

**BACILLUS TÖRZSEK LIPOPEPTID TERMELÉSÉNEK ELEMZÉSE HPLC-MS
MÓDSZEREKKEL**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

BARTAL ATTILA

TÉMAVEZETŐ:

DR. SZEKERES ANDRÁS, EGYETEMI DOCENS

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

2023

SZEGED

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke.....	4
2.	Bevezetés.....	6
3.	Irodalmi háttér.....	7
3.1.	A felületaktív anyagok napjainkban	7
3.1.1.	<i>A surfactinok mint biológiai eredetű felületaktív anyagok</i>	<i>7</i>
3.2.	A surfactinok általános jellemzése	9
3.2.1.	<i>A surfactinok szerkezete és tulajdonságai.....</i>	<i>9</i>
3.2.2.	<i>A surfactinok potenciális alkalmazási területei</i>	<i>12</i>
3.3.	A tenyésztés körülmények hatása a mikroorganizmusok surfactin termelésére.....	15
3.4.	Surfactinok mérésének tömegspektrometriás háttere.....	16
3.4.1.	<i>Peptidek általános fragmentációs nevezéktana</i>	<i>16</i>
3.4.2.	<i>Surfactinok fragmentációs mechanizmusai.....</i>	<i>17</i>
3.4.3.	<i>A kutatócsoport témában elért korábbi eredményeinek rövid összefoglalása</i>	<i>19</i>
3.4.4.	<i>Alkalmazott tömegspektrometriás technikák.....</i>	<i>19</i>
4.	Célkitűzések	21
5.	Anyagok és módszerek	22
5.1.	A vizsgált izolátumok.....	22
5.2.	Tenyésztési körülmények és mintaelőkészítés	23
5.3.	Alkalmazott módszerek	25
5.3.1.	<i>HPLC-MS módszerek.....</i>	<i>25</i>
5.3.2.	<i>Flash kromatográfias módszer.....</i>	<i>28</i>
5.3.3.	<i>Preparatív és félpreparatív HPLC módszerek</i>	<i>28</i>
5.4.	Nevezéktan.....	30
6.	Eredmények és megvitatásuk	31
6.1.	Különböző szénforrások és fémionok hatása a <i>B. subtilis</i> SZMC 6179J törzs surfactin termelésére	31

6.1.1.	<i>Különböző szénforrások surfactin termelésre gyakorolt hatásának vizsgálata.....</i>	31
6.1.2.	<i>Különböző fémionok surfactin termelésre gyakorolt hatásának vizsgálata</i>	37
6.2.	A <i>B. subtilis</i> 6178J törzs lipopeptid profiljának vizsgálata különböző tenyésztési körülmények között	44
6.2.1.	<i>Lipopeptidek kvantitatív analízise.....</i>	44
6.2.2.	<i>Surfactinok kvalitatív analízise</i>	47
6.2.3.	<i>A szénforrásokkal történő tápoldatmódosítás surfactin termelési profilra gyakorolt hatásainak összehasonlítása a <i>B. subtilis</i> 6179J és 6178J törzsek esetében.....</i>	54
6.3.	Különböző zöldségfélék rizoszférájából izolált <i>Bacillus</i> törzsek lipopeptid termelési profiljának vizsgálata	57
6.3.1.	<i>Az alkalmazott tömegspektrometriás módszer fejlesztése.....</i>	57
6.3.2.	<i>Minták surfactin tartalmának kvantitatív analízise.....</i>	61
6.3.3.	<i>A surfactinok kvalitatív és kvantitatív vizsgálata</i>	63
6.3.4.	<i>Az egyes törzsek surfactin termelési profiljainak összehasonlítása.....</i>	65
6.4.	A <i>B. subtilis</i> 6179J törzs által termelt surfactin vegyületek tisztítása preparatív analitikai módszerekkel.....	69
6.4.1.	<i>A nyers surfactin extraktum analízise</i>	69
6.4.2.	<i>A nyers extraktum flash kromatográfiás tisztítása</i>	70
6.4.3.	<i>A minta preparatív HPLC elválasztása.....</i>	72
6.4.4.	<i>A tisztított minta félpreparatív HPLC elválasztása és a kapott frakciók surfactin tartalmának vizsgálata.....</i>	73
7.	Összefoglalás	77
8.	Summary	80
9.	Irodalomjegyzék	83
10.	Köszönetnyilvánítás.....	90
11.	Mellékletek	91

1. Rövidítések jegyzéke

Ala	alanin
AME	aszparaginsav-metilészter
Asp	aszparaginsav
Da	Dalton
EIC	extracted ion chromatogram, extrahált ion kromatogram
ESI	electrospray ionization, elektropray ionizáció
Glu	glutaminsav
GME	glutaminsav-metilészter
HESI	heated electrospray ionization, fűtött elektropray ionizáció
HPLC	high-performance liquid chromatography, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HRMS	high resolution mass spectrometry, nagyfelbontású tömegspektrometria
Ile	izoleucin
IT	ion trap, ioncsapda
Leu	leucin
LPS	lipopoliszacharid
Lxx	leucin/izoleucin
<i>m/z</i>	tömeg/töltés
MeCN	acetonitril
MeOH	metanol
MS	mass spectrometry, tömegspektrometria
NCE	normalised collision energy, normalizált ütközési energia
OD	optical density, optikai sűrűség
PRM	parallel reaction monitoring, párhuzamos reakciókövetés
QOTrap	quadrupole OrbiTrap, kvadrupól-OrbiTrap
RF	rádiófrekvencia
rpm	rotations per minute, percenkénti fordulatszám
SFV	Semliki Forest virus
SHV-1	suid herpes virus

SIM	selected ion monitoring, kiválasztott ionkövetés
SRM	selected reaction monitoring, kiválasztott reakciókövetés
SZMC	Szeged Microbiology Collection, Szegedi Mikrobiológiai Gyűjtemény
TFA	trifluoroacetic acid, trifluorecetsav
TIC	total ion chromatogram, totálion kromatogram
TPH	total petroleum hydrocarbon, összes alifás szénhidrogén
Val	valin
VSV	vesicular stomatitis virus
YEG	yeast/glucose medium, élesztő/glükóz tápoldat

2. Bevezetés

A surfactinok a gyűrűs lipopeptidek családjába tartozó biológiai eredetű felületaktív anyagok, melyet 1968-ban fedeztek fel a Gram-pozitív *Bacillus subtilis* baktérium tápoldatában. A vegyületsoportot fehér, tűszerű kristályok formájában izolálták és nevét az igen erős felületaktív tulajdonságáról kapta. A surfactin molekulák egy változó szénatomszámú hidrofób β -hidroxil zsírsavláncból és egy hét aminosavból álló peptidgyűrűből állnak, melyeket egy laktonhíd kapcsol össze, így kialakítva jellegzetes szerkezetüket. A zsírsavlánc változatos hossza és a heptapeptid aminosavösszetételének variabilitása számos homológ és variáns kialakulását teszi lehetővé. A surfactin vegyületek széleskörű biológiai aktivitással bírnak, többek között antimikoplazmás, tumorellenes, gyulladáscsökkentő és antivirális hatással rendelkeznek. Jelentős felületaktív tulajdonságuknak köszönhetően az elmúlt évtizedekben számos kutatás célozta meg terápiás és környezeti alkalmazhatóságuk feltérképezését, továbbá potenciális mezőgazdasági felhasználásuk lehetőségét is egyre növekvő érdeklődés övezi. Az egyes *Bacillus* törzsek tenyésztési körülményeinek változtatása bizonyítottan hatással van azok surfactin termelési sajátságára. Ezek az elsősorban a termelt surfactin vegyületek mennyiségének növelését célzó kutatások az alkalmazott szénforrások közül a szacharóznak, a fémionok közül pedig a mangán-, vas-, kálium- és magnéziumionoknak tulajdonítanak kiemelt jelentőséget. A tápoldatok összetétele mellett az egyes *Bacillus* fajok és törzsek típusa is meghatározó szerepet játszik a fermentált surfactinösszetételében. A különböző baktériumok eltérő variánsokat és homológokat termelnek, melyek hatással lehetnek a már említett biológiai aktivitásokra.

Munkánk során megvizsgáltuk ezen tényezők különböző *Bacillus* fajok és törzsek fermentatív lipopeptidtartalmára gyakorolt hatását, azok surfactin termelési profilanalízisein keresztül, majd elvégeztük az egyes surfactin molekulák fermentáléból történő tisztítását. A tápoldatokat cellobióz, keményítő, maltóz, etanol, mannitol, fruktóz, glicerin, szacharóz és xilóz szénforrásokkal, illetve mangán, réz, nikkel, vas és cink fémionokkal módosítottuk. A vizsgált baktériumok a *B. velezensis*, *B. atrophaeus*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus* és a *B. subtilis* törzsei voltak. Vizsgálatainkat több különböző nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával csatolt tömegspektrometriás technikával végeztük. A surfactin vegyületek tisztítását pedig flash- és preparatív kromatográfiás elválasztásokkal valósítottuk meg.

3. Irodalmi háttér

3.1. A felületaktív anyagok napjainkban

A felületaktív anyagok olyan amfipatikus molekulák, amelyek hidrofil és hidrofób (általában szénhidrogén) részekkel egyaránt rendelkeznek, valamint hatásosan választják szét a különböző polaritású folyadékfázisok, például az olaj/víz vagy a levegő/víz határfelületét. Ezek a tulajdonságok teszik a felületaktív anyagokat alkalmassá a felületi és határfelületi feszültség csökkentésére, valamint mikroemulzió kialakítására, ahol a szénhidrogének vízben oldódnak, vagy ahol a víz szénhidrogénekben oldódik. Ezek a tulajdonságok kiváló detergáló, emulgeáló, habosító és diszpergáló hatásokat kölcsönöznek a felületaktív anyagoknak, ezáltal napjainkban az egyik legsokoldalúbb, legkeresettebb technológiai vegyszerekként tartják számon ezt a vegyületcsoportot [1].

A jelenleg használatos felületaktív anyagok szinte mindegyikét kémiai szintetizálják kőolajból, illetve különböző növényi olajokból, azonban ezek előállítása, alkalmazása és a felhasználást követő megsemmisítése súlyosan terheli a környezetet. Ebből kifolyólag, valamint az erőforrások végeességének következtében az utóbbi években folyamatosan nőtt az érdeklődés a mikrobiális eredetű felületaktív anyagok iránt. Ezen biosurfaktánsok változatosságuk, környezetbarát jellegük és előállítási lehetőségük miatt potenciális jelöltek többek között a környezetvédelemben, a nyersolaj visszanyerésében, az egészségügyben és az élelmiszeriparban való alkalmazásokra [1].

3.1.1. A surfactinok mint biológiai eredetű felületaktív anyagok

A javarészt kereskedelmi forgalomban is kapható felületaktív tulajdonságú vegyületeket eredetük alapján a kémiai szintézissel előállított, illetve a természetes eredetű felületaktív anyagok csoportjára oszthatók. Az utóbbi kategória tagjai különböző organizmusokból származnak, ezért biológiai eredetű felületaktív anyagoknak nevezzük őket [1]. Ezen vegyületeknek az ipar egyre nagyobb figyelmet szentel, mivel számos olyan előnnyel rendelkeznek a mesterségesen előállított csoport tagjaihoz képest, mint például a kisebb környezetszennyező hatás, a könnyebb biológiai lebonthatóság és az alacsonyabb toxicitás. Továbbá megújuló nyersanyagokból is előállíthatók, valamint extrém körülmények között specifikus aktivitással rendelkeznek [2, 3, 4].

A mikroorganizmusokból származó biológiai felületaktív anyagok amfifil vegyületek, azaz egy hidrofil „fejrészből” és egy általában szénhidrogén alkotta hidrofób „farokrészből” állnak. Felépítésük és az ebből következő tulajdonságaik révén csökkentik az egyes fázisok (pl.: olaj-víz és levegő-víz határfelületek) közötti felületi feszültséget [2, 5]. A poláris hidrofil „fejrészüket” alapján a felületaktív anyagok négy nagy csoportra oszthatók fel:

- anionos vegyületek, melyek fejcsoportjai lehetnek szulfátok (pl.: nátrium-lauril-szulfát), szulfonátok (pl.: perfluoroktán-szulfonát), foszfátészterek (pl.: nátrium-lauril-éter-szulfát) vagy karboxilátok (pl.: perfluor-nonanoát);
- kationos vegyületek, melyek fejrészeit pH-függő aminok (pl.: oktenidindihidroklorid) vagy kvaterner ammóniumsók (pl.: cetil-trimetilammóniumbromid) alkotják;
- nemionos vegyületek, amiknek karboxilsavak (pl.: Triton X-100), szénhidrogén észterek (pl.: decil-glükozid) vagy gliceridek (pl.: gliceril-laurát) képezhetik fejcsoportjait;
- ikerionos vegyületek, amik alkil-betainokból (pl.: kokamidopropil-betain), illetve alkil-dimetilaminokból (pl.: CHAPS) álló fejrészekkel rendelkeznek.

Kémiai szerkezetük és mikrobiális eredetük alapján is több csoportra oszthatók a biológiai felületaktív anyagok [4]:

- glükolipidek, pl.: rhamnolipidek, szoforolipidek, cellobiolipidek és trehalolipidek;
- foszfolipidek (vagy zsírsavak), pl.: lipid-foszfát;
- lipopeptidek (lipoproteinek), pl.: surfactin, szubtilizin, polimixinek;
- polimeres felületaktív anyagok, pl.: lipozan;
- szemcsés felületaktív anyagok, pl.: vezikulumok és fimbriumok, vagy akár egész sejtek.

3.2. A surfactinok általános jellemzése

3.2.1. A surfactinok szerkezete és tulajdonságai

A surfactin a gyűrűs lipopeptidek csoportjának egyik legjelentősebb tagja, felületaktív hatása a nátrium-lauril-szulfátét is meghaladja [6]. Főleg a Gram-pozitív *Bacillus* nemzetség tagjainak, többek között az endospórák *B. subtilis* fajba tartozó törzsek másodlagos metabolitja [2]. Ezek a pálcika alakú baktériumok főként a talajban, illetve más környezeti mintákban találhatóak meg és aktív fejlődési és szaporodási hőmérséklettartományuk 25-37 °C. A *B. subtilis* faj tagjain kívül a *B. pumilus*, *B. mojavensis*, *B. licheniformis* és a *B. amyloliquefaciens* fajok képviselői is képesek surfactin szintézisére [4].

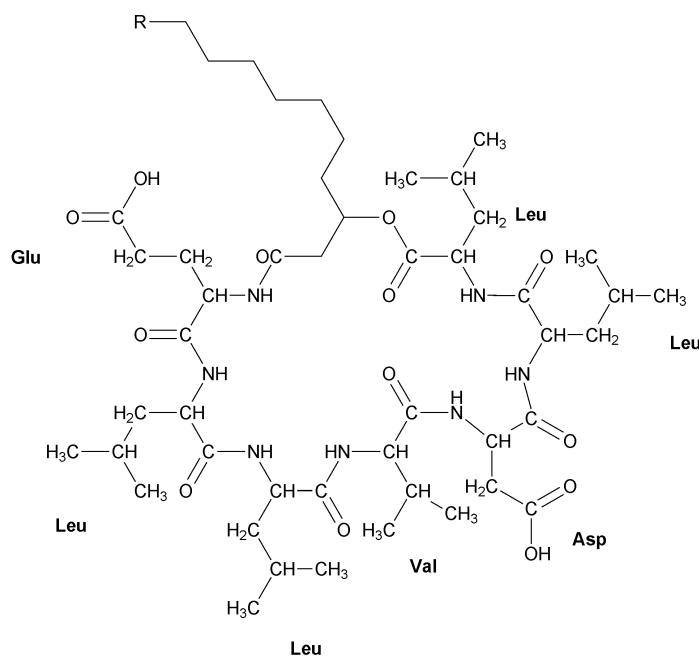
A surfactinok savas jellegű vegyületek, lúgos vízben és szerves oldószerekben, mint például metanolban, etanolban, acetonban, etil-acetátban, metilén-kloridban, ecetsavban és kloroformban jól oldódnak, viszont ezzel szemben hexánban és vízben oldhatatlanok [6].

Megfigyelték, hogy az irodalomban található legtöbb biológiai felületaktív anyaggal szemben a surfactin sokkal hatékonyabb, mivel 20 µM koncentrációban alkalmazva a víz felületi feszültségét 72 mN/m-ről 27 mN/m-re csökkenti [4].

A surfactint tulajdonságainak köszönhetően széles körben alkalmazzák környezetvédelmi (bioremediáció) és terápiás (antibakteriális kezelés) célokra, azonban a vegyület magas előállítási és visszanyerési költségei korlátozzák az alkalmazásának lehetőségeit. Mindezekből adódóan új fermentációs stratégiák bevezetése szükséges a termelés hatékonyságának növelése és árának csökkentése érdekében [4]. Továbbá az egyes mikroorganizmusok által termelt surfactin molekulák szerkezetvizsgálata, illetve új változatok izolálása és azonosítása, tulajdonságaiktól függően, hatékonyabb alkalmazást tehet lehetővé.

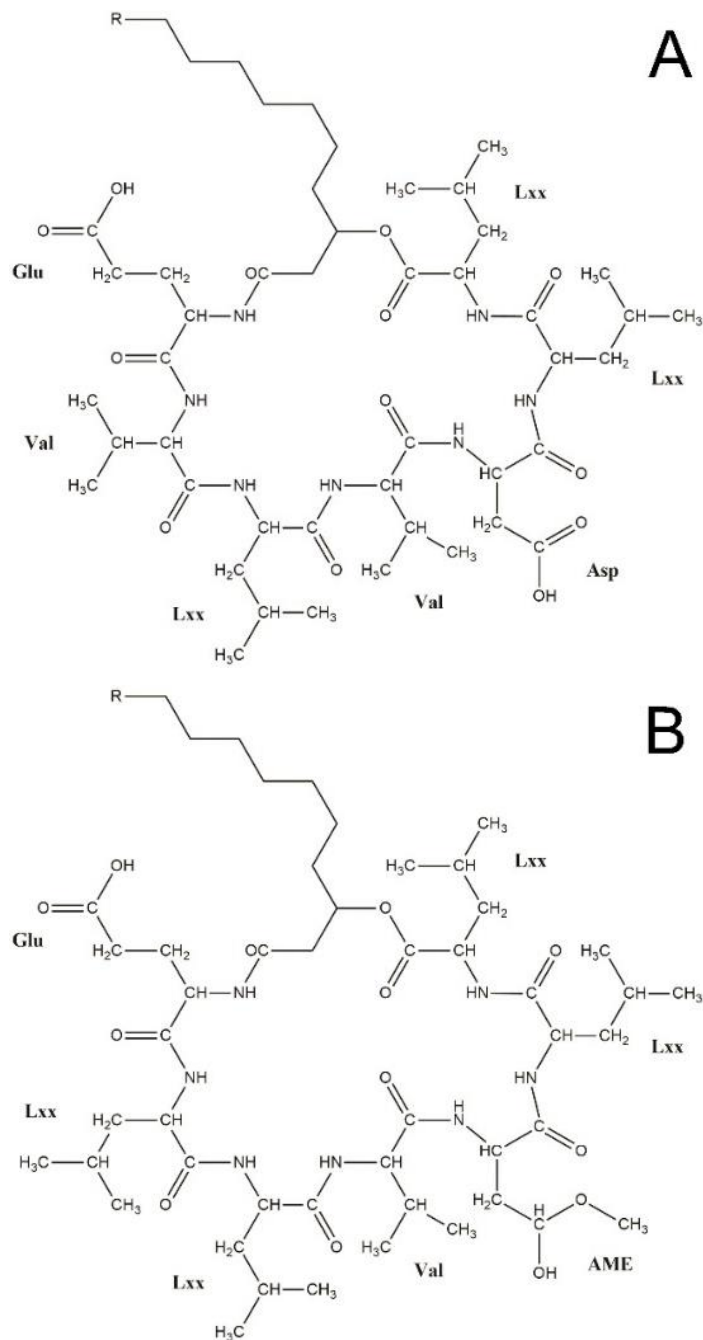
A surfactin vegyületcsalád tagjai, gyűrűs lipopeptidek különböző változatai, amelyek egy β-hidroxi zsírsavláncból, valamint egy heptapeptidből állnak (**1. ábra**). A gyűrűs szerkezetet a zsírsav β-hidroxi és a peptid terminális karboxil funkciós csoportjait összekötő lakton híd hozza létre. A zsírsavlánc változatos hosszúsága a különböző homológok széles skáláját eredményezi, emellett a peptidszekvencia aminosav-összetételének nagyfokú változatossága a fellelhető variánsok számát növeli [7]. Ezen két

tényező eredményeképpen a surfactin vegyületszalád igen nagyszámú természetes molekulája található meg a különböző *Bacillus* törzsek fermentációs termékeiben. Az elsőként azonosított és leírt surfactin molekula heptapeptid részének felépítése D-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu (**1. ábra**).



1. ábra Az elsőként felfedezett surfactin szerkezete [8].

Az aminosav-szekvenciájuk alapján Bonmatin és munkatársai 10 különböző természetes surfactin variánst soroltak fel a 2003-ban közzétett összefoglaló publikációjukban [9], melyek közös jellemzője a leucin, valin és alanin aminosavak felcserélődése (például Leu helyett Val, Val helyett Ala stb., lásd **1. táblázat**), továbbá az izoleucin és az izovalin megjelenése azok izomerjei helyett (például Leu helyett Ile, lásd **1. táblázat**). Ugyanakkor az utóbbi évek kutatásai további újabb surfactin vegyületszoportok létezését tárták fel. Az egyik ilyen variánsban az egyszeres leucin – valin csere a hetedik helyett a második aminosav pozícióban található, melyek az úgynevezett [Val2] surfactinok (**2.A ábra**) [8]. Egy, a korábban alkalmazott rendszerekhez képest jóval apolárisabb nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) elúciós módszer alkalmazása során pedig egy újabb variáncsoportot azonosítottak, melyben az ötödik aminosav pozícióban lévő aszparaginsav helyett aszparaginsav-metilészter (AME) jelenik meg, esetenként több korábban leírt módosulás mellett is. Ez a felismerés vezetett az [AME5], [AME5, Val7] és [Lxx, AME5] surfactinok azonosításához, melyek közül az első szerkezete a **2.B ábrán** látható [10, 7, 11, 12].



2. ábra A Bóka és munkatársai által azonosított [Val2] (A) surfactin variáns [8] és a Kecskeméti és munkatársai által leírt [AME5] (B) molekula [12]. R = CH₃ – C₈H₁₇.

Kutatócsoportunk további, elmúlt években tett megfigyelése, hogy a surfactinok molekulatömege a korábban leírtakhoz képest nagyobb, akár 1049 Da is lehet, továbbá a zsírsavlánc elérheti a 18 szénatomos hosszúságot is [8, 12]. Az eddig leírt természetes surfactin vegyületek és a hozzájuk tartozó aminosav szekvenciák listáját az **1. táblázat** tartalmazza.

1. táblázat A természetes surfactin vegyületek és a hozzájuk tartozó aminosav szekvenciák.

Surfactin	Peptidsorrend							Hivatkozás
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	
[Sur] surfactin	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu	[13]
[Val2] surfactin	Glu	Val	Leu	Val	Asp	Leu	Leu	[8]
[Ala4] surfactin	Glu	Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	Leu	[14]
[Leu4] surfactin	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	[15]
[Ile4] surfactin	Glu	Leu	Leu	Ile	Asp	Leu	Leu	[15]
[Ile2,4] surfactin	Glu	Ile	Leu	Ile	Asp	Leu	Leu	[16]
[Val7] surfactin	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Val	[17, 18]
[Ile7] surfactin	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Ile	[17]
[Val2,7] surfactin	Glu	Val	Leu	Val	Asp	Leu	Val	[19]
[Val2, Ile7] surfactin	Glu	Val	Leu	Val	Asp	Leu	Ile	[19]
[Ile2, Val7] surfactin	Glu	Ile	Leu	Val	Asp	Leu	Val	[19]
[Ile2,4,7] surfactin	Glu	Ile	Leu	Ile	Asp	Leu	Ile	[16]
[GME1, AME5] surfactin	GME	Leu	Leu	Val	AME	Leu	Leu	[10]
[GME1, Val7] surfactin	GME	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Val	[10]
[GME1, Ile7] surfactin	GME	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Ile	[10]
[AME5] surfactin	Glu	Leu	Leu	Val	AME	Leu	Leu	[7]
[AME5, Val7] surfactin	Glu	Lxx	Lxx	Val	AME	Lxx	Val	[12]
[Lxx4, AME5] surfactin	Glu	Lxx	Lxx	Lxx	AME	Lxx	Lxx	[12]

3.2.2. A surfactinok potenciális alkalmazási területei

Az elmúlt évtizedekben a surfactin vegyületcsoportnak jelentős figyelmet szenteltek, amely annak köszönhető, hogy számos biológiai aktivitással, mint például antikoagulációs-, tumorellenes-, antivirális-, gyulladáscsökkentő- és immunszuppresszív hatással rendelkeznek [20, 21, 22, 23]. Széles spektrumú aktivitásuk legfőbb oka, hogy a surfactin izomerek gyakran többféle módon is kölcsönhatnak a biológiai rendszerekkel, számos fiziológiai és biokémiai hatást eredményezve. Többek között a fibrin rögzződés potenciális inhibitoraiként is számontartják őket [24]. Képesek például beépülni a foszfolipid membrán kettős rétegébe, ahol amfipatikus jellegüknek köszönhetően a célsejt

permeabilitás változását indukálják. Mindezen tulajdonságok alapján a surfactin izomerek számos globális közegészségügyi probléma kezelésére alkalmasak lehetnek [7].

A surfactint a szakirodalom különböző bioremediációs és klinikai alkalmazások potenciális jelöltjeként tartja számon. A vegyületcsalád erőteljes felületaktív tulajdonságának köszönhetően környezetvédelmi szempontból lehet hasznos, míg a klinikai alkalmazását az antibakteriális és antivirális, valamint tapadás- és gyulladáscsökkentő hatásai teszik lehetővé [4].

Tulajdonságuk és aktivitásuk alapján a surfactinok lehetséges ipari, környezeti és klinikai felhasználási formái öt nagy csoportba rendezhetők:

a) Mikoplazma, baktérium- és vírusellenes hatásokon alapuló alkalmazások:

A *Mycoplasma* baktériumok légúti gyulladást és húgyúti fertőzéseket okoznak, melyek kezelésében az antibiotikumok hatástalanok, mivel képtelenek áthatolni a baktériumok citoplazmamembránján. Vollenbroich és munkatársai kutatása alapján a surfactin hatékonyan alkalmazható mikoplazmózis kezelésére, mivel a vegyület hatására a *Mycoplasma* sejtek teljesen szétesnek [20]. Kracht és munkatársai kimutatták, hogy legnagyobb antivirális aktivitással az egyszeres negatív töltésű surfactinok (C₁₅) rendelkeznek. Ez a hatás annak tulajdonítható, hogy a molekulák képesek csatornákat létrehozni az egyes vírusok (pl. Semliki Forest vírus – SFV, suid herpes vírus – SHV-1, vesicular stomatitis vírus – VSV) nukleokapszidját körülvevő lipid kettősrétegben, melybe bejutva annak teljes szétesését okozzák. Ez a lipid kettősréteg tartalmazza a vírus adszorpciójáért és sejtbe hatolásáért felelős virális lipideket, melyek nélkül a vírus elveszíti fertőzőképességét [25].

b) Gyulladáscsökkentő hatáson alapuló alkalmazások:

A surfactin amfifil szerkezete révén képes kölcsönhatásba lépni a sejtmembránokkal és a kapcsolt enzimekkel és lipopoliszacharidokkal (LPS) [26]. Számos kutatás támasztja alá, hogy a surfactin megakadályozza a bakteriális LPS és a humán sejtek közvetlen kölcsönhatásának következtében fellépő gyulladási effektust [27, 28, 29, 30].

c) Adhézió-gátláson alapuló alkalmazások:

A surfactinok, mint biológiai felületaktív anyagok adhéziógátló tulajdonságokkal rendelkeznek, ezáltal gátolják a biofilmek képződését és a mikroorganizmusok tapadását

a fertőzési helyekhez. Seydlová és munkatársai bizonyították, hogy a surfactin vegyületek gátolják a *Salmonella typhimurium*, *S. enterica*, *Escherichia coli* és a *Proteus mirabilis* biofilm-képzését. A surfactin adhéziógátló hatása potenciális orvostudományi alkalmazást biztosíthat a sebészi eszközök és implantátumok terén [27].

d) Bioremediációs alkalmazások:

A surfactin felületaktív és emulzifikáló hatása miatt környezeti alkalmazásai is ismertek, mint például a bioremediáció és a továbbfejlesztett olajvisszanyerés. A surfactin bizonyítottan felgyorsítja a szénhidrogének biológiai lebontását [31]. A *Bacillus* fajok által termelt fengicinhez és surfactinhoz hasonló lipopeptidek hatásosan segítik a nehézolajak lebontását. Whang és munkatársai a surfactin és a rhamnolipidek által mediált dízelolaj lebontást vizsgálták. Arra az eredményre jutottak, hogy a biológiai lebomlás során a biomassza termelés és a dízelolaj bomlása kétszer hatékonyabb surfactin (40 mg/l) jelenlétében, mint az annak hozzáadása nélkül végzett kísérletekben [32]. Lai és munkatársai felfedezték, hogy a rhamnolipidek és a surfactin képesek eltávolítani az alifás szénhidrogéneket (total petroleum hydrocarbon, TPH) a talajból, továbbá összehasonlították a biológiai eredetű felületaktív anyagok hatékonyságát a mesterséges felületaktív anyagokéval. Eredményeik alapján, a biológiai felületaktív anyagok sokkal magasabb TPH csökkenést okoztak, mint a mesterséges vegyületek [31].

e) Mezőgazdasági alkalmazások:

A surfactin vegyületek segíthetnek a fenntartható mezőgazdasági gyakorlat kialakításában, mivel képesek fokozni a különböző mikroorganizmusok biokontroll potenciáját, eltávolítani a biofilm képző kórokozókat a takarmányokból, valamint elpusztítani az aflatoxin termelő *Aspergillus* gombafajokat a membránpermeabilitás növelésével és a spóracsírázás gátlásával. További kísérletek tanulsága szerint a biológiai eredetű felületaktív anyagok használhatók peszticidek és műtrágyák nedvesítésére, diszpergálására, szuszpendálására és emulgeálására, ugyanakkor képesek növelni a tápanyagok biológiai hozzáférhetőségét a hasznos mikroorganizmusok talajban történő növekedésének elősegítése érdekében. A felsoroltak közül a surfactin egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy képes kölcsönhatásba lépni a biológiai membránok lipid komponenseivel, és kation megkötő képessége révén a lipid kettős réteghez kapcsolódva fejti ki biokontroll aktivitását, emellett detergensként képes oldani azt [33].

3.3. A tenyésztés körülmények hatása a mikroorganizmusok surfactin termelésére

A különböző tenyésztési körülmények a mikroorganizmusok biomassza- és surfactin termelésére gyakorolt hatásával az elmúlt évtizedek során számos kutatás foglalkozott. A vizsgált paraméterek között szerepelt többek között a pH, a hőmérséklet, az oldott oxigén koncentráció és a levegőztetés mértéke [4, 34, 35, 36, 37]. Ezek mellett nagyszámú kísérletet végeztek el azzal a céllal, hogy meghatározzák a lehető legideálisabb tápoldatösszetételt a minél nagyobb surfactin hozam elérése érdekében. Ennek során a vizsgált összetett tápoldatot különböző nitrogénforrásokkal, nyomelemekkel, szénforrásokkal és a surfactin prekursoraival egészítették ki [4, 35, 38, 39]. A *B. subtilis* surfactin bioszintézise szempontjából a Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} és Fe^{2+} nyomelemek kiemelt fontossággal bírnak [39, 40, 41, 42, 43, 44, 45], továbbá a glutaminsav jelenléte szintén képes növelni a termelt lipopeptidek mennyiségét [46]. Számos, *B. subtilis* tenyésztésére használt szénhidrátalapú (glükóz, szacharóz, galaktóz, maltóz, mannitol, oldható keményítő és dextrin) tápoldaton végeztek kísérleteket, amelyek eredményei alapján a magasabb surfactin hozam eléréséhez a szacharóz a legalkalmasabb szénforrás [47, 48, 49].

