

Enzimas como Alternativa Biotecnológica en la Síntesis del Biodiesel: revisión sistemática

Luis Carlos Cuello Díaz

Universidad Nacional Abierta y a Distancia

Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería

Programa de Maestría en Biotecnología Alimentaria.

Bogotá, Colombia

2023

Enzimas como Alternativa Biotecnológica en la Síntesis del Biodiesel: revisión sistemática

Luis Carlos Cuello Díaz

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:

Magister en Biotecnología Alimentaria.

Modalidad

Monografía

Director (a):

Juan Camilo Mendoza Combat

Universidad Nacional Abierta y a Distancia

Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería

Programa de Maestría en Biotecnología Alimentaria.

Bogotá, Colombia

2023

Declaración de Derechos de Propiedad Intelectual

El autor de la presente propuesta manifiesta que conoce el contenido del Acuerdo 06 de 2008, Estatuto de Propiedad Intelectual de la UNAD, Artículo 39 referente a la cesión voluntaria y libre de los derechos de propiedad intelectual de los productos generados a partir de la presente propuesta. Asimismo, conozco el contenido del Artículo 40 del mismo Acuerdo, relacionado con la autorización de uso del trabajo para fines de consulta y mención en los catálogos bibliográficos de la UNAD.

Agradecimientos

A DIOS.

Gracias por mi salud después de tantos tropiezos culminar este proyecto, asimismo fuerzas y no caer en las adversidades presentadas.

A MI ESPOSA E HIJAS: María Francisca Conchacala y (Adriana y Lorena - Hijas)

A mi esposa María e hijas gracias especiales por su apoyo incondicional que realmente me dieron el coraje en los momentos más difíciles, pude sacar adelante este nuevo proyecto educativo.

Y AMIGA: Dra. Tatiana Marcela Díaz Oñate por su apoyo, disposición y tiempo para compartir sus conocimientos durante la realización de este proyecto.

Muy especialmente agradezco al Ingeniero. Juan Camilo Mendoza Combat, por haberme guiado en el transcurso de este proyecto gracias a sus conocimientos, consejos y correcciones hoy puedo culminar este proyecto de investigación.

De la misma forma, agradezco a todos los tutores que me brindaron sus conocimientos y apoyo para sacar adelante todos los cursos brindados por la universitaria.

Y, por último, agradezco al INFOTEP (Instituto Nacional de Formación Técnica Profesional) de San Juan del Cesar la Guajira, por haberme brindado todo su apoyo económico para poder estudiar la Maestría en Biotecnología Alimentaria.

*La vida no es fácil, para ninguno de nosotros.
Pero... ¡Que importa! Hay que perseverar y, sobre todo,
tener confianza en uno mismo.*

Marie Curie.

Resumen

En un mundo cada vez más consciente de la necesidad de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y disminuir la dependencia de los combustibles fósiles, el uso de biodiesel como combustible renovable ha adquirido una relevancia inigualable. El biodiesel, derivado de fuentes renovables como aceites vegetales y grasas animales, representa una alternativa prometedora a los combustibles fósiles, ya que puede reducir significativamente las emisiones de dióxido de carbono y contribuir a la mitigación del cambio climático.

Sin embargo, la síntesis de biodiesel no está exenta de desafíos. La obtención eficiente de biodiesel implica la reacción de transesterificación, que generalmente requiere el uso de catalizadores químicos, que pueden ser costosos y generar residuos perjudiciales para el medio ambiente. Aquí es donde entra en juego la investigación para encontrar alternativas más eficientes y sostenibles. Uno de los enfoques más prometedores es el uso de enzimas como catalizadores en el proceso de transesterificación. Las enzimas son biocatalizadores naturales que pueden acelerar la reacción de transesterificación de manera más selectiva y menos contaminante que los catalizadores químicos convencionales, abriendo así nuevas posibilidades para la producción de biodiesel de manera más sostenible y amigable con el medio ambiente. Esta innovación no solo reduce la dependencia de los combustibles fósiles, sino que también promueve un futuro energético más limpio y sostenible para las generaciones venideras. El objetivo general de este estudio consiste en llevar a cabo una revisión sistemática de la literatura científica en los últimos 5 años enfocada en el uso de enzimas en la síntesis del biodiesel. Para

alcanzar este propósito, se han establecido objetivos específicos que incluyen la identificación de las enzimas más comúnmente empleadas en la producción de biodiesel, la evaluación de las ventajas y desafíos asociados con la utilización de enzimas en comparación con los métodos convencionales, así como el análisis detallado de estudios de casos que ejemplifiquen la eficacia de las enzimas como catalizadores en el proceso de síntesis de biodiesel. Esta revisión se espera que arroje luz sobre el potencial y la viabilidad de las enzimas como una alternativa sostenible y eficiente en la producción de biodiesel, contribuyendo así al avance de la investigación en este campo y a la promoción de tecnologías más respetuosas con el medio ambiente en la industria del transporte y la energía. La metodología empleada en la elaboración de esta monografía se basó en la recopilación de información procedente de fuentes y bases de datos ampliamente reconocidas en el ámbito científico, tales como SciElo, Dialnet, Google Académico y Scopus. El enfoque de investigación adoptado se centró en llevar a cabo una revisión sistemática de la literatura, lo que implicó una exhaustiva búsqueda y selección de artículos científicos y estudios pertinentes en las mencionadas bases de datos académicas. Posteriormente, se llevó a cabo una rigurosa evaluación crítica de la calidad y relevancia de los estudios seleccionados, garantizando así la solidez y confiabilidad de la información recopilada en esta monografía. En general, las enzimas lipolíticas se pueden dividir en dos categorías principales: las lipasas y las esterasas o carboxilesterasas. Enzimas en la Síntesis de Biodiesel: Las lipasas tienen una especialización en acilgliceroles grasos de cadena larga (>10 carbonos), utilizando la trioleína como sustrato de referencia. Por otro lado, las esterasas se enfocan en acilgliceroles de cadena corta (<10 átomos

de carbono) y otros ésteres simples, utilizando la tributirina como sustrato estándar; el proceso de producción de biodiesel a partir de aceites o grasas que contienen triglicéridos implica la reacción catalítica de estos compuestos con un alcohol alifático de cadena corta bajo condiciones específicas. Esta reacción da como resultado la formación de biodiesel, que son ésteres alquílicos de los ácidos grasos unidos a la estructura del triglicérido, junto con el subproducto glicerol, que previamente formaba parte de la estructura del aceite o grasa original. La obtención de biodiesel mediante la utilización de enzimas presenta ventajas notables, como la selectividad enzimática que garantiza una mayor precisión en la síntesis. Además, se lleva a cabo a través de condiciones de reacción más suaves, lo que se traduce en un menor consumo de energía y una reducción significativa de subproductos no deseados. Sin embargo, no se pueden pasar por alto los desafíos que conlleva este proceso, tales como los costos de producción que pueden ser elevados, la necesidad de abordar la estabilidad y reusabilidad de las enzimas, así como la adaptación a diferentes materias primas, aspectos que requieren atención y desarrollo continuo en la búsqueda de una producción de biodiesel más eficiente y sostenible. Resultados: Los estudios encontrados exploran diferentes enfoques para la producción de biodiesel utilizando enzimas como catalizadores. En el primer estudio, se destaca la enzima BTL2, producida recombinantemente a partir de *Bacillus thuringiensis*, con un tamaño de 43 kDa; se resalta su alta resistencia a solventes y cambios térmicos, lo que la hace promisoría para la producción de biodiesel. El segundo estudio emplea un biocatalizador obtenido a través de fermentación de *Rhizomucor* en medio sólido para catalizar la transesterificación en hexano, este utiliza aceite de cocina

quemado y alcoholes de cadena corta como sustrato, y se analiza la síntesis de biodiesel mediante cromatografía en capa fina. Un tercer estudio aborda la extracción de aceite de *Aspergillus niger* y su posterior transformación en biodiesel utilizando una enzima extracelular (lipasa); se destaca la importancia de optimizar las condiciones de crecimiento del hongo. Por último, un cuarto estudio presenta un método de síntesis enzimática utilizando una enzima esterasa/lipasa inmovilizada en partículas magnéticas funcionalizadas. Esta inmovilización mejora el rendimiento del proceso y permite la reutilización del catalizador, lo que reduce significativamente los costos en ciclos consecutivos de reacción. En resumen, estos estudios exploran diferentes enzimas y métodos para la producción de biodiesel, destacando sus ventajas en términos de resistencia, rendimiento y eficiencia en la síntesis de este combustible renovable.

Palabras claves: Aceite residual, lipasas, hongos lipolíticos, bacterias lipolíticas, biodiesel.

Abstract

In a world increasingly aware of the need to reduce greenhouse gas emissions and decrease dependence on fossil fuels, the use of biodiesel as a renewable fuel has gained unparalleled relevance. Biodiesel, derived from renewable sources such as vegetable oils and animal fats, represents a promising alternative to fossil fuels, as it can significantly reduce carbon dioxide emissions and contribute to climate change mitigation.

However, biodiesel synthesis is not without its challenges. Efficiently obtaining biodiesel involves the transesterification reaction, which generally requires the use of chemical catalysts, which can be costly and generate environmentally harmful waste. This is where research comes in to find more efficient and sustainable alternatives. One of the most promising approaches is the use of enzymes as catalysts in the transesterification process. Enzymes are natural biocatalysts that can accelerate the transesterification reaction in a more selective and less polluting way than conventional chemical catalysts, thus opening up new possibilities for the production of biodiesel in a more sustainable and environmentally friendly way. This innovation not only reduces dependence on fossil fuels, but also promotes a cleaner and more sustainable energy future for generations to come. The overall objective of this study is to conduct a systematic review of the scientific literature in the last 5 years focused on the use of enzymes in biodiesel synthesis. To achieve this purpose, specific objectives have been established that include the identification of the enzymes most commonly employed in biodiesel production, the evaluation of the advantages and challenges associated with the use of enzymes compared to

conventional methods, as well as The detailed analysis of case studies that exemplify the effectiveness of enzymes as catalysts in the biodiesel synthesis process. This review is expected to shed light on the potential and feasibility of enzymes as a sustainable and efficient alternative in biodiesel production, thus contributing to the advancement of research in this field and the promotion of more environmentally friendly technologies in the transportation and energy industry. The methodology used in the preparation of this monograph was based on the collection of information from sources and databases widely recognized in the scientific field, such as Scielo, Dialnet, Google Scholar and Scopus. The research approach adopted focused on conducting a systematic literature review, which involved an exhaustive search and selection of relevant scientific articles and studies in the aforementioned academic databases. Subsequently, a rigorous critical evaluation of the quality and relevance of the selected studies was carried out, thus ensuring the soundness and reliability of the information compiled in this monograph. In general, lipolytic enzymes can be divided into two main categories: lipases and esterases or carboxylesterases. Enzymes in Biodiesel Synthesis: Lipases have a specialization in long-chain fatty acylglycerols (>10 carbons), using triolein as a reference substrate. On the other hand, esterases focus on short-chain acylglycerols (<10 carbon atoms) and other simple esters, using tributyrin as the standard substrate; the process of biodiesel production from oils or fats containing triglycerides involves the catalytic reaction of these compounds with a short-chain aliphatic alcohol under specific conditions. This reaction results in the formation of biodiesel,

which are alkyl esters of the fatty acids attached to the triglyceride structure, together with the by-product glycerol, which was previously part of the structure of the Original oil or fat. Obtaining biodiesel through the use of enzymes presents notable advantages, such as enzymatic selectivity that guarantees greater precision in the synthesis. In addition, it is carried out through milder reaction conditions, which translates into lower energy consumption and a significant reduction of unwanted by-products. However, the challenges involved in this process cannot be overlooked, such as production costs that can be high, the need to address enzyme stability and reusability, as well as adaptation to different feedstocks, aspects that require attention and continued development in the search for more efficient and sustainable biodiesel production. Results: The studies found explore different approaches for biodiesel production using enzymes as catalysts. The first study highlights the BTL2 enzyme, recombinantly produced from *Bacillus thuringiensis*, with a size of 43 kDa; its high resistance to solvents and thermal changes is highlighted, which makes it promising for biodiesel production. The second study employs a biocatalyst obtained through fermentation of *Rhizomucor* in solid medium to catalyze transesterification in hexane; it uses burned cooking oil and short-chain alcohols as substrate, and the biodiesel synthesis is analyzed by thin layer chromatography. A third study addresses the extraction of oil from *Aspergillus Niger* and its subsequent transformation into biodiesel using an extracellular enzyme (lipase); the importance of optimizing the growth conditions of the fungus is highlighted. Finally, a fourth study presents an enzymatic synthesis method using an esterase/lipase enzyme immobilized on functionalized magnetic particles. This

immobilization improves the yield of the process and allows the reuse of the catalyst, which significantly reduces costs in consecutive reaction cycles. In summary, these studies explore different enzymes and methods for biodiesel production, highlighting their advantages in terms of resistance, yield and efficiency in the synthesis of this renewable fuel.

Key words: Waste oil, lipases, lipolytic fungi, lipolytic bacteria, biodiesel.

Tabla de Contenido

Introducción	20
Planteamiento del problema	22
Justificación	24
Objetivos	26
Objetivo general:	26
Objetivos específicos:	26
Técnica de Búsqueda Bibliográfica	25
Capítulo 1	
El Aceite Vegetal	31
Aceite vegetal Usado (AVU)	31
Impactos Ambientales Aceite Vegetal Usado (AVU)	33
Las Lipasas	34
Fuentes de Lipasas	34
Biocatálisis	35
Enzimas Lipasas y los Microorganismos que las Producen	37
Enzimas Lipolíticas	38
Estructura de las Lipasas	39

	15
Reacciones Catalizadas por Lipasas	40
Aplicaciones Industriales de las Lipasas	42
Capítulo 2	
Enzimas y su Aplicabilidad Biotecnológica en la Síntesis del Biodiesel	47
Biocombustibles	53
El Biodiésel	53
Panorama Mundial del Biodiesel	57
Producción de biodiesel utilizando aceite de cocina usado	59
Materias Primas en la Obtención del Biodiesel	61
La Transesterificación	62
Normatividad de los Aceites Usados	68
Panorama Internacional	69
Normatividad Colombiana en Relación a Aceites Usados	70
Resultados Obtenidos y Análisis Estadístico	72
Análisis y Discusión de Resultados	85
Conclusiones y Recomendaciones	88
Referencias Bibliográficas	

Lista de figuras

Figura 1. Proceso de deterioro del aceite en el tiempo.

Figura 2. Aplicaciones industriales más habituales de las lipasas microbianas.

Figura 3. Obtención de Biocombustible a partir de Reacción Química.

Figura 4. Proceso catalítico de transesterificación en la producción de biodiesel a partir de aceites o grasas en reacción con un alcohol de cadena corta.

Figura 5. Reacción general de transesterificación de Triglicéridos.

Figura 6. Producción de Biodiesel a partir de Aceite de Cocina Usado.

Figura 7. Cantidad de documentos publicados en por los países o territorio base de datos SciElo ecuación 1.

Figura 8. Distribución de documentos en relación al área temática base de datos SciElo ecuación 1.

Figura 9. Distribución de cantidad de documentos en relación al rango de años desde 2018-2022 base de datos SciElo ecuación 1.

Figura 10. Cantidad de documentos publicados y los países o territorio base de datos SciElo ecuación 2.

Figura 11. Distribución de documentos en relación al área temática base de datos SciElo ecuación 2.

Figura 12. Distribución de cantidad de documentos en relación al rango de años desde 2018-2021 base de datos SciELO ecuación 3.

Figura 13. Distribución de documentos en relación al área temática base de datos SciELO

Figura 14. Cantidad de documentos publicados por países o territorio base de datos SciELO

Figura 15. Cantidad de documentos en el rango de años desde 2018-2022 base de datos Scopus

Figura 16. Cantidad de documentos por autor en el rango de años 2018-2022

Figura 17. Cantidad de documentos publicados en por los países o territorio base de datos Scopus

Figura 18. Distribución porcentual de documentos en relación al área temática

Lista de tablas

Tabla 1. Técnicas de utilización de lipasas	43
Tabla 2. Ejemplo de aplicabilidad de lipasas	45
Tabla 3. Comparación de métodos de producción de biodiesel	56
Tabla 4. Tipos de catalizadores empleados en la reacción de transesterificación	66
Tabla 5. Normatividad internacional sobre manejo de los AVUS	69

Lista de Símbolos y Abreviaturas

(B100): Gasoil verde

(FAAE): Ésteres de alquilo de ácidos grasos de cadena larga.

(GEI): Emisiones de gases de efecto invernadero

(GLP): Gas licuado de petróleo

(IICA): Instituto Americano de Cooperación para la Agricultura

(OPEP): Organización de Países Exportadores de Petróleo

(PNIR): Plan Nacional Integrado de Residuos

(UE): Unión Europea

AVU: Aceite vegetal usado

NADF012-AMBT-2015: Norma ambiental para el distrito federal

TPC: Compuestos totales polares

Introducción

Las grasas y los aceites no son reconocidos por los consumidores como alimentos, no tienen valor nutricional y solo los aprecian como un medio para calentarse. Por ejemplo, parte de la razón es que no brindan un tratamiento adecuado; el uso excesivo, el almacenamiento inadecuado, la alta temperatura y la disposición inadecuada de los desechos generados contaminan el medio ambiente porque cuando se vierten en el agua, quedan en la superficie y no permiten la oxidación, provocan una capa de aceite que bloquea el flujo de luminosidad, que genera daño en los ambientes acuáticos (Rojas, 2021).

Los diferentes ambientes de nuestro planeta despliegan exclusivas características ecológicas que crean el hábitat adecuado para diferentes clases microorganismos; estas especies microbianas son capaces de generar durante su proceso de alimentación la secreción de enzimas capaces de degradar los nutrientes del medio, dentro de las cuales están lipasas.

Las lipasas son capaces de hidrolizar triglicéridos a ácidos grasos y glicerol de cadenas largas de hasta 10 átomos de carbono. Algunas pueden ingresar en la catálisis de reacciones de transesterificación e hidrolisis, lo cual genera que las que sean aspirantes perfectas en diferentes aplicaciones industriales, además representan la 3^a clase de importancia, detrás de las carbohidrasas y proteasas (Fuentes, 2020).

Así mismo estas enzimas lipasas son alternativas prometedoras en la sustitución de la catálisis de tipo químico en la obtención de biodiesel. Particularmente, las fúngicas son las

manipuladas gracias a su bajo costo y buena estabilidad en el proceso (Sustaita-Rodríguez, 2019).

