

一株产灵菌红素粘质沙雷氏菌的筛选、鉴定及发酵条件

李子武, 张显, 徐美娟, 夏海锋, 饶志明*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用贫营养条件,从土壤样品中筛选到一株产红色素的菌株。经形态学、生理生化实验进行菌株初步鉴定,并经 16S rDNA 测序分析确定该菌株为粘质沙雷氏菌属,将其命名为:*Serratia marcescens* JNB5-1。该菌株所产红色素经全波长扫描及 LC-MS 确定为灵菌红素。对 *Serratia marcescens* JNB5-1 产灵菌红素做初步发酵研究,在蔗糖 2 g/dL,牛肉膏 1.5 g/dL,CaCl₂ 1 g/dL,脯氨酸 0.75 g/dL,MgSO₄·7H₂O 0.02 g/dL,FeSO₄·7H₂O 0.006 g/dL 的培养基中发酵 72 h 后,其发酵产量可达 4.139 g/L。

关键词: 粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*);灵菌红素;筛选鉴定;发酵条件

中图分类号:Q 939.97 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2012)10—1018—07

Screening and Identification a *Serratia marcescens* Strain Producing Red-Pigment and Preliminary Study of the Fermentation Conditions

LI Zi-wu, ZHANG Xian, XU Mei-juan, XIA Hai-feng, RAO Zhi-ming*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A strain producing red-pigment was newly isolated under poor nutrition conditions. It was identified by 16S rDNA sequence and systematic analysis, as well as general morphological and biochemical characteristics. The results show that 16S rDNA sequence of the strain suggesting that the strain is *Serratia marcescens* Species. And it was named *Serratia marcescens* JNB5-1. The red-pigment was identified as prodigiosin by wavelength scanning and LC-MS. preliminary fermentation conditions of strain *Serratia marcescens* JNB5-1 was studied. The results showed that the yield of prodigiosin was improved to 4.139 g/L after 72 h in the medium: sucrose 2%, beef extract 1.5%, CaCl₂ 1%, proline 0.75%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, FeSO₄·7H₂O 0.006%.

Keywords: *Serratia marcescens*, prodigiosin, screening and identification, fermentation conditions

粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 最早在 1823 年被定名,属于肠杆菌科,沙雷氏属的一个种,

为革兰氏阴性短杆菌,形态上一般比其它肠道菌小,无荚膜,偶尔呈长丝状^[1]。其中有的菌株可产生

收稿日期: 2011-10-14

基金项目: 国家 863 计划项目 (2007AA02Z207); 国家自然科学基金项目 (30970056); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (JUSRP31001); 教育部新世纪优秀人才计划项目 (NCET-10-0459)。

* 通信作者: 饶志明(1975—),男,江西临川人,农学博士,教授,博士研究生导师,主要从事工业微生物育种和发酵代谢方面的研究。

E-mail: raozm@yahoo.com.cn

粉红色或红色色素。该红色素总称为灵菌红素(prodigiosins)。

灵菌红素及其衍生物 UP (十一烷基灵菌红素)、MP(环化十一烷基灵菌红素)、prodigiosins25-C(灵菌红素 25-C)等,作为次级代谢产物主要由粘质沙雷氏菌 *S.serratia*、假单胞菌 *Pseudomonas*、放线菌属 *Streptomyces.sp* 的一些种和某些特殊的海洋细菌产生^[2]。PG 是一种脂溶性色素,难溶于水,易溶于甲醇、乙醇、乙醚、氯仿等有机溶剂。作为生物活性物质,PG 被证实具有抗菌、抗真菌、抗疟疾、抗原生动物的效用和免疫抑制机能^[3]。除此之外,PG 具有很强的细胞溶解酶活性,可以用于治理因浮游藻类引起的赤潮等环境污染。

近年来其又因被发现具有抗肿瘤活性而受到广泛的关注,其作用机理有研究报道是作用于 DNA 而抑制拓扑异构酶,从而引发细胞凋亡^[4-5],抗癌实验表明 PG 主要对肺癌、乳腺癌等具有一定的治疗作用^[6]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品 从江苏,山东,安徽,浙江,河南等地取得的土样 20 个。

1.1.2 主要试剂 苯丙氨酸(L-Phe),酪氨酸(L-Tyr),脯氨酸(L-Pro),甘氨酸(L-Gly), K_2HPO_4 ,蔗糖,乙醇,牛肉膏,蛋白胨(鱼粉),NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$,琼脂等。

