

不同的培養裝置對紫色桿菌素生產的效益評估

蕭蓉禎* 洪宇西

建國科技大學 美容系暨美容科技研究所

50094 彰化市介壽北路 1 號

*rjshiau@ctu.edu.tw

摘要

天然色素種類繁多，除了顏色多樣，有些天然色素亦具有藥理活性。紫色桿菌素是紫色桿菌生產的疏水性色素，紫色桿菌素已被證明具有抗氧化、抗菌、以及抗腫瘤細胞等活性。本研究比較三角錐形瓶、凹槽三角錐形瓶、以及客製化的氣舉式圓柱管對紫色桿菌生產紫色桿菌素的影響。三角錐形瓶與凹槽三角錐形瓶放置於軌道搖床上搖晃培養，氣舉式圓柱管以小型打氣幫浦供氣進行培養。將紫色桿菌接種在 150 ml LB 液態培養基，分別倒入上述 3 種裝置中進行培養。在不同的培養時間點，取出菌液，使用乙酸乙酯萃取培養液中的紫色桿菌素，再將乙酸乙酯揮發去除，將含有紫色桿菌素的粉末溶解在乙醇中，利用分光光度計測量紫色桿菌素溶液的吸光值並推估其濃度。結果顯示，在培養 24 小時後，在標準三角錐形瓶、凹槽三角錐形瓶、以及氣舉式圓柱管中紫色桿菌素濃度分別為 $86.3 \pm 1.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $66.6 \pm 2.3 \mu\text{g/ml}$ 、 $115.3 \pm 2.1 \mu\text{g/ml}$ ，延長培養時間至 72 小時，紫色桿菌素濃度分別 $132.1 \pm 1.8 \mu\text{g/ml}$ 、 $146.0 \pm 2.2 \mu\text{g/ml}$ 、 $188.4 \pm 11.6 \mu\text{g/ml}$ 。因此無論是在細菌的對數生長期或是穩定生長期，氣舉式圓柱管培養所獲得的紫色桿菌素濃度都是最高。相較於錐形瓶，氣舉式圓柱管的底面積小，因此在有限的實驗室空間內，可以佈建更多的氣舉式圓柱管，進行紫色桿菌素生產條件測試或是紫色桿菌素突變菌株的篩選研究。

關鍵詞：紫色桿菌素，錐形瓶，氣舉式圓柱管

Evaluation of the Benefit of Different Devices for the Production of Violacein

RONG-JEN SHIAU* and YU-YU HUNG

Department of Beauty Science, Chienkuo Technology University

No. 1, Chieh Shou N. Rd., Changhua City 50094, Taiwan, R.O.C.

*rjshiau@ctu.edu.tw

ABSTRACT

Some natural pigments of various colors have pharmacological properties. Violacein is a hydrophobic pigment produced by *Chromobacterium violaceum* that has been reported to have antioxidant, antibacterial, and antitumor properties. This study compared the effects of conical flasks, triple-baffled flasks, and custom-made cylindrical airlift tubes on the production of violacein from *C.*



violaceum. For culturing the bacteria, conical flasks and triple-baffled flasks were placed on an orbital shaker, and the cylindrical airlift tubes were connected to a small air pump. The bacteria culture was added to a conical flask, triple-baffled flask, and cylindrical airlift tube containing 150 mL LB liquid medium. At different time points during culturing, violacein in the bacterial culture was extracted using ethyl acetate, which was later removed using an evaporator. The violacein powder was collected and dissolved in ethanol. The violacein concentration was determined using UV-visible spectroscopy. After incubation for 24 h, the concentration of violacein in the conical flask, triple-baffled flask, and cylindrical airlift tube was 86.3 ± 1 , 66.6 ± 2.3 , and 115.3 ± 2.1 $\mu\text{g/mL}$, respectively; after incubation for 72 h, the concentration of violacein was 132.1 ± 1.8 , 146.0 ± 2.2 , and 188.4 ± 11.6 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Therefore, regardless of whether the bacteria was in the logarithmic growth phase or stable growth phase, the concentration of violacein obtained using the cylindrical airlift tube was the highest among the three methods. Compared with the conical flask, the bottom area of the cylindrical airlift tube is small. Therefore, in the limited laboratory space, more cylindrical airlift tubes can be deployed to test the production conditions of violacein or search for mutant strains.

Key Words: violacein, flask, airlift cylindrical tube

一、前言

早在幾千年前，古埃及人就利用天然色素裝飾身體，展現個人的社會地位。這些天然色素大多來自植物。但是由於植物生長受限於溫度、日照、雨量等環境因子，造成植物天然色素的產量低，色素因而成為一種奢侈品。在二十世紀初，人工合成色素的製程被開發出來，色素生產不再受到環境因子的限制，可以在工廠內大量地生產。相較於天然色素，合成色素具有穩定度佳、色彩種類多、染色步驟簡單、色牢度高等優勢，合成色素的市場因此快速地成長，天然色素則是逐漸地乏人問津 [6, 26]。然而，隨著大量使用合成色素，許多缺點逐漸浮現，布料染色廠的合成色素廢液流入河川，減少了水中的溶氧量，造成水生生物死亡，除此之外，由於許多合成色素具有生殖毒性，合成色素也造成了水生生物生殖異常 [23]。對於哺乳類動物而言，攝食含有 azo 官能基的合成色素，會導致癌症 [12]。含有三芳基甲烷 (triarylmethane) 的合成色素則會經由皮膚進入血管，對組織造成毒性 [4]。為了追求更健康的生活，天然色素再次獲得了消費者的青睞。

