

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS.

ESTUDIO SOBRE EL APROVECHAMIENTO
DEL LICOR SULFITICO RESIDUAL
DE LAS FABRICAS DE PAPEL.

1003

TESIS que para su examen profesional de
Químico presenta la pasante
Margot Sotomayor Valencia.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Págs.
INTRODUCCION	5
CAPITULO I.	
LICOR SULFITICO RESIDUAL.	
1.—Composición y características físicas y químicas	7
2.—Antecedentes Industriales	9
3.—Tratamiento preparatorio para la fermentación	11
CAPITULO II.	
AGENTE FERMENTATIVO: SACCHAROMYCES CERVICIAE.	
1.—Generalidades sobre levaduras	14
2.—Selección y cultivo de la cepa empleada en la fermentación	19
CAPITULO III.	
PARTE EXPERIMENTAL: El licor residual de la fábrica de papel San Rafael como fuente de etanol	22
CAPITULO IV.	
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFIA	32

INTRODUCCION.

INTRODUCCION

Las fábricas de papel que lo obtienen procesando la pulpa de madera por el método del bisulfito, arrojan uno de los residuos industriales más voluminosos y con más alta demanda biológica de oxígeno, circunstancias que han concurrido para que su tratamiento como agua negra constituya un grave problema de polución. Durante muchos años se ha estudiado la forma de dar un tratamiento adecuado a los licores sulfíticos (sobre todo en E. U.) y algunas se han llevado a la práctica con más o menos éxito, pero últimamente se ha venido discutiendo mucho su posible valor como materia prima en diversas industrias. Es sabido que contiene disueltas substancias cuya transformación puede reportar ganancias a pesar de hallarse presentes en baja proporción, es este el caso de los azúcares y de la lignina que se halla formando un complejo soluble. La utilización de la lignina no resuelve satisfactoriamente el problema de polución; no obstante en E. U. se ha llevado a la práctica para la fabricación de vainillina. En Europa, (principalmente Suecia y Alemania) se han registrado patentes que, perfeccionándose cada vez más, permiten aprovechar los carbohidratos presentes en el licor para la fabricación de levadura de panificación o para la obtención de etanol; algunas se han llevado a la práctica con muy buen éxito. Esta forma de utilización ha sido la más socorrida en Europa, y la que ha merecido más atención de parte de los investigadores en América, pues es la que verdaderamente resuelve el problema de polución (la fermentación disminuye la demanda biológica de O_2 en un 70%) a la vez que permite obtener ganancias de un material de costo nulo. Sin embargo, debido al bajo porcentaje que representan los azúcares en el licor, su valor desde este punto de vista, está condicionado por los factores que determinan dicha concentración: procedencia de la madera que se usa en la fabricación de la pulpa, concentración de los licores usados en su tratamiento, temperatura y tiempo de cocción.

Así vemos que no obstante la gran popularidad que ha adquirido en los últimos tiempos, el aprovechamiento de este licor residual como fuente de etanol o de levadura, hay plantas cuyos licores no reúnen las condiciones requeridas para estos fines, o los productos obtenidos no compiten favorablemente con los obtenidos de otras fuentes y prefieren concentrarlo y venderlo como adhesivo (útil en agri-

cultura) o como auxiliar en curtiduría de pieles (por su contenido en sustancias mordentes). Hay aún fábricas que producen en más baja escala y para las cuales la ganancia obtenida sería tan pequeña que no justificaría la adquisición del equipo necesario para fermentar y destilar el licor aun en el caso de que fuera apropiado para ello.

Sin embargo, el problema de polución de este residuo industrial (que no permite dar un tratamiento general de aguas negras) es tan grande, que es preferible someterlo a alguna transformación aún obteniendo pocas ganancias, que darle un tratamiento especial que al final de cuentas resulta muy costoso, a fin de poder arrojarlo a los ríos sin peligro de polución.

En México hay sólo una fábrica de papel que procesa la pulpa por el método del bisulfito de calcio, es la de San Rafael, y hasta la fecha no se ha hecho intento alguno encaminado a aprovechar los carbohidratos contenidos en sus aguas residuales. El objeto principal de este trabajo, es pues investigar las posibilidades químicas de estos licores sulfíticos como material fermentescible y fuente de etanol.

CAPITULO I

LICOR SULFITICO

- 1.—Composición y características físicas y químicas.**
- 2.—Antecedentes Industriales.**
- 3.—Tratamiento preparatorio para la fermentación.**

El licor sulfítico es una solución acuosa de color amarillo rojizo. Su densidad es de 1.045 a 1.060, su pH varía entre 2.5 y 3.0, su contenido en sólidos, de 10 a 12%.

Según Klason cuando la pulpa procede del *Picea abies* o excelsa, el rendimiento de pulpa al sulfito es como de 45%, y el licor residual contiene por cada tonelada de celulosa:

Lignina	644 K.
Carbohidratos	311 „
Proteínas	15 „
Resinas y Grasas	73 „
SO ₂ combinado con lignina	235 „
CaO combinado con ac. ligno-sulfónico	102 „

Los carbohidratos son en su mayor parte azúcares, incluyendo:

Pentosanos (arabinosa y xilosa)	26.9%
Manosa	15.6%
Galactosa	8.1%
Glucosa	49.4%

El licor sulfítico procede de las autoclaves donde tiene lugar el cocimiento y digestión de la pulpa, que tiene por objeto disolver la lignina y dejar intacta la celulosa. El agente que se emplea en el tipo de pulpa llamada al sulfito, es una solución de bisulfitos de calcio y magnesio saturada de SO₂, que puesta en contacto de la madera finamente dividida, en caliente y bajo presión, disuelve toda la lignina (y demás constituyentes de la madera que no son celulosa), formando un complejo con el SO₂ que es principalmente la sal de calcio del ácido lignosulfónico; disuelve también los azúcares contenidos en la madera, y los que hayan podido resultar de la hidrólisis parcial de la celulosa durante la última etapa del cocimiento (cuando la temperatura alcanza 130-140° C.). Estos azúcares, una vez en solución, no se hallan libres como antes se suponía, sino formando complejos de ácidos sulfónicos. Estos complejos son más o menos estables según el tipo de pulpa de que procedan, pero se ha descubierto que no todo el azúcar se halla asociado en esta forma; la mayor parte (no se sabe aún que proporción) se encuentra como compuestos bisulfíticos cuyo margen de estabilidad fluctúa entre los pH de 4.0 a 7.0, tanto los compuestos de azúcar y ácidos sulfónicos como los bisulfíticos no son fermentescibles y los últimos además retardan la fermentación alcohólica.

2.—Antecedentes Industriales del Residuo Sulfitico.

El intento más antiguo encaminado a utilizar los azúcares contenidos en el licor sulfitico, lo llevó a cabo Wilcox en 1912. En la primera guerra mundial, los alemanes también trataron de resolver el problema del aprovechamiento del mismo y lograron contribuciones técnicas muy importantes, pero no alcanzaron éxito desde el punto de vista comercial.

Después, en 1929 se industrializó en Europa un invento debido al sueco G. Heijkenskjold que consiste en utilizar los licores en la fabricación de levadura de panificación. En 1935 se aplicó en América por primera vez, (Liverpool, Nova Scotia) planta que aprovechó el licor residual de la Mersey Paper Co., como materia prima.

La fábrica de papel de Ontario, Canadá, tenía hasta 1943 (que fué cuando inició sus actividades la planta productora de alcohol) una de fabricación de levadura a partir del mismo material de desecho.

