



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년08월14일

(11) 등록번호 10-1430318

(24) 등록일자 2014년08월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23D 9/02 (2006.01) C11C 1/02 (2006.01)

C11C 3/00 (2014.01)

(21) 출원번호 10-2012-7000063

(22) 출원일자(국제) 2010년06월01일

심사청구일자 2012년01월16일

(85) 번역문제출일자 2012년01월02일

(65) 공개번호 10-2012-0018219

(43) 공개일자 2012년02월29일

(86) 국제출원번호 PCT/CL2010/000018

(87) 국제공개번호 WO 2010/139085

국제공개일자 2010년12월09일

(30) 우선권주장

1343-2009 2009년06월02일 칠레(CL)

(56) 선행기술조사문헌

EP01685222 B1

Han, D.-S. et al., Korean Journal of Food Science and Technology (1987) Vol.19, No.5, pp.430-434

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 윤재우

(54) 발명의 명칭 에이코사펜타엔오산 및 도코사헥사엔오산 에스테르의 농축물을 얻기 위한 방법

**(57) 요약**

본 발명은 제약 성분이나 식품 성분으로서 사람에 의한 정기적인 대량 소비를 위해 사용하고자 하는 에이코사펜타엔오산 및 도코사헥사엔오산 에스테르의 농축물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 농축물은 중립적인 안정한 감각수용성을 특징으로 하며, 수산 오일 유도체과 관련된 전형적인 부작용이 없고, 지속적 유기 오염물질의 수준도 낮다.

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

잔류성 유기 오염물질 및 중금속을 그들의 최대 허용 한계를 넘는 농도로 포함하는 미정제 또는 정제된 수산 오일로부터 EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosapentaenoic acid)의 에틸 에스테르 농축물을 얻기 위한 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법:

- a) 미정제 또는 정제된 수산 오일을 최대 100°C의 온도에서 적어도 하나의 알칼리 및 물과 접촉시켜서 비누화된 수산 오일을 포함하는 혼합물을 얻는 단계;
- b) 비누화된 혼합물을 석유 에테르, 펜탄, 헥산, 헵탄, 옥탄 및 이들의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택된 유기 용매와 접촉시켜서 지방산의 알칼리성 염을 포함하는 정제된 상과 유기 용매 및 용해된 물질을 포함하는 추출된 상을 형성하고, 상기 정제된 상과 상기 추출된 상을 침전 또는 원심분리에 의해 서로 분리하는 단계;
- c) 정제된 상을 산의 수성 용액과 혼합하여 지방산을 포함하는 비-수성 상과 수성 상을 형성하는 단계;
- d) 상기 두개의 상을 서로 분리하고, 분리된 비-수성 상을 EPA 및 DHA의 에틸 에스테르를 포함하는 에스테르화된 혼합물이 얻어질 때까지 최대 150°C의 온도에서 에탄올 및 에스테르화 촉매와 혼합하는 단계;
- e) 에스테르화된 혼합물로부터 촉매를 제거하여 촉매 무함유의 에스테르화된 혼합물을 얻는 단계;
- f) 촉매 무함유의 에스테르화된 혼합물로부터 용매를 제거하여 EPA 및 DHA의 에틸 에스테르를 얻는 단계, 및
- g) 최대 180°C의 온도 및 1mbar 미만의 압력에서 단거리 증류 칼럼에서 촉매 무함유의 용매 제거된 에스테르화된 혼합물을 증류하여 EPA 및 DHA의 에틸 에스테르를 포함하는 농축물을 얻고, 상기 농축물은 중립적 감각수용성 및 산화 안정성을 가지고, 잔류성 유기 오염물질 및 중금속을 그들의 최대 허용 한계 미만의 농도로 포함하고, 상기 농축물의 그램 당 최대 90ng의 PCB(polychlorinated biphenyls), 최대 2pg의 디옥신과 푸란의 합계, 최대 2pg의 디옥신 유사 PCB 및 최대 100ng의 비소를 포함하는 단계.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 단계 (a)의 알칼리는 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화마그네슘 및 이들의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택되고, 알칼리 대 미정제 또는 정제된 오일의 중량비는 0.15:1이고, 물 대 미정제 또는 정제된 오일의 중량비는 0.5:1 내지 2:1인 방법.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서, 에탄올 대 단계 (a)에서 미정제 또는 정제된 오일의 중량비는 0.5:1 내지 2:1인 방법.

### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 단계 (a)의 혼합물은 헥산을 포함하며, 헥산 대 미정제 또는 정제된 오일의 중량비는 0.5:1 내지 2:1인 방법.

### 청구항 5

제 1 항에 있어서, 단계 (a)의 혼합물은 하나 이상의 항산화제를 포함하며, 항산화제 대 미정제 또는 정제된 오일의 중량비는 1:100 미만인 방법.

### 청구항 6

제 1 항에 있어서, 단계 (a)의 혼합물은 최대 1bar의 압력 및 최대 100°C의 온도에서 30분 내지 120분의 시간 동안 유지되어 비누화된 수산 오일을 얻는 방법.

### 청구항 7

제 1 항에 있어서, 단계 (b)에서 온도는 20 내지 60°C이고, 압력은 최대 1bar이고, 용매 대 비누화된 혼합물의 중량비는 1:1 내지 5:1인 방법.

## 청구항 8

제 1 항에 있어서, 단계 (c)에서 산은 황산, 인산, 아세트산, 포름산, 트리클로로아세트산 및 탄산으로 구성되는 군으로부터 선택되고, 온도는 20 내지 70°C이고, 압력은 최대 1bar이고, 산 대 단계 (a)에서 사용되는 알칼리의 화학량론적 비는 최대 1.05:1인 방법.

## 청구항 9

제 1 항에 있어서, 단계 (d)에서 온도는 30 내지 80°C이고, 압력은 최대 1bar이고, 에스테르화 혼합물은 30 내지 80°C의 온도에서 60분 내지 240분의 시간 동안 유지되어 에스테르화된 혼합물을 형성하는 방법.

## 청구항 10

제 1 항에 있어서, 지방산의 에스테르는 최대 0.1mbar의 압력 및 최대 150°C의 온도에서 증류되는 방법.

## 청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항의 방법에 따라 미정제 또는 정제된 수산 오일로부터 얻어진 EPA 및 DHA의 에틸 에스테르 농축물로서, EPA와 DHA의 에틸 에스테르의 합계가 농축물의 적어도 40중량%이고, 상기 농축물의 지방산의 트랜스 이성질체의 함량은 최대 미정제 또는 정제된 수산 오일의 지방산의 트랜스 이성질체의 함량과 동일하고, 상기 농축물이 중립적 감각수용성, 최대 0.5의 아니시딘 수, 최대 1의 토톡스(totox) 수를 가지고, 농축물의 그램 당 최대 90ng의 PCB(polychlorinated biphenyls), 최대 2pg의 디옥신과 푸란의 합계, 최대 2pg의 디옥신 유사 PCB 및 최대 100ng의 비소를 포함하는 농축물.

## 명세서

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 미정제 또는 정제된 수산 오일(marine oil)로부터 에이코사펜타엔오산 및 도코사헥사엔오산의 에스테르 농축물을 얻기 위한 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002]

음식이나 제약 제품의 섭취에 있어서  $\omega$ -3 타입 장쇄 폴리불포화 지방산류, 즉 (모두 시스)-5, 8, 11, 14, 17 에이코사펜타엔오산(이후 EPA) 및 (모두 시스)-4, 7, 10, 13, 16, 19 도코사헥사엔오산(이후 DHA)의 중요성은 잘 알려져 있고 문서화되어 있으며, 특히 이들은 동맥경화증과 심혈관 질환을 예방하고, 염증성 상태를 완화하고, 종양 성장을 저연시키는데 유용하다. 결과적으로, 전문가들은 상기 지방산들을 0.5 내지 10g의 범위에서 매일 섭취할 것을 권장한다.

[0003]

EPA와 DHA가 가장 풍부한 공급원 중 하나는 정어리, 전갱이(Jack mackerel), 앤쵸비, 연어, 대구 등과 같은 상이한 기원의 어유들이다. 전형적으로, 상기 어유들 중에 EPA와 DHA의 총 함량은 약 10 내지 35중량%이다. 결과적으로, EPA와 DHA가 풍부한 식품보조제 및 제약을 제공하려는 최초의 시도는 정제 어유에 기초했는데, 이것은 어유 특유의 불쾌한 냄새와 향미를 제거하고, 사람이 소비하기에 적합한 식품이나 제약 제품의 성분으로서 활용할 수 있도록 한 것이었다. 정제 과정은 식물성 오일을 정제하는 경우의 고전적인 과정을 주로 따르는데, 원료에 따라 상기 과정을 특별히 개조하는 생각했다(Lindsay, USP 4,915,876; Chang, USP 4,874,629; Marschner, USP 4,804,555; Stage, USP 4,599,143; Merck, USP 4,838,997).

[0004]

그렇지만, 식품 및 제약 제품의 성분으로서 적합한 정제된 수산 오일로부터 EPA와 DHA를 제공하려는 현재 시도는 허용되는 감각수용성(organoleptic property)을 갖는 한편, 특히 위 역류, 위장 및 피부 자극, 및 고창(meteorism)과 같은 전형적인 부작용이 없는 제품을 제공하는데 있어서는 성공적이지 못했다. 이런 효과들은 EPA와 DHA가 1g을 넘는 양으로 소비되었을 때, 즉 어유로 계산하면 약 5g의 어유가 소비되었을 때 심해지며, 소비자에게 상기 언급된 부작용들을 일으킨다.

[0005]

결과적으로, EPA 및 DHA를 제공하려는 노력은 수산 오일로부터 이 산들의 농축물을 생산하는 쪽으로 향하게 되었다. 이러한 농축물은 EPA 및 DHA를 자유 산의 형태로, 에스테르의 형태로, 전형적으로는 에틸 에스테르 또는 모노, 디 또는 트리글리세리드의 형태로 40-95중량%를 함유할 수 있다. 이러한 과정들의 목표는 활성 제약 성분으로서 또는 일반적인 식품 성분으로서 인체 치료 용도의 제품에 직접 사용될 수 있는, 향미, 냄새 및 색에

있어서 더 나은 감각수용성을 갖는 EPA 및 DHA 농축물을 제공하는 것이다. 그렇지만, 최신 기술은 시간이 지나도 바람직한 감각수용성을 유지할 수 있도록 양호한 감각 특성, 장기 저장 및 산화 안정성을 갖는다는 특징을 만족하는 제품, 즉 생선 냄새와 향미가 곧바로 다시 발생하지 않고, 특히 위 역류, 팽만감(flatulence), 알레르기와 같은 수산 오일 및 이들의 유도체들의 전형적인 부작용이 없는 제품을 제공할 수 있는 과정을 제공하지 않는다.

