



**REPÚBLICA DEL ECUADOR UNIVERSIDAD
ESTATAL DE MILAGRO**

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADOS**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

Evaluación de la producción de lipasa de tres especies de *Bacillus* y establecimiento de condiciones de cultivo que optimicen su producción, con el propósito de identificar la cepa con mayor potencial para su aplicación en soluciones biotecnológicas

Autores:

Sara Susana Molina Tirado

Karla Pamela Naranjo Luna

Tutor:

Juan Diego Valenzuela Cobos, PhD.

Milagro, 2026

Derechos de Autor

Sr. Dr.

Fabrizio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro Presente.

Yo, **Sara Susana Molina Tirado** y yo **Karla Pamela Naranjo Luna**, en calidad de autores y titulares de los derechos morales y patrimoniales de este proyecto de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedemos los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizado como requisito previo para la obtención de mi Grado, de **Magíster en Biotecnología**, como aporte a la Línea de Investigación **Biotecnológica** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedemos a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservamos a nuestro favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizamos a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y ubicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Los autores declaran que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, **11 de septiembre del 2026**



Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
**SARA SUSANA MOLINA
TIRADO**

Sara Susan Molina Tirado

C.I.: 0950122515



Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
**KARLA PAMELA
NARANJO LUNA**

Karla Pamela Naranjo Luna

C.I.: 0950721084

Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación

Yo, **Juan Diego Valenzuela Cobos**, en mi calidad de tutor del trabajo de titulación, elaborado por **Sara Susana Molina Tirado** y **Karla Pamela Naranjo Luna**, cuyo tema es **Evaluación de la producción de lipasa de tres especies de *Bacillus* y establecimiento de condiciones de cultivo que optimicen su producción, con el propósito de identificar la cepa con mayor potencial para su aplicación en soluciones biotecnológicas**, que aporta a la Línea de Investigación **Biotecnológica**, previo a la obtención del Grado **Magíster en Biotecnología**. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 11 de septiembre del 2026



Juan Diego Valenzuela Cobos, PhD

C.I.: 0927981670

FACULTAD DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACIÓN MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

En la Facultad de Posgrado de la Universidad Estatal de Milagro, a los once días del mes de septiembre del año dos mil veintiseis., siendo las 10:00 horas, de forma VIRTUAL comparece el/la maestrante, BIOL. NARANJO LUNA KARLA PAMELA, a defender el Trabajo de Titulación denominado " **EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASA DE TRES ESPECIES DE BACILLUS Y ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES DE CULTIVO QUE OPTIMICEN SU PRODUCCIÓN, CON EL PROPÓSITO DE IDENTIFICAR LA CEPA CON MAYOR POTENCIAL PARA SU APLICACIÓN EN SOLUCIONES BIOTECNOLÓGICAS**", ante el Tribunal de Calificación integrado por: SEVILLA CARRASCO JAIME DAVID, Presidente(a), CHENCHE LOPEZ OSCAR MAURICIO en calidad de Vocal; y, Mae. GUILLEN BONILLA ALEX EDWIN que actúa como Secretario/a.

Una vez defendido el trabajo de titulación; examinado por los integrantes del Tribunal de Calificación, escuchada la defensa y las preguntas formuladas sobre el contenido del mismo al maestrante compareciente, durante el tiempo reglamentario, obtuvo las siguientes calificaciones:

TRABAJO DE TITULACION	59.61
DEFENSA ORAL	38.90
PROMEDIO	98.51
EQUIVALENTE	EXCELENTE

Para constancia de lo actuado firman en unidad de acto el Tribunal de Calificación, siendo las 11:00 horas.



Firmado electrónicamente por:
JAIME DAVID
SEVILLA CARRASCO

SEVILLA CARRASCO JAIME DAVID
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
OSCAR MAURICIO
CHENCHE LOPEZ

CHENCHE LOPEZ OSCAR MAURICIO
VOCAL



Firmado electrónicamente por:
ALEX EDWIN
GUILLEN BONILLA

MGS GUILLEN BONILLA ALEX EDWIN
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
KARLA PAMELA
NARANJO LUNA

NARANJO LUNA KARLA PAMELA
MAESTRANTE

FACULTAD DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACIÓN MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

En la Facultad de Posgrado de la Universidad Estatal de Milagro, a los once días del mes de septiembre del año dos mil veintiseis., siendo las 10:00 horas, de forma VIRTUAL comparece el/la maestrante, BIOL. MOLINA TIRADO SARA SUSANA, a defender el Trabajo de Titulación denominado " **EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASA DE TRES ESPECIES DE BACILLUS Y ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES DE CULTIVO QUE OPTIMICEN SU PRODUCCIÓN, CON EL PROPÓSITO DE IDENTIFICAR LA CEPA CON MAYOR POTENCIAL PARA SU APLICACIÓN EN SOLUCIONES BIOTECNOLÓGICAS**", ante el Tribunal de Calificación integrado por: SEVILLA CARRASCO JAIME DAVID, Presidente(a), CHENCHE LOPEZ OSCAR MAURICIO en calidad de Vocal; y, Msc. GUILLEN BONILLA ALEX EDWIN que actúa como Secretario/a.

Una vez defendido el trabajo de titulación; examinado por los integrantes del Tribunal de Calificación, escuchada la defensa y las preguntas formuladas sobre el contenido del mismo al maestrante compareciente, durante el tiempo reglamentario, obtuvo las siguientes calificaciones:

TRABAJO DE TITULACION	59.61
DEFENSA ORAL	37.75
PROMEDIO	97.36
EQUIVALENTE	EXCELENTE

Para constancia de lo actuado firman en unidad de acto el Tribunal de Calificación, siendo las 11:00 horas.



SEVILLA CARRASCO JAIME DAVID
SEVILLA CARRASCO

SEVILLA CARRASCO JAIME DAVID
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



CHENCHE LOPEZ OSCAR MAURICIO
CHENCHE LOPEZ

CHENCHE LOPEZ OSCAR MAURICIO
VOCAL



GUILLEN BONILLA ALEX EDWIN
GUILLEN BONILLA

MGS GUILLEN BONILLA ALEX EDWIN
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL



MOLINA TIRADO SARA SUSANA
MOLINA TIRADO

MOLINA TIRADO SARA SUSANA
MAESTRANTE

Dedicatoria

A mis padres, por ser mi mayor ejemplo de esfuerzo, amor y perseverancia, y por brindarme su apoyo incondicional en cada etapa de este camino. A mi esposo, por su paciencia, comprensión y apoyo constante durante este proceso; su compañía fue fundamental para alcanzar este logro. Y a mi amado hijo, quien llegó a mi vida durante este camino académico y quien se convirtió en mi mayor inspiración para seguir adelante.

Karla Pamela Naranjo Luna

A mis padres, por su amor, confianza y apoyo incondicional a lo largo de mi formación académica y personal. A mi pareja, por acompañarme con paciencia, comprensión y aliento en cada desafío. Este logro también les pertenece porque su apoyo hizo posible la culminación de esta meta.

Sara Susana Molina Tirado

Agradecimientos

Expreso mi más sincero agradecimiento a mis padres y a mi esposo por su amor, apoyo incondicional y respaldo constante durante esta etapa académica. Su confianza y motivación fueron fundamentales para alcanzar esta meta. Agradezco también a nuestro tutor, Juan Diego Valenzuela Cobos, PhD., por su orientación y acompañamiento durante este proceso de investigación.

Karla Pamela Naranjo Luna

Quiero expresar mi gratitud a mis padres y a mi pareja, quienes me acompañaron con paciencia en cada etapa de este proceso. Su acompañamiento fue un pilar fundamental para superar cada desafío y alcanzar este logro. Asimismo, agradezco a nuestro tutor, Juan Diego Valenzuela Cobos, PhD., por su guía, disposición y acompañamiento durante el desarrollo de esta investigación.

Sara Susana Molina Tirado

De manera conjunta, expresamos nuestro más sincero agradecimiento al Blgo. John Salazar, por facilitar las cepas bacterianas certificadas empleadas en este estudio. Asimismo, manifestamos nuestro especial reconocimiento a la Blga. Doménica Valdez, por su invaluable apoyo, compromiso y disposición durante el desarrollo de la fase experimental de esta investigación. Su colaboración y asistencia fueron fundamentales para la ejecución de los ensayos y el logro de los objetivos planteados.

Resumen

Las lipasas microbianas constituyen biocatalizadores de creciente interés industrial por su capacidad de hidrolizar triglicéridos bajo condiciones controladas. El género *Bacillus* representa una fuente estratégica de lipasas extracelulares por su estatus GRAS, rápido crecimiento y tolerancia ambiental. La presente investigación tuvo como objetivo determinar las condiciones óptimas de temperatura y tiempo de incubación que maximizan la producción de lipasa en la cepa de *Bacillus* con mayor actividad lipásica. En la primera fase, se evaluó cualitativamente la actividad lipásica de tres cepas certificadas ATCC (*Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23842, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 y *Bacillus pumilus* ATCC 700214) mediante difusión en pozo en agar Rodamina B suplementado con aceite de girasol usado, utilizando *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 como control positivo. *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* y *Bacillus amyloliquefaciens* presentaron los halos fluorescentes de mayor intensidad, por lo que esta última fue seleccionada para la fase cuantitativa, dada su menor caracterización previa en la literatura.

En la segunda fase se evaluó el efecto de la temperatura (30, 35 y 40°C) y el tiempo de incubación (24, 48, 72 y 96 h) sobre la producción de lipasa mediante un diseño factorial y cuantificación titulométrica. El ANOVA bifactorial mostró que el tiempo de incubación fue el único factor significativo ($p < 0,001$), mientras que la temperatura ($p = 0,299$) y la interacción entre ambos factores ($p = 0,867$) no lo fueron. La prueba de Tukey identificó las 48 horas como la condición más eficiente, sin diferencias significativas a las 72 y 96 horas. Estos resultados confirman la variabilidad lipásica entre cepas de *Bacillus* y establecen el tiempo de incubación como la variable determinante para optimizar la producción de lipasa por *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842, sentando bases para bioprocesos locales de bajo costo.

Palabras clave: lipasas microbianas, *Bacillus*, condiciones de cultivo, tiempo de incubación, actividad lipásica.

Abstract

Microbial lipases are biocatalysts of growing industrial interest due to their ability to hydrolyze triglycerides under controlled conditions. The genus *Bacillus* represents a strategic source of extracellular lipases owing to its GRAS status, rapid growth, and environmental tolerance. This study aimed to determine the optimal temperature and incubation time conditions that maximize lipase production in the *Bacillus* strain with the highest lipase activity. In a first phase, the lipase activity of three ATCC-certified strains (*Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23842, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633, and *Bacillus pumilus* ATCC 700214) was qualitatively evaluated using the well-diffusion method on Rhodamine B agar supplemented with used sunflower oil, with *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 as a positive control. *B. subtilis* subsp. *spizizenii* and *B. amyloliquefaciens* exhibited the most intense fluorescent halos, so the latter was selected for the quantitative phase, given its more limited prior characterization in the literature.

In the second phase, the effect of temperature (30, 35, and 40 °C) and incubation time (24, 48, 72, and 96 h) on lipase production was evaluated using a factorial design and titrimetric quantification. Two-way ANOVA showed that incubation time was the only significant factor ($p < 0.001$), whereas temperature ($p = 0.299$) and the interaction between both factors ($p = 0.867$) were not significant. Tukey's test identified 48 hours as the most efficient condition, with no significant differences compared with 72 and 96 hours. These results confirm the lipolytic variability among *Bacillus* strains and establish incubation time as the determining variable for optimizing lipase production by *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842, laying the groundwork for low-cost local bioprocesses.

Keywords: microbial lipases, *Bacillus*, culture conditions, incubation time, lipase activity.

Lista de Figuras

Figura 1 Curva de producción de lipasa de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23842 en función del tiempo de incubación, a las tres temperaturas evaluadas. Los puntos representan la media $\pm$ desviación estándar (n = 3)	35
Figura 2 Preparación de placas de agar Rodamina B para el ensayo de difusión en pozo. a. Realización de pocillos de aproximadamente 5 mm de diámetro en placas de agar LB suplementado con aceite de girasol usado (2,5% v/v) y Rodamina B (0,001% p/v). b. Toma de muestra de cultivo de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. evaluadas, para centrifugación y posterior inoculación de los pocillos con el sobrenadante	51
Figura 3 Inoculación de la cepa con mayor potencial lipásico, seleccionada a partir de los resultados del cribado cualitativo, en el medio de cultivo específico para la producción de lipasa extracelular, previo a su incubación bajo las distintas combinaciones de temperatura y tiempo de incubación	52
Figura 4 Preparación de las muestras para la cuantificación de la actividad lipásica por el método titrimétrico, mediante la adición de fenolftaleína al 1% como indicador y titulación con NaOH 0,05 M.....	53

Lista de Tablas

Tabla 1 Composición de medio de cultivo Caldo Tripticasa de Soya (TSB).....	26
Tabla 2 Composición de medio de cultivo para producción de lipasa extracelular.....	27
Tabla 3 Diseño experimental para la evaluación del efecto de temperatura y tiempo de incubación sobre la producción de lipasa en la cepa de <i>Bacillus</i> seleccionada.....	28
Tabla 4 Evaluación cualitativa de la actividad lipásica de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en agar Rodamina B bajo luz UV-A ($\lambda = 350\text{--}360\text{ nm}$).....	32
Tabla 5 Actividad lipásica (U/mL) de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23842 bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación	34

Índice / Sumario

Derechos de Autor.....	II
Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación.....	III
ACTA DE CALIFICACIÓN.....	IV
Dedicatoria.....	VI
Agradecimientos.....	VII
Resumen	VIII
Abstract.....	IX
Lista de Figuras.....	X
Lista de Tablas	XI
Introducción	1
CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación.....	4
1.1 Planteamiento del Problema.....	4
1.2 Delimitación del Problema.....	5
1.3 Formulación del Problema	5
1.4 Preguntas de Investigación.....	5
1.5 Objetivos.....	5
1.5.1 Objetivo General.....	5
1.5.2 Objetivos Específicos.....	5
1.6 Hipótesis	6
1.7 Justificación	6
1.8 Declaración de las Variables (Operacionalización).....	7
1.8.1 Variables Independientes	7
1.8.2 Variable Dependiente.....	7
CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial	8
2.1 Antecedentes Referenciales.....	8
2.1.1 Diversidad de Microorganismos Productores de Lipasas	8
2.1.2 El Género <i>Bacillus</i> como Fuente Preferente de Lipasas Industriales	9
2.1.3 Métodos de Detección y Cribado de Actividad Lipolítica	9
2.1.4 Efecto de las Condiciones de Cultivo sobre la Producción de Lipasa en <i>Bacillus</i>	10
2.1.5 Vacío de Investigación y Pertinencia del Estudio.....	10
2.2 Marco Conceptual	11
2.3 Marco Teórico.....	13
2.3.1 Las Lipasas: Definición, Clasificación y Propiedades Bioquímicas	13

2.3.2	El Género <i>Bacillus</i> como Fuente de Lipasas Industriales	16
2.3.3	Factores que Influyen en la Producción de Lipasas Microbianas.....	18
2.3.4	Métodos de Optimización de la Producción de Lipasas	20
2.3.5	Métodos de Detección de Actividad Lipolítica	21
2.3.6	Aplicaciones Biotecnológicas de las Lipasas Microbianas	23
CAPÍTULO III: Diseño Metodológico		25
3.1	Tipo y Diseño de Investigación	25
3.2	La Población y la Muestra.....	25
3.3	Los Métodos y las Técnicas	25
3.3.1	Preparación de Inóculos.....	25
3.3.2	Determinación Cualitativa de Actividad Lipasa	26
3.3.3	Determinación Cuantitativa de Actividad Lipasa	27
3.3.4	Cuantificación de Actividad Lipásica	28
3.4	Procesamiento Estadístico de la Información	30
CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados		31
4.1	Análisis e Interpretación de Resultados	31
4.1.1	Evaluación Cualitativa de la Actividad Lipásica: Ensayo en Agar Rodamina B	31
4.1.1.1	Medición de la actividad lipasa.....	32
4.1.2	Selección de la Cepa de <i>Bacillus</i> con Mayor Potencial Lipásico	32
4.1.3	Efecto de la Temperatura y el Tiempo de Incubación sobre la Producción de Lipasa en <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23842	33
CAPÍTULO V: Conclusiones, Discusión y Recomendaciones		36
5.1	Discusión	36
5.2	Conclusiones	39
5.3	Recomendaciones	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		43

Introducción

Las enzimas microbianas constituyen uno de los biocatalizadores de mayor importancia en la biotecnología, debido a su versatilidad catalítica, alta especificidad de sustrato y facilidad de producción a gran escala. Entre estas, las lipasas (triacilglicerol acil-hidrolasas, EC 3.1.1.3) destacan por su capacidad de catalizar la hidrólisis de triglicéridos y de mediar reacciones de síntesis como la esterificación, transesterificación e interesterificación, bajo condiciones controladas, lo que las convierte en herramientas indispensables para sectores industriales tales como la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, de producción de biocombustibles y de tratamiento de residuos grasos (Gupta et al., 2004; Sarmah et al., 2018; Abdelaziz et al., 2025). Contrario a las lipasas de origen animal y vegetal, las lipasas microbianas ofrecen ventajas sustanciales en términos de rendimiento productivo, estabilidad fisicoquímica, menor costo de obtención y mayor facilidad de manipulación genética (Massadeh & Sabra, 2011; Chandra et al., 2020).

