

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2014-662

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)
C12N 15/01 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **25.09.2014**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **24.08.2016**
(Věstník č. 34/2016)

- (71) Přihlašovatel:
EcoFuel Laboratories s.r.o., Praha 9, CZ
Vysoká škola chemicko - technologická v Praze,
Praha 6, CZ
- (72) Původce:
Ing. Petr Kaštánek, Ph.D., Praha 2, CZ
Ing. Dana Savická, Praha 6, CZ
prof. Ing. Kateřina Demnerová, Praha 5, CZ
- (74) Zástupce:
STUDENÁ - LABALESTRA, advokátní a
patentová kancelář, Mgr. Klára Labalestra, Na
Poříčí 12, 110 00 Praha 1

(54) Název přihlášky vynálezu:
Produkční kmen *Japonochytrium sp.* AN4-10, jeho použití a způsob produkce kyseliny dokosahexaenové

(57) Anotace:
Vynález se týká produkčního kmene *Japonochytrium sp.* AN4-10, produkujícího oleje s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin, uloženého ve Sbírce mikroorganismů ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT (DBM), vedení Vysokou školou chemicko-technologickou, Ústavem biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 166 28 Praha 6, pod přírůstkovým číslem DBM 509. Používá se pro výrobu kyseliny dokosahexaenové. Způsob její výroby spočívá v tom, že produkční kmen podle nároku 1 se kultivuje v kapalném médiu obsahujícím organický uhlík, načež po kultivaci se oddělí biomasa a/nebo lipidy obsahující kyselinu dokosahexaenovou a/nebo volná kyselina dokosahexaenová.

CZ 2014 - 662 A3

~~FSK~~

~~011-562~~
2014

- 1 -

DV 2014-662

Produkční kmen *Japonochytrium sp.* AN4-10, jeho použití a způsob produkce kyseliny dokosahexaenové

Oblast techniky

Vynález se týká produkčního kmene *Japonochytrium sp.* AN4-10, jeho použití a způsobu produkce kyseliny dokosahexaenové.

Dosavadní stav techniky

Z nutričního hlediska jsou vysoce ceněné nenasycené mastné kyseliny s dlouhými řetězci (s obsahem C > 18), které nejsou vyšší rostliny schopné syntetizovat, jako jsou kyseliny ARA (struktura 20:4 omega 6,9,12,15), DHA (struktura 22:6 omega 3,6,9,12,15,18) a EPA (struktura 22:5 omega 3,6,9,12,15), které jsou nepostradatelné jako korektory vývoje mozku a očí u dětí, resp. jako doplňky pro kardiovaskulární péči u dospělých. Klinické studie potvrzují též účinky při léčbě aterosklerózy, rakoviny, revmatoidní artritidy a degenerativních onemocnění spojených s věkem, jako makulární degenerace či Alzheimerovy choroby (Simopoulos, A.P., R.R. Kifer, R.E. Martin, and S.M. Barlaw (eds.), Health Effects of ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids, S. Karger AG, Basel, Switzerland, 1991; Nettleton, A.J. (ed.), Omega-3 Fatty Acids and Health, Chapman and Hall, New York, 1995; Drevon, C.A., I. Baksaas, and H.E. Krokan (eds.), Omega-3 Fatty Acids: Metabolism and Biological Effects, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 1993).

Průmyslově využívaným zdrojem omega-3 mastných kyselin je rybí olej, obsahující až 30% EPA a DHA (Galli, C., and A.P. Simopoulos (eds.), Dietary ω 3 and ω 6 Fatty Acids: Biological Effects and Nutritional Essentiality, Plenum Press, New York, 1989). Využití rybiho oleje je však spojeno s řadou problémů, zejména nepříjemnou chutí a vůní, problémy se stabilitou produktu, vysokými náklady na izolaci ze směsi s jinými mastnými kyselinami. V neposlední řadě hrají významnou roli faktory environmentální, riziko kontaminace rybích tuků toxickými látkami, např. PCB a snižování stavu populací mořských ryb.

