

**PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR *Rhizobium* sp. A
PARTIR DE GLICEROL CRUDO**

**GINNETH ALEXANDRA HERRERA PABÓN
ANDRES FELIPE NIÑO MANTILLA**

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

2015

**PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR *Rhizobium sp.* A
PARTIR DE GLICEROL CRUDO**

**GINNETH ALEXANDRA HERRERA PABÓN
ANDRES FELIPE NIÑO MANTILLA**

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

Director:

Ph. D. VIVIANA SÁNCHEZ TORRES

Ingeniera Química, Ph.D.

Codirector:

Ph. D. GUSTAVO E. RAMIREZ CABALLERO

Ingeniero Químico, Ph.D.

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

2015

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander por brindarnos la formación en Ingeniería Química, espacios culturales y la oportunidad de conocer personas que aportaron a nuestro crecimiento personal y profesional.

Al grupo de investigación CINBIN y al grupo de Investigación en Polímeros por habernos acogido y brindado las herramientas para el desarrollo de este proyecto.

A los Doctores Viviana Sánchez y Gustavo E. Ramírez por haber confiado en nosotros y permitirnos hacer parte de este proyecto de investigación, brindándonos sus conocimientos, tiempo, dirección y sobre todo su apoyo y paciencia.

A la Bióloga Oriana Serna Danuta por su orientación y apoyo en ciertas las etapas del proyecto.

A la química Nathalia Bedoya Carvajal por el tiempo, disposición, paciencia e incondicionalidad.

Al ingeniero Guillermo Aceros del laboratorio del Centro Integrado de Laboratorios de Ingeniería Química (CLIQ), por su colaboración en el procesamiento de muestra para espectroscopia infrarrojo.

A la Ph.D. Martha Barajas por su asistencia en el procesamiento de muestras.

La idea del ser humano de ser un hombre solitario e independiente se derrumba cuando se da cuenta de que su vida no es nada sin la presencia de Dios y de las personas que lo rodean.

Por esto, le dedico este triunfo primeramente a Dios por guiarme en el camino, por darme su mano, por permitirme seguir con vida y tener una familia en la cual puedo confiar y seguir adelante.

Agradezco a las personas que me han brindado su corazón, guía, cariño y todo su apoyo desde el momento en que nací, a mi mamá Nohora Pabón y mi papá Rodolfo Herrera.

A mis hermanos Gerson, Juan David y Angie por acompañarme en las situaciones difíciles. A mis tías, tíos, abuelos etc. por aportar un granito de arena en la formación de esta joven que apenas empieza su camino.

Agradezco a mi prima Mayra por ser esa persona en la cual puedo confiar, por soportar mis locuras, por guiarme..

A Nadia, Lichi, Yessica y Clara por ser esas amigas que a pesar de mis errores confían en mí y me acompañan en mis ideas locas, raras, en fin.....

A el Potro, Marlon, July, Luz, Jised, Camilo, a cada uno de mis combos, a las ricuras y mis bfs por esos momentos de felicidad, tristeza, etc. que hicieron que mi vida fuera diferente.

Agradezco a Mario por ser esa persona incondicional, por su dedicación, por brindarme su apoyo, amor y cariño y sobre todo por su paciencia.

A mi compañero de tesis Felipe por aguantarme durante este proceso.

Finalmente, a todas aquellas personas que aportaron algo de su tiempo y vida e hicieron que esto fuera posible.

Gina Herrera Pabón

Pensar en la finalización de mis estudios como ingeniero químico en muchas oportunidades era un sueño que se veía lejano, en mi vida universitaria pase por varios inconvenientes que me hicieron pensar que este logro era algo imposible.

Dedico esta investigación a las personas más importantes de mi vida, a mis padres que en todo este tiempo fueron un apoyo incondicional, siempre se dedicaron a apoyarme, a llenarme de cariño y a cumplir cada una de mis expectativas. Mi abuela siempre ha ocupado un espacio en mi corazón, ya que siempre cumplió un papel de segunda madre cuidándome, respetándome y consintiéndome.

Mi hermana que desde mi adolescencia se convirtió en mi mejor amiga pero siempre me ha visto como su niño y su gran amor.

Por ultimo dedico este logro a mi compañera Gina, gracias por la oportunidad que me diste al trabajar conmigo.

Andrés Felipe Niño Mantilla

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	17
1. MARCO TEORICO.....	18
1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS.....	18
1.2 PRODUCCIÓN MICROBIANA DE PHA.....	19
1.3 EXTRACCIÓN DE LOS PHA.....	20
2. METODOLOGÍA.....	21
2.1 PRUEBAS PRELIMINARES.....	21
2.1.1 Curvas de crecimiento en diferentes medios de cultivo.....	21
2.1.2 Efecto de la concentración de glicerol en el crecimiento celular.....	22
2.2 PRODUCCIÓN DE PHA.....	22
2.3 CUANTIFICACIÓN DEL POLÍMERO.....	24
2.4 EXTRACCIÓN DEL POLÍMERO PHA.....	24
2.5 CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO.....	25
2.5.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	25
2.5.3 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	25
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	26
3.1 PRUEBAS PRELIMINARES.....	26
3.1.1 Curva de crecimiento.....	26
3.1.2 Crecimiento de la cepa <i>Rhizobium</i> sp en diferentes concentraciones de glicerol crudo.....	27
3.2 PRODUCCIÓN DE PHA.....	28
3.3 CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO PHB OBTENIDO.....	33
3.3.1 Paralelo entre el análisis termogravimétrico del polímero obtenido y el PHB comercial.....	33
3.3.2 Prueba de calorimetría diferencial de barrido (DSC) del polímero comercial y el obtenido PHB.....	37

3.3.3 Prueba de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) del polímero obtenido PHB y el polímero comercial.....	39
4. CONCLUSIONES.....	42
5. RECOMENDACIONES.....	43
CITAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXOS.....	48

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura general de los polihidroxicanoatos.....	18
Figura 2. Imagen por microscopía electrónica donde se muestra la acumulación de PHA por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
Figura 3. Metodología para la extracción del polímero PHA de la cepa <i>Rhizobium</i> sp.....	21
Figura 4. Crecimiento de <i>Rhizobium</i> sp en diferentes medios de cultivo.....	26
Figura 5. Crecimiento de <i>Rhizobium</i> sp en medio MSMGC con diferentes concentraciones de Glicerol Crudo.....	27
Figura 6. Diagrama de Pareto	29
Figura 7. Gráfica de DO vs tiempo para los 8 experimentos del diseño.....	30
Figura 8. Análisis termogravimétrico correspondiente al cultivo del experimento NA G 80.....	31
Figura 9. Porcentaje de PHA acumulado en base seca.....	32
Figura 10. Producción de PHB.....	33
Figura 11. Análisis termogravimétrico del polímero comercial.....	34
Figura 12. Análisis termogravimétrico del polímero extraído.....	35
Figura 13. Calorimetría Diferencial de Barrido DSC del PHB comercial.....	36
Figura 14. Prueba de Calorimetría DSC del polímero extraído.....	37
Figura 15. Análisis FTIR para el polímero comercial.....	38
Figura 16. Análisis FTIR para el polímero extraído.....	39

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Diseño de Experimentos 2^k	23
Tabla 2. Matriz de experimentos.....	23
Tabla 3. Velocidad de crecimiento específica para cada medio	26

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Propiedades fisicoquímicas del glicerol crudo	38
ANEXO B. Diseño de experimentos y análisis de varianza ANOVA.....	39

RESUMEN

TITULO: PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR *Rhizobium* sp. A PARTIR DE GLICEROL CRUDO¹

AUTOR:

Ginneth Alexandra Herrera Pabón

Andrés Felipe Niño Mantilla²

PALABRAS CLAVES: biopolímero, polihidroxicanoatos, bioplásticos, *Rhizobium*, biodegradables

DESCRIPCIÓN

Los biopolímeros han cobrado gran importancia en la industria debido a que buscan reemplazar los plásticos que actualmente generan gran acumulación y contaminación en el medio ambiente. Una alternativa para disminuir esta contaminación se centra en los polihidroxicanoatos (PHA). Los polihidroxicanoatos son biopoliésteres completamente biodegradables, sintetizados y catabolizados por microorganismos como hongos, bacterias y algunas plantas. Los microorganismos acumulan el PHA en gránulos intracelulares que alcanzan hasta el 90% del peso seco de la célula como reserva de carbono y energía en donde lo sintetizan cuando hay deficiencia de algún nutriente esencial como O, N, P, S o Mg.

En este trabajo se evaluó la influencia de un subproducto de la industria del biodiesel como lo es de la concentración de glicerol crudo, concentración de nitrógeno y agitación en el porcentaje de acumulación intercelular de PHA por medio de la bacteria *Rhizobium* sp. La mayor acumulación de PHA fue de 29,7 % en un medio con una concentración de glicerol crudo de 80 g/l y amonio a 1 g/l, incubando sin agitación. Posteriormente se extrajeron los gránulos de PHA con una solución de hipoclorito de sodio con diclorometano. Finalmente se llevó el PHA a pruebas de cuantificación y caracterización hallando similitudes entre el polímero extraído y el poli-3-hidroxitirato.

1.Trabajo de Grado

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

ABSTRACT

TITLE: PRODCUTION OF POLYHYDROXYALCANOATES BY *Rhizobium* sp.
FROM CRUDE GLYCEROL³

AUTOR:

Ginneth Alexandra Herrera Pabón

Andrés Felipe Niño Mantilla⁴

DESCRIPTION

Biopolymers have become of industrial relevance to replace plastics that currently generate large accumulation and pollution in the environment. An alternative to reduce this pollution focuses on polyhydroxyalkanoates (PHA). The polyhydroxyalkanoates are biopolyesters completely biodegradable, synthesized and catabolized by microorganisms such as fungi, bacteria and some plants. Microorganisms accumulate intracellular PHA granules that can reach 90% of the dry cell weight as a carbon and energy reserve which are synthesized when there is a deficiency of any essential nutrient as O, N, P, S and Mg.

In this study the influence of a byproduct of the biodiesel industry as it is the crude glycerol concentration, nitrogen concentration and agitation in the percentage of intracellular accumulation of PHA by the bacterium *Rhizobium* sp was evaluated. The highest production of PHA accumulation was 29.7% in a medium with 80 g/l of crude glycerol and 1 g/l of ammonium without shaking. Subsequently the PHA granules were extracted with a solution of sodium hypochlorite with dichloromethane. Finally the PHA was quantified and characterized finding similarities between the extracted polymer and poly-3-hydroxybutyrate.

