

紅色細菌色素手工皂之製作與抑菌活性分析

蕭蓉禎*、陳倩玲

建國科技大學美容系暨美容科技研究所

摘要

細菌色素是細菌生產的代謝產物中具有顏色的化合物，由於其色澤亮麗，因此被用為食品及化妝品之著色劑。本研究自土壤中篩選了三株具有生產紅色色素能力的菌株，基因序列比對的結果顯示，此三株細菌與粘質沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 的基因相似度為 99 %。色素溶解度試驗顯示，這些細菌色素不溶於水，但可溶於有機溶劑與精油中，細菌色素的顏色會隨著溶劑的種類不同而呈現不同的顏色 (例如：紅色、橙色、或桃紅色)。將細菌色素添加於皂液中，製成細菌色素手工皂，在室溫下，細菌色素手工皂的色澤可穩定保存 6 週。抑菌實驗結果顯示，細菌色素手工皂可以抑制金黃色葡萄球菌、綠膿桿菌、以及大腸桿菌的生長。本研究自製的細菌色素手工皂兼具清潔與抑制細菌生長的功效。

關鍵字：細菌色素，細菌生長抑制，手工皂

*通訊作者：蕭蓉禎; Email : rjshiau@ctu.edu.tw

文章類別：研究論文(Full Paper)

Making the Red Bacterial Pigment-Based Handmade Soap and Analysis of its Antibacterial Activity

Shiau, Rong-Jen*; Chen, Chien-Ling

Department of Beauty Science and Graduate Institute of Beauty Science Technology,
Chienkuo Technology University, Changhua City 500, Taiwan (R.O.C.)

Abstract

Bacterial pigments are color compounds produced by bacteria. Bacterial pigments are used as coloring agents for foods and cosmetics because of their bright color. In this study, three strains with the ability to produce red pigment were isolated from the soil samples. The isolated bacteria were identified as *Serratia marcescens* by DNA sequence analysis. Pigment solubility tests show that the bacterial pigments are insoluble in water but soluble in organic solvents and essential oils. Moreover, the bacterial pigments appear in different colors in different solvents (for example: red, orange, or pink). The bacterial pigments were added to the soap solution to prepare a bacterial pigment-based handmade soap. At room temperature, The color of handmade soap can be stored for 6 weeks without fading. The antimicrobial Activity test demonstrates that the bacterial pigment-based handmade soap can inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. The bacterial pigment- based handmade soap prepared in this study has the effect of cleaning and inhibiting bacterial growth.

Keywords: Bacterial pigment, Bacterial growth inhibition, Handmade soap

* Correspondence: Shiau, Rong-Jen; Email : rjshiau@ctu.edu.tw

前言

色素是美妝產業的靈魂。賞心悅目的色彩不但賦予產品不可抗拒的誘惑力，更帶給消費者夢幻般的體驗。市售美妝產品大多數使用化學合成色素，除了生產成本低，化學合成色素的穩定度高，可增長產品的販售時間，然而長期、大量地接觸化學合成色素亦可能為害消費者的健康。前人的研究顯示，化學合成色素會造成細胞癌化，胚胎發育異常，以及幼兒智力發展遲緩等⁽¹⁾。相較於化學合成色素，天然色素的細胞毒性較低，對生態環境的影響也比較少。在眾多的天然色素中，以細菌生產的色素具有巨大的商業潛力，與其他產生色素的生物相比，細菌有著許多優點，例如：細菌可以在短時間內大量繁殖、不受氣候和季節變化的影響、容易放大產量等。目前應用較為廣泛的細菌色素有類胡蘿蔔素 (carotenoids)、黑色素 (melanin)、綠膿素 (pyocyanin)、吩嗪 (phenazine)、醌 (quinones)、靈菌紅素 (prodigiosin)、色胺酮素 (tryptanthrin)、紫色桿菌素 (violacein) 等。這些細菌色素可作為食品著色劑、紡織品著色劑、抗氧化劑、以及抗微生物和抗癌劑等⁽²⁾。

類胡蘿蔔素是四萜類色素，具有多種顏色（從淺黃色、亮橙色到深紅色），目前已知的類胡蘿蔔素有 600 多種，依其化學分子結構，可分為葉黃素 (xanthophylls)（含有氧原子的四萜類化合物）與胡蘿蔔素 (carotenes)（不含氧的四萜類化合物）。在各種類胡蘿蔔素中，最常應用的類胡蘿蔔素是 α 和 β -胡蘿蔔素、葉黃素 (lutein)、茄紅素 (lycopene)、玉米黃素 (zeaxanthin) 和角黃素 (canthaxanthin) 等。類胡蘿蔔素具有保護葉綠素避免受到光損傷的功能。類胡蘿蔔素可以作為食品防曬劑，保護食物免於光照變質。類胡蘿蔔素也用作營養補充劑，具有抗氧化和防止光老化之作用。流行病學研究顯示，攝取高量的 β -胡蘿蔔素可降低罹患肺癌的風險⁽³⁾。商品化生產的類胡蘿蔔素大多是從蔬菜中萃取或是以化學合成的方式生產。然而，從植物中萃取類胡蘿蔔素受到季節性和地理環境差異的限制；化學合成則是產生過程中可能產生影響環境安全的危險廢棄物。相反的，以微生物生產類胡蘿蔔素，具有不受季節性和地理環境差異影響、生產過程對環境的污染為害也較低之優勢。已知具有生產類胡蘿蔔素能力之細菌，包括 *Flavobacterium multivorum*、*Fusarium sporotrichioides*、*Gordonia jacobea*、*Rhodobacter sphaeroides*、*Staphylococcus aureus* 等，皆被深入地研究，其色素合成相關基因也被選殖至其它微生物，用以大量生產色素⁽⁴⁾。

