

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI
**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

Irodalmi áttekintés

A felületaktív anyagok olyan amfipatikus molekulák, amelyek hidrofil és hidrofób részekkel egyaránt rendelkeznek, valamint hatásosan választják szét a különböző polaritású folyadékfázisok, például az olaj/víz vagy a levegő/víz határfelületét. 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.

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. 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.

A surfactin a gyűrűs lipopeptidek csoportjának egyik legjelentősebb tagja, felületaktív hatása a nátrium-lauril-szulfátét is meghaladja. Főleg a Gram-pozitív *Bacillus* nemzetség tagjainak, többek között az endospóras *B. subtilis* fajba tartozó törzsek másodlagos metabolitja. A surfactin vegyületcsalád tagjai gyűrűs lipopeptidek különböző változatai, amelyek egy β -hidroxi zsírsavláncból, valamint egy heptapeptidből állnak. A zsírsavlánc változatos hosszúsága a különböző homológok széles skáláját eredményezi, emellett a peptidszekvencia aminosav-összetételének nagyfokú változatossága a fellelhető variánsok számát növeli. Ezen két tényező eredményeképpen a surfactin vegyületcsalád igen nagyszámú természetes molekulája található meg a különböző *Bacillus* törzsek fermentációs termékeiben.

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. Széles spektrumú aktivitásuk legfőbb oka, hogy a surfactin izomerek gyakran többféle módon is kölcsönhatnak a biológiai rendszerekkel, számos

fiziológiai és biokémiai hatást eredményezve. 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 gyulladáscellenes hatásai teszik lehetővé.

A különböző tenyésztési körülmények a mikroorganizmusok biomassza- és surfactin termelésére gyakorolt hatásával az elmúlt évtizedek során számos kutatás foglalkozott. 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. A *B. subtilis* surfactin bioszintézise szempontjából a Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} és Fe^{2+} nyomelemek, valamint a szacharóz kiemelt fontossággal bírnak.

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.

Az egyes surfactin variánsok és homológok azonosításának leghatékonyabb módja a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával csatolt tömegspektrometriás technikával (High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry, HPLC-MS) történő analízis. A tömegspektrometriás analizátorokban ugyanis az ütközés indukált disszociáció általi hasadások során három fő fragmentációs mechanizmus (szimpla hasadásos és belső fragmentációs mechanizmus, valamint a McLafferty átrendeződés) szerint az egyes molekulákra jellemző fragmens ionok keletkeznek, így a különböző variánsok és homológok szerkezete részletesen feltérképezhető. Munkánk során három tömegspektrometriás készüléket alkalmaztunk: ioncsapda analizátoros, „OrbiTrap” elektrosztatikus ioncsapda tömeganalizátoros, valamint hármas kvadrupól tömegspektrométert.

Célkitűzések

Napjainkig 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 céljából az alábbiakat tűztük ki:

1. A különböző szénforrásokkal és fémionokkal módosított tápoldatok hatásának meghatározása két *Bacillus subtilis* törzs surfactin termelési sajátosságait 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.

Alkalmazott módszerek

Vizsgált izolátumok:

- A különböző, növényi rizoszférából izolált *Bacillus* törzsek a Szeged Microbiology Collection (SZMC) gyűjteményéből kerültek tenyésztésre.
- Vizsgált *Bacillus* fajok: *B. atrophaeus*, *B. megaterium*, *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. subtilis*.
- A vizsgált törzsek izolálásának helye: paradicsom-, paprika-, répa-, édesburgonya rizoszférája.

Tenyésztési körülmények és mintaelőkészítés:

- Élesztő/glükóz tápoldatban (YEG) való leoltás után egy napos felszaporítás, majd sejtkoncentráció meghatározása optikai denzitás alapján.
- Öt napos tenyésztés Besson-féle, valamint különböző szénforrásokkal (cellobióz, keményítő, maltóz, mannitol, fruktóz, szacharóz, glicerin, etanol, xilóz) és fémionokkal (Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) módosított tápoldatokban.
- Baktériumsejtek eltávolítása a fermentléből centrifugálással, majd fehérjék és peptidek kicsapása a pH sósavval történő csökkentésével.
- A felülúszó leöntése centrifugálást követően, a csapadék metanolban való feloldása, végül az oldhatatlan részek centrifugálással történő eltávolítása.