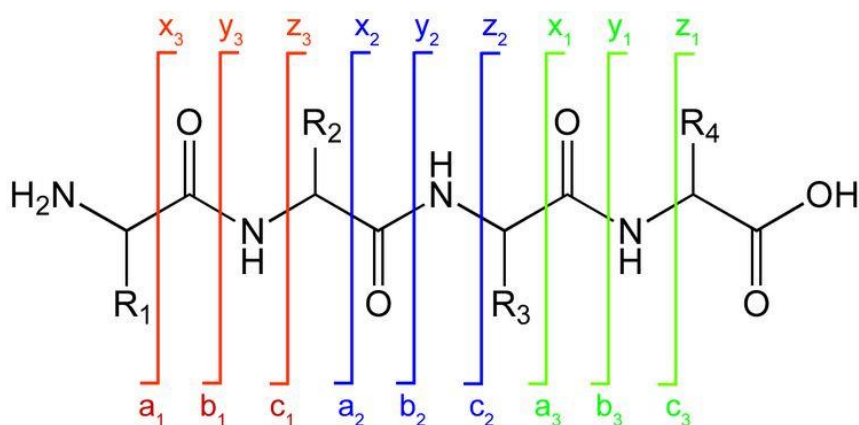
Bár a különböző tenyésztési körülmények a termelt surfactin variánsok teljes mennyiségére gyakorolt hatását a szakirodalom alaposan körbejárta az elmúlt évtizedekben, az egyes vegyületek relatív mennyiségi viszonyairól, illetve újfajta molekulák megjelenéséről kevés információval rendelkezünk. Korábban, az extraktumokban lévő surfactin tartalom a kereskedelmi forgalomban kapható standard vegyületek segítségével került meghatározásra, azonban a tápoldat módosítás hatására a termelési profilokban bekövetkező esetleges változások megfigyelése nem képezte a vizsgálatok részét [39, 49]. Továbbá, bizonyos esetekben csak egy kiválasztott variánson keresztül követték nyomon a tenyésztési körülmények változtatásának hatásait. Erre példa a Liu és munkatársai által végzett kutatás, amelyben a *B. amyloliquefaciens* surfactin termelésének optimalizása csak a C15-[Sur] molekula mennyiségének vizsgálatán keresztül ment végbe [48]. A szakirodalomban csupán Akpa és munkatársai említik meg, hogy a tenyésztési körülmények hatással lehetnek a *B. subtilis* S49 törzs által termelt surfactin homológok százalékos megoszlására. Ez a tanulmány azonban csak a [Sur] és [Val7] variánsokat (a cikkben S1 és S2 néven említve), illetve azok C13-C17 és C13 homológjait vizsgálja [50].

3.4. Surfactinok mérésének tömegspektrometriás háttere

3.4.1. Peptidek általános fragmentációs nevezéktana

A peptidek tömegspektrometriás fragmentációja általában három helyen mehet végbe a láncon belül. A hasadás leggyakrabban a két szomszédos aminosav C-N kötésénél történik meg, ezzel pontosan félbehasítva a peptidkötést. Előfordulhat továbbá, hogy a kötésben a C-terminálisával résztvevő aminosav elveszíti a karbonilcsoportját, ugyanakkor az N-terminálisával kötést kialakító aminosav aminocsoportja is átkerülhet a szomszédos aminosavhoz. A fragmentációt követően keletkezhetnek N-, illetve C-terminális fragmens ionok is, amelyek összesen hatféle fragmens ion keletkezését biztosítják (**3. ábra**) [51, 52].

Hogy a három lehetséges hasadás közül melyik megy végbe, főként a disszociáció módjától függ. Az ütközés indukált disszociáció során a peptid semleges atommal (pl. héliummal) vagy infravörös sugárzás fotonjával ütközik, így keletkezhet a „b-y” ionpár valamelyike, esetleg „a” jelű N-terminális fragmens ion. A disszociációt előidézhetheti elektron befogás vagy transzfer is, amely az „a-x” vagy a „c-z” ionpár egyik tagját hozza létre. Az alsó indexben lévő szám azt mutatja meg, hogy a peptid N-, vagy C-terminálisától számított hányadik pozíciójában lévő aminosavnál történt a fragmentáció. A surfactin fragmens ionjai alacsony energiájú ütközés indukált disszociációval keletkeznek, így a peptidkötés a „b-y” helyen hasad fel.

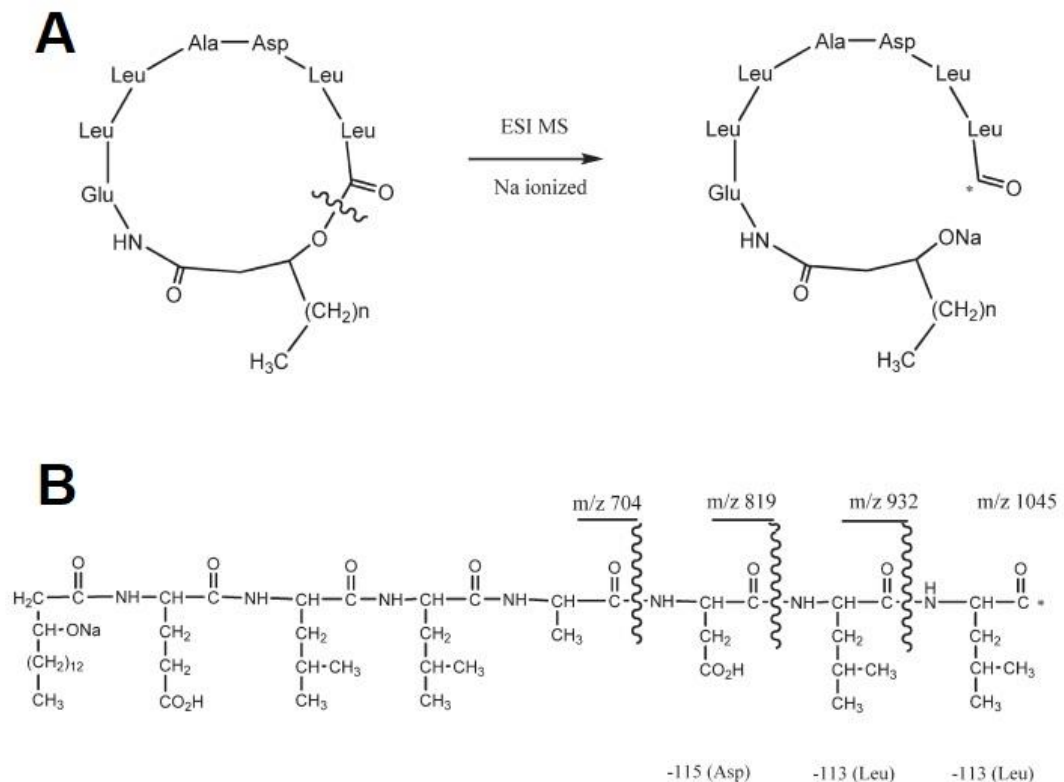


3. ábra Peptidek lehetséges fragmentációs helyei, illetve a keletkező fragmens ionok nevei.

3.4.2. Surfactinok fragmentációs mechanizmusai

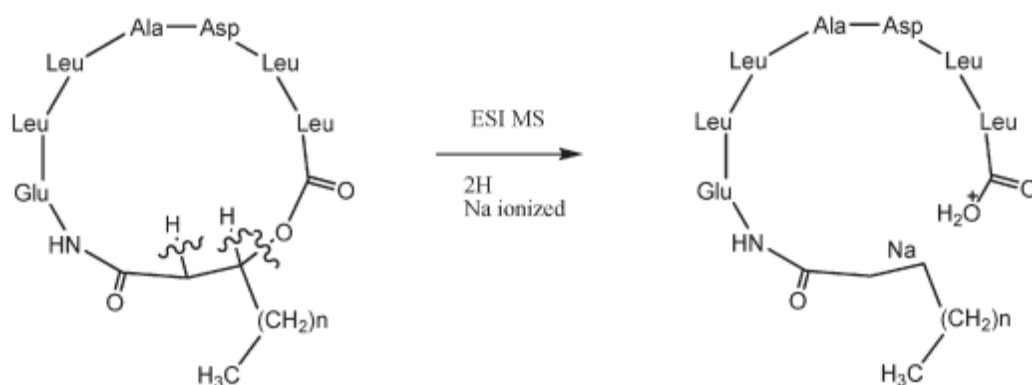
A surfactin molekulák prekursor ionjainak fragmentációjakor három fő fragmensorozat megjelenését tapasztalták, melyek különböző fragmentációs mechanizmusokkal jönnek létre. Ezek név szerint a ciklikus lipopeptidek szimpla hasadásos mechanizmusa [53], a számos kutató által ismert és publikált [53, 54, 55], a közelmúltban Bóka és munkatársai által pontosított belső fragmentációs mechanizmus [8], valamint a láncon belüli McLafferty átrendeződés [56].

Az első esetben a fragmens ionok akkor keletkeznek, amikor a nátrium ion által ionizált oxigénatom és a karbonil szénatom közötti kötés felhasadásának hatására a C-terminális aminosavat a zsírsav hidroxilcsoportjával összekötő laktonhíd felnyílik (**4.A ábra**). Ezt a C-terminális aminosavak egymást követő eliminációja követi, mely egy sorozat N-terminális fragmentumot hoz létre, melyek jelölése b_6 , b_5 , b_5^0 (az ötödik pozícióban levő aminosav oldalláncáról történő vízvesztést jelzi) és b_4 . A peptidlánc hosszának csökkenésével a leányionok intenzitása szintén csökken. Ezen ionok közötti tömegkülönbség alapján általában legalább az utolsó három aminosav meghatározható (**4.B ábra**) [53].



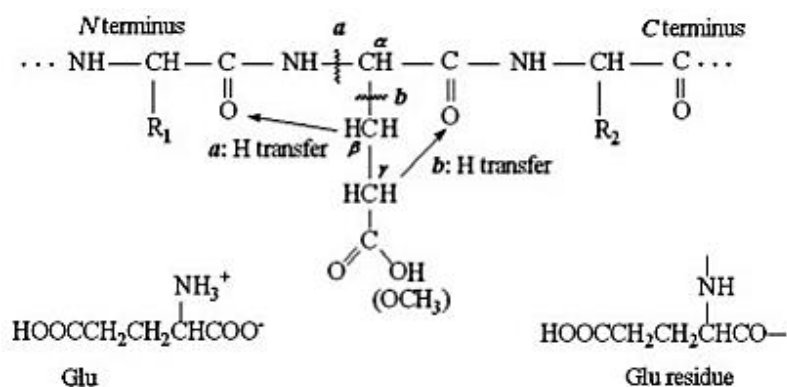
4. ábra A szimpla hasadásos mechanizmus gyűrűfelnyílása (**A**), és a C-terminális aminosavak egymást követő eliminációja (**B**) [53].

A második fragmens-sorozat tagjai a dupla hidrogéntranszfer mechanizmus szerint keletkeznek, és észteroldali gyűrűfelnyílásra utalnak (5. ábra) [57]. Ezek a leányionok nem tartalmazzák a zsírsavláncot és az első pozícióban lévő aminosavat, csak a peptidlánc aminosavjaiból állnak. A fragmens csoport legintenzívebb tagját y_6+H_2O formában jelöltük, amely az alifás zsírsavlánc és az első, Glu aminosav leszakadását jelzi, valamint egy további H_2O jelenlétét. A fragmens sorozat további tagjai ebből az ionból származnak, és a fent tárgyalt szimpla hasadással megegyezően a C-terminális aminosavak leszakadásával keletkeznek, emiatt jelölésük a következő formában történik: $y_6b_6+H_2O$, $y_6b_5+H_2O$ és $y_6b_4+H_2O$ [8]. A prekursor ion és a sorozat első tagja közötti tömegkülönbségből, az első aminosav pozícióban lévő glutaminsav ismeretének függvényében a zsírsavlánc hossza, a további fragmens ionok keletkezésével járó tömegvesztésekből pedig a peptidlánc C-terminálisán lévő aminosavak meghatározhatók.



5. ábra A belső fragmentációs mechanizmus észteroldali gyűrűfelnyílása [53].

A fragmens ionok harmadik sorozata a peptidláncon belüli McLafferty átrendeződés eredményeként jön létre. Eszerint az N-terminális glutaminsav γ -szénatomján levő hidrogén annak karbonil oxigénjére kerül át, emiatt az aminosavban felhasad az α C- β C kötés (6. ábra) [56]. Ennek következtében a tömegspektrumon 72 Da tömegkülönbség figyelhető meg a keletkező fragmens ionok között.



6. ábra A McLafferty átrendeződés szemléltetése. A hasadás helye és a γ -hidrogéntranszfer iránya a peptidek közötti (**a**), illetve a peptiden belüli (**b**) McLafferty átrendeződés szerint [56].

3.4.3. A kutatócsoport témában elért korábbi eredményeinek rövid összefoglalása

Bóka és munkatársai az alacsonyabb tömegű (1016, 1030, 1044 és 1058 m/z értékű) surfactinok különböző izomerjeit térképezték fel egy általuk felismert és pontosított fragmentációs mechanizmus segítségével [54, 56]. Az általuk alkalmazott módszerrel nagyobb tömegű (1072, 1086, 1100 és 1114 m/z értékű) nátrium addukt ionok egy része is detektálható volt, viszont csak alacsony intenzitással. Továbbá a különböző komponensek elválasztása nem volt teljes és a nagyobb tömegű komponensek nem is eluálódtak az állófázisról. Kecskeméti és munkatársai később egy továbbfejlesztett kromatográfiás módszerrel sikeresen növelték a különböző surfactin molekulák elválasztásának hatékonyságát. Az általuk alkalmazott kromatográfiás és tömegspektrometriás módszerek a már leírt surfactin variánsokat nagy számban képesek meghatározni, és lehetővé tették új vegyületek azonosítását is [14, 15, 16, 17, 19]. Mindezek alapján jól alkalmazhatóak a külső hatások okozta surfactin profilok megváltozásának követésére.

3.4.4. Alkalmazott tömegspektrometriás technikák

Munkánk során három tömegspektrometriás készüléket alkalmaztunk: ioncsapda analízátoros, „OrbiTrap” elektrosztatikus ioncsapda tömeganalízátoros, valamint hármas kvadrupól tömegspektrométert.

Az ioncsapda tömeganalízátor három hengeresen szimmetrikus, hiperbolikus felületű elektródból áll (egy gyűrűből és két lezáró „sapkából”), melyekre egyen- és váltófeszültséget kapcsolva a csapda belsejében egy alternáló, háromdimenziós

kvadrupólus tér alakul ki, mely hatására az ionforrás által ionizált molekulák tömegüktől függően eltérő periodikus pályákra állnak, „csapdázódnak” az analizátorban [58].

Az OrbiTrap egy olyan elektrosztatikus ioncsapda, amely a tömegspektrumokat Fourier-transzformáció alkalmazásával szolgáltatja. Külső része egy félbe vágott hordó alakú elektród, központi elektródja pedig orsó alakú. Az ionok tangenciálisan, néhány kilovolt kinetikus energiával injektálódnak, majd a csapdában fellépő elektrosztatikus mező hatására a központi elektród körül bonyolult spirálban oszcillálni kezdenek [59]. Az általunk alkalmazott készülék egy hibrid kvadrupóllal kapcsolt OrbiTrap készülék volt.

A hármas kvadrupól tömegspektrométerben három egymás után kapcsolt kvadrupól található, melyek közül az első és a harmadik tömegszűrőként működik, a második, ionfókuszáló tulajdonságokkal rendelkező középső kvadrupólt pedig ütközési cellaként alkalmazzák, itt történik a kiválasztott tömeg és töltés hányadossal (m/z) rendelkező prekursor ionok fragmentációja [60].

4. Célkitűzések

A *Bacillus* nemzetség által termelt surfactin vegyületcsaládnak számos biológiai aktivitást tulajdonítanak, köztük antifungális, antivirális, tumorelles, valamint gyulladáscsökkentő hatásokat. Emellett ezek a vegyületek erőteljes felületaktív tulajdonsággal bírnak, hatékonyabban csökkentik a víz felületi feszültségét, mint a legtöbb biológiai felületaktív anyag. Mindezekből adódóan az utóbbi évtizedekben számos kutatást végeztek a vegyületcsoport minél részletesebb megismerése érdekében. A molekulákat felépítő heptapeptid gyűrű variabilitása, valamint a β -hidroxil zsírsavlánc változatos hossza számos természetes eredetű surfactin variánst és homológot eredményez, melyek potenciálisan eltérő biológiai és fizikai-kémiai tulajdonságok lehetőségét hordozzák magukban. Ezidáig számos különböző surfactin molekulát azonosítottak sikeresen, azonban ezeknek a vegyületeknek az egyes *Bacillus* törzsekben levő relatív mennyiségi előfordulásáról, a tápoldat módosításának surfactin termelési profiljára gyakorolt hatásáról, valamint az egyes variánsok és homológok gyors és hatékony azonosításáról, illetve preparatív elválasztásáról kevés információval rendelkezünk. Mindezek figyelembevételével kutatásunk céljaul az alábbiakat tűztük ki:

1. A különböző szénforrásokkal és fémionokkal módosított tápoldatok hatásának meghatározása két *Bacillus subtilis* törzs surfactin termelési sajátságait az egyes variánsok szintjén.
2. A surfactin molekulák pontos azonosítása és részletes szerkezeti feltérképezése fragmentációs mechanizmusaikon keresztül nagyfelbontású kvadrupól-„OrbiTrap” elektrosztatikus ioncsapda tömeganalizátorhoz kapcsolt nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC-QOTrap) mérések segítségével különböző *Bacillus* törzsek fermentlevében.
3. A megszerzett tömegspektrometriás adatok segítségével az MS „ujjlenyomatok” azonosítása és implementálása egy gyors, hatékony és egyszerű kombinált kvalitatív-kvantitatív HPLC-MS/MS technika fejlesztésébe lehetővé téve egy gyorsabban értékelhető screening mérés kifejlesztését.
4. Különböző forrásból izolált *Bacillus* törzsek surfactin termelésének profilanalízise a screening módszerrel.
5. Egy kiválasztott *Bacillus* törzs által termelt surfactin vegyületek preparatív analitikai módszerekkel történő tisztítása és egymástól történő elválasztása.

5. Anyagok és módszerek

5.1. A vizsgált izolátumok

A vizsgált *Bacillus* törzsek taxonómiai besorolását, törzsszámát és az izolálások helyét a **2. táblázat** tartalmazza.

2. táblázat A vizsgált *Bacillus* törzsek listája.

Faj	Törzs ¹	GenBank azonosító (gyrA)	Izolációs hely
<i>B. atrophaeus</i>	SZMC 24978	-	paradicsom rizoszféra
<i>B. megaterium</i>	SZMC 24979	-	paradicsom rizoszféra
<i>B. megaterium</i>	SZMC 24988	-	paradicsom rizoszféra
<i>B. megaterium</i>	SZMC 24990	-	paradicsom rizoszféra
<i>B. megaterium</i>	SZMC 24993	-	paprika rizoszféra
<i>B. megaterium</i>	SZMC 24997	-	répa rizoszféra
<i>B. megaterium</i>	SZMC 24998	-	répa rizoszféra
<i>B. megaterium</i>	SZMC 25000	-	paprika rizoszféra
<i>B. megaterium</i>	SZMC 25001	-	paprika rizoszféra
<i>B. megaterium</i>	SZMC 25002	-	répa rizoszféra
<i>B. megaterium</i>	SZMC 25004	-	édesburgonya rizoszféra
<i>B. velezensis</i>	SZMC 24980	OK256097	paprika rizoszféra
<i>B. velezensis</i>	SZMC 24981	OK256098	paprika rizoszféra
<i>B. velezensis</i>	SZMC 24982	OK256099	paprika rizoszféra
<i>B. velezensis</i>	SZMC 24983	OK256100	paprika rizoszféra
<i>B. velezensis</i>	SZMC 24984	OK256101	paprika rizoszféra
<i>B. velezensis</i>	SZMC 24985	OK256102	paprika rizoszféra
<i>B. velezensis</i>	SZMC 24986	OK256103	paradicsom rizoszféra
<i>B. velezensis</i>	SZMC 24995	OK256104	paradicsom rizoszféra
<i>B. pumilus</i>	SZMC 24987	-	paradicsom rizoszféra
<i>B. pumilus</i>	SZMC 24991	-	paradicsom rizoszféra
<i>B. cereus</i>	SZMC 24994	-	paradicsom rizoszféra
<i>B. cereus</i>	SZMC 25003	-	paprika rizoszféra
<i>B. subtilis</i>	SZMC 24992	-	paprika rizoszféra
<i>B. subtilis</i>	SZMC 24999	-	répa rizoszféra
<i>B. subtilis</i>	SZMC 6178J	-	paradicsom rizoszféra
<i>B. subtilis</i>	SZMC 6179J	JX683908.1	paradicsom rizoszféra

¹SZMC – Szeged Microbiology Collection

5.2. Tenyésztési körülmények és mintaelőkészítés

A különböző, növényi rizoszférából izolált *Bacillus* törzsek a Szeged Microbiology Collection (SZMC) gyűjteményéből kerültek tenyésztésre. A kiválasztott törzseket 100 ml-es Erlenmeyer-lombikokban lévő 30 ml élesztő/glükóz tápoldatba (yeast/glucose medium, YEG) oltottuk le, amely 2 g/l glükózt és 2 g/l élesztőt tartalmazott, majd ezeket a 25 °C-on, 120 rpm-en rázatva, egy napon át, úgynevezett „overnight” növesztettük (IKA® Incubator shaker KS 4000 ic control, IKA, Németország). A felszaporítást követően a tenyészetben a koncentrációt 620 nm-en mért optikai sűrűség segítségével határoztuk meg 96 lyukú mikrotiterlapon spektrofotométerrel (SPECTROstar Nano Microplate Reader, BMG Labtech, Németország).

A kísérletek során a Besson és munkatársai által leírt tápoldatot alkalmaztuk [46], mely 10 g/l glükózt, 5 g/l glutaminsavat, 1 g/l KH_2PO_4 -ot (VWR Chemicals, Magyarország), 1 g/l K_2HPO_4 -ot, 1 g/l KCl-ot (Reanal Laborvegyszer Kft., Magyarország), 500 mg/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ -ot (Acidum-2 Kft., Magyarország), 5 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ -ot és 160 $\mu\text{g/l}$ $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ -ot (Reanal Laborvegyszer Kft., Magyarország) tartalmazott. A surfactin termeléséhez 5×10^7 baktériumsejtet 20 ml tápoldatot tartalmazó 100 ml-es Erlenmeyer-lombikba oltottunk, majd 25 °C-on, 120 rpm-en folyamatosan rázatva 5 napig növesztettük. Ezt követően a baktériumsejteket centrifugálással eltávolítottuk a lipopeptid tartalmú fermentléből (8000 rpm, 15 perc, SORVALL RC 6+, Thermo Scientific, USA), majd sósavval (VWR International Kft., Magyarország) a pH-t 2-re csökkentve a felülúszóban, a fehérjék és peptidok kicsapódtak a fermentléből. A keletkezett csapadékot egy éjszakán át 4 °C-on ülepítettük. A fermentlevet lecentrifugáltuk (8000 rpm, 15 min), a felülúszót leöntöttük, és a megmaradt csapadékot pedig 200 μl metanolban (VWR International Kft., Magyarország) oldottuk fel. Végül az oldhatatlan részeket szintén centrifugálással (8000 rpm, 15 min) távolítottuk el.

A *B. subtilis* SZMC 6179J és SZMC 6178J törzsek vizsgálata során különböző szénforrásokkal és fémionokkal módosított tápoldatokat alkalmaztunk. Minden esetben a Besson és munkatársai által leírt tápoldatot használtuk. A különböző szénforrások vizsgálatához a glükózt az alábbi szénforrásokra cseréltük: cellobióz (Sigma-aldrich Kft., Magyarország), keményítő (Molar Chemicals Kft., Magyarország), maltóz (Fluka,

Magyarország), mannitol, fruktóz (Reanal Laborvegyszer Kft, Magyarország), szacharóz, glicerin, etanol (VWR Chemicals, Magyarország), és D-xilóz (Spektrum-3D Kft., Magyarország), míg a fémionok esetében az eredeti tápoldatot a leoltást követően a 6179J törzs esetében 1 mM koncentrációjú $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, valamint $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, a 6178J törzs vizsgálatokor pedig 0,5 mM koncentrációjú $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ valamint $\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Reanal Laborvegyszer Kft., Magyarország) nehézfém sókat tartalmazó törzsoldatokból egészítettük ki.

A 6179J törzs fermentlevének preparatív tisztításához a mintaelőkészítés a fentebb leírtakhoz hasonlóan történt, a tápoldat mennyisége azonban itt 4×1 liter volt, 2 literes Erlenmeyer lombikokban leoltva. A savas kicsapás, ülepítés és a fermentlé centrifugálása után pedig a csapadékot 50 ml metanolban oldottuk fel. Az oldhatatlan anyagok eltávolítása után pedig 1g szilikagélt (Molar Chemicals Kft., Magyarország) adtunk az oldathoz, amelyet ezután rotációs vákuumbepárlóban (IKA RV 10 basic, IKA, Németország) szárazra pároltunk.

5.3. Alkalmazott módszerek

5.3.1. HPLC-MS módszerek

A *B. subtilis* SZMC 6179J törzs különböző szénforrásokkal és fémionokkal módosított tápoldatokban végzett tenyésztéseinek fermentleveiből extrahált surfactin vegyületeket elektropray ionizációt alkalmazó ioncsapda analizátoros tömegspektrometriával kapcsolt nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC-ESI-IT-MS) technikával vizsgáltuk, egy Agilent 1090 folyadékkromatográfiás készülékhez (Agilent, USA) kapcsolt Varian 500 tömegspektrométerrel (Varian, USA). Fordított fázisú, gradiens HPLC elúciós programot dolgoztunk ki, két eluenst alkalmazva: 0,05% trifluorecetsavat (TFA, Sigma-Aldrich Kft.) tartalmazó HPLC minőségű vizet (A eluens), valamint MeCN és MeOH 1:1 térfogatarányú elegyét szintén 0,05% TFA-val (B eluens). A gradiens elúciós program a következő volt: 47% B eluens 12 percig, majd fokozatosan emeltük 80 percen át 95%-ra, és ezt tartottuk 16 percen keresztül. Ezután a szerves eluens arányát 2 perc alatt csökkentettük 47%-ra, amit egy 10 perces ekvilibrációs szakasz követett, így a futásidő összesen 120 perc volt. Az áramlási sebesség 0,25 ml/min volt, az oszloptermosztát hőmérséklete pedig 35 °C. Az injektálási térfogat 3 µl volt. Az alkalmazott kromatográfiás oszlop paraméterei: Phenomenex Prodigy, 5µ, ODS-3, 100 × 4,6 mm (Gen-Lab Kft., Magyarország).

Az MS és MS² vizsgálatokat ESI ionforrással, pozitív módban végeztük. Az alkalmazott ESI paraméterek a következők voltak: porlasztó hőmérséklete: 50 °C; szárítógáz (N₂) nyomása: 50 psi; túfeszültség: 5000 V / -5000 V; a porlasztó feszültsége: 600 V. Általános paraméterek: maximum pásztázási idő: 1,51 másodperc/ pásztázás; pásztázási átlag: 2 µscan; adatsebesség: 0,66 Hz; sokszorozó eltolás: 0 V. Ionizációs paraméterek: cél TIC: 100%; maximum ion idő: 250000 µsec. Pásztázási paraméterek: kapilláris feszültség: 231,3 V; RF töltés: 68%; vizsgált tömegtartomány: 100 - 2000 *m/z*. A molekulák nátrium adduktjain végzett MS² vizsgálatok a fent említett általános tömegspektrometriás paraméterekkel történtek, a következő csapdázási alsó határ (*m/z*) / gerjesztési amplitúdó (V) körülmények között: *m/z* 1072 (289,3 / 4,12), *m/z* 1086 (293,3 / 4,17), *m/z* 1100 (297,4 / 4,22), *m/z* 1114 (301,5 / 4,27).

A tenyésztési körülmények SZMC 6178J törzsre gyakorolt hatásának megfigyelése során az extrahált lipopeptid vegyületeket két különböző HPLC-HESI-MS technikával vizsgáltuk. A mennyiségi meghatározások egy Shimadzu Nexera XR HPLC

rendszerhez (Shimadzu Corporation, Japán) kapcsolt Thermo TSQ Quantum Access (Thermo Scientific, USA) hármass kvadrupól tömegspektrométerrel (HPLC-MS/MS), míg a minőségi azonosítások egy Thermo UltiMate 3000 folyadékkromatográfiás készülékhez (Thermo Scientific, USA) kapcsolt Thermo OrbiTrap Q Exactive Plus (Thermo Scientific, USA) ioncsapda (HPLC-QOTrap) analizátoros tömegspektrométerrel történtek. Mindkét folyadékkromatográfiás elválasztás során fordított fázisú, gradiens HPLC elúciós módszert használtunk a következő eluensokkal: 0,1% ecetsavat (VWR Chemicals, Magyarország) tartalmazó HPLC minőségű vizet (A eluens), valamint MeOH és MeCN 1:1 térfogatarányú elegyét, szintén 0,1% ecetsavval (B eluens). A gradiens program mindkét tömegspektrometriás vizsgálat esetében a következő volt: 2 percig 5% B eluens, melyet a következő 2 perc alatt 80%-ra emeltünk. A 4 – 24. perc között a szerves eluens mennyiségét fokozatosan emeltük 95%-ra, és ezt 9 percen keresztül tartottuk. Ezután a B eluens arányát 2 perc alatt 5%-ra csökkentettük, amelyet egy 5 perces ekvilibrációs szakasz követett, így a futásidő összesen 40 perc volt. Az áramlási sebesség 0,2 ml/min, az oszloptermosztát hőmérséklete pedig 30°C volt. Az alkalmazott kromatográfiás oszlop paraméterei: Phenomenex Gemini NX, 3 μ , C18, 150 \times 2 mm (Gen-Lab Kft., Magyarország). Az injektálási térfogat a kvantitatív mérések során 10 μ l, míg a kvalitatív vizsgálatoknál 5 μ l volt.

A mennyiségi MS vizsgálatokat HESI ionforrással, szelektív ionkövetés (Selected Ion Monitoring, SIM) módban, pozitív polaritással végeztük. Az alkalmazott HESI paraméterek a következők voltak: porlasztó hőmérséklete: 200°C; kapilláris hőmérséklet: 220°C; spray feszültség: +4000V; burkológáz nyomás: 10 psi; kiegészítő gáz nyomás: 25 psi. Általános paraméterek: maximális pásztázási idő: 0,1 másodperc/pásztázás. A mérési idő első 15 percében az iturinok (1015 m/z , 1029 m/z , 1043 m/z , 1057 m/z , 1071 m/z) és a fengycinek hidrogén adduktjainak tömegeit (1449 m/z , 1463 m/z , 1477 m/z , 1491 m/z , 1505 m/z , 1519 m/z), a 15-40 perc között pedig a surfactinok nátrium adduktjainak tömegeit (1016 m/z , 1030 m/z , 1044 m/z , 1058 m/z , 1072 m/z , 1086 m/z , 1100 m/z , 1114 m/z) vizsgáltuk.

A minőségi MS/MS azonosítások szintén HESI ionforrással, pozitív polaritással és párhuzamos reakciókövetés (parallel reaction monitoring, PRM) módban történtek. Az alkalmazott HESI paraméterek a következők voltak: spray feszültség: +3000 V; kapilláris hőmérséklet: 280°C; burkológáz nyomás: 20 (készülék által alkalmazott egység); aux gas nyomás (készülék által alkalmazott egység): 15; spare gas nyomás: 3 (készülék által

alkalmazott egység) és ionforrás hőmérséklet: 175°C. A surfactin molekulák hidrogén adduktján végzett vizsgálatoknál a 7-35. perc között a következő tömegeket vizsgáltuk: 994 m/z , 1008 m/z , 1022 m/z , 1036 m/z , 1050 m/z , 1064 m/z , 1078 m/z . A fragmentáció NCE = 20, szintén készülék által alkalmazott egységben megadott ütközési energiával ment végbe.