1.1.3 培养基

1)富集培养基(组分 g/dL):苯丙氨酸(L-Phe) 2, $(NH_4)_2SO_4$ 1, K_2HPO_4 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.006, $CaCl_2$ 0.002;115 °C 灭菌 20 min。

2)选择培养基(组分 g/dL):酪氨酸(L-Tyr) 0.5, $(NH_4)_2SO_4$ 1, K_2HPO_4 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.006, $CaCl_2$ 0.002,琼脂 2;115 °C 灭菌 20 min。

3)LB 培养基(组分 g/dL):酵母膏 0.5,蛋白胨 1,NaCl 1,琼脂 2;115 °C 灭菌 20 min。

4)初始发酵培养基(组分 g/dL):鱼粉 1.5,NaCl 0.3,KCl 0.2;pH 6.0,115 °C 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 分离筛选 采用平板划线分离方法进行分离筛选。制备土样悬液,取 5 mL 样品到富集培养基

中,30 °C、160 r/min 培养 3 d,将培养物作适当梯度稀释,选取 10^{-4} 、 10^{-5} 两个稀释度涂布固体选择培养基,30 °C 静置培养 2~3 d,观察菌落颜色和形态。挑取红颜色的菌落划线分离,获得纯培养。

1.2.2 生理生化鉴定

1)形态观察:LB 斜面活化菌种,转接 LB 固体培养基,30 °C 培养 48 h,观察菌落生长状况及形态;电镜观察细胞形态。

2)生理生化实验:取 30 °C、20 h 培养的纯培养物进行相关生理生化实验。参照《伯杰细菌鉴定手册》^[7]进行鉴定。

1.2.3 16S rDNA 鉴定

1)16S rDNA 测序:提取菌株的全基因组 DNA,经琼脂糖核酸电泳验证后作为模板,使用细菌 16S rDNA 通用引物 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')及 1492R(5'-ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3')进行 PCR,产物经电泳验证后,用 1 g/dL 的厚胶回收,回收 PCR 产物连接 pMD-18T 载体,16 °C 连接过夜,连接产物转化 *E.coli* JM109 后,涂布于氨苄抗生素抗性平板,培养过夜随机挑选转化子,转化子经 LB 液体培养 10~12 h 后提取质粒、酶切验证并测序。

2)系统发育树:目的菌株的 16S rDNA 测序结果经 GeneBank 比对,使用 ClustalX-2 和 MEGA4 软件进行进化分析,绘制系统发育树。

1.3 红色素的提取鉴定和发酵研究

1.3.1 提取鉴定方法 取 5 mL 发酵液经 5 mL 酸性乙醇(pH3.0)溶沉,3 000 r/min 离心 10 min,获取上清液,再用 20 mL 氯仿萃取,吸取下层氯仿层,在酸性条件下进行全波长扫描和 LC-MS 鉴定。质谱鉴定使用 Mircomass Q-TOF micro 质谱仪,波长范围选取 200~800 nm 之间。实验条件:甲醇(色谱级)、离子化方式 ESI(+),Capillary 3 000 V、Sample Cone 35 V、Extraction Cone 35 V、Source Temp 80 °C、Desolvation Gas 200 L/h、Pump Flow 10 μ L/min^[8-9]。

1.3.2 发酵条件的研究

1)培养方法:挑取一环新鲜的斜面培养物,接入 10 mL 的 LB 液体培养基培养过夜,按体积分数 10%的接种量转接 50 mL 的 LB 液体培养基作为二级种子,二级种子培养到对数期按体积分数 4%转接到 50 mL 的发酵培养基中,160 r/min 30 °C 培养 72 h^[10]。

2)PG 标准曲线的测定:准确称取 PG 样品 10.0 mg,用酸性乙醇(pH 3.0)溶解,然后用酸性乙醇定溶于 100 mL 容量瓶,避光保存。测定不同浓度梯度标准样品的 OD₅₃₅ 值,绘制标准曲线。取发酵液溶解到酸性乙醇(pH 3.0)中,做适度的稀释(50~250倍),稀释样品密封放置 8 h(充分溶解 PG),3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,测定 OD₅₃₅。空白对照为 pH 3.0 的酸性乙醇。