Entre los microorganismos productores de lipasas, el género *Bacillus* ocupa una posición estratégica debido a su estatus GRAS (Generally Recognized as Safe), su rápido crecimiento en medios económicos, su tolerancia a condiciones ambientales variables y su eficiente sistema de producción de enzimas (Schallmeyer et al., 2004; Danilova & Sharipova, 2020). Especies como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus amyloliquefaciens* se han reportado en la literatura como fuentes de lipasas con propiedades bioquímicas específicas, que incluyen termoestabilidad, actividad en condiciones alcalinas y especificidades de sustrato variables, lo que amplía su espectro de aplicación industrial (Gupta et al., 2021; Ali et al., 2023; Kumar et al., 2023). No obstante, la producción de lipasa por este género exhibe una marcada variabilidad, influenciada por factores fisicoquímicos como temperatura, pH y tiempo de incubación, además del tipo de sustrato empleado, lo que subraya la necesidad de estudios comparativos y de optimización sistemática (Al Mohaini et al., 2022; Nadaf et al., 2025).

A nivel nacional, la disponibilidad de lipasas microbianas resulta limitada y económicamente costosa, con un mercado dominado por productos importados que limitan su implementación en procesos industriales locales e iniciativas comunitarias orientadas a la degradación de residuos grasos, la formulación de detergentes biodegradables y el aprovechamiento de subproductos agroindustriales. Esta problemática pone de manifiesto una

brecha significativa entre la demanda de soluciones biotecnológicas accesibles y la disponibilidad de alternativas de producción regional, lo que genera una oportunidad relevante para el desarrollo de investigaciones orientadas al establecimiento de bioprocesos locales, reproducibles y económicamente viables.

En este contexto, la presente investigación aborda el problema de la variabilidad en la producción de lipasa entre cepas del género *Bacillus* y la escasez de información sobre las condiciones de cultivo que optimizan su rendimiento enzimático bajo condiciones controladas. Se plantea que tanto la actividad lipásica como su máxima expresión productiva dependen de la cepa empleada y de las condiciones fisicoquímicas del cultivo, específicamente la temperatura y el tiempo de incubación, y que existe una combinación óptima de las variables que maximiza la síntesis extracelular de lipasa en la cepa con mayor potencial lipolítico.

Con el propósito de responder a esta problemática, la investigación se plantea como objetivo general determinar las condiciones óptimas de temperatura y tiempo de incubación para maximizar la producción de lipasa en la cepa de *Bacillus* con mayor actividad lipásica, evaluada mediante métodos cualitativos y cuantitativos. Para ello, se adoptó un diseño experimental factorial con dos variables independientes (temperatura de incubación y tiempo de incubación) y una variable dependiente (actividad lipásica). La fase inicial comprende la selección cualitativa de la cepa de mayor potencial lipolítico mediante el método de agar Rodamina B, seguida de una fase cuantitativa en la que se evalúa el efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción enzimática mediante titulometría.

La importancia de este estudio radica en su contribución a la generación de conocimiento científico aplicable al desarrollo de alternativas biotecnológicas de bajo costo adaptadas a las necesidades del contexto ecuatoriano. La identificación de una cepa con alta actividad lipolítica y la determinación de sus condiciones óptimas de cultivo sientan las bases para el diseño de bioprocesos locales orientados al tratamiento de residuos grasos, la síntesis de productos con valor agregado y la producción de detergentes enzimáticos biodegradables, en línea con los principios de la biotecnología sostenible y la economía circular.

El presente documento se organiza en cuatro capítulos. El Capítulo I expone el planteamiento, la delimitación y la formulación de la problemática, incluyendo las preguntas de investigación, los objetivos, la hipótesis, la justificación y la operacionalización de las variables. El Capítulo II desarrolla los antecedentes referenciales, el marco conceptual y teórico

relacionado con las lipasas microbianas, el género *Bacillus* como productor enzimático, los factores que inciden en la producción de lipasas y los métodos de detección y cuantificación de actividad lipolítica. El Capítulo III describe el diseño metodológico de la investigación, con detalle de los procedimientos experimentales y métodos de análisis estadístico empleados. Finalmente, en el Capítulo IV se presentan los resultados obtenidos, y en el Capítulo V, la discusión crítica de la literatura científica disponible, las conclusiones y las recomendaciones derivadas del estudio.

CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación

1.1 Planteamiento del Problema

Las enzimas microbianas han ganado especial importancia debido a su alta capacidad catalítica en relación a enzimas de origen animal y vegetal. Estas se caracterizan por sus altos rendimientos, la simplicidad de manipulación genética, el rápido crecimiento de microorganismos en medios económicos y su mayor estabilidad (Massadeh & Sabra, 2011; Chandra et al., 2020). Entre estas enzimas, las lipasas sobresalen por su variedad de aplicaciones en industrias como: alimentos, biorremediación, detergentes, cosmética y biocombustibles, lo que conlleva a la búsqueda de microorganismos capaces de producir enzimas de alto rendimiento, fácil producción y estabilidad térmica (Sousa et al., 2023).

Pese a que una variedad de microorganismos, como *Arthrobacter*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, ha sido estudiada por su capacidad lipolítica, el género *Bacillus* sigue siendo el más explorado debido a su fácil manipulación, crecimiento rápido y tolerancia ambiental (Gupta et al., 2021, Ali et al., 2023; Kumar et al., 2023). No obstante, la producción de lipasas puede variar y depender de factores como temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes (Al Mohaini et al., 2022, Nadaf et al., 2025).

En Ecuador y otros países, se evidencia la necesidad de alternativas biotecnológicas económicas para el tratamiento de grasas, la valorización de subproductos agroindustriales y la elaboración de detergentes biodegradables. Sin embargo, la disponibilidad de lipasas microbianas en el mercado aún es limitada y costosa, lo que limita su implementación a nivel industrial y en las comunidades que precisan soluciones de bajo costo para procesos de degradación de grasas u optimización de procesos productivos.

Considerando esta problemática, se torna necesaria la investigación de cepas de *Bacillus* con alto potencial lipolítico e incremento en la eficiencia de su cultivo, de manera que se dé lugar a procesos con mayor rendimiento, reproducibles y económicamente viables. Por lo tanto, esta investigación se centra en la identificación de una cepa de *Bacillus* con alta actividad lipolítica en un medio de cultivo óptimo que maximice su producción y su capacidad de implementación en soluciones biotecnológicas adaptadas a las necesidades locales.

1.2 Delimitación del Problema

La investigación se centra en la evaluación y optimización de la producción de la enzima lipasa por una cepa seleccionada del género *Bacillus*, bajo diferentes condiciones de cultivo (temperatura y tiempo de incubación). El estudio inicia con una selección preliminar de la cepa de mayor actividad lipasa y, posteriormente, la evaluación de diferentes condiciones de cultivo.

Se excluyen del estudio la purificación de la enzima, la caracterización molecular o genética del microorganismo seleccionado, el escalamiento industrial del proceso y la evaluación de aplicaciones directas de la lipasa obtenida.

1.3 Formulación del Problema

- ¿Cómo influyen las condiciones de cultivo en la producción de la enzima lipasa?

1.4 Preguntas de Investigación

- ¿Qué cepa del género *Bacillus* presenta mayor actividad lipásica en el método de detección en agar Rodamina B?
- ¿Cómo afectan la temperatura y el tiempo de incubación a la producción de lipasa?
- ¿Cuál es la combinación de condiciones de cultivo que permite obtener la mayor actividad lipásica?
- ¿Cuáles son las principales limitaciones experimentales asociadas a la optimización de la producción de lipasa en condiciones de laboratorio?

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General

- Determinar las condiciones óptimas de temperatura y tiempo de incubación para maximizar la producción de lipasa en la cepa de *Bacillus* con mayor actividad lipásica, evaluada mediante métodos cualitativos y cuantitativos.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Evaluar cualitativamente la actividad lipásica de tres cepas del género *Bacillus* mediante el método en agar Rodamina B, utilizando el diámetro de halos como indicador de actividad enzimática.

- Seleccionar la cepa de *Bacillus* con mayor actividad lipásica con base a los resultados obtenidos y emplearla en los ensayos de optimización.
- Evaluar el efecto de la temperatura y tiempo de incubación sobre la producción de la lipasa en la cepa seleccionada, mediante un diseño experimental que permita identificar las condiciones óptimas.
- Cuantificar la actividad lipasa mediante titulometría, bajo condiciones óptimas establecidas.

1.6 Hipótesis

Se plantea que la actividad lipasa de las cepas del género *Bacillus* evaluadas difieren entre sí y que la producción de lipasa de la cepa con mayor potencial lipolítico está condicionada por la temperatura y el tiempo de incubación, existiendo una combinación de ambas variables que maximiza su actividad enzimática.

1.7 Justificación

Las lipasas microbianas son enzimas de interés biotecnológico debido a su capacidad para catalizar la hidrólisis de grasas y lípidos en condiciones controladas de temperatura y pH, tiempo de incubación, etc. Estas características le dan relevancia en diversas industrias como: alimentaria, farmacéutica, cosmética, energética y ambiental. A su vez, en comparación con enzimas de origen vegetal o animal, las lipasas microbianas pueden producirse en cantidades mayores y a bajo costo, utilizando microorganismos de rápido crecimiento y adaptación a medios de cultivos económicos, como son los residuos agroindustriales (Chakraborty 2023; Abdelaziz et al., 2025).

De manera específica, cepas bacterianas del género *Bacillus* han mostrado potencial para la producción de lipasas estables y de alto rendimiento. Pese a ello, se ha evidenciado variabilidad significativa entre cepas, lo que vuelve necesaria la identificación y selección de aquellas con mayor capacidad lipolítica, así como de las condiciones de cultivo que maximizan su rendimiento. Esta selección y optimización es de importancia en contextos locales donde la disponibilidad de lipasas comerciales es limitada y de alto costo, lo que restringe su aplicación en procesos productivos.

El desarrollo de investigaciones orientadas a la identificación, selección y optimización de cepas de *Bacillus* no solo contribuye al avance científico, sino que tiene impacto directo en la

comunidad. La producción local de lipasas puede facilitar el tratamiento de residuos grasos, elaboración de detergentes biodegradables y la valorización de subproductos agroindustriales, promoviendo prácticas sostenibles y alternativas económicas para emprendimientos locales y pequeños productores.

Por esta razón, la presente investigación se justifica en la necesidad de identificar una cepa bacteriana con mayor actividad lipolítica y determinar las condiciones óptimas de su cultivo. Los resultados obtenidos se espera que potencien procesos industriales y comunitarios, contribuyendo al desarrollo sostenible y a la innovación biotecnológica.

1.8 Declaración de las Variables (Operacionalización)

La presente investigación es de tipo experimental con un componente cualitativo y cuantitativo. La parte cuantitativa se fundamenta en la evaluación de dos variables que permiten evaluar el efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de la enzima lipasa por la cepa de *Bacillus* seleccionada en la etapa cualitativa.

1.8.1 Variables Independientes

Corresponden a las condiciones controladas de laboratorio: la temperatura incubación (30, 35 y 40°C) y el tiempo de incubación (24, 48, 72 y 96 horas). Variables que siguen un diseño factorial con el propósito de determinar bajo que condición hay mayor producción de lipasa.

1.8.2 Variable Dependiente

Corresponde a la actividad lipásica, expresada en unidad por mililitro (U/mL), donde una unidad (U) equivale a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de ácido graso libre por minuto bajo las condiciones del ensayo.

Adicionalmente, como variable complementaria, se calculó la concentración de proteína total del sobrenadante enzimático.

CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial

2.1 Antecedentes Referenciales

La investigación sobre lipasas microbianas cuenta con una sólida base de estudios que ponen en evidencia el potencial productivo de las fuentes microbianas y la influencia de las condiciones de cultivo sobre su actividad enzimática.

Las lipasas microbianas se caracterizan por ser biocatalizadores con mayor proyección biotecnológica e industrial en la actualidad, debido a su capacidad de hidrolizar triglicéridos y catalizar reacciones como transesterificación y esterificación bajo condiciones controladas. Frente a enzimas de origen animal y vegetal, las lipasas microbianas permiten obtener rendimientos superiores, producción a bajo costo y mayor facilidad de manipulación genética (Abdelaziz et al., 2025).

2.1.1 Diversidad de Microorganismos Productores de Lipasas

La producción de lipasas no se restringe solo al uso de bacterias, otros microorganismos como las levaduras y hongos también han demostrado potencial lipolítico significativo. Romo-Silva et al. (2024) evaluaron las especies de levadura *Hyphopichia wangnamkhiaoensis* y *Yarrowia deformans*, utilizando aceite de oliva, aceite de cocina usado y glicerol como sustratos, mostraron actividad óptima de a pH 8.0 y 40°C, lo que evidencia su viabilidad en procesos sostenibles usando materia prima de bajo costo y potencial para la producción de lipasa.

De la misma manera, los hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, han sido ampliamente estudiados por su capacidad de secretar lipasas con propiedades catalíticas, tolerancia a cambios de temperatura y pH, y alto rendimiento en fermentaciones sólidas cuando se emplean residuos agroindustriales como sustrato, volviéndolos candidatos para procesos industriales y aplicaciones ambientales (Zavarise & Pinotti, 2020).

