

(19)



(10)

LT 4550 B

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

-
- (11) Patent numeris: **4550**
- (51) Int. Cl.⁶: **C12P 7/64**
A61K 31/20
A23L 1/30
- (21) Paraiškos numeris: **99-005**
- (22) Paraiškos padavimo data: **1999 01 18**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1999 06 25**
- (45) Patent paskelbimo data: **1999 10 25**
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/JP97/01946**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1997 06 06**
- (85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1999 01 19**
- (31, 32, 33) Prioritetas: **8/193516, 1996 07 23, JP**
- (72) Išradėjas:
Satohiro Tanaka, JP
Toshiaki Yaguchi, JP
Sakayu Shimizu, JP
Tsutomu Sogo, JP
Shigeaki Fujikawa, JP
- (73) Patent savininkas:
NAGASE BIOCHEMICALS, LTD,
1-17, Shinmachi 1-chome, Nishi-ku, Osaka-shi, Osaka 550-91, JP
SUNTORY LIMITED,
1-40, Dojimahama, 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530, JP
NAGASE & CO, LTD,
1-17, Shinmachi 1-chome, Nishi-ku, Osaka-shi, Osaka 550-91, JP
- (74) Patentinis patikėtinis:
Tania Sterlina, 37, Naugarduko g. 34-10, 2600 Vilnius, LT
- (83) Mikroorganizmo deponavimas:
FERM BP-5601, National Institute of Bioscience and Human Technology,
Agency of Industrial Science and Technology, JP
-

(54) Pavadinimas:

Dokozaheksaeno rūgštis ir dokozaheksaeno rūgštis gavimo būdas

(57) Referatas:

Išradime atskleidžiamas lipidų, kurie savo sudėtyje turi dokozaheksaeno rūgštį (DHR) ir/arba dokozaheksaeno rūgštį (DPR), gavimo būdas. Šis procesas apima mikroorganizmo, priklausančio genus Ulkenia, turintį savybę gaminti DHR ir/arba DPR, kultivavimą maitinamojoje terpėje ir lipidų išskyrimą iš kultūros. Būdas taip pat apima DHR ir/arba DPR išskyrimą iš lipidų.

10

15

Technikos sritis

20 Išradime aprašomas lipidų, turinčių dokozaheksaeno (toliau vadiname ją "DHR") ir/arba dokozapentaeno (toliau vadiname ją "DPR") rūgštis, gavimo būdas, kultivuojant mikroorganizmą, o taip pat DHR ir/arba DPR gavimo būdas iš lipidų. Išradime taip pat yra aprašomas mikroorganizmas, priklausantis genus Ulkenia ir turintis savybę sintezuoti lipidus.

25

Technikos lygis

30

DHR yra žuvų taukuose, pagamintuose iš žuvų, priklausančių mėlynųjų žuvų grupei. Ypatingai daug DHR yra sardinių ir tunų žuvų taukuose, kuriuose DHR yra apie 20 %.

35 Pastoruoju metu dėl žuvų audinių, turinčių aukštą DHR koncentraciją, tokių kaip tuno akiduobių riebalas, atradimo arba dėl technologinio progreso, gaminant labai išvalytas riebiąsias rūgštis, intensyviai norima paaikškinti DHR fiziologines funkcijas ir ištirti jos praktinį panaudojimą. DHR fiziologinės funkcijos apima cholesterolio kiekio mažinimą, antikoaguliacinę ir karcinostatinę poveikius. Ryšium su metaboline smegenų sistema, DHR gerina atmintį, mokymosi procesą, stabdo senilinę demenciją ir gydo Alzheimerio ligą. Priedo 40 įrodyta, kad DHR yra vertinga riebioji rūgštis, stimuliojanti mailiaus augimą. Dėl aukščiau išvardintų savybių DHR yra naudojama įvairiame maiste, pašaruose ir masale.

45 DPR įeina į žuvų taukų sudėtį, nors jos kiekis yra labai mažas. Dauguma DPR fiziologinių funkcijų iki šiol yra nežinomos. Vienintelė žinoma DPR fiziologinė funkcija yra jos gebėjimas pernešti farmacinius agentus į smegenis [Japanese Patent Publication (Kokai) No. 61- 204136 (1986)]. Bet yra tikimasi, kad DPR gali veikti fiziologinius procesus gyvūno kūne, nes yra žinoma, kad

- 5 DPR kompensuoja DHR trūkumą gyvūno kūne [Homayou et al., J. Neurochem., 51:45 (1988); Hamm et al., Biochem. J., 245:907 (1987); ir Rebhung et al., Biosci. Biotech. Biochem., 58:314 (1994)].

Yra keletas nepatogumų, išskiriant DHR ir/arba DPR iš žuvų taukų, pavyzdžiui, mažas norimų riebiųjų rūgščių kiekis, taip pat neįmanoma palaikyti
10 pastovaus žuvų taukų šaltinio dėl žuvų migracijos arba dėl blogo kvapo, kuris būdingas žuvų taukams. Be to, yra sunku išskirti geros kokybės lipidus, nes
žuvų taukai turi kitų riebiųjų rūgščių priemaišų, tokių kaip arachidono (ARR) ir eikozapentaeno (EPR) rūgštys, kurios oksiduoja lipidus.

Be žuvų taukų, lipidai kaupiasi mikroorganizmo, turinčio savybę
15 sintezuoti DHR ir/arba DPR, kultivuotose ląstelėse ir laikomo DHR ir/arba DPR šaltiniu. Pavyzdžiui, yra žinomi šie mikroorganizmai, sintezuojantys DHR ir/arba DPR : Vibrio marinus ATCC 15381, tai yra bakterija, išskirta iš giliųjų vandenų; Vibrio bakterija, išskirta iš giliavandenių žuvų žarnų; flagellate grybeliai, tokie kaip Thraustochytrium aureum 34304, Thraustochytrium sp.
20 ATCC 28211, ATCC 20890 ir ATCC 20891, Schizochytrium sp., ATCC 20888 ir ATCC 20889 (U S patentas Nr. 5340742), Traustochytrium SR21 kamienas (Nippon Nogei Kagaku Kaishi, vol. 69, extra edition. July 5, 1995), ir Japonochytrium sp. ATCC 28207 [Japanese Patent Publication (Kokai) Nr. 1-199588 (1989)]; mikroskopiniai jūros dumbliai, tokie kaip Cyclotella cryptica,
25 Crypthecodinium cohnii [Japanese Patent Publication (Kohyo) Nr. 5-503425 (1993)], ir Emiliana sp. [Japanese Patent Publication (Kokai) Nr. 5-308978 (1993)].

Naudojant bet kurį iš aukščiau išvardintų mikroorganizmų, iškyla keletas problemų, pavyzdžiui, maža DHR ir/arba DPR išeiga, nes, norint gauti
30 pakankamą DHR ir/arba DPR kiekį, reikalingi prailgintas kultivavimo periodas, specifinės maitinamosios terpės naudojimas arba specialios kultivavimo sąlygos. Kai sintezei yra naudojami jūros dumbliai, tokie kaip Emiliana sp., DHR gali būti gauta su gera išeiga, nors gali iškilti ir sunkumų, nes kultivavimą apsunkina šviesa, kuri yra būtina šiam procesui. Tai reiškia, kad šis procesas yra nepatogus
35 pramoniniam naudojimui.