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de la monografía fue ejecutar una exploración bibliográfica de información, además del manejo y disposición de los AVU en Colombia, además cuales son las especies de microorganismos más utilizadas con actividad lipolítica en la síntesis del biodiesel.

Planteamiento del Problema

El Aceite de Cocina Usado (ACU) llamado también Aceite Vegetal Usado (AVU), son aceites que son producidos de forma continua o intermitente por empresas que elaboran productos alimenticios y que, durante su uso, son sometidos a procesos térmicos que modifican las propiedades del producto original. (Solar et al., 2018)

En el panorama ambiental actual, que ha crecido y se ha desarrollado, ahora es importante satisfacer las necesidades para equilibrar el medio ambiente, además para obtener recursos potenciales a partir de desechos o excedentes; Los recursos naturales renovables y no renovables forman la base para la producción de innumerables elementos de productos, una parte importante de los cuales se descarta y se denomina desperdicio. Uno de ellos es el aceite vegetal o grasa animal, que es imprescindible en las cocinas de la mayoría de los hogares y unidades económicas, para la fritura de alimentos, por lo que su consumo es continuo y también se generan residuos más contaminantes, pero si estos residuos se retiran para su aprovechamiento o en la producción de biocombustibles se reduce el impacto sobre el medio ambiente (Sánchez González et al., 2017).

Por consiguiente, es indispensable que las estrategias biotecnológicas puedan ser apoyadas en que las opciones para solucionar las problemáticas de estos desechos sean con el menor impacto ambiental y que del mismo modo se puedan conseguir beneficios alternos como el conocimiento de especies de microorganismos que faciliten la resolución de daños o en su defecto que potencien su mejora mientras se alimentan de sus componentes como sustrato.

Actualmente es habitual el emplear materias primas como los aceites en la elaboración de alimentos, unos muy apetecidos como las frituras (empanadas), estas son alimentos de muy buen sabor y bajo costo lo que hace que su producción cada vez sea más común tanto en los hogares como establecimientos de venta, esto a su vez trae consigo la utilización de gran cantidad de aceites vegetales para freír que al final y por temas de costos son repetidamente reusados y mal dispuestos o desechados de forma inadecuada.

En la búsqueda de alternativas de solución a problemáticas tan comunes como los aceites usados, surge el interés por conocer como los son microorganismos capaces de desarrollar enzimas lipolíticas, además como estos puedan ser utilizados por su actividad enzimática en la síntesis de lípidos, y que del mismo modo sirvan como una herramienta para la obtención de subproductos como el biodiesel o la degradación de estos productos de reuso y que después de ser utilizados tengan una disminución en el impacto al ecosistema del planeta. Esta realidad muestra a su vez como el ambiente natural brinda extensas posibilidades para aislar desconocidos microorganismos creadores de lipasas con propiedades novedosas al igual las lipasas microbianas están recibiendo mucha atención debido a su potencial aplicación biotecnológica.

Justificación

Los aceites comestibles son grasas que a pesar de no ser esenciales para la dieta humana proporcionan nutrientes, energía y rico sabor a los alimentos (Restrepo et al., 2018). Así mismo el aceite vegetal o las grasas de origen animal, son necesarios en las cocinas para sofreír alimentos, lo que hace su elevado y constante consumo en hogares y establecimientos; así mismo los residuos generados posterior a uso son cada vez más elevados, aunque si estos son destinados para la elaboración de combustibles biológicos se disminuirían las huellas negativas (Solar et al., 2018).

El tema de la contaminación por aceites vegetales usados es una problemática que muchos desconocen, por ende cada vez es más difícil de solucionar las acciones y problemas alternos de estos elementos, cuando no hacemos un buen uso de estos residuos alimenticios ya sea por desconocimiento o porque en los lugares donde se genera no se cuenta con un sistema de empresas recolectoras para su tratamiento, además se genera un ola de contaminación de forma abrupta debido a no tener conciencia del daño ocasionado.

Estudios realizados por (Moya et al., 2020), demostraron que los residuos de aceites usados contaminan mucha cantidad del agua ya que crean una capa gruesa y espesa que entorpece el paso de oxígeno. Con la intención de probar la capacidad y eficacia de biodegradación in vitro de RAUC utilizando hongos productores de lipasas dentro de los que se destacan 3 géneros (*Penicilium*, *Aspergillus* y *Amorphoteca*) procedentes de ambientes acuosos en la industria de palma.

Otro estudio que apoya este tipo de investigación es la planteada por (Pérez et al., 2021) seleccionar y aislar el género con mejor acción de sus enzimas al emplear aceite usado como única fuente de sustrato.

Por su parte (Guevara et al., 2018), menciona que las lipasas forman una opción prometedora para cambiar el empleo de elementos químicos al obtener biodiesel ya que son sintetizadas de hongos tienen un menor costo y más estables. En su investigación este autor muestra nuevas cepas fúngicas productoras de lipasas, asociadas a sitios contaminados con residuos del procesamiento de aceites vegetales.

Es importante y necesario la implementación de alternativas de solución amigables de gran impacto a la sociedad, al mismo tiempo que las personas sean protagonistas en un eslabón de la solución

Objetivos

Objetivo general:

Analizar los resultados de los estudios existentes en la literatura científica sobre el uso de enzimas como alternativa biotecnológica en la síntesis de biodiesel en los últimos 5 años.

Objetivos específicos:

Determinar las principales características de los aceites vegetales, aceites vegetales usados, su impacto como residuos generados en actividades alimentarias y su potencial uso como materia prima para la obtención de biodiesel.

Establecer las principales lipasas empleadas en la obtención del biodiesel, su forma de reacción, las enzimas utilizadas y que técnicas se emplean con ellas junto con los aceites usados para generar biodiesel.

Especificar las principales técnicas de obtención de biodiesel orientadas a establecer las normas tanto internacionales como nacionales reguladas para el manejo de estos residuos en los últimos 5 años.

Técnica de Búsqueda Bibliográfica

Para la realización de esta monografía, se tuvo en cuenta los siguientes elementos para lograr adaptar la información al tema general de investigación:

Alcance y objetivos: el enfoque de investigación adoptado para llevar a cabo este estudio se basa en una revisión sistemática de la literatura científica en los últimos 5 años en relación al uso de enzimas en la síntesis del biodiesel. Esta técnica de búsqueda se estructura en varias etapas clave que tienen como objetivo recopilar, evaluar y sintetizar la información relevante sobre el tema específico. La definición de los objetivos se centró en revisar literatura reciente sobre cuales, y como son usadas dichas enzimas, identificando tendencias, y evaluación de la eficacia de diferentes enzimas en comparación con componentes químicos empleados con mayor frecuencia en la industria.

Fuentes de información: se buscó recopilar información existente de varias fuentes y bases de datos, dentro de las bases de datos se seleccionaron, Scopus, Scielo, Dialnet y Google Académico. Por ello, las bases conceptuales sobre las que se estructuró el trabajo inician de libros, revistas científicas o trabajos realizados con la temática. Se consideraron y revisaron que los términos de búsqueda estuviesen presentes en títulos, resúmenes, palabras clave y, cuando el texto estuviera disponible, el texto completo de los documentos. Igualmente, en cada búsqueda se determinó que los artículos no tuviesen una antigüedad mayor a 6 años. El criterio para la selección de estas bases de datos fue su alcance de cobertura en disciplinas como bioquímica,

ambiental, ingeniera química. Los términos que se emplearon para el algoritmo de búsqueda incluyeron palabras clave en relación al tema, tales como: “aceite vegetal usado”, “microorganismos”, “biodiesel”, “lipasas”, “enzimas”, “transesterificación”, cada uno de estos términos fueron introducidos en los motores de búsqueda de las bases de datos en diferentes combinaciones usando operadores booleanos “AND, OR”.

Por otra parte, de la misma manera se realizó una búsqueda manual dentro de las referencias bibliográficas de los estudios incluidos para hallar, buscar y añadir artículos relevantes sin identificar previamente durante las búsquedas en base de datos. Por último, solo se seleccionaron aquellos que expongan datos sobre los temas de interés como producir enzimas lipasas para la degradación de ácidos grasos y su aplicabilidad biotecnológica en la síntesis del biodiesel, además que el año de publicación estuviese entre 2017- 2022.

Criterios de selección: para garantizar la calidad y relevancia de los estudios seleccionados, se establecieron criterios de inclusión y exclusión. Los criterios de inclusión fueron la fecha de publicación, el idioma, el tipo de estudio (por ejemplo, investigaciones originales y revisiones) y la relación directa con el tema de investigación (por ejemplo, estudios sobre la aplicación de enzimas en la síntesis de biodiesel). Los criterios de exclusión pueden referirse a estudios que no cumplan con los estándares de calidad, fecha y que no aportaron información relevante o que estén duplicados.

Incluir estudios recientes (últimos 5 años) y aquellos centrados en aplicaciones industriales.

Excluir estudios con metodologías deficientes o no relevantes para el enfoque.

Búsqueda exhaustiva y selección de artículos científicos: el proceso comienza con una búsqueda exhaustiva en diversas bases de datos académicas, como Scielo, Dialnet, Google Académico y Scopus, entre otras fuentes fiables. Estas bases de datos albergan una amplia gama de publicaciones científicas y estudios relacionados con el tema de interés, en este caso, el uso de enzimas en la síntesis del biodiesel. Durante esta etapa, se aplicaron palabras clave y criterios de búsqueda específicos para identificar estudios relevantes. Se procedió a la descargar un conjunto de 73 artículos, en los cuales se llevó a cabo una revisión exhaustiva de diversos componentes, incluyendo, pero no limitándose al título, el resumen, los resultados y las conclusiones. Los elementos pertinentes a los resultados y las conclusiones fueron cuidadosamente extraídos de cada artículo y documentados de manera sistemática, con el objetivo de lograr resultados coherentes y alineados con los objetivos estipulados en la metodología del estudio.

Evaluación de la Calidad de la Evidencia: para la evaluación crítica de la calidad se tuvo en cuenta cuando una vez recopilados los estudios potencialmente relevantes, después se llevó a cabo una evaluación crítica de su calidad metodológica. Esto implicó analizar la rigurosidad de la investigación, la validez de los resultados y la confiabilidad de los datos presentados. Para ello se utilizó criterios específicos para determinar la calidad de cada estudio, lo que incluyó la revisión de la metodología, el tamaño de la muestra, el análisis estadístico y la solidez de las conclusiones.

Síntesis y análisis de los resultados: después de la evaluación crítica, los estudios de alta calidad se seleccionaron para su inclusión en la revisión sistemática. A continuación, se procedió a sintetizar y analizar los resultados de estos estudios de manera coherente y lógica. Esto implicó la identificación de tendencias, patrones o inconsistencias en la literatura científica relacionada con el uso de enzimas en la síntesis del biodiesel. Así mismo dicha información se desglosó en secciones lógicas apoyada en una redacción clara y coherente.

Capítulo 1

El Aceite Vegetal

Es una sustancia tipo oleosa que, debido a los ácidos grasos presentes de su constitución, proviene de frutos que están en ciertas clases de semillas, lo cual le otorga propiedades orgánicas como fitosteroles, beta carotenos y vitaminas, lo que la convierte en un elemento alto en nutrientes ideal para el consumo (Sánchez et al., 2017).

En los últimos diez años, es evidente el aumento en el consumo de aceite de tipo vegetal ya debido a que es un elemento en la dieta de casi toda la población. El continente Sudamericano es uno de los que más variedad de aceites vegetales produce. Una gran variedad de los elementos que componen al aceite son los aportes de omega 3-6, ácidos grasos saturados, poliinsaturados monos insaturados, provenientes de, los vegetales, semilla, planta o fruto; además genera beneficios nutricionales diferentes (Carrasco & Anchundia, 2021). Por su parte (Villabona et al.,

en 2017) reveló que, a partir del aceite de cocina residual, es posible que sea empleado en la producción de varios bienes con potencial industrial, dentro de los que se destacan: jabón, espuma de poliuretano, biocombustible (biodiésel), surfactantes y fertilizantes. Con el este uso a dicha materia prima contaminante se reduce el deterioro ambiental y se obtienen un beneficio adicional.

Las estadísticas evidencian que, en Colombia, un porcentaje cercano al 35 % de un total de 162 millones de litros de aceite de cocina que es comercializado termina como desecho que afecta las tuberías y sifones. Por su parte, el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible acepta la situación que es evidente donde el aceite termina siendo un residuo peligroso, debido a su disposición inadecuada, lo cual genera daños ambientales en redes fluviales, de alcantarillado, y en los suelos (Villabona et al, 2017).

Aceite Vegetal Usado (AVU)

Es alta la cantidad de aceite de cocina usado generado posterior a su uso por parte de los establecimientos diferentes de ventas de comidas rápidas y restaurantes, ya que no perciben el daño ocasionado y desconocen el tratamiento y la ruta adecuada para este elemento, simplemente crean un círculo de uso y descarte rutinario que termina en las tuberías, el alcantarillado o en bolsas a los camiones de basura, perdiendo así la posibilidad de ser utilizado con fines benéficos (Sánchez et al., 2017).

Debido a que los aceites vegetales refinados son empleados tanto en los hogares como a en la industria, es posible notar que para lo que mayormente lo emplean es en procesos de elaborando los alimentos, gracias a sus propiedades, consiguen la transmitir calor y otorgar el sabor y textura cuando se fríen los alimentos. Así mismo en la mayoría de los países y también en Colombia, estos aceites son indispensables en el sector hotelero (Rojas H, 2021).

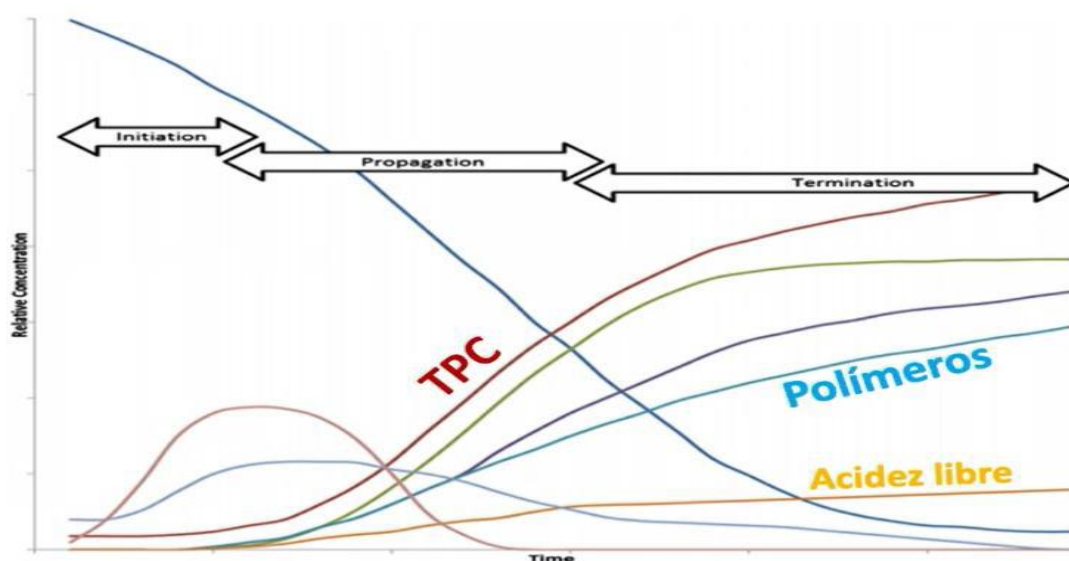


Figura 1. Proceso de deterioro del aceite en el tiempo.

Fuente: Ojeda, (2021).

En la figura 1, se observa la alteración producida con el pasar del tiempo de uso del aceite, las siglas TPC hace referencia a los compuestos polares totales, que son perjudiciales a la salud (Ojeda, 2021).

Impactos Ambientales Aceite Vegetal Usado (AVU)

La adecuada recolección y disposición de los aceites vegetales usados en Colombia aún no está generalizada entre los diversos productores, tanto locales como los centros de fabricación de alimentos, por lo que no ha habido avances significativos hacia la conveniente disposición de los aceites usados en la nación (Gómez, 2018).

Cuando los hidrocarburos alcanzan las aguas superficiales, pueden afectar la propiedad de canje de oxígeno y alterar los ecosistemas, y de igual forma su vertido en tierra puede provocar: erosión, pérdida de productividad de la tierra y pérdida de los ecosistemas. Incluso a nivel de ciudad, si se vierten en los sistemas de alcantarillado y se combinan con residuos de productos de limpieza y jabones domésticos, pueden crear las llamadas "bombas de grasa" pueden obstruir los puntos, causar problemas en la eliminación de desechos y aumento en los costos del tratamiento debido al gran contenido orgánico (Castillo, 2017).

Las Lipasas

Enzimas con la capacidad de hidrolizar los triglicéridos y logran para independizar ácidos grasos y glicerol en la interface entre aceite-agua. Son las encargadas de catalizar la hidrólisis de grasas en la interface lípido-agua y llevan a cabo diversas reacciones de transformación biológica en condiciones microacuosas. La nueva era genómica abre muchas oportunidades para las lipasas modificadas genéticamente en alimentos, combustibles y productos farmacéuticos. (Coello & Vélez, 2019).

Fuentes de Lipasas

Dentro de ciertas fuentes de origen estas las de tipo microbiana (de levaduras, bacterias y hongos filamentosos) estas poseen versatilidad y estabilidad en el manejo industrial debido a su facilidad para producirlas y ser transformadas (Filho et al., 2019). Estas lipasas microbianas tienen una función natural que se relaciona con el usar los lípidos como única fuente de carbono, con lo cual es posible que sean aislados en diferentes hábitats, como suelo contaminado con aceite, residuos de aceite o superficies de queso. (Lai et al., 2019).

Dentro de los principales microorganismos productores de lipasas se conocen: *Bacillus subtilis*, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Sataphylococcus sp.*, *Candida rugosa* y *Geobacillus stearothermophilus*. Las especies de: *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizomucor mieheim*, *Geotricum candidum*, *Candida rugosa* y *Aspergillus niger* se encuentran de manera comercial ya que pueden realizar la síntesis de biodiesel, aunque no son muy estables en la producción, lo que ocasiona que su aplicación a nivel industrial no sea mucha. Solo *Callera trans* y *Candida antarctica* en la producción han logrado su aplicación a escala industrial, siendo esta última empleada de forma comercial en la producción de biodiesel (Priyanka et al., 2019).