2 结果与讨论

2.1 筛选结果

经过选择培养基筛选分离,最终获得产红色素的目的菌株 4 株,见表 1。

表 1 目的菌株的生理特征

Tab.1 Physiological characteristic of aim strain

菌株编号	菌落形态、颜色特征
B1-1	圆形突起、湿润;粉红色
B4-1	圆形、湿润;紫红色
B5-1	圆形突起、湿润粘稠;深红色、有特殊绿色荧光
B8-1	圆形、湿润、粘稠;粉紫色

经初步发酵测试,菌株 B5-1 红色素产量明显高于其它 3 株,确定该菌株为研究菌株。该菌株菌落生长较快,在固体选择平板上,最初可观察到微小的红色斑点状菌落,后期菌落增大颜色加深,有的带有绿色荧光;在 LB 固体平板上,菌落较大颜色深红,呈现湿润、凸起、圆整的状态,见图 1。

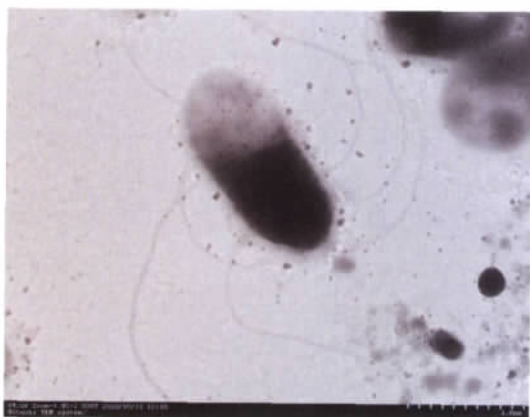


图 1 菌株 B5-1 细胞电镜观察图

Fig.1 Electron micrographs of the strain B5-1

2.2 生理生化实验

目的菌株 B5-1 生理生化实验结果见表 2。

表 2 目的菌株 B5-1 生理生化实验结果

Tab.2 Physiological and biochemical characters of the strain B5-1

项目	标准反应	B5-1 结果	项目	标准反应	B5-1 结果
接触酶	+	+	丙二酸钠	-	-
氧化酶	-	-	精氨酸	-	-
β -半乳糖苷酶	+	+	赖氨酸	+	+
脂肪酶	+	+	鸟氨酸	+	+
DNA 酶	+	+	苯丙氨酸	-	-
葡萄糖	+	+	谷氨酸	()	-
蔗糖	+	+	酪氨酸	-	+
乳糖	-	-	尿素水解	-	-
麦芽糖	+	+	明胶水解	+	+
肌醇	d	-	产 H ₂ S 与否	-	-
甘露醇	+	+	吲哚	-	-
山梨醇	+	+	M.R.试验	-	-
柠檬酸钠	+	+	V.P.试验	D	+
醋酸钠	+	+	硝酸盐还原	+	+
葡萄糖酸钠	+	+	特异的非扩散色素	D	+

“+”90%以上菌株阳性;“()”反应延迟;“-”90%以上菌株阴性;“D”不同分类单位中的反应不同;“d”11%~89%的菌株阳性

2.3 16S rDNA 鉴定

16S rDNA 测序结果经重新拼接并在 Genebank 中比对,发现菌株 B5-1 与 *Serratia marcescens* strain J2P3 相似度达 99%,并绘制系统发育树,确定该菌株为粘质沙雷氏菌,并命名为;*Serratia marcescens* JNB5-1,序列上传号:HQ260324,见图 2。

2.4 红色素鉴定

发酵 72 h 后,取 5 mL 发酵液按 1:1 比例加入到酸性乙醇中溶解,离心取上清液,再加入两倍体积的氯仿萃取,静置并获取下层清液,调节 pH 约 3.0 后测定。

2.4.1 波长扫描图谱 样品在 200~800 nm 的波长范围内具有特异性吸收峰,峰值在 535.2 nm 处,与文献^[1]报道中酸性条件下的检测波长 535 nm 一致,见图 3。

2.4.2 LC-MS 鉴定 经 TOF-MS 分析鉴定,该样品中主要物质离子化后的相对分子质量 $[M+H]^+$ 为 324.2;其次还存在一种杂质,相对分子质量 $[M+H]^+$ 为 761.4。证实该样品经萃取后在 536 nm 检测波长