Mind a már említett két, mind pedig a további, szintén növényi rizoszférából izolált *Bacillus* törzs lipopeptid profilozására egy általunk a későbbiekben fejlesztett, szimultán kvantitatív és kvalitatív információval is szolgáló módszert alkalmaztunk a fent említett Thermo TSQ Quantum Access hármas kvadrupól tömegspektrométert használva. Ezen vizsgálatokat HESI ionforrással, pozitív polaritással végeztük. Az alkalmazott HESI paraméterek a következők voltak: porlasztó hőmérséklete: 285 °C; kapilláris hőmérséklet: 350 °C; spray feszültség: +4000 V; burkológáz nyomás: 10 psi; kiegészítő gáz nyomás: 15 psi. Mindkét vizsgálat egy mérési futáson belül történt két, egymást folyamatosan váltakozva követő pásztázási esemény (scan event) alkalmazásával. Az egyik, kvantitatív információval szolgáló esemény során a surfactinok nátrium addukt ionjainak tömegeit vizsgáltuk (1016,7 m/z , 1030,7 m/z , 1044,7 m/z , 1058,7 m/z , 1072,7 m/z , 1086,7 m/z , 1100,7 m/z , 1114,7 m/z) szelektív ionkövetés (Selected Ion Monitoring, SIM) módban, pozitív polaritással. A pásztázási esemény időtartama 0,01 másodperc volt. A másik esemény az egyes surfactin molekulákra vonatkozó kvalitatív információt szolgáltatta. Ez úgynevezett kiválasztott reakciókövetés (Selected Reaction Monitoring, SRM) módban ment végbe, mely során a fragmentált „szülőionok” (parent ion) a fent említett főtömegű surfactin ionok, a vizsgált „termékionok” (product ion) pedig az $y_6 + H_2O$ (679,7 m/z , 693,7 m/z , 707,7 m/z , 721,7 m/z , 735,7 m/z) és $y_6b_6 + H_2O$ (580,7 m/z , 594,7 m/z , 608,7 m/z , 622,7 m/z) belső fragmens ionok voltak. A pásztázási esemény időtartama 0,1 másodperc volt. Az ütközési gáz nyomása 1 mTorr, az ütközési energia pedig 60 V volt.

Mind az ioncsapda analizátoros, mind pedig a hármas kvadrupól tömegspektrométernél alkalmazott módszerekkel a nátrium addukt prekursor és fragmens ionok, míg az OrbiTrap tömegspektrometriás készülékkel végzett vizsgálatok során a surfactinok protonált molekula- és fragmens ionok voltak detektálhatók nagyobb intenzitással. Ugyanakkor mindkét esetben megfigyelhetők voltak a fent említett szimpla hasadásos és belső fragmentációs mechanizmusok párhuzamos megjelenése, viszont a

McLafferty átrendeződést nem detektáltuk egyik tömegspektrometriás technikával való vizsgálat során sem.

5.3.2. *Flash kromatográfias módszer*

A surfactinok tisztítása céljából vizsgált B. subtilis SZMC 6179J törzs fermentlevének nyers extraktumát további tisztítás céljából egy CombiFlash EZ Prep (Teledyne ISCO, USA) flash és preparatív HPLC kromatográfias készüléken végzett előtisztításnak vetettük alá. A szilikagélre párolt mintát egy RediSep 25 g oszlop előtt, míg a tisztításra alkalmazott szilikagélt egy Biotage 50 g oszlop előtt alkalmazott injektálási oszlopba töltöttük. Izokratikus elúciós módszert alkalmaztunk az alábbi oldószerkelet felhasználásával: 70% toluol (A eluens, Molar Chemicals Kft., Magyarország) és 30% metanol (B eluens) két oszloptérfogatnyi (200 ml) előzetes ekvilibrálást követően öt oszloptérfogatnyi mennyiségben (500 ml). Az áramlási sebesség 40 ml/min volt és 20 ml térfogatonként gyűjtöttük a frakciókat 30 ml-es kémcsövekbe, így összesen 25 frakciót kaptunk, a futás időtartama pedig 12,5 perc volt.

5.3.3. *Preparatív és félpreparatív HPLC módszerek*

A flash kromatográfias előtisztítást a megmaradt szennyezők eltávolítása céljából egy preparatív HPLC tisztítás követte, ezzel elősegítve a különböző surfactin variánsok egymástól való elválasztására alkalmazott félpreparatív HPLC módszer hatékonyságát. Mindkét lépést a fent említett CombiFlash EZ Prep készüléken végeztük el fordított fázisban, az alábbi eluenseket alkalmazva: víz (A eluens) és acetonitril/metanol 1:1 térfogatarányú elegye (B eluens, VWR International Kft.). Mindkét oldószer 0,1% ecetsavat tartalmazott. Az elválasztáshoz használt HPLC tisztaságú vizet egy Milli-Q Gradient A10 víztisztító rendszerrel állítottuk elő (Merck Millipore, Németország).

A preparatív elválasztási lépést egy Phenomenex Gemini NX (5 μ , C18, 100 \times 21,2 mm, Gen-Lab Kft., Magyarország) oszloppal valósítottuk meg, a következő gradiens elúciós módszer szerint: 30% B eluens 2 percen át, melyet 2 perc alatt, meredeken emeltünk 75%-ra. Ezt kevésbé meredek, 26 percen át tartó lineáris emelkedés követett 95%-ig, mely eluens arányt további 15 percig tartottuk, majd 2 perc alatt a kiindulási 30%-ra visszacsökkentettük és a nyomás visszaállásáig tartottuk, a 60 perces futásidő végéig. Az áramlási sebesség 10 ml/min, az injektálási térfogat 5 ml volt, és 20 ml térfogatú frakciókat gyűjtöttünk 30 ml-es kémcsövekbe, így összesen 30 frakciót kaptunk.

A félpreparatív elválasztást egy Thermo BioBasic-18 (5 μ , C18, 250 \times 10 mm, Gen-Lab Kft., Magyarország) oszloppal hajtottuk végre, egy 90 perc hosszúságú izokratikus elúciós módszerrel (80% B eluens). Az áramlási sebesség 5 ml/min, az injektálási térfogat 1 ml volt, és 5 ml térfogatú frakciókat gyűjtöttünk 13 ml-es kémcsövekbe, összesen 90 frakciót eredményezve.

5.4. Nevezéktan

Az egyértelműség kedvéért a különböző molekulák elnevezésére a Bonmatin és munkatársai által leírt jelölést alkalmaztuk [9], kisebb módosításokkal (**1. táblázat**). A vizsgálataink során azonosított izomerekben lehetséges, hogy egyes aminosav pozíciókban a leucin (Leu) helyett izoleucin (Ile) található, ugyanis az alkalmazott technikával nem különböztethető meg a két izobár aminosav, ezért minden esetben a Lxx jelölést alkalmaztuk. Az aminosav sorrend tagjait általánosságban említve az AAⁿ elnevezést használtuk, ahol „n” az aminosav pozíciójának a peptidlánc N-terminális végétől számított sorszámát jelöli.

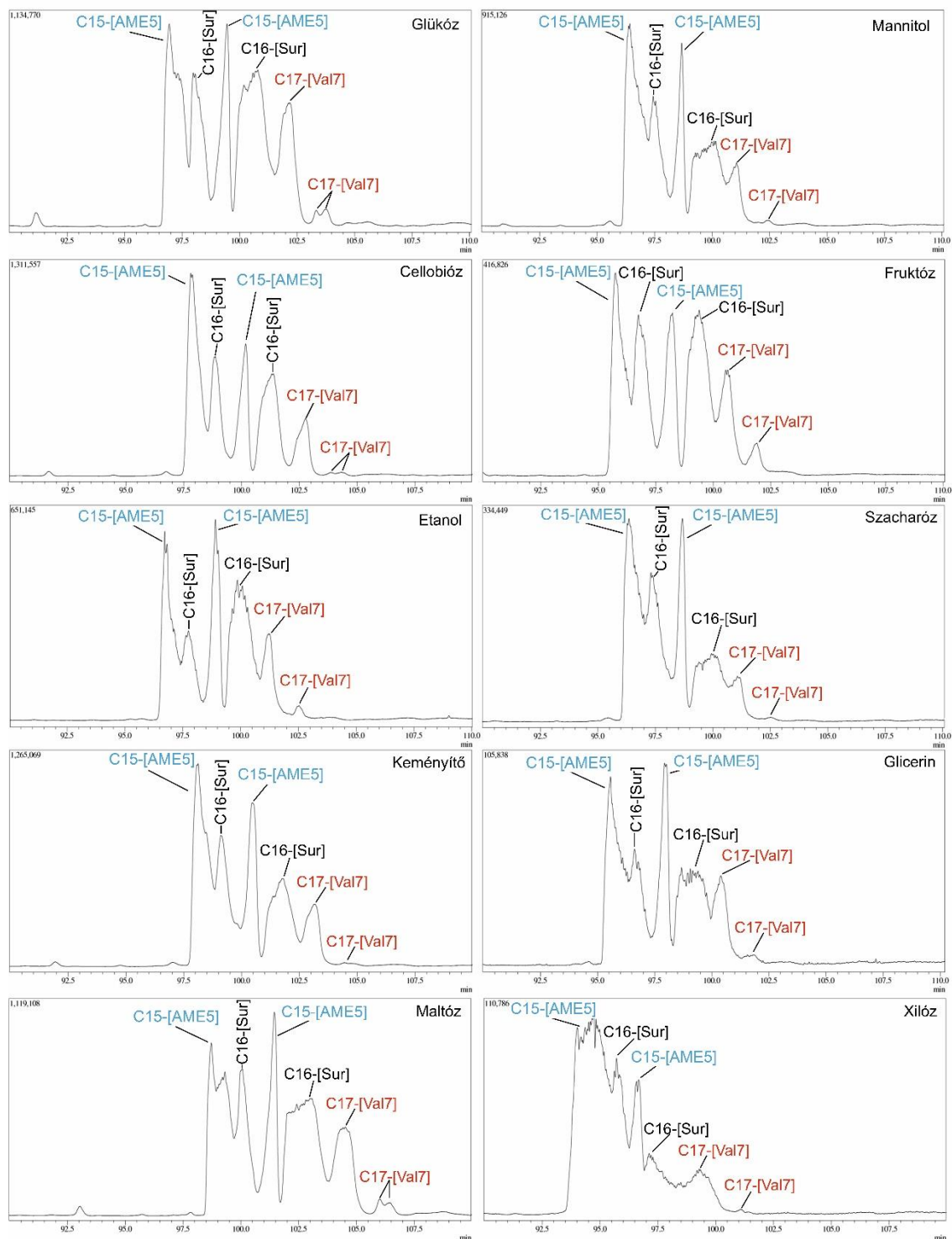
A tömegspektrumokon detektált fragmens ionok nevezéktana a Roepstorff és Fohlman [51], valamint Biemann [52] által leírt terminológiát követi. A nátrium addukt ionok belső fragmensei a Hue és munkatársai által leírt y_nb_m nevezéktan szerint lettek jelölve [57].

6. Eredmények és megvitatásuk

6.1. Különböző szénforrások és fémionok hatása a *B. subtilis* SZMC 6179J törzs surfactin termelésére

6.1.1. Különböző szénforrások surfactin termelésre gyakorolt hatásának vizsgálata

Munkánk során először a különböző szénforrásokkal módosított tápoldatok *B. subtilis* SZMC 6179J törzs surfactin termelésére, valamint a különböző változatok minőségi és relatív mennyiségi összetételére gyakorolt hatását vizsgáltuk meg. Ehhez a Besson és munkatársai [46] által közölt eredeti tenyésztési körülmények között alkalmazott glükóz mellett kilenc különböző szénforrással (cellobióz, keményítő, maltóz, etanol, mannitol, fruktóz, glicerin, szacharóz és xilóz) egészítettük ki az alkalmazott tápoldatot. A többi tenyésztési paraméter és a minták előkészítése minden esetben azonos volt. A kromatográfiás mérések eredményei (**7. ábra**) alapján megállapítható, hogy az eredeti tápoldatban történő tenyésztéshez képest nem jelentek meg új csúcsok a kromatogramokon, így a különböző szénforrások alkalmazása nem eredményezte új surfactin variánsok termelését. Ezzel szemben az egyes csúcsok intenzitása, illetve azok relatív aránya esetenként eltért, ami arra utal, hogy a különböző tápoldatban tenyésztett törzs más-más arányban állította elő az egyes surfactin variánsokat.



7. ábra A glükózt tartalmazó és a módosított szénforrású tápoldatban tenyésztett *B. subtilis* fermentlevék 1072-es m/z értékű extrahált ion kromatogramjai (EIC).

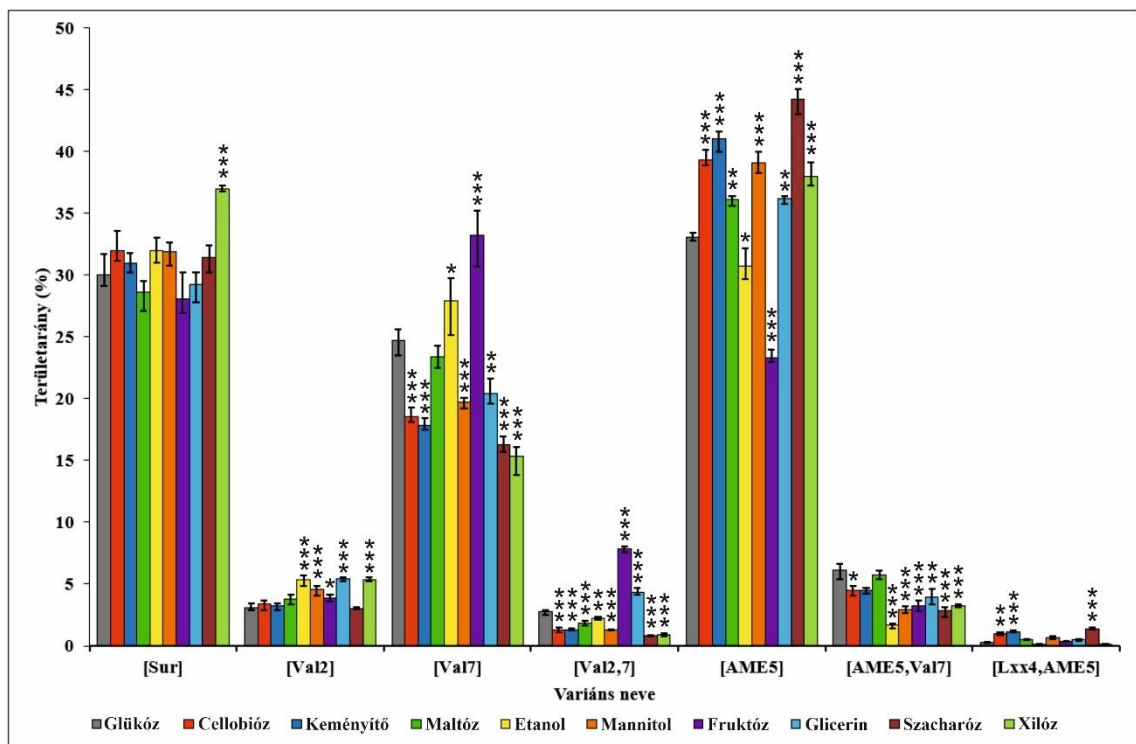
A vizsgálat során a baktérium fermentlevéből azonosított surfactin molekulák relatív mennyiségét (**5. táblázat**) a HPLC-ESI-IT-MS vizsgálatokat követően, a komponensek nátrium adduktjaira beállított extrahált kromatogramok csúcsainak egymáshoz viszonyított területarányai alapján határoztuk meg.

5. táblázat *A. B. subtilis* 6179J törzs által termelt és azonosított surfactin vegyületek.

Molekulatömeg (<i>m/z</i>)	Zsírsavlánc hossza	Peptidszekvencia
993	C13	[Val2], [Val7]
	C14	[Val2,7]
1007	C13	[Sur]
	C14	[Val7]
	C15	[Val2,7]
1021	C14	[Sur]
	C15	[Val2], [Val7]
1035	C15	[Sur]
	C16	[Val7]
1049	C15	[AME5]
	C16	[Sur]
	C17	[Val7]
1063	C16	[AME5]
	C17	[AME5, Val7], [Sur]
1077	C17	[AME5]
	C18	[AME5, Val7]
1091	C17	[Lxx4, AME5]
	C18	[AME5]
1105	C18	[Lxx4, AME5]

Összesen 22 különböző surfactin variánst detektáltunk, amelyek közül 5 [Sur], 2 [Val2], 5 [Val7], 2 [Val2,7], 4 [AME5], 2 [AME5, Val7] és 2 [Lxx4, AME5] peptidszekvenciával rendelkezett. Ha az izobár zsírsavláncokat (mint az izo, vagy anteizo elágazások) vagy a Leu/Ile aminosavak különbségét is figyelembe vesszük, ez a szám tovább növekedhet. A [Sur] változat C13-C17 hosszúságú β -hidroxi-zsírsavláncot tartalmazott, a [Val2] a C13 és C15 láncokhoz kapcsolódott, míg a [Val7], [Val2,7], [AME5], [AME5, Val7] és [Lxx4, AME5] surfactinok zsírsavai a C13-C17, C14-C15, C15-C18, C17-C18 és C16-C17 tartományban helyezkedtek el.

A különböző surfactin variánsok relatív mennyiségi arányainak az alkalmazott szénforrások függvényében való összehasonlításának érdekében a csúcsterületeket is meghatároztuk (**8. ábra**).

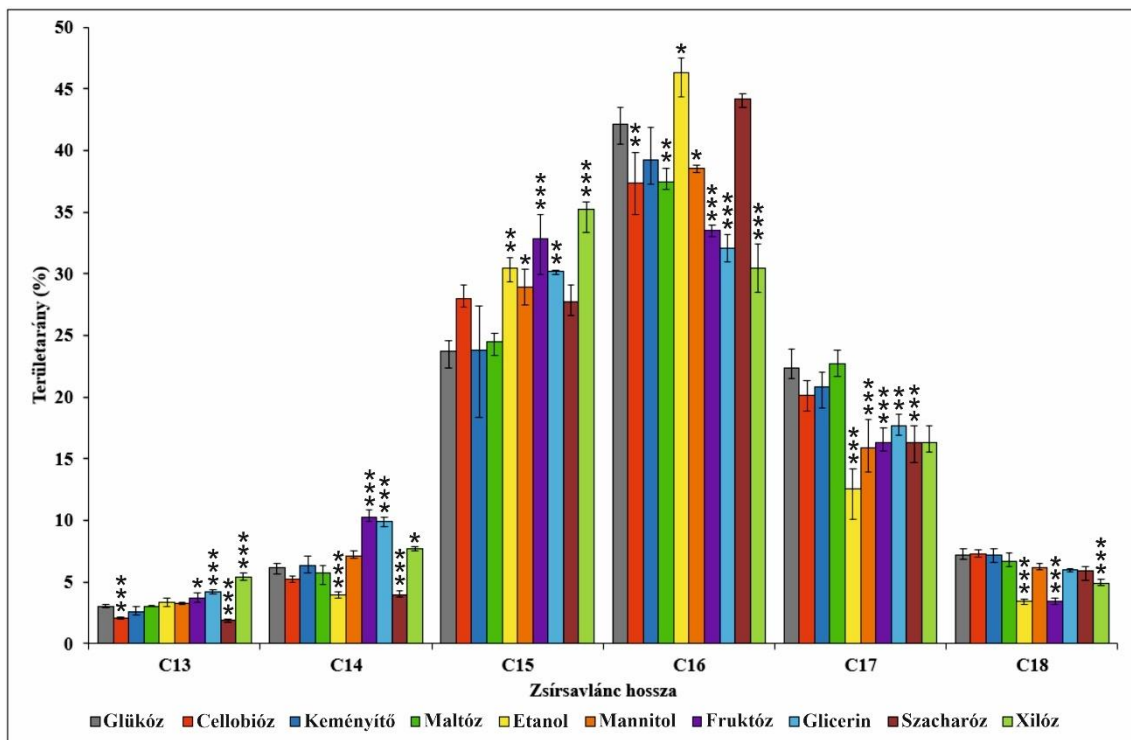


8. ábra A glükózt tartalmazó és a módosított szénforrású tápoldatban tenyésztett *B. subtilis* SZMC 6179J törzs által termelt surfactin variánsok területarány-eloszlásának összehasonlítása. A glükózhhoz képest kapott eltérések szignifikanciáját csillagok jelölik: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

A diagram alapján megfigyelhető, hogy a fruktóz és a xilóz alkalmazása eredményezte a legnagyobb változást a kontrollhoz képest. A fruktóz esetében az ötödik aminosav pozícióban AME-t tartalmazó változatok mennyisége jelentősen csökkent ([AME5], [AME5, Val7]), míg a hetedik pozícióban Val-t tartalmazó változatoké nagymértékben emelkedett ([Val7], [Val2,7]). A [Sur] relatív mennyiségét összehasonlítva, a xilóz volt az egyetlen szénforrás, amely szignifikáns növekedést eredményezett. A [Sur] mellett a [Val2] és [AME5] változatoknál is szignifikáns növekedést tapasztaltunk, de a [Val7], [Val2,7] és [AME5, Val7] relatív mennyisége csökkent, ami arra utal, hogy a xilóz, mint szénforrás nem kedvez a Val peptidlánc hetedik pozíciójába való beépülésének. A tápoldatban alkalmazott cellobióz, keményítő és szacharóz a xilózhoz hasonló hatást mutatott a surfactin vegyületcsoportok profiljára, ami a [Val7], [Val2,7] és [AME5, Val7] csökkenését, valamint az [AME5] és [Lxx4, AME5] előállításának szignifikáns növekedését eredményezte. Hasonlóképpen, a maltóz jelenléte a tápoldatban szintén magasabb [AME5] és [Lxx4, AME5] szintet eredményezett, azonban a [Val7] és [AME5, Val7] relatív mennyiségére nem volt jelentős negatív hatása,

csak a [Val2,7]-re. A xilózhoz hasonlóan az etanol, a mannitol és a glicerín a tápoldatban való alkalmazása emelte a [Val2] és csökkentette az [AME5, Val7] relatív mennyiségét, míg a [Val7], [Val2,7], [AME5] és [Lxx4, AME5] termelésére eltérő hatást mutattak.

Az egyes variánsok termelésén és relatív mennyiségén kívül megvizsgáltuk, hogy a különböző szénforrásokkal módosított tápoldatok milyen hatással vannak a *B. subtilis* SZMC 6179J által termelt surfactin molekulák zsírsavláncainak hosszára. Az integrált területek arányait a **9. ábra** mutatja be.



9. ábra Az eredeti és a módosított szénforrású tápoldatban tenyésztett *B. subtilis* SZMC 6179J törzs által termelt surfactin homológok területarány-eloszlásának összehasonlítása. A glükózhhoz képest kapott eltérések szignifikanciáját csillagok jelölik:

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a keményítő alkalmazása nem eredményezett szignifikáns különbséget a termelt surfactinok zsírsavlánchossza között a glükózt tartalmazó kontrollhoz képest, míg a maltóz, cellobióz és szacharóz szénforrások rendre egy (C16), két (C13, C16), illetve négy (C13, C14, C17, C18) homológ relatív mennyiségét csökkentették. Mind a mannit, mind az etanol alkalmazása növelte a C15, illetve a C15-C16 vegyületek relatív mennyiségét, továbbá egyes homológok előfordulásának csökkenését is okozta. A fruktózzal, glicerinnel és xilózzal kiegészített

táptalajok esetében a mannitolhoz és az etanolhoz hasonlóhatások voltak megfigyelhetők. A rövidebb zsírsavláncokat (C13-C15) tartalmazó csoportok össztermelését növelték, míg a hosszabb szénláncú zsírsavakat (C16-C18) tartalmazó molekulák szekrécióját jelentősen csökkentették.

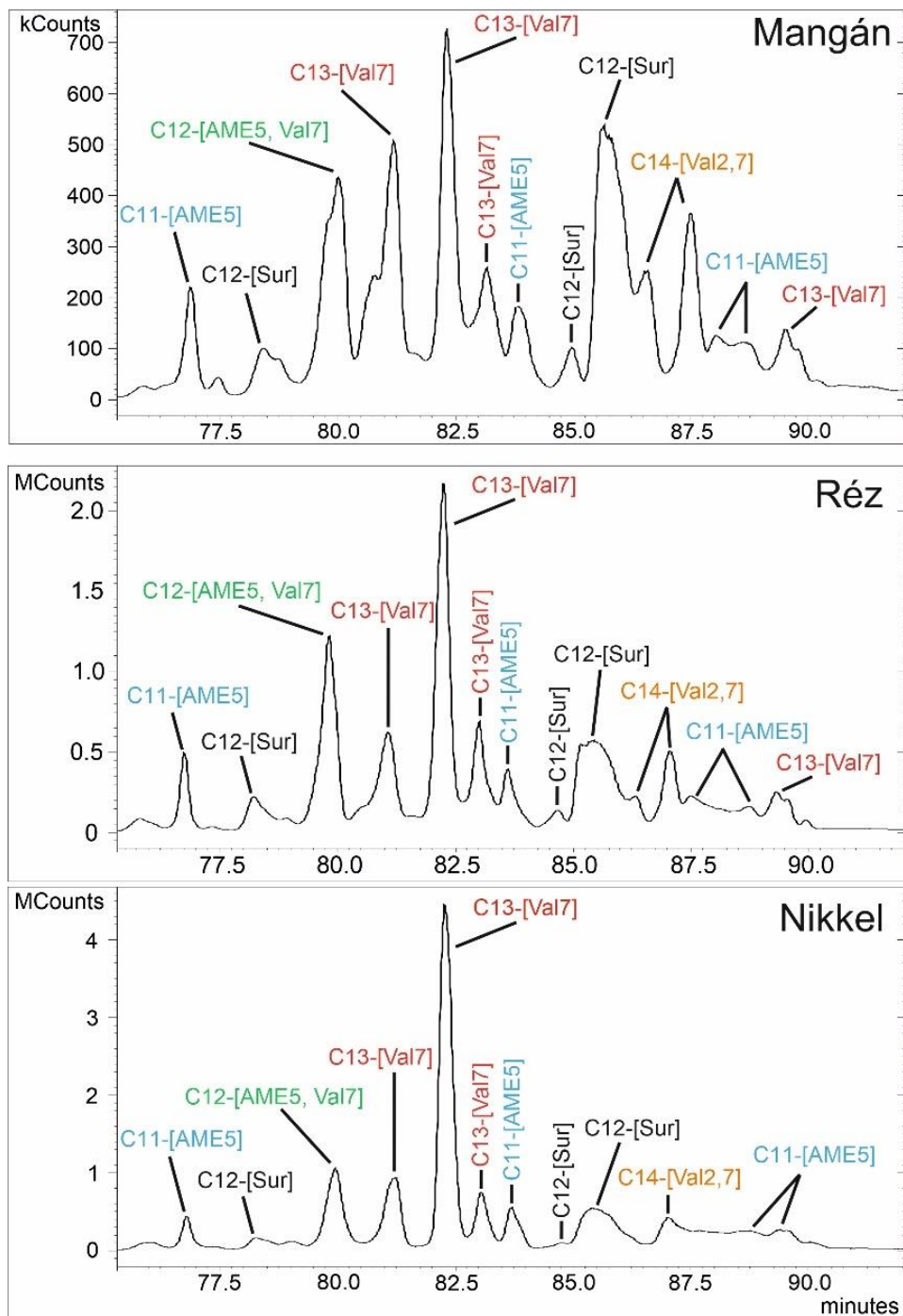
Az is bebizonyosodott, hogy a szénforrás módosításának hatása elhanyagolható a C13-as biosurfaktánsok esetében. A legnagyobb, 2%-os növekedés a xilózt tartalmazó mintáknál következett be, míg a szacharóz használata csak alig több mint 1%-kal csökkentette az arányt. Hasonlóak voltak az eredmények a C14 molekulák között is, a fruktóz alkalmazása 4%-os növekedést okozott, az etanol használata pedig mintegy 2%-kal csökkentette az arányt. Négy szénforrás azonban jelentősen megnövelte a C15 változatok relatív arányát, a xilóz volt ebben a leghatékonyabb, több mint 11%-os növekedéssel. A különböző szénforrások hasznosításának legnagyobb hatása a 16 szénatomos zsírsavlánccal rendelkező vegyületeknél figyelhető meg. Míg az etanol használata 4%-os növekedést eredményezett, addig a cellobióz, a maltóz, a fruktóz, a glicerín és a xilóz csökkentette az arányokat. A C17 és C18 felületaktív anyagok esetében is csökkenés volt megfigyelhető, de az eddig azonosított leghosszabb homológok területarányát ezek a módosítások viszonylag kevésbé befolyásolták.

A rendelkezésre álló szakirodalmi adatok számos esetben számolnak be arról, hogy a különböző szénforrások alkalmazása eltérő mértékben befolyásolja az egyes bakteriális eredetű lipopeptidek, köztük a surfactinok termelését [4]. Ezen szénforrások között szerepelnek az általunk is használt glükóz, szacharóz, maltóz, mannitol, illetve a keményítő. Alkalmaztak továbbá galaktózt, valamint dextrint a tápoldatösszetétel termelésre gyakorolt hatásának vizsgálatára [47, 48]. A szakirodalom elsősorban a szacharózt jelöli meg a legoptimálisabb tápoldatkiegészítő szénforrásnak az összes termelt surfactin mennyiségének növelésére, mivel a fruktóz, a glicerín, a mannitol, a keményítő és a dextrin nem rendelkezett jelentős hatással, a maltóz esetében pedig csökkenést tapasztaltak a fermentációban detektált surfactinok koncentrációjában. Az egyes variánsok és homológok relatív mennyiségi arányára gyakorolt hatásokról azonban kevés és hiányos információ áll rendelkezésre. Ennek legfőbb oka, hogy az eddigi kutatások főként a vegyületcsoport egészének (teljes mennyiségének) termelését tudták csak követni. A mennyiségi meghatározásokat a folyadék-kromatográfiai vizsgálatok mellett sokszor indirekt módon végezték el. Számos kísérletben a felületi feszültség változásának monitorozásán keresztül [49], vagy a *B. fusiformis* növekedésére gyakorolt gátlási zónák

átmérőinek összehasonlításával szereztek relatív mennyiségi adatokat [47]. Az alkalmazott kvalitatív analitikai módszerek sem voltak képesek részletesebb szerkezeti információt szolgáltatni a surfactin vegyületek mennyiségi arányairól. A legtöbb esetben HPLC technikát, ritkábban pedig fragmentálás nélküli MS módszert használtak a surfactinok azonosítására. A tápoldatmódosításnak a termelt surfactinok összetételére gyakorolt hatása azonban más kutatócsoportok által is tényként jegyzett, így vélhetően a közeljövőben egyre több kutatás irányul a téma feltárására [61].

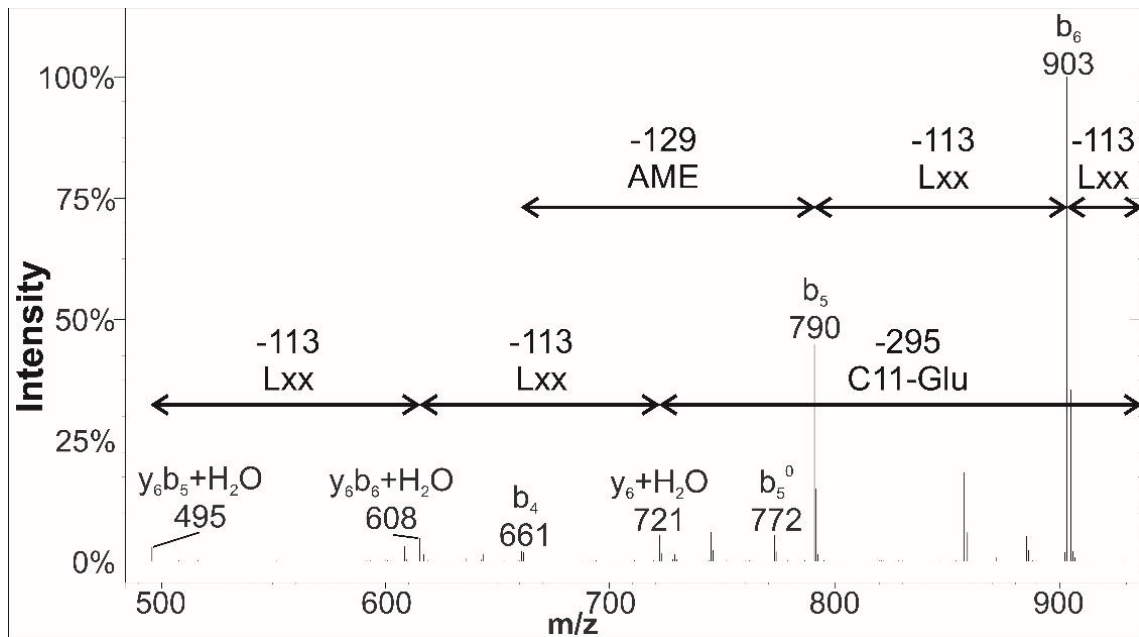
6.1.2. *Különböző fémionok surfactin termelésre gyakorolt hatásának vizsgálata*

Szakirodalmi adatok alapján a különböző fémionok jelenléte módosíthatja a surfactin variánsok összetételét. Mindezekből adódóan munkánk során vizsgáltuk a mangán, réz és nikkell ionok surfactin termelésre gyakorolt hatását. A kísérlet során a *B. subtilis* SZMC 6179J törzs fermentlevének előkészítését követően elvégeztük az extraktumok HPLC-ESI-IT-MS analízisét. A rögzített EIC-ok alapján, a vizsgált fémionok módosították a baktérium surfactin termelését, mivel több esetben tapasztaltunk az eredeti, Besson-féle tápoldatban tenyésztett mikroorganizmusok fermentlevéből kinyert minták vizsgálatának kromatogramjaitól eltérő relatív retenciós idejű, esetenként újonnan megjelenő csúcsokat. Erre példaként az 1016-os m/z értékű EIC-ok szolgálnak **(10. ábra)**.