Asimismo, trabajos recientes han purificado y caracterizado lipasas bacterianas de una cepa de *Pseudomonas* sp., aislada del Mar Mediterráneo, siendo un microorganismo funcional a bajas temperaturas (10°C), lo que indica su potencial en procesos que requieren actividad en frío, como aplicaciones en detergentes o biorremediación en climas fríos (Abdella et al., 2023).

Estos antecedentes confirman que la diversidad microbiana ofrece un amplio repertorio de lipasa, aun cuando las condiciones de producción y las propiedades catalíticas varían significativamente entre microorganismos.

2.1.2 El Género *Bacillus* como Fuente Preferente de Lipasas Industriales

Entre los microorganismos productores de lipasas, el género *Bacillus* se caracteriza por su facilidad de cultivo, rápido crecimiento, tolerancia ambiental y estatus GRAS (Generally Recognized as Safe), que lo faculta para aplicaciones en procesos industriales regulados (Gupta et al., 2021; Ali et al., 2023). Especies como *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. pumilus* comparten características genéticas y metabólicas con *B. subtilis*, lo que hace que los estudios comparativos entre estas cepas sean valiosos para comprender la diversidad lipolítica del género (Akinsemolu et al., 2024).

Dentro de este género, la variabilidad en la producción de lipasa entre cepas ha sido documentada de forma constante, lo que subraya la importancia de una selección preliminar de cepas con alto potencial enzimático (Mohan et al., 2008; Garuba et al., 2020; Volpato et al., 2020; Alsada et al., 2026). En este contexto, Nadaf et al. (2025) realizaron la purificación y caracterización de la lipasa producida por *Bacillus subtilis* *kubt4*, con el objetivo de evaluar su potencial para la producción de biodiesel. El estudio demostró que esta cepa específica posee propiedades enzimáticas prometedoras, con una actividad lipásica óptima a pH 8.0 y 35°C, y una notable estimulación de su actividad en presencia de iones de Mg^{2+} .

2.1.3 Métodos de Detección y Cribado de Actividad Lipolítica

El método de agar Rodamina B fue propuesto originalmente por Kouker y Jaeger (1987), y en la actualidad sigue siendo la herramienta de tamizaje cuantitativa más utilizada en la identificación de microorganismos lipolíticos. En estudios recientes, el método de Rodamina B en placa ha sido empleado para detectar la actividad lipásica bajo luz UV (350 nm), donde la intensidad de la fluorescencia naranja sirve como índice semicuantitativo de producción de lipasa; las colonias o pozos con mayor fluorescencia son seleccionadas para ensayos cuantitativos posteriores mediante titulación (Rabbani et al., 2013).

En este sentido, Carrasco-Palafox et al. (2018) demostraron que la adición de iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} al agar tributirina mejoraba la visualización de los halos de hidrólisis, facilitando la

selección de cepas con mayor actividad lipolítica.

2.1.4 Efecto de las Condiciones de Cultivo sobre la Producción de Lipasa en *Bacillus*

Las condiciones de temperatura y tiempo de incubación son factores determinantes en la producción de lipasas extracelulares en *Bacillus*. Estudios en *B. subtilis* han reportado que la producción enzimática aumenta progresivamente con el tiempo de incubación para luego disminuir, alcanzando su máximo durante la transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria. En cepas mesófilas, los rangos óptimos de temperatura para producción de lipasa se sitúan típicamente entre 30 y 40 °C (Nadaf et al., 2025), aunque esta característica varía entre especies e incluso entre cepas de la misma especie.

Goswami & Tipre (2025) describieron un medio de producción de lipasa con aceite de cocina usado como inductor lipídico, demostrando que la combinación de fuentes de carbono lipídicas con nitrógeno orgánico complejo (peptona y extracto de levadura) maximiza la producción extracelular en *Bacillus*. Esta formulación, adoptada con modificaciones en la presente investigación, ofrece además la ventaja de emplear un subproducto agroindustrial de bajo costo y alta disponibilidad en Ecuador.

2.1.5 Vacío de Investigación y Pertinencia del Estudio

A pesar de la literatura sobre lipasas de *Bacillus*, la mayoría de los estudios se ha realizado con cepas aisladas de ambientes específicos (suelos, residuos industriales, ambientes extremos), y son relativamente escasos los trabajos que evalúen y comparen el potencial lipolítico de cepas certificadas ATCC bajo condiciones de cultivo controladas y comparables. En Latinoamérica, el mercado de lipasas microbianas está dominado por productos importados, y la disponibilidad de alternativas de producción local sigue siendo limitada, lo que abre un espacio significativo para investigaciones orientadas al desarrollo de bioprocesos regionales.

En este contexto, la presente investigación aporta valor al identificar, bajo condiciones estandarizadas y reproducibles, la cepa de *Bacillus* con mayor potencial lipolítico entre las cepas certificadas, y al determinar las condiciones de temperatura y tiempo de incubación que maximizan su producción, contribuyendo así a sentar bases para el desarrollo de soluciones biotecnológicas adaptadas a las necesidades locales de Ecuador

2.2 Marco Conceptual

Lipasas. Son enzimas del grupo de las hidrolasas (EC 3.1.1.3), que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster presentes en triglicéridos de cadena larga, liberando ácidos grasos libres, diglicéridos, monoglicéridos y glicerol. Se diferencian de las esterasas porque presentan activación interfacial, y en condiciones de baja actividad de agua, pueden catalizar reacciones de síntesis como esterificación, transesterificación e interesterificación (Jaeger et al., 1999; Gupta et al., 2004).

Actividad lipásica. Es una medida cuantitativa de la capacidad catalítica de una enzima para hidrolizar sustratos lipídicos en condiciones controladas. Se expresa en unidades por mililitro (U/mL), donde una unidad internacional (U) equivale a la liberación de 1 μmol de ácido graso libre por minuto, y permite comparar la producción enzimática entre cepas y condiciones de cultivo (Mohaini et al., 2022).

Actividad específica. Es el parámetro que relaciona la actividad enzimática total con la concentración de proteínas presentes en el extracto, expresada en U/mg. Este parámetro permite comparar con mayor precisión la eficiencia catalítica y estimar la pureza relativa de la preparación enzimática (Bradford, 1976; Abo El-Naga et al., 2025).

Biocatalizador. Es una molécula de origen biológico que acelera una reacción química sin ser consumida en el proceso, manteniendo su especificidad de sustrato y su carácter reutilizable. Las lipasas microbianas son consideradas biocatalizadores de importancia universal por su versatilidad catalítica, su producción escalable y su compatibilidad con procesos sostenibles (Abdelaziz et al., 2025).

Cepa bacteriana certificada (ATCC). Es un microorganismo cuya identidad taxonómica, viabilidad y características fenotípicas han sido verificadas y depositadas en una colección de cultivos de referencia internacional. La American Type Culture Collection (ATCC) es el repositorio de mayor reconocimiento para cepas de referencia certificadas, que garantizan la reproducibilidad de resultados experimentales al proveer material biológico estandarizado y trazable (Schallmeyer et al., 2004).

Estatus GRAS (Generally Recognized as Safe). Es una designación otorgada por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos a microorganismos o sustancias que son reconocidas como seguras para su uso en la producción de alimentos, enzimas industriales y otros productos de consumo. Las cepas evaluadas en este estudio poseen este estatus, lo que las

habilita para aplicaciones en bioprocesos industriales regulados (Gupta et al., 2021).

Fermentación sumergida (SmF). Es el proceso de cultivo microbiano en el cual el microorganismo crece en un medio líquido bajo condiciones de agitación y aireación controladas. Es el método de elección para la producción de enzimas extracelulares a escala de laboratorio e industrial, ya que permite controlar las variables fisicoquímicas (temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto, etc.) (Adetunji & Olaniran, 2021).

Inóculo. Es la suspensión de células microbianas en estado activo de crecimiento que se añade al medio de cultivo de producción para iniciar el proceso fermentativo. La concentración del inóculo influye directamente en la cinética de crecimiento y el rendimiento enzimático final (Goswami & Tipre, 2025).

Temperatura de incubación. Es la condición térmica a la que se mantiene el cultivo microbiano durante el proceso fermentativo, y que puede afectar la cinética de crecimiento celular, la velocidad de síntesis y la secreción de enzimas extracelulares (Elibol & Özer, 2010).

Tiempo de incubación. Es el período transcurrido desde la inoculación hasta la toma de muestra para análisis (Mehrabi et al., 2017).

Halo de hidrólisis. Es la zona de aclaramiento o de fluorescencia que se forma alrededor de una colonia bacteriana o de un pozo enzimático en un medio sólido suplementado con un sustrato específico (Kouker & Jaeger, 1987).

Titulometría enzimática. Es el método cuantitativo empleado para determinar una actividad específica. En el caso de las lipasas, se basa en la neutralización con NaOH de los ácidos grasos libres generados por la hidrólisis enzimática de una emulsión lipídica, usando fenolftaleína como indicador colorimétrico del punto de equivalencia (Mohaini et al., 2022).

Sobrenadante enzimático. Es la fracción líquida obtenida tras la centrifugación del cultivo microbiano, libre de células y restos celulares (Abdelaziz et al., 2025; Abo El-Naga et al., 2025).

Bioproceso. Es un proceso industrial o biotecnológico que emplea microorganismos, células o enzimas para producir o transformar compuestos de interés (Abdelaziz et al., 2025).

Biotecnología sostenible. Es el conjunto de estrategias y procesos biotecnológicos orientados a minimizar el impacto ambiental mediante el uso eficiente de recursos (Goswami & Tipre, 2025).

2.3 Marco Teórico

2.3.1 Las Lipasas: Definición, Clasificación y Propiedades Bioquímicas

2.3.1.1 Definición y Nomenclatura

Las lipasas (triacilglicerol acil-hidrolasas, EC 3.1.1.3) constituyen una de las familias enzimáticas de mayor relevancia biotecnológica e industrial. Desde el punto de vista bioquímico, son hidrolasas de serina que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster en triglicéridos de cadena larga, liberando ácidos grasos libres, diglicéridos, monoglicéridos y glicerol. Una característica estructural definitoria de las lipasas verdaderas, que las distingue de las esterases simples, es el fenómeno de activación interfacial, por el cual su actividad catalítica se incrementa notablemente en la interfase agua-lípido, donde los sustratos hidrofóbicos forman una emulsión (Jaeger et al., 1999; Gupta et al., 2004).

Estructuralmente, las lipasas poseen un pliegue característico denominado pliegue α/β -hidrolasa, en el que la tríada catalítica compuesta por un residuo de serina nucleofílico, un residuo de ácido aspártico o glutámico usado como estabilizador de carga, y un residuo de histidina que actúa como base general, se encuentra conservada evolutivamente. Esta tríada es la responsable del mecanismo de catálisis nucleofílica que permite atacar el enlace éster del sustrato lipídico (Ollis et al., 1992; Verger, 1997). En el caso específico de las lipasas de *Bacillus* spp., la tríada catalítica se identifica típicamente como Serina (Ser), Aspartato (Asp), e Histidina (His), cuyos residuos exactos varían según la subfamilia; siendo que en la subfamilia I.4 a la que pertenecen las lipasas de *B. licheniformis* y *B. pumilus* los residuos son Ser-107, Asp-159 e His-182 (Ahmad et al., 2024).

Además de la función hidrolítica en medios acuosos, las lipasas poseen la extraordinaria capacidad de catalizar reacciones reversas y de transferencia cuando se trabaja en ambientes con baja actividad de agua incluyendo: esterificación (síntesis directa de ésteres), transesterificación, interesterificación, aminólisis y acidólisis. Esta versatilidad catalítica es la base de sus múltiples aplicaciones industriales (Sarmah et al., 2018; Eskandari et al., 2024).

2.3.1.2 Clasificación de las Lipasas Bacterianas

La clasificación sistemática más ampliamente aceptada para las lipasas bacterianas fue propuesta por Arpigny y Jaeger (1999) siendo revisada y expandida posteriormente. En dicha

clasificación, basada en la comparación de secuencias aminoacídicas y propiedades bioquímicas, las lipasas se agrupan en ocho familias principales (I a VIII), con varias subfamilias dentro de cada una.

La familia I, denominada también familia de las verdaderas lipasas bacterianas, agrupa las enzimas mejor caracterizadas e industrialmente más relevantes. Esta familia se subdivide en seis subfamilias (I.1 a I.6). Las lipasas del género *Bacillus* pertenecen fundamentalmente a la subfamilia I.4, y en menor medida a otras subfamilias. La subfamilia I.4 se caracteriza por presentar enzimas de bajo peso molecular (19-22 kDa) y por ausencia de dominios de tapa en lipasas (*lid domain*) lo que confiere una activación interfacial menos pronunciada. Estas tienen preferencia por sustratos de cadena corta a media, con un comportamiento mesofílico de temperatura óptima cercana a los 35-40 °C (Ahmad et al., 2024; Arpigny & Jaeger, 1999).

Otras clasificaciones funcionalmente relevantes dividen las lipasas según sus propiedades fisicoquímicas: las lipasas alcalinas están activas en pH 8-11 y son altamente deseadas en la industria de detergentes, las lipasas termoestables con actividad sostenida por encima de 50-60 °C, las lipasas psicrófilas que se encuentran activas a bajas temperaturas, y aquellas lipasas tolerantes a solventes orgánicos (Morya et al., 2024; Bashir et al., 2025).

2.3.1.3 Estructura Molecular y Mecanismo Catalítico

El mecanismo catalítico de las lipasas sigue la vía de catálisis ácido-base general con formación de un intermediario acil-enzima, descrita originalmente para las proteasas de serina. El proceso ocurre en dos etapas, en la primera etapa ocurre la acilación, donde el oxígeno del residuo de serina ataca nucleofílicamente al carbono carbonílico del sustrato éster, formando un intermediario tetraédrico que colapsa para liberar el primer producto (alcohol) y genera la enzima acilada; en la segunda etapa ocurre la desacilación, donde una molécula de agua actúa como nucleófilo para hidrolizar la acil-enzima, regenerando la enzima libre y liberando el segundo producto (ácido carboxílico) (Jaeger et al., 1999; Sarmah et al., 2018).

La activación interfacial, propiedad distintiva de las verdaderas lipasas, se explica por la presencia del dominio tapa (*lid domain*). Esta es una estructura secundaria anfipática (generalmente una hélice α) que en solución acuosa cubre el sitio activo hidrofóbico manteniendo la enzima en conformación cerrada e inactiva. Al entrar en contacto con una interfase agua-lípido, el *lid* se desplaza exponiendo el sitio activo y generando un aumento dramático de la

actividad catalítica. Este fenómeno se ha demostrado mediante cristalografía de rayos X en lipasas modelo como la de *Rhizomucor miehei* y *Candida rugosa* (Verger, 1997; Ollis et al., 1992).

En las lipasas de la subfamilia I.4 de *Bacillus*, la ausencia del dominio *lid* implica que la enzima se mantiene en estado activo sin requerir una interfase lipídica definida, lo que las hace aptas para actuar sobre sustratos en concentraciones bajas. Esta propiedad estructural se correlaciona con los valores de K_m más reducidos reportados para estas enzimas frente a p-nitrofenil palmitato, el cual es un sustrato sintético comúnmente empleado en ensayos enzimáticos estandarizados (Ahmad et al., 2024).

