**KHẢO SÁT CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG
ĐẾN QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT PRODIGIOSIN
TỪ VI KHUẨN *Serratia marcescens* SR3 BẰNG PHƯƠNG PHÁP
LÊN MEN CHÌM**

Nguyễn Phạm Tuấn¹, Bằng Hồng Lam²

**INVESTIGATING FACTORS AFFECTING PRODIGIOSIN PRODUCTION
FROM *Serratia marcescens* SR3 BY SUBMERGED FERMENTATION**

Nguyen Tam Tuan¹, Bang Hong Lam²

Tóm tắt – *Prodigiosin* là một sắc tố màu đỏ, được ứng dụng phong phú như kháng khuẩn, kháng nấm, chống sốt rét, chống ung thư. *Prodigiosin* được sản xuất bởi một số chủng vi khuẩn như *Serratia marcescens*, *Hahella chejuensis*, *Vibrio psychroerythrus* và *Streptomyces coelicolor*. Vi khuẩn *S. marcescens* được xem là nguồn sản xuất *prodigiosin*. Quá trình sản xuất *prodigiosin* chịu ảnh hưởng của các yếu tố như loài vi khuẩn và yếu tố môi trường, bao gồm pH, nhiệt độ, thời gian lên men. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình sản xuất *prodigiosin* từ vi khuẩn *Serratia marcescens* SR3 bằng phương pháp lên men chìm. Hàm lượng *prodigiosin* được xác định bằng phương pháp quang phổ. Kết quả nghiên cứu cho

thấy, vi khuẩn *S. marcescens* SR3 sản xuất *prodigiosin* dưới điều kiện môi trường (LB), nguồn carbon (lactose 1 g/L), nguồn nitogene (yeast extract 5 g/L), thể tích vi khuẩn ban đầu bổ sung (7%, v/v), pH môi trường (pH = 8) và thời gian lên men (96 giờ), hàm lượng *prodigiosin* đạt 527,28 unit/tế bào. Kết quả nghiên cứu cho thấy, vi khuẩn *S. marcescens* SR3 là nguồn *prodigiosin* tiềm năng cho nghiên cứu và ứng dụng.

Từ khóa: môi trường, pH, *prodigiosin*, *Serratia marcescens*, thời gian lên men.

Abstract – *Prodigiosin* is a red pigment and widely applied as antimicrobial, antifungal, anti-malarial, anti-cancer, ... *Prodigiosin* is isolated from bacteria, such as *Serratia marcescens*, *Hahella chejuensis*, *Vibrio psychroerythrus* and *Streptomyces coelicolor*,... *S. marcescens* is the major producer of *prodigiosin*. The production of *prodigiosin* has been shown to be influenced by many factors, such as species type and environmental factors, including media composition, temperature, pH and incubation time,... This

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang

²Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài: 06/9/2020; Ngày nhận kết quả bình duyệt: 15/10/2020; Ngày chấp nhận đăng: 25/12/2020
Email: ngphamtuan1983@gmail.com

¹An Giang Biotechnology center

²An Giang University, Viet Nam National University Ho Chi Minh City

Received date: 06th September 2020; Revised date: 15th October 2020; Accepted date: 25th December 2020

*study was conducted to analyze the effect of various factors on prodigiosin production process of *S. marcescens* SR3 by submerged fermentation method. Prodigiosin content was determined by the spectrophotometer method. The results showed that *S. marcescens* SR3 could produce prodigiosin in LB medium, initial bacterial volume (7%, v/v), carbon source (lactose 1 g/L), nitrogen source (yeast extract 5 g/L), pH = 8, fermentation time (96 hours), and prodigiosin content reached 527.28 Unit/cell. The results of the study showed that *S. marcescens* SR3 bacteria is a potential source of prodigiosin for research and applications.*

Keywords: *medium, pH, prodigiosin, Serratia marcescens, time of fermentation.*

I. MỞ ĐẦU

Prodigiosin là một sắc tố màu đỏ tripyrrole tuyến tính và chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học thứ cấp được tích lũy bên trong màng tế bào và hạt bên trong tế bào. Prodigiosin thu hút được nhiều quan tâm do khả năng sử dụng làm màu tự nhiên, khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, cũng như hoạt chất kháng ức chế miễn dịch, chống khối u [1] và có khả năng tiêu diệt côn trùng [2]. Với tiềm năng ứng dụng của prodigiosin trong y học và thuốc trừ sâu sinh học, prodigiosin đang thu hút sự quan tâm ngày càng tăng của các nhà khoa học [3]. Vi khuẩn *Serratia marcescens* là một trong những nguồn tổng hợp prodigiosin trong tự nhiên. Vi khuẩn *S. marcescens* sản xuất prodigiosin bằng phương pháp lên men chìm và lên men bán rắn. Tuy nhiên, trong quá trình lên men chìm, việc sản xuất prodigiosin từ

