



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

**SEDE CUENCA**

**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**OBTENCIÓN DEL POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) A PARTIR DEL LACTOSUERO  
UTILIZANDO LA BACTERIA BACILLUS SUBTILIS**

Trabajo de titulación previo a la obtención del  
título de Ingeniera Biotecnóloga

**AUTORAS: MARÍA ELENA TENECORA GAGUI**

**PAOLA VANESSA MOROCHO PACHECO**

**TUTOR: ING. JORGE BRAULIO AMAYA PINOS, PhD.**

Cuenca - Ecuador

2024

## **CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Nosotras, María Elena Tenecora Gagui con documento de identificación N° 1400864508 y Paola Vanessa Morocho Pacheco con documento de identificación N° 0104911078; manifestamos que:

Somos las autoras y responsables del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 31 de julio del 2024

Atentamente,



---

María Elena Tenecora Gagui  
1400864508



---

Paola Vanessa Morocho Pacheco  
0104911078

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotras, María Elena Tenecora Gagui con documento de identificación N° 1400864508 y Paola Vanessa Morocho Pacheco con documento de identificación N° 0104911078, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del Trabajo experimental: “Obtención del polihidroxibutirato (PHB) a partir del lactosuero utilizando la bacteria *Bacillus subtilis*”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera Biotecnóloga, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 31 de julio del 2024

Atentamente,



---

María Elena Tenecora Gagui

1400864508



---

Paola Vanessa Morocho Pacheco

0104911078

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Jorge Braulio Amaya Pinos con documento de identificación N° 0103444923, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: OBTENCIÓN DEL POLIHROXIBUTIRATO (PHB) A PARTIR DEL LACTOSUERO UTILIZANDO LA BACTERIA *BACILLUS SUBTILIS*, realizado por María Elena Tenecora Gagui con documento de identificación N° 1400864508 y por Paola Vanessa Morocho Pacheco con documento de identificación N° 0104911078, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción de Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 31 de julio del 2024

Atentamente,



---

Ing. Jorge Braulio Amaya Pinos, PhD.

0103444923

## DEDICATORIA

*A mi amado padre, Luis Tenecora, por sus consejos, por su apoyo incondicional en cada paso de este camino, por ser mi pilar, mi fortaleza y motor de inspiración.*

*Gracias por confiar y creer en mí, gracias por enseñarme con tu ejemplo el valor del esfuerzo, y dedicación. Tu sacrificio y amor han sido la base y resultado de este logro académico. Te estoy eternamente agradecida.*

*María Elena Tenecora Gagui*

## DEDICATORIA

*A mi querida abuelita que ahora me cuida desde el cielo. Aunque ya no estés presente, en cada paso de este camino sentí tu amor y palabras de aliento, tu confianza en mí ha sido una fuente constante de inspiración. Sé que en este momento estas sonriendo y compartiendo mi alegría. Este trabajo es un homenaje a tu memoria y a todo lo que hiciste por mí.*

*A mi madre, cuyo sacrificio, dedicación y amor incondicional han sido fundamentales para alcanzar mis metas. Cada hora de tu arduo trabajo ha sido el pilar sobre el que he construido mi futuro. Gracias por creer en mí.*

*Paola Vanessa Morocho Pacheco*

## AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios, por guiar mi camino, por brindarme fortaleza y sabiduría, especialmente en los momentos más difíciles.

Agradezco a mi padre, por su amor y apoyo incondicional que han sido fundamental para alcanzar este objetivo.

A mis hermanos, en especial a Roberto, por su apoyo brindado y por enseñarme a no rendirme y a luchar por mis sueños.

A los docentes, principalmente a mi tutor de tesis Ing. Jorge Amaya y a la Ing. Sandy Gavilanes. Gracias por compartir sus conocimientos, por la paciencia, enseñanzas, y por motivarnos a dar nuestro mayor esfuerzo.

Agradezco a mi compañera de tesis, Paola, por el esfuerzo, compromiso, colaboración, por las largas horas de trabajo, y por los desafíos superados durante todo este trayecto.

*María Elena Tenecora Gagui*

## AGRADECIMIENTO

A mis padres, por su apoyo incondicional. Papi, sus sabios consejos y la confianza que siempre ha tenido en mí han sido esenciales en cada desafío que he enfrentado. Mami, su dedicación y sacrificio han sido la base sobre la cual he construido cada logro.

A mis hermanos, quienes con su apoyo económico y moral me han permitido concentrarme en mis estudios para alcanzar mis metas. Su amor y respaldo han sido fundamentales en este viaje.

A mis sobrinos Carlos, Santiago, Henry, Danna, Gael y Juliana por brindarme su inagotable alegría y energía recordándome la importancia de seguir mis sueños.

A ti mi amor, cuyo apoyo incondicional ha sido un pilar fundamental durante toda mi carrera universitaria. Gracias por tu inagotable paciencia y respaldo en las largas noches de estudio.

A ti Elena, por ser una auténtica compañera y por haber estado a mi lado en este recorrido académico.

A mis profesores, especialmente a mi director de tesis, Ing. Jorge Amaya, PhD y a la Ing. Sandy Gavilanes, por su constante apoyo y orientación durante el desarrollo de mi investigación.

*Paola Vanessa Morocho Pacheco*

## Tabla de Contenido

CAPITULO 1 .....	1
1. INTRODUCCION .....	1
1.1. Planteamiento del problema de investigación.....	2
1.2. Pregunta de investigación .....	2
1.3. Justificación .....	2
1.4. Limitaciones del estudio .....	3
1.5. Objetivos .....	4
1.5.1. Objetivo general .....	4
1.5.2. Objetivos específicos .....	4
1.6. Hipótesis .....	4
CAPITULO II .....	6
2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Lactosuero.....	6
2.1.1. Composición del lactosuero .....	6
2.1.2. Tipos de lactosuero .....	7
2.1.2.1. Lactosuero ácido .....	8
2.1.2.2. Lactosuero dulce .....	8
2.2. Lactosa .....	9
2.2.1. Cristalización de lactosa.....	9
2.3. Biopolímeros.....	10
2.4. Polihidroxicanoatos (PHAs) .....	10

2.4.1.	Fermentación de los PHAs.....	11
2.4.2.	Métodos de extracción y purificación de los PHAs .....	11
2.5.	Polihidroxiбутирато (PHB).....	12
2.5.1.	Parámetros Físicoquímicos del PHB.....	13
2.5.2.	Microorganismos productores de PHB .....	13
2.6.	Bacillus Subtilis .....	14
2.6.1.	Principales características de Bacillus subtilis.....	14
2.6.2.	Clasificación taxonómica de Bacillus subtilis.....	15
CAPITULO III.....		16
3.	METODOLOGIA.....	16
3.1.	Población y muestra.....	17
3.2.	Variables .....	18
3.3.	Diseño experimental .....	19
3.3.1.	Preparación y adquisición del suero de leche .....	19
3.3.1.1.	Caracterización físicoquímica del lactosuero usado .....	20
3.4.	Activación de <i>Bacillus subtilis</i> .....	23
3.4.1.	Caracterización microscópica de <i>Bacillus Subtilis</i> .....	24
3.4.2.	Resiembra de la cepa <i>Bacillus subtilis</i> a partir de la activación .....	24
3.4.3.	Conteo de bacterias .....	25
3.5.	Fermentación.....	26
3.6.	Biomasa.....	26

3.6.1.	Peso húmedo .....	26
3.6.2.	Peso seco .....	27
3.7.	Extracción y purificación de PBH .....	27
3.7.1.	Digestión química con SDS .....	27
3.7.2.	Análisis de Muestra Seca en FTIR con SDS.....	28
3.7.3.	Purificación y estructuración de PHB con cloroformo .....	29
3.8.	Técnicas de procesamiento y análisis de datos .....	30
CAPITULO IV.....		31
4.	ANÁLISIS Y RESULTADOS .....	31
4.1.	Análisis bromatológico de humedad del lactosuero .....	31
4.2.	Cuantificación de azúcares .....	31
4.2.1.	Cuantificación de azúcares con pH 6,5 .....	31
4.2.2.	Cuantificación de azúcares con pH 5-6-7-8 del lactosuero.....	32
4.3.	Análisis estadístico de azúcares reductores: Glucosa .....	33
4.4.	Análisis del proceso fermentativo para la producción del polihidroxibutirato	
	35	
4.5.	Análisis Químico .....	36
4.6	Análisis de la biomasa seca proveniente del proceso de fermentación con	
	tratamiento SDS con interpretación del espectro (Espectroscopia infrarroja FTIR) .....	41
CAPITULO V.....		53
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	53
5.1.	Conclusiones .....	53

5.2. Recomendaciones .....	54
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	56
ANEXOS .....	63

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1	<i>Componentes del lactosuero</i> .....	7
Tabla 2	<i>Tipos de lactosuero según su acidez</i> .....	8
Tabla 3	<i>Métodos para la extracción de los PHA</i> .....	11
Tabla 4	<i>Taxonomía de Bacillus subtilis</i> .....	15
Tabla 5	<i>Parámetros para la obtención de PHB</i> .....	16
Tabla 6	<i>Tipos de variables</i> .....	18
Tabla 7	<i>Equipos, materiales y reactivos para el pretratamiento del lactosuero</i> .....	20
Tabla 8	<i>Equipos, materiales y reactivos para la caracterización del lactosuero</i> .....	22
Tabla 9	<i>Escala con parámetros de los 4 tratamientos</i> .....	25
Tabla 10	<i>Equipos, materiales y reactivos para la activación y siembra de la bacteria Bacillus subtilis</i> .....	26
Tabla 11	<i>Equipos, materiales y reactivos para la extracción y purificación de PHB</i> .....	29
Tabla 12	<i>Peso húmedo de la biomasa obtenida</i> .....	37
Tabla 13	<i>Peso seco de la biomasa después del proceso fermentativo y secado</i> .....	38
Tabla 14	<i>Cálculo de la relación del peso seco y húmedo</i> .....	39
Tabla 15	<i>Rendimiento de PHB</i> .....	45
Tabla 16	<i>Análisis descriptivo</i> .....	48
Tabla 17	<i>Pruebas de normalidad</i> .....	48

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<i>Lactosuero proveniente de la industria quesera</i>	6
<b>Figura 2</b>	<i>Estructura de las moléculas de lactosa en configuración <math>\alpha</math> y <math>\beta</math></i>	9
<b>Figura 3</b>	<i>Estructura molecular del PHB</i>	13
<b>Figura 4</b>	<i>Filtrado al vacío del lactosuero</i>	19
<b>Figura 5</b>	<i>Centrifugación del lactosuero</i>	20
<b>Figura 6</b>	<i>Analizador de Humedad con lámpara halógeno</i>	21
<b>Figura 7</b>	<i>Activación de bacteria en (TSB)</i>	23
<b>Figura 8</b>	<i>Bacteria y agar para la resiembra</i>	24
<b>Figura 9</b>	<i>Equipo Thermo Spectronic GENESYS 20</i>	25
<b>Figura 10</b>	<i>Aplicación de SDS a la biomasa húmeda</i>	28
<b>Figura 11</b>	<i>Muestra analizada en FTIR</i>	28
<b>Figura 12</b>	<i>Hidrólisis con duraciones de 1 y 2 horas</i>	32
<b>Figura 13</b>	<i>Hidrolisis con pH 5,6,7,8</i>	33
<b>Figura 14</b>	<i>Hidrólisis de glucosa con 1 y 2 horas con pH 6,5</i>	34
<b>Figura 15</b>	<i>Hidrólisis de glucosa con diferentes pH (5-6-7-8)</i>	35
<b>Figura 16</b>	<i>Caracterización microscópica de Bacillus Subtilis observada en 100X (tinción de Gram)</i>	36
<b>Figura 17</b>	<i>Biomasa húmeda</i>	37
<b>Figura 18</b>	<i>Proceso de secado y triturado de la biomasa</i>	39
<b>Figura 19</b>	<i>Comparación peso húmedo/ peso seco</i>	40
<b>Figura 20</b>	<i>Espectro FTIR de PHB</i>	41
<b>Figura 21</b>	<i>Fermentación con tratamiento SDS con interpretación FTIR</i>	42
<b>Figura 22</b>	<i>Espectro FTIR del Poli (3hidroxibutirato) plástico</i>	44
<b>Figura 23</b>	<i>PHB con cloroformo</i>	44

<b>Figura 24</b> <i>Secado de PHB</i> .....	45
<b>Figura 25</b> <i>Comparación del rendimiento en los tratamientos para la producción de PHB</i> .....	47
<b>Figura 26</b> <i>Regresión lineal de peso húmedo</i> .....	50
<b>Figura 27</b> <i>Regresión lineal de peso seco</i> .....	50
<b>Figura 28</b> <i>Regresión lineal de producto formado</i> .....	50
<b>Figura 29</b> <i>Regresión lineal del rendimiento</i> .....	51
<b>Figura 30</b> <i>Análisis de diagrama de cajas</i> .....	52

## RESUMEN

El siguiente estudio tiene como objetivo optimizar la producción de polihidroxibutirato (PHB) utilizando lactosuero y *Bacillus subtilis* como sustratos. Este estudio busca aprovechar el potencial del suero de leche, que es considerado un subproducto de la industria láctea, para producir biopolímeros biodegradables, de esta manera busca disminuir las preocupaciones ambientales asociadas con la eliminación del suero y creando productos de valor agregado. El estudio evalúa varios parámetros de fermentación, como los niveles de pH, la temperatura y tiempo de fermentación, así como la concentración de la bacteria utilizada, esto para determinar las condiciones óptimas para maximizar el rendimiento de PHB.

Los resultados experimentales demostraron que mantener un pH neutro a ligeramente básico y extender la duración de la fermentación mejora significativamente la producción de PHB. Concretamente, los rendimientos más altos de PHB se lograron a niveles de pH de 7 y 8 durante un período de fermentación de 8 días, con rendimientos de 75,73 g/mg y 66,23 g/mg, respectivamente, de esta manera se ofrece una guía práctica para mejorar la eficiencia y sostenibilidad de la producción de biopolímeros. Así también, con el análisis estadístico mediante pruebas ANOVA y Tukey HSD se demostró que las variaciones de pH durante la hidrólisis enzimática no afectaron significativamente la concentración de glucosa, lo que propone estabilidad del proceso en diferentes rangos de pH. Estos resultados destacan la viabilidad de aplicar suero de leche como sustrato sostenible para la obtención de biopolímeros, motivando a las industrias láctea y biotecnológica a colaborar en proyectos que optimicen el valor de los subproductos, aportando beneficios tanto económicos como ambientales.

**Palabras clave:** Polihidroxibutirato (PHB), *Bacillus subtilis*, lactosuero, fermentación, hidrólisis enzimática, biopolímero.

## **ABSTRACT**

The following study aims to optimize the production of polyhydroxybutyrate (PHB) using whey and *Bacillus subtilis* as substrates. This study seeks to take advantage of the potential of whey, which is considered a by-product of the dairy industry, to produce biodegradable biopolymers, thus seeking to reduce environmental concerns associated with the elimination of whey and creating value-added products. The study evaluates various fermentation parameters, such as pH levels, temperature and fermentation time, as well as the concentration of the bacteria used, this to determine the optimal conditions to maximize PHB yield.

Experimental results showed that maintaining a neutral to slightly basic pH and extending fermentation duration significantly improves PHB production. Specifically, the highest PHB yields were achieved at pH levels of 7 and 8 during a fermentation period of 8 days, with yields of 75.73 g/mg and 66.23 g/mg, respectively. In this way, a practical guide is offered to improve the efficiency and sustainability of the production of biopolymers. Also, with the statistical analysis using ANOVA and Tukey HSD tests, it was demonstrated that the pH variations during enzymatic hydrolysis did not significantly affect glucose concentration, which proposes stability of the process in different pH ranges. These results highlight the feasibility of applying whey as a sustainable substrate for obtaining biopolymers, motivating the dairy and biotechnology industries to collaborate in projects that optimize the value of byproducts, providing both economic and environmental benefits.

