

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

정정판

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 5월 31일 (31.05.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/070848 A9

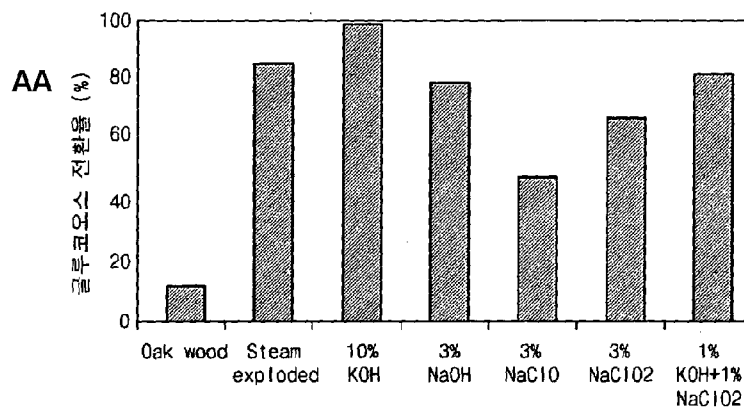
- (51) 국제특허분류: C12P 19/02 (2006.01) C12P 7/10 (2006.01) C12P 19/16 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/008934
- (22) 국제출원일: 2011년 11월 22일 (22.11.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2010-0116790 2010년 11월 23일 (23.11.2010) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 경상대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC CO-OPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 경상남도 진주시 가좌동 900, 660-701 Gyeongsangnam-do (KR). 한국화학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) [KR/KR]; 대전 유성구 장동 100번지, 305-343 Daejeon (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 양재경 (YANG, Jae-Kyung) [KR/KR]; 경상남도 진주시 호탄동 대동아파트 103동 302호, 660-788 Gyeongsangnam-do (KR). 정지영 (JUNG, Ji-Young) [KR/KR]; 경상남도 사천시 향촌동 9차 에이스빌라 가동 403호, 664-220 Gyeongsangnam-do (KR). 김지수 (KIM, Ji-Su) [KR/KR]; 경상남도 마산시 문화동 8-1 동성아트빌라 102호, 631-380 Gyeongsangnam-do (KR). 김영운 (KIM, Yeong-Un) [KR/KR]; 대전 유성구 봉명동 씨제이나인파크 102동 2603호, 305-301 Daejeon (KR). 윤병태 (YOON, Byung-Tae) [KR/KR]; 대전 대덕구 미호동 279-3, 306-180 Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 서울 금천구 가산동 60-4 코오롱테크노밸리 906호, 153-770 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,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: GLUCOSE PRODUCTION METHOD INCLUDING A MULTISTAGE PROCESS

(54) 발명의 명칭: 다단계 공정을 포함하는 글루코오스 제조방법

[Fig. 4]



BB 물리적 처리 및 화학적 처리

AA ... Glucose conversion (%)

BB ... Physical treatment and chemical treatment

(57) Abstract: The present invention relates to a glucose production method including a multistage process. The glucose production method including a multistage process according to the present invention involves performing multistage process of carrying out a steam-explosion treatment on biomass, an alkali-compound treatment, and a chlorinated-compound treatment, to thereby improve the saccharification efficiency of a saccharification process and improve the productivity and efficiency of producing glucose from biomass.

(57) 요약서: 본 발명은 다단계 공정을 포함하는 글루코오스 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 다단계 공정을 포함하는 글루코오스 제조방법은 바이오매스에 증기폭쇄 공정, 알칼리 화합물 처리 공정 및 염소계 화합물의 다단 처리함으로써, 당화 공정의 당화 효율을 향상시켜 바이오매스로부터 글루코오스의 생산성 및 제조효율을 향상시킬 수 있다.



WO 2012/070848 A9



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, QA, RO, RS, RU, RW, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(88) 국제조사보고서 공개일: 2012 년 8 월 23 일

(48) 본 정정판 공개일: 2012 년 9 월 27 일

(15) 정정사항에 관한 정보:
2012 년 9 월 27 일 자 공지 참조

명세서

발명의 명칭: 다단계 공정을 포함하는 글루코오스 제조방법 기술분야

- [1] 본 발명은 다단계 공정을 포함하는 글루코오스 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 1998년을 기준으로 한 국내바이오매스 부존자원은 연간 약 1,200만 톤에 이르며, 현재의 기술로 이용가능한 자원은 그 양의 약 20%에 해당하는 230만 톤에 이른다. 또한 농업 부산물의 부존자원은 400만 톤/년에 달하며, 보급 잠재량은 105만 톤/년에 이르며 이를 현금으로 환산하면 3,675억원에 이르고 있다. 2002년도 말 현재 우리나라의 임산자원은 461,635,000 톤으로 나타났으며, 산림에서 이루어지고 있는 숲 가꾸기사업 또는 간벌, 지장목 벌채 등으로 생산되는 폐잔목과 용재로서 이용이 불가능한 폐자원에 대한 이용방안이 절실하다. 따라서, 부존 자원이 적은 우리나라에서 저비용으로, 바이오매스로부터 순도 높은 셀룰로오스를 제조하고 이를 바탕으로 글루코오스를 제조하는 구체적인 제조공정의 개발이 요청되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [3] 본 발명의 목적은 다단계 공정을 포함하는 글루코오스 제조방법을 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

- [4] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 바이오매스 원료를 증기 폭쇄 처리하는 단계; 상기 증기 폭쇄 처리된 바이오매스 원료를 알칼리 화합물로 처리하는 단계; 상기 알칼리 화합물로 처리된 바이오매스 원료를 염소계 화합물로 처리하는 단계; 및 상기 염소계 화합물로 처리된 바이오매스 원료를 당화시키는 단계를 포함하는 글루코오스 제조방법을 제공한다.
- [5] 상기 바이오매스는 태양에너지를 받은 식물과 미생물의 광합성에 의해 생성되는 식물체 및 이를 먹고 살아가는 동물체를 포함하는 생물/미생물 유기체를 포함하는 것으로서, 구체적으로 각종 동식물을 비롯하여 농업에서 나온 부산물 및 폐기물, 음식물 쓰레기, 생체에 기초한 산업 폐기물, 바이오 연료 생산을 목적으로 재배된 작물 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 바이오매스는 사탕수수, 사탕무 등의 설탕류; 옥수수, 밀, 쌀, 카사바, 타피오카 등의 전분류; 및 목재 폐기물, 벚짚이나 옥수수대와 같은 농업 잔류물 등의 리그노셀룰로오스(lignocellulose) 중에서 적어도 어느 하나일 수 있다. 일 예로서, 상기 바이오매스는 리그노셀룰로오스계 중에서, 참나무(Oak wood)와 같은 목재 폐기물일 수 있다.
- [6] 상기 증기 폭쇄(Steam explosion) 처리하는 단계는 고압 수증기를 이용하여

바이오매스를 전처리하는 공정이다. 즉, 고온의 증기가 들어 있는 고압 용기에서 상기 바이오매스를 소정 시간 동안 쪼갬 후, 순식간에 상기 고압 용기의 밸브를 열어 마치 팝콘처럼 순간적으로 바이오매스 내의 분자의 구조가 열리도록 유도하는 방법일 수 있다.

- [7] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 증기 폭쇄 처리하는 단계는 20 내지 30kg/cm²의 압력 하에 213 내지 235°C에서 수행할 수 있다. 상기 압력이 20kg/cm² 미만일 경우 증기 폭쇄 처리가 충분하지 않을 수 있고, 30kg/cm²를 초과할 경우, 압력 증가에 따른 증기 폭쇄 처리의 효율성이 떨어질 수 있어 경제적으로 20 내지 30kg/cm²의 압력 하에 수행할 수 있다. 상기 온도가 213°C 미만의 온도의 경우 증기 폭쇄 처리가 충분하지 않을 수 있고, 235°C를 초과할 경우, 온도 증가에 따른 증기 폭쇄 처리의 효율성이 떨어질 수 있어 경제적으로 213 내지 235°C에서 수행할 수 있다. 상기 증기 폭쇄 처리 시간은 약 3 내지 10분 일 수 있다. 예를 들어, 상기 증기 폭쇄 처리는 25kg/cm²의 수증기 압력으로 225°C에서 5분 동안 처리할 수 있다.
- [8] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 알칼리 화합물로 처리하는 단계로 1 내지 3 중량% 농도의 알칼리 수용액을 처리할 수 있다.
- [9] 상기 알칼리 화합물을 처리하는 단계에서 0.5 중량% 농도 미만의 알칼리 화합물을 처리하는 경우, 알칼리 화합물 처리의 효과가 충분하지 않을 수 있고, 5 중량% 농도를 초과하여 알칼리 화합물을 처리하는 경우, 알칼리 화합물 처리에 의한 효과가 증가되지 않으므로 환경적 오염 또는 약품회수, 리사이클 측면과 경비 발생측면에서 바람직하지 않을 수 있다. 상기 알칼리 화합물을 처리하는 단계의 알칼리 화합물 수용액의 농도는 0.5 내지 5 중량%일 수 있다. 바람직하게는 상기 알칼리 화합물 수용액의 농도는 1 내지 3 중량%일 수 있다.
- [10] 상기 알칼리 화합물은 수산화나트륨(NaOH), 수산화칼륨(KOH), 수산화리튬(LiOH), 수산화암모늄(NH₄OH) 또는 수산화칼슘(CaOH) 등을 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 알칼리 화합물은 수산화나트륨(NaOH) 또는 수산화칼륨(KOH)일 수 있다. 보다 바람직하게는 상기 알칼리 화합물은 수산화칼륨(KOH)일 수 있다.
- [11] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 염소계 화합물로 처리하는 단계로 1 내지 3 중량% 농도의 염소계 화합물 수용액을 처리할 수 있다.
- [12] 상기 염소계 화합물을 처리하는 단계에서 0.5 중량% 농도 미만의 염소계 화합물을 처리하는 경우, 염소계 화합물 처리의 효과가 충분하지 않을 수 있고, 5 중량% 농도를 초과하여 염소계 화합물을 처리하는 경우, 염소계 화합물 처리에 의한 효과가 증가되지 않으므로 환경적 오염 또는 약품회수, 리사이클 측면과 경비 발생측면에서 바람직하지 않을 수 있다. 상기 염소계 화합물을 처리하는 단계의 염소계 화합물 수용액의 농도는 0.5 내지 5 중량%일 수 있다. 바람직하게는 상기 염소계 화합물 수용액의 농도는 1 내지 3 중량%일 수 있다.
- [13] 상기 염소계 화합물은 차아염소산나트륨(NaClO), 아염소산나트륨(NaClO₂)

