

**SÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS DE R. MELILOTI A PARTIR DE  
GLICEROL RESIDUAL Y ACEITE DE HIGUERILLA**

**CAMILO ANDRES PARADA MELENDEZ**

**JOHN ALEJANDRO SAYAGO BELTRAN**

**DIRECTOR:**

**PH. D. VIVIANA SÁNCHEZ TORRES  
INGENIERA QUÍMICA, PH.D.**

**CODIRECTOR:**

**PH. D. GUSTAVO E. RAMIREZ CABALLERO  
INGENIERO QUÍMICO, PH.D.**

**ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
BUCARAMANGA**

**2015**

**SÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS DE R. MELILOTI A PARTIR DE  
GLICEROL RESIDUAL Y ACEITE DE HIGUERILLA**

**CAMILO ANDRES PARADA MELENDEZ**

**JOHN ALEJANDRO SAYAGO BELTRAN**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE  
INGENIERO QUÍMICO**

**DIRECTOR:**

**VIVIANA SÁNCHEZ TORRES  
INGENIERA QUÍMICA, PhD.**

**CODIRECTOR:**

**GUSTAVO E. RAMIREZ CABALLERO  
INGENIERO QUÍMICO, PhD.**

**ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
BUCARAMANGA**

**2015**

## **DEDICATORIA**

*Hoy ha culminado un capítulo importante en mi vida, pues dejo de ser un estudiante para convertirme en un profesional que con su labor y pensamiento crítico atenderá de manera satisfactoria las necesidades de nuestra sociedad. A lo largo de estos años he tenido el placer de compartir mis experiencias con personas que me han ayudado en mi desarrollo personal, y es mi deseo dedicarles este esfuerzo realizado:*

*A la universidad y a sus profesores por enseñarme que un ingeniero no solo es sinónimo de cálculos y ecuaciones sino también de entrega, responsabilidad y pensamiento crítico ante la sociedad.*

*A mis padres que con su amor y disciplina me han formado como un ciudadano de bien. Los amo.*

*A mis amigos y colegas ingenieros químicos, Enrique, Nayis, Wilberth, Diego, Marlon, Milena, July, Jised, Natalia, Francy, Julián, Daniela, Daniel, Gina, Ángela, La Titu, Andrea, que me permitieron compartir muchos momentos de alegría, y muy pocos de amargura, Dios los bendiga y ¡éxitos muchachos en su vida profesional!*

*A Nathalia Bedoya, por toda la ayuda que nos brindó en los momentos más difíciles durante nuestras pruebas.*

*Camilo Andrés Parada Meléndez*

## Agradecimientos

Primeramente quiero darle las gracias a Dios por haberme dado la oportunidad de entrar a la universidad y haber podido llegar hasta este punto.

Gracias a mis familiares a mi mama, mi papa, mi hermana, mis nonos, mis tías y tío por haberme apoyado en cada momento de la carrera haciendo que cada día me esforzara más.

Gracias a mis amigos a todos ellos que aportaron su granito de arena desde el primer semestre para poder lograr y completar este libro. Gracias a Laura por haberme aguantado desde inicios de la carrera su amistad y compañía siempre las atesorare en el fondo mi corazón, gracias al care mañe por haberme hecho pasar muy bueno momentos en las jornadas de estudio, gracias a moni por ser dan dulce y sincera conmigo siempre siendo muy buena amiga incluso más en el final.

Gracias a Luz, Marlon, Jised, July y Francys por haberme colaborado en las largas y duras jornadas de estudio para los diferentes parciales estando siempre dispuestos a echarme una mano. Gracias a nayis por ser como es por ser tan linda y especial y aunque he sido el único que le he conocido su lado malvado siempre serás una de mis más grandes amigas, gracias a Gomitar por ser uno de mis primeros amigos de la U por ser apoyo durante estos 5 años, gracias a Yesica por colaborarme en el laboratorio por haber sido tan genial y por ser como fue con nosotros.

Gracias Diego por ser mi mejor amigo por estos años de amistad por haber compartido tanto conmigo y por sus muy SABIOS consejos sobre la vida.

Gracias a mi directora de proyecto la Dra. Viviana y a mi co director el Dr. Gustavo por compartir sus conocimientos con nosotros por habernos dado esa guía y apoyo durante todo el proyecto.

Gracias a Oriana y Nathalia por su acompañamiento y ayuda en las diferentes pruebas del proyecto así como su asesoramiento y colaboración en todo.

Gracias a mi compañero de tesis Camilo por aguantar mis llegadas tarde y por siempre estar el pendiente de todo.

Gracias Mafe por sus muy variados y grandes consejos en el CINBIN, por colaborarme siempre que necesitaba y por ser esa persona especial.

Gracias a Tefa y Eliseo por enseñarme los caminos de Dios por mostrarme su sabiduría y por procurar siempre mi bienestar, también por ser grandes amigos enviados por Dios para que siempre recuerde cuanto me ama.

Especialmente quiero dedicarte este libro por mostrarme que es lo único que realmente importa en la vida, Gracias.

John Alejandro Sayago

## CONTENIDO

	<b>pág.</b>
INTRODUCCION.....	14
1. MARCO TEÓRICO .....	16
1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS .....	16
1.2 PROPIEDADES .....	17
1.3 APLICACIONES .....	17
1.4 BIOSÍNTESIS DE PHA .....	18
2. METODOLOGÍA .....	21
2.1 PRUEBAS PRELIMINARES .....	21
2.2 CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE PHAS A PARTIR DE GLICEROL Y ACEITE DE HIGUERILLA.....	21
2.3 CUANTIFICACIÓN DEL POLÍMERO.....	22
2.4.3 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	24
3.1 PRUEBAS PRELIMINARES .....	25
3.1.1 Cuantificación del polímero .....	26
3.2.1 Cuantificación del polímero.....	29
3.3 CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO .....	32
3.3.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). .....	32
3.3.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas .....	33

3.3.3 Calorimetría diferencial de barrido .....	34
4. CONCLUSIONES .....	35
5. RECOMENDACIONES.....	36
REFERENCIAS .....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	41

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Monómero de PHA .....	16
Figura 2. Curva de crecimiento en MMS con diferente DO inicial.....	25
Figura 3. Análisis TGA del polímero comercial .....	26
Figura 4. Análisis de TGA para el cultivo con DO inicial 1 después de 5 días de cultivo.....	27
Figura 5. Porcentaje de polímero formado.....	28
Figura 6. Gráfica porcentaje de PHAs en medios con diferentes sustratos .....	29
Figura 7. Gráfica producción total de PHA.....	31
Figura 8. Espectrometría infrarroja de las muestras de los medios de cultivo .....	32
Figura 9. Espectro cromatografía higuierilla 25% glicerol 75% .....	33
Figura 10. Transición vítrea higuierilla 25% glicerol 75% .....	34

## LISTA DE TABLAS

	<b>pág.</b>
Tabla 1. Puntos de fusión y transición de varios PHA .....	17
Tabla 2. Diseño de los medios con diferente fuente de carbono .....	22
Tabla 3. T-test del cultivo higuera 2,5 g/l glicerol 7,5 g/l.....	30
Tabla 4. T-test de glicerol 5 g/l higuera 5g/l.....	31

## RESUMEN

**TÍTULO:** SÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS DE *R. MELILOTI* A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL Y ACEITE DE HIGUERILLA<sup>1</sup>

**AUTOR:**

John Alejandro Sayago Beltrán

Camilo Andrés Parada Meléndez<sup>2</sup>

**PALABRAS CLAVES:** aceite de higuera, polihidroxicanoatos, glicerol, *Rhizobium*, bioplástico

### DESCRIPCIÓN

Los biopolímeros se muestran hoy en día como una solución viable ambientalmente a la problemática generada por los plásticos comunes, que generan continuamente focos de contaminación debido a que no son biodegradables. Los polihidroxicanoatos (PHAs), son bioésteres completamente biodegradables sintetizados por hongos, bacterias y algunas plantas. En este trabajo la cepa bacteriana *Rhizobium meliloti* se usó para sintetizar PHA a partir de glicerol residual y aceite de higuera.

