

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Barbara ŠKUFGA

**VPLIV OKOLJA NA STABILNOST
PIGMENTA BAKTERIJE *Vibrio* sp. DSM 14379**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Barbara ŠKUFCA (JERAJ)

**VPLIV OKOLJA NA STABILNOST
PIGMENTA BAKTERIJE *Vibrio* sp. DSM 14379**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF ENVIRONMENT ON THE
STABILITY OF PIGMENT FROM
BACTERIAL STRAIN *Vibrio* sp. DSM 14379**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je dne 7. 6. 2011 za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Davida Stoparja, za somentorico dr. Tjašo Danevčič in za recenzentko prof. dr. Romana Marinšek Logar.

Mentor: prof. dr. David Stopar

Somentorica: dr. Tjaša Danevčič

Recenzentka: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. David Stopar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: dr. Tjaša Danevčič

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Barbara Škufca

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579.22+579.26:547.97:579.843(043)=163.6
KG *Vibrio* sp./naravna barvila/pigmentiprodigiozin/ekstrakcija pigmenta/stabilnost pigmenta/okoljski dejavniki/vpliv temperature/vpliv pH vrednosti/vpliv UV-svetlobe/vpliv topila
AV ŠKUFCA (JERAJ), Barbara
SA STOPAR, David (mentor)/DANEVČIČ, Tjaša (somentorica)/MARINŠEK LOGAR, Romana (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2011
IN VPLIV OKOLJA NA STABILNOST PIGMENTA BAKTERIJE *Vibrio* sp. DSM 14379
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 33 str., 10 sl., 7 pril., 54 vir.
IJ SI
JI sl/en
AI Prodigiozin je rdeč pigment, ki spada med prodiginine. Proizvajajo ga nekatere bakterije iz rodov *Vibrio*, *Serratia*, *Pseudomonas*, aktinomicete in druge bakterije. Znana je njihova imunosupresivna, protitumorska, protibakterijska in protiglivna aktivnost. V diplomskem delu smo preučevali rdeč pigment, ki smo ga ekstrahirali iz kulture bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379. Pigment smo ekstrahirali v metanolu. Ugotavljali smo vpliv različnih dejavnikov okolja (temperatura, pH vrednost, UV, topilo) na stabilnost prodigiozina. Stabilnost pigmenta smo spremljali z merjenjem absorpcijskih spektrov v območju med 240 in 600 nm oziroma med 380 in 600 nm pri ugotavljanju vpliva topila na stabilnost pigmenta. Površina spektra je proporcionalna količini pigmenta, zato smo koncentracijo pigmenta določili s pomočjo umeritvene krivulje. Ugotovili smo, da je pigment stabilen pri temperaturah med -20 °C in 4 °C in da se z višjo temperaturo stabilnost pigmenta manjša. Pri 28 °C se tako koncentracija v času eksperimenta zmanjša za tretjino. Pri temperaturah 60 in 105 °C pigment ni stabilen. Z manjšanjem začetne koncentracije pigmenta se daljša čas, ko opazimo znaten upad koncentracije. Rezultati kažejo, da vrednost pH vpliva na stabilnost pigmenta. Pri pH vrednosti 7 je pigment najbolj stabilen, pri pH vrednosti 2 manj in najmanj pri pH vrednosti 10. Pigment je na UV-svetlobi valovne dolžine 254 nm stabilen, medtem ko pri valovni dolžini 365 nm koncentracija počasi pada. Rezultati tudi kažejo, da je pigment stabilen v organskih topilih, kot sta aceton in metanol.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.22+579.26:547.97:579.843(043)=163.6
CX *Vibrio* sp./biological pigments/pigments/prodigiosin/pigment extraction/pigment stability/environmental factors/effect of temperature/effect of pH/effect of UV-light/effect of solvent
AU ŠKUFCA (JERAJ), Barbara
AA STOPAR, David (supervisor)/DANEVČIČ, Tjaša (co-advisor)/MARINŠEK LOGAR, Romana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2011
TI INFLUENCE OF ENVIRONMENT ON THE STABILITY OF PIGMENT FROM BACTERIAL STRAIN *Vibrio* sp. DSM 14379
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 33 p., 10 fig., 7 ann., 54 ref.
LA SI
AL sl/en
AB Red pigment, prodigiosin, is one of prodiginines, produced by some bacteria of the genera *Vibrio*, *Serratia*, *Pseudomonas*, actinomycetes and other bacteria. It is known that these pigments have immunosuppressive, anti-tumor, anti-bacterial and anti-fungal activity. In this study, we have extracted the red pigment from *Vibrio* sp. DSM 14379 with methanol. We have determined the influence of various environmental factors (temperature, pH, UV, solvent) on the stability of the pigment. Stability of the pigment was monitored by measuring the absorption spectra in the range between 240 and 600 nm or between 380 and 600 nm in determining the influence of solvent on the stability of the pigment. The area under spectrum is proportional to pigment quantity and was used to measure pigment concentration. We have found that pigment is stable at temperatures of -20 °C and 4 °C. The pigment stability is reduced with higher temperature. The pigment concentration was reduced by one third at 28 °C. The pigment is not stable at 60 and 105 °C. Lowering the initial concentration of pigment increased time when substantial pigment decrease was observed. The results show that pH affects the stability of the pigment. The pigment is most stable at pH 7 and least stable at pH 10. The pigment at UV wavelength 254 nm is stable, while at a wavelength of 365 nm, the concentration is slowly decreasing. The results also show that the pigment is stable in organic solvents such as acetone and methanol.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PRILOG	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN OPREDELITEV PROBLEMA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PRODIGIOZIN	3
2.1.1 Struktura in absorpcijske lastnosti prodigiozina	4
2.1.2 Fiziološka vloga prodigiozina	5
2.1.3 Protimikrobna aktivnost prodigiozina	7
2.2 BAKTERIJA <i>Vibrio</i> sp. DSM 14379	7
2.3 APLIKACIJE PRODIGIOZINA V INDUSTRIJI	8
2.4 VPLIV DEJAVNIKOV OKOLJA NA STABILNOST PRODIGIOZINA IN NEKATERIH DRUGIH NARAVNIH PIGMENTOV	9
2.4.1 Vpliv dejavnikov okolja na stabilnost prodigiozina	9
2.4.2 Stabilnost karotenoidov	9
2.4.3 Stabilnost antocianinov	10
2.4.4 Stabilnost fikobilinov	10
2.4.5 Stabilnost betalainov	10
2.5 METODE EKSTRAKCIJE PRODIGIOZINA	11
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 MATERIALI	12
3.1.1 Kemikalije	12
3.1.2 Gojišča	12
3.1.3 Bakterijski sev	13
3.2 GOJENJE BAKTERIJSKIH KULTUR	13
3.3 EKSTRAKCIJA PIGMENTA	13

3.4	UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE PIGMENTA.....	14
3.4.1	Merjenje absorpcijskih spektrov.....	14
3.4.2	Integriranje spektrov.....	14
3.5	SPREMLJANJE VPLIVA RAZLIČNIH OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA STABILNOST PIGMENTA	15
3.5.1	Spremljanje vpliva temperature na stabilnost pigmenta.....	15
3.5.2	Spremljanje vpliva pH vrednosti na stabilnost pigmenta.....	15
3.5.3	Spremljanje vpliva UV-svetlobe na stabilnost pigmenta	16
3.5.4	Spremljanje vpliva topila na stabilnost pigmenta	16
3.6	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	16
3.6.1	Statistična analiza podatkov	16
3.6.2	Razdelitev absorpcijskih spektrov na UV in VIS del	16
3.6.3	Superponiranje krivulj absorpcijskih spektrov.....	17
4	REZULTATI.....	18
4.1	VPLIV TEMPERATURE NA STABILNOST PIGMENTA.....	18
4.2	VPLIV pH VREDNOSTI NA STABILNOST PIGMENTA	22
4.3	VPLIV UV-SVETLOBE NA STABILNOST PIGMENTA	23
4.4	VPLIV TOPILA NA STABILNOST PIGMENTA.....	24
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	25
5.1	VPLIV TEMPERATURE NA STABILNOST PIGMENTA.....	25
5.2	VPLIV pH VREDNOSTI NA STABILNOST PIGMENTA	25
5.3	VPLIV UV NA STABILNOST PIGMENTA	26
5.4	VPLIV TOPILA NA STABILNOST PIGMENTA.....	26
5.5	SKLEPI.....	27
6	POVZETEK	28
7	VIRI.....	29

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO SLIK

Slika 1:	Produkcija prodigiozina med rastjo bakterije <i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396 (Kim in sod., 2007).	3
Slika 2:	Skupine prodigininov (Bennett in Bentley, 2000; 12, 13).	5
Slika 3:	Krivulja preživelosti divjega tipa bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM 14379 z večanjem intenzivnosti UV-stresa v odvisnosti od bakterijskega fiziološkega stanja (Borić in sod., 2011).	6
Slika 4:	Vpliv temperature na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM 14379.	18
Slika 5:	Koeficienti regresijskih krivulj ekstraktov pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM 14379, izpostavljenih različnim temperaturam. . .	19
Slika 6:	Vpliv različnih začetnih koncentracij pigmenta na stabilnost ekstrakta pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM 14379.	20
Slika 7:	VIS absorpcijski spektri ekstraktov pigmenta v metanolu, pridobljenega iz celic bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM 14379, na začetku in po 18 urah inkubacije pri temperaturah -20 °C, 4 °C, 28 °C, 60 °C in 105 °C.	21
Slika 8:	Vpliv pH vrednosti na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM 14379. . .	22
Slika 9:	Vpliv UV na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM 14379.	23
Slika 10:	Vpliv topila na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM 14379.	24

KAZALO PRILOG

- Priloga A1:** Vpliv temperature na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379.
- Priloga A2:** Vpliv temperature na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379 v VIS delu absorpcijskega spektra.
- Priloga A3:** Koncentracija ekstraktov pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379, v VIS delu absorpcijskega spektra (400 – 600 nm).
- Priloga A4:** Vpliv temperature na stabilnost različnih začetnih koncentracij ekstrakta pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379.
- Priloga B:** Vpliv pH vrednosti na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379.
- Priloga C:** Vpliv UV na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379.
- Priloga Č:** Vpliv topila na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Cl ⁻ /NO ₃ ⁻	kloridni/nitratni ion
H ⁺ /Cl ⁻	proton/kloridni ion
konc.	koncentracija
NaCl	natrijev klorid
norm.	normirana
OD ₆₅₀	optična gostota pri valovni dolžini 650 nm
oz.	oziroma
st.	standardni
t _{1/2}	čas, v katerem se koncentracija zmanjša za polovico začetne koncentracije
v/v %	volumsko – volumski odstotek
w/v %	utežno – volumski odstotek
UV	ultravijoličen
VIS	vidni spekter

1 UVOD

Bakterije proizvajajo različne pigmente v različnih barvnih odtenkih. Pigmenti so dobro preučeni predvsem pri patogenih bakterijah, pri katerih je obarvanost kolonij tudi pomembna lastnost pri diagnostiki. Za bakterije, ki jih proizvajajo, imajo pigmenti različne vloge. Zlato rumeni karotenoidi so pomembni pri virulenci bakterije *Streptococcus aureus*, poleg tega kažejo tudi imunosupresivno aktivnost (Liu in Nizet, 2009). Karotenoidi, ki jih proizvajajo bakterije rodu *Micrococcus*, so zelo različnih barv, od rumenih, oranžnih, do rožnatih. Bakterije varujejo pred poškodbami zaradi svetlobe in reaktivnimi zvrstmi kisika (Moss, 2002). Piocianin bakterije *Pseudomonas aeruginosa* je modrozeleno barve in deluje citotoksično, inducira apoptozo neutrofilcev ter spodbuja vnetni odziv. Violacein je temno vijolične barve in je močan antioksidant. Veliko biosintetskih poti teh pigmentov je dobro poznanih, zato je zanimanje za razvoj terapevtskih učinkovin vse večje (Liu in Nizet, 2009).

Bakterijski pigmenti so po drugi strani lahko alternativa sintetičnim pigmentom, ki jih uporabljajo v živilski, kozmetični in farmacevtski industriji. Njihovo pridobivanje je poceni in enostavno, v primerjavi s sintetičnimi so manj škodljivi za ljudi in okolje. V tekstilni industriji kažejo za naravna barvila, kot je prodigiozin, veliko zanimanja tudi zaradi protibakterijskih lastnosti, ki zagotavljajo daljšo obstojnost barve tekstila (Alihosseini in sod., 2008; Venil in Lakshmanaperumalsamy, 2009). Prodigiozin proizvajajo nekatere bakterijske vrste iz rodov *Serratia*, *Vibrio* (Grimont in Grimont, 1978, Song in sod., 2005) in aktinomicete. Izolacija prodigiozina in analogov hitro narašča zaradi njihovih zanimivih bioloških lastnosti. Najbolj zanimiva je imunosupresivna aktivnost v količinah, ki niso citotoksične, poznana je tudi njegova protitumorska aktivnost. Deluje proti bakterijam, praživalim, patogenim glivam (Fürstner, 2003) ter škodljivim algam (Kim in sod., 2008).

1.1 NAMEN IN OPREDELITEV PROBLEMA

Bakterija *Vibrio* sp. DSM 14379 proizvaja rdeč pigment, ki spada v družino prodigiozinu podobnih pigmentov. Poznana je njegova protibakterijska in protitumorska aktivnost. Narejene so bile prve študije o produkciji tega pigmenta. Stabilnost pigmenta je relativno slabo preučena in je predmet proučevanja v tej diplomski nalogi.

