

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
AGROINDUSTRIA**

**ESCALADO DE PROCESOS FERMENTATIVOS AEROBIOS EN
BIORREACTORES TIPO TANQUE AGITADO**

**ESCALADO DE LA FERMENTACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE
VINAGRE DE NARANJA AGRIA (*Citrus aurantium L.*) CON
*Acetobacter sp.***

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PRESENTADO COMO
REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL**

FRANCISCO ANDRÉS NÚÑEZ MINDA

francisco.nunez@epn.edu.ec

DIRECTOR: ING. MARÍA AUGUSTA PÁEZ LARA MSc.

maria.paez@epn.edu.ec

DMQ, agosto 2022

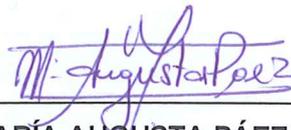
CERTIFICACIONES

Yo, FRANCISCO ANDRÉS NÚÑEZ MINDA declaro que el trabajo de integración curricular aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.



FRANCISCO ANDRÉS NÚÑEZ MINDA

Certifico que el presente trabajo de integración curricular fue desarrollado por FRANCISCO ANDRÉS NÚÑEZ MINDA, bajo mi supervisión.



**ING. MARÍA AUGUSTA PÁEZ LARA MSc.
DIRECTOR**

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

A través de la presente declaración, afirmamos que el trabajo de integración curricular aquí descrito, así como el (los) producto(s) resultante(s) del mismo, son públicos y estarán a disposición de la comunidad a través del repositorio institucional de la Escuela Politécnica Nacional; sin embargo, la titularidad de los derechos patrimoniales nos corresponde a los autores que hemos contribuido en el desarrollo del presente trabajo; observando para el efecto las disposiciones establecidas por el órgano competente en propiedad intelectual, la normativa interna y demás normas.

FRANCISCO ANDRÉS NÚÑEZ MINDA

MARÍA AUGUSTA PÁEZ LARA

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo a mi madre, Marcia Minda Galarza, quien es la persona más importante en mi vida, ella es quien me guía siempre y ha estado para mí en todo momento incondicionalmente, me ha dado su amor y su esfuerzo, gracias a mi madre he logrado todo lo que tengo hasta el día de hoy, y gracias a ella me encuentro culminando esta carrera tan importante para mí

AGRADECIMIENTO

A mi hermana Gaby por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida y carrera universitaria. A mi padre Fabián Núñez por su motivación y ejemplo profesional. A mis tíos: Lorgia Núñez, Patricio Jarrín, Carmita Mantilla por cuidar siempre de mí, a mi abuelita Maru por todo el amor incondicional, también a mis primos: Nicole, Juan, David por alentarme a seguir adelante, a Joselyn por su apoyo en el desarrollo de este proyecto y a mis amigos por los gratos momentos vividos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIONES.....	I
DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. DESCRIPCIÓN DEL COMPONENTE DESARROLLADO	1
1.1 Objetivo general	1
1.2 Objetivos específicos	1
1.3 Alcance	2
1.4 Marco teórico	2
1.4.1. Producción de vinagre a partir de frutas.....	2
1.4.2. Naranja agria (<i>Citrus aurantium L.</i>) en Ecuador.....	4
1.4.3. Escalado de procesos fermentativos	5
1.4.4. Criterios de escalado frecuentes en procesos fermentativos aerobios.....	7
2. METODOLOGÍA.....	9
2.1. Definición del proceso fermentativo en la escala prototipo	9
2.2. Dimensionamiento de los biorreactores en la escala modelo	10
2.3. Identificación y estimación de los criterios de escalado para el proceso fermentativo	10
2.4. Cálculo de las condiciones de operación en las escalas modelo laboratorio y prototipo	11
3. RESULTADOS, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	12
3.1. Producción de vinagre de naranja agria en escala prototipo.....	12
3.2. Biorreactores escala modelo laboratorio y piloto.....	13
3.3. Criterios de escalado con mayor influencia para el proceso fermentativo.....	16
3.4. Condiciones de operación en las escalas modelo laboratorio y piloto	22
3.5. Conclusiones.....	27
3.6. Recomendaciones.....	27
4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
5. ANEXOS.....	32

RESUMEN

La producción de naranja en el Ecuador no cubre las necesidades económicas de los agricultores quienes se ven afectados por la sobreproducción, los desperdicios generados durante su cadena de comercialización, y los bajos precios de venta; situación que refleja la necesidad de otorgar valor agregado a esta fruta.

En el presente trabajo se desarrollan dos protocolos de escalado para la producción de vinagre de naranja agria (*Citrus aurantium L.*) empleando *Acetobacter sp.* en biorreactores modelo escala laboratorio y piloto con volúmenes de 15 y 110 L, dimensionados mediante criterios de similitud geométrica, manteniendo constantes el coeficiente de transferencia de oxígeno (KLa) y la concentración de oxígeno disuelto (OD). Dichos criterios fueron estimados mediante ecuaciones teóricas y empíricas en base a las condiciones de operación del biorreactor STR prototipo establecidas mediante revisión bibliográfica en 400 rpm, 25 °C y 0.3 VVM. La escala prototipo presenta un volumen de operación de 1.37 L y un sistema de doble agitación tipo Rushton. Se determina para la escala prototipo un KLa de 31.5 h⁻¹, que para permanecer constante requiere que la escala laboratorio y piloto operen a 506 y 164 rpm respectivamente. De igual forma, mantener una OD de 2.33 ppm en la escala prototipo constante implica que la escala laboratorio y piloto trabajen a 563 y 156 rpm respectivamente. En todos los casos se contempla una tasa de aireación de 0.1 VVM. Estas condiciones de operación se encuentran en los rangos aceptables que aseguran un adecuado desarrollo bacteriano mediante el incremento del consumo de potencia y velocidad de punta compensando la disminución del número de bombeo.

PALABRAS CLAVE: Vinagre, Naranja agria, Biorreactor tanque agitado, coeficiente de transferencia de oxígeno, oxígeno disuelto, escalado

ABSTRACT

In Ecuador, orange production does not meet the economic requirements of farmers who are affected by overproduction, waste generated during the marketing chain, and low sales prices; therefore, there is a need to add value to this fruit.

In the present study, two scale-up protocols are accomplished to produce bitter orange (*Citrus aurantium L.*) vinegar using *Acetobacter sp.* in laboratory and pilot model scales with 15 and 110 L volume sized by means of geometric similarity criteria, and also keeping constant the oxygen transfer coefficient (KLa) and the dissolved oxygen concentration (DO). These parameters were estimated by theoretical and empirical equations based on operating conditions of 400 rpm, 25 °C and 0.3 VVM, determined through literature review, in a prototype STR bioreactor with an operating volume of 1.37 L and a Rushton-type double stirring system. A value of 31.5 h⁻¹ was determined for KLa in the prototype scale, which to remain constant requires the laboratory and pilot scale to operate at 506 and 164 rpm respectively. Similarly, to hold an OD of 2.33 ppm, the laboratory and pilot scales must operate at 563 and 156 rpm respectively. In all cases an aeration rate of 0.1 VVM is contemplated. The operating conditions found satisfy acceptable ranges that ensure adequate bacterial growth by increasing power consumption and tip speed to compensate a significant reduction of the pumping number.

KEYWORDS: vinegar, bitter orange, stirred tank, oxygen transfer coefficient, dissolved oxygen, scale-up

1. DESCRIPCIÓN DEL COMPONENTE DESARROLLADO

En el Ecuador el sector agrícola constituye un aporte fundamental a la economía productiva, con una contribución aproximada del 8 % al PIB del país (MAGAP, 2019). En el caso de la naranja, según Campelo (2020) la superficie cultivada es de 55 953 hectáreas cuya producción se destina al mercado local con un precio de comercialización fijado de cinco dólares las cien naranjas (MAGAP, 2017). Este margen de precio no genera réditos económicos representativos, por lo que se requiere generar productos con valor agregado (El Telégrafo, 2017). La producción de vinagre constituye una alternativa atractiva ya que se trata de un producto de uso diario y los requisitos de la materia prima no son rigurosos en cuanto a nivel de calidad siempre que cumpla con adecuados estándares de inocuidad (Luzón et al., 2021).

En este contexto, el presente trabajo tiene la finalidad de plantear un protocolo de escalado con criterios cinemáticos y dinámicos apropiados que permitan asegurar condiciones adecuadas de operación para la producción de vinagre a partir de naranja agria por medio de bacterias acéticas en dos biorreactores modelo, a escala laboratorio de 15 litros y a escala piloto de 110 litros.

1.1 Objetivo general

Escalar el proceso fermentativo para la obtención de vinagre de naranja agria (*Citrus aurantium* L.) con *Acetobacter* sp.

1.2 Objetivos específicos

- Definir el proceso para la obtención de vinagre de naranja agria (*Citrus aurantium* L.) en la escala prototipo en términos de las condiciones de operación y los detalles geométricos del biorreactor
- Identificar y estimar los criterios de similitud cinemática y dinámica más influyentes para el proceso de fermentación con *Acetobacter* sp. en función de las características reológicas y la transferencia de oxígeno

- Determinar las condiciones de operación en las escalas modelo de 15 y 110 litros mediante el desarrollo de un protocolo de escalado.

1.3 Alcance

Para escalar el proceso de obtención de vinagre de naranja agria se definirán las condiciones de operación para el cultivo de *Acetobacter sp.* Posteriormente se establecerá la geometría del biorreactor prototipo con detalles como volumen de operación, tipo de sistema de agitación y aireación, para verificar que el diseño cumpla con criterios de similitud geométrica estándar y con ello se dimensionarán los biorreactores en las escalas laboratorio y prototipo modelo. Luego, se establecerán los criterios de similitud dinámica y cinemática con mayor influencia en el proceso de fermentación acética para su estimación en función de la reología y transferencia de oxígeno. Finalmente, se determinarán las condiciones de operación en las escalas modelo mediante el desarrollo de un protocolo de escalado.

Todo el proceso de escalado se realizará de manera teórica sin presencia de etapas de validación experimental.