Se hicieron precultivos de *R. meliloti* en un medio mínimo de sales usando como fuente de carbono glicerol residual para determinar el tiempo ideal que favoreciera la mayor acumulación de PHAs. Luego se hicieron varios cultivos con diferentes proporciones de glicerol residual y aceite de higuera y se sometieron a pruebas de caracterización con el objetivo de analizar los Polihidroxicanoatos formados en cada uno de ellos. La mayor acumulación de PHA fue de 16% en un medio con 25% de aceite de higuera y 75% de glicerol residual en el quinto día de incubación. Posteriormente se realizó un análisis ANOVA para encontrar la concentración de la fuente de carbono que más afectaba la formación de polímero, esta fue 5 g/l de glicerol residual con 5 g/l de aceite de higuera. Con las pruebas de caracterización realizadas a cada muestra tomada de los cultivos, se demostró la existencia de polihidroxicanoatos de cadena larga.

---

<sup>1</sup> Trabajo de Grado

<sup>2</sup> Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Viviana Sánchez Torres. Codirector: Ph.D. Gustavo E. Ramírez Caballero

## ABSTRACT

**TITLE:** SYNTHESIS OF POLYHYDROXYALKANOATES BY *R. MELILOTI* FROM RESIDUAL GLYCEROL AND CASTOR OIL<sup>3</sup>

**AUTOR:**

John Alejandro Sayago Beltrán

Camilo Andrés Parada Meléndez<sup>4</sup>

**KEYWORDS:** castor oil, polyhydroxyalkanoates, glycerol, Rhizobium, bioplastics

### DESCRIPTION

Biopolymers are shown nowadays as an environmentally viable solution to the problems caused by common plastics, which continuously generate contamination sources due to they are not biodegradable. The polyhydroxyalkanoates (PHAs) are completely biodegradable bio esters synthesized by fungi, bacteria and some plants, in this work the bacterial strain *Rhizobium meliloti* was used to synthesize PHA with residual glycerol and castor oil.

*R. meliloti* precultures were made in a minimal salts medium using as carbon source residual glycerol to determine the ideal time that favors the greater accumulation of PHAs. Then several cultures were made with different proportions of residual glycerol and castor oil and subjected to characterization tests with the objective of analyze the polyhydroxyalkanoates formed in each of them. The highest accumulation of PHA was 16% in a medium with 25% castor oil and 75% residual glycerol on the fifth day of incubation. Later an ANOVA analysis was performed to find the concentration of the carbon source which most affect the polymer formation, this was 5 g / l of residual glycerol with 5 g / l of castor oil. With characterization tests made to each sample from the cultures, was demonstrated the existence of long side chain polyhydroxyalkanoates.

---

<sup>3</sup> Trabajo de Grado

<sup>4</sup> Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Viviana Sánchez Torres. Codirector: Ph.D. Gustavo E. Ramírez Caballero

## INTRODUCCIÓN

Los plásticos son materiales orgánicos compuestos fundamentalmente de carbono, hidrógeno, oxígeno, azufre y nitrógeno. En la actualidad, la mayoría de los plásticos comercializables se producen a partir de derivados del petróleo (Khanna, y otros, 2005). Este es un material versátil por todas las posibilidades de uso que tiene, pero también es un foco de contaminación para el planeta, ya que el uso intensivo de este material genera continuamente desechos que no son degradables, acumulándose en el medio ambiente. La producción actual de los plásticos ha aumentado 10 veces desde sus comienzos y alcanza aproximadamente 100 millones de toneladas anuales en todo el mundo (PlasticEurope, 2011) y en Colombia la producción es de 100.000 toneladas al año (Gomez, y otros, 2013), evidenciando un foco de contaminación importante (Ministerio de ambiente, 2004).

Se han creado varias estrategias con el fin de mitigar la contaminación por parte de estos materiales: incineración, reciclaje y fotodegradación. Sin embargo estas estrategias en algunas ocasiones crean nuevos problemas ambientales y atentan contra la salud humana (Serrano Riaño, 2010). Por lo tanto, los bioplásticos son una alternativa direccionada a la disminución de la contaminación, ya que su producción es a partir de recursos renovables o desechos, y son biodegradables.

Estos se pueden clasificar en tres tipos: bioplásticos de recursos renovables, polímeros biodegradables sintéticos y bioplásticos sintetizados por vía biotecnológica, esta última incluye a los polihidroxicanoatos (PHAs) (Remar, 2011). En este trabajo se utilizó como sustrato glicerol residual (residuo agroindustrial) por ser de bajo costo y aceite de higuera por estar disponible en toda la región para producir PHA usando *Rhizobium meliloti*. Se evaluó el crecimiento celular y la producción de polímero utilizando diferentes concentraciones iniciales de células, variando la relación de glicerol residual /

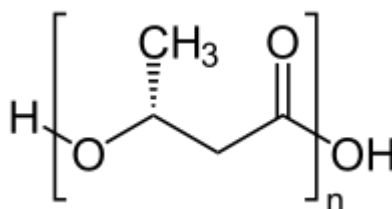
aceite de higuera (fuentes de carbono) y posteriormente con las mejores condiciones se realizó la caracterización del polímero resultante.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS

Los polihidroxicanoatos son compuestos orgánicos sintetizados y almacenados intracelularmente por microorganismos como fuente de carbono y energía en momentos de estrés y escasez de nutrientes, están conformados por grupos alcohol y ácidos carboxílicos (Figura 1.) y su concentración dentro de las células varía según la especie de microorganismo llegando a representar hasta el 90% de su peso seco (De Almeida, y otros, 2004).

Figura 1. Monómero de PHA



Fuente [1]

Estos polímeros presentan una variedad de tamaños, los cuales van desde cadenas de 3 a 5 átomos de carbono denominados PHAs de cadena corta (scl por sus siglas en inglés), a cadenas de 6 a 10 o más átomos de carbono denominados como PHAs de cadena mediana (mcl) y la combinación de los dos anteriores denominados copolímeros scl-co-mcl. Se conocen alrededor de 150 tipos diferentes de polihidroxicanoatos (Sankhla, y otros, 2010), esta multiplicidad de formas y tamaños se debe a la facilidad de agregar diferentes especies químicas a su estructura base o esqueleto, característica muy atractiva a la hora de sintetizar un compuesto deseado, sin embargo los más comunes sintetizados por microorganismos son el poli 3-hidroxi butirato (P3HB), el poli 3-hidroxi valerato (P3HV) y el copolímero conformado por éstos dos denominado P(3HB-co-3HV).

## 1.2 PROPIEDADES

Los polihidroxicanoatos poseen propiedades físicas que los convierten en candidatos atractivos para sustituir a los plásticos obtenidos a partir del petróleo, son materiales termoplásticos, exhiben actividad óptica, comportamiento piezoeléctrico, y lo más importante son biodegradables, no tóxicos y biocompatibles. También son hidrófobos, insolubles en agua, inertes y estables en presencia de aire, y son más resistentes a la degradación por luz UV que algunos plásticos comunes como el polipropileno (Laycock, y otros, 2013).

La familia de los PHA tienen diferentes puntos de fusión ( $T_m$ ) y de transición vítrea ( $T_g$ ) los cuales varían por el número de carbonos que tengan el monómero del polímero y los copolímeros que se formen durante la síntesis microbiana, en la tabla 1 se podrán ver mejor las diferentes temperaturas que ocurren estos puntos. La mayoría de los PHA tiene el punto de degradación térmica cerca de los 200 °C (Kim, y otros, 2001), pero esto varía en menor medida por el tipo de biopolímero.

Tabla 1. Puntos de fusión y transición de varios PHA

característica	P(3HB)	PHP	PP
$T_m$	180°C	61°C	176°C
$T_g$	5°C	-35°C	-10°C

Fuente: (Khanna, y otros, 2005)

## 1.3 APLICACIONES

Las aplicaciones para este tipo de polímeros son variadas al igual que las de sus contrapartes fabricados a partir de compuestos petroquímicos, estas incluyen artículos de higiene, envases y revestimientos, adhesivos, redes de pesca, prótesis médicas, entre otras.

Se han formulado patentes para utilizar el monómero quiral de los polihidroxicanoatos como intermediario en la síntesis de productos farmacológicos y de pesticidas (Madison, y otros, 1999). También debido a su naturaleza no tóxica y afín con la mayoría de compuestos biológicos, se ha estudiado la posibilidad de usarlo como un mecanismo para la liberación controlada de fármacos así como para su empaquetamiento ya que también es degradado en el cuerpo humano (Gonzales Garcia, 2012).

Sin embargo el principal obstáculo que limita sus aplicaciones en la vida cotidiana son los altos costos que se generan al momento de producirlos, así como el bajo rendimiento que se obtiene de los microorganismos y las materias primas. Si se resuelve el problema del costo de las materias primas, estos polímeros podrían entrar en competencia con los obtenidos a partir de compuestos derivados del petróleo, pues pueden ser procesados de igual manera.