**Keywords:** Polyhydroxybutyrate (PHB), *Bacillus subtilis*, whey, fermentation, enzymatic hydrolysis, biopolymer.

## **CAPITULO 1**

### **1. INTRODUCCION**

Este trabajo experimental se centra en el aprovechamiento del lactosuero un subproducto derivado de la industria láctea en Ecuador, para la producción de polihidroxibutirato (PHB) utilizando la bacteria *Bacillus subtilis*. Habitualmente, el suero de leche se ha considerado un desecho que se ha descartado debido a restricciones legales y prácticas industriales (Lema Guamán, 2023). A pesar de que su composición lo convierte en un recurso valioso, este subproducto puede ser aprovechado a través de procesos fermentativos utilizando microorganismos como la bacteria *Bacillus subtilis*. Este enfoque se centra en provechar el lactosuero como sustrato para la producción de biopolímeros (González García et al., 2013)

A demás, se busca reducir el impacto ambiental asociado a la eliminación del lactosuero, transformando este subproducto en un recurso valioso para producir PHB, un biopolímero biodegradable con diversas aplicaciones industriales.(Rivera Briso & Serrano Aroca, 2018)

El objetivo principal de esta investigación es determinar las condiciones óptimas para producir PHB a partir del lactosuero utilizando *Bacillus subtilis*. Esto involucra evaluar variables específicas del proceso de fermentación, como la concentración de lactosa, la temperatura, las condiciones de pH para maximizar la eficiencia de la producción. Además, el estudio analizará la productividad bacteriana y caracterizará las propiedades físicas y químicas del PHB resultante.

La investigación se llevará a cabo en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, utilizando un enfoque experimental y analítico-comparativo. Se emplearán técnicas como ANOVA, FTIR y análisis de datos con RStudio. Se

espera que este estudio promueva prácticas sustentables para la utilización del suero y mejore el conocimiento para futuras aplicaciones industriales del PHB derivado del suero.

### **1.1.Planteamiento del problema de investigación**

Según el Centro de la Industria Láctea (CIL, 2022) Ecuador genera un aproximado de 900 mil litros de suero diariamente, en los cuales únicamente el 10 % es utilizado por la industria; a causa de que, en 2019, la Asamblea Nacional determinó sancionar su uso y comercialización del suero lácteo para fines comerciales, salvo para el suero en polvo y sus usos en la alimentación animal.

El problema encontrado se relaciona con la gran cantidad de lactosuero producido a nivel industrial, este subproducto de leche suele tratarse como un residuo, desaprovechando su valor nutricional y biológico, reduciendo el rendimiento de cultivos y causando contaminación ambiental, por ello, ante esto hay que implementar nuevos métodos que permitan incrementar el uso del lactosuero no aprovechado.

Una de las aplicaciones posibles de los residuos agroindustriales es la obtención de polihidroxibutirato (PHB), en el que el suero de leche sirve como fuente de carbono en presencia de microorganismos como *Bacillus subtilis*. Esto permite que la bacteria almacene el polihidroxibutirato (PHB) de forma intracelular.

### **1.2.Pregunta de investigación**

¿Cómo se puede aprovechar el lactosuero como sustrato para la obtención de PHB utilizando la cepa *Bacillus subtilis*?

### **1.3.Justificación**

Durante décadas, se ha estudiado el lactosuero para la obtención de productos de alto valor agregado, tanto en la industria alimenticia como en la industria bioquímica, debido a su gran potencial fermentativo.(Álvarez Campuzano, 2015). A pesar de esto, más del 50 % del

lactosuero producido no es utilizado adecuadamente, y su abundante contenido de materia orgánica contribuye a la contaminación del entorno ambiental. (Gómez & Sánchez, 2019)

Una propuesta interesante y prometedora para aprovechar este sustrato es su utilización en la producción de polihidroxibutirato (PHB).

El polihidroxibutirato (PHB) es un biopolímero totalmente degradable que se origina mediante procesos de fermentación por microorganismos. Se ha considerado la utilización de la bacteria *Bacillus subtilis*, con el propósito de evaluar su capacidad fermentativa bajo diferentes condiciones, tales como la temperatura, pH, concentración bacteriana y días de fermentación. Mediante la ejecución de ensayos, se pretende determinar cuál de estas condiciones proporciona un rendimiento óptimo para la obtención de PHB.

*Bacillus subtilis* es conocido por su eficiente capacidad para fermentar sustratos como el lactosuero, utilizando la lactosa como fuente de carbono y energía, la obtención del biopolímero (PHB)(Lema Guamán, 2023) a partir de esta fermentación lo hace particularmente atractivo para la valorización de este subproducto de la industria láctea, convirtiéndolo en productos útiles y disminuyendo su impacto ambiental.

#### **1.4.Limitaciones del estudio**

Contaminación: La existencia de microorganismos en el lactosuero podría crear una competitividad con *B. subtilis* o la adquisición de metabolitos no deseados, lo que podría afectar la pureza del PHB obtenido. Asimismo, la presencia de residuos no deseados, como residuos de limpieza, antibióticos, pesticidas o metales pesados, puede limitar el desarrollo de esta bacteria y afectar la eficacia del PHB producido. Las condiciones fermentativas, como la temperatura, el pH, la disponibilidad de oxígeno, la agitación y la mezcla, juntamente con la concentración de lactosa, son fundamentales tanto para el crecimiento como para la actividad metabólica de *Bacillus subtilis*. Si estas condiciones no consiguen su nivel óptimo, podrían no

generar una distribución regular de nutrientes o la formación de zonas sin actividad bacteriana, lo que afectaría la obtención de PHB.

Eficiencia de la Conversión: La eficacia en la transformación de lactosa a PHB por medio de *Bacillus subtilis* puede no ser la más apropiada. Esto implicaría la necesidad de más lactosuero y prolongados tiempos de fermentación para obtener cantidades viables de PHB.

## **1.5.Objetivos**

### **1.5.1. Objetivo general**

Obtener polihidroxibutirato (PHB) a partir del lactosuero utilizando la bacteria *Bacillus subtilis*.

### **1.5.2. Objetivos específicos**

Determinar las condiciones óptimas de obtención de PHB controlando parámetros como pH, temperatura, concentración de sustrato y tiempo de fermentación, para maximizar su producción.

Determinar la pureza y las propiedades físicas y químicas del PHB producido a partir de lactosuero para garantizar su idoneidad para aplicaciones específicas, mediante Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

Evaluar la productividad de *Bacillus subtilis* para la obtención de PHB utilizando lactosuero como sustrato mediante análisis estadístico.

## **1.6.Hipótesis**

Se postula que la fermentación del lactosuero utilizando microorganismos del género *Lactobacillus* conducirá a la síntesis de polihidroxibutirato (PHB) en condiciones de cultivo específicas. Se espera que este proceso proporcione un método efectivo y sostenible para la producción de PHB a partir del lactosuero, un subproducto lácteo.

Bajo ciertas condiciones fisicoquímicas, es posible obtener polihidroxibutirato (PHB) a partir de *Bacillus subtilis*, empleando el lactosuero como sustrato principal. Se plantea que

el uso de *Bacillus subtilis* en la fermentación de lactosuero podría presentar una alternativa viable para la producción de PHB con potencial aplicabilidad industria

## CAPITULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1.Lactosuero

El lactosuero es un subproducto líquido de una coloración amarillento ligeramente verdoso, este subproducto se obtiene durante el proceso de elaboración del queso, cuando es separado de la cuajada, y puede provenir de la leche entera, de la crema, o de la leche semidescremada.(Williams Zambrano & Dueñas Rivadeneira, 2021) . Este residuo industrial se compone de dos partes: una sólida, compuesta principalmente por proteínas insolubles y lípidos, y una líquida, que contiene los nutrientes que no se incorporaron en la coagulación de la caseína.(Murillo, 2018).

El lactosuero constituye aproximadamente entre el 85% al 95% del volumen total de la leche y conserva el 55% de sus nutrientes.(González Siso, 1996)

#### Figura 1

*Lactosuero proveniente de la industria quesera*



Fuente: (Mazorra-Manzano et al., 2019)

#### 2.1.1. Composición del lactosuero

El lactosuero se compone en su mayoría por agua, lactosa, proteínas solubles, sales minerales y vitaminas hidrosolubles y una pequeña cantidad de grasa. La composición final del lactosuero está definida por varios factores como el origen de la leche, tratamiento térmico, tipo de queso, técnica de elaboración, y el entorno de almacenamiento.(Calvopiña Toapanta & Manotoa Betancourt, 2020). La Tabla 1, muestra la proporción promedio de cada uno de estos componentes.

**Tabla 1***Componentes del lactosuero*

<b>Componente</b>	<b>Observaciones</b>
Lactosa	El 95 % de la lactosa contenida en la leche se concentra entre el 4,5% y el 5,0% en volumen porcentual.
Proteína	En una concentración de aproximadamente entre el 0,8% y el 1% en volumen porcentual, se encuentra alrededor del 25% de las proteínas habitualmente presentes en la leche.
$\alpha$ - Lactoalbúmina	30% de las proteínas presentes
$\beta$ -Lactoglobulina	Equivalente al 10% del conjunto total de proteínas
Lípidos	Entre el 0,5% y el 8% del contenido de grasa en la leche
Vitaminas	Tiamina: 0,38 miligramos por mililitro; Riboflavina: 1,2 miligramos por mililitro; Ácido nicotínico: 0,85 miligramos por mililitro; Ácido pantoténico: 3,4 miligramos por mililitro; Piridoxina: 0,42 miligramos por mililitro; Cobalamina: 0,3 miligramos por mililitro; Ácido ascórbico: 2,2 miligramos por mililitro.
Minerales	Entre el 8% y el 10% del extracto seco. En cuanto al calcio, su concentración varía de 0,4 a 1,6 gramos por litro.

Fuente: (Morales, 2017)

**2.1.2. Tipos de lactosuero**

Según (Molero-Méndez et al., 2017) la composición del lactosuero puede variar según el proceso de producción y tipo de queso que se elabore, según su acidez se clasifican en ácido o dulce. El Lactosuero (LS) ácido, es obtenido mediante fermentación o la adición de ácidos para coagular la caseína, y el lactosuero (LS) dulce, se obtiene mediante la coagulación con cuajo. En la Tabla 2 se muestra los tipos de suero según su acidez.

**Tabla 2**

*Tipos de lactosuero según su acidez*

<b>Tipos de lactosuero</b>	<b>Acidez (%)</b>
Dulce	0,1 - 0,2
Ácido	0,4 - 0,6

Fuente: (Álvarez Campuzano, 2015)

### **2.1.2.1.Lactosuero ácido**

El lactosuero ácido se obtiene a través de la coagulación ácida de diversos quesos frescos de pasta blanda, como queso crema, cottage, quark y requesón, contiene valiosas fuentes en calcio y fósforo.(Barrera Aldama, 2011). El lactosuero ácido tiene un pH aproximado de 4.5.(Soto & Toro, 2019)

La coagulación ácida según (Menéndez Castillo, 2018) puede ocurrir por diversas vías biológicas como (fermentación láctica, acción del ácido láctico), o mediante la adición de ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido acético) o minerales a la leche a temperaturas superiores a los 21° C, proceso que neutralizan las micelas de caseína, haciendo que estas se agrupen y comiencen a precipitar.

### **2.1.2.2.Lactosuero dulce**

El lactosuero dulce se obtiene mediante coagulación enzimática de quesos duros y semiduros.(Calvopiña Toapanta & Manotoa Betancourt, 2020). Este tipo de LS prácticamente no contiene calcio, los niveles de calcio oscilan entre el 0,6 a 0,7%, debido que durante la coagulación enzimática el calcio queda retenido en la cuajada en forma de paracaseinato cálcico.(Posada et al., 2011)

La coagulación enzimática de la leche se inicia mediante la adición de cuajo (renina) o enzimas proteolíticas, este proceso se desarrolla en dos fases: fase enzimática o primaria, donde se produce la desestabilización controlada de las micelas de caseína, seguida de una fase de coagulación o fase secundaria, en la que la caseína se agrega y precipita. Las temperaturas

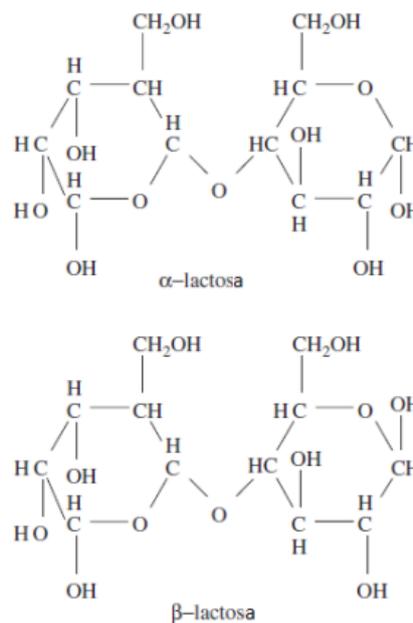
óptimas para el proceso de coagulación son de 28 a 35° C.(Menéndez Castillo, 2018). El lactosuero dulce se encuentra en un rango de pH cercano a 6.5.(Soto & Toro, 2019)

## 2.2.Lactosa

La lactosa (4-0-β-galactopiranosil-D-glucopiranososa, C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) es un disacárido que consiste en una molécula de glucosa unida a una molécula de galactosa. Una característica distintiva de la lactosa es su manifestación en diferentes estados e interrelaciones fisicoquímicas influenciados por la temperatura. En soluciones acuosas, la lactosa puede encontrarse tanto en forma α como β (Fig. 1). Los cristales de α-lactosa se pueden preparar como monohidrato concentrando una solución acuosa de lactosa hasta que se sobresature y luego dejándola cristalizar a una velocidad moderada y a una temperatura inferior a 93.5 °C.(Gänzle et al., 2008)

**Figura 2**

*Estructura de las moléculas de lactosa en configuración α y β*



Fuente: (Gänzle et al., 2008)

### 2.2.1. Cristalización de lactosa

En productos lácteos la lactosa se puede encontrar en dos formas cristalinas, α -hidrato y β -anhídrido, así como una mezcla amorfa conocida como “vidrio” que incluye las formas α

como  $\beta$ . Este vidrio de lactosa no cristalino contiene las formas  $\alpha$  y  $\beta$  en la misma proporción que en la solución a partir de la cual se generó. Además, las soluciones de lactosa son capaces de alcanzar altos niveles de sobresaturación antes de que ocurra la cristalización espontánea.(Gänzle et al., 2008)

### **2.3.Biopolímeros**

Los biopolímeros son polímeros obtenidos a partir de recursos renovables y se clasifican en dos tipos: 1) los procedentes de los organismos vivos y 2) los que requieren ser sintetizados, pero su origen es de fuentes renovables. El primer grupo incluye polímeros como proteínas o polisacáridos mientras que en el segundo grupo se incluye algunos poliésteres o productos metabolizados por microorganismos. La principal característica de estos polímeros es su biodegradabilidad, pueden descomponerse en condiciones naturales mediante la acción de los microorganismos en condiciones ambientales específicas.(Rámirez Pérez & Sánchez Vargas, 2019)

### **2.4.Polihidroxialcanoatos (PHAs)**

Los polihidroxialcanoatos son polímeros lineales de (R)-3-hidroxiácidos, donde el grupo carboxilo de un monómero forma enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente (poliéster).(Campuzano, s. f.)

Los PHA son biopoliésteres sintetizados intracelularmente por algunos microorganismos como forma de almacenamiento de carbono y energía que, una vez extraídos de la célula, presentan propiedades físicas similares a plásticos derivados del petróleo.(González García et al., 2013)

Los PHA son los únicos biopolímeros que son totalmente producidos y degradados por células vivas.(Calero Mendoza, 2020) . Los polihidroxialcanoatos (PHA) son considerados excelentes candidatos para sustituir los polímeros derivados de petroquímicos, debido a que son sintetizados por microorganismos a partir de sustratos de poco o ningún valor

económico, los PHA derivan de los recursos renovables, y poseen características físicas similares a las de los plásticos derivados del petróleo, como el polipropileno y polietileno.(Lemos Delgado & Mina Cordoba, 2015)

#### **2.4.1. Fermentación de los PHAs**

Los PHAs son producidos principalmente por bacterias mediante procesos de fermentación, utilizando diversas vías biosintéticas según las fuentes de carbono utilizadas. Las fuentes adecuadas de carbono son un factor clave para determinar el rendimiento total del proceso de fermentación.

Durante el proceso fermentativo, la biomasa crece, el polímero se sintetiza y acumula. Existen diversas bacterias con la capacidad de sintetizar y acumular estos biopolímeros, por ello se ha estudiado los procesos y sistemas de cultivo de estas bacterias, y los deferentes factores como la temperatura óptima, pH, sustrato y medio de crecimiento, con el objetivo de mejorar los rendimientos en el proceso de fermentación.(Álvarez da Silva, 2016)

#### **2.4.2. Métodos de extracción y purificación de los PHAs**

En la literatura se describen varios métodos de extracción de PHA, (Kunasundari & Sudesh, 2011; Raza et al., 2018) mencionan los métodos de extracción con solventes, método de flotación, digestión química, extracción acuosa en dos fases (ATPE),digestión enzimática y extracción con fluidos supercríticos.