Sin embargo, no todas las fábricas de pulpa al sulfito encontraron costeable este aprovechamiento, sobre todo las que producían en más baja escala, pues esperaban que los gastos del equipo se amortizaran en los dos o tres años siguientes. Así vemos que todavía en Agosto de 1943, se hacían estudios encaminados a dar al licor el tratamiento apropiado que permitiera disminuir la demanda biológica de oxígeno con el fin de poder arrojarlo a los afluentes sin constituir un peligro de polución. En este proceso, el licor primitivo se diluye, y se le añade substancias nutritivas, después se bombea a un distribuidor discoidal que lo arroja en forma de lluvia sobre una roca en la cual los microorganismos se han desarrollado hasta formar una gruesa película. Las acciones biológicas oxidan los azúcares presentes en el licor y forman material celular como subproducto. Este material tiene valor como fertilizante y puede proporcionar un retorno de una parte pequeña de los gastos que implica la operación del filtro. Todos estos procesos están destinados en un 90% a deshacerse del material de desperdicio que constituye el licor sulfitico, pero no a una verdadera utilización en su valor intrínseco.

Esto sólo se ha logrado de una manera altamente costeable, en su aprovechamiento como fuente de etanol; y si las condiciones son menos favorables, en la obtención de levadura. Esto, en primer lugar, debido a la alta demanda industrial que existe actualmente por el etanol, y en segundo lugar porque, (como ya veremos más adelante), en la fermentación del licor se requieren muy pocas substancias nutritivas-adicionales que vienen a aumentar el costo de producción, substancias de las que no se puede prescindir en el cultivo de levaduras. Además, la energía calorífica necesaria para la destilación del licor ya fermentado, puede obtenerse del mismo licor (mediante un cambiador de calor) pues al salir de los tanques de cocimiento de la pulpa, posee ya una alta temperatura (180-190° F.) Sin embargo adelantos técnicos como éste,

son recursos que se ha aprendido a explotar muy recientemente, pues en sus comienzos la manufactura del etanol a partir del residuo sulfítico, fué un problema económico. Al principio se llegó (en el afán de incrementar lo más posible el contenido de azúcares del licor) a proponer una modificación en el proceso de manufactura de la pulpa. Durante la cocción de la misma, la mayor parte de los polisacáridos son eliminados de la madera, y aparecen en el licor principalmente como monosacáridos. La eliminación es más completa con un cocimiento más prolongado y a mayor temperatura; además, el grado de hidrólisis de los polisacáridos crece con la concentración de ión hidrógeno, y con la temperatura. Al mismo tiempo tiene lugar la descomposición de los azúcares durante la cocción, por oxidación a ácidos, el ión bisulfito toma parte en este mecanismo, y el grado de descomposición es mayor en licores de alto contenido en cal, o en la cocción de los cuales la temperatura haya sido demasiado alta. Así es que para obtener el mejor rendimiento de azúcares se sugería encontrar aquella temperatura a la cual pudiera conciliarse estas dos tendencias opuestas; Bergson (sueco) obtuvo el rendimiento óptimo a la temperatura de 133° C.

Incrementando el tiempo de cocimiento, el rendimiento de azúcares alcanza un máximo y después decrece. En esta primera etapa que puede considerarse como experimental, de la explotación industrial del licor sulfítico, se creía que el único medio posible de obtener un rendimiento final de alcohol que justificara los gastos de operación, consistía en modificar los procesos de cocción de la pulpa para que diera un licor de más alto contenido en azúcares. Pero resulta que las condiciones más favorables para la extracción de éstos, son a la vez las más favorables para el ataque de la celulosa, y la resistencia de la pulpa y su rendimiento, son consecuentemente disminuídos.

Posteriormente, Hagglund propuso una cocción en dos fases usando soluciones sulfíticas de bajo contenido en cal, para hacer mínima la descomposición del azúcar. Después, Bergson propuso un sistema de retorno de los licores a subsecuentes cocciones con objeto de someter a los polisacáridos a una hidrólisis más completa y por otra parte para aumentar el por ciento de sólidos en el licor. Para una operación económica, es evidentemente deseable obtener la mayor cantidad posible de licor, con la mayor concentración posible, y sin pérdida de tiempo en la producción de la pulpa.

En la práctica sueca el licor comúnmente se colaba del tanque de cocción; por este medio se obtiene sólo la mitad del licor. Para aumentar esa cantidad, puede lavarse la masa en digestión con agua difundiéndola desde el fondo o desde el tope, o bien haciéndola llegar por un sistema de circulación. La difusión desde el fondo, da mínima dilución, pero se efectúa más lentamente que la circulación. Bergson ideó un esquema de operaciones en el cual la recolección de sólidos es de 95% teóricamente, (basado en la suposición de un mezclado perfecto) y la dilución es sólo de 1.5 veces.

Esta es pues otra de las dificultades con que se tropezó al principio, la del control de la operación consistente en obtener el mayor volumen posible de licor, con la menor dilución posible. Sin embargo, posteriormente el proceso de la producción de etanol se mejoró en otras fases de la operación, de modo que este recurso de extraer el máximo posible de licor, tanto como el de aumentar el por ciento de azúcares, perdieron importancia, sobre todo cuando redundan en detrimento de la calidad de la pulpa. Otra importante desventaja estriba en la necesidad de introducir reformas al equipo de producción de la pulpa.

No obstante, y a pesar de todas las dificultades ya expuestas y que todavía en 1943 muchos fabricantes de papel en E. U. creyeron imposibles de allanar, las tentativas para mejorar las posibilidades del residuo sulfítico como fuente de alcohol industrial, no cesaron. Esto debió principalmente a la alta demanda que tuvo el alcohol durante la guerra por su empleo como combustible y como materia prima en la síntesis del hule.

Es así como se llegó a producir (por primera vez en América) a partir del licor de la Ontario Paper Co. en el año de 1943. En esta planta se aplicaron recursos técnicos sacados de la experiencia europea y traídos por M. M. Rosten, quien fué contratado especialmente para que diseñara la fábrica. El recurso más importante introducido por este ingeniero polaco, fué la llamada re-utilización de la levadura (usada por primera vez en la planta de Attisholz, Suiza).

En 1939 había cinco plantas en Europa que aplicaban esta innovación precisamente a la fermentación del licor sulfítico, cuatro en Alemania y una en Suiza.

3.—Tratamiento Preparatorio para la Fermentación.

El licor, tal como sale de las autoclaves de cocción de la pulpa tiene una temperatura de 180 a 190° F., un pH de 2.5 a 3.0 y contiene como 3 g. de SO₂ por litro (parte libre, parte combinado). En estas condiciones no es apropiado para una fermentación alcohólica, así es que es necesario eliminar estos factores tóxicos antes de efectuar la inoculación con levadura.

Se han llevado a cabo muchos experimentos tendientes a determinar los mejores métodos de tratar el licor para dar la más eficiente fermentación, con las menores adiciones posibles. En todos se ha comenzado por neutralizar los ácidos presentes: sulfuroso, acético, fórmico y oxálico (estos tres últimos se hallan en pequeñas proporciones).

