مجله دنیای میکروب ها
سال اول، شماره اول، زمستان ۱۳۸۷
صفحات ۵۶ -۵۱

ارزیابی شرایط بهینه تولید رنگدانه پرودی جیوسین در سراشیا مارسسنس

دکترآنیتا خنافری*[1]، فاطمه احمدی فخر[2]، رضا مرندی[1]

[1]گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، [2]گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس

چکیده

مقدمه: امروزه رنگدانه‌های زیستی (Biopigments) در تهیه و تولید محصولات دارویی به وفور مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از مهمترین آنها رنگدانه قرمز تری پیرولی سراشیا مارسسنس است که Prodigiosin نامیده می‌شود. در این تحقیق افزایش توان تولید این رنگدانه توسط باکتری مزبور با استفاده از محیط‌های کشت مختلف مورد ارزِیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این بررسی، از سویه سراشیا مارسسنس *PTCC1111* استفاده شد. سپس توان تولید رنگدانه پرودی جیوسین بر روی محیط‌های کشت Nutrient broth، Sesame seed broth، Tripticase soya broth، Brain haert infusion broth و Peanut seed broth در دماهای ۲۴، ۲۸، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد با روش اسپکتروفتومتری ماورای بنفش در طول موج ۵۳۵ نانومتر بررسی شد. به منظور خالص‌سازی رنگدانه پرودی جیوسین، پس از کشت باکتری مزبوردر محیط‌های Sesame seed broth و Peanut seed broth مراحل متوالی سانتریفوژ از نمونه‌ی رشد کرده در ۱۰۰۰۰ rpm انجام گرفت. سپس با استفاده از حلال‌های آلی اتیل‌استات، استون، سدیم سولفات، دی‌کرومتان، کلروفورم رنگدانه استخراج شد و در نهایت با روش کروماتوگرافی ستونی خالص‌سازی رنگدانه صورت گرفت.

یافته ها: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بهترین محیط کشت برای بیشترین میزان تولید این رنگدانه، محیط‌های کشت Peanut broth، Sesame seed broth و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. باکتری مورد نظر در محیط‌های یاد شده حتی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نیز قادر به تولید رنگدانه بود. خالص‌سازی رنگدانه با استفاده از اسپکتروفتومتری ماورای بنفش در طول موج ۵۳۵ نانومتر تنها یک قله (پیک) را نشان داد.

نتیجه گیری: با توجه به اهمیت کاربردی رنگدانه‌های زیستی، بهینه سازی شرایط تولید آنها در حد بالاتر پیشنهاد می شود.

کلمات کلیدی: سراشیا مارسسنس، رنگدانه، پرودی جیوسین، اسپکتروفتومتری ماورای بنفش

دریافت مقاله: اردیبهشت ۱۳۸۷ پذیرش برای چاپ: آبان ۱۳۸۷

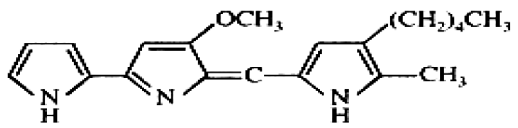
مقدمه

سراشیا مارسسنس، باکتری گرم منفی، متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است که با تولید سه آنزیم Lipase، DNAase و Gelatinase از سایر جنس‌های متعلق به این خانواده قابل تمایز می‌باشد. مشخصه دیگر این باکتری تولید رنگدانه قرمز غیر محلول در آب بنام پرودی جیوسین (Prodigiosin) است (۱و۲). این رنگدانه نوعی متابولیت ثانویه است که توسط *Vibrio psychroerythrous*، *Pseudomonas magneslorubra* و *Serratia marcescens* تولید می‌شود (۳و۴).

پرودی جیوسین از رنگدانه های قرمز خانواده تری پیرولی است (شکل ۱). فرآیند تولید این رنگدانه به صورت پیش سازهای منو و بی پیرول است که به صورت جداگانه سنتز شده و سپس به شکل نهایی پرودی جیوسین ترکیب می‌شوند. تولید رنگدانه تنها در درصد کمی از ایزوله ها دیده می‌شود (۵). مطالعات نشان می‌دهد که سویه های فاقد توان تولید رنگدانه در تولید عفونت های بیمارستانی شاخص ترند (۶). این باکتری مانند سایر اعضای خانواده انتروباکتریاسه، بر روی محیط کشت‌های سنتزی در شرایط هوازی به خوبی رشد می کند.

