

中華民國第 52 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高職組 化工、衛工及環工科

最佳創意獎

091106

囫圇吞「藻」一天價藻膽蛋白質快篩法

學校名稱：國立新竹高級工業職業學校

作者： 職二 黃斯煒	指導老師： 連守山 謝建中
---------------	---------------------

關鍵詞：藻膽蛋白、螢光劑、聚乙烯醇(PVA)

摘要

本研究的目的是開發一種新的篩藻邏輯—「藻泥+PVA 抹盤法」，可以在**少量、簡單、快速且有效地**的原則下判定藻種是否含有足量的藻膽蛋白；再以傳統萃取方法進行量化的確認。最後結果：(1)在藻株的培養上，若在充足的 CO₂ 供應下，泥生顫藻的培養可達到 7.016 g/L 乾重，濃度遠超過業界所稱具經濟性的指標 (5 g/L)。(2)在基因鑑定上，生物資源保存及研究中心確認泥生顫藻是一個新屬，也接近偽魚腥藻。(3)在藻膽蛋白的品質上，來自泥生顫藻的純度為 0.72；溫泉藻的純度為 0.74，皆大於 0.7，已達到食品級的水準；產率大於 100 mg/g (值得開發的門檻)。由於藻膽蛋白的單價比黃金還貴，說明本研究發展的新方法所發現的泥生顫藻具有非常大量的藻紅素，整體的開發極具經濟效益。

壹、緣起

一、藻膽蛋白

藻膽蛋白常見於原核的藻綠菌，真核的紅藻，單細胞真核的隱藻，灰膽藻的藍色小體 (cyanelles) (Hemlata et al., 2009)；多細胞的紅藻有髮菜與紫菜 (Yabuta et al., 2010)。

構造、功能及種類—藻膽蛋白是一種光合作用的輔助色素，是巨大複合物—藻膽體 (phycobilisomes, PBSs) 所形成的有機體，藻膽蛋白由蛋白質與四個發色團—藻膽色素 (phycobilins) A、B、C、D，以共價鍵結合而成，是一群色彩鮮豔且具有螢光的水溶性色素，該蛋白會捕捉特定波長的光能，並將其傳遞至葉綠素，示意圖如圖 1 所示。為了捕捉光，它必須位於類囊體膜 (thylakoid membrane) 的外表。藻膽蛋白 (phycobiliprotein) 有四個種類：藍綠色的異藻藍素 (allophycocyanin, APC)、深藍的藻藍素 (phycocyanin, PC)、深紅的藻紅素 (phycoerythrin, PE) 及橘色的藻青素 (phycocyanobilin, PCB)。

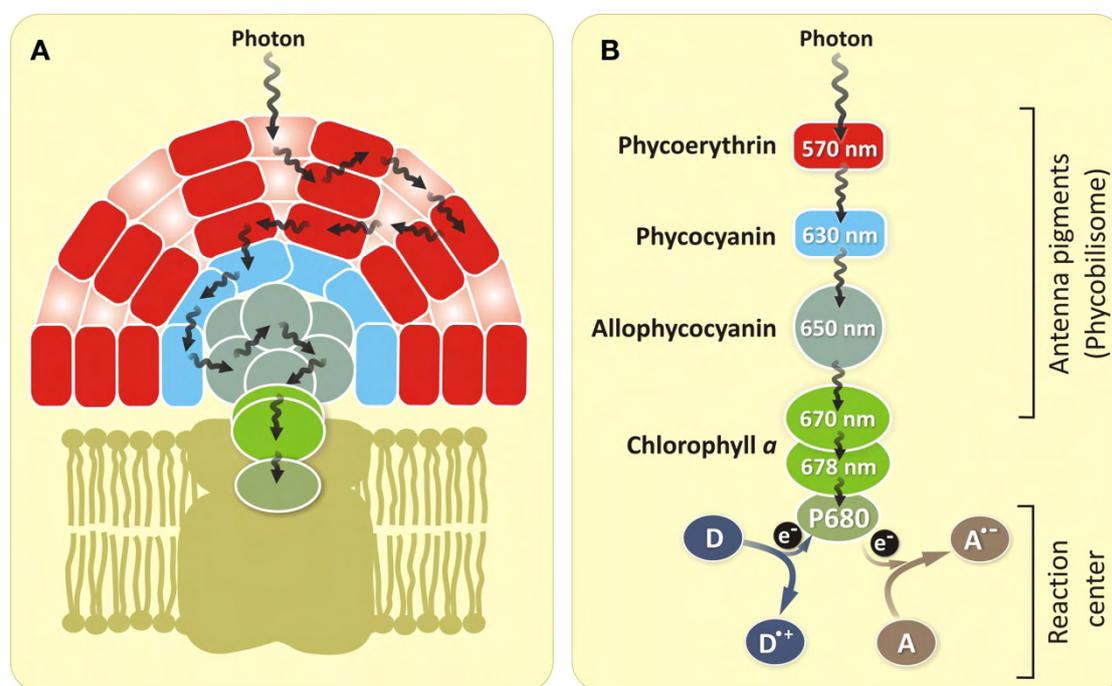


圖 1、藻膽蛋白與整個藻膽體的相對位置示意圖 (Govindjee and Shevela, 2011)

用途與重要性—藻膽蛋白的用途呈現多樣化，市場潛力無窮。藻膽粗蛋白是一種天然色素可添加於食品，而經純化後可作為醫療與保健之用。目前市場上，各種天然的藻色素可用於乳製品、口香糖、果凍等食品，以及眼影與口紅等化妝品工業 (廖遠東, 2006; 鄭俊明, 2007)。其在醫學的實務上亦十分重要，不但可以做為螢光追蹤染劑、免疫定量標誌染色法、螢光顯微法 (Eriksen, 2008)；還可用於醫療保健上，目前已證實其具有抗氧化的作用 (Romay et al., 2003; Guan et al., 2009)、抗畸胎性 (Guan et al., 2009)、抗濾過性病毒 (Murugan and Radhamadhavan, 2011)、抗癌與抗腫瘤 (Wang, 2008; Zhang et al., 2011)、抗過敏 (Shih et al., 2009)、增強免疫能力 (Li et al., 2006)、因為抗氧化能力而能保護肝臟 (Nagaraj et al., 2011)、

保護神經的作用 (Romay et al., 2003)、自由基清除 (Bhat and Madyastha, 2000; Zhou et al., 2005)、抗發炎 (Shih et al., 2009; Romay et al., 2003)、老年痴呆症 (Romay et al., 2003)、降低血脂 (Nagaoka et al., 2005) 等等，不少在製藥上有十足的貢獻。

市場與潛力—藻膽蛋白在日本已被核准作為食品著色劑。而國內，遠東藍藻工業股份有限公司推出健康食品 Apogen 健康滴液，且年產藍藻 200 噸以上的粉末 (廖遠東，2006；江善宗、殷儷容，2006)。而美國市場的藻藍素年總產值為 5-10 百萬美元 (Sekar and Chandramonhan, 2007)。由此可見，由菌體 (藍藻) 生產具有高濃度的特定藻膽蛋白，深具商業的價值。藍藻能提供的以藻藍素為大宗，其它藻膽蛋白則因藻種較不易發現，研究的文獻較少。以藻紅素為例，早年都是得自深海真核的紅藻 (Tschudy, 1934)，Dupré et al., (1995) 宣稱其紅微藻可培養到 2 g/L，事實上這數值對於菌而言並不高。然而，藻紅素的重要性並不會因此而消失，Soni et al. (2009) 就提出藻紅素具有治療糖尿病的功效，而且藻紅素與藻藍素相同，具有抗氧化與抗腫瘤，糖尿病等功效，但更具熱穩定性 (Yabuta et al., 2010; Pumas et al., 2012)，深具開發的潛力。

國內的學者近年來亦著眼於藻紅素的開發，甚於藻藍素。例如：國內台大漁科所周宏農教授花費三年的時間研究，從髮菜及紫菜中提煉出藻紅素，並作為氣喘新藥 (2011.1.6，民視新聞台；蘇惠美等，2009)。就在學者積極探討藻紅素在抗氧化與抗腫瘤等方面的功效時，若能有積極的作法來配合提高藻紅素的產量，相信藻紅素也可以像藻藍素般廣大應用於市場，讓人類受惠。只不過這些都必須等到找出高藻紅素含量的藍綠菌才能付諸實行。

藻膽蛋白的萃取—目前已知藻膽蛋白是一種螢光強度強且穩定性高的蛋白質，因此有關藻膽蛋白的萃取方式則備受重視。藻膽蛋白的萃取方法很多種，包括：傳統的均質法 (Homogenization)、超音波聲裂法 (Sonication)、溶菌酶法 (Lysozyme)、熱震法 (Heat Shock)、凍解法 (Freezing and thawing)、超臨界流體萃取法 (Nitrogen lysis) (Hemlata et al., 2009)。影響的因子則包括：各種不同的緩衝溶劑、酸鹼值 (pH)、塩度、凍解法的溫度等等。而 Galland-Irmouli et al. (2000) 與 Hemlata et al. (2009) 都提到凍結解凍法的萃取效果較傳統均質方法佳。前者，將紅藻放入液態氮凍結，解凍後再加入 0.02 M pH 7.0 的磷酸緩衝溶液，並以轉速 24,000 rpm 進行均質，萃取出藻膽蛋白。日本專利 (1995) 大日本インキ公司也指出，若將紅藻經超音波處理、反覆凍結、解凍、擠壓及以醣分解酵素水解等方式使其細胞壁破裂後，可加速紅藻中的藻膽蛋白的抽出。

純化—Hemlata et al. (2009) 說明純化的步驟有四道，第一道就是萃取，其上澄液稱作是粗萃取物 (Crude extract)；第二道則是以硫酸銨溶解後進行離心，再取其沈澱物；第三道則是純化的關鍵，可用透析的技術來分離不同的物質；最後一道則是尺寸的篩選，利用如 Sephadex G-25 or G-100 的分子篩來分級。至於純度的指標，一般都採用特定藻色素波長下的吸收度除以芳香族雜質的波長 (280 nm) 的吸收度，對藻紅素而言，即 A_{565}/A_{280} (Galland-Irmouli et al., 2000; Su et al., 2010)。若粗萃取物的純度在 0.7 以上，則稱為食品級；3.9 以上則為反應級，4.0 以上則是分析級。

藻種篩選—人類對於藻的認知不多，過去一直僅有少量的研究在進行，直到近幾年才開始大量投入研發的能量。有關藻膽蛋白的經濟性取決於是否擁有性能優越，產量豐富的藻種。然而，目前對於具有藻膽蛋白的藻種並沒有一個有效的鑑別方法，若依照傳統的萃取純化步驟不但需要大量的藻液，而且需要重複破壞細胞壁的動作，確認食用醋酸萃取液的劑量，以

及昂貴的儀器。由於步驟十分費時且費力。當面對無數的藻種需要鑑別時，常束手無策。傳統篩菌的觀念，首重篩選的邏輯，若能開發一種新的鑑別方法，在少量、簡單、快速且有效地原則下判定出藻種樣品是否含有足量的藻膽蛋白，相信再多的藻種也不用擔心。很幸運地，個人在執行以聚乙烯醇（PVA）固定化藻的實驗時，意外地發現「藻泥+PVA 抹盤法」可以用來快速且大量判別藻株是否富含藻膽蛋白，也因此從八種藻株中找到一株稀有的高藻紅素產出的泥生顫藻和一株高藻藍素產出的溫泉藻。