3.Trabajo de Grado

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

LISTA DE ABREVIATURAS

MSMGP medio mínimo de sales con glicerol puro

MSMGC medio mínimo de sales con glicerol crudo

MSMN2 medio mínimo de sales rico en nitrógeno

LB medio Luria Bertani

PHA Polihidroxialcanoato

P3HB Poli-3-Hidroxibutírico

PHV Polihidroxivalerato

DO Densidad óptica

NA Concentración de 1 g/l de nitrógeno

NB Concentración de 0,1 g/l de nitrógeno

G 80 Concentración de glicerol crudo de 80 g/l

G 10 Concentración de glicerol crudo de 10 g/l

A Agitación de 180 rpm

S Sin agitación

TGA Análisis Termogravimétrico

DSC Calorimetría Diferencial de Barrido

FTIR Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourie.

INTRODUCCIÓN

La producción de plásticos derivados del petróleo data de muchos años atrás, tiempo que lo convirtió en uno de los materiales con más uso cotidiano, debido a sus propiedades de moldeamiento y alta resistencia química. Sin embargo, ha sido un agente contaminante que ha creado un problema ambiental en nuestro planeta, pues no son biodegradables [1]. Desde el comienzo de la década de los 60 se produjo un marcado crecimiento en la industria de los plásticos. Actualmente, la producción mundial de plásticos es 10 veces mayor que en aquella época y alcanza aproximadamente los 100 millones de toneladas anuales [2]. En Colombia se procesa alrededor de 980.0000 toneladas de resinas plásticas al año [3], como resultado de su gran demanda se forman desechos que se acumulan en el ambiente gracias a su alta resistencia a la degradación.

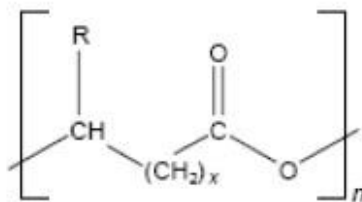
Debido a los problemas que el plástico genera, se han creado estrategias para la disminución de la contaminación como lo son los procesos de incineración, reciclaje, fotodegradación o reuso. Sin embargo estas medidas de prevención no son 100% efectivas ya que estos procesos también generan algunos efectos secundarios negativos en el medio ambiente y en la salud del ser humano [4]. Como alternativa para esta situación existe la opción de usar bioplásticos como los polihidroxialcanoatos (PHA), los cuales se producen a partir de fuentes de carbono renovables y son completamente biodegradables [5]. En este trabajo se busca producir PHA a partir de glicerol crudo usando *Rhizobium* sp. para definir las condiciones que permitan aumentar la producción, se evaluó el crecimiento celular en diferentes medios de cultivo, el efecto de la concentración de glicerol (fuente de carbono), la concentración de nitrógeno y la incidencia de la agitación en la acumulación intracelular del PHA. Posteriormente, con las mejores condiciones, se realizó la extracción y caracterización del PHA.

1. MARCO TEORICO

1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS

Los PHA son poliésteres derivados de ácidos hidroxialcanoicos (Figura 1) que algunas bacterias, arqueas y microalgas acumulan intracelularmente como material de reserva usualmente bajo condiciones limitantes de nutrientes esenciales como nitrógeno, fosfatos, sulfuros, oxígeno o magnesio en presencia de exceso de fuente de carbono. La acumulación de los PHA se da como polímeros líquidos, móviles y amorfos en forma de gránulo que alcanza hasta el 90% en peso seco de la célula. Este se aloja en el citoplasma, rodeado de una monocapa de fosfolípidos que contiene enzimas polimerasas y despolimerasas. En la Figura 2 se puede evidenciar la acumulación de PHA en el citoplasma bacteriano [6].

Figura 1. Estructura general de los polihidroxicanoatos.

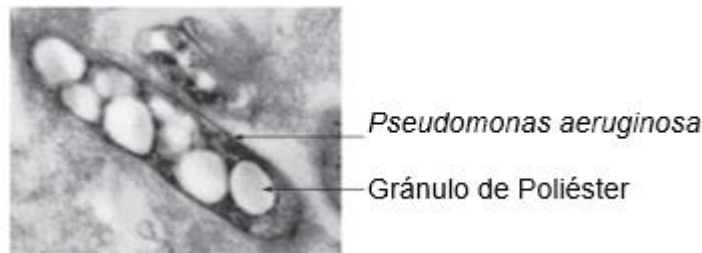


Fuente: [7]

Los PHA tienen propiedades similares a las de los termoplásticos sintéticos como el polipropileno, pero estas dependen de la cadena de monómeros que los conforman, lo que hace que sus características físicas y químicas varíen [8] (Figura 1). Los PHA se clasifican de acuerdo con la naturaleza por sus unidades monoméricas, si el polímero está formado por un sólo tipo se denomina homopolímero, si está integrado por dos monómeros con distinta longitud de átomos de carbono en el mismo gránulo se denomina copolímeros, si los monómeros que forman el polímeros poseen cada uno de

3-5 átomos de carbono se conocen como PHA de cadena corta y PHA de cadena media cuando contienen de 6-14 átomos de carbono [9].

Figura 2. Imagen por microscopía electrónica donde se muestra la acumulación de PHA por *Pseudomonas aeruginosa*.



Fuente: [4]

1.2 PRODUCCIÓN MICROBIANA DE PHA

Se efectúa por medio de una cepa pura o un consorcio de microorganismos, en procesos por lotes o continuos. Para producir PHA con una cepa pura, primero se realiza una etapa de crecimiento celular en un medio estéril el cual contiene una fuente de carbono y otros nutrientes. En la segunda etapa se limita algunos de los nutrientes esenciales dando lugar a la acumulación de PHA [9]. Dentro del grupo de microorganismos productores de PHA se destacan algunas bacterias Gram negativas las más utilizadas a escala industrial que manejan un porcentaje de acumulación entre 80 y 96% como *Wautersia eutropha*, *Methylobacterium organophyllum*, *Pseudomonas oleovoransy*, así como también se reportan algunas Gram positivas de los géneros *Clostridium*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Bacillus* [6].

En la literatura se ha reportado que cepas del género *Rhizobium* sp, las cuales son Gram negativas y fijadoras de nitrógeno [10], son capaces de acumular PHA aproximadamente hasta el 50% del peso de biomasa seca, usando los gránulos de PHA como una reserva de energía para ser utilizada en el proceso

de simbiosis [11]. Por otra parte, cepas de *Rhizobium sp.* genéticamente modificadas alcanzan un porcentaje de acumulación entre 55% a 61% teniendo mayor ventaja tanto de supervivencia como de producción de P3HB y PHV [12].

Por otro lado la producción de PHA usando cultivos mixtos ofrece una ventaja frente a los anteriormente descritos ya que las condiciones de esterilidad no son necesarias. Los consorcios productores de PHA se pueden obtener por medio de lodos activados provenientes de plantas de tratamiento residual [9].

Las variables más influyentes en la producción de PHA son: la temperatura, el tiempo de crecimiento del cultivo, la cantidad de oxígeno relacionada con la agitación, la cantidad de fuentes de carbono y nitrógeno y la concentración de nutrientes secundarios [9], en la investigación se seleccionó como variables de análisis la concentración de la fuente de carbono, la concentración de nitrógeno, la agitación y la interacción entre estas, ya que el microorganismo tiene una temperatura específica de crecimiento.

1.3 EXTRACCIÓN DE LOS PHA

La obtención de PHA requiere de tres etapas: pretratamiento, extracción y purificación. El pretratamiento consiste en la separación de la biomasa del medio de cultivo, la extracción por su parte, está relacionada con la disolución del PHA en el solvente adecuado, el cual puede ser cloroformo, diclorometano, 1,2-dicloroetano o piridina. En el último paso, la purificación del PHA se debe llevar a cabo empleando mezclas solventes. Existen numerosos métodos de extracción entre los cuales se destacan la extracción con una solución de hipoclorito de sodio y diclorometano ya que este ofrece mayor porcentaje de pureza y recuperación, con una baja degradación del polímero [9].

2. METODOLOGIA

La metodología empleada se describe brevemente en la Figura 3.

Figura 3. Metodología para la producción del polímero PHA con la cepa *Rhizobium sp.*



2.1 PRUEBAS PRELIMINARES

2.1.1 Curvas de crecimiento en diferentes medios de cultivo. En un trabajo preliminar del grupo CINBIN se comparó la acumulación intracelular de PHA por unidad de masa en diferentes medios y se encontró que *Rhizobium sp.* acumula más PHA en medio mínimo de sales con glicerol crudo como fuente de carbono (MSMGC) [12] (Anexo A). Sin embargo, en ese trabajo no se determinó el crecimiento celular en los medios estudiados. Por lo tanto, se evaluó el crecimiento de *Rhizobium sp.* en medio MSMGC [13], medio mínimo de sales con glicerol puro (MSMGP), medio mínimo de sales con una concentración 10 veces mayor de nitrógeno (MSMN2) y medio Luria Bertani (LB) [14].

Se realizaron dos precultivos de *Rhizobium* sp. en Erlenmeyer de 250 ml con 25 ml de LB a 30 °C, 180 rpm por 24 h, se evaluó la densidad óptica (DO) a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV/VIS Lambda 25 (Perkin Elmer, USA) y se calculó el volumen de cultivo necesario para inocular en Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de cada uno de los medios a evaluar para que tuvieran una DO inicial de 0,1, la absorbancia medida por el equipo se relaciona con la turbidez producida por el crecimiento celular. Los cultivos se incubaron a 30°C y 180 rpm en un baño de María con agitación TSBS40 (TECHNE, USA). Se tomaron datos de DO para el cultivo con intervalos de 6 y 12 horas durante 9 días para poder conocer cada una de las fases del crecimiento celular.

2.1.2 Efecto de la concentración de glicerol en el crecimiento celular. Se realizaron dos cultivos a partir de colonias individuales en medio MSMGC en tubos de ensayo de 12 ml a diferentes concentraciones de glicerol crudo: 5, 10, 20 40 y 80 (g/L), se mantuvo la temperatura en 30°C y se agitó a 180 rpm en un baño de María durante 48 h. Al final de la incubación se evaluó la DO a 600 nm de cada uno de los cultivos esperando que a dicho tiempo la bacteria ya se hubiera acoplado a la fuente de carbono y se encontrara en su fase exponencial.

2.2 PRODUCCIÓN DE PHA

El Para determinar la influencia de la concentración de nitrógeno, agitación y concentración de glicerol en la producción de PHA por *Rhizobium* sp., se realizó el diseño de experimentos 2^k [15] descrito en la Tabla 1. Se utilizó el software llamado STAT EASE para encontrar cuales variables o combinación de ellas influyen en la producción de PHA junto con el análisis ANOVA [15]

Tabla 1. Diseño de Experimentos 2^k

Variables	Nivel Bajo	Nivel Alto
Nitrógeno N ₂	0,1NH ₄ Cl [g/l]	1 NH ₄ Cl [g/l]
Agitación	Sin agitación	180 rpm
Glicerol crudo	10 [g/l]	80 [g/l]
Total de número de variables	3	
Diseño 2 ^k	2 ³	
Total de experimentos a realizar	8	
Duplicado de Experimentos	16	

Tabla 2. Matriz de experimentos.