#### **1.4 BIOSÍNTESIS DE PHA**

Se conocen 8 rutas metabólicas diferentes para la producción de PHA (Steinbuchel, y otros, 2003). La ruta más estudiada es la que consiste en el uso de 3 enzimas (Singh, y otros, 2012); la  $\beta$ -ketiolasa, NADPH-dependiente acetoacetyl-CoA reductasa y PHAs sintasa codificadas respectivamente por los genes *phaA*, *phaB* y *phaC* (Laycock, y otros, 2013). Para el uso de una cepa pura se hace una etapa de crecimiento en un medio estéril con una fuente de carbono y otros nutrientes. A continuación se limitan algunos nutrientes dando a lugar a la acumulación de PHA (Gomez, y otros, 2013). Los microorganismos que más se utilizan a escala industrial son las bacterias.

Entre las cepas bacterianas productoras de PHA se encuentran las del género *Rhizobium*, las cuales son Gram negativas y fijadoras de nitrógeno (Lakshman, y otros), pueden acumular PHA hasta un 50% en peso seco, usando los gránulos de PHA como reservorio de energía para futuros procesos de simbiosis (Lakshman, y

otros). Adicionalmente la cepas de *Rhizobium* genéticamente modificadas pueden alcanzar una acumulación de PHA de hasta 55 a 61% de peso en biomasa seca (Bermúdez Márques, y otros, 2004).

Las variables más importantes a la hora de evaluar la producción del biopolímeros son: la temperatura, el tiempo de crecimiento del cultivo, la cantidad de oxígeno relacionada con la agitación, la cantidad de carbono, nitrógeno y otros nutrientes (Gomez, y otros, 2013). En este trabajo, se tuvo en cuenta la fuente de carbono como variable determinante para la producción de PHA.

## **1.5 MATERIAS PRIMAS**

**1.5.1 Glicerol residual.** Es un residuo agroindustrial de la producción de biodiesel, el 65 % del glicerol residual que se encuentra es aquel que se obtiene después de retirar el metanol y el catalizador de la fase glicerina, obtenida en la transesterificación de aceites; su contenido en masa de glicerol es del 98,2% (m/m) aproximadamente. Actualmente de toda la producción de la industria oleoquímica solo el 10% corresponde a la producción del glicerol residual (Cardona, y otros, 2010).

Una vez refinado el glicerol residual es usado por las industrias de los fármacos, detergentes, aditivos alimentarios y cosméticos como materia prima, también tiene usos para la producción de energía y se ha investigado recientemente su uso en la producción de hidrógeno (Doufor, 2006).

**1.5.2 Aceite de higuera.** Es un aceite natural obtenido de la planta ricino o higuera, es considerada como una de las pocas fuentes de glicéridos naturales, el cual cerca del 90 % de los ácidos grasos está constituido de ácido ricinoléico, con la peculiaridad de ser un ácido graso con 18 carbonos con un doble enlace en los carbonos 8 y 9 y un grupo hidroxilo en el carbono 12. Es un aceite de color amarillo pálido, viscoso, casi inodoro, soluble en etanol, sin presencia de

sedimentos y su uso es exclusivamente industrial. El grupo hidroxilo del ácido ricinoléico le confiere al aceite de higuera unas propiedades especiales tales como: mayor solubilidad en alcoholes, limitada solubilidad en disolventes alifáticos del petróleo, viscosidad y gravedad específica relativamente altas (Cardona, y otros, 2010).

El aceite de higuera es importado a Colombia, 338 toneladas al año aproximadamente, no obstante en los últimos años el cultivo y la producción industrial de este aceite se ha venido incentivando debido a la facultad de esta planta para crecer en climas tropicales y hoy en día existen pequeñas parcelas demostrativas en los departamentos de Antioquia y Caldas (Finagro, 2013), las cuales cultivan la variedad *Nila Bicentenario*.

## **2. METODOLOGÍA**

### **2.1 PRUEBAS PRELIMINARES**

En un trabajo preliminar realizado por el grupo CINBIN (Bermúdez Márques, y otros, 2004) se encontró que la cepa *R. meliloti* tiene su mayor producción de PHA con el medio mínimo de sales con glicerol residual como fuente de carbono (MMSGC) (Bermúdez Márques, y otros, 2004) y una densidad óptica (DO) inicial en la inoculación celular de 0,1, pero no se evaluó la producción de PHA con una DO inicial diferente. En este trabajo se comparó la producción del biopolímero en la cepa *R. meliloti* con DO inicial de 0,1 y 1.

Se hicieron 2 precultivos en medio LB (Sambrook, y otros, 2009) en Erlenmeyers de 100 ml con 25 ml de medio por 24 h a 30 °C y 180 rpm, luego se tomaron muestras y se les evaluó su DO a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV/VIS Lambda 25 (Perkin Elmer, USA) y se calculó el volumen necesario para inocular en Erlenmeyers de 250 ml con 50 ml de MMSGC como medio de cultivo para que tuvieran valores de DO de 0,1 y 1 respectivamente. Los cultivos se incubaron a 30 °C y 180 rpm en un baño María con agitación TSBS40 (TECHNE, USA). Se tomaron datos de DO para los días 1, 3,5, 7 y 9 después de la inoculación. Se sacaron muestras del cultivo, a 60 °C por media hora y se almacenaron para el análisis termo-gravimétrico (TGA).

### **2.2 CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE PHAS A PARTIR DE GLICEROL Y ACEITE DE HIGUERILLA**

Se realizaron dos precultivos de *R. meliloti* en Erlenmeyers con 50 ml de medio LB, a 30°C y 180 rpm durante 24 horas. Los precultivos se utilizaron para inocular con DO inicial de 1 Erlenmeyer de 250 ml, cada uno con 50 ml de MMS (Bermúdez Márques, y otros, 2004) y diferentes concentraciones de la fuente de

carbón (glicerol residual o aceite de higuera), según el diseño descrito en la Tabla 2. Los experimentos se hicieron por duplicado cada uno a partir de un precultivo diferente. Los cultivos se incubaron a 180 rpm y 30°C durante 5 días.

Tabla 2. Diseño de los medios con diferente fuente de carbón

Fuente de carbón	Concentración de la fuente de carbón en cada medio (g/l)				
<b>Glicerol</b>	0	2,5	5	7,5	10
<b>Aceite de higuera</b>	10	7,5	5	2,5	0

Después de los 5 días de crecimiento, se centrifugaron (Kubota 6500) dejaron durante 10 minutos a 8000 rpm y 4°C. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 20 ml de hexano a los pellets celulares para extraer el aceite remanente, posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos a 8000 rpm y 4 °C. Se retiró el hexano de los tubos y los pellets fueron lavados con 5 ml de solución salina y se dejaron secar a 37°C por 18 h. De los pellets formados se sacaron muestras para hacerles TGA, calorimetría diferencial de barrido (DSC) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

### 2.3 CUANTIFICACIÓN DEL POLÍMERO

La cuantificación del polímero acumulado dentro de los microorganismos se realizó mediante TGA. Este método permite conocer la pérdida de peso de una muestra a medida que transcurre el tiempo bajo condiciones isotérmicas o mediante cambios de temperatura programados, se usa principalmente para investigar procesos de secado, reacciones de descomposición, entre otros.

El análisis termo gravimétrico fue realizado en una balanza Discovery TGA 1-0207, USA. El análisis se programó de la siguiente manera:

- Equilibrar la temperatura a 30°C.
- Rampa de calentamiento de 10°C min<sup>-1</sup> hasta 110°C.
- Isotherma durante 20 min.
- Rampa de calentamiento de 10°C min<sup>-1</sup> hasta 210°C.
- Isotherma durante 35 min.
- Rampa de calentamiento de 10°C hasta 500°C.

## **2.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS PHAS**

**2.4.1 Calorimetría diferencial de barrido.** La calorimetría diferencial de barrido, o DSC por sus siglas en inglés, es una técnica de medición usada para detectar transiciones endotérmicas y exotérmicas de sólidos y líquidos como una función de la temperatura. Con este análisis es posible determinar los cambios de fase y las temperaturas de transición vítrea y de fusión de los materiales, especialmente los polímeros. Así, una vez realizado el análisis e investigando en la literatura los valores de las temperaturas de fusión y transición vítrea, es posible realizar una comparación entre los resultados teóricos y experimentales para demostrar la existencia del polímero en la muestra. Este análisis fue realizado para la muestra del medio que presentó mayor acumulación de PHAs mediante el calorímetro Discovery DSC 1-0237.

