



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년12월24일
(11) 등록번호 10-0934072
(24) 등록일자 2009년12월17일

(51) Int. Cl.

C07J 9/00 (2006.01) C11B 7/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2004-7011823

(22) 출원일자 2003년01월30일

심사청구일자 2007년08월23일

(85) 번역문제출일자 2004년07월30일

(65) 공개번호 10-2004-0096544

(43) 공개일자 2004년11월16일

(86) 국제출원번호 PCT/IL2003/000081

(87) 국제공개번호 WO 2003/064444

국제공개일자 2003년08월07일

(30) 우선권주장

147942 2002년01월31일 이스라엘(IL)

(56) 선행기술조사문헌

W000/73407 A1*

EP0990391 A1

W00175083 A

W00172136 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

엔지모테크 리미티드

이스라엘 23106 미그달 하에베크 라마트-가브리엘
인더스트리얼 파크, 피.오.박스 6

(72) 발명자

가코-고란, 에이나프

이스라엘 20100 카르미엘 하티바트 기바티 9

바셰르, 소브히

이스라엘 20173 사크흐닌 피.오. 박스 9327

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 15 항

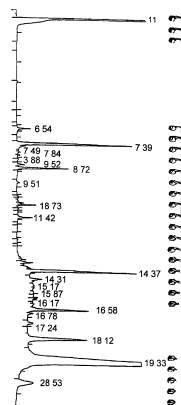
심사관 : 장봉호

(54) 오일내 피토스테롤 에스테르의 분별법

(57) 요약

본 발명은 식용 오일 및(또는) 식용 지방에 용해되거나 분산된 1종 이상의 디아실글리세롤 및 하나 이상의 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 포함하고, 임의로 모노아실글리세롤을 추가로 포함하는 조성물에 관한 것이다. 피토스테롤 에스테르는 베타-시토스테롤, 캄페스테롤, 스티그마스테롤 및 브라시카스테롤 에스테르일 수 있다. 피토스타놀 에스테르는 스티그마스테롤, 캄페스타놀 및 시토스타놀일 수 있다. 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르는 바람직하게는 C₁₄-C₂₂, 바람직하게는 C₁₆-C₁₈ 포화 또는 불포화 지방산, 특히 올레산, 리놀레산, 리놀렌산, 팔미트산 및 스테아르산의 에스테르이다. 디아실글리세롤은 바람직하게는 1,3-디-지방 아실 글리세롤이다. 본 발명은 또한 주로 불포화 지방산 또는 주로 포화 지방산의 트리아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르가 농축된 조성물의 제조 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 조성물을 포함하는 식이 식품 보조제 및 영양 제품에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

플래트,도리트

이스라엘 17906 십위트 피.오. 박스 249

벤-드로르,가이

이스라엘 37910 모스하프 에인-아이런

파르카쉬,오를리

이스라엘 17906 십위트 피.오. 박스 217

호탐,엘자판

이스라엘 30900 지크론 야코프 시바니트 스트리트
1

골드슈미트,조하르

이스라엘 19125 모스하프 라마트-제비

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

오일 및 지방 중 하나 이상 내 피토스테롤 및 피토스타놀 중 하나 이상을 에스테르화하여, 오일 및 지방 중 하나 이상 내 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르 중 하나 이상 및 1,3-디아실글리세롤로 이루어진 생성물(혼합물 A라고 칭함)을 얻는 단계를 포함하며, 여기서 상기 생성물은 뚜렷하게 다른 두 분획, 즉 주로 불포화 지방산의 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르 중 하나 이상, 1,3-디아실글리세롤, 및 트리아실글리세롤을 포함하는 오일 분획, 및 주로 포화 지방산의 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르 중 하나 이상, 1,3-디아실글리세롤, 및 트리아실글리세롤을 포함하는 페이스트상 분획을 포함하는 것인,

식용 오일 및 식용 지방 중 하나 이상에 용해되거나 분산된, 1종 이상의 1,3-디아실글리세롤, 및 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르 중 하나 이상을 포함하는 조성물을 제조하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 오일 분획이 주로 불포화 지방산의 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르 중 하나 이상 10 내지 20중량%를 함유하고, 상기 페이스트상 분획이 주로 포화 지방산의 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르 중 하나 이상 30 내지 35중량%를 함유하는 것인 방법.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 상기 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르 중 하나 이상이 C_{14} - C_{22} 의 포화 또는 불포화 지방산의 에스테르인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 지방산이 C_{16} - C_{18} 의 포화 또는 불포화 지방산인 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 지방산이 올레산, 리놀레산, 리놀렌산, 팔미트산 및 스테아르산으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 21

제18항에 있어서, 상기 지방산이 C_{20} 및 C_{22} 불포화 지방산으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 22

제16항 또는 제17항에 있어서, 상기 피토스테롤이 베타-시토스테롤, 캄페스테롤, 스티그마스테롤, 브라시카스테롤로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 피토스타놀이 캄페스타놀 및 시토스타놀로 이루어진 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 23

(a) 오일 및 지방 중 하나 이상 내 피토스테롤 및 피토스타놀 중 하나 이상을 에스테르화하여, 제1 생성물(혼합물 A라고 칭함)을 얻는 단계로서, 여기서 제1 생성물은 뚜렷하게 다른 두 분획, 즉 주로 불포화 지방산의 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르 중 하나 이상, 1,3-디아실글리세롤, 및 트리아실글리세롤을 포함하는 오일 분획인 제1 분획, 및 주로 포화 지방산의 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르 중 하나 이상, 1,3-디아실글리세롤, 및 트리아실글리세롤을 포함하는 페이스트상 분획인 제2 분획을 포함하는 것인 단계; 및

(b) 상기 혼합물 A의 두 분획을 분리하여, 주로 포화 지방산의 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르 중 하나 이상, 1,3-디아실글리세롤, 및 트리아실글리세롤을 포함하는 제1 생성물(혼합물 B라고 칭함) 및 주로 불포화 지방산의 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르 중 하나 이상, 1,3-디아실글리세롤, 및 트리아실글리세롤을 포함하는 제2 생성물(혼합물 C라고 칭함)을 얻는 단계

를 포함하는, 포화 또는 불포화 지방산과의 피토스테롤 및 피토스타놀 중 하나 이상의 에스테르를 함유하는 생성물을 얻는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 혼합물 A의 두 분획의 분리를 원심분리에 의해 수행하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 혼합물 B내 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르 중 하나 이상을 추가로 농축하여, 주로 포화 지방산의 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르 중 하나 이상 50중량% 이상을 포함하는 생성물(혼합물 B1이라고 칭함)을 형성하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 혼합물 B를 헥산 처리에 의해 농축하는 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 혼합물 B를 톨루엔 처리에 의해 농축하여, 주로 포화 지방산의 98 중량% 이상의 순도를 갖는 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르 중 하나 이상(혼합물 B2라고 칭함)을 얻는 방법.

청구항 28

제23항에 있어서, 상기 혼합물 C내 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르 중 하나 이상을 추가로 농축하여, 주로 불포화 지방산의 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르 중 하나 이상 25중량% 이상을 포함하는 생성물(혼합물 C1이라고 칭함)을 얻는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 혼합물 C를 아세톤 처리에 의해 농축하는 방법.

청구항 30

제28항에 있어서, 상기 혼합물 C를 톨루엔 처리에 의해 농축하여, 주로 불포화 지방산의 순수한 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르 중 하나 이상(95중량% 이상)(혼합물 C2라고 칭함)을 얻는 방법.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 식용 오일 및(또는) 식용 지방에 용해되거나 분산된 디아실글리세롤(DAG), 주로 1,3-디아실글리세롤, 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르(PSE) 및 임의로 모노아실글리세롤을 포함하는 물질의 조성물, 이들의 제조 및 식품 산업에서 특히 식이 영양분으로서, 식품 보조제 및(또는) 성분으로서의 다양한 용도에 관한 것이다.
- <2> 더 구체적으로, 본 발명은 고정화된, 임의로는 계면활성제 코팅된 리파제를 사용하는, 오일내 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀의 알콜분해, 에스테르화반응 및(또는) 에스테르교환반응의 생성물에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 식용 오일 및(또는) 지방내 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르의 신규 혼합물에 관한 것이다. 이러한 혼합물은 일반적으로 주로 불포화 지방산의, 특히 디아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 함유하는 오일 분획, 및 주로 포화 지방산의 디아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 함유하는 페이스트상 분획을 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 혼합물의 추가의 분별에 의해 얻어지는, 오일 또는 지방내 디아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르의 다양한 신규 농축 혼합물을 제공한다. 본 발명은 또한 고도로 정제된 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르 및 상기 분별 방법에 의해 얻어지는 에스테르 혼합물에 관한 것이다.

