

MC-Transaction on Biotechnology, 2016, Vol. 8, No. 1, e4

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

月牙藻的生物量與色素含量

楊勝凱、陳淑玲*

銘傳大學 健康科技學院 生物科技學系 (中華民國 台灣 桃園)

中文摘要

液態培養月牙藻至平原期，每公升生物量 3.577 g(鮮重)、乾重 0.573 g，含水量 84%。以乙醚和 80%丙酮萃取色素，得到葉綠素 a 分別是 20.3701 ± 1.432 和 25.0652 ± 1.234 mg/g(乾重)、葉綠素 b 分別是 6.4814 ± 0.619 和 6.5604 ± 0.385 mg(乾重)、類胡蘿蔔素分別是 8.2912 ± 0.466 和 7.9151 ± 0.269 mg/g(乾重)，使用乙醚萃取葉綠素 a 含量較高，達顯著性差異($P < 0.05$)；而葉綠素 b 和類胡蘿蔔素含量並無顯著性的差異。

關鍵字：月牙藻、生物量、葉綠素、類胡蘿蔔素

通訊作者：陳淑玲[shulingc@mail.mcu.edu.tw]

收稿：2016-7-26 修改：2016-9-11 接受：2016-9-14 線上發表：2016-9-22

前 言

月牙藻屬綠藻門(*Chlorophyta*)，綠藻綱(*Chlorophyceae*)，月牙藻屬 (*Selenastrum*)，單細胞，外型呈彎月型。

牙藻在台灣或美國的環保署或其它研究與環境毒物質相關的單位，常用它來作為毒物質之毒性檢測。Martha 在 2016 年探討 *Selenastrum capricornutum* 和 *Scenedesmus acutus* 去除水中的 benzo (α) pyrene (BaP)，結果顯示 *Selenastrum capricornutum* 去除 BaP 的效率較高^[1]。Fernández-Alba 等人(2002)測試甲基第三丁基醚(methyl tert-butyl ether 縮寫為 MTBE)混合敵草隆(Diuron)或 Dichlofluanid (抑菌靈)等有毒物質之毒性測試，*Selenastrum capricornutum* 比 *Vibrio fischeri* 或 *Daphnia magna* 易吸收測試的有毒物質，導致生長明顯受到抑制^[2]。劉(2008)研究水生植物會產生一些抑制藻類生長的抑制物質，其中之一是焦酚，隨著焦酚濃度提高，*Selenastrum capricornutum* 的生長顯著受到抑制，其葉綠素和類胡蘿蔔素的含量也隨之下降^[3]。

Selenastrum sp.行光合作用主色素是葉綠素a，葉綠素b及類胡蘿蔔素是輔助吸收

光的色素。目前已知的類胡蘿蔔素已超過600種，大致上分為兩大類：含有氧原子的葉黃素類(xanthophylls)與及不含氧原子的胡蘿蔔素(carotene)。

人類視網膜上之黃斑區含有大量的感光細胞與黃斑點色素，是眼睛感光最靈敏的區域，倘若受損傷，會造成不可逆的視力喪失。Monica 等人(1992) [4]研究顯示造成黃斑區的傷害與氧化性損傷有關，因此推測黃斑點色素具有吸光和抗氧化的特性。Billy 等人(1997) [5]和 Berendschot 等人(1997) [6]的研究指出攝取葉黃素可以增加黃斑點色素的密度。導致近年來葉黃素錠普遍商品化。

Reger 和 Krauss (1970) [7]探討光照強度對 *Chlorella vanniellii* 色素含量的影響，兩者光照強度相差 20 倍，結果顯示 *Chlorella vanniellii* 處在低光照的環境下更能促進光合作用色素的合成，其中類胡蘿蔔素的含量約是 2 倍。

Ho 等人(2014)[8]將 *Scenedesmus obliquus* FSP-3 和 CNW-N 培養在紅(600~690 nm)、藍(435~515 nm)、綠(480~580 nm)和白光(410~610 nm)的環境中，光照強度都是 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ，分析其葉黃素的含量，結果顯示白光比另三種波長的光更具有促進葉黃素的合成，其中 *Scenedesmus obliquus* FSP-3 在白光與紅光的處理間達到顯著性差異，提升葉黃素量約 17%。

本研究材料 *Selenastrum* sp. MCU008 純化自銘傳大學桃園校區，在進行液態培養時，從水色觀之，推測其類胡蘿蔔素佔總色素的比例可能較高，因此進行本試驗。參考 Chan 等人(2013)對 *Scenedesmus obliquus* CNW-N 使用不同萃取液萃取色素，其中乙醚當溶劑時提升葉黃素的萃取量[9]。本試驗萃取光合作用色素採用 80%丙酮和乙醚當溶劑。

