

MC-Transaction on Biotechnology, 2016, Vol. 8, No. 1, e3

©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.

## 長期保存小球藻和月牙藻

林仕敏<sup>‡</sup>、李芷娟<sup>‡</sup>、林宥融、楊勝凱、王派仁、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

七株小球藻(*Chlorella* sp. MCU001、MCU009、MCU011、MCU012、MCU013、MCU014、TB007)和月牙藻(*Selenastrum* sp. MCU008)採用液態氮快速冷凍保存在-80°C,都達到良好的保存效果。這八株綠藻使用 15% maltose 當抗凍劑,除小球藻 MCU001 外,都可以保存一年。小球藻 MCU001、MCU009、MCU012 和月牙藻 MCU008 都可以在 7.5% glycerol + 7.5% maltose 中保存一年。採用漸進式的冷凍保存在-20°C,小球藻 TB007 在 15% maltose 中可以保存一年,而月牙藻 MCU008 在 7.5% glycerol + 7.5% maltose 中可保存六個月。15% maltose 或 7.5% glycerol + 7.5% maltose 適宜當做這八株藻類的抗凍劑。

關鍵字：小球藻 MUC、小球藻 TB007、月牙藻 MCU008、maltose、glycerol、抗凍劑

\*通訊作者：陳淑玲[shulingc@mail.mcu.edu.tw]

<sup>‡</sup>李芷娟和林仕敏有同等貢獻

收稿：2016-7-29 修改：2016-9-11 接受：2016-9-14 線上發表：2016-9-22

### 前 言

小球藻歸屬於綠藻門(*Chlorophyta*)、綠球藻綱(*Chlorophyceae*)、綠球藻目(*Chlorococcales*)、綠球藻科(*Chlorellaceae*)、綠球藻屬(*Chlorella*)。單細胞,呈球形,大小約 2~8 μm,是水中常見的單細胞綠藻。有些種類已被商品化,目前市面上販售各種小球藻的保健食品。

月牙藻歸屬於綠藻門(*Chlorophyta*),綠藻綱(*Chlorophyceae*),月牙藻屬(*Selenastrum*)。單細胞,呈彎月型,常作為檢測環境毒物質之毒性等相關研究。

研究進行中,研究材料來源的穩定性是十分重要,因此材料須有良好的保存方法。在微生物的保存,甘油(glycerol)是最常用作抗凍劑(cryoprotectant),甘露醇(mannitol)或蔗糖(sucrose)也用於細胞的冷凍保存。近年來也使用海藻糖(trehalose)

當作抗凍劑<sup>[1]</sup>。Hwang和Homeland (1965)<sup>[2]</sup> 試驗保存23株藻類(隸屬五屬)，使用10%甘油當作抗凍劑，以1°C/min的降溫速率，降溫到-30°C，再將它們置於-165~-196°C中，可以保存19~36個月。1966年，Hwang<sup>[3]</sup>使用同樣的方法保存56株的Phycomycetes、44株Ascomycetes、9株的Basidiomycetes、33株fungi imperfecti、20株的mycelia sterilia，也同樣得到良好的保存成效。

Canavate 和 Lubian (1994)<sup>[4]</sup>測六種海生藻類對二甲基亞砜(dimethyl sulfoxide; DMSO)的耐受度，顯示5%是其最高濃度。Canavate 和 Lubian (1995)<sup>[5]</sup>再度探討海生藻類的冷凍保存測試，他們使用低鹽(20%)和高鹽(36%)兩種濃度再分別搭配5或15% DMSO，進行3~7週的試驗，結果顯示高鹽中含有15% DMSO對研究材料有較好的保護效果。Joseph et al. (2000)<sup>[6]</sup>進行三種海藻 *Tetraselmis gracilis*、*Chlorella marina* 和 *Chaetoceros calcitrans* 對 DMSO 和甘油耐受性的測試，建議兩者當抗凍劑的濃度分別是5% 和10%。

本研究室自銘傳大學桃園校區與桃園市八德區純化之七株小球藻，和純化自銘傳大學桃園校區之月牙藻。為使藻株穩定性，良好保存且延續性是必需的，因此良好保存方式是須建立。

## 材料與方法

**材料：**純化自銘傳大學桃園校區六株小球藻分別是 *chlorella* sp. MCU001、MCU009、MCU011、MCU012、MCU013、MCU014，純化自桃園市八德區的小球藻 *chlorella* sp. TB007，和純化自銘傳大學桃園校區之月牙藻 *Selenastrum* sp. MCU008。