**2.4.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).** La cromatografía líquida se implementó para determinar los monómeros presentes en el PHA. Los pellets celulares se sometieron a una reacción de metanólisis para descomponer el polímero en sus monómeros como fue descrito previamente (Bermúdez Márques, y otros, 2004). Luego de efectuada la metanólisis, cada muestra se almacenó en un vial de 1,5 ml de volumen y se analizaron con el

cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C VL MSD.

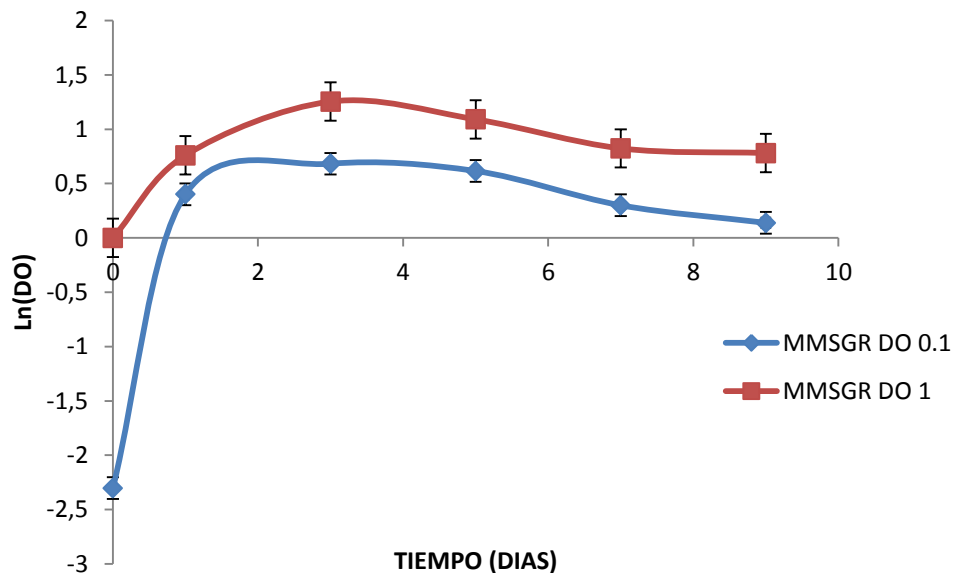
**2.4.3 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).** Se implementó la espectroscopia infrarroja con el objetivo de analizar los grupos funcionales presentes en las muestras celulares y de esa forma demostrar la existencia de polihidroxialcanoatos en cada uno de ellas. Las muestras secas de los 5 cultivos se analizaron con el espectrómetro FTIR-A8400S Shimadzu en modo de transmitancia en un rango de 4000 a 40  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 PRUEBAS PRELIMINARES

Durante 9 días se comparó el crecimiento de *Rhizobium meliloti* en el MMS con glicerol residual como fuente de carbono variando la DO inicial. Los valores aparecen registrados en la Figura 2.

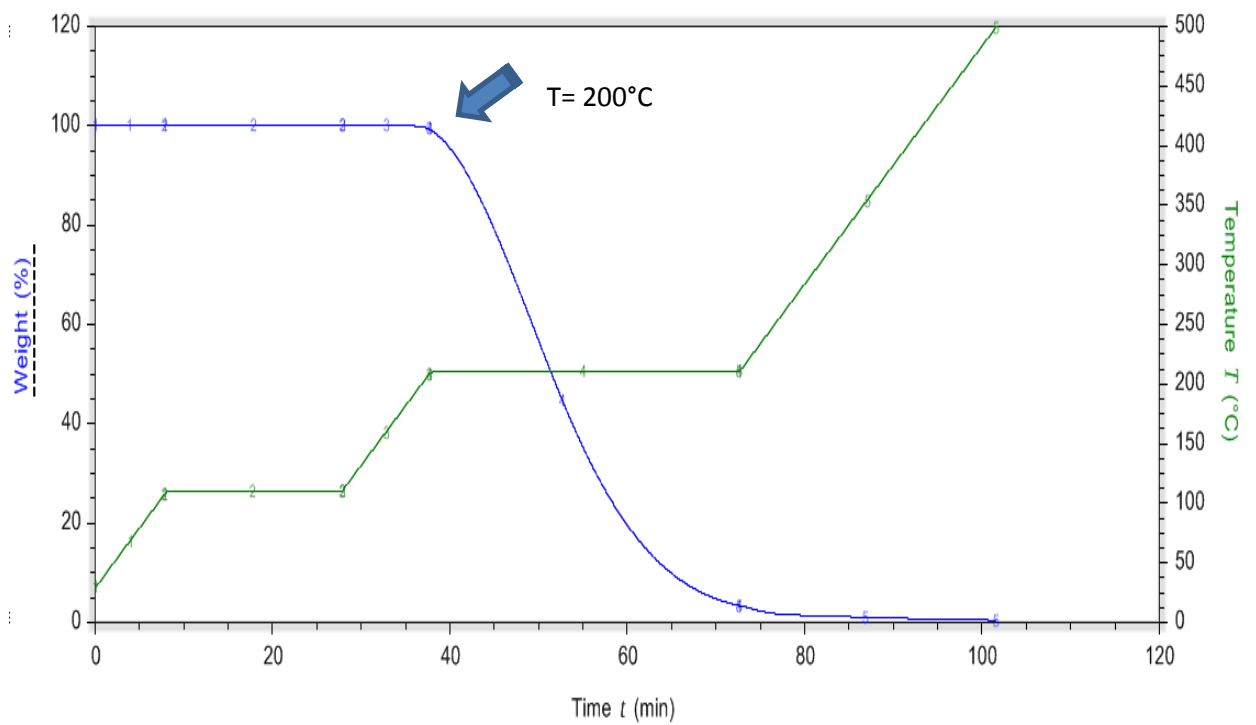
Figura 2. Curva de crecimiento en MMS con diferente DO inicial



La fase crecimiento exponencial duró aproximadamente 1 día para ambos cultivos, en donde el cultivo MMSGR DO 0.1 presentó la mayor velocidad de crecimiento específica de  $0,11 \text{ h}^{-1}$ , mientras que el cultivo MMSGR DO 1 presentó un valor de  $0,03 \text{ h}^{-1}$ , sin embargo el medio con DO inicial de 1 fue quien presentó una mayor densidad celular durante el tiempo que duró el experimento. Esto demostró la importancia de realizar la inoculación de los medios a partir de los precultivos con concentraciones altas de microorganismos, de esta manera la cantidad de células en el cultivo será mayor lo que favorecerá la acumulación de polímero en él.

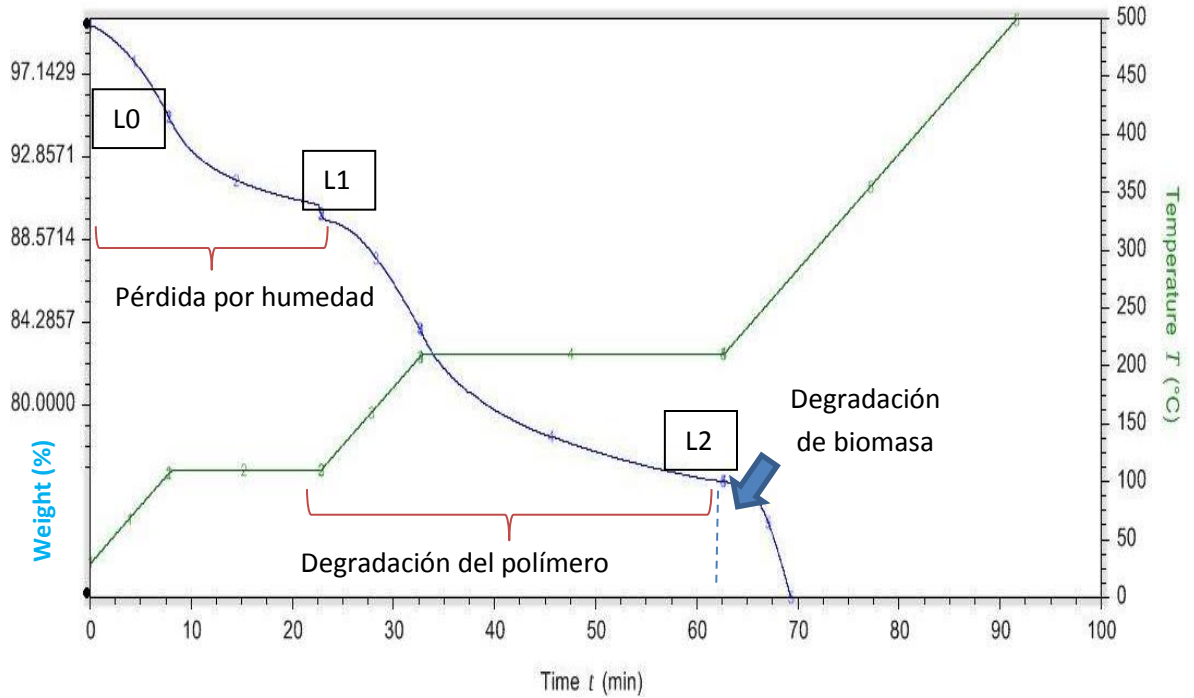
**3.1.1 Cuantificación del polímero.** La cantidad de polímero almacenado durante el crecimiento de la cepa se cuantificó por TGA. También se realizó esta prueba a una muestra de polímero comercial P3HB de (Sigma-Aldrich) para tener una referencia de la temperatura a la cual se degrada el polímero. En la Figura 3 el polímero comercial comienza una pérdida progresiva de su porcentaje en peso a partir de los 200°C siendo este el punto de degradación L1.