2.3.1.4 Propiedades Fisicoquímicas de las Lipasas Microbianas

En cuanto a las propiedades fisicoquímicas de las lipasas microbianas, estas exhiben una notable variabilidad según la cepa productora y las condiciones de producción. En términos generales, las lipasas bacterianas presentan las siguientes características que determinan su aptitud para aplicaciones industriales:

Temperatura óptima y termo estabilidad: La mayoría de las lipasas de *Bacillus* son mesófilas, con temperaturas óptimas de actividad entre 30 y 60 °C, no obstante, se han descrito variantes termoestables capaces de mantener actividad catalítica por encima de 70 °C. En particular, lipasas de *Bacillus licheniformis* muestran elevada termoestabilidad y conservan actividad significativa a temperaturas elevadas, tal como se ha documentado en revisiones recientes sobre lipasas bacterianas (Hasan et al., 2021; Kumar et al., 2023). Esta estabilidad se asocia con rasgos estructurales como mayor compactación del núcleo hidrofóbico, incremento de interacciones electrostáticas y, en algunos casos, la presencia de puentes disulfuro, factores que contribuyen a la resistencia térmica de la enzima (Vieille & Zeikus, 2001). Estas propiedades hacen que las lipasas de *Bacillus* sean especialmente atractivas para aplicaciones industriales a temperaturas elevadas.

pH óptimo y estabilidad alcalina: Las lipasas de *Bacillus* presentan actividad óptima predominante a rangos neutros a alcalinos (pH 7-11). Se han descrito enzimas con marcada alcalino tolerancia, capaces de mantener actividad catalítica en condiciones altamente alcalinas, lo que las hace especialmente atractivas para aplicaciones en detergentes industriales. Esta propiedad ha sido ampliamente reportada en especies como *Bacillus licheniformis*, *B. atrophaeus*

y *B. pumilus*, las cuales exhiben estabilidad estructural y funcional en medios alcalinos (Morya et al., 2024; Bornscheuer et al., 2022).

Peso molecular: Las lipasas de *Bacillus* pertenecientes a la subfamilia I.4 se caracterizan por presentar pesos moleculares bajos, típicamente en el rango de 19-22 kDa, siendo consideradas entre las lipasas más pequeñas descritas. Este comportamiento es consistente entre especies como *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. amyloliquefaciens*, lo que refleja la alta homología de secuencia y conservación estructural dentro de esta subfamilia. En contraste, las lipasas de mayor peso molecular (>40 kDa), menos frecuentes en este género, suelen exhibir mayor estabilidad estructural y térmica (Khurana et al., 2015; Almansoori et al., 2024).

Especificidad de sustrato: Las lipasas microbianas generalmente exhiben preferencia por sustratos de cadena media a larga (C8-C18), aunque la especificidad exacta varía según la cepa. Las lipasas de *B. amyloliquefaciens* PS35 mostraron preferencia por ésteres de p-nitrofenol de cadena larga, comportamiento característico de las verdaderas lipasas (Kanmani et al., 2015). Las lipasas de *B. pumilus*, en cambio, han sido reportadas con tendencia hacia sustratos de cadena corta a media (Gupta et al., 2004).

Efecto de iones metálicos: Los iones metálicos divalentes, en particular Ca^{2+} y Mg^{2+} , tienen un efecto estimulante sobre la actividad lipásica en la mayoría de las cepas de *Bacillus*. El Ca^{2+} se considera un cofactor estructural que estabiliza la conformación activa de la enzima a través de la formación de puentes de coordinación. En contraste, iones como Hg^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} generalmente inhiben la actividad al interactuar con residuos del sitio activo (Gupta et al., 2004; Morya et al., 2024).

2.3.2 El Género *Bacillus* como Fuente de Lipasas Industriales

El género *Bacillus* agrupa bacterias Gram-positivas, aerobias o anaerobias facultativas, caracterizadas por su capacidad de formar endosporas altamente resistentes a condiciones extremas. Esta propiedad, junto con su robustez metabólica, las convierte en organismos altamente adecuados para procesos biotecnológicos industriales, ya que permite garantizar la estabilidad, fácil conservación y tolerancia a variaciones ambientales durante la fermentación (Schallmeyer et al., 2004).

A nivel industrial, *Bacillus* representa uno de los principales sistemas de producción de

enzimas, incluyendo lipasas, proteasas y amilasas. Su relevancia radica en su eficiente sistema de secreción *Sec*, que permite la liberación directa de enzimas activas al medio extracelular, simplificando los procesos de recuperación y reduciendo costos operativos (Danilova & Sharipova, 2020). Además, el conocimiento genómico de especies como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, y *Bacillus subtilis* ha permitido identificar múltiples genes asociados a la producción de lipasas, evidenciando su potencial como plataformas biotecnológicas (Chen et al., 2007; Veith et al., 2004).

Dentro de este género, *Bacillus licheniformis* destaca por su capacidad de producir lipasas termoestables y activas en condiciones alcalinas, lo que la convierte en un microorganismo clave para aplicaciones en detergentes y en la industria alimentaria. Sus enzimas presentan actividad en un amplio rango de pH y temperatura, con estructuras conservadas típicas de lipasas bacterianas (tríada *Ser-Asp-His* y motivo *GXSXG*) lo que asegura estabilidad catalítica (Gupta et al., 2004; Rehman et al., 2022). Además, su estatus GRAS (Generally Recognized as Safe) favorece su uso en procesos industriales regulados.

Por su parte, *Bacillus subtilis* es uno de los organismos modelo mejor estudiado en biotecnología. Se caracteriza por su elevada capacidad de secreción enzimática y facilidad de manipulación genética. Sus lipasas (*LipA* y *LipB*) presentan alta estabilidad y eficiencia catalítica, con aplicaciones en la síntesis de biodiésel, producción de ésteres y control de biopelículas. La posibilidad de optimizar su producción mediante estrategias estadísticas y el uso de sustratos agroindustriales refuerza su importancia como sistema de producción sostenible (Eggert et al., 2001; Sharma et al., 2022; Singh et al., 2023).

En contraste, *Bacillus pumilus* se distingue por su resistencia a condiciones extremas, incluyendo radiación, salinidad y solventes orgánicos. Esta característica se traduce en la producción de lipasas altamente estables, incluso en ambientes no convencionales, lo que resulta especialmente valioso para procesos industriales como la síntesis de biodiésel y aplicaciones en química fina. Adicionalmente, su capacidad de producir enzimas mediante fermentación en estado sólido utilizando residuos agroindustriales representa una ventaja económica significativa (Kumar et al., 2011; Kim et al., 2002).

Finalmente, *Bacillus amyloliquefaciens* combina una alta capacidad enzimática con la producción de metabolitos secundarios de interés industrial. Sus lipasas presentan buena

estabilidad térmica y alcalina, siendo útiles en la producción de biocombustibles y formulaciones detergentes. Además, esta especie destaca por su capacidad de utilizar sustratos de bajo costo en fermentación en estado sólido, lo que reduce significativamente los costos de producción. Su potencial como plataforma recombinante para la expresión de lipasas con propiedades mejoradas refuerza su relevancia en biotecnología moderna (Liu et al., 2014; Hmidet et al., 2018; Mazhar et al., 2023).

En conjunto, las especies del género *Bacillus* constituyen una fuente estratégica de lipasas industriales debido a su diversidad metabólica, estabilidad en condiciones extremas y facilidad de producción a gran escala. Estas características posicionan a este género como uno de los pilares en el desarrollo de bioprocesos sostenibles y económicamente viables.

2.3.3 Factores que Influyen en la Producción de Lipasas Microbianas

2.3.3.1 Fuentes de Carbono e Inductores Lipídicos

La fuente de carbono es uno de los factores determinantes en la producción de lipasas microbianas, particularmente en especies del género *Bacillus*, donde los compuestos lipídicos actúan como inductores específicos a nivel transcripcional. Aceites vegetales (como el aceite de oliva, aceite de palma) así como compuestos anfifílicos como Tween 80 han demostrado inducir significativamente la síntesis de lipasas extracelulares al mejorar la biodisponibilidad del sustrato y aportar ácidos grasos que activan la expresión génica (Adetunji & Olaniran, 2021; Sharma et al., 2022).

En contraste, fuentes de carbono fácilmente metabolizables como la glucosa pueden generar represión catabólica, aunque a concentraciones controladas pueden favorecer el crecimiento sin inhibir completamente la producción enzimática (Elibol & Ozer, 2010). El uso de residuos agroindustriales ricos en polisacáridos representa una alternativa eficiente y sostenible para procesos en fermentación en estado sólido (Mazhar et al., 2023).

2.3.3.2 Fuentes de Nitrógeno

Las fuentes de nitrógeno influyen directamente en la síntesis proteica y en la producción de enzimas extracelulares. En general, las fuentes orgánicas complejas (peptona, extracto de levadura, licor de maíz) son superiores a las inorgánicas, debido a su aporte adicional de vitaminas, minerales y factores de crecimiento que favorecen tanto el desarrollo celular como la secreción enzimática (Adetunji & Olaniran, 2021). No obstante, ciertas fuentes inorgánicas como

NH₄Cl o fosfatos de amonio pueden complementar el medio y mejorar la producción en condiciones optimizadas. La selección de la fuente nitrogenada depende de la cepa y del objetivo del proceso, ya sea maximizar biomasa o actividad específica (Mehrabi et al., 2017).

2.3.3.3 Parámetros Fisicoquímicos de Cultivo

El pH inicial del medio regula tanto el crecimiento microbiano como la estabilidad estructural de la lipasa. En *Bacillus* spp., el rango óptimo de producción suele situarse entre pH 6.5 y 9.0, favoreciendo condiciones neutras a ligeramente alcalinas (Szymczak et al., 2021). La temperatura también es crítica, con valores óptimos generalmente entre 30 y 40 °C para cepas mesófilas, lo que optimiza simultáneamente la cinética de crecimiento y la síntesis enzimática (Elibol & Özer, 2010). La agitación y aireación influyen en la transferencia de oxígeno y en la disponibilidad de sustratos hidrofóbicos, siendo esenciales para bacterias aerobias; velocidades moderadas (100–200 rpm) favorecen la producción sin generar estrés celular (Adetunji & Olaniran, 2021).

Finalmente, el tiempo de fermentación determina la fase metabólica en la cual ocurre la máxima producción, típicamente en la transición entre fase exponencial tardía y estacionaria, con tiempos óptimos entre 24 y 72 h dependiendo de la cepa (Mehrabi et al., 2017).

2.3.3.4 Efecto de Sales Minerales, Surfactantes y Metales

Las sales minerales desempeñan un papel clave en la estabilidad y actividad de las lipasas. Iones como Ca²⁺ contribuyen a la estabilización estructural de la enzima, mientras que fosfatos y Mg²⁺ participan en rutas metabólicas esenciales y favorecen la producción enzimática (Kumar et al., 2011; Adetunji & Olaniran, 2021). Los surfactantes, además de actuar como inductores, mejoran la emulsificación del sustrato lipídico, incrementando la eficiencia catalítica.

Por otro lado, el tamaño de inóculo influye en la cinética del cultivo; valores excesivos pueden provocar limitación de nutrientes o cambios en el pH, afectando negativamente el rendimiento (Kumar et al., 2011).

2.3.3.5 Métodos de Fermentación: Fermentación Sumergida vs. Fermentación en Estado Sólido

La producción de lipasas puede realizarse mediante fermentación sumergida (SmF) o fermentación en estado sólido (SSF). La SmF permite un control preciso de variables operativas y

es ampliamente utilizada a escala industrial; sin embargo, implica mayores costos de operación (Adetunji & Olaniran, 2021). En contraste, la SSF ofrece ventajas económicas y ambientales al emplear residuos agroindustriales como sustratos, además de favorecer la producción de enzimas más estables en condiciones de baja actividad de agua. Estudios recientes han demostrado que la SSF puede generar lipasas con mejores propiedades fisicoquímicas en comparación con la SmF, especialmente en cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* (Mazhar et al., 2023).

2.3.4 Métodos de Optimización de la Producción de Lipasas

2.3.4.1 Estrategias de Optimización Clásica

El enfoque univariado, conocido como OVAT (One Variable At A Time), se basa en la modificación individual de cada variable experimental mientras las demás permanecen constantes. Aunque su simplicidad metodológica permite una implementación directa en etapas exploratorias, presenta limitaciones significativas en sistemas biotecnológicos complejos, ya que no permite evaluar efectos de interacción entre variables ni identificar condiciones óptimas globales. En consecuencia, su aplicación se restringe principalmente a la determinación preliminar de rangos operativos en procesos de producción de lipasas microbianas (Adetunji & Olaniran, 2021). No obstante, estudios recientes han demostrado su utilidad en la valorización de sustratos de bajo costo, permitiendo establecer condiciones iniciales eficientes en términos de rendimiento enzimático antes de la aplicación de metodologías multivariadas (Mehrabi et al., 2017)

2.3.4.2 Diseño Plackett-Burman para cribado de variables

El diseño Plackett-Burman (PBD) constituye una herramienta estadística de cribado basada en diseños factoriales fraccionados de dos niveles, ampliamente utilizada en bioprocesos con número reducido de experimentos. Este enfoque permite discriminar de manera robusta los factores con mayor impacto sobre la producción de lipasas, optimizando el uso de recursos experimentales y reduciendo la dimensionalidad del sistema previo a su modelamiento (Singh et al., 2021). En sistemas basados en *Bacillus* spp., su aplicación ha permitido identificar variables críticas como fuentes lipídicas, surfactantes y sales minerales, facilitando la posterior optimización mediante metodologías de superficie de respuesta (Kumar et al., 2011). La eficiencia del PBD radica en su capacidad para evaluar simultáneamente múltiples factores fisicoquímicos y nutricionales bajo condiciones experimentales controladas.

2.3.4.3 Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) y Diseño Compuesto Central

La Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) representa un enfoque multivariado avanzado que integra herramientas estadísticas y matemáticas para modelar y optimizar procesos biotecnológicos. El diseño compuesto central (CCD), ampliamente utilizado en este contexto, permite estimar efectos lineales, cuadráticos e interacciones entre variables con alta precisión predictiva, utilizando un número limitado de corridas experimentales (Bezerra et al., 2020). Su aplicación en la producción de lipasas ha demostrado incrementos significativos en la actividad enzimática respecto a métodos convencionales, al permitir la identificación de condiciones óptimas globales y no solo locales. En sistemas microbianos, la RSM ha permitido optimizar simultáneamente variables como pH, temperatura, tiempo de fermentación y composición del medio, logrando mejoras sustanciales en la productividad enzimática y en la eficiencia del bioproceso (Kumari et al., 2022). Estos resultados consolidan a la RSM como una herramienta clave en el escalamiento industrial de procesos lipolíticos.

2.3.5 Métodos de Detección de Actividad Lipolítica

2.3.5.1 Ensayo en Agar Tributirina

La detección primaria de actividad lipolítica en microorganismos se realiza comúnmente mediante cultivo en agar suplementado con tributirina ($\approx 1\%$ v/v) como sustrato lipídico. La hidrólisis de este triglicérido de cadena corta genera glicerol y ácidos grasos solubles, produciendo halos de aclaramiento alrededor de las colonias productoras de lipasa. Este fenómeno permite una evaluación rápida y visual de la actividad enzimática, que puede expresarse de forma semicuantitativa mediante el índice de actividad lipolítica (LAI), definido como la relación entre el diámetro del halo y el de la colonia. Aunque este método es ampliamente utilizado en etapas de tamizaje, su carácter cualitativo limita la comparación precisa entre cepas (Adetunji & Olaniran, 2021).