Tyto faktory, spolu s faktem, že ryby získávají nenasycené mastné kyseliny konzumací primárních producentů – zooplanktonu - vedly k intenzivnímu výzkumu možností produkce nenasycených mastných kyselin pomocí mořských mikroorganismů, zejména jednobuněčných řas (Yongmanitchai, W., and O.P. Ward, Omega-3 Fatty Acids: Alternative Sources of Production, *Process Biochem.* 24:117–125 (1989). US 6 582 941 popisuje způsob přípravy olejů s vysokým obsahem DHA a DPA a nízkým obsahem (nejvýše 2 % hmotn.) EPA kultivací kmene *Schizochytrium sp.* SR21(FERM BP-5034) v médiu obsahujícím zdroj uhlíku a dusíku. Způsob zvyšování obsahu olejů/tuků v mikrořasách metodami mutagenese tj. ozařováním v exponenciální fázi růstu za specifických podmínek popisuje CN 103952394.

Při kultivaci mikroorganismů jsou užívány zejména techniky heterotrofní kultivace na glukóze jako zdroji uhlíku, např. v procesu firmy Martek Biosciences využívající fermentaci mikroorganismu *Cryptocodinium cohnii* (Radmer, R.J., and T.C. Fisher, Large Scale Production of Docosahexaenoic Acid (DHA), in *Proceedings of Seventh International Conference, Opportunities from Micro- and Macro-algae*, International Association of Applied Algology, Knysna, South Africa, 1996, p. 60). Mezi další průmyslově využitelné procesy a organismy patří např. heterotrofní kultivace mikroorganismu *Schizochytrium sp.*, kmene *Ulkenia sp.* (např. proces výroby DHActive společnosti Lonza) či *Odontella aurita*. Pro produkci ARA bylo realizováno několik technologií využívající zejména kultivaci plísně *Mortierella alpine*. WO 2014/060973 popisuje nové kmeny řas, připravené kultivací v médiu a následnou mutagenézí, izolací, fúzí protoplastů a následnou kultivací. Tyto kmeny lze rovněž využívat pro výrobu PUFA (DHA).

Podstata vynálezu

Úlohou vynálezu je odstranit shora popsané nevýhody při produkci nenasycených mastných kyselin DHA.

Tento úkol se vyřeší s pomocí produkčního kmene *Japonochytrium sp.* AN4-10, produkujícího oleje s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin, uloženého ve

Sbírace mikroorganismů ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT (DBM), vedené Vysokou školou chemicko-technologickou, Ústavem biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 166 28 Praha 6., pod přírůstkovým číslem DBM 509. Produkční kmen *Japonochytrium sp.* AN4-10 si dlouhodobě udržuje produktivitu biomasy a nenasycených mastných kyselin až o 87 % vyšší, nežli má původní mikroorganismus. Je tolerantní k velkému rozmezí kultivačních teplot v rozsahu cca 15-35°C, nárazově až 38°C.

Produkční kmen podle vynálezu se s výhodou používá pro výrobu kyseliny dokosahexaenové. Způsob produkce kyseliny dokosahexaenové přitom spočívá v tom, že produkční kmen podle vynálezu se kultivuje v kapalném médiu obsahujícím organický uhlík, načež po kultivaci se oddělí biomasa a/nebo lipidy obsahující kyselinu dokosahexaenovou a/nebo volná kyselina dokosahexaenová. Kultivace kultury *Japonochytrium sp.* AN4-10 se přitom může provádět ve fermentorech na uhlíkatém substrátu. Jako zdroj organického uhlíku kapalném médiu u způsobu podle vynálezu může obsahovat alespoň jednu látku ze skupiny obsahující glukózu, glycerol, surový glycerol z výroby biopaliv, kyselinu octovou či její estery nebo etanol. Vypěstovanou biomasu je možno využít přímo vlhkou (např. jako krmné aditivum pro ryby, drůbež či hospodářská zvířata), popř. po odvodnění (např. vysušením na sprejové sušárně). Suchou biomasu je možno s výhodou použít jako zdroj DHA pro výrobu nutraceutik a doplňků stravy i krmiv.

