

環境因子對篩選之 *Oscillatoria* sp. Wu1

生產藻膽蛋白之研究

Study on The Production of Phycobiliproteins by Isolated *Oscillatoria* sp. Wu1

李秀珠¹ 陳冠伶¹ 鄭鈞維¹ 許銘展² 陳柏榮² 顏裕鴻³ 吳建一^{3*}

¹大葉大學生物產業科技學系 大學部

²大葉大學生物產業科技學系 碩士班

³大葉大學生物產業科技學系 副教授

E.mail : jywu@mail.dyu.edu.tw

摘要

藻膽蛋白(Phycobiliprotein)是種為共價聯結的線性四吡咯發色基團(linear tetrapyrrole chromophoric group)，為水溶性的補光色素(light harvesting pigments)，其常存於藍綠菌和某些真核藻類之中，而藍綠菌因為環境不同(例如光波長以及溫度)而調節四吡咯含量與成分。其中以藻藍蛋白(Phycocyanin)為主要成分，而這藻藍蛋白是一種天然色素，具高營養成分，可作為食品營養補充品，亦可為化妝品中的天然色素。除此之外，也可應用於免疫分析、抗發炎以及抗癌藥物的使用。本研究係於台灣本島周圍海域以及離島海域篩選出適合生產藻藍蛋白之本土藻株，並針對生產條件進行探討。實驗結果顯示，本研究所篩選之藻株(命名為 *Oscillatoria* sp. Wu1)進行實驗探討，以探討出最佳果糖濃度為 1.0 g/L 與尿素濃度為 0.5 g/L 作為培養時的碳/氮源，並以培養基初始 pH 為 8.5、光強度 4300 lux 的條件下，放置於 30°C 下進行培養，可獲得最佳的藻藍蛋白及異藻藍蛋白含量，分別為 380 mg/g 以及 103 mg/g 的粗萃取產量。

關鍵字: *Oscillatoria* sp.、藻膽蛋白、藻藍蛋白、碳/氮源

1. 前言

近年來，由於藻類培養的生物技術提升，且認為藻類是作為應用於生物醫學、美容保養以及食品添加物中，具有潛力的特化品來源。因此，國內對於藻類特化品的研究、生產和應用開始蓬勃發展。且目前國人對於健康意識抬頭，因此，更是積極的研究以天然的物種進行特化品的生產、純化以及應用。

在藍綠菌的細胞中含有著高經濟價值的色素蛋白，其色素蛋白稱之為藻膽蛋白(Phycobilisomes)是種巨大超分子的聚合物，本身具有水溶性性質且可從中分離出蛋白色素複合物，如藻藍蛋白(phyocyanin)，藻紅蛋白(phycoerythrins)以及異藻藍蛋白(allophycocyanins)。其中的藻藍蛋白為藻膽蛋白中的主要組成物質，具有高營養成分，可作為食品營養補充品。此外，由於藻藍蛋白為天然色素，因此也可作為化妝品及食品中的天然染料使用。不僅如此，因為藻藍蛋白本身具有螢光的性質，因此亦可作為免疫分析上的生化追蹤劑(Vonshak, 1996)以及應用於抗體、受體和其他生物分子的相關研究上(Telford *et al.*, 2001)。然而，近年來亦有學者發現藻藍蛋白具有抗氧化、抗發炎、神經保護以及保肝效用(Romay *et al.*, 2003)，這使得藻類在特化品應用上又增添了一筆。然而，對於藍綠菌來說，有許多因素會影響其藻藍蛋白的生產量，例如物種的種類、環境以及萃取的方式，這些因子皆會直接的影響其色素蛋白的生產量。由於台灣本島四周環海，海洋生物資源相當豐富，因此，本研究的目的即為篩選具生產藻藍蛋白能力的台灣本土性的藻株，探討最佳的生長環境和營養源配方。

2. 材料與方法

2.1 總醣分析

本實驗以酚硫酸法進行多醣含量的分析，取樣品與blank(蒸餾水)各1mL，分別加入5% phenol solution 1mL，隨即再加入5 mL 濃H₂SO₄，輕輕混勻後靜置10 min，再將混合液置於25°C水浴鍋加熱15 min，再以分光光度計於OD_{490 nm} 下測吸光值。並以葡萄糖做為標準品，製作0~200 mg/L的葡萄糖溶液之標準曲線，將測得的吸光值代入標準曲線之迴歸方程式中，經由計算可得總醣含量(mg-glucose/ mL-培養液)。

2.2 氨氮分析

發酵液之氨氮分析是根據indophenol reaction method (Mccullough, 1967)來進行。實驗步驟如下：取 2 mL蒸餾水(空白對照組)、(NH₄)₂SO₄ (標準品)和已稀釋適當倍數的發酵液，分別加入 1mL 10% sodium tungstate與 1N sulphuric acid混合均勻，以 3000 rpm離心 10 分鐘。取出 0.5mL上清液後，個別加入 2.5 mL Solution 1 與Solution 2 且充分混合，於 37 °C下反應 35 分鐘，接著以分光光度計 625 nm下測其吸光值，並對照檢量線(Figure 3-5)來得知NH₄⁺-N濃度。

2.3 硝酸根離子分析

本研究測定硝酸根離子含量是修正文獻所提供之方法所進行(羅，2008)，實驗原理主要為硝酸根含有N=O基團，其基團於UV光下具有強烈的吸收值，此外，這吸收值與含量具有相等的關係，符合比爾定律。實驗分析方法：將樣品直接以 220 nm進行分析測定。並以KNO₃作為標準品，製作 0~40 mg/L的NO₃⁻溶液之標準曲線 (Figure 3-6)，將測得的吸光值代入標準曲線之迴歸方程式中，經由計算可得NO₃含量(mg/L-培養液)。