Experimentos	A- Concentración Nitrógeno	B- Agitación	B- Concentración Glicerol crudo
NB G 10 A	1 g/l	180 rpm	10 g/l
NB G 80 A	1 g/l	180 rpm	80 g/l
NA G 10 S	10 g/l	0 rpm	10 g/l
NB G 10 S	1 g/l	0 rpm	10 g/l
NA G 80 A	10 g/l	180 rpm	80 g/l
NB G 80 S	1 g/l	0 rpm	80 g/l
NA G 80 S	10 g/l	0 rpm	80 g/l
NA G 10 A	10 g/l	180 rpm	10 g/l

El crecimiento se llevó hasta el séptimo día, tiempo en donde se da la etapa estacionaria, bajo la cual se acumula la mayor parte del polímero [12]. Se realizaron mediciones de la DO a las 18 h y al séptimo día, y se tomaron muestras del cultivo para las pruebas de cuantificación del polímero.

2.3 CUANTIFICACIÓN DEL POLÍMERO

El porcentaje de PHA acumulado en la masa celular seca se evaluó mediante un análisis termogravimétrico (TGA) [16] efectuado con la Balanza Termogravimétrica (Discovery TGA 1-0207, USA). El TGA permite medir la pérdida de peso de una muestra a medida que transcurre el tiempo dando cambios programados a la temperatura de la muestra [17]. Debido a que el PHA es un producto intracelular, la técnica de TGA puede cuantificar la cantidad de biopolímero acumulado en las células, conociendo la temperatura de descomposición del mismo, del contenido bacteriano y de las sustancias volátiles en este caso agua logrando relacionar las pérdidas de peso con estas temperaturas y así conocer el porcentaje de acumulación de polímero sin necesidad de una extracción previa. Según la literatura los PHA se descomponen en un intervalo de 200 a 350 °C [18].

2.4 EXTRACCIÓN DEL PHA

Se seleccionó el medio con el que se alcanzó el mayor porcentaje de acumulación de PHA según los resultados del TGA, para luego extraer el polímero en estas condiciones. Se centrifugaron 50 ml de cultivo a 15000 g, durante 30 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, luego a la masa celular se adicionó 100 ml de una solución de hipoclorito de sodio con diclorometano al 50% (v/v) por cada gramo de biomasa recuperada, se agitó durante una hora. Posteriormente se dejó decantar por 12 horas recuperando la fase orgánica, se precipitó el polímero usando metanol frío dejándolo secar a temperatura ambiente hasta alcanzar un peso constante [19].

2.5 CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO

2.5.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC). Permite determinar las propiedades térmicas de los polímeros como el punto de fusión y la temperatura de transición vítrea. Se usó el Calorímetro Diferencial de Barrido DSC 1-0237 [20] (Discovery, USA) en modo estándar con una rampa de calentamiento de 20 °C/min, desde 30 °C hasta 115 °C para eliminar el agua presente en la muestra, estabilizando la temperatura en -20 °C, y terminando con una rampa de calentamiento de 3 °C/min hasta alcanzar 225 °C.

2.5.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). La FTIR [21] se utilizó para detectar los grupos funcionales en los PHA, usando el espectrómetro FTIR-A8400S (Shimadzu, Japón) en modo de transmitancia con un rango de número de onda de 4000 cm^{-1} a 40 cm^{-1} . Se tomó una muestra de polímero extraído y comercial obteniendo un espectro para cada uno.

3. RESULTADOS Y ANALISIS

3.1 PRUEBAS PRELIMINARES

3.1.1 Curva de crecimiento. El experimento evidenció el crecimiento de la cepa en las distintas fuentes de carbono. En la Figura 4 y en la Tabla 3 se pueden observar el crecimiento de *Rhizobium* sp. en cada medio, así como la velocidad de crecimiento específica para cada uno de ellos.

Figura 4. Crecimiento de *Rhizobium* sp en diferentes medios de cultivo.

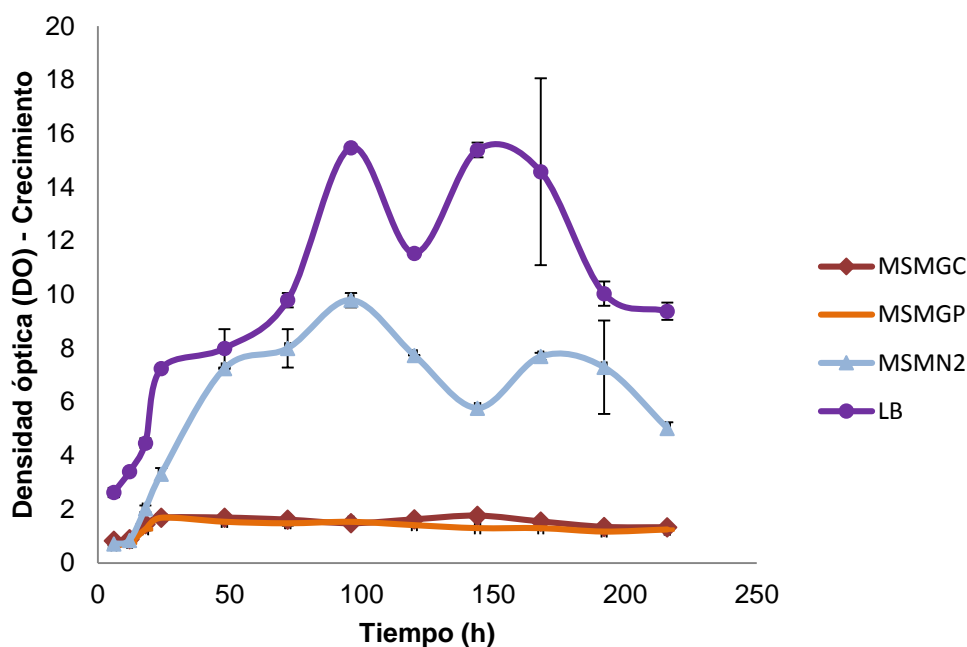


Tabla 3. Velocidad de crecimiento específica para cada medio.

Medios de Cultivo	Umax [h ⁻¹]	Ajuste lineal
MSM GC	0,093	0,999
MSM GP	0,0836	0,9999
MSM N2	0,1758	0,9984
MEDIO LB	0,2484	0,9538

Fuente: Autores

La cepa tuvo su fase exponencial entre las 0 y 24 horas para los medios con bajo contenido de nitrógeno (MSMGC y MSMGP) y hasta las 100 horas para los medios ricos en nitrógeno (LB y MSMN2). En el medio complejo LB se obtuvo un crecimiento en promedio 10 veces mayor que en los medios mínimos bajos en nitrógeno MSMGC y MSMGP. La relación del DO para el cultivo LB frente al del MSMN2 fue de 1,6. Según la literatura [3], la biosíntesis de los PHA se da en condiciones de estrés para los microorganismos donde hay deficiencias causadas por falta de nutrientes, tales como fósforo, nitrógeno, elementos traza, u oxígeno y un exceso de fuentes de carbono. Para *Rhizobium* sp. la limitación de nitrógeno es la que permite una mejor producción. Aunque el medio LB es el medio en el que obtuvo el mayor crecimiento celular, el porcentaje de acumulación en base seca del polímero no supera el 10% [12].

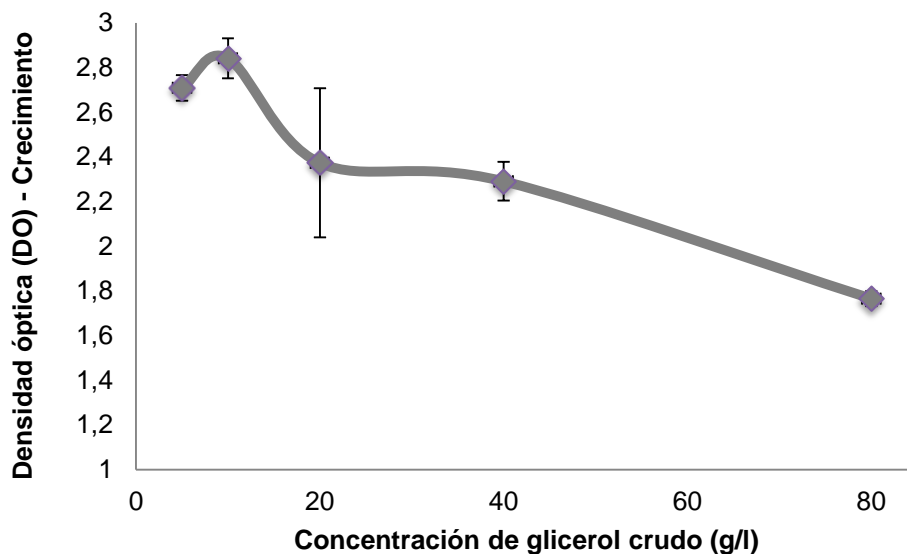
Las velocidades de crecimiento en cada medio me indican qué tan rápido crece la cepa con o sin limitaciones de nutrientes, dentro de estas, se evidencia que el medio MSMGC tiene una mayor velocidad de crecimiento con respecto a las otras, siendo este medio el que favorece el crecimiento de *Rhizobium* sp.

Los resultados obtenidos por los medios MSMGC y MSMGP son similares, sin embargo el glicerol comercial ha perdido valor debido al incremento de la producción de glicerol crudo como subproducto en la elaboración de biocombustibles, generando un problema de disposición. Estudios anteriores [12] demostraron que el MSMGC presenta mayor porcentaje de acumulación de PHA frente a los otros medios trabajados en el proyecto, por tal motivo se escogió como medio de cultivo para este trabajo al MSMGC y así poder aprovechar el glicerol crudo como sustrato para la producción de PHA.

3.1.2 Crecimiento de la cepa *Rhizobium* sp. en diferentes concentraciones de glicerol crudo. Se evaluó el efecto de la concentración de glicerol crudo (fuente de carbono) en el crecimiento celular (Figura 5)

Rhizobium sp. puede crecer en concentraciones entre 5 y 80 g/l de glicerol crudo. El crecimiento celular aumenta a medida que aumenta la concentración de glicerol crudo en el intervalo de 5 a 10 g/l y disminuye en el intervalo de 10 a 80 g/l de glicerol crudo. La concentración con mayor crecimiento celular fue 10 g/l y la menor fue 80 g/l, estas dos concentraciones se utilizaron en el diseño de experimentos (Tabla 1).