黑色素是吲哚聚合物 (indolic polymers)，常見的黑色素有真黑色素 (eumelanins)、嗜黑色素 (pheomelanins) 和異黑色素 (allomelanins)。除了大家所熟知的動物性黑色素，細菌也會產生黑色素。例如：鏈黴菌 (*Streptomyces*) 利用酪胺酸酶生產黑色素。*Marinomonas mediterranea* 利用 L-酪胺酸生產真黑色素。霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*) 的黑色素是一種由尿黑酸 (homogentisic acid) 衍生而來的異黑色素，是酪胺酸代謝改變的結果，而不是由酪胺酸酶催化合成的⁽⁵⁾。黑色素可以吸收紫外光，防止細胞被紫外光傷害，黑色素亦可應用於化妝品做為防曬劑以及芽孢桿菌 (*Bacillus thuringensis*) 殺蟲

結晶蛋白的保護劑⁽⁶⁾。近年來的研究顯示，黑色素具有抗病毒的特性，可以在試管內殺死愛滋病毒；黑色素還被用於產生單株抗體，治療人類轉移性黑色素腫瘤疾病⁽⁷⁾。

吩嗪是一群具有氧化還原活性的含氮芳族化合物。許多細菌，例如：*Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Actinomycetes*, *Pelagibacter*, 以及 *Vibrio* 都會生產吩嗪⁽⁸⁾。目前已知吩嗪有 6000 多種衍生物，顏色範圍從藍色，綠色，紫色，黃色，紅色到棕色，吩嗪化合物具有抗菌、抗腫瘤、抗瘧疾、和抗寄生蟲活性⁽⁹⁾。靈菌紅素是一種紅色色素，首先從芽孢桿菌屬 (*Bacillus prodigiosus*) 中分離出來，*Bacillus prodigiosus* 後來改名為粘質沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)^(10, 11)。在 *Serratia* 菌株中，負責生物合成靈菌紅素的蛋白為 pig B-pig E 基因，這個基因組會將 MAP 與 4-hydroxy-2,2'-bipyrrole-5-carbaldehyde 縮合成靈菌紅素⁽¹²⁾。除了粘質沙雷氏菌之外，其它細菌例如 *Actinomadura*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Streptomyces*, *Vibrio* 等也會生產靈菌紅素⁽¹³⁾。靈菌紅素具有許多用途，例如弧菌 (*Vibrio*) 生產的靈菌紅素可以染羊毛、尼龍、丙烯酸和絲綢。以羅望子作為媒染劑，粘質沙雷氏菌生產的靈菌紅素可以染聚酯超細纖維、聚酯、絲綢、和棉花。除著色劑之外，靈菌紅素具有廣泛的生物活性，包括抗菌，抗真菌，抗瘧疾，抗生素，免疫抑制和抗腫瘤等⁽²⁾。

綠膿菌素是銅綠假單胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 產生的藍色色素⁽¹⁴⁾。綠膿菌素由二個 N-methyl-1-hydroxyphenazine 分子所組成，在細菌體內，綠膿菌素的合成受到 MvfR 控制，MvfR 是一個轉錄調控因子，可以活化 *phnAB* 基因組，這些基因參與綠膿菌素合成反應⁽¹⁵⁾。綠膿菌素已被用作抗菌和抗真菌的生物製劑⁽¹⁶⁾。醌類化合物是一群具有芳香環結構的有色化合物，醌衍生物的顏色從黃色到紅色都有。醌衍生物表現出抗病毒，抗感染，抗菌，殺蟲和抗癌活性，並可作為染料和顏料⁽¹⁷⁾。色胺酮是一種黃色色素，被認為是由鄰胺基苯甲酸 (anthranilic acid) 和靛紅 (isatin) 縮合的產物。很少細菌能生產色胺酮。Wagner-Döbler 等人⁽¹⁸⁾發現 AM13.1 (一種屬於 *Cytophaga/Flexibacteria* 菌群) 可以生產色胺酮。實驗顯示色胺酮具有廣泛但適中的抗菌活性。紫色桿菌素是一種吲哚 (indole) 衍生物，主要是從棲息在熱帶和亞熱帶地區土壤和水中的色桿菌屬 (*Chromobacterium*) 細菌中分離出來。其他的細菌例如 *Iodobacter fluviatile*, *Janthinobacterium lividum*, *Pseudoalteromonas* sp. 等也會生產紫色桿菌素^(19, 20)。

其它的細菌色素，例如：Glaukothalin 是一種由 *Rheinheimera* 菌株產生的深藍色色素，其結構與任何已知的藍色色素沒有相似性，關於 glaukothalin 的生態功能與生物活性仍然在持續研究中⁽²¹⁾。Scytonemin 是一種由藍綠菌 (*Cyanobacteria*) 生產的黃綠色色素，當藍綠菌暴露在陽光下時，Scytonemin 可以保護藍綠菌避免紫外線的傷害⁽²²⁾。Scytonemin 可以抑制蛋白激酶 C β (PKC β) 和 polo 蛋白激酶 1 (PLK1)，因而具有抗炎和抗細胞增殖的活性⁽²³⁾。Tambjamins 是一種黃色色素，*Pseudoalteromonas tunicata* 生產 tambjamins 用以對抗微生物，包括細菌、無脊椎動物幼蟲、藻類孢子、原生動物和真菌⁽²⁴⁾。Tambjamins 也具有細胞毒性，可用於殺死腫瘤細胞株⁽²⁵⁾。

肥皂 (soap) 是具有界面活性劑性質的水溶性陰離子鹽，也是最早使用的人工合成

清潔劑。早期製作肥皂的方式是將動物性脂肪與木灰混合，藉由木灰中的碳酸鉀與脂肪酸進行皂化反應生成肥皂。現代的製皂工序主要是以強鹼（氫氧化鈉或氫氧化鉀）與脂肪酸進行反應。用於生產肥皂的脂肪酸主要是三酸甘油酯。皂化反應中一分子的三酸甘油酯可與三分子的鹼分子，反應產生三分子的脂肪酸鹽（肥皂）和一分子的甘油。肥皂的特性與其羧酸（-COOH）基團連接的脂族鏈（aliphatic chains）有關。脂族鏈具有多變性，其長度（碳的數目）和不飽和度（雙鍵的數目與雙鍵的位置）都會影響脂族鏈的物理性質與化學性質。皂化反應中常用的飽和脂肪酸有棕櫚酸 Palmitic acid（C16:0）、肉荳蔻酸 Myristic acid（C14:0）、辛酸 Caprylic acid（C8:0）、癸酸 Capric acid（C10:0）及月桂酸 Lauric acids（C12:0）。不飽和脂肪酸有棕櫚油酸 Palmitoleic acid（C 16:1）、油酸 Oleic acid（C 18:1）、以及亞麻油酸 Linoleic acid（C 18:2）等^{26,27}。除了工業生產的肥皂，近年來，為追求健康的生活，強調以手作的方式生產的手工皂蔚為風潮。製作者在生產手工皂的過程中，可依據不同膚質的需求，製作專用皂，也可以添加香味分子、色素、中草藥等，製作香味迷人、色彩絢麗的手工皂。