1.4 Marco teórico

1.4.1. Producción de vinagre a partir de frutas

La elaboración de vinagre es una práctica antigua de la cual se tienen referencias desde el año 2 000 A.C en donde las principales materias primas para su elaboración eran cereales, vino y cerveza. A partir del desarrollo de vinagre se ha empleado como un agente preservante, aromatizante e incluso como especia para dar sabor a las comidas, siendo un producto aprovechado a nivel mundial dada su rentabilidad asociada a bajos costos de producción (Solieri & Giudici, 2009).

En la actualidad, existe preocupación a nivel económico, político y social por el excesivo desperdicio de alimentos, sobre todo en las etapas de selección en donde vegetales y frutas son descartados debido a que no cumplen con los estándares requeridos para ser exportados a pesar de que sean productos aptos para el consumo humano. Según reportes de la FAO cerca del 21.6 % de fruta es desperdiciado a lo largo de la cadena de producción y durante la comercialización (Luzón et al., 2021).

Ante esta premisa, se han desarrollado investigaciones en el área de los alimentos con el objetivo de aprovechar dichos desperdicios y promover productos como el vinagre que utiliza como materia prima los azúcares fermentables presentes en las frutas (Solieri & Giudici, 2009). La producción de vinagre a partir de frutas como manzana, tomate, uva, arándanos, plátano y naranja, además de ser una alternativa para el aprovechamiento de productos agroindustriales, otorga características nutricionales y organolépticas (Luzón et al., 2021).

Las bacterias acéticas, cuya imagen obtenida mediante microscopía electrónica de barrido, se muestra en la Figura 1, corresponden a un amplio grupo de microorganismos aerobios estrictos, gram positivos, mesófilos con una temperatura óptima de crecimiento entre 25 y 30 °C a un pH entre 3 y 6.5, presentan una longitud entre 0.8 y 4.5 mm y ancho entre 0.4 y 1 mm (Sengun & Karabiyikli, 2011).

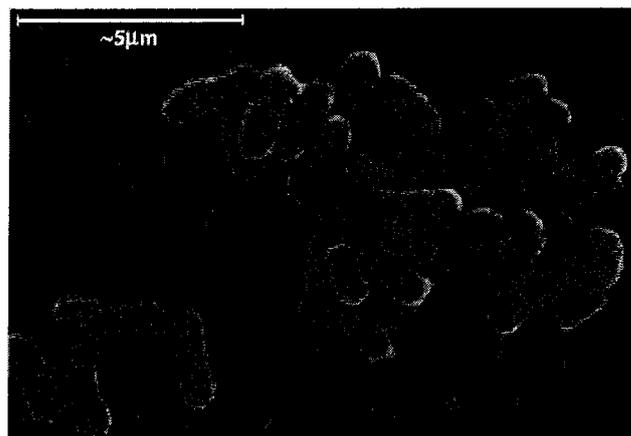
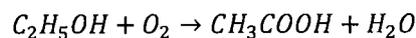


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido de bacterias acéticas (García et al., 2009).

De acuerdo con la recopilación realizada por Sengun & Karabiyikli (2011) la clasificación taxonómica de las bacterias acéticas reporta 12 géneros de los cuales destacan los géneros *Gluconacetobacter* y *Acetobacter* por ser los más estudiados y particularmente este último género de interés para la producción de vinagre. De las 16 especies pertenecientes a este género, Hutchinson et al. (2019) indican que *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter aceti* son las bacterias más empleadas para la producción de vinagre. Por otro lado, Ndoye et al. (2009) menciona que para la obtención de vinagre es una práctica habitual el uso de un cultivo iniciador el cual constituye un cóctel de microorganismos aislados y almacenados en condiciones inocuas capaces de comenzar una fermentación de forma más rápida en comparación con los procesos de fermentación espontánea. Los cultivos iniciadores pueden ser simples o mixtos, estos últimos menos

susceptibles al deterioro y a contaminación por otros microorganismos. En el caso del vinagre de frutas los cultivos iniciadores se obtienen mediante el aislamiento de bacterias presentes en jugos fermentados que han sido previamente caracterizados con el objetivo de identificar el género. Gerard (2015) en sus estudios de caracterización de bacterias acéticas destinadas a la producción de vinagre de frutas ha identificado bacterias del género *Gluconobacter*, *Asia*, *Acidomona*, *Gluconacetobacter*, *Saccharibacter*, y *Acetobacter* presentes en jugos fermentados de arándanos y cítricos como naranja y mandarina.

La ruta metabólica de las bacterias acéticas se caracteriza por la oxidación de azúcares y alcoholes para generar ácidos orgánicos como el glucónico y el acético llegando a acumularse en el medio de cultivo hasta en un 10 % (Gomes et al., 2018). La etapa primordial durante la producción de vinagre es la oxidación de etanol en ácido acético, donde teóricamente se requiere 1 mol de oxígeno para la producción de 1 mol de ácido acético. Garcia et al (2009) indica que las bacterias acéticas pueden generar ácido acético con una eficiencia teórica esperada entre 95 y 98 %.



Ecuación 1. Oxidación de etanol a ácido acético

Dada la naturaleza aerobia de las bacterias, el suministro de oxígeno en el medio de cultivo para la producción de vinagre es un requerimiento operativo fundamental. La producción de vinagre se puede realizar mediante fermentación de superficie para aprovechar el oxígeno disponible en el ambiente; por lo tanto, el desarrollo microbiano y la producción de ácido acético están limitados por el área de transferencia de oxígeno disponible. Además, el tiempo de fermentación para el caso de vinagre de frutas según la compilación de Hutchinson et al. (2019) se encuentra entre 15 a 144 días. Por otra parte, el método de fermentación sumergida que se desarrolla en tanques de agitación y con un flujo continuo de aire, aumenta la transferencia de oxígeno a los microorganismos inoculados permitiendo una mayor productividad de ácido acético en menor tiempo.

1.4.2. Naranja agria (*Citrus aurantium L.*) en Ecuador

Según los últimos datos recopilados, la superficie de cultivo de naranja en el Ecuador es de 55 993 hectáreas donde las variedades más comunes son: Valencia tardía, Valencia común, Valencia delta, Thompson, Washington, Naranja lima, Naranja agria y Naranja pomelo (Campelo, 2020). La evaluación realizada por el Ministerio de Agricultura y Pesca MAGAP (2017) muestra un incremento del 20 % en la producción de naranjas a nivel

nacional con un rendimiento de cosecha de 5.84 toneladas por hectárea lo que implica un aumento en el personal de producción requerido y en los gastos de mantenimiento de las plantaciones por parte de los productores directos quienes son propietarios del 90 % de la superficie cultivada en el país. Según el Telégrafo (2017) el precio de venta de la naranja no logra cubrir el costo de la mano de obra en el campo para suplir un pago adecuado a los trabajadores. Para el año 2020 se registró un incremento del precio de venta de 7 dólares el saco de cien naranjas; sin embargo, debido a la falta de medios de transporte y el mal estado de las vías se ha dificultado su comercialización. En este sentido, la situación de los productores de naranja resulta compleja ya que la inversión en los procesos de producción y cosecha no se retribuye por lo que se requiere otorgar un valor agregado a la naranja para promover un crecimiento económico (Campelo 2020).

Durante los procesos de comercialización de naranja los agricultores mencionan que es habitual que los compradores o intermediarios escojan la fruta dejando a un lado aquellas de menor tamaño, las cuales permanecen almacenadas y experimentan procesos de descomposición; cerca del 35 % de la cosecha del 2017 se perdió a causa de sequías, malas prácticas agrícolas, inundaciones, plagas y enfermedades, mientras que del 65 % de las pérdidas no hay registro de la causa (MAGAP, 2017). La fruta desperdiciada por factores físicos como forma, tamaño y peso presenta las mismas características organolépticas a las de mayor tamaño y son aptas para el consumo, así como para su aprovechamiento en procesos fermentativos como la obtención de vinagre.

1.4.3. Escalado de procesos fermentativos

El escalado de un proceso fermentativo implica la transferencia de las condiciones óptimas de trabajo evaluadas a nivel de laboratorio, cuyos volúmenes pueden ir desde 100 mL en frascos Erlenmeyer hasta biorreactores con capacidades de operación de 50 L, hacia modelos de dimensiones superiores. Sin embargo, el escalado no es un proceso de alta precisión ya que el desarrollo del microorganismo de interés en un medio específico está afectado por parámetros externos como la transferencia de oxígeno, pH, temperatura y velocidad de agitación (González, 2000; Mahdinia et al., 2019). El objetivo del escalado es aumentar la capacidad de procesamiento con rendimientos y productividad similares de tal manera que se alcancen escalas piloto con volúmenes de operación entre 50 y 10 000 L y posteriormente a escalas industriales.

Los biorreactores tipo tanque agitado o STR, por sus siglas en inglés, constituyen los sistemas más usados en procesos fermentativos industriales, constan de un sistema de agitación adaptable a configuraciones simples o mixtas permitiendo una mezcla

homogénea que facilita la transferencia de oxígeno y de calor necesarias para los procesos. Además, constan de deflectores que previenen la formación de vórtices y equipos de medición de parámetros como temperatura, pH y flujo de aire (García-Ochoa et al., 2011; Wang y Zhong, 2007). El proceso de escalado de este tipo de biorreactores se facilita por los diseños estándar establecidos en base a la influencia del dimensionamiento geométrico en los fenómenos de transporte involucrados en los procesos fermentativos.

El diseño de biorreactores a escalas mayores requiere mantener similitudes geométricas constantes entre escalas, dichas similitudes se establecen como la relación entre las dimensiones de los tanques como el diámetro, altura, longitud de deflectores, distancia entre agitadores, ancho de las aspas, diámetro del agitador, entre otras, según el tipo de biorreactor empleado en el proceso fermentativo.

La configuración geométrica de los agitadores influye en la transferencia de oxígeno, así como en el comportamiento hidrodinámico del biorreactor. En función del tipo, número, posición y dimensiones de los agitadores se generan distintos patrones de flujo. De acuerdo con Rutherford et al. (1996) para un sistema de doble agitación se identifican tres patrones estables: flujo paralelo, flujo de difusión y flujo divergente como se muestran en la Figura 2 en donde C1, C2 y C3 se encuentran en función del diámetro (D).