2.3.5.2 Ensayo con Rodamina B

El ensayo con Rodamina B es un método cualitativo y semicuantitativo ampliamente utilizado en el cribado de microorganismos lipolíticos. Se basa en la incorporación de un sustrato lipídico (generalmente trioleína) en agar suplementado con Rodamina B, la cual forma complejos fluorescentes con los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis. Las colonias productoras de

lipasa generan halos fluorescentes de color naranja-rojizo bajo luz UV (350–365 nm), cuya intensidad se correlaciona con la actividad enzimática. Este método ha sido adaptado a formatos de microplaca para aplicaciones de alto rendimiento, incluyendo el análisis de bibliotecas metagenómicas (Kouker & Jaeger, 1987; Zottig et al., 2016).

2.3.5.3 Ensayo Espectrofotométrico con p-nitrofenil Ésteres

La cuantificación de la actividad lipásica en extractos enzimáticos se realiza frecuentemente mediante el uso de sustratos cromogénicos como el p-nitrofenil palmitato (pNPP). La hidrólisis enzimática libera p-nitrofenol (pNP), cuyo aumento de absorbancia a 405 nm es proporcional a la actividad catalítica. Este método presenta alta sensibilidad, rapidez y compatibilidad con formatos de microplaca, lo que permite el análisis simultáneo de múltiples muestras bajo condiciones controladas. La actividad enzimática se expresa convencionalmente como unidades internacionales (U), correspondientes a la liberación de 1 μ mol de pNP por minuto (Sharma et al., 2022).

2.3.5.4 Método Titrimétrico (pH-stat)

El método titrimétrico constituye una técnica de referencia para la determinación cuantitativa de lipasas, basada en la medición de los ácidos grasos libres liberados durante la hidrólisis de triglicéridos. Este ensayo emplea emulsiones de sustratos naturales, como aceite de oliva, estabilizadas con agentes emulsificantes, y la liberación de ácidos grasos es neutralizada mediante titulación continua con NaOH para mantener el pH constante. La variante automatizada pH-stat permite monitoreo en tiempo real y alta reproducibilidad, siendo adecuada para estudios cinéticos. No obstante, su implementación requiere equipamiento especializado y un control riguroso de las condiciones experimentales, particularmente del pH y la estabilidad de la emulsión (Stoytcheva et al., 2012).

2.3.5.5 Ensayos Fluorométricos

Los métodos fluorométricos han adquirido relevancia debido a su elevada sensibilidad y capacidad de miniaturización. Estos ensayos emplean sustratos fluorogénicos, como análogos de triacilglicéridos marcados con fluoróforos tipo BODIPY o ésteres de 4-metilumbeliferona. La hidrólisis enzimática libera productos fluorescentes cuya intensidad es directamente proporcional a la actividad lipásica, permitiendo la determinación de parámetros cinéticos como V_{max} y K_m en sistemas de alto rendimiento. Estos métodos presentan límites de detección en el orden de

picomoles, superando significativamente la sensibilidad de técnicas convencionales y facilitando el cribado masivo de enzimas (Bílková et al., 2019; Bernal et al., 2024).

2.3.5.6 Método Conductimétrico

La determinación conductimétrica de la actividad lipásica se basa en la variación de la conductividad eléctrica del medio como consecuencia de la liberación de ácidos grasos ionizables. Sustratos como la triacetina son particularmente adecuados debido a su solubilidad en agua y a la alta movilidad iónica de los productos generados. Este método permite monitoreo continuo en tiempo real sin requerir reactivos cromogénicos; sin embargo, presenta limitaciones asociadas a su baja especificidad y alta sensibilidad a variaciones de temperatura, lo que puede afectar la reproducibilidad de los resultados (Stoytcheva et al., 2012).

2.3.6 Aplicaciones Biotecnológicas de las Lipasas Microbianas

2.3.6.1 Industria Alimentaria

Las lipasas microbianas desempeñan un papel esencial en la modificación de lípidos para mejorar propiedades sensoriales y nutricionales en alimentos. En la industria láctea, catalizan la hidrólisis de triglicéridos, liberando ácidos grasos de cadena corta y media que son responsables del aroma y sabor de quesos madurados. En panificación, su acción sobre lípidos asociados a gluten y almidón genera mono- y diglicéridos con función emulsificante, lo que mejorará la estabilidad de la masa, el volumen del pan y la textura de la miga. Asimismo, en la industria de aceites y grasas, se emplean en procesos de interesterificación enzimática para producir lípidos estructurados con menor contenido de ácidos grasos trans, representando una alternativa más sostenible frente a la hidrogenación química (Patel et al., 2021).

2.3.6.2 Industria de Detergentes

El sector de detergentes constituye el principal mercado de lipasas industriales debido a la necesidad de remover eficientemente contaminantes lipídicos. Las lipasas, particularmente de *Bacillus* spp., presentan elevada estabilidad en condiciones alcalinas y compatibilidad con surfactantes, lo que permite su aplicación en formulaciones moderadas de detergentes. Estas enzimas facilitan la eliminación de grasas en un amplio rango de temperaturas, favoreciendo el desarrollo de productos para lavado en frío y reduciendo el consumo energético. Además, mantienen su actividad en presencia de agentes tensioactivos y quelantes, lo que asegura su eficiencia en condiciones operativas complejas (Ali et al., 2023).

2.3.6.3 Producción de Biodiesel

La transesterificación enzimática mediada por constituye una alternativa sostenible para la producción de biodiésel, permitiendo la conversión de triglicéridos en ésteres alquílicos de ácidos grasos bajo condiciones suaves de reacción. Este enfoque ofrece ventajas significativas frente a métodos químicos, como mayor selectividad, menor generación de subproductos y capacidad para procesar materias primas con alto contenido de ácidos grasos libres. La inmovilización enzimática mejora la estabilidad y reutilización del biocatalizador, incrementando la viabilidad económica del proceso y facilitando su escalado industrial (Eskandari et al., 2024).

2.3.6.4 Industria Farmacéutica y Química Final

Las lipasas son biocatalizadores clave en la síntesis enantioselectiva debido a su alta especificidad estereoquímica. Se emplean en la resolución cinética de racematos y en la síntesis de intermediarios quirales utilizados en la producción de fármacos cardiovasculares, antivirales y antifúngicos. Además, participan en la síntesis de ésteres de vitaminas liposolubles, compuestos aromáticos y fragancias, contribuyendo al desarrollo de procesos más selectivos y ambientalmente sostenibles en comparación con rutas químicas convencionales (Verma et al., 2022).

2.3.6.5 Biorremediación y Tratamiento de Efluentes

Las lipasas presentan un creciente interés en aplicaciones ambientales, particularmente en la degradación de grasas y aceites en efluentes industriales. La hidrólisis de lípidos complejos facilita su posterior degradación por microorganismos, mejorando la eficiencia de los procesos de tratamiento. Adicionalmente, se ha evidenciado su potencial en la degradación de polímeros tipo poliésteres y microplásticos lo que amplía su aplicación en la mitigación de contaminantes emergentes. Estas características posicionan a las lipasas como herramientas clave en estrategias de biotecnología ambiental y economía circular (Kumar et al., 2023).

CAPÍTULO III: Diseño Metodológico

3.1 Tipo y Diseño de Investigación

El presente estudio corresponde a una investigación experimental con enfoque cuantitativo, cuyo objetivo fue evaluar la actividad lipásica de tres cepas bacterianas certificadas del género *Bacillus*. El diseño experimental se desarrolló en dos etapas secuenciales.

La primera etapa consistió en un cribado cualitativo de la actividad lipásica mediante placas de agar LB suplementadas con aceite de girasol y Rodamina B, a fin de identificar la cepa de mayor productividad.

La segunda etapa comprendió la determinación cuantitativa de la actividad lipásica bajo distintas condiciones de temperatura y tiempo de incubación en la cepa seleccionada, empleando el método titulométrico descrito por Mohaini et al. (2022), que cuantifica los ácidos grasos libres generados durante la hidrólisis enzimática de triglicéridos.

Adicionalmente, se realizó la determinación del contenido de proteínas en el sobrenadante del tratamiento con mayor actividad lipásica para complementar la caracterización y establecer una relación entre la actividad enzimática y la concentración proteica del extracto.

3.2 La Población y la Muestra

Se utilizaron tres cepas bacterianas pertenecientes al género *Bacillus*, obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) en formato liofilizado: *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 y *B. pumilus* ATCC 700214. Estas tres especies poseen estatus GRAS (Generally Recognized as Safe) otorgado por la FDA de los Estados Unidos, lo que las establece como seguras para la producción de enzimas industriales. Las cepas fueron reactivadas desde los liofilizados según las instrucciones del proveedor, en agar y caldo Tripticasa de Soya (TSA – TSB, correspondientemente) a 37°C durante 24 horas, y conservadas a 4°C hasta su uso.

3.3 Los Métodos y las Técnicas

3.3.1 Preparación de Inóculos

Las tres cepas fueron cultivadas en Caldo Tripticasa de Soya (TSB) (Tabla 1). El medio de cultivo fue preparado conforme a las especificaciones del fabricante.

Tabla 1

Composición de medio de cultivo Caldo Tripticasa de Soya (TSB)

Composición	Cantidad (g/L)
Digerido pancreático de caseína	17,0
Digerido papaínico de harina de soya	3,0
Cloruro de sodio (ClNa)	5,0
Fosfato dipotásico(K ₂ HPO ₄)	2,5
Glucosa monohidratada	2,5

Nota. Composición estándar del fabricante (Condalab, ref. 1224). pH final: $7,3 \pm 0,2$

Para la preparación del inóculo, se tomó biomasa de placas de TSA con 24 horas de crecimiento y se resuspendió en 5 mL de TSB estéril. Matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de TSB estéril se inocularon con la suspensión bacteriana previamente obtenida. Estos cultivos fueron incubados en agitador orbital a 37°C y 150 rpm durante 24 horas (Abo El-Naga et al., 2025).

3.3.2 Determinación Cualitativa de Actividad Lipasa

La actividad lipásica se evaluó mediante la hidrólisis de un sustrato lipídico y su posterior detección por fluorescencia, lo que permitió una selección preliminar de la cepa con mayor potencial lipásico.

3.3.2.1 Método de Detección de Actividad Lipasa en Agar Rodamina B.

La detección preliminar de la actividad lipásica se realizó mediante el método de difusión en pozo en agar Rodamina B, compuesto por agar LB suplementado con aceite de girasol (2,5% v/v) como sustrato lipídico y Rodamina B (0,001% p/v) como indicador fluorimétrico, conforme al protocolo de Ng et al. (2022) y Pedroza – Padilla et al. (2017) con modificación. Cada cepa fue evaluada por triplicado ($n = 3$), sembrando cada réplica en una placa independiente.

3.3.2.2 Procedimiento Experimental

En las placas de agar Rodamina B se realizaron pozos de aproximadamente 5mm de diámetro mediante un sacabocados estéril, donde se depositaron 20 μ L del sobrenadante de cada cultivo bacteriano. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. La actividad lipasa se evidenció mediante la formación de halos fluorescentes de color anaranjado alrededor de los

pozos, observados al exponer las placas a luz UV-A ($\lambda = 350\text{--}360\text{ nm}$) mediante una lámpara UV portátil.

Como control negativo se empleó TSB estéril sin inocular depositado en un pozo bajo las mismas condiciones de incubación, con el fin de descartar reacciones inespecíficas del medio o del colorante. Debido a la no disponibilidad de una lipasa comercial purificada, se utilizó la cepa *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 como control positivo, considerando que su actividad lipásica ha sido previamente documentada y asociada a la presencia de un gen codificante de lipasa en su genoma (Almansoori et al., 2024; Reddy et al., 2016).

3.3.2.3 Medición de Actividad Lipasa

El diámetro de los halos fluorescentes se midió con una regla milimetrada, tomando dos medidas perpendiculares por halo y calculando su promedio. Los resultados se expresaron como diámetro de halo promedio $\pm$ desviación estándar (mm).

La cepa que presentó el halo de mayor diámetro e intensidad de fluorescencia fue seleccionada para las pruebas posteriores de producción y cuantificación de lipasa bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación.

3.3.3 Determinación Cuantitativa de Actividad Lipasa

La cepa bacteriana que presentó la mayor actividad lipásica en la determinación cualitativa fue seleccionada para la producción de lipasa en un medio de producción específico bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación.

3.3.3.1 Medio de Cultivo para Producción de Lipasa

Para la producción de lipasa se utilizó un medio de cultivo específico, basado en el descrito por Goswami y Tipre (2025), con modificación, cuya composición se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2

Composición de medio de cultivo para producción de lipasa extracelular

Composición	Cantidad (L)
Aceite de cocina usado	10 mL
Peptona	5,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Cloruro de sodio (ClNa)	5,0 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	0,5 g

Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Dextrosa anhidra ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	5,0 g

El pH del medio de cultivo se ajustó a 7,0 por adición de soluciones de hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N antes de la esterilización. Una vez a temperatura ambiente, fue inoculado a una concentración bacteriana de 1×10^7 células/mL e incubado en agitador orbital a 37°C y 150 rpm durante 24 horas.

3.3.3.2 Producción de Lipasa Bajo Diferentes Condiciones de Temperatura y Tiempo de Incubación

Con el objetivo de determinar las condiciones de temperatura y tiempo de incubación que maximizan la producción de lipasa extracelular de la cepa de *Bacillus* seleccionada previamente, se diseñó un experimento factorial que evaluó tres temperaturas de incubación (30, 35 y 40°C) en combinación con cuatro tiempos de incubación (24, 48, 72 y 96 horas), conforme a lo descrito en la Tabla 3.

Tabla 3

Diseño experimental para la evaluación del efecto de temperatura y tiempo de incubación sobre la producción de lipasa en la cepa de Bacillus seleccionada

Tratamientos	Temperatura (°C)	Tiempos de incubación	Repeticiones
T 1	30°C	24 h – 48 h – 72 h – 96 h	Triplicado (n = 3)
T 2	35°C	24 h – 48 h – 72 h – 96 h	Triplicado (n = 3)
T 3	40°C	24 h – 48 h – 72 h – 96 h	Triplicado (n = 3)

Una concentración de 1×10^7 células/mL de la cepa de *Bacillus* con mayor actividad lipolítica seleccionada, fue inoculada en el medio de producción específico para lipasa (Tabla 2) e incubada en agitación orbital a 150 rpm, a las temperaturas y tiempos de incubación indicados. En cada intervalo de tiempo, se tomaron muestras de 2 mL por triplicado, estas fueron centrifugadas a 10 000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, y el sobrenadante fue almacenado a –20 °C hasta la determinación de la actividad lipásica por el método de Mohaini et al. (2022).

3.3.4 Cuantificación de Actividad Lipásica

La actividad lipásica fue determinada mediante titulación, siguiendo el método descrito

por Mohaini et al. (2022) con modificación, el cual se basa en la cuantificación de los ácidos grasos libres liberados durante la hidrólisis de triglicéridos del sustrato lipídico por acción de la enzima.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

3.3.4.1 Preparación de Sustrato Lipídico

Se utilizó como sustrato una emulsión de aceite de girasol ajustada a pH 7,0, preparada en dos etapas. En primer lugar, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se disolvieron 10 g de goma arábica en 50 mL de agua destilada bajo agitación constante hasta su completa solubilización. A continuación, se añadieron 10 mL de aceite de girasol y la mezcla fue homogenizada en vórtex durante 2 minutos hasta obtener una emulsión estable.

