

РОЗРОБЛЕННЯ УМОВ ПОВЕРХНЕВОГО БІОСИНТЕЗУ ПІГМЕНТУ ПРОДІГІОЗИНУ *SERRATIA MARCESCENS*

Д.А. Іванченко*

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

*Corresponding author: ivanchenko190889@gmail.com

Received 30 January 2020; Accepted 27 February 2020

Проблематика. Продігіозин – це червоний пігмент, що синтезується *Serratia marcescens* як вторинний метаболіт з унікальною структурою трипіролу і має фармакологічні властивості, зокрема протипухлинні, антимікробні, антиоксидантні, імунодепресантні, а також використовується в різних галузях біотехнології як натуральний барвник або маркер нафтопродуктів. Однак пігментація спостерігається лише у невеликого відсотка ізольованих культур серед різних штамів *S. marcescens*, тому ефективність біотехнологічної продуктивності визначається насамперед штамом-продуцентом, а також раціональними умовами біосинтезу. На рівень продукції пігменту сильно впливають різні фактори, такі як набір і співвідношення компонентів середовища культивування (концентрація певного субстрату, співвідношення С:N) та умови культивування (температура, рН). Крім того, важливою умовою для зменшення фінансових витрат на виготовлення живильних середовищ і підвищення рівня біосинтезу цільового продукту є використання відносно недороговартісних субстратів. Тому визначення впливу середовища культивування для штамів *S. marcescens* та виявлення основних факторів, які сприяють накопиченню пігменту продігіозину, з метою розробки біотехнологій отримання препаратів лікувально-профілактичного призначення є актуальним.

Мета. Дослідження пігментоутворюючого штаму *S. marcescens* в умовах культивування на поверхні твердих живильних середовищ, визначення біохімічних особливостей і раціональних умов культивування, що сприяють накопиченню пігменту продігіозину.

Методика реалізації. Культивування штаму *S. marcescens*, який був ізольований із Курцівського родовища лужноземельної бентонітової глини (Крим, Україна), проводили в чашках Петрі на твердих живильних середовищах із різними значеннями температури і рН, а також різними джерелами карбону та нітрогену. Вплив різних значень досліджуваних факторів встановлювали за рівнем накопичення пігменту, який визначали ваговим методом. Кислотність живильного середовища визначали потенціометричним методом.

Результати. Вивчено вплив вихідних значень рН твердого живильного середовища, температури та різних джерел карбону і нітрогену на накопичення пігменту при культивуванні штаму *S. marcescens*. Визначено сприятливі для отримання пігменту значення температури, рН та сполуки – джерела карбону і нітрогену.

Висновки. Встановлено, що раціональними параметрами для культивування є температура +27–28 °С і кислотність живильного середовища на рівні 6–7, а найкращими для накопичення продігіозину джерелами карбону та нітрогену є гліцерин і пептон (а також гідролізат казеїну, дріжджовий екстракт або амонійні (нітратні) неорганічні сполуки) відповідно.

Ключові слова: продігіозин; *Serratia marcescens*; поверхнєве культивування; тверде живильне середовище.

Вступ

Продігіозини – пігменти червоного забарвлення, синтезовані мікроорганізмами, які знаходять різноманітне застосування в біотехнологічному виробництві. Широко відомим продуцентом сполук цього типу є *Serratia marcescens*. З точки зору біотехнології, необхідність підбрати середовища, які помітно збільшують ріст бактерій і пігментоутворення, вважається проблемою, що вимагає раціонального вирішення. При підборі живильних середовищ для біосинтезу продігіозину важливими критеріями є не

тільки здатність мікроорганізму-продуцента наросувати біомасу на середовищі та синтезувати пігмент, але й відносна дешевизна сировини для приготування живильного середовища. Спираючись на результати попередніх досліджень, необхідно відзначити, що найбільш ефективний ріст і пігментоутворення культури *S. marcescens* спостерігається на натуральних живильних середовищах і середовищах змішаного складу [1].