- 또는 차아염소산칼슘($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) 등을 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 염소계 화합물은 차아염소산나트륨(NaClO) 또는 아염소산나트륨(NaClO_2)일 수 있다. 보다 바람직하게는 상기 염소계 화합물은 아염소산나트륨(NaClO_2)일 수 있다.
- [14] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 알칼리 화합물은 수산화나트륨(NaOH), 수산화칼륨(KOH), 수산화리튬(LiOH), 수산화암모늄(NH_4OH) 및 수산화칼슘(CaOH)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이며, 상기 염소계 화합물은 차아염소산나트륨(NaClO), 아염소산나트륨(NaClO_2) 및 차아염소산칼슘($\text{Ca}(\text{ClO})_2$)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [15] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 알칼리 화합물은 수산화칼륨(KOH)이며, 상기 염소계 화합물은 아염소산나트륨(NaClO_2)일 수 있다.
- [16] 상기 당화시키는 단계는 통상적인 방법에 따라 산 당화(acid saccharification)에 의해 수행될 수도 있으나, 효소 당화에 의해 수행되는 것이 보다 바람직하다.
- [17] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 당화시키는 단계는 효소 당화에 의해 수행할 수 있다.
- [18] “당화”는 셀룰로스 성분이 효소의 작용에 의해 글루코스로 전환되는 과정이며, 셀룰라아제(Cellulase)가 셀룰로오스의 반응표면에 흡착하여 셀룰로오스를 셀로바이오스(cellobiose)로 바꾸는 과정과 이렇게 생성된 셀로바이오스가 β -글루코시다제(β -glucosidase)의 효소반응에 의해 글루코스로 전환되는 과정으로 나눌 수 있다.
- [19] 상기 효소는 셀룰라아제, β -글루코시다제(β -glucosidase), 헤미셀룰라아제(hemicellulase) 및 자일라나아제(xylanase) 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 효소는 Celluclast 1.5L(Novozymes, Denmark), Viscozyme L(Novozymes, Denmark) 등을 포함할 수 있다.
- [20] 상기 효소 당화 공정 온도는 40 내지 80°C일 수 있다. 상기 당화 온도가 40°C 미만일 경우 당화 속도가 느릴 수 있으며, 상기 효소 당화 공정 온도가 80°C를 초과할 경우 효소 변성을 일으킬 수 있다. 바람직하게는 상기 효소 당화 공정 온도는 45 내지 55°C일 수 있다.
- [21] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 바이오매스 원료를 20 내지 30kg/cm²의 압력 하에 213 내지 235°C에서 증기 폭쇄 처리하는 단계; 상기 증기 폭쇄 처리된 바이오매스 원료에 1 내지 3 중량% 농도의 수산화칼륨(KOH) 수용액을 처리하는 단계; 상기 수산화칼륨(KOH) 수용액으로 처리된 바이오매스 원료에 1 내지 3 중량% 농도의 아염소산나트륨(NaClO_2) 수용액을 처리하는 단계; 및 상기 아염소산나트륨(NaClO_2) 수용액으로 처리된 바이오매스 원료를 효소 당화 공정을 이용하여 당화시키는 단계를 포함하는 글루코오스 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [22] 본 발명에 따른 다단계 공정을 포함하는 글루코오스 제조방법은 바이오매스에 증기폭쇄 공정, 알칼리 화합물 및 염소계 화합물을 다단 처리함으로써, 당화 공정의 당화 효율을 향상시켜 바이오매스로부터 글루코오스의 생산성 및 제조효율을 향상시킬 수 있다. 또한 상기 글루코오스를 이용하여 바이오 에탄올 등을 생산하는 공정 등에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [23] 도 1은 바이오 매스 원료로부터 얻은 원료 물질(raw material)을 나타내는 사진으로, (a) 및 (b)는 참나무 칩 및 참나무 밀 분쇄물을 나타낸다.
- [24] 도 2는 단당류 표준(standard)의 HPLC 크로마토그래피 결과로서, (a), (b), (c), (d) 및 (e)는 각각 글루코오스(glucose), 자일로스(xylose), 갈락토오스(galactose), 아라비노오스(arabinose) 및 만노오스(mannose)를 나타낸다. 여기에서, RT는 각각의 단당류의 머무름 시간(분)을 나타낸다.
- [25] 도 3은 고압 수증기 전처리 장치(a) 및 상기 고압 수증기 전처리 장치(a)를 이용하여 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료(b)의 사진을 나타낸다.
- [26] 도 4는 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료의 화학적 처리에 따른 글루코오스 전환율을 나타내는 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [27] 본 발명은 바이오매스 원료를 증기 폭쇄 처리하는 단계; 상기 증기 폭쇄 처리된 바이오매스 원료를 알칼리 화합물로 처리하는 단계; 상기 알칼리 화합물로 처리된 바이오매스 원료를 염소계 화합물로 처리하는 단계; 및 상기 염소계 화합물로 처리된 바이오매스 원료를 당화시키는 단계를 포함하는 글루코오스 제조방법을 제공한다.
- [28] 상기 증기 폭쇄 처리하는 단계는 20 내지 30kg/cm²의 압력 하에 213 내지 235°C에서 수행할 수 있다.
- [29] 상기 알칼리 화합물로 처리하는 단계는 1 내지 3 중량% 농도의 알칼리 화합물 수용액을 처리하는 것일 수 있다.
- [30] 상기 염소계 화합물로 처리하는 단계는 1 내지 3 중량% 농도의 염소계 화합물 수용액을 처리하는 것일 수 있다.
- [31] 상기 알칼리 화합물은 수산화나트륨(NaOH), 수산화칼륨(KOH), 수산화리튬(LiOH), 수산화암모늄(NH₄OH) 및 수산화칼슘(CaOH)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이며, 상기 염소계 화합물은 차아염소산나트륨(NaClO), 아염소산나트륨(NaClO₂) 및 차아염소산칼슘(Ca(ClO)₂)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [32] 상기 당화시키는 단계는 효소 당화에 의해 수행되는 것일 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [33] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하지만, 하기 실시예는 본 발명을

예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

- [34] 본 발명의 실시예 및 실험예에 있어서, 화학적 처리는 “물리적으로 처리” 또는 “생물학적으로 처리” 라는 표현과 구별을 하기 위하여 사용하는 것으로서, 화학 반응을 이용하는 것을 의미한다. 그러나, 본 발명은 상기 화학 반응이 추가 되는 한, 상기 화학적으로 처리시 여타의 물리적인 수단 또는 방법, 또는 생물학적인 수단 또는 방법을 배제하지 않는다.

[35] 실시예

[36] 1. 바이오매스 원료의 고압 수증기 전처리 공정(Steam explosion pretreatment)

- [37] 본 실시예에 사용된 바이오매스 원료는 (주) 유림하이텍으로부터 제공받았다. 업체로부터 제공받은 원료는 고압 수증기 처리 후 잔사 상태로 제공받았다. 고압 수증기 전처리 조건은 25kg/cm²의 수증기 압력으로 225°C에서 5분 동안 처리 하였다.

[38] 2. 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료의 화학적 처리: 다단 처리(1 중량% KOH 수용액 + 1 중량% NaClO₂ 수용액(실시예 1), 1 중량% KOH 수용액 + 3 중량% NaClO₂ 수용액(실시예 2))

- [39] 1 중량% KOH 수용액에 상기 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료를 고체 : 액체 (1:20)의 비율로 침지 시켜서 30°C로 설정된 진탕배양기에서 100rpm 으로 3시간 동안 교반하였다. 교반 후 여과하여 잔사와 액으로 분리하고 잔사는 pH 7이 될 때까지 1% 빙초산과 증류수로 세척하여 잔사는 다시 1 중량% NaClO₂ 수용액, 3 중량% NaClO₂ 수용액에 각각 고체 : 액체 (1:20) 비율로 침지시켜서 30°C로 설정된 진탕배양기에서 100rpm 으로 3시간 동안 교반하였다. 교반 후 여과하여 잔사와 액으로 분리하고 잔사는 아세톤과 증류수로 세척해서 105°C에서 건조시켰다.

[40] 3. 효소 당화

- [41] 고압 수증기 전처리 된 바이오매스 원료에 화학적 처리(1 중량% KOH 수용액 + 1 중량% NaClO₂ 수용액(실시예 1), 1 중량% KOH 수용액 + 3 중량% NaClO₂ 수용액(실시예 2))를 수행하고 효소 당화를 수행하였다.