La tabla 3 describe cada uno de los métodos mencionados anteriormente.

**Tabla 3**

*Métodos para la extracción de los PHA*

<b>Método</b>	<b>Descripción</b>
Extracción con solventes	Consta de 3 pasos: 1. Pretratamiento para romper las células, empleando NaOH o SDS. 2. Solubilizar los gránulos en un disolvente. Los disolventes más empleados son cloroformo, 1,2-dicloroetano, acetona

---

	y carbonato de etileno, y 3 la precipitación del polímero con un no disolvente, usualmente se utiliza metanol o etanol frío.
Flotación	Se realiza en dos pasos: (1) Extracción con disolventes orgánicos. Las células se mezclan con cloroformo a 30°C por 72 horas, sometiendo a una auto flotación (2) Autodestrucción de los restos celulares
Digestión química	Normalmente se utiliza Hipoclorito de sodio (NaClO) o tensoactivos para la extracción del PHA.
Extracción acuosa en dos fases (ATPE),	El sistema ATPE utiliza agua para aislar, purificar y recuperar PHA.
Digestión enzimática	Consta de tres pasos: 1. Tratamiento térmico. 2 hidrolisis enzimática y 3 lavado con surfactantes.
Extracción con fluidos supercríticos.	Se utiliza dióxido de carbono supercrítico, debido a su temperatura y presión moderadas.

---

Fuente: (Kunasundari & Sudesh, 2011; Muñoz Ariza & Ramos Farfán, 2019; Raza et al., 2018)

## **2.5.Polihidroxitirato (PHB)**

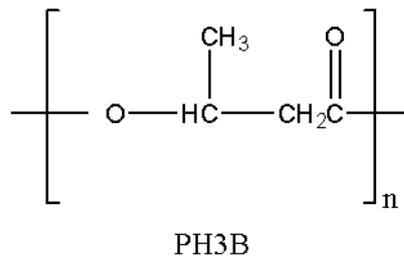
El PHB pertenece a la familia de los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros biodegradables sintetizados por microorganismos con un gran potencial biotecnológico.(Chico & Sampedro, 2022). El polihidroxitirato (PHB) es producido por varios microorganismos en respuesta a un exceso de fuentes de carbono o escasez de nutrientes esenciales. Son completamente biodegradables en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O en ambientes tanto aeróbicos como anaeróbicos.(Hamdy et al., 2022)

El Poli 3-hidroxitirato (PHB), es uno de los más estudiados ya que posee características y propiedades físicas similares al polipropileno.(Correa Bernal, 2021). Es un termoplástico que puede procesarse mediante la extracción o inyección; se caracteriza por ser un material frágil y cristalino, limitando y restringiendo su uso a nivel industrial.(Rámirez Pérez & Sánchez Vargas, 2019)

El polihidroxiбутирато se muestra como una alternativa biodegradable prometedora frente a los plásticos básicos existentes, como el polietileno y el polipropileno. (Rámirez Pérez & Sánchez Vargas, 2019)

**Figura 3**

*Estructura molecular del PHB*



Fuente: (Naranjo Vasco, 2010)

### **2.5.1. Parámetros Físicoquímicos del PHB**

Según (Rámirez Pérez & Sánchez Vargas, 2019) el PHB es un termoplástico frágil con un 50% de cristalinidad, además se considera como uno de los biopolímeros con un punto de fusión elevado ya que puede alcanzar temperaturas entre 173 °C y 180 °C con una temperatura de transición vítrea (Tg) de aproximadamente 5°C.

### **2.5.2. Microorganismos productores de PHB**

Muchas especies bacterianas son capaces de sintetizar polihidroxiбутирато (PHB), estos microorganismos acumulan el PHB durante su fase estacionaria de crecimiento, cuando las células se ven limitadas por un nutriente esencial, pero tienen un exceso de fuente de carbono. Se ha reportado que varias especies de *Bacillus spp.* acumulan un 9-45% de PHA en peso seco de las células. (Kareem et al., s. f.)

Varios microorganismos como *Cupriavidus necator*, *Priestia megatertum*, *Halomonas bluephagenesis spp.* y *Alcaligenes latus* se han utilizado en la producción industrial de PHB. *Cupriavidus necator* es considerado uno de los microorganismos más eficaces en la producción de PHB, debido a su capacidad para acumular grandes cantidades de PHB, llegando a alcanzar

el 80% de su peso celular seco, este microorganismo tiene la capacidad de utilizar fuentes de carbono simples y complejas para llevar a cabo sus procesos biológicos.(Jafari & Hejazi, 2024)

Otros microorganismos productores de PHB incluyen *Aeromonas hydrophyla*, *Acinetobacter spp.*, *Azospirillum rubrum*, *Bacillus siamensis*, *B. subtilis*, *Brevundimonas spp.*, *Enterococcus spp.*, *Methylocystis spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Ralstonia spp.*, *Rhizobium spp.*, *Sphingobacterium spp.*, y *Yokenella spp.* Estas bacterias se desarrollan en entornos donde existe una alta fuente de carbono en comparación con otros nutrientes como el fósforo y nitrógeno.(Acharjee et al., 2024)

## **2.6.Bacillus Subtilis**

*Bacillus subtilis* en 1835 fue originalmente llamado *Vibrio subtilis* por Christian Gottfried Ehrenberg y en 1872 Ferdinand Cohn lo renombró *Bacillus subtilis*; describiéndola como una bacteria formadora de endosporas resistente al calor.(Kovács, 2019; Villarreal-Delgado et al., 2018)

*Bacillus subtilis* es una especie bacteriana muy diversa, capaz de desarrollarse en diversos ambientes.(Earl et al., 2008) . Presenta características típicas Gram positivas, gracias a la presencia de flagelos peritricos puede moverse, y puede vivir en condiciones tanto aeróbicas como facultativamente anaeróbicas, además posee la capacidad de degradar almidón.(González-León et al., 2022)

### **2.6.1. Principales características de Bacillus subtilis**

*B. subtilis* presenta una forma bacilar (bastón) con un diámetro de 850 nm, crece en un rango de pH que va de 4.9 a 9.3, a temperaturas que oscilan entre 10 a 48 °C siendo su temperatura óptima para crecimiento 28 a 35 °C.(González-León et al., 2022). Además, posee un mecanismo de resistencia a distintos tipos de estrés.(Villarreal-Delgado et al., 2018)

### 2.6.2. Clasificación taxonómica de *Bacillus subtilis*

En la Tabla 4 se describe como está clasificada taxonómicamente de la bacteria Gram positiva *B. subtilis*.

**Tabla 4**

*Taxonomía de Bacillus subtilis*

<b>Taxonomía de <i>Bacillus subtilis</i></b>	
Phylum	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Genero	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>B. subtilis</i>

Fuente: (González-León et al., 2022)

## CAPITULO III

### 3. METODOLOGIA

Este estudio se realizó en los laboratorios de Ciencias de la Vida, de la Universidad Politécnica Salesiana, Campus el Vecino en Cuenca-Ecuador.

Esta investigación se basa en un diseño experimental explicativo, centrándose en las relaciones causa-efecto entre variables que influyen en la producción de polihidroxibutirato (PHB). Adopta un enfoque analítico-comparativo, utilizando técnicas analíticas para evaluar tanto la cantidad como la calidad del polímero obtenido. Además, enfatiza la recopilación, revisión y análisis de la literatura disponible para proporcionar una base sólida para la investigación.

En el diseño experimental, se manejaron variables independientes para observar su rendimiento sobre la producción de PHB, usando un enfoque cuantitativo para recopilar y analizar datos numéricos. Esto permitió evaluar el rendimiento y la calidad del PHB producido a partir del lactosuero utilizando *Bacillus subtilis* como agente fermentador. En la Tabla 5 se especifica los parámetros experimentales utilizados, examinando diferentes combinaciones de pH, temperatura, concentración de bacterias y tiempo de fermentación. Esta combinación de tratamientos posibilita el estudio de cómo cada variable influye en la producción de PHB, brindando un marco de referencia para optimizar las condiciones fermentativas. Los datos obtenidos de estos experimentos se utilizaron para modelar y entender de manera más clara la relación entre estos parámetros y la producción de PHB.

**Tabla 5**

*Parámetros para la obtención de PHB*

pH	Temperatura	Concentración	Tiempo (días)
5	30 °C	X1	5
5	35 °C	X2	6
5	37 °C	X3	7

5	40 °C	X4	8
6	35 °C	X1	5
6	35 °C	X2	6
6	37 °C	X3	7
6	40 °C	X4	8
7	30 °C	X1	5
7	35 °C	X2	6
7	37 °C	X3	7
7	40 °C	X4	8
8	30°C	X1	5
8	35°C	X2	6
8	37°C	X3	7
8	40°C	X4	8

Nota: Las 'X' representan las concentraciones de bacterias empleadas. Concretamente, X1 equivale a  $1.5 \times 10^8$ ,

X2 a  $3 \times 10^8$ , X3 a  $6 \times 10^8$ , y X4 a  $9 \times 10^8$  células/mL. Fuente: Autoras

### 3.1. Población y muestra

En la presente investigación se estudió una población dedicada a la producción de quesos, con enfoque principal en los residuos de esta elaboración, es decir, el lactosuero. Este lactosuero se adquirió de una empresa artesanal en la Parroquia Chiquintad, en la ciudad de Cuenca. Mediante un muestreo aleatorio simple, se seleccionó aproximadamente 10 litros del lactosuero, la cual sirvió como única fuente de carbono para *Bacillus subtilis* en la producción de polihidroxibutirato (PHB).

**Población:** La población para este estudio está formada por todo el lactosuero disponible, el cual sirve como materia prima para los procesos experimentales.

**Muestra:** La muestra es una porción representativa del lactosuero seleccionada para el proceso experimental. Esta muestra fue elegida y tratada con el fin de garantizar la precisión las características de la población en general. El lactosuero sirve como única fuente de carbono en el proceso de fermentación para la producción de PHB mediante *Bacillus subtilis*. Por lo

cual la selección de la muestra garantiza que los resultados alcanzados del proceso experimental se puedan extrapolar de manera fiable a toda la población de lactosuero disponible para el estudio.

### 3.2. Variables

En este estudio, se identifican 2 tipos de variables. Estas variables se pueden controlar y medir en un diseño experimental con el fin de optimizar el proceso de obtención de PHB a partir del lactosuero utilizando *Bacillus subtilis* como organismo productor.

Las variables independientes, que se manipularán durante el estudio, se expresarán numéricamente y comprenden el pH, la temperatura, el tiempo de fermentación y la concentración de la bacteria. Estas variables se ajustan con el fin de optimizar la elaboración de polihidroxibutirato (PHB) a partir de este subproducto de la leche, buscando conseguir el rendimiento máximo posible utilizando *Bacillus subtilis*.

Variables dependientes incluye a la producción de PHB, al monitorear la cantidad de la cantidad de PHB obtenido, se puede valorar la eficacia de las condiciones experimentales y determinar cómo influyen las variables independientes en el rendimiento final de PHB.

**Tabla 6**

*Tipos de variables*

<b>Variable</b>	<b>Tipo</b>	<b>Naturaleza</b>
pH del sustrato	Independiente	Cuantitativa
Temperatura	Independiente	Cuantitativa
Concentración de la bacteria en Lactosuero	Independiente	Cuantitativa
Tiempo de fermentación	Independiente	Cuantitativa
Producción de PHB	Dependiente	Cuantitativa

Fuente: Autoras

### 3.3. Diseño experimental

#### 3.3.1. Preparación y adquisición del suero de leche

El suero utilizado en este experimento fue recolectado de una empresa artesanal de elaboración de quesos en la Parroquia Chiquintad-Cuenca mencionada anteriormente. Las muestras fueron recolectadas en cuatro recipientes plásticos, cada uno de aproximadamente 2.5 L, y transportados a los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Cuenca en donde fue almacenado a 2 ° C para su posterior uso.

Debido a su alto contenido de proteínas, que puede afectar la producción de PHB, el suero requirió un tratamiento previo. De acuerdo con las sugerencias hechas por (Álvarez Campuzano, 2015) y con algunos ajustes al método propuesto, el suero se somete primero a filtración al vacío, tal como se muestra en la Figura 4. Luego, el lactosuero se sometió a un tratamiento térmico para precipitar las proteínas, calentándolo a 121°C a 1 atm durante 15 minutos. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 3500 rpm durante 26 minutos para remover las proteínas precipitadas y el agua añadida, este proceso se ilustra en la Figura 5. El pH se ajustó a 6.5 con NaOH a 1 N concentrado para preservar los azúcares. Se enfatizó el mantenimiento de condiciones asépticas para prevenir la degradación del azúcar y reducir los costos de energía.

**Figura 4**

*Filtrado al vacío del lactosuero*



Fuente: Autoras

**Figura 5**

*Centrifugación del lactosuero*



Fuente: Autoras

**Tabla 7**

*Equipos, materiales y reactivos para el pretratamiento del lactosuero*

<b>EQUIPOS</b>	<b>MATERIALES</b>	<b>REACTIVOS</b>
Autoclave	Matraz Erlenmeyer de 1000mL	NaOH
Centrifuga Labnet Z400	Embudo Buchner	
PHmetro	Matraz Kitosato	
Refrigerador	Compresor	
	Papel de aluminio	
	Algodón	
	Gasa	
	Tubos Falcon	
	Papel filtro	

Fuente: Autoras

### **3.3.1.1. Caracterización fisicoquímica del lactosuero usado**

La caracterización fisicoquímica del suero implicó analizar las siguientes variables: pH, contenido de humedad, cuantificación de azúcares e hidrólisis enzimática.

- **pH**

En cuatro matraces separados de 1000 mL que contenían 448 mL de sustrato, los niveles de pH se ajustaron a 5, 6, 7 y 8 con NaOH a una concentración de 1 N.

- **Contenido de humedad**

Para determinar el porcentaje de humedad que está presente en el lactosuero, se examinó en un analizador de humedad Mettler Toledo HB con lámpara de halógeno como se muestra en la Figura 6, utilizando una muestra de 2 g en la bandeja del analizador de humedad. Durante el análisis, la lámpara halógena seca la muestra, mientras el dispositivo monitorea continuamente la pérdida de peso hasta alcanzar una masa constante.

**Figura 6**

*Analizador de Humedad con lámpara halógeno*



Fuente: Autoras

- **Cuantificación de azúcares**

Para llevar a cabo la validación se siguió la metodología propuesta por (Miller, 1959), en la cual se utiliza el equipo UV-Vis espectrofotómetro. V-630. Para el análisis se preparan soluciones patrón de glucosa en un intervalo de concentraciones. Primero, se disolvió 0.8 g de NaOH en agua destilada, luego se añadieron 15 g de tartrato de sodio y, finalmente, 0.5 g de DNS. La mezcla se llevó a un volumen de 50 mL y se almacenó en un frasco ámbar.

Para la curva de calibración, se midieron las lecturas de absorbancia a 540 nm utilizando soluciones patrón de 200, 400, 800 y 1000 ppm. Tras obtener la curva de calibración de la glucosa, se prepararon las muestras a analizar: se calentaron 5 mL de cada muestra en baño maría durante 5 minutos y se detuvo la reacción con agua fría. Posteriormente, se reconstruyó la muestra con 5 mL de H<sub>2</sub>O, se agitó y se dejó reposar por 15 minutos. Este procedimiento se repitió para cada muestra a analizar. La curva de calibración se cuantificó mediante una regresión lineal.

- **Hidrólisis enzimática**

Utilizando la metodología aplicada para la hidrólisis enzimática de. (Castillo Granda, 2024). Se llevó a cabo una hidrólisis enzimática en cada uno de los tratamientos utilizando tabletas comerciales de LACTFLAT, cada una conteniendo 82 mg de enzima lactasa. Se disolvieron 6 1/2 tabletas en 18 mL de agua destilada para lograr una concentración de 30 mg/mL de lactasa. Con un pH-metro, se ajustó el pH de todos los tratamientos a 6.5 para facilitar una hidrólisis enzimática del 99.99%. A cada tratamiento se le añadió 1 mL de la dilución enzimática.