El ácido sulfuroso podría eliminarse expulsando el SO₂ por ebullición: $H_2SO_3 \rightleftharpoons H_2O + SO_2$ pero desde luego, en escala industrial no resultaría económico

hervirlo, pues necesitan manejarse grandes volúmenes de líquido y esto implicaría un gasto considerable de combustible. Sin embargo, en la parte experimental de este trabajo, se verá que este fué el primer paso en su tratamiento, por razones que allí se explican. En escala industrial, el licor se bombea caliente a los tanques neutralizadores, pasando previamente por un cambiador de calor tubular (donde se regula el volumen de agua a fin de controlar la temperatura del licor), de manera que al llegar a los tanques, posee una temperatura de 27.2° C. aproximadamente. Allí se elimina el SO_2 mediante aereación, y los ácidos restantes por neutralización con lechada de cal. El aire se empieza a inyectar desde que el licor entra al tanque, y el aire con SO_2 que sale, se elimina por medio de un abanico succionador. Después de la neutralización con cal, se permite reposar el licor para que se depositen las sales que han sido precipitadas. El licor claro se transporta por sistema de bombas a los tanques de fermentación, y el lodo restante se descarga a las corrientes de aguas residuales.

La función principal del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ no estriba en la neutralización de los ácidos no arrastrados por el aire, sino en que reacciona con el ión HSO_3^- que está en solución, para formar CaSO_3 insoluble. Como ya se dijo, la presencia de dicho ión no es deseable por formar compuestos de adición muy estables con los azúcares. Sin embargo, en la planta productora de Thorold no parece que se lleve a cabo dicha reacción totalmente, pues la neutralización se lleva a cabo sólo hasta un pH de 6.0-6.5, que por otra parte es el indicado para iniciar la fermentación alcohólica. (1), (5). A ese pH los compuestos de adición son todavía estables, así que en el laboratorio modifiqué este paso como ya se verá en la parte experimental de este trabajo.

Después de precipitado el CaSO_3 , y si no se controla la adición de lechada de cal, se comienza a precipitar la lignina del complejo lignosulfónico presente, pero como este no es tóxico (cuando menos los microorganismos pueden aclimatarse y llegar a tolerarlo), y su precipitación total requiere un pH muy alto, (de 11.0) no se considera necesario ni conveniente llevarla a efecto.

Ahora veremos lo relativo a los factores nutritivos de que puede disponer la levadura para llevar a cabo la fermentación. El fósforo presente en el licor se halla probablemente en forma orgánica, pues se ha descubierto, (7) que la adición de sales inorgánicas de fósforo es inútil como medio de enriquecimiento, ya que el análisis no revela sino una mínima parte del total de fósforo añadido, lo cual indica que desaparece de la solución como sal, para añadirse a la molécula de ácido calcio-lignosulfónico. En esta forma no es aprovechable por los microorganismos, así es que mientras haya lignina presente, no resulta económico enriquecer el medio con fosfatos inorgánicos. Por otra parte, se ha descubierto en Thorold (1) que tampoco es necesario hacerlo, pues el licor contiene fósforo suficiente para fermentación con la condición de que se aplique el sistema de re-uso de la levadura. Estos hechos, nos han inducido a creer que el fósforo contenido en el residuo sulfítico, está en forma orgánica probablemente unido a proteínas, forma en la cual si es aprovechado por las levadu-

ras. A esta altura de nuestro estudio queremos insistir en el hecho de que el licor es más apropiado para la fermentación alcohólica que para el cultivo de levaduras, pues para la primera, puede prescindirse, como acabamos de ver (y además comprobamos ya experimentalmente), de los fosfatos y en cambio para el cultivo no; se están necesitando constantemente para la elaboración de material celular, enzimas, etc. Además, para hacer la adición más económica (en el caso del cultivo de levaduras) no sería recomendable usar sales inorgánicas de fósforo, sino otras fuentes de fósforos de naturaleza orgánica como raicillas de malta.

El contenido en potasio, del licor sulfítico también es suficiente para los fines que nos interesan. En cambio el nitrógeno si se consideró insuficiente y por lo tanto debe añadirse en forma de sales inorgánicas, pero más convenientemente en forma orgánica, como urea. En Thorold la única substancia nutritiva que se emplea es ésta, y en proporción apreciable sólo en la primera etapa del proceso, la destinada a obtener un cultivo abundante de levadura. Una vez que se dispone de una "semilla" de estos microorganismos, desarrollada en las condiciones más favorables para la multiplicación ya no se necesita añadir sino pequeñas cantidades de esta substancia. Esto se ha hecho posible mediante el re-uso de esta misma semilla en las fermentaciones siguientes (como se verá después). En la planta de Thorold, (Ontario) se añade la urea en proporción de 100 lb. por cada 44,000 galones de licor sulfítico, en caso de usar levadura fresca. Cuando se emplea levadura que se ha usado ya en varios ciclos fermentativos, la cantidad de urea añadida disminuye hasta 20-25 lb. Hemos visto, sin embargo, que el enriquecimiento en substancias nutritivas, depende no solamente de la cantidad de licor sulfítico, sino también de la proporción de la semilla de levadura, con que la fermentación va a iniciarse.

CAPITULO II

AGENTE FERMENTATIVO: SACCHAROMYCES CEREVICIAE I.

- 1.—Generalidades sobre levaduras.
- 2.—Selección y cultivo de la cepa empleada en la fermentación.

Las levaduras son microorganismos clasificados dentro de la sub-división de las talofitas conocidas como Eumicetos u hongos verdaderos, ya que no poseen clorofila. Todos ellos son unicelulares y de dimensiones microscópicas, ampliamente distribuidos en la naturaleza, principalmente en las capas superficiales del suelo, en el polvo atmosférico y en la superficie de frutos y hojas.

Las levaduras tienen características especiales que las diferencian de los hongos, y que han hecho que se les agrupe bajo el nombre de Blastomicetos. Estos a su vez, están separados en dos divisiones: las levaduras verdaderas, o esporógenas y las levaduras falsas. Las primeras están representadas por la familia de las Endomicetáceas o Sacaromicetáceas; las segundas por las familias Rhodotoruláceas, Torula y Nectaromicetáceas. Las que a nosotros nos interesan, son únicamente las levaduras verdaderas; estas incluyen 17 géneros y gran número de especies, muchas de las cuales presentan a su vez variedades llamadas razas.

Las levaduras se desarrollan más abundantemente en soluciones azucaradas que contengan además otros elementos nutritivos. En los medios líquidos las células se encuentran aisladas o en pares, o bien agrupadas tres o cuatro células pertenecientes a diferentes generaciones. En medios sólidos adecuados, se hallan formando colonias compactas de diversos tamaños y diseños, según la naturaleza del substrato y la edad de la colonia.

Las células aisladas son generalmente esféricas, ovoides o elipsoides. Sin embargo, la forma de las células no es una característica rigurosa de cada género; ni siquiera el hecho de hallarse cierta variedad de forma (observada al microscopio) en un cultivo puro, puede ser señal de contaminación.

Las levaduras no poseen flagelo, así es que no están provistas de movimiento propio.

Las células de levadura, tienen dimensiones muy variables, dependiendo de las especies, nutrición, edad y otros factores. Pueden variar desde 1 a 5 (a veces más) micras de ancho, hasta 1 a 10 de largo. Las levaduras que tienen uso en las industrias, y que con bastante aproximación pueden considerarse como esféricas, tienen un promedio de 4 a 6 micras de diámetro, pero como ya se dijo, puede haber grandes variaciones aun dentro del mismo cultivo. La mayor parte de las levaduras muy pequeñas, no presentan interés desde el punto de vista industrial, como no sea cuando se hallan contaminando.