材料與方法

材料：月牙藻(*Selenastrum* sp. MCU008)純化自銘傳大學桃園校區。

培養條件：培養在 25°C 生長箱中，光照強度 600 lux (藍光：紅光 LED 燈管= 2:1)，16 hrs 光照/ 8 hrs 黑暗。

培養基(TAP 培養基)：20 mM Tris-HCl pH7.0, 0.375 mM phosphate buffer pH7.0, 75 mM NH_4Cl , 0.4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.33 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.37 mM H_3BO_3 , 0.9 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (溶在熱的 43 mM EDTA, pH 8.0), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.2 mg/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.2 mg/L), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.8 mg/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.44 mg/L), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.018 mg/L)。

生物量的分析：將藻類培養到平原期(stationary phase)，收集細胞(使用離心機)，稱鮮重，再用 65°C 烘箱烘乾，再稱重量。

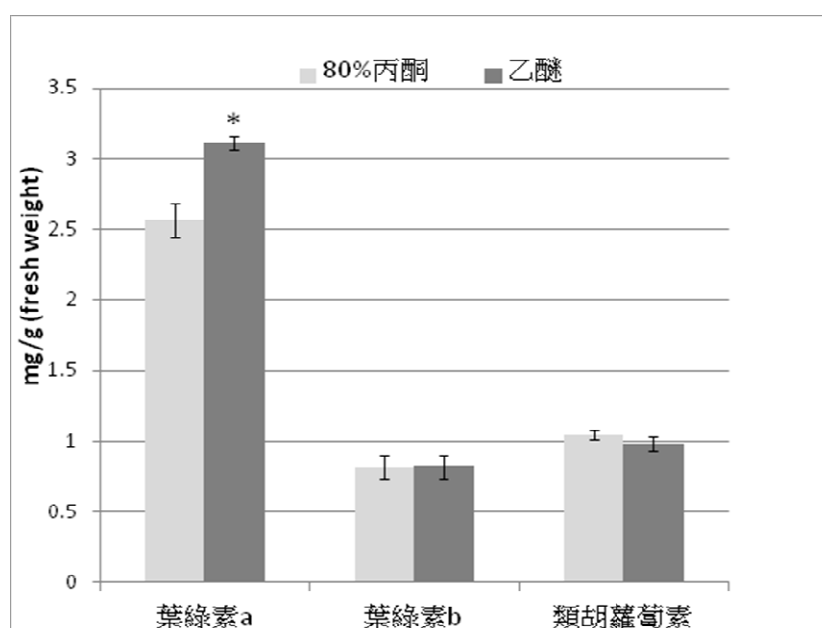
色素分析：使用 80% acetone 和 乙醚當溶劑。定葉綠素 a、b 和類胡蘿蔔素的量是依據 Arnon (1949)提出之公式^[10]，經 Porra 等人(1989)修改^[11]，使用分光光度計測 470, 646.6 和 663.6 nm 的吸光值。葉綠素 a (mg/g)： $[12.25 (A_{663.6}) - 2.55 (A_{646.6})] * (V/1000*W)$ 。葉綠素 b (mg/g)： $[20.31 (A_{646.6}) - 4.91 (A_{663.6})] * (V/1000*W)$ 。類胡蘿蔔素 (mg/g)： $[1000 (A_{470}) - 3.27 (\text{葉綠素 a}) - 104(\text{葉綠素 b})]/227 * (V/1000*W)$ 。(A：吸光值。V：萃取液之總體積(mL)。W：萃取物之重量(g))。

結 果

月牙藻(*Selenastrum* sp. MCU008)液態培養在 TAP 的培養基中，生長到平原期，收集細胞，實驗進行三重複。每公升藻液可收集 3.5778 g 鮮重的月牙藻，經 65°C 烘乾後，重量是 0.5736 g，換算其含水量約是 84% (表一)。

