



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0050902
(43) 공개일자 2025년04월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/6436 (2022.01) A23D 9/02 (2006.01)
A23G 1/38 (2006.01) C11C 3/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/6436 (2025.01)
A23D 9/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7006926
(22) 출원일자(국제) 2023년08월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년02월28일
(86) 국제출원번호 PCT/SE2023/050770
(87) 국제공개번호 WO 2024/030062
국제공개일자 2024년02월08일
(30) 우선권주장
2230253-3 2022년08월03일 스웨덴(SE)

(71) 출원인
에이에이케이 아베 (파블)
스웨덴 에스이-215 37 말뫼 펄페트가탄 20
(72) 발명자
카우세빅, 아리아나
스웨덴 215 37 말뫼 펄페트가탄 20 씨/오 에이에이케이 아베 (파블)
로센츠비스트, 요한나
스웨덴 215 37 말뫼 펄페트가탄 20 씨/오 에이에이케이 아베 (파블)
울로포손, 킴
스웨덴 215 37 말뫼 펄페트가탄 20 씨/오 에이에이케이 아베 (파블)
(74) 대리인
특허법인성암

전체 청구항 수 : 총 26 항

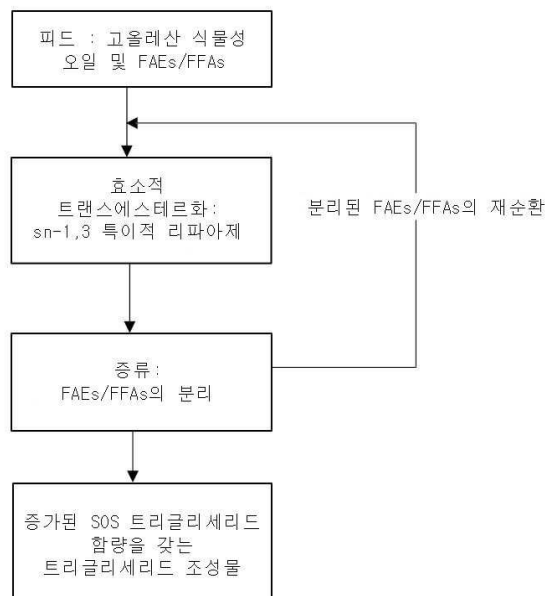
(54) 발명의 명칭 식물성 오일의 SOS 트리글리세리드 함량을 증가시키기 위한 효소 공정

(57) 요약

본 발명은 식물성 오일의 SOS 트리글리세리드 함량을 증가시키기 위한 공정에 관한 것으로, 여기서 S는 스테아르산(C18:0) 및 팔미트산(C16:0) 잔기를 나타내고 O는 올레산(C18:1) 잔기를 나타내고, 상기 공정은 다음을 포함함:

(뒷면에 계속)

대표도



a) 다음을 포함하는 반응 환경을 제공하는 단계:

i) 지지체에 고정된 *sn*-1,3-특이적 리파아제,

ii) 식물성 오일, 여기서 상기 식물성 오일은 전체 C6-C24 지방산 잔기를 기준으로, 적어도 45% 올레산 지방산 잔기를 포함하고, 여기서 상기 식물성 오일은 *sn*-2 위치에서 올레산 함량이 상기 식물성 오일의 전체 *sn*-2 지방산 잔기의 중량 기준으로 적어도 75%이고,

iii) 스테아르산, 팔미트산, 또는 이들의 혼합물의 지방족 알코올 에스테르, 선택적으로 스테아르산 및/또는 팔미트산과 혼합됨, 및

iv) 물;

여기서 상기 지방족 알코올 에스테르와 선택적인 스테아르산 및/또는 팔미트산 (iii) 대 상기 식물성 오일 (ii)의 중량비는 적어도 4:1이고;

여기서 상기 반응 환경의 수분 활성도(water activity)는 0.1 내지 0.6의 범위이다;

b) 트랜스에스테르화를 수행함으로써 트리글리세리드 상, 지방산 에스테르 및 선택적으로 유리지방산을 포함하는 혼합물을 얻기 위해 반응 환경을 30~60℃의 온도로 가열하는 단계; 및

c) 트리글리세리드 조성물을 얻기 위해, 단계 (b)에서 얻은 혼합물에서 상기 지방산 에스테르 및 유리지방산을 분리하는 단계.

상기 트리글리세리드 상은 초콜릿 또는 초콜릿-유사 제품의 구성 요소의 코코아 버터 등가물로 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A23G 1/38 (2025.01)

C11C 3/10 (2013.01)

C12P 7/6454 (2025.01)

명세서

청구범위

청구항 1

식물성 오일의 SOS 트리글리세리드 함량을 증가시키기 위한 공정으로서, 여기서 S는 스테아르산(C18:0) 및 팔미트산(C16:0) 잔기를 나타내고 O는 올레산(C18:1) 잔기를 나타내며, 상기 공정은 다음을 포함함:

a) 다음을 포함하는 반응 환경을 제공하는 단계:

- i) 지지체에 고정된 $sn-1,3$ -특이적 리파아제,
- ii) 식물성 오일, 여기서 상기 식물성 오일은 전체 C6-C24 지방산 잔기를 기준으로, 적어도 45% 올레산 지방산 잔기를 포함하고, 여기서 상기 식물성 오일은 $sn-2$ 위치에서 올레산 함량이 상기 식물성 오일의 전체 $sn-2$ 지방산 잔기의 중량 기준으로 적어도 75%이고,
- iii) 스테아르산, 팔미트산, 또는 이들의 혼합물의 지방족 알코올 에스테르, 선택적으로 스테아르산 및/또는 팔미트산과 혼합됨, 및
- iv) 물;

여기서 상기 지방족 알코올 에스테르와 선택적인 스테아르산 및/또는 팔미트산 (iii) 대 상기 식물성 오일 (i)의 중량비는 적어도 4:1이고; 및

여기서 상기 반응 환경의 수분 활성도(water activity)는 0.1~0.6의 범위이다;

b) 트랜스에스테르화를 수행함으로써 트리글리세리드 상, 지방산 에스테르, 및 선택적으로 유리지방산을 포함하는 혼합물을 얻기 위해 상기 반응 환경을 30~60℃의 온도로 가열하는 단계; 및

c) 트리글리세리드 조성물을 얻기 위해, 단계 (b)에서 얻은 혼합물에서 상기 지방산 에스테르와 유리지방산을 분리하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 (c)에서 얻은 상기 트리글리세리드 조성물은 분획(fractionation) 단계를 거치지 않고, SOS 트리글리세리드의 함량이 더욱 증가된 분획 트리글리세리드 조성물을 제공하는 것인, 공정.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (b)에서 얻은 혼합물의 상기 트리글리세리드 상이 상기 트리글리세리드 상의 중량 기준으로 적어도 65%의 SOS 트리글리세리드 함량을 갖는 것인, 공정.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)에서 얻은 혼합물의 상기 트리글리세리드 상은 SOS 트리글리세리드 대 SSO 트리글리세리드의 중량비가 적어도 80:1인 것인, 공정.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)에서 얻은 혼합물의 상기 트리글리세리드 상은 상기 트리글리세리드 상의 중량 기준으로 SSO 함량이 $\leq 1.2\%$ 인 것인, 공정.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 반응 환경의 상기 수분 활성도(water activity)는 0.2 내지 0.4 범위인 것인, 공정.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식물성 오일은 전체 C6-C24 지방산 잔기를 기준으로, 중량 기

