

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 468 799**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C11B 11/00 (2006.01)

C11C 3/10 (2006.01)

C12P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2010 E 10797105 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 2453020**

54 Título: **Procedimiento para producir fosfolípido**

30 Prioridad:

06.07.2009 JP 2009160011

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.06.2014

73 Titular/es:

**KANEKA CORPORATION (50.0%)
3-18, Nakanoshima 2-chome, Kita-ku
Osaka-shi, Osaka 530-8288, JP y
NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION
NAGOYA UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TANAKA, TATSUSHI y
IWASAKI, YUGO**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 468 799 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir fosfolípido

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a procedimientos para producir fosfolípidos, y en particular se refiere a procedimientos para producir fosfolípidos mediante fosfolipasa A2.

10 Antecedentes de la técnica

Estudios recientes sobre lípidos han revelado que los ácidos grasos altamente insaturados tales como ácido docosahexenoico (DHA) y ácido eicosapentenoico (EPA) tienen diversas funciones tales como la mejora de la función de aprendizaje, la prevención de arteriosclerosis y la función de mejora del metabolismo lipídico. En particular, se ha revelado que la toma de DHA en una forma unida a un fosfolípido tal como fosfatidilcolina proporciona una mayor actividad antioxidante y una mayor estabilidad que las de la forma de triglicérido, así como conduce a una buena absorción para proporcionar fácilmente las actividades fisiológicas del DHA. Se espera también que ácidos grasos funcionales distintos de DHA, tales como EPA, ácido linoleico conjugado y ácido araquidónico, consigan mayores actividades fisiológicas por la unión a un fosfolípido.

Los procedimientos para producir un fosfolípido unido a un ácido graso funcional tal como DHA se clasifican en un procedimiento de extracción de un producto natural y un procedimiento de síntesis de un material tal como fosfolípidos de soja. Los ejemplos específicos del primer procedimiento incluyen un procedimiento de extracción de un fosfolípido unido a DHA de huevos de animales acuáticos como material (documento de patente 1) y un procedimiento de extracción de productos marinos tales como un calamar con un disolvente orgánico (documento de patente 2). Sin embargo, estos procedimientos no pueden producir fosfolípidos unidos a ácidos grasos funcionales distintos de DHA debido a que estos materiales son caros, no pueden suministrarse establemente y la composición de fosfolípidos depende de los materiales.

Los ejemplos de procedimientos capaces de introducir un ácido graso deseado no dependiente de la composición del material incluyen un procedimiento de adición de cualquier ácido graso a una disolución de cultivo de un microorganismo para producir un fosfolípido unido con el ácido graso por el microorganismo (documento de patente 3). Sin embargo, el procedimiento produce el fosfolípido en una pequeña cantidad a partir de una gran cantidad de disolución de cultivo, y por tanto la eficacia de producción es baja.

Entre los últimos procedimientos, los ejemplos de procedimiento de unión de DHA a fosfolípidos de soja y similares incluyen un procedimiento de adición de una sustancia de alta permitividad capaz de formar enlace de hidrógeno con un sistema de reacción de lipasa y fosfolipasa (documento de patente 4). Sin embargo, el procedimiento puede conseguir una alta velocidad de reacción en la reacción de un lisofosfolípido y un ácido graso por lipasa, pero no puede conseguir una alta velocidad de reacción por fosfolipasa A2. Además, es importante para la expresión de las actividades fisiológicas del fosfolípido unido a DHA que el DHA esté unido en posición 2, pero un ácido graso diano se une principalmente a la posición 1 de un fosfolípido mediante una reacción por lipasa, y por lo tanto dicho procedimiento no es muy práctico.

Al mismo tiempo, como procedimiento para unir eficazmente un ácido graso deseado con la posición 2 de un fosfolípido, se han reseñado varios procedimientos de unión que usan fosfolipasa A2 en glicerina (documento de patente 5 y documento no de patente 1). Sin embargo, en estos informes se usa cloroformo-metanol tóxicos para extracción después de la reacción. Por tanto, el disolvente no puede usarse, dependiendo del uso pretendido del fosfolípido, o se requiere un aparato para retirar el disolvente. Además, la fosfolipasa A2 es cara, y por ello se requiere dicho procedimiento para reducir costes.

En una reacción enzimática común, se efectúa ampliamente la inmovilización enzimática para un uso eficaz de la enzima. Sin embargo, ha habido informes de que cuando se usa una fosfolipasa A2 inmovilizada en la esterificación por fosfolipasa A2, es improbable que la esterificación proceda eficazmente, incluso cuando se usa un ácido graso en gran cantidad con respecto a un lisofosfolípido (documento no de patente 2 y documento no de patente 3).

Lista de referencias**Bibliografía de patentes**

Documento de patente 1: JP-A nº 8-59678
 Documento de patente 2: JP-A nº 8-325192
 Documento de patente 3: JP-A nº 2007-129973
 Documento de patente 4: JP-A nº 8-56683
 Documento de patente 5: JP-A nº 5-236974

Bibliografía no de patentes

Documento no de patente 1: Fisheries Science, vol. 72, páginas 909-911 (2006)

Documento no de patente 2: Journal of the American Oil Chemists' Society, vol. 72, páginas 641-646 (1995)

5 Documento no de patente 3: Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1343, páginas 76-84 (1997)

Sumario de la invención**Problema técnico**

10 Como se describe anteriormente, se demanda desarrollar un procedimiento de recuperación de un fosfolípido después de una esterificación eficaz por fosfolipasa A2 y de reutilización de la fosfolipasa A2. Por ello, es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para producir un fosfolípido a bajo coste, mediante reutilización de fosfolipasa A2, en el procedimiento de producción del fosfolípido unido a cualquier ácido graso en posición 2' del fosfolípido mediante esterificación por fosfolipasa A2 en glicerina.

15

Solución del problema

20 Los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos para resolver los problemas, como resultado, han encontrado que, esterificando un lisofosfolípido con fosfolipasa A2 en glicerina, extrayendo entonces un fosfolípido con un disolvente inmisible con glicerina, retirando entonces el disolvente por evaporación y añadiendo el lisofosfolípido y un donante de acilo, puede efectuarse la reesterificación del lisofosfolípido con el donante de acilo reutilizando la fosfolipasa A2 restante en la glicerina, y se ha logrado la invención.

25 A saber, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un fosfolípido caracterizado por incluir producir un fosfolípido mediante la esterificación de un lisofosfolípido con un donante de acilo por fosfolipasa A2 en glicerina, añadir entonces un disolvente inmisible con glicerina formando una capa de glicerina y una capa de disolvente, extraer el fosfolípido en la capa de disolvente, transferir la fosfolipasa A2 a la capa de glicerina y recoger entonces la capa de glicerina, retirar el disolvente restante por evaporación de la capa de glicerina, dando una disolución de glicerina, añadir el lisofosfolípido y el donante de acilo a la disolución de glicerina y esterificar usando la fosfolipasa A2 restante en la disolución de glicerina.