배경기술

- <3> "피토스테롤"이란 용어는 식물 스테롤 및 식물 스타놀을 포함한다. 식물 스테롤은 음식물에 식물성 오일의 부성분으로서 존재하는 천연 물질이다. 식물 스테롤은 식물에서 포유동물의 콜레스테롤과 유사한 역할을 하는, 예컨대 세포막 구조를 형성하는 역할을 한다. 인간 영양학에서, 유리 식물 스테롤 및 유리 식물 스타놀이 유리하다.
- <4> 피토스테롤 및 피토스테롤 에스테르는 세가지 주요 산업 부문, 즉 제약, 화장품 및 영양 제품 부문에 널리 사용되고 있다. 인간 영양학에서, 피토스테롤은 혈청 콜레스테롤을 감소시킴으로써 심혈관 질환(CVD)의 위험을 감소시키는 것으로 나타났다(폴락(Pollak, O.J.)의 문헌[Circulation, 7, 702-706(1953)]). 피토스테롤은 지용성이 아니기 때문에, 지용성 피토스테롤 에스테르를 생성하기 위한 에스테르화 방법이 개발되었다. 피토스테롤 에스테르를 함유하는 입수가능한 일반적인 식품은 주로 오일, 마가린 및 다소의 유제품이다. 그밖의 현재 유통되는 많은 식품, 특히 소수의 파스타 및 초콜렛 제품은 피토스테롤 에스테르를 함유한다. 영양 제품에 피토스테롤 에스테르를 혼입하는 것은 중요하다고 생각되며, 예비 과콜레스테롤혈증, 및 스타틴과 함께 중증의 고콜레스테롤혈증의 경우에 표준 집단에서 혈청 콜레스테롤 감소 예방 치료법의 식이적 대안을 쉽게 제공한다.
- <5> 디아실글리세롤(DAG)
- <6> 디아실글리세롤은 지방 분자당 지방산을 3개가 아니라 단지 2개 함유한다. 두 지방산의 주요 부분은 주로 지방 분자의 양 말단(일반적으로 1,3 위치로 칭함)에 위치한다. 영양학에서, 독특한 위치의 지방산을 갖는 디아실글리세롤의 이러한 조성물은 중요한 차이를 갖는다. 신체는 DAG 오일을 통상적인 오일과 똑같이 소화한다. 그러나, DAG 오일의 두 지방산의 원래 위치로 인해, 소화 성분 중 하나가 다르다. 소화관은 이러한 소화 성분을 사용한 유사 고지방 입자를 선호하지 않으며, 이는 DAG 오일을 함유하는 식사 후 혈액내의 더 낮은 수치의 고지방

입자에 의해 알 수 있다. 그 결과, 소화 성분은 소화관에서 완전히 분해된다. 이 차이는 신체로 하여금 흡수 후 지방 저장보다는 에너지를 위해 지방산의 상기 부분을 사용하도록 한다. 인간에서의 DAG 오일의 추가 연구 결과, DAG 오일 20g의 소비 후, 혈액내 고지방 입자의 수는 통상적인 오일에 비하여 줄어든 것으로 관찰되었다(다구치(Taguchi, H.) 등의 문헌[J. Am. Coll. Nutr.(2000 Nov-Dec) 19(6):789-96]). DAG 오일 소비 후 고지방 입자의 수준은 식사 후 고지방 입자의 최고 수준에서 통상적인 오일보다 약 50% 적다. 연구자들은 혈관 건강에 대한 식사 후 지방 수준의 영향을 알고 있으므로, DAG 오일의 이러한 양상은 훨씬 더 유리할 수 있다. 높은, 특히 과도한 체중 및 비만도(BMI)를 갖는 사람에서, DAG 오일의 장기간 소비는 체중 및 신체 지방 변화에 영향을 줄 수 있다. 초기 연구는 통상적인 오일 대신에 DAG 오일을 1일 10 내지 25g 소비하였을 때 체중 및 신체 지방 손실이 크게 일어날 수 있음을 나타낸다(나가오(Nagao, T.) 등의 문헌[J. Nutr. 130(4):792-7(2000)]). DAG 오일은 일본 정부에 의해 식사 후 혈중 지방 및 체중에 관한 특별 건강 용도가 승인되었다. 또한, 일본 의사 협회는 건강식의 일부로서 DAG 오일을 공식 권장하였다. 미국에서는, DAG 오일이 전문가 고찰에 의해 일반적으로 안전하다고 인정(GRAS)되어 있고, 요리 오일 및 스프레드(spread)로서 시판될 수 있다. 초기 연구 결과, 체중 및 총 비만도 변화는 미국 과체중 성인 환자에서(문헌[FASEB J. 15(4):A301(2001)]) 일본 환자에서와 같이 동일한 유리한 방식으로 반응할 수 있는 것으로 나타났다.

- <7> WO 01/32035호에는 식물 스타놀 에스테르 및(또는) 식물 스테롤 에스테르를 포함하는, 특히 높은 등급의 올리브유(버진(virgin) 올리브유)를 기본으로 하는 올리브유계 제품이 교시되어 있다.
- <8> 미국 특허 제5,843,499호에는 페룰레이트 에스테르(페룰산으로 에스테르화되는 피토스테롤 에스테르), 특히 시토스테인 에스테르를 함유하는, 콜레스테롤 저하 활성을 갖는 것으로 나타난 옥수수 섬유로부터 추출가능한 오일이 개시되어 있다. 옥수수 섬유 오일(약 73% 지방(트리아실글리세롤), 8% 스테롤(지방산 아실) 에스테르, 4% 지방 스테롤, 6% 디아실글리세롤 및 6% 페룰레이트(스테롤 에스테르)를 함유함)은 콜레스테롤 수준을 감소시키기 위한 식품 보조제에 첨가제로서 사용됨이 언급되어 있다.
- <9> 미국 특허 제6,326,050호에는 오일 또는 지방, 오일 또는 지방에 용해되거나 분산된 디아실글리세롤, 유리 피토스테롤 및 토코페롤로 이루어진 조성물이 개시되어 있다.
- <10> 상기 문헌 중 어느 것도 오일 및(또는) 지방내 피토스테롤 에스테르 및 디아실글리세롤의 혼합물을 기술하고 있지 않다.
- <11> 또한, 종래 기술은 임의의 천연 오일 또는 지방에 디아실글리세롤 및 피토스테롤 또는 피토스타놀 에스테르를 농축함을 기술하지 않고 있다.
- <12> WO 01/75083호에는 고정화된, 임의로는 계면활성제 코팅된 리포제를 사용하여, 지방계 생성물내 유리 스테롤(피토스테롤 포함)의 선택적 알콜분해 또는 에스테르화(에스테르교환반응) 방법이 기술되어 있다. 반응은 지방계 생성물에 함유된 트리아실글리세롤의 존재하에, 임의로는 하나 이상의 카르복실 지방산 또는 그의 에스테르 유도체의 첨가 후에 일어난다. 이 문헌에 정의된 바와 같이, "선택적 알콜분해"란 그 과정이 오일계 또는 지방계 생성물, 예컨대 유지방에 존재하는 트리아실글리세롤의 글리세롤 주쇄의 지방 아실 기의 동일성 또는 위치 분포에 중요한 변화를 일으킴이 없이, 유리 스테롤의 알콜분해 또는 에스테르화를 일으킴을 뜻한다. 이 문헌은 전술한 방법에 의해 얻어진 변형된 유지방 조성물 및 저콜레스테롤 식품 제제를 기술하며, 또한 피토스테롤 에스테르가 농축된 동일 반응계내에서 얻어진 지방계 생성물을 기술한다. 그러나, WO 01/75083호는 상기 선택적 에스테르화 반응에 의해 얻어진 제품의 조성 및 성분 또는 이들의 물성에 대하여 어떠한 상세한 설명도 제공하지 않으며, 디아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르 또는 상응하는 농축 제품의 얻어진 혼합물의 개선된 사용을 위한, 얻어진 제품의 특정한 농축 단계를 교시하지도 제안하지도 않는다.
- <13> 상기로부터, 본 발명의 목적은 임의로 모노아실글리세롤을 추가로 함유할 수 있는, 오일 및(또는) 지방내 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르 및 디아실글리세롤로 이루어진 식용 조성물을 제공하는 것이다.
- <14> 본 발명의 또 하나의 목적은 식이 영양 보조제(식품 첨가물)로서 또는 영양 제품내 성분으로서 상기 조성물을 제공하는 것이다.
- <15> 본 발명의 또 하나의 목적은 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀의 효소적 에스테르교환반응에 의해(여기서, 오일 및(또는) 지방에 함유된 트리아실글리세롤은 아실 공여체로서 작용함), 또는 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르 및 디아실글리세롤을 오일 및(또는) 지방과 단순히 혼합 또는 블렌딩함으로써 상기 조성물을 제조하는 것이다.
- <16> 본 발명의 또 하나의 목적은 추가의 농축을 위하여 더 분별될 수 있는, 오일 또는 지방내 디아실글리세롤 및 피

피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르의 혼합물을 제공하는 것이다.

- <17> 본 발명의 또 다른 목적은 포화 지방산의 디아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르의 다양한 농축 혼합물을 제공하는 것이다.
- <18> 본 발명의 또 하나의 목적은 불포화 지방산의 디아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르의 다양한 농축 혼합물을 제공하는 것이다.
- <19> 본 발명의 또 다른 목적은 고도로 정제된 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 제공하는 것이다.
- <20> 본 발명의 또 하나의 목적은 오일 및(또는) 지방내 미리 정해진 조성의 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르 및 디아실글리세롤로 이루어진 조성물을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- <21> 본 발명의 상기 목적 및 다른 목적은 설명이 진행됨에 따라 분명해질 것이다.
- <22> **발명의 요약**
- <23> 본 발명은 식용 오일 및(또는) 식용 지방에 용해되거나 분산된 1종 이상의 디아실글리세롤 및 하나 이상의 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- <24> 본 발명에 따른 조성물은 바람직하게는 식용 오일 및(또는) 식용 지방에 용해되거나 분산된 디아실글리세롤 1 내지 99중량% 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르 1 내지 99중량%를 포함하며, 임의로 모노아실글리세롤을 추가로 포함할 수 있다.
- <25> 특정한 실시양태에서, 본 발명에 따른 조성물은 디아실글리세롤 1 내지 99중량%, 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르 1 내지 99중량% 및 모노아실글리세롤 0 내지 50중량% 및 트리아실글리세롤 1 내지 99중량%를 포함한다. 더 특히, 본 발명에 따른 조성물은 디아실글리세롤 3 내지 50중량%, 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르 7 내지 48중량% 및 트리아실글리세롤 2 내지 90중량%를 포함한다.
- <26> 피토스테롤 에스테르는 베타-시토스테롤, 캄페스테롤, 스티그마스테롤 및 브라시카스테롤 에스테르로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 피토스타놀 에스테르는 스티그마스테롤, 캄페스타놀 및 시토스타놀로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- <27> 특정한 실시양태에서, 상기 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르는 C₁₄-C₂₂, 바람직한 C₁₆-C₁₈ 포화 또는 불포화 지방산, 특히 올레산, 리놀레산, 리놀렌산, 팔미트산 및 스테아르산의 에스테르이다.
- <28> 디아실글리세롤은 바람직하게는 1,3-디-지방 아실 글리세롤이다.
- <29> 식용 오일 베이스는 바람직하게는 아마인유, 채종유, 옥수수유, 올리브유, 코코아 버터, 미강유, 대두유, 야자유, 인유, 피마자유, 면실유, 코코넛유, 땅콩유, 해바라기유, 아보카도유, 홍화유 및 어유로 이루어진 군에서 선택된다.
- <30> 식용 지방은 바람직하게는 유지방 및 동물 지방, 특히 라드로 이루어진 군에서 선택된다.
- <31> 또 하나의 실시양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 조성물을 포함하는 식이 식품 보조제 및 영양 제품에 관한 것이다.
- <32> 또 하나의 실시양태에서, 본 발명은 오일 및(또는) 지방내 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀을 에스테르화하여, 오일 및(또는) 지방내 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르 및 디아실글리세롤로 이루어진 생성물(혼합물 A라고 칭함)을 제공하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 생성물은 뚜렷하게 다른 두 분획, 즉 주로 불포화 지방산의 디아실글리세롤, 트리아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 포함하는 오일 분획, 및 주로 포화 지방산의 디아실글리세롤, 트리아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 포함하는 페이스트상 분획을 포함하는, 본 발명에 따른 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.
- <33> 본 발명의 방법에서, 오일 분획은 주로 불포화 지방산의 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르 약 10 내지 20중량%를 함유하고, 페이스트상 분획은 주로 포화 지방산의 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르 약 30 내지 35중량%를 함유한다.
- <34> 본 발명의 방법에서 사용된 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르는 C₁₄-C₂₂, 바람직한 C₁₆-C₁₈ 포화 또는 불포화 지방산, 특히 올레산, 리놀레산, 리놀렌산, 팔미트산 및 스테아르산의 에스테르이다. 특정 피토스테롤은 베타-시토스테롤, 캄페스테롤, 스티그마스테롤 및 브라시카스테롤로 이루어진 군에서 선택되고, 특정 피토스타

