(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 26 107 T2** 2004.01.22

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 819 760 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 26 107.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP96/03237**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 937 503.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/017460**
(86) PCT-Anmeldetag: **06.11.1996**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **15.05.1997**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.01.1998**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **05.02.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.01.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12P 13/00**
C12P 13/06, A23L 1/29

(30) Unionspriorität:
31370795 08.11.1995 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR, GB, IT, NL

(73) Patentinhaber:
Kabushiki Kaisha Yakult Honsha, Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:
Patentanwälte Lippert, Stachow, Schmidt & Partner, 51427 Bergisch Gladbach

(72) Erfinder:
SAKAI, Masashi, Tokyo 105, JP; YAMATOYA, Hideyuki, Tokyo 105, JP; KUDO, Satoshi, Tokyo 105, JP

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON PHOSPHATIDYLSERINEN MIT POLYBASISCHER, UNGESÄTTIGTER FETTSÄURE ALS SEITENKETTE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erzeugung von Phosphatidylserinen, die eine Seitenkette aufweisen, die von einer langkettigen ungesättigten Fettsäure abgeleitet ist, insbesondere einen Prozess zur Erzeugung von Verbindungen, welche sich sowohl für die Prophylaxe und die Behandlung bei Parkinson-Krankheit und Dementia wie beispielsweise Alzheimer'sche Krankheit eignen wie auch sich zur Verbesserung der Gehirntätigkeit wie beispielsweise verbesserte Resistenz gegen Hirnstress und verbesserten Lerneffekt eignen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] A. Bruni et al. berichten, dass der Hirnglukosespiegel in Mäusen, welchen durch die Schwanzvene aus Rinderhirn extrahiertes Phosphatidylserin injiziert wurde, etwa um das Vierfache des Spiegels in der Kontrollgruppe gestiegen ist (A. Bruni et al., Nature, Vol. 260, Seiten 331 ff, 1976).
[0003] A. Zanotti et al. berichten ebenfalls, dass die orale Verabreichung über 12 Wochen von aus Rinderhirn extrahiertem Phosphatidylserin an gealterten Ratten mit Erinnerungsdefiziten die Leistungsfähigkeit der gealterten Ratten verbessert (A. Zanotti et al., Psychopharmacology Berl., Vol. 99, Seiten 316, 1989).
[0004] Darüber hinaus wird bei einem doppelblinden Plazebokontrollierten klinischen Versuch am Menschen die Wirksamkeit von aus Rinderhirn extrahiertem Phosphatidylserin im Verbessern der Gedächtnisbeeinträchtigung durch die Alzheimerische Krankheit und während der Alterungsphase bestätigt (P.J. Delwaide et al., Acta Neurol. Scand., Vol. 73, Seiten 136, 1986; R. R. Engel et al., Eur. Neuropsychopharmacol., Vol. 2, Seiten 149, 1992; T. Cenacci et al., Aging Clin. Exp. Res., Vol. 5, Seiten 123, 1993).
[0005] Wie oben beschrieben hat aus Rinderhirn erhaltenes Phosphatidylserin mit der Wirkung einer Erhöhung der Hirnglukosespiegels eine verbessernde Wirkung der Gehirntätigkeit von Ratten und von Menschen. Deshalb ist es angezeigt, dass das Ausmaß des Zuwachses im Hirnglukosespiegel ein wichtiger Indikator zur Auswahl einer Substanz mit einem die Gehirntätigkeit verbessernden Einfluss ist.
[0006] Es wird angenommen, dass im Allgemeinen eine ungesättigte Fettsäure an die Betaposition eines Phospholipids gebunden ist, und in natürlichem Phosphatidylserin, wie beispielsweise solches, welches aus Tierhirn erhalten ist, mehr als zweiundneunzig (92) Prozent der Fettsäure an der Betaposition Ölsäure enthält (B. F. Szuhaj & G. R. List, „Lecithins", Am. Oil Chem. Soc., U.S.A., Seiten 125, 1985).
[0007] Unter den derzeit erhältlichen Phosphatidylserinen ist keines, welches mit niedrigem Kostenaufwand industriell hergestellt werden kann und eine langkettige ungesättigte Fettsäure einer n-3- oder einer n-6-(außer Linolsäure)Gruppe an der Betaposition umfasst.
[0008] Es wurde beispielsweise vorgeschlagen, dass ein Phosphatidylserinderivat mit einer spezifischen Fettsäure an der Betaposition einer Glyerinstruktur , welche Proteinkinase-C (PKC) aktivieren kann, ein Material ist, welches eine Zusammensetzung aus einer langkettigen ungesättigten Fettsäure und Phosphatidylserin zur Abschätzung der wie oben beschrieben Summation oder des synergetischen Effekts ist (Japanisches Patent – Offenlegungsschrift Nr. 6-279311). In dem japanischen Patent wird beschrieben, dass das Experiment unter der Bedingung durchgeführt wurde, dass das aus Rinderhirn erhaltene Phosphatidylserin, welches zur klinischen Verbesserung der Gehirntätigkeit wirksam ist, eine Art der Zusammensetzung aus einer Vielfalt von Fettsäuren ist, und die Wirksamkeit bislang noch nicht bestätigt worden ist, wenn die Fettsäurestruktur spezifiziert ist, und ebenfalls wird in dem japanischen Patent beschrieben, dass aus dem als solchen durchgeführten Experiment spezifische Proteinkinase-C Aktivität festgestellt wurde, wenn eine gesättigte Fettsäure (14 bis 18 Kohlenstoffatome) an der Alphaposition ist und Linolsäure, Linolensäure, Arachidonsäure, Docosahexaensäure (DHA) an der Betaposition ist.
[0009] Zur Erzeugung von Phosphatidylserin mit einer solchen spezifischen Struktur ist ein Verfahren in dem oben angegebenen japanischen Patent offenbart, worin Diacylphospholipide mit Phospholipase A_2 zu liso Phospholipide transformiert wurden, dann die durch Vereinigung von Fettsäure in einer chemischen Synthese erhaltenen spezifischen Phospholipide durch Transphosphatidylierung mit Phospholipase-D zu Phosphatidylserin transformiert wurden. Dieses Verfahren ist mit einer komplexen mehrstufigen Reaktion und einer chemischer Synthese verbunden, sodass das Phosphatidylserin nicht geeignet für Lebensmittel ist und die Produktionskosten höher sind.
[0010] Es wird ebenfalls berichtet, dass Glyerinderivate mit der an der Alpha- und Betaposition Fettsäure-tragenden spezifischen Struktur die Wirksamkeit einer Verbesserung der Lernleistung aufweisen (Japanisches Patent, Offenlegungsschrift Nr. 6-256179). Jedenfalls lehrt das japanische Patent, dass die Primärstruktur zur Verbesserung eher strukturell die Alpha- und Betafettsäuren des Glyerinderivates ist und der Rest in Gammaposition oder Glyerin-3-Phosphoryl-X (X bedeutet eine Hydroxyl-Cholin- oder Ethanolamingruppe) keinen direkten Einfluss auf die Verbesserung der Lernleistungsfähigkeit hat. Deshalb ist das Glyerinderivat von dem

