A lignánok elválasztása, azonosítása és mennyiségi meghatározása natív növényi mintákban és a lignántermelés fokozása *Forsythia in vitro* sejttenyészetben

Doktori tézisek

Sedlák Éva

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Gyurján István egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Böddi Béla egyetemi tanár, D.Sc.

Hivatalos bírálók: .

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Lemberkovics Éva egyetemi tanár, C. Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kéry Ágnes egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Jenes Barnabás tud. főmunkatárs, Ph.D.

Budapest
2011

Összefoglalás

A növényi másodlagos anyagcseretermékek között az utóbbi időben a lignánok kerültek a kutatások előterébe igen változatos és jelentős gyógyászati tulajdonságaiknak köszönhetően.

Doktori munkámban a lignántartalom azonosítását és mennyiségi meghatározását vizsgáltuk magas lignántartalmú intakt növényi mintákban a hatékony lignán kinyerés és előállítás érdekében. Emellett tanulmányoztuk a lignántermelés fokozásának lehetőségeit *Forsythia* fajok és fajták *in vitro* sejttenyészeteiben nagyléptékű fermentációs termelés előkészítése céljából. Munkánk során a hatóanyag-tartalmat spektrofotometriás és kromatográfiás módszerekkel vizsgáltuk, illetve a sejtek diffrenciálódását spektrofluorimetriás, fluoreszcencia- és elektronmikroszkópos módszerekkel követtük nyomon.

A lignánok vizsgálatához optimális kivonási eljárásokat, valamint előszelekcióra alkalmas spektrofotometriás módszert és többféle kromatográfiás módszer alkalmazhatóságát határoztunk meg.

Kvalitatív és kvantitatív különbségeket állapítottunk meg a lignántartalomban a *Forsythia* fajoknál és fajtáknál a levelek és a sejttenyészetek esetén egyaránt.

Forsythia kallusz- és szuszpenziós kultúrákat hoztunk létre illetve az optimalizációs kísérletek során fokoztuk a szuszpenziós kultúrák lignántartalmát a tápközeg cukor, ásványi anyag illetve hormon tartalmának változtatásával.

Megállapítottuk, hogy a fény indukálta sejtdifferenciáció és a lignántartalom növekedés között összefüggés van a *Forsythia* szuszpenziós sejttenyészetben. A megvilágítás alkalmazásával az összlignántermelés nagymértékben fokozható, viszont ez az eljárás specifikusan egyes lignánok mennyiségének növelésére nem alkalmas.

Az *Arctium lappa*, a *Centaurea scabiosa* és a *Forsythia* fajok és azok fajtái alkalmasak lehetnek a vizsgált lignánok gyógyszeripari célú felhasználására. Az *Arctium lappa* termése az arktiin, a *Forsythia* levelek elsősorban az arktigenin, pinorezinol és filligenin kinyerésére, a *Centaurea scabiosa* termése és a *Forsythia in vitro* kultúrák főleg a matairezinozid előállítására a legmegfelelőbbek.

Bevezetés

Napjainkban a gyógyászatban egyre nagyobb az érdeklődés a természetes eredetű hatóanyagok iránt. Ezek a vegyületek túlnyomórészt a növény másodlagos anyagcseretermékei közül kerülnek ki. Az analitikai módszerek fejlődésének és az igen változatos gyógyászati felhasználhatóságnak köszönhetően nőtt meg a jelentősége ennek a csoportnak, ezen belül a fenoloidok közé tartozó lignánoknak is.

A lignánok gyógyászati alkalmazási lehetőségei igen széles spektrumúak. A népgyógyászatban már több mint ezer éve alkalmazzák, rákellenes szerként vagy hashajtóként. Ezek alapján sok kutató hozzáfogott a lignánok biológiai aktivitásának feltérképezéséhez. A hatóanyagok közül a matairezinol, az arktigenin, illetve ezek glikozidjai, és a pinorezinol valamint a filligenin kerültek a kutatások középpontjába. Biológiai hatásvizsgálatok során igazolódott ezeknek a lignánoknak a rákellenes, HIV ellenes, gyulladáscsökkentő, máj- és idegrendszer védő tulajdonsága, illetve szabadgyök fogó képessége.

A korábban említett lignánok több nemzetségben fordulnak elő jelentős mennyiségben, többek között az *Arctium*, *Centaurea* illetve a *Forsythia* nemzetségekben. Ezek közül az egyik legintenzívebben kutatott nemzetség az aranyfa, *Forsythia*, amelyben a lignánok mennyiségéről és bioszintéziséről egyre pontosabb adatok állnak rendelkezésre.