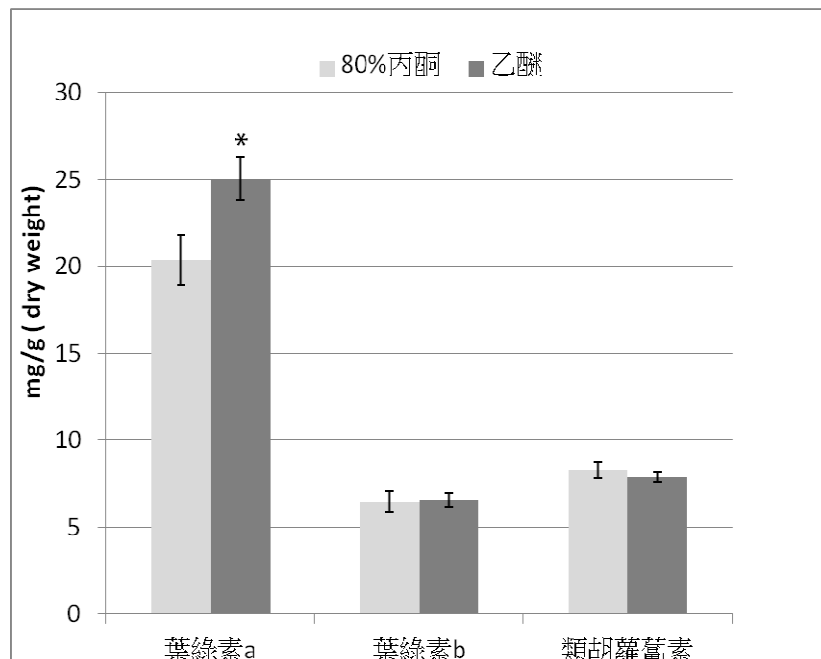
表一、月牙藻(*Selenastrum* sp. MCU008)的生物量與含水量

	鮮重(g)	乾重(g)	含水量
月牙藻	3.5778±0.062	0.5736±0.016	0.8396±0.005



圖一、月牙藻(*Selenastrum* sp. MCU008)色素分析圖(mg/g-鮮重)。圖型上方之*表示兩者間達顯著性差異(P<0.05)。

液態培養月牙藻(*Selenastrum* sp. MCU008)，生長到指數期的後半段時，收集細胞，實驗進行三重複。利用 80%的丙酮和乙醚萃取色素，並計算色素含量。結果呈現在圖一，每公克鮮重使用 80%的丙酮和乙醚萃取，葉綠素 a 的含量分別是 2.565 ± 0.122 和 3.113 ± 0.045 mg，葉綠素 b 的含量分別是 0.8172 ± 0.082 和 0.819 ± 0.081 mg，類胡蘿蔔素的含量分別是 1.0445 ± 0.036 和 0.9852 ± 0.049 mg。換算成每公克乾重色素的含量之結果在圖二，使用 80%的丙酮和乙醚萃取，葉綠素 a 的含量分別是 20.3701 ± 1.432 和 25.0652 ± 1.234 mg，葉綠素 b 的含量分別是 6.4814 ± 0.619 和 6.5604 ± 0.385 mg，類胡蘿蔔素的含量分別是 8.2912 ± 0.466 和 7.9151 ± 0.269 mg。只有葉綠素 a 以乙醚當溶劑其萃取量高於 80%丙酮，且達到顯著性的差異($P < 0.05$)。葉綠素 b 兩者萃取量十分接近，類胡蘿蔔素雖然是 80%丙酮萃取量稍高，但並未達到顯著性的差異($P < 0.05$)。



圖二、月牙藻(*Selenastrum* sp. MCU008)色素分析圖(mg/g-乾重)。圖型上方之*表示兩者間達顯著性差異($P < 0.05$)。

討 論

Chan等人(2013) [9] 用乙醚萃取*Scenedesmus obliquus* CNW-N每克乾重約含有7.2 mg的類胡蘿蔔素，本試驗的月牙藻(*Selenastrum* sp. MCU008) 含7.92 g，其類胡蘿蔔素的含量高於*Scenedesmus obliquus* CNW-N。而*Scenedesmus obliquus* CNW-N的葉黃素約佔類胡蘿蔔素35%，並且顯示使用乙醚當溶劑的萃取量是80%丙酮的1.2倍。本試驗雖也使用這兩種溶劑進行萃取，但得到類胡蘿蔔素的含量兩者間並沒有顯著性的差異。然葉黃素只是類胡蘿蔔素的一種，本實驗並未進一步分析類胡蘿蔔素的種類與含量，在此無法更明確進行比較。