Tres de los cuatro tratamientos se incubaron durante una hora en un incubador orbital Shaker con agitación a 100 rpm y una temperatura de 40°C. El cuarto tratamiento se sometió a las mismas condiciones, pero durante dos horas.

Posteriormente, se ajustó el pH de los cuatro tratamientos a valores de 5, 6, 7 y 8, respectivamente. Estos se almacenaron en un refrigerador a 2° C hasta su uso posterior para la fermentación.

**Tabla 8**

*Equipos, materiales y reactivos para la caracterización del lactosuero*

<b>EQUIPOS</b>	<b>MATERIALES</b>	<b>REACTIVOS</b>
Mettler Toledo HB con lámpara de halógeno	Gotero	NaOH

pHmetro	Tubos de ensayo	Tartrato de sodio
Nicolet iS10 FTIR	Celdas para espectros	SDS
Hornilla	Frasco ámbar	Agua destilada
Incubador orbital Shaker	Gradilla	Enzima lactosa comercial
Autoclave	Vaso de precipitación	
Refrigerador	Balón aforado	
UV-Vis espectrofotómetro. V-630	Pinzas	
	Malla de asbesto con dispersor de calor	
	Estufa	
	Probeta	

---

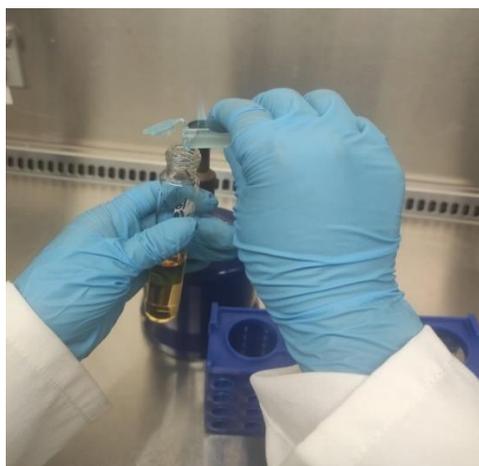
Fuente: Autoras

### 3.4. Activación de *Bacillus subtilis*

Se utilizó la cepa *Bacillus subtilis* ATCC 6051, proporcionada por la Universidad Politécnica Salesiana, sede Cuenca. Para la activación, se utilizó 2 mL de cepa, se inoculó en 10 mL de Caldo Soja Tripticaseína (TSB) durante 24 horas a 37°C, para obtener el máximo número de células viables para la fermentación.

#### Figura 7

*Activación de bacteria en (TSB)*



Fuente: Autoras.

### 3.4.1. Caracterización microscópica de *Bacillus Subtilis*

En la caracterización microscópica de *Bacillus subtilis*, se utilizó la tinción de Gram para distinguir las paredes celulares bacterianas en función de su respuesta al cristal violeta y al yodo (Rodríguez & Arenas, 2018). Inicialmente, las células bacterianas se fijaron con calor en un portaobjetos para su adherencia. Posteriormente se tiñeron con cristal violeta, seguido de yodo para formar un complejo dentro de las paredes celulares. Luego se llevó a cabo una decoloración con alcohol-acetona para diferenciar entre bacterias Gram positivas (tinción retenida) y bacterias Gram negativas (decoloradas). Finalmente, se aplicó una contra tinción con safranina para visualizar bacterias Gram negativas, facilitando la identificación y caracterización de *Bacillus subtilis* en función de sus propiedades de tinción Gram positivas.

### 3.4.2. Resiembra de la cepa *Bacillus subtilis* a partir de la activación

Para el proceso de re-cultivos se utilizó medio caldo nutritivo. Se prepararon ocho tubos de ensayo, cada uno con 10 mL de medio. En pares, los dos primeros tubos tenían cada uno 0,5 mL de bacterias activadas, los dos siguientes tenían 1 mL, los dos siguientes tenían 1,5 mL y los dos últimos tenían 2 mL de bacterias.

#### Figura 8

*Bacteria y agar para la resiembra*



Fuente: Autoras.

### 3.4.3. Cuento de bacterias

Para el conteo de las bacterias, se siguió la metodología propuesta por McFarland (Sagar, 2021) utilizando el método de la turbidez, el cual analiza las muestras dependiendo de la cantidad de luz que pasa a través del cultivo. Se utilizaron cuatro estándares, establecidos en la Tabla 9. Se midió la absorbancia a 600 nm de los cultivos preparados anteriormente con diferentes pH; para esto, se utilizó el equipo Thermo Spectronic GENESYS 20.

**Tabla 9**

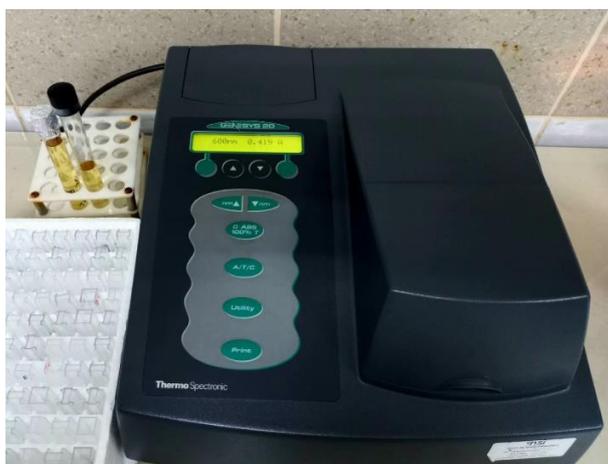
*Escala con parámetros de los 4 tratamientos*

McFarlan estándar	Absorbancia (600 nm)	Suspensión bacteriana aproximada/mL
0.5	0.08-01	$1.5 \times 10^8$
1.0	0.18-0.2	$3.0 \times 10^8$
2.0	0.36-0.4	$6.0 \times 10^8$
3.0	0.54-0.6	$9.0 \times 10^8$

Fuente: (Sagar, 2021)

**Figura 9**

*Equipo Thermo Spectronic GENESYS 20*



Fuente: Autoras

**Tabla 10***Equipos, materiales y reactivos para la activación y siembra de la bacteria Bacillus subtilis*

<b>EQUIPOS</b>	<b>MATERIALES</b>	<b>REACTIVOS</b>
Cámara de flujo laminar	Tubos de ensayo	Caldo Soja Trypticaseína (TSB)
Autoclave	Mechero	Caldo nutritivo
Thermo Spectronic GENESYS 20	Asa	Cristal violeta
Microscopio óptico	Cubre y porta objetos	Yodo
Micropipeta	Gradilla	Safranina
Incubador orbital Shaker	Puntas	Alcohol al 95 %
	Fosforo	Aceite de inmersión
	Celdas para espectros	

Fuente: Autoras

### **3.5.Fermentación**

Se prepararon dieciséis muestras, cada una con diferentes parámetros como se detalla en la Tabla 5. Cada cultivo contenía 112 mL de sustrato y 10% v/v de *Bacillus subtilis* para garantizar condiciones uniformes en todos los cultivos. Las bacterias se fermentaron bajo agitación constante a 200 rpm, con concentraciones de  $1.5 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^8$  células/mL con niveles de pH establecidos en 5, 6, 7 y 8. Para facilitar la fermentación se utilizó un Incubador orbital Shaker.

### **3.6.Biomasa**

Se evaluaron dos parámetros, peso húmedo y peso seco. La biomasa se separó del medio mediante centrifugación a 1200 rpm durante 20 minutos.(Campuzano, s. f.)

#### **3.6.1. Peso húmedo**

Para la medición del peso húmedo, la biomasa y el medio se centrifugaron inicialmente en tubos Eppendorf bajo los parámetros mencionados anteriormente. Posteriormente, la biomasa precipitada se transfirió a placas de Petri previamente pesadas.

### **3.6.2. Peso seco**

Para la determinación del peso seco, la muestra se colocó en una cámara de climatización Binder a 60°C durante 24 horas para eliminar toda la humedad. Luego las muestras secas se molieron a 2500 rpm usando un molino con tamices de 1,5 mm. Una vez molida la biomasa se procedió a pesarla.

### **3.7.Extracción y purificación de PBH**

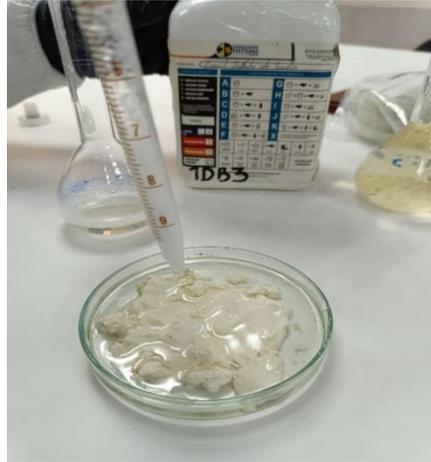
Se utilizó el método de digestión con SDS y dispersión en cloroformo para realizar la extracción y purificación del biopolímero, como parte del proceso investigativo.

#### **3.7.1. Digestión química con SDS**

Siguiendo la metodología de (Mendez Reyes, 2016) con algunas modificaciones, la cuantificación de polímeros se inició adaptando el procedimiento de cuantificación de biomasa sin el paso de secado. Este enfoque tenía como objetivo garantizar que la biomasa libre de residuos del medio de cultivo pudiera digerirse y cuantificarse el PHB. El precipitado resultante se re suspendió en una solución de dodecilsulfato sódico (SDS) al 20% a una concentración de 0,55 mL/g y se digirió a 40°C durante 2 horas en una cámara de climatización Binder. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 30 minutos para eliminar SDS y residuos de biomasa. Finalmente, la biomasa húmeda se transfirió a placas de Petri para su secado.

**Figura 10**

*Aplicación de SDS a la biomasa húmeda*



Fuente: Autoras

### **3.7.2. Análisis de Muestra Seca en FTIR con SDS**

Las muestras secas, después de ser tratadas con SDS, se midieron mediante FTIR para analizar su contenido. Este análisis se realizó para identificar y cuantificar la composición química y las características estructurales de las muestras, proporcionando información sobre la eficiencia de SDS en el proceso de tratamiento.

**Figura 11**

*Muestra analizada en FTIR*



Fuente: Autoras.

### 3.7.3. Purificación y estructuración de PHB con cloroformo

Las células obtenidas tras la digestión con SDS y posterior secado se suspendieron en cloroformo utilizando una proporción de 20 mL de disolvente por gramo de biomasa esto según (Ramos Farfán, 2019). Luego se agitaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Después de este período, la solución resultante se filtró al vacío usando filtros de celulosa. Este proceso produjo dos fases distintas: una fase líquida compuesta principalmente de polímero y cloroformo, y una fase sólida retenida en el filtro, compuesta de residuos de biomasa. La solución de polímero se vertió lentamente en placas de Petri y se dejó a temperatura ambiente para permitir que el cloroformo se evapore, dando como resultado una película de P3HB.

**Tabla 11**

*Equipos, materiales y reactivos para la extracción y purificación de PHB*

<b>EQUIPOS</b>	<b>MATERIALES</b>	<b>REACTIVOS</b>
Nicolet iS10 FTIR	Tubo Falcon	Cloroformo
Centrifuga labnet hermle z400	Balón de aforo	Dodecilsulfato sódico (SDS)
Cámara de climatización Binder	Caja Petri	
Compresor	Pipeta	
Cámara de flujo laminar	Embudo Buchner	
	Matraz Kitosato	
	Papel filtro	
	Probeta	
	Embudo	
	Caja Petri	
	Papel film	
	Gasa	
	Luna	
	Espátula	

Fuente: Autoras

### **3.8. Técnicas de procesamiento y análisis de datos**

Para el procesamiento de los datos recopilados en la investigación se realizó una tabulación inicial de los datos obtenidos. Posteriormente, se llevó a cabo su clasificación, organización, y análisis mediante el uso de Software especializados como Rstudio.

Tras la recopilación de datos, se lleva a cabo un análisis de varianza (ANOVA) y Shapiro wilk para identificar posibles diferencias significativas en la obtención de PHB entre las distintas condiciones experimentales. El análisis de varianza (ANOVA) permite determinar si las variaciones observadas en la obtención de PHB son estadísticamente relativas y no meramente producto de la variabilidad aleatoria.

## **CAPITULO IV**

### **4. ANÁLISIS Y RESULTADOS**

#### **4.1. Análisis bromatológico de humedad del lactosuero**

Se realizó el análisis bromatológico del contenido de humedad del lactosuero para determinar el porcentaje de agua en el suero utilizado para la producción de PHB con *Bacillus subtilis*. Este análisis es crucial ya que afecta la eficiencia del proceso de fermentación y el rendimiento final de polihidroxibutirato (PHB).

El contenido de humedad se midió utilizando un analizador de humedad Mettler Toledo HB con una lámpara halógena. El análisis indicó que el suero tenía un contenido de humedad de 91,64%. Según (Poveda E, 2013) el alto contenido de humedad es típico del suero, que es un subproducto de la producción de queso y retiene naturalmente una cantidad significativa de agua.

#### **4.2. Cuantificación de azúcares**

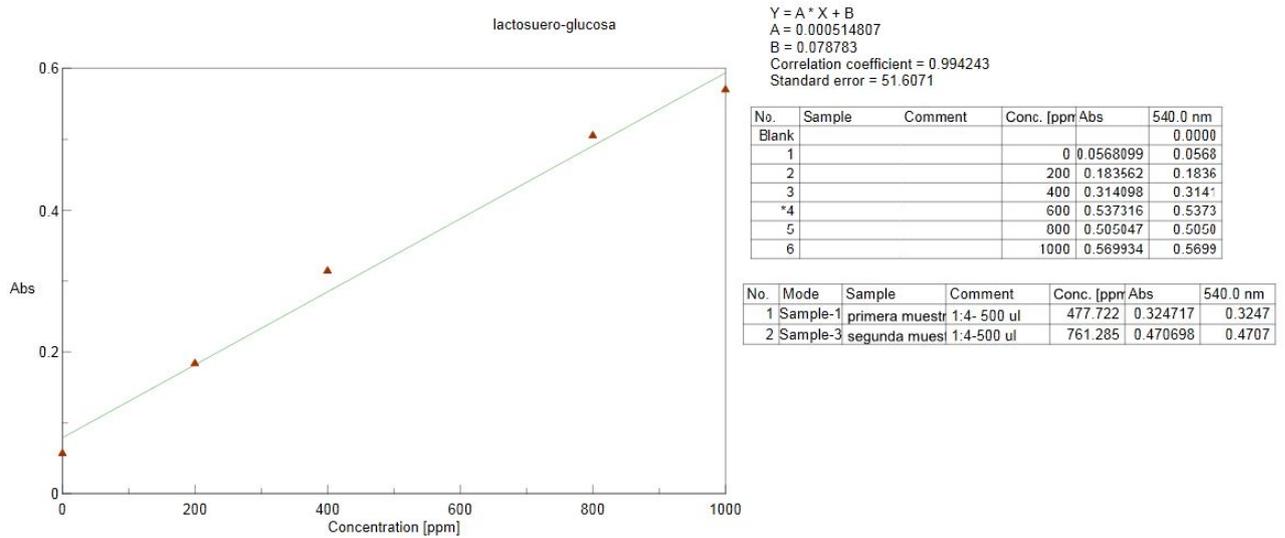
Al evaluar las concentraciones de azúcar en los diferentes niveles de pH, se pueden identificar las condiciones óptimas para la fermentación y la producción de PHB. (Khattab et al., 2021)

##### **4.2.1. Cuantificación de azúcares con pH 6,5**

Para evaluar el contenido de azúcar en diferentes condiciones, se realizó hidrólisis en muestras que contenían la enzima comercial LACTFLAT en una concentración de 30 mg/mL. La hidrólisis se llevó a cabo a un pH de 6,5 con duraciones de 1 hora y 2 horas. Estos intervalos de tiempo se seleccionaron para comprender el impacto de la duración de la hidrólisis en la liberación de azúcar. En el contexto del estudio, el resultado óptimo se logró con un proceso de hidrólisis de 2 horas, como se ilustra en la Figura 12. Este resultado indica la eficiencia de la duración de 2 horas maximiza la concentración de glucosa, destacando así su potencial como el proceso más eficiente para la hidrólisis dentro de los parámetros de esta investigación.