Phosphatidylserin im Hinblick auf die wie oben beschrieben abgeschätzte Summation oder synergetischen Effekt in der Kombination von Fettsäuren, die einen Verbesserungseffekt der Lernfähigkeit aufweisen, verschieden.

[0011] Das Herstellungsverfahren des Glyerinderivats, das in dem oben erwähnten zweiten japanischen Patent offenbart ist, ist entweder das der Separation aus einer natürlichen Verbindung oder das einer chemischen Synthese oder einem chemischen Prozess mit Phospholipase-C, und dies kann nicht ein bevorzugtes Verfahren zur industriellen Herstellung von Lebensmittel sein.

[0012] Das Dokument Chem. Abstr., Vol. 110, Nr. 19, 1989, Abstr. Nr. 1711809q (D1) offenbart die Herstellung von Phosphatidyl-D-Serin aus Lecithin mit einer Fettsäure-Seitenkette mit bis zu 22 Kohlenstoffatomen und D-Serin unter Verwendung von Phospholipase DM. In der korrespondierenden japanischen Veröffentlichung JP-A-63-123389 (Seite 3, rechte Spalte oben, Zeilen 9 bis 15) ist man der Überzeugung, dass die aus natürlichem Rohmaterial, wie beispielsweise Eigelb-Lecithin oder Sojabohnenlecithin, extrahierten Phospholipide als Anfangsmaterial verwendet werden können.

