



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

Biológia OTDK 2015

***Trichoderma harzianum* törzs által termelt peptaibol
vegyületek szerkezetének meghatározása és tisztítása**

KÉSZÍTETTE:

Vágvölgyi Máté

Vegyész M.Sc. szak

II. évfolyam

TÉMAVEZETŐ:

Dr. Szekeres András, tudományos főmunkatárs

Szeged

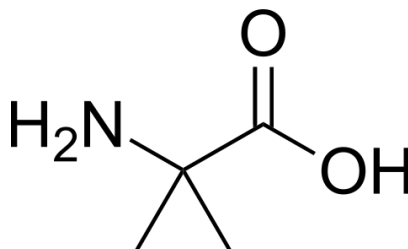
2015

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés	3
1.1. A peptaibolok általános ismertetése	3
1.1.1. A peptaibolok szerkezete	4
1.1.2. A peptaibolok biológiai hatásai	4
1.2. A peptaibolok tisztítási módszerei.....	5
2. Célkitűzés.....	6
3. Anyag és módszerek.....	7
3.1. Felhasznált anyagok és eszközök	7
3.1.1. Felhasznált anyagok	7
3.1.2. Felhasznált eszközök.....	7
3.2. Analitikai vizsgálatok	8
3.2.1. LC-MS paraméterek optimalizálása.....	8
3.2.2. Az extraktumok és a frakciók mérése	10
3.3. Szemipreparatív vizsgálatok.....	11
3.4. A vizsgált törzs és a tenyésztési körülmények	11
3.5. A metabolitok extrakciója	11
4. Eredmények és értékelésük	12
4.1. Analitikai vizsgálatok.....	12
4.1.1. Módszer optimalizálás.....	12
4.1.2. Az ismeretlen minták vizsgálata.....	21
4.2. Preparatív vizsgálatok.....	28
5. Összefoglalás.....	33
6. Irodalomjegyzék.....	34

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

A peptaibolok megnevezés a vegyületek három jellegzetes alkotórészének nevéből származik, azaz olyan peptidek (Pept), melyek tartalmazzák az α -aminoizovajsavat (Aib) és mindemellett tartalmazznak aminoalkoholt is (ol) [1]. Az α -aminoizovajsav szerkezeti képletét az 1. ábra mutatja be.



1. ábra: Az α -aminoizovajsav szerkezeti képlete

1.1. A peptaibolok általános ismertetése

A peptaibolokat fonalgombák termelik (*Trichoderma*, *Stilbella*, *Gliocladium*, *Acremonium*). Másodlagos metabolitok, azaz nem származik belőlük közvetlen haszon a termelő sejt számára, viszont a sejt csak e vegyületek segítségével tud más anyagot átalakítani, vagy a rendelkezésre álló élettérben önmaga számára előnyös környezetet teremteni, és ennek eredményeképp életben maradni.

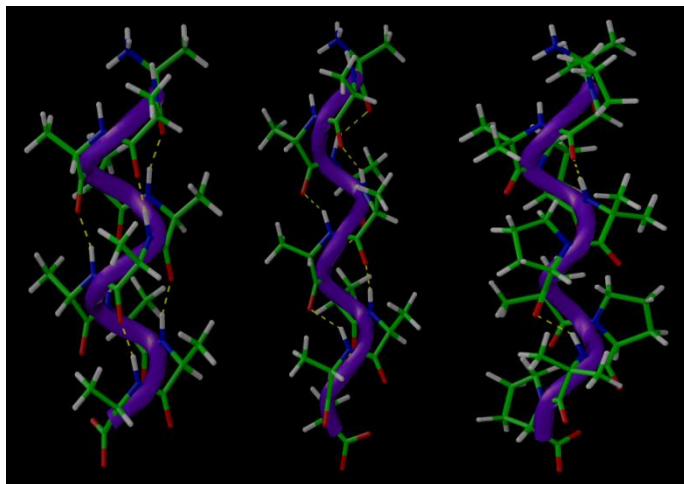
A peptaibolok néhány fontosabb jellemzője:

- jellegzetesen 4-21 aminosavból állnak.
- lineárisan vagy ciklikusan épülnek fel.
- molekulatömegük 5000-2200 Da között változik.
- *His*, *Arg*, *Lys*; *Asp*; *Thr*; *Tyr*; *Cys*, *Met* aminosavak nem fordulnak elő bennük
- mikroheterogén elegyként termelődnek nem-riboszomális peptid bioszintézis útján
- ioncsatornák kialakítására képesek kettős lipid membránokban

A peptaibolok számos biológiai aktivitással rendelkeznek, melyeknek köszönhetően a jövőben bioaktív természetes készítmények alapjaiként szolgálhatnak. Ez mezőgazdasági, orvosi és biotechnológiai szempontból különösképp értékesé teszi őket. Az elmúlt években újabb és újabb hatásaikat tárták fel [2].

1.1.1. A peptaibolok szerkezete

A peptaibolok az Aib jelenlétéből fakadóan helikális szerkezetet alakítanak ki. A kialakított szerkezet függ a peptidlánc hosszától, valamint az Aib mennyiségétől és elhelyezkedésétől. Ennek értelmében α -hélix, 3_{10} -hélix és az ún. „ β -bend ribbon” spirál (2. ábra) szerkezetek valósulhatnak meg.



2. ábra: Balról jobbra: α -hélix, 3_{10} -hélix és β -bend ribbon spirál [3]

Az α -hélix jellegzetesen a hosszabb molekuláknál alakul ki, míg a 3_{10} -hélix inkább a rövidebb molekulákra jellemző. Az említett három lehetőség mellett a kevert $\alpha/3_{10}$ hélix szerkezetek is előfordulnak [2].

1.1.2. A peptaibolok biológiai hatásai

A peptaibolok sokféle, változatos biológiai aktivitással rendelkeznek, melyet főként a kettős lipid membránokra gyakorolt hatással magyarázzák [2].

Antibakteriális sajátságukat vizsgálták többek között Béven és munkatársai. Kísérletük során *Spiroplasma melleiferum* baktériumot kezeltek a legelső sikeresen izolált peptaibollal, az alamethicinnel (ALM) [4].

A peptaibolok gombaellenes hatása is jelentős, melyet Kubicek és munkatársai vizsgáltak különféle, a *Trichoderma* nemzetség tagjai által termelt peptaibol molekulával kapcsolatban [5].

A fentebb említett két sajátság mellett számos publikáció látott napvilágot az utóbbi időben, melyek a peptaibolok antiparazitikus, inszekticid, illetve rákellenes hatásairól számolnak be [2]. Egyes képviselőik a sebgyógyulást is képesek elősegíteni [6].

1.2. A peptaibolok tisztítási módszerei

A *Trichoderma* fajok által termelt peptaibolok tisztításával, illetve szerkezeti analízisével kapcsolatban számos írás jelent meg az elmúlt évek során. A tisztítás folyamata rendszerint tartalmazza az extrakciós műveleteket, az oszlop- és vékonyréteg-kromatográfiás eljárásokat, valamint folyadékkromatográfiás módszereket is.

Kirschbaum és munkatársai egy saját fejlesztésű módszerrel izoláltak ALM származékokat a *Trichoderma* faj egy korábban nem tanulmányozott törzséből [7]. Jaworski és munkatársai is hasonló céllal, saját módszerrel, sikeresen tisztítottak egy trichovirineknek elnevezett peptideket tartalmazó mintát [8]. Mindkét munkának alapvető kiindulópontja volt Duvalnak és munkatársainak 1997-es írása, melyben a peptaibolok családjába tartozó trichorzinok reverz-fázisú HPLC-s tisztításáról részletezték tapasztalataikat [9].

2. Célkitűzés

Tudományos diákköri munkám során a SZTE-TTIK Mikrobiológiai Tanszékének kutatási tevékenységébe kapcsolódtam be. A tanszék egyik fő kutatási irányvonala a különféle fonalasgombák, elsősorban a *Trichoderma* fajok által másodlagos metabolitként termelt peptaibol vegyületek tisztítása és biológiai sajátosságainak vizsgálata.

A munkám kezdete előtt, előzetes szűrő-vizsgálatok rámutattak arra, hogy a *T. harzianum* SZMC 1874 törzs, potenciális forrása lehet új peptaibol vegyületeknek, így ez jelentette kutatásaim kiindulópontját, melynek céljai a következők voltak:

- Olyan eljárás kidolgozása, melynek segítségével a másodlagos metabolitként termelt peptaiboloknak a tenyésztésekből történő extrakciója a leggazdaságosabban kivitelezhető. Fontos szempont volt a megfelelő mértékű és minél hatékonyabb kinyerés, az egyszerűség és az oldószer takarékoság is.
- A rendelkezésre álló ALM standard segítségével egy single kvadrupól LC-MS készülék beállításainak optimalizálása ismeretlen peptaibolok detektálására.
- Az előző pontban leírtak megvalósításához egy analitikai RP-HPLC módszer fejlesztése, melynek célja a rövid futásidő (<~30 perc), és az izokratikus elúció.
- Egy előzetesen biotesztek alapján kiválasztott *Trichoderma* törzs peptaibol termelésének igazolása
- Az igazolás sikeressége esetén, az LC-MS eredmények alapján az ismeretlen peptaibolok tömegspektrumain a karakterisztikus elemek azonosítása és az egyes peptid vegyületekre jellemző szekvenciák megállapítása.
- Az analitikai RP-HPLC módszer átvitele (scale up) izokratikus szemipreparatív környezetbe, melynek segítségével az esetlegesen detektált ismeretlen peptaibolok tisztítása megvalósíthatóvá válik.
- Az MS mérések során detektált ismeretlen peptaibolok kromatográfiás tisztítása, az immáron rendelkezésre álló szemipreparatív RP-HPLC módszer segítségével.

3. Anyag és módszerek

3.1. Felhasznált anyagok és eszközök

3.1.1. Felhasznált anyagok

Anyag neve	Tisztaság	Gyártó/forgalmazó/eszköz
Víz	Ultratiszta (1. típus) TOC < 10 ppb	Millipore Milli-Q Gradient A10
Acetonitril	Gradient Grade HPLC	VWR Hungary, Magyarország
Etanol	≥ 99 %	VWR Hungary, Magyarország
Metanol	≥ 99 %	VWR Hungary, Magyarország
Trifluor-ecetsav	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Magyarország
Kloroform	≥ 99 %	VWR Hungary, Magyarország
Alamethicin standard (1 mg/cm ³)	-	Sigma-Aldrich, Magyarország

1. táblázat: A munkám során felhasznált anyagok

3.1.2. Felhasznált eszközök

Munkám sor két különböző LC-MS készülékkel nyílt lehetőségem dolgozni. Az egyik egy ioncsapdás analizátorral ellátott készülék volt (a későbbiekben Varian MS), melynek paramétereit a 2. táblázat mutatja be, a másik egy single kvadrupól analizátoros LC-MS műszer volt (a későbbiekben Shimadzu MS), melynek egységeit a 3. táblázat szemlélteti.

Eszköz neve	Típusa	Gyártó/forgalmazó
Tömegspektrométer	Varian 500 MS-LC ion trap	Agilent Technologies, USA
Rendszervezrlő egység	Agilent 1100	Agilent Technologies, USA
Diódasoros detektor	G1315B	Agilent Technologies, USA
HPLC-Pumpa	G1376A	Agilent Technologies, USA
Gáztalanító egység	G1379A	Agilent Technologies, USA
Automata mintaadagoló	G1229A	Agilent Technologies, USA
Oszloptermosztát	Jones Model 7990	Jones Chromatography, UK

2. táblázat: A Varian LC-MS készülék paramétereit

Eszköz neve	Típusa	Gyártó/forgalmazó
Tömegspektrométer	LCMS-2010A	Shimadzu, Japán
Rendszervező egység	SCL-10A VP	Shimadzu, Japán
Diódasoros detektor	SPD-M10A VP	Shimadzu, Japán
HPLC-Pumpa	LC-10AD VP	Shimadzu, Japán
Oldószerváltó szelep	FCV-10AL VP	Shimadzu, Japán
Gáztalanító egység	DGU-14A	Shimadzu, Japán
Oszloptermosztát	CTO-10AS VP	Shimadzu, Japán
Automata mintaadagoló	L-7200	Hitachi, Japán

3. táblázat: A Shimadzu LC-MS készülék paraméterei

A 2., illetve a 3. táblázatban feltüntetett eszközökön kívül oldatok bepárlására egy IKA RV 10 (IKA Works, USA) rotációs bepárló készüléket, tömegmérésre egy E10640 analitikai mérleget (Ohaus, Svájc), centrifugálásra egy Heraeus Fresco 17 (Thermo Scientific, USA) laboratóriumi centrifugát, illetve oldatok melegítésére egy Cole-Parmer (Cole-Parmer Instrument C., USA) típusú laboratóriumi hűtő-melegítő készüléket alkalmaztam.

Az adatok gyűjtéséhez, a vezérléshez és a kiértékeléshez a Shimadzu MS esetében a LabSolution (Shimadzu, Japán) szoftvert, míg a Varian MS esetében a Chemstation B.02.01 és MS Workstation 6.6 szoftvereket alkalmaztam.

