

以吸光值推估擬球藻之乾重

蘇惠美* · 鄭凱澤 · 王淑欣 · 陳紫嫻

行政院農業委員會水產試驗所東港生技研究中心

摘 要

油產率與油脂含量是用來評估產製生質柴油藻種與養殖策略相當重要的指標，又均以藻體的乾重作為運算之基準。因為測定乾重之操作繁瑣，有些研究以容易測定的吸光值來推估取代實測乾重。本研究首先探討不同去鹽方法，對油含量高的海水擬球藻乾重的影響。結果顯示，未處理組的乾重顯著高於以逆滲透水、甲酸銨或碳酸氫銨處理組，最多差 2.4 倍，而以經離心及逆滲透水洗至導電度值為零組顯著最低，以其作為後續試驗之測定法。其次探討擬球藻藻液之吸光值與乾重間的關係，發現四種不同培養條件取得之藻液，可作出四條獨立的線性方程式， R^2 值達 0.990 ~ 0.998。接著比較三種不同養殖條件下 OD682 大於 1.0 藻液之實測乾重，與由其稀釋為 0.4 及 0.8 之二種稀釋液之實測吸光值導入線性方程式得到的估算乾重，發現實測乾重與估算乾重之誤差值高達 -20 ~ 48%。但以稀釋液實測乾重，回乘稀釋倍率之計算乾重，與原液實測乾重之誤差則較小，在 -1.63 % ~ 3.62% 之間。由此可知擬球藻的生質量，必須以逆滲透水去鹽後的實測乾重來表示，並據以計算為油脂含量與產率，吸光值則作為增殖趨勢之參考。

關鍵詞：擬球藻、吸光值、乾重、線性方程式

前 言

微藻的增殖速率快，與陸上植物相比，有較高的單位面積產量，且可使用非耕種地進行培養，並且有固定煙道中之 CO_2 ，吸收排放水之營養鹽等潔淨環境之功能，因此微藻作為生質燃料的潛力備受關注。近年來，各國政府、學術機關與私人企業紛紛投入眾多人力，進行微藻產製生質燃料的研發。重點包括：藻種、養殖策略、養殖系統、收穫濃縮、油脂萃取轉化為生質柴油等。而藻種的篩選以及養殖策略的評估等通常是根據生質量 (biomass)、油脂含量 (oil content) 與油脂產率 (lipid productivity) 來比較，其中油脂產率是一個相當重要的指標特性 (Griffiths and Harrison, 2009)，並以藻細胞乾重 (dry weight, DW) 作為運算的基準。

擬球藻類 (*Nannochloropsis* spp.) 為海水養殖養殖藻類，具高生產率及高含油量 (Chiu *et al.*, 2009a; Rodolfi *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2010)，不會耗費淡水資源，作為生質燃料藻種深具潛力。培養海水藻類的過程中，不論使用天然海水或是人工海水，皆含有大量的鹽分 (如 NaCl、 $MgSO_4$ 等)，所以如何正確地去除鹽分便成為影響乾重測定之一大因素。因此本研究測試不同類別之洗液及其用量對擬球藻乾重的影響。導電度與水中離子濃度、移動性、價數及水溫等有關，其值愈高，表示水中電解質含量較多，由於大部分鹽類都可解離，因此探討可否以導電度來判斷藻水鹽分的去除程度。

藻細胞乾重的測定包括濃縮與乾燥二個步驟。細胞濃縮需將藻細胞懸浮液 (簡稱藻液) 經過離心 (Sorokin, 1979; 葉, 2006; Chiu *et al.*, 2008; Hsieh and Wu, 2009) 或過濾 (Zhu and Lee, 1997; Chini Zittelli *et al.*, 2000; 李, 2006)。乾燥係將沉澱物或濾紙置於烤箱烘乾至恆重，或以凍乾機加以乾燥。要達到恆重，加熱樣本需降溫至室溫再秤

*通訊作者 / 屏東縣東港鎮豐漁里 67 號 ; TEL: (08) 832-4121; FAX: (08) 832-0234; E-mail: hmsu@mail.tfrin.gov.tw

重，並反覆烘烤至連續 2 次重量一樣 (Sorokin, 1979)。Chiu *et al.* (2008, 2009 a) 是在 105 °C 烘乾 16 h；Gu *et al.* (2012) 在 105 °C 烘 3 h；Hsieh and Wu (2009) 則以凍乾機處理 24 h，均相當耗時費力。

