



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN EN
ENERGÍAS RENOVABLES**

TESIS

**“ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE
PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL A TRAVÉS DE
CATÁLISIS ENZIMÁTICA, UTILIZANDO
HONGOS CON CAPACIDAD LIPOLÍTICA
AISLADOS DE ACEITES RECICLADOS”**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA**

**EN MATERIALES
Y SISTEMAS ENERGÉTICOS
RENOVABLES**

P R E S E N T A

ELVIA GUADALUPE GÓMEZ VÁZQUEZ

DIRECTOR:

DRA. YOLANDA DEL CARMEN PÉREZ LUNA

CO-DIRECTOR

DR. GUILLERMO ROGELIO IBÁÑEZ DUHARTE

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Noviembre, 2024



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS AUTÓNOMA

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 24 de octubre de 2024
Oficio No. SA/DIP/0741/2024
Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

C. Elvia Guadalupe Gómez Vázquez
CVU: 539539

Candidata al Grado de Doctora en Materiales y Sistemas Energéticos Renovables
Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables
UNICACH
Presente

Con fundamento en la opinión favorable emitida por escrito por la Comisión Revisora que analizó el trabajo terminal presentado por usted, denominado Establecimiento de un sistema de producción de biodiésel a través de catálisis enzimática, utilizando hongos con capacidad lipolítica aislados de aceites reciclados cuya Directora de tesis es la Dra. Yolanda del Carmen Pérez Luna (CVU: 206547) y Co-Director el Dr. Guillermo Rogelio Ibáñez Duharte (CVU 215574) quienes avalan el cumplimiento de los criterios metodológicos y de contenido; esta Dirección a mi cargo autoriza la impresión del documento en cita, para la defensa oral del mismo, en el examen que habrá de sustentar para obtener el Grado de Doctora en Materiales y Sistemas Energéticos Renovables.

Es imprescindible observar las características normativas que debe guardar el documento impreso, así como realizar la entrega en esta Dirección de un ejemplar empastado.

Atentamente
“Por la Cultura de mi Raza”

Dra. Carolina Orantes García
Directora



C.c.p. Dr. José Francisco Pola Albores, Director del Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables UNICACH. Para su conocimiento.
Dra. Laura Elena Vereza Valladares, Coordinadora de Posgrado, Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables, UNICACH. Para su conocimiento.
Archivo/minutario.

RJAG/COG/hyb/igp/gtr

2024 Año de Felipe Carrillo Puerto
BENEMÉRITO DEL PROLETARIADO,
REVOLUCIONARIO Y DEFENSOR DEL MAYAB.



Secretaría Académica
Dirección de Investigación y Posgrado
Libramiento Norte Poniente No. 1150
Colonia Lajas Maciel C.P. 29039
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México
Tel:(961)6170440 EXT.4360
investigacionyposgrado@unicach.mx

Dedicatoria

A Dios, por la salud y la oportunidad de vivir esta experiencia.

A mis padres, Clarita y Gustavo, por la enseñanza de confiar en el proceso.

A mis hermanos, Erika, Ricardo y Gustavo, por la gracia de coincidir en esta vida.

A mis abuelos, que con su ejemplo de vida marcaron mis ganas de vivir sin miedos.

Agradecimientos

Quisiera comenzar dando gracias a Dios, por esta etapa de mi vida profesional.

Todo mi agradecimiento a mi directora de tesis la Dra. Yolanda del Carmen Pérez Luna, quisiera expresarle en estas líneas que su apoyo, comprensión y confianza fueron clave para que este proyecto se hiciera realidad. Gracias por su constante guía, experiencia, motivación y sobre todo por convertirme en equipo. A la Dra. Yazmin Sánchez Roque toda mi gratitud por su gran apertura, acompañamiento y ayudarme a ver a la ciencia con más analogía. ¡Gracias doctoras por ser mis mentoras e inspiración, siempre estaré agradecida por tanto y más!

Gracias al Dr. Guillermo Rogelio Ibáñez Duharte y al Dr. Joel Pantoja Enríquez por su guía e instrucción durante el desarrollo de este trabajo. Mi agradecimiento al Dr. Roberto Berrones Hernández por ser un colega que me brindo conocimiento y espacio para la asistencia de mis experimentos.

A los colegas y todos los colaboradores que participaron en esta investigación. Su ayuda en la recopilación de datos y sus valiosos comentarios enriquecieron este proyecto de maneras que jamás imaginé. Esta tesis es el resultado de un esfuerzo colectivo y su colaboración fue crucial para su realización.

Al Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, mi gratitud por permitirme ser estudiante de doctorado y permitirme cumplir con las metas propuestas. A la Universidad Politécnica de Chiapas, por brindarme la oportunidad de crecer académicamente y haberme apoyado en el uso de su infraestructura y laboratorios.

Finalmente, toda mi gratitud al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el soporte financiero para el desarrollo de este trabajo. Así mismo, expreso mi agradecimiento al Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Chiapas (ICTIECH) por haberme otorgado el apoyo para la conclusión de posgrado conforme a lo establecido en la Convocatoria de Apoyos únicos otorgados a los integrantes del Sistema Estatal de Investigadores 2024.

Índice de Contenido

INTRODUCCIÓN	9
Capítulo I	11
Combustibles fósiles.....	12
Biomasa	14
Conversión de biomasa	15
Biocombustibles	16
Clasificación de los biocombustibles.....	18
Biodiésel	18
Triglicéridos	19
Catálisis.....	20
Lipasas	211
Clasificación de las lipasas.....	233
Estructura catalítica.....	233
Mecanismo catalítico	266
<i>Microrganismos productores de lipasas</i>	277
Hongos filamentosos.....	288
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	29
<i>Fomitopsis meliae</i>	29
Aplicaciones biotecnológicas de lipasas fúngicas	30
Capítulo II	31
Antecedentes	32
Planteamiento del problema	34
Justificación	344
Hipótesis.....	355
Objetivo general.....	355
Objetivos específicos:.....	355
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
Sitio de estudio.....	37
Aislamiento de hongos lipolíticos y caracterización de aceites reciclados.....	37
Recolección de muestras.....	37
Caracterización de la materia prima (aceite reciclado)	37
Aislamiento de microorganismos y selección de hongos	37
Identificación morfológica	38

Identificación molecular.....	38
Identidad por homología y relación filogenética	38
Evaluación de actividad lipolítica de hongos seleccionados	39
Ensayo cualitativo.....	39
Ensayo cuantitativo	39
Rendimiento de producción enzimática en dos medios de cultivo diferente	39
Medios de cultivos para producción de enzimas	39
Evaluación y caracterización de los parámetros cinéticos de lipasas seleccionadas	40
Evaluación de sustratos.....	40
Evaluación de fuentes de carbono	40
Evaluación de diferentes fuentes de nitrógeno	40
Evaluación de diferentes iones metálicos.....	40
Evaluación de diferentes temperaturas.....	41
Estimar el rendimiento de Síntesis de biodiésel con lipasas seleccionadas	41
Síntesis de Biodiésel	41
Espectroscopia infrarroja	41
Capítulo III.....	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	433
Aislamiento y selección de hongos	45
Identificación morfológica fúngica.....	466
Reconocimiento por homología y relación filogenética	48
Determinación actividad enzimática cualitativa con rodamina B.....	50
Evaluación cuantitativa de extractos proteicos	52
Determinación de diferentes sustratos para la producción de enzimas lipolíticas	53
Fuentes de carbono para producción lipolítica.....	55
Fuentes de nitrógeno para producción lipolítica	57
Iones metálicos para producción lipolítica.....	59
Temperatura para la producción lipolítica.....	61
Reacciones de transesterificación.....	63
Capítulo IV.....	65
CONCLUSIONES	66
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	67

Índice de figuras

Figura 1. Reacción de transesterificación	19
Figura 2. Diferentes tipos de catálisis para la conversión de biodiésel	20
<i>Figura 3. A. Representación topográfica de la estructura de una α/β-hidrolasa B. B. Estructura tridimensional de una lipasa (PDB: 6A0W).</i>	24
Figura 4. Tipos de reacciones de esterificación.....	25
Figura 5. Tipos de reacciones de transesterificación	26
Figura 6. Mecanismo catalítico de una lipasa	27
Figura 7. Metodología Experimental.....	36
Figura 8. Microorganismos aislados de aceite usado de cocina	45
Figura 9. Morfología macroscópica y microscópica de HB (9A.) y del HC (9B.)	47
<i>Figura 10. Corrimiento electroforético de los productos de PCR correspondientes a la ITS de los hongos.</i>	48
<i>Figura 11. A. Árbol filogenético de <i>Fomitopsis meliae</i> y B. Árbol filogenético de <i>Cladosporium tenuissimum</i>, ambos realizados en MEGA 11</i>	50
Figura 12. Ensayo cualitativo con rodamina B para determinar la actividad lipolítica de hongos filamentosos.....	51
Figura 13. Actividad enzimática lipolítica con diferentes sustratos.	54
<i>Figura 14. Actividad enzimática lipolítica con diferentes fuentes de carbono.</i>	56
Figura 15. Actividad enzimática lipolítica con diferentes fuentes de nitrógeno.....	58
Figura 16. Actividad enzimática lipolítica con diferentes iones metálicos.	60
Figura 17. Actividad enzimática lipolítica con diferentes temperaturas.	62
Figura 18. Espectro FTIR de diferentes muestras.....	64

Índice de tablas

Tabla 1. Composición de medios de cultivos	40
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de aceite reciclado	43
Tabla 3. Parámetros de identificación de hongos filamentosos basada en la secuencia de la IT	499
Tabla 4. Concentración proteica dos diferentes medios de cultivo.....	52

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los recursos naturales no renovables como el carbón, gas y petróleo, son considerados la fuente principal de energía para la producción de combustibles fósiles donde el 80% de necesidades energéticas del mundo se cubre a partir de dichos combustibles. El aumento poblacional ha causado gradualmente la explotación de estos recursos, jugando un papel vital para el crecimiento económico de muchos países (Vogt & Weckhuysen, 2024). En la edición de un informe de Prospectivas de la energía en el mundo (WEO- World Energy Outlook) se menciona que durante el periodo de 2014 al 2040, la demanda energética aumentaría (Cronshaw, 2015; Murshed & Tanha, 2021). Para el 2030, se prevé el crecimiento de industrias, hogares y circulación de vehículos, por lo que la generación de energía y la construcción reflejarán problemas en la salud de la población, como consecuencia de la contaminación emitida por estos sectores (Shahsavari y Akbari, 2018; Sepasgozar y Blair, 2021).

La agencia International de Energía (AIE, 2024) menciona que el consumo mundial de petróleo estimado, superará expectativas de años anteriores, con nuevo récord histórico de 102,9 millones de barriles diarios. Estas condiciones han generado dependencia energética creciente de los países no productores de esta fuente de energía, provocando una infinidad de consecuencias ambientales irreversibles y un agotamiento de las reservas acumuladas durante más de 400 millones de años. Desde 1965, son más de 900 billones de barriles los que se han consumido globalmente y se han transformado en dióxido de carbono. Esta enorme cantidad de anhídrido carbónico no se recicló y representa actualmente más del 50 % de los gases de efecto invernadero que es mayormente el responsable del calentamiento climático global (Pásztor, 2015; Onifade *et al.*, 2023).

Los recursos naturales han sido explotados debido a la creciente demanda energética, junto con el crecimiento de la población. Generando agotamiento de recursos no renovables, provocando emisión de gases de efecto invernadero, principalmente dióxido de carbono cuando se utiliza carbón, petróleo y recursos de gas natural (Rahman *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2019; Tailon Martins *et al.*, 2021).

Los grandes niveles emitidos de gases contaminantes según el tipo de combustible, han generado consecuencias irreversibles. El carbón es responsable de producir grandes cantidades de CO₂ por unidad de energía (Onifade *et al.*, 2023), el petróleo produce alrededor de menos de un tercio de gases contaminantes, en comparación con las cantidades emitidas por carbón y gas natural que representa la mitad de las emisiones de CO₂ comparado con el aceite, siendo este el menos agresivo con respecto a otros combustibles (Bölük y Mert, 2015).

La contaminación atmosférica es un conjunto gases y pequeñas partículas en el aire, que implica riesgo o daño a la salud de los seres vivos, la principal causa de contaminación

del aire es la quema de combustibles fósiles, se producen partículas residuales nocivas para la salud, ocasionando un gasto de miles de millones en salud pública debido a la gran cantidad de emisiones mundiales de CO₂ por combustibles fósiles que van en aumento cada año a causa del consumo. Provocando afectaciones a la calidad del aire, resultando enfermedades en vías respiratorias (Khan *et al.*, 2017; Lelieveld *et al.*, 2020) principalmente.

Por ello, es necesario priorizar con urgencia una visión de futuro sustentable, sustituyendo el consumo de los combustibles fósiles para poder preservar la salud de los ecosistemas. Por lo tanto, investigar nuevas alternativas de energías renovables para la producción de biocombustibles que tengan mayor seguridad energética, así como la reducción de gases efecto invernadero y de contaminantes ambientales, logrando evitar el consumo de combustibles fósiles.

Los biocombustibles son una iniciativa de innovación tecnológica que busca tener un impacto de sustentabilidad energética, representando una alternativa de conservación de energías fósiles, como es el caso del biodiésel; siendo los aceites y grasas reciclados la materia prima más utilizada para su producción, por lo que resultan una posibilidad de mejores costos de producción.

La materia prima más utilizada para producción de este combustible no fósil son los aceites y grasas reciclados, siendo una alternativa de costo accesible que requiere de una correcta disposición de dichos residuos, a través de una reacción de transesterificación con la acción del alcohol y un catalizador químico o biológico (Tabatabaei *et al.*, 2015; Ben Bacha *et al.*, 2022).

Esta investigación tuvo como objetivo establecer un proceso de producción de biodiésel a través de una reacción de transesterificación mediante catálisis biológica, usando la enzima lipasa lipolítica proveniente de microorganismos fúngicos, aislados de aceites usados de cocina.

Capítulo I

Combustibles fósiles

Los combustibles fósiles son una fuente de energía generada a partir de materia orgánica de plantas, animales y microorganismos en descomposición que requiere millones de años para su transformación. Estos combustibles se encuentran en la corteza terrestre y contienen carbono e hidrógeno, que pueden quemarse para obtener energía. Ejemplos de estos combustibles son: carbón, petróleo y el gas natural (Brown, 2019).

- El carbón es un material que generalmente se encuentra en los depósitos de rocas sedimentarias de materia vegetal y animal muerta que esta acumulada en capas. El 50% del peso de una pieza de carbón debe provenir de plantas fosilizadas.
- El petróleo se encuentra originalmente como un material sólido entre capas de roca sedimentaria. Este material se calienta para producir el aceite espeso que se puede utilizar para fabricar gasolina.
- El gas natural se encuentra generalmente acumulado en depósitos de petróleo. Aunque también se puede encontrar en capas de rocas sedimentarias que no contienen petróleo. El gas natural se compone principalmente de metano. (Brown, 2019).

La creciente demanda de estas energías, junto con el crecimiento de la población, llevó al planeta a la explotación de dichos recursos naturales no renovables. (Naz *et al.*, 2019; Mensah *et al.*, 2019; Adedoyin *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2021).

Durante mucho tiempo los combustibles fósiles se han utilizado como fuente de carbono para sintetizar combustibles, productos químicos y materiales a base de carbono que utilizamos en la vida cotidiana. Sin embargo, el manejo masivo de los combustibles fósiles se asocia con una serie de cuestiones económicas, políticas, ambientales y de salud (Serrano, 2020).

En 2030 se prevé el crecimiento de industrias, hogares, circulación de vehículos, la generación de energía y la construcción que reflejarán problemas en la salud de la población, como consecuencia de la contaminación emitida por estos sectores (Shahsavari y Akbari, 2018; Sepasgozar y Blair, 2021). La contaminación del aire es una mezcla compleja de gases y pequeñas partículas y contribuye a una serie de consecuencias para la salud, que incluyen la muerte prematura de 5 millones de personas cada año (Amini *et al.*, 2019).

La quema de combustibles fósiles ha provocado una emisión de gases nocivos como CO₂, CH₄, SO_x y NO_x causando lluvia ácida, calentamiento global y cambios climáticos (Mishra *et al.*, 2019a; Reddy *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2020; Srivastava *et al.*, 2020a, 2020b, 2020c). La emisión antropogénica de CO₂ a nivel mundial fue alrededor de 3.3×10^{10}

toneladas en 2018 (Liu et al., 2020). El nivel actual de CO₂ se prevé en 394,5 ppmv (partes por millón de volumen) y que aumente a 500 ppmv alrededor de 2050 si no se controlan las emisiones no restringidas (Sharma et al., 2020).

Otra de las grandes consecuencias de la contaminación del aire es la producción de partículas residuales nocivas para la salud (Khan *et al.*, 2017; Lelieveld *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2021). La contaminación del aire por la quema de combustibles fósiles provoca cada año 4,5 millones de muertes en todo el mundo, según un estudio elaborado por Greenpeace en el 2020. Alrededor de 40.000 de los fallecidos son niños menores de cinco años, que se ven afectados ante la exposición a micropartículas procedentes de los combustibles fósiles, mientras que unos 16 millones de menores sufren asma debido al dióxido de nitrógeno (NO₂) emitido por los vehículos de combustión y las centrales eléctricas (Greenpeace, 2020).

En el informe “Atlas del Carbón en América Latina 2020” de la fundación Heinrich Böll, describe que la combustión de carbón en China genera 250,000 muertes al año; mientras que en los países de la Unión Europea la cifra de muertes es de 18 mil 200 personas. Se reconocen las grandes afectaciones que se producen por el riesgo de inhalar partículas finas de metales pesados, ya que estas ingresan a las vías respiratorias, penetran los pulmones y al flujo sanguíneo y causan distintos efectos nocivos en el cuerpo. Pueden generar inflamación crónica de los pulmones, deteriorar los reflejos pulmonares y reducir su funcionamiento hasta generar enfermedades como asma, bronquitis crónica y cáncer al pulmón. Otro efecto de deterioro en la salud es la reducción del flujo sanguíneo al cerebro, lo que genera una presión sanguínea alta, arritmias cardíacas e infartos.

Los niveles emitidos de gases contaminantes dependen del tipo de combustible, por ejemplo: el carbón es responsable de producir grandes cantidades de CO₂ por unidad de energía; el petróleo produce alrededor de un tercio menos de gases contaminantes en comparación con las cantidades emitidas por el carbón y el gas natural representa la mitad de las emisiones de CO₂ comparada con el petróleo, haciéndolo el menos agresivo que otros combustibles (Bölük y Mert, 2015; Martins et al., 2021).

Los altos niveles de emisiones de gases de efecto invernadero que han alcanzado los países desarrollados en últimos años, han generado grandes consecuencias del calentamiento global. Se estima que hasta el 2050 el suelo debe permanecer con grandes reservas de combustibles fósiles para limitar el calentamiento hasta 2 °C. McGlade y Ekinsun en 2015 estimaron que debe mantenerse un tercio de petróleo de reservas, aproximadamente la mitad de gas metano fósil y más del 80% de las actuales reservas de carbón (Welsby *et al.*, 2021). Esta iniciativa parece no solo combatir el calentamiento global, sino también promover el uso de fuentes renovables de energía y, a cambio, reducir el uso de fuentes contaminantes y nocivas.

Por lo tanto, en la actualidad se busca reducir la dependencia de dichos combustibles, buscando nuevas alternativas limpias y saludables. Estas iniciativas no solo promueven combatir el calentamiento global, además proporcionan soluciones que sustentan la vida y las actividades humanas en un medio ambiente saludable. Por medio de la sustitución de energías renovables o reciclables que produce el ecosistema (Serrano, 2020).

Biomasa

La Biomasa es cualquier material orgánico que proviene de plantas y animales (así como los materiales obtenidos mediante su transformación natural o artificial) (Serrano, 2020; Perea- Moreno *et al.*, 2019), siendo la única fuente de carbono renovable disponible en nuestro planeta, es el reemplazo natural de los combustibles fósiles para la generación de estos productos. A diferencia de los combustibles fósiles, las materias primas de biomasa (por ejemplo, almidones, azúcares, lípidos y lignocelulosas) están altamente oxigenados, son muy reactivos y químicamente complejos (Serrano, 2020).

Los recursos de biomasa naturales y residuales como madera, aserrín, paja, residuos de semillas, estiércol, residuos de papel, residuos domésticos, aguas residuales, aceites usados, etc. (Kilki, *s et al.*, 2018) han sido utilizados debido a su potencial económico, debido a la amplia disponibilidad de biomasa a nivel mundial, principalmente porque se puede obtener como subproducto de muchos procesos industriales y agrícolas, la biomasa representa una fuente renovable con alto potencial de crecimiento (Li *et al.*, 2017).

Estos nuevos procesos tecnológicos necesitan condiciones de reacción y catalizadores que sean necesarios para desarrollar materiales que logren esta transición. Este tremendo esfuerzo es actualmente liderado tanto por las academias como por la industria, que trabajan en paralelo para desarrollar, mejorar y finalmente escalar algunas de estas tecnologías a nivel industrial debido a que la biomasa es una fuente de energía neutra en carbono, ya que la biomasa durante su crecimiento absorbe CO₂ que posteriormente se libera a la atmósfera durante su combustión, con un balance neto de cero de emisiones de CO₂ (Perea- Moreno *et al.*, 2017).

Los productos químicos a partir de combustibles fósiles es un proceso bastante complejo que se requiere para funcionalización de los hidrocarburos. En el caso de la biomasa, el alto grado de las funcionalidades representa una ventaja importante para simplificar el proceso, ya que muchas de estas funcionalidades ya están presentes en la materia prima. Un buen ejemplo de ello, es proporcionado por Gómez-López *et al.* (2019), estos autores desarrollaron un proceso catalítico nuevo y simple para la producción de vanilina, una sustancia química importante para las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria (Serrano, 2020).

La biomasa proporciona oportunidad de generar estos importantes materiales a partir de fuentes renovables. Existe materia orgánica como leña, virutas de madera, algunos huesos de frutas como aceitunas, aguacates y mango, cáscaras de nueces, cacahuete, semilla de girasol (Perea-Moreno *et al.*, 2018; Perea-Moreno *et al.*, 2017). Este tipo de biomasa es la menos procesada, por lo general, se quema directamente en electrodomésticos como estufas y calderas o se desechan. Estos residuos de biomasa tanto agrícola como forestal se transforman en combustibles sólidos con una baja relación energía / volumen (Li *et al.*, 2018).

Otros tipos de biomasa contribuyen a la producción de combustibles para el sector del transporte de nuestra sociedad, que representa para un tercio de la energía total consumida en el mundo. Dos combustibles renovables para transporte tienen mucha atención en los últimos años, es el caso del bioetanol y el biodiésel. Finalmente, la biomasa se puede utilizar para preparar materiales de carbono con aplicaciones amplias y relevantes. Diversos tipos de producción de energía, con ventajas notorias como precio económico, renovable y con menos emisiones por su forma de combustión (Perea-Moreno *et al.*, 2019).

Conversión de biomasa

Para la producción de biocombustibles, los métodos para la conversión de biomasa, convencionalmente son termoquímicos, biológicos y bioquímicos (Sharma *et al.*, 2020).

- Termoquímicos

Las técnicas termoquímicas incluyen a la pirólisis, gasificación y licuefacción.

- I. Pirólisis, la biomasa se calienta a temperaturas muy altas (300-600 ° C) sin oxígeno para romper la estructura polimérica, transformándolos posteriormente en líquido (bioaceite), gas rico en hidrocarburos y residuos sólidos (biocarbón) (Sipra *et al.*, 2018).
- II. Gasificación, el carbono de la biomasa reacciona con cierta cantidad de oxígeno a altas temperaturas (800-1200 ° C) para transformarse a gas combustible (Azizi *et al.*, 2018; Neves *et al.*, 2020).
- III. La licuefacción tiene diferentes tipos de reacciones (físicas y químicas) que son llevadas a cabo para transformar la biomasa en un estado licuado a alta temperatura y presión (Azizi *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2020).

- Biológicos y bioquímicos

Para el método de conversión de biomasa se utilizan entidades biológicas como plantas y microorganismos, directamente o indirectamente para generar el biocombustible. La fermentación de hexosas y pentosas para bioetanol ocurre por microorganismos como levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Sanusi *et al.*, 2019), *Pichia stipitis* (Koti *et al.*,

2016) y bacterias como *Zymomonas mobilis* (Gao *et al.*, 2018). Además, los biocatalizadores, es decir, las enzimas como la lipasa y la celulasa tienen una tremenda importancia para la hidrolización y ruptura de grupos poliméricos en materias primas ricas en carbohidratos (Binhayeeding *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2020).

Biocombustibles

Los biocombustibles son productos derivados de fuentes orgánicas de energía que se usan para sustituir los carburantes fósiles. Se emplean como respuesta al problema del cambio climático que ha puesto en riesgo el planeta. Mismos que pueden obtenerse de biomasa o residuos orgánicos. Los principales biocombustibles producidos en el mercado global son bioetanol, biodiésel y biobutanol (Sharma *et al.*, 2020).

- **Bioetanol**

El etanol es un combustible oxigenado que tiene un alto calor de evaporación, alto índice de octanaje, bajo índice de cetano, mayor inflamabilidad temperatura que los combustibles derivados del petróleo (Sharma *et al.*, 2020). Mezcla de bioetanol con gasolina reduce las emisiones de gases de efecto invernadero y otros gases nocivos (Sindhu *et al.*, 2019).

Actualmente, el bioetanol producido por la simple fermentación de azúcares de biomasa. Mientras la tecnología de fermentación está madura y bien desarrollada, la producción a gran escala de bioetanol requiere grandes extensiones de tierra y la utilización significativa de biomasa comestible (por ejemplo, maíz y caña de azúcar) (Serrano, 2020).

Biobutanol

El Biobutanol es un biocombustible producido a partir de la fermentación acetona-butanol-etanol (ABE). Este alcohol presenta varias ventajas con respecto al bioetanol, a saber, baja miscibilidad en el agua, baja volatilidad, menor corrosividad, mayor capacidad calorífica y además presenta la ventaja de sustituir directamente la gasolina sin necesidad de realizar modificaciones al motor (Moreno y Cubillos, 2017).

En el caso del etanol y del butanol son producidos a partir de la fermentación de azúcares provenientes de caña de azúcar, maíz, remolacha y residuos vegetales agrícolas o industriales.

Los microorganismos encargados de la fermentación ABE (producción biotecnológica de Acetona, Butanol y Etanol) son las bacterias Gram-positivas. El proceso se lleva a cabo en una fermentación de 2 fases, en la primera se producen ácidos, acetatos, el butirato y anhídrido carbónico. En esta fase se da el crecimiento celular. En la segunda fase, los metabolitos producidos en la primera fase son transformados en acetona, n-butanol y etano (Moreno y Cubillos, 2017).

- Biodiésel

El combustible biodiésel tiene una mayor fracción de O₂ en comparación con el diesel, lo que resulta en una mejor combustión, disminuyendo así las emisiones de material particulado, CO e hidrocarburos no quemados (Shekofteh *et al.*, 2020). La producción de biodiésel a partir de grasas animales, aceites vegetales comestibles y no comestibles, mediante la transesterificación de los triglicéridos en presencia de alcohol y catalizador (Sharma *et al.*, 2020). La producción de biodiésel es el proceso de reducción de la longitud de la cadena de carbono de los ácidos grasos del aceite para convertirlos en ésteres metílicos de ácido graso (Da Silva César *et al.*, 2017). Actualmente se estudia ampliamente como un sustituto ecológico de los combustibles convencionales (Abukhadra y Sayed, 2018).

Las ventajas más evidentes del biodiésel es que se trata de una sustancia biodegradable, no explosiva, no inflamable, renovable, no tóxica, cuya combustión genera bajos niveles de emisiones en gases de efecto invernadero como CO₂, NO_x, SO_x y material particulado (MP) (Mofijur *et al.*, 2016); además, en comparación con el diésel obtenido a partir de combustibles fósiles, posee mayor número de cetano, punto de inflamabilidad y mejores características lubricantes sin variantes en el calor de combustión (Llanes *et al.*, 2017).

La producción de biocombustibles está aumentando rápidamente y varios países han percibido su importancia, por lo que han comenzado a producir una fuente paralela de combustible para el transporte y disminuir la dependencia de los combustibles fósiles convencionales. En 2018, la producción global de todo el biocombustible se elevó en casi un 7% en comparación con 2017, a 153 mil millones de litros (equivalente a 3.8 EJ) (REN21, 2019).

Se estima que durante el periodo 2019-2024, el crecimiento máximo de producción de biocombustibles será en China seguido por Brasil y EUA (IEA, 2020).

La conciencia sobre la bioenergía ha llevado a los Gobiernos a tomar pasos serios y establecer los objetivos que favorezcan la producción. Indonesia se ha fijado el objetivo de sustituir el 15% de gasolina por etanol además del 20% de diésel por biodiésel para 2025, mientras que se están instalando 12 unidades de bioetanol en Tailandia, que se estima que genera casi 2,6 millones de litros de etanol por día (Mathimani y Mallick, 2018). Estados Unidos tiene la intención de reemplazar 20% del combustible para transporte por carretera con biocombustible para 2022, mientras que la Unión Europea ha tomado un 10% como objetivo de biocombustible para el transporte (Sharma *et al.*, 2020).