[0006] 현재 상업적으로 이용할 수 있는 EPA와 DHA의 농축물은 식품 성분으로서 직접 사용되지는 않으며, 대신에 이들은 향미가 위장된 시럽의 형태나, 또는 설탕 코팅된 또는 마이크로 캡슐화된 알약의 형태로 이용되며, 이들은 모두 상기 제품에서 곧바로 발생하는 바람직하지 않은 향미와 냄새를 숨기거나 최소화하기 위한 목적을 가진다. 추가로, 이들 농축물은 일반적으로 매일 수 g씩 비교적 고용량의 EPA 또는 DHA를 필요로 하는 치료 용도에는 적합하지 않은데, 이러한 고용량에서는 농축물의 바람직하지 않은 부작용이 더욱더 심해지기 때문이다.

[0007] 수산 오일 유래의 사람이 소비할 수 있는 EPA나 DHA를 제공하기 위한 또 다른 접근법은 순수한 EPA 또는 DHA를 얻기 위한 과정을 개발하는 것이었는데, 이것은 USP 6,846,942에 개시된바 있다. 그렇지만, 순수한 EPA나 DHA를 얻는다는 것은 먼저 EPA와 DHA의 혼합물이 얻어지는 단계를 지난다는 의미로서, 이 접근법은 상업적인 이점은 없을 것 같은데, 표 1의 기록에서 관찰될 수 있는 대로, 개시된 대부분의 과정은 자유 산의 형태나 에스테르의 형태로 EPA와 DHA를 함유하는 농축물을 제조하는 것을 다룬다.

[0008] 오일로부터 ω-3 지방산의 농축물을 얻기 위해 다뤄진, 선행기술에서 개시된 수많은 과정들이 표 1에 제시된다.

[0009] 유럽특허 No. 0 409 903은 동물성 오일이나 식물성 오일로부터 EPA와 DHA를 함유하는 혼합물을 제조하는 과정을 개시한다. 이 과정은 원료인 동물성 오일 또는 식물성 오일을 비누화하는 단계, 비누화된 혼합물을 바로 산성화하는 단계, 이어서 고갈될 때까지 석유 에테르로 형성된 산을 추출하는 단계를 포함한다. 다음에, 추출물을 물로 세척하고, 용매를 제거한 후, 잔류물에 0.133Pa의 압력 및 110-120°C의 온도에서 분자 증류하는 단계를 1회 이상 수행한다. EPA와 DHA를 35-90% 함유하는 증류액이 얻어진다.

**표 1**

DHA 및 EPA의 제조를 위한 방법 또는 과정에 관한 특허 및 특허출원

문헌	명칭
20030027865	결정화를 사용하여 고도로 정제된 지방산을 분리하는 방법
20040022923	오염물질의 수준이 감소된 수산 오일
20040236128	순수한 EPA 및 순수한 DHA를 제조하는 방법
20050201997	디옥신 제거 촉진제
20050256326	오일 및 지방에서 환경 오염물질을 감소시키는 방법, 휘발성 환경 오염물질을 감소시키기 위한 유체, 식품보조제
20080268117	EPA 및 DHA를 함유하는 오일을 정제하는 방법
3682993	오일의 정제
4554107	정제된 어유 및 이들의 제조 방법
4599143	비등점이 높은 오일, 지방, 식용 유기 에스테르의 물리적 탈취 및/또는 정제 방법
4623488	정제된 어유 및 이들의 제조 방법
4675132	어유의 폴리불포화된 지방산
4692280	어유의 정제
4792418	자연 출처로부터 기원하는 폴리불포화된 지방산의 추출 및 정제 방법
4838997	트리글리세리드 오일의 탈취 방법
4855154	수산 오일의 탈취 방법
4874629	어유의 정제
4915876	폴리불포화된 오일의 탈취 및 안정화 방법
4966734	지방 에스테르 혼합물의 탈취
5006281	동물성 오일의 제조 방법
5023100	어유
5130061	어유에서 얻은 폴리불포화된 지방산으로부터 에스테르 추출 방법
5679809	폴리불포화된 지방산의 에틸 에스테르 농축물
5693835	생선 냄새가 적은 어유 및 그것의 제조 방법
5945318	오일 조성물의 정제

6190715	장쇄 오메가-3 지방산을 함유하는 청어 및 다른 작은 생선으로부터 정제된 식용 어유를 제조하는 방법
6204401	폴리불포화된 지방산의 글리세리드의 정제
6214396	어유 추출을 위한 방법 및 식물과 결과의 산물
6261608	정제된 어유 제조 방법
6528669	요소 애덕트에서 출발한 폴리불포화된 지방산의 회수
6537787	폴리불포화된 지방산을 풍부하게 하기 위한 효소적 방법
6664405	결정화를 사용하여 고도로 정제된 불포화된 지방산을 분리하는 방법
6846942	순수한 EPA 및 순수한 DHA의 제조 방법
EP0409903B1	폴리불포화된 지방산의 제조 방법
EP0749468B1	오일 조성물의 정제
EP0968264B1	폴리불포화된 지방산의 글리세리드의 정제
EP1153114B1	리파아제에 의해 촉매된 수산 오일의 에스테르화
EP1178103A1	폴리불포화된 지방산을 가진 생 오일의 정제
EP1202950B1	요소 애덕트에서 출발한 폴리불포화된 지방산의 회수
EP1996686A1	오메가 3
JP2007138181	폴리불포화된 장쇄 지방산의 함량이 높은 물질의 제조 방법

[0011] USP 5,130,061은 어유로부터 EPA와 DHA의 고도로 농축된 에틸 에스테르의 혼합물을 제조하는 과정을 개시한다. 개시된 과정은 어유를 에틸알콜로 트랜스에스테르화(transesterification)하는 단계, 이어서 트랜스에스테르화된 생성물을 혼합으로 추출하는 단계, 및 추출물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제하는 단계를 포함한다. 다음에, 정제된 생성물에 약 0.001mmHg의 압력 및 65-70°C의 온도에서 분자 중류하는 단계를 1회 이상 수행한다. 선택적으로, 중류하기 전에, 크로마토그래피로부터 얻은 생성물을 -40°C에서 아세톤에서 결정화한 후에 중류를 수행할 수 있다.

[0012] 개시된 과정들은 대부분 허용되는 감각수용성을 갖는 제품을 제공할 수 있지만, 이들 모두에서 상기 설명된 부작용이 야기되고, 시간이 지나면 생선 냄새와 향미가 다시 발생하는데, 이것은 소비자에게 유의한 부작용을 일으키지 않으면서 적어도 3개월의 기간 동안 실온 저장 조건에서 중립적 감각수용성을 유지하는 본 발명의 방법에 의해서 얻어진 제품과 다른 점이다. 중립적 감각수용성이란, 첨가제가 없을 때도 향미나 냄새를 가릴 수 있는 허용되는 감각수용성을 갖는 제품을 의미하며, 허용되는 감각수용성 특징은 외형, 방향 및 향미와 같은 제품 특성(각 변수의 요건은 상기 변수의 최대값의 60% 이상임), 및 산폐성(요건은 상기 변수의 최대값의 80% 이상)을 평가하는 적어도 9명의 구성원으로 이루어진 훈련된 감각 패널에 의해 평가된 제품인 것으로 이해된다.

[0013] 허용되는 감각수용성과 안정성의 요건에 더하여, EPA와 DHA의 농축물을 또한 환경에 잔존되어 식품 사슬에 축적되며 인체의 건강과 환경에 악영향을 일으킬 위험을 내포하고 있는 화학물질인 지속적 유기 오염물질(POP)이라고 알려진 오염 유기 화합물의 함량과 관련된 일련의 규제 기준에 부합되어야 한다. 이러한 오염물질에는 2007년 5월에 개최된 스톡홀름 협약 당사국들의 3차 협의회에서 인정된 17개의 물질이 현재 포함되며, 그 중에서도 다이옥신, 푸란, 폴리염소화 비페닐, 다환 방향족 탄화수소 등의 유도체들은 어유 중의 농도가 시간이 지나면서 증가하고 있는 상황이라서, 어유로부터 이를 오염물질을 제거할 수 있는 과정을 개발하려는 노력이 이루어지고 있다. 스톡홀름 협약은 사람이 소비하는 제품들, 특히 어유 및 어유 유래의 제품에서 POP의 최대 허용 한계와 관련하여 현재 엄격한 기준을 정하고 있다. POP의 제거가 구체적으로 다뤄진 과정은 특히 미국출원 US 2005/0256326 및 US 2004/0022923 및 국제출원 WO 02/06430에 개시된 과정에서 발견된다. 규제되는 오염물질의 또 다른 그룹은 특히 비소, 수은, 카드뮴 및 납과 같은 중금속이다.

[0014] 유럽특허 No. 0 409 903과 USP 5,130,061에 설명된 EPA와 DHA의 농축물을 생산하기 위한 과정은 POP의 문제를 언급하지 않는다. 따라서, 동일한 대상에 대해 개시된 과정의 오염물질을 제거하는 효율과 본 발명의 과정의 효율을 비교하기 위하여, 언급된 과정을 기지 농도의 POP를 갖는 원료를 사용하여 재현하고, 본 발명의 방법에 의해 얻어진 제품과 비교했다. 결과는 비교예 1 및 2에 제시된다.

[0015] USP 6,846,946에서는 폴리염소화 비페닐(PCB)의 문제가 언급되지만, 이들의 제거와 관련된 해결책은 개시되지 않는다.

[0016] 본 발명의 방법은 예상외로, 선행기술의 과정들과는 달리, 실온에서 적어도 3개월의 저장 기간 동안 생선 냄새와 향미가 다시 생기지 않는 허용되는 감각수용성을 갖는 제품을 제공할 수 있고, 또한 선행기술의 과정들과는 달리, POP와 중금속을 효과적으로 감소시키거나 제거할 수 있는 것으로 판명되었다. 추가로, 개시된 과정은 미

지의 대사 특성을 가진 EPA 및 DHA 이성질체의 바람직하지 않은 시스-트랜스 이성질화를 야기하지 않으며, 반대로 매우 예상외로 원료에서 발견되는 트랜스 이성질체의 함량을 감소시킨다.

