

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 164**

51 Int. Cl.:

C12P 19/00 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 7/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08868615 .9**

96 Fecha de presentación: **16.12.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2225387**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2010**

54 Título: **Procedimiento de producción de sacárido**

30 Prioridad:

27.12.2007 JP 2007338059

27.12.2007 JP 2007338060

11.08.2008 JP 2008207290

15.08.2008 JP 2008209154

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

19.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

19.12.2012

73 Titular/es:

KAO CORPORATION (100.0%)

14-10, NIHONBASHI-KAYABACHO, 1-CHOME

CHUO-KU TOKYO 103-8210, JP

72 Inventor/es:

NOJIRI, NAOKI;

UMEHARA, MASAHIRO;

TOMIOKA, KEIICHIRO;

KAWANO, TAKAKO;

KITSUKI, TOMOHITO;

OKUTSU, MUNEHISA y

OGAWA, AKINORI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 393 164 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de sacárido

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de sacárido.

5 Antecedentes de la invención

Las celulosas obtenidas por la molienda de materias primas que contienen celulosa, tales como pulpa, se han utilizado como materiales industriales, tales como materias primas de éteres de celulosa, cosméticos, productos alimenticios y otros materiales de biomasa. En años recientes, por ejemplo, desde el punto de vista de la solución de los problemas medioambientales, se han hecho intentos para producir sacárido a partir de un material de biomasa y para convertir el sacárido en etanol o en ácido láctico mediante una técnica de fermentación. La producción de sacárido a partir de un material de biomasa mediante el uso de enzimas tales como una celulasa, es especialmente útil para obtener celulosa cuya estructura cristalina se descristaliza en una etapa de tratamiento preliminar. Por el ejemplo, el documento JP 2006-223152A desvela que la celulosa se decristaliza mediante el uso de un disolvente de la celulosa tal como cloruro de litio/dimetilacetamida.

15 También se conoce un procedimiento para el tratamiento mecánico de la pulpa por medio de un molino para reducir la cristalinidad de la pulpa de la celulosa.

En los Ejemplos 1 y 4 del documento JP 62-236801A, se desvela un procedimiento para tratar la pulpa laminar usando un molino de vibración de bolas o una extrusora de doble tornillo. En los Ejemplos 1 a 3 del documento JP 2003-64184A, se desvela un procedimiento para tratar la pulpa usando un molino de bolas. En los Ejemplos 1 y 2 del documento JP 2004-331918A, se desvela un procedimiento para tratar la celulosa pulverizada obtenida sometiendo la pulpa a tratamientos químicos tales como hidrólisis usando un molino de bolas y adicionalmente un molino de aire. El documento JP 2005-68140A desvela un procedimiento para tratar la pulpa que se mantiene dispersa en el agua usando un molino de tipo medio tal como un molino de vibración de bolas.

25 Sin embargo, estos procedimientos no han podido lograr una eficacia y una productividad satisfactorias cuando se reduce la cristalinidad de las celulosas.

Mientras tanto, el documento JP 2003-135052A desvela un procedimiento de sacarificación de celulosa empleando una celulasa específica. El documento JP 2007-74992A y el documento JP 2007-74993A desvelan procedimientos de sacarificación en los que se ha tratado la celulosa o la hemicelulosa con agua caliente usando peróxido de hidrógeno, seguido de un tratamiento enzimático.

30 Zhang y col. (Cellulose 14, 2007, 447-456) analizan el desarrollo morfológico y estructural de la celulosa de madera dura durante el tratamiento previo mecanoquímico en estado sólido a través de la molienda en un recipiente. El artículo establece que la pulverización o la molienda de la celulosa reducen su cristalinidad, haciéndola de ese modo más soluble y más asequible para la modificación química. Específicamente, el aumento de la reactividad indica que se debe a la presencia de más grupos OH libres en la celulosa molida. Kobayashi y col. (Powder Technology, 180, 2007, 272-283) se refieren a las tecnologías para la utilización de la biomasa de madera pulverizada, tales como gasificación y licuefacción. El artículo indica que la cristalinidad de la celulosa se puede reducir por molienda, aumentando de ese modo el rendimiento de la sacarina cuando se trata la celulosa con agua comprimida en caliente.

40 Kobayashi y col. (Journal of the Japan Institute of Energy 86, 2007, 730-735) evalúan las propiedades del polvo de madera pulverizada mediante un molino de vibración. Se analiza, entre otras, la relación entre el tamaño de partícula y la cristalinidad.

Christakopoulos y col. (Enzyme Microb. Technol., 1991, vol. 13, págs. 272-4) describen la fermentación de la paja del trigo a etanol por *Fusarium oxisporum* F3 en un procedimiento de una sola etapa. Se informó que los rendimientos de etanol aumentaban linealmente con la disminución del índice de cristalinidad. Aproximadamente un 80% de los carbohidratos de la paja se convirtió directamente en etanol con un rendimiento de 0,28 g etanol/g de paja cuando el índice de cristalinidad se redujo al 23,6%.

50 Tassinari y col. (Biotechnology and Bioengineering, 1980, Vol. XXII, págs. 1689-1705) informan de que el tratamiento previo de molienda por compresión de la lignocelulosa es eficaz para la hidrólisis enzimática de una diversidad de fuentes de sustrato. Se informa que las reducciones en el grado de cristalinidad y en el grado de polimerización de la celulosa y la destrucción parcial de la integridad estructural de la lignocelulosa provocada por la molienda por compresión aumenta significativamente la susceptibilidad de celulosa a la hidrólisis enzimática.

Sin embargo, estos procedimientos no son satisfactorios en términos de eficacia y productividad de la sacarificación.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de sacárido, que incluye la sacarificación de la celulosa descristalizada preparada a partir de una materia prima que contiene celulosa que tiene una cristalinidad de la celulosa de tipo I superior al 33% según se ha calculado a partir de la siguiente fórmula (1):

$$\text{Cristalinidad de la Celulosa de tipo I (\%)} = \left[\frac{(I_{22,6} - I_{18,5})}{I_{22,6}} \right] \times 100 \quad (1),$$

en la que $I_{22,6}$ es la intensidad de la difracción de un plano reticular (plano 002) medida con un ángulo de difracción 2θ de 22,6° por análisis de difracción de Rayos X, y $I_{18,5}$ es la intensidad de difracción de un resto amorfo medida con un ángulo de difracción 2θ de 18,5° por análisis de difracción de Rayos X, procedimiento que contiene:

tratamiento de la materia prima que contiene celulosa mediante el uso de un molino para reducir la cristalinidad de la celulosa de tipo I de la celulosa a un 10% ó inferior, en el que la materia prima que contiene celulosa tiene un contenido de celulosa de un residuo obtenido eliminando el agua de la materia prima que contiene celulosa de un 20% en peso o superior, para preparar así la celulosa descristalizada, y provocar que una celulosa y/o una hemicelulosa actúe sobre la celulosa cristalizada, para sacarificar de ese modo la celulosa descristalizada, en el que la materia prima que contiene celulosa tiene una densidad aparente de 100 a 500 kg/m³ y un tamaño medio de partícula de 0,01 a 1 mm.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de sacárido, que incluye una reacción enzimática entre una celulosa o una enzima similar y la celulosa descristalizada, en forma de sustrato, que tiene la cristalinidad de la celulosa de tipo I y que se obtiene partir de una materia prima que contiene celulosa. El procedimiento puede producir sacárido de una manera eficaz con excelente productividad.

Los presentes inventores han descubierto que los problemas que se han mencionado anteriormente se pueden solucionar llevando a cabo un tratamiento preliminar (descristalización) de una materia prima específica que contiene celulosa en forma de material de partida por medio de un molino y, posteriormente, llevando a cabo una reacción enzimática mediante el uso de, por ejemplo, una celulasa.

De este modo, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de sacárido, que incluye la sacarificación de la celulosa descristalizada preparada a partir de una materia prima que contiene celulosa que tiene una cristalinidad de la celulosa de tipo I superior al 33% según se ha calculado a partir de la siguiente fórmula (1):

$$\text{Cristalinidad de la Celulosa de tipo I (\%)} = \left[\frac{(I_{22,6} - I_{18,5})}{I_{22,6}} \right] \times 100 \quad (1),$$

en la que $I_{22,6}$ es la intensidad de la difracción de un plano reticular (plano 002), medida con un ángulo de difracción 2θ de 22,6° por análisis de difracción de Rayos X, y $I_{18,5}$ es la intensidad de difracción de un resto amorfo como medida con un ángulo de difracción 2θ de 18,5° por análisis de difracción de Rayos X, procedimiento que contiene:

tratamiento de la materia prima que contiene celulosa usando un molino para reducir la cristalinidad de la celulosa de tipo I de la celulosa a un 10% o inferior, en el que la materia prima que contiene celulosa tiene un contenido de celulosa de un residuo obtenido eliminando el agua de la materia prima que contiene celulosa de un 20% en peso o más, para preparar de ese modo la celulosa descristalizada, y provocar que una celulosa y/o una hemicelulosa actúe sobre la celulosa cristalizada, para sacarificar de ese modo la celulosa descristalizada, en el que la materia prima que contiene celulosa tiene una densidad aparente de 100 a 500 kg/m³ y un tamaño medio de partícula de 0,01 a 1 mm.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá a continuación en detalle. Como se usa en el presente documento, el término "cristalinidad de la celulosa de tipo I" se puede mencionar simplemente como "cristalinidad."

[Materia Prima que Contiene Celulosa]

El contenido de celulosa de un residuo obtenido por eliminación del agua de la materia prima que contiene celulosa usada en la presente invención, es de un 20% en peso o superior, preferentemente de un 40% en peso o superior y más preferentemente de un 60% en peso o superior.

El contenido de la celulosa usada en la presente invención significa un contenido total de celulosa y de hemicelulosa. La materia prima que contiene celulosa usada en la presente invención no está limitada en particular. Los ejemplos de la materia prima que contiene celulosa incluyen materiales de madera tales como diversas virutas de madera, ramas podadas, restos de talado, y ramas; pulpa tal como la pulpa de madera producida a partir de materiales de

- 5 madera, y pulpa de linter de algodón obtenida de la fibra que rodea a las semillas de algodón; papel tal como periódicos, cartón corrugado, revistas, y papel sin madera; tallos u hojas de plantas tales como paja de arroz, y tallos de maíz; y cáscaras de plantas tales como paja; cáscaras de palma, y cáscaras de coco. Entre ellos, son preferentes la pulpa, el papel, los tallos o las hojas de plantas, las cáscaras de plantas, y materiales de madera, siendo más preferentes con pulpa y papel.
- 10 En los productos de pulpa disponibles en el mercado, el contenido de celulosa de un residuo obtenido por la eliminación del agua del mismo oscila generalmente del 75 al 99% en peso y la pulpa también puede contener lignina, etcétera, como otros componentes. Además, la pulpa disponible en el mercado normalmente tiene la cristalinidad de la celulosa de tipo I de un 60% o superior.

- 15 El contenido de agua de la materia prima que contiene celulosa es preferentemente de un 20% en peso o inferior, más preferentemente de un 15% en peso o inferior, incluso más preferentemente de un 10% en peso o inferior. Cuando el contenido de agua de la materia prima que contiene celulosa es de un 20% en peso o inferior, la materia prima se muele inmediatamente y se reduce inmediatamente la cristalinidad de la misma mediante el tratamiento de molienda que se menciona a continuación, por el cual se puede llevar a cabo la producción posterior de sacarído con una alta eficacia.

- 20 [Cristalinidad de la Celulosa de Tipo I]

La celulosa descristalizada preparada de acuerdo con la presente invención tiene una cristalinidad de la celulosa de tipo I reducida de un 10% o inferior. La cristalinidad de la celulosa de tipo I se calcula a partir de los valores de la intensidad de la difracción medidos por análisis de difracción de Rayos X de acuerdo con el procedimiento de Segal, y se define mediante la siguiente fórmula de cálculo (1):

$$\text{Cristalinidad de la Celulosa de tipo I (\%)} = \left[\frac{(I_{22,6} - I_{18,5})}{I_{22,6}} \right] \times 100 \quad (1),$$

- 25 en la que $I_{22,6}$ es la intensidad de la difracción de un plano reticular (plano 002) medida con un ángulo de difracción 2θ de $22,6^\circ$ por análisis de difracción de Rayos X, y $I_{18,5}$ es la intensidad de difracción de un resto amorfo medida con un ángulo de difracción 2θ de $18,5^\circ$ por análisis de difracción de Rayos X.

- 30 Una cristalinidad del 33% o inferior mejora la reactividad química de la celulosa. Por ejemplo, cuando se añade una base a la celulosa después de la producción de los éteres de celulosa, la conversión de la celulosa en celulosa básica se puede realizar inmediatamente, dando como resultado una tasa mejorada de la conversión de la reacción en una reacción de eterificación de la celulosa. Desde este punto de vista, la cristalinidad de la celulosa descristalizada es de un 10% o inferior, más preferentemente un 0%, lo que indica que no se detecta cristal de celulosa de tipo I en el análisis de la celulosa. Mientras tanto, en ocasiones se puede calcular la cristalinidad de la
- 35 celulosa de tipo I definida mediante la fórmula de cálculo anterior (1) como un valor negativo (valor menos). La cristalinidad de la celulosa de tipo I expresada por dicho valor negativo se considera como un 0%.

- La cristalinidad de la celulosa de tipo I usada en el presente documento significa una relación del cristal de tipo I de la celulosa en base a una cantidad total de una región cristalina de la celulosa. También, la celulosa de tipo I significa una estructura cristalina de la celulosa natural. La cristalinidad de la celulosa tiene alguna relación con las
- 40 propiedades físicas y químicas de la misma. Mientras que la cristalinidad aumenta, la dureza, densidad, etcétera de la celulosa aumentan, en virtud de la alta cristalinidad y de un resto menos amorfo de la misma, pero el alargamiento, la blandura, la solubilidad en agua o en disolventes y la reactividad química disminuyen.