Biocatálisis

la utilización de enzimas en los últimos años ha tenido un auge notable en los procesos industriales, es evidente dicho impacto en áreas como la fabricación de detergentes, la agricultura, la elaboración de combinados sintéticos, combustibles biológicos, polímeros sintetizados y combinados orgánico y la industria farmacéutica (Patel et al., 2017). Dentro de las ventajas que tienen las enzimas es que poseen especificidad alta de sustrato, pureza del producto y su impacto ambiental es leve. En comparación con el proceso catalítico químico, reduce el consumo activo ya que requiere una menor temperatura, y también de pH, disminuyendo así la utilización de disolventes orgánicos que son tóxicos (Sánchez & Demain, 2017 Paul et al., 2019; Sheldon & Woodley, 2018).

A nivel del mercado global los avances en relación a los biocatalizadores son impulsado por su forma reacciones catalizadas con mayor estabilidad y eficiencia, su regio-químio-, y enantioselectividad, así como sus particularidades que respetan el ambiente en comparación con las técnicas químicas (Lai et al., 2019). En 2016 se esperaba que las enzimas en el mercado estuviesen alrededor de 5.010 millones de dólares y aumentara en 2021 hasta los 6.320 millones de dólares. Así mismo desde 2005, se presentía que a nivel mundial las ventas de productos de origen biológico aumentarían del 15% para el 2025 (Paul et al., 2019; Chapman et al., 2018).

Aunque al parecer, la biocatálisis es una opción eficiente y ecológica para el campo industrial. Esta comodidad económica es dependiente, en mayor proporción, costo del aceite, que con un valor menor al 50% en relación al total de la producción (Jamil et al., 2018).

El costo de los catalizadores biológicos y su posible efecto inhibitorio sobre el alcohol con una cadena corta son los dos límites principales del uso enzimático del proceso industrial. Pero, lograr que una enzima inmovilizada conserve su actividad catalítica con su forma soluble y además sea reutilizarse posterior a sucesivos ciclos de síntesis evita esa limitación (Miao et al., 2018).

En la comercialización de las enzimas, el 85% es de origen microbiano. Dentro de los elementos a favor, en comparación a las producidas por los animales y las plantas, se destaca que son más constantes, además proporcionan elevada variedad bioquímica, mucha más facilidad de modificación genética (Patel et al., 2017).

Alrededor del 90% de las enzimas de tipo industrial son adaptaciones combinadas, debido a que las de origen naturales no son muy adecuadas en los bioprocesos. Generalmente, ciertas especies deben efectuarles cambios genéticos, con lo que se logra altos niveles de producción y mejorar sus propiedades catalíticas (Sánchez & Demain, 2017; Liu & Kokare, 2017). El apoyo brindado por la técnica de metagenómica, las herramientas genéticas, la modificación química, es posible conseguir enzimas con mayor estabilidad y un mejor desempeño (Facin et al., 2019).

Enzimas Lipasas y los Microorganismos que las Producen

La utilización de especies microbianas para sintetizar sus enzimas es de importancia en varios procesos de aplicación segura. A comienzos de 1901 se conocen los aspectos de lipasas en los microorganismos, *B. pyocyaneus* y *Bacillus prodigiosus* *B. fluorescens* (Mejía & Morales, 2022). Su destreza en catalizar la hidrólisis y sintetizar los ésteres (Ma et al., 2019).

Por su parte los autores Vyas & Chhabra (2017), por medio del aislamiento de una levadura oleoginosa llamada *Cystobasidium oligophagum* (JRC1) obtenida del residuo de celulosa; conocen su actividad lipásica (2,88 UI/mg), esta cepa indicó acción endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa. Últimamente, Sahay & Chouhan (2018), lograron conseguir dos lipasas con acciones a baja temperatura y metaloenzimática, derivados de los hongos *Penicillium canesense* y *Pseudogymnoascus roseus*.

Hay una gran cantidad de microorganismos que producen lipasa, pero solo unos pocos hongos son evaluados para su obtención. Varias especies de mohos como *Penicillium* y *Aspergillus* para la obtención de lipasa extracelular en medios sólidos y líquidos manipulando aceite de oliva como inductor (Mejía & Morales, 2022).

El estudio llevado a cabo por Castro *et al.*, (2017) permitió conocer a partir de aceite de la cepa de *Aspergillus westerdijkiae* empleada en la obtención de lipasas, su actividad enzimática

es de 52 U/g de micelio, con una temperatura óptima de 40°C y pH óptimo entre 7 y 8.

Últimamente Pereira et al., (2019) empleó semilla y cáscara de mango como inductores lipídicos.

Enzimas Lipolíticas

Las enzimas son empleadas desde civilizaciones más antiguas en distintos procesos.

Hasta la actualidad se tiene conocimiento de unos cuatro mil diferentes enzimas únicas en su especificidad (Mejía & Morales, 2022). Estas las enzimas tienen empleos en escenarios versátiles esto debido al organismo que las genera y función principal. En muchos casos el sustrato es de específico dando como resultado un único producto de cada enzima (Aravidan, 2017).

Los hongos del género *Aspergillus sp* se encuentran clasificados como mejores productores de lipasas extracelulares, logrando una alta capacidad biodegradativa bajo condiciones controladas en el estudio; así mismo, las diferencias de actividad lipolítica, están relacionadas a la capacidad de producción de lipasas y a la especificidad de utilización de ácidos grasos libres por cada género fúngico (Mejía & Morales, 2022).

Las lipasas de tipo microbiana (de bacterias, levaduras y hongos filamentosos) son de amplia aplicación industrial ya que es fácil su producción y modificación, esto además acompañado de su estabilidad y versatilidad (Filho *et al.*, 2019). Naturalmente las lipasas microbianas se relacionan con el metabolismo lipídico que se entiende como el uso de estas grasas como fuente

de carbono, por esto se han aislado de varios hábitats, dentro de los que están tierra contaminada de aceites, restos de estos en la parte externa de alimentos como el queso.

Estructura de las Lipasas

La zona de la tapa es una estructura característica de las lipasas, un móvil dominio y anfipático que envuelve la parte activa cuando falta el sustrato y es garante, en gran parte, de la actividad y selección enzimática. En este sitio puede radicar en una hélice simple, dos hélices, o una región helicoidal y, según su lugar, conserva al catalizador en su proporción cerrada o abierta. En un ambiente acuoso y sin sustrato, el equilibrio entre las dos formas cambia a una conformación cerrada, con el lado hidrofílico de la tapa expuesto al medio y su lado hidrofóbico hacia el saquillo catalítico. Aunque, cuando está presente el sustrato en ambiente hidrofóbico (orgánico) o en una interface lípido-agua, la tapa gira alrededor de las dos regiones de bisagra y cambia a su conformación abierta, exponiendo la superficie hidrofóbica, formando una gran superficie hidrofóbica. Superficie enzimática que facilita la entrada de sustratos. (Khan *et al.*, 2017).

Reacciones Catalizadas por Lipasas

Gran cantidad de las lipasas tienen especificidad de *sn*-1,3, y catalizan la hidrólisis/transesterificación de los ácidos grasos situados particularmente en ciertos puntos (Lai *et al.*, 2019; Casas-Godoy *et al.*, 2018). Particularmente, los ácidos grasos *sn*-2 no se acoplan al área activa de

la lipasa debido a que ciertas limitantes estéricas. Dentro de las enzimas están la lipasa de *Aspergillus niger*, la pancreática humana, la lipasa RML de *Rhizomucor miehei* (Filho *et al.*, 2019).

Son reacciones bisustrato las reacciones catalizadas por lipasas, en estas los sustratos pueden unirse a la enzima de dos formas: 1) paralelamente antes de constituir productos (mecanismo de complejo ternario), o 2) conectar de forma secuencial (mecanismo Ping-Pong Bi-Bi) (Corradini *et al.*, 2019; Monti *et al.*, 2018). Finalmente es apreciado el modelo cinético más comúnmente aceptado y aprovechado para referir la operación de las lipasas (Corradini *et al.*, 2019).

Fuentes de Obtención de Lipasas

- Fermentación en estado sólido (FES): empleando *Aspergillus niger* los métodos de fermentación en fase sólido (FES) son usados frecuentemente más que los sumergidos logrando elevada producción de lipasas. Estas técnicas tienen una baja inversión de dinero y forman con más facilidad cultivar los hongos filamentosos fabricantes de enzimas. Dentro de estas especies sobresalen los géneros *Aspergillus*, que son empleados en la obtención de lipasas principalmente *Aspergillus niger*, considerablemente utilizada en varias aplicaciones industriales (Cujilema-Quitio *et al.*, 2018).

Fermentación en medio líquido (FML): radica en el cultivo del microorganismo en un medio líquido que tengan en su composición los nutrientes precisos para su desarrollo y para originar la fabricación de la enzima de utilidad, la ventaja principal de este modelo radica en que se consigue homogeneidad del cultivo y la facilidad de manipulación. Mucha de las lipasas se origina en forma extracelular ya que solo con centrifugar los cultivos es posible lograr obtener el sobrenadante para después realizar la purificación de la enzima (Fatima et al., 2021; Melani et al., 2020; Sarmah et al., 2018).

Producción en medio líquido a partir de células inmovilizadas (CIN): reside en limitar en el área las células del microorganismo fabricante para resguardar de ambientes de estrés del medio de cultivo, la ventaja principal de esta técnica es que se consiguen reusar las células para realizar elaboración constante de la enzima a través del cambio del medio de cultivo. Aunque, su estudio no está desarrollado debido a la limitante en el progreso de las células confinadas (Fatima et al., 2021; Melani et al., 2020; Sarmah et al., 2018).

Aplicaciones Industriales de las Lipasas

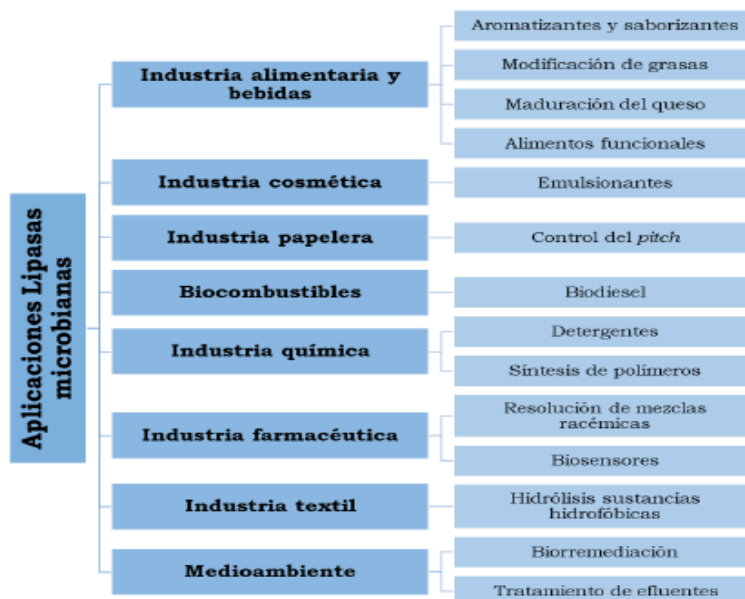


Figura 2. Aplicaciones industriales más habituales de las lipasas microbianas.

Fuente: Mejía & Morales, (2022)

La figura 2, muestra ocho áreas específicas de aplicabilidad de las lipasas microbianas donde a su vez también es posible evidenciar cada una los productos de obtención generados posterior a su aplicación en los procesos biotecnológicos.

A partir del aceite usado también se pueden producir biocombustibles de aviación, alcohol, asfalto, aditivos de caucho, cosméticos, medicamentos, detergentes, jabones, ceras,

barnices, lodos de perforación, aceites lubricantes, pinturas, poliuretanos, resinas, tensioactivos, etc. gráficos, velas y compost industrial (Ojeda, 2021).

Dentro de la investigación es posible evidenciar que son múltiples las aplicaciones que se les da a las lipasas de tipo microbiano, pero específicamente en la industria del biodiesel es posible desatacar según lo describe la tabla 1, están cinco técnicas de inmovilización para el mejor aprovechamiento de estos elementos enzimáticos.

Tabla 1.

Técnicas de utilización de lipasas

Técnica	Resultados
Inmovilización de forma no covalente sobre soportes porosos hidrofóbicos y macrorreticulares	-El método CLEAs (Cross-Linked Enzyme Aggregates), En presencia o ausencia de un soporte, se pueden provocar cambios y modificaciones en la estructura de la proteína, perjudicando su actividad o dificultando el acceso de los sustratos a los sitios activos o la evacuación de los productos de reacción, resultando en una disminución de la eficiencia de síntesis del biodiesel (Prieto et al., 2019).
LipC12 inmovilizada sobre quitosano: LipC12-Chit	-LipC12 inmovilizada sobre soportes Hidrófobos generó niveles importantes de 1,3-dicaprilina, mientras que inmovilizada sobre ImmoBead y quitosano permitió la generación de 1,2- dicaprilina en proporciones cercanas al 90%, manteniendo la 1,3-especificidad de esta lipasa aún a tiempos largos de reacción (Sánchez et al., 2021).
LipC12 inmovilizada sobre Accurel: LipC12-Accu	
LipC12 inmovilizada sobre polipropileno en polvo:	
LipC12-PPpow	
LipC12 inmovilizada sobre Nanomer: LipC12-Nano	

LipC12 inmovilizada sobre Immobead: LipC12-Immo	
Inmovilización de forma no covalente con uso de nanopartículas magnéticas funcionalizadas en superficie	Se inmoviliza mediante interacciones hidrofóbicas la enzima utilizada para la síntesis de biodiesel. Debido a la ausencia de enlaces covalentes entre la enzima y el transportador, se observó una pérdida de actividad del 66 % después de varios ciclos de síntesis, principalmente debido a la lixiviación de la propia enzima. (Prieto et al., 2019).
Inmovilización covalente	Se basan también en el uso de nanopartículas magnéticas, a las que se une la lipasa comercial Lipozyme-TL empleando glutaraldehído o una carbodiimida para la síntesis de FAMEs (ésteres metílicos de ácidos grasos, del inglés Fatty Acid Methyl Esters), alcanzando una conversión en 24 h de entre el 75% (a 50 °C) y el 94% (a 45 °C). Aunque estos rendimientos no son malos, la reciclabilidad de las enzimas está lejos de ser óptima, ya que no admiten más de 3 o 4 ciclos catalíticos consecutivos (Prieto et al., 2019).
Inmovilización de la lipasa comercial de <i>Gandida rugosa</i> sobre microesferas magnéticas de quitosano activadas con glutaraldehído.	Síntesis de FAMEs del extraído del aceite de soja y hecho reaccionar a 35 °C durante 30 h, el rendimiento fue del 87 %. El número máximo de ciclos sin excesiva pérdida de actividad fue de cuatro. (Prieto et al., 2019).

Fuente: Elaboración propia adaptado de (Prieto et al., 2019; Sánchez et al., 2021)

Tabla 2.*Ejemplo de aplicabilidad de lipasas*

Nombre	Característica	Tipo de producción	Desventajas	Estrategia de utilización	Proceso y usos
LIPASA XX SPLIT 25 L Esterasa	-Aspecto líquido - La enzima tiene tonalidad amarilla de ligero a sombrío con leve olor a fermentado. -La característica de color no es un indicador de la actividad enzimática y puede cambiar de lote a lote de producción.	Fermentación sumergida de un microorganismo (T. Lanuginosus) modificado genéticamente	- Tienen baja estabilidad n en procesos industriales -Separación complicada Reutilización muy limitada -la mayoría de las enzimas comerciales tienen un alto costo de producción	La inmovilización de una enzima es un proceso en el que se le confina o delimita en un soporte, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y pueden ser reutilizadas repetidamente, lo cual es esencial desde el punto de vista económico, además mejora su desempeño al aumentar su termo-	-La proteína enzimática, no modificada genéticamente, se separa del organismo de producción y luego se purifica - procesamiento de papel, en formulaciones para tratamientos de aguas con presencia de grasas de origen animal o vegetal, elaboración de detergentes - posee elevada cabida para degradar aceites

estabilidad y facilita su separación	derivados de cebos industriales, aceites de palma y coco y otros de origen vegetal
--	--

Fuente: Elaboración propia adaptado de (Peralta & Romero, 2019).

Capítulo 2

Enzimas y su Aplicabilidad Biotecnológica en la Síntesis del Biodiesel

Las lipasas son enzimas que se consiguen de organismos vivos cuantiosos en la naturaleza y se han usado en la elaboración de jabones, detergentes, alimentos, aceites y otros productos. Hoy en día se ha introducido una nueva clasificación de los mismos, divididos en grupos y subgrupos. También hay interés en su uso en la fabricación de biodiesel, así como en biotecnología y genética médica (Salazar et al., 2020).

Dadas las referencias, se puede decir en general que las enzimas lipolíticas se fraccionan en dos grandes categorías: lipasas y esterases o carboxilesterasas. Las lipasas son particulares de acilgliceroles grasos de cadena larga (>10 carbonos), con la trioleína como sustrato de referencia; mientras que las esterases son específicas de acilgliceroles de cadena corta (<10 átomos de carbono) y otros ésteres simples, y la tributirina es su sustrato estándar (Du et al., 2018).

Seguidamente en relación a la disminución de almacenamientos de combustibles fósiles, las consecuencias del cambio climático y la elevada contaminación de la atmosfera han requerido buscar formas alternas de energías. El biodiesel es un biocombustible que se genera empleando grasas animales, aceites vegetales, o microorganismos oleaginosos como hongos, levaduras, microalgas y bacterias, estas poseen la capacidad de originar lípidos o biocatalizadores que son empleados en las reacciones de transesterificación para la obtención de este combustible biológico (Goh et al., 2020), es un éster monoalquílico de ácidos grasos de cadena larga y se considera un combustible líquido alternativo derivado del petróleo. Se obtiene a partir de lípidos naturales como aceites usados, aceites producidos por algas aceites vegetales, grasas animales. Esto se consigue mediante diversos procesos como son: microemulsiones, pirólisis y por último esterificación o transesterificación (Rosas et al., s, f). La reacción de transesterificación puede ser catalizada por un ácido fuerte o una base fuerte o por una enzima natural, la lipasa. Estos últimos son biocatalizadores respetuosos con el medio ambiente y compatibles con procesos sostenibles (Rosas et al., s, f).