因此有些研究利用分光光度儀，取少量藻水，即時測定特定波長之吸光值，並以吸光值與乾重之線性方程式 (Chiu *et al.*, 2008) 推估其生質量 (Chiu *et al.*, 2008, 2009 a, 2009 b; Su, *et al.*, 2010)；當吸光值大於 1.0，藻水必需稀釋為 0.1 ~ 1.0，稀釋後之吸光值換算乾重後，再乘上稀釋倍率來推估其生質量 (李, 2006; Chiu *et al.*, 2008)。另一方面有些研究則報導，吸光值與乾重的線性方程式，會隨著藻種特性、藻水濃度、藻類增殖階段、培養液組成、吸收波長及測定儀器等而異 (Sorokin, 1979; 李, 2006; 薛, 2007; Hsueh *et al.*, 2007; Hsieh and Wu, 2009)。本研究探討擬球藻吸光值與乾重之關係，會不會因養殖條件而呈現不同的線性方程式，以及實測與吸光值推估的乾重，二者之間的同異性。

材料與方法

一、藻種與培養條件

本試驗使用之藻種為擬球藻 *Nannochloropsis oceanica* (原為 *N. oculata*，經分子技術鑑定改名) N-I 藻株，為本實驗室保存之種原。培養液為 modified Walne 【將 Walne's medium (蘇, 1999) 中之氮源 NaNO_3 更換為尿素 (100 mg/L) 且未添加維生素】。室內培養設施為 1 L 玻璃扁平瓶、40 L 及 100 L 壓克力圓柱槽，提供流量為 0.10 ~ 0.25 vvm (Dwyer Instruments, Inc., Michigan, IN, USA) 混合 2% CO_2 之空氣。室外為 2000 L 玻璃纖維 (FRP) 渠道池，以水車攪動並於白天提供 450 ml/min 之 CO_2 。室內以 40 W 螢光燈管連續 (24 h) 照光，室外為自然光照。

二、樣本之前處理及分析方法

(一) 吸光值之測定

微藻濃度是使用分光光度計 (Hitachi U-2800 雙光束分光光譜儀) 測定樣品於波長 682 nm 下之

吸光值 (absorbance 或 optical density, 以下簡稱 OD682)。若吸光值大於 1.0 時，則以逆滲透水 (以下簡稱 RO 水) 進行稀釋，再回乘稀釋倍數，作為高濃度藻液的吸光值。

(二) 稀釋倍數

探討稀釋倍數對於 OD682 之影響，取用時藻液之 OD682 為 2.864，試驗以不同體積比例 (2、4、6、8、10、15 及 20) 之 RO 水稀釋藻液，測得其吸光值後，再回乘其稀釋倍數，求得計算之 OD 值。

(三) 不同鹽分去除方式

試驗操作如 Fig. 1，採用於室內 1 L 扁平瓶培養之藻液，取用時藻液之 OD682 為 1.545 鹽度為 30 psu。各組皆以 25 ml 藻液進行三重複試驗，分別進行了以兩倍體積之 RO 水 (2 RO)、兩倍體積之 0.5 M 甲酸銨 (ammonium formate) (2AF)、兩倍體積 (2AB) 及等體積 (AB) 之 0.5 M 碳酸氫銨 (ammonium bicarbonate) 洗滌，以及利用導電度法 (EC)，並以不經任何處理之組別 (B) 做為對照組。以德國 WTW 廠牌之導電度計 (Conductivity Hand-Held Meter LF 330) 配備標準探針 (Standard Conductivity Cell TetraCon 325) 測定各種洗液及其處理前後藻液之導電度。EC 組是利用 RO 水及離心 (3000 rpm; 20 min) 來去除藻液之鹽分，至其導電度測值為零之方式，然後，以濾紙過濾藻細胞。

(四) 乾重之測定

將不同方式處理之藻液，經由抽氣過濾於預先在 105 °C 烘乾 16 h 並秤至恆重的 Whatman GF/C (47 mm) 濾紙上。為避免細胞暴露於空氣中，每次潤洗時不抽氣，使液體蓋滿濾紙，然後快速抽氣 (壓力 35 ~ 55 mm Hg) 以移走洗液。過濾後之濾紙於 105 °C 下烘乾 16 h，置於乾燥盒冷卻至室溫秤重，反覆烘乾測得恆重。過濾後之濾紙重量扣除濾紙空重，即為 DW。

(五) 吸光值與乾重之關係

試驗操作如 Fig. 2，取 1-L 扁平瓶養殖 6 天、40-L 培養槽養殖 5 天、2000-L 渠道池養殖 3 天及 17 天之藻液，先測其吸光值。然後以稀釋後藻液

