

葉綠素衍生物之光敏抗菌研究

楊淑惠^{1,*} 洪千雅²

摘要

楊淑惠、洪千雅。2019。葉綠素衍生物之光敏抗菌研究。台灣農業研究 68(4):341–345。

結合光敏劑與特定光源產生活性氧分子，應用於抑制微生物生長，乃近年常見的抑菌研發技術。本研究將菠菜葉綠素降解，製備成具光敏性的衍生物。經高效液相層析儀 (high performance liquid chromatography; HPLC) 分析顯示，衍生物主要成分為脫鎂葉綠素或脫鎂葉綠酸。經添加於小鼠胚胎纖維細胞，以發光二極體 (light-emitting diode; LED) 藍光 (光量子束密度 $560 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 照射 60 min 或添加於痤瘡桿菌以 $280 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 照射 10 min，或於葡萄球菌照射 30 min，均可增強光過敏反應，而造成細胞或細菌存活率下降。研究顯示，葉綠素衍生物具有光敏性，可應用為抗菌光敏劑。

關鍵詞：葉綠素衍生物、光敏劑、抑菌、LED 藍光。

前言

無所不在的微生物對人們的生活環境、食品保存及人類健康有著威脅性影響，而不當的抑菌藥物使用衍生出具有抗藥性的微生物，而降低了藥效。尋找新型抑菌方法替代傳統抑菌藥物，成為現今重要研究課題，而利用光動力方法抗菌已成為趨勢。光敏物 (photosensitizer) 在光動力抗菌方法 (photodynamic antimicrobial chemotherapy; PACT) 中，扮演關鍵角色。當光敏物吸收光源後，會催化產生活性氧分子 (reactive oxygen species; ROS)，產生有毒性的單態氧 (single oxygen) 或自由基 (free radicals)，達到毒殺細胞或微生物 (Ganz *et al.* 2005; Kharkwal *et al.* 2011) 的效果。例如，青春痘不易治癒，與痤瘡桿菌 (*Propionibacterium granulosum*) 密切相關，光動力抗菌療法施用在治療青春痘上已有明確療效 (Itoh *et al.* 2001; Song *et al.* 2014)，其他食品致病菌及醫院抗藥菌殺滅研究也正推展中。

葉綠素為自然界重要的光合作用色素，葉綠素衍生物的生物相容性遠高於其他化學合成

的光敏感藥物，具有類似血紫質 (porphyrin) 系統的雙氫葉吩類 (chlorins) 結構，其光學物理特性與血紫質系統相似。研究顯示，以葉綠素衍生物作為光敏劑功效與血紫質衍生物 (hematoporphyrin derivative; HpD) 類的光感藥物一樣 (Park *et al.* 1989)。葉綠素被降解後可產生葉綠酸 (chlorophyllide)、脫鎂葉綠素 (pheophytin、phytin) 及脫鎂葉綠酸 (pheophorbide、phorbide)，在植物中很少積累。本研究開發葉綠素降解技術，生產葉綠素衍生光敏物質，並探討添加光敏物質與光照處理對細胞的影響，以確認葉綠素衍生物具光過敏性及細菌生長的影響，以釐清其抑菌功效，相關資料提供後續商業化應用研究和產品品質指標建立之參考。

結果與討論

葉綠素及其衍生物的細胞光過敏試驗

萃取自菠菜的葉綠素，經不同化學處理，所獲得之衍生物質以高效液相層析儀 (high

投稿日期：2019年5月1日；接受日期：2019年8月12日。

* 通訊作者：debbie@fthes-tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所經營利用系副研究員兼系主任。台灣 高雄市。

² 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所經營利用系助理研究員。台灣 高雄市。

performance liquid chromatography; HPLC) 分析並與標準品比對，為脫鎂葉綠素 (pheophytin、phytin) 或脫鎂葉綠酸 (pheophorbide、phorbide)，如圖 1 所示。利用發光二極體 (light-

