

MC-Transaction on Biotechnology, 2019, Vol. 10, No. 1, e1

©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.

***Scenedesmus* sp. MCU003、MCU008 和 MCU010 的色素分離與定量分析**

李佶鴻、王健文、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

Scenedesmus sp. MCU003、MCU008 和 MCU010 培養在溫度 25 ~ 28°C，光照強度 55 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ ，16hr 光照/ 8hr 黑暗。*Scenedesmus* sp. MCU003、MCU008 和 MCU010 的葉綠素含量分別為 32.92 ± 13.19 (a/b, $27.22 \pm 11.24 / 5.69 \pm 1.95$)、 58.98 ± 3.09 (a/b, $51.15 \pm 2.74 / 7.83 \pm 0.35$)和 13.24 ± 1.03 (a/b, $10.15 \pm 0.61 / 3.1 \pm 0.52$) mg/g D.W.；類胡蘿蔔素含量分別為 7.41 ± 0.93 、 16.77 ± 0.15 和 6.37 ± 0.82 mg/g D.W.；葉黃素的含量分別為 6.72 ± 0.11 、 14.50 ± 0.42 和 5.48 ± 0.03 mg/g D.W.。顯示葉綠素、類胡蘿蔔素和葉黃素的含量都是 *Scenedesmus* sp. MCU008 最高，並且與其它兩株藻都達到顯著性的差異(n=5; t test, $p < 0.05$)。*Scenedesmus* sp. MCU008 有高含量的葉黃素 14.50 ± 0.42 mg/g D.W.， $0.73 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 低產率。

關鍵字：柵藻、葉綠素、類胡蘿蔔素、葉黃素

通訊作者：陳淑玲[shulingc@mail.mcu.edu.tw]

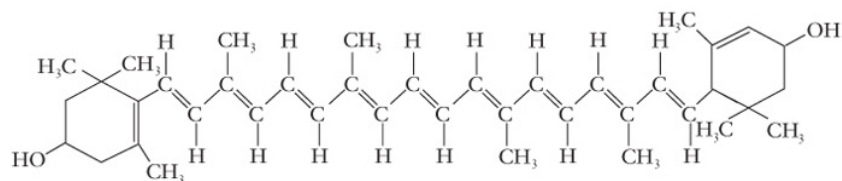
收稿：2019-7-29 修改：2019-8-18 接受：2019-9-2 線上發表：2019-9-9

緒 論

微藻是指一群生長在水中的光合真核生物的統稱。微藻的應用價值高，可用於清理各種污水中的各種污染，生質燃料之開發[1,2]。微藻富含補抓光子能量並進行電子傳遞之色素，主色素葉綠素 a，輔色素有葉綠素 b、c 或 d、類胡蘿蔔素或藻膽素，這些色素都具有良好的抗氧化功能，具有清除自由基的能力。市面上已販售各種品牌之藻類保健食品。

葉黃素(lutein)歸屬於類胡蘿蔔素中，化學結構式名稱是 β, ϵ -carotene-3,3'-diol (圖一)，具有長鏈的共軛多烯結構，是良好的抗氧化物，可以捕捉超氧自由基，清除單重態氧，可作為食品添加劑、保養品、動物飼料，並具有治療老年性黃斑部病變及心血管疾病等功能[4,5]。目前市售的葉黃素產品都是萃取自金盞花，金盞花的栽種競爭其它農作物之耕種面積，近年來朝向尋找微藻或其它微生物作為生

產葉黃素的替代性原料。



圖一、葉黃素(lutein)結構圖(資料來自 Hopkins and Huner, 2009)^[3]。

微藻中具有高價值的附加產物葉黃素(lutein)，微藻是很好生產葉黃素(lutein)的替代性原料，利用微藻生產葉黃素，除了可以利用固碳作用降低大氣中的 CO₂ 的濃度外，Schließmann and Schmid-Staiger^[6]更指出三大優點：(1)微藻的生物質可以在四季收穫；(2)微藻可以在海水、半鹹水或淡水中非耕地栽培，不會與傳統的農業競爭資源；(3)微藻的生長速度是植物的 5~10 倍。且微藻葉黃素的年產量比金盞花高 3~6 倍^[4,6]。詹(2012)分析本土柵藻 *Scenedesmus obliquus* FSP-3 有高葉黃素含量 4.5 mg/g D.W.^[7]。Ambati et al. (2019)分析 *Scenedesmus almeriensis* 葉黃素產率為 4.9 mg/L/d^[5]。