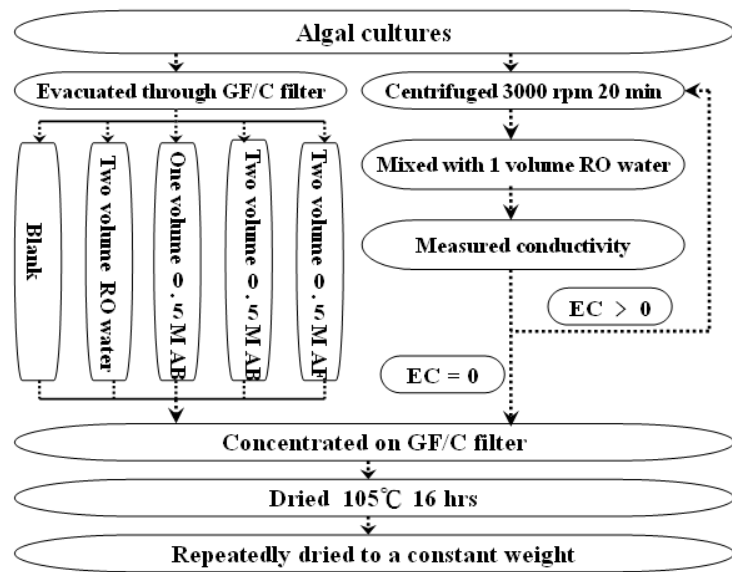


Fig. 1 The procedures for de-salted treatments and dry weight measurements.

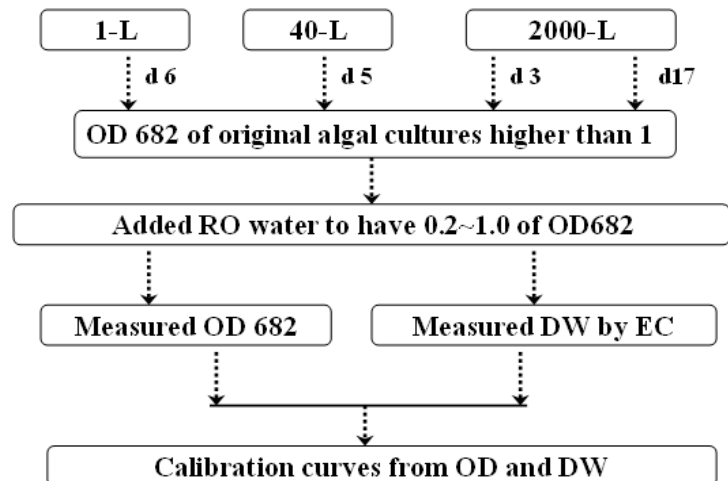


Fig. 2 The procedures for the regression curves of OD and dry weight from the *Nannochloropsis oceanica* cultures under different conditions.

之 OD682 = 0.2 ~ 1.0 為目標，將藻液稀釋成共五組不同吸光值之稀釋液，以導電度法測得各稀釋液藻細胞乾重。以測得稀釋液之吸光值與其乾重繪圖，究明是否成線性並求出方程式及其相關係數。

另一方面，以不同養殖設施與養殖天數取得之藻液，比較其實測乾重、計算乾重與推估乾重，評估利用吸光值來推估乾重之可行性，試驗步驟如 Fig. 3。取 1-L 扁平瓶養殖 3 天、40-L 及 100-L 培養槽養殖 11 天與 5 天之藻液，測其吸光值並以導電度法取得其實測乾重 (measured DW)。其次，將這三種藻液之 OD682 稀釋至 0.4 及 0.8，測得稀釋液之吸光值與其導電度法乾重，然後回乘稀釋倍數，得到其計算乾重 (calculated DW)。接著，

以稀釋藻液之 OD682 代入前述實驗做出之 1-L、40-L 及 2000-L 之三條線性方程式換算乾重，再乘上稀釋倍率，得到推估乾重 (deduced DW)。最後，以單因子變異數分析法，比較實測乾重與從稀釋液測得之計算乾重間之差異，並以誤差百分比計算二者之差異及評估從線性方程式導出之推估乾重與實測乾重之差異。其計算式如下：