Namen diplomskega dela je ugotoviti, kako različni dejavniki okolja vplivajo na stabilnost pigmenta, izoliranega iz bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379. Ugotoviti želimo, kako na stabilnost pigmenta vpliva:

- temperatura,
- pH vrednost,
- UV-sevanje,
- topilo.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

V diplomskem delu smo preverili sledeče hipoteze:

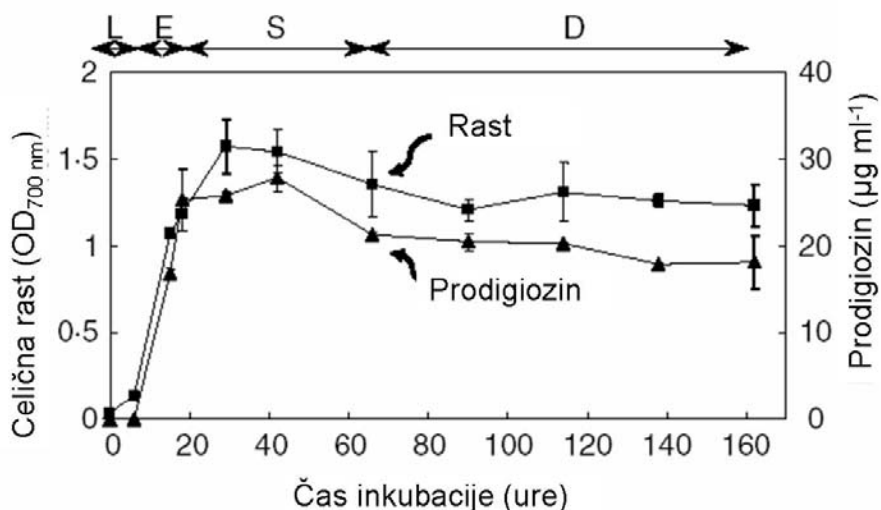
- pri višji temperaturi je pigment manj stabilen,
- pigment je najbolj stabilen v nevtralnem pH območju, v kislem in bazičnem manj,
- topilo nima vpliva na stabilnost pigmenta,
- pigment, izpostavljen UV-sevanju, ni stabilen.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PRODIGIOZIN

Mikroorganizmi proizvajajo veliko stabilnih pigmentov, kot so karotenoidi, flavonoidi, kinoni in rubramini ter prodigiozini (Alihosseini in sod., 2008). Rdeč pigment prodigiozin so prvič izolirali iz bakterije *Serratia marcescens* leta 1902, strukturo so ugotovili leta 1960 (Gerber, 1975). Bakterija *Serratia marcescens* je bila zaradi svoje obarvanosti, ki je posledica sinteze prodigiozina in spominja na kapljice krvi, večkrat v zgodovini opažena (Bennett in Bentley, 2000). Pojave »krvi« na različni hrani opisujejo že v času Aleksandra Velikega, ko so vojaki opazili »kri« v kosu kruha (Fürstner, 2003). V srednjem veku se je »kri« pojavljala predvsem v hostijah, fižolu in drugi škrobni hrani, kot sta polenta in krompir. Te, sprva čudežne pojave »krvi«, so kasneje pripisali rasti bakterije *Serratia marcescens*, iz katere so tudi ekstrahirali pigment v etanolu in ga uporabili za barvanje svile ter volne (Bennett in Bentley, 2000).

Prodigiozin je tipičen sekundaren metabolit, ki ga bakterije sintetizirajo v poznih stopnjah rasti (slika 1) (Williamson in sod., 2005). V bakterijskih celicah se nahaja v intracelularnih granulah, v ekstracelularnih veziklih ali na celicah (Khanafari in sod., 2006). Različne bakterije lahko proizvajajo različne analoge prodigiozina, njihova produkcija je odvisna od tipa bakterije, gojišča, pH vrednosti in temperature (Alihosseini in sod., 2010).



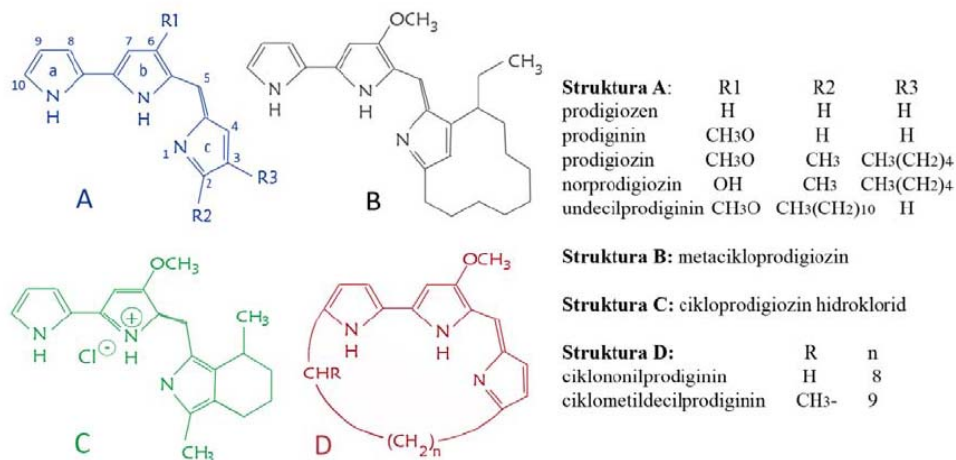
Slika 1: Produkcija prodigiozina med rastjo bakterije *Hahella chejuensis* KCTC 2396. Označene so štiri faze rasti: lag (L), eksponentna (E), stacionarna faza (S) in faza odmiranja (D) (Kim in sod., 2007).

Do danes so prodigiozin in njegove analoge izolirali iz različnih bakterij, ki živijo v različnih okoljih. Največ študij je bilo opravljenih na bakteriji *Serratia marcescens* (Williamson in sod., 2006), ki je po Gramu negativna bakterija in oportunistični patogen. Je ubikvitarna, saj so jo izolirali iz zemlje, vode in insektov (Haddix in sod., 2008). Prodigiozin proizvajajo tudi številne druge po Gramu negativne bakterije, kot so *Serratia rubidaea*, *Alteromonas rubra*, *Rugamonas rubra*, bakterije iz rodu *Vibrio* (Rameshkumar in Nair, 2009) in *Pseudomonas* ter po Gramu pozitivne bakterije, kot so bakterije iz rodu *Streptomyces* (Song in sod., 2005). Prodigiozin proizvajajo tudi bakterije *Hahella chejuensis* (Kim in sod., 2007), *Streptoverticillium rubr-reticuli*, ki je zanimiva predvsem zaradi kolonizacije polivinil klorida (Gerber in Stahly, 1975), izolirali so ga tudi iz bakterij, ki rastejo na mehkih sirih (Galaup in sod., 2005).

Bakterije, ki proizvajajo prodigiozin, živijo tudi v ekstremnih razmerah. Iz mrzlih tal na Aljaski so namreč izolirali bakterijo *Janthinobacterium lividum*, ki proizvaja prodigiozin pri nižjih temperaturah, kot ostale bakterije (Schloss in sod., 2010).

2.1.1 Struktura in absorpcijske lastnosti prodigiozina

Prodigiozin ima tri pirolne obročje in spada med prodiginine. Je piril dipiril meten z molekulska formulo $C_{20}N_2S_5N_3O$ in ima dva pirolna obročja povezana direktno, tretji je povezan preko metenskega mostička. Od drugih prodigininov se razlikuje po metilni skupini, ki je vezana na osnovno strukturo, in alkilni verigi s 5 C atomi. Prodigiozin spada v skupino prodigininov (slika 2, A), ki jo predstavljajo prodiginini z ravnimi alkilnimi verigami. Ostale tri skupine zastopajo ciklični prodiginini (slika 2, B, C, D) (Bennett in Bentley, 2000).



Slika 2: Skupine prodigininov (Bennett in Bentley, 2000: 12, 13).

Prodigiozin tvori svetleče kristale v obliki kvadratnih piramid, ki so temno rdeče barve z zelenkastim odsevom. Visoko konjugiran sistem sedmih dvojnih vezi daje intenzivno obarvanost (Bennett in Bentley, 2000).

Prodigiozin ima dve obliki, ki sta odvisni od koncentracije vodikovih ionov v raztopini. V kislih raztopinah je protonirana oblika pigmenta obarvana rdeče z visokim in ozkim absorpcijskim vrhom z maksimumom med 535 in 540 nm. V alkalnih raztopinah je največja absorpcija pri približno 470 nm. Absorpcijski vrh je širši in nižji, posledično je pigment oranžno rumene barve (Hubbard in Rimington, 1950; Williams in sod., 1956). Tudi drugi avtorji navajajo največjo absorpcijo pri 535 nm in v večini ugotavljajo količino prodigiozina s spektrofotometrično metodo z merjenjem absorbance pri tej valovni dolžini (Lewis in Corpe, 1964; Wang in sod., 2004; Kim in sod., 2007).

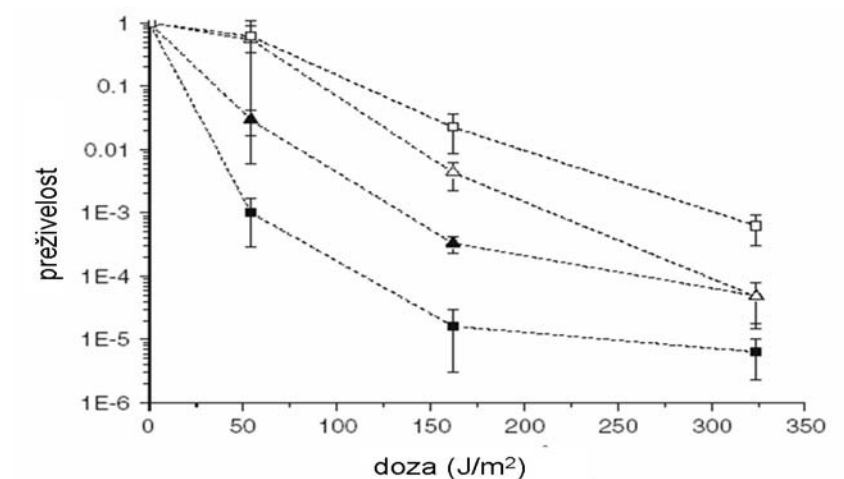
2.1.2 Fiziološka vloga prodigiozina

Dejanska fiziološka vloga prodigiozina in njegovih analogov v bakterijah še ni točno poznana (Venil in Lakshmanaperumalsamy, 2009). Bakterije, ki proizvajajo prodigiozin, imajo verjetno prednost v kompeticiji za ekološko nišo (Kalivoda in sod., 2010). Možno je, da bakterija *Serratia marcescens* pigment uporablja za preživetje v gostitelju, saj pigmentiranost sovpada s količino flagelarnih antigenov. Variacije teh površinskih antigenov pomagajo patogenim sevom pri izogibanju imunskemu sistemu gostitelja (Bennett in Bentley, 2000). Možna funkcija prodigiozina je tudi omejevanje oksidativnega stresa v celici pri aerobnih pogojih rasti. Verjetno je prodigiozin tudi mediator celične

smrti v stacionarni fazi rasti (Haddix in sod., 2008). Prodigiozin je tudi anionski antiporter $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ ionov (Seganish in Davis, 2005). Montaner in Pérez-Tomás (2003) navajata, da prodigiozin deluje kot simport H^+/Cl^- ionov.

Barlett je že leta 1970 omenil, da prodigiozin verjetno služi tudi kot zaščita celicam proti UV-sevanju. Nedavno so vlogo prodigiozina pri UV-zaščiti ugotavljali pri bakteriji *Vibrio* sp. DSM 14379. Izkazalo se je, da so v fazi prilagajanja (lag) in zgodnji fazi rasti celice občutljive na UV-stres ter bolj odporne v pozni eksponentni v stacionarni fazi rasti (slika 3). Prehod iz občutljivega v odporno stanje bakterijskih celic sovpada z začetkom proizvodnje prodigiozina pri bakteriji *Vibrio* sp. Pigmentacija se namreč začne v sredini eksponentne faze rasti in je največja na koncu eksponentne in začetku stacionarne faze rasti (Starič in sod., 2010). Ugotovili so tudi, da je zaščitna vloga prodigiozina bolj pomembna pri višjih dozah UV-sevanja in je odvisna od koncentracije prodigiozina v celici. Odpornost na UV-stres ne pigmentiranih mutant se lahko obnovi, če se v gojišče doda eksogeni ekstrakt prodigiozina. To dokazuje, da je prodigiozin zaščitni pigment proti UV-svetlobi (Borič in sod., 2011).

Preučevali so tudi vpletenost prodigiozina pri hidrofobnosti bakterijskih celic. Syzdek (1985) ugotavlja, da imajo pigmentirane celice večjo hidrofobnost, medtem ko Rosenberg in sodelavci (1986) poročajo, da so hidrofobni tudi nekateri ne pigmentirani sevi bakterije *Serratia marcescens*.



Slika 3: Krivulja preživelosti divjega tipa bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379 z večanjem intenzivnosti UV-stresa v odvisnosti od bakterijskega fiziološkega stanja: lag (polni kvadrat), zgodnja eksponentna (polni trikotnik), pozna logaritemska (prazen trikotnik) in stacionarna faza (prazen kvadrat) (Borič in sod., 2011).

