



등록특허 10-2263760



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월11일  
(11) 등록번호 10-2263760  
(24) 등록일자 2021년06월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C11C 1/08* (2006.01) *B01D 15/18* (2006.01)

(52) CPC특허분류  
*C11C 1/08* (2013.01)  
*B01D 15/185* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7032878

(22) 출원일자(국제) 2014년04월23일  
심사청구일자 2019년04월15일

(85) 번역문제출일자 2015년11월18일

(65) 공개번호 10-2016-0005046

(43) 공개일자 2016년01월13일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2014/058166

(87) 국제공개번호 WO 2014/180654

국제공개일자 2014년11월13일

(30) 우선권주장

13305596.2 2013년05월07일

유럽특허청(EPO)(EP)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문현

US20030222024 A1

WO2013005046 A1

US20110091947 A1

US20050245405 A1

(73) 특허권자

그룹 노바셉

프랑스 에프 54340 품페이 블러바드 드 라 모젤  
사이트 에펠

(72) 발명자

발레리 에릭

프랑스 에프-54425 솔쉬르 레 낭시 그랑드 뤼 8

아담 필리페

프랑스 에프-54320 막세빌 뤼 드 라 쥬스티스 42

블레오 장

프랑스 에프-54000 낭시 비스 뤼 드 메츠 58

(74) 대리인

리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 37 항

심사관 : 박소일

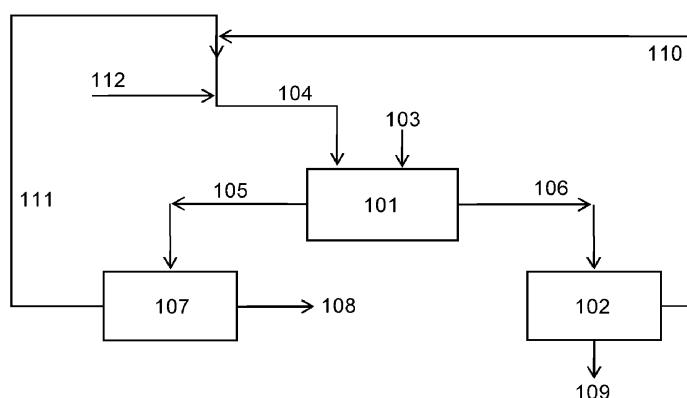
(54) 발명의 명칭 고도 정제된 다가 불포화 지방산의 제조를 위한 크로마토그래피 방법

**(57) 요약**

본 발명은 공급물 혼합물로부터 제1 다가 불포화 지방산을 회수하는 방법으로서, 상기 공급물 혼합물은 상기 제1 다가 불포화 지방산 외에 적어도 제2 지방산을 포함하고, 상기 방법은 하기 단계들을 포함하는 방법에 관한 것이다: - 수계 유기 용리제를 사용하여 주요 크로마토그래피 분리 단계를 수행함으로써, 상기 제1 다가 불포화 지방

(뒷면에 계속)

**대 표 도** - 도11



산이 풍부한 제1 용리제 스트림 및 상기 제2 지방산이 풍부한 제2 용리제 스트림을 수거하는 단계; - 상기 제2 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 고갈된 제2 용리제 스트림을 얻는 단계로서, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 중량비는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 중량비보다 낮은 단계; - 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 적어도 일부를 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계.

(52) CPC특허분류

**B01D 15/1892** (2013.01)

(30) 우선권주장

61/820,459 2013년05월07일 미국(US)

13/897,056 2013년05월17일 미국(US)

14/149,420 2014년01월07일 미국(US)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

공급물 혼합물로부터 제1 다가 불포화 지방산을 회수하는 방법으로서, 상기 공급물 혼합물은 상기 제1 다가 불포화 지방산 외에 적어도 제2 지방산을 포함하고, 상기 방법은,

- 수계 유기 용리제를 사용하여 주요 크로마토그래피 분리 단계를 수행함으로써, 상기 제1 다가 불포화 지방산이 풍부한 제1 용리제 스트림 및 상기 제2 지방산이 풍부한 제2 용리제 스트림을 수거하는 단계;
- 상기 제2 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 상기 농축 단계 이전의 제2 용리제 스트림보다 더 높은 농도의 제2 지방산을 포함하는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 상기 농축 단계 이전의 제2 용리제 스트림보다 더 낮은 농도의 제2 지방산을 포함하는 고갈된 제2 용리제 스트림을 얻는 단계로서, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 중량비는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 중량비보다 낮은 단계;
- 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 적어도 일부를 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 중량비는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 중량비의 0.95 배 미만인 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

- 상기 제1 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 상기 농축 단계 이전의 제1 용리제 스트림보다 더 높은 농도의 제1 다가 불포화 지방산을 포함하는 농축된 지방산의 스트림을 얻고, 다른 한편으로는 상기 농축 단계 이전의 제1 용리제 스트림보다 더 낮은 농도의 제1 다가 불포화 지방산을 포함하는 고갈된 제1 용리제 스트림을 얻는 단계, 및
- 상기 고갈된 제1 용리제 스트림의 적어도 일부를 재순환시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 고갈된 제1 용리제 스트림의 유량은 상기 제1 용리제 스트림의 유량의 적어도 90 %인 방법.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

단일의 분리 단계, 즉 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에 단일의 예비 분리 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 단일의 추가 분리 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서,

세 개 이상의 크로마토그래피 분리 단계로 본질적으로 이루어지는 방법.

#### 청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서,

재순환 전에 상기 고갈된 제2 용리제 스트림에 새로운 물을 첨가하여 이를 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 10

공급물 혼합물로부터 제1 다가 불포화 지방산을 회수하는 방법으로서, 상기 공급물 혼합물은 상기 제1 다가 불포화 지방산 외에 적어도 제2 지방산을 포함하고, 상기 방법은,

- 수계 유기 용리제를 사용하여 주요 크로마토그래피 분리 단계를 수행함으로써, 상기 제1 다가 불포화 지방산이 풍부한 제1 용리제 스트림 및 상기 제2 지방산이 풍부한 제2 용리제 스트림을 수거하는 단계; 및

- 상기 제2 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 상기 농축 단계 이전의 제2 용리제 스트림보다 더 높은 농도의 제2 지방산을 포함하는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 상기 농축 단계 이전의 제2 용리제 스트림보다 더 낮은 농도의 제2 지방산을 포함하는 고갈된 제2 용리제 스트림을 얻는 단계를 포함하고,

상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 적어도 일부는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이외의 다른 공정 단계에 사용되기 위해 재순환되는 방법.

#### 청구항 11

제10항에 있어서,

상기 고갈된 제2 용리제 스트림 중 어느 것도 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에 사용되기 위해 재순환되지 않는 방법.

#### 청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서,

상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 적어도 일부는 한 종을 다른 종으로부터 분리하는 단계에서 용리제로 사용되기 위해 재순환되거나, 또는 연료로 사용되기 위해 재순환되거나, 또는 용매를 재생하기 위해 재순환되는 방법.

#### 청구항 13

제10항 또는 제11항에 있어서,

- 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에, 하나 이상의 수계 유기 용리제를 사용하여 하나 이상의 예비 분리 단계들을 수행하는 단계;

- 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 적어도 일부를 상기 하나 이상의 예비 분리 단계에 사용하기 위해 재순환시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 14

제10항 또는 제11항에 있어서,

상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 적어도 하나의 추가 분리 단계를 더 포함하는 방법.

#### 청구항 15

제10항 또는 제11항에 있어서,

- 상기 제1 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 상기 농축 단계 이전의 제1 용리제 스트림보다 더 높은 농도의 제1 다가 불포화 지방산을 포함하는 농축된 지방산의 스트림을 얻고, 다른 한편으로는 상기 농축 단계 이전의 제1 용리제 스트림보다 더 낮은 농도의 제1 다가 불포화 지방산을 포함하는 고갈된 제1 용리제 스트림을 얻는 단계,
- 상기 고갈된 제1 용리제 스트림의 적어도 일부를 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 또는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전의 적어도 하나의 예비 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 16

제10항 또는 제11항에 있어서,

- 상기 공급물 혼합물을 적어도 제3 지방산을 더 포함하고, 상기 방법은,
- 수계 유기 용리제를 사용하여 제2 크로마토그래피 분리 단계를 수행함으로써, 상기 제1 다가 불포화 지방산이 풍부한 제3 용리제 스트림 및 상기 제3 지방산이 풍부한 제4 용리제 스트림을 수거하는 단계;
  - 상기 제3 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 상기 농축 단계 이전의 제3 용리제 스트림보다 더 높은 농도의 제1 다가 불포화 지방산을 포함하는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 상기 농축 단계 이전의 제3 용리제 스트림보다 더 낮은 농도의 제1 다가 불포화 지방산을 포함하는 고갈된 제3 용리제 스트림을 얻는 단계; 및 이후
  - 상기 고갈된 제3 용리제 스트림의 적어도 일부를 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계;
  - 상기 제4 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 상기 농축 단계 이전의 제4 용리제 스트림보다 더 높은 농도의 제3 지방산을 포함하는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 상기 농축 단계 이전의 제4 용리제 스트림보다 더 낮은 농도의 제3 지방산을 포함하는 고갈된 제4 용리제 스트림을 얻는 단계; 및 이후
  - 상기 고갈된 제4 용리제 스트림의 적어도 일부를 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 17

제16항에 있어서,

- 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에 수행되는 예비 크로마토그래피 분리 단계이거나; 또는
- 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 수행되는 추가 크로마토그래피 분리 단계이거나; 또는
- 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 동시에 수행되는 방법.

### 청구항 18

제16항에 있어서,

동일한 수계 유기 용리제가 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되거나; 또는 상이한 수계 유기 용리제가 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 방법.

### 청구항 19

제16항에 있어서,

상기 공급물 혼합물을 적어도 제4 지방산을 더 포함하고, 상기 방법은,

- 수계 유기 용리제를 사용하여 제3 크로마토그래피 분리 단계를 수행함으로써, 상기 제1 다가 불포화 지방산이 풍부한 제5 용리제 스트림 및 상기 제4 지방산이 풍부한 제6 용리제 스트림을 수거하는 단계;
- 상기 제5 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 상기 농축 단계 이전의 제5 용리제 스트림보다 높은 농도의 제1 다가 불포화 지방산을 포함하는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 상기 농축 단계 이전의 제5 용리제 스트림보다 더 낮은 농도의 제1 다가 불포화 지방산을 포함하는 고갈된 제5 용리제 스트림을 얻는 단계; 및 이후에
- 상기 고갈된 제5 용리제 스트림의 적어도 일부를 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계;
- 상기 제6 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 상기 농축 단계 이전의 제6 용리제 스트림보다 더 높은 농도의 제4 지방산을 포함하는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 상기 농축 단계 이전의 제6 용리제 스트림보다 더 낮은 농도의 제4 지방산을 포함하는 고갈된 제6 용리제 스트림을 얻는 단계; 및 이후에
- 상기 고갈된 제6 용리제 스트림의 적어도 일부를 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계를 포함하는 방법.

## 청구항 20

제19항에 있어서,

- 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에 수행되는 예비 크로마토그래피 분리 단계이거나; 또는
- 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 수행되는 추가 크로마토그래피 분리 단계이거나; 또는
- 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계 단계 및 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 동시에 수행되는 방법.

## 청구항 21

제19항에 있어서,

- 동일한 수계 유기 용리제가 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되거나; 또는
- 상이한 수계 유기 용리제가 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되거나; 또는
- 동일한 수계 유기 용리제가 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되거나; 또는
- 상이한 수계 유기 용리제가 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 방법.

## 청구항 22

공급물 혼합물로부터 제1 다가 불포화 지방산을 회수하는 방법으로서, 상기 공급물 혼합물은 상기 제1 다가 불포화 지방산 및 상기 제1 다가 불포화 지방산 외에 적어도 제2 지방산을 포함하고, 상기 방법은,

- 수계 유기 용리제를 사용하여 주요 크로마토그래피 분리 단계를 수행함으로써, 상기 제1 다가 불포화 지방산이 풍부한 제1 용리제 스트림 및 상기 제2 지방산이 풍부한 제2 용리제 스트림을 수거하는 단계;
- 상기 제2 용리제 스트림이 부분 농축 단계를 거치도록 함으로써, 상기 부분 농축 단계 이전의 제2 용리제 스트림보다 더 높은 농도의 제2 지방산을 포함하는 상기 제2 용리제 스트림의 농축 부분 및 상기 부분 농축 단계 이전의 제2 용리제 스트림보다 더 낮은 농도의 제2 지방산을 포함하는 상기 제2 용리제 스트림의 고갈 부분을 얻는 단계; 및
- 상기 제2 용리제 스트림의 고갈 부분을 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 적어도 부

분적으로 재순환시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 23

제22항에 있어서,

상기 제2 용리제 스트림의 고갈 부분 중의 물 대 유기물 중량비는 상기 제2 용리제 스트림 중의 물 대 유기물 중량비의 0.95 배 미만인 방법.

### 청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서,

상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 연속적인 크로마토그래피 기술에 의해 수행되는 방법.

### 청구항 25

제22항 또는 제23항에 있어서,

상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 모의(simulated) 이동층 유닛 또는 실제(actual) 이동층 유닛에서 수행되는 방법.

### 청구항 26

제22항 또는 제23항에 있어서,

상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 적어도 하나의 다른 크로마토그래피 분리 단계는 동일한 유닛에서 수행되는 방법.

### 청구항 27

제22항 또는 제23항에 있어서,

상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 단일 칼럼 크로마토그래피 유닛에서 수행되는 방법.

### 청구항 28

제22항 또는 제23항에 있어서,

상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 크로마토그램의 비-분리 부분이 재순환되고, 주기적인 정상 상태(steady-state)가 도달되는 시스템에서 수행되는 방법.

### 청구항 29

제22항 또는 제23항에 있어서,

- 상기 제1 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 상기 농축 단계 이전의 제1 용리제 스트림보다 더 높은 농도의 제1 다가 불포화 지방산을 포함하는 상기 제1 용리제 스트림의 농축 부분 및 상기 농축 단계 이전의 제1 용리제 스트림보다 더 낮은 농도의 제1 다가 불포화 지방산을 포함하는 상기 제1 용리제 스트림의 고갈 부분을 얻는 단계 및

- 상기 제1 용리제 스트림의 고갈 부분을 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 적어도 부분적으로 재순환시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 30

제22항 또는 제23항에 있어서,

상기 제1 용리제 스트림의 고갈 부분의 유량이 상기 제1 용리제 스트림의 유량의 적어도 90 %인 방법.

### 청구항 31

제22항 또는 제23항에 있어서,

상기 제2 용리제 스트림의 고갈 부분의 유량이 상기 제2 용리제 스트림의 유량의 적어도 90 %인 방법.

### 청구항 32

제22항 또는 제23항에 있어서,

재순환 전에 상기 제2 용리제 스트림의 고갈 부분에 새로운 물을 첨가하여 이를 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하는 방법.

### 청구항 33

제22항 또는 제23항에 있어서,

상기 주요 크로마토그래피 분리 단계의 용리제 중의 유기 용매(들)의 중량 농도는 적어도 0.5 %의 정밀도로 목표치로 제어 또는 조정되는 방법.

### 청구항 34

제1항, 제10항 및 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 다가 불포화 지방산은, 조성물 내의 지방산의 총 중량에 대하여 1 중량% 미만의 제2 지방산을 함유하는 조성물로서 상기 방법의 종료시에 회수되는 방법.

### 청구항 35

제1항, 제10항 및 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 다가 불포화 지방산은 에이코사펜타엔산이고, 상기 제2 지방산은 도코사헥사엔산인 방법.

### 청구항 36

제1항, 제10항 및 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 모의 이동층 또는 실제 이동층 크로마토그래피 분리 단계인 방법.

### 청구항 37

제1항, 제10항 및 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 다가 불포화 지방산을 포함하는 모든 지방산은, 에스테르화 형태인 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 고도 정제된 다가 불포화 지방산 및 그 유도체의 제조를 위한 크로마토그래피 방법에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002]

이 부분은 본 발명과 관련된 배경 정보를 제공하고, 상기 배경 정보는 반드시 종래기술은 아니다.

[0003]

지방산 (FAs: fatty acids), 특히 다가 불포화 지방산 (PUFAs: polyunsaturated fatty acids)뿐만 아니라 이들의 유도체는 세포막의 성분이며, 수많은 생물학적 과정, 예를 들어, 혈소판 응집, 염증, 트리글리세리드 수준의 저하, 면역 반응 등에 중요한 역할을 수행하는 호르몬 (예를 들어, 프로스타글란딘)의 합성에 관여하는 중요한 생물학적 화합물이다.

[0004]

점점 더 많은 수의 PUFAs계 약물들이 개발 및 상용화되고 있다. 일부 PUFAs는 매우 독특한 기능을 갖는다. 예를 들어:

[0005]

- 아라키돈산 또는 ARA (C20의 6ω3)는 근육 성장 및 복구에 필수적인 것으로 알려져 있다.

[0006]

- 도코사헥사엔산 또는 DHA (C22의 6ω3)는 특히 뇌 발달 및 신경 전달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있

다.

[0007] - 에이코사펜타엔산 (eicosapentaenoic acid) 또는 EPA (C20의 5ω3)은 트리글리세리드(triglyceride)를 낮추는 것으로 알려져 있다. 특히, 몇몇 임상 연구는 순수한 EPA가 저밀도 지단백질 (LDL, "불량"이라 불림) 콜레스테롤 수준을 상승시키지 않고 트리글리세리드를 감소시킨다는 사실을 보여 주었다.

[0008] - 도코사펜타엔산 (docosapentaenoic acid) 또는 DPA (C22의 5ω3)는 심장 혈관 건강을 개선시키는 것으로 알려져 있다.

[0009] 일부 다른 연구는 EPA와 DHA의 혼합물이, 트리글리세리드를 낮추면서도, LDL을 증가시킨다는 사실을 보여 주었다.

[0010] 따라서, EPA를 포함하고 0.5 % 미만의 DHA, 바람직하게는 0.05 % 미만의 DHA, 더 바람직하게는 검출 불가능한 수준의 DHA를 함유하는 조성물을 제조할 필요가 있다. 유사하게는, 실질적으로 ARA 없이 DHA를 포함하거나, 또는 실질적으로 DHA 없이 ARA를 포함하고, 일반적으로 고도 정제 PUFAs를 제조하기 위한 조성물들을 제조하는데 잠재적인 관심이 있다. 이때, 실질적으로 다른 PUFAs (또는 다른 FAs)를 포함하지 않는 조성물들은 더욱 제어된 효능 및 적은 부작용을 갖는 고도 정제된 개개의 PUFAs에 기초한 신약의 개발 및 상용화를 가능하게 한다.

[0011] EPA는 일반적으로, 예를 들어, 어유, 조류 (algae) 또는 효모로부터 정제된다.

[0012] 그러나, 어유 및 다른 바이오매스는 또한 EPA로부터 분리될 필요가 있는 다수의 지방산, 특히 다량의 DHA를 함유한다.

[0013] DHA는 어유로부터 정제될 수 있으며, 다양한 어종으로부터 유래되는 대부분의 오일에서 DHA보다 훨씬 더 풍부한 EPA를 포함하는 다수의 다른 지방산을 분리할 필요가 있다. 대안적으로, DHA는 예를 들어 조류로부터 생성될 수 있으며, 여기서 ARA가 상당한 양으로 존재하기 때문에 ARA로부터 분리될 필요가 있다. 반대로, 조류 공급원으로부터 ARA를 정제할 경우에는, ARA가 DHA로부터 분리되어야 한다.