На рівень продукції бактеріального продігіозину сильно впливають поживні речовини та фізико-хімічні фактори, такі як джерела азоту і вуглецю, неорганічні солі, температура, рН та

концентрація розчиненого кисню [2, 3]. Основним фактором, який впливає на продукцію продігіозину, є склад живильного середовища. В загальному були досліджені вуглеводи, які знижували рівень продукції та виступали як інгібітори синтезу пігменту продігіозину. Наприклад, глюкоза репресує синтез продігіозину в *S. marcescens* через циклічний 3'-5'-аденозинмонофосфат (цАМФ)-негативну регуляцію [4]. Водночас продукція продігіозину значно збільшується завдяки додаванню 0,5 % (вага/об'єм) глюкози або мальтози до поживного бульйону [5]. Крім того, джерела вуглецю й азоту і співвідношення вуглець:азот також по-різному впливають на продукцію продігіозину. В цілому гліцерин, гліцин, жирні кислоти і рослинні олії є перспективними джерелами вуглецю або добавками для підвищення рівня продукції [6]. Було встановлено, що висока концентрація NaCl інгібує продукцію продігіозину в *S. marcescens* і *S. rubidaea* [7], а також було визначено оптимальні концентрації пептону і неорганічного фосфату для підвищення продукції продігіозину *S. marcescens* до рівня 2,4 г/л, важливість сахарози і гліцину для високого рівня продукції [8] й отримано покращені показники продукції продігіозину в *S. marcescens* С3 до рівня 15,6 г/л через статистичні експерименти визначенням співвідношення вуглець:азот, яке становило 6:4 (крохмаль:пептон) [9]. Найбільший вихід продігіозину – до 49,5 г/л – отримано при ферментації *S. marcescens* UCP 1459, який був виділений із пустельного ґрунту, а як живильне середовище був використаний екстракт (6 % від загального об'єму) пустельного маніоку (рослина) з манітом. Умови культивування суттєво впливають на рівень продукції продігіозину [10]. За температури вище +37 °С і нижче +20 °С синтез ацилпродігіозину в *Streptomyces sp.* JS 520 [11], *S. marcescens* SS 1 [3] та ізоляту *S. marcescens*, виділеного з ґрунту, був повністю інгібований [5]. Було показано, що зниження рН до 4 покращує вихід ацилпродігіозину в штаму *S. coelicolor* M 511 у 1,8 разу (37 мг/г сухої ваги клітин), але негативно впливає на цю продукцію в штаму *S. coelicolor* SJM 1. Результати експериментальних досліджень дають можливість припустити, що це складний і скоординований регуляторний процес біосинтезу у відповідь на зовнішні стимули чи/або стресові умови [12].

Метою представленої роботи було дослідження бентонітового штаму *S. marcescens* в умовах культивування на поверхні твердих живиль-

них середовищ, визначення біохімічних особливостей та раціональних умов середовища, що сприяють накопиченню пігменту.

Для досягнення зазначеної мети було поставлено такі завдання:

- визначити вплив різних значень температури і рН живильного середовища на накопичення пігменту;
- підібрати найкращі для накопичення пігменту джерела карбону та нітрогену;
- оцінити можливість отримання продігіозину на поверхні твердих природних і синтетичних середовищ у чашках Петрі.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень був вид *S. marcescens*, а саме пігментоутворюючий штам, який виділили з Курцівського родовища лужноземельної бентонітової глини (Крим, Україна) в лабораторіях кафедри мікробіології, вірусології та імунології НМУ ім. О.О. Богомольця. Перед виділенням у чисту культуру чашки Петрі, після посіву досліджуваного матеріалу, інкубували в термостаті за +28 °С протягом 24–72 год у перевернутому положенні для скринінгу штамів, які продукують пігмент. Отримані ізоляти були відібрані та ідентифіковані за допомогою морфологічної та біохімічної характеристик з використанням визначника Берджі про систематичну бактеріологію [13, 14].

Для дослідження впливу рН і температури на продукцію пігменту в умовах поверхневого культивування використовували тверде живильне середовище такого складу: гліцерол – 10 мл/л, пептон – 10 г/л, екстракт дріжджів – 2 г/л, K₂SO₄ – 10 г/л, MgCl₂ – 1,4 г/л, агар-агар – 15 г/л, яке було отримано модифікацією основного середовища ГРМ № 9 у результаті зміни кількісного співвідношення гліцеролу та пептону.