- [42] 삼각플라스크에 전처리된 시료 1g과 0.1M 구연산 나트륨 완충액(sodium citrate buffer) 50ml(pH 4.8)을 투입한 후 50°C가 될 때 까지 가열해준 후 시판되는 효소 Celluclast 1.5L과 Viscozyme L을 각각 0.8ml, 0.2ml 넣고 진탕배양기에서 50°C, 150rpm으로 96시간 동안 효소가수분해 하였다.

[43]

[44] 실험예 1. 바이오매스 원료의 화학적 조성 분석

[45] 1. 시료

- [46] 바이오매스 원료로 참나무(Oak wood)를 사용하였고 윌리스 밀로 분쇄하여 20 메쉬(mesh)를 통과하였고 80 메쉬(mesh)를 통과하지 못한 시료의 크기로 균일화시켜 바이오매스 화학적 조성분석을 위한 시료로 사용하였으며 도 1에 나타내었다.

- [47] 2. 바이오매스 원료의 화학적 조성 분석을 위한 분석법
- [48] 바이오매스 원료의 화학적 조성을 분석하기 위해 NREL (National Renewable Energy Laboratory) 분석법에 따라 다음과 같은 분석을 하였다.
- [49] (1) 추출물 함량 (NREL/TP510-42619)
- [50] 정칭한 시료 2g을 원통여과지(thimble filter)에 옮겨 속슬렛 추출기에서 에탄올 200ml으로 24시간 동안 추출한 후 추출물 함량을 측정하고 탈지된 시료는 리그닌 함량 및 탄수화물 함량 측정 시료로 사용하였다. 추출물 함량, %는 하기 수학적 식 1에 의하여 계산하였다.
- [51] [수학적 식 1]
- [52]
$$\text{추출물 함량}(\%) = (\text{전건 시료의 무게} - \text{추출 후 전건 시료의 무게}) / \text{전건 시료의 무게} \times 100$$
- [53] (2) 무기물 함량 (NREL/TP510-42622)
- [54] 도가니에 시료를 2g을 정칭하여 도가니에 넣고 $600 \pm 25^\circ\text{C}$ 의 전기로에서 24시간 동안 완전히 탄화시켜서 무기물의 함량을 측정하였다. 무기물 함량, %는 하기 수학적 식 2에 의하여 계산하였다.
- [55] [수학적 식 2]
- [56]
$$\text{무기물 함량}(\%) = \text{회분 무게} / \text{시료의 전건 무게} \times 100$$
- [57] (3) 탄수화물 및 리그닌 함량 (NREL/TP510-42618)
- [58] 탄수화물 함량과 리그닌 함량은 에탄올 추출한 탈지시료를 사용하여 72% H_2SO_4 로 30°C 에서 60 분간 가수분해한 후 증류수를 첨가하여 4% H_2SO_4 로 희석시킨 가수분해액을 121°C 에서 1시간 동안 오토클레이브(autoclave)한 후 여과하여 여과액은 탄수화물 함량 및 산가용성 리그닌 측정을 하고 잔사는 산불용성 리그닌 측정을 하였다. 산불용성 리그닌함량과 산가용성 리그닌 함량, %는 다음 식에 의하여 계산하였다.
- [59] [수학적 식 3]
- [60]
$$\text{산불용성 리그닌}(\%) = \text{산불용성 잔사의 무게} / \text{탈지 시료의 무게} \times 100$$
- [61] [수학적 식 4]
- [62]
$$\text{산가용성 리그닌 함량}(\%) = [\text{UV 흡광도} \times \text{여과액의 양} \times \text{희석배수}] / [\epsilon \times \text{탈지 시료 무게}] \times 100$$
- [63] 상기 수학적 식 4에서, UV 흡광도 = UV 분광광도계 240nm에서의 흡광도, ϵ = 권장된 파장에서의 흡광도($\text{L/g}\cdot\text{cm}$) - 25)
- [64] (4) 단당류 분석 (NREL/TP510-42623)
- [65] 탄수화물 함량 분석을 위해 HPLC (Agilent Technologies, Inc., 1100 series, USA)를 사용하여 단당류 분석을 하였다. 컬럼은 Aminex HPX-87P (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 이동상은 증류수를 사용하였고 유속은 0.6 mL/min, 온도는 85°C 를 유지 하였다. 도 2에 단당류별 표준(standard)의 머무름 시간(retention time)을 나타내었다.
- [66] 3. 바이오매스 원료의 화학적 조성

[67] 바이오매스 원료의 화학적 조성은 표 1에서 보는 바와 같이 탄수화물인 셀룰로오스(cellulose)와 헤미셀룰로스(hemicellulose) 함량은 각각 44.6%, 14.0%로 전체 바이오매스무게의 약 58.6%를 차지하였다. 특히 글루코오스(glucose)로 전환 가능한 잠재적인 셀룰로오스 함량은 44.6%로 높은 수치를 나타내지만 비활성 요소인 총 리그닌의 함량이 27.5%, 회분(ash) 2.9%로 나타났다.

[68] 글루코오스 전환 시 목질계바이오매스 원료는 효소의 접근성을 방해하는 구조로 이루어져 있어 당화 효율의 저하를 가져올 수 있으므로 효소의 접근성을 높일 수 있는 물리·화학적인 전처리가 필요할 것으로 판단되었다.

[69] 표 1

[Table 1]

조성물	% 건조 무게(Dry weight)
원료(recovered raw material)	100.0 ± 0.0
추출물(Extractives)	5.7 ± 0.4
셀룰로오스(Cellulose as glucose)	44.6 ± 0.0
헤미 셀룰로오스 ^a (Hemicellulose as)	14.0
자일로스(Xylose)	10.8 ± 0.2
갈락토오스(Galactose)	2.4 ± 0.1
아라비노오스(Arabinose)	0.5 ± 0.1
만노오스(Mannose)	0.3 ± 0.1
산불용성 리그닌(Acid insoluble lignin)	24.2 ± 0.3
산가용성 리그닌(Acid soluble lignin)	3.3 ± 0.6
회분(Ash)	2.9 ± 0.3
총합계(total)	94.7

[70] 상기 표 1에서 데이터는 오븐 건조 시료를 기초로 한 것이며, 헤미셀룰로오스^a는 자일로스 + 갈락토오스 + 아라비노스 + 만노오스를 나타낸다.

[71] 글루코오스 전환 시 목질계바이오매스 원료는 효소의 접근성을 방해하는 구조로 이루어져 있어 당화 효율의 저하를 가져올 수 있으므로 효소의 접근성을 높일 수 있는 물리·화학적인 전처리가 필요할 것으로 판단되었다.

[72]

[73] 실험예 2. 바이오매스 원료의 고압 수증기 전처리 공정

[74] 1. 고압 수증기 전처리(Steam explosion pretreatment)

[75] 본 실험예에 사용된 바이오매스 원료는 (주)유림하이텍에서 제공 받았다. 업체로부터 제공받은 원료는 고압 수증기 처리 후 잔사 상태로 제공받았으며 이

때 고압 수증기 전처리 조건은 25kg/cm²의 수증기 압력으로 225°C에서 5분 동안 처리하였다. 고압 수증기 전처리에 사용된 장치와 전처리된 바이오매스 원료의 사진을 도 3에 나타내었다.

[76] 2. 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료의 화학적 조성 분석

[77] 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료 화학적 조성을 분석하기 위해 NREL (National Renewable Energy Laboratory) 분석법에 따라 상기 실험에 1에서 설명한 방법과 실질적으로 동일한 방법으로 분석 하였다.

[78] 3. 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료의 화학적 조성

[79] 고압 수증기 전처리된 바이오매스의 화학적 조성을 표 2에 나타내었다.

고압수증기 전처리 후에 회수되는 바이오매스의 양은 95%로 5% 정도의 손실을 나타내었고 셀룰로오스 함량 52.4%, 헤미셀룰로오스 함량 0.4%로 고압수증기 전처리 전 바이오매스보다 셀룰로오스 함량은 7.8% 증가하였고 헤미셀룰로오스 함량은 13.6% 감소하였다. 셀룰로오스 함량 및 리그닌 함량의 상대적인 증가는 바이오매스 원료에 존재하는 헤미셀룰로오스가 고온 전처리 동안 가수분해 되어 저분자 된 상태에서 휘발되어 제거된 것으로 사료된다. 총 리그닌의 경우 7.7% 증가한 35.2%의 수치를 나타냄에 따라 셀룰로오스의 함량을 높이고 헤미셀룰로오스와 리그닌의 제거를 위한 공정이 추가적으로 필요할 것으로 판단되었다.

[80] 표 2

[Table 2]

조성물	% 건조 무게(Dry weight)
원료(recovered raw material) ^a	95.0 ± 0.0
추출물(Extractives)	5.3 ± 0.3
셀룰로오스(Cellulose as glucose)	52.4 ± 0.0
헤미 셀룰로오스 ^b (Hemicellulose as)	0.4
자일로스(Xylose)	0.1 ± 0.0
갈락토오스(Galactose)	0.1 ± 0.1
아라비노오스(Arabinose)	0.1 ± 0.0
만노오스(Mannose)	0.1 ± 0.0
산불용성 리그닌(Acid insoluble lignin)	32.0 ± 0.3
산가용성 리그닌(Acid soluble lignin)	3.2 ± 0.3
회분(Ash)	2.4 ± 0.2
총합계(total)	95.7

[81] 상기 표 2에서 데이터는 오븐 건조 시료를 기초로 한 것이다. 전 처리 조건은

25kg/cm²의 수증기 압력으로 225°C에서 5분 동안 처리 한 후 1시간 동안 열수 추출이다. 상기 잔사의 수율을 나타낸다. 헤미셀룰로오스는 자일로스 + 갈락토오스 + 아라비노스 + 만노오스를 나타낸다.