科學家致力尋找各種天然色素，細菌是他們的首要目標。細菌的適存性強，從沙漠到海洋，從極地到溫泉，都可以發現細菌的蹤跡。這些細菌製造數以萬計的代謝物，其中具有顏色的代謝物被作為色素使用。這些細菌色素除了具有顏色，有些也有藥理功能，例如抗氧化能力、殺菌、殺病毒、以及抑制腫瘤生長等。目前已被發現的細菌色素有類胡蘿蔔素 (carotenoids)、黑色素 (melanin)、吩嗪 (phenazine)、

靈菌紅素 (prodigiosin)、綠膿菌素 (pyocyanin)、醌 (quinone)、色胺 (tryptamine)、glaukothalin、偽枝藻素 (scytonemin)、tambjamins 以及紫色桿菌素 (violacein) [17]。

類胡蘿蔔素是四萜類分子 (tetraterpen)，有黃色、橙色、紅色等顏色，具有吸收光線的能力，可以作為防曬劑來保護食物免受強烈陽光照射。多食黃桿菌 (*Flavobacterium multivorum*)、鐮孢菌 (*Fusarium sporotrichioides*)、球形紅菌 (*Rhodobacter sphaeroides*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等細菌可以生產類胡蘿蔔素，有些色素合成基因也已經被選殖到其他微生物中，以用於大量生產類胡蘿蔔素 [22]。黑色素是一種常見於動物體內的吲哚聚合物 (indolic polymer)，鏈黴菌 (*Streptomyces*)、霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*)、*Marinomonas mediterranea* 具有產生黑色素的能力，黑色素可以吸收紫外線，保護細胞免受紫外線的傷害。吩嗪是具有氧化還原活性的烴類化合物 [25]，*Streptomyces*、*Pseudomonas*、*Actinomycetes*、*Pelagibacter*、以及 *Vibrio* 等細菌可以產生吩嗪。現在已知的吩嗪具有超過 6,000 種衍生物，有藍、綠、紫、黃、紅、棕等顏色，吩嗪具有抗菌、腫瘤、抗瘧疾和抗寄生蟲活性 [15]。靈菌紅素是一種紅色色素，最早是從芽孢桿菌屬 (*Bacillus prodigiosus*) 中分離出來，後來該細菌改名為粘質沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)。除粘質沙雷氏菌外，還發現其他細菌如 *Actinomadura*、*Pseudomonas*、*Pseudoalteromonas*、*Streptomyces*、*Vibrio* 等也會產生



prodigiosin。靈菌紅素可以作為布料染劑，也具有廣泛的生物活性，包括抗菌，抗真菌，抗瘡疾，抗生素，免疫抑制和抗腫瘤等，這些特徵使得靈菌紅素成為研究人員感興趣的細菌色素 [5]。綠膿菌素是由銅綠假單胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 產生的藍色色素，綠膿菌素已被用作抗菌和抗真菌生物製劑 [11]。醌類是一群具有芳香環結構的有色化合物，醌類的顏色介於黃色至紅色，醌衍生物具有抗病毒，抗感染，抗菌，殺蟲和抗癌活性，可用作染料和顏料。*Streptomyces* sp. B6921、*Streptomyces* sp.、*Alteromonas nigrifaciens* 以及 *Shewanella violacea* 皆會產生醌衍生物 [27]。色胺是一種黃色色素，具有廣泛的抗菌活性，色胺被認為是鄰氨基苯甲酸和靛紅的縮合產物，*Cytophaga* / *Flexibacteria* 屬的菌株可以產生色胺。Glaukothalin 是由 *Rheinheimera* 菌株產生的深藍色素，其結構與任何已知的藍色顏料不相似，Glaukothalin 生物活性仍在研究中。Scytonemin 是由藍綠菌 (*cyanobacteria*) 產生的黃綠色素，具有抗紫外線、抗發炎和抗細胞增殖的活性。Tambjamins 是一種黃色色素，*Pseudoalteromonas tunicata* 藉由產生 tambjamins 對抗細菌、無脊椎動物幼蟲、藻類孢子、原生動物和真菌，Tambjamins 也具有細胞毒性，可用於殺死腫瘤細胞株 [20, 29, 30]。

本研究的標的色素是紫色桿菌素，紫色桿菌 (*Chromobacterium violaceum*) 是最早被發現具有生產紫色桿菌素能力的細菌，後來更多細菌例如 *Collimonas* sp.、*Duganella* sp.、*Iodobacter fluvialis*、*Janthinobacterium lividum*、*Microbulbifer* sp. 及 *Pseudoalteromonas* sp. 也被發現可以生產紫色桿菌素，這些細菌分佈在淡水、海水、以及土壤等環境中 [1, 13, 16, 24, 31, 32]。在細菌體內，生產紫色桿菌素需要色胺酸 (tryptophan)、氧氣、以及紫色桿菌素合成基因 [9]。當紫色桿菌細胞密度增加時，群體感應分子 (quorum sensing molecule) 在細胞中會持續積累，超過一定閾值時，會誘導紫色桿菌素合成基因表達，進而催化紫色桿菌素合成 [2]。紫色桿菌素具有廣泛的生物活性，前人的研究顯示紫色桿菌素具有抗菌活性，特別是對革蘭氏陽性細菌。例如在 5.7 至 15 mg / L 的濃度下，紫色桿菌素能夠抑制多重抗藥性的金黃色葡萄球菌的生長 [21]。紫色桿菌素對於噬菌原蟲與線蟲也具有毒殺性質，當變形蟲 *Acanthamoeba castellanii* 暴露於含有紫色桿菌素溶液，會造成其體內細胞凋亡而死亡 [18]。餵食大腸桿菌的秀麗隱桿