Una vez formada la emulsión, se incorporaron 2 mL de cloruro de calcio (CaCl_2) al 0,6% (p/v) y 5 mL de buffer fosfato de sodio 0,2 M. El volumen total fue completado a 100 mL con agua destilada, manteniendo el pH en 7,0.

3.3.4.2 Procedimiento Experimental

Se colocaron 10 mL de la emulsión de sustrato en un matraz Erlenmeyer de 100 mL de capacidad, a los cuales se añadieron 0,1 mL de sobrenadante enzimático. Las mezclas se incubaron durante 1 hora a 35 °C en agitador orbital a 150 rpm. Transcurrido este tiempo, la reacción fue detenida con la adición de 2 mL de solución etanol:acetona (1:1), seguida de agitación para homogeneizar. A continuación, se añadieron 3 gotas de fenolftaleína al 1% como indicador; las muestras fueron tituladas con NaOH 0,05 M hasta la aparición de una coloración rosada persistente (mínimo 30 segundos). Se registró el volumen de NaOH consumido en cada caso.

Como control negativo, se realizaron ensayos en las mismas condiciones experimentales, con la diferencia de que el sobrenadante enzimático fue añadido después de la adición de la solución etanol:acetona (1:1), con el fin de evitar la hidrólisis del sustrato.

3.3.4.3 Cálculo de la Actividad Enzimática

La actividad lipásica se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad lipasa } \left(\frac{U}{\text{mL}} \right) = \frac{(V_s - V_b) \times n \times 1\,000}{S}$$

Donde:

V_S = volumen de NaOH consumido en la muestra (mL)

V_B = volumen de NaOH consumido en el blanco (mL)

N = molaridad de la solución de NaOH (0,05 M)

S = volumen de la solución sustrato (10 mL)

1 000 = factor de conversión de equivalentes a micromoles

La actividad lipásica se expresó en U/mL, donde una unidad (U) equivale a la cantidad de lipasa capaz de liberar 1 μ mol de ácido graso libre por minuto bajo condiciones del ensayo (Mohaini et al., 2022).

3.4 Procesamiento Estadístico de la Información

Los datos de determinación cualitativa, correspondientes al diámetro de los halos de hidrólisis, se expresaron como media $\pm$ desviación estándar ($n = 3$). Previamente, se evaluó la normalidad mediante la prueba de Shapiro–Wilk ($\alpha = 0,05$). En función de los resultados, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de la prueba de Tukey (HSD, $p < 0,05$) para la comparación de medias. En caso de no cumplirse la normalidad, se aplicará la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn.

Para la evaluación cuantitativa, los valores de actividad lipásica (U/mL) obtenidos bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación se expresaron como media $\pm$ desviación estándar ($n = 3$) y se analizaron mediante un ANOVA bifactorial, previa verificación de normalidad (Shapiro-Wilk, $\alpha = 0,05$) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Se consideraron como variables independientes a la temperatura y el tiempo de incubación, así como su interacción, utilizando la actividad lipásica como variable dependiente.

Cuando se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$), se empleó la prueba de Tukey para la comparación de medias. Los resultados se representaron mediante curvas de producción enzimática en función de la temperatura y tiempo de incubación.

La concentración de proteína determinada en la condición de mayor actividad lipásica se expresó como media $\pm$ desviación estándar ($n = 3$), y se utilizó para calcular la actividad específica de la enzima (U/mg). Todos los análisis se realizaron en R (versión 4.3), considerando un nivel de significancia de $p < 0,05$.

CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados

4.1 Análisis e Interpretación de Resultados

En el presente capítulo se exponen los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo experimental, estructurados en dos fases secuenciales que responden a los objetivos específicos planteados en el Capítulo I. La primera fase corresponde a la evaluación cualitativa de la actividad lipásica de tres cepas del género *Bacillus* mediante el método de agar Rodamina B, cuyo propósito fue seleccionar la cepa de mayor potencial lipásico. La segunda fase comprendió la cuantificación de la actividad enzimática de la cepa seleccionada bajo un diseño factorial de temperaturas (30, 35 y 40 °C) y tiempos de incubación (24, 48, 72 y 96 horas), con el fin de identificar las condiciones óptimas de cultivo. Adicionalmente se presentan los resultados de actividad lipasa en la condición de mayor producción enzimática.

4.1.1 Evaluación Cualitativa de la Actividad Lipásica: Ensayo en Agar Rodamina B

La actividad lipásica de las cepas evaluadas se determinó cualitativamente mediante el método de difusión en pozo en agar Rodamina B suplementado con aceite de girasol usado al 2,5 % (v/v) como sustrato lipídico. Este ensayo permitió detectar la actividad lipásica a través de la formación de halos fluorescentes generados por la interacción de la Rodamina B con los ácidos grasos libres liberados durante la hidrólisis del aceite presente en el medio.

Los resultados obtenidos evidenciaron diferencias en la intensidad y extensión de la fluorescencia observada entre las cepas evaluadas. El control negativo, constituido por caldo TSB estéril sin sobrenadante bacteriano, no presentó fluorescencia anaranjada alrededor del pozo, confirmando la ausencia de actividad lipolítica y la especificidad del método. Por su parte, el control positivo correspondiente a *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 mostró una fluorescencia anaranjada claramente visible, corroborando la adecuada funcionalidad del ensayo.

En cuanto a las cepas experimentales, *B. pumilus* ATCC 700214 presentó fluorescencia difusa con menor extensión e intensidad alrededor del pozo, interpretándose como actividad lipasa positiva de carácter moderado. Por su parte, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 y *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842 mostraron fluorescencia anaranjada amplia e intensa, con zonas de mayor concentración alrededor de los pozos, lo que se interpretó como actividad lipasa positiva alta en ambos casos.

4.1.1.1 Medición de la actividad lipasa

Aunque se observó fluorescencia positiva en las cepas evaluadas, los halos observados no presentaron bordes definidos ni delimitación circular uniforme, lo que impidió realizar mediciones milimétricas del diámetro de hidrólisis. Por esta razón, los resultados se interpretaron únicamente a partir de criterios cualitativos: presencia, extensión e intensidad visual de la fluorescencia anaranjada. Los resultados del ensayo cualitativo de actividad lipásica se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4

Evaluación cualitativa de la actividad lipásica de las cepas de Bacillus spp. en agar Rodamina B bajo luz UV-A ($\lambda = 350\text{--}360\text{ nm}$)

Muestra	Tipo de muestra	Observación visual	Interpretación cualitativa
C (-)	Caldo TSB estéril sin sobrenadante bacteriano	Ausencia de fluorescencia	Negativa
C (+)	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	Fluorescencia amplia	Positiva alta
M1	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 700214	Fluorescencia difusa	Positiva moderada
M2	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i> ATCC 6633	Fluorescencia amplia	Positiva alta
M3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23842	Fluorescencia amplia	Positiva alta

C (-): Control negativo; C (+): Control

Nota. La interpretación cualitativa se basó en la presencia, extensión e intensidad visual de la fluorescencia anaranjada bajo luz UV-A ($\lambda = 350\text{--}360\text{ nm}$). La ausencia de halos con bordes definidos imposibilitó la medición milimétrica del diámetro de hidrólisis.

4.1.2 Selección de la Cepa de *Bacillus* con Mayor Potencial Lipásico

Los resultados obtenidos en el ensayo cualitativo en agar Rodamina B mostraron que

Bacillus subtilis subsp. *spizizenii* ATCC 6633 y *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23842 presentaron actividad lipásica elevada, evidenciada por la formación de halos de fluorescencia anaranjada amplios e intensos alrededor de los pozos. Debido a la similitud observada en la extensión e intensidad de la fluorescencia y a la imposibilidad de realizar mediciones cuantitativas confiables de los halos, no fue posible establecer diferencias entre ambas cepas mediante esta etapa de cribado cualitativo.

Ante la ausencia de criterios cuantitativos que permitieran discriminar entre las dos cepas con mayor actividad aparente, se seleccionó *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842 para la fase de cuantificación de actividad lipásica. Esta decisión se fundamentó en la menor disponibilidad de información reportada para esta especie en comparación con *B. subtilis*, permitiendo orientar el estudio hacia la generación de resultados sobre una cepa con potencial lipásico demostrado y menor grado de caracterización en condiciones experimentales similares a las evaluadas en la presente investigación.

La variabilidad observada entre las cepas evaluadas confirma la primera parte de la hipótesis, que establece que "la actividad lipasa de las cepas evaluadas del género *Bacillus* difieren entre sí"

4.1.3 Efecto de la Temperatura y el Tiempo de Incubación sobre la Producción de Lipasa en *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23842

Una vez seleccionado *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842 como la cepa de mayor potencial lipásico, se procedió a cuantificar su producción de lipasa extracelular bajo un diseño factorial que combinó tres temperaturas (30, 35 y 40 °C) y cuatro tiempos de incubación (24, 48, 72 y 96 horas), en el medio de producción específico. Cada condición se evaluó por triplicado (n=3). La actividad lipásica se determinó mediante el método titulométrico.

En la **Tabla 5** se presentan los valores de actividad lipásica obtenidos para cada combinación de temperatura y tiempo de incubación. En la **Figura 1** se muestra la evolución temporal de la producción enzimática a las tres temperaturas evaluadas.

Tabla 5

Actividad lipásica (U/mL) de Bacillus amyloliquefaciens ATCC 23842 bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación

Tiempo (Horas)	Temperatura (°C)	Tratamiento	
		(U/mL)	Media $\pm$ DE
24	30	14,0	1,5
48	30	20,0	0,5
72	30	20,2	0,8
96	30	19,8	1,3
24	35	14,5	2,2
48	35	19,8	1,3
72	35	19,2	1,5
96	35	19,2	1,3
24	40	15,3	0,8
48	40	19,8	0,8
72	40	20,2	1,3
96	40	20,5	0,5

Nota: Actividad determinada por titulometría con NaOH 0,05 M, usando emulsión de aceite usado como sustrato. DE: desviación estándar.

Con el fin de determinar el efecto de la temperatura y el tiempo de incubación sobre la producción de lipasa, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) bifactorial sobre los valores de actividad lipásica (U/mL) obtenidos para el tratamiento. Previamente, se verificó el cumplimiento de los supuestos del modelo: la prueba de Shapiro-Wilk aplicada sobre los residuales del modelo no mostró evidencia de desviación de la normalidad ($W = 0,964$; $p = 0,276$), y la prueba de Levene confirmó la homogeneidad de varianzas entre los grupos experimentales ($F = 0,391$; $p = 0,947$), por lo que se procedió con el análisis paramétrico.

El ANOVA bifactorial mostró que la temperatura de incubación no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la actividad lipásica ($F = 1,270$; $p = 0,299$). En contraste, el

tiempo de incubación influyó de manera significativa sobre la producción enzimática ($F = 41,394$; $p < 0,001$). La interacción entre ambos factores no resultó significativa ($F = 0,408$; $p = 0,867$), lo que indica que el patrón de producción en función del tiempo fue consistente en las tres temperaturas evaluadas.

Dado que el factor tiempo fue el único significativo, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (HSD) sobre este factor. Los resultados mostraron que la actividad lipásica registrada a las 24 horas de incubación ($14,6 \pm 1,5$ U/mL) fue significativamente menor que la observada a las 48 horas ($19,9 \pm 0,8$ U/mL; $p < 0,001$), 72 horas ($19,8 \pm 1,2$ U/mL; $p < 0,001$) y 96 horas ($19,8 \pm 1,1$ U/mL; $p < 0,001$). No se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de 48, 72 y 96 horas entre sí ($p > 0,05$ en todas las comparaciones), lo que evidencia que la producción enzimática alcanza una meseta a partir de las 48 horas de incubación, sin incrementos adicionales relevantes hasta las 96 horas.

En conjunto, estos resultados indican que la condición más eficiente para la producción de lipasa por *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842 corresponde a 48 horas de incubación, independientemente de la temperatura empleada dentro del rango evaluado (30–40 °C), dado que tiempos de incubación más prolongados no se tradujeron en una mayor actividad enzimática.

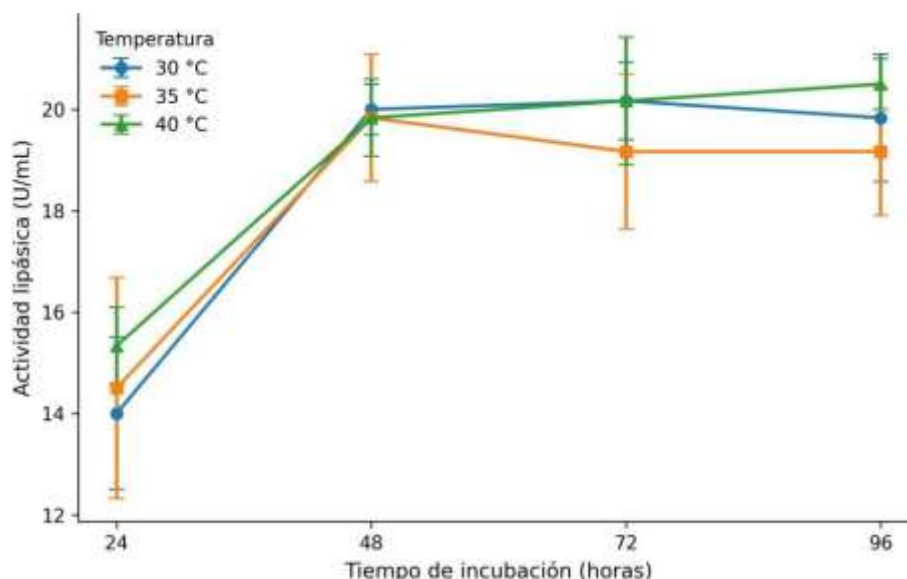


Figura 1

Curva de producción de lipasa de Bacillus amyloliquefaciens ATCC 23842 en función del tiempo de incubación, a las tres temperaturas evaluadas. Los puntos representan la media $\pm$ desviación estándar ($n = 3$)

CAPÍTULO V: Conclusiones, Discusión y Recomendaciones

5.1 Discusión

Los resultados obtenidos en la fase cualitativa muestran que las cepas ATCC evaluadas del género *Bacillus* presentan diferencias significativas en su actividad lipásica, evidenciadas por la formación de halos fluorescentes en agar Rodamina B. Este hallazgo es consistente con lo reportado por Foronda et al. (2025) en su estudio sobre la producción de lipasa a partir de *Bacillus safensis* VC-6, quienes emplearon la intensidad del halo fluorescente en placas con Rodamina B como criterio de selección de la cepa con mayor actividad lipásica. Esto pone de manifiesto la utilidad del ensayo como una herramienta de discriminación entre cepas previo a cualquier proceso de optimización de condiciones de cultivo.

La utilización de agar Rodamina B suplementado con aceite de girasol usado como sustrato lipídico permitió distinguir el potencial lipásico de cada cepa evaluada, de acuerdo con el protocolo clásico de Kouker y Jaeger (1987), ampliamente utilizado en estudios de tamizaje microbiológico (Rabbani et al., 2013; Xu et al., 2024).