2.1.3 Protimikrobna aktivnost prodigiozina

Mnoge študije kažejo, da ima prodigiozin širok spekter delovanja proti bakterijam, praživalim in glivam (Fürstner, 2003). Toksično deluje proti bakterijam, kot so *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Micrococcus leuteus*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* in *Staphylococcus epidermidis* (Boudjella in sod., 2007; Khanafari in sod., 2006; Štraser, 2008). Proti bakteriji *Bacillus* sp. signifikantno deluje že v koncentraciji 10^{-5} mg/L (Starič in sod., 2010). Deluje tudi proti glivam *Candida albicans*, *Penicillium* sp., *Candida albicans* in *Saccharomyces cerevisiae* (Castro in sod., 1967) ter proti malariji (Han in sod., 1998).

Dokazali so tudi, da prodigiozin litično deluje proti algam, kot je dinoflagelat *Cochloidium polykrikoides*. Ta v morju povzroča cvetenje, imenovano tudi rdeča plima, ki je škodljivo za ribe, školjke in druge morske organizme. Zaradi te lastnosti je ideja, da bi se prodigiozin uporabljal kot alternativna in biološka metoda za zatiranje teh škodljivih alg (Kim in sod., 2008).

Prodigiozin ima tudi številne druge učinke. Citotoksično deluje proti številnim celičnim linijam raka, imunosupresivno na T celice in blokira tumorske metastaze (Liu in Nizet, 2009). Uporaba prodigiozina v terapevtske namene je kljub različnim učinkom vprašljiva, saj je pri učinkoviti dozi toksičen (Fürstner, 2003).

2.2 BAKTERIJA *Vibrio* sp. DSM 14379

Bakterijo *Vibrio* sp. DSM 14379 so izolirali iz brakičnih voda v Tržaškem zalivu (Gnezda-Meijer in sod., 2005). Bakterija raste pri temperaturnem razponu med 15 in 43 °C in je halotolerantna bakterija, saj raste do 17 % (w/V) NaCl. Sprememba slanosti okolja, ki povzroča osmotski stres, vpliva na povečanje hitrosti mikrobne respiracije, dehidrogenazne aktivnosti, glikolitično aktivnost in nivoja ATP v bakterijski celici. Spremeni se sestava polarnih glav ter acilnih verig v membrani ter zmanjša transport elektronov v dihalni verigi (Danevčič, 2006). *Vibrio* sp. ima v genomu zapis za enega ali več profagov, ki ga induciramo z mitomicinom C, kar povzroči sproščanje morfološko različnih bakteriofagom podobnih delcev iz bakterije (Gnezda-Meijer in sod., 2005).

Ena najbolj opaznih lastnosti bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379 je vsekakor produkcija rdečega pigmenta prodigiozina (Starič in sod., 2010; Borić in sod., 2011). Prodigiozin je

sekundarni metabolit, saj je njegova sinteza največja po prehodu v stacionarno fazo rasti (Štraser, 2008; Starič in sod., 2010). Največja produkcija pigmenta je pri temperaturi 28 °C in 3 % (w/V) NaCl v gojišču PKS. Na produkcijo vpliva tudi glukoza. V gojišču M9 je produkcija pigmenta največja pri koncentraciji glukoze okoli 5 g/L (Starič, 2007).

2.3 APLIKACIJE PRODIGIOZINA V INDUSTRIJI

Zanimanje za bakterijske pigmente je veliko predvsem v tekstilni, živilski, kozmetični in farmacevtski industriji. Bakterijski pigmenti so potencialno dobra alternativa sintetičnim pigmentom. Bakterijski pigmenti imajo številne prednosti tudi pred rastlinskimi pigmenti. Te so predvsem enostavno in poceni pridobivanje, visok donos pigmenta, manjši odpadek pri proizvodnji ter neodvisnost od vremenskih razmer. Poleg tega imajo nekatera naravna barvila, kot je tudi prodigiozin, še protibakterijske učinke, kar v tekstilni industriji zagotavlja daljšo obstojnost barve tekstila (Venil in Lakshmanaperumalsamy, 2009). Protibakterijski učinek barvanega tekstila so ugotavljali tudi Alihosseini in sod. (2008). Prodigiozin in njegove derivate so ekstrahirali iz bakterije *Vibrio* sp. in pobarvali volno, svilo ter bombaž. Največji učinek proti bakterijam *Streptococcus aureus* in *Escherichia coli* je imela obarvana volna, medtem ko bombaž ni imel nobenega protibakterijskega učinka. Po drugi strani bakterija *Streptoverticillium rubrreticuli* povzroča težave v industriji plastike. Zaradi proizvodnje prodigiozina rožnato obarva polivinil klorid, do obarvanosti prihaja tudi na pohištvo, stenskih oblogah in vratih, ki so z njim prekrita (Gerber in Stahly, 1975).

2.4 VPLIV DEJAVNIKOV OKOLJA NA STABILNOST PRODIGOZINA IN NEKATERIH DRUGIH NARAVNIH PIGMENTOV

2.4.1 Vpliv dejavnikov okolja na stabilnost prodigiozina

Vplivi različnih dejavnikov okolja na stabilnost ekstrahiranega prodigiozina so slabo preučeni, vendar so se pri nekaterih študijah dotaknili tudi tega področja. Alihosseini in sod. (2008) navajajo, da prodigiozin ni stabilen v kisli raztopini pri temperaturi 80 °C. Spektroskopija je namreč pokazala, da se koncentracija pigmenta v raztopini zmanjša za 15 % po 60-minutnem segrevanju pri pH vrednosti 4,5. Ugotavljali so tudi stabilnost prodigiozina pri različnih svetlobah. Ugotovili so, da se na beli in modri svetlobi razgradi skoraj ves prodigiozin po 36 urah inkubacije, medtem ko je na rdeči in temno rdeči svetlobi stabilen (Someya in sod., 2004).

2.4.2 Stabilnost karotenoidov

Karotenoidi so široko razširjeni pigmenti in dajejo barvo različnemu sadju, rožam, mnogim pticam, insektom in morskim živalim. V prehrani ljudi predstavljajo pomemben vir vitamina A (Gouveia in Empis, 2003). Stabilnost karotenoidov so preverili v pomarančnem soku po pasterezaciji, ki je pogost način podaljšanja obstojnosti različnim živilom. Ugotovili so, da se po 10 sekundah pri temperaturi med 95 in 105 °C koncentracija vseh karotenoidov ne zmanjša signifikantno (Torres Gama in Sylos, 2007). Ugotavljali so tudi stabilnost karotenoidov iz mikroalg pri različnih pogojih. Študija je pokazala, da so karotenoidi v suhi biomasi mikroalg po letu in pol najbolj stabilni v vakuumu, kjer se koncentracija karotenoidov zmanjša za največ 9,1 %. Največji upad karotenoidov je bil na svetlobi, tudi za 89 %. Karotenoidi v etanolnem ekstraktu so po drugi strani precej manj stabilni, saj jih že po enem mesecu hranjenja na svetlobi ne zaznamo več. Podobno so karotenoidi v ekstraktu najbolj stabilni v vakuumu, kjer se po 6 mesecih koncentracija zmanjša za približno 13 % (Gouveia in Empis, 2003).

Preučevali so tudi vpliv UV-sevanja na karotenoide, kot so β -karoten, likopen, lutein in neoksantin. Karotenoide v heksanu so obsevali z UV C (254 nm), UV B (300 nm) in UV A (350 nm) sevanjem. Karotenoidi so najmanj stabilni na UV C, najbolj na UV A sevanje. Od vseh preučevanih karotenoidov sta najbolj stabilna lutein in neoksantin na UV A sevanje, kjer je k , ki predstavlja enačbo regresijske krivulje logaritmirane absorbance v odvisnosti od časa izpostavljenosti UV-svetlobi, $0,0023 \text{ min}^{-1}$. Najmanj stabilen je likopen na UV C sevanju, kjer je k $0,6011 \text{ min}^{-1}$. Študija je pokazala, da karotenoidi niso učinkoviti

pri absorpciji UV, vendar kljub temu opravljajo zaščitno funkcijo proti UV-svetlobi (Cvetković in Marković, 2008).

2.4.3 Stabilnost antocianinov

Antocianini so naravni pigmenti, ki jih najdemo v sadju, zelenjavi, rožah in drugih rastlinah (Parisa in sod., 2007). V živilski industriji se uporabljajo kot rdeče barvilo (Kirca, 2007). Ugotavljali so termo stabilnost antocianinov iz rdečega zelja. Kirca (2005) navaja, da je stabilnost antocianinov odvisna od koncentracije askorbinske kisline in temperature. Stabilnost antocianinov v soku grozdja, ki vsebuje najmanj askorbinske kisline, je največja pri 4 °C, kjer je izračunani razpolovni čas ($t_{1/2}$) 144 tednov. Pri temperaturi 37 °C je $t_{1/2}$ 1,8 tednov. Sok pomaranče vsebuje največ askorbinske kisline, kar vpliva na manjšo stabilnost antocianinov. Pri 4 °C je $t_{1/2}$ 43,1 tedne, medtem ko je pri 37 °C le 1,4 tedne (Kirca, 2005). Kasneje Kirca (2007) navaja, da ima pH vrednost velik vpliv na stabilnost antocianinov iz rdečega zelja. Antocianini so najmanj stabilni pri pH višjem od 5,0. Tako je pri pH vrednosti nad 6,0 $t_{1/2}$ pri 70 °C 12,6 ur, pri 90 °C pa približno 5,3 ur. Pri pH vrednosti med 2,5 in 4 je $t_{1/2}$ pri temperaturi 70 °C 25,1 ur, pri 90 °C v povprečju 6 ur. Pomembna je tudi vsebnost suhe snovi v vzorcu. Pri 37 °C je $t_{1/2}$ približno 4 tedne ne glede na začetno vsebnost suhe snovi. Razlike so večje pri inkubaciji pri 4 °C. Pri 64 °Brix je $t_{1/2}$ pri 4 °C 215 tednov, medtem ko je pri 30 °Brix le 71,8 tednov (Kirca, 2007). Ugotavljali so tudi stabilnost antocianina v kompleksu s ko-pigmentom, ki je lahko flavonoid, alkaloid ali kovina. Kompleksu se absorbanca po 2 urah inkubacije pri 80 °C in pH vrednosti 3,5 v povprečju zmanjša za polovico. Na UV-sevanju tako antocianin kot kompleks nista stabilna, saj se absorbanca vseh po 120 minutni izpostavitvi zmanjša (Parisa in sod., 2007).

2.4.4 Stabilnost fikobilinov

Fikobilini so fotosintetski pigmenti pri cianobakterijah in imajo ključno vlogo pri zbiranju sončne svetlobe. Na UV-sevanju fikobilini niso stabilni, saj jih že po 30 minutah obsevanja ne zaznamo več. Upad koncentracije je linearen (Li in sod., 2009).

2.4.5 Stabilnost betalainov

Betalaini so naravni pigmenti, ki obsegajo rdečevijoličen barvni spekter. Najdemo jih v koreninah, sadju in rožah. Betalaini so najbolj stabilni pri pH vrednostmi med 5 in 6,

najmanj pri pH, nižjem od 3. Po 5-minutni pasterizaciji soka za pitje pri 80 °C se koncentracija betalainov pri pH vrednosti 4 zmanjša za približno 10 %. Na stabilnost vpliva tudi topilo. Betalaini so pri temperaturi med 60 °C in 86 °C najbolj stabilni v mešanici vode in etanola, manj v mešanici vode in glicerola ter vode in etilen glikola (Azeredo, 2009).

2.5 METODE EKSTRAKCIJE PRODIGIOZINA

V študijah so opisane različne metode ekstrakcije in detekcije prodigiozina. Hubbard in Rimington (1950) sta za ekstrakcijo prodigiozina uporabila dve vrsti ekstrakcije, in sicer alkalno in kislinsko. Pri alkalni ekstrakciji se kulturi najprej doda trdni NaOH do koncentracije 10 % (w/v), nato čisti etanol in petrolej, pri kislinski ekstrakcija poteka v acetonu z 10 % (v/v) 3N HCl. Drugi avtorji so ekstrakcijo prodigiozina izvedli s kislim metanolom (Barlett in sod., 1970; Allen in sod., 1983; Montaner in sod., 2000; Wang in sod., 2004; Kim in sod., 2007), čistim metanolom (Galaup in sod., 2005; Alihosseini in sod., 2008), acetonom (D'Aoust in Gerber, 1974; Gerber in Stahly, 1975; Giri in sod., 2004; Alihosseini in sod., 2008; Starič in sod., 2010), dietil etrom (Kawauchi in sod., 1997) in etanolom (Alihosseini in sod., 2008). Ekstrakcija prodigiozina iz bakterije *Vibrio* sp. je uspešna v metanolu (Alihosseini in sod., 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

- aceton C_3H_6O $M_w = 58,08$ g/mol (Merck, Nemčija),
- agar-agar (Biolife, Italija),
- amonijev klorid NH_4Cl $M_w = 53,49$ g/mol (Merck, Nemčija),
- destilirana voda,
- D-(+)-glukoza $C_6H_{12}O_6$ $M_w = 180,16$ g/mol (Kemika, Hrvaška),
- dinatrijev hidrogen fosfat Na_2HPO_4 $M_w = 141,96$ g/mol (Merck, Nemčija),
- kalcijev klorid dihidrat $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ $M_w = 147,02$ g/mol (Zorka Šabac, Srbija),
- kalijev dihidrogen fosfat KH_2PO_4 $M_w = 136,09$ g/mol (Merck, Nemčija),
- kvasni ekstrakt (Biolife, Italija),
- magnezijev klorid heksahidrat $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ $M_w = 203,3$ g/mol (Merck, Nemčija),
- magnezijev sulfat heptahidrat $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $M_w = 246,48$ g/mol (Merck, Nemčija),
- metanol CH_3OH $M_w = 32,04$ (Merck, Nemčija),
- natrijev klorid $NaCl$ $M_w = 58,5$ g/mol (Merck, Nemčija),
- peptokompleks (Biolife, Italija).