[82]

[83] 실험예 3. 전처리 원료로부터 셀룰로오스 확보 기술 도출

[84] 1. 화학적 처리

[85] 실험예 2의 방법에 의해 고압 수증기 전처리 된 바이오매스 원료(고압 수증기 처리후의 잔사)를 알칼리와 염소계를 이용하여 화학적 처리를 하였다.

[86] (1) 알칼리 처리 (1~3 중량% NaOH 수용액, 1~3 중량% KOH 수용액)

[87] 1 중량% NaOH, 3 중량% NaOH 수용액과 1 중량% KOH, 3 중량% KOH 수용액에 고압 수증기 전처리 된 바이오매스 원료를 각각 고체(solid) : 액체(liquid) (1:20)의 비율로 침지시켜서 30°C로 설정된 진탕배양기(shaking incubator)에서 100rpm으로 3시간 동안 교반하였다. 교반 후 여과하여 잔사와 액으로 분리하고 잔사는 1% 빙초산수용액과 증류수를 사용하여 pH 7이 될 때까지 세척해서 105°C에서 건조시킨 후 화학적 조성 분석을 하였다.

[88] (2) 염소계 처리 (1~3 중량% NaClO 수용액, 1~3 중량% NaClO₂ 수용액)[89] 1 중량% NaClO, 3 중량% NaClO 수용액과 1 중량% NaClO₂ 수용액, 3 중량% NaClO₂ 수용액에 고압 수증기 전처리 된 바이오매스 원료를 각각 고체 : 액체 (1:20)의 비율로 침지 시켜서 30°C로 설정된 진탕배양기에서 100rpm 으로 3시간 동안 교반하였다. 교반 후 여과하여 잔사와 액으로 분리하고 잔사는 아세톤과 증류수로 세척해서 105°C에서 건조시킨 후 화학적 조성 분석을 하였다.[90] (3) 다단 처리(1 중량% KOH 수용액+ 1 중량% NaClO₂ 수용액, 1 중량% KOH 수용액+ 3 중량% NaClO₂ 수용액)[91] 1 중량% KOH 수용액에 고압 수증기 전처리 된 바이오매스 원료를 고체 : 액체 (1:20)의 비율로 침지 시켜서 30°C로 설정된 진탕배양기에서 100rpm 으로 3시간 동안 교반하였다. 교반 후 여과하여 잔사와 액으로 분리하고 잔사는 1% 빙초산수용액과 증류수를 사용하여 pH 7이 될 때까지 세척한 다음 잔사는 다시 1 중량% NaClO₂ 수용액, 3 중량% NaClO₂ 수용액에 각각 고체 : 액체 (1:20) 비율로 침지시켜서 30°C로 설정된 진탕배양기에서 100rpm 으로 3시간 동안 교반하였다. 교반 후 여과하여 잔사와 액으로 분리하고 잔사는 아세톤과 증류수로 세척해서 105°C에서 건조시킨 후 화학적 조성 분석을 하였다.

[92] 2. 화학적 처리에 따른 화학적 조성의 분석

[93] 실험예 2의 방법에 의해 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료의 알칼리, 염소계, 다단 처리한 후 화학적 조성을 분석하기 위해 NREL 분석법에 따라 상기 실험예 1에서 설명한 방법과 실질적으로 동일한 방법으로 분석 하였다.

[94] 3. 알칼리 처리에 따른 전처리된 바이오매스 원료의 화학적 조성

[95] (1) NaOH 처리

[96] 실험예 2의 방법에 의해 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료에 1 중량%

NaOH, 3 중량% NaOH 수용액을 처리한 바이오매스의 화학적 조성을 표 3에 나타내었다. NaOH 처리를 했을 경우 회수되는 바이오매스의 수율은 약 50%이고 셀룰로오스의 함량은 1 중량% NaOH, 3 중량% NaOH 수용액에서 각각 72.0%, 69.9%로 약 70%의 높은 셀룰로오스 함량을 나타냈다. 고압수증기 전처리된 바이오매스보다 약 19.6% 증가한 수치로 3 수용액% NaOH보다 1 중량% NaOH 수용액에서 높은 셀룰로오스 함량을 나타냈다. 총 리그닌의 함량은 약 15%로 고압 수증기 전처리된 바이오매스보다 약 17% 감소한 수치로 일부 용해되어 추출되었을 것으로 되었다.

[97] 표 3

[Table 3]

조성물	% 건조 무게(Dry weight)	
	1 중량% NaOH	3 중량% NaOH
원료(recovered raw material) ^a	51.0	50.2
추출물(Extractives)	4.8 ± 0.4	5.2 ± 0.2
셀룰로오스(Cellulose as glucose)	72.0 ± 0.1	69.9 ± 0.1
헤미셀룰로오스 ^b (Hemicellulose as)	0.5	0.2
자일로스(Xylose)	-	-
갈락토오스(Galactose)	0.5 ± 0.0	0.1 ± 0.0
아라비노오스(Arabinose)	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0
만노오스(Mannose)	-	0.0
산불용성 리그닌(Acid insoluble lignin)	14.8 ± 0.4	15.7 ± 0.5
산가용성 리그닌(Acid soluble lignin)	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.1
회분(Ash)	3.6 ± 0.1	3.0 ± 0.1
총합계(total)	97.4	95.7

[98] 상기 표 3에서 데이터는 오븐 건조 시료를 기초로 한 것이다. 전처리 조건은 30°C에서 1 중량% NaOH 수용액 및 30°C에서 3 중량% NaOH 수용액, 3시간, 100rpm, 고체 : 액체 (1:20) 침지이다. ^a잔사의 수율을 나타낸다. 상기 헤미셀룰로오스^b는 자일로스 + 갈락토오스 + 아라비노스 + 만노오스를 나타낸다.

[99] (2) KOH 처리

[100] 실험예 2의 방법에 의해 고압 수증기 전처리 된 바이오매스 원료에 1 중량% KOH, 3 중량% KOH 수용액 처리한 바이오매스의 화학적 조성을 표 4에 나타내었다. KOH 처리를 했을 경우 회수되는 바이오매스의 수율은 약 50%이고 셀룰로오스의 함량은 1 중량% KOH, 3 중량% KOH 경우 각각 75.1%, 75.2% 로

고압 수증기 전처리 된 바이오매스 원료보다 22.7%, 22.8% 증가한 수치를 나타냈으며 헤미셀룰로오스의 함량은 3 중량% KOH의 경우 검출되지 않았으며 1 중량% KOH의 경우 1.0%의 수치를 나타냈다. 총 리그닌의 함량은 약 14%로 고압 수증기 전처리된 바이오매스보다 약 19% 감소되었다. 1 중량% KOH 수용액, 3 중량% KOH 수용액에서 두드러지는 차이를 보이지 않음에 따라 다단 처리시 1 중량% KOH 수용액이 가장 적절할 것으로 판단되었다.

[101] 표 4

[Table 4]

조성물	% 건조 무게(Dry weight)	
	1 중량% KOH	3 중량% KOH
원료(recovered raw material) ^a	51.7	50.7
추출물(Extractives)	3.2 ± 0.2	3.4 ± 0.1
셀룰로오스(Cellulose as glucose)	75.1 ± 0.0	75.2 ± 0.0
헤미셀룰로오스 ^b (Hemicellulose as)	1.0	-
자일로스(Xylose)	0.1 ± 0.0	-
갈락토오스(Galactose)	0.7 ± 0.1	-
아라비노오스(Arabinose)	0.1 ± 0.0	-
만노오스(Mannose)	0.1 ± 0.0	-
산불용성 리그닌(Acid insoluble lignin)	13.2 ± 0.1	13.0 ± 0.0
산가용성 리그닌(Acid soluble lignin)	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.2
회분(Ash)	2.5 ± 0.3	2.4 ± 0.6
총합계(total)	96.6	95.6

[102] 상기 표 5에서 데이터는 오븐 건조 시료를 기초로 한 것이다. 전처리 조건은 30°C에서 1 중량 % KOH 수용액 및 30°C에서 3 중량% KOH 수용액 3시간, 100rpm, 고체 : 액체 (1:20) 침지이다. ^a잔사의 수율을 나타낸다. 상기 헤미셀룰로오스^b는 자일로스 + 갈락토오스 + 아라비노스 + 만노오스를 나타낸다.

[103] 3. 염소계 전처리에 따른 바이오매스의 화학적 조성

[104] (1) NaClO 처리

[105] 실험에 2의 방법에 의해 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료에 1 중량%

NaClO 수용액, 3 중량% NaClO 수용액으로 처리한 바이오매스의 화학적 조성을 표 5에 나타내었다. NaClO 처리를 했을 경우 회수되는 바이오매스의 수율은 1 중량% NaClO 경우 76.5%, 3 중량% NaClO 경우 67.4%로 알칼리 처리에 비해 높은 회수율을 나타냈다. 셀룰로오스의 함량은 1 중량% NaClO, 3 중량% NaClO 경우 각각 50.2%, 50.1%로 높은 회수율에 비해 얻어지는 셀룰로오스의 함량은 낮은 수치를 나타냈으며, 헤미셀룰로오스의 함량은 1 중량% NaClO, 3 중량% NaClO 경우 각각 0.4%, 0.5%의 함량을 나타냈고 총 리그닌의 함량은 약 37~39%로 알칼리처리에 비해 리그닌 제거율이 낮았다.