En general, las células de levadura son mucho más grandes que las células bacterianas, y jamás podrán ser confundidas con éstas en el campo microscópico.

Para terminar lo relativo a su morfología, diremos que cada célula está rodeada por una membrana permeable. La composición exacta de esta membrana, es hasta la fecha desconocida, aunque sí se sabe que su naturaleza es semejante a la ce-

lulosa. En las células juvenes es invisible, pero en las adultas ha experimentado un engrosamiento que las vuelve visibles.

Composición celular.—El protoplasma, observado al microscopio, aparece compuesto por una masa semi-flúida grisácea y granulosa. Probablemente, se trata de una dispersión de albúmina y otras materias orgánicas y sales, en agua. Dentro del protoplasma, se encuentra un núcleo y una o más vacuolas en donde se almacenan las substancias de reserva. Las vacuolas no son muy notables en células jóvenes, pero a medida que la misma envejece, se van haciendo cada vez más prominentes hasta el grado de poderse teñir con colorantes específicos. El núcleo ocupa una posición casi central dentro de la célula, y es tan pequeño, que generalmente no puede apreciarse si no se emplea un colorante a propósito, como hematoxilina férrica. Dentro del protoplasma, hay multitud de otros materiales de reserva distribuidos como pequeñas gotas o gránulos, algunos de los cuales son de naturaleza sumamente compleja. Estas reservas, incluyen carbohidratos, grasas, complejos de proteínas. El carbohidrato más importante encontrado allí, es el glicógeno, aunque también hay otros; trehalosa, por ejemplo, que se hidrolisa dando glucosa. Hay también en el protoplasma, fosfátidos, enzimas, vitaminas, factores de crecimiento, volutina y a veces pigmentos.

Composición química.—Las levaduras contienen de 68 a 83% de humedad, la ceniza varía de 3.8 a 8.8% base seca. La siguiente tabla representa el análisis de la porción seca de una levadura conteniendo 70% de humedad:

Proteínas	52.41%
Grasa	1.72 „
Glicógeno	30.25 „
Celulosa, gomas,	6.99 „
Ceniza	8.74 „
	<hr/>
	100.00%

El análisis de la ceniza, es el siguiente:

P ₂ O ₅	54.5%
K ₂ O	36.5 „
MgO	5.2 „
CaO	1.4 „
SiO ₂	1.2 „
Na ₂ O	0.7 „
SO ₂	0.5 „
Cl y Fe	trazas

Las proteínas de la levadura incluyen albúmina, globulina, fosfoproteínas, núcleo-proteínas, lecito-proteínas y glico-proteínas. Los derivados solubles de las proteínas: peptonas, polipéptidos y aminoácidos también se hallan en el protoplasma.

Reproducción.—Las levaduras verdaderas, Endomicetáceas, se reproducen vegetativamente por gemación o división, o por esporulación.

Durante la gemación, el citoplasma y las substancias nucleares fluyen de la célula madre formando una protuberancia en la periferia de la célula. Esta es la célula hija naciente que luego se contrae en su base, se separa de la célula madre mediante una pared, y permanece adherida hasta que alcanza cierto tamaño. El otro tipo de reproducción es semejante al que caracteriza a las bacterias; la célula madre crece, se prolonga, se contrae ligeramente en su parte media en donde lentamente se va formando una pared divisoria; así resultan dos células de una. Los géneros Schizosaccharomyces y Endomyces se reducen vegetativamente, sólo por este medio.

La esporulación que es el proceso reproductivo de las levaduras verdaderas, puede ser de naturaleza sexual o asexual. Las esporas, cuyo número puede variar desde 1 hasta 4, 6, 8 y aun 12, se llaman ascosporas o endosporas, y las células que contienen esporas, se han llamado "ascas". En la formación de las ascosporas, el núcleo de la célula de levadura se divide repetidas veces. Luego cada núcleo se rodea de material citoplásmico más denso, y finalmente de una pared.

La esporulación en las levaduras es importante por dos razones: es la base de un método de reproducción y constituye un importante medio de defensa para los casos en que el medio no es favorable. Las ascosporas de levadura son mucho más resistentes al calor y la falta de humedad que las células vegetativas.

Nutrición.—Los elementos necesarios a las levaduras para su nutrición son: carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio, azufre y cloro. **Carbón.**—Al considerar el azúcar como fuente de carbono, debe tenerse en cuenta que la habilidad para asimilarla, es muy independiente de la habilidad que la misma levadura posea para fermentarla.

El carbono puede ser suministrado en forma de azúcares, aldehidos, sales de ácidos orgánicos, glicerina o etanol. Según Guillermond, la maltosa impura es muy adecuada al metabolismo de las levaduras. La sacarosa, glucosa, fructuosa y rafinosa no son tan importantes desde el punto de vista de la asimilación, no obstante que algunos de estos azúcares son directamente fermentescibles.

Los lactatos, citratos, succinatos, malatos y tartratos, así como los ácidos correspondientes pueden también ser empleados como fuente de carbono.

Nitrógeno.—Puede suministrarse como componente de un gran número de substancias: productos solubles de la degradación de proteínas, peptonas, péptidos y aminoácidos, amida, urea, sales de amonio.

Minerales.—El Mg., K. fosfatos, azufre y calcio se suministran en forma de sales. Las más comúnmente usadas son los fosfatos de potasio, sulfato de magnesio y fosfato o cloruro de calcio.

Los medios más favorables para el crecimiento de levaduras son principalmente los que contienen azúcares asimilables, además de otras sustancias que imparten reacción ácida a la solución.

No todos los azúcares son fermentados a la misma velocidad. Tampoco todas las levaduras actúan con la misma eficiencia. A bajas concentraciones de fructuosa la fermentación tiene lugar con menor rapidez (expresada en mg. de CO₂ por minuto). La glucosa es fermentada aproximadamente con la misma rapidez entre concentraciones de la misma que oscilen de 1 a 10%; la fructuosa entre 2 y 8%.

Enzimos producidos por las levaduras.—Incluyen generalmente, por lo menos tres grupos distintos: los respiratorios, los que desdoblan los disacáridos, y los de la fermentación.

Los enzimos catalizan las complejas reacciones químicas que tienen lugar en los medios nutritivos. El hecho de que un carbohidrato sea fermentado o asimilado, depende de la naturaleza de los enzimos de la levadura, suponiendo, naturalmente, que el medio sea favorable para el desarrollo, o para la fermentación. Los polisacáridos generalmente no fermentan. La lactosa es fermentada por *Saccharomyces fragilis*, pero no por *S. cerevisiae* ni por *S. ellipsoideus* que son los dos tipos más conocidos.

Los enzimos de las levaduras son de dos clases: endoenzimas (intracelulares) y exoenzimas (extracelulares). Estos enzimos actúan de acuerdo con leyes generales que rigen las reacciones enzimáticas, pero además, exhiben cierto grado de especificidad.

Los enzimos de las levaduras se clasifican en hidrolasas y desmolasas. Los primeros catalizan las reacciones hidrolíticas, por ejemplo las que convierten las proteínas en polipéptidos, los polisacáridos en monosacáridos o los esters en sus correspondientes alcoholes y ácidos. Algunos enzimos tienen la propiedad de catalizar reacciones en un sentido y también en el opuesto, dependiendo de las condiciones.

Las desmolasas son enzimos que intervienen en la respiración y el metabolismo, por ejemplo la carboxilasa que cataliza la descarboxilación del ácido pirúvico, transformándolo en acetaldehído y CO₂.