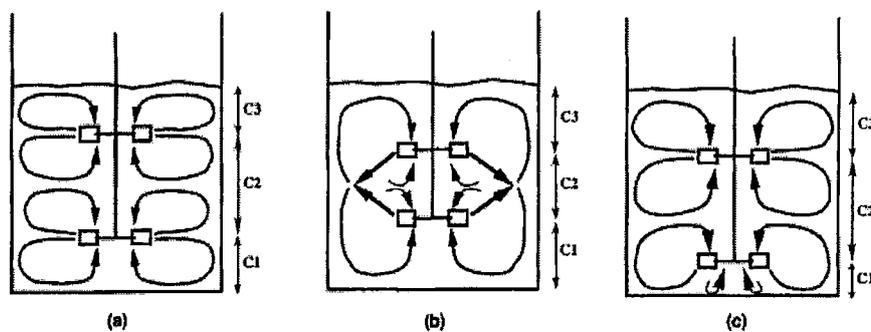


Figura 2. Patrones de flujo en sistemas de agitación doble a) Flujo paralelo b) Flujo de fusión c) Flujo divergente (Rutherford et al., 1996)

En un flujo paralelo C1 debe ser mayor a $0.2D$, C2 mayor a $0.385D$ y C3 menor a $0.415D$ de manera que los agitadores generen un patrón de flujo independiente. En el flujo de fusión C1, C2 y C3 presentan un valor de $0.33D$ sujeto a que C1 puede estar por encima de $0.17D$ y C2 por debajo de $0.385D$ entonces las corrientes generadas por ambos agitadores se cruzan entre sí. Por otro lado, el flujo divergente se caracteriza por la posición del agitador inferior que produce corrientes que chocan con la base de tanque, en esta

configuración C1, C2 y C3 exhiben valores de 0.15D, 0.5D y 0.35D respectivamente sujeto a que C2 puede ser mayor a 0.385D y C1 menor a 0.15D (Rutherford et al., 1996).

La combinación entre la velocidad de agitación y el flujo de aire suministrado al medio es importante para asegurar una adecuada transferencia de oxígeno. Si el flujo de aire es excesivo los agitadores no serán capaces de dispersar el oxígeno en el medio ocasionando que las burbujas de aire se acumulen entre las aspas generando el fenómeno conocido como inundación (García-García et al., 2009; Stanbury et al., 2017).

1.4.4. Criterios de escalado frecuentes en procesos fermentativos aerobios

Los criterios de escalado comunes para fermentaciones aerobias incluyen el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (KLa), la potencia por unidad de volumen (P/V), la tasa de transferencia de oxígeno (OTR), y la concentración de oxígeno disuelto en el medio (OD) (Junker, 2004; González et al., 2009).

El KLa indica el grado de eficiencia en la transferencia de oxígeno desde la burbuja de aire hacia el medio de cultivo, mientras mayor sea el valor, la eficiencia del proceso de transferencia es mejor (González et al., 2009). Para el cálculo de KLa se han propuesto varias correlaciones empíricas y teóricas a partir de las condiciones de operación de los procesos fermentativos como velocidad de agitación, potencia, volumen de operación y características reológicas del sustrato. Por otro lado, se han desarrollado metodologías experimentales para su determinación que incluyen el método de oxidación de sulfito de sodio con el cual se determina la concentración de la sal que se ha consumido como producto de la reacción con el oxígeno disuelto en el medio (García & Gómez, 2009).

La tasa de transferencia de oxígeno (OTR) muestra la velocidad con la cual se transfiere oxígeno y depende del gradiente de concentración relativo a la solubilidad de la fase gaseosa en el medio líquido. Para determinar OTR es necesario conocer el KLa por lo que este parámetro está influenciado por las propiedades reológicas del medio de cultivo y la temperatura de operación del proceso fermentativo (García-García et al., 2009).

La potencia por unidad de volumen (P_g/V) se relaciona con la intensidad de la agitación traducida a consumo energético durante un proceso fermentativo. Este parámetro depende de las dimensiones de los tanques agitados, la configuración del sistema de agitación, el volumen de trabajo y las características reológicas del medio de cultivo (Mcconville & Kessler, 2010). Para determinar esta relación se parte del cálculo de la potencia sin aireación (P_o) a través un método gráfico en función de la disposición y tipo de agitadores

en el biorreactor, el número de Reynolds y el número de potencia (NP); posteriormente se determina la potencia con agitación (P_g) en base a relaciones teóricas o empíricas cuyo valor obtenido será menor a P_o debido a que hay una menor resistencia del fluido a desplazarse a una misma velocidad dada la incorporación de aire al sistema (García-Ochoa & Gómez, 2009).

2. METODOLOGÍA

Para el desarrollo del presente trabajo se utiliza una metodología deductiva con un enfoque cuantitativo que parte del estudio de casos enfocados en el escalado de procesos fermentativos para la obtención de vinagre. La recolección de la información se realizó mediante revisión bibliográfica para su posterior tratamiento y obtención de datos específicos.

2.1. Definición del proceso fermentativo en la escala prototipo

Definir el proceso de obtención de vinagre de naranja implica establecer las condiciones de operación, la configuración del biorreactor STR y el detalle de los rendimientos y productividad alcanzados. Para ello, se realizó una revisión bibliográfica de artículos científicos y trabajos de titulación en los cuales se estudie la obtención de vinagre de frutas que cumplan con los siguientes requisitos:

- La producción de vinagre se debe llevar a cabo mediante el proceso de fermentación sumergida.
- Emplear microorganismos del género *Acetobacter*.
- El sustrato corresponde a subproductos agroindustriales o productos con potencial de otorgar un valor agregado.
- El proceso de fermentación se realice en modalidad batch en un biorreactor tipo tanque agitado del cual se conozca al menos el volumen nominal, volumen de operación y la marca comercial.
- Presentar las condiciones de operación (temperatura, velocidad de agitación, tasa de aireación).
- Pertener a una línea de investigación con trabajos predecesores y/o posteriores relacionados con el proceso fermentativo en biorreactores similares.

En caso de que la información este incompleta en la bibliografía base fue necesario buscar bibliografía suplementaria en la cual se estudie procesos de fermentación empleando bacterias acéticas en procesos batch o semicontinuos con sustratos similares. Además,

deben incluir resultados respecto a rendimientos estequiométricos o reales y ecuaciones relacionadas con las condiciones de operación que permitan predecir el comportamiento del proceso fermentativo.

2.2. Dimensionamiento de los biorreactores en la escala modelo

En principio, se verificó que exista similitud geométrica en el biorreactor de la escala prototipo. Para ello, se establecieron las relaciones geométricas estándar mediante la revisión bibliográfica de estudios orientados al dimensionamiento de tanques agitados los cuales debían tener en su configuración un sistema de agitación con el mismo tipo y número de agitadores establecidos en la escala prototipo, contar con deflectores y un sistema de aireación.

Luego, se definió el volumen nominal de las escalas modelo laboratorio y piloto manteniendo un factor de escala constante con un valor que justifique la implementación de un proceso de escalado y asegurando que se encuentren en los rangos de trabajo que limitan las diferentes escalas.

Finalmente, se dimensionaron los biorreactores STR modelo que guardan similitud geométrica con el de la escala prototipo.

2.3. Identificación y estimación de los criterios de escalado para el proceso fermentativo

Los criterios de escalado se definieron a través de una investigación bibliográfica de artículos científicos y trabajos de titulación donde se estudien procesos fermentativos para la obtención de vinagre de fruta en fermentación sumergida. El biorreactor utilizado en los estudios debía ser del tipo STR con características similares al establecido en la escala prototipo. A su vez los artículos seleccionados debían emplear bacterias acéticas del género *Acetobacter* de tal forma que el análisis realizado sea aplicable al proceso de obtención de vinagre de naranja.

Los resultados reportados y validados en los artículos revisados debían presentar mediciones y parámetros relacionados con criterios de escalado en procesos fermentativos

o evaluación de la influencia de condiciones de operación como velocidad de agitación, transferencia de oxígeno, oxígeno disuelto, y flujo de aire suministrado al medio de cultivo.

Para estimar los criterios de escalado seleccionados se realizó una búsqueda bibliográfica de relaciones empíricas aplicadas y validadas en el contexto de procesos de obtención de vinagre empleando bacterias acéticas en fermentación sumergida con sustratos similares al establecido en la escala prototipo. También se contemplaron correlaciones teóricas siempre que los estudios detallen todas las ecuaciones y se hayan desarrollado en función de conceptos fenomenológicos de la transferencia de oxígeno y características reológicas del medio de cultivo.

Las correlaciones identificadas se validaron mediante la comparación de los resultados obtenidos tras su aplicación en la escala prototipo con valores bibliográficos encontrados en procesos de fermentación acética.

2.4. Cálculo de las condiciones de operación en las escalas modelo laboratorio y prototipo

Se desarrolló un protocolo de escalado que constituye un proceso sistemático que a partir del valor del criterio de escalado en la escala prototipo permite calcular las condiciones de operación referidas a flujo de aire y velocidad de agitación en las escalas modelo.

El rango de las condiciones de operación obtenidas se validó en función de una tasa de aireación máxima permitida de 0.3 VVM sobre el cual se observa inhibición en el crecimiento bacteriano según los estudios realizados por Garrido et al (2003).

3. RESULTADOS, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

3.1. Producción de vinagre de naranja agria en escala prototipo

Se revisaron 7 artículos científicos y 1 trabajo de titulación publicados entre los años 1960 y 2017 donde, en forma general, se investiga la influencia de las condiciones de operación como temperatura, tasa de aireación y velocidad de agitación en la producción batch de vinagre de naranja en tanques agitados. Entre las marcas de los biorreactores más empleados destacan el Acetator Frings y la serie Bioflo de la marca New Brunswick.

El documento base es el estudio realizado por Ferreyra et al. (2012) que define las condiciones de operación óptimas, que se presentan en la Tabla 1, en cuanto a velocidad de agitación, temperatura y flujo de aire para la obtención de vinagre de naranja (*Citrus sinensis*) batch en un biorreactor STR escala laboratorio.