3.2. Analitikai vizsgálatok

3.2.1. LC-MS paraméterek optimalizálása

A Varian MS működési paramétereinek optimalizálása

A Varian LC-MS esetében, még munkám megkezdése előtt rendelkezésre állt egy olyan konfiguráció, melynek segítségével lehetőség nyílt peptaidok detektálására. Ezeket a beállításokat munkám során mindvégig megtartottuk [10]. A szóban forgó készülék atmoszférikus nyomású ESI ionforrással volt ellátva, mely scan üzemmódban mért, normál scan sebesség mellett. A pozitív és negatív ESI paraméterek a következők voltak: A spray kamra hőmérséklete, 50°C; a szárító gáz (N₂) nyomása és hőmérséklete, 30 psi és 350°C; a porlasztó gáz (N₂) nyomása, 50°C; tű feszültség, 5704 V/-5000 V; a spray pajzs feszültség, 600V/-600V. Az általános paraméterek: Maximum scan idők, 2.78 μ Scan; átlag, 2 μ Scan; Adatfelvételi ráta, 0.36 Hz; multiplier offset, 0. Az ionizációs vezérlő paraméterek a következőképpen alakultak: cél TIC, 100%; maximális ion idő, 250000 μ sec. A teljes scan paraméterek: kapilláris feszültség, 66V; RF töltés, 147%; a legalacsonyabb detektálható tömeg küszöbértéke, 100 (m/z); a legmagasabb detektálható tömeg küszöbértéke, 2000 (m/z).

Az említett MS beállítások mellett a korábban bevált HPLC paraméterek sem változtak: az A eluens víz, a B eluens MeCN/MeOH 1:1 (v/v) arányú elegye, és mindkettő eluenst 0,05 % (v/v) TFA-val egészítettük ki. Az elválasztásokhoz a Phenomenex Gemini NX-C18 (Genlab Kft., Magyarország) oszlopot (150 mm x 2,0 mm, 3 μ m) alkalmaztam 0,2 ml/perc-es áramlási sebesség mellett. Az oszloptermosztát hőmérséklete 40°C volt. A mérésekhez a gradiens program a következő volt: A futás 65% B arányról indul, mely 5 percre állandó értéken marad, majd lineárisan emelkedik a 45. percre 80 százalékra, és ezt követően, a 70. percre 100 %-ra. Végül a kiindulási arányra áll vissza 2 perc alatt, egészen a nyomás állandósulásáig. Az injektálási térfogat minden esetben 5 μ l volt. [10]

Shimadzu MS működési paramétereinek optimalizálása

A Varian készülékkel szemben, a Shimadzu LC-MS-re nem rendelkezünk a peptidok detektálására alkalmas módszerrel, így egy saját módszer fejlesztése vált szükségessé.

Az optimalizálás során öt MS paraméter változásának jellegzetességeire gyakorolt hatását vizsgáltuk. Optimalizáláskor oszlop nélkül mértünk, hogy gyorsabb legyen az analízisidő. A módszerfejlesztés során az ESI ionforrással, a készülék alapbeállításainak alkalmazásával, pozitív ionizációval, scan módban vettük fel az ALM standard tömegspektrumait. A csúcsokból vett spektrumok alapján azonosítottuk a karakterisztikus ionokat, melyek segítségével meg tudtuk határozni a komponensekhez tartozó, és a későbbi kvantitatív analízisben alkalmazható SIM ionokat. Első lépésként a CDL feszültséget változtattuk 10V és -200V között, majd a CDL hőmérsékletet változtattuk 150°C és 300°C között. Következő lépésben a porlasztó gáz áramlási sebességét változtattuk 0,5 l/perc és 1,5 l/perc között. Negyedik lépésben a Q-array feszültség DC értékét teszteltük az alapbeállításokból kiindulva. Az ötödik, utolsó lépésben a fűtőblokk hőmérsékletét változtattuk 100°C és 150°C között. Az MS paraméterek optimalizálása után megkezdjük a kromatográfiás módszer kidolgozását.

Kromatográfiás paraméterek optimalizálása

A kromatográfiás paraméterek optimalizálásánál az MS paramétereket változatlanul hagytuk, és bekötöttük az elválasztáshoz alkalmazott Phenomenex Prodigy (Genlab Kft., Magyarország) 100 x 2 mm 3 μ -os HPLC- oszlopot. A mérések során a kiindulási pontot a Varian LC-MS készüléknél bevált módszer jelentette. Az oszlop használata már megnövelte a mérések futási idejét és így a módszerfejlesztés idejét is. A fejlesztés pozitív ionizációval, scan módban történt, az ALM standard oldat injektálásával (10 μ l), ahol az idő függvényében

a különböző rendszerekben az egyes eluensek arányát állandó értéken tartva törekedtünk az izokratikus elválasztás megvalósítására. Célunk az volt, hogy a vizsgált vegyületek csúcsai jól láthatóan elkülönüljenek egymástól, ezáltal jól azonosíthatóak legyenek a retenciós idejük alapján. A vizsgált rendszereket a 4. táblázat foglalja össze.

Rendszer	B eluens (%)	Elválasztási idő (perc)
1	100	30
2	90	30
3	80	30
4	85	30

4. táblázat: A kromatográfiás módszerfejlesztés során tesztelt izokratikus oldószer rendszerek

3.2.2. Az extraktumok és a frakciók mérése

A valódi minták mérésére a Shimadzu készülék optimalizálását követően, az ALM standard segítségével felállított, az ismeretlen peptaibolok karakterisztikus ionjainak leírására is alkalmas szabályrendszer birtokában kerülhetett sor.

Kromatográfiás paraméterek:

- Injektálási térfogat: 10 µl
- Mozgófázisok: A – H₂O + 0,05% TFA, B – MeCN/MeOH + 0,05% TFA
- Oszlop: Phenomenex Prodigy 100 x 2 mm, 3 µ
- Optimális módszer: 85% B, 15% A; 30 perc
- Mérési hullámhosszak: 210 nm, 254 nm

Tömegspektrometriás paraméterek:

- Interface feszültség: 2 kV
- Detektor feszültség: 1,5 kV
- Curved Desolvation Line (CDL) feszültség: 0 V
- Q-array feszültség: DC – 0 V, R_f – 150
- CDL hőmérséklet: 250 °C
- Fűtő blokk: 150 °C
- Porlasztó gáz (N₂) áramlás: 1,5 l/perc

- Polaritás: + üzemmódban
- Analizátor mód: scan

3.3. Szemipreparatív vizsgálatok

A szemipreparatív tisztítás során a Shimadzu LC-MS készüléknél optimálisnak talált izokratikus HPLC módszert alkalmaztuk, az áramlási sebességet azonban növeltük 1 ml/percre, valamint állófázisként egy Thermo Scientific (Thermo Scientific, USA) BioBasic 250 x 4 mm-es, 5 µ-os C18 oszlopot használtunk. A frakciók szedése manuálisan történt, a 210 nm-en mért PDA detektor jel alapján, a következő időintervallumokban: 1. frakció (9,7 perc - 10,5 perc), 2. frakció (11,7 perc - 12,5 perc), 3. frakció (14 perc – 15,5 perc), 4. frakció (16,5 perc - 18 perc), 5. frakció (19 perc - 21 perc), 6. frakció (22,5 perc - 24 perc).

3.4. A vizsgált törzs és a tenyésztési körülmények

A Szeged Mikrobiológiai Törzsgyűjteményben (SZMC) rendelkezésre álló *Trichoderma harzianum* SZMC 1874 törzs Kecskemétről származik és *Agaricus bitorquis* termőtestéről került izolálásra. A törzseket ferde-agaron élesztő kivonatos táptalajon (10 g glükóz; 5 g élesztőkivonat; 20 g agar) tartottuk fenn.

A korábbi bioteszt eredmények alapján a tenyésztéshez malátakivonatos táptalajt (30 g maláta extraktum, 3 g szója pepton, 20 g agar, 1 liter vízben) alkalmaztunk. A kiöntött Petri-csészéket (25 ml) csíkhúzásos módszerrel oltottuk le. A tenyészeteket 25°C-on 7 napig inkubáltuk.

3.5. A metabolitok extrakciója

A vizsgált törzs által termelt peptaibolok kloroformmal történő extrakcióját két eljárással valósítottuk meg. Az első módszer alapján, minden egyes Petri-csésze felszínére 5 ml kloroformot pipettázunk, amit egyenletesen szétterítünk az agar felszínén. A művelet végeztével a felülúszó oldatot pipettával felszívtuk és egy Falcon-csőbe vagy gömblombikba gyűjtöttük, majd bepároltuk. A bepárlást követően az anyagot 1 ml metanolban újra felvettük, lecentrifugáltuk és a felülúszó oldatrészt használtuk a további mérésekhez.

A második módszer szerint a csésze felső 3-5 mm-es rétegét egy lemez segítségével eltávolítottuk és egy nagyobb térfogatú (pl. 500 ml-es) főzőpohárba gyűjtöttük. Ezt 2x100 ml kloroformmal extraháltuk. A művelet végeztével a felülúszót gömblombikba öntöttük, majd a

bepárlást követően az előző eljárással azonos módon készítettük elő a mintát a további vizsgálatokra.

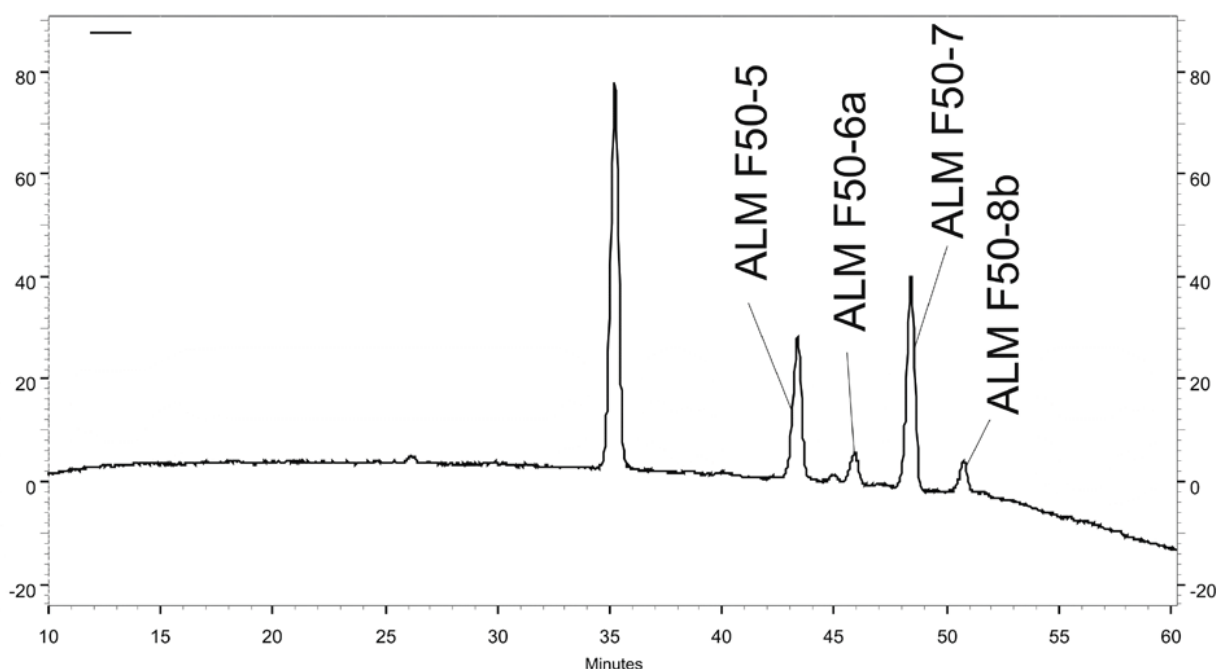
4. Eredmények és értékelésük

4.1. Analitikai vizsgálatok

4.1.1. Módszer optimalizálás

A Shimadzu készülék optimalizálása

A folyamat során 1 mg/cm^3 -es koncentrációjú ALM standard oldat segítségével oszlop bekötése nélkül, gyors futási időkkel dolgoztam. A feladatom az volt, hogy olyan tömegspektrometriás beállításokat találjak a Shimadzu készülékhez, melyek segítségével a korábban Varian LC-MS-el azonosított, az ALM 4 komponensét leíró karakterisztikus ionokat (3. ábra, 1. függelék, 5. táblázat) majdan ezzel a készülékkel is megfelelő érzékenységgel detektálni tudjam. Az eljárás során az ALM standard F50-5 és F50-7 komponensének m/z 774 y_7 ionjának, valamint F50-7 és F50-8b komponensének m/z 1204 b_{13} ionjának intenzitását vizsgáltam a műszer különböző beállításai mellett. [10]

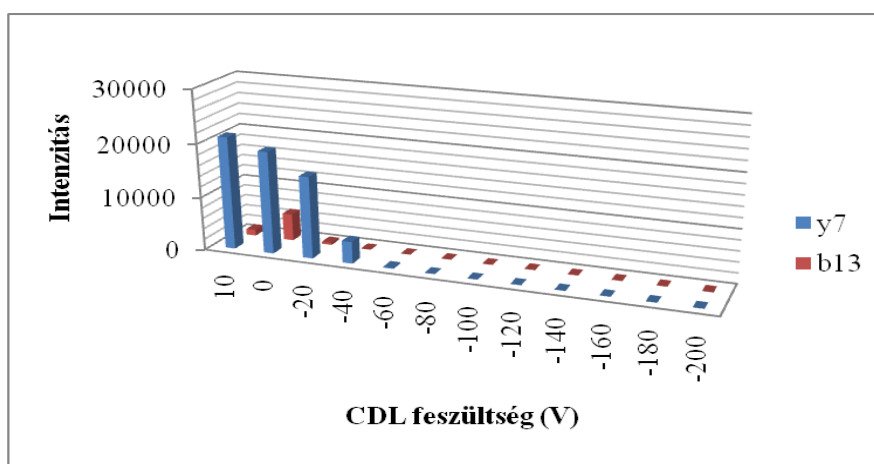


3. ábra: A Varian LC-MS készülékhez tartozó HPLC-UV detektorral felvett kromatogram az alamethicinről, 210 nm-en. [10]

	Alamethicin komponensek			
	5	6a	7	8b
R _t (perc)	43,7	46,2	48,5	51,1
(M+H) ⁺	1963	1977	1977	1991
(M+Na) ⁺	1985	1999	1999	nd.
(M+2Na) ²⁺	1004	1011	1011	1018
(M+Na+H) ²⁺	993	1000	1000	1007
(M+2H) ²⁺	982	989	989	996
(M-H ₂ O) ⁺	1945	1959	1959	1973
b ₁₃	1189	1189	1203	1203
b ₁₀	934	934	948	948
b ₈	750	750	764	764
b ₄	381	381	381	381
b ₃	310	310	310	310
y ₇	774	788	774	788

5. táblázat: A Varian MS segítségével meghatározott ALM komponensek pozitív mérési módban detektálható karakterisztikus ionjaihoz tartozó m/z értékek [10].