Un estudio realizado en 2018 se probaron tres lipasas diferentes en la producción de biodiesel. Dos de ellos están disponibles comercialmente en *Rhizomucor miehei* (RML) y *Thermomyces lanuginosus* (TLL) y tienen 29,5 kDa y 31,7 kDa, respectivamente. El tercero, producido de forma recombinante en el laboratorio, proviene de *Bacillus thermostreptus* (BTL2). El tamaño de BTL2 es de 43 kDa. “En el caso de BTL2, encontramos que es altamente resistente

a la presencia de solventes y cambios térmicos (ya que puede soportar temperaturas entre 60 °C y 75 °C por un corto período de tiempo)”, (Hoon et al., 2019).

Otra investigación revela que en la Producción de conidias de *Aspergillus niger* para la obtención de lipasa extracelular y extracción de aceites microbianos potenciales para la obtención de biodiesel fue posible evaluar el efecto de parámetros como temperatura, pH, y fuente de nitrógeno sobre la capacidad de desarrollo de conidias del hongo *Aspergillus niger* en medio líquido para extracción de aceite y obtener lipasa extracelular con potencial aplicación en la producción de biodiesel. Las microscópicas revelaron características morfológicas típicas de *Aspergillus niger*, como hifas septadas transparentes, conidióforos largos, vesículas esféricas y abundantes conidias de tono marrón a negro. Los datos resultantes del estudio mostraron que las conidias de *Aspergillus niger* crecieron abundantemente (21.050 células/ml) en el ambiente nutritivo a 30 °C, pH 4,0 y sin fuente de nitrógeno. Está claro que la temperatura superior a 30 °C inhibió el crecimiento de *Aspergillus niger*, ya que las esporas deben tener suficiente humedad para germinar, lo que resulta en la inactivación de las esporas; teniendo en cuenta esto cuando se optimizan las condiciones de crecimiento del hongo, el aceite se puede extraer con un rendimiento del 40% poniéndolo en contacto con una enzima extracelular (lipasa) para producir biodiesel (Guiral et al.2023).

Así mismo un estudio plantea la producción de combustible biodiesel mediante una reacción de transesterificación catalizada por lipasa. Para ello, se emplea el biocatalizador el cual se

obtiene fermentando un cultivo del hongo filamentoso *Rhizomucor* en medio sólido. Se utilizó bagazo de agave como soporte y aceite de oliva como inductor. Se realizaron cinéticas de obtención para controlar la fecha del pico de obtención de lipasa. La fermentación se secó a temperatura ambiente y se almacenó hasta su uso. Para las reacciones de transesterificación catalizadas por la lipasa *Rhizomucor* se lleva a cabo en hexano utilizando aceite de cocina quemado y alcoholes de cadena de uno, tres y cuatro carbonos (metilo, etilo, propilo y butilo) como sustrato y la síntesis de biodiesel mediante análisis de cromatografía en capa fina. (Rosas et al., s, f).

Otro método de obtención por medio de la síntesis enzimática de ésteres alquílicos de ácidos grasos de cadena larga empleando un alcohol y una elaboración enzimática utilizando una enzima esterasa/lipasa retenida covalentemente sobre partículas magnéticas funcionalizadas en superficie. Esta inmovilización de la lipasa versátil eleva el rendimiento del proceso de síntesis de ésteres alquílicos, así mismo logra rescatar el catalizador para otras reacciones de manera eficiente, sin la actividad y velocidad de la enzima empleada. Lo cual reduce de forma considerable durante al menos 10 ciclos seguidos de reacción (Prieto et al., 2019).

En la fabricación de ésteres etílicos de ácidos grasos (EE) (principal componente del biodiesel), la inmovilización de lipasa sobre soportes porosos tiene ventajas sobre la catálisis tradicional, tales como: el biocatalizador se puede reutilizar y reduce el consumo de energía en la producción. En comparación con los procesos convencionales llevados a cabo a 323 K, el rango

de temperatura más bajo entre 293 y 310 K, el menor exceso molar de etanol y el consumo mínimo de disolvente contribuyen a un proceso más respetuoso con el medio ambiente (Godoy et al., 2019).

En relación a estos estudios planteados las lipasas (triacilglicerol hidrolasas, EC 3.1.1.3) poseen grandes aplicaciones en biotecnología. Dentro de las aplicaciones de tipo industrial está la obtención de biocombustibles. El biodiesel es obtenido por síntesis de triglicéridos con origen distinto, a través del proceso de transesterificación con alcoholes de cadena corta como metanol o etanol, este proceso actualmente es el más empleado a partir de la catálisis química homogénea. Las lipasas como fuente potencial para encabezar este proceso, con su aplicación se obtiene una mezcla de esteres dentro de los parámetros de calidad solicitados. Se emplearon dos estrategias bioquímicas de purificaron fracciones empleando lipasas, se escogieron la (Lip J1) y (Lip J2). La última mostró características bioquímicas atrayentes, siendo relacionada como halófila, basófila e hipertermófila. Así mismo ambas fueron descritas a partir de *Janibacter R02* (Lip J 1 y Lip J2) ya que exhibieron peculiaridades bioquímicas diferentes, teniendo en cuenta a estas como candidatas de aplicación en la síntesis de biodiesel (Castilla, 2022).

Biocombustibles

El incremento en la cantidad de energía y el detrimento del ecosistema son elementos que inducen a conseguir ciertos tipos de combustibles alternos, capaces de reemplazar de forma general o parcial los de tipo fósil (Cutty & Mejía, 2019). Del mismo modo los combustibles fósiles al no ser una fuente de tipo renovable de energía ocasionan contaminación y aumenta el calentamiento en la tierra, además genera grandes cambios en el ambiente y su clima (García, 2018). El uso de aceite vegetal como combustible se remonta a 1900 cuando Rudolph Diesel utilizó inicialmente aceite vegetal en su motor de encendido por compresión y predijo el futuro uso de biocombustibles (Méndez, 2018). El 31 de agosto de 1937, G. Chavanne de la Universidad de Bruselas en Bélgica ha recibido una patente para la "transformación de aceites vegetales en combustible". Con esto manifiesta que la transesterificación de aceites utilizando etanol o metanol para eliminar el glicerol de los ácidos grasos y reemplazarlos con alcoholes de cadena corta. Esta es la originaria fabricación de biodiesel. Más recientemente, en 1977, el científico brasileño Expedito Parente ideó y registró el primer proceso industrial para la fabricación de biodiesel (Méndez, 2018).

Con la transesterificación/esterificación catalizada por lipasas es posible conseguir biodiesel. Este biocombustible es un líquido biodegradable y no tóxico combinado por ésteres alquílicos de ácidos grasos de cadena larga procedentes de elementos renovables. Tiene particularidades de combustión confrontables al combustible diésel convencional, y su uso en la

mezcla eleva la eficacia del motor y disminuye el consumo de combustible. Cuando se emplea en mezclas, también se disminuyen las emisiones de CO, CO₂, SO_x, hidrocarburos, y partículas los NO_x liberados. (Suresh et al., 2018).

La rentabilidad de estas técnicas tiene que ver, en gran parte con el costo de la materia prima, el cual debe ser menor de 50% en comparación con la producción (Jamil *et al.*, 2018). Las tecnologías (1G) o de primera generación, fundadas en la utilización de aceites de semillas, facilitan la mayor parte de los combustibles líquidos obtenidos hoy en día a través de la biomasa, pero son ética, ambiental y poco sostenibles económicamente. Por consiguiente, es posible utilizar residuos lipídicos, en caso del aceite de cocina usado y grasas animales, como materias primas reversibles y competitivas para originar biodiesel 2G. Si se mezclan estas materias primas con la utilización de técnicas industriales, se obtendría un proceso biológico selectivo amigable, y viable económicamente (Mejía & Morales, 2022).

Uno de los usos principales del aceite de cocina usado es en la elaboración de biocombustible, que reduce las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) del sector del transporte en un 8%. En particular, el biocombustible generado en Colombia disminuye en un 83% las emisiones de gases de efecto invernadero, como se destacó en la Conferencia Internacional de Palma Aceitera (Medina, 2019). Cada litro de aceite vegetal usado convertido en biodiésel ahorra 2,5 kg de CO₂ de emisiones al medio ambiente (Rojas H., 2021).

El Biodiésel

Es el compuesto obtenido por ácidos grasos de cadena larga con una mezcla de ésteres de alquilo. (FAAE), derivado por una reacción de transesterificación de triglicéridos y alcohol, catalizados por alcalinos ácidos, enzimas catalizadores heterogéneos inorgánicos o matemáticos (Asri et al., 2018).

El biodiésel se puede producir mediante transesterificación/esterificación catalizada por lipasa. El biodiesel es un líquido biodegradable y no tóxico combinado por ésteres alquílicos de ácidos grasos de cadena larga obtenidos de fuentes renovables. Tiene una utilidad de combustión confrontable al combustible diesel convencional, y su uso en la mezcla puede optimar la eficacia del motor y disminuir el gasto de combustible. (Méndez, 2018).

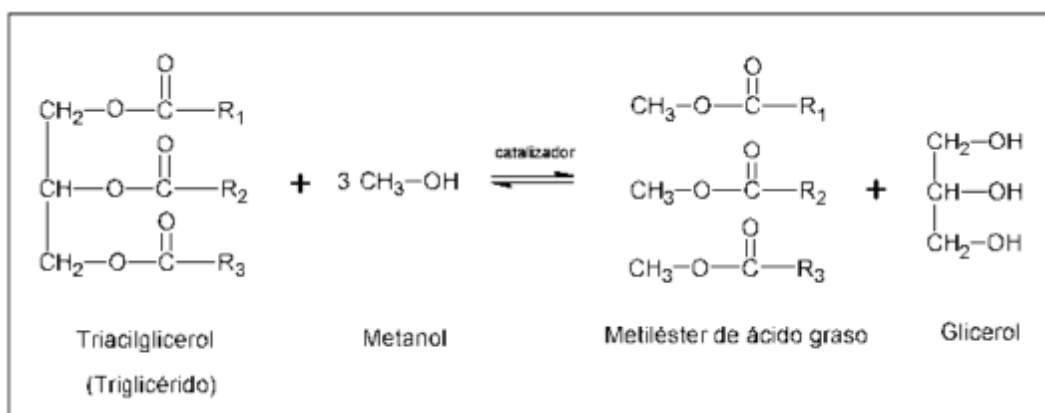


Figura 3. Obtención de Biocombustible a partir de Reacción Química.

Fuente: Méndez, (2018).

Con la obtención del biodiesel, es posible obtener un combustible a partir de aceites y grasas animales, el cual contamina menos que otros combustibles procedentes del petróleo (Twenergy, 2020).

De igual forma el proceso de la transesterificación utilizando la enzima lipasa, tiene la superioridad ya que la enzima puede reutilizarse a medida que se inmoviliza, lo que sirve para una mejor división del subproducto y el catalizador en el proceso transesterificación. La lipasa inmovilizada puede llevarse a cabo en leves condiciones, causando una elevada pureza del producto y así mismo trabaja con una materia prima de gran contenido de ácido graso libre, como aceite de cocina residual (Gusniah et al., 2020).

Sin embargo, el biocombustible (biodiesel) tiene bajas características operativas con temperaturas bajas y se reduce durante su acopio, formando corrosión en los motores y el deterioro de piezas automotrices. Hoy en día, se experimentan algunas soluciones, aunque por lo general tienen un elevado costo (Marchetti et al., 2019).

Según Rojas H (2021), La mayor parte del AVU procesado en Colombia no es utilizado por la industria nacional, sino que se exporta a los mercados internacionales. Esto se debe principalmente al mercado potencial (productores de biodiesel) y universidades públicas con programas iniciales de investigación, desarrollo e innovación orientados a producir biocombustibles a partir de aceite de cocina usado.

Debido a la cantidad en Europa de Aceite Vegetal Usado debido a la demanda, ciertos administradores que ejecutan la recolección y procesamiento de aceites residuales en Colombia,

encuentran en Europa una oportunidad de negocio para exportar desde Colombia y hacia los productores de biodiesel en Europa. La visión del AVU a largo plazo es considerablemente efectiva, ya que los países que forman la Unión Europea (UE) quieren eliminar gradualmente los biocombustibles basados en productos agrarios para ampliar los combustibles procedentes de desechos (Ojeda, 2021).

La tabla 3, describe las características principales de los dos procesos en la fabricación industrial de biodiesel, además la clase de catalizador empleado en cada uno de estos métodos.

Tabla 3.

Comparación de métodos de producción de biodiesel

Método	Proceso	Catalizador
Químico	El aceite se calienta continuamente a 70°C para eliminar algunas impurezas, y luego el proceso de hidratación de KOH y metanol se agita continuamente hasta que el KOH se diluye completamente en metanol y luego se disuelve en aceite (aceite de ricino) para completar la transesterificación. Proceso, agitando y manteniendo a una temperatura constante durante 2 horas, el proceso de separación final se completa en dos fases, es decir, biodiésel y glicerina, que se separan tras 24 horas de reposo en el embudo de decantación.	KOH

Enzimático	Calentar el aceite y mantener la temperatura constante hasta que la temperatura del aceite alcance los 30°C, luego mezclar la lipasa con el aceite (ricino) hasta diluir completamente, luego agregar el metanol, iniciar la reacción de transesterificación, mezclar y mantener la temperatura por 1 hora. Finalmente, el proceso de separación se lleva a cabo en dos etapas de biodiesel y glicerol, que se separan después de 24 horas en un embudo de decantación.	Enzima Lipasa (acil-hidrolasas de triacilglicerol).
------------	---	---

Fuente: Elaboración propia adaptado de (Peralta & Romero, 2019).

Panorama Mundial del Biodiesel

Desde finales del siglo XIX, los biocombustibles se obtienen a partir de grasas animales y aceites vegetales, últimamente, por transesterificación con microorganismos como levaduras, algas o bacterias que muestran un buen contenido en triglicéridos (Chávez et al, 2021). Así mismo además de ser un combustible alternativo, renovable, biodegradable y respetuoso con el medio ambiente, el biodiésel también se puede utilizar en motores de encendido por compresión sin ningún problema. (Oliveira & Coelho, 2017).

La demanda mundial de combustible diésel referida por la Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP) estuvo en 30,1 millones de barriles (mdb) en promedio por día en 2020 y también ha sostenido una propensión lineal desde años pasados, además la proyección

es que la demanda sea constante por debajo de 31 mdb por día en 2030 y 2040. El diesel es el combustible más consumido en el mundo, según esta organización, incluso más que la gasolina y el gas licuado de petróleo (GLP), y a medida que crece la demanda, también lo hacen sus formulaciones en un esfuerzo por reducir el costo de su uso (OPEC, 2020).

El Instituto Americano de Cooperación para la Agricultura (IICA), manifiesta que el consumo de biocombustibles líquidos ha aumentado significativamente en los años anteriores específicamente, la producción de bioetanol y biodiesel aumentan paralelas en las últimas dos décadas en un 92.8% de 2000 a 2019. Los biocombustibles pueden proporcionar un transporte más limpio sin grandes cambios tecnológicos, al tiempo que brindan una alternativa ambientalmente más sostenible a los combustibles fósiles, además diversificar la matriz energética e influir positivamente en el desarrollo de la agricultura familiar y el territorio, certificando una permanencia en la demanda en relación a las materias primas y creando empleo y valor agregado (IICA, 2020; Hernández & Jiménez, 2018).

En la distribución de los productores de biodiesel se destacan 5 países de la siguiente manera: Indonesia (16%), Estados Unidos (13%), Brasil (11%), Alemania (8%) y Francia (5%), el 47 % sobrante se distribuye en otros donde participan países como: Tailandia, Malasia, Argentina, España y Países Bajos. A nivel mundial el panorama del consumo de este producto es descentralizado a Estados Unidos 14%, Indonesia 13%, Brasil 12%, Francia y Alemania con 8% y 5%. El 48% que queda se distribuye en países participantes importantes como: Reino Unido, Italia, Argentina, España, Suecia y Tailandia (OCDE-FAO, 2020).

Se estima que alrededor del 77% del biodiésel procede de aceites vegetales (37% aceite de canola, 27% aceite de soya y 13% aceite de palma) o aceites de cocina de desecho (23%). En países como EE. UU., Brasil y Argentina, la mayoría del biodiésel producido es a partir del aceite de soja, mientras que en Indonesia, Tailandia y Colombia, el aceite de palma es el más empleado; sin embargo, China, India y algunos países de la unión europea (UE) originan biodiesel a partir de aceite vegetal usado, estos a su vez son Líder en el fomento de la producción de biocombustible con aceite residual, que tiene cuatro décimas de huella positiva en el ecosistema respecto al biodiésel procedente de occidente

(OCDE-FAO, 2020)

Dentro de los problemas más relevantes para llevar este biocombustible al mercado es el precio y la cantidad de materias primas disponibles como grasas animales y aceites vegetales. Es evidente que el acceso al biodiesel por la extracción del aceite usado es una excelente opción, además reduce significativamente el precio del biodiesel y disminuye la marca negativa de la eliminación del aceite usado para el ecosistema. Aunque el uso del biodiésel es todavía pequeño, representa una sostenibilidad mejor que el biodiésel de primera generación, debido a que para este se usa en suelos agrícolas, con el de segunda generación por su parte se da uso adecuado a los residuos generados (Londoño et al., 2021).

Producción de Biodiesel Utilizando Aceite de Cocina Usado

El biodiésel se obtiene por transesterificación de aceites vegetales. Cada molécula de triglicéridos del aceite vegetal se convierte en tres moléculas de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga y se libera una molécula de glicerol como subproducto (Avagyan & Singh, 2019). Así mismo la producción de biodiesel es posible con técnicas catalíticas o no catalíticas. Estas técnicas pueden ser catalizadores sólidos heterogéneos, catalizadores químicos homogéneos, y catalizadores biológicos (Inamuddin et al., 2021).