$$\text{誤差(\%)} = \frac{\text{【計算乾重(或推估乾重) - 實測乾重】}}{\text{實測乾重}} \times 100$$

(六) 統計分析

實驗數據以單因子變異數分析(ANOVA) 及 Tukey's test 分析各處理組間之差異，顯著水準定為 $p < 0.05$ 。

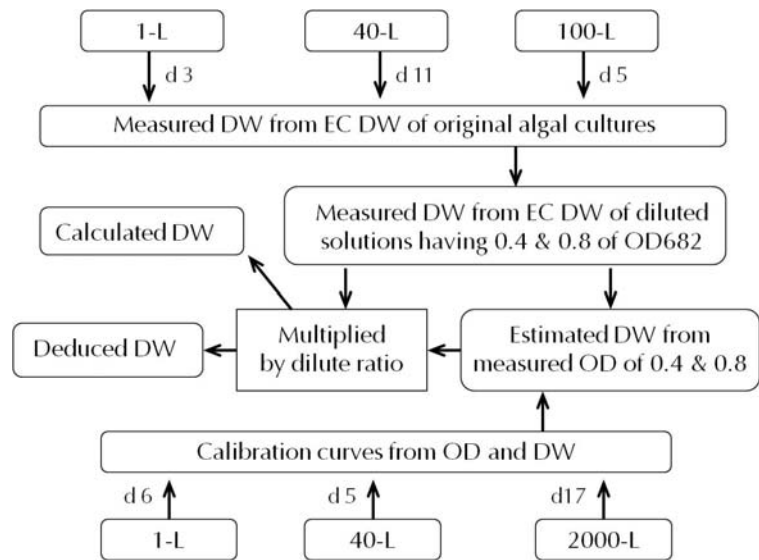


Fig. 3 The procedures for the measured, calculated and deduced dry weight of three *Nannochloropsis oceanica* cultures under different conditions.

Table 1 The measured optical density at 682nm of *Nannochloropsis oceanica* cultures and its diluted solutions with 2 to 20 volume RO water and the calculated values using the dilute ratio. The values with different superscripts for the calculated are significantly different ($P < 0.05$, Turkey's test). Data are Means \pm standard deviation (SD) ($n = 3$)

Dilute rate	OD682 measured	OD682 calculated
0	2.864	
2	1.484 \pm 0.002	2.969 \pm 0.004 ^g
4	0.764 \pm 0.004	3.056 \pm 0.014 ^f
6	0.521 \pm 0.003	3.128 \pm 0.015 ^e
8	0.401 \pm 0.002	3.211 \pm 0.017 ^d
10	0.329 \pm 0.002	3.287 \pm 0.015 ^c
15	0.226 \pm 0.002	3.395 \pm 0.023 ^b
20	0.174 \pm 0.002	3.473 \pm 0.031 ^a

結果與討論

一、稀釋倍數對吸光值之影響

實驗結果如 Table 1，以分光光度儀測得高濃度擬球藻藻液之 OD682 為 2.864 時，將其以 RO 水作 2~20 倍稀釋後，測得之 OD682 介於 0.174~1.484，回乘其稀釋倍數後，OD682 介於 2.969~3.473，明顯高於原值，且隨著稀釋倍數的增加而上升。以 RO 水進行稀釋造成的偏離可能是鹽度的問題，且不同養殖期間藻體分泌之代謝物濃度也不一樣；若用等鹽度海水或再加營養鹽來稀釋，是否不會有如上的結果，待後續探討。

二、鹽分去除方式對乾重之影響

擬球藻 OD682 為 1.545 之導電度為 48 mS/cm，經過不同去鹽方式後，導電度下降至 0~0.51 mS/cm，各處理間有顯著差異 ($p < 0.05$)。以 EC 法去除鹽分者，其導電度為 0，乾重最低；未經任何處理組 (B) 的乾重明顯高於其他五個處理組 (Table 2)。試驗結果亦顯示，以等體積之 AB 洗滌的效果明顯較不佳，而兩倍體積 RO 水處理之效果亦較前述二種洗液差 (Table 2)。由此可以得知，試驗藻液中確實含有鹽分，且會造成微藻乾重之誤判。而欲處理較高濃度的藻液時，洗液的用量為其體積之二倍有時是不足夠的，因為附於藻細胞之鹽分會隨著藻液濃度而改變。所以洗液

Table 2 The Conductivity of *Nannochloropsis oceanica* cultures before and after de-salted treatments and their biomass dry weight. The values with different superscripts for the same column are significantly different ($P < 0.05$, Turkey's test). Data are Means \pm standard deviation (SD) ($n = 3$)

Treatments	Conductivity (mS/cm)			Dry weight (g/L)
	Rinse	Start	End	
B	-	48	48	0.8859 \pm 0.0027 ^a
2AF	45.8	48	0.05 \pm 0.02 ^{cd}	0.3268 \pm 0.0008 ^d
1AB	37	48	0.51 \pm 0.03 ^a	0.3947 \pm 0.0013 ^b
2AB	37	48	0.08 \pm 0.03 ^c	0.3244 \pm 0.0014 ^e
2RO	0	48	0.17 \pm 0.04 ^b	0.3319 \pm 0.0008 ^c
EC	0	48	0 ^d	0.3208 \pm 0.0004 ^f

*B: no treatment; 2AF: 2 volume Ammonium formate; 2AB: 2 volume Ammonium bicarbonate; 2RO: 2 volume reverse osmosis water; EC: centrifuged and wash with RO till conductivity = 0

與藻液之比例有用 2 倍 (Zhu and Lee, 1997)、5 倍 (李, 2006) 甚至達 10 倍之多 (Chini Zittelli *et al.*, 2000)。