Найсприятливіші для накопичення пігменту значення рН визначали на вказаному вище живильному середовищі, в якому зміною концентрації HCl і NaOH (до автоклавування) отримували розчини з різним значенням рН – від 5 до 8.

З метою відбору кращих для накопичення пігменту джерел карбону та нітрогену були використані готові живильні середовища (виробництво HiMedia) та модифіковані, які отримували комбінацією певних субстратів у різних кількісних співвідношеннях. Як джерела нітрогену використовувались такі субстрати: пептон та поживні субстрати, які не містять у своєму складі

пептон (м'ясні та дріжджові екстракти, панкреатичний гідролізат рибної муки та гідролізат казеїну, триптон, екстракт соєвої муки) або неорганічні сполуки азоту, такі як $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 і $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Визначення кращих джерел карбону проводили з додаванням таких субстратів: гліцерол, глюкоза, крохмаль, мальтоза і рамноза.

Екстракцію пігменту продігіозину з біомаси бактерій проводили подвійною переробкою біомаси 96 %-ним етанолом. Отриманий препарат висушували на повітрі та повторно екстрагували. Процедуру повторювали кілька разів до виходу нерозчинних домішок. Отриманий гомогенний розчин позначали як неочищений пігментний комплекс або етанольний екстракт. Етанольний екстракт випарювали насухо в сушильній печі за температури $+45$ – 50 °C, а залишок розчиняли в хлороформі (10 мл/г осаду). Отриманий розчин змішували з рівним об'ємом суміші вода-етанол (4:1) і емульгували на магнітній мішалці протягом 1 год за $+25$ °C. Водноетанольну суміш, що містить водорозчинні домішки, відокремлювали роздільною воронкою. Процедуру повторювали, збільшуючи об'ємний вміст етанолу вдвічі. Потім пігмент повторно висушували в сушильній печі та повторно розчиняли в етанолі (10 мл/г осаду) [15].

Усі дослідження виконували у трьох повторях і статистично обчислювали за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel. Значення концентрації продігіозину подано як середнє арифметичне із зазначенням похибки середнього арифметичного. Статистично достовірними вважали результати досліджень, які за t -критерієм Стьюдента мали рівень значущості $p \leq 0,05$ [16, 17].

Результати

Важливим фактором, що впливає на накопичення біомаси і синтез пігменту *S. marcescens*, є температура, яка обумовлює як ростові, так і біосинтетичні властивості бактерій і є важливим параметром ведення біотехнологічного процесу культивування. Тому на першому етапі досліджень відібраного штаму визначався вплив різних значень температури інкубації на накопичення пігменту. Загальні результати впливу температури на синтез продігіозину бентонітовим штамом *S. marcescens* наведено на рис. 1.

Раціональними для синтезу і максимального накопичення пігменту бентонітовим штамом *S. marcescens* були температури в діапазоні від

$+25$ до $+30$ °C. У ході дослідження було встановлено, що температура $+27$ – 28 °C, за якої було накопичено 108 мг/л (в перерахунку на об'єм живильного середовища), є найбільш раціональною для максимальної продукції продігіозину.

На другому етапі досліджень відібраного штаму визначався рН живильного середовища культивування на накопичення пігменту. Загальні результати впливу рН середовища на синтез пігменту бентонітовим штамом *S. marcescens* наведено на рис. 2.

Слабокисле і нейтральне значення рН живильного середовища (рН у межах 6–7) були найбільш раціональними для максимального накопичення пігменту бентонітовим штамом *S. marcescens*. Середовище, значення рН якого було на рівні 5 (кисле) або, навпаки, 8 (лужне), призводило до суттєвого зменшення утворення пігменту (див. рис. 2).

Результати щодо накопичення пігменту бентонітовим штамом *S. marcescens* залежно від джерел карбону та нітрогену на твердому живильному середовищі наведено нижче в табл. 1 і 2.