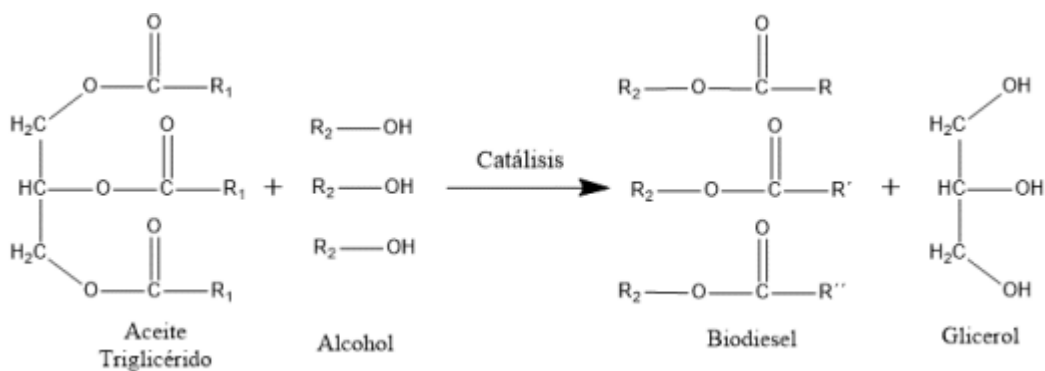


Figura 4. Proceso catalítico de transesterificación en la producción de biodiesel a partir de aceites o grasas en reacción con un alcohol de cadena corta.
Fuente: Avagyan & Singh, (2019)

En general la figura 4, describe el proceso de producción que se genera usando cualquier tipo de aceites o grasas, que contienen triglicéridos, se logra con la reacción catalíticamente de la grasa o aceite con un alcohol alifático de cadena corta bajo ciertas condiciones, originando el biodiesel, que son los ésteres alquílicos de los ácidos grasos unidos a

la estructura del triglicérido, y como subproducto, el glicerol, el cual también forma parte de la estructura del aceite (Avagyan & Singh, 2019). Generalmente, el biodiesel da como resultado ésteres alquílicos con propiedades similares a las que se obtienen a partir de derivados de combustibles fósiles (Pata & Isaías, 2022; Campos et al, 2020).

El "biodiesel" parece ser la alternativa más prometedora al diesel a base de petróleo. El auge en el reconocimiento del biodiesel como principio de energía alterno y renovable para el reemplazo del diesel fósil se debe fundamentalmente a las políticas ambientales para disminuir las emisiones de dióxido de carbono, debido a que es el principal elemento que ocasiona el efecto invernadero y el calentamiento global. Este biodiésel al ser combinado con el diésel puede emplearse para disminuir las emisiones de gases contaminantes al ambiente; este combustible se puede usar de forma puro en máquinas de combustión interna adaptadas y se identifica con el nombre gasoil verde (B100) o en mezclas con diésel de petróleo en diferentes concentraciones siendo la mezcla B5 (5% biodiésel y 95% de diesel) la más común, también se dan mezclas B10, B15, B20 (Granholm & Turk, 2018).

Materias Primas en la Obtención del Biodiesel

Hay varios recursos de usos como materia prima para la obtención de biodiesel, incluido aceites vegetales (palma, soja, girasol, coco, colza, jatrofa, moringa), también albaricoque y semillas algodón. De igual forma otras fuentes desatacadas son los aceites obtenidos a partir de

bacterias, algas y hongos, gracias a su crecimiento rápido. Dentro de las materias primas la más desatendida son los aceites vegetales producto de las frituras, ya que son abundantes y sin una gestión adecuada generan una gran contaminación ambiental, el conseguir estas materias primas es fácil ya que su costo es la mitad en relación al precio del aceite virgen, lo cual disminuye el precio de fabricación (Antonio et al., 2017).

El "biodiesel" parece ser la alternativa más prometedora al diesel a base de petróleo. El auge en el reconocimiento del biodiesel como fuente de energía renovable y alterna para cambiar el diesel fósil se debe especialmente a las políticas ambientales para reducir las emisiones de dióxido de carbono, que se sabe que es el principal culpable del calentamiento global. (Granholm & Turk, 2018).

La Transesterificación

Se genera a partir de varias metodologías: enzimática, básica, ácida, aplicando microondas, con ultrasonido y en régimen supercrítico, donde la básica es la más empleada, aunque tiene algunas desventajas, como por ejemplo su materia prima al contener ácidos grasos libres en presencia de una base y agua genera jabones lo cual representa un problema al separar del biodiesel del otro producto (glicerina) de la reacción creando una emulsión lo que causa una deducción en utilidad así mismo incrementa el proceso de elaboración. Por otra parte, la transesterificación ácida al no tener esa desventaja permite usar materias primas con gran

contenido de ácidos grasos libres como ejemplo, los aceites de frituras, que tiene muy bajo costo. Este tipo transesterificación ácida se genera por una catálisis homogénea o heterogénea (Pata & Isaías, 2022).

Según el autor Pata & Isaías, (2022) la reacción de transesterificación es una reacción reversible (para una reacción ácida) e irreversible (para una reacción básica) donde reaccionan los triglicéridos del aceite o grasa con exceso de un alcohol de cadena corta. Teniendo en cuenta que la reacción puede ser catalizada por un ácido, una base, enzimas o no emplear ningún catalizador. De esta manera se pueden obtener los intermediarios: mono y diglicéridos. Por su parte el autor Antonio et al., (2017) manifiesta que la estequiometría de la reacción de transesterificación es por cada mol de triglicéridos se obtienen tres moles de biodiésel y un mol de glicerina.

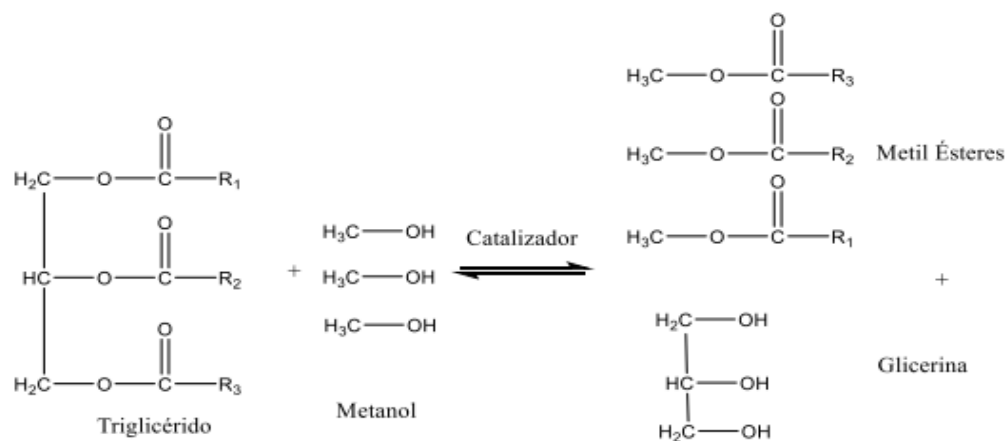


Figura 5. Reacción general de transesterificación de Triglicéridos.
Fuente: Pata & Isaías (2022).

La transesterificación es un proceso reversible en el que los triglicéridos de cadena larga se convierten en cadenas de éster más pequeñas en presencia de alcoholes de cadena corta y un catalizador. Primero convierte los triglicéridos en diglicéridos. En la segunda etapa, los monoglicéridos se forman a partir de diglicéridos., por último, En la última reacción, la formación de monoglicéridos promueve la formación de glicerol. Los ésteres se forman en todas las reacciones. El catalizador más utilizado es el hidróxido de sodio (NaOH), también conocido como soda cáustica o hidróxido de potasio (KOH). En los procesos de transesterificación e hidroesterificación se produce biodiesel como componente importante y como subproducto se produce glicerina, la cual es de gran importancia en la producción de fármacos, cosméticos, alimentos, resinas y aditivos (Andrade et al., 2019).

La producción de biodiésel implica varios pasos hasta el producto final, reacciones observadas que convierten grandes moléculas de triglicéridos ramificados en 9 moléculas de éster de alquilo no ramificadas lineales más pequeñas que son muy similares al biodiésel. (Mendez, 2018).

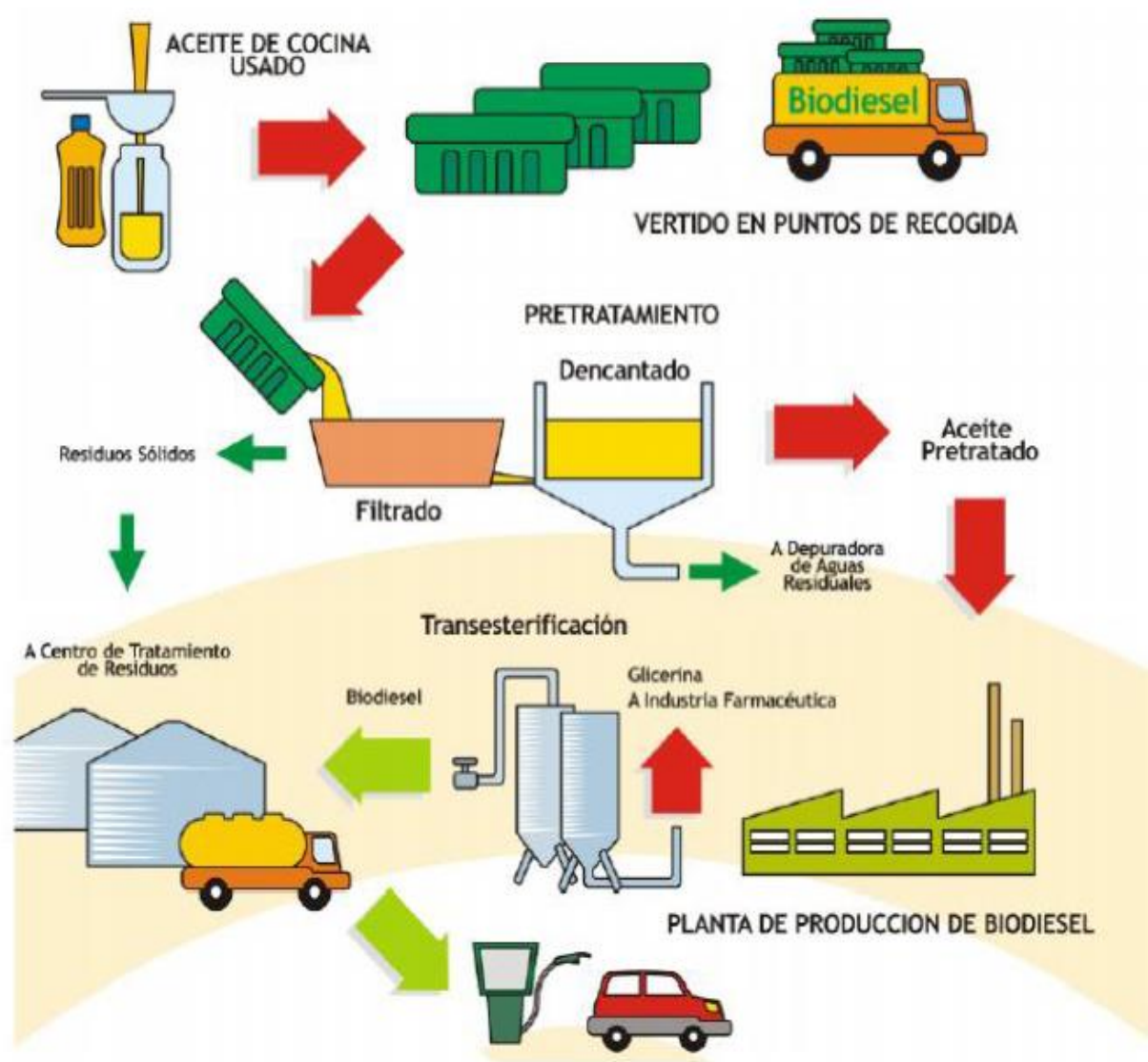


Figura 6. Producción de Biodiesel a partir de Aceite de Cocina Usado.

Fuente: Ojeda, (2021)

La figura 6, muestra la reacción que convierte una molécula grande de 9-triglicéridos ramificados en una molécula de éster de alquilo lineal no ramificado que es de menor tamaño y se parece mucho al diésel de petróleo. (Mendez, 2018).

Las reacciones de transesterificación pueden ser catalizadas por bases, ácidos o enzimas. Los triglicéridos son ésteres de ácidos carboxílicos de cadena larga combinados con glicerol. La Tabla 4 describe los aspectos relevantes de cada catalizador. (Peralta & Romero, 2019).

Tabla 4.

Tipos de catalizadores empleados en la reacción de transesterificación

Tipo catalizador	Descripción	Tipo de catalizador	desventajas	Ventajas
Bases	- Las bases se pueden quitar con Un protón del alcohol, haciéndolo más reactivo, mientras que el ácido puede catalizar la reacción donando un protón al grupo carbonilo, haciéndolo más reactivo.	-alcóxidos e hidróxidos de metales alcalinos -carbonatos de potasio o sodio - Los hidróxidos de metales alcalinos (NaOH KOH) - La glicerina, producida como subproducto de procesos químicos, es difícil de trabajar porque es muy costosa de purificar	-Los hidróxidos de metales alcalinos (KOH y NaOH) Son menos activos - reacción de saponificación 21 indeseable reduce los rendimientos de éster y dificulta considerablemente la recuperación de glicerina por formación de emulsión	-Avanza más rápido que la reacción catalizada por ácido. -son menos corrosivos que los compuestos ácidos -Los hidróxidos de metales alcalinos (KOH y NaOH) Son más baratos que los alcóxidos metálicos.

		- Los residuos de este proceso son contaminantes y deben ser tratados antes de su eliminación.	- La temperatura de reacción es a menudo alta, lo que significa costos de energía muy altos.	- es una buena alternativa ya que pueden proporcionar una conversión tan alta como los aceites vegetales simplemente aumentando la concentración del catalizador a 1-2 mol%
Ácidos	-Los ácidos carboxílicos {R- C (=O) - O - H} pueden ser Convertidos dentro de los metil ésteres {R- C (=O) - O - CH ₃ } por la acción de un agente de transesterificación.	-ácidos sulfónico y sulfúrico	-reacciones son lentas, requiriendo, típicamente, temperaturas superiores a 100 ° C y más de 3 h para alcanzar la conversión completa Una cantidad excesiva de alcohol dificulta la recuperación del glicerol,	- Estos catalizadores proporcionan rendimientos muy altos de ésteres de alquilo Una gran cantidad de alcohol ayuda a la formación de los productos
Enzimas.	Aplicadas ampliamente en síntesis orgánica. Su potencial para la síntesis regioselectiva y especialmente para la síntesis enantioselectiva los convierte en herramientas valiosas	Lipasas	- Listo para usar y fácil de manejar -aún no se han desarrollado comercialmente - El tiempo de reacción sigue siendo desventajoso en comparación con los sistemas de reacción	-No requieren ninguna coenzima - son razonablemente estables y con frecuencia toleran solventes orgánicos. - Una mezcla de reacción más limpia facilita la recuperación del

Costo del catalizador y (2) el efecto inhibidor del metanol en muchos catalizadores	catalizados por bases. - Coproducción de glicerol contaminado con catalizador y formación de jabón que dificultan el proceso de purificación del biodiésel resultante - las enzimas usadas como catalizadores tienen costo alto	producto sin residuos tóxicos.
---	---	--------------------------------

Fuente: Elaboración propia adaptado de (Peralta & Romero, 2019), (Prieto et al., 2019).

Normatividad de los Aceites Usados

Con la finalidad de tratar adecuadamente los aceites vegetales usados, algunos países han desarrollado normativas para promover el manejo adecuado de los aceites comestibles usados desde su producción, recolección, uso y disposición final, con base en disposiciones normativas, se pretende reducir y mitigar los posibles impactos al medio ambiente, el agua, la salud humana y los recursos de la tierra debido al descarte no adecuado de desechos (Rojas H., 2021).

Panorama Internacional

Tabla 5.

Normatividad internacional sobre manejo de los AVUS.

País	Normatividad	Autor
España	<p>Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y tierras contaminados, expone “antes de 2020, la cantidad de residuos domésticos y comerciales destinados a la preparación para la reutilización y el reciclado para las fracciones de papel, metales, vidrio, plástico, bioresiduos u otras fracciones reciclables deberá alcanzar, en conjunto, como mínimo el 50% en peso”.</p> <p>Para el período 2008-2015 el plan Nacional Integrado de Residuos (PNIR): Suscita la recolección por separado de residuos de aceites vegetales.</p> <p>Política Energética Europea: objetivos de producción de energía renovables a través de la producción de biocombustibles, sistemas de recolección municipales y para grandes generadores.</p> <p>el 18 de diciembre de 2014 se efectúa el convenio pactado con la Federación Española de Hostelería y la Asociación de Gestores de Residuos de Aceites, en donde se trazan acuerdos para una adecuada gestión de estos residuos.</p>	Miteco, (s, f)
Chile	<p>Prohibición del vertimiento de aceites de cocina usados en el desagüe, por medio del decreto Supremo N° 609/98 MOP:</p> <p>Resolución Exenta N° 4808 SAG: Prohíbe la alimentación de animales con ACU</p>	ANDI, (2017)

Promueve el ACU como materia prima para producir biocombustibles, con la ley Nacional de Promoción de los Biocombustibles:

Argentina	Creación del programa para el reciclado y recolección del aceite vegetal usado con ayuda de la comunidad educativa como entes de recepción del residuo resultante de restaurante y diferentes generadores, llamado EL PlanBio en el año 2008: Ley de regulación, control y gestión de aceites vegetales y grasas de fritura usados. Legislatura de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires del año 2009:	OPDS, (s, f)
México	NADF012-AMBT-2015 del año: Normas Ambientales del Distrito Federal por las que se establecen las condiciones y especificaciones técnicas para el manejo integral de grasas y aceites residuales de origen animal y/o vegetal en el territorio de la Ciudad de México. Esta norma define normas y especificaciones técnicas para los generadores, recolectores y transportistas de residuos, así como para los centros de acopio o empresas recicladoras. Además, contiene un apartado que promueve la gestión integrada de grasas y aceites domésticos a partir de residuos animales y/o vegetales.	SEDEMA, (2018)

Fuente: elaboración propia, 2022.

Normatividad Colombiana en Relación a Aceites Usados.

Acuerdo 634 del 30 de diciembre de 2015, Concejo de Bogotá: "Por medio del cual se establecen regulaciones para la generación, recolección y tratamiento o aprovechamiento adecuado del aceite vegetal usado y se dictan otras disposiciones"

Concepto 00166 de 2016, secretaria Distrital de Ambiente: La conclusión del concepto de aplicación y poder sobre el concepto legal establecido en la Ley 634 en 2015 es que

la agencia legal de control ambiental, que puede ser legal para monitorear y controlar las disposiciones del contrato anterior.

Resolución 316 de 2018, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible: Se ha desarrollado normativa para el tratamiento de aceites usados de cocina, que define el generador industrial, comercial y de servicios (Murcia, 2019).