vi khuẩn *S. marcescens* chịu sự tác động của nhiều yếu tố sinh học và phi sinh học ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng của sản phẩm. Với nguồn nguyên liệu thuận lợi và những ứng dụng của prodigiosin trong thực tế, đề tài “Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sản xuất prodigiosin từ vi khuẩn *S. marcescens* SR3 bằng phương pháp lên men chìm” được thực hiện nhằm xác định các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sản xuất prodigiosin từ vi khuẩn. Nghiên cứu góp phần tạo nguồn nguyên liệu cho quá trình sản xuất các sản phẩm có khả năng hỗ trợ và điều trị bệnh cũng như ứng dụng trong nông nghiệp.

II. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu của Helvia [4] tối ưu hóa quy trình sản xuất prodigiosin từ *S. marcescens* UCP 1549 bằng việc sử dụng 6% nước thải từ công nghiệp chế biến sắn và bổ sung 2% mannitol ở 28°C và pH = 7 trong 48 giờ. Kết quả, *S. marcescens* sản xuất prodigiosin cao nhất là 49,5 g/L. Antony [5] tối ưu hóa quá trình sản xuất prodigiosin từ *S. marcescens* SU-10 và đánh giá các hoạt tính sinh học của prodigiosin. Kết quả cho thấy, điều kiện tối ưu cho sản xuất prodigiosin trong môi trường NB là ở nhiệt độ 28°C, pH = 47 và thời gian 72 giờ, li trích prodigiosin bằng dung môi ethanol: HCl (9,5 : 0,5, v/v) hoặc acetone: ethyl acetate (1 : 1, v/v). Ngoài ra, prodigiosin thu nhận có tác dụng ức chế tốt ở cả vi khuẩn gram dương và vi khuẩn gram âm. Theo Chandni [6], prodigiosin có khả năng kháng khuẩn (*S. aureus*, *B. Cereus*) và kháng nấm bệnh (*C. albicans*, *C. parapsilosis* và *Cryptococcus* sp.); ngoài ra, prodigiosin còn có khả năng chống oxy hóa (nồng độ 22,05 µg/mL) và

có tiềm năng nhuộm. Cùng với việc không bị ảnh hưởng acid và kiềm, chất tẩy rửa, prodigiosin có thể ứng dụng rộng rãi trong ngành dệt và các ngành công nghiệp trị liệu. Shahitha [7] cải tiến quá trình sản xuất prodigiosin trong *S. marcescens*, môi trường đầu đậu phộng sản xuất prodigiosin cao nhất (2,72 mg/mL) và có thể sử dụng để nhuộm bông tạo ra màu đẹp. San [8] sử dụng chất thải chế biến thủy sản như nguồn carbon và nitơ để sản xuất prodigiosin từ *S. marcescens* TKU011.

III. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

A. Vật liệu nghiên cứu

Dòng vi khuẩn nội sinh *S. marcescens* SR3 được lưu giữ tại Phòng Thí nghiệm Sinh hóa của Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang. Hóa chất và thiết bị: peptone, yeast extract (Himedia, Ấn Độ), cân phân tích (Ohaus, Mỹ), máy đo quang phổ (Human, Hàn Quốc), nồi hấp thanh trùng (Hirayama, Nhật Bản), hóa chất và thiết bị cần thiết khác.

B. Phương pháp nghiên cứu

1) *Khảo sát ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến quá trình sinh prodigiosin*: Chuẩn bị môi trường nhân sinh khối: vi khuẩn *S. marcescens* được tiến hành nhân sinh khối trên môi trường Nutrient broth trong 24 – 36 giờ và tiến hành kiểm tra mật số vi khuẩn trước khi thí nghiệm. Chuẩn bị 100 mL môi trường dinh dưỡng khác nhau (môi trường LB, NB và đậu tương lỏng 25 g/L) trong bình tam giác 250 mL, điều chỉnh pH môi trường là pH = 7. Các bình tam giác được tiến hành khử

trùng ở điều kiện nhiệt độ 121°C trong 20 phút và để nguội. Chủng 5 mL vi khuẩn nội sinh (mật số tế bào là 10⁶ tế bào/mL) trong môi trường nhân sinh khối. Sau đó, các bình tam giác được nuôi ủ trong điều kiện nhiệt độ 28 ± 2°C trong 72 giờ. Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng prodigiosin.