Výroba kyseliny dokosahexaenové podle vynálezu dále může pokračovat separací lipidů obsahujících DHA či volné DHA z kultivačního média nebo vlhké či suché biomasy pomocí fyzikálně-chemických separačních metod, jako je lisování, extrakce rozpouštědly, suprakritická extrakce CO₂, působení ultrazvuku a/nebo mikrovlnného záření, extrakce spojená s chemickou reakcí atd. Takto extrahované lipidy či frakce lipidů mohou být dále rafinovány s cílem oddělení jiných mastných kyselin a získání DHA o vyšší čistotě. Takovýto

produkt pak může být s výhodou využit jako surovina ve speciálních potravinářských, farmaceutických a kosmetických aplikacích.

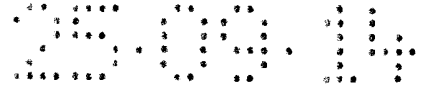
Po extrakci lipidů z biomasy může být zbytek biomasy po částečném či úplném odstranění lipidů s výhodou využit jako doplněk krmiva pro zvířata, neboť obsahuje vysoké množství proteinů a dále významné obsahy pigmentů s antioxidačními účinky, zejména karotenoidů.

Objasnění výkresů

Vynález je dále blíže objasněn na příkladech svého provedení pomocí výkresů, kde znázorňuje:

- Obr. 1 klastř buněk *Japnochytrium* sp. AN-4 obarvených Nile red se zářícími globulemi lipidů v UV mikroskopii,
- Obr. 2 uvolňující se zoospory *Japnochytrium* sp. AN-4, obarveno Nile red, UV mikroskopie,
- Obr. 3 růstové křivky kmenů AN1-5 (vyjádřené jako OD_{450nm}) v mikrotitrační destičce,
- Obr. 4 vliv počáteční koncentrace substrátu (glukosy) na koncentraci buněk v suspenzi (vyjádřené jako OD_{450nm}) po 3 dnech kultivace kmene AN4 v 250ml Erlenmayerových baňkách na třepače,
- Obr. 5 srovnání růstových charakteristik původního kmene AN4 a dvaceti vybraných mutantů,
- Obr. 6 profil mastných kyselin obsažených v biomase kmenů *Japnochytrium* sp. AN4, AN4-10 a AN4-20,
- Obr. 7 srovnání růstové křivky původního kmene AN4 a produkčního kmene AN4-10,
- Obr. 8 složení mastných kyselin obsažených v biomase produkčního kmene *Japnochytrium* sp. AN4-10.

Příklady uskutečnění vynálezu



Výroba kyseliny dokosaheptaenové podle vynálezu dále může pokračovat separací lipidů obsahujících DHA či volné DHA z kultivačního média nebo vlhké či suché biomasy pomocí fyzikálně-chemických separačních metod, jako je lisování, extrakce rozpouštědly, suprakritická extrakce CO₂, působení ultrazvuku a/nebo mikrovlnného záření, extrakce spojená s chemickou reakcí atd. Takto extrahované lipidy či frakce lipidů mohou být dále rafinovány s cílem oddělení jiných mastných kyselin a získání DHA o vyšší čistotě. Takovýto produkt pak může být s výhodou využit jako surovina ve speciálních potravinářských, farmaceutických a kosmetických aplikacích.

Po extrakci lipidů z biomasy může být zbytek biomasy po částečném či úplném odstranění lipidů s výhodou využit jako doplněk krmiva pro zvířata, neboť obsahuje vysoké množství proteinů a dále významné obsahy pigmentů s antioxidačními účinky, zejména karotenoidů.

