

國立臺灣大學漁業科學研究所

碩士論文

指導教授：張繼堯 博士

廖文亮 博士

不同食物對橈足類短角異劍水蚤族群成長  
及脂肪酸組成之影響

**Effects of different food types on population  
growth and fatty acid composition of Copepods**

許登瑋 撰

中華民國 97 年 7 月

July, 2008

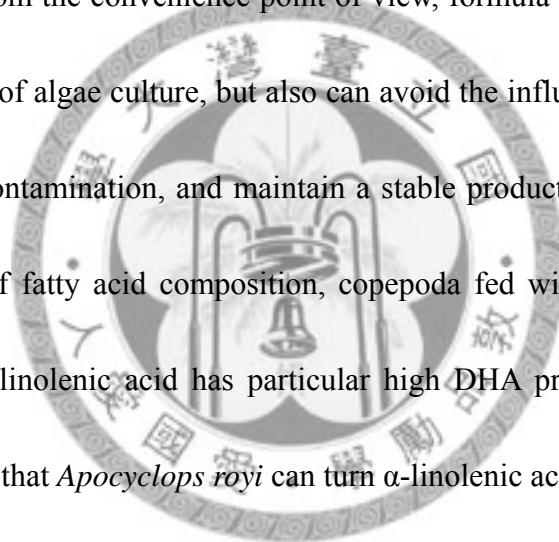
## 摘要

DHA 和 EPA 為魚類成長發育及維持正常生理代謝所必須的重要脂肪酸，而橈足類含高量的 DHA 和 EPA，因此橈足類成為水產種苗重要的餌料生物。傳統的橈足類戶外粗放混養方式，容易讓病毒等病原體隨著橈足類由戶外攜入種苗池，為了培育優質且無特定病原之橈足類，可以特定藻類食物，生產出高密度的橈足類，然而藻類的培養，除了需要較多的人力及空間，亦容易受到敵害生物之競爭及氣候影響。緣此，本實驗嘗試建立一個純淨的培育方式及更換其他食物配方供給橈足類生長所需，以達到餌料生產之目的，同時亦探討以藻類及其他配方為食物的橈足類體內所含的脂肪酸組成差異。短角異劍水蚤 (*Apocyclops royi*) 是在養殖池中常見的橈足類，本實驗以周氏扁藻 (*Tetraselmis chui*) 及其他人工食物配方來培養短角異劍水蚤 13 天，並觀察族群變化。於第 14 天收集蟲體分析脂肪酸組成，發現餵食周氏扁藻的蟲體，密度為每公升 23,100 隻，DHA 和 EPA 分別佔總脂肪酸的 4.44% 與 2.15%。餵食蝦片的蟲體，密度為每公升 3,750 隻，DHA 和 EPA 分別佔總脂肪酸的 4.00% 與 2.36%。餵食人工配方的蟲體，密度為每公升 5,475 隻，DHA 和 EPA 分別佔總脂肪酸的 15.08% 與 1.86%。餵食人工配方二的蟲體，密度為每公升 6,700 隻，DHA 和 EPA 分別佔總脂肪酸 7.09% 與 3.96%。以產量而言，藻類仍然是生產短角異劍水蚤之最佳食物來源，但以便利性而言，人工配方餵食不但可省去藻類培養的所需的成本及時間，亦可去除天候因素及外來生物的影響，以維持短角異劍水蚤的一定生產量。另一方面，由脂肪酸分析結果得知，餵食含高量  $\alpha$ -linolenic acid 的配方一之短角異劍水蚤體內 DHA 比其他實驗組高出許多，推論短角異劍水蚤可自行將  $\alpha$ -linolenic acid 轉換成 DHA。

## Abstract

DHA and EPA are important fatty acids that essential for fish development and physiological function maintenance. The rich content of DHA and EPA in Copepoda enables it become an important living food of fish fry in aquaculture. Traditional outdoor and mixed culture of copepoda brings virus pathogens into fish fry culture pond easily. The high quality and high density culture of copepoda with no specific pathogens can be achieved by providing specific algae as food. However, the culture of algae needs intensive labor and large space, and is easily influenced by the competition of harmful biological organisms and climate. In order to cope with the problem, we tried to establish a pure culture system and design the food formula for copepoda to produce the living food for fish fry. Besides, we also compare the fatty acids composition difference between copepoda that fed with algae and other formula food. *Apocyclops royi* is a common copepoda found in aquaculture pond, so we use *Tetraselmis chui* and other formula food to culture *Apocyclops royi* for 13 days and observe its population changes. On the 14<sup>th</sup> day, the copepoda were collected and the fatty acids composition were analyzed. We found that the density of copepoda that fed with *Tetraselmis chui* is 23,100 per liter, and the DHA and EPA composition is 4.44% and 2.15% in total fatty acids, respectively. The density of copepoda that fed with shrimp chips is 3,750 per liter, and the DHA and EPA

composition is 4.00% and 2.36% in total fatty acids, respectively. The density of copepoda that fed with formula food I is 5,475 per liter, and the DHA and EPA composition is 15.08% and 1.86% in total fatty acids, respectively. The density of copepoda that fed with formula food II is 6,700 per liter, and the DHA and EPA composition is 7.09% and 3.96% in total fatty acids, respectively. As far as production volume is concerned, algae are still the best food to produce *Apocyclops royi*. However, from the convenience point of view, formula food not only can save the cost and time of algae culture, but also can avoid the influence from climate and other pathogen contamination, and maintain a stable production. Besides, from the analysis results of fatty acid composition, copepoda fed with formula food I that contain highly  $\alpha$ -linolenic acid has particular high DHA production in copepoda, which may imply that *Apocyclops royi* can turn  $\alpha$ -linolenic acid into DHA.



# 目錄

摘要 .....	I
Abstract .....	III
目錄 .....	V
圖目次 .....	VII
表目次 .....	VII
附錄 .....	VII
壹、前言 .....	1
1.1 石斑魚與水產養殖 .....	1
1.2 水產養殖之餌料生物 .....	1
1.3 不飽和脂肪酸含量及種類在餌料生物上的重要性 .....	2
1.4 不飽和脂肪酸之種類及命名 .....	3
1.5 不飽和脂肪酸的生合成與代謝 .....	4
1.6 橈足類在養殖業上的應用 .....	8
1.7 橈足類之營養來源及培育 .....	9
1.8 短角異劍水蚤之簡介 .....	9
1.9 周氏扁藻之簡介 .....	11
1.10 實驗目的 .....	12
貳、材料與方法 .....	13
2.1 生物性材料 .....	13
2.2 不同食物條件對短角異劍水蚤族群成長的影響 .....	13
2.2.1 藥品 .....	13
2.2.2 周氏扁藻的培養 .....	14
2.2.3 短角異劍水蚤的培養 .....	15
2.2.4 蝦片 .....	16
2.2.5 人工配方 .....	16
2.3 不同食物與短角異劍水蚤的脂肪酸分析 .....	17
2.3.1 藥品 .....	17
2.3.2 粗脂肪萃取 .....	18
2.3.3 皂化 .....	19

2.3.4 甲基酯化 .....	20
2.3.5 氣相層析 (Gas Chromatograph, GC) .....	20
參、結果 .....	22
3.1 不同食物來源對橈足類族群成長之影響 .....	22
3.2 不同食物來源對橈足類脂肪酸組成之影響 .....	25
3.2.1 以不同食物培養的橈足類之粗脂肪比例 .....	25
3.2.2 以不同食物培養的橈足類之脂肪酸組成分析 .....	26
肆、討論 .....	27
伍、參考文獻 .....	31



## Figure

<b>Figure 1.1</b> Structure of Polyunsaturated fatty acids (PUFA).....	4
<b>Figure 1.2</b> Elongation and unsaturation of fatty acids.....	5
<b>Figure 1.3</b> <i>Apocyclops royi</i> naulpi.....	10
<b>Figure 1.4</b> <i>Apocyclops royi</i> egg sac-bearing female.....	11
<b>Figure 1.</b> Population growth of <i>Apocyclops royi</i> fed with <i>Tetraselmis chui</i> .....	38
<b>Figure 2.</b> Population growth of <i>Apocyclops royi</i> fed with shrimp flasks.....	39
<b>Figure 3.</b> Population growth of <i>Apocyclops royi</i> fed with formula 1 containing flaxseed oil.....	40
<b>Figure 4.</b> Population growth of <i>Apocyclops royi</i> fed with formula 2 containing squid oil and fish oil.....	41
<b>Figure 5.</b> Population growth of <i>Apocyclops royi</i> fed with formula 3.....	42
<b>Figure 6.</b> Population growth of <i>Apocyclops royi</i> fed with different kinds of food....	43
<b>Figure 7.</b> Gas Chromatograph of standards. (A) EPA. (B) DHA. (C) EPA/DHA 2:1.....	44
<b>Figure 8.</b> Comparison of Gas Chromatograph data. (A) <i>Tetraselmis chui</i> . (B) <i>Apocyclops royi</i> fed with <i>T. chui</i> .....	45
<b>Figure 9.</b> Comparison of Gas Chromatograph data. (A) Shrimp flakes. (B) <i>Apocyclops royi</i> fed with shrimp flakes.....	46
<b>Figure 10.</b> Comparison of Gas Chromatograph data. (A) Formula 1. (B) <i>Apocyclops royi</i> fed with formula 1.....	47
<b>Figure 11.</b> Comparison of Gas Chromatograph data. (A) Formula 2. (B) <i>Apocyclops royi</i> fed with formula 2.....	48

## Table

<b>Table 1.1</b> Essential fatty acid requirement of fish.....	7
<b>Table 1.</b> Summary of changes in fatty acid composition of copepods fed with different kinds of food.....	49

## 附錄

<b>Figure 1.</b> Relationship between relative retention time and carbon number of fatty acid. (Watanabe, 1987).....	50
--	----

# 壹、前言

## 1.1 石斑魚與水產養殖

水產品是優良的蛋白質和脂質來源，然而過度漁撈已經使得許多天然漁場日漸枯竭，近年來油價高漲更使得捕撈漁業邁入停滯狀態，另一方面由於世界人口快速增加，生活水準提高，水產品需求也增加，導致水產養殖業有相當快速且蓬勃發展的趨勢。台灣四面環海，位居熱帶以及亞熱帶之間，發展養殖產業具備先天的優勢，西部沿海地區，如嘉義、台南、高雄、屏東及澎湖，是重要的養殖區。其中屬於熱帶珊瑚礁的石斑魚是目前極具代表性的高經濟養殖魚種。由於石斑魚適應性強且成長快速，肉質細嫩鮮美，加上市場需求量大，價格高昂，因此已成為發展快速的養殖魚種。石斑魚養殖區主要位於台南至屏東沿海陸上鹹水養殖魚塢，近來許多養殖業者也開始投入箱網養殖及室內養殖石斑魚，室內養殖以集約式養殖方式，此為未來大量生產之趨勢。

石斑魚的生產流程分為四個階段，每個階段都有專門的漁民經營。第一個階段是種魚場，這個階段以天然或人工催熟的方法生產石斑魚受精卵。第二個階段是白身場，在此將受精魚卵孵化為魚花並飼養至稚魚階段，稚魚俗稱白身仔，體長約 1.8 至 2.4 公分，重量 0.4 至 0.6 公克。第三階段是吋苗場，稚魚在此被飼養至二到三吋。第四階段是成魚場，養殖8至12個月將石斑魚將石斑魚養至一公斤左右的上市體型 (邱，2007)。

## 1.2 水產養殖之餌料生物



魚苗在孵化後會利用卵黃囊營養繼續發育，俟口部發育完成即需進食，然而大多數剛孵化的魚類幼苗，由於消化系統尚未發育健全，難以消化人工飼料。而自然界中的浮游生物體內含有消化酵素，當被魚苗攝食後這些消化酵素造成浮游生物體的自身分解，釋放出的消化酵素還可幫助魚苗分解其他原本難以消化食物，因此這些浮游生物在魚苗繁殖工作上是不可或缺的生物餌料。以石斑魚苗養殖為例，依序投餵的餌料生物有牡蠣受精卵、輪蟲、橈足類和豐年蝦等 (蘇，1999)。