**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 (用 acetatic acid 滴定，pH7.0)、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (108 mg/L)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (56 mg/L)、NH<sub>4</sub>Cl (0.4 g/L)、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.1 g/L)、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (50 mg/L)、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (70 mg/L)、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1.25 mg/L，溶在70~80°C 12.5 mg/L 的EDTA，pH 8.0)、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.2 mg/L)、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.2 mg/L)、MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (1.8 mg/L)、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.44 mg/L)、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.018 mg/L)。

**小球藻的保存：**將小球培養到藻數約5X10<sup>6</sup>個/mL，收集細胞，使用三種抗凍劑，再個別分成兩種方式處理，保存時藻數約10<sup>8</sup>個/mL。總共有6種處理：ML、MF、GML、GMF、GL和GF。M：15% maltose。GM：7.5% glycerol + 7.5% maltose。G：50% glycerol。L：漸進式冷凍，先將樣品放入4°C中8小時，再移至-20°C中保存。F：用液態氮快速冷凍後，立即放入-80°C中保存。各處理中都含有0.3% DMSO。

**小球藻的存活分析：**這八株藻類保存後，第1、2、3、6、12個月，個別進行存

活分析。分析液態氮快速冷凍保存在-80°C 的樣品：先將樣品移到-20°C 冰箱 4~8 hrs，再移到 4°C 冰箱 4~8 hrs，再移到室溫 2 hrs，再使用平板包埋，再放入生長箱中培養。分析漸進式冷凍保存在-20°C 的樣品：先將樣品移到 4°C 冰箱 4~8 hrs，再移到室溫 2 hrs，再使用平板包埋，再放入生長箱中培養。平板包埋之培養基：下層是含 1.5% 洋菜的 TAP 培養基，上層是含 6.5% agarose TAP 培養基(總體積 6 mL)。過程使用水浴槽的溫度是 42°C。

## 結 果

採用漸進式冷凍保存在-20°C 之樣品分析，7 株小球藻的結果列在表一，只有 BT007 達到良好的保存效果，在使用 15% maltose 當抗凍劑時，至少可以保存一年；使用 7.5% glycerol + 7.5% maltose 當抗凍劑時，可以保存半年。其中 MCU011、MCU013 和 MCU014 都無法達到保存效果。MCU001、MCU009 和 MCU012 在使用 7.5% glycerol + 7.5% maltose 當抗凍劑時，分別可以保存 1、1 和 3 個月。月牙藻 MCU008 在 15% maltose 中可以保存 2 個月；在 7.5% glycerol + 7.5% maltose 中可以保存半年(表三)。

採用液態氮快速冷凍保存在-80°C 的樣品，分析 7 株小球藻的結果列在表二，七株小球藻都達到良好的保存效果。使用 15% maltose 當抗凍劑，至少可以保存一年的小球藻株有：MCU009、MCU011、MCU012、MCU013、MCU014 和 BT007。使用 7.5% glycerol + 7.5% maltose 當抗凍劑，至少可以保存一年的小球藻株有：MCU001、MCU009 和 MCU012；可保存 3 個月的是小球藻 MCU011。50% glycerol 無法當作這七株小球藻冷凍保存的抗凍劑，因在不同時間點都測不到藻株的存活。月牙藻 MCU008 使用 15% maltose 或 7.5% glycerol + 7.5% maltose 當抗凍劑，至少都可以保存 1 年；50% glycerol 也無法當它的冷凍保存的抗凍劑(表三)。

依據漸進式冷凍保存在-20°C 和液態氮快速冷凍保存在-80°C 中的樣品分析結果，這七株小球藻可以歸類為三群。銘傳大學桃園校區純化之六株小球藻歸為兩群，MCU001、MCU009 和 MCU012 是一群，MCU011、MCU013 和 MCU014 是一群，純化自桃園八德區的 TB007 獨自成一群。因從漸進式冷凍保存在-20°C 的樣品分析結果觀之，MCU001、MCU009 和 MCU012 在 7.5% glycerol + 7.5% maltose 處理，可以分別保存 1、1 和 3 個月；MCU011、MCU013 和 MCU014 這一群之所有處理，在不同的時間點分析，都無法偵測到存活。純化自桃園八德區的小球藻 TB007 在 15% maltose 至少可以保存一年；在 7.5% glycerol + 7.5% maltose 可以保存半年。這三群的歸納也符合液態氮快速冷凍保存在-80°C 中的樣品分析結果。

依據液態氮快速冷凍保存在-80°C 的樣品分析結果，做為推薦本試驗八株單細胞綠藻低溫保存最適宜的抗凍劑。小球藻第一群(MCU001、MCU009 和 MCU012)適宜使用 7.5% glycerol + 7.5% maltose 當抗凍劑，若採用液態氮快速冷凍保存在-80°C，至少可以保存一年。小球藻第二群(MCU011、MCU013 和 MCU014)適宜使