30

35 En la presente invención, puede añadirse un disolvente cetona como disolvente inmisible con glicerina, o puede añadirse un alcohol que tenga 4 átomos de carbono o menos después de la esterificación y añadirse entonces al menos un disolvente seleccionado del grupo consistente en disolventes hidrocarburos, disolventes cetonas y disolventes ésteres como disolvente inmisible con glicerina.

40 En la presente invención, en la esterificación, puede añadirse un aminoácido y/o un péptido que tenga 3 o menos residuos aminoacídicos al sistema de reacción.

El aminoácido es preferiblemente al menos uno seleccionado del grupo consistente en glicina, alanina, asparagina, glutamina, isoleucina, leucina, serina, treonina, valina, fenilalanina y tirosina.

45 El péptido es preferiblemente una combinación que incluye glicina, alanina y/o serina.

Efectos ventajosos de la invención

50 Según la presente invención, puede proporcionarse un procedimiento de producción de un fosfolípido a bajo coste reutilizando la fosfolipasa A2 en el procedimiento de producción del fosfolípido unido a cualquier ácido graso en la posición 2 del fosfolípido mediante esterificación por fosfolipasa A2 en glicerina.

Descripción de realizaciones

55 De aquí en adelante, la presente invención se describirá con más detalle. El procedimiento de producción de un fosfolípido de la presente invención se caracteriza por incluir producir un fosfolípido mediante esterificación de un lisofosfolípido con un donante de acilo por fosfolipasa A2 en glicerina, añadir entonces un disolvente inmisible con glicerina formando una capa de glicerina y una capa de disolvente, extraer el fosfolípido en la capa de disolvente, transferir la fosfolipasa A2 a la capa de glicerina, recoger entonces la capa de glicerina, retirar el disolvente restante por evaporación de la capa de glicerina, dando una disolución de glicerina, añadir el lisofosfolípido y el donante de acilo a la disolución de glicerina y reesterificar usando la fosfolipasa A2 restante en la disolución de glicerina.

60

65 El lisofosfolípido de la presente invención es un compuesto resultante de la retirada de un ácido graso de la posición 2 de un fosfolípido, y significa un lípido diferente de fosfolípidos. El lisofosfolípido usado en la presente invención puede ser un fosfolípido modificado y deriva preferiblemente de soja, semilla de colza y yema de huevo debido a su fácil disponibilidad. Los lisofosfolípidos derivados de soja son más preferidos debido al bajo coste, pero pueden usarse lisofosfolípidos derivados de otras plantas.

Los ejemplos del procedimiento para modificar un fosfolípido para retirar un residuo de ácido graso de la posición 2 incluyen, pero no están necesariamente limitados a, un procedimiento de uso de fosfolipasa A2 o similar para hidrolizar el residuo de ácido graso en la posición 2 del fosfolípido. El fosfolípido utilizable en este caso es una molécula que tiene un esqueleto de glicerina, un grupo fosfato y dos ésteres de ácido graso, puede ser un sustrato de fosfolipasa A2 y no incluye una molécula que tenga un esqueleto de esfingosina. Los ejemplos específicos incluyen fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. El procedimiento que usa la fosfolipasa A2 puede llevarse a cabo sin usar ninguna sustancia tóxica, y puede emplearse por lo tanto para la producción de un fosfolípido usado, por ejemplo, para alimentos.

En la invención, el ácido graso como donante de acilo que se introduce en posición 2 de un lisofosfolípido en la esterificación del lisofosfolípido por fosfolipasa A2 en glicerina no está específicamente limitado. Puede usarse un ácido graso libre o se hidroliza un éster etílico o un triglicérido por una enzima tal como lipasa en el sistema de reacción para usar, pero desde el punto de vista de la reactividad, se usa preferiblemente un ácido graso libre. Los ejemplos específicos incluyen, considerando la funcionalidad, ácidos grasos altamente insaturados tales como DHA, EPA, ácido araquidónico y ácido linoleico conjugado. Los ejemplos de DHA y EPA utilizables incluyen ácidos grasos libres que se obtienen mediante la hidrólisis principalmente de aceites de animales marinos o aceites y grasas derivados de algas. El donante de acilo usado en la presente invención se usa preferiblemente en una cantidad de 30 a 1000 partes en peso con respecto a 100 partes en peso de un lisofosfolípido desde los puntos de vista de eficacia y costes.

Cuando un ácido graso es difícil de obtener como compuesto individual a partir de fuentes naturales, por ejemplo DHA, puede usarse una mezcla de ácidos grasos que contiene el ácido graso deseado. En dicho caso, la mezcla de ácidos grasos incluye deseablemente el ácido graso deseado en una cantidad de aproximadamente 20 % en peso o más. Por ejemplo, en el caso de DHA, una mezcla de ácidos grasos que contiene DHA tiene preferiblemente una concentración de DHA de 20 % en peso o más, y se usa más preferiblemente una mezcla que tiene una concentración de DHA de 45 % en peso o más. Después de la esterificación según la invención, puede llevarse a cabo la separación de disolvente o similar para aumentar la concentración de un fosfolípido como producto de reacción.

La fosfolipasa A2 usada en la presente invención puede derivar de cualquier fuente, y es preferiblemente fosfolipasa A2 que puede usarse comúnmente para alimentos. Los ejemplos incluyen aquellas derivadas de páncreas porcino y microorganismos. La fosfolipasa A2 usada en la presente invención se usa preferiblemente a una cantidad de 1.000 a 10.000 U con respecto a 1 g de lisofosfolípido desde los puntos de vista de eficacia y costes.

En la presente invención, la esterificación se lleva a cabo en glicerina. Esto es debido a que la glicerina tiene una alta polaridad eficaz para esterificación y puede usarse para alimentos. Tiene también una ventaja porque puede disolver los aminoácidos descritos a continuación como componentes opcionales. La glicerina se usa preferiblemente en una cantidad de 500 a 10.000 partes en peso con respecto a 100 partes en peso de un lisofosfolípido, considerando reactividad y similares.

En la presente invención, la esterificación se lleva a cabo en glicerina como se menciona anteriormente, y por ello, para la extracción de un fosfolípido resultante se usa un disolvente inmiscible con glicerina para extraer el fosfolípido. Como disolvente inmiscible con glicerina usado en la presente invención, puede usarse al menos un disolvente seleccionado del grupo consistente en disolventes hidrocarburos, disolventes cetonas y disolventes ésteres, y el uso de dicho disolvente conduce a una extracción eficaz de un fosfolípido diana. Donde, excepto para la extracción con disolvente cetona solo, es preferible añadir un alcohol de 4 átomos de carbono o menos y añadir entonces el disolvente para reducir la viscosidad de una disolución de reacción que contiene glicerina para una fácil extracción. La razón por la que la adición de alcohol no es necesaria cuando se usa solo el disolvente cetona es porque tiene una mayor solubilidad en glicerina que la de los disolventes hidrocarburos y disolventes éster. El disolvente se añade preferiblemente en una cantidad de 20 a 300 partes en peso con respecto a 100 partes en peso de glicerina, considerando la eficacia de recuperación de fosfolípido y similares.