3.1.2 Gojišča

- Gojišče PKS (pepton-kvasni ekstrakt) (Danevčič in sod., 2005):

5 g peptokompleks
1 g kvasni ekstrakt
2 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
30 g (3 % (w/V) PKS) NaCl
1000 mL destilirane vode

– Gojišče M9 (Starič in sod., 2010):

200 mL 5xM9 soli (64 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 15 g KH_2PO_4 , 5 g NH_4Cl , 150 g NaCl in 1000 mL destilirane vode)
2 mL 1M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,1 mL 1M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
10 mL 500 g L^{-1} glukoza (končna koncentracija glukoze v gojišču 5 g L^{-1})
750 mL destilirane vode

Za trdna gojišča PKS smo dodali 15 g agar-agar na 1000 mL tekočega gojišča.

3.1.3 Bakterijski sev

– *Vibrio* sp. DSM 14379

3.2 GOJENJE BAKTERIJSKIH KULTUR

Kulturo *Vibrio* sp. smo nacepili iz trdnega gojišča PKS s 3 % (w/V) NaCl v 5 mL tekočega gojišča PKS s 3 % (w/V) NaCl . Po 8 urah smo kulturo precepili v 200 mL tekočega gojišča M9 s 5 g L^{-1} glukoze in inkubirali 24 ur na stresalniku (Vibromix 40, Tehtnica, Slovenija) pri 200 obratih na minuto pri 28 °C. Delali smo v treh ponovitvah.

Kulturo *Vibrio* sp. smo v viabilnem stanju ohranjali tako, da smo jo enkrat tedensko precepili na sveže trdno gojišče PKS s 3 % (w/V) NaCl . Inkubirali smo jo 24 ur pri 28 °C ter hranili pri temperaturi 4 °C.

3.3 EKSTRAKCIJA PIGMENTA

Po 24-urni inkubaciji smo kulturi izmerili optično gostoto pri valovni dolžini 650 nm (OD_{650}) na fotometru (Photometer MA9510, Iskra, Slovenija), nato smo 180 mL kulture centrifugirali 10 minut pri 10000 obratih na minuto in 4 °C v centrifugi (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija). Supernatant smo odlili in usedlino celic resuspendirali v enakem volumnu metanola. Sledila je ekstrakcija pigmenta, ki je potekala 2 uri pri 200 obratih na minuto na stresalniku (Vibromix 40, Tehtnica, Slovenija). Ostanke

celice smo po ekstrakciji odstranili s 15-minutnim centrifugiranjem pri 13000 obratih na minuto in temperaturi 4 °C (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija).

3.4 UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE PIGMENTA

3.4.1 Merjenje absorpcijskih spektrov

Pri vsaki meritvi smo na mikrotitrsko ploščo v treh ponovitvah nanесли po 300 µL ekstraktov pigmenta v metanolu ter izmerili absorpcijski spekter z optičnim čitalcem (Multiskan Spectrum, THERMO, Finska) v območju med 240 in 600 nm s korakom po 5 nm. Za ničlitev smo uporabili čisto topilo metanol. Pri spremljanju vpliva topila na stabilnost pigmenta smo absorpcijske spektre izmerili v območju med 380 in 600 nm s korakom po 5 nm. Za ničlitev smo uporabili čisto topilo aceton.

3.4.2 Integriranje spektrov

Dobljene absorpcijske spektre smo analizirali s programom OriginPro 7.5, tako da smo integrirali vsak spekter posebej. Tako smo dobili površino absorpcijskega spektra, ki je proporcionalna količini pigmenta (Starič in sod., 2010).

Koncentracijo pigmenta v metanolu smo določili s pomočjo umeritvene krivulje z enačbo

$$y = 0,22 \cdot x, \quad \dots (1)$$

kjer y predstavlja površino absorpcijskega spektra pigmenta med 240 in 600 nm in x koncentracijo pigmenta v mg L^{-1} .

Koncentracijo pigmenta v acetonu smo določili s pomočjo umeritvene krivulje z enačbo

$$y = 3,106 \cdot x, \quad \dots (2)$$

kjer y predstavlja površino absorpcijskega spektra pigmenta med 380 in 600 nm in x koncentracijo pigmenta v mg L^{-1} .

3.5 SPREMLJANJE VPLIVA RAZLIČNIH OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA STABILNOST PIGMENTA

3.5.1 Spremljanje vpliva temperature na stabilnost pigmenta

Ekstrakt pigmenta v metanolu smo alikvotirali po 1,2 mL v 20 stekleničke s tesnilom iz teflona (v nadaljevanju: stekleničke) in jih izpostavili različnim temperaturam (-20 °C, 4 °C, 28 °C, 60 °C in 105 °C). Absorpcijske spektre ekstraktov smo izmerili na začetku in v različnih točkah inkubacije.

Čas inkubacije in točke spektrofotometričnih meritve ekstraktov pigmenta smo določili glede na spremembo koncentracije pigmenta, ki smo jo sproti preračunali iz podatkov o absorpcijskih spektrih, kot je opisano pod točko 3.4.2. Ekstrakte pigmenta pri temperaturah -20 °C, 4 °C in 28 °C smo inkubirali 1708 ur in izvedli 13 meritev. Pri temperaturi 60 °C smo ekstrakt pigmenta inkubirali 238 ur in izvedli 8 meritev, pri 105 °C 48 ur in izvedli 11 meritev.

Ugotavljali smo tudi vpliv začetne koncentracije pigmenta na toplotno stabilnost pigmenta. Ekstrakt pigmenta smo predhodno redčili z metanolom, tako da smo dobili 2-, 4-, 10- in 100-kratno redčitev. Redčene ekstrakte pigmenta smo inkubirali 167 ur pri 60 °C ter izvedli 7 meritev za vsako redčitev oziroma začetno koncentracijo.

3.5.2 Spremljanje vpliva pH vrednosti na stabilnost pigmenta

Ekstrakt pigmenta v metanolu smo iz ene ekstrakcije razdelili na tri enake dele in vsem izmerili pH vrednost s pH metrom (WTW pH 720, inoLab, Nemčija), ki smo ga umerili z dvotočkovno kalibracijo. Enemu alikvotu ekstrakta pigmenta smo ohranili nespremenjeno pH vrednost, delu smo dodali kislino (HCl) in umerili pH vrednost na 2, tretjemu bazo (NaOH) in umerili pH vrednost na 10. Ekstrakt pigmenta smo inkubirali 1343 ur pri 28 °C, saj se je predhodno izkazalo, da je pigment pri tej temperaturi stabilen. Absorpcijske spektre smo izmerili na začetku in v različnih točkah inkubacije.

3.5.3 Spremljanje vpliva UV-svetlobe na stabilnost pigmenta

Stekleničke z ekstraktom pigmenta v metanolu smo pripravili na enak način kot pri spremljanju vpliva temperature na stabilnost pigmenta (glej točko 3.4.1.). Stekleničke z ekstraktom pigmenta smo izpostavili UV-sevanju pri 254 nm in 365 nm pod UV-lučjo (VL-6, Vilber Lourmat, Francija) pri 28 °C. Absorpcijske spektre smo izmerili na začetku ter po 5, 10, 15, 30, 60, 75, 90, 120, 150 in 180 minutah po izpostavitvi UV-svetlobi.

3.5.4 Spremljanje vpliva topila na stabilnost pigmenta

Ekstraktom pigmenta v metanolu smo odparili metanol z rotavaporjem (Büchi Rotavapor K-124, Vacobox B-177, Büchi corporation, ZDA). Posušeni ekstrakt smo nato raztopili v enakem volumnu acetona in ga alikvotirali v stekleničke na enak način kot pri predhodnih poskusih. Ekstrakt pigmenta smo inkubirali 317 ur pri 28 °C, saj se je predhodno izkazalo, da je pigment pri tej temperaturi stabilen. Absorpcijske spektre smo izmerili na začetku ter po 29, 53, 149 in 317 urah inkubacije.

3.6 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

3.6.1 Statistična analiza podatkov

Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk s tremi ponovitvami meritev absorpcijskega spektra. Za primerjavo smo jih normirali na enako začetno koncentracijo, tako da smo vse ponovitve paralelk delili s povprečjem začetne koncentracije. Dodani so tudi standardni odkloni.

3.6.2 Razdelitev absorpcijskih spektrov na UV in VIS del

Absorpcijske spektre smo pri spremljanju vpliva temperature na stabilnost pigmenta razbili na UV in VIS del pri 400 nm. UV in VIS dele absorpcijskega spektra smo ponovno integrirali s programom OriginPro 7.5 in izračunali koncentracijo pigmenta, tako kot je opisano pod točko 3.4.2.

3.6.3 Superponiranje krivulj absorpcijskih spektrov

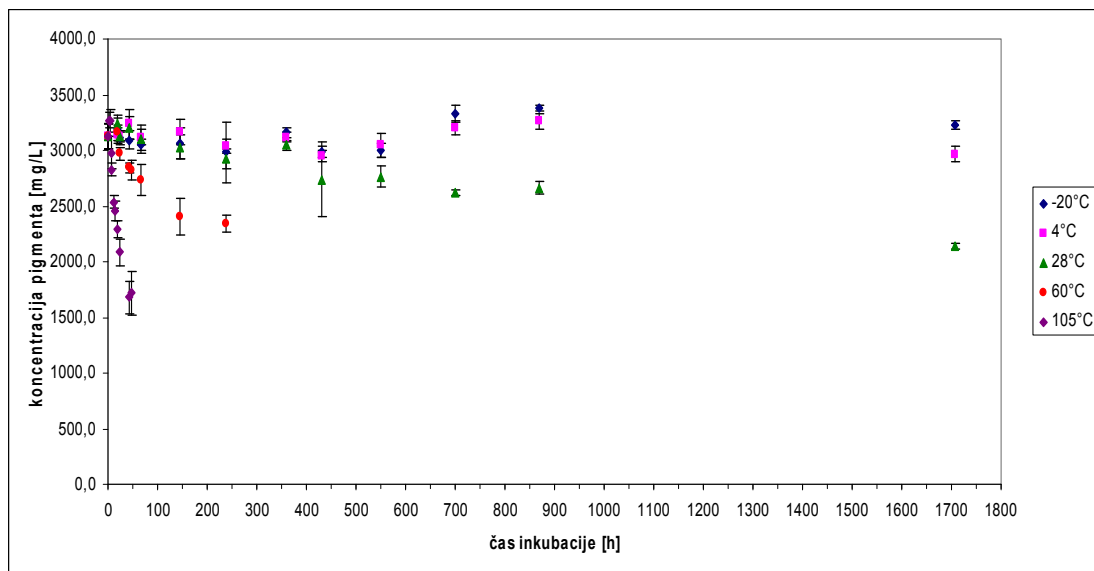
Absorpcijske spektre smo grafično prikazali v območju med 350 in 600 nm ter poenotili bazne linije posameznih spektrov na ničlo tako, da smo absorbanci posameznih spektrov odšteli absorbanco padajoče linije, ki poveže absorbanci začetne in končne valovne dolžine.

4 REZULTATI

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti, kako različni dejavniki okolja vplivajo na stabilnost pigmenta, ki ga proizvaja bakterija *Vibrio* sp. DSM 14379. V ta namen smo ekstrakt pigmenta izpostavili različnim temperaturam (-20 °C, 4 °C, 28 °C, 60 °C in 105 °C), UV-svetlobi (254 nm in 365 nm), različnim pH vrednostim (2, 7 in 10) ter organskima topiloma metanol in aceton. Stabilnost pigmenta smo spremljali z merjenjem absorpcijskih spektrov v območju med 240 in 600 nm oziroma med 380 in 600 nm pri ugotavljanju vpliva topila na stabilnost pigmenta.