[0013] Das Dokument Chem. Abstr., Vol. 109, Nr. 9, 1988, Abstr. Nr. 72066t, (D2) offenbart die enzymatische Herstellung von Phospolipidderivaten aus Serin, Phospholipase D und Phospholipid aus Sojabohnen. In der korrespondierenden japanischen Veröffentlichung JP-A-63-36791 (Seite 2, untere linke Spalte, Zeilen 8 bis 19) ist man der Auffassung, dass aus natürlichem Rohmaterial wie beispielsweise Sojabohnenlecithin extrahiertes natürliches Lecithin als das Phospholipid verwendet werden kann. In der japanischen Veröffentlichung (Seite 3, obere rechte Spalte, Zeilen 2 bis 9) ist man ebenfalls der Auffassung, dass das Serin (d. h., ein Akzeptor der Reaktion) und Phospholipase D absorbiert sind oder ein aktiver Kohlenstoffträger für die Reaktion sind.

[0014] Das Dokument Chem. Abstr., Vol. 108, Nr. 23, 1988, Abstr. Nr. 2033122, (D3) offenbart die enzymatische Herstellung von Phospholipidderivaten aus Serin, Phospholipase D und aus Sojabohnen extrahiertem Phospholipid. In der korrespondieren japanischen Veröffentlichung JP-A-63-36792, Seite 5 (obere rechte Spalte, Zeilen 6 bis 19) ist man der Auffassung, dass das Sojabohnenphospholipid-Gemisch in einem organischen Lösungsmittel gelöst wird, um eine organische Phase zu ergeben, und das Serin und Phospholipase D mit einem Essigsäure-Puffer vermischt werden, um eine wässrige Phase zu ergeben. Die beiden, organische und wässrige, Phasen werden vermischt, um eine klare umgekehrte Micell-Flüssigkeit durch Tropfen der wässrigen Phase in die organische Phase mit Ultraschalleinwirkung zu ergeben. Danach wird die Micell-Flüssigkeit zur Inkubation mit Schütteln gerührt, um eine Reaktion einzugehen.

[0015] Das Dokument Biochem. Biophys. Acta, Vol. 488, 1997, Seiten 36-42 (D4) offenbart die Herstellung von Phosphatidylserin unter Verwendung von Phospholipiden (wie beispielsweise Eiweißlecithin, usw.) als ein Ausgangsmaterial zusammen mit Serin in einer Einstufen-Transphosphatidylierung, die durch Kohl-Phospholipase D katalysiert wird.

[0016] Das Dokument Biosci., Biotechnol., Biochem , Vol. 57, Nr. 8, 1993, Seiten 1302-1305, (D5) offenbart die Herstellung von verschiedenen Phosphatidylsacchariden durch Phospholipase D, welche aus Actinomadura sp. Stamm Nr. 362 erhalten wurde. Auf Seite 1302, linke Spalte, Zeilen 1 bis 6 wird angegeben, dass unter Verwendung der Transphosphatidylierungs-Aktivität der Phospholipase D (PL-D) die Kopfgruppe von Phosphatidylcholin (PC) einfach modifiziert werden kann und so PhosphatidylGlyerin (RG), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin aus PC durch Katalyse mit PL-D hergestellt werden können.

[0017] Das Dokument JP-A-5-336983, (D6) offenbart die Herstellung von Phospholipidderivaten aus Phospholipid und einem Akzeptor mit einer Hydroxylgruppe (wie beispielsweise Monoethanolamin, Serin, usw.) unter Verwendung einer Kulturlösung, die aus einem zur Herstellung von Phospholipase D fähigen Mikroorganismus hergestellt ist.

[0018] Dokument JP-A-63-245684, (D7) offenbart die Herstellung von Derivaten der Phosphatidsäure aus einem Phospholipid und einem Akzeptor (Serin, usw.) unter Verwendung von Phospholipase D, welche mit einem organischen Lösungsmittel ohne Verwendung eines divalenten Metallions aktiviert wurde.

[0019] Dokument JP-A-2-79990 (D8) offenbart die Herstellung von hochreinem Phosphatidylserin aus Serin und Phosphatidylcholin unter Verwendung von Phospholipase D, welches aus Mikroorganismen des Genus Streptomyces abgeleitet ist.