[0017] Pronova BioPharma([www.pronova.com](http://www.pronova.com))는 활성 제약 성분으로서 사용하기 위한 EPA와 DHA의 에틸 에스테르의 농축물을 생산하는 과정을 개시한다. 상기 과정에서는 미정제 어유가 먼저 탈 산성화되어 정제된 어유가 얻어지고, 이 정제된 어유에 미국출원 US 2005/0256326에 개시된 과정에 의해서 구체적으로 오염물질의 제거를 의도하는 스트립핑 과정이 수행된다. 계속해서, 얻어진 정제된 어유가 에틸알콜로 트랜스에스테르화된다. 트랜스에스테르화된 생성물에 문자 증류 단계가 여러 번 수행된다. 증류액이 요소로 처리되고, 다음에 표백되고 다시 문자 증류되어, EPA 내지 DHA의 장쇄  $\omega$ -3 지방산을 최대 90%까지 갖는 최종 생성물이 얻어진다. 이 과정의 단점은 스트립핑 단계 동안 트랜스이성질화가 일어날 가능성이 있다. 추가로, 상업적 제품은 생선 냄새와 향미가 회복되고, 제품 섭취시에 앞서 언급된 모든 부작용들이 관찰될 수 있다.

[0018] EPA와 DHA의 에틸 에스테르의 농축물 생산을 위해 Napro Pharma([www.napro-pharma.no/production](http://www.napro-pharma.no/production))에 의해 개발된 과정은 Pronova BioPharma의 과정과 유사하지만, 스트립핑 단계와 요소 처리 단계가 없으며, 산물은 역시 생선 냄새와 향미가 회복되고, 제품의 섭취시 앞서 언급된 모든 부작용들이 관찰될 수 있다.

[0019] 최신 기술의 과정에 의해서 얻어진 EPA와 DHA의 농축물과 비교하여, 본 발명의 방법에 의해 얻어진 농축물은 선 행기술에 비해 놀라운 예상치 못한 이점들을 가지는데, 이것은 발명의 상세한 설명에서 증명될 것이다. 이런 이점들은 종립적 감각수용성과 안정성 및 허용 한계 이하의 지속적 유기 오염물질 함량을 갖고, 결과적으로 제약 또는 식품 성분으로서 사람이 소비하기에 적합한, 수산 오일로부터 EPA 및 DHA의 에스테르 농축물의 제조를 위한 신규 방법을 제공하는 것이다.

### 발명의 내용

[0020] 본 발명의 목적은 중립적인 감각수용성, 안정성 및 허용 한계 이하의 지속적 유기 오염물질 함량을 갖고, 결과적으로 제약 또는 식품 성분으로서 사람이 소비하기에 적합한, 수산 오일로부터 EPA 및 DHA의 에스테르 농축물의 제조를 위한 신규 방법을 제공하는 것이다.

[0021] 상기 목적은 다음 단계를 포함하는 방법에 의해 얻어진 EPA와 DHA의 에틸 에스테르를 포함하는 농축물에 의해서 달성된다.

잔류성 유기 오염물질 및 중금속을 그들의 최대 허용 한계를 넘는 농도로 포함하는 미정제 또는 정제된 수산 오일로부터 EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosapentaenoic acid)의 에틸 에스테르 농축물을 얻기 위한 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법:

- 미정제 또는 정제된 수산 오일을 최대 100°C의 온도에서 적어도 하나의 알칼리 및 물과 접촉시켜서 비누화된 수산 오일을 포함하는 혼합물을 얻는 단계;
- 비누화된 혼합물을 석유 에테르, 펜탄, 헥산, 헵탄, 옥탄 및 이들의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택된 유기 용매와 접촉시켜서 지방산의 알칼리성 염을 포함하는 정제된 상과 유기 용매 및 용해된 물질을 포함하는 추출된 상을 형성하고, 상기 정제된 상과 상기 추출된 상을 침전 또는 원심분리에 의해 서로 분리하는 단계;
- 정제된 상을 산의 수성 용액과 혼합하여 지방산을 포함하는 비-수성 상과 수성 상을 형성하는 단계;
- 상기 두개의 상을 서로 분리하고, 분리된 비-수성 상을 EPA 및 DHA의 에틸 에스테르를 포함하는 에스테르화된 혼합물이 얻어질 때까지 최대 150°C의 온도에서 에탄올 및 에스테르화 촉매와 혼합하는 단계;
- 에스테르화된 혼합물로부터 촉매를 제거하여 촉매 무함유의 에스테르화된 혼합물을 얻는 단계;
- 촉매 무함유의 에스테르화된 혼합물로부터 용매를 제거하여 EPA 및 DHA의 에틸 에스테르를 얻는 단계, 및
- 최대 180°C의 온도 및 1mbar 미만의 압력에서 단거리 증류 칼럼에서 촉매 무함유의 용매 제거된 에스테르화된 혼합물을 증류하여 EPA 및 DHA의 에틸 에스테르를 포함하는 농축물을 얻고, 상기 농축물은 종립적 감각수용성 및 산화 안정성을 가지고, 잔류성 유기 오염물질 및 중금속을 그들의 최대 허용 한계 미만의 농도로 포함하고, 상기 농축물의 그램 당 최대 90ng의 PCB(polychlorinated biphenyls), 최대 2pg의 디옥신과 푸란의 합계, 최대 2pg의 디옥신 유사 PCB 및 최대 100ng의 비소를 포함하는 단계.

[0023] 삭제

[0024] 삭제

[0025] 삭제

[0026] 삭제

[0027] 삭제

[0028] 삭제

[0029] 삭제

[0030] 삭제

[0031] 과정 단계들은 조화된 방식으로 본 발명의 목적을 향해서 상승작용적으로 수렴하고 있다.

### **발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0032] 원료

[0033] 본 발명의 실시에 있어서, EPA 또는 DHA, 바람직하게는 어유를 함유하는 어떠한 원료라도 사용될 수 있다. 본 발명을 위한 적합한 원료들은, 예를 들어 정어리, 앤쵸비, 참고등어(Pacific mackerel), 다랑어, 대구, 연어, 크릴 및 연체류의 오일 그리고 상기 오일들의 혼합물, 해양 동물의 내장과 같은 해양 동물의 가공 과정에서 나오는 부산물들의 오일과 또한 예를 들어 *Nannochloropsis* sp 및 플랑크톤과 같은 미세조류의 오일들이다. 본 발명에서, 오일이란 단어는 EPA 또는 DHA 및 이들의 부산물, 예를 들어 글리세리드 및 지방산을 함유하는 지방 또는 왁스를 또한 포함한다.

[0034] Totox 수가 30 미만인 원료를 사용하는 것이 바람직하지만, 본 발명의 방법은 실시예에 나타낸 대로 Totox 수가 더 높은 원료를 사용해서도 실시될 수 있다.

[0035] 본 발명의 방법의 실시에 있어서, 미정제 또는 정제된 수산 오일이 알칼리를 사용하여 비누화되어, 미정제 또는 정제된 수산 오일에 존재하는 지방산의 글리세리드 또는 다른 에스테르를 가수분해함으로써, 미정제 또는 정제된 수산 오일의 비누화 가능한 화합물의 알칼리성 염과 비누화 가능하지 않은 물질을 포함하는 비누화된 혼합물이 얻어진다. 이를 위해서, 미정제 또는 정제된 수산 오일이 물과 하나 이상의 적절한 알칼리, 및 선택적으로 알콜 및 탄화수소와 같은 하나 이상의 용매와 접촉되거나, 또는 하나 이상의 적절한 항산화제와 접촉된다. 비누화 과정을 위한 적절한 알칼리는 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화리튬, 수산화마그네슘 및 상기 수산화물들의 혼합물을 포함한다. 알칼리 대 미정제 또는 정제된 수산 오일의 바람직한 비는 미정제 또는 정제된 수산 오일 100g 당 대략 알칼리 15g이며, 알칼리의 양은 미정제 또는 정제된 수산 오일 각 100g 당 알칼리 5-40g의 범위이다. 물 대 미정제 또는 정제된 수산 오일의 바람직한 비는 미정제 또는 정제된 수산 오일 100g 당 물 50-200g의 범위이며, 사용된 물의 양은 미정제 또는 정제된 수산 오일 100g 당 10-500g의 범위이다. 에탄올과 같은 알콜이 사용된 경우, 알콜의 양은 미정제 또는 정제된 수산 오일 100g 당 알콜 10-500g의 범위이고, 알콜 대 미정제 또는 정제된 수산 오일의 바람직한 비는 미정제 또는 정제된 수산 오일 100g 당 알콜 50-200g의 범위이다. 헥산과 같은 탄화수소가 사용된 경우, 용매의 양은 미정제 또는 정제된 수산 오일 100g 당 용매 10-500g의 범위, 바람직하게는 미정제 또는 정제된 수산 오일 100g 당 용매 50-200g의 범위이다. 예를 들어, BHT, 토코페

를 또는 아스코르브산 및 이들의 유도체들과 같은 적절한 항산화제가 사용된 경우, 사용된 항산화제의 양은 미정제 또는 정제된 미네랄 오일 100g 당 1g 이하인 것이 바람직하다. 미정제 또는 정제된 수산 오일, 물, 하나 이상의 알칼리 및 선택적으로 하나 이상의 용매 사이의 접촉은 10 내지 100°C의 온도, 바람직하게는 40 내지 85°C의 온도 및 0.1 내지 5bar의 압력, 바람직하게는 대기압에서 교반 중인 용기에서 연속식 또는 배치식으로 수행될 수 있다. 배치식 작업의 경우 미정제 또는 정제된 수산 오일의 비누화를 완료하는데 필요한 시간, 또는 연속식 작업의 경우 체류 시간은 10 내지 400분, 바람직하게는 30 내지 120분의 범위이다.

[0036] 비누화된 수산 오일을 포함하는 혼합물은 추출물 상 및 추출물 상과 혼화되지 않는 정제된 상이 형성될 때까지 하나 이상의 유기용매와 접촉되며, 추출물 상은 유기용매와 용해된 물질을 포함하고, 정제된 상은 지방산의 알칼리성 염을 포함한다. 상기 상들은 침전이나 원심분리에 의해서 분리된다. 비누화된 미정제 또는 정제된 수산 오일을 포함하는 혼합물과 유기용매의 접촉은 10 내지 100°C의 온도, 바람직하게는 20 내지 80°C의 온도 및 0.1 내지 5bar의 압력, 바람직하게는 대기압에서 배치식 또는 연속식으로 수행될 수 있다. 추출에 적합한 용매 또는 유기용매의 혼합물은 석유 에테르, 펜탄, 헥산, 헵탄, 옥탄, 시클로헥산, 메틸시클로헥산, 아세톤, 톨루엔, 크실렌, 메틸크실렌, 에틸벤젠, 디클로로메탄, 클로로포름, 사염화탄소, 이염화에틸렌, 삼염화에틸렌, 과염화에틸렌, 디메틸슬록시드 및 테트라히드로푸란으로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 용매는 지방족 탄화수소류, 예를 들어 석유 에테르, 펜탄, 헥산, 헵탄, 옥탄 또는 이들 용매들의 혼합물을 포함한다. 비누화된 혼합물에 대한 용매 또는 용매들의 비는 혼합물 100g 당 50-1000g, 바람직하게는 혼합물 100g 당 100-500g의 범위이다. 추출물 상으로부터 정제된 상이 일단 분리된 후에는, 원한다면 하나 이상의 용매와 개시된 조건에서 다시 접촉될 수 있고, 이로써 제 2의 추출물 상과 제 2의 정제된 상이 형성되며, 원한다면 정제된 상을 더 추출하는 과정이 수행될 수 있다.