[0014] 정제된 PUFAs의 제조 방법은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 잘 알려져 있다. 상기 제조 방법들은 일반적으로 트리글리세리드를 유리 지방산으로 전환시키는 가수 분해 단계 또는 지방산을 알킬 (바람직하게는 에틸) 에스테르로 전환시키는 트리글리세리드 에스테르 교환 단계, 표백 단계, 우레아 분별 단계, 문자 중류 단계, 크로마토그래피 단계들 중 하나 이상을 포함한다. 문자 중류는 장쇄 PUFAs를 농축시키기 위해 널리 사용되는 기술이지만, 이는 장쇄 PUFAs를 서로로부터 효율적으로 분리하기 위해 사용될 수 없다. 또한, PUFAs는 산화 및 분해되는 경향이 있는 매우 깨지기 쉬운 문자이다. 가열될 때, PUFAs는 이성화, 산화, 과산화 및 올리고머화하는 경향이 있다.

[0015] 크로마토그래피 단계는 PUFAs를 농축시키는 효율적인 수단이고 상기 논의된 정제 기술들 중 하나 이상과 결합될 수 있다. 가장 널리 개시된 크로마토그래피 단계는, 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 공정 또는 정상 상태 재순환 크로마토그래피 단계를 포함하는 단일 칼럼 크로마토그래피 단계뿐만 아니라, 모의 이동층 (SMB), VARICOL™ 또는 실제 이동층 (AMB) 공정뿐만 아니라 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 공지된 다른 공정과 같은 멀티칼럼 크로마토그래피 기법이다. PUFAs는 일반적으로 매우 복잡한 혼합물로 제조되기 때문에, 두 개 또는 세 개의 크로마토그래피 단계가 일반적으로 높은 순도를 달성하기 위해 요구된다. 이러한 공정들 중 일부는 다음의 문헌들에 기술되어있다: US 5,719,302, US 2011/0091947, WO 2011/080503, WO 2013/005048, WO 2013/005051, WO 2013/005052, 이들 각각은 전체로서 인용에 의하여 본 명세서에 통합된다.

[0016] 두 개의 크로마토그래피 단계의 동시 수행을 가능하게 하는 일부 SMB 또는 AMB 공정에서는, 특히 중간 순도의 목표 PUFA를 함유하는 하나 또는 수개의 스트림이 농축 없이 SMB 또는 AMB 장치의 비 인접 칼럼에 재주입될 수 있다.

[0017] 대부분의 크로마토그래피 단계는 수계 유기 용매를 사용하는, 역상 모드의 사용을 포함한다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자들에 의해 공지된 바와 같이, 일반적으로 에스테르의 형태인 지방산은 그들의 극성에 따라 분리되고, 극성이 강한 지방산일수록 극성이 약한 지방산보다 더 빨리 용출된다.

[0018] 크로마토그래피 단계의 주요 단점들 중 하나는 정제된 분획의 상당한 희석을 초래한다는 것이다. SMB, VARICOL™ 및 AMB 같은 연속 공정이 HPLC와 같은 배치 공정보다 선호될 수 있는데, 그 이유는 연속 공정이 일반적으로 추출액 (더 많이 유지된 화합물을 함유함) 및 추잔액 (덜 유지된 화합물을 함유함)으로 지칭되는 더 많이 농축된 스트림들을 초래하기 때문이다.

[0019] 또한, 크로마토그래피 분리에 의해 제조된 정제된 폐기물 분획은 매우 끓은 상태로 유지되어, 경제적 및 환경적 이유로, 다양한 수거된 스트림을 농축시켜, 사용된 용리제 (주로 하나 이상의 유기 용매 및 물로 이루어짐)를 회수하고 이들을 상기 공정으로 재순환시킬 필요가 있다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0020] 제한된 용매의 소비와 함께 PUFAs를 더 높은 순도로 정제하기 위한 개선된 공정에 대한 필요성이 여전히 일반적으로 존재한다.

#### 과제의 해결 수단

[0021] 이 부분은 본 발명의 일반적인 개요를 제공하며, 본 발명의 전체 범위 또는 모든 특징의 포괄적인 개시는 아니다. 공급물 혼합물로부터 다가 불포화 지방산을 회수하기 위한 다양한 구현예들이 구체적으로 개시된다. 공정들은 본 명세서에서 기술된 다음과 같은 방법들, 단계들, 또는 특징들 중 어느 하나 또는 하나 이상의 임의의 조합을 선택적으로 포함할 수 있다.

[0022] 특히 본 발명은 다음의 항목들에 관한 것이다.

[0023] 항목 1. 공급물 혼합물로부터 제1 다가 불포화 지방산을 회수하는 방법으로서, 상기 공급물 혼합물은 상기 제1 다가 불포화 지방산 외에 적어도 제2 지방산을 포함하고, 상기 방법은 하기 단계들을 포함하는 방법:

[0024] - 수계 유기 용리제를 사용하여 주요 크로마토그래피 분리 단계를 수행함으로써, 상기 제1 다가 불포화 지방산이 풍부한 제1 용리제 스트림 및 상기 제2 지방산이 풍부한 제2 용리제 스트림을 수거하는 단계;

[0025] - 상기 제2 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 고갈된 제2 용리제 스트림을 얻는 단계로서, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 중량비는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 중량비보다 낮은 단계;

[0026] - 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 적어도 일부를 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계.

[0027] 항목 2. 항목 1에 있어서, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 전체가 재순환되어 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 방법.

[0028] 항목 3. 항목 1 또는 2에 있어서, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 유량은 상기 제2 용리제 스트림의 유량에 비해 감소되고, 바람직하게는 상기 제2 용리제 스트림의 유량에 비해 적어도 약 2 %, 또는 적어도 약 5 %, 또는 적어도 약 10 %, 또는 적어도 약 15 %만큼 감소되는 방법.

[0029] 항목 4. 항목 1 내지 3 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비의 약 0.95 배 미만 (또는 동일)이고, 바람직하게는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비의 약 0.9 배 미만 (또는 동일), 또는 약 0.8 배 미만 (또는 동일), 또는 약 0.7 배 미만 (또는 동일), 또는 약 0.6 배 미만 (또는 동일), 또는 약 0.5 배 미만 (또는 동일), 또는 약 0.4 배 미만 (또는 동일), 또는 약 0.3 배 미만 (또는 동일), 또는 약 0.2 배 미만 (또는 동일), 또는 약 0.1 배 미만 (또는 동일)인 방법.

[0030] 항목 5. 항목 1 내지 4 중 어느 한 항목에 있어서,

[0031] - 상기 제1 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산의 스트림을 얻고, 다른 한편으로는 고갈된 제1 용리제 스트림을 얻는 단계, 및

[0032] - 상기 고갈된 제1 용리제 스트림의 적어도 일부, 바람직하게는 전부를, 바람직하게는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계를 포함하는 방법.

[0033] 항목 6. 항목 5에 있어서, 상기 고갈된 상기 제1 용리제 스트림의 유량은 상기 제1 용리제 스트림의 유량의 적어도 90 %, 바람직하게는 적어도 95 %, 가장 바람직하게는 적어도 98 %인 방법.

[0034] 항목 7. 항목 1 내지 6 중 어느 한 항목에 있어서, 단일의 분리 단계, 즉 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계를 포함하는 방법.

- [0035] 항목 8. 항목 1 내지 6 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에 단일의 예비 분리 단계를 포함하고, 상기 단일의 예비 분리 단계는 바람직하게는 예비 크로마토그래피 분리 단계이고, 상기 단일의 예비 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 동일한 크로마토그래피 유닛 또는 상이한 크로마토그래피 유닛에서 수행되는 방법.
- [0036] 항목 9. 항목 1 내지 6 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에 두 개의 예비 분리 단계를 포함하고, 바람직하게는 상기 두 개의 예비 분리 단계 중 하나의 단계는 예비 크로마토그래피 분리 단계이고, 더욱 바람직하게는 두 개의 예비 분리 단계가 모두 예비 크로마토그래피 분리 단계이고, 각각의 예비 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 동일한 크로마토그래피 유닛 또는 상이한 크로마토그래피 유닛에서 수행되고, 상기 두 개의 예비 크로마토그래피 분리 단계는 동일한 크로마토그래피 유닛 또는 상이한 크로마토그래피 유닛에서 수행되는 방법.
- [0037] 항목 10. 항목 8 또는 9에 있어서, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 일부는 예비 분리 단계에서 사용되기 위해 재순환되는 방법.
- [0038] 항목 11. 항목 1 내지 6 또는 항목 8 내지 9 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 단일의 추가 분리 단계를 포함하고, 상기 단일의 추가 분리 단계는 바람직하게는 추가 크로마토그래피 분리 단계이고, 상기 단일의 추가 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 동일한 크로마토그래피 유닛 또는 상이한 크로마토그래피 유닛에서 수행되는 방법.
- [0039] 항목 12. 항목 1 내지 6 또는 항목 8 내지 9 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 두 개의 추가 분리 단계를 포함하고, 바람직하게는 상기 두 개의 추가 분리 단계 중 하나의 단계는 추가 크로마토그래피 분리 단계이고, 더욱 바람직하게는 상기 두 개의 추가 분리 단계가 모두 추가 크로마토그래피 분리 단계이고, 각각의 추가 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 동일한 크로마토그래피 유닛 또는 상이한 크로마토그래피 유닛에서 수행되고, 상기 두 개의 추가 크로마토그래피 분리 단계는 동일한 크로마토그래피 유닛 또는 상이한 크로마토그래피 유닛에서 수행되는 방법.
- [0040] 항목 13. 항목 1 내지 6 중 어느 한 항목에 있어서, 세 개 이상의 크로마토그래피 분리 단계, 바람직하게는 세 개의 크로마토그래피 분리 단계로 본질적으로 이루어지고 (또는 이루어지고), 상기 크로마토그래피 분리 단계들은 상이한 크로마토그래피 유닛에서 수행되거나, 또는 적어도 부분적으로 동일한 크로마토그래피 유닛에서 수행되는 방법.
- [0041] 항목 14. 항목 13에 있어서, 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계, 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에 수행되는 예비 크로마토그래피 분리 단계, 및 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 수행되는 추가 크로마토그래피 분리 단계로 본질적으로 이루어지는 (또는 이루어지는) 방법.
- [0042] 항목 15. 항목 13에 있어서, 두 개의 예비 크로마토그래피 분리 단계 및 그 이후에 수행되는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계로 본질적으로 이루어지는 (또는 이루어지는) 방법.
- [0043] 항목 16. 항목 13에 있어서, 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 그 이후에 수행되는 두 개의 추가 크로마토그래피 분리 단계로 본질적으로 이루어지는 (또는 이루어지는) 방법.
- [0044] 항목 17. 항목 1 내지 16 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 공급물 혼합물을 적어도 제3 지방산을 더 포함하고, 상기 방법은 다음의 단계들을 포함하는 방법:
- 수계 유기 용리제를 사용하여 제2 크로마토그래피 분리 단계를 수행함으로써, 상기 제1 다가 불포화 지방산이 풍부한 제3 용리제 스트림 및 상기 제3 지방산이 풍부한 제4 용리제 스트림을 수거하는 단계;
- [0045]
- 상기 제3 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 고갈된 제3 용리제 스트림을 얻는 단계; 및
- [0046]
- 상기 고갈된 제3 용리제 스트림의 적어도 일부, 바람직하게는 전부를, 바람직하게는 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계; 및/또는
- [0047]
- 상기 제4 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 고갈된 제4 용리제 스트림을 얻는 단계로서, 상기 고갈된 제4 용리제 스트림의 물 대 유기물 중량비는 선택적으로 상기 제4 용리제 스트림의 물 대 유기물 중량비보다 낮은 단계; 및
- [0048]
- 상기 고갈된 제4 용리제 스트림의 적어도 일부, 바람직하게는 전부를 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서

사용하기 위하여 재순환시키는 단계.

[0050] 항목 18. 항목 17에 있어서, 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에 수행되는 예비 크로마토그래피 분리 단계이거나; 또는 대안적으로 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 수행되는 추가 크로마토그래피 분리 단계인 방법.

[0051] 항목 19. 항목 17 또는 18에 있어서, 동일한 수계 유기 용리제가 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되거나; 또는 상이한 수계 유기 용리제가 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되고; 바람직하게는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제 중의 물 대 유기물 중량비는 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제 중의 물 대 유기물 중량비와 다른 방법.

[0052] 항목 20. 항목 17 내지 19 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 공급물 혼합물을 적어도 제4 지방산을 포함하고, 상기 방법은 다음의 단계들을 포함하는 방법:

- 수계 유기 용리제를 사용하여 제3 크로마토그래피 분리 단계를 수행함으로써, 상기 제1 다가 불포화 지방산이 풍부한 제5 용리제 스트림 및 상기 제4 지방산이 풍부한 제6 용리제 스트림을 수거하는 단계;

- 상기 제5 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 고갈된 제5 용리제 스트림을 얻는 단계; 및

- 상기 고갈된 제5 용리제 스트림의 적어도 일부, 바람직하게는 전부를, 바람직하게는 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계; 및/또는

- 상기 제6 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 고갈된 제6 용리제 스트림을 얻는 단계로서, 상기 고갈된 제6 용리제 스트림의 물 대 유기물 중량비는 선택적으로 상기 제4 용리제 스트림의 물 대 유기물 중량비보다 낮은 단계; 및

- 상기 고갈된 제6 용리제 스트림의 적어도 일부, 바람직하게는 전부를, 바람직하게는 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계.

[0056] 항목 21. 항목 20에 있어서, 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에 수행되는 예비 크로마토그래피 분리 단계이거나; 또는 대안적으로 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 수행되는 추가 크로마토그래피 분리 단계인 방법.

[0057] 항목 22. 항목 20 또는 21에 있어서,

- 동일한 수계 유기 용리제가 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되거나; 또는 상이한 수계 유기 용리제가 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되고; 바람직하게는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제의 물 대 유기물 비는 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제의 물 대 유기물 비와 다르거나; 및/또는

- 동일한 수계 유기 용리제가 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되거나; 또는 상이한 수계 유기 용리제가 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되고; 바람직하게는 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제의 물 대 유기물 비는 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제의 물 대 유기물 비와 다른 방법.

[0058] 항목 23. 항목 20 내지 22 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 제1 다가 불포화 지방산은 에이코사펜타엔산이고, 상기 제2 지방산은 도코사헥사엔산 또는 스테아리돈산 (stearidonic acid)이고, 상기 제3 및 제4 지방산은 도코사헥사엔산 또는 스테아리돈산 중 다른 하나, 포화 지방산 및 단일 불포화 지방산으로부터 선택되는 방법.

[0059] 항목 23a. 항목 1 내지 23 중 어느 한 항목에 있어서, 재순환 전에 상기 고갈된 제2 용리제 스트림에 새로운 물을 첨가하여 상기 새로운 물을 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하는 단계를 포함하는 방법.

[0060] 항목 24. 공급물 혼합물로부터 제1 다가 불포화 지방산을 회수하는 방법으로서, 상기 공급물 혼합물은 상기 제1 다가 불포화 지방산 외에 적어도 제2 지방산을 포함하고, 상기 방법은,

- 수계 유기 용리제를 사용하여 주요 크로마토그래피 분리 단계를 수행함으로써, 상기 제1 다가 불포화 지방산

이 풍부한 제1 용리제 스트림 및 상기 제2 지방산이 풍부한 제2 용리제 스트림을 수거하는 단계; 및

[0066] - 상기 제2 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 고갈된 제2 용리제 스트림을 얻는 단계를 포함하고,

[0067] 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 적어도 일부는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이외의 다른 공정 단계에 사용되기 위해 재순환되는 방법.

[0068] 상기 다른 공정 단계는 상기 제1 다가 불포화 지방산을 회수하는 것에 기여하는 단계일 수 있다. 대안적으로, 상기 다른 공정 단계는 다른 목적, 예를 들어, 다른 화합물의 제조 또는 정제에 기여하는 단계일 수 있다.

[0069] 항목 24의 바람직한 구현예에 따르면, 다른 공정 단계에서 사용되는 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 적어도 일부는 액체 형태로 사용된다. 이는 바람직하게는 상기 농축 단계로부터 얻어진 기상의 형태로 직접 사용되지 않는다. 상기 고갈된 제2 용리제 스트림으로부터의 열 회수가 항목 24에서 언급된 용도의 일부일 수 있지만, 상기 용도가 열의 회수로 한정되지 않는다. 상기 용도는 바람직하게는 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 적어도 일부를 다른 스트림 또는 생성물과 혼합하거나, 또는 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 적어도 일부를 화학적으로 개질하는 단계 (예를 들어, 이것이 연소를 거치도록 하는 단계)를 포함한다.

[0070] 항목 25. 항목 24에 있어서, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림 중 어느 것도 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되기 위해 재순환되지 않는 방법.

[0071] 항목 26. 항목 24 또는 25에 있어서, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 적어도 일부, 바람직하게는 전부는 한 종을 다른 종들로부터 분리하는 단계, 바람직하게는 한 종을 다른 종들로부터 크로마토그래피 분리하는 단계에서 용리제로 사용되기 위해 재순환되거나, 및/또는 연료로 사용되기 위해 재순환되거나, 및/또는 용매를 재생하기 위해 재순환되는 방법.

[0072] 항목 27. 항목 24 내지 26 중 어느 한 항목에 있어서,

[0073] - 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에, 각각의 수계 유기 용리제를 사용하여 하나 이상의 예비 분리 단계들을 수행하는 단계;

[0074] - 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 적어도 일부를 하나 이상의 상기 예비 분리 단계에 사용하기 위해 재순환시키는 단계.

[0075] 항목 28. 항목 27에 있어서, 상기 예비 분리 단계들 중 적어도 하나는 크로마토그래피 분리 단계이고, 바람직하게는 상기 예비 분리 단계 모두가 크로마토그래피 분리 단계인 방법.

[0076] 항목 29. 항목 27 또는 28에 있어서, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 실질적으로 전부는 재순환되어 상기 예비 분리 단계들 중 하나 이상의 단계에서 사용되는 방법.

[0077] 항목 30. 항목 24 내지 29 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 적어도 하나의 추가 분리 단계, 바람직하게는 단일의 추가 분리 단계를 포함하고, 상기 추가 분리 단계 (들)은 바람직하게는 추가 크로마토그래피 분리의 단계 (들)인 방법.

[0078] 항목 31. 항목 24 내지 30 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 일부가 재순환되어 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 방법.

[0079] 항목 32. 항목 24 내지 31 중 어느 한 항목에 있어서, 단일의 예비 분리 단계를 포함하는 방법.

[0080] 항목 33. 항목 24 내지 31 중 어느 한 항목에 있어서, 정확히 두 개의 예비 분리 단계를 포함하는 방법.

[0081] 항목 34. 항목 28 내지 33 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 적어도 하나의 예비 크로마토그래피 분리 단계는 동일한 크로마토그래피 유닛에서 수행되거나; 및/또는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 적어도 하나의 추가 크로마토그래피 분리 단계는 동일한 크로마토그래피 유닛에서 수행되거나; 및/또는 모든 예비 크로마토그래피 분리 단계, 모든 선택적인 추가 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 상이한 크로마토그래피 유닛에서 수행되는 방법.