2.4 藻膽蛋白萃取及含量測定

將藍綠菌由血清瓶中以刮除的方式進行收集，使其細胞與培養基進行分離。收集後之藍綠菌以 sodium phosphate buffer 清洗兩次，接著以 9000 rpm 的離心條件進行離心 10 min。隨後將細胞添加 0.5 M sodium phosphate buffer (0.08 g-dry cell : 1 mL)後，以均質機進行細胞破碎(2500 rpm，30 min)，將破碎後之萃取溶液以 9500 rpm 離心 10 min，收集其上清液，分別以波長 562、615、620 以及 652 nm 測量其吸光值，根據 Silveira *et al.* (2007)所提供之公式進行計算，獲得粗萃取之藻藍蛋白濃度(PC)，藻紅蛋白(PE)以及異藻藍蛋白(APC)。公式如下：

$$PC = \frac{(OD_{615} - 0.474(OD_{652}))}{5.34} \quad (1)$$

$$APC = \frac{(OD_{652} - 0.208(OD_{620}))}{5.09} \quad (2)$$

$$PE = \frac{(OD_{562} - 2.41 \times PC - 0.847 \times APC)}{9.62} \quad (3)$$

3 結果與討論

3.1 最適氮源濃度探討

本研究利用藻株 *Oscillatoria* sp. Wu1 來生產藻藍蛋白，並以 urea 為最佳的氮源。因此，本階段實驗針對藻株 (*Oscillatoria* sp. Wu1) 在不同 urea 濃度下培養時，對於色素合成量之變化進行探討。由圖 1 能夠觀察到不同的 Urea 濃度對碳源合成 biomass 的影響。在未添加 Urea 的情況下，其 $Y_{X/S}$ ($\text{gCell gGlucose}^{-1}$) 為 0.04，明顯高於培養基中有添加不同 Urea 濃度的條件。由這實驗結果認為 Urea 的添加會造成 *Oscillatoria* sp. Wu1 的生長抑制，且當 Urea 的濃度為 0.25 g/L 的條件時， $Y_{X/S}$ ($\text{gCell gGlucose}^{-1}$) 會下降至 0.033；而當 Urea 的濃度提升至 0.5 g/L 的同時， $Y_{X/S}$ ($\text{gCell gGlucose}^{-1}$) 則會下降至 0.024。然而，當 Urea 的濃度繼續提高時並不會繼續影響 $Y_{X/S}$ ($\text{gCell gGlucose}^{-1}$) 的數值。對於添加 Urea 作為氮源會影響藍綠藻細胞的生長量，在文獻中也曾經提及，當 Urea 添加於培養基中的濃度超過 0.2 g/L 時則會對螺旋藻生長造成強烈的抑制作用，其主要的原因是由於在這條件下，75~80% 的 Urea-N 都將被轉換成具有強烈毒性的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ，因而造成藍綠菌細胞被毒害的情況 (Zeng, 2002)。

從圖 2 中可發現，在培養初期 (2 天內) 藻液的 pH 會有下降的趨勢，尤其以 Urea 濃度為 0.5 g/L 時最為明顯 (pH 由 8.2 下降至 5.3)，之後於培養 2 天後 pH 逐漸上升，且當 Urea 的添加量越多時，相對的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 生成的含量會相對較高。由圖 3 可知，無論 Urea 濃度高低皆可提高藻膽色素 (phycocyanin、allophycocyanin 以及 phycoerythrin) 的含量。尤其是當以 Urea 濃度為 1.5 g/L 為氮源時，在培養至第 3 天時培養基中有最大的色素含量 (phycocyanin、allophycocyanin 以及 phycoerythrin 含量分別為 0.016、0.024 和 0.01 g/L)。此外，由實驗結果發現，當培養第 4 天後培養基中藻膽蛋白含量會開始下降，且當 Urea 濃度提升後藻藍蛋白釋放於培養基中的濃度也會有所增加。

對於 *Oscillatoria* sp. Wu1 的細胞中所含有的藻膽蛋白含量，由圖 4 所得之實驗結果顯示，當培養基中 Urea 的添加濃度大於 0.5 g/L 時，其藻藍蛋白以及異藻藍蛋白含量可達到最高 (255.35 mgPC/gCell and 75.75 mgAPC/gCell)，而未添加 Urea 的條件其藻藍蛋白和異藻藍蛋白的含量 (1.28 mgPC/gCell and 1.69 mgAPC/gCell) 則遠遠低於培養基中含有 Urea 的培養條件。然而，實驗結果也發現，在未添加 Urea 的條件下 *Oscillatoria* sp. Wu1 能夠合成藻紅蛋白，其含量為 1.04 mgPE/gCell，而在培養基中存在於 Urea 的情況下，*Oscillatoria* sp. Wu1 的細胞則無法合成藻紅蛋白；在文獻當中曾經提及，藻膽體上外桿的磁盤狀數量為藻藍蛋白與藻紅蛋白的比例，而其數量會隨著不同的生物體或環境的差異而有所改變 (Robert, 2004)，但目前仍無文獻指出在含有 Urea 的條件下影響藻紅蛋白合成的機制。綜合以上的實驗結果，以培養基中添加 Urea 濃度為 0.5 g/L 的條件時，能夠獲得最佳的藻藍蛋白和異藻藍蛋白的含量，且當 Urea 過度添加不僅造成 *Oscillatoria* sp. Wu1 生長的抑制以及降低其色素蛋白的產量，在工業上的生產也會使其生產成本有所提高，故本實驗所獲得之最佳 Urea 的添加濃度為 0.5 g/L，並作為後續實驗延續的條件。

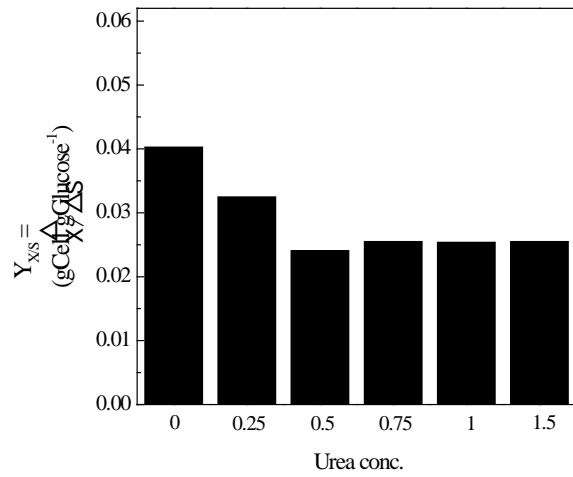


圖 1. urea 濃度對 *Oscillatoria* sp. Wu1 細胞產量之影響

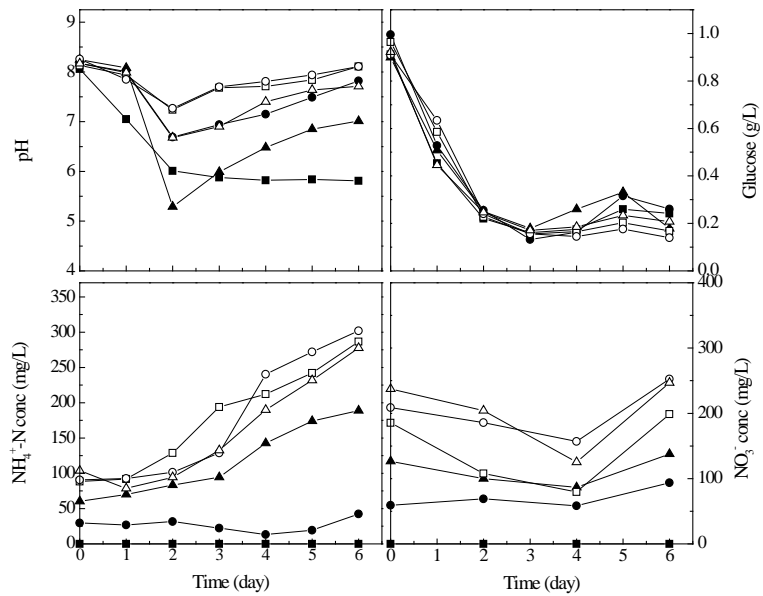


圖 2. 在不同 Urea 濃度下對 *Oscillatoria* sp. Wu1 的 pH, Glucose, NH₄⁺-N 與 NO₃⁻ 濃度之時間變化

Urea conc. (g/L): (■) 0; (●) 0.25; (▲) 0.5; (□) 0.75; (○) 1; (△) 1.5.