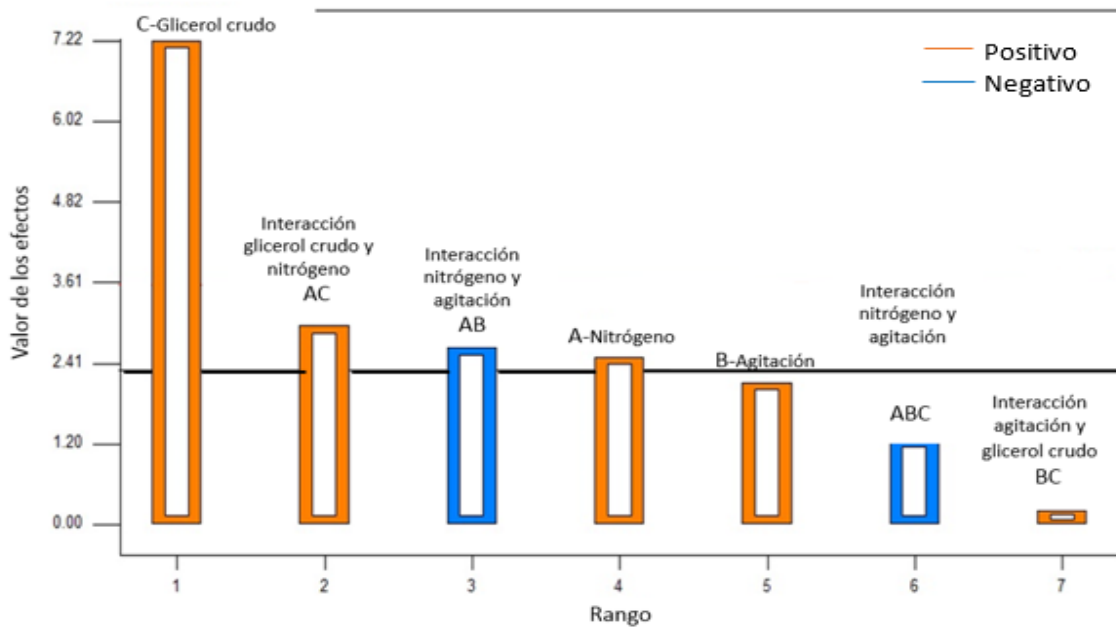
Figura 5. Crecimiento de *Rhizobium* sp. en medio MSMGC con diferentes concentraciones de glicerol crudo



3.2 PRODUCCIÓN DE PHA

Se realizó un análisis de varianza ANOVA para conocer el efecto de las variables así como las interacciones relevantes de cada una de ellas. Las variables se identifican de la siguiente manera: A- Concentración de nitrógeno, B-Agitación, C- Concentración glicerol crudo. La figura 6, muestra los diferentes efectos.

Figura 6. Diagrama de Pareto para el análisis ANOVA

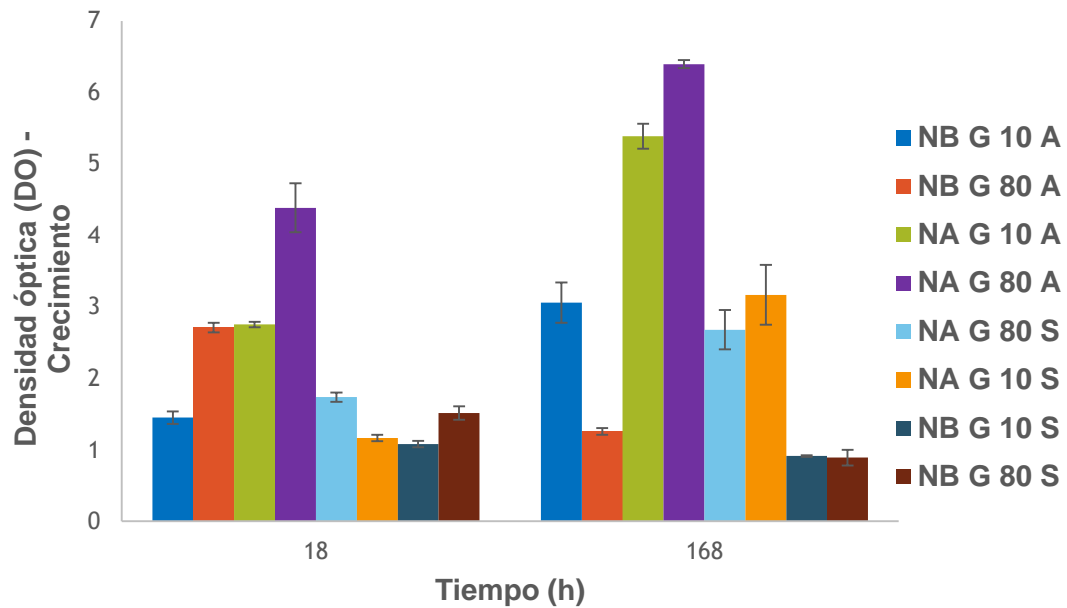


Según el ANOVA, los valores $P < 0.05$ indican que existe diferencia significativa de las variables. De acuerdo con el valor P de cada variable (ver anexo B), se infiere que concentración de glicerol crudo, nitrógeno y las interacciones entre las variables AB y AC, tienen incidencia significativa sobre la producción de PHA. Por otro lado la variable agitación por sí sola no presenta incidencia significativa, así como la interacción entre BC y ABC. Este resultado puede explicarse debido a que posiblemente a altas concentraciones de nitrógeno y a altas cantidades de carbono en la cepa *Rhizobium sp.* mejora su crecimiento y evita la inhibición por sustrato.

La Figura 7 muestra el crecimiento celular en las 8 diferentes condiciones (Tabla 2) a las 18 horas y a las 168 horas (7 días). La influencia de la oxigenación producida por la agitación es notable, los cultivos con agitación a 180 rpm tuvieron mayor DO que los que estaban en reposo. Los cultivos con nitrógeno bajo y una concentración de glicerol crudo de 80 g/l (NB G 80 A y NB G 80 S) tuvieron una disminución en su DO con el tiempo, este comportamiento pudo ocurrir por una limitación de nitrógeno. Las altas concentraciones de nitrógeno en los medios con agitación producen

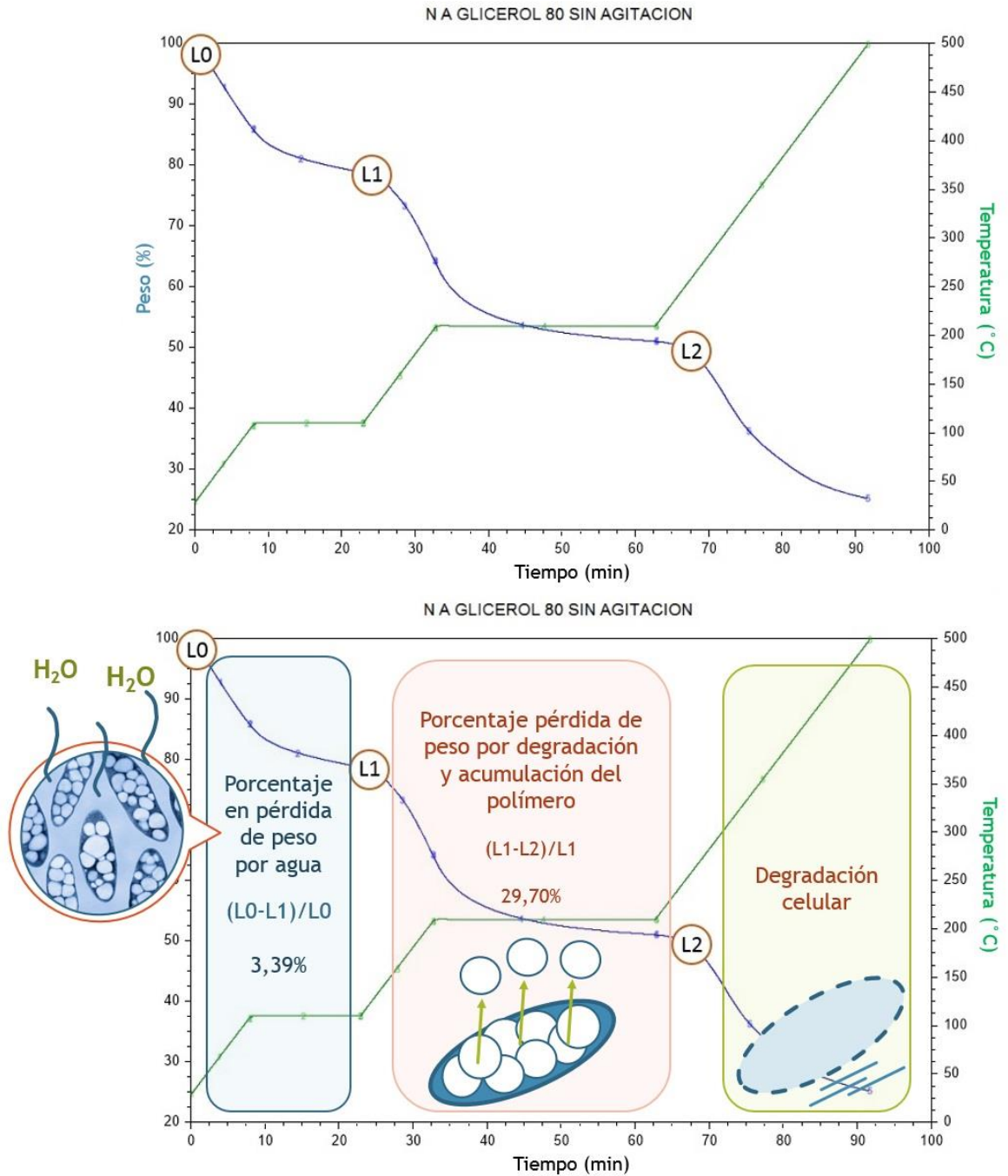
crecimientos celulares mayores en los tiempos medidos, siendo el cultivo en el medio con concentración alta de nitrógeno y glicerol y con agitación (NA G 80 A) el que alcanzó la mayor DO 6,39.

Figura 7. Gráfica de DO vs tiempo para los 8 experimentos del diseño.



Se tomaron muestras de los cultivos a los 7 días y se realizó un TGA para encontrar el porcentaje de acumulación de PHA en base seca. En la Figura 8 se muestra los resultados de TGA para el experimento NA G 80 S.