Šiame išradime aprašoma galimybė sintezuoti DHR ir/arba DPR, o taip pat lipidus, turinčius DHR ir/arba DPR, naudojant nebrangią ir patogią maitinamąją terpę ir paprastus gamybos būdus, per trumpą laiką ir su gera išeiga.

40 Šiame išradime taip pat aprašoma lipidų, turinčių DHR ir/arba DPR, gamyba kultivuojant maitinamojoje terpėje mikroorganizmą, priklausančią genus Ulkenia, turintį savybę sintezuoti DHR ir/arba DPR ir išskirti lipidus iš kultūros.

Išradime taip pat aprašomas DHR ir/arba DPR gamybos būdas kultivuojant maitinamojoje terpėje mikroorganizmą, priklausančią genus Ulkenia,
45 turintį savybę sintezuoti DHR ir/arba DPR, išskiriant lipidus iš kultūros ir atskiriant DHR ir/arba DPR nuo lipidų.

IŠRADIMO ESMĖ

Pagal šį išradimą lipidų, turinčių savo sudėtyje dokozaheksaeno rūgštį ir dokozapentaeno rūgštį, gavimo būdas susideda iš mikroorganizmo, priklausančio genus Ulkenia ir turinčio savybę produkuoti lipidus, turinčius dokozaheksaeno rūgštį ir dokozapentaeno rūgštį, kultivavimo terpėje ir šių lipidų išskyrimo iš kultūros.

Pagal šį išradimą dokozaheksaeno rūgšties gavimo būdas susideda iš mikroorganizmo, priklausančio genus Ulkenia ir turinčio savybę produkuoti lipidus, turinčius dokozaheksaeno rūgštį, kultivavimo terpėje, šių lipidų išskyrimo iš kultūros, ir minėtos dokozaheksaeno rūgšties atskyrimo nuo minėtų lipidų.

Pagal šį išradimą dokozapentaeno rūgšties gavimo būdas susideda iš mikroorganizmo, priklausančio genus Ulkenia ir turinčio savybę produkuoti lipidus, turinčius dokozapentaeno rūgštį, kultivavimo terpėje, šių lipidų išskyrimo iš kultūros, ir minėtos dokozapentaeno rūgšties atskyrimo nuo minėtų lipidų.

Išradime aprašomos mikroorganizmo, priklausančio genus Ulkenia, turinčio lipidų, kurių sudėtyje yra dokozaheksaeno rūgšties ir/arba dokozapentaeno rūgšties, ląstelės.

Išradime aprašomas Ulkenia sp. SAM 2179 kamienas, kuris turi savybę sintezuoti lipidus, turinčius dokozaheksaeno rūgštį ir dokozapentaeno rūgštį.

Išradimas aprašo maistą su maistingaisiais priedais, kompoziciją, tinkamą kūdikių mitybai, kompoziciją, tinkamą neišnešiotų kūdikių mitybai, vaikų maistą, nėščių ir besilaukiančių moterų maistą, senyvo amžiaus žmonių maistą, enterinį agentą, skirtą maitinimui skatinti, gyvulių pašarą, gyvulių pašaro priedą, ir masalą skirtą mikroorganizmų mitybai, turinčių lipidų, gautų pagal bet kurį iš aukščiau minėtų būdų.

Pagal šį išradimą struktūrizuotų peptidų, turinčių dokozaheksaeno rūgštį ir dokozapentaeno rūgštį, gavimo būdas susideda iš mikroorganizmo, priklausančio genus Ulkenia ir turinčio savybę produkuoti lipidus, turinčius dokozaheksaeno rūgštį ir dokozapentaeno rūgštį, kultivavimo terpėje, šių lipidų išskyrimo iš kultūros, šių lipidų apdorojimo grybeline lipaze tam, kad paverstų riebiąsias rūgštis 1 ir 3 padėtyse, į vidutinio ilgio grandinės riebiąsias rūgštis (C: 8-12, žiūr. "SEIKAGAKUJITEN" (second edition) pp. 834, TOKYO KAGAKUDOJIN (1990)).

5

TRUMPAS FIGŪRŲ APRAŠYMAS

Fig. 1 pavaizduota triacilglicerolių skysčių chromatograma neutraliame lipide, sintezuotame naudojant šiame išradime aprašytą gavimo būdą.

10

IŠRADIMO ĮGYVENDINIMO BŪDAS

Šis išradimas smulkiau yra aprašomas žemiau. Kaip čia naudojamas terminas “dokozaheksaeno rūgštis” arba “DHR” yra priskiriamas prie dokozaheksaeno rūgšties (n-3) serijos. Kaip čia naudojamas terminas “dokozapentaeno rūgštis” arba “DPR” priskiriamas prie dokozapentaeno rūgšties (n-3) ir/arba (n-6) serijų. Terminai “riebalai”, “lipidai” ir “aliejai” yra naudojami tomis pačiomis reikšmėmis.

Bet kurie mikroorganizmai, priklausantys genus Ulkenia, gali būti naudojami šiame išradime gaminant DHR ir/arba DPR tol, kol jie galės sintezuoti DHR ir/arba DPR. Pavyzdžiui, gali būti naudojami Ulkenia sp. SAM 2180 ir SAM 2179 kamienai, išskirti šio išradimo autorių iš jūros vandenų. Tarp šių kamienų SAM 2179 turi savybę sintezuoti abi rūgštis, DHR ir DPR, žymiai didesniais kiekiais. Šitas kamienas buvo deponuotas Nacionaliniame Biologijos ir Žmogaus Technologijos Institute, Pramonės Mokslo ir Technologijos Agentūroje (adresas: 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN), 23 liepos, 1996 metais, gaunant inventarinį numerį FERM BP-5601.

Ulkenia sp. SAM 2179 ir SAM 2180 kamienų mikologinės charakteristikos yra šios. Kai šie mikroorganizmai buvo kultivuojami skystoje KMV maitinamojoje terpėje (Fuller. M. and A. Jaworski eds. ; Zoosporic Fungi in Teaching & Research VII, 303 pp., 1987. Southern Publishing Corporation, Athens) 20°C temperatūroje ir tamsoje, buvo pastebėtos rutulio formos arba apvalios ląstelės, taip pat buvo matomos dvižiūželinės zoosporos. Tačiau ektoplazminis filamentų tinklas nebuvo matomas. Tokiu būdu, šie mikroorganizmai buvo suklasifikuoti kaip grybeliai ir priskirti prie Thraustochytriales, remiantis “Icons of the Japanese Water Mould with Precise Explanation” autorių Yosio Kobayasi ir Kazuko Konno (autorių išleista asmeniškai jų lėšomis, p.169, 1986). Be to, šitie mikroorganizmai sudarė rizoidus, trūkstant apofizių, ir sudarė į amebas panašios formos ląsteles KMV skystoje terpėje. Todėl jie (mikroorganizmai) buvo identifikuoti kaip grybeliai ir priskirti prie genus Ulkenia, o du išskirti buvo pažymėti kaip Ulkenia sp. SAM 2179 ir SAM 2180, atitinkamai.