Figura 3. Análisis TGA del polímero comercial



La Figura 4 esquematiza el resultado obtenido para una de las muestras.

Figura 4. Análisis de TGA para el cultivo con DO inicial 1 después de 5 días de cultivo



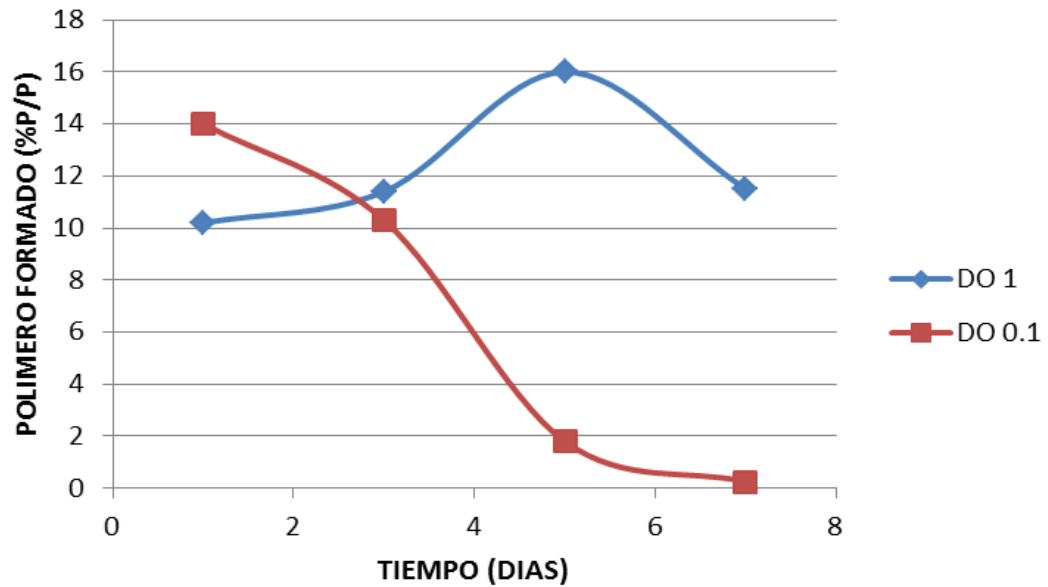
Los resultados obtenidos para las muestras tomadas de los medios de cultivos registran una pérdida en el porcentaje en peso entre los puntos L0 y L1 correspondiente a la humedad, luego ocurre otra pérdida entre L1 y L2 que corresponde a la degradación del polímero y otra más allá de la temperatura de degradación del polímero, después del punto L2, debido a la biomasa residual.

El porcentaje en peso seco perdido en la muestra a causa de la degradación del biopolímero, se calculó mediante la expresión:

$$\text{polimero formado } \left(\% \frac{p}{p}\right) = \frac{L1 - L2}{L1}$$

En la Figura 5 grafican los resultados obtenidos de acumulación de polímero a través del tiempo para los cultivos con DO inicial de 0,1 y 1.

Figura 5. Porcentaje de polímero formado

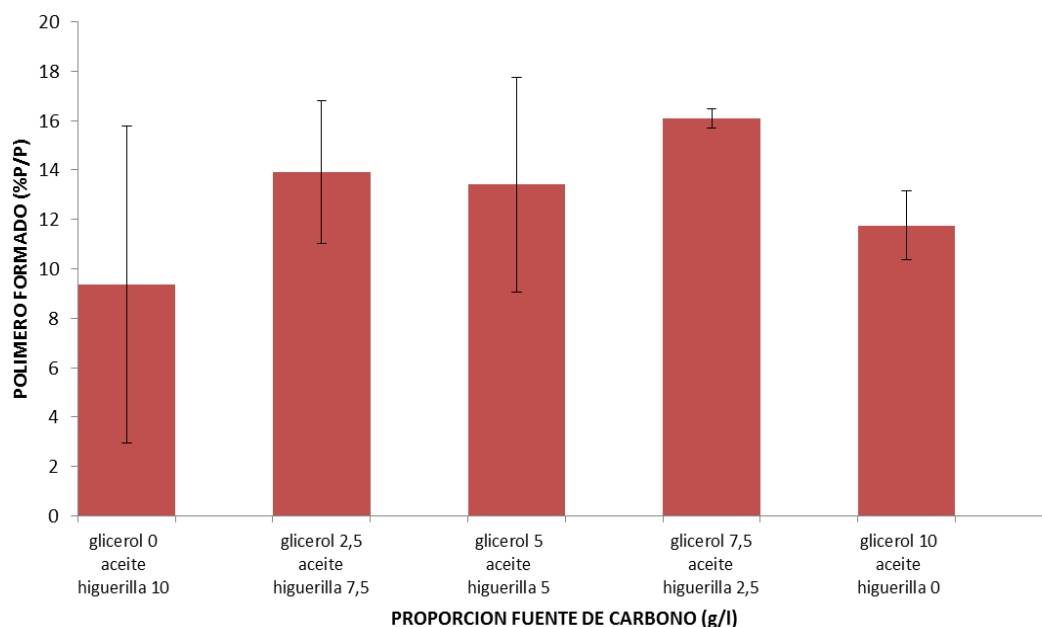


Con base a la figura anterior, el medio DO 1 presentó la mayor acumulación de polímero, en el quinto día con un porcentaje de acumulación del 16%. También se evidencia que el cultivo DO 0.1 presentó la mayor acumulación de polímero durante el primer día, resultado que coincide con el crecimiento máximo que se presentó con este mismo cultivo como ya se mostró en las pruebas preliminares, es probable que el polímero después del día 1 se haya destinado al consumo y metabolismo celular.

### 3.2 CRECIMIENTO EN MMS CON ACEITE DE HIGUERILLA Y PRODUCCIÓN DE PHAS

**3.2.1 Cuantificación del polímero.** El crecimiento de las cepas de *Rhizobium meliloti* se llevó a cabo de acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas preliminares, los inóculos de precultivo se tomaron a partir de una DO inicial de 1 y se incubaron durante los 5 días. Los resultados de la cuantificación del polímero para estos cultivos se muestran en la Figura 6.

Figura 6. Gráfica porcentaje de PHAs en medios con diferentes sustratos



Los medios con sustrato puro dan una menor producción de polímero, en cambio los medios que mezclan sustratos en distinta proporción aumentan la formación de éste.

Se realizó una prueba ANOVA para corroborar el efecto de utilizar los medios de carbono en diferentes proporciones en la producción de PHA (anexo A). Los resultados de ese análisis aparecen en la Tabla A1 en dicho anexo.

Siendo el factor A la concentración de glicerol, B la concentración de aceite de higuierilla y el factor AB la combinación de ambos sustratos. Con base en los valores anteriores se evidencia que los factores B y AB si satisfacen la hipótesis nula  $f_o > f_\alpha$  y por lo tanto tienen un efecto significativo sobre la formación de polímero por parte de microorganismos. El análisis corrobora lo ilustrado por la Figura 6, puesto que el cultivo que presentó una mayor formación de polímero fue aquel que poseía una proporción de glicerol de 7,5 g/l y aceite de higuierilla de 2,5 g/l.