놀은 캄페스타놀 및 시토스타놀로 이루어진 군에서 선택된다.

- <35> 다른 실시양태에서, 본 발명은 (a) 오일 및(또는) 지방내 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르화하여, 뚜렷하게 다른 두 분획(제1 분획은 주로 불포화 지방산의 디아실글리세롤, 트리아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 포함하는 오일 분획이고, 제2 분획은 주로 포화 지방산의 디아실글리세롤, 트리아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 포함하는 페이스트상 분획임)을 포함하는 제1 생성물(혼합물 A라고 칭함)을 얻는 단계, 및 (b) 혼합물 A의 두 분획을 분리하여, 주로 포화 지방산의 디아실글리세롤, 트리아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 포함하는 제1 생성물(혼합물 B라고 칭함) 및 주로 불포화 지방산의 디아실글리세롤, 트리아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 포함하는 제2 생성물(혼합물 C라고 칭함)을 얻는 단계를 포함하는, 포화 또는 불포화 지방산의 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 함유하는 생성물을 얻기 위한 방법에 관한 것이다.
- <36> 혼합물 A의 두 분획의 분리는 원심분리에 의해 수행될 수 있다.
- <37> 혼합물 B내의 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르의 함량은 더 농축되어 주로 포화 지방산의 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르 50중량% 이상을 포함하는 생성물(혼합물 B1이라고 칭함)을 형성할 수 있다. 따라서, 혼합물 B는 헥산 처리에 의해 농축되거나 또는 톨루엔 처리에 의해 농축되어, 주로 포화 지방산의 실질적으로 순수한 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르(98중량% 이상)(혼합물 B2라고 칭함)를 제공할 수 있다.
- <38> 혼합물 C내의 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르의 함량은 더 농축되어 주로 불포화 지방산의 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르 25중량% 이상을 포함하는 생성물(혼합물 C1이라고 칭함)을 제공할 수 있다. 따라서, 혼합물 C는 아세톤 처리에 의해 또는 톨루엔 처리에 의해 농축되어, 주로 불포화 지방산의 순수한 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르(95중량% 이상)(혼합물 C2라고 칭함)를 제공할 수 있다.
- <39> 본 발명은 또한 특히 청구항 20 및 청구항 22의 방법에 의해 얻어지는, 혼합물 B, 혼합물 B1, 혼합물 B2, 혼합물 C, 혼합물 C1 및 혼합물 C2에 관한 것이다.
- <40> 또한, 본 발명은 주로 불포화 지방산 및(또는) 주로 포화 지방산의 디아실글리세롤, 트리아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 포함하는, 식이 영양제, 영양 제품 또는 식품 보조제에 관한 것이다. 식이 영양제, 영양 제품 또는 식품 보조제는 모노아실글리세롤을 추가로 포함할 수 있다.
- <41> 본 발명은 또한 투여 단위형, 바람직하게는 정제 또는 캡슐제 형태의 식이 영양제, 영양 제품 또는 식품 보조제에 관한 것이다.
- <42> 본 발명에 따른 식이 영양제 또는 영양 제품은 저콜레스테롤 버터, 코코아 버터, 무수 유지방, 아이스크림, 커피 화이트너(coffee whitener) 및 크림, 유제품, 특히 치즈 및 기타 콜레스테롤 함유 식품 중 임의의 하나일 수 있다.

발명의 상세한 설명

- <53> 더욱 더 유리한 식품 보조제에 대한 연구에서, 본 발명자들은 놀랍게도 오일 및(또는) 지방 베이스내 디아실 글리세롤, 주로 1,3-디아실 글리세롤(DAG) 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르(PSE)의 혼합물에 도달하였고, 이는 본 발명의 목적이다. 피토스테롤 및 디아실글리세롤의 혼합물의 다양한 혼합물은 공지되어 있지만(예컨대, 미국 특허 제6,326,050호), 피토스테롤 에스테르 및 디아실글리세롤의 혼합물은 신규하며, 예상외로 디아실글리세롤 및 유리 피토스테롤의 공지의 혼합물에 비하여 몇가지 이점을 갖는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 종래의 유리 피토스테롤 대신에 피토스테롤 에스테르를 사용하여, 혼합물내 이들의 농도를 증가시키는 것이 더 쉽다. 또한, 결정질 식물 스테롤은 소화관내 고질상에 유의적인 정도로 용해되지 않으므로, 콜레스테롤 흡수를 효율적으로 저해할 수 없다. 게다가, 오일 및 지방은 단지 제한된 정도로만 유리 스테롤을 용해할 수 있다. 스테롤은 단지 용해된 형태로만 콜레스테롤의 흡수를 저해한다.
- <54> 따라서, 본 발명의 주요 특징은 식용 오일 및(또는) 식용 지방 베이스에 용해되거나 분산된 디아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르로 본질적으로 이루어진 조성물이다. 본 발명의 조성물은 식품 산업에서 식이 영양제로서, 식품 보조제로서 및(또는) 성분으로서 유용할 수 있다.
- <55> 본 발명의 조성물은, 예컨대 WO 01/75083호에 기술된 선택적 알콜분해 또는 에스테르(교환)화 방법에 의해 얻어질 수 있다. 본 발명에 이르러, WO 01/75083호에 기술된 선택적 피토스테롤 에스테르화 또는 유사한 방법에 의해 얻어질 수 있는 오일 생성물은 두 분획으로 이루어지며, 이들은 각각 디아실글리세롤 및 상이한 유형의 피토

스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 함유하는 것으로 밝혀졌다. 더 특히, 선택적 알콜분해 또는 에스테르 교환반응 생성물은 두 분획(오일 및 페이스트)으로 이루어진 혼합물이며, 포화 지방산의 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르는 실질적으로 한쪽 분획에 함유되는 한편, 불포화 지방산의 에스테르는 실질적으로 다른쪽 분획에 함유된다.