Hàm lượng prodigiosin được tính dựa trên phương pháp của Darshan and Manonmani [9] và có điều chỉnh để phù hợp với điều kiện thí nghiệm: mẫu vi khuẩn được nuôi trong môi trường lên men với điều kiện nhiệt độ 28 ± 2°C và tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 72 giờ. Chúng ta tiến hành thu dịch lọc bằng phương pháp li tâm với tốc độ 5.000 vòng/10 phút, thu phần cặn và loại bỏ phần dung dịch. Phần cặn được li trích với 1 mL hỗn hợp HCL 1N – methanol (4 mL : 96 mL, v/v) để giúp tế bào vi khuẩn phóng thích prodigiosin. Sau đó, hỗn hợp được li tâm với tốc độ 5.000 vòng/10 phút, phần dịch trong được tiến hành đo ở bước sóng $\lambda = 499$ nm và hàm lượng prodigiosin (unit/tế bào) được tính theo công thức:
$$\text{Prodigiosin}(\text{unit/tế bào}) = \frac{[OD_{499} - (1,381 \times OD_{620})]}{OD_{620}} \times 1000$$

Trong đó, OD: độ hấp thụ, OD₄₉₉: độ hấp thụ của chất màu.

OD₆₂₀: độ hấp thụ của tế bào vi khuẩn; 1,381: hệ số chuyển đổi.

2) *Khảo sát ảnh hưởng của pH đến quá trình sinh prodigiosin*: Chuẩn bị 100 mL môi trường LB lỏng trong bình tam giác 250 mL, điều chỉnh pH môi trường khác nhau (pH = 5 – 9). Các bình tam giác được tiến hành khử trùng ở điều kiện nhiệt độ 121°C trong 20 phút và để nguội. Chủng 5 mL vi khuẩn nội sinh (mật số tế bào là 10⁶ tế bào/mL) trong môi trường nhân sinh khối. Sau đó, các bình tam giác được

nuôi ủ trong điều kiện nhiệt độ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong 72 giờ. Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng prodigiosin.

3) *Khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon đến quá trình sinh prodigiosin:*

Chuẩn bị 100 mL môi trường LB lỏng trong bình tam giác 250 mL, điều chỉnh pH = 8, bổ sung nguồn carbon khác nhau (glucose, sucrose, dextrose và lactose 1 g/L). Các bình tam giác được tiến hành khử trùng ở điều kiện nhiệt độ 121°C trong 20 phút và để nguội. Chủng 5 mL vi khuẩn nội sinh (mật số tế bào là 10^6 tế bào/mL) trong môi trường nhân sinh khối. Sau đó, các bình tam giác được nuôi ủ trong điều kiện nhiệt độ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong 72 giờ. Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng prodigiosin.

4) *Khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến quá trình sinh prodigiosin:* Chuẩn bị 100 mL môi trường LB lỏng trong bình tam giác 250 mL, điều chỉnh pH = 8 và bổ sung lactose 1 g/L, bổ sung nguồn nitrogen khác nhau (peptone, yeast extract, beef extract, malt extract và tryptone) (5 g/L). Các bình tam giác được tiến hành khử trùng ở điều kiện 121°C trong 20 phút và để nguội. Chủng 5 mL vi khuẩn nội sinh (mật số tế bào là 10^6 tế bào/mL) trong môi trường nhân sinh khối. Sau đó, các bình tam giác được nuôi ủ trong điều kiện nhiệt độ $28 \pm 20^{\circ}\text{C}$ trong 72 giờ. Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng prodigiosin.

5) *Khảo sát ảnh hưởng của thể tích chủng ban đầu đến quá trình sinh prodigiosin:* Chuẩn bị 100 mL môi trường LB lỏng trong bình tam giác 250 mL, chỉnh về pH = 8, bổ sung lactose 1 g/L, yeast extract 5 g/L và thời gian lên men là 72 giờ. Các bình tam giác được tiến hành khử trùng ở điều kiện nhiệt độ 121°C trong 20 phút và để nguội. Chủng vi khuẩn nội sinh (thể tích ban đầu khác nhau từ 1 – 10%,

v/v) trong môi trường nhân sinh khối với lượng thể tích khác nhau. Sau đó, các bình tam giác được nuôi ủ trong điều kiện nhiệt độ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong ba ngày. Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng prodigiosin.