مطالعات اخیر خواص ضد قارچی و ضد سرطانی این رنگدانه و اهمیت آن را در صنایع داروسازی نشان داده است (۷، ۸، ۹و ۱۰). از آنجا که تولید رنگدانه های زیستی در تولیدات پزشکی نیز بسیار حائز اهمیت می باشند، هدف از این تحقیق، بررسی شرایط

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، khanafari_a@yahoo.com



شکل ۱: ساختار تری پیرولی پرودی جیوسین

بهینه برای تولید این رنگدانه با ارزش و همچنین انتخاب یک محیط ارزان قیمت به منظور تولید رنگدانه با توجیه اقتصادی است.

مواد و روش‌ها

نمونه باکتریایی و شرایط کشت: سوش لیوفیلیزه *Serratia marcescens* با کد PTCC 1111 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به عنوان یک سوش بومی به منظور تعیین میزان توانایی جذب تولید رنگدانه پرودی جیوسین تهیه گردید. این سوش پس از تایید توسط آزمون‌های متداول تشخیصی میکروبیولوژیکی، به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در محیط کشت مایع TSBو BHI در دمای ۲۸-۲۴ °C کشت داده شد. غلظت باکتریایی با تعیین میزان جذب درطول موج ۶۰۰ nm اندازه گیری شد.

تعیین میزان رنگدانه پرودی تولید شده در محیط کشت: برای این منظور باکتری مورد نظر که در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذبی معادل ۱-۰/۸ را داشت به نسبت ۳٪ به محیط های کشت: Sesame seed broth (Sesame seed powder 20 g, distilled water 1000 mL)، Nutrient broth، Peanut seed broth (Peanut seed powder 20 g، distilled water 1000 mL) و BHI broth تلقیح گردید و نمونه ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس میزان تولید رنگدانه با روش اسپکتروفتومتری ماورای بنفش در طول موج ۵۳۵ نانومتر ارزیابی شد (۱۱).

بهینه سازی تولید رنگدانه پرودی جیوسین:

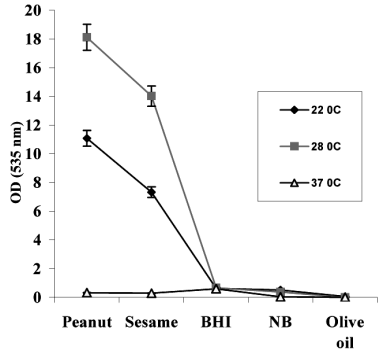
الف) تاثیر دما: برای این منظور کشت تلقیح باکتری مورد نظر با شرایط فوق تهیه و به نسبت ۳٪ به محیط‌های کشت Sesame seed broth، Peanut seed broth، BHI broth و Nutrient broth اضافه گردید و نمونه ها در دماهای ۲۴، ۲۸، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس میزان تولید رنگدانه با روش اسپکتروفتومتری ماورای بنفش در طول موج ۵۳۵ نانومتر سنجیده شد.

ب)تاثیر نوع منبع کربن: در این مرحله محیط کشت‌های یاد شده با منابع قندی گلوکز و مالتوز به نسبت ۰/۵ ٪ غنی شده و پس از کشت باکتری‌های مورد نظر، گرمخانه‌گذاری در دماهای۲۴، ۲۸، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد صورت گرفت و میزان تولید رنگدانه با روش اسپکتروفتومتری ماورای بنفش سنجیده شد.

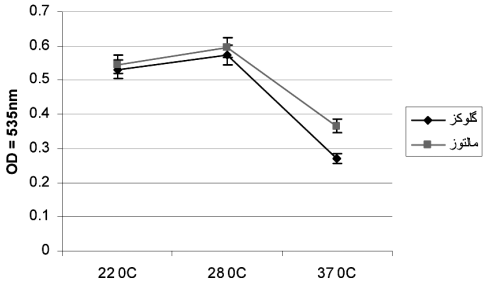
ج)تاثیر نوع منبع چربی: برای این منظور محیط کشت‌های یاد شده با منابع چربی نظیر روغن زیتون، روغن دانه فندق و روغن دانه کنجد تهیه شد و بعد از انجام کشت با شرایط یاد شده میزان تولید رنگدانه با روش اسپکتروفتومتری سنجیده شد.

د)تاثیرpH: برای این منظور محیط کشت‌های یاد شده با میزان pH ۴، ۶، ۷ و ۸ تهیه شد و پس از انجام کشت میزان تولید رنگدانه ارزیابی گردید.