- <56> 따라서, 본 발명은 또한 오일 및(또는) 지방내 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀을 에스테르화하여, 오일 및(또는) 지방내 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르 및 디아실글리세롤로 이루어진 생성물(혼합물 A라고 칭함)을 생성하는 단계를 포함하는, 상기 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 이 생성물은 뚜렷하게 다른 두 분획(층), 즉 주로 불포화 지방산의 디아실글리세롤, 트리아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 함유하는 오일 분획, 및 주로 포화 지방산의 디아실글리세롤, 트리아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 함유하는 페이스트상 분획(스프레드)을 포함한다. 두 분획을 분리하여, 주로 포화 지방산의 디아실글리세롤, 트리아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 포함하는 하나의 생성물(혼합물 B라고 칭함) 및 주로 불포화 지방산의 디아실글리세롤, 트리아실글리세롤 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 포함하는 또 다른 생성물(혼합물 C라고 칭함)을 제공한다.
- <57> 또한 본 발명에 따라, 혼합물 B 및 C내의 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르의 함량을 임의로 추가로 농축할 수 있다. 중요하게는, 본 발명은 임의의 천연 오일에 스테롤-에스테르 및 디아실글리세롤을 농축할 수 있다.
- <58> 혼합물 B 및 C는 각 층에 함유된 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르의 추가의 농축 단계에 적용될 수 있다.
- <59> 또 하나의 실시양태에서, 본 발명의 분별 방법은 혼합물 A를 농축하여 다음과 같이 다양한 신규 혼합물을 제공함을 포함한다:
- <60> (i) 주로 포화 지방산 에스테르, 바람직하게는 C_{14} - C_{22} 포화 지방산, 및 특히 C_{16} - C_{18} 포화 지방산 에스테르로 이루어진, 디아실글리세롤 약 3 내지 50중량% 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르 약 7 내지 48중량%를 포함하는 페이스트(본원에서 혼합물 B라고 칭함);
- <61> (ii) 주로 불포화 지방산 에스테르, 바람직하게는 C_{14} - C_{22} 불포화 지방산, 및 특히 C_{16} - C_{18} 불포화 지방산 에스테르로 이루어진, 디아실글리세롤 약 3 내지 50중량% 및 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르 약 7 내지 48중량%를 포함하는 오일(본원에서 혼합물 C라고 칭함);
- <62> (iii) 주로 포화 지방산 에스테르, 바람직하게는 C_{14} - C_{22} 포화 지방산, 및 특히 C_{16} - C_{18} 포화 지방산 에스테르로 이루어진 피토스테롤 에스테르 약 60중량%를 포함하는 고체(본원에서 혼합물 B1이라고 칭함);
- <63> (iv) 주로 불포화 지방산 에스테르, 바람직하게는 C_{14} - C_{22} 불포화 지방산, 및 특히 C_{16} - C_{18} 불포화 지방산 에스테르로 이루어진, 피토스테롤 에스테르 약 30 내지 35중량%를 포함하는 페이스트(본원에서 혼합물 C1이라고 칭함);
- <64> (v) 주로 포화 지방산 에스테르, 바람직하게는 C_{14} - C_{22} 포화 지방산, 및 특히 C_{16} - C_{18} 포화 지방산 에스테르로 이루어진, 고도로 정제된 피토스테롤 에스테르(본원에서 혼합물 B2라고 칭함);
- <65> (vi) 주로 불포화 지방산 에스테르, 바람직하게는 C_{14} - C_{22} 불포화 지방산, 및 특히 C_{16} - C_{18} 불포화 지방산 에스테르로 이루어진, 고도로 정제된 피토스테롤 에스테르(본원에서 혼합물 C2라고 칭함).
- <66> 이러한 피토스테롤 에스테르의 다양한 혼합물은, 예를 들어 식품 산업에서,식이 영양제와 같은 최종 제품, 및 영양 제품의 기능성 성분 및 식품 보조제로서 광범위한 용도로 유용할 수 있다.
- <67> 언급된 바와 같이, 본 발명의 혼합물은 또한 식용 오일 및(또는) 지방내 디아실글리세롤 및 피토스테롤 또는 피토스타놀 에스테르를 단순히 블렌딩함으로써 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명은 식용 오일 및(또는) 지방내 디아실글리세롤 및 피토스테롤 또는 피토스타놀 에스테르의 다양한 블렌드를 제공한다. 본 발명에 따라, 이들 블렌드는 피토스테롤 또는 피토스타놀 에스테르 1 내지 99중량%, 디아실글리세롤 1 내지 99중량% 및 모노아실글리세롤 0 또는 50중량%, 바람직하게는 디아실글리세롤 3 내지 50중량% 및 피토스테롤 또는 피토스타놀 에스테르 7 내지 48중량%를 함유할 수 있다.
- <68> 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르의 유형이 예정된 조성물을 제조하는 능력은 매우 중요하다. 더 구체

적으로, 본 발명에 따라 에스테르화 과정 동안 특정 오일 및(또는) 지방에 바람직한 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀을 첨가함으로써, 조성물내 피토스테롤 및 피토스타놀 에스테르가 예정된 조성물을 제조하는 것이 가능하다. 에스테르화 과정 후, 오일 및 페이스트상 분획의 분리는 불포화 지방산 잔기를 함유하는, 주로 바람직한 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르로 이루어진 조성물, 및(또는) 포화 지방산 잔기를 함유하는, 주로 바람직한 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르로 이루어진 조성물을 제공한다. 오일 및(또는) 지방내 트리아실글리세롤은 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르화 방법에서 지방 아실 기의 내부 공급원으로서 작용할 수 있다. 선택적으로 또는 추가로, 유리 지방산 및(또는) 이들의 유도체는 아실 기의 외부 공급원으로서 작용할 수 있다.

<69> 본 발명의 정제 및 농축 공정은 또한 고도로 정제된 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀 에스테르를 제공할 수 있다.

<70> 본 발명의 조성물 및 영양제는 단위 투여형으로 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여가능한 투여형은 정제 또는 캡슐제일 수 있다. 경구 투여를 위한 각각의 투여형은 1일 권장량의 본 발명의 혼합물, 또는 그의 일부분 또는 배가물을 함유할 수 있다. 권장량은 일반적으로 주치의 또는 영양사에 의해 결정되고, 예기된 소비자의 연령, 성별, 체중 및 전체적인 상태에 의존할 것이다.

<71> 정제의 제조에 있어서, 고체 제형을 제조하는데 일상적으로 사용되는 임의의 약학 담체, 예를 들어 마그네슘 스테아레이트, 전분, 백도토, 활석, 젤라틴, 아라비아 고무, 스테아르산, 락토즈 및 슈크로즈가 사용될 수 있다. 캡슐제의 제조에 있어서, 경질 젤라틴 캡슐 껍질에 상기 담체를 사용하는 것과 같은 임의의 일상적인 캡슐화가 적합하다. 연질 젤라틴 껍질 캡슐은 또한 분산액 또는 현탁액을 제조하는데 일상적으로 사용되는, 연질 젤라틴 캡슐 껍질에 혼입될 수 있는 임의의 약학 담체, 예를 들어 수성 겔, 셀룰로즈, 실리케이이트 또는 오일을 사용하여 제조될 수 있다.

<72> 본 발명의 설명에서, 디글리세라이드 및 디아실글리세롤이란 용어는 호환적으로 사용되며, 상 및 분획, 및 페이스트, 페이스트상 및 스프레드도 그러하다.

<73> 본 발명은 본원에 개시된 특정 실시예, 공정 단계 및 물질에 제한되지 않으며, 이러한 공정 단계 및 물질은 다소 변할 수 있음을 알아야 한다. 또한, 본 발명의 범주는 첨부된 청구의 범위 및 그의 등가물에 의해서만 제한될 것이기 때문에, 본원에 사용된 용어는 단지 특정 실시양태를 기술할 목적으로 사용된 것이지, 본 발명을 제한하려는 것은 아님을 알아야 한다.

<74> 본 명세서 및 첨부된 청구의 범위에 사용된 바와 같이, "하나의" 및 "그"란 단수형은 내용을 분명하게 달리 기술하지 않는 한 다수의 대상을 포함함을 알아야 한다.

<75> 본 명세서 및 첨부된 청구의 범위 전체에 걸쳐서, 문맥이 달리 요구하지 않는한, "포함"이란 단어 및 "포함한다" 및 "포함하는"과 같은 변형은 기술된 완전체 또는 단계, 또는 완전체 또는 단계의 군을 포함함을 뜻하는 것이지, 임의의 다른 완전체 또는 단계, 또는 완전체 또는 단계의 군을 제외함을 뜻하지 않음을 알아야 할 것이다.

<76> 하기 실시예는 본 발명의 양상을 수행하는 데 있어서 본 발명자들이 사용한 대표적인 기법이다. 이들 기법은 본 발명의 실시예 바람직한 실시양태의 예이며, 당업자라면 본 개시내용에 비추어 볼 때 본 발명의 소기의 범주로부터 벗어남이 없이 다수의 변형이 이루어질 수 있음을 인지할 것을 알아야 한다.

실시예

<77> 방법

<78> (1) 생성물의 제조: 혼합물 A 및 분획 B 및 C

<79> 혼합물 A는 유리 지방산 및(또는) 상응하는 모노-, 디아실- 또는 트리아실-글리세롤의 존재하에 오일내 피토스테롤 및(또는) 피토스타놀의 직접 에스테르화 및(또는) 알콜분해+에스테르교환반응 후 얻어지는 혼합물로서 정의된다.

<80> 반응은 배치식으로 수행된다. 계면활성제 코팅된 고정화 리파제 및 피토스테롤 또는 식물 스타놀을 오일 또는 지방에 첨가한다. 전형적인 혼합물은 촉매 1부에 대하여 오일 1 내지 10부 및 피토스테롤(또는 식물 스타놀) 1부에 대하여 오일 1 내지 10부를 함유한다. 그 다음, 반응 혼합물을 혼합하고 5 내지 96시간 동안, 바람직하게는 10 내지 48시간 동안 35 내지 70℃, 바람직하게는 50 내지 60℃로 가열한다. 피토스테롤 또는 피토스타놀의

피토스테롤 에스테르 또는 피토스타놀 에스테르로의 변환은 기체 크로마토그래프에 의해 결정된다. 배치로부터 반응 혼합물(촉매 없이)의 샘플을 칭량하여 취하고, 하기 기술된 방법에 따라 n-헥산 또는 톨루엔에 20 내지 60 mg/mL의 농도로 희석하고 GC에 바로 주사한다. 유리 피토스테롤 또는 피토스타놀의 농도는 정량적으로 결정하고(보정 곡선에 따라), 변환율은 피토스테롤의 초기 농도에 비해 계산한다. 반응은 일반적으로 70 내지 100%, 전형적으로 85 내지 95%의 변환율에서 중지된다.