Mikroorganizmas, priskirtas genus Ulkenia, kuris panaudojamas šio išradimo būde, nėra apribotas tik laukinio-tipo kamieniu, bet taip pat gali apimti ir mutantus arba rekombinantinius kamienus. Tokiu būdu, mutantinių arba rekombinantinių kamienų panaudojimas, norint gauti pakankamą kiekį DHR ir/arba DPR, yra išradimo sferos ribose. Tokios mutantinės arba

5 rekombinantinės gentys apima mikroorganizmus, turinčius didesnę DHR ir/arba DPR procentinę koncentraciją lipiduose, didesnę bendrą lipidų kiekį arba jų abiejų (ir lipidų, ir rūgščių kiekį), palyginant procentinę koncentraciją DHR ir/arba DPR arba lipidų kiekį, kurie gaminami originalaus laukinio tipo kamieno, naudojant tuos pačius substratus. Pagal šį laukinio tipo kamienas, turi ne mažiau
10 kaip 25 % DHR ir/arba 5 % DPR, pageidautina 40-48 % DHR ir/arba 8-13 % DPR lipiduose. Be to, laukinio tipo kamienas, pagal šį išradimą, turi mažiau 3 g DHR ir/arba 0,5 g DPR, pageidautina 5 g DHR ir/arba 1g DPR viename maitinamosios terpės litre. Be to, yra aprašomi mikroorganizmai, skirti sintezuoti palyginamąjį kiekį DHR ir/arba DPR, su atitinkamu laukinio tipo
15 kamieniu ir ypač naudojant substratus, su didžiausiomis gamybos išlaidomis, yra taip pat aprašomi.

Mikroorganizmai, pagal šį išradimą, yra kultivuojami inokuliuojant skystą arba kietą maitinamąją terpę su mikroorganizmų pradine kultūra. Maitinamoji terpė gali turėti arba neturėti natūralaus arba dirbtinio jūros
20 vandens.

Bet koks anglies šaltinis, įskaitant, pavyzdžiui, bet neapribojant, tokių kaip gliukozė, fruktozė, ksilozė, sacharozė, maltozė, tirpstantis krakmolas, fukozė, gliukozaminas ir dekstras, taip pat oleino rūgštis, riebalai, tokie kaip sojos pupelių aliejus, glutaminino rūgštis, melasa, glicerolis, manitolis ir natrio
25 acetatas, gali būti naudojami kaip anglies šaltinis ir dedami į maitinamąją terpę.

Natūralūs azoto šaltiniai, tokie kaip peptonas, mielių ekstraktas, salyklo ekstraktas, mėsos ekstraktas, kasamino rūgštis ir kukurūzų ekstraktas, išdžiovintos sojos pupelės, organiniai azoto šaltiniai, tokie kaip natrio glutamatas ir karbamidas ir neorganiniai azoto šaltiniai, tokie kaip amonio
30 acetatas, amonio sulfatas, amonio chloridas ir amonio nitratas gali būti naudojami kaip azoto šaltinis.

Be to, fosfatai, tokie kaip kalio fosfatas ir kalio dihidrofosfatas, neorganinės druskos, tokios kaip amonio sulfatas, natrio sulfatas, magnio sulfatas, geležies sulfatas, vario sulfatas, magnio chloridas, kalcio chloridas ir
35 vitaminai reikalui esant gali būti pridėti kaip mikroelementai.

Šių komponentų kiekis maitinamojoje terpėje nėra specialiai nustatytas, jis turi būti toks, kad komponentų koncentracijos nepradėtų žalingai veikti mikroorganizmų augimą. Bendrai, anglies šaltiniai gali būti pridedami nuo 20 iki 180 g viename maitinamosios terpės litre koncentracijos ir azoto šaltiniai gali
40 būti pridėti nuo 0,6 iki 6 g viename maitinamosios terpės litre koncentracijos. Pageidautina, kad azoto šaltinio kiekis didėtų, atitinkamai augant anglies šaltinio kiekiui.

Po to, kai yra paruošta maitinamoji terpė, jos pH yra palaikomas tarp 3,0 ir 8,0, geriau tarp 3,5 ir 5,0, o idealiausiai tarp 3,5 ir 4,5, naudojant tinkamą
45 rūgštį arba šarmą, po to terpė sterilizuojama autoklave arba panašiai. Mikroorganizmo kultivavimas dažniausiai trunka nuo 2 iki 7 dienų, geriau, nuo 2 iki 5 dienų, nuo 10 iki 35°C, bet optimaliausiai nuo 17 iki 30°C, taip pat naudojami aeracija-maišymas, plakimas arba stacionarinė kultūra.

5 Be to, DHR ir/arba DPR pirmtakai gali būti pridėti į maitinamąją terpę, norint pagreitinti DHR ir/arba DPR sintezę. Pavyzdžiui, angliavandeniliai, tokie kaip tetradekanas, heksadekanas ir oktadekanas, riebiosios rūgštys, tokios kaip oleino rūgštis, linolo rūgštis ir α -linoleno rūgštis, arba druskos, pavyzdžiui, natrio arba kalio druskos arba jų esteriai naudojami kaip pirmtakai. Taip pat, gali
10 būti pridedami riebalai, turintys šitų riebiųjų rūgščių, kaip sudedamąją dalį (pavyzdžiui, alyvų aliejus, sojų pupų aliejus, medvilnės aliejus arba palmių aliejus). Šitie komponentai gali būti naudojami atskirai arba kombinuojant juos vieną su kitu.

Anglies šaltiniai, azoto šaltiniai, pirmtakai arba panašios medžiagos gali
15 būti dedami į maitinamąją terpę prieš arba kultivavimo metu. Šie komponentai gali būti dedami vieną kartą, pakartotinai arba dedami pastoviai.

Išskiriant praktiniam naudojimui pakankamą kiekį lipidų, turinčių DHR ir/arba DPR, geriausia yra naudoti skystą maitinamąją terpę ir kultivuoti su aeracija-maišymu. Gali būti naudojami tradicinis fermentatorius maišytuvas arba
20 fermentatoriaus barbatavimo kolonėlė.

Kultivuojant, kaip buvo aprašyta aukščiau, lipidai, turintys DHR ir/arba DPR, gaunami ir kaupiami ląstelėse. Kai yra naudojama skysta maitinamoji terpė, lipidai, turintys DHR ir/arba DPR, gali būti išskirti iš kultūros arba iš sterilizuotos kultūros, kultivavimo metu iš kultūros arba kultivavimo pabaigoje
25 sterilizuojant kultūrą, arba iš kultivuotų ląstelių, arba iš išdžiovintų ląstelių, pasirenkant bet kurią iš aukščiau aprašytų kultūrų. Į aukščiau panaudotą terminą "kultūra", įeina kultivuotos ląstelės, išdžiovintos kultivuotos ląstelės ir apdorotos kultivuotos ląstelės; taip pat mėsos buljono ląstelių kultūra ir supernatanto kultūra.