También elaboran las levaduras ciertas sustancias llamadas activadores o coenzimos que son necesarios para el buen funcionamiento de los enzimos. La zimasa, por ejemplo, no sólo es un enzimo sino un complejo de enzimos y co-enzimos.

Los enzimos que actúan en la fermentación alcohólica son muchos y todos ellos específicos para un solo tipo de reacción; además, sus acciones están conecta-

das entre sí de tal modo que dentro de las condiciones (pH, rH, temperatura, etc.) la transformación de energía química en energía calorífica, sea lo más completa posible. Esto no significa sin embargo, que las necesidades energéticas de las levaduras sean muy grandes, pues experimentalmente se ha comprobado que el desprendimiento de energía no es una medida de las necesidades metabólicas; aún a veces sucede que el calor desprendido causa una elevación tal de temperatura, que es capaz de inhibir el desarrollo de los microorganismos y suspender su actividad. Es por esto, que en las fermentaciones que se llevan a cabo en la industria hay necesidad de emplear un sistema de enfriamiento que mantenga la temperatura óptima para la actividad de las levaduras.

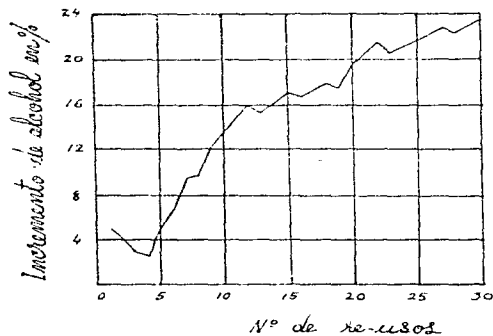
Ahora bien, cuando de una fermentación se trata de obtener un producto final con el mejor rendimiento posible, por ejemplo alcohol, deben establecerse las condiciones ya mencionadas (pH, rH,) que eviten la oxidación total de los azúcares, pues es ésta la reacción que produce mayor desprendimiento de calor, sería la que tendría lugar si se permitiera el libre acceso de oxígeno. Así pues, lo indicado es que la fermentación se efectúe en tanques cerrados en donde el mismo CO₂ que se libera durante la misma se encarga de mantener un rH lo suficientemente bajo. Es el caso contrario cuando se trata de favorecer únicamente la multiplicación, y en este caso no sólo se permite el libre acceso de aire sino que se inyecta para aumentar la superficie de contacto. En este caso, la producción de alcohol será mínima.

2.—Selección y cultivo de la levadura usada en la fermentación del licor sulfítico.

La levadura que se escoja como agente de fermentación del licor sulfítico, debe reunir varios requisitos: ser capaz de fermentar directa y rápidamente, las exosas en él contenidas y que son como ya hemos dicho, glucosa, manosa y galactosa (aparte hay otros carbohidratos, las pentosas xilosa y arabinosa que no son fermentescibles); producir, dentro de las condiciones el máximo rendimiento de alcohol, y por último, estar ya aclimatada al medio. Las dos primeras condiciones las reúne el *Saccharomyces cerevisiae* I. La tercera, puede obtenerse sometiendo un cultivo puro de esta levadura a una aclimatación por medio de siembras sucesivas en medios preparados con proporciones crecientes del licor (ya tratado como se indicó en el capítulo anterior). En escala industrial, la "semilla" se obtiene a partir de un cultivo puro preparado en esta forma, pero la total aclimatación de la levadura, y que permite un aumento cada vez mayor del rendimiento de alcohol, se logra en la planta de Thorold por el sistema de re-uso de la levadura. La secuela de este proceso, es más o menos la siguiente: el residuo sulfítico, una vez fermentado, se transporta a un separador de centrifuga para depositar allí la levadura. Esta misma se usa de nuevo en una fermentación posterior del ciclo operatorio, previamente tratada con ácido sulfúrico. La base de este método (dado a conocer en una patente de L e s Usines de Melle) estriba en que, cuando la levadura está presente en un medio adecuado que contenga azúcar, el curso de la fermentación tiende a dividirse en dos fases: la pri-

mera en que las células de levadura se multiplican usando azúcar como principal fuente de energía, hasta que hay suficiente cantidad de células como para formar una suspensión densa. Durante esta primera fase que dura como 25 horas, ha habido un máximo de crecimiento y multiplicación y un mínimo de producción de alcohol. En la segunda etapa, la levadura reduce su rapidez de multiplicación y continúa aprovechando el azúcar restante del medio. Durante esta fase, ha habido un desarrollo mínimo y una máxima producción de alcohol. El objeto de re-utilizar la levadura, es establecer desde un principio, en cada nueva fermentación, la misma densidad de células que existía en la fermentación que le antecedió; de este modo la fermentación se limita sólo a la segunda fase, y el rendimiento de alcohol mejora notablemente.

En el caso del licor sulfítico, trae una enorme ventaja trabajar a través de todo el ciclo fermentativo, con una gran concentración de levadura, pero antes de alcanzar esa concentración, es preciso establecer las condiciones favorables para un crecimiento rápido y abundante de células. Este desarrollo se obtiene a expensas de azúcar que de otro modo sería una fuente de alcohol; por otra parte, como el licor sulfítico es una solución muy diluida de azúcar, la cantidad requerida para esa multiplicación, representa una proporción mucho mayor del total, que tratándose de otras soluciones más concentradas que se usan en la industria del alcohol. La ventaja de la aplicación de este sistema de Melle, es pues mucho mayor en el caso que nos ocupa, ya que el incremento final de alcohol está representado por un valor más alto que en otros casos a los cuales también se ha aplicado. Tiene otras importantes ventajas, como la ya mencionada de aclimatar la levadura, y se supone que la influencia de esta aclimatación es el principal factor determinante en la curva de la figura siguiente:



Se nota en esta gráfica, que el efecto inhibitorio del medio, impide la completa aclimatación sólo hasta el 4o. uso; después, el rendimiento de etanol crece rápidamente durante las siguientes fermentaciones, hasta llegar a un máximo como a los 25 ó 30 ciclos fermentativos. La segunda ventaja adicional, es que el peligro de contaminación queda grandemente disminuído. Tres factores contribuyen a esto: las condiciones en que se han llevado a cabo las fermentaciones, permiten sólo una mínima multiplicación de las levaduras, pero favorecen la conservación de su vitalidad inicial. Es evidente, pues, que la posibilidad de contaminación es muy pequeña debido a la competencia vital que en esas condiciones puede ejer-

cer la levadura. Además, como se ha eliminado el largo periodo de crecimiento inicial, el medio nutritivo resulta pobre y probablemente tóxico a cualquier otro microorganismo. El segundo factor lo constituye el hecho ya conocido, de que los organismos de contaminación son generalmente más pequeños y ligeros que las levaduras, y por consiguiente no se separan con ella en la centrifuga sino que se quedan suspendidos en el liquido que se va a destilar, con lo cual quedan automáticamente eliminados. El tercer factor lo constituye la posibilidad de vaciar y limpiar perfectamente los tanques entre cada fermentación.

El reporte de Sieber y Pigeot, (1) nos da los datos de 14 pares de fermentaciones llevadas a cabo en la planta de Attisholz (Suiza) -primera donde fué aplicado el sistema de re-uso a la fermentación del residuo sulfítico-; una de cada par con la técnica antigua de levadura nueva y la otra con una carga completa de levadura re-usada. En cada caso, el método de re-uso dió el rendimiento mayor, siendo el incremento medio, de 15%. El incremento más alto que se observó en uno de ellos, fué de 26.9%, el más bajo 2.4%. Sin embargo, los resultados obtenidos en Thorold fueron mejores después de muchos ciclos fermentativos.