- <81> 따라서, 혼합물 A는 피토스테롤 에스테르 및 에스테르화를 겪지 않은 유리 피토스테롤의 잔사를 함유할 것이다.
- <82> 또한, 피토스테롤과 천연 지방 또는 오일 사이의 반응에서 생성된 혼합물 A는 디아실글리세롤, 모노아실글리세롤 및 약간의 유리 지방산을 함유할 것이다. 디아실글리세롤 및 모노아실글리세롤의 농축은 트리아실글리세롤로부터 피토스테롤 에스테르 형태로의 지방산의 "공여"를 통해 달성된다.
- <83> 반응이 끝나면, 촉매를 반응 온도에서의 고온 여과에 의해 오일로부터 제거한다. 실온 이하로 냉각한 후, 얻어진 혼합물 A는 뚜렷하게 다른 별개의 두 상(분획으로도 부름)을 갖는 고체 액체 슬러리를 형성한다: 혼합물 B: 페이스트상 상; 및 혼합물 C: 오일 상.
- <84> 두 상은 이들이 함유하는 피토스테롤 에스테르의 유형에 의해 다르다. 오일 상(분획 C)은 올레산, 리놀레산 및 리놀렌산과 같은 불포화 지방산의 에스테르가 농축되는 반면에, 스프레드 상(분획 B)은 팔미트산 및 스테아르산과 같은 포화 지방산의 에스테르가 농축된다.
- <85> 혼합물 A의 분획 B 및 분획 C로의 분리는 3,000 내지 14,000g 및 10 내지 25℃에서 5 내지 60분, 바람직하게는 10 내지 30분 동안 혼합물 A를 원심분리함으로써 얻을 수 있다.
- <86> 분획 B는 저부 상으로서 페이스트상 형태로 얻어지고, 분획 C는 상부 상으로서 투명 오일로서 얻어진다.
- <87> 분획 C를 실온에서 1 내지 10일 동안 놔두면 페이스트의 추가의 잔여 침전 및 오일 투명성의 손실이 일어날 수 있다. 투명 형태는 2차 원심분리 또는 여과에 의해 얻어질 것이다.
- <88> 도 3은 혼합물 A의 기체 크로마토그램을 나타내고, 60℃에서 일어난 목재 피토스테롤 및 해바라기유 사이의 반응을 형성한다. 혼합물은 해바라기유로부터 유도된 피토스테롤(16.136 내지 15.413분에서 6개의 주 피크), 오일의 트리아실글리세롤(17.083 및 16.707), 디아실글리세롤(12.642), 피토스테롤(11.663 내지 11.182에서 3개의 주 피크) 및 유리 지방산(9.586, 8.686, 6.69)을 포함한다.
- <89> 도 4는 혼합물 B의 기체 크로마토그램을 나타낸다. 혼합물은 소량의 불포화 지방산의 피토스테롤 에스테르(16.335, 16.159, 16.044)를 갖는 포화 지방산의 피토스테롤 에스테르(15.966, 15.751, 15.361), 오일로부터 유도된 트리아실글리세롤(16.904, 17.26), 디아실글리세롤(12.348), 피토스테롤(11.861, 11.580, 11.215) 및 소량의 유리 지방산을 포함한다. 이 혼합물내 스테롤 에스테르의 총량은 31중량%이다.
- <90> 도 5는 혼합물 C의 기체 크로마토그램을 나타낸다. 혼합물은 불포화 지방산의 피토스테롤 에스테르(16.009, 15.825, 15.686), 오일로부터 유도된 트리아실글리세롤(16.981, 16.597), 디아실글리세롤(12.506), 피토스테롤(11.526, 11.242, 11.043) 및 소량의 유리 지방산을 포함한다. 이 혼합물내 스테롤 에스테르의 총량은 15중량%이다.
- <91> 천연 오일 및 지방의 예는 식물 및 식물성 오일(아마인유, 채종유, 옥수수유, 올리브유, 코코아 버터, 미강유, 대두유, 야자유, 인유, 피마자유, 면실유, 코코넛유, 땅콩유, 해바라기유 등), 동물성 오일(유지방, 어유 등)이다.
- <92> 피토스테롤 및 피토스타놀의 예는 베타-시토스테롤, 캄페스테롤, 스티그마스테롤 및 브라시카스테롤, 및 스티그마스테롤, 캄페스타놀 및 시토스타놀이다.
- <93> **(2) 기체 크로마토그래피**

- <94> 피토스테롤, 피토스타놀, 피토스테롤 에스테르, 피토스타놀 에스테르, 지방산 및 트리아실글리세롤의 농도는 불꽃 이온화 검출기가 장착된 기체 크로마토그래프, HP-5890에 의해 결정되었다. 다음의 분리 조건하에 모세관 칼럼 콰덱스(Quardex) 400-1HT를 사용하였다: 주사기 및 검출기 온도는 350℃로 유지시켰고, 초기 칼럼 온도는 160℃이고, 2분간의 등온 후; 오븐 온도를 5℃/분의 속도로 180℃까지 상승시켰고; 그 후, 오븐 온도를 20℃/분의 속도로 400℃까지 상승시킨 후, 10분간 등온을 유지하였다.

- <95> **(3) 혼합물 B 및 C 사이의 분별의 추가 설명**

- <96> 혼합물 B 및 C의 분별을 추가로 알기 위하여, 지방산 조성이 다른 다양한 유형의 오일을 가지고 반응을 수행하였다. 각각의 오일 공급원에 대하여 전술한 반응을 수행하고, 분획 B, C를 분리하고, 칭량한다.
- <97> 하기 표 1은 상이한 오일내 피토스테롤과 대두 공급원의 에스테르화 반응으로부터 얻어진 오일상 분획(B) 및 스프레드 분획(C)의 중량%를 나타낸다. 반응은 진탕 배양기에서 24시간 동안 50℃에서 수행하였고, 피토스테롤:오일 중량비는 1:9이고, 촉매:오일 중량비는 1:5였다.

표 1

- <98> 상이한 식물성 오일내 대두 피토스테롤의 에스테르화로부터 얻어진 분획 B(스프레드) 및 C(오일)의 질량 분율

반응에 사용된 오일의 유형	식용 오일내 포화 지방산(중량%)	오일상(혼합물 C) 질량 분율(중량%)	스프레드상(혼합물 B) 질량 분율(중량%)
순수한 트리올레인*	0	100	0
어유**	1	100	0
카놀라***	9.2	93	7
해바라기***	11.0	91.5	8.5
대두***	15.8	80	20
올리브****	19.8	76	24
* 표준 트리올레인 순도>99%-시그마(Sigma) ** 에팍스(Epax) 2050-"프로노바(Pronova)" *** 상업용 정류 공급원 **** 엑스트라 버진(Extra virgin) 올리브유			

- <99> 표 1로부터 스프레드상(혼합물 B)의 질량 분율이 이 경우 지방산 공급원 대 오일내 포화 지방산 비가 증가함에 따라 증가함이 분명히 나타난다.
- <100> 또한, 혼합물 A 및 분획 B 및 C를 추가로 분석하여 피토스테롤 에스테르 분자내 지방산의 조성 차이를 평가한다.
- <101> 혼합물로부터의 피토스테롤 에스테르의 정제는 메르크(Merck) 실리카 겔 60(0.04 내지 0.063 μ m) 및 용매로서 석유 에테르:에테르 혼합물(에테르 2 내지 10%)을 사용하여 기체 칼럼 크로마토그래피에 의해 달성한다. 이 분리 시스템에서, 피토스테롤 에스테르가 최초로 용출되고 정제하기에 쉽다.
- <102> 피토스테롤 에스테르를 함유하는 분획을 합하고, 순수한 피토스테롤 에스테르 분획내 지방산을 AOC 방법 Ce-2-66을 적용하여 메틸 에스테르로 옮겼다. 메틸 에스테르의 분리 및 정량은 내부 기준물질을 사용하여 모세관 기체 크로마토그래피에서 수행하였다.
- <103> 하기 표 2는 분획 결과물에 대한 기준물질로서 선택된 식물성 오일의 지방산 조성을 나타낸다.
- <104> 하기 표 3 내지 5는 상이한 유형의 오일과의 반응으로부터 얻어진 혼합물 A, B 및 C의 지방산 조성을 나타낸다.
- <105> SFA는 포화 지방산을 나타내고, MUFA는 일포화 지방산을 나타내고, PUFA는 다중포화 지방산을 나타낸다. 반응 조건은 표 1에 대하여 기술된 것과 유사하다.

표 2

- <106> 식물성 오일 공급원의 지방산 함량

오일 유형	오일내 지방산 조성		
	SFA 중량%	MUFA 중량%	PUFA 중량%
올리브	20	69.5	10.5

카놀라	9	55	36
대두	16	23.5	60.5
해바라기	11	27.5	61.5

표 3

혼합물 A에서 얻어진 피토스테롤 에스테르의 지방산 함량

오일 유형	피토스테롤 에스테르의 지방산 조성		
	SFA 중량%	MUFA 중량%	PUFA 중량%
올리브	17	64	19
대두	11	25	64

표 4

혼합물 B(스프레드상)에서 얻어진 피토스테롤 에스테르의 지방산 함량

오일 유형	피토스테롤 에스테르의 지방산 조성		
	SFA 중량%	MUFA 중량%	PUFA 중량%
올리브	32	53	15
카놀라	30	45	26
대두	41	17	42
해바라기	43	17	40

표 5

혼합물 C(오일-액체상)에서 얻어진 피토스테롤 에스테르의 지방산 함량

오일 유형	피토스테롤 에스테르의 지방산 조성		
	SFA 중량%	MUFA 중량%	PUFA 중량%
올리브	6	73	21
카놀라	4	59	37
대두	5	26	69
해바라기	4	25	67

표 2 내지 5에 제시된 데이터는 하기 1 내지 4를 나타낸다:

1. 표 2와 3을 비교하면, 피토스테롤 에스테르내 포화 지방산 대 불포화 지방산의 비는 반응에 사용되는 오일의 지방산 조성에 의존함을 알 수 있다. 달리 말하면, 혼합물 A의 (MUFA+PUFA)/SFA(표 3)는 천연 오일내 동일한 비(표 2)와 매우 유사하다고 할 수 있다.

2. 표 4와 5를 비교하면, 혼합물 B(스프레드) 및 C(오일)에 함유된 피토스테롤 에스테르를 구별짓는 주된 특징은 지방산 조성이라는 결론에 이른다. 더 구체적으로, 에스테르화 반응에 의하여 분획 B에 포화 지방산 피토스테롤 에스테르가 농축되고, 분획 C에 불포화 지방산 피토스테롤 에스테르가 농축된다. 이러한 스테롤 에스테르의 분별은 2가지의 다른 상을 형성하게 할 수 있다.

3. 표 5로부터 오일상(분획 C)이, 공급원 오일의 불포화 지방산 조성과 상관없이, 94%보다 높은 불포화 지방산

피토스테롤 에스테르를 함유함을 알 수 있다.

4. 분획 B(스프레드) 및 분획 C(액체)의 물리적 형태의 차이는 스프레드상내의 비교적 높은 농도의 포화 지방산 피토스테롤 에스테르에 의해 설명되며, 이는 스프레드의 높은 융점의 원인이다.