Příklad 1:

V mangrovníkové oblasti poloostrova Ancon, Kuba byl proveden sběr spadaneho mangrovníkového listů z mořské vody z hloubky cca 10 + 100 cm pod hladinou. Z listů byly sterilně odebrány sekce o rozměrech cca 10 x 25 mm, 3 x promyty 15% sterilní mořskou vodou doplněnou 0,3 g/l penicilinu a 0,3 g/l streptomycinu pro potlačení bakteriálního růstu. Poté byly umístěny na agar, obsahující kvasničný extrakt, pepton, mořskou sůl a antibiotika. Byly izolovány morfologicky odlišné kmeny, označované jako AN-1, AN-2, AN-3, AN-4, AN-5, AN-6. Metodou 18sRNA byly kmeny identifikovány jako Japonochytrium sp., řád Traustochytriales. Tyto organismy se primárně vyskytují v mořských biotopech, na povrchu řas či rostlin a v organickém detritu. Trofickou fází tvoří nepohyblivé, pouze po substrátu se pohybující vegetativní buňky, většinou kulovité ale i vejčité či elipsoidní, viz obr. 1. Dochází k vytváření tzv. ektoplazmatických výběžků, které se spojují v síťovité útvary, označované u tohoto řádu (ve starší literatuře) jako rhizoidy. Jsou produkovány pomocí botrozomů, které se nachází na povrchu buněk. Pomocí těchto výběžků jsou ukotveny k substrátu. Vegetativní buňky se dělí, čímž vzniká útvar, který se zde označuje jako sporangium (jedná se o shluk,

sorus buněk), viz obr. 2. Zástupci tohoto řádu tvoří typické kolonie, ale jejich růst se projevuje zvětšováním buňky a následnou přeměnou ve sporangia. Sporangium je obaleno vícevrstvou stěnou, složenou ze šupinek. Uvnitř dochází k dělení a vznikají poměrně malé zoospory (jedná se o mitospory) se 2 bičíky. Po čase přisednou k substrátu, ztratí bičíky a dorůstají.

Příklad 2:

Předběžná kultivace všech kmenů prokázala dobrý růst na glukose a glycerolu jako substrátu, a to při počátečních koncentracích substrátu v širokém rozmezí 5-170g/l. Koncentrace substrátu > 100g/l vykazují již zpomalení růstu, či delší lag-fázi (viz obr. 4). V souladu s literárními údaji vykazují horší růst na disacharidech (laktosa), nežli monosacharidech (glukosa). Růstová rychlost na glycerolu odpovídá glukose. Stacionární fáze dosahují za cca 3-4 dny růstu. Optimální salinita se jeví kolem 9-18g/l. Obsah DHA se pohybuje až kolem 12-16% v sušině, resp. 46-56% podílu mastných kyselin, což odpovídá nejlepším literárním údajům a z kmenů činí kandidáty na průmyslovou kultivaci. Z kultivačních testů na médiu o složení 20g/l glukosa, 10g/l kvasniční extrakt, 18g/l NaCl při pH média 7 a teplotě 28°C plyne, že vysokou růstovou rychlostí a obsahem DHA vyniká kmen, označený pracovním jménem Japonochytrium sp. AN-4 (viz obr. 3). Proto byl zvolen pro následnou mutagenezi.

Příklad 3:

K vyvolání mutací buněk bylo použito UV záření. Buňky v suspenzi o koncentraci $5,8 \times 10^4$ b/ml byly vystavovány záření o vlnové délce 360 nm na vzdálenost 18,5cm po dobu 10s, kdy docházelo k přežívání $1,5 \times 10^2$ b/ml. Byl sledován vliv osvětlení na růst buněk a fenotypové vlastnosti kolonií. Mutageneze byla provedena ve tmě, naředění, vyočkování a následná kultivace rovněž. Po 48h byly nejrychleji rostoucí kolonie vyočkovány. Mutagenezi byla získána řada fenotypově odlišných klonů, které se lišily od původních kmenů vzhledem kolonií a rychlostí růstu. U 20 mutantů (současně s původním kmenem AN 4) byla sledována