Después de los datos anteriores, queremos puntualizar el hecho de que las cantidades de levadura fresca usada, son muy grandes en comparación con un inoculum convencional; aproximadamente se necesita comenzar la fermentación con una concentración de 1 g. de levadura fresca por litro de medio. También es necesario hacer hincapié en la necesidad de favorecer la actividad de la levadura fresca en las primeras fermentaciones, mediante la adición de mayores cantidades de urea que las necesarias en el caso de estar ya bastante aclimatadas; cuando se ha usado la misma semilla durante 15 fermentaciones consecutivas, la cantidad de urea puede reducirse aproximadamente a la cuarta parte de la inicial.

Las levaduras deben separarse del liquido fermentado, inmediatamente después de concluída la fermentación, con objeto de que no pierdan su actividad; en estas condiciones pueden fermentar una nueva porción de licor y comenzar la fermentación con un máximo de actividad. Según la patente de Melle, las levaduras se tratan con ácido sulfúrico diluido en los tanques de almacenamiento, y de allí se transportan a los tanques de fermentación.

Sólo nos resta decir que el tiempo de fermentación usando este sistema, puede llegar a disminuirse hasta 20 hs., lo cual representa un ahorro como de 65% con respecto al tiempo de fermentación con la técnica antigua.

CAPITULO III

**PARTE EXPERIMENTAL: EL LICOR SUL-
FITICO RESIDUAL DE LA FABRICA DE
PAPEL SAN RAFAEL COMO MATERIAL
FERMENTESCIBLE Y COMO FUENTE
DE ETANOL.**

En la parte experimental de este trabajo, practiqué varios ensayos y determinaciones en dos muestras del licor obtenidas en la fábrica de papel de San Rafael, con el fin de encontrar el tratamiento que requiere para poder ser fermentadas por un cultivo puro de *Saccharomyces cerviciae* I (obtenido en la Junta Técnica de Alcoholes) y las posibilidades que puede tener como fuente de etanol.

El licor usado en estas fermentaciones, representa al licor que sale de la purga de un hervidero, mezclado con las aguas de lavado de la pulpa. Esta mezcla, la llevé a cabo en la proporción de 68% (en volumen) de agua de lavado y 32% de licor sulfítico, con objeto de poder referir los resultados obtenidos, a un peso cualquiera, pero fijo, de pulpa sulfítica, pues según datos proporcionados en la fábrica, esa es la proporción aproximada en que intervienen la lejía sulfítica y el agua con que se efectúa el lavado.

Una vez preparados dos litros de esta mezcla, separé 250 c.c. para hacer las siguientes determinaciones:

- I.—Peso específico.
- II.—Concentración de SO_2 en g/l.
- III.—pH con Potenciómetro.

El resto del licor después de sometido al tratamiento que ya anotaremos, lo separé en tres porciones: la primera, para llevar a cabo la aclimatación, la segunda sirvió para las siguientes determinaciones:

- IV.—Azúcares Reductores.
- V.—Azúcares Fermentescibles.

La tercera se usó en la fermentación final, cuya eficiencia se investigó, valiéndose de las siguientes determinaciones que sirvieron para calcular el rendimiento final de alcohol:

- VI.—Peso específico del licor fermentado.
- VII.—Peso específico del destilado.
- VIII.—Índice de refracción del destilado.

I.—Peso específico del licor sulfítico.

Esta determinación se hizo por medio de un picnómetro, y los datos obtenidos para las dos muestras del licor (ya mezclado con agua de lavado), son:

Muestra No. 1	1.051 a 19.3° C.
„ No. 2	1.052 „ 19.5° C.

Antes de efectuar las pesadas, se sumergió el picnómetro en un baño a 20° C. durante 15 min. y la temperatura anterior se tomó inmediatamente después de haber pesado.

II.—Concentración de SO₂. (Determinación volumétrica).

Se midieron con pipeta 50 c.c. de licor y se disolvieron en 200 c.c. de agua. Se añadieron 25 c.c. de NaOH N. mezclando bien; el objeto de esto es romper los productos de adición de los azúcares reductores con el ácido sulfuroso. Después se pasó una corriente rápida de nitrógeno (generado, calentando una mezcla de NaNO₂ y NH₄Cl) a través de la solución por 10 min. aproximadamente para expeler el aire. La solución se acidificó entonces con 10 c.c. de ácido sulfúrico al 35% y se tituló rápidamente con iodo N/10, usando almidón como indicador. Se corrió un testigo, pero en lugar de hacerlo con agua, se hizo con licor sulfítico hervido, aereado, y tratado con Ca(OH)₂ (en una palabra, exento de SO₂) y aforado con agua destilada a su volumen primitivo. De éste se tomaron también 50 c.c. y se trataron en forma idéntica a la solución problema. Los datos obtenidos de ambas titulaciones fueron:

Muestras	Testigos	c.c. de I. N/10	Diferencia
No. 1	50.25	
	No. 1	1.05	49.2 c.c.
No. 2	50.05	
	No. 2	1.75	48.3 c.c.

Resultados obtenidos de los datos anteriores (sabiendo que 1 c.c. de Iodo 0.1 N = 3.2 mg. de SO₂):

Muestra No. 1	3.14 g/l. de SO ₂
„ No. 2	3.09 g/l. „ „

Los valores así encontrados, se refieren al SO₂ total (tanto libre como combinado).

III.—Determinación del pH en el licor sulfítico.

Esta determinación la llevé a cabo en un potenciómetro de Fisher (electrodos de vidrio y de calomel). Se usó una solución buffer (standard) de pH=6.99, la cual dió en el aparato, 5.83; así que la corrección por potencial asimétrico del electrodo de vidrio, viene siendo 1.16. La determinación se hizo a 25° C. Los valores siguientes se hallaron para muestras sacadas de la Muestra No. 2 proporcionada por la fábrica:

a)	2.15	
b)	2.12	Promedio = 2.14; corrección = 1.16,
c)	2.15	pH corregido = 2.14 + 1.16 = 3.3
d)	2.15	

Como puede verse por los resultados de las determinaciones anteriores, el bajo pH del medio y el alto contenido en SO_2 , son suficientes para inhibir el desarrollo de las levaduras; pero aún eliminando estos factores tóxicos, hay pequeñas cantidades de ácidos oxálico, fórmico y el complejo lignosulfónico cuya presencia en el medio puede llegar a ser tolerada por la levadura, mediante una buena aclimatación. Para ésta, fué necesario preparar un medio de cultivo apropiado —por una parte— y por otra, un litro de licor sulfitico exento de SO_2 y a un pH favorable al crecimiento de levaduras.