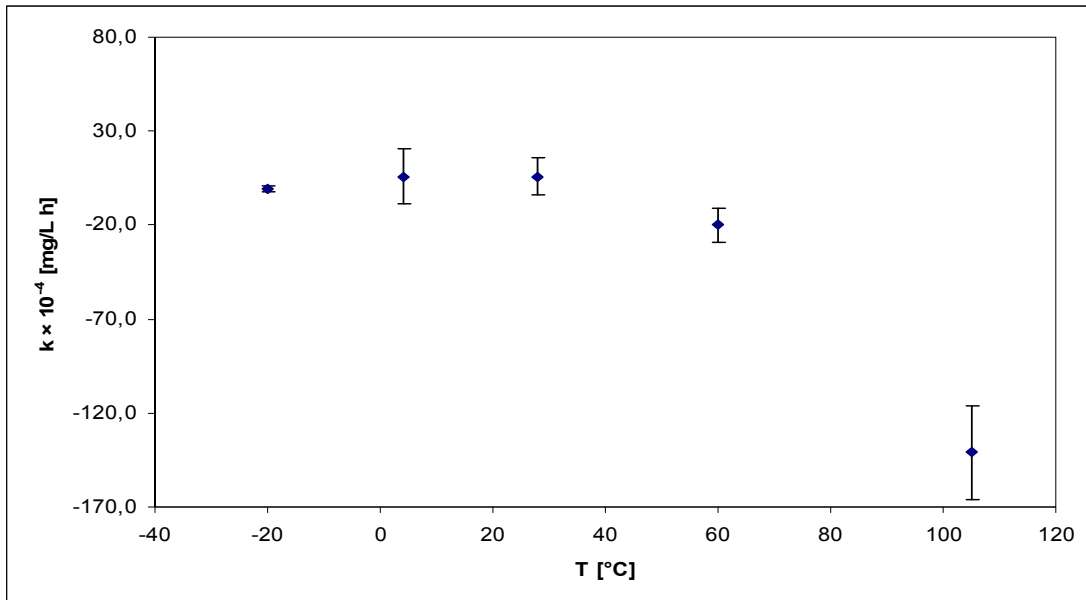
4.1 VPLIV TEMPERATURE NA STABILNOST PIGMENTA

Vpliv temperature na stabilnost pigmenta je prikazana na sliki 4. Kot je razvidno s slike (priloga A), je pri temperaturah -20 °C in 4 °C pigment stabilen. Pri temperaturi 28 °C se je koncentracija pigmenta po 1708 urah inkubacije zmanjšala za tretjino. Največji vpliv temperature na stabilnost pigmenta je viden pri temperaturah 60 °C in 105 °C. Pri inkubaciji na 60 °C se je namreč koncentracija pigmenta zmanjšala za tretjino po 238 urah. Pri 105 °C se je koncentracija pigmenta po 48 urah zmanjšala na polovico začetne koncentracije.



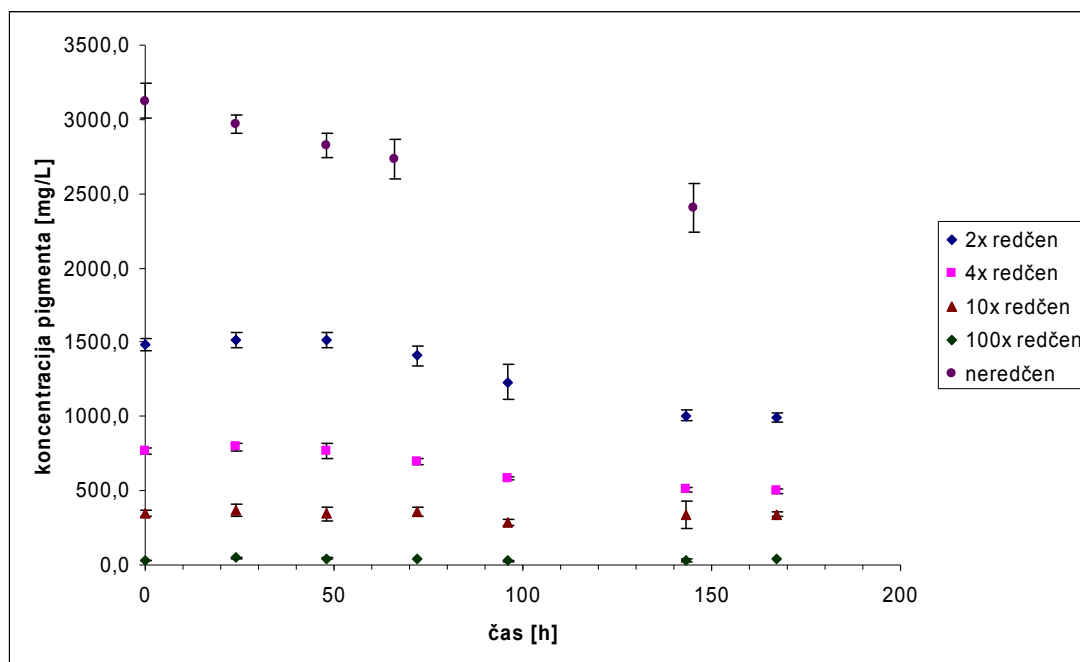
Slika 4: Vpliv temperature na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379. Ekstrakte pigmenta v metanolu smo inkubirali 48 ur pri 105 °C, 238 ur pri 60 °C ter 1708 ur pri temperaturah -20 °C, 4 °C in 28 °C. Absorbanco ekstrakta pigmenta smo izmerili v območju med 240 in 600 nm.

Koeficienti regresijskih krivulj, ki so izračunani na podlagi enačb eksponentnega upada koncentracij pigmenta po 48 urah inkubacije pri različnih temperaturah, so prikazani na sliki 5. Pri temperaturah -20 °C, 4 °C in 28 °C se koeficienti ne razlikujejo signifikantno. Z večanjem temperature nad 28 °C se hitrost razgradnje pigmenta poveča. Največja hitrost razgradnje pigmenta je pri temperaturi 105 °C.



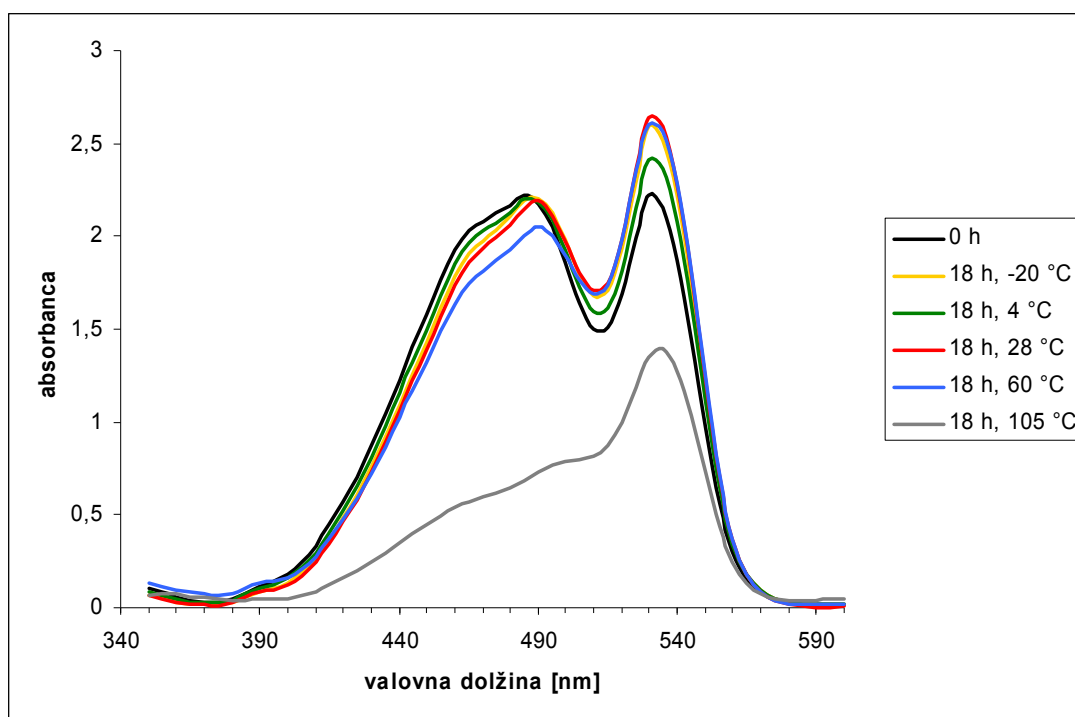
Slika 5: Koeficienti regresijskih krivulj ekstraktov pigmenta, pridobljenih iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379 in izpostavljeni različnim temperaturam. Koeficienti so izračunani na podlagi enačb eksponentnega upada v prvih 48 urah inkubacije pri temperaturah -20 °C, 4 °C, 28 °C, 60 °C in 105 °C.

Vpliv temperature na stabilnost različnih začetnih koncentracij ekstrakta pigmenta je prikazan na sliki 6. Kot je razvidno s slike (priloga A4) je pri večjih začetnih koncentracijah pigmenta vpliv temperature opažen prej kot pri nižjih koncentracijah. Z redčenjem koncentracije pigmenta se daljša čas, ko opazimo znaten upad koncentracije. Pri najbolj razredčenem vzorcu (100-krat redčenem) vpliva temperature na stabilnost pigmenta pri 60 °C v 167 urah inkubacije nismo zaznali.



Slika 6: Vpliv različnih začetnih koncentracij pigmenta na stabilnost ekstrakta pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379. Ekstrakte pigmenta v metanolu smo redčili 2-krat, 4-krat, 10-krat in 100-krat ter inkubirali 167 ur pri temperaturi 60 °C. Absorbanco ekstrakta pigmenta smo izmerili v območju med 240 in 600 nm.

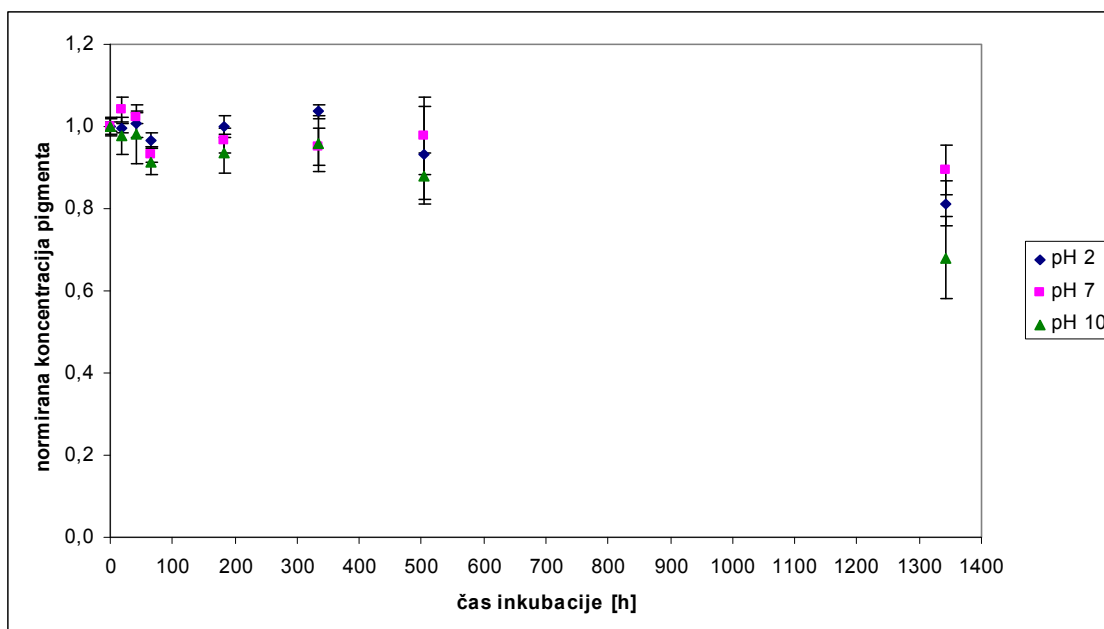
Spektri ekstrakta pigmenta po 18 urah inkubacije pri različnih temperaturah so prikazani na sliki 7. Poziciji spektroskopskih vrhov pri 485 in 535 nm se pri različnih temperaturah ne spreminjata, spreminja se le razmerje med njima. Oblika absorpcijskih spektrov ekstrakta pigmenta je pri vseh temperaturah zelo podobna, izstopa le spekter po 18 urah inkubacije pri 105 °C. Površina spektra je namreč za 2,3-krat manjša, kar je posledica nižje koncentracije pigmenta zaradi vpliva temperature. Poleg tega se je zmanjšalo razmerje med vrhovoma pri 535 in 485 nm. Glede na začetno stanje vrh pri 485 nm skorajda ni opazen, absorbanca tega vrha se je zmanjšala za 3,2-krat. Nasprotno se pri inkubaciji pri temperaturah -20 °C, 4 °C in 28 °C koncentracija pigmenta ni bistveno spremenila, zato tudi med absorpcijskimi spektri ni velike razlike. Majhno spremembo v lokaciji in intenziteti spektroskopskega vrha pri 485 nm opazimo pri 60 °C, ki je za 0,09 krat manjši kot na začetku.



Slika 7: VIS absorpcijski spektri ekstraktov pigmenta v metanolu, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379, na začetku in po 18 urah inkubacije pri temperaturah -20 °C, 4 °C, 28 °C, 60 °C in 105 °C. Absorpcijski spektri so prikazani v območju med 350 in 600 nm in so bili superponirani s poenotenjem bazne linije posameznih absorpcijskih spektrov na nič tako, da smo absorbanci posameznih spektrov odšteli absorbanco padajoče linije, ki poveže absorbanci začetne in končne valovne dolžine.