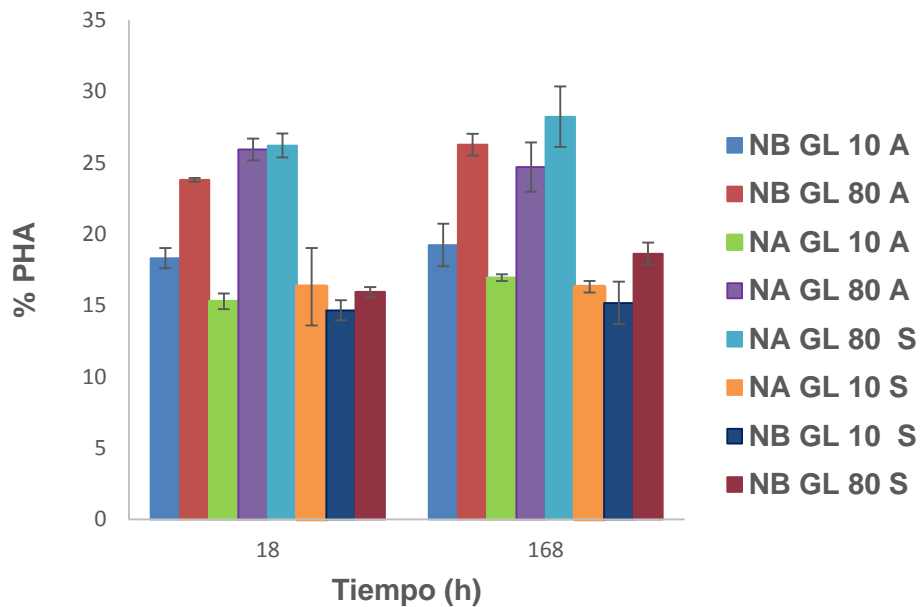
Figura 8. Análisis termogravimétrico correspondiente al cultivo del experimento NA G 80 S



La diferencia entre los puntos L0 y L1 representa la posible pérdida de peso por el agua la cual fue de 1,141 mg y la diferencia entre L1 y L2 corresponde a la pérdida de peso por degradación del polímero, lo cual ocurre después de alcanzados los 200 °C y posterior a los 280 °C se evidencia la degradación del

cuerpo celular. El porcentaje de PHA en peso seco de la muestra fue de 29,70%, ésta es la diferencia entre $(L1-L2 / L1)*100$. A continuación se ilustra en la figura 9 los porcentajes de peso seco para los cultivos realizados en tiempos de 18 y 168 horas.

Figura 9. Porcentaje de PHA acumulado en base seca.

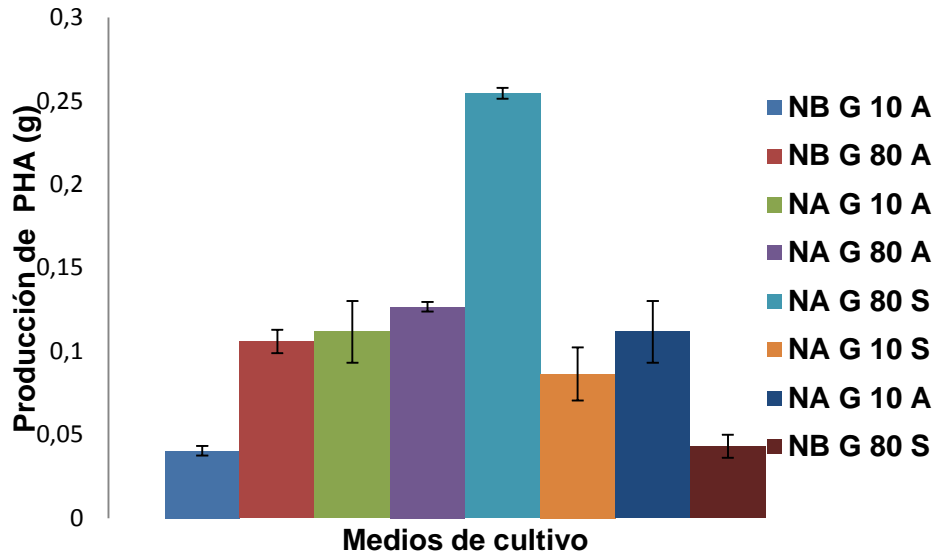


En el cultivo con la concentración alta de nitrógeno y glicerol (80 g/l), sin agitación se encontró el mayor porcentaje de PHA acumulado. Estos resultados difiere en cierta parte con la literatura que indica que bajas concentraciones de nitrógeno favorecen la acumulación de PHA pero confirman que a altas relaciones carbono/nitrógeno la acumulación aumenta debido a un alto crecimiento celular y a la alta producción de enzimas que se relacionan a la producción de PHA [10].

Para determinar la producción total de PHA se estimó la masa celular seca obtenida en cada cultivo, conociendo la masa seca utilizada en cada una de las pruebas de TGA y relacionándola con la masa húmeda obtenida de las centrifugaciones, se multiplicó por el porcentaje de acumulación de PHA en

base seca en cada medio, dando como resultado el PHA producido por la cepa (Figura 10)

Figura 10. Producción de PHA



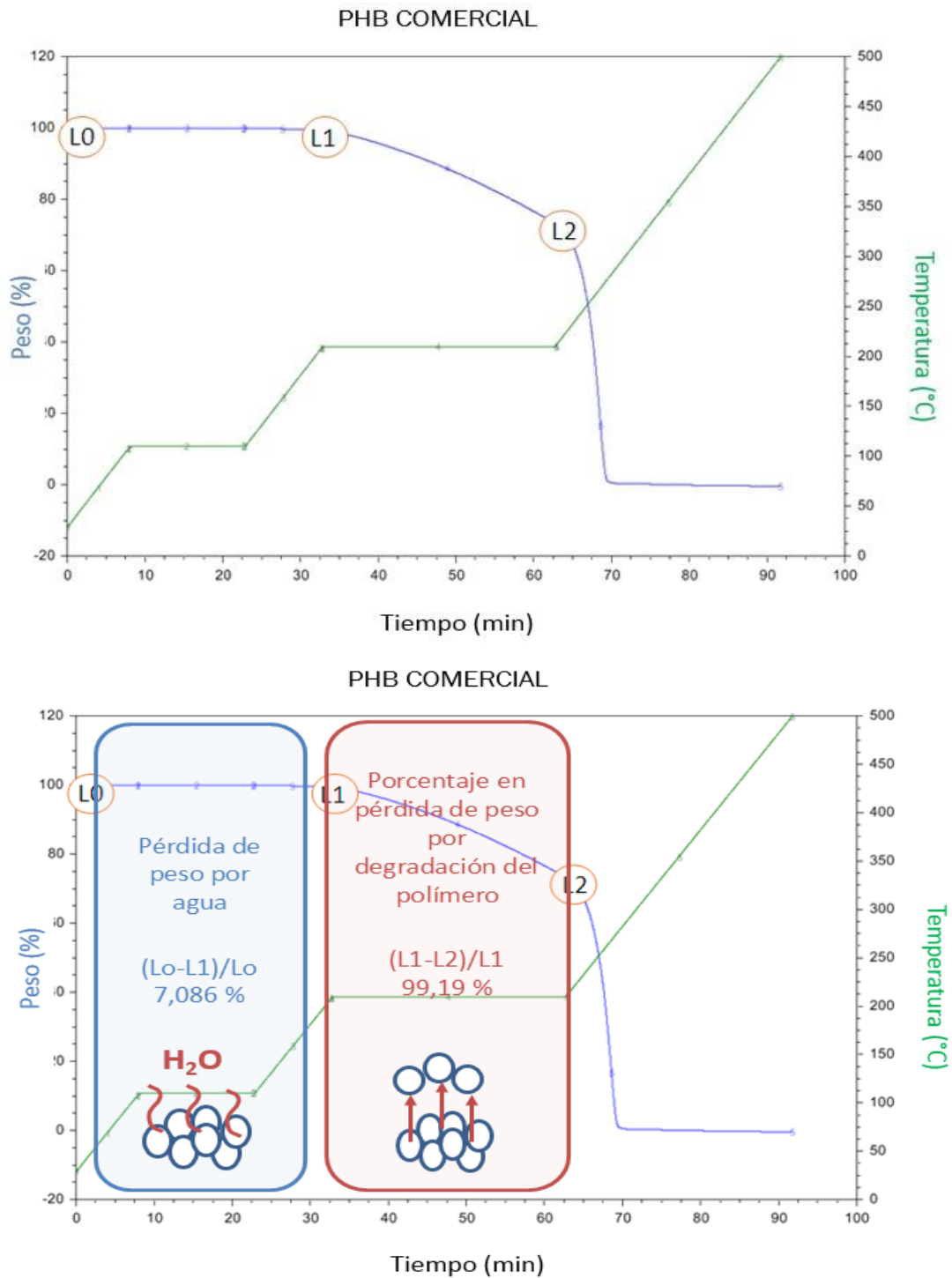
Para un medio de cultivo de 50 ml, la mayor producción se alcanza con el medio que tiene una concentración de 80 g/l de glicerol crudo, altos niveles de nitrógeno y sin agitación, obteniendo 0,2568 g es decir una concentración de 5,13 (g de polímero) / (l de cultivo), esta concentración está cercana al 30 por ciento de producción obtenida por bacterias utilizadas a escala industrial. Los medios que contienen nitrógeno alto y glicerol alto presentaron mayor acumulación de PHA (Figura 9) así como mayor producción de polímero (Figura 10), infiriendo que la combinación entre estas variables favorece la producción de PHA.