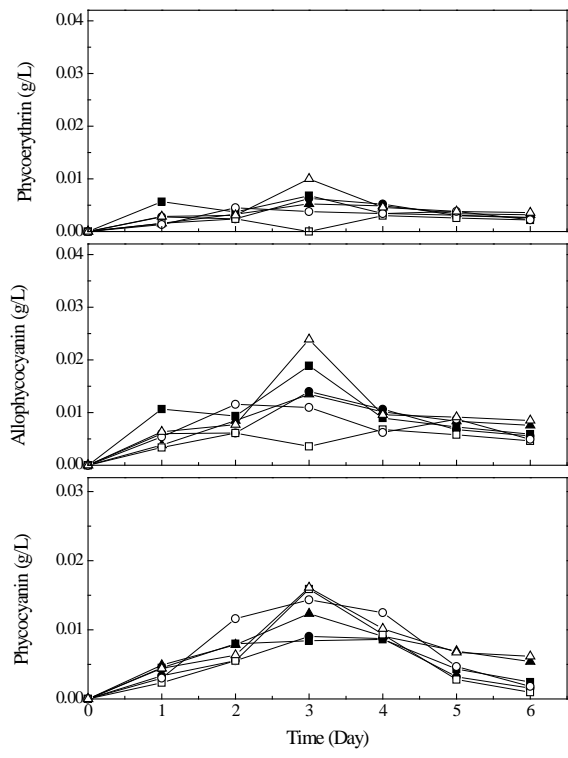


圖 3. 在不同 Urea 濃度下對 *Oscillatoria* sp. Wu1 之藻藍蛋白濃度時間變化
 Urea conc. (g/L): (■) 0; (●) 0.25; (▲) 0.5; (□) 0.75; (○) 1; (△) 1.5.

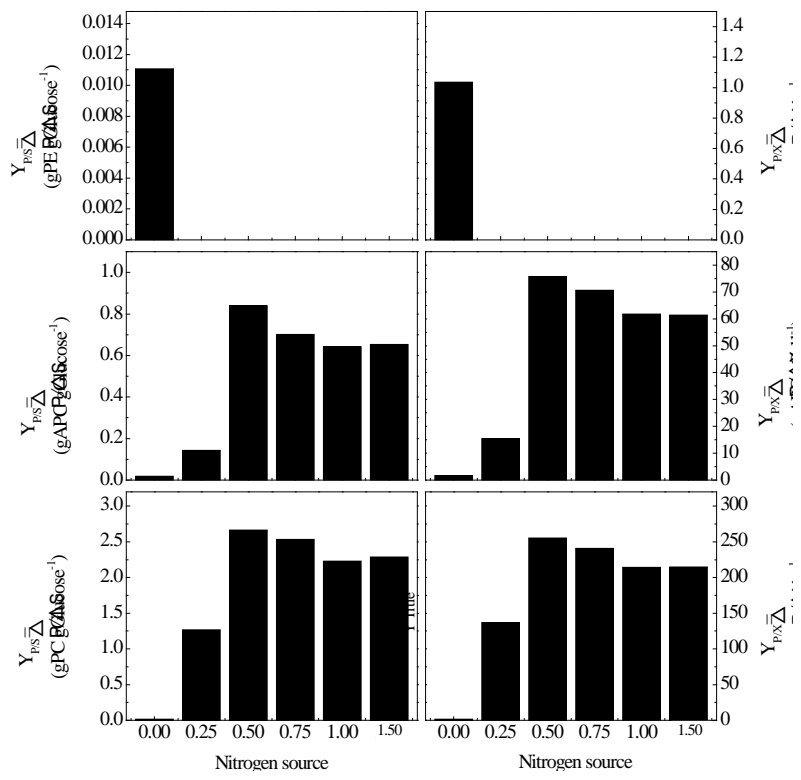


圖 4. Urea 濃度對 *Oscillatoria* sp. Wu1 生產藻藍蛋白、異藻藍蛋白及藻紅蛋白產量之影響

3.2 最適碳源濃度探討

對於藻藍蛋白的生產曾有文獻提及在氮充足但限制碳的異營培養條件下，紅色微藻*G. sulphuraria*可以生產藻藍蛋白(Perez-Garcia *et al.*, 2011)。針對上述，本實驗，以fructose作為最適培養碳源並進而探討其碳源濃度對藻藍蛋白產量的影響，同時了解其最佳的碳源濃度。首先，在不同的碳源濃度對於整體的biomass影響方面，由圖5結果顯示隨著果糖濃度由0 g/L增加至10 g/L時，*Oscillatoria* sp. Wu1的最終biomass量也會隨著碳源濃度的提高而增加，當以10 g/L的fructose作為培養基的碳源濃度時，可獲得67 mg的乾燥藻體細胞量。

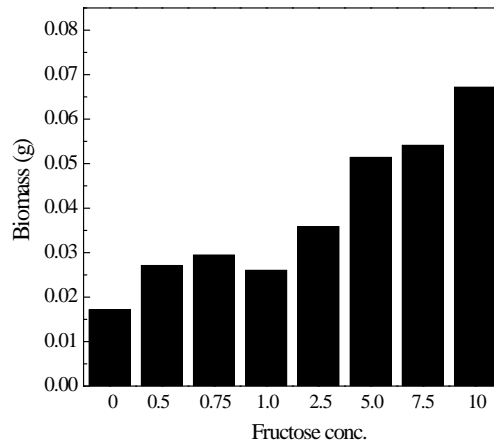


圖5. fructose 濃度對*Oscillatoria* sp. Wu1 biomass 的影響

在培養期間觀察其pH、fructose、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 以及 NO_3^- 的含量變化，其實驗結果顯示於圖6。在pH值的變化部分，由於添加不同濃度的fructose，其最終的pH會隨著越高濃度的fructose，其pH值則越低。此外，當培養基中的fructose濃度高於2.5 g/L時，在pH值的變化上對於回升的趨勢就會非常的不明顯，甚至當fructose濃度大於7.5 g/L時，pH值的變化趨勢則持續往下降，而本研究認為這個現象也相對造成biomass在生長上有所影響，因此，造成fructose濃度的提高，但最終的biomass量增加的卻有所限制。初步判斷為*Oscillatoria* sp. Wu1培養至第2天後，由於培養基的pH值偏酸性，不利於*Oscillatoria* sp. Wu1的生長，因而造成生長減緩的情況。此外，在 NO_3^- 濃度變化趨勢的部分，還發現了一個有趣的現象，當培養基中fructose的濃度越高，*Oscillatoria* sp. Wu1對於 NO_3^- 的消耗效率則會有所下降，當fructose濃度為0.5 g/L時 NO_3^- 的消耗率可達到73%，然而，當fructose濃度提升至10 g/L時期消耗效率僅為21%。