rychlost růstu měřením OD ve zkumavkách (Obr. 5). Je zřejmé, že kmeny AN4-10, AN4-16 a AN4-20 vykazovali o cca 30% vyšší výtěžek biomasy. U kmenů AN4, AN4-10 a AN4-20 byla sušina analyzována na obsah PUFA. Z výsledků analýz (Obr. 6) plyne, že vysoký podíl DHA v profilu mastných kyselin vykazuje kmen AN4-10, a to 48,65% mastných kyselin. Z analýzy také plyne, že u tohoto kmene došlo ke snížení obsahu z nutričního hlediska nežádoucí nasycené mastné kyseliny palmitové, a to z 30 na 16% oproti obsahu v původním kmenu AN4. U kmene AN-20 naproti tomu obsah nasycených kyselin mírně vzrostl a obsah DHA se mírně snížil. Jako produkční byl proto zvolen kmen AN4-10, vyznačující se výrazně zvýšenou produktivitou biomasy i DHA. Tato mutace je dlouhodobě stabilní.

Příklad 4:

Byla provedena ověřovací kultivace na glycerolu, kdy z Petriho misky byly buňky původního kmene *Japonochytrium sp.* AN4 a produkčního kmene *Japonochytrium sp.* AN4-10 asepticky převedeny do 100 ml sterilního komplexního media (KM) s pH 7, které obsahovalo: glycerol (20 g.l⁻¹), kvasničný extrakt (10 g.l⁻¹), chlorid sodný (18 g.l⁻¹), mikroelementy (v mg l⁻¹: 40 FeNa-EDTA, 88 CaCl₂, 0,83 H₃BO₃, 0,95 CuSO₄.5H₂O, 3,3 MnCl₂.4H₂O, 0,17 (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, 2,7 ZnSO₄.7H₂O, 0,6 CoSO₄.7H₂O, a 0,014 NH₄VO₃) a destilované vody. Kultury v Erlenmeyerově baňce byly umístěny do třepačky (130 rpm) při 23°C a po dobu 120 hodin probíhala kultivace. Srovnáním růstových křivek, stanovených měřením optické hustoty suspenze (OD) bylo zjištěno, že *Japonochytrium sp.* AN4-10 dosáhlo o 87% vyššího nárůstu biomasy nežli původní kmen, konkrétně 5. den kultivace bylo u kmene *Japonochytrium sp.* AN4-10 dosaženo koncentrace sušiny 8,3 g.l⁻¹. Analýza ukázala, že *Japonochytrium sp.* AN4-10 obsahovalo 344,58 g mastných kyselin na 1kg suché váhy. Podíl DHA byl 163,19 g.kg⁻¹ sušiny (resp. 47% obsahu mastných kyselin) a podíl EPA 1,35 g.kg⁻¹ sušiny. Profil mastných kyselin uvádí obr. 8.

Průmyslová využitelnost

Vynález je využitelný v biotechnologickém průmyslu. Způsob výroby podle vynálezu je možno realizovat jak s využitím stávajících průmyslových fermentačních kapacit. Vyrobena biomasa mikroorganismů představuje cennou surovinu pro řadu žádaných produktů v oblasti potravinářského a farmaceutického průmyslu, v kosmetice, zejména jako součást funkčních potravin, potravinových doplňků a krmiv s obsahem nenasycených omega-3 mastných kyselin.