[0082] 항목 35. 항목 24 내지 34 중 어느 한 항목에 있어서,

[0083] - 상기 제1 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산의 스트림을 얻고, 다른 한편으로는 고갈된 제1 용리제 스트림을 얻는 단계, 및

- [0084] - 상기 고갈된 제1 용리제 스트림의 적어도 일부, 바람직하게는 전부를, 바람직하게는 상기 방법의 분리 단계, 가장 바람직하게는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및/또는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전의 적어도 하나의 예비 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0085] 항목 36. 항목 35에 있어서, 상기 고갈된 제1 용리제 스트림의 유량은 상기 제1 용리제 스트림의 유량의 적어도 약 95 %, 바람직하게는 적어도 약 98 %, 가장 바람직하게는 적어도 약 99 %인 방법.
- [0086] 항목 37. 항목 24 내지 36 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 공급물 혼합물을 적어도 제3 지방산을 더 포함하고, 상기 방법은 다음 단계들을 더 포함하는 방법:
- [0087] - 수계 유기 용리제를 사용하여 제2 크로마토그래피 분리 단계를 수행함으로써, 상기 제1 다가 불포화 지방산이 풍부한 제3 용리제 스트림 및 상기 제3 지방산이 풍부한 제4 용리제 스트림을 수거하는 단계;
- [0088] - 상기 제3 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 고갈된 제3 용리제 스트림을 얻는 단계; 및
- [0089] - 상기 고갈된 제3 용리제 스트림의 적어도 일부, 바람직하게는 전부를, 바람직하게는 상기 방법의 분리 단계, 가장 바람직하게는 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계; 및/또는
- [0090] - 상기 제4 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 고갈된 제4 용리제 스트림을 얻는 단계; 및 이후
- [0091] - 상기 고갈된 제4 용리제 스트림의 적어도 일부, 바람직하게는 전부를, 바람직하게는 상기 방법의 분리 단계, 가장 바람직하게는 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계.
- [0092] 항목 38. 항목 37에 있어서, 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에 수행되는 예비 크로마토그래피 분리 단계이거나; 또는 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 수행되는 추가 크로마토그래피 분리 단계인 방법.
- [0093] 항목 39. 항목 37 또는 38에 있어서, 동일한 수계 유기 용리제가 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되거나; 또는 상이한 수계 유기 용리제가 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되고; 바람직하게는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제의 물 대 유기물 비는 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제의 물 대 유기물 비와 다른 방법.
- [0094] 항목 40. 항목 37 내지 39 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 공급물 혼합물을 적어도 제4 지방산을 더 포함하고, 상기 방법은 다음 단계들을 더 포함하는 방법:
- [0095] - 수계 유기 용리제를 사용하여 제3 크로마토그래피 분리 단계를 수행함으로써, 상기 제1 다가 불포화 지방산이 풍부한 제5 용리제 스트림 및 상기 제4 지방산이 풍부한 제6 용리제 스트림을 수거하는 단계;
- [0096] - 상기 제5 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 고갈된 제5 용리제 스트림을 얻는 단계; 및
- [0097] - 상기 고갈된 제5 용리제 스트림의 적어도 일부, 바람직하게는 전부를, 바람직하게는 상기 방법의 분리 단계, 가장 바람직하게는 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계; 및/또는
- [0098] - 상기 제6 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 고갈된 제6 용리제 스트림을 얻는 단계; 및
- [0099] - 상기 고갈된 제6 용리제 스트림의 적어도 일부, 바람직하게는 전부를, 바람직하게는 상기 방법의 분리 단계, 가장 바람직하게는 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계.
- [0100] 항목 41. 항목 40에 있어서, 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에 수행되는 예비 크로마토그래피 분리 단계이거나; 또는 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 수행되는 추가 크로마토그래피 분리 단계인 방법.
- [0101] 항목 42. 항목 40 또는 41에 있어서,
- [0102] - 동일한 수계 유기 용리제가 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되거나; 또는 상이한 수계 유기 용리제가 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제3 크로마토그래피

분리 단계에서 사용되고; 바람직하게는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제의 물 대 유기물 비는 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제의 물 대 유기물 비와 다르거나; 및/또는

- [0103] - 동일한 수계 유기 용리제가 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되거나; 또는 상이한 수계 유기 용리제가 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되고; 바람직하게는 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제의 물 대 유기물 비는 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제의 물 대 유기물 비와 다른 방법.
- [0104] 항목 43. 항목 40 내지 42 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 제1 다가 불포화 지방산은 에이코사펜타엔산이고, 상기 제2 지방산은 도코사헥사엔산 또는 스테아리돈산이고, 상기 제3 및 제4 지방산은 도코사헥사엔산 또는 스테아리돈산 중 다른 하나, 포화 지방산 및 단일 불포화 지방산으로부터 선택되는 방법.
- [0105] 항목 44. 공급물 혼합물로부터 제1 다가 불포화 지방산을 회수하는 방법으로서, 상기 공급물 혼합물은 상기 제1 다가 불포화 지방산 외에 적어도 제2 지방산을 포함하고, 상기 방법은 하기 단계들을 연속하여 포함하는 방법:

  - 수계 유기 용리제를 사용하여 주요 크로마토그래피 분리 단계를 수행함으로써, 상기 제1 다가 불포화 지방산이 풍부한 제1 용리제 스트림 및 상기 제2 지방산이 풍부한 제2 용리제 스트림을 수거하는 단계;
  - 상기 제2 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 고갈된 제2 용리제 스트림을 얻는 단계로서, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 유량이 상기 제2 용리제 스트림의 유량에 비해 감소되는 단계;
  - 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 적어도 일부를 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계.

- [0109] 항목 45. 항목 44에 있어서, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 유량이 상기 제2 용리제 스트림의 유량에 비해 적어도 약 2 %, 또는 적어도 약 5 %, 또는 적어도 약 10 %, 또는 적어도 약 15 %만큼 감소되는 방법.
- [0110] 항목 46. 항목 44 또는 45에 있어서, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 전체는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에 사용되기 위해 재순환되는 방법.
- [0111] 항목 47. 항목 44 내지 46 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비의 약 0.95 배 미만이고, 바람직하게는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비의 약 0.9 배 미만, 또는 약 0.8 배 미만, 또는 약 0.7 배 미만, 또는 약 0.6 배 미만, 또는 약 0.5 배 미만, 또는 약 0.4 배 미만, 또는 약 0.3 배 미만, 또는 약 0.2 배 미만, 또는 약 0.1 배 미만인 방법.
- [0112] 항목 48. 항목 44 내지 47 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 방법은 다음 단계들을 더 포함하는 방법:

  - 상기 제1 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산의 스트림을 얻고, 다른 한편으로는 고갈된 제1 용리제 스트림을 얻는 단계,
  - 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 적어도 일부, 바람직하게는 전부를, 바람직하게는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계.

- [0115] 항목 49. 항목 48에 있어서, 상기 고갈된 제1 용리제 스트림의 유량이 상기 제1 용리제 스트림의 유량의 적어도 약 90 %, 바람직하게는 적어도 약 95 %, 가장 바람직하게는 적어도 약 98 %인 방법.
- [0116] 항목 50. 항목 44 내지 49 중 어느 한 항목에 있어서, 단일의 분리 단계, 즉 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계를 포함하는 방법.
- [0117] 항목 51. 항목 44 내지 49 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에 단일의 예비 분리 단계를 포함하고, 상기 단일의 예비 분리 단계는 바람직하게는 단일의 예비 크로마토그래피 분리 단계이고, 상기 단일의 예비 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 동일한 크로마토그래피 유닛 또는 상이한 크로마토그래피 유닛에서 수행되는 방법.
- [0118] 항목 52. 항목 44 내지 49 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에 두 개의 예비 분리 단계를 포함하고, 바람직하게는 상기 두 개의 예비 분리 단계 중 하나의 단계는 예비 크로마토그래피 분리 단계이고, 더욱 바람직하게는 두 개의 예비 분리 단계가 모두 예비 크로마토그래피 분리 단계이고, 각각의

예비 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 동일한 크로마토그래피 유닛 또는 상이한 크로마토그래피 유닛에서 수행되고, 상기 두 개의 예비 크로마토그래피 분리 단계는 동일한 크로마토그래피 유닛 또는 상이한 크로마토그래피 유닛에서 수행되는 방법.

- [0119] 항목 53. 항목 51 또는 52에 있어서, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 일부는 예비 분리 단계에서 사용되기 위해 재순환되는 방법.
- [0120] 항목 54. 항목 44 내지 49 또는 항목 51 내지 53 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 단일의 추가 분리 단계를 포함하고, 상기 단일의 추가 분리 단계는 바람직하게는 추가 크로마토그래피 분리 단계이고, 상기 단일의 추가 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 동일한 크로마토그래피 유닛 또는 상이한 크로마토그래피 유닛에서 수행되는 방법.
- [0121] 항목 55. 항목 44 내지 49 또는 항목 51 내지 53 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 두 개의 추가 분리 단계를 포함하고, 바람직하게는 상기 두 개의 추가 분리 단계 중 하나의 단계는 추가 크로마토그래피 분리 단계이고, 더욱 바람직하게는 상기 두 개의 추가 분리 단계가 모두 추가 크로마토그래피 분리 단계이고, 각각의 추가 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 동일한 크로마토그래피 유닛 또는 상이한 크로마토그래피 유닛에서 수행되고, 상기 두 개의 추가 크로마토그래피 분리 단계는 동일한 크로마토그래피 유닛 또는 상이한 크로마토그래피 유닛에서 수행되는 방법.
- [0122] 항목 56. 항목 44 내지 49 중 어느 한 항목에 있어서, 세 개 이상의 크로마토그래피 분리 단계, 바람직하게는 세 개의 크로마토그래피 분리 단계로 본질적으로 이루어지고 (또는 이루어지고), 상기 크로마토그래피 분리 단계들은 상이한 크로마토그래피 유닛에서 수행되거나, 또는 적어도 부분적으로 동일한 크로마토그래피 유닛에서 수행되는 방법.
- [0123] 항목 57. 항목 56에 있어서, 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계, 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에 수행되는 예비 크로마토그래피 분리 단계, 및 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 수행되는 추가 크로마토그래피 분리 단계로 본질적으로 이루어지는 (또는 이루어지는) 방법.
- [0124] 항목 58. 항목 56에 있어서, 두 개의 예비 크로마토그래피 분리 단계 및 그 이후에 수행되는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계로 본질적으로 이루어지는 (또는 이루어지는) 방법.
- [0125] 항목 59. 항목 56에 있어서, 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 그 이후에 수행되는 두 개의 추가 크로마토그래피 분리 단계로 본질적으로 이루어지는 (또는 이루어지는) 방법.
- [0126] 항목 60. 항목 44 내지 59 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 공급물 혼합물을 적어도 제3 지방산을 더 포함하고, 상기 방법은 다음 단계들을 더 포함하는 방법:
- 수계 유기 용리제를 사용하여 제2 크로마토그래피 분리 단계를 수행함으로써, 상기 제1 다가 불포화 지방산이 풍부한 제3 용리제 스트림 및 상기 제3 지방산이 풍부한 제4 용리제 스트림을 수거하는 단계;
- [0128] - 상기 제3 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 고갈된 제3 용리제 스트림을 얻는 단계; 및
- [0129] - 상기 고갈된 제3 용리제 스트림의 적어도 일부, 바람직하게는 전부를, 바람직하게는 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계; 및/또는
- [0130] - 상기 제4 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 고갈된 제4 용리제 스트림을 얻는 단계로서, 상기 고갈된 제4 용리제 스트림의 유량은 선택적으로 상기 제4 용리제 스트림의 유량에 비해 감소되는 단계; 및
- [0131] - 상기 고갈된 제4 용리제 스트림의 적어도 일부, 바람직하게는 전부를, 바람직하게는 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계.
- [0132] 항목 61. 항목 60에 있어서, 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에 수행되는 예비 크로마토그래피 분리 단계이거나; 또는 대안적으로 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 수행되는 추가 크로마토그래피 분리 단계인 방법.
- [0133] 항목 62. 항목 60 또는 61에 있어서, 동일한 수계 유기 용리제가 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되거나; 또는 상이한 수계 유기 용리제가 상기 주요 크로마토그래피 분

리 단계 및 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되고; 바람직하게는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제 중의 물 대 유기물 비는 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제 중의 물 대 유기물 비와 다른 방법.

[0134] 항목 63. 항목 60 내지 62 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 공급물 혼합물을 적어도 제4 지방산을 포함하고, 상기 방법은 다음 단계들을 더 포함하는 방법:

- 수계 유기 용리제를 사용하여 제3 크로마토그래피 분리 단계를 수행함으로써, 상기 제1 다가 불포화 지방산이 풍부한 제5 용리제 스트림 및 상기 제4 지방산이 풍부한 제6 용리제 스트림을 수거하는 단계;

[0135] - 상기 제5 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 고갈된 제5 용리제 스트림을 얻는 단계; 및 이후

[0136] - 상기 고갈된 제5 용리제 스트림의 적어도 일부, 바람직하게는 전부를, 바람직하게는 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계; 및/또는

[0137] - 상기 제6 용리제 스트림이 농축 단계를 거치도록 함으로써, 한편으로는 농축된 지방산 스트림을 얻고 다른 한편으로는 고갈된 제6 용리제 스트림을 얻는 단계로서, 상기 고갈된 제6 용리제 스트림의 유량은 선택적으로 상기 제4 용리제 스트림의 유량에 비해 감소되는 단계; 및 이후

[0138] - 상기 고갈된 제6 용리제 스트림의 적어도 일부, 바람직하게는 전부를, 바람직하게는 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계.

[0139] 항목 64. 항목 63에 있어서, 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에 수행되는 예비 크로마토그래피 분리 단계이거나; 또는 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 수행되는 추가 크로마토그래피 분리 단계인 방법.

[0140] 항목 65. 항목 63 또는 64에 있어서,

- 동일한 수계 유기 용리제가 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되거나; 또는 상이한 수계 유기 용리제가 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되고; 바람직하게는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제의 물 대 유기물 비는 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제의 물 대 유기물 비와 다르거나; 및/또는

[0141] - 동일한 수계 유기 용리제가 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되거나; 또는 상이한 수계 유기 용리제가 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계 및 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되고; 바람직하게는 상기 제2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제의 물 대 유기물 비는 상기 제3 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되는 상기 수계 유기 용리제의 물 대 유기물 비와 다른 방법.

[0142] 항목 66. 항목 63 내지 65 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 제1 다가 불포화 지방산은 에이코사펜타엔산이고, 상기 제2 지방산은 도코사헥사엔산 또는 스테아리돈산이고, 상기 제3 및 제4 지방산은 도코사헥사엔산 또는 스테아리돈산 중 다른 하나, 포화 지방산 및 단일 불포화 지방산으로부터 선택되는 방법.

[0143] 항목 67. 항목 44 내지 66 중 어느 한 항목에 있어서, 각각의 농축 단계는 막 여과 장치, 증발기, 정류 칼럼, 증류 칼럼, 액체-액체 추출기 또는 이러한 장치들의 조합에서 수행되는 방법.

[0144] 항목 68. 항목 44 내지 67 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 제1 다가 불포화 지방산은, 조성물 내의 지방산의 총 중량에 대하여 약 1 중량% 미만, 바람직하게는 약 0.5 중량% 미만 또는 약 0.1 중량% 미만 또는 약 0.05 중량% 미만 또는 약 0.03 중량% 미만 또는 약 0.01 중량% 미만의 제2 지방산을 함유하는 조성물로서 상기 방법의 종료시에 회수되는 방법.

[0145] 항목 69. 항목 44 내지 68 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 제1 다가 불포화 지방산은 에이코사펜타엔산이고, 상기 제2 지방산은 도코사헥사엔산인 방법.

[0146] 항목 70. 항목 44 내지 69 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 제1 다가 불포화 지방산은 도코사헥사엔산이고, 상기 제2 지방산은 에이코사펜타엔산인 방법.

[0147] 항목 71. 항목 44 내지 70 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 제1 다가 불포화 지방산 에이코사펜타엔산이고, 상

기 제2 지방산은 스테아리돈산인 방법.

[0150] 항목 72. 항목 44 내지 71 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 제1 다가 불포화 지방산은 도코사펜타엔산이고, 상기 제2 지방산은 도코사헥사엔산인 방법.

[0151] 항목 73. 항목 44 내지 72 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 제1 다가 불포화 지방산은 도코사헥사엔산이고, 상기 제2 지방산은 도코사펜타엔산인 방법.

[0152] 항목 74. 항목 44 내지 73 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 제1 다가 불포화 지방산은 아라키돈산이고, 상기 제2 지방산은 도코사헥사엔산인 방법.

[0153] 항목 75. 항목 44 내지 74 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 제1 다가 불포화 지방산은 도코사헥사엔산이고, 상기 제2 지방산은 아라키돈산인 방법.

[0154] 항목 76. 항목 44 내지 75 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 공급물 혼합물이 어류, 조류 및/또는 효모, 바람직하게는 어류로부터 유래되는 방법.

[0155] 항목 77. 항목 44 내지 76 중 어느 한 항목에 있어서, 연속 공정인 방법.

[0156] 항목 78. 항목 44 내지 77 중 어느 한 항목에 있어서, 적어도 주요 크로마토그래피 분리 단계, 바람직하게는 모든 크로마토그래피 분리 단계들은, 모의 이동층 또는 실제 이동층 크로마토그래피 분리 단계인 방법.

[0157] 항목 79. 공급물 혼합물로부터 제1 다가 불포화 지방산을 회수하는 방법으로서, 상기 공급물 혼합물은 상기 제1 다가 불포화 지방산 외에 적어도 제2 지방산을 포함하고, 상기 방법은,

[0158] - 수계 유기 용리제를 사용하여 주요 크로마토그래피 분리 단계를 수행함으로써, 상기 제1 다가 불포화 지방산이 풍부한 제1 용리제 스트림 및 상기 제2 지방산이 풍부한 제2 용리제 스트림을 수거하는 단계를 포함하고,

[0159] 상기 제2 용리제 스트림의 적어도 일부가 연료로 사용되기 위해 재순환되는 방법.

[0160] 항목 80. 항목 79에 있어서, 항목 25 내지 43 또는 항목 67 내지 78 중 어느 한 항목의 특징 (상기 표현은 항목 25 내지 43 또는 항목 67 내지 78에서는 "고갈된 제2 용리제 스트림"이 "제2 용리제 스트림"으로 대체되어야 함을 제외함)을 더 포함하는 방법.

[0161] 상기 사용된 용리제의 연료로서의 재이용이 (항목 79에 따라) 실행되는 경우, 농축 단계는 단지 선택 사항임을 유의하여야 한다. 상기 제2 용리제 스트림의 조성에 따라, 상기 제2 용리제 스트림의 일부 또는 전부의 연료로서의 직접적인 (추가 농축 또는 가공 없이) 사용이 고려된다.

[0162] 따라서, 일 구현예에 따르면, 상기 제1 다가 불포화 지방산 및 상기 제1 다가 불포화 지방산 외에 적어도 제2 지방산을 포함하는 공급물 혼합물로부터 상기 제1 다가 불포화 지방산을 회수하기 위한 방법이 제공된다. 상기 방법은 수계 유기 용리제를 사용하여 주요 크로마토그래피 분리 단계를 수행하는 단계, 및 이에 의해 상기 제1 다가 불포화 지방산이 풍부한 제1 용리제 스트림 및 상기 제2 지방산이 풍부한 제2 용리제 스트림을 수거하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 상기 제2 용리제 스트림의 적어도 일부를 사전 농축 단계 없이 연료로서 사용하기 위하여 재순환시키는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0163] 본 발명은 종래기술의 단점을 극복할 수 있다. 특히, 본 발명은 제한된 용매의 소비와 함께 PUFAs의 높은 순도로의 정제를 위한 개선된 방법(예를 들어, 매우 순수한 DHA 또는 매우 순수한 EPA의 정제 방법 등)을 제공한다.

[0164] 특정 측면에서, 본 발명은, 일반적으로 용리제의 증발을 포함하는, 크로마토그래피 분리에 의해 출발 PUFA 스트림으로부터 분리된 바람직하지 않은 FA(특히 바람직하지 않은 PUFAs)를 함유하는 크로마토그래피 분획의 농축 동안에, 이러한 바람직하지 않은 FA의 작지만 무시할 수 없는 양이 재순환 용리제 내로 혼입되어, 이에 의해 상기 재순환된 용리제를 오염시킨다는 놀라운 발견에 의존한다. 결과적으로, 상기 바람직하지 않은 FA는, 바람직한 PUFA를 함유하는 크로마토그래피 스트림을 오염시킬 수 있고, 이에 의해 최종 생성물 내의 바람직하지 않은 FAs(특히 바람직하지 않은 PUFAs)에 대한 목표 사양이 도달되는 것을 잠재적으로 막을 수 있다.