Adicionalmente se realizó un t-test para determinar si el cultivo que dió mayor producción de PHA (higuierilla 2,5 g/l glicerol 7,5 g/l) es significativamente diferente a los demás cultivos. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

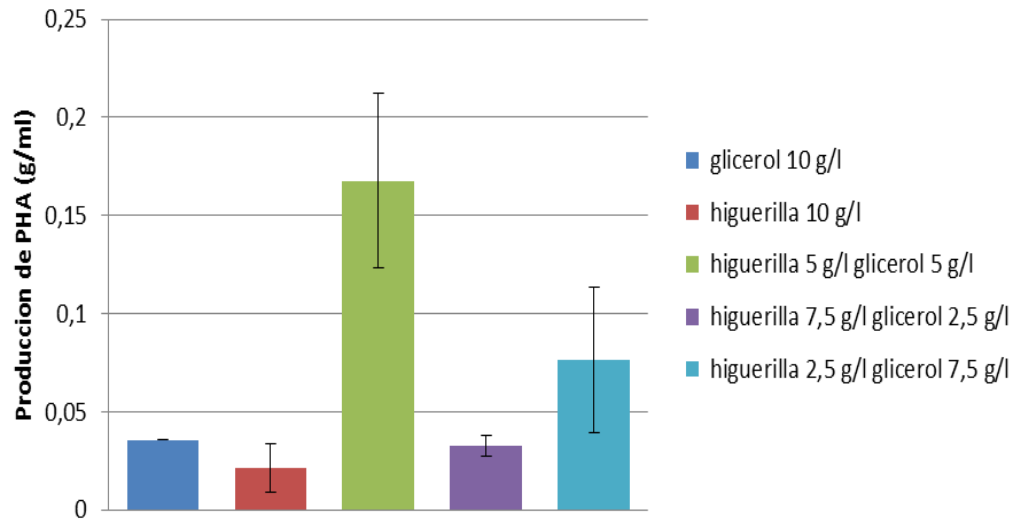
Tabla 3. T-test del cultivo higuierilla 2,5 g/l glicerol 7,5 g/l

Experimentos	Valor P
glicerol 10 g/l	0,22
higuierilla 10 g/l	0,049
higuierilla 5 g/l glicerol 5 g/l	0,25
higuierilla 7,5 g/l glicerol 2,5 g/l	0,08

Con base en lo anterior el cultivo higuierilla 10 g/l es el único significativamente diferente al cultivo higuierilla 2,5 g/l glicerol 7,5 g/l pues el valor P es menor a la tolerancia  $p=0,05$ .

Para determinar la producción total de PHA se calculó la concentración de biomasa seca en cada configuración de cultivo, para eso se midió el peso de la biomasa seca por unidad de volumen y con los análisis del TGA se multiplicó por el porcentaje de acumulación en cada cultivo, dando como resultado la producción total de PHA en cada condición de cultivo (Figura 7).

Figura 7. Gráfica producción total de PHA



Se realizó un t-test para evaluar las diferencias significativas entre el cultivo que presentó mayor producción total de PHA (glicerol 5 g/l higuerrilla 5 g/l) y los demás. Los resultados de este test se muestran a continuación:

Tabla 4. T-test de glicerol 5 g/l higuerrilla 5g/l

Experimentos	Valor P
glicerol 10 g/l	0,049
higuerrilla 10 g/l	0,043
higuerrilla 7,5 g/l glicerol 2,5 g/l	0,047
higuerrilla 2,5 g/l glicerol 7,5 g/l	0,13

El valor P para el cultivo higuerrilla 2,5 g/l glicerol 7,5 g/l, es mayor que el valor de tolerancia  $p= 0,05$  por lo tanto no representa un valor significativamente diferente comparado con el cultivo de higuerrilla 5 g/l glicerol 5 g/l.

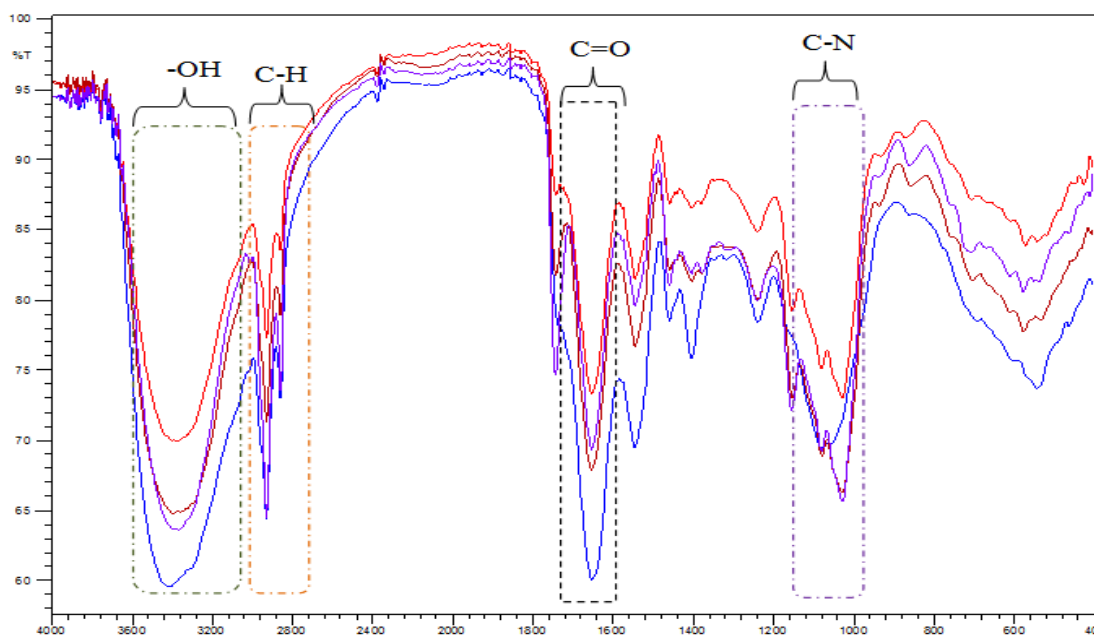
La mayor producción se alcanzó con el medio que contiene 5 g/l de ricino y 5 g/l glicerol residual, dando una producción de 0,089 g polímero/ l cultivo.

### 3.3 CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO

**3.3.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).** Luego de realizar la espectroscopia infrarroja a las muestras tomadas de todos los medios se encontraron cuatro grupos funcionales característicos (ver Figura 8):

Entre los  $3200-3600\text{ cm}^{-1}$  se detectó el grupo hidroxilo (-OH) el cual hace parte de la estructura quiral del monómero de los PHAs, en el intervalo  $2800-3200\text{ cm}^{-1}$  aparece el grupo alcano (C-H) que puede ser una cadena lateral diferente para cada polímero pues reemplaza el radical alifático R en el monómero de los PHAs, en el intervalo  $1600-1800\text{ cm}^{-1}$  se encuentra el grupo carbonilo (C=O) propio de los poliésteres. Adicionalmente aparece un pico en el intervalo  $1000-1200\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a aminas alifáticas (C-N) probablemente residuos de las proteínas estructurales de las bacterias debido a que no se realizó un proceso de purificación previo al análisis. La intensidad de los picos varía de acuerdo al medio de cultivo.

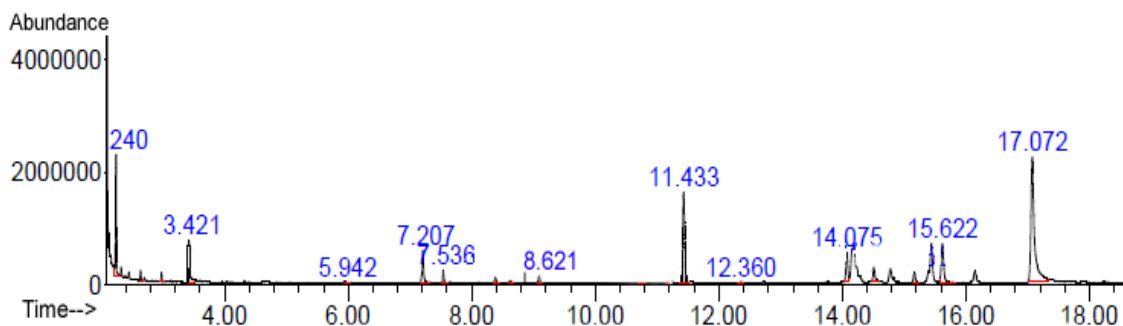
Figura 8. Espectrometría infrarroja de las muestras de los medios de cultivo



25% Ricino 75% Glicerol; 50% Ricino 50% Glicerol; 75% Ricino 25% glicerol; Ricino 100%

**3.3.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.** El espectro obtenido para la muestra tomada del cultivo con un 75% de glicerol residual y 25% de aceite de higuera, el cual presentó una mayor acumulación intracelular de polímero (Figura 9). El análisis registra una serie de picos que corresponden a los compuestos químicos presentes en la muestra. Los picos más intensos son 2.24, 11.433 y 17.072. El pico 2.24 corresponde al cloroformo, usado como solvente para el análisis, en 11.433 y 17.072 aparecen una serie de metil ésteres los cuales son posibles monómeros de polímeros de cadena larga no obstante también se pueden interpretar como ácidos grasos procedentes del glicerol residual y el aceite de higuera.

