

Financiado por:



**Junta de Andalucía**

Consejería de Transformación Económica,  
Industria, Conocimiento y Universidades



# TECNOLOGÍAS DE VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS DEL SECTOR OLEÍCOLA

*FERMENTACIÓN*



Elaborado por:



**CIT  
OLIVA**  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEL OLIVAR Y  
EL ACEITE

## INDICE

1.	El proceso de fermentación.....	4
1.1.	Materias Primas .....	4
1.2.	Aplicaciones y Producción Industrial .....	5
1.3.	Cinética y Control del Proceso de Fermentación .....	5
1.4.	Parámetros del proceso de fermentación.....	5
	Temperatura .....	5
	pH .....	6
	Concentración de Sustrato.....	7
	Tasa de Inoculación.....	8
	Concentración de Etanol.....	8
1.5.	Etapas del proceso de fermentación .....	9
	Preparación del sustrato .....	9
	Inoculación y ajuste de parámetros.....	9
	Fermentación alcohólica .....	10
	Separación y destilación .....	10
	Purificación y tratamiento de subproductos .....	10
1.6.	Técnicas del proceso fermentación .....	10
	Fermentación en batch o por lotes.....	10
	Fermentación en Fed-Batch o alimentación gradual.....	11
	Fermentación continua .....	12
	Fermentación de alta densidad o high-gravity fermentation .....	12
	Fermentación simultánea de sacarificación y fermentación (SSF) .....	13
2.	Subproductos de la industria oleícola utilizables en el proceso de fermentación .....	14
2.1.	Alperujo.....	14
2.2.	Poda y Hojín .....	14
2.3.	Hueso .....	15
3.	Productos Obtenidos de la Fermentación de los Subproductos de la Industria Oleícola .....	16
3.1.	Bioetanol.....	17
	Bio-ETBE (Etil-terc-butil éter) .....	18



---

3.2.	Dióxido de carbono .....	19
3.3.	Bioplásticos .....	20
	Ácidos Orgánicos Volátiles (VFAs) .....	20
	Poli-hidroxicanoatos (PHA) .....	20
4.	Industria andaluza dedicada a la fermentación de biomasa .....	20
5.	Patentes sobre técnicas dedicadas a la fermentación de biomasa .....	22
6.	Proyectos de investigación sobre la tecnología de fermentación de subproductos de la industria oleícola en Andalucía.....	29
7.	Bibliografía.....	31

## 1. El proceso de fermentación

La fermentación es un proceso metabólico en el que ciertos microorganismos, principalmente levaduras, convierten los azúcares en productos como etanol y dióxido de carbono. Este proceso, al realizarse en condiciones anaerobias (sin oxígeno), es fundamental en la producción de bioetanol, ya que permite transformar materiales ricos en azúcares o almidones en un biocombustible utilizable.

El microorganismo más común en la fermentación es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, conocida por su alta tolerancia al etanol y su capacidad para fermentar eficientemente azúcares simples, especialmente la glucosa y la fructosa (Busic et al., 2018; Arifeen, 2007). Este tipo de levadura es particularmente eficiente en la conversión de glucosa en etanol, alcanzando un rendimiento cercano al 90-95% del teórico (0.51 gramos de etanol por gramo de glucosa).

Otras levaduras y bacterias, como *Zymomonas mobilis*, también son capaces de producir etanol, especialmente en sistemas que combinan diferentes azúcares como glucosa y xilosa (Lynd et al., 2002). Sin embargo, *Z. mobilis* presenta una menor tolerancia a altas concentraciones de etanol en comparación con *S. cerevisiae*, lo que limita su uso en sistemas de producción de etanol a gran escala (Balat, 2011).

### 1.1. Materias Primas

Existen dos categorías principales de materias primas para la producción de bioetanol mediante fermentación:

- **Primera generación:** Incluyen fuentes ricas en almidón y azúcares, como el maíz, la caña de azúcar, la remolacha y el trigo. Estos materiales no requieren pretratamientos intensivos, ya que los azúcares están fácilmente disponibles para la fermentación (Manufactura LATAM, 2023; Vázquez y Dacosta, 2007). En estos casos, se utiliza la hidrólisis enzimática para descomponer el almidón en azúcares fermentables, permitiendo un proceso más directo y menos costoso.
- **Segunda generación:** Se enfocan en materias primas lignocelulósicas, tales como residuos agrícolas, desechos de madera y plantas no comestibles. Estas materias requieren un pretratamiento más complejo debido a su estructura, que incluye celulosa, hemicelulosa y lignina. La hidrólisis enzimática o ácida se aplica para descomponer la celulosa en azúcares simples antes de que la fermentación pueda comenzar. Los biocombustibles 2G son una opción más sostenible al evitar la competencia con fuentes alimenticias y maximizar el uso de residuos (Busic et al., 2018; Balat, 2011).
- **Tercera generación:** Se basa en el uso de biomasa proveniente de algas, incluyendo microalgas y macroalgas. Aunque el aprovechamiento de algas como materia prima para la producción de bioetanol está aún en fase de desarrollo, esta técnica presenta un gran potencial (Rascón, 2022). Las algas son especialmente atractivas debido a su baja proporción de hemicelulosa y lignina, su facilidad de

cultivo en diversos entornos acuáticos y su alta capacidad de absorción de CO<sub>2</sub> (Rascón, 2022).

### **1.2. Aplicaciones y Producción Industrial**

La fermentación se ha implementado industrialmente en diferentes partes del mundo, con Brasil y Estados Unidos liderando la producción de bioetanol a partir de caña de azúcar y maíz, respectivamente. El bioetanol producido mediante fermentación se emplea como aditivo en la gasolina, ofreciendo un combustible más limpio y contribuyendo a la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero (Manufactura LATAM, 2023). Además, los residuos de la fermentación, como la burlanda húmeda del maíz, se utilizan como suplementos proteicos en la alimentación animal, cerrando el ciclo de aprovechamiento y generando beneficios adicionales.

### **1.3. Cinética y Control del Proceso de Fermentación**

La eficiencia de la fermentación depende de múltiples factores:

- **Cinética de la fermentación:** En la producción de bioetanol, la tasa de fermentación sigue modelos cinéticos que incluyen la ecuación de Monod, adaptada para factores como la inhibición del producto (etanol) y la limitación de sustrato (azúcar). A medida que aumenta la concentración de etanol, la actividad de las levaduras puede inhibirse, lo que limita el rendimiento del proceso (Arifeen, 2007; Lynd et al., 2002).
- **Factores de inhibición:** El proceso es sensible a factores como la concentración de etanol, que puede volverse tóxico para los microorganismos a niveles elevados. *S. cerevisiae* presenta una tolerancia más alta al etanol en comparación con otras especies, lo cual la hace adecuada para sistemas de producción continua, donde la concentración de etanol debe manejarse cuidadosamente para evitar la inhibición del proceso (Busic et al., 2018).

### **1.4. Parámetros del proceso de fermentación**

#### **Temperatura**

La temperatura es un parámetro fundamental en la fermentación de bioetanol, ya que afecta directamente la actividad enzimática de las levaduras, la velocidad de fermentación y la estabilidad de la biomasa microbiana. En la producción de bioetanol, el rango óptimo de temperatura para *S. cerevisiae*, la levadura más utilizada, es de 30 a 35 °C. Dentro de este rango, la actividad enzimática y el crecimiento celular de la levadura alcanzan su punto máximo, lo que permite una conversión eficiente de los azúcares en etanol y mantiene la viabilidad celular sin inducir estrés térmico. Estudios han demostrado que, en este rango de temperatura, la fermentación es altamente estable y adecuada para aplicaciones industriales (Lin et al., 2012).

Cuando la temperatura se encuentra por debajo de los 30 °C, la actividad metabólica de *S. cerevisiae* disminuye, lo que reduce la velocidad de fermentación y prolonga el tiempo necesario para completar el proceso. A pesar de que estas temperaturas más bajas no



---

afectan drásticamente la viabilidad de la levadura, el rendimiento de etanol es menor debido a una menor actividad enzimática y a la ralentización de las reacciones metabólicas necesarias para la producción de etanol (Hashmi et al., 2017).

Por otro lado, a temperaturas superiores a 35 °C, aunque puede haber un incremento inicial en la actividad metabólica de *S. cerevisiae*, la exposición prolongada a estos niveles térmicos genera estrés en las células. En condiciones cercanas a los 40 °C, la viabilidad de las levaduras disminuye considerablemente debido a la desnaturalización de proteínas y a la desestabilización de la membrana celular, lo cual afecta negativamente el rendimiento de etanol. Esto se debe a que las células de levadura estándar son sensibles a temperaturas elevadas y pueden inhibirse rápidamente por la acumulación de etanol y otros compuestos tóxicos (Gebrekidan et al., 2023).

En aplicaciones industriales, el control preciso de la temperatura es fundamental, ya que la fermentación en sí genera calor, lo que puede elevar la temperatura del medio en fermentadores de gran escala y provocar zonas de sobrecalentamiento. Para gestionar este efecto, es común utilizar sistemas de enfriamiento y monitoreo continuo de la temperatura, con el objetivo de mantener las condiciones óptimas y asegurar un proceso estable. Algunas cepas de *S. cerevisiae* han sido adaptadas para soportar temperaturas más altas mediante procesos de evolución adaptativa, lo cual permite su uso en condiciones de hasta 42 °C en sistemas industriales específicos, aunque estos casos suelen requerir cepas especialmente diseñadas para resistir el estrés térmico en niveles elevados (Gebrekidan et al., 2023).