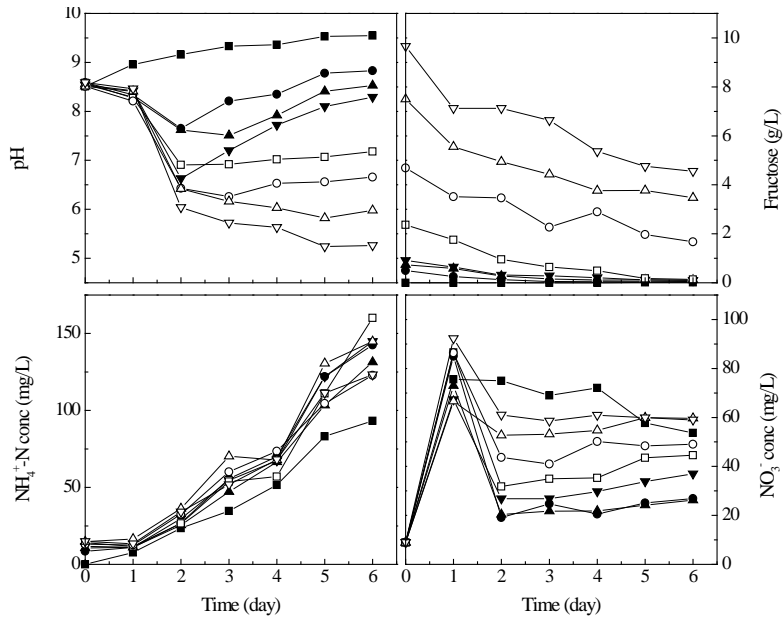


圖6.在不同fructose濃度下對 *Oscillatoria* sp. Wu1. pH, Glucose, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 與 NO_3^- 濃度之時間變化

Fructose conc. (g/L): (■) 0; (●) 0.5; (▲) 0.75; (▼) 1.0; (□) 2.5; (○) 5; (△) 7.5; (▽) 10.

圖7為培養期間*Oscillatoria* sp. Wu1釋放於培養基中的藻藍蛋白含量變化。由實驗的結果可以發現，*Oscillatoria* sp. Wu1在培養的過程中，藻藍蛋白的含量對於培養基中不同的fructose濃度並無明顯的差異性，但對於完全未添加fructose的條件，在藻藍蛋白的釋放量上極少，藻藍蛋白最高釋放於培養基中的濃度僅為9 mg/L。

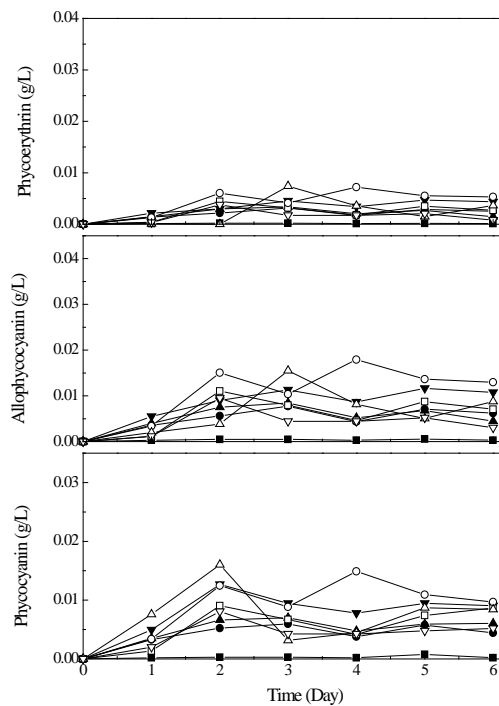


圖7. 在不同fructose濃度下對*Oscillatoria* sp. Wu1之藻藍蛋白濃度時間變化

Fructose conc. (g/L): (■) 0; (●) 0.5; (▲) 0.75; (▼) 1.0; (□) 2.5; (○) 5; (△) 7.5; (▽) 10.

圖8所顯示的是*Oscillatoria sp. Wu1*經過細胞破碎後所萃取的粗萃取藻膽蛋白的產量。當培養基中的fructose含量提高，確實可以有效的提高藻膽蛋白的含量，以fructose濃度為1.0 g/L的條件與完全未添加碳源的條件相較之下，其藻藍蛋白的含量可提高90.9%、異藻藍蛋白可提高85.8%。然而，當fructose濃度高過於1.0 g/L的條件時，藻藍蛋白和異藻藍蛋白的含量會迅速遞減，fructose濃度提高至10 g/L的條件下，其藻藍蛋白和異藻藍蛋白的產量僅剩下1.61和1.66 mg/g，與1.0 g/L的條件相較之下，分別下降了99.6%及98.4%，甚至比未添加fructose的條件要來的低。其主要原因，本研究推測可能為*Oscillatoria sp. Wu1*在biomass增長上對於光源的需求降低，使得作為光反應系統中輔助性的藻膽蛋白含量下降。而本研究中對於胞內藻紅蛋白測量的結果部分與先前最適氮源探討的實驗結果相同，會因為培養基中含有urea的情況，對於*Oscillatoria sp. Wu1*來說並無法合成藻紅蛋白的情況，而在目前尚未了解無法合成藻紅蛋白的原因，這可能需要由代謝及合成路徑的研究方向來加以解釋。

根據以上的實驗結果，其實驗結果發現當培養基中同時含有fructose作為碳源以及urea作為氮源的條件下，當fructose於培養基中的濃度增加時，確實能夠有效的提升藻藍蛋白、異藻藍蛋白的產量。然而，這fructose的添加量卻有一定的限度，當添加濃度超過1.0 g/L的條件時，不僅無法增加色素蛋白的產量，甚至會造成劇降的情況發生，因此，當利用fructose作為碳源來培養*Oscillatoria sp. Wu1*時，以1.0 g/L的濃度進行培養可獲得最佳的色素蛋白。故本實驗選以此條件繼續後續實驗的探討。