導電度法採用的是以 RO 水進行洗滌至導電度為零並搭配離心方式來去除鹽分，可免除洗液用量不足造成之干擾，故本研究後續之試驗皆以導電度法來進行乾重之測定。不過對於細胞壁薄的海水藻類如巴夫藻 (*Pavlova*)、等鞭金藻 (*Isochrysis*) 之去鹽，因滲透壓關係，使用 RO 水會造成細胞破裂，必需使用 AF 或 AB 來洗滌 (Zhu and Lee, 1997)，其中 AB 大約在 60 °C 就會揮發，因此本試驗測得 2AB 組的擬球藻乾重更趨近 EC (Table 2)。

三、吸光值與乾重之關係

為了方便實驗操作，探討以即時可測得之吸光值來推估乾重的可行性。取在 2% CO₂ 0.25 vvm 打氣量下，以 1-L 扁平瓶養殖 6 天後之藻液，其稀釋 10 倍之藻液之 OD₆₈₂ 為 0.958，回乘其稀釋倍率，換算後為 9.58。再將原高濃度藻液，稀釋為 OD₆₈₂ 介於 0.246 ~ 0.950 之間共五組不同吸光值之稀釋液。以導電度法測得此五種稀釋液之乾重與其相對應之吸光值 (Fig. 4A)，結果顯示吸光值與乾重成線性關係，其方程式為： $y = 0.2829x - 0.0171$ (x 代表 OD₆₈₂； y 代表乾重 g/L)， $R^2 = 0.9973$ 。另取 40-L 培養槽、2000-L 渠道池不同養殖天數及不同濃度之藻液，以相同的稀釋與乾重

測定方法，求出五種稀釋液之吸光值與乾重之線性關係圖 (Fig. 4 B - D)，其 R^2 值均達 0.99。但取自不同養殖設施的藻液所求得的線性方程式是不一樣的，即使同樣使用 2000-L 渠道池進行培養，不同養殖天數作出之線性方程式也不一樣。

四、實測乾重、計算乾重與推估乾重之比較

比較三種培養條件取得之藻液，在實測乾重與由稀釋液實測乾重回乘稀釋倍率之計算乾重之結果，如 Table 3。以單因子變異數分析，在 1-L 養殖 3 天藻液濃度最高 (OD₆₈₂ = 3.699) 之實測乾重與計算乾重間有顯著差異，其稀釋為 OD 0.445 的藻液之實測乾重乘以稀釋倍數後之計算乾重，較原液的實測乾重增加 2.60% (2.152 g/L \rightarrow 2.208 g/L)；而稀釋為 OD 0.79 的藻液則減少 1.63%。另，以單因子變異數分析在實測乾重與計算乾重間沒有差異的 100-L 養殖 5 天藻液，稀釋為 OD = 0.391 及 OD = 0.794 之計算乾重，則分別較實測乾重增加 0.91% 及 3.73%。而在 40-L 養殖 11 天藻液，稀釋為 OD = 0.395 及 OD = 0.785 之計算乾重與實測乾重也沒有差異(雖然二種稀釋液之間有差異)，則分別較實測乾重減少 1.61% 及增加 1.07%。此結果顯示以稀釋液實測乾重，回乘稀釋倍率之計算乾重，與原液實測乾重之誤差在 -1.63 ~ 3.62% 之間。