[Tratamiento de Descristalización]

- 45 En la presente invención, la materia prima que contiene celulosa tiene una densidad aparente de 100 a 500 kg/m³ y un tamaño medio de partícula de 0,01 a 1 mm se trata por medio de un molino para reducir la cristalinidad de la celulosa de tipo I de la celulosa contenida en ella hasta un 10% ó inferior. Cuando se emplea una materia prima que contiene celulosa que tiene una densidad aparente inferior a 100 kg/m³, preferentemente se lleva a cabo un tratamiento preliminar, para aumentar de ese modo la densidad aparente de 100 a 500 kg/m³. De este modo, mediante el tratamiento de la materia prima que contiene celulosa por medio del molino, la materia prima se puede
- 50 moler adicionalmente para reducir su cristalinidad, llevando a cabo de ese modo una descristalización eficaz de la celulosa.

En la presente invención, se usa preferentemente como molino un molino de tipo medio. Los molinos de tipo medio

se clasifican en molinos de tipo giratorio y molinos de tipo de agitación media. Los ejemplos de los molinos de tipo giratorio incluyen un molino de bolas, un molino de vibración, un molino planetario, y un molino de fluido centrífugo. Entre estos molinos de tipo giratorio, desde los puntos de vista de una buena eficacia de la molienda y de una buena productividad, es preferente el molino de vibración. Los ejemplos de los molinos de tipo de agitación media incluyen los molinos de tipo torre tales como molino de torre; molinos de tipo tanque de agitación tal como un Attritor, un Aquamizer, y un molino de Arena; los molinos de tipo tanque de flujo tales como un molino Visco y un molino Pearl; molinos de tipo tubo de flujo; molinos de tipo anular tales como un molino de bolas laterales; y molinos dinámicos de tipo continuo. Entre estos molinos de tipo de agitación media, desde los puntos de vista de una alta eficacia de molienda y una buena productividad, son preferentes los molinos de tipo tanque de agitación. Cuando se emplea un molino de tipo de agitación media, la velocidad periférica de las cuchillas de agitación del mismo es preferentemente de 0,5 a 20 m/s, más preferentemente de 1 a 15 m/s.

Los tipos de molinos anteriores se entenderán haciendo referencia a "Progress of Chemical Engineering; 30ª Colección; Control of Microparticles", Institute of Chemical Engineering, Tokai Division, 10 de Octubre de 1996, Maki-Shoten. El procedimiento del tratamiento puede ser un procedimiento discontinuo o un procedimiento continuo.

Los ejemplos de los medios (medios de molienda) usados en los molinos incluyen bolas, vástagos, y tubos. Entre estos medios, desde los puntos de vista de la alta eficacia de la molienda y una buena productividad, son preferentes las bolas y los vástagos.

El material de los medios usados en los molinos no está limitado en particular. Los ejemplos del material de los medios incluyen hierro, acero inoxidable, alúmina, circonia, carburo de silicio, nitruro de silicio, y cristal.

Cuando se emplea un molino de vibración como molino y bolas como soporte del mismo, el diámetro externo de las bolas es preferentemente de 0,1 a 100 mm, más preferentemente de 0,5 a 50 mm. Cuando el tamaño de las bolas entra dentro del intervalo especificado anteriormente, se puede alcanzar la fuerza de molienda deseada y la celulosa se puede descristalizar de manera eficaz sin contaminación de la materia prima que contiene celulosa que de otro modo se podría provocar por la inclusión de fragmentos de las bolas en la misma.

De acuerdo con la presente invención, una materia prima que contiene celulosa se muele por medio de un molino de vibración equipado con vástagos, que es preferente, mediante el que se puede descristalizar la celulosa contenida en la materia prima de manera eficaz.

Los ejemplos de molino de vibración que usa vástagos como medios de molienda del mismo incluyen un molino de vibración disponible en Chuo Kakohki Co., Ltd., un molino de vibración con vástagos de tamaño pequeño "Modelo 1045" disponible en Yoshida Seisakusho Co., Ltd., un molino de vibración de taza "Modelo P-9" disponible en Fritsch Inc. de Alemania, y un molino de vibración de tamaño pequeño "Tipo NB-O" disponible en Nitto Kagaku Co., Ltd. El procedimiento del tratamiento usado en estos molinos de vibración puede ser un procedimiento discontinuo o un procedimiento continuo.

Los vástagos a llenar en el molino de vibración son medios de molienda de tipo barra, y preferentemente, cada vástago tiene una forma de sección tal como una forma poligonal; por ejemplo, una forma cuadrada o una forma hexagonal, una forma circular, una forma elíptica, etcétera.

Cada uno de los vástagos a llenar en el molino de vibración tiene un diámetro externo de preferentemente 0,5 a 200 mm, más preferentemente de 1 a 100 mm, incluso más preferentemente de 5 a 50 mm. La longitud de los respectivos vástagos no está limitada en particular siempre que los vástagos sean más cortos que la longitud del recipiente del molino. Cuando el tamaño de los vástagos entra dentro del intervalo que se ha especificado anteriormente, se puede lograr la fuerza de molienda deseada y la celulosa se puede descristalizar de forma eficaz sin contaminación de la celulosa pulverizada que de otro modo podría provocar la inclusión de fragmentos de los vástagos en ella.

La relación de llenado de los medios tales como bolas y vástagos en el molino varía dependiendo de la clase de molino de vibración usado, y preferentemente es del 10 al 97%, más preferentemente del 15 al 95%. Cuando la relación de llenado entra dentro del intervalo que se ha especificado anteriormente, la frecuencia de contacto entre la materia prima que contiene celulosa y los medios aumenta, y la eficacia de la molienda de la misma se puede potenciar sin inhibir el movimiento de los medios de molienda. La "relación de llenado" usada en el presente documento significa una relación del volumen aparente de los medios al volumen del molino.

El tiempo de tratamiento en el molino varía dependiendo de la clase de molino como de la clase, tamaño, y relación de llenado bolas y vástagos y, por lo tanto, no está limitada en particular. Desde el punto de vista de la reducción de la cristalinidad de la celulosa, el tiempo de tratamiento es preferentemente de 0,01 a 72 horas, más preferentemente de 0,01 a 50 horas, incluso más preferentemente de 0,05 a 20 horas, todavía más preferentemente de 0,1 a 10 horas. La temperatura de tratamiento en el molino tampoco está limitada en particular, y es preferentemente de 5 a 250 °C, más preferentemente de 10 a 200 °C desde el punto de vista de la prevención del deterioro por el calor.

Cuando se lleva a cabo el procedimiento del tratamiento anterior, la celulosa descristalizada que tienen la cristalinidad de la celulosa de tipo I de un 33% o inferior se puede producir de forma eficaz a partir de la materia

prima que contiene celulosa. Además, después del tratamiento por medio del molino, la materia prima que contiene celulosa se puede tratar en condiciones secas sin permitir que el material molido se adquiera al interior del molino.

El tamaño medio de partícula de la celulosa descristalizada resultante es preferentemente de 25 a 150 μm , preferentemente de 30 a 100 μm , desde los puntos de vista de la buena reactividad química y de la buena propiedad de manejo cuando se emplea la celulosa descristalizada en forma de una materia prima industrial. En particular, se puede evitar que la celulosa descristalizada que tiene un tamaño medio de partícula de 25 μm o superior forme un así llamado "conglomerado o harina sin disolver" cuando entra en contacto con un líquido tal como el agua.

Para llevar a cabo de forma eficaz la molienda y la descristalización en la presente invención, la densidad aparente de la materia prima que contiene celulosa alimentada al molino es de 100 kg/m^3 o superior, más preferentemente de 120 kg/m^3 o superior, todavía más preferentemente 150 kg/m^3 ó superior. Cuando la densidad aparente de la materia prima que contiene celulosa es 100 kg/m^3 ó superior, la materia prima que contiene celulosa tiene un volumen apropiado, dando como resultado una propiedad de manejo mejorada. Además, en tal caso, se puede aumentar la cantidad de la materia prima cargada en el molino, dando como resultado una capacidad de tratamiento mejora del molino. Por otro lado, el límite superior de la densidad aparente de la materia prima que contiene celulosa alimentada al molino es de 500 kg/m^3 ó inferior, más preferentemente de 400 kg/m^3 ó inferior, todavía más preferentemente de 350 kg/m^3 ó inferior, desde los puntos de vista de una buena propiedad de manejo y de una buena productividad. Desde estos puntos de vista, la densidad aparente de la materia prima que contiene celulosa alimentada al molino es de 100 a 500 kg/m^3 , más preferentemente de 120 a 400 kg/m^3 , todavía más preferentemente de 150 a 350 kg/m^3 .

El tamaño medio de partícula de la materia prima que contiene celulosa alimentada al molino es de 0,01 a 1 mm, desde el punto de vista de la dispersión eficaz de un material para la molienda en el molino. Cuando la materia prima que contiene celulosa tiene un tamaño medio de partícula de 1 mm ó inferior, se puede dispersar el material para la molienda que se alimenta al molino de forma eficaz en el molino, y moler hasta un tamaño deseado de partícula sin necesitar un período de tiempo prolongado. Por otro lado, el límite inferior del tamaño medio de partícula de la materia prima que contiene celulosa alimentada al molino es 0,01 mm ó superior, en vista de la buena productividad. Desde estos puntos de vista, el tamaño medio de partícula de la materia prima que contiene celulosa alimentada al molino es más preferentemente de 0,01 a 0,7 mm, todavía más preferentemente de 0,05 a 0,5 mm. Mientras tanto, la densidad aparente y el tamaño medio de partícula que se han mencionado anteriormente se pueden medir mediante los procedimientos descritos en los Ejemplos a continuación.

[Tratamiento Preliminar antes de la Molienda]

En la presente invención, la materia prima que contiene celulosa que se alimenta al molino que se ha mencionado anteriormente se somete preferentemente a un tratamiento preliminar. Por ejemplo, la materia prima que contiene celulosa se trata por medio de una extrusora, a través de la cual se puede ajustar la densidad aparente y el tamaño medio de partícula de la materia prima que contiene celulosa para entrar dentro de los intervalos preferentes.

Antes de la carga de la materia prima que contiene celulosa en la extrusora, el material se muele preferentemente de forma gruesa en virutas. El tamaño de las virutas molidas de forma gruesa es preferentemente de 1 a 50 mm, más preferentemente de 1 a 30 mm. Cuando se emplea la materia prima que contiene celulosa de tipo virutas molidas de forma gruesa que tiene un tamaño de 1 a 50 mm, el tratamiento extrusor se puede llevar a cabo fácilmente de una manera eficaz, reduciendo de ese modo la carga requerida para la molienda.

La materia prima que contiene celulosa se puede moler de forma gruesa por medio de un triturador o de una cuchilla giratoria. Cuando se emplea una cuchilla giratoria, se puede controlar el tamaño del material molido de forma gruesa resultante modificando el tamaño de la malla de un tamiz usado en ello. El tamaño de la malla del tamiz preferentemente es de 1 a 50 mm, más preferentemente de 1 a 30 mm. Cuando se emplea un tamiz que tiene un tamaño de malla de 1 mm ó superior, se puede obtener el material molido de forma gruesa resultante con un volumen adecuado, dando como resultado una propiedad de manejo del mismo mejorada. Cuando se emplea un tamiz que tiene un tamaño de malla de 50 mm ó superior, la materia prima que contiene celulosa tiene un tamaño adecuado para el tratamiento de molienda posterior, dando como resultado una carga reducida para la molienda.

Cuando la materia prima que contiene celulosa (preferentemente la materia prima molida de forma gruesa que contiene celulosa) se trata mediante una extrusora, se puede aplicar una fuerza de cizallamiento de compresión a la materia prima que contiene celulosa para romper la estructura cristalina de la celulosa y moler la materia prima que contiene celulosa hasta un polvo.

En el procedimiento de molienda de forma mecánica de la materia prima que contiene celulosa aplicando una fuerza de cizallamiento de compresión a ella, si se usa un molino de tipo impacto que generalmente se ha empleado en las técnicas convencionales, tal como un molino cortador, un molino de martillos, un molino de púas, etcétera, el material molido tiende a sufrir floculación y, por lo tanto, un volumen muy alto, dando como resultado una propiedad de mal manejo y deterioro de la capacidad del tratamiento en base al peso. Por otro lado, la materia prima que contiene celulosa molida por medio de una extrusora puede presentar un volumen deseado y un tamaño medio de partícula, dando como resultado una propiedad de manejo de la misma mejorada.

La extrusora puede ser de tipo de tornillo único o de tipo de doble tornillo. Desde el punto de vista de la mejora de la capacidad de transporte, etcétera, de estos aparatos, se usa preferentemente la extrusora de doble tornillo.

Como extrusora de doble tornillo, se puede usar una extrusora de doble tornillo conocida convencionalmente, en la que los dos tornillos están insertados de manera giratoria en un cilindro. Las direcciones de rotación de los dos tornillos en la extrusora de doble tornillo pueden ser idénticas u opuestas. Desde el punto de vista de la mejora de la capacidad de entrega, etcétera, los dos tornillos giran preferentemente en la misma dirección.

El mallado de los tornillos en la extrusora puede ser de cualquier tipo de mallado completo, tipo de mallado parcial y un tipo de no mallado. Desde el punto de vista de la mejora de la capacidad del tratamiento, etcétera, es preferente el tipo de mallado completo o el tipo de mallado parcial.

Desde el punto de vista de la aplicación de una fuerza de cizallamiento de compresión fuerte a la materia prima que contiene celulosa, la extrusora está provista preferentemente con un así llamado segmento del disco de amasado en cualquier porción de los respectivos tornillos de la misma.

El segmento del disco de amasado está constituido por una pluralidad de discos de amasado que se disponen continuamente en combinación mientras que sus posiciones se compensan en una fase constante; por ejemplo, a intervalos de 90° es capaz de aplicar una fuerza de cizallamiento fuerte a la materia prima que contiene celulosa con la rotación de los tornillos pasando de manera forzada la materia prima a través de un hueco estrecho entre los discos de amasado o entre el disco de amasado y el cilindro. El tornillo tiene preferentemente una estructura tal que los segmentos de los discos de amasado y los segmentos del tornillo en una relación alterna entre sí. En la extrusora de doble tornillo, los dos tornillos son preferentemente idénticos entre sí en su estructura.