준으로 적어도 50%의 올레산(C18:1) 지방산 잔기, 바람직하게는 적어도 60%의 올레산(C18:1) 지방산 잔기, 및 보다 바람직하게는 적어도 70%의 올레산(C18:1) 지방산 잔기를 포함하는 것인, 공정.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식물성 오일은 *sn*-2 위치에서 올레산 함량이 상기 식물성 오일의 전체 *sn*-2 지방산 잔기의 중량 기준으로 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 그리고 가장 바람직하게는 적어도 95%인 것인, 공정.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식물성 오일은 고올레산 유채/카놀라유, 올리브유, 고올레산 대두유, 고올레산 해바라기유, 고올레산 홍화유(Safflower oil), 시어 오일(Shea oil), 또는 유채유 및/또는 이들의 분획 또는 조합으로부터 선택된 것인, 공정.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식물성 오일은 고올레산 해바라기유, 고올레산 홍화유(Safflower oil) 및/또는 이들의 분획 또는 조합으로부터 선택되는 것인, 공정.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 *sn*-1,3-특이적 리파아제는 박테리아 리파아제 또는 진균 리파아제와 같은 미생물 리파아제인 것인, 공정.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 *sn*-1,3-특이적 리파아제는 리조푸스 오리자에(*Rhizopus oryzae*), 테르모마이세스 라누기노수스(*Thermomyces lanuginosus*), 및 리조무코르 미에헤이(*Rhizomucor miehei*)로부터 선택된 진균 중에서 유래된 것인, 공정.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 반응 환경은 35-45℃의 온도로 가열되는 것인, 공정.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지방족 알코올 에스테르와 선택적인 스테아르산 및/또는 팔미트산(iii) 대 상기 식물성 오일(ii)의 중량비는 적어도 5:1, 예를 들어 적어도 6:1 또는 적어도 7:1인 것인, 공정.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식물성 오일은 *sn*-2 위치에서 올레산 함량, 상기 식물성 오일의 전체 *sn*-2 지방산 잔기의 중량 기준으로 적어도 90%이고, 바람직하게는 적어도 95%이고, 상기 지방족 알코올 에스테르와 선택적인 스테아르산 및/또는 팔미트산 (iii) 대 상기 식물성 오일 (ii)의 중량비는 4:1 내지 7:1 범위인 것인, 공정.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 스테아르산 또는 팔미트산의 상기 지방족 알코올 에스테르는 스테아르산 또는 팔미트산의 알킬 에스테르 또는 이들의 혼합물이고, 바람직하게는 스테아르산 또는 팔미트산의 C₁-C₄ 알킬 에스테르 또는 이들의 혼합물이고, 보다 바람직하게는 메틸 스테아레이트, 에틸 스테아레이트, 메틸 팔미테이트, 에틸 팔미테이트 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되고, 가장 바람직하게는 메틸 스테아레이트 및 에틸 스테아레이트로부터 선택되는 것인, 공정.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 트랜스에스테르화는 배치(batch) 공정으로, 페드-배치(fed-

batch) 공정으로, 또는 연속 공정으로 수행되는 것인, 공정.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 추가로 다음을 포함하는 공정:

d1) 단계 (c)에서 분리된 지방산 에스테르와, 존재하는 경우, 유리지방산을 상기 반응 환경으로 재순환시키는 단계.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지방족 알코올 에스테르(iii)는, 선택적으로 스테아르산과 혼합된, 스테아르산의 지방족 알코올 에스테르를 포함하고, 여기서 상기 공정은 추가로 다음을 포함하는, 공정:

d2) 단계 (c)에서 분리된 지방산 에스테르와, 존재하는 경우, 유리지방산을 수소화하고, 상기 수소화된 지방산 에스테르 및 유리지방산을 상기 반응 환경으로 재순환시키는 단계.

청구항 20

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 추가로 다음을 포함하는 공정:

d3) 단계 (c)에서 분리된 지방산 에스테르와, 존재하는 경우, 유리지방산을 다음과 같이 분리하는 단계:

스테아레이트 및/또는 팔미테이트 에스테르, 및 선택적으로 스테아르산 및/또는 팔미트산을 포함하는 제1 분획; 및

올레이트 에스테르(oleate ester)와 선택적으로 올레산을 포함하는 제2 분획; 및 상기 제1 분획을 상기 반응 환경으로 재순환함.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 지방족 알코올 에스테르(iii)는, 선택적으로 스테아르산과 혼합된, 스테아르산의 지방족 알코올 에스테르를 포함하고, 여기서 상기 공정은 추가로 다음을 포함하는, 공정:

e3) 상기 제2 분획을 수소화하여 스테아레이트 에스테르 및 선택적으로 스테아르산을 제공하고, 상기 수소화된 제2 분획을 상기 반응 환경으로 재순환함.

청구항 22

제18항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 다음 중 하나는 상기 반응 환경으로 재순환되기 전에 표백되는 것인, 공정:

단계 (c)에서 분리된 지방산 에스테르 및 선택적으로 유리지방산;

단계 (d2)에서 제공된 수소화된 지방산 에스테르 및 유리지방산;

단계 (d3)에서 제공된 제1 분획; 또는

수소화 전 또는 후의, 단계 (d3)에서 제공된 제2 분획.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 초콜릿 또는 초콜릿-유사 제품의 제조에서 단계 (c)에서 얻은 상기 트리글리세리드 조성물을 코코아 버터 등가물 또는 그 구성 요소로 사용하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 공정.

청구항 24

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 공정으로부터 얻을 수 있는 트리글리세리드 조성물.

청구항 25

제24항의 상기 트리글리세리드 조성물을 중량 기준으로 10-70% 포함하는 코코아 버터 등가물.

청구항 26

제24항의 상기 트리글리세리드 조성물을 포함하는 초콜릿 또는 초콜릿-유사 제품.

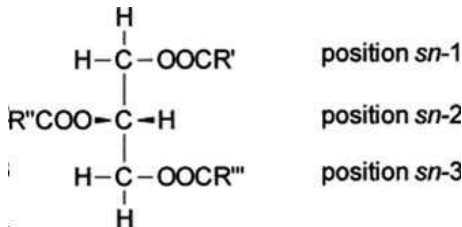
발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물성 오일의 SOS 트리글리세리드 함량을 증가시키기 위한 공정 및 상기 공정에 의해 얻어질 수 있는 트리글리세리드 조성물에 관한 것이다. SOS 함량이 높은 트리글리세리드 조성물은 초콜릿 및 초콜릿-유사 제품의 제조에 사용되는 코코아 버터 등가물(equivalent) 또는 그 구성 요소로 유용하다.

배경 기술

[0002] 트리글리세리드는 글리세롤 골격에 결합된 세 개의 지방산 잔기를 포함한다. 이들의 구조는 입체특이적 번호 매기기를 의미하는 "sn" 표기법을 사용하여 설명할 수 있다. 천연 L-글리세롤 유도체의 피셔 투영도(Fisher projection)에서, 2차 하이드록실기는 C-2의 왼쪽에 표시된다; 그 위의 탄소 원자는 C-1이 되고, 그 아래의 탄소 원자는 C-3이 된다. 접두사 "sn"은 화합물의 어간 이름(stem name) 앞에 배치된다.



[0003]

[0004] 천연 L-글리세롤 유도체에 대한 피셔 투영도.

[0005]

트리글리세리드의 물리적 특성은 지방산 잔기의 특성과 글리세롤 골격상의 위치에 따라 달라진다. 그러므로 식물성 오일에서 지방산 잔기의 타입과 위치를 변경하는 공정을 제공하는 것이 바람직할 수 있다.

[0006]

높은 SOS 트리글리세리드 함량(S는 스테아르산(C18:0) 및 팔미트산(C16:0) 잔기를 나타내고 O는 올레산(C18:1) 잔기를 나타냄)을 갖는 트리글리세리드 조성물은 상업적으로 특히 가치 있는 제품이다. SOS 트리글리세리드는 코코아 버터에 높은 수준으로 함유되어 있으며 초콜릿의 특징적인 물리적 특성에 기여한다. 그에 따라, 높은 SOS 트리글리세리드 함량을 갖는 트리글리세리드 조성물은 코코아 버터 등가물 또는 그 성분으로 유용할 수 있다.

[0007]

시어 버터(shea butter)는 상업적으로 SOS 트리글리세리드의 공급원으로 사용되고 있으며, 특히 포화된 지방산 잔기 S가 스테아르산 잔기인 경우 더욱 그렇다. 시어 버터는 시어 버터 나무인 부티로스페르뎀 파르키(*Butyrospermum parkii*)에서 채취하며, 분획하면 더 높은 SOS 트리글리세리드 수준을 갖는 시어 스테아린(shea stearin)을 얻을 수 있으므로, 코코아 버터 등가물 생산에 유용하다. 시어 스테아린의 공급량은 시어 너트(shea nut)의 공급에 따라 달라진다.

[0008]

SOS 트리글리세리드 함량이 높은 트리글리세리드 조성물을 생산하는 효소적 트랜스에스테르화 방법이 알려져 있다. 이러한 방법은 시어 너트의 공급량에 의존하지 않는 SOS 트리글리세리드의 공급원을 제공한다.