[106] 표 5

[Table 5]

조성물	% 건조 무게(Dry weight)	
	1 중량% NaClO	3 중량% NaClO
원료(recovered raw material) ^a	76.5	67.4
추출물(Extractives)	5.7 ± 0.5	5.8 ± 0.1
셀룰로오스(Cellulose as glucose)	50.2 ± 0.2	50.1 ± 0.0
헤미셀룰로오스 ^b (Hemicellulose as)	0.4	0.5
자일로스(Xylose)	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
갈락토오스(Galactose)	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.3
아라비노오스(Arabinose)	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0
만노오스(Mannose)	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1
산불용성 리그닌(Acid insoluble lignin)	36.3 ± 0.2	34.3 ± 0.2
산가용성 리그닌(Acid soluble lignin)	2.6 ± 0.2	2.6 ± 0.1
회분(Ash)	3.3 ± 0.2	3.1 ± 0.3
총합계(total)	98.5	96.4

[107] 상기 표 5에서 데이터는 오븐 건조 시료를 기초로 한 것이다. 전처리 조건은 30°C에서 1 중량% NaClO 수용액 및 30°C에서 3 중량% NaClO 수용액, 3시간, 100rpm, 고체 : 액체 (1:20) 침지이다. ^a잔사의 수율을 나타낸다. 상기 헤미셀룰로오스^b는 자일로스 + 갈락토오스 + 아라비노스 + 만노오스를 나타낸다.

[108] (2) NaClO₂ 처리

[109] 실험예 2의 방법에 의해 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료에 1 중량% NaClO₂ 수용액, 3 중량% NaClO₂ 수용액으로 처리한 바이오매스의 화학적 조성을 표 6에 나타내었다. NaClO₂ 처리를 했을 경우 회수되는 바이오매스의

수율은 1 중량% NaClO₂의 경우 74.8%, 3 중량% NaClO₂의 경우 50.2%로 1 중량% NaClO₂ 처리 했을 때 높은 회수율을 나타냈다. 그러나 셀룰로오스의 함량을 비교해 보았을 때 1 중량% NaClO₂의 경우 53.4%, 3 중량% NaClO₂의 경우 70.6%로 3 중량% NaClO₂로 처리했을 때 높은 셀룰로오스 함량을 나타냈다. 헤미셀룰로오스의 함량은 1 중량% NaClO₂, 3 중량% NaClO₂ 경우 각각 0.6%, 0.2%의 함량을 나타냈으며 총 리그닌의 함량은 1 중량% NaClO₂의 경우 33.1%, 3 중량% NaClO₂ 경우 19.3%로 3 중량% NaClO₂ 처리 시 낮은 리그닌 함량을 나타냈다. 3 중량% NaClO₂ 처리 시 1 중량% NaClO₂ 처리 했을 때 보다 회수율은 낮았지만 글루코오스로의 전환을 고려해볼 때 탄수화물 함량이 높고 리그닌 함량이 낮은 3 중량% NaClO₂ 처리가 고압 수증기 전처리 된 바이오매스 원료의 화학적 처리로 바람직할 수 있음을 확인하였다.

[110] 표 6

[Table 6]

조성물	% 건조 무게(Dry weight)	
	1 중량% NaClO ₂	3 중량% NaClO ₂
원료(recovered raw material) ^a	74.8	50.2
추출물(Extractives)	6.1 ± 0.1	6.2 ± 0.1
셀룰로오스(Cellulose as glucose)	53.4 ± 0.3	70.6 ± 0.2
헤미셀룰로오스 ^b (Hemicellulose as)	0.6	0.2
자일로스(Xylose)	0.0 ± 0.0	-
갈락토오스(Galactose)	0.5 ± 0.1	-
아라비노오스(Arabinose)	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
만노오스(Mannose)	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0
산불용성 리그닌(Acid insoluble lignin)	30.6 ± 0.2	16.4 ± 0.1
산가용성 리그닌(Acid soluble lignin)	2.5 ± 0.4	2.9 ± 0.3
회분(Ash)	2.8 ± 0.5	2.6 ± 0.1
총합계(total)	96.0	98.9

[111] 상기 표 6에서 데이터는 오븐 건조 시료를 기초로 한 것이다. 전처리 조건은 30°C에서 1 중량% NaClO₂ 수용액 및 30°C에서 3 중량% NaClO₂ 수용액, 3시간, 100rpm, 고체 : 액체 (1:20) 침지이다. ^a잔사의 수율을 나타낸다. 상기 헤미셀룰로오스^b는 자일로스 + 갈락토오스 + 아라비노스 + 만노오스를 나타낸다.

[112] 4. 알칼리와 염소계의 다단 처리에 따른 바이오매스의 화학적 조성

[113] (1) KOH와 NaClO₂의 다단 처리

- [114] KOH, NaOH, NaClO, NaClO₂ 처리 시 효율성이 높았던 1 중량% KOH 수용액과 1~3 중량% NaClO₂ 수용액의 화학적 처리방법을 선정하여 다단 처리를 실시하였다.
- [115] 실험에 2의 방법에 의해 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료에 1 중량% KOH, 1~3 중량% NaClO₂ 수용액으로 처리한 바이오매스의 화학적 조성을 표 7에 나타내었다. 1 중량% NaClO₂, 1~3 중량% NaClO₂ 수용액으로 다단처리를 했을 경우 회수되는 바이오매스 수율은 약 50%로 1 중량% KOH만 처리했을 경우의 회수율과 유사하게 나타난 것으로 볼 때 KOH 처리 시 헤미셀룰로오스와 리그닌 등이 일부 추출되어 NaClO₂ 처리 시에는 영향을 받지 않은 것으로 판단되었다.
- [116] 셀룰로오스의 함량을 비교해 보았을 때 1 중량% KOH와 1 중량% NaClO₂의 다단 처리 시 74.1%, 1 중량% KOH와 3 중량% NaClO₂ 다단 처리 시 77.2%로 KOH와 NaClO₂ 수용액을 1단 처리했을 경우와 유사한 함량 또는 증가한 함량을 나타내는 것으로 보아 다단처리는 농도에 따라 영향을 받는 것으로 판단되었다. 총 리그닌의 함량은 다단 처리의 경우 약 14%로 KOH 처리시의 리그닌 함량과 유사한 수치를 나타내는 것으로 보아 리그닌 제거는 알칼리의 영향을 받는 것으로 판단되었다.
- [117] 표 7

[Table 7]

조성물	% 건조 무게(Dry weight)	
	1 중량% KOH + 1 중량% NaClO ₂	1 중량% KOH + 3 중량% NaClO ₂
원료(recovered raw material) ^a	50.7	50.1
추출물(Extractives)	4.3 ± 0.1	4.6 ± 0.1
셀룰로오스(Cellulose as glucose)	74.1 ± 0.1	77.2 ± 0.1
헤미셀룰로오스 ^b (Hemicellulose as)	0.3	0.1
자일로스(Xylose)	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1
갈락토오스(Galactose)	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0
아라비노오스(Arabinose)	-	-
만노오스(Mannose)	-	-
산불용성 리그닌(Acid insoluble lignin)	13.2 ± 0.1	12.9 ± 0.1
산가용성 리그닌(Acid soluble lignin)	2.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1
회분(Ash)	0.8 ± 0.1	0.3 ± 0.1
총합계(total)	95.5	96.6

[118] 상기 표 7에서 데이터는 오븐 건조 시료를 기초로 한 것이다. 전 처리 조건은 30°C, 3시간, 100rpm, 고체 : 액체 (1:20) 침지이다. ^a잔사의 수율을 나타낸다. 상기 헤미셀룰로오스^b는 자일로스 + 갈락토오스 + 아라비노스 + 만노오스를 나타낸다.

[119] 실험예 4. 조제된 셀룰로오스로부터 효소를 이용한 글루코오스의 전환기술 확립

[120] 1. 효소 당화

[121] 실험예 2의 방법에 의해 고압 수증기 전처리 된 바이오매스 원료와 고압 수증기 전처리 된 바이오매스 원료에 알칼리 처리(1 중량% NaOH, 1 중량% KOH 수용액), 염소계 처리 (1~3 중량% NaClO, 1~3 중량% NaClO₂ 수용액), 다단 처리를 통해 제조된 셀룰로오스의 글루코오스로의 전환율을 평가하기 위해 효소 당화를 실시하였다.

[122] 삼각플라스크에 전처리된 시료 1g과 0.1M 구연산 나트륨 완충액(sodium citrate buffer) 50ml(pH 4.8)을 투입한 후 50°C가 될 때 까지 가열해준 후 시판되는 효소 Celluclast 1.5L과 Viscozyme L을 각각 0.8ml, 0.2ml 넣고 진탕배양기에서 50°C,

150rpm으로 96시간 동안 효소가수분해 하였다. 가수분해가 끝난 후 여과하여 잔사는 효소가수분해율을 측정하였고 여과액은 HPLC로 단당류 분석을 하여 글루코오스 함량 및 글루코오스 전환율을 측정하였다.

[123] (1) 탈리그닌율(Delignification)

[124] 탈리그닌율은 리그닌이 제거된 비율을 백분율로 나타냈다.

