

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2022 년 3 월 31 일 (31.03.2022)



(10) 국제공개번호

WO 2022/065602 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 5/04 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2020/018706

(22) 국제출원일:

2020 년 12 월 18 일 (18.12.2020)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2020-0125751 2020 년 9 월 28 일 (28.09.2020) KR

(71) 출원인: 전남대학교 산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY)

[KR/KR]; 61186 광주광역시 북구 용봉로 77, Gwangju (KR).

(72) 발명자: 남승희 (NAM, Seung-Hee); 61111 광주광역시 북구 저불로 21, 105동 1102호, Gwangju (KR). 양광열 (YANG, Kwang-Yeol); 61186 광주광역시 북구 용봉로 77, 농생대 4호관 210호, Gwangju (KR). 임애은 (IM, Ae-

Eun); 61186 광주광역시 북구 용봉로 77, 농생대 4호관 209호, Gwangju (KR).

(74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 06779 서울시 서초구 동산로 23 베텔회관 8층, Seoul (KR).

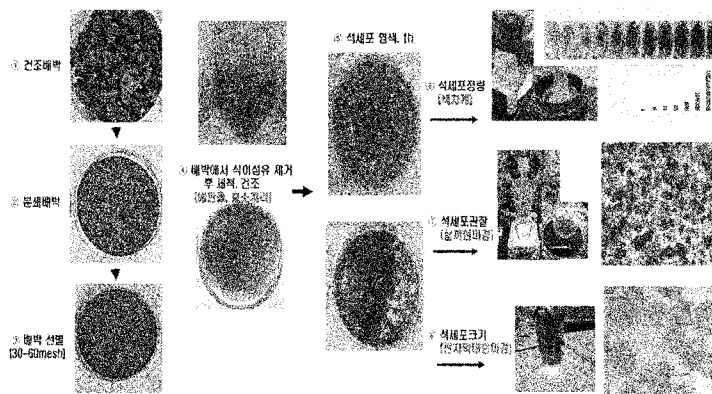
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

(54) Title: METHOD FOR EXTRACTING PEAR-DERIVED STONE CELLS

(54) 발명의 명칭: 배 유래 석세포의 추출방법

[도1]



- ① ... Dry pear dregs
- ② ... Pulverize pear dregs
- ③ ... Sort pear dregs [30-60 mesh]
- ④ ... Wash and dry pear dregs after removing dietary fibers therefrom [treat with ethanol and enzyme]
- ⑤ ... Stain stone cells, 1h
- ⑥ ... Quantify stone cells [color-difference meter]
- ⑦ ... Observe stone cells [stereoscopic microscope]
- ⑧ ... Size of stone cells [digital microscope]

(57) Abstract: The present invention relates to a method for extracting pear-derived stone cells, the method comprising a step for treating a pear with a mixed enzyme including cellulose and hemicellulose. Accordingly, the method for extracting pear-derived stone cells according to the present invention can be used to conveniently extract stone cells using only alcohol and enzyme treatment without using complex processes or harmful chemicals, and extract highly pure stone cells of uniform size, while minimizing the use of unnecessary processes, chemicals, and enzymes, by separating out portions in which stone cells are concentrated.

[다음 쪽 계속]

LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 배(pear)에 셀룰레이즈(cellulose) 및 헤미셀룰레이즈(hemicellulose)를 포함하는 혼합효소를 처리하는 단계를 포함하는 배 유래 식세포의 추출방법에 관한 것이다. 이에 의하여, 본 발명의 배 유래 식세포의 추출방법은 배 유래의 식세포를 추출하는데 있어서 복잡한 공정이나 유해한 화학제품의 사용을 하지 않고 알코올과 효소처리만으로 간편하게 식세포를 추출하며, 나아가 식세포가 밀집된 부분을 선별하여 불필요한 공정과 화학물질, 효소의 사용을 최소화하며 고순도의 균일한 크기를 갖는 식세포를 추출할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 배 유래 석세포의 추출방법

기술분야

- [1] 본 발명은 배 유래 석세포의 추출방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 배의 착즙 후 부산물인 배박 등을 재료로 고순도의 균일한 크기를 갖는 배 유래 석세포를 간편하게 추출하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 우리나라 배 면적은 수입 자유화 이후 상대적으로 경제성이 낮은 수도 등 타 작목 전환에 의해 매우 짧은 기간에 재배 면적이 확대되어 전체 과수재배 면적의 16% 이상을 차지하는 중요한 과종이 되었다. 배의 최대 수출입 국가인 유럽 지역에 동양배가 최근 수출되어 과육 내 수분이 많고 생과로 소비가 가능한 동양배의 특성이 알려지기 시작했으며 소비자들은 중소과 및 조직감이 부드러운 유연 다즙한 배를 선호하는 것으로 조사되었다. 특히 리그닌과 셀룰로오스 등으로 구성되어있는 단단한 석세포가 많이 존재하는 배는 과실의 조직감이 강해 불량한 것으로 알려져 있다. 이러한 석세포에 대한 연구는 서양배에서는 석세포의 성분, 형성시기, 과육내 석세포 밀도 등의 많은 연구가 이루어졌다. 그러나 우리나라에서 주로 재배하고 있는 남방형 동양배에서는 연구가 미흡한 상태이다.
- [3] 석세포는 세포 조직 내에서 세포벽의 셀룰로오스 안에 리그닌이 침적되는 목질화 현상으로 세포벽이 단단하게 굳어 고정된 형태로 배나무(Pyrus)속 과실, 작약과 다알리아의 덩이뿌리, 벚나무(Prunus)속 종자의 껍질에 균을 이루어 산재한다. 배 과육 내 석세포의 발생은 만개 후 14일 이후부터 관찰되고 초기에는 구형을 나타내다가 성장하면서 방사 형태로 되는 것을 특징으로 한다. 여러 개의 세포가 뭉쳐진 구조이고 품종에 따라 함량과 크기가 다양하다. 또한 석세포는 만개 28일까지 급속히 증가하여 건물중의 50% 정도를 차지하며 과실이 성장하면서 줄어들어 품종 간 차이가 있지만 수확기에 건물중의 12 내지 18% 크기는 0.1 내지 0.5mm 정도를 이루며 주요 성분은 리그노셀룰로오스, 탄수화물(셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 펙틴), 리그닌 등으로 구성된다. 석세포의 형성은 수체 내 수분 부족 시 엽과 과실간의 수분 경합 등 환경요인이나 기계적인 장애를 극복하기 위한 과정에서 나타나는 목질화 현상(lignification)에 의해 발생이 촉진된다. 참고로 도 7에 배의 석세포의 과실 분포 부위에 따른 석세포의 성상에 대한 사진을 나타내었다.
- [4] 미세플라스틱은 지름 5mm 이하의 플라스틱 알갱이로 이물질들을 효과적으로 제거하는 효과적이므로 치약, 비누, 각질제거용품 등에 널리 사용되고 있다. 또한 관계법령: 「화장품 안전기준 등에 관한 규정」 (식품의약품안전처 고시 제2016-74호, 2016. 7. 28) 화장품법 시행규칙, 별표3, 의약외품

품목허가·신고·심사 규정(식품의약품안전처 고시 제2017-43호, 2017. 1. 26.) 이 들어간 화장품 등은 만들거나 수입할 수 없고 판매가 금지된다.