下基本为单一物质,而且该物质相对分子质量($M=[M+H]^+-1=323.2$)与灵菌红素(PG) $C_{20}H_{25}N_3O$ 的相对

分子质量($M=323$)一致,最终确定样品中红色素为灵菌红素(PG),见图4。

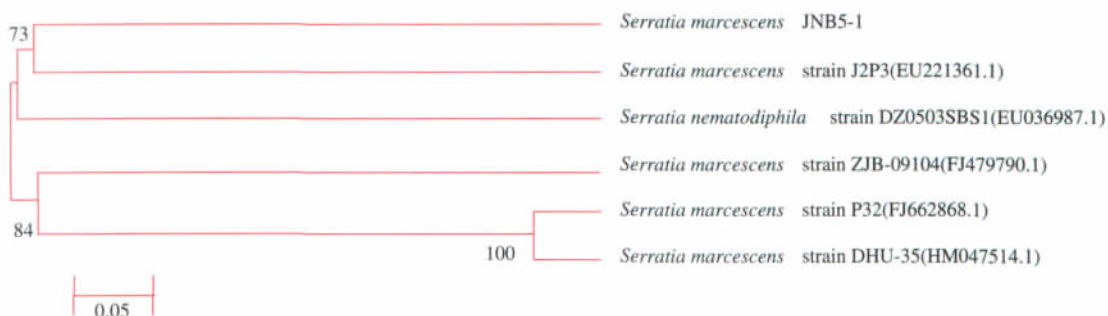


图2 B5-1菌株的16S rDNA基因的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree derived from 16S rDNA gene sequence of strain B5-1

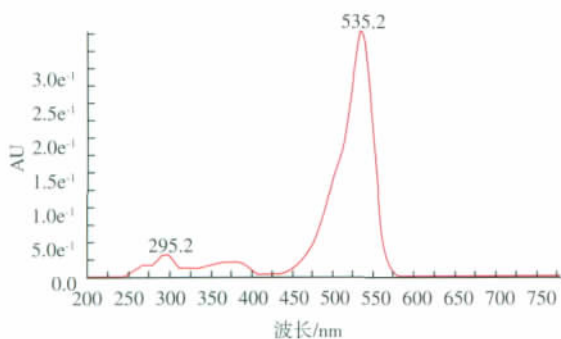


图3 红色素样品波长扫描图

Fig.3 Wavelength scanning of pigment sample

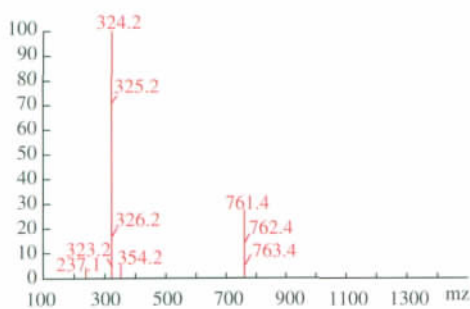


图4 红色素样品的TOF-MS图

Fig.4 TOF-MS of pigment sample

2.5 初步发酵研究

2.5.1 种子生长曲线 按照方法中描述的种子培养条件进行种子培养,每隔1 h取样测定OD₆₀₀并绘制生长曲线,见图5。*Serratia marcescens* JNB5-1在8~12 h达到对数生长期,选择11 h为接种时间。

2.5.2 发酵条件初步研究及优化结果 PG作为次级代谢产物,是经由两个分支途径最终合成的,国外在早期对其发酵特征已有较深入的研究^[12],但是对于不同的菌株,其发酵特征有很大的不同。经初

步研究发现 *Serratia marcescens* JNB5-1 发酵产PG的条件与报道[13]基本相似。作者考察了在初始发酵培养基中选择不同的碳源、氮源、无机盐、pH值和氨基酸对产生PG的影响,并在此基础上对发酵培养基作初步优化。

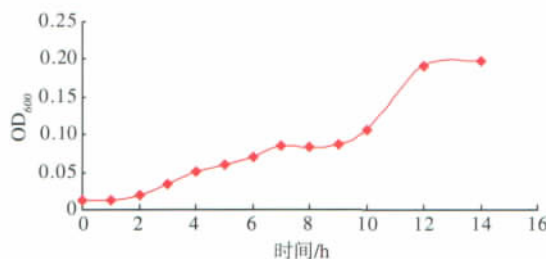


图5 B5-1生长曲线

Fig.5 Growth curve of B5-1 strain

Serratia marcescens JNB5-1 可以利用多种碳源,在初始发酵培养基中分别加入2 g/dL的葡萄糖、蔗糖、乳糖、乙醇和甘油考察不同碳源对该菌株产PG的影响,结果见图6。葡萄糖和乳糖对PG产量的提高不利,有关研究发现,葡萄糖会对PG的生成产生一定阻遏,葡萄糖不适于作为该菌的碳源来发酵产PG。甘油、蔗糖和乙醇对目的菌株*Serratia marcescens* JNB5-1产PG影响最大,相比之下蔗糖和乙醇,可作为下一步优化的因素之一。