Resolución 0631, artículo 12: Para valores máximos permitidos para emisiones especiales para el cuerpo de agua superficial y los sistemas de tratamiento de aguas residuales públicas, la resolución se considerará en detalle en 0631 campos de alimentos y bebidas. El nivel más alto permitido (20 mg/l) resalta los parámetros de grasa y aceite en productos de alimentos y bebidas (Mendez, 2018).

Resultados Obtenidos y Análisis Estadístico

Para el analizar la información aprovechable en las bases datos de Scielo se determinó la utilización de 3 tipos de ecuación de búsqueda, para Scopus 1, en uno de los casos para las dos bases de datos se determinó utilizar la misma ecuación de búsqueda y analizar aspectos cantidad de documentos o publicaciones en relación al rango de años seleccionado al inicio que fue desde 2018-2022, así mismo se gestiona información sobre la distribución de documentos en relación al área temática, las publicaciones en relación a los países o territorio y los autores más representativos; para el caso de Dialnet y Google académico al no arrojar la ecuación de

búsqueda se decide solo utilizar el rango de fechas para 2018-2022, así mismo la información pertinente para el desarrollo del documento dando como resultado lo siguiente:

Base de Datos de SciELO

Ecuación 1: (used vegetable oils) OR (lipases) OR (microorganisms) OR (biodiesel) OR (enzymes)

Fechas de años de publicación desde 2018-2022

Cantidad total de la búsqueda: 1.983 documentos en total

Países o territorio: Suramérica

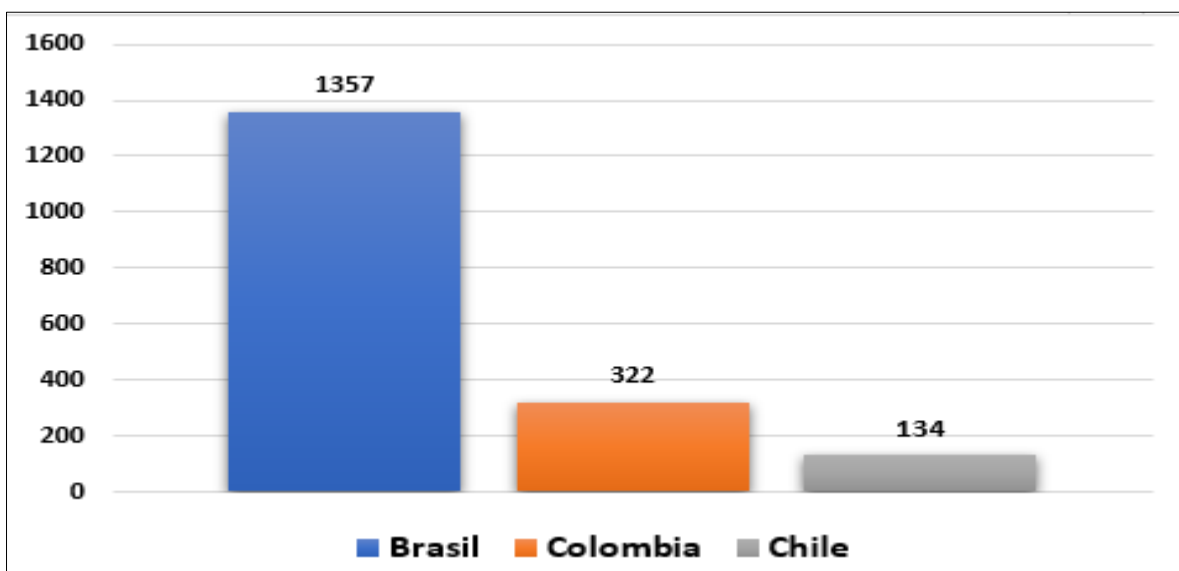


Figura 7. Cantidad de documentos publicados por los países o territorio base de datos SciELO ecuación 1.

Fuente: elaboración propia, información tomada de base de datos SciELO

La figura 7 muestra que tomando un total de 1.983 documentos relacionados con la ecuación de búsqueda se realizó el filtro para seleccionar los países de Suramérica debido a que se observa que son los principales aportantes en las publicaciones teniendo en total 1.813 documentos; los países seleccionados fueron: Brasil: 1.357, Colombia: 322. Chile: 134; estos se tuvieron en cuenta debido a que superaban las 100 publicaciones.

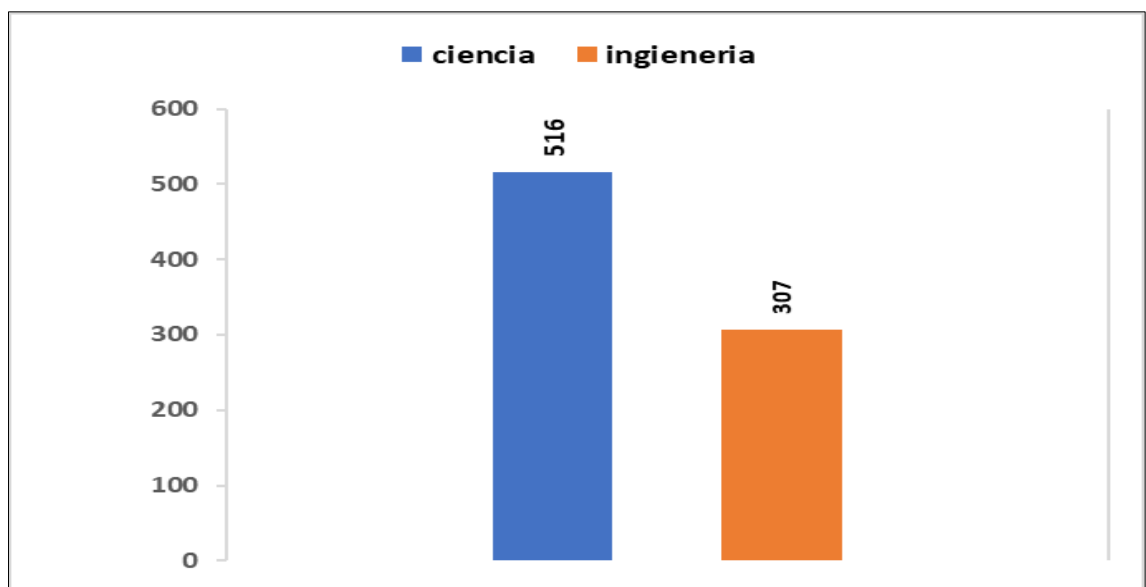


Figura 8. Distribución de documentos en relación al área temática base de datos SciElo ecuación 1.

Fuente: base de datos SciElo

La figura 8 describe la totalidad de documentos en relación al área temática de interés de la investigación obtenida la cual fue de 1.168 documentos distribuidos de la siguiente manera: el área de ciencia:516 e ingeniera: 307.Es notorio que estas disciplinas o áreas se relacionan en torno a estudios de esta clase donde se evidencia una gran cantidad de información.

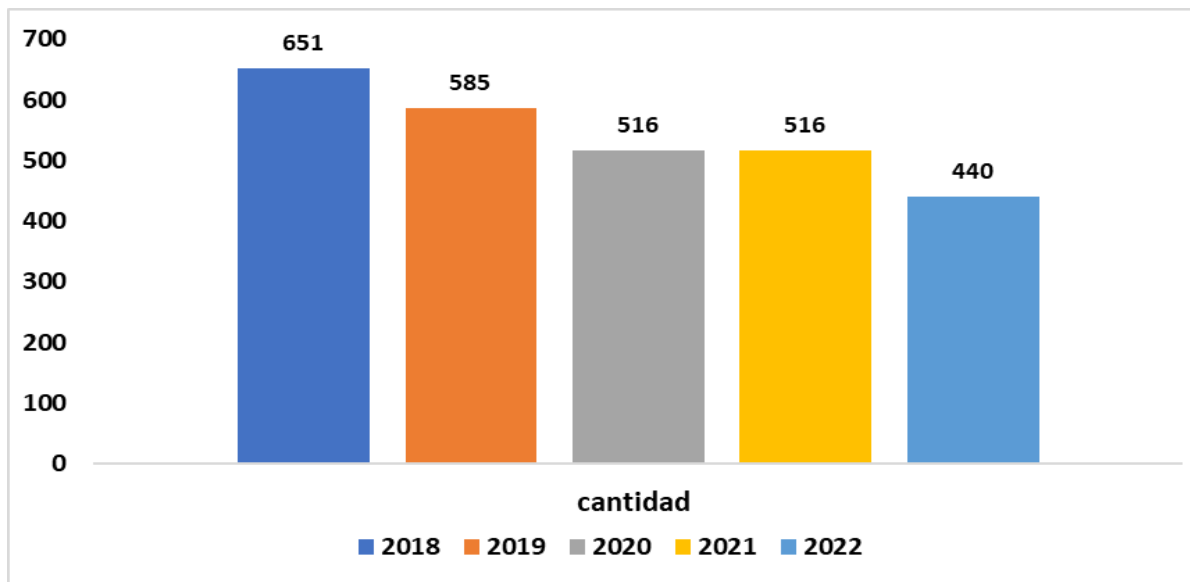


Figura 9. Distribución de cantidad de documentos en relación al rango de años desde 2018-2022 base de datos SciElo ecuación 1.

Fuente: base de datos SciElo

La figura 9 muestra como desde el año 2018 se observa un aumento ya que este lidera la lista como el periodo en el cual se realizaron un mayor número de publicaciones en relaciona a la temática de investigación de los aceites, enzima y biodiesel con esto se evidencia la continuidad en el año 2019, 2020 y 2021 con cantidades similares y por ultimo un valor un poco más

reducido para los años 2022; estas cifras demuestran que aunque aún está en curso el año 2023 es posible que llegue a evidenciar cifras similares a estos años anteriores.

Base de Datos de SciELO

Ecuación 2: (biodiesel) AND (LIPASAS)

Fechas de años de publicación desde 2018-2022

Cantidad total de la búsqueda: 4 documentos en total

Países o territorio: todos los disponibles

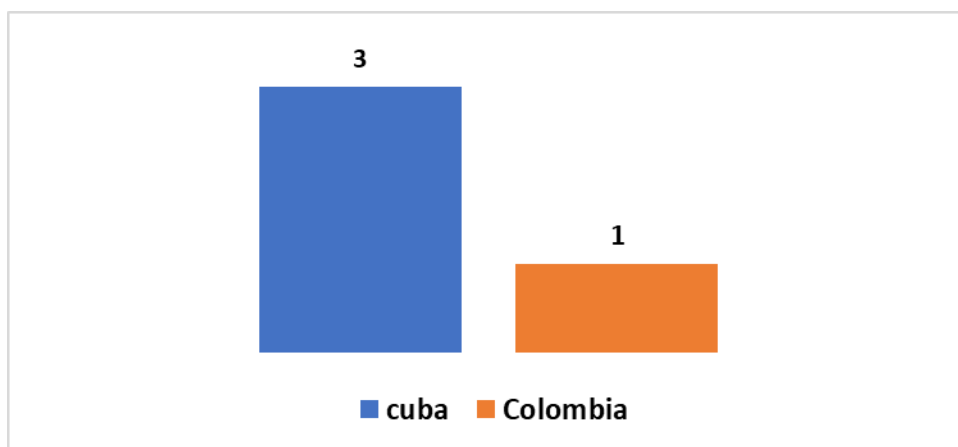


Figura 10. Cantidad de documentos publicados y los países o territorio base de datos SciELO ecuación 2.

Fuente: elaboración propia, base de datos SciELO

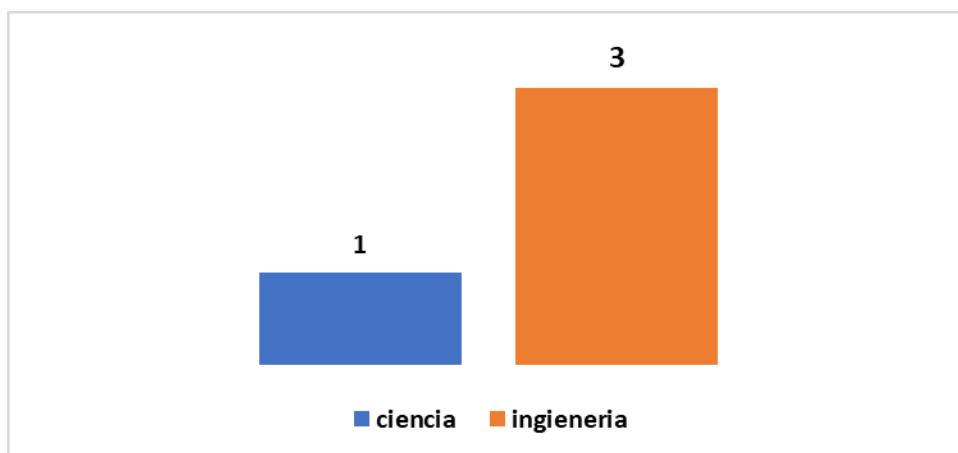


Figura 11. Distribución de documentos en relación al área temática base de datos SciElo ecuación 2.

Fuente: elaboración propia, base de datos SciElo

La figura 10 y 11, muestra un total de 4 documentos relacionados con la ecuación de búsqueda los países evidenciados son Cuba: 4 documentos y Colombia: 1 documento respectivamente; a pesar de que son pocos los archivos para esta ecuación son de gran interés para el desarrollo del documento, ya que evidencia información adecuada a temas de biodiesel, transesterificación, aceite vegetal entre otros para las áreas de ciencia e ingeniería.

Base de Datos de SciElo

Ecuación 3: ((biodiesel) AND (transesterificación)) OR (enzimas) AND (lipasas)

Fechas de años de publicación desde 2018-2021

Cantidad total de la búsqueda: 6 documentos en total

Países o territorio: todos los disponibles

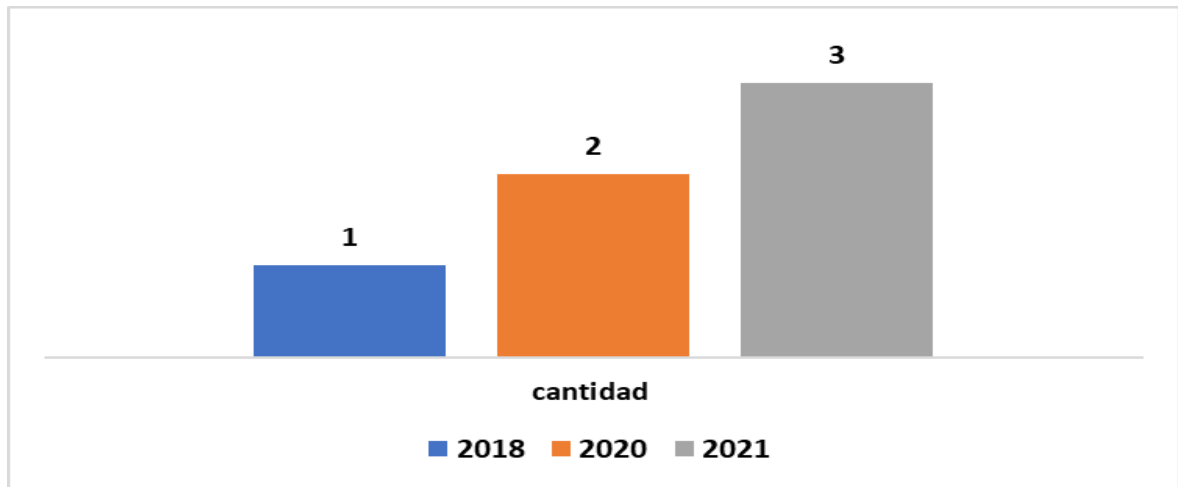


Figura 12. Distribución de cantidad de documentos en relación al rango de años desde 2018-2021 base de datos SciElo ecuación 3.

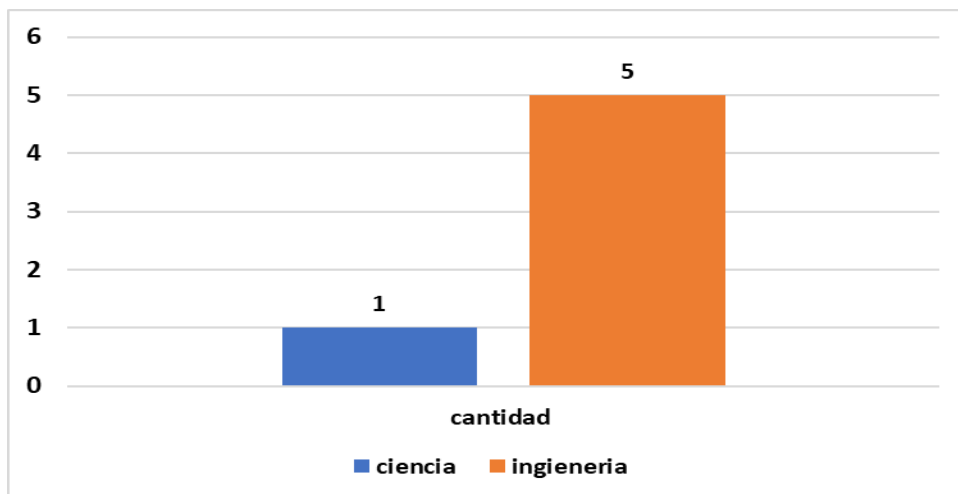


Figura 13. Distribución de documentos en relación al área temática base de datos SciElo

Fuente: elaboración propia, base de datos SciElo ecuación 3.

La figura 12, muestra un ligero aumento en la cantidad de documentos, aunque aún es posible evidenciar que son pocos los encontrados con la ecuación directamente la tendencia es al aumento; por su parte es evidente que en la figura 13, la cantidad de información obtenida radica del área de la ingeniería.