目前常見的手工皂製程有四種：

（一）冷製程（Cold Process）：將油脂與氫氧化鈉水溶液混合後，倒入皂模，進行皂化反應。皂化反應完成後的肥皂通常無法立即使用，需要經過一段時間，待皂體內的 pH 值下降以及水分揮發後，才可以包裝上市，這段時間稱之為熟成期。冷製程的手工皂稱之為冷製皂或是 CP 皂。冷製皂的優點是製作者可以完全掌握手工皂的成分與配方，缺點則是皂化反應過程中的強鹼可能會破壞製作者添加的營養成分及香味分子。

（二）熱製程（Hot Process）：將油脂與氫氧化鈉混合液加熱，加速皂化反應，其成品稱之為熱製皂或是 HP 皂。熱製皂因採加熱方式加速反應，因此可以縮短反應時間與成熟期，但加熱時產生的高溫亦可能破壞手工皂中的添加物。

（三）再生法製程（Rebatching Process）：將 CP 皂加熱融化後，重新倒入模型中製成。稱之為再生皂。此種方法較少被手工皂業者使用。

（四）融化再製法（Melt and Pour）：將市售的皂基加熱融化後，添加香精、色素或中草藥，倒入模型而成。此種方法製成的人工皂稱之為融化再製皂或 MP 皂。融化再製皂的製作過程簡便，使用的皂基大多為中性，因此添加物較不會被破壞。但因各廠牌皂基的成分與配方差異較大，製作者在使用時可能無法完全掌握。

本研究的目的是篩選具有生產紅色色素能力的細菌，萃取其色素，添加於 MP 皂中，量測其色素的穩定度以及抑制細菌生長的活性。

材料與方法

一、菌株篩選

本研究的菌株分離自彰化地區的土壤（校園、公園、農牧用地等）。分離方式如下：

稱取 1 mg 土壤樣本，置於塑膠離心管內，加入 30 mL 無菌水，震盪均勻後，靜置於桌面上，待土壤沉澱後，吸取 500 μ L 上層液，置於 1.5 mL 微量離心管內，再將上層液以無菌水進行 10 倍序列稀釋，吸取 200 μ L 不同倍率的稀釋液，滴在 LB 固態培養基（每公升含有 10 g NaCl, 10 g paptone, 5 g yeast extract, 15 g bacto-agar），以三角塗抹棒將菌液塗抹均勻。放入 28°C 定溫培養箱內，培養 48 小時後，取出培養基，觀察固態培養基上的菌落顏色，並計數其數量。

挑選培養基上紅色的菌落，以無菌牙籤小心地沾黏少量菌體，接種於 LB 固態培養基上，每一個紅色菌落接種在一個 LB 固態培養基上，將培養基放入 28°C 定溫培養箱內，繼續培養 48 小時後，取出培養基，觀察培養基上的菌落的顏色與型態。重複此步驟，直到培養基上呈現單一型態的紅色菌落。

二、菌種鑑定

挑選單一紅色菌落，接種於 LB 固態培養基上，委請生技公司，進行 16S rRNA 基因定序，再以其定序結果與基因庫中的菌種進行同源性比對，找出與目標菌株相近的菌種。

三、紅色細菌培養

為了要獲得大量的細菌進行後續的實驗，我們將目標菌株培養於大體積的培養液中。做法如下：取單一菌落接種在 3 mL LB 液態培養基，放置於 28°C 恆溫培養箱內，培養 24 小時後，將菌液移入含有 250 mL LB 培養液的三角錐形瓶內，再將三角錐形瓶放在 28°C 恆溫培養箱內的軌道搖床上，以 180 rpm 的轉速，培養 48 小時，培養過程中，觀察並記錄細菌生長以及色素分泌情形。

四、色素萃取

細菌培養完成後，將菌液倒入 500 mL 的血清瓶內，加入 200 mL 的乙酸乙酯，以磁力攪拌器攪拌混合，此時菌液中的色素會溶解在乙酸乙酯中。再將含有乙酸乙酯的菌液倒入分液漏斗中，靜置待其分層後，收集含有色素的乙酸乙酯溶液，放入離心管內，再將離心管放入離心機內，以 10000 rcf 的轉速，離心 10 分鐘，去除乙酸乙酯溶液中的雜質。取出離心後的乙酸乙酯溶液，放入抽氣櫃內，減壓抽氣，待乙酸乙酯揮發後，再將色素粉末溶於 100% 甲醇溶液中，重複離心的步驟，再次去除溶液中的雜質。取出離心後的甲醇溶液，放入抽氣櫃內，以減壓抽氣的方式去除甲醇後，將色素粉末放置於 4°C 冰箱內保存。

五、色素在有機溶劑與精油中的溶解度分析

稱取 1 mg 的色素粉末，置入微量離心管，分別加入 250 μ L 甲醇、乙酸乙酯、丙酮、

乙醇、尤加利精油、葡萄柚精油、薰衣草精油、茶樹精油、薄荷精油、以及天竺葵精油。將微量離心管放在桌上型振盪器上，振盪 5 分鐘後，置於室溫下，觀察並紀錄溶液的顏色。

六、細菌色素手工皂之製作

秤取 0.1 g 的色素粉末，分別溶解在 250 μ L 的有機溶劑與精油，包含甲醇、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、尤加利精油、薄荷精油、薰衣草精油、迷迭香精油、山雞椒精油、以及茶樹精油。將 MP 皂切塊狀以隔水加熱方式溶化，各取 10 mL 皂液置於燒杯中，待其溫度降至 45°C 時，加入色素溶液與皂液攪拌均勻後，倒入模具中，在室溫下靜置兩小時，待皂液呈現固體狀後方可脫模，即為色素手工皂。