[0009]

US4268527A는 sn-1,3-특이적 리파아제, 및 스테아르산 및 팔미트산 잔기의 공급원으로서 스테아르산 및 팔미트산의 지방족 알코올 에스테르를 사용하여 지방 및 오일의 트랜스에스테르화를 통한 코코아 버터 대용품을 생산하는 방법을 개시한다. 이 공정은 sn-2 위치에 올레산 함량이 높은 지방과 오일을 사용하지만, 대부분은 이미 sn-1 및 sn-3 위치에 상대적으로 높은 수준의 스테아르산과 팔미트산 잔기(예: 분획 팜유 및 살 지방(sal fat))를 함유하고 있다. 상기 반응 혼합물의 수분 함량은 중량 기준으로 0.18%를 넘지 않는다. 만족스러운 코코아 버터 대용품을 얻기 위해 지방산과 그 지방족 알코올 에스테르를 증류하여 제거한 후, 생성된 조성물을 분획한다.

[0010]

EP2251428B1은 트리올레인으로부터 고농도의 SOS(중량 기준 50-80%)를 함유하는 조성물을 제조하기 위한 공정, 예를 들어 고올레산 해바라기유, 스테아르산 및 리조푸스 오리자에(*Rhizopus oryzae*)로부터의 sn-1,3-특이적 효소를 개시한다. 사용되는 온도는 바람직하게는 65-80°C 사이이고, 인터에스테르화된(interesterified) 트리글리

세리드는 용매 분획에 의해 분획된다.

- [0011] WO 2010/053244 A1은 *sn*-1,3 특이적 효소를 사용하여, 다양한 지방과 오일을 지방산 및 지방산 에스테르와 효소적으로 인터에스테르화하여 생산된 코코아 버터 등가물을 개시하고 있으며, 반응물을 증류하고, 분획하여 제품을 분리한다. 지방 또는 오일과 지방산 또는 지방산 에스테르의 몰 비율은 1:2 내지 1:6 범위이고, 상기 반응에 사용되는 온도는 40~50℃이며, 오일의 수분 함량은 0.02% 미만이다.
- [0012] KR101344491B1은 코코아 버터 등가물(CBE, cocoa butter equivalents) 또는 코코아 버터 개량제(CBI, cocoa butter improvers)를 위한 오일 및 지방 조성물을 생산하는 방법을 개시하는데, 이 방법은 지방산 또는 지방산 에스테르를 오일 또는 지방과 혼합하여 혼합 오일을 제조하는 제1 단계; 혼합 오일의 녹는점(일반적으로 40~70℃)보다 20℃ 낮은 온도 내지 20℃ 높은 온도에서 *sn*-1,3-특이적 효소를 사용한 혼합 오일의 트랜스에스테르화의 제2 단계; 및 분자 증류를 통해 부반응물을 제거하고 트랜스에스테르화 반응 이후 분획하는 제3단계를 포함한다.
- [0013] EP2508078A1은 식물성 지방 또는 오일에 지방산 또는 지방산 유도체를 효소적 트랜스에스테르화하고, 증류하여 지방산 또는 지방산 유도체를 제거한 후 분획하여, POS 트리글리세리드(P는 팔미트산을 나타내고, S는 스테아르산을 나타냄) 함량이 높은 지방을 제조하는 방법을 개시한다. 선호되는 식물성 지방 또는 오일은 팜유나 그 분획물이다.
- [0014] GB2205850B는 수분 함량이 낮은 효소적 인터에스테르화 공정을 개시하는데, 이는 (a) 지방 또는 오일 및 (b) (i) 다른 지방 또는 오일, (ii) 저급 알코올을 함유하는 지방산 에스테르 및 (iii) 지방산으로 이루어진 그룹에서 선택된 멤버를 포함하는 반응 액체를 고정된 효소 촉매 형태의 리파아제의 작용에 맡기고, 반응 중에 반응 액체의 수분 농도를 조절하는 것을 포함한다.
- [0015] EP 245076 A2는 포화 지방산 또는 그 에스테르("산분해 반응물")의 존재 하에 리파아제 효소를 사용하여 불포화 글리세리드 오일 및 높은 올레이트 함량을 갖는 지방을 재배열하여, 제과에 적합한 식용 지방을 제조하기 위한 공정을 개시한다. 바람직하게는 오일 1몰당 산분해 반응물 1 내지 5몰을 사용하고, 보다 바람직하게는 오일 1몰당 3~5몰을 사용한다. 예시된 공정에서 산분해 반응물과 오일의 중량비는 1:1(실시예 1), 1:2.5(실시예 3), 및 2.4:2.5(실시예 4)이다.
- [0016] 따라서, 높은 SOS 트리글리세리드 함량을 갖는 트리글리세리드 조성물을 생산하기 위한 알려진 효소 공정은 일반적으로 적절한 트리글리세리드 구성을 달성하기 위해 분획을 포함한다(건조 분획 또는 용매 분획). 용매 분획은 우수한 품질의 제품을 생산할 수 있지만, 공정을 만드는 데 드는 비용이 높고 용매를 사용하면 안전 및 고객 수용 문제가 발생할 수 있다. 건조 분획은 경제적으로 더 실현 가능한 대안이지만 SOS 트리글리세리드를 분리하는 데 있어서는 효율적이지 않다. 이로 인해 제품을 재순환해야 하며, 이로 인해 공정 비용이 추가된다. 재순환이 많아질수록 부산물이 더 많이 형성되고 그러므로 전체 수확량도 감소한다. 원하는 품질을 얻으려면 하나 초과 분획 단계가 필요할 수 있다. 따라서, 두 가지 유형의 분획 모두 복잡하고 비용이 많이 드는 공정 단계이며, 이는 공정 경제에 영향을 미친다.
- [0017] 따라서, 보다 효율적인 효소적 트랜스에스테르화 공정이 필요하며, 이는 코코아 버터 등가물 또는 그 구성 요소로 사용하기에 적합한 트리글리세리드 조성물을 생성하고, 개선된 공정 경제성과 더 적은 공정 단계를 갖고, 효소적 트랜스에스테르화에서 생성되는 트리글리세리드 조성물의 분획이 필요하지 않는 것을 의미한다. 또한, 고올레산 오일을 출발 물질로 이용할 수 있고, 그러므로 이미 시어 스테아린 또는 팜유와 같은 높은 수준의 스테아르산 및/또는 팔미트산을 함유하고 있는 식물성 오일의 사용이 필요하지 않은 효소적 트랜스에스테르화 공정을 제공하는 것이 바람직하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0018] 발명의 요약

- [0019] 본 발명자들은 놀랍게도 효소적 트랜스에스테르화 공정에서 특정 반응물 및 조건을 사용함으로써, 높은 수준의 SOS 트리글리세리드를 포함하고, 지방산 에스테르와 유리지방산을 간단히 분리한 후, 트리글리세리드 상의 분획 없이, 코코아 버터 등가물 또는 그 성분으로 사용할 수 있는 트리글리세리드 조성물을 제공할 수 있다는 것을 발견했다.