Disolvente hidrocarburo significa un compuesto que puede usarse como disolvente entre los compuestos constituidos por carbonos e hidrógenos solos. Los ejemplos específicos incluyen pentano, hexano y heptano, y es más preferido el hexano porque se retira fácilmente por evaporación debido a su bajo punto de ebullición, y puede usarse como aditivo alimentario.

Disolvente cetona significa un compuesto que puede usarse como disolvente entre los compuestos que tienen un grupo ceto en la molécula. Los ejemplos específicos incluyen acetona y butanona, y se prefiere la acetona porque se retira fácilmente por evaporación debido a su bajo punto de ebullición y puede usarse como aditivo alimentario.

Disolvente éster significa un compuesto que puede usarse como disolvente entre los compuestos que tienen un ligamiento éster en la molécula. Los ejemplos específicos incluyen acetato de metilo y acetato de etilo, y se prefiere acetato de etilo debido que se usa para alimentos.

En la presente invención, en la esterificación de un lisofosfolípido por fosfolipasa A2, puede usarse un antioxidante

para suprimir la oxidación de un donante de acilo, y pueden usarse una fuente de calcio tal como cloruro de calcio, un aminoácido y un péptido de 3 residuos aminoacídicos para activar la fosfolipasa A2. Pueden usarse también otros aditivos según sea necesario.

5 Como antioxidante, puede usarse cualquier antioxidante en la medida en que pueda esperarse un efecto antioxidante sobre ácidos grasos tales como DHA, y los ejemplos incluyen polifenoles tales como catequina, tocoferol, ácido ascórbico, derivados de los mismos y dibutilhidroxitolueno (BHT) desde el punto de vista de las aplicaciones alimentarias.

10 Para suprimir la oxidación de un ácido graso, puede llevarse a cabo la esterificación de un lisofosfolípido en atmósfera de nitrógeno sin oxígeno.

Aminoácido significa un compuesto constituyente principal de una proteína y que tiene un grupo carboxilo y un grupo amino en la molécula, y es preferiblemente un compuesto que puede usarse para alimentos. Entre ellos, se prefieren los aminoácidos neutros porque dicho aminoácido puede activar la fosfolipasa A2 causando un efecto relativamente pequeño sobre el estado de carga de la fosfolipasa A2, y los ejemplos incluyen glicina, alanina, asparagina, glutamina, isoleucina, leucina, serina, treonina, valina, fenilalanina y tirosina. Para el procedimiento de producción de un fosfolípido de la presente invención, puede usarse al menos uno seleccionado de los mismos.

20 Péptido que tiene 3 residuos aminoacídicos o menos significa principalmente un dímero o trímero de aminoácidos mediante ligamientos amida. Puede sintetizarse a partir de aminoácidos o puede ser el producto de degradación de una proteína por una enzima o similar. Es preferiblemente un péptido que incluye glicina, alanina y/o serina porque dicho péptido tiene una solubilidad comparativamente alta en glicerina, y los ejemplos incluyen glicilglicina. El uso de dicho péptido que tiene unos pocos residuos aminoacídicos conduce a una alta molaridad cuando se disuelve en glicerina, y puede activar eficazmente la fosfolipasa A2.

La fuente de calcio se usa para activar la fosfolipasa A2 como se describe anteriormente, y es preferiblemente un compuesto que puede estar presente como ión de calcio en el sistema de reacción. Por tanto, las fuentes de calcio preferidas son compuestos que tienen una solubilidad comparativamente alta y son también utilizables como materiales alimentarios. Los ejemplos adecuados de fuente de calcio incluyen cloruro de calcio como se menciona anteriormente

Cada cantidad de antioxidante, fuente de calcio, aminoácido y péptido que tiene 3 residuos aminoacídicos o menos puede ser la cantidad adecuada para la consecución de cada fin. Sin embargo, cada uno de aminoácido y péptido que tiene 3 residuos aminoacídicos o menos se añade preferiblemente en una cantidad de 10 a 2.000 partes en peso con respecto a 100 partes en peso de un lisofosfolípido, y más preferiblemente de 50 a 500 partes en peso. La adición de dicho compuesto en una cantidad de menos de 10 partes en peso puede reducir la eficacia de la reacción, y la adición de dicho compuesto en una cantidad de más de 2.000 partes en peso aumenta el coste y puede reducir la eficacia de reacción. Pueden añadirse dos o más de los aminoácidos y péptidos que tienen 3 residuos aminoacídicos o menos en combinación entre sí para aumentar la cantidad total en disolución en el sistema de esterificación.

Se describirá a continuación un ejemplo preferido de procedimiento para producir un fosfolípido de la presente invención.

45 En primer lugar, se disuelven un lisofosfolípido y un donante de acilo en glicerina; se añade fosfolipasa A2 y, si es necesario, un antioxidante y un aminoácido, un péptido de 3 residuos aminoacídicos o menos y cloruro de calcio para activar la fosfolipasa A2, dando una disolución de reacción de glicerina; y se agita la disolución de reacción de glicerina para esterificar el lisofosfolípido con el donante de acilo. Si es necesario, la esterificación puede llevarse a cabo en atmósfera de nitrógeno sin oxígeno para suprimir la oxidación del ácido graso.

En ese momento, la esterificación se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura en el intervalo de 35 a 80 °C y más preferiblemente a una temperatura en el intervalo de 45 a 70 °C desde los puntos de vista de la temperatura óptima de la fosfolipasa A2 y la supresión de la oxidación del ácido graso como donante de acilo.

55 Puede llevarse a cabo una despresurización durante la reacción para retirar el agua que se forma mediante la esterificación por la fosfolipasa A2 para acelerar la esterificación. La despresurización para retirar agua puede llevarse a cabo, por ejemplo, a una temperatura de 35 a 80 °C a 20 kPa o menos durante 12 a 24 horas.

60 Como se describe anteriormente, la esterificación del lisofosfolípido con el ácido graso como donante de acilo forma un fosfolípido con el ácido graso deseado introducido en la posición 2 del lisofosfolípido. Puede comprobarse la progresión de la esterificación por cromatografía en capa fina (TLC) y similares.