- [5] 치약의 플라그 제거, 화장품의 각질제거 또는 세정, 공업용 연마용으로 사용되는 미세플라 스틱으로 인한 환경오염 문제가 지속적으로 제기되며 현재, 국내외에는 미세플라 스틱이 함유된 화장품, 치약등 관련 제품의 제조, 사용이 전면 금지됨. 국내에서는 미세플라 스틱 대체제로 살구씨나 호두껍질 분말 등을 외국에서 전량 수입해 판매하고 있는 실정으로 배석세포 활용 개발 상업용 제품은 전무하다. '18년도 농촌진흥청에서는 배의 석세포 함유 치약 등 의약외품으로 이용하기 위한 식약청 인증 획득을 위해 안전성·유효성 및 인체적용 시험을 추진한 바 있으며, 미국, 독일 등에서 미세플라 스틱 대체제로 살구씨, 밀랍, 쌀 왁스, 바이오기반 생분해성 폴리머를 포함한 천연물들에 대한 연구 진행중이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 배 유래의 석세포를 추출하는데 있어서 복잡한 공정이나 유해한 화학제품의 사용을 하지 않고 알코올과 효소처리만으로 간편하게 석세포를 추출하며, 나아가 석세포가 밀집된 부분을 선별하여 불필요한 공정과 화학물질, 효소의 사용을 최소화하며 고순도의 균일한 크기를 갖는 석세포를 추출하는 방법을 제공하는데 있다.

기술적 해결방법

- [7] 본 발명의 일 측면에 따르면,
- [8] 배(pear)에 셀룰레이즈(cellulose) 및 헤미셀룰레이즈(hemicellulose)를 포함하는 혼합효소를 처리하는 단계를 포함하는 배 유래 석세포의 추출방법이 제공된다.
- [9] 상기 혼합효소는 베타글루카네이즈(β -glucanase) 및 펙티나아제(pectinase)를 추가로 포함할 수 있다.
- [10] 상기 배 유래 석세포 추출방법은 알코올 처리 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [11] 상기 배 유래 석세포 추출방법은 산 처리 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [12] 상기 배 유래 석세포 추출방법은, 상기 알코올 처리 단계; 및 상기 효소 처리 단계;를 순차적으로 수행할 수 있다.
- [13] 상기 배 유래 석세포 추출방법은, 상기 알코올 처리 단계; 상기 산 처리 단계; 및 상기 효소 처리 단계;를 순차적으로 수행할 수 있다.
- [14] 바람직하게는 상기 배 유래 석세포 추출방법은,
- [15] (a) 배에 알코올을 첨가하여 알코올을 혼합하는 단계;
- [16] (b) 상기 알코올 혼합물로부터 침전물을 수득하는 단계; 및
- [17] (c) 상기 침전물에 상기 혼합효소와 완충용액을 첨가하여 효소 반응시켜 효소반응 용액을 제조하는 단계; 및
- [18] (d) 상기 효소반응 용액을 원심분리한 후 상등액을 제거하고 석세포를

추출하는 단계;를 순차적으로 수행할 수 있다.

[19] 단계 (a)에서, 상기 알코올은 90 내지 100% 농도의 에탄올 수용액일 수 있다.

[20] 단계 (c)에서, 상기 혼합효소는 고형물의 0.01 내지 0.15wt% 함량으로 첨가할 수 있다.

[21] 상기 배 유래 석세포 추출방법은,

[22] (1) 배에 알코올을 첨가하여 알코올을 혼합하는 단계;

[23] (2) 상기 알코올 혼합물로부터 침전물을 수득하는 단계;

[24] (3) 상기 침전물에 산을 혼합하여 산처리하고 산처리된 침전물을 수득하는 단계;

[25] (4) 상기 산처리된 침전물에 상기 혼합효소와 완충용액을 첨가하여 효소 반응시켜 효소반응 용액을 제조하는 단계; 및

[26] (5) 상기 효소반응 용액을 원심분리한 후 상등액을 제거하고 석세포를 추출하는 단계;를 순차적으로 수행할 수 있다.

[27] 상기 배는 배를 착즙한 후 잔여하는 부산물인 배박의 건조 분말일 수 있다.

[28] 상기 배박의 건조 분말은 입자 크기가 30 내지 60 메쉬일 수 있다.

[29] 상기 배는 개화 후 30 내지 60일이 경과된 배 유과의 분쇄물일 수 있다.

[30] 상기 배 유과의 분쇄물은 건조 분말 상태일 수 있다.

[31] 상기 알코올 처리에 사용되는 알코올은 에탄올, 프로판올 및 부탄올 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

[32] 상기 산 처리에 사용되는 산은 염산(HCl), 질산(HNO₃), 황산(H₂SO₄), 불산(HF) 및 인산(H₃PO₄) 중에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

발명의 효과

[33] 본 발명의 배 유래 석세포의 추출방법은 배 유래의 석세포를 추출하는데 있어서 복잡한 공정이나 유해한 화학제품의 사용을 하지 않고 알코올과 효소처리만으로 간편하게 석세포를 추출하며, 나아가 석세포가 밀집된 부분을 선별하여 불필요한 공정과 화학물질, 효소의 사용을 최소화하며 고순도의 균일한 크기를 갖는 석세포를 추출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[34] 도 1은 비교예 1 내지 5, 및 실시예 1 내지 7의 석세포 추출과정 및 석세포의 관찰에 대한 과정의 개략도이다.

[35] 도 2는 실험예 1의 배박 입자 크기별 사진과 현미경 이미지이다.

[36] 도 3은 실험예 2에 따른 배박 분말 유래의 배석세포의 추출조건 별 현미경 이미지이다.

[37] 도 4는 실험예 2에 따른 30 내지 60mesh의 입자크기로 선별된 배박 분말 유래의 배석세포의 추출조건 별 현미경 이미지이다.

[38] 도 5는 개화 후 60일 경과된 어린 배의 분말(유과) 유래의 배석세포의 추출조건 별 현미경 이미지이다.

- [39] 도 6은 실험예 3에 따른 석세포의 전자현미경 이미지이다.
 [40] 도 7은 배의 석세포의 과실 분포 부위에 따른 석세포의 성장에 대한 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [41] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [42] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [43]
- [44] 이하, 본 발명의 배(pear) 유래 석세포의 추출방법에 대해 설명하도록 한다.
- [45] 본 발명의 배 유래 석세포의 추출방법은 배(pear)에 셀룰레이즈(cellulose) 및 헤미셀룰레이즈(hemicellulose)를 포함하는 혼합효소를 처리하는 단계를 포함한다.
- [46] 경우에 따라, 상기 혼합효소는 베타글루카네이즈(β -glucanase) 및 펙티나아제(pectinase)를 추가로 포함할 수 있다.
- [47] 바람직하게는 상기 배 유래 석세포 추출방법은 석세포 추출 단계는 알코올 처리 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [48] 또한, 경우에 따라 상기 배 유래 석세포 추출방법은 산 처리 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [49] 상기 배가 배박인 경우에는 알코올 처리 단계만 단독으로 추가하는 것이 바람직하고, 석세포 형성이 완전하지 않은 개화 후 30 내지 60일 경과된 배 유과의 경우에는 알코올 처리와 산처리를 병행하는 것이 석세포 추출효율을 향상시키는데 유리하다.
- [50] 또한, 상기 배 유래 석세포 추출방법은, 상기 알코올 처리 단계, 상기 산 처리 단계 및 상기 효소 처리 단계를 순차적으로 수행하거나, 또는 상기 산 처리를 생략하고 상기 알코올 처리 단계 및 상기 효소 처리 단계를 순차적으로 수행할 수 있다. 이때, 상기 배를 배박으로 사용하는 경우에는 알코올 처리와 효소 처리를 순차적으로 하는 것이 바람직하고, 석세포 형성이 완전하지 않은 배

유과를 사용하는 경우에는 알코올 처리, 산 처리, 효소 처리를 순차적으로 수행하는 것이 추출효율을 높이는 데 더욱 유리하다.

[51] 상기 배는 배를 착즙한 후 잔여하는 부산물인 배박을 사용하는 것이 바람직하고, 추출 전 상기 배박은 분쇄하여 건조 분말 상태로 사용하는 것이 바람직하다.

[52] 상기 배박의 분말은 입자 크기가 30 내지 60 메쉬인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 30 내지 50 메쉬, 더욱 더 바람직하게는 30 내지 40 메쉬인 것을 선별하여 사용할 수 있다. 이 경우 석세포의 밀도가 높아 불필요한 공정을 최소화할 수 있다.