將這三種藻液之稀釋液測得之 OD₆₈₂ (0.391

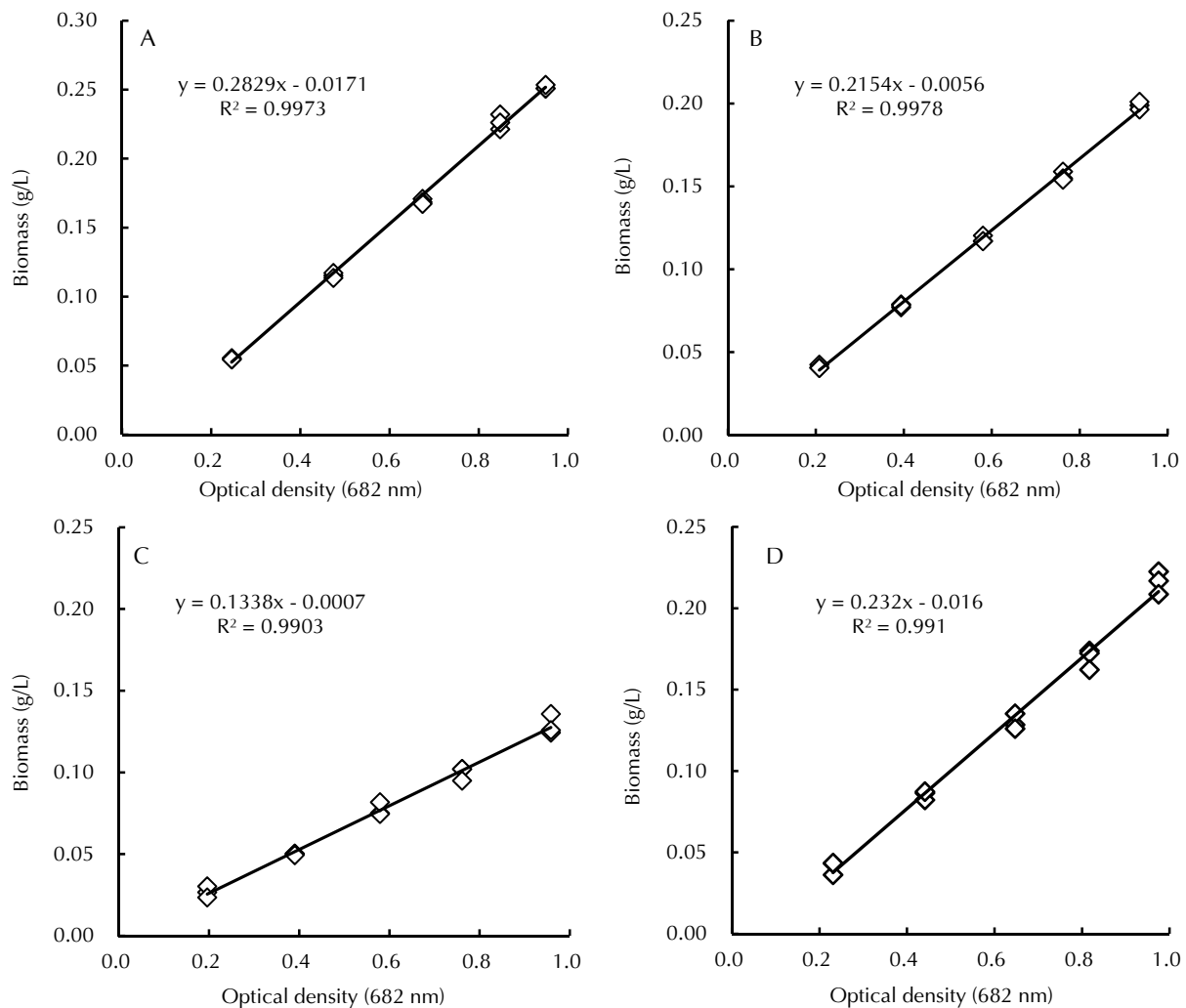


Fig. 4 Calibration curve obtained from optical density at 682 nm and the biomass dry weight from the *Nannochloropsis oceanica* cultures under different conditions. A: 1-L; 2% CO₂; 0.25 vvm; d 6 culture day; OD₆₈₂ = 0.958 × 10. B: 40-L; 2% CO₂; 0.15 vvm; d5 culture day; OD₆₈₂ = 0.290 × 10. C: 2000-L; 450 ml/min CO₂; Peddle wheel; d3 culture day; OD₆₈₂ = 1.123. D: 2000-L; 450 ml/min CO₂; Peddle wheel; d17 culture day; OD₆₈₂ = 0.966. Algal culture of the indicated culture day was diluted to 5 groups with RO water to have its OD₆₈₂ value ranged from 0.2 to 1.0. Dry weight was measured by EC method.

~ 0.794 Table 4 OD₆₈₂ of diluted solutions), 導入 Fig. 4A, 4B & 4D 之三條線性方程式並回乘稀釋倍率, 每一種藻液各可得到二組三種共六個推估乾重 (Table 4)。比較推估乾重與實測乾重, 發現其誤差值為實測乾重之 1 ~ 48% 或 -1 ~ -20%。在相同養殖條件下之誤差值較小, 如同為 1-L 及 40-L 線性方程式導出之推估乾重, 較實測乾重增加 1 ~ 5% 及 15 ~ 18%; 不同養殖條件下, 其誤差值擴大分別為 -13 ~ -20% 及 10 ~ 48%; 但未發現誤差值與藻水濃度、稀釋倍率之間的相關性。而 100-L

藻液, 以 1-L、40-L 及 2000-L 線性方程式, 導出之推估乾重與實測乾重比較, 則分別增加 12 ~ 24%、-1 ~ -6% 及 -11 ~ 1%, 也沒有規律可循。

以藻水吸光值估算生質量乾重, Chiu *et al.* (2008) 指出當 OD₆₈₂ 大於 1.0, *Chlorella sp.* 藻水必需稀釋為 0.1 ~ 1.0 以內, 否則其生質量會因不在線性內而被低估; 並依據實驗所得之吸光值與乾重 (0.0 ~ 0.21 g/L) 之線性方程式, 推估 *Chlorella sp.* 的生質量達 1.2 ~ 5 g/L (Chiu *et al.*, 2009a, b)。然而, 李 (2006) 報導耐高溫高鹼之藍