線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) 在實驗室中可以正常健康地生長，但如餵食生產紫色桿菌素的菌株 *Janthinobacterium* sp. HH01 及 *C. violaceum* 則會導致線蟲死亡 [14]，紫色桿菌素的抗菌與毒殺原蟲的特性被認為可以增加紫色桿菌在環境中的生存優勢。

紫色桿菌素具有抗氧化活性，與 β -環狀糊精 (β -cyclodextrin) 共同使用可保護大鼠肝細胞以及胃粘膜免於過氧化損傷 [10]。這種抗氧化的活性可能是來自於紫色桿菌素的共面異構體中的 N7 - H7 的氫原子轉移能力和供給電子的能力 [2]。在紫外光區域 ($\lambda = 310$ nm)，紫色桿菌素有強的吸收峰，這是由於紫色桿菌素具有高度共軛的分子結構，利用紫色桿菌素可以吸收紫外光的特性，將其添加在防曬霜中，可增加防曬霜的防曬係數 (sunscreen protection factors, SPF)，Suryawanshi 等人 (2015) [28] 將紫色桿菌素添加到蘆薈葉和黃瓜果實提取物的防曬霜中，用以增強防曬霜的紫外線吸收能力。紫色桿菌素也被用在紡織工業的纖維染色，在硫脲 (thiourea) 的作用下，紫色桿菌素可將絲線染成藍紫色 [7]。紫色桿菌素也可用作書寫用的墨水，在紙上寫出紫色的字跡 [8]。

紫色桿菌素的用途廣泛，然而市售的紫色桿菌素價格偏高，為了降低紫色桿菌素的生產成本，需要研發新式的生產裝置。在本研究中，我們比較了標準三角錐形瓶、凹槽三角錐形瓶、以及客製化的氣舉式圓柱管生產紫色桿菌素的效率。實驗數據顯示氣舉式圓柱管最適合用於生產紫色桿菌素。

二、材料與方法

(一) 細菌培養

將保存在 -80°C 低溫環境下的紫色桿菌取出，使用移菌環沾取少量菌液，塗抹在 Luria Bertani (LB) 固態培養基上，再將其放置於 28°C 培養箱中進行培養。當紫色桿菌在培養基表面生長成單一菌落時，使用移菌環將菌落接種到含有 3 ml LB 液體培養基的試管中，將試管置於 28°C 培養箱中，培養 18 小時。培養完成後，以分光光度計量測試管內的細菌濃度 (OD_{600} 的數值)。取出適量的菌液，加入含有 150 ml LB 液體培養基的 500 ml 標準三角錐形瓶 ($\emptyset 105 \times 180 \text{H}/\text{mm}$)、500 ml 凹槽三角錐形瓶 ($\emptyset 105 \times 180 \text{H}/\text{mm}$)、以及 450 ml 氣舉式圓柱管 ($\emptyset 40 \times 440 \text{H}/\text{mm}$)，進行紫色桿菌素生產試驗。

(二) 紫色桿菌素生產



裝有菌液的標準三角錐形瓶與凹槽三角錐形瓶，放置於軌道搖床上，以每分鐘 200 轉的轉速進行搖晃培養，裝有菌液的氣舉式圓柱管以軟管與打氣幫浦連接，由幫浦提供氣體，每秒鐘的氣體流量約為 0.3 ml。在培養開始後的特定時間點（例如：24、48、72 小時），取出適量的菌液，進行紫色桿菌素萃取。

（三）紫色桿菌素萃取

將菌液倒入裝有 100 mL 乙酸乙酯的血清瓶中，將瓶子放在磁力攪拌板上，放入磁力攪拌棒進行攪拌，通過攪拌將菌液中的紫色桿菌素萃取到乙酸乙酯溶液中。萃取時間約為 18 小時，萃取完成後，將溶液置於分液漏斗中，待菌液與乙酸乙酯分層後，打開分液漏斗的開關，讓下層的菌液流出，保留含有紫色桿菌素的乙酸乙酯溶液。再將乙酸乙酯溶液置於離心管中，放入離心機，通過離心除去懸浮在乙酸乙酯溶液中的細胞碎片。將乙酸乙酯溶液放入新的離心管中，再將離心管放在抽氣機內，以減壓抽氣法除去乙酸乙酯。待乙酸乙酯完全揮發後，紫色桿菌素粉末會聚集在底部或吸附在管壁上。將 10 ml 乙醇加入離心管，溶解紫色桿菌素粉末。使用 UV-vis 光譜儀測定紫色桿菌素在 575 nm 的吸光度。再以消光係數(extinction coefficient) $\epsilon = 56.01 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ，計算紫色桿菌素的濃度 [19]。

（四）高效能液相層析 (High performance liquid chromatography: HPLC)