Después del tratamiento por medio de una extrusora, es preferente que la materia prima que contiene celulosa, preferentemente la materia prima que contiene celulosa molida de forma gruesa, se cargue en la extrusora y se trate continuamente en ella. La tasa de cizallamiento usada en el tratamiento es preferentemente 10 s^{-1} ó superior, más preferentemente de 20 a 30000 s^{-1} , incluso más preferentemente de 50 a 3000 s^{-1} . Cuando la tasa de cizallamiento es 10 s^{-1} ó superior, la molienda de la materia prima que contiene celulosa avanza de manera eficaz. Las otras condiciones del tratamiento no están limitadas en particular. La temperatura del tratamiento es preferentemente de 5 a 200°C .

El número de pases de la materia prima que contiene celulosa a través de la extrusora para lograr un efecto suficiente puede ser solamente uno (pase). Desde el punto de vista de la reducción de la cristalinidad y del grado de polimerización de la materia prima que contiene celulosa, si no es satisfactorio un tratamiento de un pase, se llevan a cabo preferentemente 2 ó más pases. También, en vista de una buena productividad, el número de pases de la materia prima que contiene celulosa a través de la extrusora es preferentemente de 1 a 10 (pases). Cuando los pases se repiten a través de la extrusora, las partículas gruesas contenidas en la materia prima se muelen, teniendo de ese modo una materia prima pulverizada que contiene celulosa que tiene una pequeña variación en el tamaño de partícula. Cuando se llevan a cabo 2 ó más pases, se pueden disponer una pluralidad de extrusoras en serie, en vista de la alta capacidad de producción.

[Sacarificación mediante el uso de Enzima tal como Celulasa]

Ya que la celulosa descristalizada producida mediante el tratamiento que se ha mencionado anteriormente tiene una baja cristalinidad, la celulosa se puede formar rápidamente, a través de un tratamiento enzimático mediante el uso de una celulasa, una mezcla de glucosa y oligosacáridos tales como celobiosa o celotriosa con una alta eficacia. La sacarificación se lleva a cabo preferentemente para formar monosacáridos, considerando que el producto de sacarificación se somete a la fermentación de etanol o la fermentación láctica después de la sacarificación. Como se usa en el presente documento, el término "celulasa" se refiere a las enzimas que hidrolizan un enlace glicosídico de β -1,4-glucano de celulosa y de forma colectiva se refiere a las enzimas que incluyen endoglucanasa, exoglucanasa, celobiohidrasa, y β -glucosidasa. Cuando se hace que una hemicelulasa tal como xilanasa actúe junto con celulasa, se puede potenciar la eficacia de la sacarificación.

No se impone ninguna limitación en particular a la celulasa y a la hemicelulasa empleadas en la sacarificación y se pueden emplear productos comerciales de celulasa y los obtenidos a partir de animales, plantas y microorganismos. Los ejemplos de la celulasa incluyen productos de celulasa derivados de Trichoderma reesei tal como Celluclast 1,5 I (producto de Novozymes); celulasa derivada de la cepa KSM-N145 (FERM P-19727) de Bacillus sp.; celulasa derivada de las cepas KSM-N252 (FERM P-17474) de Bacillus sp., KSM-N115 (FERM P-19726) de Bacillus sp., KSM-N440 (FERM P-19728) de Bacillus sp., KSM-N659 (FERM P-19730) de Bacillus sp., etcétera; mezclas de celulasa derivadas de Trichoderma viride, Aspergillus aculeatus, Clostridium thermocellum, Clostridium stercorarium, Clostridium josui, Cellulomonas fimi, Acremonium cellulolyticus, Irpep lacteus, Aspergillus niger y Humicola insolens; y una celulasa resistente al calor derivada de Picrococcus horikoshii. Entre ellas, se usan preferentemente las celulasas derivadas de Trichoderma reesei, Trichoderma viride o Humicola insolens (por ejemplo, Celluclast 1,5 I (producto de Novozymes), TP-60 (producto de Meiji Seika Kaisha, Ltd.), o Ultraflo L (producto de Novozymes), para producir de ese modo sacáridos de manera eficaz.

Los ejemplos de la hemicelulasa incluyen una xilanasa derivada de Bacillus sp. KSM-N546 (FERM P-19729);

xilanasas derivadas de Aspergillus niger, Trichoderma viride, Humicola insolens y Bacillus alcalophilus; y xilanasas derivadas del género Thermomyces, Aureobasidium, Streptomyces, Clostridium, Thermotoga, Thermoascus, Caldocellum y Thermomonospora. Como alternativa, también se puede emplear una enzima contenida en las mezclas de celulasa que se han mencionado anteriormente y que tiene una actividad hemicelulasa.

- 5 Estas enzimas se pueden usar de forma única y, más preferentemente, las enzimas se usan en combinación para lograr una producción más eficaz de sacáridos. A través de la adición de una celulasa específica tal como β -glucosidasa a estas enzimas, la eficacia de la producción de sacáridos se puede mejorar. Los ejemplos de la β -glucosidasa añadida a estas enzimas incluyen un enzima derivada de Aspergillus niger (por ejemplo, Novozyme 188 (producto de Novozymes) o β -glucosidasa (producto de Megazyme)) y enzimas derivadas de Trichoderma reesei y Penicillium emersonii.

- 10 Las condiciones de reacción en las que se lleva a cabo la sacarificación mediada por la celulasa de la celulosa descristalizada producida mediante el tratamiento que se ha mencionado anteriormente se pueden seleccionar apropiadamente, dependiendo de la cristalinidad de la celulosa descristalizada obtenida mediante el tratamiento preliminar y de la enzima usada. Por ejemplo, cuando se emplea Celluclast 1,5 l (producto de Novozymes) como la
- 15 celulasa y como sustrato se emplea la celulosa derivada de la pulpa y que tiene cristalinidad del 0%, se añade Celluclast 1,5 l a una suspensión del sustrato del 0,5 al 20% (p/v) para ajustar la concentración enzimática del 0,001 al 15% (v/v) (del 0,00017 al 2,5% en forma de proteína) y la reacción enzimática se lleva a cabo en un tampón en el que el pH se ajusta de 2 a 10 (preferentemente el pH se selecciona apropiadamente dependiendo del tipo de enzima empleada y el pH es preferentemente de 3 a 7, particularmente preferentemente cerca de 5 en el caso de Celluclast
- 20 1,5 l), a una temperatura de reacción de 10 a 90 °C (preferentemente la temperatura se selecciona apropiadamente dependiendo del tipo de enzima empleada y la reacción se lleva a cabo preferentemente de 20 a 70 °C, en particular preferentemente aproximadamente 50 °C en el caso de Celluclast 1,5 l), durante 30 minutos a 5 días, más preferentemente de 0,5 a 3 días, para producir sacárido de ese modo.

Ejemplos

- 25 Se midieron el tamaño medio de partícula, la densidad aparente y la intensidad de la difracción de Rayos X de la celulosa descristalizada o de la materia prima que contiene celulosa y el contenido de celulosa de la materia prima mediante los siguientes procedimientos. La sacarificación de celulosas tal como la celulosa descristalizada se llevó a cabo en las siguientes condiciones.

(1) Medida del Tamaño Medio de Partícula

- 30 El tamaño medio de partícula se midió por medio de un dispositivo para la medición de la distribución del tamaño de partícula de tipo difracción/dispersión "LA-920" disponible en Horiba, Ltd. Después de la medida, una muestra se sometió a un tratamiento ultrasónico durante 1 min antes de la medición del tamaño de partícula de la misma y después, usando agua como medio de dispersión, se midió el diámetro medio de la muestra a 25 °C.

(2) Medida de la Densidad Aparente

- 35 La densidad aparente se midió usando un "Medidor de Polvo" disponible en Hosokawa Micron Corporation. Después de la medida, se hizo caer una muestra a través de un conducto en una pantalla que se hace vibrar y se recibe en un recipiente patrón (que tiene una capacidad de 100 ml) para medir el peso de la muestra en el recipiente y calcular la densidad aparente de la misma a partir del valor medio.

(3) Medida de las Intensidades por Difracción de Rayos X

- 40 La cristalinidad de la celulosa de tipo I de una muestra se calculó a partir de las intensidades por difracción de Rayos X de la misma que se midieron en las siguientes condiciones mediante un "difractómetro de Rayos X Rigaku RINT 2500VC" disponible en Rigaku Corporation, de acuerdo con la fórmula de cálculo anterior (1).

Condiciones de Medida:

- 45 Fuente de Rayos X: Cu/radiación $K\alpha$; voltaje del tubo: 40 kV; corriente del tubo: 120 mA; e intervalo de medida: $2\theta =$ de 5 a 45°. La muestra a medir se preparó a través de compresión para formar sedimentos, cada uno con un área de 320 mm² y un espesor de 1 mm. La velocidad del análisis por Rayos X fue 10°/min.

(4) Medida del Contenido de Agua

Se midió el contenido de agua a 150 °C por medio de un analizador de humedad por infrarrojos "FD-610" disponible en Kett Electric Laboratory.

- 50 (5) Medida del Contenido de Celulosa

Cada una de las muestras de materia prima que contiene celulosa se sometió a extracción Soxhlet con una mezcla de disolventes etanol-benceno (1:1) durante 6 horas y adicionalmente con etanol durante 4 horas. La muestra extraída se secó al vacío a 60 °C. Se añadieron a la muestra seca (2,5 g), agua (150 ml), clorito sódico (1,0 g) y

ácido acético (0,2 ml) y la mezcla se calentó de 70 a 80 °C durante una hora. Posteriormente, se repitió la adición de clorito sódico y de ácido acético y el calentamiento de 3 a 4 veces hasta que se eliminó el color de la muestra. El residuo resultante de color blanco se filtró a través de un filtro de cristal (1G-3), seguido de lavado secuencialmente con agua fría y acetona. El producto se secó a 105 °C hasta que el peso del mismo alcanzó un valor constante, después se midió el peso del residuo. Se calculó el contenido de celulosa en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de celulosa (\% en peso)} = [\text{peso del residuo (g)} / \text{cantidad de muestra recogida (g)}] \times 100$$

(6) Reacción de sacarificación

La reacción de sacarificación en presencia de una enzima se llevó a cabo en las siguientes condiciones. Específicamente, se suspendió una cantidad apropiada de un sustrato (celulosa pulverizada o celulosa descristalizada) en una mezcla de reacción enzimática (3 ml) (que contenía tampón citrato 100 mM (pH: 5,0) y 30 µg/ml de tetraciclina (antiséptico) y se colocó en un tubo con tapón de rosca (Nº 3, φ: 21 x 45 mm, producto de Maruemu Corporation) en los Ejemplos 2-1 y 2-2 y en el Ejemplo Comparativo 2-1 ó en un tubo con tapón de rosca (Nº 5, φ: 27 x 55 mm, producto de Maruemu Corporation) en los otros Ejemplos y Ejemplos Comparativos). Después, se añadió a la suspensión una cantidad apropiada de una enzima y la mezcla se agitó con sacudidas a 50 °C por medio de un agitador termostático (Modelo: BR-15CF, producto de TAITEC Corporation) a 150 rpm de manera que la reacción se llevó a cabo durante de 6 a 75 horas. Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se separó en un precipitado y el sobrenadante mediante centrifugación (17000 x g, 5 min). El peso del precipitado seco y de la cantidad de sacárido o de sacárido reductor liberado en el sobrenadante se determinó de manera cuantitativa mediante el procedimiento con fenol-ácido sulfúrico, el procedimiento DNS, o el procedimiento HPLC, que se describe a continuación. Como un control, se analizó de la misma manera una mezcla de reacción enzimática sin reaccionar.

(7) Determinación Cuantitativa de Sacárido mediante el Procedimiento de Fenol-Ácido Sulfúrico (Texto del Experimento de Bioingeniería, Baifu-kan)

Cada sobrenadante (0,1 ml) se diluyó de forma apropiada con agua de intercambio iónico y se añadió una solución (0,1 ml) de fenol al 5% (p/p) al sobrenadante diluido, seguido de mezcla. Se añadió adicionalmente a esto ácido sulfúrico (0,5 ml), seguido de mezcla suficiente. La mezcla resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 20 minutos, y se analizó por colorimetría a una longitud de onda de 490 nm. Se calculó la cantidad total de sacárido contenida en el sobrenadante mediante una curva de calibración obtenida mediante el uso de glucosa como un sacárido patrón.

(8) Determinación Cuantitativa de Sacáridos mediante el Procedimiento DNS ("Determinación de azúcar reductor," Bioquímica Experimental, Gakkai Shuppan Center)

Se añadió una cantidad apropiada de cada sobrenadante a una solución de DNS (1 ml) (ácido 3,5-dinitrosalicílico al 0,5%, tetrahidrato de tartrato de sodio y potasio al 30%, e hidróxido sódico al 1,6%) y la mezcla se calentó a 100 °C durante 5 minutos para el desarrollo del color. Después de un periodo de refrigeración, la mezcla se analizó por colorimetría a una longitud de onda de 535 nm. Se calculó la cantidad de sacárido reductor contenido en el sobrenadante mediante una curva de calibración obtenida mediante el uso de glucosa como un sacárido patrón. Téngase en cuenta que, ya que un determinado tipo los sacáridos formados presentan una intensidad del desarrollo del color que no es igual al de la glucosa, la cantidad de sacárido reductor determinada puede variar del valor determinado por HPLC.

(9) Determinación Cuantitativa de Sacáridos mediante el Procedimiento de HPLC

La determinación se llevó a cabo mediante un Sistema de Cromatografía DX500 (producto de Dionex Corporation) (columna: CarboPac PA1 (Dionex Corporation, 4 x 250 mm) y detector: detector de amperometría pulsada ED40). Se emplearon los siguientes eluyentes: (A) solución de hidróxido sódico 100 mM, (B) solución de hidróxido sódico 100 mM que contenía acetato sódico 1 M y (C) agua ultrapura. El análisis del azúcar se llevó a cabo en condiciones de gradiente lineal: A al 10%-C al 90% (en inyección) y A al 95%-B al 5% (de 0 a 15 min). Como patrones, glucosa al 0,01% (p/v) (producto de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), xilosa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), xilobiosa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y celobiosa (producto de Seikagaku Corporation).

(10) Determinación Cuantitativa de Proteína

Se empleó un Kit de Ensayo de Proteína A DC (producto de Bio-Rad Laboratories) y se calculó el peso de la proteína mediante una curva de calibración obtenida mediante el uso de albúmina de suero bovino como una proteína estándar.