Az intakt növényekből történő hatóanyag kinyerés mellett az *in vitro* sejttenyészeteket egyre nagyobb mértékben alkalmazzák a másodlagos anyagcseretermékek előállítására, mivel a sejtkultúrákban a biológiailag aktív vegyületek szabályozott, optimalizált körülmények között termeltethetők és könnyebb, hatékonyabb az anyagok kivonása.

Célkitűzések

A lignánok gyógyászati szempontból igen jelentős növényi másodlagos anyagcsere termékek, viszont nagy hatékonyságú kinyerésük és előállításuk nem minden esetben ismert, ezért a doktori értekezésben célul tűztük ki:

Hatékony lignán kinyerés és előállítás érdekében a lignánok azonosítását és mennyiségi meghatározását magas lignántartalmú intakt növényi mintákban és a

lignántermelés fokozását *Forsythia* fajok és fajták *in vitro* sejttenyészeteiben, nagyléptékű fermentációs termelés céljából.

Céljaink:

1. A lignánok vizsgálatához hatékony módszerek kidolgozását:
    a) megfelelő kivonás kiválasztása háromféle extrakciós eljárás és négyféle kivonó elegy kombinációjának vizsgálatával a *Forsythia* x *intermedia* levél kivonatánál,
    b) előszelekcióra alkalmas spektrofotometriás mérés keresése az fenoloid tartalom és az antioxidáns kapacitás meghatározásával a *Forsythia* fajokban és fajtákban
    c) pontos analitikai módszer fejlesztése HPLC-UV, HPLC-ESPI-MS és GC-MS módszerek esetén *Arctium lappa*, *Centaurea scabiosa* terméseiben és *Forsythia* fajok leveleiben.
2. A *Forsythia* fajok és fajták leveleiben a lignánösszetétel és a lignántartalom mennyiségi meghatározását, a további munkákban alkalmazott optimális fajta kiválasztása céljából.
3. A *Forsythia* kallusz- és szuszpenziós kultúrák létrehozását illetve a szuszpenziós kultúrák hatóanyag-termelésének a fokozását:
    a) tápközegek módosításával, különböző hormon, cukor illetve ásványi anyag mennyiségek alkalmazásával,
    b) megfelelő fajták kiválasztásával.
4. A *Forsythia* szuszpenziós sejttenyészetben a fény indukálta sejtdifferenciáció és a lignántartalom közötti összefüggés vizsgálata megvilágítás időtartamának változtatásával.

Módszerek

Az *Arctium lappa* érett terméseit, a *Forsythia* leveleket a Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Karának Botanikus Kertjéből gyűjtöttük. A *Centaurea scabiosa* terméseket a francia B and World Seed cégtől vásároltuk.

A *Forsythia in vitro* sejttenyészetek hatóanyag termelésének a vizsgálatához levélből indítottuk el a kallusz indukciót. Gamborg B5 szilárd táptalajon (0.5 mg l^{-1} 2,4-

D, 8 g l^{-1} agar, 30 g l^{-1} szacharóz) szobahőmérsékleten és sötétben tartottuk fenn a kalluszokat. A stabil kalluszokból indítottuk el a sejtszuszpenziókat B5 és Murashige Skoog tápközeget tartalmazó 250 ml-es Erlenmeyer lombikban. Sötétben és természetes megvilágítás mellett tartottuk és 110 rpm sebességgel rázattuk, kéthetenkénti átoltási periódusidővel.

A sejttenyészet lignántermelésének a fokozása céljából táptalaj optimalizációt végeztünk. Ennek során megváltoztattuk a hormonösszetételt, (3 féle auxin, IAA, NAA, 2,4-D és egy citokinin, kinetin kombinációját), növeltük a szacharóz mennyiségét (az eredeti kétszeresére és háromszorosára) és csökkentettük az makro- és mikroelemek mennyiségét az eredeti felére és harmadára.

A fény sejtdifferenciációra és lignán bioszintézisre gyakorolt hatásának elemzéséhez a szuszpenziós kultúrákat sötétben, természetes és mesterséges megvilágítás mellett tartottuk fenn. A fénycsővel történő megvilágításnál háromféle megvilágítási periódust, (napi 4 óra fény, napi 8 óra és napi 12 óra) alkalmaztunk.