考察了几种有机氮源和无机氮源对PG产量的影响,在基础培养中选择牛肉膏、玉米浆、尿素、硫酸铵来替代蛋白胨。发酵结果见图7。显示牛肉膏对PG产量的贡献明显好于其他氮源。氮源对于PG具有重要的作用,牛肉膏中丰富的氨基酸等物质除了提供菌体生长必要的营养外,也为PG的合成提供了必需的骨架结构,在其后期合成中可能起到了至

关重要的作用。

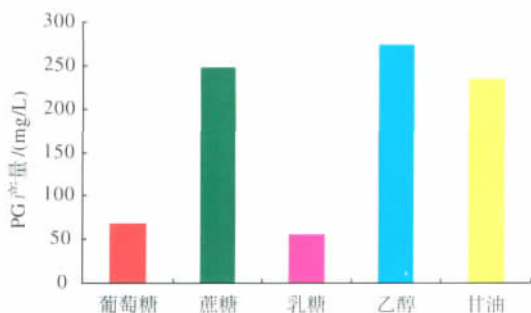


图 6 2 g/dL 碳源发酵结果

Fig.6 Fermentation result of 2% carbon source

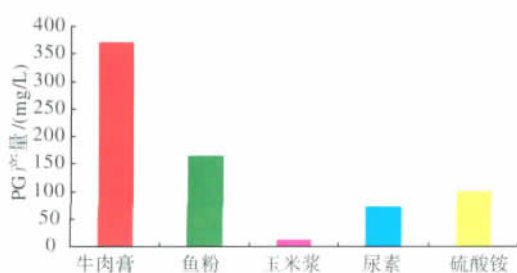


图 7 2 g/dL 氮源发酵结果

Fig.7 Fermentation result of 2% nitrogen source

有报道柠檬酸盐和醋酸盐对 PG 的生成有重要的影响,钾离子可以促进细胞生长,钠离子对维持细胞的渗透压有重要作用,因此作者对以上几个因素进行考察。从无机盐单因素发酵结果(图 8)中可以看出, CaCl_2 可以明显地提高 PG 的产量,其具体机理还未阐明,可能原因是钙离子对产物的释放有促进作用,PG 色素产生后会附着在细胞壁上,加入钙离子可在一定程度上改变细胞壁的通透性,使其释放到发酵液中,减少细胞自身的负担从而有利于色素的生成。其它无机盐因素对该菌株发酵产 PG 影响不大。

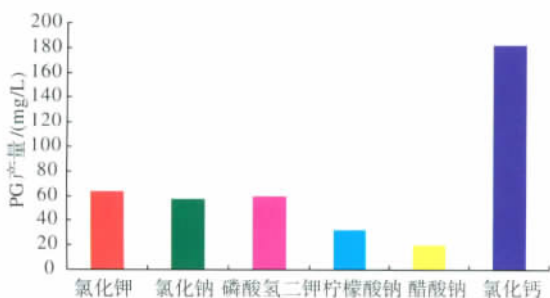


图 8 添加不同无机盐发酵结果

Fig.8 Fermentation result of adding mineral salts

在有关 PG 合成途径的研究中发现,脯氨酸是

合成 PG 二氢途径中的一个重要前体^[14],有研究添加不同的氨基酸来考察对 PG 产量的影响。*Serratia marcescens* JNB5-1 在最初的筛选平板上是受酪氨酸影响的,发酵研究中以酪氨酸为对照,然后在初始发酵培养基中添加不同的氨基酸,发酵结果见图 9。表明脯氨酸和甘氨酸对 PG 产量的影响较大,可以作为进一步优化的因素。