3.3 CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO PHB OBTENIDO.

3.3.1 Paralelo entre el análisis termogravimétrico del polímero obtenido y el PHB comercial. Estudios anteriores [12] identifican que el PHB es el producto principal en procesos donde se utiliza como materia prima glicerol

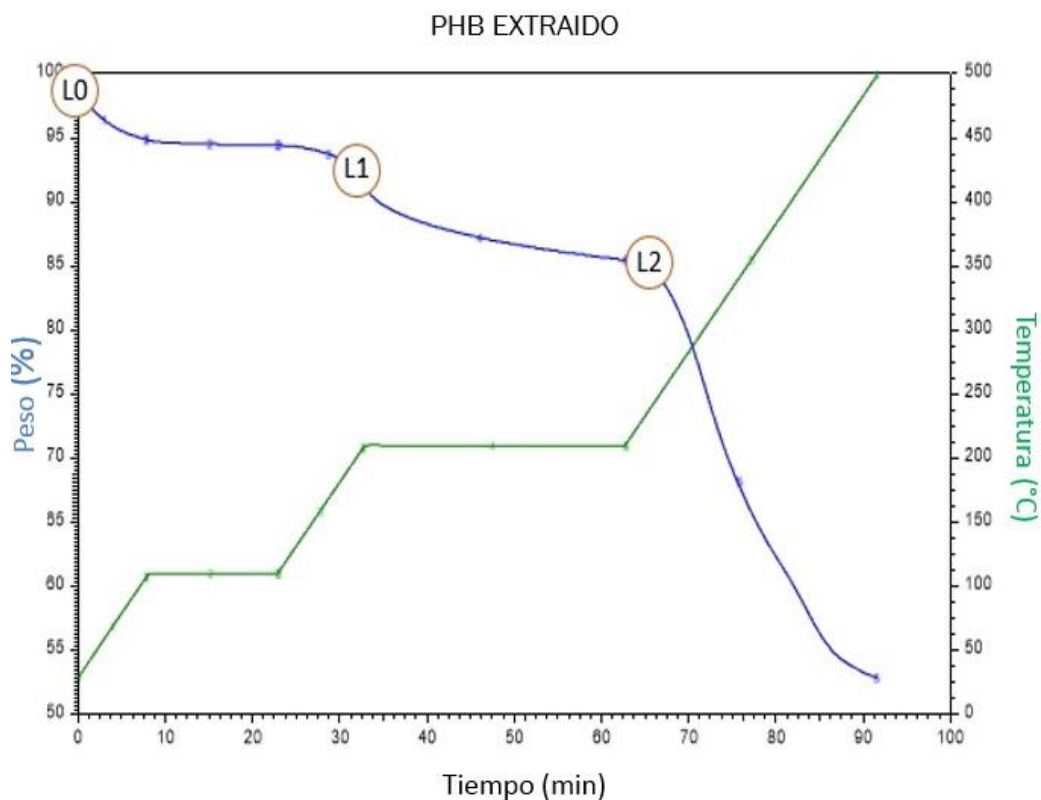
crudo. Por ende, se realizó un TGA para una muestra comercial de dicho polímero que se puede observar en la Figura 11, usando como patrón el PHB de sigma-Aldrich.

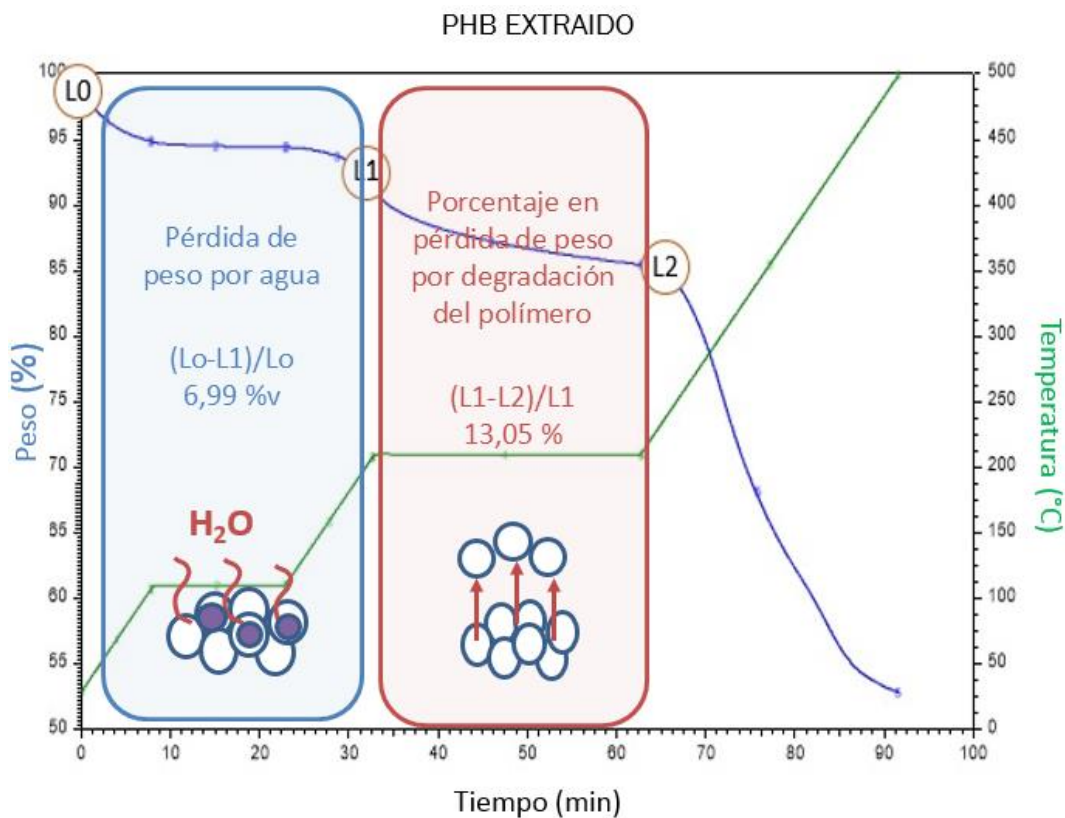
Figura 11. Análisis termogravimétrico del polímero comercial.



La pérdida de agua encontrada en el polímero fue de 0,42 mg, la cual se da en la temperatura de 29,854 °C hasta 200 °C. La pérdida de peso por degradación del polímero entre los puntos fue de 5,28 mg. Se evidencia gráficamente que la temperatura de degradación es después de 200°C porque se observa una gran pérdida de materia. El porcentaje en peso seco de la muestra fue de 99,19% ésta se alcanza entre las temperaturas 200°C y 280 °C. Estos datos fueron utilizados como parámetro de comparación con los resultados para el polímero extraído. Conjuntamente, se realizó el mismo análisis para la muestra extraída y purificada del polímero.

Figura 12. Análisis termogravimétrico del polímero extraído.

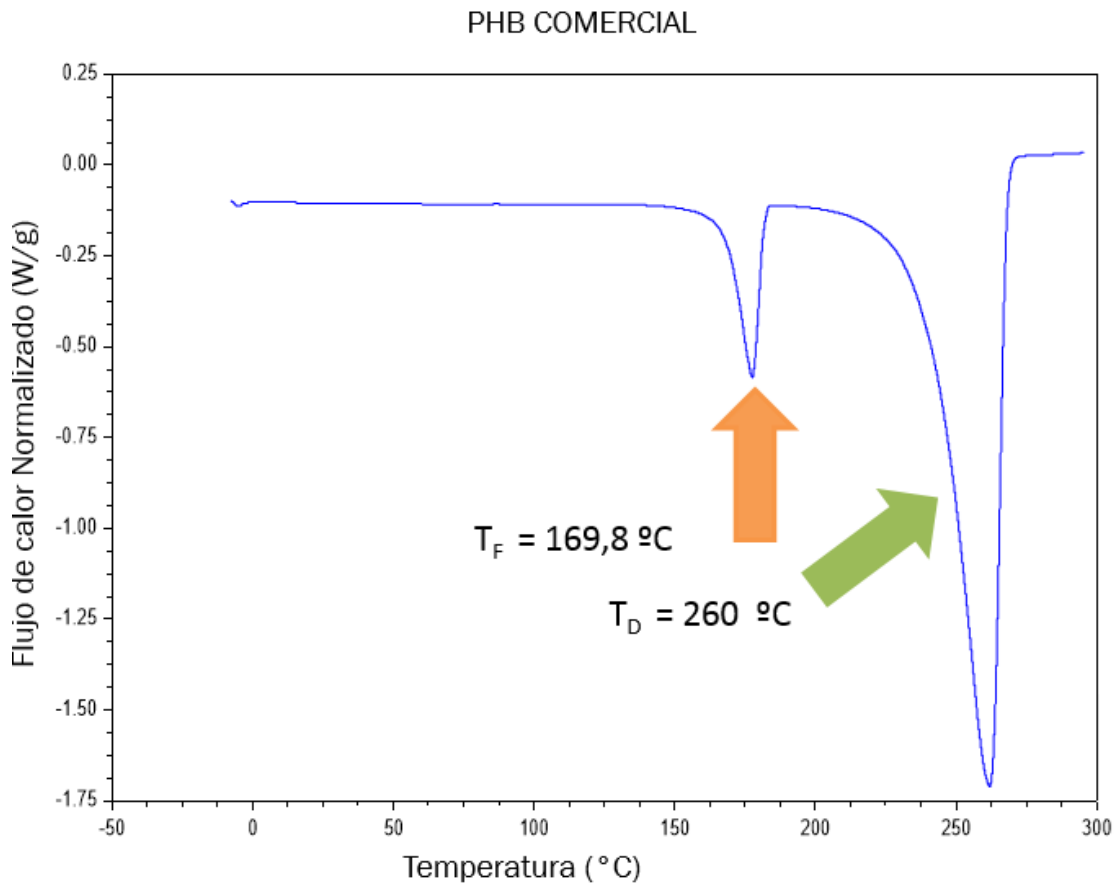




Se encontró una pérdida de agua dada por el polímero extraído de 0,0456 mg, con un porcentaje de PHA de 13,08 %. Comparando con la muestra comercial, se observa la descomposición del polímero entre 200 °C y 280 °C temperaturas similares al del PHB comercial que se utilizó como patrón de comparación. Sin embargo la pureza del PHA producido fue baja. Por otra parte, analizando los porcentajes antes y después de la extracción bajo las mismas condiciones (Figura 8 y 12), se halló una disminución de casi 10% en el peso seco perdido probablemente por errores que dependen del gran número de variables no controladas durante la extracción o que el método de extracción escogido no es el más adecuado a escala laboratorio.

3.3.2 Prueba de calorimetría diferencial de barrido (DSC) del polímero comercial y el obtenido PHB: La prueba DSC para el PHB comercial arrojó el resultado mostrado en la Figura 13.