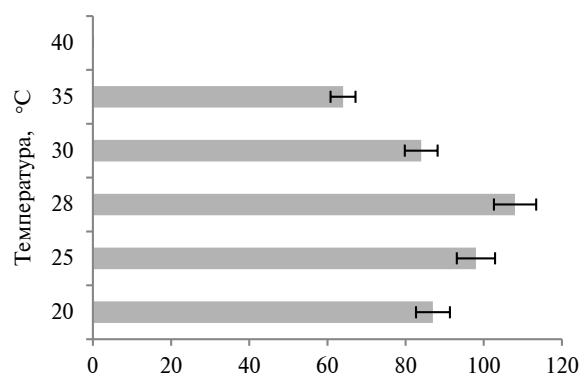


Рисунок 1: Вплив температури на синтез продігіозину бентонітовим штамом *S. marcescens*: ■ – концентрація продігіозину, мг/л

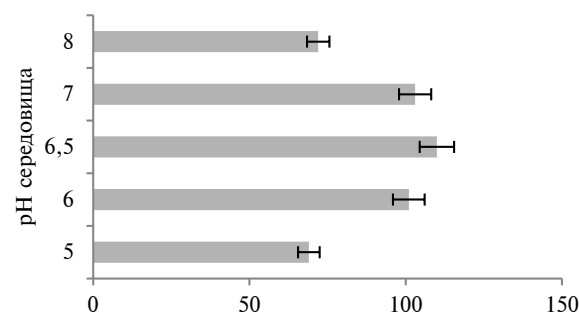


Рисунок 2: Вплив рН середовища на синтез пігменту бентонітовим штамом *S. marcescens*: ■ – концентрація продігіозину, мг/л

Обговорення

Одним з етапів розробки біотехнології отримання препаратів на основі біомаси бактерій є встановлення раціональних умов проведення безпосередньо процесу культивування, тобто підбір складу живильного середовища та умов культивування. При цьому важливими параметрами, що потребують досліджень, є температура, рН і склад живильного середовища, а саме сполуки, що можуть бути ефективно використані як джерела карбону та нітрогену.

За результатами проведених досліджень було встановлено, що найменше накопичення пігменту спостерігається при культивуванні бентонітового штаму *S. marcescens* на поверхні твердих живильних середовищ, які містять дріжджовий гідролізат (чи екстракт), комбінації білкових субстратів, триптон або вуглеводи. Найвищі концентрації виділеного пігменту були на середовищах, які включали як джерело вуглецю і нітрогену багатоатомні спирти (гліцерол) та білкові ферментативні гідролізати (або екстракти) відповідно (табл. 1).

Таблиця 1: Результати біосинтезу продігіозину бентонітовим штамом *S. marcescens* залежно від природних джерел карбону та нітрогену

Склад живильного середовища, г/л	Концентрація продігіозину, мг/л
М'ясо-пептонний агар (пептон – 10; екстракт яловичини – 5; натрію хлорид – 5; агар-агар – 15)	17 ± 1
Поживний агар (пептон – 5; екстракт яловичини – 1,5; екстракт дріжджів – 1,5; натрію хлорид – 5; агар-агар – 15)	11 ± 1
Живильне середовище ГРМ (панкреатичний гідролізат рибної муки – 8; пептон – 8; натрію хлорид – 4; агар-агар – 15)	5 ± 1
Живильне середовище ГРМ № 1 (панкреатичний гідролізат рибної муки – 15; гідролізат казеїну – 10; екстракт дріжджів – 2; натрію хлорид – 3,5; агар-агар – 15)	25 ± 2
Живильне середовище ГРМ № 9 (пептон – 20; калію сульфат – 10; магнію хлорид – 1,4; агар-агар – 15)	27 ± 2
Триптон-декстрозний агар (триптон – 15; папаїновий екстракт соєвої муки – 5; екстракт дріжджів – 5; агар-агар – 20)	4 ± 1
Живильне середовище ГРМ № 6 (панкреатичний гідролізат рибної муки – 20; екстракт дріжджів – 1,5; NaCl – 5; агар-агар – 15)	13 ± 1
SOB-агар (триптон – 20; екстракт дріжджів – 5; NaCl – 0,5; агар-агар – 20)	11 ± 1
Пептонно-дріжджовий агар* (пептон – 5; екстракт дріжджів – 3; агар-агар – 15)	7 ± 1
Гліцерол-казеїновий агар* (гліцерол – 10 мл/л; гідролізат казеїну – 5; агар-агар – 15)	43 ± 2
Глюкозо-казеїновий агар* (глюкоза – 10; гідролізат казеїну – 5; агар-агар – 15)	3 ± 1
Гліцерол-пептонний агар* (гліцерол – 10 мл/л; пептон – 10; агар-агар – 15)	52 ± 3
Глюкозо-пептонний агар* (глюкоза – 10; пептон – 10; агар-агар – 15)	4 ± 1
Гліцерол-дріжджовий агар* (гліцерол – 10 мл/л; екстракт дріжджів – 5; агар-агар – 15)	34 ± 2
Поживний агар із додаванням гліцеролу* (гліцерол – 10 мл/л; пептон – 5; екстракт яловичини – 1,5; екстракт дріжджів – 1,5; натрію хлорид – 5; агар-агар – 15)	13 ± 1
Живильне середовище ГРМ № 9 із додаванням гліцеролу* (гліцерол – 10 мл/л; пептон – 20; калію сульфат – 10; магнію хлорид – 1,4; агар-агар – 15)	62 ± 3
Поживний агар із додаванням мальтози* (мальтоза – 10 г/л; пептон – 5; екстракт яловичини – 1,5; екстракт дріжджів – 1,5; натрію хлорид – 5; агар-агар – 15)	9 ± 1
Поживний агар із додаванням маніту* (маніт – 10 г/л; пептон – 5; екстракт яловичини – 1,5; екстракт дріжджів – 1,5; натрію хлорид – 5; агар-агар – 15)	4 ± 1
Живильне середовище ГРМ № 9 із додаванням мальтози* (мальтоза – 10 г/л; пептон – 20; калію сульфат – 10; магнію хлорид – 1,4; агар-агар – 15)	7 ± 1
Живильне середовище ГРМ № 9 із додаванням маніту* (маніт – 10 г/л; пептон – 20; калію сульфат – 10; магнію хлорид – 1,4; агар-агар – 15)	9 ± 1