Este control de temperatura no solo maximiza la productividad de etanol, sino que también minimiza las pérdidas de viabilidad de las levaduras, lo cual es crucial para mantener la eficiencia y la continuidad del proceso de fermentación en entornos industriales (Lin et al., 2012)

### pH

El pH es un parámetro crucial en la fermentación de bioetanol, ya que influye en la actividad de las levaduras, en particular *S. cerevisiae*, y en la estabilidad del medio de fermentación. Un pH ligeramente ácido, generalmente entre 4 y 5, se considera óptimo para maximizar la eficiencia de la fermentación y evitar el crecimiento de microorganismos no deseados. Mantener el pH en este rango permite que las levaduras funcionen de manera óptima, favoreciendo la producción de etanol y la viabilidad celular (Glover et al., 2021).

Un pH menor a 4 puede inducir estrés en *S. cerevisiae*, afectando la estabilidad de sus membranas celulares y reduciendo su actividad enzimática. Sin embargo, estudios muestran que, en un ambiente moderadamente ácido, las levaduras pueden aumentar su producción de CO<sub>2</sub>, un indicador indirecto de su capacidad para fermentar azúcares eficientemente. Esto es especialmente relevante en condiciones industriales donde se busca optimizar la producción de etanol sin afectar la salud celular de la levadura (Narendranath & Power, 2005).



Por otro lado, un pH superior a 5 puede llevar a la proliferación de bacterias y otros contaminantes que compiten con *S. cerevisiae* por los nutrientes del medio, disminuyendo el rendimiento de etanol. La actividad enzimática también se ve comprometida fuera del rango óptimo, afectando la conversión de azúcares en etanol y provocando variaciones en la calidad del proceso de fermentación (Lin et al., 2012).

En sistemas industriales, el control del pH es esencial. Frecuentemente se utilizan soluciones amortiguadoras para mantener el pH dentro del rango deseado, lo que reduce la variabilidad en la producción de etanol y asegura una fermentación más estable y eficiente. Las condiciones de pH bien controladas también ayudan a prevenir la formación de subproductos no deseados que pueden inhibir el rendimiento de la levadura y la calidad del bioetanol final (Glover et al., 2021).

### Concentración de Sustrato

La concentración de sustrato es fundamental para maximizar la eficiencia de la fermentación en la producción de bioetanol, ya que influye directamente en la actividad de las levaduras y en la cantidad de etanol producido. Concentraciones moderadas de glucosa, generalmente entre 100 y 150 g/L, permiten a *S. cerevisiae* convertir los azúcares en etanol de forma eficiente, logrando un balance óptimo entre disponibilidad de sustrato y rendimiento del proceso. Este rango de concentración inicial maximiza la productividad sin causar efectos adversos en la levadura (Chen et al., 2018).

En contraste, cuando la concentración de glucosa supera los 200 g/L, pueden ocurrir efectos de inhibición osmótica. Esta alta concentración afecta la viabilidad celular y reduce la velocidad de fermentación, debido a que el ambiente hiperosmótico obliga a las células de levadura a redirigir recursos hacia la regulación osmótica, en lugar de centrarse en la producción de etanol (Christofoleti-Furlan et al., 2022). Para contrarrestar este efecto en sistemas industriales, se ha implementado la técnica de alimentación escalonada o "fed-batch", donde el sustrato se añade de manera gradual, manteniendo la concentración en un rango que evita la inhibición. Esta estrategia ha demostrado ser efectiva, permitiendo una concentración final de hasta 130 g/L de etanol en sistemas donde el sustrato se dosifica controladamente (Chen et al., 2018).

Además, la concentración de sustrato impacta en la tolerancia al etanol de la levadura. En condiciones de alta concentración de azúcar, la acumulación de etanol puede llegar a niveles tóxicos, limitando aún más la eficiencia de la fermentación. En estos casos, las cepas industriales de *S. cerevisiae* toleran hasta un 16% de etanol, pero para ello es necesario optimizar el proceso y, en ocasiones, emplear cepas especialmente adaptadas para resistir el estrés osmótico y la toxicidad causada por el etanol (Christofoleti-Furlan et al., 2022).

La gestión precisa de la concentración de sustrato es, por tanto, esencial para maximizar el rendimiento del bioetanol, evitando tanto la subalimentación, que reduciría la eficiencia del proceso, como la sobrealimentación, que podría inhibir el crecimiento de las levaduras. Este parámetro es especialmente crítico en aplicaciones industriales de alta densidad celular y en sistemas de fermentación continua, donde la optimización de cada variable es clave para alcanzar altos rendimientos en la producción de bioetanol.





### Tasa de Inoculación

La tasa de inoculación determina la cantidad inicial de levadura, *S. cerevisiae*, en el medio de fermentación. Este parámetro afecta directamente la rapidez con la que las levaduras inician su actividad y alcanzan la fase de crecimiento exponencial, lo cual influye en la eficiencia del proceso y en el rendimiento de etanol. En general, se recomienda una tasa de inoculación entre el 5% y el 10% del volumen del medio, lo que asegura un arranque rápido de la fermentación y minimiza el tiempo necesario para alcanzar la máxima producción de etanol (Wanderley et al., 2023).

Con una tasa de inoculación baja, el crecimiento de la levadura es más lento, prolongando la fermentación y reduciendo la productividad del sistema. Por otro lado, una tasa demasiado alta puede llevar a una sobrepoblación que genera competencia por los nutrientes, lo que puede afectar el rendimiento global al acumularse subproductos que inhiben la actividad de las levaduras (Zhang et al., 2023).

En procesos industriales, la tasa de inoculación debe ajustarse cuidadosamente. En cultivos de alta densidad, el uso de una inoculación gradual en sistemas *fed-batch* ha mostrado mejorar la producción, ya que reduce los efectos de inhibición por etanol al distribuir uniformemente el crecimiento celular y evitar sobrecargas metabólicas. Este enfoque permite a las cepas industriales de *S. cerevisiae* mantener una alta viabilidad y maximizar la conversión de glucosa en etanol (Christofoleti-Furlan et al., 2022).

Elegir la tasa de inoculación adecuada es clave para garantizar un equilibrio entre el crecimiento de la levadura y la conversión de sustrato, optimizando la estabilidad y la productividad de la fermentación. En aplicaciones a gran escala, este ajuste asegura una producción de etanol eficiente y reduce la variabilidad en los resultados finales.

### Concentración de Etanol

La concentración de etanol es un parámetro de especial importancia en la fermentación de bioetanol, ya que el propio etanol, a medida que se acumula en el medio, se vuelve tóxico para *S. cerevisiae*. A concentraciones elevadas, el etanol afecta la viabilidad de las levaduras al dañar la estabilidad de sus membranas celulares y desnaturalizar proteínas esenciales para la fermentación, lo cual disminuye tanto la productividad como el rendimiento del proceso (Christofoleti-Furlan et al., 2022).

En condiciones industriales, *S. cerevisiae* puede tolerar concentraciones de etanol entre el 10% y el 15% en volumen, pero en sistemas de alta densidad celular o procesos intensivos se han utilizado cepas modificadas que soportan hasta un 16% de etanol. Este nivel de tolerancia no solo depende de la capacidad de la cepa, sino también de un manejo preciso de las condiciones del proceso. Estrategias como la alimentación gradual del sustrato ayudan a minimizar el estrés por etanol, permitiendo a la levadura continuar con la fermentación sin alcanzar niveles críticos de inhibición (Zhang et al., 2023).

La acumulación de etanol en el medio de cultivo afecta también el transporte de glucosa y otros nutrientes, lo cual impacta negativamente en las rutas metabólicas que generan la energía necesaria para la actividad fermentativa. Este estrés puede llevar a





---

fermentaciones incompletas, reduciendo la eficiencia del proceso y dificultando la obtención de bioetanol en concentraciones óptimas (Christofoleti-Furlan et al., 2022).

Para superar estas limitaciones, se han implementado estrategias de ingeniería genética y de evolución adaptativa que aumentan la resistencia de *S. cerevisiae* a concentraciones elevadas de etanol. Estas innovaciones, combinadas con un control cuidadoso del proceso, son esenciales para mejorar la estabilidad y eficiencia de la fermentación en contextos industriales, donde el etanol acumulado puede inhibir el crecimiento celular y reducir el rendimiento global de bioetanol (Zhang et al., 2023).

### **1.5. Etapas del proceso de fermentación**

La fermentación para la producción de bioetanol implica una serie de etapas cuidadosamente controladas que permiten convertir azúcares en etanol de manera eficiente y sostenible. Cada etapa, desde la preparación del sustrato hasta la purificación final del etanol, está diseñada para maximizar el rendimiento y asegurar la viabilidad de la levadura durante el proceso (Christofoleti-Furlan et al., 2022; Zhang et al., 2023).

