

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 11월 18일 (18.11.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/131829 A1

- (51) 국제특허분류:
C12P 7/06 (2006.01) *C12P 7/08* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/000290
- (22) 국제출원일: 2010년 1월 18일 (18.01.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0042121 2009년 5월 14일 (14.05.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **계명대학교 산학협력단 (INDUSTRY ACADEMIC CO-OPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY)** [KR/KR]; 대구광역시 달서구 신당동 1000번지, 704-701 Daegu (KR).
- (72) 발명자: **겸**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **윤경표 (YOON, Kyung Pyo)** [KR/KR]; 대구광역시 수성구 황금동 100가든하이츠 201동 106호, 706-040 Daegu (KR).
- (74) 대리인: **양부현 (YANG, Boo-Hyun)**; 서울특별시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301호, 151-832 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

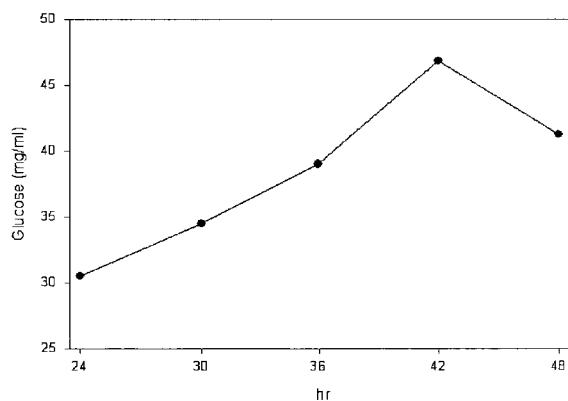
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR PRETREATING BIOMASS TO PRODUCE BIOETHANOL

(54) 발명의 명칭 : 바이오에탄올 생산을 위한 바이오매스 전처리법

도 13



(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing bioethanol from biomass. The present invention relates to a method for pretreating biomass, which is a material for producing bioethanol, wherein a chemical method and a physical method are mixed. The method of the present invention prevents the generation of several kinds of toxic materials which might cause problems in fermentation, and thus eliminates the necessity of a detoxification process. The method of the present invention uses low concentration acids to eliminate the necessity of a re-enriching process for reutilizing acids, which is required when using high concentration acids. The method of the present invention prevents the saccharification of cellulosic materials to eliminate the necessity of a delignification process which is required in preparing cellulosic ethanol. Thus, the method of the present invention has the advantages of being environmentally-friendly and having low production costs and a high yield rate of bioethanol.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2010/131829 A1



- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를
접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙

48.2(h))

본 발명은 바이오매스(biomass)로부터 바이오에탄올의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 특징은 바이오에탄올 제조를 위한 공급 원료인 바이오매스의 전처리 방법으로서 화학적 방법과 물리적 방법을 혼용한 것으로, 발효에 지장을 주는 여러 종류의 독성물질이 생성되지 않아 제독(detoxification)공정이 불필요하고, 저농도의 산을 사용하므로 고농도 산 사용시 필수적인 산 재활용을 위한 재 농축 공정이 불필요하고, 섬유소의 당화를 방해하여 섬유소계 에탄올 제조공정에 필수적인 리그닌제거(de-lignification)공정도 불필요하여 친환경적이고 생산단가가 저렴한 이점이 있으며 본 발명의 방법을 통하여 고수율의 바이오에탄올을 수득할 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

바이오에탄올 생산을 위한 바이오매스 전처리법

【기술 분야】

5 본 발명은 바이오매스(biomass)로부터 바이오에탄올의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 공급원료인 바이오매스를 화학적 방법 및 물리적 방법으로 전처리하는 공정을 포함함으로써 제독 공정, 황산재농축 . 재활용공정 및 리그닌 제거 공정 등이 불필요한 바이오매스로부터 바이오에탄올의 제조방법에 관한 것이다.

10 【배경 기술】

 재생 에너지원으로서 바이오에탄올의 상업적 생산을 위해 바이오매스의 전환 기술을 고안해내기 위하여 수많은 노력이 이루어지고 있다. 세계적으로 발효는 에탄올 생산을 위한 주요 기술이고, 전 세계 에탄올의 90%까지 생산하고 있다. 세계적으로, 대부분의 바이오에탄올은 15 사탕수수(sugar cane)(브라질), 당밀(molasses) 및 옥수수(미합중국)로부터 생산되지만, 밀, 보리 및 호밀과 같은 다른 전분 재료도 또한 적합하다. 전분을 포함하는 곡물은 우선 당으로 전환되어야 한다. 유럽의 경우, 바이오에탄올 생산을 위한 주된 곡물은 전분 곡물(예컨대, 일반 밀) 및 사탕무이다.

20 당의 에탄올으로의 발효는 대규모의 상업적으로 발단된 기술이다. 발효기술은 수 천년동안 이어져 왔으며 또한 최적화되었다. 발효에 소요 비용은 바이오매스 공급 원료의 가격에 의해 크게 결정되고, 에탄올의 최종 가격의 55-80%에 이를 수 있다. 브라질 및 미국은 세계 바이오에탄올의 대부분을 생산하고 있고, 상기 바이오에탄올의 25 세계적인 수요는 크게 증가하고 있다. 이러한 사실은 인간의 소비에 필요한 옥수수, 사탕수수 및 다른 중요한 곡물의 가격을 불가피하게 증가시키고 있다.

 전분-포함 곡물은 전분을 방출하기 위해서 곡물의 밀링 또는 그라인딩과 같은 전환 공정이 실시된다. 그리고 이러한 재료들은 물에서 30 회석되고 모든 수용성 전분을 해리하기 위해서 쿡킹된다. 상기 전분은 동시에 당으로 전환된다. 이러한 과정은 효소 또는 산 가수분해에 의해

실시될 수 있다. 산 가수분해의 경우, 희석 미네랄 산이 쿡킹 이전에 곡물 슬러리에 첨가된다. 이러한 공정 단계의 결과물인 짧은 탄수화물은 효모와 같은 미생물에 의해 발효될 수 있다. 발효 중에, 에탄올이 생산되고, 일련의 증류 및 수분 제거(dehydration) 단계를 통해서, 에탄올 농도는 증가될 수 있다. 따라서, 발효 공정은 당을 에탄올로 전환한다.

다른 식물 재료는 우수한 당 원료일 수 있다. 실제로, 생원료의 선택은 만연하는 기후 조건하에서 그 국가에서 가장 잘 자라는 식물이 무엇인지 여부 뿐만 아니라, 당 함량 및 다양한 식물의 이용 용이성에 의존한다. 새롭고 유망한 기술은 보다 더 실질적인 에탄올을 제조하기 위한 가능성을 가진다. 옥수수알이 아닌, 식물의 줄기, 뿌리 및 잎으로부터 에탄올을 생산하기 위한 방법은 셀룰로오스 재료로서 알려져 있다. 소위 셀룰로오스 에탄올은 알려진지 수년이 되었지만, 발효에 의해 셀룰로오스를 파괴할 수 있다는 점은 비효율적이고 고비용이라고 입증되었다. 최근에 기술 진보 및 고유가는 보다 경쟁적인 공정을 만들고 있다. 그러나, 수많은 사람들은 현 기술의 진보가 현재 생산 비용을 상당히 감소시키기 위해서 필요하다는 점에 여전히 동의한다.

식물 세포벽은 리그노셀룰로오스 물질로 구성되어 있고, 상기 물질의 구조는 간략히 셀룰로오스(선형 글루코오스 폴리머), 헤미셀룰로오스(고분지된 헤테로폴리머) 및 리그닌(고분자량 및 교차-결합된 방향족 거대분자)에 의해 대표된다. 다당류(셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스) 및 비-다당류(리그닌) 성분의 결합은 기계적 및 생물학적 저항성의 주된 원인이 된다. 지구상에서 가장 풍부한 다당류인 셀룰로오스는, 목재 중량의 50% 이상을 차지하는, 셀로바이오스(D-글루코피라노실- β -1,4-D-글루코피라노오스)가 매우 질서정연하게 배열된 폴리머이다. 분자의 긴 번들(bundle)인 피브릴(fibril)을 형성하는 셀룰로오스 사슬에 있어, 목재 셀룰로오스는 약 10,000 글루코오스 유닛을 가진다. 셀룰로오스 물질은 화학적 및 생화학적 공격을 위한, 덜 질서정연하게 배열되고 무정형의 영역으로 분리된 크리스탈 도메인을 제공한다. 셀룰로오스 분해 효소는 셀룰로오스 폴리머를 모노머로 가수분해할 수 있고, 당 글루코오스는 자연적으로 효모 사카로마이스스 세레비시아에 의해 에탄올로 발효된다. 따라서, 이러한 생촉매는 바이오매스 에탄올 기술의

중심이다. 헤미셀룰로오스는 셀룰로오스 및 리그닌의 결합 물질이다. 목재 헤미셀룰로오스는 우세한 크실로오스와 아올러 글루코오스, 만노스, 갈락토오스 및 아라비노스 뿐만아니라 다른 종류의 우론산(uronic acid)의 짧고(중합도 100 내지 200), 고 분지된

5 헤테로폴리머이다. C5 및 C6 당들은, 셀룰로오스 및 리그닌간의 구별기준으로 작용하는, 1,3, 1,6 및 1,4 글루코시딕 결합을 통해 연결되고 종종 아세틸화되어 있다. 한편, 리그닌은 상응하는 p-하이드록시시나밀 알코올로부터 유래된, 디메톡시, 모노메톡시 및 on-메톡시화된 페닐프로파노이드 유닛의 3-차원 폴리페놀릭 네트워크이다. 리그닌은

10 소수성이고 화학적 및 생물학적 분해에 대한 고 저항성을 가진다. 이는 헤미셀룰로오스와 함께, 셀룰로오스 피브릴이 임비드되어 있고 생분해에 대한 저항성을 가지는, 무정형 매트릭스를 형성하는 식물 세포사이에 접합체로서 작용한다. 식물 조직의 다른 비-구조적 성분(페놀, 탄닌, 지방, 스테롤, 당, 전분, 단백질 및 재(ashes))은 일반적으로 목재 건조

15 중량의 5% 이하를 차지한다.

바이오매스 다당류의 발효가능한 당으로 분해(depolymerization)와 같은, 바이오매스 가수분해를 달성하는데 있어, 증기 폭쇄(steam explosion), 마일드 산 처리, 강산 처리, 암모니아 처리, 또는 하이드로옥사이드 처리 등과 같은 몇 가지 전처리 단계가 있다. 어떤

20 처리법이 선택되던 간에, 전처리 방법은 친환경적이고 경제적으로 실현가능한 기술로 실시되어야 한다. 전처리 방법의 결정은 공정 수율, 생산 파라미터 뿐만 아니라 공정 의존성 및 비용에 의해 영향 받아야한다.

본 발명은 세계 곡물 가격에 영향을 미치지 않는, 또한 대기 중의 이산화탄소를 광합성작용으로 제거하여 세계 기후 변화에 대비할 수 있는

25 신재생에너지 생산법을 제시하고 있다. 그리고 바이오에탄올 생산 과정에서 생성되는 부산물은 가축사료첨가제, 스팀 및 발전용 연료, 석고보드 원료, 시멘트첨가제 또는 비료 등으로 사용됨으로서 저렴하게 대량으로 수급 가능한 옥수숫대, 벧짚, 밀짚, 과일껍질, 사탕수수대 또는 수숫대 등의 비식량 자원 바이오매스를 100% 사용가능한 고부가가치 소중한

30 자원으로 사용법을 제시하고 있다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

5

【발명의 상세한 설명】

본 발명자들은 친환경적이고 저비용의 공정을 이용하여 생물자원으로부터 바이오에탄올을 제조하는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 바이오매스를 화학적으로 산 가수분해를 한 다음
10 초음파 단일 처리, 또는 초음파 처리 및 프렌치 프레스 이중 처리를 함으로써 제독(detoxification) 공정 및 리그닌 제거(de-lignification) 공정이 불필요한 친환경적이고 저비용의 공정으로 고수율의 바이오에탄올을 제조하였음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 비식량 바이오매스(biomass)로부터
15 바이오에탄올의 제조방법을 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 바이오매스(biomass)로부터 에탄올의 제조 방법을 제공한다: (a) 바이오매스를 분쇄하는 단계; (b) 상기 분쇄된 바이오매스에 산(acid)을 처리하여 가수분해하는 단계; (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 액상 및 고상으로 분리하는 단계; (d) (d-1) 상기 단계 (c)의 결과물 중 액상에
25 중화제를 처리하여 중화하고 오탄당을 수득하는 단계; 또는 (d-2) 상기 단계 (c)의 결과물 중 고상에 초음파를 처리하고, 이어 셀룰로오스 분해 효소로 처리하여 육탄당을 수득하는 단계; 그리고, (e) 상기 단계 (d-1) 및 (d-2)의 오탄당 또는 육탄당, 또는 오탄당과 육탄당에 에탄올-생성 발효 미생물을 처리하여 발효시키는 단계.