[125] [수학식 5]

[126] $\text{탈리그닌율 (\%)} = (\text{전처리 전 리그닌 함량} - \text{전처리 후 리그닌 함량}) / \text{전처리 전 리그닌 함량} \times 100$

[127] (2) 효소 가수분해율(Enzymatic digestibility)

[128] 효소 가수분해율은 투입된 시료에 대해 효소 가수분해 후 잔사의 무게를 이용하여 계산하였다.

[129] [수학식 6]

[130] $\text{효소 가수분해율 (\%)} = (\text{투입된 시료의 무게} - \text{효소 가수분해 후 잔사의 무게}) / \text{투입된 시료의 무게} \times 100$

[131] (3) 글루코오스 전환율(glucose conversion)

[132] 글루코오스 전환율은 투입된 시료에 함유된 글루코오스에 대해 효소가수분해 후 분해액 중의 글루코오스의 무게를 이용하여 계산하였다.

[133] [수학식 7]

[134] $\text{글루코오스 전환율 (\%)} = \text{효소 가수분해 후 분해액중의 글루코오스 무게} / \text{시료에 함유되어 있는 글루코오스의 무게} \times 100$

[135] 2. 단당류 분석 (NREL/TP510-42623)

[136] 글루코오스 함량 분석을 위해 HPLC (Agilent Technologies, Inc., 1100 series, USA)를 사용하여 단당류 분석을 하였다. 컬럼은 Aminex HPX-87P (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 이동상은 증류수를 사용하였고 유속은 0.6ml/분, 온도는 85°C를 유지 하였다.

[137] 3. 바이오매스와 고압수증기 전처리된 바이오매스에서 제조된 셀룰로오스의 글루코오스 전환율 분석

[138] 바이오매스와 실험예 2의 방법에 의해 고압 수증기 전처리된 바이오매스의 효소가수분해 후 생성된 글루코오스의 함량 및 당 전환율을 표 8에 나타내었다.

[139] 바이오매스는 고압 수증기 전처리 시 헤미셀룰로오스 및 리그닌이 가수분해되어 소량 용출됨에 따라 회수되는 기질의 수율은 약 95% 정도의 수치를 나타내었고 셀룰로오스 함량은 바이오매스보다 고압 수증기 전처리된 바이오매스에서 7.8% 증가하였다. 헤미셀룰로오스 함량이 감소함에 따라 리그닌의 함량은 상대적으로 고압 수증기 전처리 전보다 높은 수치를 나타내었다.

[140] 생성되는 글루코오스 함량은 바이오매스의 경우 1.1g/l, 고압수증기 전처리 바이오매스의 경우 9.1g/l로 고압 수증기 전처리 시 많은 양의 글루코오스가 생성되었고 효소 가수분해율은 고압 수증기 전처리 시 64.9% 증가하였으며

글루코오스를 기준으로 한 글루코오스 전환율은 고압 수증기 전처리시 86.8%의 높은 전환율을 나타냈다.

[141] 표 8

[Table 8]

	원료(raw material)	증기 폭쇄된 원료(steam exploded)
잔사 수율(Yield of residue) (%)	-	95
리그닌 ^a (%)	27.5	35.2
탈리그닌율 (%)	-	-
셀룰로오스 (%)	44.6	52.4
홀로셀룰로오스 ^b (Holocellulose; 셀룰로오스 + 헤미셀룰로오스) (%)	58.6	52.8
효소 가수분해율 ^c (%)	12.1	64.9
글루코오스 (%)	1.1	4.1
글루코오스 전환율 (%)	12.3	39.1

[142] 상기 표 8에서 데이터는 오븐 건조 시료를 기초로 한 것이다. 리그닌^a는 산불용성 리그닌 + 산가용성 리그닌을 나타낸다. 홀로셀룰로오스^b는 셀룰로오스 + 헤미셀룰로오스를 나타낸다. 효소가수분해 조건^c은 pH 4.8, 0.1M 구연산 나트륨 완충액, 50°C, 150rpm으로 96시간 동안 효소가수분해하였다.

[143] 4. 알칼리 전처리된 바이오매스에서 제조된 셀룰로오스의 글루코오스 전환율 분석

[144] 실험에 2의 방법에 의해 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료에 1% NaOH 및 1% KOH의 알칼리를 각각 처리한 후 효소가수분해 하여 생성된 글루코오스의 함량 및 당 전환율을 표 9 및 표 10에 나타내었다.

[145] 표 9

[Table 9]

	1 중량% NaOH
잔사 수율(Yield of residue) (%)	51.0
리그닌 ^a (%)	16.5
탈리그닌율 (%)	53.1
셀룰로오스 (%)	72.0
홀로셀룰로오스 ^b (Holocellulose; 셀룰로오스 + 헤미셀룰로오스) (%)	72.5
효소 가수분해율 ^c (%)	59.1
글루코오스 ^c (%)	9.7
글루코오스 전환율 (%)	67.4

- [146] 상기 표 9에서 데이터는 오븐 건조 시료를 기초로 한 것이다. 리그닌^a는 산불용성 리그닌 + 산가용성 리그닌을 나타낸다. 홀로셀룰로오스^b는 셀룰로오스 + 헤미셀룰로오스를 나타낸다. 효소가수분해 조건^c은 pH 4.8, 0.1M 구연산 나트륨 완충액, 50°C, 150rpm으로 96시간 동안 효소가수분해하였다.

- [147] 표 10

[Table 10]

	1 중량% KOH
잔사 수율(Yield of residue) (%)	51.7
리그닌 ^a (%)	14.8
탈리그닌율 (%)	58.0
셀룰로오스 (%)	75.1
홀로셀룰로오스 ^b (Holocellulose; 셀룰로오스 + 헤미셀룰로오스) (%)	76.1
효소 가수분해율 ^c (%)	58.5
글루코오스 (%)	10.2
글루코오스 전환율 (%)	67.9

- [148] 상기 표 10에서 데이터는 오븐 건조 시료를 기초로 한 것이다. 리그닌^a는 산불용성 리그닌 + 산가용성 리그닌을 나타낸다. 홀로셀룰로오스^b는 셀룰로오스 + 헤미셀룰로오스를 나타낸다. 효소가수분해 조건^c은 pH 4.8, 0.1M 구연산 나트륨 완충액, 50°C, 150rpm으로 96시간 동안 효소가수분해하였다.

- [149] 5. 염소계 전처리된 바이오매스에서 제조된 셀룰로오스의 글루코오스 전환율

분석

[150] (1) NaClO

[151] 실험에 2의 방법에 의해 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료에 1 중량% NaClO, 3 중량% NaClO 수용액을 각각 처리한 후 효소가수분해 하여 생성된 글루코오스의 함량 및 당 전환율을 표 11에 나타내었다.

[152] 회수되는 기질의 수율은 1 중량% NaClO의 경우 76.5%, 3 중량% NaClO의 경우 약 67.4%로 농도가 증가함에 따라 효소가수분해를 위해 회수되는 기질의 양은 큰 폭으로 감소되는 수치를 나타내었고 수치를 나타내었고 리그닌은 상대적으로 증가함에 따라 탈리그닌율에 있어서 효과적이지 못한 수치를 나타내었다.

[153] 셀룰로오스의 함량은 1 중량% NaClO과 3 중량% NaClO 처리 시 약 50%로 회수되는 기질의 양에 비해 예상보다 적은 수치를 나타내었다. 효소가수분해 후 생성된 글루코오스의 함량은 4.8~4.9g/l로 알칼리 전처리에 비해 낮은 함량을 나타내었고 글루코오스의 전환율도 1 중량% NaClO과 3 중량% NaClO 처리 시 약 48%로 낮은 수치를 나타내었다.

[154] 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료에 있어서 2차적인 NaClO의 처리는 회수되는 기질의 양은 많으나 셀룰로오스의 함량, 생성되는 글루코오스 양, 글루코오스의 전환율을 평가해 볼 때 단독 전처리 방법으로는 적합하지 않다고 판단된다.

[155] 표 11

[Table 11]

	1 중량% NaClO	3 중량% NaClO
잔사 수율(Yield of residue) (%)	76.5	67.4
리그닌 ^a (%)	38.9	36.9
탈리그닌율 (%)	-	-
셀룰로오스 (%)	50.2	50.1
홀로셀룰로오스 ^b (Holocellulose; 셀룰로오스+헤미셀룰로오스) (%)	50.6	50.6
효소가수분해율 ^c (%)	25.6	26.1
글루코오스 (%)	4.8	4.9
글루코오스 전환율 (%)	47.8	48.9

[156] 상기 표 11에서 데이터는 오븐 건조 시료를 기초로 한 것이다. 리그닌^a는 산불용성 리그닌 + 산가용성 리그닌을 나타낸다. 홀로셀룰로오스^b는 셀룰로오스 + 헤미셀룰로오스를 나타낸다. 효소가수분해 조건^c은 pH 4.8, 0.1M 구연산

나트륨 완충액, 50°C, 150rpm으로 96시간 동안 효소가수분해하였다.

[157] (2) NaClO₂

[158] 실험에 2의 방법에 의해 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료에 1 중량% NaClO₂, 3 중량% NaClO₂ 수용액을 각각 처리한 후 효소가수분해 하여 생성된 글루코오스의 함량 및 당 전환율을 표 12에 나타내었다. 회수되는 기질의 양은 1 중량% NaClO₂의 경우 74.8%, 3 중량% NaClO₂의 경우 약 50.2%로 1 중량% NaClO₂처리를 했을 경우 높은 함량의 기질을 회수 할 수 있었고 탈리그닌율은 3 중량% NaClO₂ 처리 시 45.2%로 높은 수치를 나타냈다. 셀룰로오스의 함량은 1 중량% NaClO₂과 3 중량% NaClO₂ 처리 시 각각 53.4%, 70.6% 로 3 중량% NaClO₂ 처리 시 높은 함량을 나타내었다.