Ejemplo de Producción 1-1

[Tratamiento Triturador]

Se cortó una pasta de madera de tipo laminar como materia prima que contiene celulosa ["Éter Ultra Bear Azul" disponible en Borregaard, tamaño: 800 mm x 600 mm x 1,5 mm; cristalinidad: 81%; contenido de celulosa: 96% en peso; contenido de agua: 7% en peso] mediante una trituradora "MSX2000-IVP440F" disponible en Meikoshokai Co., Ltd., para preparar virutas de pulpa con un tamaño de aproximadamente 10 mm x 5 mm x 1,5 mm.

5 [Tratamiento con Molino de Vibración]

Las virutas de pulpa resultantes (100 g) se cargaron en un molino de vibración "MB-1" disponible en Chuo Kakohki Co., Ltd., (capacidad total del recipiente: 3,5 l) y se trató en él con una amplitud de vibración de 8 mm y una velocidad de rotación circular de 1200 cpm durante 3 h en condiciones tales que los 16 vástagos de acero inoxidable cada uno con una sección de forma circular, un diámetro de 25 mm y una longitud de 218 mm se colocaron en el
10 molino de vibración (relación de llenado: 49%). La celulosa descristalizada obtenida después del tratamiento usando el molino de vibración tenía un tamaño medio de partícula de 80 μm . También, la temperatura de la celulosa descristalizada resultante fue tan alta como 85 °C debido al calor generado en el tratamiento. Después de la finalización del tratamiento, no se observó pulpa adherida a la superficie interior de la pared y en el fondo del molino de vibración. La celulosa descristalizada obtenida de este modo se sacó del molino de vibración y se sometió a
15 medidas de un tamaño medio de partícula y de la intensidad de la difracción de Rayos X de la misma. Se calculó la cristalinidad de la celulosa descristalizada a partir de la intensidad medida por difracción de Rayos X. Los resultados se muestran en la Tabla 1-1.

Ejemplo de Producción 1-2

[Tratamiento Extrusor]

20 Las virutas de pulpa, que se habían obtenido a partir de la misma pasta de madera de tipo laminar tanto mediante el mismo procedimiento como el empleado en el Ejemplo de Producción 1-1, se cargó en un extrusora de doble tornillo "EA-20" disponible en Suehiro EPM Corporation, a una tasa de alimentación de 2 kg/h y se pasó a través de ella una vez (un pase) a una velocidad de cizallamiento de 660 s^{-1} y a una velocidad de rotación del tornillo de 300 rpm mientras que fluía el agua de refrigeración desde fuera a través del mismo. Mientras tanto, la extrusora de doble
25 tornillo usada fue de un mallado completo y de un tipo de rotación unidireccional en el que los tornillos colocados en dos filas fueron provistas cada una con un segmento de tornillo con un diámetro de tornillo de 40 mm y un segmento de disco de amasado de una combinación de 12 bloques de discos de amasado descentrados entre sí a intervalos de 90° y los dos tornillos tenían la misma construcción. Además, la temperatura en la extrusora de doble tornillo aumentó de 30 a 70 °C debido al calor generado en el tratamiento.

30 Como resultado, se confirmó que la pulpa obtenida después del tratamiento extrusor tenía un tamaño medio de partícula de 121 μm y una densidad aparente de 254 kg/m^3 .

[Tratamiento con Molino de Vibración]

La pulpa obtenida mediante el tratamiento extrusor se sometió a molino de vibración de una forma similar a la de la empleada en el Ejemplo de Producción 1-1, para producir de ese modo celulosa descristalizada. Después de la
35 finalización de la trituración, no se observó pulpa adherida en la superficie interna de la pared ni en el fondo del molino de vibración. Los resultados se muestran en la Tabla 1-1.

Ejemplo de Producción 1-3

Se repitió el mismo procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo de Producción 1-2 excepto en el llenado de los
40 13 vástagos de acero inoxidable cada uno con una sección de forma circular, un diámetro de 30 mm y una longitud de 218 mm en el molino de vibración (relación de llenado: 57%) y con el molino de vibración funcionando durante 1 h, para obtener de ese modo celulosa descristalizada. Los resultados se muestran en la Tabla 1-1.

Ejemplo de Producción 1-4

Se repitió el mismo procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo de Producción 1-2 excepto en el llenado de los
45 14 vástagos de acero inoxidable en el molino de vibración (relación de llenado: 62%), para obtener de ese modo celulosa descristalizada. Los resultados se muestran en la Tabla 1-1.

Ejemplo de Producción 1-5

Se repitió el mismo procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo de Producción 1-2 excepto en el llenado de los 8
50 vástagos de acero inoxidable cada uno con un diámetro de 36 mm y una longitud de 218 mm en el molino de vibración (relación de llenado: 51%) y con el molino de vibración funcionando durante 1 h, para obtener de ese modo celulosa descristalizada. Los resultados se muestran en la Tabla 1-1.

Ejemplo de Producción 1-6

Se repitió el mismo procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo de Producción 1-2 excepto en el llenado de los 11 vástagos de acero inoxidable cada uno con un diámetro de 30 mm y una longitud de 218 mm en el molino de

vibración (relación de llenado: 48%) y con el molino de vibración funcionando durante 3 h, para obtener de ese modo celulosa descristalizada. Los resultados se muestran en la Tabla 1-1.

[Tabla 1]

Tabla 1-1

		Ejemplo de Producción					
		1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	1-6
Trituración		si	si	si	si	si	si
Tratamiento con extrusora de doble tornillo	Tratamiento	no	si	si	si	si	si
	Tasa de cizallamiento (s^{-1})		660	660	660	660	660
	Tamaño medio de partícula (μm)		121 ^{*1}	121 ^{*1}	121 ^{*1}	121 ^{*1}	121 ^{*1}
	Densidad aparente (kg/m^3)		254 ^{*1}	254 ^{*1}	254 ^{*1}	254 ^{*1}	254 ^{*1}
Tratamiento con molino de vibración	Forma de los soportes de molienda en el recipiente	vástagos	vástagos	vástagos	vástagos	vástagos	vástagos
	Diámetro del vástago (mm)	25	25	30	25	36	30
	Número de vástagos	16	16	13	14	8	11
	Cantidad de pulpa cargada (g)	100	100	100	100	100	100
	Tiempo de tratamiento (h)	2	2	1	2	1	3
Evaluación	Cristalinidad de la Celulosa de tipo I (%)	0	0	0	0	0	0
	Aparición de depósito después de la molienda ^{*2}	no	no	no	no	no	no
	Tamaño de partícula de la celulosa descristalizada (μm) ^{*3}	80	57	68	88	55	57
*1: Tamaño medio de partícula o densidad aparente o pulpa después del tratamiento extrusor de doble tornillo							
*2: Presencia o ausencia de pulpa adherida en el molino de vibración después del tratamiento de molino de vibración							
*3: Tamaño medio de partícula de la celulosa descristalizada obtenida después del tratamiento de molino de vibración							

5

Ejemplo de Producción Comparativo 1-1

El mismo tratamiento triturador que se ha descrito en el Ejemplo de Producción 1-1 se llevó a cabo para obtener virutas de pulpa. Después, las virutas de pulpa resultantes (100 g) se cargaron en un molino de volteo "Pot Mill ANZ-51S" disponible en Nitto Kagaku Co., Ltd., (capacidad del recipiente: 1,0 l; relleno con bolas de circonia de ϕ 10 mm: 1,8 kg; relación de llenado: 53%) y se trató mediante el molino de volteo a una velocidad de rotación de 100 rpm durante 48 h. Se confirmó que la pulpa no se transformó en polvo y que aún se mantuvo básicamente en un estado de virutas. La cristalinidad de la pulpa obtenida se calculó a partir de las intensidades medidas por difracción de Rayos X de la misma mediante el procedimiento que se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 1-2.

10

15 Ejemplo de Producción Comparativo 1-2

Se llevó a cabo el mismo tratamiento triturador que se ha descrito en el Ejemplo de Producción 1-1 para obtener virutas de pulpa. Después, las virutas de pulpa resultantes (500 g) se cargaron en un molino de cuchillas "Modelo POWER MILL P-02S" disponible en Dalton Co., Ltd. y se trató allí dentro a una velocidad de rotación de 3000 rpm durante 0,5 h. Como resultado, el producto resultante molido se floculó, no pudiendo obtener de este modo celulosa

descristalizada. Los resultados se muestran en la Tabla 1-2.

Ejemplo de Producción Comparativo 1-3

5 El mismo tratamiento triturador que se ha descrito en el Ejemplo de Producción 1-1 se llevó a cabo para obtener virutas de pulpa. Después, las virutas de pulpa resultantes (500 g) se cargaron en un molino de martillos "SAMPLE-MILL" disponible en Dalton Co., Ltd. y se trató allí dentro a una velocidad de rotación de 13500 rpm durante 0,5 h. Como resultado, el producto resultante molido se floculó, no pudiendo obtener de este modo celulosa descristalizada. Los resultados se muestran en la Tabla 1-2.

Ejemplo de Producción Comparativo 1-4

10 El mismo tratamiento triturador que se ha descrito en el Ejemplo de Producción 1-1 se llevó a cabo para obtener virutas de pulpa. Después, las virutas de pulpa resultantes (500 g) se cargaron en un molino de púas "KOLLOPLEX" disponible en Hosokawa Micron Corporation y se trató allí dentro a una velocidad de rotación de 13000 rpm durante 0,25 h. Como resultado, el producto resultante molido se floculó, no pudiendo obtener de este modo celulosa descristalizada. Los resultados se muestran en la Tabla 1-2.

Ejemplo de Producción Comparativo 1-5

15 Se repitió el mismo procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo de Protección 1-1, para producir de ese modo virutas de pulpa. Después, de una manera similar a la del Ejemplo de Producción 1-2, las virutas de pulpa se sometieron a tratamiento extrusor de doble tornillo, pero no se dirigió ningún tratamiento de molienda, obteniendo de ese modo pulpa pulverizada. A través de los procedimientos de análisis que se han mencionado anteriormente, la pulpa pulverizada resultante se sometió a medidas de un tamaño medio de partícula y de la intensidad por difracción de Rayos X de la misma. Se calculó la cristalinidad del producto obtenido a partir de la intensidad medida por difracción de Rayos X. Los resultados se muestran en la Tabla 1-2.

[Tabla 2]

Tabla 1-2

		Ejemplos de Producción Comparativos				
		1-1	1-2	1-3	1-4	1-5
Trituración		Si	si	si	si	si
Tratamiento con extrusora de doble tornillo	Tratamiento	No	no	no	no	si
Tratamiento de molino	Tratamiento	Si	si	si	si	no
	Tipo de molino	Molino de volteo	Molino cortador	Molino de martillo	Molino de púas	-
	Tipo de bolas	circonia ϕ 10 mm	-	-	-	-
	Cantidad de pulpa cargada (g)	100	500	500	500	-
	Tiempo de tratamiento (h)	48	0,5	0,5	0,25	-
Evaluación	Cristalinidad de la Celulosa de tipo I (%)	73	78	74	75	76
	Tamaño medio de partícula de la pulpa (μm)* ¹	(Casi de tipo virutas)	(Floculado)	(Floculado)	(Floculado)	156
*1: Tamaño medio de partícula de la pulpa después del tratamiento de molino						

Ejemplos de producción 1-7 a 1-10

25 Los materiales que contienen celulosa (papel sin madera (Ejemplo de Producción 1-7, contenido de celulosa: 83% en peso y contenido de agua: 5,7% en peso), cartón corrugado (Ejemplo de Producción 1-8, contenido de celulosa:

84% en peso y contenido de agua 7,2% en peso), periódico (Ejemplo de Producción 1-9, contenido de celulosa: 83% en peso y contenido de agua: 7,7% en peso) y paja (Ejemplo de Producción 1-10, contenido de celulosa: 60% en peso y contenido de agua: 13,6% en peso) se sometieron al tratamiento triturador mediante el procedimiento y en las condiciones que se han descrito en el Ejemplo de Producción 1-1 y después al tratamiento extrusor mediante el procedimiento y en las condiciones que se han descrito en el Ejemplo de Producción 1-2. Las propiedades de los materiales que contienen celulosa obtenidos después del tratamiento extrusor son como sigue: (Ejemplo de Producción 1-7) papel sin madera, tamaño medio de partícula de 71 μm /densidad aparente de 274 kg/m^3 ; (Ejemplo de Producción 1-8), cartón corrugado, tamaño medio de partícula de 93 μm /densidad aparente de 216 kg/m^3 ; (Ejemplo de Producción 1-9), periódico, tamaño medio de partícula de 61 μm /densidad aparente de 303 kg/m^3 ; y (Ejemplo de Producción 1-10), paja, tamaño medio de partícula de 85 μm /densidad aparente de 380 kg/m^3 .

Estos materiales se sometieron adicionalmente al tratamiento de molino de vibración mediante el procedimiento y en las condiciones que se han descrito en el Ejemplo de Producción 1-6, para producir de ese modo celulosas descristalizadas. Las propiedades de los mismos son las que siguen: (Ejemplo de Producción 1-7) papel sin madera, cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 42 μm , (Ejemplo de Producción 1-8) cartón corrugado, cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 48 μm , (Ejemplo de Producción 1-9) periódico, cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 55 μm y (Ejemplo de Producción 1-10) paja, cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 48 μm).

Ejemplos de producción 1-11 a 1-12

[Tratamiento de molino grueso de ramas podadas]

Como materia prima que contiene celulosa, se molió una mezcla de ramas podadas con forma de vástago, de árboles del borde de la carretera (*Prunus vedoensis*, *Quercus phillyraeoides*, alcanfor, *Quercus acutissima* y *Campsis grandiflora*) (Ejemplo de Producción 1-11) (ϕ : 10 mm x 300 mm, contenido de celulosa: 67% en peso y contenido de agua: 12% en peso), ramas podadas con forma de vástago de mandarinos (Ejemplo de Producción 1-12) (ϕ : 10 mm x 500 mm, contenido de celulosa: 64% en peso y contenido de agua: 22% en peso) por medio de un molino de plástico (Modelo: JC-2, producto de Morita Seiki Kogyo Co., Ltd.), para producir de ese modo virutas (aproximadamente 2 mm x 3 mm x 1 mm) de los materiales. Posteriormente, las virutas producidas de árboles del borde de la carretera y las virutas de ramas de poda de mandarino se secaron por medio de un secador hasta un contenido de agua de un 2,3% en peso y un 3,5% en peso, respectivamente. Se encontró que las virutas de las ramas podadas de los mandarinos tenían una densidad aparente de 224 kg/m^3 .