30

본 발명자들은 친환경적이고 저비용의 공정을 이용하여 생물자원으로부터 바이오에탄올을 제조하는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 바이오매스를 화학적으로 산 가수분해를 한 다음 초음파 처리, 또는 초음파 및 프렌치프레스 이중처리를 함으로써

5 제독(detoxification) 공정, 황산재농축, 재활용공정 및 리그닌 제거(de-lignification) 공정이 불필요한 친환경적이고 저비용의 공정으로 고수율의 바이오에탄올을 제조하였음을 확인하였다. 또한 본 발명은 세계 곡물 가격에 영향을 미치지 않고, 세계 기후 변화에 대비할 수 있는 신재생에너지 생산법임을 보여주고 있다. 그리고 바이오에탄올 생산 과정

10 중 생성되는 부산물은 가축사료첨가제, 스팀 및 발전용 연료, 석고보드 원료, 시멘트첨가제 또는 비료 등으로 사용됨으로서 저렴하게 대량으로 공급 가능한 옥수수대, 벼짚, 밀짚, 과일껍질, 사탕수수대 또는 수숫대 등의 비식량 자원 바이오매스를 100% 사용가능한 고부가가치 소중한 자원으로 사용법을 제시하고 있다.

15

바이오매스(biomass)로부터 바이오에탄올의 제조하기 위한 본 발명의 방법을 단계별로 상세하게 설명하면 다음과 같다:

(a) 바이오매스의 분쇄

20 우선, 바이오에탄올을 제조하기 위한 전처리 공정으로 공급 원료로 이용되는 바이오매스를 분쇄한다.

본 발명의 공급 원료로 이용되는 바이오매스는 셀룰로오스 또는 리그노셀룰로오스 물질을 포함하는 당업계에 공지된 다양한 생물자원을 포함하고, 바람직하게는, 옥수수대(corn stover), 옥수수속(corn cobs),

25 수숫대, 벼짚, 밀짚, 벼 껍질, 과일껍질, 종이제품, 목재, 톱밥, 농업 폐기물, 잔디, 사탕수수 찌꺼기(bagasse), 면(cotton), 아마(flax), 대나무, 마닐라삼(abaca), 조류(algae), 또는 해조류이고, 보다 바람직하게는 옥수수대(corn stover), 벼짚, 밀짚, 수숫대, 벼껍질, 목재, 톱밥, 사탕수수 찌꺼기(bagasse) 또는 과일껍질이며, 가장 바람직하게는

30 옥수수대(corn stover), 옥수수속(corn cobs), 벼짚, 밀짚, 톱밥, 수숫대, 사탕수수 찌꺼기(bagasse) 또는 과일껍질이다.

본 발명에서 바이오매스를 분쇄하는 공정은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 물리적으로 잘게 부수는 예컨대, 전단(shearing), 밀링(milling) 또는 그라인딩방법을 포함하고, 밀, 나이프 커터 또는 믹서기를 이용하여 바이오매스를 분쇄한다.

- 5 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 상술한 단계 (a) 이후에 분쇄된 바이오매스를 한 변의 길이가 0.25-5 mm 인 그물망에 통과시키는 단계를 추가적으로 포함한다. 보다 바람직하게는 그물망의 한 변의 길이는 0.25-3 mm 이고, 가장 바람직하게는 0.25-2 mm 이다.

10 한 변의 길이가 0.25-5 mm 인 그물망에 통과시키는 이유는 후술할 산 가수분해 및 초음파 처리를 하여 바이오매스의 조직을 연화시키는데 있어 표면적을 증가시키기 위해서이다.

(b) 분쇄된 바이오매스의 산 가수분해

15 다음, 물리적으로 분쇄된 바이오매스에 산(acids)을 처리하여 가수분해하는 단계를 거친다.

분쇄된 바이오매스를 가수분해하기 위해서 이용하는 산은 당업계에 공지된 다양한 산을 포함하나, 바람직하게는 황산, 염산, 질산, 아세트산, 포름산 또는 인산이고, 보다 바람직하게는 황산, 염산 또는 질산이며, 가장 바람직하게는 황산이다.

20 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법의 단계 (b)의 가수분해는 0.1-10%(v/v)의 산으로 80-150℃에서 20-120 분 동안 실시하고, 보다 바람직하게는 산의 농도는 0.1-5%(v/v), 온도 100-150℃ 및 시간은 20-80 분이며, 가장 바람직하게는 산의 농도 0.1-2%(v/v), 온도 120-140℃ 및 시간은 20-60 분이다.

25 본 발명의 가장 큰 특징으로, 고농도 산이 아닌 10%(v/v) 이하의 저농도의 산을 이용하는데, 이는 고농도의 산을 이용하는 경우 기기의 부식을 초래하고 한번 사용하여 회석된 산의 재 농축 공정이 산 재활용을 위해 추가적으로 필요하며 독성물질의 병행 발생으로 제독공정이 추가적으로 필요하고 많은 폐기물이 발생하는 등의 높은 생산비용이
30 발생하는 문제점이 있기 때문이다. 또한 비교적 낮은 온도와 짧은 처리

시간은 전처리에 필요한 총 에너지 비용이 절감되어, 저렴한 바이오 에탄올 생산이 가능하게 한다.

(c) 상기 단계 (b)의 결과물을 액상 및 고상으로 분리

5 분쇄된 바이오매스를 산 가수분해 한 다음 그 결과물을 액상 및 고상으로 분리한다.

 액상 및 고상의 혼합 용액상태인 상기 단계 (b)의 결과물을 분리하는데 있어, 당업계에서 공지된 다양한 여과정비를 이용할 수 있고, 예컨대, 필터 프레스, 원심분리, 막 필터 또는 나노-필터를 통하여
10 분리한다.

(d) (d-1) 상기 단계 (c)의 결과물 중 액상을 중화하여 오탄당의 수득

 본 발명의 방법은 분리한 액상에 중화제를 첨가하여 중화함으로써 오탄당을 수득하는 단계를 포함한다.

15 본 발명에 이용되는 중화제는 당업계에 공지된 다양한 산성을 중화하는 중화제를 포함하고, 바람직하게는 수산화나트륨(NaOH), 탄산나트륨(Na_2CO_3), 수산화마그네슘($\text{Mg}(\text{OH})_2$), 소석회($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 생석회(CaO) 또는 탄산칼슘(CaCO_3)이고, 보다 바람직하게는 수산화나트륨(NaOH), 탄산나트륨(Na_2CO_3) 또는 탄산칼슘(CaCO_3)이며, 가장
20 바람직하게는 탄산칼슘(CaCO_3)이다. 황산 및 탄산칼슘(CaCO_3)이 반응하여 생성되는 석고(CaSO_4)는 석고보드 원료, 시멘트 첨가제 또는 비료 등으로 사용가능하다.

 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 오탄당은 크실로오스(xylose)와 아라비노스(arabinose)이다.

25

(d-2) 상기 단계 (c)의 결과물 중 고상에 초음파 처리 및 셀룰로오스 분해 효소를 처리하여 육탄당 수득

 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 고상에 초음파 처리하기 전에 상기 고상을 분쇄하는 단계를 추가적으로 포함한다.

초음파 처리하기 전에 필터로 고상을 분리하고 믹서기를 이용하여 5-20 분 동안 추가적으로 분쇄하여 초음파 처리 및 셀룰로오스 분해 효소 처리를 위한 고상의 표면적을 증가시킨다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 분쇄된 고상은 평균 입자
5 길이가 0.1 mm - 2 cm 이고, 보다 바람직하게는 0.1 mm - 1 cm 이며, 보다 더 바람직하게는 0.1 mm - 0.5 mm 이고, 가장 바람직하게는 0.1 mm - 0.25 mm 이다.

본 발명의 방법은 화학적인 방법으로 전처리된 고상 산 가수분해물에
초음파 단일처리를 하고, 이어 셀룰로오스 분해 효소로 처리하여 육탄당을
10 수득한다. 그리고 효소처리 잔유물은 가축사료첨가제, 발전 및 스팀생산 연료 등으로 사용가능하다.

초음파 시스템은 셀룰로오스를 포함하는 배지에 기포를 발생하고, 상기 기포는 성장한 다음 격렬하게 붕괴한다. 기포의 붕괴 중에, 기포 내
15 국소 온도는 매우 높이 올라가고(어떤 경우에는 약 5100 K 또는 그 이상, 참조: Suslick et al., Nature 434, 52-55) 1000 atm 이상의 압력을 발생시킨다. 이러한 높은 온도 또는 압력 때문에, 셀룰로오스 시료의 결합은 붕괴된다. 초음파 시스템 및 음파화학(sonochemistry)에 대해서는 문헌[예컨대, OHi et al., U.S. Patent No. 5,766,764; Roberts, U.S.
20 Patent No. 5,828,156; Mason, Ultrasound: its Chemical, Physical and Biological Effects, VCH, Weinheim, (1988); Avivi et al., J. Amer. Chem. Soc. 121, 4196 (1999); 및 Avivi et al., J. Amer. Chem. Soc. 122, 4331 (2000)]에 기재되어 있다. 상기 미세 공동화(microcavitation) 장치의 작동은 문헌 Stuart, U.S. PatentNo. 5,370,999 에 기재되어 있다.

25 초음파 변환기(Ultrasonic transducer)는 전자적 에너지를 초음파 범위의 소리로 전환하는 압전소자(piezoelectric element)를 포함한다.

슬러리(예컨대, 11-13%(w/v)의 셀룰로오스 시료)에 초음파를 처리하는 경우, 상기 변환기는 Sonics & Materials (USA) model VCX-600 또는 750(각각 20 kHz 에서 작동되고 최대 전력이 600 및 750 W 으로 디자인
30 됨) 그리고 Branson Ultrasonics 사의 모델 105 또는 502(각각 20 kHz 에서 작동되고 최대 전력이 3 kW 로 디자인 됨)과 같은, 상업적으로 이용 가능한

압전 변환기(piezoelectric transducers)를 포함한다. 또한, 고출력의 초음파 변환기(예컨대, Hielscher Inc., Ringwood, New Jersey, USA)도 상업적으로 구입하여 이용가능하다. 이들은 16 kW의 연속 전력을 전달할 수 있다.

5

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명 방법의 초음파 처리는 주파수 15-130 kHz의 초음파를 0.5-36 시간 동안 상기 고상 산 가수분해물에 처리한다. 보다 바람직하게는 주파수 15-80 kHz의 초음파를 0.5-30 시간 동안 처리하며, 가장 바람직하게는 주파수 15-40 kHz의 초음파를 0.5-10 시간 동안 처리한다.

10

주파수 15-130 kHz의 초음파를 0.5-36 시간 동안 처리하는 경우, 셀룰로오스의 결합을 붕괴시키는 데 우수한 효과를 달성한다.

15

본 발명의 방법은 분리한 고상에 셀룰로오스 분해 효소로 처리하여 육탄당을 수득한다. 상술한 물리 화학적 전처리 과정을 통하여 질서정연하게 배열된 셀룰로오스의 결합은 붕괴되고 그 붕괴된 틈으로 셀룰로오스 분해 효소가 용이하게 침투되어 가수분해(당화)효율을 증가시킴으로써 다량의 육탄당이 수득된다.

20

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명 방법의 셀룰로오스 분해 효소 처리는 pH 4-7 및 30-70°C에서 24-48 시간 동안 실시하고, 보다 바람직하게는 셀룰로오스 분해 효소 제조회사의 프로토콜에 따라 pH 4.8-5 및 48-52°C에서 36-48 시간 동안 100 rpm의 속도로 천천히 교반하면서 실시한다.

25

본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 상기 육탄당은 포도당(글루코오스)이다.

30

또한, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명 방법은 상기 단계 (d-2)의 초음파 처리 이후에 초음파 처리된 고상 산 가수분해물에 프렌치 프레스 이중 처리하는 단계를 추가적으로 포함하고, 바이오매스가 옥수수대, 수숫대, 사탕수수대, 톱밥과 같은 목재일 경우 초음파 및 프렌치 프레스 이중 처리는 보다 바람직하다.

본 발명에서, 사용되는 용어 “프렌치 프레스”는 “유압 프레스”와 동일한 의미로 본 명세서에서 혼용되어 사용된다.