材料與方法

材料：

為分離自銘傳大學桃園校區的三株柵藻 *Scenedesmus sp.*，分別命名為 MCU003、MCU008、MCU010。

培養條件：

培養在 25~28°C 的培養室，光強度為 55 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{S}^{-1}$ (LED 燈管的晝光(400~700 nm)、藍光(450~495 nm)及紅光(620~750 nm)交錯)，光週期為(光照/黑暗，16/8 hr)。

培養基(TAP 培養基)：

20 mM Tris-HCl pH 7.0 (用醋酸滴定)，0.375 mM phosphate buffer pH7.0，75 mM NH₄Cl，0.4 mM MgSO₄·7H₂O，0.33 mM CaCl₂·2H₂O，0.37 mM H₃BO₃，0.9 mM FeSO₄·7H₂O (溶在熱的 43 mM EDTA，pH 8.0)，CoCl₂·6H₂O (0.2 mg/L)，CuSO₄·5H₂O (0.2 mg/L)，MnCl₂·4H₂O (1.8 mg/L)，ZnSO₄·7H₂O (0.44 mg/L)，Na₂MoO₄·2H₂O (0.018 mg/L)。

生長曲線：

細胞接種 5*10⁴ 個/mL(三重複)，每天中午約 12:00 使用血球計數器數細胞數目，直到細胞數目持續三天以上不再增加為止。

生物量的分析：

細胞接種 5×10^4 個/mL(不同批次，五重複)，培養到剛進入平原期(stationary phase)時，收集細胞(使用離心機)，去上清液，稱鮮重，再利用冷凍乾燥後，稱乾量。

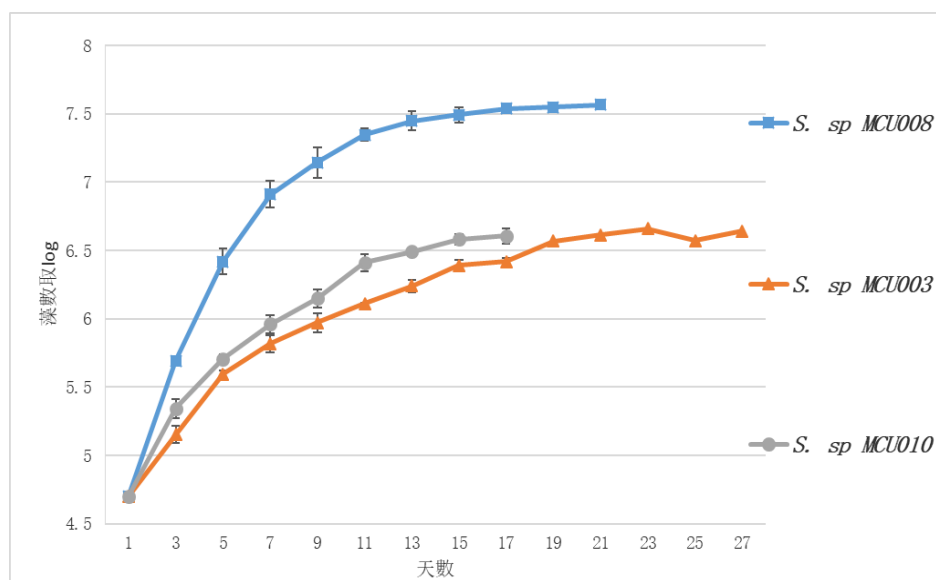
色素分析：

總色素的測定(不同批次，五重複)。使用 95%乙醇當溶劑，萃取總色素。再用分光光度計掃描 300-750 nm 全波長吸收光譜，參照 Sumanta (2014)的公式^[8]，換算葉綠素及類胡蘿蔔素的含量；Ch.a(葉綠素 a)= $13.36 \times A_{664} - 5.19 \times A_{649}$ ；Ch.b(葉綠素 b)= $27.43 \times A_{649} - 8.12 \times A_{664}$ ；C.x+c(總類胡蘿蔔素)=($1000 \times A_{470} - 2.13 \times \text{Ch.a} - 97.63 \times \text{Ch.b}$)/209。