Table 3 The directly measured DW, and the calculated DW from the measured DW of diluted solutions multiplied by dilute ratio. The values with different superscripts (a, b) for the same culture are significantly different ($P < 0.05$, Turkey's test). Data are Means \pm standard deviation (SD) ($n = 3$). Error % = (Calculated DW – Measured DW) / Measured DW %

Culture facilities	1-L		40-L		100-L	
Aeration	2% CO ₂ ; 0.25vvm		2% CO ₂ ; 0.15vvm		2% CO ₂ ; 0.10vvm	
Culture days	d3		d11		d5	
OD682	3.699		1.83		1.991	
Measured DW(g/L)	2.152 \pm 0.003 ^b		0.373 \pm 0.002 ^{ab}		0.552 \pm 0.003 ^a	
Calculated DW(g/L)	2.208 \pm 0.010 ^a	2.117 \pm 0.019 ^c	0.367 \pm 0.004 ^b	0.377 \pm 0.006 ^a	0.557 \pm 0.009 ^a	0.572 \pm 0.037 ^a
OD682 of diluted solutions	0.445	0.79	0.395	0.785	0.391	0.794
Measured DW(g/L)	0.106	0.2027	0.0681	0.1402	0.0844	0.1717
Dilute ratio	20.8	10.5	5.4	2.7	6.6	3.3
Calculated DW(Error %)	2.60%	-1.63%	-1.61%	1.07%	0.91%	3.62%

Table 4 The directly measured DW, and the deduced DW from the estimated DW from the linear equations under different culture conditions using the measured OD of diluted solutions and multiplied by dilute ratio. Error (%) = (Deduced DW – Measured DW) / Measured DW %

Culture condition	1-L (d3)		40-L (d11)		100-L (d5)	
OD682	3.699		1.83		1.991	
Measured DW(g/L)	2.152 \pm 0.003		0.373 \pm 0.002		0.552 \pm 0.003	
OD682 of diluted solutions	0.445	0.79	0.395	0.785	0.391	0.794
Dilute ratio	20.8	10.5	5.4	2.7	6.6	3.3
Deduced DW(g/L)						
1-L d6*	2.263	2.167	0.511	0.553	0.617	0.685
40-L d5*	1.877	1.728	0.429	0.441	0.519	0.546
2000-L d17*	1.815	1.756	0.408	0.449	0.493	0.555
Deduced DW (Error %)						
1-L d6*	5%	1%	37%	48%	12%	24%
40-L d5*	-13%	-20%	15%	18%	-6%	-1%
2000-L d17*	-16%	-18%	10%	20%	-11%	1%

*The linear equations 1-L: $y = 0.2829x - 0.0171$; 40-L: $y = 0.2154x - 0.0056$; 2000-L: $y = 0.232x - 0.016$ derived from Fig. 4.

藻的 OD680 與乾重之線性方程式，會因培養液中碳酸氫鈉的濃度 (3, 5, 10 g/L) 而異，擬球藻之線性方程式也會有差異 (薛, 2007) 且用 625 nm 波長取得之迴歸相關係數較佳 (Hsueh *et al.*, 2007)。Hsieh and Wu (2009) 則認為 *Chlorella* sp. 在尿素充足或不足的條件下培養，用吸光值來估算生質量的公式是不一樣的。本研究結果也顯示相同養殖條件下，不同養殖日數測得之吸光值，參考 Chiu *et al.* (2008) 的方法，若以其他天數導出之線性方

程式來推估，有較實測乾重增加 1 ~ 18% 之誤差；在不同養殖條件下，則誤差為 -13 ~ -20%、48 ~ 10% 與 24 ~ -11%。Sorokin (1979) 早已指出當以吸光值來推估細胞數量，若影響吸光值測定的因子改變 (如藻種特性或測量儀器有變)，其吸光值與細胞數量之線性方程式需重新計算，即使養殖條件幾乎未改變，也需不時量測，以確定線性關係仍舊。因此吸光值測定雖簡易，但僅可作為增殖情形之參考，若用來比對推估藻體之乾重時則

要謹慎。至於海水藻類之生質乾重，必需先經去鹽處理後再測定。

謝 辭

本研究獲行政院農業委員會「微藻生質燃料產製技術開發-生物反應器與採收系統」(99 農科-10.3.1-水-AB) 計畫經費補助，方能順利完成，謹此致謝。另，特別感謝審稿人對本文的細心審閱與指正。