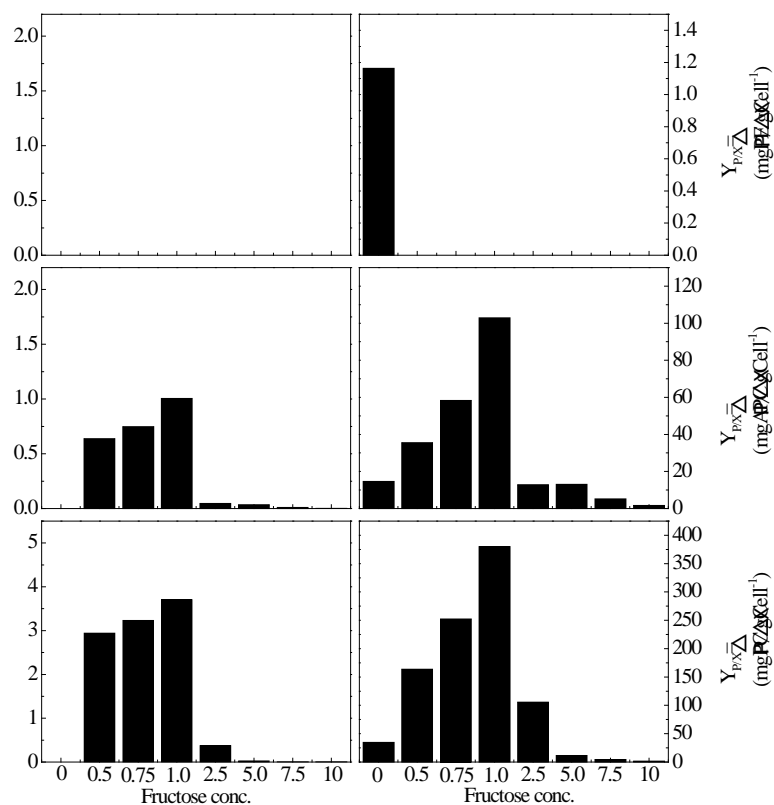


圖8. fructose濃度對*Oscillatoria sp. Wu1*的藻藍蛋白、異藻藍帶白與藻紅蛋白產量之影響

3.3 藻株培養於不同 pH 下生產藻藍蛋白之影響

培養基的pH值對藻類的培養來說也是一個很重要的因子。對藻類的生長來說培養基的pH值通常為中性(neutral)或弱酸性(slightlyacidic)，主要是避免數個重要的元素發生沉澱(precipitation)現象。藻類的生長與生長培養基的pH值明顯相關且pH值對不同種類的藻類影響也有很大的不同。常見的培養的藻類種類其生長pH範圍是介於7-9之間，而最適的pH值則是8.2-8.7之間。沒有維持好藻類生長可適應的pH範圍會引起許多細胞程序的崩解，而這樣的結果會造成整個培養失敗。因此，本研究以培養基的初始pH條件為4、5、6、7、8、8.5、9，這7種不同的pH來進行探討，找尋最適的pH條件來進行後續實驗。

首先，對於培養期間的pH、Fructose、NO₃⁻以及NH₄⁺-N的變化趨勢顯示於圖9。由圖9的結果顯示，當培養基的初始pH不同的情況下，培養期間pH的變化趨勢在培養的前3天會有所不同，當培養基初始pH小於6的條件時，其pH的變化趨勢會在培養的前2天會有明顯上升的情況，pH會上升至6以上，而pH為7以上的條件組，則會有pH值下降的情形，且所有的培養基的pH會在培養的第2天和第3天時下降或上升至pH 6-7之間。隨後所有的培養條件其pH會開始有回升的趨勢。對於不同的初始pH環境條件，*Oscillatoria* sp. Wu1的biomass實驗結果顯示於圖10。由圖10可觀察到當培養基初始pH偏酸的條件時，*Oscillatoria* sp. Wu1的最終biomass相較於培養基初始pH偏鹼的條件要來的低，當pH為8的條件下，*Oscillatoria* sp. Wu1的最終biomass量可達20.5 mg，相較於pH條件為4的情況下，biomass量僅有11.1 mg，與最佳條件下biomass量相差了46%，此外，不僅酸性的pH會影響biomass的量，當越偏鹼性的環境條件下，biomass也會有遞減的趨勢。而這一實驗曾有文獻提出類似的結果，當過高的pH值10-12和過低的pH值2-3會阻礙微藻*I. galbana* CCMP 1324的生長，而最適適合生長的pH值為pH 9 (Lin et al., 2007)。

從色素方面看來，分析藻膽蛋白的結果顯示於圖11。由圖11的實驗結果可以看出，當pH在4的條件下，其藻藍蛋白和異藻藍蛋白的含量分析後幾乎為0。但特別的一點是，*Oscillatoria* sp. Wu1以urea和fructose的條件培養時，並不會合成藻紅蛋白的部分，然而當pH為4或5的條件時，*Oscillatoria* sp. Wu1雖然對於藻藍蛋白和異藻藍蛋白的合成會有所抑制，但卻可明顯的觀察到藻紅蛋白的生成。而這一實驗結果，本研究尚未了解其原因，且在文獻上尚未提出類似的情況發生，因此，本研究目前無法解釋這一現象。然而，這一實驗結果可能需要藉由藻膽蛋白的合成機制方面著手探討。

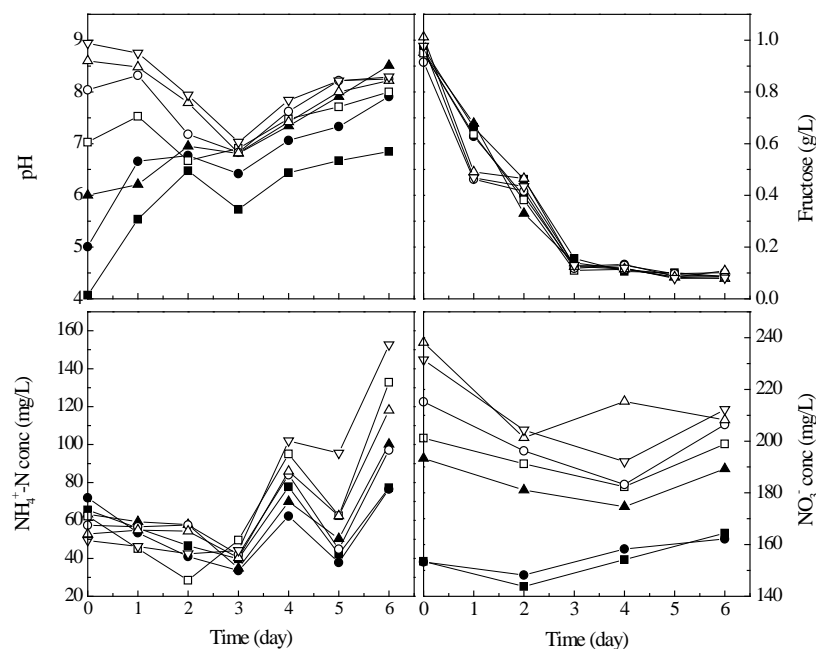


圖 9. 在不同pH 環境下對*Oscillatoria* sp. Wu1. pH, Fructose, NH₄⁺-N 與NO₃⁻濃度之時間變化

pH: (■) 4; (●) 5; (▲) 6; (□) 7; (○) 8; (△) 8.5; (▽) 9.

