

## 壹、前言

### 一、擬球藻作為餌料食物

擬球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 屬單珠藻科，形狀為球體，直徑約 2 ~ 4  $\mu\text{m}$ ，外觀與綠球藻極為相似，故俗稱擬球藻 (Poncet & Veron, 2003)。擬球藻是一種分布廣泛的微型海藻，富含油脂及蛋白質，是臺灣水產養殖重要的餌料食物之一，近年相關研究著重於反應器組的設計，嘗試以連續循環培養系統生產大量的擬球藻 (Lin et al., 2012)。在臺東，目前正積極開發深層海水，深層海水含有豐富礦物質、微量元素及營養鹽，而且沒有表面海水的污染雜質，可以避免成為水產養殖之病菌帶源者。未來結合深層海水來大量培養無病毒的擬球藻，是頗被受期待重視的一項深層海水應用。太陽光、硝酸鹽及溫度對擬球藻生長有所影響 (Lin et al., 2012; Srinivas & Ochs, 2012)，本研究配合實驗室設備，先期檢視溫度對擬球藻生長的影響。

### 二、擬球藻生產生質柴油

除了作為餌料食物之外，最近許多擬球藻研究在於開發其成為綠色能源的供應者，因擬球藻含有極高量的油脂，可相當經濟地轉化成生質柴油 (Adam, Abert-Vian, Peltier, & Chemat, 2012; Chen et al., 2012; Day, Thomas, Achilles-Day, & Leakey, 2012; Srinivas & Ochs, 2012)。另一方面，在大量培養擬球藻的過程中，藻類藉由光和二氧化碳行光合作用，同時也可降低大氣中二氧化碳的含量，達到產能減碳的目的。有些研究探討促進油脂生成的因素，如 UV-A (Srinivas & Ochs, 2012)；有的研究探討如何將擬球藻油脂有效地萃取出來 (Adam et al., 2012)；有些研究則是探討轉化生質柴油的藻類培養槽生態 (Chen et al., 2012; Day et al., 2012)。

### 三、擬球藻的低溫保存

目前有許多種保存微藻的方法，各有其優點。將微藻放置於液氦低溫 ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) 的超低溫保存具有穩定種質遺傳的特性，因此，過去發展出直接放入液氦內的一步直接冷凍法；以及兩步法，用程式降溫的方法將藻類樣品溫度從室溫逐次降低到  $-20^{\circ}\text{C}$ ，再放入液態氦中保存，目前大多數藻類的冷凍保存係採取兩步法。另外還有包埋脫水法，結合乾燥法與固定化技術，與超低溫保

存相較下，成本較低 (Day, 2007; Fleck, Benson, Bremner, & Day, 2003; Gwo, Chiu, Chou, & Cheng, 2005; Hubalek, 2003; Poncet & Veron, 2003)。

由於本實驗室不需做到純種原的保存，也沒有超低溫的冷凍設備，因此配合實驗室需求，開發一簡易低溫保存程序，利用  $-20^{\circ}\text{C}$  冷凍庫進行藻種保存，並探討適合的抗凍劑種類及濃度，另外也設計了複方抗凍劑，測試其保存效果。其最大優點是實驗室擁有所需設備，可在大量繼代培養間，加以短期低溫冰凍，穩定保存藻種品質，控制實驗批次間樣品的差異。

將兩個以上的試劑組合在一起，看其效果，稱之為複方處理。複方處理的好處有增加效果、減少毒性等。在精卵保存等領域皆有其應用 (Rasul, Ahmed, & Anzar, 2007; Stoll, Holovati, Acker, & Wolkers, 2012; Wang & Xu, 2010)。然而針對藻類，尤其是擬球藻的低溫保存，很少人研究抗凍劑的複方處理，因此本研究嘗試以幾個複方組合，測試其效果。如果實驗結果理想，再進一步開發複方抗凍劑。

## 貳、方法與材料

### 一、擬球藻培養

擬球藻在經選殖後進行實驗，培養液為取 35 公克海鹽置入 1 公升二次水，再加入 0.03g 過磷酸鈣、尿素和 0.07 克硫酸銨配製而成，利用血球計數表計算擬球藻細胞數，吸取 100  $\mu\text{l}$  染劑和 100  $\mu\text{l}$  藻液置入盤式吸收器皿，充分混和 10 分鐘。在吸取 20  $\mu\text{l}$  置入血球計數器，計算細胞的數量。

### 二、生長溫度測試

取擬球藻 25 ml 加入鹽水 100 ml 在不同溫度中 ( $34^{\circ}\text{C}$ 、 $28^{\circ}\text{C}$  及  $20^{\circ}\text{C}$ ) 培養 7 天，每天測一次細胞數，檢視溫度對擬球藻生長的影響。所有實驗重複三次以上，求其平均。

### 三、抗凍劑毒性及抗凍性測試

取 15 ml 擬球藻液，利用血球計數表計算細胞數，各取 0.5 ml 置入到試管中，再將三種抗凍劑各取三種濃度取 0.5 ml 置入離心小管中，離心管震盪充分混和 30 分鐘。抗凍實驗組直接放入冷凍離心機設置，進行 30 分鐘梯度下降溫