(4) 혼합물 A, B 및 C의 추가 농축

4.1. 분자 종류에 의한 분획 A의 피토스테롤 에스테르 및 디아실글리세롤 농축

반응 생성물에 디아실글리세롤 및 피토스테롤 에스테르를 추가 농축시키는 것은 분자 종류를 도입함으로써 얻어질 수 있다. 3가지의 주성분은 이들의 분자량에 따라 순서대로 증류된다: 처음에 디아실글리세롤, 그 다음으로 피토스테롤 에스테르 및 그 다음으로 트리아실글리세롤. 따라서, 공급 스트림 조성 및 증류 조건을 변화시킴으로써 예상된 디아실글리세롤 및 피토스테롤 에스테르 농축된 증류물 및 트리아실글리세롤 농축된 잔사를 얻을 수 있다. 0.001 내지 0.01밀리바, 바람직하게는 0.001 내지 0.005밀리바 및 200 내지 300℃, 바람직하게는 220 내지 280℃의 증류 조건은 2가지의 더 가벼운 성분, 즉 디아실글리세롤 및 피토스테롤 에스테르의 증류를 가능하게 한다.

4.2. 결정화에 의한 분획 B 및 C의 피토스테롤 에스테르 농축

생성물내의 다른 성분에 비하여 피토스테롤 에스테르의 비교적 낮은 용해도 및 높은 융점으로 인하여, 분획을 다양한 유기 용매에 용해시킨 후 냉각시키면, 피토스테롤 에스테르의 선택적 결정화가 일어난다. 이 방법은 피토스테롤 에스테르 농도를 증가시킬 수 있다.

사용될 수 있는 유기 용매는 헥산, 톨루엔, 아세톤, 에탄올, 메탄올 등이다.

실시예 1: 카놀라유내 스티그마스테롤의 리파제-촉진 알콜분해

1.1 효소 반응

카놀라유내 스티그마스테롤의 스티그마스테롤 에스테르로의 리파제-촉진 변환은 다음 반응 조건을 사용하여 수행하였다: WO 01/75083호에 따라 얻어진 리파제 제제 9g을 스티그마스테롤 4g이 농축된 카놀라유 50ml에 첨가하였다. 그 다음, 반응 혼합물을 60℃로 14시간 동안 가열하였다. 이 기간이 끝나면, 샘플을 취하고, n-헥산으로 희석하고(반응 혼합물 30 μ l/n-헥산 600 μ l), 전술한 바와 같이 기체 크로마토그래피 시스템으로 주사하였다. 반응하지 않은 스티그마스테롤의 농도는 GC에 따라 결정하였고, 변환율은 94%로 계산되었다.

1.2 반응 생성물의 분리

반응이 끝나면 효소를 여과하고, 혼합물을 25℃로 냉각시킨 다음, 12시간 동안 놔두었다.

얻어진 혼합물(본원에서 혼합물 A라고 칭함)은 2가지 다른 분리된 상/분획을 갖는다: 오일 상/분획 및 스프레드(페이스트상) 상/분획.

혼합물 B 및 C는 혼합물 A를 8000 $\times$ rpm 및 약 15℃에서 5분 동안 원심분리함으로써 얻는다.

도 1 및 도 2는 두 개별 분획의 기체 크로마토그램 분석을 나타낸다.

도 1은 카놀라유내 스티그마스테롤의 알콜분해에 의해 얻어진 혼합물 B의 기체 크로마토그램을 나타낸다. 혼합물은 스티그마스테롤 팔미테이트(화학 합성된 유사 기준물질에 의해 확인됨)(16.5분), 카놀라유로부터 유도된 트리아실글리세롤(19.35-18.12분), 디아실글리세롤(14.37분), 스티그마스테롤(10.73분), 모노아실글리세롤(11.42분) 및 유리 지방산(8.72 내지 6.54분)을 포함한다.

도 2는 카놀라유내 스티그마스테롤의 알콜분해에 의해 얻어진 혼합물 C의 기체 크로마토그램을 나타낸다. 혼합물은 스티그마스테롤 올리에이트(화학 합성된 유사 기준물질에 의해 확인됨)(15.96분), 스티그마스테롤 팔미테이트(16.56분), 오일로부터의 트리아실글리세롤(19.42 내지 18.17), 디아실글리세롤(14.38), 스티그마스테롤(10.75분), 모노아실글리세롤(11.45분) 및 유리 지방산(8.75 내지 6.57분)을 포함한다.

실시예 2: 올리브유내 대두 공급원으로부터의 피토스테롤의 리파제-촉진 알콜분해

2.1 효소 반응

WO 01/75083호에 따라 얻어진 리파제 제제 100g 및 대두 공급원으로부터의 피토스테롤(브라시카스테롤 0.3 내지 4%, 캄파스테롤 20 내지 30%, 스티그마스테롤 11 내지 20%, 베타 시토스테롤 >40%를 함유함) 120g을 1리터들이

유리 교반 반응기내 엑스트라 버진 올리브유 450g에 첨가하였다. 그 다음, 반응 혼합물을 50℃로 가열하고, 24 시간 동안 교반하였다. 변환율은 93%이었다. 촉매는 50℃에서 여과에 의해 분리한다. 여과된 촉매를 반응하지 않은 피토스테롤 120g을 갖는 엑스트라 버진 올리브유 450g의 새 혼합물에 첨가한다. 2차 배치는 24시간 후에 역시 93%에 도달하였다. 촉매의 여과를 반복하고, 생성물(혼합물 A) 566g은 실온에서 20시간 동안 놔두었다.

<134> 혼합물 B 및 C는 7,500×g 및 25℃에서 혼합물 A를 15분 동안 원심분리함으로써 얻어진다.

<135> 혼합물 B(스프레드 분획)는 중량이 164g인 한편, 혼합물 C(오일 분획)는 중량이 402g이었다.

<136> 혼합물 A의 조성은 디아실글리세롤 16.3%, 모노아실글리세롤 6.1%, 피토스테롤 에스테르 30.5% 및 지방산 5% 및 잔여량의 트리아실글리세롤다.

<137> 분획 B 및 C로부터의 피토스테롤 에스테르의 지방산 조성물은 전술한 바와 같이 결정되었다. 결과는 하기 표 6에 나타낸다.

표 6

<138> 피토스테롤 에스테르의 지방산 조성

지방산	오일(분획 C)내 %	스프레드(분획 B)내 %
C16	3.0	29.9
C16:1	1.8	1.2
C18	1.2	2.0
C18:1	71.5	51.7
C18:2	20.9	14.1
C18:3	1.4	0.9
C20	0.2	0.1

<139> 실시예 3: 분자 종류에 의한 피토스테롤 에스테르 및 디아실글리세롤의 추가 강화:

<140> 피토스테롤 에스테르 13중량%, 디아실글리세롤 20중량%, 유리 피토스테롤 0.1 내지 1중량% 및 유리 지방산 5중량%를 함유하는 카놀라유 공급원으로부터 얻어진 반응 혼합물을 분자 증류기(유리로 만들어짐, 직경 2인치, 실험실 장치)로 공급하였다. 유리 피토스테롤 및 유리 지방산의 제거를 가능케 하는 조건에서 제1 통과를 수행하였다: 180 내지 200℃ 및 0.01 내지 0.001밀리바. 하기 표 7 및 표 8에 나타낸 바와 같이, 다양한 증류물 조성물을 가능케 하는 상이한 조건하에 제1 통과와 잔류물을 다시 공급하였다. PSE는 피토스테롤 에스테르를 나타낸다.

표 7

<141> 증류물 분획내의 증류물 질량 및 피토스테롤 에스테르 수득량(상이한 온도에서 0.001 내지 0.005밀리바)

온도(℃)	증류물 질량/공급물 질량	증류물내 PSE 질량/공급물내 PSE 질량
235	0.17	0.40
240	0.23	0.58
250	0.28	0.62
265	0.53	0.95

<142> 증류물 상내 90%보다 높은 피토스테롤 에스테르를 얻기 위하여, 필요한 조건은 260 내지 265℃ 및 0.001 내지 0.005밀리바인 것으로 나타났다.

표 8

<143> 증류에서 얻어진 증류물 조성(상이한 온도에서 0.001 내지 0.005밀리바)

온도(℃)	증류물의 조성		
	피토스테롤 에스테르 중량%	트리아실글리세롤 중량%	디아실글리세롤 중량%
235	27	22	51
240	32	28	40
250	32	25	43
265	27	52	21

<144> 계산은 공급물 질량 균형 및 GC로부터 얻은 상대적 적분 면적을 기본으로 한다.

<145> **실시예 4: 용매 결정화에 의한 분획 B 내지 C내 피토스테롤 에스테르의 추가 농축**

<146> (i) 혼합물 C에 피토스테롤 에스테르 함량을 농축하기 위하여, 상기 실시예 2에 기술된 바와 같이 얻어진 혼합물 C 100ml에 아세톤 100ml를 첨가하였다. 혼합물을 12시간 동안 -20℃로 냉각하였다. 이 기간 동안 오일상 혼합물로부터 백색의 고체 침전물(혼합물 C1)이 침전되었다. 고체 침전물(25g)을 냉여과 방법으로 여과하고, 찬 아세톤으로 수차례 세척하였다.

<147> 도 6은 혼합물 C1의 기체 크로마토그램을 나타낸다. 이 혼합물은 불포화 지방산의 피토스테롤 에스테르(16.247, 16.067, 15.934), 오일로부터 유도된 트리아실글리세롤(17.119, 16.814), 디아실글리세롤, 피토스테롤(11.764, 11.486, 11.291) 및 소량의 유리 지방산을 포함한다. 이 혼합물내 스테롤 에스테르의 총량은 30중량%이다.

<148> (ii) 혼합물 C에 피토스테롤 에스테르 함량을 더 농축시키기 위하여, 온화하게 가열하면서, 전술한 바와 같이 얻어진 고체 혼합물 C 20g에 톨루엔 50ml를 첨가하였다. 혼합물을 12시간 동안 -20℃로 냉각하였다. 이 기간 동안 용액으로부터 백색의 고체 침전물(혼합물 C2)이 침전되었다. 고체 침전물(4g)을 냉여과 방법으로 여과하고, 찬 톨루엔으로 수차례 세척하였다.