#### **Preparación del sustrato**

La primera etapa implica la preparación del sustrato, que puede incluir almidones, azúcares simples o materiales lignocelulósicos. Para sustratos lignocelulósicos, es necesario un pretratamiento, como la hidrólisis enzimática o ácida, para descomponer las fibras en azúcares fermentables, como glucosa y xilosa. Este paso es crucial, especialmente en la producción de bioetanol de segunda generación, para asegurar la disponibilidad de azúcares que las levaduras puedan fermentar (Zhang et al., 2023).

En el caso de los materiales lignocelulósicos, el pretratamiento busca hacer accesible la celulosa a la acción de las enzimas hidrolíticas, eliminando barreras químicas y físicas que limitan la hidrólisis. Estas barreras incluyen la lignina, que inhibe la acción de la celulasa y puede ser tóxica para los microorganismos; la hemicelulosa, que forma una red compleja con la lignina, y la cristalinidad de la celulosa, que limita la accesibilidad enzimática (Kim, 2013). Sin embargo, estos pretratamientos pueden generar inhibidores de fermentación como furfural, ácido acético o compuestos fenólicos, los cuales deben gestionarse para evitar reducciones en el rendimiento (Harmsen et al., 2010; Martínez-Patiño et al., 2017a).

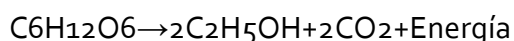
#### **Inoculación y ajuste de parámetros**

Una vez preparado el sustrato, se inocula con *S. cerevisiae*, manteniendo la tasa de inoculación entre un 5% y un 10% del volumen total para asegurar un rápido inicio de la fermentación. Durante esta etapa, se ajustan los parámetros de temperatura, pH y concentración de nutrientes para optimizar la actividad de la levadura. Este control es esencial para evitar la inhibición causada por condiciones subóptimas que puedan reducir la eficiencia del proceso.



### Fermentación alcohólica

En esta fase, la levadura convierte los azúcares en etanol y CO<sub>2</sub> mediante fermentación anaerobia. La temperatura óptima se mantiene entre 30-35 °C y el pH alrededor de 4-5, lo cual permite a *S. cerevisiae* trabajar de manera eficiente. Aunque la levadura muestra alta tolerancia al bioetanol, la acumulación de este compuesto puede inhibir su actividad; por ello, es crucial monitorear y ajustar las condiciones según sea necesario (Christofoleti-Furlan et al., 2022). En el caso de utilizar hexosas como glucosa, la reacción de fermentación es:



Para mejorar la eficiencia del proceso, se están desarrollando cepas genéticamente modificadas capaces de fermentar tanto hexosas como pentosas (Mohagheghi et al., 2002).

### Separación y destilación

Tras la fermentación, el etanol resultante debe separarse del medio. La mezcla fermentada se somete a un proceso de destilación para concentrar el etanol, generalmente hasta alcanzar una pureza del 95%. Métodos adicionales, como tamices moleculares, pueden elevar la pureza a 99.5%, eliminando el agua residual.

### Purificación y tratamiento de subproductos

Finalmente, el etanol destilado puede someterse a purificación para cumplir con los estándares de calidad, especialmente si se destina a biocombustibles. Los subproductos generados, como CO<sub>2</sub> y biomasa residual, tienen potencial de valorización. El CO<sub>2</sub> puede capturarse para aplicaciones industriales, mientras que la biomasa de levadura puede emplearse como suplemento proteico o en la producción de bioproductos.

El desarrollo de tecnologías avanzadas, como la hidrólisis y fermentación simultáneas, y la inmovilización de microorganismos con alginato cálcico, ofrece soluciones prometedoras para superar limitaciones en procesos que emplean materias primas lignocelulósicas como la poda de olivo (Romero et al., 2000; Toor et al., 2020).

## **1.6. Técnicas del proceso fermentación**

En la producción de bioetanol existen diferentes técnicas de procesos de fermentación que se aplican según el tipo de sustrato, las condiciones de operación y los objetivos específicos del proceso. A continuación, se presentan las más utilizadas:

### Fermentación en batch o por lotes

La fermentación en batch, también conocida como fermentación por lotes, es una técnica básica y ampliamente utilizada en la producción de bioetanol, especialmente en escalas de laboratorio y en estudios de optimización. En este método, todos los ingredientes necesarios para la fermentación (sustrato, agua, nutrientes y levadura) se introducen en el biorreactor desde el inicio del proceso. A diferencia de otras técnicas, en la fermentación en batch no se añade sustrato adicional ni se extrae producto durante el



---

tiempo de reacción; el sistema se mantiene cerrado hasta el final del ciclo de fermentación.

Este tipo de fermentación permite un control preciso de las condiciones iniciales, como la concentración de sustrato, la temperatura y el pH, lo que facilita la evaluación de los efectos de cada variable en el rendimiento y en la actividad de la levadura. La fermentación en batch sigue las siguientes etapas en el comportamiento de las levaduras: fase de latencia (adaptación al medio), fase exponencial (máxima actividad fermentativa), y fase estacionaria (disminución de la actividad debido al agotamiento del sustrato).

Uno de los principales desafíos de este método es la acumulación de etanol en el medio a medida que avanza el proceso. La concentración de etanol puede llegar a niveles inhibitorios para *S. cerevisiae*, afectando la viabilidad celular y la eficiencia global del proceso. En general, *S. cerevisiae* tolera hasta un 10-15% de etanol en volumen, pero concentraciones superiores pueden reducir drásticamente su rendimiento (Christofoliti-Furlan et al., 2022)

Aunque la fermentación en batch es adecuada para estudios experimentales y producción a pequeña escala, sus limitaciones hacen que no sea ideal para aplicaciones industriales de gran volumen. En contextos industriales, la fermentación en fed-batch o la fermentación continua suelen ser preferibles, ya que permiten un suministro constante de sustrato y un rendimiento más estable. Sin embargo, el proceso en batch sigue siendo una herramienta fundamental en la investigación de bioetanol, especialmente para establecer parámetros óptimos y analizar el comportamiento de las cepas de levadura en condiciones específicas (Zhang et al., 2023).

### **Fermentación en Fed-Batch o alimentación gradual**

La fermentación en fed-batch, o fermentación de alimentación gradual, es una técnica ampliamente utilizada en la producción industrial de bioetanol, ya que permite un control más preciso de la concentración de sustrato y minimiza los efectos de inhibición causados por acumulaciones de etanol y otros subproductos. En este método, a diferencia de la fermentación en batch, el sustrato se introduce de manera controlada y progresiva durante el proceso de fermentación, permitiendo a las levaduras trabajar en condiciones óptimas sin enfrentar una sobrecarga de nutrientes o una acumulación de subproductos que puedan inhibir su actividad.

En la fermentación en fed-batch, la adición gradual del sustrato permite mantener una concentración constante y controlada de glucosa, evitando los problemas de inhibición osmótica y acumulación de productos inhibitorios, lo que maximiza el rendimiento de etanol. Este sistema es particularmente eficaz en cultivos de alta densidad, donde la capacidad de la levadura para tolerar condiciones estresantes es esencial para asegurar la continuidad y la eficiencia del proceso (Christofoliti-Furlan et al., 2022).

Esta técnica se emplea comúnmente en la industria del bioetanol debido a su capacidad para maximizar la producción en contextos de alta densidad y en presencia de concentraciones elevadas de sustrato y etanol. Esta técnica permite aprovechar al

máximo la actividad fermentativa de *S. cerevisiae*, incluso en condiciones que podrían ser inhibitoras en un sistema batch. Al mantener niveles óptimos de glucosa y etanol, el proceso se vuelve más estable y eficiente, produciendo etanol a una mayor concentración final en comparación con otros métodos. Es una técnica ideal en contextos industriales, donde la estabilidad y el rendimiento constante son clave para la viabilidad del proceso a gran escala (Zhang et al., 2023).

### **Fermentación continua**

La fermentación continua es una técnica avanzada que permite una producción sostenida y constante de bioetanol mediante la introducción continua de sustrato en el biorreactor mientras se extrae simultáneamente el producto fermentado. A diferencia de los métodos batch o fed-batch, la fermentación continua mantiene a *S. cerevisiae* en su fase de crecimiento activo, lo que permite maximizar la productividad del sistema sin detener el proceso para recargar el sustrato. Este flujo continuo de sustrato y producto facilita una operación estable y reduce los tiempos de inactividad, siendo ideal para operaciones industriales de gran escala donde la demanda de bioetanol es constante (Demirci et al., 1993).

El sistema continuo evita las fases de agotamiento del sustrato y la acumulación de productos inhibitorios, como el etanol, que pueden limitar el rendimiento en procesos batch. Además, se ha demostrado que las cepas de *S. cerevisiae* pueden ser adaptadas o modificadas genéticamente para tolerar altos niveles de etanol y otros factores de estrés, mejorando así su eficacia en condiciones industriales. Por ejemplo, investigaciones recientes han identificado mecanismos de tolerancia al etanol en cepas industriales mediante la expresión de genes específicos como MSN2, que permiten a las células resistir mejor las altas concentraciones de etanol presentes en sistemas de fermentación continua (Hohmann & Rendleman, 1993; Zhang et al., 2023).