~~1000~~

~~20104-650~~
20104-650

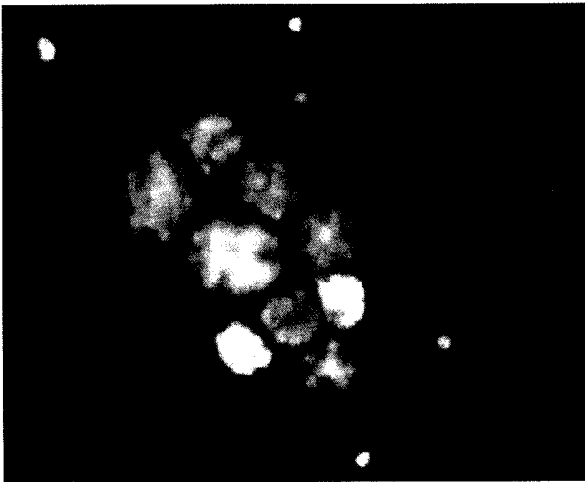
- 9 -

PATENTOVÉ NÁROKY

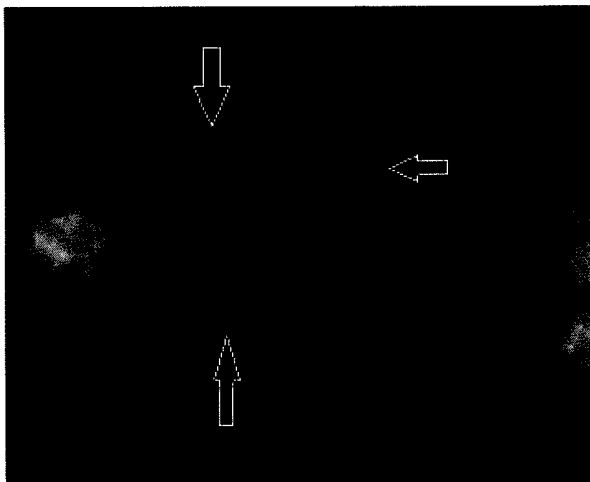
1. Produkční kmen *Japonochytrium sp.* AN4-10, produkující oleje s vysokým obsahem poly-
nenasycených mastných kyselin, uložený ve Sbírce mikroorganismů ústavu biochemie a
mikrobiologie VŠCHT (DBM), vedené Vysokou školou chemicko-technologickou,
Ústavem biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 166 28 Praha 6., pod přírůstkovým
číslem DBM 509.
2. Použití produkčního kmene podle nároku 1 pro výrobu kyseliny dokosahexaenové.
3. Způsob produkce kyseliny dokosahexaenové, **vyznačující se tím, že** produkční kmen podle
nároku 1 se kultivuje v kapalném médiu obsahujícím organický uhlík, načež po kultivaci se
oddělí biomasa a/nebo lipidy obsahující kyselinu dokosahexaenovou a/nebo volná kyselina
dokosahexaenová.
4. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím, že** kapalně médium obsahuje jako zdroj
organického uhlíku alespoň jednu látku ze skupiny obsahující glukózu, glycerol, surový
glycerol z výroby biopaliv, kyselinu octovou či její estery nebo etanol.