6) *Khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên men đến quá trình sinh prodigiosin:*

Chuẩn bị 100 mL môi trường LB lỏng trong bình tam giác 250 mL, chỉnh về pH = 8, bổ sung lactose 1 g/L, yeast extract 5 g/L và thể tích chủng ban đầu là 7% (v/v), điều chỉnh thời gian lên men khác nhau (24 – 120 giờ). Các bình tam giác được tiến hành khử trùng ở điều kiện 121°C trong 20 phút và để nguội. Chủng 5 mL vi khuẩn nội sinh (mật số tế bào là 10^6 tế bào/mL) trong môi trường nhân sinh khối. Sau đó, các bình tam giác được nuôi ủ trong điều kiện nhiệt độ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong thời gian nuôi cấy khác nhau. Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng prodigiosin.

C. Phương pháp thống kê

Các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và phần mềm Statgraphics 16.0. Sự khác biệt giữa các giá trị trung bình được kiểm tra theo phép thử Duncan và LSD.

IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

A. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến quá trình sinh prodigiosin

Các loại môi trường dinh dưỡng khác nhau ảnh hưởng đến quá trình sản xuất prodigiosin được tiến hành nghiên cứu và đánh giá hiệu quả (Hình 1). Kết quả nghiên cứu cho thấy, các môi trường nghiên cứu khác nhau cho hàm lượng prodigiosin khác nhau. Cụ thể, môi trường

LB cho hàm lượng cao nhất với prodigiosin đạt 456,75 unit/tế bào; kế đến là môi trường NB, prodigiosin đạt 400,08 unit/tế bào và thấp nhất là môi trường đậu tương, prodigiosin chỉ đạt 395,75 unit/tế bào.

Hình 1: Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến quá trình sản xuất prodigiosin từ vi khuẩn *Serratia marcescens* SR3

(Ghi chú: các chữ số giống nhau trên cùng một cột không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%.)

Kết quả này khác so với nghiên cứu của Anuradha [10]. Anuradha [10] cho rằng, việc sản xuất prodigiosin trong môi trường NB (0,52 mg/mL) so với môi trường peptone glycerol prodigiosin đạt 0,02 mg/mL. Môi trường LB và NB có chứa các thành phần chính là peptone, thịt và men chiết xuất. Peptone là một loại tiêu hóa có sẵn trên thị trường của một loại protein thực vật hoặc động vật cụ thể, được tạo sẵn cho các sinh vật dưới dạng peptide và acid amin để giúp đáp ứng các yêu cầu về nitơ, lưu huỳnh, carbon và năng lượng. Nấm men và thịt có chứa các mô nhân chuẩn (nấm men, cơ thịt bò, gan, não và

tim) được chiết xuất bằng cách đun sôi và sau đó cô đặc thành bột nhão hoặc sấy khô thành bột. Những chiết xuất này thường được sử dụng như một nguồn acid amin, vitamin và coenzyme, yếu tố tăng trưởng sinh vật khó tính. Nguyên nhân của sự khác biệt này là do loài sinh vật sản xuất hợp chất màu và điều kiện sinh trưởng khác nhau [11]. Như vậy, vi khuẩn *S. marcescens* SR3 sản xuất prodigiosin tốt nhất trong điều kiện môi trường dinh dưỡng ban đầu là LB và hàm lượng prodigiosin đạt 456,75 unit/tế bào.

B. Ảnh hưởng của pH đến quá trình sinh prodigiosin

pH ảnh hưởng đến quá trình sản xuất prodigiosin đã được nghiên cứu bởi Ahmad WA, Wan Ahmad WY, Zakaria ZA and Yusof NZ [12]. Theo một số tác giả, pH là quan trọng, trong khi những người khác cho rằng pH không đáng kể cho sản xuất prodigiosin. Theo Buckland [13], pH của môi trường đóng vai trò quan trọng cho sự phát triển của tế bào vi khuẩn và sản xuất các hợp chất thứ cấp hoặc kích thích và kìm hãm hoạt tính của enzyme. Các mức pH (5, 6, 7, 8 và 9) của môi trường khác nhau được sử dụng để tối ưu hóa quá trình sản xuất prodigiosin từ *S. marcescens*. Kết quả phân tích cho thấy, các giá trị pH khác nhau cho hiệu quả sản xuất prodigiosin khác nhau (Hình 2). Cụ thể, prodigiosin được sản xuất cao nhất ở mức pH = 8, với giá trị prodigiosin là 475,97 unit/tế bào; kế đến là mức pH = 7 với prodigiosin đạt 413,69 unit/tế bào; thấp nhất là ở mức pH = 5, prodigiosin chỉ đạt 291,11 unit/tế bào. Tóm lại, vi khuẩn *S. marcescens* SR3 sản xuất prodigiosin tốt nhất trong điều kiện pH môi trường lên