Kromatográfiai módszerek:

- Ioncsapda analizátoros tömegspektrometriával kapcsolt nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC-IT-MS).
- Hármaskvadrupól tömegspektrométerrel kapcsolt nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC-MS/MS).
- Kvadrupól-„OrbiTrap” tömegspektrometriával kapcsolt nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC-QOTrap).
- Flash kromatográfia.
- Preparatív nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia.
- Félpreparatív nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia.

Eredmények

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

Megállapítottuk, hogy az eredeti tápoldatban történő tenyésztéshez képest különböző szénforrásokkal való tápoldatmódosítás hatására nem jelentek meg új csúcsok a kromatogramokon, így a különböző szénforrások alkalmazása nem eredményezte új surfactin variánsok termelését, az egyes csúcsok intenzitása, illetve azok relatív aránya azonban eltért, ami arra utalt, hogy a különböző tápoldatban tenyésztett törzs más-más arányban állította elő az egyes surfactin variánsokat. A vizsgált fémionok azonban nagyban 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. A különböző molekulák minőségi és relatív mennyiségi viszonyainak összehasonlítása céljából HPLC-IT-MS vizsgálatokat végeztünk el, az extrahált ion kromatogramok csúcsainak egymáshoz viszonyított területarányai alapján. Összesen 35 különböző, [Sur], [Val2], [Val7], [Val2,7], [AME5], [AME5, Val7] és [Lxx4, AME5] peptidszekvenciát, illetve 11–18 szénatomból álló zsírsavláncot tartalmazó surfactin molekulát detektáltunk.

Az egyes variánsok területarányainak összehasonlítása által megfigyeltük, hogy az alkalmazott szénforrások közül 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, míg a hetedik pozícióban Val-t tartalmazó változatoké nagymértékben emelkedett. A xilóz volt az egyetlen szénforrás, amely szignifikáns hatással volt a [Sur] variáns relatív mennyiségére, emellett a [Val2] és [AME5] változatoknál is szignifikáns növekedést tapasztaltunk, de a [Val7], [Val2,7] és [AME5, Val7] relatív mennyisége csökkent. A cellobióz, keményítő, szacharóz, maltóz, mannitol és glicerin a xilózhoz hasonló hatásokkal bírt, míg az etanol a fruktózhoz hasonló tulajdonságokat mutatott. A mangán, réz és nikkel fémionokkal módosított tápoldatok relatív mennyiségi viszonyainak vizsgálatakor megállapítottuk, hogy az ötödik aminosav pozícióban AME-t tartalmazó variánsok jelenléte domináns,

96% feletti mindhárom mintában, míg a többi molekula százalékos mennyisége szinte elhanyagolható.

A különböző szénforrásokkal módosított tápoldatok surfactin homológok relatív mennyiségére gyakorolt hatásainak összehasonlítása során megállapítottuk, 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 szignifikánsan csak csökkenő relatív mennyiségeket eredményeztek. Az etanol egyedülként növelte jelentősen a C16 homológok arányát, továbbá a fruktóz, glicerin és xilóz esetében a rövidebb zsírsavláncú surfactin molekulák össztermelése nőtt, a hosszabb zsírsavláncúaké pedig jelentősen csökkent. A különböző fémionokkal kiegészített *Bacillus* törzs extraktumait megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a C11 és C12 surfactin homológok relatív mennyisége meglehetősen alacsony volt. A C15 és C16 változatok esetében a százalékos arányokban jelentős csökkenés volt megfigyelhető, míg a C13 és C14 molekulák esetében enyhe, a C17 és a C18 surfactinok tekintetében viszont jelentős növekedés volt megfigyelhető. Ez utóbbi 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 zsírsavlánccal.

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

A lipopeptidek mennyiségi analízise során megállapítottuk, hogy a fruktóz, szacharóz, mannitol, cellobióz és xilóz nem volt számottevő hatással a termelt összes biosurfaktáns mennyiségére. Glicerin, maltóz, keményítő és etanol tápoldatban való felhasználása kedvezőtlenül hatott a termelésre, a különböző fémionok tápoldatban történő alkalmazása szinte teljes mértékben gátolta a baktérium lipopeptid termelését. A mintákban lévő surfactinok azonosítása céljából a surfactinok MS/MS vizsgálatait is elvégeztük HPLC-QOTrap készülékkel. A minták vizsgálata során összesen 31 vegyület protonált molekulaionja került azonosításra, [Sur], [Val2], [Val7], [Val2,7], [AME5] variánsokat, illetve C12 – C17 homológokat detektáltunk.