二、藻類應用於保健食品之現況

藻類（algae）具有真核細胞，但缺少根莖葉，在分類學上屬於原生生物界（Kingdom Protista）；亦即不為動物或植物界的微生物。不過，其個體的形狀有很大的差異，最小的藻類為單細胞，直徑僅有 1-2 微米，最大的卻長達 60 多米，為缺少維管束的多細胞；在外形上則有纖維狀與球狀、橢圓狀、桿狀之分（Tortora et al., 2007; Talaro, 2008）。藻類最大的特點則在於具有葉綠素，能夠行光合作用，大部份在生理上屬於光合自營性；少數則是化學異營性。

藻源與分類—藻類生活在水中，如海水或淡水皆能生存。若以生長的形態來區分可分為三類：浮游藻類（floating algae），浮游生長於水中，如甲藻門和綠藻門中的單細胞藻類；漂浮藻類（drift weed），常見飄浮纏繞於蚵棚，如馬尾藻；有的藻類則固著生長在一定基質上，稱為底棲藻類（benthic algae），如藍藻門、紅藻門、褐藻門、綠藻門，多數生長在海岸帶上。在台灣，藻類主要以冬春兩季生長最為茂盛；而在夏秋時，海藻的種類與數量明顯的減少，因此潮間帶海藻相呈現相當明顯的季節性（江善宗，2006）。

環境議題—海藻對環境的貢獻最大，可吸收大氣中大部份的二氧化碳，大幅減低溫室效應，其貢獻遠較亞馬遜雨林的植物更加重要。如今，人類為因應能源危機，又再度重視藻類生產質柴油（或藻油）的研究。不過，在環境生態學上，藻類卻因為湖泊、河川等水體優養化的問題而背負不少惡名。還好，若能在純藻株的培養下，充份提供營養源，定時排除大量的藻體，則可以有效避免藻華現象所產生的毒性問題，還可利用其優養化的特性，發展脫磷脫氮的處理技術。目前大陸從陽澄湖或太湖等重度優養化地區採收藻體，製作藻膽蛋白，可想而知其價廉卻鮮少顧客訂貨。反觀本研究所使用的藻株，來自新竹內灣山區乾淨水源處，經多道程序篩選出來的純藻株，該藻株亦經中央研究院吳俊宗教授看過，確認沒有毒性之虞。

營養價值—以下按已商品化的保健食品，即綠藻及藍藻分別作說明。

（一）綠藻

綠藻（green algae, 2-8 μm ）又稱為小球藻（*Chlorella*），為一種單細胞藻。二次大戰之後，除了美、德之外，日本也相繼投入綠藻的研究。宮田教授於 1959 年，開始大量培養並製成食品銷售（<http://aimat.myweb.hinet.net/science/algae.htm>）。目前，綠藻是極受歡迎的天然綠色食品之一。

綠藻的顏色呈現翡翠綠，所含的葉綠素是植物界之冠。綠藻中含約 60 %的植物性蛋白質、20 %的複合性澱粉、11 %的脂肪（82 %為不飽和脂肪酸）、豐富的 DNA 及 RNA(核酸)、超過 23 種的維生素及礦物質（如葉綠素、礦物質、維他命、纖維質、葉酸、核酸、菸鹼酸、鈣、鎂、鐵、鋅）、8 種必需氨基酸；但不含藻膽蛋白。綠藻為鹼性食品，可調整人體成為正常弱鹼性體質。綠藻的光合效率也比其他植物快數十倍，同樣土地面積所產生的營養價值比小麥大出 60 倍以上，所含葉綠素遠比其他植物豐富。

(二) 螺旋藻

螺旋藻 (*Spirulina*)，俗稱藍藻 (Blue algae, 5-8 μm , 長約 0.3-0.5 mm)，為多細胞藻類，適合在氣候溫熱、年降雨量少的地區，可生長於濃度為海水 6~7 倍的鹹水湖中。法國克里門特博士，於 1973 年 5 月的國際蛋白質會議正式發表對藍藻的成分、生態、培養方法、安全性、保健效果等的研究成果，立即受到全世界的注目 (<http://aimat.myweb.hinet.net/science/algae.htm>)。

螺旋藻是藍綠藻的一種藻類，但其光合作用與其他植物不同，不是貯存澱粉而是貯存動物性的肝醣，並能合成蛋白質、維生素、礦物質、葉綠素、酵素等營養素。由於其所含的營養素極為豐富且完整，又因為細胞壁較薄，營養素容易被人體所吸收，所以被譽為最完善的天然營養食品。例如：螺旋藻含有：(1)八種人體所需又無法自身合成的氨基酸，蛋白質含量高達 60~70%，比大豆 (33~35%) 多 1 倍以上，甚至是牛肉 (18~20%) 的 3 倍以上，因此可當做優質的高蛋白質食品。(2)維生素，包括維生素 B1、B2、B3、B6、B12 和維生素 E、A。其中 β -胡蘿蔔素的含量豐富為所有食物之冠，比胡蘿蔔的含量還要高出 10 倍。(3)礦物質，包括鈣、磷、鎂、鐵等，其中鐵的含量比一般豐富鐵質食物多出 12 倍，是含鐵質量最豐富的食物。(4)葉綠素為普通蔬菜含量的 10 倍以上。(5) γ -次亞麻油酸，是目前所有天然食品中最高的。在天然食品中能被人體直接吸收的 γ -次亞麻油酸只存在於母乳和螺旋藻中。此外，螺旋藻中還含有不飽和脂肪酸、藻藍素、酵素和小分子多醣體等高生物活性物質，人體吸收消化率高達 86% (鄭俊明, 2007)。

市場規模—藍藻的優越營養價值，目前世界上已有很多國家進行生產及利用，全世界年產量約達三千餘公噸，主要生產國家有中國、印度、美國、墨西哥、泰國等，主要用途作為保健食品、營養補充劑、食品添加物等 (<http://www.cabco.com.tw/chinese/05.htm>)。目前台灣是藍藻的主要出口國家之一，以遠東藍藻工業股份有限公司為例，年產量藍藻 200 噸粉末以上，品質早就已經達世界級的標準外 (廖遠東, 2006; 江善宗、殷儷容, 2006)。

至於綠藻，台灣也是綠藻全世界最大的生產國 (經濟部與產業工會統計資料, 2006)，台灣綠藻公司，綠藻年產量達 1200 公噸以上，全球市佔率達 70%。另外，遠東藍藻工業股份有限公司，綠藻年產量 1000 噸粉末以上 (廖遠東, 2006; 江善宗、殷儷容, 2006)。

市場價格與潛力—儘管藍藻具有藻藍素，但是藍藻的培養成本很高，傳統培養基 (BG-11) 的營養份不夠，必須經常添加昂貴的維生素 B12，而且若為海藻則需有海水，不但成本高，興建工廠必須臨海也十分不便利。這也造成藻藍素價格高達每毫克 2-25 美元 (鄭俊明, 2007)，比黃金還貴上 30-500 倍 (金價每盎司 1700 美元，每盎司 31103.5 毫克；因此金價每毫克 0.055 美元)。若能夠獲得藻膽蛋白產量高的淡水型藻種，則可以大幅降低藻藍素生產的成本。

三、PVA 固定化技術於藻類的應用

固定化技術大致可分為七大類，分別為結絮法 (flocculation)、物理吸附法 (adsorption)、共價鍵結法 (covalent)、離子鍵結法 (ionic binding)、交聯法 (cross-linking)、包埋法 (entrapment) 及微膠囊包覆法 (micro encapsulation) (陳國誠, 2000)。陳國誠教授實驗室過去曾成功使用 PVA (polyvinyl alcohol, 聚乙烯醇) 磷酸酯化法及 PAA (Polyacrylamide, 聚丙烯醯胺) 及 PU (polyurethane, 聚氨酯) 製備固定化 (包埋) 菌體顆粒 (Chen and Lin, 1994)。

聚乙烯醇 (Polyvinyl Alcohol, 簡稱 PVA) 是在西元 1924 年由德國的科學家 Dr. Hermann

與 Dr. Haenel 合成得到此一水溶性高分子化合物。PVA 是一種白色或微黃色，顆粒或粉狀，安定、無毒的水溶性高分子。有關藻與 PVA 結合的研究不勝枚舉，大多是作為生物可分解塑膠。例如：[Chiellini et al. \(2008\)](#) 提出將 40%PVA 在甘油溶液下摻配綠藻 *Ulva* 纖維與澱粉，可以增強塑膠膜的強度達 30%，而該膜在土壤中僅 100 天即可以分解 80%。至於藻種的固定化方法，過去大多使用天然的褐藻膠，目前仍未有使人工合成聚合物進行包埋的研究發表，更沒有學者利用固定化方法作為是否分泌藻膽蛋白的判定方法。

貳、 研究動機

藻紅素用途廣泛，既可以作為天然色素廣泛應用於食品、化妝品、染料等工業，又可製成螢光試劑，用於臨床醫學診斷和免疫化學及生物工程等領域。國內台大海洋所周宏農教授從髮菜及紫菜中提煉出藻紅素，並作為氣喘新藥。大陸汕頭醫學院李冠武教授還發現藻紅素具有光敏作用，能藉導鐳射殺傷腫瘤細胞。廈門大學等也已經做過了以硫酸透析法萃取藻紅素的研究（[鄭江等，2003](#)；[Viskari et al., 2003](#)）。因而研究和開發藻紅素具有重要的理論和實際意義。然而，在整個藻紅素的開發上，藻種的選定仍有很大的空間，一般而言，植物的成長較藻類慢，而真核多細胞的紅藻，又較藍綠藻（菌）來得慢。若能夠獲得藻膽蛋白產量高的藍綠藻（菌），則可以大幅降低藻紅素生產的成本。很幸運地，我們在進行藻類其他項目的研究中，偶然發現了這個能**少量、快速、輕鬆地**萃取出藻紅素的方法，甚至為了證明我們所發現的泥生顫藻具有非常大量的藻紅素，極具經濟效益（比黃金還貴），於是展開了一連串的研究。

參、 研究目的

- 一、發展一套**少量、簡單與快速地**判定藻是否具備藻膽蛋白的「藻泥抹盤+PVA 覆蓋」的固定化方法。
- 二、以舊有藻膽蛋白萃取方法及螢光原理分析實驗之藻種中的藻膽蛋白及含量。
- 三、探討創新的「藻泥抹盤+PVA 覆蓋」的固定化方法，其運作的原理。
- 四、找到具有**最大量藻膽蛋白**（尤其是藻紅素）的藻種。

肆、 研究設備及器材

- 一、研究設備：
 - (一) 高速冷凍離心機 (Refrigerated Centrifuge)：No. 10165, SIGMA 2-16PK, SIGMA (德國)，最高轉速 15,300 rpm，轉盤容量為 16x50 mL
 - (二) 分光光度計 (UV-VIS spectrophotometer)：DR4000U, HACH (美國)：光束：1 mm；光度計精準度：5 mAbs at 0.0 to 0.5 (1 % at 0.50 to 2.0 Abs)，±1.5 nm
 - (三) 半微量分析電子天平：XR 205A, Precisa, Swiss. Precision, 0.0001 g; max. load, 205 g
 - (四) 強力震盪器 (Vortex)：GDS150, Gene Pure
 - (五) 顯微鏡：Olympus BH-2