[53] 본 발명에서 메쉬(mesh) 단위는 KS A 5101(표준체에 의한 입도를 나타내는 단위)를 기준으로 하였으며, 이에 따른 메쉬와 마이크로미터(μm) 단위 환산표를 아래의 표 1에 나타내었다.

[54] [표1]

메쉬(Mesh)	마이크로미터(μm)	메쉬(Mesh)	마이크로미터(μm)
10	1900	40	381
12	1520	42	355
14	1300	45	323
16	1130	48	295
18	980	50	279
20	864	60	221
24	701	65	203
28	577	70	185
30	535	80	173
32	500	90	150
35	447	100	140

[55] 또는, 상기 배는 개화 후 30 내지 60일이 경과된 배 유과의 분쇄물을 사용할 수 있고, 이때 분쇄물은 건조 분말일 수 있다. 상기 알코올 처리에 사용되는 알코올은 에탄올, 프로판올 및 부탄올 중에서 선택된 어느 하나일 수 있고, 바람직하게는 에탄올일 수 있다.

[56] 상기 산 처리에 사용되는 산은 염산(HCl), 질산(HNO₃), 황산(H₂SO₄), 불산(HF) 및 인산(H₃PO₄) 중에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 염산을 사용할 수 있다.

[57] 상기 배 유래 석세포 추출방법은 전체 배박 또는 30 내지 60메쉬로 선별된 배박을 사용하는 경우 아래의 순서에 따라 석세포를 추출하는 것이 바람직하다.

- [58] 먼저, 배에 알코올을 첨가하여 알코올을 혼합한다(단계 a).
- [59] 상기 알코올은 90 내지 100% 농도의 에탄올 수용액인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 95 내지 100% 농도의 에탄올 수용액일 수 있다.
- [60] 상기 반응은 20 내지 30°C에서 반응시키는 것이 바람직하다.
- [61] 다음으로, 상기 알코올 혼합물을 원심분리 후 상등액을 제거하고 침전물을 수득한다(단계 b).
- [62] 이후, 상기 침전물에 상기 혼합효소와 완충용액을 첨가하여 효소 반응시켜 효소반응 용액을 제조한다(단계 c).
- [63] 상기 혼합효소는 침전물의 0.01 내지 0.15wt% 함량으로 첨가하는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 0.05 내지 0.1wt% 함량으로 첨가할 수 있다.
- [64] 상기 효소 반응은 35 내지 40°C에서 수행되는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 36 내지 38°C에서 수행될 수 있다. 상기 온도범위를 벗어나는 경우 배박의 식이섬유의 분해가 충분히 이루어지지 않으므로 석세포의 분리 효율이 저하될 수 있다.
- [65] 상기 효소 반응은 8 내지 20시간 동안 수행되는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 10 내지 18시간, 더욱 더 바람직하게는 14 내지 16시간 동안 수행될 수 있다. 8시간 미만으로 반응시킬 경우 식이섬유 분해가 충분히 이루어지기 어렵고, 20시간 초과시에는 불필요한 공정이 되거나 석세포가 손상될 수 있다.
- [66] 마지막으로, 상기 효소반응 용액을 원심분리한 후 상등액을 제거하고 석세포를 추출한다(단계 d).
- [67] 한편, 상기 배 유래 석세포 추출방법은 개화 후 30 내지 60일이 경과된 배 유과를 사용하는 경우 아래의 순서에 따라 석세포를 추출하는 것이 바람직하다.
- [68] 먼저, 배에 알코올을 첨가하여 알코올을 혼합한다(단계 1).
- [69] 이후, 상기 알코올 혼합물로부터 침전물을 수득한다(단계 2).
- [70] 다음으로, 상기 침전물에 산을 혼합하여 산처리하고 산처리된 침전물을 수득한다(단계 3).
- [71] 이후, 상기 산처리된 침전물에 상기 혼합효소와 완충용액을 첨가하여 효소 반응시켜 효소반응 용액을 제조한다(단계 4).
- [72] 마지막으로, 상기 효소반응 용액을 원심분리한 후 상등액을 제거하고 석세포를 추출한다(단계 5).
- [73] 상술한 석세포 추출방법에서 세부적인 사항은 배박을 사용한 석세포 추출방법과 동일하다.
- [74]
- [75] 이하 본 발명의 실시예를 들어 설명하나 본 발명의 범위가 여기에 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[76] 이하 석세포의 추출에서 사용되는 시료는 i) 배박 전체의 건조분말로서 배 전체를 착즙하고 남은 부산물을 65°C~70°C에서 24시간 동안 건조한 것, ii) 30 내지 60mesh의 입자크기로 선별된 배박 건조분말, iii) 개화 후 60일 경과된 어린 배(유과)의 건조분말 3종으로 각각 사용하였다.

[77]

[78] 비교예 1: 물리적 처리

[79] 시료 10g을 1L 삼각플라스크에 정량해 증류수 450ml를 첨가하여 1시간 동안 25°C에서 120rpm 속도로 반응시킨 후, 8,000rpm으로 원심분리를 10분간 수행하고 4°C로 냉각시켜 상등액 제거함으로써 석세포를 추출하였다.

[80]

[81] 비교예 2: 에탄올 처리

[82] 시료 10g을 1L 삼각플라스크에 정량해 에탄올 450ml를 첨가하여 1시간 동안 25°C에서 120rpm 속도로 반응시켰다. 이후 8,000rpm으로 원심분리를 10분간 수행하고 4°C로 냉각시켜 상등액 제거함으로써 석세포를 추출하였다.

[83]

[84] 비교예 3: 염산 처리

[85] 시료 10g에 1N HCl 450ml를 첨가하여 1시간 동안 25°C에서 120 rpm 속도로 반응 후, 증류수 450ml를 첨가해 3회 씻어낸 후 8,000rpm으로 원심분리를 10분간 수행하고 4°C로 냉각시켜 상등액 제거함으로써 석세포를 추출하였다.

[86]

[87] 비교예 4: 에탄올 -> 염산 처리

[88] 비교예 2와 동일한 조건의 에탄올 처리과정을 거친 후, 증류수로 2번 세척 해 잔류된 에탄올 성분을 원심분리로 제거하고, 비교예 3과 동일한 조건의 염산처리 과정을 순차적으로 거쳐 석세포를 추출하였다.

[89]

[90] 비교예 5: 염산 -> 에탄올 처리

[91] 비교예 3과 동일한 조건으로 염산 처리한 후, 원심분리로 수분 제거하고 비교예 2와 동일한 조건으로 에탄올 처리하여 석세포를 추출하였다.

[92]

[93] 실시예 1: 혼합효소 처리

[94] 시료 10g 에 셀룰레이즈(cellulose)와 헤미셀룰레이즈(hemicellulose)가 1:1중량비로 혼합된 혼합효소를 0.1중량%로 첨가한 후, 소듐아세테이트 버퍼(sodium acetate buffer)(0.01M, pH 5.0)를 450ml 첨가하고 37°C에서 80rpm 속도로 15시간 동안 반응시켜 원심분리한 후 상등액을 완전히 제거하고 석세포를 추출하였으며, 최종 시료는 60°C에서 15시간 동안 건조시켰다.

[95]

[96] 실시예 2: 에탄올 -> 혼합효소 처리

[97] 비교예 2와 동일한 조건으로 에탄올 처리한 후 증류수로 2번 세척하고 잔류

에탄올 성분을 원심분리로 제거하고, 실시예 1과 동일한 조건으로 혼합효소 처리하여 석세포를 추출하였다.

[98]

[99] 실시예 3: 혼합효소 -> 에탄올 처리

[100] 실시예 1과 동일한 조건으로 혼합효소 처리 후, 증류수로 2번 세척하고 원심분리하여 버퍼에 함유된 염을 제거하고, 비교예 2와 동일한 조건으로 에탄올 처리하였으며, 최종 시료는 60°C에서 15시간 동안 열풍 건조시켰다.