[0165] FAs는 매우 높은 비점을 가지므로, 농축 단계에서 상기 FAs의 증기 상으로의 혼입은 특히 예상되지 않았다. 본 발명자들은 FAs(특히 PUFAs)가 특히 물 유기물 용리제의 물 성분과 함께 혼입되는 것을 확인하였다.

[0166] 특정 측면에서, 본 발명의 목적은 용리제(들)을 재순환시킬 때 바람직하지 않은 FA에 의한 바람직한 PUFA의 오염을 감소시키거나 방지하기 위한 것이다.

[0167] 두 가지 유사한 해결책이 상기 목적을 달성하기 위해 제공되고, 이를 해결책은 크로마토그래피 유닛으로부터 수거되는 적어도 하나의 바람직하지 않은 FA를 함유하는 스트림으로부터 회수된 용리제의 재순환을 처리하는 방법에 초점을 맞추고 있다:

[0168] - 제1 해결책은 상기 바람직하지 않은 FA가 상기 수거된 용리제로 혼입되는 것을 감소 또는 방지하기 위하여, 상기 용리제를 크로마토그래피 유닛으로 재순환시키기 전에 상기 바람직하지 않은 FA를 포함하는 상기 스트림을 농축시키는 단계를 조정하는 단계를 포함한다. 더 구체적으로, 상기 조정은 상기 재순환된 용리제의 물 대 유기물 비가 (상기 크로마토그래피 유닛으로부터 수거된 스트림의 물 대 유기물 비에 대해) 상기 농축 단계에서 감소되는 방식으로 수행된다.

[0169] - 제2 해결책은 용리제를 상기 용리제가 수거되었던 크로마토그래피 유닛으로 재순환시키지 않고 (또는 완전히 재순환시키지 않고), 오히려 상기 용리제를 다른 목적으로 재순환시켜 이를 사용하는 단계를 포함하며, 예를 들어, 상기 용리제를 상기 용리제가 수거되었던 크로마토그래피 유닛의 상류에 위치하는 다른 분리 유닛으로 재순환시키는 단계를 포함한다. 상기 제2 해결책에 따르면, 농축 단계에서는 상기 재순환된 용리제와 함께 일부 바람직하지 않은 FA가 혼입되는 것을 방지하기 위한 특정 단계가 취해지지 않지만, 상기 재순환된 용리제는 상기 크로마토그래피 유닛에서 바람직하지 않은 FA의 축적이 없는 방식으로 상기 방법에서 사용된다.

### 도면의 간단한 설명

[0170] 도 1은 크로마토그래피 단계를 증발 및 용매 재순환 수단과 연결하는 예를 개략적으로 도시한다.

도 2는 강제 순환을 갖는 강하막 증발기 (falling film evaporator)를 사용하는, 크로마토그래피 스트림의 증발의 구현예를 개략적으로 도시한다.

도 3은 증발된 스트림 중 하나가 제2 용리제 스트림을 증발시켜 전체적인 에너지 소비를 줄이기 위해 사용되는, 크로마토그래피 스트림의 농축의 구현예를 개략적으로 도시한다.

도 4는 증발 단계 및 스트리핑 단계를 포함하는, 크로마토그래피 스트림의 증발의 구현예를 개략적으로 도시한다.

도 5는 증류 단계를 포함하는, 크로마토그래피 스트림의 농축의 구현예를 개략적으로 도시한다.

도 6은 나노여과 단계를 포함하는, 크로마토그래피 스트림의 농축의 구현예를 개략적으로 도시한다.

도 7은 두 개의 연속 나노여과 단계를 포함하는, 크로마토그래피 스트림의 농축의 구현예를 개략적으로 도시한다.

도 8은 잔류수로부터 농축된 지방산의 분리를 가능하게 하는, 액체-액체 추출 단계를 포함하는, 크로마토그래피 스트림의 농축의 구현예를 개략적으로 도시한다.

도 9는 증발 단계 및 나노여과 단계를 포함하는, 크로마토그래피 스트림의 농축의 구현예를 개략적으로 도시한다.

도 10은 증발 단계 및 나노여과 단계를 포함하는, 감소된 전체 에너지 소비를 가능하게 하는, 크로마토그래피 스트림의 농축의 구현예를 개략적으로 도시한다.

도 11은 본 발명의 제1 해결책의 구현예를 개략적으로 도시한다.

도 12는 본 발명의 제2 해결책의 구현예를 개략적으로 도시한다.

도 13은 본 발명의 제2 해결책의 다른 구현예를 개략적으로 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0171] 본 발명은 이제 다음의 설명에서 제한없이 보다 상세하게 설명될 것이다. 별도의 규정이 없는 한, 모든 농도 및 비는 중량으로 표현된다.

[0172] 용어 제1, 제2, 제3 등은 다양한 요소, 성분, 부분 등을 설명하기 위해 본 명세서에서 사용될 수 있으며, 이러한 요소, 성분, 부분 등은 이러한 용어에 의해 한정되어서는 안된다. 상기 용어들은 단지 하나의 요소, 성분, 부분 등을 다른 요소, 성분, 부분 등과 구별하기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에서 사용될 때, "제1", "제2", 및 다른 수치 용어는 문맥에 의해 명시되지 않는 한 시퀀스 또는 순서를 의미하지는 않는다. 따라서, 후술

하는 바와 같은 제1 요소, 성분, 부분 등은 예시적인 구현예들의 교시로부터 벗어남이 없이 제2 요소, 성분, 부분 등으로 지칭될 수 있다.

[0173] 정제 공정의 개요

[0174] 이 부분에서 제공되는 설명은 본 발명의 상기 제1 해결책 및 상기 제2 해결책에 모두 적용된다.

[0175] 본 발명의 방법은 공급물 혼합물로부터 제1 (바람직한) PUFA를 회수하는 공정이다. 또한, 상기 공급물 혼합물은 적어도 제2 (바람직하지 않은) FA (바람직하게는 제2, 바람직하지 않은, PUFA), 바람직하게는 수많은 다른 (바람직하지 않은) FAs, 예를 들어, 포화 또는 단일 불포화 지방산 및 다른 PUFAs뿐만 아니라 잠재적으로 다른 불순물을 포함한다.

[0176] 상기 공급물 혼합물은 어류, 조류 및/또는 효모, 바람직하게는 어류로부터 유래되는 지방산들의 혼합물일 수 있다. 상기 공급물 혼합물은, 예를 들어, 어유, 또는 조류 오일과 같은 원료일 수 있다. 또한, 상기 공급물 혼합물은 상기 원료로부터 유래되는 생성물, 및 예를 들어, 어유, 조류 오일 및/또는 효모 오일로부터 유래되는 생성물일 수 있다. “원료로부터 유래되는 생성물”은 하나 이상의 처리 단계를 거친 원료를 의미한다. 상기 처리 단계는 하나 이상의 분리 또는 정제 단계 (예를 들어, 분별), 및/또는 트리글리세리드를 유리 지방산으로 전환시키는 가수 분해 단계, 및/또는 지방산을 알킬 (바람직하게는 에틸) 에스테르로 전환시키는 트리글리세리드 에스테르 교환 단계, 및/또는 표백 단계, 및/또는 우레아 분류 단계, 및/또는 분자 종류 단계, 및/또는 하나 이상의 크로마토그래피 분리 단계 등을 포함할 수 있다.

[0177] 바람직하게는, 상기 공급물 혼합물은 에스테르화 또는 에스테르교환된 생성물, 예를 들어, 에스테르교환된 어유, 조류 오일 및/또는 효모 오일이다.

[0178] 따라서, 본 발명의 방법에서 얻어지거나 사용되는 상기 지방산들 각각 (특히 상기 PUFAs 각각)은, 특히 모노-, 디- 또는 트리-글리세리드, 에스테르, 인지질, 아미드, 락톤, 또는 염의 형태의 지방산 유도체일 수 있다. 트리글리세리드 및 에스테르가 바람직하다. 에스테르가 더욱 바람직하다. 에스테르는 전형적으로 알킬 에스테르, 바람직하게는 C1-C6 알킬 에스테르, 더욱 바람직하게는 C1-C4 알킬 에스테르이다. 에스테르의 예는 메틸 및 에틸 에스테르를 포함한다. 에틸 에스테르가 가장 바람직하다.

[0179] 본 발명의 방법은 하나의 주요 크로마토그래피 분리 단계를 포함한다.

[0180] 위의 표현에서 용어 “주요”는 단지 상기 방법에서 당해 크로마토그래피 분리를 다른 잠재적인 분리 단계 (이는 본 출원에서 예비 분리 단계, 추가 분리 단계, 또는 제2 또는 제3 분리 단계로 지칭됨)와 형식적으로 구별할 목적으로 사용된다. 이는 당해 크로마토그래피 분리가 반드시 더 중요하거나, 정제 공정의 더 큰 부분을 달성하거나, 또는 상기 방법의 다른 잠재적인 분리 단계보다 더 높은 처리량을 갖는 것을 의미하는 것은 아니다.

[0181] 본 출원의 문맥에서, 크로마토그래피 분리는 흡착층과 종들 중 일부의 상이한 상호 작용으로 인해 발생하는, 액상에 혼입된 종의 분리를 포함한다.

[0182] 크로마토그래피 분리는 연속, 반 연속 또는 배치 분리일 수 있다.

[0183] 본원에서 언급된 각각의 크로마토그래피 분리 단계는 크로마토그래피 유닛에서 수행된다. 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계를 수행하기 위해 사용되는 크로마토그래피 유닛은 주요 크로마토그래피 유닛으로 지칭된다.

[0184] 용어 “크로마토그래피 유닛”은 단일 칼럼 크로마토그래피 시스템 또는 멀티칼럼 크로마토그래피 시스템 중 하나를 표시한다.

[0185] 단일 칼럼 크로마토그래피 시스템의 예는 HPLC 또는 CYCLOJET™ (또한 정상 상태 재순환으로도 지칭됨) 시스템을 포함한다. 멀티칼럼 칼럼 크로마토그래피 시스템의 예는 SMB, iSMB, AMB, VARICOL™, MODICON™, POWERFEED™, DCC, MCSGP 또는 GSSR (멀티칼럼 구배 크로마토그래피) 시스템을 포함한다.

[0186] 상기 CYCLOJET™ 시스템은 문헌 US 6,063,284에 개시되어 있고, 상기 문헌은 인용에 의하여 전체로서 본 명세서에 통합된다. 상기 시스템은 단일 칼럼의, 불연속적인 크로마토그래피 분리 시스템으로서, 상기 분리된 (i) 더 많이 유지된 종 및 (ii) 덜 유지된 종은 칼럼의 출구에서 별도로 수거되고, 상기 크로마토그램의 비-분리된 부분은 주요 펌프를 통해 재순환되는 시스템이다. 상기 분리되는 혼합물은 주입 루프에 의해 실질적으로 상기 크로마토그램의 재순환된 부분에 주기적으로 주입된다. 상기 주입 루프는 바람직하게는 주요 펌프와 칼럼 사이에 (또는 이들의 중간에) 연결된다. 수회의 크로마토그래피 사이클 이후, 상기 방법은 주기적인 정상 상태에 도달하고, 여기서 주입된 생성물의 양은 상기 칼럼의 출구에서 별도로 수거된 분리된 생성물의 양과 동일하다.

- [0187] 일 구현예에 따르면, 정상 상태 재순환을 갖는 단일 칼럼 고정층 시스템에서의 크로마토그래피 분리는 순환적이며 하기 단계들을 포함한다:
- 용리제 펌프에 의해 칼럼을 관통하는 순환 크로마토그래피 프로파일을 구축 및 유지하는 단계;
- [0189] - 분리되는 적어도 두 개의 성분을 포함하는 시료를 상기 순환 프로파일의 내부로 불연속적으로 각 사이클에서 주입하는 단계로서, 상기 주입은 주입 밸브에 의해 주입 위치로 제어된 주입 루프에 의해 수행되어 상기 루프 내의 시료를 상기 순환 프로파일의 내부로 주입하고, 상기 주입 밸브는 바람직하게는 모든 프로파일이 상기 칼럼으로부터 용출될 때까지 주입 시점에서부터 주입 위치로 유지되고, 이후 바람직하게는 상기 모든 프로파일이 칼럼 상에 있을 때 상기 주입 밸브를 로딩 위치로 조정하여 상기 주입 루프를 로딩하는 단계, 및
- [0190] - 상기 순환 프로파일로부터 적어도 두 개의 농축된 분획을 불연속적이고 주기적으로 수거하는 단계.
- [0191] 또한, 이러한 분리는 다음의 단계를 포함할 수 있다:
- [0192] - 용리제 펌프를 통해, 용리제를, 이동상으로서, 단일 사이클 동안 (바람직하게는 분획들의 수거 동안, 그러나 상기 사이클의 나머지 동안 용리제가 재순환됨) 상기 칼럼 내로 실질적으로 연속적으로 펌핑하는 단계.
- [0193] 또한 이러한 분리는 다음의 단계들을 포함할 수 있다:
- [0194] - 상기 제1 분획의 수거의 개시 이후에 발생하는 모든 사건을 상기 제1 분획의 수거의 다음 번 개시를 포함하는 사건에 시간에 따라 배열하는 단계;
- [0195] - 제3 분획의 수거 동안 상기 용리제 펌프를 정지시키는 단계로서, 이러한 정지는 상기 사이클의 종료시까지 지속되어 시간에 따라 재현성 있는 사이클을 제공하는 단계.
- [0196] 일 구현예에 따르면, 상기 유지된 순환 프로파일 상에 주입하는 동안 상기 순환 프로파일의 손실은 발생하지 않는다.
- [0197] 이 시스템의 구체적인 구현예는 전술한 US 6,063,284의 칼럼 5의 36행-칼럼 10의 41행에 기술되어 있다.
- [0198] 두 개의 칼럼에 기초한 CYCLOJET™의 시스템의 변형은 US 5,630,943에 기술되어 있고, 상기 문헌은 인용에 의하여 본 명세서에 통합된다.
- [0199] SMB 시스템은 직렬로 서로 연결되어 있는 흡착제를 포함하는 수많은 개개의 칼럼으로 이루어진다. 용리제는 제1 방향으로 상기 칼럼을 통과한다. 상기 시스템에서 공급 원료 및 용리제의 주입 지점, 및 상기 분리된 성분의 수거 지점은 일련의 밸브에 의해 주기적으로 그리고 동시에 이동된다. 전체적인 효과는 고체 흡착제의 이동층을 포함하는 단일 칼럼의 작동을 모사하는 것으로서, 상기 고체 흡착제는 용리제의 흐름에 역류하는 방향으로 이동한다. 따라서, SMB 시스템은 종래의 고정층 시스템에서와 같이, 용리제가 통과하는 고체 흡착제의 고정층들을 포함하는 칼럼들로 구성되지만, SMB 시스템에서 작동은, 예를 들어, 연속적인 향류 이동층을 모사하는 것이다.
- [0200] SMB 시스템의 가장 전통적인 형태는 네 구역 SMB 시스템이다. 기타 형태는 세 구역 SMB 시스템 및 두 구역 SMB 시스템 (Separation Science and Technology 35(4):519-534, 2000에 게재된, 이광남의 기고문 *Two Section Simulated Moving Bed Process*에 기술된 바와 같으며, 상기 기고문은 인용에 의하여 전체로서 본 명세서에 통합됨)이다.
- [0201] iSMB 시스템은 문헌 EP 0342629 및 US 5,064,539에 개시된 바와 같으며, 상기 문헌들은 인용에 의하여 전체로서 본 명세서에 통합된다. iSMB 시스템에는, 상기 시스템이 물질의 입/출력없이 폐 루프에서 작동하는 하나의 단계가 존재한다.
- [0202] SMB 시스템의 다른 변형은 다음과 같다: 문헌 US 5,102,553 및 Journal of Chromatography A, 1006:87-99, 2003에 게재된 Zhang et al의 기고문 *PowerFeed operation of simulated moving bed units: changing flow-rates during the switching interval*에 개시된 바와 같은, 시간 변수 SMB 시스템 및 POWERFEED™ 시스템 (상기 문헌들은 둘 다 인용에 의하여 전체로서 본 명세서에 통합됨); 문헌 US 7,479,228에 개시된 MODICON™ 시스템 (상기 문헌은 인용에 의하여 전체로서 본 명세서에 통합됨); 및 문헌 US 8,282,831에 개시된 바와 같은 내부 재순환을 갖는 SMB 시스템 (상기 문헌은 인용에 의하여 전체로서 본 명세서에 통합됨).
- [0203] AMB 시스템은 SMB 시스템과 작동이 유사하다. 그러나, 밸브 시스템에 의해 상기 공급물 혼합물 및 상기 용리제의 주입 지점, 및 상기 분리된 성분들의 수거 지점을 이동시키기 보다는, 그 대신에 일련의 흡착 유닛들 (즉, 칼럼들)이 상기 공급 및 배출 지점에 대하여 물리적으로 이동된다. 또한, 작동은, 예를 들어, 연속적인 향류

이동층을 모사하는 것이다.

- [0204] VARICOL™ 크로마토그래피 시스템은 문현 US 6,136,198, US 6,375,839, US 6,413,419 및 US 6,712,973에 개시된 바와 같으며, 상기 문현들은 인용에 의하여 전체로서 본 명세서에 통합된다. VARICOL™ 시스템은 직렬로 함께 연결된 수많은 개개의 흡착제 함유 칼럼들로 이루어진다. 용리제는 제1 방향으로 상기 칼럼들을 통과한다. 상기 SMB 시스템과는 달리, 이 시스템에서 상기 공급 원료 및 용리제의 주입 지점, 및 상기 분리된 성분들의 수거 지점은 일련의 밸브에 의해 주기적이지만 비동기적으로 (asynchronously) 이동된다. 전체적인 효과는 시간이 지남에 따라 가변 길이의 분리 영역을 생성하는 것이며, 이에 의해 정지상을 이것이 가장 필요한 상기 영역들에 동력학적으로 할당하고, 따라서 적은 크로마토그래피 유닛으로 유사한 분리능을 가능하게 하고 생산성을 향상시킨다. SMB 시스템과는 달리, VARICOL™ 시스템은 용리제의 흐름에 역류하는 방향으로 이동하는 고체 흡착제의 이동층을 함유하는 단일 칼럼의 작동을 모사하지 않으며, 따라서 VARICOL™의 작동 원리는 등가 AMB 시스템에서는 실행될 수 없다.
- [0205] DCC 크로마토그래피 시스템은 문현 FR 2,889,077에 개시되어 있는 바와 같고, 상기 문현은 인용에 의하여 전체로서 본 명세서에 통합된다. DCC 시스템은 이동층 및 공급물 주입 지점의 주기적인 이동을 갖는 순차적 공정이며, 이는 항상 개방 루프로 작동하는 것을 특징으로 한다. 상기 DCC 시스템은 2개 이상의 칼럼을 사용한다.
- [0206] 본 발명의 방법은 단일의 분리 단계를 포함할 수 있고, 이는 전술한 주요 크로마토그래피 분리 단계이다.
- [0207] 대안적으로, 본 발명의 방법에는 (총) 두 개의 분리 단계, 즉 전술한 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 다른 분리 단계가 존재할 수 있다. 일 구현예에 따르면, 상기 다른 분리 단계는 전술한 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에 수행될 수 있다: 이때, 상기 다른 분리 단계는 예비 분리 단계로 지칭될 수 있다. 다른 구현예에 따르면, 상기 다른 분리 단계는 전술한 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후에 수행될 수 있다: 이때, 상기 다른 분리 단계는 추가 분리 단계로 지칭될 수 있다.
- [0208] 대안적으로, 본 발명의 방법에는 (총) 세 개의 분리 단계, 즉 전술한 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 두 개의 다른 분리 단계가 존재할 수 있다. 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 (i) 예비 분리 단계, (ii) 다른 예비 분리 단계 및 (iii) 전술한 주요 크로마토그래피 분리 단계의 연속적인 단계들을 포함한다. 다른 구현예에 따르면, 상기 방법은 (i) 예비 분리 단계, (ii) 전술한 주요 크로마토그래피 분리 단계 및 (iii) 추가 분리 단계의 연속적인 단계들을 포함한다. 또 다른 구현예에 따르면, (i) 전술한 주요 크로마토그래피 분리 단계, (ii) 추가 분리 단계 및 (iii) 다른 추가 분리 단계의 연속적인 단계들을 포함한다.
- [0209] 대안적으로, 본 발명의 방법에는, (총) 네 개의 분리 단계, 또는 네 개 이상의 분리 단계가 존재할 수 있으며, 하나의 분리 단계는 전술한 주요 크로마토그래피 분리 단계이고, 다른 분리 단계들은 (전술한 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전의) 예비 분리 단계이거나 (전술한 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후의) 추가 분리 단계이다.
- [0210] 각각의 분리 단계는 분리 유닛에서 수행된다. 상기 예비 분리 단계들은 소위 각각의 예비 분리 유닛에서 수행되고, 상기 추가 분리 단계들은 소위 각각의 추가 분리 유닛에서 수행된다.
- [0211] 각각의 예비 분리 단계 및 각각의 추가 분리 단계는 전술한 것과 동일한 유형의 크로마토그래피 분리 단계 (다른 분리 단계와 독립적으로)일 수 있다 - 이 경우에 상기 예비 분리 유닛 또는 상기 추가 분리 유닛은 전술한 바와 같은 크로마토그래피 유닛이다.
- [0212] 대안적으로, 각각의 예비 분리 단계 및 각각의 추가 분리 단계는 (다른 분리 단계와 독립적으로), 예를 들어, 분자 종류 단계와 같은 비-크로마토그래피 분리 단계일 수 있다.
- [0213] 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 두 개 (및 오직 두 개)의 연속적인 분리 단계들을 포함하고, 상기 연속적인 분리 단계들은 AMB, SMB 또는 VARICOL™ 분리 단계일 수 있다 (이들 두 개의 단계들 중 하나는 전술한 주요 크로마토그래피 분리 단계임).
- [0214] 다른 구현예에 따르면, 상기 방법은 세 개 (및 오직 3 개)의 연속적인 분리 단계들을 포함하고, 상기 연속적인 분리 단계들은 AMB, SMB 또는 VARICOL™ 분리 단계일 수 있다 (이들 세 개의 단계들 중 하나는 전술한 주요 크로마토그래피 분리 단계임).
- [0215] 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 세 개 (및 오직 3 개)의 연속적인 분리 단계들, 즉, (예비) VARICOL™ 분리 단계, 이후의 전술한 주요 크로마토그래피 분리 단계 (이는, 예를 들어, CYCLOJET™의 분리 단계 또는 HPLC 분

리 단계일 수 있음), 이후의 (추가) VARICOL™ 분리 단계를 포함한다.