- (六) 磁石攪拌機 (附加熱器) : HMS-212, Fargo Instrument
- (七) 烘箱 : DS-60, Deng Yng, Taipei
- (八) 超純水製造機 : Aqua MAX-ultra 370, Young Lin Instrument, Korea
- (九) 高溫高壓滅菌釜 : TM-329, TOMIN, Taipei
- (十) 冷凍乾燥機 : FDU1200, Eyela associated with a pump, GCD136x, Ulvac

二、研究器材：

- (一) 過濾裝置：今日儀器
- (二) 玻璃砂：0.1mm
- (三) 紫外燈
- (四) 離心管 Eppendorf tube, 50 mL
- (五) 培養皿 (Petri dish)：玻璃製，10 cm 直徑

三、藻類的培養基：

表 1、BG11 培養基的成份 (Borowitzka, 1988)

藥品成分	濃度(g/L)
NaNO ₃	1.5
K ₂ HPO ₄	0.040
MgSO ₄	0.075
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.036
Citric acid	0.006
Ferric ammonium citrate	0.006
EDTA- Na ₂	0.001
Na ₂ CO ₃	0.020
trace element solution*	1 mL

*trace element solution

藥品成分	濃度 (g/L)
H ₃ BO ₃	2.860
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.810
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.220
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.390
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.010
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079