[0037] 산 첨가 단계에서, 정제된 상은 수성 상과 지방산을 포함하는 비-수성 상이 형성될 때까지 황산, 염산, 인산, 아세트산, 트리클로로아세트산 또는 탄산과 같은 산의 용액과 접촉된다. 산 첨가 단계에서 사용된 산의 양은 비누화 단계에서 사용된 알칼리의 화학량론적 양의 최대 1.5배, 바람직하게는 정제된 상의 총 중화에 필요한 알칼리의 화학량론적 양의 1.05배일 수 있다. 정제된 상을 산성화하는데 필요한 산의 양은 정제된 상의 총 알칼리도를 측정함으로써 결정될 수 있다. 정제된 상과 산을 접촉시켜서 산성화 혼합물을 형성하는 것은 10 내지 100°C, 바람직하게는 20 내지 60°C의 온도 및 0.1 내지 5bar의 압력, 바람직하게는 대기압에서 교반 중인 용기에서 배치식 또는 연속식으로 수행될 수 있으며, 연속 작업의 경우 체류 시간은 1-120분, 바람직하게는 5-60분의 범위이다. 선택적으로, 혼합물은 BHT, 토코페롤 또는 아스코르브산 및 그것의 유도체들과 같은 항산화제 또는 항산화제들의 혼합물을 또한 포함할 수 있다. 다음에, 침전이나 원심분리에 의해서 수성 상으로부터 비-수성 상이 분리된다. 분리된 비-수성 상은 10 내지 100°C, 바람직하게는 20 내지 60°C의 온도 및 0.1 내지 5bar의 압력, 바람직하게는 대기압에서 물, 일가 알콜, 아세톤 또는 황산나트륨이나 염화나트륨의 수용액을 포함하는 세척 혼합물로 세척된다. 세척된 비-수성 상은 선택적으로 여과되어 불용성 고체가 제거될 수 있다. 이후 사용되는 비-수성 상이라는 용어는 앞서 설명된 산 첨가 단계 후에 얻어진 세척된 비-수성 상뿐만 아니라 세척되고 여과된 비-수성 상을 모두 지칭한다.

[0038] 선택적으로, 비-수성 상은 용매 증발에 의해서 부분적으로 또는 완전히 용매 제거될 수 있으며, 이것은 150°C 이하의 온도에서 감압하에 이루어지는 것이 바람직하고, 얻어진 것은 부분적으로 또는 완전히 용매 제거된 비-수성 상이라고 한다.

[0039] 선택적으로, 비-수성 상 또는 부분적으로 또는 완전히 용매 제거된 비-수성 상은 결정화 단계를 거칠 수 있다. 이를 위해서, 상은 석유 에테르, 펜탄, 헥산, 헵탄, 옥탄, 시클로헥산, 메틸시클로헥산, 톨루엔, 크실렌, 메틸크실렌, 에틸벤젠, 디클로로메탄, 클로로포름, 사염화탄소, 이염화에틸렌, 삼염화에틸렌, 과염화에틸렌, 디메틸슬록시드, 디메틸포름아미드, 테트라히드로푸란, 메탄올, 에탄올, 아세톤 및 메틸에틸케톤으로 구성되는 군으로부터 선택된 용매 또는 용매들의 혼합물과 혼합된다. 바람직한 용매는 헥산, 에탄올, 아세톤, 또는 이들의 혼합물이다. 이 단계에서 사용되는 용매의 양은 결정화되는 상 100g 당 50-1000g, 바람직하게는 결정화되는 상 100g 당 100-500g 범위일 수 있다. 이어서, 형성된 혼합물은 액체 상 중에 결정화된 고체 상이 형성될 때까지 0 내지 -50°C, 바람직하게는 -20 내지 -40°C 범위의 온도에서 냉각된다. 결정화 작업은 배치식 또는 연속식으로, 바람직하게는 대기압에서 수행될 수 있다. 이어서, 결정화된 고체 상과 액체 상은, 바람직하게는 결정화의 최종 온도와 동일한 온도에서 여과 또는 원심분리에 의해 분리된다. 다음에, 액체 상의 용매가 용매의 증발에 의해서 부분적으로 또는 완전히 제거되고, 여기서 얻어진 것을 결정화 단계에서 생산된 제 1의 부분적으로 또는 완전히 용매 제거된 상이라고 하며, 이용된 미정제 또는 정제된 수산 오일보다 고 농도로 EPA 및 DHA를 포함한다.

- [0040] 선택적으로, 비-수성 상 또는 부분적으로 또는 완전히 용매 제거된 비-수성 상 또는 결정화 단계에서 생산된 제 1의 부분적 또는 완전 용매 제거된 상은 요소로 처리되거나, 또는 지방산 또는 이들의 유도체와 복합체나 애덕트를 형성하는 다른 화합물로 처리될 수 있다. 이를 위해서, 50 내지 100°C의 온도에서 용해액이 형성되며, 용해액은 유기 용매 중에서 복합체 또는 애덕트를 형성하는 화합물 용액 100g 당 요소 처리될 상 5~40g으로 구성되고, 에탄올 100g 당 대략 요소 30g을 함유하는 에탄올 중의 요소인 것이 바람직하다. 다음에, 용해액이 실온 이하로 냉각되고, 이로써 복합체 또는 애덕트를 포함하는 고체 상과 고체 무함유 액체 상이 형성된다. 복합체 또는 애덕트와 고체 무함유 액체 상이 여과나 원심분리에 의해서 분리되고, 고체 무함유 액체 상은 해당 상에 용해되어 있는 복합체나 애덕트를 형성하는 잔류 화합물이 완전히 추출될 때까지 물 또는 산성 용액으로 세척된다. 다음에, 고체 무함유 액체 상의 용매가 완전히 또는 부분적으로 제거되면, 여기서 얻어진 것을 복합체 형성 단계에서 생산된 제 2의 부분적으로 또는 완전히 용매 제거된 상이라고 하는데, 원료보다 고 농도로 EPA 및 DHA를 포함한다.
- [0041] 다음에, 비-수성 상 또는 부분적으로 또는 완전히 용매 제거된 비-수성 상 또는 결정화 단계에서 생산된 제 1의 부분적 또는 완전 용매 제거된 상 또는 복합체 형성에서 생산된 제 2의 부분적 또는 완전 용매 제거된 상은 에스테르화 단계를 거친다. 이를 위해서, 상은 메탄올 또는 에탄올과 같은 일가 알콜 또는 글리세롤과 같은 다가 알콜과 상 100g 당 알콜 500g 내지 상 100g 당 알콜 20g의 범위, 바람직하게는 20 내지 200g 범위의 비율로 혼합되고, 황산, p-톨루엔 술폰산, 메탄술폰산, 에탄술폰산 또는 앰버라이트와 같은 수지와 상 100g 당 촉매 0.05~10g의 비율로 혼합된다. 에스테르화 단계는 10 내지 150°C의 온도, 바람직하게는 30 내지 80°C의 온도 및 0.1 내지 5bar의 압력, 바람직하게는 대기압에서 교반 중인 반응기에서 배치식 또는 연속식으로 수행될 수 있다. 배치식 작업의 경우 에스테르화 시간 또는 연속식 작업의 경우 체류 시간은 30~600분, 바람직하게는 60~240분의 범위이다. 에스테르화 단계가 끝나면 지방산의 에스테르를 포함하는 에스테르화된 혼합물이 얻어진다. 다음에, 고체 촉매인 경우에는 여과에 의해서, 또는 액체 촉매인 경우에는 수성 용액을 사용한 중화 및 세척에 의해서 에스테르화된 혼합물로부터 촉매가 제거되고, 이로써 촉매 무함유의 에스테르화된 혼합물이 형성된다. 촉매 무함유의 에스테르화된 혼합물은, 바람직하게는 150°C 미만의 온도에서 감압하에 증발에 의해서 용매 제거되고, 이로써 지방산의 에스테르를 포함하는 용매 제거된 혼합물이 얻어진다.
- [0042] 이어서, 용매 제거된 지방산의 에스테르들의 혼합물이 단거리 증류 칼럼에서 증류되어 증류액과 잔류물이 얻어질 수 있다.
- [0043] 증류액 또는 잔류물은 상기 조건에서 다시 증류될 수 있으며, 이로써 제 2의 증류액과 제 2의 잔류물이 얻어진다. 이 과정은 EPA 및 DHA의 원하는 농도의 에스테르 또는 EPA 및 DHA의 농축물을 함유하는 증류액이나 잔류물이 얻어질 때까지 반복될 수 있다. 증류는 180°C 미만, 바람직하게는 150°C 미만의 온도 및 1mbar 미만, 바람직하게는 0.1mbar 미만의 압력에서 수행될 수 있다. 결과의 농축물은 EPA 및 DHA 에스테르를 최대 95중량%까지 포함할 수 있다.
- [0044] EPA 및 DHA 또는 에스테르 함유 분획은 1회 이상의 추가 정제 단계를 더 거칠 수 있는데, 예를 들어 -5°C 미만의 온도에서 냉각에 의한 분별 및 여과나 원심분리에 의한 고체의 분리; 200°C 이하, 바람직하게는 150°C 미만의 온도에서 감압하에 질소 또는 탈취용 스트림을 사용하여 충진 칼럼 또는 트레이 칼럼에서 탈취; 특히 규조토 (infusorial earth), 활성탄, 제올라이트 및 분자 시브의 사용에 의한 흡착 단계를 거칠 수 있다.
- [0045] 마찬가지로, 선택적으로, EPA 및 DHA의 농축물은 글리세린을 사용하여 트랜스에스테르화될 수 있으며, 이로써 EPA와 DHA의 농축된 글리세리드가 형성된다.
- [0046] 특히 토코페롤, 토코페롤의 에스테르, 아스코르브산 및 이들의 유도체, 로즈마리 추출물, 볼도 추출물과 같은 하나 이상의 적합한 항산화제가 EPA와 DHA의 농축물에 첨가될 수 있다. 바람직하게, 농축물 중 항산화제의 양은 농축물의 1중량% 미만, 바람직하게는 0.5중량% 미만이다.
- [0047] 얻어진 EPA와 DHA의 농축물은 어유 유도체들의 소비와 관련된 바람직하지 않은 부작용, 예를 들어 특히 위역류, 위장 및 피부 자극 및 고창이 없어진다. 추가로, EPA와 DHA의 농축물은 놀랍게도 생선 냄새나 향미로의 회복을 나타내지 않으며, 따라서 향미 및 냄새 차폐제, 캡슐화 및 마이크로 캡슐화에 의존할 필요 없이 식품 또는 제약 제품의 성분으로서 활용이 가능하다. 또한, 개시된 방법은 어유에 존재할 수 있는 지속적 유기 오염물질과 중금속의 함량을 국제적으로 허용되는 최대 수준 이하로 유의하게 감소시킨다. 또한, 상기 방법은 트랜스 지방산 등을 생성하지 않으며, 놀랍게도 예상외로 트랜스 지방산이 원료에 존재하는 경우 트랜스 지방산의 함량을 감소시킬 수도 있다.