La fermentación continua es particularmente eficaz en contextos industriales donde se requiere un flujo constante de bioetanol. Este sistema permite maximizar la eficiencia del proceso manteniendo un equilibrio dinámico entre la adición de sustrato y la extracción de producto. Sin embargo, la implementación de este sistema requiere una supervisión intensiva para asegurar la estabilidad del proceso, especialmente en la industria del bioetanol, donde la calidad y el rendimiento constante son críticos. Gracias a los avances en ingeniería de cepas, como la modificación de la levadura para mejorar su tolerancia a condiciones de alta producción de etanol, la fermentación continua se ha convertido en una de las estrategias preferidas para optimizar la productividad en aplicaciones industriales (Demirci et al., 1993; Hohmann & Rendleman, 1993; Zhang et al., 2023).

### **Fermentación de alta densidad o high-gravity fermentation**

La fermentación de alta densidad, también conocida como high-gravity fermentation (HGF), es una técnica que emplea concentraciones muy altas de sustrato (azúcar) en el medio de fermentación para producir bioetanol en niveles mucho más altos que los obtenidos con fermentaciones convencionales. Este enfoque permite alcanzar mayores concentraciones finales de etanol, optimizando así el rendimiento y reduciendo los costos de destilación al disminuir la cantidad de agua en el medio. La fermentación de

alta densidad es especialmente atractiva en aplicaciones industriales, ya que permite un aumento significativo en la productividad por lote (Gomes et al., 2021).

Al trabajar con concentraciones elevadas de azúcar, se generan condiciones estresantes para *S. cerevisiae*, incluyendo una presión osmótica elevada y mayores niveles de etanol, ambos factores que pueden inhibir el crecimiento celular y reducir la viabilidad de la levadura. Estudios han demostrado que el uso de cepas industriales, como las cepas PE-2 y CA1185, que presentan una robustez superior y acumulan compuestos protectores como el trehalosa y el glicógeno, mejora significativamente la tolerancia de las levaduras en ambientes de alta densidad, permitiendo alcanzar concentraciones de etanol superiores al 19% (v/v) (Gomes et al., 2021).

En aplicaciones industriales, la fermentación de alta densidad es una herramienta eficaz para maximizar la producción de bioetanol y reducir el consumo de recursos. Este enfoque permite mantener la eficiencia operativa al tiempo que disminuye la cantidad de agua necesaria, lo cual es beneficioso tanto desde el punto de vista económico como ambiental. Sin embargo, su implementación requiere un control preciso de los nutrientes y una selección cuidadosa de las cepas de levadura, ya que solo las más robustas pueden resistir las condiciones adversas que surgen en entornos de alta densidad (Casey & Ingledew, 2020; Gomes et al., 2021).

### **Fermentación simultánea de sacarificación y fermentación (SSF)**

La fermentación simultánea de sacarificación y fermentación (SSF) es una técnica que combina en un solo paso la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos y la fermentación alcohólica de los azúcares liberados, lo que permite a *S. cerevisiae* transformar directamente los azúcares en etanol. A diferencia de los procesos secuenciales, en los cuales la sacarificación y la fermentación se llevan a cabo en etapas separadas, SSF integra ambos procesos en el mismo biorreactor, optimizando el uso de energía y recursos. Esta técnica es especialmente útil en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, como los desechos agrícolas, que requieren una descomposición inicial para liberar sus componentes fermentables (Marbawi et al., 2022).

La SSF se caracteriza por utilizar enzimas (como celulasas y  $\beta$ -glucosidasas) que convierten la celulosa en glucosa. Esta glucosa es inmediatamente fermentada por *S. cerevisiae*, lo que minimiza la acumulación de glucosa en el medio y reduce los efectos inhibitorios que podrían disminuir la eficiencia de la hidrólisis y de la fermentación. En un estudio reciente, se optimizó el proceso de SSF para producir bioetanol a partir de racimos vacíos de palma, alcanzando una alta eficiencia de conversión gracias a la acción combinada de *S. cerevisiae* y otros microorganismos auxiliares que mejoraron la disponibilidad de azúcares fermentables (Marbawi et al., 2022).

La SSF se utiliza en la producción de bioetanol a partir de residuos agrícolas como los racimos vacíos de palma y otros materiales lignocelulósicos difíciles de descomponer. En estudios recientes, esta técnica ha mostrado ser efectiva para convertir biomasa de bajo costo en bioetanol de manera eficiente, logrando altas tasas de conversión y

---

rendimientos de etanol al integrar procesos que de otro modo serían secuenciales y consumirían más recursos (Gomes et al., 2021).

En el contexto industrial, la SSF ofrece una opción viable para la producción sostenible de bioetanol, especialmente cuando se utilizan enzimas y cepas de levadura resistentes a condiciones adversas. Esta técnica contribuye a reducir el impacto ambiental del proceso al permitir la valorización de residuos lignocelulósicos y al optimizar el consumo de energía en la conversión de biomasa en biocombustible.

## **2. Subproductos de la industria oleícola utilizables en el proceso de fermentación**

### **2.1. Alperujo**

El alperujo, generado principalmente en sistemas de extracción de dos fases, representa hasta el 80% de la masa original de la aceituna y contiene una gran cantidad de compuestos orgánicos como celulosa, hemicelulosa y lignina, además de polifenoles y otros compuestos bioactivos que le confieren valor agregado en una biorrefinería (Fernández-Prior et al., 2020).

Para convertir el alperujo en bioetanol, se requiere de pretratamientos específicos que liberen los azúcares fermentables de la matriz lignocelulósica. Los métodos de pretratamiento incluyen la hidrólisis ácida o enzimática, y en algunos casos, el uso de procesos de alta temperatura para facilitar la solubilización de la materia orgánica. Sin embargo, estos métodos también deben manejar cuidadosamente la presencia de fenoles y otros inhibidores de fermentación, que pueden afectar negativamente la eficiencia del proceso (Gordillo-Fuenzalida et al., 2019). Un enfoque innovador para superar este desafío es la aplicación de enzimas lignocelulolíticas, como las celulasas, que permiten la descomposición de la celulosa en azúcares simples. Estas enzimas pueden ser producidas in situ a partir de otros residuos agroindustriales, lo cual no solo optimiza el proceso, sino que reduce los costos de operación al disminuir la dependencia de enzimas comerciales costosas (Gordillo-Fuenzalida et al., 2019).

Además, una biorrefinería de alperujo puede integrar la recuperación de compuestos fenólicos antes del proceso de fermentación. Estos compuestos tienen aplicaciones potenciales en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica, lo que añade valor económico a todo el proceso. En estudios recientes, se ha observado que los residuos de alperujo tratados pueden ser sometidos a digestión anaeróbica para producir biogás, incluso después de la extracción de fenoles. Esto demuestra que el alperujo es un recurso valioso para la producción de bioetanol y biogás, contribuyendo a la sostenibilidad del sector oleícola (Fernández-Prior et al., 2020).

### **2.2. Poda y Hojín**

Los restos de poda, formados principalmente por ramas de diferentes tamaños, contienen un alto porcentaje de celulosa y hemicelulosa, dos polímeros que pueden hidrolizarse a azúcares simples para su posterior fermentación. Sin embargo, también

están compuestos por lignina, un polímero complejo y resistente que forma una barrera estructural que dificulta el acceso de las enzimas a los carbohidratos. Este contenido de lignina, junto con la rigidez de la estructura leñosa de las ramas, hace necesario el uso de pretratamientos específicos que permitan descomponer la matriz lignocelulósica y liberar los azúcares fermentables de manera eficiente. Procesos como la hidrólisis ácida y la explosión de vapor han demostrado ser efectivos en la descomposición de estos materiales, facilitando el acceso enzimático a los componentes celulósicos y mejorando la conversión en azúcares simples (Cara et al., 2008; Díaz et al., 2019). La explosión de vapor, en particular, es un método que utiliza altas presiones y temperaturas para romper la lignina y hacer más accesibles los carbohidratos, permitiendo una conversión más eficaz en bioetanol en etapas posteriores de fermentación.

Por otro lado, el hojín, que consiste en hojas y pequeñas ramas separadas de las aceitunas durante el proceso de limpieza en las almazaras, presenta un perfil químico ligeramente diferente. Aunque también es rico en celulosa y hemicelulosa, este material contiene una alta concentración de compuestos fenólicos, como polifenoles y terpenos, que pueden actuar como inhibidores en los procesos de fermentación, interfiriendo en la actividad de las levaduras y otros microorganismos fermentadores. Sin embargo, estos compuestos inhibidores tienen un alto valor en industrias como la cosmética, farmacéutica y de suplementos alimenticios, por lo que pueden ser extraídos previamente en el marco de una biorrefinería (ver ficha de extracción de compuestos bioactivos). La extracción de estos compuestos bioactivos antes de la fermentación no solo mejora la eficiencia del proceso al reducir la inhibición, sino que también proporciona una fuente de ingresos adicional a partir de la venta de productos de valor añadido (Ballesteros et al., 2002; Ramos-Carmona et al., 2018). Este enfoque permite maximizar el aprovechamiento del hojín al obtener bioetanol y, al mismo tiempo, extraer compuestos valiosos que pueden comercializarse en otros sectores.