[Tratamiento por molino de vibración de ramas podadas]

Las virutas producidas de este modo se sometieron al adicionalmente al tratamiento de molino de vibración mediante el procedimiento y en las condiciones que se han descrito en el Ejemplo de Producción 1-6, para producir de este modo celulosas descristalizadas. Las propiedades de los mismos son como sigue: (Ejemplo de Producción 1-11) ramas de árboles del borde de la carretera, cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 49 μm , y (Ejemplo de Producción 1-12) mandarinos, cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 44 μm .

Ejemplos de producción comparativos 1-6 a 1-11

Las materias primas que contienen celulosa de los Ejemplos de Producción 1-7 a 1-10 se sometieron a tratamiento triturador al tratamiento extrusor de la misma manera. Las ramas podadas de árboles del borde de la carretera del Ejemplo de Producción 1-11 y las ramas podadas de los mandarinos del Ejemplo de Producción 1-12 tales sometieron a tratamiento de molino grueso por medio de un molino de plástico de la misma manera, pero no al tratamiento de molino de vibración. Por lo tanto, se produjeron productos de celulosa pulverizados y en virutas. Las propiedades de los mismos son como sigue: (Ejemplo de Producción Comparativo 1-6) papel sin madera, cristalinidad del 71%/tamaño medio de partícula de 71 μm ; (Ejemplo de Producción Comparativo 1-7) cartón corrugado, cristalinidad del 71%/tamaño medio de partícula de 93 μm ; (Ejemplo de Producción Comparativo 1-8) periódico, cristalinidad del 56%/tamaño medio de partícula de 61 μm ; (Ejemplo de Producción Comparativo 1-9) paja, cristalinidad del 47%/ tamaño medio de partícula de 85 μm ; (Ejemplo de Producción Comparativo 1-10) ramas podadas de árboles del borde de la carretera, cristalinidad del 51%/dimensiones de 2 mm x 3 mm x 1 mm; y (Ejemplo de Producción Comparativo 1-11: ramas podadas de mandarinos, cristalinidad del 46%/dimensiones de 2 mm x 3 mm x 1 mm).

Ejemplos 1-1 y Ejemplo Comparativo 1-1

En el Ejemplo 1-1, la celulosa descristalizada (cristalinidad: 0%, tamaño de partícula: 57 μm) preparada mediante el tratamiento extrusor y el tratamiento de molino de vibración empleando un medio de vástagos en el Ejemplo de Producción 1-6, se sometió a la reacción de sacarificación mediante el uso de una muestra patrón de celulasas (Celluclast 1,5 I, producto de Novozymes). De forma análoga, en el Ejemplo Comparativo 1-1, la pulpa pulverizada (cristalinidad: 76%, tamaño de partícula: 156 μm) producida mediante el tratamiento extrusor del Ejemplo de Producción Comparativo 1-5 se sometió a la misma reacción. La celulosa descristalizada o la pulpa pulverizada (0,15 g) se suspendió en una mezcla de reacción enzimática (3 ml) (que contenía tampón de citrato 100 mM (pH: 5,0), 3% (v/v) Celluclast 1,5 I (0,5% en forma de proteína), y 30 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina), y la mezcla se hizo reaccionar

a 50 °C durante 18 horas, 26 horas, y 42 horas, durante el cual la mezcla se agitó con agitación. Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se separó en un precipitado y un sobrenadante mediante centrifugación. La cantidad de sacárido reductor (en forma de glucosa) liberado en el sobrenadante se determinó de manera cuantitativa a través del procedimiento DNS. Los resultados se muestran en la Tabla 1-3.

5 [Tabla 3]

Tabla 1-3

	Muestra	Cristalinidad (%)	Cantidad de reducción de sacárido liberado en el sobrenadante (g/l)			
			Tiempo de reacción (h)			
			0 (sin reaccionar)	18	26	42
Ej. 1-1	Celulosa descristalizada	0	0	39,7	40,8	46,0
Ej. Comp. 1-1	Pulpa pulverizada	76	0	21,7	24,8	29,9

Ejemplos 1-2 a 1-4 y Ejemplos Comparativos 1-2 a 1-4

10 En los Ejemplos 1-2 a 1-4, se prepararon las celulosas descristalizadas en las condiciones que se han mencionado anteriormente del Ejemplo de Producción 1-6 (Ejemplos 1-2 a 1-4: cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 57 µm). En los Ejemplos Comparativos 1-2 a 1-4, se empleó un producto de pulpa pulverizada (Ejemplos Comparativos 1-2 a 1-4: cristalinidad del 76%/tamaño medio de partícula de 156 µm) preparado en el Ejemplo de Producción Comparativo 1-5. Cada una de las muestras se sometió a la reacción de sacarificación mediante el uso de una muestra patrón de celulasas (Celluclast 1,5 l, producto de Novozymes). Cada una de las celulosas descristalizadas y el producto de pulpa pulverizada (0,15 g) se suspendieron en una mezcla de reacción enzimática (3 ml), y se hizo que la mezcla reaccionara a 50 °C durante 6 horas, 24 horas, 48 horas, y 72 horas, durante las que se agitó la mezcla con sacudidas. Se emplearon las siguientes mezclas de reacción enzimática: (Ejemplo 1-2 y Ejemplo Comparativo 1-2) tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 3% (v/v) Celluclast 1,5 l (0,5% en forma de proteína), y 30 µg/ml de tetraciclina; (Ejemplo 1-3 y Ejemplo Comparativo 1-3) tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 1,5% (v/v) Celluclast 1,5 l (0,25% en forma de proteína), y 30 µg/ml de tetraciclina; y (Ejemplo 1-4 y Ejemplo Comparativo 1-4) tampón de citrato 100 mM (pH: 5,0), 0,6% (v/v) Celluclast 1,5 l (0,1% en forma de proteína), y 30 µg/ml de tetraciclina). Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se separó en un precipitado y un sobrenadante mediante centrifugación. La cantidad de sacárido reductor (forma de glucosa) liberado en el sobrenadante se determinó de manera cuantitativa mediante el procedimiento DNS. Los resultados se muestran en la Tabla 1-4.

25 [Tabla 4]

Tabla 1-4

	Muestra	Cristalinidad (%)	Cantidad de reducción de sacárido liberado en el sobrenadante (g/l)			
			Tiempo de reacción (h)			
			6	24	48	72
Ej. 1-2	Celulosa descristalizada	0	25,8	45,8	47,7	58,4
Ej. Comp. 1-2	Pulpa pulverizada	76	13,4	22,5	31,1	34,3
Ej. 1-3	Celulosa descristalizada	0	18,7	36,0	40,3	45,7
Ej. Comp. 1-3	Pulpa pulverizada	76	8,8	18,4	23,1	28,1
Ej. 1-4	Celulosa descristalizada	0	14,3	23,3	32,9	40,3
Ej. Comp. 1-4	Pulpa pulverizada	76	6,1	15,0	21,0	20,8

Ejemplo 1-5

El sobrenadante de la mezcla de sacarificación (tiempo de reacción: 72 horas) obtenido en el Ejemplo 1-2 se analizó de la siguiente manera por medio de un Sistema de Cromatografía DX500 (Dionex Corporation) (columna: CarboPac PA1 (Dionex Corporation, 4 x 250 mm) y un detector: detector de amperometría pulsada ED40). Se emplearon los siguientes eluyentes: (A) solución de hidróxido sódico 100 mM, (B) solución de hidróxido sódico 100 mM que contenía acetato sódico 1 M y (C) agua ultrapura.

El análisis del azúcar se llevó a cabo en condiciones de gradiente lineal: A al 10%-C al 90% (en inyección) y A al 95%-B al 5% (de 0 a 15 min). Como patrones, glucosa al 0,01% (p/v) (producto de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), xilosa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), xilobiosa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y celobiosa (producto de Seikagaku Corporation). Los tiempos de retención de los patrones son como sigue: glucosa (aproximadamente 5,5 min), xilosa (aproximadamente 6,5 min), xilobiosa (aproximadamente 14 min), y celobiosa (aproximadamente 14,5 min). Cada sobrenadante de la mezcla de sacarificación se diluyó 100 veces, y se inyectó una alícuota (10 µl). Los resultados se muestran en la Tabla 1-5.

[Tabla 5]

Tabla 1-5

	Muestra	Cantidad de sacárido liberado en el sobrenadante (g/l)			
		Tiempo de reacción (72 h)			
		glucosa	xilosa	xilobiosa	celobiosa
Ej. 1-5	Celulosa descristalizada	43	3,9	3,5	3,8

Ejemplos 1-6 a 1-11

La celulosa descristalizada (cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 57 µm) preparada en las condiciones empleadas en el Ejemplo de Producción 1-6 fue a la reacción de sacarificación mediante el uso de una muestra patrón de celulasas (TP-60, producto de Meiji Seika Kaisha, Ltd., 650 mg-proteína/g) (Ejemplos 1-6 a 1-8) o (Ultraflo L, producto de Novozymes, 50 mg-proteína/ml) (Ejemplos 1-9 a 1-11). Cada una de las celulasas descristalizadas (0,15 g) se suspendió en una mezcla de reacción enzimática (3 ml), y la mezcla se hizo reaccionar a 50 °C durante 24 horas, 48 horas, y 72 horas, durante las que la mezcla se agitó con sacudidas. Se emplearon las siguientes mezclas de reacción enzimática: (Ejemplo 1-6) tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 0,83% (p/v) TP-60 (0,54% en forma de proteína), y 30 µg/ml de tetraciclina; (Ejemplo 1-7) tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 0,42% (p/v) TP-60 (0,28% en forma de proteína), y 30 µg/ml de tetraciclina; (Ejemplo 1-8) tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 0,17% (p/v) TP-60 (0,11% en forma de proteína), y 30 µg/ml de tetraciclina; (Ejemplo 1-9) tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 10% (v/v) Ultraflo L (0,5% en forma de proteína), y 30 µg/ml de tetraciclina; (Ejemplo 1-10) tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 5% (v/v) Ultraflo L (0,25% en forma de proteína), y 30 µg/ml de tetraciclina; y (Ejemplo 1-11) tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 2% (v/v) Ultraflo L (0,1% en forma de proteína), y 30 µg/ml de tetraciclina). Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se separó en un precipitado y un sobrenadante mediante centrifugación. La cantidad de sacárido reductor (en forma de glucosa) liberado en el sobrenadante se determinó de forma cuantitativa mediante el procedimiento DNS. Los resultados se muestran en la Tabla 1-6.

[Tabla 6]

Tabla 1-6

	Producto enzimático	Cantidad de sacárido reductor liberado en el sobrenadante (g/l)		
		Tiempo de reacción (h)		
		24	48	72
Ej. 1-6	TP-60	39,4	45,6	48,8
Ej. 1-7	TP-60	35,9	41,7	44,2
Ej. 1-8	TP-60	26,0	35,2	37,7
Ej. 1-9	Ultraflo L	24,3	37,0	36,0
Ej. 1-10	Ultraflo L	20,8	27,3	32,1
Ej. 1-11	Ultraflo L	20,4	19,6	23,7

Ejemplos 1-12 y 1-13

En los Ejemplos 1-12 y 1-13, la celulosa descristalizada (cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 57 μm) preparada en las condiciones empleadas en el Ejemplo de Producción 1-6 fue a la reacción de sacarificación mediante el uso de una muestra patrón de celulasas (Celluclast 1,5 I, productos de Novozymes) (Ejemplo 1-12) ó (Celluclast 1,5 I y Novozyme 188 (β -glucosidasa) productos de Novozymes) (Ejemplo 1-13). Cada una de las celulosas descristalizadas (0,15 g) se suspendió en una mezcla de reacción enzimática (3 ml), y la mezcla se hizo reaccionar a 50 °C durante 6 horas, 24 horas, 48 horas, y 75 horas, durante las que la mezcla se agitó con agitación. Se usaron las siguientes mezclas de reacción enzimática:

(Ejemplo 1-12) tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 0,6% (v/v) Celluclast 1,5 I (0,1% en forma de proteína), y 30 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina y (Ejemplo 1-13) tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 0,6% (v/v) Celluclast 1,5 I (0,1% en forma de proteína), 0,03% (v/v) Novozyme 188 (0,0075% en forma de proteína), y 30 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina. Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se separó en un precipitado y un sobrenadante mediante centrifugación. La cantidad de sacárido reductor (en forma de glucosa) liberado en el sobrenadante se determinó de forma cuantitativa mediante el procedimiento DNS. Los resultados se muestran en la Tabla 1-7.

[Tabla 7]

Tabla 1-7

	Producto enzimático	Cantidad de sacárido reductor liberado en el sobrenadante (g/l)			
		Tiempo de reacción (h)			
		6	24	48	75
Ej. 1-12	Celluclast 1,5 I	11,1	22,0	29,0	30,5
Ej. 1-13	Celluclast 1,5 I Novozyme 188	11,9	26,6	33,9	39,9

Ejemplos 1-14 y 1-15

Los sobrenadantes (tiempo de reacción: 75 horas) de las mezclas de sacarificación obtenidos en los Ejemplos 1-12 y 1-13 se analizaron mediante un Sistema de Cromatografía DX500 (Dionex Corporation) de una forma similar a la del Ejemplo 1-5. Los resultados se muestran en la Tabla 1-8.