과제의 해결 수단

- [0020] 그에 따라, 본 발명은 식물성 오일의 SOS 트리글리세리드 함량을 증가시키기 위한 공정을 제공하며, 여기서 S는 스테아르산(C18:0) 및 팔미트산(C16:0) 잔기를 나타내고 O는 올레산(C18:1) 잔기를 나타내고, 상기 공정은 다음을 포함함:
- [0021] a) 다음을 포함하는 반응 환경을 제공하는 단계:
- [0022] i) 지지체에 고정된 sn -1,3-특이적 리파아제,
- [0023] ii) 식물성 오일, 여기서 상기 식물성 오일은 전체 C6-C24 지방산 잔기를 기준으로, 적어도 45% 올레산 지방산 잔기를 포함하고, 여기서 상기 식물성 오일은 sn -2 위치에서 올레산 함량이 상기 식물성 오일의 전체 sn -2 지방산 잔기의 중량 기준으로 적어도 75%이고,
- [0024] iii) 스테아르산, 팔미트산, 또는 이들의 혼합물의 지방족 알코올 에스테르, 선택적으로 스테아르산 및/또는 팔미트산과 혼합됨, 및
- [0025] iv) 물;
- [0026] 여기서 상기 지방족 알코올 에스테르와 선택적인 스테아르산 및/또는 팔미트산 (iii) 대 상기 식물성 오일 (i)의 중량비는 적어도 4:1이고; 및
- [0027] 여기서 상기 반응 환경의 수분 활성도(water activity)는 0.1~0.6의 범위이다;
- [0028] b) 트랜스에스테르화를 수행함으로써 트리글리세리드 상, 지방산 에스테르 및 선택적으로 유리지방산을 포함하는 혼합물을 얻기 위해 상기 반응 환경을 30~60℃의 온도로 가열하는 단계; 그리고
- [0029] c) 트리글리세리드 조성물을 얻기 위해, 단계 (b)에서 얻은 혼합물에서 상기 지방산 에스테르와, 존재하는 경우, 유리지방산을 분리하는 단계.
- [0030] 본 명세서에 개시된 공정은 트리글리세리드 상의 중량 기준으로 SOS 함량이 적어도 65%인 트리글리세리드 상을 생성할 수 있다. 또한, 단계 (b)에서 얻은 혼합물의 상기 트리글리세리드 상은 SOS 트리글리세리드 대 SSO 트리글리세리드의 중량비를 적어도 80:1로 유지함으로써, SSO 트리글리세리드의 바람직하지 않은 생성을 최소화할 수 있다. 또한, 바람직하지 않은 SSS 트리글리세리드 생성을 최소화할 수 있으며, 상기 혼합물의 상기 트리글리세리드 상은 트리글리세리드 상의 중량 기준으로 SSS 트리글리세리드 함량이 $\leq 4\%$ 일 수 있다. 이러한 양과 비율은 상기 혼합물의 상기 트리글리세리드 상을 기준으로 중량으로 계산된다. 트리글리세리드 조성물은 코코아 버터 등가물 또는 그 구성 요소로 사용하기에 적합하다.
- [0031] 상기 공정의 단계는 3가지 대체 단계 d1), d2) 및 d3) 중 하나가 이어질 수 있으며, 여기서 단계 c)의 지방산 에스테르 및 선택적으로 유리지방산은 트랜스에스테르화의 기질로 사용될 목적으로 단계 a)의 반응 환경으로 반환된다.
- [0032] d1) 단계 (c)에서 분리된 지방산 에스테르와, 존재하는 경우, 유리지방산을 상기 반응 환경으로 재순환시키는 단계;
- [0033] d2) 상기 지방족 알코올 에스테르(iii)는, 선택적으로 스테아르산과 혼합됨, 스테아르산의 지방족 알코올 에스테르를 포함하는 경우, 단계 (c)에서 분리된 지방산 에스테르와, 존재하는 경우, 유리지방산을 수소화하고, 상기 수소화된 지방산 에스테르 및 유리지방산을 상기 반응 환경으로 재순환시키는 단계;
- [0034] d3) 단계 (c)에서 분리된 지방산 에스테르와, 존재하는 경우, 유리지방산을 다음과 같이 분리하는 단계:
- [0035] 스테아레이트 및/또는 팔미테이트 에스테르, 및 선택적으로 스테아르산 및/또는 팔미트산을 포함하는 제1 분획; 및
- [0036] 올레이트 에스테르(oleate ester)와 선택적으로 올레산을 포함하는 제2 분획; 및
- [0037] 상기 제1 분획을 상기 반응 환경으로 재순환함.
- [0038] 상기 지방족 알코올 에스테르(iii)가, 선택적으로 스테아르산과 혼합됨, 스테아르산의 지방족 알코올 에스테르를 포함하는 경우, 상기 공정은 또한 제2 분획을 수소화하여 스테아레이트 에스테르 및 선택적으로 스테아르산을 제공하고 상기 수소화된 제2 분획을 상기 반응 환경으로 재순환시키는 추가 단계(e3)를 포함할 수 있다.

- [0039] 상기 식물성 오일(ii)은 고올레산 유채/카놀라유, 올리브유, 고올레산 대두유, 고올레산 해바라기유, 고올레산 홍화유(Safflower oil), 시어 오일(Shea oil) 또는 유채유 및/또는 이들의 분획 또는 조합 중에서 선택될 수 있다. 바람직하게는, 상기 식물성 오일(ii)은 고올레산 해바라기유, 고올레산 홍화유(Safflower oil) 및/또는 이들의 조합 또는 분획으로부터 선택된다.
- [0040] 상기 공정은 초콜릿 또는 초콜릿-유사 제품의 제조에서 단계 (c)에서 얻은 트리글리세리드 조성물을 코코아 버터 등가물 또는 그 구성 요소로 사용하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명은 또한 상기 공정으로부터 얻을 수 있는 트리글리세리드 조성물을 제공한다.
- [0042] 본 발명은 또한 상기 트리글리세리드 조성물을 포함하는 초콜릿 또는 초콜릿-유사 제품을 제공한다.
- [0043] 본 발명은 또한 CBE를 포함하는 초콜릿 또는 초콜릿-유사 제품을 제공한다.
- [0044] **정의**
- [0045] 본 명세서에서 사용되는 용어 "식물성(vegetable)"은 식물 또는 단일 세포 유기체에서 유래한 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 식물성 오일 또는 식물성 트리글리세리드는, 상기 트리글리세리드 또는 오일을 얻기 위해 사용된 모든 지방산이 식물 또는 단일 세포 유기체에서 유래된 경우, 여전히 식물성 오일 또는 식물성 트리글리세리드로 이해되어야 한다.
- [0046] 본 명세서에서 사용되는 용어 "오일"은 지방산 아실기를 함유하는 글리세리드 지방 및 오일을 지칭하며, 특정한 녹는점을 의미하지 않는다. 본 명세서에서 "지방(fat)"이라는 용어는 "오일"과 동의어로 사용된다.
- [0047] 본 명세서에서 사용되는 용어 "그것에서 유래된 오일(oils derived therefrom)"에는 가공된 오일, 즉 공정 과정을 거친 오일이 포함된다. 예를 들어, 이 용어는 오일의 모든 분획, 즉 분획을 거친 오일이 포함된다.
- [0048] 본 명세서에서 사용되는 용어 "지방산"은 유리지방산(free fatty acids)과 트리글리세리드의 지방산 잔기를 포함한다.
- [0049] CX라는 명명법을 사용하면 지방산이 X개의 탄소 원자를 포함한다는 것을 의미한다. 예를 들어 C16-지방산은 탄소 원자가 16개이고 C18-지방산은 탄소 원자가 18개이다.
- [0050] CX:Y라는 명명법을 사용하면 지방산이 X개의 탄소 원자와 Y개의 이중 결합을 포함한다는 것을 의미한다. 예를 들어, C16:0 지방산은 탄소 원자 16개와 이중 결합 0개를 갖는 반면, C18:1 지방산은 탄소 원자 18개와 이중 결합 1개를 갖는다.
- [0051] 본 명세서에서 사용되는 약어 "SOS" 및 "SSO"는 트리글리세리드(TAG's)를 포함하며, 여기서 S는 포화된 지방산 에스테르(FAE's) 팔미테이트(C16:0) 또는 스테아레이트(C18:0), 및 O는 불포화 올레이트(C18:1)를 나타낸다. 따라서 "SOS"는 sn-2 위치에 하나의 O, 그리고 sn-1 및 sn-3 위치에 각각 하나의 S(스테아르산 또는 팔미트산 잔기)를 갖는 단일 불포화 트리글리세리드를 나타낸다. "SSO"는 sn-1 또는 sn-3 위치에 하나의 O, sn-2 위치에 하나의 S, 그리고 sn-1 또는 sn-3 위치에 하나의 S를 갖는 비대칭 단일 불포화 트리글리세리드를 나타낸다.
- [0052] 코코아 버터 등가물은 식용 지방으로 해당 분야에서 잘 알려져 있으며, 일반적으로 하나 이상의 식물성 지방으로 구성되고, 코코아 버터와 유사한 구성 및 특성을 가지며, 코코아 버터와 호환되고, 이들을 사용하는 초콜릿의 거동에 큰 영향을 미치지 않는다.
- [0053] 본 명세서에서 사용되는 "%" 또는 "백분율"은 중량 백분율을 말한다. 즉, 달리 명시되지 않는 한 wt.% 또는 wt.-%를 의미한다.
- [0054] 본 명세서에서 사용되는 "수분 활성도(water activity)"라는 표현은 오일 내 물의 부분 증기압을 동일한 온도에서 순수한 물의 증기압으로 나눈 값으로 정의된다. 평형 상태에서 수분 활성도(water activity)는 상대 습도와 같다. 수분 활성도(water activity)를 조정하기 위한 간단하고 일반적으로 사용되는 방법 중 하나는 밀폐된 용기에서 증기 상을 통한 포화 염 용액으로 사전 평형을 이루는 것이다(R.H. Valivety, P. J. Halling, A.R. Macrae, reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents, Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol. (1992) and H.L. Goderis, G. Ampe, M.P. Feyten, B.L. Fouw t, W.M. Guffens, S.M. Van Cauwenbergh, P.P. Tobback, Lipase- catalyzed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity, Biotechnol. Bioeng. 30 (1987) 258-266). 또 다른 방법은 기질에 건조 또는 습한 공기나 질소 가스를 분사하여 물을 제거하거나 공급하는 것이다

(K. Won, Sun Bok Lee, Computer-aided control of water activity for lipase-catalyzed esterification in solvent-free systems, Biotechnol. Prog. 17 (2001) 258-264 and A.E.V. Petersson, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, A water activity control system for enzymatic reactions in organic media, Biotechnol. Bioeng. 97 (2007) 235-241).