Tabla 1. Condiciones de operación en la escala prototipo

Parámetro	Descripción
Temperatura de operación	25 °C
Velocidad de agitación	400 rpm
Tasa de aireación	0.3 VVM
Volumen nominal	2 L
Sustrato	Vino de naranja diluido en un 6% v/v
Inóculo	Mixto aislado de jugo fermentado de naranja (<i>Citrus sinensis</i>)

En el estudio base se alcanza una concentración final de 60 g/L de ácido acético después de 32 horas de haber iniciado el proceso de fermentación acética con una productividad de 1.77 g/L h.

El inóculo mixto al que se refiere el estudio base resulta del aislamiento de bacterias acéticas presentes en jugo de naranja fermentado empleando medios de cultivo enriquecidos propuestos por Gerard (2015) quien caracterizó las bacterias acéticas aisladas a partir de frutas cítricas. Para el caso del jugo fermentado de naranja de diferentes variedades se identificó únicamente la presencia de bacterias pertenecientes al género *Acetobacter*. Por otro lado, la población de bacterias en el inóculo no está específica en el

estudio base por lo que se establece en 3×10^8 Ufc/ml, de acuerdo con Ferreyra et al (2014). En este estudio complementario se desarrolla el proceso de acetificación para la obtención de vinagre de naranja en un proceso semicontinuo a partir de un cultivo iniciador mixto obtenido mediante el aislamiento de *Acetobacter sp.* a partir de naranjas de diversas variedades de Argentina en un medio enriquecido hasta lograr una concentración entre 3×10^8 y 5×10^8 Ufc/ml.

En el estudio base, el vinagre se obtiene a partir de vino de naranja de la especie *Citrus sinensis*, mientras que el presente trabajo plantea el uso de naranja agria ecuatoriana, especie *Citrus aurantium*. En este sentido, es necesario validar el uso de una especie diferente bajo las mismas características establecidas en la escala prototipo. En la Tabla 2 se muestra una comparación de los parámetros fisicoquímicos recopilados por Almache y Escudero (2021) entre las especies mencionadas.

Tabla 2. Comparación de los parámetros fisicoquímicos de las especies *Citrus sinensis* y *Citrus aurantium*.

Parámetro	Unidad	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Citrus aurantium</i>	Desviación (%)
pH	-	3.89	3.67	5.65
Sólidos solubles	°Brix	9.4	8.3	11.7
Acidez titulable	%	1.46	1.55	6.16
Índice de madurez	-	6.43	5.35	16.79

La diferencia de los parámetros fisicoquímicos entre las dos especies de naranja se encuentra en un rango aceptable de 5 % a 17 %, por lo cual se espera que la sustitución entre especies de naranja no genere cambios significativos en el desarrollo de la fermentación acética.

3.2. Biorreactores escala modelo laboratorio y piloto

Se identifica 5 artículos que plantean relaciones geométricas estándar de tanques agitados que cumplen las características principales del biorreactor prototipo, es decir, presentan un sistema de doble agitación, aireación y deflectores. De las relaciones recopiladas, que se detallan en el ANEXO I, se extraen aquellas establecidas en los estudios de Vasconcelos et al. (1999) y González-Sáiz et al., (2009) porque permiten el dimensionamiento de la

mayoría de los elementos de un biorreactor STR y en el caso del segundo artículo se evalúa un biorreactor de la misma marca y serie comercial que el prototipo para la producción de vinagre.

El biorreactor prototipo STR es marca New Brunswick Cientific Co. modelo Bioflo 2000, pero el estudio base no presenta las dimensiones y el catálogo del equipo está descontinuado. Por ello, se dimensionó el biorreactor prototipo en base a las relaciones geométricas de los modelos de la misma serie comercial Bioflo 4500, 115 y 415, que se muestran en el ANEXO II, y en base a las relaciones estándar tomadas de las referencias bibliográficas. En la Tabla 3 se muestran las relaciones geométricas establecidas tras la verificación de similitud geométrica.

Tabla 3. Relaciones geométricas establecidas para el dimensionamiento de las escalas prototipo, laboratorio y piloto.

Criterio	Desviación Porcentual			Relación estándar	Referencia
	Bioflo 4500	Bioflo 115	Bioflo 415		
H/D	1.4	1.2	42.1	2	Vasconcelos et al., 2000
HL/D	-	5.5	68.4	1.37	González-Sáiz et al., 2009
Ha/Da	50	46	215	1.5	N/A
J/Da	-	10	1.6	0.28	Vasconcelos et al., 2000
H1/D	7.7	26.6	42.7	1	N/A
H2/Di	20.8	2	21.1	0.5	Vasconcelos et al., 2000
Da/D	18.7	25.3	18.4	0.33	Vasconcelos et al., 2000
Hs/D	-	181	161	0.26	N/A
Ds/D	-	3.8	19.9	0.32	González-Sáiz et al., 2009
HB/D	-	5.6	124.5	0.22	González-Sáiz et al., 2009
LB/Da	-	20.9	76	3.38	González-Sáiz et al., 2009
W/Da	-	63	18	0.21	González-Sáiz et al., 2009
L/Da	-	15.53	53.71	0.26	González-Sáiz et al., 2009

La desviación de las relaciones geométricas de cada biorreactor de la serie Bioflo respecto a las relaciones determinadas bibliográficamente permite definir las relaciones estándar. Así, se considera aceptable si al menos una de las desviaciones es menor al 43 % para las

cuales se establece directamente el valor bibliográfico; mientras que para desviaciones mayores al 70 % se toma el valor de la relación establecida en el biorreactor que presente el menor porcentaje de desviación en comparación con los demás equipos. Particularmente, en el caso de la distancia entre agitadores se considera el valor establecido en el biorreactor Bioflo 4500, que a pesar de presentar una desviación del 50 %, corresponde al valor recomendado en el manual del biorreactor. En cuanto al diseño del sistema de agitación, los parámetros C1, C2 y C3 mencionados anteriormente e indicados en la Figura 2 son de 0.44D, 0.5D y 0.5D respectivamente; por lo tanto, el patrón de flujo se aproxima a un flujo estable paralelo.

El volumen nominal para las escalas modelo laboratorio y piloto se establecen en 15 y 110 L respectivamente a partir de un factor de escala constante igual a 7, valor que justifica la ejecución de un proceso de escalado y que además asegura que se opera en los rangos definidos como laboratorio y piloto. En la Tabla 4 se muestra el dimensionamiento y en la Figura 4 la representación gráfica de los biorreactores en las escalas prototipo y modelos.

Tabla 4. Dimensionamiento de los biorreactores en las diferentes escalas.

Parámetro	Prototipo	Modelo Laboratorio	Modelo Piloto
Volumen de operación (L)	1.3	10	75
Diámetro del tanque (mm)	108	212	412
Altura del tanque (mm)	217	424	824
Altura del líquido (mm)	148	291	565
Posición de los deflectores desde el fondo del tanque (mm)	24	47	91
Longitud de los deflectores (mm)	122	239	464
Ancho de los deflectores (mm)	10	19	37
Diámetro del difusor (mm)	34	67	131
Posición del difusor (mm)	28	55	107
Distancia entre agitadores (mm)	54	106	206
Posición del agitador superior (mm)	108	212	412
Posición del agitador inferior (mm)	54	106	206
Longitud de las aspas (mm)	9	18	35
Ancho de las aspas (mm)	8	15	29

En el desarrollo del proceso de acetificación valores de KLa de 100 y 150 h^{-1} son los más frecuentes reportados a escalas industriales, que resultan elevados debido a que la concentración de oxígeno disuelto en el medio disminuye significativamente conforme el proceso se desarrolla en su fase exponencial y por consiguiente la velocidad de transferencia de oxígeno debe aumentar (Macías et al. 1996). La combinación de la velocidad de agitación y el flujo de aire complementado con las características geométricas del biorreactor permiten alcanzar valores de KLa requeridos. Fregapane et al. (1999) demuestran que el flujo de aire es directamente proporcional al KLa ; sin embargo, Garrido et al (2003) comprueban que una tasa de aireación por encima de 0.33 VVM genera un aumento de presión en el sistema con efectos negativos en la tasa de crecimiento bacteriano.

En síntesis, el oxígeno disuelto es un parámetro importante de controlar, por lo cual se evaluará las condiciones de operación manteniendo este valor constante para el desarrollo del protocolo del escalado. Por otro lado, se identifica la importancia de mantener un equilibrio entre el flujo de aire y la agitación para asegurar una transferencia de oxígeno adecuada para lo cual se plantea el desarrollo de un protocolo para evaluar las condiciones de operación manteniendo el KLa constante.

3.3.1. Estimación de KLa

García-Ochoa y Gómez (2004) plantean un enfoque teórico para la determinación de KLa mediante un modelo matemático basado en la teoría de penetración de Higbie que considera las propiedades reológicas y fisicoquímicas del fluido, la geometría de los biorreactores tipo tanque agitados mediante la estimación independiente del coeficiente de transferencia KL y el área interfacial (a) determinada mediante la retención de gas y el tamaño medio de burbuja con las Ecuaciones 2 y 3 respectivamente.

$$KL = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sqrt{D_L} \left(\frac{\varepsilon \rho}{\mu} \right)^{\frac{1}{4}}$$

Ecuación 2. Coeficiente de transferencia KL

En donde D_L es la difusividad del oxígeno en el agua en $m^2 s^{-1}$, ε es la energía de disipación en $w Kg^{-1}$, ρ la densidad del oxígeno en $Kg m^{-3}$ y μ la viscosidad del oxígeno en $Pa s$.

$$a = 6\phi/d_b$$

Ecuación 3. Área interfacial

Donde ϕ es el coeficiente adimensional de retención de gas el cual se obtiene mediante la ecuación 6, d_b corresponde al diámetro de la burbuja en metros.