Offenbarung der Erfindung

[0020] Die vornehmliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung von Phosphatidylserin mit einer langkettigen ungesättigten Fettsäureseitenkette in einer relativ simplen Art und Weise, die weniger Schritte zur Überwindung der oben erwähnten Probleme erfordert.

[0021] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur leichten Herstellung von Phosphatidylserin eines solchen Typs bereitzustellen, der als Fettsäurestruktur eine langkettige ungesättigte Fettsäure mit einer n-3- oder n-6-Gruppe aufweist.

[0022] In Übereinstimmung mit einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird daher ein Verfahren zur Erzeugung von Phosphatidylserin bereitgestellt, welches eine wie in Anspruch 1 genannte langkettige ungesättigte

Fettsäurekette umfasst. Die so hergestellten Phosphatidylserine können hervorragende Verbesserer der Gehirntätigkeit sein, welche eine Vielzahl von Summation oder synergistischen Effekten von beiden, Phosphatidylserin und der langkettigen ungesättigten Fettsäure, aufweisen, da sie eine Fülle von langkettigen ungesättigten Fettsäuren aufweisen.

[0023] Natürliches Lecithin, welches insbesondere für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet ist, enthält zumindest eine der langkettigen ungesättigten Fettsäuren, welche aus der Gruppe bestehend aus der n-3-Gruppe wie beispielsweise Alphalinolensäure, Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) und der n-6-Gruppe wie beispielsweise Linolsäure, Gamma-Linolensäure und Arachidonsäure ausgewählt ist. Diese langkettigen ungesättigten Fettsäuren weisen einen Verbesserungseffekt der Lernfähigkeit und eine Vielzahl von physiologischen Aktivitäten auf. So können die aus solchem natürlichem Lecithin erhaltenen und diese langkettigen ungesättigten Fettsäuren umfassenden Phosphatidylserine Verbesserungseffekte der Lernfähigkeit und einer Vielzahl von physiologischen Aktivitäten aufweisen.

[0024] Deshalb kann im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung hergestelltes Phosphatidylserin ein Gehirntätigkeitsverbesserer sein, welcher in einer summations- oder synergistischen Art und Weise den Effekt der Gehirntätigkeitsverbesserung des Phosphatidylserins selbst und oben erwähnte andere Effekte der langkettigen ungesättigten Fettsäuren zeigt, die in den Molekülen derselben enthalten sind.

[0025] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist das eine langkettige ungesättigte Fettsäure in der Seitenkette tragende Phosphatidylserin einfach durch nur eine einzige Stufe der Transphosphatidylierungsreaktion hergestellt, ohne durch eine Reihe von komplexen und mehrstufigen Reaktionen oder chemischen Syntheseprozessen der konventionellen Methoden zu bedürfen. In Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kann deshalb ein Gehirntätigkeitsverbesserer, welcher die Wirksamkeit von sowohl einer langkettigen ungesättigten Fettsäure als auch Phosphatidylserin in einer Summation oder synergistischen Art und Weise aufweist, mit Sicherheit geeignet für die Verwendung in Lebensmittelanwendungen – wie vergleichbar mit der konventionellen Methode – industriell vorteilhaft hergestellt werden.

[0026] Da der Gehalt der langkettigen ungesättigten Fettsäure, welche wie oben beschrieben physiologische Aktivitäten aufweist und in dem fraglichen Phosphatidylserin enthalten ist, vorzugsweise so hoch wie möglich ist, sollte natürliches Lecithin, welches als das Substrat in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, vorzugsweise derart ausgewählt sein, dass es soviel langkettige ungesättigte Fettsäure wie möglich enthält.

[0027] Damit das natürliche Lecithin hochgradig viel einer langkettigen ungesättigten Fettsäure an der Betaposition enthält, ist es bevorzugt, ein aus Seefisch extrahiertes Lecithin zu verwenden, welches eine langkettige ungesättigte Fettsäure im Körpergewebe, insbesondere im Kopfgewebe enthält, wie beispielsweise aus Thunfischen, Blaufischen, Makrelen, Sardinen, makrelenartige Fischen (Scombroiden), Makrelenhechten (Sauries), Stöckerfischen (Horse Mackerels) und Bastardmakrelen (Saurels) oder ein aus den Eiern von Hennen extrahierten Eigelblecithin, die hervorgebracht sind mit Futtermitteln, welche eine langkettige ungesättigte Fettsäure enthalten.