伍、 研究過程及方法

一、藻種性質

(一) 藻種外觀

1. 泥生顫藻



圖 2、泥生顫藻的鏡檢照片

說明：泥生顫藻，桿狀，基本節數為六節，約 70-110 μm ，營養份足夠，可養出更長的泥生顫藻，培養後溶液呈現深褐色。

2. 溫泉藻

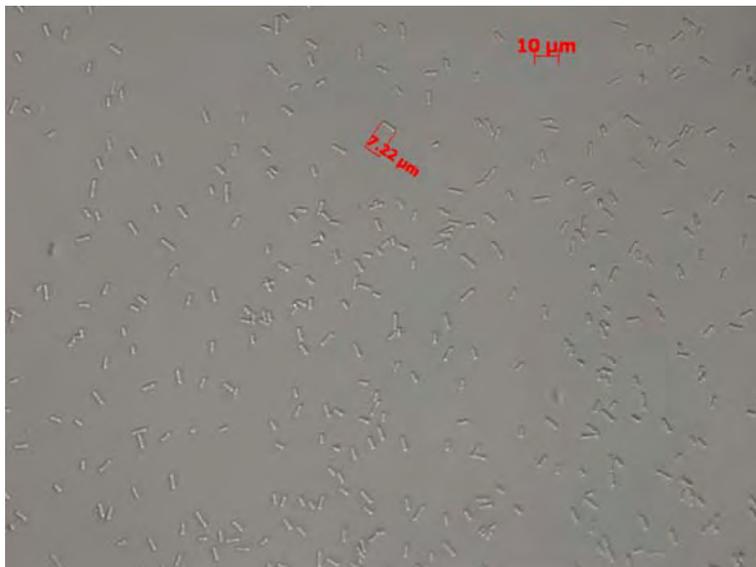


圖 3、溫泉藻的鏡檢照片

說明：溫泉藻，桿狀，約 7-8 μm ，培養後溶液呈現深綠色。

3. 聚球藻

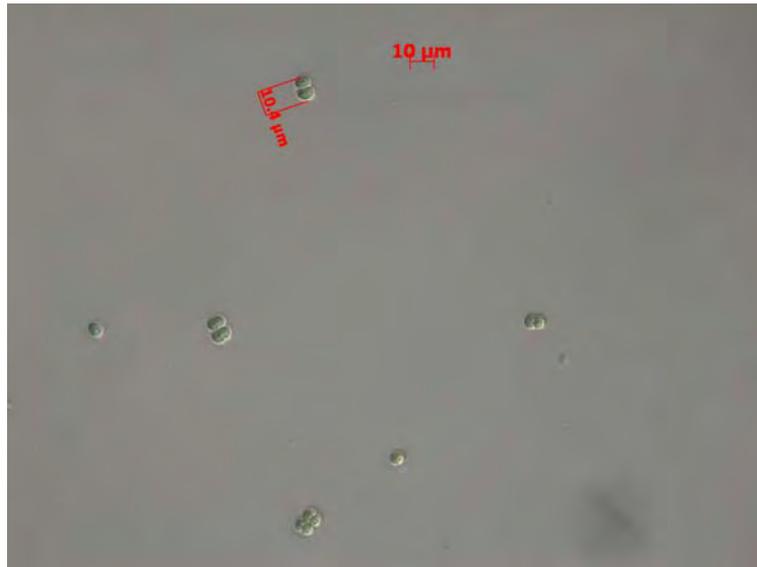


圖 4、聚球藻的鏡檢照片

說明：聚球藻，雙球狀，約 10 μm，培養後溶液呈現與溫泉藻不同的綠色，深度相仿。

(二) 藻種培養生長曲線

1. 泥生顫藻

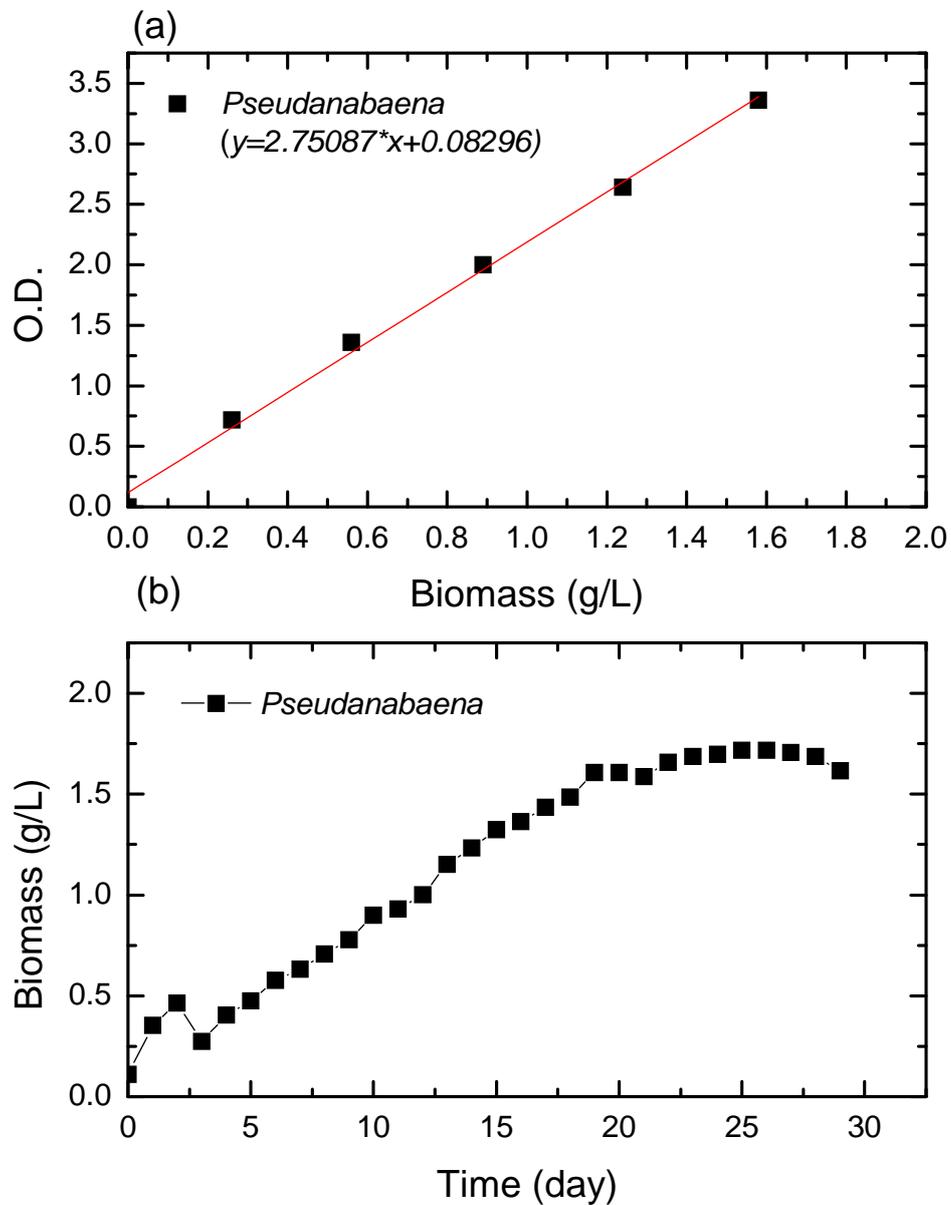


圖 5、泥生顫藻的藻重檢量線(a)與生長培養曲線(b)。

說明：咖啡色的泥生顫藻其光學密度介於以下溫泉藻與聚球藻之間，相對應下成長的最高峰接近 1.8 g/L。

2. 溫泉藻

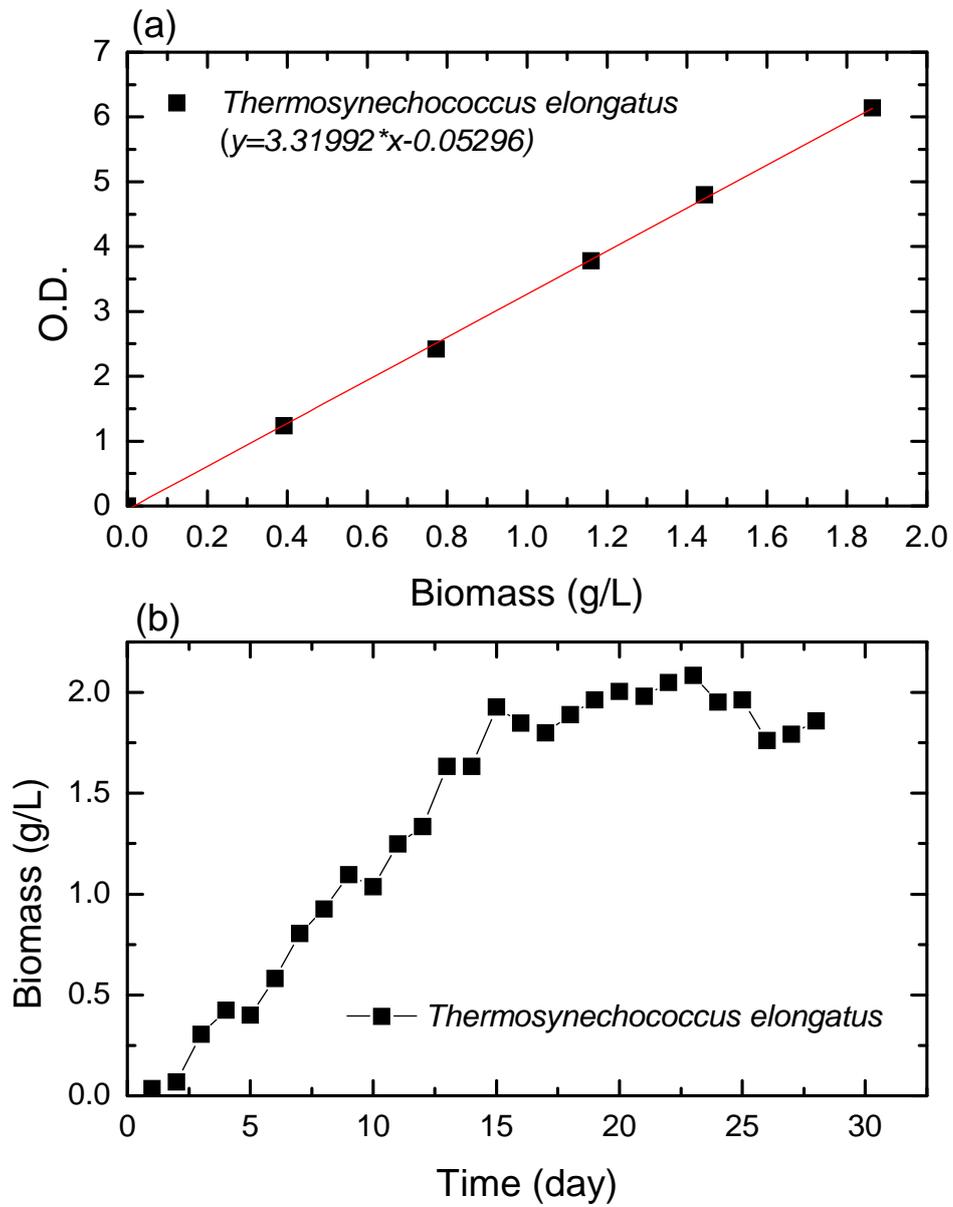


圖 6、溫泉藻的藻重檢量線(a)與生長培養曲線(b)。

說明：溫泉藻的光學密度較高，相對應下成長的最高峰只有 2.0 g/L。

3. 聚球藻

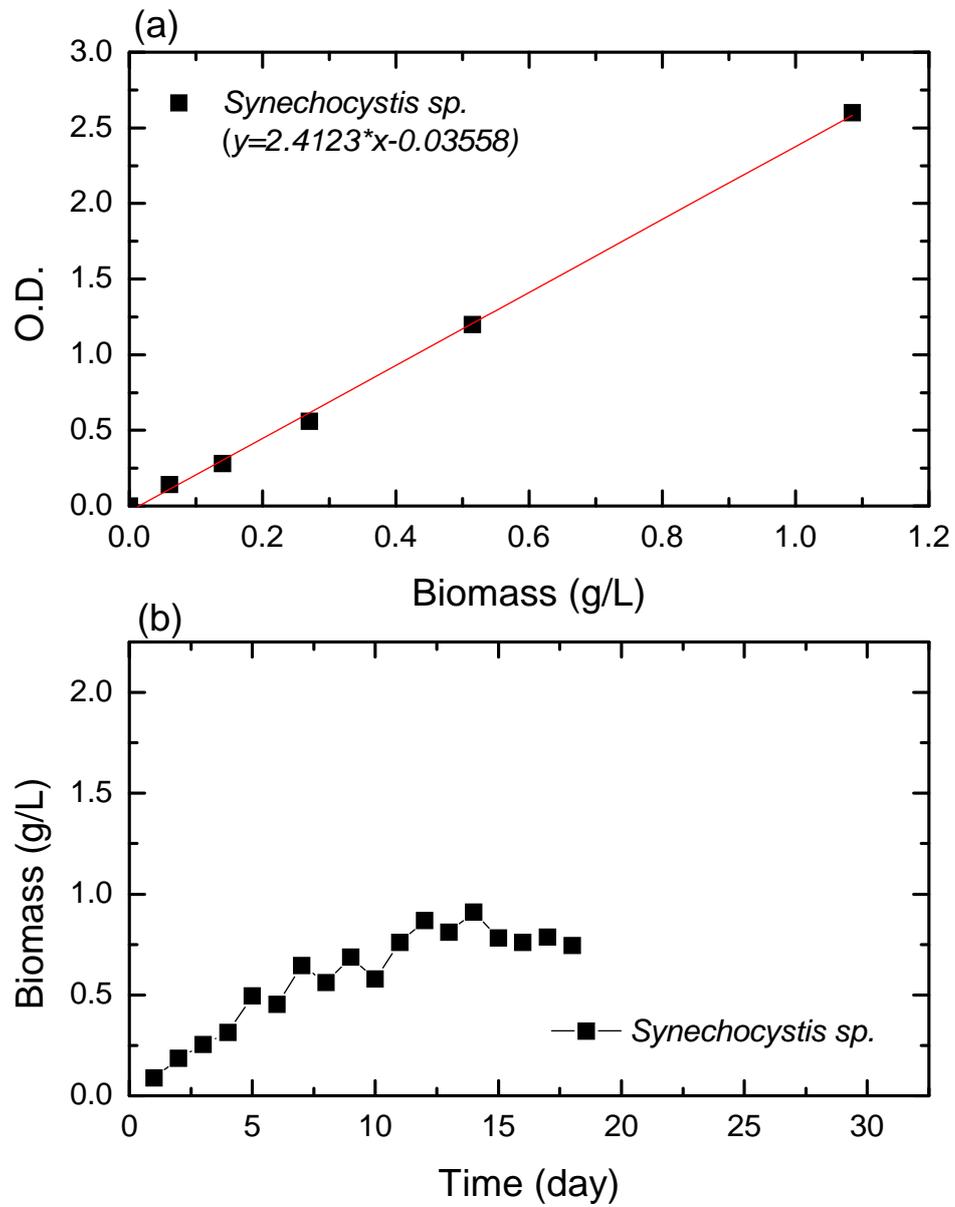


圖 7、聚球藻的藻重檢量線(a)與生長培養曲線(b)。

說明：聚球藻的光學密度較低，相對應下成長的最高濃度僅 0.9 g/L。

表 2，實驗所用藻的濃度分析，取樣 100 c.c.，分為兩管離心烘乾

藻種	第一管 (g)	藻+管重(g)	藻重(A) (g)	第二管 (g)	藻+管重 (g)	藻重(B) (g)	A+B (g)	濃度 (g/L)
泥生顫藻	1.3021	1.8045	0.5024	1.2752	1.4744	0.1992	0.7016	7.016
溫泉藻	1.302	1.587	0.285	1.3021	1.431	0.1289	0.4139	4.139
聚球藻	1.2723	1.4264	0.1541	1.2723	1.311	0.0387	0.1928	1.928

說明：由表中看出，泥生顫藻在充足 CO₂ 供應下，達到穩定期時（約 12 天）的濃度為約其他藻類的 2 倍以上。

(三) 藻種基因鑑定結果

1. 溫泉藻

表 3，溫泉藻的部份基因序列與 NCBI 網站的比對 (Blast) 結果。

命名	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> WFW-1																																																																														
鑑定序列	AGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAGCACTTCGGTGCTAGTGGCG GACGGGTGAGTAACACGTGAGAATCTACCCTCAGGAGGGGATAACGGCTGGAACCGCCGCTAATACCCCATATGCCG AAGGTGAAATCTTTTTGGCCTGGGGATGAGCTCGCGGTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACG ATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG GGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGACCCGCTGAGGGATGAAGGCCCTTTGGGTTGTAAACCTCTTT TCTCAGGGAAGAACAATGACGGTACCTGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAG GAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAAGTGGCTTTCCAAGTCTGCCGTCAAAGCCCCGAGGCTT AACCTCGGATCGGCGGTGAAACTGGATCGTAGAGTGCCTCAGGGGTAGGGGGAATCCCGGTGTAGCCGTGAAATGC GTAGATATCGGGAAGAACAACAGTGCAGAAAGTGCCCTACTGGGACGTTACTGACACTCATGGACGAAAGCTAGGGGAG CGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGCTGGTATCCACTCCAGCAGTGGCC TAGCCAACCGTTAAGTGTCCGCTGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATGACGGGGGCCGCACA AGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTCGCGAATCCTGCGGAAAC GTGGGAGTGCCTTCGGGAACGCGAACAACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTC CCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAGGGGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGA GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATATGCCCTTACGTCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTGTGGACAGAGAGT TGCCAACCCGCGAGGGCGAGCTAATCTCTTAAACCACGGCTCAGTTCAGATTGCAAGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGC GGAATCGTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCGCCGTACACCATGG GAGTTGGCCACGCCGAAGTCGTTACTTAACCCGAAGGGAGGGGGACGCCTAAGGCAGGGGTGATGACTGGGGTGAA GTCGTAACAAGTAGCCG																																																																														
NCBI 比對結果	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Accession</th> <th>Description</th> <th>Max score</th> <th>Total score</th> <th>Query coverage</th> <th>E value</th> <th>Max ident</th> <th>Links</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BA000039.2</td> <td>Thermosynechococcus elongatus BP-1 DNA, complete genome</td> <td>1834</td> <td>1834</td> <td>96%</td> <td>0.0</td> <td>91%</td> <td></td> </tr> <tr> <td>D83715.1</td> <td>Synechococcus elongatus gene for 16S rRNA</td> <td>1834</td> <td>1834</td> <td>96%</td> <td>0.0</td> <td>91%</td> <td></td> </tr> <tr> <td>EF429505.2</td> <td>Uncultured cyanobacterium clone MPB15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</td> <td>1808</td> <td>1808</td> <td>96%</td> <td>0.0</td> <td>90%</td> <td></td> </tr> <tr> <td>EF429507.2</td> <td>Uncultured cyanobacterium clone MPB18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</td> <td>1805</td> <td>1805</td> <td>96%</td> <td>0.0</td> <td>90%</td> <td></td> </tr> <tr> <td>EF429498.2</td> <td>Uncultured cyanobacterium clone MPB04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</td> <td>1801</td> <td>1801</td> <td>96%</td> <td>0.0</td> <td>90%</td> <td></td> </tr> <tr> <td>DQ131174.1</td> <td>Uncultured Synechococcus sp. from Philippines 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</td> <td>1799</td> <td>1799</td> <td>96%</td> <td>0.0</td> <td>90%</td> <td></td> </tr> <tr> <td>FR681774.1</td> <td>Uncultured Synechococcus sp. partial 16S rRNA gene, clone GMMC_16S_171</td> <td>1797</td> <td>1797</td> <td>90%</td> <td>0.0</td> <td>92%</td> <td></td> </tr> <tr> <td>EF429501.2</td> <td>Uncultured cyanobacterium clone MPB08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</td> <td>1788</td> <td>1788</td> <td>96%</td> <td>0.0</td> <td>90%</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>							Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links	BA000039.2	Thermosynechococcus elongatus BP-1 DNA, complete genome	1834	1834	96%	0.0	91%		D83715.1	Synechococcus elongatus gene for 16S rRNA	1834	1834	96%	0.0	91%		EF429505.2	Uncultured cyanobacterium clone MPB15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	96%	0.0	90%		EF429507.2	Uncultured cyanobacterium clone MPB18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1805	1805	96%	0.0	90%		EF429498.2	Uncultured cyanobacterium clone MPB04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1801	1801	96%	0.0	90%		DQ131174.1	Uncultured Synechococcus sp. from Philippines 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1799	1799	96%	0.0	90%		FR681774.1	Uncultured Synechococcus sp. partial 16S rRNA gene, clone GMMC_16S_171	1797	1797	90%	0.0	92%		EF429501.2	Uncultured cyanobacterium clone MPB08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1788	1788	96%	0.0	90%	
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links																																																																								
BA000039.2	Thermosynechococcus elongatus BP-1 DNA, complete genome	1834	1834	96%	0.0	91%																																																																									
D83715.1	Synechococcus elongatus gene for 16S rRNA	1834	1834	96%	0.0	91%																																																																									
EF429505.2	Uncultured cyanobacterium clone MPB15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	96%	0.0	90%																																																																									
EF429507.2	Uncultured cyanobacterium clone MPB18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1805	1805	96%	0.0	90%																																																																									
EF429498.2	Uncultured cyanobacterium clone MPB04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1801	1801	96%	0.0	90%																																																																									
DQ131174.1	Uncultured Synechococcus sp. from Philippines 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1799	1799	96%	0.0	90%																																																																									
FR681774.1	Uncultured Synechococcus sp. partial 16S rRNA gene, clone GMMC_16S_171	1797	1797	90%	0.0	92%																																																																									
EF429501.2	Uncultured cyanobacterium clone MPB08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1788	1788	96%	0.0	90%																																																																									