Az optimalizálás legelső lépésében a CDL feszültséget változtattam. Az eredményeket a 4. ábra szemlélteti.



4. ábra: A Shimadzu készülék CDL feszültségének optimalizálása ALM standard (100 µg/ml) segítségével.

A kapott eredmények alapján kitűnik, hogy bár a legnagyobb y₇ csúcshintenzitás értéket 10 V CDL feszültség mellett tudtam detektálni, de a b₁₃ ion intenzitása lényegesen elmarad a

0 V esetben detektáltától, így a további mérések során a CDL feszültséget 0V értéken alkalmaztam. Megfigyelhető továbbá a csúcsmagasságok viszonylagos monoton csökkenése a CDL feszültség lépcsőzetes növelésével.

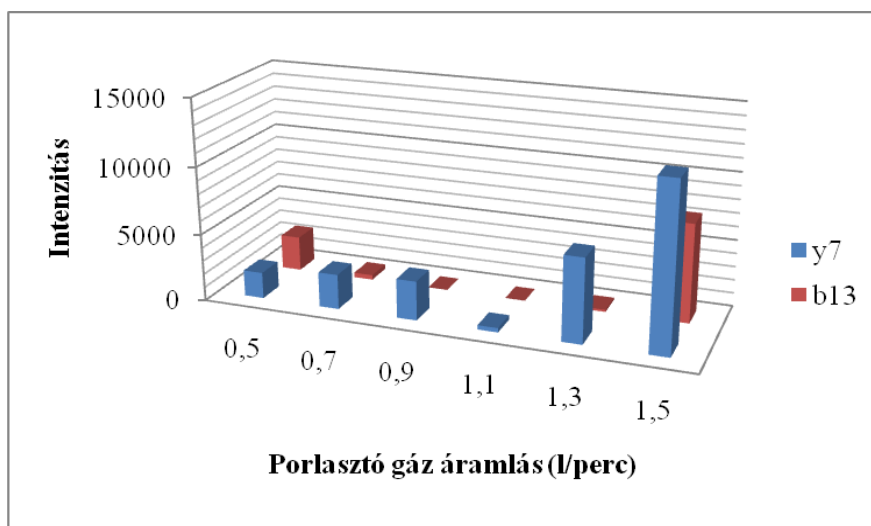
Második lépésben a CDL hőmérséklet változásának a csúcsmagasságra gyakorolt hatását vizsgáltam meg a 150°C és 250°C hőmérséklet tartományon. Az eredményeket a 6. táblázat mutatja be.

T_{CDL} (°C)	I_{y7}	I_{b13}
150	3655	149
200	8773	0
250	29240	5412

6. táblázat: A Shimadzu készülék CDL hőmérsékletének optimalizálása ALM standard (100 µg/ml) segítségével.

Mint látható, a mérési tartományon belül a legnagyobb intenzitás értékeket a 250°C melletti CDL hőmérséklet beállításon sikerült mérni, így a továbbiakban is ennél az értéknél maradtam.

A harmadik vizsgált paraméter a porlasztó gáz áramlásának mértéke volt, az eredményeket az 5. ábra foglalja össze:



5. ábra: A Shimadzu készülék porlasztó gáz áramlásának optimalizálása ALM standard (100 µg/) segítségével a 0,5 l/perc és 1,5 l/perc közötti intervallumon.

A mérések során a legnagyobb ion-intenzitásokat a 1,5 l/perc melletti beállításon tapasztaltam, így a későbbiekben is ennél az értéknél mértem.

Az optimalizálás negyedik lépésében a Q-array feszültség DC értékét változtattam a 0V és 40V közötti intervallumon, 20V-os léptékben. Az eredményeket a 7. táblázat szemlélteti:

$U_{Q\text{-array} - DC} \text{ (V)}$	I_{y7}	I_{b13}
0	31700	2490
20	19000	2260
40	17100	1610

7. táblázat: A Shimadzu készülék Q-array feszültségének DC értékének optimalizálása ALM standard (100 µg/ml) segítségével.

A vizsgálat során az alapkonfiguráció 0 V értékéről indultunk, majd látva a csúcsmagasságokban a monoton csökkenést, a 0 V értéket választottuk ki a további méréseinkhez.

Az ötödik, egyben utolsó tesztelt paraméter a fűtőblokk hőmérséklete volt, melynél az alapkonfigurációban 100°C érték van megadva. Az eredmények a következők voltak:

$T_{\text{fűtőblokk}} \text{ (°C)}$	I_{y7}	I_{b13}
100	17308	2046
125	24214	3208
150	37008	17910
175	25390	4487

8. táblázat: A Shimadzu készülék Q-array feszültségének DC értékének optimalizálása ALM standard (100 µg/ml) segítségével.

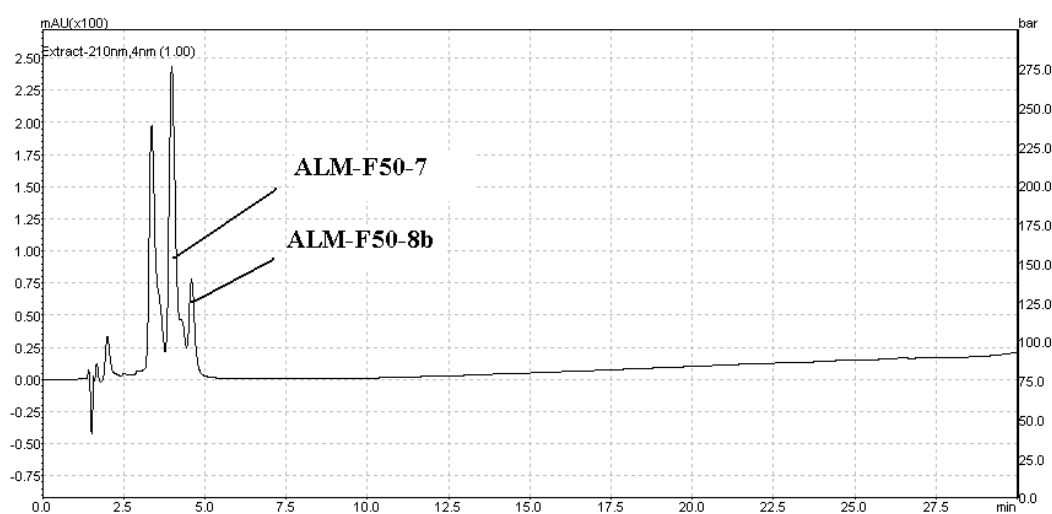
A legideálisabbnak a 150°C hőmérsékletnél mért értékek mutatkoztak, így a későbbi méréseimhez is ezt a beállítást alkalmaztam.

A karakterisztikus ionok keresése

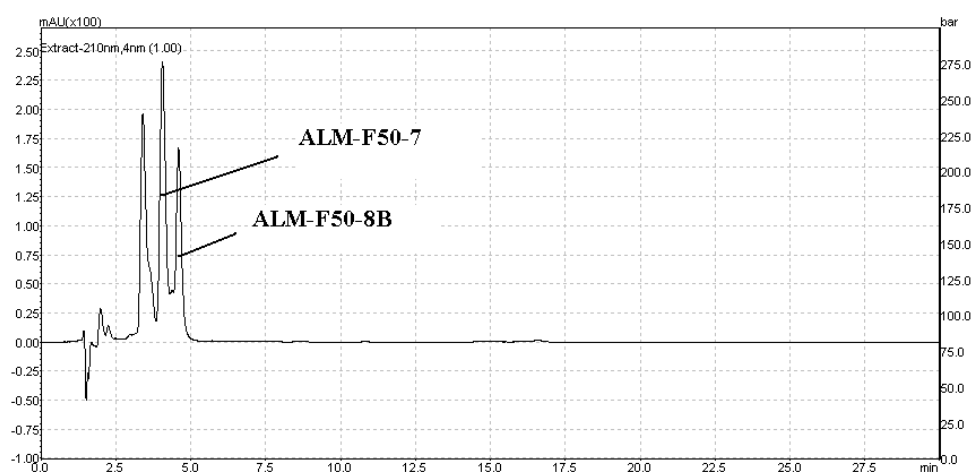
Az optimálisnak tekintett Shimadzu MS beállítások birtokában, következő feladatomban a műszerhez kapcsolódó HPLC készülékhez egy olyan kromatográfiás módszer fejlesztése volt, amellyel a 3. ábrához hasonlóan, lehetőségem lesz az ALM 4 komponensének izokratikus elválasztására és ebből következően, a komponensek karakterisztikus ionjainak vizsgálatára (5. táblázat). A módszerfejlesztés során a 4. táblázatban bemutatott rendszereket vizsgáltam meg. Méréseim legfőbb célja az ioncsapdás Varian MS és a single kvadrupól analízátoros

Shimadzu LC-MS készülék érzékenységének összevetése volt, amely a gyakorlatban a detektált karakterisztikus ionok abundanciáinak összevetését jelentette. A peptaibol fragmens ionok abundanciáinak pontos ismerete azon túl, hogy a Shimadzu készülék tömegspektrumainak jövőbeli kiértékelését jelentősen egyszerűsíti, a későbbiekben lehetőséget biztosítana számomra a tömegek detektálásán alapuló tisztításra.

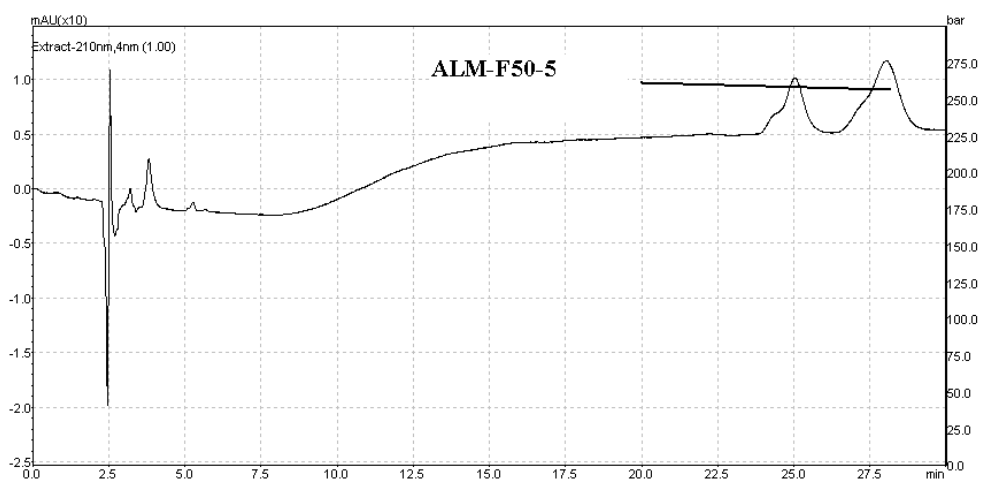
A kromatográfiás módszerfejlesztés során kipróbált rendszereket a 4. táblázat foglalja össze, a készített kromatogramokat a 6. - 9. ábra szemlélteti.



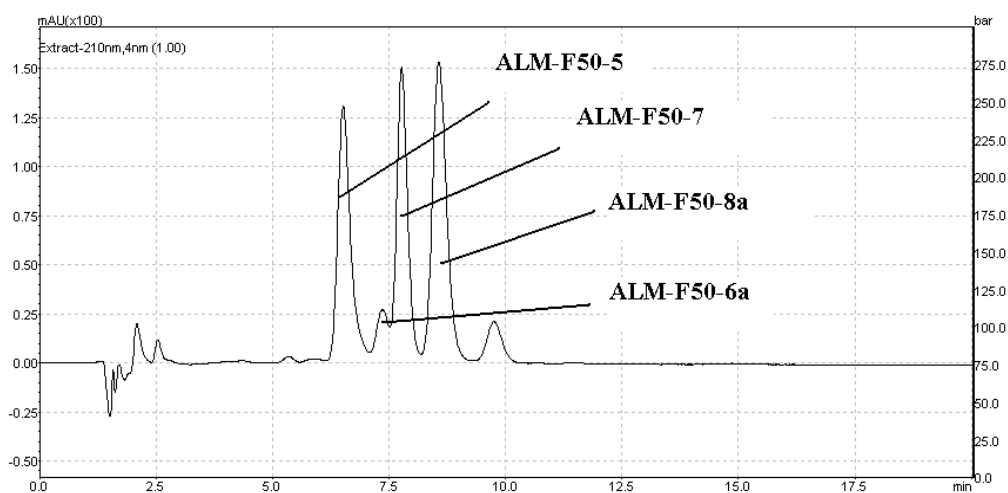
6. ábra: Alamethicin standard ($c = 200 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, $10 \mu\text{l}$ injektálva) kromatogramja 100% B eluens izokratikus áramoltatása mellett, 210 nm-en.