[159] 효소 가수분해 후 생성된 글루코오스의 함량에 있어서 1 중량% NaClO₂과 3 중량% NaClO₂ 처리 시 각각 5.9g/l, 9.7g/l 로 3 중량% NaClO₂ 처리시 높은 함량을 나타내었고 글루코오스의 전환율에 있어서도 1 중량% NaClO₂ 및 3 중량% NaClO₂ 처리 시 각각 68.5%, 68.7%로 3 중량% NaClO₂ 처리 시 높은 수치를 나타내었다.

[160] NaClO₂ 처리에 있어서는 NaClO₂의 농도가 증가함에 따라 회수되는 기질의 양은 감소하지만 제조되는 셀룰로오스의 함량 및 글루코오스의 함량은 증가함으로 고압 수증기 전처리된 바이오매스에 있어서 NaClO₂ 처리를 병행할 경우 농도가 증가할수록 더 효과적일 것으로 판단된다.

[161] 표 12

[Table 12]

	1 중량% NaClO ₂	3 중량% NaClO ₂
잔사 수율(Yield of residue) (%)	74.8	50.2
리그닌 ^a (%)	33.1	19.3
탈리그닌율 (%)	6.0	45.2
셀룰로오스 (%)	53.4	70.6
홀로셀룰로오스 ^b (Holocellulose; 셀룰로오스+헤미셀룰로오스) (%)	54.0	70.8
효소 가수분해율 ^c (%)	36.4	50.2
글루코오스 (%)	5.9	9.7
글루코오스 전환율 (%)	55.2	68.7

[162] 상기 표 12에서 데이터는 오븐 건조 시료를 기초로 한 것이다. 리그닌^a는 산불용성 리그닌 + 산가용성 리그닌을 나타낸다. 홀로셀룰로오스^b는 셀룰로오스 + 헤미셀룰로오스를 나타낸다. 효소가수분해 조건^c은 pH 4.8, 0.1M 구연산

나트륨 완충액, 50°C, 150rpm으로 96시간 동안 효소가수분해하였다.

[163] 6. 알칼리 화합물과 염소계 화합물의 다단 처리에서 제조된 셀룰로오스의 글루코오스 전환율 분석

[164] (1) KOH와 NaClO₂의 다단 처리

[165] 1차적으로 실험에 2의 방법에 의해 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료에 1 중량% KOH 수용액, 1~3 중량% NaClO₂ 수용액으로 다단 처리하여 제조된 셀룰로오스를 효소가수분해 하여 생성된 글루코오스의 함량 및 당 전환율을 표 13에 나타내었다.

[166] 알칼리와 염소계의 다단 처리 후 회수되는 기질의 수율은 1 중량% KOH + 1 중량% NaClO₂와 1 중량% KOH + 3 중량% NaClO₂에서 약 50%로 유사한 양이 회수되었고 탈리그닌율은 1 중량% KOH + 3 중량% NaClO₂에서 1 중량% KOH + 1 중량% NaClO₂에 비해 약 4%정도 효과적이었다. 셀룰로오스 함량은 1 중량% KOH + 3 중량% NaClO₂에서 77.2%로 더 높은 수치를 나타내었지만 글루코오스 생성량, 글루코오스 전환율은 1 중량% KOH + 1 중량% NaClO₂에서 더 높은 수치를 나타내었다.

[167] 표 13

[Table 13]

	1 중량% KOH + 1 중량% NaClO ₂	1 중량% KOH + 3 중량% NaClO ₂
잔사 수율(Yield of residue) (%)	50.7	50.1
리그닌 ^a (%)	15.7	14.3
탈리그닌율 (%)	55.4	59.4
셀룰로오스 (%)	74.1	77.2
홀로셀룰로오스 ^b (Holocellulose; 셀룰로오스+헤미셀룰로오스) (%)	74.4	77.3
효소 가수분해율 ^c (%)	64.8	65.2
글루코오스 (%)	12.4	12.2
글루코오스 전환율 (%)	83.7	79.0

[168] 상기 표 13에서 데이터는 오픈 건조 시료를 기초로 한 것이다. 리그닌^a는 산불용성 리그닌 + 산가용성 리그닌을 나타낸다. 홀로셀룰로오스^b는 셀룰로오스 + 헤미셀룰로오스를 나타낸다. 효소가수분해 조건^c은 pH 4.8, 0.1M 구연산 나트륨 완충액, 50°C, 150rpm으로 96시간 동안 효소가수분해하였다.

[169] 7. 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료의 화학적 처리에 따른 글루코오스 전환율 비교

- [170] 알칼리와 염소계 화합물 수용액을 단독 처리했을 경우와 다단 처리했을 경우의 글루코오스 전환율을 비교하였다(도 4 참조). 고압 수증기 전처리 시 39.1% 이상의 글루코오스 전환율을 나타냈고 고압 수증기 전처리 된 바이오매스 원료에 1 중량% KOH와 1 중량% NaOH를 단독으로 처리했을 경우 각각 67.9%, 67.4%의 글루코오스 전환율을 나타냈으며 1 중량% NaClO₂와 3 중량% NaClO₂를 단독으로 처리했을 경우 55.2%, 68.7%의 글루코오스 전환율을 나타냈다. 따라서 알칼리에서 높은 글루코오스 전환율을 나타낸 1 중량% KOH와 염소계에서 높은 글루코오스 전환율을 나타낸 1 중량% NaClO₂와 3 중량% NaClO₂를 각각 병행하여 다단 처리한 결과 1 중량% KOH와 1 중량% NaClO₂의 다단처리에서는 83.7%, 1 중량% KOH와 3 중량% NaClO₂의 다단처리에서는 79%의 글루코오스 전환율을 나타냈다. 이와 같은 결과에서 투입되는 생산단가와 생성되는 글루코오스의 전환율을 비교해 볼 때 고압 수증기 전처리된 바이오매스 원료에 약알칼리와 약염소계 처리를 병행하는 것이 가장 효과적인 것으로 판단된다.

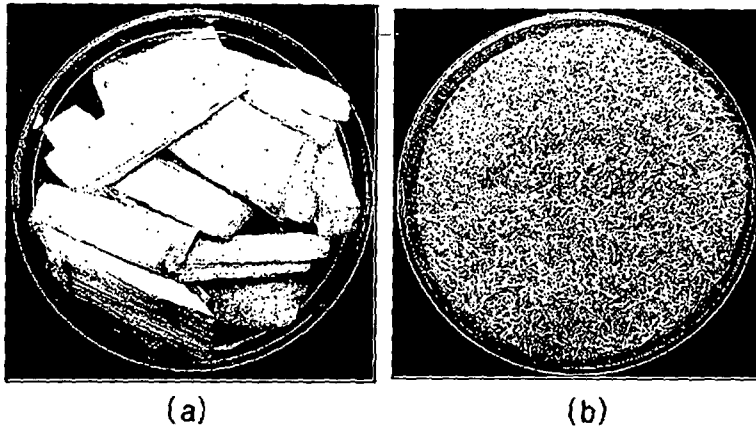
산업상 이용가능성

- [171] 본 발명에 따른 다단계 공정을 포함하는 글루코오스 제조방법은 당화 공정의 당화 효율을 향상시켜 바이오매스로부터 글루코오스의 생산성 및 제조효율을 향상시킬 수 있으며, 상기 글루코오스를 이용하여 바이오 에탄올 등을 생산하는 공정 등에 유용하게 사용될 수 있다.