[0028] Um in der Praxis Eigelb-Lecithin mit hohem Gehalt an langkettiger ungesättigter Fettsäure wie beispielsweise Gammalinolenat, Alphalinolenat, Arachidonat und Docosahexaenat zu erhalten, ist ein simples gebräuchliches Verfahren zum Erhalten des Eigelblecithins die Verwendung von Eiern von Hennen, welche mit Futtermittel gefüttert wurden, dem Fischöl und/oder Pflanzenöl zugesetzt wurde, welches solch eine langkettige ungesättigte Fettsäure enthält. Zum Beispiel kann Sesamöl als ein solches Pflanzenöl verwendet werden. So kann das eine Fülle der langkettigen ungesättigten Fettsäure aufweisendes Eigelblecithin aus dem Eigelb extrahiert werden, welches von Hennen erhalten wird, die mit einem eine langkettige ungesättigte Fettsäure enthaltenden Futtermittel gefüttert werden.

[0029] Dieses natürliche Lecithin enthält in erster Linie spezifische Phospholipide, d. h. Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin, und zusätzlich in manchen Fällen Phosphatidylglyerin. So kann nicht nur das natürliche Lecithin als Substrat zur Reaktion verwendet werden, sondern auch zu spezifischen Phospholipiden, wie beispielsweise Phosphatidylcholin oder Phosphatidylethanolamin, fraktioniertes und konzentriertes Lecitin kann als ein Substrat für die Reaktion der Transphosphatidylierung verwendet werden.

[0030] Ein gewünschtes Lecithin ist aus der oben erwähnten Vielzahl von natürlichem Lecithin und dem konzentrierten Extrakt daraus ausgewählt und mit Phospholipase-D in Anwesenheit von Serin zur Durchführung der Transphosphatidylierung unter Verwendung des Serins als ein Rezeptor daraus umgesetzt, sodass Phosphatidylserine mit einer Fülle einer langkettigen ungesättigten Fettsäure der gewünschten Art erhalten werden können.

Beste Art zur Durchführung der Erfindung

Beispiel 1:

[0031] In dem ersten Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung wurde Phosphatidyl-L-Serin unter Verwendung von DHA beinhaltendem Eigelblecithin als Ausgangsmaterial hergestellt. Das hierbei verwendete Ei-

gelblecithin wurde aus Eiern von Hennen extrahiert, die mit Futtermittel gefüttert wurden, welches mit Fischöl und Pflanzenöl, das langkettige ungesättigte Fettsäuren enthält und kommerziell erhältlich ist, versetzt war.

[0032] Zunächst wurde ein Gramm des Eigelblecithins enthaltend 10 DHA, 2 ml an Ethylacetat, 400 µL einer Lösung enthaltend 120 mg von L-Serin und 300 µL einer Enzymlösung mit 150 U Phospholipase-D (Handelsname: Phospholipase-D-Y1; vertrieben durch Yakult Honsha Co. Ltd., Japan) hergestellt und in einem Gefäß unter einer Stickstoffatmosphäre abgeschlossen, danach mit Schütteln zur Inkubation bei 50°C für 10 Stunden zur Durchführung einer Transphosphatilierungsreaktion gerührt.

[0033] Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gefäß gekühlt und die am Boden des Gefäßes präzipitierte Paste in Chloroform gelöst. Die so erhaltene Lösung wurde mittels Dünnschichtchromatography (verwendetes Laufmittel enthielt Chloroform : Methanol : Essigsäure im Volumenverhältnis von 13 : 5 : 2) getrennt. Dittomerlesterreagenz wurde auf die Dünnschichtbasis gesprüht, damit sie Phosphorfarben entwickelt, um das Phospholipid unter Verwendung eines Bildanalyseapparates (Image Analyzer) (Handelsname: Geru-hakase, kommerziell erhältlich bei Mitani Trading Co., Ltd., Japan) zu analysieren. Als Ergebnis der Analyse wurde die Ausbildung von 27,2% Phosphatidyl-L-Serin festgestellt.