Reger和Krauss (1970)^[7]探討光照強度對*Chlorella vanniellii*色素含量的影響，萃取色素採用甲醇當溶劑，他們使用的低光照與本試驗的光照強度接近，當*Chlorella vanniellii*生長在低光照環境中，每公克乾重含有37.99 mg的葉綠素a，12.39 mg的葉綠素b 和5.2 mg的類胡蘿蔔素。每公克乾重的*Chlorella vanniellii*所含葉綠素a和b，分別高於月牙藻(*Selenastrum* sp. MCU008) 17.62 mg和5.91 mg，約是月牙藻(*Selenastrum* sp. MCU008)的1.9倍。*Chlorella vanniellii*和月牙藻(*Selenastrum* sp. MCU008)之葉綠素a：b都接近3：1。但類胡蘿蔔素每公克乾重卻比月牙藻(*Selenastrum* sp. MCU008)少3.09 mg，月牙藻(*Selenastrum* sp. MCU008)的類胡蘿蔔素約是它的1.6倍。*Chlorella vanniellii*的類胡蘿蔔素約佔總色素9.35%，月牙藻(*Selenastrum* sp. MCU008)約佔23.6%。以溶劑的性質觀之，甲醇萃取類胡蘿蔔素的效果會比80%丙酮差，這也可能造成每公克乾重*Chlorella vanniellii*，只有5.2 mg的類胡蘿蔔素。

參考文獻

- [1] García de Llasera MP, Olmos-Espejel JJ, Díaz-Flores G, Montañó-Montiel A: Biodegradation of benzo (α) pyrene by two freshwater microalgae *Selenastrum capricornutum* and *Scenedesmus acutus*: a comparative study useful for bioremediation. *Environ Sci Pollut Res* 2016, 23:3365–3375.
- [2] Fernández-Alba AR, Piedra L, Mezcua M, and Hernando MD: Toxicity of single and mixed contaminants in seawater measured with acute toxicity bioassays. *Sci. World J* 2002, 2:1115–1120.
- [3] 劉碧云、周培疆、吳振斌、李紅慶：焦酚對藍藻和綠藻生長、光合色素及微量元素的作用。《武漢大學學報(理學版)》2008，6:719-724.
- [4] Paz ML, Anderson RE: Region and age-dependent variation in susceptibility of the human retina to lipid peroxidation. *Inves Ophthalmol Vis Sci* 1992, 33:3497-3499.
- [5] Hammond BR, Johnson EJ, Russell RM, Krinsky NI, Yeum K, Edwards RB, Nodderly DM: Dietary modification of human macular pigment density. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997, 38:1795-1801.
- [6] Berendschot TTJM, Goldbohm RA, Klopping WAA, van de Kraats J, van Norel J, van Norren D: Influence of lutein supplementation on macular pigment, assessed with two objective techniques. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, 41:3322–3326.
- [7] Reger BJ and Krauss RW: The photosynthetic response to a shift in the chlorophyll a to chlorophyll b ratio of *Chlorella*. *Plant Physiol* 1970, 46:568-575.
- [8] Ho SH, Chan MC, Liu CC, Chen CY, Lee WL, Lee DJ, Chang JS: Enhancing lutein

productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies . *Bioresource Technol* 2014, 152:275–282.

[9] Chan MC, Ho SH, Lee DJ, Chenc CY, Huang CC, Chang JS: Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Biochem Engineering J* 2013, 78:24– 31.

[10] Arnon DI: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in beta vulgaris. *Plant Physiol.* 1949, 24:1–15.

[11] Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE: Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectrometry. *Biochem Biophys Acta* 1989, 975: 84-394.

The Biomass and Pigment Content of *Selenastrum* sp.

Sheng-Kai Yang and Shu-Ling Chen*

Department of Biotechnology, Ming Chuan University, Gui-Shan 333, Taoyuan, Taiwan, R.O.C

Abstract

Selenastrum sp. MCU008 using liquid culture to the stationary phase, can be harvested biomass 3.577 g (fresh weight), 0.573 g (dry weight), its water content is 84%. Its pigment was extracted by diethyl ether or 80% acetone. The content of chlorophyll a are 20.3701 ± 1.432 and 25.0652 ± 1.234 mg/g (dry w.), chlorophyll b are 6.4814 ± 0.619 and 6.5604 ± 0.385 mg/g (dry w.), carotenoids are 8.2912 ± 0.466 and 7.9151 ± 0.269 mg/g (dry w.). Extracted with diethyl ether got a higher content of chlorophyll a and had significant difference ($P < 0.05$), but the content of chlorophyll b and carotenoid had no significant difference.

Keywords: *Selenastrum* sp. MCU008, biomass, chlorophyll, carotenoid

Corresponding author: Shu-Ling Chen [shulingc@mail.mcu.edu.tw]

Received 7-26-2016 / Revised 9-11-2016 / Accepted 9-14-2016 / Online published 9-22-2016

MC-Transaction on Biotechnology, 2016, Vol. 8, No. 1, e4

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.