La Ecuación 4 permite la determinación de la energía de disipación, mientras que la potencia con aireación se calcula con la Ecuación 5.

$$\varepsilon = \frac{P}{\rho \left(\frac{\pi}{4}\right) T^2 H_L}$$

Ecuación 4. Energía de disipación

En donde P es la potencia de agitación con aireación en W , T es el diámetro del agitador y H_L la altura del líquido en metros

$$P = \alpha \left(\frac{P_0^2 N T^3}{Q^{0.56}} \right)^\beta$$

Ecuación 5. Potencia de agitación

En donde α y β son coeficientes que dependen de la configuración del sistema de agitación ya sea simple o doble para agitadores tipo Rushton, P_0 potencia sin aireación la cual se determina mediante el número de Reynolds y el número de potencia (N_p), Q es el flujo de aire en m^3/s .

El coeficiente de retención de gas se determina mediante la Ecuación 6 y el diámetro de la burbuja con la Ecuación 7.

$$\frac{\phi}{1-\phi} = 0.819 \frac{V_s^{\frac{2}{3}} N^{\frac{2}{5}} T^{\frac{4}{15}}}{g^{\frac{1}{3}}} \left(\frac{\rho_L}{\sigma} \right)^{\frac{1}{5}} \left(\frac{\rho_L}{\rho_L - \rho_G} \right) \left(\frac{\rho_L}{\rho_G} \right)^{-\frac{1}{15}}$$

Ecuación 6. Coeficiente de retención de gas

En donde V_s es la velocidad superficial del aire en $m s^{-1}$, σ la tensión superficial del medio en Nm^{-1} , g la gravedad en $m s^{-2}$, ρ_L y ρ_G la densidad de la fase líquida y gaseosa respectivamente en Kgm^{-3} .

$$d_b = 0.7 \frac{\sigma^{0.6}}{\left(\frac{P}{V}\right)^{0.4} \rho_L^{0.2}} \left(\frac{\mu_L}{\mu_G}\right)^{0.1}$$

Ecuación 7. Diámetro de la burbuja

En donde μ_L y μ_G corresponden a la viscosidad del medio líquido y oxígeno respectivamente en Pa s.

La validez del valor de KLa obtenido con el enfoque teórico se establece mediante comparación con la relación empírica a continuación propuesta por González-Sáiz et al., (2008).

$$KLa = C_o (\theta_p)^P (\theta_T)^T \left(\frac{P_g}{V_L}\right)^{ak} (\mu_s)^{bk}$$

Ecuación 8. Relación empírica para la determinación de KLa

Donde $C_o, \theta_p, \theta_T, ak, bk$ son coeficientes adimensionales iguales a 0.363, 1.439, 1.0386×10^4 , 1.319, y 1.107 respectivamente, P es la presión de operación en atm, T es la temperatura de operación, V_L corresponde al volumen de operación y μ_s representa la velocidad superficial de aireación.

Esta expresión determina el KLa a partir del análisis de las condiciones de operación, velocidad de agitación, flujo de aire y temperatura, en procesos batch de producción de vinagre a partir de vino blanco. Además, González-Sáiz et al., (2008) reportan una relación lineal con valores de KLa experimentales descrita en la Ecuación 9 con un coeficiente de correlación de 0.9616.

$$KLa(\text{empírico}) = 1.11 KLa(\text{experimental}) + 8$$

Ecuación 9. Relación para determinar el KLa experimental

Con el enfoque propuesto por García-Ochoa y Gómez (2004) aplicado a las condiciones de operación y detalles geométricos de la escala prototipo se obtiene un valor de KLa de 24 h^{-1} , mientras que la relación empírica produce un valor de 31.5 h^{-1} , lo que implica una desviación de 31.25 %. El cálculo del KLa en la escala prototipo se detalla en el ANEXO III.

Estudios realizados por Sang-Moo & Keun-Tai, (1992) determinaron valores de KLa entre 10 y 29.4 h^{-1} para fermentaciones acéticas ejecutadas con velocidades de agitación entre 300 y 700 rpm. Por otra parte, Fregaran et al. (1999) muestran que es posible obtener valores de KLa por encima de 60 h^{-1} en procesos semicontinuos empleando un reactor con columna de burbujeo que permite obtener un diámetro de burbuja lo suficientemente pequeño para mejorar la transferencia de oxígeno. En este sentido, para obtener un valor de KLa específico para el proceso definido en la escala prototipo en función de las

características del sustrato y el producto obtenido se opta por emplear la Ecuación 7 para la estimación en las diferentes escalas.

3.3.2. Estimación de oxígeno disuelto

La Ecuación 10 propuesta por Jiménez-Hornero et al., (2009) pertenece a un modelo matemático, que describe el comportamiento de las variables operativas durante el proceso de fermentación acética, que relaciona directamente el KLa con la concentración de oxígeno disuelto

$$OD = O^0 - \left(\frac{1}{KLa} + \frac{RTH}{VVM} \right) r_o$$

Ecuación 10. Determinación de oxígeno disuelto a partir del KLa

En donde R es la constante de gases ideales con el valor de $0.082 \frac{atmL}{Kmol}$, T es la temperatura de operación en grados Kelvin, VVM es la tasa de aireación en h^{-1} , H es la constante de Henry en $\frac{mol}{atmL}$, OD es la concentración de oxígeno en el medio en $\frac{g}{L}$, O^0 es la concentración de oxígeno disuelto en equilibrio en el aire con un valor de $7.6 \frac{mg}{L}$ y r_o es la tasa de consumo de oxígeno en $\frac{g}{Lh}$.

La tasa de consumo de oxígeno se calcula con la Ecuación 11 que combina los rendimientos durante la oxidación del etanol y el crecimiento microbiano.

$$r_o = \frac{a_{x/E} \mu X_v}{Y_{E/O}}$$

Ecuación 11. Tasa de consumo de oxígeno

Donde $a_{x/E}$ es el coeficiente determinado experimentalmente con un valor de 116.96 g etanol/ g biomasa, μ la velocidad de crecimiento microbiano en h^{-1} , X_v es la concentración de biomasa en el medio en $\frac{g}{L}$ y $Y_{E/O}$ es el coeficiente estequiométrico del etanol relativo a oxígeno con un valor de 1.44 g etanol/ g oxígeno.

La velocidad de crecimiento microbiano, que el modelo requiere, no se especifica en el documento base. Por ello, se estima en forma empírica a través de la Ecuación 12 que pertenece al modelo matemático desarrollado por González-Sáiz et al. (2009) aplicado al proceso de obtención de vinagre a partir de vino blanco. Esta expresión considera la influencia de parámetros como presión de operación, velocidad de agitación, flujo de aire y temperatura.

$$\mu = 0,06874 - 0,00526 X_1 + 0,043798 X_2 + 0,03401 X_3 + 0,031077 X_4 - 0,000232 X_5 - 0,000595 X_1^2 - 0,025606 X_2^2 - 0,040034 X_3^3 - 0,038633 X_4^2 - 0,009619 X_5^2 - 0,0077 X_1 X_2 - 0,002372 X_1 X_3 + 0,044161 X_2 X_3 - 0,013122 X_1 X_4 + 0,031656 X_2 X_4 + 0,009065 X_3 X_4 + 0,011637 X_1 X_5 - 0,022271 X_2 X_5 - 0,017904 X_3 X_5 + 0,011003 X_4 X_5$$

Ecuación 12. Velocidad de crecimiento bacteriano.

Donde X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 son variables adimensionales que se determinan con las ecuaciones que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Ecuaciones para la determinación de variables para determinar la velocidad de crecimiento bacteriano.

Variable	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
Ecuación	$\frac{P - 1,5}{0,5}$	$\frac{E - 20,681}{27,39}$	$\frac{VVM - 19,917}{20,084}$	$\frac{N - 600}{507,5}$	$\frac{T - 29,5}{4,52}$

Donde P es la presión en atm, E es la concentración final de etanol en g/L, N la velocidad de agitación en rpm, T a temperatura de operación en °C.

La concentración final de etanol tampoco se reporta en el estudio base ni en los documentos complementarios, por lo que se considera el rendimiento obtenido de ácido acético respecto a etanol consumido ($Y'_{A/E}$) de $1.29 \frac{\text{g ácido acético}}{\text{g etanol}}$ reportado por González-Sáiz et al (2009). Además, se estima la población bacteriana al final de la fermentación acética para un tiempo de duración igual a 32 horas reportado en el estudio base. Para mantener consistencia dimensional, la concentración microbiana debe reportarse en mg/L en base seca, pero el inóculo está dado en Ufc/ml por lo que se considera un factor de conversión de 2.25×10^6 . Esta conversión se reportó por Romero et al. (1994) durante el desarrollo de un modelo cinético de crecimiento para *Acetobacter acetii* para la fermentación acética sumergida.

La implementación del modelo en la escala prototipo, cuyo detalle se presenta en el ANEXO IV, se resume en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros para la determinación del oxígeno disuelto en la escala prototipo

Parámetro	Valor
Concentración inicial de etanol (g/L)	47.34
Concentración inicial de ácido acético (g/L)	6.6
Concentración final de etanol (g/L)	5.94
Concentración final de ácido acético (g/L)	60
Concentración de biomasa (mg/L)	172.6
Velocidad de crecimiento bacteriano (h^{-1})	1.12×10^{-2}

Los estudios realizados por Sang-Moo y Keun-Tai (1992) indican valores de velocidad de crecimiento microbiano en un rango de 2×10^{-2} a $3,97 \times 10^{-2} h^{-1}$ con velocidades de agitación entre 500-700 rpm, tomando en cuenta que en la escala prototipo se trabaja a 400 rpm, y el valor del rendimiento de la biomasa generada respecto al consumo de etanol es un valor asumido, la velocidad de crecimiento microbiano es adecuada.

Por otro lado, se obtiene un valor de 2.33 ppm como la concentración de oxígeno disuelto en el medio. Estudios realizados por Soo et al. (1989) muestran que las condiciones óptimas para la oxidación de ácido acético se encuentran en un rango de 3-7 ppm, por lo cual el valor obtenido para el presente caso de estudio es aceptable con una desviación del 22 % respecto al valor establecido bibliográficamente.