說明：基因的相似度與 BA000039.2 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 相似 91%。

#註：NCBI 為 National Center for Biotechnology Information 的縮寫。

2. 聚球藻

表 4，聚球藻的部份基因序列與 NCBI 網站的比對 (Blast) 結果。

命名	<i>Synechocystis</i> sp. THH-1																																																																
鑑定序列	ATTCCCTTATCTACTCGTATGCAGTCGACGGTCTCTTCTGGATGGCGTGGGACGGTGAGGAACGCGTGTAGGTGCGTCTC CGTCGGGGACAACGATTGGAATCGACTGCGCGGACCGGATGAGCCGAAAAGGTAGAAAATTTATCGCTTACAGAGGGGCT CGCGTCTGATTTGCTAGATGGTGGTGTAAAGGACTACCATGGCAACTATCAGTAGCTGGTCTGACAGGATGAGCATCCGCA CTGGGACTGAGACACAGCCAGACACCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGA GCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCAAACCTTAGGGAAGAAGAAAGTGACGGTACCTAATA TAAGCATCGGTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGGATGCAAGCGTTATCCGGAATCATTGGGCGTAAAGC GTCCGTAGGTGGCACTTCAAGTCTGCTGTCAAAGACCGAAGCTCAACTTCTGGTGGCGGTGGAAACTGAAGAGCTAGA GTATATATGGGTATAGGGAATTCCTAGTGTATCGCTGAAATGCGTATAGATTAGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGTCT ACTGGGCATATACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGTAGCGAGAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCGGTAAAC CATGGATACTAAGTGTGTCTGTATCGACCCACAGTGCCGAAGCAAACACGTTAAGTATCCCGCTGGGAGTACGCA CGCAAGTGTGAAACTCAAATGAATTGACGGGGAGCGCGCACAAAGCCCTGGAGTATGTGGTTAGTTCATGCAGCTCGAA GAACATTACCAAGGCGTCGACATCCTGCGATCTTGGGAAACAGGAGAGTAGCGTTATGGAACGCGAAGAAACAAGTAGT CGTGGGCTGGCGGGCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAGTCCCTCAACTATCGCAACCCTCGTCTGTTAGT																																																																
NCBI 比對結果	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Accession</th> <th>Description</th> <th>Max score</th> <th>Total score</th> <th>Query coverage</th> <th>E value</th> <th>Max ident</th> <th>Links</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>HM128346.1</td> <td>Uncultured bacterium clone SINH908 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</td> <td>1310</td> <td>1310</td> <td>98%</td> <td>0.0</td> <td>90%</td> <td></td> </tr> <tr> <td>DQ512834.1</td> <td>Uncultured cyanobacterium clone GPENV154 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</td> <td>1297</td> <td>1297</td> <td>97%</td> <td>0.0</td> <td>90%</td> <td></td> </tr> <tr> <td>DQ512828.1</td> <td>Uncultured cyanobacterium clone GPENV110 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</td> <td>1297</td> <td>1297</td> <td>97%</td> <td>0.0</td> <td>90%</td> <td></td> </tr> <tr> <td>AB039001.1</td> <td>Synechocystis PCC6308 gene for 16S rRNA, partial sequence</td> <td>1288</td> <td>1288</td> <td>98%</td> <td>0.0</td> <td>90%</td> <td></td> </tr> <tr> <td>DQ512824.1</td> <td>Uncultured cyanobacterium clone GPENV75 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</td> <td>1280</td> <td>1280</td> <td>97%</td> <td>0.0</td> <td>90%</td> <td></td> </tr> <tr> <td>DQ512807.1</td> <td>Uncultured cyanobacterium clone GPENV11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</td> <td>1277</td> <td>1277</td> <td>97%</td> <td>0.0</td> <td>90%</td> <td></td> </tr> <tr> <td>FJ86623.1</td> <td>Uncultured cyanobacterium clone BK-45-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence</td> <td>1275</td> <td>1275</td> <td>92%</td> <td>0.0</td> <td>91%</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links	HM128346.1	Uncultured bacterium clone SINH908 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1310	1310	98%	0.0	90%		DQ512834.1	Uncultured cyanobacterium clone GPENV154 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1297	1297	97%	0.0	90%		DQ512828.1	Uncultured cyanobacterium clone GPENV110 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1297	1297	97%	0.0	90%		AB039001.1	Synechocystis PCC6308 gene for 16S rRNA, partial sequence	1288	1288	98%	0.0	90%		DQ512824.1	Uncultured cyanobacterium clone GPENV75 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1280	1280	97%	0.0	90%		DQ512807.1	Uncultured cyanobacterium clone GPENV11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1277	1277	97%	0.0	90%		FJ86623.1	Uncultured cyanobacterium clone BK-45-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1275	1275	92%	0.0	91%	
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links																																																										
HM128346.1	Uncultured bacterium clone SINH908 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1310	1310	98%	0.0	90%																																																											
DQ512834.1	Uncultured cyanobacterium clone GPENV154 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1297	1297	97%	0.0	90%																																																											
DQ512828.1	Uncultured cyanobacterium clone GPENV110 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1297	1297	97%	0.0	90%																																																											
AB039001.1	Synechocystis PCC6308 gene for 16S rRNA, partial sequence	1288	1288	98%	0.0	90%																																																											
DQ512824.1	Uncultured cyanobacterium clone GPENV75 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1280	1280	97%	0.0	90%																																																											
DQ512807.1	Uncultured cyanobacterium clone GPENV11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1277	1277	97%	0.0	90%																																																											
FJ86623.1	Uncultured cyanobacterium clone BK-45-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1275	1275	92%	0.0	91%																																																											

說明：基因的相似度與 AB039001.1 *Synechocystis* sp. PCC6308 相似 90%。

3. 泥生顫藻

經由食品所生物資源保存及研究中心鑑定，確認為新種，而且 NCBI Blast 最高僅 91%，說明有可能是新屬。目前僅能說它是一種接近泥生顫藻（舊名），也接近偽魚腥藻的新種。

表 5，泥生顫藻的部份基因序列與 NCBI 網站的比對 (Blast) 結果。

命名	<i>Pseudanabaena</i> sp. THH-1
鑑定序列	AGTTTGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGGAGATAGTGGCG GACGGGTGAGTAAACGCGTAAGAACCAACCCTTAAGACGGGGACAACAGCTGGAAACGGCTGCTAATACCCGATGAGCCG AGAGGTAAAAGGATGAGTCGCTTAAGGACGGCTTTCGCTCCGATTAGCTAGATGGTGAAGAGCTACCATGGCGA CGATCGGTAACCTGGTCTGAGAGGATGGCCAGTCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT GGGGAATTTCCGCAATGGGCGAGAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGGAAGAAGGTCTGTGGATTGTAAACCTCT TTTGTGGGGGAAGATAATGACGGTACCCAACGAATAAGCCTCGGCTAATCCGTGCCAGCAGCCGGTAAAGACGGAGG AGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTATGTAGGCGGTCGAGTAAGTCTGCTGTCAAAGACTGGGGCTTA ACCCTGGGGGGCAGTGGAACTACTAGACTAGAGTGCCTGAGGGGCAGGAGGAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCG TAGATATCGGGAAGAACACCAGCGGCGAAGGCGTCTGCCGGGCCGTAAGTACGCTGAGGTACGAAAGCTAGGGGAGC GAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCAGCGTAAACGATGGACACTAGATGTTGTCTGTATCGACCCAGACAGTGTCTGT AGCTAACGCGTTAAGTGTCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAA GCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCTGCGAACCCCTGCTGAGAGG TGGGGGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCAGTTCTTAGTTGCCAGCTAAAGTTGGGCACTTAAGGAGACCCAGTCCGAGTGAACAAACGGAG GAAGGTGTGGATGACGTCAAGTATCATGCCCATACGCTTGGGCTACACAGTACTACAATGGTTGGGACAAAAGAGCA GCGAGCACGCGAGTGAAGCGAATCTATAAACTAGCCTCAGTTGAGATTGACAGGCTGCAACTCGCTGCATGAAGGA GGAATCGTAGTAATCGCCGTCAGCATAACGGCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCCGCCCTCACACCATGG GAGCTGGTACGCCCCAAGTCGTTATTCTAACCGAGAGGGGGAGACGCTAAGGCAGGGCTGGTGACTGGGGTGAAGT CGTAACA

	NCBI 比對結果					
	Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	Max ident
	HQ904134.1	Uncultured bacterium clone sa0.45 16S ribosomal RNA gene, partial se	1954	1954	100%	91%
	HQ904133.1	Uncultured bacterium clone sa0.37 16S ribosomal RNA gene, partial se	1949	1949	100%	91%
	HQ904117.1	Uncultured bacterium clone sa0.24 16S ribosomal RNA gene, partial se	1949	1949	100%	91%
	HQ904111.1	Uncultured bacterium clone sa0.10 16S ribosomal RNA gene, partial se	1943	1943	100%	91%
	HQ904143.1	Uncultured bacterium clone sa0.66 16S ribosomal RNA gene, partial se	1936	1936	99%	91%
	JN869081.1	Uncultured bacterium clone NN12 16S ribosomal RNA gene, partial sec	1934	1934	100%	91%
	HQ904180.1	Uncultured bacterium clone sa23.63 16S ribosomal RNA gene, partial s	1934	1934	100%	91%
	HQ904160.1	Uncultured bacterium clone sa23.28 16S ribosomal RNA gene, partial s	1934	1934	100%	91%
	AB039017.1	Pseudanabaena PCC6903 gene for 16S rRNA, partial sequence	1932	1932	98%	91%
	HQ904137.1	Uncultured bacterium clone sa0.35 16S ribosomal RNA gene, partial se	1930	1930	100%	91%
	AM259268.1	Pseudanabaena sp. Otu30s18 partial 16S rRNA gene, strain Otu30s18	1916	1916	98%	91%
	AF132778.1	Pseudanabaena sp. PCC 6903 small subunit ribosomal RNA gene, parti	1916	1916	97%	91%
	AM709632.1	Pseudanabaena sp. PCC 6903 partial ribosomal RNA operon, strain PCC	1914	1914	97%	91%
	GU025257.1	Pseudanabaena sp. G-1014 16S ribosomal RNA gene, partial 16S rRNA	1906	1906	100%	91%