7. ábra: Alamethicin standard ($c = 200 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, $10 \mu\text{l}$ injektálva) kromatogramja 90% B eluens izokratikus áramoltatása mellett, 210 nm-en.



8. ábra: Alamethicin standard ($c = 200 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, $10 \mu\text{l}$ injektálva) kromatogramja 80% B eluens izokratikus áramoltatása mellett, 210 nm-en.



9. ábra: Alamethicin standard ($c = 200 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, $10 \mu\text{l}$ injektálva) kromatogramja 85% B eluens izokratikus áramoltatása mellett, 210 nm-en.

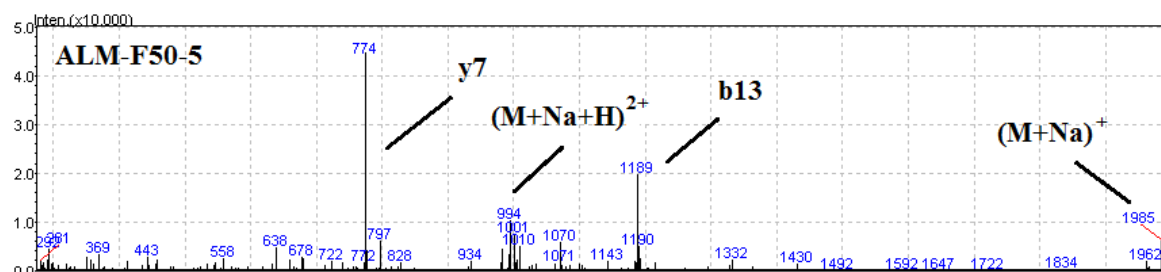
Első lépésként a teljes mértékben szerves oldószeres (100% B) rendszert vizsgáltam meg, amelynél bár egyértelműen kitűnik, hogy az anyag röviddel az injektálást követően eluálódik az oszlopról, mégis észrevehetően jelentkeznek 2 csúcs (ALM-F50-7 és ALM-F50-8a) (13. és 14. ábra) minimális elválása, amelyből arra következtettem, hogy a döntő részt szerves (azaz B) eluenst alkalmazó izokratikus módszer jó kiindulási pont, de a szerves eluens mellé nagyobb arányú vizes oldószert is szükséges alkalmaznom. A következő lépésben 10%-os léptékben folytattam tovább az A eluens térfogat százalékának növelését, kevés eredménnyel. A 80% B arányú izokratikus módszer lényeges változást hozott a retenciós időkben. A 9. ábrán jól látható, ahogy ~23 perctől indulva megjelenik az első jellegzetes ALM csúcs, melyet közvetlenül követ a többi, melyek közül csak az első kettőt sikerült a 30

perces futási idő miatt azonosítani (11., 12. ábra). A jelentős mértékű változás hatására, némileg emeltem a szerves oldószer arányán és a 85 % B – 15 % A arány melletti oldószer rendszer alkalmazásával ismételt meg a mérést. A vizsgált rendszer az opcionális, 30 perces futási időn belül, a 10. ábrán látható mértékben, a 9. táblázatban feltüntetett paraméterekkel elválasztotta az ALM komponenseket egymástól, ezáltal lehetőséget biztosítva az egyes alkotóelemek karakterisztikus ionjainak MS vizsgálatára és a későbbi szemipreparatív vizsgálatokra, tömegre történő frakciószedéssel.

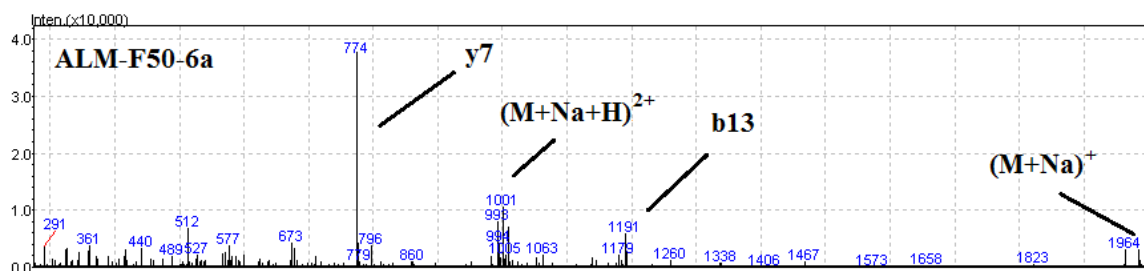
Komponens	R _t (perc)	Csúcsterület
ALM-F50-5	6,689	1403570
ALM-F50-6a	7,545	457435
ALM-F50-7	8,721	2157418
ALM-F50-8b	9,852	386522

9. táblázat: Alamethicin standard ($c = 200 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, 10 μl injektálva) komponenseinek retenciós idői és csúcsterület értékei 85% B – 15 % A eluens arányú izokratikus elválasztás során. (210 nm-en)

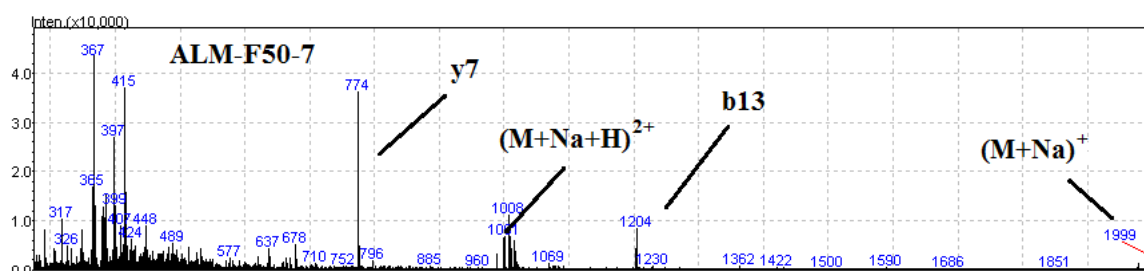
A kapott eredmény egy olyan analitikai módszert jelentett, amely az izokratikus elúció miatt, a későbbiekben jó eséllyel átvihető lesz szemipreparatív rendszerre, akár kizárólag az oszlop cseréjével és az áramlási sebesség változtatásával. Emelett biztosította a megfelelő kromatográfiás elválasztást az ALM komponenseinek tömegspektrometriás vizsgálatához. A 10. ábrán bemutatott PDA-kromatogram felvételével egyidejűleg készített, az egyes UV-ban detektált csúcsok full scan méréséről készült tömegspektrumokat a 10. – 13. ábrák szemléltetik.



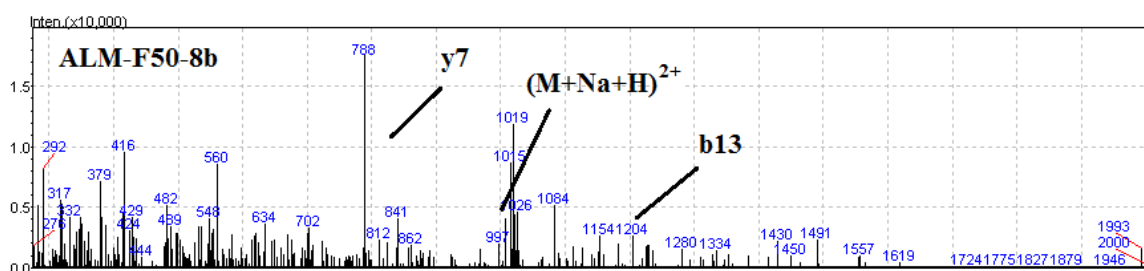
10. ábra: Alamethicin standard F50-5 komponensének full scan spektruma pozitív ion módban.



11. ábra: Alamethicin standard F50-6a komponensének full scan spektruma pozitív ion módban.

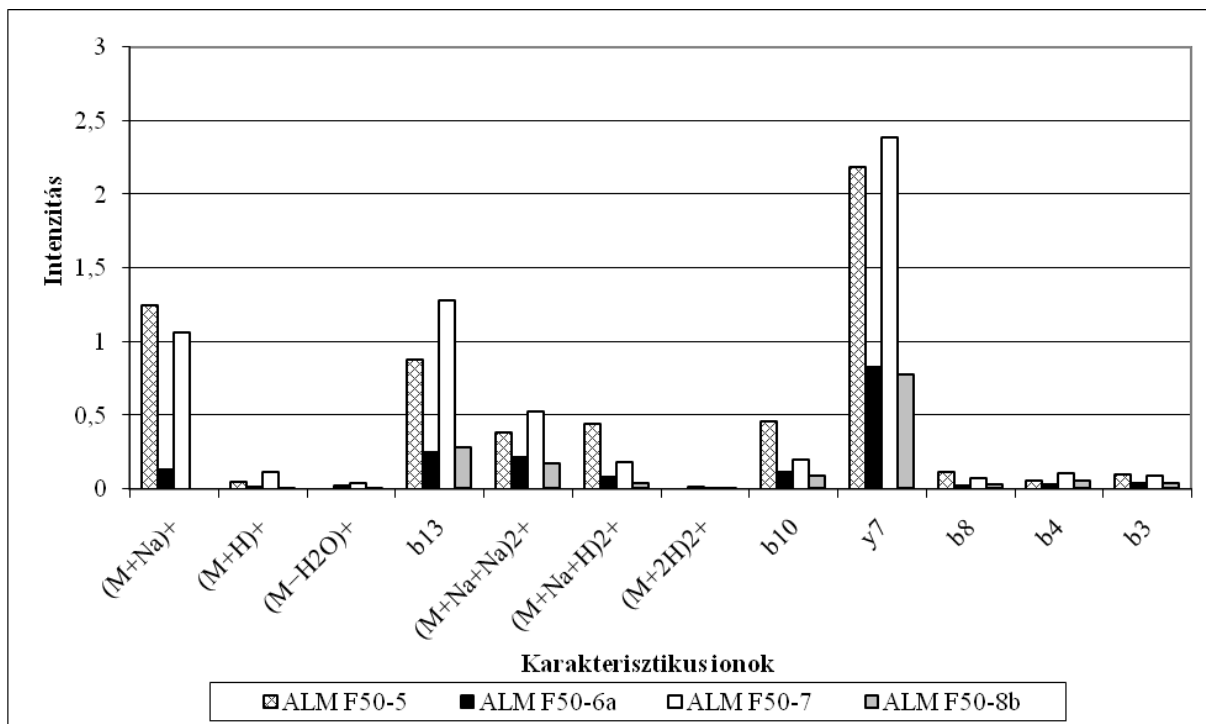


12. ábra: Alamethicin standard F50-7 komponensének full scan spektruma pozitív ion módban.

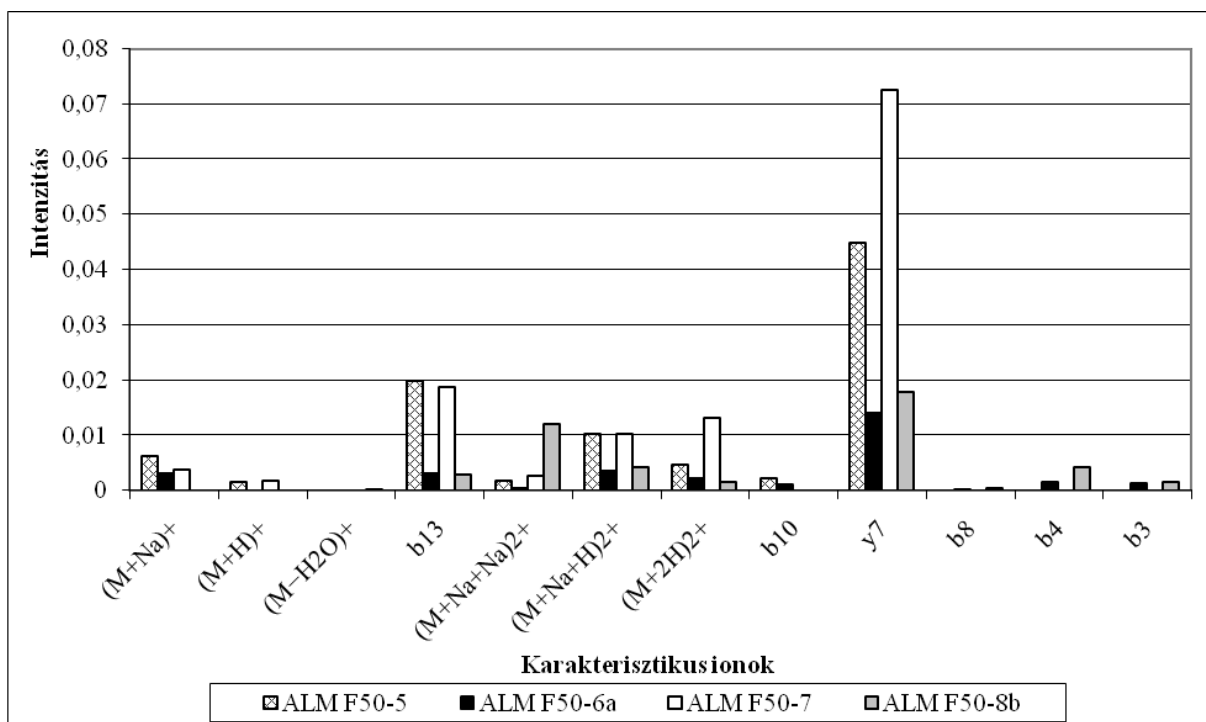


13. ábra: Alamethicin standard F50-8b komponensének full scan spektruma pozitív ion módban.