[101]

[102] 실시예 4: 염산 -> 혼합효소 처리

[103] 비교예 3과 동일한 조건으로 염산 처리한 후, 수득한 시료 pH를 확인하고 물로 3~4번 세척한 후 pH 1.5가 되면 소듐아세테이트 버퍼(0.01M, pH 5.0)를 첨가하여 pH 5.0가 되도록 하였다. 이후 실시예 1과 동일한 조건으로 혼합효소 처리 후 물로 세척하고, 원심분리로 수분 제거 후 60°C에서 15시간 열풍 건조시켰다.

[104]

[105] 실시예 5: 혼합효소 -> 염산 처리

[106] 실시예 1과 동일한 조건으로 혼합효소 처리 후, 증류수로 2번 세척하고 원심분리하여 버퍼에 함유된 염을 제거하고, 비교예 3과 동일한 조건으로 염산 처리하여 석세포를 추출하였다.

[107]

[108] 실시예 6: 에탄올 -> 염산 -> 혼합효소 처리

[109] 비교예 4와 동일한 조건으로 에탄올 처리 및 염산 처리를 순차적으로 수행한 후, 수득한 시료 pH를 확인하고 물로 3~4번 세척한 후 pH 1.5가 되면 소듐아세테이트 버퍼(0.01M, pH 5.0)를 첨가하여 pH 5.0가 되도록 하였다. 이후 실시예 1과 동일한 조건으로 혼합효소 처리 후 물로 세척하고, 원심분리로 수분 제거 후 60°C에서 15시간 열풍 건조시켰다.

[110]

[111] 실시예 7: 혼합효소 -> 에탄올 -> 염산 처리

[112] 실시예 1과 동일한 조건으로 혼합효소 처리 후 증류수 세척하고, 비교예 4와 동일한 조건으로 에탄올 처리 및 염산 처리를 순차적으로 수행한 후 최종시료를 60°C에서 15시간 열풍 건조시켰다.

[113]

[114] *참고로 비교예 1 내지 5, 및 실시예 1 내지 7의 석세포 추출과정 및 석세포의 관찰에 대한 과정의 개략도를 도 1에 나타내었다.

[115]

[116] [실험예]

[117] 실험예 1: 배박 분말 크기별 배석세포 분석

[118] 시료로 사용한 배박은 배즙 제조 후 남은 배박을 물로 2회 세척 후 동결 건조 및 분쇄하여 분말화하였다. 분말화된 배박을 0~120 mesh 범위의 크기별로 분리하여

전체에서 구성되는 배박 입자 크기별 조성을 관찰하였다. 이들을 2% 플로로글루시놀-HCl(phloroglucinol-HCl) 염색 용액을 첨가해 실온에서 1시간 100rpm으로 염색 후 실체현미경(Stereo Zoom microscopy KS-208M, Olympus)으로 20~25배 확대하여 관찰하였다. 이에 따른 배박 입자 크기별 사진과 현미경 이미지를 도 2에 나타내었고, 배박 입자 크기별 함량을 아래의 표 2에 나타내었다. 이때, 석세포의 함량은 색차계의 적색도(a 값)을 이용하여 분석하였다.

[119] [표2]

크기 (메쉬)	함량 (g/kg DW)	함량 (%)	함량 (%)
10이상	28.2±0.464	2.90	5.6
10-20	10.9±0.202	1.10	
20-30	15.8±0.216	1.60	
30-40	368.5±9.37	36.90	60.7
40-50	198.2±3.164	19.76	
50-60	41.3±0.626	4.07	
60-80	30.7±0.414	3.10	33.70
80-120	64.7±1.001	6.40	
120이하	242.4±1.848	24.20	
전체	100.01	100.0	100.0

[120] 이에 따르면, 배유래 석세포는 대부분 30 내지 60 메쉬 크기의 배박입자에 집중되어 있는 것으로 나타났다. 즉, 30 내지 60 메쉬 크기의 배박 입자에 석세포 전체의 60.7%가 존재하는 것으로 나타났으며, 특히, 30 내지 40 메쉬 크기의 배박 입자에 석세포 함량이 36.9%로 가장 높은 것으로 나타났다. 따라서 배박을 재료로 하여 석세포 추출을 수행할 경우 배박 입자의 크기를 선별하면 더욱 높은 수율로 석세포를 추출할 수 있을 것으로 사료된다.

[121] **실험예 2: 석세포의 추출 효율 분석**

[122] i) 배박 분말, ii) 30 내지 60mesh의 입자크기로 선별된 배박 분말, iii) 개화 후 60일 경과된 어린 배의 분말(유과) 3종의 시료에 대하여 상기 비교예 또는 실시예의 방법에 따라 각각 추출된 석세포를 실험예 1과 동일한 조건으로 염색하여 실체 현미경 이미지를 관찰하였다. i) 배박 분말 유래의 배석세포의 추출조건 별 현미경 이미지를 도 3에 나타내었고, ii) 30 내지 60mesh의 입자크기로 선별된 배박 분말 유래의 배석세포의 추출조건 별 현미경 이미지를 도 4에 나타내었고, iii) 개화 후 60일 경과된 어린 배의 분말(유과) 유래의 배석세포의 추출조건 별 현미경 이미지를 도 5에 나타내었다.

[123] 이에 따르면, 석세포의 추출의 시료는 선별된 배박 분말, 배박 분말, 유과

순으로 석세포의 함량이 높은 것으로 나타났으며, 배의 유과는 석세포 함량은 높지만 성장이 완전하지 않아 조직간 한계선이 불분명하여 성숙과의 배박에서 추출하는 것이 바람직하고, 30 내지 60mesh의 입자크기로 선별된 배박 분말을 재료로 하여 추출하는 것이 더욱 적합한 것을 확인할 수 있었다.

[124] 또한, 시료별 추출 조건에 따른 석세포 추출효율을 분석한 결과를 아래의 표 3에 나타내었다.

[125] [표3]

시료명		전체 배박 (%)	선별 배박 (%)	유과(60일) (%)
무처리(비교예1)		15.53 ^f ±0.11	32.74 ^h ±2.77	26.61 ⁱ ±0.26
단일처리	효소(실시예1)	45.91 ^a ±0.79	69.88 ^{de} ±1.13	31.14 ^f ±0.08
	EtOH(비교예2)	30.52 ^e ±0.15	58.86 ^f ±1.01	38.22 ^d ±0.11
	HCl(비교예3)	13.03 ^g ±0.28	41.16 ^g ±6.97	28.86 ^g ±0.12
에탄올 선처리	EtOH+HCl(비교예4)	31.89 ^e ±2.49	66.52 ^e ±4.15	38.02 ^d ±0.52
	EtOH+효소(실시예2)	46.50 ^a ±0.20	89.97 ^a ±1.15	58.49 ^b ±0.12
	EtOH+HCl+효소(실시예6)	39.37 ^c ±0.20	83.53 ^b ±2.31	86.16 ^a ±0.22
효소 선처리	효소+HCl(실시예5)	35.01 ^d ±0.04	54.21 ^f ±1.28	27.39 ^h ±0.32
	효소+EtOH(실시예3)	43.72 ^b ±0.53	80.43 ^{bc} ±4.11	32.95 ^e ±0.24
	효소+EtOH+HCl(실시예7)	36.64 ^d ±1.72	75.85 ^{cd} ±2.40	43.79 ^c ±0.81

[126] 이에 따르면, 전체 배박이나 선별 배박을 시료로 사용한 경우에는 단일처리군 중에는 실시예 1이 식이섬유를 제거할 수 있는 효소처리이므로 가장 효율적인 것으로 나타났고, 복합처리군 중에는 실시예 2의 에탄올 -> 효소 처리군이 가장 효율이 높은 것으로 나타났고, 염산을 추가 처리한 실시예 6은 오히려 효율이 저하되는 것으로 나타났다. 한편 유과 시료를 사용한 경우에는 실시예 6의 에탄올 -> 염산 -> 효소처리군이 추출 효율이 가능 우수한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 석세포가 생성중에 있으므로 화학적 처리가 효율을 향상시키는 역할을 한 것으로 보인다.