30 DHR ir/arba DPR gali būti atskirtos nuo lipidų, turinčių DHR ir/arba DPR išskirtų iš kultivuotų ląstelių, kaip išvardinta. Po kultivavimo ląstelės surenkamos iš kultūros bendrai priimtu kietos/skystos separacijos būdu, tokiu kaip centrifugavimas ir filtravimas. Ląstelės yra intensyviai plaunamos vandeniu ir geriausiai, kai jos paskui būtų išdžiovinamos. Ląstelių džiovinimui gali būti
35 panaudoti džiovinimas šalčiu, oru arba panašiai. Išdžiovintos ląstelės paskui suardomos, pavyzdžiui, naudojant presą arba ultragarsinį būdą ir lipidai išskiriami iš ląstelių, naudojant organinį tirpiklį, pageidautina, azoto aplinkoje. Gali būti naudojami organiniai tirpikliai, tokie kaip eteris, heksanas, metanolis, etanolis, chloroformas, dichlorometanas arba petrol eteris. Kintama ekstrakcija
40 metanoliu ir petrol eteriu arba ekstrakcija sumaišytų tirpiklių sistema, sudaryta iš chloroformo/metanolio/vandens, taip pat gali būti naudojama. Aukšta lipidų koncentracija, turinčiu DHR ir/arba DPR, gaunama išgarinus organinį tirpiklį iš ekstrakto sumažintame slėgyje.

Alternatyviai, gali būti atliekama šlapių ląstelių ekstrakcija. Šiuo atveju
45 tirpiklis, toks kaip metanolis ir etanolis, suderintas su vandeniu, arba sumaišytas tirpiklis, sudarytas iš alkoholio (alkoholių) ir vandens ir/arba gali būti naudojami kiti tirpikliai, suderinti su vandeniu. Kiti veiksmi atliekami taip, kaip buvo aprašyta aukščiau.

5 DHR kiekis lipiduose, gautos kaip buvo aprašyta aukščiau, siekia mažiausiai 3 g viename kultūros litre, geriausiai, 5 g viename kultūros litre. DPR kiekis lipiduose yra mažiausiai 0,7 g viename kultūros litre, optimaliausiai 1,0 g viename kultūros litre.

10 Lipiduose, pagamintuose kaip buvo aprašyta aukščiau, DHR ir/arba DPR yra pateikiama neutralių lipidų (pavyzdžiui, triacilglicerolio) arba polinių lipidų (pavyzdžiui, fosfatidilcholino, fosfatidiletanolamino arba fosfatidilinozitolio) formoje. Triacilglicerolių, turinčių DHR ir/arba DPR, valymas nuo lipidų, turinčių DHR ir/arba DPR, išskirtų iš kultūros, atliekamas standartiniais metodais, tokiais kaip ausinamoji separacija arba kolonėlių chromatografija.

15 Tipiška, kad neutralių lipidų kiekis šio išradimo lipiduose, kurie yra aprašomi mūsų išradime, yra labai aukštas (daugiau negu 90 % visų lipidų kiekio). Riebiųjų rūgščių neutraliuose lipiduose sudėties pavyzdys yra kaip išvardinta palmitino rūgštis : 30-38 % ; (n-3) DHR : 40-48 %; (n-6) DPR : 8-13 %; (n-3) EPR : 0-1 %; ARR : 0-0,6 %; kitos riebiosios rūgštys : 10-20 %.

20 Neutralūs lipidai, iš visų šio išradimo lipidų turi ne mažiau kaip 85 % triacilglicerolių, optimalus kiekis yra ne mažiau kaip 90 % triacilglicerolių. Diacilglicerolių ir monoacilglicerolių kiekis neutraliuose lipiduose yra labai žemas. Laisvo sterolio ir/arba sterolio esterio kiekis taip pat gaunamas 1-3 %. Šios tipiškos molekulinės rūšys yra randamos triacilgliceroliuose :

25 16 : 0-16 : 0-22 : 5, 16 : 0-16 : 0-22 : 6, 16 : 0-22 : 5-22 : 6, 16 : 0-22 : 6-22 : 6, 22 : 5-22 : 6-22 : 6 ir 22 : 6-22 : 6-22 : 6, kur pavyzdžiui, "16 : 0" reiškia riebiąją rūgštį, turinčią "16" anglies atomų ir neturinčią ("0") dvigubų jungčių. Įdomu tai, kad lipiduose, aprašytuose mūsų išradime, triacilgliceroliai sudaryti tik iš polineprisotintų riebiųjų rūgščių.

30 DHR ir/arba DPR atskiriami nuo lipidų, turinčių DHR ir/arba DPR, hidrolizuojant lipidus, vėliau koncentruojant ir atskiriant gautas sumaišytas riebiąsias rūgštis arba sumaišytus riebiųjų rūgščių esterius, pagamintus standartiniais metodais, tokiais, kaip karbamido pridėjimas, aušinamoji separacija arba kolonėlių chromatografija.

35 DHR ir/arba DPR, taip pat lipidai, turintys DHR ir/arba DPR, pagaminti kaip buvo aprašyta aukščiau, gali būti dedami į įvairų maistą, pašarus arba masalą, siekiant padidinti DHR ir/arba DPR stoką. Tokių maistų pavyzdžiai apima pavyzdžiui, maistiniai priedai, kurių sudėtis yra tinkama maitinant vaikus arba neišnešiotus kūdikius, sveikas maistas, funkcinis maistas (toks kaip enterinis faktorius virškinimui skatinti), kūdikių maistas, nėsčiųjų arba 40 maitinančių moterų maistas ir senyvo amžiaus žmonių maistas. Pašarai apima naminių gyvulių, tokių kaip kiaulės ir karvės maistą, naminių paukščių, tokių kaip vištos maistą ir maistą šunims, katėms ir panašiai, maistą žuvų augimui. Masalas apima, pavyzdžiui, tokius mikroorganizmus (taip vadinamus 45 zooplanktonus), kurie yra duodami kaip masalas kultivuojant žuvis ir moliuskus.

Pašarams ir masalui yra naudingiau ir ekonomiškiau naudoti išradime aprašytą mikroorganizmo kultūrą, ląsteles, išskirtas iš kultūros, arba ląstelių

5 liekanas po lipidų išskyrimo. Pavyzdžiui, mikroorganizmų ląstelės, kurios gamina DHR ir/arba DPR gali būti tiesiogiai panaudotos mailiaus (žuvies jaunikliai) maitinimui, vietoj netiesioginio jų maitinimo zooplanktonu arba panašiai. Šitos medžiagos, gali būti panaudotos reikalui esant po išdžiovinimo arba sterilizacijos.