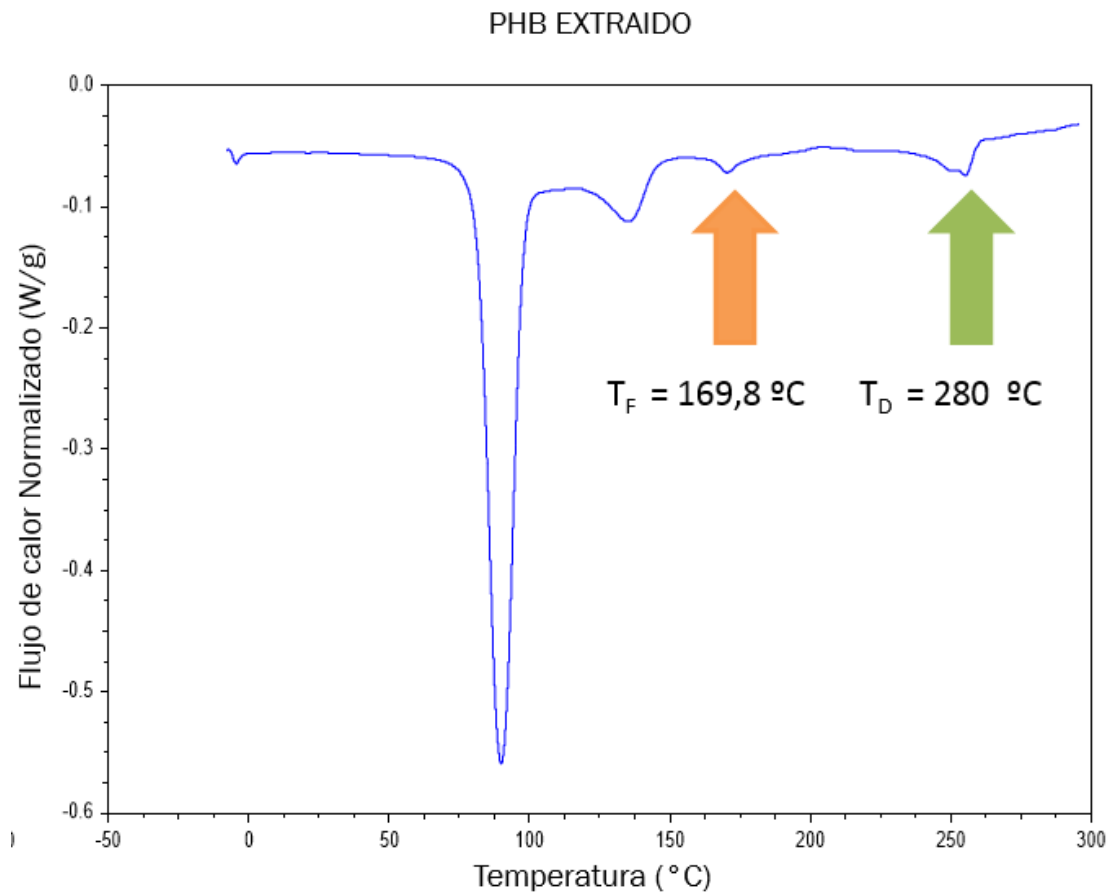
Figura 13. Calorimetría Diferencial de Barrido DSC del PHB comercial.



El termograma obtenido para el PHB comercial, muestra un leve enfriamiento al minuto 25 se observa pequeños cambios ubicados entre -5 y 5 °C los cuales se relacionan con la temperatura de transición vítrea polímero. El primer pico se encuentra a 169,8 °C, el cual representa la temperatura de fusión del polímero que está muy cercano a los 175 °C [5]. El segundo pico se observa a 260 °C donde empieza a degradarse el PHB, después de dicho pico no se observan cambios en el flujo de calor, este termograma fue utilizado como parámetro de comparación con el obtenido en el laboratorio.

Por otro lado, para comparar el polímero obtenido con el comercial se le hizo la misma prueba de DSC. La Figura 14 muestra el comportamiento del polímero extraído.

Figura 14. Prueba de Calorimetría DSC del polímero extraído.



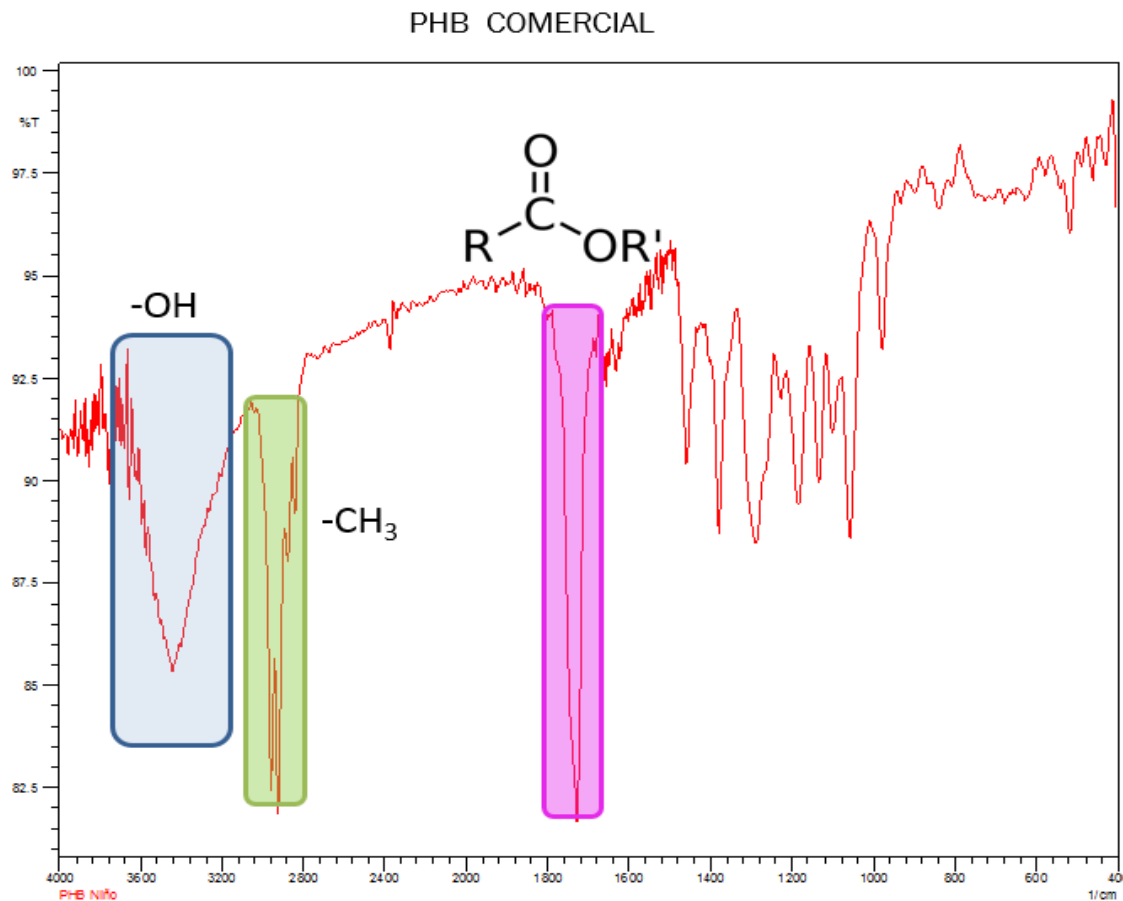
En la Figura 14 se observa el termograma obtenido para la muestra del polímero extraído, el cual presenta algunos picos similares a los observados en la caracterización del polímero comercial. El primero ubicado entre -10 y 0 $^\circ\text{C}$ corresponde a la temperatura de transición vítrea del polímero, el segundo pico está muy cercano a los $89,5^\circ\text{C}$ tratándose posiblemente del comportamiento de algunos de los reactivos usados para la extracción como agua, hipoclorito y metanol, la longitud del pico se da por una alta concentración de estas sustancias y la baja acumulación de PHA. El cuarto

pico se observa a los 171 °C temperatura de fusión del P3HB, el último pico cercano a los 280 °C corresponde al material polimérico degradado [19].

Comparando los resultados para los dos polimeros se encuentra que existe una similitud entre los picos característicos del P3HB los cuales corresponden a los picos de temperatura de transición vitrea y la temperatura de fusión del P3BH.

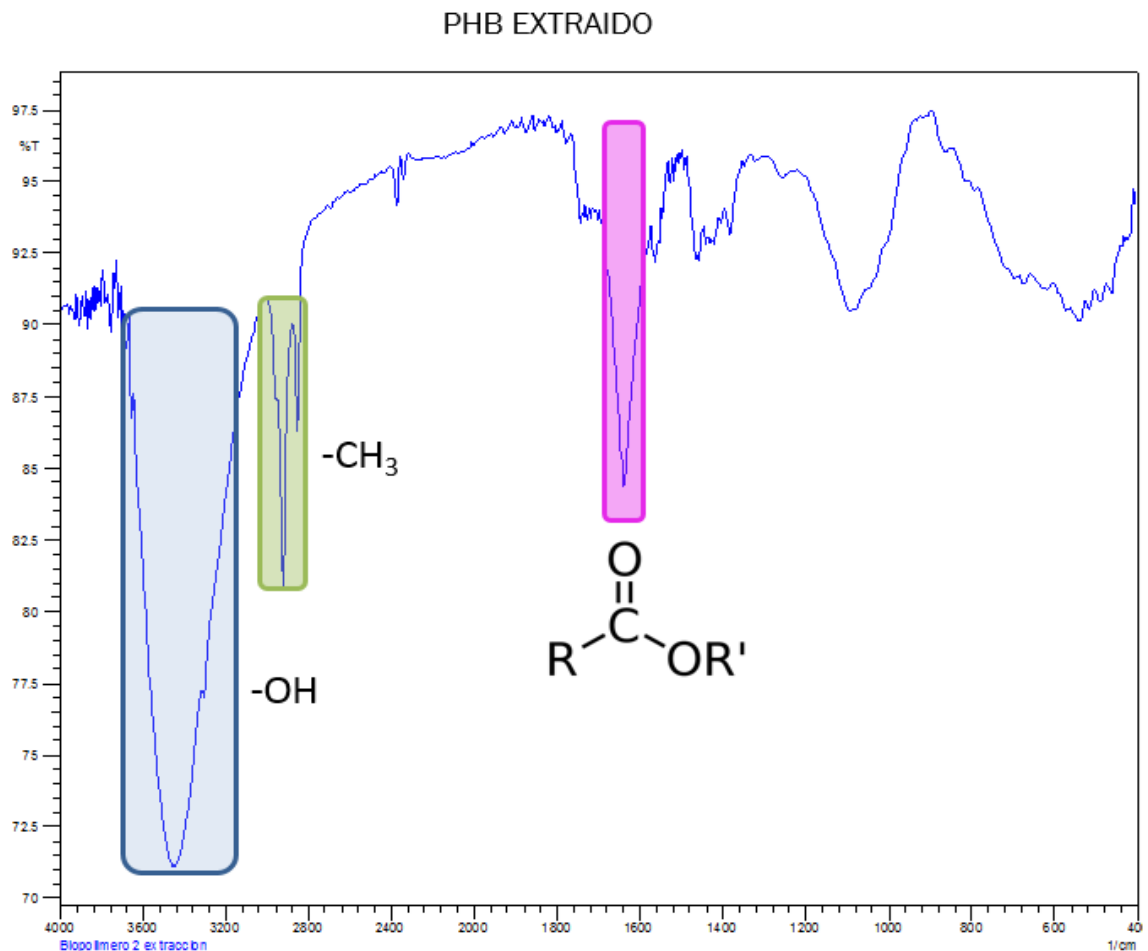
3.3.3 Prueba de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) del polímero obtenido PHB y el polímero comercial: El análisis de infrarrojo de Fourier realizado para el polímero comercial generó el esquema presentado en la Figura 15.