使用 HPLC 系統 (Hitachi, Tokyo) 與 Inertsil ODS-3 管柱 (長度 150 mm, 內徑 5 mm, GL Science, Tokyo) 進行紫色桿菌素分離與檢測。流動相 A 由 1% 甲酸組成，流動相 B 由 100% 乙腈組成，流速為每分鐘 0.2 ml。分離程序如下：紫色桿菌素樣品注入管柱後，在 0 至 4 分鐘，使用 90% 流動相 A 與 10% 流動相 B 混合，在 4.1 至 30 分鐘，線性地增加流動相 B 的濃度由 10% 到 88% 溶液 B，在 30.1 至 31 分鐘。將流動相 B 的濃度由 88% 提升至 100%，在 31.1 至 35 分鐘，使用 100% 溶液 B，在 35.1 至 40 分鐘將流動相 B 的濃度由 100% 線性地降至 0%，在 40.1 至 45 分鐘，使用 100% 流動相 A 清洗管柱。清洗完成後，將新的樣品注入分析。

三、結果與討論

（一）紫色桿菌在固態與液態培養基生長情形

紫色桿菌在 LB 固態培養基上形成圓形菌落，生長初期，菌體呈現淡紫色，在接種後 48~72 小時，菌體顏色轉變

成深紫色。紫色桿菌生產的紫色桿菌素因為具有疏水性，當紫色桿菌素自菌體分泌出來後，會吸附在菌體表面，並不會溶於水，因此在培養基表面生長的紫色桿菌所生產的紫色桿菌素不會擴散到培養基內。在 LB 液態培養基內，菌液呈現紫色，此時若是將菌液以高速離心，沉澱菌體，將可發現在離心管底部的菌體呈現紫色，而培養液為淡紫色，可能是破裂的菌體懸浮在培養液中。在培養瓶內壁有時候會發現吸一些紫色顆粒，這些是在培養過程中，在培養液表面的紫色桿菌附著在培養瓶內壁所形成的 (圖 1)。

（二）標準三角錐形瓶、凹槽三角錐形瓶、以及客製化的氣舉式圓柱管之效果分析

在本研究中，我們測試不同通氣方式的培養裝置對紫色桿菌素產量的影響。我們選擇三種微生物培養器具：標準三角錐形瓶、凹槽三角錐形瓶、以及氣舉式圓柱管 (圖 2)。標準三角錐形瓶的底部平滑 (圖 2A)。凹槽三角錐形瓶的底部有三個凸起 (圖 2B，箭頭所示)，當凹槽三角錐形瓶在軌道搖床上搖晃時，瓶內的培養液會與瓶底的凸起產生碰撞擾動，進而增加培養液與瓶內的空氣接觸。

氣舉式圓柱管是由玻璃製成，在管柱的底部連接一根中空的玻璃通氣管 (圖 2C，箭頭所示)，打氣幫浦將氣體經由玻璃通氣管送入管柱底部，當氣泡由底部向上浮起時，會將

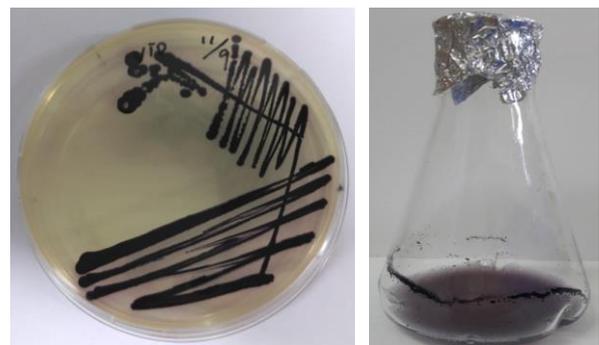


圖 1. 紫色桿菌在 LB 固態以及液態培養基的生長情形

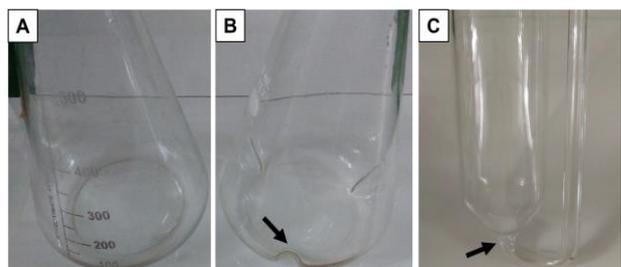


圖 2. 標準三角錐形瓶、凹槽三角錐形瓶、以及氣舉式圓柱管的底部構造



沉積在底部的菌體提起，因此稱之為氣舉式圓柱管。本研究使用的氣舉式圓柱管的長度為 430 mm，管內的直徑為 35 mm。管口有一個玻璃蓋子，在蓋子的頂端有一個空心細管，具有排氣功能。在不影響排氣的情形下，可利用玻璃棉或濾紙將細管塞住，避免空氣中的雜物掉入氣舉式圓柱管中，也可以在打氣幫浦與細管間的連接管上安裝碟型過濾膜(孔徑 $0.45\ \mu\text{m}$)，過濾去除空氣中的微生物。若要同時使用多個氣舉式圓柱管進行培養實驗，可以使用多孔轉接管，將一台打氣幫浦的氣體接到多個氣舉式圓柱管，如果各個圓柱管中裝的培養液體積不同時，會造成壓力差，因此需要調整通氣量，讓各個管柱都能獲得相同的通氣量。圖 3 所呈現的是氣舉式圓柱管的組裝圖，各個圓管柱分別裝有 150、200、300、以及 400 ml 培養液，用來進行紫色桿菌培養。結果顯示，裝有 400 ml 培養液的管柱中，在培養 72 小時後亦可產生紫色桿菌素。