10 Šiame išradime aprašyti lipidai gali būti naudojami DHR ir/arba DPR trūkumo korekcijai, pavyzdžiui, naminių paukščių kiaušiniuose, jaučiamas šitų rūgščių trūkumas, todėl tinka lesinti naminius paukščius, geriausiai lesinti viščiukus, skirtus kiaušinių perėjimui, maistu, turinčiu lipidų, aprašytų mūsų išradime. Kiaušinio trynio aliejus, kuris yra praturtintas DHR ir/arba DPR, irgi
15 gali būti gaminamas, ekstrahuojant aliejų iš tokių naminių paukščių kiaušinių arba iš kiaušinio trynio, naudojant bendrai priimtą metodą. Sudėtis, į kurios įeina kiaušinio trynio aliejus tinka vaikams, neišnešiotiems kūdikiams, kūdikiams, nėščiosioms ir maitinančioms moterims.

Ilgai buvo mėginama pagaminti miltelių pavidalo pieno kompoziciją
20 vaikams, kuris savo sudėtimi būtų panašus į moters pieną. Ypač yra svarbu, kad moters pieno pagrindiniai ingredientai (tai yra proteinais, riebalais ir cukrus) būtų tokie pat kaip ir miltelių pavidalo pieno ingredientai. Tai yra labai problematiška būtent dėl lipidų, nes paprastame miltelių pavidalo piene nepakanka polineprisotintų riebiųjų rūgščių, kurių pakankamai yra moters piene. Keletas
25 pranešimų apie polineprisotintas riebiasias rūgštis moters piene buvo paskelbti (polineprisotintos riebiosios rūgštys Amerikos, Europos ir Afrikos moterų piene, žiūrėk INFORM 6(8):940-946 (1995); polineprisotintos riebiosios rūgštys Japonų moterų piene, žiūrėk JPEN, 13 (9) : 765-772 (1991)).

Pastaruoju metu buvo akivaizdžiai įrodyta, kad ARR ir DHR, abi įeina į
30 moters pieno sudėtį ir yra efektyvios vaikų augimui ("Advances in Polyunsaturated Fatty Acid Research", Elsevier Science Publishers, pp. 261-264 (1993)). ARR ir DHR svarba ūgio didėjimui ir smegenų išsivystymui taip pat buvo aprašytos (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 1073-1077 (1993); Lancet, 344 : 1319-1322 (1994)).

35 Todėl yra padidėjęs dėmesys DHR ir ARR pridėjimui į modifikuotą pieną. Modifikuotu pienu, turinčiu žuvų taukų, kaip DHR šaltinį, jau prekiaujama. Žuvų taukai taip pat turi EPA, kuri vargu ar yra moters piene ir kuri, kaip buvo paskelbta, neigiamai veikia nepakankamai išsivysčiusių kūdikių augimą "Advances in Polyunsaturated Fatty Acid Research", Elsevier Science
40 Publishers, pp. 261-264 (1993)). Išradime aprašyti lipidai yra tinkami kaip modifikuoto pieno priedai, nes EPA kiekis juose yra ypač mažas, taip pat jie gali būti dedami į vaikišką maistą.

Išradime aprašyti lipidai gali būti dedami į maistą, tokį maistą su maistingaisiais priedais, senyvo amžiaus žmonių maistą arba sveiką maistą, kai
45 norima koreguoti DHR ir/arba DPR trūkumą arba pagerinti sveikatą. Maisto kompozicija gali būti skystos, kietos formos arba aliejinė. Geriausia, kai lipidų kiekis maiste yra nuo 0,001 iki 50 % masės, priklausomai nuo maisto rūšies, į kurį įdedami lipidai.

5 Maisto, turinčio aliejų pavyzdys apima natūralų maistą (tokį kaip mėsa, žuvis arba riešutai), maistą, į kurį lipidai įdedami gaminant (tokį kaip sriuba), maistą, kuriame lipidai naudojami kaip virimo aplinka (tokį kaip spurgos), riebų maistą (tokį kaip sviestas), perdirbtą maistą, į kurį lipidai įdedami gaminimo metu (tokį kaip sausainiai), maistą, į kurį lipidai yra įpurškiami arba naudojami
10 paskutiniame gaminimo etape (tokį kaip traškučiai). Išradime aprašyti lipidai (arba išskirtos DHR ir/arba DPR) taip pat gali būti įdedami į agrokultūrinį maistą, fermentinį maistą, naminių gyvulių pašarus, jūros maistą arba gėrimą, kurie neturi riebalų.

Alternatyviai, išradime aprašyti lipidai taip pat gali būti dedami į funkcinį
15 maistą, kuris parodo fiziologinį DHR ir/arba DPR veikimą, skirtą susilpnėjusių kūno funkcijų atnaujinimui arba fiziologinio aktyvumo susilpnėjimui išvengti. Funkcinis maistas, apie kurį kalbama išradime, gali būti medikamento arba perdirbtos formos (tokios kaip enterinis agentas maitinimui skatinti, milteliai, granulės, tabletės, tirpalas vidiniam naudojimui, suspensija, emulsija, sirupas
20 arba panašiai), kuriose išradime aprašyti lipidai kombinuojami su proteinais, sacharidais, lipidais, retaisiais elementais, vitaminais, emulsikliais arba kvapiosiomis medžiagomis.

Be to, išradime aprašyti lipidai gali būti naudojami kaip priedas kosmetikoje arba kaip priemonė plovimui, kaip pradinė medžiaga gaminant jų
25 darinius, kurie gali būti naudojami kaip medikamentas.

Toliau išradimas bus aprašytas pavyzdžiais, bet išradimas neapribotas vien tik jais.

1 Pavyzdys

30

Lipidų gavimo būdas, naudojant mikroorganizmus, priklausančius genus Ulkenia (1)

35

Ulkenia sp. SAM 2180 ir SAM 2179 kamienai buvo kultivuojami 5 litrų (1) tūrio fermentatoriuje (fermentatorius ašochio formos), talpinančio 3 L maitinamosios terpės, esant tam tikroms kultūros sąlygoms, kurios sudėtis yra tokia:

40

(1) Maitinamosios terpės sudėtis

45

1) Gliukozė (g/l):	60
2) Kalio fosfatas (g/l):	3
3) Amonio sulfatas (g/l):	2
4) Vandeningas kukurūzų tirpalas (g/l):	0,7
5) 50% dirbtinio jūros vandens (l):	1
6) pH:	4,0

5 (2) Kultūros sąlygos

- 1) Kultivavimo temperatūra (°C): 28
 2) Aeracijos kiekis (VVM): 0,5
 3) Maišymo dažnis (apsisukimų per minutę): 300
 4) pH reguliavimas: palaikomas pH 4 su 10 % (g/l) natrio
 10 hidroksido ir 1M sieros rūgšties.