[0216] 다른 구현예에 따르면, 상기 방법은 세 개 (및 오직 3 개)의 연속적인 분리 단계들, 즉, (예비) VARICOL™ 분리 단계, 이후의 전술한 주요 크로마토그래피 분리 단계 (이는, 예를 들어, CYCLOJET™의 분리 단계 또는 HPLC 분리 단계일 수 있음), 이후의 (추가) CYCLOJET™ 또는 HPLC 분리 단계를 포함한다.

[0217] 상기 방법이 두 개 이상의 분리 단계를 포함하는 경우, 상기 단계들은 상이한 분리 유닛들을 사용하여 동시에 수행될 수 있거나, 또는 상이한 분리 유닛들을 사용하거나 동일한 분리 유닛들을 사용하여 순차적으로 수행될 수 있다. 또한, SMB 또는 AMB 시스템에서 수행되는 크로마토그래피 분리 단계인 두 개의 분리 단계의 경우에는, 동일한 SMB 또는 AMB 시스템에서 이러한 단계들을 동시에 수행하는 것이 가능하다. 동일한 장치에서의 이러한 동시 수행의 일 예는 문헌 WO 2011/080503에 개시되어 있으며, 상기 문헌은 인용에 의하여 전체로서 본 명세서에 통합된다.

[0218] 따라서, 상기 분리 단계들을 실행하기 위해 사용되는 분리 유닛들의 일부는 동일할 수 있다. 예를 들어, 상기 주요 크로마토그래피 유닛 및 하나의 예비 분리 유닛은 하나의 동일한 유닛일 수 있거나; 및/또는 상기 주요 크로마토그래피 유닛 및 하나의 추가 분리 유닛은 하나의 동일한 유닛일 수 있거나; 및/또는 하나의 예비 분리 유닛 및 다른 예비 분리 유닛은 하나의 동일한 유닛일 수 있거나; 및/또는 하나의 예비 분리 유닛 및 하나의 추가 분리 유닛은 하나의 동일한 유닛일 수 있거나; 및/또는 하나의 추가 분리 유닛과 다른 추가 분리 유닛은 하나의 동일한 유닛일 수 있다.

[0219] 대안적으로, (상기 주요 크로마토그래피 유닛을 포함하는) 모든 분리 유닛은 별개일 수 있다.

[0220] (상기 주요 크로마토그래피 분리 단계를 포함하는) 각각의 크로마토그래피 분리 단계는 역상 (reverse phase)에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 결정되는 바와 같이, 약한 극성의 수지에 기초한 흡착제들, 또는 알킬 (특히 C4, C8, C18, C24, C30), 페닐, 또는 다른 적절한 잔기와 같은 유기 잔기로 화학적으로 개질된 실리카계 정지상이 사용될 수 있다.

[0221] 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 물 유기를 용리제를 사용하여 수행된다. 물 유기를 용리제는 하나의 유기 용매와 물의 혼합물, 또는 몇가지 유기 용매와 물의 혼합물이다.

[0222] 바람직하게는, 다른 크로마토그래피 분리 단계들이 상기 방법에 존재하는 경우, 이들 단계는 또한 각각의 물 유기를 용리제를 사용하여 수행된다. 대안적으로, 다른 크로마토그래피 분리 단계들은 실질적으로 순수한 유기 용매 또는 실질적으로 순수한 유기 용매들의 혼합물을 사용하여 수행될 수 있다.

[0223] (특히, 물 유기물 용리제 (들)을 형성하기 위하여) 본 발명에 사용될 수 있는 유기 용매는, 예를 들어, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올 및 더욱 바람직하게는 메탄올과 같은 알코올; 아세톤 또는 메틸 에틸 케톤과 같은 케톤; 아세토니트릴과 같은 니트릴; 메틸아세테이트 또는 에틸아세테이트와 같은 에스테르; 테트라하이드로퓨란과 같은 퓨란; 디에틸에테르 또는 메틸에틸에테르와 같은 에테르; 및 상기한 것들 중 2 이상의 조합을 포함한다. 바람직한 유기 용매는 메탄올 및 아세톤이다.

[0224] 각각의 물 유기물 용리제는 상기 용리제 중의 물 성분 대 유기 용매(들) 성분의 중량비인 물 대 유기물 비를 특징으로 한다.

[0225] 각각의 물 유기물 용리제의 물 대 유기물 비는 바람직하게는 0.01:99.99 내지 30:70 사이, 더욱 바람직하게는 5:95 내지 25:75 사이에서 변할 수 있다.

[0226] 적어도 두 개의 크로마토그래피 분리 단계가 상기 방법에 존재하는 경우, 이러한 크로마토그래피 분리 단계들은 동일한 조성 또는 상이한 조성을 갖는 용리제들을 사용하여 수행될 수 있다. 상이한 조성 및 특히 상이한 물 대 유기물 비를 갖는 용리제들을 사용하는 것이 바람직한데, 그 이유는 이것이 각각의 분리 단계에서 용리제의 용출력을 조정하여 각각의 단계에서 상이한 화합물들의 분리를 달성하는 것을 가능하게 하기 때문이다. 또한, 상이한 단계들에서는 상이한 유기 용매들로 이루어진 용리제들을 사용하는 것이 바람직할 수 있는데, 그 이유는 이것이 각각의 분리 단계에서 분리될 특정 종들 사이의 크로마토그래피 선택도를 조정하여 각각의 단계에서 상이한 화합물들의 분리를 달성하는 것을 가능하게 하기 때문이다.

[0227] 특정 구현예들에 따르면, 각각의 용리제에서 유기 용매 (들)의 중량 농도는 적어도 2 %, 또는 1 %, 또는 0.5 % 또는 0.2 %로, 또는 0.1 %의 정밀도로 목표 값으로 제어 또는 조정된다. 이는 특히 항목 1 내지 80에서 위에서 언급된 모든 구현예들에 적용된다. 이는 본 명세서에서 기술된 물 및/또는 유기 용매 보충을 사용하거나, 및/또

는 용출 농도 및 재순환의 파라미터들을 조정함으로써 수행될 수 있다.

[0228] 본 발명의 방법에 의해 얻어진 최종 생성물은 잔류 불순물과 함께, 정제된 제1 PUFA를 포함한다. 최종 생성물에서 제1 PUFA의 양은, 예를 들어, (지방산들의 총 함량에 대하여) 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 90 % 이상, 또는 약 95 % 이상, 또는 약 97 % 이상, 또는 약 98 % 이상일 수 있다.

[0229] 특히, 최종 생성물은 (지방산들의 총 함량에 대하여) 약 80 % 이상, 또는 약 95 % 이상, 또는 약 97 % 이상, 또는 약 98 % 이상, 또는 약 99 % 이상의 양으로 EPA를 포함할 수 있고; 뿐만 아니라 약 1 % 이하, 또는 약 0.1 % 이하, 또는 약 0.05 % 이하, 또는 약 0.03 % 이하, 또는 약 0.01 % 이하의 양으로 DHA를 포함할 수 있다.

[0230] 토코페롤 등과 같은 안정화제가 상기 최종 생성물에 첨가될 수 있다. 용어 "안정화제"는 안정화제 화합물들의 혼합물을 포함한다.

#### 용리제의 농축 및 재순환

[0231] 이 부분에서 제공되는 설명들은 본 발명의 상기 제1 해결책 및 상기 제2 해결책에 모두 적용된다.

[0233] 상기 주요 크로마토그래피 유닛의 출구에서, 적어도 2 개의 스트림, 즉, 상기 제1 (바람직한) PUFA가 풍부한 제1 용리제 스트림 및 상기 제2 (바람직하지 않은) FA가 풍부한 제2 용리제 스트림이 수거된다. 예를 들어, 상기 제1 스트림은 추잔액일 수 있고, 상기 제2 용리제 스트림은 추출액일 수 있거나, 또는 이와 반대일 수 있다.

[0234] 본 발명의 방법은 농축 유닛에서, 상기 제2 용리제 스트림에 대해 수행되는 적어도 하나의 농축 단계를 포함한다. 이 농축 단계는 한편으로는 농축된 FAs 스트림을 제공하고, 다른 한편으로는 고갈된 제2 용리제 스트림을 제공한다. 용어 "고갈된"은 제2 FA (및 다른 지방산들)가 상기 용리제로부터 실질적으로 제거되었다는 사실을 의미한다. 또한, 표현 "농축된 FAs 스트림"은 농축 단계 전의 제2 용리제 스트림보다 높은 고농도의 FAs, 특히 고농도의 제2 FA를 포함하는 조성물을 나타낸다는 것이 이해되어야 한다. 상기 조성물은 다른 지방산, 특히 다른 바람직하지 않은 지방산뿐만 아니라, 얼마간의 물 및/또는 용매를 포함할 수 있다.

[0235] 이후, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림은 아래에서 기술될 방식으로, 상기 공정으로 재순환된다.

[0236] 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이후의 농축 및 재순환 단계의 일반적인 원리는 도 1의 일반적인 스킴을 참조함으로써 더 잘 이해될 수 있다 (또한, 동일한 원리가, 다른 크로마토그래피 분리 단계, 예를 들어, 예비 또는 추가 크로마토그래피 분리 단계 이후에 수행되는 농축 및 재순환 단계가 존재하는 경우, 그러한 농축 및 재순환 단계에 적용될 것임).

[0237] 주요 크로마토그래피 유닛 (3)에는 유입되는 용리제 스트림 (1) 및 유입되는 공급물 스트림 (2)이 공급된다. 주요 크로마토그래피 분리 단계가 상기 방법의 첫번째 단계인 경우, 공급물 스트림 (2)은 (초기) 공급물 혼합물 스트림일 수 있으며; 다르게는, 분리 단계들과 같은 하나 이상의 처리 단계가 이미 수행된 경우, 공급물 스트림 (2)은 중간 생성물 스트림일 수 있다.

[0238] 주요 크로마토그래피 유닛 (3)의 출구에서, 제1 PUFA가 풍부한 제1 용리제 스트림 (4) 및 제2 FA가 풍부한 제2 용리제 스트림 (5)이 수거된다.

[0239] 제1 PUFA가 풍부한 제1 용리제 스트림 (4)은 제1 농축 유닛 (6)에 공급되고, 제2 FA가 풍부한 제2 용리제 스트림 (5)은 제2 농축 유닛 (7)에 공급된다.

[0240] 각각의 농축 유닛 (6, 7)에서, 상기 용리제는 증발된 후 응축된다; 따라서, 상기 용리제는 모든 지방산으로부터 실질적으로 분리된다. 따라서, 농축된 FAs (9) 스트림 (특히, 제1 PUFA를 농축된 형태로 함유함)이 제1 농축 유닛 (6)의 출구에서 얻어지고, 다른 농축된 FAs 스트림 (8) (특히, 제2 FA를 농축된 형태로 함유함)이 제2 농축 유닛 (7)의 출구에서 얻어진다. 또한, 고갈된 제1 용리제 스트림 (11) (즉, 제1 PUFA 및 다른 FAs가 고갈됨)이 제1 농축 유닛 (6)의 출구에서 회수되고, 고갈된 제2 용리제 스트림 (10) (즉, 상기 제2 FA뿐만 아니라 다른 FAs가 고갈됨)이 제2 농축 유닛 (7)의 출구에서 회수된다.

[0241] 선택적으로, 상기 고갈된 제1 용리제 스트림 (11)은 상기 방법에서 사용되는 주요 크로마토그래피 유닛 (3) 또는 다른 분리 유닛으로 부분적으로 또는 완전히 재순환될 수 있다. 상기 고갈된 제1 용리제 스트림에 대한 오염의 문제는 없는데, 그 이유는 상기 스트림이 잔류 PUFA에 의해 오염되는 경우, 이는 주로 상기 제1 (바람직한) PUFA에 의한 것이고, 이는 최종 생성물 (정제된 형태의 제1 PUFA)의 순도에 부정적인 영향을 미치지 않을 것이다.

- [0242] 또한, 고갈된 제2 용리제 스트림 (10)도 부분적으로 또는 완전히 재순환될 수 있다. 그러나, 이 경우에는, 본 발명에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림에 혼입되는 일부 잔류하는 제2 (바람직하지 않은) FA 때문에 최종 생성물 (정제된 형태의 제1 PUFA)의 순도에 부정적인 영향을 미치는 것을 피하기 위하여 특별한 단계들이 취해진다. 이러한 특별한 단계들이 아래에서 기술될 것이다.
- [0243] 농축 단계를 수행하기 위해 사용되는 농축 유닛은, 예를 들어, 강제 재순환을 갖는 강하막 증발기, 상승 증발기, 플래쉬 증발기, 또는 용리제 성분의 증발을 가능하게 하고 농축된 지방산을 장치의 바닥에 남기는 당해 기술분야에서 공지된 다른 유형의 증발기일 수 있다.
- [0244] 도 2를 참조하면, 일 구현예에 따르면, 농축 유닛은 상 분리기 (13)와 응축기 (12)에 연결된 강제 재순환을 갖는 다관식 증발기 (11)를 포함한다. 농축될 용리제 스트림 (14)이 증발기 (11)에 공급된다. 가열된 스트림은 증발기 (11)에서 배출되어 상 분리기 (13)로 들어간다. 상 분리기 (13)의 출구에서는, 농축된 FAs 스트림 (15)이 회수되고, 증발된 용리제는 응축기 (12)로 수거되고 이송된다. 용리제 증기는 응축기 (12)에서 액체 형태로 응축된다. 응축기 (12)의 출구에서는, 고갈된 용리제 스트림이 회수 라인 (16)을 통해 수거된다.
- [0245] 증발 기술들은, 에너지 소비의 수준을 최적화하기 위하여, 두 개 이상의 효과의 사용, 증기 재압축 기술, 또는 예를 들어, 증발된 크로마토그래피 스트림을 다른 크로마토그래피 스트림용 가열 유체로서 사용하는 것과 같은 당해 기술 분야에서 공지된 방법으로 실행될 수 있다.
- [0246] 예로서, 도 3이 참조될 수 있다. 여기서, 두 개의 농축 유닛, 예를 들어, 제1 용리제 스트림을 처리하기 위한 하나 및 제2 용리제 스트림을 처리하기 위한 다른 하나가 연결된다 (이들 스트림은, 예를 들어, 위에서 정의된 제1 용리제 스트림 및 제2 용리제 스트림과 동일하거나, 또는 그 반대일 수 있음). 상기 제1 농축 유닛은 제1 상 분리기 (22) 및 제1 응축기 (23)에 연결된 제1 증발기 (21)를 포함한다. 제1 용리제 스트림 (26)이 제1 증발기 (21)에 공급된다. 농축된 지방산 스트림 (27)이 제1 상 분리기 (22)의 출구에서 회수된다. 또한, 증기 상이 제1 상 분리기 (22)의 출구에서 회수되어 제1 응축기 (23)로 이송된다.
- [0247] 상기 제2 농축 유닛은 제1 응축기 (23)와 동일한 장치인 제2 증발기 (23)를 포함한다. 제2 증발기 (23)는 제2 상 분리기 (24)와 제2 응축기 (25)에 연결되어 있다. 제2 용리제 스트림(28)은 제2 증발기 (23)로 공급된다. 제2 용리제 스트림(28)의 증발은 상기 제1 농축 유닛으로부터의 기상의 응축 때문에 (적어도 부분적으로) 달성된다. 농축된 지방산 스트림 (29)은 제2 상 분리기 (24)의 출구에서 회수된다. 또한, 증기 상이 제2 상 분리기 (24)의 출구에서 회수되고 제2 응축기 (25)로 이송된다.
- [0248] 하나 또는 두 개의 고갈된 용리제 스트림 (30)이 제1 응축기 (23) 및 제2 응축기 (25)의 출구에서 각각 회수된다.
- [0249] 일 구현예에 따르면, 강제 순환을 갖는 증발기가 농축된 지방산 스트림 내의 잔류 용리제를 제거하기 위해 배치식 또는 연속식 스트리핑 칼럼에 연결될 수 있다. 예를 들어, 도 4를 참조하면, 농축 유닛은 한편으로는 응축기 (32)에 연결되고, 다른 한편으로는 스트리핑 칼럼 (33)에 연결된 증발기 (31)를 포함할 수 있다. 용리제 스트림 (38)이 증발기 (31)에 공급된다. 증발기 (31)에서 생성된 증기 상은 응축기 (32)로 이송되고, 고갈된 용리제 스트림 (37)은 응축기 (32)의 출구에서 회수된다. 증발기 (31)에서 생성된 액상은 스트리핑 칼럼 (33)으로 이송된다. 또한, 가스 스트림 (34) (예를 들어, 질소 스트림)도 스트리핑 칼럼 (33)에 공급된다. 농축된 지방산 스트림 (36)뿐만 아니라 잔여 용리제 증기를 함유하는 가스 스트림 (35)이 스트리핑 칼럼 (33)의 각각의 출구에서 수거된다.
- [0250] 또한, 상기 농축 단계는 증류 단계를 포함할 수 있으며, 이 경우 상기 농축 유닛은 적어도 하나의 증류 칼럼을 포함한다. 예를 들어, 도 5를 참조하면, 상기 농축 유닛은 응축기 (42)에 연결된 증류 칼럼 (41)을 포함할 수 있다. 용리제 스트림 (43)이 상기 증류 칼럼으로 공급된다. 증기 상이 상기 칼럼의 상부에서 회수되고, 응축기 (42)로 이송된다. 고갈된 용리제 스트림 (44)이 응축기 (42)의 출구에서 수거된다. 농축된 지방산 스트림 (45)이 증류 칼럼 (41)의 바닥에서 수거된다.
- [0251] 또한, 상기 농축 단계는 나노여과 단계와 같은 막 여과 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 도 6을 참조하면, 상기 농축 유닛은 나노여과 시스템 (51)을 포함할 수 있다. 용리제 스트림 (52)이 나노여과 시스템 (51)에 공급된다. 고갈된 용리제 스트림 (54)이 투과물 스트림으로서 회수된다. 농축물 스트림의 일부는 나노여과 시스템 (51)으로 재순환되고, 그것의 일부는 농축된 지방산 스트림 (53)으로서 회수된다.
- [0252] 또한, 두 개의 막 여과 단계를 직렬로 사용하는 것도 가능하다. 예를 들어, 도 7을 참조하면, 상기 농축 유닛은

제1 나노여과 시스템 (61) 및 제2 나노여과 시스템 (62)을 포함할 수 있다. 용리제 스트림 (63)이 제1 나노여과 시스템 (61)에 공급된다. 제1 나노여과 시스템 (61)으로부터의 농축물 스트림의 일부는 제1 나노여과 시스템 (61)으로 재순환되고, 그것의 일부는 농축된 지방산 스트림 (64)으로서 회수된다. 제1 나노여과 시스템 (61)으로부터의 투과물 스트림은 제2 나노여과 시스템 (62)으로부터의 농축물 스트림과 혼합된다. 이 혼합 스트림의 일부는 제2 나노여과 시스템 (62)으로 공급되고, 그 일부는 제1 나노여과 시스템 (61)으로부터의 농축물 스트림과 혼합된다. 마지막으로, 고갈된 용리제 스트림 (65)은 제2 나노여과 시스템 (62)로부터 투과물 스트림으로서 회수된다.