Las diferencias en la actividad lipásica observadas entre las cepas evaluadas, donde *B. subtilis* subsp. *spizizenii* y *B. amyloliquefaciens* presentaron los halos de mayor intensidad en comparación con *B. pumilus*, presentan una tendencia consistente con lo documentado por Shart & Elkhailil (2020). Estos autores reportaron una marcada heterogeneidad en la producción lipásica entre cepas, rasgo atribuible no solo a factores intrínsecos de cada cepa sino a condiciones experimentales como el tiempo de incubación.

La actividad del control positivo *B. licheniformis* ATCC 14580 también fue detectada, lo que confirma la validez del ensayo empleado. Este resultado es coherente con lo reportado por Almansoori et al. (2024), quienes confirmaron la presencia de un gen codificante de lipasa en el genoma de esta cepa, con actividad demostrable en ensayos en placa. La ausencia de halo en el control negativo (TSB sin inocular) descartó interferencias del medio o del colorante.

En cuanto a la metodología de detección, el uso de aceite de girasol usado como sustrato lipídico en lugar del aceite de oliva convencional representa una adaptación justificada que busca abordar una problemática ambiental relevante como lo es el vertido de aceites vegetales usados en suelos y cuerpos de agua. Sin embargo, es importante reconocer que la composición de ácidos grasos del aceite de girasol difiere de la del aceite de oliva. Mientras el aceite de oliva es predominantemente rico en ácido oleico, el aceite de girasol contiene mayor proporción de

ácido linoleico, lo que puede influir tanto en la intensidad del halo como en la especificidad de la señal fluorescente generada por la Rodamina B. No obstante, investigaciones previas han demostrado que las lipasas microbianas, son capaces de hidrolizar una amplia gama de sustratos lipídicos, como lo evidencia Abo El-Naga et al. (2025), quienes optimizaron la producción de lipasa a partir de *Bacillus subtilis* utilizando suero de leche como sustrato, obteniendo resultados prometedores para aplicaciones biotecnológicas.

Respecto a los factores de cultivo, el medio específico para producción de lipasa empleado en la fase cuantitativa se diseñó con base en el trabajo de Goswami y Tipre (2025), quienes emplearon aceite de cocina usado como inductor lipídico y peptona/extracto de levadura como fuentes nitrogenadas. Esta formulación es coherente con lo descrito por Adetunji y Olaniran (2021), quienes destacaron que las fuentes orgánicas de nitrógeno y los sustratos lipídicos inductores maximizan la secreción extracelular de lipasas en cepas mesófilas de *Bacillus*.

Una vez establecida la idoneidad metodológica del ensayo cualitativo y de las condiciones de cultivo empleadas, los resultados de la fase de optimización cuantitativa permiten profundizar en el efecto específico de la temperatura y el tiempo de incubación sobre el rendimiento enzimático de la cepa seleccionada.

Respecto al efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción enzimática, los resultados del presente estudio mostraron que la temperatura, dentro del rango mesofílico evaluado (30 - 40 °C), no constituyó un factor determinante de la actividad lipásica de *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842 ($p = 0,299$). Este hallazgo es consistente con el comportamiento mesófilo característico de las lipasas del género *Bacillus*, cuyos rangos óptimos de temperatura se sitúan típicamente entre 30 y 40 °C (Nadaf et al., 2025), lo que sugiere una tolerancia fisiológica de la cepa a la variación térmica dentro de este intervalo, sin comprometer su capacidad de secreción enzimática.

Cabe señalar que estudios que han ampliado el rango de temperatura evaluado más allá del intervalo mesofílico, como el de Shart y Elkhailil (2020), quienes examinaron temperaturas de hasta 90°C, han encontrado diferencias marcadas en la temperatura óptima entre distintos aislados de *Bacillus* (40, 60 y 75 °C, según el aislado). Esto sugiere que la variabilidad térmica del género podría manifestarse de forma más pronunciada fuera del rango mesofílico estrecho explorado en el presente estudio, lo que podría explicar, al menos en parte, la falta de

significancia estadística de este factor en el diseño experimental empleado.

En contraste, el tiempo de incubación se confirmó como la variable determinante del rendimiento enzimático, con un incremento marcado de la actividad lipásica entre las 24 y 48 horas, seguido de una fase de estabilización hasta las 96 horas. Este patrón es coherente con la dinámica de producción de enzimas extracelulares descrita para *Bacillus* spp., en la que la síntesis máxima de lipasa ocurre durante la transición entre la fase exponencial tardía y la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, posiblemente asociada a mecanismos de regulación por *quorum sensing* y a la disponibilidad decreciente de nutrientes en el medio (Adetunji & Olaniran, 2021). La estabilización de la actividad lipásica observada entre las 48 y 96 horas podría explicarse por los mecanismos de regulación que controlan la secreción de enzimas extracelulares en *Bacillus* spp. durante la fase estacionaria, los cuales involucran sistemas de dos componentes (*DegS-DegU*) y de *quorum sensing* (*ComQXPA*), cuya expresión varía según la etapa de crecimiento del cultivo (Feng et al., 2025).

Estos resultados tienen una implicación práctica relevante: dado que no se observaron diferencias significativas en la actividad lipásica entre 48 y 96 horas, la condición de 48 horas de incubación representa la combinación más eficiente en términos de tiempo de proceso, sin comprometer el rendimiento enzimático. Este intervalo coincide, además, con el tiempo óptimo de incubación reportado por Shart y Elkhailil (2020) para el aislado de mayor actividad lipásica global de su estudio, el cual alcanzó su máxima producción también a las 48 horas; no obstante, estos mismos autores documentaron tiempos óptimos heterogéneos, entre 24 y 96 horas, según el aislado evaluado. Esta coincidencia, junto con la variabilidad reportada entre aislados, refuerza el carácter cepa-dependiente de este parámetro y respalda la pertinencia de procesos de optimización específicos por cepa. Esto reviste particular importancia para el diseño de bioprocesos escalables, en los que la reducción del tiempo de fermentación se traduce directamente en menores costos operativos y energéticos. Según un estudio sobre expresión extracelular de lipasas en *Bacillus subtilis*, la disminución de la actividad lipásica después de las 24 horas de cultivo se acompaña de una ligera disminución en la densidad celular, lo cual podría atribuirse a la posible liberación de enzimas proteolíticas endógenas por autólisis, dado que cepas de *Bacillus subtilis* deficientes en proteasas extracelulares son propensas a la autólisis tras la transición a la fase estacionaria temprana (Reyes et al., 2021).

La ausencia de interacción significativa entre temperatura y tiempo ($p = 0,867$) refuerza

la robustez del hallazgo anterior, al indicar que el patrón temporal de producción enzimática se mantiene independientemente de la temperatura de incubación seleccionada dentro del rango ensayado, lo que otorga flexibilidad operativa al momento de definir las condiciones de cultivo a escala piloto.

Cabe destacar que gran parte de la literatura disponible sobre optimización de la producción de lipasa en *Bacillus* se ha desarrollado a partir de aislados ambientales no certificados, como los 65 aislados de suelo y efluentes de aceite evaluados por Shart y Elkhail (2020), mientras que los estudios que emplean cepas de colección certificadas bajo condiciones estandarizadas y reproducibles continúan siendo escasos. Esto refuerza la pertinencia de la presente investigación como aporte a la caracterización del potencial lipolítico de cepas ATCC bajo un diseño experimental controlado, sentando bases metodológicas para futuras investigaciones orientadas al desarrollo de bioprocesos locales reproducibles.

5.2 Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos y en correspondencia con los objetivos específicos y la hipótesis planteados en la presente investigación, se establecen las siguientes conclusiones:

La evaluación cualitativa de la actividad lipásica mediante el método de difusión en pozo en agar Rodamina B permitió determinar que las tres cepas certificadas del género *Bacillus* evaluadas (*B. amyloliquefaciens* ATCC 23842, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 y *B. pumilus* ATCC 700214) presentaron actividad lipásica detectable, evidenciada por la formación de halos fluorescentes bajo luz UV-A. Se confirma así la primera parte de la hipótesis planteada, según la cual la actividad lipásica de las cepas evaluadas difiere entre sí: *B. subtilis* subsp. *spizizenii* y *B. amyloliquefaciens* presentaron los halos de mayor intensidad fluorescente, en contraste con *B. pumilus*, que mostró la menor actividad lipasa relativa en esta fase de detección preliminar.

En atención al segundo objetivo específico, se seleccionó *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23842 como la cepa de mayor potencial lipásico para los ensayos de optimización cuantitativa. Esta decisión se fundamentó en los resultados obtenidos de la fase cualitativa de detección enzimática y responde, además, al interés de generar nueva información sobre la capacidad de producción de lipasa de una cepa que ha sido escasamente caracterizada en este contexto. De este modo, la selección permitió continuar con la fase experimental orientada a identificar las condiciones de cultivo que maximizan su producción enzimática, sentando las

bases para futuras aplicaciones biotecnológicas.

En atención al tercer y cuarto objetivos específicos, el análisis de varianza bifactorial aplicado a la actividad lipásica de *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842 permitió determinar que el tiempo de incubación constituye el factor determinante de la producción enzimática ($p < 0,001$), mientras que la temperatura, dentro del rango mesofílico evaluado (30–40 °C), no ejerció un efecto significativo ($p = 0,299$), tampoco se evidenció interacción significativa entre ambos factores ($p = 0,867$). La prueba de Tukey evidenció que la actividad lipásica alcanza su máximo nivel a partir de las 48 horas de incubación, sin diferencias significativas frente a los tiempos de 72 y 96 horas, por lo que se establece esta condición como la más eficiente para la producción de lipasa por la cepa seleccionada. Estos hallazgos confirman la segunda parte de la hipótesis planteada, según la cual existe una combinación de temperatura y tiempo de incubación que maximiza la actividad enzimática, evidenciando que dicha combinación está determinada principalmente por el tiempo de cultivo.

5.3 Recomendaciones

Para la práctica

Con base en los hallazgos de este estudio, se recomienda seguir utilizando *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23842 como cepa de referencia para el desarrollo de protocolos de producción de lipasas a escala de laboratorio, dado su demostrado potencial lipásico en la fase cualitativa. Se sugiere adoptar las condiciones óptimas de temperatura y tiempo de incubación que se identifiquen en la fase cuantitativa de este estudio como punto de partida para procesos de fermentación sumergida a escala piloto.

Se recomienda también continuar empleando aceite vegetal usado como inductor lipídico en el medio de producción, dado que esta práctica no solo reduce los costos del bioproceso, sino que ofrece una vía de valorización para un residuo que representa un problema ambiental relevante por su vertido inadecuado en suelos y cuerpos de agua.

Para la aplicación práctica de la lipasa producida por *B. amyloliquefaciens*, se recomienda explorar su uso en el tratamiento de efluentes con alta carga lipídica en industrias alimentarias locales, como alternativa biotecnológica de bajo costo frente a los tratamientos químicos convencionales.

Se recomienda emplear un tiempo de incubación de 48 horas para la producción de lipasa por *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842, dado que constituye la condición más eficiente en

términos de relación rendimiento-tiempo, sin diferencias significativas frente a tiempos de incubación más prolongados (72 y 96 horas). Esto permite reducir costos operativos y energéticos en futuros procesos de escalamiento.

En cuanto a la temperatura de incubación, al no haberse identificado diferencias significativas entre 30, 35 y 40 °C, se sugiere seleccionar la temperatura operativa con base en criterios de eficiencia energética o de compatibilidad con la infraestructura disponible, sin que ello comprometa el rendimiento enzimático esperado.

Se recomienda evaluar tiempos de incubación inferiores a 48 horas (por ejemplo, intervalos de 6 o 12 horas) con el fin de caracterizar con mayor precisión la cinética de producción de lipasa durante la fase exponencial de crecimiento, y determinar el momento exacto en que se alcanza la meseta de producción observada en este estudio.

Asimismo, dado que no se observaron incrementos adicionales en la actividad enzimática más allá de las 48 horas, futuras investigaciones podrían explorar las causas de esta estabilización, evaluando la posible degradación proteolítica de la lipasa secretada o la influencia de mecanismos de regulación génica asociados a la fase estacionaria del crecimiento bacteriano

Para la investigación futura

Los resultados de esta investigación plantean nuevas interrogantes que podrían constituir líneas de estudio posteriores. En primer lugar, dado que *B. subtilis* subsp. *spizizenii* presentó una actividad lipásica cualitativa similar a la de *B. amyloliquefaciens* en la fase cualitativa, futuras investigaciones podrían profundizar en la comparación cuantitativa directa entre ambas cepas bajo el mismo diseño factorial de temperatura y tiempo, con el fin de determinar si esta similitud cualitativa se mantiene en términos de actividad enzimática real (U/mL) y no únicamente en la intensidad del halo de hidrólisis.

En segundo lugar, se recomienda evaluar el efecto del tipo de sustrato lipídico (aceite de girasol usado frente a aceite de oliva u otros aceites vegetales) sobre la magnitud de la señal fluorescente en el ensayo de Rodamina B, dado que las diferencias en la composición de ácidos grasos entre sustratos podrían estar introduciendo un sesgo metodológico en la comparación del potencial lipásico entre cepas. Esta limitación debe considerarse al interpretar y replicar los resultados aquí obtenidos.

En tercer lugar, se sugiere aplicar metodologías de optimización multivariada, como la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) con Diseño Compuesto Central (CCD), para

optimizar simultáneamente variables adicionales del medio de cultivo (concentración del inductor lipídico, pH, velocidad de agitación) en *B. amyloliquefaciens*, más allá de la temperatura y el tiempo de incubación abordados en este estudio.