不論是淡水或海洋魚類，在幼魚階段多以浮游動物為食，其中橈足類佔了相當大的比例。不論雜食性魚類或食浮游植物的鏈魚腸道中，經常發現有橈足類的殘肢。橈足類在分類上屬於節肢動物門 (Arthropoda)、甲殼綱 (Crustacea)，種類已知超過一萬兩千種 (鄭等，2004)，其中有寄生性種類也有自由生活的種類，有濾食為主的種類也有捕食為主的種類，有浮游性種類也有底棲性種類 (陳，1997)。由於橈足類的分佈廣，種類多，歧異度大，營養價值高，能將浮游植物當作食物而轉化成營養層次較高的有機物質，是海洋食物鏈中重要的一環，故無論以養殖漁業或以海洋生態學的觀點來看，橈足類動物之研究是具有重要意義的 (張，1992)。

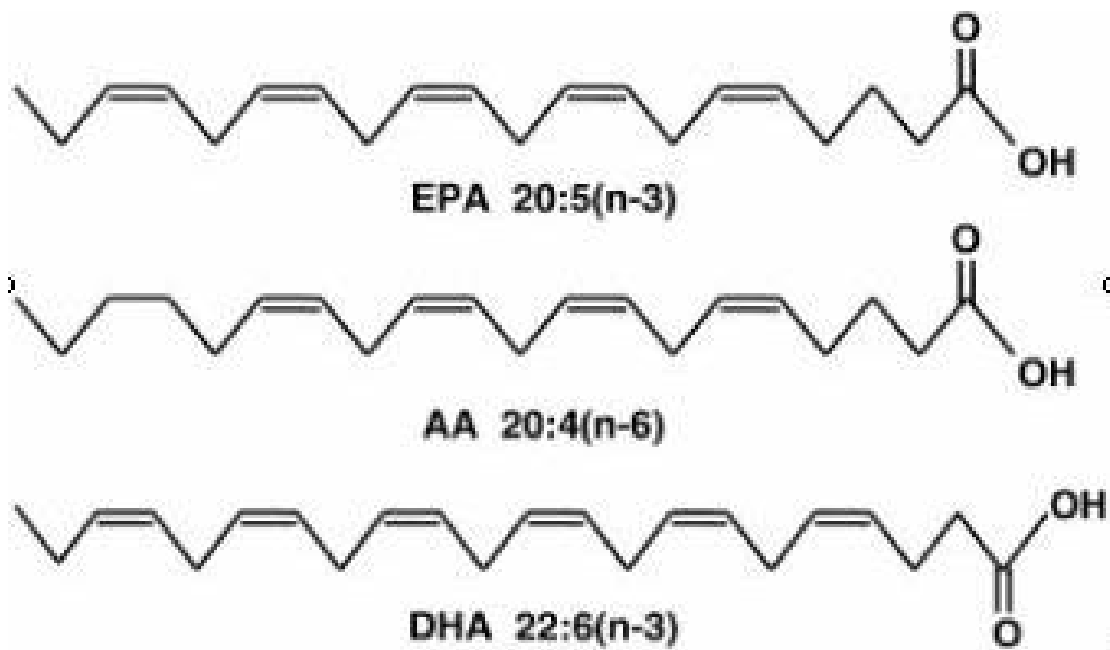
### 1.3 不飽和脂肪酸含量及種類在餌料生物上的重要性

在魚苗的栽培過程中，適當的餌料生物所提供的營養成分將是魚苗得以發育完全的重要關鍵。許多漁民養殖經驗指出，石斑魚苗之飼養若只餵食豐年蝦而不投餵橈足類，將使成長之石斑魚苗發育不健全，容易產生緊迫現象，這種現象在補以橈足類餵食後可以改善。豐年蝦的營養成分中缺乏不飽和脂肪酸、DHA 和 EPA，而相對的橈足類則富含 DHA 和 EPA 等不飽和脂肪酸。Toledo 等

(1999) 指出橈足類含高量的 DHA (Docosahexaenoic acid, 二十二碳六烯酸, 22:6n-3) 和 EPA (Eicosapentaenoic acid, 二十碳五烯酸, 20:5n-3), 以其幼蟲飼養點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 比壺狀輪蟲 (*Brachionus sp.*) 之存活率和成長為佳。自然界中微藻會自行合成長鏈不飽和脂肪酸, 而攝食微藻的浮游動物則進一步修飾其所得不飽和脂肪酸經由食物鏈魚類可取得其發育所需的不飽和脂肪酸營養。DHA 和 EPA 為魚類成長發育及維持正常生理代謝所必須的重要脂肪酸 (周, 2002)。

#### 1.4 不飽和脂肪酸之種類及命名

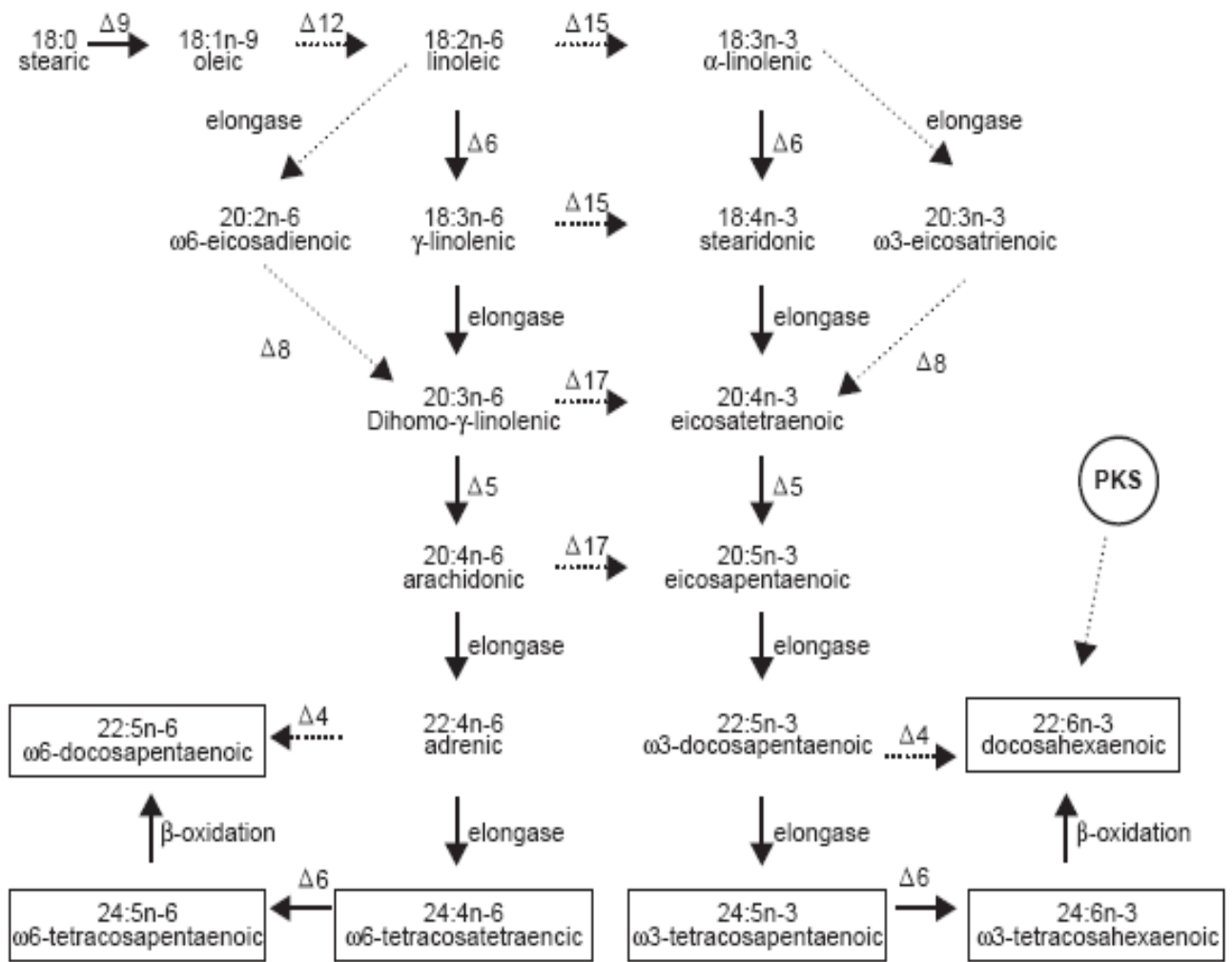
脂肪酸是構成脂質的基本單位之一, 其化學結構為 R-COOH, R 代表碳氫鏈, 依照碳氫鏈中碳原子之間雙鍵的數目可分為飽和脂肪酸 (Saturated fatty acids)、單元不飽和脂肪酸 (Monounsaturated fatty acids) 和多元不飽和脂肪酸 (Poly unsaturated fatty acids, PUFA), 20 碳以上的脂肪酸若雙鍵在四個以上則特別稱為高度不飽和脂肪酸 (Highly unsaturated fatty acid, HUFA)。不飽和脂肪酸的碳原子和雙鍵位置可以倒數表示, 也就是由甲基算起的第一個雙鍵若位在第三個碳-碳鍵, 則稱為 n-3 fatty acid (亦稱為  $\omega$ -3 fatty acid), 同理, 若雙鍵位置在第六個碳-碳鍵上, 則稱為 n-6 fatty acid (亦稱為  $\omega$ -6 fatty acid)。通常兩個雙鍵之間隔著兩個單鍵, 脂肪酸的結構表示可以簡寫為碳數: 雙鍵數、雙鍵位置, 例如以 18:2n-6 來表示 Linoleic acid, 表示此脂肪酸含 18 個碳, 碳鏈中含有兩個雙鍵, 且第一個雙鍵位於由甲基端數來第六個碳上。其他高度不飽和脂肪酸結構表示如 Figure 1.1。



**Figure 1.1** Structure of polyunsaturated fatty acids (PUFA). (蘇，1999)

### 1.5 不飽和脂肪酸的生合成與代謝

植物以及一些微生物可以在體內合成多種多元不飽和脂肪酸(王，1997)，在動物體中，短鏈脂肪酸可以經由碳鏈延長酶 (elongase) 的作用代謝為較長鏈的脂肪酸，脂肪酸的碳鏈也可以經由不同的去飽和酶 (desaturase) 產生碳-碳雙鍵，長鏈 n-3脂肪酸只可以短鏈 n-3脂肪酸為前趨物，長鏈 n-6脂肪酸只可以短鏈 n-6脂肪酸為前趨物。ALA ( $\alpha$ -linolenic acid) 是 n-3 多元不飽和脂肪酸的典型代表，在魚體中可以通過一系列去飽和酶 (desaturase) 和碳鏈延長酶 (elongase) 作用，將 ALA 代謝為 DHA (Docosahexaenoic acid) 和 EPA (Eicosapentaenoic acid) 但參與合成的酵素其活性在不同物種中並不一致 (Figure 1.2)，魚類無法有效自行合成足量的長鏈不飽和脂肪酸，仍須依賴食物補充所需的長鏈不飽和脂肪酸 (Watanabe, 1982)。



**Figure 1.2** Elongation and desaturation of fatty acids. 虛線表示低等真核及部分原核生物體內可能的代謝途徑，實線表示高等動物體內可能的代謝途徑， $\Delta 4$ 、 $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ ...等代號表示  $\Delta 4$  desaturase、 $\Delta 5$  desaturase、 $\Delta 6$  desaturase...等酵素。

長鏈不飽和脂肪酸與魚類種苗消化生理的基因表現有關，進而影響魚苗的成長、活存、神經發育、滲透壓調節及操作抗力，這類脂肪酸包括 n-3 族的十八碳三烯酸 (ALA)、二十碳五烯酸 (EPA)、二十二碳六烯酸 (DHA)，及 n-6 族的十八碳二烯酸 (LA)、二十碳四烯酸 (ARA)，水產動物把 ALA 轉換為 EPA

及 DHA 的能力不一，因此需求的必需脂肪酸也不同，一般而言，海水魚類需要 DHA、EPA 及 ARA 等不飽和脂肪酸，淡水魚類需要 ALA 及 LA 等不飽和脂肪酸 (陳與蘇，2005)。