**Figura 12**

*Hidrólisis con duraciones de 1 y 2 horas*



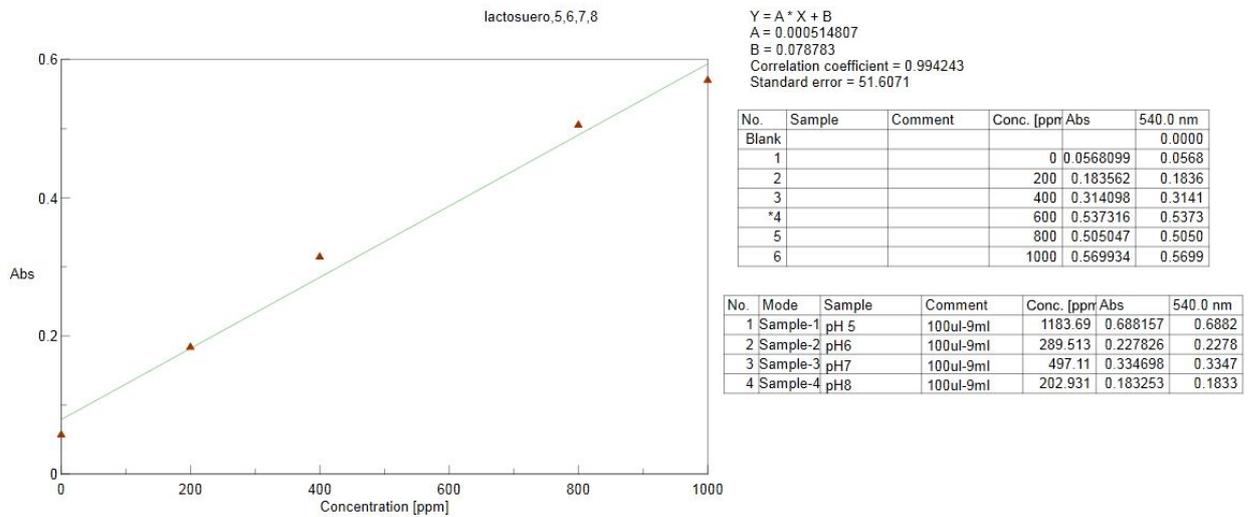
Fuente: Autoras

#### 4.2.2. Cuantificación de azúcares con pH 5-6-7-8 del lactosuero

El análisis cuantificó los azúcares con rangos de pH de 5, 6, 7 y 8. Permitiendo determinar cómo estas variaciones afectan la concentración del lactosuero hidrolizado. La muestra 1, con un pH de 5, mostró una concentración mayor de 1183,69 ppm y una absorbancia de 0,68857. Demostrando que un pH ácido favorece el proceso de hidrólisis, lo que resulta en una mayor concentración de azúcares fermentables. Por otro lado, la Muestra 4, con un pH de 8, mostró una concentración más baja de 202,931 ppm y una absorbancia de 0,183253, lo que infiere que un pH alcalino es menos eficiente para la hidrólisis. Las muestras con rangos de pH (6 y 7) mostraron concentraciones y valores de absorbancia moderados. El error estándar de 51,6071 respalda aún más la confiabilidad y precisión del modelo de regresión.

**Figura 13**

*Hidrolisis con pH 5,6,7,8*



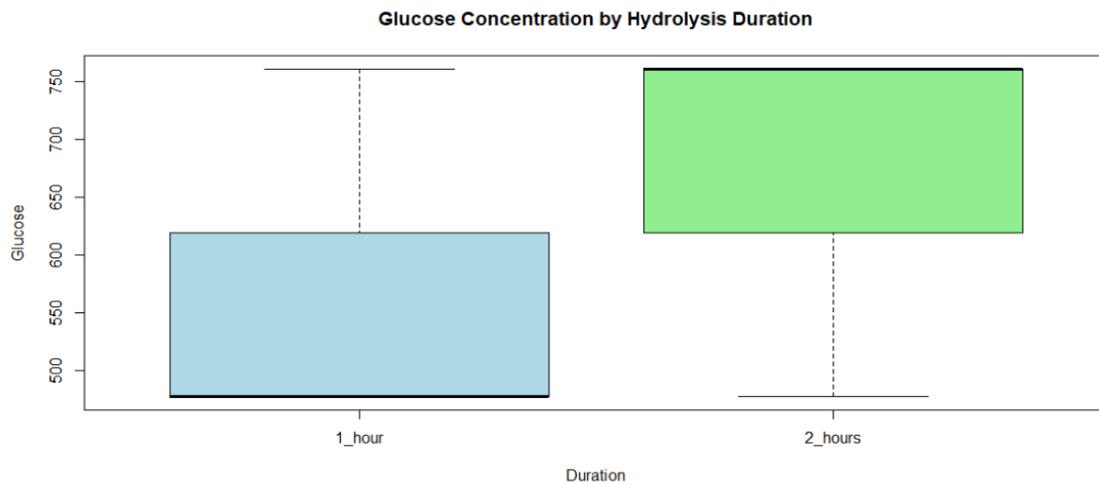
Fuente: Autoras

#### 4.3. Análisis estadístico de azúcares reductores: Glucosa

Para analizar los datos obtenidos producto de las hidrolisis, se realizó una evaluación estadística de los azúcares reductores (glucosa). Con el objetivo de determinar su importancia con diferentes duraciones y condiciones. Se emplearon pruebas estadísticas como ANOVA y análisis Tukey HSD para identificar las condiciones óptimas para maximizar el rendimiento de glucosa. Estos métodos estadísticos permitieron realizar una comparación de los grupos experimentales, asegurando que las diferencias observadas en la liberación de glucosa fueran estadísticamente significativas y no se debieran a una variación aleatoria.

**Figura 14**

*Hidrólisis de glucosa con 1 y 2 horas con pH 6,5*



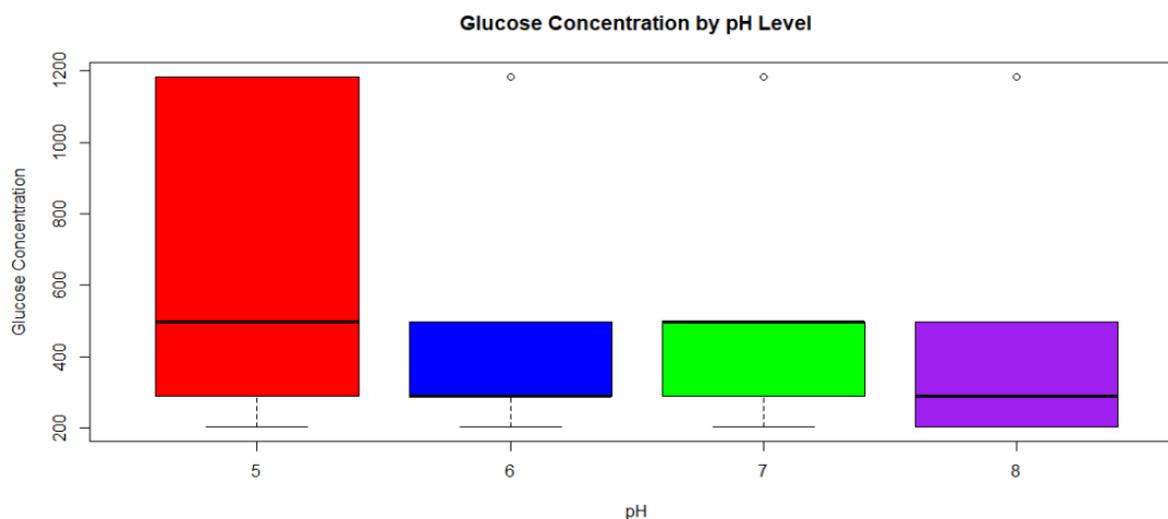
Fuente: Autoras

El análisis de ANOVA indicó que, si bien la duración de la hidrólisis representa una cierta variabilidad en la concentración de glucosa (Sum Sq = 13401), el valor F de 0,5 y el valor p de 0,519 indican que esta diferencia no es estadísticamente significativa. Por lo que, el estudio no presenta pruebas sólidas de que la duración de la hidrólisis afecte significativamente la concentración de glucosa. La prueba Tukey HSD resguarda este resultado, dando como resultado una media entre 1 hora y 2 horas de hidrólisis 94,521, con intervalos de confianza (-276,616 a 465,658) y un valor p (0,5185187). Esto indica que la diferencia en la concentración de glucosa entre las dos duraciones de hidrólisis no es estadísticamente significativa.

- **Hidrólisis de glucosa con diferentes pH (5-6-7-8)**

**Figura 15**

*Hidrólisis de glucosa con diferentes pH (5-6-7-8)*



Fuente: Autoras

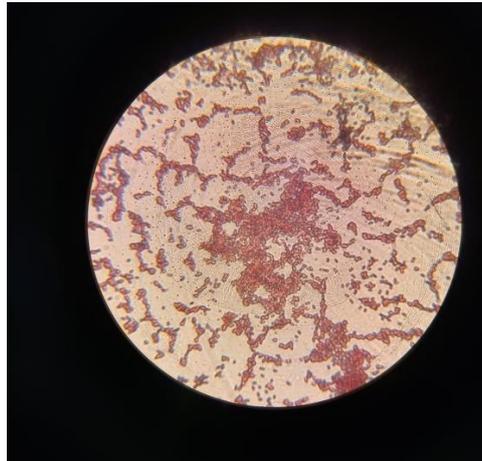
Los resultados de ANOVA demuestran que el valor de p para el factor de pH fue 0,88, indicando que no existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de glucosa entre los distintos niveles de pH. Diferencia Significativa Honesta (HSD) de Tukey también demuestra que no hay diferencias significativas entre los rangos de pH, puesto que los valores de p son todos superiores a 0,88, sugiriendo que los niveles de pH no tuvieron un valor significativo en la concentración de glucosa.

#### **4.4. Análisis del proceso fermentativo para la producción del polihidroxi butirato**

Para corroborar que se cumplió con la fermentación del lactosuero utilizando *Bacillus subtilis*, se realizó una caracterización microscópica para confirmar la autenticidad de la bacteria donada. Esta caracterización demostró que el microorganismo empleado durante el proceso fermentativo del lactosuero se tratase efectivamente de *Bacillus subtilis*, asegurando así las condiciones experimentales y la fiabilidad de los resultados.

## Figura 16

Caracterización microscópica de *Bacillus Subtilis* observada en 100X (tinción de Gram)



Fuente: Autoras

Para corroborar de se trata de la bacteria *Bacillus subtilis* se utilizó el microscopio óptico, observando minuciosamente la morfología y características propias de este microorganismo. En la imagen se visualiza un campo densamente poblado por células con una estructura en forma de bastón, en pares y en cadenas cortas, siendo esta una característica morfológica típica de *Bacillus subtilis*. Las paredes celulares de este microorganismo son gruesas, un rasgo propio de las bacterias Gram positivas, siendo parte de estas *Bacillus subtilis*. Como lo describen (González et al., 2024)

Esta observación microscópica confirma, que el microorganismo utilizado en el proceso fermentativo se trata realmente de *Bacillus subtilis*, debido a su forma tamaño y la disposición consistente de las células observadas.

### 4.5. Análisis Químico

Este estudio examina la producción de polihidroxibutirato (PHB) utilizando *Bacillus subtilis* y lactosuero, enfatizando el impacto del peso húmedo de la biomasa en el rendimiento de PHB. Se analizan variables como la concentración bacteriana, el tiempo de fermentación y el pH para optimizar la producción. (Philip et al., 2009) detalla que el peso de la biomasa sea húmedo o seco tiende a aumentar o reducir de forma variada con el cambio en el pH.

- **Peso húmedo**

**Tabla 12**

*Peso húmedo de la biomasa obtenida*

<b>pH</b>	<b>X1, (5D)</b>	<b>X2, (6D)</b>	<b>X3, (7D)</b>	<b>X4, (8D)</b>
5	15.69	15.01	12.32	17.57
6	16.93	14.56	13.41	17.68
7	16.72	15.60	13.35	16.67
8	16.57	15.23	13.61	18.44

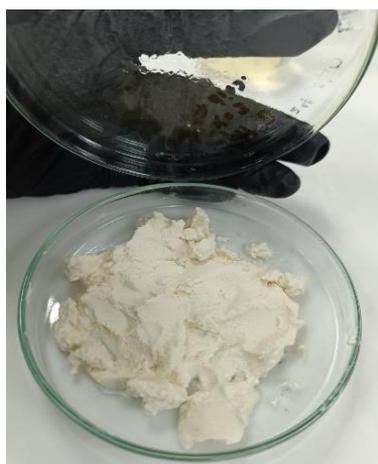
Nota: 'D' representa los días de fermentación empleados en el estudio y las unidades están en g. Fuente: Autoras

Con el análisis mediante pesaje se pudo determinar que:

A pH 5, el peso húmedo disminuye durante el período de fermentación, lo que indica que condiciones más ácidas pueden provocar una menor acumulación. Por el contrario, a pH 8, el peso húmedo aumenta con el tiempo, lo que sugiere que un ambiente ligeramente básico promueve una mayor acumulación. La consistencia de los valores en cada nivel de pH muestra una clara tendencia en las concentraciones a lo largo del tiempo.

**Figura 17**

*Biomasa húmeda*



Fuente: Autoras

- **Peso seco**

La Tabla 13 resume las mediciones de peso seco (en gramos) para diferentes niveles de pH durante varios días (5D, 6D, 7D, 8D):

**Tabla 13**

*Peso seco de la biomasa después del proceso fermentativo y secado*

pH	X1, (5D)	X2, (6D)	X3, (7D)	X4, (8D)
5	4.14	3.41	2.83	2.17
6	4.94	4.15	4.44	5.12
7	4.86	3.23	2.92	2.10
8	4.98	3.49	4.13	3.67

Fuente: Autoras

- Con un pH 5, el peso seco disminuye con el tiempo, el día 5 con peso de 4,14 g y el día 8 un peso de 2,17 g.
- A un pH 6, el peso mostró un aumento constante, con medidas de 4,94 g, 4,15 g, 4,44 g y 5,12 g durante los cuatro días.
- A pH 7, el peso seco disminuyó constantemente de 4,86 g el día 5 a 2,10 g el día 8.
- A pH 8, el peso seco varia, comenzando con 4,98 g el día 5, cayendo a 3,49 g el día 6, aumentando a 4,13 g el día 7 y terminando en 3,67 g el día 8.

### Figura 18

*Proceso de secado y triturado de la biomasa*



Nota: La imagen de la izquierda muestra las muestras en un horno y la imagen de la derecha muestra las muestras trituradas en el molino. Fuente: Autoras.

Según (SANCHEZ GONZALES & MARTINEZ SALDANA, s. f.) la relación entre el peso seco y el peso húmedo se determina dividiendo el peso seco por el peso húmedo para cada conjunto de datos. Esta relación brinda información sobre la proporción de biomasa seca dentro de la muestra total, lo cual es esencial para evaluar la eficiencia de la producción de bioproductos, como el PHB.

**Tabla 14**

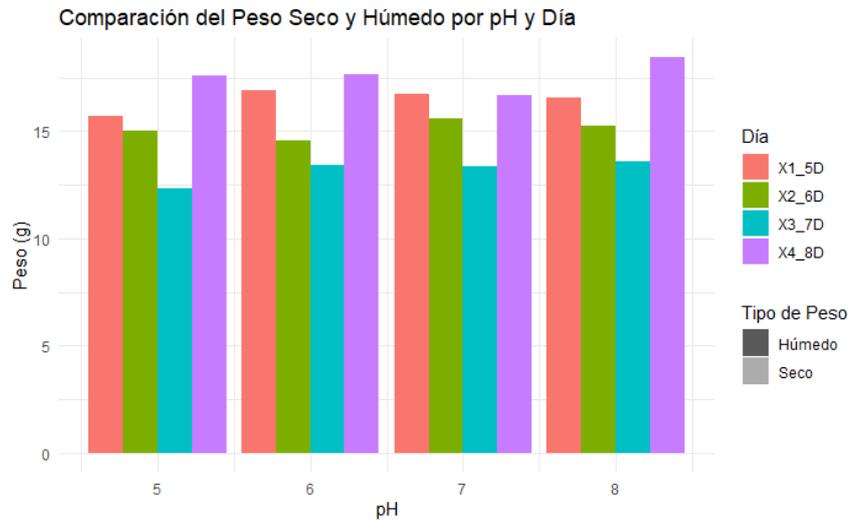
*Cálculo de la relación del peso seco y húmedo*

pH	Relación 5D	Relación 6D	Relación 7D	Relación 8D
5	0.264	0.227	0.230	0.124
6	0.292	0.285	0.331	0.289
7	0.291	0.207	0.219	0.126
8	0.301	0.229	0.304	0.199

Fuente: Autoras

**Figura 19**

*Comparación peso húmedo/ peso seco*



Fuente: Autoras

Considerando la relación peso seco/peso húmedo, se observó lo siguiente:

El pH 8 en el día 5 tiene la relación más alta (0.301), seguida por el pH 6 en el día 7 (0.331) y el pH 8 en el día 7 (0.304).