* – живильні середовища виготовлені з указаних компонентів.

Збільшення концентрації NaCl (>1 %) у середовищах, які містять м'ясний екстракт, пептон та/або гідролізат рибної муки, призводило до зменшення синтезу пігменту. Зниження концентрації екстрагованого пігменту також відзначається на середовищах, що містять як джерело вуглецю й азоту тільки білкові ферментативні гідролізати (чи екстракти). При додаванні вуглеводів або гліцеролу до живильного середовища, яке містить комбінації білкових (або дріжджових) гідролізатів (чи екстрактів), відбувається пригнічення синтезу пігменту, що, можливо, пов'язано з катаболічною репресією. Однак комбінація гліцеролу з окремим білковим субстратом, навпаки, сприяє підвищенню продукції пігменту з переключенням на утилізацію в першу чергу багатоатомного спирту як єдиного джерела вуглецю.

При культивуванні на середовищах із різними неорганічними джерелами азоту і вуглеводами або багатоатомними спиртами (табл. 2) найменше накопичення пігменту спостерігається при додаванні цитрату натрію, крохмалю або мальтози, а найбільше – при внесенні як єдиного джерела вуглецю гліцеролу.

Гліцерол у поєднанні з неорганічними формами азоту забезпечує синтез пігменту на рівні середовищ, які включали, крім гліцеролу, білкові або дріжджові гідролізати (чи екстракти). Додавання гліцеролу до амонійних і нітратних неорганічних сполук також сприяє підвищенню концентрації екстрагованого пігменту порівняно із середовищами, які містять комбінації різних білкових субстратів.

Загалом аналіз отриманих даних стосовно впливу різних джерел карбону і нітрогену та раціональних умов культивування на накопичення пігменту показав, що джерело вуглецю суттєво впливає на утворення пігменту. Було встановлено, що високий рівень синтезу пігменту відбувається на середовищах, де як джерело вуглецю міститься гліцерол. Другим фактором, який впливає на накопичення пігменту, виступає природа джерел азоту та їх кількісне співвідношення. Раціональним у нашому випадку виявилася наявність співвідношення пептону та дріжджового гідролізату (або ферментативного) 5:1. Необхідність додавання останнього компонента може бути обумовлена наявністю певних факторів росту, вітамінів та мікроелементів, які впливають на процес синтезу пігменту.