[127] 한편, 동일한 복합처리라 하더라도 에탄올을 선처리한 경우에 효소를 선처리한 경우와 대비하여 15 내지 20% 수율을 향상시키는 것으로 나타났다. 가장

효율적인 방법은 입자크기가 30 내지 50 메쉬로 선별된 배박 분말을 시료로 사용하고 에탄올 -> 효소 처리한 실시예 2의 추출방법으로 나타났다.

[128]

[129] **실험예 3: 배석세포 크기 및 분포 분석**

[130] 전체 배박, 선별 배박, 유과로부터 최적 추출조건으로 확보된 시료의 석세포 입자크기를 2% Phloroglucinol-HCl 염색용액을 첨가해 실온에서 1시간 100rpm으로 염색 후 전자현미경 (ino-Lite Digital Microscope AM3111)으로 65배 확대한 이미지를 도 6에 나타내었고, DinoCapture 2.0 (AM/413ZT) 프로그램을 이용해 석세포의 크기를 측정하여 그 결과를 표 4에 나타내었다.

[131] [표4]

시료명	처리조건	지름 (μm)	
		평균	표준편차
전체 배박	무처리(비교예 1)	654.70	268.90
	에탄올->효소(실시예 2)	232.11	85.44
선별 배박	무처리(비교예 1)	362.64	82.99
	에탄올->효소(실시예 2)	161.8	20.63
유과	무처리(비교예 1)	533.4	355.8
	에탄올->염산->효소(실시예 6)	242.6	153.4

[132] 이에 따르면, 전자현미경을 이용하여 각 시료의 가장 높은 추출효율을 나타내는 방법으로 수득한 석세포의 크기 및 균일도를 조사한 결과, 전체 배박, 선별배박, 유과 중 선별 배박을 시료로 실시예 2의 방법으로 추출된 석세포의 크기가 $161.8\mu\text{m}$ 로 가장 작고, 표준편차가 $20.63\mu\text{m}$ 로 나타나 균일도도 높은 것으로 나타나 상업적 활용에 가장 적합할 것으로 보인다.

[133] 이상, 본 발명의 실시예들에 대하여 설명하였으나, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서, 구성 요소의 부가, 변경, 삭제 또는 추가 등에 의해 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있을 것이며, 이 또한 본 발명의 권리범위 내에 포함된다고 할 것이다.

산업상 이용가능성

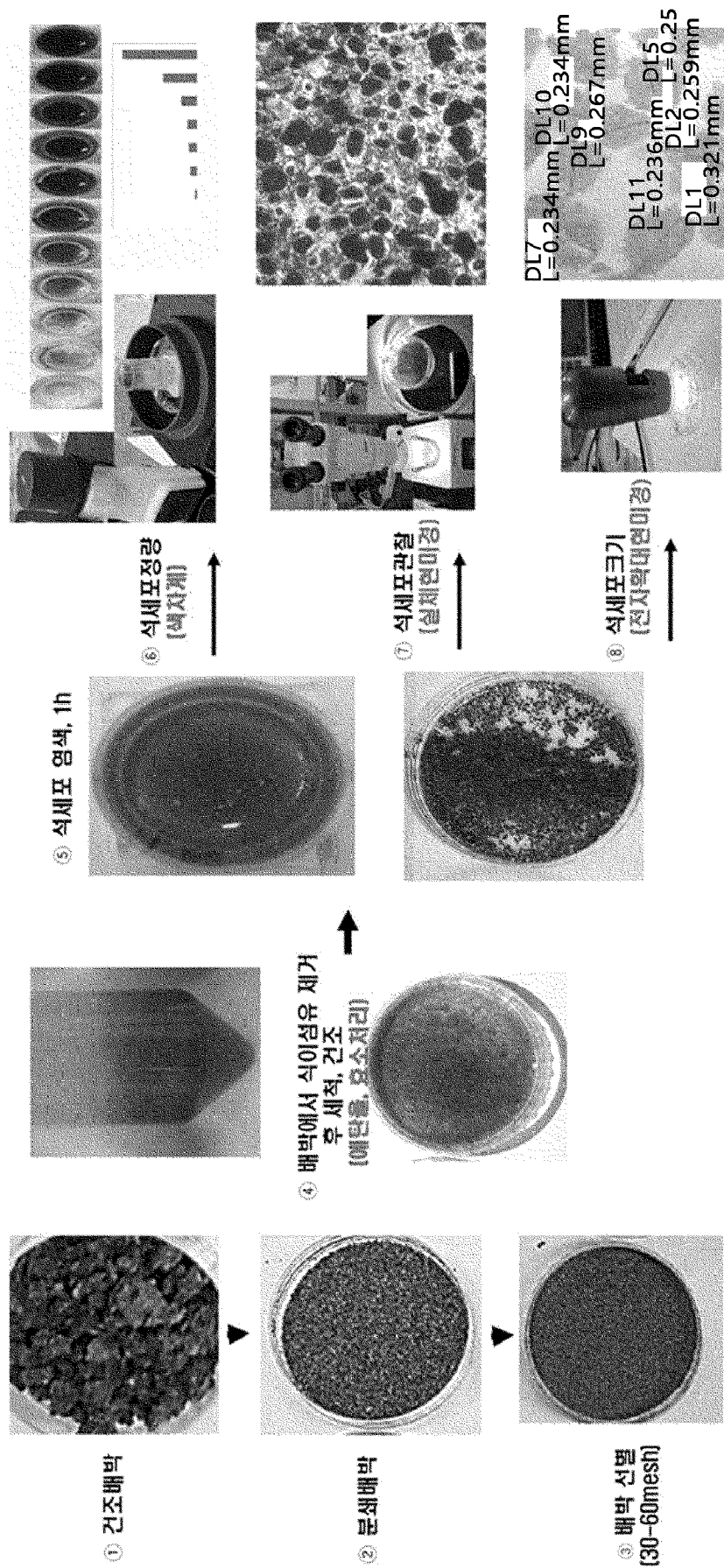
[134] 본 발명의 배 유래 석세포의 추출방법은 배 유래의 석세포를 추출하는데 있어서 복잡한 공정이나 유해한 화학제품의 사용을 하지 않고 알코올과 효소처리만으로 간편하게 석세포를 추출하며, 나아가 석세포가 밀집된 부분을 선별하여 불필요한 공정과 화학물질, 효소의 사용을 최소화하며 고순도의 균일한 크기를 갖는 석세포를 추출할 수 있다.