餌料脂質在動物體組織的熱能產生過程，以及必需脂肪酸的營養來源方面扮演重要角色，除了這些功用以外脂質在餌料的角色中，還扮演若干非脂肪營養素的攜載 (Carriers) 功能，這些營養素中有維生素 A、D、E 和 K 等油溶性維生素。最近在魚類必需脂肪酸的研究證明，不同魚類對其必需脂肪酸的需求，有大幅度差別存在，這種魚類脂肪酸需求上的突出特性差別之一，就是淡水魚與海水魚間對必需脂肪酸的不同需要 (Watanabe, 1982)。



**Table 1.1 Essential fatty acid requirement of fish.** 在不同魚類中，對於脂肪酸有不同需求，大致上可以看出淡水魚類需要 18 個碳的多元不飽和脂肪酸系列，海水魚需要 20 個碳以上的高度不飽和脂肪酸，比較特別的是香魚雖然是淡水魚，對 EPA 卻有大量需求 (Watanabe, 1982)。

Essential fatty acid requirement of fish		
Fish species	Requirement	Reference
Rainbow trout	18:3n-3 1%	Castell <i>et al.</i> (1972)
	18:3n-3 0.8%	Watanabe <i>et al.</i> (1974)
	18:3n-3 20% of lipid	Takeuchi & Watanabe (1977)
	n-3 HUFA 10% lipid	Takeuchi & Watanabe (1977)
Carp	18:2n-6 1% and 18:3n-3 1%	Watanabe <i>et al.</i> (1974)
		Takeuchi & Watanabe (1977)
Eel	18:2n-6 0.5% and 18:3n-3 0.5%	Takeuchi <i>et al.</i> (1980)
Chum salmon	18:2n-6 1% and 18:3n-3 1%	Takeuchi <i>et al.</i> (1979, 1980)
	n-3 HUFA 0.5%	Takeuchi <i>et al.</i> (1980)
Coho salmon	18:3n-3 1-2.5%	Yu & Sinnhuber (1979)
Ayu	18:3-n-3 1% or 20:5n-3 1%	Kanazawa <i>et al.</i> (1982)
<i>Tilapia zillii</i>	18:2n-6 1% or 20:4n-6 1%	Kanazawa <i>et al.</i> (1980)
<i>Tilapia nilotica</i>	18:2n-6 0.5%	Takeuchi <i>et al.</i> (1983)
Red sea bream	n-3 HUFA 0.5% or 20:5n-3 0.5%	Yone <i>et al.</i> (1971)
Turbot	n-3 HUFA 0.8%	Gatesoupe <i>et al.</i> (1972)
Yellowtail	n-3 HUFA 2%	Deshimaru <i>et al.</i> (1983)

(Watanabe, 1982)

當以玉米油添加入飼料中時，額外添加 20:5n-3 (EPA) 及 22:6n-3 (DHA) 對溫水性的肉食性海水魚，如 red sea bream，有促進健康及成長的效果 (Yone and Fujii, 1975)。由於海水魚的必需脂肪酸為 20:5n-3 及 22:6n-3 (Watanable, 1982)，因此提供適當的必需脂肪酸為海水魚飼料所需。此外在免疫學的研究方面指出，必需脂肪酸的給予能強化魚體的免疫反應，缺乏必需脂肪酸會影響巨噬細胞 (macrophages) 及抗體 (antibody) 的產生 (Kiron *et al.*, 1995; 吳, 2002)。因此缺乏必需脂肪酸的飼料，往往會造成較高的死亡率 (Takeuchi *et al.*, 1991)。飼料中添加 n-3 必需脂肪酸的虹鱒，在精子與卵的品質、受精率及受精卵的孵化率上都會有較佳的影響 (Vassallo-Agius, *et al.*, 2001)。

## 1.6 橈足類在養殖業上的應用

早期橈足類的取得，大都從養殖池捕撈。大約在 1985 年左右，市場上才開始有橈足類的交易買賣 (其來源也是由魚蝦池捕撈而得)。1990 年代開始，漸有專業培育橈足類的養殖場建立 (陳與蘇, 2005)。

橈足類具有豐富養分，可補強人工飼料所欠缺的元素和缺點。若運用得當，可使海水魚苗有較佳的成長和活存率，且能避免畸形或營養不良情況發生。橈足類的捕撈都是在蝦池或魚池用水車來帶動水流，並架設定置網捕撈。捕撈時間必須在天亮前，約為上午3-5時(因為橈足類夜晚通常活動於池水中上層)。專業橈足類培育池為室外池，池中會混養少量魚或蝦 (每甲五千尾蝦或六百至一千尾魚，池中鹽分18-25 ppt)。每甲的培育池，每天平均可捕撈35-50公斤的橈足類，且每隔5-7天，須投餵80-100公斤經活菌分解後的魚粉有機肥，並需視池中水色 (肥度) 增減投餵量。如要使池中每日都有橈足類可捕撈收成，則必須調整定置網的網目大小，以控制收成交量。否則連續過度捕撈4-5天後，池

中橈足類密度會急速降低，這時就必須再另等12-15天，才会有高密度的橈足類可收成 (陳與蘇，2005)。

### 1.7 橈足類之營養來源及培育

養殖戶在培養橈足類時，除了以下雜魚作為橈足類營養源，有時也添加鰹粉或是蝦片來作為橈足類的食物。蝦片的營養成分多樣化，顆粒小，使用上極為方便。鄭 (2002) 指出將魚粉、蝦粉及微生物製劑的混合飼料，經由發酵後可用於橈足類的培養。Rhodes (2005) 認為對於底棲性的猛水蚤 (*Nitokra lacustris*) 而言，以酵母菌、果汁及亞麻仁油為主的人工配方足以取代藻類 (*Tetraselmis suecica*)。

台灣目前橈足類生產大多採戶外培育方式，故產量常受氣候影響。值得注意的是，有時魚蝦池或橈足類培育池水質不佳，也容易造成病蟲害發生，而使橈足類夾帶其他病菌，如鐘形蟲、指環蟲、神經壞死病毒、蝦白點病病毒等。把帶有病菌的橈足類投入苗池後，會影響魚苗成長及活存率，而神經壞死病毒感染甚至造成魚苗九成以上的死亡率 (Chi *et al.*, 1997)。因此，無特定病原 (Specific Pathogen Free) 橈足類的大量人工培育技術仍有待建立。

### 1.8 短角異劍水蚤之簡介

短角異劍水蚤 (*Apocyclops royi*) 是一種小型的橈足類動物，幼蟲體長 125~450  $\mu\text{m}$  (Figure 1.3)，成蟲可成長至 1,100  $\mu\text{m}$  (Figure 1.4)，為典型的半淡鹹水種類，分佈於河口域中為暖水性或廣溫性種類。在分類上屬於節肢動物門 (Arthropoda)、甲殼綱 (Crustacea)、劍水蚤目 (Cyclopoida)、劍水蚤科



(Cyclopoidae)、劍水蚤亞科 (Cyclopinae)、異劍水蚤屬 (*Apocyclops*) (Chang *et al.*, 1991)。剛孵化的個體為無節幼蟲，無節幼蟲期有六期，經過第六次蛻皮後才具有橈足類的典型型態，此階段稱為橈足狀幼體，橈足狀幼體有五期，最後一次蛻皮成為成熟個體，雌雄異體，成熟雌蟲受精後帶有兩個卵囊，雌蟲一次可產下大約有 14~22 個卵，卵孵化後雌蟲可以繼續產卵數次 (張，1992)。



**Figure 1.3** *Apocyclops royi* naupli. Bar = 0.2 mm



**Figure 1.4** *Apocyclops royi* egg sac-bearing female. Bar = 0.2 mm

短角異劍水蚤 (*Apocyclops royi*) 是在養殖池常見且容易培養的種類 (張等, 1991), 半底棲生活, 在靜止水體則浮游於水體中。比較不同藻類和人工餌料對短角異劍水蚤生殖的影響, 結果顯示周氏扁藻 (*Tetraselmis chui*) 比其他藻類或人工飼料更適合作為短角異劍水蚤的食物來源 (Hsu *et al.*, 2001)。

### 1.9 周氏扁藻之簡介

周氏扁藻 (*Tetraselmis chui*) 在分類上屬於綠藻門 (Chlorophcophyta)，綠色鞭毛藻綱(Prasinophyceae)，綠色鞭毛藻目 (Prasinocladales)，綠色鞭毛藻科 (Prasinocladaceae)，周氏扁藻為單細胞藻類，細胞一般長 11~14  $\mu\text{m}$ ，寬 7~9  $\mu\text{m}$ ，厚 3.5~5  $\mu\text{m}$ ，利用鞭毛在水中快速運動 (陳，1997)，藻體在靜止的水中一段時間後會呈現雲霧狀聚集，依此特性可判斷藻體健康情況，周氏扁藻是橈足類的良好餌料 (Hsu *et al.*, 2001)，然而藻類的培養需要相當大的空間，且戶外培養容易受到溫度、陽光及敵害生物的影響，因此有必要尋求在藻類短缺時能夠替代藻類的材料。

#### 1.10 實驗目的

飼料中的脂肪組成對於水產品養殖的重要性已經有相當多的研究，海水魚營養需求的相關報告亦肯定高度不飽和脂肪酸為海水魚的必須脂肪酸，其中 DHA 和 EPA 在魚體中的重要性也更加被重視。魚苗的養成需要大量的餌料生物，橈足類因為嗜口性佳又富含 DHA 和 EPA，為海水魚苗重要的餌料生物。更換食物配方以供給橈足類生長所需，而達到高密度餌料生產之目的，是目前魚苗繁養殖上重要的課題。本實驗使用周氏扁藻、蝦片 (Omega<sup>®</sup>) 以及麵包酵母為主但添加不同油脂的人工配方，探討不同食物餵食短角異劍水蚤的族群成長情形之影響，以及脂肪酸組成之差異，以選取出最適之人工配方，做為藻水供應不穩時的輔助營養源。

## 貳、材料與方法

### 2.1 生物性材料

1. 短角異劍水蚤 (*Apocyclopus royi*)，購自東港水產試驗所。
- 2 周氏扁藻 (*Tetraselmis chui*)，購自東港水產試驗所。

### 2.2 不同食物條件對短角異劍水蚤族群成長的影響

#### 2.2.1 藥品

- (1) 海水素 (Instant Ocean)
- (2) Boric acid ( $\text{H}_3\text{BO}_3$  , Sigma)
- (3) Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$  , Bioman)
- (4) Ferric chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  , Sigma)
- (5) Manganese chloride tetrahydrate ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  , Sigma)
- (6) Sodium dihydrogen phosphate dehydrate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  , Sigma)
- (7) Sodium nitrate ( $\text{NaNO}_3$  , Bioman)
- (8) Zinc Sulphate heptahydrate ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  , Sigma)
- (9) Cobalt chloride hexahydrate ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  , Sigma)
- (10) Ammonium molybdate tetrahydrate ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  , Sigma)
- (11) Cupper sulfate pentahydrate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  , Sigma)
- (12) Thiamine (Vitamin B1 , Sigma)
- (13) Cyanocobalamine (Vitamin B12 , Sigma)

- (14) Biotin (Vitamin H , Sigma)
- (15) Dry baker's yeast (White rose<sup>®</sup>)
- (16) Flaxseed oil (Ölmühle solling<sup>®</sup>)
- (17) Vegetable juice (Kagome<sup>®</sup>)
- (18) Vitamin mix (Wyeth<sup>®</sup>)
- (19) Fish oil (廖文亮老師實驗室提供)
- (20) Squid oil (廖文亮老師實驗室提供)
- (21) 亞美佳特級蝦片 (Omega<sup>®</sup>)

### 2.2.2 周氏扁藻的培養

周氏扁藻 (*Tetraselmis chui*) 50 ml 藻種，購自東港水產試驗所。以 Walne (1970) medium 培養。

Walne medium 配方如下：

Walne 貯備液 I	1 ml
Walne 貯備液 III	0.1 ml
以滅菌人工海水定量到	1,000 ml

Walne 貯備液 I：

NaNO <sub>3</sub>	100 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	20 g
Na <sub>2</sub> EDTA	45 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33.6 g
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.36 g
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1.30 g

Walne貯備液 1 ml  
以DDH<sub>2</sub>O 定量到 1,000 ml  
以0.22 μm 過濾膜 (Millipore) 過濾

Walne貯備液 II :

ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 4.4 g  
CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 2.0 g  
(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.9 g  
CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 2.0 g  
以DDH<sub>2</sub>O 定量到 100 ml  
以0.22 μm 過濾膜 (Millipore) 過濾。

Walne貯備液 III

維生素 B<sub>1</sub> 200 mg  
維生素 B<sub>12</sub> 10 mg  
Biotin 10 mg  
以DDH<sub>2</sub>O 補足到 100 ml  
以0.22 μm 過濾膜 (Millipore) 過濾後避光儲存。

周氏扁藻培養於 2 公升錐形瓶中，以兩支各 55 瓦，色溫 7,200 K 的 PL 燈管 (Philips) 為光源，24 小時光照，並以經過 0.22μm 過濾膜 (Millipore) 過濾過的空氣打氣，鹽度為 2%，水溫 26±1°C。

### 2.2.3 短角異劍水蚤的培養

短角異劍水蚤 (*Apocyclopus royi*) 蟲種，購自東港水產試驗所。培養於 2

公升錐形瓶中，投餵周氏扁藻，水色澄清即添加藻水至  $10^5$  cells/ml，以 1 支 13 瓦，色溫 7,200 K 的 PL 燈管 (Philips) 為光源，24 小時光照，並以經過 0.22  $\mu\text{m}$  過濾膜 (Millipore) 過濾過的空氣微弱打氣 (0.02~0.04 公升/分鐘)，鹽度為 20 ppt，水溫  $26\pm 1^\circ\text{C}$ 。經過一個半月以上馴化繁殖後，移入 56 公升橘色塑膠桶進行實驗，分為五組，各組投餵食不同食物，分別為：周氏扁藻 (*Tetraselmis chui*)、蝦片，人工配方一、人工配方二以及人工配方三，起始水量 40 公升，放養密度 300 隻/公升，鹽度為  $22\pm 1$  ppt，水溫  $26\pm 1^\circ\text{C}$ ，打氣量 0.6~1.2 公升/分鐘，於第 1 天、第 4 天、第 7 天、第 10 天、第 13 天餵食食物一次，在餵食前取水樣計算蟲體密度，第 14 天以 300 mesh (平均網目 45  $\mu\text{m}$ ) 浮游生物網收集蟲體，收集蟲體前停止打氣 1 小時，以虹吸管吸取中上層水體至浮游生物網內，再將蟲體集中於 100 ml 燒杯中，靜置置置半分鐘分離糞和蟲體後，以滴管將蟲體移至另一個浮游生物網，以淡水清洗後瀝乾，秤重後保存於  $-20^\circ\text{C}$  冷凍櫃，做為脂肪酸分析的樣品。蟲體族群成長實驗二重複。

#### 2.2.4 蝦片

亞美加特級蝦片 (Omega<sup>®</sup>)，購自群冠企業有限公司，秤取 5 g 乾燥蝦片於 300 mesh 浮游生物網內，以少量鹽度 2% 人工海水將蝦片搓洗，完全洗出細碎蝦片後加 2% 人工海水至 100 ml，分裝保存。實驗時每公升水體投餵 2 ml，即終濃度為 50 mg/l。

#### 2.2.5 人工配方

依據 Rhodes (2005) 的配方作調整。設定三種不同配方：

人工配方一：

Vegetable juice (Kagome <sup>®</sup> )	200 ml
Dry bakers yeast (White rose <sup>®</sup> )	15 g
Vitamin mix (wyeth <sup>®</sup> )	0.5 g
Flaxseed oil (Ölmühle solling <sup>®</sup> )	5 ml

人工配方二：

Vegetable juice (Kagome <sup>®</sup> )	200 ml
Dry bakers yeast (White rose <sup>®</sup> )	15 g
Vitamin mix (wyeth <sup>®</sup> )	0.5 g
Squid oil (廖文亮老師實驗室提供)	3 ml
Fish oil (廖文亮老師實驗室提供)	2 ml

人工配方三：

Vegetable juice (Kagome <sup>®</sup> )	200 ml
Dry bakers yeast (White rose <sup>®</sup> )	15 g
Vitamin mix (wyeth <sup>®</sup> )	0.5 g

各配方以 2% 人工海水添加至 1,000 ml，均勻混合後分裝並保存 -20 °C 冷凍，作為實驗時短角異劍水蚤之人工配方餌料。實驗時每次投餵量為每公升水體投餵 2 ml。

## 2.3 不同食物與短角異劍水蚤的脂肪酸分析

### 2.3.1 藥品



- (1) Sodium chloride (NaCl , Sigma)
- (2) Chloroform (CHCl<sub>3</sub> , Sigma)
- (3) Methanol (Sigma)
- (4) Ethanol (Sigma)
- (5) Ethyl ether (Sigma)
- (6) Acetone (Sigma)
- (7) n-Hexane (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> , Sigma)
- (8) Boiling stone (Sigma)
- (9) Methyl orange (Sigma)
- (10) Potassium hydroxide (KOH , Sigma)
- (11) Hydrochloric acid (HCl , sigma)
- (12) Sodium sulfate anhydrous (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> , Sigma)
- (13) 51% Boron trifluoride methanol (Sigma)
- (14) 0.1% Methyl orange (Sigma)
- (15) Docosahexaenoic acid (DHA , Sigma)
- (16) Eicosapentaenoic acid (EPA , Sigma)
- (17) Magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub> , Sigma)

### 2.3.2 粗脂肪萃取

依據 Folch 等人 (1975) 的方法，將秤重過的樣品加入 50 ml 的氯仿/甲醇(chloroform/methanol, 2 : 1 v/v) 溶液中，以均質機 (Nissei AM-3, Tokyo Japan) 5,000 rpm 攪拌 5 分鐘再用濾紙與抽濾漏斗過濾，並以 50 ml 氯仿/甲醇 (2 : 1 v/v) 洗滌均質機刀片與抽濾漏斗，將濾液全部移入分液漏斗中，再加入 20 ml 的 0.03 M 氯化鎂 (MgCl<sub>2</sub>) 水溶液，上下震盪分液漏斗 1 分鐘使水層和有機

層混合，置於室溫中隔夜，取下層溶液於秤重過的濃縮瓶中，以減壓迴轉濃縮儀抽除有機溶劑，即可得到萃取物，以萃取物重除以樣品重量求得粗脂肪含有率。

### 2.3.3 皂化

依據 Takeuchi *et al.*, (1990) 的方法。將 1 ml 的 50% 氫氧化鉀 (KOH) 水溶液和 15 ml 乙醇 (ethanol) 加入含有粗脂肪的濃縮瓶中，於濃縮瓶中放入一小顆沸石 (boiling stone)，接上冷凝管後於電熱爐上加熱至 80 °C 皂化 40 分鐘，然後將濃縮瓶內的液體倒入分液漏斗中，並以 40 ml 去離子水清洗濃縮瓶，將此去離子水連同 30 ml 乙醚 (ethyl ether) 移入分液漏斗中，上下震盪分液漏斗 1 分鐘使水層和有機層混合，靜置分層後取下方的水層以 40 ml 乙醚再萃取 2 次以除去不被皂化的脂溶性物質，將 3 次萃取的乙醚集中於分液漏斗與 20 ml 的去離子水混合萃取出乙醚中殘留的脂肪酸鉀，靜置分層後取下方的水層集中於分液漏斗中，加入 50 ml 乙醚和 2 滴 0.1% 甲基橙 (methyl orange) 指示劑，加入 2 N 鹽酸 (HCl) 使水層由黃色 (pH > 4.5) 轉為紅色 (pH < 3.3)，上下震盪分液漏斗 1 分鐘使水層和有機層混合，在酸性環境下脂肪酸溶入乙醚中，靜置分層後去除下方水層，以去離子水分次洗滌分液漏斗中的乙醚，直到水層接近中性，將上層液置於濃縮瓶中，以減壓迴轉濃縮儀抽除乙醚，得到脂肪酸。

### 2.3.4 甲基酯化

依據 Vorbeck 等人 (1961) 的方法。以甲醇為甲基來源，氟化硼 ( $\text{BF}_3$ ) 為催化劑，將 5 ml 的 7% 氟化硼甲醇溶液加入含有脂肪酸的濃縮瓶中，於濃縮瓶中放入一小顆沸石 (boiling stone)，接上冷凝管後於電熱爐上加熱至  $80^\circ\text{C}$  酯化 20 分鐘，然後將 5 ml 正己烷 (n-hexane) 由冷凝管頂端加入，待濃縮瓶內液體沸騰 1 分鐘後取下濃縮瓶，待冷卻後加入飽和氯化鈉 ( $\text{NaCl}$ ) 水溶液，使正己烷層浮至濃縮瓶上端，將正己烷層以無水硫酸鈉 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 脫水並移至秤重過的梨型濃縮瓶，以減壓迴轉濃縮儀抽除正己烷，即可得到脂肪酸甲酯。

### 2.3.5 氣相層析 (Gas Chromatograph, GC)

以正己烷為溶劑，依 10 mg 脂肪酸甲酯/0.1 ml 正己烷的比例稀釋脂肪酸甲酯，以微量注射器將 0.5  $\mu\text{l}$  樣本注入氣相層析儀分析。

氣相層析操作條件如下：

機型：	Shimadzu GC-14 A
偵測器：	Hydrogen Flame Ionization Detector
偵測溫度：	$240^\circ\text{C}$
管柱：	Supelcowax-10, 30 m $\times$ 0.32 mm I.D.
管柱溫度：	$205^\circ\text{C}$
載氣：	氦氣 (Helium)
進氣壓力：	He = $0.2\text{ kg/cm}^2$ H <sub>2</sub> = $0.5\text{ kg/cm}^2$ Air = $0.9\text{ kg/cm}^2$

氣相層析儀的偵測資料經由電腦換算後，由積分器 (Hitachi) 畫出圖形並積分出曲線下面積，比對標準品 (DHA 和 EPA) 的 retention time，由 relative retention time 推算曲線上波峰代表的脂肪酸。



## 參、結果

### 3.1 不同食物來源對橈足類族群成長之影響

在五種食物配方的條件下餵食短角異劍水蚤 (*A. royi*) 的實驗中，結果分別如 Figure 1 至 Figure 5 所示，短角異劍水蚤的生長曲線與族群變化。餵食 *T. chui* 的 *A. royi* 在第 4 天時的生長曲線與族群變化，分別是 naupli 密度為 550 ind./L，佔總族群的 32.84%，copepodid 密度為 875 ind./L，佔總族群的 52.24%，egg sac-bearing female 密度為 250 ind./L，佔總族群的 14.93%；第 7 天時，*A. royi* 的 naupli 密度為 1,575 ind./L，佔總族群的 25.00%，copepodid 密度為 3,750 ind./L，佔總族群的 59.52%，egg sac-bearing female 密度為 975 ind./L，佔總族群的 15.48%；第 10 天時，*A. royi* 的 naupli 密度為 3,875 ind./L，佔總族群的 28.55%，copepodid 密度為 7,300 ind./L，佔總族群的 53.78%，egg sac-bearing female 密度為 2,400 ind./L，佔總族群的 17.68%；最後，觀察至第 13 天時，*A. royi* 的 naupli 密度提高到 5,275 ind./L，佔總族群的 22.84%，copepodid 密度則提高到 13,925 ind./L，佔總族群的 60.28%，而 egg sac-bearing female 密度為 3,900 ind./L，佔總族群的 16.88% (Figure 1)。

在餵食 shrimp flakes 方面如 Figure 2 所示，其結果顯示在第 4 天的 *A. royi* 之 naupli 密度為 400 ind./L，佔總族群的 40.00%，copepodid 密度為 500 ind./L，佔總族群的 50.00%，egg sac-bearing female 密度為 100 ind./L，佔總族群的 10.00%；在第 7 天 *A. royi* 的 naupli 密度為 400 ind./L，佔總族群的 16.67%，copepodid 密度為 1,700 ind./L，佔總族群的 70.83%，egg sac-bearing female 密度為 300 ind./L，佔總族群的 12.50%；第 10 天的 *A. royi* 之 naupli 密度為 750 ind./L，佔總族群的 22.39%，copepodid 密度為 2,200 ind./L，佔總