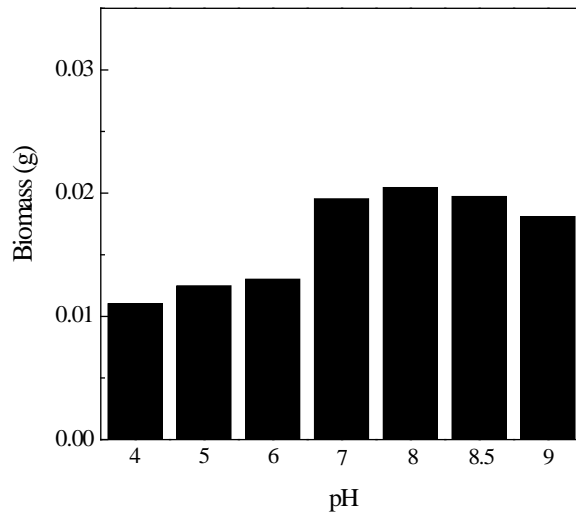


圖 10. 不同 pH 環境對 *Oscillatoria* sp. Wu1. biomass 之影響

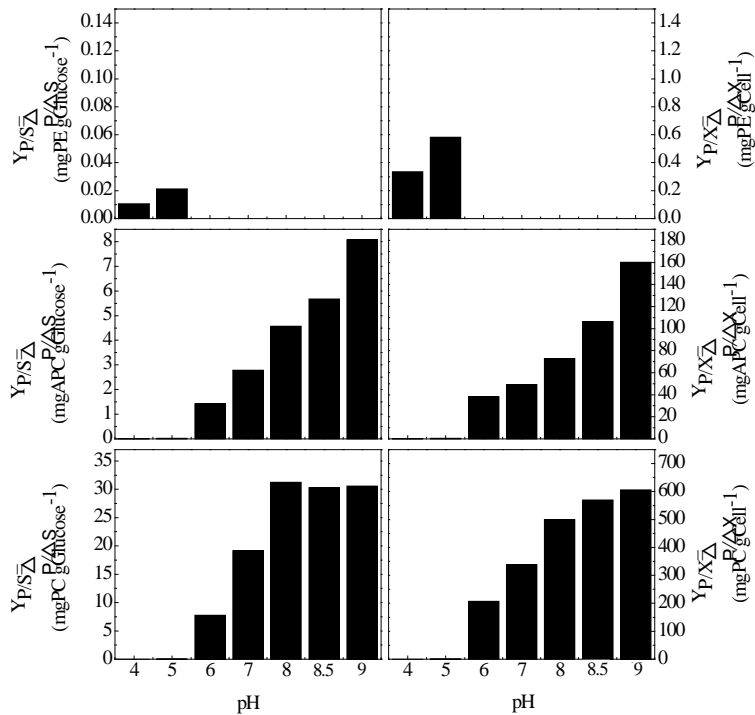


圖 11. 不同 pH 環境對 *Oscillatoria* sp. Wu1 對 *Oscillatoria* sp. Wu1 的藻藍蛋白、異藻藍帶白與藻紅蛋白產量之影響

綜合以上的實驗結果，在不同的培養基初始 pH 的條件之下，*Oscillatoria* sp. Wu1 會隨著 pH 處於鹼性的條件下而在 biomass 以及光合色素上的產量也會相對提高。然而，當過高的 pH 也會造成一個問題，就是當培養基的 pH 值高於 9 時有一個常見的情形，那就是有數個鈣鹽(calcium salts)(例如: carbonates, phosphates 和 sulfates)產生沉澱，而沉澱的礦物質會導致營養物不足和生長延遲(growth retardations)或甚至藻類產生絮凝現象(flocculation)，因此，過低及過高的 pH 環境條件，皆不適合 *Oscillatoria* sp. Wu1 的生長，此外，由於本研究所探討的培養基配方，經過滅菌程序後，在不調整 pH 的條件下，其 pH 值為 8.5，

且在 pH 為 8.5 的條件下藻藍蛋白、異藻藍蛋白和 biomass 都有著良好的產量，故本研究後續實驗皆以 pH 8.5 做為實驗條件接續後續的研究探討。

3.4 藻株培養於不同溫度下生產藻藍蛋白之影響

在自然界中氣候的變化是一個非常複雜的過程，而這複雜的過程中包含了太陽的輻射變化以及環境溫度的改變(Williamson *et al.*, 2009)。一般來說，在培養的環境溫度上亦會造成細胞的結構組成(特別是脂質、色素以及蛋白質)，甚至反應速率的溫度係數也會產生改變(Sandnes *et al.*, 2005)。不僅如此，生長的最適溫度也會因為不同的物種而有所差異。而在不同的溫度條件下，最顯著的差異就是色素的含量，因此，本研究以 *Oscillatoria* sp. Wu1 於特定的光源、固定的光照強度以及相同的光週期的條件下，探討 *Oscillatoria* sp. Wu1 生產藻藍蛋白最佳的培養溫度。

一般來說，每個物種皆有最適的培養溫度，而本實驗以台灣本島氣候一般的室溫範圍 20、30 以及 40°C，3 個溫度來進行 *Oscillatoria* sp. Wu1 的生長及生產藻藍蛋白產量方向來探討。首先，根據不同的溫度條件，觀察 *Oscillatoria* sp. Wu1 最終的 biomass 量，其實驗結果顯示於圖 12。由圖 12 的結果可觀察到，當溫度條件於 30°C 條件下，*Oscillatoria* sp. Wu1 最終的 biomass 量為 42.8 mg，當培養溫度高於室溫 10°C 後，biomass 量會略微下降 18%，而溫度條件若低於室溫 10°C 時，biomass 量則會有較大幅度的下降，約下降 53%。這結果顯示，*Oscillatoria* sp. Wu1 對於溫度較高的情況下比溫度低的條件上有較好的耐受性。可見此藻株對於溫度的適應來說，如同本章節最初所提到的，在低溫的環境下受到寒害的情況，使得整體在 biomass 量上有明顯的降低。而 *Oscillatoria* sp. Wu1 對於台灣的夏季型氣候較能夠適應，而對於春天和秋天的較低溫氣候較不適合生長。