프렌치 프레스 셀 프레스는 프레스에서 유압 압력을 다양하게 하기
 5 위하여 컨트롤 밸브 및 모터-동력 펌프를 이용하는 유압
 프레스이다. 상기 프레스는 매우 큰 기계적 압력하에서 박테리아 세포를
 파괴할 수 있다. 세포 현탁액을 스틸 실린더 셀의 중심 구멍(bore)에
 첨가한 다음, 시료를 프렌치 프레스로 압력을 가한다. 이 경우에 프렌치
 프레스 셀의 압력은 증가하고 동시에 세포내 압력을 증가시킨다. 상기
 10 압력이 32,000-35,000 psi 에 도달하면, 스크류 밸브에 부착된 작은 테플론
 볼에 의해 시료 주입구 튜브를 통하여 상기 시료를 분배한다. 이는
 세포벽 상의 외부 압력을 대기압으로 급속히 떨어지게 한다. 세포 내의
 압력은 압력이 또한 감소하나 세포 외부의 압력만큼 빠르지는
 않는다. 이러한 압력의 차이는 세포벽을 즉시 파괴하여, 결과적으로
 15 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스도 또한 파괴한다. 연속 필 프로토콜(fill
 protocol)은 큰 부피의 세포(>100 ml)를 파괴해야 하는 경우 유용하다.

본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 프렌치 프레스
 처리는 압력 25,000-40,000 psi 에서 실시되고, 보다 바람직하게는 30,000-
 20 40,000 psi 이며, 가장 바람직하게는 31,000-36,000 psi 이다.

프렌치 프레스 압력을 25,000-40,000 psi 인 경우, 압력의 차이로
 세포벽을 파괴하여, 결과적으로 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스를 파괴하는
 효과를 가진다.

25 (e) 오탄당 또는 육탄당, 또는 오탄당과 육탄당에 에탄올-생성 발효
 미생물을 처리하여 발효

상술한 물리화학적인 전처리 과정을 통하여 오탄당 또는 육탄당,
 또는 오탄당과 육탄당을 수득한 다음 에탄올-생성 발효 미생물의 처리를
 통한 발효 과정을 통하여 최종 생산물인 에탄올을 수득한다.

30 본 발명에 이용되는 에탄올-생성 발효 미생물은 발효 산물로서
 에탄올을 생성하는 당업계에 공지된 다양한 미생물을 포함하고,

- 바람직하게는 상기 미생물은 효모이고, 보다 바람직하게는 상기 효모는 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 사이조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*), 스포로보로마이세스(*Sporobolomyces*), 토루로프시스(*Torulopsis*),
- 5 트리코스포론(*Trichosporon*), 워커하미아(*Wickerhamia*), 아쉬바이아(*Ashbya*), 블라스토마이세스(*Blastomyces*), 캔디다(*Candida*), 사이테로마이세스(*Citeromyces*), 크레브로테슘(*Crebrothecium*), 크립토코커스(*Cryptococcus*), 드바리오마이세스(*Debaryomyces*),
- 에노마이코프시스(*Endomycopsis*), 지오텐리움(*Geotrichum*),
- 10 한센룰라(*Hansenula*), 클로엑케라(*Kloeckera*), 리포마이세스(*Lipomyces*), 피키아(*Pichia*), 로도스포리둠(*Rhodospiridium*) 또는 로도토룰라(*Rhodotorula*) 속(genus)에 속하는 효모이고, 보다 더 바람직하게는 사카로마이세스(*Saccharomyces*)에 속하는 효모이며, 가장 바람직하게는 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*),
- 15 사카로마이세스 바이아누스(*Saccharomyces baynus*), 또는 사카로마이세스 칼스베르겐시스(*Saccharomyces carlsbergensis*)이다.

【도면의 간단한 설명】

도 1 은 비식량 자원인 바이오매스를 이용한 바이오에너지 생산과
20 부산물의 활용도를 나타내는 블록다이아 그램이다.

도 2 는 바이오매스(biomass)를 에탄올로 전환하는 것을 나타내는, 즉 공급 원료(feedstock)를 가공하기 위한 연속적 처리 과정을 보여주는 블록 다이아그램이다.

도 3 은 섬유소 원을 생산물(예컨대, 에탄올)로 전환하는 공정의
25 일반적인 개요를 보여주는 모형도(schematic diagram)이다: 1. 밀(mill); 2. 나이프 커터(knife cutter); 3. 산-가수분해 챔버; 4. 고.액상 분리 필터; 5. 오탄당 발효조; 6. 나이프 커터; 7. 소니케이팅 챔버; 8. 유압(hydraulic) 프레스(프렌치 프레스); 9. 셀룰로오스 당화 챔버; 10. 육탄당 발효조; 11. 원심분리기; 12. 증류 컬럼; 13. 에탄올 저장 탱크.

도 4 는 소니케이팅 챔버의 단면도이다: 1. 멀티-엘리먼트 소니케이팅 프로브; 2. 믹서; 3. 소니케이팅 챔버; 4. 주입구(inlet); 5, 배출구(outlet).

도 5 는 프렌치 프레스 셀(40 K)(SLM-AMINCO, USA)의 단면도를 보여준다: 1. 프렌치 프레스 셀(40K); 2. 피스톤; 3. 주입구; 4. 배출구.

도 6 은 밀(mill)에 의해 벧짚으로부터 생산되는 섬유 물질을 보여주는 사진이다. 자 단위는 cm 이다.

도 7 은 산-가수분해 전처리 과정 전에 나이프 커터에 의해 분쇄된 다음 1 mm 의 그물망을 통과한 섬유 물질을 보여주는 사진이다. 자 단위는 10 cm 이다.

도 8 은 산-가수분해 전처리 과정 이후에 섬유 물질을 100 배로 확대해서 본 현미경 사진을 나타낸다.

도 9 는 벧짚으로부터 생산된 섬유 물질의 100 배 현미경 사진이다. 상기 섬유 물질은 산-가수분해 전처리 과정후에 분리된 고상을 한 번 이상 나이프 커터로 분쇄한 섬유물질이다.

도 10 은 초음파 처리한 다음, 벧짚으로부터 생산되는 섬유 물질의 100 배 현미경 사진이다.

도 11 은 초음파 및 프렌치 프레스 처리 한 다음, 벧짚으로부터 생산되는 섬유 물질의 100 배 현미경 사진이다. 규칙적으로 정렬되어 있던 셀룰로오스 피브릴이 파괴되어 셀룰로오스 분해 효소의 접근이 용이하게 된다.

도 12 는 하나 또는 그 이상의 다른 전처리 방법의 벧짚의 가수분해에 대한 효과를 보여주는 그래프이다. none 은 무처리; AH 는 산-가수분해 처리; S 는 초음파 처리; F 는 프렌치 프레스 처리; E 는 셀룰로오스 분해 효소 처리를 나타낸다. ○은 벧짚의 잔여 건조 중량(g)을, ●은 가수분해된 글루코스의 양(g)을, ▲는 산-가수분해에 의해 생산된 크실로오스의 양을 나타낸다.

도 13 은 초음파 단일 처리된 벧짚시료로부터 셀룰로오스 분해 효소에 의해 생산되는 글루코스 양을 보여주는 그래프이다. 셀룰로오스 분해 효소의 미리 결정된 양을 초음파 단일 처리된 벧짚에 첨가하고 글루코오스의 농도는 상술한 실험재료 및 방법에 따라 측정하였다.

도 14 는 벗짚 당화액의 발효 중 시간의 경과에 따른 글루코오스 및 에탄올 농도를 보여주는 그래프이다. ○는 글루코오스 농도를, ●는 에탄올 농도를 나타낸다.

도 15 는 전처리 준비를 위한 옥수숫대 분쇄과정을 보여준다. 옥수숫대를 작두로 약 5mm 길이로 자른 후 건조시키고 분쇄기에 넣어 30 초 ON, 3 분 OFF 주기로 5-6 회 분쇄한다.

도 16 은 위의 시료를 1.5% 황산을 첨가하고 130℃에서 40 분간 처리 후 시료를 100 배 확대하여 본 것이다(좌). 좌측의 시료를 초음파 및 프렌치프레스로 추가로 처리하여 100 배 확대하여 본 것이다(우). 물리적 처리가 추가로 된 경우에 매우 무질서하게 파괴된 모습을 볼 수 있으며 이 틈새로 효소가 용이하게 침투하게 되어 당화가 용이하게 된다.

도 17 은 각 물리적 처리가 옥수숫대의 당화에 미치는 효과를 보여준다.

●는 무처리시 생성되는 포도당 양을, ■는 초음파 처리시 생성되는 포도당 양을, ▲는 초음파와 프렌치 프레스 처리시 생성되는 포도당 양을 나타낸다.

도 18 은 옥수숫대 당화 액의 발효 중 시간의 경과에 따른 글루코오스 및 에탄올 농도를 보여주는 그래프이다. ○는 글루코오스 농도를, ●는 에탄올 농도를 나타낸다.

도 19 는 오렌지껍질 당화 액의 발효 중 시간의 경과에 따른 글루코오스 및 에탄올 농도를 보여주는 그래프이다. ○는 글루코오스 농도를, ●는 에탄올 농도를 나타낸다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

30 【실시예】

실험재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험에 사용한 표준 효모는 균주번호 7905 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)로서 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 구입하여 사용하였고, 효모 균주 배양용 배지는 YM
 5 배지(효모 추출물 3 g, malt 추출물 3 g, 펩톤 5 g, 덱스트로스 10 g, 증류수 1 L, pH 6.3)를 사용하였으며, 효모 균주는 진탕배양기를 사용하여 30℃에서 배양하였다.

섬유소 분해로 얻은 포도당을 이용한 에탄올 발효는 다음과 같이 하였다: 사면(slant) 배지에 보존된 효모를 100 ml 의 YM broth 에 접종하여
 10 30℃에서 24 시간 동안 진탕배양하고 원심분리하여 균체를 회수한 다음, 식염수로 세척하고 다시 5 ml 의 덱스트로즈(dextrose)가 없는 덱스트로즈-프리 YM 배지로 현탁하였다. 상기 현탁된 균체 전부를 0.2 μ m 포어 크기 필터로 제공된 포도당 함유 섬유소 분해액 200 ml 에 접종한 다음, 30℃의 미호기성 조건에서 24 시간 또는 48 시간 동안 발효하여 에탄올 양을
 15 HPLC(Waters 2690, USA)로 정량하였다.

분쇄, 산처리 및 슬러리 제조

건조된 볏짚, 과일껍질 혹은 옥수수대를 신일믹서기(SMX-3000JS)를 이용하여 30 초 ON, 3 분 OFF 주기로 5-6 회 분쇄하고, 1 mm 의 구멍크기를
 20 지닌 채를 통과시키고 95℃에서 3 시간 건조하여 산처리용 시료를 준비하였다. 산 처리는 50-100 g 의 분쇄된 시료를 2L 비이커 속에 넣은 후, 묽은 황산(0.5-2%)을 약 500-1000 ml 정도 첨가하여 잘 현탁시키고, Hirayama 고압멸균기 HVA-110 를 사용하여 130℃에서 40 분 동안 산 가수분해를 시켰다. 이렇게 산 가수분해된 시료는 냉각하고 Advantec
 25 필터용지(#2, 150 mm)를 사용하여 필터를 통과하는 액상과 통과하지 못하는 고상으로 분리하였다. 그리고 상기 분리된 액상은 CaCO_3 로 중화시켜 크실로오스(xylose) 함량을 HPLC(Waters 2690, USA)로 측정하였고, 분리된 고상은 가정용 브라운믹서기로 10 분 동안 고속에서 2 회로 나누어 30 초 ON, 1 분 OFF 주기로 분쇄한 다음, 초음파 처리(sonication)와 프렌치
 30 프레스어(french pressure)와 같은 물리적 전처리를 위한 슬러리(건조 고상 함유량 11-13%(w/v))로 제조하였다.

초음파 처리(Sonation)

초음파처리기(High Intensity Ultrasonic Processor)는 Sonics & Materials (USA)사의 VCX-600 와 VCX-750 을 사용하였으며 3 mm tapered
5 마이크로팁과 13 mm 표준형 팁을 사용하였다.

초음파처리 방법은 다음과 같다:

소량 슬러리(30 ml)는 50 ml 원심분리튜브(Corning 사)에 넣고
얼음위에서 4 분간 5 회 내지 10 회 처리하였으며, 대량 슬러리(1 L)는 IKA
혼합기(RW 20 DZM.n)를 이용하여, 1 L 비이커속에 있는 슬러리를 100
10 rpm 으로 회전교반하면서 앰플리튜드(amplitude) 15% 이하에서 9 초 ON, 9 초
OFF 펄서(pulser)를 사용하여 5 시간 내지 24 시간 동안 초음파 처리하였고,
13 mm 표준형 팁을 사용할 경우 10 초 ON, 20 초 OFF 주기로 1-5 시간 초음파
처리하였다.