Clasificación de los biocombustibles

La clasificación de los biocombustibles está representada en 3 diferentes generaciones, según la materia prima y la metodología de conversión (Sharma *et al.*, 2020).

A. Primera generación

Los biocombustibles se derivan de la biomasa comestible como el azúcar, almidón y aceite vegetal (Luiza Astolfi *et al.*, 2020; Murillo *et al.*, 2018).

B. Segunda generación

Está conformada por la biomasa desechada, es decir, los residuos de agricultura y materias primas forestales como hojas de caña de azúcar (Jutakridsada *et al.*, 2019), tallo de yuca (Sivamani *et al.*, 2020), paja de arroz y pasto varilla (*Panicum virgatum*). La materia prima agrícola se compone de biomasa lignocelulósica (derivada de lignina, celulosa y hemicelulosas) como componentes primarios (Westensee *et al.*, 2018).

C. Tercera generación

Las materias primas de tercera generación incluyen aceites usados y aceites de algas. El aprovechamiento de los aceites usados generados en diversas industrias de procesamiento de alimentos es una necesidad del futuro (Liu *et al.*, 2021). La mayoría de los aceites usados se generan a partir de aceites comestibles después de las operaciones de fritura o cocción (Singh *et al.*, 2021).

Otro representante de esta generación es la representa la biomasa de algas (Kumar *et al.*, 2018). Específicamente, se informa que los organismos de microalgas tienen capacidad suprema para crear importantes productos químicos y nutricionales que son los principales responsables de la producción de biodiésel. Las microalgas tienen muchas características atractivas como alto contenido de aceite, potencial de crecer en ambientes tanto artificiales como naturales, alta eficiencia de fijación de CO₂, potencial para la fotosíntesis oxigénica, además de ser amigable con el medio ambiente (Choi *et al.*, 2019; Javed *et al.*, 2019).

D. La "cuarta generación"

Se obtienen de los microorganismos de bioingeniería como algas, levaduras, hongos y cianobacterias o cultivos (Jiang *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2016).

Biodiésel

El biodiésel es un biocombustible que se define como ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME- fatty acid methyl esters) o ésteres etílicos (FAEE- fatty acid ethyl esters) obtenidos a partir de triglicéridos (Figura 1) naturales a través de una reacción de transesterificación con alcohol en presencia de catálisis (Litinas *et al.*, 2020; Alagumalai *et al.*, 2021).

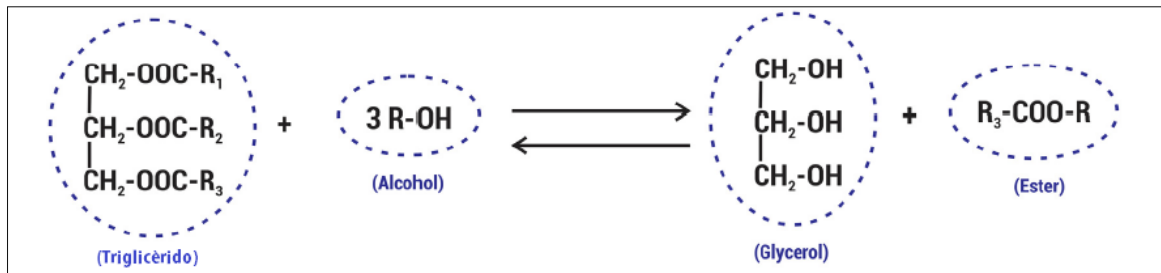


Figura 1. Reacción de transesterificación (Alagumalai et al., 2021)

Triglicéridos

La materia prima principal para la obtención de dichos biocombustibles son los ácidos grasos de aceites vegetales (comestibles y no comestibles) y grasas animales para la obtención de biodiésel (Aderibigbe et al., 2020; Sharma et al., 2019).

Los recursos biológicos con mayor disponibilidad para la producción de biodiésel se encuentran en los principales países: *Jatropha curcas* (Cuba, India, Malasia, Malí, Mozambique, Pakistán, Perú, Tanzania, Tailandia y Zimbabwe), aceite de palma (Brasil, Irán, Malasia, México, Perú y Tailandia), colza (Canadá, Chile, China, Grecia, Italia y Turquía), girasol (Argentina, Canadá, Grecia, Italia y Turquía), *Pongamia pinnata* (Australia, Bangladesh e India), *Calophyllum inophyllum* (Australia y Malasia), soja (Argentina, Canadá, Italia y Estados Unidos), aceite de pescado (Irán), aceite de cocina usado (Irlanda), grasa animal y residuos de pescado (Noruega) y países como China emplea microalgas como materia prima (Alagumalai et al., 2021). Sin embargo, los aceites comestibles son una alternativa rentable de materia prima para la producción de biodiésel (Mofijur et al., 2017).

El aceite de cocina es usado como materia prima para producción de biodiésel, debido a que en el mundo se produce miles de millones de galones de aceite usado cuya eliminación y el almacenamiento son costosos. En los países desarrollados esta materia prima se desecha al sistema de alcantarillado que contamina las aguas subterráneas, los ríos y los océanos. Por lo tanto, si el aceite es convertido en combustible, entonces se pueden resolver dos problemas simultáneamente.

Primero, reducción del costo de tratamiento de los desechos que contienen aceite de cocina usada y reducción de la contaminación del medio ambiente. Segundo, la conversión de aceite usado en combustible puede reducir la crisis energética (Arslan y Ulusoy, 2018).

El poder calorífico del aceite obtenido de girasol, semilla de algodón, colza, soya, utilizados para la producción de biodiésel oscila entre 33 y 44 MJ / kg en comparación con 43 a 44 MJ / kg reportados para diésel. Además, el aceite vegetal también tiene un índice de cetano (37 a 47) comparable al del diésel. Por lo tanto, el biodiésel derivado de triglicéridos se comporta de manera similar al combustible diésel, ofreciendo la

ventaja de no ser tóxico y biodegradable. Los aceites vegetales contienen más oxígeno (10 a 45%) en comparación con el hidrocarburo derivado del petróleo (casi cero), lo que permite una combustión completa y menos niveles de monóxido. La viscosidad de los triglicéridos vegetales es de 17.3 a 32.9 mm²/s, mientras que el diésel contiene de 1.9 a 4.1 mm²/s (Singh *et al.*, 2021).

Catálisis

La catálisis es el proceso a través del cual se acelera la velocidad de una reacción química, lo cual reduce tiempos y costos de producción, pues con una pequeña cantidad de catalizador se puede incrementar la velocidad y la cantidad de producto obtenido durante la reacción (ICN, 2024).

Los catalizadores juegan un papel muy importante en el aceleramiento de la reacción transesterificación efectiva, este puede ser químico o biológico (Kolet *et al.*, 2020). Un catalizador adecuado será un gran avance en la industria catalizadora, ya que puede contribuir a la sostenibilidad del biodiésel junto con la reducción de costos (Ramos *et al.*, 2019).

Los catalizadores para la producción de biodiésel se clasifican en tres tipos, como se observa en la Figura 2 (Nasreen *et al.*, 2018).

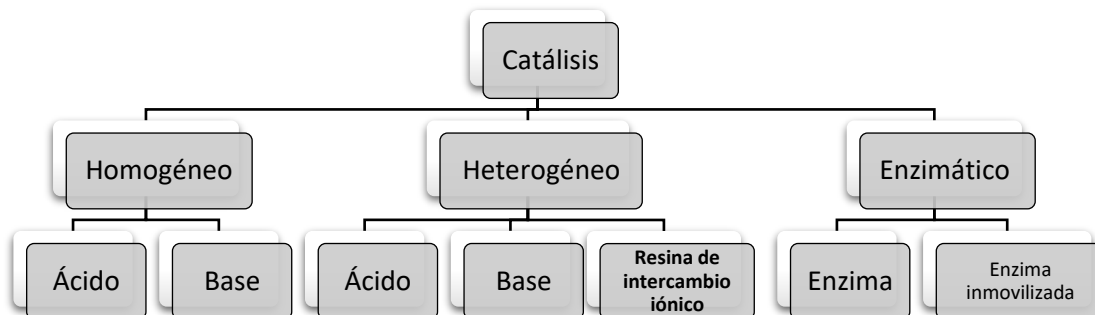


Figura 2. Diferentes tipos de catálisis para la conversión de biodiésel (Nasreen *et al.*, 2018).

Los dos primeros tipos de catalizador (ácidos y básicos) tienen un tiempo de reacción corto y bajos costos, son los más comunes comercialmente. Los catalizadores homogéneos no generan problemas durante el proceso de transferencia de masa, NaOH y KOH son los catalizadores líquidos alcalinos más utilizados, mientras que los ácidos (H₂SO₄ y HCl) actúan con baja velocidad de reacción y provocan corrosión de equipos, además de ser costosos (Talha y Sulaiman, 2016). Estos catalizadores tienen sus propias ventajas y desventajas. Por ejemplo, al final de la reacción con líquido catalizadores, se produce una gran cantidad de aguas residuales, la separación de los catalizadores del producto es difícil, y la reutilización del catalizador es menor que para los catalizadores heterogéneos. Talavari *et al.*, 2020 sugieren que cuando el aceite contiene un alto porcentaje de ácidos grasos libres, es mejor utilizar un catalizador ácido porque en estos casos el catalizador básico genera productos secundarios como jabón, que reduce la

eficiencia del proceso y dificulta la separación de producto. Estos parámetros influyen en el costo total del proceso. (De Lima y Mota, 2019; Eze *et al.*, 2018; Monteiro *et al.*, 2018; Tran *et al.*, 2019). Mientras que para producir biodiésel a partir de aceites que contienen niveles bajos de ácidos grasos libres, se deben utilizar los catalizadores básicos sólidos (Dai *et al.*, 2017).

La aplicación de catalizadores ácidos homogéneos y heterogéneos requiere temperaturas de proceso más altas en comparación con catalizadores básicos homogéneos o heterogéneos. La actividad de los catalizadores básicos es más alta que el de los catalizadores ácidos para catalizadores homogéneos y heterogéneos, y la reacción ocurre en condiciones más suaves. Sin embargo, los catalizadores básicos causan el problema de una saponificación lateral. Reacción que se produce en presencia de FFA (Etim *et al.*, 2020).

Los catalizadores heterogéneos de base y ácido son mucho más fáciles de separar del producto, y permitir la realización de procesos continuos o la reutilización del catalizador en regímenes discontinuos. Los catalizadores base, como CaO, tienen ventajas sobre los homogéneos, ya que exhiben una mayor actividad catalítica y tienen una vida útil más larga. Pero tienen inconveniente como es su tiempo de reacción más largo que en el caso de catalizadores homogéneos (Kolet *et al.*, 2020).

La transesterificación de aceite de cocina usado bajo catalizadores heterogéneos de base que usan metanol generalmente se realiza a temperaturas alrededor de 65 °C, ya que por encima de esta temperatura el metanol se evapora, y como consecuencia, el rendimiento de la reacción disminuye. A diferencia de los catalizadores básicos, heterogéneos y los catalizadores ácidos homogéneos no causan reacciones secundarias con los FFA y, por lo tanto, se pueden utilizar en reacciones de esterificación y transesterificación (Kolet *et al.*, 2020).

Los biocatalizadores como las enzimas libres que actúan a temperaturas más bajas que los catalizadores químicos, presentan alta especificidad por el sustrato y mayor recuperación del producto. Mientras que la inmovilización del catalizador permitirá un ciclo de respuesta de reacción más largo y el desarrollo de un proceso continuo (Kolet, *et al.*, 2020).

Lipasas

Las lipasas (E.C. 3.1.1.3) se denominan triacilglicerol acilhidrolasas. Son consideradas biocatalizadores suaves y amigables con el medio ambiente, son enzimas serina hidrolasas que catalizan la hidrólisis de triglicéridos en diglicéridos, monoglicéridos, glicerol y grasas libres ácidos en la interfaz orgánico-acuosa. (Sarmah *et al.*, 2018; Akhter *et al.*, 2021; Isiaka and Olufolahan, 2020; Yao *et al.*, 2021). Tienen un papel importante en la degradación de materiales naturales, contaminantes industriales y otros productos

tóxicos, debido a dos de sus propiedades: regioselectividad y enantioselectividad (Miranda *et al.*, 2021).

Catalizan una serie de reacciones como: esterificación, inter-esterificación, transesterificación, alcoholisis, acidólisis, y aminólisis en un medio no acuoso y microacuoso. Las lipasas representan la tercera enzima más comercializada, después de las proteasas y las carbohidrasas, y pertenece en una quinta parte del mercado mundial de enzimas (Borrelli y Trono, 2015; Isiaka y Olufolahan, 2020; Yao *et al.*, 2021).

Las propiedades que manifiestan estos catalizadores la alta eficiencia catalítica, pueden funcionar en condiciones de reacción comparativamente suaves, no involucran coenzimas u otros cofactores o subproductos (Yao *et al.*, 2021). Además, presentan quimioespecificidad, regio-selectividad y enantio-selectividad hacia los sustratos (Isiaka y Olufolahan, 2020).

Sin embargo, los parámetros más estudiados para comprender la actividad lipolítica son la alta especificidad (Das *et al.*, 2016), alta eficiencia catalítica (Amoah *et al.*, 2016), temperatura (Liu *et al.*, 2015), dependencia del pH, actividad en solventes orgánicos (Kumar *et al.*, 2016), naturaleza no tóxica, baja inhibición del producto, alta actividad / rendimiento en medios no acuosos, bajo tiempo de reacción y la reutilización de la enzima inmovilizada (Mehta *et al.*, 2017).

Sin embargo, desde el punto de vista económico, las lipasas obtenidas a partir de microorganismos son preferibles a las de origen animal o vegetal. Debido a su alto rendimiento en poco tiempo y los costos más bajos asociados con la materia prima (Miranda *et al.*, 2021). Además, las lipasas microbianas son una clase de enzima más utilizada en biotecnología debido a su estabilidad en amplios rangos de temperatura y pH, especificidad del sustrato, altos rendimientos, menores costos de producción, y facilidad de manipulación genética (Kanmani *et al.*, 2015).

Los microorganismos pueden cultivarse en un proceso de fermentación, con parámetros establecidos produciendo lipasas extracelulares (Isiaka y Olufolahan, 2020). La expresión de las lipasas microbianas está modulada por factores ambientales, ligada a un medio privado de nutrientes, variaciones en temperatura, concentración de inductores, etc. La presencia de lípidos y ácidos grasos como fuentes de carbono induce la producción de estas enzimas extracelulares. Por lo tanto, los microorganismos son el modelo más interesante para la producción de proteínas, porque el repertorio de genes y promotores constitutivos se pueden explorar en el proceso de fermentación (Casas-Godoy *et al.*, 2018).

Clasificación de las lipasas

La especificidad es una característica distintiva de las lipasas y se puede categorizar en ubicación, sustrato y estereoespecificidad. Esto dependerá de la fuente u origen, por ejemplo, la mayoría de las lipasas producidas por hongos son 1,3-posicionales (Helal *et al.*, 2021).

Las lipasas se dividen en tres categorías: Lipasas no específicas, lipasas específicas 1, 3 y lipasas específicas de ácidos grasos.

- Las lipasas no específicas catalizan la hidrólisis de triglicéridos en ácidos grasos libres y glicerol a través de monoglicéridos y diglicéridos intermedios; estas enzimas son capaces de eliminar los ácidos grasos de cualquiera de los tres sitios esterificados del sustrato original, aunque la hidrólisis de monoglicérido y diglicérido intermedios procede más rápido que el de triglicéridos como sustrato original (Yao *et al.*, 2021).
- Las lipasas específicas 1, 3 catalizan la liberación de ácidos grasos de los sitios 1 y 3 de carbonos de los sustratos de triglicéridos; ellos no son capaces de realizar la hidrólisis en el segundo enlace éster. Las lipasas específicas 1, 3 promueven la hidrólisis de triglicéridos en monoglicéridos a un ritmo más rápido que el realizado por lipasas no específicas (Kavadia *et al.*, 2018; López-Fernández *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2020).
- Las lipasas específicas de ácidos grasos demuestran selectividad al sustrato; estas enzimas se dirigen a la cadena larga de ácidos grasos con dobles enlaces cis entre C-9 y C-10 (Yao *et al.*, 2021).

Estructura catalítica

El peso molecular de las lipasas microbianas tiene un tamaño de 20 a 60 kDa, pertenecen a la familia de proteínas hidrolasa α/β plegada. Las hidrolasas son una clase de enzimas cuya actividad depende de la triada catalítica (Ser, His y Asp/Glu) (Faouzi *et al.*, 2015; Isiaka y Olufolahan, 2020). Han sido detectados en un orden los tres residuos de aminoácidos como Ser- Asp-His (residuo nucleofílico, residuo de ácido catalítico y residuo de histidina); el aminoácido de Ser está ubicado en una secuencia conservada Gly-X-Ser-X-Gly. Esta secuencia de pentapéptidos está presente en todas las serinas hidrolasas y juega un papel clave con respecto a la actividad catalítica de este grupo de lipasas (Yao *et al.*, 2021).

La primera estructura obtenida de una lipasa fúngica fue la de *Rhizomucor miehei* (antes *Mucor miehei*), expresada en *Aspergillus oryzae*, un polipéptido sencillo de 269 residuos de aminoácidos, con un sitio catalítico conformado por Ser144, His257 y Asp203, y la presencia de tres puentes disulfuro (Martinez *et al.*, 2019).

Contienen un dominio estructural canónico conformado por ocho cadenas β que forman una hoja β . Estas cadenas están conectadas por α hélices, que quedan empaquetadas a ambos lados de la hoja β . Tienen un núcleo central que es el responsable directo de la actividad catalítica y determina el plegamiento α/β -hidrolasa (Mehta *et al.*, 2017), como se muestra en la Figura 3.

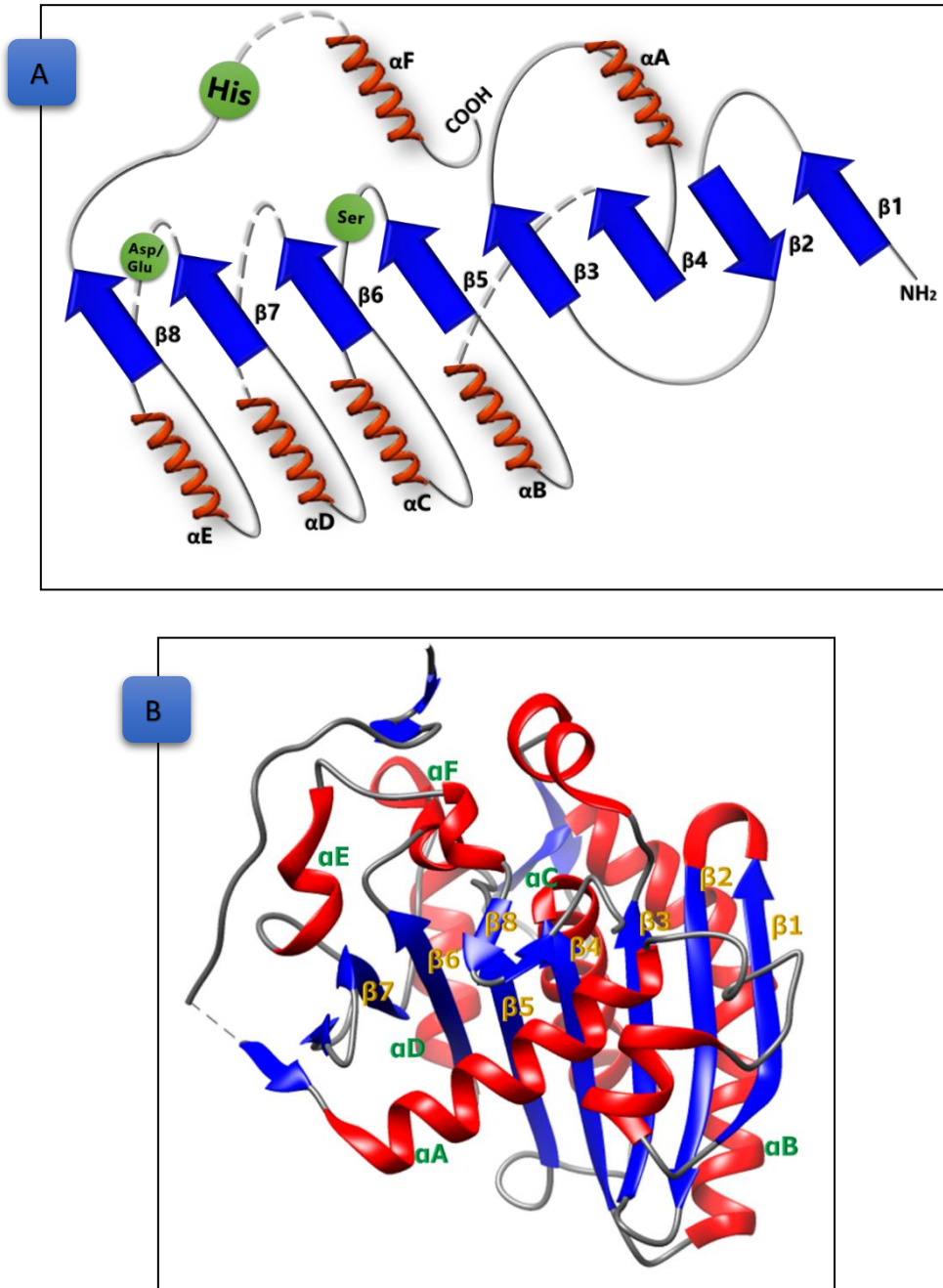


Figura 3. A. Representación topográfica de la estructura de una α/β -hidrolasa B (Jaeger *et al.*, 1999). B. Estructura tridimensional de una lipasa (PDB: 6A0W) (Zhang *et al.* 2019).

La mayoría de las lipasas también contienen un dominio inestable conocido como "Estructura Lid" (Sarmah *et al.*, 2018). Esta estructura cubre el sitio activo; cuando se encuentra en una interfaz aceite-agua, la estructura Lid se abre para permitir interacciones entre el sitio catalítico y el sustrato, facilitando así la reacción catalizada por el disolvente (Khan *et al.*, 2017; Rrcm *et al.*, 2020). Otra característica estructural de las lipasas es el "agujero oxianión", de acuerdo con la preferencia del agujero se dividieron a las lipasas en tres tipos, GGGX, GX y γ , debido a la catálisis de diferentes sustratos (Albayati *et al.*, 2020). También existen sitios de reconocimiento interfacial en la estructura de la lipasa, que cambiará la conformación en presencia de lípidos (Yao *et al.*, 2021).

Reacción de síntesis

Las lipasas bajo ciertas condiciones termodinámicas favorables (es decir, baja actividad de agua), catalizan una gran variedad de reacciones de síntesis que pueden clasificarse en dos: esterificación y transesterificación (Figura 4 y 5, respectivamente) (Kapoor y Gupta, 2012).

La esterificación es una reacción en la que un ácido graso se une, mediante la acción de la enzima, a un alcohol mediante un enlace covalente, produciendo un éster y liberando una molécula de agua. La tioesterificación y la amidación son reacciones similares, pero con un tiol o una amina como sustratos. Mientras que la transesterificación agrupa reacciones de alcoholisis, acidólisis, aminólisis e interesterificación (Casas-Godoy *et al.*, 2018).

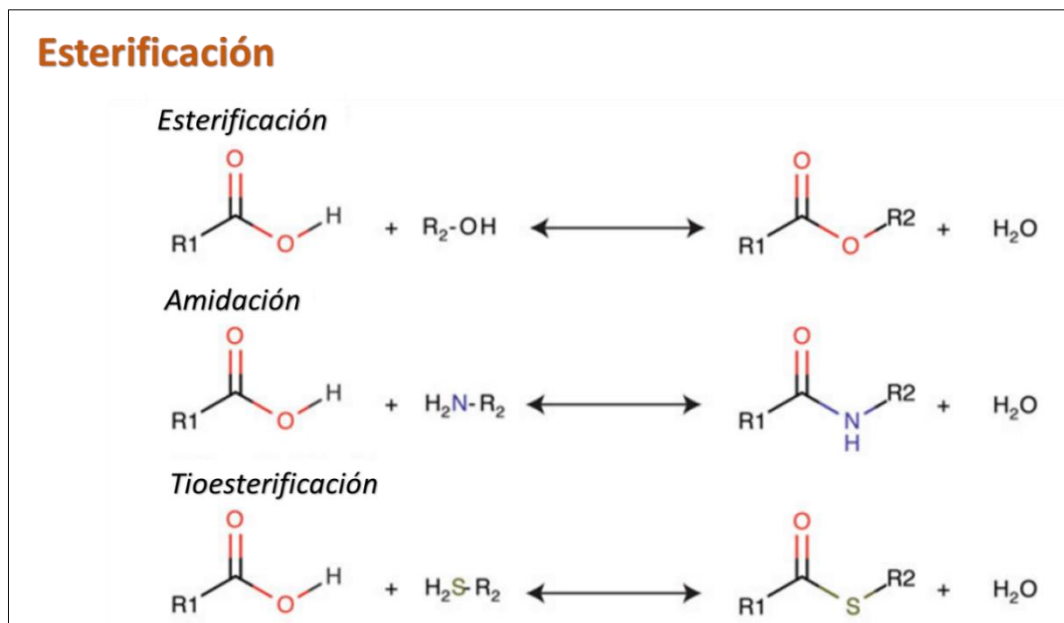


Figura 4. Tipos de reacciones de esterificación (Casas-Godoy *et al.*, 2018).

Transesterificación

Acidólisis



Aminólisis



Alcohólisis



Interesterificación



Figura 5. Tipos de reacciones de transesterificación (Casas-Godoy *et al.*, 2018).

Mecanismo catalítico

El mecanismo de la lipasa para catalizar se puede visualizar en la Figura 6, inicia con una reacción de acilación. En esta etapa se realiza una transferencia de un protón entre los residuos de ácido aspártico, histidina y serina de la triada catalítica de la enzima, estimulando la activación del grupo hidroxilo de la serina catalítica. Resultando un aumento de nucleofilicidad del hidroxilo, provocando un ataque al grupo carbonilo del sustrato.

El primer intermedio tetraédrico está conformado con una carga negativa en el oxígeno del grupo carbonilo. Mientras el agujero de oxianión estabiliza la distribución de carga y reduce la energía del estado intermedio tetraédrico formando al menos dos enlaces de hidrógeno. Posteriormente resulta la reacción de desacilación, donde se observa que un compuesto nucleófilo ataca la enzima, liberando el producto y regenerando la enzima. Este nucleófilo puede ser agua en el caso de hidrólisis o un alcohol en el caso de alcohólisis (Casas-Godoy *et al.*, 2018).

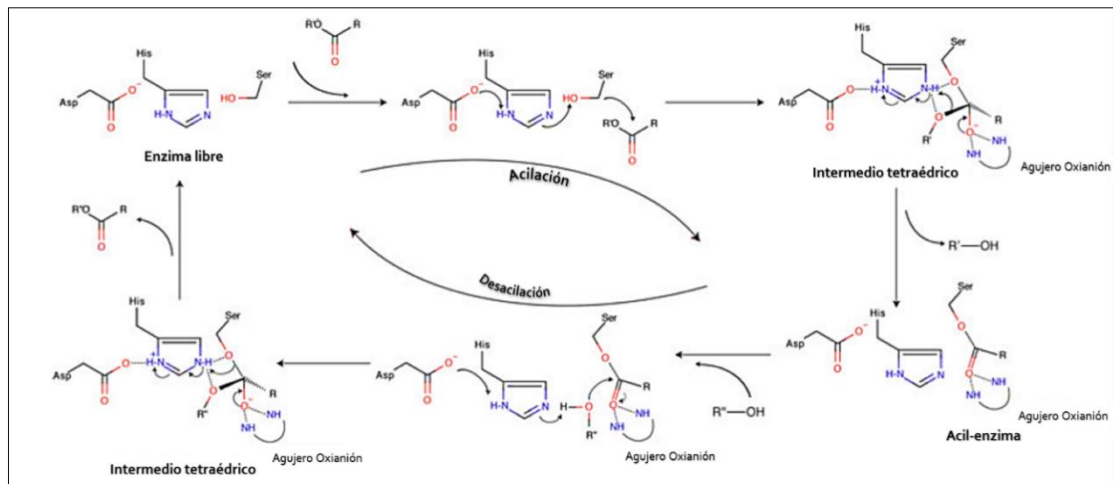


Figura 6. Mecanismo catalítico de una lipasa (Casas-Godoy *et al.*, 2018).

Microrganismos productores de lipasas

Los microorganismos productores de lipasas son bacterias, levaduras y hongos (Bharathi y Rajalakshmi, 2019).

- Bacterias

Algunas de origen bacteriano se encuentra el género *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Microbacterias*, *Lactobacillus*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas* y *Thermosyntropha*, etc. Sin embargo, los géneros *Bacillus* *Pseudomonas* son reconocidos como productores de lipasas destacadas.

- Levaduras

Las Levaduras: *Candida general*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Aureobasidium* y *Rhodotorula*, también han demostrado ser potenciales productores de lipasas.

Estos productores de lipasas, han sido localizados en diferentes hábitats, incluidos residuos industriales, efluentes de molinos de aceite vegetal, efluentes lácteos, sitios contaminados con aceite, alimentos en descomposición, aguas termales, etc. (Isiaka y Olufolahan, 2020).