청구범위

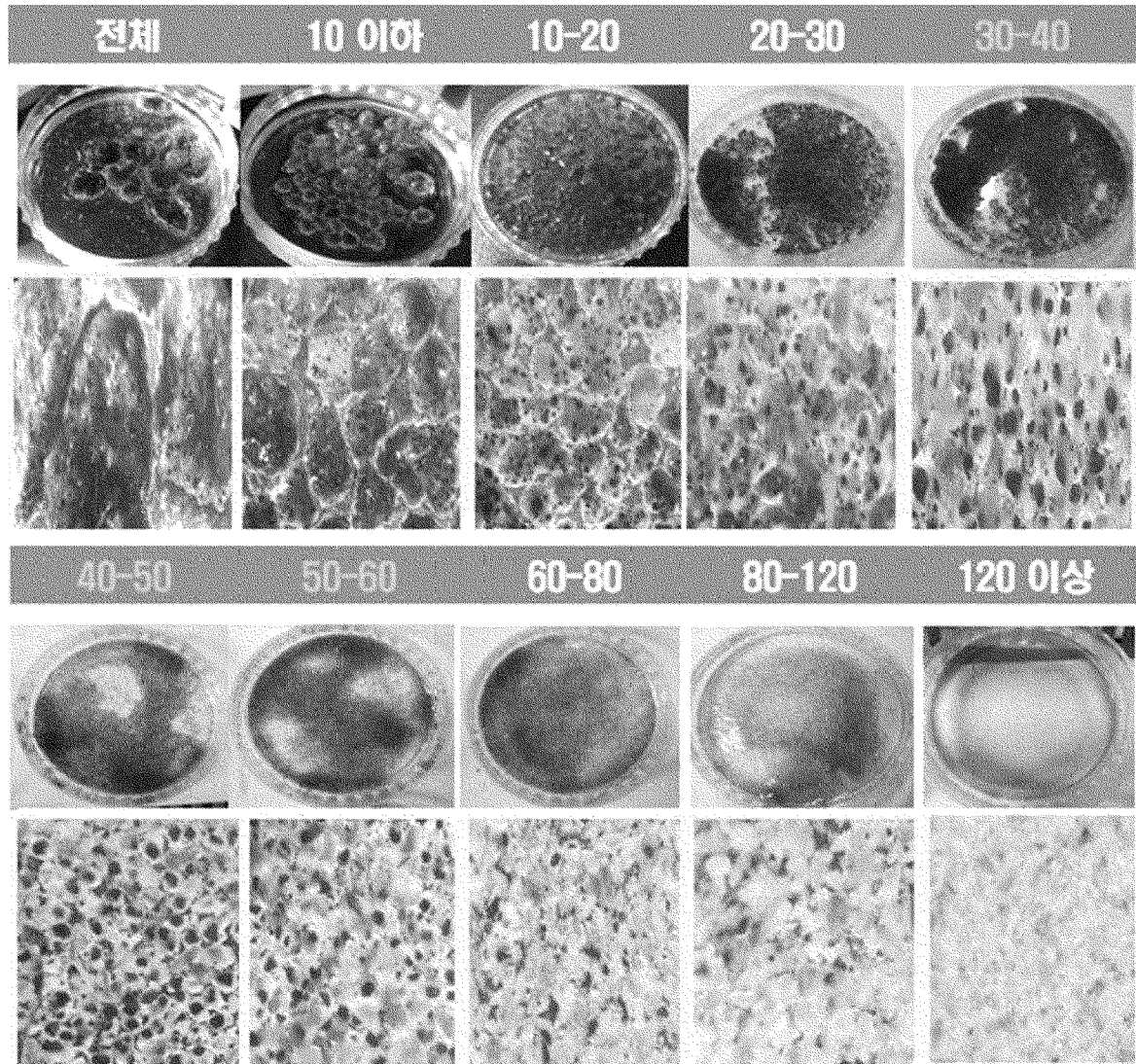
- [청구항 1] 배(pear)에 셀룰레이즈(cellulose) 및 헤미셀룰레이즈(hemicellulose)를 포함하는 혼합효소를 처리하는 단계를 포함하는 배 유래 식세포의 추출방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 혼합효소는 베타글루카네이즈(β -glucanase) 및 펙티나아제(pectinase)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 배 유래 식세포의 추출방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 배 유래 식세포 추출방법은 알코올 처리 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 배 유래 식세포의 추출방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 배 유래 식세포 추출방법은 산 처리 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 배 유래 식세포의 추출방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 배 유래 식세포 추출방법은,
상기 알코올 처리 단계; 및 상기 효소 처리 단계;를 순차적으로 수행하는 것을 특징으로 하는 배 유래 식세포의 추출방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 배 유래 식세포 추출방법은,
상기 알코올 처리 단계; 상기 산 처리 단계; 및 상기 효소 처리 단계;를 순차적으로 수행하는 것을 특징으로 하는 배 유래 식세포의 추출방법.
- [청구항 7] 제5항에 있어서,
상기 배 유래 식세포 추출방법은,
(a) 배에 알코올을 첨가하여 알코올을 혼합하는 단계;
(b) 상기 알코올 혼합물로부터 침전물을 수득하는 단계; 및
(c) 상기 침전물에 상기 혼합효소와 완충용액을 첨가하여 효소 반응시켜 효소반응 용액을 제조하는 단계; 및
(d) 상기 효소반응 용액을 원심분리한 후 상등액을 제거하고 식세포를 추출하는 단계;를 순차적으로 수행하는 것을 특징으로 하는 배 유래 식세포의 추출방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
단계 (a)에서, 상기 알코올은 90 내지 100% 농도의 에탄올 수용액인 것을 특징으로 하는 배 유래 식세포의 추출방법.
- [청구항 9] 제7항에 있어서,
단계 (c)에서, 상기 혼합효소는 고형물의 0.01 내지 0.15wt% 함량으로 첨가하는 것을 특징으로 하는 배 유래 식세포의 추출방법.

- [청구항 10] 제6항에 있어서,
상기 배 유래 석세포 추출방법은,
(1) 배에 알코올을 첨가하여 알코올을 혼합하는 단계;
(2) 상기 알코올 혼합물로부터 침전물을 수득하는 단계;
(3) 상기 침전물에 산을 혼합하여 산처리하고 산처리된 침전물을 수득하는 단계;
(4) 상기 산처리된 침전물에 상기 혼합효소와 완충용액을 첨가하여 효소 반응시켜 효소반응 용액을 제조하는 단계; 및
(5) 상기 효소반응 용액을 원심분리한 후 상등액을 제거하고 석세포를 추출하는 단계;를 순차적으로 수행하는 것을 특징으로 하는 배 유래 석세포의 추출방법.
- [청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 배는 배를 착즙한 후 잔여하는 부산물인 배박의 건조 분말인 것을 특징으로 하는 배 유래 석세포의 추출방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 배박의 건조 분말은 입자 크기가 30 내지 60 메쉬인 것을 선별한 것을 특징으로 하는 배 유래 석세포의 추출방법.
- [청구항 13] 제1항에 있어서,
상기 배는 개화 후 30 내지 60일이 경과된 배 유과의 분쇄물인 것을 특징으로 하는 배 유래 석세포의 추출방법.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 배 유과의 분쇄물은 건조 분말 상태인 것을 특징으로 하는 배 유래 석세포의 추출방법.
- [청구항 15] 제3항에 있어서,
상기 알코올 처리에 사용되는 알코올은 에탄올, 프로판올 및 부탄올 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 배 유래 석세포 추출방법.
- [청구항 16] 제4항에 있어서,
상기 산 처리에 사용되는 산은 염산(HCl), 질산(HNO₃), 황산(H₂SO₄), 불산(HF) 및 인산(H₃PO₄) 중에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 배 유래 석세포 추출방법.

[도1]

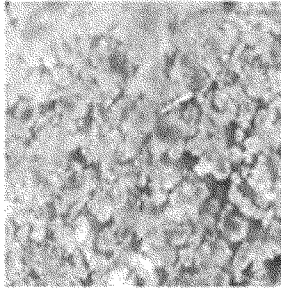
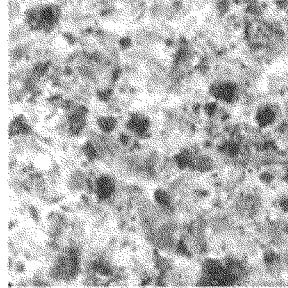
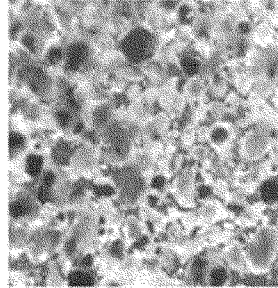
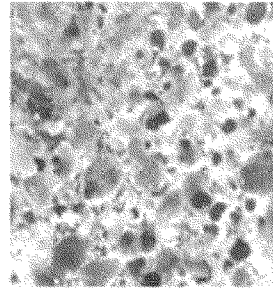
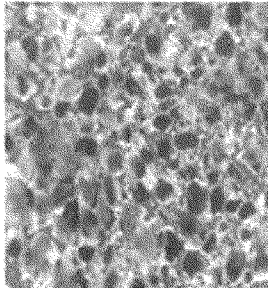
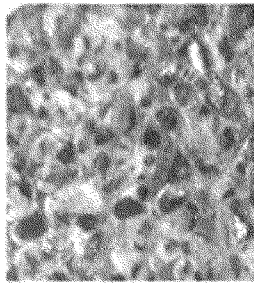
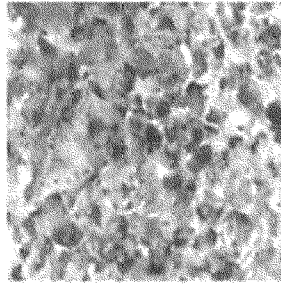
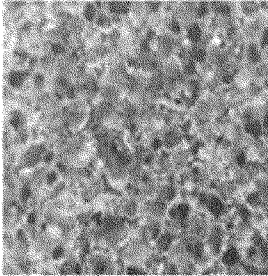
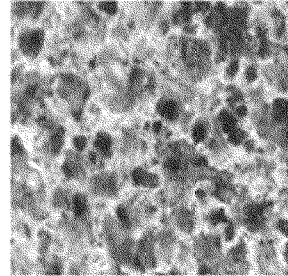
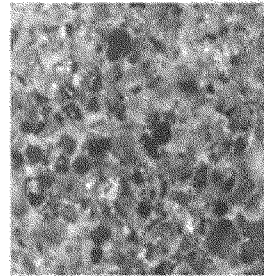