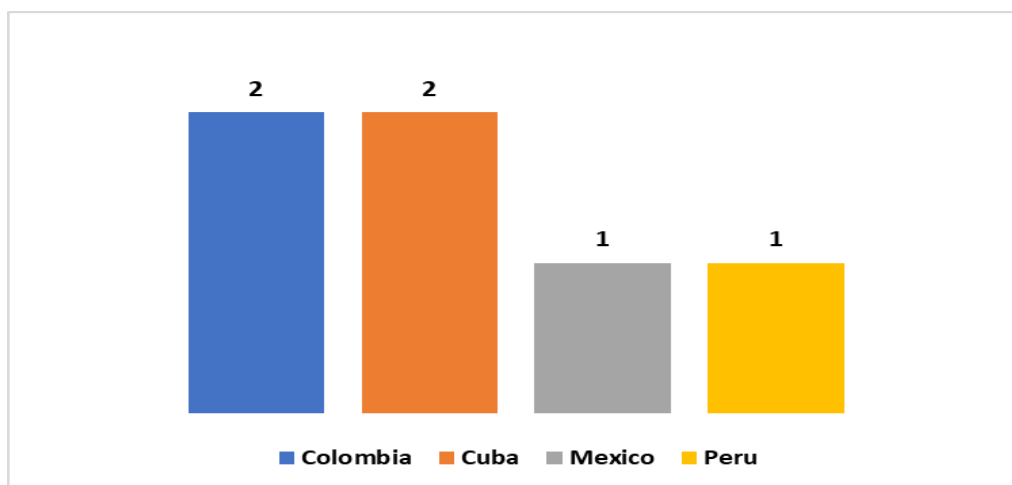


Figura 14. Cantidad de documentos publicados por países o territorio base de datos SciElo

Fuente: elaboración propia, base de datos SciElo ecuación 3.

En relación a 6 documentos en total obtenidos la distribución esta pareja en ciertos países como Colombia y Cuba con 2 publicaciones cada uno; así mismo se encuentran en igual cantidad de publicaciones Mexico y Perú con 1 respectivamente.

Base de Datos de Scopus

Ecuación de búsqueda Scopus: (used vegetable oils) OR (lipases) OR (microorganisms) OR (biodiesel) OR (enzymes)

Fechas de años de publicación desde 2018-2022

Cantidad total de la búsqueda: 793.590 documentos en total

Países o territorio: todos

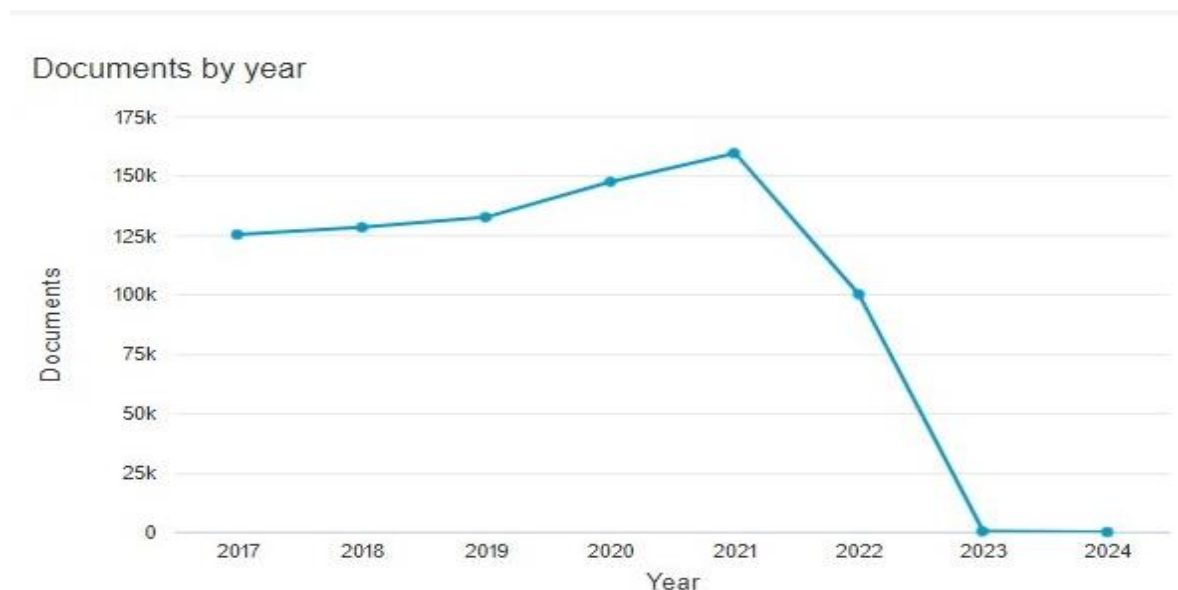


Figura 15. Cantidad de documentos en el rango de años desde 2018-2022 base de datos Scopus

Fuente: base de datos Scopus

La figura 15, muestra cómo ha sido el comportamiento estable y creciente en relación a la temática donde desde 2018 con un total de más o menos 125.269 documentos publicados hasta 2019 donde se mantiene dicha cantidad, aunque con un ligero aumento, de igual forma en 2020 y 2021 es notable un aumento de más o menos 20.000 publicaciones, en relación al año 2022 aunque está cerca de los 100.000 mil documentos

Seguidamente se analizó la información relacionada con los autores más destacados en torno a la temática como lo describe la siguiente figura.

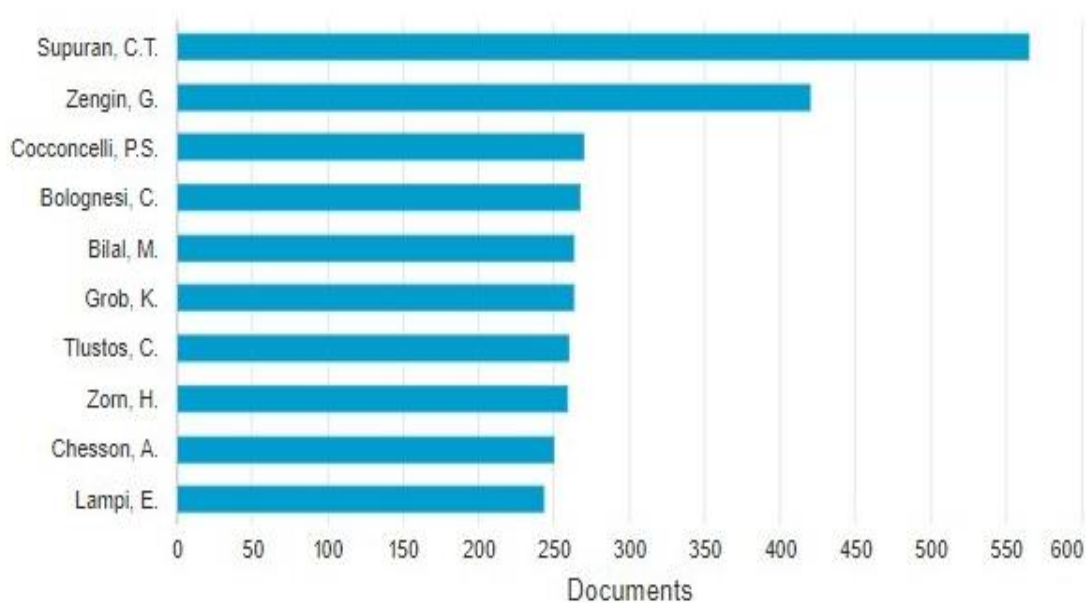


Figura 16. Cantidad de documentos por autor en el rango de años 2018-2022
Fuente: base de datos Scopus.

La figura 16, permite conocer en total 10 autores, donde el autor Spuran, C. T, es el más representativo en lo relacionado con cantidad de publicaciones del tema, este encabeza el listado de la tabla con un total de 565 publicaciones seguido de Zengin, G con 420, así mismo desde el autor Cocconcelli hasta Lampi son un grupo con rangos entre 270 a 243 distribuidas como se describe en la imagen del gráfico.

Si bien es cierto la importancia de las investigaciones son claras y comunes que las diferentes publicaciones encontradas en la web apuntan a países desarrollados, es cada vez más notorio el que países como Brasil muestren un amplio interés en áreas de investigación realizando aportes significativos en miras de que Suramérica genere mucho más contenido en temas de biotecnología y estrategias amigables en relación al manejo de residuos como el aceite vegetal usado y las enzimas para obtener biodiesel; Así mismo el aspecto acerca de que tanto los países o territorios realizan aportes a esta base de datos permite tener la siguiente información expresada en el siguiente grafico

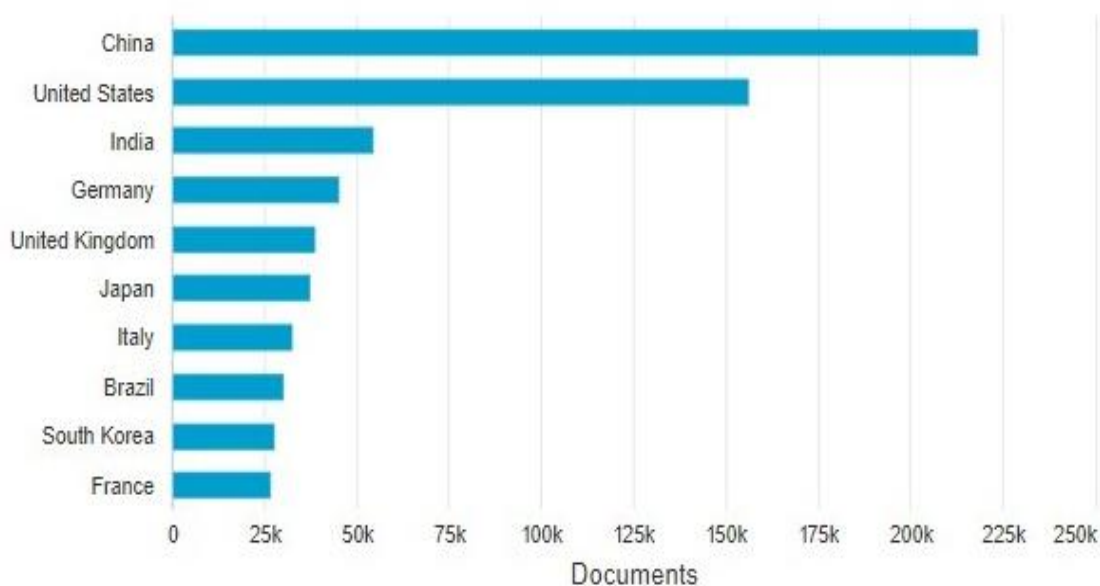


Figura 17. Cantidad de documentos publicados en por los países o territorio base de datos Scopus

Fuente: base de datos Scopus

La figura 17, presenta a China como cabeza de la lista con un total de 218.195 documentos seguido de estados unidos con 155.968, posterior se encuentran los países entre India y Alemania en un rango de 75.000-50.000 publicaciones y por último los países en menor rango, aunque no menos importante desde Reino Unido hasta Francia.

Por otro lado, la interacción de los aspectos de la temática de estudio en distribución porcentual es posible evidenciarla a través del siguiente grafico número 18.

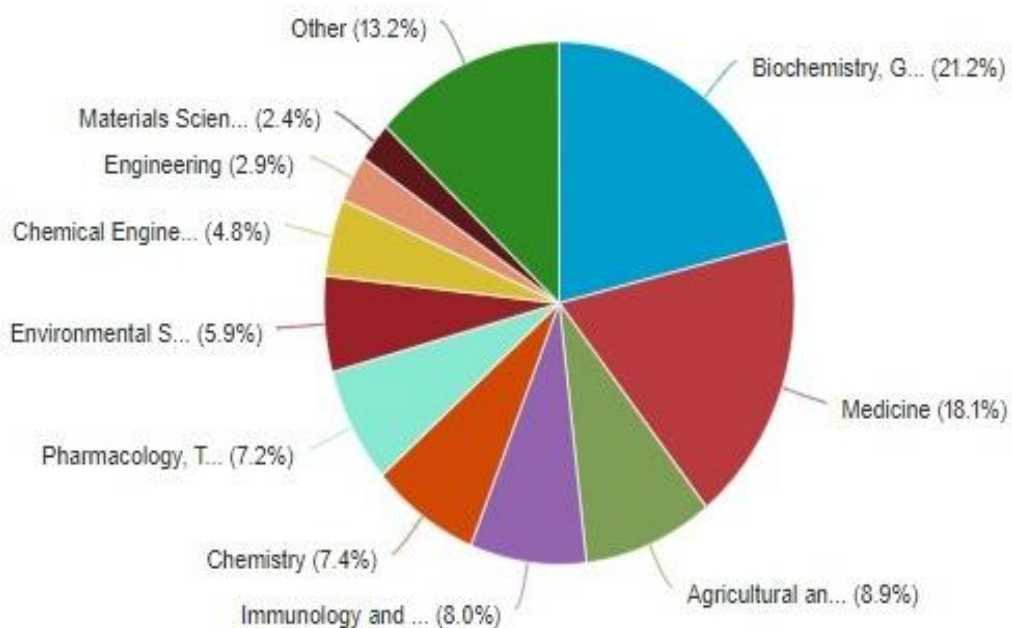


Figura 18. Distribución porcentual de documentos en relación al área temática
Fuente: base de datos Scopus

Esta figura 18, permite evidenciar como existe una gran variedad de áreas temáticas que engloban temas y elementos claves como las enzimas, los aceites y el biodiesel, además es posible evidenciar que las tres áreas de mayor cobertura son la bioquímica con un 21 %, la medicina con un 18 % y otras con un 13 %, seguidamente están las demás donde se reparten el restante 48 %.

Análisis y Discusión de Resultados

La principal expectativa con el desarrollo de este trabajo monográfico se centra en identificar los elementos claves en la obtención del biodiesel y la utilización de aceite usado junto con enzimas microbianas; como resultado destacar las técnicas de conveniencia para el aceite vegetal usado y mejorar positivamente el impacto en el medio ambiente. Por lo tanto, se estructuró una búsqueda bibliográfica sistemática, que incluye el conocimiento de las materias primas empleadas, la implementación de métodos de transesterificación, enzimas y catálisis de las mismas y por último la normatividad pertinente de investigación en un conjunto de bases de datos científicas, documentos, páginas web o repositorios previamente creados a nivel nacional y mundial, cuyas publicaciones contienen información relevante y explora los datos de interés sobre este tema.

La presente revisión de literatura permitió identificar que durante los años 2018 a 2022, hubo un incremento en el número de publicaciones basadas en la obtención de biodiesel y las enzimas bajo la utilización de un aceite vegetal de primera generación y el usado; lo anterior se puede sustentar con un reciente estudio basado en los métodos para la valorización del Aceite vegetal usado, en donde se observó como a partir de técnicas biotecnológicas utilizaban nuevas estrategias para la obtención del biodiesel dándole uso al aceite residual; existen varios procesos y técnicas para el aprovechamiento de estos residuos. Por ejemplo, en; jabón, cera, velas, biocombustibles, lubricantes, procesamiento de alimentos, etc. Se cree que el uso de estos residuos reduce el impacto ambiental y proporciona beneficios económicos como lo describe

Ojeda, (2021). Por otra parte, se evidenció con la búsqueda que, En Colombia, así como en muchos países del mundo, los aceites vegetales son indispensables en las cocinas domésticas y en establecimientos de comercio (Hoteles, Restaurantes y Cafeterías). Además, El mayor productor de residuos de aceite vegetal del país es un restaurante y un hogar para colombianos (Rojas H., 2021).

A pesar de la existencia en Colombia de normas sobre la adecuada disposición de los residuos como el aceite vegetal usado, no es una necesidad primaria la generación y el aprovechamiento de este residuo de forma constante, por lo tanto, las alternativas de gestión para el aceite de cocina usado son desconocidas para la mayoría de la población. En la actualidad no es mucha la información sobre la implementación constante de estas alternativas biotecnológicas debido al apego a economías dependientes de la industria fósil. De igual forma es evidente que la desinformación permite que los ciudadanos no tengan información ni educación sobre la disposición y el aprovechamiento de este residuo, el cual se considera peligroso.

La discusión de los resultados de los cuatro principales casos abordados en la investigación sobre la producción de biodiesel utilizando enzimas revela diversas perspectivas y avances en este campo:

El primer caso, que involucra la lipasa BTL2 recombinante de *Bacillus thuringiensis*, destaca su alta resistencia a solventes y cambios térmicos, lo que la convierte en una candidata

promisoria para aplicaciones en la síntesis de biodiesel. Sin embargo, es importante considerar la viabilidad económica y la escalabilidad de su producción en el laboratorio.

En el segundo caso, la utilización de un biocatalizador derivado del hongo *Rhizomucor* en la transesterificación de aceite de cocina quemado con alcoholes de cadena corta ofrece una perspectiva interesante. La cromatografía en capa fina utilizada para analizar la síntesis de biodiesel indica la eficiencia de este enfoque. No obstante, es crucial evaluar la escalabilidad y la disponibilidad de materias primas a gran escala.

El tercer caso resalta la importancia de optimizar las condiciones de crecimiento del hongo *Aspergillus niger* para lograr un rendimiento óptimo en la extracción de aceite y su posterior conversión en biodiesel mediante una enzima extracelular (lipasa). Este enfoque plantea cuestiones de viabilidad y eficiencia en la producción a gran escala.

El último caso presenta un enfoque innovador al inmovilizar una enzima esterasa/Lip.

Conclusiones y Recomendaciones

La obtención del biodiesel es posible a través de las materias primas para que son generadas en gran medida por la población mundial posterior a su utilización rutinaria en procesos de fritura, lo cual encamina a el sector de biocombustibles a poder establecer estrategias de mejor aprovechamiento de este residuo alimenticio.

Los países en desarrollo cada vez más emplean elementos obtenidos biotecnológicamente como los son las lipasas de origen microbiano para la síntesis de biodiesel, junto con técnicas de inmovilización enzimática es posible lograr un aprovechamiento aún mejor de las mismas, con lo que se apoya al progreso y sostenibilidad, estructurado en políticas y legislaciones que lo sustentan.

En Colombia es aún poco evidente el aumento en la implementación de políticas de utilización de residuos hacia una economía circular en relación al biodiesel; aunque es posible evidenciar normativas que dan luz en la gestión ambiental de las organizaciones, es un camino largo en comparación con países como Brasil y argentina quienes ya hacen parte en cierto modo de cifras en la utilización y generación de biocombustibles.

El ministerio del medio ambiente, como organismo de autoridad debería enfatizar y realizar una mejor auditoría y control al cumplimiento normas de unidades económicas, para con esto lograr una mejor disposición final al aceite vegetal usado.

Desde las instituciones de formación y desde el mismo núcleo familiar es indispensable la educación en relación al buen uso y disposición de estos aceites vegetales usados, los cuales si

no son bien dispuestos generan un gran impacto negativo en las fuentes hídricas y los suelos principalmente los cultivados por campesinos, lo que al final se refleja en efectos en la población en general.

Referencias Bibliográficas

ANDI. (2017). Asociación Nacional de Empresarios de Colombia. Recuperado el 20 de noviembre de 2019, de <http://www.andi.com.co/Uploads/Documento%20Soporte%20Tecnico%20ACU%20-Ajustes%20-29-09-17.pdf>.