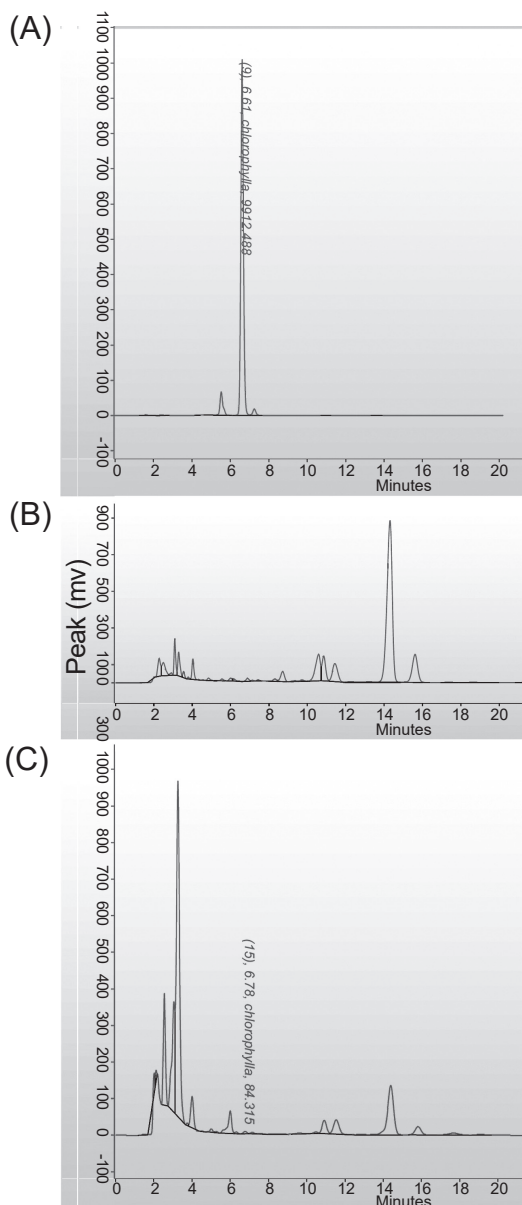


圖 1. 葉綠素 a、脫鎂葉綠素及脫鎂葉綠酸 HPLC 分析圖。

Fig. 1. High performance liquid chromatography (HPLC) assay of chlorophyll a, pheophytin and pheophorbide. (A) Chlorophyll a standard (STD); (B) pheophytin; and (C) pheophorbide.

emitting diode; LED) 藍光 (光量子束密度 $560 \text{ J m}^{-2} 60 \text{ min}^{-1}$) 照射小鼠胚胎纖維細胞 (Sandos inbred mice thioguanine/ouabain-resistant cell; STO cell)，進行 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 細胞存活率測試。如圖 2 所示，與未照光對照組 (PC) 為存活率 100% 比較，照光控制組 (CK) 細胞存活率為 $69.7\% \pm 6.3\%$ ，而添加濃度 $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ 的葉綠素 (chlorophyll a, 標準品) 或葉綠素衍生物 phytin、phorbide 照光處理試驗組，STO 細胞存活率分別為 $29.1\% \pm 3.8\%$ 、 $14.6\% \pm 2.1\%$ 及 $23.4\% \pm 0.5\%$ ，細胞存活率極顯著下降 ($P < 0.01$)。由此顯示，照光造成的細胞傷害，添加葉綠素衍生物會降低細胞存活率，此結果顯示葉綠素衍生物具光敏性，因此接續評估其抑菌功效。

葉綠素光敏物的抗菌試驗

痤瘡桿菌 (*P. granulosum*) 經 reinforced clostridial medium (RCM) 培養液活化、稀釋，取 $100 \mu\text{L}$ 菌液 ($\text{CFU } 10^4 \text{ mL}^{-1}$) 塗布於 RCM 培養基。表面乾燥後，加入濃度 $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 待測試光敏樣品 $100 \mu\text{L}$ ，塗抹均勻。表面乾燥後，以 LED 藍光 ($280 \text{ J m}^{-2} 30 \text{ min}^{-1}$) 照射，移入 37°C 厭氧培養 72 h 進行光敏抗菌試驗，每組做 3 重複。葉綠素光敏物抑菌試驗顯示，與未照光對照組 (PC) 為存活率 100% 比較，照光處理控制組 (CK) 痤瘡桿菌 (*P. granulosum*) 存

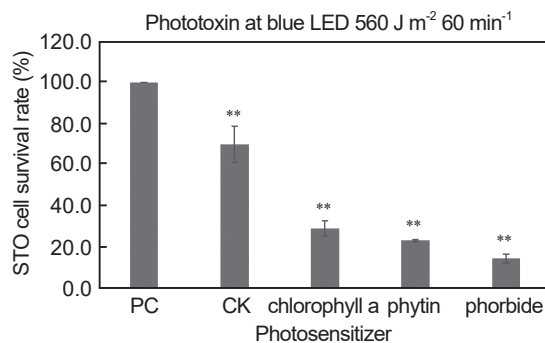


圖 2. 照光及光敏物對小鼠胚胎纖維細胞存活率的影響。

Fig. 2. Effects of illumination and photosensitizer on survival rate of Sandos inbred mice thioguanine/ouabain-resistant (STO) cells.