men là pH = 8 và hàm lượng prodigiosin đạt 475,97 unit/tế bào. Kết quả này tương tự với kết quả của Giri [14] cho rằng, pH kiềm thích hợp cho quá trình sản xuất prodigiosin. Ngoài ra, kết quả cho thấy tăng hoặc giảm giá trị pH của môi trường sản xuất trên hoặc dưới mức giảm pH tối ưu cho sản xuất prodigiosin, điều này có thể do sự thay đổi hoạt động của tất cả các gen chịu trách nhiệm sinh tổng hợp prodigiosin [15]. Ảnh hưởng của giá trị pH đến quá trình sản xuất chất màu gồm: thứ nhất là ảnh hưởng đến các tính chất của môi trường nuôi cấy, bao gồm độ hòa tan của các chất dinh dưỡng, vận chuyển và ion hóa; thứ hai là ảnh hưởng của pH đến độ ổn định của chất màu.

Hình 2: Ảnh hưởng của pH lên men đến quá trình sản xuất prodigiosin từ vi khuẩn *Serratia marcescens* SR3

(Ghi chú: Các chữ số giống nhau trên cùng một cột không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%.)

C. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến quá trình sinh prodigiosin

Trong quá trình sản xuất, prodigiosin chịu sự ảnh hưởng của các nguồn carbon khác nhau trong quá trình lên men. Để xác định hiệu quả của việc kết hợp các nguồn carbon bổ sung đến hàm lượng prodigiosin, các nguồn carbon khác nhau cụ thể là glucose, maltose, sucrose, lactose và dextrose được thêm vào môi trường lên men của quá trình lên men chìm của vi khuẩn. Kết quả ảnh hưởng của nguồn carbon đến quá trình sinh prodigiosin của vi khuẩn *S. marcescens* được thể hiện trong Hình 3. Hàm lượng prodigiosin giữa các nguồn carbon khác nhau cho hiệu quả sản xuất khác nhau (Hình 3). Cụ thể, hàm lượng prodigiosin thể hiện cao nhất với nguồn carbon bổ sung ban đầu là lactose với hàm lượng prodigiosin là 486,19 unit/tế bào; kế đến là nguồn carbon bổ sung là maltose và dextrose với hàm lượng prodigiosin lần lượt là 471,52 unit/tế bào; 465,15 unit/tế bào và thấp nhất là nguồn carbon bổ sung glucose, hàm lượng prodigiosin chỉ đạt 441,06 unit/tế bào. Kết quả này tương tự nghiên cứu của Vijay [16]. Vijay [16] cho rằng, hàm lượng prodigiosin đạt cao nhất với nguồn carbon bổ sung là lactose (1%, w/v) và hàm lượng prodigiosin đạt 0,52 mg/mL. Như vậy, vi khuẩn *S. marcescens* SR3 sản xuất prodigiosin tốt nhất với nguồn carbon là lactose (1 g/L) và hàm lượng prodigiosin đạt 486,19 unit/tế bào.

Giri [14] nghiên cứu sử dụng bột hạt vừng trong nước, môi trường NB broth và peptone glycerol broth làm môi trường cho sự phát triển của *S. marcescens*. Kết quả cho thấy, vi khuẩn *Serratia* sp. phát triển tốt trên môi trường tổng hợp sử dụng

Hình 3: Ảnh hưởng của nguồn carbon đến quá trình sản xuất prodigiosin từ vi khuẩn *Serratia marcescens* SR3

(Ghi chú: Các chữ số giống nhau trên cùng một cột không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%.)

các hợp chất khác nhau như một nguồn carbon duy nhất và thúc đẩy quá trình sản xuất các sắc tố khi môi trường được bổ sung nguồn carbon đơn (lactose) [17]. Theo Sundaramoorthy et al. [18], việc sản xuất sắc tố đạt tối đa khi môi trường có sự hiện diện của maltose, trong khi đó, nghiên cứu hiện tại cho thấy rằng, lactose làm tăng sản xuất sắc tố tốt nhất trong một số nguồn carbon được thử nghiệm. Hàm lượng prodigiosin sản xuất thấp nhất trong các nguồn carbon sử dụng nghiên cứu là do trong môi trường lên men có chứa nguồn carbon là glucose, vi khuẩn *S. marcescens* có thể sản xuất enzyme al-enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase và enzyme này ức chế sản xuất sắc tố [19]. Vi khuẩn *S. marcescens* phát triển trên môi trường dinh dưỡng không tạo ra sắc tố khi nguồn carbon là glucose hoặc nguồn nitơ là amoni clorua, mặc dù

proline có trong môi trường [20].

D. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến quá trình sinh prodigiosin

Nguồn và loại nguồn carbon, nitơ là những yếu tố quan trọng nhất cho bất kỳ quá trình lên men nào. Nguồn nitơ hữu cơ rất giàu protein và nguồn acid amin cho sinh vật. Acid amin rất quan trọng cho quá trình sinh tổng hợp hợp chất sinh học [21]. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến quá trình sản xuất prodigiosin từ vi khuẩn *S. marcescens* được khảo sát ở các loại nitrogen khác nhau như peptone, yeast extract, malt extract, beef extract và tryptone. Kết quả ảnh hưởng của nguồn nitrogen bổ sung đến quá trình sản xuất prodigiosin từ vi khuẩn *S. marcescens* được trình bày trong Hình 4. Hàm lượng prodigiosin giữa các nguồn nitrogene khác nhau cho hiệu quả sản xuất khác nhau (Hình 4). Cụ thể, hàm lượng prodigiosin thể hiện cao nhất với nguồn nitrogene bổ sung ban đầu là yeast extract với hàm lượng prodigiosin là 497,01 unit/tế bào; kế đến là nguồn nitrogene bổ sung là beef extract và tryptone với hàm lượng prodigiosin lần lượt là 487,05 unit/tế bào; 482,09 unit/tế bào và thấp nhất là nguồn nitrogene bổ sung malt extract, hàm lượng prodigiosin chỉ đạt 471,19 unit/tế bào. Tóm lại, vi khuẩn *S. marcescens* SR3 sản xuất prodigiosin tốt nhất với nguồn nitrogene là yeast extract (5 g/L) và hàm lượng prodigiosin đạt 497,01 unit/tế bào.

Kết quả nghiên cứu tương tự Vijay [16], hàm lượng prodigiosin đạt cao nhất với nguồn nitrogene bổ sung là yeast (1%, w/v) và hàm lượng prodigiosin đạt 0,6 mg/mL. Trong nghiên cứu này, yeast extract như một nguồn nitơ làm tăng quá

Hình 4: Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến quá trình sản xuất prodigiosin từ vi khuẩn *Serratia marcescens* SR3

(Ghi chú: Các chữ số giống nhau trên cùng một cột không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%.)

trình sản xuất sắc tố, sau đó là beef extract và tryptone. Andrade [22] cho rằng, việc bổ sung nguồn yeast extract trong môi trường làm gia tăng quá trình sản xuất hợp chất màu. Hơn nữa, theo Suryawanshi [23], yeast extract làm gia tăng quá trình sản xuất prodigiosin.

E. Ảnh hưởng của thể tích chủng ban đầu đến quá trình sinh prodigiosin

Thể tích cấy ban đầu ảnh hưởng đến quá trình sản xuất prodigiosin từ vi khuẩn. Khi thể tích cấy ban đầu tăng sẽ tỉ lệ thuận với khả năng sản xuất prodigiosin (Hình 5). Hàm lượng prodigiosin đạt cao nhất ở thể tích cấy ban đầu là 7% (v/v), với hàm lượng prodigiosin đạt 515,36 unit/tế bào; kế đến là thể tích ban đầu 5% và 10% (v/v) với hàm lượng prodigiosin lần lượt là 503,29 unit/tế bào và 505,68 unit/tế bào; và thấp nhất là ở thể tích 1% với

hàm lượng 486,27 unit/tế bào. Tóm lại, vi khuẩn *Serratia marcescens* SR3 sản xuất prodigiosin tốt nhất trong điều kiện thể tích giống vi khuẩn ban đầu là 7% (v/v) và hàm lượng prodigiosin đạt 515,36 unit/tế bào.

Hình 5: Ảnh hưởng của thể tích ban đầu đến quá trình sản xuất prodigiosin từ vi khuẩn *Serratia marcescens* SR3

(Ghi chú: Các chữ số giống nhau trên cùng một cột không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%.)