Po kultivavimo ląstelės surenkamos centrifuguojant ir išdžiovinamos šaltyje, po to išmatuojamas ląstelių kiekis (pagal masę) viename maitinamosios terpės litre. Po to buvo atliekama ląstelių destrukcija ir lipidų ekstrakcija, pridedant chloroformo/metanolio mišinio (tūrių santykiu 2:1) į išdžiovintas ląsteles, santykiu 100 ląstelių tūrių pagal ląstelių masę ir homogenizuojant mišinį, naudojant stikliarusą. Po ekstrakto praplovimo pagal Folch'o metodą, tirpiklis buvo išgarintas, kad gautume išvalytus lipodus, ir po to buvo išmatuota
 20 lipidų masė.

Norint įvertinti riebiųjų rūgščių sudėtį po lipidų išvalymo, buvo pagaminti riebiųjų rūgščių metilo esteriai, ištirpinus dalį lipidų sumaišytame tirpale, kuris sudarytas iš lygaus kiekio metanolio tirpalo, turinčio 10 % HCl ir dichlormetano, šildant 60°C dvi valandas. Esteriai buvo veikiami dujine
 25 chromatografija, norint išanalizuoti riebiosios rūgšties sudėtį. Dujinės – skysčių chromatografijos atskyrimo sąlygos buvo tokios:

(3) Atskyrimo sąlygos

- 1) Kolonėlė: kapiliarinė kolonėlė TC-70 (GL Science Co., LTD.),
 30 vidinis diametras 0,25 mm × ilgis 30 m
 2) Tekėjimo greitis: 0,8 ml/min, 100 kPa (kolonėlės galvutės slėgis)
 3) Dujos-nešiklis: azoto dujos
 4) Kolonėlės temperatūra: kilimo būdas, 170-220°C (4°C/min)
 5) Registracija: FID

35

Duomenys pateikiami 1 ir 2 lentelėse

1 LENTELĖ

Kamienas	Kultivavimo laikas (dienos)	Išdžiovintų ląstelių masė (g) *1	Bendras lipidų kiekis (g) *1	Lipidų procentinis kiekis (masės %) *2	DHR kiekis (g) *1	DPR kiekis (g) *1
SAM 2180	3	23,2	14,1	61	4,0	0,9
SAM 2179	3	19,5	11,9	61	5,5	1,3

40

*1) Masė viename maitinamosios terpės litre

*2) Procentas, lyginant su išdžiovintomis ląstelėmis

5

2 LENTELĖ

10

Kamienas	14 : 0	15 : 0	16 : 0	17 : 0	18 : 0	20 : 4 (ARR)	20 : 5 (EPR)	22 : 5 (DPR)	22 : 6 (DHR)
SAM 2180	2,7	2,4	55,0	1,0	1,4	-	0,2	6,7	28,7
SAM 2179	2,4	0,9	37,2	0,3	0,8	0,4	0,6	10,6	46,2

2 Pavyzdys

15

Lipidų gavimo būdas, naudojant mikroorganizmus priklausančius genus
Ulkenia (2)

20

Lipidų gavimo būdas, naudojant mikroorganizmus, priklausančius Ulkenia sp. SAM 2179 kamienui, buvo kultivuojama 5 l tūrio fermentatoriuje (fermentatorius kaip ašotis), talpinančio 3 L maitinamosios terpės, turinčios šią sudėtį, tokiomis kultūros sąlygomis.

25

1) Maitinamosios terpės sudėtis

	1) Gliukozė (g/l):	60
	2) Kalio fosfatas (g/l):	3
30	3) Amonio sulfatas (g/l):	2
	4) Magnio chloridas (g/l):	1,3
	5) natrio sulfatas (g/l):	1
	6) Kalcio chloridas (g/l):	0,3
	7) Vandėninis kukurūzų tirpalas (g/l):	0,7
35	8) pH:	4,0

2) Kultūros sąlygos

	1) Kultivavimo temperatūra (°C):	28
	2) Aeracijų kiekis (VVM):	0,5
40	3) Maišymo dažnis (apsisukimų per minutę):	300
	4) pH reguliavimas: palaikomas pH 4 su 10 % (g/l) natrio hidroksido ir 1 M sieros rūgšties.	

Po kultivavimo ląstelės surenkamos centrifuguojant ir išdžiovinamos šaltyje, buvo pasvertas ląstelių kiekis (pagal masę) viename maitinamosios terpės litre. Po to atliekama ląstelių destrukcija ir lipidų ekstrakcija, pridėjus chloroformo/metanolio mišinio (tūrių santykiu 2:1) į išdžiovintas ląsteles santykiu 100 ląstelių tūrių pagal ląstelių svorį ir homogenizuojant mišinį, naudojant stikliarusą. Po ekstrakto praplovimo pagal Folch'o metodą, tirpiklis buvo išgarintas, kad gautume išvalytus lipodus, ir paskui buvo išmatuota lipidų masė.

Norint įvertinti riebiųjų rūgščių sudėtį po lipidų išvalymo, buvo pagaminti riebiųjų rūgščių metilo esteriai, ištirpinus dalį lipidų sumaišytame tirpale, kuris sudarytas iš lygaus kiekio metanolio tirpalo, turinčio 10 % HCl ir dichlormetano, šildant 60°C temperatūroje dvi valandas. Esteriai buvo veikiami dujine chromatografija, norint išanalizuoti riebiosios rūgšties sudėtį. Dujinės – skysčių chromatografijos atskyrimo sąlygos buvo tokios, kaip aprašyta pirmame pavyzdyje.

Duomenys pateikti 3 ir 4 lentelėse.

3 LENTELĖ

Kamienas	Kultivavimo laikas (dienos)	Išdžiovintų ląstelių masė (g)*1	Bendras lipidų kiekis (g)*1	Lipidų Procentinis Kiekis (masė %)*2	DHR kiekis (g)*1	DPR kiekis (g)*1
SAM 2179	3	21,5	12,0	56	5,5	1,5

*1) Masė viename maitinamosios terpės litre

*2) Procentas, lyginant su išdžiovintomis ląstelėmis

4 LENTELĖ

Kamienas	14 : 0	15 : 0	16 : 0	17 : 0	18 : 0	20 : 4 (ARR)	20 : 5 (EPR)	22 : 5 (DPR)	22 : 6 (DHR)
SAM 2179	2,0	1,5	34,3	0,5	0,9	0,7	0,7	12,4	45,8

3 Pavyzdys

Lipidų, priklausančių Ulkenia sp. SAM 2179, analizė

Neutralūs ir poliniai lipidai buvo atskirti nuo lipidų, gautų pirmame pavyzdyje, naudojant bendrai priimtą skystis-skystis padalinimo metodą,

naudojant atitinkamą heksaną ir 90 % metanolį. 0,92 g neutralių lipidų ir 0,05 g polinių lipidų buvo pagaminta iš 1 g lipidų. Neutralių ir polinių lipidų rezultatai buvo analizuojami, naudojant plonasluoksnę chromatografiją. Spalvinis tyrimas buvo padarytas, naudojant sieros rūgštį. Gautų dėmių identifikacija buvo patvirtinta, lyginant jų Rf reikšmes su standartiniais lipidais.

Daugiau negu 90 % neutralių lipidų buvo triacilgliceroliai. Poliniai lipidai sudaryti iš fosfatidilcholino (60-80 %), fosfatidiletanolamino (5-20 %) ir fosfatidilinozitolio (2-8 %).