Az ultrastruktúrális változásokat transzmissziós elektronmikroszkópos felvételekkel követtük nyomon. A fény hatásának vizsgálatánál spektrofotométerrel mértük a klorofill-a és b pigmentek mennyiségét.

A leghatékonyabb kivonási módszer megtalálásához összevetettük az irodalomban leggyakrabban alkalmazott módszereket és kivonószereket. Az ultrahangos dezintegrálást, refluxálást és SFE eljárást kombináltuk 100 % (v/v) és 60 % (v/v) etanollal ill. metanollal.

Az előszelekcióra alkalmas spektrofotometriás mérés kiválasztásához a Folin-Ciocalteu reagenssel végzett fenoloid tartalom és az antioxidáns kapacitás (FRAP) meghatározást használtuk.

A lignánok azonosítása és mennyiségi meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztásuk után ultraibolya spektrofotometriás (UV) és tömegspektrometriás (MS) detektálással, illetve gázkromatográfiás (GC) elválasztásukat követően MS detektálással történt a natív és az *in vitro* mintákban.

Eredmények

A lignán extrakció optimalizálása *Forsythia* x *intermedia* fajban

Az irodalomban nem volt egységes feltárási módszer a *Forsythia* fajokban fellelhető arktigeninre és arktiinre vonatkozóan és a meglevő módszerek egymással nem voltak összevethetőek. Ezért volt szükség az extrakciós módszerek optimalizálására és összehasonlítására. Így a három leggyakrabban használt módszert hasonlítottuk össze, kombinálva négyféle kivonó eleggyel.

A 12 féle metodikát összevetve több mint kétszeres eltérés mutatkozott, a leghatékonyabb módszer, a 60%-os metanollal végzett SFE és a legkevésbé hatékony módszer, a 100%-os etanollal történt refluxálás között. A kivonás hatékonyságát az oldószer ugyanolyan mértékben befolyásolta, mint a kivonás módszere. A három metodika összehasonlításában azonban, ha figyelembe vesszük a hatékonyság mellett a költség igényt, a hasznos információ tartalmat, az egy időben feldolgozható mintaszámot és az ehhez szükséges minimális időt is, megváltozik az alkalmasság sorrendje.

A *Forsythia* fajok és fajták leveleinek fenoloid és lignántartalma, illetve antioxidáns kapacitása

A magas lignántartalmú fajok, illetve fajták kiválasztásának gyorsítása érdekében az időigényesebb kromatográfiás módszerek használata előtt, mintaszám csökkentő szelekcióra kívántuk alkalmazni a spektrofotometriás színreakciókat. Mivel az összlignán tartalom mérésére nem ismert spektrofotometriás színreakció, így a fenoloid tartalom és az antioxidáns kapacitás meghatározását választottuk ki munkánkban, hogy megvizsgáljuk alkalmasak-e ezek a módszerek az előszelekcióra.

Az összesített lignántartalom, a fenoloid tartalom és az antioxidáns kapacitás értékei heterogének voltak. Az összesített lignántartalommal a fenoloid tartalom mutatott szoros korrelációt, az antioxidáns kapacitás nem. Valószínűleg a mintákban jelenlevő flavonoidok, fenilpropanoidok és fenolsavak erős gyökfogó képessége csökkentette az utóbbi esetben a korrelációt.

A lignánösszetétel azonosítása és mennyiségi meghatározása

Az *Arctium lappa*, *Centaurea scabiosa* és *Forsythia* fajok minőségi és mennyiségi lignán összetételét kromatográfiás módszerekkel határoztuk meg, HPL-UV, GC-MS valamint HPLC-ESPI-MS készülékkel A vizsgált lignánok azonosítása standardokkal egyező retenciós idejük (arktiin, matairezinol, arktigenin) és tömegspektrometriás jellemzőik alapján történt.

A lignánok analitikai vizsgálata során a butirolakton és furofurán típusú lignánok együtt mérhetőek mindhárom készülékkel. Viszont a HPLC-UV mérés során az arktigenin és a filligenin nem választható el egymástól alapvonalig.

A munkánk során először határoztuk meg a *Forsythia* fajon belül a fajták közötti ligántartalomban megjelenő eltéréseket. A lignánösszetételt vizsgálva megállapítható, hogy az arktigenin volt a fő lignán mindegyik fajban és fajtában, viszont ezek összlignán tartalomhoz viszonyított aránya nagyon változó (41%-92%) nemcsak a fajok, de a fajták között is.