[0253] 또한, 상기 농축 유닛에 액체-액체 추출기를 제공할 수 있다. 예를 들어, 도 8을 참조하면, 상기 농축 유닛은 응축기 (72) 및 액체-액체 추출기 (73)에 연결된 증발기 (71)를 포함할 수 있다. 용리제 스트림 (74)이 증발기 (71)로 공급된다. 증발기 (71)로부터의 증기 상은 응축기 (72)로 이송된다. 고갈된 용리제 스트림 (75)은 응축기 (72)의 출구에서 회수된다. 증발기 (71)로부터의 액상은 부분적으로 증발기 (71)로 재순환되고, 부분적으로 액체-액체 추출기 (73)로 이송된다. 농축된 지방산 스트림 (76)은 액체-액체 추출기 (73)의 한 출구에서 회수되고, 잔류수 스트림 (77)은 액체-액체 추출기 (73)의 다른 출구에서 회수된다. 다른 구현예에서, 증발기 (71)는 중류 칼럼으로 대체될 수 있다.

[0254] 또한, 나노여과와 같은 막 여과 단계를 증발 단계와 결합하는 것도 가능하다. 예를 들어, 도 9를 참조하면, 상기 농축 유닛은 응축기 (82) 및 나노여과 시스템 (83)에 연결된 증발기 (81)를 포함할 수 있다. 용리제 스트림 (84)이 나노여과 시스템 (83)에 공급된다. 농축된 지방산 스트림 (85)이 나노여과 시스템 (83)으로부터의 농축물 스트림의 일부로서 회수된다. 나노여과 시스템 (83)으로부터의 농축물 스트림의 다른 부분은 나노여과 시스템 (83)으로 재순환된다. 나노 시스템 (83)으로부터의 투과물 스트림은 증발기 (81)로 이송된다. 증발기 (81)로부터의 증기 상은 응축기 (82)로 이송된다. 고갈된 용리제 스트림 (86)은 응축기 (82)의 출구에서 회수된다. 증발기 (81)로부터의 액상의 일부는 증발기 (81)로 재순환되고, 증발기 (81)로부터의 액상의 일부는 나노여과 시스템 (83)으로부터의 농축물 스트림과 혼합된다.

[0255] 다른 예에서, 도 10을 참조하면, 상기 농축 유닛은 응축기 (93) 및 나노여과 시스템 (92)에 연결된 증발기 (91)를 포함할 수 있다. 용리제 스트림 (94)이 나노여과 시스템(92)으로 공급된다. 고갈된 용리제 스트림 (95)은 나노여과 시스템 (92)로부터 투과물 스트림으로서 회수된다. 나노여과 시스템 (92)으로부터의 농축물 스트림의 일부는 나노여과 시스템 (92)으로 재순환되고, 그것의 일부는 증발기 (91)로 이송됨으로써 추가로 농축된다. 증발기 (91)로부터의 증기 상은 응축기 (93)로 이송된다. 다른 고갈된 용리제 스트림 (97)은 응축기 (93)의 출구에서 회수된다. 증발기 (91)로부터의 액상의 일부는 증발기(91)로 재순환되고, 그것의 일부는 수거되어 농축된 지방산 스트림 (96)을 형성한다.

#### 용리제 재순환의 변형

[0257] 본 발명에 따르면, 상기 제1 (바람직한) PUFA가 풍부한 제1 용리제 스트림 및 상기 제2 (바람직하지 않은) FA가 풍부한 제2 용리제 스트림이 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 얻어진다. 본 발명에 따르면, 적어도 상기 제2 용리제 스트림이 농축되고 재순환된다.

[0258] 또한, 상기 제1 용리제 스트림은 (도 1에 도시된 바와 같이) 농축되고 재순환될 수 있다. 상기 제1 용리제 스트림의 적어도 90 %, 바람직하게는 적어도 99 % 및 더욱 바람직하게는 적어도 99.9 %가 (PUFAs와 같은 고비점 지방산을 고려하여) 상술한 농축 기술, 또는 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 다른 농축 기술 중 하나를 사용하여, (특히 상기 주요 크로마토그래피 유닛으로) 재순환될 수 있다.

[0259] 이제 상기 제2 용리제 스트림의 농축 및 재순환으로 돌아가서, 본 발명의 제1 해결책은 상기 고갈된 제2 용리제 스트림 (즉, 농축 후)의 물 대 유기물 비가 상기 제2 용리제 스트림(즉, 농축 전)의 물 대 유기물 비보다 작은 방식으로 농축 단계를 수행하는 것이다.

[0260] 이는 농축 단계의 파라미터들을 조정함으로써 달성될 수 있는데, 그 이유는 물은 용리제 내에 존재하는 유기 용매 (들)과는 다른 비점을 가지기 때문이다. 전형적으로, 증발 또는 증류 또는 다른 농축 방법은 단지 부분적으로 및 완전하지 않게 수행되어, 유기 용매가 풍부하고 (지방산뿐만 아니라) 물이 고갈되고 이후 수거되어 상기 고갈된 제2 용리제 스트림을 형성하는 증기 상을 생성한다.

[0261] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비에 비해 약 1 % 내지 약 10%만큼 감소된다.

[0262] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유

기물 비에 비해 약 10 % 내지 약 20%만큼 감소된다.

[0263] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비에 비해 약 20 % 내지 약 30%만큼 감소된다.

[0264] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비에 비해 약 30 % 내지 약 40%만큼 감소된다.

[0265] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비에 비해 약 40 % 내지 약 50%만큼 감소된다.

[0266] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비에 비해 약 50 % 내지 약 60%만큼 감소된다.

[0267] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비에 비해 약 60 % 내지 약 70%만큼 감소된다.

[0268] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비에 비해 약 70 % 내지 약 80%만큼 감소된다.

[0269] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비에 비해 약 80 % 내지 약 90%만큼 감소된다.

[0270] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비에 비해 약 90 % 내지 약 95%만큼 감소된다.

[0271] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물의 비는 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비에 비해 약 95 % 초과만큼 감소된다.

[0272] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림은 약 20 % 이하의 물, 선택적으로 약 10 % 이하의 물, 바람직하게는 약 5 % 이하의 물, 또는 약 2 % 이하의 물, 또는 약 1 % 이하의 물, 또는 약 0.5 % 이하의 물, 또는 약 0.1 % 이하의 물, 또는 약 0.05 % 이하의 물, 또는 약 0.01 % 이하의 물, 또는 약 0.005 % 이하의 물, 또는 약 0.001 % 이하의 물을 함유한다.

[0273] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 유량은 상기 제2 용리제 스트림의 유량에 비해 약 1 % 내지 약 5%만큼 감소된다.

[0274] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 유량은 상기 제2 용리제 스트림의 유량에 비해 약 5 % 내지 약 10%만큼 감소된다.

[0275] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 유량은 상기 제2 용리제 스트림의 유량에 비해 약 10 % 내지 약 20%만큼 감소된다.

[0276] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 유량은 상기 제2 용리제 스트림의 유량에 비해 약 20 % 내지 약 30%만큼 감소된다.

[0277] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 유량은 상기 제2 용리제 스트림의 유량에 비해 약 30 % 내지 약 40%만큼 감소된다.

[0278] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 유량은 상기 제2 용리제 스트림의 유량에 비해 약 40 % 내지 약 50%만큼 감소된다.

[0279] 일 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 유량은 상기 제2 용리제 스트림의 유량에 비해 약 50 % 초과만큼 감소된다.

[0280] 상기 제2 용리제 스트림 대비 물 대 유기물 비의 감소로 인해, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림은, 최소 또는 낮은 수준의 혼입된 바람직하지 않은 제2 FA를 함유하고, 바람직하게는 혼입된 바람직하지 않은 제2 FA를 함유하지 않는다. 따라서, 이 고갈된 제2 용리제 스트림은 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계를 실행하기 위해, 상기 주요 크로마토그래피 유닛으로 부분적으로, 또는 바람직하게는 완전히 재순환될 수 있다.

[0281] (새로운) 물의 보충이 물의 고갈을 보상하기 위해 제공될 수 있다. 이러한 물의 첨가는 농축 단계 및 상기 주요 크로마토그래피 유닛으로의 스트림의 반송 사이의 어딘가에서 일어날 수 있다. 상기 물의 첨가는 특히, 증기 형

태의 상기 고갈된 제2 용리제 스트림이 응축되기 전에, 또는 바람직하게는 이것이 응축된 후에 일어날 수 있다.

[0282] 물의 첨가는 상기 스트림의 물 대 유기물 비를 농축 단계 이전의 원래 값으로 되돌리거나, 또는 이를 다른 값으로 가져올 수 있다.

[0283] (새로운) 유기 용매 (들)의 선택적인 보충도 제공될 수 있다.

[0284] 상기 고갈된 제2 용리제 스트림은 재순환되어 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에 사용되기 전에 다른 종류의 처리를 거칠 수 있다.

[0285] 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비가 상기 제2 용리제 스트림의 물 대 유기물 비와 동일하든지 동일하지 않든지, 본 발명의 제2 해결책은 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 전부를 상기 주요 크로마토그래피 유닛에서 사용하기 위해 재순환하지 않는 것을 특징으로 한다. 이러한 제2 해결책에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 적어도 일부는, 예를 들어, 용리제로서 또는 연료로서, 다른 공정 단계에서 사용되기 위해 재순환된다.

[0286] 이로써, 잠재적으로 혼입된 바람직하지 않은 제2 FA는 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계의 효율을 손상시키지 않으며, 그럼에도 불구하고 공장의 전체 운전 비용이 실질적으로 증가되지 않는다.

[0287] 이러한 방식으로 재순환되는 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 비율이 소정 임계치 아래로 유지되어 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계의 종료시에 상기 제2 FA에 의한 상기 제1 PUFA의 오염도가 특정 한계 미만으로 유지되는 한, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 일부를 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용하기 위해 재순환하는 것은 여전히 가능하다. 예를 들어, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 0 내지 70 %, 또는 약 0 내지 약 60 %, 또는 약 0 내지 약 50 %, 또는 약 0 내지 약 40 %, 또는 약 0 내지 약 30 %, 또는 약 0 내지 약 20 %, 또는 약 0 내지 약 10 %가 재순환되어 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용된다.

[0288] 다른 구현예에 따르면, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림 중 어느 것도 재순환되어 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계에서 사용되지 않는다. 가장 바람직하게는, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 전부가 재순환되어 다른 공정 단계에 사용된다.

[0289] 상기 고갈된 제2 용리제 스트림은 재순환되어 동일한 공정의 다른 단계, 또는, 예를 들어, 다른 생성물을 제조하기 다른 공정의 단계에서 사용될 수 있다. 이 다른 공정은 동일한 설비 또는 다른 설비 (이 경우 상기 고갈된 제2 용리제 스트림은 저장되어 한 설비로부터 다른 설비로 이송됨)에서 수행될 수 있다.

[0290] 예를 들어, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림은 동일한 설비 또는 원격지에서 상기 스트림으로부터 순수한 유기 용매를 재생하기 위해 사용될 수 있으며, 그러한 순수한 유기 용매는 전체 공정 비용이 실질적으로 영향을 받지 않도록 상기 주요 크로마토그래피 단계에 공급하기 위해 부분적으로 또는 완전히 사용된다.

[0291] 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 상기 고갈된 제2 용리제 스트림의 일부 또는 전부를 (상기 주요 크로마토그래피 분리 단계 이전에 수행되는 예비 분리 단계를 실행하기 위하여) 상기 주요 크로마토그래피 유닛의 상류에 위치하는 다른 분리 유닛으로 재순환시키는 단계를 포함한다.

[0292] 상기 사용된 용리제의 연료로서의 재이용이 실행되는 경우, 상기 농축 단계는 선택 사항이 됨을 주목하여야 한다. 상기 제2 용리제 스트림의 조성에 따라, 적은 지방산 (또는 물)을 함유하는 고갈된 제2 용리제 스트림을 먼저 생성하지 않고 상기 제2 용리제 스트림의 일부 또는 전부를 연료로서 직접 사용하는 것이 가능할 수 있다.

[0293] 본 발명의 제1 해결책을 실행하는 일 구현예에 따르면, 그리고 도 11을 참조하면, 상기 방법은 주요 크로마토그래피 분리 단계를 포함하고, 상기 주요 크로마토그래피 분리 단계는 용리제 스트림 (104)을 사용하여, 주요 크로마토그래피 유닛 (101)에서 제1 (바람직한) PUFA 및 제2 (바람직하지 않은) FA를 포함하는 유입되는 스트림 (103)을 처리하는 단계를 포함한다. 제1 PUFA가 풍부한 제1 용리제 스트림 (105) 및 제2 FA가 풍부한 제2 용리제 스트림 (106)이 주요 크로마토그래피 유닛 (101)의 출구에서 수거된다.

[0294] 제1 용리제 스트림 (105)은 제1 농축 유닛 (107)으로 이송되고, 제2 용리제 스트림 (106)은 제2 농축 유닛 (102)으로 이송된다.

[0295] 제1 농축 유닛 (107)의 출구에서는, 제1 농축된 지방산 스트림 (108) (농축된 제1 PUFA 및 가능하게는 추가 성분들을 함유함) 및 고갈된 제1 용리제 스트림 (111)이 각각 수거된다. 상기 고갈된 제1 용리제 스트림 (111)은 주요 크로마토그래피 유닛 (101)으로 재순환된다. 제1 용리제 스트림 (104)에 함유된 용리제의 실질적으로 전부 까지가 고갈된 제1 용리제 스트림 (111)으로서 재순환될 수 있고, 상기 고갈된 제1 용리제 스트림 (111)의 물

대 유기물 비는 제1 용리제 스트림 (104)의 물 대 유기물 비와 실질적으로 동일할 수 있으며, 그 이유는 어떠한 오염 문제도 없기 때문이다.

[0296] 제2 농축 유닛 (102)의 출구에서는, 제2 농축된 지방산 스트림 (109) (농축된 제2 FA 및 가능하게는 추가 성분들을 함유함) 및 고갈된 제2 용리제 스트림 (110)이 각각 수거된다. 고갈된 제2 용리제 스트림 (110)은 주요 크로마토그래피 유닛 (101)으로 재순환된다. 고갈된 제2 용리제 스트림 (110)의 물 대 유기물 비는 제2 용리제 스트림 (106)의 물 대 유기물 비보다 낮다. 상관적으로, 제2 농축된 지방산 스트림 (109)은 제2 용리제 스트림 (106)의 물 대 유기물 비보다 큰 물 대 유기물 비를 갖는, 잔류 용리제를 함유한다. 예를 들어, 제2 농축된 지방산 스트림 (109)은 잔류수를 함유할 수 있으며, 유기 용매를 실질적으로 함유하지 않을 수 있다.

[0297] 물의 보충(112)이 상기 물 중의 재순환된 용리제의 고갈을 보상하기 위해 제공된다. 또한, 유기 용매의 보충 (미도시)도 제공될 수 있다.

[0298] 상기 방법이 하나의 단일 분리 단계를 포함하는 경우, 또는 상기 방법이 수개의 분리 단계 (이들 중 첫번째 단계는 여기에 도시된 주요 크로마토그래피 분리 단계임)를 포함하는 경우, 유입되는 스트림 (103)이 공급물 혼합물일 수 있음을 유의하여야 한다.

[0299] 마찬가지로, 제1 농축된 지방산 스트림 (108)은 상기 방법의 최종 생성물일 수 있다. 또는, 도 11에 도시된 크로마토그래피 분리 단계 이후에 추가 분리 단계가 뒤따르는 경우, 이 스트림은 상기 스트림에 존재하는 다른 성분들로부터 제1 PUFA를 분리하기 위하여 다음 분리 단계로 이송된다.

[0300] 도 12는 본 발명의 제2 해결책을 실행하는 하나의 변형을 도시한다. 도 11의 부호와 유사한 부호는 동일한 의미를 갖는다. 이 변형과 도 11의 상술한 구현에 사이의 차이는 고갈된 제2 용리제 스트림 (110)이 주요 크로마토그래피 유닛 (101)으로 재순환되지 않는다는 것이다. 대신에, 이 고갈된 제2 용리제 스트림 (110)은 주요 크로마토그래피 유닛 (101)의 상류에 위치하는 다른 분리 유닛 (미도시)으로 재순환된다. 이 경우, 고갈된 제2 용리제 스트림 (110)의 물 대 유기물 비는 제2 용리제 스트림(106)의 물 대 유기물 비와 동일할 (또는 동일하지 않을) 수 있으며; 제2 농축된 지방산 스트림(109)은 실질적으로 용리제를 함유하지 않을 수 있고, 특히 물을 함유하지 않을 수 있다.

[0301] 이 변형에서, 새로운 유기 용매의 보충 (113)의 존재는 고갈된 제2 용리제 스트림 (110)의 주요 크로마토그래피 유닛 (101)으로의 전체 재순환의 결여를 보상하기 위해 필요하다. 물의 보충 (112)과 유기 용매의 보충 (113)은 용리제의 단일 보충에 의해 대체될 수 있다.

[0302] 도 13은 본 발명의 제2 해결책을 실행하는 다른 변형 예를 도시한다. 도 11과 유사한 부호는 동일한 의미를 갖는다. 이 변형과 도 11의 상술한 구현에 사이의 차이는 고갈된 제2 용리제 스트림 (110)이 두 부분으로 분할된다는 점이다. 제1 부분 (114)은 주요 크로마토그래피 유닛 (101)으로 재순환되지만, 제2 부분 (115)은 주요 크로마토그래피 유닛 (101)으로 재순환되지 않는다. 대신에, 이 제2 부분 (115)은 주요 크로마토그래피 유닛 (101)의 상류에 위치하는 다른 분리 유닛 (미도시)으로 재순환된다. 이 경우, 고갈된 제2 용리제 스트림 (110)의 물 대 유기물 비는 제2 용리제 스트림(106)의 물 대 유기물 비와 동일할 (또는 동일하지 않을) 수 있으며; 제2 농축된 지방산 스트림(109)은 실질적으로 용리제를 함유하지 않을 수 있고, 특히 물을 함유하지 않을 수 있다.