[0048] 도면의 설명

도 1을 참조하면, 미정제 어유가 라인(1)을 통해 비누화 반응기(4), 즉 교반 중인 용기에 공급되며, 여기에 수산화나트륨 용액 스트림이 또한 오일의 비누화 지수와 등가의 비율로 또는 최대 20%까지 과량으로 라인(2)을 통해 공급되고, 50%의 수성 에탄올 스트림이 라인(3)을 통해서 반응기에 공급된다. 반응기(4)는 40 내지 80°C의 온도 및 1 내지 2bar의 압력에서 작동하며, 체류 시간은 45분이고, 비누화된 혼합물이 생성된다. 상기 비누화된 혼합물은 라인(7)을 통해 2 내지 5bar의 압력 및 20 내지 60°C의 온도에서 작동하는 역류 추출 칼럼(8)에 공급된다. 추출 칼럼(8)에는 라인(9)을 통해서 60 내지 80°C 범위의 비동점을 가진 지방족 탄화수소들의 혼합물이 공급되고, 라인(10)을 통해서는 지방족 탄화수소들의 혼합물과 추출된 물질을 포함하는 추출물 상이 회수되며, 라인(11)을 통해서는 지방산의 알칼리성 염을 포함하는 정제된 상이 회수된다. 정제된 상은 라인(11)을 통해서 산 첨가 반응기(12)로 공급되며, 여기에 염산 스트림이 또한 정제된 상의 총 알칼리도와 등가의 비율로 또는 최대 10%까지 과량으로 라인(13)을 통해서 공급되고 있다. 반응기(12)는 교반 중이며, 20 내지 70°C의 온도 및 1 내지 2bar의 압력에서 작동하고, 체류 시간은 최대 30분까지이며, 산 첨가된 혼합물이 생성된다. 산 첨가된 혼합물은 라인(14)을 통해 침전기(15)로 공급되어 산 첨가의 수성 상으로부터 비-수성 상이 분리된다. 침전기(15)는 20 내지 70°C의 온도 및 1 내지 2bar의 압력에서 작동하고, 체류 시간은 5 내지 60분이다. 수성상은 라인(16)을 통해서 제거되어 후속 처리된 다음, 용매와 글리세린으로 회수된다. 라인(17)을 통해서 침전기(15)에서 분리된 비-수성 상이 세척 반응기(18)로 공급되고, 여기서 교반되면서 50% 에탄올 수용액을 포함하는 스트림(19)과 접촉되어 세척 혼합물이 생성된다. 반응기(18)는 20 내지 70°C의 온도 및 1 내지 2bar의 압력에서 작동하고, 체류 시간은 1 내지 30분이다. 반응기(18)의 세척 혼합물은 라인(20)을 통해 디캔터(21)로 공급되어 세척 혼합물의 중질상으로부터 경질상이 분리된다. 디캔터(21)는 20 내지 70°C의 온도 및 1 내지 2bar의 온도에서 작동하고, 체류 시간은 5 내지 60분이다. 중질상은 라인(22)을 통해서 제거되어 후속 처리된 다음, 용매로 회수되거나, 또는 전부 또는 일부가 세척 반응기(18)로 재순환된다. 라인(23)을 통해서 침전기(21)에서 분리된 경질상이 에스테르화 반응기(24)로 공급되고, 또한 라인(25)을 통해서는 에탄올에 용해된 p-톨루엔 술폰산 용액의 스트림이 공급된다. 반응기(24)는 교반되면서 40 및 85°C의 온도 및 0.5 내지 2bar의 압력에서 작동되고, 체류 시간은 180분이며, 에스테르화된 혼합물이 생성된다. 에스테르화된 혼합물은 라인(26)을 통해서 세척 및 중화 반응기(27)로 공급되고, 여기서 교반되면서 20 내지 70°C의 온도 및 1 내지 2bar의 압력에서 1 내지 30분의 체류 시간으로 5% 탄산나트륨 수용액을 포함하는 스트림(28)과 접촉되어 중화된 세척 혼합물이 생성된다. 라인(30)을 통해서 세척 반응기(27)의 중화된 세척 혼합물이 침전기(31)로 공급되어 지방산의 에스테르들의 혼합물과 수성 상이 분리된다. 디캔터(31)는 20 내지 70°C의 온도 및 1 내지 2bar의 압력에서 작동되고, 체류 시간은 6 내지 60분이다. 라인(32)을 통해서 수성 상이 제거되어 후속 처리된 다음, 용매로서 회수된다. 침전기(31)에서 분리된 지방산의 에스테르들의 혼합물이 라인(33)을 통해서 50 내지 180°C의 온도 및 1 내지 100mbar의 압력에서, 30분 이하의 체류 시간으로 작동되는 하강막 증발기(34)에 공급되어, 지방산의 에스테르들을 포함하는 증류액 및 용매 제거된 잔류물이 얻어진다. 증류액은 라인(35)을 통해 도시되지 않은 저장 탱크로 공급된다. 용매 제거된 지방산의 에스테르는 라인(36)을 통해 50 내지 180°C의 온도 및 0.001 내지 1mbar의 압력에서 작동되는 단거리 증발기(37)로 공급된다. 라인(38)을 통해 단거리 증발기(37)로부터 증류액이 제거되고, 라인(39)을 통해 단거리 증발기(37)의 증류 잔류물이 제거되어 단거리 증발기(40)로 공급된다. 단거리 증발기(40)는 50 내지 180°C의 온도 및 0.001 내지 1mbar의 압력에서 작동된다. 라인(41)을 통해서 단거리 증발기(40)의 증류 잔류물이 제거되고, 라인(42)을 통해서 EPA와 DHA의 에스테르 농축 혼합물을 포함하는 단거리 증발기(40)의 증류액이 제거된다.

[0050] 실시예

[0051] 실시예 1 내지 11은 본 발명이 실시될 수 있는 방식들과 얻어진 농축물의 현저한 감각수용성 및 산화 안정성을 예시한다.

[0052] 비교예 1(EP 0 409 903)

[0053] EP 0 409 903에 개시된 과정에 따라서 연어 오일로부터 EPA와 DHA의 에틸 에스테르 농축물을 제조한다.

[0054] 표 2에 나타낸 특징들을 가진 연어 오일(샘플 M1) 300g, 에탄올 150g 및 28% 수산화나트륨 증류수 용액 150g을 2000mL Erlenmeyer 플라스크에 넣었다. 혼합물을 1시간 동안 질소를 불어 넣으면서 환류시켜 연어 오일을 완전히 비누화한 다음, 26% 염산 수용액 160g을 가하고, 혼합물을 5분간 세게 흔들었다. 다음에, 석유 에테르 450mL를 가하고 다시 한번 흔들었다. 혼합물을 2000mL 분리깔대기에 넣어 침전시켜 위층과 아래층으로 분리했다. 위층은 제거하고, 아래층의 수성 상을 석유 에테르 450mL로 2번 이상 추출했다. 석유 에테르 추출물을

2000mL 깔대기에 수집해서 중성이 될 때까지 물로 세척했다. 세척된 추출물을 10mbar 및 60°C에서 작동하는 회전 증발기에서 증발시켰다. 이어서, 미량의 석유 에테르를 제거하고, 회전 증발기의 증발 잔류물을 단거리 증류 칼럼 KDL5 UIC에 공급했다. 증류 칼럼의 유속은 1250mL/h, 재킷 온도는 90°C, 응축기 온도는 -4°C, 롤러 속도는 350rpm, 압력은 4mbar였다. 연어 오일의 지방산들의 혼합물이 얻어졌으며, 장쇄  $\omega$ -3 지방산은 30.1%였다 (샘플 M2).

[0055] 연어 지방산들의 혼합물을 단거리 증류 칼럼 KDL5 UIC에 공급했다. 증류 칼럼의 유속은 100mL/h, 재킷 온도는 65°C, 응축기 온도는 4°C, 롤러 속도는 350rpm, 압력은 0.005mbar였고, 제 1 증류액 및 제 1 잔류물이 얻어졌다. 85°C의 온도에서 제 1 잔류물에 단거리 증류의 2차 단계를 행하여 제 2 증류액 및 제 2 잔류물을 얻었다. 제 2 증류액은 장쇄  $\omega$ -3 지방산을 52.2% 함유했다(샘플 M3).

[0056] 비교예 1의 샘플을 분석한 결과를 표 2에 나타낸다.

표 2

비교예 1의 샘플 분석

	연어 오일 샘플 M1	제1 증류액 샘플 M2	제2 증류액 샘플 M3
EPA, % p/p	10.3	11.4	16.6
DHA, % p/p	15.1	16.8	30.7
총 오메가-3, % p/p	28.2	30.1	52.2
PCB, ppb	148.6	133.2	96.7
디옥신으로서 PCB, ppt	4.6	4.5	4.1
디옥신+푸란, ppt	2.7	2.4	2.1
페록시드, meq/kg	7.2	1.3	1.1
아니시딘	6.1	2.4	1.9
Totox	20.3	8.7	4.1
중금속			
비소, ppb	1200	538	359

[0058] 비교예 2(US 5,130,061)

US 5,130,061에 개시된 과정에 따라서 연어 오일로부터 EPA와 DHA의 에틸 에스테르 농축물을 제조한다.

[0060] 비교예 1에서 사용된 연어 오일 300g과 무수 에탄올 중의 5% 황산 용액 200g을 2000mL Erlenmeyer 플라스크에서 혼합했다. 혼합물을 8시간 동안 질소를 불어 넣으면서 환류시켰다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각하면서 감압 하에 증류하여 과량의 에탄올을 제거했다. 증류 잔류물을 헥산 400mL로 회석해서 물 500mL로 세척했다. 이 비균질 혼합물을 세게 훼들었다. 분리깔대기에서 헥산 상으로부터 수성 상을 분리하고, 헥산 상은 수성 상의 pH 가 중성이 될 때까지 물로 반복해서 세척했다. 세척된 헥산 추출물을 실리카겔 칼럼을 통과시켜 정제했다. 이어서, 정제된 헥산 추출물을 최대 10mbar 및 60°C에서 회전 증발기에서 증발시켰다. 미량의 용매를 제거하고, 회전 증발기의 증발 잔류물을 단거리 증류 칼럼 KDL5 UIC에 공급했다. 증류 칼럼의 유속은 1250mL/h, 재킷 온도는 90°C, 응축기 온도는 -4°C, 롤러 속도는 350rpm, 압력은 4mbar였다. 장쇄 (에스테르화된)  $\omega$ -3 지방산을 27.9% 함유하는 에틸 에스테르들의 혼합물이 얻어졌다(샘플 M4).