10. ábra A fémionokkal módosított tápoldatban tenyésztett *B. subtilis* SZMC 6179J törzs által termelt surfactin tartalmú minták 1016-os m/z értékű EIC-jai.

A detektált csúcsok a különböző szénforrásokkal módosított minták kromatogramjai alapján nem voltak azonosíthatóak, ezért MS^2 analíziseket végeztünk az ioncsapdás tömeganalizátor segítségével. A vizsgálat eredményeinek kiértékelésére példaként szolgál a **10. ábra** legfelső kromatogramján látható első csúcs ($R_t = 76,9$ min, C11-[AME5]) MS^2 spektruma (**11. ábra**). Az ábrán jelölt m/z értékek nem pontos, hanem számolt, reprezentatív tömegeket jelölnek az átláthatóság és a követhetőség érdekében.



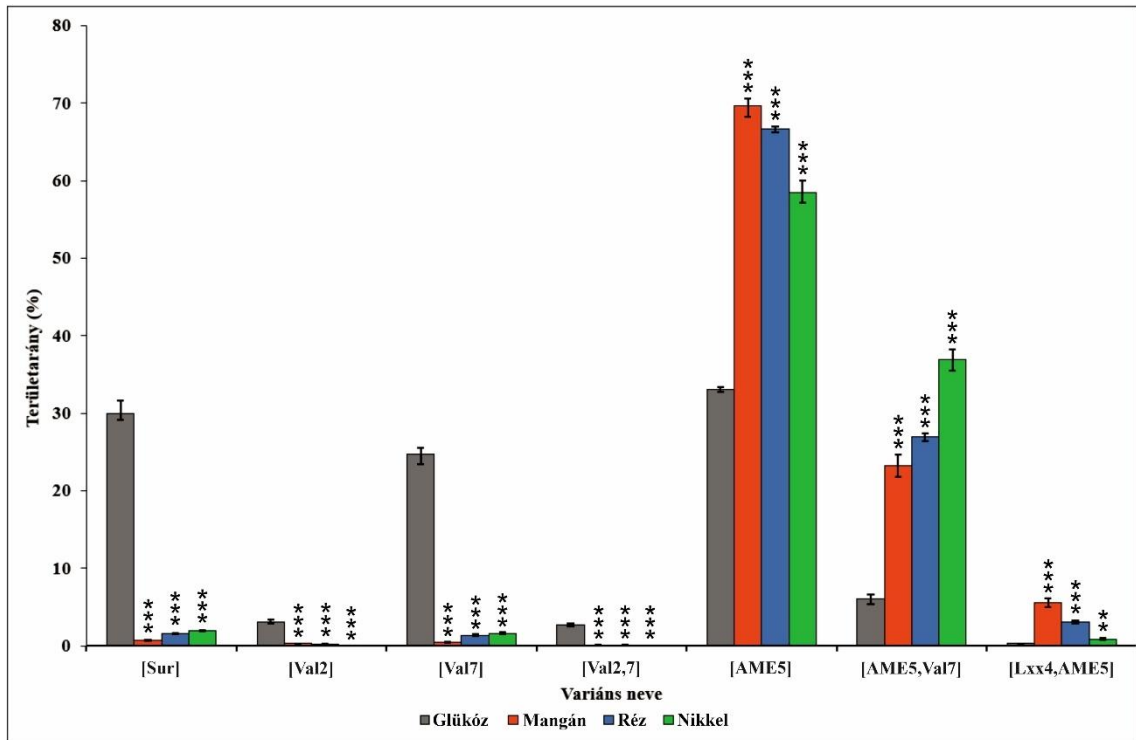
11. ábra A mangánnal módosított tápoldatban tenyésztett *B. subtilis* SZMC 6179J törzs által termelt surfactin tartalmú minta 1016-os m/z értékű EIC-ján látható első csúcs MS^2 spektruma.

A surfactin változatok MS^2 spektrumain több fragmens ion sorozat is felismerhető volt. Ezek közül az első, belső fragmentációs mechanizmussal ($y_6 + H_2O$) [15] képződött fragmens ion rendelkezett a Kecskeméti és munkatársai [12] által jellemzett 14 Da tömegkülönbséggel, ami arra utal, hogy a surfactin molekula az 5. aminosav pozícióban AME-t tartalmaz. A sorozat következő fragmens ionjai ($y_6b_6 + H_2O$, $y_6b_5 + H_2O$) arra utaltak, hogy a peptidszekvencia hetedik és hatodik aminosav pozíciójában egyaránt Lxx található. Az egyszerű hasadási mechanizmus fragmensei (b_6 , b_5 és b_4) [41] közötti tömegkülönbségek szintén megerősítik, hogy a C-terminálison elhelyezkedő utolsó három aminosav Lxx, Lxx és Glu. Továbbá a prekursor ion nátrium adduktja és az első belső fragmens ($y_6 + H_2O$) közötti m/z különbség azt jelzi, hogy C11 homológáról van szó. Ilyen rövid alifás résszel rendelkező surfactin molekuláról korábban még nem számolt be az irodalom. A szénforrásokkal módosított tápoldatokból származó mintákhoz képest 10 új variánst találtunk a fémionok hozzáadásával tenyésztett *B. subtilis* fermentleveiben, köztük C12-[Sur], C14-[Val2], C11/C12-[AME5], C12/C13/C14/C15/C16-[AME5, Val7] és C15-[Lxx4, AME5] molekulákat (**3. táblázat**). A minták MS^2 spektrumának további vizsgálata kimutatta, hogy a központi aszparaginsav metilészterezett változata minden olyan mintában megjelent, amely fémionokkal kiegészített tápoldatból származik.

3. táblázat A fémionokkal módosított tápoldatokban tenyésztett *B. subtilis* 6179J törzs által termelt surfactin vegyületek.

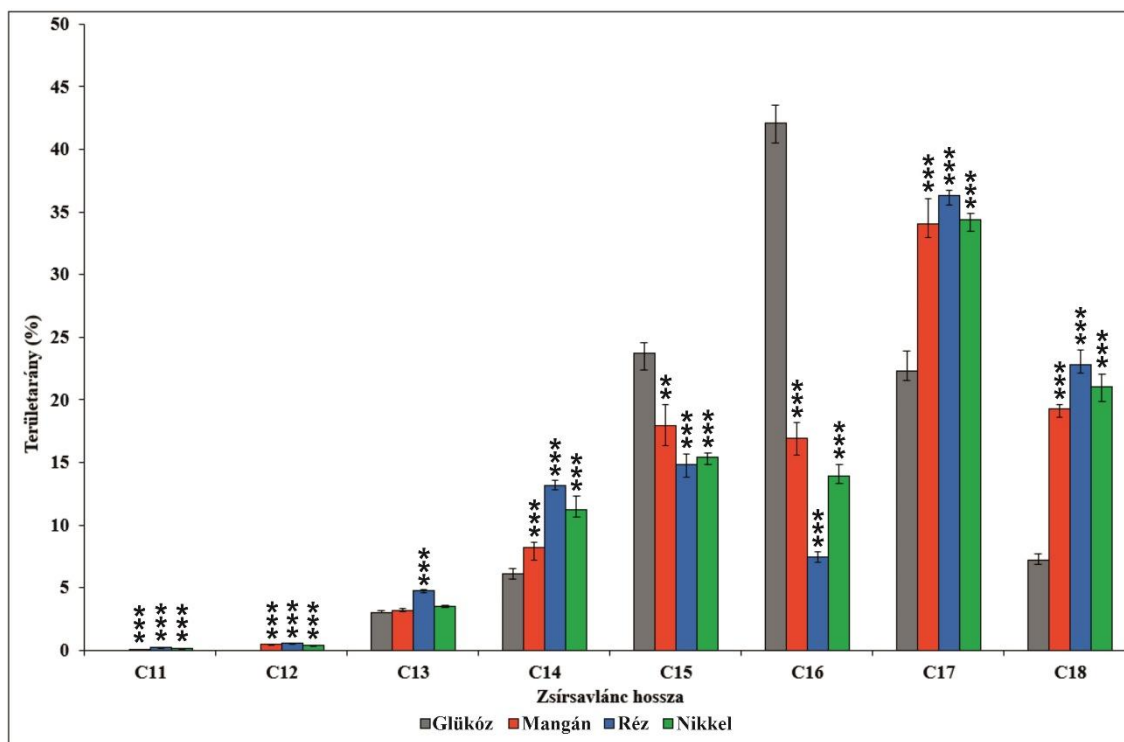
Molekulatömeg (<i>m/z</i>)	Zsírsavlánc hossza	Peptidszekvencia
993	C11	[AME5]
	C12	[Sur], [AME5, Val7]
	C13	[Val7]
	C14	[Val2,7]
1007	C12	[AME5]
	C13	[Sur], [AME5, Val7]
	C14	[Val2], [Val7]
1021	C13	[AME5]
	C14	[Sur], [AME5, Val7]
1035	C14	[AME5]
	C15	[AME5, Val7]
1049	C15	[AME5]
	C16	[Sur], [AME5, Val7]
1063	C15	[Lxx4, AME5]
	C16	[AME5]
	C17	[AME5, Val7]
1077	C16	[Lxx4, AME5]
	C17	[AME5]
	C18	[AME5, Val7]
1091	C17	[Lxx4, AME5]
	C18	[AME5]

A fémionokkal kiegészített tápoldatból extrahált surfactin variánsok integrált csúcsterületeiből számolt relatív mennyiségeit összehasonlítottuk az eredeti tenyésztési körülmények között kapott minta területarányaival (**12. ábra**).



12. ábra A *B. subtilis* SZMC 6179J által termelt surfactin variánsok relatív mennyiségi összehasonlítása az eredeti, valamint mangánnal, rézzel és nikkellel kiegészített tápoldatban. A glükózhoz képest kapott eltérések szignifikanciáját csillagok jelölik: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Megállapítható, hogy az ötödik aminosav pozícióban AME-t tartalmazó variánsok jelenléte domináns, 96% feletti mindhárom mintában, míg a [Sur], [Val2], [Val7] és [Val2,7] molekulák relatív mennyisége szinte elhanyagolható, egyikük sem érte el a 2%-ot egyik módosított mintában sem. Ez arra utal, hogy a fémionok hozzáadása szelektíven befolyásolhatja a baktérium olyan AME5 típusú vegyületek termelését, mint például az [AME5], [AME5, Val7] és [Lxx4, AME5]. A különböző homológok arányát is megvizsgáltuk a surfactin vegyületeken belül, összehasonlítva a különböző fémionokkal kiegészített táptalajon tenyésztett törzs extraktumait (**13. ábra**).



13. ábra *A. B. subtilis* SZMC 6179J által termelt surfactin homológok relatív mennyiségi összehasonlítása az eredeti, valamint mangánnal, rézzel és nikkellel kiegészített tápoldatban. A glükózhoz képest kapott eltérések szignifikanciáját csillagok jelölik: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

A diagram alapján az újonnan kimutatott C11 és C12 surfactin homológok relatív mennyisége meglehetősen alacsony volt és egyik sem érte el az 1%-ot, míg a C13 és C14 molekulák esetében enyhe növekedés volt megfigyelhető az eredeti mintához képest; a rézzel módosított közegből származó mintában volt a legnagyobb növekedés a két homológ relatív mennyiségében (2%, illetve 7%). A C15 és C16 változatok esetében a százalékos arányokban jelentős csökkenés volt megfigyelhető. A fémionokkal kiegészített tápoldatból származó mintákban 14-18% és 7-17% közötti arányban jelentek meg ezek a homológok, míg az eredeti tápoldatból származó mintában körülbelül kétszer nagyobb volt ez a relatív mennyiség. A fémionokat nem tartalmazó tápoldatban ez a két lánc hossz volt a legdominánsabb, azonban a fémionok alkalmazása a C17 és a C18 relatív mennyiségének növekedését eredményezte. Ez utóbbi két homológot vizsgálva a relatív százalékos arányokban nagymértékű növekedés volt megfigyelhető, amely mindkét esetben elérte a 12-15%-ot. Ez a két homológ képviselte a kimutatott változatok több mint 50%-át mindhárom fémionokkal módosított közegből származó mintában, továbbá a surfactinok több mint kétharmada rendelkezett 15 szénatom feletti zsírsvláncsal.

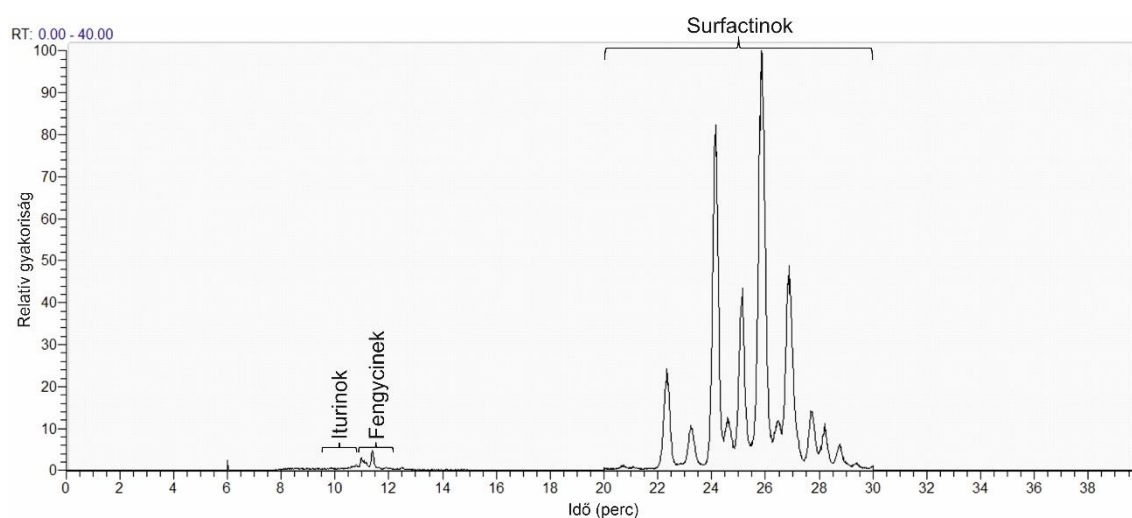
Korábban több kutatócsoport is beszámolt a fémionok tápoldatban való alkalmazásának surfactin termelésre gyakorolt hatásairól [4]. Wei és Chu tanulmányai szerint a Mn^{2+} , Fe^{2+} , K^+ és Mg^{2+} ionok elősegítik a surfactin bioszintézisét [39, 62]. Cooper és munkatársai a jelen fejezetben tárgyalt mangán-, réz- és nikkelsók mellett Fe^{2+} , Mg^{+2} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Zr^{4+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} és Co^{2+} ionok sóival is vizsgálták a *B. subtilis* surfactin termelésének növelését. Ezek közül a Fe^{2+} és Mn^{2+} ionok jelentős pozitív hatást eredményeztek, a Mg^{+2} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Zr^{4+} ionok nem voltak hatással a termelésre, a Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} és Co^{2+} ionok pedig gátolták a *B. subtilis* növekedését [40]. A különböző fémionok surfactin bioszintézisre gyakorolt hatásainak vizsgálatával foglalkozó kutatások a szénforrások esetében leírtakhoz hasonlóan szintén a mikroorganizmusok összes lipopeptid termelését tanulmányozták, az egyes variánsok, illetve homológok relatív mennyiségének változásáról nem áll rendelkezésre információ. Az ismeretek hiánya a vizsgálatok kiterjesztésének szükségességét igazolja, további *Bacillus* törzsek és tápoldatmódosításra használt fémionok, valamint analitikai technikák bevonásával.

6.2. A *B. subtilis* 6178J törzs lipopeptid profiljának vizsgálata különböző tenyésztési körülmények között

Az előző fejezetben bemutatott eredmények alapján egy másik *B. subtilis* törzs (SZMC 6178J) lipopeptid termelési sajátosságait is megvizsgáltuk összehasonlítás céljából egy rendelkezésünkre álló, nagyobb felbontású és érzékenységgű HPLC-QOTrap készülék segítségével. Elsőként azonban kidolgoztunk egy HPLC-MS/MS módszert az eredeti és a módosított tápoldatokban tenyésztett baktériumtörzs fermentleveiből extrahált lipopeptidek kvantitatív vizsgálataihoz.

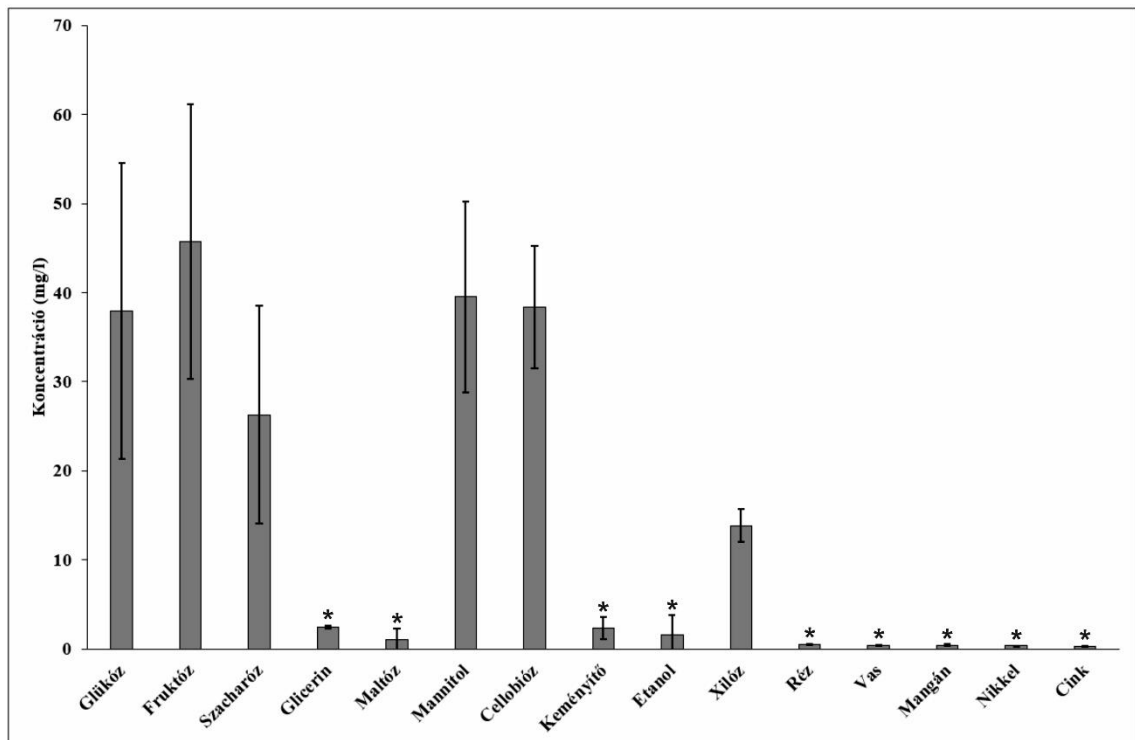
6.2.1. Lipopeptidek kvantitatív analízise

A vizsgálatokat SIM módban végeztük el, melyeket a nagyobb tömegű nátrium addukt ionokra állítottuk be, mivel előzetes vizsgálatok alapján ezek sokkal intenzívebbek voltak, mint a kisebb tömegű hidrogén addukt ionok. Az eredeti, Besson-féle tápoldatban tenyésztett minta totáليون kromatogramja (TIC) a **14. ábrán** látható.



14. ábra A Besson-féle tápoldatban tenyésztett *B. subtilis* 6178J törzs fermentleveiből HPLC-MS/MS SIM mérésének TIC-ja.

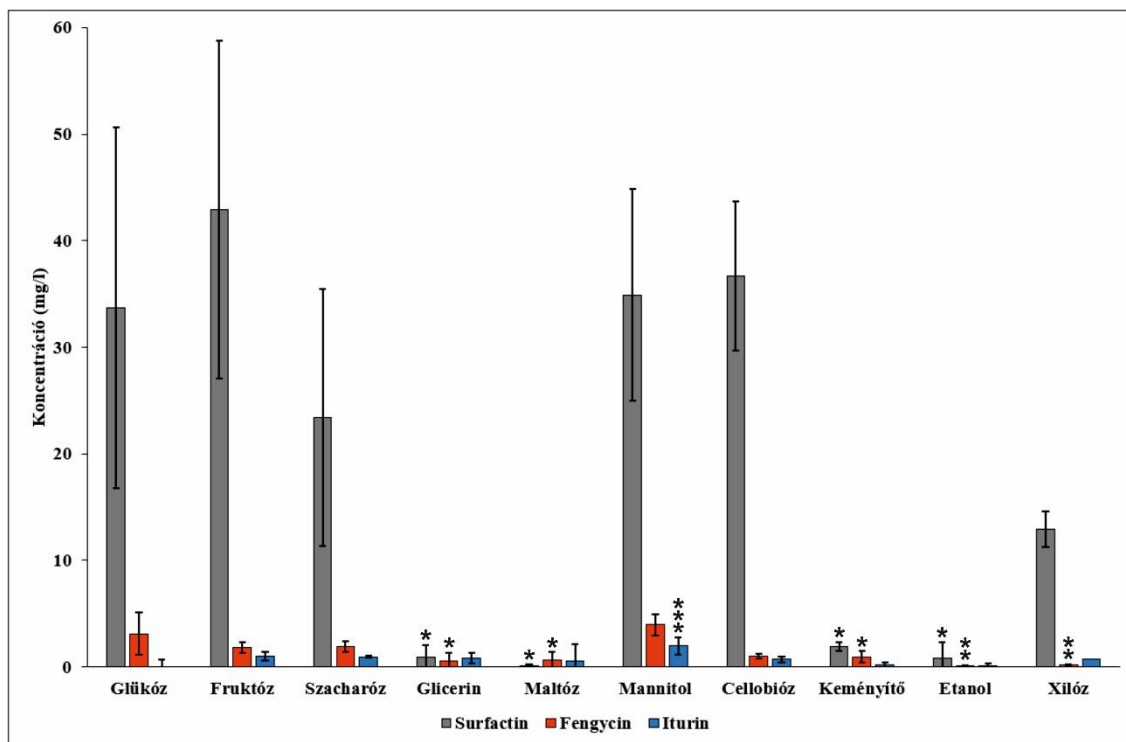
A kromatogram 10-12. percében az iturinok, illetve a fungycinek, míg a surfactinok csak később, a 20. perc környékén detektálhatók. A kapott csúcs alatti területeket integráltuk majd az előzetesen elvégzett kalibráció alapján meg tudtuk határozni a mintáink surfactin-, fungycin- és iturin koncentrációját, amiből kiszámoltuk a fermentlé összes lipopeptid-tartalmát (**15. ábra**).



15. ábra A *B. subtilis* SZMC 6178J összes lipopeptid termelése különböző tápoldatok hatására. A glükózhoz képest kapott eltérések szignifikanciáját csillagok jelölik: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

A **15. ábrán** megfigyelhető, hogy a különböző szénforrások és fémionok alkalmazása milyen hatással volt a *B. subtilis* SZMC 6178J törzs lipopeptid termelésére. Fruktóz, szacharóz, mannitol, cellobióz és xilóz hatására számottevő változás nem volt megfigyelhető, az eltérések szignifikanciáját megvizsgálva statisztikai különbség nem volt tapasztalható, amely a koncentrációk átlaga közötti kis mértékű különbség mellett a viszonylag nagy relatív szórásnak tudható be. Glicerín, maltóz, keményítő és etanol tápoldatban való felhasználása kedvezőtlenül hatott a termelésre, a diagramon is egyértelműen látható, hogy a lipopeptidek összkoncentrációja mindegyik esetben 5 mg/l alá csökkent. A különböző fémionok alkalmazásának hatására ez a tendencia tovább romlott, egyik esetben sem érte el az 1 mg/ml-t.

Az összes bioszurfaktáns termelés mellett megvizsgáltuk a három fő lipopeptid, az iturin, a fengycin és a surfactin fermentlevekben lévő koncentrációit is. Az egyes vegyületsaládok arányainak összehasonlítása által részletesebb képet kaphatunk arról, hogy milyen kvantitatív hatásai vannak a különböző szénforrások, illetve fémionok tápoldatban való alkalmazásának. (**16-17. ábra**).

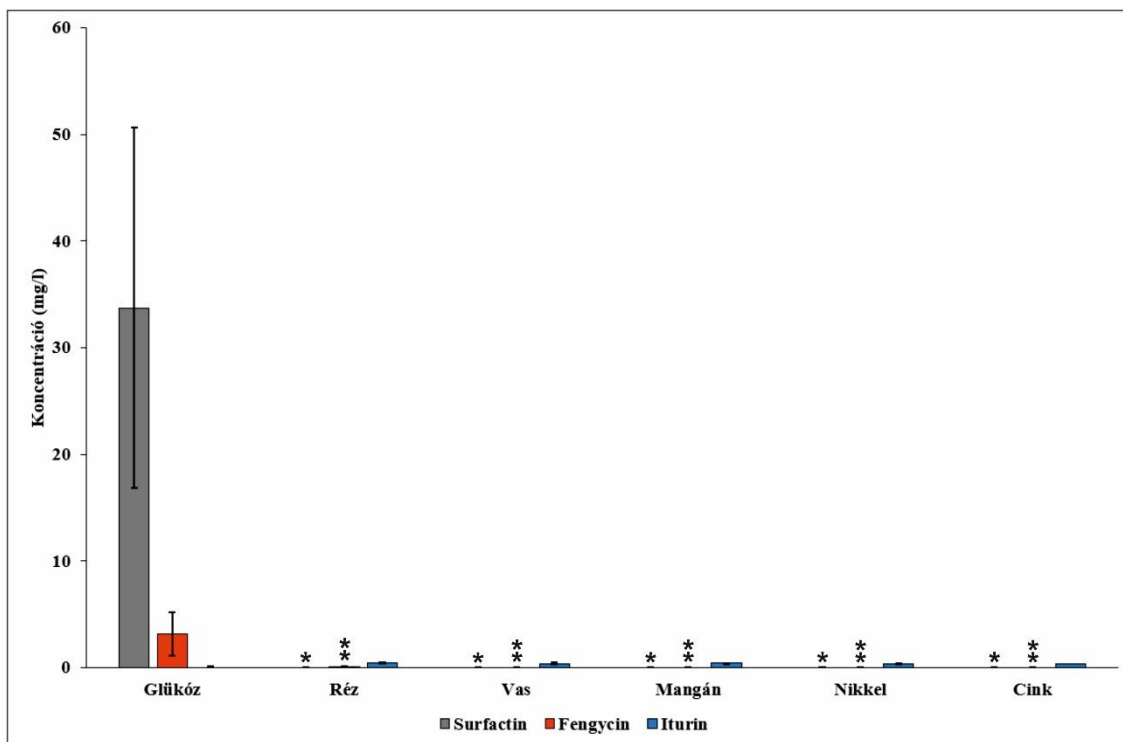


16. ábra Különböző szénforrások hatása az egyes lipopeptid vegyületcsaládok termelésére a *B. subtilis* SZMC 6178J fermentlevében. A glükózhoz képest kapott eltérések szignifikanciáját csillagok jelölik: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

A **16. ábrán** látható diagram jól szemlélteti, hogy az eredeti tápoldatban a baktérium fermentlevében a surfactin koncentrációja volt a legnagyobb. Surfactin mellett alacsony koncentrációban fengycin és iturin is található, viszont az iturin mennyisége alig éri el az 1 mg/l-t. Hasonlóan magas koncentrációban volt mérhető surfactin a fruktóz, mannitol, cellobióz és a szacharóz esetében is. Ezeknél a mintáknál megfigyelhető az iturin és fengycin jelenléte is, azonban koncentrációjuk egyik esetben sem haladta meg az 5 mg/l-t. A glicerín, maltóz, keményítő és az etanol tartalmú tápoldatokban – ahogy a 15. ábrán is látható – egyik vegyületcsoport sem termelődött nagy mennyiségben, viszont az eredeti szénforrás alkalmazásával ellentétben mindegyiknél megjelent az iturin. A xilóz esetében a surfactinból keletkezett a legtöbb, azonban az iturin mennyisége meghaladja a fengycin mennyiségét, ellentétben a többi mintával. A mannitollal kiegészített tápoldat hatására termelődött a legtöbb iturin és fengycin, ez esetben is csak 2, illetve 4 mg/l koncentrációban. A fruktóz pozitív hatással volt a surfactin, valamint az iturintermelésre, viszont a fengycin mennyisége csökkent az eredeti összetételű tápoldathoz viszonyítva. A szacharóz szénforrásként való használata is ezt a tendenciát

követte, azonban ebben az esetben a surfactin koncentrációja alacsonyabb volt, mint az előbb említett mintákban.

Bár az összes lipopeptid termelés vizsgálatánál megfigyelhető volt, hogy a fémionok jelenléte csökkentette a baktérium biosurfaktáns szintézisét (**15. ábra**), a vegyületsoportok fermentleveken belüli megoszlásának feltérképezése céljából részletes mennyiségi analízist végeztünk el (**17. ábra**).



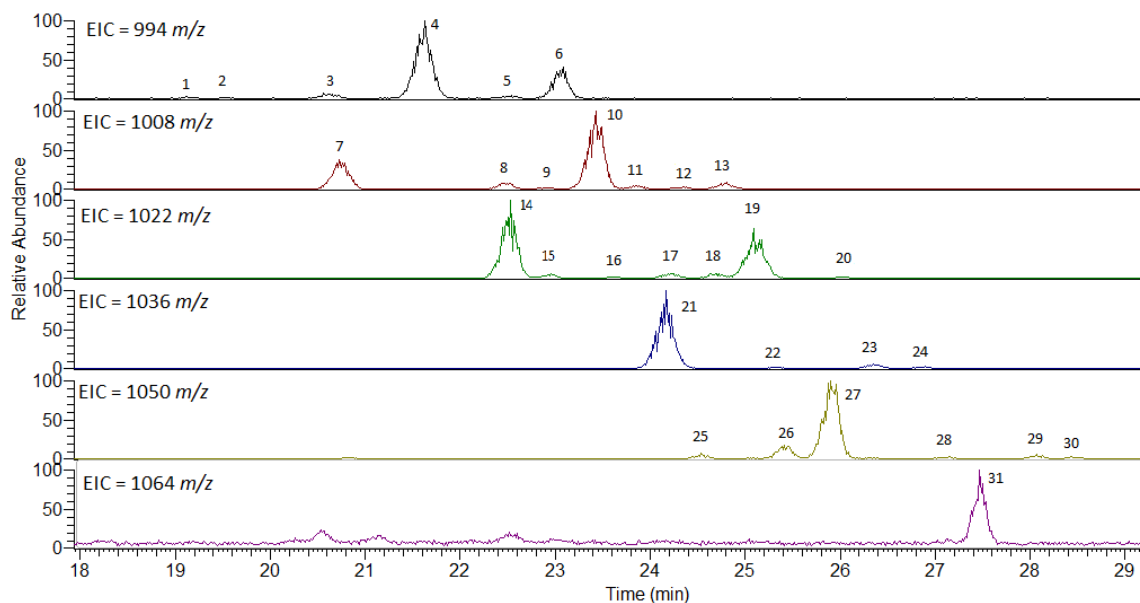
17. ábra Fémionokkal módosított tápoldatok hatása a lipopeptidek termelésére a *B. subtilis* SZMC 6178J fermentlében. A glükózhoz képest kapott eltérések szignifikanciáját csillagok jelölik: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

A **17. ábra** jól szemlélteti, hogy a fémek tápoldatban történő alkalmazása szinte teljes mértékben gátolta a baktérium lipopeptid termelését. Egyedül iturin jelenléte volt megfigyelhető a fermentlében kis mennyiségben. Ezek az eredmények eltérnek az általunk várt termelésre gyakorolt hatásoktól, mivel a szakirodalmi adatok alapján a fémionok elősegítik a mikroorganizmusok lipopeptid bioszintézisét [41, 42, 45].