Triacilgliceroliai neutraliuose lipiduose buvo toliau analizuojami, atskiriant molekulinės rūšis, naudojant skysčių chromatografiją (kolonėlė: ODS kolonėlė; mobili fazė: acetonas/acetonitrilas (3:2); registracija: diferencinis refraktometras) (žiūrėk 1 lentelę). Gautos viršūnės buvo izoliuotos ir po hidrolizės paverstos metilo esteriais. Riebiųjų rūgščių likučiai buvo nustatyti, naudojant dujinę-skysčių chromatografiją.

Penkios pagrindinės viršūnės buvo nustatytos, kaip parodyta 5 lentelėje. Triacilgliceroliai buvo sudaryti iš 12,8 % 1,2,3-tri-dokozaheksaenolio-triacilglicerolio ir 8,0 % 1-dokozapentaenolio-2,3-di-dokozaheksaenolio-triacilglicerolio. Apie 20 % visų triacilglicerolių buvo sudaryti iš tripolineprisotintų riebiųjų rūgščių.

25

5 LENTELĖ

Viršūnė	Molekulių rūšys	Santykis (%)
1	22 : 6-22 : 6-22 : 6	12,8
2	22 : 5-22 : 6-22 : 6	8,0
3	16 : 0-22 : 6-22 : 6	18,3
4	16 : 0-22 : 5-22 : 6	8,1
5	16 : 0-16 : 0-22 : 6	10,8

30

4 Pavyzdys

Riebiųjų rūgščių liekanų nustatymas priklausomai nuo jų padėčių triacilgliceroliuose

35

Riebiųjų rūgščių liekanų padėčių priklausomybė triacilgliceroliuose aprašyta trečiame pavyzdyje, buvo analizuojama tokiu būdu. Triacilgliceroliai, aprašyti trečiame pavyzdyje (molekulių rūšys: 16 : 0-16 : 0-22 : 6), buvo išdžiovinti ir apdoroti lipaze (iš *Rhizopus japonicus*), kuri yra specifinė padėčiai 1,3. Riebiųjų rūgščių liekanos buvo nustatytos naudojant GC/MS ir po 2-monoacilglicerolių gavimo buvo trimetilsililinti. Apdorojimas lipaze buvo

40

- 5 įvykdytas 2-se ml 50 mM acetato buferio (pH 5,5) su 1000 vienetų lipazės 35°C 30 minučių. Reakcijos produktai buvo ekstrahuoti eteriu ir trimetilsililinti, naudojant komerciškai prieinamą trimetilsililinio agentą.

- Fragmento viršūnė, atitinkanti molekulinę triacilglicerolių masę, prie kurios 22 : 6 yra prijungtas, tai parodė, kad triacilgliceroliai yra 16 : 0-22 : 6-16 : 0, prie kurių riebiosios rūgštys 22 : 6 liekanos buvo prijungtos 2-je glicerolio grandinių padėtyje.

5 Pavyzdys

15

Modifikuoto pieno, turinčio DHR ir/arba DPR, gamyba

- Modifikuotas pienas, turintis DHR ir/arba DPR, buvo pagamintas pridėjus 20 0,44 g lipidų, iš 1 pavyzdžio, kuriame yra 46,2 % DHR ir 10,6 % DPR, į 100 g pieno miltelių.

- DHR ir DPR sudėtis galutiniame produkte buvo 0,80 % ir 0,19 % nuo visų riebiųjų rūgščių, atitinkamai, šita sudėtis buvo panaši į moters pieną.

25

6 Pavyzdys

30

Struktūrizuotų lipidų, turinčių DHR ir DPR, gavimas

- 50 ml lipazės tirpalo (5,600 v/ml, lipazė specifinė padėčiai 1,3 iš Rhizopus delemar) buvo sumaišyta su 2,5 g kalcio karbonato, jį naudojant kaip 35 imobilizavimo nešiklį. Fermentas buvo imobilizuotas ir precipituotas pridėjus į mišinį 40 ml acetono ir po to imobilizuotas fermentas buvo išdžiovintas. Specifinis gauto imobilizuoto fermento aktyvumas buvo 9,3 v/mg. 120 mg imobilizuoto fermento buvo sumaišyta su 1 g DHR ir DPR turinčių lipidų, pagamintų iš SAM 2180, 1 pavyzdys, 2 g kaprono rūgštys ir 60 mg vandens, 40 kratant 30°C 8 valandas. Paskui triacilgliceroliai buvo išskirti iš reakcijos mišinio, naudojant bendrai priimtą metodą ir buvo nustatyta riebiųjų rūgščių, įeinančių į triacilglicerolius, sudėtis. Duomenys pateikti 6 lentelėje.

45

5

6 LENTELĖ

	8:0	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	20:4 (ARR)	20:5 (EPR)	22:5 (DPR)	22:6 (DHR)
Be apdorojimo	0,0	2,7	2,4	55,0	1,0	1,4	0,0	0,2	6,7	28,7
Po apdorojimo lipaze	36,2	1,8	1,2	17,6	1,0	1,8	0,0	0,2	7,3	30,4

10

Daugiau negu 30 % triacilglicerolių turėjo polineprisotintas riebiąsias rūgštis glicerolių SN 2 padėtyje. Taigi, šitie lipidai yra tinkami struktūrizuotų lipidų, kurie turi vidutinio ilgio grandinės riebiąsias rūgštis glicerolių SN 1 ir SN 3 padėtyse ir polineprisotintas riebiąsias rūgštis glicerolių SN 2 padėtyje, gamybai.

15

PRAMONINIS PRITAIKOMUMAS

20

Lipidai, turintys didelį kiekį DHR ir/arba DPR ir mažą EPR kiekį, gali būti gaunami panaudojus išradime aprašytą gavimo būdą. DHR ir/arba DPR taip pat gali būti pagamintos toliau jas išskiriant iš lipidų.

25

Išradime aprašyti lipidai, turintys DHR ir/arba DPR, išskirta DHR ir išskirta DPR, naudojami kaip priedas maistui, pašarams, masalui, vaistams ir panašiai. Pašarams arba masalui gali būti panaudotos ląstelės, turinčios DHR ir/arba DPR, kurios buvo aprašytos išradime. Naminių paukščių kiaušiniai arba naminių paukščių kiaušinio trynys gali būti praturtinti DHR ir/arba DPR, šeriant naminius paukščius išradime aprašytais pašarais.