[0034] Auch wurde die fixierte Phase der Banden von Phosphatidyl-L-Serin auf der Dünnschicht abgelöst und mit Chloroform extrahiert. Danach wurde die Phospholipidfraktion von den Extrakten durch Mittel der Kapillarsäulenchromatography getrennt. Durch die Ergebnisse der Analyse wurde bestätigt, dass das so erhaltene Phospholipid 13% an DHA (22 Kohlenstoffatome, 6 Doppelbindungen) enthält.

[0035] Wie oben angeführt wurde DHA enthaltendes Eiweißlecithin als Reaktionssubstrat für die Transphosphatidylierungsreaktion mit Phospholipase-D verwendet, wobei Phosphatidyl-L-Serin, welches DHA enthält, hergestellt wird.

[0036] Die unten stehende Tabelle 1 zeigt, dass das Produkt 13% DHA (C22 : 6), etwa 3% Linolsäure (C18 : 2) und etwa 6% Arachidonsäure (C20 : 4) enthält.

Beispiel 2:

[0037] In dem zweiten Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung wurde Phosphatidyl-L-serin durch Verwendung eines aus dem Kopfmuskelgewebes des Gelbflossenthunfisches (Thunnus Albacares) gewonnenen Lecithins hergestellt.

[0038] Zunächst wurde der Kopf des Gelbflossenthunfisches (etwa 1,6 Kg) zermahlen, pulverisiert und gefriergetrocknet, um ein trockenes Pulver davon zu erhalten. Danach wurden zu 100 g des Pulvers ein Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol, Hexan und Wasser (in einem Volumenverhältnis von 10 : 20 : 3) hinzugefügt, um die Lipidfraktion zu extrahieren. Das Extrakt wurde konzentriert und im Vakuum getrocknet. Die so erhaltene, getrocknete Lipidfraktion (18 g) wurde zu Aceton hinzugefügt und mit Eis gekühlt. Das Präzipitat wurde getrocknet, um etwa 300 mg Phospholipid zu ergeben.

[0039] Dieses Phospholipid verwendend, wurde Phosphatidyl-L-Serin hergestellt. Genauer wurden 100 g des durch den obigen Prozess erhaltenen Phospholipids, 2 mL Ethylacetat, 400 µL einer 120 mg L-Serin enthaltenden Lösung und 300 µL einer Enzymlösung mit 15 U Phospholipase-D (Handelsname : Phospholipase-D-Y1; hergestellt durch Yakult Honsha Co. Ltd., Japan) hergestellt und in einem Gefäß unter einer Stickstoffatmosphäre abgeschlossen, dann mit Schütteln gerührt, um bei 50°C für 10 Stunden zur Durchführung der Transphosphatidylierungsreaktion zu inkubieren.

[0040] Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gefäß gekühlt und eine Paste, welche auf dem Boden des Gefäßes präzipitiert worden war, mit Mitteln der Dünnschichtchromatography und Bildanalyse in einer ähnlich wie unter Beispiel 1 beschriebenen Art und Weise analysiert. Als ein Ergebnis der Analyse wurde festgestellt, dass 34,5% Phosphatidyl-L-serine in dem Phospholipid ausgebildet worden sind.

[0041] Ferner wurde in einer ähnlichen wie unter Beispiel 1 beschriebenen Art und Weise die fixierte Phase der Bande von Phosphatidyl-L-Serin auf der Dünnschicht abgetragen und mit Chloroform extrahiert, und die Phospholipidfraktion wurde von den Extrakten durch Mittel der Kapillarsäulenchromatography separiert. Die Analyse der Fettsäure zeigte, dass – wie in der nachfolgenden Tabelle 1 dargestellt – das Phospholipid etwa 45% DHA (C22 : 6) und 4% EPA (C20 : 5) beinhaltet.

[0042] Wie in Beispiel 2 dargelegt, wurde ein aus einem Kopf eines Gelbflossenthunfisches extrahiertes Lecithin als ein Substrat für die Reaktion verwendet, und Phosphatidyl-L-serin, welches in hohem Maße DHA enthält, wurde durch die Transphosphatidylierungsreaktion des Substrates mit Phospholipase-D erhalten.

Beispiel 3:

[0043] In dem dritten Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung wurde Phosphatidyl-L-serin unter Verwendung eines Ausgangsmaterials oder Lecithins, erhalten aus dem Kopfmuskelgewebe eines Großaugenthunfisches (Thunnus Obesus), hergestellt.