6.2.2. Surfactinok kvalitatív analízise

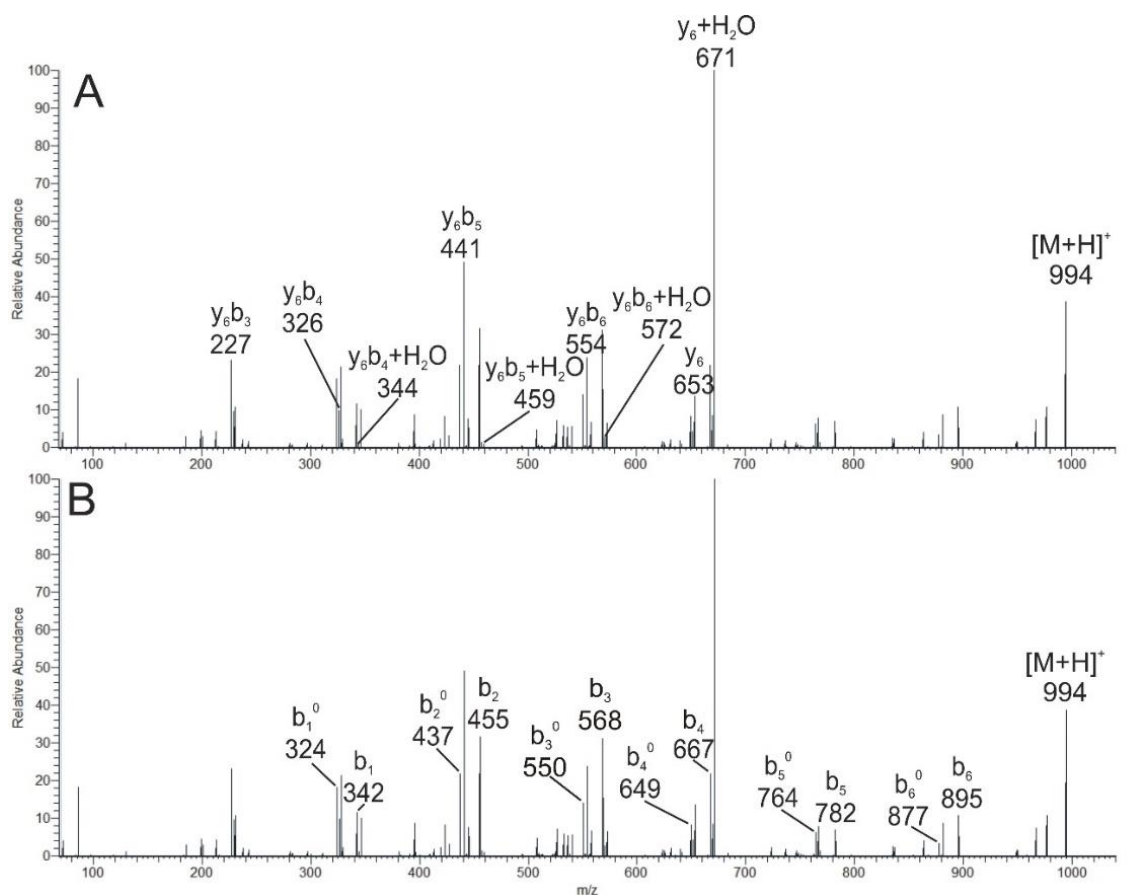
A mintákban túlnyomó többségben lévő surfactinok azonosítása céljából a surfactinok MS/MS vizsgálatait is elvégeztük HPLC-QOTrap készülékkel. Az eredeti,

szénforrásként glükózt tartalmazó mintán végzett mérések EIC-jai a **18. ábrán** láthatók. A minta vizsgálata során összesen 31 vegyület protonált molekulaionja került azonosításra, amit az ábrán látható csúcsok számozásával jeleztünk. A 994-es m/z értékűek jelentek meg először, a 19-24. perc között. A 994-esnél és az 1050-esnél 6 csúcs, az 1008-asnál, 1022-esnél 7 csúcs, az 1036-osnál már csak 4 csúcs, és az 1064-es m/z értékűnél pedig csak 1 csúcs volt detektálható.



18. ábra A glükóz szénforrású tápoldatban tenyésztett *B. subtilis* 6178J törzs surfactin komponenseinek EIC-jai.

A fragmens ionok az egyes csúcsokhoz tartozó MS/MS spektrumok kiértékelése során kerültek azonosításra, amelyek tömegkülönbségeiből az adott csúcshoz tartozó molekula aminosavsorrendje és a zsírsavlánc hossza megállapítható. Példaként a fenti ábrán található 4. csúcshoz tartozó MS/MS spektrum látható, az egyes fragmens ionok feltüntetésével (**19. ábra**). Az ábrán jelölt m/z értékek nem pontos, hanem számolt, reprezentatív tömegeket jelölnek.



19. ábra Az $m/z = 994$ EIC C13-[Val7]-hez (4. csúcs) tartozó MS/MS tömegspektrum (*B. subtilis* 6178J törzs), a belső fragmens ionok (A) és szimpla hasadásos mechanizmus fragmens ionjainak jelölésével (B).

A fenti ábrán látható mind a szimpla hasadásos, mind pedig a belső fragmentációs mechanizmussal keletkező fragmens sorozat. A belső fragmensek (19. A ábra) első tagja, az y_6+H_2O jelű ion 671-es m/z értékkel rendelkezik, ez az elsőként leírt surfactin molekuláétól 14 Da értékkel kevesebb, ezért feltételezhető, hogy aminosav csere történt, továbbá a prekursor ionhoz képest végbemenő 323 Da tömegvesztés alapján kijelenthető, hogy a glutaminsavhoz 13 szénatomból álló zsírsavlánc kapcsolódik. A következő, $y_6b_6+H_2O$ jelű fragmens tömegét megfigyelve 113 helyett 99 Da tömegkülönbség lép fel a legnagyobb m/z értékű belső fragmenséhez képest. Ez arra enged következtetni, hogy a hetedik aminosav az elsőként azonosított surfactin molekulában levő leucin/izoleucin helyett valin. A fragmens sorozat további, $y_6b_5+H_2O$ és $y_6b_4+H_2O$ jelű tagjainak m/z értékét megvizsgálva a tömegkülönbségek sorban 113 és 115, ezek alapján a hatodik aminosav leucin/izoleucin, az ötödik pedig aszparaginsav. Megjelentek továbbá az előzőekből vízvesztéssel keletkező fragmens ionok is, melyek elnevezése y_6 , y_6b_6 , y_6b_5 , y_6b_4 , valamint megtalálható az y_6b_3 ion is, melynek tömege

alapján a negyedik pozícióban Val található, továbbá kikövetkeztethető az is, hogy a heptapeptid harmadik és második tagja is Leu/Ile. További érdekes eredmény, hogy a kutatócsoport korábbi tapasztalataival ellentétben az $y_n b_m$ fragmens ionok intenzitása az alkalmazott tömegspektrométerrel sokkal nagyobb, mint az $y_n b_m + H_2O$ fragmenseké [8, 12].

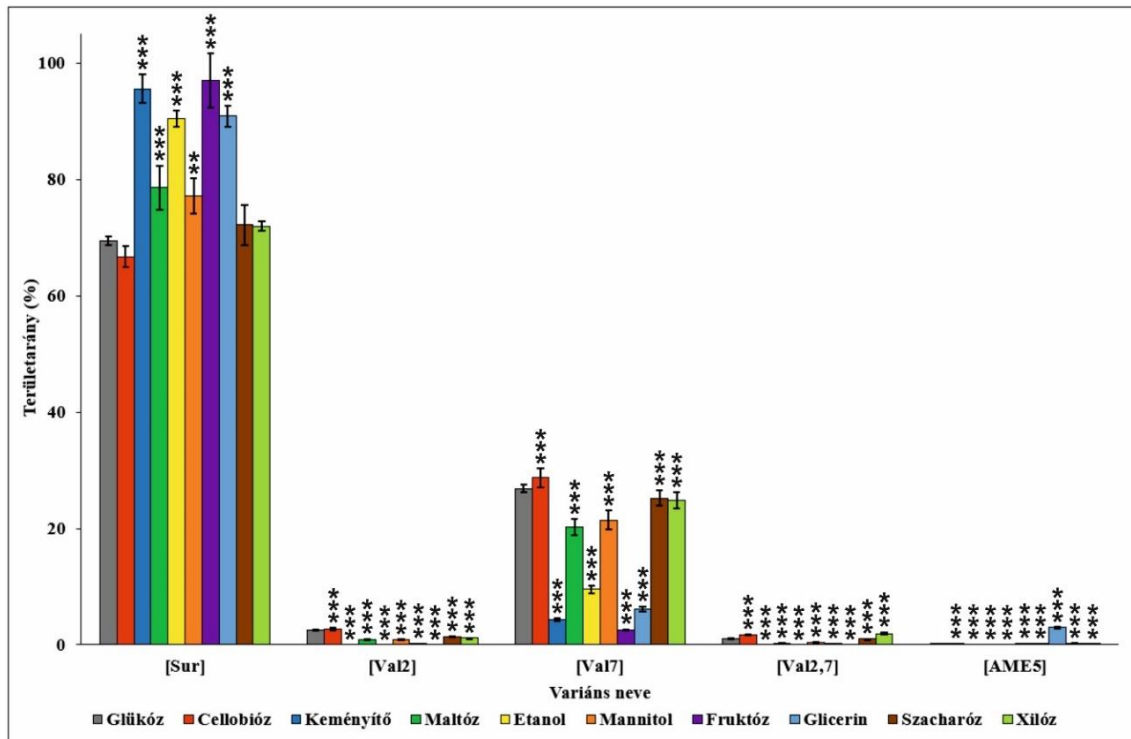
A szimpla hasadásos mechanizmussal keletkezett fragmens ionokat megvizsgálva (**19. B ábra**) megfigyelhető, hogy az összes aminosav lehasadását nyomon lehet követni, egészen a zsírsavláncához kapcsolódó Glu-t jelölő b_1 ionig, ezen kívül a vízvesztés ezen fragmens sorozat tagjainál is fellép. Ezek alapján az előzőekben feltételezett aminosav sorrend egyértelműen leírható: Glu-Lxx-Lxx-Val-Asp-Lxx-Val, továbbá az is kijelenthető, hogy a zsírsavlánc 13 szénatomból áll. Így az MS^2 spektrum alapján a molekulát C13-[Val7] surfactinként azonosítottuk.

Az összes kapott csúcshoz tartozó MS/MS spektrum kiértékelésre került, így sikerült meghatározni, hogy az egyes csúcsok milyen molekulákat tartalmaznak. A vizsgálatok során McLafferty átrendeződésre utaló fragmens ionok nem voltak detektálhatók. A kapott eredményeket a **4. táblázat** foglalja össze, az $y_n/y_n b_m$, illetve a b_m fragmensek m/z értékein keresztül. Az táblázaton felsorolt m/z értékek nem pontos, hanem számolt, reprezentatív tömegeket jelölnek.

4. táblázat Az *B. subtilis* 6178J törzs által termelt, azonosított surfactin molekulák jellemzése a különböző fragmens ionjaikon keresztül.

Prekurzor ion [M+H ⁺] (<i>m/z</i>)	Csúcs száma	Név	Szimpla hasadás fragmensei						Belső fragmensek			
			b₆	b₅	b₄	b₃	b₂	b₁	y₆	y₆b₆	y₆b₅	y₆b₄
994	1,2	C12-[Sur]	881	768	653	554	441	328	667	554	441	326
	3,4	C13-[Val7]	895	782	667	568	455	342	653	554	441	326
	5,6	C14-[Val2,7]	895	782	667	568	469	356	639	540	427	312
1008	7,9	C13-[Sur]	895	782	667	568	455	342	667	554	441	326
	8	C14-[Val2]	895	782	667	568	469	356	653	554	441	326
	10-12	C14-[Val7]	909	796	681	582	469	356	653	554	441	326
	13	C15-[Val2,7]	909	796	681	582	483	370	639	540	427	312
1022	14-16,18	C14-[Sur]	909	796	681	582	469	356	667	554	441	326
	17	C15-[Val2]	909	796	681	582	483	370	653	554	441	326
	19,20	C15-[Val7]	923	810	695	596	483	370	653	554	441	326
1036	21-23	C15-[Sur]	923	810	695	596	483	370	667	554	441	326
	24	C16-[Val7]	937	824	709	610	497	384	653	554	441	326
1050	25	C15-[AME5]	937	824	713	614	501	388	681	568	455	344
	26-29	C16-[Sur]	937	824	709	610	497	384	667	554	441	326
	30	C17-[Val7]	951	838	723	624	511	398	653	554	441	326
1064	31	C17-[Sur]	951	838	723	624	511	398	667	554	441	326

A surfactin molekulák azonosítását követően összehasonlítottuk a relatív mennyiségüket is. Az egyes variánsokhoz tartozó csúcsok alatti integrált területek százalékos összetételét az alábbi diagram ábrázolja (**20. ábra**).

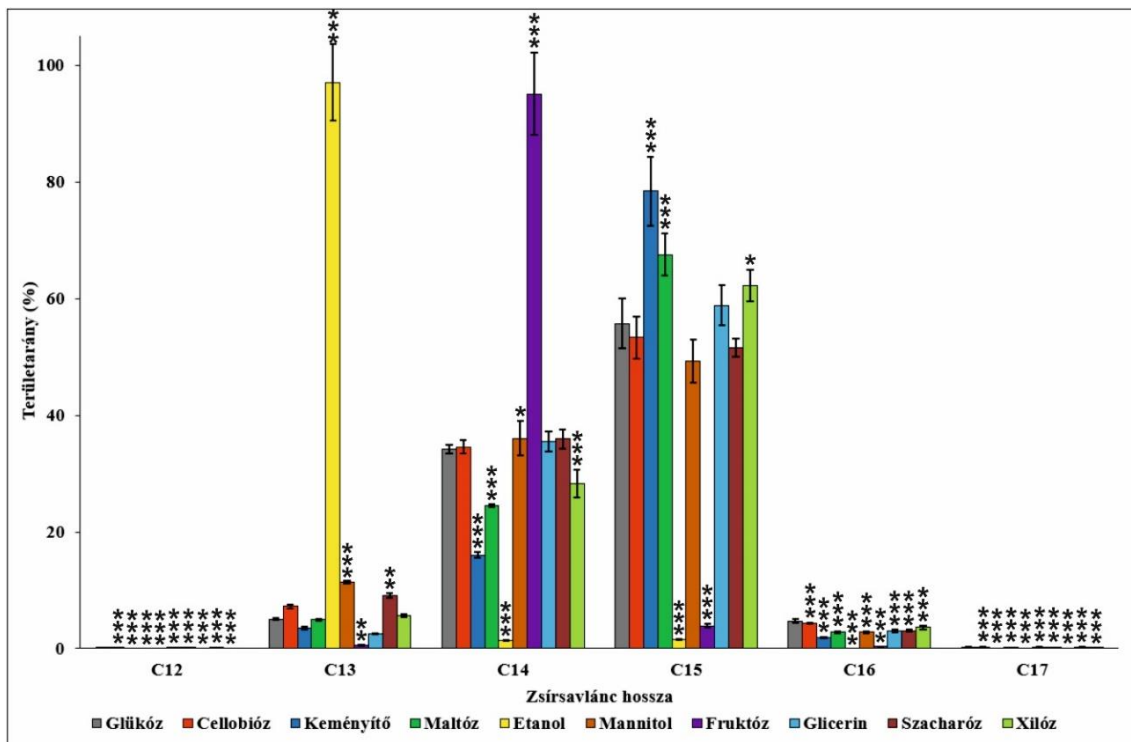


20. ábra A *B. subtilis* 6178J törzs által termelt surfactin variánsok relatív mennyiségi viszonyai a különböző szénforrásokkal módosított mintákban. A glükózhoz képest kapott eltérések szignifikanciáját csillagok jelölik: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

A diagram alapján elmondható, hogy a cellobióz kivételével mindegyik szénforrás pozitív hatással volt a [Sur] variáns szintézisére. A fruktóz, glicerín, keményítő és etanol szénforrások esetében több mint 90%-ban [Sur] keletkezett. A többi tápoldat esetén 20-30%-ban volt jelen a [Val7] molekula. A cellobióz eredményezte a [Val7] legnagyobb arányban való jelenlétét, (28,72%). A cellobióz tartalmú tápoldatban a [Val2] relatív mennyisége is emelkedett az eredeti tápoldat 2,5%-os területarányához képest. A szacharóz és xilóz hatására ezen variánsok százalékos jelenléte a glükózos tápoldathoz képest körülbelül a felére csökkent, a többi esetében azonban ez a mennyiség elhanyagolható volt, vagy nem volt detektálható. A xilóz és a cellobióz a [Val2,7] surfactin képződését segítette elő, a többi mintához képest legalább kétszeres mennyiség található meg bennük. A glicerín nem csak [Sur] variánst eredményezett nagy relatív

mennyiségben, hanem az [AME5] is ebben a mintában volt a legtöbb, bár nem haladta meg a 3%-ot, azonban a többihez viszonyítva kiemelkedően ez volt a legmagasabb érték.

A variánsok relatív mennyiségi vizsgálata során számos szignifikáns hatást figyeltünk meg a tápoldatok szénforrásokkal történő módosításának köszönhetően. Érdekesnek tartottuk megfigyelni molekulák zsírsavláncának szénatomszámában bekövetkező változásokat is, hogy a tápoldatmódosítás hatásainak vizsgálata teljes legyen, ezért elvégeztük az egyes surfactin homológok százalékos arányainak összehasonlítását (21. ábra).



21. ábra Az *B. subtilis* 6178J törzs által termelt surfactin homológok relatív mennyiségi viszonyai a különböző szénforrásokkal módosított mintákban. A glükózhoz képest kapott eltérések szignifikanciáját csillagok jelölik: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

A diagram alapján látható, hogy a C12 és C17-es zsírsavláncok elhanyagolható arányban találhatók meg a mintákban, a C17-es homológ csak az eredeti tápoldatban érte el a 0,3%-ot. A C13 hosszúságú láncok átlagban 2-12%-ban vannak jelen, a fruktóz és az etanol kivételével. Fruktóz tartalmú tápoldat esetében a 0,5%-ot alig haladja meg ez az arány, ezzel szemben etanol hatására ugrásszerű emelkedés figyelhető meg, a mintában található molekulák 97%-a C13 homológ. Hasonlóan kiemelkedő változást a fruktóz

eredményezett a C14-es zsírsavlánc esetében, 95%-os területarányal. Az etanol tartalmú tápoldat hatására képződött a legkevesebb C14 és C15 surfactin homológ, arányuk 2% alatti. Ez utóbbi az eredeti tápoldat esetében 55%, melyet a glicerin, maltóz, xilóz és a keményítő haladja meg. A C16 surfactin molekulák relatív mennyisége csak a glükóz és a cellobióz esetében haladta meg a 4%-ot, ez az érték a többi szénforrás hatására csökkent.

6.2.3. *A szénforrásokkal történő tápoldatmódosítás surfactin termelési profilra gyakorolt hatásainak összehasonlítása a B. subtilis 6179J és 6178J törzsek esetében*

Az előző fejezetben (6.2.2.) részletezett eredmények a tápoldatok szénforrásokkal való módosításának következtében fellépő változások előjelének és szignifikanciájának tekintetében összehasonlításra kerültek a korábban vizsgált *B. subtilis* 6179J törzs által termelt surfactin molekulák relatív mennyiségeire gyakorolt hatásokkal, mind az egyes variánsok, mind a homológok esetében (**5. táblázat**). A sötét háttérrel jelölt [AME5, Val7] és [Lxx4, AME5] variánsok, valamint C12 és C18 homológok nem képezik az összehasonlítás tárgyát, ugyanis ezeket nem detektáltuk mindkét törzs fermentlevegőjében, de a teljesség kedvéért fel vannak tüntetve, hogy átfogó összegzést kaphassunk a korábban ábrázolt diagramokról. Így összesen 45-45 vizsgált adatpár található a variánsok és a homológok esetében is.

Az összehasonlító táblázatból megállapítható, hogy ugyanazon szénforrások alkalmazása a két törzsben a legtöbb esetben eltérő hatást eredményezett, azonban az egyes surfactin variánsok tekintetében 16, a homológoknál pedig 19 olyan adatpár található, melyekben legalább a hatás előjele azonos. Ezek közül 13 és 14 adatpárban a hatás szignifikanciája is megegyezik. Fontos megjegyezni, hogy ezekbe beletartoznak azok az esetek is, amelyeknél az alkalmazott szénforrás nem okozott szignifikáns eltérést. Cellobióznál, maltóznál és mannitolnál a C16, etanolnál az [AME5], glicerinnél a [Val7], az [AME5] és a C17, xilóznál pedig a C15 surfactinok aránybeli változásának az előjele (glicerin – [AME5] és xilóz – C15 esetében pozitív, a többinél negatív) egyezik meg a két törzsben, a szignifikanciák értéke azonban eltérő. Variánsok szempontjából a legtöbb egyezés a szacharóz esetében található a két törzs között ([Sur], [Val7], [Val2,7], [AME5]), a homológok esetében pedig a fruktózzal és a cellobiózzal módosított mintákban 3-3 adatpárnál azonos hatás figyelhető meg, az előbbiben a C14, C16 és C17,

az utóbbiban pedig a C14, C15 és C16 surfactinoknál, habár a legutolsó esetben a szignifikancia nem egyezik meg.

Az összehasonlítás részeként ismét érdemes megemlíteni a *B subtilis* 6179J törzs vizsgálataiban során tett kitekintést, miszerint a fellelhető irodalmi adatok a tápoldatmódosításnak kifejezetten az összes surfactin termelésre gyakorolt hatását vizsgálták, az egyes variánsok és homológok relatív mennyiségi összehasonlítása az alkalmazott analitikai módszerek sajátosságai miatt eddig nem képezte részletes kutatások tárgyát.

5. táblázat A különböző szénforrások *B. subtilis* 6179J és 6178J törzsek surfactin termelési profiljára gyakorolt hatásainak összehasonlítása, a változás előjelen és szignifikanciáján keresztül.

Variánsok		Cellobióz	Keményítő	Maltóz	Etanol	Mannitol	Fruktóz	Glicerín	Szacharóz	Xilóz
6179J	[Sur]	n.sz. [†]	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz. [†]	***
	[Val2]	n.sz.	n.sz.	n.sz.	***	***	*	***	n.sz.	***
	[Val7]	***	*** [†]	n.sz.	*	*** [†]	***	*** [†]	*** [†]	*** [†]
	[Val2,7]	***	*** [†]	*** [†]	*** [†]	*** [†]	***	***	*** [†]	***
	[AME5]	***	***	**	* [†]	***	*** [†]	*** [†]	*** [†]	***
	[AME5, Val7]	*	n.sz.	n.sz.	***	***	***	*	***	***
	[Lxx4, AME5]	**	***	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	***	n.sz.
6178J	[Sur]	n.sz. [†]	***	***	***	**	***	***	n.sz. [†]	n.sz.
	[Val2]	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	[Val7]	***	*** [†]	***	***	*** [†]	***	*** [†]	*** [†]	*** [†]
	[Val2,7]	***	*** [†]	*** [†]	*** [†]	*** [†]	***	***	*** [†]	***
	[AME5]	***	***	***	*** [†]	***	*** [†]	*** [†]	*** [†]	***

Homológok		Cellobióz	Keményítő	Maltóz	Etanol	Mannitol	Fruktóz	Glicerín	Szacharóz	Xilóz
6179J	C13	***	n.sz. [†]	n.sz. [†]	n.sz.	n.sz.	*	***	***	***
	C14	n.sz. [†]	n.sz.	n.sz.	*** [†]	n.sz.	*** [†]	***	***	*
	C15	n.sz. [†]	n.sz.	n.sz.	**	*	***	**	n.sz. [†]	*** [†]
	C16	*** [†]	n.sz.	*** [†]	*	* [†]	*** [†]	*** [†]	n.sz.	*** [†]
	C17	n.sz.	n.sz.	n.sz.	*** [†]	*** [†]	*** [†]	*** [†]	*** [†]	n.sz.
	C18	n.sz.	n.sz.	n.sz.	***	n.sz.	***	n.sz.	n.sz.	***
6178J	C12	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	C13	n.sz.	n.sz. [†]	n.sz. [†]	***	***	**	n.sz.	**	n.sz.
	C14	n.sz. [†]	***	***	*** [†]	*	*** [†]	n.sz.	n.sz.	***
	C15	n.sz. [†]	***	***	***	n.sz.	***	n.sz.	n.sz. [†]	* [†]
	C16	*** [†]	***	*** [†]	***	*** [†]	*** [†]	*** [†]	***	*** [†]
C17	***	***	***	*** [†]	*** [†]	*** [†]	*** [†]	*** [†]	***	

n.sz. – nem szignifikáns; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Piros háttér – negatív hatás; zöld háttér – pozitív hatás. [†] azonos előjelű, de eltérő szignifikanciájú hatás; [†] azonos előjelű és szignifikanciájú hatás.

6.3. Különböző zöldségfélék rizoszférájából izolált *Bacillus* törzsek lipopeptid termelési profiljának vizsgálata

6.3.1. Az alkalmazott tömegspektrometriás módszer fejlesztése

Korábbi munkánk során a surfactinok mennyiségi és minőségi vizsgálatait két különböző műszerrel és módszerrel végeztük el. Míg az egyszerűbben megvalósítható kvantitatív mérésekhez elég volt a fragmentálás nélküli, a különböző molekulák nátrium adduktjainak tömegeire beállított SIM mód alkalmazása, addig a kvalitatív meghatározások a nagyságrendekkel érzékenyebb Thermo OrbiTrap Q Exactive Plus tömegspektrométerrel történtek PRM módban (HPLC-QOTrap). Ez a megvalósítás lehetővé tette a molekulák alapos szerkezeti feltérképezését, viszont a minták két részben történő vizsgálata megnöveli a mérési időtartamot, továbbá a PRM módban történő vizsgálatok során kapott részletes, de bonyolult MS/MS spektrumok analízise is hosszabb időt vesz igénybe. Ez a jelen dolgozatban is alkalmazott nagy mintaszám esetén rendkívül időigényes kísérleti és kiértékelési folyamatot eredményezett volna, ezért a már részletesen megismert fragmentációs mechanizmusok megfigyelése alapján egy gyorsabb és egyszerűbb módszer beállítását tűztük ki célul egy Thermo TSQ Quantum Access készülékre (HPLC-MS/MS). Szükséges azonban kiemelni, hogy egy ilyen összetett és részletes szerkezeti vizsgálat hármaskvadrupól tömegspektrométerre adaptálásához és a technika korlátaihoz történő egyszerűsítéséhez elengedhetetlenek voltak a HPLC-QOTrap módszer által szolgáltatott információk és a surfactin molekulák ezen adatokból nyert tömegspektrometriás „ujjlenyomataik”.

Előzetes tapasztalataink alapján úgy döntöttünk, hogy az új módszerünket érdekesebb a belső fragmensek tömegeire beállítanunk (**6. táblázat**), ugyanis ezek intenzitása jellemzően nagyobb, ezáltal kisebb mennyiségben lehetséges a molekulák detektálása. Valamint, az előzőnél talán még fontosabb tényező, hogy ezek a fragmens ionok nem tartalmazzák a zsírsavláncot, ezáltal függetlenek annak hosszától, és az egyes homológokra egyértelműen lehet következtetni a prekursor ion tömegéből (**7. táblázat**). A táblázatokban felsorolt m/z értékek nem pontos, hanem számolt, reprezentatív tömegeket jelölnek.

Mivel a korábbi kísérleteink alatt az egyes surfactin variánsokat és homológokat kiterjedten megismertük, szerkezetüket alaposan feltérképeztük, vizsgálataink rutin méréseknek tekinthetők, így azokat az ilyen típusú analízisekre alkalmazott HPLC-

MS/MS tömegspektrométeren kívántuk elvégezni. A műszeren végrehajtott előzetes kalibrációk során a hidrogén helyett nátrium adduktok jelenlétét, illetve a fenti ábrán látható vízvesztéssel keletkező y_6 , y_6b_6 , y_6b_5 , y_6b_4 és y_6b_3 fragmens ionok hiányát figyeltük meg, ennek fényében a lehetséges belső fragmentációs mechanizmussal létrejövő ionok m/z értékeinek listáját a **6. táblázat** foglalja össze, az összes eddig azonosított surfactin variáns esetében.

6. táblázat Az egyes surfactin variánsok belső fragmenseinek m/z értékei.

		Belső fragmensek m/z értékei			
		$y_6 + H_2O$	$y_6b_6 + H_2O$	$y_6b_5 + H_2O$	$y_6b_4 + H_2O$
Surfactin variánsok	[Sur]	707	594	481	366
	[Val2]	693	580	467	352
	[Leu4, AME5]	735	622	509	380
	[AME5]	721	608	495	366
	[AME5, Val7]	707	608	495	366
	[Val7]	693	594	481	366
	[Val2,7]	679	580	467	352

7. táblázat A belső fragmentációs mechanizmus első lépéseként lehasadó zsírsavlánc és első aminosav pozícióban található Glu m/z értéke a [Sur] variáns egyes homológjai esetében.

Homológ	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19
m/z ($[M+Na]^+$)	1016	1030	1044	1058	1072	1086	1100	1114
m/z ($[y_6 + H_2O + Na]^+$)	707	707	707	707	707	707	707	707
m/z (C_n -Glu)	309	323	337	351	365	379	393	407

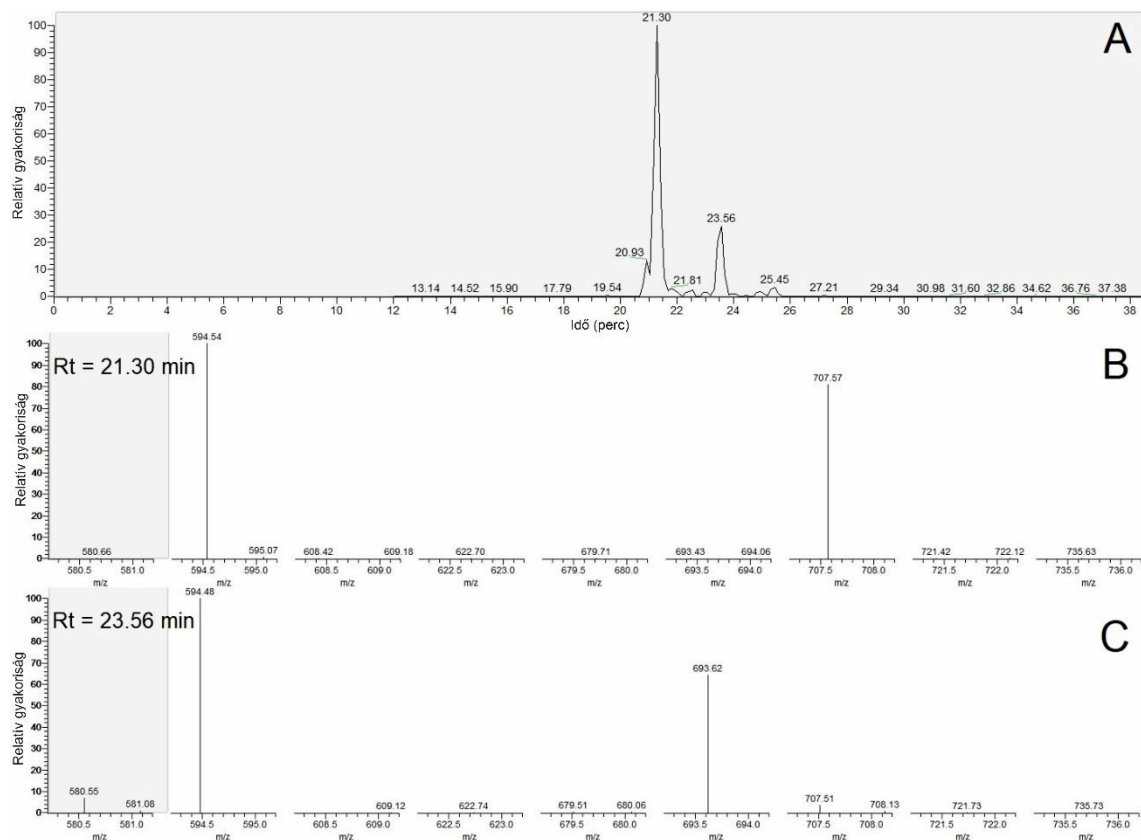
A táblázatok alapján kijelenthető, hogy az egyes variánsok egyértelműen azonosíthatók csupán az $y_6 + H_2O$ és az $y_6b_6 + H_2O$ belső fragmens ionok jelenlétét detektálva, ami azért is kedvező, mert az MS/MS spektrumokon ezek rendelkeznek a legnagyobb intenzitás értékekkel. Mindezen megállapítások után a surfactinok mennyiségét

analízisét azok nátrium addukt ionjainak fő tömegeihez tartozó csúcsok alatti területek integrálásának útján, a pontos minőségi meghatározásokat pedig a homológok tekintetében a prekursor ion és az $y_6 + H_2O$ belső fragmens ionok m/z értékeinek különbségéből, a variánsok szempontjából pedig az $y_6 + H_2O$ és az $y_{6b_6} + H_2O$ fragmens ionok egymással átfedő csúcsainak m/z értékei alapján terveztük elvégezni. Ehhez a hármas kvadrupól analizátoron egy két, gyors egymásutánban váltakozó scan eseményből álló SIM/SRM módszert állítottunk be.