30

35

40

IŠRADIMO APIBREŽTIS

1. Lipidų, turinčių dokozaheksaeno rūgštį ir dokozapentaeno rūgštį, gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad maitinamojoje terpėje kultivuoja mikroorganizmą, priklausančią genus Ulkenia, turintį savybę sintezuoti lipidus, turinčius dokozaheksaeno rūgštį ir dokozapentaeno rūgštį, ir išskiria minėtus lipidus iš kultūros.
2. Dokozaheksaeno rūgšties gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad maitinamojoje terpėje kultivuoja mikroorganizmą, priklausančią genus Ulkenia, turintį savybę sintezuoti lipidus, turinčius dokozaheksaeno rūgštį, išskiria minėtus lipidus iš kultūros, ir atskiria minėtą dokozaheksaeno rūgštį nuo minėtų lipidų.
3. Dokozapentaeno rūgšties gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad maitinamojoje terpėje kultivuoja mikroorganizmą, priklausančią genus Ulkenia, turintį savybę sintezuoti lipidus, turinčius dokozapentaeno rūgštį, išskiria minėtus lipidus iš kultūros, ir atskiria minėtą dokozapentaeno rūgštį nuo minėtų lipidų.
4. Mikroorganizmo, priklausančio genus Ulkenia, turinčio lipidų į kuriuos įeina dokozaheksaeno rūgštis ir dokozapentaeno rūgštis, ląstelės.
5. Ulkenia sp. SAM 2179 kamienas (FERM BP-5601), turintis savybę sintezuoti lipidus, turinčius dokozaheksaeno rūgštį ir dokozapentaeno rūgštį.
6. Maistas su maistingaisiais priedais, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame yra lipidų, gautų būdu pagal bet kurį iš 1-3 punktų.
7. Kompozicija, tinkama kūdikių mitybai, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje yra lipidų, gautų būdu pagal bet kurį iš 1-3 punktų.
8. Kompozicija, tinkama neišnešiotų kūdikių mitybai, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje yra lipidų, gautų būdu pagal bet kurį iš 1-3 punktų.
9. Vaikų maistas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame yra lipidų, gautų būdu pagal bet kurį iš 1-3 punktų.
10. Senyvo amžiaus žmonių maistas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame yra lipidų, gautų būdu pagal bet kurį iš 1-3 punktų.
11. Enterinis agentas, skirtas maitinimui skatinti, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame yra lipidų, gautų būdu pagal bet kurį iš 1-3 punktų.
12. Gyvulių pašaras, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame yra lipidų, gautų būdu pagal bet kurį iš 1-3 punktų.
13. Pašarų priedas gyvuliams šerti, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi lipidų, gautų būdu pagal bet kurį iš 1-3 punktų.
14. Masalas, skirtas mikroorganizmų maitinimui, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame yra lipidų, gautų būdu pagal bet kurį iš 1-3 punktų.
15. Maistas, skirtas nėsčiųjų ir maitinančiųjų moterų mitybai, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame yra lipidų, gautų būdu pagal bet kurį iš 1-3 punktų.

16. Struktūrizuotų lipidų, turinčių dokozaheksaeno rūgštį ir dokozapentaeno rūgštį, gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad maitinamojoje terpėje kultivuoja mikroorganizmą, priklausančią genus Ulkenia, turintį savybę sintezuoti lipidus, turinčius dokozaheksaeno rūgštį ir dokozapentaeno rūgštį, išskiria minėtus lipidus iš kultūros, ir apdoroja minėtus lipidus grybelio lipaze, paverčiant riebiąsias rūgštis 1 ir 3 padėtyse į vidutinio ilgio grandinės riebiąsias rūgštis.

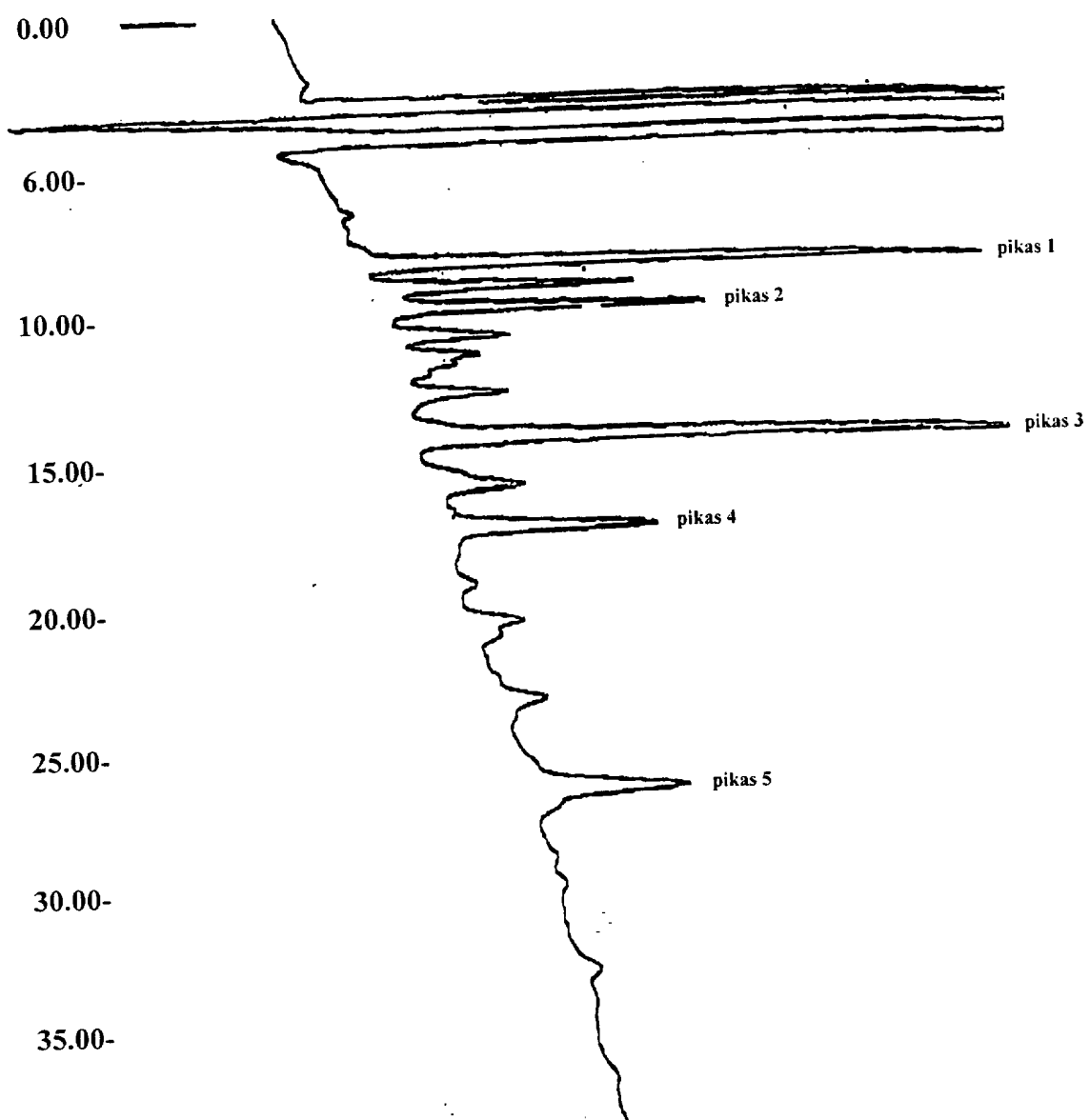


Fig. 1