Basado en la relación peso seco/peso húmedo, las condiciones óptimas para la fermentación y producción de PHB parecen ser:

- pH 6 en el día 7: Relación 0.331
- pH 8 en el día 5: Relación 0.304

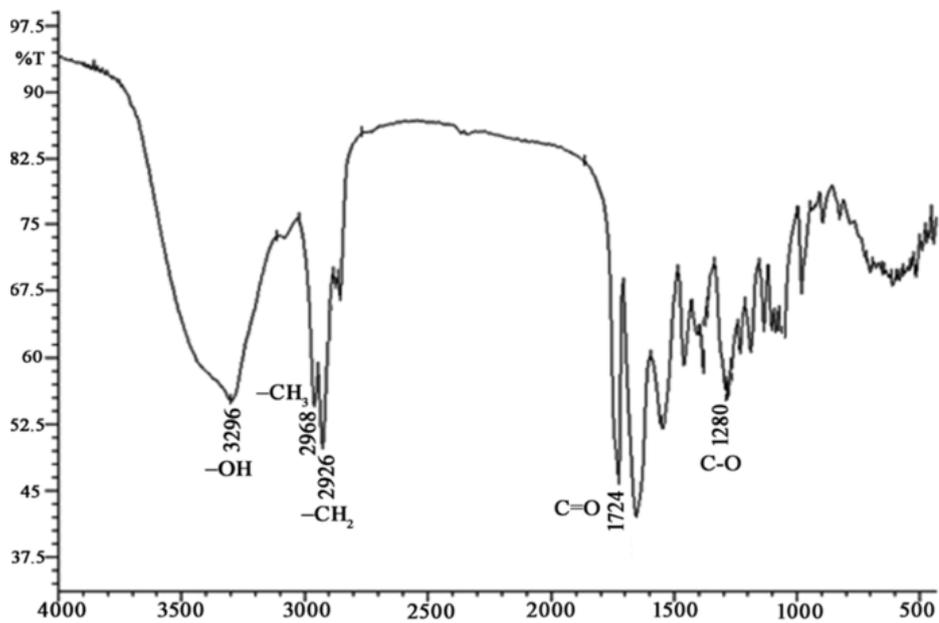
En general estos resultados demuestran cómo los diferentes rangos de pH influyen en el peso seco como en el peso húmedo de las muestras en el transcurso del tiempo. Las condiciones ácidas (pH 5) son menos óptimas para una producción estable de biomasa. Por consiguiente, las condiciones ligeramente ácidas (pH 6) y neutras (pH 7) benefician una producción más estable, siendo el pH 6 el más favorable para pesos secos y húmedos. Las condiciones ligeramente básicas (pH 8) mejoran la retención de agua, pero el peso seco muestra variabilidad, lo que sugiere que, si bien estas condiciones pueden favorecer el crecimiento, no son las más adecuadas para la acumulación de biomasa seca.

#### 4.6 Análisis de la biomasa seca proveniente del proceso de fermentación con tratamiento SDS con interpretación del espectro (Espectroscopia infrarroja FTIR)

El espectro de infrarrojo (FTIR) muestra diversos picos de absorción que son característicos de ciertos grupos funcionales del PHB. Para identificar la presencia de polihidroxibutirato (PHB), se comparó con los picos observados en el espectro de (Mostafa et al., 2020)

**Figura 20**

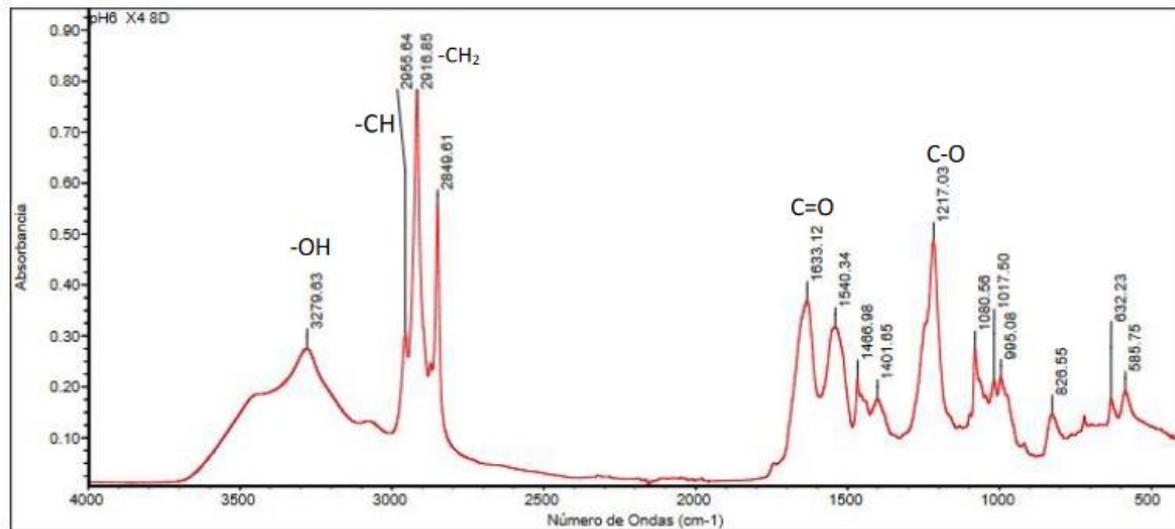
*Espectro FTIR de PHB*



Fuente:(Mostafa et al., 2020)

**Figura 21**

*Fermentación con tratamiento SDS con interpretación FTIR*



Mie Jul 17 13:06:30 2024 (GMT-05:00)

BUSCAR PICOS:

Espectros: pH6 X4 8D  
Región: 4000.00 400.00  
Umbral absoluto: 0.034  
Sensibilidad: 50

Lista de picos:

Posición:	585.75	Intensidad:	0.192
Posición:	632.23	Intensidad:	0.175
Posición:	826.55	Intensidad:	0.145
Posición:	995.08	Intensidad:	0.217
Posición:	1017.50	Intensidad:	0.211
Posición:	1080.56	Intensidad:	0.272
Posición:	1217.03	Intensidad:	0.485

Fuente: Autoras

### **Comparación con Picos Característicos de PHB:**

- 3279.63 cm<sup>-1</sup>: Este pico muestra la presencia de grupos OH de alcoholes o ácidos carboxílicos.
- 2955.64 cm<sup>-1</sup> y 2916.81 cm<sup>-1</sup>: Representa a las vibraciones de estiramiento C-H de los grupos metilo y metileno.
- 2849.61 cm<sup>-1</sup>: Es el estiramiento de los grupos metilo. -CH<sub>2</sub>
- 1633.12 cm<sup>-1</sup>: Este pico simboliza los estiramientos C=O de los ésteres, con lo cual se puede indicar la presencia de PHB
- 1217.03 cm<sup>-1</sup>: Este pico se asocia a la vibración de estiramiento C-O de los ésteres, lo que también respalda la presencia de PHB.

- $585.75\text{ cm}^{-1}$ ,  $632.23\text{ cm}^{-1}$ : Estas absorciones se relacionan con la presencia de grupos funcionales en la estructura del SDS o contaminantes

Por lo tanto, se puede concluir que el espectro de la biomasa seca tratada con SDS muestra características espectrales compatibles con la presencia de PHB.

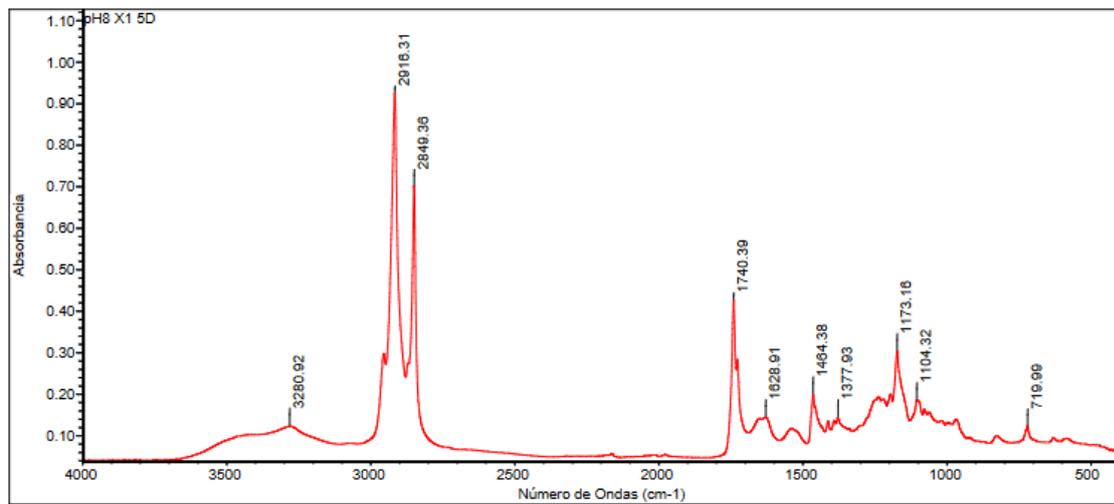
#### **4.7 Interpretación del espectro del film plástico de P3HB**

El espectro FTIR proporcionado en la Figura 22 ilustra el análisis de una película de plástico hecha de polihidroxibutirato (PHB) que se ha sometido a purificación con cloroformo. Donde se puede ver que al transformar el poli(3-hidroxibutirato) de polvo a plástico, el espectro FTIR y sus principales bandas de absorción no muestran cambios durante la formación de la película. Demostrando que la purificación con cloroformo contribuyó a conservar la integridad del PHB, como lo evidencia la ausencia de impurezas significativas. Por lo cual, se confirma que el cloroformo mantiene la estructura de manera efectiva, haciéndola apta para futuras aplicaciones.

Los picos a  $1740,39\text{ cm}^{-1}$ ,  $1173,16\text{ cm}^{-1}$  y  $1104,32\text{ cm}^{-1}$  señalan la presencia de grupos funcionales éster, característicos del PHB. Adicionalmente, el pico a  $3280,02\text{ cm}^{-1}$  posiblemente esté asociado a vibraciones de estiramiento O-H de grupos hidroxilo residuales, lo cual podría deberse a una purificación incompleta o a la presencia de humedad residual.

**Figura 22**

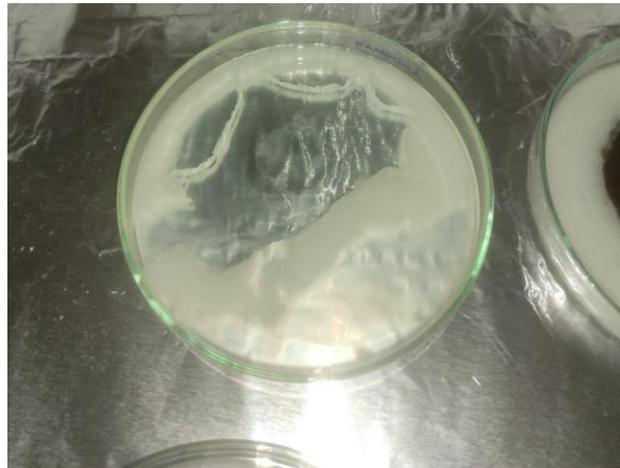
*Espectro FTIR del Poli (3hidroxibutirato) plástico*



Fuente: Autoras

**Figura 23**

*PHB con cloroformo*



Fuente: Autoras

**Figura 24**

*Secado de PHB*



Fuente: Autoras

#### **4.9 Rendimiento del PHB a partir del sustrato**

Con los datos presentados en la Tabla 15, se determinan las condiciones óptimas para obtener polihidroxibutirato (PHB) a partir de suero utilizando *Bacillus subtilis* evaluando el rendimiento y % de recuperación de PHB en diferentes parámetros experimentales. Para evaluar el porcentaje de recuperación obtenido en el proceso se utilizó un valor estándar de 98. En el rendimiento del proceso y el porcentaje de recuperación los resultados muestran que el mayor rendimiento de PHB se consigue con las siguientes condiciones: a un nivel de pH de 7 u 8 y un período de fermentación de 8 días con el Tratamiento X4. El rendimiento máximo obtenido es de 0.5266 g con un % de purificación de 53.74 que se observa a un pH de 7 con el tratamiento X4 después de 8 días de fermentación.

**Tabla 15**

*Rendimiento de PHB*

<b>Tratamiento</b>	<b>Producto formado (g)</b>	<b>Biomasa total (g)</b>	<b>Rendimiento del PHB</b>	<b>% Purificación</b>
pH 5 X1 5D	3.34	19.83	0.1684	19.78
pH6 X1 5D	3.61	21.87	0.1650	16.84
pH7 X1 5D	3.54	21.58	0.1641	16.75

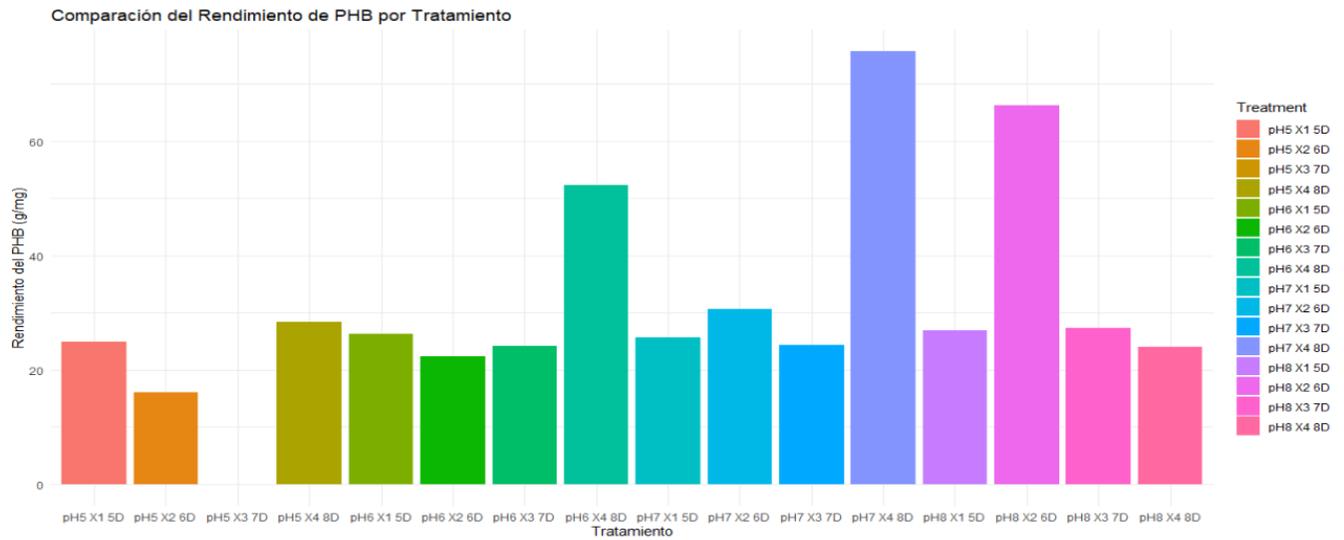
pH 8 X1 5D	3.58	21.55	0.1661	16.94
pH5 X2 6D	2.32	18.42	0.1260	12.86
pH6 X2 6D	3.12	18.71	0.1667	17.02
pH7 X2 6D	4.10	18.83	0.2177	22.22
pH8 X2 6D	8.31	18.72	0.4440	45.31
pH5 X3 7D	2.91	15.15	0.1920	19.59
pH6 X3 7D	3.35	17.85	0.1877	19.16
pH7 X3 7D	3.37	16.27	0.2072	21.14
pH8 X3 7D	3.74	17.74	0.2109	21.52
pH5 X4 8D	3.88	19.74	0.1966	20.06
pH6 X4 8D	6.89	22.88	0.3011	30.72
pH7 X4 8D	9.83	18.67	0.5266	53.74
pH8 X4 8D	3.32	22.11	0.1502	15.33

Fuente: Autoras

Este hallazgo sugiere que niveles más altos de pH y períodos de fermentación prolongados mejoran significativamente la producción de PHB. Específicamente, un pH de 7 u 8 combinado con 8 días de fermentación conduce a la mayor acumulación de PHB, lo que indica que estas condiciones son las más efectivas. El rendimiento de PHB aumenta con el tiempo de fermentación, siendo el día 8 el más productivo. Por lo tanto, el Tratamiento X4, que utiliza un pH de 7 y 8 días de fermentación, logra el rendimiento más alto con 70 g/mg. El Tratamiento X2, con un pH de 6 y 8 días de fermentación, también muestra un alto rendimiento de 60 g/mg.