<149> 도 7은 혼합물 C2의 기체 크로마토그램을 나타낸다. 이 혼합물은 불포화 지방산의 피토스테롤 에스테르(16.319, 16.125, 15.981), 피토스테롤(11.151, 10.850, 10.640) 및 디아실글리세롤(13.24, 13.01)를 포함한다. 이 혼합물내 스테롤 에스테르의 총량은 >90중량%이다.

<150> (i) 혼합물 B에 피토스테롤 에스테르 함량을 농축시키기 위하여, 실시예 2에 기술된 바와 같이 얻어진 혼합물 B 90g에 헥산 100ml를 첨가하였다. 혼합물을 -20℃로 12시간 동안 냉각하였다. 이 기간 동안 용액으로부터 백색의 고체 침전물(혼합물 B1)이 침전되었다. 고체 침전물(35g)을 냉여과 방법으로 여과하고, 찬 헥산으로 수차례 세척하였다.

<151> 도 8은 혼합물 B1의 기체 크로마토그램을 나타낸다. 이 혼합물은 주로 포화 지방산의 피토스테롤 에스테르(15.941, 15.752, 15.612), 소량의 불포화 지방산의 피토스테롤 에스테르(16.335, 16.159, 16.031), 오일로부터 유도된 트리아실글리세롤(17.196, 16.870), 디아실글리세롤, 피토스테롤(11.830, 11.553, 11.190), 디아실글리세롤(14.39, 13.97) 및 소량의 유리 지방산을 포함한다. 이 혼합물내 스테롤 에스테르의 총량은 50중량%이다.

<152> (ii) 혼합물 B에 피토스테롤 에스테르 함량을 더 농축시키기 위하여, 온화하게 가열하면서, 실시예 2에 전술한 바와 같이 얻어진 고체 혼합물 B 20g에 톨루엔 50ml를 첨가하였다. 혼합물을 12시간 동안 -20℃로 냉각하였다. 이 기간 동안 용액으로부터 백색의 고체 침전물(혼합물 B2)이 침전되었다. 고체 침전물(5g)을 냉여과 방법으로 여과하고, 찬 톨루엔으로 수차례 세척하였다.

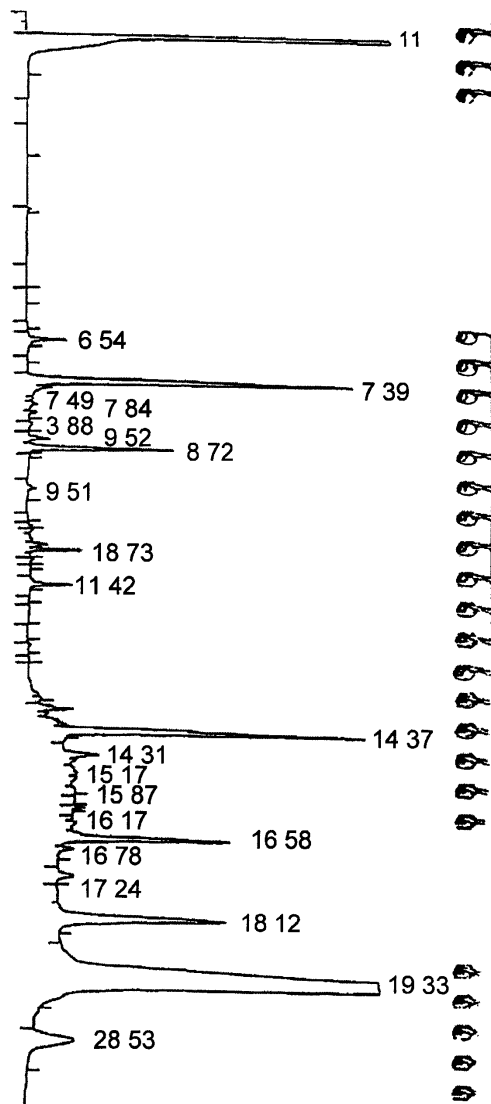
<153> 도 9는 혼합물 B2의 기체 크로마토그램을 나타낸다. 이 혼합물은 주로 포화 지방산의 피토스테롤 에스테르(15.371, 15.184, 15.047), 소량의 불포화 지방산의 피토스테롤 에스테르(15.761, 15.588, 15.461) 및 피토스테롤(10.615, 10.310, 10.096)을 포함한다. 이 혼합물내 스테롤 에스테르의 총량은 >95중량%이다.

도면의 간단한 설명

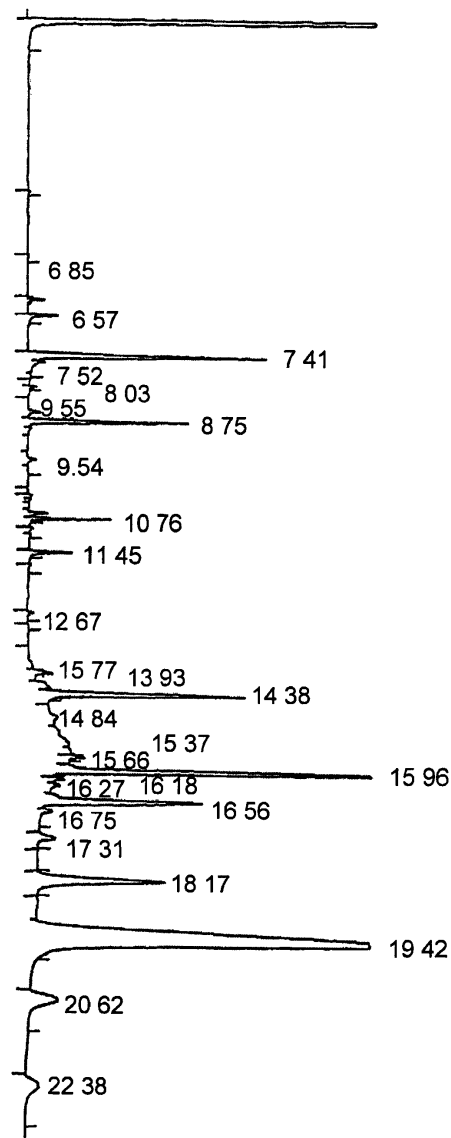
- <43> 본 발명은 바람직한 실시양태의 상세한 설명 및 첨부된 도면으로부터 더 분명하게 이해될 것이다.
- <44> 도 1은 카놀라유내 스티그마스테롤의 알콜분해에 의해 얻어진 혼합물 B의 기체 크로마토그램을 나타낸다.
- <45> 도 2는 카놀라유내 스티그마스테롤의 알콜분해에 의해 얻어진 혼합물 C의 기체 크로마토그램을 나타낸다.
- <46> 도 3은 해바라기유내 피토스테롤의 에스테르화 후, 60℃에서 얻어진 혼합물 A의 기체 크로마토그램을 나타낸다.
- <47> 도 4는 도 3의 혼합물 A로부터 얻어진 혼합물 B의 기체 크로마토그램을 나타낸다.
- <48> 도 5는 도 3의 혼합물 A로부터 얻어진 혼합물 C의 기체 크로마토그램을 나타낸다.
- <49> 도 6은 도 5의 혼합물 C로부터 얻어진 혼합물 C1의 기체 크로마토그램을 나타낸다.
- <50> 도 7은 도 5의 혼합물 C로부터 얻어진 혼합물 C2의 기체 크로마토그램을 나타낸다.
- <51> 도 8은 도 3의 혼합물 B로부터 얻어진 혼합물 B1의 기체 크로마토그램을 나타낸다.
- <52> 도 9는 도 3의 혼합물 B로부터 얻어진 혼합물 B2의 기체 크로마토그램을 나타낸다.