族群的 65.67%，egg sac-bearing female 密度為 400 ind./L，佔總族群的 11.94%；而餵食 shrimp flakes 至第 13 天時，*A. royi* 的 naupli 密度為 550 ind./L，佔總族群的 14.67%，copepodid 密度為 2,750 ind./L，佔總族群的 73.33%，egg sac-bearing female 密度為 450 ind./L，佔總族群的 12.00%。

而在餵食 formula 1 的實驗方面，結果如 Figure 3 所示，在第 4 天的 *A. royi* 之 naupli 密度為 275 ind./L，佔總族群的 37.29%，copepodid 密度為 400 ind./L，佔總族群的 54.24%，egg sac-bearing female 密度為 63 ind./L，佔總族群的 8.47%；第 7 天的 *A. royi* 之 naupli 密度為 400 ind./L，佔總族群的 2.38%，copepodid 密度為 1,200 ind./L，佔總族群的 67.13%，egg sac-bearing female 密度為 188 ind./L，佔總族群的 10.49%；第 10 天的 *A. royi* 之 naupli 密度為 725 ind./L，佔總族群的 20.94%，copepodid 密度為 2,375 ind./L，佔總族群的 68.59%，egg sac-bearing female 密度為 363 ind./L，佔總族群的 12.67%；當觀察到第 13 天時，*A. royi* 之 naupli 密度為 800 ind./L，佔總族群的 14.61%，copepodid 密度為 4,150 ind./L，佔總族群的 75.80%，egg sac-bearing female 密度為 525 ind./L，佔總族群的 9.59%。

另外，在餵食 formula 2 的實驗方面，其結果如 Figure 4 所示，其中第 4 天的 *A. royi* 之 naupli 密度為 250 ind./L，佔總族群的 31.25%，copepodid 密度為 400 ind./L，佔總族群的 50.00%，egg sac-bearing female 密度為 150 ind./L，佔總族群的 18.75%；第 7 天的 *A. royi* 之 naupli 密度為 500 ind./L，佔總族群的 24.39%，copepodid 密度為 1,250 ind./L，佔總族群的 60.98%，egg sac-bearing female 密度為 300 ind./L，佔總族群的 14.63%；第 10 天的 *A. royi* 之 naupli 密度為 950 ind./L，佔總族群的 24.05%，copepodid 密度為 2,500 ind./L，佔總族群的 63.29%，egg sac-bearing female 密度為 500 ind./L，佔總族群的 12.66%；觀察至第 13 天時，*A. royi* 之 naupli 密度為 1,250 ind./L，佔總族群的 18.66%，copepodid 密度為 4,600 ind./L，佔總族群的 68.66%，egg

sac-bearing female 密度為 850 ind./L，佔總族群的 12.69%。

最後，在餵食 formula 3 的實驗方面，其結果如 Figure 5 所顯示，第 4 天的 *A. royi* 之 naupli 密度為 167 ind./L，佔總族群的 35.46%，copepodid 密度為 283 ind./L，佔總族群的 60.28%，egg sac-bearing female 密度為 20 ind./L，佔總族群的 4.26%；第 7 天的 *A. royi* 之 naupli 密度為 67 ind./L，佔總族群的 16.39%，copepodid 密度為 300 ind./L，佔總族群的 73.77%，egg sac-bearing female 密度為 40 ind./L，佔總族群的 9.84%；第 10 天的 *A. royi* 之 naupli 密度為 83 ind./L，佔總族群的 16.03%，copepodid 密度為 383 ind./L，佔總族群的 73.72%，egg sac-bearing female 密度為 53 ind./L，佔總族群的 10.26%；觀察至第 13 天時，*A. royi* 之 naupli 密度有 67 ind./L，佔總族群的 12.20%，copepodid 密度為 433 ind./L，佔總族群的 79.27%，egg sac-bearing female 密度為 47 ind./L，佔總族群的 8.54%。

比較以 *T. chui*、shrimp flakes、formula 1、formula 2 以及 formula 3 餵養 *A. royi* 之生長曲線如 figure 6 所示，起始密度皆為 300 ind./L，餵食 *T. chui* 組第 4 天的族群密度為 1,675 ind./L，第 7 天的族群密度為 6,300 ind./L，第 10 天的族群密度為 13,575 ind./L，第 13 天的族群密度為 23,100 ind./L。餵食 shrimp flakes 組第 4 天、第 7 天、第 10 天與第 13 天的族群密度分別為 1,000 ind./L、2,400 ind./L、3,350 ind./L 與 3,750 ind./L。而餵食 formula 1 組族群密度變化分別為 738 ind./L、1,788 ind./L、3,463 ind./L 與 5,475 ind./L。餵食 formula 2 組則為 800 ind./L、2,050 ind./L、3,950 ind./L 與 6,700 ind./L。最後，餵食 formula 3 組的族群密度則分別為 470 ind./L、407 ind./L、444 ind./L 與 547 ind./L。與起始密度比較後發現，投餵周氏扁藻可以使短角異劍水蚤得到最高的族群密度，約成長 77 倍 (23,100 ind./L)，其次是投餵 shrimp flakes、formula 1 及 formula 2，成長倍數分別為 13 倍 (3,750 ind./L)、18 倍 (5,475 ind./L) 及 22 倍 (6,700 ind./L)，投餵 formula 3，成長倍數則低於 2 倍

(547 ind./L)。除了 formula 3 無法使 *A. royi* 族群量有效提昇之外，以 shrimp flakes、formula 1 及 formula 2 餵食 *A. royi* 均可使其族群量明顯增加。

另外，餵食 *T. chui* 的 *A. royi* 之 egg sac-bearing female 比例較高 (14.93~16.88%) 且較穩定 (Figure 1 B 至 Figure 5 B)，餵食 formula 3 的 *A. royi* 之 egg sac-bearing female 比例偏低 (4.26~10.26%)，第四天後族群幾乎沒有成長。餵食 shrimp flakes 的 *A. royi* 之 egg sac-bearing female 比例 (10.00~12.00%) 和餵食 formula 1 的 *A. royi* 之 egg sac-bearing female 比例 (8.47~12.67%) 略低於餵食 *T. chui* 組。餵食 formula 2 的 *A. royi* 之 egg sac-bearing female 比例 (12.66~18.75%) 較為接近餵食 *T. chui* 組，但數值變動大。

## 3.2 不同食物來源對橈足類脂肪酸組成之影響

### 3.2.1 以不同食物培養的橈足類之粗脂肪比例

分別以 *T. chui*、shrimp flakes、formula 1、formula 2 以及 formula 3 餵養短角異劍水蚤，於培養之第 1 天、第 4 天、第 7 天、第 10 天和第 13 天提供食物，將第 14 天收集得到的蟲體，進行粗脂肪萃取並計算蟲體中粗脂肪的重量百分比。除了 formula 3 因蟲體數量過少難以分析外，其餘各組橈足類粗脂肪含量依次分別為 formula 2 的 3.39%，*T. chui* 的 3.12%，formula 1 的 2.99% 以及 shrimp flakes 的 1.75%。



### 3.2.2 以不同食物培養的橈足類之脂肪酸組成分析

由脂肪酸分析後的結果發現 (Table 1)，攝食 *T. chui* 的短角異劍水蚤含有 DHA 4.44%，EPA 2.15%，最多的脂肪酸為 16:0 (28.83%)，其次為 18:1n-9 (13.75%) (Figure 1 B)；攝食 shrimp flakes 的短角異劍水蚤則含有 DHA 4.00%，EPA 2.36%，最多的脂肪酸為 14:0 (43.44%)，其次為 16:0 (12.34%) (Figure 2 B)；然而，攝食 formula 1 的短角異劍水蚤含有 DHA 15.08%，EPA 1.86%，最多的脂肪酸為 16:0 (19.05%)，其次為 DHA，再其次為 18:1n-9 (13.28%) (Figure 3 B)；而攝食 formula 2 的短角異劍水蚤含有 DHA 7.09%，EPA 3.96%，最多的脂肪酸為 14:0 (45.68%)，其次為 18:1n-9 (12.86%) (Figure 4 B)。



## 肆、討論

利用同位素追蹤動物體內的脂肪酸代謝路徑，證實 16 個碳以下的飽和脂肪酸在細胞質胞液中由 fatty acid synthase 合成，碳數在 18 以上的脂肪酸則是經由平滑內質網和粒線體內的脂肪酸延長酵素 (elongase) 由 16:0 繼續生合成 (張，2004)。硬脂酸 (18:0) 可在人體內由  $\Delta 9$  desaturase 將其轉變為 18:1n-9，再經由 elongase 轉變為更長鏈的 n-9 系列脂肪酸。由於人體內缺乏  $\Delta 12$  desaturase 及  $\Delta 15$  desaturase 所以無法直接在體內生成 18:2n-6 和 18:3n-3。所以必須經由食物來獲取 18:2n-6 和 18:3n-3，因此對人體而言這兩種脂肪酸是必須脂肪酸。18:2n-6 可以經由其他 desaturase 和 elongase 代謝為 20:4n-6 (ARA) 等 n-6 系列的脂肪酸；18:3n-3 也經由相同的酵素系統代謝為 20:5n-3 (EPA) 和 22:6n3 (DHA) 等 n-3 系列的脂肪酸，但是由於人體中  $\Delta 9$  以外的酵素系統活性並不強，所以仍需要由食物中攝取 DHA 和 EPA 以補充身體之所需，所以在營養學上也有學者將這類高度不飽和脂肪酸當作必須脂肪酸來探討 (Nelson and Cox, 2000)。在魚體內的脂肪酸代謝情況大致被認為和人體內的情況相近，對於必須脂肪酸的需求大致上也是 18:2n-6 和 18:3n-3，不同魚類代謝 18:2n-6 和 18:3n-3 的酵素活性不同，因此對許多魚類而言飼料中若缺乏 20:4n-6、20:5n-3 和 22:3n-3 等高度不飽和脂肪酸，仍會造成生長低下以及死亡率增加的問題。

對於魚類的必須脂肪酸種類和需求的比例，自 1960 年代之後，在日本開始進行一系列的研究，根據 Watanabe 和 Takeuchi 等人的研究，歸納出魚類對脂肪酸需求的普遍原則：冷水性的魚類對於 ARA、EPA 和 DHA 等 HUFA 的需求量，往往較溫水性的魚類要來的高；海水魚對於 HUFA 的需求也往往高於淡水魚 (吳，1982)。石斑魚是台灣海水魚生產大宗，對於飼料脂質、蛋白質以及礦物質等各種營養素的要求也已經有許多研究，惟石斑魚苗在適應人工飼料之前仍有一段相當

長的時間必須仰賴生物餌料為食，因此生物餌料的充足供應可說是魚苗養成的重要關鍵之一。

張 (1992) 比較短角異劍水蚤 *Apocyclops royi* 對周氏扁藻 (*Tetraselmis chui*)、綠藻 (*Chlorella sp.*)、矽藻 (*Navicula sp.*) 的攝食率，發現 *A. royi* 對 *T. chui* 有最高的攝食率。許 (2000) 和 Hsu 等 (2001) 探討周氏扁藻 (*Tetraselmis chui*)、牟氏角毛藻 (*Chaetoceros muelleri*)、等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 和擬球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 等四種微細藻類培養短角異劍水蚤 (*Apocyclops royi*) 時，發現以餵食 *T. chui* 的雌蟲產下最多子代，且幼體發育速度最快。本實驗以周氏扁藻餵食短角異劍水蚤亦可獲得極高的族群密度 (23,100 ind./L)。族群成長的分析除了計算個體數外，需同時觀察帶卵囊成體的數量在整體族群中的比例，因為帶卵囊成體的大小遠大於無節幼蟲和不帶卵囊的個體 (張，1992)，而且多數的胚胎幼體已發育在卵囊中，在短時間內可以生產更多無節幼蟲。由族群比例分析可以看出帶卵囊成體比例高且穩定時，族群成長快速，因此在大水體培養橈足類時或許可由帶卵囊成體比例的高低，來評估族群生長情形，並適時調整餵食策略。餵食人工配方三的橈足類，第四天後族群幾乎沒有成長，然而持續存有帶卵囊的個體，推測在食物缺乏或食物營養組成不適合時，導致 *A. royi* 成蟲帶卵囊的胚胎發育變慢。