(三) 不同的培養時間對紫色桿菌素產量的影響

如圖 4A 所示，在開始培養後第 6 小時，無論是在標準三角錐形瓶、凹槽三角錐形瓶、或是氣舉式圓柱管內，都紫色桿菌培養在不同培養裝置(標準三角錐形瓶、凹槽三角錐形瓶、以及氣舉式圓柱管)，分別在對數生長期(A)與穩定生長期(B)的時間點，進行紫色桿菌素的萃取與定量分析。沒有紫色桿菌素的產生，直到第 8 小時，在氣舉式圓柱管內的菌液中可以測得紫色桿菌素 ($\text{OD}_{575} = 0.5$)，而在標準三角錐形瓶或是凹槽三角錐形瓶內，仍然無法測得紫色桿菌素。在開始培養後第 10 小時，無論是在標準三角錐形瓶、凹槽三角錐形瓶、或是氣舉式圓柱管內，皆可測得紫色桿菌素，在氣舉式圓柱管內的紫色桿菌素產量最高，其次是在凹槽三角錐形瓶，而在標準三角錐形瓶的產量最低。在開始培養後第 24 小時，在氣舉式圓柱管內的紫色桿菌素產量依然是最高的 ($\text{OD}_{575} = 6.46$)，而在標準三角錐形瓶的產量 ($\text{OD}_{575} = 4.83$) 高於在凹槽三角錐形瓶的產量 ($\text{OD}_{575} = 3.73$)，這些結果用顯示氣舉式圓柱管培養紫色桿菌，可以最快產生紫色桿菌素，且其產量也是最高的。接著，我們延長培養時間，再次比較這三種培養裝置對紫色桿菌素產量的影響。如圖 4B 所示，在開始培養後第 48 小時，紫色桿菌素產量最高的仍是在氣舉式圓柱管內，而在凹槽三角錐形瓶的產量略高於在標準三角錐形瓶的產量。培養後第 72 小時，在氣舉式圓柱管內的紫色桿菌素產量維持最高，其次是在凹槽三角錐形瓶內)，最少的是在標準三角錐形瓶。以消光係數 (extinction

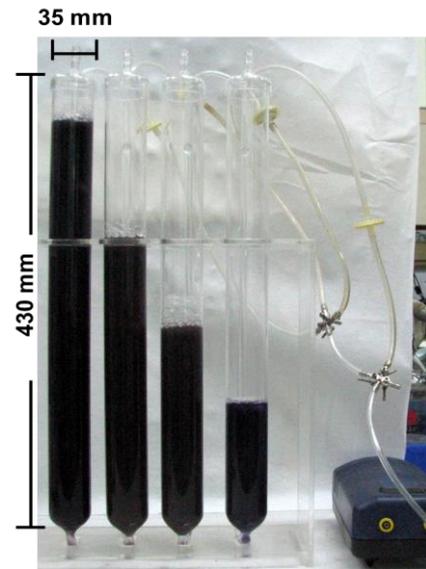


圖 3. 氣舉式圓柱管分別裝有 400、300、200 以及 150 ml 培養液(由左至右)