A surfactin molekulák azonosítását követően összehasonlítottuk a relatív mennyiségüket is. Megállapítottuk, hogy a cellobióz kivételével mindegyik szénforrás

pozitív hatással volt a [Sur] variáns szintézisére, ez a szénforrás ugyanakkor a leucin helyett valint tartalmazó változatok területarányára volt pozitív hatással. A glicerin tápoldatban való alkalmazása a [Sur] mellett az [AME5] variánsok százalékos mennyiségét is jelentősen növelte. Az egyes homológok tekintetében megfigyeltük, hogy a C12 és C17-es zsírsavláncok elhanyagolható arányban találhatóak meg a mintákban. A C13 molekulák relatív mennyiségének ugrásszerű növekedését detektáltuk a szénforrásként etanolt tartalmazó tápoldatokban tenyésztett *Bacillus* törzs fermentlevében, a C14 homológok esetében pedig a fruktózzal módosított mintában figyeltünk meg hasonló hatást. A C16 surfactinok területaránya minden esetben csökkent. A különböző szénforrások termelési profilra gyakorolt hatásainak előjelét és szignifikanciáját összehasonlítottuk a *Bacillus subtilis* 6179J és 6178J törzs esetében. Az egyes variánsok és homológok eredményeinél összesen 45-45 vizsgált adatpár található, az előbbieket 16, az utóbbiaknál 19, melyekben a megfigyelt hatások egyformán pozitívak, negatívak, vagy inszignifikánsak voltak. Variánsok szempontjából a szacharóznál, a homológok esetében pedig a fruktóznál és a cellobióznál találtuk a legtöbb egyezést a molekulák relatív mennyiségi viszonyaira gyakorolt hatásokban.

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

Előzetes tapasztalataink alapján egy HPLC-MS/MS készülékre kombinált SIM/SRM módszert fejlesztettünk a minták gyors és hatékony vizsgálata céljából. A módszer a nagyobb intenzitású belső fragmensek tömegén alapul, ugyanis ezek a fragmens ionok nem tartalmazzák a zsírsavláncot, így az egyes homológokat egyértelműen megadják a prekursor ionok m/z értékei, illetve azok különbségei, a különböző variánsok pedig egyértelműen azonosíthatók az első két belső fragmens ion m/z értékéből. Négy különböző zöldség rizoszférájából izolált, összesen 25 *Bacillus* törzs vizsgálatát végeztük el az általunk fejlesztett módszerrel.

Az egyes minták fermentlevében lévő lipopeptid koncentrációk meghatározása során megállapítottuk, hogy a 25 törzsből 13 termelt surfactint, melyek extraktumaiban 0,5–7 mg/l koncentrációtartományban azonosítottunk biosurfaktánokat. A kvalitatív vizsgálatok során 29 különböző szerkezetű surfactin molekulát azonosítottunk, legtöbbjüköt több, eltérő retenciós idejű csúccsal, ami a zsírsavláncok elágazásában

bekövetkezett változásokra utal. Ezen specifikus csúcsok nagy számban való megjelenése következtében a vizsgált mintákban összesen 158 esetben detektáltunk különböző retenciós idővel rendelkező csúcsokat.

A különböző surfactin variánsok és homológok sikeres azonosítása után megvizsgáltuk relatív mennyiségi viszonyait. Megfigyeltük, hogy variánsok tekintetében a [Sur], [AME5] és [Val7] molekulák voltak detektálhatók a legnagyobb relatív mennyiségben, a többi variáns területaránya gyakorlatilag elenyésző mindegyik mintában. Míg a *B. atrophaeus*, *B. cereus*, *B. pumilus* és *B. subtilis* törzsekben a [Sur] variánsok aránya ezen három közül is az abszolút domináns, 60 – 90 % közötti, addig a *B. velezensis* minták esetében a [Sur] és [AME5] arányai - az SZMC 24995 törzs kivételével – arányaikban összemérhetőek. Az egyes homológok relatív mennyiségeit összehasonlítva megfigyeltük, hogy a *B. atrophaeus*, *B. cereus*, *B. pumilus* és *B. subtilis* törzsek esetében a C14 és C15 molekulák területaránya a legmarkánsabb, a *B. velezensis* törzsnél azonban a C12, C16, C17 homológok relatív mennyisége jelentősebb, továbbá az SZMC 24981 törzsben C18 surfactinok is előfordulnak, még ha alacsony százalékos arányban is.