用 15% maltose 當抗凍劑，若採用液態氮快速冷凍保存在-80°C，至少可以保存一年。小球藻第三群(TB007)適合使用 15% maltose 當抗凍劑，若使用液態氮快速冷凍保存在-80°C 或漸進式冷凍保存在-20°C，兩者至少都可以保存一年。月牙藻 MCU008 適宜使用 7.5% glycerol + 7.5% maltose 當抗凍劑，若採用液態氮快速冷凍保存在-80°C，至少可以保存一年；若採用漸進式冷凍保存在-20°C，可以保存半年。

表一：漸進式冷凍保存小球藻株，一年間分析存活的結果。

小球藻株/處理/月份		1	2	3	6	12
MCU001	ML	-	-	-	-	-
	GML	+	-	-	-	-
	GL	-	-	-	-	-
MCU009	ML	-	-	-	-	-
	GML	+	-	-	-	-
	GL	-	-	-	-	-
MCU011	ML	-	-	-	-	-
	GML	-	-	-	-	-
	GL	-	-	-	-	-
MCU012	ML	-	-	-	-	-
	GML	+	+	+	-	-
	GL	-	-	-	-	-
MCU013	ML	-	-	-	-	-
	GML	-	-	-	-	-
	GL	-	-	-	-	-
MCU014	ML	-	-	-	-	-
	GML	-	-	-	-	-
	GL	-	-	-	-	-
TB007	ML	+	+	+	+	+
	GML	+	+	+	+	-
	GL	-	-	-	-	-

+：存活。-：測不到存活。M: 15% Maltose 縮寫。GM: 7.5% Glycerol +7.5% Maltose 縮寫。G: 50% Glycerol 縮寫。L: 漸進式冷凍保存在-20°C 的縮寫。

表二：快速冷凍保存小球藻株，一年間分析存活的結果。

小球藻編號/處理/月份		1	2	3	6	12
MCU001	MF	-	-	-	-	-
	GMF	+	+	+	+	+
	GF	-	-	-	-	-
MCU009	MF	+	+	+	+	+
	GMF	+	+	+	+	+
	GF	-	-	-	-	-
MCU011	MF	+	+	+	+	+
	GMF	+	+	+	+	+
	GF	-	-	-	-	-
MCU012	MF	+	+	+	+	+
	GMF	+	+	+	+	+
	GF	-	-	-	-	-
MCU013	MF	+	+	+	+	+
	GMF	-	-	-	-	-
	GF	-	-	-	-	-
MCU014	MF	+	+	+	+	+
	GMF	-	-	-	-	-
	GF	-	-	-	-	-
BT007	MF	+	+	+	+	+
	GMF	-	-	-	-	-
	GF	-	-	-	-	-

+：存活。-：測不到存活。M: 15% Maltose 縮寫。GM: 7.5% Glycerol +7.5% Maltose 縮寫。  
G: 50% Glycerol 縮寫。F:液態氮快速冷凍保存在-80°C 的縮寫。

## 討 論

Hwang 和 Homeland ( 1965) [2]使用 10%甘油作為抗凍劑保存 23 株藻類(隸屬五屬)，以 1°C/min 的降溫速率，降溫到-30°C，再保存在-165~-196°C 中，可保存 19~36

個月，在恢復培養中，觀察到兩種眼蟲活動能力下降。Hwang 在 1966 年<sup>[3]</sup>使用同樣的方法保存 167 株真菌，一樣達到良好的保存效果。

**表三：**漸進式冷凍和快速冷凍保存月牙藻 MCU008，一年間分析存活的結果。

處理/月份	1	2	3	6	12
ML	+	+	-	-	-
GML	+	+	+	+	-
GL	-	-	-	-	-
GMF	+	+	+	+	+
GMF	+	+	+	+	+
GF	-	-	-	-	-

+：存活。-：測不到存活。M: 15% Maltose 縮寫。GM: 7.5% Glycerol +7.5% Maltose 縮寫。G: 50% Glycerol 縮寫。L: 漸進式冷凍保存在-20°C的縮寫。F:液態氮快速冷凍保存在-80°C。

2000年<sup>[6]</sup>針對*Tetraselmis gracilis*、*Chlorella marina*和*Chaetoceros calcitrans*這三種海藻在2 hrs內，對不同濃度DMSO和甘油耐受性的測試，結果顯示*Chaetoceros calcitrans*對較高濃度的甘油和DMSO具有較大的耐受性，*Chaetoceros calcitrans*在5%、10%、15%、20%、25%、30%甘油，或5%、10%、15% DMSO，生長不受影響，甚至於有促進生長的作用；*Tetraselmis gracilis*處理2 hrs後，在5%、10%、15%甘油和5%、10%、15% DMSO的生長率約是對照組的80%；*Chlorella marina*處理2 hrs後，在5%、10%、15%甘油和5% DMSO的生長率約是對照組90%。從他們的實驗結果顯示，甘油對不同藻類生長的抑制性並不相同。