65 Se añade a una disolución de reacción de glicerina que contiene el fosfolípido formado mediante la esterificación como anteriormente, un disolvente cetona o un alcohol de 4 átomos de carbono o menos para reducir la viscosidad de la glicerina para una fácil extracción, y se añade entonces al menos un disolvente seleccionado del grupo

consistente en disolventes hidrocarburos, disolventes cetonas y disolventes ésteres a la disolución de reacción, formando una capa de glicerina y una capa de disolvente. Se extrae entonces el fosfolípido formado mediante la esterificación en la capa de disolvente, se transfiere la fosfolipasa A2 a la capa de glicerina y por consiguiente puede extraerse el fosfolípido diana. En ese momento, la capa de disolvente (capa superior) incluye el fosfolípido/lisofosfolípido diana, el disolvente y el donante de acilo, y la capa de glicerina (capa inferior) incluye principalmente la glicerina, el disolvente, la fosfolipasa A2 y el fosfolípido/lisofosfolípido que no puede extraerse completamente, otros aditivos y similares. A continuación, se separan (recogen) la capa de disolvente (capa superior) y la capa de glicerina (capa inferior). En ese momento, puede repetirse apropiadamente la adición de un disolvente predeterminado y la separación, considerando la mejora de la pureza del fosfolípido y de la eficacia operativa. De esta manera, puede extraerse eficazmente el fosfolípido diana de la disolución de reacción de glicerina.

El fosfolípido y la fosfolipasa A2 pueden separarse como anteriormente, pero la fosfolipasa A2 puede incluirse en la capa de disolvente traza acompañando al fosfolípido diana. En este caso, el fosfolípido diana puede mezclarse con la fosfolipasa A2 incluso después del tratamiento como se ejemplifica a continuación. Dicha mezcla que incluye fosfolipasa A2 puede usarse para alimentos pero, si es necesario, la fosfolipasa A2 puede degradarse apropiadamente e inactivarse, por ejemplo, usando una enzima degradativa tal como una proteasa.

Alcohol de 4 átomos de carbono o menos significa metanol, etanol, propanol y butanol, y es más preferido etanol porque tiene una baja toxicidad y puede usarse como aditivo alimentario. El alcohol se añade preferiblemente en una cantidad de 10 a 150 partes en peso con respecto a 100 partes en peso de glicerina.

En la presente invención, el ácido graso como donante de acilo puede retirarse de la capa de disolvente separado (capa superior) que contiene el fosfolípido diana como anteriormente. El procedimiento para retirar el ácido graso como donante de acilo de la capa superior separada no está específicamente limitado, y los ejemplos del procedimiento incluyen un procedimiento de desgrasado con un disolvente cetona, un disolvente mixto de etanol-hexano o similares y un procedimiento de retirada del ácido graso usando gel de sílice.

Por ejemplo, en el procedimiento que usa un disolvente cetona o similar, se retira el disolvente de la capa superior separada (recogida) por evaporación; se añade entonces de nuevo un disolvente cetona o similar; se enfría la mezcla a 5 °C o menos para precipitar el fosfolípido y se separa el disolvente cetona que disuelve el ácido graso y se retira, dando el fosfolípido con el ácido graso deseado introducido en la posición 2 del lisofosfolípido. En el procedimiento, el disolvente cetona o similar para adición después de la retirada de disolvente por evaporación es preferiblemente acetona, porque tiene un bajo punto de ebullición para retirar fácilmente por evaporación, y puede usarse como aditivo alimentario.

En el procedimiento de retirada de ácido graso usando gel de sílice, se separa (recoge) la capa superior; se pasa entonces la capa superior a través de una columna empaquetada con gel de sílice para adsorber el fosfolípido y para efluir el ácido graso para retirada; y se pasa entonces un disolvente eluyente tal como metanol a través de la columna para desorber el fosfolípido que está adsorbido al gel de sílice y recoger la fracción de fosfolípido deseado solo, se recristaliza entonces el fosfolípido, dando el fosfolípido con el ácido graso deseado introducido en la posición 2 del lisofosfolípido.

Mientras tanto, un disolvente tal como etanol puede inhibir la actividad fosfolipasa A2. Por tanto, se separan (recogen) la capa superior y la capa inferior y la capa de glicerina puede descomprimirse como capa inferior, retirando el disolvente restante. Dicho tratamiento proporciona una disolución de glicerina que contiene la fosfolipasa A2, el fosfolípido/lisofosfolípido restante, otros aditivos opcionales y similares.

Se añaden adicionalmente entonces a la disolución de glicerina el lisofosfolípido como sustrato de reacción y el ácido graso como donante de acilo, consiguiendo la reesterificación usando la fosfolipasa A2 restante en la disolución de glicerina, y por consiguiente puede reutilizarse la fosfolipasa A2.

En este momento, la manera de añadir el lisofosfolípido y el donante de acilo no está específicamente limitada. Pueden añadirse a la disolución de glicerina el lisofosfolípido y el donante de acilo simultáneamente, el lisofosfolípido puede añadirse seguido por la adición del donante de acilo o el donante de acilo puede añadirse seguido de la adición del lisofosfolípido. Cada cantidad puede ajustarse apropiadamente para que sea sustancialmente la misma que en la primera esterificación, dependiendo de la progresión de la reacción o del grado de extracción, y considerando que está presente lisofosfolípido no reaccionado en la disolución de glicerina. Además, pueden añadirse apropiadamente materiales distintos de lisofosfolípido y donante de acilo, tales como fuente de calcio, aminoácido y/o péptido de 3 residuos aminoácidos o menos y glicerina, en una cantidad reducida por la extracción del fosfolípido cuando se añaden lisofosfolípido y donante de acilo. La reesterificación puede llevarse a cabo en las mismas condiciones que aquellas de la primera esterificación, y la extracción del fosfolípido puede llevarse a cabo de la misma manera que anteriormente.

De esta manera, a condición de que la fosfolipasa A2 mantenga su actividad, se repite dicha operación para reutilizar la fosfolipasa A2 muchas veces, y por consiguiente puede producirse un fosfolípido deseado a menor

coste. En este momento, cuando la productividad del fosfolípido se reduce, puede reducirse parcialmente la cantidad de fosfolipasa A2, aditivos opcionales tales como aminoácido, péptido de 3 residuos aminoacídicos o menos y cloruro de calcio, glicerina o similares debido a la extracción, o puede reducirse la actividad de la fosfolipasa A2 o similar. Por ello, dicho material puede añadirse según sea necesario. Además, de la misma manera que en la primera esterificación, para suprimir la oxidación del ácido graso, puede llevarse a cabo la esterificación con un antioxidante o en atmósfera de nitrógeno sin oxígeno, según sea necesario.

El procedimiento para producir un fosfolípido de la presente invención puede emplearse adecuadamente como procedimiento para producir un fosfolípido con un ácido graso deseado introducido en posición 2. El procedimiento puede llevarse a cabo sin usar materiales ni disolventes tales como cloroformo, inadecuados para alimentos en el proceso de producción, y por lo tanto se emplea adecuadamente especialmente para la producción de fosfolípidos comestibles. Además, el fosfolípido obtenido de esta manera, en particular el fosfolípido con un ácido graso altamente insaturado introducido en la posición 2, puede usarse adecuadamente como fosfolípido comestible de alta funcionalidad.

EJEMPLOS

De aquí en adelante, se describirá la presente invención con más detalle por referencia a ejemplos, pero la presente invención no se pretende que esté limitada a los ejemplos. En los ejemplos, "parte" y "%" están basados en peso.