說明：基因的相似度與 AB039017.1 *Pseudanabaena* PCC6903 相似 91%。

二、流程圖

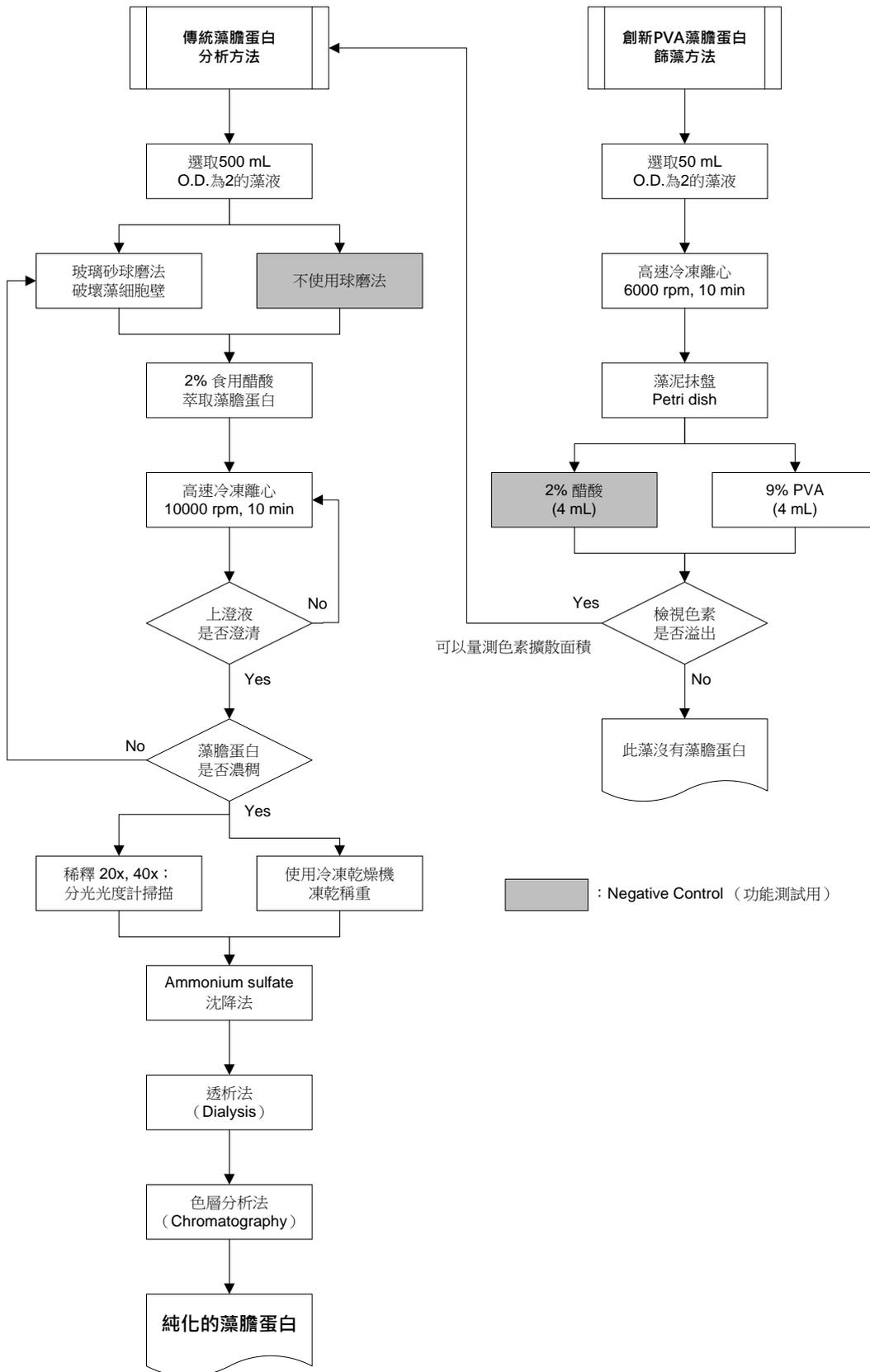


圖 8、實驗流程圖

三、「藻泥抹盤+PVA 覆蓋」的固定化方法

本研究首先發展「藻泥抹盤+PVA 覆蓋法」快速鑑別藻種是否具有藻膽蛋白；以及在棉紙上擴散的面積，或是直接吸取擴散液，然後量其 OD 值，則可以得到比較定量性質的分析結果。如圖 8 右側流程，其詳細步驟如下：

(一)「藻泥抹盤+PVA 覆蓋法」裝置簡圖

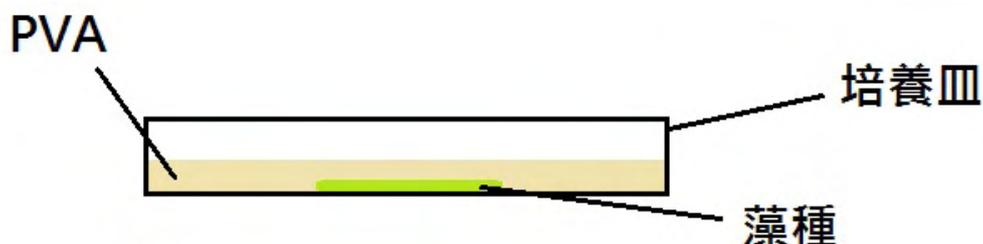


圖 9、裝置簡圖

(二) 實驗步驟

1. 配製 9%PVA，於 45 °C 烘箱中加熱直到溶解。
2. 取適當量的藻泥，將其塗抹於玻璃培養皿或濾紙上，等數分鐘後即風乾完畢。
3. 從烘箱取出事先準備好溶解的 PVA 溶液，取出 4 c.c.塗抹於已風乾藻泥的培養皿上，等待其風乾。
4. 風乾後加入 BG-11 培養基，淹沒 PVA 薄膜至少 2 mm 厚。約 1 小時~第 2 天，即可見到藻膽蛋白溢出。

四、傳統分析方法

主要在於證明新發展出鑑別方法的可行性，如圖 8 左側流程，其步驟如下：

(一)定性分析

1. 加入約 8 mL，0.5 M 的醋酸，再與約 0.1 mm 的玻璃砂，約兩湯匙，合併放入藻泥所在的離心管（50 mL）。
2. 將上述離心管以 vortex 進行震盪，充份混合，約 5 到 15 分鐘。
3. 之後，放入離心機，以 10,000 rpm 的轉速離心 10 分鐘，再取出上層液體。
4. 重複步驟 3，直到上層液澄清。
5. 由於藻泥經過研磨後非常地細，必須將上層液體（上澄液仍含藻泥）再次以 10,000 rpm 的轉速離心 10 分鐘。
6. 取上澄液置入分光光度計中測量吸光度；波長設於 562 nm（藻紅素），以及 618 nm（藻藍素）。
7. 取步驟 5 之上澄液，以紫外光照射，可在白紙上照出紅色（藻紅素），以及藍色（藻藍素），此為肉眼可見。

(二)定量分析

1. 將定性分析步驟 5 之上澄液冷凍乾燥後秤重得藻膽蛋白重。
2. 取與定性分析相同體積之藻泥冷凍乾燥，即可得每 g 有多少 mg 的藻紅素或藻藍素。

陸、 研究結果

一、 以創新的 PVA 抹盤法分析

(一) 泥生顫藻將 PVA 與藻混合及將藻先塗抹在盤面上結果



圖 10、將 PVA 與藻混合（第一天）



圖 11、將 PVA 與藻混合（第三天）

說明：將 PVA 與藻混合的抹盤法無法將藻膽蛋白萃取出來，即使三天了，仍然沒有顏色溢出。



圖 12、將藻先塗抹在盤面上（第一天）



圖 13、將藻先塗抹在盤面上（第二天）



圖 14、將藻先塗抹在盤面上（第三天）

說明：將 PVA 與藻混合的抹盤法無法將藻膽蛋白萃取出來，而將藻先塗抹在盤面上的抹盤法則可輕鬆萃取，並且時間越長析出藻膽蛋白濃度越高。

(二) 泥生顫藻、溫泉藻及聚球藻在濾紙上的效果



圖 15、泥生顫藻（初始）

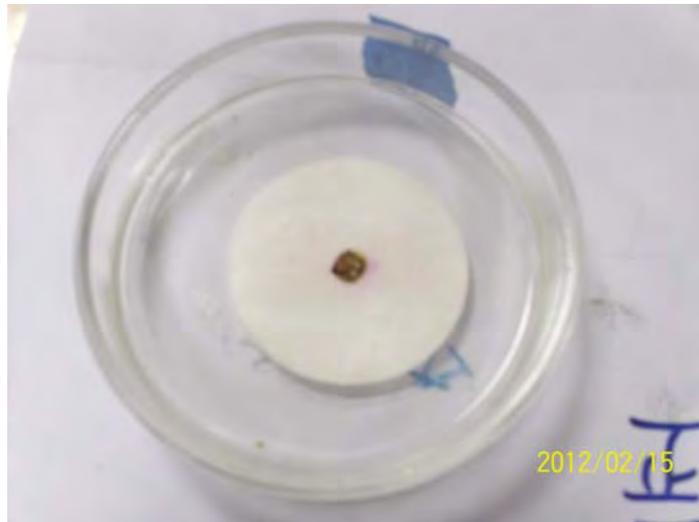


圖 16、泥生顫藻（12 小時後）



圖 17、溫泉藻（初始）

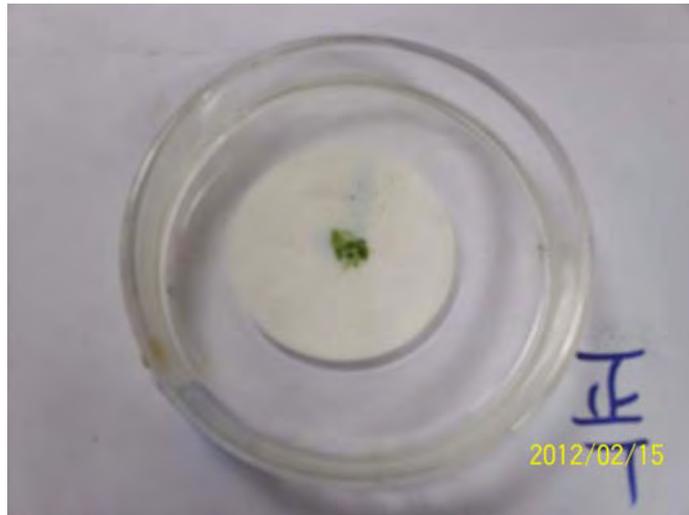


圖 18、溫泉藻（12 小時後）



圖 19、聚球藻（初始）



圖 20、聚球藻（12 小時後）

說明：溫泉藻及泥生顫藻皆可以「藻泥抹盤+PVA 覆蓋」的固定化方法輕鬆將藻膽蛋白析出，聚球藻則無法析出。

二、傳統定量分析結果

(一) 藻膽蛋白萃取後的外觀結果與產量



(正面照片)



(背面照片)