A fajták közötti szelekció megkönnyítésére alkalmaztuk a biplot elemzést. A *Forsythia* x *intermedia* fajták lignán összetétel szerinti csoportosításánál a pinorezinol és filligenin mennyiségi meghatározása redundáns, ehhez elegendő az egyik lignán mérése. Viszont az arktigenin független ennek a két lignánnnak a mennyiségétől, ezért ennek mennyiségi meghatározása szükséges a fajták lignán összetétel szerinti kategorizálásához.

***Forsythia* fajok és fajták szövettenyészeteinek létrehozása**

Számos előnyüknek köszönhetően az *in vitro* növényi sejttenyészetek egyre gyakrabban kiindulópontjai a hatóanyag kinyerésnek. A *Forsythia* fajoknak nagyszámú fajtája ismeretes, amelyekből létrehozott sejttenyészetek lignántartalma alig ismert az irodalomban. Emiatt kiemelkedő, hogy a kísérleteinkben figyelmet fordítottunk az eredetre és a sejttenyészeteket azonos körülmények között neveltük, így azok lignántermelése összehasonlíthatóvá vált.

A *Forsythia* nemzetségen belül 3 fajból *(F. intermedia, F. ovata, F. suspensa*) és 6 fajtából (*F. intermedia* Beatrix Farrand, Melissa, Minigold, Primulina és Week-End, emellett a *F. ovata Robusta* és *Tetragold*) sikerült kalluszt, majd szuszpenziós

tenyészeteket létrehozni lignántermelés céljából. A *Forsythia ovata* faj esetén elsőként írtuk le az *in vitro* kultúra létrehozását.

Az *in vitro* kultúrák táptalaj összetételének módosítása hat a lignántartalomra

Az *in vitro* tenyészetek hatóanyag tartalma általában elmarad az intakt növényekétől, ezért szükséges a sejttenyésztés optimalizálása a nagyobb lignántermelés elérése érdekében.

Az *in vitro* sejttenyészeteinek lignántartalma fokozható a táptalaj összetevőinek módosításával. A tápközeg hormon összetételében (2 mg g-1 NAA és 0.2 mg g-1 kinetin), ásványi anyag (makro- és mikroelemek harmadára csökkentése) valamint a szacharóz (90 g l^{-1}) tartalomban alkalmazott módosítások fokozták a sejttenyészet lignántartalmát. Ráadásul a változtatások együttes alkalmazása a felére csökkentette a maximális produkció eléréséhez szükséges időt.

A fény hatása az *in vitro* kultúrák sejt differenciációjára és lignántartalmára

Az összklorofill tartalom és a 77 K fluoreszcencia spektrumok alapján megállapítható, hogy az összes fényen nevelt szuszpenziós sejttenyészetben, bár alacsony szintű volt a klorofillt tartalom, a fotoszintetikus apparátus teljesen kiépült.

Az ultrastruktúrális vizsgálatok a *Forsythia* fajok és fajták esetében megerősítették azt a megállapítást, miszerint a szuszpenziós kultúrák hatóanyag-termelésének a feltétele a magasabb szintű sejtdifferenciáció.

A *Forsythia* x *intermedia* szuszpenziós kultúrájában a lignántermeléshez nem volt elégséges az úgy nevezett hatóanyag termelő táptalaj alkalmazása, a fény jelenléte is szükséges volt. Ezt támasztotta alá, hogy a sötétben nevelt kultúrában nem volt detektálható mennyiségben lignántermelés, viszont a megvilágítás mellett mindegyik esetben mérhető volt a lignán produkció.

A megvilágítás idejével és módjával gyenge összefüggést mutatott a lignántermelés. A maximális lignán mennyiségeket a negyedik héten, a 8/16 Fény/Sötét megvilágításnál mértük.. A megvilágítás hatása általánosan növelte meg a lignánok menyiségét, specifikusan nem fokozta egyes lignánok termelését, mivel az a bioszintézis útvonal kezdeti lépéseinél fejti ki hatását.

Forsythia fajok és fajták közti különbség az *in vitro* kultúrák lignántartalmában

A munkánk során először vizsgáltuk meg a fajták közötti az *in vitro* kultúrák lignán tartalmában megjelenő különbségeket. Mivel a fajták között közel akkora eltérést tapasztaltunk, mint amekkora mértékkel sikerült a lignántermelést fokozni a táptalaj összetevők mennyiségének módosításával, fontos ezt a szempontot is figyelembe venni a hatóanyag-termelés optimalizálása során.