A felvett tömegspektrumok lehetőséget biztosítottak az 5. táblázatban szereplő, előzőleg már meghatározott karakterisztikus ionok visszakeresésére, majd azok abundanciáinak összevetésére, mely során a két készülék (Varian MS, Shimadzu MS) közti detektálási különbséget határozhattuk meg. A Varian MS segítségével detektált karakterisztikus ionok abundanciáit a 14. ábra mutatja be.



14. ábra: Az alamethicin komponensek karakterisztikus ionjainak a Varian MS készüléken detektált intenzitásai pozitív ion módban. [10]



15. ábra: Az alamethicin komponensek karakterisztikus ionjainak a Shimadzu MS készüléken detektált intenzitásai pozitív ion módban.

Az eredményeket összevetve megállapítható, hogy az egyes karakterisztikus ionok intenzitásai a két készülék esetében közel hasonló arányúak. Mindkét tömegspektrométerrel készített spektrumokon a legnagyobb intenzitással az y_7 ionok jelentkeznek, majd valamelyest alacsonyabb érték mellett a b_{13} ionok. A Varian készülék lényegesen jobb érzékenységgel detektálja az $(M+Na)^+$ ionokat, ugyanakkor a Shimadzu MS valamelyest nagyobb érzékenységet mutat a $(M+2H)^{2+}$ molekulaionokra.

Az ALM komponensek karakterisztikus ion-típusainak és azok intenzitás viszonyainak az alkalmazott készülékeken történő megismerésével következtetni lehet a későbbi ismeretlen peptaidok molekulák tömegspektrális viselkedésére, így lehetővé válik azok detektálása és szerkezetének feltárása.

4.1.2. Az ismeretlen minták vizsgálata

A peptaidok tömegspektrometriás vizsgálatának folyamata

Számos írás jelent már meg peptaidok tömegspektrometriás vizsgálatáról, amelyek több jellegzetességükről is beszámolnak [10, 11]. Az általános tapasztalatok alapján, az ismeretlen peptaidok tömegspektrometriás azonosítása során a következő, több lépéses szabályrendszert és eljárást dolgoztuk ki:

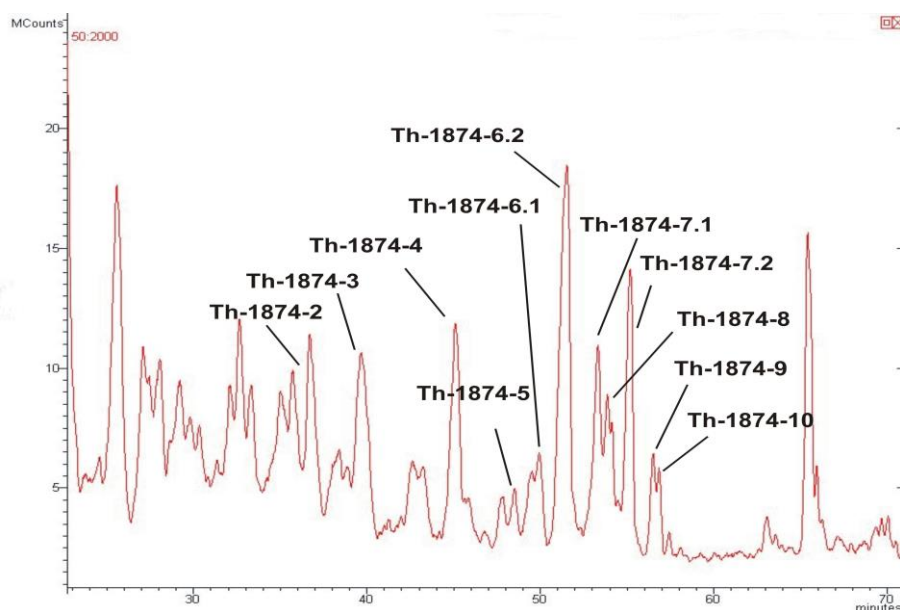
- 1) Elsőként a legcélszerűbb a gyakori hasadási pontokból származó nagy intenzitású ionokat megkeresni. A peptaidok egyik legjellegzetesebb MS sajátossága a labilis Aib-Pro kötés felszakadása, amely során egy (C-terminális) y-ion és egy (N-terminális) b-ion keletkezik. Pozitív mérési módban dolgozva, ezek tömegének összege megegyezik az $(M+H)^+$ ionnal, amelyből megállapítható a peptid moláris tömege (M).
- 2) A peptaidok fragmensek ionjai előszeretettel vesznek fel Na^+ , így a főtömeg megállapítása után legcélszerűbb az $(M+Na)^+$ értékhez tartozó tömeget megkeresni a spektrumon (M értékének visszaellenőrzése).
- 3) Az $(M+Na)^+$ ion azonosítását követően, következik az $(M+2Na)^{2+}$ ion meglétének ellenőrzése, amely kétszeresen pozitív töltéséből fakadóan a valós tömegének felével jelentkezik a spektrumon. E tömegek együttes jelenléte (y-b pár, $M+Na^+$, $M+Na^{2+}$) igazolja a vizsgált vegyület peptaidok minőségét.
- 4) Az azonosítás negyedik lépésében célszerű az Aib-Pro kötés felszakadásából származó legnagyobb b ion tömegéből az N-terminális fragmens végén elhelyezkedő 85-ös (m/z) (Aib) tömeget levonni és megállapítani a megelőző b_{x-1} ion tömegét.

- 5) A következő feladat a további b ionok megkeresése és azonosítása az aminosavak tömegeinek ismeretében (2. függelék).
- 6) Az y ion (C-terminális fragmens az Aib-Pro kötés hasadása után) MS2 fragmentálása és a keletkező b ionok azonosítása az 5. ponthoz hasonlóan.
- 7) A vegyület újdonságának ellenőrzése a Comprehensive Peptaibiotics Database segítségével [12].

Az ismeretlen vegyületek vizsgálata

Az optimalizálási munkák végeztével, a vizsgált *T. harzianum* SZMC 1874 törzs által termelt metabolitok extrakciójára 2 eltérő, kloroformos kioldáson alapuló módszert vizsgáltam meg. Céлом az extraktumban kioldott anyag mennyiségének összevetésével az eljárás optimalizálása volt. A kapott eredmények a kioldott anyagmennyiségek közel hasonló értékéről számoltak be, ugyanakkor a tenyésztés során a Petri-csészékbe öntött agar felső 3-5 mm-es rétegének eltávolításán alapuló módszer lényegesen gyorsabbnak és oldószer-takarékosabbnak bizonyult, így a tenyésztések során termelt metabolitok extrakciójára a továbbiakban ezt az eljárást alkalmaztam.

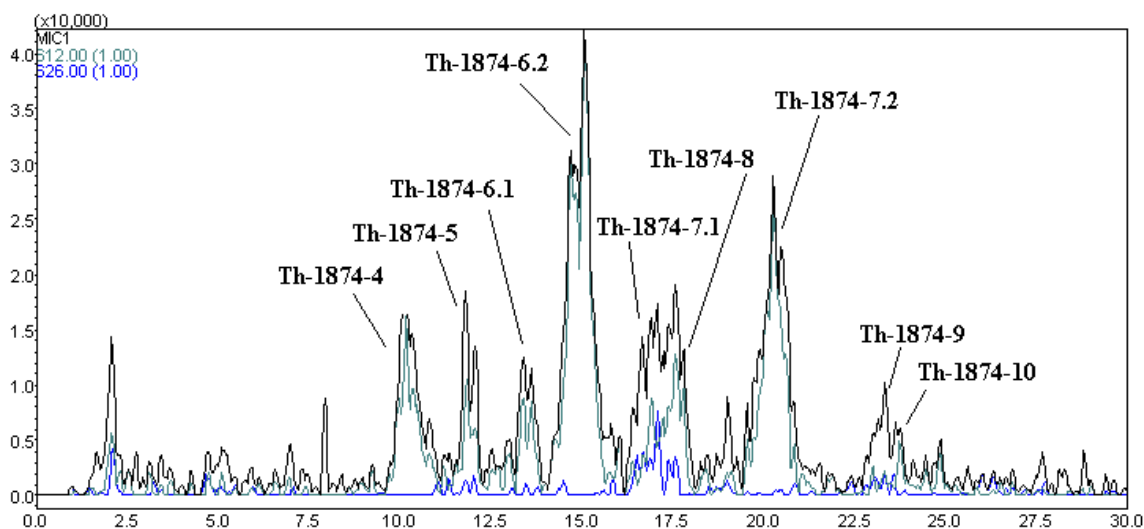
A *T. harzianum* SZMC 1874 törzs 120 db Petri-csészéről gyűjtött micéliumát a bepárlást követően 1 cm³ metanolban visszaoldottam, majd a Varian LC-MS segítségével rögzítettem a totál ion kromatogramját. (16. ábra).



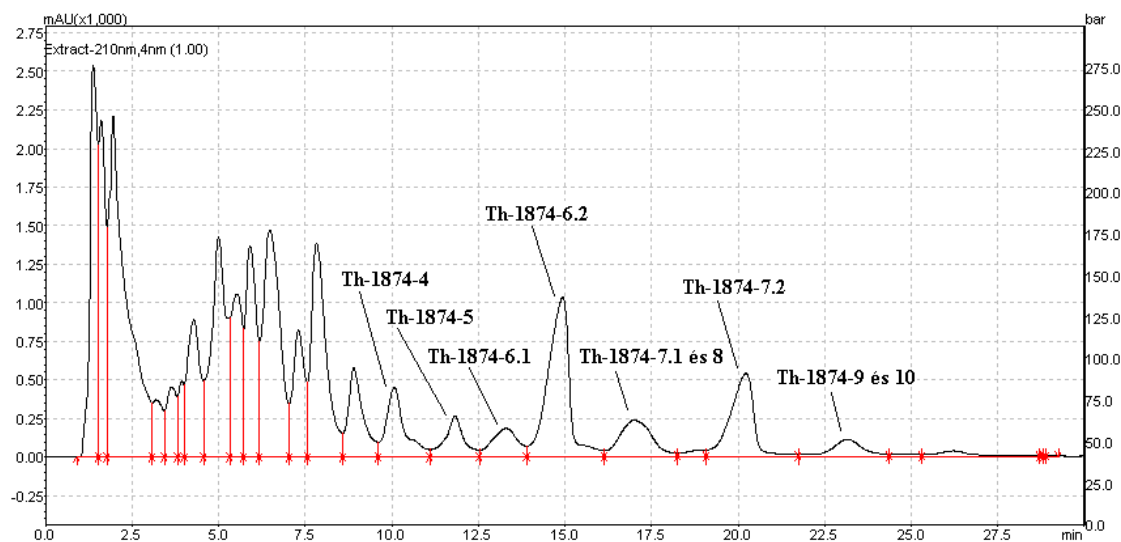
16. ábra: *T. harzianum* SZMC 1874 kloroformmal kinyert extraktumának totál ion kromatogramja a Varian LC- MS rendszeren

A totál ion kromatogramon, a korábban részletezett elemzési folyamat alapján eljárva összesen 11 db ismeretlen peptaibol vegyületet azonosítottunk, melyek retenciós időit, illetve karakterisztikus ionjait a 3. -, illetve a 4. függelék mutatja be.

A Shimadzu LC-MS készülékkel rögzített totál ion kromatogramot a 17. ábra, a PDA detektorral 210 nm-en rögzített UV- kromatogramot a 18. ábra mutatja be.