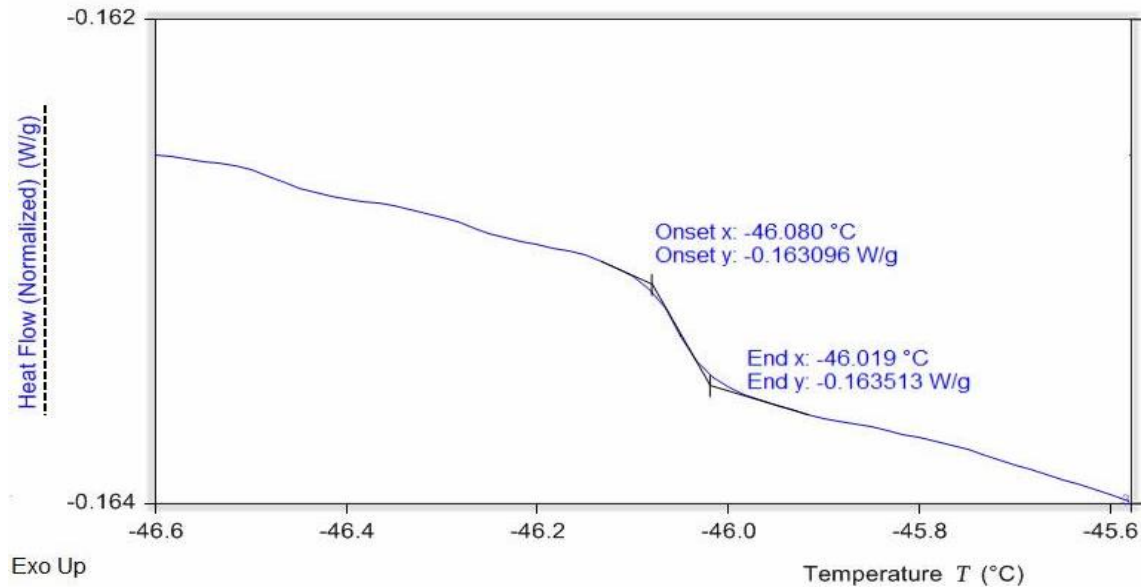
Figura 9. Espectro cromatografía higuera 25% glicerol 75%



Si bien las muestras no contenían el PHB, se evidencia la existencia de otro tipo de polihidroxicanoato, que confirma el hecho de que las cepas de *R. meliloti* son capaces de sintetizar este tipo de compuestos usando como sustrato el MMS con glicerol residual y aceite de higuera.

**3.3.3 Calorimetría diferencial de barrido.** Se le realizó el análisis TGA a una muestra tomada del cultivo con 25% de aceite de higuera, el cual dio mayor producción de PHA, el resultado de ese análisis aparece en la Figura 10.

Figura 10. Transición vítrea higuera 25% glicerol 75%



En la Figura 10 se registra el valor de la temperatura de transición vítrea del polímero, la cual ocurre a los -46 °C aproximadamente. Revisando la literatura se encuentra que el valor de la temperatura de transición vítrea es similar a las de PHA de cadena larga.

#### **4. CONCLUSIONES**

Los resultados muestran que con una DO inicial de 1 se consigue mayor acumulación de polímero que con una DO inicial de 0.1.

El análisis ANOVA demostró que las variables más influyentes en la acumulación intracelular de PHAs son la concentración de aceite de higuera y la relación aceite de higuera y glicerol residual.

Las pruebas de caracterización sugieren la presencia de polímeros de cadena larga en los medios de cultivo.

## 5. RECOMENDACIONES

Debido a las pruebas realizadas y anteriores investigaciones se sabe que la cepa *R. meliloti* es capaz de producir más de un tipo de polímero por lo tanto es necesario que se hagan más investigaciones mirando otros sustratos y buscando óptimos en las condiciones de operación.

Para que los resultados de la cromatografía líquida sean más precisos, se requiere realizar una purificación adecuada de las muestras, en aras de que las impurezas y los compuestos diferentes a los monómeros no interfieran en la lectura de los mismos.

## REFERENCIAS

- [1] S. Khanna and A. K. Srivastava, "A simple structured mathematical model for biopolymer (P3HB) production.," 2005.
- [2] PlasticEurope, "Plásticos - Situación en 2011 Análisis de la producción, la demanda y la recuperación," Union europea, 2011.
- [3] C. Gomez and J. Ricardo, "Producción y caracterización de polihidroxicanoatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos," Universidad Nacional de Colombia, Medellin, 2013.
- [4] v. y. d. t. Ministerio de ambiente, "Sector Plástico, Principales Procesos Básicos de transformación de la Industria Plástica y Manejo, aprovechamiento y disposición de residuos plásticos y post-consumo," Dirección de Desarrollo Sectorial Sostenible. República de Colombia., Bogota , 2004.
- [5] Y. J. Serrano Riaño, "Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos.Una solución frente a la contaminación del medio ambiente," vol. 5, 2010.
- [6] Remar, "Biolásticos. Guía práctica - Número 2," 2011.
- [7] A. De Almeida, J. A. Ruiz, N. I. Lopez and M. J. Pettinari, "Bioplásticos: Una alternativa ecología," 2004.

- [8] I. S. Sankhla, R. Bhati, A. K. Singh and N. Mallick, "Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer production from a local isolate *Brevibacillus invocatus* MTCC9039," 2010.
- [9] B. Laycock, P. Halley, S. Pratt, A. Werker and P. Lant, "The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates," *Progress in Polymer Science*, 2013.
- [10] L. Kim and R. Lenz, "Polyesters from microorganism," *Advances in Biochemical engineering biotechnology*, vol. 71, pp. 54-74, 2001.
- [11] L. L. Madison and G. Huisman, "Engineering of poly(3hydroxyalkanoates): from DNA to plastic," *Microbiol Mol Biol*, vol. 63, 1999.
- [12] Y. Gonzales Garcia, "Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano," Universidad de Guadalajara, 2012, 2012.
- [13] A. Steinbuchel and T. Lutke-Eversloh, "Metabolic engineering and path-way construction for biotechnological production of relevant polyhydroxalkanoates in microorganism," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 16, pp. 81-96, 2003.
- [14] M. Singh, K. S. Patel and C. V. Kalia, "Bacillus subtilis as potential producer for polyhydroxyalkanoates," *BioMed Central*, 2012.
- [15] K. Lakshman and N. K. Rastogi, "Simultaneous and comparative assessment of parent and mutant strain of *Rhizobium Meliloti* for nutrient limitation and

enhanced polyhydroxyalkanoate (PHA) production using optimization studies," *Process Biochemistry*, vol. Volumen 39.

- [16] K. Lakshman and T. Ramachandrian Shamala, "Enhanced biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in a mutant strain of *Rhizobium Meliloti*," *Department of Food Microbiology. Biotechnology Letters*.
- [17] R. A. Bermúdez Márques and M. C. Ordoñez Franco, "Biosíntesis bacteriana de polihidroxicanoatos a partir de glicerol crudo," *Universidad Industrial de Santander*, 2004.
- [18] S. Cardona, R. Gonzales , A. Franco, F. Cardeño and L. Rios, "OBTENCIÓN DE MONOGLICÉRIDOS DE ACEITE DERICINO EMPLEANDO GLICERINA REFINADA Y CRUDA. ESTUDIO DE LAS PRINCIPALES VARIABLES DEL PROCESO," *REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*, vol. 17, no. 2, pp. 129-131, 2010.
- [19] J. Doufor, "¿Qué hacer con la glicerina procedente de las plantas de biodiésel?," *mi+d*, 29 Junio 2006. [Online]. Available: <http://www.madrimasd.org/blogs/energiasalternativas/2006/06/29/33193>. [Accessed 2015].
- [20] Finagro, "INFORMACION DE INTERES SOBRE EL CULTIVO DE LA HIGUERILLA," *Corpoica*, pp. 1-3, 2013.
- [21] J. Sambrook, E. F. Fritch and T. Maniatis, "Molecular cloning: a laboratory manual," *Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, no. 2nd ed, 2009.