七、色素手工皂之色澤穩定度

將色素手工皂放置於實驗室的架子上，模擬一般開架式商品販售存放情形。實驗室溫度 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ，每日光照 10 小時。色素手工皂上架後的第 6、12、18、24 週，拍照紀錄色素手工皂的顏色變化。

八、濾紙擴散法 (paper disc diffusion assay)

秤取 150 mg 色素粉末，溶解於 250 μ L 乙醇溶液，加入 6 mL 手工皂液，均勻混合後，倒入模具中，待其成皂後，分別秤取 0.5 g 與 1 g 皂塊，放入燒杯中，加入 50 mL 無菌水，將燒杯放置於迴轉式振盪器，振盪 30 分鐘，待細菌色素手工皂充分溶解成液狀後，靜置 2 小時，完全消泡後做為抑菌實驗之色素手工皂的溶解液。溶液中的細菌色素濃度分別為 0.25 mg/mL 與 0.5 mg/mL。

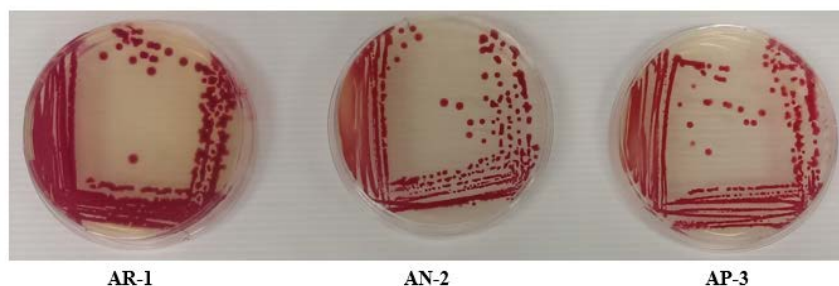
將待測菌株 (金黃色葡萄球菌 (*S. aureus*)、綠膿桿菌 (*P. aeruginosa*)、以及大腸桿菌 (*E. coli*))，以劃線法接種在 LB 固態培養基上，待其菌落長成後，分別取單一菌落，接種於 3 mL LB 培養液。將菌液置於 35°C 恆溫培養箱中培養 24 小時。吸取 300 μ L 菌液，滴在 LB 固態培養基表面，再以三角塗抹棒將菌液塗抹均勻。將 20 μ L 色素手工皂的溶解液滴在已滅菌的圓形濾紙 (直徑為 0.5 cm)，待濾紙浸吸均勻後，將其覆蓋至塗有待測菌株的 LB 固態培養基表面，在 35°C 恆溫培養箱中培養 24 小時後，測量抑制環的直徑。另取等量的無菌水滴在濾紙上做為對照組 (blank)，另二組對照組為未添加色素的手工皂溶解液，及以青黴素 (Ampicillin: 100 μ g/mL) 水溶液作為負控制組與正控制組。

結果與討論

一、目標菌株篩選

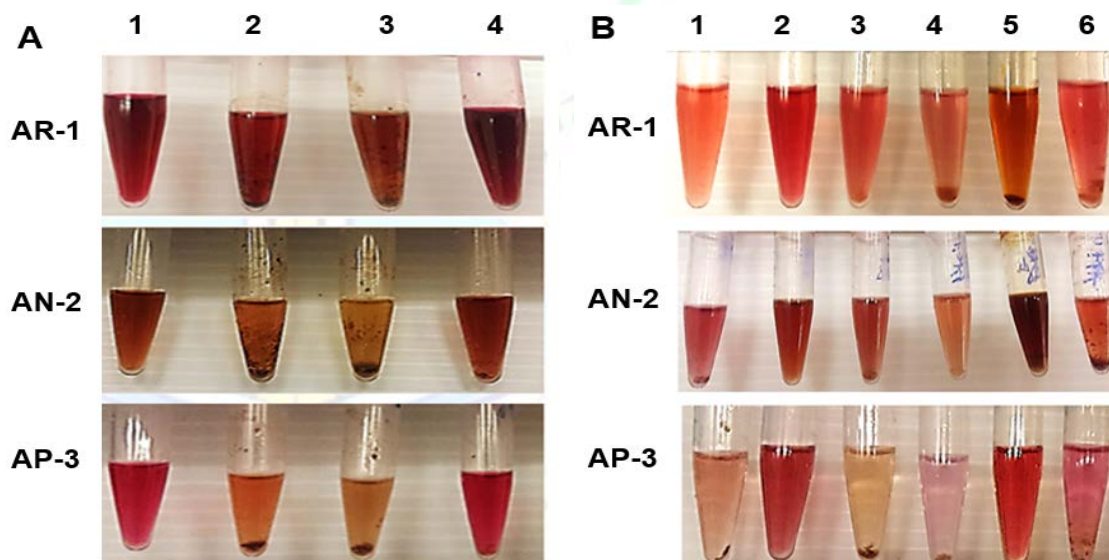
紅色是討喜的顏色，市場接受度高。本研究的目標是篩選具有生產紅色色素能力的

細菌。經過多次篩選，獲得了三株紅色菌株，分別編號為 AR-1、AN-2、AP-3。在 LB 固態培養基表面，AR-1 的菌落呈現暗紅色，AN-2 的菌落顏色為橘紅色，而 AP-3 的菌落顏色為桃紅色（圖一）。在菌落周圍並未觀察到色素擴散到培養基內，可能是因為色素依然在菌體內，未被釋放出體外，或是色素具有疏水性，細菌釋放出的色素不會溶解在培養基內，而是附著在菌體表面。



圖一、AR-1、AN-2、以及 AP-3 在 LB 固態培養基上的菌落顏色

將此三株紅色菌株的 16S rRNA 基因定序後，進行物種間基因序列比對，結果顯示，這三株菌與粘質沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 的基因最為相似，其相似度為 99%。粘質沙雷氏菌是一種土壤中常見的細菌，前人研究發現粘質沙雷氏菌會生產紅色色素⁽¹¹⁾，此一紅色色素稱之為靈菌紅素 (prodigiosin)。本研究所篩選到的 AR-1、AN-2、AP-3 也顯現出紅色的菌落顏色，此一情形與粘質沙雷氏菌的特性相同。但因為這三株紅色菌株的基因序列並不完全相同，且其所生產的色素顏色也略有不同，我們認為這三株菌應屬於不同的品系 (strain)，因此將其命名為 *S. marcescens* AR-1、*S. marcescens* AN-2、以及 *S. marcescens* AP-3。在後續的實驗中，仍以編號：AR-1、AN-2、AP-3 表示之。