**Figura 25**

*Comparación del rendimiento en los tratamientos para la producción de PHB*



Las condiciones óptimas para lograr el mayor rendimiento de PHB se observan con el Tratamiento X4, a pH 7 y 8 días de fermentación. También es importante destacar que el Tratamiento X2, a pH 6 y 8 días de fermentación, produce un rendimiento notablemente alto del biopolímero.

#### **4.10 Análisis estadístico del producto obtenido (PHB)**

Para el análisis estadístico descriptivo, se examinaron 16 muestras en total para determinar biomasa, rendimiento de polímero y rendimiento general. Se formularon dos hipótesis para estos 16 parámetros: la hipótesis nula y la hipótesis alternativa.

H0: El conjunto de datos se comportan de forma normal.

H1: El conjunto de datos no se comportan de forma normal.

- Para la biomasa húmeda y biomas seca se aceptó la hipótesis nula, aceptando que los datos se comportan de forma normal. Los datos parecen distribuidos normalmente ( $p > 0.05$ )
- Para el polímero obtenido y el rendimiento del PHB se aceptó la hipótesis alternativa aceptando que los datos originales para "Producto Formado" y

"Purificación" no siguen una distribución normal. Las transformaciones logarítmicas también muestran que los datos transformados no se ajustan a una distribución normal, ( $p \leq 0.05$ ).

En la tabla 16 se puede visualizar los valores de media, mediana, varianza y desviación Estándar tanto de la biomasa húmeda, seca, polímero obtenido y su rendimiento.

**Tabla 16**

*Análisis descriptivo*

Numero de muestras	Parámetros descriptivos	Media	Mediana	Varianza	Desviación estándar
16	Biomasa Húmeda	16.06	15.645	1.4618	1.21
16	Biomasa seca	4.03	4.13	0.5197	0.72
16	Producto formado	4.26	3.61	6.63	2.58
16	Rendimiento	0.2202	0.1966	0.0255	0.1597
16	% Purificación	22.68 %	19.59%	156.34	12.49%

Fuente: Autoras

En la tabla 17 se detallan los resultados de las pruebas de normalidad usado en los 16 tratamientos de análisis.

**Tabla 17**

*Pruebas de normalidad*

Pruebas de normalidad			
Shapiro-Wilk			
N de muestras	Parámetros descriptivos	Estadístico	p_value
16	Biomasa húmeda	0.9647914	0.7488196
16	Biomasa Seca	0.9440673	0.4018503

16	Producto formado	0.6984	0.0002
16	Rendimiento	0.7041	0.0002

Fuente: Autoras

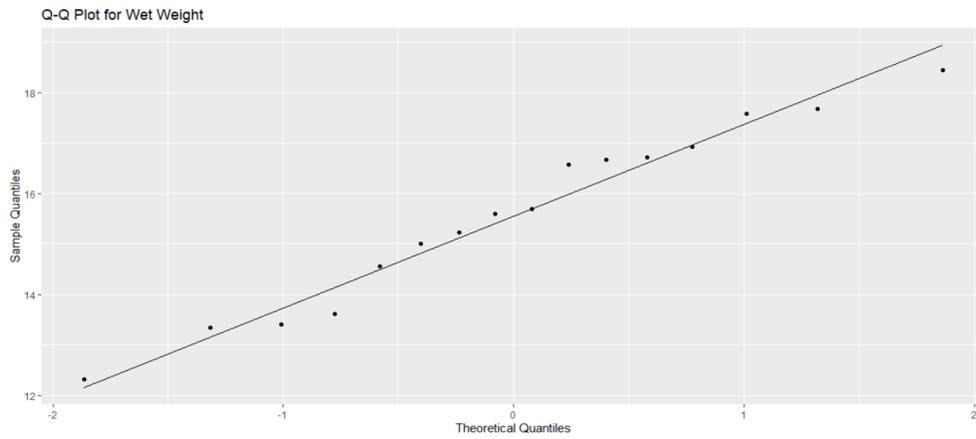
En la Tabla 17 se muestran los resultados de la prueba Shapiro-Wilk, en los que se indican que para la biomasa húmeda como para la biomasa seca tienen una distribución normal, ya que sus valores p fueron altos (0,7488 y 0,4019, respectivamente). Esto sugirió que estos conjuntos de datos son adecuados para métodos estadísticos paramétricos. Por el contrario, los datos de producto formado y rendimiento revelaron desviaciones significativas de la normalidad, con valores p muy bajos (0,0002 para ambos). Por lo cual implica que estos parámetros no siguieron una distribución normal y son afectados por sesgos o valores atípicos.

### **Regresiones lineales**

Se puede apreciar una distribución normal en las regresiones lineales de los parámetros analizados en las Figuras 26 y 27, que corresponden a la biomasa húmeda y seca respectivamente, cumpliendo con la prueba de normalidad. Sin embargo, los tratamientos presentados en las Figuras 28 y 29 muestran datos muy dispersos, indicando que no siguen una distribución normal.

**Figura 26**

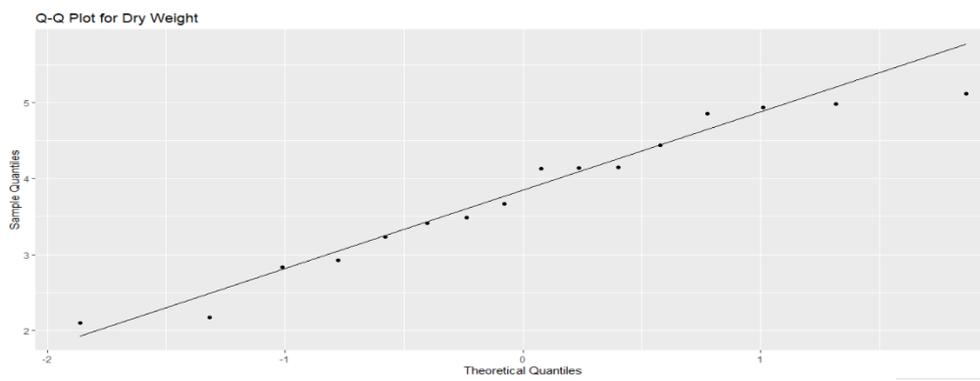
*Regresión lineal de peso húmedo*



Fuente: Autoras

**Figura 27**

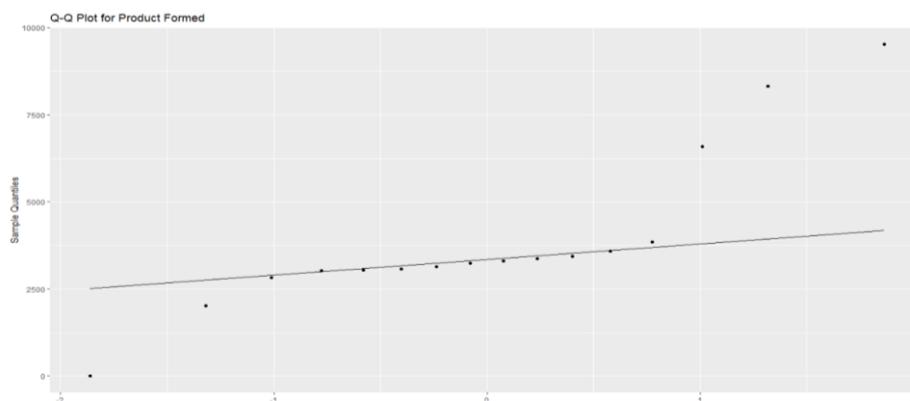
*Regresión lineal de peso seco*



Fuente: Autoras

**Figura 28**

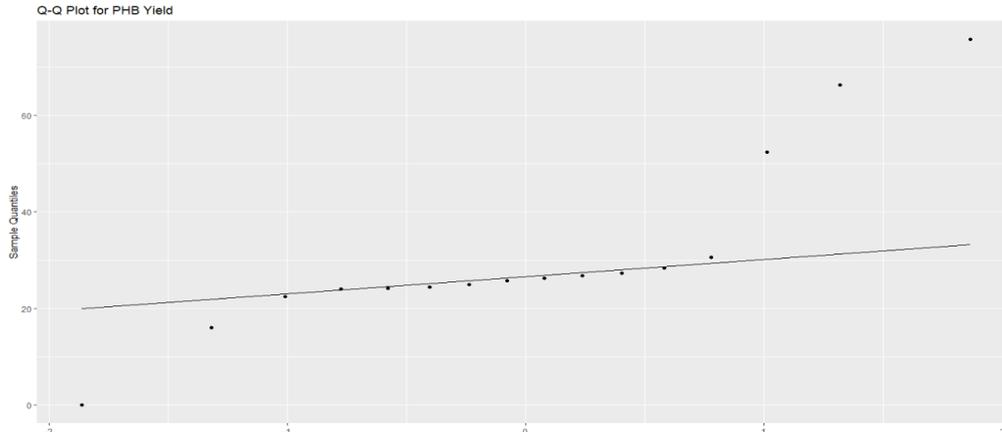
*Regresión lineal de producto formado*



Fuente: Autoras

## Figura 29

### Regresión lineal del rendimiento



Fuente: Autoras

### Diagrama de cajas

A continuación, Figura 30, se presenta un diagrama de cajas que ilustra la distribución del peso seco, peso húmedo, producto formado y rendimiento del PHB obtenido durante el proceso de fermentación. Este gráfico permite analizar la mediana, el rango intercuartílico y la variabilidad de los datos.

La figura A representa al peso húmedo, demuestra que la consistencia del proceso de fermentación es evidente en la estrecha dispersión de los datos (15-17 gramos). Una mediana cercana a los 16 gramos refleja una producción eficiente, que podría mejorarse con ajustes en las condiciones de fermentación. La ausencia de puntos atípicos resalta un control efectivo de las variables.

En la figura B se muestra el peso seco con una mediana de 5 gramos y un rango intercuartílico (IQR) que va de 4 a 6 gramos, lo que indica un IQR de aproximadamente 2 gramos, indicando una consistencia razonable y una variabilidad controlada sin puntos atípicos significativos. Este análisis sugiere una producción eficiente y de calidad.

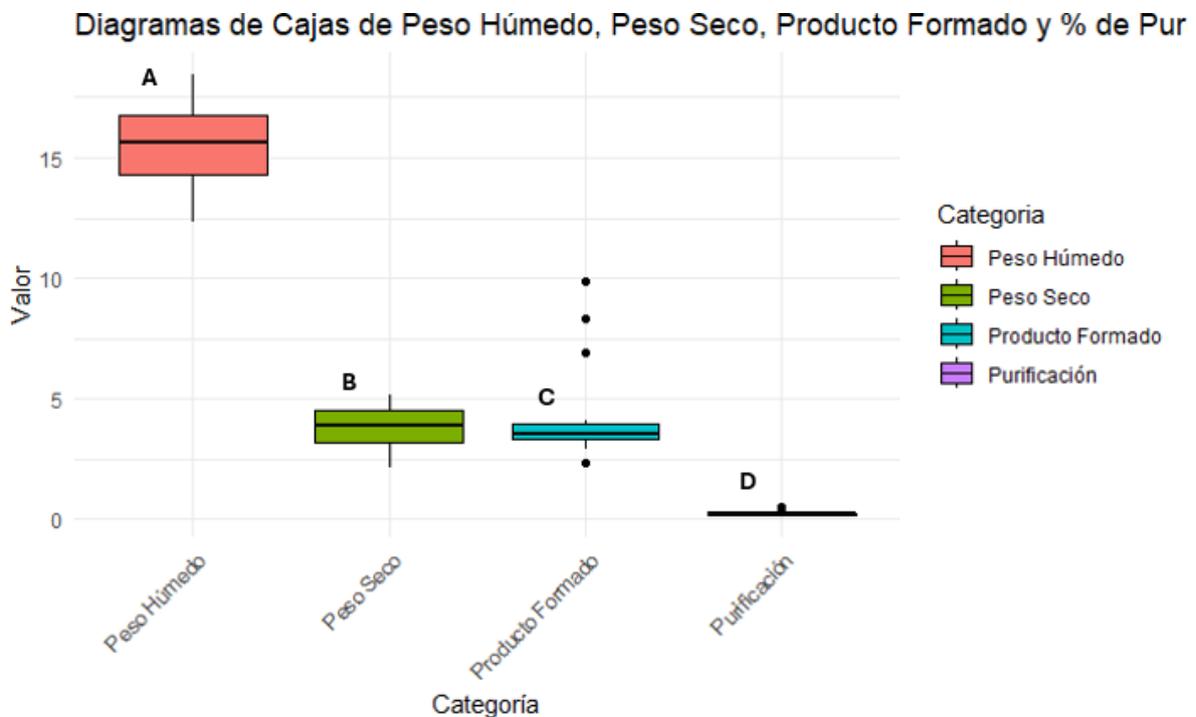
En la figura C el diagrama de cajas con consistencia la producción de PHB con una dispersión de datos entre 1.5 y 2.5 g con una mediana de 2 g, indicando un rendimiento

promedio razonable. Sin embargo, la presencia de puntos atípicos que están por debajo de 1.5 g, indica variaciones en comparación con las categorías que ya se mencionaron, este puede deberse por el proceso debido a condiciones de fermentación.

En la Figura D, se ilustra la dispersión de datos del producto, mostrando que la mediana está muy cerca de 0 gramos. El rango intercuartil (RIC) abarca desde 0 hasta aproximadamente 0,5 gramos, lo que da como resultado un RIC de aproximadamente 0,5 gramos. Esta categoría exhibe la mayor variabilidad relativa, con varios valores atípicos por debajo de 1,5 gramos, lo que indica una mayor dispersión de datos. Aunque la producción promedio de PHB parece razonable con una mediana de 0 gramos, la presencia de estos valores atípicos sugiere variaciones significativas en algunas muestras, posiblemente debido a factores como el tiempo de fermentación, la temperatura o la concentración bacteriana.

**Figura 30**

*Análisis de diagrama de cajas*



Nota: A) Diagrama de cajas de peso húmedo, B) Diagrama de cajas peso seco, C) Diagrama de cajas de producto formado, D) Diagrama de cajas de purificación. Fuente: Autoras

## **CAPITULO V**

### **5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **5.1. Conclusiones**

La investigación realizada acerca la producción de polihidroxibutirato (PHB) utilizando *Bacillus subtilis* y lactosuero como sustrato ha dado resultados significativos, ya que ha optimizado las condiciones de pH y el tiempo de fermentación para maximizar el rendimiento del biopolímero.

Las pruebas estadísticas utilizadas como ANOVA y Tukey HSD revelaron que la variación del pH (de 5 a 8) durante la hidrólisis enzimática no afecta significativamente la concentración de glucosa, lo que indica la estabilidad del proceso en diferentes rangos de pH. Este hallazgo simplifica la optimización de las condiciones de fermentación para la producción de PHB.

El estudio encontró que el pH influye notoriamente en el peso húmedo de la biomasa. Un pH ligeramente básico (7) proporcionó las condiciones más estables con las desviaciones estándar más bajas, mientras que las condiciones ácidas (pH 5) y neutras (pH 7) fueron más favorables para la producción de biomasa seca. El análisis del peso seco mostró que un pH de 6 el día 7 y un pH de 8 el día 5 produjeron las proporciones más altas de peso seco a húmedo, lo que sugiere que estos niveles de pH son óptimos para la acumulación de biomasa.

Con lo que respecta al rendimiento de PHB, los tratamientos a parámetros de pH de 7 y 8 durante un período de fermentación de 8 días fueron los más efectivos, logrando rendimientos máximos de 53.74 y 45.31, respectivamente. Estos hallazgos indican que los niveles de pH ligeramente básicos y los períodos de fermentación prolongados son esenciales para mejorar la producción de PHB.

Por lo cual se puede inferir que, este estudio muestra que la producción de PHB a partir de suero utilizando *Bacillus subtilis* se puede optimizar manteniendo el pH en niveles neutros

o ligeramente básicos y ampliando el tiempo de fermentación. Estos conocimientos son valiosos para desarrollar procesos industriales eficientes y sostenibles para la producción de biopolímeros.