Tanto los restos de poda como el hojín pueden utilizarse de manera secuencial para producir bioetanol, biogás y compuestos fenólicos. Tras la extracción de compuestos bioactivos y la producción de bioetanol, los residuos restantes de estos subproductos pueden someterse a digestión anaeróbica para producir biogás, una fuente adicional de energía renovable que puede utilizarse para cubrir las necesidades energéticas de la propia biorrefinería o de instalaciones cercanas (Molina-Alcaide & Yáñez-Ruiz, 2008). Este enfoque de biorrefinería reduce la dependencia de combustibles fósiles y permite una gestión de residuos más sostenible, contribuyendo a la economía circular del sector oleícola.

### 2.3. Hueso

El hueso de aceituna es un subproducto con alto potencial para la producción de bioetanol debido a su composición lignocelulósica, que incluye un 21% de celulosa y entre un 23% y 26% de hemicelulosa, convirtiéndolo en una fuente rica de azúcares fermentables (Rascón, 2022). No obstante, su alto contenido en lignina (32-36%) forma una barrera estructural recalcitrante que dificulta el acceso de las enzimas a los polímeros



de carbohidratos, por lo que requiere de un pretratamiento efectivo para descomponer esta matriz (Lama-Muñoz et al., 2014; Gil et al., 2019).

Entre los pretratamientos más efectivos para el hueso de aceituna se encuentran la hidrólisis ácida y la explosión de vapor, ambos útiles para descomponer la lignina y liberar azúcares fermentables. La hidrólisis ácida, con ácido sulfúrico diluido, permite solubilizar gran parte de la hemicelulosa, facilitando el acceso enzimático a la celulosa en etapas posteriores (Ballesteros et al., 2006). Por su parte, la explosión de vapor, que usa altas presiones y temperaturas, ha demostrado mejorar la accesibilidad de los carbohidratos al romper las uniones entre lignina y carbohidratos, además de reducir la cristalinidad de la celulosa, lo cual incrementa la eficiencia de conversión en bioetanol (Martínez-Patiño et al., 2018; Fernández-Bolaños et al., 2001).

Para mitigar la presencia de inhibidores generados durante el pretratamiento, tales como compuestos furánicos y ácidos orgánicos que afectan negativamente la fermentación, se ha investigado el uso de adsorbentes como carbón activo y resinas de intercambio iónico, logrando reducir estos inhibidores y optimizar la fermentación (Tahezadeh & Karimi, 2008; Romero-García et al., 2016). Este enfoque mejora la actividad de microorganismos fermentadores como *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli*, que son capaces de procesar tanto hexosas como pentosas, alcanzando niveles de producción de etanol de hasta 47 g/L (Zabed et al., 2016; Huijgen et al., 2012).

Además, la composición del hueso de aceituna permite la extracción de compuestos fenólicos de la fracción de lignina, los cuales tienen aplicaciones valiosas en las industrias cosmética y farmacéutica, añadiendo un valor económico adicional dentro del marco de una biorrefinería (Vergara-Barberán et al., 2014). Estos compuestos pueden ser extraídos antes de la fermentación, lo que no solo mejora la eficiencia al reducir la inhibición, sino que también contribuye a la viabilidad económica del proceso (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2014; Lobato-Peralta et al., 2021).

Finalmente, tras la extracción de compuestos fenólicos y la producción de bioetanol, los residuos sólidos remanentes pueden ser sometidos a digestión anaeróbica para la producción de biogás. Este proceso complementario genera energía renovable para el autoconsumo de la biorrefinería, además de contribuir a una gestión integral de los residuos y promover una economía circular en el sector oleícola (Contreras et al., 2020; Molina-Alcaide & Yáñez-Ruiz, 2008).

### 3. Productos Obtenidos de la Fermentación de los Subproductos de la Industria Oleícola

El proceso de fermentación de los subproductos oleícolas genera dos productos principales: bioetanol y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). La producción de bioetanol, que se lleva a cabo en condiciones anaerobias, convierte los azúcares simples, como la glucosa, en un biocombustible utilizable. La eficiencia del proceso y la pureza del bioetanol dependen de varios factores, entre ellos, el tipo de sustrato, las cepas de levadura empleadas (como *Saccharomyces cerevisiae*) y las condiciones de fermentación, tales

como el pH, la temperatura y la concentración de sustrato (Busic et al., 2018; Arifeen, 2007).

Además del bioetanol, el CO<sub>2</sub> es un subproducto de la fermentación y, aunque se produce en menor proporción, puede capturarse y utilizarse en diversas aplicaciones industriales (Balat, 2011). La proporción de bioetanol y CO<sub>2</sub> puede variar según las condiciones de fermentación y la concentración de azúcares en el sustrato inicial (Lynd et al., 2002).

### 3.1. Bioetanol

El etanol ha sido uno de los combustibles más utilizados en la historia de la industria automovilística. Originalmente, los motores de ciclo Otto fueron diseñados para funcionar con etanol. Sin embargo, con el auge de la industria petrolera, el etanol fue desplazado por los combustibles fósiles. En años recientes, la fluctuación en los precios del petróleo y los problemas ambientales asociados a los combustibles fósiles han renovado el interés por el bioetanol como fuente de energía alternativa (Abascal Fernández, 2017; Ibarra González, 2016).

El bioetanol moderno se produce a partir de la fermentación de azúcares presentes en diferentes tipos de biomasa, generando un alcohol hidratado que requiere deshidratación para ser usado como combustible. Además de su utilización en mezclas con gasolina, el bioetanol destaca por su capacidad para reducir las emisiones contaminantes y ofrecer un alto poder energético. Para fomentar su uso, en 2003, la Unión Europea incentivó la producción de bioetanol de primera generación, utilizando cultivos como la caña de azúcar, remolacha y cereales. Sin embargo, debido a los problemas de sostenibilidad y uso del suelo, la Comisión Europea ha limitado la participación de biocombustibles de primera generación, promoviendo la investigación en alternativas de segunda y tercera generación, como la biomasa lignocelulósica y las microalgas (Abascal Fernández, 2017; Ibarra González, 2016; CORDIS, 2015).

En condiciones normales de temperatura y presión, el etanol es un líquido incoloro e inflamable con un punto de ebullición de 78.4°C. A continuación, se detallan sus principales propiedades físicas, químicas y termoquímicas (Abascal Fernández, 2017; Vivo Vílches, 2017).

Tabla 1. Propiedades físicas del etanol (Abascal Fernández, 2017).

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Apariencia	Incoloro
Densidad	789 kg/m <sup>3</sup>
Masa molecular	46.07 g/mol
Punto de fusión	-114 °C
Punto de ebullición	78.4 °C
Temperatura crítica	241 °C
Presión crítica	63 atm
Estructura	Cristalina monoclinica
Viscosidad	1.074 mPa·s a 20 °C

<b>Índice de refracción</b>	1.3611
-----------------------------	--------

El etanol es inflamable y requiere medidas de seguridad para evitar su exposición a fuentes de calor y chispas, ya que sus vapores pueden formar mezclas explosivas en presencia de aire a temperatura ambiente (Vivo Vílches, 2017).

El bioetanol producido mediante fermentación genera una mezcla con un contenido de etanol de entre 12% y 20% en peso, mientras que el resto es principalmente agua junto con impurezas menores. Este contenido de agua proviene del medio de fermentación y necesita ser eliminado a través de procesos de destilación y purificación para obtener bioetanol de alta pureza (95-99%) adecuado para su uso en combustibles y aplicaciones industriales (Abascal Fernández, 2017; Ibarra González, 2016).

Las principales aplicaciones del bioetanol se centran en su uso como biocombustible y como aditivo en combustibles fósiles.

- **Bioetanol como Combustible:** Actualmente, el etanol se utiliza en motores de explosión, ya sea puro o en mezclas con gasolina, como el E85 (85% de etanol). Esta mezcla incrementa el octanaje del combustible, aunque su densidad energética es menor que la de la gasolina pura. En motores tradicionales, se pueden usar mezclas de hasta 25% de etanol sin modificaciones sustanciales en el motor, aunque es recomendable ajustar la relación de compresión y el sistema de carburación para optimizar su rendimiento y reducir el desgaste de piezas metálicas (Abascal Fernández, 2017; Vivo Vílches, 2017; Moro et al., 2014).
- **Bioetanol como Aditivo:** Además de su uso directo como combustible, el etanol se emplea como aditivo para mejorar las propiedades de combustión de otros combustibles. Su uso en gasolinas sin plomo ha sido clave para mejorar el octanaje y reducir emisiones, especialmente en comparación con otros aditivos como el metil-terc-butil éter (MTBE) y el éter etil-terc-butil (ETBE) (Abascal Fernández, 2017; Moro et al., 2014).