- Hongos

De la familia de los hongos se han reportado, las lipasas de *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium* y *Geotrichum*.

Los hongos filamentosos son fuente preferible de expresión de lipasas, ya que generalmente forman parte del metabolismo extracelular, lo que favorece su extracción del medio fermentado. Los hongos lipolíticos tienen grandes ventajas, debido a que son microorganismos seguros de manipular. Algunas especies con potencial para la

producción de lipasas, descritos en la literatura, pertenecen a los géneros *Rhizopus sp.*, *Mucor sp.*, *Geotrichum sp.*, *Penicillium sp.* y *Aspergillus sp.* (Miranda *et al.*, 2021).

Novo Nordisk en el año 1994, incluyó la primera lipasa recombinante comercial denominada "Lipolasa" que se originó a partir del hongo *Thermomyces lanuginosus* y se expresó en *Aspergillus oryzae* (Mehta *et al.*, 2017).

Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son organismos eucariotas que se desarrollan en diferentes ambientes como alimentos, residuos agroindustriales, suelo y plantas (Powers y Fletcher *et al.*, 2016). Estos residuos orgánicos pueden ser grasas y aceites que se originan en las cocinas o en la industria alimentaria. Sin embargo, estos desechos son causa de contaminación de suelos y ríos y también son productores de toxinas que causan daños a la salud y afectan la calidad de vida al generar malos olores en el ambiente. Es por ello que estos productos, con la ayuda de hongos aislados del mismo ambiente, permiten la posibilidad de una conversión biológica a nuevos productos con valor agregado (Kumar y Negi 2015; Liu *et al.*, 2021, Mohammadi y Nasrabadi *et al.*, 2019, Orjuela y Clark 2020).

Los hongos son considerados saprófitos y colonizan sustratos mediante el crecimiento de células pluricelulares altamente polares llamadas hifas (Cairns *et al.*, 2019; Fütting *et al.*, 2021) cuyo crecimiento ocurre de forma septada o continua en la pared celular, estas diferencias significativas en la estructura favorecen la clasificación de los hongos (Powers-Fletcher *et al.*, 2016). Por otro lado, la reproducción de los hongos puede ser asexual y sexual. El tipo asexual produce conidios o esporas distribuidas sin fusión nuclear, mientras que el tipo sexual implica la unión de dos núcleos haploides compatibles (Cole, 1996). Por lo tanto, las formas de organización de las esporas determinan las categorías taxonómicas (filo) (Powers y Fletcher *et al.*, 2016).

Otra cualidad interesante de los hongos filamentosos es su capacidad de degradar materia orgánica compleja, transformándola en nuevos componentes biodegradables para ser absorbidos por el suelo y la flora terrestre, generando un ciclo evolutivo de reciclaje (Téllez Vargas *et al.*, 2017; Mancilla *et al.*, 2020). Además, se sabe que secretan altos niveles de enzimas hidrolíticas y metabolitos secundarios que tienen aplicaciones biotecnológicas (Fütting *et al.*, 2021; Siddiqui, 2016), debido a la actividad metabólica natural de los hongos filamentosos que permite optimizar las fábricas celulares productoras de metabolitos específicos, para el desarrollo y escalamiento de bioprocesos (Meyer, 2021).

El creciente interés en los hongos filamentosos se debe principalmente al hecho de que sus procesos metabólicos se pueden utilizar para producir y refinar una amplia gama de productos y soluciones que crean valor para la ciencia, las industrias y los consumidores (Hüttner *et al.*, 2020).

Cladosporium tenuissimum

El género *Cladosporium*, familia Ascomycota, es un hongo filamentoso cosmopolita que se encuentran comúnmente en todo tipo de plantas, hongos y otros desechos, se aíslan con frecuencia del suelo, alimentos, pinturas, textiles y otras materias orgánicas o colonizan como invasores secundarios lesiones foliares causadas por hongos fitopatógenos (Bensch *et al.*, 2012).

La clasificación y diferenciación de *Cladosporium* es extremadamente difícil debido a la abundancia de complejidad en tamaño, forma, pigmentación, ornamentación de la superficie y estructura del conidióforo (Nasiri-Jahrodi *et al.*, 2023). El comportamiento y las propiedades de *Cladosporium* están fuertemente influenciados por factores externos e influencias tales como el clima, el tipo de suelo y varias influencias de latitud (Bensch *et al.*, 2012.).

Cladosporium es un hongo filamentoso, perteneciente al filo Ascomycota y al grupo de los dematiáceos, caracterizados por presentar una coloración oscura. Microscópicamente presenta hifas finas, septadas, ramificadas, de color hialino a marrón. Las hifas sostienen cadenas ramificadas de conidios unicelulares, elipsoides o cilíndricos, algunos con forma de escudo debido a las cicatrices de unión entre ellos. Los conidios se forman por gemación sucesiva del conidio anterior, estando el conidio más joven y pequeño al final de la cadena. Mientras que macroscópicamente forma colonias aterciopeladas, pulverulentas o vellosas, con pliegues radiales, de color blanco o crema que tienden a oscurecerse en tonos verde oliva y, a veces, gris verdoso o marrones. Es un hongo saprófito, se encuentra colonizando las plantas o el suelo, su temperatura óptima de crecimiento es de 18 °C a 28 °C y requieren alta humedad (Tasic y Miladinovic, 2007).

Las especies de este género son comúnmente consideradas como contaminantes ambientales, pero también pueden causar infecciones en diferentes individuos como infecciones superficiales o invasivas. *Cladosporium tenuissimum* se diferencia ligeramente mediante el color de las colonias y las formas microscópicas, y la diferenciación final se realiza mediante pruebas moleculares (Swami *et al.*, 2016).

Fomitopsis meliae

Fomitopsis es uno de los géneros de hongos basidiomicetos más destacados que causan la pudrición parda principalmente en la madera blanda y en algunas especies de madera dura. Se han estudiado muy pocas enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas de este hongo, por lo tanto, no existe información suficiente de ellos (Patel *et al.*, 2021).

En el caso de *Fomitopsis meliae* a menudo atacan a las coníferas, las maderas duras y árboles frutales; sin embargo, se ha identificado que estas cepas demostraron tolerancia a concentraciones de metales que exceden los límites permisibles a nivel mundial para

suelos contaminados. Se prevé que este rasgo de tolerancia a los metales exhibido por estas cepas de hongos puede indicar su potencial como agentes efectivos para la limpieza biorremediativa de ambientes contaminados con metales pesados (Oladipo *et al.*, 2017).

Aplicaciones biotecnológicas de lipasas fúngicas

Desde una perspectiva social y económica, los hongos juegan un papel importante en las industrias farmacéutica, agrícola, alimentaria, de detergentes, de cuero, papel y de biocombustibles (El-Sawah *et al.*, 2021; Hyde *et al.*, 2019; KC *et al.*, 2020; Meyer, 2021; Molina y Gutiérrez *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2021), para la generación de enzimas hidrolíticas, que pueden ser utilizadas en nuevos procesos biotecnológicos (Ramos Sánchez, 2015; Syedd y León *et al.*, 2022).

Estas enzimas se cultivan significativamente en la industria mundial y están involucradas en una amplia gama de aplicaciones para la mejora de diferentes sectores de la industria (alimentaria, de detergentes para hidrólisis de aceites o grasas, farmacéutica para la síntesis de fármacos quirales, plantas de tratamiento de aguas residuales para la extracción de aceite, industria del cuero para la eliminación de la grasa de la piel de los animales y biocombustibles en la producción de biodiésel (Sarmah *et al.*, 2018). El origen de las lipasas es de animales, plantas y microorganismos (Akhter *et al.*, 2021).

En este sentido, las lipasas constituyen una alternativa prometedora para reemplazar la catálisis química en la síntesis de biodiésel. En particular, las lipasas fúngicas son las más utilizadas debido a su menor costo y mayor estabilidad operacional. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y, desde un punto de vista fisiológico, su función es catalizar las reacciones de catabolismo de los triglicéridos en ácidos grasos y glicerol, ocupando un lugar central en el metabolismo lipídico.

Capítulo II

ANTECEDENTES

La historia menciona que el uso de aceite vegetal (originalmente aceite de cacahuate) en el motor, fue formulado por primera vez por Rudolph Diesel en 1900 en una exposición de París. Tiempo después, Diesel confirmó su valoración de aceites vegetales como combustible alternativo. Fue durante la Segunda Guerra Mundial que el aceite de la semilla de algodón y las mezclas de aceite de maíz con diesel se utilizaron en América para reemplazar el diesel importado. Posteriormente, dos décadas después de la crisis del petróleo en la década de 1970, comenzó el interés real en los combustibles de aceite vegetal. Sin embargo, fue hasta 1982 cuando se realizó una conferencia titulada “Combustibles de aceite vegetal” en Fargo, Dakota del Norte, donde el tema principal fue la conversión de aceites vegetales en biodiésel (Alagumalai *et al.*, 2021).

El biodiésel es un combustible líquido renovable generado a partir de lípidos mediante una reacción de transesterificación, la cual consiste en combinar triglicéridos y/o ácidos grasos de los aceites vegetales o grasas animales con un alcohol y la participación de un catalizador químico o biológico (Sajjad *et al.*, 2022; Farouk *et al.*, 2024).

Sajjad *et al.*, (2022) realizaron una investigación que tenía como objetivo optimizar las condiciones de reacción para la producción de biodiésel a través de una transesterificación catalizada por álcali del aceite de semilla de *Tamarindus indica*.

Otro estudio a través del uso de materiales de aceites de semillas fue de Akhtar *et al.*, (2017), quienes optimizaron y caracterizaron la producción de biodiésel a partir de aceite de semilla de *Eriobotrya japonica*.

El informe de OCDE/FAO, 2023 sugiere que la producción mundial de biodiésel llegará a 66.9 miles de millones de litros para 2032, lo que equivale a un aumento del 18% a 24% con respecto al año 2022, siendo el aceite vegetal la materia prima preferida para la producción de biodiésel. Los aceites y grasas reciclados son una alternativa para producir biodiésel al ser una materia prima de bajo costo que requiere de una correcta disposición de dichos residuos (Tabatabaei *et al.*, 2015).

Sin embargo, otros autores han evaluado la producción de biodiésel utilizando materias primas vegetales recicladas, como es el uso de aceites usados de cocina para producción de dicho biocombustible con la ayuda de un catalizador de dióxido de titanio sulfatado (STi) obtenido a partir de un precursor comercial de TiO_2 (Berrones *et al.*, 2019).

La reacción de transesterificación requiere catalizadores químicos de naturaleza alcalina con los cuales se obtienen niveles altos de conversión, pero con varias desventajas energéticas como son altas temperaturas de reacción, gasto de energía que incrementa notablemente el costo del equipamiento y seguridad relacionado con el proceso, una difícil separación del glicerol como subproducto y grandes cantidades de agua de lavado para la obtención del biocombustible; debido a esto, se sugiere realizar un proceso

bioquímico como alternativa, donde la diferencia de la reacción sea la aplicación de un catalizador biológico (enzima lipasa) (Go *et al.*, 2016).

Guerrand (2017) menciona que las enzimas microbianas representan el 90% del mercado global y los 3 productores de enzimas mundiales dominantes son Novozymes, Dupont y DSM, que representan más del 75% del negocio de enzimas. Estos biocatalizadores industriales son provenientes de fuentes como bacterias, levaduras u hongos.

Yao *et al.* (2021) menciona que las lipasas microbianas presentan grandes ventajas de reacción para la producción de biodiésel: las condiciones de temperatura pueden ser ambientales (35-40 °C), alta especificidad de la enzima por el sustrato, posibilidad de reúso de la enzima, eliminación de costos de recuperación del catalizador químico, uso de menores cantidades de relación alcohol/aceite, minimización de impurezas, separación y recuperación del producto de forma más fácil, además de beneficios ambientales. Martínez *et al.*, (2019) expresa que los microorganismos fúngicos poseen alta capacidad para producir lipasas, estas pueden ser localizadas en diferentes hábitats, principalmente en desechos o residuos de aceites vegetales empleados en la elaboración de frituras, industrias de productos lácteos, suelos contaminados con aceites, semillas y alimentos deteriorados.

Estos hongos filamentosos: *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Ashbya*, *Geotrichum*, *Beauveria*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Eurotrium* y *Ophiostoma*, tienen actividad fúngica de bioconversión para la producción de una gran cantidad de sustancias útiles (Mehta *et al.*, 2017), entre ellas promover la depuración de residuos agroindustriales convirtiéndolos en productores de biocarburantes (Isiaka y Olufolahan, 2020).

Helal *et al.*, (2021) reportó catálisis enzimática de lipasas fúngicas para obtención de biodiésel, con la ayuda de R1 lipasa de *R. oryzae* a través de una reacción consistente en hidrólisis y esterificación de ácidos grasos. Otra investigación ha sido la transesterificación de aceite de jatropha con metanol, en un sistema lípido / acuoso por utilización de lipasa aciltransferasa (CpLIP2) inmovilizada de *Candida parapsilosis* como catalizador para producir biodiésel (Rodrigues *et al.*, 2016). Otras enzimas han demostrado producción de biocarburante y mejoras en la reacción de transesterificación, como el caso de la lipasa Lipozyme (LipozymeTL-IM) de *Thermomyces lanuginosus* que presentó una mejora significativa en la producción de biodiésel mediante la reducción de la cantidad de metanol en exceso utilizado en este proceso (Samah *et al.*, 2020).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una problemática que se acrecentó a nivel mundial es el agotamiento de recursos no renovables, como el petróleo, debido a la gran demanda energética que exige el desarrollo social. Estas reservas de petróleo existentes en el mundo son utilizadas para la producción de combustibles fósiles, desencadenando altos niveles de contaminación al ambiente, a través de emisiones de gases de efecto invernadero como CO_2 , NO_x , SO_x y material particulado (MP).

Por otra parte, el uso de estos combustibles ha provocado el aumento en problemáticas ambientales, de salud y económicas en el mundo. Lo que genera una imperiosa necesidad de buscar alternativas económicas y tecnológicas de producción de combustibles alternativos renovables. Los biocombustibles son considerados productos renovables y sostenibles, como es el caso del biodiésel que puede ser sintetizado a partir de aceites usados de cocina.

En la actualidad los aceites residuales son considerados grandes contaminantes ambientales, ya que pueden resultar los causantes de obstrucciones de alcantarillas, provocan malos aromas en los drenajes, son contaminantes de aguas subterráneas. Con ello se plantea obtener mejores parámetros de reacción, para la obtención de un biocombustible con recursos sustentables económicos, basados en fuentes biológicas con potencial para escalar a un proceso industrial.

JUSTIFICACIÓN

La catálisis enzimática es una alternativa para la producción de biodiésel impactando en los sistemas energéticos renovables, generando una alternativa de conversión de biocombustibles a través de aceites vegetales usados que son una fuente de contaminación para el ambiente.

El aprovechamiento de aceites reciclados para la producción de biocombustibles disminuye el impacto negativo de los mismos al ser tratados adecuadamente e impedir que se desechen y contaminen los recursos, además de ser un desarrollo biotecnológico que pretende obtener combustibles no fósiles con mejores rendimientos de producción. A partir de la reacción de transesterificación en presencia de un catalizador no convencional (químico) que será sintetizado a partir de microorganismos fúngicos aislados de un medio natural (aceite reciclado), que contribuya a la eliminación de subproductos indeseables contaminantes (saponificación), minimización de empleo de grandes cantidades de agua, descartar el empleo de compuestos químicos, uso moderado de solventes, disminución de temperatura de reacción, mejora de velocidad de reacción, buena calidad del producto.

Sin olvidar, que se busca la obtención de una sustancia biodegradable, no explosiva, no inflamable, renovable, no tóxica, cuya combustión genere bajos niveles de emisiones en gases de efecto invernadero.

HIPÓTESIS

Si los hongos filamentosos tienen la capacidad de ser productores de enzimas lipasas, por lo tanto, aislar los microorganismos fúngicos de aceites usados tendrán la capacidad de sintetizar catalizadores que produzcan energías limpias, como biocombustibles. A través de la reacción de transesterificación mediante una catálisis biológica.

OBJETIVO GENERAL

Establecer un proceso de producción de biodiésel a través de catálisis enzimática, mediante la aplicación de hongos con capacidad lipolítica aislados de aceites reciclados.

Objetivos específicos:

- A. Aislar e identificar hongos por métodos taxonómicos y moleculares, productores de lipasas extracelulares a partir de aceites usados de cocina.
- B. Evaluar la capacidad de producción de las cepas aisladas para identificar aquella que será utilizada para la producción de la enzima.
- C. Determinar y caracterizar parámetros enzimáticos de extractos crudos obtenidos con actividad lipolítica.
- D. Establecer un sistema de producción de biodiésel a partir de catálisis enzimática.
- E. Evaluar la conversión catalítica del biodiésel producido.

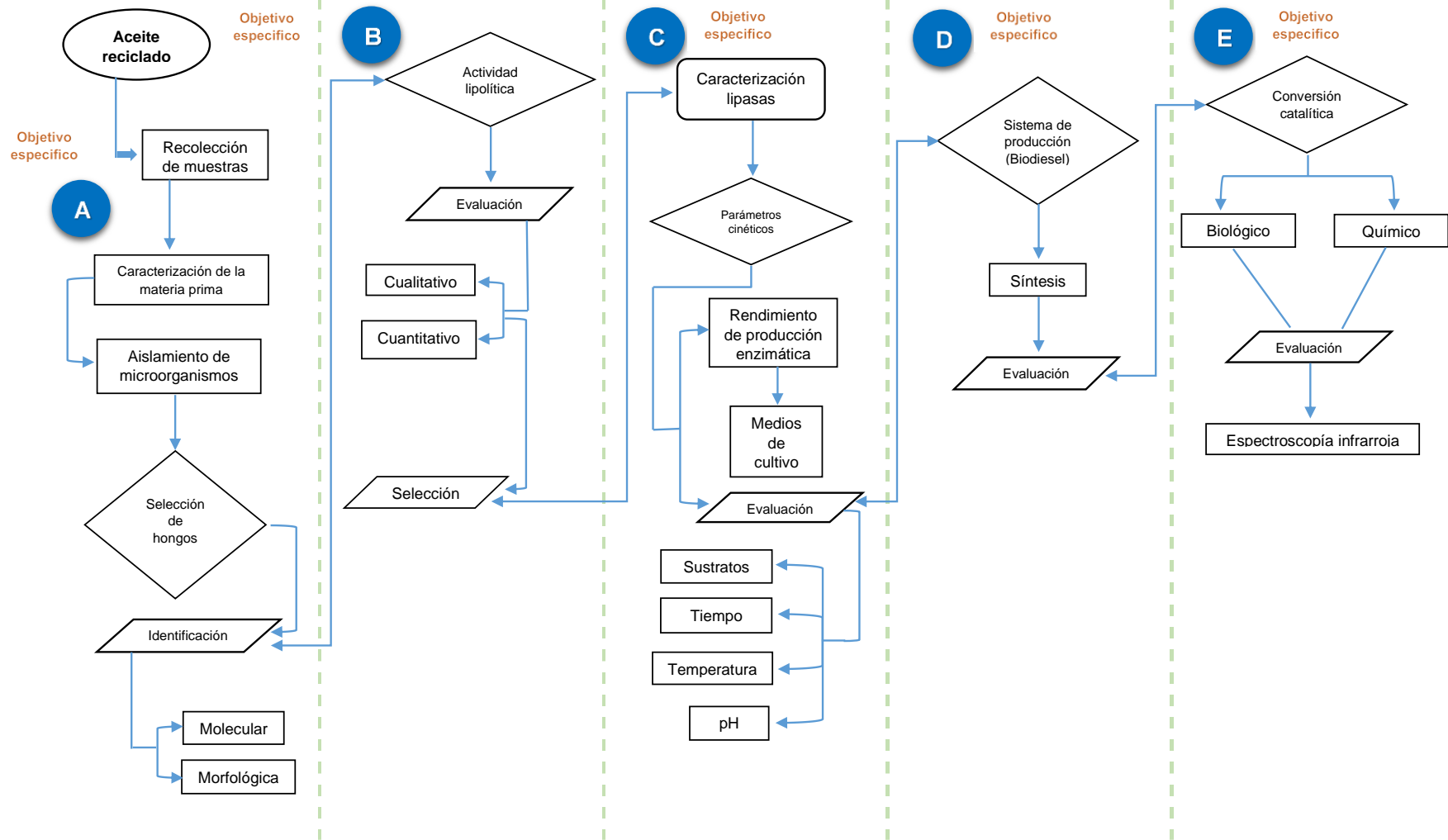


Figura 7. Metodología Experimental

La metodología experimental que se visualiza en la Figura 7, describe un esquema general de la planificación del proyecto de investigación y la estructura experimental que se cumplió para cada objetivo específico propuesto. A continuación, se puntualiza los detalles de los métodos usados en dicha figura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Chiapas, México, ubicada en Suchiapa, Chiapas, localizada a 16° 37' latitud norte y entre 93° 06' longitud oeste. La altitud es de 530 metros sobre el nivel del mar. Las condiciones climatológicas de este sitio corresponden a cálido subhúmedo con temperatura media anual de 16-24 °C (Municipios, 2023).

Aislamiento de hongos lipolíticos y caracterización de aceites reciclados

Recolección de muestras

Se recolectaron las muestras de aceite vegetal reciclado provenientes de frituras de alimentos (cocinas económicas y restaurantes) en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, se depositaron en frascos de vidrio con capacidad de 5 L previamente esterilizados.

Caracterización de la materia prima (aceite reciclado)

Para caracterizar las muestras de aceite reciclado se evaluaron algunas propiedades fisicoquímicas de acuerdo a las normas mexicanas vigentes. Las determinaciones fueron: Índice de refracción (NMX-F-074-SCFI-2011), Índice de acidez (NMX-F-101-SCFI-2012), Densidad relativa (NMX-F-075-SCFI-2012), Índice de Yodo (NMX-F-152-SCFI-2011), Índice de peróxido (NMX-F-154-SCFI-2010), Índice de saponificación (NMX-F-174-SCFI-2014), Humedad y materia volátil (NMX-F-211-SCFI-2012), Impurezas insolubles (NMX-F-215-SCFI-2006) y para el parámetro de Viscosidad se utilizó un Viscosímetro Cannon Fenske serie 150.

Aislamiento de microorganismos y selección de hongos

Los microorganismos fueron aislados de muestras de aceites vegetales usados provenientes de cocinas donde se elaboran alimentos. Para ello, se utilizó el método de siembra por extensión en superficie en placas de agar PDA (extracto de papa 4 g, dextrosa 20 g y agar 15 g) a 28-30 °C por 7 días. Las cepas posteriormente fueron inoculadas sucesivamente para tener cultivos selectivos, en un medio de cultivo sólido PDA suplementado con 0.1 g de cloranfenicol y se incubaron a 28-30 °C por 7 días. Cada aislamiento fue conservado por triplicado en viales con medio PDB (almidón de papa 4g y dextrosa 20 g) y glicerol al 40%, estos fueron almacenados a -20°C (Mendes *et al.*, 2019).

Identificación morfológica

Para la evaluación de las características morfológicas a nivel macro y microscópico de las cepas seleccionadas, se realizó una comparación por medio de claves taxonómicas determinadas (familia/género) de cepas estudiadas, a través de captura de imágenes tomadas directamente en las placas de PDA y en muestras previamente preparadas en solución de azul de algodón para localizar micelio, cuerpos fructíferos, disposición de conidios (Guarro *et al.*, 1999; Naranjo y Gabaldón, 2019; Money, 2016).

Identificación molecular

Para la identificación molecular de los hongos seleccionados se consideró la secuenciación genética, para ello se efectuó la extracción de ADN genómico de las cepas obtenidas por el método de CTAB y se amplificó con iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') mediante la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) que se llevó a cabo en un volumen de reacción de 20 μ l que incluyó los siguientes componentes: 1 μ l de ADN molde (100 ng), 0.5 μ l de una mezcla de 2.5 mM de dNTPs, 2 μ l de buffer de reacción de PCR 10X, 1.2 μ l de una solución de 50 mM de MgCl₂, 0.5 μ l de una solución de 10 μ M de oligonucleótidos, 0.2 μ l de Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ μ L) (ThermoFisher Scientific) y agua mili-Q (para un volumen final de 20 μ l). La PCR se llevó a cabo en un termociclador (Bio-Rad) con las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización a 95°C por 7 min, una segunda etapa de desnaturalización a 95°C por 1 min, 35 ciclos de amplificación con una etapa de alineamiento por 30 s a 60 °C, una etapa de elongación de 1 min a 72°C y una etapa de extensión final a 72 °C por 3 min. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 70 volts por 1 h en buffer TAE 1x. Los fragmentos amplificados de cada cepa corresponden al espaciador transcrito interno 1 y 2 (ITS, internal transcribed spacer), mismos que se purificaron con el kit comercial Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA) y se corrieron en un gel de agarosa al 2% y se sometieron a secuenciación en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del IPICYT en San Luis Potosí (Raeder y Broda, 1985; Tel-zur *et al.* 1999).

Identidad por homología y relación filogenética

Las secuencias obtenidas de la región espaciadora transcrita interna (ITS) de ambos hongos se utilizaron para identificar sus homólogos utilizando la herramienta NCBI Blastn (National Center for Biotechnology Information) (Altschul *et al.* 1990). Se realizó un alineamiento múltiple utilizando el software MEGA 11 (Tamura *et al.* 2021) con el algoritmo Clustal W, se tomaron las cinco secuencias con mayor homología para cada amplicón y se identificaron las secuencias fúngicas reportadas previamente por Bensch *et al.* (2012) y por Liu *et al.* (2021), para HCITS4 y HBITS4, respectivamente. El análisis filogenético se realizó utilizando el método de Máxima Verosimilitud con 1000 bootstraps, utilizando el software IQ-Tree (Trifinopoulos *et al.* 2016). Los árboles filogenéticos resultantes fueron editados utilizando el software I-Tol (Letunic y Bork 2011).

Evaluación de actividad lipolítica de hongos seleccionados

Ensayo cualitativo

Para detectar la actividad lipolítica de las cepas seleccionadas, se determinó a través de la detección de halos de fluorescencia naranja alrededor de la colonia, bajo luz UV a 350 nm donde las cepas seleccionadas fueron sembradas en placas de PDA suplementadas con 1% (p/p) de aceite de oliva (p/p) o 1% (p/p) de aceite reciclado y 0,01% (p/p) de Rodamina B, incubadas a 25-30°C durante 7 días (Kumar *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2019); finalmente, se validó la presencia o ausencia (+ o -) de formación de los halos fluorescentes.

Ensayo cuantitativo

Para evaluar esta prueba, se necesitó el extracto crudo de cada uno de los hongos filamentosos. El ensayo de actividad enzimática de lipasa se realizó con *p*-nitrofenilpalmitato (p-NPP) como sustrato. El sobrenadante libre de células (0.1 mL) se añadió a 0.9 mL de la mezcla de sustrato que contenía la solución A (3 mg de pNPP en 1 mL de isopropanol) y la solución B (10 mg de goma arábiga y 40 mg de Triton-X en 9 mL de 50 nM Tampón Tris-HCl, pH 8). La absorbancia se midió espectrofotométricamente a 410 nm después de 15 minutos de incubación a 30 °C en un baño de temperatura constante con agitación. Los controles se prepararon sin enzima. Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de *p*-nitrofenol/min en las condiciones del ensayo (Gómez *et al.*, 2024; Rodrigues *et al.*, 2023). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se calcularon los valores medios. La concentración de proteínas se determinó utilizando estándares de albúmina sérica bovina (BSA) de acuerdo al método descrito por Bradford (Eko Sukohidayat *et al.* 2018; Pacheco *et al.* 2015).

Al realizar el análisis de los datos cualitativos y cuantitativos de la actividad lipolítica de las cepas seleccionadas, se eligieron las cepas de mayor rango de actividad, generando una nueva selección de cepas para las siguientes pruebas.

Rendimiento de producción enzimática en dos medios de cultivo diferente

Medios de cultivos para producción de enzimas

Los medios se cultivaron por triplicado en matraces Erlenmeyer (500 ml) que contenían 100 mL del medio (Tabla 1), suplementado con 1.0 % p/v de aceite de oliva y 0.2 % p/v de extracto de levadura previamente esterilizados en la autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Tabla 1. Composición de medios de cultivos

Medio de cultivo	Componentes (g/L)	Referencia bibliográfica
M1	0.14-MgSO ₄ .H ₂ O; 0.50 K ₂ HPO ₄ ; 7.20 CaCl ₂ .2H ₂ O	(Kashmiri <i>et al.</i> , 2006)
M3	1.0-KH ₂ PO ₄ ; 1.123-MgSO ₄ .H ₂ O; 0.06-CuSO ₄	(Pera <i>et al.</i> , 2006)

El medio fue inoculado con 1 mL de suspensión de conidios (10^7 esporas por mL) e incubado a 30 °C, 180 rpm por 7 días. El cultivo se centrifugó utilizando una centrifuga refrigerada (Centrifuge 5804 R- eppendorf) a 5000 rpm, 4 °C durante 30 min. Sólo se recogió el sobrenadante libre de células que contenía el extracto crudo. El sobrenadante recogido se utilizó posteriormente para los ensayos de actividad enzimática (Eko *et al.*, 2018; Mendes *et al.*, 2019).