استخراج رنگدانه پرودی جیوسین: برای این منظور کشت تلقیح باکتری سراشیا مارسسنس که در طول موج ۶۰۰ نانومتر جذبی معادل ۱-۰/۸ را نشان می داد به نسبت ۳٪ به محیط کشت Peanut seed broth افزوده شد. نمونه به مدت پنج روز در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و شیکر ۱۸۰rpm گرمخانه گذاری شد. به منظور استخراج رنگدانه پرودی جیوسین نمونه با افزودن اتیل



نمودار۱: اثر نوع محیط کشت و دماهای مختلف در تولید پرودی جیوسین



نمودار ۲: بررسی اثر منابع قندی در محیط نوترینت براث بر میزان تولید پرودی جیوسین

استات در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس به محلول بدست آمده استون افزوده شد و مجددا با شرایط فوق سانتریفوژ گردید. محلول رویی واجد رنگدانه از سلول های سفید رنگ باکتری راسب شده در انتهای ظرف جداسازی شد. پس از آن محلول به یک ظرف شیشه‌ای دهانه گشاد انتقال داده شد و به آن سدیم سولفات به میزان یک درصد اضافه گردید. پس از ۵ روز به دلیل فرار بودن حلال ها، رنگدانه قرمز پرودی جیوسین در ته ظرف باقی ماند.

خالص سازی رنگدانه: خالص سازی رنگدانه باروش کروماتوگرافی ستونی با سیلیکاژل مش ۱۰۰ انجام گرفت. دراین روش از حلال‌های کلروفورم، دی‌کلرومتان و استون بانسبت های ۵/۵ :۲/۰ :۲/۵ به عنوان حلال استخراج کننده استفاده شد و درجه خلوص آن با روش اسپکتروفتومتری ماورای بنفش در طول موج ۵۳۵ نانومتر ارزیابی گردید.

نتایج

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بهترین دما برای رشد و تولید رنگدانه پرودی جیوسین توسط جنس سراشیا مارسسنس (PTTC 1111) دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. این نمونه در محیط کشت Peanut seed broth در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نیز تولید رنگدانه را به صورت ضعیف نشان داد. در دمای ۲۸ محیط Peanut seed broth بهترین محیط کشت برای دستیابی به بهترین میزان تولید این رنگدانه ارزیابی گردید (نمودار ۱). بهترین pH، برای تولید رنگدانه، حدود ۸ (خنثی تا کمی قلیایی) گزارش شد (نمودار ۲).

افزودن منابع قندی مالتوز و گلوکز به محیط کشت نوترینت براث، تاثیر چندانی در افزایش تولید رنگ دانه نشان نداد. اما تاثیر مالتوز اندکی بیش از گلوکز بود. به طوری‌که این مقدار در مقایسه با کشت باکتری در محیط حاوی دانه کنجد قابل مقایسه نبود. نتایج کروماتوگرافی ستونی پرودی جیوسین جدا شده در طول موج ۵۳۵ نانومتر یک پیک را نشان دادند.

بحث

یکی از ویژگی های شاخص این باکتری تولید رنگ دانه قرمز متصل به سلول بنام پرودی جیوسین می باشد که یک متابولیت ثانویه در این باکتری محسوب می شود. بررسی‌های Parachuri و همکارانش در سال ۱۹۸۷نشان داد که تولید رنگ دانه تنها در درصد محدودی از ایزوله‌ها دیده می‌شود. میزان تولید رنگ دانه در سویه‌های مولد، بسیار متفاوت بوده و به عواملی نظیر نوع سویه، زمان گرماگذاری، نوع محیط کشت و دما بستگی دارد (۴). نتایج این پژوهش نشان داد که محیط کشت نوترینت برات در مقایسه با دو محیط یاد شده برای تولید رنگ دانه مناسب نمی‌باشد. احتمالا دلیل آن این است که ترکیب اصلی این محیط کشت، پپتون می‌باشد که در اکثر موارد پروتئین هیدرولیز شده با منشا گیاهی یا جانوری است و توسط باکتری به عنوان منبع پپتیدی برای دستیابی به منابع آمینواسیدی، نیتروژنی، گوگردی، کربنی و انرژی مورد استفاده قرار می گیرد. در حالی‌که دانه های روغنی نظیر دانه فندق و کنجد که در این تحقیق به عنوان محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت، حاوی عناصر فلزی، ویتامین و اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع می باشد که غلظت آن در دانه های روغنی مختلف متفاوت است.

مطالعات Giri و همکاران در سال۲۰۰۴ میلادی نشان داد، که منابع اسیدهای چرب اشباع شده، منبع کربن بهتری برای افزایش تولید رنگدانه پرودی جیوسین می باشد و این منابع در دانه های روغنی فندق و کنجد به وفور یافت می شود (۱۱).

با توجه به نتایج این پژوهش و ارزیابی دانه‌های روغنی به عنوان منبع کربن به نظر می‌رسد که استفاده از ضایعات فندق و کنجد به منظور تولید این رنگدانه مقرون به صرفه‌تر از محیط کشت‌های متداول باشد.