使用薄層層析法(thin layer chromatography, TLC)分離色素(不同批次，五重複)。用 95%乙醇當溶劑，萃取色素，點在固定相 TLC 的薄片上；依據行光合作用色素葉綠素 a、b 和五種類胡蘿蔔素的構造，移動相(展著劑)：石油醚：異丙醇：水= 10:1.1:0.02 (修改自 Keusch)^[9,10,11]。色素分離後，再分別刮下色素帶的粉末，用 95%乙醇溶出吸附在粉末上的色素，再使用分光光度計掃描 300 ~ 700 nm 的吸收光譜，積分吸收光譜峰的面積，換算出葉黃素的含量。

結 果

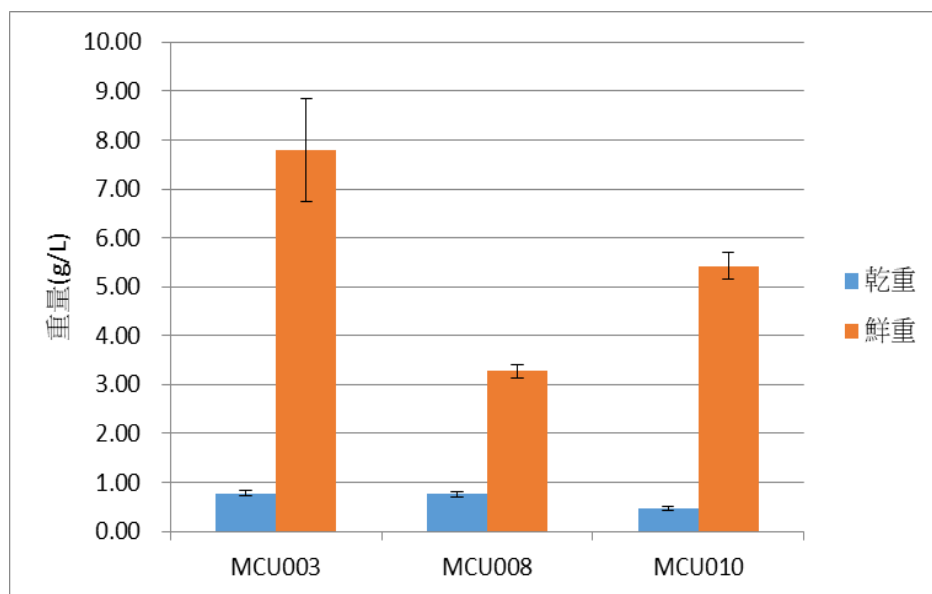
Scenedesmus sp. MCU003、MCU008 和 MCU010 一開始各接種 5×10^4 個/mL 別培養 19、15 和 15 天才剛進入平原期，此數據作為實驗收集細胞的培養天數；其中 *S. sp.* MCU008 的生長速度最快，每毫升的細胞數目也最多(圖二)。



圖二、*Scenedesmus sp.* MCU003、MCU008、MCU010 的生長曲線(n=3; t test, P value < 0.05)。

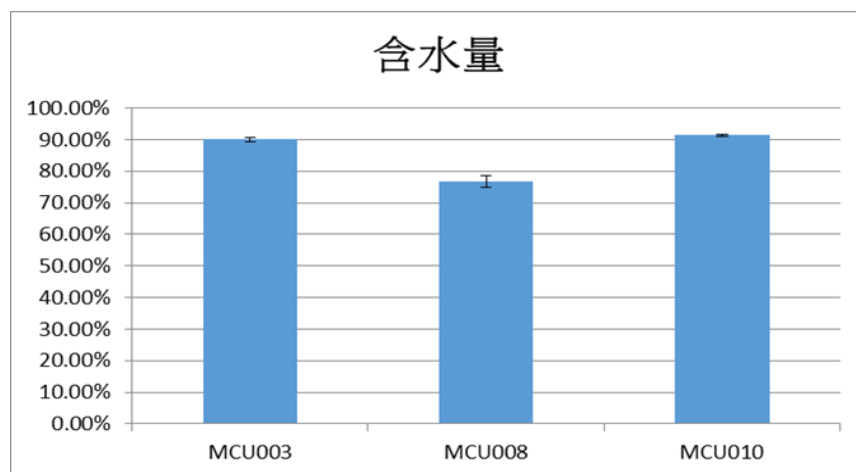
Scenedesmus sp. MCU003、MCU008 和 MCU010 鮮重及乾重，鮮重分別為 $7.79 \pm$