[0303] 이 변형에서, 새로운 유기 용매의 보충 (113)의 존재는 고갈된 제2 용리제 스트림 (110)의 주요 크로마토그래피 유닛 (101)으로의 재순환의 결여를 보상하기 위해 필요하다. 물의 보충 (112)과 유기 용매의 보충 (113)은 용리제의 단일 보충에 의해 대체될 수 있다.

[0304] 고갈된 제2 용리제 스트림 (110)의 물 대 유기물 비가 제2 용리제 스트림 (106)의 물 대 유기물 비보다 낮은 경우, 이러한 변형은 또한 본 발명의 제1 해결책의 구현이다.

[0305] 상기 고갈된 제2 용리제 스트림은 수개의 분리 유닛, 특히 수개의 크로마토그래피 유닛에 공급되는 용리제의 풀 (pool)로 재순환될 수 있음을 유의하여야 한다.

[0306] 매우 일반적인 언급과 같이, 본 발명의 방법이 단일의 설비, 또는 2 개 이상의 별개의 설비에서 실행될 수 있음을 유의하여야 한다. 본 명세서에서 기술된 스트림은 이후 저장되고, 한 설비에서 다른 설비로 이송되어 상기 방법이 전체로서 수행될 수 있도록 한다. 예를 들어, 상기 분리 유닛 (들)은 하나의 설비에 제공될 수 있으며, 상기 농축 유닛 (들) (예를 들어, 하나 이상의 종류 칼럼을 포함함)은 다른, 별개의, 설비에 제공될 수 있다.

[0307] 다양한 스트림의 조성, 특히, 상기 고갈된 제2 용리제 스트림과 같은 재순환된 용리제 스트림의 조성은 적절한

방법 또는 장치에 의해 온라인 또는 오프라인으로 분석될 수 있으며, 당해 기술 분야에서 공지된 수단을 사용하여 배치 방식으로 또는 연속적으로 재조정될 수 있다.

[0308] 바람직한 정제 스킴

제1 바람직한 구현예에서, 하나 또는 수개의 크로마토그래피 단계가 지방산들의 혼합물로부터 제1 PUFA (예를 들어, EPA)을 정제하기 위해 사용된다. 특히, 제2 FA (예를 들어, DHA)의 양은 상기 제1 PUFA를 함유하는 (최종) 정제된 스트림에서 약 2 % 이하, 바람직하게는 약 0.5 % 이하, 바람직하게는 약 0.05 % 이하, 바람직하게는 약 0.03 % 이하, 더욱 바람직하게는 검출 불가능 수준으로 감소된다.

[0310] 상기 크로마토그래피 단계들 중 적어도 하나는 상기 제2 FA로부터 상기 제1 PUFA 분리하는 것을 목적으로 하고, 바람직하게는 물과 메탄올의 혼합물을 용리제로 사용한다. 목표 분획은 상기 제1 PUFA를 함유하고, 감소된 양의 상기 제2 FA를 함유한다. 수거된 목표 분획은, 최대 함량의 유기 용매가 상기 크로마토그래피 공정으로 재순환되도록, 나노여과 시스템, 증발기, 증류 칼럼 또는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지된 하나의 기술 또는 기술들의 조합을 포함하는 다른 적절한 방법과 같은 증발 또는 막 기술에 의해 농축된다.

[0311] 바람직한 증발 수단은 감압 하에서 작동되는, 강제 순환을 갖는 강하막 증발기이다. 또한, 상기 방법은 상기 제2 FA를 함유하는 적어도 하나의 폐기물 분획을 생성한다. 상기 제2 FA를 혼입하지 않고 제2 용리제 스트림으로부터의 용리제의 가장 큰 부분을 재순환시키기 위하여, 물의 상당한 부분이 상기 농축된 제2 FA와 함께 증발기의 바닥에 잔류하도록, 증발 수단이 선택되고, 증발 파라미터가 설정된다. 그 결과, 증류된 용매 혼합물은 물에 비해 유기 용매가 풍부하고, 용매 증기에의 제2 FA의 혼입이 허용 가능한 수준으로 감소되어, 증류액의 동일한 크로마토그래피 유닛으로의 재순환을 가능하게 된다.

[0312] 바람직한 수단은 증류 칼럼 또는 증류 칼럼과 강제 순환을 갖는 강하막 증발기의 조합을 포함한다. 대안적으로, 막 기술이 폐기물 스트림에서 제2 FA를 농축시키기 위해 사용될 수 있고, 상기 막 기술은 용매 혼합물의 일부를 크로마토그래피 공정으로 재순환시키기 위해 증발 기술과 결합될 수 있다.

[0313] 제2 바람직한 구현예에서, 하나 또는 수개의 크로마토그래피 단계는 지방산들의 혼합물로부터 제1 PUFA (예를 들어, EPA)를 정제하기 위해 사용된다. 특히, 제2 FA (예를 들어, DHA)의 양은 상기 제1 PUFA를 함유하는 정제된 스트림에서 약 2 % 이하, 바람직하게는 약 0.5 % 이하, 바람직하게는 약 0.05 % 이하, 바람직하게는 약 0.03 % 이하, 더욱 바람직하게는 검출 불가능 수준으로 감소된다.

[0314] 상기 크로마토그래피 단계들 중 적어도 하나는 상기 제2 FA로부터 상기 제1 PUFA를 분리하는 것을 목적으로 하고, 바람직하게는 물과 메탄올의 혼합물을 용리제로 사용한다. 목표 분획은 상기 제1 PUFA를 함유하고, 감소된 양의 상기 제2 FA를 함유한다. 상기 목표 분획은 상기 제1 PUFA를 추가로 정제하기 위하여 후속 크로마토그래피 단계로 직접 재주입된다. 또한, 상기 방법은 상기 제2 FA를 함유하는 적어도 하나의 폐기물 분획을 생성한다.

[0315] 상기 제2 FA를 혼입하지 않고 상기 제2 FA를 함유하는 제2 용리제 스트림으로부터의 용리제의 가장 큰 부분을 재순환시키기 위하여, 물의 상당한 부분이 상기 농축된 제2 FA와 함께 증발기의 바닥에 잔류하도록 증발 수단이 선택되고, 증발 파라미터가 설정된다. 그 결과, 증류된 용매 혼합물은 물에 비해 유기 용매가 풍부하고, 용매 증기에의 제2 FA의 혼입이 허용 가능한 수준으로 감소되어, 증류액의 동일한 크로마토그래피 유닛으로의 재순환을 가능하게 된다.

[0316] 바람직한 수단은 증류 칼럼과 강제 순환을 갖는 강하막 증발기의 조합을 포함한다. 대안적으로, 막 기술은 폐기물 스트림에서 제2 FA를 농축시키기 위해 사용될 수 있고, 용매 혼합물의 일부를 크로마토그래피 공정으로 재순환시키기 위해 증발 기술과 연결될 수 있다.

[0317] 제3 바람직한 구현예에서, 하나 또는 수개의 크로마토그래피 단계는 지방산들의 혼합물로부터 제1 PUFA (예를 들어, EPA)를 정제하기 위해 사용된다. 특히, 제2 FA (예를 들어, DHA)의 양은 상기 제1 PUFA를 함유하는 정제된 스트림에서 약 2 % 이하, 바람직하게는 약 0.5 % 이하, 바람직하게는 약 0.05 % 이하, 바람직하게는 약 0.03 % 이하, 더욱 바람직하게는 검출 불가능 수준으로 감소된다.

[0318] 상기 크로마토그래피 단계들 중 적어도 하나는 상기 제2 FA로부터 상기 제1 PUFA 분리하는 것을 목적으로 하고, 바람직하게는 물과 메탄올의 혼합물을 용리제로 사용한다. 목표 분획은 상기 제1 PUFA를 함유하고, 감소된 양의 상기 제2 FA를 함유한다.

[0319] 수거된 목표 분획은, 최대 함량의 유기 용매가 상기 크로마토그래피 공정으로 재순환되도록, 나노여과 시스템, 증발기, 증류 칼럼 또는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지된 하나의 기술 또는 기술들의 조합

을 포함하는 다른 적절한 방법과 같은 증발 또는 막 기술에 의해 농축된다. 바람직한 증발 수단은 감압 하에서 작동되는, 강제 순환을 갖는 강하막 증발기이다.

[0320] 또한, 상기 방법은 상기 제2 FA를 함유하는 적어도 하나의 폐기물 분획을 생성한다. 상기 폐기물 분획으로부터의 용매는 상기 제2 FA로부터 상기 제1 PUFA를 분리하는 것을 목적으로 하는 상기 크로마토그래피 단계로 재순환되지 않는다.

[0321] 제4 바람직한 구현예에서, 하나 또는 수개의 크로마토그래피 단계는 지방산들의 혼합물로부터 제1 PUFA (예를 들어, EPA)를 정제하기 위해 사용된다. 특히, 제2 FA (예를 들어, DHA)의 양은 상기 제1 PUFA를 함유하는 정제된 스트림에서 약 2 % 이하, 바람직하게는 약 0.5 % 이하, 바람직하게는 약 0.05 % 이하, 바람직하게는 약 0.03 % 이하, 더욱 바람직하게는 검출 불가능 수준으로 감소된다.

[0322] 상기 크로마토그래피 단계들 중 적어도 하나는 상기 제2 FA로부터 상기 제1 PUFA 분리하는 것을 목적으로 하고, 바람직하게는 물과 메탄올의 혼합물을 용리제로 사용한다. 목표 분획은 상기 제1 PUFA를 함유하고, 감소된 양의 상기 제2 FA를 함유한다. 상기 목표 분획은 상기 제1 PUFA를 추가로 정제하기 위하여 농축 없이 후속 크로마토그래피 단계로 직접 재주입된다. 또한, 상기 방법은 상기 제2 FA를 함유하는 적어도 하나의 폐기물 분획을 생성한다. 상기 폐기물 분획으로부터의 용매는 상기 제2 FA로부터 상기 제1 PUFA를 분리하는 것을 목적으로 하는 상기 크로마토그래피 단계로 재순환되지 않는다.

#### 실시예

[0324] 하기 실시예들은 본 발명을 제한없이 예시한다.

#### 실시예 1

[0326] 어유로부터 얻어진 지방산 에틸 에스테르의 혼합물 (4g)을 메탄올 (144g) 및 물 (14.5 g)의 93/7 v/v 혼합물에 용해시킨 후, 교반 반응기에서 60 °C에서 증발을 거치게 하였다. 각각 33.1 g 및 45.1 g의 질량을 갖는 증류액 F1과 F2의 두 개의 분획을 0.6 바의 절대 압력에서의 증발 동안 수거하였고, 32.9 g의 질량을 갖는 하나의 분획 F3를 0.55 바의 절대 압력에서의 증발 동안 수거하였고, 18.9 g의 질량을 갖는 하나의 분획 F4를 0.05 바의 절대 압력에서의 증발 동안 수거하였다. 상기 증발된 분획들 중 수분 함량 및 지방산 에스테르의 함량의 분석을 하기 표 1에 제공하였다. 하기 표 1은 지방산 에스테르 혼합물의 존재하에 메탄올과 물의 혼합물의 증발을 나타낸다.

**표 1**

분획	온도 (° C)	압력 (bar)	회수된 질량	물 % (w/w)	지방산 에스테르 함량 (ppm)
F1	60	0.6	33.1	1.78	미검출
F2	60	0.6	45.1	3.25	미검출
F3	60	0.55	32.9	5.09	미검출
F4	60	0.05	18.9	19.99	27
바닥			6.4	41.26	미결정

[0328] 상기 표 1은 소량의 물 (5 % w/w 이하)로는 검출 불가능한 양의 지방산이 증류액에 혼입되고, 높은 물 함량 (20 % w/w)으로는 상당한 혼입 (27 ppm)이 증류액에서 발생하였음을 보여준다.

[0329] 초기 혼합물의 지방산 조성 및 분획 F4의 지방산 조성을 GC 크로마토그래피로 분석하였다. 결과를 하기 표 2에 제공하였다. 하기 표 2는 증발 전 공급물 조성과 비교한 혼입된 지방산의 조성을 나타낸다.

**표 2**

지방산의 확인	체류시간 (min.)	초기 혼합물 (surf.%)	분획 F4 (surf.%)
	6.904	0.29	
C16-0	8.985	3.11	14.65
C16-1	9.302	1.20	4.99
	10.094	0.19	
	10.17	0.21	
	10.344	0.23	

	10.551	0.19	
	11.097	0.16	
C16-4 ω 1	11.428	0.37	
C18-0	11.958	3.59	9.48
C18-1 ω 9	12.267	7.23	20.32
C18-1 ω 7	12.394	2.71	7.61
C18-2 ω 6	13.045	0.90	
	13.44	0.38	
	13.548	0.19	
C18-3 ω 3	14.238	0.63	
C18-4 ω 3	14.793	2.51	4.59
	15.037	0.20	
	15.68	0.48	
C20-1	16.043	1.11	
	16.221	0.69	
	16.578	0.25	
	17.000	0.37	
	17.487	0.42	
C20-4 ω 6	17.902	2.04	
	18.36	0.19	
C20-4 ω 3	18.896	1.67	
	19.014	0.29	
C20-5 ω 3 (EPA)	19.39	34.12	27.97
	19.874	0.21	
	20.128	0.22	
	20.274	0.34	
	20.485	0.28	
C21-5 ω 3	21.671	1.88	
	22.316	0.19	
	22.433	0.20	
C22-5 ω 6	22.858	0.75	
C22-5 ω 3	23.794	4.68	
C22-6 ω 3 (DHA)	24.384	24.95	10.37
	24.653	0.39	
합계		100	99.98

[0331] 상기 표 2는 F4 내의 혼입된 오일의 조성이 장쇄 지방산에 비해 단쇄 지방산에서 풍부함을 보여주고, 이는 물의 증가량이 증발될 때 열역학적 혼입이 발생함을 실증한다.

#### 실시예 2

[0333] 본 실시예에서, 약 70 % EPA 및 약 10 % DHA를 함유하는 미리 정제된 오메가-3 PUFAs의 혼합물을 VARICOL™ 멀티칼럼 크로마토그래피 장치 (칼럼들은 약 90 %의 아세톤 및 10 %의 물 (부피당 부피)을 함유하는 이동상에서 62g/l의 총 농도로, C18 20 μm 역상 실리카로 충전됨)를 사용하여 수득하였다. 이 혼합물을 도 2에 기술된 바와 같은, 강제 재순환을 갖는 다중 퓨브 증발기를 사용하여 단일 증발 단계에서 연속적으로 농축시켰다:

[0334] - 희석 PUFA 용액 유량: 96 l/h

[0335] - 가열 유체의 온도: 약 100 °C

[0336] - 증발 온도: 약 75 °C

[0337] - 증발 압력: 약 250 밀리바

[0338] - 농축된 스트림 출구의 유량: 6 l/h

[0339] PUFA 혼합물을 강제 순환 (11)을 갖는 다중 퓨브 증발기를 포함하는 증발 장치에 주입하였다. 농축된 PUFA 혼합물을 라인 (15)을 통해 수거하였고, 증발된 용매를 응축기 (12)에서 응축시켜 라인 (16)을 통해 수거하였다.

[0340] 증발기로부터 배출된 농축된 PUFA 혼합물은 약 0.2 %의 물 및 1 %의 아세톤을 함유하였다. 라인 (16)에서 회수

된 증발된 용매의 혼합물은 30 내지 100 ppm의 지방산 에스테르를 함유하였다. 99 % 초파의 용매를 회수하였고, 이를 상기 공정의 동일한 정제 단계로 재순환시켰다.

[0341] 실시예 3a

본 실시예에서, 약 70 % EPA 및 약 10 % DHA를 함유하는 미리 정제된 오메가-3 PUFAs의 혼합물을, 약 93 %의 메탄올 및 7 %의 물 (부피당 부피)을 함유하는 이동상과 함께, C18 20  $\mu\text{m}$  역상 실리카로 충전된 20.2 cm 내경 및 8.5 cm 길이의 5개의 칼럼을 장착한 VARICOL™ 멀티칼럼 크로마토그래피 장치를 사용하여 정제하였으며, 용리제 중 DHA의 잔류량은 약 0.1 ppm이었다. 운전 조건은 다음과 같았다:

[0343] - 공급물 속도: 1.5 l/h

[0344] - 용리제 속도: 279 l/h

[0345] - 추출액 속도: 226 l/h

[0346] - 추잔액 속도: 54.5 l/h

[0347] - 작동 온도: 35 °C

[0348] 목표 추잔액 스트림은 약 92 %의 GC 순도의 정제된 EPA 및 0.03 % 미만의 DHA를 19 g/1의 총 농도로 함유하였다. 이 혼합물을, 도 2에 기술된 바와 같은, 강제 재순환을 갖는 다중 튜브 증발기를 사용하여 단일의 연속 증발기에서 연속적으로 농축시켰다. 운전 조건은 다음과 같았다:

[0349] - 희석 PUFA 용액 유량: 54.5 l/h

[0350] - 가열 유체의 온도: 약 100 °C

[0351] - 증발 온도: 약 75 °C

[0352] - 증발 압력: 약 250 밀리바

[0353] - 농축된 스트림 출구의 유량: 6 l/h

[0354] 증발기로부터 배출된 농축된 PUFA 혼합물은 약 0.04 %의 물 및 0.6 %의 메탄올을 함유하였다. 추잔액 스트림으로부터 99 % 초파의 용매를 회수하였고, 상기 공정의 동일한 정제 단계로 재순환시켰다.

[0355] 약 36 %의 GC 순도의 DHA 및 약 1.7 g/1의 총 지방산 에스테르 농도를 함유하는 추출액 스트림을 도 2에 기술된 것과 유사한 연속 증발 장치에서 부분적으로 농축시켰다. 운전 조건은 다음과 같았다:

[0356] - 희석 PUFA 용액 유량: 226 l/h

[0357] - 가열 유체의 온도: 약 100 °C

[0358] - 증발 온도: 약 70 °C

[0359] - 증발 압력: 약 1000 밀리바

[0360] - 농축된 스트림 출구의 유량: 40 l/h

[0361] 증발기로부터 배출된 농축된 혼합물은 약 40 %의 물 및 60 %의 메탄올을 함유하였다. 추출액 스트림으로부터 단지 약 82 %의 용매를 회수하였고, 본 발명의 공정의 동일한 정제 단계로 재순환시켰다.

[0362] 추출액 및 추잔액 증발기 둘 다로부터 수거된 증류된 용리제는 약 93.2 %의 메탄올, 약 12 ppm의 지방산 에스테르 및 단지 0.1 ppm의 DHA를 함유하였으며, 크로마토그래피 공정으로 재순환되었다.