Evaluación y caracterización de los parámetros cinéticos de lipasas seleccionadas

Evaluación de sustratos

Los medios de fermentación estaban constituidos como se describió anteriormente (Tabla 1) para la producción de enzimas, únicamente se sustituyó el sustrato (aceite de semilla de girasol, oliva y aceite reciclado). Se tomaron alícuotas previamente descritas para el ensayo de actividad de la lipasa con ρ -nitrofenil-palmitato (p-NPP) (Adetunji *et al.*, 2018; Gómez *et al.*, 2024; Nerurkar *et al.*, 2013).

Evaluación de fuentes de carbono

Se ocuparon los medios de fermentación (Tabla 1), en los que se reemplazó la fuente de carbono (almidón, sacarosa, manitol y glucosa) bajo las condiciones de 1.0 % p/v. Se recolectaron alícuotas para el ensayo de actividad de la lipasa con ρ -nitrofenil-palmitato (p-NPP) (Soleymani *et al.*, 2017).

Evaluación de diferentes fuentes de nitrógeno

En este caso los medios de fermentación se les varió la fuente de nitrógeno (triptona, extracto levadura, NH₄Cl, Peptona) a una concentración de 2.0 % p/v. Se midió actividad de lipasa con ρ -nitrofenil-palmitato (p-NPP) (Brozzoli *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2019; Rathi *et al.*, 2001).

Evaluación de diferentes iones metálicos

Para la producción de enzimas (Tabla 1), se sustituyó en los medios de fermentación a los iones metálicos en condiciones de 0.2 % p/v (ZnCl₂, MnCl₂, CuSO₄). Se determinó actividad lipolítica con ρ -nitrofenil-palmitato (p-NPP) de cada fermentación (Esteban-Torres *et al.*, 2015; Merih and Esra, 2022).

Evaluación de diferentes temperaturas

El ensayo enzimático se realizó como se observa en la tabla 1, excepto que la incubación se realizó a temperaturas de 20 a 50 °C en incrementos de 5 °C (Ghori *et al.*, 2011; Merih and Esra, 2022).

Estimar el rendimiento de Síntesis de biodiésel con lipasas seleccionadas

Síntesis de Biodiésel

Cada extracto proteico se evaluó con la mezcla de 4 g del aceite reciclado en un matraz Erlenmeyer durante 12 horas para su tratamiento y activación. El metanol se adicionó en tres fracciones de tiempo de la reacción: 0, 4 y 10 horas, para evitar la inactivación de la enzima, relación molar aceite-metanol (1:3). El sistema de reacción se realizó en un agitador orbital a 30-35 °C y 200 rpm en agitación constante hasta completar un tiempo de 24 h. Los productos obtenidos se centrifugaron a 3500 rpm durante 30 min, con la finalidad de separar el catalizador enzimático (Talukder *et al.*, 2009; Polo *et al.*, 2018).

Espectroscopia infrarroja

El contenido de biodiésel se determinó mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en el espectrómetro Thermo Scientific Nicolet iS10 FT-IR. Todos los espectros de absorción infrarroja se obtuvieron en el rango de 500-4000 cm^{-1} . El espectrofotómetro se ejecutó con el software OMNIC y se obtuvieron diferentes espectros en la región del infrarrojo medio.

Cada espectro fue el resultado de exploraciones por triplicado de cada muestra a evaluar. Se registró un espectro por muestra utilizando aire como referencia, además se evaluaron controles de biodiésel y aceite usado de cocina. El cristal de diamante se limpió utilizando un pañuelo empapado en agua destilada pura, entre análisis sucesivos de muestras (Li *et al.*, 2018; Wembabazi *et al.*, 2015).

Capítulo III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del aceite reciclado

El aceite usado de origen vegetal presentó una coloración marrón oscura y un olor rancio. Estas dos cualidades representan la oxidación de un aceite de cocina reciclado (Liu *et al.*, 2022; Totani *et al.*, 2012). Estos aceites pueden ser de maíz, girasol, palma, coco, maní, soja, algodón, canola y cártamo, los cuales se utilizan para freír alimentos. Comúnmente sufren transformaciones a través de procesos de hidrólisis, polimerización y degradación térmica (Adhikesavan *et al.*, 2022).

Se evaluaron propiedades fisicoquímicas que permitieron caracterizar la muestra en estudio, los resultados obtenidos fueron de aceite limpio y aceite reciclado, lo que permitió la comparación con valores de referencias ya estudiados (Tabla 2). Los cambios más notables en el aceite al freír alimentos son la viscosidad, la densidad y la humedad (Adhikesavan *et al.*, 2022; Choe y Min 2007).

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de aceite reciclado

Propiedad	Unidades	Valor de aceite limpio	Valor de referencia	Norma	Valor de aceite reciclado	Valores de referencia de aceite reciclado	Referencia Bibliográfica
Índice de refracción a 20°C	nD	1.472±0.000 2	1,3000- 1,7000±0.0 002	(NMX-F- 074-SCFI- 2011)	1.475±0.000 2	1,4605	Ordoñez <i>et al.</i> , 2013
Índice de acidez	mg KOH/g aceite	0.371±0.011 4	0.398- 1.99±0.25	(NMX-F- 101-SCFI- 2012)	1.081±0.016 2	1,87	Ordoñez <i>et al.</i> , 2013; Singh <i>et al.</i> , 2021
Densidad relativa a 20°C	----	0.918±0.000 2	0.918 – 0.923±0.00 1	(NMX-F- 075-SCFI- 2012)	0.927±0.000 5	0.9210	Tomazzoni <i>et al.</i> , 2013; Singh <i>et al.</i> , 2021
Índice de Yodo	cg de yodo/ g aceite	42.560±0.13 36	15-70±0.25	(NMX-F- 152-SCFI- 2011)	37.094±0.24 40	99,585	Ordoñez <i>et al.</i> , 2013; Singh <i>et al.</i> , 2021
Índice de peróxido	mEq O ₂ / 1000 g	7.6±0.6773	<70	(NMX-F- 154-SCFI- 2010)	15.2±0.7888	13.77	Canesin <i>et al.</i> , 2014; Singh <i>et al.</i> , 2021
Índice de saponificación	mg de KOH/ g de aceite	191.862±0.5 883	188.0 192.0±0.5 (ác. oleico)	(NMX-F- 174-SCFI- 2014)	195.602±0.4 223	185.6	Ordoñez <i>et al.</i> , 2013; Singh <i>et al.</i> , 2021
Humedad y materia volátil	%	1.6±0.0894	NR	(NMX-F- 211-SCFI- 2012)	0.555±0.180 9	0.0899	Ordoñez <i>et al.</i> , 2013; Singh <i>et al.</i> , 2021
Impurezas insolubles	%	0±0	Max. 0.05±0.25	(NMX-F- 215-SCFI- 2006)	0.134±0.058 2	0.052	Ordoñez <i>et al.</i> , 2013; Singh <i>et al.</i> , 2021
Viscosidad a 20°C (Viscosímetro Cannon Fenske serie 150)	cSt = mm ² /s	56.389±0.93 02	50-60	ASTM D- 445	82.958±1.90 75	39.74 - 56.04	Alias <i>et al.</i> , 2018; Singh <i>et al.</i> , 2021

El Índice de acidez y el índice de refracción del aceite usado de cocina son similares a los valores que menciona Singh *et al.*, 2021; pero el aceite usado presentó mayor valor de acidez en comparación con aceites limpios, debido a que la presencia de calor y agua acelera la hidrólisis de triacilgliceroles y por tanto aumenta el contenido de ácidos grasos libres (Ordoñez *et al.*, 2013).

Los resultados de la densidad del aceite coinciden con los reportados por Tomazzoni *et al.*, (2013) quienes mencionan que los aceites vegetales tienen una densidad relativa entre 0.840 y 0.960; al ser menor que la del agua, todos los aceites flotan en ella y permanecen en la superficie y, por lo tanto, es importante mencionar que los valores están asociados a la temperatura (15°C), debido a que, a medida que ésta aumenta, el aceite se expande, y, por lo tanto, su densidad disminuye (NMXF- 075-SCFI-2012). Por otro lado, la viscosidad presente en estos aceites residuales se clasifica con un índice de viscosidad bajo, ya que se encuentra por debajo de los establecidos por la NOM-116-SCFI-2018 y ASTM D-445 (índice alto mayor a 80 mm/s), por lo que experimentarán una disminución en su viscosidad con respecto al aumento de la temperatura (Esfe *et al.*, 2018).

Los valores de Índice de Yodo disminuyeron con respecto de un aceite usado a uno limpio y difieren con los valores de referencia, debido a que es un parámetro que evalúa el número de insaturaciones presentes en los ácidos grasos y se utiliza para demostrar la pureza y calidad de un aceite/grasa. Cuanto mayor es la cantidad de yodo que reacciona con la grasa, mayor es la presencia de dobles enlaces en la muestra. Medir el índice de yodo de una grasa es imprescindible para caracterizar el tipo de producto: cuanto más alto es el índice de yodo, más líquida es la consistencia de la grasa y menos estable es el producto a la oxidación, ya que los aceites con índices de yodo elevados contienen más ácidos grasos insaturados, que son más propensos a reacciones rápidas de degradación como la autooxidación o la polimerización (Banfi, 2024).

El índice de peróxido demostró un aumento en los valores de aceite reciclado a diferencia de uno limpio, debido a que indica el grado de oxidación primaria y, por tanto, su probabilidad de enranciarse. Un valor bajo de peróxidos indica una buena calidad de los aceites y grasas y un buen estado de conservación (FOODLAB, 2023). Pero el aceite usado presentó valores próximos a los reportados por Ordoñez *et al.*, (2013), que posteriormente usaron su muestra para transformarla en biodiésel.

El valor de índice de Saponificación del aceite fresco fue similar a lo reportado en otros trabajos (Singh *et al.*, 2021) y existe poca variación, comparado con los valores obtenidos para aceite usado.

Finalmente, la determinación de la humedad y materia volátil es particularmente importante para la vida útil de los aceites. La vida útil es el periodo durante el cual el aceite puede mantener sus propiedades sensoriales, químicas, físicas y nutricionales si se almacena en condiciones adecuadas; por lo tanto, los valores obtenidos están por

debajo de los valores ideales (1-2%) según Ordoñez *et al.*, (2013), lo anterior debido a las inadecuadas formas de recolección y almacenamiento de los aceites residuales de cocina (Orjuela y Clark, 2020). Sin embargo, esta característica fisicoquímica evaluada genera un ambiente ideal para la propagación de microorganismos (Liu *et al.*, 2022), especialmente aquellos de alta resistencia al estrés causado por temperaturas, viscosidad y materia volátil; en este sentido, los hongos filamentosos lideran este grupo de microorganismos (Kumar y Negi, 2015; Syedd-León *et al.*, 2022), ya que crecen bajo las características fisicoquímicas identificadas en los aceites recolectados en este trabajo de investigación.

Aislamiento y selección de hongos

En cuanto al aislamiento de microorganismos, después de inoculadas las cajas se observó la presencia de hongos filamentosos, demostrándose el crecimiento a través de la diferencia en coloración. Se visualizó un hongo de color café (HC) de rápido crecimiento y un hongo de color blanco (HB) (Figura 8).

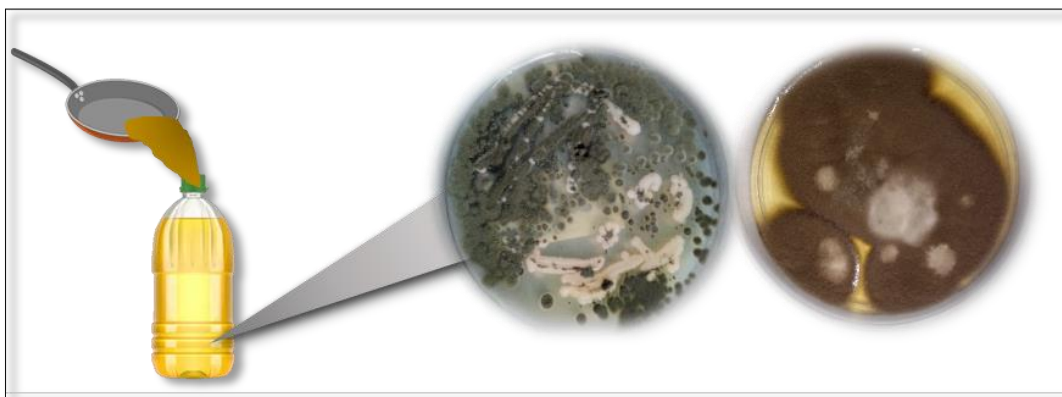


Figura 8. Microorganismos aislados de aceite usado de cocina

Estos resultados demuestran una gran adaptabilidad fisiológica y capacidad metabólica (Peraza-Jiménez *et al.*, 2021) de los hongos filamentosos para crecer en nutrientes con estas características.

Diversos estudios han demostrado que los hongos podrían captar fuentes de carbono para su potencial crecimiento. Estos estudios promueven la importancia de la biovalorización de los materiales oleosos como sustrato para el crecimiento de los hongos, especialmente porque las demandas y el uso de ácidos grasos están aumentando (Papanikolaou *et al.*, 2011; Hamdi *et al.*, 2022). Además, son heterótrofos y requieren materiales orgánicos que utilizan como fuente de energía y como esqueletos de carbono para la síntesis celular. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, encontrándose en hábitats muy diversos; de ahí su frecuente aparición como alteradores en alimentos, además de ser reconocidos por su resistencia a las condiciones

de vida y altas tasas de duplicación, a diferencia de las bacterias (Powers-Fletcher *et al.*, 2016; Téllez Vargas *et al.*, 2017; Fütting *et al.*, 2021). Por tanto, el aislamiento de microorganismos nativos a partir de materia orgánica les otorga ciertas características para expresar su potencial de producción de enzimas y poder ser utilizados como alternativa en áreas problemáticas de origen residual (Chaudhary *et al.*, 2022, Ghosh *et al.*, 2023; Richards y Talbot, 2018, Talukdar *et al.*, 2022).

Identificación morfológica fúngica

El hongo blanco (cepa HB) presentó una morfología algodonosa blanca hialina con bordes irregulares (Figura 9A), mientras que el hongo marrón (cepa HC) apareció en colonias de color verde oscuro con una superficie arenosa con un borde beige bien definido en el crecimiento temprano hasta quedar en un color marrón, de paredes algo rugosas, delgadas y subhialinas, que con la edad suelen volverse paredes gruesas con la edad ligeramente pigmentadas a marrón oscuro (Fig. 9B). Las características microscópicas de la cepa HB muestran que presentan micelio continuo y esporas endógenas (esporangiosporas). Estas características corresponden a hongos zigomicetos que poseen un talo de hifas cenocíticas en el que los núcleos son haploides cuando el organismo se encuentra en etapa vegetativa (Meyer *et al.*, 2020) y, para la cepa HC, se visualizaron micelios septados y esporas endógenas (ascosporas), la mayoría de los hongos conocidos pertenecientes a este Phylum Ascomycota, que se caracteriza por la formación de un asco (plural, ascos), una estructura tipo saco que contiene esporas haploides (Naranjo-Ortiz y Gabaldón, 2019).

(Bensch *et al.*, 2012) mencionan que las colonias de *Cladosporium* son de color café grisáceo a café oscuro, efusas, confluentes, densamente aterciopeladas a vellosas. Presentan un micelio inmerso; hifas ramificadas, de 2–7 μm de ancho, septadas, con constricciones en los septos, células hifales a veces irregularmente hinchadas, a veces irregularmente lobuladas, subhialinas a marrón oliváceo pálido, hifas que dan lugar a conidióforos a menudo más oscuros, de color marrón medio a oscuro y paredes algo engrosadas.

El hongo color blanco presentó una morfología algodonosa de color blanco hialino con bordes irregulares (Figura 9A), mientras que el hongo color café se presentó en colonias de color verde oscuro de superficie arenosa con un borde bien definido de color beige en crecimiento temprano hasta quedar en un color café oscuro (Figura 9B). Las características microscópicas de la cepa HB se presentan en la Figura 9A₁, demostrando que presentan micelio continuo y esporas endógenas (esporangiosporas) y para la cepa HC (Figura 9B₁) se visualizó micelios tabicados y esporas endógenas (ascosporas).

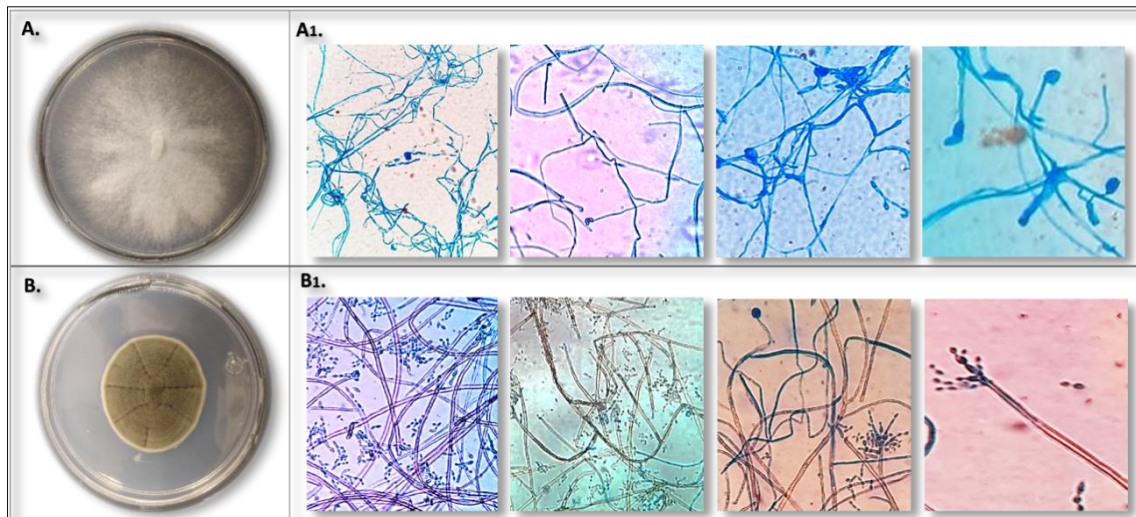


Figura 9. Morfología macroscópica y microscópica de HB (9A.) y del HC (9B.) en medio PDA a los 7 días de crecimiento. A y B. Morfología colonial. A1 y B1. Visualización microscópica (40x)

El análisis morfológico del hongo blanco demuestra similitud con *Fomitopsis*. El género se caracteriza por basidiomas sésiles a efusivos, hábito de crecimiento perenne, superficie de poro de color blanco a tostado o rosa con poros pequeños y regulares, hifas generativas adheridas en un sistema di- o trimitiquifal y paredes hialinas delgadas y basidiosporas lisas (Patel *et al.*, 2021).

Identificación molecular fúngica

Para la caracterización molecular de los hongos se identificaron fragmentos del espaciador transcrito interno (ITS) de las secuencias genómicas de dichas cepas, obteniéndose el ADN genómico de cada una y posteriormente se amplificó el producto por PCR con los primer's ITS1 e ITS4. Se obtuvieron fragmentos de 500-650 pb de tamaño en ambas cepas (Figura 10). Este resultado confirma la ventaja de utilizar la región del espaciador transcrito interno (ITS) como marcador estándar, porque se encuentra entre los genes fúngicos 18S rRNA, 5.8S rRNA y 28S y también se utiliza para analizar la diversidad genética e identificación taxonómica de especies fúngicas, en base a esta región genómica (Badotti *et al.*, 2017; Kim, 2011).

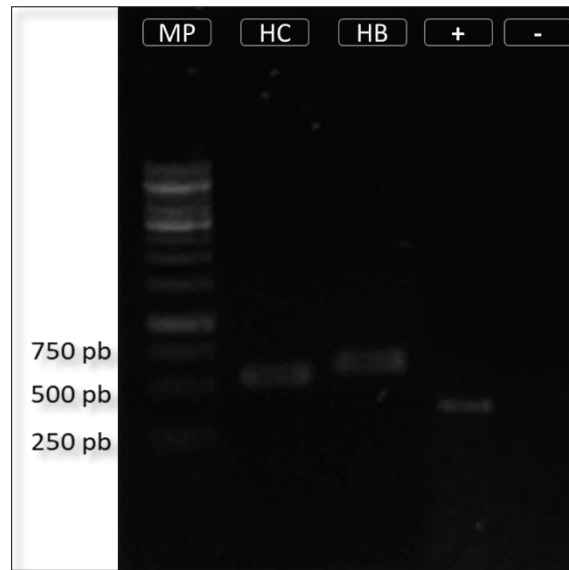


Figura 10. Corrimiento electroforético de los productos de PCR correspondientes a la ITS de los hongos. Carril MP (marcador de peso molecular de 1 kb), carril HC (hongo café), carril HB (hongo blanco), carril (+) control positivo *Trichoderma atroviride* IMI206040, carril (-) control negativo sin DNA.

Reconocimiento por homología y relación filogenética

El resultado de identidad por homología de las secuencias en la base de datos BLASTn, se determinó por dos parámetros: el E-value cuyo valor debe estar próximo a un puntaje de 0,0 y el porcentaje de identidad, que fue de 100% y 99.55%, que corresponden a *Cladosporium tenuissimum* y *Fomitopsis meliae*, respectivamente (Tabla 3).

La homología con la secuencia con número de acceso [OQ780870](#) indicó que el género del hongo blanco corresponde a *Fomitopsis meliae*, sugiriendo que pertenece al reino fungi en la división de Basidiomycota (basidiomycetes). Mientras que la secuencia con número de acceso [OQ780869](#) del hongo café pertenece a *Cladosporium tenuissimum*, sugiriendo que el género corresponde a *Cladosporium* y al reino fungi, en la división de Ascomycota (ascomycetes). La literatura describe importantes contribuciones de hongos filamentosos con potencial biotecnológico, relacionados con el filo Ascomycota que fueron aislados de suelos contaminados con grasa o residuos aceitosos (*Geotrichum sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium chrysogenum*, *Yarrowia lipolytica*, *Alternaria tenuissima*, *Fusarium oxysporum*) y Mucoromycota (*Rhizomucor miehei*, *Mucor sp.*), mientras que, en la división Basidiomycota, hay poca evidencia de estos microorganismos (Adamczak y Bednarski, 2004; Carvalho *et al.*, 2005, Cesário *et al.*, 2021, Kumar y Negi, 2015; Hita *et al.*, 2009). Estos microorganismos confirman su identidad a través de la información morfológica y molecular evaluada, demostrando diferencias en su filo.

Tabla 3. Parámetros de identificación de hongos filamentosos basada en la secuencia de la ITS

Muestra	Longitud de secuencia (ITS)	Closest Blast match	Identidad (%)	E-value	Query cover
Hongo que produce colonias de color café	546 bp	<i>Cladosporium tenuissimum</i> (MF473304.1)	100%	0.0	100%
Hongo que produce colonias de color blanco	662 bp	<i>Fomitopsis meliae</i> (MW221272.1)	99.55%	0.0	100%

El análisis filogenético de cada cepa se realizó mediante el método de Máxima Verosimilitud con 1000 bootstraps; se obtuvo a través del análisis de cinco secuencias con mayor homología para cada amplicón, utilizando el software IQ-Tree (Trifinopoulos *et al.*, 2016).

En la Figura 11 se pueden visualizar dos árboles filogenéticos: (A) corresponden a *Fomitopsis meliae* (HBITS4) y (B) a *Cladosporium tenuissimum* (HCITS4). La cepa HBITS4 fue analizada con los cinco homólogos más cercanos al amplicón y también fue comparada con otros taxones de *Fomitopsis* que fueron revisados en un análisis filogenético inferido a partir de los datos de secuencia de las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) que representan 11 taxones pertenecientes al Phylo Basidiomycota (Liu *et al.*, 2021), dando como resultado que la secuencia se asocia con el taxón de la especie *meliae* (Figura 11A). Si bien la cepa HCITS4 fue comparada también con cinco secuencias homólogas identificadas por la herramienta NCBI Blastn (Altschul *et al.*, 1990) y otras secuencias pertenecientes a *Cladosporium*, estas secuencias fueron seleccionadas a partir de un análisis de género de hifomicetos de *Cladosporium*, y se evaluaron las diferencias entre los clados, con base en su filogenia, características sistemáticas y ecológicas (Bensch *et al.*, 2012), demostrando que están relacionadas con el género *Cladosporium* y pertenecen al clado *tenuissimum* (Figura 11B).

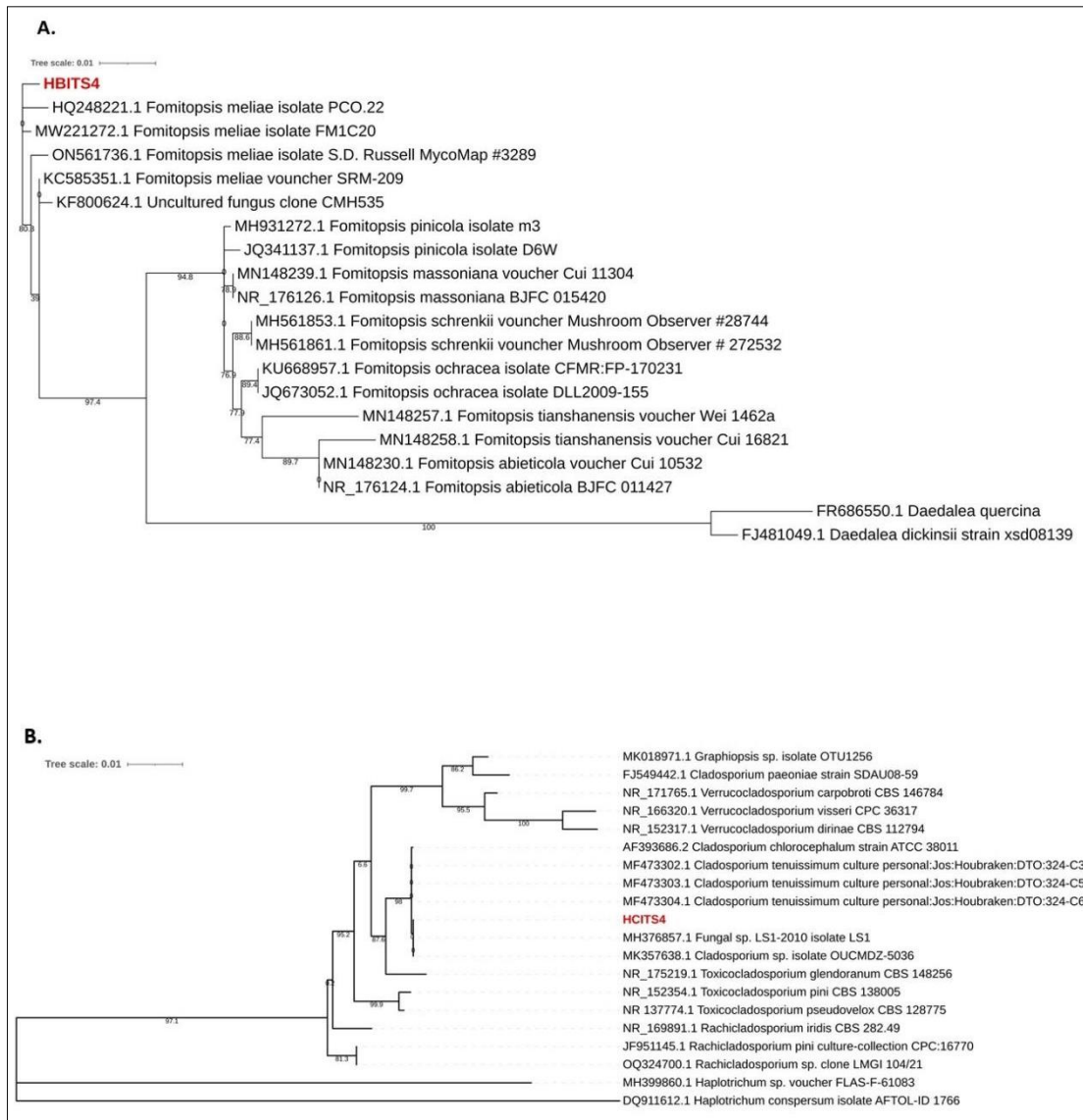


Figura 11. A. Árbol filogenético de *Fomitopsis meliae* y B. Árbol filogenético de *Cladosporium tenuissimum*, ambos realizados en MEGA 11

Determinación actividad enzimática cualitativa con rodamina B

Para la determinación de la actividad enzimática cualitativa con rodamina B, se observó que no existían variaciones considerables entre las cepas aisladas, correspondiendo las placas con mayor fluorescencia emitida al medio en el que se encontraba *Fomitopsis meliae*, ya que es evidente el halo de iluminación que se presenta. Bajo luz UV, indicando una mayor dimensión de capacidad lipolítica, esta cepa mostró respuestas similares en ambos ensayos con diferentes sustratos, sugiriendo la factibilidad de utilizar aceite de oliva o reciclado indistintamente, mientras que, para *Cladosporium tenuissimum*, hubo una menor presencia de halos de fluorescencias en ambos sustratos (Figura 12).