[0055] 본 명세서에서 사용되는 표현 "반응 환경"은 효소적 트랜스에스테르화가 일어나는 환경이며 지지체에 고정된 *sn*-1,3-특이적 리파아제, 물, 반응물, 즉 식물성 오일 및 스테아르산, 팔미트산의 지방족 알코올 에스테르, 또는 이들의 혼합물을 포함하며, 선택적으로 스테아르산 및/또는 팔미트산과 혼합된다.

[0056] 본 명세서에서 사용되는 표현 "피드(feed)"는 *sn*-1,3-특이적 리파아제에 대한 기질의 중량 합계, 즉 식물성 오일(ii)과 스테아르산, 팔미트산, 또는 이들의 혼합물의 지방족 알코올 에스테르(선택적으로 스테아르산 및/또는 팔미트산과 혼합됨)(iii)의 중량 합계로 정의된다.

[0057] 본 명세서에서 사용되는 표현 "기질 비율(substrate ratio)"은 스테아르산, 팔미트산, 또는 이들의 혼합물의 지방족 알코올 에스테르(선택적으로 스테아르산 및/또는 팔미트산과 혼합됨)(iii) 대 식물성 오일(ii)의 중량비를 의미한다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 본 발명의 공정의 세 가지 다른 구현예에 대한 공정 다이어그램을 나타낸다.

도 1A는 효소적 트랜스에스테르화 반응에 이어 트리글리세리드 상에서 분리된 지방산 에스테르(FAE)와 유리지방산(FFA)이 반응 환경으로 재순환되는 공정을 나타낸다.

도 1B는 효소적 트랜스에스테르화 반응에 이어 트리글리세리드 상에서 분리된 지방산 에스테르(FAE)와 유리지방산(FFA)이 반응 환경으로 재순환되기 전에 수소화되는 공정을 나타낸다.

도 1C는 효소적 트랜스에스테르화 반응에 이어 트리글리세리드 상에서 분리된 지방산 에스테르(FAE) 및 유리지방산(FFA)이 스테아레이트 및/또는 팔미테이트 에스테르, 및 선택적으로 스테아르산 및/또는 팔미트산을 포함하는 제1 분획, 및 올레산 에스테르 및 선택적으로 올레산을 포함하는 제2 분획으로 분리되는 공정을 나타낸다.

제1 분획은 반응 환경으로 재순환되고, 제2 분획은 수소화되어 다시 반응 환경으로 재순환된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 아래의 구현예를 설명할 때, 본 발명은 위에 공개된 측면과 아래 설명된 구현예의 모든 가능한 조합 및 변형을 예상한다.

[0060] 본 발명은 식물성 오일의 SOS 트리글리세리드 함량을 증가시키기 위한 공정에 관한 것으로, 여기서 S는 스테아르산(C18:0) 및 팔미트산(C16:0) 잔기를 나타내고 O는 올레산(C18:1) 잔기를 나타내고, 상기 공정은 다음을 포함함:

[0061] a) 다음을 포함하는 반응 환경을 제공하는 단계:

[0062] i) 지지체에 고정된 *sn*-1,3-특이적 리파아제,

[0063] ii) 식물성 오일, 여기서 상기 식물성 오일은 전체 C6-C24 지방산 잔기를 기준으로, 적어도 45% 올레산 지방산 잔기를 포함하고, 여기서 상기 식물성 오일은 *sn*-2 위치에서 올레산 함량이 상기 식물성 오일의 전체 *sn*-2 지방산 잔기의 중량 기준으로 적어도 75%이고,

[0064] iii) 스테아르산, 팔미트산, 또는 이들의 혼합물의 지방족 알코올 에스테르, 선택적으로 스테아르산 및/또는 팔미트산과 혼합됨, 및

[0065] iv) 물;

[0066] 여기서 지방족 알코올 에스테르 및 선택적인 스테아르산 및/또는 팔미트산(iii) 대 식물성 오일(ii)의 중량비는 적어도 4:1이고; 및

[0067] 여기서 상기 반응 환경의 수분 활성도(water activity)는 0.1 내지 0.6의 범위이다;

[0068] b) 트랜스에스테르화를 수행함으로써 트리글리세리드 상, 지방산 에스테르 및 선택적으로 유리지방산을 포함하

는 혼합물을 얻기 위해 상기 반응 환경을 30~60℃의 온도로 가열하는 단계; 및

- [0069] c) 트리글리세리드 조성물을 얻기 위해, 단계 (b)에서 얻은 혼합물에서 상기 지방산 에스테르와 유리지방산을 분리하는 단계.
- [0070] 단계 (b)에서 얻은 혼합물의 트리글리세리드 상은 트리글리세리드 상의 중량 기준으로 적어도 65%의 SOS 트리글리세리드 함량을 갖고, SOS 트리글리세리드 대 SSO 트리글리세리드의 중량비가 적어도 80:1이다. 상기 트리글리세리드 상의 SSO 함량은 상기 트리글리세리드 상의 중량 기준으로 $\leq 1.2\%$ 일 수 있다. 상기 트리글리세리드 상의 SSS 함량은 트리글리세리드 상의 중량 기준으로 $\leq 4\%$, 바람직하게는 트리글리세리드 상의 중량 기준으로 $\leq 3\%$, 보다 바람직하게는 트리글리세리드 상의 중량 기준으로 $\leq 2\%$, 그리고 가장 바람직하게는 트리글리세리드 상의 중량 기준으로 $\leq 1.5\%$ 일 수 있다. 그러므로 본 조성물은 추가적인 트리글리세리드 상의 분획이 필요 없이, 코코아 버터 등가물 또는 그 구성 요소로 사용될 수 있다.
- [0071] 상기 트리글리세리드 상의 SOS 트리글리세리드, SSO 트리글리세리드 및 SSS 트리글리세리드 함량은 비수용성 역상 HPLC 방법(non-aqueous reversed-phase HPLC method)을 사용하여 결정할 수 있다. 적합한 방법은 "Non-aqueous reversed phase liquid chromatography with charged aerosol detection for quantitative lipid analysis with improved accuracy", Causevic, A. et al., Journal of Chromatography A, Vol. 1652, 2021, pages 1-11. 에 설명되어 있다.
- [0072] 효소적 트랜스에스테르화를 위한 반응 환경은 지지체에 고정된 *sn*-1,3-특이적 리파아제를 포함한다. 이 효소는 식물성 오일의 *sn*-1 및 *sn*-3 위치에 있는 트랜스에스테르화에 영향을 미쳐, 식물성 오일의 해당 위치에서 지방산 잔기를 스테아르산 또는 팔미트산의 지방족 알코올 에스테르 및 선택적인 유리지방산에서 나온 스테아르산 및 팔미트산 잔기로 대체한다. 하나 이상의 구현예에서 *sn*-1,3-특이적 리파아제(i)는 미생물 리파아제, 예를 들어 박테리아 또는 진균 리파아제이다. 바람직하게는, *sn*-1,3-특이적 리파아제는 진균 종, 특히 리조푸스 오리자에(*Rhizopus oryzae*), 테르모마이세스 라누기노수스(*Thermomyces lanuginosus*) 또는 리조무코르 미에헤이(*Rhizomucor miehei*) 중에서 유래된다. 이들 중에서 유래된 리파아제는 특이성, 반응 속도 및 견고성 측면에서 본 발명의 트랜스에스테르화 공정에 특히 적합한 것으로 밝혀졌다.
- [0073] 지지체에 효소를 고정하는 것은 당해 기술 분야에서 잘 알려져 있으며, 고정된 *sn*-1,3-특이적 리파아제는 다양한 공급업체에서 상업적으로 구입 가능하다. 지지체 물질 상에 *sn*-1,3-특이적 리파아제의 고정은, 효소 성능이 향상되어 더 높은 수준의 SOS 트리글리세리드를 제공하는 것으로 밝혀졌다. 다양한 지지체 재료가 알려져 있으며, 예를 들어 다양한 폴리머 및 실리카가 있다. 본 발명의 구현예에서, *sn*-1,3-특이적 리파아제가 고정되는 지지체 물질은 소수성이다. 특히 유용한 효소 중 하나는 리조푸스 오리자에(*Rhizopus oryzae*)의 고정된 Lipase DF "Amano" IM이다(Amano Enzyme에서 구입 가능).
- [0074] 본 발명의 공정에 사용된 식물성 오일(ii)는 비교적 높은 수준의 올레산을 갖는 지방산 조성을 가져야 한다. 오일이나 지방의 지방산 조성은 트랜스에스테르화에 의해 준비된 메틸 에스테르 유도체의 가스크로마토그래피 분석을 통해 결정될 수 있다. 가스-액체 크로마토그래피(GLC) 기술은 가스 크로마토그래피(GC)라고도 하며, 이동상이 가스이고 고정상이 액체인 본래 크로마토그래피의 한 형태이다. 주입하는 동안 샘플이 휘발되고, 기체상과 액체상 사이에 평형이 형성되며, 이 평형은 컬럼의 내벽에 고정된다. 샘플에 다양한 성분이 포함되어 있는 경우, 각 성분은 개별 평형 상수에 따라 다양한 정도로 액상으로 확산되어 컬럼을 따라 서로 다른 속도로 이동한다. 이로 인해 보유 시간이 달라지고, 결과적으로 물리적 분리가 발생한다. 분리된 성분은 컬럼 끝에서 나오면서 이상적으로 가우시안 분포를 따르는 농도 피크를 나타낸다. 이러한 피크는 화염 이온화 검출기(FID, Flame Ionization Detector)에 의해 감지된다. FID는 가스 상태의 성분 농도를 전기 신호로 변환하고, 이 신호는 증폭되어 연속 기록기로 전달되어 분리 진행 상황을 모니터링하고 정량화할 수 있다. 적합한 방법은 IUPAC 방법 2.304이다.
- [0075] 상기 트랜스에스테르화의 반응물로 사용되는 식물성 오일(ii)은 반응 환경에 제공된 식물성 오일의 전체 C6-C24 지방산 잔기를 기준으로 적어도 45% 올레산(C18:1) 지방산 잔기를 포함해야 한다. 바람직하게는, 상기 식물성 오일은 적어도 50% 올레산(C18:1) 지방산 잔기, 보다 바람직하게는 적어도 60% 올레산(C18:1) 지방산 잔기, 및 가장 바람직하게는 적어도 70% 올레산(C18:1) 지방산 잔기를 포함한다. 본 발명의 한 가지 유리한 특징은 *sn*-2 위치뿐만 아니라 *sn*-1 및 *sn*-3 위치에도 높은 수준의 올레산을 갖는 식물성 오일을 사용하여 코코아 버터 등가물 및 그 성분을 제공할 수 있다는 것이다.
- [0076] 본 발명의 공정은 *sn*-1,3-특이적 리파아제를 사용하는 것을 수반하므로, 높은 수준의 SOS를 갖는 조성물을 제