4.2 VPLIV pH VREDNOSTI NA STABILNOST PIGMENTA

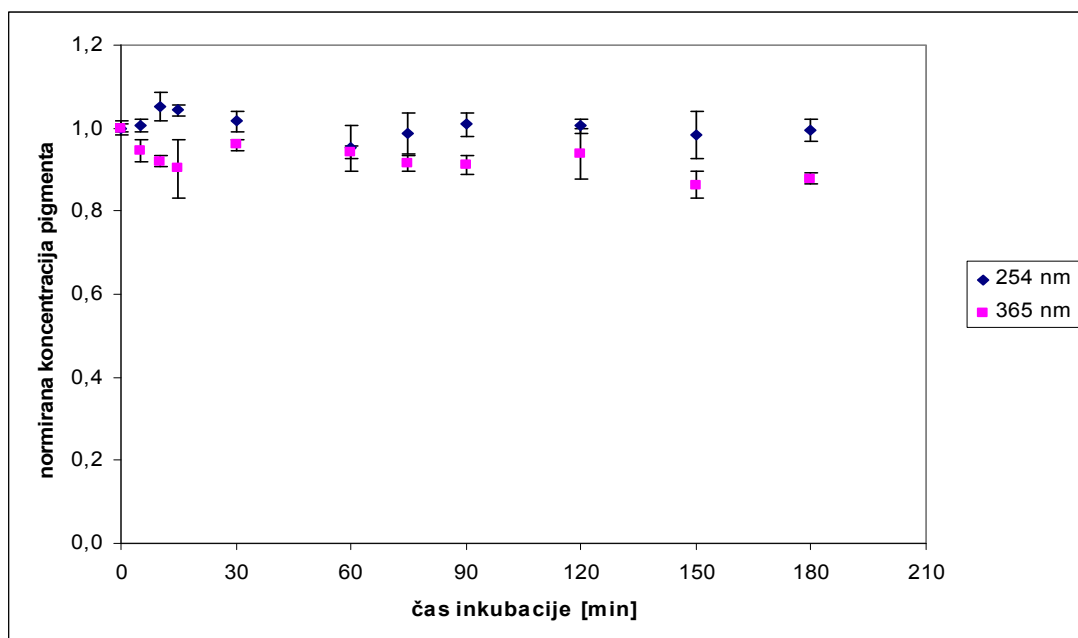
Vpliv pH vrednosti na stabilnost pigmenta je prikazana na sliki 8. Pigment je najbolj stabilen pri pH vrednosti 7, najmanj pri pH vrednosti 10 (priloga B). Koncentracija pigmenta je pri pH vrednosti 7 po 1343 urah inkubacije manjša za 11 %, pri pH vrednosti 10 se zmanjša za približno 32 % in pri pH vrednosti 2 za 19 % začetne koncentracije.



Slika 8: Vpliv pH vrednosti na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379. Ekstrakte pigmenta v metanolu smo inkubirali 1343 ur pri pH vrednosti 2, 7 oz. 10 pri temperaturi 28 °C. Koncentracije so normirane na enako začetno koncentracijo pigmenta. Absorbanco ekstrakta pigmenta smo izmerili v območju med 240 in 600 nm.

4.3 VPLIV UV-SVETLOBE NA STABILNOST PIGMENTA

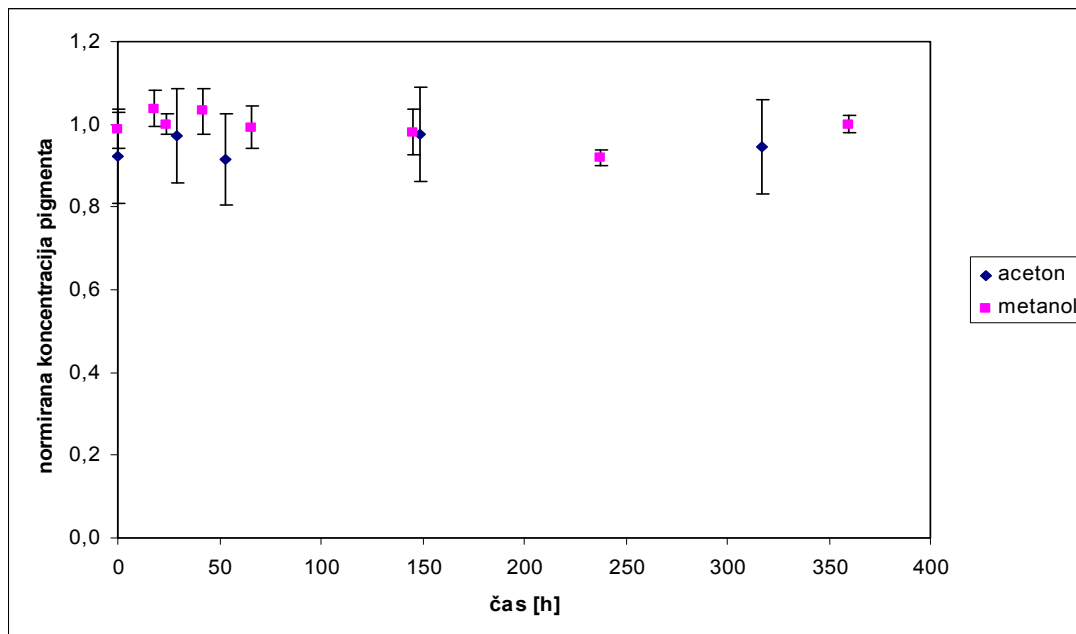
Pigment je po 180 min obsevanja z UV-svetlobo valovne dolžine 254 nm stabilen, saj se se koncentracija pigmenta po obsevanju ne spreminja signifikantno (slika 9). Po obsevanju z UV-svetlobo valovne dolžine 365 nm se koncentracija pigmenta po 30 min zmanjša za 16 % začetne koncentracije, nato se le-ta ne spreminja več znatno (priloga C).



Slika 9: Vpliv UV-svetlobe na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379. Ekstrakte pigmenta v metanolu smo za 180 min izpostavili UV-svetlobi valovne dolžine 254 oz. 365 nm pri temperaturi 28 °C. Koncentracije so normirane na enako začetno koncentracijo pigmenta. Absorbanco pigmenta smo izmerili v območju med 240 in 600 nm.

4.4 VPLIV TOPILA NA STABILNOST PIGMENTA

Stabilnost pigmenta v acetonu in metanolu je prikazana na sliki 10. Pigment je tako v acetonu kot v metanolu pri 28 °C stabilen v času inkubacije. Koncentracija pigmenta se ni v nobenem primeru signifikantno spremenila (priloga Č).



Slika 10: Vpliv topila na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379. Ekstraktom pigmenta v acetonu smo izmerili absorbanco v območju med 380 in 600 nm, ekstraktom pigmenta v metanolu v območju med 240 in 600 nm. Koncentracije so normirane na enako začetno koncentracijo pigmenta.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Cilj diplomskega dela je preučiti, kako različni dejavniki okolja vplivajo na stabilnost pigmenta, izoliranega iz bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379. V ta namen smo pigment izpostavili različnim temperaturam, UV-svetlobi, različnim pH vrednostim ter topiloma metanol in aceton. Stabilnost pigmenta smo spremljali spektrofotometrično.

5.1 VPLIV TEMPERATURE NA STABILNOST PIGMENTA

Temperatura je dejavnik, ki vpliva na stabilnost snovi. Podatki o stabilnosti snovi pri različnih temperaturah se lahko uporabljajo pri shranjevanju snovi, določanju roka trajanja ali postopkih, pri katerih se uporabljajo ekstremni pogoji in podobno. Iz rezultatov je razvidno, da je pigment stabilen pri nizkih temperaturah. Pri 28 °C je pigment delno stabilen. Po daljši inkubaciji ~ 70 dni se je njegova koncentracija zmanjšala za tretjino. Pri temperaturah 60 in 105 °C pigment ni bil stabilen. Inkubacijski čas je bil pri 60 in 105 °C znatno krajši, ker smo uporabili metanol kot topilo. Metanol je hlapljiv že pri sobni temperaturi, pri višjih temperaturah se je zaradi izhlapevanja v stekleničkah povečal tlak. To je povzročilo pokanje zamaškov, zaradi hlapov se je volumen ekstrakta pigmenta vidno zmanjšal, kar je vodilo v povečanje koncentracije, zato nadaljnjih meritev nismo izvedli.

Trend upada koncentracije ekstrakta pigmenta v vidnem delu spektra (priloga A2, priloga A3) je zelo podoben tistemu v celotnem absorpcijskem spektru (slika 4). Zato lahko trdimo, da se večina sprememb dogaja v vidnem delu spektra, medtem ko UV del spektra ne prispeva bistveno k spremembi rezultatov. Oblika absorpcijskih spektrov pri -20 °C, 4 °C, 28 °C in 60 °C je podobna kontroli, vrhovi pri 535 nm so višji kot na začetku inkubacije. Spekter pri 105 °C je različen od ostalih. Vrh pri 485 nm skorajda ni opazen, površina spektra je od začetnega manjša za 2,3-krat, kar pomeni, da se je že po 18 urah koncentracija pigmenta pri 105 °C opazno zmanjšala. Upad koncentracije pigmenta pri povišani temperaturi je bil odvisen od začetne koncentracije pigmenta. Zelo verjetno gre za eksponentni upad prvega reda, kar kaže, da je stabilnost pigmenta pogojena s številom trkov med molekulami pigmenta.

5.2 VPLIV pH VREDNOSTI NA STABILNOST PIGMENTA

Pokazali smo, da pH vrednost vpliva na stabilnost pigmenta (slika 7). V alkalnem okolju (pri pH vrednosti 10) je pigment najmanj stabilen, saj se koncentracija po 1343 urah

zmanjša za približno tretjino. V kislem okolju (pH vrednost je 2) je koncentracija pigmenta manjša za približno petino, medtem ko je pigment najbolj stabilen v nevtralnem pH (pH vrednost je 7), kjer se koncentracija pigmenta po 1343 urah inkubacije zmanjša za približno desetino. Alihosseini in sod. (2008) navajajo zmanjšanje koncentracije pigmenta, ki so ga izolirali iz bakterijskega seva *Vibrio* sp. KSJ45, za 15 % pri pH vrednosti 4,5 že po eni uri, vendar so pigment obenem segrevali na 80 °C. Prodigiozin kaže na večjo stabilnost pri ekstremnih vrednostih pH kot nekateri drugi pigmenti. Kislo okolje namreč negativno vpliva na stabilnost betalainov (Azeredo, 2009) in antocianinov, ki kažejo nizko stabilnost tudi v alkalnem okolju (Kirca in sod., 2007).

5.3 VPLIV UV NA STABILNOST PIGMENTA

Rezultati kažejo, da je pigment na UV-svetlobi valovne dolžine 254 nm stabilen. Po obsevanju z UV-svetlobo valovne dolžine 365 nm koncentracija pigmenta po 30 min zmanjša za šestino začetne koncentracije, nato se koncentracija ne spreminja več znatno. Verjetno bi se vpliv UV-svetlobe na stabilnost pigmenta pokazal šele po daljšem času obsevanja. Someya in sod. (2004) so izolirali prodigiozin iz bakterijskega seva *Serratia marcescens* B2 in ga izpostavili svetlobi iz vidnega dela spektra. Čas inkubacije je bil daljši. Na modri svetlobi (450 do 495 nm) se je po 36 urah razgradil skoraj ves prodigiozin, medtem ko je bil na rdeči svetlobi (620 do 750 nm) stabilen. Stabilnost ekstrakta pigmenta na UV-svetlobi je pričakovana, saj je bila nedavno ugotovljena njegova zaščitna vloga pred UV-stresom pri bakteriji *Vibrio* sp. (Borić in sod., 2011).

5.4 VPLIV TOPILA NA STABILNOST PIGMENTA

V različnih študijah uporabljajo različna organska topila za ekstrakcijo prodigiozina in njegovih analogov, med katerimi sta pogosta tudi aceton (D'Aoust in Gerber, 1974; Gerber in Stahly, 1975; Giri in sod, 2004; Alihosseini, 2008; Starič in sod., 2010) in metanol (Galaup in sod., 2005; Alihosseini in sod., 2008). Rezultati kažejo, da je pigment stabilen tako v acetonu kot v metanolu.

5.5 SKLEPI

Z našimi eksperimenti smo potrdili, da:

- je pigment stabilen v času 1700 ur pri temperaturah $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- se z višjo temperaturo stabilnost pigmenta manjša, pri $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ se koncentracija v času eksperimenta zmanjša za tretjino. Pigment ni stabilen pri temperaturah 60 in $105\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- se z manjšanjem začetne koncentracije pigmenta daljša čas, ko opazimo znaten upad koncentracije;
- pH vrednost vpliva na stabilnost pigmenta. Pri pH vrednosti 7 je pigment najbolj stabilen, pri pH vrednosti 2 manj in najmanj pri pH vrednosti 10 ;
- je pigment stabilen na UV-svetlobi valovne dolžine 254 nm , medtem ko se pri valovni dolžini 365 nm koncentracija počasi manjša;
- je pigment stabilen v organskih topilih, kot sta aceton in metanol.

6 POVZETEK

Pigmenti bakterij so že od nekdaj zelo opazni, saj dajejo kolonijam bakterij značilno barvo. Pigmenti bakterijam lahko predstavljajo različne prednosti v okolju, številni kažejo različne terapevtske učinke, zato je zanimanje za preučevanje pigmentov vse večje (Liu in Nizet, 2009). Eden izmed potencialno uporabnih pigmentov je tudi rdeč pigment prodigiozin, ki je bil prvič izoliran iz bakterije *Serratia marcescens* (Gerber, 1975). Prodigiozin je piril dipiril meten in spada med prodiginine (Bennett in Bentley, 2000). Je tipičen sekundaren metabolit, ki ga bakterije proizvajajo v poznih stopnjah rasti (Williamson in sod., 2005). Dejanska fiziološka vloga prodigiozina in njegovih analogov pri bakterijah še ni točno definirana (Venil in Lakshmanaperumalsamy, 2009). Znana je njihova imunosupresivna, protitumorska, protibakterijska in protiglivna aktivnost (Fürstner, 2003). Zanimanje za bakterijske pigmente se zaradi številnih prednosti pred sintetičnimi pigmenti povečuje tudi v tekstilni, živilski in kozmetični industriji (Venil in Lakshmanaperumalsamy, 2009).