Figura 15. Análisis FTIR para el polímero Comercial.



El análisis de espectroscopía infrarroja para la muestra del polímero comercial, tiene la finalidad de mostrar los grupos funcionales característicos generando un patrón de comparación frente a la muestra de PHB obtenida en el laboratorio. En la Figura 15 se presenta el análisis del polímero comercial, donde el pico observado entre 3600 [cm⁻¹] y 3200 [cm⁻¹] simboliza el grupo funcional O-H, alcohol o ácido carboxílico característico de ciertas terminaciones de los poliésteres, el pico con bandas variables encontrado en 2900 [cm⁻¹] corresponde al grupo metilo correspondiente a una de las ramificaciones del P3HB y el pico en el punto 1720 [1/cm] es debido al grupo éster (C=O).

Figura 16. Análisis FTIR para el polímero Extraído



La muestra extraída en el laboratorio (Figura 16) tiene un espectro similar al del polímero comercial, el pico observado entre $3600 \text{ [cm}^{-1}\text{]}$ y $3000 \text{ [cm}^{-1}\text{]}$ representa al grupo funcional O-H, alcohol o ácido carboxílico, , también hay un pequeño pico en la región de los $2850 \text{ [cm}^{-1}\text{]}$ que representa el grupo metilo, el pico que se encuentra en $1650 \text{ [cm}^{-1}\text{]}$ permite predecir la existencia de un grupo éster o uno cetona parecido al encontrado al análisis de referencia, además hay ciertas ondulaciones entre $1500 \text{ [cm}^{-1}\text{]}$ y $1400 \text{ [cm}^{-1}\text{]}$ llamadas banda amida que se da al haber ciertas proteínas celulares, dado que la extracción no produjo un polímero totalmente puro.

4. CONCLUSIONES

Las variables que presentaron mayor influencia según el análisis ANOVA fueron la concentración alta de nitrógeno (A), la concentración de glicerol crudo (C) y la interacción entre ellas (AC), teniendo efecto significativo sobre el porcentaje de acumulación de PHA.

La mayor acumulación de PHA dentro del citoplasma celular se presenta a una concentración de 80 g/l de glicerol crudo y una concentración de 1 g/l de nitrógeno para el crecimiento sin agitación de la cepa *Rhizobium* sp

Las pruebas de caracterización sugieren que el polímero producido por *Rhizobium* sp es PHB.

5. RECOMENDACIONES

En las diferentes pruebas realizadas, se predice una producción de polímeros diferentes al PHB, es necesario continuar con la investigación de la misma cepa en medios de cultivo similares utilizando pruebas de caracterización distintas que puedan identificar de manera exacta los productos creados por la bacteria como también analizar el efecto de otras variables en la producción de PHA.

Todos los volúmenes utilizados fueron a escala de laboratorio, es importante utilizar cantidades mayores de sustrato para obtener más producto y así poder predecir qué tan viable son estos procesos en situaciones industriales.

La cepa *Rhizobium sp.* presenta un bajo porcentaje de acumulación de PHA, por lo tanto, se podría encontrar y trabajar con cepas diferentes, que tengan la capacidad de producir más cantidad de polímero para poder acercarse a resultados superiores de tal manera que se pueda competir comercialmente con los plásticos utilizados comúnmente.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CASTILLO FRANCO, Diego Armando. Tesis de grado. Efecto del GEN *fadH1* en la producción de PHA conteniendo monómeros insaturados por *Pseudomonas putida*. Universidad Pontificia Javeriana. Sao Paulo, Brasil. Noviembre 2008.
- [2] 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. Dirección de Desarrollo Sectorial Sostenible. República de Colombia. Bogotá, Junio 2004.
- [3] NUÑEZ, German Enrique. Confidencial Colombia, Sector de plásticos. Agosto 31 de 2012. Disponible en: [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).
- [4] SERRANO RIAÑO, Julieth Yadira. Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. Revista Teoría y praxis investigativa. Volumen 5. Diciembre 2010.
- [5] VERLINDEN, R.A.J; HILL, D.J. Bacterial synthesis of biodegradable of polyhydroxyalkanoates. University of Wolverhampton. Wolverhampton, UK. 21 Noviembre 2006.
- [6] GONZÁLEZ GARCÍA, Yolanda. Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. Rev. Int. Contam. Ambie. 29 (1) 77-115. Universidad de Guadalajara. México. 2012
- [7] NARANJO, Javier Mauricio. Producción de polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales. Universidad Nacional de Colombia. Manizales. 25 de Mayo 2010.
- [8] GRADOS TORREZ, Ricardo Enrique. Tesis de grado. Digestión anaeróbica de desechos agrícolas por consorcios microbianos para la producción de

polihidroxicanoatos. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia. 2008.

[9] GOMEZ CARDOZO, Javier Ricardo. Tesis de grado. Producción y caracterización de polihidroxicanoatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 2013.

[10] LAKSHMAN Kshama; RAMACHANDRAN SHAMALA Tumkur. Enhanced biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in a mutant strain of *Rhizobium Meliloti*. Department of Food Microbiology. Biotechnology Letters. Netherlands. 22 August.

[11] LAKSHMAN Kshama; 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. Process Biochemistry. Volumen 39. Elsevier. 29 de octubre.

[12] BERMÚDEZ MÁRQUEZ, Richard Alexander; ORDÓÑEZ FRANCO, María Carolina. Biosíntesis bacteriana de polihidroxicanoatos a partir de glicerol crudo. Universidad Industrial de Santander. 2014.

[13] M. Berlanga, M. T. Montero, J. Hernandez-Borrell y R. Guerrero, «Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats.»

[14] J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., spring harbor: cold spring harbor laboratory press, 1989.

[15] MONTGOMERY, Douglas C. Probabilidad y estadística para ingeniería y administración. Editorial Continental. Tercera Edición. México. 1996.

[16] FIACO GARCÍA, José Fernando. Evaluación de los modelos de degradación de los polímeros basados en la lignina. Universidad Politécnica de Valencia. 2011.

[17] RODRIGUEZ, Ellen. Caracterización de polímeros aplicando el método termogravimétrico. LanammeUCR. 30 de julio de 2012.

[18] LEHRLE', Roy S; WILLIAMS, Robert J. Thermal degradation of bacterial poly(hydroxybutyric acid): mechanisms from the dependence of pyrolysis yields on sample thickness. University of Birmingham. April 19 de 1994.

[19] BECERRA JIMÉNEZ, Mónica Liliana. Producción de un polímero tipo polihidroxialcanoato (PHA) empleando residuos de la producción de biodiesel. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 2013.

[20] ANÁLISIS TÉRMICO. Calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico.

[21] SERRANO MARTINEZ, Jose Luis. Curso de instrumentación y métodos de análisis químico. Espectroscopía infrarroja 2- equipos y preparación de muestras.

BIBLIOGRAFÍA

ANEJA, P; CHARLES, T.C. Poly-3-Hydroxybutyrate Degradation in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*: Isolation and Characterization of a Gene Encoding 3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase. En: Journal of Bacteriology. Quebec. Feb. 1999, p. 849–857 Vol. 181, No. 3. 0021-9193/99/\$04.0010

BANACORE, Analía. Producción de polihidroxialcanoatos (pha) por *Bacillus* sp. utilizando glicerol como fuente de carbono. Instituto de Ingeniería Química. Departamento de Bioingeniería. Montevideo, Uruguay.2001.

BELLO, Daniel; ZINN, Manfred. Aislamiento y caracterización de Poli-B-hidroxibutirato obtenido por vía fermentativa a partir de *Bacillus megaterium*. En: Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Cuba. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. XLII, núm. 1-3, Enero-Diciembre, 2008, pp. 101-105. ISSN 0138-6204.

CARRASCO, F. Los polihidroxialcanoatos. Plásticos biodegradables producidos por microorganismos. Universidad de Girona. Dpto de Ingeniería Química, Agraria y Tecnología Agroalimentaria. España. Junio 2004, p. 244-251.

CERRONE, Federico. Producción de poliésteres biopoliméricos (PHAs) desde alpeorajo por medio de bacterias fijadoras de nitrógeno. Universidad de Granada. Dpto de Microbiología. España. Febrero de 2011.

JINDAL, Parul. Biosynthesis of PHA and it's copolymers. En: International Journal of Scientific and Engineering Research. August 2013, Volume 4, Issue 8. ISSN 2229-5518

ANEXO A. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL GLICEROL CRUDO.

Tabla A1. Propiedades Físico-Químicas del Glicerol Crudo

PARÁMETRO FÍSICOQUÍMICO	
pH	6.135 ± 0.05
Densidad [g/cm ³]	1.275 ± 0.001
Humedad [%]	10.52 ± 0.01
Jabones [%]	13.90 ± 0.05
Metales [mg/Kg]	
Sodio (Na)	22850 ± 3860.8
Potasio (K)	46.705 ± 3.542
Calcio (Ca)	17.090 ± 1.782
Magnesio (Mg)	8.616 ± 0.684
Cenizas [%p/p]	3.489 ± 0.424
Glicerol [%p/p]	75 ± 1.414
Metanol [%p/p]	0.025 ± 0.08
Esteres metílicos de ácidos grasos [%p/p]	
Ácido palmítico	63.28
Ácido esteárico	5.58
Ácido oleico	29.58
Ácido linoleico	1.56
Otros	0

ANEXO B. DISEÑO DE EXPERIMENTOS Y ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA

Se evaluó el efecto en la acumulación de PHA de las variables nitrógeno, agitación y glicerol crudo realizando un análisis ANOVA. La Tabla B1 arroja los datos de dicho análisis.

Tabla B1. Resultado de Análisis de varianza ANOVA

Factores	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
Model	487,11	7	69,58	11,46	0,001
A-Nitrogeno	37,75	1	37,75	6,21	0,037
B-Agitación	26,99	1	26,99	4,44	0,068
C- Concentración de Glicerol Crudo	316,96	1	316,96	52,19	9,02 E-05
AB	42,24	1	42,24	6,95	0,02
AC	53,39	1	53,39	8,79	0,017
BC	0,24	1	0,24	0,04	0,84
ABC	9,51	1	9,51	1,56	0,24
Error Total	48,57	8	6,07		
Cor Total	535,69	15			

A partir de los resultados de los 16 experimentos e identificando los efectos de las variables y su interacción se encontró que las variables que afectan la producción de PHA son las que tienen valores $P < 0.05$, concluyendo que la concentración de glicerol crudo, la concentración de nitrógeno y la interacción entre ellas (AC) tienen efecto significativo sobre la elaboración de PHA dentro de la cepa *Rhizobium* sp.