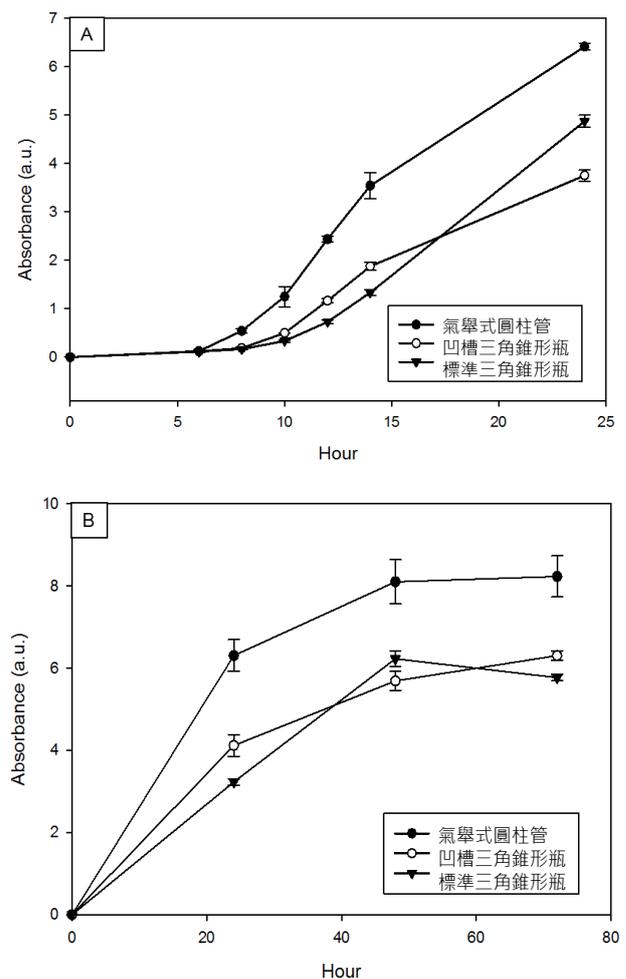


圖 4. 紫色桿菌素在不同的培養時間的產量



coefficient) $\epsilon = 56.01 \text{ mL mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，計算紫色桿菌素的濃度。結果顯示在氣舉式圓柱管內的紫色桿菌素的濃度為 $188.4 \pm 11.6 \text{ }\mu\text{g/ml}$ ，在凹槽三角錐形瓶內的濃度為 $146.0 \pm 2.2 \text{ }\mu\text{g/ml}$ ，在標準三角錐形瓶的濃度為 $132.1 \pm 1.8 \text{ }\mu\text{g/ml}$ 。我們也注意到，在培養後 48 小時的紫色桿菌素的濃度與培養後 72 小時的紫色桿菌素的濃度相近，因此就生產成本而言，以氣舉式圓柱管進行紫色桿菌培養，在培養後第 48 小時，進行紫色桿菌素萃取，可獲得最大的生產效益。

我們注意到在標準三角錐形瓶與凹槽三角錐形瓶的紫色桿菌素的產量相差不大，有時在標準三角錐形瓶的產量甚

至比在凹槽三角錐形瓶產量還高。紫色桿菌在生產紫色桿菌素時需要氧氣，而凹槽三角錐形瓶的氧氣質傳係數(oxygen mass transfer coefficient)比標準三角錐形瓶的高，理應產生更多的紫色桿菌素，然而實驗結果並非如此，因此氧氣傳送量可能不是唯一影響紫色桿菌在生產紫色桿菌素的因素。Yang 等人(2007)使用錐形瓶培養 *Pseudoalteromonas luteoviolacea* 生產紫色桿菌素時，發現攪拌強度(agitation intensities)增加反而會減少紫色桿菌素的產量，他們的結果顯示在 0 和 50 rev min^{-1} 產量最高，在 150 與 200 rev min^{-1} 產量則會下降。紫色桿菌素是疏水性分子，細菌生產出紫色

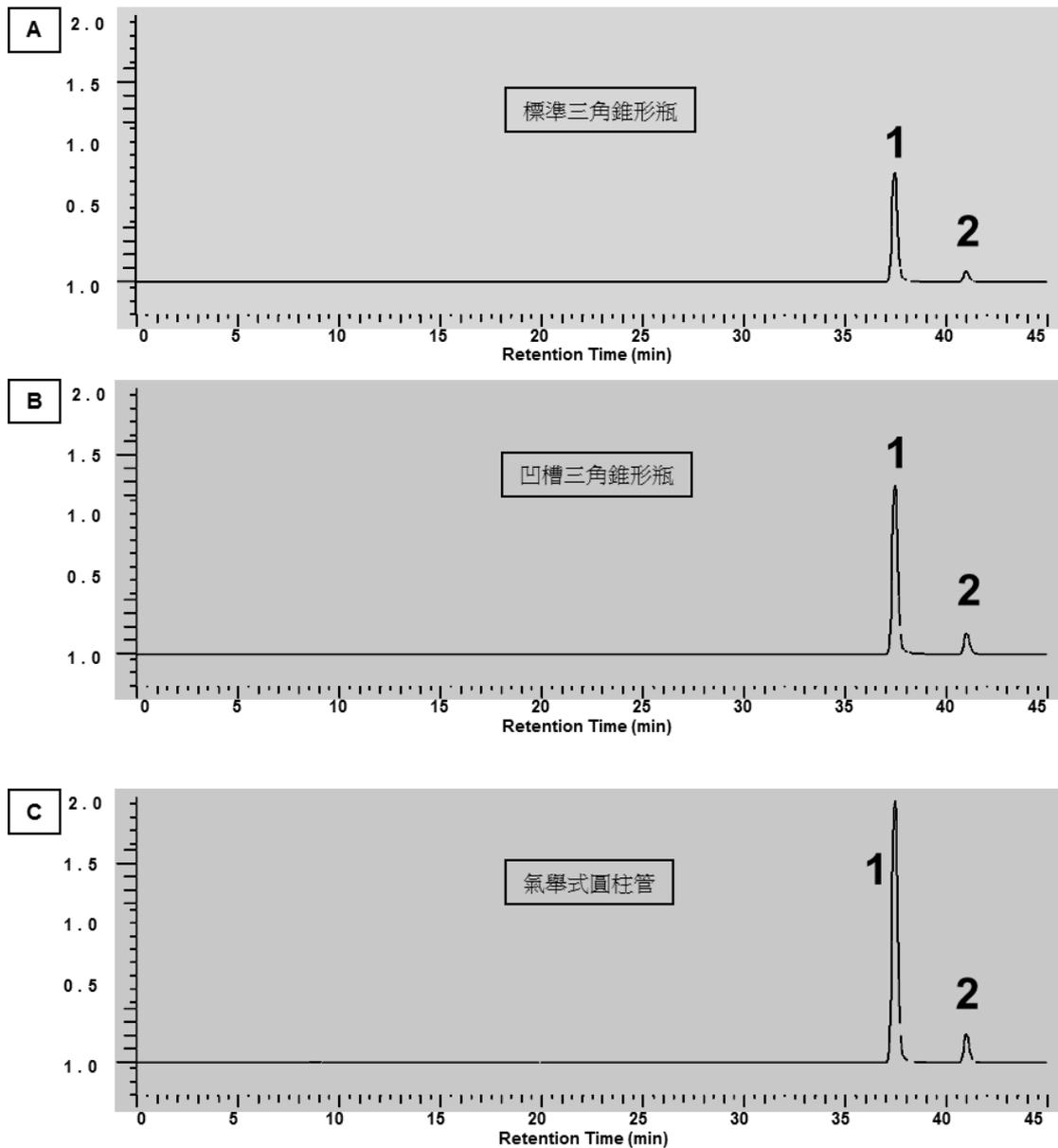


圖 5. 以 HPLC 分離與偵測紫色桿菌素



桿菌素後，紫色桿菌素會聚集在菌體的表面，作者推測攪拌強度影響細菌聚集體，因而造成紫色桿菌素的產量下降 [32]。而氣舉式圓柱管除了提供氧氣，是否也因為不會影響細菌聚集體而增加紫色桿菌素的產量，需要進一步的研究證明。