V diplomskem delu smo preučili vpliv različnih dejavnikov okolja (temperatura, pH vrednost, UV, topilo) na stabilnost prodigiozina, izoliranega iz bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379. V ta namen smo ekstrakt pigmenta izpostavili različnim temperaturam, UV-svetlobi, različnim pH vrednostim ter organskima topiloma metanol in aceton. Preverjali smo tudi vpliv različnih začetnih koncentracij pigmenta na stabilnost ekstrakta pigmenta. Stabilnost pigmenta smo ugotavljali na podlagi sprememb koncentracije pigmenta z merjenjem absorpcijskih spektrov.

Ugotovili smo, da je pigment stabilen pri temperaturah $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in da se z višjo temperaturo stabilnost pigmenta manjša. Pri $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ se tako koncentracija v času eksperimenta zmanjša za tretjino. Pri temperaturah 60 in $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ pigment ni stabilen. Z manjšanjem začetne koncentracije pigmenta se daljša čas, ko opazimo znaten upad koncentracije. Rezultati kažejo, da pH vrednost vpliva na stabilnost pigmenta. Pri pH vrednosti 7 je pigment najbolj stabilen, pri pH vrednosti 2 manj in najmanj pri pH vrednosti 10. Pigment je na UV-svetlobi valovne dolžine 254 nm stabilen, medtem ko se pri valovni dolžini 365 nm koncentracija počasi manjša. Rezultati kažejo tudi, da je pigment stabilen v organskih topilih, kot sta aceton in metanol.

7 VIRI

- Alihosseini F., Ju K.S., Lango J., Hammock B.D., Sun G. 2008. Antibacterial colorants: characterization of prodiginines and their applications on textile materials. *Biotechnology Progress*, 24, 3: 742–747.
- Alihosseini F., Lango J., Ju K.S., Hammock B.D., Sun G. 2010. Mutation of bacterium *Vibrio gazogenes* for selective preparation of colorants. *Biotechnology Progress*, 26, 2: 352–360.
- Allen G.R., Reichelt J.L., Gray P.P. 1983. Influence of environmental factors and medium composition on *Vibrio gazogenes* growth and prodigiosin production. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 6: 1727–1732.
- Azeredo H.M.C. 2009. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 2365–2376.
- Barlett W.T., O'Donovan G.A., Neff R.D. 1970. Effect of gamma radiation on *Serratia marcescens*. Studies on the radiosensitivity of prodigiosin production. *Radiation Research Society*, 43, 1: 196–203.
- Bennett J.W., Bentley R., 2000. Seeing red: The story of prodigiosin. *Advances in Applied Microbiology*, 47: 1–32.
- Borić M., Danevčič T., Stopar D. 2011. Prodigiosin from *Vibrio* sp. DSM 14379; a new UV-protective pigment. *Microbial Ecology*, 62:528-536.
- Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. 2007. Isolation and partial characterization of pigment-like antibiotics produced by a new strain of *Streptosporangium* isolated from an Algerian soil. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1: 228–236.
- Castro A.J, Gale G.R., Means G.E., Tertzakian G. 1967. Antimicrobial properties of pyrrole derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 10, 1: 29–32.
- Cvetković D., Marković D. 2008. Stability of carotenoids toward UV-irradiation in hexane solution. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 73, 1: 15–17.
- Danevčič T. 2006. Vpliv slanosti na energetski metabolizem pri bakteriji *Vibrio* sp. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 94 str.
- Danevčič T., Rilfors L., Štrancar J., Lindblom G., Stopar D. 2005. Effects of lipid composition on the membrane activity and lipid phase behaviour of *Vibrio* sp. DSM14379 cells grown at various NaCl concentrations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1712: 1-8.

- D'Aoust J.Y., Gerber N.N. 1974. Isolation and purification of prodigiosin from *Vibrio psychroerythrus*. *Journal of Bacteriology*, 118, 2: 756–757.
- Fürstner A. 2003. Chemistry and biology of roseophilin and the prodigiosin alkaloids: A survey of the last 2500 years. *Angewandte Chemie International Edition*, 42: 3582–3603.
- Galaup P., Flamin C., Carlet E., Dufosse L. 2005. HPLC analysis of the pigments produced by the microflora isolated from the »Protected designation of origin« French red-smear soft cheeses Munster, Epoisses, Reblochon and Livarot. *Food Research International*, 38, 8-9: 855–860.
- Gerber N.N. 1975. Prodigiosin-like pigments. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 3: 469–485.
- Gerber N.N., Stahly D.P. 1975. Prodiginine (prodigiosin-like) pigments from *Streptovorticillium rubroreticuli*, an organism that causes ping staining of polyvinyl chloride. *Applied Microbiology*, 30, 5: 807–810.
- Giri A.V., Anandkumar N., Muthukumaram D., Pennathur G. 2004. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*, 4: 11, doi: 10.1186/1471-2180-4-11: 11 str.
- Gnezda-Meijer K., Mahne I., Poljšak-Prijatelj M., Stopar D. 2005. Host physiological status determines phage – like particle distribution in the lysate. *FEMS Microbiology Ecology*, 55, 1: 136–145.
- Gouveia L., Empis J. 2003. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4: 227–233.
- Grimont P.A.D., Grimont F. 1978. The genus *Serratia*. *Annual Review of Microbiology*, 32: 221–248.
- Haddix P.L., Jones S., Patel P., Burnham S., Knihhts K., Powell J.N., LaForm A. 2008. Kinetic analysis of growth rate, ATP, and pigmentation suggests an energy-spilling function for the pigment prodigiosin of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 190, 22: 7453–7463.
- Han S.B., Kim H.M., Kim Y.H., Lee C.W., Jang E.S., Son K.H., Kim S.U., Kim Y.K. 1998. T-cell specific immunosuppression by prodigiosin isolated from *Serratia marcescens*. *International Journal of Immunopharmacology*, 20: 1–13.
- Hubbard R., Rimington C. 1950. The biosynthesis of prodigiosin, the tripyrrylmethene pigment from *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*). *Biochemical Journal*, 46, 2: 220–225.

- Kalivoda E.J., Stella N.A., Aston M.A., Fender J.E., Thompson P.P., Kowalski R.P., Shanks R.M.Q. 2010. Cyclic AMP negatively regulates prodigiosin production by *Serratia marcescens*. *Research in Microbiology*, 161: 157–167.
- Kawauchi K., Shibutani K., Yagisawa H., Kamata H., Nakatsuji S., Anzai H., Yokoyama Y., Ikegami Y., Moriyama Y., Hirata H. 1997. A possible immunosuppressant, cycloprodigiosin hydrochloride, obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237: 543–547.
- Khanafari A., Assadi M.M., Fakhr F.A. 2006. Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens*. *Online Journal of Biological Sciences*, 6, 1, doi: 10.3844/ojbsci.2006.1.13: 1–13.
- Kim D., Kim J.F., Yim J.H., Kwon S.K., Lee C.H., Lee H.K. 2008. Red to red – the marine bacterium *Hahella chejuensis* and its product prodigiosin for mitigation of harmful algal blooms. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 10: 1621–1629.
- Kim D., Lee J.S., Park Y.K., Kim J.F., Jeong H., Oh T.K., Kim B.S., Lee C.H. 2007. Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium *Hahella chejuensis* KCTC 2396. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 937–944.
- Kırca A., Özkan M., Cemeroğlu B. 2006. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chemistry*, 97: 598–605.
- Kırca A., Özkan M., Cemeroğlu B. 2007. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry*, 101: 212–218.
- Lewis S.M., Corpe W.A. 1964. Prodigiosin-producing bacteria from marine sources. *Applied Microbiology*, 12, 1: 13–17.
- Li Y., Cao F., Zhao X., Wang J. 2009. The stability of C-phycoerythrin doped silica biomaterials in UV irradiation. *Journal of Wuhan University of Technology – Materials Science Edition*, 24, 6: 852–856.
- Liu G.Y., Nizet V. 2009. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiology*, 17, 9: 406–413.
- Montaner B., Navarro S., Pigué M., Vilaseca M., Martinell M., Giralt E., Gil J., Pérez-Tomás R. 2000. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *British Journal of Pharmacology*, 131: 585–593.
- Montaner B., Pérez-Tomás R. 2003. The prodigiosins: a new family of anticancer drugs. *Current Cancer Drug Targets*, 3: 57–65.

- Moss M. 2002. Bacterial pigments. *Microbiologist: The Magazine of the Society for Applied Microbiology*, 3: 10-12.
- Parisa S., Reza H., Elham G., Rashid J. 2007. Effect of heating, UV irradiation and pH on stability of the anthocianin copigment complex. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10, 2: 267–272.
- Rameshkumar N., Nair S. 2009. Isolation and molecular characterization of genetically diverse antagonistic, diazotrophic red-pigmented vibrios from different mangrove rhizospheres. *FEMS Microbiology Ecology*, 67, 3: 455–467.
- Rosenberg M., Blumberger Y., Bar-Ness R., Rubinstein E., Mazor Y. 1986. Cell surface hydrophobicity of pigmented and nonpigmented clinical *Serratia marcescens* strains. *Infection and Immunity*, 51, 3: 932–935.
- Schloss P.D., Allen H.K., Klimowicz A.K., Mlot C., Gross J.A., Savengsuksa S., McEllin J., Clardy J., Ruess R.W., Handelsman J. 2010. Psychrotrophic strain of *Janthinobacterium lividum* from a cold Alaskan soil produces prodigiosin. *DNA and Cell Biology*, 29, 9: 533–541.
- Seganish J.L., Davis J.T. 2005. Prodigiosin is a chloride carrier that can function as an anion exchanger. *Chemical Communications*, 46: 5781–5783.
- Someya N., Nakajima M., Hamamoto H., Yamaguchi I., Akutsu K. 2004. Effects of lights conditions on prodigiosin stability in the biocontrol bacterium *Serratia marcescens* strain B2. *Journal of General Plant Pathology*, 70, 6: 367–370.
- Song M.J., Bae J., Lee D.S., Kim C.H., Kim J.S., Kim S.W., Hong S.I. 2005. Purification and characterization of prodigiosin produced by intergrated bioreactor from *Serratia* sp. KH-95. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 2: 157–161.
- Starič N. 2007. Vpliv okoljskih faktorjev na produkcijo barvila naravega izolata *Vibrio* sp. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 37 str.
- Starič N., Danevčič T., Stopar D. 2010. *Vibrio* sp. DSM 14379 pigment production – a competitive advantage in the environment? *Microbial Ecology*, 60: 592–598.
- Syzdek L.D. 1985. Influence of *Serratia marcescens* pigmentation on cell concentrations in aerosols produced by bursting bubbles. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1:173–178.
- Štraser A. 2008. Opis lastnosti rdečega pigmenta iz naravnega izolata bakterije *Vibrio* sp. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 51 str.

- Torres Gama J.J., Sylos C.M. 2007. Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of brazilian Valencia orange juice. *Food Chemistry*, 100: 1686–1690.
- Venil C.K., Lakshmanaperumalsamy P. 2009. An insightful overview on microbial pigment, prodigiosin. *Electronic Journal of Biology*, 5, 3: 49–61.
- Wang X., Tao J., Wei D., Shen Y., Tong W. 2004. Development of an adsorption procedure for the direct separation and purification of prodigiosin from culture broth. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 40, 3: 277–280.
- Williamson N.R., Simonsen H.T., Ahmed R.A.A., Goldet G., Slater H., Woodley L., Leeper F.J., Salmond G.P.C. 2005. Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amylypyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Molecular Microbiology*, 56, 4: 971–989.
- Williamson N.R., Fineran P.C., Leeper F.J., Salmond G.P.C. 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nature Reviews Microbiology*, 56, 4: 887–899.
- Williams R.P., Green J.A., Rappoport D.A. 1956. Studies on pigmentation of *Serratia marcescens*. I. Spectral and paper chromatographic properties of prodigiosin. *Journal of Bacteriology*, 71, 1: 115–120.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju **prof. dr. Davidu Stoparju** za nasvete, usmerjanje, strokovne popravke ter vso prijaznost, razumevanje in dobro voljo.

Iskreno se zahvaljujem somentorici **dr. Tjaši Danevčič** za veliko pomoč pri eksperimentalnem delu diplomske naloge, usmerjanje in diskutiranje rezultatov, strokovne popravke, potrpežljivost in prijaznost.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim s katedre za Mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo, ki so mi kakorkoli pomagali in mi popestrili delo v laboratoriju.

Iskrena hvala tudi **prof. dr. Romani Marinšek Logar** za recenzijo moje diplomske naloge ter predsednici komisije za zagovor diplomske naloge **prof. dr. Ines Mandić Mulec** za posvečen trud in čas.

Nenazadnje se zahvaljujem vsem **profesoricam in profesorjem**, ki so me pospremili v svet mikroorganizmov in delili z mano svoje znanje ter izkušnje. Zahvaljujem se tudi **sošolkam in sošolcem** za vso pomoč v času študija, zanimive debate in druženja. Zaradi vas je študij minil prehitro. Še posebno bi se rada zahvalila **Anji in Martini**, ki sta mi vedno stali ob strani, me poslušali in krajšali prosti čas.

Lepo se zahvaljujem tudi **Katji Križnik Jeraj** za lektoriranje moje diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi:

Svoji **mami Jožici** za vse, kar si mi omogočila, za podporo, vse življenjske nasvete ter razumevanje. **Bratoma Mihi in Juretu** za vso pomoč, spodbude in navihanost, s katero me vedno nasmejeta.

Najlepša hvala **možu Boštjanu** za razumevanje, potrpežljivost, spodbude, najboljše kave in sprehode, ki so mi vedno zbistrili misli, ter prijateljstvo in ljubezen, ki mi jo daješ.

Hvala tudi **stari mami** za spodbujanje v času šolanja in **vsem prijateljem**, ki ne pozabite name.