Következtetések

A magas lignántartalom és a kedvező összetétel elérése céljából a munkánkban intakt növényi mintákban és *Forsythia* fajok és fajták *in vitro* sejttenyészeteiben vizsgáltuk a lignántartalmat.

1. A lignánok vizsgálatánál használt hatékony módszerek kidolgozása során a következőket állapítottuk meg:
    a) az arktigenin és arktiin megfelelő extrakciójának kiválasztása során szükséges figyelembe venni a hatékonyság mellett a metodika többi paraméterét is. A kisebb mintaszám esetén az SFE készülékkel 60%-os metanollal végzett kivonás volt a megfelelő, nagy mintaszámnál a 100% metanolt alkalmazó refluxálás.
    b) az időigényesebb kromatográfiás módszerek használatát megelőző, mintaszám csökkentő szelekcióra alkalmas spektrofotometriás mérést kerestünk a *Forsythia* nemzetségen belüli magas lignántartalmú fajok és fajták kiválasztásának gyorsítása érdekében. A *Forsythia* fajok és fajták leveleinek vizsgálata során megállapítottuk, hogy a fenoloid tartalom (Folin Ciocaletu reagenst alkalmazó spektrofotometriás módszer) szoros korrelációt mutat a HPLC mérésekkel nyert összesített lignántartalommal, emiatt ez a reakció alkalmas az előszelekcióra. A *Forsythia* fajoknál és fajtáknál az antioxidáns kapacitás (FRAP módszer) meghatározása nem megfelelő

módszer az előszelekcióra, az összesített lignántartalommal mért alacsony korreláció miatt.

c) pontos analitikai módszerek esetén a butirolakton és furofurán típusú lignánok együtt mérhetőek GC-MS és HPLC-ESPI-MS készülékkel *Arctium lappa*, *Centaurea scabiosa* és *Forsythia* fajokban. A HPLC-UV erre nem minden esetben alkalmas, mert az arktigenin és a filligenin megbízhatóan nem mindig választható el egymástól. A pontosság és a megbízhatóság növelése érdekében ajánlott az eltérő kromatográfiás metodikák együttes alkalmazása.

2. Elsőként állapítottuk meg, hogy a *Forsythia* nemzetségen belül a levelek lignántartalmát tekintve az összmennyiség és az összetétel szempontjából is jelentős különbség mutatkozik nemcsak a fajok, hanem a fajták között is. Ennek részletesebb elemzéséhez alkalmaztuk a biplot analízist, amely alkalmas statisztikai módszer volt a fajták lignán összetétel szerinti szelekciójához. Ezek alapján e nemzetség további felhasználása során szükséges a fajták elemzése is.
3. Munkánk alapján megállapítható, hogy a *Forsythia* nemzetségen belül mind a fajokból, mind a fajtákból létrehozhatóak *in vitro* kallusz, illetve szuszpenziós kultúrák, amely megerősíti és kibővíti a korábbi irodalmi adatokat. A levelekből létrehozott sejttenyészetek lignántartalma minőségileg és mennyiségileg is eltér a levelekétől. A levelek hatóanyagtartalmából nem következtethetünk az azokból elindított sejttenyészetek pontos hatóanyagtartalmára, szükséges az utóbbiak önálló elemzése is. Annak ellenére, hogy az *in vitro* szövet- és sejtkultúrák lignántartalma csak töredéke az intakt levélmintákénak, a lignánok *in vitro* termelése előnyös módszer a hatóanyagok előállítására, a termelés fokozhatósága, egyes hatóanyagok célzott termeltetése és az *in vitro* kultúrák általános előnyei miatt. A sejtszintű és szöveti differenciáció befolyásolja a lignántermelést a levelekben és az *in vitro* tenyészetekben egyaránt.

a) mivel az *in vitro* tenyészetek hatóanyag tartalma elmarad az intakt növényekétől, a nagyobb lignántermelés elérése érdekében szükséges a sejttenyésztés optimalizálása a tápközegek módosításával. A tápközeg cukor, ásványi anyag illetve hormon összetételének változtatása jelentősen fokozza a szuszpenziós kultúrák lignántartalmát. E hatások együttes alkalmazása szinergista módon növeli a sejttenyészetek hatóanyag tartalmát és felgyorsítja a termelést.

b) Elsőként mutattuk ki, hogy a szuszpenziós tenyészetek lignántermelésében is jelentős az eltérés a fajták között. A lignántermelés fokozásának egyik újabb eszköze lehet a megfelelő fajták kiválasztása.