[0363] 실시예 3b (비교예)

[0364] 본 실시예에서는, 재순환된 용리제 중의 DHA의 영향을 컴퓨터 모사에 의해 추정하였다. 약 70 % EPA 및 약 10 % DHA를 함유하는 미리 정제된 오메가-3 PUFAs의 혼합물을, 약 93 %의 메탄올 및 7 %의 물 (부피당 부피)을 함유하는 이동상과 함께, C18 20  $\mu\text{m}$  역상 실리카로 충전된 20.2 cm 내경 및 8.5 cm 길이의 5개의 칼럼을 장착한 VARICOL™ 멀티칼럼 크로마토그래피 장치를 사용하여 정제하였으며, 용리제 중 DHA는 약 20 ppm이었다. 운전 조건은 다음과 같았다:

[0365] - 공급물 속도: 1.5 l/h

[0366] - 용리제 속도: 279 l/h

[0367] - 추출액 속도: 226 l/h

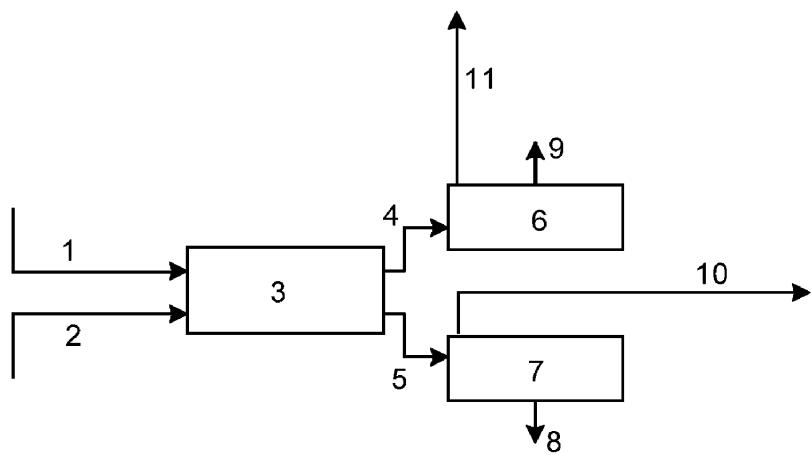
[0368] - 추잔액 속도: 54.5 l/h

[0369] - 작동 온도: 35 °C

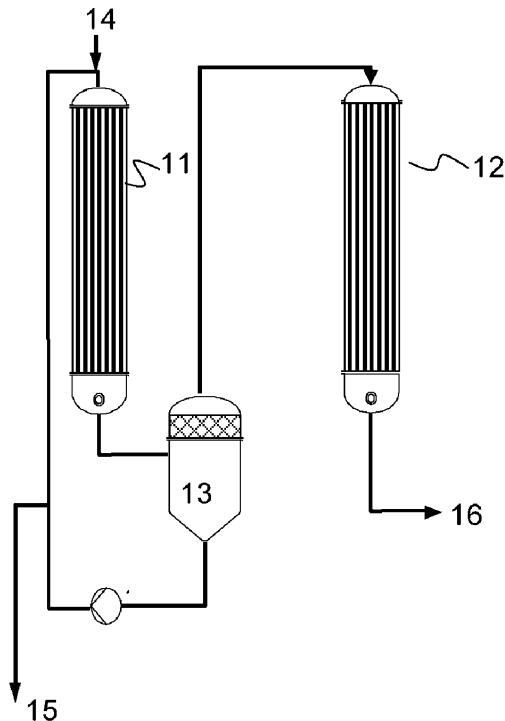
[0370] 목표 추잔액 스트림은 약 92 %의 GC 순도의 정제된 EPA 및 0.12 %의 DHA를 19 g/1의 총 농도로 함유하였다. 추출액 및 추잔액 스트림 둘 다의 완전한 농축으로부터 얻어진 용리제 스트림 중의 20 ppm의 DHA의 영향은 정제된 EPA 스트림 중의 약 0.1 % DHA이다.

## 도면

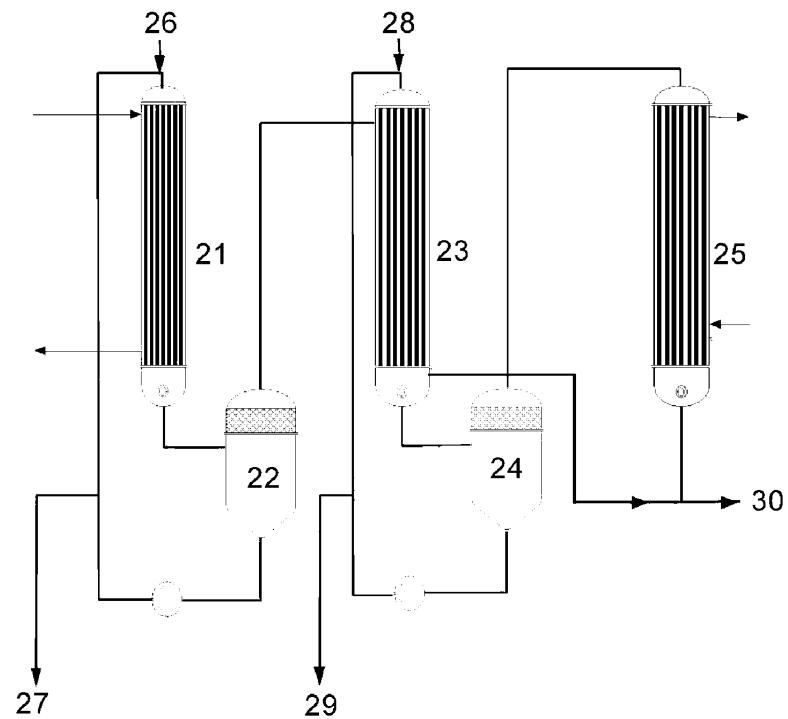
### 도면1



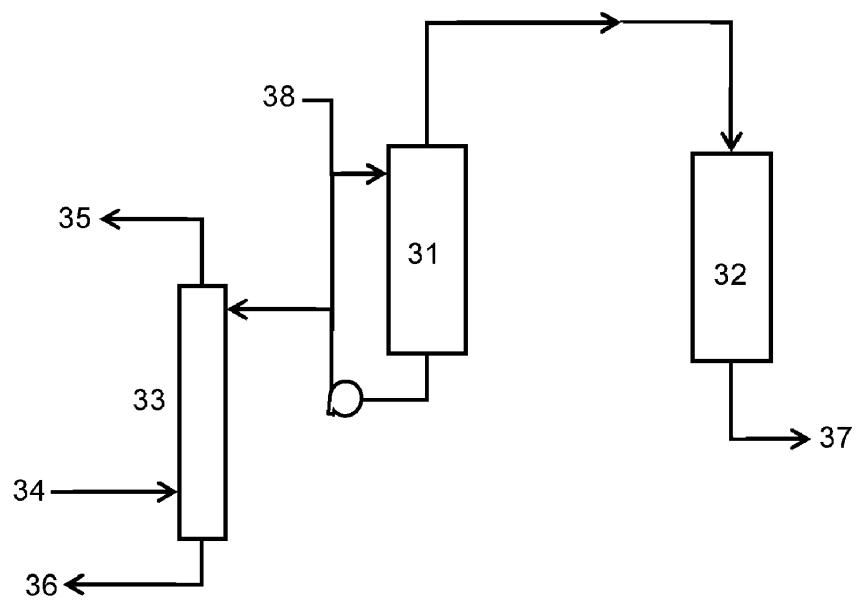
### 도면2



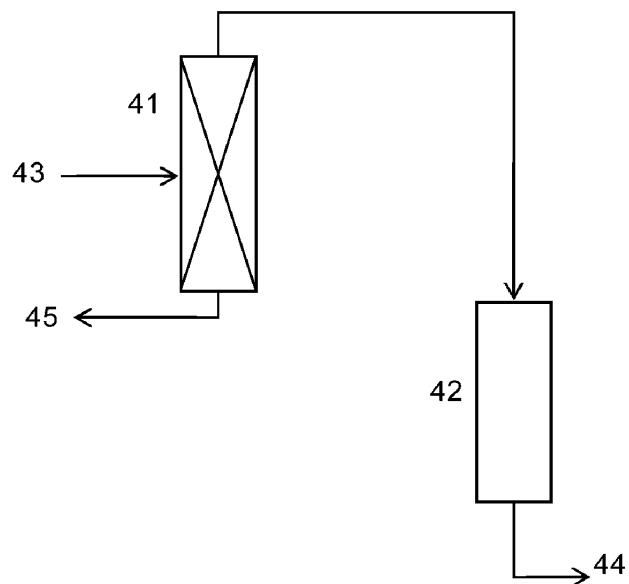
도면3



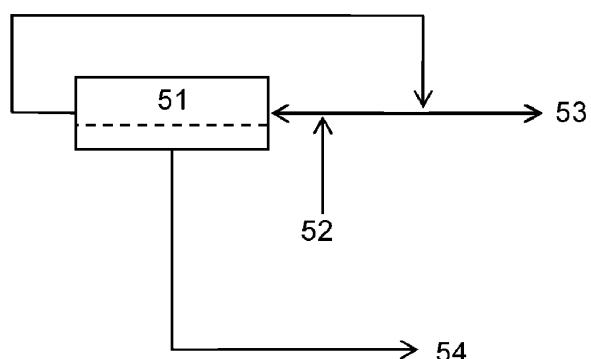
도면4



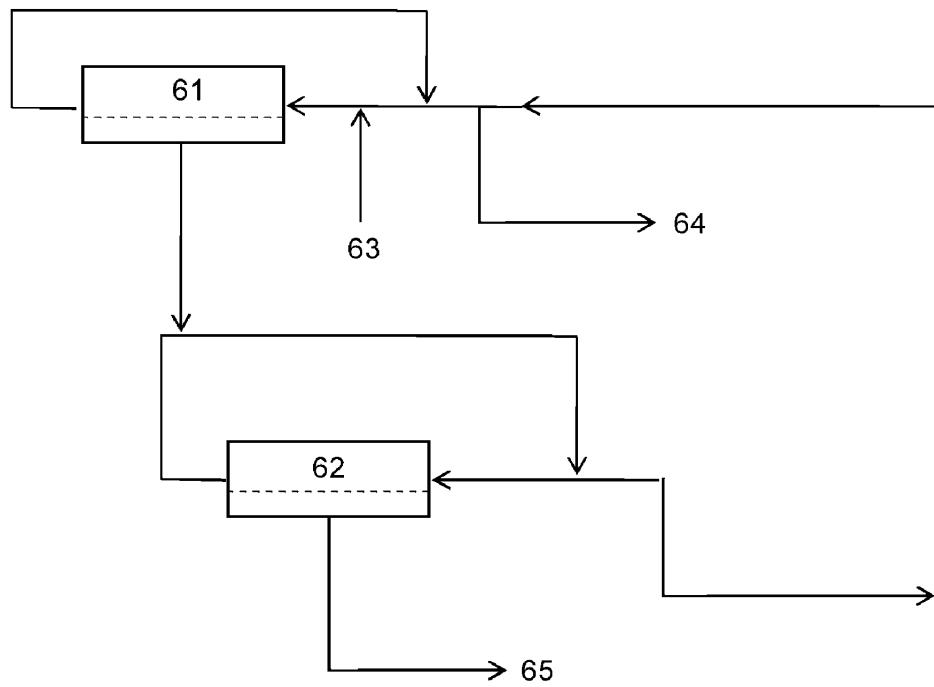
도면5



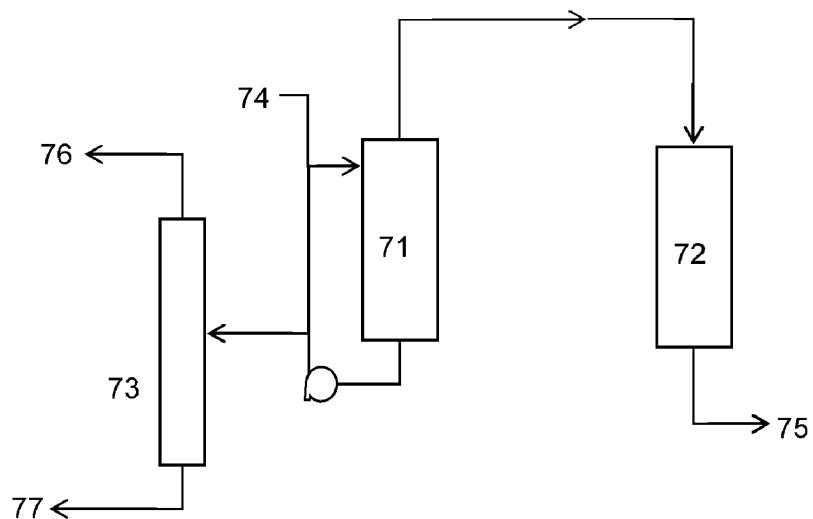
도면6



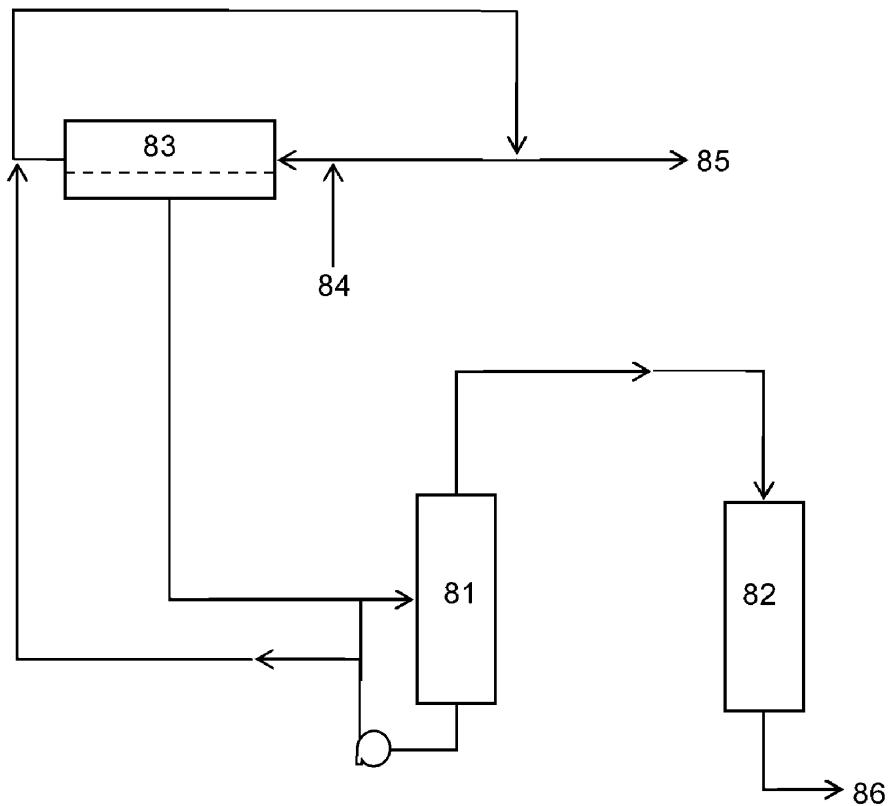
도면7



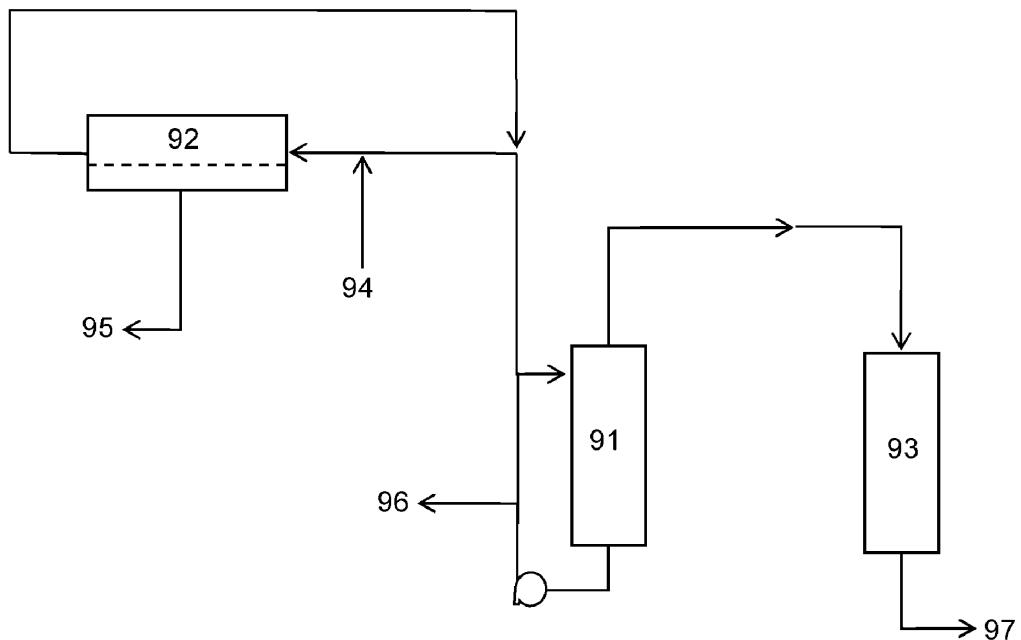
도면8



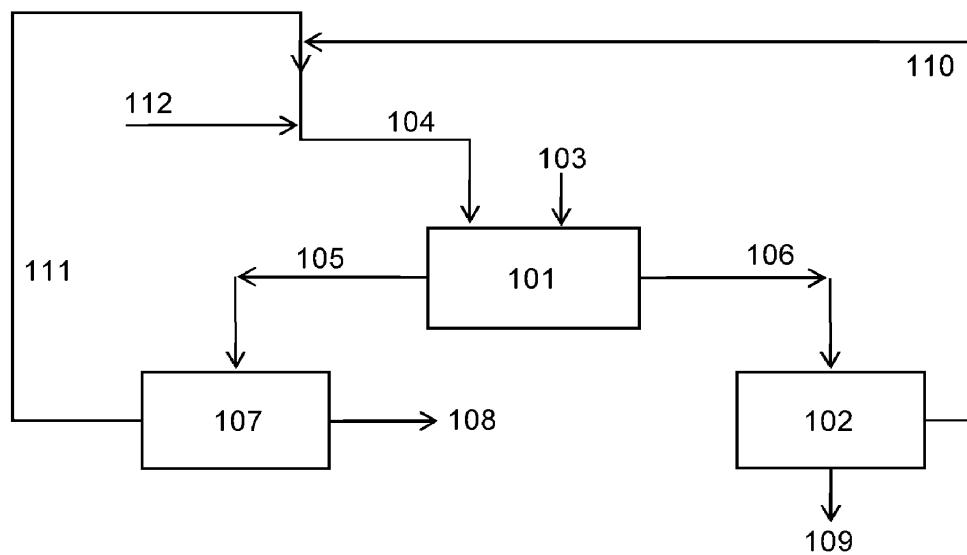
도면9



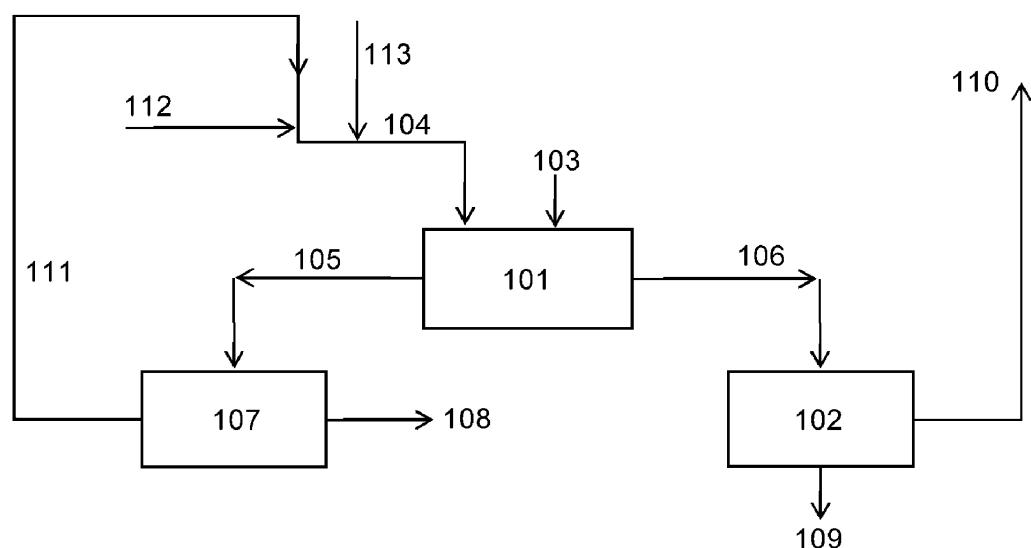
도면10



도면11



도면12



도면13