17. ábra: *T. harzianum* SZMC 1874 kloroformmal kinyert extraktumának az y_7 ionokra extrahált kromatogramja. (Shimadzu LC-MS)

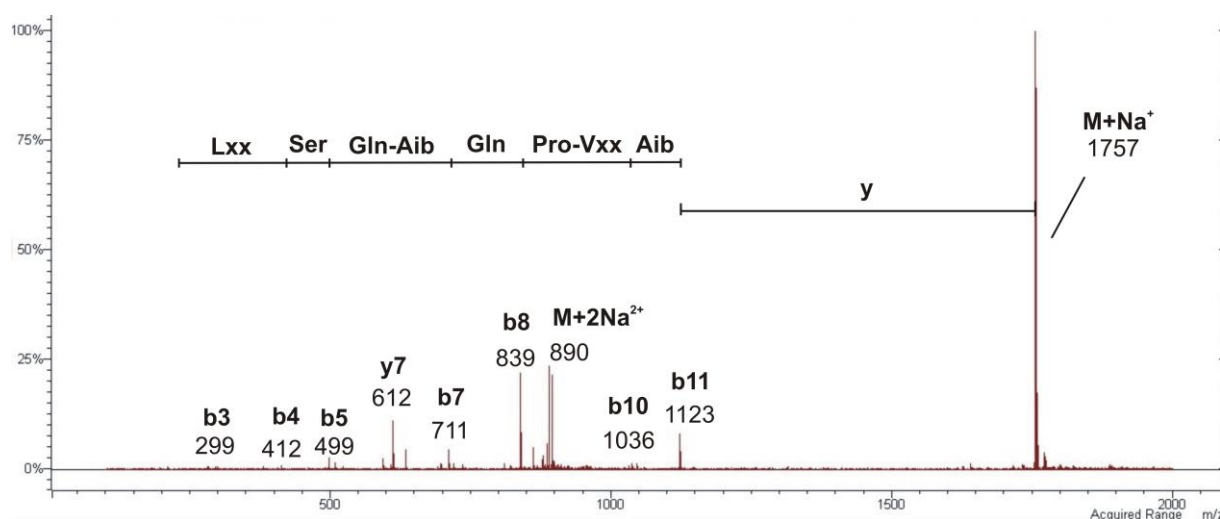


18. ábra: *T. harzianum* SZMC 1874 kloroformmal kinyert extraktumának PDA-kromatogramja, 210 nm-en. (Shimadzu LC-MS)

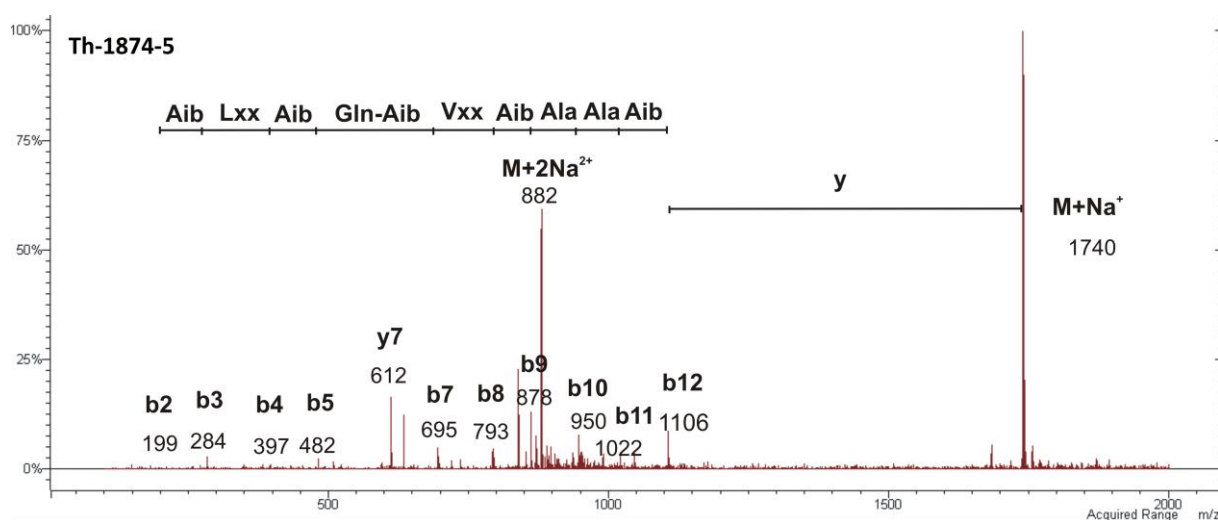
Az eredményeket összevetve, a Varian MS készülékkel valamelyest jobb hatásfokkal sikerült az ismeretlenek elválasztását és azonosítását elvégezni. Ez főként az érzékenyebb

ioncsapdás analízátorral, illetve az összetettebb, időben is hosszabb gradiens programmal volt magyarázható. A Shimadzu készülék ezzel szemben egy gyorsabb programmal dolgozott, amely egyszerűségéből fakadóan, a későbbi szemipreparatív LC-MS vizsgálatokhoz nyújtott ígéretes alapot.

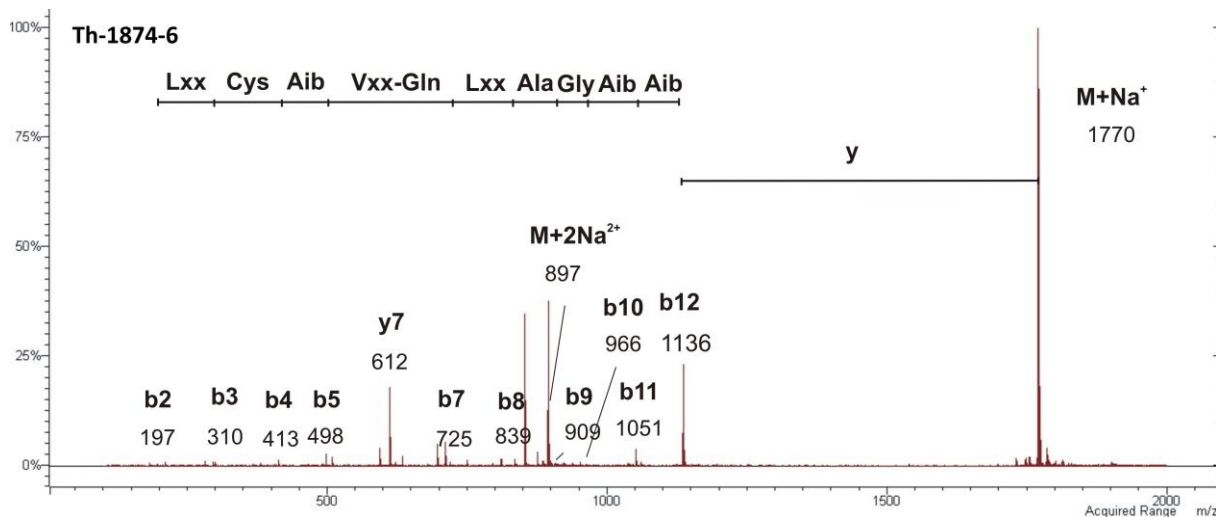
A karakterisztikus ionok segítségével, néhány ismeretlen peptaibol vegyületre megállapítottam a jellemző peptid szekvenciát, melyeket a 19. – 25. ábrák mutatnak be. A vizsgálat során az egyes ismeretlenek esetében detektált két különböző y ion szekvenciája is felírásra került. (23. -, 24. ábra)



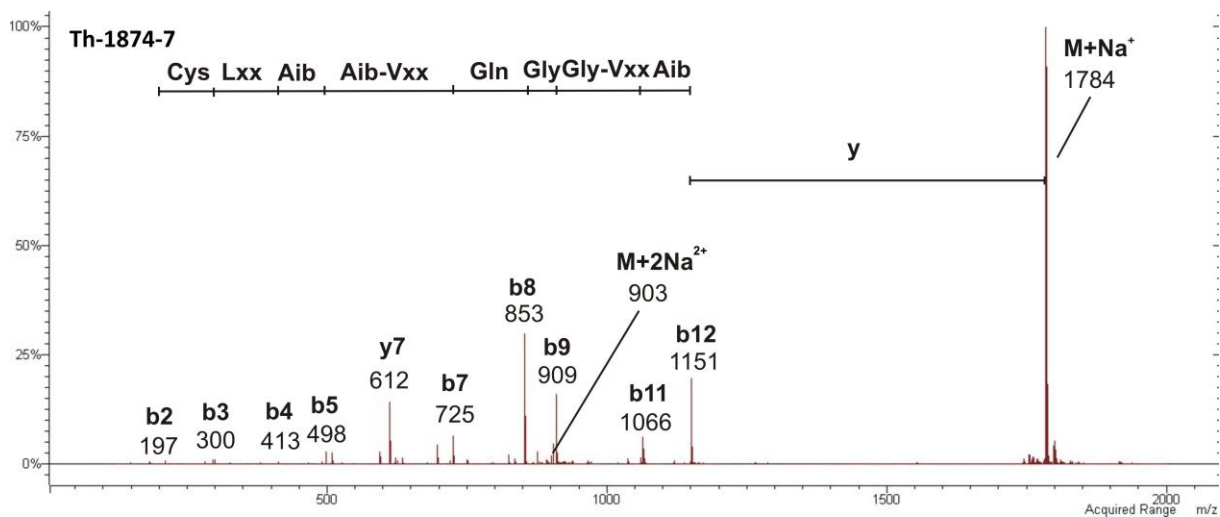
19. ábra: Th-1874-4 peptaibol vegyület szekvenciája. (y_6 ion: 23. ábra)



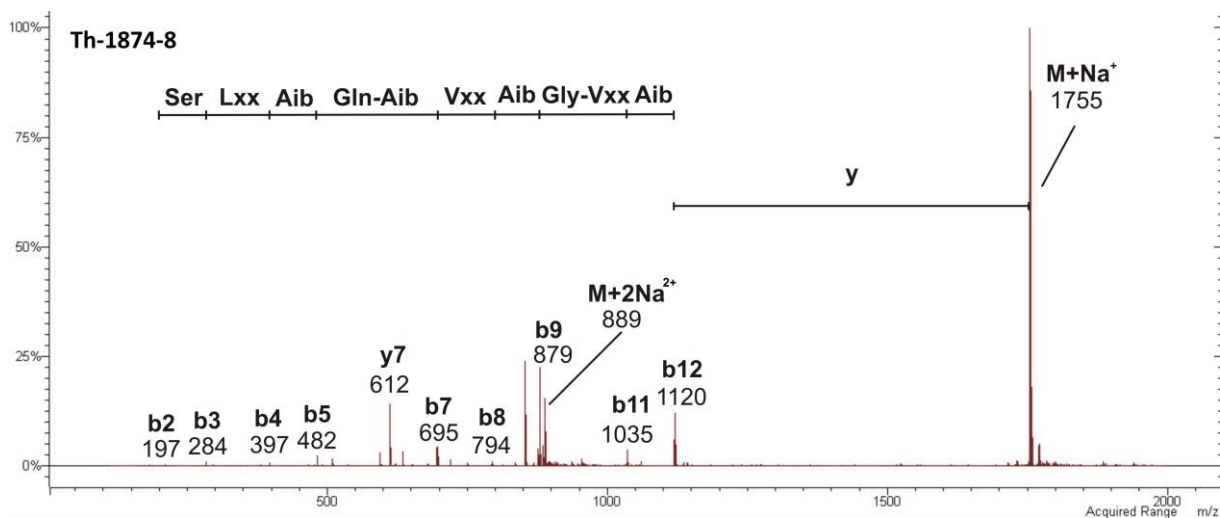
20. ábra: Th-1874-5 peptaibol vegyület szekvenciája. (y_6 ion: 23. ábra)



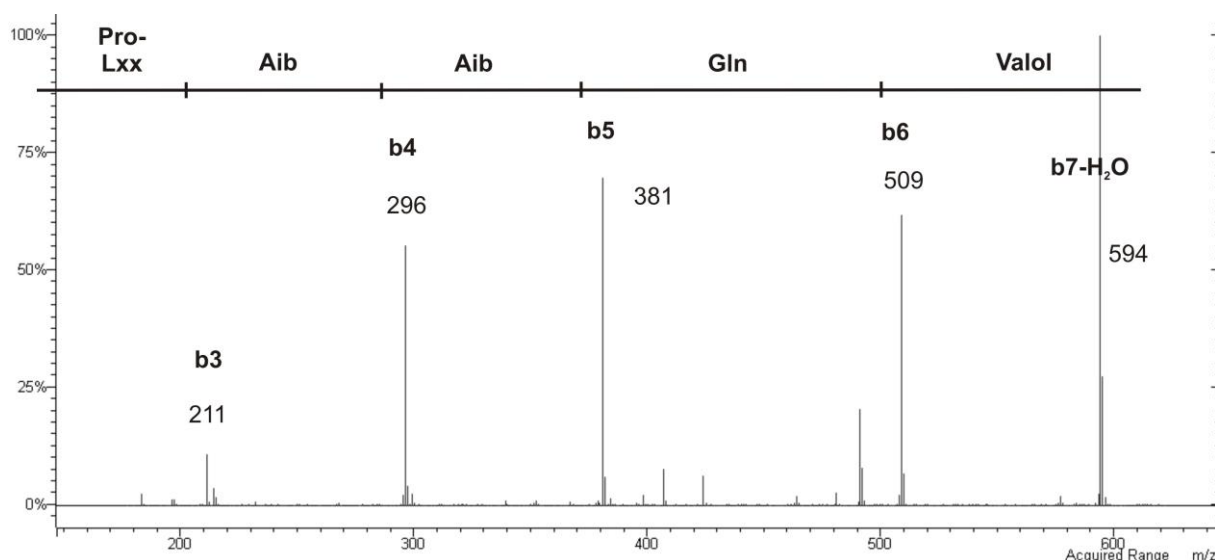
21. ábra: Th-1874-6 peptaibol vegyület szekvenciája. (y_6 ion: 23. ábra)



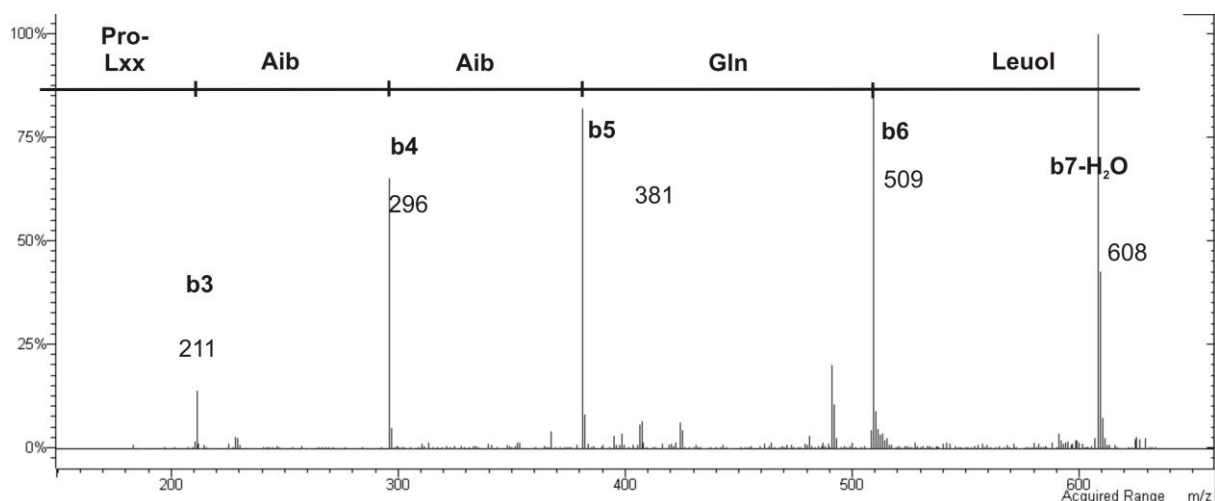
22. ábra: Th-1874-7 peptaibol vegyület szekvenciája. (y_6 ion: 23. ábra)



23. ábra: Th-1874-8 peptaibol vegyület szekvenciája. (y_6 ion: 23. ábra)



24. ábra: *Th-1874-1, valamint Th-1874-3 - 9 peptaibol vegyületek y_6 ($m/z = 612$) ionjának szekvenciája.*



25. ábra: *Th-1874-2 és Th-1874-10 peptaibol vegyületek y_6 ($m/z = 626$) ionjának szekvenciája.*

Az ismeretlen peptaibol vegyületek részleges-, vagy teljes szekvenciáit a 10. táblázat foglalja össze. A szekvenciák azonosítása során alkalmazott technikával a peptid láncban esetlegesen előforduló izobár aminosavakat (Ile/Leu - Lxx, Iva/Val - Vxx), valamint az egyes aminosavak D/L konfigurációját nem tudtuk meghatározni. Krause és munkatársai korábbi munkájuk során olyan stabil kötésekről számoltak be, melyek nagyon ritkán hasadnak el, és többnyire együttes tömegvesztésként jelentkeznek [11]. Ezek a 213 tömegkülönbséget adó Gln-Aib, a 211 tömegkülönbséget adó Pro-Lxx és a 197 tömegkülönbséget adó Pro-Vxx. Jelen kutatásom során kiderült, hogy a 156 tömegkülönbséget adó Gly-Vxx is egy igen stabil kötés és az ebből származó m/z különbségek a mi módszerünk alapján jól detektálhatóak.