A vizsgálatok kvantitatív, SIM módban végzett scan eseménye során az első kvadrupól analizátorban a nyolc kiválasztott surfactin nátrium addukt ion fő tömeg (1016,7 m/z , 1030,7 m/z , 1044,7 m/z , 1058,7 m/z , 1072,7 m/z , 1086,7 m/z , 1100,7 m/z , 1114,7 m/z) átengedése van beállítva, a második, ütközési cellaként szolgáló kvadrupólban nem történik fragmentálás, a harmadik kvadrupól analizátor pedig nincs feszültség alatt, az összes iont átengedi. A kvalitatív meghatározások céljából beállított SRM módban történő scan eseményben az első kvadrupól a fent említett nyolc „szülőion” egyikét engedi tovább az ütközési cellába, ahol a prekursor ion ütközés indukált disszociáció útján fragmentálódik. Ezalatt a harmadik kvadrupól az általunk beállított öt $y_6 + H_2O$ és négy $y_{6b_6} + H_2O$ termékionnak megfelelő m/z értékű fragmenseket engedi a detektorba. Így összesen 72 átmenetet vizsgálunk SRM módban (**8. táblázat**), 8 prekursor iont pedig SIM módban 0,11 másodperc (ciklusidő) alatt. Az így kapott EIC-okat és MS/MS spektrumokat a **22. ábra** szemlélteti, az analízisek sorrendjében elsőként vizsgált *B. velezensis* SZMC 24980 törzs példáján keresztül.

8. táblázat Az általunk beállított SIM/SRM módban végzett méréshez tartozó összes átmenet, a szülő- és termékionok m/z értékeivel.

SIM mód átmenetei										
Prekurzor ion m/z	1016,7	1030,7	1044,7	1058,7	1072,7	1086,7	1100,7	1114,7		
SRM mód átmenetei										
Szülőion m/z	1016,7									
Termékion m/z	580,7	594,7	608,7	622,7	679,7	693,7	707,7	721,7	735,7	
Szülőion m/z	1030,7									
Termékion m/z	580,7	594,7	608,7	622,7	679,7	693,7	707,7	721,7	735,7	
Szülőion m/z	1044,7									
Termékion m/z	580,7	594,7	608,7	622,7	679,7	693,7	707,7	721,7	735,7	
Szülőion m/z	1058,7									
Termékion m/z	580,7	594,7	608,7	622,7	679,7	693,7	707,7	721,7	735,7	
Szülőion m/z	1072,7									
Termékion m/z	580,7	594,7	608,7	622,7	679,7	693,7	707,7	721,7	735,7	
Szülőion m/z	1086,7									
Termékion m/z	580,7	594,7	608,7	622,7	679,7	693,7	707,7	721,7	735,7	
Szülőion m/z	1100,7									
Termékion m/z	580,7	594,7	608,7	622,7	679,7	693,7	707,7	721,7	735,7	
Szülőion m/z	1114,7									
Termékion m/z	580,7	594,7	608,7	622,7	679,7	693,7	707,7	721,7	735,7	



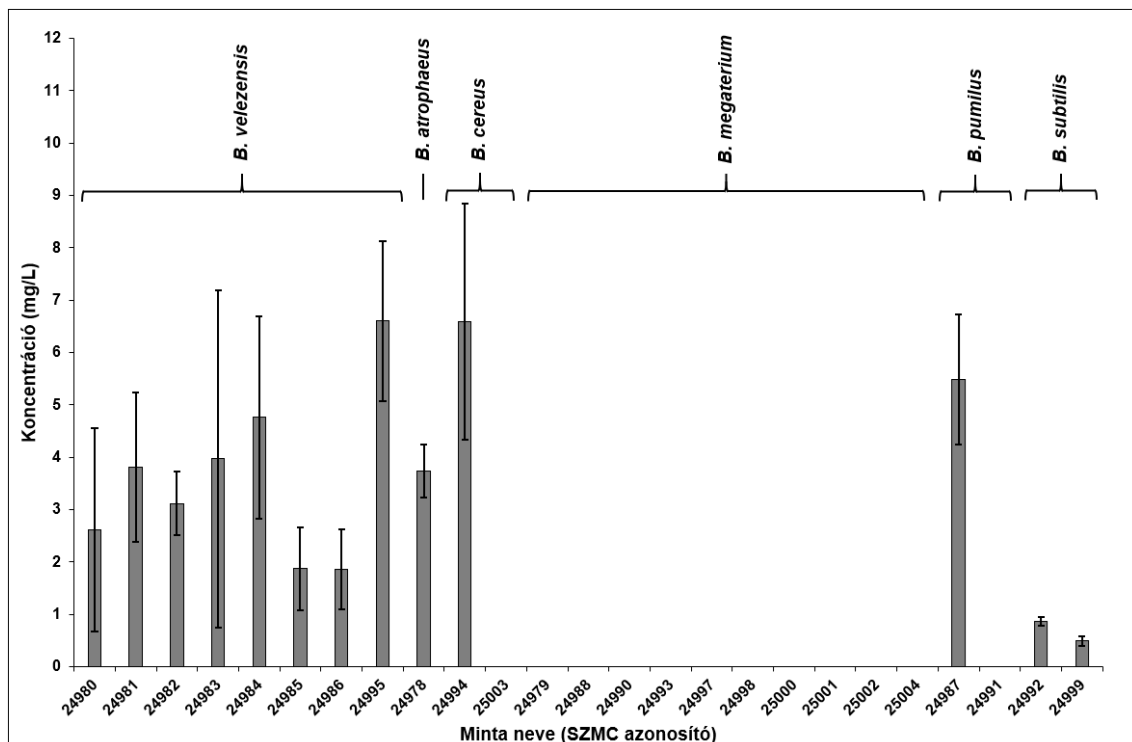
22. ábra A *B. velezensis* SZMC 24980 törzsének EIC-ja (A, $m/z = 1016,7$) és a 21,30. percnél (B), illetve a 23,56. percnél (C) detektált csúcsok MS/MS spektruma.

A **22. ábrát** és a **6-7. táblázatokat** megfigyelve egyszerűen azonosítható mindkét csúcshoz tartozó surfactin molekula. A 21,30 percnél található csúcshoz tartozó MS² spektrumon (**22. B ábra**) 707,57 és 594,54 m/z értékű fragmens ionok detektálhatók. Ez a két ion egyértelműen [Sur] variánst azonosít. Az előbbi, $y_6 + H_2O$ belső fragmens ion tömegét az 1016,7 m/z értékű prekursor ion tömegéből kivonva kapott 309,13 Da tömeg pedig a C12 homológoknak felel meg, így a molekula C12-[Sur] surfactinként azonosítható. Az eljárást a 23,56 percnél található csúcshoz tartozó MS² spektrumon (**22. C ábra**) megismételve C13-[Val7] surfactint kapunk.

6.3.2. Minták surfactin tartalmának kvantitatív analízise

A különböző *Bacillus* fajok és törzseik eltérő összmenyiségű és variánsok, illetve homológok tekintetében változó összetételű surfactinokat termelnek, így a fermentlevek biológiai, környezeti tulajdonságai különböznek egymástól. A baktériumok izolálásának helye szintén fontos szerepet játszhat a termelt lipopeptid molekulák összetételében, amely mezőgazdasági szempontból kiemelkedő szereppel bírhat. Mindezek alapján 4 különböző zöldség (paradicsom, paprika, répa és édesburgonya) rizoszférájából összesen

25 *Bacillus* törzs került izolálásra, melyek a *B. atrophaeus*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis* és *B. velezensis* fajok tagjait alkották. A minőségi és mennyiségi meghatározások egy Shimadzu Nexera XR HPLC rendszerhez kapcsolt Thermo TSQ Quantum Access hármass kvadrupól tömegspektrométerrel történtek (HPLC-MS/MS). Az egyes minták fermentlevegében lévő lipopeptid koncentrációk meghatározását és az eredmények összehasonlítását a surfactin standarddal történő kalibrálás után a SIM módban végzett mérések TIC-jainak integrált csúcsterületeinek kiszámításával végeztük el, a nátriumtartalmú prekursorionok m/z értékeire állítva (23. ábra).



23. ábra Az egyes törzsek fermentlevegiben mért összes surfactin koncentráció.

A vizsgált *B. megaterium* törzsek egyike sem termelt surfactint. A nyolc *B. velezensis* minta extrahált fermentlevei 2-5 mg/l koncentrációtartományban tartalmaztak surfactint, kivéve az SZMC 24995 törzset, amely a vizsgált minták közül a legmagasabb surfactin tartalommal rendelkezett, amelynek koncentrációja majdnem elérte a 7 mg/l-t. A *B. atrophaeus* SZMC 24978 törzs a fent említett törzsek többségéhez hasonló biosurfaktáns-termelő tulajdonságokkal rendelkezett. A *B. cereus* esetében az SZMC 24994 törzs a vizsgált minták közül az egyik legnagyobb mennyiségben termelt surfactint, azonban az SZMC 25003 törzs fermentleve nem tartalmazott surfactint. Hasonló eredmények születtek a *B. pumilus* minták esetében is, ahol az SZMC 24991 törzs nem termelte a vizsgált molekulákat, míg a 24987 törzs fermentleve a harmadik

legnagyobb koncentrációban tartalmazott surfactinokat. Mindkét *B. subtilis* törzsben 1 mg/l alatti bioszurfaktáns szinteket mértünk.

6.3.3. A surfactinok kvalitatív és kvantitatív vizsgálata

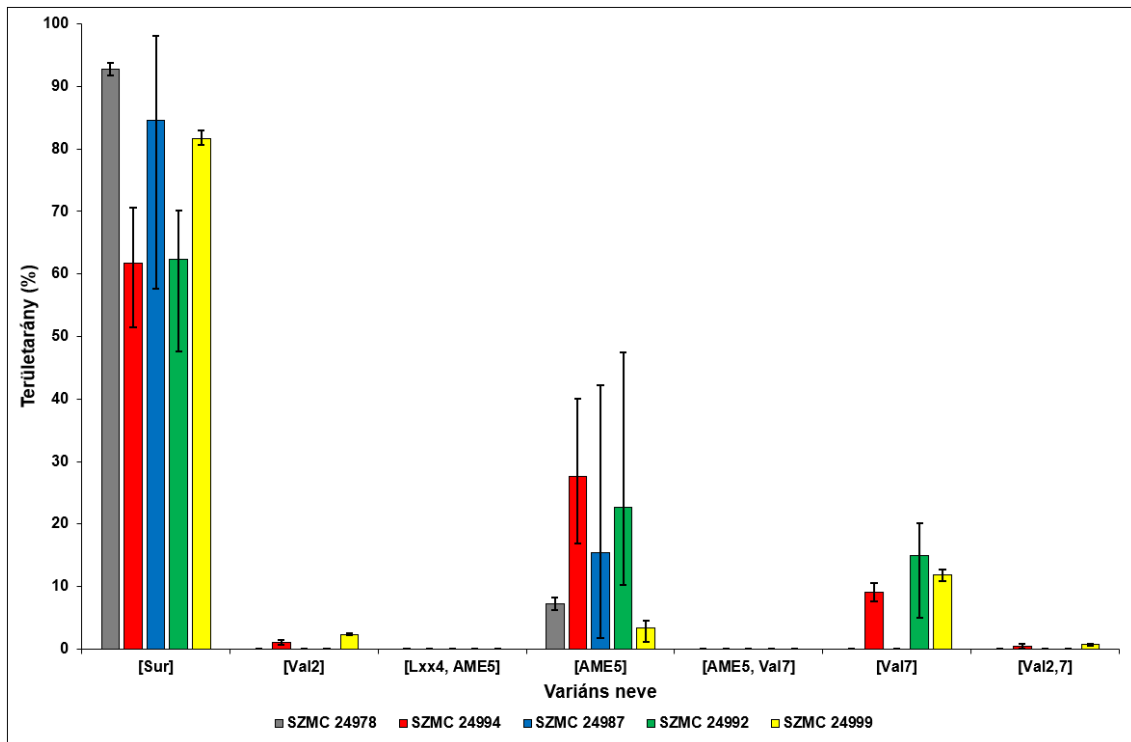
A korábban részletezett módszer alapján elvégeztük a különböző surfactin variánsok azonosítását. Az EIC-ok vizsgálatával az eddig leírt összes surfactint detektálni képes módszerrel azonosítottuk az izolátumok által termelt variánsokat és homológokat, melyek szemi-quantitatív viszonyait hőtésképen ábrázoltuk (**1. melléklet**). 29 különböző szerkezetű surfactin molekulát azonosítottunk, a legtöbbjük (C13/C14/C15-[AME5, Val7], C15-[Val2,7], C16-[Val2], C18-[AME5] többszörös, eltérő retenciós idejű csúccsal, ami a zsírsavláncok elágazásában bekövetkezett változásokra utal. Az egyes molekulákhoz tartozó detektált csúcsok száma egészen szélsőséges tartományban változik, amíg a C13-[AME5, Val7], C14-[AME5, Val7], C15-[AME5, Val7], C15-[Val2,7], C16-[Val2] és C18-[AME5] surfactinok esetében mindössze 1-1 ilyen csúcs volt megfigyelhető, addig 15 különböző retenciós idővel bíró csúcsot azonosítottunk C16-[Sur] surfactinként. Ezen specifikus csúcsok nagy számban való megjelenése következtében a vizsgált mintákban összesen 158 esetben detektáltunk különböző retenciós idővel rendelkező csúcsokat. A legtöbb ilyen csúcs a *B. cereus* SZMC 24994 törzsben fordul elő, ahol 90 különböző surfactin molekulából álló csúcsot (5 variáns, 6 homológ, **9. táblázat**), a *B. atrophaeus* SZMC 24978 törzs MS/MS spektrumát értékelve pedig csak 10 csúcsot detektáltunk (2 variáns, 2 homológ, **9. táblázat**). Érdekes eredmény az utóbbi törzs esetében, hogy fermentleve csak összesen három különböző molekulát - C14-[Sur], C15-[Sur] és C15-[AME5] – tartalmazott, ezek összesített koncentrációja a többi vizsgált *Bacillus* törzshöz képest átlagon felülinek bizonyult (**23. ábra**). Míg a detektált surfactin csúcsok száma *B. atrophaeus*, *B. cereus*, *B. pumilus* és *B. subtilis* mintáiban széles tartományban változik (10, 90, 36, 45, 24 darab az SZMC 24978, 24994, 24987, 24992 és 24999 mintákban), addig a *B. velezensis* törzsekben egy sokkal szűkebb, 41-55 csúcs közötti előfordulást detektáltunk. Az egyetlen kivétel az SZMC 24995 törzs vizsgálata során volt megfigyelhető, ugyanis ennek fermentlevében összesen 84 különböző surfactin molekulát azonosítottunk, továbbá a lipopeptid profil hasonlít a *B. cereus* SZMC 24994 extraktumában megfigyelthez. Bár a két törzs eltérő fajokhoz tartozik, érdemes megjegyezni, hogy mindkettő ugyanazon mezőgazdasági területről (Csantavér, Szerbia), paradicsomok rizoszférájából lett izolálva.

9. táblázat A különböző *Bacillus* törzsekben található, az egyes surfactin molekulákhoz tartozó, de eltérő retenciós időkkel rendelkező csúcsok száma.

Homológ	Variáns	Csúcsok száma												
		SZM/C 24980	SZM/C 24981	SZM/C 24982	SZM/C 24983	SZM/C 24984	SZM/C 24985	SZM/C 24986	SZM/C 24985	SZM/C 24978	SZM/C 24994	SZM/C 24987	SZM/C 24992	SZM/C 24999
C12	[Sur]	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	4	0	0
	[AME5]	1	1	2	1	2	2	1	0	0	0	0	0	0
C13	[Sur]	1	1	2	2	2	1	2	4	0	5	6	5	2
	[Val2]	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	[AME5]	2	1	1	3	2	2	2	0	0	2	0	0	0
	[AME5, Val7]	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	[Val7]	1	0	2	1	2	1	0	6	0	3	0	4	0
C14	[Sur]	5	4	5	4	4	5	5	7	3	6	8	6	4
	[Val2]	0	0	0	2	0	1	1	0	0	3	0	0	1
	[AME5]	3	3	3	3	3	3	3	0	0	5	0	0	2
	[AME5, Val7]	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	[Val7]	4	4	4	3	4	3	2	7	0	7	0	0	3
	[Val2,7]	0	0	2	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0
C15	[Sur]	3	3	5	4	5	6	6	8	3	6	3	8	3
	[Val2]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	[AME5]	4	6	6	5	5	4	4	7	4	8	6	3	2
	[AME5, Val7]	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	[Val7]	2	3	2	1	4	2	2	9	0	6	0	6	1
	[Val2,7]	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
C16	[Sur]	4	5	5	5	4	3	4	10	0	12	9	9	3
	[Val2]	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	[Lxx4, AME5]	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	[AME5]	4	4	4	4	4	4	4	11	0	10	0	4	0
	[AME5, Val7]	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	[Val7]	2	0	3	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0
C17	[Sur]	2	3	3	3	4	3	2	7	0	7	0	0	0
	[AME5]	2	2	2	2	2	2	3	4	0	5	0	0	0
	[Val2,7]	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
C18	[AME5]	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Összesen:		41	48	55	46	49	47	45	84	10	90	36	45	24

6.3.4. Az egyes törzsek surfactin termelési profiljainak összehasonlítása

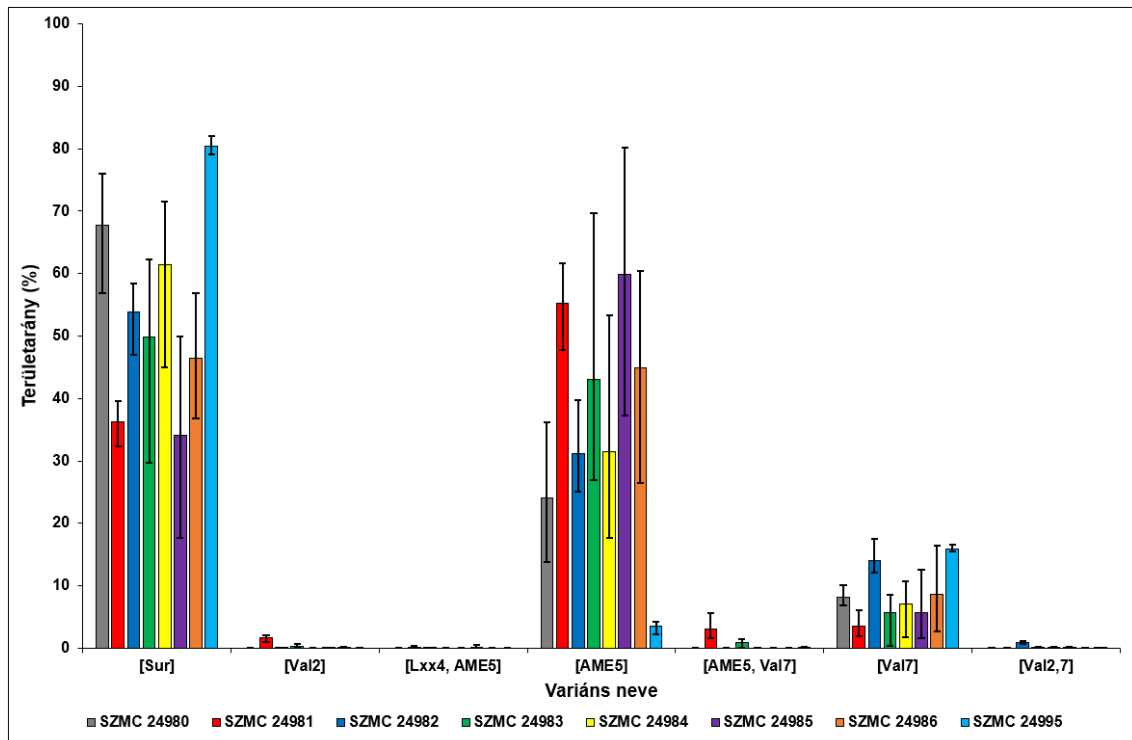
A különböző surfactin variánsok és homológok sikeres azonosítása után megvizsgáltuk relatív mennyiségi viszonyait (24-27. ábra). A diagramok alapján egyértelműen megfigyelhető, hogy a *B. atrophaeus*, *B. cereus*, *B. pumilus* és *B. subtilis* törzsek között a [Sur] molekulák relatív mennyisége a legdominánsabb. Ennek mennyisége minden esetben meghaladta a 60%-ot, és az SZMC 24978 törzsben még 90% fölé is emelkedett (24. ábra). A második legnagyobb területarányú változat az [AME5], kivéve az SZMC 24999 törzs esetében, ami nagyobb mennyiségben termelt [Val7] surfactinokat. A [Val2] és [Val2,7] változatok területarányai közel elhanyagolhatóak voltak, a [Leu4, AME5] és [AME5, Val7] surfactinok pedig nem is voltak kimutathatók az említett négy *Bacillus* faj mintáiban.



24. ábra A *B. atrophaeus* SZMC 24978, *B. cereus* SZMC 24994, *B. pumilus* SZMC 24987 és *B. subtilis* SZMC 24992, SZMC 24999 törzsek által termelt összes surfactin variáns relatív mennyiségi aránya.

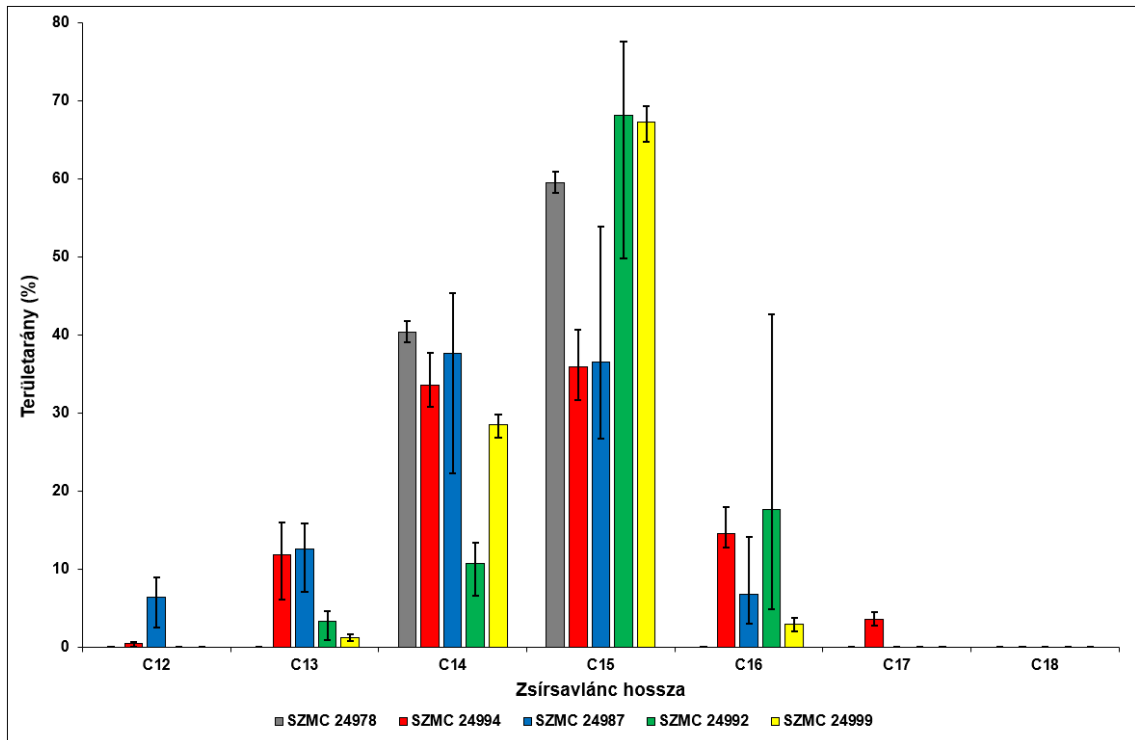
A *B. velezensis* minták esetében is a [Sur], [AME5] és [Val7] variánsok a legnagyobb relatív mennyiséggel rendelkező surfactin molekulák, azonban [Sur] és [AME5] arányai az SZMC 24995 törzs kivételével sokkal hasonlóbbak. Az [AME5] variáns még a [Sur] molekulákat is meghaladja területarány tekintetében az SZMC 24981

és SZMC 24985 törzsekben (**25. ábra**). A [Val7] molekulák is nagyobb relatív mennyiségben termelődtek, ugyanakkor csak az SZMC 24982 és SZMC 24995 törzsekben haladták meg a 10%-ot. A többi surfactin variáns területaránya minden mintában 4% alatt maradt, a legtöbb esetben még az 1%-ot sem érte el.



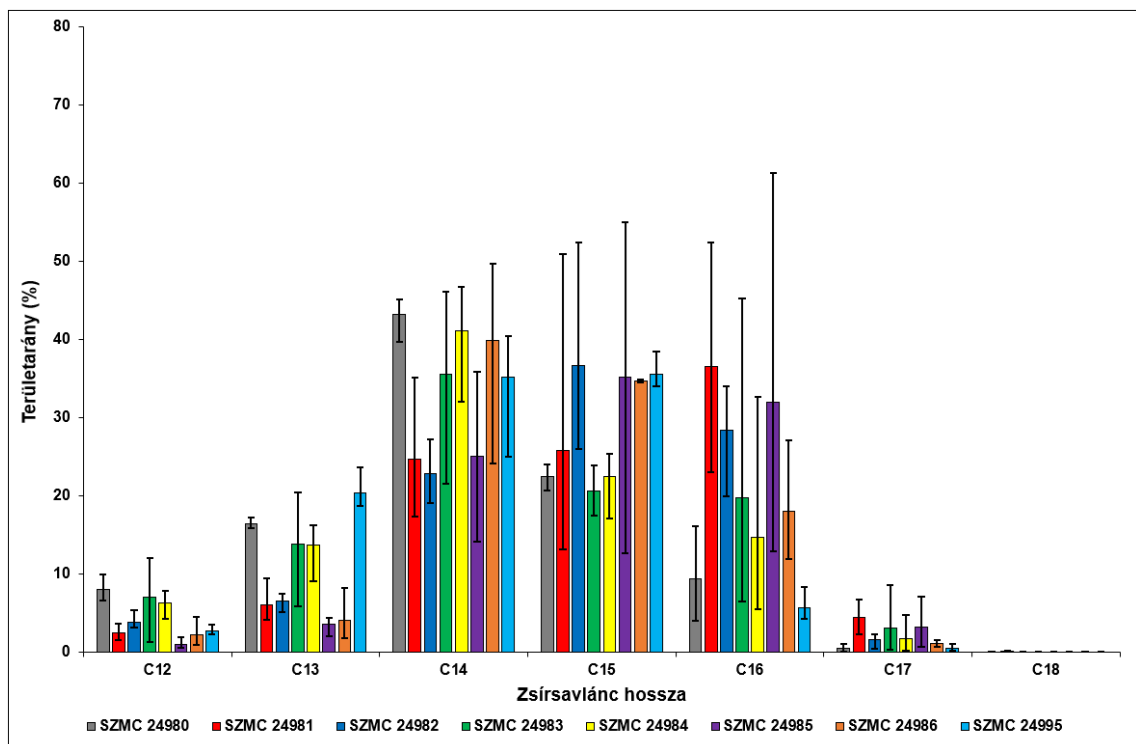
25. ábra A *B. velezensis* törzs által termelt összes surfactin variáns relatív mennyiségi aránya.

Megfigyelve a különböző surfactin homológok relatív mennyiségét a *B. atrophaeus*, *B. cereus*, *B. pumilus* és *B. subtilis* törzsekben, jól látszik a C14 és C15 molekulák dominanciája, ahol csak az SZMC 24992 törzs kivétel, amelyben a C15 surfactinok után a C16 homológok rendelkeznek a második legnagyobb területarányal (**26. ábra**). A *B. atrophaeus* SZMC 24978 törzs fermentlevében a korábbi eredményekhez hasonlóan fordultak elő más homológok. A *B. cereus* törzs esetében a C18 surfactinok kivételével mindegyik homológ (C12-C17) előfordulását detektáltuk, míg a *B. subtilis* mintákból hiányoztak a C12, C17 és C18 molekulák. Mindkét *B. subtilis* törzs (SZMC 24992, SZMC 24999) 70% körüli relatív mennyiségben termelt C15 homológokat, ami az összes többi mintához képest a legnagyobb.



26. ábra A *B. atrophaeus* SZMC 24978, *B. cereus* SZMC 24994, *B. pumilus* SZMC 24987 és *B. subtilis* SZMC 24992, SZMC 24999 törzsek által termelt összes surfactin homológ relatív mennyiségi aránya.

A *B. velezensis* törzsekre kapott eredmények szerint a C16 homológok területarányai meghaladják C14 és C15 molekulákét, az SZMC 24981 törzsben ezek voltak megfigyelhetők a legnagyobb relatív mennyiségben (**27. ábra**). Ez az egyetlen minta, amelyben C18 homológokat is kimutattunk, igaz, csupán mindössze 0,05%-os arányban, míg az összes többi, 12 és 17 szénatom közötti zsírsvlánc-hossz minden törzsben jelen volt.



27. ábra *A. B. velezensis* törzs által termelt összes surfactin homológ relatív mennyiségi aránya.

Ahogy azt a korábbi kísérletek diszkusziójánál kiemeltük, a jelenleg fellelhető irodalmi adatok meglehetősen hiányosak a különböző baktériumtörzsek által termelt surfactin molekulák részletes azonosítása és relatív mennyiségi viszonyainak feltérképezése terén, mely a témában folytatott kutatások céljának, valamint a korábban alkalmazott analitikai technikák korlátainak tudható be. Emiatt az ebben a fejezetben bemutatott, számos *Bacillus* törzsre kiterjedő, az egyes surfactin molekulák pontos azonosítását sikeresen megvalósító és azok relatív mennyiségi viszonyait részletesen bemutató vizsgálatok jelenleg egyedinek számítanak a szűk tudományterületen belül, és kiindulópontot nyújthatnak a hasonló irányú, vagy akár a surfactin vegyületcsaládon belül egy-egy adott molekula esetlegesen sajátos biológiai hatásainak feltérképezését megcélzó kutatásoknak.