1.05、 3.27 ± 0.14 和 5.43 ± 0.26 g/L，乾重分別為 0.78 ± 0.06 、 0.76 ± 0.06 和 0.47 ± 0.03 g/L(圖三)。鮮重為 *S. sp.* MCU003 最高，*S. sp.* MCU008 最低在，三者間彼此都達到顯著差異($n=5$; t test, $P < 0.05$)；*S. sp.* MCU003 和 MCU008 的乾重彼此間並未達到顯著差異，但它們的乾重都大於 *S. sp.* MCU010 並達到顯著差異($n=5$; t test, $P < 0.05$)。



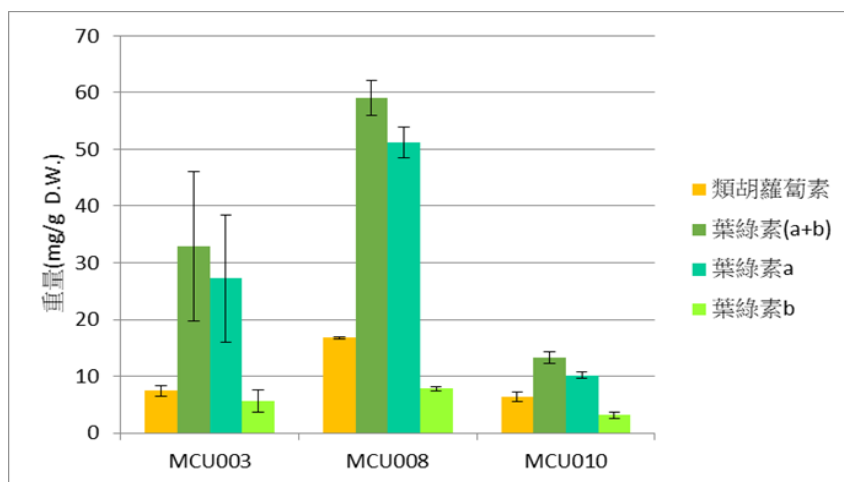
圖三、*Scenedesmus sp.* MCU003、MCU008、MCU010 鮮重及乾重($n=5$; t test, P value < 0.05)。

Scenedesmus sp. MCU003、MCU008 和 MCU010 的含水百分率分別為 90 ± 0.01 、 76.75 ± 0.02 和 91.40 ± 0.003 %，三者彼此都達到顯著差異($n=5$; t test, $P < 0.05$)，其中 *S. sp.* MCU003 和 MCU010 含水百分率高達 90%，而 *S. sp.* MCU008 含水百分率 76.75% 為三株中最低(圖四)。

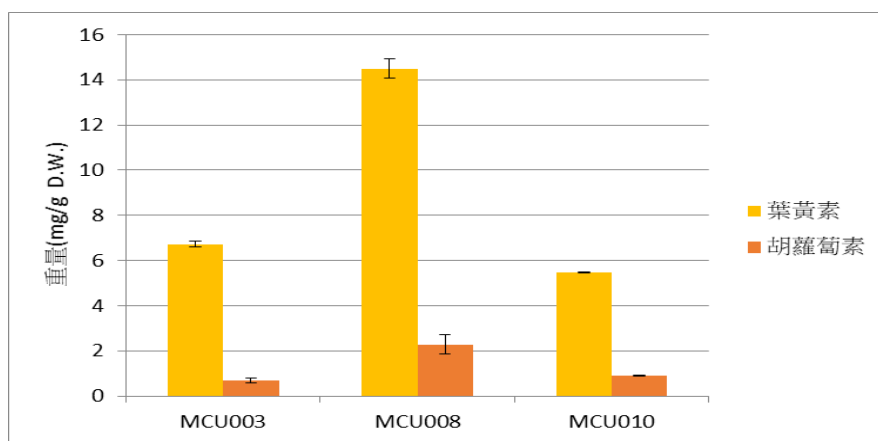


圖四、*Scenedesmus sp.* MCU003、MCU008、MCU010 含水量($n=5$; t test, P value < 0.05)。

Scenedesmus sp. MCU003、MCU008 和 MCU010 的葉綠素(a+b)的含量分別為 32.92 ± 13.19 (a/b, $27.22 \pm 11.24/5.69 \pm 1.95$)、 58.98 ± 3.09 (a/b, $51.15 \pm 2.74/7.83 \pm 0.35$) 和 13.24 ± 1.03 (a/b, $10.15 \pm 0.61/3.1 \pm 0.52$) mg/g D.W.; 類胡蘿蔔素的含量分別為 7.41 ± 0.93 、 16.77 ± 0.15 和 6.37 ± 0.82 mg/g D.W. (圖五)。葉綠素和類胡蘿蔔素都是 *S. sp.* MCU008 最高，並且與其他兩株藻都達到顯著性的差異(n=5; t test, $P < 0.05$)。 *S. sp.* MCU003 的葉綠素比 *S. sp.* MCU010 高，並達到顯著差異；但兩者在類胡蘿蔔素含量並未達到無顯著差異(n=5; t test, $P < 0.05$)。