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

A többlépcsős módszer során 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-MS/MS készüléken vizsgáltuk. A kalibrációt követően meghatározott koncentrációból számolt összes surfactin mennyiségét a nyers extraktum mért tömegéhez viszonyítva a kapott surfactin tartalom 21,4 % volt. A flash kromatográfiás elválasztás minden frakcióját összegyűjtöttük, majd azok surfactin tartalmát és tisztaságát megvizsgáltuk. Ezen eredmények alapján a megfelelő frakciókat egyesítettük. A surfactinok aránya ebben az összevont mintában 30,4% volt. A további szennyezőktől való megtisztítás érdekében preparatív HPLC elválasztást végeztünk el. Az így kapott 30 frakció HPLC-MS/MS vizsgálatai során kapott kromatogramokat összehasonlítva egyértelműen látható, hogy a surfactinokat sikerült elválasztani a szennyeződések nagy részétől. A frakciók kiértékelése után kiszámítottuk a surfactinok

csúcsterületeit és azok arányait, melyek alapján a megfelelő frakciókat ismételtén 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. A detektált surfactin molekulák HPLC-MS/MS vizsgálatát és azok relatív mennyiségi meghatározását SRM és full MS módokban végeztük el. Az MS² spektrumok 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.

Minden tisztítási lépés után az összegyűjtött és egyesített frakciókat bepároltuk, és megmértük a tömegét. A surfactinok és egyéb szennyeződések tömegét a HPLC-MS/MS-elemzések megfelelő csúcsterület-arányai alapján számoltuk ki, így kaptuk meg a különböző tisztítási lépések hatékonyságát. A csúcsterületek arányát tekintve a teljes terület 21,4%-a a nyers extraktumban a surfactinokhoz tartozott. Ez a flash-kromatográfiás 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 szárazanyag-tömegek 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.

Összegzésként a következő eredményekről számolhatunk be:

1. A *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs eredetileg glükózt tartalmazó tápoldatát különböző szénforrásokkal és fémionokkal egészítettük ki, majd HPLC-IT-MS technikát alkalmazva sikeresen azonosítottuk a mintákban található surfactin molekulákat, továbbá megvizsgáltuk és összehasonlítottuk a termelt surfactinok relatív mennyiségi viszonyait.
2. A fenti vizsgálatokat összehasonlítás céljából egy HPLC-QOTrap technikával megismételtük a *B. subtilis* SZMC 6178J törzsen is, melynek lipopeptid termelési profilja nagyban eltér az előző baktériumtörzsetől, fémionokkal módosított tápoldatban a 6178J törzs termelése megszűnik. A tápoldatmódosítás relatív kvantitatív hatásait és azok szignifikanciáját összehasonlítottuk a 6179J törzsnél kapott eredményekkel, a variánsok és homológok esetében összesen 45-45 vizsgált adatpárból 16, illetve 19 olyan található, melyekben a megfigyelt hatások egyformán pozitívak, negatívak, vagy inszignifikánsak voltak.
3. Különböző zöldségfélék rizoszférájából izolált, összesen 25 *Bacillus* törzs surfactin termelési profilanalízisére egy kombinált SIM/SRM tömegspektrometriás módszert fejlesztettünk, 13 törzsnél 29 különböző surfactin molekula termelését detektáltuk összesen 158 eltérő retenciós időben megjelenő csúccsal.
4. Több munkafolyamatból álló preparatív elválasztástechnikai módszert fejlesztettünk a surfactinok *B. subtilis* 6179J fermentlevének nyers extraktumából történő tisztítására és az egyes variánsok egymástól való izolálására.

Summary

The main goal of the work of our research group was to characterize the qualitative and relative quantitative ratios of the different surfactin molecules through 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 different carbon sources and metal ions, and the relative amounts of surfactins produced were compared to investigate differences in their detectable composition in the ferment broth. 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.

These experiments were repeated to observe the effects on the lipopeptide production profile of another *B. subtilis* (SZMC 6178J) strain. The range of metal ions was extended to include iron and zinc ions and the total concentration of each lipopeptide was determined using a standard calibration solution series. 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. 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, where the effects on both are positive, negative or insignificant.