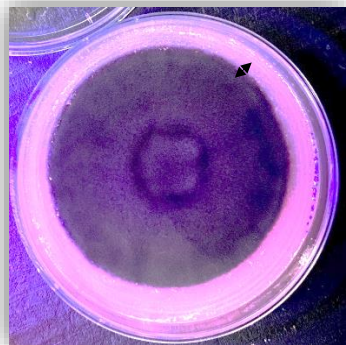
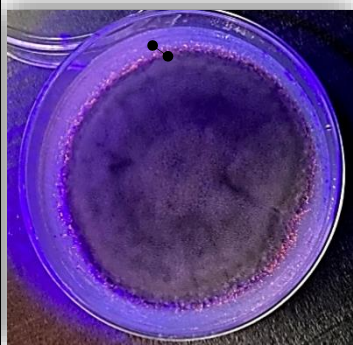


Cepa <i>Cladosporium tenuissimum</i>	Rodamina B con Aceite reciclado	Rodamina B con aceite de oliva	Actividad lipasa extracelular
Día 6			+
Cepa <i>Fomitopsis meliae</i>	Rodamina B con Aceite reciclado	Rodamina B con aceite de oliva	Actividad lipasa extracelular
Día 6			+

Figura 12. Ensayo cualitativo con rodamina B para determinar la actividad lipolítica de hongos filamentosos

La combinación con rodamina B es un método colorimétrico, en el que este compuesto se une a ácidos grasos mono y diglicéridos y desarrolla fluorescencia bajo luz ultravioleta (UV). Este ensayo se basa en la interacción de la forma catiónica de la rodamina B con la forma aniónica de los ácidos grasos, dando lugar a la formación de complejos cuya estabilidad e intensidad de fluorescencia es proporcionalmente inversa a la longitud de la cadena del ácido graso (Mendes *et al.*, 2019).

Los resultados obtenidos están relacionados con las condiciones de vida de cada hongo filamentoso evaluado, debido a que *Cladosporium tenuissimum* es muy exigente en sus condiciones de vida para favorecer su propagación, requiere de un sustrato con al menos 1% de cloruro de sodio (NaCl) en condiciones aeróbicas, a diferencia de *Fomitopsis meliae* que corresponde a un basidiomiceto de podredumbre parda donde su condición ideal de vida corresponde a condiciones de alta humedad y procesos preferentemente anaeróbicos, por ser un microorganismo facultativo con alta maleabilidad metabólica (Nam *et al.*, 2015; Polanco-Florián *et al.*, 2020).

El reconocimiento de hongos filamentosos con actividad enzimática hidrolítica sugiere que son fuentes preferidas para la industria, debido a una versatilidad metabólica

superior (Su *et al.* 2012). Las enzimas fúngicas se utilizan en procesos de producción de biocombustibles, biorremediación de contaminantes orgánicos, para producción de detergentes, producción de antibióticos, blanqueo de tejidos textiles, clarificación de jugos, eliminación de aromas de cuero y producción de papel (El-Sawah *et al.*, 2021; Fütting *et al.*, 2021; Hyde *et al.*, 2019; Kirk *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2020; Molina-Gutiérrez *et al.*, 2021; Niyonzima, 2020; Singh *et al.*, 2021; Sudeep *et al.*, 2020; Syedd-León *et al.*, 2022).

Evaluación cuantitativa de extractos proteicos

Cladosporium tenuissimum y *Fomitopsis meliae* se cultivaron en medios diferentes, de manera que *Fomitopsis meliae* presentó 1.186 mg/ml de concentración proteica en M3 mientras que en M1 se cuantificó 0.476 mg/ml hasta el día 7; sin embargo, *Cladosporium tenuissimum* tuvo comportamientos similares en la producción de extractos en ambos medios, pero siendo notable el aumento de extracto enzimático en M3, comparado con M1 (Tabla 4). Demostrando que *Cladosporium tenuissimum* produce aproximadamente 5 veces más extracto proteico que *Fomitopsis meliae*

Tabla 4. Concentración proteica dos diferentes medios de cultivo

Tiempo de cultivo (días)	<i>Fomitopsis meliae</i>		<i>Cladosporium tenuissimum</i>	
	M1 [mg/ml]	M3 [mg/ml]	M1 [mg/ml]	M3 [mg/ml]
1	0 ± 0	0.288 ± 0.003	0 ± 0	0 ± 0
2	0 ± 0	0.380 ± 0.002	0 ± 0	0 ± 0
3	0 ± 0	0.459 ± 0.004	1.492 ± 0.005	1.510 ± 0.005
4	0 ± 0	0.555 ± 0.002	1.190 ± 0.017	2.294 ± 0.004
5	0 ± 0	0.739 ± 0.002	5.627 ± 0.020	4.318 ± 0.004
6	0.476 ± 0.003	1.186 ± 0.003	4.300 ± 0.013	5.636 ± 0.005

En este sentido, Mendes *et al.* (2019) evaluaron 6 diferentes tipos de medio para la producción de lipasas fúngicas (i.e., *Trichoderma harzianum*, *Fusarium solani*, *Trichoderma harzianum* F5 y *Penicillium* sp. F36), demostrando que los medios más eficientes fueron los evaluados en este trabajo, mencionando que estos medios son óptimos para hongos filamentosos, aunque pueden presentar diferentes comportamientos frente a la composición del medio, lo que indica que las condiciones mejoradas para la producción de lipasas deben optimizarse para cada cepa de hongos con el fin de determinar los requisitos ideales de nutrientes de los cultivos.

Es por ello que en este trabajo se caracterizaron y modificaron ambos medios para cultivar los hongos filamentosos y así evaluar los parámetros enzimáticos (fuentes de sustratos, carbono, nitrógeno, iones-minerales y temperatura), comparando entre todos ellos el efecto de rendimiento en la producción lipolítica y las condiciones óptimas para cada microorganismo.

Determinación de diferentes sustratos para la producción de enzimas lipolíticas

Para el cultivo de *Fomitopsis meliae* la primera modificación de M1 y M3 fue evaluar 3 tipos de sustratos: Aceite de oliva, aceite de cocina usado donde fueron aislados los hongos y aceite de girasol. M1 no presentó actividad enzimática en los primeros días con ninguno de los sustratos, excepto hasta el día 7 de incubación de la fermentación, demostrando actividades de 35.56 U/L con sustrato de aceite oliva, 48 U/L con aceite de cocina usado y 5.78 U/L de aceite de girasol. Mientras que M3, las evaluaciones con aceite de oliva y de girasol obtuvieron actividad desde el primer día de incubación hasta el último día evaluado, presentando 24.52 U/L y 27.04 U/L. Pero las pruebas con aceite de cocina reciclado demostraron actividades a partir del día 2 al 6 con un valor máximo de 9.70 U/L (Figura 13A).

Los resultados obtenidos con diferentes sustratos para *Cladosporium tenuissimum* se muestran en la Figura 13B, demostrando 2 veces más actividad con respecto a *Fomitopsis meliae*. Sin embargo, se puede observar que M1 con aceite de girasol no presentó actividad, mientras que la evaluación con aceite de oliva demostró actividad a partir del tercer día de incubación con una cuantificación máxima de 94.67 U/L y para el aceite reciclado se observó actividad a partir del día 5, con una actividad de 93.33 U/L en el último día de incubación. El efecto de M3 es que se puede visualizar actividad lipolítica con los tres diferentes sustratos, exponiendo que el sustrato de aceite de girasol alcanzó una máxima de 26.81 U/L, mientras que el aceite de oliva obtuvo 97.03 U/L y el aceite de cocina usado 89.48 U/L.

Un buen inductor de la producción de lipasa son los aceites y pueden ser responsables de una mayor producción enzimática (Mendes *et al.*, 2019). La posibilidad de producir enzima lipasa a partir de desechos como aceites usados, reduce el costo de producción, además de reducir y eliminar los desechos de manera que no dañe el medio ambiente (Alabdallal *et al.*, 2021; Houde *et al.*, 2004).

Mendes *et al.*, 2019 reportan que *F. solani* F61 obtuvo una actividad hidrolítica de 2370 U/L en el medio 3, por otra parte, para *Trichoderma* sp. F5, *Penicillium* sp. F36, *T. harzianum* F37 y *T. harzianum* F307, la mayor producción de lipasa se observó utilizando M1 (420-730 U/L). Por lo tanto, las lipasas (EC 3.1.1.3) catalizan la hidrólisis de los triglicéridos en los aceites naturales, generando moléculas de ácidos grasos libres a partir del sustrato lipídico (Kotogán *et al.*, 2022).

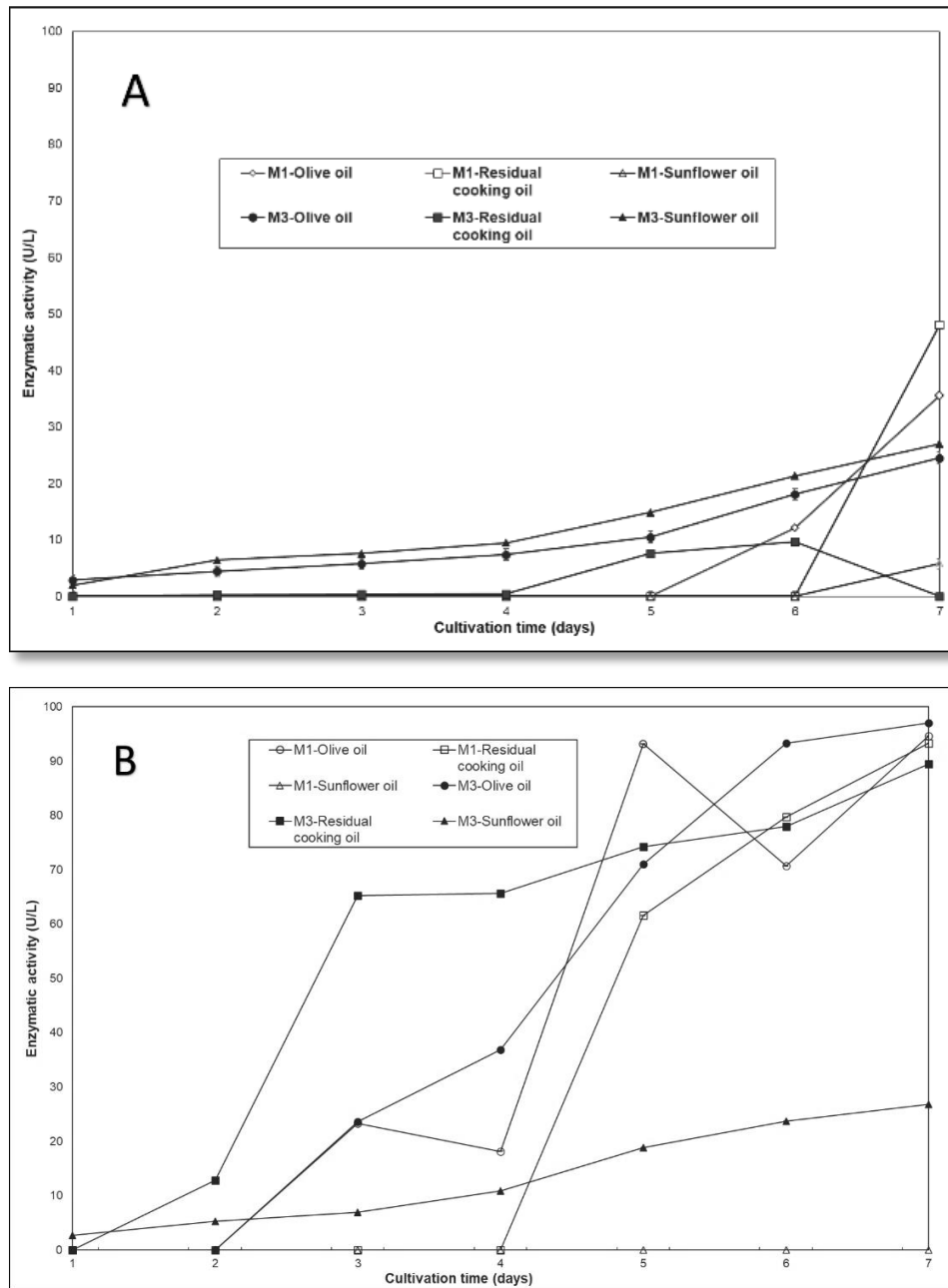


Figura 13. Actividad enzimática lipolítica con diferentes sustratos. A. *Fomitopsis meliae* B. *Cladosporium tenuissimum*

La lipasa de *C. viswanathii* presentó una alta actividad hidrolítica sobre trioleína y aceite de oliva, sugiriendo que esta enzima hidroliza preferentemente los enlaces éster de ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga (C18:1 Δ^9 – oleico). La cantidad de ácido oleico de los aceites vegetales mejoró claramente la producción de lipasa de *C. viswanathii*. Este hallazgo también se informó para la producción de lipasa por parte de muchos microorganismos, para los cuales el aceite de oliva sirve no solo como inductor de la producción de lipasas sino también como fuente de carbono para el crecimiento de microorganismos (De Almeida *et al.*, 2013).

Por lo tanto, las diferentes fuentes de lípidos, como aceite de mostaza, aceite de neem, aceite de coco, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de palma y aceite de pepino, son considerados fuentes de carbono lipídicas, pero también existen otras fuentes de carbono no lipídicas como sacarosa, lactosa, maltosa, glucosa, galactosa, xilosa (Kumar et al., 2023). Es por ello, que se decidió evaluar este otro tipo de fuentes en los medios para cada hongo filamentoso.

Fuentes de carbono para producción lipolítica

En la evaluación de fuentes de carbono se agregaron de manera individual, 4 diferentes moléculas en el M3 seleccionado anteriormente: almidón, sacarosa, manitol y glucosa; utilizando fuente de sustrato de aceite de girasol para *Fomitopsis meliae* y aceite de oliva para *Cladosporium tenuissimum* (Figura 14).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: en la Figura 14A se puede visualizar que no hubo presencia de actividad enzimática de *Fomitopsis meliae* con la adición de almidón y sacarosa, pero con manitol se obtuvo actividad de 1.63 U/L- 42.07 U/L y para glucosa fue de 12.15 U/L - 48 U/L, ambas muestras fueron evaluadas durante un periodo de 7 días. Para *Cladosporium tenuissimum* se logra visualizar que todas las fuentes de carbono evaluadas demostraron actividad durante el periodo de 7 días, sin embargo, la molécula que alcanzó mayor actividad enzimática fue glucosa con 91.56 U/L, mientras que almidón obtuvo 36 U/L, sacarosa a través de los días disminuyó el efecto de su actividad de 11.85 U/L-6.07 U/L y manitol logró obtener 5.19 U/L (Figura 14B).

El efecto de la glucosa en ambos microorganismos, demostró que es una fuente de carbono que permite producir actividad lipolítica en mayores cantidades con respecto a las otras moléculas. Obteniendo el doble de rendimiento con la adición de glucosa en el medio de *Fomitopsis meliae*, aunque para *Cladosporium tenuissimum* se mantuvo en valores similares al ser evaluado con sustrato de aceite de oliva.

Bindiya y Ramana, (2013) utilizaron fructosa y manitol en los medios de *Aspergillus sydowii* para comprobar el efecto de estas fuentes en la producción de lipasa. Los carbohidratos actúan como fuentes de carbono monovalentes para la producción de lipasa, por lo que, en presencia de almidón y sacarosa, *Aspergillus niger* logró un bajo rendimiento de lipasa, pero cuando se utilizó fructosa como fuente de carbono, mostró una alta producción de lipasa de 777,440 U/L (Alabdall et al., 2020).

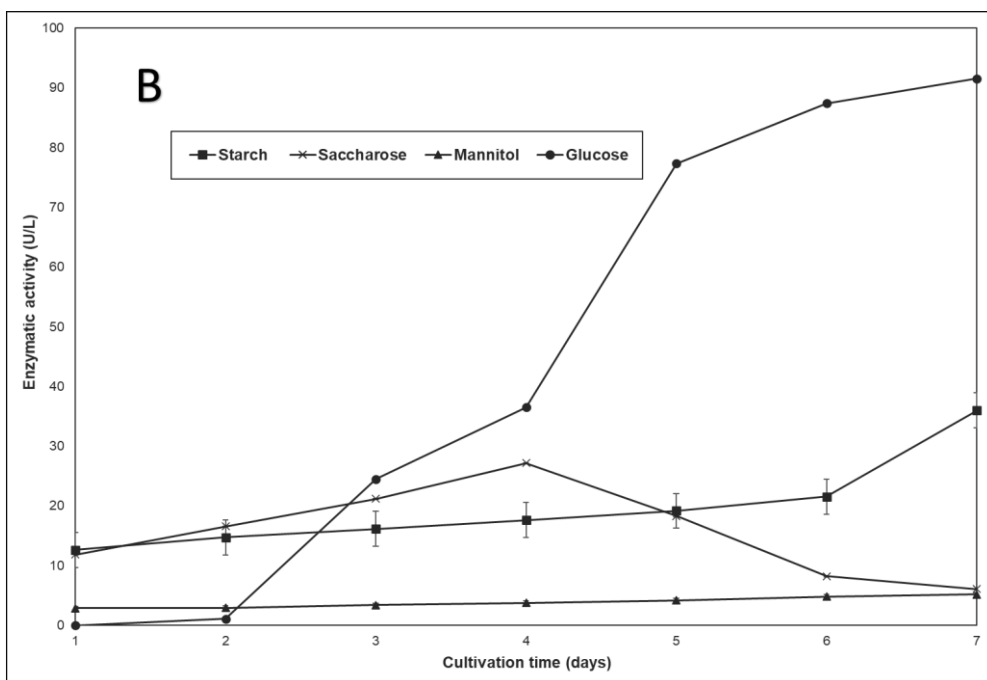
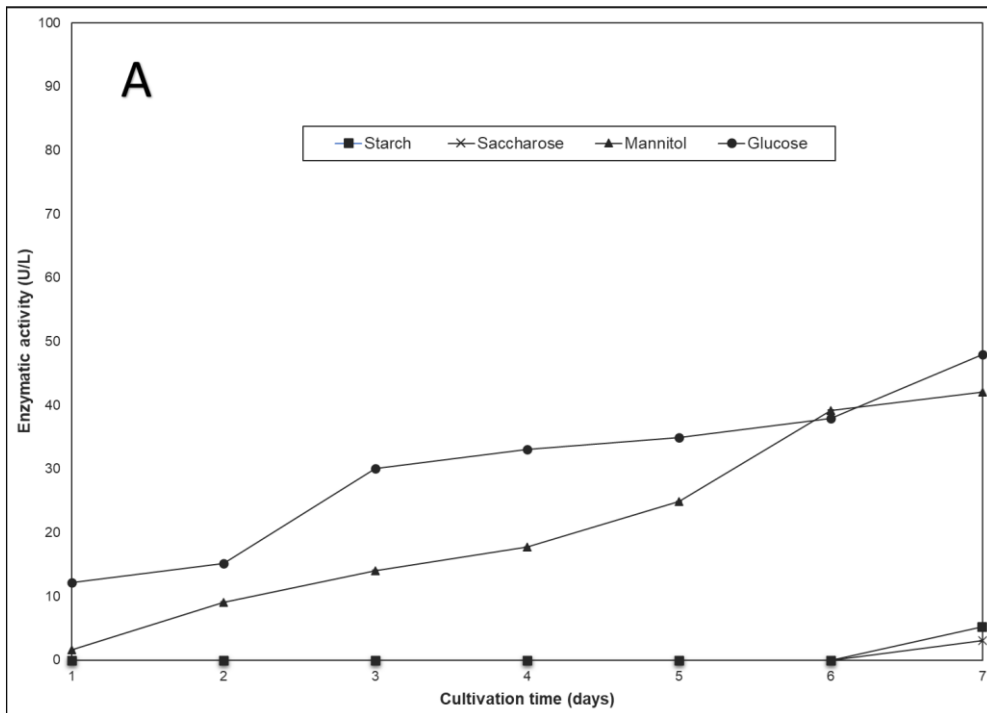


Figura 14. Actividad enzimática lipolítica con diferentes fuentes de carbono. A. *Fomitopsis meliae* B. *Cladosporium tenuissimum*

Fuentes de nitrógeno para producción lipolítica

Se analizaron 4 fuentes de nitrógeno: triptona, extracto de levadura, cloruro de amonio (NH_4Cl) y peptona en medios de fermentación modificados con los resultados anteriores correspondientes a cada microorganismo. Se observó que la triptona y el cloruro de amonio inhiben la actividad enzimática de los hongos.

Fomitopsis meliae presentó un rendimiento de 43.56 U/L con peptona y 21.704 U/L con extracto de levadura (Figura 15A), demostrando valores similares al ensayo de fuentes de carbono. Mientras que *Cladosporium tenuissimum* presenta valores máximos de actividad lipolítica siendo estos de extracto de levadura 42.963 U/L y de peptona 88.15 U/L, respectivamente (Figura 15B). Se logra percibir que la peptona se puede considerar la fuente de nitrógeno para los medios de ambos microorganismos, ya que la productividad se mantiene en valores similares a los ensayos con fuente de carbono.

Las fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico, como peptona, triptona, nitrato de sodio, sales de amonio, urea y extracto de levadura, tienen un papel importante en la producción de lipasas en varios microorganismos, porque pueden suministrar muchos factores de crecimiento celular y aminoácidos, que son necesarios para el metabolismo celular y la síntesis de enzimas (Mendes *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2016; Priyanka *et al.*, 2019; Fátima *et al.*, 2021). Bharathi y Rajalakshmi, (2019) utilizaron peptona y otro extracto nitrogenado para la producción de lipasa de *Aspergillus* observaron que una mezcla de fuentes de nitrógeno influye en la actividad de la enzima lipasa.

Algunos ensayos han alcanzado una máxima actividad de lipasa cuando la glucosa y la peptona actuaron como fuentes de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo de *Trichoderma harzianum*, mientras que la actividad mínima de la lipasa se observó con glucosa y extracto de levadura como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente (Colonia *et al.*, 2019). Es por ello que es importante evaluar si la fuente de nitrógeno actúa en el rendimiento de la actividad, debido a que el costo de los nutrientes del medio es uno de los factores más importantes y la suplementación con una fuente de nitrógeno es demasiado costosa para la producción comercial de enzimas y biocombustibles, ya que podría representar el 50% del costo total del medio (Edwinoliver *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2019).

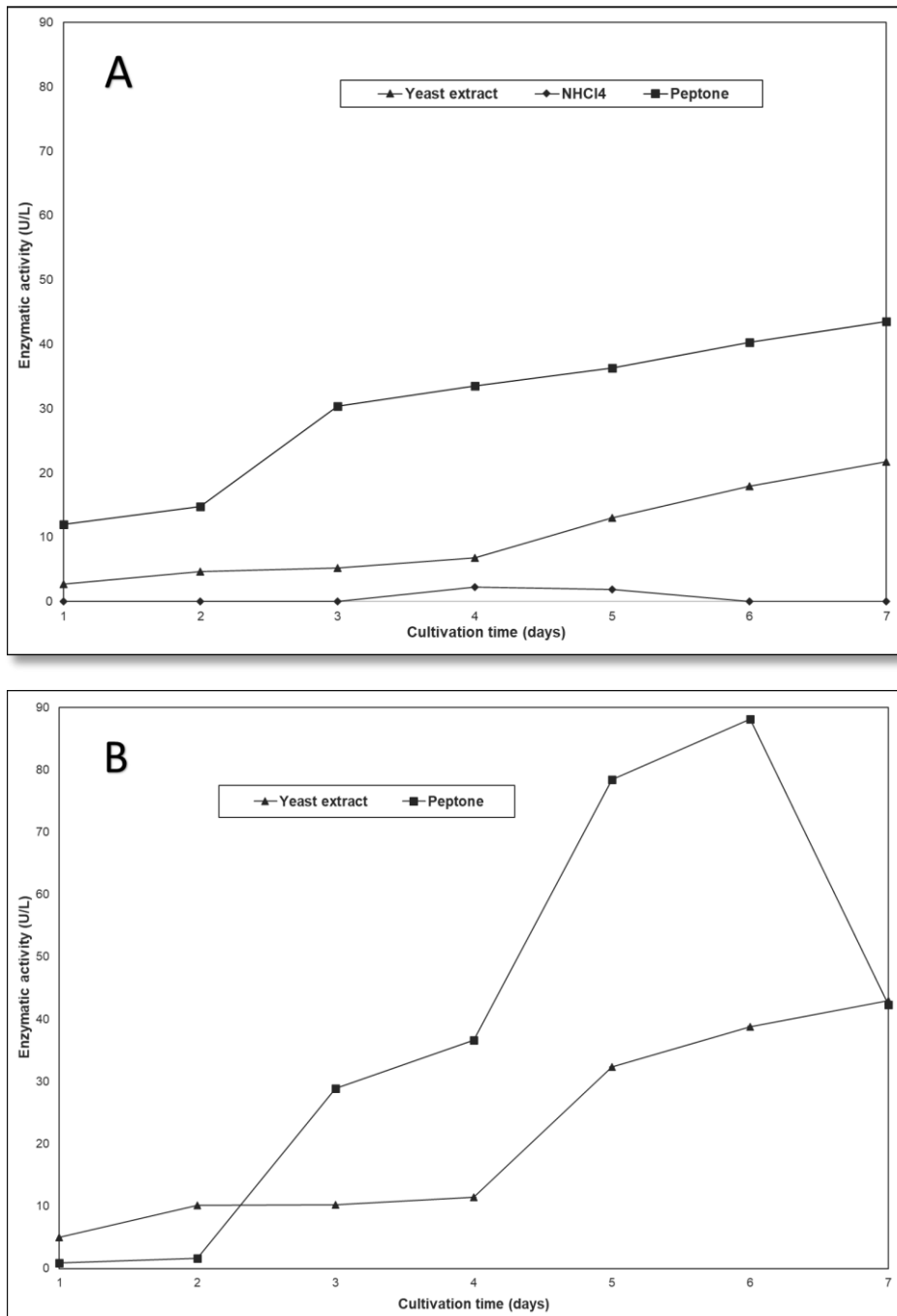


Figura 15. Actividad enzimática lipolítica con diferentes fuentes de nitrógeno. A. *Fomitopsis meliae* B. *Cladosporium tenuissimum*

Iones metálicos para producción lipolítica

En la caracterización de medios modificados con la adición de iones metálicos, se agregaron 3 diferentes compuestos: Cloruro de Zinc ($ZnCl_2$), Cloruro de manganeso ($MnCl_2$) y Sulfato de cobre ($CuSO_4$) a los medios específicos de fermentación modificados con los mejores rendimientos de actividad para los hongos filamentosos. El $MnCl_2$ inhibió la actividad lipolítica en ambas cepas (Figura 16). Demostrando que el $CuSO_4$ fue el compuesto que obtuvo mejores rendimientos de actividad enzimática, con 45.704 U/L de *Fomitopsis meliae* (Figura 16A) y para *Cladosporium tenuissimum* 87.926 U/L (Figura 16B).

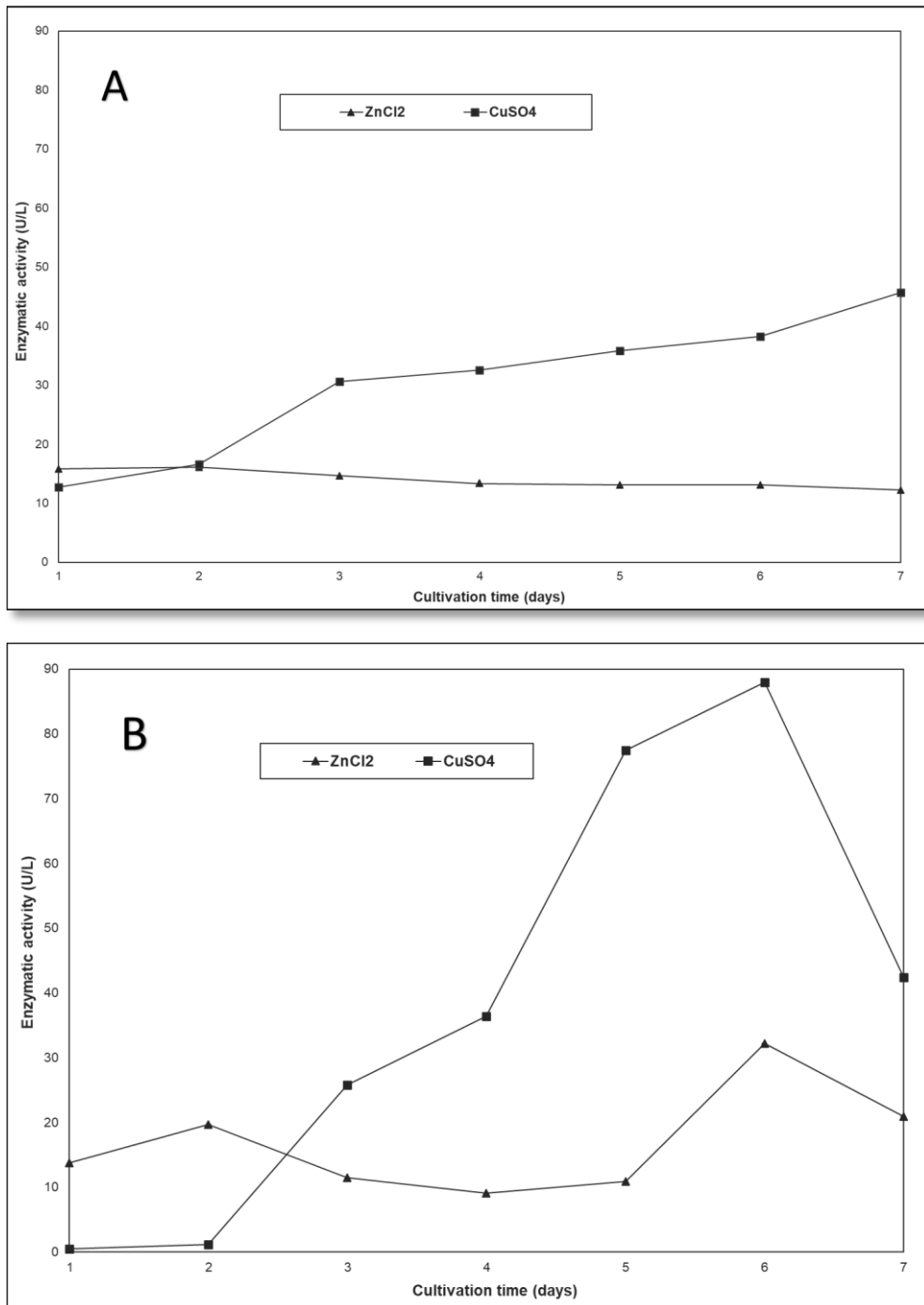


Figura 16. Actividad enzimática lipolítica con diferentes iones metálicos. A. *Fomitopsis meliae* B. *Cladosporium tenuissimum*

Mahfoudhi *et al.*, (2022) menciona que los iones metálicos son un ingrediente importante y desempeñan diferentes funciones al influir en los componentes estructurales y el funcionamiento de las enzimas. Los iones que se unen a la enzima podrían mejorar o inhibir la actividad enzimática (Alabdall *et al.*, 2021). Estos efectos pueden aparecer debido a enlaces iónicos en sitios específicos de las proteínas, alterando su nivel de hidratación (Yu *et al.*, 2005). Por lo tanto, los iones como Mg^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Na^+ , K^+ , Mn^{2+} y Zn^{2+} parecen influir positivamente en la producción

de lipasa (Sharma et al., 2001). Además, son agentes comunes en diversas vías metabólicas (Alabdallal et al., 2021).