圖二、AR-1、AN-2、及 AP-3 色素在有機溶劑與精油中的溶解情形。

(A) 有機溶劑：1. 甲醇；2. 乙酸乙酯；3. 丙酮；4. 乙醇。(B) 精油：1. 尤加利精油；2. 葡萄柚精油；3. 薰衣草精油；4. 茶樹精油；5. 薄荷精油；6. 天竺葵精油。

二、色素在溶劑中的溶解度

為了方便描述，我們將 AR-1、AN-2、以及 AP-3 所生產的色素簡稱成為 AR-1 色素、AN-2 色素、以及 AP-3 色素。如圖二 A 所示，在不同的有機溶劑中，AR-1 色素、AN-2 色素、以及 AP-3 色素的顏色與溶解度略有不同。AR-1 色素在甲醇溶液呈現深紅顏色，在乙醇溶液中則是暗紅色，在乙酸乙酯與丙酮溶液中的顏色呈現淡紅色。AN-2 色素在甲醇溶液中呈現的顏色為深橘色與在乙醇溶液的顏色相近，在乙酸乙酯與丙酮溶液中則呈現較淡的紅色。AP-3 色素在甲醇與乙醇溶液呈現桃紅色，但是在乙酸乙酯與丙酮溶液中卻是淡紅色。AR-1 色素、AN-2 色素、以及 AP-3 色素在乙酸乙酯與丙酮溶液中，都可以觀察到沉澱的情形產生。

在溶劑中，溶質的溶解度與溶劑的極性有關。AR-1 色素、AN-2 色素、以及 AP-3 色素在甲醇與乙醇的溶解效果佳，此兩種溶劑屬於極性較大的溶劑，而在極性稍低的丙酮與非極性溶劑的乙酸乙酯溶液中，紅色色素的溶解度較低，顯示此色素的特性較為偏向親水性。

三、色素在精油中溶解之情形

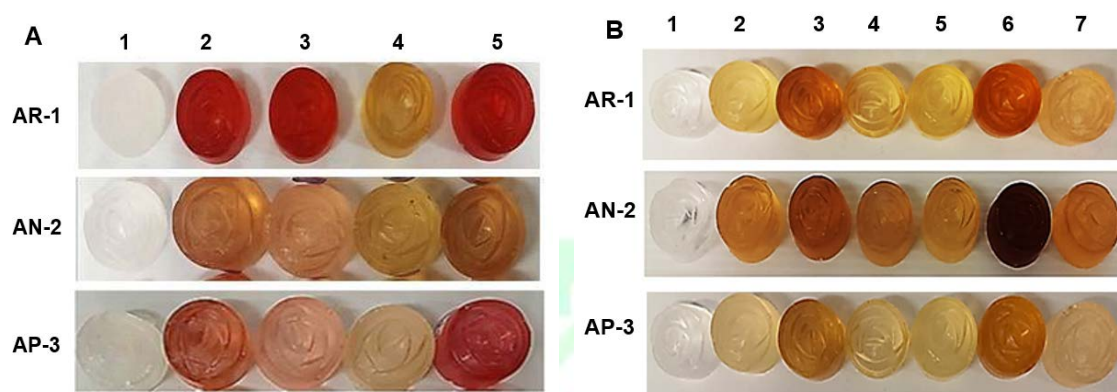
精油的氣味芬芳，深受消費者喜愛。在本研究中，我們測試以精油做為色素溶劑的可行性。實驗結果顯示，AR-1 色素、AN-2 色素、以及 AP-3 色素在 6 種不同的精油（尤加利精油、薄荷精油、薰衣草精油、迷迭香精油、山雞椒精油、茶樹精油溶液）的顏色與溶解度差異很大。如圖二 B 所示，AR-1 色素在 6 種精油中呈現紅色，其溶解度在迷迭香精油、山雞椒精油、以及茶樹精油中較低，在山雞椒精油中可以觀察到明顯的沉澱物。AN-2 色素在 6 種精油中呈現的顏色與 AR-1 色素相似。但 AN-2 色素在山雞椒精油中呈現更深的暗紅色，AN-2 色素在茶樹精油中亦有沉澱物產生。AP-3 色素在 6 種精油中呈現多種的顏色（紅色、橙色、以及桃紅色），也有沉澱的情形發生。與 AR-1 色素和 AN-2 色素比較不同的是，AP-3 色素在山雞椒精油中呈現紅色，沒有沉澱物產生。

大多數的色素分子含有苯環類的結構，環上的電子吸收光能後，會躍遷至較高的能階，當電子返回低能階時，多餘的能量會以光的形式釋放出來，此時若是釋放出的光的波長位於可見光區，色素分子就呈現我們所熟悉的顏色，此外在苯環類上如果接上不同的官能基也可能改變電子躍遷的能階，造成色素分子的顏色改變。在本研究中，紅色色素在不同的有機溶劑或精油中所呈現的顏色略微不同，可能是因為紅色色素與這些溶劑分子形成部分鍵結，致使色素分子的電子躍遷能階發生改變，進而改變其顏色。

本研究中所篩選到的 AR-1、AN-2、以及 AP-3 其基因序列雖然相近，但是所生產的紅色色素在有機溶劑與精油中的顏色不完全相同。我們認為可能是色素分子的結構或是官能基略有不同，將來可以進一步進行化學分子結構鑑定，了解 AR-1、AN-2、以及 AP-3 生產的色素的詳細構造。