[도2]



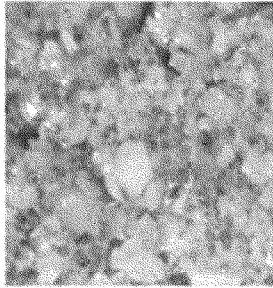
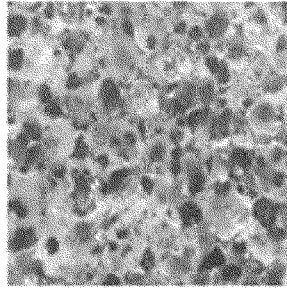
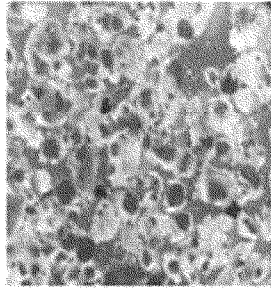
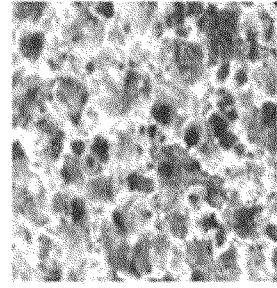
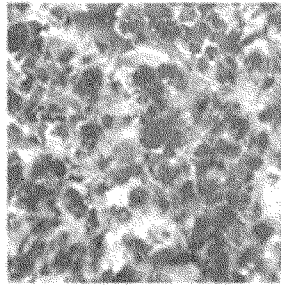
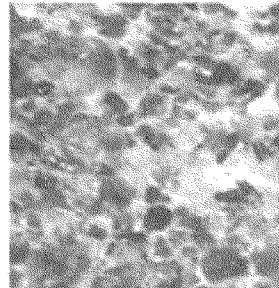
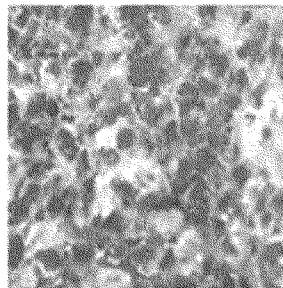
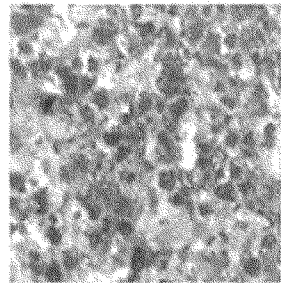
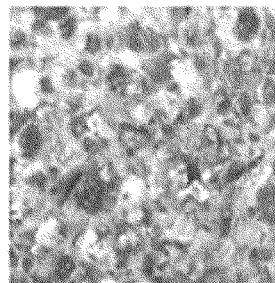
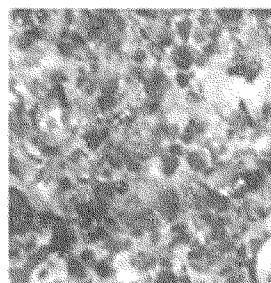
[도3]

[비교예1]

[실시예1]
EZ[비교예2]
ET[비교예3]
HCl[실시예2]
ET-EZ[비교예4]
ET-HCl[실시예6]
ET-HCl-EZ[실시예3]
EZ-ET[실시예5]
EZ-HCl[실시예7]
EZ-ET-HCl

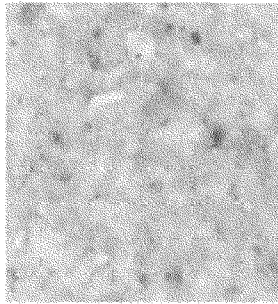
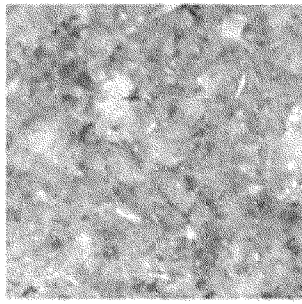
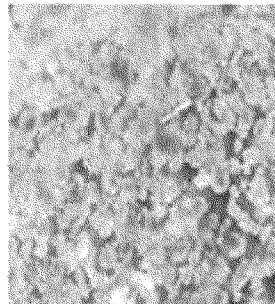
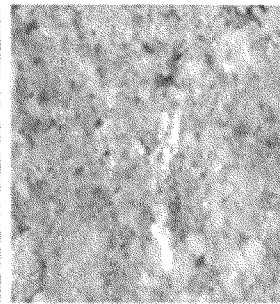
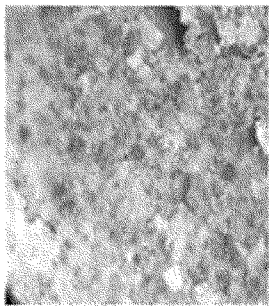
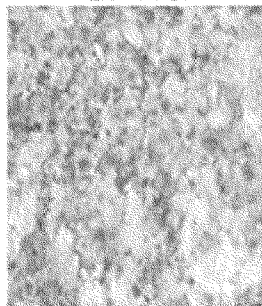
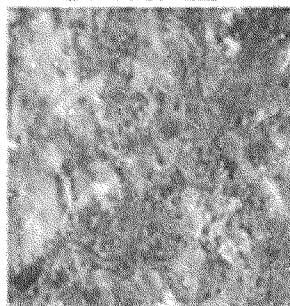
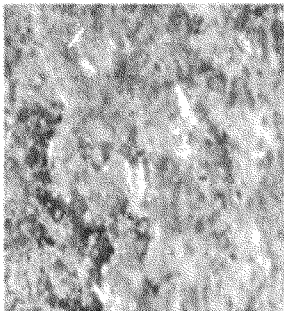
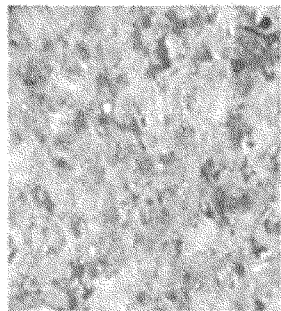
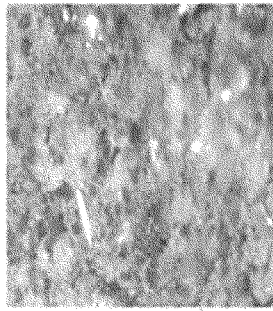
[도4]

[비교예1]

[실시예1]
EZ[비교예2]
ET[비교예3]
HCl[실시예2]
ET-EZ[비교예4]
ET-HCl[실시예6]
ET-HCl-EZ[실시예3]
EZ-ET[실시예5]
EZ-HCl[실시예7]
EZ-ET-HCl