[0061] 에틸 에스테르들의 혼합물을 단거리 증류 칼럼 KDL5 UIC에 공급했다. 증류 칼럼의 유속은 100mL/h, 재킷 온도는 65°C, 응축기 온도는 4°C, 롤러 속도는 350 rpm, 압력은 0.005mbar였고, 제 1 증류액 및 제 1 잔류물이 얻어졌다. 85°C의 온도에서 제 1 잔류물에 단거리 증류의 2차 단계를 행하여 제 2 증류액 및 제 2 잔류물을 얻었다. 제 2 증류액은 장쇄 (에스테르화된) 지방산을 51.6% 함유했다(샘플 M5).

[0062] 비교예 2의 샘플을 분석한 결과를 표 3에 나타낸다.

표 3

[0063]

## 비교예 2의 샘플 분석

	연어 오일 샘플 M1	제1 증류액 샘플 M4	제2 증류액 샘플 M5
EPA, % p/p	10,3	9,9	17,1
DHA, % p/p	15,1	14,8	29,7
총 오메가-3, % p/p	28,2	27,9	51,6
PCB, ppb	148,6	136,4	103,7
디옥신으로서 PCB, ppt	4,6	4,5	3,9
디옥신+푸란, ppt	2,7	2,5	2,3
페옥시드, meq/kg	7,2	7,5	3,9
아니시딘	6,1	6,0	2,4
Totox	20,3	21,0	10,2
중금속			
비소, ppb	1200	945	450

[0064]

실시예 1

[0065]

연어 오일의 EPA와 DHA의 에틸 에스테르 농축물을 제조한다.

[0066]

비교예 1에서 사용된 연어 오일 300g, 에탄올 150g 및 28% 수산화나트륨 증류수 용액 150g을 2000mL Erlenmeyer 플라스크에 넣었다. 혼합물을 1시간 동안 질소를 불어 넣으면서 환류시켜 연어 오일을 완전히 비누화했다.

[0067]

비누화된 혼합물을 3000mL 분리깔대기에 넣고, 에탄올 150g, 증류수 150g 및 헥산 900g을 깔대기에 넣었다. 결과의 혼합물을 세게 흔든 다음, 침전되도록 두었다. 위층의 헥산 상을 분리하고, 아래층의 수성 상을 헥산 700mL로 3회 이상 추출했다. 헥산 추출물을 감압하에 회전 증발기에서 용매 제거했다.

[0068]

20% 염산 수용액 200g을 가하여 수성 상에 산을 첨가했다. 결과의 유기상을 pH 4-5가 될 때까지 50% 에탄올 수용액을 조금씩 가해 세척한 다음, 10mbar 및 60°C에서 회전 증발기에서 증발시켰다. 장쇄 ω-3 지방산을 29.6% 함유하는 지방산들의 혼합물이 얻어졌다(샘플 M6).

[0069]

지방산들의 혼합물을 무수 에탄올 중의 1.0% 황산 용액 100g과 혼합해서 2시간 동안 환류시켰다. 혼합물이 일정한 산가에 도달하면 반응이 종료된 것으로 생각했다. 반응 혼합물을 10% 탄산나트륨 증류수 용액 40g으로 중화하고, 이어서 증류수 40g으로 조금씩 세척했다. 계속해서, 혼합물을 10mbar 및 60°C에서 회전 증발기에서 증발시켰다. 미량의 용매를 제거하고, 증발 잔류물을 단거리 증류 칼럼 KDL5 UIC에 공급했다. 증류 칼럼의 유속은 1250mL/h, 재킷 온도는 90°C, 응축기 온도는 -4°C, 롤러 속도는 350rpm, 압력은 4mbar였다. 장쇄 ω-3 지방산을 30.9% 함유하는 에틸 에스테르들의 혼합물이 얻어졌다(샘플 M7).

[0070]

에틸 에스테르들의 혼합물을 단거리 증류 칼럼 KDL5 UIC에 공급했다. 증류 칼럼의 유속은 100mL/h, 재킷 온도는 65°C, 응축기 온도는 4°C, 롤러 속도는 350 rpm, 압력은 0.005mbar였고, 제 1 증류액 및 제 1 잔류물이 얻어졌다. 85°C의 온도에서 단거리 증류 칼럼에서 제 1 잔류물을 다시 증류하여 제 2 증류액 및 제 2 잔류물을 얻었다. 제 2 증류액은 장쇄 ω-지방산을 52.3% 함유했다(샘플 M8).

[0071]

실시예 1의 샘플의 분석 결과를 표 4에 나타낸다.

**표 4**

## 실시예 1의 샘플 분석

	연어 오일 샘플 M1	지방산 샘플 M6	에틸 에스테르 샘플 M7	제2 증류액 샘플 M8
EPA, % p/p	10,3	10,1	10,3	20,4
DHA, % p/p	15,1	17,2	17,4	29,8
총 오메가-3, % p/p	28,2	29,6	30,9	52,3
PCB, ppb	148,6	46,3	44,9	26,7

디옥신으로서 PCB, ppt	4,6	0,8	1,0	1,2
디옥신+푸란, ppt	2,7	0,6	0,6	0,8
페옥시드, meq/kg	7,2	1,1	1,2	0,1
아니시딘	6,1	0,9	1,1	0,3
Totox	20,3	3,1	3,5	0,5
중금속				
비소, ppb	1200	200	205	< 100

[0073] 실시예 2

[0074] 정어리 오일로부터 EPA와 DHA의 에틸 에스테르 농축물을 제조한다.

[0075] Totox 값이 45인 정어리 오일을 사용하여 실시예 1을 반복했다. 샘플 분석 결과를 표 5에 나타낸다.

**표 5**

## 실시예 2의 샘플 분석

	정어리 오일	지방산	에틸 에스테르	제2 중류액
EPA, % p/p	16,1	16,3	16	30,1
DHA, % p/p	6,2	6,1	6,2	15,4
총 오메가-3, % p/p	24,1	24,2	23,4	48,2
PCB, ppb	104,6	41,6	44,1	18,5
디옥신으로서 PCB, ppt	3,2	0,3	0,4	0,6
디옥신+푸란, ppt	2,1	0,3	0,3	0,4
페옥시드, meq/kg	10,7	3,5	3,6	0,1
아니시딘	23,6	1,9	1,8	0,1
Totox	45	8,9	9,0	0,2
중금속				
비소, ppb	980	345	330	< 100

[0077] 실시예 3

[0078] 고등어 오일로부터 EPA와 DHA의 에틸 에스테르 농축물을 제조한다.

[0079] Totox 값이 33인 전갱이 오일을 사용하여 실시예 1을 반복했다. 샘플 분석 결과를 표 6에 나타낸다.

**표 6**

## 실시예 3의 샘플 분석

	전갱이 오일	지방산	에틸 에스테르	제2 중류액
EPA, % p/p	5,4	5,4	5,1	15,7
DHA, % p/p	16,8	16,9	16,3	32,2
총 오메가-3, % p/p	24,4	24,6	22,6	50,1
PCB, ppb	91	26	27	18
디옥신으로서 PCB, ppt	3,7	0,9	1,0	1,1
디옥신+푸란, ppt	3,1	0,5	0,5	0,4
페옥시드, meq/kg	9,2	4,1	3,8	0,3
아니시딘	14,6	1,1	1,1	0,2
Totox	33	9,3	8,7	0,8
중금속				

비소, ppb	890	210	196	< 100
---------	-----	-----	-----	-------

[0081] 실시예 4

200L 반응기에서 정어리 오일로부터 EPA와 DHA의 에틸 에스테르 농축물을 제조한다.

200L의 배풀을 구비한 재킷이 있는 터빈 교반되는 스테인리스 스틸 반응기를 에탄올 15kg, 18.7% 수산화나트륨 수용액 15kg 및 표 7에 나타낸 특징들을 가진 정어리 오일(샘플 M10) 15kg으로 채웠다. 혼합물을 1시간 동안 55°C까지 가열한 다음, 45°C까지 냉각했다. 다음에, 헥산 45kg을 가하고 10분간 교반했다. 혼합물을 15분간 침전되도록 방치하고, 수성 상으로부터 유기상을 분리했다. 수성 상을 동일한 과정을 사용하여 2번 추출했다. 헥산 추출물을 수집해서 감압하에 용매 제거했다. 수성 상 또는 정제된 상에 25°C에서 10% 염산 용액 28kg을 가하여 산을 침가하고, 혼합물을 5분간 교반했다. 산 침가된 혼합물을 15분간 침전되도록 방치하여, 수성 상과 유기상을 분리했다. 일단 유기상을 제거하고, 제거된 유기상을 pH 5가 될 때까지 50% 에탄올 수용액 10kg으로 세척했다. 세척된 유기상을 여과하여 혼탁되어 있는 고체를 분리했다. 세척되고 여과된 유기상을 최대 20중량 %까지 헥산으로 희석한 다음, 앵커 타입 교반기와 냉각 자켓을 구비한 150L의 2차 반응기로 옮겨서 -25°C까지 냉각했다. -25°C에서 냉각된 혼합물을 10 마이크론의 폴리에스테르 메시를 통해 여과되는 백에서 여과했다. 얻어진 여과물을 200L 반응기에 채우고, 200mbar의 압력에서 55°C에서 가열했다. 용매 제거된 지방산들의 혼합물을 80°C에서 에탄올 55kg에 용해된 요소 20kg의 용액과 접촉시켰다. 혼합물을 교반하여 요소와의 복합체를 형성하고 15°C로 냉각했다. 침전된 고체를 여과해서 분리하여 고체 무함유 여과물을 얻었다. 고체 무함유 여과물을 1°C로 냉각한 다음, 여과하여 제 2의 고체 무함유 여과물을 얻었다. 제 2의 고체 무함유 여과물을 물 50kg과 헥산 20kg에 용해된 염산 3kg과 혼합하고 교반한 다음, 침전하도록 두었다. 산성인 수성 상을 분리하고, 유기상을 pH가 중성이 될 때까지 물 5kg으로 세척했다. 80°C 및 50mbar에서 유기상을 용매 제거했다. ω-3 지방산을 77.2% 함유하는 지방산들의 혼합물 2.3kg이 얻어졌다(샘플 M11).