Biểu hiện sắc tố chủ yếu phụ thuộc vào hiện tượng cảm nhận đặc trưng [24]. Tăng trưởng trong nuôi cấy chất lỏng ở mật độ tế bào thấp cho phép biểu hiện mức độ thấp của một chất điều tính thẩm qua màng biểu hiện prodigiosin. Nồng độ nội bào của chất điều hòa vẫn thấp ở mật độ tế bào thấp do sự khuếch tán của nó qua màng tế bào sau khi tổng hợp. Tuy nhiên, khi mật độ tế bào tăng, nồng độ chất điều hòa nội bào tăng đến ngưỡng cần thiết để kích hoạt nhanh hơn biểu hiện prodigiosin [25].

F. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến quá trình sinh prodigiosin

Thời kì lên men đóng một vai trò rất quan trọng trong sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp của vi khuẩn. Thời gian lên men ngắn có thể góp phần hiệu quả để tăng lợi nhuận khi sản xuất ở quy mô công nghiệp [26]. Thời gian lên men khác nhau trong khoảng từ 24 giờ đến 120 giờ (Hình 6). Khi gia tăng thời gian lên men, hàm lượng thu prodigiosin tăng tỉ lệ thuận với nhau. Cụ thể, thời gian lên men là 96 giờ, hàm lượng prodigiosin cao nhất đạt 527,28 unit/tế bào; kế đến với thời gian lên men là 120 giờ, hàm lượng prodigiosin đạt 521,79 unit/tế bào; với thời gian lên men là 72 giờ, hàm lượng prodigiosin đạt 511,97 unit/tế bào và thấp nhất hàm lượng prodigiosin chỉ đạt 305,17 unit/tế bào khi thời gian lên men là 24 giờ. Kết quả nghiên cứu tương tự Srimathi et al. [27], thời gian lên men thích hợp cho quá trình sản xuất prodigiosin từ vi khuẩn *Serratia marcescens* là 96 giờ. Như vậy, vi khuẩn *S. marcescens* SR3 sản xuất prodigiosin tốt nhất trong điều kiện thời gian lên men là 96 giờ và hàm lượng prodigiosin đạt 527,28 unit/tế bào.

Hình 6: Ảnh hưởng của thời gian lên men đến quá trình sản xuất prodigiosin từ vi khuẩn *Serratia marcescens* SR3

(Ghi chú: Các chữ số giống nhau trên cùng một cột không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%.)

V. KẾT LUẬN

Vi khuẩn *S. marcescens* SR3 sản xuất prodigiosin tốt nhất trong điều kiện lên men chìm dưới các điều kiện như môi trường dinh dưỡng LB; pH = 8; nguồn carbon (lactose 1 g/L); nguồn nitrogen (yeast extract 5 g/L); thể tích chủng ban đầu (7%, v/v) và thời gian lên men (96 giờ) cho hàm lượng prodigiosin 527,28 unit/tế bào.

