

# **Titel: Lipopeptide aus *Paenibacillus polymyxa* CCI-25: Produktion, Extraktion und Analyse**

## **Einleitung**

Die Pflanzen-assoziierten *Paenibacillus*-Stämme sind bekannt für die biosynthetische Vielfalt ihrer Sekundärmetaboliten, insbesondere Polyketide und Lipopeptide. Diese Sekundärmetaboliten finden Einsatz bei der Förderung des Pflanzenwachstums und in der biologischen Schädlingsbekämpfung. Die Genomsequenzierung des *Paenibacillus polymyxa* CCI-25, eines Isolats aus Wurmkompost, auf der MiSeq-Plattform zeigte, dass 6,6% des gesamten Genoms der Biosynthese von Sekundärmetaboliten gewidmet ist. Das CCI-25 Genom enthält Gene, die für Fusaricidin C, Tridecaptin, eine Polymyxin-Variante mit veränderter Monomerzusammensetzung, ein dem Paenicidin A ähnliches Lantibiotikum sowie eine Polyketidsynthase Typ 1 kodieren. Darüber hinaus wurde ein iturinartiges Lipopeptid mit völlig anderen Monomeren als die bisher veröffentlichten Metaboliten aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 vorhergesagt [1]. Diese Studie zielte auf die Isolierung, massenspektrometrische Identifizierung und Bestimmung der antimikrobiellen Eigenschaften von Lipopeptiden ab, die vom *P. polymyxa* CCI-25 produziert werden.

## **Methode**

### **Kulturbedingungen und Lipopeptidextraktion**

Um die besten Wachstumsbedingungen von *P. polymyxa* CCI-25 für die Produktion von Metaboliten mit antimikrobieller Aktivität zu schaffen, wurden unterschiedlichen Nährmedien getestet. Zur weiteren Optimierung wurde eine Fermentation mit dem besten Medium in einem 1-Liter-Laborfermenter durchgeführt. Der Kulturüberstand wurde mit n-Butanol, Ethylacetat und XAD-16-Beads extrahiert, getrocknet und durch Wassermethanol-Extraktion weiter gereinigt. Nach einer Festphasenextraktion mit C18-Säulen erfolgten LC-MS- und DIMS-Analysen (Direct Infusion to MS). Das antagonistische Potenzial der erhaltenen Kulturüberstände sowie der Rohextrakte wurde in Agardiffusions-Bioassays gegen *Escherichia coli* und einige Pilze, darunter *Fusarium oxysporum* und *Rhizoctonia solani*, bestimmt.

### **Massenspektrometrische Identifizierung und Strukturaufklärung der Lipopeptidprodukte**

Alle LC-HRMS-Analysen wurden mit HPLC und hochauflösendem Orbitrap-Massenspektrometer durchgeführt. Für die Optimierung der chromatographischen Trennung und der massenspektrometrischen Einstellungen wurden Referenzlipopeptide wie Surfactin, Polymyxin B und Iturin A verwendet. Die Lipopeptid-Rohstoffextrakte wurden über SPE (C18 Festphasenextraktion) fraktioniert, gefolgt von einer semi-präparativen HPLC-Fraktionierung,

um im Rahmen des Screenings nach antimikrobiell aktiven Stoff-Kandidaten eine massenspektrometrische Ausgabe zu ermöglichen. Die gewonnenen Rohdaten wurden mit dem Qual Browser TM sowie der Compound DiscovererTM Software ausgewertet.

## Ergebnisse

Es wurde bestätigt, dass die Zusammensetzung der Nährmedien ein wichtiger Faktor für die Produktion von Sekundärmetaboliten ist. Das Wachstum von CCI-25 in GSC Medium führte zur Produktion der meisten Metaboliten mit antimikrobieller Aktivität. Zwei Extraktionsmethoden, eine Flüssig/Flüssig-Extraktion mit n-Butanol und eine Extraktion mit XAD-16-Beads, erwiesen sich als erfolgreich für die Extraktion von Lipopeptiden aus Kulturüberständen, während iturinartige Metaboliten nur im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnten. Die Lipopeptid-Rohstoffextrakte aus CCI-25-Kulturüberstand zeigten eine starke Aktivität gegen *Escherichia coli* und Pilze, einschließlich *Fusarium graminearum* und *Rhizoctonia solani*. Wir identifizierten Fusaricide A-D und die Polymyxine A1 und A2, für eine iturinartige Verbindung wurde ein möglicher Kandidat gefunden [2]. Zur genauen Strukturaufklärung dieses potenziell neuartigen Lipoheptapeptids sind weitere Untersuchungen erforderlich.

## Diskussion

Die Studie zeigt das Potenzial von *Paenibacillus polymyxa* CCI-25 für die Gewinnung neuer Wirkstoffe mit antimikrobieller Wirkung, die in der Medizin oder Landwirtschaft zur Anwendung kommen könnten. Dabei lieferte Genom Mining in Kombination mit Massenspektrometrie einen vielversprechenden Ansatz zur Erforschung dieser Substanzen.

Quellen:

- [1] ALETI, G., ANTONIELLI, L., CORRETTO, E., NIKOLIĆ, B., SESSITSCH, A. & BRADER, G. 2016a. The draft genome sequence of *Paenibacillus polymyxa* strain CCI-25 encompasses high potential for secondary metabolite production. *Genome announcements*, 4, e00366-16.
- [2] VATER, J., HERFORT, S., DOELLINGER, J., WEYDMANN, M., BORRISS, R. & LASCH, P. 2018. Genome Mining of the Lipopeptide Biosynthesis of *Paenibacillus polymyxa* E681 in Combination with Mass Spectrometry: Discovery of the Lipoheptapeptide Paenilipoheptin. *ChemBioChem*, 19, 744-753.