活率為 $43.8\% \pm 5.9\%$ ，而添加葉綠素 (chlorophyll a, 標準品) 或葉綠素衍生物 phytin、phorbide 照光處理試驗組，痤瘡桿菌存活率分別為 $36.1\% \pm 1.5\%$ 、 $23.8\% \pm 1.2\%$ 及 $8.3\% \pm 0.7\%$ ，如圖 3 所示。顯示痤瘡桿菌本身即含有光敏物質，外加不同光敏物質，可以增加細菌的感光度、提升抑菌效力，脫鎂葉綠酸 (phorbide) 對痤瘡桿菌所引發的光敏抑制效力尤其顯著 ($P < 0.01$)。

葡萄球菌 (*Staphylococcus* sp. BCRC10783) 經 nutrient broth (NB) 活化培養、稀釋，取 $100 \mu\text{L}$ 菌液 ($\text{CFU } 10^4 \text{ mL}^{-1}$) 塗布於 nutrient agar (NA) 培養基，加入濃度 $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 光敏

樣品 $100 \mu\text{L}$ 。表面乾燥後，以 LED 藍光 ($280 \text{ J m}^{-2} 30 \text{ min}^{-1}$) 照射，移入 37°C 培養，每組做 3 重複。抑菌試驗顯示，相對於未照光對照組 (PC) 葡萄球菌所需生長時間 48 h，照光控制組 (CK) 及添加光敏物試驗組，葡萄球菌所需生長時間為 96 h，生長時間比對照組延遲 2 d；照光控制組存活率 $64.1\% \pm 5.5\%$ ，試驗組添加 chlorophyll a, ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$)、phytin ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) 和 phorbide ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) 存活率分別為 $54.3\% \pm 0.2\%$ 、 $44.5\% \pm 0.6\%$ 及 $39.8\% \pm 2.9\%$ ，如圖 4 所示。

適合的光敏劑處理，在可見光藍光 (波長 420–470 nm)、特定照度及光照時間下照射，即能對微生物產生失活作用，是一項簡單安全的抗菌技術。初期試驗顯示，菠菜葉綠素降解所生產的光敏物質，HPLC 分析顯示並非單一成分，而是以 phytin 或 phorbide 為主要成分的混合物，添加於 STO 細胞，痤瘡桿菌 (*P. granulosum*) 或葡萄球菌，確實對 LED 藍光產生光過敏反應，而使存活率下降；而製備葉綠素光敏劑技術相對簡單 (Kang *et al.* 2018)，試樣在冷凍、避光保存一年濃度無顯著變化，具有應用為天然光敏劑來源的潛力。文獻報告顯示，光敏抗菌對格蘭氏陽性菌 [Gram-positive; G(+)] 有效，對格蘭氏陰性菌 [Gram-negative; G(-)] 則否 (Tang *et al.* 2004; Tang *et al.* 2008)，這與菌的組成結構有關 (Malik *et al.* 1992; Min-

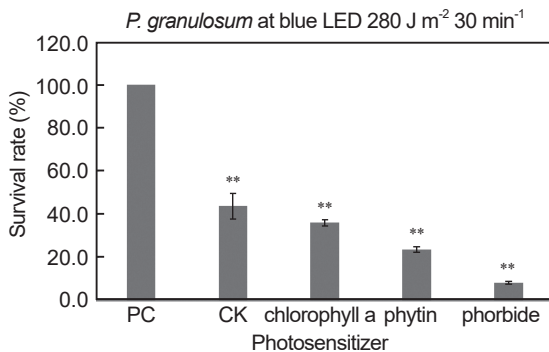


圖 3. 照光及光敏物對痤瘡桿菌存活率的影響。

Fig. 3. Effects of illumination and photosensitizer on survival rate of *Propionibacterium granulosum*.

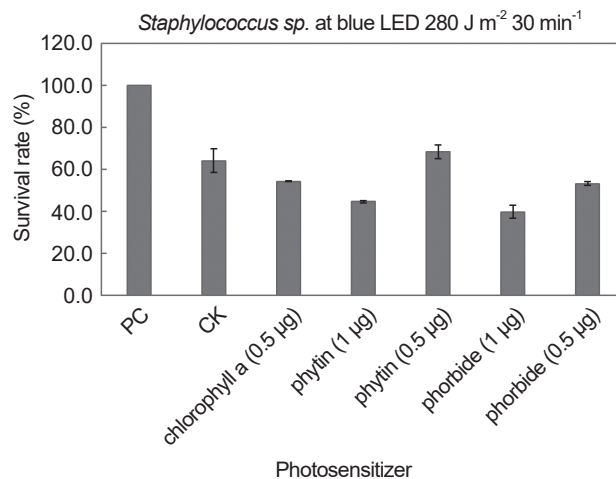


圖 4. 照光及光敏物對葡萄球菌存活率的影響。

Fig. 4. Effects of illumination and photosensitizer on survival rate of *Staphylococcus* sp.