Таблиця 2: Результати біосинтезу продігіозину бентонітовим штамом *S. marcescens* залежно від джерела вуглецю і синтетичних джерел нітрогену

Склад живильного середовища, г/л	Концентрація продігіозину, мг/л
Цитратний агар Сімонса (магнію сульфат – 0,2; амонію дигідрофосфат – 1; калію гідрофосфат – 1; натрію цитрат – 2; натрію хлорид – 5; агар-агар – 15)	5 ± 1
Гліцерол-аміачний агар* (гліцерол – 10 мл/л; амонію сульфат – 2; калію гідрофосфат – 1; магнію сульфат – 1; кальцію карбонат – 3; агар-агар – 20)	39 ± 2
Гліцерол-нітратний агар (гліцерол – 10 мл/л; калію нітрат – 1; калію дигідрофосфат – 1; магнію сульфат – 1; кальцію хлорид – 0,2; агар-агар – 15)	37 ± 2
Мальтозо-аміачний агар (мальтоза – 10; амонію сульфат – 2; калію гідрофосфат – 1; магнію сульфат – 1; кальцію карбонат – 3; агар-агар – 20)	13 ± 1
Мальтозо-нітратний агар** (мальтоза – 10; калію нітрат – 1; калію дигідрофосфат – 1; магнію сульфат – 1; кальцію хлорид – 0,2; агар-агар – 15)	13 ± 1
Крохмально-аміачний агар (крохмаль – 10; амонію сульфат – 2; калію гідрофосфат – 1; магнію сульфат – 1; кальцію карбонат – 3; агар-агар – 20)	12 ± 1
Рамнозо-аміачний агар* (рамноза – 10; амонію сульфат – 2; калію гідрофосфат – 1; магнію сульфат – 1; кальцію карбонат – 3; агар-агар – 20)	7 ± 1
Рамнозо-нітратний агар** (рамноза – 10; калію нітрат – 1; калію дигідрофосфат – 1; магнію сульфат – 1; кальцію хлорид – 0,2; агар-агар – 15)	7 ± 1
Маніт-аміачний агар* (маніт – 10; амонію сульфат – 2; калію гідрофосфат – 1; магнію сульфат – 1; кальцію карбонат – 3; агар-агар – 20)	17 ± 1
Маніт-нітратний агар** (маніт – 10; калію нітрат – 1; калію дигідрофосфат – 1; магнію сульфат – 1; кальцію хлорид – 0,2; агар-агар – 15)	17 ± 1

* – живильні середовища виготовлені модифікацією джерела вуглецю на основі компонентного складу крохмально-аміачного агару; ** – живильні середовища виготовлені модифікацією джерела вуглецю на основі компонентного складу гліцерин-нітратного агару.

Висновки

Досліджено вплив різних джерел карбону та нітрогену на накопичення пігменту при культивуванні бентонітового штаму *S. marcescens* за різних значень температури і рН. У проведеному дослідженні було встановлено, що температура +27–28 °С і показники рН у межах 6–7 (слабокисле та нейтральне значення) живильного середовища є найбільш раціональними параметрами для максимального накопичення продігіозину. Найвищі концентрації виділеного пігменту були на середовищах, що включали як джерело

вуглецю гліцерол та білкові або дріжджові гідролізати (чи екстракти). Отримані дані також свідчать про можливість накопичення високої концентрації продігіозину зі значним зменшенням об'ємів використаного живильного середовища за умови культивування на поверхні твердого середовища.

Фінансування

Робота виконана на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології НМУ ім. О.О. Богомольця в рамках ініціативно-пошукової теми “Біологічна активність пігменту продігіозину”.