3.4. Condiciones de operación en las escalas modelo laboratorio y piloto

Las condiciones de operación se desprenden de un protocolo de escalado que es un procedimiento sistemático que parte de un criterio de escalado fijo e igual al valor obtenido en la escala prototipo. En la Figura 5 se muestra el protocolo de escalado para el KLa como criterio de escalado identificado con mayor influencia para la obtención de vinagre.

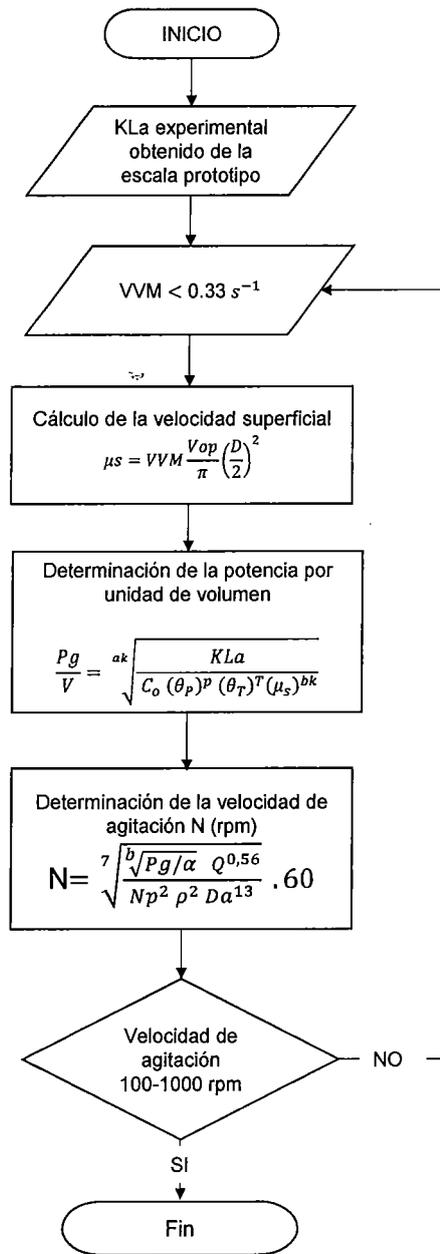


Figura 5. Protocolo de escalado con KLa constante

El protocolo parte de un valor de KLa igual a 31.5 h⁻¹ calculado en la escala prototipo y una tasa de aireación definida en 0.1 VVM de acuerdo con los límites establecidos por Garrido et al. (2003) durante la fermentación acética que evitan efectos negativos en el crecimiento bacteriano.

Luego se estima la velocidad superficial del aire conocido el volumen de operación en las escalas modelo y el área transversal del biorreactor STR. La potencia de agitación con aireación se define a partir de la expresión del KLa indicada en la ecuación 8, para posteriormente obtener la potencia sin aireación y relacionar con el número de potencia que permitirá despejar la velocidad de agitación.

El valor de la velocidad de agitación calculado debe estar en un rango entre 200 y 1000 rpm, establecido de acuerdo con los resultados obtenidos en los artículos base y complementarios. Así, Ferreyra et al (2012) opera a velocidades de agitación entre 200 y 400 rpm para un volumen de 2 litros, mientras que Garrido et al., (2003) trabajan en un rango de 200 a 1000 rpm al igual que los estudios desarrollados por González-Sáiz et al., (2009) durante el desarrollo del modelado matemático para el proceso de escalado del proceso de acetificación.

Luego de la aplicación del protocolo, en la escala laboratorio con un volumen de operación de 10 L la velocidad de agitación es de 506 rpm, mientras que para la escala piloto con un volumen de operación de 75 L es de 164 rpm.

En la Figura 6 se muestra el protocolo de escalado para la concentración de oxígeno disuelto como criterio de escalado identificado con alto grado de influencia para la obtención de vinagre.

El protocolo inicia con el valor de oxígeno disuelto igual a 2.33 ppm determinado en la escala prototipo y un valor fijo de tasa de aireación de 0.1 VVM. Se estima el valor de KLa con la ecuación 10, para luego determinar la potencia por unidad de volumen mediante la expresión del KLa indicada en la ecuación 8, para posteriormente obtener la potencia sin aireación y relacionar con el número de potencia que permitirá despejar la velocidad de agitación.

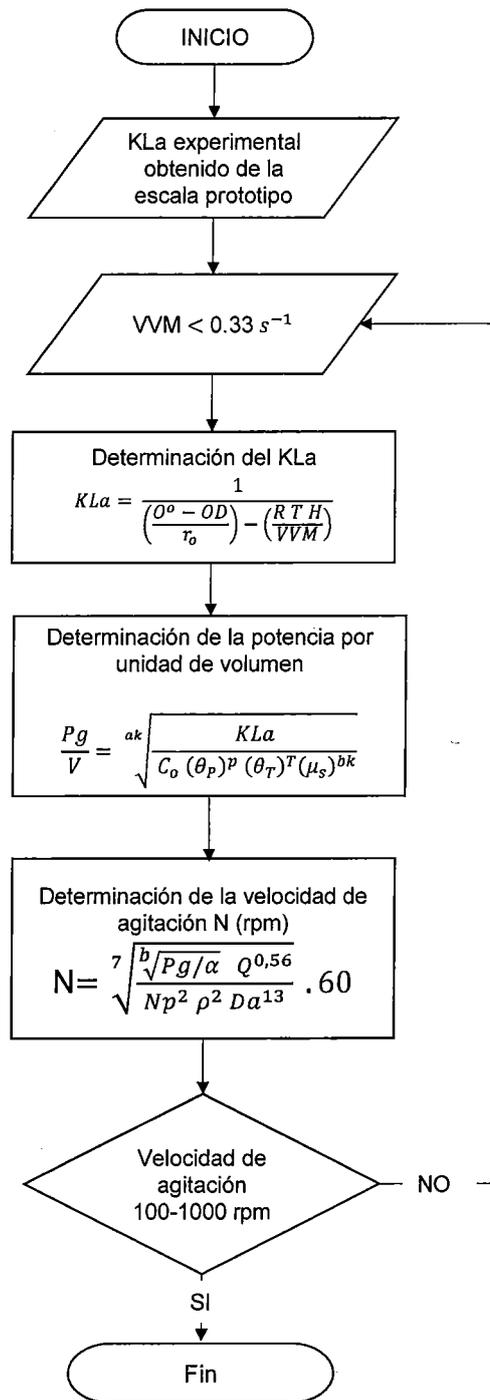


Figura 6. Protocolo de escalado manteniendo oxígeno disuelto constante

Luego de la aplicación del protocolo en la escala laboratorio con un volumen de operación de 10 L, la velocidad de agitación es de 563 rpm, mientras que para la escala piloto con un volumen de operación de 75 L es de 156 rpm.

Con el objetivo de analizar el efecto de cada criterio de escalado en el desarrollo del proceso fermentativo en escalas superiores se presenta la matriz de escalado en la Tabla 7, la misma que incluye parámetros adicionales de evaluación como velocidad de punta, número de bombeo y potencia por unidad de volumen.

Tabla 7. Matriz comparativa de las condiciones de operación de las escalas modelo laboratorio y piloto respecto a la escala prototipo

		$k_L a$	P/V	N*D	N_a	OD
15 L	$k_L a$	1	10.35	2.48	0.18	0.76
	OD	1.13	14.32	2.76	0.16	1
110 L	$k_L a$	1	0.74	1.33	0.65	0.76
	OD	1.13	1.03	1.48	0.59	1

En el caso de mantener el $K_L a$ constante se observa que en la escala laboratorio de 15 L incrementa la potencia por unidad de volumen requerida y la velocidad de punta en un factor de 10.3 y 2.5 respectivamente mientras que el número de bombeo, que indica la capacidad de suministro de flujo de aire al sistema, disminuye. Por otro lado, en la escala piloto de 110 L la potencia por unidad de volumen, número de bombeo y oxígeno disuelto disminuyen y la velocidad de punta aumenta en los factores respectivos. Estas tendencias indican que el incremento de la velocidad de punta en cada escala compensa la disminución del número de bombeo con la finalidad de asegurar el suministro de oxígeno al medio el cual en ambas escalas disminuye en un 76 % respecto al valor establecido en el prototipo.

Al mantener el oxígeno disuelto constante se evidencia que en la escala laboratorio y modelo incrementa la potencia por unidad de volumen de forma proporcional a la velocidad de agitación. De forma similar la velocidad de punta compensa la disminución del número de bombeo en función de su magnitud de disminución; por otro lado, para mantener la concentración de oxígeno disuelto en ambas escalas el coeficiente de transferencia de oxígeno aumento en un 13 % respecto al establecido en la escala prototipo.

3.5. Conclusiones

- La revisión bibliográfica realizada permitió establecer los parámetros de operación más relevantes en la escala prototipo para una velocidad de agitación de 400 rpm con una tasa de aireación de 0.3VVM y una temperatura de operación de 25°C, así como también la comparación realizada entre las variedades de naranja empleadas en los artículos revisados con respecto a la naranja agría cultiva en el Ecuador con una desviación entre el 5 y 17 %.
- El dimensionamiento de las escalas modelo con una distancia entre agitadores de 0.5 veces el diámetro del tanque describiendo un flujo paralelo fue posible mediante la recopilación bibliográfica de relaciones estándar para tanques agitados con sistema de doble agitación tipo Rushton y artículos suplementarios referentes a la serie de biorreactores Bioflo.
- Debido a la naturaleza aerobia de las bacterias acéticas y a la necesidad de oxígeno para la biotransformación de etanol, los criterios más relevantes para el escalado fueron el KLa y el oxígeno disuelto los cuales permiten asegurar un adecuado suministro de oxígeno al medio de cultivo con valores de 31.5 h⁻¹ y 2.33 ppm respectivamente calculados a partir de la escala prototipo
- Las condiciones de operación obtenidas en las escalas laboratorio y piloto con volúmenes nominales de 15 y 110 L respectivamente se encuentran entre los rangos esperados establecidos mediante revisión bibliográfica mediante los cuales se proyecta que el desarrollo del proceso es viable.