四、色素在 MP 皂中的顏色會隨著溶劑不同而改變

無添加色素的 MP 皂是透明無色的。在本研究中，我們將 AR-1、AN-2、以及 AP-3 色素分別溶解在有機溶劑後，加入溶化的 MP 皂液，製成色素 MP 皂。如圖三 A 所示，在甲醇、乙酸乙酯、以及乙醇溶液中的 AR-1 色素 MP 皂呈現紅色，AN-2 色素 MP 皂呈現淡紅色。在丙酮溶液中，AR-1 色素 MP 皂與 AN-2 色素 MP 皂皆呈現黃色。以甲醇、乙酸乙酯、乙醇、以及丙酮溶解的 AP-3 色素 MP 皂分別呈現淡紅色、粉紅色、淡黃色以及桃紅色。這些 MP 皂的顏色與色素溶解在有機溶劑的顏色相似。



圖三、色素在 MP 皂中之顏色變化。

利用有機溶劑或精油溶解色素，再加入溶化的皂液，製作色素 MP 皂。

A 圖 1. 未添加色素；2. 色素溶解於甲醇；3. 乙酸乙酯；4. 丙酮；5. 乙醇。

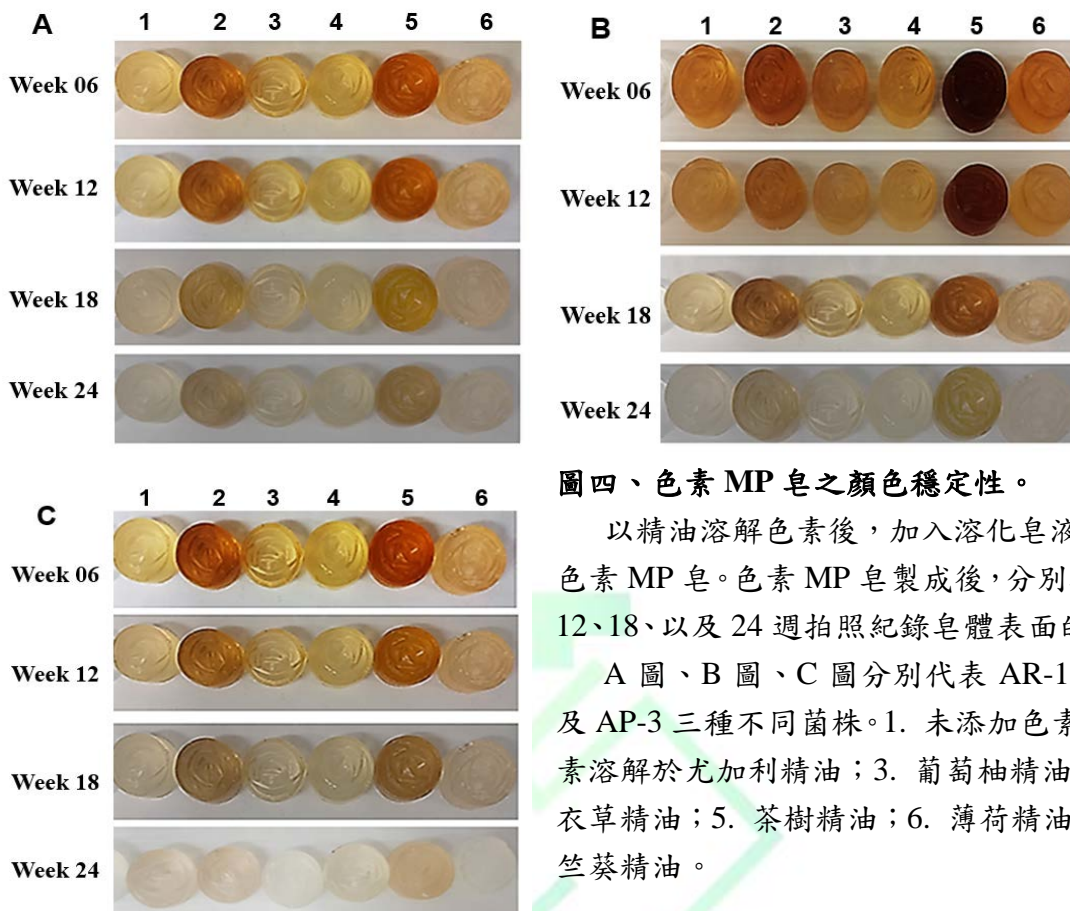
B 圖 1. 未添加色素；2. 色素溶解於尤加利精油；3. 葡萄柚精油；4. 薰衣草精油；5. 茶樹精油；6. 薄荷精油；7. 天竺葵精油。

圖三 B 是利用精油溶解色素所製作而成的色素 MP 皂。相較於以有機溶劑溶解色素製成的 MP 皂，精油色素 MP 皂的顏色明顯較淡，呈現橙色、黃色或淡紅色，除了以山雞椒精油溶解的 AN-2 色素 MP 皂，其顏色呈現深咖啡色。

綜合上述的實驗結果，紅色色素在 MP 皂中的顏色與溶解在溶劑中的顏色相近，顯示在製作色素 MP 皂的過程中，使用的溶化的 MP 皂液不會改變色素的顏色，因此可以利用不同精油或其他物質改變紅色色素的顏色，製作出不同顏色的色素 MP 皂。

五、色素 MP 皂之顏色穩定性

如圖四所示，以精油溶解色素製作的色素 MP 皂，在製作完成後的 6 週內的色度都較穩定，隨著存放時間增加，色度開始衰退。在第 12 週時，以薄荷精油與山雞椒精油製作的 AR-1 色素 MP 皂，其顏色由橙色轉變為淡黃色，其他的色素 MP 皂的顏色也變得非常淡。在第 24 週時，所有的 AR-1 色素 MP 皂的皆衰退到幾乎無色度存在(圖四 A)。AN-2 色素 MP 皂的顏色衰退情形與 AR-1 色素 MP 皂相似，儘管以山雞椒精油溶解的 AN-2 色素 MP 皂具有深咖啡色，但其顏色也明顯地衰退，在第 24 週時，變成了淡黃色(圖四 B)。AP-3 色素 MP 皂退色的情形也與 AR-1 和 AN-2 色素 MP 皂相似(圖四 C)。