25.09.14
PV 2014-662

1/6



Obr. 1

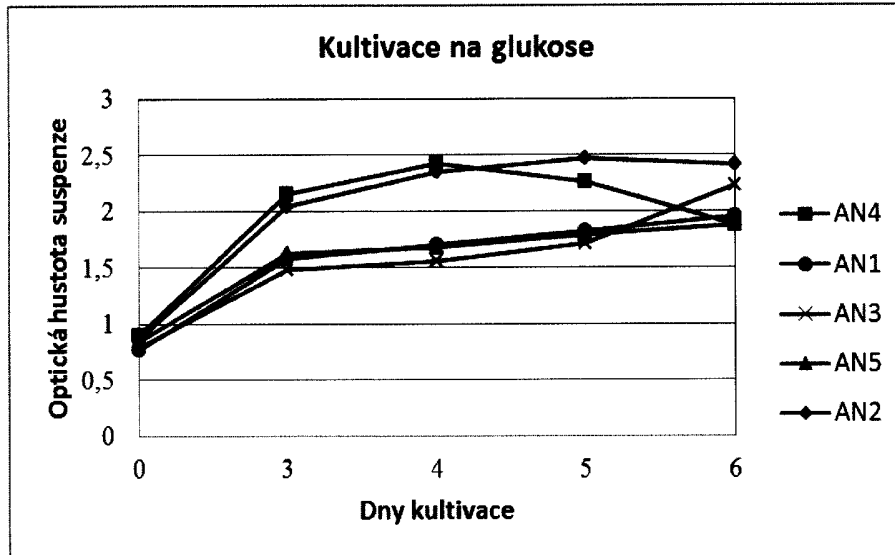


Obr. 2

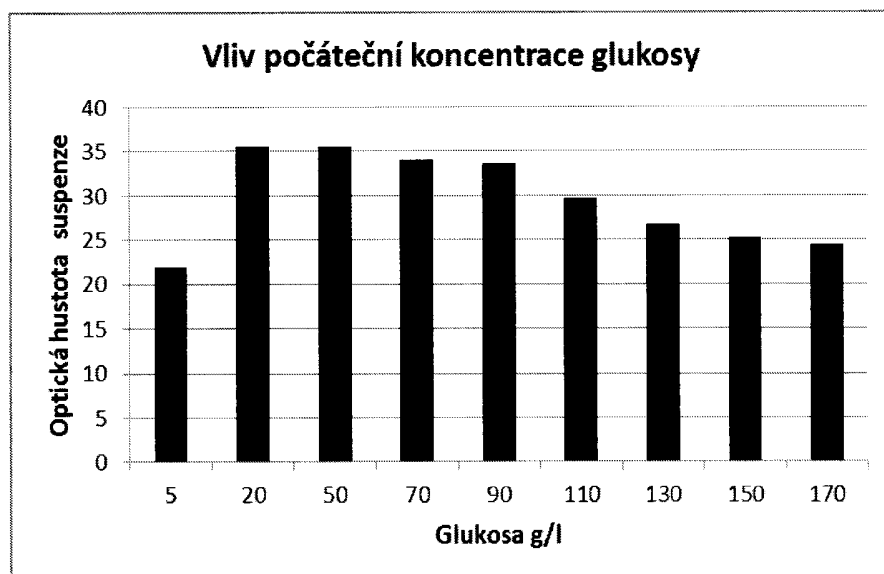
25.09.14

PV 2014-062

2/6



Obr. 3



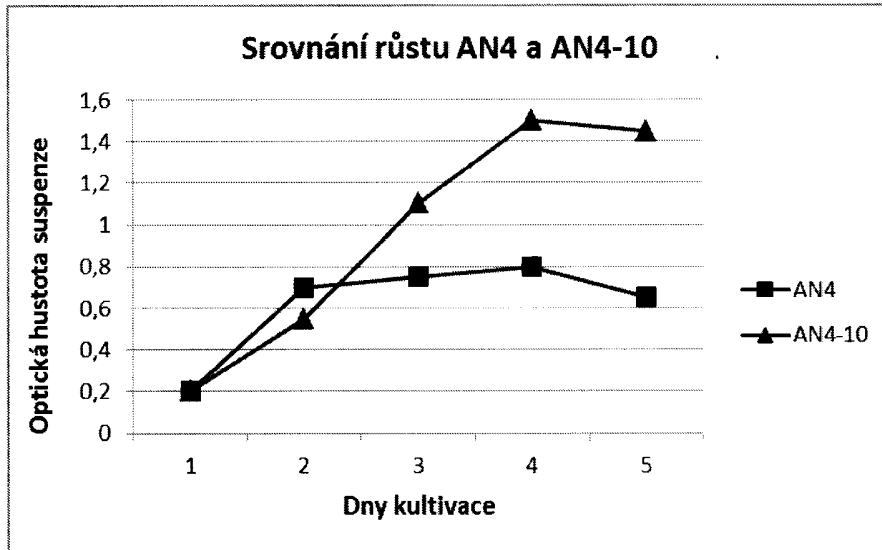
Obr. 4

	OD(0h)	OD(72h)	Nárůst (%)	Urychlení oproti AN-4 (%)
AN4	1,4	3,3	135,7	0,0
AN4-1	1,7	3,6	111,8	-17,6
AN4-2	1,6	3,4	112,5	-17,1
AN4-3	1,5	3,7	146,7	8,1
AN4-4	1,5	3,7	146,7	8,1
AN4-5	1,4	2,8	100,0	-26,3
AN4-6	1,4	3,4	142,9	5,3
AN4-7	1,5	3,6	140,0	3,2
AN4-8	1,3	3,3	153,8	13,4
AN4-9	1,6	3,6	125,0	-7,9
AN4-10	1,4	3,9	178,6	31,6
AN4-11	1,3	3,3	153,8	13,4
AN4-12	1,3	3,3	153,8	13,4
AN4-13	1,2	2,8	133,3	-1,7
AN4-14	1,3	3,1	138,5	2,0
AN4-15	1,3	3,1	138,5	2,0
AN4-16	1,3	3,6	176,9	30,4
AN4-17	1,5	3,4	126,7	-6,7
AN4-18	1,5	3,8	153,3	13,0
AN4-19	1,5	3,2	113,3	-16,5
AN4-20	1,3	3,7	184,6	36,0

Obr. 5

	AN4	AN4-10	AN4-20
Name	hm.%	hm.%	hm.%
C08:0	< 0,1	< 0,1	-
C10:0	< 0,1	< 0,1	-
C11:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C12:0	0,10	0,06	0,11
C13:0	0,30	0,18	0,39
C14:0	2,88	1,73	3,04
C14:1	< 0,1	< 0,1	-
C15:0	13,72	9,38	18,74
C16:0	30,25	19,06	34,51
C16:1	0,15	0,17	0,15
C17:0	2,65	1,93	3,71
C17:1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C18:0	1,16	0,70	1,40
C18:1n11c	0,35	0,36	0,27
C18:1n9t	< 0,1	< 0,1	-
C18:2n6c	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C18:2n6t	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C18:3n3	0,11	0,13	0,14
C18:3n6	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C20:0	0,10	< 0,1	< 0,1
C20:1n9	-	< 0,1	-
C20:2	0,17	0,20	0,10
C20:3n3	0,35	0,41	0,23
C20:3n6	< 0,1	0,10	< 0,1
C20:4n6	< 0,1	0,13	< 0,1
C20:5n3	0,48	0,55	0,31
C21:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C22:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C22:2	0,35	0,47	0,24
C22:5n3	0,13	0,14	0,06
C22:5n6	6,44	8,88	4,45
C22:6n3	33,20	48,60	25,14
C23:0	-	-	< 0,1
C24:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C24:1n9	< 0,1	< 0,1	< 0,1

Obr. 6



Obr. 7

Obsah MK v sušině (g.kg-1)	Název mastné kyseliny (MK)
0,14	Laurová kyselina (C12:0)
0,38	Tridecanová kyselina (C13:0)
6,22	Myristová kyselina (C14:0)
39,04	Pentadecanová kyselina (C15:0)
103,03	Palmitová kyselina (C16:0)
0,27	Palmitolejová kyselina (C16:1)
9,45	Heptadecanová kyselina (C17:0)
3,40	Stearová kyselina (C18:0)
0,33	Olejová kyselina (C18:1n9c)
0,08	Linolelaidová kyselina (C18:2n6t)
0,51	α -Linolenová kyselina (C18:3n3)
0,30	γ -Linolenová kyselina (C18:3n6)
0,70	Arachová kyselina (C20:0)
0,60	cis-11,14-Eicosadienová kyselina (C20:2)
11,41	cis-11,14,17-Eicosatrienová kyselina (C20:3n3)
0,49	cis-8,11,14-Eicosatrienová kyselina (C20:3n6)
0,42	Arachidonová kyselina (C20:4n6)
1,35	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenová kyselina (C20:5n3)
0,21	Heneicosanová kyselina (C21:0)
0,32	Behenová kyselina (C22:0)
2,08	cis-13,16-Docosadienová kyselina (C22:2)
163,19	cis-4,7,10,13,16,19-Docosaheptaenová kyselina (C22:6n3)
0,22	Tricosanová kyselina (C23:0)
0,22	Lignocerová kyselina (C24:0)
0,22	Nervonová kyselina (C24:1n9)
344,58	celkem suma MK

Obr. 8