[Tabla 8]

Tabla 1-8

	Producto enzimático	Cantidad de sacárido reductor liberado en el sobrenadante (g/l)			
		Tiempo de reacción (75 h)			
		glucosa	xilosa	xilobiosa	celobiosa
Ej. 1-14	Celluclast 1,5 I	24,6	2,6	0	17,8
Ej. 1-15	Celluclast 1,5 I Novozyme 188	36,7	3,2	4,8	3,0

Ejemplos 1-16 a 1-18 y Ejemplos Comparativos 1-5 a 1-7

En los Ejemplos 1-16 a 1-18, se emplearon las celulosas descristalizadas producidas en los Ejemplos de Producción 1-7 a 1-9 de papel sin madera ((Ejemplo 1-16), cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 42 μm , cartón corrugado (Ejemplo 1-17), cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 48 μm , y periódicos (Ejemplo 1-18), cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 55 μm). En los Ejemplos Comparativos 1-5 a 1-7, se emplearon las celulosas pulverizadas producidas en los Ejemplos de Producción Comparativos 1-6 a 1-8 de papel sin madera ((Ejemplo Comparativo 1-5), cristalinidad del 71%/tamaño medio de partícula de 71 μm , cartón corrugado (Ejemplo Comparativo 1-6), cristalinidad del 71%/tamaño medio de partícula de 93 μm , y periódicos (Ejemplo Comparativo 1-7, cristalinidad de 56%/tamaño medio de partícula de 61 μm). En los ejemplos y Ejemplos Comparativos, cada uno de los productos de celulosa se sometió a la reacción de sacarificación mediante el uso de un producto patrón de celulasas (Celluclast 1,5 I, producto de Novozymes). Cada una de las celulosas descristalizadas y de las celulosas pulverizadas (0,15 g) se suspendió en una mezcla de reacción enzimática (3 ml), y la mezcla se hizo reaccionar a 50 °C durante 6 horas, 24 horas, 48 horas, y 72 horas, durante las que la mezcla se agitó con sacudidas. Se usaron las siguientes mezclas de reacción enzimática: (Ejemplos 1-16 y 1-17 y Ejemplos Comparativos 1-5 y 1-6) tampón

citrato 100 mM (pH: 5,0), 1,5% (v/v) Celluclast 1,5 I (0,25% en forma de proteína), y 30 µg/ml de tetraciclina y (Ejemplo 1-18 y Ejemplo Comparativo 1-7) tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 12% (v/v) Celluclast 1,5 I (2% en forma de proteína), y 30 µg/ml de tetraciclina. Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se separó en un precipitado y un sobrenadante mediante centrifugación. La cantidad de sacárido reductor (en forma de glucosa) liberado en el sobrenadante se determinó de forma cuantitativa mediante el procedimiento DNS. Los resultados se muestran en la Tabla 1-9.

[Tabla 9]

Tabla 1-9

	Materia prima que contiene celulosa	Muestra	Cristalinidad (%)	Cantidad de sacárido reductor liberado en el sobrenadante (g/l)			
				Tiempo de reacción (h)			
				6	24	48	72
Ej. 1-16	Papel sin madera	Celulosa descristalizada	0	11,0	21,9	25,8	33,7
Ej. Comp. 1-5	Papel sin madera	Celulosa pulverizada	71	10,6	13,3	18,7	21,8
Ej. 1-17	Cartón corrugado	Celulosa descristalizada	0	15,0	23,8	27,0	31,2
Ej. Comp. 1-6		Celulosa pulverizada	71	8,8	12,3	13,2	13,1
Ej. 1-18	Periódico	Celulosa descristalizada	0	21,8	23,7	26,9	30,6
Ej. Comp. 1-7		Celulosa pulverizada	56	12,7	9,3	11,9	13,2

Ejemplos 1-19 a 1-21 y EJEMPLOS COMPARATIVOS 1-8 a 1-10

En los Ejemplos 1-19 a 1-21, se emplearon las celulosas descristalizadas de paja ((Ejemplo 1-19), cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 48 µm, ramas podadas de árboles del borde de la carretera (Ejemplo 1-20), cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 49 µm, y ramas de un mandarino (Ejemplo 1-21), cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula 44 µm), producidas en los Ejemplos de Producción 1-10 a 1-12). En los Ejemplos Comparativos 1-8 a 1-10, se emplearon las celulosas pulverizadas y en virutas de paja ((Ejemplo Comparativo 1-8), cristalinidad de 47%/tamaño medio de partícula de 85 µm, ramas podadas de árboles del borde de la carretera (Ejemplo Comparativo 1-9), cristalinidad de 51%/dimensiones de 2 mm x 3 mm x 1 mm, y ramas podadas de mandarinos (Ejemplo Comparativo 1-10), cristalinidad de 46%/dimensiones de 2 mm x 3 mm x 1 mm), producidas en los Ejemplos Comparativos de Producción 1-9 a 1-11). En los Ejemplos y en los Ejemplos Comparativos, cada uno de los productos de celulosa se sometió a la reacción de sacarificación mediante el uso de producto patrón de celulasas (Celluclast 1,5 I, producto de Novozymes). Cada una de las celulosas descristalizadas o de las celulosas pulverizadas (0,15 g) se suspendió en una mezcla de reacción enzimática (3 ml), y la mezcla se hizo reaccionar a 50 °C durante 3 días, durante los que la mezcla se agitó con agitación. La mezcla enzimática de reacción que se empleó fue tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 3% (v/v) Celluclast 1,5 I (0,5% en forma de proteína), y 30 µg/ml de tetraciclina. Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se separó en un precipitado y un sobrenadante mediante centrifugación. La cantidad de sacárido reductor (en forma de glucosa) liberado en el sobrenadante se determinó de forma cuantitativa mediante el procedimiento DNS. Los resultados se muestran en la Tabla 1-10.

[Tabla 10]

Tabla 1-10

	Materia prima que contiene celulosa	Muestra	Cristalinidad (%)	Cantidad de sacárido reductor liberado en el sobrenadante (g/l)
				Tiempo de reacción (72 h)
Ej. 1-19	Paja	Celulosa descristalizada	0	24,4

(continuación)

	Materia prima que contiene celulosa	Muestra	Cristalinidad (%)	Cantidad de sacárido reductor liberado en el sobrenadante (g/l)
				Tiempo de reacción (72 h)
Ej. Comp. 1-8		Celulosa pulverizada	47	3,1
Ej. 1-20	Ramas podadas de árboles del borde de la carretera	Celulosa descristalizada	0	29,0
Ej. Comp. 1-9		Celulosa en virutas	51	1,8
Ej. 1-21	Ramas podadas de mandarinos	Celulosa descristalizada	0	27,5
Ej. Comp. 1-10		Celulosa en virutas	46	4,0

A partir de las Tablas 1-1 y 1-2, se confirmó que los procedimientos para la producción de las celulosas descristalizadas de acuerdo con los Ejemplos de Producción 1-1 a 1-6 fueron capaces de producir celulosa descristalizada con una cristalinidad reducida de una manera eficaz y por lo tanto fueron excelentes en productividad en comparación con aquéllas de acuerdo con los Ejemplos Comparativos de Producción 1-1 a 1-5. Además, a partir de la comparación entre el Ejemplo de Producción 1-1 y el Ejemplo Comparativo de Producción 1-1, se confirmó que el procedimiento que empleaba vástagos como medio de molienda para el molino de vibración de acuerdo con la presente invención capaz de producir dicha celulosa descristalizada cuya cristalinidad se redujo al 0%, de una forma eficaz. Se descubrió que las celulosas descristalizadas producidas en los Ejemplos de Producción 1-1 a 1-6 tenían un tamaño medio de partícula apropiado, en comparación con aquéllas producidas en los Ejemplos Comparativos de Producción 1-2 a 1-5.

Como se desprende de las Tablas 1-3 y 1-4, el procedimiento para la producción de sacáridos de la presente invención mostrado en los Ejemplos 1-1 a 1-4 presentó una mayor productividad en comparación con los Ejemplos Comparativos 1-1 a 1-4. Como se desprende de la Tabla 1-5, el sacárido producido se formó principalmente de glucosa. Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención es útil para la producción de una materia prima para la producción de etanol o de ácido láctico mediante fermentación. Como se desprende de la Tabla 1-6, la producción de sacárido se puede conseguir de forma eficaz independientemente del tipo del producto enzimático empleado en el procedimiento. También, como se desprende de las Tablas 1-7 y 1-8, la adición de β -glucosidasa al producto de celulosa consigue la producción más eficaz de sacárido. Como se desprende de las Tablas 1-9 y 1-10, el procedimiento para la producción de sacáridos de la presente invención es eficaz para diversos materiales de celulosa; es decir, no solamente para pulpa sino también para materiales de papel tales como papel sin madera, cartón corrugado, y periódico; cáscaras de planta tales como paja; y materiales de madera.

Ejemplo de Producción 2-1

La misma pasta de madera de tipo laminar que la empleada en el Ejemplo de Producción 1-1 se sometió al mismo tratamiento triturador que el empleado en el Ejemplo de Producción 1-1 y al mismo tratamiento extrusor que el empleado en el Ejemplo de Producción 1-2. La temperatura empleada por la extrusora de doble tornillo aumentó de 30 a 70 °C mediante el calor generado durante el tratamiento. La pulpa después del tratamiento tenía un tamaño medio de partícula de 120 μm y una densidad aparente de 219 kg/m^3 . Posteriormente, la pulpa resultante (130 g) se cargó en un molino de tanque de agitación de tipo discontinuo "Sand Grinder" disponible en Igarashi Kikai Co., Ltd., (capacidad del recipiente: 800 ml; relleno de perlas de circonia de ϕ 5 mm: 720 g; relación de relleno: 25%; diámetro de la pala de agitación: 70 mm). Mientras que fluía el agua de refrigeración a través de una camisa del recipiente, el tratamiento de molienda se llevó a cabo durante 2,5 h a una velocidad de agitación de 2000 rpm, obteniendo de ese modo celulosa descristalizada.

Después de la finalización del tratamiento de molienda, no se observó pulpa adherida a la superficie interna de la pared o en el fondo del tanque agitación del molino. La celulosa descristalizada obtenida de este modo se sacó del tanque de agitación del molino y se pasó a través de un tamiz con un tamaño de malla de 75 μm , obteniendo de ese modo 117 g de la celulosa descristalizada en forma de un producto subdimensionado (que corresponde al 90% en peso en base al material cargado). El producto subdimensionado resultante se sometió a medidas de un tamaño medio de partícula mediante el procedimiento que se ha mencionado anteriormente, y la cristalinidad del mismo se calculó a partir de las intensidades medidas por difracción de Rayos X. Los resultados se muestran en la Tabla 2-1.

Ejemplo de Producción 2-2

Se repitió el mismo procedimiento que el que se ha descrito en el Ejemplo de Producción 2-1 excepto en que se usó el molino de vibración de tipo discontinuo "MB-1" disponible en Chuo Kakohki Co., Ltd., (capacidad del recipiente: 2,8 l; relleno de bolas de circonia de ϕ 20 mm: 7,6 kg; relación de relleno: 80%) en lugar del molino de tanque de agitación discontinua, y se cargó la pulpa (200 g) como la materia prima que contiene celulosa en el molino y se trató en él a una frecuencia de vibración de 20 Hz y una amplitud de vibración total de 8 mm durante 4 h, obteniendo de ese modo celulosa descristalizada. Después de la finalización del tratamiento de molienda, no se observó pulpa adherida a la superficie interna de la pared o en el fondo del tanque agitación del molino. La celulosa descristalizada obtenida de este modo se pasó a través de un tamiz con un tamaño de malla de 75 μ m, obteniendo de ese modo 142 g de un producto subdimensionado de la celulosa descristalizada (que corresponde al 71% en peso en base a la materia prima que contiene la celulosa cargada). El producto resultante subdimensionado se sometió a medidas de un tamaño medio de partícula mediante el procedimiento que se ha mencionado anteriormente, y se calculó la cristalinidad de la celulosa descristalizada a partir de las intensidades medidas por difracción de Rayos X. Los resultados se muestran en la Tabla 2-1.

Ejemplo de Producción 2-3 (Ejemplo de referencia)

Se repitió en mismo procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo de Producción 2-1 excepto en que se usó un molino de vibración "Pot Mill ANZ-51S" disponible en Nitto Kagaku Co., Ltd., (capacidad del recipiente: 1,0 l; relleno de bolas de circonia de ϕ 10 mm: 1,8 kg; relación de relleno: 53%) en lugar de un molino de tanque de agitación discontinua, y se cargó la pulpa (100 g) como materia prima que contiene celulosa en el molino y se trató en él a una velocidad de rotación de 100 rpm durante 48 h, obteniendo de ese modo celulosa descristalizada. Después de la finalización del tratamiento de molienda, no se observó pulpa adherida a la superficie interna de la pared o en el fondo del tanque agitación del molino. La celulosa descristalizada obtenida de este modo se pasó a través de un tamiz con un tamaño de malla de 75 μ m, obteniendo de ese modo 63 g de un producto subdimensionado de la celulosa descristalizada (que corresponde al 63% en peso en base a la materia prima que contiene la celulosa cargada). El producto resultante subdimensionado se sometió a medidas de un tamaño medio de partícula mediante el procedimiento que se ha mencionado anteriormente, y se calculó la cristalinidad de la celulosa descristalizada a partir de las intensidades medidas por difracción de Rayos X. Los resultados se muestran en la Tabla 2-1.

[Tabla 11]

Tabla 2-1

		Ej. de producción 2 - 1	Ej. de producción 2 - 2	Ej. de producción 2 - 3
Trituración		si	si	si
Tratamiento extrusor de doble tornillo	Tratamiento	si	si	si
	Tasa de cizallamiento (s^{-1})	660	660	660
	Tamaño medio de partícula (μ m)* ¹	120	120	120
	Densidad aparente (kg/m^3) * ¹	219	219	219
Tratamiento de molienda	Tratamiento	si	si	si
	Tipo de molino	Molino de tanque de agitación	Molino de vibración	Molino de volteo
	Medios	Circonia ϕ 5 mm	Circonia ϕ 20 mm	Circonia ϕ 10 mm
	Cantidad de pulpa cargada (g)	130	200	100

(continuación)

		Ej. de producción 2 - 1	Ej. de producción 2 - 2	Ej. de producción 2 - 3
Trituración		si	si	si
	Tiempo de tratamiento (h)	2,5	4	48
Evaluación	Cristalinidad de la Celulosa de tipo I (%)	0	0	31
	Aparición de depósito después de la molienda *2	no	no	no
	Relación de peso pasado a través de un tamiz de 75 µm a peso total cargado en el molino (% en peso)*3	90	71	63
	Tamaño medio de partícula de la celulosa descristalizada (µm)	31	57	59
*1: Tamaño medio de partícula o densidad aparente de la pulpa después del tratamiento extrusor de doble tornillo *2: Presencia o ausencia de pulpa adherida en la pared interna del molino después del tratamiento extrusor *3: Peso del producto de celulosa descristalizada subdimensionado que pasa a través de un tamiz de 75 µm que se obtuvo después del tratamiento en el molino				

Ejemplo de Producción Comparativo 2-1

Se repitió el mismo procedimiento que el que se ha descrito en el Ejemplo de Producción 2-1 excepto en que la pulpa se sometió al tratamiento triturador y después al tratamiento extrusor de doble tornillo, pero no se llevó a cabo ningún tratamiento de molienda, obteniendo de ese modo una pulpa pulverizada. La pulpa pulverizada resultante se sometió a medidas de una densidad aparente y de un tamaño medio de partícula, a través del procedimiento que se ha mencionado anteriormente. La cristalinidad del producto obtenido se calculó a partir de las intensidades medidas por difracción de Rayos X. Los resultados se muestran en la Tabla 2-2.