Con base a los resultados obtenidos en la prueba de Shapiro-Wilk presentada en la Tabla 17 se concluye lo siguiente en cuanto a las hipótesis planteadas: Para los conjuntos de datos de biomasa húmeda y seca, el valor p es 0.4018503, siendo mayor que el nivel de significancia 0.05 esto nos indica que los datos se comportan de forma normal, por lo tanto, no se rechaza la H0 mientras que para los conjuntos de datos de producto formado y rendimiento, el valor p es 0.002806932, siendo menor que el nivel de significancia 0.05 esto indica que el rendimiento no se comporta de forma normal por lo que se rechaza H0.

## **5.2.Recomendaciones**

- Se debe realizar un pretratamiento del lactosuero utilizando técnicas de filtración, tratamiento térmico, centrifugación, con el objetivo de eliminar impurezas que podrían interferir en la obtención de PHB, así mismo se debe ajustar el pH para que el lactosuero sea un sustrato idóneo para el crecimiento la bacteria *Bacillus subtilis*.
- Realizar una agitación adecuada ya que es un parámetro clave para el proceso fermentativo, una velocidad de agitación adecuada es esencial para asegurar una mezcla uniformemente de los nutrientes y distribución del oxígeno, si el nivel de oxígeno es escaso, puede afectar negativamente el crecimiento bacteriano y producción del polihidroxibutirato.
- Considerar solventes alternativos al cloroformo para la purificación del PHB, por ejemplo, el etanol ya que su manipulación es más segura, menos toxico y costoso que el cloroformo, además que es más amigable con el medio ambiente.

- Elegir el microorganismo adecuado para la obtención del polihidroxitirato, con adaptabilidad a condiciones de pH y temperaturas, mayor aprovechamiento del lactosuero, con el fin de optimizar el rendimiento y producción de PHB.
- Para el análisis de datos estadísticos para los productos formados como para el rendimiento evaluar con métodos estadísticos no paramétricos o transformaciones de datos para estos casos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acharjee, S. A., Bharali, P., Ramachandran, D., Kanagasabai, V., Gogoi, M., Hazarika, S., Koch, P. J., Dutta, N., Maadurshni, G. B., Manivannan, J., Kumari, S., Walling, B., Gogoi, B., Alemtoshi, Sorhie, V., & Vishawkarma, V. (2024). Bioplástico sostenible a base de polihidroxitirato (PHB) derivado de *Bacillus* sp. KE4 aislado de efluentes de desechos de cocina. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 39, 101507. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2024.101507>
- Álvarez Campuzano, C. (2015). *ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO USANDO LACTOSUERO COMO MATERIA PRIMA*. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/54014/1053807168.2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Álvarez da Silva, L. (2016). *Bioplásticos: Obtención y aplicaciones de polihidroxicanoatos*. <https://idus.us.es/handle/11441/54517?show=full>
- Barrera Aldama, Y. (2011). *Evaluación del impacto económico de la elaboración de bebidas de suero dulce fermentado*. Universidad de La Habana. Facultad de Farmacia y Alimentos,. <https://elibro.net/es/ereader/bibliotecaufg/86214>
- Calero Mendoza, R. R. (2020). Español Obtención de polihidroxicanoatos a partir del suero lácteo por cultivos microbianos mixtos. En *Portal de libros Editorial UPSE*. UPSE. <https://incyt.upse.edu.ec/libros/index.php/upse/catalog/view/15/33/223-1>
- Calvopiña Toapanta, C. G., & Manotoa Betancourt, J. C. (2020). *Obtención de ácido láctico a partir de lactosuero y almidón de papa mediante fermentación láctica*. <https://www.dspace.uce.edu.ec/entities/publication/www.dspace.uce.edu.ec>
- Castillo Granda, Y. D. (2024). *Optimización de la concentración de ácido cítrico mediante la modulación de parámetros de fermentación con *Aspergillus niger* a partir de*

*lactosuero*. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/27667/1/UPS-CT011386.pdf>

Chico, M. F., & Sampedro, T. (2022). Production of Bioplastic and their Applications as Food Packaging: PLA AND PHB. *Alimentos Ciencia e Ingeniería*, 29(2), Article 2. <https://doi.org/10.31243/aci.v29i2.1858>

CIL, C. de la I. L. (2022). *Datos del sector / CIL Ecuador*. Centro de la Industria Láctea. <https://www.cil-ecuador.org/pagina-en-blanco-1>

Correa Bernal, J. N. (2021). *PROPUESTA DE PRODUCCIÓN DE BIOPLÁSTICO A PARTIR DEL SUERO DE LECHE GENERADO POR EL CLÚSTER DE DERIVADOS LÁCTEOS DE CAJAMARCA*. [https://tesis.usat.edu.pe/bitstream/20.500.12423/4052/1/TL\\_CorreaBeranalJulia.pdf](https://tesis.usat.edu.pe/bitstream/20.500.12423/4052/1/TL_CorreaBeranalJulia.pdf)

Earl, A. M., Losick, R., & Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16(6), 269-275. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>

Gänzle, M. G., Haase, G., & Jelen, P. (2008). Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *International Dairy Journal*, 18(7), 685-694. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.003>

González, G., Huerta, M., Sánchez, G., & Díaz, D. (2024). *Bacillus*: Una bacteria versátil, multifuncional y ampliamente aplicada. *Biología y Sociedad*, 7, 73-81. <https://doi.org/10.29105/bys7.13-108>

González García, Y., Meza Contreras, J. C., González Reynoso, O., & Córdova López, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 29(1), 77-115.

González Siso, M. I. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*, 57(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00036-3](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00036-3)

- González-León, Y., Ortega-Bernal, J., Anducho-Reyes, M. A., Mercado-Flores, Y., González-León, Y., Ortega-Bernal, J., Anducho-Reyes, M. A., & Mercado-Flores, Y. (2022). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 25. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.520>
- Hamdy, S. M., Danial, A. W., Gad El-Rab, S. M. F., Shoreit, A. A. M., & Hesham, A. E.-L. (2022). Production and optimization of bioplastic (Polyhydroxybutyrate) from *Bacillus cereus* strain SH-02 using response surface methodology. *BMC Microbiology*, 22(1), 183. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02593-z>
- Jafari, M. S., & Hejazi, P. (2024). Producción de poli(3-hidroxi-butirato) a partir de subproductos del procesamiento del maíz suplementado a partir de *Cupriavidus necator* mediante fermentación en estado sólido: Cultivo a escala de matraz y biorreactor. *Journal of Biotechnology*, 392, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2024.06.013>
- Kareem, H. A., Khalaf, M., Gebreel, H., El-Mahalawy, A., Omar, S., & Hamed, D. (s. f.). *Production of Biopolymer (PHB) from Whey by Local Strain of Bacillus cereus*. [https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/39/120/39120307.pdf](https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/39/120/39120307.pdf)
- Khattab, A. M., Esmael, M. E., Farrag, A. A., & Ibrahim, M. I. A. (2021). Evaluación estructural del bioplástico (poli-3-hidroxi-butirato) producido por *Bacillus flexus* Azu-A2 a través de la valorización del suero del queso. *International Journal of Biological Macromolecules*, 190, 319-332. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.090>
- Kovács, Á. T. (2019). *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 27(8), 724-725. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.008>
- Kunasundari, B., & Sudesh, K. (2011). Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters*, 5(7), 620-634. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.60>

- Lema Guamán, J. A. (2023). *Aprovechamiento del suero de la leche para la obtención de ácido láctico*. [bachelorThesis, Riobamba, Universidad Nacional de Chimborazo]. <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/10593>
- Lemos Delgado, A. C., & Mina Cordoba, A. (2015). Polihidroxicanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador técnico*, 79(1), 93-101.
- Mazorra-Manzano, M. Á., Moreno-Hernández, J. M., Mazorra-Manzano, M. Á., & Moreno-Hernández, J. M. (2019). Propiedades y opciones para valorizar el lactosuero de la quesería artesanal. *CienciaUAT*, 14(1), 133-144. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v14i1.1134>
- Mendez Reyes, D. A. (2016). *Modelamiento matemático y optimización del proceso de producción de polihidroxicanoatos empleando la bacteria Burkholderia cepacia B27 a partir de ácidos grasos*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/57458>
- Menéndez Castillo, T. (2018). *Fabricación de quesos en el mundo*. El Cid Editor.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Molero-Méndez, M., Castro-Albornoz, G., & Briñez-Zambrano, W. (2017). Evaluación Físicoquímica Del Lactosuero Obtenido De La Producción De Queso Blanco Aplicando Un Método Artesanal. *Revista Científica*, XXVII(3), 149-153.
- Morales, L. P. H. (2017). *Evaluación de la aceptabilidad y estabilidad de una bebida láctea endulzada con hidrolizado de lactosa y enriquecida con hierro*. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/62409/1017141876.2017.pdf?sequence>
- Mostafa, Y. S., Alrumman, S. A., Alamri, S. A., Otaif, K. A., Mostafa, M. S., & Alfaify, A. M. (2020). Bioplastic (poly-3-hydroxybutyrate) production by the marine bacterium

- Pseudodonghicola xiamenensis through date syrup valorization and structural assessment of the biopolymer. *Scientific Reports*, 10(1), 8815. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65858-5>
- Muñoz Ariza, O. M., & Ramos Farfán, A. F. (2019). *EVALUACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL POLÍMERO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) P3HB OBTENIDO DE LA CEPA Burkholderia cepacia B27 CON UN SOLVENTE ORGÁNICO NO HALOGENADO*. <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7396/1/6112776-2019-1-IQ.pdf>
- Murillo, J. P. M. (2018). Elaboración de manjar con nueces (juglans regia) utilizando diferentes niveles de lactosuero como sustituto de la leche. *Pro Sciences: Revista de Producción, Ciencias e Investigación*, 2(10), 27-33. <https://doi.org/10.29018/issn.2588-1000vol2iss10.2018pp27-33>
- Naranjo Vasco, J. M. (2010). *Producción de polihidroxitirato a partir de residuos agroindustriales*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/70146>
- Philip, S. E., Sengupta, S., Keshavarz, T., & Roy, I. (2009). Effect of impeller speed and pH on the production of Poly(3-hydroxybutyrate) using Bacillus cereus SPV. *Biomacromolecules*, 10(4), Article 4. <https://doi.org/10.1021/bm801395p>
- Posada, K., Terán, D. M., & Ramírez-Navas, J. S. (2011). *Empleo de lactosuero y sus componentes en la elaboración de postres y productos de confitería*. [https://www.researchgate.net/publication/257890639\\_Empleo\\_de\\_lactosuero\\_y\\_sus\\_componentes\\_en\\_la\\_elaboracion\\_de\\_postres\\_y\\_productos\\_de\\_confiteria](https://www.researchgate.net/publication/257890639_Empleo_de_lactosuero_y_sus_componentes_en_la_elaboracion_de_postres_y_productos_de_confiteria)
- Poveda E, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista chilena de nutrición*, 40(4), 397-403. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182013000400011>

- Rámirez Pérez, L. A., & Sánchez Vargas, D. (2019). *EVALUACIÓN DE DIFERENTES MEZCLAS DE POLIHIDROXIBUTIRATO (P3HB) CON ADITIVOS PARA LA OBTENCIÓN DE UN MATERIAL POLIMÉRICO*.  
<https://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/7718>
- Ramos Farfán, A. F. (2019). *Extracción, purificación y modificación de un biopolímero del tipo poli (3-hidroxibutirato) obtenido de la fermentación de ácidos grasos con B. cepacia*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/76043>
- Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>
- Rivera Briso, A. L., & Serrano Aroca, Á. (2018). Métodos de refuerzo mecánico del poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) para aplicaciones industriales avanzadas. *Nereis: revista iberoamericana interdisciplinar de métodos, modelización y simulación*, 10, 79-94.
- Rodríguez, P. A., & Arenas, R. (2018). *Hans Christian Gram y su tinción*. 16(2).  
<https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>
- Sagar, A. (2021). *Normas McFarland: Principio, preparación, usos, limitaciones*.  
<https://microbenotes.com/mcfarland-standards/>
- SANCHEZ GONZALES, J. A., & MARTINEZ SALDANA, Y. E. (s. f.). *Determinación de Biomasa: Peso Húmedo, Peso Seco y Turbidimetría | Course Hero*. Recuperado 27 de julio de 2024, de <https://www.coursehero.com/es/file/211223826/pdf-labo2-peso-humedo-peso-seco-turbidimetriadocx/>
- Soto, J. A. G., & Toro, Ó. J. S. (2019). Producción de galactooligosacáridos: Alternativa para el aprovechamiento del lactosuero-Una revisión. *Ingeniería y Desarrollo*, 37(1), Article 1. <https://doi.org/10.14482/inde.37.1.637>

- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., Santos-Villalobos, S. de los, Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & Santos-Villalobos, S. de los. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Williams Zambrano, M. B., & Dueñas Rivadeneira, A. (2021). Alternativas para el aprovechamiento del lactosuero: Antecedentes investigativos y usos tradicionales. *La Técnica*, 11(2), 39-50.

## **ANEXOS**

### **Anexo 1. Proceso de filtración del lactosuero**



### **Anexo 2. Centrifugación del lactosuero**



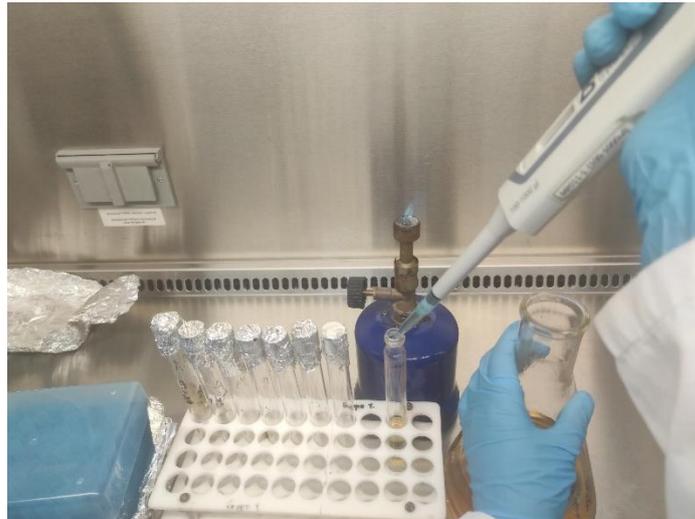
### Anexo 3. Lactosuero centrifugado



### Anexo 4. Ajuste de pH al lactosuero



### Anexo 5. Siembra del microorganismo *Bacillus subtilis*



### Anexo 6. Introducción de *Bacillus subtilis* en sustrato



## Anexo 7. Muestras para la fermentación



## Anexo 8. Biomasa húmeda



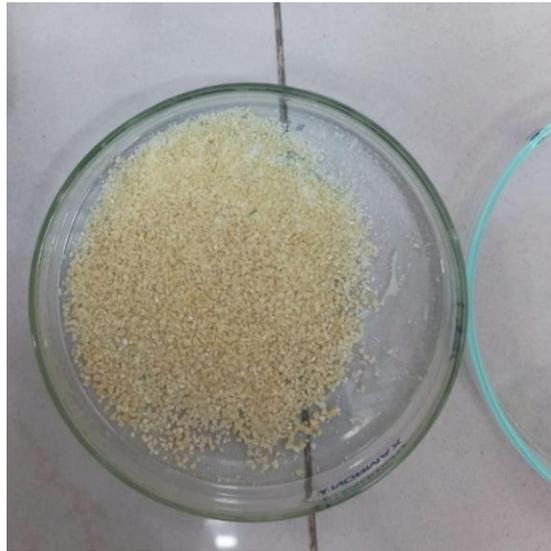
**Anexo 9. Muestras en cámara de climatización para su secado**



**Anexo 10. Biomasa seca**



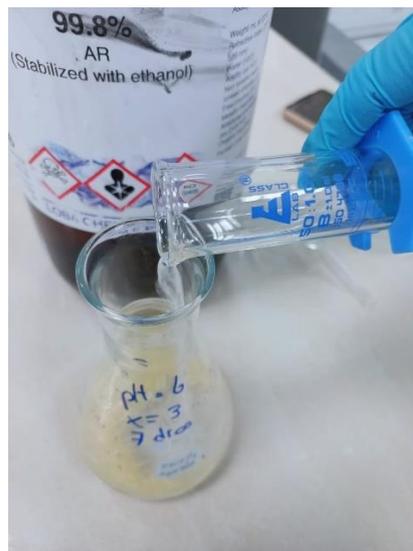
### **Anexo 11. Biomasa triturada**



### **Anexo 12. Adición de cloroformo a la biomasa**



### Anexo 13. Purificación de las muestras con cloroformo



### Anexo 14. Evaporación del solvente