References

- [1] Guryanov ID, Karamova NS, Yusupova DV, Gnezdilov OI, Koshkarova LA. Bacterial pigment prodigiosin and its genotoxic effect. *Bioorganic Chem.* 2013;39:121-28. DOI: 10.1134/s1068162012060040
- [2] Wei YH, Chen WC. Enhanced production of prodigiosin-like pigment from *Serratia marcescens* SMΔR by medium improvement and oil-supplementation strategies. *J Biosci Bioeng.* 2005;99:616-22. DOI: 10.1263/jbb.99.616
- [3] Wei YH, Yu WJ, Chen WC. Enhanced undecylprodigiosin production from *Serratia marcescens* SS-1 by medium formulation and amino-acid supplementation. *J Biosci Bioeng.* 2005;100:466-71. DOI: 10.1263/jbb.100.466
- [4] Kalivoda EJ, Stella NA, Aston MA, Fender JE, Thompson PP, Kowalski RP, et al. Cyclic AMP negatively regulates prodigiosin production by *Serratia marcescens*. *Res Microbiol.* 2010;161:158-67. DOI: 10.1016/j.resmic.2009.12.004
- [5] Giri A, Anandkumar N, Muthukumaran G, Pennathur G. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiol.* 2004;4:1-10. DOI: 10.1186/1471-2180-4-11
- [6] Chang CC, Chen WC, Ho SF, Wu HS, Wei YH. Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *J Biosci Bioeng.* 2011;111:501-11. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.12.026
- [7] Yamazaki G, Nishimura S, Ishida A, Kanagasabhapathy M, Zhou X, Nagata S, et al. Effect of salt stress on pigment production of *Serratia rubidaea* N-1: a potential indicator strain for screening quorum sensing inhibitors from marine microbes. *J Gen Appl Microbiol.* 2006;52:113-7. DOI: 10.2323/jgam.52.113
- [8] Su WT, Tsou TY, Liu H.L. Response surface optimization of microbial prodigiosin production from *Serratia marcescens*. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 2011;42:217-22. DOI: 10.1016/j.jtice.2010.05.009
- [9] Chen WC, Yu WJ, Chang CC, Chang JS, Huang SH, Chang CH, et al. Enhancing production of prodigiosin from *Serratia marcescens* C3 by statistical experimental design and porous carrier addition strategy. *Biochem Eng J.* 2013;78:93-100. DOI: 10.1016/j.bej.2013.02.001
- [10] de Araújo HWC, Fukushima K, Takaki GMC. Prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using renewable-resources as a low cost substrate. *Molecules.* 2010;15:6931-40. DOI: 10.3390/molecules15106931
- [11] Stankovic N, Radulovic V, Petkovic M, Vuckovic I, Jadrantin M, Vasiljevic B, et al. *Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;96:1217-31. DOI: 10.1007/s00253-012-4237-3
- [12] Mo SJ, Kim JH, Oh CH. Different effects of acidic pH shock on the prodiginine production in *Streptomyces coelicolor* M511 and SJM1 mutant. *J Microbiol Biotechnol.* 2013;23:1454-9. DOI: 10.4014/jmb.1307.07067
- [13] Bergey DH, Holt JG. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993.
- [14] Phatake YB, Dharmadhikari SM. Isolation and screening of prodigiosin production bacteria and characterization of produced pigment. *Int J Sci Nature.* 2016;7(1):202-9.
- [15] Darshan N, Manonmani HK. Prodigiosin and its potential applications. *J Food Sci Technol.* 2015;52(9):5393-407. DOI: 10.1007/s13197-015-1740-4
- [16] Vadzinsky RN. *Statistical calculations in the Excel environment.* User library. St. Petersburg: Piter Publ.; 2016. 608 p.
- [17] Colquhoun D. The reproducibility of research and the misinterpretation of p-values. *R Soc Open Sci.* 2017;4(12):171085. DOI: 10.1098/rsos.171085

Д.А. Иванченко

РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ ПОВЕРХНОСТНОГО БИОСИНТЕЗА ПИГМЕНТА ПРОДИГИОЗИНА *SERRATIA MARCESCENS*

Проблематика. Продигозин – это красный пигмент, который синтезируется *Serratia marcescens* как вторичный метаболит с уникальной структурой трипирола и имеет фармакологические свойства, в частности противоопухолевые, антимикробные, антиоксидантные, иммунодепрессантные, а также используется в различных отраслях биотехнологии как натуральный краситель или маркер нефтепродуктов. Однако пигментация наблюдается только в небольшом проценте изолированных культур среди различных штаммов *S. marcescens*, поэтому эффективность биотехнологической производительности определяется в первую очередь штаммом-продуцентом, а также рациональными условиями биосинтеза. На уровень продукции пигмента сильно влияют различные факторы, такие как набор и соотношение компонентов среды культивирования (концентрация определенного субстрата, соотношение C:N) и условия культивирования (температура, pH). Кроме того, важным условием для уменьшения финансовых затрат на изготовление питательных сред и повышения уровня биосинтеза целевого продукта является использование относительно недорогих субстратов. Поэтому определение влияния среды культивирования для штаммов *S. marcescens* и выявление основных факторов, способствующих накоплению пигмента продигозина, с целью разработки биотехнологий получения препаратов лечебно-профилактического назначения является актуальным.