[0044] Zunächst wurden etwa 1,2 kg des Kopfes des Großaugenthunfisches zermahlen, pulverisiert und ge-

friergetrocknet, um ein getrocknetes Pulver des Thunfischkopfes zu ergeben. Danach wurden 100 g des Pulvers einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol, Hexan und Wasser (mit einem Volumenverhältnis von 10 : 20 : 3) hinzugefügt, um eine Lipidfraktion zu extrahieren. Das Extrakt wurde konzentriert und im Vakuum getrocknet. Die so erhaltene getrocknete Lipidfraktion (10 g) wurde zu Aceton hinzugefügt und mit Eis gekühlt. Danach wurde das so entwickelte Präzipitat getrocknet, um etwa 250 mg Phospholipid zu ergeben.

[0045] Dieses Phospholipid verwendend wurde Phosphatidyl-L-serin hergestellt. Genauer wurden 100 mg des durch den obigen Prozess erhaltenen Phospholipids, 2 mg Ethylacetat, 400 µL einer Lösung suspendierend 120 mg L-Serin und 300 µL einer 150 U Phospholipase-D (Handelsname: Phospholipase-D-Y1; hergestellt durch Yakult Honsha Co. Ltd., Japan) enthaltenden Enzymlösung, und 5 mg $CaCl_2$ angefertigt und in einem Gefäß unter einer Stickstoffatmosphäre abgeschlossen, dann mit starkem Schütteln zur Inkubation bei 50°C für 10 Stunden gerührt, um eine Transphosphatidylierungsreaktion durchzuführen.

[0046] Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gefäß gekühlt und eine Paste, welche auf dem Boden des Gefäßes präzipitiert worden war, durch Mittel der Dünnschichtchromatography und Bildanalyse in einer ähnlich wie die oben unter Beispiel 1 genannten Art und Weise analysiert. Als ein Ergebnis der Analyse wurde festgestellt, dass 82% Phosphatidyl-L-serin in dem Phospholipid ausgebildet worden waren.

[0047] Ferner wurde in einer ähnlich wie in Beispiel 1 beschrieben Art und Weise die fixierte Phase der Bande von Phosphatidy-L-Serin auf der Dünnschicht abgetragen und mit Chloroform extrahiert, und die Phospholipidfraktion wurde von den Extrakten durch Mittel der Kapillarsäulenchromatography separiert. Die Analyse der Fettsäure zeigte, dass sie – wie nachfolgend in Tabelle 1 gezeigt – einen hohen Gehalt (etwa 88%) an EPA (C20 : 5) bei einem Gehalt an DHA (C22 : 6) von 3% aufwies.

[0048] Wie in Beispiel 3 dargelegt, wurde ein aus dem Kopf eines Großaugenthunfisches extrahiertes Lecithin als ein Substrat für die Reaktion verwendet und Phosphatidyl-L-Serin, insbesondere mit einem hohen Gehalt an EPA, durch die Transphosphatidylierungsreaktion mit Phospholipase-D erhalten.

Beispiel 4:

[0049] In dem vierten Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung wurde Phosphatidyl-L-serine unter Verwendung eines Ausgangsmaterials oder Lecithins, erhalten aus dem Kopfmuskelgewebe eines Salzwasserblaufisch (Katasuwonus pelamis), hergestellt.

[0050] Zunächst wurden etwa 0,5 kg des Kopfes des Salzwasserblaufisches pulverisiert und gefriergetrocknet, um ein getrocknetes Pulver des Fischkopfes zu ergeben. Danach wurden 100 g des Pulvers einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol, Hexan und Wasser (mit einem Volumenverhältnis von 10 : 20 : 3) hinzugefügt, um eine Lipidfraktion zu extrahieren. Das Extrakt wurde konzentriert und im Vakuum getrocknet. Die so erhaltene getrocknete Lipidfraktion (11 g) wurde zu Aceton hinzugefügt und mit Eis gekühlt. Danach wurde das Präzipitat getrocknet, um etwa 300 mg Phospholipid zu ergeben.