15 프렌치 프레스(French Pressure) 처리

프렌치 프레스는 SLM-AMINCO 사의 The FRENCH® PRESSURE CELL
PRESS 를 사용하였고 셀은 40K 프렌치 프레스 셀을 이용하였다. 25 ml 의
초음파 처리된 시료를 셀 속에 첨가하여 32,000-35,000 psi 의 압력에서
3 번 내지 6 번 처리하였고, 필요한 경우 다시 초음파 처리하여 효소를
20 이용한 가수분해가 더욱 더 용이하게 하였다.

당화(Saccharification)를 위한 셀룰로오스 분해 효소(Cellulolytic Enzymes)

셀룰로오스 분해 효소는 Novozyme 사(Bagsvard, Denmark)의 효소를
25 이용하였다. 초음파 단일 처리 또는 초음파와 프렌치 프레스 이중 처리를
한 슬러리 1 kg 에 Celluclast®1.5L 10,000 NCU (1,500 NCU/g)와
Novozyme®188 330 Cbu (250 Cbu/g)를 첨가하여 pH 4.8 및 50℃에서 24, 30,
36, 42, 및 48 시간 동안 100 rpm 의 속도로 천천히 교반시키면서 반응시켜
가수분해도를 비교하였다. 효소처리된 시료는 한일 고속원심분리기(Supra
30 22K)와 한일 A2505-6N 로터를 사용하여 8,000rpm 에서 15 분간 회전시킨
후에 고상과 액상으로 분리하였으며 포도당을 함유한 액상은 0.2 μ m 포어

크기 필터가 장착된 142 mm 프레스 필터레이션 홀더를 사용하여 여과를 하고 Sigma Glucose Assay Kit GAHK-20(Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 글루코오스 농도를 측정한 다음, 밀봉하여 다음 발효 시까지 냉장고에 보관하였다.

5

HPLC 정량 분석 및 글루코오스 농도 측정

에탄올, 푸르프랄(furfural) 및 크실로오스의 정량은 Aminex HPX-87-H 컬럼(300mm x 7.8mm, BIO-RAD, USA)을 이용하여 HPLC(Waters 2690, USA)에서 65℃에서 5 mmol 황산을 0.5 ml/min 의 유속으로 RI detector 로 측정하였다. 분석을 위한 모든 시료는 포어 크기가 0.2 μ m인 HPLC 용
10 멤브레인 필터로 여과한 다음 분석에 이용하였다. 글루코오스 함량은 Sigma Glucose Assay Kit GAHK-20(Sigma-Aldrich, USA)을 구입하여 제조회사의 프로토콜에 따라 측정하였다.

15 실험결과 및 논의

전체 개념

도 1 은 비식량 바이오매스를 사용한 바이오에너지생산과 부가적 생성물의 활용도를 보여주는 블록 다이어그램이다.

광합성작용에 의하여 세계 기후 변화의 원인이 되는 대기 중의 이산화탄소가 바이오매스로 변환된다. 옥수수알, 쌀, 밀, 과일주스,
20 사탕수수 당즙 등의 식량자원이 제거된 후에 남은 옥수수대, 벼짚, 밀짚, 과일껍질 또는 사탕수수 찌꺼기 등의 비식량 자원은 대량으로 수급 가능하여 바이오에탄올 또는 바이오부탄올 등의 신재생에너지로 변환된다. 이때 함께 생성되는 부산물은 가축사료첨가제, 스팀 및 발전용
25 연료, 석고보드 원료, 시멘트첨가제 또는 비료 등으로 사용가능하다.

전체 공정

도 2 는 바이오매스(biomass)를 에탄올로 전환하는 것을 나타내는, 즉 공급 원료(feedstock)를 가공하기 위한 연속적 처리 과정을 보여주는 블록
30 다이어그램이다.

리그노셀룰로오스 바이오매스(lignocellulosic biomass)로부터 에탄올 생성은 다음과 같이 전체적으로 주요한 다섯 단계를 포함한다: 1) 바이오매스 전처리 단계, 2) 셀룰로오스 가수분해단계, 3) 육탄당(hexose) 및 오탄당(pentose)의 발효 단계, 4) 통상적 에탄올 증류 및 탈수 후
5 상품화 단계 및 5) 폐수처리 단계.

특히, 본 발명의 방법이 있어, 제독(detoxification) 공정, 황산 재농축공정 및 리그닌 제거(de-lignification) 공정이 불필요하다.

연속적인 컨피규레이션은 전처리된 리그노셀룰로오스 시료의 고상 부분은 가수분해(당화) 처리되고, 상기 고상부분은 효소로 처리될 수 있는
10 셀룰로오스를 포함한다는 것을 보여준다. 일단 셀룰로오스 분해 효소에 의해 가수분해가 실시되면, 그 결과물인 셀룰로오스 가수분해물은 발효되고 에탄올로 전환된다. 육탄당 및 오탄당의 발효는 독립적인 유닛에서 실시된다.

15 원료분쇄 및 산분해

건조된 벚짚은 셀룰로오스 36%, 헤미셀룰로오스 26%, 리그닌 20%, 조단백질 5% 및 회분 13%로 구성되어 있으며, 한국에서는 보통 10 a 당 500 Kg 정도 생산된다. 이런 벚짚을 분쇄기로 도 6 의 시료크기로 자른 다음, 가정용 신일 믹서기를 사용하여 추가로 분쇄하여 1 mm 그물망 채를
20 통과시켜 도 7 의 시료크기를 지닌 산분해용 시료를 준비하였다. 산 분해하기 위하여 2% 황산으로 현탁하여 130℃에서 40 분 동안 처리하고(도 8), 고상은 필터로 분리하여 가정용 브라운 믹서기로 10 분 동안 추가로 분쇄하여 도 9 의 형태가 되었다. 광학현미경에서 100 배의 배율로 촬영한 시료 모습(도 9)을 보면, 산 분해 처리 후(도 8)보다 더욱 더 작은 크기로
25 분쇄되었음을 알 수 있고 또한 이미 산 분해 처리로 인하여 연화된 시료이므로 적은 힘(소형 모터)으로 쉽게(짧은 시간) 분쇄가 가능하여 총 에너지 사용량을 줄이는 효과가 있었다. 이때 분쇄된 고상의 평균 입자 길이는 약 0.25 mm 이하 이었다.

30 과일껍질(오렌지껍질)의 경우에는 실내에서 건조된 껍질을 위에 사용한 가정용 신일믹서기를 사용하여 분쇄하고 1 mm 그물망을 통과시킨 후,

1.5% 황산에 현탁시켜 130℃에서 40 분 동안 처리하였고 이 후 공정은 벧짚과 동일하다.

옥수숫대의 경우는 옥수숫대를 약 5 mm 길이로 작두를 이용하여 자른 후 실내 건조시킨 시료를 위 믹서기에 넣고 30 초 ON, 3 분 OFF 주기로 5-6 회 분쇄하였다 (도 15). 이 분쇄된 옥수숫대 시료는 1.5% 황산에 현탁시켜 130℃에서 40 분 동안 처리하였고 이 후 공정은 벧짚과 동일하다.

초음파 및 프렌치 프레스 처리

도 10 은 벧짚의 초음파 처리된 시료의 형태이고 도 11 은 벧짚의 초음파처리 후 프렌치 프레스로 추가로 처리한 시료의 형태이다. 도 16 은 옥수숫대의 초음파및 프렌치프레스 처리 전 후의 시료의 형태이다. 초음파처리로 인하여 벧짚세포의 전체모양이 붕괴되고 형클어진 섬유소 형태를 볼 수 있으며 프렌치 프레스 처리된 시료에서는 붕괴도가 더욱 더 진행되어 완전히 형클어진 모습을 볼 수 있었다. 그러나, 초음파 처리 시간을 증가시키면 프렌치프레스 처리 없이도 도 11 에 가까운 형태가 얻어지며 또한 셀룰로오스 분해 효소에 의하여 충분히 당화되는 결과를 얻었다. 따라서 벧짚의 경우는 프렌치프레스 처리가 필수적인 것은 아니며, 톱밥의 경우는 프렌치프레스가 섬유소 파쇄를 확연히 증가시켰다. 옥수숫대의 경우는 프렌치프레스처리는 42 시간 당화시 당화효율을 17% 증가시켰다(도 17). 크리스탈 형태로 규칙적으로 잘 정렬되어 있던 셀룰로오스가 산 분해 및 초음파와 프레스의 물리화학적 처리방법에 의하여 붕괴되어 형클어졌으며 이렇게 형클어진 틈새로 셀룰로오스 분해 효소가 용이하게 침투하여 섬유소의 가수분해(당화)효율을 증가시키고, 따라서 다량의 포도당이 생성된다고 판단된다.

각 물리화학적 방법의 조합효율

도 12 는 각 물리화학적 방법의 조합이 벧짚 산가수분해후 잔사량과 당생성량에 미치는 영향을 보여준다. 각각 100 g 의 95℃에서 3 시간 건조된 벧짚시료를 사용하여 각 방법의 조합들을 비교하여 보았다.

2% 황산을 사용하여 130℃에서 40 분 동안 산분해 하였을 때(도 12의 AH)는 건조된 잔사량이 56.7 g 이었고, 오탄당인 크실로오스와 육탄당인 포도당은 각각 27.9 g 과 0.51 g 이 생성되었다. 크실로오스가 많이 얻어진 이유는 크실로오스가 주성분인 대부분의 헤미셀룰로오스는 용이하게

5 상기 조건에서 가수분해되기 때문이다(Karin Ohgren et al., High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 607-613(2007)).

밀겨 시료에 2% 황산 사용하는 경우, 발효를 저해하는 대표적인

10 독성물질인 푸르푸랄(furfural)은 130℃까지는 0.4g/ℓ 생성되다가 140℃부터 급격하게 증가하며 150℃부터는 발효를 억제할 정도의 농도(4g/ℓ)로 생성된다고 보고되었다(Beatriz Palmarola-Adrados et al., Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresource Technology* 96: 843-850(2005)).

15 본 발명의 실시예의 조건에서는 푸르푸랄은 0.18 g/ℓ 가 검출되었으며, 이 후 에탄올 발효가 용이하게 진행되는 것을 보아 이 농도의 푸르푸랄은 아주 소량으로 발효에 영향을 미치는 정도가 아니라는 것을 알 수가 있었고, 따라서 본 발명의 방법은 희석황산을 사용함으로써 황산재농축 . 재활용 공정이 필요 없고 추가적인 제독공정이 필요하지 않은

20 경제적인 간편한 전처리공정이라는 것을 알 수 있다.

산분해되고 남은 잔사에 실험 재료 및 방법에 기술되어 있는 방법으로 셀룰로오스 분해 효소를 첨가하여 50℃에서 42 시간 동안 반응시켜 보았다(도 12의 AH-E). 이때 효소분해되고 남은 잔사량이 47.9 g 이었고 포도당은 9.1 g 이 생성되어, 대부분의 셀룰로오스가 첨가된 셀룰로오스

25 분해 효소로 가수분해 되지 않은 것을 알 수 있었으며, 추가적인 전처리의 필요성을 강력하게 보여준다.

이런 당화의 비효율성으로 인하여 전처리과정이 쉽지 않았고 현재까지 알려진 고비용 다단계 전처리법으로서 증기폭쇄법으로 전처리 후, 크실라나제(xylanase), 페루릭산 에스트라아제(ferulic acid enterase),

30 셀룰로오스 분해 효소(cellulase) 및 라케이즈(laccase) 등의 4 가지 효소로 다단계 처리하여 20-49% 포도당 수율을 얻었다는 보고가 있다(M. G. Tabka

et al., Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 897-902(2006)).

그리고, 72% 진한 황산을 사용하여 완전 산가수분해 방법이 있으나,
5 이 방법은 진한 황산을 사용하여 기기의 부식을 초래하고 또한 진한 황산을 재순환시켜 재사용하기 위하여 한번 사용하여 회석된 황산의 재 농축 공정이 추가적으로 필요하며 높은 황산농도로 인하여 독성물질이 병행하여 발생하므로 제독공정이 추가적으로 필요하며 또한 많은 폐기물이 발생하는 등의 높은 생산비용구조로 되어있는 문제점이 있다.

10 본 발명은 이러한 추가적인 공정이 필요 없고 회석된 황산을 사용하여 폐기물도 최소량 발생하므로 본 발명의 방법은 경제적 가치는 높다고 판단된다.

산분해된 후 생성된 고체 슬러리에 추가적인 초음파 처리를 하고 상기 실험 재료 및 방법에 따라, 셀룰로오스 분해 효소를 첨가하여
15 50℃에서 42 시간 동안 반응시켜 보았고(도 12 의 AH-S-E) 또한 초음파 처리 후에 추가적으로 프렌치 프레스 처리를 하여 동일한 방법으로 셀룰로오스 분해 효소를 첨가시켜 반응을 시켜보았다(도 12 의 AH-S-F-E). 이때 건조된 잔사량이 각각 37.2 g 및 31.6 g 이었고, 생성된 포도당의 양이 19.8 g 및 25.4 g 이었다.