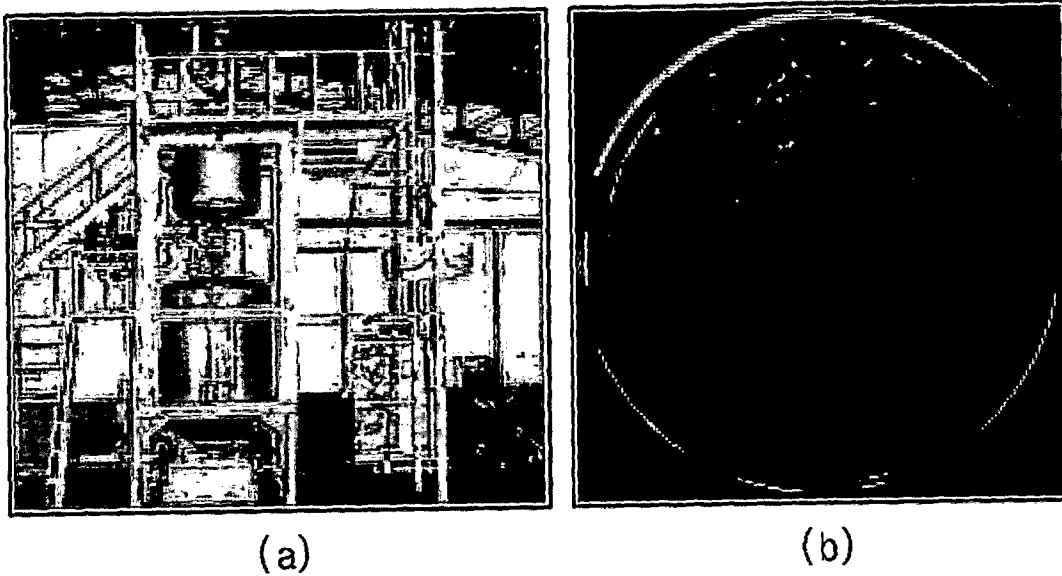
청구범위

- [청구항 1] 바이오매스 원료를 증기 폭쇄 처리하는 단계;
상기 증기 폭쇄 처리된 바이오매스 원료를 알칼리 화합물로 처리하는 단계;
상기 알칼리 화합물로 처리된 바이오매스 원료를 염소계 화합물로 처리하는 단계; 및
상기 염소계 화합물로 처리된 바이오매스 원료를 당화시키는 단계를 포함하는 글루코오스 제조방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 증기 폭쇄 처리하는 단계는 20 내지 30kg/cm²의 압력 하에 213 내지 235°C에서 수행하는 것을 특징으로 하는 글루코오스의 제조방법.
- [청구항 3] 제 1항 또는 제 2항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알칼리 화합물로 처리하는 단계는 1 내지 3 중량% 농도의 알칼리 화합물 수용액을 처리하는 것을 특징으로 하는 글루코오스의 제조방법.
- [청구항 4] 제 3항에 있어서, 상기 염소계 화합물로 처리하는 단계는 1 내지 3 중량% 농도의 염소계 화합물 수용액을 처리하는 것을 특징으로 하는 글루코오스의 제조방법.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 알칼리 화합물은 수산화나트륨(NaOH), 수산화칼륨(KOH), 수산화리튬(LiOH), 수산화암모늄(NH₄OH) 및 수산화칼슘(CaOH)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이며, 상기 염소계 화합물은 차아염소산나트륨(NaClO), 아염소산나트륨(NaClO₂) 및 차아염소산칼슘(Ca(ClO)₂)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 글루코오스의 제조방법.
- [청구항 6] 제 4항에 있어서, 상기 당화시키는 단계는 효소 당화에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 글루코오스의 제조방법.

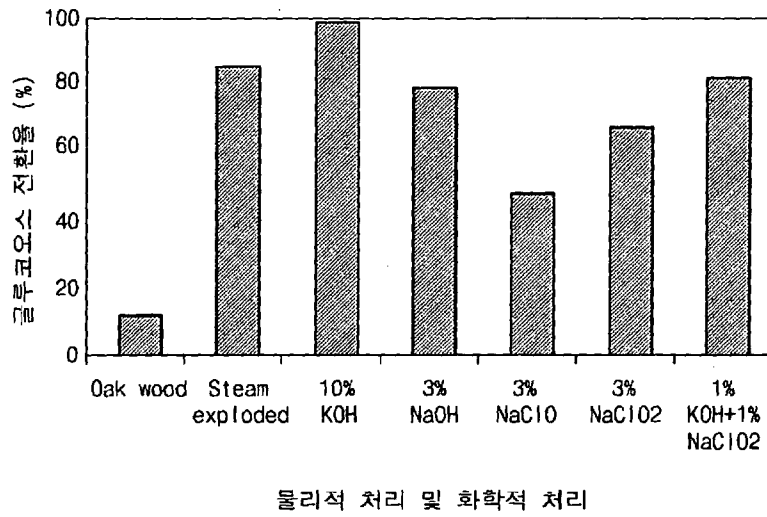
[Fig. 1]



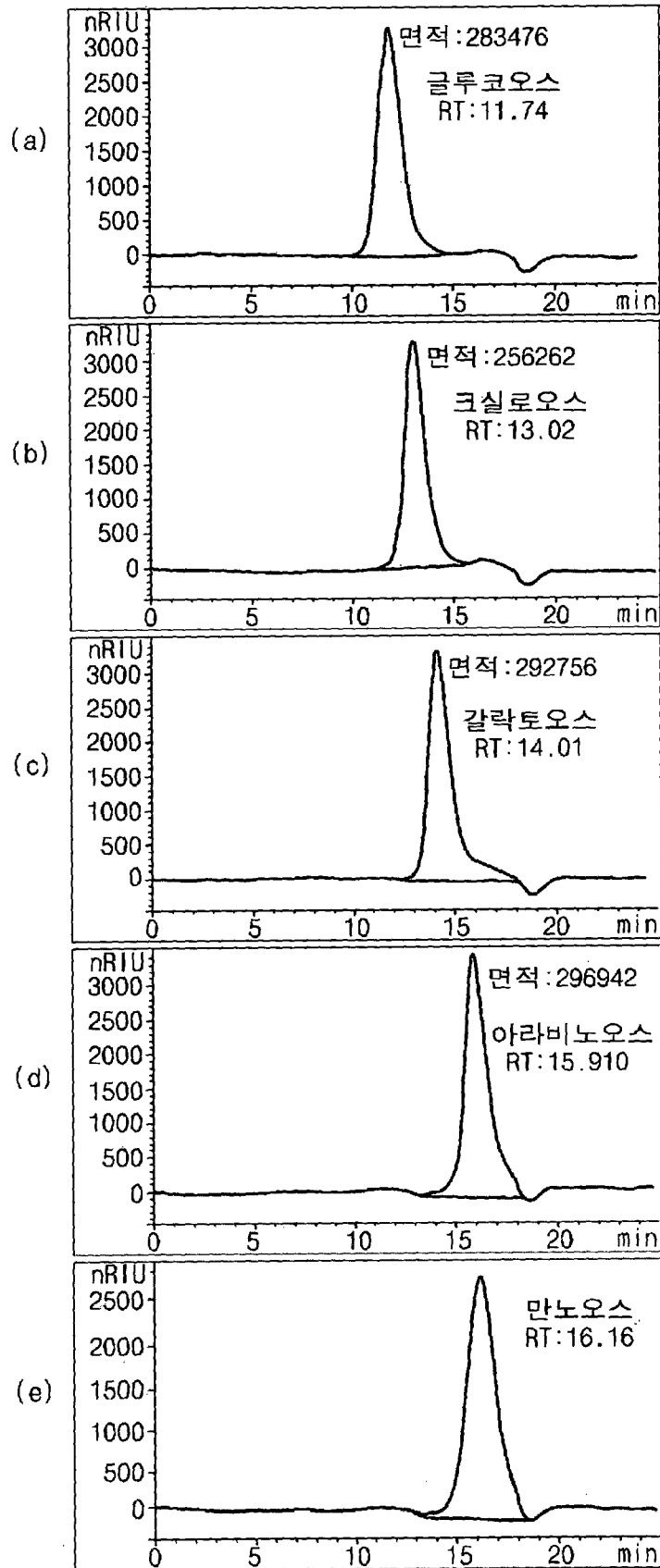
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/008934**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12P 19/02(2006.01)i, C12P 19/16(2006.01)i, C12P 7/10(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 19/02; C12P 1/00; C12P 7/04; C07H 1/08; D21C 3/02; C07H 3/02

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: glucose, manufacture, method

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CARA, CRISTOBAL et al., Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. Process Biochemistry 2006, Vol. 41, pages 423-429. See the whole document	1-6
Y	KR 10-1996-0004655 A (LEE, JONG YOON) 23 February 1996 See abstract, claims 1 to 2	1-6
A	KR 10-2009-0025221 A (KOREA INSTITUTE OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY) 10 March 2009 See abstract, claims 1 to 21, figures 1 to 20	1-6
A	KR 10-2009-0039470 A (THE REPUBLIC OF KOREA (FORESTRY ADMINISTRATION FORESTRY RESEARCH INSTITUTE)) 22 April 2009 See abstract, claims 1 to 5, figures 1 to 8	1-6



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

"I" 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

21 JUNE 2012 (21.06.2012)

Date of mailing of the international search report

21 JUNE 2012 (21.06.2012)

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/KR2011/008934

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1996-0004655 A	23.02.1996	NONE	
KR 10-2009-0025221 A	10.03.2009	CN 101932715 A EP 2129784 A1 JP 2010-518850 A KR 10-2012-0024975 A US 2010-0124774 A1 WO 2008-105618 A1	29.12.2010 09.12.2009 03.06.2010 14.03.2012 20.05.2010 04.09.2008
KR 10-2009-0039470 A	22.04.2009	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12P 19/02(2006.01)i, C12P 19/16(2006.01)i, C12P 7/10(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12P 19/02; C12P 1/00; C12P 7/04; C07H 1/08; D21C 3/02; C07H 3/02 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: 글루코오스, 제조, 방법		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	CARA, CRISTOBAL et al., Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. Process Biochemistry 2006, Vol. 41, pages 423-429. The whole document 참조	1-6
Y	KR 10-1996-0004655 A (이종윤) 1996.02.23 요약, 특허청구범위 제1항 내지 제2항 참조	1-6
A	KR 10-2009-0025221 A (한국생산기술연구원) 2009.03.10 요약, 청구항 1 내지 21, 도면 1 내지 20 참조	1-6
A	KR 10-2009-0039470 A (대한민국(관리부서 : 산림청 국립산림과학원장)) 2009.04.22 요약, 청구항 1 내지 5, 도면 1 내지 8 참조	1-6
☐ 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 2012년 06월 21일 (21.06.2012)		국제조사보고서 발송일 2012년 06월 21일 (21.06.2012)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 최종환 전화번호 82-42-481-5592 

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1996-0004655 A	1996.02.23	없음	
KR 10-2009-0025221 A	2009.03.10	CN 101932715 A EP 2129784 A1 JP 2010-518850 A KR 10-2012-0024975 A US 2010-0124774 A1 WO 2008-105618 A1	2010.12.29 2009.12.09 2010.06.03 2012.03.14 2010.05.20 2008.09.04
KR 10-2009-0039470 A	2009.04.22	없음	