[0084] 다음에, 에탄올 10kg에 용해된 황산 40g로 반응기를 채우고 80°C에서 가열했다. 이어서, 반응기를 40°C까지 냉각하고, 헥산 10kg을 물 5kg에 용해된 탄산나트륨 70g과 함께 가했다. 혼합물을 5분간 교반한 다음, 수성 상을 침전시켜 유기상으로부터 분리했다. 유기상을 물 5kg으로 세척하고, 80°C 및 50mbar에서 용매 제거했다. ω-3 지방산을 70.9% 함유하는 지방산의 에틸 에스테르들의 혼합물 2.5kg이 얻어졌다(샘플 M12).

[0085] 에틸 에스테르로부터 미량의 용매를 제거하고, 단거리 증류 칼럼 KDL5 UIC에 혼합물을 공급했다. 증류 칼럼의 유속은 1250mL/h, 재킷 온도는 80°C, 응축기 온도는 -5°C, 롤러 속도는 350rpm, 압력은 4mbar였다. 증류된 에틸 에스테르들의 혼합물을 단거리 증류 칼럼 KDL5 UIC에 공급했다. 증류 칼럼의 유속은 90mL/h, 재킷 온도는 85°C, 응축기 온도는 4°C, 롤러 속도는 350rpm, 압력은 0.005mbar였고, 제 1 증류액 및 제 1 잔류물이 얻어졌다.

[0086] 제 1 잔류물을 70°C에서 감압하에 1% Tonsil과 30분간 혼합하고 여과하여 정제된 여과물을 얻었고, 이것에 98°C의 온도에서 단거리 증류의 2차 단계를 행하여 제 2 증류액 및 제 2 잔류물을 얻었다. 제 2 증류액은 장쇄 ω-3 지방산을 86.2% 함유했다. 제 2 증류액을 12시간 동안 -25°C까지 냉각한 다음, 여과했다. 결과의 여과물을 탈취 칼럼에 공급했다. 탈취 칼럼은 100°C의 온도 및 15mbar의 압력에서 130°C의 질소를 사용하여 탈취를 행한다. 장쇄 ω-3 지방산의 에틸 에스테르들의 탈취된 농축물(샘플 M13)이 얻어졌으며, 여기에 토코페롤의 에스테르들의 혼합물, 아스코르빌 팔미테이트 및 로즈마리 추출물을 2550ppm의 농도로 첨가했다.

[0087] 실시예 4의 샘플 분석 결과를 표 7에 나타낸다.

표 7

## 실시예 4의 샘플 분석

	정어리 오일 샘플 M10	지방산 샘플 M11	에틸 에스테르 샘플 M12	제2 증류액 샘플 M13
EPA, % p/p	10,3	29,9	27,1	29,1
DHA, % p/p	15,1	44,3	40,5	56,2
총 오메가-3, % p/p	26,1	77,2	70,9	86,3
PCB, ppb	98	44	46	17
디옥신으로서 PCB, ppt	3,8	1,8	1,7	1,2

디옥신+푸란, ppt	4,1	0,4	0,5	0,3
페옥시드, meq/kg	5,1	0,9	1,3	0,1
아니시딘	8,9	0,8	0,8	0,1
Totox	19,1	2,6	3,4	0,3
중금속				
비소, ppb	1090	304	321	< 100

[0089] 실시예 5

[0090] 200L 반응기에서 고등어 오일로부터 EPA와 DHA의 에틸 에스테르 농축물을 제조한다.

[0091] 200L의 배풀을 구비한 재킷이 있는 터빈 교반되는 스테인리스 스틸 반응기를 에탄올 15kg, 17.4% 수산화나트륨 수용액 15kg 및 표 8에 나타낸 특징들을 가진 실시예 3의 전쟁이 오일 15kg으로 채웠다. 혼합물을 1시간 동안 75°C까지 가열한 다음, 45°C까지 냉각했다. 다음에, 헥산 45kg을 가하고 10분간 교반했다. 혼합물을 15분간 침전되도록 방지하고, 수성 상으로부터 유기상을 분리했다. 수성 상을 동일한 과정을 사용하여 2번 추출했다. 수성 상 또는 정제된 상에 25°C에서 10% 염산 용액 26kg을 가하여 산을 첨가하고, 혼합물을 5분간 교반했다. 산 첨가된 혼합물을 15분간 침전되도록 방지하여, 수성 상과 유기상을 분리했다. 유기상을 pH 5가 될 때까지 50% 수용액 10kg으로 세척했다. 세척된 유기상을 에탄올 10kg에 용해된 황산 100g과 혼합하고, 80°C의 온도에 도달할 때까지 용매들의 혼합물을 가열 증류했다. 이어서, 반응기를 40°C로 냉각하고, 물 5kg에 용해된 탄산나트륨 350g을 가한 다음, 10분간 교반했다. 수성 상을 분리했다. 유기상을 물 5kg으로 세척하고, 80°C 및 50mbar에서 용매 제거했다. ω-3 지방산을 24.7% 함유하는 지방산의 에틸 에스테르들의 혼합물 14.6kg이 얻어졌다(샘플 M14).

[0092] 에틸 에스테르로부터 미량의 용매를 제거하고, 단거리 증류 칼럼 KDL5 UIC에 혼합물을 공급했다. 증류 칼럼의 유속은 1250mL/h, 재킷 온도는 80°C, 응축기 온도는 -5°C, 롤러 속도는 350rpm, 압력은 4mbar였다. 증류된 에틸 에스테르를 단거리 증류 칼럼 KDL5 UIC에 공급했다. 증류 칼럼의 유속은 90mL/h, 재킷 온도는 85°C, 응축기 온도는 4°C, 롤러 속도는 350rpm, 압력은 0.005mbar였고, 제 1 증류액 및 제 1 잔류물이 얻어졌다.

[0093] 계속해서, 제 1 잔류물에 96°C의 온도에서 2차 단거리 증류를 행했고, 제 2 증류액 및 제 2 잔류물이 얻어졌다. 제 2 증류액은 장쇄 ω-3 지방산을 51.2% 함유했다(샘플 M15). 마지막으로, 토코페롤 아세테이트(Grindox Toco 70, Danisco)를 2000ppm을 제 2 증류액과 혼합했다.

[0094] 실시예 5의 샘플 분석 결과를 표 8에 나타낸다.

**표 8**실시예 5의 샘플 분석

	전쟁이 오일	에틸 에스테르 샘플 M14	제2 증류액 샘플 M15
EPA, % p/p	5,4	5,8	12,9
DHA, % p/p	16,8	16,1	35,7
총 오메가-3, % p/p	24,4	24,7	51,2
PCB, ppb	91	31	15
디옥신으로서 PCB, ppt	3,7	1,4	1,0
디옥신+푸란, ppt	3,1	0,7	0,4
페옥시드, meq/kg	9,2	3,4	0,1
아니시딘	14,6	0,9	0,3
Totox	33	7,7	0,5
중금속			
비소, ppb	890	269	< 100

- [0096] 실시예 6
- [0097] 실시예 2 및 3의 농축물에서 EPA의 시스/트랜스 이성질체.
- [0098] 실시예 2의 제 2 중류액 1g을 10°C에서 수성 메탄올 중의 수산화칼륨 용액으로 24시간 동안 비누화했다. 다음에, 비누화된 혼합물을 10°C에서 1% 염산을 가하여 산을 첨가했다. 산 첨가된 혼합물을 석유 에테르로 3번 추출했다. 석유 에테르 추출물을 수집해서 20% 메탄올 수용액으로 세척하고, 세척된 추출물을 20°C 및 5mbar에서 회전 증발기에서 용매 제거했다. 잔류물을 삼불화붕소를 사용하여 메틸화했다. 장쇄 ω-3 지방산의 메틸 에스테르 870mg을 얻었다. 실시예 3의 제 2 중류액의 장쇄 ω-3 지방산의 메틸 에스테르 샘플을 유사한 방식으로 제조했다.
- [0099] 유사하게, 실시예 2의 정어리 오일과 실시예 3의 전갱이 오일의 지방산의 메틸 에스테르를 설명된 기술을 사용하여 제조했다.
- [0100] 모두 시스 (5,8,11,14,17) 에이코사펜타엔오산의 메틸 에스테르 표준물질을 Agilent Technologies의 5975Cinert의 선택적 질량 검출기를 구비한 기체 크로마토그래피 시리즈 7890A에 주사했다. 이것은 100-미터 SP 2560 칼럼을 사용하며, 칼럼의 내경은 0.25mm이고, 필름 두께는 0.20 마이크론이다. 크로마토그래피 프로그램은 초기 온도 140°C 5분; 2°C/분의 속도로 최대 240°C까지 온도 증가 후 240°C에서 30분간 유지하는 것이다. 주사기 및 검출기 온도는 250°C였다. 여분의 순수한 헬륨을 캐리어로 사용했다. 표준물질의 질량 스펙트럼을 데이터 라이브러리에 저장했다.
- [0101] 이어서, 실시예 2 및 3의 제 2 중류액의 샘플로부터 제조된 메틸 에스테르와 실시예 2 및 3의 원 오일로부터 얻어진 메틸 에스테르의 샘플을 크로마토그래피에 주사했다. 소프트웨어 Chemstation을 사용하여 메틸화된 각 샘플마다 99%의 "매치 웰러티"를 얻었다. 추가로, 크로마토그래피된 모든 메틸 에스테르의 크로마토그램과 스펙트로그램을 비교한바, EPA의 이성질화와 관련된 새로운 피크는 관찰되지 않았다.
- [0102] 추가로, AOCS Ce 1h-05의 방법에 따라서 16-22 탄소 원자의 지방산의 트랜스 이성질체의 함량을 결정했다. 결과를 표 9에 나타낸다. 볼 수 있는 대로, 실시예 2 및 3의 시험에서는 트랜스 이성질체가 생성되지 않았고, 예상외로 최종 산물에서 상기 이성질체가 감소하였다.