20 25.4 g 의 포도당 양은 볏짚에 함유된 셀룰로오스의 함량이 36% 정도 되므로 70% 이상의 셀룰로오스가 가수분해되어 포도당으로 변했다는 것을 알 수 있다. 이는 크실로오스의 양(28 g)과 합하면 100 g 의 볏짚으로부터 당을 53.4 g 얻었다는 것을 알 수 있다.

옥수숫대 슬러리 당화액 제조는 130℃에서 40 분 동안 황산 처리시
25 1.5% 황산을 사용한 것을 제외하고는 볏짚과 동일하다. 여러 물리적 처리 조합이 옥수숫대 슬러지의 당화에 미치는 영향을 보면 다음과 같다. 무처리, 초음파처리 및 초음파와 프렌치 프레스 처리시 효소 첨가 24 시간 후 포도당의 생성량은 각각 26.7, 108.8, 117.6 mg 이었고, 42 시간 후에는 각각 66.0, 111.8 및 130.4 mg 이었다(도 17). 특히 24 시간의
30 경우에는 4.1-4.4 배의 더 많은 포도당이 빠르게 생성되고 있음을 보여주고 있고 그 생성속도는 프렌치 프레스 처리까지 하였을 때 가장 많은 포도당이

얻어진다는 것을 알 수 있었고, 섬유소의 포도당 전환율은 초음파 처리시 71%, 그리고 프렌치프레스 추가 처리시 전환율은 83% 으로서 매우 높은 전환율을 보였다.

이런 결과로 볼 때, 본 발명의 방법인 전처리 당화 공정은 많은 당을
5 만드는 매우 우수한 전처리법이라는 것을 알 수 있다.

톱밥을 시료로 하여 벧짚과 동일한 방법으로 산처리, 초음파처리, 프렌치 프레스처리를 하였을 때 포도당 수율은 벧짚의 1/2 정도가 된다. 이것은 나무의 강도가 리그닌으로 인하여 벧짚보다 더 강하여 초음파 및 프렌치프레스에 의한 파괴의 정도가 낮는데 기인한다고
10 판단된다. 그러나 본 발명의 실시예에 사용한 초음파기기의 출력이 600 W 인 점을 감안하면 상용화된 3 kW 혹은 16 kW 출력을 내는 초음파 기기를 사용하면 벧짚보다 더 좋은 포도당 수율을 얻을 수 있다고 본다. 그리고 16 kW 보다 더 강한 초음파 기기를 전처리 전용기기로 설계 제조하여 사용하면 더 좋은 수율을 얻을 수 있다는 것은 자명하다고 본다.

15

반응시간의 영향

셀룰로오스 분해 효소를 상기 실험 재료 및 방법에 따라, 벧짚 슬러리에 첨가하고 pH 4.8 및 50℃에서 24, 30, 36, 42 및 48 시간 동안 반응을 시키고 글루코오스 농도를 측정해 보았다(도 13). 42 시간 동안
20 반응하였을 때 글루코오스의 농도가 46.8 mg/ml 이었다. 옥수숫대의 경우에도 42 시간 반응하였을 때 최고농도의 글루코오스(37.3 mg/ml)가 나왔다. 최근에 옥수숫대와 벧짚을 증기폭쇄법으로 처리하여 22-23 mg/ml 글루코오스를 수득하였다는 보고가 있었다(심포지움, 목질 바이오매스를 이용한 바이오연료 산업과 전처리 공정, 제 6 회 대한민국 그린엑스포에너지
25 산림청, 2009 년 4 월 8 일 대구 EXCO). 본 발명의 방법으로 수득한 글루코오스 농도는 최신 보고된 증기폭쇄법으로 수득한 농도보다 2 배가 더 높다. 따라서, 본 발명의 방법은 매우 효율적인 바이오매스 전처리법이라는 것을 알 수 있다.

30 섬유질 바이오에탄올의 생산

상술한 실험 재료 및 방법에 따라, 벚짚(도 14), 옥수수대(도 18) 및 오렌지껍질(도 19)을 초음파만으로 처리후 생성된 당화액을 사용하여 에탄올 발효를 실시하였다. 접종 하루 후, 배지속의 포도당은 전 실험에서 거의 전부 소비되었으며 그 결과 각각 3.1%(도 14), 2.4%(도 18), 2.1%(도 19) 에탄올이 생성된 것을 알 수 있었다. 이 실험결과로 볼 때, 발효를 저해하는 독성 물질이 전처리 도중에 생성되지 않았다는 것과 당화로 얻어진 당이 용이하게 에탄올 발효의 기질로 사용될 수 있어 본 발명의 물리화학적 전처리방법의 탁월성을 입증하고 있다는 것을 알 수 있다.

이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명은 바이오매스(biomass)로부터 바이오에탄올의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 특징은 바이오에탄올 제조를 위한 공급 원료인 바이오매스의 전처리 방법으로 화학적 방법과 물리적 방법을 혼용한 것으로, 발효에 지장을 주는 여러 종류의 독성물질이 생성되지 않아 제독(detoxification)공정이 불필요하고, 산재활용을 위한 산재농축 공정이 불필요하며, 초음파 처리를 하면 당화가 용이하게 되므로 섬유소의 당화를 방해하여 섬유소계 에탄올제조공정에 필수적인 리그닌제거(de-lignification)공정도 불필요하여 친환경적이고 생산단가가 저렴한 이점이 있으며, 본 발명의 방법을 통하여 고수율의 저렴한 바이오에탄올을 수득할 수 있다.

또한 본 발명은 세계 곡물 가격에 영향을 미치지 않고, 세계 기후 변화에 대비할 수 있는 신재생에너지 생산법으로서, 부산물은 가축사료첨가제, 스팀 및 발전용 연료, 석고보드 원료, 시멘트첨가제 또는 비료 등으로 사용됨으로서 저렴하게 대량으로 수급 가능한 옥수수대, 벚짚, 밀짚, 과일껍질, 사탕수수대 또는 수숫대 등의 비식량자원 바이오매스를 100% 사용가능한 고부가가치 소중한 자원으로 사용법을 제시하고 있다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은

명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

다음 단계를 포함하는 바이오매스(biomass)로부터 바이오에탄올의 제조 방법:

- 5 (a) 바이오매스를 분쇄하는 단계;
- (b) 상기 분쇄된 바이오매스에 산(acid)을 처리하여 가수분해하는 단계;
- (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 액상 및 고상으로 분리하는 단계;
- (d) (d-1) 상기 단계 (c)의 결과물 중 액상에 중화제를 처리하여
10 중화하고 오탄당을 수득하는 단계; 또는 (d-2) 상기 단계 (c)의 결과물 중
고상에 초음파를 처리하고, 이어 셀룰로오스 분해 효소로 처리하여
옥탄당을 수득하는 단계; 그리고,
- (e) 상기 단계 (d-1) 및 (d-2)의 오탄당 또는 옥탄당, 또는 오탄당과
옥탄당에 에탄올-생성 발효 미생물을 처리하여 발효시키는 단계.

15

【청구항 2】

- 제 1 항에 있어서, 상기 바이오매스는 벳짚, 밀짚, 옥수수속(corn
cobs), 옥수수대(corn stover), 벼 껍질, 종이제품, 목재, 톱밥, 농업
폐기물, 잔디, 사탕수수 찌꺼기(bagasse), 면(cotton), 아마(flax), 대나무,
20 마닐라삼(abaca), 조류(algae), 과일껍질 및 해조류로 구성된 군으로부터
선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

- 제 1 항에 있어서, (a-1) 상기 단계 (a)와 단계 (b) 사이에 상기
25 단계 (a)의 분쇄된 바이오매스를 한 변의 길이가 0.25-5 mm 인 그물망에
통과시키는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 4】

- 제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 산은 황산, 염산, 질산,
30 아세트산, 포름산 및 인산으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로
하는 방법.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 가수분해는 0.1-10%(v/v)의 산으로 100-150℃에서 20-60 분 동안 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

5

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (d-2)의 초음파 처리는 주파수 15-130 kHz 의 초음파를 0.5-36 시간 동안 상기 단계 (c)의 고상 산 가수분해물에 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.

10

【청구항 7】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (d-2)의 초음파 처리 이후에 프렌치 프레스 처리하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 8】

제 7 항에 있어서, 상기 프렌치 프레스 처리는 25,000-40,000 psi 에서 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 9】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (d-1)의 중화제는 수산화 나트륨(NaOH), 탄산 나트륨(Na_2CO_3), 수산화 마그네슘($\text{Mg}(\text{OH})_2$), 소석회($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 생석회(CaO) 또는 탄산칼슘(CaCO_3)인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 10】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (d-2)의 셀룰로오스 분해 효소 처리는 pH 4-7 및 30-70℃에서 24-48 시간 동안 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 11】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (e)의 에탄올-생성 발효 미생물은 효모인 것을 특징으로 하는 방법.

30

【청구항 12】

제 11 항에 있어서, 상기 효모는 사카로마이세스(*Saccharomyces*),
 사이조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*),
 스포로보로마이세스(*Sporobolomyces*), 토루로프시스(*Torulopsis*),
 5 트리코스포론(*Trichosporon*), 워커하미아(*Wickerhamia*),
 아쉬바이아(*Ashbya*), 블라스토마이세스(*Blastomyces*), 캔디다(*Candida*),
 사이테로마이세스(*Citeromyces*), 크레브로테슘(*Crebrothecium*),
 크립토코커스(*Cryptococcus*), 드바리오마이세스(*Debaryomyces*),
 에노마이코프시스(*Endomycopsis*), 지오티리컴(*Geotrichum*),
 10 한센룰라(*Hansenula*), 클로엑케라(*Kloeckera*), 리포마이세스(*Lipomyces*),
 피키아(*Pichia*), 로도스포리둠(*Rhodospiridium*) 또는
 로도토룰라(*Rhodotorula*)인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 13】

15 제 12 항에 있어서, 상기 사카로마이세스(*Saccharomyces*)는
 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이세스
 바이아누스(*Saccharomyces baynus*), 또는 사카로마이세스
 칼스베르겐시스(*Saccharomyces carlsbergensis*)인 것을 특징으로 하는 방법.

20 【청구항 14】

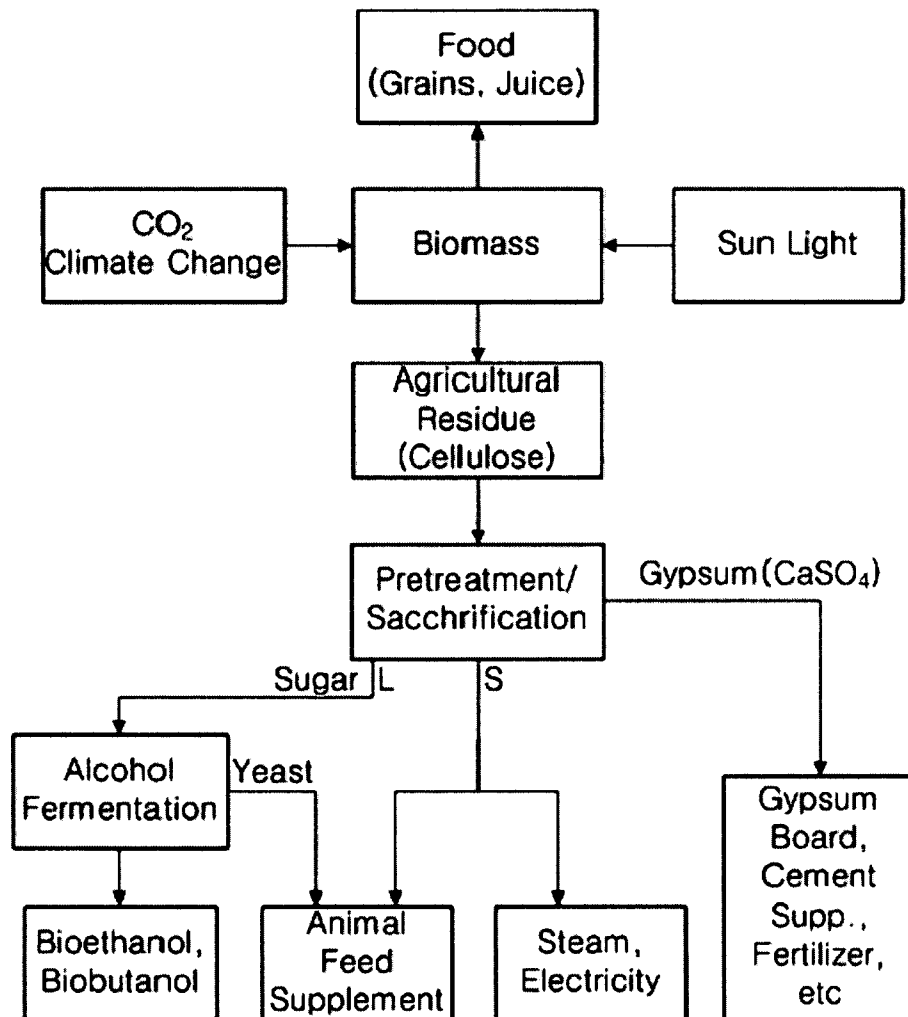
제 1 항에 있어서, 상기 (d-2) 단계는 고상에 초음파 처리하기 전에
 상기 고상을 분쇄하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는
 방법.