而對於在不同溫度環境下，*Oscillatoria* sp. Wu1 在對於 pH、葡萄糖、NO₃⁻ 以及 NH₄⁺-N 的變化趨勢分析結果顯示於圖 13。從 pH 的變化看來，環境溫度確實會使得 *Oscillatoria* sp. Wu1 在培養期間的 pH 變化趨勢有所差異。當培養溫度為 20°C 的條件下，pH 在回升的趨勢會相較低於 30 和 40°C 的條件，這結果的可能性需要從 NO₃⁻ 的消耗量來解釋，當於較低溫的情況下 *Oscillatoria* sp. Wu1 對於 NO₃⁻ 的消耗效率較不明顯，僅下降 19.9% 比 30 和 40°C 條件的 39.2% 和 27.1% 要來的少。這可能使得 OH⁻ 的釋放量上較低，使得 pH 的回升有減慢的趨勢。此外，當觀察葡萄糖的消耗變化趨勢，在不同的條件下，幾乎皆在培養的第 2 天時對於葡萄糖的消耗就進入了平穩的情況。在培養期間觀察不同溫度條件是否影響 *Oscillatoria* sp. Wu1 釋放藻藍蛋白釋放於培養基中的含量，實驗結果顯示於圖 14。在實驗的結果顯示，雖然 *Oscillatoria* sp. Wu1 釋放於培養基中的藻藍蛋白含量相對於藻體中的含量低於許多，但仍可觀察到以 20°C 的條件下，藻藍蛋白釋放於培養基中的含量略高於另外兩者。

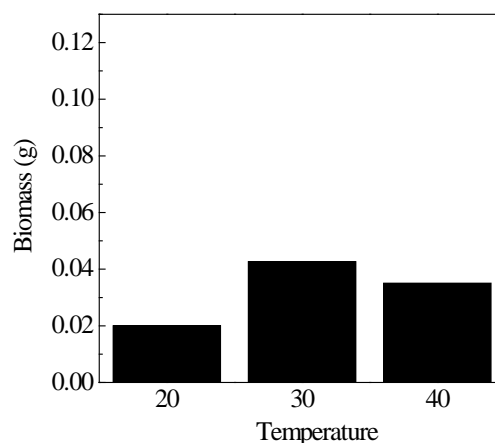


圖 12. 不同培養溫度對 *Oscillatoria* sp. Wu1 biomass 之影響

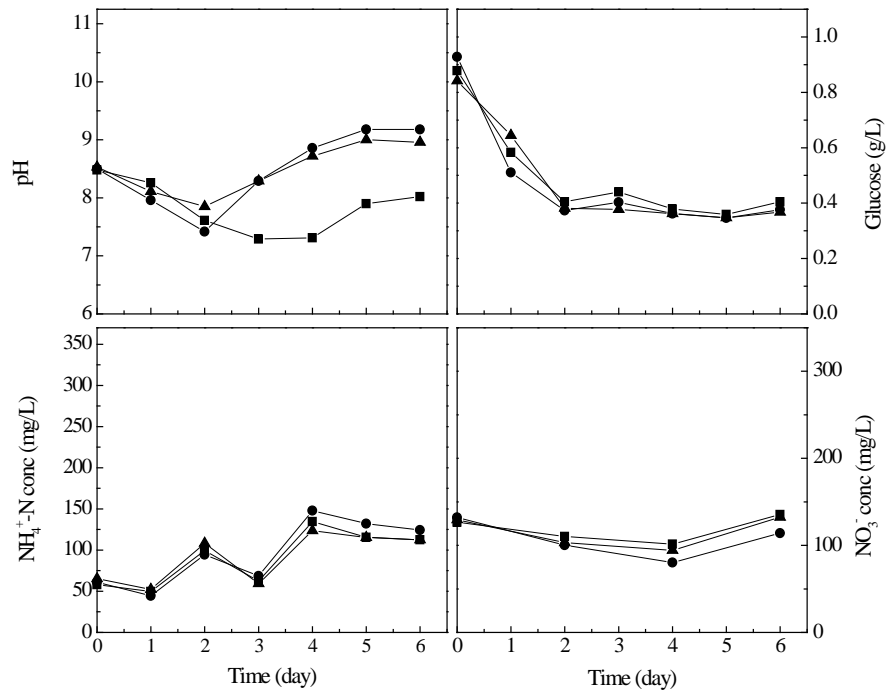


圖 13. 在不同培養溫度下對 *Oscillatoria* sp. Wu1. 的 pH, Glucose, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 與 NO_3^- 濃度之時間變化

Temperature ($^{\circ}\text{C}$): (■) 20; (●) 30; (▲) 40.

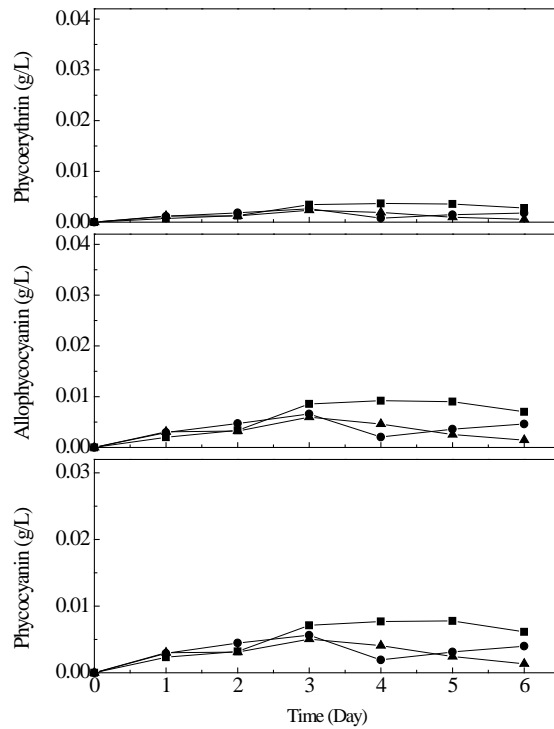


圖 14. 不同培養溫度對 *Oscillatoria* sp. Wu1 藻藍蛋白濃度之時間變化

Temperature ($^{\circ}\text{C}$): (■) 20; (●) 30; (▲) 40.