Hvala vsem!

PRILOGE**Priloga A1:**

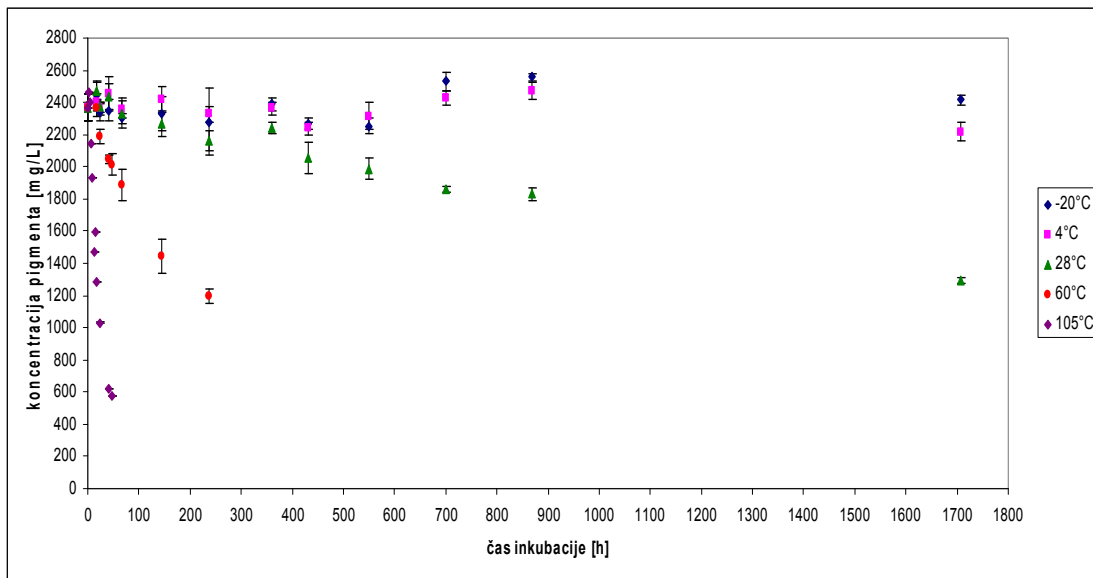
Vpliv temperature na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz koncentracij pigmenta, ki smo jih preračunali iz površine absorpcijskih spektrov treh neodvisnih paralelk ekstraktov pigmenta in treh ponovitev za vsako paralelko. Ekstrakte pigmenta v metanolu smo inkubirali 1708 ur pri temperaturah -20 °C, 4 °C, 28 °C, 60 °C in 105 °C, absorbanco smo izmerili v območju med 240 in 600 nm. Koncentracije pigmenta so v preglednici podane v mg/L.

čas [h]	-20 °C		4 °C		28 °C		60 °C		105 °C	
	konc. [mg/L]	st. odklon	konc. [mg/L]	st. odklon	konc. [mg/L]	st. odklon	konc. [mg/L]	st. odklon	konc. [mg/L]	st. odklon
0	3126,2	113,6	3126,2	113,6	3126,2	113,6	3126,2	113,6	3126,2	113,6
3									3271,2	67,8
4									3266,4	100,9
6									2978,8	147,7
8									2826,0	56,2
13									2537,4	57,4
15									2456,1	89,6
18	3188,0	101,7	3133,6	68,9	3241,2	80,5	3159,0	65,0	2290,6	72,6
24	3109,2	64,2	3124,4	53,1	3131,6	38,2	2970,8	59,9	2083,4	118,5
42	3091,9	84,6	3237,0	129,7	3203,2	106,1	2842,1	45,1	1678,7	146,8
48							2822,1	84,5	1719,5	198,0
66	3050,6	55,2	3119,7	68,3	3102,5	126,7	2734,7	133,7		
145	3067,7	139,2	3165,7	110,2	3028,5	108,4	2405,1	166,4		
238	2982,4	275,6	3042,6	63,9	2926,1	91,1	2346,1	74,3		
360	3158,4	47,7	3119,9	45,7	3047,0	47,9				
431	2986,5	46,7	2949,4	46,2	2739,9	339,9				
549	2998,1	66,1	3044,4	109,4	2763,8	90,7				
700	3326,5	76,9	3200,5	60,4	2619,1	28,5				
868	3380,2	28,6	3259,8	68,5	2662,9	57,5				
1708	3226,4	38,2	2967,5	73,2	2137,4	27,8				

Priloga A2:

Vpliv temperature na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379 v VIS delu absorpcijskega spektra. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz koncentracij pigmenta v mg/L, ki smo jih preračunali iz površine absorpcijskih spektrov treh neodvisnih paralelk ekstraktov pigmenta in treh ponovitev za vsako paralelko. Ekstrakte pigmenta v metanolu smo inkubirali različno dolgo pri temperaturah -20 °C, 4 °C, 28 °C, 60 °C in 105 °C, absorbanco smo izmerili v območju med 400 in 600 nm. Koncentracije pigmenta so v preglednici podane v mg/L.

čas [h]	-20 °C		4 °C		28 °C		60 °C		105 °C	
	konc. [mg/L]	st. odklon	konc. [mg/L]	st. odklon	konc. [mg/L]	st. odklon	konc. [mg/L]	st. odklon	konc. [mg/L]	st. odklon
0	2367,1	83,9	2367,1	83,9	2367,1	83,9	2367,1	83,9	2367,1	83,9
3									2463,0	59,3
4									2403,5	80,7
6									2140,9	126,2
8									1930,6	50,1
13									1467,6	65,3
15									1594,5	39,7
18	2447,9	74,9	2404,3	54,2	2473,9	62,0	2362,7	53,9	1286,5	23,6
24	2342,0	53,5	2362,0	42,3	2374,4	30,8	2188,6	45,5	1031,7	52,5
42	2348,8	66,1	2458,5	100,1	2434,0	83,3	2047,2	30,3	618,5	87,4
48							2015,4	64,8	579,0	87,2
66	2303,0	30,4	2358,0	49,9	2334,2	94,2	1888,0	96,2		
145	2329,6	107,3	2420,8	79,0	2266,9	79,1	1446,8	107,9		
238	2278,4	208,4	2326,1	48,3	2160,6	59,7	1194,8	42,7		
360	2389,7	37,7	2363,5	38,0	2243,4	35,5				
431	2265,3	35,2	2239,0	37,2	2059,2	97,0				
549	2254,2	50,6	2315,3	82,8	1987,7	67,2				
700	2531,5	59,9	2426,9	45,1	1859,1	18,3				
868	2559,9	21,8	2471,0	52,7	1830,8	40,0				
1708	2415,7	28,2	2218,1	59,0	1293,0	18,9				



Priloga A3: Koncentracija ekstraktov pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379, v VIS delu absorpcijskega spektra (400 – 600 nm). Ekstrate pigmenta v metanolu smo inkubirali različno dolgo pri temperaturah -20 °C, 4 °C, 28 °C, 60 °C in 105 °C.

Priloga A4:

Vpliv temperature na stabilnost različnih začetnih koncentracij ekstrakta pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz koncentracij pigmenta, ki smo jih preračunali iz površine absorpcijskih spektrov treh neodvisnih paralelk ekstraktov pigmenta in treh ponovitev za vsako paralelko. Ekstrakte pigmenta v metanolu smo redčili 2-krat, 4-krat, 10-krat in 100-krat ter inkubirali 167 ur pri temperaturi 60 °C, absorbanco smo izmerili v območju med 240 in 600 nm. Koncentracije pigmenta so v preglednici podane v mg/L.

čas [h]	2x REDČEN		4x REDČEN		10x REDČEN		100x REDČEN	
	konc. [mg/L]	st. odklon	konc. [mg/L]	st. odklon	konc. [mg/L]	st. odklon	konc. [mg/L]	st. odklon
0	1481,7	40,6	770,0	19,0	347,9	21,4	35,2	4,5
24	1514,1	46,8	793,1	28,8	369,4	40,3	46,6	4,0
48	1514,8	50,7	771,0	51,9	347,3	46,6	42,7	3,5
72	1410,5	66,6	696,6	21,6	357,7	28,9	37,8	6,2
96	1233,1	113,0	580,6	12,0	287,2	17,6	28,2	8,3
143	1005,2	35,5	508,2	18,4	336,3	90,2	30,3	5,4
167	991,1	27,3	497,6	17,6	342,7	16,2	37,4	1,5

Priloga B:

Vpliv pH vrednosti na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379. Povprečne vrednosti koncentracij pigmenta, povprečne vrednosti normiranih koncentracij pigmenta in standardni odkloni so izračunani iz koncentracij pigmenta, ki smo jih preračunali iz površine absorpcijskih spektrov treh neodvisnih paralelk ekstraktov pigmenta in treh ponovitev za vsako paralelko. Ekstrakte pigmenta v metanolu smo inkubirali 1343 ur pri pH vrednostih 2, 7 ter 10 pri temperaturi 28 °C, absorbanco smo izmerili v območju med 240 in 600 nm. Koncentracije pigmenta so v preglednici podane v mg/L.

čas [h]	pH VREDNOST 2				pH VREDNOST 7			
	konc. [mg/L]	st. odklon	norm. konc.	st. odklon	konc. [mg/L]	st. odklon	norm. konc.	st. odklon
0	2350,2	232,6	1	0	1965,8	447,7	1	0
18	2241,2	235,3	1	0	2038,2	412,5	1	0
42	2369,1	276,8	1	0	1727,4	204,1	1	0
66	2271,5	213,9	1	0	1537,5	173,9	0,9	0
184	2352,5	236,6	1	0	1630,3	171,2	1	0
335	2439,0	273,3	1	0	1603,2	142,3	1	0
503	2182,5	338,5	0,9	0,1	1940,2	576,8	1	0,1
1343	1910,0	229,7	0,8	0,1	1815,6	620,2	0,9	0,1

čas [h]	pH VREDNOST 10			
	konc. [mg/L]	st. odklon	norm. konc.	st. odklon
0	2119,8	408,2	1	0
18	2058,3	317,3	1	0
42	2058,7	293,3	1	0,1
66	1927,4	312,5	0,9	0
184	1966,9	295,1	0,9	0
335	2009,7	275,9	1	0,1
503	1841,9	252,0	0,9	0,1
1343	1415,4	193,0	0,7	0,1

Priloga C:

Vpliv UV-svetlobe na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379. Povprečne vrednosti koncentracij pigmenta, povprečne normirane vrednosti koncentracij pigmenta in standardni odkloni so izračunani iz koncentracij pigmenta, ki smo jih preračunali iz površine absorpcijskih spektrov treh neodvisnih paralelk ekstraktov pigmenta in treh ponovitev za vsako paralelko. Ekstrakte pigmenta v metanolu smo inkubirali 180 min pri UV-svetlobi valovne dolžine 254 in 365 nm ter temperaturi 28 °C, absorbanco smo izmerili v območju med 240 in 600 nm. Koncentracije pigmenta so v preglednici podane v mg/L.

čas [min]	254 nm				365 nm			
	konc. [mg/L]	st. odklon	norm. konc.	st. odklon	konc. [mg/L]	st. odklon	norm. konc.	st. odklon
0	2307,6	347,7	1	0	2396,1	380,1	1	0
5	2321,2	340,6	1	0	2274,7	393,2	0,9	0
10	2435,1	418,3	1,1	0	2037,1	302,6	0,9	0
15	2408,9	378,6	1	0	2015,8	445,7	0,9	0,1
30	2344,8	348,7	1	0	2125,3	326,7	1	0
60	2211,6	439,0	1	0,1	2257,7	348,0	0,9	0
75	2283,0	407,8	1	0	2026,5	330,9	0,9	0
90	2330,1	370,2	1	0	2023,6	350,6	0,9	0
120	2318,7	346,5	1	0	2248,7	378,8	0,9	0,1
150	2265,1	351,9	1	0,1	1904,4	229,4	0,9	0
180	2296,2	344,5	1	0	2105,2	327,9	0,9	0

Priloga Č:**Vpliv topila na stabilnost pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379.**

Povprečne vrednosti koncentracij pigmenta, povprečne vrednosti normiranih koncentracij pigmenta in standardni odkloni so izračunani iz koncentracij pigmenta, ki smo jih preračunali iz površine absorpcijskih spektrov treh neodvisnih paralelk ekstraktov pigmenta in treh ponovitev za vsako paralelko. Ekstrakte pigmenta v acetonu smo inkubirali 317 ur, ekstrakte pigmenta v metanolu 360 ur pri temperaturi 28 °C. Ekstraktom pigmenta v acetonu smo absorbanco izmerili v območju od 380 do 600 nm, ekstraktom pigmenta v metanolu v območju med 240 in 600 nm. Koncentracije pigmenta so v preglednici podane v mg/L.

čas [h]	TOPILO - ACETON				TOPILO - METANOL			
	konc. [mg/L]	st. odklon	norm. konc.	st. odklon	konc. [mg/L]	st. odklon	norm. konc.	st. odklon
0	123,5	16,5	0,9	0,1	3126,2	113,6	1	0
18					3241,2	80,5	1	0
24					3131,6	38,2	1	0
29	129,4	15,9	1	0,1				
42					3203,2	106,1	1	0,1
53	122,3	15,8	0,9	0,1				
66					3102,5	126,7	1	0,1
145					3028,5	108,4	1	0,1
149	129,5	14,9	1	0,1				
238					2926,1	91,1	0,9	0
317	124,2	14,8	0,9	0,1				
360					3047,0	47,9	1	0