도면

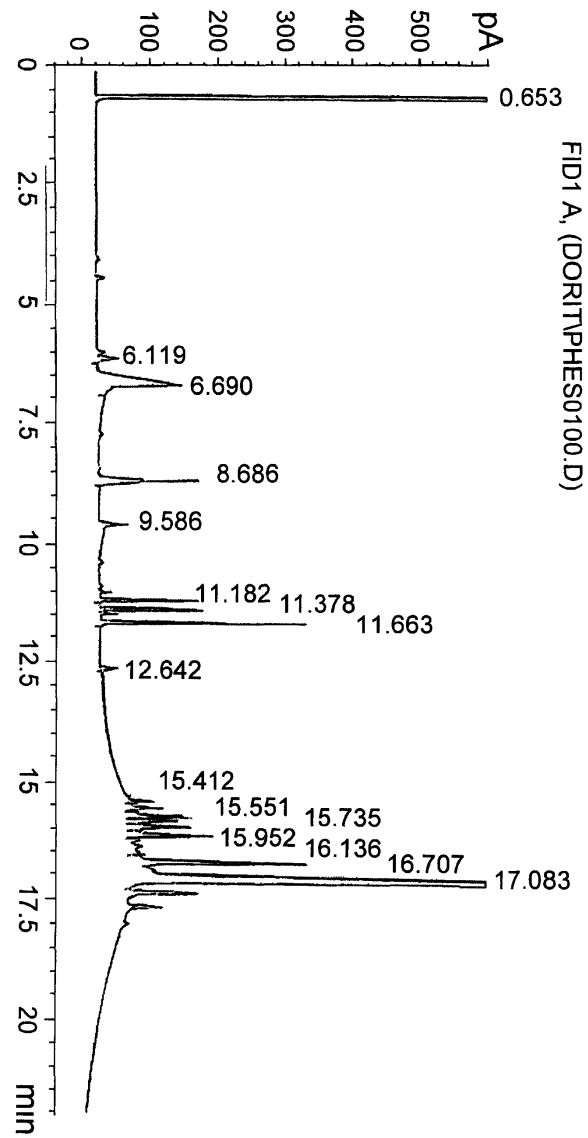
도면1



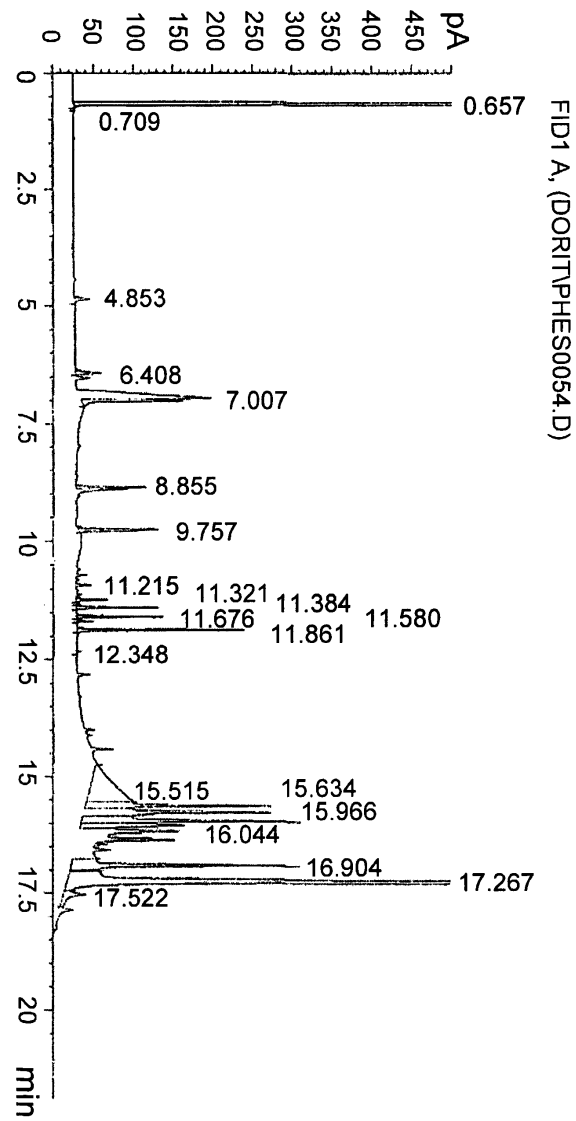
도면2



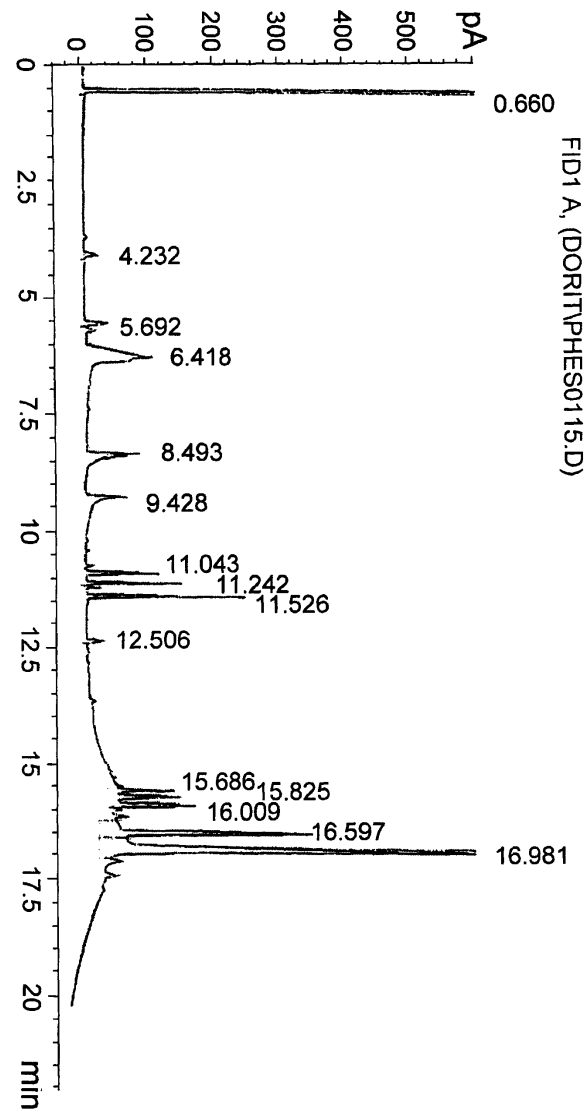
도면3



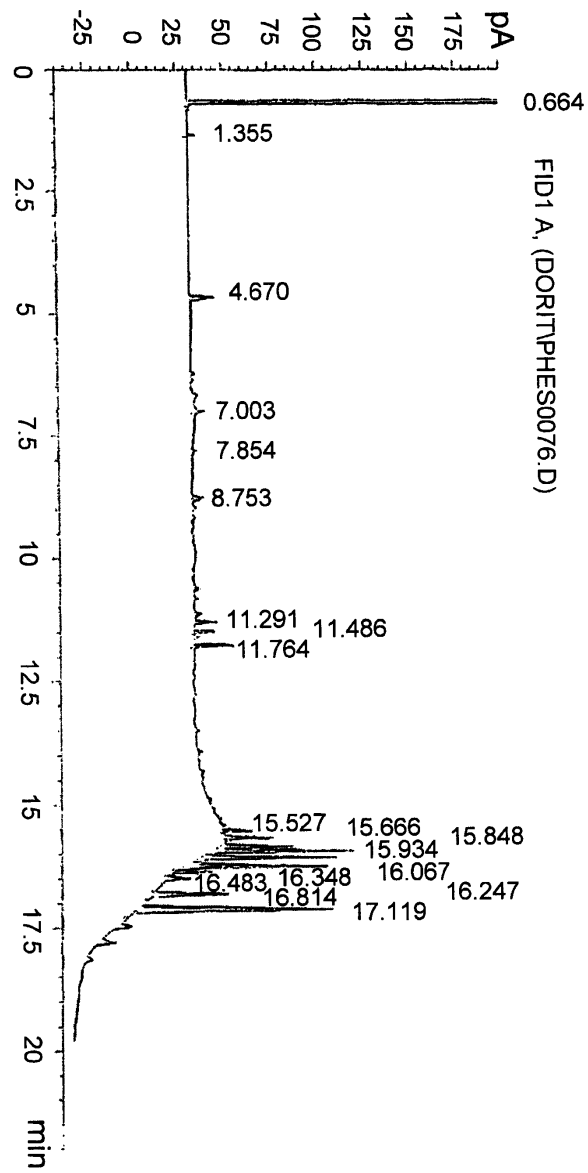
도면4



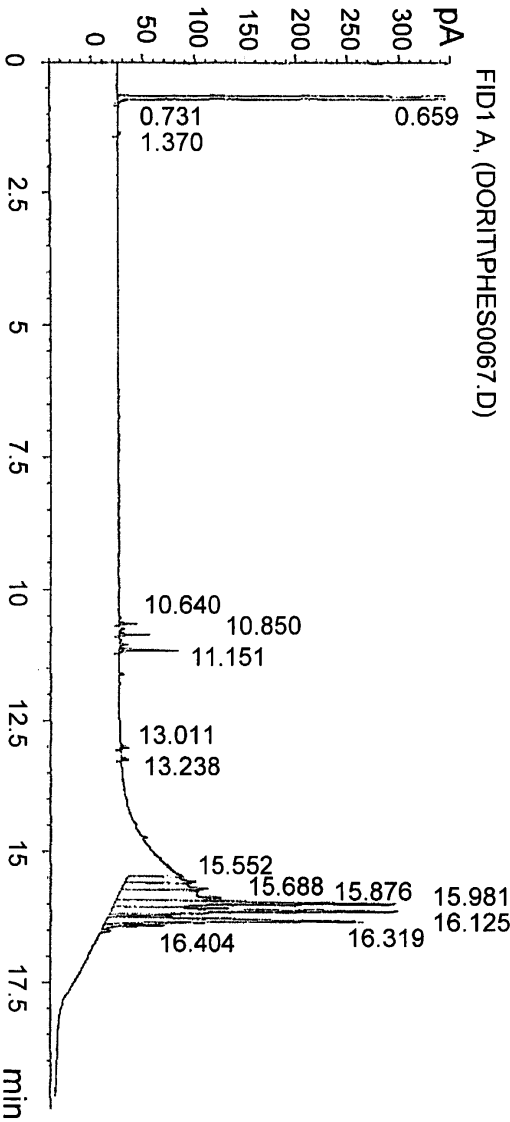
도면5



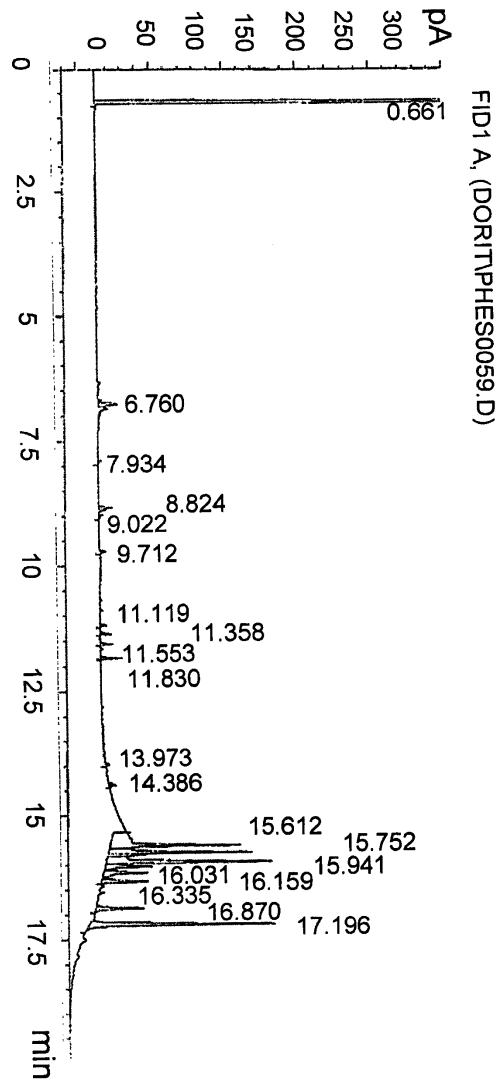
도면6



도면7



도면8



도면9