4. A fény indukálta sejtdifferenciáció és lignántartalom növekedés között összefüggés állapítható meg a *Forsythia* szuszpenziós sejttenyészetet vizsgálva. A megvilágítás lignántermelést fokozó hatásának a részletesebb elemzése során megállapítottuk, hogy a klorofilltartalom mennyisége és a kloroplasztiszok fejlettségének mértéke jól jelzi a sejtdifferenciáció fokát, viszont nem mutat szoros összefüggést a lignántermeléssel. A megvilágítás elősegítette a sejtdifferenciációt, ezáltal tudta közvetve növelni a sejttenyészet lignántermelését. A lignántermelés nagymértékben, de általánosan fokozható a megvilágítás alkalmazásával, tehát szelektíven egyes lignánok bioszintése így nem befolyásolható.

Az *Arctium lappa*, *Centaurea scabiosa* és a *Forsythia* fajok és fajták alkalmasak lehetnek a vizsgált lignánok gyógyszeripari célú felhasználására. Az *Arctium lappa* termése az arktiin, a *Forsythia* levelek elsősorban az arktigenin, pinorezinol és filligenin kinyerésére, a *Centaurea scabiosa* termése és a *Forsythia in vitro* kultúrák főleg a matairezinozid előállítására a legmegfelelőbbek.

Publikációk jegyzéke

Sedlák É, Boldizsár I, Borsodi L, Füzfai Zs, Molnár-Perl I, Preininger É, Gyurján I. (2008)
Identification and quantification of lignans, carboxylic acids and sugars in the leaves of *Forsythia* species and cultivars. Chromatographia 68 (S1): 35-41.

Sedlák É, Borsodi L, Boldizsár I, Preininger É, László M, Szőke É, Gyurján I. (2008)
Biologically active phenols in leaves of *Forsythia* species. Int. J. Horticult. Sci. 14 (3): 57-9.

Boldizsár I, Zs. Fűzfai, F. Tóth, É. Sedlák, L. Borsodi, I. Molnár-Perl (2010)
Mass fragmentation study of the trimethylsilyl derivatives of arctiin, matairesinoside, arctigenin, phylligenin, matairesinol, pinoresinol and methylarctigenin: Their gas and liquid chromatographic analysis in plant extracts J. Chrom. A 1217: 1674-1682.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Böddi Béla tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette doktori munkám elvégzését a Növényszervezettani Tanszéken. Emellett témavezetőként fáradtságot nem kímélve segítette a munkámat: a kísérleti eredmények összerendezésében, megvitatásában és a disszertáció megírásában.

Hálásan köszönöm Dr. Gyurján István egyetemi tanárnak, hogy témavezetőként kiemelt figyelemmel irányította munkámat, ellátott ötletekkel, és a kísérletek során felmerülő elméleti és gyakorlati problémák megoldásában mindig készséggel segítségemre volt.

Köszönöm dr. Preininger Éva egyetemi adjunktusnak a laboratóriumi munkában és a mikroszkópiában nyújtott segítségét.

Köszönöm Borsodi-Szokol Lillának PhD hallgatónak támogató bátorítását és hogy a segítségemre volt a laboratóriumi munkában és társszerzőként részt vett a disszertációban bemutatott munkákból írt publikációkban.

Köszönöm dr. Boldizsár Imre tanársegédnek, hogy megtanított a HPLC berendezés használatára, és az eredmények kiértékelésére.

Köszönet illeti Dr. Perlné Molnár Ibolya professzor asszonyt és dr. Fűzfai Zsófia tanársegédet (ELTE Analitikai Kémia Tanszék) a kromatográfiás mérésekben nyújtott segítségükért.

Köszönöm dr. László Miklós tudományos főmunkatársnak a fermentációs technológia megismertetését.

Köszönöm a Növényrendszertani és Ökológiai Tanszéken Mészáros Szófiának a SYN-TAX program használatában nyújtott segítségét.

Köszönöm Kálmán Ágnes, Seres Adrienne és Jónás Csilla asszisztenseknek, hogy precíz és lelkiismeretes munkájukkal jelentős mértékben hozzájárultak a kísérletek eredményességéhez.

Köszönöm a Növényszervezettani Tanszék minden munkatársának, hogy szakmai és emberi támogatásukkal segítették munkámat.

Köszönetet mondok családomnak és barátaimnak a kitartó és folyamatos támogatásért.