Existen estudios de lipasas fúngicas que han mostrado diferentes comportamientos con algunos iones metálicos. La lipasa producida por *Aspergillus japonicas* se inhibe cuando se incuba con Mn^{2+} y Hg^{2+} , mientras que permanece estable cuando se incuba con Ca^{2+} (Jayaprakash y Ebenezer, 2012). Saranya y Ramachandra, (2020) informaron que no existe ningún efecto de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} y K^{+} sobre la actividad de la lipasa producida a partir de *Cladosporium tenuissimum*. Otro estudio de una lipasa aislada de *Aspergillus oryzae* notaron que los iones metálicos, como Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} y Ag^{+} , inhibían la actividad enzimática (Toida et al., 1995).

Temperatura para la producción lipolítica

Los resultados obtenidos en el ensayo de temperatura, se representa en la Figura 17. El máximo rendimiento fue de 113.85 U/L para *Fomitopsis meliae* con la temperatura de 35°C, con 40°C 102.15 U/L y 45°C de 102.81 U/L, mientras que, en temperaturas más bajas, como 20 °C los rendimientos fueron de 90.148 U/L y a 25°C, 98.815 U/L. Sin embargo, en la temperatura de 30°C y 50°C se presentan rendimientos muy bajos (Figura 17A). Alcanzando a duplicar la actividad enzimática con relación al medio modificado y evaluado para dicho microorganismo. Sin embargo, en la Figura 17B se visualiza que con la temperatura de 30°C se obtiene la máxima producción de 44.296 U/L de actividad lipolítica, seguida de la temperatura de 35°C con valores de 41.56 U/L y por otro lado rendimiento bajos y similares en temperatura de 45 °C y 50 °C. Además, de presentar inhibición de actividad con temperaturas de 20 °C, 25 °C y 40 °C. Respondiendo a una disminución de la actividad con respecto al medio original y propuesto en la metodología, alcanzando valores de 97.037 U/L. Sugiriendo que la temperatura provoca aceleración de las reacciones químicas y que las enzimas son proteínas que pueden dañarse con cambios de temperaturas no específicas para ellas. Todas las enzimas son específicas y tienen un rango de temperatura ideal donde funcionan mejor y se logra un mejor rendimiento de la enzima (Alabdallal et al., 2021). Las altas temperaturas alteran la estructura tridimensional de las enzimas, provocando su desnaturalización y pérdida de sus propiedades catalíticas (Robinson, 2015).

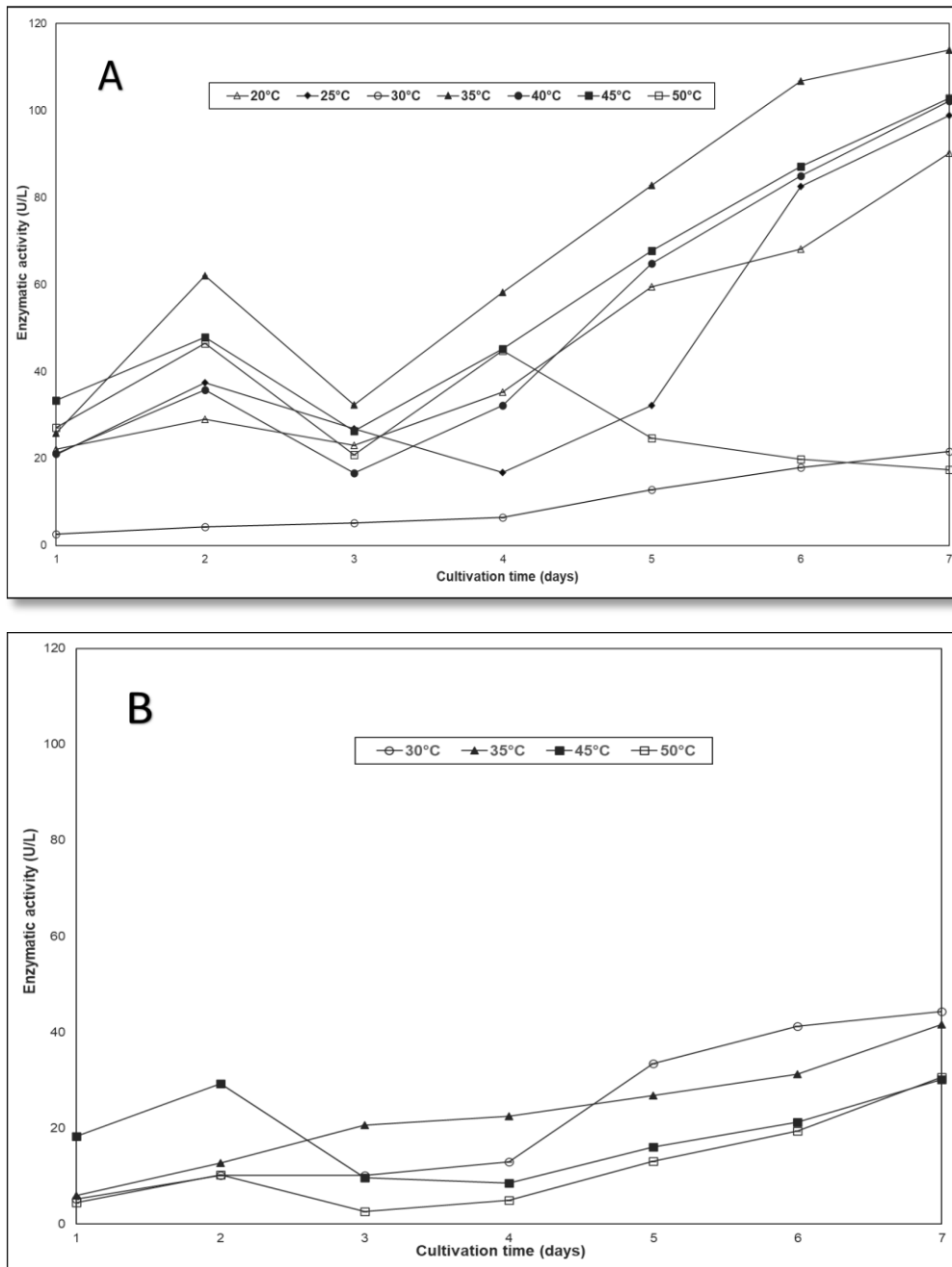


Figura 17. Actividad enzimática lipolítica con diferentes temperaturas. A. *Fomitopsis meliae* B. *Cladosporium tenuissimum*

Algunas investigaciones han estudiado el efecto de diferentes temperaturas de incubación que oscilan entre 25 y 55 °C sobre la producción de la enzima lipasa de *Aspergillus niger*. La mayor producción de lipasa se obtuvo a 30 °C, seguida de 35, 40, 25, 50 y 55 °C (Mukhtar et al. (2016)). En otro estudio, Mahmoud *et al.*, (2015) investigaron el efecto de varias temperaturas de incubación, con valores de 10, 20, 30 y 45 °C, sobre la producción de lipasa de *Aspergillus terreus*. La actividad máxima de la lipasa se logró a 45°C (15,000 U/L), que disminuyó con la disminución de las temperaturas, es decir, 30°C (12,000 U/L), 20°C (9,500 U/L), y 10°C (3,000 U/L).

Reacciones de transesterificación

Los aceites de cocina usados fueron sometidos a reacciones de transesterificación con la ayuda de catálisis biológica de extractos proteicos de *Fomitopsis meliae* y *Cladosporium tenuissimum* y se determinó el producto de las reacciones con el método de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

En la Figura 18 se observan los espectros FTIR de 4 muestras, el aceite de cocina usado y el biodiésel son controles para identificar los grupos funcionales y las bandas correspondientes a diversas vibraciones de estiramiento y flexión de dos muestras de las reacciones de transesterificación con catálisis enzimática de los hongos filamentosos, en el rango de 0 – 4000 cm^{-1} . No hubo picos significativos en las regiones 1700 – 2800 cm^{-1} y 3000 – 4000 cm^{-1} tanto para el aceite de cocina usado como para los espectros de biodiésel, sin embargo, existen algunas valores similares en los espectros de 2800 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} . Ya que son bandas que indican la presencia de los enlaces simétricos y asimétricos de C-H o correspondiente al modo de estiramiento CH de olefinas (Ortiz *et al.*, 2016; Rosset y Perez, 2019). Otros estudios sugieren que los picos de 2916 cm^{-1} pertenecen a las grasas y a 2922 cm^{-1} a biodiésel, que representan las vibraciones de estiramiento de los grupos metilo (Ortiz *et al.*, 2016).

Las diferencias que se observan en la Figura 18 son los espectros que se encuentran en el rango de 1500 a 500 cm^{-1} y las exhiben principalmente los ésteres (biodiésel), como resultado de las vibraciones de C – O (Wembabazi *et al.*, 2015). Sin embargo, en el rango de 1735-1750 cm^{-1} se logran visualizar algunas diferencias numéricas en los espectros de las reacciones de transesterificación. Bukhari *et al.*, (2022) menciona que en ese rango de frecuencia existe un estiramiento de C=O del grupo funcional de un éster alifático saturado y que los picos del carbono carbonilo (C=O) y alcano (CH) del éster se producen a 1742,13 cm^{-1} y 2923,51 cm^{-1} . Además, sugiere que los picos entre 1450-1470 cm^{-1} son curva CH de los alcanos y los haluros de alquilo entre 1150 – 1300 cm^{-1} . Demostrando que el pico de flexión CH de biodiésel representado en color verde fue de 1448.89 cm^{-1} (Figura 18). Estos resultados son consistentes con los valores comparados en la literatura de los espectros que permiten corroborar la presencia de ésteres metílicos en las reacciones de transesterificación de ambas catálisis enzimáticas.

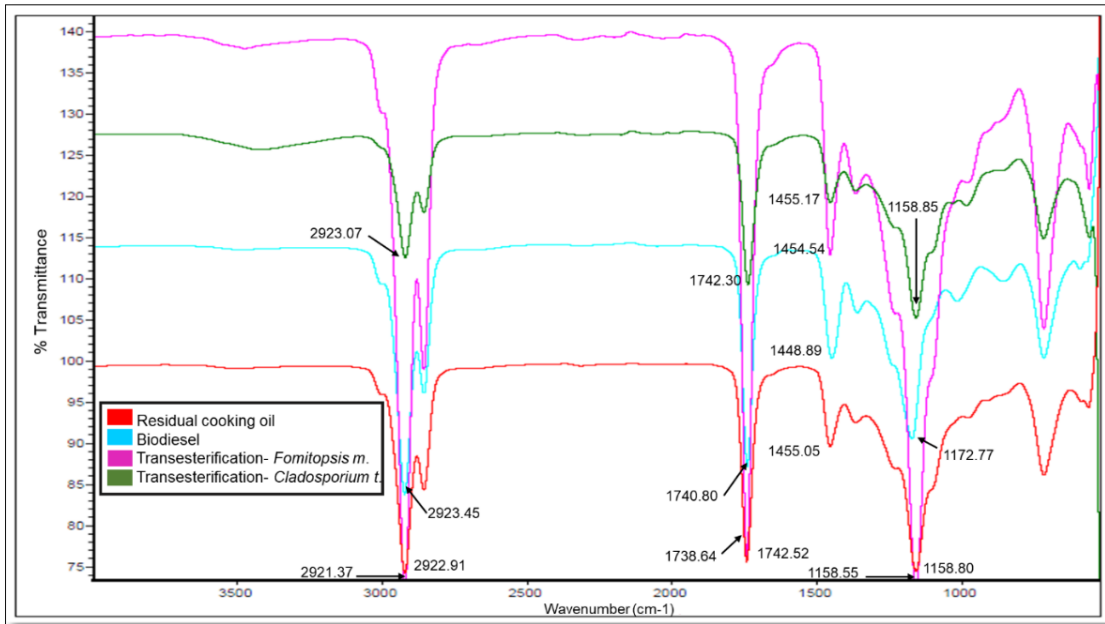


Figura 18. Espectro FTIR de diferentes muestras

Capítulo IV

CONCLUSIONES

El aislamiento e identificación taxonómica y molecular de *Cladosporium tenuissimum* y *Fomitopsis meliae* proporciona evidencia de dos especies nativas que crecen en aceite usado, demostrando la presencia de hongos filamentosos en diferentes ambientes orgánicos. Estos microorganismos son cepas adaptadas a condiciones de su lugar de origen, con dominios Ascomycota y Basidiomycota, capaces de desarrollarse en nichos inhóspitos y carentes de nutrientes que probablemente otras células no puedan asimilar dichos sustratos para su crecimiento.

La evaluación de actividad enzimática de *Fomitopsis meliae* y *Cladosporium tenuissimum* en este trabajo, evidencia el potencial de dichas cepas silvestres en la producción de lipasas utilizando aceites no convencionales.

La evaluación de la composición basal del medio de cultivo elegido de manera específica para los microorganismos, tiene la finalidad de incrementar el rendimiento de enzimas lipolíticas y con ello suplementar con inductores (aceite de oliva y girasol), fuentes de carbono (glucosa), nitrógeno (peptona), iones metálicos (CuSO_4) y temperatura (30°C y 35°C). La producción lipolítica de *Fomitopsis meliae* aumento 4.21 veces, mientras que *Cladosporium tenuissimum* no demostró aumento en el rendimiento con los cambios en los medios, debido a que las condiciones para dicho microorganismo no favorecieron a la síntesis de enzimas y disminuyeron un 50% con respecto al medio original propuesto en la literatura (M3), demostrando la caracterización de parámetros enzimáticos de cada organismo.

Los hongos son capaces de producir varias enzimas para su supervivencia dentro de una amplia gama de sustratos, lo que permite este estudio es optimizar parámetros nutricionales, para la mejora de rendimientos en producción de lipasas, que desempeñen un papel importen como biocatalizadores en diferentes aplicaciones biotecnológicas futuras de bajo costo. Se estableció un proceso de producción de biodiésel a través de catálisis enzimática, mediante la aplicación de hongos con capacidad lipolítica aislados de aceites reciclados. Estos extractos enzimáticos pueden ser considerados catalizadores biológicos para la síntesis de biocombustibles.

La identificación de estas cepas fúngicas contribuye a la divulgación de conocimiento y a la generación de futuros estudios de la diversidad metabólica de estos organismos. Además de la posibilidad de estudiar cepas que no han sido evaluadas debido a la carencia de información en la literatura pero que cuentan con potencial biotecnológico. Esto permitirá investigar y desarrollar a estos organismos para obtener posibles productos innovadores y con efectos benéficos, en este caso para la producción de biodiésel.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abbas, H., Hiol, A., Deyris, V. and Comeau, L.C. (2002). Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor sp.* Strain Isolated from Palm Fruit". *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 968-975. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00190-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00190-4).
- Abukhadra M.R., Sayed M.A. (2018). Kp trapped kaolinite (Kaol/Kp) as low cost and eco-friendly basic heterogeneous catalyst in the transesterification of comercial waste cooking oil into biodiesel. *Energy Convers. Manag.* 177, 468–476. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.09.083>.
- Adamczak M, Bednarski W (2004) Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles. *Process Biochemistry* 39 (11): 1347-1361. [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(03\)00266-8](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(03)00266-8)
- Adedoyin F.F., et al. (2020). Modelling coal rent, economic growth and CO2 emissions: does regulatory quality matter in BRICS economies? *Sci. Total Environ.* 710, 136284.
- Aderibigbe F., Mustapha S., Adewoye T., Mohammed I., Gbadegesin A., Niyi F., et al., 2020. Qualitative role of heterogeneous catalysts in biodiesel production from *Jatropha curcas* oil. *Biofuel Res J* <https://doi.org/10.18331/BRJ2020.7.2.4>.
- Adetunji AI, Olaniran AO. Optimization of culture conditions for enhanced lipase production by an indigenous *Bacillus aryabhatai* SE3-PB using response surface methodology. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2018;32(6):1514–1526.
- Adham N. Z. and Ahmed E. M. (2009) "Extracellular lipase of *Aspergillus niger* NRRL3; production, partial purification and properties". *Indian Journal of Microbiology*, vol. 49, no. 1, pp. 77–83.
- Adhikesavan C, Ganesh D, Charles Augustin V, et al. (2022) Effect of quality of waste cooking oil on the properties of biodiesel, engine performance and emissions. *Cleaner Chemical Engineering* 4 <https://doi.org/10.1016/j.clce.2022.100070>
- Akhtar, T., Tariq, M. I., Iqbal, S., Sultana, N., & Wei, C. K. (2017). Production and characterization of biodiesel from *Eriobotrya Japonica* seed oil: an optimization study. *International Journal of Green Energy*, 14(6), 569–574. <https://doi.org/10.1080/15435075.2017.1310107>
- Akhter K., Nazir N., Faheem A., Ghous T., Andleeb S., Kiani H.A., Rasheed A. (2021). Partial Purification and Characterization of Lipase from Locally Produced Edible Oil-Seeds and its Relevance in Industries. *Biotechnol Prog-WILEY*, Volume37.
- Alabdall, A. H., Alanazi, N. A., Aldakeel, S. A., AbdulAzeez, S., and Borgio, J. F. (2020). Molecular, physiological, and biochemical characterization of

- extracellular lipase production by *Aspergillus niger* using submerged fermentation. PeerJ. 8, e9425. doi: 10.7717/peerj.9425
- Alabdallal, A.H., Al-Anazi, N.A., Aldakheel, L.A. et al. Application and characterization of crude fungal lipases used to degrade fat and oil wastes. Sci Rep 11, 19670 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98927-4>
 - Alagumalai A., Mahian O., Hollmann F., Zhang W. (2021). Environmentally benign solid catalysts for sustainable biodiesel production: A critical review. The Science of The Total Environment. Vol.768, p.144856.
 - Albayati, S. H., Masomian, M., Ishak, S., Ali, M., and Rahman, R. (2020). Main structural targets for engineering lipase substrate specificity. Catalysts 10:747. doi: 10.3390/catal10070747
 - Alcalá G. M. D., Cujilema Q. M. C., León R. G., Baryolo G. L, Ramos S. L. B.. (2018). Producción enzimática de biodiesel con biomasa lignocelulósica. Tecnología Química, 38(1), 138-152. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S222461852018000100011&lng=es&tlng=es.
 - Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D, et al. (1990) Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215 (3): 403-410. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)
 - Amini H., et al. (2019). Short-term associations between daily mortality and ambient particulate matter, nitrogen dioxide, and the air quality index in a Middle Eastern megacity. Environ. Pollut. 254, 113121.
 - Amoah J, Ho SH, Hama S, Yoshida A, Nakanishi A, Hasunuma T, Ogino C, Kondo A. (2016). Converting oils high in phospholipids to biodiesel using immobilized *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalysts expressing Fusarium heterosporum lipase. Biochem Eng J. 105: 10-15.
 - Anobom CD, et al. From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. Biomed. Res. Int. 2014; 2014:684506. doi: 10.1155/2014/684506.
 - Anonymous (2023) Municipios. <http://www.municipios.mx/chiapas/suchiapas>
 - Arslan R, Ulusoy Y. (2018). Utilization of waste cooking oil as an alternative fuel for Turkey. Environ Sci Pollut Res 25(25):24520–24525. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8899-3>
 - ASTM International (2004) American Society for Testing Materials, Sec 5 Petroleum products, Lubricants, and Fossil Fuels.
 - ASTM International. (2015). American Society for Testing and Materials. Obtenido de ASTM D6751-15ce1 Standard Specification for Biodiésel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels: <http://dx.doi.org/10.1520/D6751-15CE01>
 - Astolfi A., Rempel A., Cavanhi, V., Alves M., Deamici K.M., Colla L., Costa J. (2020). Simultaneous saccharification and fermentation of *Spirulina sp.* and corn starch

for the production of bioethanol and obtaining biopeptides with high antioxidant activity. *Bioresour. Technol.* 301, 122698. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122698>.

- Azizi K., Keshavarz M., Abedini , H. (2018). A review on bio-fuel production from microalgal biomass by using pyrolysis method. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 82, 3046–3059. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.10.033>.
- B`olük G., Mert M. (2015). The renewable energy, growth and environmental Kuznets curve in Turkey: an ARDL approach. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 52, 587–595
- Badotti F, de Oliveira FS, Garcia CF, Vaz A, Fonseca P, Nahum L, Oliveira G, Góes-Neto A (2017) Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). *BMC Microbiology* 17 (1). <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0958-x>
- Banfi, S. (2024). Nuevo método para determinar el índice de yodo en aceites y grasas. Florencia – ITALIA: Ensayos de validación de la nueva prueba para la determinación del Índice de Yodo con CDR FoodLab®.
- Bart, J. C., Palmeri, N., & Cavallaro, S. (2011). *Biodiesel Science and Technology*. CRC Press.
- Batista, B.N.; Matias, R.R.; Oliveira, R.L.; Albuquerque, P.M. Hydrolytic enzyme production from açai palm (*Euterpe precatoria*) endophytic fungi and characterization of the amylolytic and cellulolytic extracts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2022, 38, 30–45.
- Ben Bacha A, Alonazi M, Alharbi MG, Horchani H, Ben Abdelmalek I. Biodiesel Production by Single and Mixed Immobilized Lipases Using Waste Cooking Oil. *Molecules.* 2022 Dec 9;27(24):8736. doi: 10.3390/molecules27248736. PMID: 36557867; PMCID: PMC9782179.
- Bensch K, Braun U, Groenewald JZ, Crous PW, et al. (2012) The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology* 72: 1-401. <https://doi.org/10.3114/sim0003>
- Bharathi, D., and Rajalakshmi, G. (2019). Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 22, 101368. doi: 10.1016/j.bcab.2019.101368
- Bindiya, P., and Ramana, T. (2013). Production of lipase by repeated batch fermentation using immobilized *Aspergillus sydowii*. *Int. J. Chem. Biochem. Sci.* 4, 72–78.
- Binhayeeding N., Yunu T., Pichid N., Klomklao S., Sangkharak K. (2020). Immobilisation of *Candida rugosa* lipase on polyhydroxybutyrate via a combination of adsorption and cross-linking agents to enhance acylglycerol production. *Process Biochem.* 95, 174–185. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.007>.

- *Boletín ICN*. (s/f). Unam.mx. Recuperado el 5 de octubre de 2024, de https://www.nucleares.unam.mx/boletin_icnoticias/2023_01/noticia_destacada.html
- Bornscheuer U. T. (2002). “Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 26, no. 1, pp. 73–81.
- Borrelli G.M., Trono D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their uses as biocatalysts for industrial applications. *Int J Mol Sci* 16(9):20774–20840.
- Brown T. (2019). Sociedad Geográfica Nacional. Obtenido de Sociedad Geográfica Nacional: <https://www.nationalgeographic.org/encyclopedia/fossil-fuels/>
- Brozzoli,V, Crognale S, Sampedro I, Federici F, D’Annibale A, Petruccioli M (2009) Assessment of olive-mill wastewater as growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. *Bioresour Technol* 100 (13):3395-3402.
- Bukhari SAZ, Ullah K, Ahmad M, Zafar M, Ullah A, Sultana S, Ibrahim MM, Hessien MM, Mersal GAM, Ghoneim SSM. Biodiesel from *Dodonaea* Plant Oil: Synthesis and Characterization-A Promising Nonedible Oil Source for Bioenergy Industry. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022 jun 6; 10:864415. doi: 10.3389/fbioe.2022.864415. PMID: 35733522; PMCID: PMC9207505.
- Cairns T, Zheng X, Zheng P, Sun J, Meyer V (2019) Moulding the mould: understanding and reprogramming filamentous fungal growth and morphogenesis for next generation cell factories. *Biotechnology for Biofuels* 12 (1). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1400-4>
- Caldeira C, Corrado S, Sala S, et al. (2017) Food waste accounting - Methodologies, challenges and opportunities. Publications Office of the European Union. <https://doi.org/10.2760/54845>
- Carvalho P, Calafatti S, Marassi M, Silva Dd, Contesini F, Bizaco R, Macedo GA (2005) Potencial de biocatálise enantioselectiva de lipases microbianas. *Química Nova* 28 (4): 614-621. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422005000400012>
- Casas-Godoy L, Gasteazoro F, Duquesne S, Bordes F, Marty A, Sandoval G. (2018). Lipases: an overview. *Methods Mol Biol*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_1.
- Cesário LM, Pires GP, Pereira RFS, Fantuzzi E, da Silva Xavier A, Cassini STA, de Oliveira JP (2021) Optimization of lipase production using fungal isolates from oily residues. *BMC Biotechnology* 21 (1). <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00724-4>
- Chandra P., Enespa, Singh R., Arora P.K. Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. *Microb. Cell Factories*. 2020; 19:169. doi: 10.1186/s12934-020-01428-8

- Chapman J., Ismail AE, Dinu CZ Aplicaciones industriales de enzimas: avances, técnicas y perspectivas recientes. *Catalizadores*. 2018; 8 :238. doi: 10.3390/catal8060238.
- Chaudhary P, Beniwal V, Sharma P, Goyal S, Kumar R, Alkhanjaf A, Umar A (2022) Unloading of hazardous Cr and Tannic Acid from real and synthetic waste water by novel fungal consortia. *Environmental Technology & Innovation* 26 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102230>
- Chiou, S. and Wu, W. (2004). "Immobilization of *Candida rugosa* Lipase on Chitosan with Activation of the Hydroxyl Groups". *Biomaterials*, 25, 197-204. [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00482-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00482-4).
- Chisti, Y. (2008). "Biodiesel from microalgae beats bioethanol". *Trends biotechnol.* vol. 26, p. 126–131.
- Choe E, Min DB, et al. (2007) Chemistry of Deep-Fat Frying Oils. *Journal of FoodScience* 72 (5): R77-R86. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00352.x>
- Choi Y., Patel A., Hong M., Chang W., Sim S. (2019). Microalgae Bioenergy with Carbon Capture and Storage (BECCS): an emerging sustainable bioprocess for reduced CO2 emission and biofuel production. *Bioresour. Technol. Reports* 7, 100270. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100270>.
- Cole GT (1996) Basic biology of fungi. In: Baron S (Ed.) *Medical Microbiology*. 4th Edition, 73. University of Texas Medical Branch at Galveston, 10 pp. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8099/>
- Colonia, B. S. O., Woiciechowski, A. L., Malanski, R., Letti, L. A. J., and Soccol, C. R. (2019). Pulp improvement of oil palm empty fruit bunches associated to solid-state biopulping and biobleaching with xylanase and lignin peroxidase cocktail produced by *Aspergillus sp.* LPB-5. *Bioresour. Technol.* 285, 121361. doi: 10.1016/j.biortech.2019.121361
- Cronshaw I. (2015) World Energy Outlook 2014 projections to 2040: natural gas and coal trade, and the role of China. *Aust J Agric Resour Econ* 59(4):571–585
- Dai Y.M., Kao I.H. and Chen C.C. (2017). Evaluating the optimum operating parameters of biodiesel production process from soybean oil using the Li₂TiO₃ catalyst. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 70: 260–266.
- Das A., Shivakumar S., Bhattacharya S., Shakya S., Swathi S.S. (2016). Purification and characterization of a surfactant-compatible lipase from *Aspergillus tamarii* JGIF06 exhibiting energy-efficient removal of oil stains from polycotton fabric. *3Biotech.* 6(2):131 DOI: 10.1007/s13205-016-0449-z.
- Da Silva Guabiroba, R. C., da Silva, R. M., da Silva César, A., & da Silva, M. A. V. (2017). Value chain analysis of waste cooking oil for biodiesel production: Study case of one oil collection company in Rio de Janeiro-Brazil. *Journal of Cleaner Production*, 142, 3928-3937.