10 Ejemplo de Producción Comparativo 2-2

Se llevó a cabo el mismo tratamiento triturador que el que se ha descrito en el Ejemplo de Producción 2-1 para obtener virutas de pulpa. Después, las virutas de pulpa resultante se cargaron en un molino de tanque de agitación discontinua sin someter previamente la pulpa al tratamiento extrusor. Sin embargo, la cantidad de las virutas de pulpa capaz de ser cargada en el molino fue solamente de 65 g lo cual era la mitad de la pulpa cargada en el Ejemplo de Producción 2-1, debido a la elevada voluminosidad de la misma. Después de la finalización de la carga, las virutas de pulpa se sometieron al tratamiento usando el molino de tanque agitación discontinua en las mismas condiciones que las empleadas en el Ejemplo de Producción 2-1, obteniendo de ese modo una pulpa pulverizada. Como resultado se confirmó, después del tratamiento, que se observaba la pulpa adherida en el fondo del molino del tanque de agitación. La pulpa pulverizada obtenida de este modo se pasó a través de un tamiz con un tamaño de malla de 75 µm, obteniendo de ese modo 16,9 g de la pulpa pulverizada en forma de un producto subdimensionado (que corresponde al 26,0% en peso en base al material cargado). El producto resultante subdimensionado se sometió a medidas de un tamaño medio de partícula mediante el procedimiento que se ha mencionado anteriormente, y se calculó la cristalinidad de la celulosa descristalizada a partir de las intensidades medidas por difracción de Rayos X. Los resultados se muestran en la Tabla 2-2.

25 Ejemplo de Producción Comparativo 2-3

Se llevó a cabo el mismo tratamiento triturador que el que se ha descrito en el Ejemplo de Producción 2-1 para obtener virutas de pulpa. Después, las virutas de pulpa resultantes (500 g) se cargaron en un molino de cuchillas "Modelo POWER MILL P-02S" disponible en Dalton Co., Ltd., sin someter la pulpa al tratamiento extrusor previamente y se trató allí a una velocidad de rotación de 3000 rpm durante 0,5 h. La pulpa obtenida estaba en forma de un peso floculado con una densidad aparente de 33 kg/m³. Después, la pulpa floculada se cargó en el molino de tanque de agitación discontinua. Sin embargo, la cantidad de la pulpa floculada capaz de ser cargada en el molino fue solamente de 30 g debido a la alta voluminosidad de la misma. Después de la finalización de la carga, la pulpa floculada se sometió al tratamiento usando el molino de tanque agitación discontinua en las mismas condiciones que las empleadas en el Ejemplo de Producción 2-1, obteniendo de este modo una pulpa pulverizada. Como resultado se confirmó, después del tratamiento, que no se observaba pulpa adherida en el interior del molino del tanque de agitación. La pulpa pulverizada obtenida de este modo se pasó a través de un tamiz con un tamaño de malla de 75 µm, obteniendo de ese modo 23,4 g de la pulpa pulverizada en forma de un producto subdimensionado

(que corresponde al 78,0% en peso en base al material cargado). El producto resultante subdimensionado se sometió a medidas de un tamaño medio de partícula mediante el procedimiento que se ha mencionado anteriormente y se calculó la cristalinidad de la celulosa descristalizada a partir de las intensidades medidas por difracción de Rayos X. Los resultados se muestran en la Tabla 2-2.

5 [Tabla 12]

Tabla 2-2 (1/2)

		Ejs. Producción Comp.		
		2-1	2-2	2-3
Trituración		si	si	si
Tratamiento extrusor de doble tornillo	Tratamiento	si	no	no
	Tasa de cizallamiento (s^{-1})	660	-	-
	Tamaño medio de partícula (μm)	120 ^{*1}	-	-
	Volumen (kg/m^3)	219 ^{*1}	-	33 ^{*2}
Tratamiento de molienda	Tratamiento	no	si	si
	Tipo de molino	-	Molino de tanque de agitación	Molino de tanque de agitación
	Medios	-	Circonia ϕ 5 mm	Circonia ϕ 5 mm
	Cantidad de pulpa cargada (g)	-	65	30
	Tiempo de tratamiento (h)	-	2,5	2,5
Evaluación	Cristalinidad de la Celulosa de tipo I (%)	76	0	0
	Aparición de depósito después de la molienda ^{*3}	-	si	no
	Relación de peso pasado a través de un tamiz de 75 μm a peso total cargado en el molino (% en peso) ^{*4}	-	26	78
	Tamaño medio de partícula de la pulpa pulverizada (μm)	156	38	23
^{*1} : Tamaño medio de partícula o densidad aparente de la pulpa después del tratamiento extrusor de doble tornillo ^{*2} : Densidad aparente de la pulpa después del tratamiento en molino de cuchillas ^{*3} : Presencia o ausencia de pulpa adherida en la pared interna del molino después del tratamiento en el molino ^{*4} : Peso del producto de celulosa descristalizada subdimensionado que pasa a través de un tamiz de 75 μm que se obtuvo después del tratamiento en el molino				

Tabla 2-2 (2/2)

		Ejs. Producción Comp.			
		1-1	1-2	1-3	1-4
Trituración		si	si	si	si
Tratamiento extrusor de doble tornillo	Tratamiento	no	no	no	no
	Tasa de cizallamiento (s^{-1})	-	-		
	Tamaño medio de partícula (μm)	-	-	-	-
	Densidad aparente (kg/m^3)	-	-	-	

(continuación)

		Ejs. Producción Comp.			
		1-1	1-2	1-3	1-4
Tratamiento de molienda	Tratamiento	si	si	si	si
	Tipo de molino	Molino de volteo	Molino de cuchillas	Molino de martillos	Molino de púas
	Medios	Circonia ϕ 10 mm	-	-	-
	Cantidad de pulpa cargada (g)	100	500	500	500
	Tiempo de tratamiento (h)	48	0,5	0,5	0,25
Evaluación	Cristalinidad de la Celulosa de tipo I (%)	73	78	74	75
	Aparición de depósito después de la molienda* ³	-	-	-	-
	Relación de peso pasado a través de un tamiz de 75 μ m a peso total cargado en el molino (% en peso)* ⁴	-	-	-	-
	Tamaño medio de partícula de la pulpa pulverizada (μ m)	(Casi como virutas)	(Floculado)	(Floculado)	(Floculado)
*3: Presencia o ausencia de pulpa adherida en la pared interna del molino después del tratamiento en el molino *4: Peso del producto de celulosa descristalizada subdimensionado que pasa a través de un tamiz de 75 μ m que se obtuvo después del tratamiento en el molino					

Ejemplos de Producción 2-4 a 2-8

- En vez de pulpa, se sometieron al tratamiento triturador y al tratamiento extrusor los materiales que contenían celulosa (papel sin madera (Ejemplo de Producción 2-4, contenido de celulosa: 83% en peso y contenido de agua: 5,7% en peso), cartón corrugado (Ejemplo de Producción 2-5, contenido de celulosa: 84% en peso y contenido de agua 7,2% en peso), periódico (Ejemplo de Producción 2-6, contenido de celulosa: 83% en peso y contenido de agua: 7,7% en peso), paja de arroz (Ejemplo de Producción 2-7, contenido de celulosa: 55% en peso y contenido de agua: 8,0% en peso), revistas (Ejemplo de Producción 2-8, contenido de celulosa: 60% en peso y contenido de agua: 4,5% en peso) a través de los procedimientos y en las condiciones que se han descrito en el Ejemplo de Producción 2-1. Las propiedades de los materiales que contienen celulosa obtenidos después del tratamiento extrusor son como sigue: papel sin madera (Ejemplo de Producción 2-4), tamaño medio de partícula de 71 μ m/densidad aparente de 274 kg/m³; cartón corrugado (Ejemplo de Producción 2-5), tamaño medio de partícula de 93 μ m/densidad aparente de 216 kg/m³; periódico (Ejemplo de Producción 2-6), tamaño medio de partícula de 61 μ m/densidad aparente de 303 kg/m³; paja de arroz (Ejemplo de Producción 2-7), tamaño medio de partícula de 82 μ m/densidad aparente de 339 kg/m³, y revistas (Ejemplo de Producción 2-8), tamaño medio de partícula de 72 μ m/densidad aparente de 431 kg/m³.

- Estos materiales se sometieron adicionalmente al tratamiento de molino de tanque de agitación discontinua a través del procedimiento y en las condiciones que se han descrito en el Ejemplo de Producción 2-1, para producir de ese modo las celulosas descristalizadas. Las propiedades de las mismas son como sigue: papel sin madera (Ejemplo de Producción 2-4), cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 50 μ m, cartón corrugado (Ejemplo de Producción 2-5), cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 28 μ m, (Ejemplo de Producción 2-6) periódico, cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 32 μ m, paja de arroz (Ejemplo de Producción 2-7), cristalinidad del 2%/tamaño medio de partícula de 27 μ m, y revistas (Ejemplo de Producción 2-8), cristalinidad del 4%/tamaño medio de partícula de 24 μ m).

Ejemplo de Producción Comparativo 2-4

- La paja de arroz del Ejemplo de Producción 2-7 (contenido de celulosa: 55% en peso; contenido de agua: 8,0% en peso), que servía como la materia prima que contiene celulosa, se sometió al tratamiento triturador y al tratamiento extrusor mediante los procedimientos y en las condiciones que se han descrito en el Ejemplo de Producción 2-1. Sin embargo, no se llevó a cabo el tratamiento con molino de tanque de agitación discontinua, obteniendo de ese modo una celulosa pulverizada (paja de arroz, cristalinidad del 54%/tamaño medio de partícula de 82 μ m).

Ejemplos 2-1, Ejemplo de Referencia 2-2 y Ejemplo Comparativo 2-1

En el Ejemplo 2-1, se empleó como sustrato la celulosa descristalizada (cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 43 μm) producida en el Ejemplo de Producción 2-1. En el Ejemplo de referencia 2-2, se empleó una celulosa descristalizada (cristalinidad del 30%/tamaño medio de partícula de 46 μm) producida de la misma manera que la empleada en el Ejemplo de Producción 2-1, excepto en que se cambió el tiempo de tratamiento en el molino de 2,5 horas a 30 minutos. En el Ejemplo Comparativo 2-1, se empleó un producto de celulosa pulverizada comercial (KC Flock, producto de Nippon Paper Chemicals Co., Ltd., cristalinidad del 76%, tamaño de partícula de 26 μm). Cada una de las muestras se sometió a la reacción de sacarificación mediante el uso de una muestra patrón de celulasas (Celluclast 1,5 I, producto de Novozymes). Cada una de las celulosas descristalizadas y de los productos de pulpa pulverizada (0,15 g) se suspendió en una mezcla de reacción enzimática (3 ml), y la mezcla se hizo reaccionar a 50 °C durante 24 horas, 48 horas, y 72 horas, durante las que la mezcla se agitó con sacudidas. La mezcla de reacción enzimática empleada fue tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 1% (v/v) Celluclast 1,5 I (0,17% en forma de proteína), y 30 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina). Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se separó en un precipitado y un sobrenadante mediante centrifugación. Se midió el peso del precipitado seco. La cantidad de sacárido reductor (en forma de glucosa) liberado en el sobrenadante se determinó de forma cuantitativa mediante el procedimiento de fenol-ácido sulfúrico. Los resultados se muestran en la Tabla 2-3.

[Tabla 13]

Tabla 2-3

	Muestra	Cristalinidad (%)	Cantidad de sacárido liberado en el sobrenadante (base de glucosa) (g/l) (Peso del precipitado seco (g/l))			
			Tiempo de reacción (h)			
			0 (sin reaccionar)	24	48	72
Ej. 2-1	Celulosa descristalizada	0	1,5 (52,1)	18,7 (26,6)	47,1 (5,6)	46,0 (2,7)
Ej. de Referencia 2-2	Celulosa descristalizada	30	0,9 (55,8)	16,2 (31,0)	31,9 (26,3)	51,7 (14,7)
Ej. Comp. 2-1	Producto comercial de celulosa pulverizada	76	0,2 (60,2)	14,7 (45,8)	25,4 (44,1)	26,3 (36,9)

Ejemplos 2-3 a 2-5 y Ejemplos Comparativos 2-2 a 2-4

En los Ejemplos 2-3 a 2-5, se preparó celulosa descristalizada en las condiciones que se han mencionado anteriormente en el Ejemplo de Producción 2-1 (cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 43 μm). En los Ejemplos Comparativos 2-2 a 2-4, se empleó un producto de pulpa pulverizada (cristalinidad del 76%/tamaño medio de partícula de 156 μm) preparada en el Ejemplo Comparativo de Producción 2-1. Cada una de las muestras se sometió a la reacción de sacarificación mediante el uso de una muestra patrón de celulasas (Celluclast 1,5 I, producto de Novozymes). La celulosa descristalizada o el producto de pulpa pulverizada (0,15 g) se suspendieron en una mezcla de reacción enzimática (3 ml) y la mezcla se hizo reaccionar a 50°C durante 6 horas, 24 horas, 48 horas, y 72 horas, durante las que la mezcla se agitó con sacudidas. Se usaron las siguientes mezclas de reacción enzimática: (Ejemplo 2-3 y Ejemplo Comparativo 2-2) tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 3% (v/v) Celluclast 1,5 I (0,5% en forma de proteína), y 30 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina); (Ejemplo 2-4 y Ejemplo Comparativo 2-3) tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 1,5% (v/v) Celluclast 1,5 I (0,25% en forma de proteína), y 30 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina); y (Ejemplo 2-5 y Ejemplo Comparativo 2-4) tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 0,6% (v/v) Celluclast 1,5 I (0,1% en forma de proteína), y 30 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina). Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se separó en un precipitado y un sobrenadante mediante centrifugación. La cantidad de sacárido reductor (en forma de glucosa) liberado en el sobrenadante se determinó de forma cuantitativa mediante el procedimiento DNS. Los resultados se muestran en la Tabla 2-4.