在色素方面，本研究測量其藻藍蛋白的產量，其實驗結果顯示於圖 15。由圖 15 的實驗結果可以發現，藻

藍蛋白及異藻藍蛋白於溫度為 30°C 的條件下產量最高，分別為 228.46 及 156.67 mg/g。本研究在不同的溫度條件下，有著相對不同的藻藍蛋白含量，而這實驗結果，曾有研究提出一個觀點，在不同的光照強度下，生產色素及色素蛋白的最佳培養溫度也會有所不同(Zucchi and Necchi, 2001)。

綜合以上的實驗結果，以本實驗在日光燈作為光源的培養條件下，光照強度為 4300 Lux，其培養溫度條件為 30°C 的條件下能夠獲得最佳的藻藍蛋白以及異藻藍蛋白產量。然而，文獻中所提及的光照強度所造成不同培養溫度的影響，由於本研究皆以日光燈作為光照來源，且光照強度維持在 4300 Lux 的條件下，因此，在此研究條件下 *Oscillatoria* sp. Wu1 最佳的培養溫度為 30°C。故本研究後續的實驗條件皆以此實驗結果持續進行。

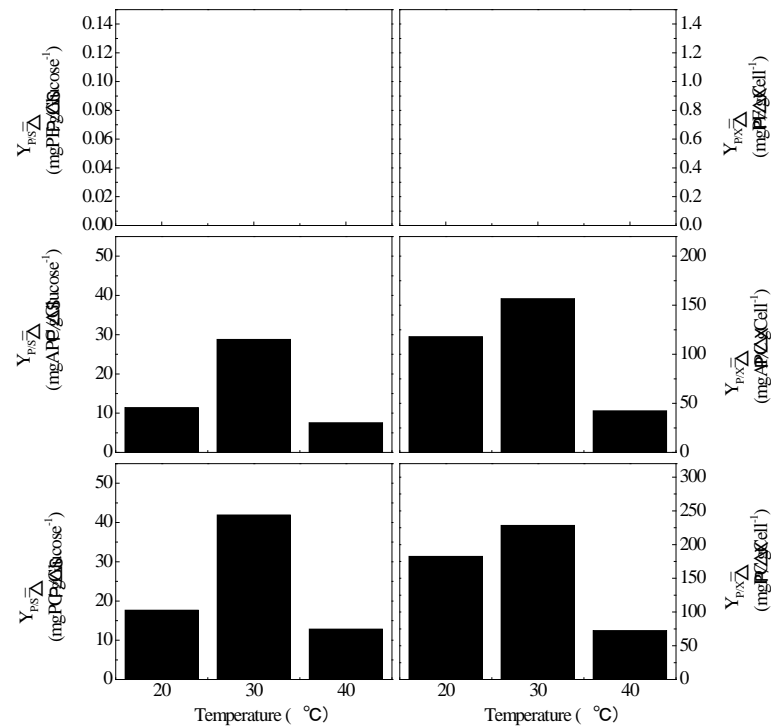


圖 15. 不同培養溫度對 *Oscillatoria* sp. Wu1 對 *Oscillatoria* sp. Wu1 的藻藍蛋白、異藻藍帶白與藻紅蛋白產量之影響

4 結論

Oscillatoria sp. Wu1 是一種絲狀的藍綠菌，其主要生產的色素為藻藍蛋白可作為天然色素、螢光標記試劑以及具有藥理活性的藥物。對於培養基成分上來說，由於文獻曾提及，缺乏氮源時，在極低或極高的溫度下以及高光照的強度下，會導致 *A. africanum* 的 biomass 有生長惡化的情況，且會降低藻藍蛋白的含量(Chaneva, 2007)。因此，本研究以濃度為 1.0 g/L 的果糖以及濃度為 0.5 g/L urea 分別作為 *Oscillatoria* sp. Wu1 在培養時的碳/氮源。此外，不僅培養基的成分會造成 *Oscillatoria* sp. Wu1 在生長上以及藻藍蛋白產量上會有所影響，對於培養的環境因子也極為重要。在此，本研究以培養溫度以及培養基初始的 pH 這些環境因子來探討是否會造成 *Oscillatoria* sp. Wu1 的 biomass 產量及藻藍蛋白含量有所影響。就培養溫度的實驗結果來看，*Oscillatoria* sp. Wu1 最適生長溫度為 30°C 因此，以台灣本土的一般室溫情況下為最適的培養條件。另外，在酸鹼值方面從結果來看以 pH 8.5 最佳。因此，本研究認為 *Oscillatoria* sp. Wu1 以本研究的培養基組成經過滅菌程序後的 pH 作為培養的初始條件最為理想，還可省去調整 pH 的步驟。

5 參考文獻

- 羅曉艷、沉艷、任體輝。2008。水中硝酸根分析方法的改進。化肥工業 35: 58-60。
- Chaneva, G., Furnadzhieva, S., Minkova, K. and Lukavsky, J. 2007. Effect of light and temperature on the cyanobacterium *Arthonema africanum* – a prospective phycobiliprotein-producing strain. *J Appl Phycol* 19: 537-544.
- Li, X., Xu, H. and Wu, Q. 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 98:764-771.
- Parsons, T. R., Maita, Y. and Lalli, C. M. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. *Pergamon Press*, New York, U.S.A. 1st ed., 14-17.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E. and Bashan, Y. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water research* 45: 11-36.
- Robert, M. C. 2004. Allophycocyanin and energy transfer. *Biochim Biophys Acta* 1657: 73-81.
- Romay, C., Gonzalez, R., Ledon, N., Ramirez, D. and Rimbau, V. 2003. C-Phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Curr Protein Pept Sci* 4:207-216.
- Silveira, S. T., Burkert, J. F. M., Costa, J. A. V., Burkert, C. A. V. and Kalil S. J. 2007. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresour Technol* 98: 1629-1634.
- Telford, W., Moss, M., Morseman, J. and Allnut, T. 2001. Cryptomonad algal phycobiliproteins as fluorochromes for extracellular and intracellular antigen detection by flow cytometry. *Cytometry* 44:16-23.
- Vonshak, A., Chanawongse, L., Bunnag, B. and Tanticharoen, M. 1996. Light acclimation and photoinhibition in three *Spirulina platensis* (cyanobacteria) isolates. *Journal of Applied Phycology* 8: 35-40.
- Zeng, W.L., Cong, W., Cai, Z.L. and Ouyang, F. 2002. Reviews on the trophic modes and factors affecting photosynthesis of *spirulina*. *Chinese Bulletin of Botany* 19: 70-77.
- Zucchi, M. R. and Necchi, O. Jr. 2001. Effects of temperature, irradiance and photoperiod on growth and pigment content in some freshwater red algae in culture. *Phycol Res* 49: 103-14.