	N-terminális (b)												C-terminális (y)					
	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12	b1	b2	b3	b4	b5	b6
Th-1874-1	Ala	Ala	Ala	Vxx	Aib	Gly	Vxx	Aib	-	-	-	-	Pro	Lxx	Aib	Aib	Gln	Valol
Th-1874-2	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	Aib	-	-	-	-	Pro	Lxx	Aib	Aib	Gln	Leuol
Th-1874-3	Aib	Aib	Lxx	Gln	Vxx	Vxx	Aib	Gly	Vxx	Aib	-	-	Pro	Lxx	Aib	Aib	Gln	Valol
Th-1874-4	nd.	nd.	nd.	nd.	Lxx	Ser	Gln	Aib	Gln	Pro	Vxx	Aib	Pro	Lxx	Aib	Aib	Gln	Valol
Th-1874-5	Aib	Ala	Aib	Lxx	Aib	Gln	Aib	Vxx	Aib	Ala	Ala	Aib	Pro	Lxx	Aib	Aib	Gln	Valol
Th-1874-6.1	Aib	Ala	Lxx	Cys	Aib	Vxx	Gln	Lxx	Ala	Gly	Aib	Aib	Pro	Lxx	Aib	Aib	Gln	Valol
Th-1874-6.2	Aib	Ala	Lxx	Lxx	Aib	Gln	Aib	Vxx	Aib	Gly	Vxx	Aib	Pro	Lxx	Aib	Aib	Gln	Valol
Th-1874-7.1	Aib	Ala	Cys	Lxx	Aib	Gln	Aib	Gln	Gly	Gly	Vxx	Aib	Pro	Lxx	Aib	Aib	Gln	Valol
Th-1874-7.2	Aib	Ala	Cys	Lxx	Aib	Gln	Aib	Gln	Gly	Gly	Vxx	Aib	Pro	Lxx	Aib	Aib	Gln	Valol
Th-1874-8	Aib	Ala	Ser	Lxx	Aib	Gln	Aib	Vxx	Aib	Gly	Vxx	Aib	Pro	Lxx	Aib	Aib	Gln	Valol
Th-1874-9	Aib	Ala	Lxx	Aib	Gln	Aib	Cys	nd.	nd.	Gly	Vxx	Aib	Pro	Lxx	Aib	Aib	Gln	Valol
Th-1874-10	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	Aib	Pro	Lxx	Aib	Aib	Gln	Leuol

10. táblázat: Az újonnan azonosított peptaibol vegyületek részleges -, vagy teljes (vastagítva) szekvenciáinak összefoglaló táblázata.

A szekvenciák azonosítása során az egyik leglényegesebb tapasztalat volt, hogy az általunk felírt C-terminális fragmentek meglehetősen gyakoriak a peptaibolok trichorzin csoportjában, valamint az újonnan felírt vegyületek moláris tömegei is több esetben pontos egyezést mutatnak ismert trichorzin csoportbéli peptidekkel. Ezen esetekben a felépítésbeli eltérés az N-terminális aminosavak eltérő minőségéből, illetve elhelyezkedéséből adódik, ugyanakkor itt sem ritkák a szekvenciák részleteinek bizonyos fokú azonosságai. Erre példa a Th-1874-8 peptaibol esetében a b₈ -b₁₂ rész egyezése a trichovirin II 5 azonos helybéli szakaszával (10. táblázat, szürke háttérrel). A moláris tömegek egyezésére az egyik példa a Th-1874-5 tömegének pontos egyezése a trichorzin HA III peptiddel, illetve szintén tömegbéli egyezést mutat a Th-1874-8 a trichorzin HA V peptiddel.

Az említett trichorzin csoport mellett, kisebb mértékű hasonlóságok mutatkoztak még a hypomurocin csoport peptidjeivel. Erre példa, hogy a Th-1874-8 peptaibol esetében a b₄ – b₁₂ szekvenciárész megegyezik a hypomurocin B5 peptidével. (10. táblázat, szürke háttér) [12].

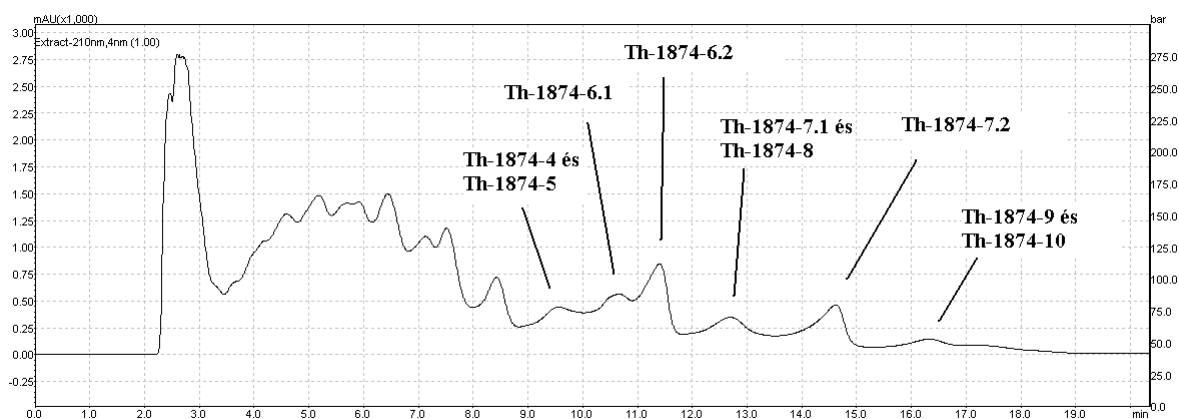
A kapott eredmények tükrében megjegyzendő, hogy egészen a legutóbbi vizsgálatainkig a Th-1874-6.2 peptaibol szekvenciájában kizárólag az Lxx/Vxx izomerek jelenlétéből fakadó eltérést feltételeztünk. Legújabb eredményeink azonban már a 10. táblázatban is részletezett szekvenciát támasztották alá, így a módosulatra vonatkozó 6.2 jelölés kizárólag viszonylagos.

4.2. Preparatív vizsgálatok

Az ismeretlen peptaibolok további szerkezetvizsgálata (GC, NMR) a szekvenciák pontosítása érdekében szükségessé teszik kromatográfiás tisztításukat.

Ennek első lépésében a Shimadzu készülékre fejlesztett módszert hangoltam át szemipreparatív eljárássá, amely során 1 ml/perc áramlási sebességgel dolgoztam egy 250x4mm, 5 μ -os C18 oszlopon.

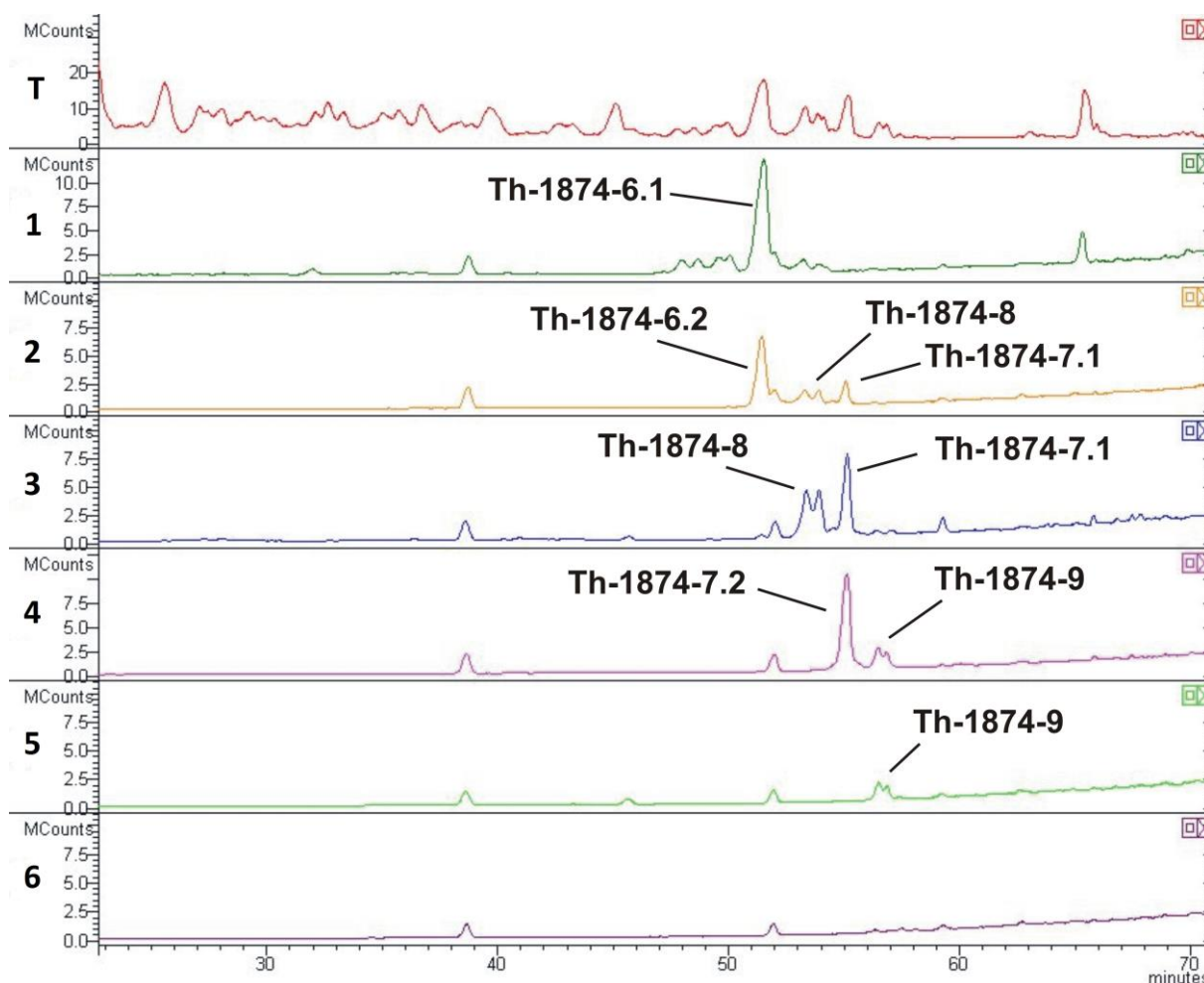
Kezdetben a tisztításokat az MS készülék bevonásával terveztem megvalósítani, a munkák során a totál ion kromatogramon megjelenő karakterisztikus ionokat azonosítva, tömegre történő frakciószedést végeztem, de az esetek többségében csak igen kevés anyagot sikerült ilyen módon elválasztani, így a továbbiakban a szeparálás során az UV detektor jelét alkalmaztam. Az új módszer az LC készülék által UV tartományban (210 nm) detektált csúcsok elválasztásán alapult (18. ábra), mely során a Shimadzu HPLC készüléket alkalmaztam, az MS által előzetesen konfirmált csúcsok gyűjtésére. A tisztítás során az összesen 120 db Petri-csészés tenyészetéről összegyűjtött extraktumot 1 ml metanolban vettem fel, majd az így kapott mintából futásonként 50 μ l térfogatot injektáltam a HPLC-re és összesen 6 frakciót szedtem. Az első alkalom során 210 nm-en felvett PDA kromatogramot a 26. ábra mutatja be.



26. ábra: *T. harzianum* SZMC 1874 kloroformmal kinyert extraktumának 210 nm-en felvett kromatogramja, az MS spektrumok alapján azonosított csúcsok jelölésével.