Procedimos, pues, en primer lugar a neutralizar el licor, hirviéndolo durante una hora en un matraz Erlenmeyer, al cual se hizo llegar simultáneamente, una corriente de aire a presión por medio de un tubo de vidrio. Se dejó enfriar hasta 20°C . aproximadamente, y se añadió lechada de cal al 20% hasta un pH de 10 aproximadamente (usando papel indicador Universal). Se dejó reposar el líquido con el precipitado y se filtró. El objeto de hervir el líquido además de aerearlo, fué disminuir su volumen y dejar así espacio para agregar la lechada de cal, que de no ser así, alteraría la concentración inicial del licor. También debe quedar espacio para lavar el precipitado después de haber filtrado y para neutralizar los filtrados con ácido sulfúrico. Esta neutralización trae una doble finalidad: reducir el pH hasta 6.0 que es el apropiado para iniciar la fermentación, y la muy importante de precipitar el exceso de calcio en solución, como CaSO_4 , que se elimina filtrando nuevamente. Después de todas estas operaciones, el volumen debe ser ajustado exactamente al primitivo, pues este licor ya tratado sirve para determinar la concentración de otras sustancias.

El paso siguiente consistió en agregar las sustancias nutritivas: urea en proporción de 0.3 gr. por litro de licor, y luego esterilizar en la autoclave a 15.5 lib. El medio así preparado se empleó en la aclimatación de la levadura, como ya veremos.

El medio nutritivo que sirvió como auxiliar en dicha aclimatación fué el de Valbuena, que se prepara con los siguientes ingredientes: 250 gr. de betabeles, 250 gr. de zanahorias, 10 gr. de glicerina, y 20 gr. de miel de abejas más el agua destilada que basta para un litro. Se hierve primero el agua con las zanahorias y betabeles, se filtra, y se añade la miel y la glicerina; se completa a un litro y se esteriliza.

Los dos medios así preparados, se distribuyeron en varios matraces de 250 c.c. empezando por una mezcla de 10% de licor y 90% de Valbuena; luego el siguiente matraz con 15% de licor y 85 % de Valbuena; así sucesivamente hasta terminar con una mezcla de 95% de licor sulfitico y 5% de medio nutritivo. Todos estos matraces con sus contenidos, se esterilizaron en la autoclave y se guardaron para irlos usando después conforme se iban haciendo las siembras.

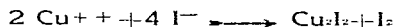
El cultivo puro de *Saccharomyces cereviciae* I. lo resembramos varias veces en tubos con Valbuena líquido para aumentar su vigor, observando periódicamente al microscopio para controlar su pureza. A la resiembra No. 5 se utilizó para inocu-

lar el medio contenido en el primer matraz, se dejó fermentar a 28°C. durante 48 hs., después de lo cual se transfirió asépticamente el contenido a tubos de ensayo done se centrifugó durante 10 min. aproximadamente. Asépticamente, se extrajo el liquido claro dejando el depósito de levaduras en el fondo del tubo. Este depósito se juntó (también asépticamente) en un solo tubo; esta constituyó la semilla usada para la siembra el matraz No. 2. Las operaciones anteriores se repitieron cada 48 hs. hasta llegar a la mezcla formada por 50% de licor; aquí la levadura resultante se dividió en dos porciones aproximadamente iguales, las cuales se sembraron en sendos matraces conteniendo mezclas idénticas del licor sulfítico y Valbuena (55% del primero, y 45% del segundo). Así seguí trabajando paralelamente con estas dos series de cultivos hasta agotar los matraces. Las levaduras resultantes de las mezclas finales, se sembraron en licor 100% (que ya ha sido tratado y enriquecido con urea como hemos visto) habiendo resembrado esta misma semilla cinco veces en otros matraces con licor puro. Finalmente, las levaduras de la primera serie, se reservaron para usarse en la determinación de azúcares fermentescibles; las de la segunda, constituyeron la semilla para inocular 1 lt. de licor el cual fué posteriormente destilado.

IV.—Determinación de Azúcares Reductores.

Procedimiento: 100 c.c. de licor sulfítico (original) se calientan con aereación por espacio de media hora, se tratan con CaCO_3 hasta dar un pH de 6.0; se enfría y se filtra completando nuevamente a 100 c.c. con agua destilada; de aquí se toman 10 c.c., se diluyen hasta 100 c.c. en matraz aforado, y se determinan azúcares reductores por el método de Schoorl. Antes de continuar diremos, que para aumentar la exactitud de esta determinación, creimos conveniente precipitar el exceso de Ca de los 10 c.c. de licor, con oxalato de potasio al 3% (según Enyon y Lane (11) las sales de calcio disminuyen el poder reductor de los azúcares que se van a determinar en los productos azucarados impuros). Después de filtrar el precipitado obtenido, se lava; el filtrado se afora a 100 c.c. y de esta solución se toman 30 c.c. con la pipeta y se transfieren a un matraz Erlenmeyer de 300 c.c. Se añaden 10 c.c. de c/u de los reactivos de Soxhlet y se coloca el matraz en una tela de alambre con asbestos sobre una parrilla eléctrica. Se hace hervir dentro del espacio de 3 min. y se mantiene en ebullición suave durante otros 2 min. El matraz entonces se enfría con la mayor rapidez posible, se agregan 3 gr. de KI disueltos en 100 c.c. de agua y 10 c.c. de una solución al 25% de ácido sulfúrico. Se mezcla bien y se titula inmediatamente con tiosulfato N/10 hasta que el liquido se vuelva de color amarillo-café pálido; se agrega un poco de almidón indicador, y se continúa con cuidado la titulación. Se corre un testigo con 30 c.c. de agua; la diferencia entre los c.c. usados para el testigo y para el problema, da los c.c. de tiosulfato N/10 equivalentes al cobre reducido, y por lo tanto reductor.

La base de este método de Schoorl para la determinación de azúcares reductores, es la siguiente reacción:



El iodo así liberado, se titula con tiosulfato verificándose la siguiente reacción:



Estas reacciones, como puede verse, tienen lugar debido a que ha quedado cobre sin reducir por los azúcares reductores presentes; es pues este cobre residual el que se determina, y el que reaccionó se obtiene por diferencia.

Los resultados obtenidos, fueron los siguientes:

	c.c. de tiosulfato N/10	Diferencia
Testigo	28.40	
Muestra No. 1	8.90	19.50 c.c.
„ No. 2	8.75	19.65 c.c.

Los valores correspondientes, en glucosa, se leen en las tables de Schoorl (11) y haciendo los cálculos para referir el resultado al licor original, quedan:

Muestra No. 1.	2.08 g./100 c.c. (en glucosa)	
„ No. 2.	2.09 g./100 c.c.	„

Como ya hemos dicho, estos azúcares reductores incluyen arabinosa y xilosa que no son fermentescibles, además de glucosa, galactosa y manosa que sí lo son.

V.—Determinación de azúcares fermentescibles.

Para saber la proporción en que estos azúcares se hallan en el licor, se ha propuesto (6) un método rápido y muy práctico. La base estriba en el poder de las levaduras para ejercer una adsorción selectiva de los azúcares reductores que son aptos para la fermentación alcohólica, en presencia de los no fermentescibles, de manera que éstos permanecen totalmente en solución. Así, la diferencia entre los valores representativos de los azúcares reductores antes y después de la adsorción, da una medida exacta de los azúcares fermentescibles presentes. Este procedimiento, se ha probado que da resultados seguros habiéndose estudiado ya el mecanismo de la adsorción con diferentes azúcares (manosa, glucosa y galactosa) aislados y en mezclas.

Procedimiento:

De la dilución del licor, preparada para el análisis de reductores, se miden 30 c.c. y se mezclan con la suspensión de levadura ya aclimatada (que se reservó exclusivamente para este análisis). Nosotros consideramos conveniente lavar dichas levaduras con una solución salina, y así ya mezclarla con los 30 c.c. de licor sulfítico. El peso de levadura así añadida, debe fluctuar entre 2 y 5 gr. La mezcla se agita luego en un termostato a 30°C. durante una hora. Después se centrifuga y el líquido claro se analiza en la misma forma que el anterior, por el método de Schoorl. La diferencia, nos da los azúcares fermentescibles.