(四) 以 HPLC 分析紫色桿菌素相對產量

將在標準三角錐形瓶、凹槽三角錐形瓶、以及氣舉式圓柱管內生產的紫色桿菌素分次注射入層析管柱中，進行液相層析。如圖 5 所示，紫色桿菌素皆在流洗時間 37.5 分鐘出現，而以尖峰範圍計算，在標準三角錐形瓶、凹槽三角錐形瓶、以及氣舉式圓柱管的紫色桿菌素產量比值約為 1 : 1.58 : 2.44，再次證實氣舉式圓柱管能生產最高濃度的紫色桿菌素。

在圖 4 中，以分光光度量測吸光值後再以消光係數計算的紫色桿菌素濃度的相對比率與由 HPLC 偵測器獲得的吸光值所獲得的紫色桿菌素濃度比值不相同，這可能是由於分光光度計是直接量測有機溶劑萃取液中的紫色桿菌素吸光值，存在著雜質干擾的情形，這些未知的雜質的濃度也可能受到不同培養條件而改變。利用 HPLC 進行分離萃取液中的紫色桿菌素的過程，得以去除萃取液中的雜質，因此由 HPLC 偵測器獲得的吸光值推算紫色桿菌素濃度與直接量測萃取液中的紫色桿菌素吸光值存在著差異。雖然量測 HPLC 分離純化的紫色桿菌素得到的數據較為精確，但以分光光度量直接量測萃取液較為簡便，因此在許多的紫色桿菌素相關研究中，依然使用分光光度計直接量測萃取液中的紫色桿菌素吸光值，做為紫色桿菌素濃度計算的依據 [9]。

前人的研究指出，在 HPLC 分析中，除了主產物紫色桿菌素，也會出現另一個少量的產物：去氧紫色桿菌素 [8]，在我們的實驗中也發現一個微小的吸收峰在 41.0 分鐘出現。標準三角錐形瓶、凹槽三角錐形瓶、以及氣舉式圓柱管的 HPLC 圖譜中，去氧紫色桿菌素的產量也是在氣舉式圓柱管中產生較多，其含量約為紫色桿菌素的 10.37%。

去氧紫色桿菌素是紫色桿菌素生物合成的副產物，其與紫色桿菌素的差異點是在吡啶環中缺失一個氧原子 [9]。去氧紫色桿菌素與紫色桿菌素具有相似但略有不同的抗菌和抗真菌特性。前人的研究顯示，雖然去氧紫色桿菌素是一種效率較低的抗菌劑，但它是一種更強的抗真菌劑 [31]。

最後，我們也發現去氧紫色桿菌素與紫色桿菌素的相對產量 (OD_{575} 去氧紫色桿菌素 / OD_{575} 紫色桿菌素) 在標準三角錐形瓶、凹槽三角錐形瓶、以及氣舉式圓柱管內皆為相同，顯示培養過程的曝氣量並不會影響去氧紫色桿菌素與紫色桿菌素的相對產量。

四、結論

本研究的實驗結果顯示，以 150 ml 的培養液體進行紫色桿菌培養，氣舉式圓柱管比實驗室中常用的標準三角錐形瓶或是凹槽三角錐形瓶生產更多的紫色桿菌素。氣舉式圓柱管的底面積小，可在實驗室內建置大量的氣舉式圓柱管，高通量地生產突變菌株的紫色桿菌素，尋找更具藥理活性的紫色桿菌素衍生物。

參考文獻

1. Aranda, S., M. Montes-Borrego and B. B. Landa (2011) Purple-pigmented violacein-producing *Duganella* spp. inhabit the rhizosphere of wild and cultivated olives in southern Spain. *Microbial Ecology*, 62(2), 446-459.
2. Balibar, C. J. and C. T. Walsh (2006) In vitro biosynthesis of violacein from l-tryptophan by the enzymes VioA- E from *Chromobacterium violaceum*. *Biochemistry*, 45(51), 15444-15457.
3. Cao, W., W. Chen, S. Sun, P. Guo, J. Song and C. Tian (2007) Investigating the antioxidant mechanism of violacein by density functional theory method. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 817(1-3), 1-4.
4. Carrocho, M., M. F. Barreiro, P. Morales and I. C. Ferreira (2014) Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377-399.
5. Darshan, N. and H. K. Manonmani (2015) Prodigiosin and its potential applications. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5393-5407.
6. Delgado-Vargas, F., A. R. Jiménez and O. Paredes-López (2000) Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains-characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173-289.
7. Durán, M., A. N. Ponezi, A. Faljoni-Alario, M. F. Teixeira, G. Z. Justo and N. Durán (2012) Potential applications of