3.6. Recomendaciones

- En el presente trabajo valores de rendimientos fueron tomados de estudios realizados en base a la producción de vinagre a partir de vino blanco, por lo que se recomienda desarrollarlo el proceso de fermentación acética a partir de naranja con el objetivo de determinar rendimientos reales y de esta forma obtener resultados más cercanos a los obtenidos.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allgeier, R. J., & Hildebrandt, F. M. (1960). Newer Developments in Vinegar Manufacture. *Advances in Applied Microbiology*, 2(C), 163–182. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70125-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70125-4)

Almache, M. A., y Villacrés Escudero, A. E. (2021). *EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD EN DOS VARIETADES DE NARANJA, VALENCIA (Citrus x sinensis) Y NARANJA AGRIA (Citrus x aurantium) PARA LA ELABORACIÓN DE JUGO*. (Proyecto de titulación previo a la obtención de título de Ingenieros Agroindustriales). Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga, Ecuador.

Campelo, G. (2020). *Situación actual de los productores de naranja (Citrus sinensis) en el Ecuador*. (Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario). Universidad Técnica de Babahoyo, Babahoyo, Ecuador

Devi, T. T., & Kumar, B. (2017). Mass transfer and power characteristics of stirred tank with Rushton and curved blade impeller. *Engineering Science and Technology, an International Journal*, 20(2), 730–737. <https://doi.org/10.1016/J.JESTCH.2016.11.005>

El Productor. (10 de Julio de 2017). Ecuador: La sobreproducción de naranja provoca que el precio de la fruta en finca se desplome. *El Productor*. <https://elproductor.com/2017/07/ecuador-la-sobreproduccion-de-naranja-provoca-que-el-precio-de-la-fruta-en-finca-se-desplome/>

Ferreira, M., Schavab, M., Davies, C., Gerard, L., & Solda, C. (2014). Obtención de vinagre de naranja en proceso semicontinuo, a escala laboratorio. *Ciencia, Docencia y Trabajo*, 25 (49), 154-165. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1453263500>

Ferreira, M., Schvab, M., Davies, C., Gerard, L., & Hours, R. (2012). Influence of air flow, temperature, and agitation speed in the batch acetification process to obtain orange vinegar (*Citrus sinensis* var.W. Navel). *Scientia Agropecuaria*, 3(1), 61-65. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3892205>

Fregapane, G., Rubio-Fernández, H., Nieto, J., & Salvador, M. D. (1999). Wine Vinegar Production Using a Noncommercial 100-Litre Bubble Column Reactor Equipped with a Novel Type of Dynamic Sparger. *Biotechnology and Bioengineering* 63, 141-146. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)10970290\(19990420\)63:2<141::AID-BIT2>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)10970290(19990420)63:2<141::AID-BIT2>3.0.CO;2-6)

García-García, I., Santos-Dueñas, I. M., Jiménez-Ot, C., Jiménez-Hornero, J. E., & Bonilla-Venceslada, J. L. (2009). Vinegar engineering. *Vinegars of the World*, 97–120. https://doi.org/10.1007/978-88-470-0866-3_6/COVER

García-Ochoa, F., & Gomez, E. (2004). Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chemical Engineering Science*, 59(12), 2489–2501. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.02.009>

García-Ochoa, F., Santos, V. E., & Gomez, E. (2011). Stirred Tank Bioreactors. *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition, 2, 179–198. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00108-2>

García, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnology Advances*, 27(2), 153–176. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2008.10.006>

Garrido, D., Pizarro, C., & González-Sáiz, J. M. (2003). Study of Process Variables in Industrial Acetic Fermentation by a Continuous Pilot Fermentor and Response Surfaces. *Biotechnology Progress*, 19(5), 1468–1479. <https://doi.org/10.1021/bp034055r>

Gerard, L. (2015). Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinagres de frutas (Tesis doctoral no publicada). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

Gomes, R. J., Borges, M. de F., Rosa, M. de F., Castro-Gómez, R. J. H., & Spinosa, W. A. (2018). Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2), 139–151. <https://doi.org/10.17113/FTB.56.02.18.5593>

González, Roberto. (2000). *Principios básicos de escalado*. La Habana, Cuba: Editorial Universitaria.

González-Sáiz, J. M., Garrido-Vidal, D., & Pizarro, C. (2009). Scale up and design of processes in aerated-stirred fermenters for the industrial production of vinegar. *Journal of Food Engineering*, 93(1), 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.01.002>

González, J. M., Pizarro, C., & Garrido, D. (2008). Modelling gas-liquid and liquid-gas transfers in vinegar production by genetic algorithms. *Journal of Food Engineering*, 87(1), 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.11.020>

Hutchinson, U., Jolly, N., Chidi, B., Ngongang, M., & Ntwampe, S. (2019). Vinegar Engineering: a Bioprocess Perspective. *Food Engineering Reviews*, 11(4), 290–305. <https://doi.org/10.1007/s12393-019-09196-x>

- Jiménez-Hornero, J. E., Santos-Dueñas, I. M., & García-García, I. (2009). Optimization of biotechnological processes. The acetic acid fermentation. Part I: The proposed model. *Biochemical Engineering Journal*, 45(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.01.009>
- Junker, B. (2004). Scale-Up Methodologies for Escherichia coli and Yeast Fermentation Processes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(6), 347-364. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70218-2](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70218-2)
- Luzón, L., Castro, R., & Durán, E. (2021). Biotechnological Processes in Fruit Vinegar Production. *Foods*, 10(5), 1-23. <https://doi.org/10.3390/foods10050945>
- MAGAP (2017). *Boletín situacional naranja*. Obtenido de: http://sipa.agricultura.gob.ec/biblioteca/boletines_situacionales/2016/naranja/boletin_situacional_naranja_2016.pdf (agosto, 2022).
- Macías, M., Caro, I., & Cantero, D. (1996). Optimum operating conditions in closed-system industrial acetifiers (batch operation): a study by computer simulation. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, 62(3), 183–191. [https://doi.org/10.1016/0923-0467\(95\)03069-7](https://doi.org/10.1016/0923-0467(95)03069-7)
- Mahdinia, E., Cekmecelioglu, D. & Demirci, A. (2019). Bioreactor Scale-Up. 213–236. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16230-6_7
- McConville, F. X., & Kessler, S. B. (2010). Scale-Up of Mixing Processes: A Primer. *Chemical Engineering in the Pharmaceutical Industry: R&D to Manufacturing*, 249–267. <https://doi.org/10.1002/9780470882221.CH14>
- Micale, G., Brucato, A., Grisafi, F., & Ciofalo, M. (1999). Prediction of flow fields in a dual-impeller stirred vessel. *AIChE Journal*, 45(3), 445–464. <https://doi.org/10.1002/AIC.690450303>
- Muraoka, H., Watabe, Y., & Ogasawara, N. (1982). Effect of Oxygen Deficiency on Acid Production and Morphology of Bacterial Cells in Submerged Acetic Fermentation by *Acetobacter aceti*. *J. Ferment. Technology*, 60 (3), 171-180.
- Ndoye, B., Cleenwerck, I., Destain, J., Guiro, A. & Thonart, P. (2009). Preservation of vinegar acetic acid bacteria. *Vinegars of the World*, 61–71. https://doi.org/10.1007/978-88-470-0866-3_4/COVER
- Romero, L. E., Gómez, J. M., Caro, I., & Cantero, D. (1994). A kinetic model for growth of *Acetobacter aceti* in submerged culture. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, 54(1), 15–24. [https://doi.org/10.1016/0923-0467\(93\)06046-S](https://doi.org/10.1016/0923-0467(93)06046-S)

- Rutherford, K., Lee, K., Mahmoudi, S. & Yianneskis, M. (1996). Hydrodynamic characteristics of dual Rushton impeller stirred vessels. *AIChE Journal*, 42(2), 332– 346. <https://doi.org/10.1002/AIC.690420204>
- Sang-Moo, K., & Keun-Tai, L. (1992). Kinetic Studies on Submerged Acetic Acid Fermentation of *Acetobacter aceti*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 25(4), 301-306. <https://koreascience.kr/article/JAKO199223607641210.page>.
- Sengun, I. Y., & Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22(5), 647–656. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2010.11.008>
- Solieri, L. & Giudici, P. (2009). Vinegars of the world. *Vinegars of the World*, 1–16. https://doi.org/10.1007/978-88-470-0866-3_1/COVER
- Soo, Y., Ohtake, H., Fukaya, M., Okumura, H., Kawamura, Y., & Toda, K. (1989). Effects of Dissolved Oxygen and Acetic Acid Concentrations on Acetic Acid Production in Continuous Culture of *Acetobacter aceti*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* .68 (2). [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(89\)90055-X](https://doi.org/10.1016/0922-338X(89)90055-X)
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017). Aeration and agitation. *Principles of Fermentation Technology*, 537–618. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099953-1.00009-0>
- Vasconcelos, J. M. T., Orvalho, S. C. P., Rodrigues, A. M. A. F., & Alves, S. S. (1999). Effect of Blade Shape on the Performance of Six-Bladed Disk Turbine Impellers. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 39(1), 203–213. <https://doi.org/10.1021/IE9904145>
- Yances, S. (2018). *Importancia de la producción de naranja en Caluma y el impacto que tiene en los festivales del cantón* (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Licenciada en Gastronomía). Universidad San Francisco de Quito. Quito, Ecuador.
- Wang, S. J., & Zhong, J. J. (2007). Bioreactor Engineering. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, 131–161. <https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50007-4>