### **Bio-ETBE (Etil-terc-butil éter)**

El bioetanol, además de ser utilizado directamente como combustible o aditivo, sirve como precursor en la síntesis del Bio-ETBE (Etil-terc-butil éter), un compuesto que se emplea ampliamente en la formulación de gasolinas para motores de ciclo Otto. Este éter se obtiene mediante una reacción exotérmica entre bioetanol e isobuteno en condiciones moderadas de temperatura (40-60 °C) y presión (10 bar), utilizando un catalizador ácido, como resinas de intercambio iónico. La conversión de esta reacción alcanza valores elevados, del 95-98%, aunque en el caso del ETBE puede ser ligeramente inferior respecto al MTBE. La mayor densidad molecular del bioetanol frente al metanol compensa esta pérdida con un incremento en el rendimiento total del producto.

El Bio-ETBE es apreciado por su elevado índice de octano, que mejora el rendimiento antidetonante de las gasolinas, y por sus propiedades compatibles con los requerimientos técnicos y medioambientales actuales. Puede usarse en mezclas de hasta el 15% en volumen con gasolina según las normativas europeas, contribuyendo a la sustitución de aditivos como el benceno, el plomo tetraetilo o el MTBE, que presentan

mayores riesgos ambientales y sanitarios. Además, su combustión tiene un impacto menor en el balance de emisiones de CO<sub>2</sub> en comparación con otros compuestos de formulación de gasolinas.

En términos logísticos, el Bio-ETBE ofrece ventajas sobre el uso directo del bioetanol, como su menor solubilidad en agua y menor volatilidad. Estas características reducen problemas de corrosión y evaporación, mejorando la estabilidad de las mezclas y facilitando su manejo en refinerías y sistemas de distribución. Asimismo, la relación estequiométrica del Bio-ETBE es más cercana a la de la gasolina convencional, y su mayor poder calorífico optimiza el desempeño energético del combustible.

El Bio-ETBE se considera un biocombustible en la medida proporcional al peso del bioetanol en su composición, equivalente aproximadamente al 47%. Esto lo posiciona como una solución intermedia que aprovecha los beneficios del bioetanol en términos de sostenibilidad, mientras mitiga los desafíos logísticos asociados a su uso directo en las mezclas de gasolina. Su implementación refuerza el papel del bioetanol como un recurso estratégico en la transición hacia una matriz energética más sostenible.

### 3.2. Dióxido de carbono

El dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) producido durante la fermentación no es solo un subproducto inevitable, sino también un recurso con múltiples posibilidades de valorización dentro de una economía circular. Lejos de ser un simple gas residual, el CO<sub>2</sub> puede integrarse en procesos industriales, agrícolas y energéticos, ampliando el impacto positivo de la producción de bioetanol (Naik et al., 2010).

En la industria alimentaria, el CO<sub>2</sub> capturado se utiliza ampliamente para gasificar bebidas como refrescos y cervezas, así como para prolongar la conservación de alimentos mediante atmósferas controladas. Este enfoque no solo reduce el desperdicio alimentario, sino que también añade un valor comercial significativo al gas generado en los procesos de fermentación.

En el sector agrícola, el CO<sub>2</sub> puede desempeñar un papel esencial en la fertilización de cultivos bajo invernadero. Al enriquecer la atmósfera con este gas, las plantas incrementan su tasa de fotosíntesis, mejorando su crecimiento y productividad. Este uso del CO<sub>2</sub> es especialmente relevante en regiones productoras de olivos, donde podría cerrar un ciclo sostenible dentro de la cadena productiva (Kaiser et al., 2024).

La industria energética también encuentra aplicaciones estratégicas para este gas. Uno de los avances más prometedores es su uso en la síntesis de combustibles como el metanol, en combinación con hidrógeno renovable. Este enfoque transforma el CO<sub>2</sub> en un recurso para la producción de combustibles líquidos, contribuyendo a reducir la dependencia de fuentes fósiles (Olah et al., 2011). Además, tecnologías emergentes de captura y almacenamiento de carbono (CCS) permiten almacenar el CO<sub>2</sub> de forma segura en formaciones geológicas profundas, o bien reutilizarlo en la creación de materiales como el cemento verde, una solución sostenible para la construcción (Haszeldine, 2009).

Otro campo innovador es el cultivo de microalgas alimentadas con CO<sub>2</sub>, que aprovechan este gas para su crecimiento. Estas microalgas pueden convertirse en biodiésel,

biofertilizantes o incluso suplementos alimenticios, maximizando el valor de un residuo que, de otro modo, se liberaría a la atmósfera (Chisti, 2007).

### **3.3. Bioplásticos**

El proceso de fermentación de subproductos de la industria oleícola como el alperujo se posiciona como un eje clave para la obtención de ácidos orgánicos volátiles (VFAs) y, posteriormente, para la síntesis de poli-hidroxialcanoatos (PHA), conectando ambas etapas dentro de un modelo de economía circular.

#### **Ácidos Orgánicos Volátiles (VFAs)**

El primer paso del proceso implica la conversión de los subproductos oleícolas en ácidos orgánicos volátiles a través de fermentación anaeróbica. Este proceso aprovecha la riqueza en materia orgánica presente en los alpechines y el orujo para generar compuestos como ácido acético, propiónico y butírico. Estos VFAs no solo representan productos intermedios con múltiples aplicaciones, sino que también constituyen la base para etapas posteriores de valorización.

La fermentación anaeróbica se optimiza para maximizar la producción de VFAs, asegurando una eficiencia significativa en la transformación de los residuos oleícolas, tradicionalmente considerados desechos, en recursos estratégicos.

#### **Poli-hidroxialcanoatos (PHA)**

Los VFAs generados en la etapa anaeróbica actúan como sustrato principal para la síntesis de PHA en una etapa aeróbica posterior. En esta fase, microorganismos especializados metabolizan los ácidos orgánicos mediante regímenes de alimentación "festín-hambre", diseñados para promover la acumulación de PHA como reservas intracelulares de energía. Este proceso puede alcanzar rendimientos de hasta un 39% del peso seco celular, con una conversión de 0,3625 g de PHA por litro de fermentado (Valentino et al., 2018; Waller et al., 2012).

Los PHA, como bioplásticos completamente biodegradables, ofrecen una alternativa sostenible a los plásticos convencionales. Además, su producción directamente vinculada al aprovechamiento de VFAs refuerza el enfoque de economía circular, generando materiales con aplicaciones en envases, dispositivos médicos y productos compostables.

## **4. Industria andaluza dedicada a la fermentación de biomasa**

Aunque en la región no existen actualmente plantas dedicadas a la producción de bioetanol, Andalucía alberga dos instalaciones enfocadas en la producción de ETBE (Etil-terc-butil éter), un biocarburante clave en la formulación de gasolinas sostenibles. Es importante señalar que el etanol utilizado como materia prima en la síntesis de ETBE en estas plantas proviene de otras comunidades autónomas, lo que destaca la necesidad de fortalecer la capacidad de producción local de bioetanol para completar la cadena de valor y potenciar la sostenibilidad energética de la región.



Tabla 2. Listado de empresas dedicadas a la fermentación de biomasa.

CIF	Razón Social	Domicilio	Teléfono	CP	Municipio	Provincia
B87646196	Cepsa Bioenergía San Roque Sl.	11369 San Roque, Cádiz	627492739	11369	San Roque	Cádiz
A28003119	Parque Energético La Rábida de Cepsa (PELR)	C. Trans. A, 48,	916492543	21810	Palos de la Frontera	Huelva

## 5. Patentes sobre técnicas dedicadas a la fermentación de biomasa

Tabla 3. Listado de patentes sobre técnicas de fermentación de biomasa.

N.º de publicación	Título	Solicitantes	Inventores	Descripción	Fecha de publicación
ES2898874	Conversión hidrotermo-mecánica de biomasa lignocelulósica en etanol u otros productos de fermentación.	GranBio Intellectual Property Holdings, LLC	Retsina, Theodora; Pylkkanen, Vesa; Rutherford, Steven; Monclin, Jean-Pierre.	El proceso convierte biomasa lignocelulósica en un producto de fermentación. Primero, la biomasa se trata con vapor o agua caliente para separar hemicelulosa y obtener celulosa sólida, que se refina mecánicamente. Luego, la mezcla se hidroliza enzimáticamente para generar azúcares fermentables, que finalmente se fermentan para obtener el producto.	09/03/2022
ES2799298	Sacarificación y co-fermentación simultánea en dos etapas para producir etanol a partir de lignocelulosa.	Indian Oil Corporation Ltd.: Department Of Biotechnology	Sharma, Ajay Kumar; Swain, Manas Ranjan; Singh, Ajit; Mathur, Anshu Shankar; Gupta, Ravi Prakash; Tuli,	El procedimiento produce etanol a partir de biomasa lignocelulósica pretratada. Primero, se fermentan azúcares C5 con celulasas y microorganismos. Luego,	16/12/2020