本試驗的方是參考Hwang和Homeland<sup>[2]</sup>及Joseph *et al.*<sup>[6]</sup>的研究成果，顯示不同藻株對甘油濃度之抑制效果並不同，所以在進行本實驗之前，更進行不同濃度的甘油(glycerol)、蔗糖(sucrose)、甘露醇(mannitol)與麥芽糖(maltose)處理藻株之冷凍測試，得到最佳抗凍劑的處理濃度：15% maltose和7.5% glycerol + 7.5% maltose，至於50% glycerol當處理組之一，是因此濃度在-20°C中呈液態，具有使用之便利性。

小球藻株第一群(MCU001、MCU009、MCU012)和第二群(MCU011、MCU013、MCU014)，都純化自銘傳大學桃園校區校園內不同區域。依據快速冷凍保存在-80°C的樣品分析結果顯示，MCU001和MUC013、MCU014分別位於兩群的兩端，因MCU001只能用7.5% glycerol + 7.5% maltose當抗凍劑，MUC013和MCU014

只能用 15% maltose 當抗凍劑。MUC011 雖在第二群，但較靠近第一群，因它可以在 7.5% glycerol + 7.5% maltose 中可保存六個月。第一群的 MCU009 和 MCU011 是靠近第二群的，因都可以在 15% maltose 中至少保存一年。實際的親緣性關係是否也與本試驗結果顯示相符，須以 DNA 定序比對之後，才能更明確的確定之間的親緣性。

## 致 謝

感謝蘇柏鴻和吳韻茹進行本實驗抗凍劑濃度的前測試，讓本試驗得以便利進行。感謝丁肇伶對本試驗進行的協助。

## 參考文獻

- [1] Israeli E, Shaffer BT, Lighthart B: Protection of freeze-dried *Escherichia coli* by trehalose upon exposure to environmental conditions. *Cryobiology* 1993, 30:519-523.
- [2] Hwang SW, Homeland W: Survival of algal cultures after freezing by controlled and uncontrolled cooling. *Cryobiology* 1995, 1:305-311.
- [3] Hwang SW: Long-term preservtion of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. *Appl Microbiol* 1966, 14:784-788.
- [4] Canavate JP, Lubian LM: Tolerance of six marine microalgae to the cryoprotectants DMSO and methanol. *J Phycol* 1994, 30:559-565.
- [5] Canavate JP, Lubian LM: Relationship between cooling rates cryoprotectant concentrations and salinities in the cryopreservation of marine microalgae. *Mar Biol* 1995, 124:325-334.
- [6] Joseph I, Panigrahi A, Chandra PK: Tolerance of three marine microalgae to cryoprotectants dimethyl sulfoxide, methanol and glycerol. *Indian J Mar Sci* 2000, 29:243-247.

# Long-term Preservation of *Chlorella* sp. and *Selenastrum* sp.

Shi-Min Lin<sup>#</sup>, Jai-Jing Lee<sup>#</sup>, Yu-Jung Lin, Sheng-Kai Yang, Pai-Ren Wang and Shu-Ling Chen<sup>\*</sup>

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

## Abstract

Seven *Chlorella* sp. strains, MCU001, MCU009, MCU011, MCU012, MCU013, MCU014, TB007, and *Selenastrum* sp. MCU008 were rapidly freezed by liquid nitrogen, and then to put in the -80°C refrigerator, they got well preservation for one year. They could be kept for one year, when they were in 15% maltose, except *Chlorella* sp. MCU001. *Chlorella* sp. MCU001, MCU009, MCU012, and *Selenastrum* sp. MCU008 could be preserved in 7.5% glycerol + 7.5% maltose for one year. They were freezed by progressive frozen, and then to put in the -20°C refrigerator. *Chlorella* sp. TB007 was immersed by 15% maltose, could be kept for one year. *Selenastrum* sp. MCU008 was immersed by 7.5% glycerol + 7.5% maltose, could be kept for six months. 15% maltose or 7.5% glycerol + 7.5% maltose can be used as antifreeze for these eight algae.

Keywords: *Chlorella* sp. MCU, *Chlorella* sp. TB007, *Selenastrum* sp. MCU008, maltose, glycerol, antifreeze

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

<sup>#</sup>Jai-Jing Lee and Shi-Min Lin have contributed equally in this paper.

Received 7-29-2016 / Revised 9-11-2016 / Accepted 9-14-2016 / Online published 9-22-2016

---

MC-Transaction on Biotechnology, 2016, Vol. 8, No. 1, e3

©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.