- violacein: a microbial pigment. *Medicinal Chemistry Research*, 21(7), 1524-1532.
8. Durán, N., G. Z. Justo, M. Durán, M. Brocchi, L. Cordi, L. Tasic, G.R. Castro and G. Nakazato (2016) Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. *Biotechnology Advances*, 34(5), 1030-1045.
 9. Durán, N., G. Z. Justo, C. V. Ferreira, P. S. Melo, L. Cordi and D. Martins (2007) Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 48(3), 127-133.
 10. Durán, N., G. Z. Justo, P. S. Melo, M. B. De Azevedo, A. R. Souza Brito, A. B. Almeida and M. Haun (2003). Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with β -cyclodextrin. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 81(4), 387-396.
 11. El-Fouly, M. Z., A. M. Sharaf, A. A. M. Shahin, H. A. El-Bialy and A. M. A. Omara (2015) Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(1), 36-48.
 12. Engel, E., H. Ulrich, R. Vasold, B. König, M. Landthaler, R. Süttinger and W. Bäumler (2008) Azo pigments and a basal cell carcinoma at the thumb. *Dermatology*, 216(1), 76-80.
 13. Hakvåg, S., E. Fjærvik, G. K. Linkenberget, S. E. Borgos, K. Josefsen, T. Ellingsen and S. Zotchev (2009) Violacein-producing *Collimonas* sp. from the sea surface microlayer of coastal waters in Trøndelag, Norway. *Marine Drugs*, 7(4), 576-588.
 14. Hornung, C., A. Poehlein, F. S. Haack, M. Schmidt, K. Dierking, A. Pohlen, H. Schulenburg, M. Blokesch, L. Plener, K. Jung and A. Bonge (2013) The *Janthinobacterium* sp. HH01 genome encodes a homologue of the *V. cholerae* CqsA and *L. pneumophila* LqsA autoinducer synthases. *PLoS one*, 8(2), e55045.
 15. Laursen, J. B. and J. Nielsen (2004) Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chemical Reviews*, 104(3), 1663-1686.
 16. Logan, N. A. (1989) Numerical taxonomy of violet-pigmented, gram-negative bacteria and description of *Iodobacter fluviatile* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(4), 450-456.
 17. Malik, K., J. Tokkas and S. Goyal (2012) Microbial pigments: a review. *International Journal of Microbial Resource Technology*, 1(4), 361-365.
 18. Matz, C., J. S. Webb, P. J. Schupp, S. Y. Phang, A. Penesyan, S. E. Gan, P. Steinberg and S. Kjelleberg (2008) Marine biofilm bacteria evade eukaryotic predation by targeted chemical defense. *PLoS One*, 3(7), e2744.
 19. Mendes, A. S., J. E. de Carvalho, M. C. Duarte, N. Durán and R. E. Bruns (2001) Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. *Biotechnology Letters*, 23(23), 1963-1969.
 20. Mumtaz, R., S. Bashir, M. Numan, Z. K. Shinwari and M. Ali (2019) Pigments from soil bacteria and their therapeutic properties: a mini review. *Current Microbiology*, 76(6), 783-790.
 21. Nakamura, Y., C. Asada and T. Sawada (2003) Production of antibacterial violet pigment by *psychrotropic bacterium* RT102 strain. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(1), 37-40.
 22. Nelis, H. and A. P. De Leenheer (1991) Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *Journal of Applied Bacteriology*, 70(3), 181-191.
 23. Padhi, B. S. (2012) Pollution due to synthetic dyes toxicity & carcinogenicity studies and remediation. *International Journal of Environmental Sciences*, 3(3), 940.
 24. Pantanella, F., F. Berlutti, C. Passariello, S. Sarli, C. Morea and S. Schippa (2007) Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4), 992-999.
 25. Plonka, P. M. and M. Grabacka (2006) Melanin synthesis in microorganisms-biotechnological and medical aspects. *Acta Biochimica Polonica*, 53(3), 429-443.
 26. Shahid, M. and F. Mohammad (2013) Recent advancements in natural dye applications: a review. *Journal of Cleaner Production*, 53, 310-331.
 27. Soliev, A. B., K. Hosokawa and K. Enomoto (2011) Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011(3), 670349.
 28. Suryawanshi, R. K., C. D. Patil, H. P. Borase, C. P. Narkhede, A. Stevenson, J. E. Hallsworth and S. V. Patil (2015) Towards an understanding of bacterial metabolites prodigiosin and violacein and their potential for use in



- commercial sunscreens. *International Journal of Cosmetic Science*, 37(1), 98-107.
29. Tuli, H. S., P. Chaudhary, V. Beniwal and A. K. Sharma (2015) Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 4669-4678.
30. Venil, C. K., Z. A. Zakaria and W. A. Ahmad (2013) Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065-1079.
31. Wang, H., F. Wang, X. Zhu, Y. Yan, X. Yu, P. Jiang and X. H. Xing (2012) Biosynthesis and characterization of violacein, deoxyviolacein and oxyviolacein in heterologous host, and their antimicrobial activities. *Biochemical Engineering Journal*, 67, 148-155.
32. Yang, L. H., H. Xiong, O. O. Lee, S. H. Qi and P. Y. Qian (2007) Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. *Letters in Applied Microbiology*, 44(6), 625-630.

收件：110.09.22 修正：110.11.16 接受：110.12.17