			Deepak; Puri, Suresh Kumar; Ramakumar, Sankara Sri Venkata.	se hidroliza el sistema a 48-55°C por 18-24 horas, se enfría a 35-37°C y se fermentan azúcares C6 con una segunda dosis de microorganismos, generando etanol.	
ES2742184	Procedimiento de producción de hidrógeno por fermentación oscura a partir de biomasa obtenidas de la industria vitivinícola, sin aporte de consorcio microbiano.	Université de Strasbourg; Centre National de la Recherche Scientifique; Institut National Supérieur des Sciences Agronomiques de l'Alimentation et de l'Environnement; Université de Bourgogne.	Ernst, Barbara; Gougeon, Régis; François-Lopez, Emilie; Dumas, Christine; Vuilleumier, Stéphane; Alexandre, Hervé.	Procedimiento de producción de hidrógeno que comprende la fermentación oscura de biomasa vitivinícolas, sin adición de consorcio microbiano y sin pretratamiento térmico, y en el que se extrae el gas producido por dicha fermentación de la biomasa.	13/02/2020
ES2612009	Procedimiento para producir etanol a partir de biomasa con contenido en lignocelulosa.	Zylum Beteiligungsgesellschaft mbH & Co.	Ties Karstens	Se describe un método para la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica triturada. El proceso incluye la separación de lignina mediante tratamiento con un	11/05/2017

				<p>alkanolamina, seguida de la obtención de celulosa y, opcionalmente, hemicelulosa. Este residuo, sin necesidad de secado, se convierte en azúcares que luego se fermentan para obtener bioetanol. La alta reactividad del material celulósico (celulosa/hemicelulosa) facilita su conversión en azúcares y su posterior fermentación a bioetanol.</p>	
ES2606611	Acondicionamiento de biomasa para la liberación mejorada de azúcares C5/C6 antes de la fermentación.	Greenfield Specialty Alcohols Inc.	Dottori, Frank A.; Benson, Robert Ashley Cooper; Benech, Régis-Olivier.	<p>Proceso para recuperar azúcares C5 y C6 de biomasa lignocelulósica: incluye pretratamiento con vapor (80-100°C por 5-60 minutos), eliminación de inhibidores mediante compresión (2:1 a 6:1) y ajuste de humedad al 60-80% con agua o catalizador ácido (0-5%).</p>	24.03.2017

ES2539370	Proceso para separación líquido/sólido de un caldo de fermentación de hidrolizado de biomasa lignocelulósica.	E.I. Du Pont De Nemours And Company	Hennessey, Susan Marie; Mitchell, Annemarie; Stolarski, Mathias E.	Un proceso para separar la fracción líquida de un caldo de fermentación de biomasa lignocelulósica comprende: (1) obtener un caldo de fermentación con etanol, butanol o 1,3-propanodiol; (2) opcionalmente, extraer el producto diana para generar un caldo empobrecido; (3) tratar térmicamente el caldo o caldo empobrecido para reducir la resistencia de filtración en al menos un 20%; y (4) filtrar el caldo tratado para separar las fracciones líquida y sólida.	30/06/2015
WO/2013/156642	Proceso para la producción de bioetanol en una biorrefinería multifuncional	Vicente Merino Febrero; José Luis Febrero López	Vicente Merino Febrero; José Luis Febrero López	La invención describe un proceso para producir azúcar y/o bioetanol a partir de biomasa, que incluye la extracción de un jugo de difusión separando residuos o pulpas, seguido de	31/01/2013

				fermentación alcohólica, destilación y deshidratación para obtener bioetanol y/o azúcar. Además, contempla un proceso secundario para transformar el bioetanol o sus subproductos en biocombustibles y/o productos químicos.	
ES2376682	Método para la obtención de biocombustibles y productos químicos a partir de bioetanol y de subproductos del proceso de producción de bioetanol.	Vicente Merino Febrero	Vicente Merino Febrero	Método para la obtención de biocombustibles y productos químicos a partir de bioetanol y sus subproductos, implementado en un complejo industrial o biorrefinería diseñado específicamente para este propósito.	16/03/2012
MXMX/a/2009/00071	Sistemas para conversión de biomasa	Xyleco INC	Marshall Medoff	La producción de etanol a partir de biomasa económica busca competir con la gasolina y reducir la dependencia de combustibles extranjeros.	13/05/2009

				Para abaratar costos, se emplean plantas móviles o cercanas a las fuentes de biomasa, transportables por tierra, agua o aire. Estas instalaciones también pueden generar otros productos como hidrocarburos, gas, plásticos y proteínas.	
MXMX/a/2008/000529	Planta de producción y método para convertir biomasa.	The Texas A&M University System.	Holtzaple, Mark T.; Davison, Richard R.; Granda, Cesar B.; Agbogbo, Frank K.; Fu, Zhihong.	La invención describe un método para convertir biomasa en productos químicos útiles. La biomasa se fermenta en fermentadores con una solución de carbonato o bicarbonato de amonio, generando sales de carboxilato de amonio. Estas sales reaccionan con una amina para formar carboxilato de amina, que se craquea térmicamente para obtener ácido carboxílico,	27.06.2008

				o con un alcohol para producir ésteres, que pueden hidrogenarse para generar alcoholes.	
AR029472	Procedimiento de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica utilizando una nueva levadura termotolerante	Centro de Investigaciones energéticas, Medioambientales y tecnológicas (C.I.E.M.A.T.)	Centro de Investigaciones energéticas, Medioambientales y tecnológicas (C.I.E.M.A.T.)	El proceso incluye moler biomasa lignocelulósica (15-30 mm), pretratarla con explosión de vapor (190-230°C, 1-10 min), separar fracciones sólida y líquida, fermentar la fracción sólida con celulasas, b-glucosidasa y la bacteria termotolerante <i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 10875, agitándola durante 72 horas a 42°C.	02/07/2003

## 6. Proyectos de investigación sobre la tecnología de fermentación de subproductos de la industria oleícola en Andalucía

Tabla 4. Listado de proyectos de investigación en Andalucía sobre la tecnología de fermentación de subproductos de la industria oleícola.

Nombre del proyecto	Entidades	Investigadores	Descripción	Fecha de ejecución
<b>Exploitation of olive tree pruning biomass through hydrothermal pretreatments</b>	Universidad de Jaén (UJA)	Romero-García, Juan Miguel; López-Linares, Juan Carlos; Contreras, María del Mar; Romero, Inmaculada; Castro, Eulogio.	El proceso convierte biomasa lignocelulósica, como poda de olivo, en etanol mediante pretratamientos con agua caliente o explosión de vapor, generando bioetanol y subproductos útiles. El método con agua caliente recupera más azúcares (92%) que el de vapor (80%), destacando la poda de olivo como fuente potencial de biocombustible.	Mayo 2022
<b>OliPFUEL</b>	Universidad de Jaén (UJA)	Martínez Cartas, Lourdes; Asad Karim, Adnan.	El proyecto OliPFUEL busca producir biocombustibles a partir de residuos de la industria del aceite de oliva mediante procesos hidrotérmicos y biotecnológicos, sin usar sustancias químicas tóxicas. Esto permitirá optimizar la conversión y aumentar la producción de biocombustibles de orujo de oliva, promoviendo un futuro energético más sostenible.	Diciembre 2022 – Enero 2026
<b>Avances hacia una biorrefinería flexible en materias primas y productos en regiones</b>	Universidad de Jaén (UJA)	Romero Pulido, María Inmaculada; Ruiz Ramos, Encarnación; Cara Corpas, Cristóbal; Castro Galiano,	Optimizar un método químico para obtener antioxidantes y bioetanol de hojas de olivo, promoviendo la economía circular. Este proceso rentable y sostenible separa la biomasa en una	Enero 2018 – Junio 2021



<p><b>con alta densidad de biomasa agroindustrial: caso del olivar.</b></p>		<p>Eulogio; Espínola Lozano, Francisco; Moya Vilar, Manuel; Torres Sánchez, Antonia.</p>	<p>fase sólida, de la que se obtiene bioetanol y lignina, y una líquida, rica en antioxidantes con aplicaciones farmacológicas, ofreciendo nuevas oportunidades en los sectores agrícola y energético.</p>	
<p><b>Bioreol</b></p>	<p>Universidad de Jaén (UJA); Unidad de Biocombustibles del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (Ciemat)</p>	<p>Castro Galiano, Eulogio.</p>	<p>El proyecto Bioreol desarrolla un método para extraer azúcares del hueso de aceituna, logrando recuperar el 83% de glucosa, que puede transformarse en bioetanol, xilitol (edulcorante) y ácido láctico (base de macromoléculas). Se emplea un tratamiento en dos fases: una solución ácida para separar componentes del hueso y una reacción química que mejora los resultados frente a métodos previos. El objetivo es integrar estos procesos en biorrefinerías para producir productos y energía renovables que sustituyan derivados del petróleo, optimizando logística y sostenibilidad.</p>	<p>2008 – enero 2021</p>