- De Almeida, A.F., Taulk-Tornisielo, S.M. & Carmona, E.C. Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain. *Ann Microbiol* 63, 1225–1234 (2013). <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0580-y>
- De Andrade Silva T, Keijok WJ, Guimarães MCC, Cassini STA, de Oliveira JP. Impact of immobilization strategies on the activity and recyclability of lipases in nanomagnetic supports. *Sci Rep.* 2022 Apr 26;12(1):6815. doi: 10.1038/s41598-022-10721-y. PMID: 35474328; PMCID: PMC9042828.
- De Feo G, Di Domenico A, Ferrara C, Abate S, Sesti Osseo L, et al. (2020) Evolution of Waste Cooking Oil Collection in an Area with Long-Standing Waste Management Problems. *Sustainability* 12 (20): 1-16. <https://doi.org/10.3390/su12208578>
- De la Rosa-Hernández M C, Mercado-Flores Y, Evangelista-Martínez Z, Arana-Cuenca A. (2015) “Estudio de la actividad enzimática extracelular en cepas de actinomicetos aisladas del parque Nacional El Chico”. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería <http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/l/carteles/CI-19.pdf>.
- De Lima A.L. and Mota C.J. (2019). Biodiesel: A survey on production methods and catalysts. In: Mulpuri S, Nicolas C and Bir B (eds) *Jatropha*, Challenges for a New Energy Crop. Singapore: Springer, 475–491.
- Edwinoliver NG, Thirunavukarasu K, Purushothaman S, Rose C, Gowthaman MK, Kamini NR. Corn steep liquor as a nutrition adjunct for the production of *Aspergillus niger* lipase and hydrolysis of oils thereof. *J Agric Food Chem.* 2009 nov 25;57(22):10658-63. doi: 10.1021/jf902726p. PMID: 19860451.
- Eko Sukohidayat N, Zarei M, Baharin B, Manap M (2018) Purification and characterization of lipase produced by *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* ATCC 8293 using an aqueous two-phase system (ATPS) composed of triton X-100 and maltitol. *Molecules* 23 (7). <https://doi.org/10.3390/molecules23071800>
- El-Sawah A.M., El-Keblawy A., Ali D.FI., Ibrahim H.M., El-Sheikh M.A., Sharma A., Hamoud Y.A., Shaghaleh H., Brestic M., Skalicky M., et al. Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria improve key soil enzymes, plant growth, seed yield and qualitative attributes of Guar. *Agriculture.* 2021; 11 :194. doi: 10.3390/agricultura11030194.
- Enoch Wembabazi, Patrick Joram Mugisha, Asumani Ratibu, Deborah Wendi, Joseph Kyambadde, Peter California Vuzi, "Spectroscopic Analysis of Heterogeneous Biocatalysts for Biodiesel Production from Expired Sunflower Cooking Oil", *Journal of Spectroscopy*, vol. 2015, Article ID 714396, 8 pages, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/714396>

- Esfe MH, Arani AAA, Esfandeh S, et al. (2018) Improving engine oil lubrication in lightduty vehicles by using of dispersing MWCNT and ZnO nanoparticles in 5W50 as viscosity index improvers (VII). Applied Thermal Engineering 143: 493-506. <https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2018.07.034>
- Etim A., Musonge P., Eloka-Eboka A. (2020). Effectiveness of biogenic waste-derived heterogeneous catalysts and feedstock hybridization techniques in biodiesel production. Biofuels Bioprod. Biorefin. Vol 14, 620–649.
- Eze V.C., Phan A.N. and Harvey A.P. (2018). Intensified one-step biodiesel production from high water and free fatty acid waste cooking oils. Fuel 220:567–574.
- Faouzi L., Fatimazahra E., Moulay S., Adel S., Wifak B., Soumya E., et al. (2015). Higher tolerance of a novel lipase from *Aspergillus flavus* to the presence of free fatty acids at lipid/water interface. Afr. J. Biochem. Res. 9, 9–17. doi:10.5897/ajbr2014.0804
- Farouk SM, Tayeb AM, Abdel-Hamid SMS, Osman RM. Recent advances in transesterification for sustainable biodiesel production, challenges, and prospects: a comprehensive review. Environ Sci Pollut Res Int. 2024 Feb;31(9):12722-12747. doi: 10.1007/s11356-024-32027-4. Epub 2024 Jan 23. PMID: 38253825; PMCID: PMC10881653.
- Fatima S., Faryad A., Ataa A., Joyia F.A., Parvaiz A. Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques. Biotechnol. Appl. Biochem. 2021; 68:445–458. doi: 10.1002/bab.2019
- FOODLAB. (Junio de 2023). CDR Foodlab. Obtenido de Análisis del Índice de Peróxidos en aceites y grasas: <https://www.cdrfoodlab.es/cdrfoodlab/analisis/peroxidos-aceite-grasas>
- Fungal cellulases compatible with Niyonzima FN detergents. Folia Microbiol. 2021; 66 :25–40. doi: 10.1007/s12223-020-00838-w.
- Fütting P, Barthel L, Cairns T, Briesen H, Schmieder S (2021) Filamentous fungal applications in biotechnology: a combined bibliometric and patentometric assessment. Fungal Biology and Biotechnology 8 (1). <https://doi.org/10.1186/s40694-021-00131-6>
- Gao K., Chu W., Sun J., and Mao X. (2020). Identification of an alkaline lipase capable of better enrichment of EPA than DHA due to fatty acids selectivity and regioselectivity. Food Chem. 330:127225. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127225
- Gao X., Gao Q., Bao J. (2018). Improving cellulosic ethanol fermentability of *Zymomonas mobilis* by overexpression of sodium ion tolerance gene ZMO0119. J. Biotechnol. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.05.013>.
- García C. J. M. y García L. J. A. (2006). “Biocarburantes líquidos: biodiésel y bioetanol. Centro para la Innovación y Transferencia de la Tecnología y del Conocimiento (CINTTEC) y el Círculo de Innovación en Tecnologías

- Medioambientales y Energía (CITME). Comunidad de Madrid. www.madrimasd.org.
- Geoffry K., Achur RN (2018). Detección y producción de lipasa a partir de organismos fúngicos. *Biocatal. Agrícola. Biotecnología*. 14, 241–253. [10.1016/j.bcab.2018.03.009](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.009)
 - Ghori MI, Iqbal MJ, Hameed A. Characterization of a novel lipase from *Bacillus* sp. isolated from *Tannery wastes*. *Braz J Microbiol*. 2011 Jan;42(1):22-9. doi: [10.1590/S1517-83822011000100003](https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100003). Epub 2011 Mar 1. PMID: 24031600; PMCID: PMC3768906.
 - Ghosh P. K., Saxena R. K., Gupta R., Yadav R. P., Davidson S. (1996). Microbial lipases: production and applications. *Sci Prog*. 79: 119-157.
 - Ghosh S, Rusyn I, Dmytruk O, Dmytruk K, Onyeaka H, Gryzenhout M, Gafforov Y (2023) Filamentous fungi for sustainable remediation of pharmaceutical compounds, heavy metal and oil hydrocarbons. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1106973>
 - Go A.W., Sutanto S., Ong L.K. (2016). Tran-Nguyen P.L., Ismadji S., Ju Y. Developments in in-situ (trans) esterification for the biodiesel production: a critical review. *Renew Sustain Energy Rev* 60: 284–305.
 - Gochev V., Montero G., Kostov G. et al. (2012) “Nutritive médium engineering enhanced production of extracellular lipase by *Trichoderma longibrachiatum*”. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, vol. 26, no. 2, pp. 2875–2882.
 - Gómez P., Lázaro N., Alvarado C., Pineda A., Balu A., Luque R. (2019). One-pot Cu/TiO₂ nanoparticles synthesis for trans-ferulic acid conversion into vanillin. *Molecules*, 24, 3985.
 - Gómez-Vázquez EG, Sánchez Roque Y, Ibáñez-Duharte GR, Canseco-Pérez MA, Zenteno-Carballo AG, Berrones-Hernández R, Pérez-Luna YC (2024) Molecular identification and lipolytic potential of filamentous fungi isolated from residual cooking oil. *Biodiversity Data Journal* 12: e113698. <https://doi.org/10.3897/BDJ.12.e113698>
 - Gopinath S. C. B., Anbu P., and Hilda A. (2005). “Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments,” *Mycoscience*, vol. 46, no. 2, pp. 119–126.
 - Gopinath S. C. B., Hilda A., Priya T. L., Annadurai G., and Anbu P. (2003) “Purification of lipase from *Geotrichum candidum*: conditions optimized for enzyme production using Box-Behnken design,” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 19, no. 7, pp. 681–689.
 - Greenpeace. (2020) Aire tóxico: el precio de los combustibles fósiles. <https://www.efeverde.com/storage/2020/02/gp-toxic-air-briefing-spain.pdf>
 - Guarro J, Gené J, Stchigel A (1999) Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (3): 454-500. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.3.454>

- Guerrand D. (2017) Lipases industrial applications: Focus on food and agroindustries. OCL. 24: D403 10.1051/ocl/2017031.
- Gupta R, Gupta N, Rathi P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Appl Microbiol Biotechnol 64:763–781. doi: 10.1007/s00253-004-1568-8.
- H.W. Yu, H. Chen, Y.Y. Yang, C.B. Ching, Effect of salts on activity, stability and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in isooctane, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Volume 35, Issues 1–3, 2005, Pages 28-32, ISSN 1381-1177, <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2005.05.002>
- Hamdi NA, Sha'arani S, Azman NF, Rafi SBM, Norsin E, Othman N, et al. (2022) Management of Waste Cooking Oil and its Potential for Value-added Materials: A Mini Review. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 1091 (1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1091/1/012054>
- Hankin L. and Anagnostakis S. L. (1975) "The use of solid media for detection of enzyme production by fungi". Mycologia, vol. v.67, n. 3, pp. 597–607.
- Hasan F., Shah A. A., and Hameed A. (2006). "Industrial applications of microbial lipases," Enzyme and Microbial Technology, vol. 39, no. 2, pp. 235–251.
- Heinrich-Böll-Stiftung, Schumannstraße. (2020). Atlas del carbón. o Creative Commons "Attribution-ShareAlike 3.0 Unported" (CC BY-SA 3.0)." https://cl.boell.org/sites/default/files/2020-12/atlas_del_carbon%20web.pdf
- Helal S., Abdelhady H., Abou-Taleb K., Hassan M. and Amer M. (2021). Lipase from *Rhizopus oryzae* R1: in-depth characterization, immobilization, and evaluation in biodiesel production. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 19:1. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00094-y> PMID: 33400043; PMCID: PMC7785608.
- Hernández M., y Hernández, J. (2008). Verdades y mitos de los biocombustibles. Elementos 71, 15-18.
- Hita E, Robles A, Camacho B, González P, Esteban L, Jiménez M, Muñío M, Molina E (2009) Production of structured triacylglycerols by acidolysis catalyzed by lipases immobilized in a packed bed reactor. Biochemical Engineering Journal 46 (3): 257-264. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.05.015>
- Houde, A., Kademi, A. & Leblanc, D. Lipases and their industrial applications. Appl Biochem Biotechnol 118, 155–170 (2004). <https://doi.org/10.1385/ABAB:118:1-3:155>
- Hüttner, S., Johansson, A., Teixeira, P. G., Achterberg, P., & Nair, R. (2020). Recent advances in the intellectual property. Obtenido de Fungal Biology and: <https://fungalbiolbiotech.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40694-020-00106-z#Sec19>
- Hyde K, Xu J, Rapior S, Jeewon R, Lumyong S, Niego A, Abeywickrama P, Aluthmuhandiram JS, Brahamanage R, Brooks S, Chaiyasen A, Chethana KWT, Chomnunti P, Chepkirui C, Chuankid B, de Silva N, Doilom M, Faulds C, Gentekaki

- E, Gopalan V, Kakumyan P, Harishchandra D, Hemachandran H, Hongsanan S, Karunarathna A, Karunarathna S, Khan S, Kumla J, Jayawardena R, Liu J, Liu N, Luangharn T, Macabeo A, Marasinghe D, Meeks D, Mortimer P, Mueller P, Nadir S, Hyde K.D., Xu J., Rapior S., Jeewon R., Lumyong S., Niego AGT, Abeywickrama PD, Aluthmuhandiram JVS, Brahamanage RS, Brooks S., et al. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity* 97, 1–136 (2019). doi: 10.1007/s13225-019-00430-9.
- IEA, (2020). Bioenergy - fuels & technologies - IEA [WWW Document]. URL. <https://www.iea.org/fuels-and-technologies/bioenergy>.
 - Isiaka A. & Olufolahan A. (2020). Production strategies and biotechnological relevance of microbial lipases: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00503-5>
 - Jaeger K.E., Dijkstra B.W., Reetz M.T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 53:315–351. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.315>.
 - Jaeger KE, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002; 13:390–397. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00341-5
 - Javed F., Aslam M., Rashid N., Shamair Z., Khan A.L., Yasin M., Fazal T., Hafeez A., Rehman F., Rehman M.S.U., Khan Z., Iqbal J., Bazmi A. (2019). Microalgae-based biofuels, resource recovery and wastewater treatment: a pathway towards sustainable biorefinery. *Fuel* 255, 115826. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.115826>.
 - Javed S, Azeem F, Hussain S et al (2018) Bacterial lipases: a review on purification and characterization. *Prog Biophys Mol Biol* 132:23–34. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>
 - Jayaprakash, A., and Ebenezer, P. (2012). Purification and characterization of *Aspergillus japonicus* lipase from a pig fat production medium. *J. Acad. Ind. Res.* 1, 1–7.
 - Jiang W., Brueggeman A., Horken K., Plucinak T., Weeks D. (2014). Successful transient expression of Cas9 and single guide RNA genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 13, 1465–1469. <https://doi.org/10.1128/EC.00213-14>.
 - Jutakradsada P., Saengprachatanarug K., Kasemsiri P., Hiziroglu S., Kamwilaisak K., Chindaprasirt P. (2019). Bioconversion of *saccharum officinarum* leaves for ethanol production using separate hydrolysis and fermentation processes. *Waste and Biomass Valorization* 10, 817–825. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0104-x>.
 - Kanmani P., Aravind J., Kumaresan K. (2015). An insight into microbial lipases and their environmental facet. *Int J Environ Sci Technol* 12(3):1147–1162
 - Kapoor M, Gupta MN (2012) Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem* 47:555–569. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.011>.

- Karimi M. (2016). Immobilization of lipase onto mesoporous magnetic nanoparticles for enzymatic synthesis of biodiesel. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 8, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.09.009>.
- Kashmiri M. A., Adnan A., and Butt B.W. (2006) “Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma viride*,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 5, no. 10, pp. 878–882.
- Kavadia M. R., Yadav M. G., Odaneth A. A., and Lali A. M. (2018). Synthesis of designer triglycerides by enzymatic acidolysis. *Biotechnol. Rep. (Amst)* 18:e00246. doi: 10.1016/j.btre.2018.e00246
- KC S, Upadhyaya J, Joshi DR, Lekhak B, Kumar Chaudhary D, Raj Pant B, Raj Bajgai T, Dhital R, Khanal S, Koirala N, Raghavan V (2020) Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains. *Fermentation* 6(2). <https://doi.org/10.3390/fermentation6020059>
- Khan F. I., Lan D., Durrani R., Huan W., Zhao Z., and Wang Y. (2017). The lid domain in lipases: structural and functional determinant of enzymatic properties. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 5:16.
- Khan N., et al., 2019. Review of energy storage and transportation of energy. *Energy Storage* 1 (3), 1–49.
- Kilkis S., Krajačić G., Duić N., Rosen M.A., Al-Nimr M.A. (2018). Advancements in sustainable development of energy, water and environment systems. *Energy Convers. Manag.* 176, 164–183.
- Kim JY (2011) Molecular and Morphological Identification of fungal species isolated from Bealmijang Meju. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21 (12): 1270-1279. <https://doi.org/10.4014/jmb.1105.05013>
- Kim S, Lee J, Park J, Choi S, Bui DC, Kim JE, Shin J, Kim H, Choi GJ, Lee YW, Chang PS, Son H. Genetic and Transcriptional Regulatory Mechanisms of Lipase Activity in the Plant Pathogenic Fungus *Fusarium graminearum*. *Microbiol Spectr.* 2023 Jun 15;11(3):e0528522. doi: 10.1128/spectrum.05285-22. Epub 2023 Apr 24. PMID: 37093014; PMCID: PMC10269793.
- Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC (2002) Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13 (4): 345-351. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(02\)00328-2](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(02)00328-2)
- Ko IT, Wang IT, Ann PJ. 2005. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biol Biochem.* 37(3): 597-599.
- Kolet M., Atrash M., Molina K., Zerbib D., Albo Y, Nakonechny F., Nisnevitch M. (2020). Sol–Gel Entrapped Lewis acids as catalysts for biodiesel production. *Molecules*, 25(24), 5936.
- Kolet M., Zerbib D., Molina K., Nakonechny F., Nisnevitch M. (2020). Biodiesel Production using Lewis catalysts under ultrasonic activation. *Isr. J. Chem.* Vol. 60, 644–651.

- Kosa, M. y Ragauskas, A.J. "lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research". Trends in biotechnology. 2011, vol. 29, núm. 2, p. 53-61.
- Kotogán A, Furka ZT, Kovács T, Volford B, Papp DA, Varga M, Huynh T, Szekeres A, Papp T, Vágvölgyi C, Mondal KC, Kerekes EB, Takó M. Hydrolysis of Edible Oils by Fungal Lipases: An Effective Tool to Produce Bioactive Extracts with Antioxidant and Antimicrobial Potential. Foods. 2022 Jun 10;11(12):1711. doi: 10.3390/foods11121711. PMID: 35741908; PMCID: PMC9222666.
- Kumar A, Verma V, Dubey VK, Srivastava A, Garg SK, Singh VP, Arora PK. Industrial applications of fungal lipases: a review. Front Microbiol. 2023 Apr 28; 14:1142536. doi: 10.3389/fmicb.2023.1142536. PMID: 37187537; PMCID: PMC10175645.
- Kumar A., Dhar K., Kanwar S.S., Arora P.K. (2016). Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. Biol Proced Online. 18 DOI: 10.1186/s12575-016-0033-2.
- Kumar D., Kumar L., Nagar S., Raina C., Parshad R., and. Gupta V. K. (2012) "Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus sp.* strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions". Archives of Applied Science Research, vol. 4, no. 5, pp. 1763–1770, 2012.
- Kumar D.S., Ray S. (2014) Fungal Lipase Production by Solid State Fermentation- An Overview. J Anal Bioanal Tech 6: 230 doi: 10.4172/2155-9872.1000230
- Kumar R., Strezov V., Weldekidan H., He J., Singh S., Kan T., Dastjerdi B. (2020). Lignocellulose biomass pyrolysis for bio-oil production: a review of biomass pre-treatment methods for production of drop-in fuels. Renew. Sustain. Energy Rev. 123, 109763. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109763>
- Kumar S, Mathur A, Singh V, Nandy S, Khare SK, Negi S (2012) Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. Bioresource Technology 120: 300-304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.018>
- Kumar S, Negi S (2015) Transformation of waste cooking oil into C-18 fatty acids using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* through solid state fermentation. 3 Biotech 5 (5): 847-851. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0268-z>
- Kumar V., Nanda M., Joshi H.C., Singh A., Sharma S., Verma M. (2018). Production of biodiesel and bioethanol using algal biomass harvested from fresh water river. Renew. Energy 116, 606–612. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.10.016>.
- Lelieveld J., et al. (2020). Loss of life expectancy from air pollution compared to other risk factors: a worldwide perspective. Cardiovasc. Res. 116 (11), 1910–1917.

- Letunic I, Bork P, et al. (2011) Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Research* 39: W-475-w-478. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr201>
- Li G., Liu C., Yu Z., Rao M., Zhong Q., Zhang Y., Jiang T. (2018). Energy saving of composite agglomeration process (CAP) by optimized distribution of pelletized feed. *Energies*, 11, 2382.
- Li L, Bi X, Sun H, Liu S, Yu M, Zhang Y, Weng S, Yang L, Bao Y, Wu J, Xu Y, Shen K. Characterization of ovarian cancer cells and tissues by Fourier transform infrared spectroscopy. *J Ovarian Res.* 2018 Aug 2;11(1):64. doi: 10.1186/s13048-018-0434-8. PMID: 30071867; PMCID: PMC6090913.
- Li Y., Rezgui Y., Zhu H. (2017). District heating and cooling optimization and enhancement—towards integration of renewables, storage and smart grid. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 72, 281–294.
- Litinas A., Geivanidis S., Faliakis A., Courouclis Y., Samaras Z., Keder A., et al., (2020). Biodiesel production from high ffa feedstocks with a novel chemical multifunctional process intensifier. *Biofuel Res J.* Volume 7, Issue 2 - Serial Number 2, Pages 1170-1177. <https://doi.org/10.18331/BRJ2020.7.2.5>.
- Liu G., Hu S., Li L., Hou Y. (2015). Purification and characterization of a lipase with high thermostability and polar organic solvent tolerance from *Aspergillus niger* AN0512. *Lipids*. 50: 1155-1163.
- Liu J., Baeyens J., Deng Y., Tan T., Zhang H. (2020.) The chemical CO₂ capture by carbonation-decarbonation cycles. *J. Environ. Manag.* 260, 110054. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.110054>.
- Liu S, Han M, Xu T, Wang Y, Wu D, Cui B, et al. (2021) Taxonomy and Phylogeny of the *Fomitopsis pinicola* Complex With Descriptions of Six New Species From East Asia. *Frontiers in Microbiology* 12 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.644979>
- Liu Y., Liu M.Y., Qi Y.X., Jin X.Y., Xu H.R., Chen Y.X., Chen S.P., Su H.P. Synthesis and properties of wax based on waste cooking oil. *RSC Adv.* 2022 Jan 25;12(6):3365-3371. doi: 10.1039/d1ra08874b. PMID: 35425352; PMCID: PMC8979279.
- López-Fernández J., Barrero J. J., Benaiges M., and Valero F. (2019). Truncated prosequence of *Rhizopus oryzae* lipase: key factor for production improvement and biocatalyst stability. *Catalysts* 9:961. doi: 10.3390/catal9110961
- Mahfoudhi, A., Benmabrouk, S., Fendri, A., and Sayari, A. (2022). Fungal lipases as biocatalysts: A promising platform in several industrial biotechnology applications. *Biotechnol. Bioeng.* 119, 3370–3392. doi: 10.1002/bit.28245
- Mahmoud, G. A., Koutb, M. M., Morsy, F. M., and Bagy, M. M. (2015). Characterization of lipase enzyme produced by hydrocarbons utilizing fungus *Aspergillus terreus*. *Eur. J. Biol. Res.* 5, 70–77.

- Mancilla J, Mora M, Montañez DDC, Martínez V, Fuentes R, Carranza R (2020) Micobiota aislada de serpientes en cuarentena del centro para investigaciones y respuestas en Ofidología de la Universidad de Panamá (CEREO). *Tecnociencia* 23 (1): 180-197. <https://doi.org/10.48204/j.tecno.v23n1a10>
- Martínez R., Cortes C., Madrigal L y González J. (2019). Hongos y levaduras: fábricas de lipasas. *Interciencia*, vol. 44, núm. 7, pp. 378-385, 2019
- Martinez-Klimova, E.; Rodríguez-Peña, K.; Sánchez, S. Endophytes as sources of antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* 2017, 134, 1–17.
- Martins T., C. B. (2021). Fossil fuels consumption and carbon dioxide emissions in G7 countries. *Elsevier-Environmental Pollution* 291, 0269-7491.
- Mathimani T., Mallick N. (2018). A comprehensive review on harvesting of microalgae for biodiesel - key challenges and future directions. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 91, 1103–1120. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.083>.
- Matias, R.R.; Rodrigues, J.G.C.; Procópio, R.E.L.; Matte, C.R.; Duvoisin Junior, S.; Soares, R.M.D.; Albuquerque, P.M. Lipase production from *Aniba canelilla* endophytic fungi, characterization, and application of the enzymatic extract. *Res. Soc. Dev.* 2022, 11, e180111234326.
- Matias, R.R.; Sepúlveda, A.M.G.; Batista, B.N.; Lucena, J.M.V.M.; Albuquerque, P.M. Degradation of *Staphylococcus aureus* biofilm using hydrolytic enzymes produced by amazonian endophytic fungi. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2021, 193, 2145–2161.
- McGlade C. & Ekins P. The geographical distribution of fossil fuels unused when limiting global warming to 2 °C. *Nature* 517, 187–190 (2015).
- Mehta A., Bodh U., Gupta R. (2017). Fungal lipases: a review. *J. Biotech Res.* 8 58–77.
- Mendes D. B., Da Silva F.F., Guarda P. M, Almeida A. F., De Oliveira D. P., Morais P. B., Guarda E. A. (2019) “Lipolytic enzymes with hydrolytic and esterification activities produced by filamentous fungi isolated from decomposition leaves in an aquatic environment”. *Hindawi Enzyme Research*. Volume 2019, Article ID 8182425, 13 pages. <https://doi.org/10.1155/2019/8182425>.
- Mensah I.A., et al. (2019). Analysis on the nexus of economic growth, fossil fuel energy consumption, CO2 emissions and oil price in Africa based on a PMG panel ARDL approach. *J. Clean. Prod.* 228, 161–174.
- Merih-Kivanc, Esra Acu. (2022). Production of extracellular lipase by *Enterococcus faecium* E68 with olive oil waste as substrate. *Biotecnia*, 24(3), 87-93. Epub 19 de junio de 2023. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v24i3.1750>
- Meyer V (2021) Metabolic engineering of filamentous fungi. *Metabolic Engineering* 765-801. <https://doi.org/10.1002/9783527823468.ch20>
- Meyer V, Basenko E, Benz JP, Braus G, Caddick M, Csukai M, de Vries R, Endy D, Frisvad J, Gunde-Cimerman N, Haarmann T, Hadar Y, Hansen K, Johnson R, Keller N, Kraševc N, Mortensen U, Perez R, Ram AJ, Record E, Ross P, Shapaval V,

- Steiniger C, van den Brink H, van Munster J, Yarden O, Wösten HB (2020) Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal Biology and Biotechnology* 7 (1). <https://doi.org/10.1186/s40694-020-00095-z>
- Miranda L., Pinto G., Santos R., Fantuzzi E., Silva X., Alves S. and Pinto J. (2021). Optimization of lipase production using fungal isolates from oily residues. *BMC Biotechnology* (2021) 21:65 <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00724-4>
 - Mishra A., Basu S., Shetti N.P., Reddy K.R. (2019). Metal oxide nanohybrids-based low-temperature sensors for NO₂ detection: a short review. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* 30, 8160–8170. <https://doi.org/10.1007/s10854-019-01232-0>.
 - Mofijur M., Rasul M. G., Hyde J., Azad A. K., Mamat R., & Bhuiya M. (2016). Role of biofuel and their binary (diesel–biodiesel) and ternary (ethanol–biodiesel–diesel) blends on internal combustion engines emission reduction. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 53, 265-278.
 - Mofijur M., Rasul M.G., Hassan N.M.S., Masjuki H.H., Kalam M.A., Mahmudul H.M. (2017). Assessment of physical, chemical, and tribological properties of different biodiesel fuels. In: *Clean Energy for Sustainable Development: Comparisons and Contrasts of New Approaches*. Elsevier Inc., pp. 441–463. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805423-9.00014-4>.
 - Mohammadi-Nasrabadi F., Zargaraan A., Salmani Y., Esfarjani F. Challenges of Cooking Oils in Fast-Food Restaurants of Iran: Views of Consumers. *Int Q Community Health Educ.* 2020 Jan;40(2):135-141. doi: 10.1177/0272684X19862473. Epub 2019 Jul 25. PMID: 31345122.
 - Molina-Gutiérrez M, Alcaraz L, López F, Rodríguez-Sánchez L, Martínez MJ, Prieto A (2021) Immobilized forms of the *Ophiostoma piceae* lipase for green synthesis of biodiesel. Comparison with Eversa Transform 2.0 and Cal A. *Journal of Fungi* 7 (10). <https://doi.org/10.3390/jof7100822>
 - Money N. (2016) *Fungal Diversity*. Chapter 1 . *The Fungi* (Third Edition). Elsevier Ltd. All rights reserved, Pages 1-36. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00001-3>
 - Monteiro M.R., Kugelmeier C.L., Pinheiro R.S., et al. (2018). Glycerol from biodiesel production: Technological paths for sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 88: 109–122.
 - Moreno J., Cubillos. J. (2017). Biobutanol como combustible: una alternativa sustentable. *Investigación Joven*, 4(1), 45-50.
 - Mtui GYS, et al. (2012) Lignocellulolytic enzymes from tropical fungi: Types, substrates and applications. *Scientific Research and Essays* 7 (15). <https://doi.org/10.5897/sre11.1812>
 - Mukhtar, H., Khursheed, S., Mumtaz, M. W., Rashid, U., and Al-Resayes, S. I. (2016). Optimization of lipase biosynthesis from *Rhizopus oryzae* for biodiesel production using multiple oils. *Chem. Eng. Technol.* 39, 1707–1715. doi: 10.1002/ceat.201500584

- Municipios 2023. (marzo de 2023). Todos Los Municipios de México. Obtenido de Todos Los Municipios de México: <http://www.municipios.mx/chiapas/suchiapa/#:~:text=La%20altitud%20del%20municipio%20de,total%20de%20355.20%20kil%C3%B3metros%20cuadrados>.
- Murcia, O., Chaves, B., Rodríguez Pérez, L. & Murcia, A. (2013). “Caracterización de biodiesel obtenido de aceite residual de cocina”. Revista Colombiana de Biotecnología, 15(1), pp. 61-70.
- Murillo G., Sun J., Ali S.S., Yan Y., Bartocci P., He Y. (2018). Evaluation of the kinematic viscosity in biodiesel production with waste vegetable oil, ultrasonic irradiation and enzymatic catalysis: a comparative study in two-reactors. Fuel 227, 448–456. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.04.119>.
- Murshed M, Tanha MM. Oil price shocks and renewable energy transition: Empirical evidence from net oil-importing South Asian economies. Energy Ecol Environ. 2021;6(3):183-203. doi: 10.1007/s40974-020-00168-0. Epub 2020 May 21. PMID: 32838023; PMCID: PMC7240004.
- Nam MH, Park MS, Kim HS, Kim TI, Kim HG (2015) *Cladosporium cladosporioides* and *C. tenuissimum* cause blossom blight in strawberry in Korea. Mycobiology 43 (3): 354-359. <https://doi.org/10.5941/myco.2015.43.3.354>
- Naranjo M., Gabaldón T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. Biol. Rev., 94, pp. 2101–2137. 2101doi: 10.1111/brv.12550
- Nasiri-Jahrodi A, Sheikholeslami FM, Barati M. *Cladosporium tenuissimum*-induced sinusitis in a woman with immune-deficiency disorder. Braz J Microbiol. 2023 Jun;54(2):637-643. doi: 10.1007/s42770-023-00978-4. Epub 2023 Apr 27. PMID: 37101101; PMCID: PMC10234976.
- Nasreen S., Nafees M., Qureshi L., Asad M., Sadiq A., Ali S. (2018). Review of Catalytic Transesterification Methods for Biodiesel Production, in: Biofuels - State of Development. 10.5772/intechopen.75534.
- Nataraja K, Nontachaiyapoom S, O’Brien M, Penkhrue W, Phukhamsakda C, Ramanan US, Rathnayaka A, Sadaba R, Sandargo B, Samarakoon B, Tennakoon D, Siva R, Sriprom W, Suryanarayanan TS, Sujarit K, Suwannarach N, Suwunwong T, Thongbai B, Thongklang N, Wei D, Wijesinghe SN, Winiski J, Yan J, Yasanthika E, Stadler M (2019) The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. Fungal Diversity 97 (1): 1-136. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00430-9>
- Naz, S., et al. (2019). Moderating and mediating role of renewable energy consumption, FDI inflows, and economic growth on carbon dioxide emissions: evidence from robust least square estimator. Environ. Sci. Pollut. Control Ser. 26 (3), 2806–2819.