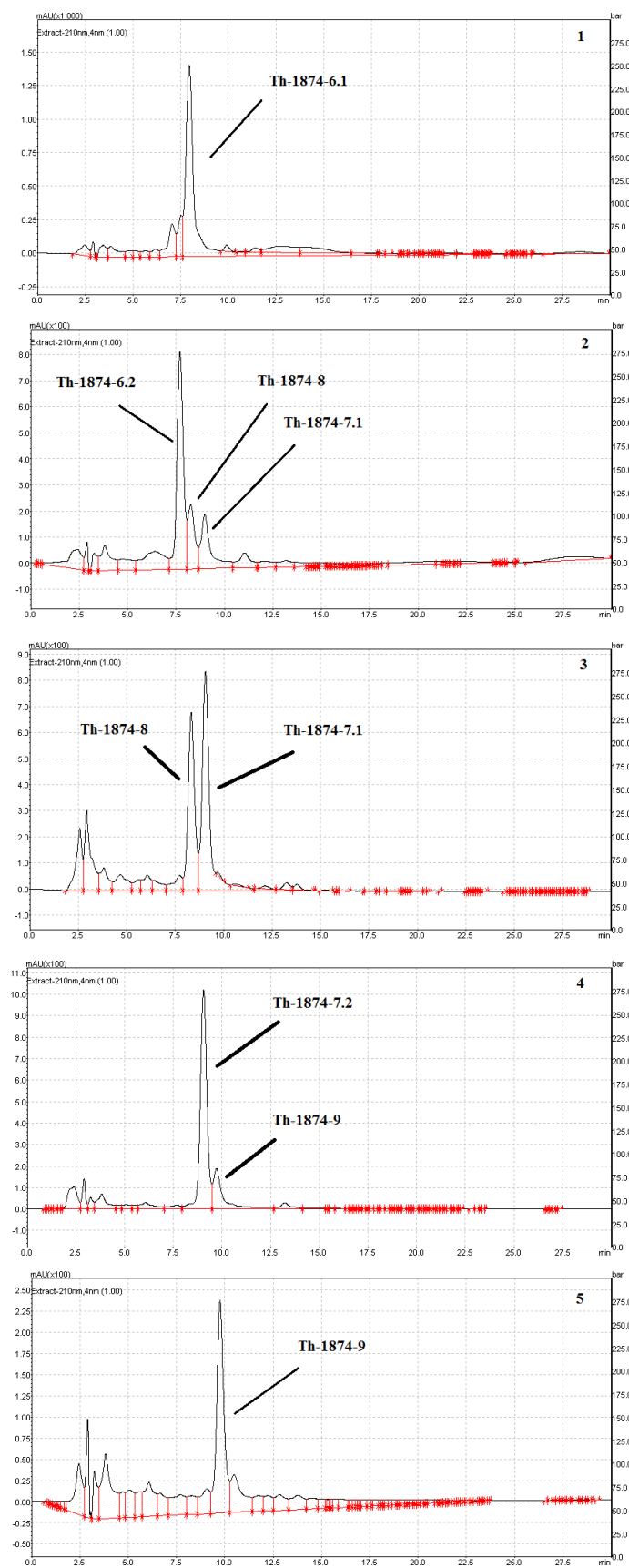
A kapott kromatogramon igen erősen jelentkezett a nagyobb mennyiségű minta injektálásából fakadó térfogati hatás, amely az egyes csúcsok alakját jelentős mértékben eltorzította, kis mértékben a retenciós idők értékét is eltolva. A hatásból fakadó torzulás ellenére, a kromatogramon jelentkező peptaibol csúcsok igen jól összevethetőek és

visszaazonosíthatók az analitikai futás (18. ábra) során detektáltakkal. Mivel a tisztítási folyamat első lépésében a céloom csak a vizsgált komponensek előzetes dúsítása volt, ezért a műveletet összesen öt alkalommal megismételtem, majd a visszaellenőrzést követően a megfelelő frakciókat egyesítettem. A mintákat 200 µl metanolba oldottam vissza, majd az összetételük elemzésére analitikai LC-MS vizsgálatokat végeztem. A Varian MS segítségével felvett totál ion kromatogramokat a 27. ábra szemlélteti.



27. ábra: A kiindulási (T), valamint a tisztított frakciók totál ion kromatogramjai.

Az eredmények alapján világossá vált, hogy a hatodik frakció nem tartalmaz számomra érdeklődést keltő anyagot. További tapasztalat volt, hogy az időben először leszedett (25. ábra, $R_t = 9,5$ perc) frakció, a várakozásokkal ellentétben nem a Th-1874-4, illetve Th-1874-5 ismeretleneket tartalmazta, hanem Th-1874-6.1-et. A fellépő jelenség mellett jellemző volt az egyes anyagok (Th-1874-7.1, Th-1874-8) jelentős mértékű megoszlása több frakció között. A Shimadzu HPLC segítségével 210 nm-en készített PDA- kromatogramokat az egyes frakciókról a 28. ábra mutatja be.



28. ábra: Az elválasztás során gyűjtött frakciók (1-5) PDA- kromatogramja 210 nm-en.

A korábbi tapasztalatok mellett, a PDA- kromatogramokon az egyes peptaibolok retenciós időinek számottevő mértékű módosulását tapasztaltam. Ennek esetleges oka lehet az anyag tisztulása, mely során a tisztítandó mintát terhelő szennyezők eltűnéséből következően némileg változhatnak a komponensek retenciós idői. A tisztítás eredményeit a 11. – 16. táblázatok foglalják össze.

1. frakció				
Komponens	Rt (perc)	Csúcsterület	Terület %	m _{becsült} (mg)
Th-1874-6.1	7,947	58641246	56,15	3,37
Egyéb	-	45792428	43,85	2,63
m _{össz} = 6 mg				

11. táblázat: Az első tisztított frakció összetétele.

2. frakció				
Komponens	Rt (perc)	Csúcsterület	Terület %	m _{becsült} (mg)
Th-1874-6.2	7,702	19527414	35,64	1,46
Th-1874-8	8,256	6109415	11,15	0,46
Th-1874-7.1	8,984	7460384	13,62	0,56
Egyéb	-	21689875	39,59	1,62
m _{össz} = 4,1 mg				

12. táblázat: A második tisztított frakció összetétele.

3. frakció				
Komponens	Rt (perc)	Csúcsterület	Terület %	m _{becsült} (mg)
Th-1874-6.2	8,327	16233891	24,90	1,44
Th-1874-8	9,063	23674306	36,31	2,11
Egyéb	-	25294466	38,79	2,25
m _{össz} = 5,8 mg				

13. táblázat: A harmadik tisztított frakció összetétele.

4. frakció				
Komponens	Rt (perc)	Csúcsterület	Terület %	m _{becsült} (mg)
Th-1874-7.2	9,051	24669121	55,89	2,68
Th-1874-9	9,713	6584722	14,92	0,72
Egyéb	-	12883363	29,19	1,40
m _{össz} = 4,8 mg				

14. táblázat: A negyedik tisztított frakció összetétele.

5. frakció				
Komponens	Rt (perc)	Csúcsterület	Terület %	m _{becsült} (mg)
Th-1874-9	9,747	6581888	26,01	0,88
Egyéb	-	18726216	73,99	2,52
m _{össz} = 3,4 mg				

15. táblázat: Az ötödik tisztított frakció összetétele.

Th-1874 kiindulási extraktum			
Komponens(ek)	Rt (perc)	Csúcsterület	Terület %
Th-1874-4	10,09	16487859	3,20
Th-1874-5	11,82	9828119	1,91
Th-1874-6.1	13,30	9559815	1,85
Th-1874-6.2	14,93	44519235	8,63
Th-1874-7.1 és 8	17,00	15406321	2,99
Th-1874-7.2	20,23	25295066	4,90
Th-1874-9 és 10	23,16	6938532	1,35
Egyéb	-	387822429	75,18

16. táblázat: A kiindulási minta összetétele.

Az eredmények alapján, több peptaibol vegyület esetében is jelentős mértékű tisztulást sikerült elérnem. Az egyes frakciók peptaibol komponenseinek terület százalékos változása a kiindulási értékhez képest a következők voltak: (ahol lehetőség nyílt a meghatározásra)

- 1. frakció: Th-1876-6.1 – 1,85% → 56,15 %
- 2. frakció: Th-1874-6.2 – 8,63 % → 35,64 %
- 3. frakció: Th-1874-6.2 – 8,63 % → 24,9 %
- 4. frakció: Th-1874-7.2 – 4,9 % → 55,89 %

A retenciós idők értékeiben tapasztalt változásokból kifolyólag, valamint a nagyobb fokú (>90%-os) tisztaság elérésének érdekében a továbbiakban egy nagyobb hatékonyságú LC eljárás fejlesztését helyeztük kilátásba.

5. Összefoglalás

Tudományos diákköri munkám keretében a SZTE-TTIK Mikrobiológiai Tanszékén működő Elválasztástechnikai kutatócsoport kutatási tevékenységébe kapcsolódtam be, ahol az egyik fő kutatási irányvonal a különféle fonalgombák, elsősorban a *Trichoderma* fajok által másodlagos metabolitként termelt peptaibol vegyületek tisztítása és biológiai sajátosságainak vizsgálata. Az előzetes szűrő-vizsgálatok alapján kiválasztásra került a *T. harzianum* SZMC 1874 törzs, mint potenciálisan peptaibol termelő izolátum, amely a munkám kiindulópontját jelentette.

Munkám első lépésében, a rendelkezésre álló ALM standard oldat felhasználásával megállapítottam a peptaibolok detektálására legalkalmasabb konfigurációt a single kvadrupól analizátoros Shimadzu LC-MS készülékhez. Ezt követően, a készülékre egy rövid futási idejű (30 perc), izokratikus analitikai RP-HPLC módszert fejlesztettem.

Az optimális LC-MS paraméterek megállapítását követően megvizsgáltam az ALM standard komponenseinek karakterisztikus ionjainak abundanciáit és azokat összevettem a korábban már peptaibolok detektálására többször alkalmazott, ioncsapdás analizátorral ellátott Varian MS-el készült ALM mérésekkel. Az eredmények, illetve az irodalmi források segítségével egy egyszerű, lépésről-lépésre alkalmazható módszert állapítottam meg a peptaibolok tömegspektrometriás azonosítására. Igazoltam a *T. harzianum* SZMC 1874 törzs peptaibol termelését és egy gyors és oldószer takarékos extrakciós módszert dolgoztam ki a tenyésztett törzs peptaibol metabolitjainak kioldására, majd a vizsgált törzsből kinyert ismeretlen peptaibolokat tartalmazó extraktum LC-MS vizsgálatainak eredményeiből feltérképeztem az egyes detektált ismeretlenek karakterisztikus ionjait és ezek ismeretében megállapítottam az egyes peptid vegyületekre jellemző részleges- vagy teljes szekvenciákat.

Munkám utolsó lépésében a korábban kidolgozott analitikai RP-HPLC módszert sikeresen hangoltam át szemipreparatív eljárássá, majd megkezdtem az ismeretlenek tisztítását. A folyamat során a Shimadzu LC-MS készülékkel detektált ismeretlen peptaibol vegyületek HPLC tisztítását végeztem el, majd előkészítettem a mintákat a további tisztítási munkákra.

6. Irodalomjegyzék

- [1] Benedetti E., Bavoso A., Di Blasio B., Pavone V., Pedone C., Toniolo C., Bonora G. M., *Peptaibol antibiotics: a study on the helical structure of the two sequences of emerimicins III and IV.*, *Proc Natl Acad Sci USA* **79** (1982) 7951–7954.
- [2] Szekeres A., Leitgeb B., Kredics L., Antal Zs., Hatvani L., Manczinger L., Vágvölgyi Cs., *Peptaibols and related peptaibiotics of Trichoderma*, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, **52** (2005) 137-168.
- [3] Szekeres A., Leitgeb B., Kredics L., Antal Zs., Hatvani L., Manczinger L., Vágvölgyi Cs., *Peptaibols and related peptaibiotics of Trichoderma*, Előadás, 3rd Hungarian Mycological Conference, Mátraháza (Hungary), May 26-27, 2005
- [4] Béven L., Helluin O., Molle G., Duclohier H., Wróblewski H., *Correlation between anti-bacterial activity and pore sizes of two classes of voltage-dependent channel-forming peptides*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1421** (1) 53-63.
- [5] Kubicek C.P., Mach R.L., Peterbauer C.K. & Lorito M., *Trichoderma: from genes to biocontrol*, *Journal of Plant Pathology* **83** (2) 11-23.
- [6] Marahiel M. A., *J Pept. Sci.*, **15** (2009) 799–807.
- [7] Kirschbaum J., Krause C., Winzheimer R.K., Brückner H., *Sequences of alamethicins F30 and F50 reconsidered and reconciled*, *J. Peptide Sci*, **9** (2003) 799–809.
- [8] Jaworski A., Kirschbaum J., Brückner H., *Structures of trichovirins II, peptaibol antibiotics from the mold Trichoderma viride NRRL 5243*, *J Pept Sci*. **8** (1999) 341-51.
- [9] Duval D., Rebuffat S., Goulard C., Prigent Y., Becchi M. and Bodo B., *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1** (1997) 2147-2154.
- [10] Marik T., Várszegi Cs., Kredics L., Vágvölgyi Cs., Szekeres A., *Mass spectrometric investigation of alamethicin*, *Acta Biologica Szegediensis*, **57** (2013) 109-112.
- [11] Krause C., Kirschbaum J., Brückner H., *Peptaibiotics: an advanced, rapid and selective analysis of peptaibiotics/ peptaibols by SPE/ LC-ES-MS*, *Amino Acids*, **30** (2006) 435-443.
- [12] <https://peptaibiotics-database.boku.ac.at>