5. ANEXOS

ANEXO I

RELACIONES GEOMÉTRICAS PARA BIORREACTORES STR CON SISTEMA DE DOBLE AGITACIÓN TIPO RUSHTON

Tabla A1. Relaciones geométricas bibliográficas

Parámetro	Vasconcelos et al., 1999	Micale et al., 1999	Devi & Kumar, 2017	González-Sáiz et al., 2009	Cooker., 2000
Diámetro del tanque	D	D	D	D	N/A
Altura del tanque	2D	2D	2D	H/D= 2.01	D
Altura del líquido	N/A	N/A	N/A	HL/D= 1.37	N/A
Distancia entre agitadores	D	D	D	0.83 D	Da
Posición del agitador superior desde el fondo	3/2 D	3/2D	3/2D	H2/D=1,02	N/A
Posición del agitador inferior desde el fondo	D/2	N/A	N/A	H1/D=0.18	N/A
Diámetro del agitador	D/3	D/3	D/3	D/Da=2.335	D/4
Ancho de las aspas	N/A	N/A	N/A	W/Da= 0.209	N/A
Posición del difusor	D/10	D/10	D/10	Hs/D=0.1053	N/A
Diámetro del difusor	0.15D	N/A	N/A	Ds/D=0.3274	N/A
Ancho de los deflectores	D/10	D/10	D/10	J/Da= 0.267	D/12
Posición de los deflectores desde el fondo	N/A	N/A	N/A	HB/D= 0.22	N/A
Longitud de los deflectores	N/A	N/A	N/A	LB/Da= 3.38	N/A

* D (diámetro del tanque), H(altura del tanque , HL(altura del líquido), H1(posición del agitador inferior), H2(posición del agitador superior), Da (diámetro del agitador), Hs (posición del difusor), J (ancho de los deflectores) , LB (Longitud de los deflectores), W (ancho de los agitadores)

ANEXO II

RELACIONES GEOMÉTRICAS BIORREACTORES NEW BRUNSWICK SERIE BIOFLO

Tabla AII. Relaciones geométricas birreactores Bioflo

Relación	Bioflo 4500	Bioflo 115	Bioflo 415
H/D	1.97	1.97	2.84
HL/D	N/A	1.44	2.3
Ha/Da	1.5	1.46	3.15
J/Da	N/A	0.2	0.27
H1/D	1.38	1	2.14
H2/D	0.39	0.48	0.39
Da/D	0.39	0.42	0.39
Hs/D	N/A	0.28	0.26
Ds/D	N/A	0.32	0.25
HB/D	N/A	0.23	0.49
LB/Da	N/A	2.67	5.9
L/Da	N/A	0.29	0.11
W/Da	N/A	0.34	0.17

* D (diámetro del tanque), H (altura del tanque, HL (altura del líquido), H1(posición del agitador inferior), H2(posición del agitador superior), Ha (distancia entre agitadores), Da (diámetro del agitador), Hs (posición del difusor), J (ancho de los deflectores) , LB (Longitud de los deflectores), W (ancho de los agitadores, L (longitud de las aspas), HB (posición del deflector desde el fondo)

ANEXO III

DETERMINACIÓN DEL KLa EN LA ESCALA PROTOTIPO

Determinación de la potencia por unidad de volumen

Cálculo número de Reynolds

$$Re = \frac{997.13 \frac{Kg}{m^3} (0.036 m)^2 6.66 \frac{1}{s}}{9 \times 10^{-4} Pa s}$$

$$Re = 9.64 \times 10^3$$

Determinación del número de potencia mediante la figura AIII

$$Np = 6$$

Determinación de la potencia sin agitación

$$Po = 6 * 997.13 \frac{Kg}{m^3} * \left(6.66 \frac{1}{s}\right)^3 * (0.036 m)^5$$

$$Po = 0.109 W$$

Determinación de la potencia con agitación empleando la ecuación 5

$$Pg = 1.224 \left(\frac{(0.109 W)^2 * 6.66 rps * (0.036 m)^3}{(1 \times 10^{-5} \frac{m^3}{s})^{0.56}} \right)^{0.432}$$

$$Pg = 8.97 \times 10^{-2} W$$

Determinación de KLa

Se aplica la ecuación 8 para determinar el KLa empírico

$$KLa(\text{empírico}) = \left(1.0386 \times 10^4 * 1.319^1 * 1.107^{25} * \frac{8.97 \times 10^{-2} W^{0.363}}{1.37 \times 10^{-3} m^3} * \left(1.08 \times 10^{-3} \frac{m}{s} \right)^{1.439} \right)$$

$$KLa \text{ empírico} = 42.95 h^{-1}$$

Se aplica la ecuación 9 para determinar el KLa experimental

$$KLa_{\text{experimental}} = \frac{42.95 - 8}{1.11}$$

$$KLa_{\text{experimental}} = 31.5 \text{ h}^{-1}$$

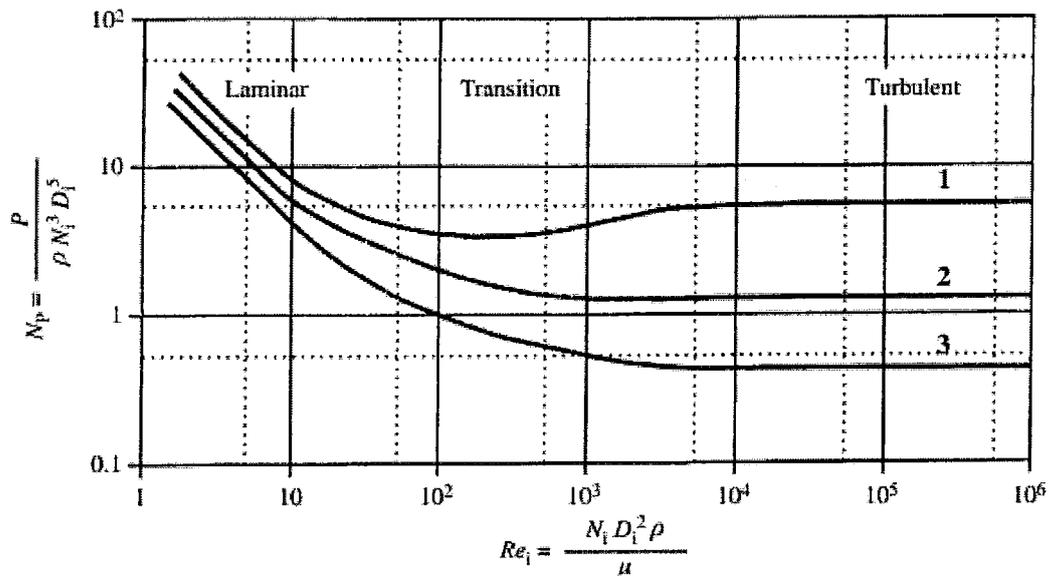


Figura AIII. Relación gráfica de número de potencia y número de Reynolds

ANEXO IV

DETERMINACIÓN DE OXÍGENO DISUELTUO EN LA ESCALA PROTOTIPO

Variables X_1

$$X_1 = \frac{1 - 1.5}{0.5}$$

$$X_1 = -1$$

Concentración final de etanol

$$E = \frac{(60 - 6.6) \frac{gAc. acético}{L} - (47.34 \frac{g Etanol}{L}) * 1.29 \frac{g Ac. acético}{g Etanol}}{1.29 \frac{g Ac. acético}{g Etanol}}$$

$$E = 5.94 \frac{g Etanol}{L}$$

Variable X_2

$$X_2 = \frac{5.94 - 20.681}{27.39}$$

$$X_2 = -0.538$$

Variable X_3

$$X_3 = \frac{18 - 19.917}{20.084}$$

$$X_3 = -0.095$$

Variable X_4

$$X_4 = \frac{400 - 600}{505.9}$$

$$X_4 = -0.395$$

Variable X_5

$$X_5 = \frac{25 - 29.5}{4.52}$$

$$X_5 = -0.99$$

Aplicación del modelo matemático

$$\begin{aligned} \mu = & 0,06874 - 0,00526(-1) + 0,043798(-0.538) + 0,03401(-0.095) \\ & + 0,031077(-0.395) - 0,000232(-0.99) - 0,000595(-1^2) \\ & - 0,025606(-0.538^2) - 0,040034(-0.095^2) - 0,038633(-0.395^2) \\ & - 0,009619(-0.99^2) - 0,0077(-1)(-0.538) \\ & - 0,002372(-1)(-0.095) + 0,044161(-0.538)X_3 \\ & - 0,013122(-1)(-0.395) + 0,031656(-0.538)(-0.395) \\ & + 0,009065(-0.095)(-0.395) + 0,011637(-1)(-0.99) \\ & - 0,022271(-0.538)(-0.99) - 0,017904(-0.095)(-0.99) \\ & + 0,011003(-0.395)(-0.99) \end{aligned}$$

$$\mu = 1.12 \times 10^{-2} h^{-1}$$

Concentración final de microorganismos

$$\ln(X_f) = \ln(3 \times 10^8) + (1.12 \times 10^{-2} * 23h)$$

$$X_f = 3.88 \times 10^8 \text{ Ufc/ml}$$

Concentración de biomasa

$$\text{Concentración final de biomasa} = \frac{3.88 \times 10^8 \text{ Ufc/ml}}{2.25 \times 10^6 \frac{\text{Ufcml}^{-1}}{\text{mgbiomasa L}^{-1}}}$$

$$\text{Concentración final de biomasa} = 172.6 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

Tasa de consumo de oxígeno

$$r_o = \frac{116.96 \frac{\text{g etanol}}{\text{g biomasa}} 1.12 \times 10^{-2} h^{-1} 1.7 \times 10^{-1} \frac{\text{g biomasa}}{\text{L}}}{1.44 \frac{\text{g etanol}}{\text{g oxígeno}}}$$

$$r_o = 1.57 \times 10^{-1} \frac{\text{g oxígeno}}{\text{Lh}}$$

Oxígeno disuelto en el medio

$$OD = 7.6 \times 10^{-3} \frac{\text{g oxígeno}}{\text{L}} - \left(\frac{1}{31.5 h^{-1}} + \frac{0.082 \frac{\text{atmL}}{\text{molK}} 298K 1.3 \times 10^{-3} \frac{\text{atm}}{\text{molL}}}{18 h^{-1}} \right) * 1.57 \times 10^{-1} \frac{\text{g oxígeno}}{\text{Lh}}$$

$$OD = 2.32 \times 10^{-3} \frac{\text{g oxígeno}}{\text{L}} * \frac{1000 \text{ mg oxígeno}}{1 \text{ g oxígeno}} * \frac{1 \text{ L medio}}{0.997 \text{ Kg medio}}$$

$$OD = 2.33 \text{ ppm}$$