25 【청구항 15】

제 14 항에 있어서, 상기 분쇄된 고상은 평균 입자 지름이 0.1 mm-2
 cm 인 것을 특징으로 하는 방법.

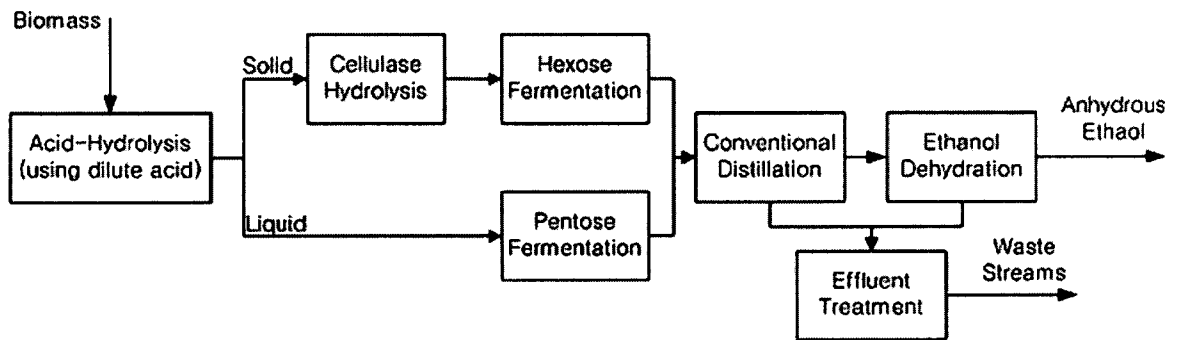
1/10

도 1

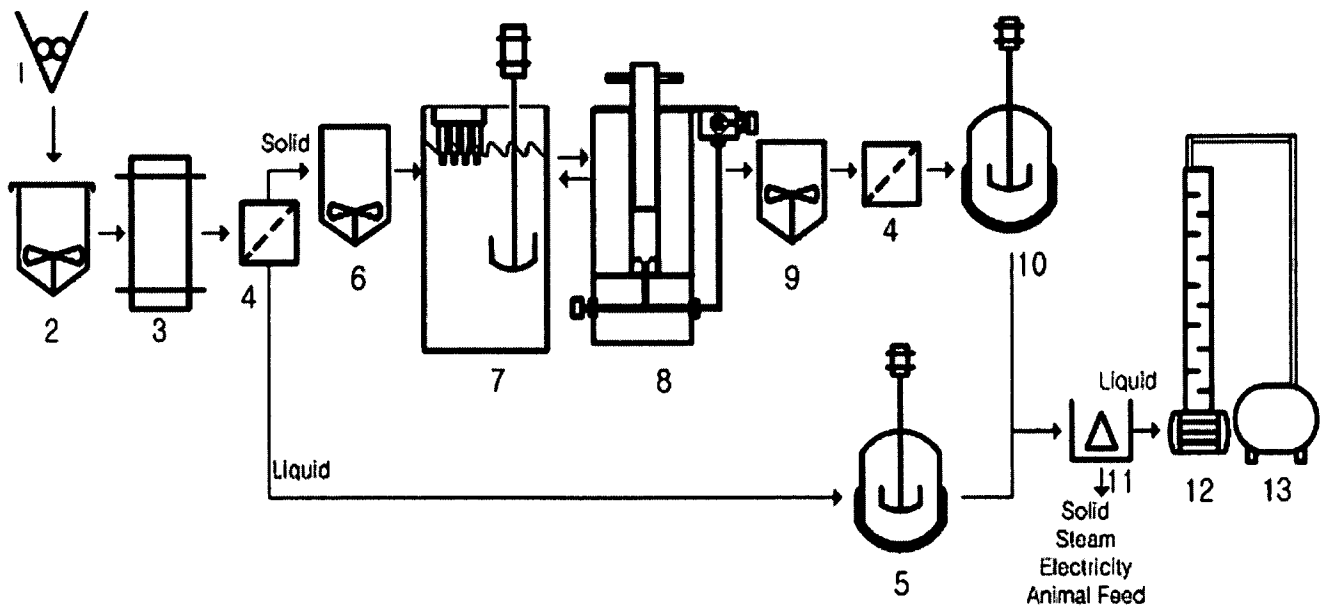


2/10

도 2

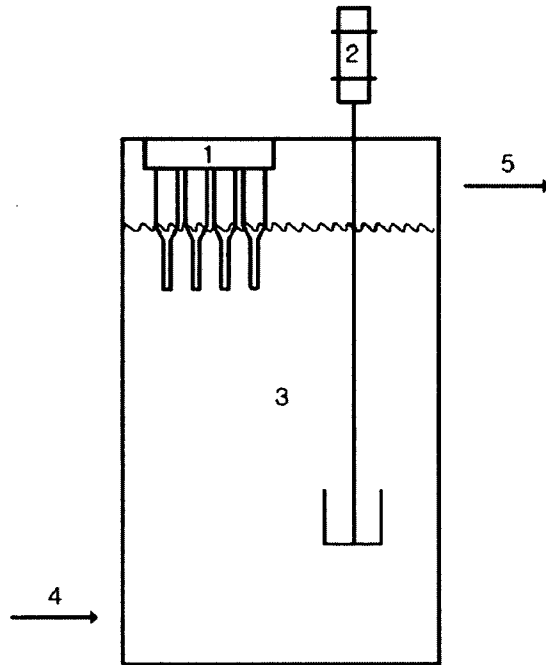


도 3

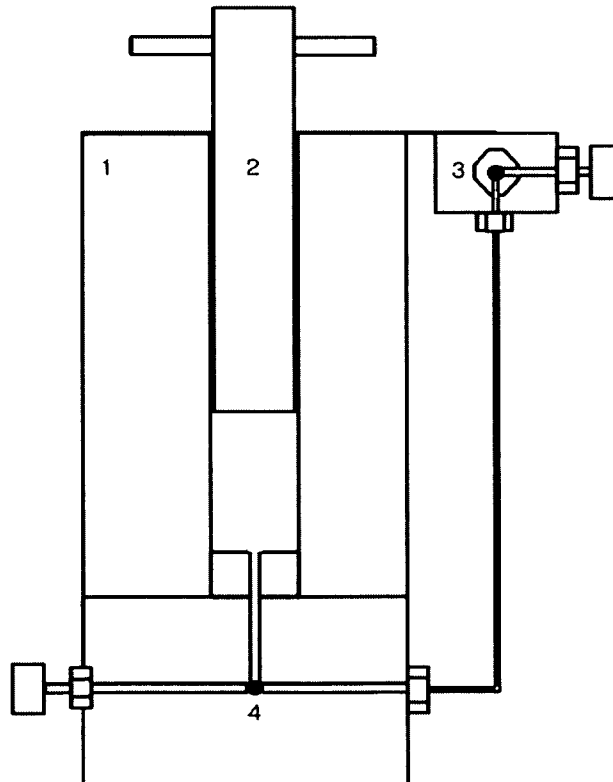


3/10

도 4



도 5

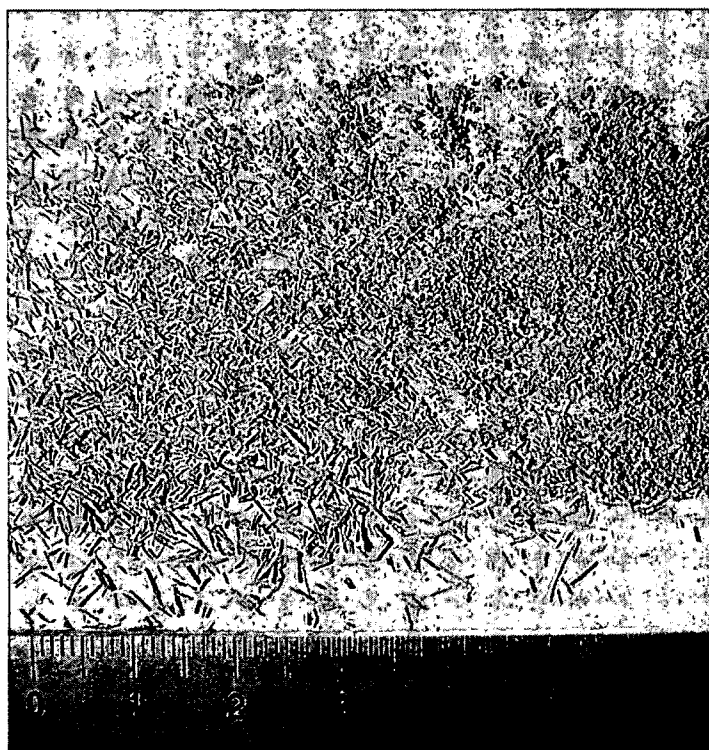


4/10