[0051] Dieses Phospholipid verwendend wurde Phosphatidyl-L-serin hergestellt. Genauer wurden 100 mg des durch den obigen Prozess erhaltenen Phospholipids, 2 mg Ethylacetat, 400 µL einer Lösung enthaltend 120 mg L-Serin und 300 µL einer 15 U Phospholipase-D (Handelsname: Phospholipase-D-Y1; hergestellt durch Yakult Honsha Co. Ltd., Japan) enthaltenden Enzymlösung angefertigt und in einem Gefäß unter einer Stickstoffatmosphäre abgeschlossen, dann mit Schütteln zur Inkubation bei 50°C für 10 Stunden gerührt, um eine Transphosphatidylierungsreaktion durchzuführen.

[0052] Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gefäß gekühlt und eine Paste, welche auf dem Boden des Gefäßes präzipitiert worden war, durch Mittel der Dünnschichtchromatography und Bildanalyse in einer ähnlich wie die oben unter Beispiel 1 genannten Art und Weise analysiert. Als ein Ergebnis der Analyse wurde festgestellt, dass 34% Phosphatidyl-L-serin in dem Phospholipid ausgebildet worden waren.

[0053] Ferner wurde in einer ähnlich wie in Beispiel 1 beschrieben Art und Weise die fixierte Phase der Bande von Phosphatidy-L-Serin auf der Dünnschicht abgetragen und mit Chloroform extrahiert, und die Phospholipidfraktion wurde von den Extrakten durch Mittel der Kapillarsäulenchromatography separiert. Die Analyse der Fettsäure zeigte, dass die Gehalte – wie nachfolgend in Tabelle 1 gezeigt – an DHA (C22 : 6) etwa 45% und an EPA (C20 : 5) etwa 8% waren.

[0054] Wie in Beispiel 4 dargelegt, wurde ein aus dem Kopf eines Salzwasserblaufisches extrahiertes Lecithin als ein Substrat für die Reaktion verwendet, und DHA und EPA enthaltendes Phosphatidyl-L-Serin wurde durch die Transphosphatidylierungsreaktion mit Phospholipase-D erhalten.

[0055] Die nachfolgende Tabelle 1 zeigt die Gehalte einer jeden Art der Fettsäure (FA) in dem nach den obigen Beispielen 1 bis 4 erhaltenen Phosphatidyl-L-Serin.

Tabelle 1

FA Art (C: Doppel-bindungen)	Gehalte von FA in Phosphatidyl-L-Serin (%)			
	Beispiel 1	Beispiel 2	Beispiel 3	Beispiel 4
C16:0	30	30	3	20
C18:0	8	--	--	--
C18:1	22	18	4	12
C18:2	3	--	--	--
C18:3	2	--	--	--
C20:4	6	--	--	--
C20:5	--	4	88	8
C22:6	13	45	3	45

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung von Phosphatidylserin mit einer langkettigen ungesättigten Fettsäurekette, in dem ein naturliches Lecithin als Substrat verwendet wird und Phospholipase-D in Anwesenheit von L-Serin auf das natürliche Lecithin angewendet wird, um eine Transphosphatidylierungsreaktion zu verursachen, **dadurch gekennzeichnet**, dass das natürliche Lecithin mindestens ein Lecithin enthält, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
(a) einem Lecithin, das aus Kopfgewebe von Seefisch extrahiert ist;
(b) einem Eigelb-Lecithin, das aus Eiern von Hennen extrahiert ist, die mit Fischöl und/oder Pflanzenöl, das langkettige ungesättigte Fettsäuren enthält, gefüttert worden sind;
(c) Phosphatidylcholinen, die aus dem Lecithin (a) oder (b) fraktioniert und konzentriert worden sind, und
(d) Phosphatidylethanolaminen, die aus dem Lecithin (a) oder (b) fraktioniert und konzentriert worden sind.
und dass das natürliche Lecithin als Substrat für eine Einstufenreaktion der Transphosphatidylierung verwendet wird, um durch die Einstufen-Transphosphatidylierungsreaktion ein Phosphatidyl-L-Serin mit einer Seitenkette zu erzeugen, die aus einer langkettigen ungesättigten Fettsäure mit einer n-3- oder n-6-Gruppe zusammengesetzt ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Fisch ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Thunfisch, Blaufisch, Makrele, Sardine, makrelenartigem Fisch und Stöckerfisch.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Pflanzenöl Sesamöl ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die einzige Stufe der Transphosphatidylierungsreaktion bei einer Temperatur von 50°C und über eine Reaktionszeit von 10 Stunden stattfindet.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen