



Akademie věd České republiky

Teze disertace

k získání vědeckého titulu „doktor věd“

**Mechanismy biosyntézy a produkce triacylglycerolů a komplexních lipidů
olejotvornými mikroorganismy**

Tomáš Řezanka

Mikrobiologický ústav AV ČR

Praha, září 2012



Akademie věd České republiky

Teze disertace

k získání vědeckého titulu „doktor věd“

ve skupině molekulárně biologických a lékařských věd

Mechanismy biosyntézy a produkce triacylglycerolů a komplexních lipidů
olejotvornými mikroorganismy

Komise pro obhajoby doktorských disertací v oboru:
mikrobiologie, virologie a mykologie

Tomáš Řezanka
Mikrobiologický ústav AV ČR

Praha, září 2012

Obsah

Souhrn	3
Summary	4
Úvod	5
Definice lipidů	8
Jednoduché lipidy - triacylglyceroly	9
3.1. De novo syntéza mastných kyselin	10
Biosyntéza acyl-lipidů	10
Molekulární a druhová skladba triacylglycerolů	12
Využití LC-MS při analýze	14
Řasy a sinice	16
Bakterie	20
Komplexní lipidy	23
Důležité komplexní lipidy – popis, výskyt a význam	23
Řasy a sinice	25
Bakterie	27
Termofilní bakterie	27
Bakterie – producenti povrchově aktivních látek	30
Anaerobní a fakultativně anaerobní bakterie	32
Houby – živočichové	33
Závěr	34
Použitá literatura	35
Seznam zkratk	42
Seznam publikací použitých v DSc. disertaci	44
Seznam všech publikací autora	44

Souhrn

Řasy, sinice i bakterie produkují “single cell oils” (SCO), které obsahují jako hlavní složku triacylglyceroly (TAG), jež jsou důležitým zdrojem polyenových mastných kyselin a dalších neobvyklých mastných kyselin důležitých pro výživu lidí i zvířat, ale uplatňují se i jako zdroje biopaliv 3. generace. Cílem předkládané teze bylo vůbec poprvé analyzovat SCO, pokud jde o obsah a spektrum intaktních TAG. Ty se liší délkou acylů, počtem a polohou dvojných vazeb, stereochemickou pozicí a cis/trans izomerií. Výsledkem je obrovský počet izomerů s podstatně odlišnými vlastnostmi a výživovou hodnotou, ale i hodnotami důležitými pro biopaliva, jako jsou bod zákalu a tuhnutí. Separace TAG pomocí HPLC byla optimalizována použitím několika kolon v sérii k dosažení co nejvyšší selektivity separace. Analýza zahrnuje LC-MS-APCI (hmotnostní spektrometrie-chemická ionizace při atmosférickém tlaku) a LC-MS/ESI (ionizace elektrosprejem) s kladnou nebo zápornou ionizací. Mikrobiální oleje SCO z širokého spektra přírodních vzorků, zahrnují především (a) SCO důležité pro výživu, a (b) SCO obsahující neobvyklé mastné kyseliny, připravené pomocí prekurzorem řízené biosyntézy, s lichým počtem uhlíků, mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem, neobvyklými polohami dvojných vazeb a/nebo větvenými alkylovými řetězci, použitelné jako biopaliva.

Dále byly analyzovány komplexní lipidy z mnoha mikroorganismů, přičemž hlavní důraz byl kladen na poznání struktury lipidů a jejich produkci ve vztahu k chemotaxonomii jednotlivých bakterií, převážně termofilních. U těchto bakterií byla identifikována široká škála mikrobiálních lipidů, z nichž za nejdůležitější lze považovat přítomnost plasmalogenů jak v anaerobních bakteriích rodu *Pectinatus* způsobujících kontaminaci piva, kde jejich výskyt může sloužit jako důležitých chemotaxonomický marker. Byly izolovány i u termofilních bakterie *Anoxybacillus*, izolované z termálních pramenů. Dále byla u termofilních bakterií izolována celá škála polárních lipidů, a např. objasněna biosyntesa rozvětvené mastné kyseliny s cykloheptanovým kruhem pomocí izotopicky značených prekurzorů. Důležitým produktem, využitelným i v praxi, byla identifikace rhamnolipidů, důležitých smáčedel u nepatogenních termofilních bakterií rodu *Thermus* sp., *T. aquaticus* a *Meiothermus ruber*.

Summary

Algae, cyanobacteria and bacteria produce “single cell oils” (SCO), which contain as the major component triacylglycerols (TAG) that serve as an important source of polyenoic fatty acids and other unusual fatty acids important in animal and human nutrition and have also a significant application as sources of the 3rd generation of biofuels. The aim of this work was to analyze SCO in terms of their content and spectrum of intact TAG, which differ in the length of the acyl chains, number and position of double bonds, stereochemical position and *cis/trans* isomerism. This variety results in a vast number of isomers with substantially different properties and nutritional value, as well as in properties important for biofuels such as cloud point and pour point. Separation of TAG by HPLC was optimized by using several columns in series to achieve the highest possible selectivity of separation. The analysis involved LC-MS-APCI (mass spectrometry- atmospheric pressure chemical ionization) and LC-MS/ESI (electrospray ionization) with positive or negative ionization. Microbial SCO from a broad spectrum of natural samples include mostly (a) nutritionally important SCO, and (b) SCO containing unusual fatty acids that have been prepared by precursor-directed biosynthesis, as well as fatty acids with odd number of carbon atoms, very-long-chain fatty acids, or acids with unusual positions of double bonds, and/or branched alkyl chains, suitable for use as biofuels.

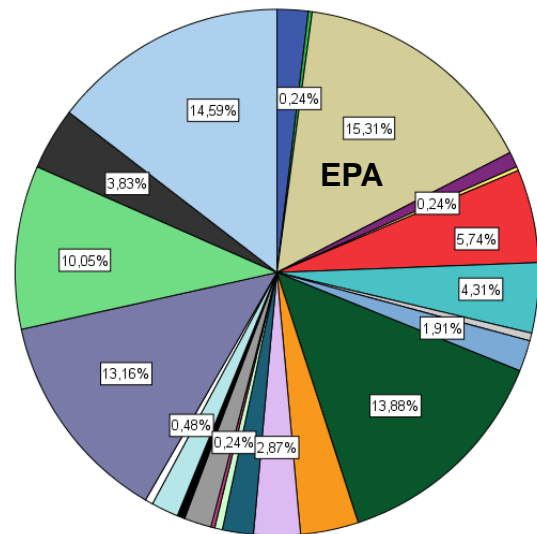
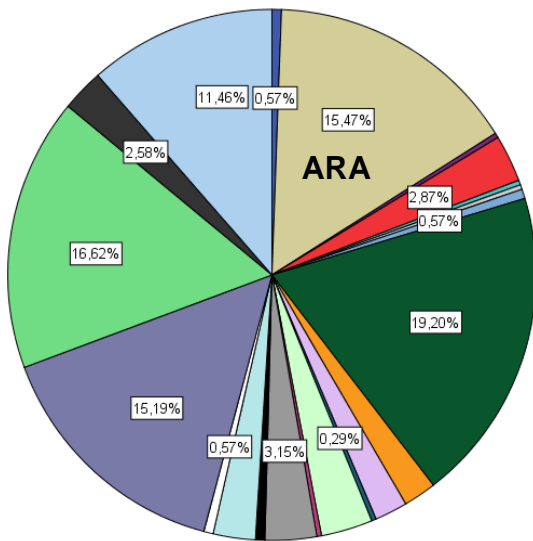
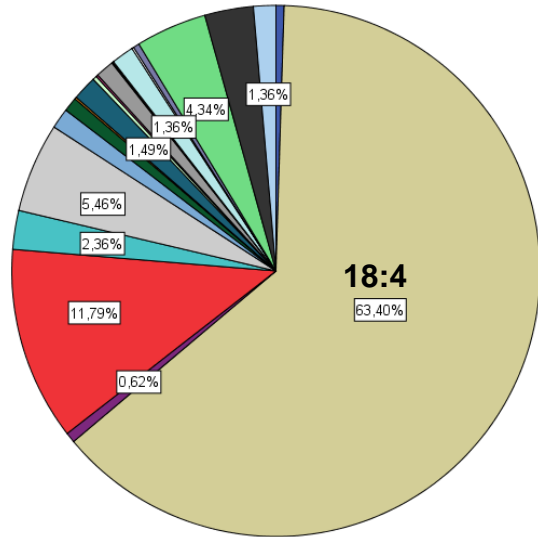
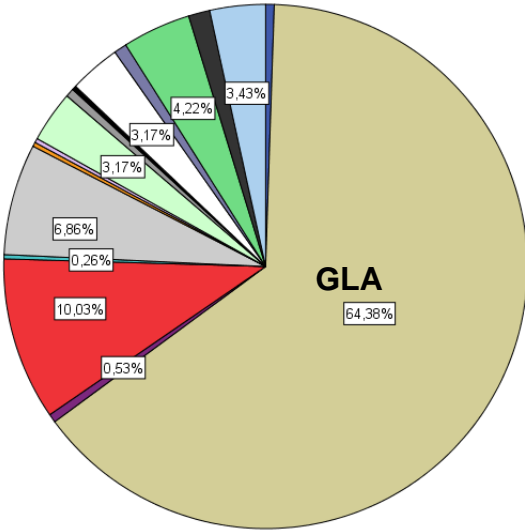
Another part of the work concerns the analysis of complex lipids from many microorganisms, the main concern being the identification of lipid structure and production in relation to the chemotaxonomy of individual bacteria, especially thermophilic ones. These bacteria have been found to contain a broad spectrum of lipids, the most interesting and important of them being plasmalogens in anaerobic bacteria of the genus *Pectinatus* causing beer spoilage, whose occurrence can serve as an important chemotaxonomical marker. They were also isolated from the thermophilic bacterium *Anoxybacillus* isolated from thermal springs. Thermophilic bacteria were also found to contain a plethora of polar lipids; for instance, the biosynthesis was elucidated of the branched fatty acid with a cycloheptane ring by using isotopically labeled precursors. An important finding that has practical impact was the identification of rhamnolipids, important biosurfactants in nonpathogenic thermophilic bacteria *Thermus* sp., *T. aquaticus* and *Meiothermus ruber*.

1. Úvod

Analýza mastných kyselin (FA) a triacylglycerolů (TAG) obsažených v olejích z mikroorganismů (single cell oil, SCO), se dostává do popředí zájmu z dietních, nutričních i léčebných důvodů, kde mohou hrát důležitou roli pro zdraví lidí a zvířat (Schenk a kol. 2008, Brennan a Owende 2010), ale také při získávání biopaliv třetí generace. Tyto oleje jsou komplexní směsi, které obsahují řadu tříd lipidů, jejichž hlavními složkami jsou TAG. Informace o přesném složení TAG má zásadní význam pro pochopení chování tuku v průběhu zpracování, jejich dietetických a nutričních vlastností, atd. Chemické, fyzikální a nutriční vlastnosti olejů jsou ovlivněny složením TAG, tj. obsahem FA a jejich stereospecifitou (pozicí FA na glycerolu). Námi použité metody umožňují přímou extrakci lipidů z malého množství buněk mikroorganismů, pro analýzu složení TAG. Informace o přesném složení TAG směsí mají zásadní význam pro pochopení jejich biosyntézy, a tím i jejich nadprodukce.

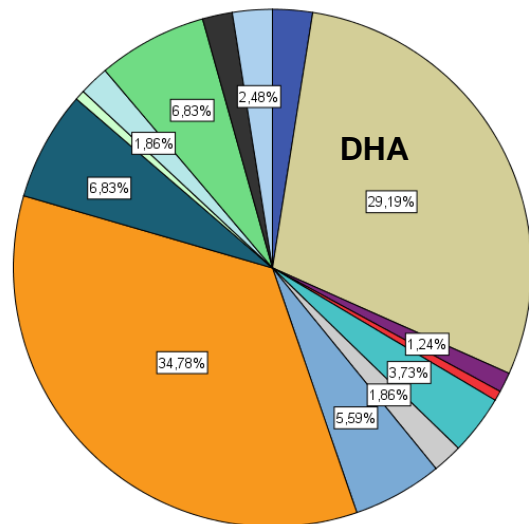
Dosud nejběžnějším zdrojem PUFA, tj. polyenových mastných kyselin, je především rybí olej. Ryby však tyto kyseliny nebiosyntetizují, nýbrž získávají je z potravy, kterou tvoří převážně plankton, mezi který patří i řasy nebo sinice. Obsah nejdůležitějších PUFA v řasách a sinicích ukazuje Obrázek 1, který byl kompilován na základě publikace Lang a kol. (2011). Z grafu plyne, že mikroskopické řasy, ale též další mikroorganismy, jsou potenciálně vhodnými producenty PUFA. Podrobné zkoumání růstu mikroskopických řas a produkce PUFA ukázalo, že produkce a akumulace PUFA jsou složité procesy, které je obtížné optimalizovat. Jako jeden z hlavních přínosů řas je označována přítomnost vysokých hladin PUFA, tj. mastných kyselin s dlouhým řetězcem (ARA, EPA a DHA, tj. kyseliny arachidonová, eikosapentaenová a dokosahexaenová), které jsou nezbytné pro organismy v posledních stupních potravinového řetězce, včetně člověka. Využití a aplikace olejů z řas, obsahujících TAG s PUFA jsou do značné míry dány strukturou těchto TAG, zejména polohou FA v molekule glycerolu.

Struktura a složení mastných kyselin v TAG (Řezanka 1989, **pub 39**, Řezanka a Sigler 2009, **pub 205**) ovlivňuje jejich vstřebávání a distribuci v organismu (Mu a Porsgaard 2005). Nejlepší výživové vlastnosti jsou připisovány strukturovaným TAG, které mají PUFA v poloze *sn-2*. TAG obsahující v poloze *sn-2* většinou EPA a ARA jsou snadněji absorbovatelné než TAG, které mají náhodné rozdělení PUFA. Absorpce strukturovaných TAG (STAG) je také rychlejší než u mateřských olejů a tyto TAG mohou chránit před hypertriglyceridemií a obezitou způsobenou vysokým obsahem tuku ve stravě (Takeuchi a kol. 2002). STAG by mohly být potenciálně použity k redukci hmotnosti a nižší akumulace tuku, stejně jako snížení sérového cholesterolu.



Název

- Bacillariophyceae
- Chlorarachniophyta
- Chlorophyceae
- Chrysophyceae
- Coleochaetophyceae
- Conjugatophyceae
- Cryptophyceae
- Cyanobacteria
- Dinophyceae
- Euglenophyceae
- Eustigmatophyceae
- Glaucophyceae
- Haptophyceae
- Klebsormidiophyceae
- Mesostigmatophyceae
- Phaeophyceae
- Phaeothamniophyceae
- prasinophyte
- Raphidophyceae
- Rhodophyceae
- Trebouxiophyceae
- Ulvophyceae
- Xanthophyceae



Obrázek 1. Průměrný výskyt PUFA, tj. kyselin γ -linolenové (GLA), oktadekatetraenové (18:4n-3), arachidonové (ARA, 20:4n-6), eikosapentaenové (EPA, 20:5n-3), dokosaheptaenové (DHA, 22:6n-3), u více než 2000 druhů řas a sinic ze sbírky SAG (Culture Collection of Algae of Göttingen University) (Lang a kol. 2011).

Dalším využitím SCO, je jeho použití jako zdroje biopaliv. Biopaliva první generace používají jako vstupní suroviny potravinářské plodiny, jako je kukuřice, řepka, sója, cukrová třtina a cukrová řepa. Všechny tyto rostliny obsahují běžně dostupné sacharidy, včetně škrobu, nebo jsou producenty rostlinných olejů. Získání biopaliva z nich je tak relativně jednoduché, protože fermentací sacharidů vzniká bioethanol (používaný jako náhrada benzínu), zatímco transesterifikací mastných kyselin vzniká bionafta. Na druhé straně, biopaliva první generace vykazují dobře známé a široce publikované problémy, jako je zvýšená produkce skleníkových plynů nebo zvýšení cen potravin (Brennan a Owende 2010). Biopaliva 2. generace, získávaná např. zpracováním agro-odpadů, jako jsou kukuřičné stonky (celulóza) nebo odpady z výroby celulózy (lignin) vyžadují nákladné technologie, včetně předzpracování speciálními enzymy, a proto druhá není generace biopaliv v současné době rozšířena (Brennan a Owende 2010).

Z toho důvodu se pozornost zaměřuje na další generaci biopaliv, např. biopaliva z řas, které jsou považovány za zdroj energie bez hlavních nevýhod spojených s 1. a 2. generací biopaliv (Nigam a Singh 2011). Kromě toho při srovnání s konvenčními plodinami, které jsou sklizeny jednou nebo dvakrát za rok, mají řasy velmi krátký životní cyklus (v řádu dní), což umožňuje více či méně kontinuální sklizeň a značné zvýšení výnosů na čtvereční metr plochy (Schenk a kol. 2008). Vztaheno na 1 m² mohou mikroskopické řasy produkovat 15–300 krát více oleje pro výrobu bionafty než tradiční plodiny. Mnoho druhů řas a sinic má schopnost produkovat značné množství TAG (např. 20 – 50 % sušiny) jako zásobní lipidy (Hu a kol. 2008).

Řasy a sinice jsou též přizpůsobené k růstu při nízkých a vysokých teplotách (psychrofilové a termofilové) a představují významnou skupinu extremofilních mikroorganismů. Mikroorganismy přizpůsobené extrémnímu chladu a teplu mají také značný potenciál v biotechnologických aplikacích.

Bakterie produkující mikrobiální oleje patří převážně do skupiny aktinomycet, které jsou schopny akumulovat TAG při nedostatku dusíku (Alvarez a Steinbuchel 2002). Rod *Rhodococcus* je nejslibnější, protože jeho mimořádně efektivní metabolismus umožňuje využít i takové organické sloučeniny, jako je např. fenol, který je přítomen jako jediný zdroj uhlíku. Změnou fyziologických a kultivačních podmínek je možné připravit triacylglyceroly

obsahující mastné kyseliny s požadovanou délkou řetězce (počtem atomů uhlíku) nebo požadovaným počtem dvojných vazeb, a tím upravit bod zákalu a tuhnutí, což jsou důležité parametry biopaliv.

2. Definice lipidů

Lipidy jsou různorodé látky, jejichž definice není dosud úplně vyjasněná. Celkový přehled o chemii, výskytu, složení a biologii těchto základních a fascinujících přírodních látek je uveden níže. Základní učebnice obvykle popisují lipidy jako skupiny přirozeně se vyskytujících látek, které jsou rozpustné v nepolárních rozpouštědlech, což jsou uhlovodíky, chloroform, benzen, ethery a alkoholy. Patří mezi ně pestrá škála sloučenin, jako jsou mastné kyseliny a jejich deriváty, karotenoidy, terpeny, steroidy, atd. Mnohé z těchto sloučenin se významně liší strukturou nebo funkcí. Dále tyto látky, které jsou dnes všeobecně považovány za lipidy, mohou být téměř stejně snadno rozpustné jak ve vodě, tak i v organických rozpouštědlech. Proto byla poměrně kladně přijata definice IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), která říká, že:

Lipidy jsou mastné kyseliny a jejich deriváty a látky s nimi biosynteticky nebo funkčně související.

Nezahrnuje však takové přírodní látky, jako jsou steroidní hormony, ropné produkty, jednoduché terpeny, některé vitamíny rozpustné v tucích, většinu polyketidů, karotenoidy, apod.; tato definice, přestože je užitečná, byla již zpochybněna (Fahy a kol. 2005, 2009).

Nejčastější lipidické třídy nalézané v přírodě se skládají z mastných kyselin, které jsou spojeny pomocí esterové vazby s glycerolem, nebo s jinými alkoholy, jako jsou steroly nebo amidovou vazbou se sfingosinem a podobnými aminoalkoholy. Kromě toho mohou obsahovat i např. kyselinu fosforečnou, organické zásady, sacharidy a mnoho dalších komponent, které se z nich mohou uvolnit různými hydrolytickými postupy.

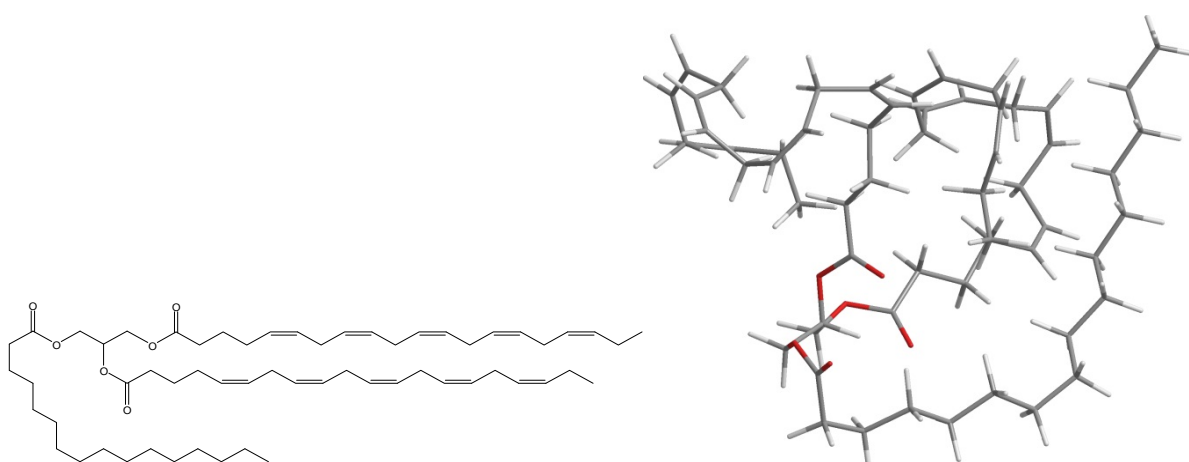
Lipidy lze členit do dvou širokých kategorií, které jsou vhodné zejména pro analytické účely. Jednoduché lipidy jsou definovány jako takové lipidy, které hydrolyzou poskytují nejvýše dva typy primárního produktu; složené (komplexní) lipidy dávají hydrolyzou tři nebo více primárních produktů. Výrazy „neutrální“ a „polární“ lipidy rovněž slouží pro definice těchto skupin, ale jsou méně přesné.

Komplexní lipidy jsou glycerofosfolipidy (nebo méně přesně fosfolipidy), které jako polární složku obsahují jednu z kyselin fosforu a glycerol, nebo glykolipidy (buď glykoglycerolipidy nebo glykosfingolipidy), které obsahují polární sacharid(y) (Schmid a Ohlrogge 2008). Situace je dále komplikována existencí fosfoglykolipidů a sfingofosfolipidů (např. sfingomyelinu).

3. Jednoduché lipidy – Triacylglyceroly (TAG)

Skoro všechny komerčně důležité tuky a oleje živočišného nebo rostlinného původu se skládají téměř výlučně z jednoduchých lipidů – triacylglycerolů („triglyceridů“ ve starší literatuře). TAG obsahují v molekule glycerol, kde každý hydroxyl je esterifikován mastnou kyselinou. V přírodě jsou syntetizovány enzymovými systémy, které umožňují vznik centra asymetrie na druhém uhlíku glycerolu, a tak TAG existují ve dvou enantiomerních formách.

Pro popis struktury se doporučuje stereospecifický systém číslování TAG. Ve Fischerově projekci přírodního L-glycerolu je sekundární hydroxylová skupina na levé straně C-2 atomu uhlíku. Předpona „*sn*“ je umístěna před názvem sloučeniny, pokud je u ní definována stereochemie, viz např. Obrázek 2.



Obrázek 2. Struktura a trojrozměrný model 1,2-(*cis*)-5,8,11,14,17-dieicosapentaenoyl-3-palmitoyl-*sn*-glycerolu (EEP).

Všechny eukaryotní organismy a dokonce i několik organismů prokaryotních (Alvarez and Steinbuchel 2002) má schopnost syntetizovat triacylglyceroly a jejich biosyntéza je intenzivně zkoumána zejména ve vyšších rostlinách, řasách a kvasinkách. TAG slouží především jako úložiště energie, která může být rychle uvolněna. Kapičky lipidů (droplets) mohou také sloužit jako absorbenty biologicky aktivních a potenciálně škodlivých lipidů jako jsou volné mastné kyseliny, diacylglyceroly, estery koenzymu A, apod.

TAG jsou vůbec nejdůležitějšími lipidy, ať na ně pohlížíme jako na zdroj energie pro rostliny nebo živočichy včetně člověka, nebo jako na náhradu za fosilní paliva, tj. biopaliva.

3.1. *De novo* syntéza mastných kyselin

Řasy fixují vzdušný CO₂ pomocí sluneční energie za vzniku glukosy. Sacharidy jsou dále štěpeny na acetyl-CoA, který slouží pro syntézu mastných kyselin v chloroplastech. Mastné kyseliny jsou stavebními kameny drtivé většiny lipidů, včetně triacylglycerolů. Acetyl

CoA karboxylasa produkuje malonyl-CoA, základní prekurzor používaný při biosyntéze mastných kyselin. 16- nebo 18-uhlíkaté mastné kyseliny jsou tvořeny opakující se sérií reakcí, při které je prodlužován uhlíkatý řetězec o dva atomy uhlíku. Řetězová reakce je ukončena působením acyl-AKT thioesterasy. Specificita tohoto enzymu obvykle určuje konečnou délku řetězce mastné kyseliny. Vzniklé mastné kyseliny mohou být dalšími enzymatickými reakcemi buď prodlouženy, nebo desaturovány, nebo mohou probíhat obě dvě reakce.

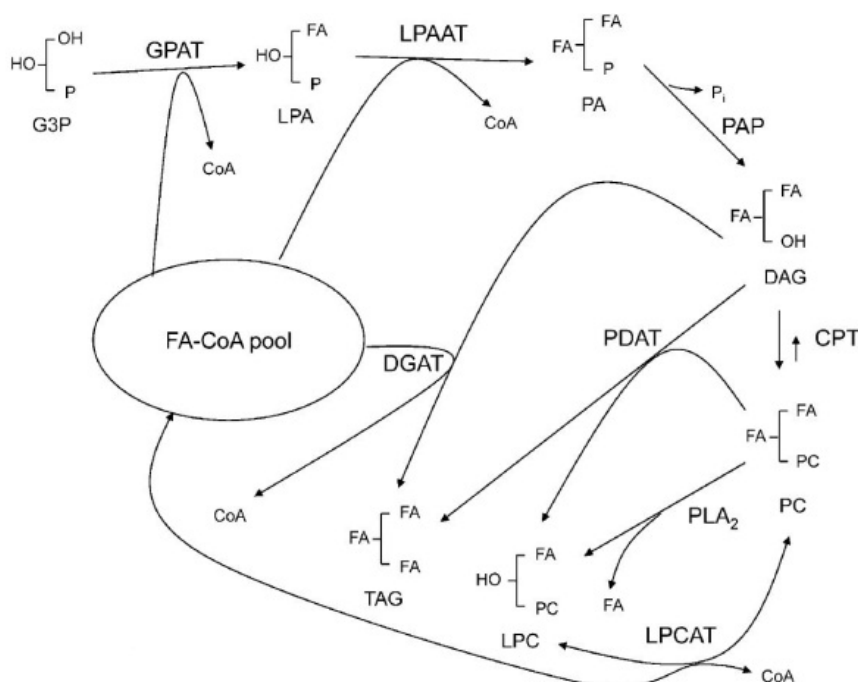
3.2. Biosyntéza acyl-lipidů

Je všeobecně známo, že triacylglyceroly jsou tvořeny sekvenční acylací *sn*-glycerol-3-fosfátu (G3P) třemi acyl-CoA katalyzovaných skupinou enzymů označovaných jako acyltransferasy. Tuto dráhu poprvé popsal Eugene Kennedy se spolupracovníky v roce 1950 a je také známá jako „Kennedyho dráha“ (Obrázek 3).

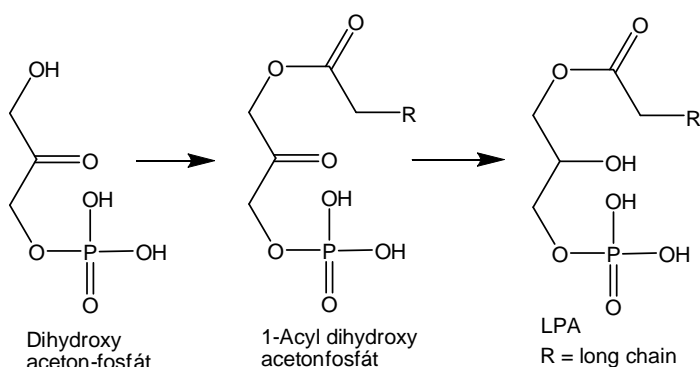
Biosyntéza je zahájena acylací *sn*-1 polohy G3P prostřednictvím *sn*-glycerol-3-fosfát acyltransferasy (GPAT) za vzniku lyso-fosfatidové kyseliny (LPA). LPA je pak dále acylována pomocí acyltransferasy fosfolipidů. (LPAT) za vzniku kyseliny fosfatidové (PA). Kyselá fosfatid fosfatasa (PAP) katalyzuje uvolnění fosfátové skupiny z kyseliny fosfatidové za tvorby *sn*-1,2-diacylglycerolu (DAG), centrálního meziprojektu všech glycerolipidů. Posledním krokem biosyntézy je katalýza diacylglycerol acyltransferasou (DGAT), za tvorby triacylglycerolů. Výše uvedené tři acyltransferasy používají acyl-CoA jako dárce acylu a tyto reakce jsou tak závislé na acyl-CoA.

V prokaryotních mikroorganismech je glycerol-3-fosfátová dráha biosyntézy majoritní, ale u kvasinek glycerol-3-fosfát a dihydroxyaceton-fosfát mohou být primárními prekurzory (Obrázek 4) a syntéza probíhá v cytoplazmatických kapičkách lipidů a endoplazmatickém retikulu (Murphy 2001). Je však jen málo známo o tom, proč membránové a zásobní lipidy mají velmi odlišné složení mastných kyselin (Chapman and Ohlrogge 2012).

Alternativní cesty syntézy TAG jsou přítomny jak v rostlinách, tak i v dalších eukaryotních organismech. Za katalýzy diacylglycerol acyltransferasou (PDAT) dochází k syntéze triacylglycerolů pomocí fosfatidylcholinu jako dárce acylu a *sn*-1,2-diacylglycerolu jako jeho příjemce.



Obrázek 3. Schéma biosyntézy TAG. Zkratky: CoA, koenzym A; CPT, cholinefosfotransferasa; DAG, sn-1,2-diacylglycerol; FA-CoA, acyl-koenzym A; G3P, sn-glycerol-3-fosfát; GPAT, sn-glycerol-3-fosfát acyltransferasa; LPA, lysofosfatidová kyselina; LPAAT, acyltransferasa lysofosfatidové kyseliny; LPC, lysofosfatidylcholin; LPCAT, lysofosfatidylcholin acyltransferasa; PA, fosfatidová kyselina; PAP, fosfatasa fosfatidové kyseliny; PC, fosfatidylcholin; PDAT, fosfolipid:diacylglycerol acyltransferasa; PLA₂, fosfolipasa A2 (Snyder a kol. 2009).



R=dlouhý řetězec

Obrázek 4. Alternativní cesty syntézy TAG z dihydroxyaceton-fosfátu.

Byly popsány nesčetné pokusy o predikci složení molekul přírodních TAG, zvláště co se týká skladby mastných kyselin v různých polohách glycerolu. V přírodních TAG podíly jednotlivých molekul závisí na konkrétních aktivitách enzymů, tj. acyl transferáz, které se podílejí na jejich biosyntéze a na množství mastných kyselin, jež jsou k dispozici. Byly navrženy matematické modely, které vycházejí z aktivit těchto enzymů, a které využívají pro

analýzu dat stereospecifického podílu jednotlivých molekul. Bohužel však tyto modely neobstály díky stále se rozšiřujícím možnostem analytických přístrojů a byly proto opuštěny.

3.3. Molekulární a druhová skladba triacylglycerolů

Je dobře známo, že přírodní TAG existují v podobě velkého množství různých molekul (molekulárních druhů). Problém může být velmi složitý; například pro triacylglycerol s pouhými pěti různými mastnými kyselinami je počet možných molekulárních druhů (různých molekul) 75, nepočítaje v to optické izomery, nebo 125, pokud jsou zahrnuty, viz Tabulka 1.

Tabulka 1. Počet možných TAG.

popis	počet
bez isomerů	$y=(x^3+3x^2+2x)/6$
bez optických isomerů	$y=(x^3+x^2)/2$
všechny isomery	$y=x^3$

x je počet mastných kyselin v TAG, kde y je počet TAG

S rostoucím počtem přítomných mastných kyselin roste i počet molekulárních druhů a dosahuje astronomických rozměrů, např. pro 20 mastných kyselin, které jsou součástí většiny mikrobiálních olejů (Lang a kol. 2011), lze ze vzorce v Tabulce 1 zjistit, že celkový počet TAG je 8000. Dosud se nepodařilo v jednom vzorku identifikovat více než stovky molekulárních druhů (přesně 324), viz např. Francois a kol. (2010).

Existují, lépe řečeno existovaly, tři základní metody analýzy TAG - vysokoteplotní plynová chromatografie, chromatografie na reverzní fázi a argentační iontová chromatografie, při níž se TAG v podstatě dělí podle stupně nenasycenosti a vytváří se slabé vazby mezi π elektrony dvojných vazeb mastné kyseliny a d elektrony iontů stříbra.

Byly publikovány separace triacylglycerolů plynovou chromatografií (Ruiz-Gutierrez a Barron 1995, Aparicio a Aparicio-Ruiz 2000), ale bohužel tato technologie byla prováděna na hranici svých možností a o kvantifikaci TAG se nemohlo ani uvažovat, neboť při teplotách okolo 300°C docházelo k degradaci vzorku TAG, zvláště když se jednalo o TAG obsahující nenasycené mastné kyseliny. Tuto skutečnost jsme potvrdili v jedné z našich prací (Řezanka and Mareš 1991, **pub 48**), kde byly molekulární druhy TAG stanoveny v rostlinných tucích a olejích, a to jak kvalitativně, tak také kvantitativně. Analýza byla provedena prostřednictvím kapilární GC-MS na „polarizovatelné“ koloně, dále s pomocí RP-HPLC a též za použití hmotnostní spektrometrie – desorpce chemickou ionizací (DCI-MS). Pro kvalitativní analýzu a identifikaci byly použity hodnoty ECN (equivalent carbon number) a ECL (equivalent chain length). Některé rostlinné oleje, včetně kakaového másla, tj. TAG s menším počtem dvojných

vazeb, lze identifikovat bez problémů pomocí GC-MS, RP-HPLC i DCI-MS. Stanovení GC-MS selhala pouze u olejů s velkou distribucí délek řetězců, tj. řepkového oleje (s vysokým obsahem kyseliny erukové) nebo u olejů s vysokým stupněm nenasycenosti, jako je lněný olej nebo olej z černého rybízu. Nicméně vzájemnou kombinací výsledků všech tří metod bylo možno identifikovat řadu molekulárních druhů TAG v různých rostlinných olejích (Řezanka and Mareš 1991, **pub 48**, Řezanka a Řezanková 1999 **pub 108**). Z dosažených výsledků tak plyne, že např. u olejů s vysokým podílem molekulárních druhů obsahujících PUFA, tj. lněný olej a olej z černého rybízu, které obsahují TAG typu L_nL_n a LLL_n (kde L je kyselina linolová a L_n je kyselina linolenová, viz Tabulky 9 a 10 v příslušné publikaci), nelze stanovit kvantitativní a v mnoha případech ani kvalitativní zastoupení.

Tytéž metody jsme použili i pro stanovení TAG v zelené řase *Chlorella kessleri* (nyní přejmenované na *Parachlorella kessleri*) (Krienitz a kol. 2004). Bylo zjištěno, že majoritními jsou C54 triacylglyceroly, tj. takové TAG, které mají tři kyseliny s 18 atomy uhlíku. Opět se potvrdilo, že u nenasycených TAG (s více než 4 dvojnými vazbami) dochází k diskriminaci při GC-MS a TAG se 7 dvojnými vazbami už nebyly pomocí GC-MS nalezeny, zatímco DCI-MS jejich přítomnost potvrdila, viz Tabulka 1 v příslušné publikaci (Řezanka a kol. 1986, **pub 20**). Tak se vlastně použití plynové chromatografie a případně i spojení GC-MS opět neosvědčilo a muselo se čekat více než 20 let na vývoj další metody, kterou je LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry), viz níže.

Aby obraz nepolárních lipidů, které obsahovala řasa *C. kessleri*, byl úplný, charakterizovali jsme jak voskové estery, tak i estery sterolů. Vosky je obecný termín používaný k označení směsi nepolárních lipidů s dlouhými řetězci nebo velmi dlouhými uhlíkovými řetězci (od 12 do asi 38 atomů uhlíku), které vytvářejí ochranný povlak na řasách, houbách a bakteriích. Všechny vosky jsou ve vodě nerozpustné a jsou složeny z různých molekul organických sloučenin, včetně monoesterů (wax esters). V některých rostlinách a řasách může být alkoholem fyto. Voskové estery chrání povrch buňky před vysušením. U některých řas rodů *Chlorella* a *Scenedesmus* byla později dokázána přítomnost komplexních esterů vosků (Allard a Templier 2001).

Voskové estery byly izolovány ze sladkovodní zelené řasy *C. kessleri* kultivované heterotrofně a jejich jednotlivé molekulární druhy obsahující až 50 atomů uhlíku, byly identifikovány pomocí GC-MS. Tyto voskové estery jsou složeny z velmi dlouhých mastných kyselin až do kyseliny dotriakontanové (C32) a z alkoholů, kde 13-eikosenol a hexadekanol jsou hlavními zástupci. Monoenové kyseliny měly neobvyklou polohu dvojně vazby, a to v pozici ω -18 (Řezanka and Podojil 1986, **pub 21**).

Kvasinky a houby všeobecně, spolu s řasami, mohou obsahovat obrovskou škálu různých sterolů (Volkman 2003). Estery sterolů jsou přítomny v buňkách, ale v menším zastoupení v porovnání s volnými steroly. Mastné kyseliny i steroly ve sterol esterech se kvalitativně i kvantitativně podobají ostatním lipidům buněk, ale mohou být i značně rozdílné. U sterol esterů se předpokládá, že slouží jako inertní zásobní forma sterolů, nicméně byly nalezeny i v membránách, zejména v mikrozomech a mitochondriích, ale jejich funkce je neznámá. Mohou hrát také roli v přenosu uvnitř buněk, protože byly nalezeny ve formě rozpustných lipoproteinových komplexů (Grille a kol. 2010).

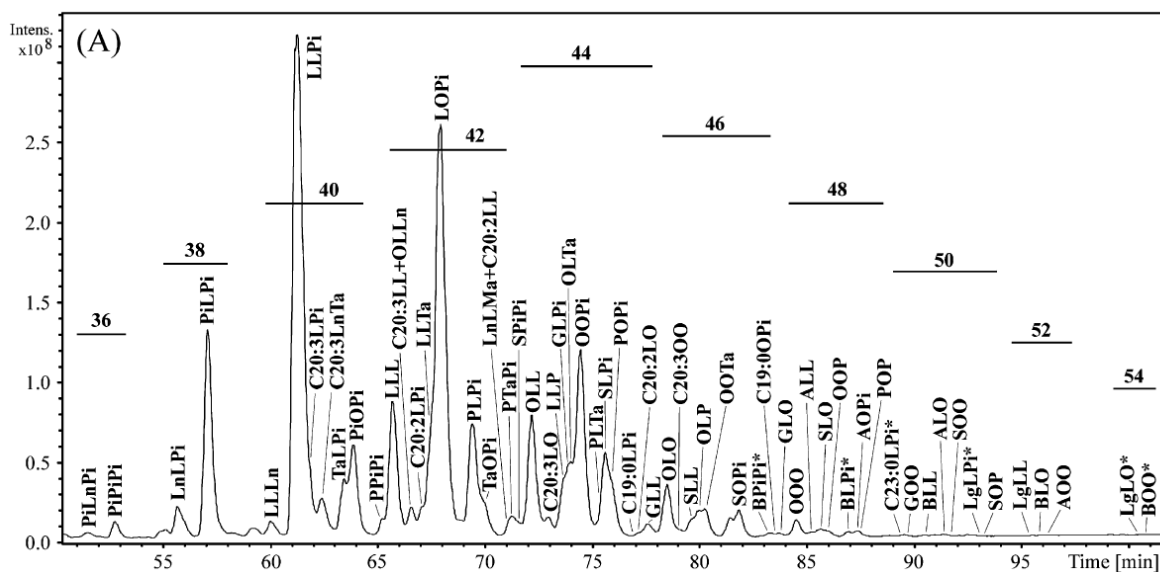
Steroly ze zelené řasy *C. kessleri* a z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byly analyzovány pomocí tandemu dvou vysoce účinných kapalinových chromatografií (HPLC-HPLC) (Řezanka 1992, **pub 58**). Nepolární lipidy byly rozděleny HPLC s normální fází (silikagelem) na jednotlivé třídy a frakce sterol esterů byla následně dělena RP-HPLC na molekulární druhy. Další separace a identifikace frakcí po HPLC byla provedena pomocí GC-MS s pozitivní a/nebo negativní chemickou ionizací. Těmito metodami bylo možné prokázat více než 30 sterol esterů v řase a bylo zjištěno více než 20 nových sterol esterů v kvasince (Řezanka 1992, **pub 58**).

3.4. Využití LC-MS při analýze

Při chromatografii na reverzní fázi (RP-HPLC) je využíváno kombinované dělení jak dle stupně nenasycenosti, tak i dle délky řetězce mastných kyselin. Vynikající rozlišení TAG na RP-HPLC je známo již mnoho let, bohužel mnoho praktických a teoretických aspektů zůstává dosud neobjasněno (Dugo a kol. 2006, Hellmuth a kol. 2011).

Teorie dělení je poměrně dobře známa a z těchto teoretických předpokladů plyne, že retenční čas je závislý na celkovém počtu atomů uhlíku ve třech acylech; s každou dvojnou vazbou se snižuje efektivní řetězec o dva atomy uhlíku. Ve skutečnosti je v účinných moderních systémech toto číslo menší než dvě a závisí na poloze dvojně vazby. Dvojná vazba v dienech má jiný efekt než dvě dvojně vazby ve dvou monoenech (Perrin and Naudet 1983). Obrázek 5 ukazuje rozdělení molekul triacylglycerolů z rostlinného oleje (modřín).

K dispozici je omezený výběr stacionárních fází, které můžeme vzít v úvahu. Fáze typu octadecylsilyl (C18 nebo ODS) se používají téměř všeobecně. Z teoretického hlediska stacionární fáze podobné délkou řetězce acyl řetězcům mastných kyselin maximalizují interakce a mají nejvyšší účinnosti (C8 a C30 fáze byly vyzkoušeny bez zjevné výhody). Standardní 250 x 4.6 mm kolony s fází o průměru 5 mikronů lze snadno nahradit fází se 3 mikrony z důvodů úspory času a rozpouštědla, a to bez ztráty rozlišení.



Obrázek 5. RP-HPLC/APCI-MS analýza TAG z oleje semen modřínu opadavého (Lisa a kol. 2007, **pub 181**)

Výběr mobilní fáze se v podstatě zúžil na směs acetonitrilu s vhodným modifikátorem, kterým bývá buď aceton, dichlormethan, tetrahydrofuran nebo methyltercbutylether a 2-propanol. Modifikátor rozpouštědla zvyšuje rozpustnost triacylglycerolů v mobilní fázi, což má vliv na selektivitu a účinnost separace. Aceton nebo acetonitril jsou velmi dobré pro dělení rostlinných olejů, ale jsou méně vhodné pro nasycené TAG, jako je tristearin, protože tyto TAG mají tendenci srážet se z roztoku. Tento účinek není u směsi dichlormethan-acetonitril (Heron a Tchapla 1994). Dobré výsledky byly také získány s mobilní fází tetrahydrofuran-acetonitril, i když methyltercbutylether má přednost před tetrahydrofuranem, a to proto, že je stabilnější vůči oxidaci.

Jedním z důležitých praktických bodů, který je třeba zmínit, je volba rozpouštědla pro injekci TAG. Vzorky je nejlépe aplikovat v minimálním objemu mobilní fáze, tj. 5 až 10 μl , nikoliv v hexanu, který má podobné vlastnosti jako stacionární fáze a tím konkuruje rozpuštěným látkám (TAG).

Teplota kolony je velmi důležitá, nejčastěji se používá laboratorní teplota a pokud možno termostatovaná kolona, aby se zamezilo fluktuaci teploty během analýzy. Teoreticky platí, že čím nižší teplota, tím lepší separace, bohužel však při nižší teplotě se některé nasycené TAG mohou z roztoku vysrážet. Při vyšší teplotě se zhoršuje dělení a u labilních TAG (majících až 18 dvojných vazeb) může též docházet k degradaci.

V podstatě jediný smysluplný detektor je hmotnostní spektrometr. Všechny ostatní (měření UV, indexu lomu nebo evaporative light-scattering detector) mají velká omezení a při jejich použití dochází ke ztrátě informací o struktuře eluované látky, respektive z principu

nemůže být získána žádná informace o struktuře, viz např. historická kniha (Christie 1989). Použití standardů je naprosto nesmyslné, neboť by se jednalo o stovky TAG, navíc komerčně dostupných je jich jen pár desítek. APCI (atmospheric-pressure chemical ionization) nebo ESI (electrospray ionisation) se dobře hodí pro identifikaci komponent i pro jejich kvantifikaci, pokud je pečlivě provedena kalibrace (Byrdwell 2005, Christie and Han 2010, Leskinen a kol. 2010).

V současné době je použití tandemové hmotnostní spektrometrie (MSⁿ) stále běžnější. Používá se většinou ionizace atmosférickým tlakem nebo elektrosprejem. Tyto techniky mohou být použity ve spojení s kapalinovou chromatografií nebo přímým vstřikem TAG do přístroje a poskytují informace o molekulárních druzích včetně regiospecifického, ne však stereospecifického rozdělení mastných kyselin v *sn*-triacylglycerolech.

Nová kapitola ve výzkumu TAG začala přibližně po 20 letech a to s rozvojem analytických technik. Jak plyne z našeho review (Řezanka a Sigler 2007, **pub 186**), metody analýzy se za 20 let diametrálně změnily, což lze dokumentovat především na základě Tabulky 1 tohoto review. Jsou zde uvedeny desítky příkladů analýzy TAG pomocí RP-HPLC, a to mnohdy i z kuriózních zdrojů, jako jsou zbytky lipidů na dně hrnců na vaření z doby starého Říma. Bohužel ani zde se neobjevily analýzy TAG majících ve své molekule PUFA, což nás vedlo k zahájení výzkumu TAG v zelených řasách, ale i v dalších mikroorganismech.

3.5. *Řasy a sinice*

Jak řasa *Trachydiscus minutus* z třídy Eustigmatophyceae, tak i rozsivka *Phaeodactylum tricorutum* byly kultivovány na standardním mediu a mediích s vyloučením sloučenin síry, křemíku, dusíku a nebo fosforu. TAG byly analyzovány pomocí RP-HPLC/MS-APCI a bylo identifikováno mnoho desítek molekulárních druhů, viz Tabulka 2 v Řezanka a kol. (2011b, 2012d, **pub 225 a 231**).

V obou těchto publikacích jsme se zaměřili především na produkci, lépe řečeno na vzájemný poměr TAG majících v molekule alespoň jednu PUFA, tj. esenciální mastnou kyselinu EPA (all-*cis*-5,8,11,14,17-eikosapentaenovou). Zatímco polohové izomery TAG lze od sebe separovat na RP-HPLC a dále je identifikovat na základě příslušných iontů v MS, optické izomery je nutno dělit na chirální koloně. Ty byly dosud odděleny jen zřídka (syntetické směsi), a pouze jednou z přírodního zdroje (palmový olej). Iwasaki a kol. (2001) oddělil bez předchozí derivatizace za použití chirální stacionární fáze na bázi polysacharidů enantiomery TAG s velmi odlišnými acyl skupinami, např. 1-eicosapentaenoyl-2,3-dicapryroyl-*sn*-glycerol (*sn*-ECC od *sn*-CCE). Nagai a kol. (2011) a Gotoh a kol. (2011) použili opakovanou HPLC (6 cyklů) pro separaci 1,2-dioleoyl-3-palmitoyl-*sn*-glycerolu a 1-

palmitoyl-2,3-dioleoyl-*sn*-glycerolu (*sn*-POO a/nebo *sn*-OOP) z palmového oleje. Tím byla otevřena cesta, i když poměrně náročná, k získání strukturovaných TAG.

Přítomnost vysokých koncentrací ω -3 FA v řasách, tj. kyselin arachidonové a eicosapentaenové je označována jako jedna z hlavních výhod, které jsou nezbytné pro organismy v posledním článku potravinového řetězce (např. člověka). Bylo popsáno, že poloha FA v molekule TAG ovlivňuje mnoho nutričních vlastností, oxidační stabilitu, absorpci a metabolismus v organismu a aterogenesi (Cubow 1996, Cossignani a kol. 1999). FA vázané v polohách *sn*-1 a *sn*-3 jsou lépe hydrolyzovány pankreatickou lipázou, zatímco FA v *sn*-2 poloze glycerolu se mnohem lépe vstřebávají ve formě monoacylglycerolů; např. děti lépe absorbují kyselinu palmitovou vázanou v *sn*-2 poloze a obsaženou v mateřském mléce, než tutéž FA z rostlinných olejů, vázanou však v polohách *sn*-1 nebo *sn*-3 (Quinlan a Moore 1993). Nejlepší nutriční vlastnosti mají TAG obsahující v *sn*-2 poloze PUFA. Tyto TAG obsahují v *sn*-2 poloze především EPA a ARA a jsou snadněji absorbovány než TAG se stejným složením FA, které jsou ale náhodně rozděleny. Je zajímavé, že tyto strukturované TAG mohou chránit před hypertriglyceridemií a obezitou způsobenou vysokým obsahem tuku ve stravě (Takeuchi a kol. 2002).

Použití moderních analytických metod, jako je RP-HPLC/MS-APCI spolu s tandemovým MS nebo SIM (single ion monitoring), nám umožnilo identifikovat 82 molekulárních druhů TAG v řase *Trachydiscus minutus*. Drtivá většina z nich, tj. 74, obsahuje alespoň jednu PUFA. Pomocí GC-MS methyl esterů jsme zjistili, že obsah EPA a ARA je závislý na nedostatku dusíku a fosforu. Podobný efekt byl pozorován u TAG analyzovaných pomocí LC-MS. Bylo zjištěno, že poměr čtyř molekulárních druhů, tj. EEE, EEA, EAA a AAA, se rychle zvyšuje při nedostatku dusíku.

Nejdůležitější však bylo zjištění, že nedostatek dusíku a fosforu má velký vliv na regiostereospecifitu TAG, tj. na biosyntézu polohových izomerů, ať už se jedná o symetrické (EPE, PEP, APA, PAP), nebo asymetrické TAG. Tento fakt může být použit k přípravě cílených stereoisomerů TAG, tj. strukturovaných TAG, obsahujících PUFA. Tyto TAG, jak bylo již zmíněno, umožňují lepší využití triacylglycerolů v lidské výživě.

Pomocí RP-HPLC v kombinaci s APCI-MS jsme identifikovali jednotlivé polohové izomery u rozsivky *Phaeodactylum tricorutum*, a to jak v kontrolní kultivaci, tak i při N, P, S a Si-hladovění. Na chirální stacionární fázi jsme také separovali směsi racemických asymetrických TAG, a to dva páry TAG, tj. *sn*-PPE, *sn*-EPP a *sn*-EEP, *sn*-PEE, na jednotlivé enantiomery v jednom cyklu. S výjimkou křemíku, nedostatek dalších živin (N, P, S) obrátil

poměry symetrických a asymetrických TAG, zatímco poměry jednotlivých enantiomerů byly také ovlivněny různými typy hladovění, viz Tabulka 2.

Za vhodných kultivačních podmínek tak lze přímo vytvářet strukturované TAG, které mají ve zvýšené míře PUFA v poloze *sn-2*, protože při kontrolní kultivaci je množství EPA v *sn-2* poloze pouhých 25 %, zatímco při nedostatku fosforu a křemíku se zvyšuje až na 85 % celkových TAG obsahujících dvě molekuly palmitové kyseliny a jednu kyselinu eikosapentaenovou. Obdobně platí, že při kultivaci za nedostatku síry a křemíku bylo biosyntetizováno největší množství nutričně prospěšných TAG s kyselinou palmitovou v poloze *sn-2* (Tabulka 2).

Úplné vysvětlení, proč jsou u rozsivky oba enantiomery TAG syntetizovány, stále chybí. Bylo navrženo několik teorií, viz podrobně v naší **pub 231**. Domníváme se, že nejpravděpodobnější možností je změna v centru chiraloty na uhlíku *sn-2* a tím i tvorba obou enantiomerů, která by se mohla uskutečnit intramolekulární transesterifikací - viz např. *in vitro* experiment ze studie Iwasaki a kol. (2001). Poměry jednotlivých TAG enantiomerů byly ovlivněny nedostatkem dusíku, fosforu a síry, viz Tabulka 2.

Další pokrokem v chirálních separacích asymetrických TAG by bylo možné získat dostatečné množství strukturovaných TAG a provést experimenty *in vivo*, aby se buď potvrdily, nebo vyvrátily výše uvedené dietetické hypotézy.

Tabulka 2. Poměry tří TAG, tj. *sn*-EEP, *sn*-PEE, *sn*-EPE, *sn*-PPE, *sn*-EPP, a *sn*-PEP při různém nedostatku živin – hladovění u rozsivky *Phaeodactylum tricornutum*.

živiny	<i>sn</i> -EEP	<i>sn</i> -PEE	Σ asym	<i>sn</i> -EPE	Σ sym	<i>sn</i> -EPP	<i>sn</i> -PPE	Σ asym	<i>sn</i> -PEP	Σ sym
kontrola	57	29	86[#]	14	14	41	34	75	25	25
-P-Si	6	16	22	78	78	5	10	15	85	85
-N-Si	23	9	32	68	68	23	10	33	67	67
-S-Si*	19	7	26	74	74	18	7	25	75	75
-P+Si	6	10	16	84	84	7	13	20	80	80
-N+Si	21	11	32	68	68	22	8	30	70	70
-S+Si*	14	7	21	89	89	16	6	22	78	78
kontrola <i>Trachydiscus</i>			91		9			75		25
-P <i>Trachydiscus</i>			33		67			16		84
-N <i>Trachydiscus</i>			40		60			25		75

*N/P 7.82 (16.04 mg N/L a 2.05 mg P/L), poslední tři řádky - bylo doplněno srovnání pro *Trachydiscus* (Řezanka a kol. 2011b, **pub 225**).

Tučné číslice jsou sumy enantiomerů (*sn*-EEP + *sn*-PEE and/or *sn*-EPP + *sn*-PPE) z (Řezanka a kol. 2011b), kde byly identifikovány jen polohové izomery a nikoliv enantiomery.

Ve fotosyntetizujících prokaryotních mikroorganismech byly nepolární lipidy identifikovány v mnoha sinicích, např. v *Scytonema julianum* a *Chroococcidiopsis* sp. (Antonopoulou a kol. 2005a, b), *Pseudanabaena* sp. a *Oscillatoria splendida* (Deloura a kol. 1987). Řezanka a kol. (2003) a Ward a kol. (1994) identifikovali nepolární lipidy v sinicích na základě dvojrozměrné TLC. Již v roce 1993 Taranto a kol. (1993) analyzoval lipidy sinice *Nostoc commune* pomocí TLC a identifikoval nejen nepolární lipidy, ale i TAG, bohužel bez jejich kvantifikace. Také Bychek a Bychek (1997) identifikovali v *N. commune* nepolární lipidy, převážně TAG (až 4,4 mg/g suché biomasy). Ramadan a kol. (2008) našel pomocí TLC až 25 % TAG, vztaženo na sušinu sinice *Spirulina platensis*.

RP-HPLC/APCI-MS byla použita pro přímou analýzu TAG z různých kmenů sinic *Mastigocladus laminosus* a *Tolypothrix* cf. *tenuis* a *T. distorta* (Řezanka a kol. 2012a, **pub 228**). Tato technika umožnila identifikaci a kvantifikaci specifických molekulárních druhů. Regioisomerní serie TAG s kyselinami α -linolenovou a γ -linolenovou a také olejovou a *cis*-vaccenovou byly děleny RP-HPLC a identifikovány pomocí APCI-MS. *M. laminosus* produkuje jen několik molekulárních druhů TAG, viz obrázek 2S (Supplements v **pub 228**), včetně obou izomerů oktadecenových kyselin (olejová a vaccenová), zatímco *T. distorta* obsahovala desítky molekulárních druhů TAG, obsahujících FA až se čtyřmi dvojnými vazbami, jako je kyselina stearidonová a její polohový izomer, tj. 3,6,9,12-oktadekatetraenová kyselina) a dále i polohové izomery (α a γ) kyseliny linolenové.

Například složení 54:11 frakce nám umožnilo ukázat, jaký vliv má nadmořská výška na nenasycenost FA. Suma procentového zastoupení dvou TAG tj. $St\alpha LnSt$ a $St\gamma LnSt$ (St - stearidonová, αLn - α -linolenová, γLn - γ -linolenová kyselina) v sinici sebrané v Tatrách je 1,2 %, což může být podle našeho názoru způsobeno nižší průměrnou teplotou v horách, protože místo, kde byly sinice sebrány, leží v nadmořské výšce 1750 m (Kopské sedlo), zatímco Pražská botanická zahrada se nachází v nadmořské výšce nižší než 200 m, a tak obsahuje jen 0,3 % sumy obou výše zmíněných TAG.

Bylo též zjištěno, že *M. laminosus*, který byl izolován z horkých pramenů v blízkosti Sofie, má velmi podobné složení mastných kyselin, ale ne už TAG, jako *M. laminosus* izolovaný z Karlových Varů (Tabulka 2 v **pub 228**). Různý poměr TAG se projevuje především v odlišnosti regioisomerů obsahujících polohové izomery mastných kyselin, tj. olejové a vaccenové, viz Tabulka 3. Tato analýza je krásným příkladem toho, proč nestačí analyzovat jen FA, ale je nutné analyzovat též TAG.

Tabulka 3. Obsah oktadecenových kyselin a jim odpovídajících TAG v sinicích.

Zkratka FA nebo TAG	<i>M. laminosus</i> K. Vary	<i>M. laminosus</i> Sofie
O	21,0±1,45	19,8±1,73
V	9,4±0,65	11,0±0,98
POO	1,2	4,1
OPO	0,7	3,9
PVV	3,9	0,8
VPV	3,4	0,6

Z tabulky je zřejmé, že zatímco obsah FA byl téměř shodný, např. kyseliny olejové bylo přítomno okolo 20 % v obou kmenech, tak obsah triacylglycerolu OPO byl u sinice z K. Varů více než 5x nižší.

3.6. Bakterie

Teprve nedávno bylo dokázáno, že TAG jsou přítomny v některých skupinách prokaryotních mikroorganismů (Alvarez and Steinbuchel 2002). Biosyntéza a intracelulární akumulace TAG byla potvrzena jak u Gram-negativních, tak i u Gram-positivních bakterií, ale také u sinic. Tato schopnost je však omezena pouze na několik skupin prokaryotů, mezi něž patří zvláště bakterie ze skupiny aktinomycet, tj. rody *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*. Zástupci těchto rodů produkují různé množství neutrálních lipidů při pěstování na různých zdrojích uhlíku. Koncentrace TAG v buňkách *Rhodococcus opacus* může dosahovat až 80 % sušiny buněk (Alvarez a kol. 1996). V TAG rodu *Rhodococcus* byly identifikovány některé neobvyklé mastné kyseliny (4,8,12-trimethyl tridekanová nebo fenyldekanová), pokud buňky rostly na neobvyklých zdrojích uhlíku, jako byl pristan (2,6,10,14-tetramethylpentadekan) nebo fenyldekan. Vysoce větvené a aromatické mastné kyseliny, získané při katabolismu uhlovodíků, nejsou vhodné pro udržení funkčnosti (vhodné fluidity) buněčných membrán, a proto byly inkorporovány do TAG. *R. opacus* pěstovaný na glukonátu vykázal poměrně vysoký obsah lichých mastných kyselin (Alvarez a kol. 1996).

Pro přímou analýzu TAG u rodu *Rhodococcus erythropolis* CCM 2595 byla použita RP-HPLC/MS-APCI (Řezanka a kol. 2010a, **pub 211**). Tato technika nám umožnila identifikaci a kvantifikaci specifických molekulárních druhů TAG přímo z bakterií, včetně stanovení jejich základních charakteristik, jako jsou retenční časy a hmotnostní spektra. Vícenásobná lineární regresní analýza byla použita pro predikci retenčních časů molekulárních druhů, převážně pro TAG s lichými řetězci. Celkem bylo identifikováno 17 TAG majících alespoň jednu lichou FA. Je to poprvé, kdy byly v takovém množství identifikovány TAG s lichými řetězci, převážně s pentadekanovou a heptadekanovou a heptadecenovou kyselinou. Kultivace na

dvou různých substrátech (fenol a kyselina jantarová), jako jediných zdrojích uhlíku a při dvou různých teplotách (20 a 30 °C) ukázala, že pouze teplota měla vliv na obsah TAG. Při snížení teploty z 30 na 20 °C a při kultivaci na sukcinátu, jako jediném zdroji uhlíku se obsah TAG zvýšil o polovinu (tj. z 23,5 na 34,2 %). Obsah triacylglycerolů PoPoMo, PoMoO a PPoMo (viz Tabulka 1 **pub 211**; Po - palmitolejová, P - palmitová a O - olejová kyselina) obsahujících v molekule heptadecenovou kyselinu (Mo), což je kyselina s lichým řetězcem, se zvýšil z 0,0 na 7,1 %. V případě kultivace na fenolu, jako jediném zdroji uhlíku a při snížení kultivační teploty se obsah těchto TAG zvýšil z 0,5 na 6,7 %. Podobná zjištění byla publikována ve dvou pracích týkajících se rodu *Rhodococcus* (Takaichi a Ishitsu 1993, Whyte a kol. 1999). První práce uvádí, že obsah FA s lichým počtem atomů uhlíku se mění se změnou teploty a při zvýšené teplotě dochází ke snížení obsahu těchto FA, ale tento fakt není dále komentován. Detailní RP-HLPC/MS-APCI analýza tak umožnila identifikovat TAG z rodu *Rhodococcus* jako vhodný zdroj pro biotechnologickou bakteriální produkci oleje z jednobuněčných organismů (single cell oil), což může být zajímavé pro využití bakteriálních olejů jako potenciálních producentů oleo-chemikálií, tj. bionafty, případně biobenzínu.

V našich dalších dvou publikacích (Schreiberová a kol. 2010, Řezanka a kol. 2011c, **pub 215** a **223**), zmíněných níže jsme se zaměřili na další vynikající schopnost *R. erythropolis*, kterou je prekurzorem řízená biosyntéza (precursor directed biosynthesis).

Přidání větvených prekurzorů, tj. Val, Leu nebo Ile, případně jejich metabolitů - isobutyrátu (i-Bu), isovalerátu (i-Va) a 2-methylbutyrátu (2-MeBu) do kultivačního media má za následek tvorbu iso- mastných kyselin se sudým počtem atomů uhlíku (Val nebo i-Bu), iso- mastných kyselin s lichým počtem atomů uhlíku (Leu nebo i-Va) a anteiso- mastných kyselin s lichým počtem atomů uhlíku (Ile nebo 2-MeBu) (Schreiberová a kol. 2010, **pub 215**). Tato skutečnost byla již popsána u jiných bakterií, např. myxobakterií, *Propionibacterium freudenreichii*, *Staphylococcus xylosus* či *S. carnosus* (Beck 2005; Beck a kol. 2004; Bode a kol. 2005; Dherbecourt a kol. 2008; Jovetic a kol. 2008). Je však nutno podotknout, že rod *Rhodococcus* neprodukuje rozvětvené mastné kyseliny, pokud je kultivován na glukose. Tyto kyseliny, zvláště isopentadekanová a anteisopentadekanová kyselina, byly v nedávných studiích zjištěny jako možné inhibitory tkáňových kultur rakovinných buněk *in vivo* a *in vitro* (Parodi 2005; Vlaeminck a kol. 2006). Další experimenty odhalily, že tato aktivita se snižuje (zvysuje) se snižující se (zvysující se) délkou řetězce od isopalmitové kyseliny (Wongtangtintharn a kol. 2004). Tento efekt je vysvětlován vyšší citlivostí rakovinných buněk k syntéze mastných kyselin, než je tomu u buněk zdravých.

Tabulka 3 příslušné publikace (Schreiberova a kol. 2010, **pub 215**) uvádí relativní zastoupení těchto TAG při kultivacích na uvedených prekurzorech a sukcinátu jako kontrole. Celkem bylo identifikováno 69 TAG (detekční limit byl 0,1 % celkových TAG). Bohužel nebylo možné separovat od sebe takové TAG, jejichž FA se lišily pouze ve větvení (iso- a anteiso-), tyto TAG jsou tedy souhrnně označeny jako „br“ (branched). Párový t-test odhalil, že významné začlenění prekurzorů do molekul TAG se projevilo pouze u páru Val a i-Bu (hodnota P 0,012). U páru Leu a i-Va je tato hodnota 0,154 a u Ile a 2-MeBu je to 0,453. Další odlišností, která se projevila u valinu a isobutyrátu je přítomnost dvou rozvětvených FA v jedné molekule TAG, u ostatních prekurzorů byly nalezeny TAG s pouze jednou rozvětvenou FA. Celkový obsah rozvětvených TAG se pohyboval od 21 % (i-Bu) až k 33 % u Ile. Rod *Rhodococcus* byl tudíž shledán dobrým producentem rozvětvených FA a odpovídajících TAG a mohl by tedy být s výhodou použit jako producent těchto látek, např. pro farmaceutické použití.

Dalšími produkty prekurzorem řízené biosyntézy, na které jsme se zaměřili, byly ω -fenyl kyseliny (Řezanka a kol. 2011c, **pub 223**). Potenciální využití těchto látek spočívá v antioxidačních vlastnostech ω -fenyl kyselin a TAG, které je obsahují. Tyto látky byly identifikovány například v semenech čeledi Araceae (*Arum maculatum*, *Dracunculus vulgaris*) (Schmid a kol. 1997), čehož jsme využili pro získání standardů. Schopnost produkovat tyto látky byla prokázána i u některých bakterií, např. *Vibrio alginolyticus* (Carballeira a kol. 1997) nebo *Bacillus* sp. (Carballeira a kol. 2001). Dalším kmenem, který prokázal schopnost inkorporovat fenylovou skupinu do TAG byl *Rhodococcus opacus* při kultivaci na fenylalaninu (Phe) a následné inkubaci v přítomnosti fenyldekanu (Alvarez a Steinbuchel 2002).

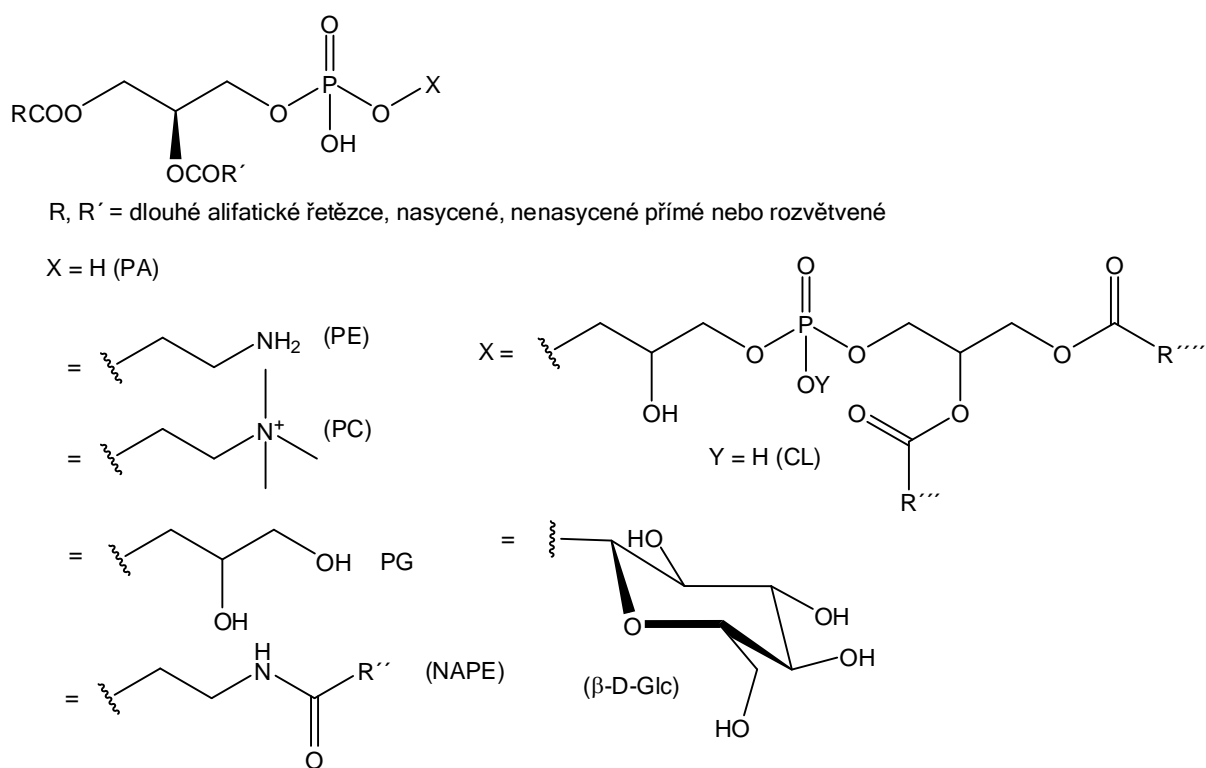
Při kultivaci našeho kmene *R. erythropolis* na Phe (tento kmen za standardních podmínek neprodukuje FA obsahující fenylovou skupinu, viz Tabulka 4 z publikace **211**) byla prokázána inkorporace fenylové skupiny do mastných kyselin. Byly nalezeny kyseliny se sudým počtem atomů uhlíku a fenylovou skupinou - ω -fenyltetradekanová a ω -fenyldodekanová (v minoritním zastoupení). Biosyntéza těchto FA zahrnuje známý mechanismus, během kterého z Phe vzniká fenylacetyl-CoA, který dále slouží jako stavební jednotka pro biosyntézu ω -fenylalkanových kyselin (Smith a Stern 1983, Smith a Tsai 2007). Při analýze TAG nalezených v *R. erythropolis* (Tabulka 3 z pub **223**) byla zjištěna inkorporace ω -fenyl-FA do 13 molekulárních druhů TAG. Všechny tyto TAG obsahovaly maximálně jednu ω -fenyl-FA, přičemž nejvíce byla zastoupena ω -fenyltetradekanová kyselina. TAG izolované z *R. erythropolis* vykazovaly antiradikálovou aktivitu, tj. schopnost

vázat volné radikály a mají též antioxidační schopnosti (Tabulka 4 z pub **223**) okolo 20 % oproti standardu, tj. BHT (butyl-hydroxytoluen). Tento výsledek předčí publikované aktivity esenciálních olejů z oregana či pelyňku (Lopes-Lutz a kol. 2008).

4. Komplexní lipidy

4.1 Důležité komplexní lipidy – popis, výskyt a význam

Komplexní lipidy, jak již bylo výše zmíněno, dávají hydrolýzou tři nebo více primárních produktů, tj. FA, glycerol nebo aminoalkohol, kyselinu fosforečnou nebo též sacharid. Všeobecně lze komplexní lipidy rozdělit na tři základní třídy, tj. na fosfolipidy, což jsou lipidy obsahující v molekule kyselinu fosfatidovou (PA), kde kyselina fosforečná je esterifikována další sloučeninou (Obrázek 6).



Obrázek 6. Struktura hlavních tříd fosfolipidů.

Glykolipidy obsahují vedle diacylglycerolu (DAG) i sacharid, nejčastěji galaktosu nebo glukosu. Ve sfingolipidech je glycerol nahrazen amino alkoholem. Nejjednodušší ze všech fosfolipidů je kyselina fosfatidová (Testerink a Munnik 2011) neboli 1,2-diacyl-*sn*-glycerol-3-fosfát, která se přirozeně vyskytuje ve stopovém množství, ale je důležitá jako metabolický prekursor většiny ostatních glycerolipidů (Vance 2008).

Fosfatidylglycerol (PG) (1,2-diacyl-*sn*-glycerol-3-fosforyl-1'-*sn*-glycerol) bývá stopovou složkou organismů, převážně rostlinných chloroplastů. Difosfatidylglycerol

(kardiolipin, CL) se nachází hlavně v bakteriích (Peter-Katalinic a Fischer 1998, Schlame 2008).

Fosfatidylethanolamin (PE) je hojný v rostlinných tkáních a bývá hlavní třídou lipidů mikroorganismů. Často obsahuje relativně vysoký podíl plasmanyl a plasmenyl molekulárních druhů, viz zmínka níže. Aminoskupina může být enzymaticky methylována za vzniku meziproductů: fosfatidyl-*N*-monomethylethanolaminu a potom fosfatidyl-*N,N*-dimethylethanolaminu; konečný produkt je fosfatidylcholin. *N*-acyl-fosfatidylethanolamin bývá součástí některých rostlinných tkání a byl nalezen také v sinicích.

U anaerobních bakterií existují analogy obsahující vinyl etherovou a etherovou vazbu, což jsou „plasmenyl“ a „plasmanyl“ lipidy, blíže Řezanka a kol. (2012b, **pub 233**).

Fosfatidylcholin (PC), 1,2-diacyl-*sn*-glycerol-3-fosforylcholin, je obvykle nalézán v membránách rostlin a někdy i mikroorganismů. Všechny glycerofosfolipidy obsahují 1,2-diacyl-*sn*-glycerol a tato část molekuly může být získána hydrolyzou pomocí fosfolipasy C, což má velký význam při analýze fosfolipidů, viz níže.

Fosfatidylserin (PS) je přítomen ve většině rostlin a byl také nalezen v mikroorganismech.

Stejně jako u TAG, mastné kyseliny ve fosfolipidech mají výrazné polohové rozdělení; nasycené FA jsou obecně vázány v poloze *sn*-1 a nenasycené FA v poloze *sn*-2, ale v mnoha případech je tomu naopak. Dá se říci, že čím extrémofilnější je mikroorganismus, tím méně platí toto pravidlo.

Glyceroglykolipidy

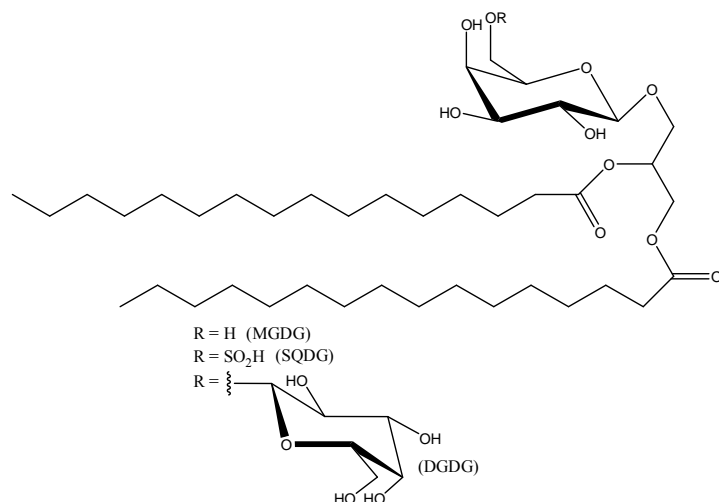
Rostlinné tkáně obsahují značné množství lipidů, ve kterých jsou 1,2-diacyl-*sn*-glyceroly vázány glykosidickou vazbou v poloze *sn*-3 na sacharid (Holzl a Dormann 2007). Hlavními složkami jsou mono- a digalaktosyldiacylglyceroly (MGDG, respektive DGDG, viz obrázek 7), ale byly nalezeny lipidy obsahující až čtyři galaktosové jednotky, případně jedna nebo více z nich může být nahrazena glukosou (Kates 1990). Další unikátní rostlinný glykolipid je sulfochinovosyldiacylglycerol (SQDG), který obsahuje kyselinu sulfonovou vázanou na sacharid monoglykosyldiacylglycerolu. Tento lipid se nachází výhradně v chloroplastech (Shimojima 2011).

Sfingolipidy

Tyto lipidy obsahují místo glycerolu bázi s dlouhým řetězcem (12 až 22 atomů uhlíku), tj. alifatický amin, který obsahuje dvě nebo tři hydroxylové skupiny a *trans*-dvojnou vazbu v poloze 4. Nejčastější a nejrozšířenější je sfingosin ((2*S*,3*R*,4*E*)-2-amino-4-oktadecen-1,3-diol). U rostlin a mikroorganismů bylo identifikováno několik desítek bází. Alifatické řetězce

mohou být nasycené, mono- a di-nenasycené, s dvojnými vazbami majícími buď *cis* nebo *trans* konfiguraci (lépe *E* nebo *Z* konfiguraci), a mohou mít také methyl substituenty. Nejčastější bázi rostlinného původu je fytosfingosin ((2*S*,3*S*,4*R*)-2-amino-oktadekantriol).

Oligoglykosfingolipidy, tj. lipidy obsahující ceramid (amid aminoalkoholu) a mající dva nebo více sacharidů vázaných na ceramid, tvoří nezbytnou součást buněčných membrán většiny eukaryotických organismů a některých bakterií (Merril 2008, 2011).



Obrázek 7. Struktura některých glyko- a sfingolipidů.

4.2. Řasy a sinice

Lipidní extrakt ze zelené sladkovodní řasy *C. kessleri* kultivované za heterotrofních podmínek byl dělen pomocí preparativní HPLC na silikagelu celkem do dvanácti lipidních tříd, v nichž byl obsah mastných kyselin stanoven pomocí GC-MS (Řezanka a Podojil 1989, **pub 34**). Dělení bylo provedeno gradientovou elucí ze směsi hexan-isopropanol (6:8) do směsi hexan-isopropanol-voda (60:80:14) během 20 min a pak isokraticky 30 min. Jednotlivé druhy lipidů v separovaných lipidních třídách byly dále děleny na 18 molekulárních druhů pomocí RP-HPLC. PC a PE byly hydrolyzovány fosfolipázou C a odpovídající diacylglyceroly byly identifikovány GC-MS na polární kapilární koloně. V mono- a digalaktosyldiglycerolech byly mastné kyseliny v poloze 1 identifikovány až po hydrolyze lipázou. U kvantifikace pomocí UV detektoru v HPLC a hmotnostního spektrometru v GC-MS bylo prokázáno, že relativní odezva UV detektoru klesá s rostoucí nasyceností kyselin, zatímco u relativních odezev hmotnostního spektrometru je tomu opačně. Opět bylo identifikováno, jako např. u TAG (viz výše, nebo o glykosylceramidů, viz níže) mnoho desítek molekulárních druhů fosfolipidů. Např. jen u jediné z 18 izolovaných tříd, tj. PC, bylo stanoveno, že obsahuje přes 50 různých druhů molekul. Tím počet molekulárních druhů lipidů

v této řase a nejen v ní překročil tisícovku. To vše ukazuje na velkou schopnost buněk reagovat na vnější prostředí a přizpůsobovat se mu.

Kombinované použití HPLC, RP-HPLC a kapilární polární GC-MS spolu s enzymatickým štěpením (α - a β -galaktosidasou), dělení lipidů na TLC (tenkovrstvá chromatografie) a identifikace pomocí NI-FAB-MS (Negative Ionization - Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry) nám umožnilo stanovit v zelené sladkovodní řase *C. kessleri*, kultivované heterotrofně, více než 400 druhů molekulárních druhů glykosylceramidů (Řezanka a Mareš 1990, **pub 44**). Je jasné, že identifikované glykosylceramidy představují pouze majoritní molekulární druhy. Došli jsme k závěru, že kombinace moderních analytických metod může dát obraz o struktuře lipidů a také, že komplexní přístup může být aplikován na jiné druhy biologického materiálu.

Pomocí TLC bylo stanoveno lipidové složení tří druhů makrofytních řas, tj. *Acrosiphonia* sp., *Chara vulgaris* a *Nitellopsis obtusa* rostoucích v Kaspickém moři (Dembitsky a kol. 1993, **pub 65**). PC, PE a PG byly hlavní zjištěné třídy fosfolipidů. Identifikace FA v neutrálních lipidech, glykolipidech a fosfolipidech byla provedena pomocí GC-MS. Esenciální FA v glykolipidové a fosfolipidové frakci byly kyseliny hexadekatrienová a α -linolenová. Kromě běžných FA bylo zjištěno více než 40 dalších kyselin, včetně FA s velmi dlouhým řetězcem (nad C24), ovšem už v minoritním zastoupení.

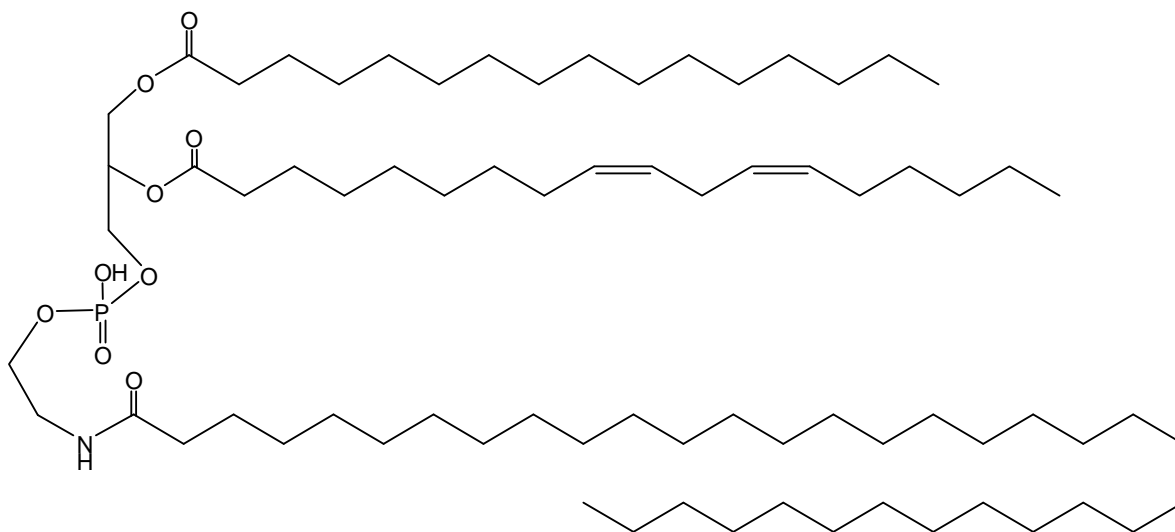
Byl publikován výskyt polárních lipidů a mastných kyselin ve třech kmenech rodu *Chroococciopsis* tj. *C. supralittoralis*, *C. umbratilis* a *C. versatilis* sesbíraných v jezeře Kinneret (Galilejské jezero), v Mrtvém moři a u města Ein Kerem (Viniční pramen) (Řezanka a kol. 2003, **pub 149**). Jednotlivé třídy lipidů byly stanoveny dvourozměrnou TLC a GC-MS analýzou. Mezi polárními lipidy byly jako hlavní izolovány glykolipidy, tj. MGDG, DGDG, SQDG a též neobvyklý DGTS (*N,N,N*-trimethylhomoserin-4-*O*-yl-diacylglycerol) a fosfatidylglycerol, přičemž DGTS byl nalezen poprvé u sinic.

Kromě toho, že sinice rodu *Chroococciopsis* jsou prvními pionýry života v extrémních podmínkách, např. v mokřadech s vysokou salinitou, mohou také sloužit jako důležitý zdroj esenciálních mastných kyselin pro býložravce.

Neobvyklé molekulární druhy NAPE (*N*-acylfosfatidylethanolaminů) (Obrázek 8) byly identifikovány ze sinice *Calothrix* sp. sesbírané v Antarktidě (Řezanka a kol. 2009b, **pub 202**). Analýza byla provedena kombinací TLC, ESI-MS/MS a GC-MS. Byly identifikovány anteiso rozvětvené FA s velmi dlouhým řetězcem (až do C33), tj. VLCFA.

Akumulace fosfolipidů s VLCFA může mít vliv na strukturu membrán buňky. Na základě všech výše uvedených údajů lze předpokládat, že tyto fosfolipidy obsahující

rozvětvenou VLCFA hrají dominantní roli v membránách *Calothrix* sp., což představuje příklad adaptace složení fosfolipidů na extrémní podmínky Antarktidy, které umožňují růst a přežití této sinice.

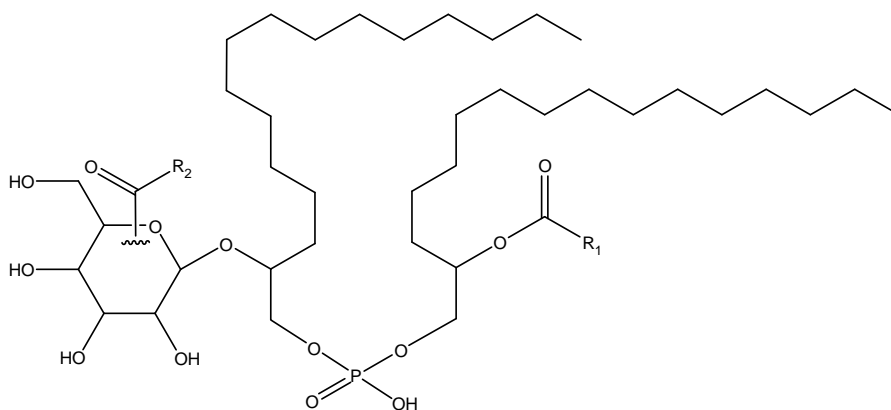


Obrázek 8. Struktura N-35:0-16:0/18:2-PE z *Calothrix* sp.

4.3. Bakterie

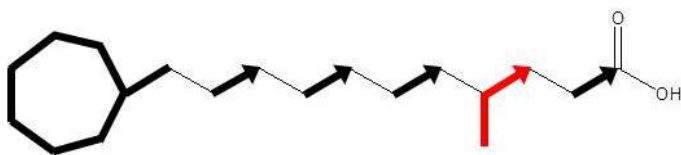
4.3.1. Termofilní bakterie

Složení mastných kyselin ve 12 kmenech rodů *Thermus*, *Meiothermus*, *Geobacillus* a *Alicyclobacillus*, jejichž taxonomické určení bylo provedeno pomocí analýzy sekvence 16S rDNA, bylo analyzováno pomocí GC-MS (Šiřišťová a kol. 2009, **pub 200**). Převažovaly rozvětvené FA typu iso a anteiso, C15 až C17, které tvořily více než 80 % všech naměřených FA. FAB-MS byla použita pro analýzu neobvyklých glykofosfolipidů, tj. acylglykosylkardiolipinů z rodů *Geobacillus* a *Alicyclobacillus* a 1-(hydroxy(2-(O-acylglycosyl-oxy)hexadecyloxy)phosphoryloxy)hexadecanol-2-yl esterů C15-C17 kyselin z rodů *Thermus* a *Meiothermus*, viz Obrázek 9.



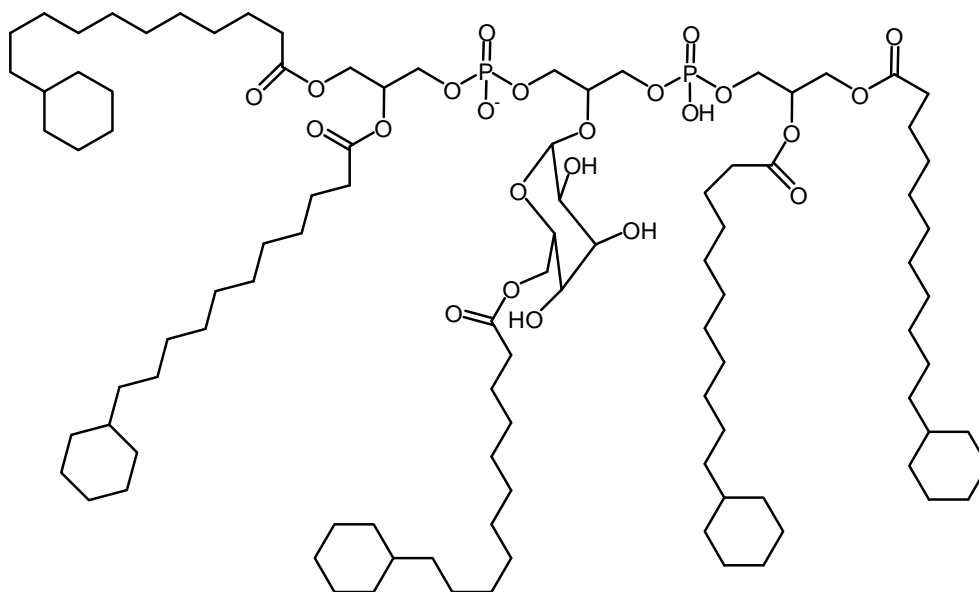
Obrázek 9. Všeobecná struktura glykofosfolipidů; R_{1,2} – zbytky FA.

V termofilní bakterii *Alicyclobacillus acidoterrestris* byly kombinací fyzikálně-chemických metod, tj. TLC, negativní RP-HPLC-ESI-MS/MS a enzymatické hydrolyzy identifikovány molekulární druhy acylfosfatidylglycerolů (Řezanka a kol. 2009a, **pub 201**). Jeden z nich obsahuje rozvětvenou cyklo mastnou kyselinu - 11*S*-cykloheptyl-4-methylundekanovou. Pro plné potvrzení struktury jsme kyselinu syntetizovali. Její biosyntéza byla též objasněna pomocí ^{13}C značeného prekurzoru ($^{13}\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$), čímž bylo dokázáno, že methyl pochází z propionátu a nikoli z methioninu (sedmičlenný kruh vzniká šikimátovou drahou) (Obrázek 10).



Obrázek 10. Biosyntéza kyseliny 11*S*-cykloheptyl-4-methylundekanové

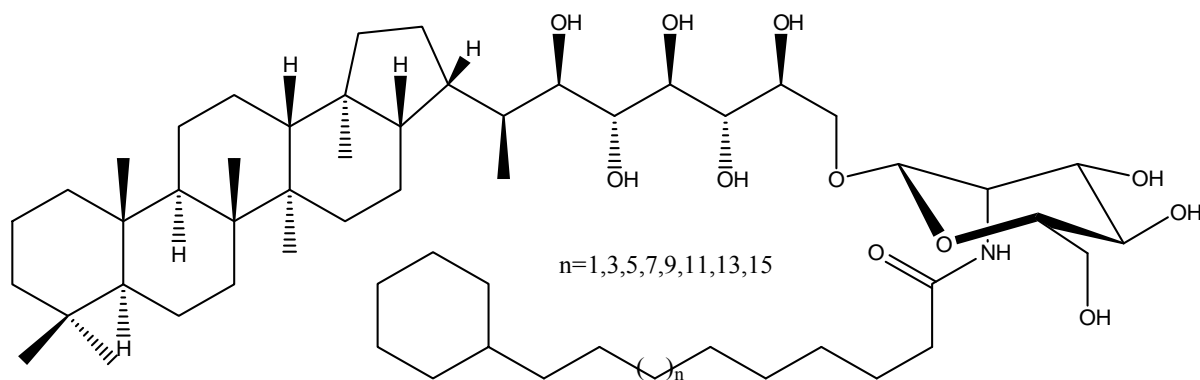
Z termofilní bakterie *A. acidoterrestris* byly přímou ESI-MS analýzou identifikovány molekulární druhy derivátů kardiolipinu, viz Obrázek 11 (Řezanka a kol. 2009c, **pub 209**). Použitím triple-kvadrupólového typu hmotnostního spektrometru, enzymatické hydrolyzy a ^1H a ^{13}C NMR pro identifikaci těchto lipidů bylo zjištěno, že se jedná o *O*-acyl glykosylované kardiolipiny. Tyto techniky nám umožnily identifikaci a kvantifikaci specifických molekulárních druhů derivátů kardiolipinu přímo z lipidových extraktů bakterií, včetně identifikace sacharidu jako α -D-manosy a všech pěti acylů, včetně jejich polohových izomerů. Bylo zjištěno, že nejvíce jsou v derivátu CL zastoupeny liché mastné kyseliny, což má podstatný vliv na fluiditu membrán (lichá FA má vyšší bod tání než kterákoliv ze dvou sousedních sudých) Jedním z majoritních molekulárních druhů je derivát CL, který obsahuje pět mastných kyselin, přičemž každá z nich má cyklohexanový kruh.



Obrázek 11. *O*-acyl manosyl kardiolipin z termofilní bakterie *A. acidoterrestriis*.

Hopanoidy jsou triterpenické sloučeniny nacházející se hlavně v různých bakteriích (G⁺ a G⁻, aerobních, fakultativně anaerobních, striktně anaerobních), v methanotrofních purpurových nesírných bakteriích (purple non-sulphur bacteria), sinicích a také v sedimentech (Řezanka a kol. 2010b, **pub 214**). Vyskytují se v různých formách od jednoduchých hopanoidů až do sloučenin s polyfunkčními postranními řetězci jako jsou bakteriohopanpolyoly. Review shrnuje současné poznatky o výskytu těchto látek v různých bakteriálních druzích a rodech, jejich biosyntéze a funkcí v buněčných membránách a v důležitých biochemických a fyziologických procesech. Jsou též zmíněny poslední pokroky a trendy v oblasti analýzy hopanoidů, zejména identifikace pomocí LC-MS s měkkými ionizačními technikami, jako jsou APCI a/nebo ESI.

V termofilní bakterii *A. acidoterrestriis* byly identifikovány další neobvykle molekulární druhy *N*-acylovaných bakteriohopanhexol-manosamidů, vzorec viz Obrázek 12 (Řezanka a kol. 2011e, **pub 218**). Pomocí semipreparativní HPLC a RP-HPLC/MS-ESI triple-kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem, ¹H a ¹³C NMR, CD, včetně stereospecifické syntézy 7-deoxy-*D*-glycero-*D*-allo-heptitolu se nám podařilo určit jejich strukturu, včetně absolutní konfigurace. Na základě všech výše uvedených metod jsme identifikovali celou strukturu nové třídy bakteriohopanoidů, zastoupených různými *N*-acylovanými bakteriohopanhexol-mannosamidy. Tím bylo dokázáno, že termofilní bakterie *A. acidoterrestriis* může být jedním ze zdrojů podobných látek v sedimentech, viz naše **pub 214**.



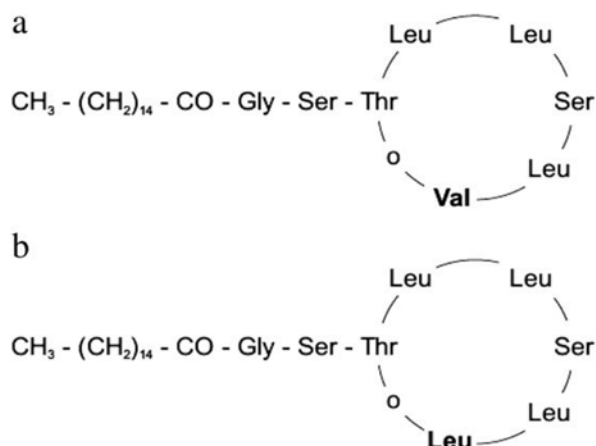
Obrázek 12. *N*-acylované bakteriohopanhexol-mannosamidy z termofilní bakterie *A. acidoterrestris*.

4.3.2 Bakterie – producenti povrchově aktivních látek

Rhamnolipidy jsou glykolipidické biodetergenty produkované různými bakteriemi, exkretované do media patogenní *Pseudomonas aeruginosa*; byly popsány jako směs čtyř kongenerů, tj. α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydekanoyl- β -hydroxydekanoát (RHA-RHA-C10-C10), α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydekanoyl- β -hydroxydekanoát (RHA-RHA-C10), stejně jako jejich mono-rhamnolipid kongenery RHA-C10-C10 a RHA-C10. Vývoj analytických metod vedl k objevu široké škály rhamnolipidních kongenerů a homologů (Abdel-Mawgoud a kol. 2011), které jsou produkovány v různých koncentracích a různými druhy rodu *Pseudomonas* a jim příbuzných bakterií, např. *Burkholderia*, u které bylo prokázáno, že produkuje rhamnolipidy, které mají delší alkylové řetězce, než ty, které byly identifikovány u *P. aeruginosa*. Fyziologická funkce těchto sekundárních metabolitů je stále nejasná. Velmi užitečná by byla produkce rhamnolipidů z nepatogenních producentů, zvláště pokud při jejich použití jako biodetergentů v potravinářství nebo lékařství.

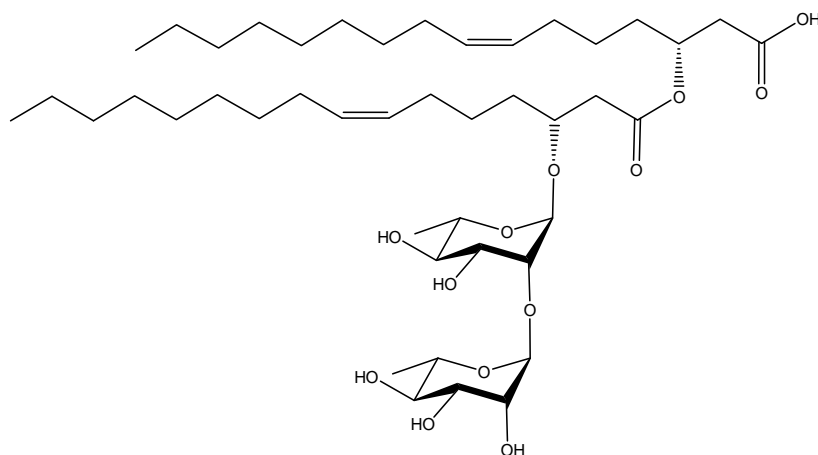
Na arktickém souostroví Špicberky byla izolována sladkovodní bakterie *Pseudomonas fluorescens* produkující povrchově aktivní látky (Janek a kol. 2010, **pub 212**) Surové biodetergenty byly extrahovány ze supernatantu ethylacetátem a přečištěny preparativní RP-HPLC. Chemická struktura purifikovaných biodetergentů, pseudofaktinu I a II, byla zjištěna pomocí tandemové MALDI TOF (matrix assisted laser desorption/ionization time of flight). Obě sloučeniny jsou nové cyklické lipopeptidy s kyselinou palmitovou, která tvoří amid s terminální aminoskupinou osmé aminokyseliny v cyklickém peptidu, viz Obrázek 13. C-terminální karboxylová skupina poslední aminokyseliny (Val nebo Leu) tvoří lakton s hydroxylem v Thr3. Pseudofactin II snižuje povrchové napětí vody z 72 mN/m na 31,5 mN/m při koncentraci 72 mg/l. Jeho emulgační aktivita a stabilita byla vyšší než u syntetických

povrchově aktivních látek Tween 20 a Triton X-100. Pseudofaktiny mají proto velký potenciál pro využití v průmyslových aplikacích a také v bioremediaci a biomedicině.



Obrázek 13. Struktura pseudofactinu I (a) a II (b) ze sladkovodní bakterie *Pseudomonas fluorescens*.

U teplomilných bakterií *Thermus* sp., *T. aquaticus* a *Meiothermus ruber* byla zjištěna produkce rhamnolipidů (Řezanka a kol. 2011d, **pub 226**). Rhamnolipidy byly získány ze supernatantu a dále čištěny pomocí TLC. Pomocí negativní ESI-MS bylo identifikováno 77 rhamnolipidových homologů s různou délkou řetězce a nenasyceností, např. Obrázek 14. Tandemovou MS byly identifikovány mono- a di-rhamnolipidy, homology obsahující jednu nebo dvě 3-hydroxy-mastné kyseliny, ať již nasycené, monoenoové nebo dienové, a též řetězce s délkou až C24. Stereochemie rhamnozy byla L a 3-hydroxy-mastných kyselin byla R, poloha dvojných vazeb v monoenoových kyselinách byla *cis*- ω -9. Všechny tři druhy produkovaly rhamnolipidy, které se liší svou strukturou od rhamnolipidů *Pseudomonas aeruginosa* a vykazují vynikající vlastnosti při snižování povrchového napětí. Nejdůležitějším zjištěním však je, že ve srovnání s *P. aeruginosa*, oba kmeny tj. *Thermus* a *Meiothermus* nejsou patogenní pro člověka a mají biologickou bezpečnost na úrovni 1.



Obrázek 14. Struktura di-rhamno-di-lipidických kongenerů.

4.3.3 Anaerobní a fakultativně anaerobní bakterie

Plasmalogeny jsou skupinou lipidů s potenciálně důležitou, a ještě ne zcela objasněnou funkcí, zejména u bakterií (Řezanka a kol. 2012b, **pub 233**) Vyskytují se od bakterií přes prvoky a bezobratlé až k savcům, ale nebyly dosud nalezeny v rostlinách a houbách. Mohou chránit buňky před škodlivými účinky reaktivních forem kyslíku, tj. chránit ostatní fosfolipidy nebo lipoproteiny proti oxidačnímu stresu. Byla popsána i jejich vlastnost jako signálních molekul a modulátorů membránové dynamiky. Biosyntéza je různá v aerobních a anaerobních organismech. Použití moderních identifikačních technik, převážně LC-MS a/nebo lipidomiky umožňuje zjistit nejen jednotlivé třídy plasmalogenů, ale i jejich polohové izomery a často i jednotlivé molekulární druhy.

LC/ESI-MSⁿ byla použita k analýze fosfolipidů ze tří druhů anaerobních bakterií kontaminujících pivo rodu *Pectinatus* (Řezanka a kol. 2011a, **pub 221**). Analýzou celkových lipidů pomocí HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) se podařilo oddělit diacyl a plasmalogenové fosfolipidy. Plasmalogeny byly poté analyzovány pomocí ESI-MS/MS a bylo zjištěno více než 220 molekul čtyř tříd plasmalogenů - pPC (cholin plasmalogen), pPE (ethanolamin plasmalogen), pPG (glycerol plasmalogen) a pPS (serin plasmalogen). Hlavními molekulárními druhy byly c-p-19: 0/15: 0 PE a PS, které představovaly více než 4 % celkových lipidů.

Použitá metoda vyniká především výbornou reprodukovatelností, vysokou citlivostí (1 $\mu\text{mol/mL}$) a dynamickým rozsahem 4 řádů. Je téměř ideální pro separaci amfifilních sloučenin jako jsou fosfolipidy. To vše z ní činí jednu z nejcitlivějších a bezesporu nejrychlejších metod pro detekci těchto nežádoucích bakterií v pivu.

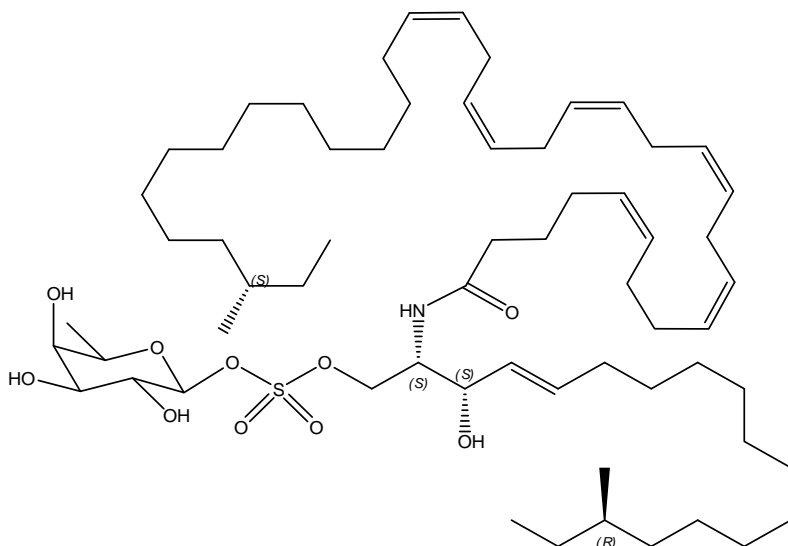
Fosfolipidy a glykolipidy ze dvou nově popsaných druhů rodů *Anoxybacillus bogrovensis* a *A. rupiensis* patřících k termofilním bakteriím byly analyzovány LC/ESI-MSⁿ (Řezanka a kol. 2012c, **pub 229**). Analýza celkových lipidů z fakultativně anaerobní *A. bogrovensis* na HILIC koloně umožnila oddělit diacyl- a plasmalogen-fosfolipidy. LC/ESI-MS/MS analýza striktně aerobní *A. rupiensis* dokázala přítomnost různých unikátních polárních lipidů, převážně alanyl-, lysyl- a glukosyl-fosfatidylglycerolů a kardiolipinů. Každá z těchto tříd polárních lipidů byla pak analyzována pomocí ESI-MS/MS a bylo identifikováno více než 140 molekulárních druhů šesti lipidových tříd z *A. bogrovensis* a téměř 200 molekulárních druhů devíti tříd polárních lipidů z *A. rupiensis*. Plasmalogeny byly poprvé identifikovány ve fakultativně anaerobní bakterii *A. bogrovensis*.

4.4. Živočišné houby

Jen jako ukázkou možností moderních fyzikálně-chemických metod a jejich analytického potenciálu byly vybrány dvě publikace popisující analýzu lipidu u živočišných hub.

Lipidy a fosfolipidy (jak plasmanyl, tak také plasmenyl formy) byly analyzovány ve sladkovodní houbě *Lubomirskia baicalensis* (čeled Lubomirskiidae) a jejího parazita *Brandtia (Spinacanthus) parasitica* (Dembitsky a kol. 1994, **pub 88**). Bylo určeno složení PC a PE alkenyl-acyl, alkylacyl a diacyl forem. Pomocí GC-MS bylo identifikováno přes 180 FA, z toho bylo 46 nasycených, 55 monoenoových, 35 dienoových, 25 trienoových a 22 tetra-, penta- a hexaenoových. U sladkovodní houby bylo prokázáno, že obsahuje neobvyklé dlouhé mastné kyseliny: anteiso-5,9-oktakosadienové, rozvětvené-5,9-nonakosadienové a 5,9,23-nonakosatrienové, 5,9,23-triakontatrienové, 15,18,21,24-triakontatetraenové a 15,18,21,24,27-triakontapentaenové. Některé z těchto mastných kyselin byly nalezeny též v lipidech parazita. Tato studie prokázala, že houby z Bajkalu obsahují více druhů FA, než bylo dosud popsáno u mořských hub. Může to být ovlivněno jak jedinečností místa, to je životem houby v nejhlubším a nejstarším jezeře na Zemi, které přímo oplývá endemity a mezi něž patří jak houba, tak i parazit. Výsledky dále ukazují, že složení plasmanyl a plasmenyl lipidů a demospongových kyselin z parazita a z houby se podstatně nelišilo.

Syriacin (Obrázek 15), nový neobvyklý sulfátovaný glykosylceramid s rozvětvenou mastnou kyselinou s velmi dlouhým řetězcem tj. (Z)-34-methylhexatriaconta-5,9,12,15,18,21 hexaenovou kyselinou, byl izolován ze sladkovodní houby *Ephydatia syriaca* sesbírané v řece Jordán (Izrael) (Řezanka a kol. 2006, **pub 173**). Jeho struktura byla stanovena pomocí rozsáhlých spektroskopických analýz (IR, UV, 2D NMR, MS, CD) a chemických degradací. Syriacin má antifeeding (působí proti ožírání) aktivitu proti zlatým karasům a to v koncentraci cca 10 mg/l. Zajímavostí této molekuly je „nepřirodní“ konfigurace methylu ve sfingosinu, která pravděpodobně pochází z L-alloisoleucinu (2*S*,3*R*), kdežto rozvětvená mastná kyselina má „přirodní“ konfiguraci, kde jako startérová jednotka byl L-isoleucin (2*S*,3*S*). Domníváme se, že právě tato skutečnost, tj. opačná konfigurace methylů v řetězcích, je nositelem biologických účinků.



Obrázek 15. Struktura syriacinu.

Závěr

Soubor předkládaných prací je zaměřen na výzkum biosyntézy, produkci a analýzu lipidů, převážně z mikroorganismů. Pochopení mechanismu mezi biosyntézou a produkcí lipidů, umožní genetické manipulace specifických kmenů mikroorganismů pro zvýšení produkce TAG, tj. takových, které mají jak rychlý růst, tak i vysokou akumulaci lipidů využitelných jako doplňky potravy a/nebo biopaliva. Jedním z důležitých faktorů pokroku ve zkoumání a poznávání těchto pochodů u mikroorganismů jsou nové analytické techniky, jako je například hmotnostní spektrometrie, zejména ve vysokém rozlišení, a také použití ultra-výkonné kapalinové chromatografie. Další moderní přístroje (Orbitrap, apod.) umožňují analýzu mnohem většího spektra vzorků a tedy vyšší efektivitu výzkumu mikroorganismů, jako jsou řasy, kvasinky nebo bakterie, které jsou dosud prakticky zcela neprozkoumány, pokud jde o biosyntézu a produkci lipidů. Problematickým procesem je v řadě případů kultivace potenciálně důležitých mikroorganismů. Důležitým nutným krokem je tedy žádoucí optimalizace a zlepšení kultivačních technik, které zahrnují i výzkum v genetickém inženýrství, v produkci a následném zpracování biomasy a kultivačních produktů kultivace, včetně jejich analýzy. Výzkum metabolismu lipidů a genů zodpovědných za jejich produkci přispěje ke zlepšení nadprodukce nutričně i technologicky důležitých TAG.

Použitá literatura

- Abdel-Mawgoud AM, Hausmann R, Lepine F, Muller MM, Deziel E (2011) Rhamnolipids: detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation, and bioengineering of production. In: Steinbuechel A Microbiology Monographs Series, Editor, Soberon-Chavez G, Volume Editor, Biosurfactants from genes to applications, Vol. 20, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 13–56
- Allard B, Templier J (2001) High molecular weight lipids from the trilaminar outer wall (TLS)-containing microalgae *Chlorella emersonii*, *Scenedesmus communis* and *Tetraedron minimum*. *Phytochemistry* 57:459–467
- Alvarez H, Steinbuechel A (2002) Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:367–376
- Alvarez HM, Mayer F, Fabritius D, Steinbuechel A (1996) Formation of intracytoplasmatic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630. *Arch Microbiol* 165:377–386
- Antonopoulou S, Karantonis HC, Nomikos T, Oikonomou A, Fragopoulou E, Pantazidou A (2005a) Bioactive polar lipids from *Chroococcidiopsis* sp. (Cyanobacteria). *Comp Biochem Physiol B* 142:269–282
- Antonopoulou S, Nomikos T, Oikonomou A, Kyriacou A, Andriotis M, Fragopoulou E, Pantazidou A (2005b) Characterization of bioactive glycolipids from *Scytonema julianum* (cyanobacteria). *Comp Biochem Physiol B* 140:219–231
- Aparicio R, Aparicio-Ruiz R (2000) Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *J Chromatogr A* 881:93–104
- Beck HC (2005) Branched-chain fatty acid biosynthesis in a branched-chain amino acid aminotransferase mutant of *Staphylococcus carnosus*. *FEMS Microbiol Lett* 243:37–44
- Beck HC, Hansen AM, Lauritsen FR (2004) Catabolism of leucine to branched-chain fatty acids in *Staphylococcus xylosus*. *J Appl Microbiol* 96:1185–1193
- Bode HB, Dickschat JS, Kroppenstedt RM, Schulz S, Muller R (2005) Biosynthesis of iso-fatty acids in *Myxobacteria*: Iso-even fatty acids are derived by α -oxidation from iso-odd fatty acids. *J Am Chem Soc* 127:532–533
- Brennan L, Owende P (2010) Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable Sustainable Energ Rev* 14:557–577
- Bychek IA, Bychek EA (1997) Desiccation-induced changes in the lipid and fatty acid composition of the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Russ J Plant Physiol* 44:298–302
- Byrdwell WC (2005) Qualitative and quantitative analysis of triacylglycerols by atmospheric pressure ionization (APCI and ESI) mass spectrometry techniques. In: *Modern Methods for Lipid Analysis by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Related Techniques*. Editor, Byrdwell WC, AOCS Press, Champaign, pp. 298–412
- Carballeira NM, Miranda C, Lozano CM, Nechev JT, Ivanova A, Ilieva M, Tzvetkova I, Stefanov K (2001) Characterization of novel methyl-branched chain fatty acids from a halophilic *Bacillus* species. *J Nat Prod* 64:256–259
- Carballeira NM, Sostre A, Stefanov K, Popov S, Kujumgiev A, Dimitrova-Konaklieva S, Tosteson CG, Tosteson TR (1997) The fatty acid composition of a *Vibrio alginolyticus* associated with the alga *Cladophora coelothrix*: Identification of the novel 9-methyl-10-hexadecenoic acid. *Lipids* 32:1271–1275

- Cossignani L, Simonelti MS, Neri A, Damiani P (1999) Structural analysis of triacylglycerol fraction and some its sub-fractions from an eicosapentaenoic acid/docosahexaenoic acid dietary supplement. *Z Lebensmittel - Untersuchung und Forschung* 208:203–207
- Cubow S (1996) The influence of positional distribution of fatty acids in native, interesterified and structure-specific lipids on atherogenesis. *Nutritional Biochem* 7:530–541
- Deloura IC, Dubacq JP, Thomas JC (1987) The effects of nitrogen deficiency on pigments and lipids of cyanobacteria. *Plant Physiol* 83:838–843
- Dherbecourt J, Maillard MB, Catheline D, Thierry A (2008) Production of branched-chain aroma compounds by *Propionibacterium freudenreichii*: links with the biosynthesis of membrane fatty acids. *J Appl Microbiol* 105:977–985
- Dugo P, Kumm T, Crupi ML, Cotroneo A, Mondello L (2006) Comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in the analyses of triacylglycerols in natural lipidic matrixes. *J Chromatogr A* 1112:269–275
- Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill Jr. AH, Murphy RC, Raetz CRH, Russell DW, Seyama Y, Shaw W, Shimizu T, Spener F, Van Meer G, VanNieuwenhze MS, White SH, Witztum JL, Dennis EA (2005) A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 46:839–862
- Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, Nishijima M, Raetz CR, Shimizu T, Spener F, van Meer G, Wakelam MJ, Dennis EA (2009) Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 50:S9–S14
- Francois I, Dos Santos Pereira A, Sandra P (2010) Considerations on comprehensive and off-line supercritical fluid chromatography x reversed-phase liquid chromatography for the analysis of triacylglycerols in fish oil. *J Sep Sci* 33:1504–1512
- Gotoh N, Wada S, Nagai T (2011) Separation of asymmetric triacylglycerols into their enantiomers by recycle high-performance liquid chromatography. *Lipid Technol* 23:105–108
- Grille S, Zaslowski A, Thiele S, Plat J, Warnecke D (2010) The functions of steryl glycosides come to those who wait: Recent advances in plants, fungi, bacteria and animals. *Prog Lipid Res* 49:262–288
- Hellmuth C, Uhl O, Segura-Moreno M, Demmelmair H, Koletzko B (2011) Determination of acylglycerols from biological samples with chromatography-based methods. *J Sep Sci* 34:3470–3483
- Heron S, Tchaplal A (1994) Choice of stationary and mobile phases for separation of mixed triglycerides by liquid-phase chromatography. *Analisis* 22:114–126
- Holz G, Dormann P (2007) Structure and function of glycolipids in plants and bacteria. *Prog Lipid Res* 46:225–243
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant J* 54:621–639
- Chapman KD, Ohlrogge JB (2012) Compartmentation of triacylglycerol accumulation in plants. *J Biol Chem* 287:2288–2294
- Christie (1989) *Gas Chromatography and Lipids: A Practical Guide*, Oily Press, Ayr

- Christie WW, Han X (2010) *Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis* (4th edition), Oily Press, Bridgwater, U.K., 446 pages - www.pjbarnes.co.uk/op/la4.htm.
- IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycolipids. Recommendations 1997
- Iwasaki Y, Yasui M, Ishikawa T, Irimescu R, Hata K, Yamane T (2001) Optical resolution of asymmetric triacylglycerols by chiral-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 905:111–118
- Jovetic S, Feroggio M, Marinelli F, Lancini G (2008) Factors influencing cell fatty acid composition and A40926 antibiotic complex production in *Nonomuraea* sp. ATCC 39727. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:1131–1138
- Kates M (1990) Several chapters. *Handbook of Lipid Research 6. Glycolipids, Phosphoglycolipids and Sulfoglycolipids* Editor, Kates M, Plenum Press, NY
- Krienitz L, Hegewald EH, Hepperle D, Huss VAR, Rohr T, Wolf M (2004) Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia* 43:529–542
- Lang I, Hodac L, Friedl T, Feussner I (2011) Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: A comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biology* 11, art. no. 124
- Leskinen HM, Suomela JP, Kallio HP (2010) Quantification of triacylglycerol regioisomers by ultra-high-performance liquid chromatography and ammonia negative ion atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 24:1–5
- Lopes-Lutz D, Alviano DS, Alviano CS, Kolodziejczyk PP (2008) Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry* 69:1732–1738
- Merrill AH (2008) Sphingolipids. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (5th Edition), Editor, Vance DE and Vance J, Elsevier, Amsterdam, pp. 363–397
- Merrill AH (2011) Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chem Rev* 111:6387–6422
- Murphy DJ (2001) The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 40:325–438
- Mu H, Porsgaard T (2005) The metabolism of structured triacylglycerols. *Prog Lipid Res* 44, 430–448
- Nigam PS, Singh A (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progr Energy Combust Sci* 37:52–68
- Nagai T, Mizobe H, Otake I, Ichioka K, Kojima K, Matsumoto Y, Gotoh N, Kuroda I, Wada S (2011) Enantiomeric separation of asymmetric triacylglycerol by recycle high-performance liquid chromatography with chiral column. *J Chromatogr A* 1218:2880–2886
- Parodi PW (2005) Dairy product consumption and the risk of breast cancer. *J Am Coll Nutr* 24:556S–568S
- Perrin JL, Naudet M (1983) Identification et dosage des triglycérides des corps gras naturels par CLHP. *Rev Franc Corps Gras* 30:279–285

- Peter-Katalinic J, Fischer W (1998) α -Glucopyranosyl-, D-alanyl- and L-lysylcardiolipin from gram-positive bacteria: analysis by fast atom bombardment mass spectrometry. *J Lipid Res* 39:2286–229
- Quinlan P, Moore S (1993) Modification of triglycerides by lipases: process technology and its application to the production of nutritionally improved fats. *Inform* 4:580–585
- Ramadan MF, Asker MMS, Ibrahim ZK, (2008) Functional bioactive compounds and biological activities of *Spirulina platensis* lipids. *Czech J Food Sci* 26:211–222
- Ruiz-Gutierrez V, Barron LJR (1995) Methods for the analysis of triacylglycerols. *J Chromatogr B: Biomedical Applications* 671:133–168
- Shimajima M (2011) Biosynthesis and functions of the plant sulfolipid. *Prog Lipid Res* 50:234–239
- Schenk P, Thomas-Hall S, Stephens E, Marx U, Mussgnug J, Posten C, Kruse O, Hankamer B (2008) Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Res.* 1:20–43
- Schlame M (2008) Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *J Lipid Res* 49:1607–1620
- Schmid KM, Ohlrogge JB (2008) Lipid metabolism in plants. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th Edition, Editor, Vance DE and Vance J, Elsevier, Amsterdam, pp. 97–130
- Schmid PC, Holman RT, Soukup VG (1997) 13-Phenyltridecanoic acid in seed lipids of some aroids. *Phytochemistry* 45:1173–1175
- Smith S, Stern A (1983) The effect of aromatic CoA esters on fatty acid synthetase: biosynthesis of ω -phenyl fatty acids. *Arch Biochem Biophys* 222:259–265
- Smith S, Tsai SC (2007) The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Nat Prod Rep* 24:1041–1072
- Snyder CL, Yurchenko OP, Siloto RMP, Chen X, Liu Q, Mietkiewska E, Weselake RJ (2009) Acyltransferase action in the modification of seed oil biosynthesis. *New Biotechnol* 26:11–16
- Takaichi S, Ishitsu J (1993) Influence of growth temperature on compositions of carotenoids and fatty acids from carotenoid glucoside ester and from cellular lipids in *Rhodococcus rhodochrous* RNMS1. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:1886–1889
- Takeuchi H, Kasai M, Taguchi N, Tsuji H, Suzuk, M (2002) Effect of triacylglycerols containing medium- and long-chain fatty acids on serum triacylglycerols levels and body fat in college athletes. *J Nutr Sci Vitaminol* 48:109–114
- Taranto PA, Keenan TW, Potts M (1993) Rehydration induces rapid onset of lipid biosynthesis in desiccated *Nostoc commune* (Cyanobacteria). *Biochim Biophys Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 1168:228–237
- Testerink C, Munnik T (2011) Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *J Exp Botany* 62:2349–2361
- Vance DE (2008) Phospholipid biosynthesis in eukaryotes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th Edition, Editor, Vance DE and Vance J, Elsevier, Amsterdam, pp. 213–244

- Vlaeminck B, Fievez V, Cabrita ARJ, Fonseca AJM, Dewhurst RJ (2006) Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Anim Feed Sci Technol* 131:389–417
- Volkman JK (2003) Sterols in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:495–506
- Ward DM, Panke S, Kloppel KD, Christ R, Fredrickson H (1994) Complex polar lipids of a hot spring cyanobacterial mat and its cultivated inhabitants. *Appl Environ Microbiol* 60:3358–3367
- Whyte LG, Slagman SJ, Pietrantonio F, Bourbonniere L, Koval SF, Lawrence JR, Inniss WE, Greer CW (1999) Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by *Rhodococcus* sp. strain Q15. *Appl Environ Microbiol* 65:2961–2968
- Wongtangintharn S, Oku H, Iwasaki H, Toda T (2004) Effect of branched-chain fatty acids on fatty acid biosynthesis of human breast cancer cells. *J Nutr Sci Vitaminol* 50:137–143

Seznam zkratek

2D NMR	dvou dimenzionální nukleární magnetická resonance
2-MeBu	2-methylbutyrát
APCI	atmospheric-pressure chemical ionization
ARA	arachidonová kyselina
BHT	butyl-hydroxytoluen
C18 nebo ODS	octadecylsilyl fáze
CD	cirkulární dichroismus
CL	kardiolipin
CoA	koenzym A
CPT	cholinefosfotransferasa
DAG	diacylglycerol
DCI-MS	desorpce chemickou ionizací
DGAT	diacylglycerol acyltransferasa
DGDG	digalaktosyldiacylglycerol
DGTS	<i>N,N,N</i> -trimethylhomoserin-4- <i>O</i> -yl-diacylglycerol
DHA	dokosaheptaenová kyselina
ECL	equivalent chain length
ECN	equivalent carbon number
EEP	1,2-(all- <i>cis</i>)-5,8,11,14,17-dieicosapentaenoyl-3-palmitoyl-sn-glycerol
EPA	eikosapentaenová kyselina
ESI	electrospray ionisation
FA	mastná kyseliná
FA-CoA	fatty acyl-koenzym A
G3P	sn-glycerol-3-fosfát
GC-MS	plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie
GPAT	sn-glycerol-3-fosfát acyltransferasa
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
i-Bu	isobutyryl
IR	infračervené záření
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
i-Va	isovalerát
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry
LLL _n	TAG, kde L je kyselina linolová a L _n je kyselina linolenová
LL _n L _n	TAG, kde L je kyselina linolová a L _n je kyselina linolenová
LPA	lysofosfatidová kyselina
LPAAT	acyltransferasa lysofosfatidové kyseliny
LPAT	acyltransferasa fosfolipidů
LPC	lysofosfatidylcholin
LPCAT	lysofosfatidylcholin acyltransferasa
MGDG	monoalaktosyldiacylglycerol
MS	hmotnostní spektrometrie
NI-FAB-MS	Negative Ionization - Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry
PA	kyselina fosfatidová
PAP	fosfatasa fosfatidové kyseliny
PC	fosfatidylcholin
PDAT	fosfolipid:diacylglycerol acyltransferasa
PE	fosfatidylethanolamin

PG	fosfatidylglycerol
Phe	fenylalanin
PLA2	fosfolipasa A2
pPC	cholin plasmalogen
pPE	ethanolamin plasmalogen
pPG	glycerol plasmalogen
pPS	serin plasmalogen
PS	fosfatidylserin
PUFA	polyenová mastná kyselina
RP-HPLC	HPLC na reversní fázi
SCO	single cell oil
SQDG	sulfochinovosyldiacylglycerol
STAG	strukturovaný TAG
TAG	triacylglycerol
UV	ultrafialové záření
VLCFA	FA s velmi dlouhým řetězcem (nad C22)

Seznam publikací použitých v DSc. disertaci

- Dembitsky VM, Řezanka T, Kashin AG (1994) Comparative study of the endemic freshwater fauna of lake Baikal-VI. Unusual fatty acid and lipid composition of the endemic sponge *Lubomirskia baicalensis* and its amphipod crustacean parasite *Brandtia (Spinacanthus) parasitica*. *Comp Biochem Physiol B* 109:415–426
- Dembitsky VM, Řezanka T, Rozentsvet OA (1993) Lipid composition of three macrophytes from the Caspian sea. *Phytochemistry* 33:1015–1019
- Janek T, Lukaszewicz M, Řezanka T, Krasowska A (2010) Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. *Bioresource Technol* 101:6118–6123
- Lisa M, Holčapek M, Řezanka T, Kabátová N (2007) High-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry and gas chromatography-flame ionization detection characterization of Delta 5-polyenoic fatty acids in triacylglycerols from conifer seed oils. *J Chromatogr A* 1146:67–77
- Řezanka T (1989) Very-long-chain fatty-acids from the animal and plant kingdoms. *Prog Lipid Res* 28:147–187
- Řezanka T (1992) Analysis of sterol esters from alga and yeast by high performance liquid chromatography and capillary gas chromatography mass spectrometry with chemical ion. *J Chromatogr* 598:219–226
- Řezanka T, Kambourova M, Derekova A, Kolouchová I, Sigler K (2012c) LC-ESI-MS/MS identification of polar lipids of two thermophilic *Anoxybacillus* bacteria containing a unique lipid pattern. *Lipids* 47:729–739
- Řezanka T, Křesinová Z, Kolouchová I, Sigler K (2012b) Lipidomic analysis of bacterial plasmalogen. *Folia Microbiologica* 57:463–472
- Řezanka T, Lukavský J, Nedbalová L, Kolouchová I, Sigler K (2012d) Effect of starvation on the distribution of positional isomers and enantiomers of triacylglycerol in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Phytochemistry* 80:17–27
- Řezanka T, Lukavský J, Nedbalová L, Sigler K (2011b) Effect of nitrogen and phosphorus starvation on the polyunsaturated triacylglycerol composition, including positional isomer distribution, in the alga *Trachydiscus minutus*. *Phytochemistry* 72:2342–2351
- Řezanka T, Lukavský J, Siříšťová L, Sigler K (2012a) Regioisomer separation and identification of triacylglycerols containing vaccenic and oleic acids, and α - and γ -linolenic acids, in thermophilic cyanobacteria *Mastigocladus laminosus* and *Tolypothrix* sp. *Phytochemistry* 78:147–155
- Řezanka T, Mareš P (1990) Preparative separation of sphingolipids and of individual molecular species by high-performance liquid chromatography and their identification by gas chromatography. *J Chromatogr* 509:333–346
- Řezanka T, Mareš P (1991) Determination of plant triacylglycerols using capillary gas chromatography, high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr* 542:145–159
- Řezanka T, Mareš P, Hušek P, Podojil M (1986) Gas chromatography-mass spectrometry and desorption chemical ionization mass spectrometry of triacylglycerols from the green alga *Chlorella kessleri*. *J Chromatogr* 355:265–271

- Řezanka T, Nedbalová L, Elster J, Cajthaml T, Sigler T (2009b) Very-long-chain iso and anteiso branched fatty acids in *N*-acylphosphatidylethanolamines from a natural cyanobacterial mat of *Calothrix* sp. *Phytochemistry* 70:655–663
- Řezanka T, Podojil M (1986) Identification of wax esters of the fresh-water green alga *Chlorella kessleri* by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 362:399–406
- Řezanka T, Podojil M (1989) Preparative separation of algal polar lipids and individual molecular species by high-performance liquid chromatography and their identification by gas chromatography. *J Chromatogr* 463:397–408
- Řezanka T, Řezanková H (1999) Characterization of fatty acids and triacylglycerols in vegetable oils by gas chromatography and statistical analysis. *Anal Chim Acta* 398:253–261
- Řezanka T, Schreiberová O, Čejková A, Sigler K (2011c) The genus *Dracunculus* - A source of triacylglycerols containing odd-numbered omega-phenyl fatty acids. *Phytochemistry* 72:1914–1926
- Řezanka T, Schreiberová O, Krulikovská T, Masák J, Sigler K (2010a) RP-HPLC/MS-APCI analysis of odd-chain TAG from *Rhodococcus erythropolis* including some regioisomers. *Chem Phys Lipids* 163:373–380
- Řezanka T, Sigler K (2007) The use of atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry with high performance liquid chromatography and other separation techniques for identification of triacylglycerols. *Curr Anal Chem* 3:252–271
- Řezanka T, Sigler K. (2009) Odd-numbered very-long-chain fatty acids from the microbial, animal and plant kingdoms. *Prog Lipid Res* 48:206–238
- Řezanka T, Sigler K, Dembitsky VM (2006) Syriacin, a novel unusual sulfated ceramide glycoside from the freshwater sponge *Ephydatia syriaca* (Porifera, Demospongiae, Spongillidae). *Tetrahedron* 62:5937–5943
- Řezanka T, Siřišťová L, Matoulková D, Sigler K (2011a) Hydrophilic interaction liquid chromatography: ESI-MS/MS of plasmalogen phospholipids from *Pectinatus* bacterium. *Lipids* 46:765–780
- Řezanka T, Siřišťová L, Melzoch K, Sigler K (2009c) Direct ESI-MS analysis of O-acyl glycosylated cardiolipins from the thermophilic bacterium *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Chem Phys Lipids* 161:115–121
- Řezanka T, Siřišťová L, Melzoch K, Sigler K (2009a) Identification of (*S*)-11-cycloheptyl-4-methylundecanoic acid in acylphosphatidylglycerol from *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Chem Phys Lipids* 158:104–113
- Řezanka T, Siřišťová L, Melzoch K, Sigler K (2010b) Hopanoids in bacteria and cyanobacteria – their role in cellular biochemistry and physiology, analysis and occurrence. *Mini-Rev Org Chem* 7:300–313
- Řezanka T, Siřišťová L, Melzoch K, Sigler K (2011e) *N*-Acylated bacteriohopanehexol-mannosamides from the thermophilic bacterium *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Lipids* 46:249–261
- Řezanka T, Siřišťová L, Sigler K (2011d) Rhamnolipid-producing thermophilic bacteria of species *Thermus* and *Meiothermus*. *Extremophiles* 15:697–709
- Řezanka T, Viden I, Go JV, Dor I, Dembitsky VM (2003) Polar lipids and fatty acids of three wild cyanobacterial strains of the genus *Chroococciopsis*. *Folia Microbiol* 48:781–786

Schreiberová O, Krulíková T, Sigler K, Čejková A, Řezanka T (2010) RP-HPLC/MS-APCI analysis of branched chain tag prepared by precursor-directed biosynthesis with *Rhodococcus erythropolis*. *Lipids* 45:743–756

Sířišťová L, Melzoch K, Řezanka T (2009) Fatty acids, unusual glycophospholipids and DNA analyses of thermophilic bacteria isolated from hot springs. *Extremophiles* 13:101–109

Seznam všech publikací autora

- 1 Rezanka, T., Zahradnik, J., Podojil, M. Hydrocarbons in green and blue-green algae. **Folia Microbiol.** 27, 450-454 (1982).
- 2 Rezanka, T., Prikrylova, V., Yarotsky, S.Y., Podojil, M. Monosaccharides of the green fresh-water alga *Chlorella kessleri* **Folia Microbiol.** 28, 287-291 (1983).
- 3 Rezanka, T., Vokoun, J., Slavicek, J., Podojil, M. Determination of fatty acids in algae by capillary gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr.** 268, 71-78 (1983).
- 4 Rezanka, T., Viden, I., Pokorna, L., Klanova, K., Podojil, M. Fatty acids of *Lactobacillus bulgaricus* determined by gas chromatography-mass spectrometry. **Folia Microbiol.** 28, 470-473 (1983).
- 5 Podojil, M., Rezanka, T., Votápek, V. Zpusob vyroby mastnych kyselin ze zelenych sladkovodnich ras. Czech patent No. 246 772 (198).
- 6 Rezanka, T., Klanova, K., Podojil, M., Vanek, Z. Fatty acids of *Streptomyces cinnamonensis*, producer of monensin. **Folia Microbiol.** 29, 217-221 (1984).
- 7 Rezanka, T., Vanek, Z., Klanova, K., Podojil, M. The use of different oils for the cultivation of *Streptomyces cinnamonensis* **Folia Microbiol.** 29, 306-309 (1984).
- 8 Karnetova, J., Mateju, J., Rezanka, T., Prochazka, K., Nohynek, M., Rokos, J. Estimation of lipase activity by the diffusion plate method. **Folia Microbiol.** 29, 346-347 (1984)
- 9 Rezanka, T., Podojil, M. The very long chain fatty acids of the green alga, *Chlorella kessleri*. **Lipids** 19, 472-473 (1984).
- 10 Pospisil, S., Rezanka, T., Viden, I., Krumphanzl, V., Vanek, Z. Altered fatty acid composition in regulatory mutants of *Streptomyces cinnamonensis*. **FEMS Microbiol. Lett.** 27, 41-43 (1985).
- 11 Vanek, Z., Pospisil, S., Sedmera, P., Tichy, P., Rezanka, T., Krumphanzl, V. Optimization of streptomycete strains producing polyether and macrolide antibiotics. **Biochem. Soc. Transaction** 12, 587-589 (1984).
- 12 Podojil, M., Rezanka, T., Votapek, V., Balak, K. Komplexni vyuziti biomasy zelenych sladkovodnich ras. **Kvasny Prumysl** 31, 180-181 (1985).
- 13 Rezanka, T., Dolezalova, L., Vyhnalek, O., Novotny, C. Effect of clomiphene on the content of sterols and fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Folia Microbiol.** 30, 501-505 (1985).
- 14 Rezanka, T., Podojil, M. Gradient separation of fatty acids (C₁₄-C₃₀) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.** 346, 453-455 (1985).
- 15 Rezanka, T., Livansky, K., Podojil, M. Regulation of lipid biosynthesis in *Chlorella kessleri* by clomiphene. **J. Basic Microbiol.** 25, 521-525 (1985).
- 16 Kren, V., Rezanka, T., Rehacek, Z. Occurrence of ricinoleic acid submerged cultures of various *Claviceps* sp. **Experientia** 41, 1476-1477 (1985).
- 17 Kren, V., Rezanka, T., Sajdl, P., Rehacek, Z. Identification of fatty acids in submerged cultures of *Claviceps* species. **FEMS Microbiol. Lett.** 30, 359-363 (1985).

- 18 Rezanka, T., Vyhnalek, O., Podojil, M. Identification of sterols and alcohols produced by green algae of the genera *Chlorella* and *Scenedesmus* by means of gas chromatography-mass spectrometry. **Folia Microbiol.** 31, 44-49 (1986).
- 19 Rezanka, T., Podojil, M. Inhibicni vliv clomifenu na biosyntezu mastnych kyselin a sterolu. **Cs. Farmacie** 35, 10-13 (1986).
- 20 Rezanka, T., Mares, P., Husek, P., Podojil, M. Gas chromatography-mass spectrometry and desorption chemical ionization mass spectrometry of triacylglycerols from the green alga *Chlorella kessleri*. **J. Chromatogr.** 355, 265-271 (1986).
- 21 Rezanka, T., Podojil, M. Identification of wax esters of the fresh-water green alga *Chlorella kessleri* by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr.** 362, 399-406 (1986).
- 22 Kren, V., Rezanka, T., Sajdl, P., Rehacek, Z. Identification of sterols in submerged cultures of different *Claviceps* species **Biochem. Physiol. Pflanzen** 181, 505-510 (1986).
- 23 Rezanka, T., Cudlin, J., Podojil, M. Very-long-chain fatty acids from lower organisms. **Folia Microbiol.** 32, 149-176 (1987).
- 24 Vancura, A., Rezanka, T., Marsalek, J., Kristan, V., Basarova, G. Fatty acids and production of tylosin-like compounds in *Streptomyces fradiae*. **J. Basic. Microbiol.** 27, 167-171 (1987).
- 25 Rezanka, T., Kren, V., Sajdl, P., Rehacek, Z. Identification of an unusual 4,5-dimethyloctanoic acid, in submerged mycelium of *Claviceps purpurea*. **J. Nat. Prod.** 50, 335 (1987)
- 26 Viden, I., Rezanka, T. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of aliphatic saturated alpha,omega-dicarboxylic acid dimethyl esters and direct inlet mass spectrometry of the dicarboxylic acids. **J.Chromatogr.** 408, 145-155 (1987).
- 27 Rezanka, T., Mares, P. Unusual and very long-chain fatty acids produced by Basidiomycetes. **J. Chromatogr.** 409, 390-395 (1987).
- 28 Rezanka, T., Doucha, J., Mares, P., Podojil, M. Effect of cultivation temperature and light intensity on fatty acid production in the red alga *Porphyridium cruentum*. **J. Basic Microbiol.** 27, 167-171 (1987).
- 29 Vancura, A., Rezanka, T., Marsalek, J., Vancurova, I., Kristan, V., Basarova, G. Effect of ammonium ions on the composition of fatty acids in *Streptomyces fradiae*, producer of tylosin. **FEMS Microbiol. Lett.** 48, 357-360 (1987).
- 30 Vancura, A., Rezanka, T., Marsalek, J., Melzoch, K., Basarova, G., Kristan, V. Metabolism of L-threonine and fatty acids and tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. **FEMS Microbiol. Lett.** 49, 411-415 (1987).
- 30a Sajdl, P., Kren V., Pazoutova S., Rezanka T., Malinka Z., Harazim P., Zpusob fermentacni vyroby namelovych alkaloidu s modifikaci bunecnych lipidu. **Czech patent No. 273373**
- 31 Rezanka, T., Vyhnalek, O., Podojil, M. Separation and identification of lipids and fatty acids of the marine alga *Fucus vesiculosus* by TLC and GC-MS. **Folia Microbiol.** 33, 309-313 (1988).

- 32 Pazoutova, S., Kren, V., Rezanka, T., Sajdl, P. Effect of clomiphene on fatty acids, sterols and membrane fluidity in clavine producing *Claviceps purpurea* strains. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 152, 190-196 (1988).
- 33 Tvrzicka, E., Rezanka, T., Krijt, J., Janousek, V. Identification of very-long-chain fatty acids in rat and mouse harderian gland lipids by capillary gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr.** 431, 231-238 (1988).
- 34 Rezanka, T., Podojil, M. Preparative separation of algal polar lipids and individual molecular species by high-performance liquid chromatography and their identification by gas chromatography. **J. Chromatogr.** 463, 397-408 (1988).
- 35 Viden, I., Rezanka, T. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of very-long-chain alfa, omega-dicarboxylic dimethyl esters from *Equisetum* (horsetail). **J. Chromatogr.** 465, 390-394 (1989).
- 36 Koza, T., Rezanka, T., Wurst, M. Quantitative analysis of fatty acid methyl esters by capillary gas chromatography with flame-ionization detection: quadrupole and sector mass spectrometer. **Folia Microbiol.** 34, 165-169 (1989).
- 37 Rezanka, T., Koza, T., Kysilka, R., Viden, I., Wurst, M. Reversed-phase liquid chromatography for enrichment of very-long-chain fatty acids and their identification by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr.** 472, 290-295 (1989).
- 38 Pazoutova, S., Kren, V., Rezanka, T., Amler, E., Flieger, M., Rylko, V., Sajdl, P. Effect of triadimefon on lipids, sterols, and membrane fluidity in submerged cultures of *Claviceps purpurea*. **Pest. Biochem. Physiol.** 34, 211-217 (1989).
- 39 Rezanka, T. Very-long-chain fatty acids from the animal and plant kingdoms. **Progr. Lipid Res.** 28, 147-187 (1989).
- 40 Rezanka, T., Sokolov, M. Yu., Viden, I. Unusual and very-long-chain fatty acids in *Desulfotomaculum*, a sulfate-reducing bacterium. **FEMS Microbiol. Ecol.** 73, 231-238 (1990).
- 41 Kren, V., Pazoutova, S., Rezanka, T., Viden, I., Amler, E., Sajdl, P. Regulation of lipid and ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea* by chlorophenoxy acids. **Biochem. Physiol. Pflanzen** 186, 99-108 (1990)
- 42 Rezanka, T., Sokolov, M. Yu. Identification of fatty acids longer than C₃₂ in a sulphate reducing bacterium by reversed phase high performance liquid chromatography and gas chromatography. **J. Chromatogr.** 508, 275-277 (1990).
- 43 Rezanka, T. Analysis of very-long-chain polyenoic fatty acids by high performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry with chemical ionization. **LC-GC** 8, 542-545 (1990).
- 44 Rezanka, T., Mares, P. Preparative separation of sphingolipids and of individual molecular species by high-performance liquid chromatography and their identification by gas chromatography. **J. Chromatogr.** 509, 333-346 (1990).
- 45 Novak, J., Rezanka, T., Koza, T., Vanek, Z. Biosynthesis of avermectins and lipids in *Streptomyces avermitilis*. **FEMS Microbiol. Lett.** 70, 291-294 (1990).
- 46 Rezanka, T. Identification of very long polyenoic acids as picolinyl esters by Ag ion-exchange high-performance liquid chromatography, reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.** 513, 344-348 (1990).

- 47 Buranova, L., Rezanka, T., Jandera, A. Screening for strains of the genus *Mortierella*, showing elevated production of highly unsaturated fatty acids. **Folia Microbiol.** 35, 578-582 (1990).
- 48 Rezanka, T., Mares, P. Determination of plant triacylglycerols using capillary gas chromatography, high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. **J. Chromatogr.** 542, 145-159 (1991).
- 49 Mares, P., Rezanka, T., Novak, M. Analysis of human blood plasma triacylglycerols using capillary gas chromatography, silver ion thin-layer chromatographic fractionation and desorption chemical ionization. **J. Chromatogr.** 568, 1-10 (1991).
- 50 Rezanka, T., Zlatkin, I.V., Viden, I., Slabova, O.I., Nikitin, D.I. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of unusual and very long-chain fatty acids from soil oligotrophic bacteria. **J. Chromatogr.** 558, 215-221 (1991).
- 51 Rezanka, T. Overproduction of microbial lipids and lipases. **Folia Microbiol.** 36, 211-224 (1991).
- 52 Rezanka, T., Reichelova, J., Kopecky, J. Isobutyrate as a precursor of n-butyrate in the biosynthesis of tylosine and fatty acids. **FEMS Microbiol. Lett.** 84, 33-36 (1991).
- 53 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Bychek, I.A., Shustov, M.V. Identification of fatty acids from *Cladonia* lichens. **Phytochemistry** 30, 4015-4018 (1991).
- 54 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Bychek, I.A., Shustov, M.V. Fatty acid composition of *Parmelia* species. **Phytochemistry** 31, 841-843 (1992).
- 55 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Bychek, I.A. Fatty acids and phospholipids from lichens of the order Lecanorales. **Phytochemistry** 31, 851-853 (1992).
- 56 Rezanka, T., Vancurova, I., Kristufek, V., Koza, T., Caslavská, J., Prikrylova, V., Blumauerova, M. Taxonomic studies of *Streptomyces virginiae* mutants overproducing virginiamycin M1. **Folia Microbiol.** 37, 105-110 (1992).
- 57 Novak, J., Hajek, P., Rezanka, T., Vanek, Z. Nitrogen regulation of fatty acids and avermectins biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. **FEMS Microbiol. Lett.** 93, 57-62 (1992).
- 58 Rezanka, T. Analysis of sterol esters from alga and yeast by high performance liquid chromatography and capillary gas chromatography mass spectrometry with chemical ion. **J. Chromatogr.** 598, 219-226 (1992).
- 59 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Bychek, I.A. Lipid composition of some lichens. **Phytochemistry** 31, 1617-1620 (1992).
- 60 Rezanka, T., Mikova, H., Jurkova, M. Influence of inhibitors of lipid biosynthesis on the production of avermectins in *Streptomyces avermitilis*. **FEMS Microbiol. Lett.** 96, 31-36 (1992).
- 61 Rezanka, T. Identification of very-long chain acids from peat and coals by capillary gas chromatography-mass spectrometry **J. Chromatogr.** 627, 241-245 (1992).
- 62 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Kashin, A.G. Comparative examination of phospholipids and fatty acids from some Caspian invertebrates. **Comp. Biochem. Physiol.** B 104, 617-622 (1993).
- 63 Rezanka, T., Sokolov, M.Yu. Rapid method for enrichment of very long-chain fatty acids from microorganisms. **J. Chromatogr.** 636, 249-254 (1993).

- 64 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Bychek I.A., Afonina, O.M. Polar lipid and fatty acid composition of some Bryophytes. **Phytochemistry** 33, 1009-1014 (1993).
- 65 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Rozentsvet, O.A. Lipid composition of three macrophytes from the Caspian sea. **Phytochemistry** 33, 1015-1019 (1993).
- 66 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Bychek I.A., Afonina, O.M. Acetylenic acids and lipid compositions of some mosses from Russia. **Phytochemistry** 33, 1021-1027 (1993).
- 67 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Kashin, A.G. Fatty acid and phospholipid composition of freshwater molluscs *Anadonta piscinalis* and *Limnaea fragilis* from the river Volga. **Comp. Biochem. Physiol. B** 105, 597-601 (1993).
- 68 Rezanka, T., Polyunsaturated and unusual fatty acids from slime moulds. **Phytochemistry** 33, 1441-1444 (1993).
- 69 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Shubina, E.E. Unusual hydroxy fatty acids from higher fungi. **Phytochemistry** 34, 1057-1059 (1993).
- 70 Rezanka, T., Dembitsky, V.M. Occurrence of C₄₀-C₁₃₀ polyisoprenoid alcohols in lower plants. **Phytochemistry** 34, 1335-1339 (1993).
- 71 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Shubina, E.E. Chemical constituents of some higher fungi. I. Fatty acid and phospholipid compositions of Basidiomycetes. **Crypt. Bot.** 3, 373-377 (1993).
- 72 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Shubina, E.E. Chemical constituents of some higher fungi. II. Fatty acids composition of Ascomycetes. **Crypt. Bot.** 3, 378-382 (1993).
- 73 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Shubina, E.E. Chemical compositions of fatty acids from some fungi. **Crypt. Bot.** 3, 383-386 (1993).
- 74 Rezanka, T., Dembitsky, V.M. Isoprenoid polyunsaturated fatty acids from freshwater sponges. **J. Nat. Prod.** 56, 1898-1904 (1993).
- 75 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Kashin, A.G. Comparative study of the endemic freshwater fauna of lake Baikal-I. Phospholipid and fatty acid composition of two mollusc species, *Baicalia oviformis* and *Benedictia baicalensis*. **Comp. Biochem. Physiol. B** 106, 819-823 (1993).
- 76 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Kashin, A.G. Comparative study of the endemic freshwater fauna of lake Baikal-II. Unusual lipid composition of two sponge species *Baicalospongia bacillifera* and *Baicalospongia intermedia* (family Lubomirskiidae, class Demospongiae) **Comp. Biochem. Physiol. B** 106, 825-831 (1993).
- 77 Rezanka, T., Libalova, D., Votruba, J., Viden, I. Identification of odorous compounds from *Streptomyces avermitilis*. **Biotechnol. Lett.** 16, 75-78 (1994).
- 78 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Kashin, A.G. Comparative study of the endemic freshwater fauna of lake Baikal-III. Phospholipid and fatty acid compositions of the amphipod crustacean of the genus *Eulimnogammarus*. **Comp. Biochem. Physiol. B** 107, 317-323 (1994).
- 79 Rezanka, T., Dembitsky, V.M., Kashin, A.G. Comparative study of the endemic freshwater fauna of lake Baikal-IV. Phospholipid and fatty acid compositions of two gastropod molluscs of the genus *Valvata*. **Comp. Biochem. Physiol. B** 107, 325-330 (1994).

- 80 Rezanka, T., Dembitsky, V.M., Kashin, A.G. Phospholipid and fatty acid compositions of the endemic amphipod crustacean *Issycogammarus bergi* from the brackish mountain lake Issyk-Kul (Tian Shan, Middle Asia). **Comp. Biochem. Physiol. B** 107, 331-336 (1994).
- 81 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Bychek I.A. Seasonal variability of lipids and fatty acids in the tree-growing lichen *Xanthoria parietina*. **J. Experimental Botany** 45, 403-408 (1994).
- 82 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Bychek I.A., Afonina, O.M. Chemical constituents of some moss species. **J. Hattori Bot. Lab.** 75, 161-172, (1994).
- 83 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Bychek I.A. Seasonal variation of lipids and fatty acids from tree-growing lichens of the genus *Physcia*. **Phytochemistry** 36, 601-608 (1994).
- 84 Dembitsky, V.M., Rezanka, T. Acetylenic acids of the Dicranaceae. **Phytochemistry** 36, 685-689 (1994).
- 85 Pospisil, S., Rezanka, T. Changes in fatty acid branching and unsaturation of *Streptomyces cinnamonensis* as a response to NaCl concentration. **Folia Microbiol.** 39, 187-190 (1994).
- 86 Dembitsky, V.M., Kashin, A.G., Rezanka, T. Comparative study of the endemic freshwater fauna of lake Baikal-V. Phospholipid and fatty acid compositions of the deep-water amphipod crustacean *Acanthogammarus (Brachyuropus) grewingkii*. **Comp. Biochem. Physiol. B** 108, 443-448 (1994).
- 87 Rezanka, T., Dembitsky, V.M. Identification of unusual cyclopropane monounsaturated fatty acids from the deep-water lake invertebrate *Acanthogammarus grewingkii*. **Comp. Biochem. Physiol. B** 109, 407-413 (1994).
- 88 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Kashin, A.G. Comparative study of the endemic freshwater fauna of lake Baikal-VI. Unusual fatty acid and lipid composition of the endemic sponge *Lubomirskia baicalensis* and its amphipod crustacean parasite *Brandtia (Spinacanthus) parasitica*. **Comp. Biochem. Physiol. B** 109, 415-426 (1994).
- 89 Dembitsky, V.M., Rezanka, T. Distribution of diacylglycerylhomoserines, phospholipids and fatty acids in thirteen moss species from southwestern Siberia. **Biochem. System. Ecol.** 23, 71-78 (1995).
- 90 Rezanka, T., Dembitsky, V.M. The occurrence and structural identification of long-chain unsaturated ketones in the deep-lake invertebrate *Acanthogammarus grewingkii*. **Comp. Biochem. Physiol. B** 111, 249-255 (1995).
- 91 Dembitsky, V.M., Rezanka, T. Distribution of acetylenic acids and polar lipids in some aquatic bryophytes. **Phytochemistry** 40, 93-97 (1995).
- 92 Rezanka, T. Two-dimensional separation of fatty acids by TLC on urea and silver nitrate silica gel plates. **J. Chromatogr. A** 727, 147-152 (1996).
- 93 Dembitsky, V.M., Rezanka, T. Molecular species of wax esters in *Cereus peruvianus*. **Phytochemistry** 42, 1075-1080 (1996).
- 94 Dembitsky, V.M., Rezanka, T. Unusually high levels of eicosatetraenoic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic fatty acids in Palestinian freshwater sponges. **Lipids** 31, 647-650 (1996).
- 95 Juzlova, P., Rezanka, T., Martinkova, L., Kren, V. Long-chain fatty acids from *Monascus purpureus*. **Phytochemistry** 43, 151-153 (1996).

- 96 Dembitsky, V.M., Rezanka, T. Comparative study of the endemic freshwater fauna of Lake Baikal .7. Carotenoid composition of the deep-water amphipod crustacean *Acanthogammarus (Brachyuropus) grewingkii*. **Comp. Biochem. Physiol. B** 114, 383-387 (1996).
- 97 Dembitsky, V.M., Rezanka, T. Furan fatty acids of some brackish invertebrates from the Caspian sea **Comp. Biochem. Physiol. B** 114, 317-320 (1996).
- 98 Kren, V., Rezanka, T. Sterols and fatty acids in *Peziza muralis*. **Can. J. Microbiol.** 42, 1176-1178 (1996).
- 99 Rezanka, T., Votruba, J. Effect of salinity on the formation of avermectins, odor compounds and fatty acids by *Streptomyces avermitilis*. **Folia Microbiol.** 43, 47-50 (1998).
- 100 Rezanka, T., Dembitsky, V.M. Very-long-chain alkyl esters in *Cereus peruvianus* wax. **Phytochemistry** 47, 1145-1148 (1998).
- 101 Rezanka T. Branched and very long-chain dicarboxylic acids from *Equisetum* species. **Phytochemistry** 47, 1539-1543 (1998).
- 102 Patakova-Juzova, P., Rezanka, T., Viden, I. Identification of volatile metabolites from rice fermented by the fungus *Monascus purpureus* (Ang-kak). **Folia Microbiol.** 43, 407-410 (1998).
- 103 Rezanka, T., Votruba, J. Fermentation odor and bioprocess scale-up. **Bioprocess Engineering** 19, 159-160 (1998).
- 104 Rezanka, T., Dembitsky, V. Brominated fatty acids from lichen *Acarospora gobiensis*. **Phytochemistry** 50, 97-99 (1998).
- 105 Rezanka, T., Dembitsky, V.M. Very long chain polyunsaturated fatty acids in crustacea of the order Bathynellacea. **Bioch. Syst. Ecol.** 27, 551-558 (1999).
- 106 Nikolova N., Rezanka T., Nikolova-Damyanova B., Kalushkov P. Hydrocarbons in adult *Chrysomela vigintipunctata*. **Comp. Bioch. Phys.** 123, 67-77 (1999).
- 107 Rezanka, T., Dembitsky, V. Novel brominated lipidic compounds from lichens of Central Asia. **Phytochemistry** 51, 963-968 (1999).
- 108 Rezanka, T., Rezankova H. Characterization of FAs and triacylglycerols in vegetable oils by GC and statistical analysis. **Anal. Chim. Acta** 398, 253-261 (1999).
- 109 Rezanka T., Dembitsky, V.M. Chiral high performance liquid chromatography of astaxanthin's stereoisomers. **Trends in Comparative Biochem. Physiol.** 5, 301-304 (1998).
- 110 Rezanka, T., Guschina, I.A. Brominated depsidones from *Acarospora gobiensis*, a lichen of Central Asia. **J. Nat. Prod.** 62, 1675-1677 (1999).
- 111 Rezanka, T., Analysis of polyunsaturated fatty acids using high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **J. High Resol. Chromatogr.** 23, 338-342 (2000).
- 112 Rezanka T. Analysis of VLCPUFA using HPLC - APCI/MS. **Biochem. Syst. Ecol.** 28, 847-856 (2000).
- 113 Rezanka, T., Rozentsvet, O.A., Dembitsky, V. Characterization of the hydroxy fatty acid content of Basidiomycotina. **Folia Microbiol.** 44, 635-641 (1999).

- 114 Rezanka, T., Dembitsky, V. Fatty acid of lichen species from Tian Shan Mountains. **Folia Microbiol.** 44, 643-646 (1999).
- 115 Rezanka, T., Guschina, I.A. Glycosidic compounds of murolic, protoconstipatic and allo-murolic acids from lichens of Central Asia. **Phytochemistry** 54, 635-645 (2000).
- 116 Nikolova, N., Rezanka T., Nikolova-Damyanova B. Fatty acid profiles of main lipid classes in adult *Chrysomela vigintipunctata*. **Z. Naturforsch.** 55c, 661-666 (2000).
- 117 Rezanka, T., Guschina, I.A. Further glucosides of lichens' acids from Central Asian lichens. **Phytochemistry** 56, 181-188 (2001).
- 118 Rezanka, T., Dembitsky, V.M. Bromoallenlic lipid compounds from lichens of central Asia. **Phytochemistry** 56, 869-874 (2001).
- 119 Rezanka, T., Dembitsky, V.M. Polyhalogenated homosesquiterpenic fatty acids from *Plocamium cartilagineum*. **Phytochemistry** 57, 607-611 (2001).
- 120 Rezanka, T., Guschina, I.A. Glycoside esters from lichens of central Asia. **Phytochemistry** 58, 509-516 (2001).
- 121 Rezanka, T., Dembitsky, V.M. gama-Lactones from the soft corals *Sarcophyton trocheliophorum* and *Lithophyton arboreum*. **Tetrahedron** 57, 8743-8749 (2001).
- 122 Rezanka, T., Votruba, J. Chromatography of long chain alcohols (polyprenols) from animal and plant sources. **J. Chromatogr. A** 936, 95-110 (2001).
- 123 Rezanka, T., Guschina, I.A. Macrolactone glycosides of three lichen acids from *Acarospora gobiensis*, a lichen of Central Asia **Phytochemistry** 58, 1281-1287 (2001).
- 124 Rezanka, T., Votruba, J. Chromatography of very long-chain fatty acids from animal and plant kingdoms. **Anal. Chim. Acta** 465, 273-297 (2002).
- 125 Jachymova, J., Votruba, J., Viden I., Rezanka, T., Identification of *Streptomyces* odor spectrum. **Folia Microbiol.** 47, 37-41 (2002).
- 126 Go, J.V., Rezanka, T., Srebnik, M., Dembitsky, V.M., Variability of fatty acid components of marine and freshwater gastropod species from the littoral zone of the Red Sea, Mediterranean Sea, and Sea of Galilee. **Bioch. Syst. Ecol.** 30, 819-835 (2002).
- 127 Rezanka, T., Dembitsky, V.M., Multi branched polyunsaturated and very long-chain fatty acids of freshwater Israeli sponges. *J. Nat. Prod.* 65, 709-713 (2002).
- 128 Rezanka, T., Dembitsky, V.M., Eight-membered cyclic 1,2,3-trithiocane derivatives from *Perophora viridis*, an Atlantic tunicate. **Eur. J. Org. Chem.** 2400-2404 (2002).
- 129 Rezanka, T., Glycosides of polyenoic branched fatty acids from myxomycetes. **Phytochemistry** 60, 639-646 (2002).
- 130 Rezanka T., Jachymova J., Dembitsky V.M. Prenylated xanthone glucosides from Ural's lichen *Umbilicaria proboscidea*. **Phytochemistry** 62, 607-612 (2003)
- 131 Rezanka T., Dembitsky V.M. Brominated oxylipins and oxylipin glycosides from Red Sea corals. **Eur. J. Org. Chem.** 309-316 (2003)
- 132 Rezanka T. Identification of very long chain fatty acids by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography-mass spectroscopy from green alga *Chlorella kessleri*. **J. Sep. Sci.** 25, 1332-1336 (2002)
- 133 Rezanka T., Spizek J. Compounds isolated at the Institute of Microbiology in 1989–2001 and future trends. **Folia Microbiol.**, 47, 587–639 (2002).

- 134 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Srebnik M., Lipid compounds of freshwater sponges: family Spongillidae, class Demospongiae. **Chemistry and Physics of Lipids** 123, 117-155 (2003)
- 135 Fliieger M., Kantorova M., Prell A., Rezanka T., Votruba J., Biodegradable plastics from renewable sources. **Folia Microbiol.**, 48, 27–44 (2003)
- 136 Rezanka T., Dor I., Prell A., Dembitsky V.M., Fatty acid composition of six freshwater wild cyanobacterial species. **Folia Microbiol.** 48, 71–75 (2003)
- 137 Dembitsky, V.M., Rezankova, H., Rezanka, T., Hanus, L.O., Variability of the fatty acids of the marine green algae belonging to the genus *Codium*. **Biochemical Systematics and Ecology** 31, 1125-1145 (2003)
- 138 Rezanka, T., Dembitsky, V.M., Identification of acylated xanthone glycosides by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry in positive and negative modes from the lichen *Umbilicaria proboscidea*. **J. Chromatogr. A** 995, 109-118 (2003)
- 139 Rezanka, T., Dembitsky, V.M., Go, J.V., Dor, I., Prell, A., Hanus, L., Sterol compositions of the filamentous nitrogen-fixing terrestrial cyanobacterium *Scytonema* sp. **Folia Microbiol.** 48, 357-360 (2003)
- 140 Rezanka, T., Dembitsky, V.M., Ten-membered substituted cyclic 2-oxecanone (decalactone) derivatives from *Latrunculia corticata*, a Red Sea sponge. **Eur. J. Org. Chem.** 2144-2152 (2003)
- 141 Rezanka, T., Dvorakova, R., Polypropionate lactones of deoxysugars glycosides from slime-mould *Lycogala epidendrum*. **Phytochemistry** 63, 945–952 (2003)
- 142 Hanus, L.O., Rezanka, T., Dembitsky, V.M., A trinorsesterterpene glycoside from the North American fern *Woodwardia virginica* (L.) Smith. **Phytochemistry** 63, 869–875 (2003)
- 143 Rezanka, T., Dembitsky, V.M., Hanus, L.O., Two cyclohexenone glycosides from the North American fern *Woodwardia virginica* (L.) Smith. **Phytochemistry** 63, 931–937 (2003)
- 144 Rezanka, T., Hanus, L., Dembitsky, V.M., Chagosensine, a new chlorinated macrolide from the Red Sea sponge *Leucetta chagosensis*. **Eur. J. Org. Chem.** 4073-7079 (2003)
- 145 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Natural occurrence of arseno compounds in plants, lichens, fungi, algal species, and microorganisms. **Plant Science** 165, 1177-1192 (2003)
- 146 Spizek, J., Rezanka, T., Lincomycin, cultivation of producing strains and biosynthesis. **Appl Microbiol Biotechnol** 63, 510–519 (2004)
- 147 Rezanka T., Dvorakova R., Hanus L.O., Dembitsky V.M., Enteridinines A and B from slime mold *Enteridium lycoperdon*. **Phytochemistry** 65, 455–462 (2004)
- 148 Rezanka T., Jachymova J., Spizek J., Halogenated natural products in Streptomyces. **Advances in Phytochemistry** pp.109-184 (2003)
- 149 Rezanka T., Viden I., Go J.V., Dor I., Dembitsky V.M., Polar lipids and fatty acids of three wild cyanobacterial strains of the genus *Chroococidiopsis*. **Folia Microbiol.** 48, 781-786 (2003)

- 150 Rezanka, T., Dvorakova, R., Hanus, L.O., Dembitsky, V.M., Lycoperdinoside A and B, new glycosides from the slime mold *Enteridium lycoperdon*. **Eur. J. Org. Chem.** 995-1001 (2004)
- 151 Rezanka T., Spizek J., Halogen-containing antibiotics from Streptomyces. **Stud Nat Prod Chem** 29, 309-353 (2003)
- 152 Spizek J., Rezanka T. Lincomycin, clindamycin and their applications. **Appl Microbiol Biotechnol** 64, 455-464 (2004)
- 153 Rezanka, T., Dembitsky, V.M., Tetratriacontanonaenoic acid, first natural acid with nine double bonds isolated from a crustacean *Bathynella natans*. **Tetrahedron** 60, 4261-4264 (2004)
- 154 Rezanka, T., Spizek, J., Prikrylova, V., Prell, A., Dembitsky, V.M., Five new derivatives of nonactic and homo-nonactic acids from *Streptomyces globisporus*. **Tetrahedron** 60, 4781-4787 (2004)
- 155 Rezanka, T., Temina, M., Hanus, L., Dembitsky, V.M., The tornabeatins, four tetrahydro-2-furanone derivatives from the lichenized ascomycete *Tornabea scutellifera* (With.) J.R. Laundon. **Phytochemistry** 65, 2605-2612 (2004)
- 156 Rezanka, T., Spizek, J., Prikrylova, V., Prell, A., Dembitsky, V.M., The new derivatives of trihomo-nonactic acids from *Streptomyces globisporus*. **Eur. J. Org. Chem.** 4239-4244 (2004)
- 157 Spizek J., Novotna J., Rezanka T., Lincosamides, chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance and applications. **Adv. Appl. Microbiol.** 56, 121-154 (2004)
- 158 Rezanka, T., Temina, M., Tolstikov, A.G., V., Dembitsky, V.M., Natural microbial UV radiation filters - Mycosporine-like amino acids. **Folia Microbiol.** 49, 339-352 (2004)
- 159 Rezanka, T., Hanus, L.O., Dembitsky, V.M., Lytophilippines A-C: Novel Macrolactones from the Red Sea Hydroid *Lytocarpus philippinus* **Tetrahedron** 60, 12191-12199 (2004)
- 160 Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Spizek, J., Hanus, L.O., Secondary metabolites of slime molds (myxomycetes). **Phytochemistry** 66, 747-769 (2005)
- 161 Rezanka T., Hanus L.O. Kujan P., Dembitsky V.M. Fulicineroside, an Unusual Glycosidic Dibenzofuran Metabolite from the Slime Mold *Fuligo cinerea* (Schwein.) Morgan **Eur. J. Org. Chem.** 2708-2714 (2005)
- 162 Rezanka T., Votruba J., Analysis of Fatty Acids by APCI-MS, pp. 242-275, in **Modern Methods for Lipid Analysis by LC-MS and Related Techniques** (Ed.W.C.Byrdwell), AOCS Press, 2005, Champaign, Il. USA
- 163 Rezanka T., Dembitsky V.M. The colleflaccinosides, two chiral bianthraquinone glycosides with antitumor activity from the lichen *Collema flaccidum* collected in Israel and Russia. **Nat. Prod. Res.** 20, 969-980 (2006)
- 164 Hanus L.O., Rezanka T., Dembitsky, V.M., Moussaieff, A. Myrrh-*Commiphora* Chemistry. **Biomed. Papers** 149, 3-28 (2005)
- 165 Hanus L.O., Rezanka T., Spizek J., Dembitsky, V.M. Substances isolated from *Mandragora* species. **Phytochemistry** 66, 2408-2417 (2005)

- 166 Kujan P., Prell A., Safar H., Sobotka M., Rezanka T., Holler P. Removal of copper ions from dilute solutions by *Streptomyces noursei* mycelium. Comparison with yeast biomass. **Folia Microbiol.** 50, 309–314 (2005)
- 167 Dembitsky V.M., Rezanka T. Metabolites produced by nitrogen-fixing *Nostoc* species. **Folia Microbiol.** 50, 363–392 (2005)
- 168 Rezanka T., Spizek J., Griseofulvin and other biologically active halogen containing compounds from fungi. In **Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 32 - Bioactive Natural Products (Part L)** pp. 471-547 (2005).
- 169 Rozentsvet O.A., Rezanka T., Bosenko E.S., Uzhametskaya E.A., Dembitskii V.M., Fatty acids, phospholipids, and the betaine lipid DGTS from the aquatic fern *Salvinia natans*. **Chem. Nat. Comp.** 41, 487-490 (2005)
- 170 Rezanka T., Sobotka M., Spizek J., Sigler K., Pharmacologically Active Sulfur-Containing Compounds. **Anti-Infect. Agents Med. Chem.** 5, 187-224 (2006)
- 171 Temina M., Rezankova H., Rezanka T., Dembitsky V.M., Diversity of the fatty acids of the *Nostoc* species and their statistical analysis. **Microbiol. Res.** 162, 308-321 (2007)
- 172 Rezanka T., Sigler K., Identification of very long chain fatty acids from sugar cane wax by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography–mass spectroscopy. **Phytochemistry** 67, 916–923 (2006)
- 173 Rezanka T., Sigler K., Dembitsky V.M., Syriacin, a novel unusual sulfated ceramide glycoside from the freshwater sponge *Ephydatia syriaca* (Porifera, Demospongiae, Spongillidae). **Tetrahedron** 62, 5937-5943 (2006)
- 174 Kujan, P., Prell, A., Safar, H., Sobotka, M., Rezanka T., Holler P., Use of the industrial yeast *Candida utilis* for cadmium sorption. **Folia Microbiol.** 51, 257-260 (2006)
- 175 Rezanka T., Sigler K., Volatile Lactones - (5S,S)-5-Methyl-3-(methylalkyl)furan-2(5H)-ones - Identified in the submerged cultivation of *Streptomyces avermitilis* . **Eur. J. Org. Chem.** 4277-4284 (2006)
- 176 Rezanka T., Sigler K., Biologically active compounds of semi-metals. In **Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 35 - Bioactive Natural Products, Part O**, 835-924 (2008).
- 177 Rezanka T., Dembitsky V.M., Metabolites produced by cyanobacteria belonging to several species of the family Nostocaceae. **Folia Microbiol.** 51, 159–182 (2006).
- 178 Dubnickova M., Rezanka T., Koscova H., Adaptive changes in fatty acids of *E. coli* strains exposed to a quaternary ammonium salt and an amine oxide. **Folia Microbiol.** 51, 371-374 (2006).
- 179 Rezanka T., Sigler K., Identification of very long chain unsaturated fatty acids from *Ximenia* oil by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography–mass spectroscopy . **Phytochemistry** 68, 925-934 (2007).
- 180 Rezanka T., Spizek, J., Sigler K., Medicinal use of Lincosamides and microbial resistance to them. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry** 6, 133-144 (2007).
- 181 Lisa, M., Holcapek, M., Rezanka, T., Kabatova, N., HPLC/APCI-MS and GC/FID characterization of 5-olefinic fatty acids in triacylglycerols from conifer seed oils. **J. Chromatogr.** 1146, 67-77 (2007).

- 182 Hanus, L.O., Moussaieff, A., Rezanka, T., Abu-Lafi, S., Dembitsky, V.M., Phytochemical analysis and comparison for differentiation of *Boswellia carterii* and *Boswellia errata*. **Nat. Prod. Comm.** 2, 139-142 (2007).
- 183 Rezanka, T., Sigler K., Sinaicinone, a complex adamantanyl derivative from *Hypericum sinaicum*. **Phytochemistry** 68, 1272–1276 (2007).
- 184 Rezanka, T., Nedbalova, L., Sigler, K., Unusual medium-chain polyunsaturated fatty acids from snow alga *Chloromonas brevispina*. **Microbiol. Res.** 163, 373-379 (2008).
- 185 Rezanka T., Sobotka M., Prell A., Sigler K., Relationship between volatile odor substances and production of avermectins by *Streptomyces avermitilis*. **Folia Microbiol.** 52, 26-32 (2007).
- 186 Rezanka T., Sigler K., The use of atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry with high performance liquid chromatography and other separation techniques for identification of triacylglycerols. **Current Analytical Chemistry** 3, 252-271 (2007).
- 187 Rezanka T., Sigler K., Structural analysis of a polysaccharide from *Chlorella kessleri* by means of gas chromatography–mass spectrometry of its saccharide alditols. **Folia Microbiol.** 52, 246-252 (2007).
- 188 Rezanka T., Nedbalova L., Sigler K., Cepak V., Identification of astaxanthin diglucoside diesters from snow alga *Chlamydomonas nivalis* by LC-MS/APCI. **Phytochemistry** 69, 479-490 (2008).
- 189 Rezanka T., Sigler K., Hirtusneanoside, an unsymmetrical dimeric tetrahydroxanthone from the lichen *Usnea hirta*. **J. Nat. Prod.** 70, 1487–1491 (2007).
- 190 Grigova, M., Kubes, M., Drazna, N., Rezanka, T., Lipavska, H., Storage lipid dynamics in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*): histochemical and quantitative analyses. **Tree Physiology** 27, 1533–1540 (2007).
- 191 Rezanka T., Sigler K., Biologically active compounds of semi-metals. **Phytochemistry** 69, 585-606 (2008).
- 192 Rezanka T., Dembitsky V.M., Hanus L.O., Sigler K., Identification of eight-membered heterocycles Hicksoanes A-C from the gorgonian *Subergorgia hicksoni*. **Eur. J. Org. Chem** 1265–1270 (2008).
- 193 Rezanka T., Rezanka P., Sigler K., A biaryl xanthone derivative having axial chirality from *Penicillium winaceum*. **J. Nat. Prod.** 71, 820–823 (2008).
- 194 Hanus L.O., Rezanka T., Dembitsky V.M., Fatty acid and phospholipid profile of freshwater sardine *Mirogrex terraesanctae* from the sea of Galilee. **J. Food Lipids** 15, 150-163 (2008).
- 195 Kren V., Rezanka T., Sweet antibiotics - the role of glycosidic residues in antibiotic and antitumor activity and their randomization. **FEMS Microbiol. Rev.** 32, 858-889 (2008).
- 196 Rezanka T., Nedbalova L., Sigler K., Identification of very-long-chain polyunsaturated fatty acids from *Amphidinium carterae* by LC-MS/APCI. **Phytochemistry** 69, 2391–2399 (2008).
- 197 Rezanka T., Prell A., Sigler K., Identification of odorous compounds from nine fermentor-cultivated *Streptomyces* strains. **Folia Microbiol.** 53, 315-318 (2008).

- 198 Rezanka T., Nedbalova L., Sigler K., Odd-numbered very-long-chain polyunsaturated fatty acids from the dinoflagellate *Amphidinium carterae* identified by APCI-LC-MS. **Phytochemistry** 69, 2849–2855 (2008).
- 199 Rezanka T., Olsovska J., Sobotka M., Sigler K., The Use of APCI-MS with HPLC and Other Separation Techniques for Identification of Carotenoids and Related Compounds. **Current Analytical Chemistry** 5, 1-25 (2009).
- 200 Siristova L., Melzoch K., Rezanka T., Fatty acids, unusual glycopospholipids and DNA analyses of thermophilic bacteria isolated from hot springs. **Extremophiles** 13, 101-109 (2009).
- 201 Rezanka T., Siristova L., Melzoch K., Sigler K., Identification of (*S*)-11-cycloheptyl-4-methylundecanoic acid in acylphosphatidylglycerol from *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Chem. Phys. Lipids** 158, 104-113 (2009).
- 202 Rezanka, T., Nedbalova, L., Elster, J., Cajthaml, T., Sigler, T., Very-long-chain iso and anteiso branched fatty acids in N-acylphosphatidylethanolamines from a natural cyanobacterial mat of *Calothrix* sp. **Phytochemistry** 70, 655–663 (2009).
- 203 Rezanka T., Siristova L., Sigler K., Antiviral Sesqui-, Di- and Sesterterpenes. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry** 8, 169-192 (2009).
- 204 Rezanka T., Siristova L., Sigler K., Sterols and Triterpenoids with Antiviral Activity. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry** 8, 193-210 (2009).
- 205 Rezanka T., Sigler K., Odd-numbered very-long-chain fatty acids from the microbial, animal and plant kingdoms. **Progr. Lip. Res.** 48, 206-238 (2009).
- 206 Hanus L.O., Rosenthal D., Rezanka T., Dembitsky V.M., Moussaief A., Fast and easy GC/MS identification of myrrh resins. **Pharm. Chem. J.** 42, 719-720 (2008).
- 207 Rezanka T., Rezanka P., Sigler K., Glycosides of aryl-naphthalene lignans from *Acanthus mollis* having axial chirality. **Phytochemistry** 70, 1049–1054 (2009).
- 208 Cajthaml T., Kresinova Z., Svobodova K., Sigler K., Rezanka T., Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethinyloestradiol **Environmental Pollution** 157, 3325–3335 (2009).
- 209 Rezanka T., Siristova L., Melzoch K., Sigler K., Direct ESI-MS analysis of O-acyl glycosylated cardiolipins from the thermophilic bacterium *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Chem. Phys. Lipids** 161, 115-121 (2009).
- 210 Rezanka T., Rezanka P., Sigler K., Glycosides of benzodioxole-indole alkaloids from *Narcissus* having axial chirality. **Phytochemistry** 71, 301-306 (2010).
- 211 Rezanka T., Schreiberova O., Krulikovska T., Masak J., Sigler K., RP-HPLC/MS-APCI analysis of odd-chain TAGs from *Rhodococcus erythropolis* including some regioisomers. **Chem. Phys. Lipids** 163, 373-380 (2010).
- 212 Janek, T., Lukaszewicz, M., Rezanka, T., Krasowska, A., Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. **Bioresource Technology** 101, 6118-6123 (2010).
- 213 Rezanka, T., Petrankova, M., Cepak, V., Pribyl, P., Sigler, K., Cajthaml, T., *Trachydiscus minutus*, a New Biotechnological Source of Eicosapentaenoic acid. **Folia Microbiol.** 55, 265-269 (2010).

- 214 Rezanka T., Siristova L., Melzoch K., Sigler K., Hopanoids in Bacteria and Cyanobacteria – Their Role in Cellular Biochemistry and Physiology, Analysis and Occurrence. **Mini-Rev. Org. Chem.** 7, 300-313 (2010).
- 215 Schreiberova O., Krulikovska T., Sigler K., Cejkova A., Rezanka T., RP-HPLC/MS-APCI Analysis of Branched Chain TAG Prepared by Precursor-Directed Biosynthesis with *Rhodococcus erythropolis*. **Lipids** 45, 743-756 (2010).
- 216 Rezanka T., Prell A., Spizek J., Sigler K. Pilot-plant cultivation of *Streptomyces griseus* producing homologues of nonactin by precursor-directed biosynthesis and their identification by LC/MS-ESI. **J. Antibiot.** 63, 524-529 (2010).
- 217 Spizek J., Novotna J., Rezanka T., Demain AL. Do we need new antibiotics? The search for new targets and new compounds. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 37, 1241-1248 (2010).
- 218 Rezanka T., Siristova L., Melzoch K., Sigler K., N-Acylated Bacteriohopanehexol-Mannosamides from the Thermophilic Bacterium *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Lipids** 46, 249-261 (2011).
- 219 Lukavsky J., Cepak V., Rezanka T., Petkov G., Furnadzhieva S., Iliev I., Andreeva R., Bankova V., *Trachydiscus minutus* algae, Lukavsky & Pribyl 2005/1 strain producing oils with high amount of higher unsaturated fatty acids. **Czech Patent** CZ302118 (2010).
- 220 Rezanka T., Siristova L., Schreiberova O., Rezanka M., Masak J., Melzoch K., Sigler K., Pivalic acid acts as a starter unit in a fatty acid and antibiotic biosynthetic pathway in *Alicyclobacillus*, *Rhodococcus* and *Streptomyces*. **Environmental Microbiology** 13, 1577–1589 (2011).
- 221 Rezanka T., Siristova L., Matoulkova D., Sigler K., Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography: ESI-MS/MS of Plasmalogen Phospholipids from *Pectinatus* Bacterium. **Lipids** 46, 765-780 (2011).
- 222 Siristova L., Luhovy R., Sigler K., Rezanka T. Biosynthesis of omega-alicyclic fatty acids induced by cyclic precursors and change of membrane fluidity in thermophilic bacteria *Geobacillus stearothermophilus* and *Meiothermus ruber*. **Extremophiles** 15, 423-429 (2011).
- 223 Rezanka T., Schreiberova O., Cejkova A., Sigler K., The genus *Dracunculus* – A source of triacylglycerols containing odd-numbered omega-phenyl fatty acids. **Phytochemistry** 72, 1914-1926 (2011).
- 224 Zapomelova E., Hrouzek P., Rezanka T., Jezberova J., Rehakova K., Hisem D., Komarkova J., Polyphasic characterization of *Dolichospermum* spp. and *Sphaerospermopsis* spp. (Nostocales, Cyanobacteria): morphology, 16s rRNA gene sequences and fatty acid and secondary metabolites profiles. **J. Phycol.** 47, 1152-1163 (2011).
- 225 Rezanka T., Lukavsky J., Nedbalova L., Sigler K., Effect of nitrogen and phosphorus starvation on the polyunsaturated triacylglycerol composition, including positional isomer distribution, in the alga *Trachydiscus minutus*. **Phytochemistry** 72, 2342-2351 (2011).
- 226 Rezanka T., Siristova L., Sigler K., Rhamnolipid-producing thermophilic bacteria of species *Thermus* and *Meiothermus*. **Extremophiles** 15, 697-709 (2011).

- 227 Hudcovic T., Kolinska J., Klepetar J., Stepankova R., Rezanka T., Srutkova D., Schwarzer M., Erban V., Du Z., Hrnčir T., Tlaskalova-Hogenova H., Kozakova H., Protective effect of *Clostridium tyrobutyricum* in acute dextran sodium sulfate-induced colitis: Differential regulation of tumour necrosis factor- α and interleukin-18 in BALB/c and severe combined immunodeficiency mice **Clinical & Experimental Immunology** 167, 356-365 (2012).
- 228 Rezanka T., Lukavsky J., Siristova L., Sigler K. Regioisomer separation and identification of triacylglycerols containing vaccenic and oleic acids, and α - and γ -linolenic acids, in thermophilic cyanobacteria *Mastigocladus laminosus* and *Tolypothrix* sp. **Phytochemistry** 78, 147-155 (2012).
- 229 Rezanka T., Kambourova M., Derekova A., Kolouchova I., Sigler K. LC-ESI-MS/MS identification of polar lipids of two thermophilic *Anoxybacillus* bacteria containing a unique lipid pattern. **Lipids** 47, 729-739 (2012).
- 230 Kolouchova I., Schreiberova O., Masak J., Sigler K., Rezanka T. Structural analysis of mycolic acids from phenol-degrading strain of *Rhodococcus erythropolis* by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Folia Microbiologica** 57, 473-483 (2012).
- 231 Rezanka T., Lukavsky J., Nedbalova L., Kolouchova I., Sigler K., Effect of starvation on the distribution of positional isomers and enantiomers of triacylglycerol in the diatom *Phaeodactylum tricornerutum* **Phytochemistry** 80, 17-27 (2012).
- 232 Rezanka T., Masak J., Cejkova A., Natural Products: Strategic Tools for Modulation of Biofilm Formation. In **Studies in Natural Products Chemistry**, Vol. 38 - Chapter No: 10, pp. 269-303 (2012).
- 233 Rezanka, T., Kresinova, Z., Kolouchova, I., Sigler, K., Lipidomic analysis of bacterial plasmalogens. **Folia Microbiologica** 57, 463-472 (2012). DOI 10.1007/s12223-012-0178-6
- 234 Rezanka T., Kolouchova, I., Cejkova A., Sigler, K., Biosynthesis and metabolic pathways of pivalic acid. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 95, 1371-1376 (2012).