공하기 위해서는 식물성 오일이 이미 *sn*-2 위치에 높은 수준의 올레산 잔기를 갖는 것이 필요하다. 그에 따라, 상기 식물성 오일은 반응 환경에 제공된 식물성 오일의 전체 *sn*-2 지방산 잔기의 중량 기준으로 *sn*-2 위치에서 올레산 함량이 적어도 75%이어야 한다. 반응 환경에 제공된 식물성 오일의 전체 *sn*-2 지방산 잔기의 중량 기준으로, 상기 식물성 오일은 *sn*-2 위치에서 올레산 함량이 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 더 바람직하게는 적어도 90%, 그리고 가장 바람직하게는 적어도 95%이다.

[0077] 식물성 오일의 *sn*-2 위치에서 올레산 함량은 췌장 리파아제 효소(pancreatic lipase enzyme)를 사용하여 *sn*-1 및 *sn*-3 위치의 지방산을 절단한 다음, TLC 또는 NPLC를 사용하여 생성된 *sn*-2 모노아실글리세롤(MAG)을 분리하고, 마지막으로 가스 크로마토그래피로 지방산 메틸 에스테르를 분석하는 방법을 통해 측정할 수 있다. 적합한 방법은 IUPAC 공식 방법 2.210: "Determination of fatty acids in the 2-position in the triglyceride of oil and fats", seventh ed., Standard Methods for the Analysis of oil, Fats and Derivatives, Blackwell, Oxford, 1992. 이다.

[0078] 하나 이상의 구현예에서, 상기 식물성 오일(ii)은 고올레산 유채/카놀라유, 올리브유, 고올레산 대두유, 고올레산 해바라기유, 고올레산 홍화유(Safflower oil), 시어 오일(Shea oil) 또는 유채유 및/또는 이들의 분획 또는 조합으로부터 선택된다. 바람직하게는, 상기 식물성 오일(ii)은 고올레산 해바라기유, 고올레산 홍화유(Safflower oil) 및/또는 이들의 조합 또는 분획으로부터 선택된다. 이러한 오일들은 올레산 함량이 높고 가격이 비교적 저렴하기 때문에 특히 적합하다.

[0079] 상기 반응 환경은 추가로 스테아르산 및/또는 팔미트산 잔기의 공급원을 포함하는데, 이는 스테아르산, 팔미트산, 또는 이들의 혼합물의 지방족 알코올 에스테르이며, 선택적으로 스테아르산 및/또는 팔미트산과 혼합된다. 스테아르산 및 팔미트산의 지방족 알코올 에스테르를 사용하는 것이 유리한데, 이는 이들 에스테르가 그에 상응하는 지방산보다 녹는점이 낮기 때문이다. 이를 통해 더 낮은 온도를 사용할 수 있어 효소 안정성이 향상되고 공정 중에 원치 않는 결정화가 방지된다. 바람직하게는, 스테아르산 또는 팔미트산의 지방족 알코올 에스테르는 스테아르산의 알킬 에스테르 또는 팔미트산 에스테르 또는 이들의 혼합물이고, 보다 바람직하게는 스테아르산 또는 팔미트산의 C₁-C₄ 알킬 에스테르 또는 이들의 혼합물이다. 보다 더 바람직하게는, 상기 에스테르는 메틸 스테아레이트, 에틸 스테아레이트, 메틸 팔미테이트, 에틸 팔미테이트 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택된다. 가장 바람직하게는, 상기 에스테르는 메틸 스테아레이트, 에틸 스테아레이트 및 이들의 혼합물로 구성된 그룹에서 선택된다.

[0080] 스테아레이트 에스테르가 더 선호되는데, 그 이유는 SOS 트리글리세리드에서 S는 스테아르산 잔기를 나타내며, 팜유와 같이 널리 이용 가능한 식물성 오일에서 많은 양으로 얻을 수 없기 때문이다. 스테아르산 또는 팔미트산의 지방족 알코올 에스테르는 스테아르산 및/또는 팔미트산과 혼합하여 유리지방산으로 사용될 수 있다. 하지만 바람직하게는, 이러한 유리지방산은 사용되지 않는다.

[0081] 반응 환경은 또한 물을 포함한다. 높은 수준의 SOS 트리글리세리드를 얻기 위해서는 충분한 효소 활성을 제공하기 위해 물이 존재해야 한다. 그러나 수분의 수준이 너무 높으면 상기 공정의 단계 (b)에서 얻은 트리글리세리드 상에서 디아실글리세리드와 SSO 트리글리세리드가 더 많은 양으로 형성되는 것으로 밝혀졌다. SOS 트리글리세리드의 높은 수준과 디아실글리세리드 및 SSO 트리글리세리드의 낮은 수준을 제공하기 위해서는, 단계 a)에서 수분 활성화도(water activity)가 0.1-0.6, 바람직하게는 0.2-0.4의 범위에 있어야 한다는 것이 밝혀졌다.