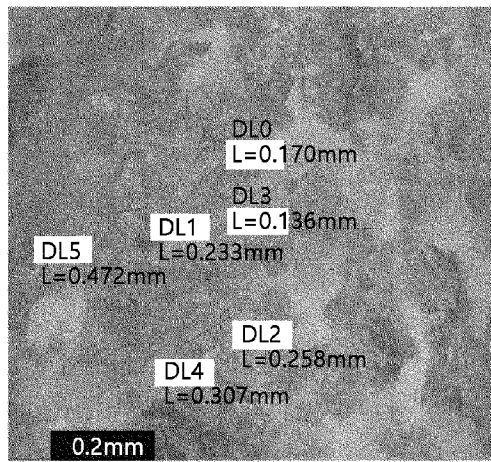
[도5]

[비교예1]

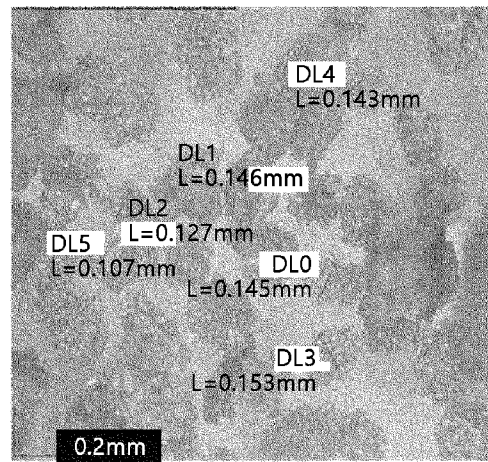
[실시예1]
EZ[비교예2]
ET[비교예3]
HCl[실시예2]
ET-EZ[비교예4]
ET-HCl[실시예6]
ET-HCl-EZ[실시예3]
EZ-ET[실시예5]
EZ-HCl[실시예7]
EZ-ET-HCl

[도6]

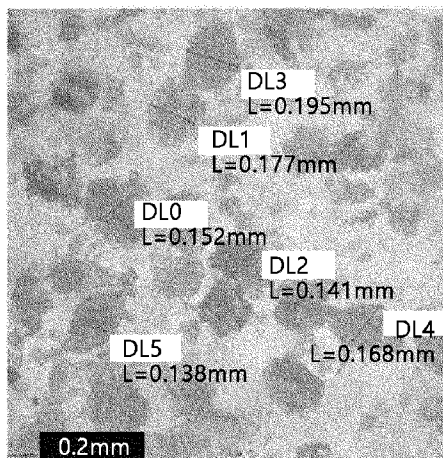
[실시예2: 배박]



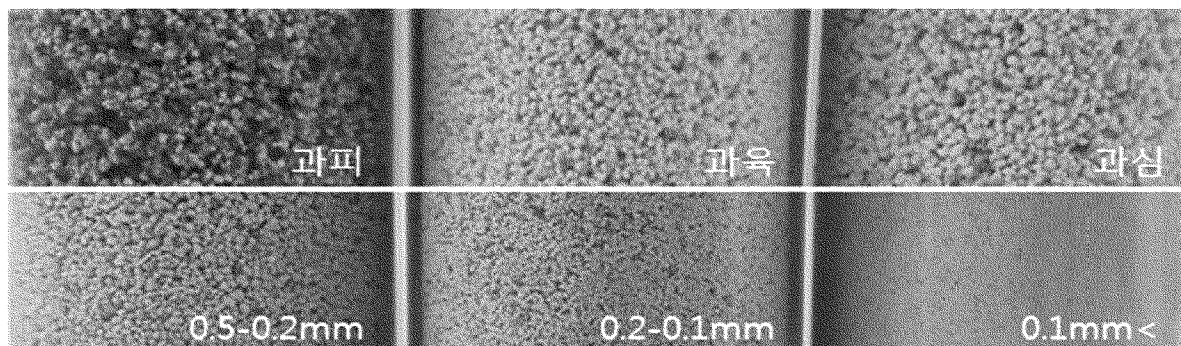
[실시예2: 선별배박]



[실시예6: 유과]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/018706

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/04(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 5/04(2006.01); A23B 7/155(2006.01); A23L 1/30(2006.01); A23L 2/02(2006.01); A23L 2/06(2006.01); A23L 3/3463(2006.01); A23L 33/00(2016.01); C12P 19/04(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 배(pear), 셀룰레이즈(cellulase), 헤미 셀룰레이즈(hemicellulase), 베타글루카네이즈(β -glucanase), 펙티나아제(pectinase), 석세포(stone cell), 추출(extraction), 알코올(alcohol), 산(acids)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2020-0027346 A (REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT : RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION)) 12 March 2020 (2020-03-12) See abstract; example 2; paragraphs [0008] and [0044]; claim 1; and table 1.	1,3-16
Y		2
Y	KR 10-2015-0045028 A (HOSEO UNIVERSITY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 28 April 2015 (2015-04-28) See claims 1 and 3.	2
A	KR 10-2014-0147964 A (JEOLLANAMDO) 31 December 2014 (2014-12-31) See entire document.	1-16
A	KR 10-2009-0043480 A (NA, Gwang Chul et al.) 06 May 2009 (2009-05-06) See entire document.	1-16
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 December 2021		Date of mailing of the international search report 23 December 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/018706**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2014-0147965 A (JEOLLANAMDO) 31 December 2014 (2014-12-31) See entire document.	1-16
A	RABETAFIKA, H. N. et al. Comparative study of alkaline extraction process of hemicelluloses from pear pomace. Biomass and Bioenergy. 2014, vol. 61, pp. 254-264. See entire document.	1-16
A	TOUSHIK, S. H. et al. Functional Applications of Lignocellulolytic Enzymes in the Fruit and Vegetable Processing Industries. Journal of Food Science. 2017, vol. 82, no. 3, pp. 585-593. See entire document.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/018706

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2020-0027346	A	12 March 2020	KR	10-2108747	B1	08 May 2020
KR	10-2015-0045028	A	28 April 2015	None			
KR	10-2014-0147964	A	31 December 2014	KR	10-1539651	B1	28 July 2015
KR	10-2009-0043480	A	06 May 2009	None			
KR	10-2014-0147965	A	31 December 2014	KR	10-1619147	B1	12 May 2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/04(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/04(2006.01); A23B 7/155(2006.01); A23L 1/30(2006.01); A23L 2/02(2006.01); A23L 2/06(2006.01); A23L 3/3463(2006.01); A23L 33/00(2016.01); C12P 19/04(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 배(pear), 셀룰레이즈(cellulase), 헤미 셀룰레이즈(hemicellulase), 베타글루카네이즈(β -glucanase), 펙티나아제(pectinase), 석세포(stone cell), 추출(extraction), 알코올(alcohol), 산(acids)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2020-0027346 A (대한민국(농촌진흥청장)) 2020.03.12 요약, 실시예 2; 단락 [0008], [0044]; 청구항 1; 및 표 1	1,3-16
Y		2
Y	KR 10-2015-0045028 A (호서대학교 산학협력단) 2015.04.28 청구항 1, 3	2
A	KR 10-2014-0147964 A (전라남도) 2014.12.31 전체 문헌	1-16
A	KR 10-2009-0043480 A (나광출 등) 2009.05.06 전체 문헌	1-16
A	KR 10-2014-0147965 A (전라남도) 2014.12.31 전체 문헌	1-16
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년12월23일(23.12.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년12월23일(23.12.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 한인호 전화번호 +82-42-481-3362

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	RABETAFIKA, H. N. 등, 'Comparative study of alkaline extraction process of hemicelluloses from pear pomace', Biomass and Bioenergy, 2014, 61권, 페이지 254-264 전체 문헌	1-16
A	TOUSHIK, S. H. 등, 'Functional Applications of Lignocellulolytic Enzymes in the Fruit and Vegetable Processing Industries', Journal of Food Science, 2017, 82권, 3호, 페이지 585-593 전체 문헌	1-16

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2020-0027346 A	2020/03/12	KR 10-2108747 B1	2020/05/08
KR 10-2015-0045028 A	2015/04/28	없음	
KR 10-2014-0147964 A	2014/12/31	KR 10-1539651 B1	2015/07/28
KR 10-2009-0043480 A	2009/05/06	없음	
KR 10-2014-0147965 A	2014/12/31	KR 10-1619147 B1	2016/05/12