<Determinación de la composición de ácidos grasos del fosfolípido >

En los ejemplos, ejemplos comparativos y similares, después de la terminación de la reacción, se añadieron 200 µl de un disolvente cloroformo:metanol = 2:1 (relación en volumen) y 500 µl de una disolución saturada de cloruro de sodio a 50 µl de la disolución de reacción, se agitó entonces el conjunto, se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto y se extrajo la capa inferior. Se llevó a cabo la centrifugación de nuevo usando 200 µl de un disolvente cloroformo/metanol= 2:1 (relación en volumen) de manera similar, y se extrajo la capa inferior. Se reveló la capa inferior tratada que contenía un fosfolípido y un ácido graso por TLC (cromatografía en capa fina) con el disolvente, recogiendo una fracción de fosfolípido y lisofosfolípido. Se esterificó la fracción con metilato de sodio, formando ésteres metílicos y se analizó la composición de ácidos grasos de los ácidos grasos unidos a fosfolípido y lisofosfolípido con un cromatógrafo de gases ("GC-14B" fabricado por Shimadzu Corporation). El porcentaje de relación de áreas de cada ácido graso en el cromatograma se consideró como el porcentaje de relación en peso del correspondiente ácido graso.

(Ejemplo 1)

Se añadieron 105 mg de una mezcla de ácidos grasos que contenía DHA que se preparó por hidrólisis común de DHA-50G (fabricado por Nippon Chemical Feed Co., Ltd., contenido de DHA: 51,8 % en peso) y 1 g de glicerina (fabricada por Sakamoto Yakuhin Kogyo Co., Ltd.) a 35 mg de lisofosfatidilcolina ("SLP-LPC70" fabricada por Tsuji Oil Mills Co., Ltd.) y se añadieron adicionalmente 37,5 mg de glicina (fabricada por Showa Denko K. K.) y 37,5 mg de alanina (fabricada por Musashino Chemical Laboratory, Ltd.). A continuación, se añadieron adicionalmente 20 mg de fosfolipasa A2 ("Lyonase en polvo" fabricada por SANYO FINE CO., LTD., 53 U/mg) y se descomprimió el conjunto a 80 Pa durante 10 minutos para retirar el agua. Se añadieron entonces 10 µl de una disolución de cloruro de calcio 0,3 mol/l (fabricada por Tomita Pharmaceutical Co., Ltd.) y 30 µl de agua y se hizo reaccionar el conjunto a 50 °C durante 24 horas. La fracción de fosfolípido y lisofosfolípido incluida en la disolución de reacción tenía un contenido de DHA de 13,4 % en peso.

Se añadió 1 ml de etanol a la disolución de reacción. Se agitó el conjunto y se extrajo entonces con 1 ml de hexano dos veces, separando (recogiendo) la capa de hexano (capa superior) y la capa de glicerina (capa inferior) en un procedimiento común. En cuanto a la composición de ácidos grasos de la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido incluida en cada una de la capa de hexano (capa superior) y capa de glicerina (capa inferior) separadas (recogidas), la capa de hexano tenía un contenido de DHA de 20,7 % en peso y la capa de glicerina tenía un contenido de DHA de 6,3 % en peso.

Se descomprimió la capa de glicerina (capa inferior) separada (recogida) a 80 Pa durante 15 minutos para retirar el disolvente. Se añadieron 18 mg de lisofosfatidilcolina (SLP-LPC70) y 105 mg de mezcla de ácidos grasos que contenía DHA a la capa de glicerina descomprimida (disolución de glicerina), se añadieron adicionalmente entonces 40 µl de agua y se hizo reaccionar el conjunto a 50° C durante 24 horas. La fracción de fosfolípido y lisofosfolípido incluida en la disolución de reacción tenía un contenido de DHA de 13,6 % en peso.

(Ejemplo 2)

Se añadieron 30 mg de una mezcla de ácidos grasos que contenía DHA que se preparó mediante hidrólisis común de Incromega DHA-J46 (fabricado por Croda Japan KK., contenido de DHA: 49,7 % en peso) y 1 g de glicerina (fabricada por Sakamoto Yakuhin Kogyo Co., Ltd.) a 35 mg de lisofosfatidilcolina ("SLP-LPC70" fabricada por Tsuji Oil Mills Co., Ltd.), y se añadieron adicionalmente 25 mg de glicina (fabricada por Showa Denko K. K.) y 25 mg de

alanina (fabricada por Musashino Chemical Laboratory, Ltd.). Se añadieron a continuación 20 mg de fosfolipasa A2 ("Lyonase en polvo" fabricada por SANYO FINE CO., LTD., 53 U/mg), y se descomprimió el conjunto a 80 Pa durante 10 minutos para retirar el agua. Se añadieron entonces 10 µl de una disolución de cloruro de calcio 0,3 mol/l (fabricada por Tomita Pharmaceutical Co., Ltd.) y se hizo reaccionar el conjunto a 50 °C durante 24 horas con descompresión a 6,7 kPa. La fracción de fosfolípido y lisofosfolípido incluida en la disolución de reacción tenía un contenido de DHA de 16,9 % en peso.

Se extrajo la disolución de reacción con 1 ml de acetona dos veces para separar (recoger) la capa de acetona (capa superior) y la capa de glicerina (capa inferior) en un procedimiento común. En cuanto a la composición de ácidos grasos de la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido incluida en cada una de la capa de acetona (capa superior) y capa de glicerina (capa inferior) separadas (recogidas), la capa de acetona tenía un contenido de DHA de 17,6 % en peso y la capa de glicerina tenía un contenido de DHA de 14,1 % en peso.

Se descomprimió la capa de glicerina separada (recogida) a 80 Pa durante 15 minutos para retirar la acetona. Se añadieron 30 mg de lisofosfatidilcolina (SLP-LPC70) a la capa de glicerina descomprimida (disolución de glicerina) y se agitó a 50 °C durante 30 minutos para disolver. Se determinó que el contenido de DHA en la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido incluida en la disolución de reacción era de 4,8 % en peso. Se añadieron a la mezcla 30 mg de la mezcla de ácidos grasos que contenía DHA y se hizo reaccionar el conjunto a 50 °C durante 24 horas con descompresión a 6,7 kPa. La fracción de fosfolípido y lisofosfolípido incluida en la disolución de reacción tenía un contenido de DHA de 11,2 % en peso después de 24 horas de reacción.