圖五、*Scenedesmus sp.* MCU003、MCU008、MCU010 的類胡蘿蔔素、葉綠素總量、a、b 含量(n=5; t test, P value < 0.05)。



圖六、*Scenedesmus sp.* MCU003、MCU008、MCU010 的葉黃素及胡蘿蔔素含量(n=5; t test, P value < 0.05)。

Scenedesmus sp. MCU003、MCU008 和 MCU010 色素經 TLC 分離後，葉黃素的含量分別是 6.72 ± 0.11 、 14.50 ± 0.42 和 5.48 ± 0.03 mg/g D.W. (圖六)。再利用 *S. sp.* MCU003、MCU008 和 MCU010 生長培養天數是 19、15 和 15 天，計算出葉黃素

產率分別為 0.27、0.73 和 0.17 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

討 論

Scenedesmus sp. MCU003 的每公升鮮重量都比 *S. sp.* MCU008 和 MCU010 高約兩倍，*S. sp.* MCU003 的含水百分率高，導致其乾重與 *S. sp.* MCU008 相近，這可能是 *S. sp.* MCU008 細胞較小，收集細胞之後細胞與細胞間的間隙也較小，也可能是它的液胞也較小，導致整體含水百分率較低，呈現鮮重較低。

Scenedesmus sp. MCU008 的生長速率較 *S. sp.* MCU003 快四天(圖二)，可增加收成的次數，且含水量最低(圖五)，可減少凍乾時間，能節省生產成本。*S. sp.* MCU008 葉黃素含量為 $14.50 \pm 0.42 \text{ mg/g D.W.}$ 是另外兩株藻的 2 倍以上，在本研究中的三株藻它最具有開發潛力。

其 *Scenedesmus sp.* MCU008 葉黃素含量與詹(2012)^[7]分析六株柵藻比較，*S. sp.* MCU008 的葉黃素含量高達到三倍以上。*S. sp.* MCU008 有高含量的葉黃素，可能是因個體累積葉黃素量較高，加上本實驗使用低光照($55 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$)的環境培養，細胞為了有效率的捕抓光子，必需擴大捕抓光子的天線，相對地輔色素中之葉黃素也跟著提升；詹(2012)分析 *Scenedesmus obliquus* FSP-3 培養在光強度 $450 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ ，其葉黃素含量為 4.07 mg/g D.W. ，當光照強度下降至 30 與 $75 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ 時，其葉黃素含量都提升至 $5.4 \sim 5.5 \text{ mg/g D.W.}$ 之間，提升率約 34 %^[7]。

Scenedesmus sp. MCU008 生長到第 15 天才剛進入平原期(stationary phase)，乾重是 $0.76 \pm 0.06 \text{ g/L}$ ，生物質量(biomass)產率為 $50.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ，生物質量(biomass)產率很低。*Scenedesmus sp.* MCU008 雖有高含量的葉黃素，生物質量(biomass)產率很低，導致葉黃素的產率只有 $0.73 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ，得提高它的生長速率，才能提高開發性的價值。

孫(2011)探討光強度影響 *Scenedesmus obliquus* 生物質量與葉黃素的含量^[12]，採用連續通氣 1 vvm (含 20% CO_2)、光強度分別為 5、115、600、1600、2600、3600 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ ，生物質量(biomass)產率分別為 18.57、281.43、330、351.43、344.29 和 $354.29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ；詹(2012)使用連續通氣 0.4 vvm，含 2.5 % CO_2 ，其材料 *Scenedesmus obliquus* FSP-3，光強度分別為 150、300、450 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ ，生物質量(biomass)產率分別為 308.89、625、730 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ^[7]。顯示光照強度適度增強，有助益生物質量的產率。本研究的培養基之碳源是內含的醋酸根，並未進行通氣培養。本研究採用低光照 $55 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ ，低光照可能導致 *Scenedesmus sp.* MCU008 等藻株生長速率放緩，是生物質量產率下降的主因。未來得探討光照強度是否能提高 *Scenedesmus sp.* MCU008 生物質量的產率，然隨著光照強度的提升，可能會讓細胞中葉黃素的含量下降，因此得找到適當的光照強度。另外可