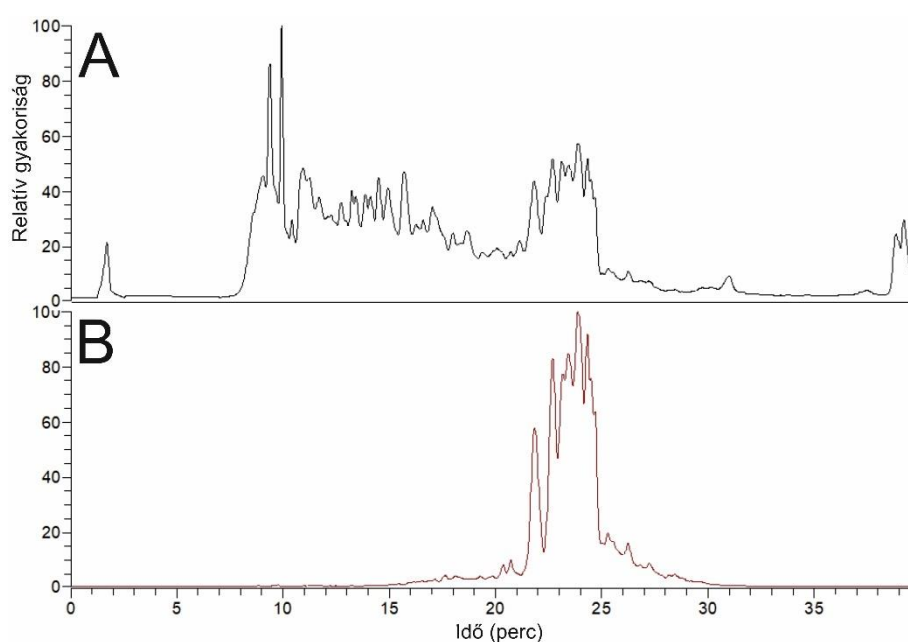
6.4. A *B. subtilis* 6179J törzs által termelt surfactin vegyületek tisztítása preparatív analitikai módszerekkel

Az előző fejezetekben leírt vizsgálatok egyik célja a különböző szénforrásokkal és fémionokkal kiegészített tápoldatok *B. subtilis* törzsek surfactin termelési sajátosságaira gyakorolt hatásainak vizsgálata volt. Célul tűztük ki továbbá a nagy számban detektált surfactin molekulák azonosítását és szerkezeti feltérképezését, valamint a különböző *B.* fajok törzseinek lipopeptid termelési profilanalízisét. Eredményeinket felhasználva megkíséreltük a fermentlevek szennyezőktől való megtisztítását, illetve a különböző surfactin molekulák egymástól történő kromatográfiás elválasztását. Kísérleteink megvalósításához a *B. subtilis* 6179J törzset választottuk, mivel kutatócsoportunk korábbi munkáinak tárgyát is ez a törzs képezte [8, 12], emiatt lipopeptid termelési profiljáról több információval rendelkezünk.

Az előtisztításhoz flash kromatográfiát, illetve preparatív HPLC-t alkalmaztunk, míg az alaposabb elválasztást félpreparatív HPLC technikával valósítottuk meg, folyamatos frakciógyűjtés mellett. Az egyes, kémcsövekbe gyűjtött minták tisztaságát HPLC-HESI-HRMS készüléken vizsgáltuk.

6.4.1. A nyers surfactin extraktum analízise

A lipopeptidek fermentléből történő extrahálása után a nyers extraktum tisztaságát HPLC-HESI-MS vizsgálattal határoztuk meg, full MS módban (28. ábra).

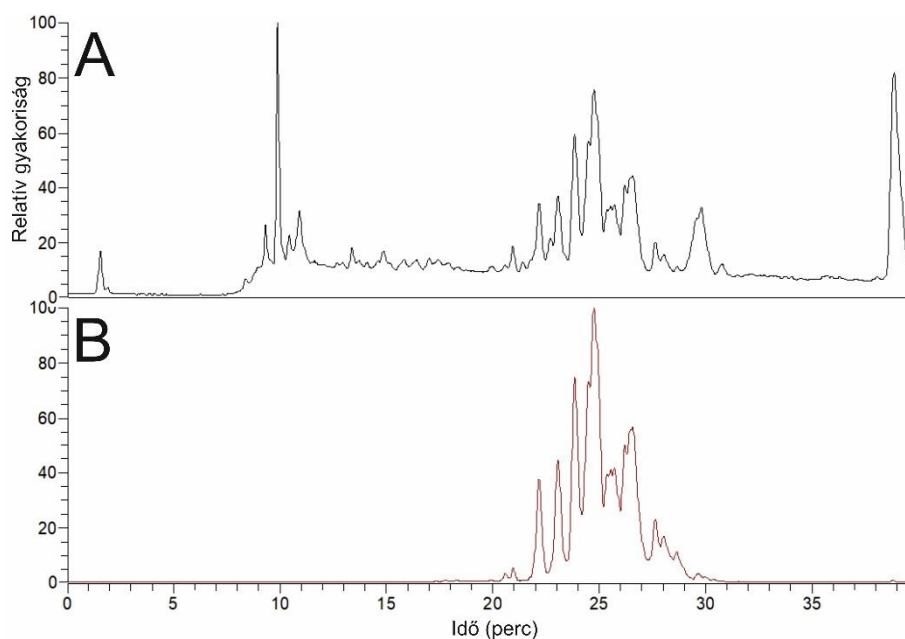


28. ábra A nyers extraktum TIC-ja (A) és a surfactinok EIC-ja (B).

Ahogy az a nyers extraktum TIC-ján is látható (**28A. ábra**), nagy mennyiségű szennyezés jelent meg főként az alacsonyabb retenciós időknél. Standard oldatsorozattal történő kalibrálást követően a minta surfactinokhoz tartozó összes m/z értéket tartalmazó EIC-ján (**28B. ábra**) lévő csúcsterületeket kiintegálva kapott koncentráció segítségével kiszámoltuk a nyers extraktumban lévő surfactin mennyiségét (105,07 mg), amelynek aránya 21,4% volt az extraktum mért össztömegéhez (387,17 mg) képest.

6.4.2. A nyers extraktum flash kromatográfiás tisztítása

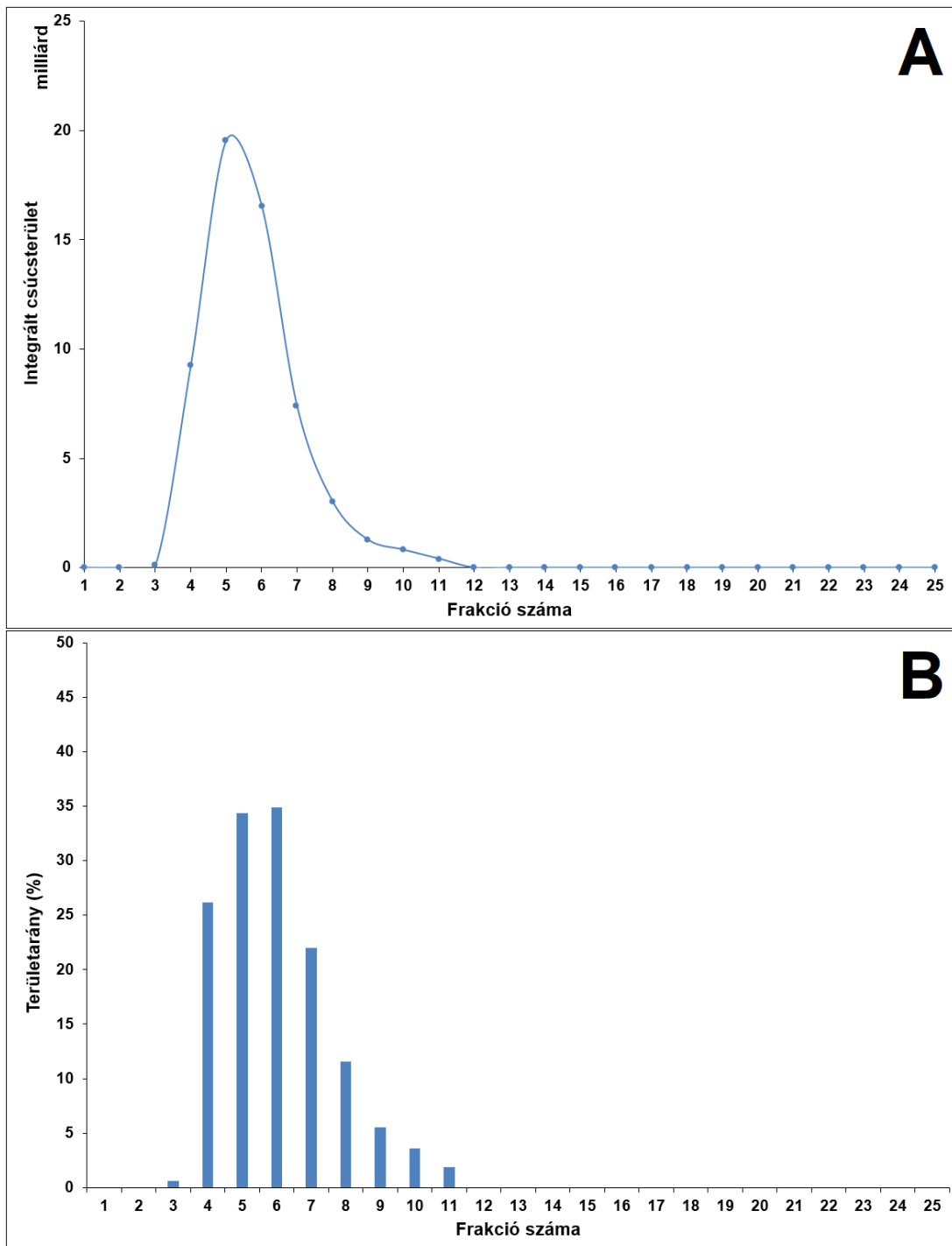
A flash kromatográfiás elválasztás minden frakcióját összegyűjtöttük, majd azok surfactin tartalmát és tisztaságát HPLC-HESI-MS technikával vizsgáltuk full scan módban. Egy ilyen frakció vizsgálata során eredményül kapott TIC és a surfactinok m/z értékeire beállított EIC a **29. ábrán** látható.



29. ábra A preparatív flash kromatográfiás elválasztás 6. frakciójának TIC-ja (A) és a detektált surfactinok EIC-ja (B).

Megfigyelhető, hogy bár a szennyező anyagok relatív mennyisége jelentősen csökkent, a tíz perc körüli csúcs még mindig meghaladja a felületaktív anyagok intenzitását. Mind a TIC (**29A. ábra**), mind az EIC (**29B. ábra**) integrált csúcsterületeinek kiszámítása alapján valamennyi frakcióból meghatároztuk a surfactinok relatív mennyiségét és tisztaságát (**30. ábra**). Ezen eredmények alapján a 4-7. frakciókat együtt gyűjtöttük össze, míg a többit elvetettük. A surfactinok aránya ebben az összevont

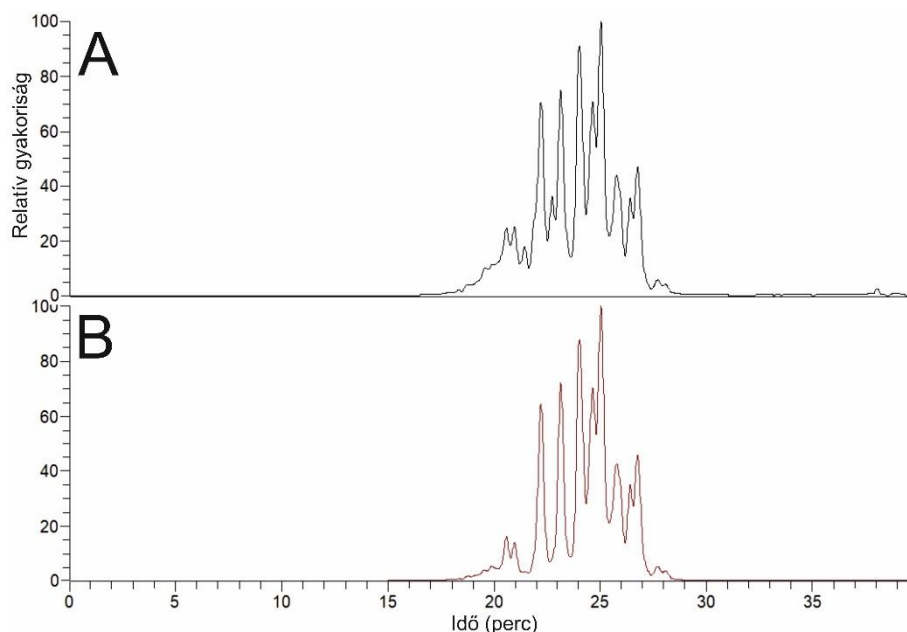
mintában 30,4% volt. A további szennyezőktől való megtisztítás érdekében preparatív HPLC elválasztást végeztünk el a 4 – 7. frakciók összesítésével kapott mintán.



30. ábra A preparatív flash kromatográfias elválasztás egyes frakcióiban található összes surfactin integrált csúcsterülete (A) és azok százalékos területaránya (B).

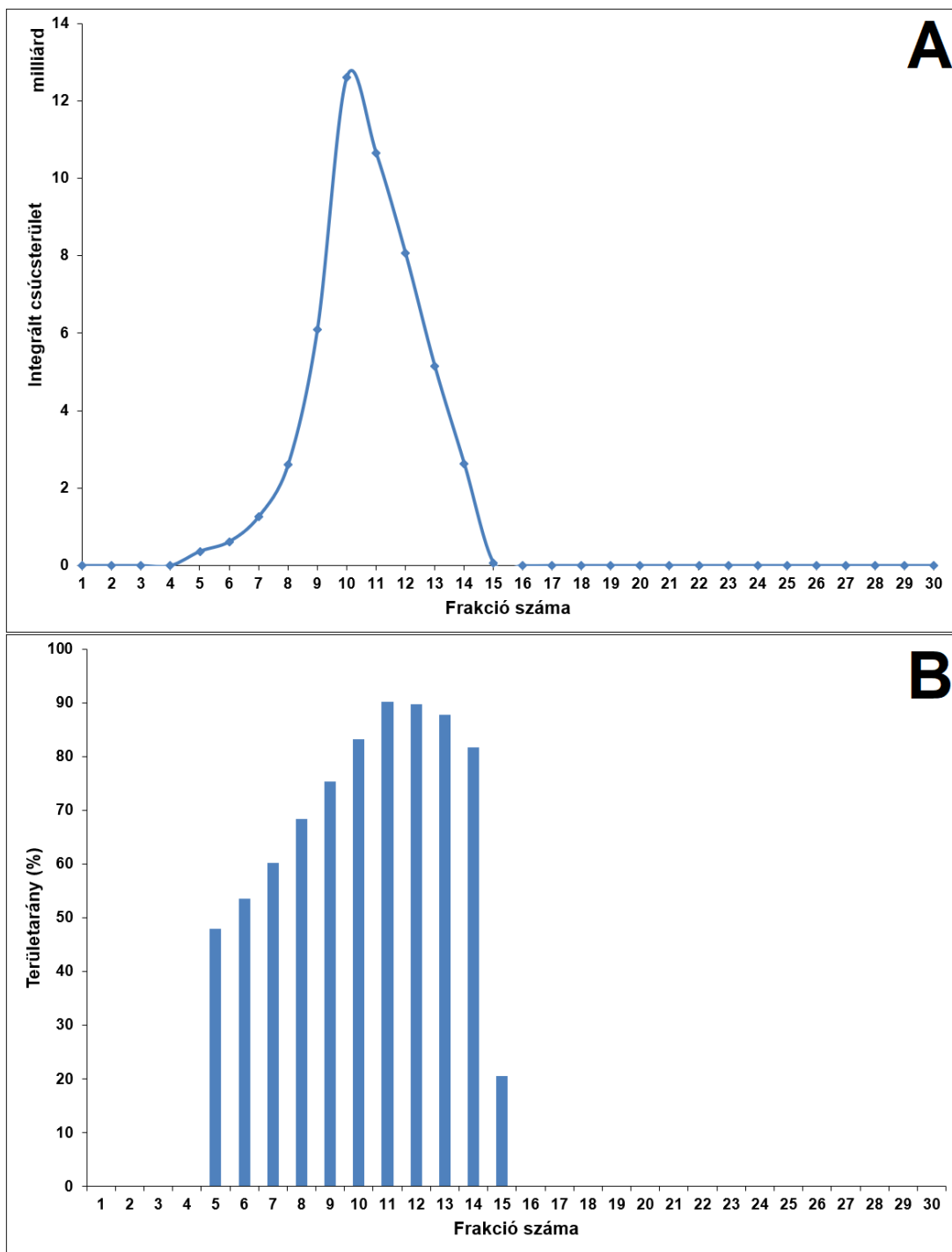
6.4.3. A minta preparatív HPLC elválasztása

A preparatív HPLC elválasztást követően kapott 30 frakciót összegyűjtöttük, és HPLC-HESI-MS vizsgálatokkal meghatároztuk azok relatív surfactin tartalmát és tisztaságát. A 10. frakció TIC-ja és a mintában található surfactinok EIC-ja a **31. ábrán** látható.



31. ábra A preparatív HPLC elválasztás során gyűjtött 10. frakció TIC-ja (A) és a detektált surfactinok EIC-ja (B).

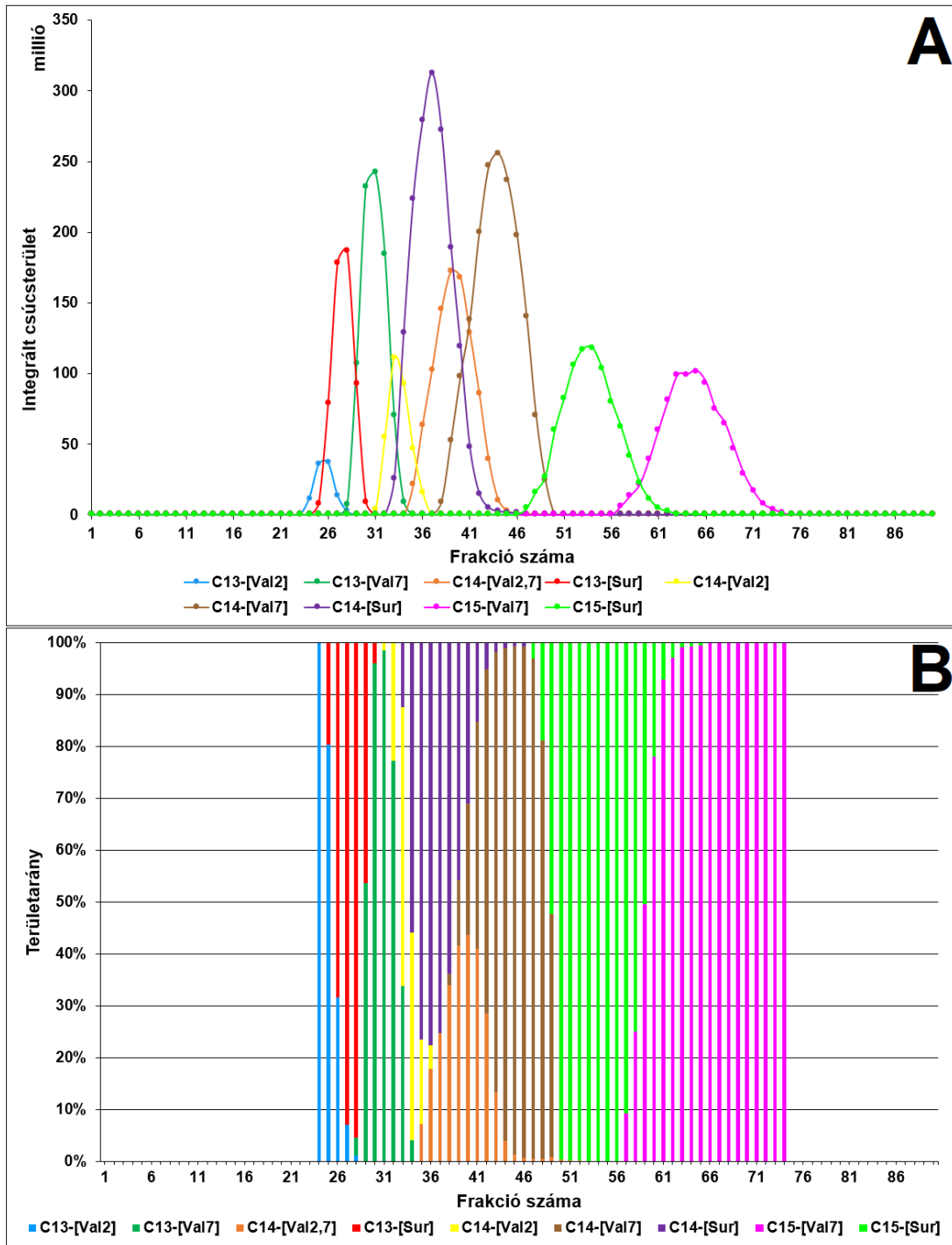
A kromatogramokat összehasonlítva egyértelműen látható, hogy a surfactinokat sikerült elválasztani a szennyeződések nagy részétől, az összes alacsonyabb retenciós idővel rendelkező csúcs eltűnt, csak néhány kisebb szennyeződés volt megfigyelhető a lipopeptidek csúcsai között. A frakciók kiértékelése után kiszámítottuk a surfactinok csúcsterületeit és azok arányait (**32. ábra**) és a 9-13. frakciókat összevontuk. A minta végső surfactin tartalma 85,39% volt. Utolsó lépésként egy félpreparatív HPLC elválasztást végeztünk el a különböző surfactin variánsok és homológok izolálásának céljából.



32. ábra A preparatív HPLC elválasztás során kapott frakciók integrált csúcsterületei (A) és területarányai (B).

6.4.4. *A tisztított minta félpreatatív HPLC elválasztása és a kapott frakciók surfactin tartalmának vizsgálata*

A félpreatatív HPLC elválasztást követően a detektált surfactin molekulák vizsgálatát és azok relatív mennyiségi meghatározását egy HPLC-HESI-HRMS technikával végeztük el SRM és full MS módokban (**33. ábra**).

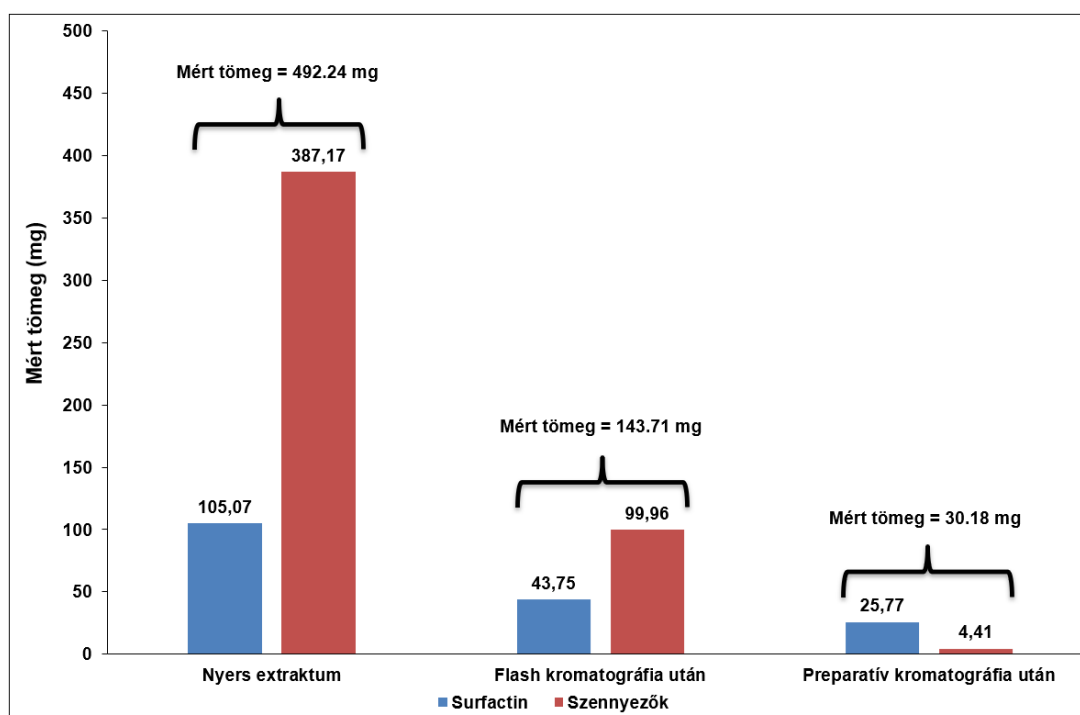


33. ábra A félpreparatív HPLC technikával elválasztott, majd tömegspektrometriával azonosított surfactin molekulák integrált csúcsterületei (A) és fraktogramja (B).

A félpreparatív HPLC elválasztással kapott összes frakció MS² spektrumának vizsgálatával összesen kilenc molekulát azonosítottunk négy különböző aminosav szekvenciával ([Sur], [Val2], [Val7], [Val2,7]) és három különböző hosszúságú zsírsavlánccal (C13-C15). A kilenc variáns közül csak a C13-[Val2], C15-[Val7] és C15-[Sur] molekulák voltak kimutathatók 95%-nál nagyobb arányban egy-egy frakcióban. A

C15-[Val7], C14-[Val2,7], C13-[Sur], C14-[Val2], C14-[Val7] és [C14-Sur] surfactinok esetében a legtisztább frakciók aránya 98,55%, 43,66%, 95,34%, 53,81%, 98,69% és 77,54% volt.

Minden tisztítási lépés után az összegyűjtött és egyesített frakciókat bepároltuk, és megmértük a tömegét. A surfactinok és egyéb szennyeződések tömegét a HPLC-HESI-MS-elemzések megfelelő csúcsterület-arányai alapján számoltuk ki, így kaptuk meg a különböző tisztítási lépések hatékonyságát (**34. ábra**).



34. ábra A szárazanyagok mért tömege az egyes elválasztási lépések után, valamint a surfactinok és a szennyező anyagok számított tömege a HPLC-HESI-MS mérések csúcsterület-arányai alapján.

A csúcsterületek arányát tekintve a teljes terület 21,4%-a a nyers extraktumban a surfactinokhoz tartozott. Ez a flash-kromatográfias elválasztás után 30,4%-ra nőtt, majd a preparatív HPLC-s tisztítás pedig 85,4%-ra emelte a surfactinok arányát.

Ezen adatok és a mért szárazanyagtömegek alapján a szennyeződések 74,2%-át a flash-kromatográfiával távolítottuk el, a fennmaradó szennyeződések 95,6%-át pedig a preparatív HPLC során tisztítottuk ki, így a mintában lévő szennyeződések teljes mennyiségének mindössze 1,2%-a maradt meg. A preparatív flash-kromatográfiával a surfactinok 58,4%-át is elvesztettük, amit a preparatív HPLC elválasztási lépés tovább

csökkentett 41,1%-kal. Így a mintában maradt felületaktív anyagok számított mennyisége csak 24,53%-a volt a nyers extraktumnak. Ez lehet a magyarázata annak, hogy a félpreparatív HPLC elválasztás frakcióiban csak 9 különböző surfactin variánst detektáltunk, annak ellenére, hogy ez a törzs sokkal nagyobb számban és variációban termel különböző variánsokat és homológokat, amelyek a tisztítási folyamat során elveszhetnek. Különösen a hosszabb zsírsavláncokkal rendelkező molekulák elvesztése utal arra, hogy ezeket a később gyűjtött frakciókkal együtt elvesztettük, továbbá az, hogy kisebb területarányokkal rendelkeztek, mint az összegyűjtött és összevont frakciókban található többi lipopeptid.

7. Összefoglalás

A gyűrűs lipopeptidek, köztük a surfactinok iránt az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb érdeklődés alakult ki jelentős felületaktív tulajdonságuk miatt, valamint széleskörű biológiai aktivitásuknak, köztük anti-mikoplazmás, tumorellenes, gyulladáscsökkentő és antivirális hatásuknak köszönhetően. Számos kutatás célozta meg terápiás, környezeti, illetve mezőgazdasági alkalmazhatóságuk vizsgálatát. Megállapították, hogy az egyes *Bacillus* fajok és törzsek típusa, valamint a tenyésztési körülményeinek változtatása hatással van a baktériumok surfactin termelési sajátságaira. Ezek a kutatások elsősorban az előállított surfactin vegyületek mennyiségének növelését célozták meg, azonban a vegyületcsoport nagy számú, egymástól különböző molekulákból áll. Ezen vegyületek között szerepelnek a változatos szénatomszámú zsírsavlánccal bíró homológok és az eltérő aminosav-összetételű heptapeptid gyűrűvel rendelkező variánsok, melyek szerkezetüktől függően más-más hatással lehetnek a biológiai aktivitásokra. Ezeknek variánsoknak és homológoknak a baktériumok fermentlevében mérhető aránya szintén változhat az adott *Bacillus* törzs típusa és a tenyésztési körülmények függvényében, azonban ezekről a relatív mennyiségi hatásokról a korábbi kísérletek eltérő céljai és az alkalmazott analitikai módszerek miatt kevés információval rendelkezünk. Kutatócsoportunk munkájának fő célja ezen kvalitatív és relatív kvantitatív viszonyok feltérképezése volt, melyet a különböző *Bacillus* törzsek surfactin termelési profilanalízisének keresztül, HPLC-MS technikákkal kívántunk megvalósítani.

A *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs eredetileg glükózt tartalmazó tápoldatát cellobióz, etanol, keményítő, maltóz, mannitol, fruktóz, szacharóz, glicerin és xilóz szénforrásokkal módosítottuk, valamint mangán-, réz- és nikkelfémionokkal egészítettük ki, majd összehasonlítottuk a termelt surfactinok relatív mennyiségi viszonyait, azok fermentlevében detektálható összetételében fellépő különbségeket vizsgálva. Ezen vizsgálatokra egy HPLC-ESI-IT-MS technikát alkalmaztunk, amellyel sikeresen azonosítottuk a mintákban található surfactin molekulákat. A detektált vegyületeket eltérő aminosav szekvenciájú variánsaik és változó hosszúságú zsírsavláncaik szerint csoportosítottuk, majd elvégeztük ezen csoportok relatív kvantitatív összehasonlítását. Azt tapasztaltuk, hogy az alkalmazott szénforrás változtatása hatással volt a termelt molekulák arányára, némely esetben egyértelműen megfigyelhető szelektivitást mutatva,

a különböző fémionokkal történő tápoldatkiegészítés pedig sokkal markánsabb változásokat okozott a surfactin termelési profilokban, ezekben a mintákban az ötödik aminosav pozícióban AME-t tartalmazó molekulák voltak a legnagyobb arányban detektálhatók. Emellett a fémionok elősegítették a hosszabb zsírsavlánccal bíró surfactinok domináns jelenlétét, az azonosított molekulák kétharmada C16, C17 és C18 homológok voltak.

A fenti vizsgálatokat megismételtük egy másik *B. subtilis* törzs (SZMC 6178J) lipopeptid termelési profiljára gyakorolt hatások megfigyelése céljából. A tápoldatkiegészítő fémionok számát bővítettük a vas- és cink ionjaival, illetve ezúttal standard kalibráló oldatsorozat segítségével az egyes lipopeptidek abszolút koncentrációját is meghatároztuk. A kvantitatív és kvalitatív vizsgálatok céljából HPLC-QOTrap technikát alkalmaztunk. A mennyiségi meghatározások során azt tapasztaltuk, hogy a fruktóz, szacharóz, mannitol, cellobióz és xilóz alkalmazása nem volt szignifikáns hatással, a glicerin, maltóz, keményítő és etanol pedig csökkentette a termelt lipopeptidek mennyiségét. További érdekes eredmény, hogy a korábbi tapasztalatokkal és irodalmi adatokkal ellentétben fémek hatására gyakorlatilag megszűnt a baktérium lipopeptid termelése. Ezután összehasonlítottuk az egyes vegyületcsaládok mennyiségi viszonyait is. A legtöbb fermentlében a surfactin koncentrációja volt a legnagyobb. Az iturin és fengycin termelésére nem volt igazán pozitív hatással egyik tápoldat sem. A fémionokkal módosított mintákban egyedül iturin volt detektálható, az is elhanyagolható mennyiségben. A kvalitatív MS/MS vizsgálatokat a surfactinokon végeztük el. Megfigyeltük, hogy a cellobióz kivételével mindegyik szénforrás pozitív hatással volt a [Sur] variáns szintézisére, az [AME5] molekula azonban az SZMC 6179J törzshöz képest elenyésző relatív mennyiségben volt detektálható mindegyik minta esetében. Az egyes homológok tekintetében érdekes eredmény volt, hogy az etanol a C13, a fruktóz pedig a C14 surfactinok rendkívül szelektív termelését indukálta. A tápoldatmódosítás hatásainak előjelét és szignifikanciáját összehasonlítottuk az SZMC 6179J törzsnél kapott eredményekkel, a variánsok és homológok esetében összesen 45-45 vizsgált adatpárból 16, illetve 19 olyan található, melyekben legalább a hatás előjele azonos.

