento obtenido en condiciones de cultivo agitados de <i>C. vulgaris</i> para medio TAP y HS.	41
Figura 16. Fotografías representativas del crecimiento de la microalga <i>C. vulgaris</i> en medio TAP y HS estáticos por 7 días (168 horas).	43

Figura 17. Curvas de crecimiento y rendimiento de la microalga <i>C. vulgaris</i> en medio TAP y HS estáticos por 7 días (168 horas).	44
Figura 18. Fotografías representativas del crecimiento de la microalga <i>C. vulgaris</i> en medio de cultivo TAP con agitación y luz constante durante 7 días (168 horas).	47
Figura 19. Crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en medio TAP bajo agitación y luz constante.	48
Figura 20. Fotografías representativas del crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en medio HS en condiciones estáticas y luz constante durante 7 días (168 horas).	50
Figura 21. Gráficos representando el crecimiento y el rendimiento de la microalga <i>C. vulgaris</i> en medio HS en condiciones estáticas y luz constante.	51
Figura 22. Co-cultivos entre <i>C.vulgaris</i> y <i>G. xylinus</i> estáticos en medio HS estudiados bajo fotoperiodo por 12 días.	53
Figura 23. Fotografías representativas de cultivos obtenidos de co-cultivos estáticos entre <i>G. xylinus</i> y <i>C. vulgaris</i> , después de 12 días de cultivos bajo luz continua.	56
Figura 24. Rendimiento de celulosas obtenidas en cultivos estáticos bajo fotoperiodo, mediante cultivos separados entre <i>C. vulgaris</i> en medio TAP y <i>G. xylinus</i> en medio HS.	58
Figura 25. Rendimiento obtenido en celulosas obtenidas mediante cultivos separados bajo luz continua entre <i>C. vulgaris</i> en medio TAP y <i>G. xylinus</i> en medio HS.	61
Figura 26. Producción de celulosa bacteriana en controles y cultivos separados (CS) bajo luz constante entre <i>C. vulgaris</i> en medio TAP y <i>G. xylinus</i> en medio HS.	63
Figura 27. Rendimientos obtenidos de celulosas producidas por cultivos separados bajo luz continua entre <i>C. vulgaris</i> en medio TAP y <i>G. xylinus</i> en medio HS.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

UDP: Uridina difosfato glucosa

NADPH₂: Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato dihidrogenado

ATP: Adenosin trifosfato

CO₂: Dióxido de carbono

CaCO₃: Carbonato de calcio

NaOH: Hidróxido de sodio

D.O: Densidad óptica

HS: Medio de cultivo Hestrin Schramm

NaH₂PO₄: Bifosfato de sodio

CC: Co-cultivo

CS: Cultivo separado

TAP: Medio de cultivo Tris-Acetato-Fosfato

NH₄Cl: Cloruro de amonio

MgSO₄ 7H₂O: Sulfato de magnesio heptahidratado

CaCl₂ 2H₂O: Cloruro de calcio dihidratado

K₂HPO₄: Fosfato dipotásico

KH₂PO₄: Fosfato de potasio monobásico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético,

ZnSO₄ 7 H₂O: Sulfato de zinc heptahidratado

H₃BO₃: Ácido Bórico

MnCl₂: Cloruro de manganeso (II)

CoCl₂ 6 H₂O: Cloruro de cobalto (II) hexahidratado

CuSO₄ 5 H₂O: Sulfato de cobre pentahidratado

(NH₄)₆Mo₇O₂₄: Amonio Heptamolibdato

FeSO₄ 7 H₂O: Sulfato de hierro (II) heptahidratado

Tris: Trisaminometano

RESUMEN

La celulosa es un polisacárido que se encuentra presente en la naturaleza, el cual es de importancia mundial, debido a sus propiedades únicas que lo hacen fundamental en aplicaciones industriales tan diversas, como lo son en la producción del papel, en la industria biomédica, en el vestuario, cosméticos, entre otros. No sólo los organismos vegetales son capaces de producir celulosa, sino que también microorganismos como las bacterias *Acetobacter*, entre ellas la bacteria *Gluconacetobacter xylinus* (*G. xylinus*), la cual es el organismo más estudiado por el rendimiento de biopelícula producida, como también por la fuente de celulosa limpia obtenida sin necesidad de purificación. Sin embargo, este rendimiento varía según las condiciones en las que crece la bacteria, como lo son la fuente de glucosa utilizada y la oxigenación que necesita al ser un microorganismo aeróbico estricto. Se ha utilizado esta bacteria a nivel industrial de producción, no obstante, el alto costo de mantenimiento por las necesidades antes mencionadas, no ha logrado concretar el potencial que esta fuente entrega. Es por esto, que en el presente estudio se buscó una fuente natural de oxigenación, como lo es la microalga *Chlorella vulgaris* (*C.vulgaris*), la cual es de fácil manejo y económicamente rentable de mantener en laboratorio por sus amplios usos, como también su capacidad de producir oxígeno bajo luminosidad constante como fotoperiodo.

Así es como en este trabajo de investigación se caracterizó el crecimiento de *G. xylinus* y *C. vulgaris*. Luego, se realizaron *co*-cultivos (CC) y cultivos separados (CS) entre ambos microorganismos. El objetivo de esta investigación fue estudiar la capacidad de optimizar la producción de celulosa bacteriana, entregando oxigenación controlada

desde las microalgas fotosintéticamente activas (bajo fotoperiodo y luz constante) hacia el cultivo bacteriano.

Nuestros resultados indican que, mediante la metodología de CS y bajo luminosidad constante al sexto día de cultivo estático, se produjo un rendimiento de celulosa bacteriana, dos veces mayor al producido por los controles, siendo el oxígeno producido por las microalgas esencial para esta producción.

Estos resultados sugieren que sería más eficiente producir CS por sólo seis días que dejar cultivos por doce días estáticos, siendo factible producir más de dos cultivos para producir un mayor rendimiento que uno por más días.

ABSTRACT

Cellulose is a polysaccharide that is present in nature, which is of global importance, due to its unique properties that make it essential in industrial applications as diverse as in paper production in the biomedical industry, clothes, cosmetics, among others. Not only are plants capable of producing cellulose, but also microorganisms such as the bacteria *Acetobacter*, including the bacteria *Gluconacetobacter xylinus* (*G. xylinus*), which is the organism most studied for the biofilm yield produced, as well as by the source of clean cellulose obtained without purification. However, this yield varies depending on the conditions in which the bacteria grow, such as the source of glucose used and the oxygenation it needs as a strict aerobic microorganism. This bacteria has been used at the industrial production level, however, the high cost of maintenance because of the aforementioned needs, has failed to realize the potential that this source delivers. For this reason, in the present study, a natural source of oxygenation was sought, as is the microalga *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*), which is easy to use and economically profitable to maintain in the laboratory for its wide uses, as well as its ability to produce oxygen under constant light as photoperiod.

Therefore, the growth of *G. xylinus* and *C. vulgaris* was characterized in this research work, by performing co-cultures (CC) and separate cultures (CS) between both microorganisms. The objective of this research was to study the ability to optimize the production of bacterial cellulose, by delivering controlled oxygenation from photosynthetically active microalgae (under photoperiod and constant light) to the bacterial culture.

Our results indicate that, through the CS methodology and under constant luminosity at the sixth day of static cultivation, a yield of bacterial cellulose, was produced twice as high as that produced by the controls, the oxygen produced by the microalgae being essential for this production.

These results suggest that it would be more efficient to produce CS for only six days than to leave cultures for twelve static days, being feasible to produce more than two cultures to produce a higher yield than one for more days.