LỜI CẢM ƠN

Chân thành cảm ơn Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang, Sở Khoa học & Công nghệ An Giang đã tạo điều kiện và hỗ trợ để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Tsuji R.F, Magae J, Jamashita M, Nagai K, Yamasaki M. Immunomodulating properties of prodigiosin 25-C, an antibiotic which preferentially suppresses of cytotoxic T cells. *Journal of Antibiotics*. 1992; 45:1295–1302.
- [2] Wang SL, Wang CY, Yen YH. Enhanced production of insecticidal prodigiosin from *Serratia marcescens* TKU011 in media containing squid pen. *Process Biochem*. 2011;47:1684–1690.
- [3] Siva R, Subha K, Bhakta D. Characterization and enhanced production of prodigiosin from the spoiled coconut. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012;166:187–196.
- [4] Helvia W, Casullo de A, Fukushima K, Galba M, Campos T. Prodigiosin Production by *Serratia marcescens* UCP 1549 Using Renewable-Resources as a Low Cost Substrate. *Molecules*. 2010; 15:6931–6940; DOI:10.3390/molecules15106931.
- [5] Antony V, Samrot L, Chandana K, Senthilkumar PG. Optimized Production of Prodigiosin from *Serratia marcescens* SU-10 Grown as Batch Culture and Evaluation of Bioactivity of Produced Prodigiosin. *International Journal of Medicobiological*. 2011; 1(3):145–150.
- [6] Chandni G, Sourav B, Arijit D. Assessment of Process Parameters Influencing the Enhanced Production of Prodigiosin from *Serratia marcescens* and Evaluation of Its Antimicrobial, Antioxidant and Dyeing Potentials. *Malaysian Journal of Microbiology*. 2012;8(2):116–122.
- [7] Shahitha S, Poornima K. Enhanced production of prodigiosin production in *Serratia marcescens*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012; 2(8):138–140.
- [8] San LW, Yue HY, Tzu WL, Shin YC, Chia HC. Enhanced production of insecticidal prodigiosin from *Serratia marcescens* TKU011 in media containing squid pen. *Process Biochemistry*. 2012; 47(11):1684–1690.
- [9] Darshan N, Manonmani HK. Prodigiosin and its potential applications. *Journal of Food Science and Technology*. 2016; 52:5393–5407. DOI: 10.1007/s13197-015-1740-4.
- [10] Anuradha V.G, Anandkumar N, Muthukumar G. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiol*. 2004; 4:11–18.
- [11] Kurbanoglu EB, Ozdal OG, Algur OF. Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* MO-1 using ram horn peptone. *Braz J Microbiol*. 2015;46:631–637.
- [12] Ahmad WA, Wan Ahmad WY, Zakaria ZA, Yusof NZ. *Application of Bacterial Pigments as Colorant*; 2012. DOI: 10.1007/978-3-642-24520-6.
- [13] Buckland B, Gbewonyo K., Hallada T., Kaplan L., Masurekar P. Production of lovastatin, an inhibitor of cholesterol accumulation in humans. In: *Novel Microbial Products for Medicine and Agriculture*, A.L.Demain, G.A.Somkuti, J.C.Hunter-Cevera and H.W.Rossmoore, eds. Elsevier. 1989; p.161–169.
- [14] Giri AV, Anandkumar N, Muthukumar

- G. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiol.* 2004; 4:11–18.
- [15] Sole M, Francia A, Rius N. The role of pH in the glucose effect on prodigiosin production by non-proliferating cells of *S. marcescens*. *Lett Appl Microbiol.* 1997; 25:81–84.
- [16] Vijay Singh Gondil, Mohammad Asif, Tek Chand Bhalla. Optimization of physico-chemical parameters influencing the production of prodigiosin from *Serratia nematodiphila* RL2 and exploring its antibacterial activity. *Biotech.* 2017; 7:338–345.
- [17] Furstner A. Chemistry and biology of roseophilin and the prodigiosin alkaloids: a survey of the last 2500 years. *Angewandte Chemie International Edition.* 2003; 42:3582–3603.
- [18] Sundaramoorthy N, Yogesh P, Dhandapani R. Production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *Indian Journal of Science and Technology.* 2009; 2:32–34.
- [19] Gargallo D, Loren JG, Guinea J, Vina M. Glucose-6-phosphate dehydrogenase alloenzymes and their relationship to pigmentation in *Serratia marcescens*. *Appl Environ Microbiol.* 1987; 53:1983–1986.
- [20] Hejazi A, Falkiner FR. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology.* 1997; 46:903–912.
- [21] Manzoni M, M Rollini. Biosynthesis and Biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2002; 58:555–564.
- [22] Andrade RFS, Luna JM, Rufino RD, Costa Albuquerque CD, Sarubbo LA, Takaki GM. Surface active agent produced by *Candida lipolytica* using cassava flour wastewater as substrate. In: *Current research topics in applied microbiology and microbial biotechnology.* Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 2009; p.751–756.
- [23] Suryawanshi RK, Patil CD, Borase HP, Narkhede CP, Shinde L, Patil SV. Studies on production and biological potential of prodigiosin by *Serratia marcescens*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014; 173:1209–1221.
- [24] Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP. Census and consensus in bacterial ecosystem: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology.* 1996; 50:727–751.
- [25] Haddix PL, Werner TF. Spectrophotometric assay of gene expression: *Serratia marcescens* pigmentation. *Bioscience.* 2000; 26:3–13.
- [26] Sadia J, Meraj M, Mahmood S, Hameed A, Naz F, Hassan S, Irfan R. Biosynthesis of lovastatin using agro-industrial wastes as carrier substrates. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research February.* 2017; 16(2):263–269.
- [27] Srimathi R, Priya R, Malarvizhi A. Isolation, Identification, Optimization of Prodigiosin Pigment Produced by *Serratia marcescens* and its Applications. *International Journal of Latest Engineering and Management Research.* 2017; 2(9):11–21.