參考文獻

- 李文哲 (2006) 以高溫高鹼度環境培養微藻固定模擬吸收塔之吸收液中 CO₂ 之研究. 國立成功大學環境工程學所 碩士論文, 113 pp.
- 葉俊良 (2006) 在光生化反應器中以二階段策略培養微藻生產油脂之研究. 國立成功大學化學工程學所 碩士論文, 79 pp.
- 薛新達 (2007) 以光合微生物固定高溫高鹼度吸收液中碳源之研究. 國立成功大學環境工程學所 博士論文, 122 pp.
- 蘇惠美 (1999) 餌料生物之培養與利用. 台灣省水產試驗所東港分所, 屏東, 105 pp.
- Chini Zittelli, G., R. Pastorelli and M. R. Tredici (2000) A Modular Flat Panel Photobioreactor (MFPP) for indoor mass cultivation of *Nannochloropsis* sp. under artificial illumination. *J. Appl. Phycol.*, 12: 521-526.
- Chiu, S. Y., C. Y. Kao, C. H. Chen, T. C. Kuan, S. C. Ong and C. S. Lin (2008) Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresour. Technol.*, 99: 3389-3396.
- Chiu, S. Y., C. Y. Kao, M. T. Tsai, S. C. Ong, C. H. Chen and C. S. Lin (2009a) Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresour. Technol.*, 100: 833-838.
- Chiu, S. Y., M. T. Tsai, C. Y., Kao, S. C. Ong and C. S. Lin (2009b) The air-lift photobioreactors with flow patterning for high-density cultures of microalgae and carbon dioxide removal. *Eng. Life Sci.*, 9(3): 254-260.
- Griffiths, M. J. and S. T. L. Harrison (2009) Lipid productivity as a key aracteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.*, 21: 493-507.
- Gu, N., Q. Lin, G. Li, G. Qin, J. Lin and L. Huang (2012) Effect of salinity change on biomass and biochemical composition of *Nannochloropsis oculata*. *J. World Aquacul. Soc.*, 43(1): 97-106.
- Hsieh, C. H. and W. T. Wu (2009) Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresour. Technol.*, 100: 3921-3926.
- Hsueh, H. T., H. Chu and S. T. Yu (2007) A batch study on the bio-fixation of carbon dioxide in the absorbed solution from a chemical wet scrubber by hot spring and marine algae. *Chemosphere*, 66: 878-886.
- Rodolfi L., G. Chini Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini and M. R. Tredici (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 102: 100-112.
- Sorokin, C. (1979) Dry weight, packed cell volume and optical density. *In Handbook of Phycological Methods Culture Methods & Growth Measurements* (J. R. Stein ed.), Cambridge University Press, NY, USA, 321-343.
- Su, C. H., L. J. Chien, J. Gomes, Y. S. Lin, Y. K. Yu, J. S. Liou and R. J. Syu (2010) Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. *J. Appl. Phycol.*, 23: 903-908.
- Zhu, C. J. and Y. K. Lee (1997) Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *J. Appl. Phycol.*, 9: 189-194.

Estimation of Biomass Dry Weight of *Nannochloropsis oceanica* Using Optical Density

Huei-Meei Su^{*}, Kai-Tse Cheng, Sui-Sin Wang and Tzyy-Ing Chen

Tungkang Biotechnology Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

Lipid productivity, calculated from the biomass production and lipid content, is a key characteristic of the algal species and the culture strategy for biodiesel production. Both biomass production and lipid content are based on the biomass dry weight (DW). Due to inconvenient operation of the exactly measured DW, some reports used the estimated biomass DW by the optical density measurements and their calibration curves. At first, the different de-salted methods for DW determination of marine microalgae *Nannochloropsis oceanica*, a candidate for biodiesel production, were tested. The DW of non-washed samples was at least 2.4 times higher than those washed by reverse osmosis (RO) water, 0.5 M ammonium formate or 0.5 M ammonium bicarbonate or EC method (algal centrifuged and then washed with RO water till its electric conductivity became zero). The DW of EC method was the significantly lowest ($p < 0.05$) and used in the following experiments. The independent calibration curves from OD682 and DW were obtained by linear regression ($R^2 = 0.990 \sim 0.998$) from 4 different culture conditions. Compared the measured DW of three condensed algal (OD682 > 1) and their deduced DW, estimated from measured OD682 of their diluted solutions and the linear equations, a great difference was found with the errors from -20% to 48%. The errors that compared the measured DW of the original algal cultures was compared with the calculated DW from the measured DW of their diluted solutions multiplied by dilution factor were lower (-1.63 ~ 3.62%). The results indicated that the biomass concentration of *N. oceanica* might be determined by DW measurement of de-salted algal taht washed with RO water, and then used for its lipid content or productivity calculation. The OD682 may be used as a reference of the growth of algal culture.

Key words: *Nannochloropsis oceanica*, optical density, biomass dry weight, regression equation

*Correspondence: Tungkang Biotechnology Research Center, Fisheries Research Institute, Pingtung 928, Taiwan, TEL: (08)-832-4121; Fax: (08)-8320234; E-mail: hmsu@mail.tfrin.gov.tw