[Tabla 14]

Tabla 2-4

	Muestra	Cristalinidad (%)	Cantidad de sacárido reductor liberado en el sobrenadante (g/l)			
			Tiempo de reacción (h)			
			6	24	48	72
Ej. 2-3	Celulosa descristalizada	0	19,0	37,6	46,1	50,7
Ej. Comp. 2-2	Pulpa pulverizada	76	13,4	22,5	31,1	34,3
Ej. 2-4	Celulosa descristalizada	0	13,6	33,9	38,3	46,1
Ej. Comp. 2-3	Pulpa pulverizada	76	8,8	18,4	23,1	28,1
Ej. 2-5	Celulosa descristalizada	0	13,0	28,5	35,1	41,7
Ej. Comp. 2-4	Pulpa pulverizada	76	6,1	15,0	21,0	20,8

Ejemplo 2-6

5 El sobrenadante de la mezcla de sacarificación (tiempo de reacción: 72 horas) obtenido en el Ejemplo 2-3 se analizó de la siguiente forma por medio de un Sistema de Cromatografía DX500 (Dionex Corporation) (columna: CarboPac PA1 (Dionex Corporation, 4 x 250 mm) y detector: detector de amperometría pulsada ED40). Se emplearon los siguientes eluyentes: (A) solución de hidróxido sódico 100 mM, (B) solución de hidróxido sódico 100 mM con acetato sódico 1 M y (C) agua ultrapura.

10 El análisis del azúcar se llevó a cabo en condiciones de gradiente lineal: A al 10%-C al 90% (en inyección) y A al 95%-B al 5% (de 0 a 15 min). Como patrones, glucosa al 0,01% (p/v) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), xilosa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), xilobiosa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y celobiosa (Seikagaku Corporation). Los tiempos de retención de los patrones son como sigue: glucosa (aproximadamente 5,5 min), xilosa (aproximadamente 6,5 min), xilobiosa (aproximadamente 14 min), y celobiosa (aproximadamente 14,5 min). Cada sobrenadante de la mezcla de sacarificación se diluyó 100 veces y se inyectó una alícuota (10 µl). Los resultados se

15 muestran en la Tabla 2-5.

[Tabla 15]

Tabla 2-5

	Muestra	Cantidad de sacárido liberado en el sobrenadante (g/l)			
		Tiempo de reacción (72 h)			
		glucosa	xilosa	xilobiosa	celobiosa
Ej. 2-6	Celulosa descristalizada	41	3,7	3,2	4,8

Ejemplos 2-7 a 2-9 y Ejemplos Comparativos 2-5 a 2-7

En los Ejemplos 2-7 a 2-9, se emplearon las celulosas descristalizadas producidas en los Ejemplos de Producción 2-4 a 2-6 (papel sin madera (Ejemplo 2-7), cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 50 μm , cartón corrugado (Ejemplo 2-8), cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 28 μm y periódico (Ejemplo 2-9), cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 32 μm). En los Ejemplos Comparativos 2-5 a 2-7, se emplearon las celulosas en producidas en los Ejemplos Comparativos de Producción 1-6 a 1-8 (papel sin madera (Ejemplo Comparativo 2-5), cristalinidad del 71%/tamaño medio de partícula de 71 μm , cartón corrugado (Ejemplo Comparativo 2-6), cristalinidad del 71%/tamaño medio de partícula de 93 μm , y periódico (Ejemplo Comparativo 2-7), cristalinidad del 56%/tamaño medio de partícula de 61 μm). En los Ejemplos y Ejemplos Comparativos, cada uno de los productos de celulosa se sometió a la reacción de sacarificación mediante el uso de un producto patrón de celulasas (Celluclast 1,5 l, Novozymes). Cada una de las celulosas descristalizadas y de las celulosas pulverizadas (0,15 g) se suspendió en una mezcla de reacción enzimática (3 ml), y la mezcla se hizo reaccionar a 50 °C durante 6 horas, 24 horas, 48 horas, y 72 horas, durante las que la mezcla se agitó con sacudidas. Se usaron las siguientes mezclas de reacción enzimática: (Ejemplos 2-7 y 2-8 y Ejemplos Comparativos 2-5 y 2-6) tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 1,5% (v/v) Celluclast 1,5 l (0,25% en forma de proteína), y 30 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina y (Ejemplo 2-9 y Ejemplo Comparativo 2-7) tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 12% (v/v) Celluclast 1,5 l (2% en forma de proteína), y 30 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina. Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se separó en un precipitado y un sobrenadante mediante centrifugación. La cantidad de sacárido reductor (en forma de glucosa) liberado en el sobrenadante se determinó de forma cuantitativa mediante el procedimiento DNS. Los resultados se muestran en la Tabla 2-6.

[Tabla 16]

Tabla 2-6

	Materia prima que contiene celulosa	Muestra	Cristalinidad (%)	Cantidad de sacárido reductor liberado en el sobrenadante (g/l)			
				Tiempo de reacción (h)			
				6	24	48	72
Ej. 2-7	Papel sin madera	Celulosa descristalizada	0	9,7	15,1	22,8	25,5
Ej. Comp. 2-5		Celulosa pulverizada	71	10,6	13,3	18,7	21,8
Ej. 2-8	Cartón corrugado	Celulosa descristalizada	0	17,7	26,8	26,7	28,6
Ej. Comp. 2-6		Celulosa pulverizada	71	8,8	12,3	13,2	13,1
Ej. 2-9	Periódico	Celulosa descristalizada	0	20,9	27,1	30,2	34,6
Ej. Comp. 2-7		Celulosa pulverizada	56	12,7	9,3	11,9	13,2

Ejemplo 2-10 y Ejemplo Comparativo 2-8

En el Ejemplo 2-10, se empleó la celulosa descristalizada (paja de arroz, cristalinidad del 2%/tamaño medio de partícula de 27 μm) obtenida en el Ejemplo de Producción 2-7. En el Ejemplo Comparativo 2-8, se empleó una celulosa pulverizada (paja de arroz, cristalinidad del 54%/tamaño medio de partícula de 82 μm) obtenida en el Ejemplo Comparativo de Producción 2-4. En el Ejemplo y el Ejemplo Comparativo, cada uno de los productos de celulosa se sometió a la reacción de sacarificación mediante el uso de un producto patrón de celulasas (Celluclast 1,5 l, Novozymes). La celulosa descristalizada o la celulosa pulverizada (0,15 g) se suspendió en una mezcla de reacción enzimática (3 ml) y la mezcla se hizo reaccionar a 50 °C durante 3 días, durante los que la mezcla se agitó con sacudidas. La mezcla enzimática de reacción empleada fue tampón citrato 100 mM (pH: 5,0), 3% (v/v) Celluclast 1,5 l (0,5% en forma de proteína), y 30 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina. Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se separó en un precipitado y un sobrenadante mediante centrifugación. La cantidad de sacárido reductor (en forma de glucosa) liberado en el sobrenadante se determinó de forma cuantitativa mediante el procedimiento DNS. Los resultados se muestran en la Tabla 2-7.

[Tabla 17]

Tabla 2-7

	Materia prima que contiene celulosa	Muestra	Cristalinidad (%)	Cantidad de sacárido reductor liberado en el sobrenadante (g/l)
				Tiempo de reacción (72 h)
Ej. 2-10	Paja de arroz	Celulosa descristalizada	2	31,3
Ej. Comp. 2-8		Celulosa pulverizada	54	13,1

Ejemplos 2-11 y 2-12

- En los Ejemplos 2-11 y 2-12, se emplearon las celulosas descristalizadas producidas en los Ejemplos de Producción 2-6 y 2-8 (periódico (Ejemplo 2-11), cristalinidad del 0%/tamaño medio de partícula de 32 μm y revistas (Ejemplo de Producción 2-12), cristalinidad del 4%/tamaño medio de partícula de 24 μm). En los Ejemplos, cada producto de celulosa se sometió a la reacción de sacarificación mediante el uso de un producto patrón de celulasas (Celluclast 1,5 I, Novozymes). La celulosa descristalizada o la celulosa pulverizada (0,15 g) se suspendió en una mezcla de reacción enzimática (3 ml), y la mezcla se hizo reaccionar a 50 °C durante 3 días, durante los que la mezcla se agitó con sacudidas. Se usaron las siguientes mezclas de reacción enzimática: (Ejemplo 2-11) tampón acetato 100 mM (pH: 3,5), 3% (v/v) Celluclast 1,5 I (0,5% en forma de proteína), y 30 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina y (Ejemplo 2-12) tampón acetato 200 mM (pH: 3,5), 3% (v/v) Celluclast 1,5 I (0,5% en forma de proteína), y 30 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina. Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se separó en un precipitado y un sobrenadante mediante centrifugación. La cantidad de sacárido reductor (en forma de glucosa) liberado en el sobrenadante se determinó de forma cuantitativa mediante el procedimiento DNS. Los resultados se muestran en la Tabla 2-8.

[Tabla 18]

Tabla 2-8

	Materia prima que contiene celulosa	Muestra	Cristalinidad (%)	Cantidad de sacárido reductor liberado en el sobrenadante (g/l)
				Tiempo de reacción (72 h)
Ej. 2-11	Periódico	Celulosa descristalizada	0	34,9
Ej. 2-12	Revista	Celulosa descristalizada	4	27,9

- A partir de las Tablas 2-1 y 2-2, se confirmó que los procedimientos para la producción de las celulosas descristalizadas de acuerdo con los Ejemplos de Producción 2-1 a 2-3 fueron capaces de producir celulosa descristalizada con una cristalinidad reducida de una manera eficaz y por lo tanto fueron excelentes en la productividad en comparación con aquéllas de acuerdo con los Ejemplos Comparativos de Producción 2-1 a 2-3 y 1-1 a 1-4. Además, se descubrió que las celulosas descristalizadas producidas en los Ejemplos de Producción 2-1 a 2-3 tenían un tamaño medio de partícula apropiado, en comparación con aquéllas producidas en el Ejemplo Comparativo de Producción 2-1.
- Como queda claro a partir de las Tablas 2-3 y 2-4, el procedimiento para la producción de sacáridos mostrado en los Ejemplos 2-1 a 2-5 presentó una mayor productividad en comparación con los Ejemplos Comparativos 2-1 a 2-4. Como queda claro a partir de la Tabla 2-5, el sacárido producido estaba formado principalmente por glucosa. Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención es útil para la producción de una materia prima para la producción de etanol o ácido láctico mediante fermentación. Como queda claro a partir de las Tablas 2-6, 2-7 y 2-8, el procedimiento para la producción de Sacáridos es eficaz para diversos materiales de celulosa; es decir, no solamente para la pulpa sino también para los materiales de papel tales como papel sin madera, cartón corrugado, periódico y revistas; y tallos y hojas de plantas tal como paja de arroz.

Aplicabilidad industrial

- De acuerdo con el procedimiento de la presente invención para la producción de sacárido, la celulosa descristalizada que tiene una cristalinidad reducida de la celulosa de tipo I se puede producir a partir de una materia prima que

contiene celulosa a través de un tratamiento preliminar. Por lo tanto, el sacárido se puede producir con una alta productividad y eficacia a través de la reacción enzimática. El sacárido producido de este modo es útil, por ejemplo, para la producción de sustancias tales como etanol y ácido láctico a través de fermentación o de un procedimiento similar.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de sacárido, que incluye la sacarificación de la celulosa descristalizada preparada a partir de una materia prima que contiene celulosa que tiene una cristalinidad de la celulosa de tipo I superior al 33% según se calcula a partir de la siguiente fórmula (1):

$$5 \quad \text{Cristalinidad de la Celulosa de Tipo I (\%)} = \frac{[(I_{22.6} - I_{18.5})/I_{22.6}] \times 100}{(1)}$$

10 en la que $I_{22.6}$ es la intensidad de la difracción de un plano reticular (plano 002), como se mide con un ángulo de difracción 2θ de $22,6^\circ$ por análisis de difracción de Rayos X, y $I_{18.5}$ es la intensidad de difracción de un resto amorfo como se mide con un ángulo de difracción 2θ de $18,5^\circ$ por análisis de difracción de Rayos X, procedimiento que comprende:

15 tratamiento de la materia prima que contiene celulosa por medio de un molino para reducir la cristalinidad de la celulosa de tipo I de la celulosa a un 10% o inferior, en el que la materia prima que contiene celulosa tiene un contenido de celulosa de un residuo obtenido por eliminación del agua de la materia prima que contiene celulosa en un 20% en peso o superior, para preparar de ese modo celulosa descristalizada, y provocando que una celulosa y/o hemicelulosa actúe sobre la celulosa cristalizada, para de ese modo sacarificar la celulosa descristalizada, en el que la materia prima que contiene celulosa tiene una densidad aparente de 100 a 500 kg/m³ y un tamaño medio de partícula de 0,01 a 1 mm.

20 2. Un procedimiento de producción de sacárido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la materia prima que contiene celulosa se trata por medio de un molino durante 0,01 a 72 horas.

3. Un procedimiento de producción de sacárido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la materia prima que contiene celulosa es un material que ha sido tratado inicialmente por medio de una extrusora.

4. Un procedimiento de producción de sacárido de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la extrusora es una extrusora de doble tornillo.

25 5. Un procedimiento para la producción de sacárido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el molino es un molino de tipo medio.

6. Un procedimiento de producción de sacárido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la materia prima que contiene celulosa es al menos una especie seleccionada del grupo que consiste en pulpa, papel, tallos u hojas de plantas, cáscaras de plantas, y madera.