(Ejemplo 3)

Se añadieron 30 mg de una mezcla de ácidos grasos que contenía DHA que se preparó mediante la hidrólisis común de Incromega DHA-J46 (fabricado por Croda Japan KK., contenido de DHA: 49,7 % en peso) y 1 g de glicerina (fabricada por Sakamoto Yakuhin Kogyo Co., Ltd.) a 50 mg de lisofosfatidilcolina (fabricada por Tsuji Oil Mills Co., Ltd. "SLP-WhiteLyso"), y se añadieron adicionalmente 25 mg de glicina (fabricada por Showa Denko K. K.) y 25 mg de alanina (fabricada por Musashino Chemical Laboratory, Ltd.). A continuación, se añadieron adicionalmente 20 mg de fosfolipasa A2 ("Lyonase en polvo" fabricada por SANYO FINE CO., LTD., 53 U/mg) y se descomprimió el conjunto a 80 Pa durante 10 minutos para retirar el agua. Se añadieron entonces 10 µl de disolución de cloruro de calcio 0,3 mol/l (fabricada por Tomita Pharmaceutical Co., Ltd.) y se hizo reaccionar el conjunto a 50 °C durante 24 horas con descompresión a 6,7 kPa. La fracción de fosfolípido y lisofosfolípido incluida en la disolución de reacción tenía un contenido de DHA de 15,3 % en peso.

Se añadieron a la disolución de reacción 0,5 ml de etanol. Se agitó el conjunto y se extrajo con un disolvente mixto de 0,5 ml de hexano y 0,2 ml de acetona dos veces para separar (recoger) la capa de hexano/acetona (capa superior) y la capa de glicerina (capa inferior) en un procedimiento común. En cuanto a la composición de ácidos grasos de la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido incluida en cada una de la capa de hexano/acetona (capa superior) y capa de glicerina (capa inferior) separadas (recogidas), la capa de hexano/acetona tenía un contenido de DHA de 18,0 % en peso y la capa de glicerina tenía un contenido de DHA de 11,6 % en peso.

Se descomprimió la capa de glicerina separada (recogida) a 80 Pa durante 15 minutos para retirar el disolvente. Se añadieron 30 mg de lisofosfatidilcolina (SLP-WhiteLyso) a la capa de glicerina descomprimida (disolución de glicerina) y se agitó a 50 °C durante 30 minutos para disolver. Se determinó que el contenido de la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido incluida en la disolución de reacción era de 6,6 % en peso. Se añadieron a la mezcla 30 mg de mezcla de ácidos grasos que contenía DHA y se hizo reaccionar el conjunto a 50 °C durante 24 horas con descompresión a 6,7 kPa. La fracción de fosfolípido y lisofosfolípido incluida en la disolución de reacción tenía un contenido de DHA de 12,3 % en peso después de 24 horas de reacción.

(Ejemplo 4)

Se añadieron 30 mg de una mezcla de ácidos grasos que contenía EPA que se preparó mediante la hidrólisis común de EPA-45G (fabricado por Nippon Chemical Feed Co., Ltd., contenido de EPA: 45,7 % en peso) y 1 g de glicerina (fabricada por Sakamoto Yakuhin Kogyo Co., Ltd.) a 50 mg de lisofosfatidilcolina (fabricada por Tsuji Oil Mills Co., Ltd. "SLP-WhiteLyso"), y se añadieron adicionalmente 25 mg de glicina (fabricada por Showa Denko K. K.) y 25 mg de alanina (fabricada por Musashino Chemical Laboratory, Ltd.). A continuación, se añadieron adicionalmente 20 mg de fosfolipasa A2 ("Lyonase en polvo" fabricada por SANYO FINE CO., LTD., 53 U/mg) y se descomprimió el conjunto a 80 Pa durante 10 minutos para retirar el agua. Se añadieron entonces 10 µl de una disolución de cloruro de calcio 0,3 mol/l (fabricada por Tomita Pharmaceutical Co., Ltd.) y se hizo reaccionar el conjunto a 50 °C durante 24 horas con descompresión a 6,7 kPa. La fracción de fosfolípido y lisofosfolípido incluida en la disolución de reacción tenía un contenido de EPA de 19,5 % en peso.

Se añadieron a la disolución de reacción 0,25 ml de etanol. Se agitó el conjunto y se extrajo entonces con 0,75 ml de acetato de etilo dos veces, para separar (recoger) la capa de acetato de etilo (capa superior) y la capa de glicerina (capa inferior) en un procedimiento común. En cuanto a la composición de ácidos grasos de la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido incluida en cada una de la capa de acetato de etilo y la capa de glicerina separadas (recogidas), la

capa de acetato de etilo tenía un contenido de EPA de 22,1 % en peso y la capa de glicerina tenía un contenido de EPA de 17,8 % en peso.

5 Se descomprimió la capa de glicerina separada (recogida) a 80 Pa durante 15 minutos para retirar el disolvente. Se añadieron 36 mg de lisofosfatidilcolina (SLP-WhiteLyso) a la capa de glicerina descomprimida (disolución de glicerina) y se agitó a 50 °C durante 30 minutos para disolver. Se determinó que el contenido de EPA en la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido incluida en la disolución de reacción era de 11,2 % en peso. Se añadieron a la mezcla 30 mg de mezcla de ácidos grasos que contenía EPA y se hizo reaccionar el conjunto a 50 °C durante 24 horas con descompresión a 6,7 kPa. La fracción de fosfolípido y lisofosfolípido incluida en la disolución de reacción tenía un contenido de EPA de 16,3 % en peso después de 24 horas de reacción.

(Ejemplo 5)

15 Se añadieron 3 g de una mezcla de ácidos grasos que contenía DHA que se preparó mediante la hidrólisis común de Incromega DHA-J46 (fabricado por Croda Japan KK., contenido de DHA: 49,7 % en peso) y 100 g de glicerina (fabricada por Sakamoto Yakuhi Kogyo Co., Ltd.) a 7,5 g de lisofosfatidilcolina (fabricada por Tsuji Oil Mills Co., Ltd. "SLP-WhiteLyso"), y se añadieron adicionalmente 3 g de glicina (fabricada por Showa Denko K K.) y 3 g de alanina (fabricada por Musashino Chemical Laboratory, Ltd.). A continuación, se añadieron adicionalmente 3 g de fosfolipasa A2 ("Lysonase en polvo" fabricada por SANYO FINE CO., LTD., 53 U/mg) y se añadieron 0,5 ml de una disolución de cloruro de calcio 2 mmol/l (fabricada por Tomita Pharmaceutical Co., Ltd.). Se hizo reaccionar el conjunto a 50 °C durante 24 horas a presión reducida de 0,40 kPa.

25 Se añadieron a la disolución de reacción 50 ml de etanol. Se agitó el conjunto y se extrajo entonces con 50 ml de hexano dos veces para separar (recoger) la capa de hexano (capa superior) y la capa de glicerina (capa inferior) en un procedimiento común. Se retiró el disolvente de la capa de hexano separada (capa superior) por evaporación, y se añadieron 50 ml de acetona. Se enfrió el conjunto a 0° C durante 1 hora, dando 6,3 g del fosfolípido diana en forma de precipitado. En cuanto a la composición de ácidos grasos, el fosfolípido tenía un contenido de DHA de 17,0 % en peso. En cuanto a la composición de ácidos grasos de la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido, la capa de glicerina separada (capa inferior) tenía un contenido de DHA de 8,3 % en peso.