Цель. Исследование пигментообразующего штамма *S. marcescens* в условиях культивирования на поверхности твердых питательных сред, определение биохимических особенностей и рациональных условий культивирования, способствующих накоплению пигмента продигозина.

Методика реализации. Культивирование штамма *S. marcescens*, который был изолирован из Курцивского месторождения щелочноземельной бентонитовой глины (Крым, Украина), проводили в чашках Петри на твердых питательных средах с разными значениями температуры и pH, а также разными источниками углерода и азота. Влияние различных значений исследуемых факторов устанавливали по уровню накопления пигмента, который определяли весовым методом. Кислотность питательной среды определяли потенциометрическим методом.

Результаты. Изучено влияние исходных значений pH твердой питательной среды, температуры и различных источников углерода и азота на накопление пигмента при культивировании штамма *S. marcescens*. Определены благоприятные для получения пигмента значения температуры, pH и соединения – источники карбона и азота.

Выводы. Установлено, что рациональными параметрами для культивирования являются температура +27–28 °C и кислотность питательной среды на уровне 6–7, а лучшими для накопления продигозина источниками углерода и азота являются глицерол и пептон (а также гидролизат казеина, дрожжевой экстракт или аммонийные (нитратные) неорганические соединения) соответственно.

Ключевые слова: продигозин; *Serratia marcescens*; поверхностное культивирование; твердая питательная среда.

D.A. Ivanchenko

DEVELOPMENT OF CONDITIONS OF SURFACE BIOSYNTHESIS OF PRODIGIOSIN PIGMENT *SERRATIA MARCESCENS*

Background. Prodigiosin is a red pigment produced as a secondary metabolite by *Serratia marcescens*, characterized with unique tripyrrole structure and exhibits such pharmacological characteristics as antitumor, antimicrobial, antioxidant, immunodepressant, and also used in various branches of biotechnology as a natural dye or marker of petroleum products. However, pigmentation is only present in a small percentage of isolated cultures among different *S. marcescens* strain, therefore, the effectiveness of biotechnological productivity is primarily determined by the producer strain, as well as the rational conditions for biosynthesis. Pigment production levels are strongly influenced by various factors, such as the set and ratio of the components of the culture medium (concentration of a particular substrate, C:N ratio) and cultivation conditions (temperature, pH). Besides, the use of relatively low-cost substrates is an important condition for reducing financial costs for the production of culture media and increasing the level of biosynthesis of the target product. Therefore, the determination of the influence of the culture medium for the strains of *S. marcescens* and the identification of the main factors contributing to the accumulation of the pigment prodigiosin to develop biotechnologies for the production of drugs for therapeutic purposes is relevant.

Objective. The purpose of the paper is investigation of pigment-forming strain of *S. marcescens* under cultivation conditions on the surface of solid nutrient media, determination of biochemical features, and rational cultivation conditions that contribute to the accumulation of the pigment prodigiosin.

Methods. The strain of *S. marcescens* isolated from the bentonite clays of Kurtsivskyi deposit (Crimea, Ukraine) was cultured in Petri dishes on solid nutrient media with different temperatures, pH, carbon and nitrogen sources. The influence of various values of the studied factors was established by the level of pigment accumulation, which was determined by the gravimetric method. The acidity of the nutrient medium was determined by the potentiometric method.

Results. The influence of the initial pH values of solid nutrient medium, temperature, and various sources of carbon and nitrogen on the accumulation of pigment during the cultivation of the strain *S. marcescens* was studied. The temperature, pH, and compounds, sources of carbon and nitrogen, favorable for obtaining the pigment, were determined.

Conclusions. It was found that the rational parameters for cultivation are the temperature +27–28 °C and the acidity of the nutrient medium of 6–7, and the best sources of carbon and nitrogen for prodigiosin accumulation are glycerin and peptone (as well as casein hydrolysate, yeast extract or ammonium (nitrate) inorganic compounds), respectively.

Keywords: prodigiosin; *Serratia marcescens*; surface cultivation; solid nutrient medium.