圖四、色素 MP 皂之顏色穩定性。

以精油溶解色素後，加入溶化皂液，製作色素 MP 皂。色素 MP 皂製成後，分別在第 6、12、18、以及 24 週拍照紀錄皂體表面的顏色。

A 圖、B 圖、C 圖分別代表 AR-1、AN-2 及 AP-3 三種不同菌株。1. 未添加色素；2. 色素溶解於尤加利精油；3. 葡萄柚精油；4. 薰衣草精油；5. 茶樹精油；6. 薄荷精油；7. 天竺葵精油。

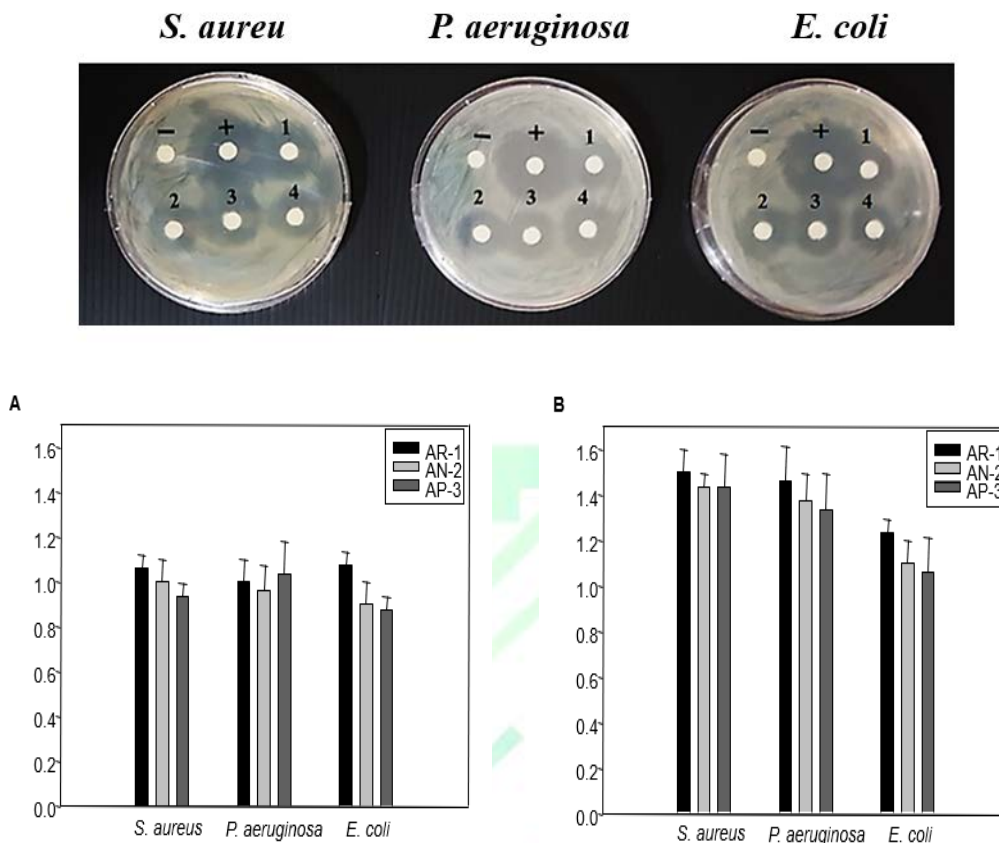
造成色素 MP 皂退色的原因可能是因為色素接觸到空氣，產生氧化反應，因而破壞了色素的結構。避免色素氧化，可使用保鮮膜將色素 MP 皂包覆，阻絕色素與空氣接觸。此外，為了模擬色素 MP 皂在商店上架販售的實際情況，我們將色素 MP 皂置於光照的環境中，色素受到長時間的光照，其結構也可能會被破壞。因此，避免光線直接照射色素 MP 皂，應可延長色素 MP 皂的保存時間⁽²⁶⁾。至於將來在販售現場陳列的色素 MP 皂展示樣品，則需要定期更新，避免顧客買到退色的商品。

六、色素 MP 皂之抑菌效果

色素 MP 皂對待測菌株的生長抑制情形如圖五所示。負控制組為未添加色素的 MP 皂，並無抑菌效果，正控制組為添加 Ampicillin (100 µg/mL) 溶液，可以觀察到明顯的抑菌效果。

添加三種色素 MP 皂溶液，也可以觀察到抑菌環的存在 (圖五 A)。進一步量測抑菌環的大小，結果顯示：0.5 g 的 AR-1 色素、AN-2 色素、以及 AP-3 色素 MP 皂溶液對待測菌株的測抑菌環直徑分別為： 1.06 ± 0.06 cm、 1.00 ± 0.1 cm、 0.93 ± 0.06 cm (*S. aureus*)； 1.00 ± 0.1 cm、 0.96 ± 0.11 cm、 1.03 ± 0.15 cm (*P. aeruginosa*)，以及 1.07 ± 0.06 cm、 0.9 ± 0.1 cm、 0.87 ± 0.06 cm (*E. coli*)。1 g 的 AR-1、AN-2 色素、以及 AP-3 色素

MP 皂溶液的菌環直徑分別為： 1.50 ± 0.1 cm、 1.43 ± 0.06 cm、 1.43 ± 0.15 cm (*S. aureus*)； 1.46 ± 0.15 cm、 1.37 ± 0.12 cm、 1.33 ± 0.16 cm (*P. aeruginosa*)，以及 1.23 ± 0.06 cm、 1.1 ± 0.1 cm、 1.06 ± 0.15 cm (*E. coli*) (圖五 B)。



圖五 色素 MP 皂之抑菌效果

圖五、色素 MP 皂對 *S. aureus*、*P. aeruginosa*、以及 *E. coli* 的生長抑制情形。

(A) 濾紙擴散法分析的實例，顯示色素 MP 皂會抑制待測菌株的生長，在培養基可觀察到暈圈。(–) 未添加色素；(+) 含有 Amp；1. 紫色桿菌素；2. AR-1；3. AN-2；4. AP-3。(B) 三次濾紙擴散法測定的平均暈圈直徑圖 (M ± SD)。