Los datos obtenidos en este segundo análisis, fueron:

	Tiosulfato N/10 en c.c.	Diferencia con el testigo	Diferencia con el 1er. Análisis
Muestra No. 1	21.20	7.20	12.30 c.c.
„ No. 2	21.40	7.00	12.65 c.c.

Leyendo en las tablas de Schoorl, y haciendo los cálculos para referir al licor original, quedan:

Muestra No. 1.	1.31 g/100 c.c. de azúcares fermentescibles.
„ No. 2.	1.35 g/100 „ „ „

Estos resultados están también expresados en glucosa; representan respectivamente, el 62% y el 64% de los azúcares reductores totales en el licor sulfítico.

Fermentación del licor sulfítico.— Tiempo de fermentación.

Después de las siembras hechas con objeto de aclimatar las levaduras, se llevó a cabo una serie de cinco fermentaciones en las cuales fué empleada la misma semilla sucesivamente. Estas fermentaciones de licor sulfítico preparado, pero ya sin mezclar con Valbuena, tuvieron un doble objeto: primero, el de determinar el tiempo de fermentación aproximado y, segundo, acercarse lo más posible a la total aclimatación que, como ya hemos dicho, sólo se logra después de 25 ó 30 ciclos, y que garantizan un incremento máximo en el alcohol final.

El tiempo empleado por las levaduras para fermentar totalmente los azúcares fermentescibles contenidos en el licor, fué determinado del modo siguiente: terminada (aparentemente) la primera de estas cinco fermentaciones, separamos con ayuda de la centrifuga, el licor claro, de la levadura en suspensión. Esta separación fué efectuada 48 horas a partir de la inoculación. La levadura se empleó en la inoculación del segundo matraz con licor; del licor claro resultante de esta primera fermentación, tomé 30 c.c. y practiqué en ellos, el mismo análisis de azúcares reductores que ya hemos visto, y a otros 30 c.c., el de fermentescibles, empleando la misma levadura del análisis efectuado en el licor original.

Estos dos análisis, los efectué también en el licor fermentado de la segunda, tercera y cuarta fermentaciones de licor puro. Los resultados fueron tabulados como sigue:

Fermentación No.	Tiempo en hs.	Azúcares fermentescibles (g/100 c.c.)
I	48	0.12
II	51	0.09
III	55	0.04
IV	56	0.00

En la quinta fermentación, dejamos pues, en contacto la levadura y el licor, durante 60 hs. y después procedimos a la destilación.

Como ya hemos dicho, el volumen de licor con que se inició la fermentación, fué en cada caso, de un litro; ahora bien, como después de terminada, el volumen ha disminuído como es natural (debido al desprendimiento de CO₂ durante la misma aforamos con agua destilada al volumen primitivo, antes de principiar la destilación. Entonces se tomaron muestras de 100 c.c. medidas a 20°C. y se destilaron separadamente para promediar resultados.

El procedimiento seguido para calcular el rendimiento de alcohol, fué el siguiente: se midieron 100 c.c. de la muestra a 20° y se pusieron en un matraz de destilación. Se diluyeron con 50 c.c. de agua destilada y se destilaron casi 100 c.c. Se aforó a la marca a 20° C. y se determinó el peso específico por medio de un picnómetro. El % en volumen de alcohol, se lee en las tablas correspondientes. El resultado obtenido puede checarsé por medio del refractómetro de inmersión.

VII.—Peso Específico del destilado a 20/20° C.

Muestra No. 1.	0.99907
„ No. 2.	0.99900

En las tablas (A. O. A. C.) se lee:

Peso Específico 20/20°	% de Alcohol en volumen
0.99910	0.6
0.99895	0.7

Para la Muestra No. 1 se obtiene, interpolando, 0.62% de alcohol; para la No. 2, 0.66%.

VIII.—Índice de refracción del destilado.

Esta determinación se hizo también a 20° C. en un refractómetro de inmersión Zeiss.

Muestra No. 1.	15.10
.. No. 2.	15.15

En las tablas (A. O. A. C.) se leen los valores siguientes:

Lectura a 20° C.	% de Alcohol en volumen
15.0	0.54
15.2	0.69

Interpolando también, para la Muestra No. 1 se obtiene 0.61% y para la No. 2, 0.65%. Como puede verse, los valores obtenidos a partir del peso específico y a partir de las lecturas refractométricas coinciden muy aproximadamente.

CONCLUSIONES

Aprovechando los datos proporcionados por la fábrica, según los cuales cada tonelada de celulosa "al sulfito" necesita 8 metros cúb. de lejía sulfítica y 17 metros cúb. de agua de lavado, hemos podido calcular que el contenido de azúcares fermentescibles del licor residual -de acuerdo con nuestro análisis- es aproximadamente de 330 K. por tonelada de pulpa sulfítica producida.

En cuanto a la producción de etanol, creemos que en la práctica industrial podría mejorarse considerablemente con respecto al rendimiento obtenido en la parte experimental de este trabajo, pues llevamos a cabo la aclimatación solamente hasta el 6o. re-uso de la levadura.

Sin embargo, calculamos también que para cada tonelada de celulosa al sulfito, podrían obtenerse teóricamente y basándose en una colección de un 100% del licor residual procedente de las autoclaves, aproximadamente 150 litros de alcohol. En la práctica, sabemos por los datos publicados acerca de la planta de Thorold, en Canadá, que el máximo de licor que ha llegado a colectarse sin necesidad de introducir reformas serias al equipo de producción de pulpa, es de 70% del licor total. Según esto, nuestro rendimiento de etanol, llevado a la práctica industrial, quedaría reducido a 105 litros aproximadamente, por tonelada de pulpa sulfítica.

FIN

BIBLIOGRAFIA

- 1.—"Ethyl Alcohol from Sulphite Liquor". C. A. Sankey. — Canadian Chemistry and Process Industries. — July 1944.
- 2.—"From Waste Liquor to War Alcohol". John R. Callahm. — Chemical and Metallurgical Engineering. — December, 1943.
- 3.—"Yeast from Wood". E. W. Eweson. — Chemical Industries. — June 1936.
- 4.—"Fermentability of Sulphite Waste Liquors". — (Technical Developments). The Paper Industry and Paper World. — August, 1943.
- 5.—"Alcohol from Sulphite Waste Liquor". — Chemical Industries. — December, 1943.
- 6.—"Determination of Fermentable Sugar in Sulphite Wastes". — (Technical Developments) The Paper Industry and Paper World. — June, 1943.
- 7.—"Acetone Butyl Alcohol Fermentation of Waste Sulphite Liquor" Ind. and Engineering Chemistry. — May, 1941.
- 8.—"Ethyl Alcohol from Sulphite Waste Liquor". — Paper Trade J. — December, 1943.
- 9.—"Waste Liquor Pilt Plant starts Operation". — Paper Trade J. August, 1943.
- 10.—"Industrial Microbiology". — Prescott and Dunn. — First Edition, Mc Graw-Hill Book Co. New York and London. — 1940.
- 11.—"Sugar Analysis. Ch. A. Browne and F. W. Zerban. — 3d ed. J. Wiley & Sons, Inc., New York, — 1941.