一般作為餌料生物的橈足類主要是哲水蚤目 (Calanoida)、猛水蚤目 (Harpacticoida) 與劍水蚤目 (Cyclopoida) 的種類。不同橈足類體內的脂肪酸代謝酵素的差別，可能導致不同種類將短鏈不飽和脂肪酸轉換為 DHA 和 EPA 能力上的差異。Rhodes 和 Boyd (2005) 以底棲性的海洋橈足類猛水蚤 *Nitokra lacus* 為實驗材料，分別給予鞭毛藻 *Tetraselmis suecica* 和富含 18:3n-3 的人工配方，分析猛水蚤 *Nitokra lacus* 族群成長和脂肪酸組成，發現不論是餵食藻類或是富含 18:3n-3 的人工配方，族群成長速率皆無顯著差異，且蟲體內 DHA 和 EPA 的比例也沒有

顯著改變，因此認為可以利用富含 18:3n-3 的人工配方取代藻水或價格昂貴的魚油來培養猛水蚤。另一種橈足類虎斑猛水蚤 *Tigriopus sp.* 在攝食缺乏高度不飽和脂肪酸的麵包酵母的情況下，蟲體內仍含有豐富長鏈 n-3 系列脂肪酸 (12% DHA 和 7% EPA) (Watanabe *et al.*, 1978)，推論虎斑猛水蚤具備轉換代謝酵素，可以修飾所需高度不飽和脂肪酸。上述 *Nitokra lacusc* 和 *Tigriopus sp.* 皆屬於猛水蚤目，而 *Apocyclopus royi* 屬於劍水蚤目，是台灣做為魚苗栽培常用的餌料生物 (Su *et al.*, 2005)，轉換脂肪酸的能力並未有文獻報告。本實驗脂肪酸分析結果顯示，*T. chui* 含有的 DHA 並不多 (0.17%)，但是含有高比例的短鏈 n-3 系列脂肪酸，餵食 *T. chui* 的 *A. royi* 卻具有 4.44% 的 DHA 和 2.15% 的 EPA，而餵食配方一 (缺乏 DHA 和 EPA，含有 59.18% 的 18:3n-3) 的 *A. royi* DHA 含量更比藻類組明顯提高，雖然 EPA 略含量有減少，而餵食配方二 (含豐富 DHA 和 EPA) 的 *A. royi* DHA 含量與餵食藻類組差異不大，而 EPA 則有提高。因此推論 *A. royi* 也許可以利用自身的酵素系統，進行短鏈不飽和脂肪酸的 elongation 和 desaturation 將短鏈 n-3 不飽和脂肪酸代謝為 DHA 和 EPA。

由脂肪酸分析結果 (Table 1) 顯示，餵食周氏扁藻的 *A. royi* 蟲體內 n-3 HUFA 佔脂肪酸 6.59%，與餵食蝦片組相當 (6.36%)，遠不及餵食配方一組 (16.94%) 和餵食配方二組 (11.05%)，周氏扁藻雖然對於蟲體族群成長有良好的效果，但 DHA 和 EPA 的比例仍然太低，蝦片操作方便，但是除了 DHA 和 EPA 比例太低之外，蟲體內的粗脂肪比例也太低。在藻水短缺時添加人工配方一或人工配方二餵食 *A. royi* 是可以考慮的替代方案，然而此方法長時間培養橈足類是否對水體造成污染，或是對族群長期維持在一定密度仍有待進一步研究。

相較於人工滋養過的輪蟲和豐年蝦無節幼蟲，其 n-3 HUFA 往往佔總脂肪酸 20% 以上，對於 yellowtail 幼苗的 n-3 HUFA 需求研究發現，若餵予滋養過的豐年蝦無節幼蟲，n-3 HUFA 必須佔豐年蝦無節幼蟲乾重 3.9% 以上，而 red sea bream

幼苗則需佔 2.05%，海水魚苗對於 DHA 和 EPA 的需求相當高，本實驗中各組的 *A. royi* 所含的 n-3 HUFA 比例皆遠不及滋養過的輪蟲和豐年蝦，雖然尚不清楚以純周氏扁藻或添加人工配方所培養出的 *A. royi* 是否滿足石斑幼苗成長發育之所需，但以其他海水魚類幼苗的資料來推測，這樣的 *A. royi* 其脂肪酸組成可能不能完全滿足石斑幼苗，由其它浮游動物和微細藻類的培養研究可發現一個趨勢，在高鹽度低溫度的條件下，不飽和脂肪酸的比例增加，雖然在較高的鹽度和較低的溫度下可能會讓橈足體內 n-3 HUFA 比例增加，但是這樣可能在族群成長上就有所限制。所以未來研究方向可能偏向混合藻類和人工配方投餵橈足類，尋求能夠養出高密度又有高 n-3 HUFA 的 *A. royi*，或是以類似滋養豐年蝦的方式來滋養橈足類，探討滋養的效果。雖然目前戶外養殖的橈足類和輪蟲對於海水魚苗的營養在脂肪酸方面似乎是足夠的，但傳統方式培養的橈足類體內營養組成不見得穩定，且容易帶原病菌，所以尋求便宜操作容易不帶病菌又富含高度不飽和脂肪酸橈足類的培育方法，以生產優質的魚苗，是相當重要的研究發展方向。



## 伍、參考文獻

- 王紹明，1997。以海洋微藻生產多元不飽和脂肪酸 DHA 之研究。
- 邱盈綺，2007。社會網絡與區域分工：台灣石斑於養殖業的分工。台灣社會學年會。
- 吳清熊，1982。養魚和飼料脂質。水本水產學會編著。國立編譯館。
- 吳豐成，2002。瑪拉巴石斑稚魚之必須脂肪酸營養及其對免疫反應之影響。國立中山大學海洋生物研究所博士論文。
- 周勝倫，2002。不同蛋白質含量下脂質及 n-3 高度不飽和脂肪酸對赤鯮笛鯛成長之研究。國立台灣大學漁業科學研究所碩士論文。
- 許家興，2000。食物及溫度對短角異劍水蚤生長及生殖的影響。國立中山大學海洋資源研究所碩士論文。
- 陳紫嫻、蘇蕙美，2005。水產種苗的生產。科學發展，385：32-41。
- 陳明耀，1997。生物餌料培養。水產出版社。
- 張文炳，1992。橈腳類短角異劍水蚤之生理生態學研究。國立台灣大學海洋研究所博士論文。
- 張楚富，2004。生物化學原理。pp. 488-499。九州圖書文物有限公司。
- 鄭新鴻，2002。添加人工培養基醱酵液對培養模糊許水蚤的增殖效果。水產試驗所年報。
- 鄭新鴻、陳鳳琴、陳紫嫻，2004。水試專訊 5:11。
- 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。
- Borlongan I.G., 1992. The essential fatty acid requirement of milkfish (*Chanos chanos*). *Fish Physiology and Biochemistry* 9:401-407.
- Buranapanidgit J., Boonyaratpalin M. and Watanabe T., 1989. Essential fatty acid

requirement of juvenile seabass, *Lates calcarifer*. Paper presented at Third International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish, Toba, Japan, August 28-September 1, 1989.

Castell J.D., Sinnhuber, R.O., Wales J.H., and Lee D.J., 1972. Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Growth, feed conversion and some gross deficiency symptoms. *Journal of Nutrition* 102:77-86.

Chang W.B., Wu F.L., Wu K.S., and Lei C.H., 1991. Study on the zooplankton of shrimp ponds in Taiwan. *COA Fishers Series* 28:53-79.

Chi S.C., Lo C.F., Kou G.H., Chang P.S., Peng S.E., and Chen S.N., 1997. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel). *Journal of fish disease* 20:85-193.

Deshimaru O. and Kuroki K., 1983. Studies on the optimum levels of protein and lipid in yellowtail diets. In: *Reports of Kagoshima Prefectural Fishery Experimental Station*. pp. 44-79. Kagoshima Prefectural Fishery Experimental Station, Kagoshima, Japan.

Folch J., Lees M. and Stanely C. H. S., 1975. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem* 226:477-509.

Gatesoupe F.J., Leger C., Boudon M., Metailler R., and Luquet P., 1977. Lipid feeding

of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). 2. Influence on growth of supplementation with methyl esters of linolenic acid and fatty acids of the  $\omega$ -9 series. *Annales Hydrobiologie* 8:247-254.

Hsu C.H., Su H.M., and Chen I.M., 2001. Effects of food types on the development and reproduction of *Apocyclops royi*. In: *Larvi'01-Fish and Shellfish Larviculture Symposium*, edited by C.I. Hendry, G. Van Stappen, M. Wille and P. Sorgeloos, pp.250-253. Oostende, Belgium, European Aquaculture Society, Special Publication No. 30.

Kanazawa A., Teshima S.T., Inamori S., Sumida S., and Iwashita T., 1982. Rearing of larval red sea bream and ayu with artificial diets. *Memoirs of the Faculty of Fisheries*, Kagoshima University. 31:185-192.

Kanazawa A., Teshima S.T., Sakamoto M., and Awal M.A., 1980. Requirement of *Tilapia zillii* for essential fatty acids. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 46:1353-1356.

Kiron V., Fukuda H., Takeuchi T., and Watanabe T., 1995. Essential fatty acid nutrition and defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.* 11A:361-367.

Nelson L.D., and Cox M.M., 2000. Principles of Biochemistry. 3<sup>rd</sup>. pp.770-788. New York, USA:Worth Publishers.



Rhodes A., and Boyd L., 2005. Formulated feed for harpacticoid copepods: implications for population growth and fatty acid composition. In *Copepods in Aquaculture*, edited by C.S. Lee, P.J. O'Bryen, and N.H. Marcus, pp.61-73. Ames, Iowa, USA: Blackwell, Inc.

Su H.M., Cheng, S.H., Chen, T.I., and Su M.S., 2005. In *Copepods in Aquaculture*, edited by C.S. Lee, P.J. O'Bryen, and N.H. Marcus, pp.183-194. Ames, Iowa, USA: Blackwell, Inc.

Takeuchi T., Shiina Y., and Watanabe T., 1991. Suitable protein and lipid levels in diet for fingerling of red sea bream, *Pagrus major*. *Nippon suisan Gakkaishi* 57:293-299.

Takeuchi T., Satoh S., and Watanabe T., 1983. Requirement of *Tilapia nilotica* for essential fatty acids. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 49:1127-1134.

Takeuchi T., Toyota M., Satoh S., and Watanabe T., 1990. Requirement of juvenile red seabream (*Pagrus major*) for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56:1263-1269.

Takeuchi T., and Watanabe T., 1977. Requirement of carp for essential fatty acids. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 43:541-551.

Takeuchi T., and Watanabe T., 1980. Effect of polyunsaturated fatty acids in the growth

of rainbow trout, chum salmon and coho salmon. *Oral presentation at annual meeting of Japanese of the Society of Scientific Fisheries in October, 1980.*

Takeuchi T., and Watanabe T., 1982. Effects of various polyunsaturated fatty acids on growth and fatty acid compositions of rainbow trout *Salmo gairdneri*, coho salmon *Onchorhynchus kisutch*, and chum salmon *Onchorhynchus keta*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 48:1745-1752.

Toledo J. D., Golez M.S.N., Doi M., and Ohno A., 1999. Use of copepod naupli in during the early feeding stage of grouper, *Epinephelus coioides*. *Fisheries Science* 65:390-397.

Vassallo-Agius R., Watanabe T., Yoshizaki G., Satoh S., and Takeuchi Y., 2001. Quality of eggs and spermatozoa of rainbow trout fed an n-3 essential fatty acid-deficient diet and its effects on the lipid and fatty acid components of eggs, serum and livers. *Fisheries Science* 67:818-827.

Vorbeck M.L., Mattick L.R., Lee F.A., and Pederson C.S., 1961. Preparation of methyl esters of fatty acids for gas liquid chromatography. *Anal. Chem.* 33:1512-1514.

Walne P.R., 1970. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria*, and *Mytilis*. *Fish. Invest.* 26:162.

Watanabe T., 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B:3-15.

Watanabe T., 1988. *Fish nutrition and mariculture*. JICA text book. The general aquaculture course, p.216.

Watanabe T., 1989. Nutritive value of animal and plant lipid sources for fish. In: *Proceedings of Aquaculture International*. pp. 437-442. Vancouver Canada.