## 7. Bibliografía

- Arifeen, N. (2007). *Process Design and Optimization of Bio-ethanol Production System*. The University of Manchester (United Kingdom).
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy conversion and management*, 52(2), 858-875.
- Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabañas, A., Manzanares, P., & Ballesteros, M. (2006). Ethanol Production From Steam-Explosion Pretreated Wheat Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129, 13.
- Ballesteros, I., Oliva, J. M., Negro, M. J., Manzanares, P., & Ballesteros, M. (2002). Ethanol production from olive oil extraction residue pretreated with hot water. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals: The Twenty-Third Symposium* (pp. 717-732). Humana Press.
- Basic, A., Mardetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., & Šantek, B. (2018). Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: A review. *Food Technology and Biotechnology*, 56(3), 289-311. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5542>
- Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M. J., & Castro, E. (2008). Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel*, 87(6), 692-700.
- Chen, C.-Y., Hsu, C.-L., Chang, T.-C., & Jang, H.-D. (2018). Enhancement of the efficiency of bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* via gradually batch-wise and fed-batch increasing the glucose concentration. *Fermentation*, 4(2), 45.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306.
- Christofoleti-Furlan, R. M., Raposo, M. S., Basso, L. C., & Stambuk, B. U. (2022). Increasing ethanol tolerance and ethanol production in an industrial fuel ethanol *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Fermentation*, 8(10), 470.
- Contreras, M. del M., Romero, I., Moya, M., & Castro, E. (2020). Olive-derived biomass as a renewable source of value-added products. *Process Biochemistry*, 97, 43-56.
- Demirci, A., Pometto, A. L., & Johnson, K. E. (1993). Lactic acid production in a mixed-culture biofilm bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 203-207.
- Derman, E., Abdulla, R., Marbawi, H., Sabullah, M. K., Gansau, J. A., & Ravindra, P. (2022). Simultaneous saccharification and fermentation of empty fruit bunches of palm for bioethanol production using a microbial consortium of *S. cerevisiae* and *T. harzianum*. *Fermentation*, 8(7), 295.
- Díaz, M. J., Romero-García, J. M., Romero, I., Cara, C., Moya, M., & Castro, E. (2019). Enzymatic hydrolysis of olive tree pruning biomass after different dilute acid

- pretreatments. In *2nd International workshop on biorefinery of lignocellulosic materials*. Ámbito Gráfico SLL.
- Fernández-Bolaños, J., Felizón, B., Heredia, A., Rodríguez, R., Guillén, R., & Jiménez, A. (2001). Steam-explosion of olive stones: hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresource Technology*, *79*, 53–61.
- Fernández-Prior, Á., Trujillo-Reyes, Á., Serrano, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Reinhard, C., & Feroso, F. G. (2020). Biogas Potential of the Side Streams Obtained in a Novel Phenolic Extraction System from Olive Mill Solid Waste. *Molecules*, *25*(22), 5438.
- Geberekidan, M., Yan, Z., Yi, X., & Bao, J. (2023). Very high thermotolerance of an adaptive evolved *Saccharomyces cerevisiae* in cellulosic ethanol fermentation. *Fermentation*, *9*(4), 393.
- Gil, M.V., González-Vázquez, M.P., García, R., Rubiera, F., & Pevida, C. (2019). Assessing the influence of biomass properties on the gasification process using multivariate data analysis. *Energy Conversion and Management*, *184*, 649–660.
- Glover, J., Birkenholz, J., Doss, K., Fox, A., & England, E. (2021). Effect of acidic pHs on CO<sub>2</sub> production in baker's yeast. *Journal of Introductory Biology Investigations*, *15*(2), 1-3.
- Gomes, D., Cruz, M., de Resende, M., Ribeiro, E., Teixeira, J., & Domingues, L. (2021). Very high gravity bioethanol revisited: main challenges and advances. *Fermentation*, *7*(1), 38.
- Gordillo-Fuenzalida, F., Echeverría-Vega, A., Cuadros-Orellana, S., Faundez, C., Kähne, T., & Morales-Vera, R. (2019). Cellulases production by a *Trichoderma* sp. using food manufacturing wastes. *Applied Sciences*, *9*(20), 4419.
- Harmsen, P. F., Huijgen, W., Bermudez, L., & Bakker, R. (2010). *Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass* (No. 1184). Wageningen UR-Food & Biobased Research.
- Hashmi, M., Shah, A. A., & Hameed, A. (2017). Enhanced production of bioethanol by fermentation of autohydrolyzed and C<sub>4</sub>mimOAc-treated sugarcane bagasse employing various yeast strains. *Energies*, *10*(8), 1207.
- Haszeldine, R. S. (2009). Carbon capture and storage: How green can black be? *Science*, *325*(5948), 1647–1652. <https://doi.org/10.1126/science.1172246>
- Hohmann, N., & Rendleman, C. M. (1993). Emerging technologies in ethanol production. *Agricultural Information Bulletin*, 663.
- Huijgen, W.J.J., Smit, A.T., de Wild, P.J., & den Uil, H. (2012). Fractionation of wheat straw by prehydrolysis, organosolv delignification and enzymatic hydrolysis for production of sugars and lignin. *Bioresource Technology*, *114*, 389–398.

- Kaiser, E., Kusuma, P., Violet-Chabrand, S., Folta, K., Liu, Y., Poorter, H., ... & Marcelis, L. F. (2024). Vertical farming goes dynamic: optimizing resource use efficiency, product quality, and energy costs. *Frontiers in Science*, 2, 1411259. <https://doi.org/10.3389/ffsci.2024.1411259>
- Lama-Muñoz, A., Romero-García, J.M., Cara, C., Moya, M., & Castro, E. (2014). Low energy-demanding recovery of antioxidants and sugars from olive stones as preliminary steps in the biorefinery context. *Industrial Crops and Products*, 60, 30–38.
- Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., & Kong, H. (2012). Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenergy*, 47, 395-401.
- Lobato-Peralta, D.R., Duque-Brito, E., Villafán-Vidales, H.I., Longoria, A., Sebastian, P.J., Cuentas-Gallegos, A.K., Arancibia-Bulnes, C.A., & Okoye, P.U. (2021). A review on trends in lignin extraction and valorization of lignocellulosic biomass for energy applications. *Journal of Cleaner Production*, 293, 126123.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(3), 506-577.
- Manufactura LATAM. (2023). Bioetanol: Definición, proceso de fabricación y usos industriales. *Manufactura LATAM*. Recuperado de <https://www.manufactura-latam.com/es/noticias/bioetanol-definicion-proceso-de-fabricacion-y-usos-industriales>
- Martínez-Patiño, J.C., Ruiz, E., Cara, C., Romero, I., & Castro, E. (2018). Advanced bioethanol production from olive tree biomass using different bioconversion schemes. *Biochemical Engineering Journal*, 137, 172–181.
- Mohagheghi, A., Evans, K., Chou, Y. C., & Zhang, M. (2002). Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-Integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* ax101. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals: The Twenty-Third Symposium* (pp. 885-898). Humana Press.
- Molina-Alcaide, E., & Yáñez-Ruiz, D. R. (2008). Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 147(1-3), 247-264.
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first- and second-generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 578–597.
- Narendranath, N. V., & Power, R. (2005). Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. *Applied and Environmental Biology*, 71(5), 2239-2243.

- Nikolić, S., Mojović, L., Rakin, M., & Pejin, D. (2020). Bioethanol production from corn meal by simultaneous saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Fuel*, 89(7), 1602-1607.
- Olah, G. A., Prakash, G. K. S., & Goepfert, A. (2011). Anthropogenic chemical carbon cycle for a sustainable future. *Journal of the American Chemical Society*, 133(33), 12881-12898.
- Ramos-Carmona, S., Martínez, J. D., & Pérez, J. F. (2018). Torrefaction of patula pine under air conditions: A chemical and structural characterization. *Industrial crops and products*, 118, 302-310.
- Rascón, C. P. (2022). *Producción de furfural y bioetanol a partir de hueso de aceituna* (Doctoral dissertation, Universidad de Jaén).
- Rodríguez-Gutiérrez, G., Rubio-Senent, F., Lama-Muñoz, A., García, A., & Fernández-Bolaños, J. (2014). Properties of Lignin, Cellulose, and Hemicelluloses Isolated from Olive Cake and Olive Stones: Binding of Water, Oil, Bile Acids, and Glucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 8973-8981.
- Romero, M., Romero Zúñiga, L. E., & Cantero Moreno, D. (2000). *Desactivación del sistema enzimático glucosa oxidasa-catalasa. Operación en reactor discontinuo*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz.
- Romero-García, J.M., Martínez-Patiño, C., Ruiz, E., Romero, I., & Castro, E. (2016). Ethanol production from olive stone hydrolysates by xylose fermenting microorganisms. *Bioethanol*, 2.
- Taherzadeh, M., & Karimi, K. (2008). Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 1621-1651.
- Toor, M., Kumar, S. S., Malyan, S. K., Bishnoi, N. R., Mathimani, T., Rajendran, K., & Pugazhendhi, A. (2020). An overview on bioethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Chemosphere*, 242, 125080.
- Vázquez, H. J., & Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 8(4), 249-259.
- Vergara-Barberán, M., Lerma-García, M.J., Herrero-Martínez, J.M., & Simó-Alfonso, E.F. (2014). Efficient Extraction of Olive Pulp and Stone Proteins by using an Enzyme-Assisted Method: Enzyme extraction of olive proteins. *Journal of Food Science*, 79, C1298-C1304.
- Wanderley, M. J., et al. (2023). Optimization of inoculum size for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* using sugarcane bagasse hydrolysate. *African Journal of Biotechnology*, 22(5), 764-776.

---

Zabed, H., Sahu, J.N., Boyce, A.N., & Faruq, G. (2016). Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 751–774.

Zhang, H., Zhang, P., Wu, T., & Ruan, H. (2023). Bioethanol production based on *Saccharomyces cerevisiae*: Opportunities and challenges. *FEMS Yeast Research*, 20(1), fozo89.