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 7 mg/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. 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.

A dolgozat alapját képező publikációk:

Attila Bartal, Thu Huynh, Anita Kecskeméti, Mónika Vörös, Orsolya Kedves, Henrietta Allaga, Mónika Varga, László Kredics, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2023. "Identifications of surfactin-type biosurfactants produced by *Bacillus* species isolated from rhizosphere of vegetables." *Molecules* 28 (3), IF: 4.600

Attila Bartal, Henriett Hunkár, Gábor Endre, Mónika Vörös, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2020. "Purification of surfactin compounds produced by a *Bacillus subtilis* strain." *Acta Biologica Szegediensis* 64 (2): 121–128.

Attila Bartal, Aruna Vigneshwari, Bettina Bóka, Mónika Vörös, István Takács, László Kredics, László Manczinger, Mónika Varga, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2018. "Effects of different cultivation parameters on the production of surfactin variants by a *Bacillus subtilis* strain." *Molecules* 23 (10), IF: 3.060

Anita Kecskeméti, **Attila Bartal**, Bettina Bóka, László Kredics, László Manczinger, Kadaikunnan Shine, Naiyf S. Alharby, Jamal M. Khaled, Mónika Varga, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2018. "High-frequency occurrence of surfactin monomethyl isoforms in the ferment broth of a *Bacillus subtilis* strain revealed by ion trap mass spectrometry." *Molecules* 23 (9), IF: 3.060

A dolgozat témájához kapcsolódó konferencia összefoglalók:

Attila Bartal, Anita Kecskeméti, Thu Huynh, Mónika Vörös, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2022. "Mass spectrometric examinations of surfactin variants produced by *Bacillus* strains." *Biosurfactants 2022, Book of Abstract*, 78.

Rita Büchner, Mónika Vörös, Henrietta Allaga, András Varga, **Attila Bartal**, András Szekeres, Sarolta Varga, Judit Bajzát, Nóra Bakos-Barczy, András Misz, Csaba Csutorás, Lóránt Hatvani, Csaba Vágvölgyi, László Kredics. 2022. "Biocontrol potential of a native *Bacillus* Strain against *Trichoderma aggressivum*, the causal agent of *Agaricus* green mould." *FEMS conference on microbiology in association with Serbian Society of Microbiology*, 617.

Attila Bartal, Thu Huynh, Mónika Vörös, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2021. "Surfactin production of *Bacillus* strains isolated from rhizosphere of various vegetables." *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 68 (Supplement 1): 114.

Attila Bartal, Henriett Hunkár, Mónika Vörös, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2019. “Lipopeptide profiling of a *Bacillus* strain by HPLC-HRMS technique.” Proceedings of the 25th International Symposium on Analytical and Environmental Problems, 257.

Attila Bartal, Dávid Rakk, László Manczinger, Kadaikunnan Shine, Naiyf S. Alharby, Jamal M. Khaled, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2018. “Lipopeptide profiling of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain extract by HPLC-HRMS technique.” 16th Wellmann International Scientific Conference “Hello Modern Agriculture!,” 113–114.

András Szekeres, **Attila Bartal**, Aruna Vigneshwari, Bettina Bóka, Mónika Vörös, László Kredics, Mónika Varga, Csaba Vágvölgyi, László Manczinger. 2018. “Characterisation of novel surfactins and effects of different cultivation parameters on their productions.” A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi nagygyűlése és a XIII. Fermentációs Kollokvium, 59.

András Szekeres, **Attila Bartal**, Bettina Bóka, Mónika Vörös, László Kredics, Mónika Varga, László Manczinger, Csaba Vágvölgyi. 2018. “*Bacillus subtilis* által termelt bioszurfaktánsok azonosítása, termelési tulajdonságai.” A Magyar Tudományos Akadémia analitikai és környezeti kémiai bizottságának 7. Környezetkémiai Szimpóziuma, 17.

Attila Bartal, Anita Kecskeméti, Bettina Bóka, László Manczinger, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2017. “Characterization of novel surfactin isoforms and the effects of different cultivation parameters on their production by *Bacillus subtilis*.” Proceedings of the 23rd International Symposium on Analytical and Environmental Problems, 379.