Watanabe T., Arakawa T., Kitajima C., Fukusho K., and Fujita S., 1978. Nutritional quality of living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 44:1223-1227.

Watanabe T., Ogino C., Koshiishi Y., and Matsunaga T., 1974. Requirement of rainbow trout for essential fatty acids. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 40:493-499.

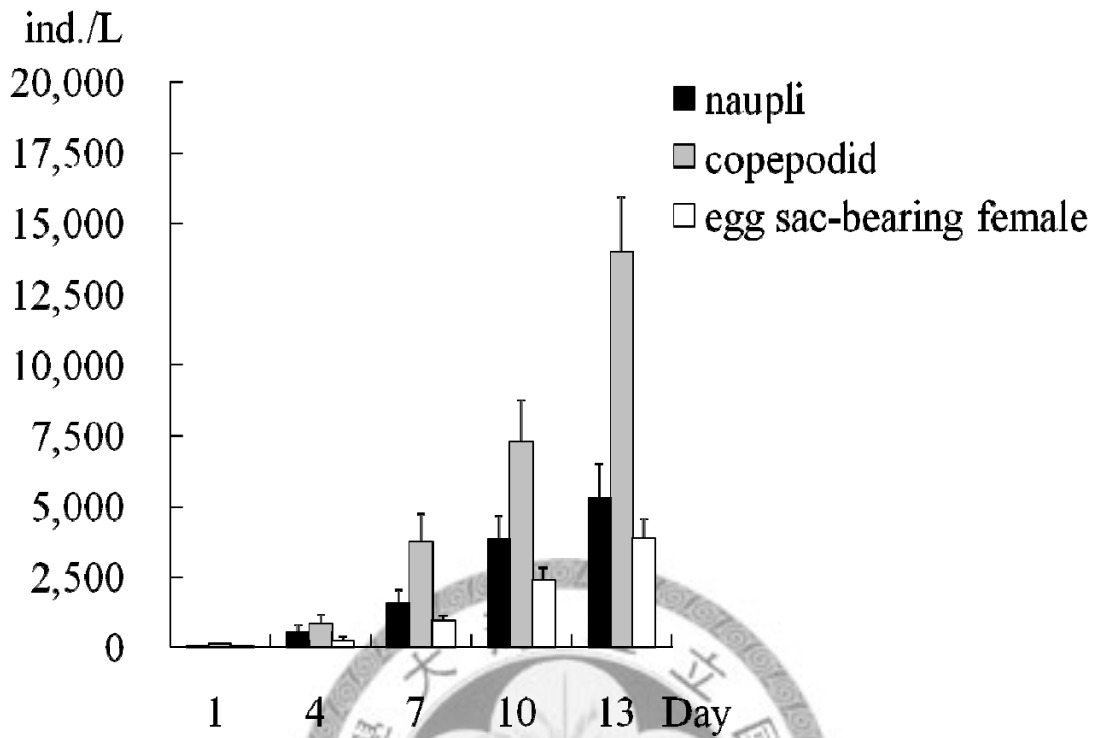
Yone Y., and Fujii M., 1975. Studies on nutrition of red sea bream. Effect of  $\omega$ 3 fatty acid supplement in a corn oil diet on growth rate and feed efficiency. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 41:73-86.

Yone Y., Furuichi M., and Sakamoto S., 1971. Studies on nutrition of red sea bream. *Nutritive value and optimum content of lipids in diet. Report of Fisheries Research Laboratory Kyushu University* 1:49-60.

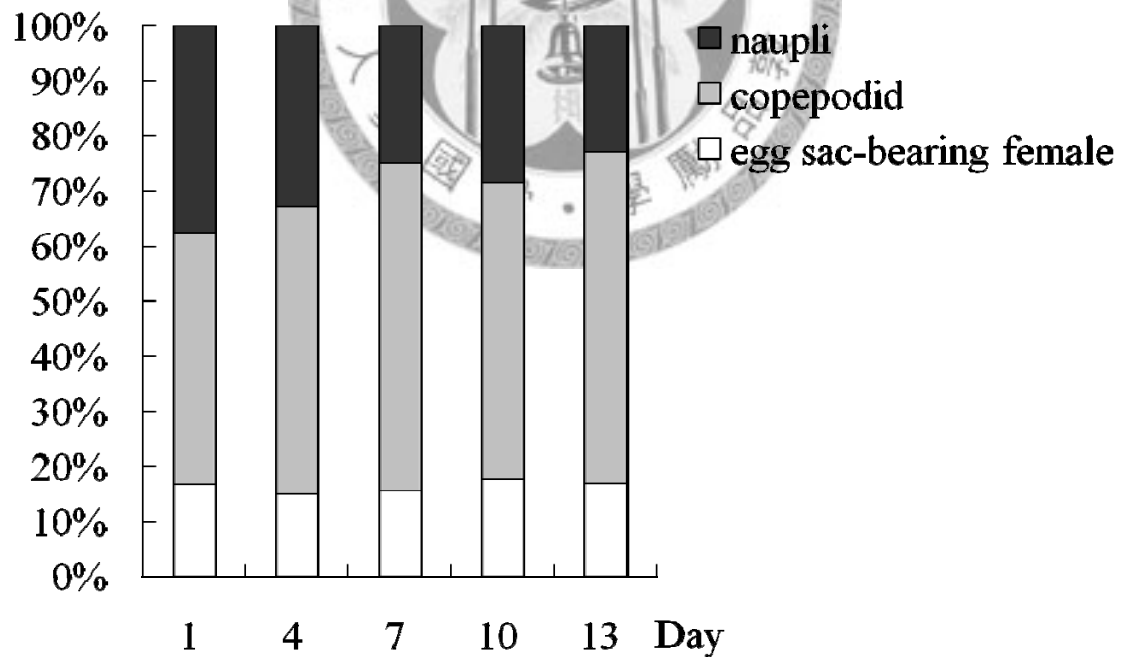
Yu T.C., and Sinnhuber R.O., 1979. Effects of dietary n-3 and n-6 fatty acids on growth and feed conversion efficiency of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture* 16:31-38.



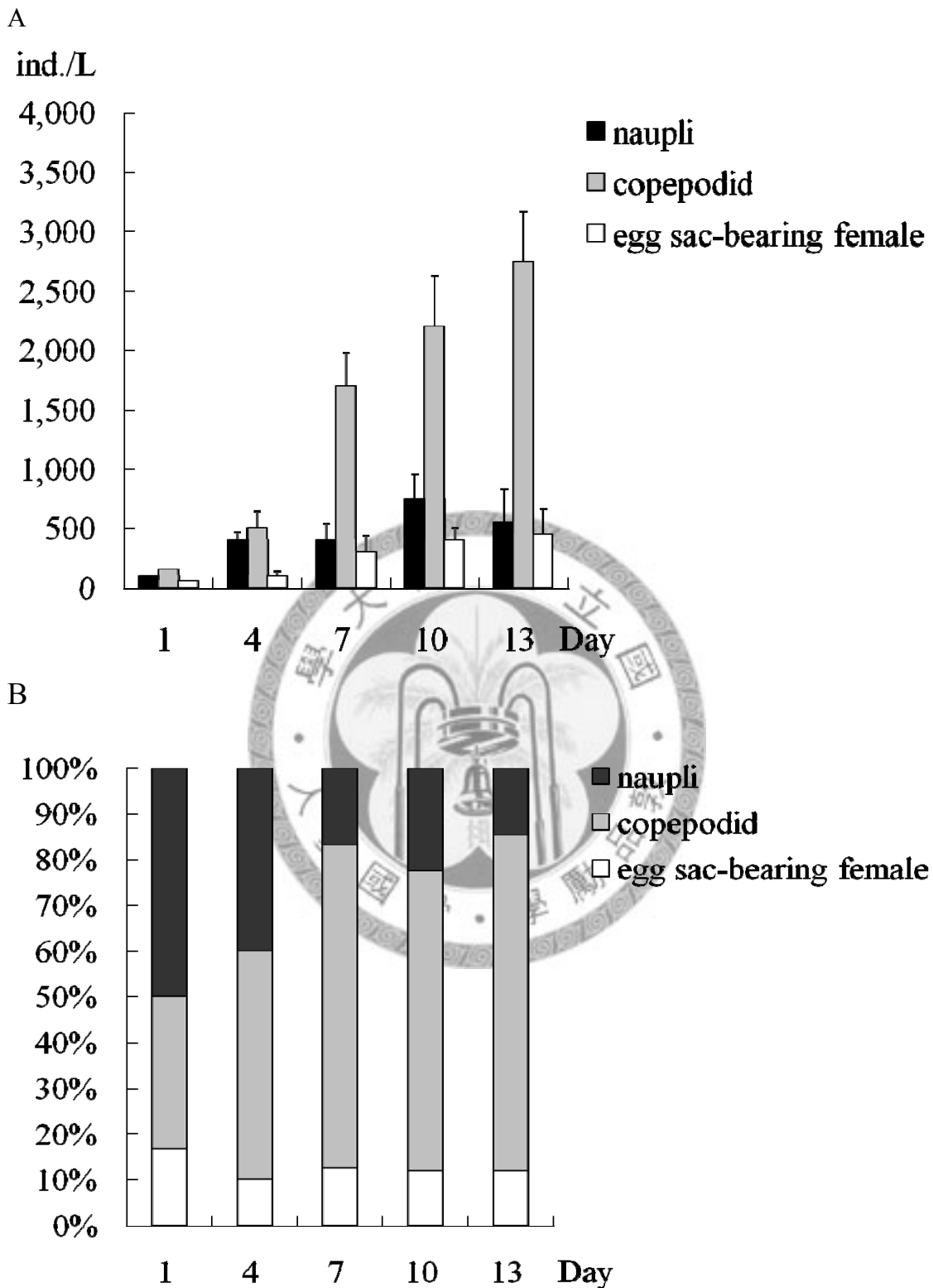
A



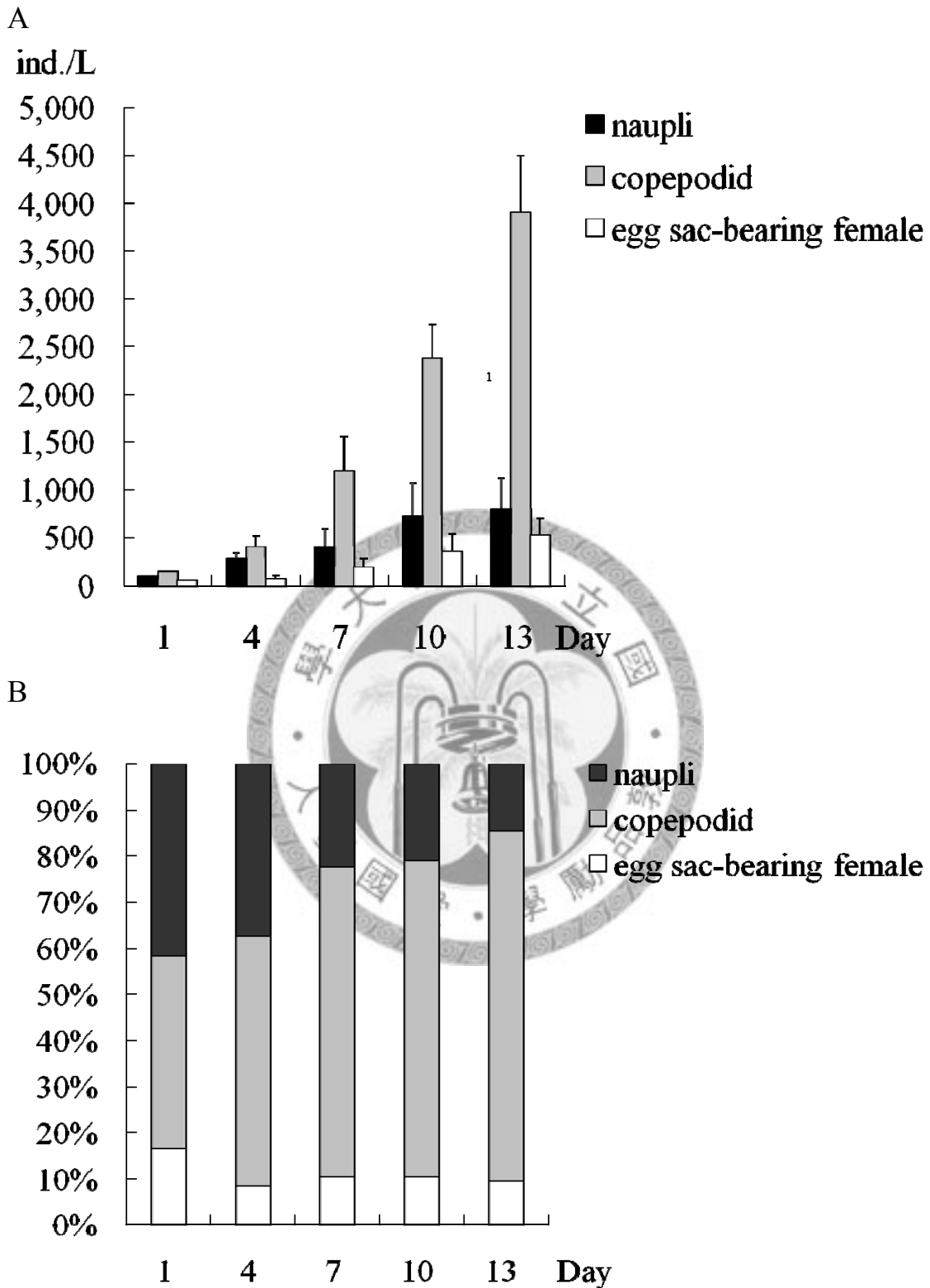
B



**Figure 1.** Population growth of *Apocyclops royi* fed with *Tetraselmis chui*. (A) Growth rate of *A. royi* in different culture days. (B) Percentage of egg sac-bearing female, copepodid and naupli of *A. royi* in different culture days.