도 6

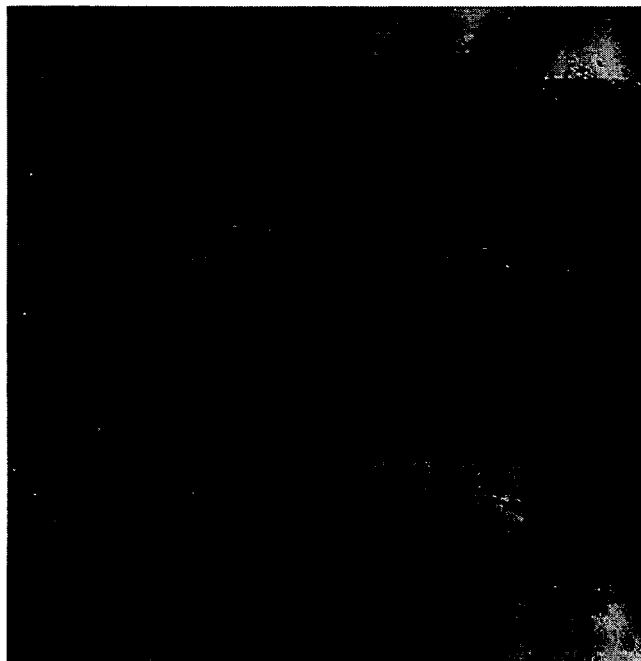


도 7

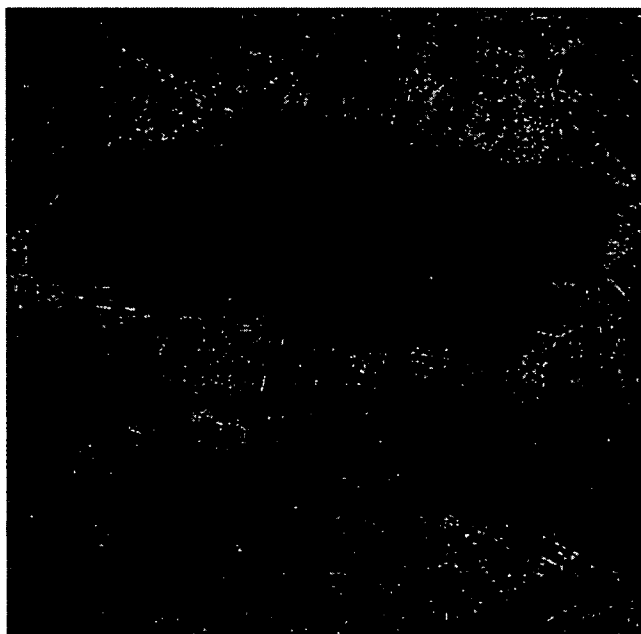


5/10

도 8



도 9

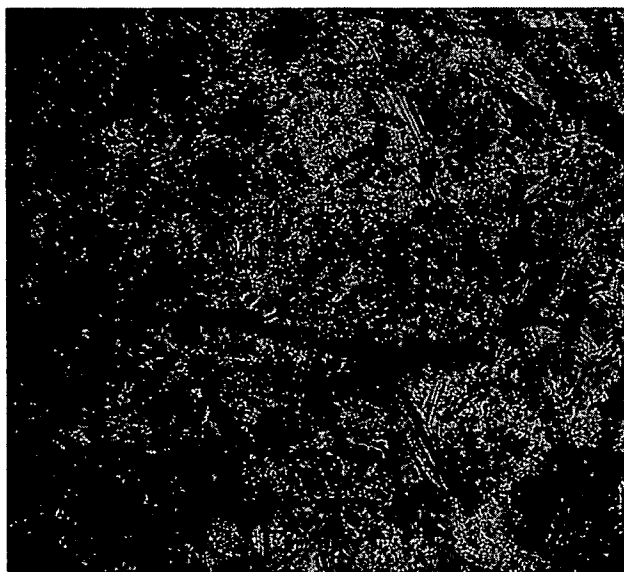


6/10

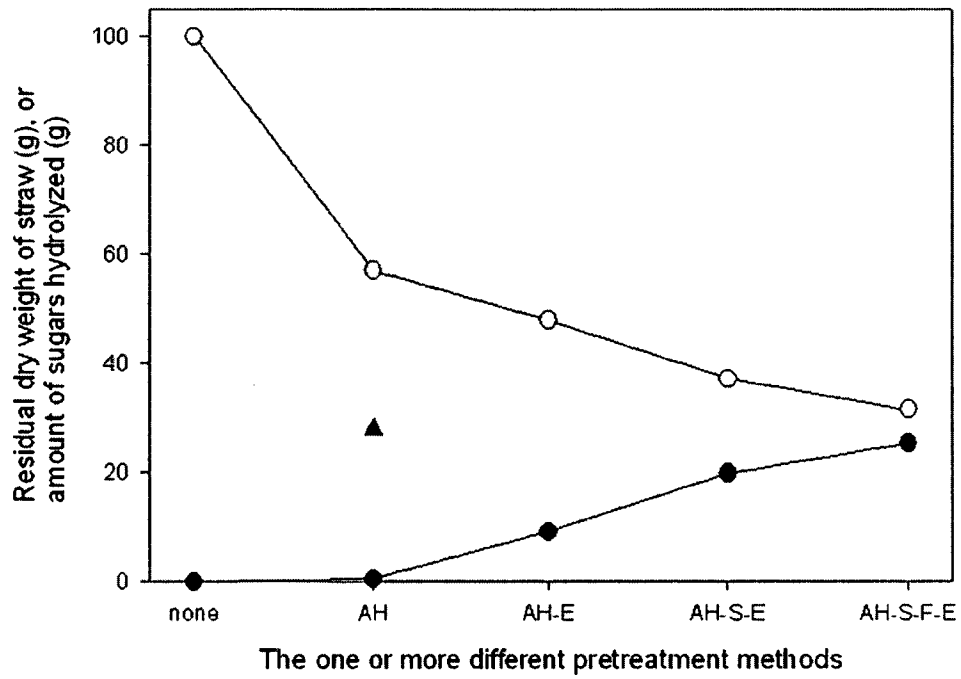
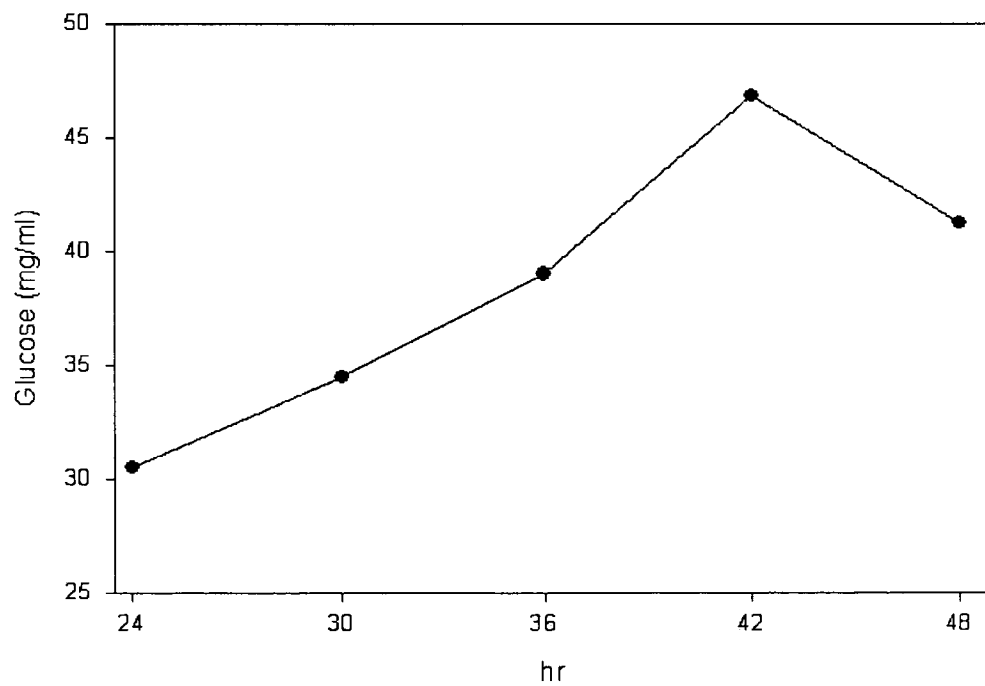
도 10



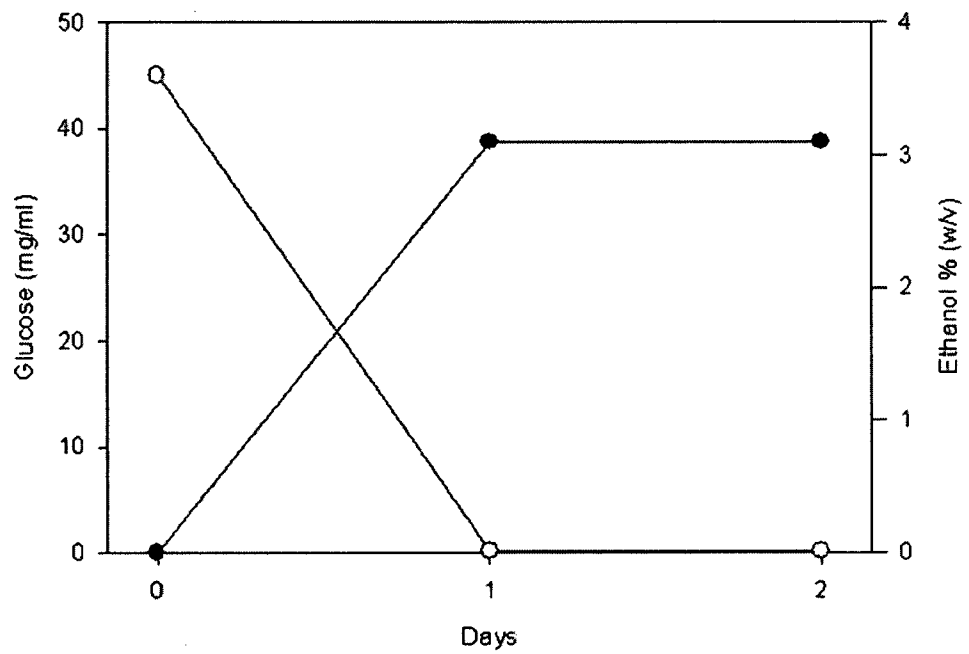
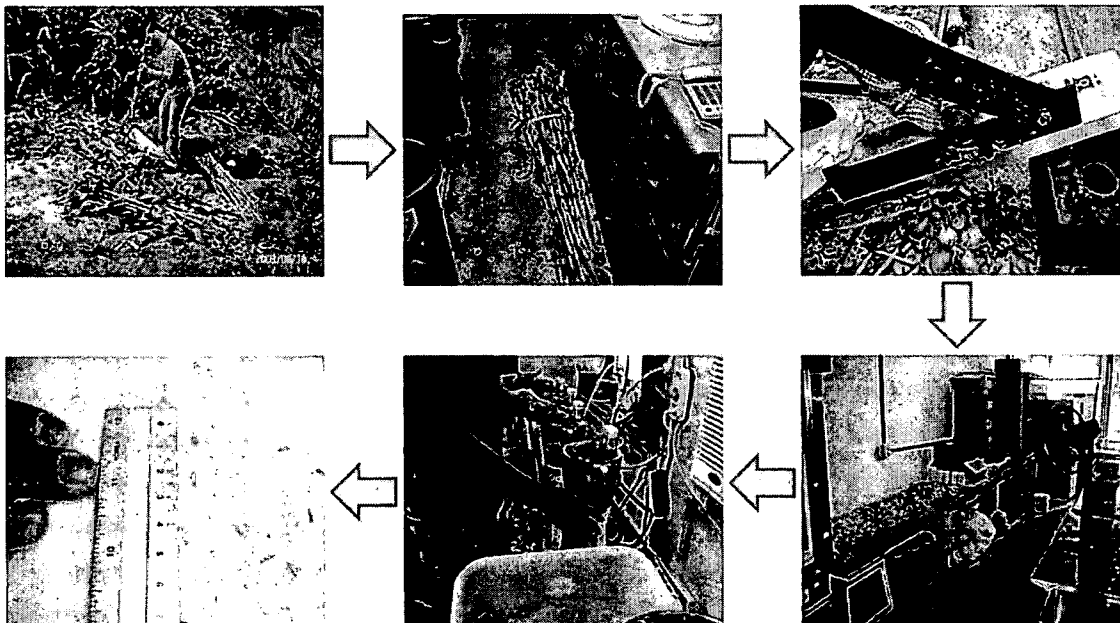
도 11