圖 21、溫泉藻（最左邊）、泥生顫藻（左邊數第二個）及聚球藻（最中間）

說明：此三種藻類各個含藻膽蛋白不透光性（肉眼）為泥生顫藻>溫泉藻>>聚球藻。

(二) 各種藻的吸收光譜分析

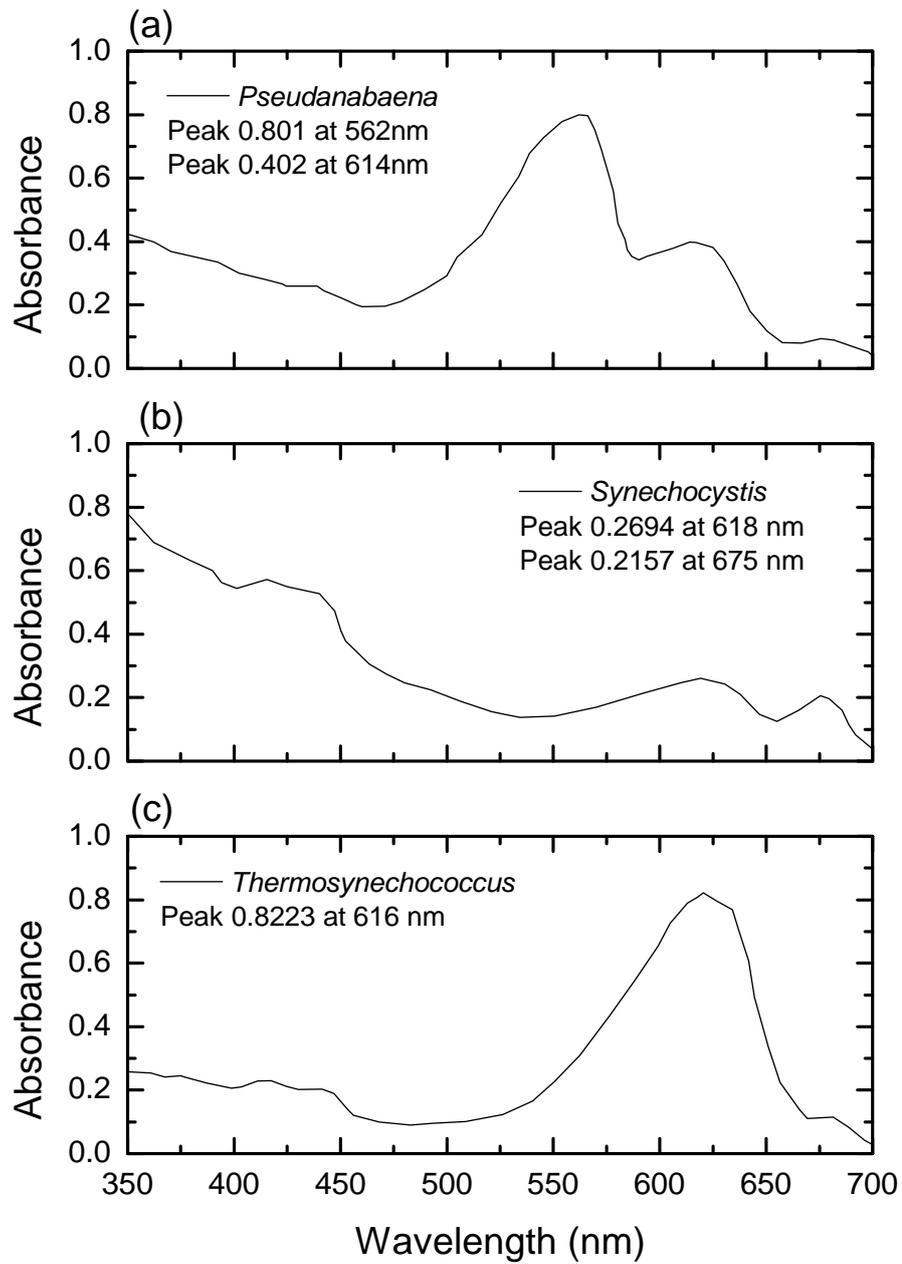


圖 22，各種藻稀釋 40 倍的吸收光譜掃描。

說明：泥生藍藻，最大吸光量為 0.801@562nm 及 0.402@614nm (a)；聚球藻，最大吸光量為 0.269@618 nm 及 0.216@675 nm (b)；溫泉藻，最大吸光量為 0.822@616nm (c)。

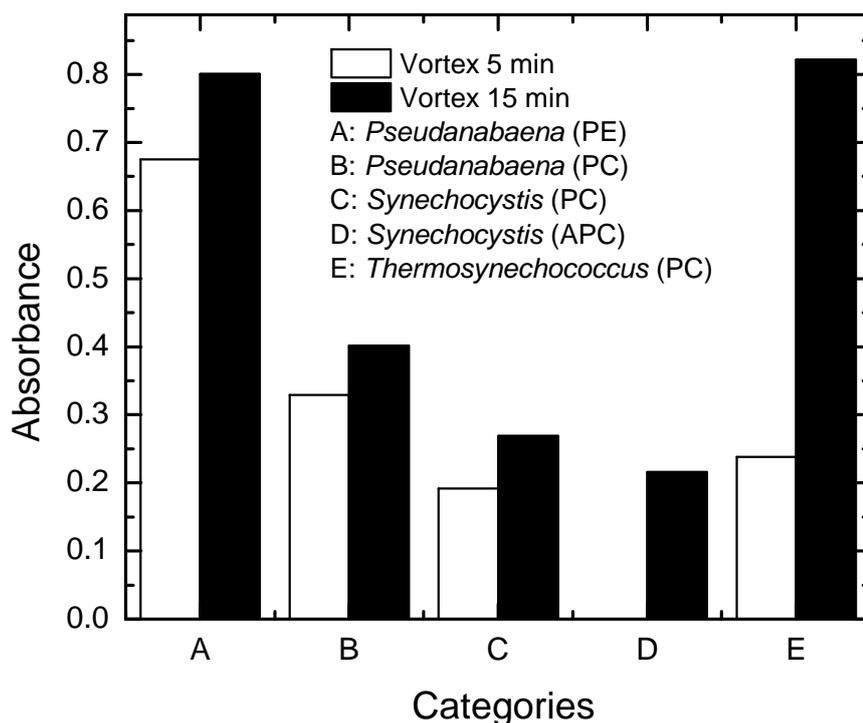


圖 23，研究中各類藻株經玻璃珠 5 或 15 分鐘研磨後，各藻膽蛋白稀釋 40 倍的吸光度變化。說明：在不同玻璃珠研磨時間對藻膽蛋白吸光度的差異中發現，由於溫泉藻與聚球藻的變化最大，應該是其細胞較厚之故，但是在量的方面，溫泉藻亦可由「藻泥抹盤+PVA 覆蓋」的固定化方法，其顏色的溢出得到驗證，顯然本研究所提的方法與細胞壁厚薄無關。因此，利用本研究所提出的方法可以得到具商業價值的藻膽蛋白，其結果與傳統方法是一致的。

表 5、研究中藻膽粗蛋白的產率與吸光度（純度： A_{xxx}/A_{280} ），〔註： $A_{280}=44.5$ 〕

類別	泥生顫藻 <i>Pseudanabaena</i>	溫泉藻 <i>Thermosynechococcus</i>	聚球藻 <i>Synechocystis</i> sp.
藻膽蛋白 (mg/g)	162.58	127.48	107.62
藻紅素 (A_{565})	32.04 (0.72)	—	—
藻藍素 (A_{615})	16.08 (0.36)	32.88 (0.74)	10.76 (0.24)
異藻藍素 (A_{675})	—	—	8.64 (0.19)

說明：泥生顫藻，藻紅素的產率為 162.58 mg/g、最大吸光度為 32.04@562nm，純度為 0.72；溫泉藻，藻藍素的產率為 127.48 mg/g、最大吸光度為 32.88@616nm，純度為 0.74。

(三) 螢光原理證明

1. 泥生顫藻的藻紅素



圖 24、未經紫外光照射

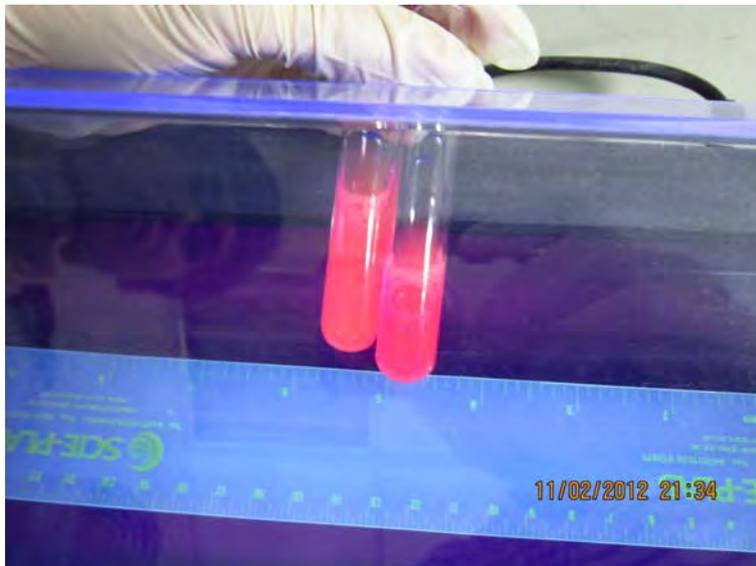


圖 25、經紫外光照射後的螢光顏色

說明：泥生顫藻及溫泉藻萃取出來濃縮液稀釋 20 倍（右）及 40 倍（左）的藻紅素，在未經或是經過紫外光照射後之顏色變化。由圖中得知經紫外光照射後可獲得螢光顏色，這證明該藻紅素具有作為螢光指示劑的能力。

三、醋酸直接萃取方法

(一) 在創新方法中以醋酸直接浸泡風乾的藻泥



圖 26、泥生顫藻



圖 27、溫泉藻

說明：泥生顫藻是不可能直接以醋酸來測得其具有釋放出藻紅素的能力。

(二) 在傳統方法不加玻璃珠直接以醋酸萃取



圖 28、泥生顫藻（最右邊）及溫泉藻（右邊數來第二個）

說明：其結果與有添加玻璃珠的不透明度差異甚大；不添加玻璃珠完全無效。

柒、 討論

- 一、 由傳統分析實驗看出，聚球藻的顏色最淡，完全不符合經濟效益，無法商品化。溫泉藻比起聚球藻濃稠多了，具有常見的藻藍素。而泥生顫藻具有極稀有的藻紅素，最近的研究證實對於癌症具有療效，商品化價值極高，更可驗證使用本研究新發明的藻泥與 PVA 分開抹盤固定化方法，可以快速篩得此頗具商品化價值的泥生顫藻與溫泉藻。
- 二、 由各種藻的吸收光譜掃描得知：溫泉藻，藻藍素的產率為 127.48 mg/g、最大吸光度為 32.88@616nm，純度為 0.74；聚球藻，藻藍素的產率為 107.62 mg/g、最大吸光度為 10.76@618nm，純度為 0.24；泥生顫藻，藻紅素的產率為 162.58 mg/g、最大吸光度為 32.04@562nm，純度為 0.72。由此可見，聚球藻雖具有藍綠藻中常見的藻藍素（610-629 nm 之間），但是其蛋白量不夠，而不具有商品化的價值。反觀，泥生顫藻，具有兩種藻藍蛋白，包括常見的藻藍素（614 nm）與罕見的藻紅素（562 nm）；而溫泉藻其藻藍素的量比起其他兩種藻的量多。根據 Hemlata et al. (2011) 的研究，這些粗蛋白的純度皆大於 0.7，已經是食品級。還可以進一步純化使泥生顫藻的藻紅素和溫泉藻的藻藍素更具商品化的價值。
- 三、 在不同玻璃珠研磨時間對藻藍蛋白吸光度的差異中發現，由於溫泉藻與聚球藻的變化最大，應該是其細胞較厚之故，但是在量的方面，溫泉藻亦可由「藻泥抹盤+PVA 覆蓋」的固定化方法，其顏色的溢出得到驗證，顯然本研究所提的方法與細胞壁厚薄無關。因此，利用本研究所提出的方法可以得到具商業價值的藻藍蛋白，其結果與傳統方法是一致的。
- 四、 基於考量到藻藍蛋白的應用大都是與食用有關，所以採用醋酸來萃取。而由醋酸直接萃取方法實驗的結果發現，直接以醋酸是無萃取出藻藍蛋白。這說明藻藍蛋白的萃光是只有萃液是無法直接得知是否具有足夠量的藻藍蛋白。更從在傳統方法中不添