nock *et al.* 2000) , 更進一步的致病性微生物的抑制應用 , 有待後續跨領域投入。

引用文獻

- Ganz, R. A., J. Viveiros, A. Ahmad, A. Ahmadi, A. Khalil, M. J. Tolkoff, N. S. Nishioka, and M. R. Hamblin. 2005. Helicobacter pylori in patients can be killed by visible light. *Lasers Surg. Med.* 36:260–265.
- Itoh, Y., Y. Ninomiya, S. Tajima, and A. Ishibashi. 2001. Photodynamic therapy of acne vulgaris with topical δ -aminolaevulinic acid and incoherent light in Japanese patients. *Br. J. Dermatol.* 144:575–579.
- Kang, Y. R., J. Park, S. K. Jung, and Y. H. Chang. 2018. Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins. *Food Chem.* 245:943–950.
- Kharkwal, G. B., S. K. Sharma, Y. Y. Huang, T. Dai, and M. R. Hamblin. 2011. Photodynamic therapy for infections: Clinical applications. *Lasers Surg. Med.* 43:755–767.
- Malik, Z., H. Ladan, and Y. Nitzan. 1992. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: Problems and possible solutions. *J. Photochem. Photobiol. B.* 14:262–266.
- Minnock, A., D. I. Vernon, J. Schofield, J. Griffiths, J. H. Parish, and S. B. Brown. 2000. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:522–527.
- Park, Y. J., W. Y. Lee, B. S. Hahn, M. J. Han, W. I. Yang, and B. S. Kim. 1989. Chlorophyll derivatives: A new photosensitizer for photodynamic therapy of cancer in mice. *Yonsei Med. J.* 30:212–218.
- Song, B. H., D. H. Lee, B. C. Kim, S. H. Ku, E. J. Park, I. H. Kwon, K. H. Kim, and K. J. Kim. 2014. Photodynamic therapy using chlorophyll-a in the treatment of acne vulgaris: A randomized, single-blind, split-face study. *J. Amer. Acad. Dermatol.* 71:764–771.
- Tang, L., J. P. Cao, K. Wu, W. L. Shao, H. Z. Hu, and G. F. Zhang. 2004. Lethal photosensitization of chlorophyllin ester. *J. Wuxi Univ. Light Ind.* 23:58–61. (in Chinese with English abstract)
- Tang, L., L. Xu, Y. Han, and H. Mao. 2008. Preparation and photosensitive antimicrobial activity of pheophorbide. *Chinese J. Antibio.* 33:474–476. (in Chinese with English abstract)

Antibacterial Photosensitive Activity of Chlorophyll Derivatives

Shu-Hui Yang^{1,*} and Chien-Ya Hung²

Abstract

Yang, S. H. and C. Y. Hung. 2019. Antibacterial photosensitive activity of chlorophyll derivatives. *J. Taiwan Agric. Res.* 68(4):341–345.

The combination of a photosensitizer and a specific light source to generate reactive oxygen species for the inhibition of microbial growth is a developing antibacterial technique. In this study, the chlorophyll of spinach was degraded to prepare photosensitizer chlorophyll derivatives. The results of high performance liquid chromatography (HPLC) analysis showed that the main component was pheophytin or pheophorbide. The photosensitivity could be enhanced and resulted in the decrease of survival rate when pheophytin or pheophorbide was added to Sandos inbred mice thioguanine/ouabain-resistant (STO) cells, *Propionibacterium granulosum* and *Staphylococcus* sp. (BCRC10783), with light-emitting diode (LED) blue light at illuminance of $5.6 \text{ J m}^{-2} 60 \text{ min}^{-1}$, $2.8 \text{ J m}^{-2} 10 \text{ min}^{-1}$ and $2.8 \text{ J m}^{-2} 30 \text{ min}^{-1}$, respectively. The results indicate that chlorophyll derivatives have the photosensitivity property and can be applied as an antibacterial photosensitizer.

Key words: Chlorophyll derivative, Photosensitizer, Antibacterial, LED blue light.

Received: May 1, 2019; Accepted: August 12, 2019.

* Corresponding author, e-mail: debbie@fthes-tari.gov.tw

¹ Associate Research Fellow and Head, Department of Management and Utilization, Fengshan Tropical Horticultural Experimental Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

² Assistant Research Fellow, Department of Management and Utilization, Fengshan Tropical Horticultural Experimental Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.