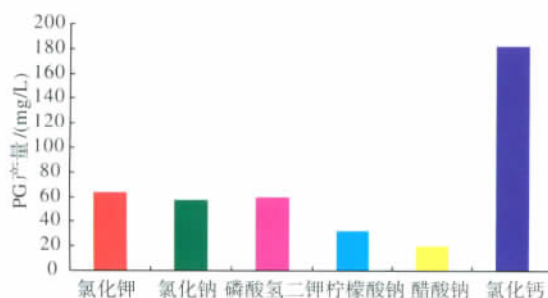


图 8 添加不同无机盐发酵结果

Fig.8 Fermentation result of adding mineral salts

通过四因素三水平正交实验,对发酵培养基的优化结果见表 3、4。最优培养基确定为:蔗糖 2 g/dL、牛肉膏 1.5 g/dL、氯化钙 1 g/dL、脯氨酸 0.75 g/dL、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/dL、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.006 g/dL。菌株 5-1 在该优化培养基中,30 ℃、160 r/min 的摇床条件下培养 72 h 后,其发酵产量可达 4.139 g/L,比初始发酵培养基 0.088 g/L 的产量有了明显的提高。正交优化实验对产量的提高有很大的效用,为进一步的培养基优化以及发酵条件优化提供了一个可行的思路。

表 3 正交优化实验因素水平表

Tab.3 Factors and level of orthogonal experiment

因素	水平		
	(1)	(2)	(3)
A 蔗糖/(g/dL)	1	1.5	2
B 牛肉膏/(g/dL)	1	1.5	2
C 氯化钙/(g/dL)	0.5	1	1.5
D 脯氨酸/(g/dL)	0.25	0.5	0.75

3 结 语

作者筛选到的 *Serratia marcescens* JNB5-1 具有良好的 PG 生产能力,进行单因素发酵研究后发现,脯氨酸和 CaCl_2 对 PG 的形成具有很好的促进作用。本研究预先设计的低温筛选方法具有一定的选

表 4 正交优化实验结果表
Tab.4 Result of orthogonal experiment

试验号	因素				
	A 蔗糖	B 牛肉膏	C 氯化钙	D 脯氨酸	OD ₅₃₅ 均值 *
1	(1)	(1)	(1)	(1)	0.499
2	(1)	(2)	(2)	(2)	1.950
3	(1)	(3)	(3)	(3)	0.389
4	(2)	(1)	(2)	(3)	2.125
5	(2)	(2)	(3)	(1)	1.882
6	(2)	(3)	(1)	(2)	0.364
7	(3)	(1)	(3)	(2)	1.575
8	(3)	(2)	(1)	(3)	2.765
9	(3)	(3)	(2)	(1)	0.365
K ₁	0.914	1.383	1.193	0.899	
K ₂	1.457	2.184	1.465	1.281	
K ₃	1.568	0.373	1.282	1.706	
极差	0.654	1.811	0.272	0.861	
最优培养基	B ₂ D ₃ A ₃ C ₂				

择则性和目的性,通过对目的菌株的发酵研究,其产量有明显地提高,证明该筛选方案具有切实的可行性,为今后筛选高产灵菌红素的粘质沙雷氏菌提供了一种很好的参考方法。

PG 作为一种很有潜力的抗癌药物和免疫抑制剂,它具有可观的市场前景。PG 应用仍正处于研究阶段,除了常见的生物活性外,近年来研究热点集中在其良好的抗癌性能上;同时选育 PG 高产菌株和对 PG 进行发酵研究也具有重要的意义。但 PG 的工业化生产还未实现,原因之一就是 PG 的产量现阶段除了个别菌株外普遍不高。薛建、刘青等^[11]以黄豆饼发酵产色素达到 2.646 g/L,为国内较高水平;Cang S 等^[15]分离到一株粘质沙雷氏菌 S389,以

乙醇为碳源最终 PG 产量可达 2.95 g/L;发酵研究中 Giri A 等^[16]以花生粉为底物,获得粘质沙雷菌产 PG 的最高产量 38.75 g/L;2010 年 Helvia W 等人^[17]利用木薯废液甘露醇发酵产 PG 达到 49.5 g/L 的新高,但是也未见产业化报道。另外 Steven A. dauenhauer 等人^[18]在大肠杆菌中实现了 PG 基因的表达,近年来研究多集中于粘质沙雷氏菌调控 PG 表达的 pig 基因簇以及个别关键基因的研究^[19-20]。

因此,对培养基、发酵条件进行更深入的优化,以期实现 PG 产量提高的同时,本课题组将采用诱变、分子改造等手段过对该菌株进行改良以进一步提高 PG 的产量,相关研究正在进行中。

参考文献:

- [1] A Hejazi, F R Falkiner. *Serratia marcescens*[J]. **J Med Microbiol**, 1997, 46 (11): 903-912.
- [2] Kwon S K, Park Y K, Kim J F. Genome-wide screening and identification of factors affecting the biosynthesis of prodigiosin by *Hahella chejuensis*, using *Escherichia coli* as a surrogate host[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2010, 76 (5): 1661-1668.
- [3] Sang B H, Mook H K, Hee Y K, et al. T-cell specific immunosuppression by prodigiosin isolated from *Serratia marcescens*[J]. **International Journal of Immunopharmacology**, 1998, 20 (1-3): 1-13.
- [4] Ricardo P T, Beatriz M, Esther L, et al. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties [J]. **Biochemical**

- Pharmacology**, 2003, 66(8): 1447–1452.
- [5] Beatriz M, Wilmar C A, Marc M, et al. DNA interaction and dual topoisomerase I and II inhibition properties of the anti-tumor drug prodigiosin[J]. **Toxicological Sciences**, 2005, 85(2): 870–879.
- [6] Ho T F, Peng Y T, Chuang S M, et al. Prodigiosin down regulates survivin to facilitate paclitaxel sensitization in human breast carcinoma cell lines[J]. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2009, 235 (2): 253–260.
- [7] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 452–454.
- [8] Daoust J Y, Gerber N N. Isolation and purification of prodigiosin from *Vibrio psychroerythrus* [J]. **Journal of Bacteriology**, 1974, 118(2): 756–757.
- [9] Chen A, Rannulu N S, Cai Y, et al. Unusual odd electron fragments from even electron protonated prodiginine precursors using positive-ion electrospray tandem mass spectrometry[J]. **J Am Soc Mass Spectrom**, 2008, 19(12): 1856–1866.
- [10] 曾化伟, 蔡宇杰, 廖祥儒等. 菌株 *Serratia marcescens* SYBC08 产过氧化氢酶液态发酵工艺的优化及酶性质研究[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(3): 410–416.
- ZENG Hua-wei, CAI Yu-jie, LIAO Xiang-ru, et al. Optimization of fermentation conditions for catalase by *Serratia marcescens* SYBC08 and characterization of its crude enzyme[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(3): 410–416. (in Chinese)
- [11] 薛建, 刘青, 杨启银. 粘质沙雷氏菌发酵产红色素培养基及其结构研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(12): 5375–5378.
- XUE Jian, LIU Qing, YANG Qi-yin. Study on medium for *Serratia marcescens* fermenting and producing red pigment and the structure of red pigment[J]. **Journal of Anhui Agri Sci**, 2009, 37(12): 5375–5378. (in Chinese)
- [12] Williams R P. Biosynthesis of prodigiosin, a secondary metabolite of *Serratia marcescens* [J]. **Applied Microbiology**, 1973, 25(3): 396–402.
- [13] Williams R P, Gott C L, Hussain S M, et al. Influence of temperature of incubation and type of growth medium on pigmentation in *Serratia marcescens* [J]. **Journal of Bacteriology**, 1971, 106(2): 438–443.
- [14] Williams R P, Gott C L, Hussain S M. Induction of pigmentation in nonproliferating cells of *Serratia marcescens* by addition of single amino acids[J]. **Journal of Bacteriology**, 1971, 106(2): 444–448.
- [15] Cang S, Sanada M, Johdo O, et al. High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* grown on ethanol[J]. **Biotechnology Letters**, 2000, 22(22): 1761–1765.
- [16] Giri AV, Anandkumar N, Muthukumaran G, et al. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soils[J]. **BMC Microbiol**, 2004, 4(2): 1–10.
- [17] Helvia W, Casullo de Araújo, Fukushima K, et al. Prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using renewable resources as a low cost substrate[J]. **Molecules**, 2010, 15(10): 6931–6940.
- [18] Dauenhauer S A, Hull R A, Williams R P. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Serratia marcescens* genes encoding prodigiosin biosynthesis[J]. **Journal of Bacteriology**, 1984, 158(3): 1128–1132.
- [19] Harris A K P, Williamson N R, Slater H, et al. The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species and strain independent genome context variation[J]. **Microbiology**, 2004, 150(11): 3547–3560.
- [20] Fineran P C, Williamson N R, Lilley K S, et al. Virulence and prodigiosin antibiotic biosynthesis in *Serratia* are regulated pleiotropically by the GGDEF/EAL domain protein, pigX[J]. **Journal of Bacteriology**, 2007, 198(21): 7653–7662.