Attila Bartal, Anita Kecskeméti, Bettina Bóka, Kadaikunnan Shine, Naiyf S. Alharby, Jamal M. Khaled, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2017. “Lipopeptide profiling of a *Bacillus subtilis* strain.” 19th DKMT Euroregional Conference on Environment and Health, 14.

Attila Bartal, Anita Kecskeméti, Bettina Bóka, László Manczinger, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2016. “Effects of various cultivation parameters on surfactin production of biocontrol *Bacillus subtilis* isolate.” International Conference on Science and Technique Based on Applied and Fundamental Research, 49.

Anita Kecskemét, **Attila Bartal**, Bettina Bóka, László Manczinger, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2016. “Új surfactin molekulák detektálása HPLC-MS technikával.” Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2016, 51.

Anita Kecskeméti, **Attila Bartal**, Bettina Bóka, László Manczinger, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2016. “Bakteriális eredetű ciklikus peptidok fragmentációs tulajdonságai IT-MS készülékben.” Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2016, 71.

Anita Kecskeméti, **Attila Bartal**, Bettina Bóka, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2016. “Identification of novel surfactin isomers by ion trap mass spectrometry.” A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2016. évi nagygyűlése és a XII. Fermentációs Kollokvium, 30.

Bettina Bóka, Anita Kecskeméti, **Attila Bartal**, László Manczinger, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2016. “Variations in the yields of surfactin isomers influenced by cultivation parameters.” A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2016. évi nagygyűlése és a XII. Fermentációs Kollokvium, 11.

Anita Kecskeméti, **Attila Bartal**, Bettina Bóka, László Manczinger, Dávid Rakk, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2016. “Novel fragmentation features of surfactin revealed by ion trap mass spectrometry.” In 18th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health, 67.

Referált folyóiratban megjelent egyéb publikációk:

Büchner, Rita, Mónika Vörös, Henrietta Allaga, András Varga, **Attila Bartal**, András Szekeres, Sarolta Varga, et al. 2022. “Selection and Characterization of a *Bacillus* Strain for Potential Application in Industrial Production of White Button Mushroom (*Agaricus Bisporus*).” AGRONOMY (BASEL) 12 (2), IF: 3.700

Összesített impakt faktor: 14,420

MTMT azonosító: 10060866

Nyilatkozat

Én, Dr. Szekeres András (Egyetemi docens, Szegedi Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék) Bartal Attila doktorjelölt témavezetője nyilatkozom, hogy Bartal Attila meghatározó mértékben hozzájárult az alábbi publikációk elkészítéséhez, valamint doktori dolgozatában foglalt eredmények az alábbi publikációkon alapulnak:

Attila Bartal, Thu Huynh, Anita Kecskeméti, Mónika Vörös, Orsolya Kedves, Henrietta Allaga, Mónika Varga, László Kredics, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2023. “Identifications of surfactin-type biosurfactants produced by *Bacillus* species isolated from rhizosphere of vegetables.” *Molecules* 28 (3), IF: 4.600

Attila Bartal, Henriett Hunkár, Gábor Endre, Mónika Vörös, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2020. “Purification of surfactin compounds produced by a *Bacillus subtilis* strain.” *Acta Biologica Szegediensis* 64 (2): 121–128.

Attila Bartal, Aruna Vigneshwari, Bettina Bóka, Mónika Vörös, István Takács, László Kredics, László Manczinger, Mónika Varga, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2018. “Effects of different cultivation parameters on the production of surfactin variants by a *Bacillus subtilis* strain.” *Molecules* 23 (10), IF: 3.060

Anita Kecskeméti, **Attila Bartal**, Bettina Bóka, László Kredics, László Manczinger, Kadaikunnan Shine, Naiyf S. Alharby, Jamal M. Khaled, Mónika Varga, Csaba Vágvölgyi, András Szekeres. 2018. “High-frequency occurrence of surfactin monomethyl isoforms in the ferment broth of a *Bacillus subtilis* strain revealed by ion trap mass spectrometry.” *Molecules* 23 (9), IF: 3.060

Továbbá nyilatkozom arról is, hogy Bartal Attila doktori disszertációjában részletezett eredmények nem lettek felhasználva más doktori disszertációkhoz, illetve a jövőben sem lesznek felhasználva.

Szeged, 2023. 08. 25.

Dr. Szekeres András