[0082] 본 발명의 상기 공정은 지방족 알코올 에스테르 및 선택적인 스테아르산 및/또는 팔미트산(iii) 대 식물성 오일(ii)의 특히 높은 비율을 활용한다. 적어도 4:1의 높은 기질 비율에서는 트리글리세리드의 *sn*-1 및 *sn*-3 위치에 스테아르산 및 팔미트산이 더 많이 결합되어 더 많은 SOS 트리글리세리드가 생성되는 것으로 밝혀졌다. 놀랍게도, 높은 기질 비율은 본 발명의 공정의 다른 반응 조건과 결합해도 SSO 및 SSS 트리글리세리드의 생성을 허용할 수 없을 정도로 높은 수준으로 증가시키지 않는다. 그에 따라, 본 발명의 공정에 의해 생산된 트리글리세리드 조성물은 SSO 및 SSS 트리글리세리드에서 SOS 트리글리세리드를 분리하기 위한 추가 분획 단계 없이, 코코아 버터 등가물 또는 그 성분으로 사용될 수 있다. 바람직하게는, 기질 비율은 적어도 5:1이고, 보다 바람직하게는 적어도 6:1이고, 보다 더 바람직하게는 적어도 7:1이다. 본 발명에서는 적어도 8:1 또는 적어도 9:1과 같이 더 높은 기질 비율도 고려된다. 매우 높은 기질 비율에서, 단계 (c)에서 많은 양의 지방산 에스테르와 유리지방산을 제거해야 하기 때문에 공정의 효율성이 떨어질 수 있다. 그에 따라, 기질 비율은 일반적으로 최대 15:1, 또는 최대 12:1, 또는 최대 10:1이다.

[0083] 특정 공정에 사용되는 기질 비율은 상기 식물성 오일(ii)의 특성에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 상기 식물성 오일이 *sn*-2 위치에 특히 높은 올레산 함량을 갖는 경우, 상기 지정된 범위의 하한선에 가까운 기질 비율을

사용하더라도 트랜스에스테르화를 통해 높은 수준의 SOS 트리글리세리드를 달성할 수 있다. 이런 경우, 상기 지정된 범위의 하한선에 가까운 기질 비율을 사용하는 것이 공정 효율성 측면에서 유리할 수 있다. 그에 따라, 일 구현예에서, 상기 식물성 오일은 *sn*-2 위치에서 올레산 함량이, 상기 식물성 오일의 전체 *sn*-2 지방산 잔기의 중량 기준으로 적어도 90% 또는 적어도 95%이고, 상기 지방족 알코올 에스테르와 선택적인 스테아르산 및/또는 팔미트산 (iii) 대 상기 식물성 오일 (ii)의 중량비는 4:1 내지 7:1 범위이다. 반대로, 상기 식물성 오일이 *sn*-2 위치에서 더 낮은 올레산 함량을 가지고 있다면, 더 높은 기질 비율을 사용하여 반응 제품에서 SOS 트리글리세리드 수준을 최대화할 수 있다. 그에 따라, 다른 구현예에서, 상기 식물성 오일은 *sn*-2 위치에서 올레산 함량이, 상기 식물성 오일의 전체 *sn*-2 지방산 잔기의 중량 기준으로 75% 내지 90% 범위, 또는 75% 내지 85% 범위이고, 상기 지방족 알코올 에스테르와 선택적인 스테아르산 및/또는 팔미트산(iii) 대 상기 식물성 오일(ii)의 중량비는 적어도 7:1이다. 따라서 기질 비율은 사용되는 식물성 오일의 트리글리세리드 함량과 원하는 제품 구성에 따라 달라질 수 있다.

- [0084] 모든 구현예에서, 반응 환경이 가열되는 온도는 30~60℃ 범위이다. 바람직하게는 상기 온도는 35~45℃ 범위이다. 상기 반응 환경의 온도는 좋은 효소 활성과 높은 수준의 SOS 트리글리세리드를 제공할 만큼 충분히 높으면서도 SSO 및 SSS 트리글리세리드와 같은 바람직하지 않은 부산물의 생성을 최소화할 만큼 충분히 낮도록 선택된다. 낮은 반응 온도를 사용하면 효소 안정성이 향상되고, 이는 일반적으로 녹는점이 낮은 지방족 알코올 에스테르를 사용하면 가능하다.
- [0085] 본 발명의 공정은 배치(batch) 공정, 페드-배치(fed-batch) 공정, 또는 연속 공정으로 구현될 수 있다.
- [0086] 배치(batch) 공정에서는, 성분 (i)~(iv)를 특정 반응 시간 동안 하나의 반응기에서 원하는 수율의 제품이 생성될 때까지 혼합한 후, 효소를 여과하여 제거한다.
- [0087] 페드-배치(fed-batch) 공정에서는, 기질이 한꺼번에 배치 반응기에 첨가되지 않고, 조금씩 첨가된다.
- [0088] 연속 공정에서는, 효소가 충전층 반응기(packed bed reactor)에 고정되고, 기질이 반응기에 펌핑되고, 생성물 흐름이 반응기에서 추출된다. 연속 공정에서 반응기를 통한 공급물(feed)(즉, 식물성 오일(ii)과 스테아르산, 팔미트산, 또는 이들의 혼합물의 지방족 알코올 에스테르(선택적으로 스테아르산 및/또는 팔미트산과 혼합됨)(iii)의 중량 합계)의 흐름 속도는 바람직하게는 0.5 내지 14, 보다 바람직하게는 2 내지 10, 가장 바람직하게는 4 내지 8g 공급물/g 효소/h의 범위이다. 연속 공정은 지방산 에스테르 및 지방산의 재활용이 더 간단하고 트리글리세리드 내에서 아실기의 이동을 줄이는 데 유리하다는 것이 밝혀졌다. 본 발명의 유리한 구현예에서, 트랜스에스테르화 이후 반응 혼합물에 남아 있는 지방산 에스테르 및 유리지방산은 선택적으로 처리되어 반응 환경으로 재순환된다.
- [0089] 한 구현예에서, 상기 공정은 또한 단계 (c)에서 분리된 지방산 에스테르와, 존재하는 경우, 유리지방산을 반응 환경으로 재순환시키는 단계(d1)를 더 포함한다. 이런 방식으로, 더 효율적인 반응을 얻을 수 있으며, 추가 반응물을 제공하는 데 드는 비용 없이 기질 비율을 높일 수 있다. 이러한 공정은 도 1A에 개략적으로 표시되어 있다.
- [0090] 또 다른 구현예에서, 지방족 알코올 에스테르(iii)가, 선택적으로 스테아르산과 혼합된 스테아르산의 지방족 알코올 에스테르를 포함하는 경우, 상기 공정은 단계 (d2)를 추가적으로 포함하며, 상기 단계 (d2)는 단계 (c)에서 분리된 지방산 에스테르와, 존재하는 경우, 유리지방산을 수소화하고, 수소화된 지방산 에스테르와 유리지방산을 반응 환경으로 재순환시키는 단계를 포함한다. 본 구현예에서, 단계 (c)에서 분리된 성분 중 자유 올레산 및 올레산 에스테르는 스테아르산 및 이의 에스테르로 전환되어, 반응 환경에서 스테아르산의 지방족 알코올 에스테르와 선택적인 스테아르산을 추가로 보충할 수 있다. 본 구현예는 도 1B에 개략적으로 도시되어 있다.
- [0091] 또 다른 대안적 구현예에서, 상기 공정은 단계 (d3)를 추가로 포함하는데, 이 단계 (d3)는 단계 (c)에서 분리된 지방산 에스테르와, 존재하는 경우 유리지방산을, 스테아레이트 및/또는 팔미테이트 에스테르, 및 선택적으로 스테아르산 및/또는 팔미트산을 포함하는 제1 분획, 및 올레이트 에스테르 및 선택적으로 올레산을 포함하는 제2 분획으로 분리하고, 상기 제1 분획을 반응 환경으로 재순환시키는 단계를 포함한다. 선택적으로, 본 구현예에서, 상기 제2 분획은 수소화되어 스테아르산 에스테르, 및 선택적으로 스테아르산을 제공하고, 반응 환경으로 재순환될 수 있다. 본 구현예는 도 1C에 개략적으로 도시되어 있다.
- [0092] 일 구현예에서, 분리된 지방산 에스테르 및 유리지방산, 즉 단계 (c)에서 분리된 지방산 에스테르 및 선택적으로 유리지방산, 또는 단계 (d2)에서 제공된 수소화된 지방산 에스테르 및 유리지방산, 또는 단계 (d3)에서 제공된 제1 분획, 또는 단계 (d3)에서 제공된 제2 분획(수소화 전 또는 후)은 반응 환경으로 재순환되기 전에 표백

된다. 표백(bleaching)은 불순물을 제거하고 효소의 수명을 연장하며, 결과적으로 더욱 효율적인 트랜스에스테르화를 보장한다.