- [22] G. E. Nuñez, "Confidencial Colombia, Sector de plásticos.," 2012. [Online]. Available: [http://confidencialcolombia.com/es/1/304/1525/Sector-de-pl%C3%A1sticos-vende-US\\$4000-millones-anuales-Plastico-Industria-Acoplasticos-TLC.htm..](http://confidencialcolombia.com/es/1/304/1525/Sector-de-pl%C3%A1sticos-vende-US$4000-millones-anuales-Plastico-Industria-Acoplasticos-TLC.htm..)
- [23] C. Carminatti, F. E. Messana, M. C. Zanchet and R. V. Pinheiro, "Producao de polihidroxiclcanoatos," *enghenaria bioquimica*, 2006.
- [24] E. B. Hermida and G. Diaz, "Cambios micro estructurales durante la cristalización de poliésteres biodegradables," *CONGRESO CONAMET/SAM*, 2004.
- [25] P. Phukon, J. Saikia and K. B. Konwar, "Bioplastics (P-3HB-co-3HV) from bacillus circulans (MTCC 8167) and its biodegradation," *Colloids and Surfaces: Biointerfaces*, vol. 92, pp. 30-34, 2012.
- [26] A. N. Sayegh Ordoñez and L. G. Cardenas Arias, "Plan de empresa basado en el uso de aciete de higuierilla para la industria cosmetica," *Universidad Icesi*, pp. 13-15, 2011.

## BIBLIOGRAFÍA

Bermúdez Márques Richard Alexander y Ordoñez Franco Maria Carolina Biosíntesis bacteriana de polihidroxicanoatos a partir de glicerol crudo [Publicación periódica] // Universidad Industrial de Santander. - 2004.

Cardona Sandra [y otros] OBTENCIÓN DE MONOGLICÉRIDOS DE ACEITE DE RICINO EMPLEANDO GLICERINA REFINADA Y CRUDA. ESTUDIO DE LAS PRINCIPALES VARIABLES DEL PROCESO [Publicación periódica] // REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA. - 2010. - 2 : Vol. 17. - págs. 129-131.

Carminatti C [y otros] Producción de polihidroxicanoatos [Publicación periódica] // Ingeniería bioquímica. - 2006.

De Almeida A [y otros] Bioplásticos: Una alternativa ecológica [Publicación periódica]. - 2004.

Doufor Javier ¿Qué hacer con la glicerina procedente de las plantas de biodiésel? [En línea]. - mi+d, 29 de Junio de 2006. - 2015. - <http://www.madrimasd.org/blogs/energiasalternativas/2006/06/29/33193>.

Finagro INFORMACIÓN DE INTERÉS SOBRE EL CULTIVO DE LA HIGUERILLA [Publicación periódica] // Corpoica. - 2013. - págs. 1-3.

Fresno Biodiesel a partir de aceite de higuerilla [Publicación periódica] // Conferencia biocombustibles. - 2010.

Gómez Cardozo y Ricardo Javier Producción y caracterización de polihidroxicanoatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos [Informe]. - Medellín : Universidad Nacional de Colombia, 2013.

Gonzales Garcia Yolanda Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano [Informe]. - 2012 : Universidad de Guadalajara, 2012.

Hermida E B y Diaz G Cambios micro estructurales durante la cristalización de poliésteres biodegradables [Publicación periódica] // CONGRESO CONAMET/SAM. - 2004.

Khanna S y Srivastava A K A simple structured mathematical model for biopolymer (P3HB) production. [Publicación periódica]. - [s.l.] : Biotechnol, 2005. - Prog. 21, 830-838.

Kim L y Lenz R Polyesters from microorganism [Publicación periódica] // Advances in Biochemical engineering biotechnology. - 2001. - Vol. 71. - págs. 54-74.

Lakshman Kshama y Ramachandrian Shamala Tumkur Enhanced biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in a mutant strain of Rhizobium Meliloti [Publicación periódica] // Department of Food Microbiology. Biotechnology Letters.

Lakshman Kshama y Rastogi N K Simultaneous and comparative assessment of parent and mutant strain of Rhizobium Meliloti for nutrient limitation and enhanced polyhydroxyalkanoate (PHA) production using optimization studies [Publicación periódica] // Process Biochemistry. - Vol. Volumen 39.

Laycock B [y otros] The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates [Publicación periódica] // Progress in Polymer Science. - 2013.

Madison L L y Huisman G Engineering of poly(3hydroxyalkanoates): from DNA to plastic [Publicación periódica] // Microbiol Mol Biol. - 1999. - Vol. 63.

Ministerio de ambiente vivienda y desarrollo territorial Sector Plástico, Principales Procesos Básicos de transformación de la Industria Plástica y Manejo, aprovechamiento y disposición de residuos plásticos y post-consumo [Informe]. -

Bogotá : Dirección de Desarrollo Sectorial Sostenible. República de Colombia., 2004.

Núñez German Enrique Confidencial Colombia, Sector de plásticos. [En línea]. - 2012. - [http://confidencialcolombia.com/es/1/304/1525/Sector-de-pl%C3%A1sticos-vende-US\\$4000-millones-anuales-Plastico-Industria-Acoplasticos-TLC.htm..](http://confidencialcolombia.com/es/1/304/1525/Sector-de-pl%C3%A1sticos-vende-US$4000-millones-anuales-Plastico-Industria-Acoplasticos-TLC.htm..)

Phukon P, Saikia J y Konwar K B Bioplastics (P-3HB-co-3HV) from bacillus circulans (MTCC 8167) and its biodegradation [Publicación periódica] // Colloids and Surfaces: Biointerfaces. - 2012. - Vol. 92. - págs. 30-34.

PlasticEurope Plásticos - Situación en 2011 Análisis de la producción, la demanda y la recuperación [Informe]. - [s.l.] : Union europea, 2011.

Remar Bioplásticos. Guía práctica - Número 2 [Publicación periódica]. - [s.l.] : Red de energía y medio ambiente, 2011.

Sambrook J, Fritsch E F y Maniatis T Molecular cloning: a laboratory manual [Publicación periódica] // Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. - 2009. - 2nd ed.

Sankhla I S [y otros] Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer production from a local isolate *Brevibacillus invocatus* MTCC9039 [Publicación periódica]. - 2010.

Sayegh Ordoñez Andraws Nabil y Cardenas Arias Luis Gerardo Plan de empresa basado en el uso de aceite de higuera para la industria cosmética [Publicación periódica] // Universidad Icesi. - 2011. - págs. 13-15.

Serrano Riaño Yadira Julieth Polihidroxialcanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente [Publicación periódica]. - [s.l.] : Revista Teoría y praxis investigativa, 2010. - Vol. 5.

Singh M, Patel K S y Kalia C V Bacillus subtilis as potential producer for polyhydroxyalkanoates [Publicación periódica] // BioMed Central. - 2012.

Steinbuchel A y Lutke-Eversloh T Metabolic engineering and path-way construction for biotechnological production of relevant polyhydroxalkanoates in microorganism [Publicación periódica] // Biochemical Engineering Journal. - 2003. - Vol. 16. - págs. 81-96.

## Anexo A. DISEÑO DE EXPERIMENTOS Y ANALISIS DE VARIANZA ANOVA

Se evaluó el efecto en la acumulación de PHA de las variables concentración de glicerol, concentración de aceite de higuera y la interacción entre ambas realizando un análisis ANOVA. La tabla A1 muestra los datos de dicho análisis

Tabla A1. Análisis de varianza ANOVA 1

factores	suma de cuadrados	grados de libertad	cuadrado medio	razón F0	razón $F_{\alpha}$	$f_0 > F_{\alpha}$
A-Glicerol	10,13	4	2,53	0,9	2,76	no
B-Higuera	49,28	4	12,32	4,4	2,76	si
AB	1324,66	16	82,79	29,4	2,074	si
error total	70,33	25	2,81			
cor total	1454,4	49				