نتیجه گیری

با توجه به اهمیت بیو مولکول ها دردهه اخیر و استفاده از آنها در بیوتکنولوژی، تولید رنگ‌دانه‌های زیستی توسط باکتریها از جمله پژوهش های نوینی است که کاربرد آنها مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. بررسی خواص ضد قارچی و ضد سرطانی این رنگ دانه وکاربرد آن در صنایع نساجی نیارمند تحقیقات بیشتری است.

References

1. Kobayashi N, Ichikawa Y: Separation of the prodigiosin localizing crude vesicles which retain the activity of protease and nuclease in Serratia marcescens. Microbiol Immunol. 1991, 35:607-614
2. Hiroaki M, Hiroyuki A, Masakatsu F, Takeji S, Teisuya T: Industrial production of optically active intermediate in the synthesis of dialtizem with lipase. Seibutsu-kogaku. 1996, 74:273-288.
3. Gerber NN: Prodigiosin like pigments CRC Crit Rev Microbiol. 1975, 3:469-485.
4. Parachuri DK, Harshey RM: Flagellar variation in Serratia marcescens is associated with color variation. J Bacteriol. 1987, 169:61-65.
5. Boger DL, Patel M: Total synthesis of prodigiosin, prodigiosene, and desmethoxyprodigiosin: Diels-Alder reactions of heterocyclic azidenes and development of an effective palladium (II)-promoted 2'2'-bipyrrole coupling procedure. Org Chem. 1988, 53:1405-1415.
6. Carbonell, T., H.H.M. Della Colleta, T. Yano, A.L.C. Darini, C.E. Levy and B.A.L. Fonseca, Clinical relevance and virulence factors of pigmented Serratia marcescens. A low frequency of isolation of pigmented Serratia marcescens from clinical specimens, indicating that non pigmented strains are clinically more significant FEMS. Immunol. Microbiol. Mtds.2000, 28:143-149.
7. Mandarville RA: Synthesis, Proton affinity, and Anticancer properties of the Prodigiosin group of natural products. Current Medicinal Chemistry. 2001, 1(2):195-218.
8. Nobutaka S, Masami N, Kazuyuki H, Tadaaki H, Katsumi A: Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, Serratia marcescens strain B2 against gray mold pathogen, Botrytis cinerea. J Gen Plant Pathol. 2001, 67(4):312-319.
9. Pryce LH, Terry FW: Spectrophotometric assay of gene expression: Serratia marcescens Pigmentation. Bioscene. 2000, 26(4):3-13
10. Montaner B, Navarro S, Pique M, Vilaseca M, Martinell M, Giralt E, Gil J, Perez-Tomas R: Prodigiosin from supernatant of Serratia marcescens induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. British Journal of Pharmacology, 2000, 131:585-593
11. Giri, A.V., N. Anandkumar, G. Muthukumaran and G. Pennathur, . A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from Serratia marcescens isolated from soil. BMC Microbiology, 2004, 4: 11.

Journal of Microbial World
Volume 1, No. 1, Winter 2009

Determination of optimize situations for the enhancement in producing of prodigiosin pigment from *Serratia marcescens*

Khanafari A[1*], Ahmadifakhr F[2], Marandi R[1]

[1]Science Faculty, Azad University North Branch, Tehran, Iran
[2]Department of Microbiology, Science & Research Azad University, Fars Branch, Marvdasht, Iran

Abstract

Background and objectives: Nowadays, the synthesized biopigments by bacteria possess enormous efficiency as medicinally important products. One of the most important biopigments is tripyrrole red pigment of Serratia marcescens that is called prodigiosin. Resent studies reported antifungal and anti-cancer activity for them. The aim of this work from an industrial point of view is the necessity of obtaining a suitable medium to enhance the growth of Serratia marcescens and the pigment production.

Materials and Methods: In this research Serratia marcescens PTCC 1111 was used. The enhancement of prodigiosin production on Peanut broth, Sesame seed broth, TSB, BHI and nutrient broth medium at 24, 28, 30 and 37°C by UV Spectrophotometer method at 535 nm was investigated. In the next process, Serratia marcescens grow in peanut broth was centrifuged at 10,000 rpm and by using organic solvents such as acetone, ethyl acetate, sodium sulphate, chloroform, dichloromethane and column chromatography, pigments got purified.

Results: The result of this research determines the optimum situations for pigment production as follow Temperature 28°C, Culture medium: Peanut seed broth containing significant fatty acid source. The results of pigment purification showed only one peak by using UV Spectrophotometer at 535 nm.

Conclusion: With regard to importance of biopigment application, optimization in large scale is recommended.

Keywords: Serratia marcescens, Pigment, Prodigiosin, UV Spectrophotometer