30 Se añadieron a la capa de glicerina separada 5,5 g de lisofosfatidilcolina (SLP-WhiteLyso) y 3 g de la mezcla de ácidos grasos que contenía DHA (preparada a partir de Incromega DHA-J46). Se agitó la capa de glicerina a 13 kPa durante 30 minutos para retirar el disolvente por evaporación y se hizo reaccionar a 50 °C durante 24 horas con descompresión a 0,40 kPa. Después de terminada la reacción, se extrajo la mezcla de reacción con etanol y hexano y se purificó con acetato de manera similar a la anterior, dando 6,0 g del fosfolípido diana. En cuanto a la composición de ácidos grasos, el fosfolípido tenía un contenido de DHA de 15,8 % en peso.

40 Como se describe anteriormente, se reveló que la reutilización de fosfolipasa A2 puede conducir a la producción de un fosfolípido unido a un ácido graso arbitrario en la posición 2 del fosfolípido. De aquí en adelante, se describirán como ejemplos de referencia los resultados de la primera esterificación que usaba diversos aminoácidos, péptidos que tienen 3 residuos aminoacídicos o menos y similares.

45 Como se menciona anteriormente, resulta evidente que el uso de diversos aminoácidos, péptidos que tienen 3 residuos aminoacídicos o menos y similares puede conseguir una producción eficaz de un fosfolípido deseado. Por lo tanto, la reutilización de la fosfolipasa A2 con dicho compuesto se espera que consiga también una producción eficaz de un fosfolípido deseado

(Ejemplo de referencia 1)

50 Se añadieron 97 mg de ácido oleico (fabricado por TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) y 1 g de glicerina (fabricada por Sakamoto Yakuhi Kogyo Co., Ltd.) a 35 mg de lisofosfatidilcolina (fabricada por Tsuji Oil Mills Co., Ltd. "SLP-LPC70H"), y se añadieron adicionalmente 50 mg de glicina (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). A continuación, se añadieron adicionalmente 10 mg de fosfolipasa A2 ("Lecitase 100S" fabricada por Novozymes Japan, 130 U/mg) y 2,5 µl de una disolución de cloruro de calcio 1,0 mol/l (fabricada por Tomita Pharmaceutical Co., Ltd.) y se hizo reaccionar el conjunto a 60 °C durante 24 horas, dando un fosfolípido (fosfatidilcolina) unido con ácido oleico en posición 2. En cuanto a la composición de ácidos grasos, la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido obtenida tenía un contenido de ácido oleico de 39,2 % en peso.

(Ejemplo de referencia 2)

60 Se añadieron 113 mg de DHA (fabricado por TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) y 1 g de glicerina (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a 35 mg de lisofosfatidilcolina ("SLP-LPC70" fabricada por Tsuji Oil Mills Co., Ltd.), y se añadieron adicionalmente 50 mg de glicina (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). A continuación, se añadieron 10 mg de fosfolipasa A2 ("Lecitase 100S" fabricada por Novozymes Japan, 130 U/mg) y se añadieron adicionalmente 2,5 µl de una disolución de cloruro de calcio 1,0 mol/l (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 3 mg de dibutilhidroxitolueno (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

como antioxidante. Se hizo reaccionar el conjunto a 60 °C durante 48 horas, dando un fosfolípido (fosfatidilcolina) unido a un ácido graso altamente insaturado (DHA) en posición 2. En cuanto a la composición de ácidos grasos, la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido obtenida tenía un contenido de DHA de 34,2 % en peso.

5 (Ejemplo de referencia 3)

Se añadieron 113 mg de DHA (fabricado por TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) y 1 g de glicerina (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a 35 mg de lisofosfatidilcolina (SLP-LPC70 fabricado por Tsuji Oil Mills Co., Ltd.), y se añadieron adicionalmente 60 mg de glicilglicina (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). A continuación, se añadieron 20 mg de fosfolipasa A2 (fabricada por SANYO FINE CO., LTD., Lysonase en polvo, 53 U/mg) y 2,5 µl de una disolución de cloruro de calcio 1,2 mol/l (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y se añadieron adicionalmente 3 mg de Sankatol NO1 (fabricado por Taiyo Kagaku Co., Ltd.) que contenía catequina y 3 mg de ácido ascórbico (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) como antioxidantes. Se hizo reaccionar el conjunto a 60 °C durante 48 horas, dando un fosfolípido (fosfatidilcolina) unido a un ácido graso altamente insaturado (DHA) en posición 2. En cuanto a la composición de ácidos grasos, la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido obtenida tenía un contenido de DHA de 30,7 % en peso.

(Ejemplo de referencia 4)

Se obtuvo un fosfolípido unido a un ácido graso altamente insaturado (EPA) en posición 2 de manera similar a la del ejemplo de referencia 3, excepto porque se usaron 104 mg de EPA (fabricado por NACALAI TESQUE, INC.) en lugar de 113 mg de DHA y se usaron 60 mg de glicina en lugar de 60 mg de glicilglicina. En cuanto a la composición de ácidos grasos, la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido obtenida tenía un contenido de EPA de 25,5 % en peso.

25 (Ejemplo de referencia 5)

Se obtuvo un fosfolípido (fosfatidilcolina) unido a un ácido graso altamente insaturado (ácido araquidónico) en posición 2 de manera similar a la del ejemplo de referencia 3, excepto porque se usaron 103 mg de ácido araquidónico (fabricado por Sigma Aldrich Japan) en lugar de 113 mg de DHA y se usaron 40 mg de glicina en lugar de 60 mg de glicilglicina. En cuanto a la composición de ácidos grasos, la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido tenía un contenido de ácido araquidónico de 32,3 % en peso.

(Ejemplo de referencia 6)

Se añadieron 105 mg de una mezcla de ácidos grasos que contenía DHA que se preparó mediante la hidrólisis común de DHA-50G (fabricado por Nippon Chemical Feed Co., Ltd., contenido de DHA de 51,8 % en peso) y 1 g de glicerina (fabricada por Sakamoto Yakuhin Kogyo Co., Ltd.) a 35 mg de lisofosfatidilcolina ("SLP-LPC70" fabricada por Tsuji Oil Mills Co., Ltd.), y se añadieron adicionalmente 75 mg de glicina (fabricada por Showa Denko K. K.). A continuación, se añadieron adicionalmente 20 mg de fosfolipasa A2 ("Lysonase en polvo" fabricada por SANYO FINE CO., LTD.) y se descomprimió el conjunto a 80 Pa durante 10 minutos para retirar el agua. Se añadieron entonces 10 µl de una disolución de cloruro de sodio 0,3 mol/l (fabricada por Tomita Pharmaceutical Co., Ltd.) y se hizo reaccionar el conjunto a 60 °C durante 48 horas, dando un fosfolípido (fosfatidilcolina) unido a un ácido graso altamente insaturado (DHA) en posición 2. En cuanto a la composición de ácidos grasos, la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido obtenida tenía un contenido de DHA de 15,5 % en peso.