Andrade Lage, L. H., Teixeira Gonçalves, R. A. F. A. E. L., Andrade de Oliveira, U. L. I. S. S. E. S., & Argolo Saliba, W. I. L. L. I. A. M. (2019). Análise dos processos de Transesterificação e Hidroesterificação na Produção de biodiesel. *Journal of Exact Sciences*, 21(3).

Antonio, E., Cedeño, L., Rocha-Hoyos, J., Alvear, P. S., & Medrano Barboza, J. (2017). Producción e Impacto del Biodiesel: Una Revisión. *INNOVA Research Journal*, 2(7), 59–76.

Aravindan, R. (2017). Lipase applications in food industry. *Indian Journal of Biotechnology*. 6(4), 141-58.

Asri NP, Soe'eib S, Poedjojono B, Suprpto (2018) Compatible con alúminacatalizador de óxido de zinc para la producción de biodiésel a partir de aceite de kesambiy optimización para lograr los mayores rendimientos de biodiésel, euro-Mediterráneo. *J Environ Integr*. <https://doi.org/10.1007/s41207-017-0043-8>.

Avagyan, A. B.; Singh, B. (2019). Biodiesel: Feedstocks, technologies, economics and barriers: Assessment of environmental impact in producing and using chains. Singapore: Springer, p. 15-76.

- Campos-Ramírez, L., Pérez-Sánchez, A., Benítez-Legra, A., & Benítez, I. (2020). Estudio técnico-económico de dos tecnologías de producción de biodiesel a partir de aceite de soya empleando el simulador superpro designer. *TecnoLógicas*, 23(48), 117-139.
- Chávez-Sandoval, B. E., Hernández-Salgado, K. F., Martínez-García, M., Ávila-Paredes, H. J., Díaz-Álvarez, F. H., & García-Franco, F. (2021). Obtaining Biodiesel by Direct Transesterification of *Botryococcus braunii* and *Coccomyxa subellipsoidea*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 65(3), 318-330
- Carrasco Mendoza, R. N., & Anchundia Mendoza, K. S. (2021). Estudio del proceso de conservación de paiche (*Arapaimas gigas*) aplicando distintos aceites de origen vegetal: Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*), ajonjolí (*Sesamun indicum*), maní (*Arachis hypogaea* (Bachelor's thesis, Quevedo: UTEQ).
- Castilla Arboleya, A. (2022.). Producción, caracterización bioquímica e inmovilización de lipasas microbianas y sus aplicaciones. Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Química
- Castillo, M. M. (2017). Saponificación: Una propuesta didáctica para el aprendizaje significativo del concepto de cambio químico. Bogota, Universidad Nacional de Colombia.
- Castro, F. F., Ponchio, A. B., Nassur, C. B., Parra, I. (2017). Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus westerdijikiae*. *Biocatal. Agric. Biotechnol*, Vol. 10, pp. 321-328.
- Casas-Godoy, L., Gasteazoro, F., Duquesne, S., Bordes, F., Marty, A., Sandoval, G.

(2018). Lipases: an overview, in: Sandoval, G. (Ed.), *Lipases and Phospholipases. Methods in Molecular Biology*, Vol 1835. Humana Press, New York, NY, pp. 3–38.

Chapman, J., Ismail, A.E., Dinu, C.Z. (2018). Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts* 8, 20–29. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>.

Coello Quinde, C. P., & Vélez Rizco, F. E. (2019). Inmovilización de la enzima lipasa en soporte de quitosano para el tratamiento de agua con contenido de grasas y aceites de origen animal (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química).

Corradini, F.A.S., Alves, E.S., Kopp, W., Ribeiro, M.P.A., Mendes, A.A., Tardioli, P.W., Giordano, R.C., Giordano, R.L.C. (2019). Kinetic study of soybean oil hydrolysis catalyzed by lipase from solid castor bean seeds. *Chem. Eng. Res. Des.* 144, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.02.008>.

Cujilema-Quitio, M. C., León-Revelo, G., Rizo Porro, M., Taramona Ruiz, L., & Ramos-Sánchez, L. B. (2018). Producción de lipasas por fermentación sólida con *aspergillus niger*: influencia del pH. *Centro Azúcar*, 45(4), 1-9

Cuty Clemente, E. R., & Mejía Regalado, A. D. (2019). Influencia del biodiésel de aceite de fritura usado, sobre las emisiones: índice de opacidad. *Tecnura*, 23(59), 60-67.

Du W, Li W, Sun T, Chen X, Liu D. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. *J Applied Microbiology Biotechnology*. 2018;79(1):331-57.

Facin, B.R., Melchior, M.S., Valério, A., Oliveira, J.V., Oliveira, D. De. (2019). Driving immobilized lipases as biocatalysts: 10 years state of the art and future prospects. *Ind. Eng.*

Chem. Res. 58, 5358–5378. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b00448>

Fatima, S., Faryad, A., Ataa, A., Joyia, F. A., & Parvaiz, A. (2021). Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68(3), 445–458.

<https://doi.org/10.1002/bab.2019>

Filho, D.G., Silva, A.G., Guidini, C.Z. (2019). Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 7399–7423.

<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10027-6>.

Fuentes, D. H. (2020). Estudio in silico de la interacción de la esterasa HSL BaEstB de *Bjerkandera adusta* con sustratos esterificados y evaluación de su actividad in vitro.

García-Muentes, S. A., Sánchez del Campo-Lafita, A. E., Labrada-Vázquez, B., Lafargue-Pérez, F., & Díaz-Velázquez, M. (2018). Cinética de la reacción de transesterificación para la producción de biodiesel a partir del aceite de *Jatropha curcas* L., en la provincia de Manabí, Ecuador. *Tecnología Química*, 38(2), 281-297

Granholm, J. M., & Turk, D. M. (2018). Alternative Fuels Data Center: Biodiesel Blends. https://afdc.energy.gov/fuels/biodiesel_blends.html.

Guevara, A. A. De, & Ii, C. M. S. (2018). Aislamiento y selección de hongos lipolíticos de materiales contaminadas con desechos de aceite vegetal. *Revista Cubana de Química*, 30(3), 362-378. <http://scielo.sld.cu/pdf/ind/v30n3/ind01318.pdf>

Godoy CA, Klett J, Di Geronimo B, Hermoso JA, Guisán JM, Carrasco-López C.

Disulfide Engineered Lipase to Enhance the Catalytic Activity: A Structure-Based Approach on BTL2. *Int J Mol Sci.* 2019;20(21):5245.

Goh, B. H. H., Chong, C. T., Ge, Y., Ong, H. C., Ng, J.-H., Tian, B., Ashokkumar, V., Lim, S., Seljak, T. y Józsa, V. (2020). Progress in utilisation of waste cooking oil for sustainable biodiesel and biojet fuel production. *Energy Conversion and Management* 223. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.113296>

Gómez, J. (2018). Proceso de recolección de aceite vegetal usado en la corporación de abastos de Bogotá S.A. <https://repositorio.ucundinamarca.edu.co/bitstream/handle/20.500.12558/1413/PROCESO%20DE%20RECOLECCI%C3%93N%20DE%20ACEITE%20VEGETAL%20USADO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Gusniah, A., Veny, H. y Hamzah, F. (2020). Actividad y estabilidad de la lipasa inmovilizada para su utilización en la transesterificación de aceite de cocina usado. *Boletín de catálisis e ingeniería de reacciones químicas*, 15 (1), 242-252.

Guiral, L. M. P., Restrepo, D. A. G., Giraldo, L. A. H., & Restrepo, M. L. V. (2023). Producción de conidias de *Aspergillus niger* para la obtención de lipasa extracelular y extracción de aceites microbianos potenciales para la obtención de biodiesel. *Revista de Biotecnología Aplicada* 2do., 1(1), 157.

Hernández, C S., & Díaz Jiménez, M. D. L. V. (2018). Evaluación de un proceso industrial de producción de biodiésel mediante análisis de ciclo de vida. *Revista internacional de*

contaminación ambiental, 34(3), 453-465.

Hoon KC, Lee JH, Kim SW, Kang JW. Lipase-catalysed esterification of(S)-Naproxen ethyl ester in supercritical carbon dioxide. *J Micro Biotech.* 2019;19(8):16-52.

IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). Atlas de los biocombustibles líquidos 2019-2020. Disponible en:< <https://www.iica.int/es>> Acceso en: 12 sep. 2021.

Inamuddin, I.; Ahamed, M. I.; Boddula, R.; Rezakazemi, M. (2021). *Biodiesel Technology and Applications.* Wiley. p. 1-58.

Jamil, F., Al-Haj, L., Al-Muhtaseb, A.H., Al-Hinai, M.A., Baawain, M., Rashid, U., Ahmad, M.N.M, (2018). Current scenario of catalysts for biodiesel production: A critical review. *Rev. Chem. Eng.* 34, 267–297. <https://doi.org/10.1515/revce-2016-0026>

Khan, F.I., Lan, D., Durrani, R., Huan, W., Zhao, Z., Wang, Y. (2017). The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 5, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00016>.

Lai, O.-M., Lee, Y.-Y., Phuah, E.-T., Akoh, C.C. (2019). Lipase/Esterase: properties and industrial applications. *Encycl. Food Chem.* 158–167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21640-5>

Liu, X., Kokare, C. (2017). *Microbial enzymes of use in industry, Biotechnology of microbial enzymes: Production, biocatalysis and industrial applications.* Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>.

Londoño, J. P. A., Avendaño, A. J. A., Llanos, J. W. P., & Ordoñez, D. C. R. (2021). Aprovechamiento de aceites vegetales usados para la obtención de biodiésel de segunda generación: una revisión.

https://aprepro.org.br/combrepro/2021/anais/arquivos/09272021_220941_61526cf9343f5.pdf

Ma, F., Hanna, M. A. (2019). Biodiesel production: a review 1. *J Bio Tech.* 70(15), 15-40.

Marchetti, R., Vasmara, C., & Fiume, F. (2019). Pig slurry improves the anaerobic digestion of waste cooking oil. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 8267-8279.

Mejía, O. J. A., & Morales, A. D. (2022). Caracterización de hongos productores de enzimas lipasas. *Ciencia e Ingeniería*, 9(1), e6708445-e6708445.

Melani, N. B., Tambourgi, E. B., & Silveira, E. (2020). Lipases: From Production to Applications. *Separation and Purification Reviews*, 49(2), 143–158. <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1564328>

Méndez, M. (2018). Estudio de la viabilidad ambiental y económica del aprovechamiento de aceite vegetal usado (AVU) proveniente de cocinas comerciales del centro de Villavicencio como insumo para la elaboración de biodiesel en el Meta. Villavicencio, Meta, Colombia: Facultad de Ingeniería Ambiental, Universidad Santo Tomás.
<https://repository.usta.edu.co/handle/11634/14196?show=full>

Miao, C., Yang, L., Wang, Z., Luo, W., Li, H., Lv, P., Yuan, Z. (2018). Lipase immobilization on amino-silane modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production. *Fuel* 224, 774–782. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2018.02.149>.

Miteco. (S, f). Ministerio para la transición ecológica. Recuperado el 20 de noviembre de 2019, de <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestionresiduos/flujos/domesticos/fracciones/aceites-cocina/>.

Moya-Salazar, m. m., y Moya-Salazar, j. (2020). Actividad lipolítica de hongos aislados del aceite de cocinar usado y de suelos de talleres mecánicos. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 36(2), 351-359. <https://doi.org/10.20937/rica.53054>.

Murcia, Z. (2019). Propuesta de uso de bioaceite para vendedores informales desde la perspectiva del ciclo de vida de la ISO 14001:2015.

OECD/FAO. OECD Agriculture Statistics. Disponible en: <https://www.oecdilibrary.org/agriculture-and-food/data/oecd-agriculture-statistics_agr-data-en> Acceso en: 26 agosto 2021.

Ojeda Arias, J. (2021). Procesos para la valorización del Aceite vegetal usado: Revisión sistemática. <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/44500/jojedaa.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

OPEC (Organization of the Petroleum Exporting Countries). World Oil Outlook 2020-2045. Disponible en: < <https://woo.opec.org/pdf-download-es/> > Acceso en: 22 agosto 2021.

OPDS. (S, f). Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible. Recuperado el 20 de noviembre de 2019, de <http://www.opds.gba.gov.ar>.

Oliveira, C.; Coelho, T. (2017). History, evolution, and environmental impact of biodiesel in Brazil: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 75, p. 168-179.

Paul, P.E.V., Sangeetha, V., Deepika, R.G. (2019). Emerging trends in the industrial production of chemical products by microorganisms. *Recent Dev. Appl. Microbiol. Biochem.* 107 125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00009-X>.

Pata, M., & Isaías, L. (2022). Obtención de Biodiésel a partir de aceite de palma utilizando catalizadores ácidos sólidos y metanol (Bachelor's thesis, Quito: UCE).

Patel, A.K., Singhanian, R.R., Pandey, A. (2017). Production, purification, and application of microbial enzymes. *Biotechnol. Microb. Enzym.* 13–41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00002-9>.

Pereira, A. da, S., Fontes-Sant'Ana, G.C., Amaral, F.F. (2019). Mango agro-industrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid as a biocatalyst. *Food Bioprod. Proc.*, vol. 115, pp. 68-77.

Pérez, Z., Uriarte Ortiz, R., y Gazo, G. (2021). Actividad lipolítica de hongos aislados del aceite de cocinar usado y de suelos de talleres mecánicos. *Revista torreón universitario*, 10(27), 119-129. <https://doi.org/10.5377/torreon.v10i27.10845>.

Peralta, D. A. & Romero, L. P. (2019). Producción de biodiesel a partir de tres tipos de semilla de *Ricinus Communis* (Higuerilla) mediante proceso químico y enzimático y utilización

del residuo de la extracción del aceite como biocombustible. Recuperado de:

<http://hdl.handle.net/20.500.12749/1502>

Prieto, A., Molina-Gutiérrez, M., Martínez, Á. T., & Martínez, M. J. (2019). Síntesis de biodiesel catalizada por un crudo enzimático inmovilizado sobre partículas magnéticas.

<http://hdl.handle.net/10261/242064>

Restrepo, d. f., Quintero, a. g., y combatt, e. (2018). review espectroscopia de infrarrojo en el análisis de la capacidad de intercambio catiónico de los suelos – una revisión infrared spectroscopy in the analysis of cation exchange capacity of soils – a review. journal of science with technological applications, 5(2018), 55-65. <https://www.jsta.cl/resource?doi=jsta.18.5.35>

Rojas, H. A. (2021). Caracterización de la logística de recolección, tratamiento y exportación de aceite de cocina usado en Colombia, Bogotá: Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12010/20776>.

Rosas, M. A. H., Rodríguez, N. D. C. R., García, J. D. R., & Márquez, Á. A. C. (s, f). Producción de biodiésel por transesterificación en medio orgánico. https://www.cunorte.udg.mx/sites/default/files/investigacion/publicaciones/investigacion_permanente_-_tomo_2_-_pensar_la_ciencia_desde_la_frontera-1.pdf#page=88

Sánchez, S., Demain, A.L., 2017. Useful microbial enzymes-An introduction, Biotechnology of microbial enzymes: Production, biocatalysis and industrial applications. Elsevier Inc <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00001-7>

Sánchez González, L. G., y Cortázar Lozano, L. F. (2017). Plan de negocio para la creación de una empresa de recolección de aceite vegetal y grasas de origen animal, en los Municipios de Mosquera, Funza y Madrid Cundinamarca. 83.

https://repository.uniminuto.edu/bitstream/handle/10656/4925/T.IND_CortazarLozanoLuisa_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Sánchez, D. A., Alnoch, R. C., Tonetto, G. M., Krieger, N., & Ferreira, M. L. (2021). Inmovilización de la lipasa metagenómica LipC12 combinada con bioimprinting para la obtención de biocatalizadores aplicados a la hidrólisis de triglicéridos. https://repositoriosdigitales.mincyt.gob.ar/vufind/Record/RIDUNaM_550293a8db66662ed4801ab92e520146

Sahay, S., Chouhan, D. (2018). Study on the potential of cold-active lipases from psychrotrophic fungi for detergent formulation. *J. Genet. Eng. Biotechnol*, vol. 16, pp. 319-325.

Salazar Carranza, L. A., Hinojoza Guerrero, M. M., Acosta Gaibor, M. P., Escobar Torres, A. F., & Scrich Vázquez, A. J. (2020). Caracterización, clasificación y usos de las enzimas lipasas en la producción industrial. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 39(4).

Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., & Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology Progress*, 34(1), 5–28. <https://doi.org/10.1002/btpr.2581>

Sustaita-Rodríguez, A., Rocha-Gutiérrez, B. A., García-Triana, A., Ramos-Sánchez, V. H., Beltrán-Piña, B. G., & Chávez-Flores, D. (2019). Epoxidación enzimática de metil ésteres de ácidos grasos de origen vegetal y sus aplicaciones como alternativa para sustituir a los derivados del petróleo. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 22.

Sheldon, R.A., Woodley, J.M. (2018). Role of biocatalysis in sustainable chemistry. *Chem. Rev.* 118, 801–838. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>.

SEDEMA. (12 de junio de 2018). Secretaria del Medio Ambiente Mexico. Recuperado el 20 de noviembre de 2019, de http://data.sedema.cdmx.gob.mx/nadf24/images/infografias/GACETA%20OFICIAL%20431_NOR%20MA%20GRASAS%20Y%20ACEITES.pdf.

Solar, D. E. U. N. H., MFL, E., Suarez, O., Johan, R., Bravo, V., y David, J. (2018). Influencia de las características físico-químicas de aceites residuales de restaurantes en la calidad de biodiesel. Escuela superior politécnica agropecuaria de Manabí Manuel Félix López. <http://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/869/1/TTMA26.pdf>.

Suresh, M., Jawahar, C.P., Richard, A., (2018). A review on biodiesel production, combustion, performance, and emission characteristics of non-edible oils in variable compression ratio diesel engine using biodiesel and its blends. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 92, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.048>.

Twenergy. (2020). Twenergy. Ecología y reciclaje ¿Cómo y por qué reciclar el aceite usado? Recuperado de <https://twenergy.com/ecologia-y-reciclaje/reciclaje/la-importancia-de>

reciclar-el-aceite-de-cocina-128/.

Villabona Ortiz, A., Iriarte Pico, R., & Tejada Tovar, C. (2017). Alternativas para el aprovechamiento integral de residuos grasos de procesos de fritura

Teknos Revista Científica Vol. 17 Núm. 1 Pág. 21-29.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6382715>.