Limitaciones del estudio

Una limitación relevante de la presente investigación fue la imposibilidad de determinar la actividad específica de la lipasa (U/mg), que requería la cuantificación de la concentración de proteína total del sobrenadante enzimático mediante el método de Bradford (1976). Esta determinación no pudo completarse debido a una avería imprevista del espectrofotómetro en la fase final del trabajo experimental, lo que impidió realizar las lecturas de absorbancia necesarias para dicho ensayo. En consecuencia, los resultados de actividad enzimática se reportan únicamente en términos de actividad lipásica volumétrica (U/mL), sin normalizar por el contenido proteico del extracto. Se considera que la determinación de la actividad específica constituye un punto importante que debería abordarse en futuras investigaciones, ya que este parámetro permite una comparación más precisa entre cepas y condiciones de cultivo al independizar la actividad enzimática de posibles variaciones en la concentración total de proteína secretada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelaziz, A., Mahmoud, H., Abd El-Aty, A., El-Henawy, A., y Shawky, S. (2025). Microbial lipases: Advances in production, purification, biochemical characterization, and multifaceted applications in industry and medicine. *Microbial Cell Factories*, 24(1), Artículo 40. <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02360-9>
- Abo El-Naga, M., Khan, M., Abu-Hussien, S., Mahdy, S., Al-Farga, A., y Hegazy, A. (2025). Optimizing lipase production by *Bacillus subtilis* on cheese whey and evaluating its antimicrobial, antibiofilm, anti-virulence and biosafety properties. *Scientific Reports*, 15, Artículo 11087. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-92181-8>
- Adetunji, A., & Olaniran, A. (2021). Production strategies and biotechnological relevance of microbial lipases: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(3), 1257–1269. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00503-5>
- Adetunji, A., & Olaniran, A. (2021). Production and potential biotechnological applications of microbial lipases: A review. *Biotechnology Reports*, 29, e00542. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00542>
- Akinsemolu A., Onyeaka H., Odion S., Adebajo I. (2024) Exploring *Bacillus subtilis*: ecology, biotechnological applications, and future prospects. *J Basic Microbiol*, 64:2300614. <https://doi.org/10.1002/jobm.202300614>
- Ali, Y., Verma, M. L., & Kumar, H. (2023). Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 232, 123393. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123393>
- Alsada, W., & Abas, I. (2026). Molecular Profiling of Lipase-Producing *Bacillus* spp. from Basrah Extreme Soils. *Indonesian Journal on Health Science and Medicine*, 3(1), 10.21070/ijhsm.v3i1.386. <https://doi.org/10.21070/ijhsm.v3i1.386>
- Ahmad, S., Noor, U., Asghar, S., & Rashid, H. (2024). Characterization of a novel subfamily 1.4 lipase from *Bacillus licheniformis* IBRL-CHS2: Cloning and expression optimization. *PLOS ONE*, 19(12), e0314556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0314556>
- Almansoori, A., & Subba, N. (2024). Characterization of a novel subfamily 1.4 lipase from *Bacillus licheniformis*. *PLOS ONE*, 19(12).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0314556>

- Bernal, C., Rodríguez, K., & Martínez, R. (2024). Advances in fluorescence-based assays for enzyme screening and kinetics. *Analytical Biochemistry*, 676, 115225. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115225>
- Bezerra, M., Santelli, R., Oliveira, E., Villar, L., & Escaleira, L. (2020). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Bílková, Z., Slováková, M., & Horák, D. (2019). Fluorometric assays for lipase activity determination using 4-methylumbelliferone derivatives. *Analytical Methods*, 11(36), 4618–4625. <https://doi.org/10.1039/C9AY01345A>
- Bílková, Z., Churáček, J., & Španěl, P. (2019). Biosensors and bioassays based on lipases, principles and applications: A review. *Molecules*, 24(3), 616. <https://doi.org/10.3390/molecules24030616>
- Bornscheuer, U., Hauer, B., Jaeger, K., & Schwaneberg, U. (2022). Directed evolution empowered redesign of natural proteins for the sustainable production of chemicals and pharmaceuticals. *Angewandte Chemie International Edition*, 61(3), e202114759. <https://doi.org/10.1002/anie.202114759>
- Borriß, R. (2020). *Bacillus*, a plant-beneficial bacterium. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(4), 523–542.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Carrasco-Palafox, J., Rivera-Chavira, B., Ramírez-Baca, N., Manzanares-Papayanopoulos, L., & Nevárez-Moorillón, G. (2018). Improved method for qualitative screening of lipolytic bacterial strains. *MethodsX*, 5, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.01.004>
- Chen, X., Koumoutsis, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süßmuth, R., Piel, J., & Borriß, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, 25(9), 1007–1014. <https://doi.org/10.1038/nbt1325>

- Contesini, F., Davanço, M., Borin, G., Vanegas, K., Cirino, J., & de Melo, R. (2020). Advances in the use of lipases in industrial biotechnology: A review. *Molecular Catalysis*, 494, 111132. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2020.111132>
- Eggert, T., van Pouderooyen, G., Dijkstra, B., & Jaeger, K. (2001). Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure. *FEBS Letters*, 502(3), 89–92. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02665-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02665-5)
- Eggert, T., Brockmeier, U., Dröge, M., Quax, W., & Jaeger, K. (2003). Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: Regulation of gene expression and enzyme activity by amino acid supply and external pH. *FEMS Microbiology Letters*, 225(2), 319–324. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00536-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00536-6)
- Elibol, M., & Ozer, D. (2010). Optimization and modeling of process parameters for lipase production by *Bacillus brevis*. *Food and Bioprocess Technology*, 4(3), 487–496. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0387-4>
- Eskandari, A., Leow, T., Abdul Rahman, M., & Oslan, S. (2024). Recent insight into the advances and prospects of microbial lipases and their potential applications in industry. *International Microbiology*, 27(6), 1597–1631. <https://doi.org/10.1007/s10123-024-00498-7>
- Feng, X., Liu, Y., Cheng, R., & Jin, M. (2025). Activity dynamics and regulation mechanism of extracellular proteases in *Bacillus velezensis* SW5. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.01294-25>
- Foronda, V., Castellanos, V., Hoepfner, C., Guzmán, D., Guzmán, H., & Solis, J. L. (2025). Lipase production from *Bacillus safensis* VC-6 isolated from the volcanic region of Copahue: optimization and functional genomic insights. *Frontiers in Microbiology*, 16, Article 1621262. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1621262>
- Garuba, E., Ajunwa, O., Oguntomi, O. y Onilude, A. (2020). Producción electrofermentativa de lipasas termotolerantes mediante bacterias electrogénicas aisladas de efluentes de fábricas de aceite de palma. *Novel Research in Microbiology Journal*, 4 (1), 624-640. <https://doi.org/10.21608/nrmj.2020.73436>
- Goswami, V., & Tipre, D. (2025). Sustainable lipase production from an unexplored marine

- Bacillus safensis* strain using waste cooking oil. *The Microbe*, 8, Artículo 100517.
<https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100517>
- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), 763–781.
<https://doi.org/10.1007/s00253-003-1568-8>
- Hasan, F., Shah, A., & Hameed, A. (2021). Industrial applications of microbial lipases: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 152, 109882.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109882>
- Hermansyah, H., Maresya, A., Putri, D., Sahlan, M., & Meyer, M. (2018). Production of dry extract lipase from *Pseudomonas aeruginosa* by the submerged fermentation method in palm oil mill effluent. *International Journal of Technology*, 9(2), 325–334.
<https://doi.org/10.14716/ijtech.v9i2.1511>
- Hmidet, N., Bayoudh, A., Berrin, J., Kanoun, S., & Nasri, M. (2018). Purification and biochemical characterization of a novel alkaline protease from *Bacillus amyloliquefaciens* and its potential application. *Process Biochemistry*, 39(12), 1659–1666.
- Jaeger, K., Dijkstra, B., & Reetz, M. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*, 53, 315–351. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.315>
- Kanmani, P., Kumaresan, K., & Aravind, J. (2015). Gene cloning, expression, and characterization of the *Bacillus amyloliquefaciens* PS35 lipase. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4), 1235–1243. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246420141068>
- Khazaal A., Reddy, N., Abdulfattah, M., Ismail, S., & Abdul, R. (2024). Characterization of a novel subfamily 1.4 lipase from *Bacillus licheniformis* IBRL-CHS2: Cloning and expression optimization. *PloS one*, 19(12), e0314556.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0314556>
- Khurana, J., Kumar, R., Kumar, A., Singh, K., Singh, R., & Kaur, J. (2015). New insight into *Bacillus* lipase: solvent stable mesophilic lipase. *Folia Microbiologica*.
<https://doi.org/10.1159/000439276>
- Kim, H., Park, S., Lee, J., & Oh, T. (2002). Gene cloning and characterization of a lipase from

- Bacillus pumilus* B26. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17(1–3), 85–92. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(02\)00214-7](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(02)00214-7)
- Kouker, G., & Jaeger, K. (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(1), 211–213. <https://doi.org/10.1128/aem.53.1.211-213.1987>
- Kumari, A., Singh, R., & Kaur, B. (2022). Statistical optimization of lipase production using response surface methodology and its industrial applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 41, 102316. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102316>
- Kumar, R., Mahajan, S., Kumar, A., & Singh, D. (2011). Identification of variables and value optimization for optimum lipase production by *Bacillus pumilus* RK31 using statistical methodology. *New Biotechnology*, 28(1), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.06.006>
- Kumar, A., Dhar, K., Kanwar, S., & Arora, P. (2023). Lipase catalysis in organic solvents: Advantages and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 232, 123388. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123388>
- Mahfoud, M., et al. (2025). Optimizing lipase production by *Bacillus subtilis* on cheese whey and evaluating its antimicrobial, antibiofilm, antivirulence and biosafety properties. *Scientific Reports*, 15, 18421. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-92181-8>
- Mazhar, S., Abbas, S., & Hassan, A. (2023). Production and optimization of thermostable lipase from *Bacillus amyloliquefaciens* using agro-industrial wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 49, 102662. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102662>
- Mehrabi, Z., Golmohamadi, A., & Farajzadeh, D. (2017). Optimization of lipase production by *Bacillus pumilus* in solid-state fermentation using agro-industrial residues. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, 388–395. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.04.006>
- Mohaini, M., Farid, A., Muzammal, M., Ghazanfar, S., Dadrasnia, A., Alsalman, A., Al Hawaj, M., Alhashem, Y., & Ismail, S. (2022). Enhancing lipase production of *Bacillus salmalaya* strain 139SI using different carbon sources and surfactants. *Applied Microbiology*, 2(1), 237–247. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010017>
- Mohan, T., Palavesam, A., & Immanuel, G. (2008). Isolation and characterization of lipase-

- producing *Bacillus* strains from oil mill waste. *African Journal of Biotechnology*, 7(15). <https://doi.org/10.4314/ajb.v7i15.59132>
- Morya, V., Kim, J., & Kim, E. (2024). Microbial enzymes in industrial biotechnology: sources, production, and significant applications of lipases. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuaf010>
- Nadaf, P., Ghagane, S., Nadaf, R. D., & Timmappa, S. C. (2025). Purification and characterization of lipase from *Bacillus subtilis* kubl4 for biodiesel production. *Discover Applied Sciences*, 7, 116. <https://doi.org/10.1007/s42452-024-06340-z>
- Ng, Y., Ikeno, S., Kadhim, A., Muhammad, I., & Abdul, R. (2022). Characterization of *Sphingobacterium* sp. Ab3 lipase and its coexpression with LEA peptides. *Microbiology Spectrum*, 10(6), e01422-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01422-21>
- Ollis, D., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S., Harel, M., Remington, S., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J., Verschueren, K., & Goldman, A. (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering*, 5(3), 197–211. <https://doi.org/10.1093/protein/5.3.197>
- Pedroza Padilla, C., Romero Tabares, M., & Orduz Peralta, S. (2017). Actividad lipolítica de microorganismos aislados de aguas residuales contaminadas con grasas. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(1), 36–44. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(15\)36-44](https://doi.org/10.18684/BSAA(15)36-44)
- Rabbani, M., Bagherinejad, M., Sadeghi, H., Shariat, Z., Etemadifar, Z., Moazen, F., & Zaghian, S. (2013). Isolation and characterization of novel thermophilic lipase-secreting bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1113–1119. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000400013>
- Reddy, N., Rahim, R., Ibrahim, D., & Kumar, K. (2016). Cloning and Expression of a Subfamily 1.4 Lipase from *Bacillus licheniformis* IBRL-CHS2. *Tropical life sciences research*, 27(supp1), 145–150. <https://doi.org/10.21315/tlsr2016.27.3.20>
- Rehman, R., Ahmad, M., & Zafar, M. (2022). Production and characterization of thermostable lipase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00328-0>
- Patel, R., Shah, D., & Patel, M. (2021). Industrial applications of lipases: A review. *Biocatalysis*

- and Agricultural Biotechnology*, 35, 102061. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102061>
- Reyes-Reyes, A. L., Valero, F., & Sandoval, G. (2021). Extracellular expression in *Bacillus subtilis* of a thermostable *Geobacillus stearothermophilus* lipase. *Electronic Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.07.001>
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., & Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology Progress*, 34(1), 5–28. <https://doi.org/10.1002/btpr.2581>
- Saxena, R., Davidson, W., Sheoran, A., & Giri, B. (2020). Microbial lipases: Potential biocatalysts for future industry. *Current Genomics*, 21(6), 403–417
- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. (2022). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 60, 108010. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108010>
- Shart, A., & Elkhailil, E. (2020). Biochemical characterization of lipase produced by *Bacillus* spp. isolated from soil and oil effluent. *Advances in Enzyme Research*, 8(4), 39–48. <https://doi.org/10.4236/aer.2020.84004>
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. (2021). Microbial enzymes: Industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 11, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02612-8>
- Singh, A., Mukhopadhyay, M., & Ghosh, S. (2023). Optimization of lipase production from *Bacillus subtilis* using agro-industrial residues. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 46, 1123–1135. <https://doi.org/10.1007/s00449-023-02867-5>
- Stoytcheva, M., Montero, G., Zlatev, R., León, J., & Gochev, V. (2012). Analytical methods for lipases activity determination: A review. *Current Analytical Chemistry*, 8(3), 400–407. <https://doi.org/10.2174/157341112801264879>
- Szymczak, T., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2021). The influence of environmental conditions on enzyme activity and stability. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6531. <https://doi.org/10.3390/ijms22126531>
- Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K., Ehrenreich, P., Bäumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A., & Gottschalk, G. (2004). The complete

- genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7(4), 204–211. <https://doi.org/10.1159/000079829>
- Vieille, C., & Zeikus, G. (2001). Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001>
- Verger, R. (1997). 'Interfacial activation' of lipases: facts and artefacts. *Trends in Biotechnology*, 15(1), 32–38. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(96\)10064-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(96)10064-0)
- Verma, S., Gupta, N., & Rathi, P. (2022). Enantioselective applications of microbial lipases in pharmaceutical industries. *Process Biochemistry*, 115, 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.015>
- Volpato, G., Migliavacca, V., Andrade, B., Heck, J., & Ayub, M. (2020). Screening of Amazonian *Bacillus* strains for lipase production using glycerol as substrate. *ScientiaTec: Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS*, 7(3), 121–131. <https://doi.org/10.35819/scientiatec.v7i03.2560>
- Xu, L., Liu, H., Zhang, M., Zhang, H., Li, J., Qu, C., & Wang, C. (2024). Cribado, expresión y análisis de las propiedades enzimáticas de una cepa productora de lipasa activa en frío. *Ciencia y tecnología de la industria alimentaria*, 45(20): 133–140. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110093
- Zavarise, J. P., & Pinotti, L. M. (2020). Avanços em caracterização bioquímica de lipases microbianas: uma revisão [Advances in biochemical characterization of microbial lipases: a review]. *Research, Society and Development*, 9(4), e104942897. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i4.2897>
- Zottig, X., Bissaro, B., & Lavigne, R. (2016). High-throughput screening of lipolytic enzymes using rhodamine-based assays. *Journal of Microbiological Methods*, 122, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.01.003>

ANEXOS



Figura 2

*Preparación de placas de agar Rodamina B para el ensayo de difusión en pozo. a. Realización de pocillos de aproximadamente 5 mm de diámetro en placas de agar LB suplementado con aceite de girasol usado (2,5% v/v) y Rodamina B (0,001% p/v). b. Toma de muestra de cultivo de las cepas de *Bacillus* spp. evaluadas, para centrifugación y posterior inoculación de los pocillos con el sobrenadante*



Figura 3

Inoculación de la cepa con mayor potencial lipásico, seleccionada a partir de los resultados del cribado cualitativo, en el medio de cultivo específico para la producción de lipasa extracelular, previo a su incubación bajo las distintas combinaciones de temperatura y tiempo de incubación



Figura 4

Preparación de las muestras para la cuantificación de la actividad lipásica por el método titrimétrico, mediante la adición de fenolftaleína al 1% como indicador y titulación con NaOH 0,05 M