A különböző zöldségfélék rizoszférájából izolált *Bacillus* törzsek surfactin termelési profilanalízisére egy kombinált SIM/SRM tömegspektrometriás módszert fejlesztettünk, mely képes szimultán kvantitatív és kvalitatív adatot szolgáltatni. Összesen 25 törzset vizsgáltunk meg, melyből 13 termelt surfactint 0,5 – 6,6 g/l koncentrációban.

A minőségi meghatározások során 29 különböző surfactin molekulát azonosítottunk, összesen 158 eltérő retenciós idejében megjelenő csúccsal, mely arra utal, hogy rengeteg különféle elágazás fordulhat elő a zsírsavláncokban. Ezen előfordulások száma a *B. velezensis* esetében 41 – 84, a *B. subtilis* törzsnél 24 – 45, a *B. atrophaeus*, *B. cereus* és *B. pumilus* baktériumoknál pedig 10, 90 és 30 volt. Az egyes surfactinok relatív mennyiségi viszonyait megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy minden esetben a [Sur], [AME5] és [Val7] variánsok domináltak, míg homológok tekintetében a C14 – C16 molekulák bírtak a legnagyobb területarányal.

A *B. subtilis* 6179J fermentlevének nyers extraktumában lévő surfactinok szennyezőktől történő tisztítására, illetve az egyes molekulák egymástól való elválasztására egy többlépcsős preparatív kromatográfiás módszert fejlesztettünk. A módszer egy normál fázisú flash kromatográfiás előtisztításból és két egymást követő fordított fázisú preparatív és félpreparatív HPLC tisztítási lépésből áll. Minden lépés során kapott mindegyik frakciót HPLC-HESI-MS vizsgálatnak vetettük alá. A többlépcsős tisztítás és a surfactinok elválasztása sikeresnek bizonyult, a nyers extraktumban kimutatott szennyeződések több mint 98%-át eltávolítottuk, és a C13-[Val2], C15-[Val7] és C15-[Sur] változatokat teljesen elválasztottuk a többi molekulától, míg három másik változatot több mint 95%-ban mutattunk ki egyes frakciókban. Az elválasztás hatékonyságát azonban optimalizálni kell, mivel a folyamat során a számított kiindulási felületaktív mennyiség mintegy 75%-a elveszett, valószínűleg a zsírsavláncukban 15-nél több szénatomot tartalmazó homológokat is beleértve. A flash-kromatográfiás technika szorul leginkább fejlesztésre, a lépés újbóli megismétlése megfelelő megoldás lehet a surfactinok veszteségének csökkentésére és a tisztítási potenciál növelésére.

Jövőbeli terveink között szerepel a tenyésztési körülmények hatásainak mélyrehatóbb vizsgálata a tápoldatmódosítás kiterjesztésén keresztül, többféle szénforrás és fémion akár együttes alkalmazásával, továbbá a vizsgált *Bacillus* fajok és törzsek számának bővítése eltérő izolációs helyekről származó minták bevonásával, valamint az extrahált fermentlevék tisztítására alkalmazott többlépcsős preparatív kromatográfiás módszer optimalizálása.

8. Summary

Cyclic lipopeptides, including surfactins, have been gaining increasing interest in recent decades due to their significant surface activities and their broad range of biological properties, including anti-micoplasmic, anti-tumour, anti-inflammatory and antiviral effects. Numerous studies have been carried out to investigate their therapeutic, environmental and agricultural applications. It has been found that the type of *Bacillus* species and strains, as well as the alteration of their culture conditions, affect the surfactin production properties of the bacteria. These studies have mainly been aimed at increasing the amount of surfactin compounds produced, but the compound group consists of a large number of different molecules. These compounds include homologues with fatty acid chains of varying number of carbon atoms and variants with heptapeptide rings of different amino acid composition, which may have different effects on the biological activities depending on their structure. The ratio of these variants and homologues in the bacterial ferment broth may also vary depending on the type of *Bacillus* strain and culture conditions, but limited information is available on these relative quantitative effects due to the different objectives of the previous experiments and the analytical methods applied. The main goal of the work of our research group was to characterize these qualitative and relative quantitative ratios through surfactin production profile analysis of the different *Bacillus* strains using HPLC-MS techniques.

The culture media of *Bacillus subtilis* SZMC 6179J, originally containing glucose, were modified with carbon sources of cellobiose, ethanol, starch, maltose, mannitol, fructose, sucrose, glycerol and xylose, and were also supplemented with manganese, copper and nickel metal ions, and the relative amounts of surfactins produced were compared to investigate differences in their detectable composition in the ferment broth. For these studies, an HPLC-ESI-IT-MS technique was used to successfully identify the surfactin molecules present in the samples. The detected compounds were grouped according to their variants with different amino acid sequences and fatty acid chains of varying lengths, and a relative quantitative comparison of these groups was performed. We found that varying the carbon source used had an effect on the proportion of molecules produced, in some cases showing a clearly observable selectivity, and that nutrient supplementation with different metal ions caused more significant changes in surfactin production profiles, with molecules containing AME at the fifth amino acid

position being the most abundant in these samples. Furthermore, metal ions promoted the dominant presence of surfactins with longer fatty acid chains, with two thirds of the molecules identified being C16, C17 and C18 homologues.

The experiments mentioned above were repeated to observe the effects on the lipopeptide production profile of another *B. subtilis* (SZMC 6178J) strain. The range of metal ions supplementing the nutrient solution was extended to include iron and zinc ions and the total concentration of each lipopeptide was determined using a standard calibration solution series. HPLC-QOTrap technique was used for quantitative and qualitative analyses. Quantitative determinations showed that the use of fructose, sucrose, mannitol, cellobiose and xylose had no significant effect, while glycerol, maltose, starch and ethanol reduced the amount of lipopeptides produced. Another interesting result is that, contrary to previous experience and data from the literature, the presence of metals practically abolished the production of lipopeptides by the bacteria. Subsequently, we also compared the quantitative relationships between the different compound groups. Surfactin concentrations were the highest in most ferment broths. The production of iturine and fengycin was not particularly positively affected by any of the culture media. Only iturin was detectable in the samples supplemented with metal ions, and even in negligible amounts. The qualitative MS/MS studies were performed on surfactins. We observed that all carbon sources except cellobiose had a positive effect on the synthesis of the [Sur] variant, whereas the [AME5] molecule was detected in negligible relative amounts in all samples compared to strain SZMC 6179J. An interesting result for the different homologues was the highly selective production of C13 and C14 surfactins induced by ethanol and fructose, respectively. The sign and significance of the culture medium modification effects were compared with the results obtained for strain SZMC 6179J, a total of 45-45 pairs of data examined for variants and homologues, with 16 and 19, respectively, having at least the same sign of the effect.

For the surfactin production profile analysis of *Bacillus* strains isolated from different vegetable rhizospheres, a combined SIM/SRM mass spectrometry method was developed, which is able to provide simultaneous quantitative and qualitative data. A total of 25 strains were analysed, of which 13 produced surfactin at concentrations ranging from 0.5 to 6.6 g/l. The qualitative determinations identified 29 different surfactin molecules with peaks occurring at a total of 158 different retention times, suggesting that a wide variety of branching may occur in the fatty acid chains. These occurrences ranged

from 41 to 84 for *B. velezensis*, 24 to 45 for *B. subtilis*, and 10, 90 and 30 for *B. atropheus*, *B. cereus* and *B. pumilus* strains, respectively. Examining the relative abundance of the different surfactins, we found that in all cases the [Sur], [AME5] and [Val7] variants were dominant, while in terms of homologues, the C14 - C16 molecules had the largest area ratio.

A multi-step preparative chromatographic method was developed to purify surfactins from contaminants in the crude extract of *B. subtilis* SZMC 6179J ferment broth and to separate the individual molecules from each other. The method consists of a normal phase flash chromatographic prepurification and two consecutive reverse phase preparative and semi-preparative HPLC purification steps. Every fraction obtained in each step was examined by HPLC-HESI-MS analysis. The multistep purification and the separation of surfactins proved to be successful, with more than 98% of the impurities detected in the crude extract being removed, and the C13-[Val2], C15-[Val7] and C15-[Sur] variants were completely separated from the other molecules, while three other variants were detected in more than 95% of certain fractions. The efficiency of the separation, however, needs to be optimised, as about 75% of the calculated initial surfactant amount was lost during the process, presumably including homologues with more than 15 carbon atoms in their fatty acid chain. The flash chromatography technique is the one most in need of improvement, repeating the step may be a suitable solution to reduce the loss of surfactins and increase the purification potential.

Our future plans include a more in-depth investigation exploring the effects of culture conditions by extending the culture medium modification to include various carbon sources and metal ions, possibly applied simultaneously, expanding the number of *Bacillus* species and strains tested by including samples from different isolation sources, and optimising the multi-step preparative chromatography method for the purification of the extracted fermented broths.

9. Irodalomjegyzék

- [1] J. Desai, I. Banat, Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 47-48, 1997.
- [2] M. Yeh, Y. Wei, J. Chang, Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers, *Biotechnology Progress*, 21, 1329-1334, 2005.
- [3] S. Cameotra, R. Makkar, J. Kaur, S. Mehta, Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind, *Biosurfactants*, 672, 261-280, 2010.
- [4] W.-C. Chen, R.-S. Juang, Y.-H. Wei, Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganism, *Biochemical Engineering Journal*, 103, 158-169, 2015.
- [5] G. Georgiou, S.-C. Lin, M. M. Sharma, Surface-active compounds from microorganism, *Biotechnology (N.Y.)*, 10, 60-65, 1992.
- [6] K. Arima, A. Kakinuma, G. Tamura, Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31, 488-494, 1968.
- [7] J.-S. Tang, F. Zhao, H. Gao, Y. Dai, Z.-H. Yao, K. Hong, J. Li, W.-C. Ye, X.-S. Yao, Characterization and online detection of surfactin isomers based on HPLC-MS(n) analyses and their inhibitory effects on the overproduction of nitric oxide and the release of TNF- α and IL-6 in LPS-induced macrophages, *Marine Drugs*, 8, 2605-2618, 2010.
- [8] B. Bóka, L. Manczinger, A. Kecskeméti, M. Chandrasekaran, S. Kadaikunnan, N. S. Alharbi, C. Vágvölgyi, A. Szekeres, Ion trap mass spectrometry of surfactins produced by *Bacillus subtilis* SZMC 6179J reveals novel fragmentation features of cyclic lipopeptides, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 30, 1581-1590, 2016.
- [9] J.-M. Bonmatin, O. Laprevote, F. Peypoux, Diversity Among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 6, 541-556, 2003.

- [10] J.-S. Tang, H. Gao, K. Hong, J. Yu, M.-M. Jiang, H.- Lin, W.-C. Ye, X.-S. Yao, Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR spectral data of nine surfactin isomers, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 45, 792–796, 2007.
- [11] G. Moro, R. Almeida, A. Napp, C. Porto, E. Pilau, D. Lüdtkke, A. Moro, M. Vainstein, Identification and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry characterization of biosurfactants, including a new surfactin, isolated from oil-contaminated environments, *Microbial Biotechnology*, 11, 759-769, 2018.
- [12] A. Kecskeméti, A. Bartal, B. Bóka, L. Kredics, L. Manczinger, K. Shine, N. S. Alharby, J. M. Khaled, M. Varga, C. Vágvölgyi, A. Szekeres, High-frequency occurrence of surfactin monomethyl isoforms in the ferment broth of a *Bacillus subtilis* strain revealed by ion trap mass spectrometry, *Molecules*, 23, 2675, 2018.
- [13] A. Kakinuma, A. Ouchida, T. Shima, H. Sugino, M. Isono, G. Tamura, K. Arima, Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry, *Agricultural and Biological Chemistry*, 33, 1669-1671, 1969.
- [14] F. Peypoux, J.-M. Bonmatin, H. Labbé, I. Grangemard, B. C. Das, M. Ptak, J. Wallach, G. Michel, [Ala4]surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies, *European Journal of Biochemistry*, 224, 89-96, 1994.
- [15] J.-M. Bonmatin, H. Labbé, I. Grangemard, F. Peypoux, R. Maget-Dana, M. Ptak, G. Michel, Production, isolation and characterization of [Leu4]- and [Ile4]surfactins from *Bacillus subtilis*, *Letters in Peptide Science*, 2, 41-47, 1995.
- [16] I. Grangemard, F. Peypoux, J. Wallach, B. C. Das, H. Labbé, A. Caille, M. Genest, R. Maget-Dana, M. Ptak, J.-M. Bonmatin, Lipopeptides with improved properties: structure by NMR, purification by HPLC and structure-activity relationships of new isoleucyl-rich surfactins, *Journal of Peptide Science*, 3, 145-154, 1998.
- [17] F. Baumgart, B. Kluge, C. Ullrich, J. Vater, D. Ziessow, Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 177, 998-1005, 1991.
- [18] F. Peypoux, J.-M. Bonmatin, H. Labbé, B. C. Das, M. Ptak, G. Michel, Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [Val7]surfactin, *European Journal of Biochemistry*, 202, 101-106, 1991.

- [19] M. Kowall, J. Vater, B. Kluge, T. Stein, Franke, D. Ziessow, Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105, *Journal of Colloid and Interface Science*, 204, 1-8, 1998.
- [20] D. Vollenbroich, G. Pauli, M. Özel, J. Vater, Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 44-49, 1997.
- [21] X. Wang, W. Hu, L. Zhu, Q. Yang, *Bacillus subtilis* and surfactin inhibit the transmissible gastroenteritis virus from entering the intestinal epithelial cells, *Bioscience Reports*, 37, 2017.
- [22] C. Duarte, E. Gudiña, C. Lima, L. Rodrigues, Effects of biosurfactants on the viability and proliferation of human breast cancer cells, *AMB Express*, 4, 2014.
- [23] Y. Zhang, C. Liu, B. Dong, X. Ma, L. Hou, X. Cao, C. Wang, Anti-inflammatory activity and mechanism of surfactin in lipopolysaccharide-activated macrophages, *Inflammation*, 38, 756-764, 2015.
- [24] N. K. Walia, S. S. Cameotra, Lipopeptides: biosynthesis and applications, *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 7, 103-107, 2015.
- [25] M. Kracht, H. Rokos, M. Özel, M. Kowall, G. Pauli, J. Vater, Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives, *The Journal of Antibiotics*, 52, 613-619, 1999.
- [26] C.-C. Chang, W.-C. Chen, T.-F. Ho, H.-S. Wu, Y.-H. Wei, Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111, 501-511, 2011.
- [27] G. Seydlová, J. Svobodová, Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications, *Central European Journal of Medicine*, 3, 123-133, 2008.
- [28] M. Hwang, J. Lim, H. Yun, M. Rhee, J. Cho, W. Hsu, Surfactin C inhibits the lipopolysaccharide-induced transcription of interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in murine RAW 264.7 cells, *Biotechnology Letters*, 27, 1605-1608, 2005.
- [29] Y. Hwang, B. Park, J. Lim, M. Kim, S. Park, M. Hwang, Lipopolysaccharide-binding and neutralizing activities of surfactin C in experimental models of septic shock, *European Journal of Pharmacology*, 556, 166-171, 2007.

- [30] T. Takahashi, O. Ohno, Y. Ikeda, R. Sawa, Y. Homma, M. Igarashi, Inhibition of lipopolysaccharide activity by a bacterial cyclic lipopeptide surfactin, *The Journal of Antibiotics*, 59, 35-43, 2006.
- [31] C.-C. Lai, Y.-C. Huang, Y.-L. Wei, J.-S. Chang, Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil, *Journal of Hazardous Materials*, 167, 609-614, 2009.
- [32] L.-M. Whang, -W. G. Liu, C.-C. Ma, S.-S. Cheng, Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil, *Journal of Hazardous Materials*, 151, 155-163, 2008.
- [33] F. Y. Hafeez, Z. Naureen, A. Sarwar, Surfactin: an emerging biocontrol tool for agriculture sustainability, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability*, 203-213, 2019.
- [34] M.-S. Yeh, Y.-H. Wei, J.-S. Chang, Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers, *Biotechnology Progress*, 21, 1329-1334, 2005.
- [35] A. M. Abdel-Mawgoud, M. M. Aboulwafa, N. A.-H. Hassouna, Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150, 305-325, 2008.
- [36] N. I. A. Haddad, J. Wang, B. Mu, Identification of a biosurfactant producing strain: *Bacillus subtilis* HOB2, *Protein and Peptide Letters*, 16, 7-13, 2009.
- [37] R. Sen, T. Swaminathan, Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47, 358-363, 1997.
- [38] D. Ghribi, S. Ellouze-Chaabouni, Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration, *Biotechnology Research International*, 2011, 1-6, 2011.
- [39] Y.-H. Wei, I.-M. Chu, Mn^{2+} improves surfactin production by *Bacillus subtilis*, *Biotechnology Letters*, 24, 479-482, 2002.
- [40] D. G. Cooper, C. R. Macdonald, S. J. B. Duff, N. Kosaric, Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions, *Applied and Environmental Microbiology*, 42, 408-412, 1981.

- [41] J. D. Sheppard, D. G. Cooper, The response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to manganese during continuous-phased growth, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 72-76, 1991.
- [42] Y.-H. Wei, I.-M. Chu, Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 724-728, 1998.
- [43] Y.-H. Wei, L.-F. Wang, J.-S. Changy, S.-S. Kung, Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96, 174-178, 2003.
- [44] Y.-H. Wei, L.-F. Wang, J.-S. Chang, Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*, *Biotechnology Progress*, 20, 979-983, 2004.
- [45] X. Huang, J. Liu, Y. Wang, J. Liu, L. Lu, The positive effects of Mn²⁺ on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 29, 381-389, 2015.
- [46] F. Besson, C. Chevanet, G. Michel, Influence of the culture medium on the production of iturin A by *Bacillus subtilis*, *Journal of General Microbiology*, 133, 767-772, 1987.
- [47] M. M. Al-Ajlani, M. A. Sheikh, Z. Ahmad, S. Hasnain, Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium, *Microbial Cell Factories*, 6, 17, 2007.
- [48] X. Liu, B. Ren, H. Gao, M. Liu, H. Dai, F. Song, Z. Yu, S. Wang, J. Hu, C. R. Kokare, L. Zhang, Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity, *PLoS ONE*, 7, 1-9, 2012.
- [49] R. R. Fonseca, A. J. R. Silva, F. De França, V. L. Cardoso, E. F. C. Sérvulo, Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136, 137-140, 2007.
- [50] E. Akpa, Jacques, B. Wathelet, M. Paquot, R. Fuchs, H. Budzikiewicz, Thonart, Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91, 551-561, 2001.
- [51] P. Roepstorff, J. Fohlman, Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides, *Biomedical Mass Spectrometry*, 11, 601, 1984.

- [52] K. Biemann, Sequencing of peptides by tandem mass spectrometry and high-energy collision-induced dissociation, *Methods in Enzymology*, 193, 455-479, 1990.
- [53] A. Romano, D. Vitullo, A. D. Pietro, G. Lima, V. Lanzotti, Antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO7, *Journal of Natural Products*, 74, 145-151, 2011.
- [54] S.-Z. Yang, D.-Z. Wei, B.-Z. Mu, Determination of the amino acid sequence in a cyclic lipopeptide using MS with DHT mechanism, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 31, 69-74, 2006.
- [55] X.-Y. Liu, S.-Z. Yang, B.-Z. Mu, Isolation and characterization of a C12-lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO 121, *Journal of Peptide Science*, 14, 864-875, 2008.
- [56] S.-Z. Yang, X.-Y. Liu, B.-Z. Mu, The McLafferty rearrangement in the Glu residue in a cyclic lipopeptide determined by Q-TOF MS/MS, *Journal of Mass Spectrometry*, 43, 1673-1678, 2008.
- [57] N. Hue, L. Serani, O. Laprévotte, Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high-energy tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15, 203-209, 2001.
- [58] K. Jonscher, J. Yates, The quadrupole ion trap mass spectrometer - A small solution to a big challenge, *Analytical Biochemistry*, 244, 1-15, 1997.
- [59] E. D. Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and applications*, John Wiley & Sons, 2007.
- [60] E. D. Hoffmann, Tandem mass spectrometry: a primer, *Journal of Mass Spectrometry*, 129-137, 1996.
- [61] B. Koim-Puchowska, G. Kłosowski, D. Mikulski, A. Menka, Evaluation of various methods of selection of *B. subtilis* strains capable of secreting surface-active compounds, *PLoS One*, 11, 14, 2019.
- [62] Y.-H. Wei, C.-C. Lai, J.-S. Chang, Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Process Biochemistry*, 42, 40-45, 2007.
- [63] C. Dass, *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*, John Wiley & Sons, 2007.

- [64] C. Dass, Principles and practice of biological mass spectrometry, Wiley-Interscience, 2001.
- [65] K. Levsen, H. Schwarz, Gas-phase chemistry of collisionally activated ions, *Mass Spectrometry Reviews*, 2, 77-148, 1983.
- [66] A. K. Shukla, J. H. Futrell, Collisional activation and dissociation of polyatomic ions, *Mass Spectrometry Reviews*, 12, 211-255, 1993.
- [67] R. A. Yost, C. G. Enke, Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer, *Journal of the American Chemical Society*, 100, 2274-2275, 1978.
- [68] M. C. McMaster, HPLC - A practical user's guide, Wiley-Interscience, 2006.
- [69] R. W. Scott, Chrom-Ed Book Series Book 12 - Preparative chromatography, Library4science, 2003.
- [70] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, Rapid chromatographic technique for preparative separation with moderate resolution, *Journal of Organic Chemistry*, 43, 2923-2925, 1978.
- [71] A. B. Roge, S. N. Firke, R. M. Kawade, S. K. Sarje, S. M. Vadvalkar, Brief review on: flash chromatography, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2, 1930-1937, 2011.
- [72] H. Chaudhari, F. Chaudhari, M. Patel, K. Pradhan, U. M. Upadhyay, A review on a flash chromatography, *International Journal of Pharmaceutical Development & Technology*, 2, 80-84, 2012.
- [73] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan, Introduction to modern liquid chromatography. Third Edition, John Wiley & Sons, 2009.

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, aki lehetővé tette PhD dolgozatom elkészítését a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszékén.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Szekeres Andrásnak, aki hozzáértésével, türelmével és hasznos szakmai tanácsaival segítette kutatói munkámat, valamint elindított azon a szakmai úton, amit a mai napig járok.

Szeretném megköszönni az Elválasztástechnikai Csoport valamennyi munkatársának a szakmai és emberi támogatást. Külön szeretném megköszönni Dr. Varga Mónikának, Rakk Dávidnak, Dr. Endre Gábornak, Dr. Váradí Orsolyának, Dr. Aruna Vigneshwarinak, Dr. Adiyadolgor Turbatnak, Papp Dórának és Hegedűs Zsófiának a segítséget, a jókedvet és a vidámságot, amivel emlékezetessé tették a közös munkával eltöltött éveket.

Köszönet illeti szakdolgozóimat, Lajosné Hunkár Henriettet és Yahya Anist, akik szorgalmukkal, kitartásukkal és friss szemléletű észrevételeikkel nagyban hozzájárultak kutatásomhoz.

Emellett köszönetemet szeretném kifejezni a Mikrobiológiai Tanszék valamennyi volt és jelenlegi munkatársának, akik bármilyen módon segítettek a dolgozatban ismertetett kutatási eredmények létrejöttét.

Végül, de semmiképpen sem utolsó sorban itt is szeretném szavakban leírni leírhatatlan hálámat családom, barátaim és párom iránt, akik nélkül ennek a rögös útnak neki sem tudtam volna vágni. Külön ki szeretném emelni Papp Henriettet, Mikó Jánost és persze Zsolnai Dánielt. Éljen a 2/B, éljen a Tudomány!

Doktori disszertációm az „Új utak a természetes anyag alapú gyógyszerkutatásban: rendszermetabolomikai megközelítések növényi és mikrobiális eredetű bioaktív terpenoidok felkutatására" (GINOP-2.2.1-15-2016-00012) és a "Mikrobiális génbankoz kapcsolódó integrált élettudományi és hatóanyag kutatás-fejlesztési centrum" (GINOP-2.3.3-15-2016-00006) projektek támogatásával készült.

11. Mellékletek

1. melléklet A *B. atrophaeus* SZMC 24978, *B. cereus* SZMC 24994, *B. pumilus* SZMC 24987, *B. subtilis* SZMC 24992, SZMC 24999 és *B. velezensis* SZMC 24980, SZMC 24981, SZMC 24982, SZMC 24983, SZMC 24984, SZMC 24985, SZMC 24986, SZMC 24995 törzsek detektált surfactin molekuláinak relatív mennyisége, azok tízes alapú logaritmusai szerint.

Név	Rt (min)	SZMC szám												
		24980	24981	24982	24983	24984	24985	24986	24995	24978	24994	24987	24992	24999
C12-[Sur]-1	21,3	■												
C12-[AME5]-1	21,2			■		■	■							
C12-[AME5]-2	21,6	■						■						
C13-[Val7]-1	22,4			■		■			■					
C13-[Val2]-1	22,6		■	■										
C13-[Sur]-1	22,6	■						■						■
C12-[Sur]-2	22,7								■		■	■		
C13-[AME5]-1	22,8	■						■						
C13-[Sur]-2	23,1			■				■			■			
C13-[AME5, Val7]-1	23,1		■											
C12-[Sur]-3	23,2										■			
C13-[AME5]-2	23,4				■	■	■							
C13-[Val7]-2	23,4	■		■	■	■	■		■					
C13-[Val7]-3	23,7								■			■		
C13-[AME5]-3	23,7				■									
C13-[Val2]-2	23,8									■				
C14-[Sur]-1	23,9	■		■	■	■	■							
C13-[Sur]-3	24,0								■		■	■	■	
C12-[Sur]-4	24,1										■			
C13-[AME5]-4	24,1									■				
C14-[AME5]-1	24,1	■		■	■	■	■							
C13-[Val7]-4	24,2								■		■		■	
C13-[Sur]-4	24,2								■		■	■	■	■
C14-[Val7]-1	24,2	■		■		■	■		■		■			
C13-[AME5]-5	24,4	■								■				
C14-[Val2]-1	24,5				■			■		■				■
C14-[Sur]-2	24,5	■	■	■	■	■	■	■						■

0 1 2 3 4 5 6 7

log(csúcsterület):



Név	Rt (min)	SZMC szám												
		24980	24981	24982	24983	24984	24985	24986	24995	24978	24994	24987	24992	24999
C12-[Sur]-5	24,6													
C14-[AME5]-2	24,6													
C14-[Val2]-2	24,8													
C14-[Sur]-3	24,9													
C13-[Val7]-5	25,0													
C14-[Val2,7]-1	25,0													
C14-[Val7]-2	25,0													
C14-[AME5]-3	25,1													
C13-[Val7]-6	25,2													
C13-[Sur]-5	25,3													
C14-[Val2]-3	25,3													
C14-[Val2,7]-2	25,5													
C14-[Val7]-3	25,5													
C14-[Sur]-4	25,5													
C14-[AME5, Val7]-1	25,5													
C14-[Sur]-5	25,6													
C15-[Sur]-1	25,6													
C14-[AME5]-4	25,8													
C14-[Val7]-4	25,8													
C15-[Sur]-2	25,9													
C15-[AME5]-1	25,9													
C13-[Sur]-6	26,1													
C15-[Val2]-1	26,1													
C14-[Sur]-6	26,2													
C15-[Sur]-3	26,3													
C14-[AME5]-5	26,3													
C14-[Val7]-5	26,4													
C15-[AME5]-2	26,4													
C14-[Val2,7]-3	26,5													
C14-[Sur]-7	26,5													
C15-[Sur]-4	26,5													
C13-[Sur]-7	26,6													
C14-[Val7]-6	26,6													
C14-[Sur]-8	26,7													
C15-[Val7]-1	26,7													
C15-[AME5, Val7]-1	26,8													

0 1 2 3 4 5 6 7

log(csőcsterület):



Név	Rt (min)	SZMC szám												
		24980	24981	24982	24983	24984	24985	24986	24995	24978	24994	24987	24992	24999
C14-[Val7]-7	26,9													
C15-[Val2,7]-1	26,9													
C15-[Sur]-5	26,9													
C15-[AME5]-3	26,9													
C15-[Val7]-2	27,1													
C16-[Sur]-1	27,2													
C14-[Sur]-9	27,2													
C15-[AME5]-4	27,3													
C16-[Sur]-2	27,4													
C15-[Sur]-6	27,5													
C14-[AME5]-6	27,5													
C15-[AME5]-5	27,5													
C16-[AME5]-1	27,5													
C14-[Val7]-8	27,6													
C16-[Val7]-1	27,9													
C16-[Sur]-3	27,9													
C15-[AME5]-6	27,9													
C16-[Leu4, AME5]-1	27,9													
C15-[Val7]-3	28,0													
C14-[AME5]-7	28,0													
C16-[Val2]-1	28,0													
C14-[Val7]-9	28,1													
C15-[Val2]-2	28,1													
C15-[Sur]-7	28,1													
C16-[AME5]-2	28,2													
C15-[Val7]-4	28,3													
C16-[Sur]-4	28,4													
C14-[Sur]-10	28,5													
C15-[Sur]-8	28,5													
C16-[AME5]-3	28,5													
C16-[Leu4, AME5]-2	28,7													
C15-[Val7]-5	28,9													
C15-[AME5]-7	28,9													
C17-[Sur]-1	29,1													
C16-[Val7]-2	29,1													
C16-[AME5]-4	29,2													

0 1 2 3 4 5 6 7

log(csőcsterület):



Név	Rt (min)	SZMC szám												
		24980	24981	24982	24983	24984	24985	24986	24995	24978	24994	24987	24992	24999
C14-[Sur]-11	29,3													
C16-[Sur]-6	29,3													
C17-[AME5]-1	29,4													
C15-[Val7]-6	29,5													
C16-[Val7]-3	29,5													
C16-[AME5]-5	29,6													
C17-[Sur]-2	29,7													
C16-[AME5]-6	29,8													
C17-[AME5]-2	29,8													
C17-[Sur]-3	30,1													
C17-[AME5]-3	30,1													
C15-[Val7]-7	30,1													
C16-[AME5]-7	30,2													
C16-[Sur]-9	30,3													
C15-[Val7]-8	30,4													
C15-[Sur]-12	30,4													
C16-[AME5]-8	30,4													
C17-[Sur]-4	30,6													
C15-[Val7]-9	30,6													
C17-[Sur]-5	30,8													
C17-[AME5]-4	30,8													
C16-[AME5]-9	30,9													
C17-[Sur]-6	31,1													
C18-[AME5]-1	31,1													
C16-[AME5]-10	31,3													
C17-[Sur]-7	31,4													
C17-[AME5]-5	31,6													
C16-[AME5]-11	31,7													
C17-[Sur]-8	31,9													
C17-[AME5]-6	32,0													
C16-[AME5]-12	32,1													
C17-[AME5]-7	32,2													
C17-[Sur]-9	32,3													
C16-[AME5]-13	32,6													
C17-[AME5]-8	32,6													
C16-[AME5]-14	33,0													

0 1 2 3 4 5 6 7

log(csőcsterület):



Név	Rt (min)	SZMC szám												
		24980	24981	24982	24983	24984	24985	24986	24995	24978	24994	24987	24992	24999
C17-[Sur]-10	33,1									6		7		
C16-[AME5, Val7]-1	28,7									6				
C16-[Sur]-5	28,9									6		6		
C15-[Sur]-9	29,1									6		6		
C16-[Sur]-7	29,4									6		6		
C15-[AME5]-8	29,4									6	6	6		
C15-[Sur]-10	29,5												6	
C16-[Sur]-8	29,8									6		6		
C15-[AME5]-9	29,8									6		6		
C17-[Val2,7]-1	29,9									6				
C15-[Sur]-11	30,2										7		6	
C17-[Val2,7]-2	30,3									6				
C16-[Sur]-9	30,3									6		6		
C15-[AME5]-10	30,3									6		6		
C15-[AME5]-11	30,5									6		6		
C16-[Sur]-10	30,7										6	6		
C15-[Sur]-13	30,8										6	6		
C16-[Sur]-11	30,9									6		6		
C16-[Sur]-12	31,3									6		6		
C15-[Sur]-14	31,4									6		6		
C16-[Sur]-13	31,9									6		6		
C16-[Sur]-14	32,3									6		6		
C16-[Sur]-15	32,8									6		6		