45 (Ejemplo de referencia 7)

Se añadieron 105 mg de una mezcla de ácidos grasos que contenía DHA que se preparó mediante la hidrólisis común de DHA-50G (fabricado por Nippon Chemical Feed Co., Ltd., contenido de DHA de 51,8 % en peso) y 1 g de glicerina (fabricada por Sakamoto Yakuhin Kogyo Co., Ltd.) a 35 mg de lisofosfatidilcolina ("SLP-LPC70" fabricada por Tsuji Oil Mills Co., Ltd.), y se añadieron adicionalmente 37,5 mg de glicina (fabricada por Showa Denko K. K.) y 37,5 mg de alanina (fabricada por Musasbino Chemical Laboratory, Ltd.). A continuación, se añadieron adicionalmente 20 mg de fosfolipasa A2 ("Lysonase en polvo" fabricada por SANYO FINE CO., LTD.) y se descomprimió el conjunto a 80 Pa durante 10 minutos para retirar el agua. Se añadieron entonces 10 µl de una disolución de cloruro de calcio 0,3 mol/l (fabricada por Tomita Pharmaceutical Co., Ltd.) y se hizo reaccionar el conjunto a 60 °C durante 48 horas, dando un fosfolípido (fosfatidilcolina) unido a un ácido graso altamente insaturado (DHA) en posición 2. En cuanto a la composición de ácidos grasos, la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido obtenida tenía un contenido de DHA de 17,2 % en peso.

60 (Ejemplo de referencia 8). Preparación de una disolución de esterificación que contiene fosfolípido para mejorar la pureza de la fosfatidilcolina

Se añadieron 30 mg de una mezcla de ácidos grasos que contenía DHA que se preparó mediante la hidrólisis común de DHA-50G (fabricado por Nippon Chemical Feed Co., Ltd., contenido de DHA de 51,8 % en peso) y 1 g de glicerina (fabricada por Sakamoto Yakuhin Kogyo Co., Ltd.) a 35 mg de lisofosfatidilcolina ("SLP-LPC70" fabricada por Tsuji Oil Mills Co., Ltd.), y se añadieron adicionalmente 37,5 mg de glicina (fabricada por Showa Denko K K) y

37,5 mg de alanina (fabricada por Musashino Chemical Laboratory, Ltd.). A continuación, se añadieron 20 mg de fosfolipasa A2 ("Lyonase en polvo" fabricada por SANYO FINE CO., LTD.) y se añadieron adicionalmente 6 µl de una disolución de cloruro de calcio 0,5 mol/l (fabricada por Tomita Pharmaceutical Co., Ltd.). Se descomprimió el conjunto a 80 Pa durante 10 minutos para retirar el agua, y se hizo reaccionar a 50 °C durante 24 horas, dando una disolución de esterificación que contiene fosfolípido para mejorar la pureza de la fosfatidilcolina. La fracción de fosfolípido y lisofosfolípido incluida en la disolución de reacción tenía un contenido de DHA de 15,3 % en peso.

(Ejemplo comparativo 1)

Se obtuvo un fosfolípido unido a ácido oleico en posición 2 de manera similar a la del ejemplo de referencia 1, excepto porque no se usó glicina. En cuanto a la composición de ácidos grasos, la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido obtenida tenía un contenido de ácido oleico de 19,4 % en peso.

(Ejemplo comparativo 2)

Se obtuvo un fosfolípido unido a un ácido graso altamente insaturado (DHA) en posición 2 de manera similar a la del ejemplo de referencia 3, excepto porque no se usó glicilglicina. En cuanto a la composición de ácidos grasos, la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido obtenida tenía un contenido de ácido oleico de 12,9 % en peso.

(Ejemplo comparativo 3)

Se obtuvo un fosfolípido unido a un ácido graso altamente insaturado (EPA) en posición 2 de manera similar a la del ejemplo de referencia 4, excepto porque no se usó glicina y se añadieron 60 µl de agua. En cuanto a la composición de ácidos grasos, la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido obtenida tenía un contenido de EPA de 8,9 % en peso.

(Ejemplo comparativo 4)

Se obtuvo un fosfolípido unido a un ácido graso altamente insaturado (ácido araquidónico) en posición 2 de manera similar a la del ejemplo de referencia 5, excepto porque no se usó glicina. En cuanto a la composición de ácidos grasos, la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido obtenida tenía un contenido de ácido araquidónico de 5,5 % en peso.

(Ejemplo comparativo 5)

Se obtuvo un fosfolípido unido a un ácido graso altamente insaturado (DHA) en posición 2 de manera similar a la del ejemplo de referencia 6, excepto porque no se usó glicina. En cuanto a la composición de ácidos grasos, la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido obtenida tenía un contenido de DHA de 4,4 % en peso.

(Ejemplo comparativo 6)

Se obtuvo un fosfolípido unido a un ácido graso altamente insaturado (DHA) en posición 2 de manera similar a la del ejemplo de referencia 8, excepto porque no se usaron glicina ni alanina. En cuanto a la composición de ácidos grasos, la fracción de fosfolípido y lisofosfolípido obtenida tenía un contenido de DHA de 7,6 % en peso.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir un fosfolípido, comprendiendo el procedimiento:
- 5 producir un fosfolípido mediante esterificación de un lisofosfolípido con un donante de acilo por la fosfolipasa A2 en glicerina; y entonces
- añadir un disolvente inmiscible con glicerina, formando una capa de glicerina y una capa de disolvente;
- 10 extraer el fosfolípido en la capa de disolvente;
- transferir la fosfolipasa A2 a la capa de glicerina; y entonces
- 15 recoger la capa de glicerina;
- retirar el disolvente restante por evaporación de la capa de glicerina, dando una disolución de glicerina;
- añadir un lisofosfolípido y un donante de acilo a la disolución de glicerina; y
- 20 reesterificar usando la fosfolipasa A2 restante en la disolución de glicerina.
2. El procedimiento para producir un fosfolípido según la reivindicación 1, en el que se añade un disolvente cetona como disolvente inmiscible con glicerina.
- 25 3. El procedimiento para producir un fosfolípido según la reivindicación 1, en el que se añade un alcohol de 4 átomos de carbono o menos después de la esterificación, y se añade entonces al menos un disolvente seleccionado del grupo consistente en disolventes hidrocarburos, disolventes cetonas y disolventes ésteres como disolvente inmiscible con glicerina.
- 30 4. El procedimiento para producir un fosfolípido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que, en la esterificación, se añade un aminoácido y/o un péptido de 3 residuos aminoacídicos o menos a un sistema de reacción, en el que el aminoácido es al menos uno seleccionado del grupo consistente en glicina, alanina, asparagina, glutamina, isoleucina, leucina, serina, treonina, valina, fenilalanina y tirosina, y en el que el péptido es una combinación que incluye glicina, alanina y/o serina.