加玻璃珠，直接以醋酸萃取溫泉藻及泥生顫藻之藻膽蛋白的結果，與有添加玻璃珠的不透明度差異甚大這點，可看出用來破壞細胞壁的玻璃珠是不可或缺的。

- 五、分析了以上眾多的結果後，我們大概可以推測出，能夠輕鬆萃取出藻膽蛋白的關鍵因素在於 PVA 本身。由於 PVA 一般可用來當作書本封面的拋光處理，或是當作膠水黏著劑，本身不具有反應性；因此懷疑本研究的發明純粹只是一種物理現象，當風乾後的藻泥被 PVA 所覆蓋後，其結果就像東西被膠水黏著一般，乾掉後緊繃在一起而爆裂。然而，從前面不同研磨時間卻又證明溫泉藻與聚球藻的細胞壁比較厚，但是經過本研究所發明的「藻泥抹盤+PVA 覆蓋」的固定化方法，證實細胞壁薄的泥生顫藻與細胞壁厚的溫泉藻都會有溢出情形。到底這種乾掉的力量有多大呢？值得未來進一步的探討。但就理論而言，我們都知道純物質在經過相變化時，相同的物質會優先聚集在一起。例如矽晶圓的製造，利用高週波的線圈，來回在矽晶棒上移動，就在這相改變的同時，矽晶圓的純度愈來愈高，最後雜質被逼到兩端。另外，水的結冰也有類似現象，當冰從外而內凝結時，很多雜質會因此而超越，因庫侖斥力與凡得瓦爾力形成的能量障礙，而互相吸引在一起。同理，我們的藻泥可能因為 PVA 的凝結，另一面又是玻璃構造而無處逃脫，最後互相擠壓而釋出藻膽蛋白。直接與 PVA 混合的現象不明顯，主要是藻體被分散，在濃度不高的情形下，不容易互相擠壓而爆開。

捌、 結論

- 一、 本研究所發明的「藻泥抹盤+PVA 覆蓋」固定化方法確實可行，**量少、輕鬆且快速**。
- (一) 在創新方法的確認上，發現將藻先塗抹再塗 PVA 於玻璃盤面上可輕鬆地萃取出藻膽蛋白，但不能將 PVA 與藻直接混合再抹盤。
 - (二) 在傳統萃取方法的確認上，發現萃取時不用玻璃細砂，或僅用食用醋酸都無法獲得藻膽蛋白。
- 二、 篩選獲得高藻膽蛋白產量的新屬藻類—**泥生顫藻**，其**藻紅素**更是稀有而可貴。
- (一) 在藻種的產率方面，泥生顫藻的最高可培養到 7.016 g DCW/L，其濃度遠超過業界 5 g DCW/L，具極高的經濟價值。
 - (二) 在藻膽蛋白的品質上，泥生顫藻藻紅素的產率為 162.58 mg/g、純度為 0.72（另一個溫泉藻，藻藍素的產率為 127.48 mg/g、純度為 0.74）。由於這些粗蛋白的純度皆大於 0.7，已達到食品級的水準；產率大於 100 mg/g，值得開發的門檻。
 - (三) 在藻膽蛋白的產值上，**每公升最高可達 28,516.5 美元**（溫泉藻的藻藍素至少每公升也有 13,191.0 美元），比起現有黃金的價格高上 500 倍，其寬廣的應用性更可加惠普羅大眾。

玖、 參考資料

大日本インキ化学工業株式会社，日本專利特開平 7-118555，1995 年 5 月 9 日。

江善宗、殷儷容，纖維素水解酵素於綠藻工業之應用研究農業生技產業季刊，2006 年，第 7 期，第 26-36 頁。

鄭江、高亞輝、王文星、黃水英，「紅毛藻藻紅素的粗提方法比較及不同光照條件下藻膽蛋白變性機制的初步探討」，廈門大學學報，第 42 卷，第一期，2003 年 1 月。

鄭俊明，微藻產業，科學發展（國科會網站，科普知識），2007 年 7 月 5 日，第 415 期，第 34-40 頁。

陳國誠，生物固定化技術與產業應用，茂昌圖書有限公司，89 年 12 月 1 日出版。

廖遠東，泛談藻藍素（phycocyanin）之保健功效，農業生技產業季刊，2006 年，第 7 期，第 37-45 頁。

蘇惠美、黃俊翰、蔡健偉、陳紫嫻，海藻的利用與養殖，科學發展，2009 年 1 月，第 433 期，第 12-19 頁。

Bhat VB, Madyastha KM. C-phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger *in Vivo* and *in Vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* 275(1):20-25.

Borowitzka MA (1988) Algal media and sources of algal cultures.
In: Borowitzka MA, Borowitzka LJ (eds), *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge: 456-465.

Chen KC, Lin YF. Immobilization of microorganisms or enzymes in polyvinyl alcohol beads. 1994, US Patent: 5290693.

Chiellini E, Cinelli P, Ilieva VI, Martera M. Biodegradable thermoplastic composites based on polyvinyl alcohol and algae. *Biomacromol.* 2008, 9(3):1007-1013.

Dupré C, Guary JC, Grizeau D. Culture of an autoflocculent microalgae in a vertical tubular photobioreactor for phycoerythrin production. *Biotechnol Tech.* 1995, 9(3):185-190.

Eriksen NT. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008, 80(1):1-14.

Galland-Irmouli AV, Pons L, Luçon M, Villaume C, Mrabet NT, Guéant JL, Fleurence J. One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 2000, 739(1):117-123.

Govindjee, Shevela D. Adventures with cyanobacteria: a personal perspective. *Front Plant Sci.* 2011, 2:28.

Guan XY, Zhang WJ, Zhang XW, Li YX, Wang JF, Lin HZ, Tang XX, Qin S. A potent anti-oxidant property: fluorescent recombinant alpha-phycocyanin of *Spirulina*. *J Appl Microbiol.* 2009, 106(4):1093-100.

Hemlata, Pandey G, Bano F, Fatma T, Studies on *Anabaena* sp. NC CU-9 with special reference to phycocyanin. *J. Algal Biomass Utiln.* 2011, 2 (1): 30-51.

Li B, Gao MH, Zhang XC, Chu XM. Molecular immune mechanism of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells *In vitro*. *Biotechnol Appl Biochem.* 2006, 43(3):155-164.

Murugan T and Radhamadhavan. Screening for antifungal and antiviral activity of C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *J. Pharm. Res.* 2011,4(11):4161-4163.

- Nagaoka S, Shimizu K, Kaneko H, Shibayama F, Morikawa K, Kanamaru Y, Otsuka Hirahashi T, Kato T. A novel protein C-phycoerythrin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *J Nutr*. 2005, 135(10):2425-2430.
- Nagaraj S, Arulmurugan P, Karuppasamy K, Jayappriyan KR, Sundararaj R, Vijayanand N, Rengasamy R. Hepatoprotective and antioxidative effects of C-Phycocyanin in CCl₄ induced hepatic damage rats. *Acad J Can Res*. 2011,4(2):29-34.
- Pumas C, Peerapornpisal Y, Vacharapiyasophon P, Leelapornpisid P, Boonchum W, Ishii M, Khanongnuch C. Purification and characterization of a thermostable phycoerythrin from hot spring cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. KC45. *Int J Agric Biol*. 2012, 14:121-125.
- Romay C, González R, Ledón N, Remirez D, Rimbau V. C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. *Current Protein and Peptide Science*. 2003, 4:207-216.
- Sekar S, Chandramohan M. Phycobiliprotein as a commodity: trends in applied research patents and commercialization. *J Appl Phycol*. 2007, 20:113-136.
- Shih CM, Cheng SN, Wong CS, Kuo YL, Chou TC. Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycoerythrin. *Anesth Analg*. 2009, 108(4):1303-1310.
- Soni B, Visavadiya NP, Madamwar D. Attenuation of diabetic complications by C-phycoerythrin in rats: antioxidant activity of C-phycoerythrin including copper-induced lipoprotein and serum oxidation. *Br J Nutr*. 2009, 102(1):102-109.
- Su HN, Xie BB, Chen XL, Wang JX, Zhang XY, Zhou BC, Zhang YZ. Efficient separation and purification of allophycoerythrin from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *J Appl Phycol*. 2010, 22(1):65-70.
- Talaro KP (2008) *Foundations in Microbiology-basic principles*, 6th ed., McGraw-Hill International edition, McGraw-Hill Company.
- Tortora/Funke/Case (2007) *Microbiology- an introduction*, 9th ed., Pearson International Edition, Pearson Benjamin Cummings.
- Tschudy RH. Depth studies on photosynthesis of the red algae. *Am J Bot*. 1934, 21(9):546-556.
- Viskari PJ, Christa L, Colyer CL. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Analyt. Biochem*. 2003, 319(2):263-271.
- Wang H. *The C-Phycocyanin/Beta Protein Inhibits Cancer Cell Proliferation*. A master thesis of Georgia State University, 2008.
- Yabuta Y, Fujimura H, Chung SK, Enomoto T, Watanabe F. Antioxidant activity of the phycoerythrobilin compound formed from a dried Korean purple laver (*Porphyra* sp.) during *in Vitro* digestion. *Food Sci Technol Res*. 2010, 16(4): 347-352.
- Zhang LX, Cai CE, Guo TT, Gu JW, Xu HL, Zhou Y, Wang Y, Liu CC, He PM. Anti-cancer effects of polysaccharide and phycocyanin from *Porphyra yezoensis*. *J. Mar Sci Technol*. 2011,19(4):377-382.
- Zhou ZP, liu LN, chen XL, Wang JX, Chen M, Zhang YZ, ZHOU BC. Factors that effect antioxidant activity of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis*. *J Food Biochem*. 2005, 29:313-322.

【評語】 091106

1. 本作品提出一套簡易快速判定藻種是否具備藻膽蛋白的方法，利用聚乙烯醇將藻種固定於培養皿，風乾後觀察顏色變化判定是否有藻膽蛋白溢出。
2. 建議未來宜以適當儀器進一步分析所溢出物質確為藻膽蛋白，並嘗試其他材料及環境變因，探討最佳藻膽蛋白判定技術。