以將初始培養的細胞數目提升 10 倍，並將收集細胞的時間往前移至指數期(log phase)的末端，可以有效縮短培養時間，增加生物質量產率。最後再評估是否需要探討通氣的必要性。

參考文獻

- [1] Veraart AJ, Romani AM, Tornés E, Sabater S: 2008. Algal response to nutrient enrichment in forested oligotrophic stream. *J Phycol* 2008, 44:564–572.
- [2] Wijffels RH, Barbosa MJ: An outlook on microalgal biofuels. *Science* 2010, 329:796–799.
- [3] Hopkins WG, Huner NPA. *Introduction to plant physiology*. 2009, John Wiley & Sons, Inc. pp104.
- [4] Lin JH, Lee DJ, Chang JS: Lutein production from biomass: marigold flowers versus microalgae. *Bioresour Technol* 2015 184:421-428.
- [5] Ambati RR, Gogisetty D, Aswathanarayana RG, Ravi S, Bikkina PN, Bo L, Yuepeng S: Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: current trends and future prospects. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2019, 59:1880-1902.
- [6] Schließmann IU, Schmid-Staiger U: Energetische Nutzung von Mikroalgen: Status quo und Entwicklungspotentiale. In: *Energie Speicher Symposium 2013*, Marz, Stuttgart.
- [7] 詹明章：本土微藻生產葉黃素之技術開發-微藻培養、萃取方法、保存條件及產量程式最適化，碩士論文，化學工程學系，國立成功大學 2012。
- [8] Sumanta N, Haque CI, Nishika J, Suprakash R: Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Res J Chem Sci* 2014, 4:63-69.
- [9] Keusch P: Separation of plant pigments by TLC. Personal communication. http://w3.ufsm.br/larp/media/camada_delgada_aplicacoes.pdf
- [10] Hennion MC: Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1999, 856:3–54.
- [11] Fontanals N, Marce´ RM, Borrull F: New hydrophilic materials for solid-phase extraction. *Trends Anal Chem* 2005, 24:394-406.
- [12] 孫證雄：自營環境下培養柵藻生成葉黃素與超臨界流體萃取葉黃素之探討，碩士論文，化學工程與材料工程研究所，私立東海大學 2011。

Separation and Quantitative Analysis of Pigments in *Scenedesmus* sp. MCU003, MCU008, and MCU010

Ji-Hong Li, Jian-Wen Heng, and Shu-Ling Chen*

Department of Biotechnology, School of Health Technology, Ming-Chuan University, Taoyuan, Taiwan, R.O.C.

Abstract

Scenedesmus sp. MCU003, MCU008 and MCU010 were cultured at 25 ~ 28 °C, 55 $\mu\text{mol} \cdot \text{M}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$, 16 hr light/ 8 hr dark. The chlorophyll contents of *Scenedesmus* sp. MCU003, MCU008 and MCU010 each were 32.92 ± 13.19 (a/b, $27.22 \pm 11.24/ 5.69 \pm 1.95$), 58.98 ± 3.09 (a/b, $51.15 \pm 2.74/ 7.83 \pm 0.35$), and 13.24 ± 1.03 (a/b, $10.15 \pm 0.61/ 3.1 \pm 0.52$) mg/g D.W.. The carotenoid content each were 7.41 ± 0.93 , 16.77 ± 0.15 , 6.37 ± 0.82 mg/g D.W., and the content of lutein each were 6.72 ± 0.11 , 14.50 ± 0.42 , 5.48 ± 0.03 mg/g D.W.. *Scenedesmus* sp. MCU008 has the highest the content of chlorophyll, carotenoids, and lutein, and they all reach significant differences ($n=5$; t test, $p < 0.05$). *Scenedesmus* sp. has a high lutein content of 14.50 ± 0.42 mg/g D.W., a low yield of $0.73 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

Keywords: *Scenedesmus*; chlorophyll; carotenoids; lutein

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

Received 7-29-2019 / Revised 8-18-2019 / Accepted 9-2-2019 / Online published

9-9-2019

MC-Transaction on Biotechnology, 2019, Vol. 10, No. 1, e1

©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.