- Nerurkar M, Manasi J, Sujata P, Ravindra A. Application of lipase from marine bacteria *Bacillus sonorensis* as an additive in detergent formulation. *J Surfactant Deterg.* 2013;16(3):435–443.
- Neves R., Klein B., da Silva R., Rezende, M., Funke A., Olivarez E., Bonomi A., Maciel, R. (2020). A vision on biomass-to-liquids (BTL) thermochemical routes in integrated sugarcane biorefineries for biojet fuel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 119, 109607. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109607>
- Niyonzima F (2020) Detergent-compatible fungal cellulases. *Folia Microbiologica* 66 (1): 25-40. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00838-w>
- OCDE/FAO (2023), “Biocombustibles”, en OCDE-FAO *Perspectivas Agrícolas 2023-2032*, OECD Publishing, París.
- Oladipo OG, Awotoye OO, Olayinka A, Bezuidenhout CC, Maboeta MS. Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites. *Braz J Microbiol.* 2018 Jan-Mar;49(1):29-37. doi: 10.1016/j.bjm.2017.06.003. Epub 2017 Aug 8. PMID: 28844883; PMCID: PMC5790576.
- Oliveira, F., Moreira, C., Salgado, J. M., Abrunhosa, L., Venâncio, A., and Belo, I. (2016). Olive pomace valorization by *Aspergillus* species: Lipase production using solid-state fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 96, 3583–3589. doi: 10.1002/jsfa.7544
- Olson B. H. and Johnson M. J. (1948) “Factors producing high yeast yields in synthetic media”. *Journal of Bacteriology*, vol. 57, no. 3, pp. 235–246.
- Onifade ST, Erdoğan S, Alola AA. The role of alternative energy and globalization in decarbonization prospects of the oil-producing African economies. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2023 Apr;30(20):58128-58141. doi: 10.1007/s11356-023-26581-6. Epub 2023 Mar 28. PMID: 36977876; PMCID: PMC10163144.
- Ordoñez BM, Chaves LC, Rodríguez-Pérez W, Murcia MA, et al. (2013) Characterization of biodiesel obtained from waste cooking oil. *Revista Colombiana de Biotecnología* 15 (0123-3475): 61-70. URL: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v15n1/v15n1a7.pdf>
- Orjuela A, Clark J (2020) Green chemicals from used cooking oils: Trends, challenges, and opportunities. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 26 <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.100369>
- Ortiz Tapia, María del Consuelo, García Alamilla, Pedro, Lagunes Gálvez, Laura Mercedes, Arregoitia Quezada, María Isabel, García Alamilla, Ricardo, & León Chávez, María Alejandra. (2016). Obtención de biodiesel a partir de aceite crudo de palma (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Aplicación del método de ruta ascendente.* *Acta universitaria*, 26(5), 3-10. <https://doi.org/10.15174/au.2016.910>
- Pacheco SMV, Júnior AC, Morgado AF, Júnior AF, Amadi OC, Guisán JM, Pessela B (2015). “Isolation and screening of filamentous fungi producing extracellular

- lipase with potential in biodiesel production”. *Advances in Enzyme Research*, vol. 03, no. 04, pp. 101–114, 2015. <http://dx.doi.org/10.4236/aer.2015.34011>.
- Papanikolaou S, Dimou A, Fakas S, Diamantopoulou P, Philippoussis A, Galiotou-Panayotou M, Aggelis G, et al. (2011) Biotechnological conversion of waste cooking olive oil into lipid-rich biomass using *Aspergillus* and *Penicillium* strains. *Journal of Applied Microbiology* 110 (5): 1138-1150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04961.x>
 - Pastore, G.M., Costa, V.S.R. and Koblitz, M.G.B. (2003) “Production, Partial Purification and Biochemical Characterization of a Novell *Rhizopus sp.* Strain Lipase”. *Food Science and Technology*, 23, 135-140. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612003000200006>.
 - Pásztor, A. (2015) "Advanced biofuel production: Engineering metabolic pathways for butanol and propane biosynthesis". Ph. D. Thesis, University of Turku.
 - Patel A, Divecha J, Shah A, et al. (2021) *Fomitopsis meliae* CFA 2, a novel brown rot for endoglucanase: emphasis towards enhanced endoglucanase production by statistical approach. *Mycology* 12 (4): 325-340. <https://doi.org/10.1080/21501203.2021.1918277> PMID: 34900384; PMCID: PMC8654404
 - Patel G. B., Shah K. R. (2020). Isolation, screening and identification of Lipase producing fungi from cotton seed soapstock. *Indian J. Sci. Technol.* 13, 3762–3771. [10.17485/IJST/v13i36.1099](https://doi.org/10.17485/IJST/v13i36.1099)
 - Patinha C, Corrado S, Sala S, et al. (2017) Food waste accounting - Methodologies, challenges and opportunities. Publications Office of the European Union. <https://doi.org/10.2760/54845>
 - Pera L. M., Romero C. M, Baigori M. D., and Castro G. R. (2006) “Catalytic properties of lipase extracts from *Aspergillus niger*”. *Food Technology and Biotechnology*, vol. 44, no. 2, pp. 247–252. <http://hdl.handle.net/11336/45883>.
 - Peraza-Jiménez K, De la Rosa-García S, Huijara-Vasconcelos JJ, Reyes-Estebanez M, Gómez-Cornelio S (2021) Enzymatic bioprospecting of fungi isolated from a Tropical Rainforest in Mexico. *Journal of Fungi* 8 (1). <https://doi.org/10.3390/jof8010022>
 - Perea A., García A., Novas N., Manzano F. (2017). Rooftop analysis for solar flat plate collector assessment to achieving sustainability energy. *J. Clean Prod.* p148, 545–554.
 - Perea A., Perea M., Dorado M., Manzano F. (2018) Mango stone properties as biofuel and its potential for reducing CO2 emissions. *J. Clean Prod.* , 190, 53–62.
 - Perea A., Perea M., Hernandez Q., Manzano F. (2017). Towards forest sustainability in Mediterranean Countries using biomass as fuel for heating. *J. Clean Prod.*, 156, 624–634.
 - Perea M., Samerón E., and Perea A. (2019). Biomass as Renewable Energy: Worldwide Research Trends. *Sustainability*, 11 (3): 863.

- Petrovic S. E., Skrinjar M., Becarevic A., Vujicic I. F., and Banka L., “Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis,” *Biotechnology Letters*, vol. 12, no. 4, pp. 299–304, 1990.
- Pinotsis N, Krüger A, Tomas N, Chatziefthymiou SD, Litz C, Mortensen SA, Daffé M, Marrakchi H, Antranikian G, Wilmanns M. Discovery of a non-canonical prototype long-chain monoacylglycerol lipase through a structure-based endogenous reaction intermediate complex. *Nat Commun*. 2023 Nov 27;14(1):7649. doi: 10.1038/s41467-023-43354-4. PMID: 38012138; PMCID: PMC10682391.
- Polanco-Florián LG, Alvarado-Gómez OG, Olivares-Sáenz E, González-Garza R, Pérez-González O (2020) Control biológico de *Lasiodiplodia theobromae* y *Fomitopsis meliae* causantes de la muerte regresiva de los cítricos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11 (5): 1069-1081. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i5.2272>
- Polo L., Fontalvo M., Mendoza D.L. (2018) “Biodiesel production by enzymatic transesterification of oil extracted from food industrial waste”, *Prospectiva*, Vol 16, N° 1, 26-33, 2018. <http://dx.doi.org/10.15665/rp.v16i1.1164>.
- Powers-Fletcher M, Kendall B, Griffin A, Hanson K (2016) Filamentous fungi. *Microbiology Spectrum* 4 (3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.dmiH2-0002-2015>
- Priyanka, P., Kinsella, G., Henehan, G. T., and Ryan, B. J. (2019). Isolation, purification and characterization of a novel solvent stable lipase from *Pseudomonas reinekei*. *Protein Expr. Purif.* 153, 121–130. doi: 10.1016/j.pep.2018.08.007
- Puente, Y.; Marcano, J.; Quevedo, Y.; Martinez, H.; Salinas, N. (2016) “Obtención de biocombustible vía catálisis enzimática a partir de aceites de desecho provenientes de frituras en profundidad”. *Revista INGENIERÍA UC*. Vol. 23, núm. 2, agosto, 2016, pp. 186-196. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=70746634008>.
- Raeder U, Broda P, et al. (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1 (1): 17-20. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1985.tb01479.x>
- Rahman F.A., et al. (2017). Pollution to solution: capture and sequestration of carbon dioxide (CO₂) and its utilization as a renewable energy source for a sustainable future. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 71, 112–126.
- Rahman M.M., Kashem M.A. (2017). Carbon emissions, energy consumption and industrial growth in Bangladesh: empirical evidence from ARDL cointegration and Granger causality analysis. *Energy Pol.* 110, 600–608.
- Ramos-Sanchez L.B., Cujilema-Quitio M.C., Julian-Ricardo M.C., Cordova J., Fickers P. (2015) Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. *J Bioprocess Biotech* 5: 203 doi:10.4172/2155-9821.1000203

- Rathi P, Saxena RK, Gupta R. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochem.* 2001;37(2):187–192.
- Ratledge, C. y Cohen, Z. "microbial and algal oils: do they have a future for biodiesel or as commodity oils". *Lipid techn.* 2008, vol. 20, p. 155–160.
- Reddy K., Reddy C., Nadagouda M., Shetti, N., Jaesool, S., Aminabhavi, T. (2019). Polymeric graphitic carbon nitride (g-C₃N₄)-based semiconducting nanostructured materials: synthesis methods, properties and photocatalytic applications. *J. Environ. Manag.* 238, 25–40. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.075>.
- REN21, 2019. Renewables 2019: Global Status Report. REN21, the Renewable Energy Policy Network for the 21st Century [WWW Document]. URL. http://www.ren21.net/wp-content/uploads/2019/05/gsr_2019_full_report_en.pdf
- Richards T, Talbot N (2018) Osmotrophy. *Current Biology* 28 (20). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.069>
- Robinson PK. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* 2015; 59:1-41. doi: 10.1042/bse0590001. Erratum in: *Essays Biochem.* 2015; 59:75. PMID: 26504249; PMCID: PMC4692135.
- Rocha K. S., Queiroz M. S., Gomes B. S., Dallago R., de Souza R. O., Guimarães D. O., et al. (2020). Lipases of endophytic fungi *Stemphylium lycopersici* and *Sordaria sp.*: Application in the synthesis of solketal derived Monoacylglycerols. *Enzyme Microb. Technol.* 142, 109664. [10.1016/j.enzmictec.2020.109664](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109664)
- Rodrigues J, Perrier V, Lecomte J, Dubreucq E, Ferreira-Dias S. (2016) Biodiesel production from crude *jatropha* oil catalyzed by immobilized lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* in aqueous medium. *Bioresour Technol.* 2016 Oct; 218:1224-9. doi: 10.1016/j.biortech.2016.07.090. Epub 2016 Jul 25. PMID: 27474957.
- Rodrigues, J.G.C.; Cardoso, F.V.; Santos, C.C.d.; Matias, R.R.; Machado, N.T.; Duvoisin Junior, S.; Albuquerque, P.M. (2023) Biocatalyzed Transesterification of Waste Cooking Oil for Biodiesel Production Using Lipase from the Amazonian Fungus *Endomelanconiopsis endophytica*. *Energies* 2023, 16, 6937. <https://doi.org/10.3390/en16196937>
- Rodríguez-Alonso G, Toledo-Marcos J, Serrano-Aguirre L, Rumayor C, Pasero B, Flores A, Saborido A, Hoyos P, Hernáiz MJ, de la Mata I, Arroyo M. A (2023) Novel Lipase from *Streptomyces exfoliatus* DSMZ 41693 for Biotechnological Applications. *Int J Mol Sci.* 2023 Dec 2;24(23):17071. doi: 10.3390/ijms242317071. PMID: 38069394; PMCID: PMC10707221.
- Rosset M., Perez-Lopez O.W. FTIR spectroscopy analysis for monitoring biodiesel production by heterogeneous catalyst. *Vib. Spectrosc.* 2019; 105:102990. doi: 10.1016/j.vibspec.2019.102990.

- Rrcm A., Vo B., Bm C., Tndr A., Jcsds D., and Ara, E. (2020). Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. *Catal. Today* 362, 141–154.
- Sajjad N, Orfali R, Perveen S, Rehman S, Sultan A, Akhtar T, Nazir A, Muhammad G, Mehmood T, Ghaffar S, Al-Taweel A, Jilani MI, Iqbal M. Biodiesel Production from Alkali-Catalyzed Transesterification of *Tamarindus indica* Seed Oil and Optimization of Process Conditions. *Molecules*. 2022 May 18;27(10):3230. doi: 10.3390/molecules27103230. PMID: 35630710; PMCID: PMC9148013.
- Salihu A., Alam M. Z., AbdulKarim M. I., and Salleh H. M., “Suitability of using palm oil mill effluent as a medium for lipase production,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 11, pp. 2044–2052, 2011.
- Sanusi I., Faloye F., Gueguim E. (2019). Impact of various metallic oxide nanoparticles on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* BY4743: screening, kinetic study and validation on potato waste. *Catal. Lett.* 149, 2015–2031. <https://doi.org/10.1007/s10562-019-02796-6>.
- Saranya, G., and Ramachandra, T. V. (2020). Novel biocatalyst for optimal biodiesel production from diatoms. *Renew. Energ.* 153, 919–934. doi: 10.1016/j.renene.2020.02.053
- Sarmah N., Revathi D., Sheelu G., Yamuna Rani K., Sridhar S., Mehtab V., et al. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnol. Prog.* 34, 5–28.
- Sepasgozar S.M., Blair J. (2021). Measuring non-road diesel emissions in the construction industry: a synopsis of the literature. *Int. J. Construct. Manag.* 21 (6), 582–597.
- Serrano-R. J. (2020). Biomass: A Renewable Source of Fuels, Chemicals and Carbon Materials. *Molecules*, 25, 5217.
- Shaari M.S., et al. (2020). The effects of energy consumption and national output on CO₂ emissions: new evidence from OIC countries using a panel ARDL analysis. *Sustainability* 12 (8), 3312.
- Shabbir A. R. O. O. S. H., Mukhtar H. (2018). Optimization process for enhanced extracellular lipases production from a new isolate of *Aspergillus terreus* ah-F2. *Pak. J. Bot.* 50, 1571–1578.
- Shahsavari A., Akbari M., (2018). Potential of solar energy in developing countries for reducing energy-related emissions. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 90, 275–291.
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. (2001). Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol Adv.* 19(8): 627-662.
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv.* 2001 Dec;19(8):627-62. doi: 10.1016/s0734-9750(01)00086-6. PMID: 14550014.
- Sharma R.K., O’Neill C.A., Ramos H.A.R., Thapa B., Barcelo V., Gaur K., et al. (2019). *Candida rugosa* lipase nanoparticles as robust catalyst for biodiesel

- production in organic solvents. *Biofuel Res. J.* <https://doi.org/10.18331/BRJ2019.6.3.3>.
- Sharma S., Basu S., Shetti N.P., Aminabhavi T.M. (2020). Waste-to-energy nexus for circular economy and environmental protection: recent trends in hydrogen energy. *Sci. Total Environ.* 713, 136633. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136633>.
 - Shekofteh M., Gundoshmian T.M., Jahanbakhshi A., Heidari A. (2020). Performance and emission characteristics of a diesel engine fueled with functionalized multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs-OH) and diesel–biodiesel–bioethanol blends. *Energy Rep.* 6, 1438–1447. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2020.05.025>.
 - Singh, D., Sharma, D., Soni, S. L., Inda, C. S., Sharma, S., Sharma, P. K., & Jhalani, A. (2021). A comprehensive review of biodiesel production from waste cooking oil and its use as fuel in compression ignition engines: 3rd generation cleaner feedstock. *Journal of Cleaner Production*, 307(127299), 127299. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127299>.
 - Shin S., Lim, Koh, H., Kim, E., Kang N., Jeon S., Kwon S, Shin W, Lee B., Hwangbo K., Kim J., Ye S., Yun J., Seo H., Oh H, Kim K., Kim J., Jeong W, Chang Y., Jeong B. (2016). CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Rep.* 6, 27810. <https://doi.org/10.1038/srep27810>.
 - Siddiqui S (2016) Protein Production. New and future developments in microbial Biotechnology and Bioengineering 257-266. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63505-1.00024-5>
 - Sindhu R., Binod P., Pandey A., Ankaram S., Duan Y., Awasthi M. (2019). Biofuel Production from Biomass, Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64083-3.00005-1>.
 - Singh A. K. and Mukhopadhyay M. (2012). Overview of fungal lipase: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 166, no. 2, pp. 486–520, 2012.
 - Singh AK, Bilal M, Iqbal HN, Meyer A, Raj A (2021) Bioremediation of lignin derivatives and phenolics in wastewater with lignin modifying enzymes: Status, opportunities and challenges. *Science of The Total Environment* 777 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145988>
 - Singh R., Arora A, Singh V. (2021). Biodiesel from oil produced in vegetative tissues of biomass—A review. *Biores. Technol.*, 326, p. 124772, [10.1016/j.biortech.2021.124772](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124772)
 - Sipra A., Gao N., Sarwar H. (2018). Municipal solid waste (MSW) pyrolysis for bio-fuel production: a review of effects of MSW components and catalysts. *Fuel Process. Technol.* 175, 131–147. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2018.02.012>

- Sivamani S., Baskar R., Chandrasekaran A.P. (2020). Response surface optimization of acid pretreatment of cassava stem for bioethanol production. *Environ. Prog. Sustain. Energy* 39. <https://doi.org/10.1002/ep.13335>.
- Soleymani S, Alizadeh H, Mohammadian H, Rabbani E, Moazen F, MirMohammad Sadeghi H, Shariat ZS, Etemadifar Z, Rabbani M. Efficient Media for High Lipase Production: One Variable at a Time Approach. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2017 Apr-Jun;9(2):82-86. PMID: 28496947; PMCID: PMC5410133.
- Srivastava R.K., Shetti N.P., Reddy K.R., Aminabhavi T.M. (2020b). Biofuels, biodiesel and biohydrogen production using bioprocesses. A review. *Environ. Chem. Lett.* <https://doi.org/10.1007/s10311-020-00999-7>.
- Srivastava R.K., Shetti N.P., Reddy K.R., Aminabhavi, T.M. (2020a). Sustainable energy from waste organic matters via efficient microbial processes. *Sci. Total Environ.* 722, 137927. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137927>.
- Srivastava R.K., Shetti N.P., Reddy K.R., Aminabhavi, T.M. (2020c). Biofuels, biodiesel and biohydrogen production using bioprocesses. A review. *Environ. Chem. Lett.* <https://doi.org/10.1007/s10311-020-00999-7>.
- Su X, Schmitz G, Zhang M, Mackie RI, Cann IKO, et al. (2012) Heterologous gene expression in filamentous fungi. *Advances in Applied Microbiology* 81: 1-61. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394382-8.00001-0>
- Sudeep K, Jitendra U, Raj JD, Binod L, Dhiraj KC, Bhoj RP, Tirtha RB, Rajiv D, Santosh K, Niranjana K, Vijaya R, et al. (2020) Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains. *Fermentation* 6 (2): 1-10. <https://doi.org/10.3390/fermentation6020059>
- Swami T, Pannu S, Kumar M, Gupta G. Chronic invasive fungal rhinosinusitis by *Paecilomyces variotii*: A rare case report. *Indian J Med Microbiol.* 2016 Jan-Mar;34(1):103-6. doi: 10.4103/0255-0857.174126. PMID: 26776131.
- Syedd-León R, Solano-Campos F, Campos-Rodríguez J, Pereira-Arce D, Villegas-Peñaranda LR, Sandoval-Barrantes M (2022) Fungal extracellular lipases from coffee plantation environments for the sustainable management of agro-industrial coffee biomass. *Biomass* 2 (2): 62-79. <https://doi.org/10.3390/biomass2020005>
- Tabatabaei, M., Karimi, K., Horvatáh, I. S., & Kumar, R. (2015). Recent trends in biodiesel production. *Biofuel Research Journal*, 258-267.
- Tacias Pascacio V.G.; Torrestiana Sánchez B.; Rosales-Quintero A. (2016) "Evaluación y caracterización de grasa y aceites residuales de cocina para la producción de biodiesel: un caso de estudio". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.* Vol. 32(3), 303-313.
- Talavari R., Hosseini S., and Moradi G. R. (2020). Low-cost biodiesel production using waste oil and catalyst. *Waste Manag. Res.* 39, 250–259. doi: 10.1177/0734242X20935174.

- Talha N.S. and Sulaiman S. (2016). Overview of catalysts in biodiesel production. ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences 11: 439–448.
- Talukdar D, Jasrotia T, Umar A, Kumar R, Kumar R, Alkhanjaf A, Ibrahim A, Mukherjee TK, Jaswal VS, Akhtar MS (2022) Mechanistic and analytical understanding of biological immobilization of chromium metal ions from waste-sites. Journal of Environmental Chemical Engineering 10 (3). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107498>
- Talukder M, J.C. WU, T.B. Nguyen, Ng. Fen, “Novozyme 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil comparison of metanalysis methods”, J Mol Catal B-Enzym. (60), 106-112. 2009.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular Biology and Evolution 38 (7): 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tasic, S., & Miladinovic, N. (2007). Cladosporium spp. – cause of opportunistic mycoses. Acta Facultatis Meicae Naissensis, 24(1), 15-19.
- Téllez Vargas J, Rodríguez-Monroy M, López Meyer M, Montes-Belmont R, Sepúlveda- Jiménez G (2017) *Trichoderma asperellum* ameliorates phytotoxic effects of copper in onion (*Allium cepa* L.). Environmental and Experimental Botany 136: 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.01.009>
- Tel-zur N, Abbo S, Myslabodski D, Mizrahi Y, et al. (1999) Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). Plant Molecular Biology Reporter 17 (3): 249-254. <https://doi.org/10.1023/a:1007656315275>
- Thakur S. 2012. Lipases, its sources, properties and applications: A Review. Int J Sci Eng Res. 3(7): 1-29.
- Toida, J., Kondoh, K., Fukuzawa, M., Ohnishi, K., and Sekoguchi, J. (1995). Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59, 1199–1203. doi: 10.1271/bbb.59.1199
- Tomazzoni G, Meira M, Quintella C, Zagonel GF, Costa BJ, de Oliveira PR, Pepe IM, da Costa Neto PR (2013) Identification of vegetable oil or biodiesel added to diesel Using fluorescence spectroscopy and principal component analysis. Journal of the American Oil Chemists' Society 91 (2): 215-227. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2354-5>
- Totani N, Tateishi S, Chiue H, Mori T (2012) Color and chemical properties of oil used for deep frying on a large scale. Journal of Oleo Science 61 (3): 121-126. <https://doi.org/10.5650/jos.61.121>
- Tran N., Ong L. and Ju Y. (2019). Biodiesel production from waste oils. In: Pandey A, Larroche C, Dussap C-G, et al. (eds) Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels. Cambridge, MA: Elsevier, 575–600.

- Treichel H., de Oliveira D., Mazutti MA, Di Luccio M., Oliveira JV (2010). Una revisión sobre la producción de lipasas microbianas. *Bioprosesamiento alimentario. Tecnología.* 3, 182-196. [10.1007/s11947-009-0202-2](https://doi.org/10.1007/s11947-009-0202-2)
- Trifinopoulos J, Nguyen L, von Haeseler A, Minh BQ, et al. (2016) W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research* 44:w-232-w-235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>
- Trifinopoulos J, Nguyen L, von Haeseler A, Minh BQ, et al. (2016) W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research* 44: w-232-w-235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>
- Ulker S., Ozel A., Colak A., Karaoglu A. S., and Karaoğlu A. S. (2011) "Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil". *Turkish Journal of Biology*, vol. v. 35, pp. 543–550.
- Vasudevan, P.T. y Briggs, M. "biodiesel production-current state of the art and challenges". *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008, vol. 35, p. 421–430.
- Vogt ETC, Weckhuysen BM. The refinery of the future. *Nature.* 2024 May;629(8011):295-306. doi: 10.1038/s41586-024-07322-2. Epub 2024 May 8. PMID: 38720037.
- Welsby D., P. J. (2021). Unextractable fossil fuels in a 1.5 °C world. *Nature*, Vol 597 p230-234.
- Westensee D.K., Rumbold K., Harding K.G., Sheridan C.M., van Dyk L.D., Simate G.S., Postma F. (2018). The availability of second-generation feedstocks for the treatment of acid mine drainage and to improve South Africa's bio-based economy. *Sci. Total Environ.* 637, 132–136. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.410>, 638.
- Yao W., Liu K., Liu H., Jiang Y., Wang R., Wang W. and Wang T. (2021). A Valuable Product of Microbial Cell Factories: Microbial Lipase. *Front. Microbiol.* 12: 743377. doi: 10.3389/fmicb.2021.743377
- Zeraik, A.E., Souza, F.S., Fatibello-Filho, O. and Leite, O.D. (2008) "Desenvolvimento de um Spot Test para Monitoramento da Atividade da Peroxidase em um Procedimento de Purificação". *Química Nova*, 31, 731-734. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000400003>.
- Zhang M., Yu X. W., Xu Y., Guo R. T., Swapna G., Szyperski T., Hunt J. F., & Montelione, G. T. (2019). Structural Basis by Which the N-Terminal Polypeptide Segment of *Rhizopus chinensis* Lipase Regulates Its Substrate Binding Affinity. *Biochemistry*, 58(38), 3943–3954. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00462>
- Zheng Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. 2000. "A greedy algorithm for aligning DNA sequences". *J Comput Biol* 7:203-14.
- Zininga J., Kumar A. P., Govender A., Singh S., Permaul K. (2019) "Concomitant production of chitosan and lipids from a newly isolated *Mucor circinelloides* ZSKP for biodiesel production". *Bioresource Technology*. PII: S0960-8524(18)31458-5. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.035>.