Lee 等人⁽²⁸⁾發現，prodigiosin 和 cycloprodigiosin 對沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、金黃色葡萄球菌、大腸桿菌、枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 和白色念珠菌 (*Candida albicans*) 有顯著地抑制效果。在另一項研究中，Lapenda 等人⁽²⁹⁾發現 prodigiosin 會抑制金黃色葡萄球菌、糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*)、化膿性鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的生長，本研究的實驗結果與前人的實驗數據相符。

結論

本研究自土壤中篩選到三株不同品系的紅色細菌，萃取其生產的紅色色素，添加於 MP 皂中。在實驗室的環境中，色素 MP 皂的顏色可以穩定維持 6 週，若需長久儲存則

需要進一步改善儲存方式。本研究的結果也顯示色素 MP 皂具有抑制 *S. aureus*、*P. aeruginosa*、以及 *E. coli* 生長的能力。因此用於洗手清潔時，可減少手部細菌，降低細菌性疾病傳染的風險。未來我們將進一步針對造成皮膚疾病的病菌進行抑菌實驗，開發新配方的色素 MP 皂，讓使用者在洗臉時，減緩青春痘等細菌性皮膚疾病。

參考文獻

- (1) Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., and Paredes-López, O. (2000) Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173-289.
- (2) Ahmad, W. A., Ahmad, W. Y. W., Zakaria, Z. A., and Yusof, N. Z. (2012) Application of bacterial pigments as colorant. In *Application of Bacterial Pigments as Colorant* (pp. 57-74). Springer, Berlin, Heidelberg.
- (3) Armstrong, G. A., and Hearst, J. E. (1996) Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB Journal*, 10(2), 228-237.
- (4) Mata-Gómez, L. C., Montañez, J. C., Méndez-Zavala, A., and Aguilar, C. N. (2014) Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 12.
- (5) Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S., and Wortsman, J. (2004) Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological reviews*, 84(4), 1155-1228.
- (6) Sansinenea, E., and Ortiz, A. (2015). Melanin: a photoprotection for *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Biotechnology Letters*, 37(3), 483-490.
- (7) Plonka, P. M., and Grabacka, M. (2006) Melanin synthesis in microorganisms—biotechnological and medical aspects. *Acta Biochimica Polonica*, 53(3), 429-443.
- (8) Pierson, L. S., and Pierson, E. A. (2010) Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1659-1670.
- (9) Nansathit, A., PHAOSIRI, C., Pongdontri, P., Chanthai, S., and Ruangviriyachai, C. (2011) Synthesis, isolation of phenazine derivatives and their antimicrobial activities. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 6(1), 79-91.
- (10) Williams, R. P., Green, J. A., and 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.

- (11) Gerber, N. N. (1975) Prodigiosin-like pigments. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 3(4), 469-485.
- (12) Williamson, N. R., Fineran, P. C., Leeper, F. J., and Salmond, G. P. (2006) The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nature Reviews Microbiology*, 4(12), 887.
- (13) Darshan, N., and Manonmani, H. K. (2015) Prodigiosin and its potential applications. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5393-5407.
- (14) Hassan, H. M., and Fridovich, I. R. W. I. N. (1980) Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. *Journal of bacteriology*, 141(1), 156-163.
- (15) Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G., and Thomashow, L. S. (2001) Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology*, 183(21), 6454-6465.
- (16) Jayaseelan, S., Ramaswamy, D., and Dharmaraj, S. (2014) Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 1159-1168.
- (17) Koyama, J. (2006) Anti-infective quinone derivatives of recent patents. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 1(1), 113-125.
- (18) Wagner-Döbler, I., Beil, W., Lang, S., Meiners, M., and Laatsch, H. (2002) Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. In *Tools and Applications of Biochemical Engineering Science* (pp. 207-238). Springer, Berlin, Heidelberg.
- (19) Durán, N., Justo, G. Z., Ferreira, C. V., Melo, P. S., Cordi, L., and Martins, D. (2007) Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology and applied biochemistry*, 48(3), 127-133.
- (20) Aranda, S., Montes-Borrego, M., and Landa, B. B. (2011) Purple-pigmented violacein-producing *Duganella* spp. inhabit the rhizosphere of wild and cultivated olives in southern Spain. *Microbial ecology*, 62(2), 446-459.
- (21) Grossart, H. P., Thorwest, M., Plitzko, I., Brinkhoff, T., Simon, M., and Zeeck, A. (2009) Production of a blue pigment (glaukothalin) by marine *Rheinheimera* spp. *International Journal of Microbiology*, 2009.
- (22) Proteau, P. J., Gerwick, W. H., Garcia-Pichel, F., and Castenholz, R. (1993) The structure

- of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria. *Experientia*, 49(9), 825-829.
- (23) Stevenson, C. S., Capper, E. A., Roshak, A. K., Marquez, B., Eichman, C., Jackson, J. R., Mattern, M., Gerwick, W. H., Jacobs, R. S., and Marshall, L. A. (2002) The identification and characterization of the marine natural product scytonemin as a novel antiproliferative pharmacophore. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303(2), 858-866.
- (24) Franks, A., Haywood, P., Holmström, C., Egan, S., Kjelleberg, S., and Kumar, N. (2005) Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Molecules*, 10(10), 1286-1291.
- (25) Pinkerton, D. M., Banwell, M. G., Garson, M. J., Kumar, N., de Moraes, M. O., Cavalcanti, B. C., ... and Pessoa, C. (2010) Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Synthetically Derived Tambjamins C and E-J, BE-18591, and a Related Alkaloid from the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Chemistry and Biodiversity*, 7(5), 1311-1324.
- (26) Spitz, L. (Ed.). (2016) Soap manufacturing technology. Elsevier.
- (27) Dunn, K. M. (2010) Scientific soapmaking: The chemistry of the cold process. Clavícula press.
- (28) Lee, J. S., Kim, Y. S., Park, S., Kim, J., Kang, S. J., Lee, M. H., Ryu, S., Choi, J. M., Oh, T. K., and Yoon, J. H. (2011) Exceptional production of both prodigiosin and cycloprodigiosin as major metabolic constituents by a novel marine bacterium, *Zooshikella rubidus* S1-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(14), 4967-4973.
- (29) Lapenda, J. C., Silva, P. A., Vicalvi, M. C., Sena, K. X. F. R., and Nascimento, S. C. (2015) Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 399-406.