7/10

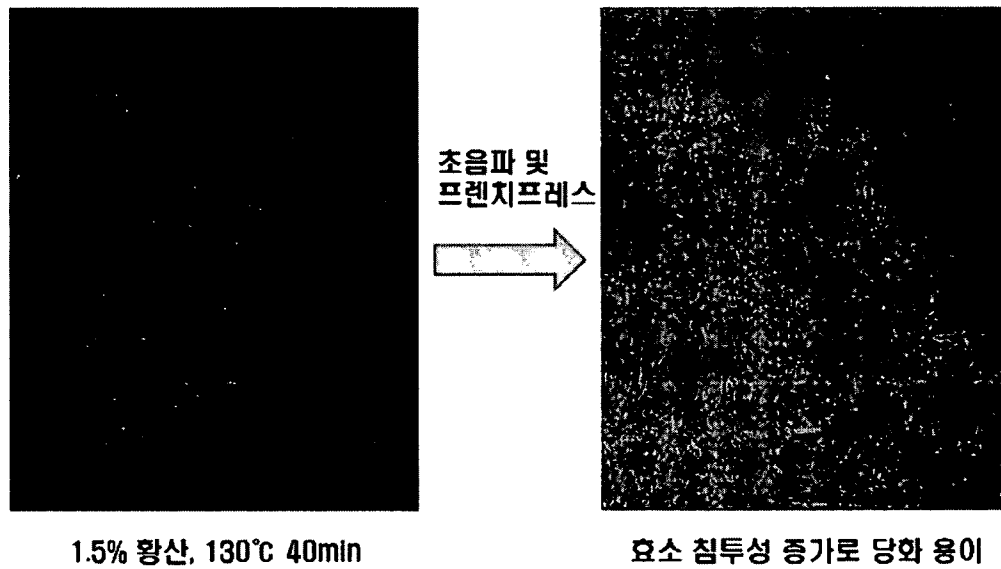
도 12**도 13**

8/10

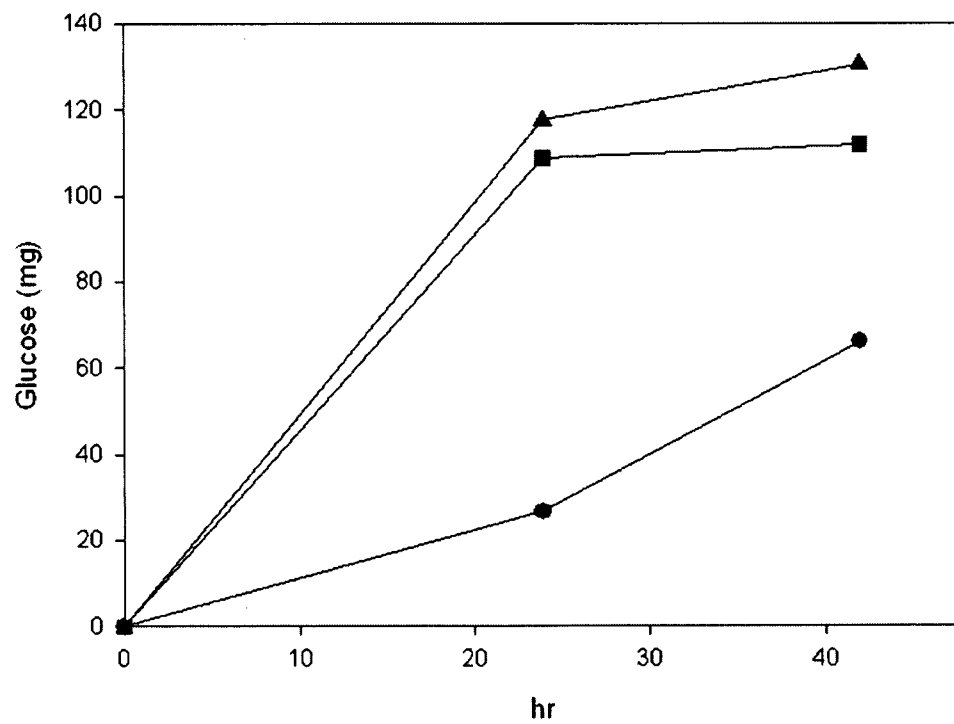
도 14**도 15**

9/10

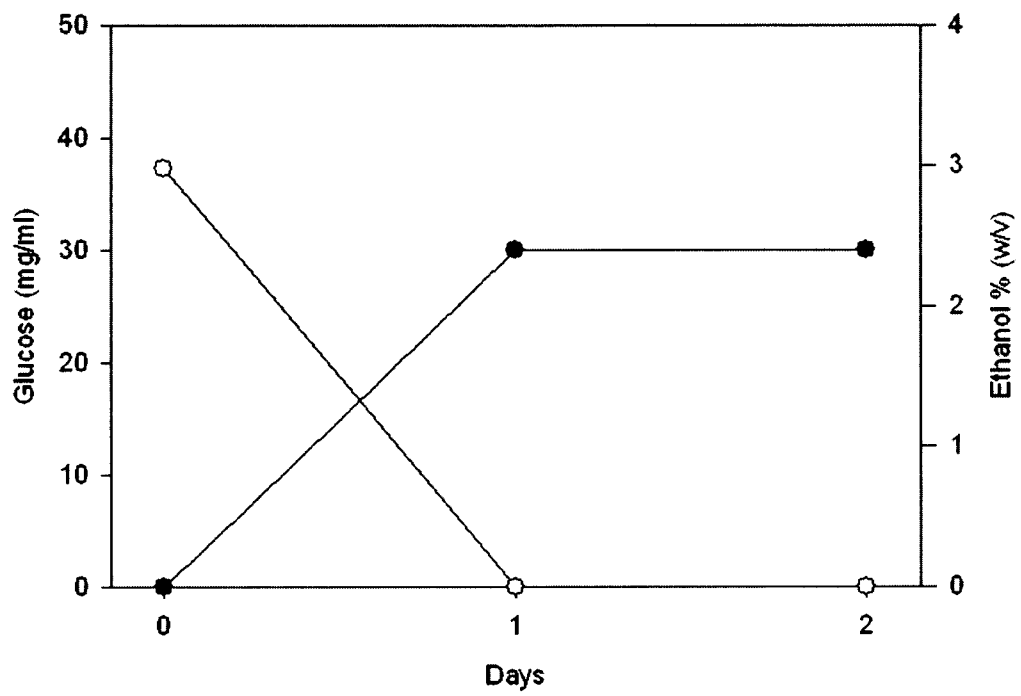
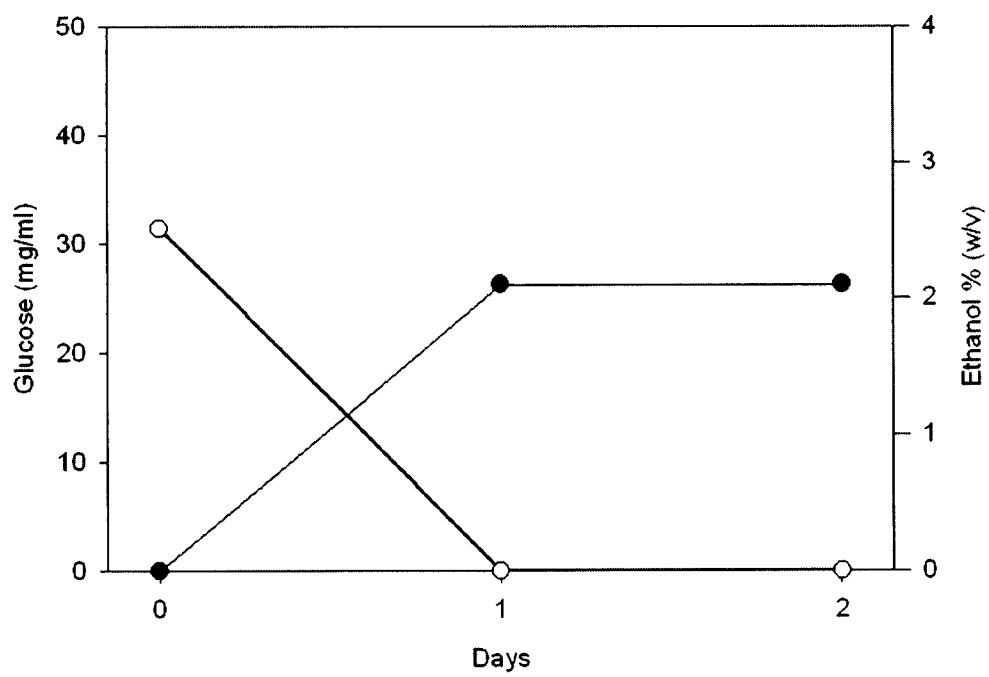
도 16



도 17



10/10

도 18**도 19**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2010/000290**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12P 7/06(2006.01)i, C12P 7/08(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)

C12P 7/06; C12P 1/00; C12P 7/10; C08H 5/04

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: bioethanol, biomass, ultrasonic wave, hydrolysis, frequency, liquid phase, solid phase, neutralizer, enzyme, pentose, hexose**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 7504245 B2 (KINLEY, M. T. AND KROHN, B) 17 March 2009 Abstract; figures 4-6; claims 1-12.	1-15
A	US 6333181 B1 (INGRAM, O. I AND WOOD, B. E.) 25 December 2001 Abstract; figures 1, 2; claims 1-4.	1-15
A	WO 2008-073186 A2 (MEDOFF, M.) 19 June 2008 Abstract; claims 1, 6, 9, 10.	1-15
A	US 7514246 B2 (KINLEY, M. T. et al.) 07 April 2009 Abstract; figures 1-3, 5-8; claims 1, 6, 7.	1-15
A	WO 2009-003167 A1 (SMITH, M. T. et al.) 31 December 2008 Abstract; claims 1, 23, 54.	1-15



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

"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

07 OCTOBER 2010 (07.10.2010)

Date of mailing of the international search report

08 OCTOBER 2010 (08.10.2010)

Name and mailing address of the ISA/KR


 Korean Intellectual Property Office
 Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
 Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

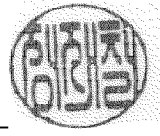
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2010/000290

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 7504245 B2	17.03.2009	US 2005-0136520 A1 US 2008-0044891 A1	23.06.2005 21.02.2008
US 6333181 B1	25.12.2001	AU 755248 B2 CA 2285312 A1 EP 0981608 A1 EP 0981608 B1 JP 2001-518790 A US 2003-0054500 A1 WO 98-45418 A1	05.12.2002 15.10.1998 01.03.2000 11.01.2006 16.10.2001 20.03.2003 15.10.1998
WO 2008-073186 A2	19.06.2008	AU 2007-333012 A1 CA 2667628 A1 CN 101641397 A EP 2069423 A2 EP 2098556 A1 EP 2098557 A1 EP 2098558 A1 EP 2098559 A1 EP 2100911 A1 EP 2204432 A1 JP 2010-508390 A KR 10-2009-0096432 A WO 2008-073186 A3	19.06.2008 19.06.2008 03.02.2010 17.06.2009 09.09.2009 09.09.2009 09.09.2009 09.09.2009 16.09.2009 07.07.2010 18.03.2010 10.09.2009 19.03.2009
US 7514246 B2	07.04.2009	US 2005-0118692 A1 US 2006-0286654 A1 US 2008-0096261 A1 US 7101691 B2 WO 2005021742 A2	02.06.2005 21.12.2006 24.04.2008 05.09.2006 10.03.2005
WO 2009-003167 A1	31.12.2008	AU 2008-268139 A1 CA 2692185 A1 CN 101680004 A EP 2162545 A1 KR 10-2010-0031526 A US 2010-0196980 A1	31.12.2008 31.12.2008 24.03.2010 17.03.2010 22.03.2010 05.08.2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12P 7/06(2006.01)i, C12P 7/08(2006.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12P 7/06; C12P 1/00; C12P 7/10; C08H 5/04 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: 바이오에탄올, 바이오매스, 초음파, 가수분해, 주파수, 액상, 고상, 중화제, 효소, 오타당, 육탄당																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>US 7504245 B2 (KINLEY, M. T. 및 KROHN, B) 2009.03.17 초록; 도면 4-6; 청구항 1-12.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6333181 B1 (INGRAM, O. I 및 WOOD, B. E.) 2001.12.25 초록; 도면 1, 2; 청구항 1-4.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2008-073186 A2 (MEDOFF, M.) 2008.06.19 초록; 청구항 1, 6, 9, 10.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 7514246 B2 (KINLEY, M. T. 외 2명) 2009.04.07 초록; 도면 1-3, 5-8; 청구항 1, 6, 7.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2009-003167 A1 (SMITH, M. T. 외 5명) 2008.12.31 초록; 청구항 1, 23, 54.</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	A	US 7504245 B2 (KINLEY, M. T. 및 KROHN, B) 2009.03.17 초록; 도면 4-6; 청구항 1-12.	1-15	A	US 6333181 B1 (INGRAM, O. I 및 WOOD, B. E.) 2001.12.25 초록; 도면 1, 2; 청구항 1-4.	1-15	A	WO 2008-073186 A2 (MEDOFF, M.) 2008.06.19 초록; 청구항 1, 6, 9, 10.	1-15	A	US 7514246 B2 (KINLEY, M. T. 외 2명) 2009.04.07 초록; 도면 1-3, 5-8; 청구항 1, 6, 7.	1-15	A	WO 2009-003167 A1 (SMITH, M. T. 외 5명) 2008.12.31 초록; 청구항 1, 23, 54.	1-15
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
A	US 7504245 B2 (KINLEY, M. T. 및 KROHN, B) 2009.03.17 초록; 도면 4-6; 청구항 1-12.	1-15																		
A	US 6333181 B1 (INGRAM, O. I 및 WOOD, B. E.) 2001.12.25 초록; 도면 1, 2; 청구항 1-4.	1-15																		
A	WO 2008-073186 A2 (MEDOFF, M.) 2008.06.19 초록; 청구항 1, 6, 9, 10.	1-15																		
A	US 7514246 B2 (KINLEY, M. T. 외 2명) 2009.04.07 초록; 도면 1-3, 5-8; 청구항 1, 6, 7.	1-15																		
A	WO 2009-003167 A1 (SMITH, M. T. 외 5명) 2008.12.31 초록; 청구항 1, 23, 54.	1-15																		
☐ 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 “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 2010년 10월 07일 (07.10.2010)		국제조사보고서 발송일 2010년 10월 08일 (08.10.2010)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 선사로 139, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 정재철 전 화 번호 82-42-481-8385 																		

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 7504245 B2	2009.03.17	US 2005-0136520 A1 US 2008-0044891 A1	2005.06.23 2008.02.21
US 6333181 B1	2001.12.25	AU 755248 B2 CA 2285312 A1 EP 0981608 A1 EP 0981608 B1 JP 2001-518790 A US 2003-0054500 A1 WO 98-45418 A1	2002.12.05 1998.10.15 2000.03.01 2006.01.11 2001.10.16 2003.03.20 1998.10.15
WO 2008-073186 A2	2008.06.19	AU 2007-333012 A1 CA 2667628 A1 CN 101641397 A EP 2069423 A2 EP 2098556 A1 EP 2098557 A1 EP 2098558 A1 EP 2098559 A1 EP 2100911 A1 EP 2204432 A1 JP 2010-508390 A KR 10-2009-0096432 A WO 2008-073186 A3	2008.06.19 2008.06.19 2010.02.03 2009.06.17 2009.09.09 2009.09.09 2009.09.09 2009.09.09 2009.09.16 2010.07.07 2010.03.18 2009.09.10 2009.03.19
US 7514246 B2	2009.04.07	US 2005-0118692 A1 US 2006-0286654 A1 US 2008-0096261 A1 US 7101691 B2 WO 2005021742 A2	2005.06.02 2006.12.21 2008.04.24 2006.09.05 2005.03.10
WO 2009-003167 A1	2008.12.31	AU 2008-268139 A1 CA 2692185 A1 CN 101680004 A EP 2162545 A1 KR 10-2010-0031526 A US 2010-0196980 A1	2008.12.31 2008.12.31 2010.03.24 2010.03.17 2010.03.22 2010.08.05