**표 9****실시예 2 및 3의 농축물 중의 트랜스 지방산의 분석**

% pp 메틸 에스테르 지방산 트랜스	정어리 오일 실시예 2	제2 중류액 실시예 2	전갱이 오일 실시예 3	제2 중류액 실시예 3
C16:1 T	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
C18:1 T	2,02%	1,18%	0,37%	0,28%
C18:2 T	0,22%	0,05%	0,15%	0,13%
C18:3 T	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
C20:1 T	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
C22:1 T	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

- [0103] 실시예 7
- [0104] 실시예 2 및 3의 지방산의 에틸 에스테르 샘플의 감각 평가 및 안정성 결정.
- [0105] 12명의 훈련된 패널들에 의해 감각수용성 및 안정성을 평가했다. 평가될 샘플은 무작위 3자리 숫자가 표시된 작은 유리잔에 15mL씩 담겨 각 패널에게 제공되었다. 오전 약 11시에 감각성 평가 연구실에서 평가를 수행했다.
- [0106] 제품의 감각 특성을 평가하는데 있어서 다음의 변수들이 고려되었다: 외형, 방향, 향미, 산패성 및 외부적 향미 및 악취의 존재. 상기 변수들의 측정 규모는 1점에서 9점 범위였으며, 9점은 향미의 경우 "양호한, 전형적인, 예외적으로 기분 좋은"을 의미하고, 1점은 "이상한, 불쾌한, 악취"를 의미한다. 산패성의 경우, 기준은 5점에서 1점의 범위였으며, 5점은 "산패 없음"을 의미하고, 1점은 "극도로 산패됨"을 의미한다.
- [0107] 표 10에 실시예 5(A)의 신선한 샘플과 실온에서 29주 저장한 후의 동일한 샘플인 지방산 M15의 에틸 에스테르 샘플의 감각수용성 평가에서 얻어진 평균 결과를 나타낸다. 향미, 악취 또는 외형 차폐제는 샘플에 첨가되지

않았다.

### 표 10

실시예 7의 감각수용성 평가 및 안정성의 결과

샘플	외형	방향	향미	산패성
M15 실시예 5(A)	7.5	7.6	7.1	4.7
M15 실시예 5(B)	7.9	7.4	7.2	4.6

[0110] 외형: 7.5의 점수는 외형이 "양호"하다는 것을 의미함.

[0111] 방향: 얻어진 점수는 7.6이었으며, "양호"하다는 것을 의미함.

[0112] 향미: 향미에 관하여, 7.1 점수의 샘플은 "양호"를 의미함.

[0113] 산패성: 4.6 점수의 샘플은 "산패성 낮음"을 의미함.

[0114] 볼 수 있는 대로, 모든 샘플은 허용되는 감각수용성 및 안정성을 가졌다.

#### 실시예 8

[0116] 섭취된 샘플의 부작용.

[0117] 어유로부터 얻어진 EPA와 DHA의 상이한 농축물에 의해 야기되는 부작용을 비교하기 위해서 10명의 지원자를 각각 5명씩 A와 B의 두 그룹으로 나누었다.

[0118] 요구르트 900g에 EPA 33g과 DHA 22g를 함유하는 지방산 제제의 상업적 에틸 에스테르 100g을 혼합했다(샘플 1). 병행 방식으로 실시예 5의 에틸 에스테르 샘플 M15 100g을 요구르트 900g에 혼합했다(샘플 2).

[0119] 그룹 A의 각 구성원은 샘플 1의 요구르트 혼합물을 150g을 섭취했고, 그룹 B의 각 구성원은 샘플 2의 요구르트 혼합물을 150g을 섭취했다. 섭취 후 3시간 뒤에 그룹 A에서 4명과 그룹 B에서 1명이 위 역류를 경험했다고 보고했다.

[0120] 1주일 후에 상기 설명된 대로 신선하게 제조된 샘플 1과 샘플 2를 사용하여 그룹 A와 B의 동일한 사람들을 대상으로 시험을 반복했으며, 다만 이번에는 그룹 A의 구성원에 샘플 2를 제공했고, 그룹 B의 구성원에 샘플 1을 제공했다. 섭취 후 3시간 뒤에 그룹 A의 구성원은 아무도 위 역류를 경험하지 않았지만, 그룹 B에서는 5명이 모두 위 역류를 경험했다고 보고했다.

[0121] 본원에 개시된 방법에 따라서 제조된 EPA와 DHA의 농축물들은 어유 유도체의 섭취와 통상 관련되는 특징적인 부작용을 나타내지 않는다고 결론을 내릴 수 있다.

#### 실시예 9

[0123] 산화 조건에서 유지된 샘플의 감각 평가

[0124] 실시예 5의 샘플 M15가 20g 담긴 직경 15cm의 페트리 접시를 45°C의 강제 대류식 오븐에 6시간 보관했다. 이어서, 샘플을 오븐에서 꺼내서 냉각했다.

[0125] 5명의 패널에 의해 샘플을 평가했다. 생선 냄새는 검출되지 않았다.

[0126] 비교예 1의 샘플 M3를 사용하여 시험을 반복했다. 산패된 생선 냄새가 패널에 의해 인식되었다.

[0127] 비교예 2의 샘플 M5를 사용하여 시험을 반복했다. 다시, 산패된 생선 냄새가 패널에 의해 인식되었다.

[0128] 실시예 8에서 사용된 지방산 33/22 EPA/DHA의 에틸 에스테르 샘플을 사용하여 시험을 반복했다. 다시, 산패된 생선 냄새가 패널에 의해 인식되었다.

#### 실시예 10

[0130] 샘플 M15의 산화 안정성의 결정.

[0131] 실시예 5의 샘플 M15의 일부분의 산화 안정성을 Rancimat 검사법으로 측정했다. 80°C에서 유도 시간은 28.11±0.97시간이었다. 병행하여, 실시예 8에서 사용된 에틸 에스테르 33/22의 샘플을 대상으로 Rancimat 검사를 수

행했다. 80°C에서 유도 시간은 1.67±0.10시간이었다.

[0132] 실시예 11

[0133] 샘플의 질량 스펙트럼.

[0134] 실시예 4의 핵산 잔류물 샘플을 질량 검출기를 구비한 5975Cinert에 연결된 HP7890 크로마토그래피에 의해 판정했다. 크로마토그래피 기록은 표 11에서 볼 수 있는 대로 1000ppm을 초과하는 농도로 50개 이상의 화합물이 샘플에 존재함을 시사했다.

### 표 11

실시예 4의 핵산 잔류물의 GC-MS 분석

No.	화합물 명칭	일치%	CAS #
1	베타-페넨	93	000127-91-3
2	1,2-벤젠디카르복실산, 모노(2-에틸헥실)에스테르	50	004376-20-9
3	1,4-부탄디아민, N-(3-아미노프로필)	47	000124-20-9
4	1,6-옥타디엔-3-올, 3,7-디메틸	30	000078-70-6
5	1-아닐리노이소퀴놀린	41	013797-20-1
6	1-노나데센	94	018435-45-5
7	1R-알파-페넨	96	007785-70-8
8	2(1H)-나프탈레논, 3,4,4a,5,6,7-헥사히드로-4a-[(메틸아미노)메틸]	43	1000197-08-7
9	2,3-디히드로-4-메틸-8-니트로-1H-1,5-벤조디아제핀-2-온	52	037546-88-6
10	2-데카논	55	000693-54-9
11	3,5-디-tert-부틸-4-히드록시벤즈알데히드	64	001620-98-0
12	3,5-디-tert-부틸-4-히드록시벤질알콜	93	000088-26-6
13	3-카렌	95	013466-78-9
14	3-시클로헥센-1-올, 4-메틸-1-(1-메틸에틸)	93	000562-74-3
15	3-플루오로-2,2,3,4,4,5,5,6,6,7,7-운데카메틸-[1,2,3,4,5,6,7]옥사헥사실례판	49	1000311-73-1
16	4,4'-에틸렌비스(2,6-디-tert-부틸페놀)	94	001516-94-5
17	4,7,10,13,16,19-도코사헥사엔오산, 메틸 에스테르, (모두-Z)	38	002566-90-7
18	4-[4-메틸아미노-1-메틸부틸아미노]-7-클로로퀴놀린	27	031510-53-9
19	5-(2-아미노프로필)-2-메틸페놀	38	021618-99-5
20	5,8,11,14,17-에이코사펜타엔오산, 메틸 에스테르, (모두-Z)	86	002734-47
21	5-안드로스텐-17-알파-에티닐-3-베타-디올	70	1000126-90-5
22	아세타미드, 2,2,2-트리클로로	53	000594-65-0
23	벤젠, 1-메틸-2-(1-메틸에틸)	97	000527-84-4
24	벤조[h]퀴놀린, 2,4-디메틸	46	000605-67-4
25	벤조산, 3,5-비스(1,1-디메틸에틸)-4-히드록시-, 메틸 에스테르	60	002511-22-0
26	벤질알콜, 알파-(1-아미노에틸)-m-히드록시-	25	000054-49-9
27	부탄아미드, 3-메틸	38	000541-46-8
28	부틸화 히드록시톨루엔	89	000128-37-0
29	콜레스테트-5-엔-3-올(3. 베타)	99	000057-88-5
30	시트로넬릴 이소부티레이트	64	000097-89-2
31	시클로헥산, 1,2,4-트리에텐일	45	002855-27-8
32	시클로프로판메탄올, 2-메틸-2-(4-메틸-3-펜텐일)	38	000541-05-9
33	디히드로쿠마린, 4,4,5,7,8-펜타메틸	46	039170-97-3
34	d1-알라닐-1-페닐알라닌	43	108740-86-9
35	도데칸	58	000112-40-3
36	도데칸, 4-메틸	58	006117-97-1
37	유칼립톨	98	000470-82-6
38	헵탄아미드, N-페닐	38	056051-98-0
39	헥사데칸	95	000544-76-3
40	헥사데칸산, 에틸 에스테르	98	000628-97-7
41	메틸 (Z)-5,11,14,17-에이코사테트라에노에이트	50	059149-01-8
42	펜타데칸	96	000629-62-9

43	펜타데칸, 2,6,10,14-테트라메틸	91	001921-70-6
44	펜에틸아민, p.알파-디메틸	43	000064-11-9
45	페놀, 2,6-비스(1,1-디메틸에틸 에틸에틸)	50	004130-42-1
46	페놀, 3-(1,1-디메틸에틸)-4-메톡시	60	000088-32-4
47	프탈산, 부틸헥실 에스테르	59	1000308-99-5
48	프테린-6-카르복실산	22	000948-60-7
49	스쿠알렌	99	007683-64-9
50	테트라데칸	92	000629-59-4
51	티오시안산, 5.알파-콜레스탄-3.베타-일 에스테르	38	020997-50-6
52	티오시안산, 5.알파-콜레스탄-3.베타-일 에스테르	52	020997-50-6
53	티오펜, 2,5-디부틸	59	006911-45-1
54	트리데칸	92	000629-50-5
55	운데칸산, 에틸 에스테르	70	000627-90-7

[0136] 표 11에 나타낸 데이터로부터 결론을 내릴 수 있듯이, 개시된 방법은 자연발생 화합물인 상이한  $\omega$ -3 지방산 및 오염물질을 포함하여 많은 어유 농축물에서 부작용 및 향미와 냄새의 바람직하지 않은 회복을 초래할 수 있는 상당한 부류의 화합물들을 수산 오일에서 제거할 수 있다.

## 도면

### 도면1