[0093] 앞서 논의한 바와 같이, 본 발명의 공정의 한 가지 장점은 생산된 상기 트리글리세리드 조성물이 충분히 높은 수준의 SOS 트리글리세리드와 충분히 낮은 수준의 SSO 및 SSS 트리글리세리드를 갖고 있어, 추가적인 분획 단계가 필요 없이 코코아 버터 등가물 또는 그 성분으로 사용될 수 있다는 것이다. 그에 따라, 바람직한 구현예에서, 단계 (c)에서 얻은 트리글리세리드 조성물은 분획 단계를 거치지 않고, SOS 트리글리세리드의 함량이 더욱 증가된 분획된 트리글리세리드 조성물을 제공한다.

[0094] 상기 공정은 또한 단계 (c)에서 얻은 트리글리세리드 조성물을 코코아 버터 등가물 또는 그 구성 요소로 사용하여 초콜릿 또는 초콜릿-유사 제품을 제조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 특히 바람직한 구현예에서, 단계 (c)에서 얻은 트리글리세리드 조성물은 SOS 트리글리세리드의 함량이 더욱 증가된 분획된 트리글리세리드 조성물을 제공하기 위해 분획 단계를 거치지 않고, 트리글리세리드 조성물은 초콜릿 또는 초콜릿-유사 제품의 제조에서 코코아 버터 등가물 또는 그 구성 요소로 사용된다.

[0095] 본 발명은 또한 본 발명의 공정으로부터 얻을 수 있는 트리글리세리드 조성물을 제공한다.

[0096] 상기 트리글리세리드 조성물은 일반적으로 중량 기준으로 10~70%의 양으로 코코아 버터 등가물의 구성 요소로 사용될 수 있다. 그에 따라, 본 발명은 또한 트리글리세리드 조성물의 중량 기준으로 10~70%를 포함하는 코코아 버터 등가물을 제공한다. 본 발명은 또한 트리글리세리드 조성물을 포함하는 초콜릿 또는 초콜릿-유사 제품을 제공한다.

[0097] 실시예

[0098] 트리글리세리드 상에서 SOS, SSO 및 SSS의 양과 같이 개별 위치 이성질체를 결정하려는 구현예에서는 비수용성 역상 HPLC 방법이 사용되었다(Causevic, A. et al. "Non-aqueous reversed phase liquid chromatography with charged aerosol detection for quantitative lipid analysis with improved accuracy", Journal of Chromatography A, Vol. 1652, 2021, pages 1-11.). 이 방법은 또한 다양한 유리지방산, 지방산 에스테르, 모노아실글리세리드, 디아실글리세리드 및 트리아실글리세리드를 분리하고 정량화하는데 사용되었다.

[0099] 실시예 1:

[0100] 효소적 트랜스에스테르화는 고올레산 홍화유(High Oleic Safflower oil)(HOSFO) 및 메틸 스테아레이트(Me-St)를 함유한 피드(feed)에서 SOS를 생산하기 위해 연속 공정 설정에서 수행되었다. 리조푸스 오리자에(*Rhizopus oryzae*)(Amano Enzyme)의 고정된 Lipase DF "Amano" IM 15g이 채워진 컬럼이 아래 표에 설명된 반응 조건과 함께 사용되었다. 유량은 기어 펌프로 제어되었으며, 오일은 탱크로부터 효소 컬럼으로 펌핑되었다. 온도는 히터로 조절되고 설정되었으며, 기질 탱크, 연결부 및 효소 컬럼이 놓인 수조를 가열했다.

표 1

[0101]

실험번호	기질비율 (Me-St/ HOSFO)	수분 함 성도	온도 (°C)	유속 (g oil/ g enzyme/h)	트리글리세 리드 상의 SOS %	트리글리세 리드 상의 SSO %	SOS/SSO 비 율
1	9.0	0.24	50.0	6.9	81.2	0.6	140
2	5.0	0.24	45.0	9.1	72.7	0.4	184
3	7.0	0.24	45.0	9.1	78.5	0.5	138
4	9.0	0.24	45.0	9.0	81.5	0.7	116
5	5.0	0.24	50.0	8.9	73.8	0.4	184
6	2.0	0.24	50.0	7.4	41.4	0.3	125
7	3.0	0.24	50.0	9.1	46.1	0.2	255
8	4.0	0.7	70.0	9.2	61.8	2.2	28

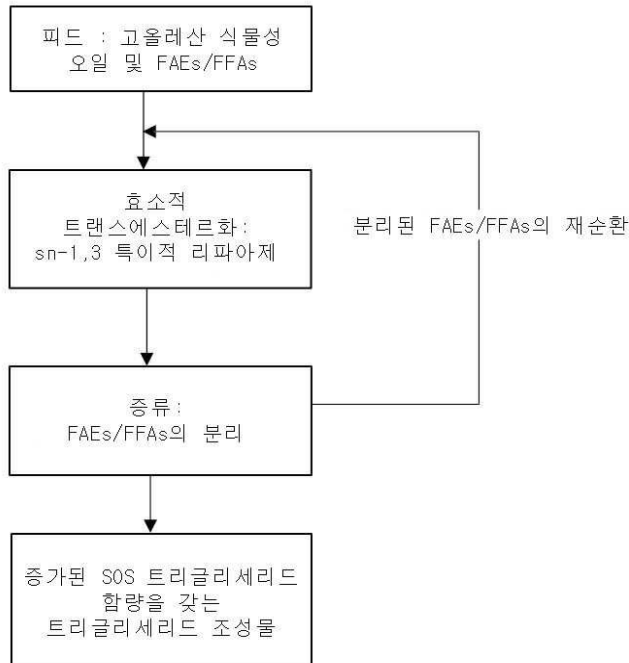
[0102] S = C18:0 및 C16:0, O=C18:1

[0103] 이러한 결과로부터, 높은 기질 비율과 본 발명의 추가적인 공정 조건을 함께 사용하면, 높은 SOS 함량과 높은 SOS/SSO 비율을 함유하는 고품질의 제품을 생산할 수 있음을 알 수 있다. 대조적으로, 실험 6 및 7과 같이 기질 비율이 낮으면 65% 이상의 SOS 함량을 달성할 수 없다. 더욱이, 실험 1-5에서 트리글리세리드 상의 SSO 함량은 충분히 낮은 수준을 유지하여 SOS/SSO 비율이 허용 가능한 수준을 유지했다. 이와 대조적으로, 실험 8과 같이

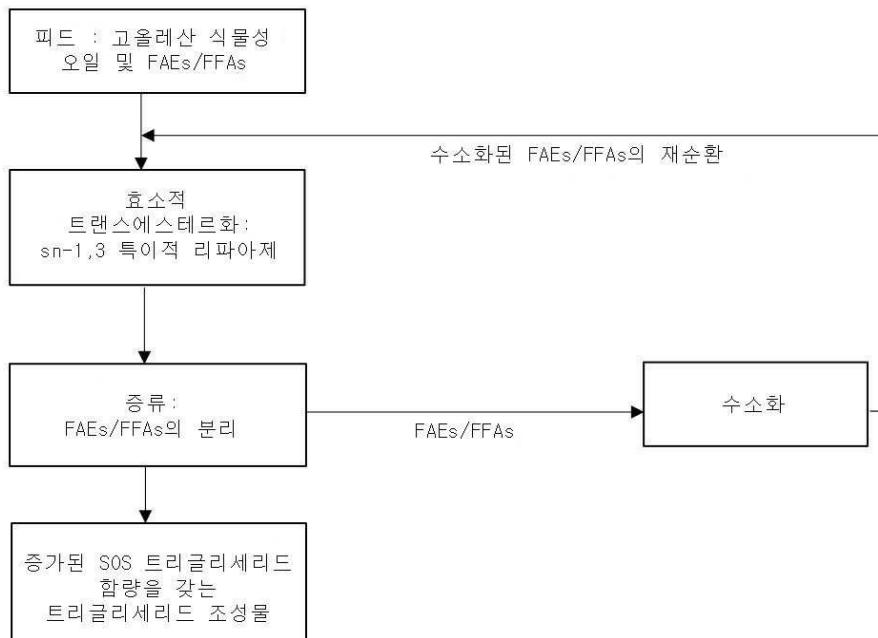
온도와 수분 활성도(water activity)가 높을 때, SSO 트리글리세리드가 더 많은 양으로 생성되어 SOS/SSO 비율이 낮아진다.

도면

도면1



도면2



도면3