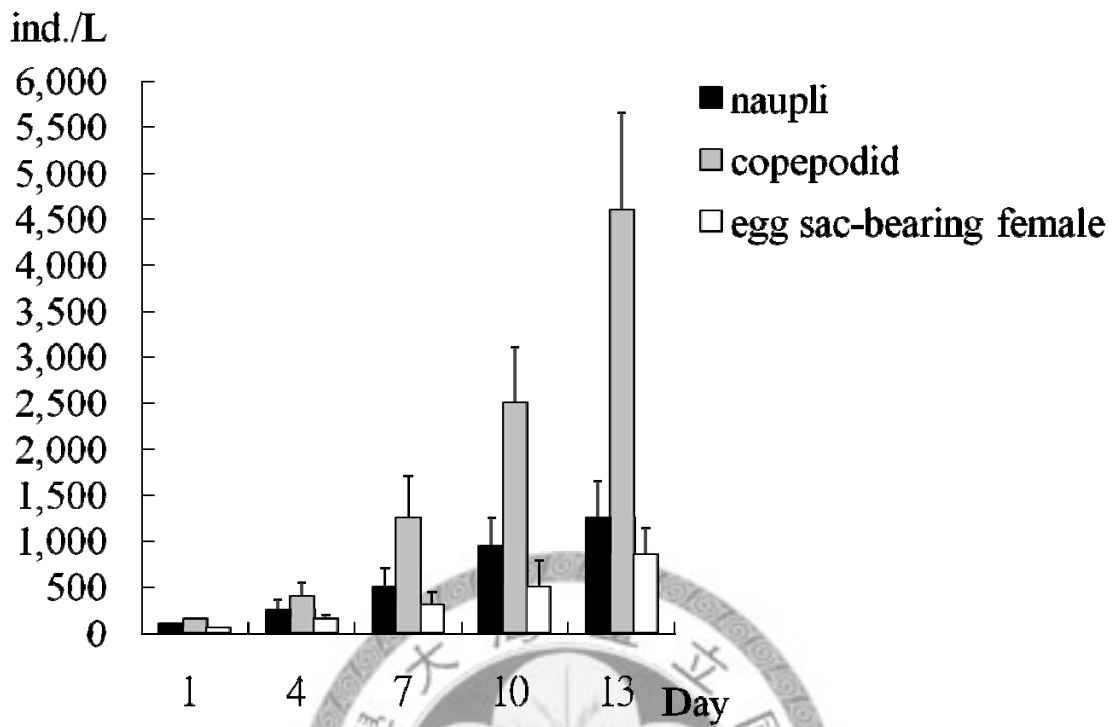


**Figure 2.** Population growth of *Apocyclops royi* fed with shrimp flasks. (A) Growth rate of *A. royi* in different culture days. (B) Percentage of egg sac-bearing female, copepodid and naupli of *A. royi* in different culture days.

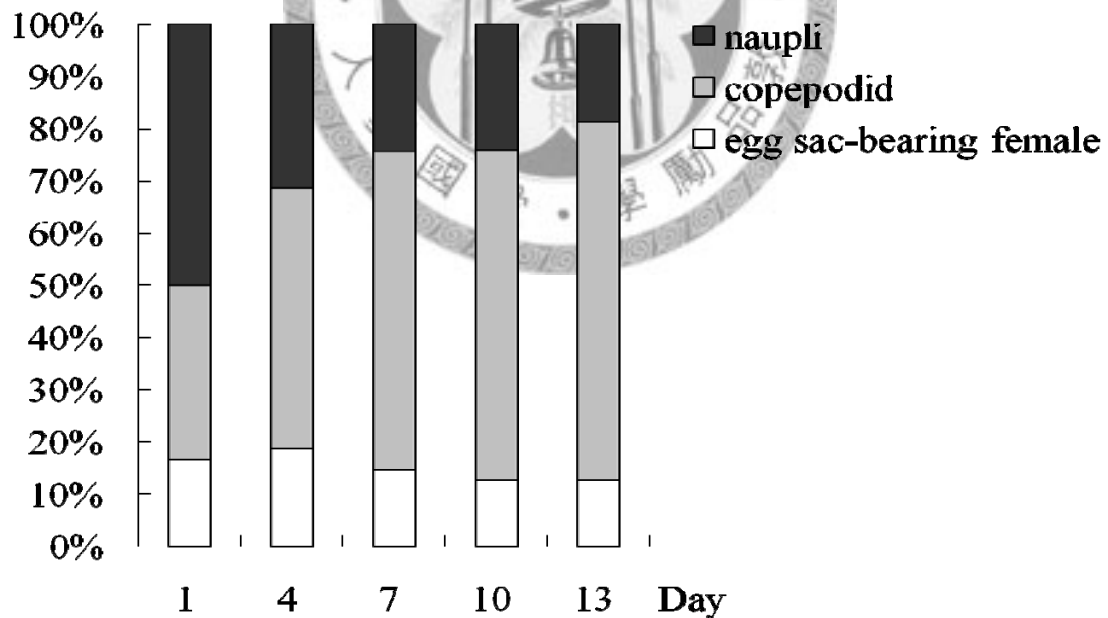


**Figure 3.** Population growth of *Apocyclops royi* fed with formula 1 containing flaxseed oil. (A) Growth rate of *A.royi* in different culture days. (B) Percentage of egg sac-bearing female, copepodid and naupli of *A. royi* in different culture days.

A



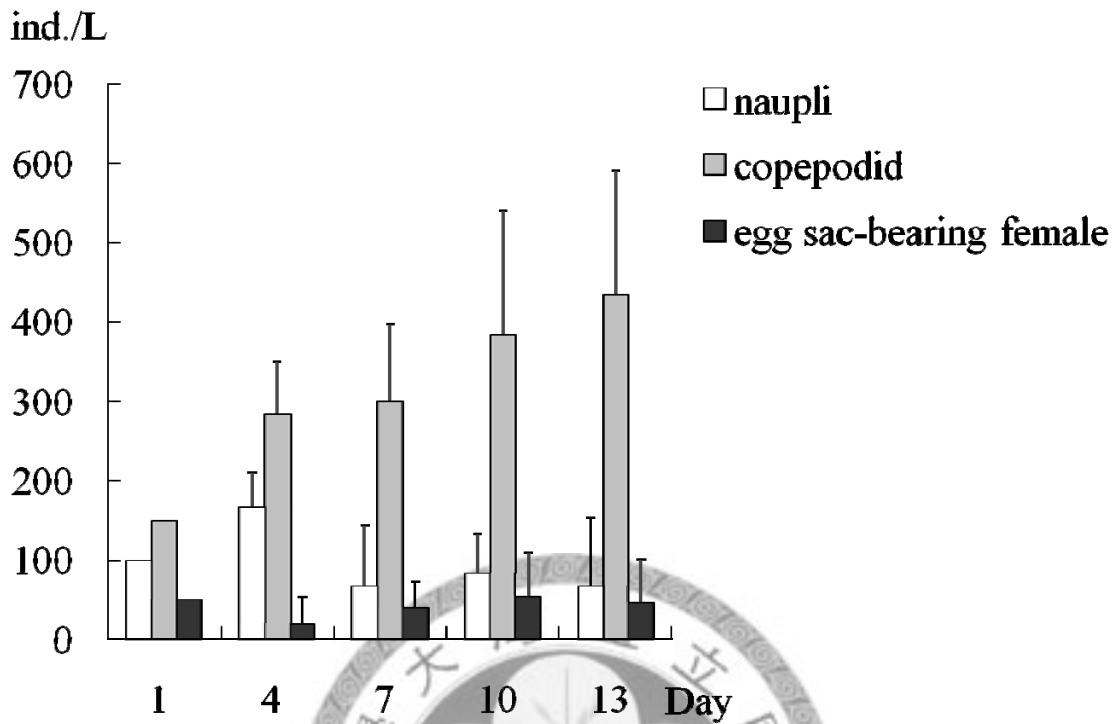
B



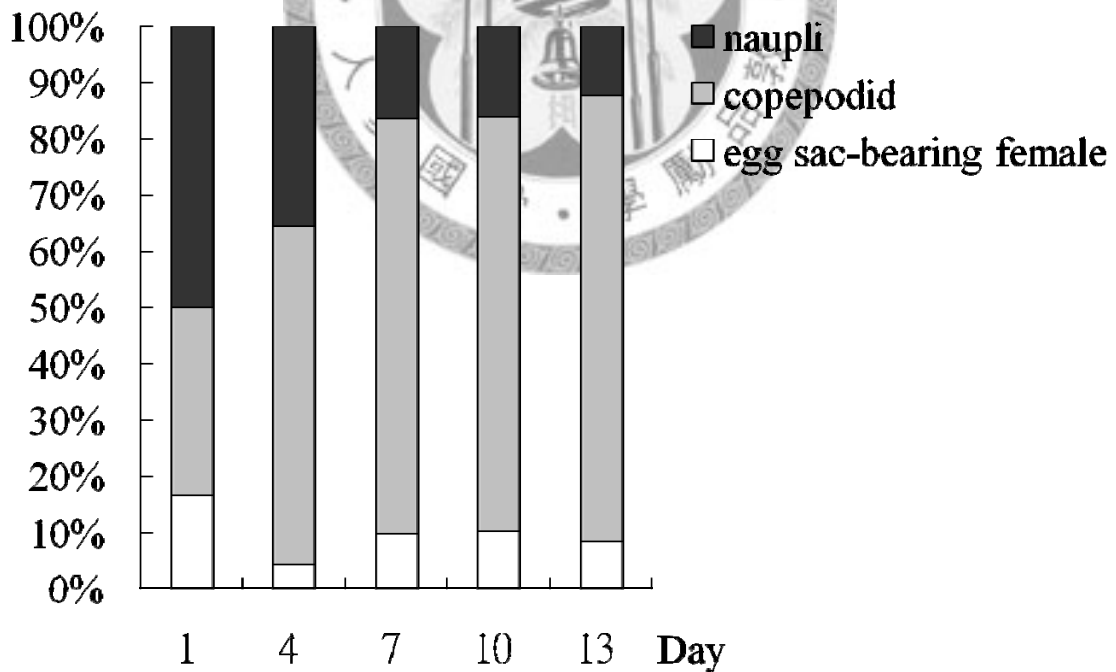
**Figure 4.** Population growth of *Apocyclops royi* fed with formula 2 containing squid oil and fish oil. (A) Growth rate of *A. royi* in different culture days. (B) Percentage of egg sac-bearing female, copepodid and naupli of *A. royi* in different culture days.



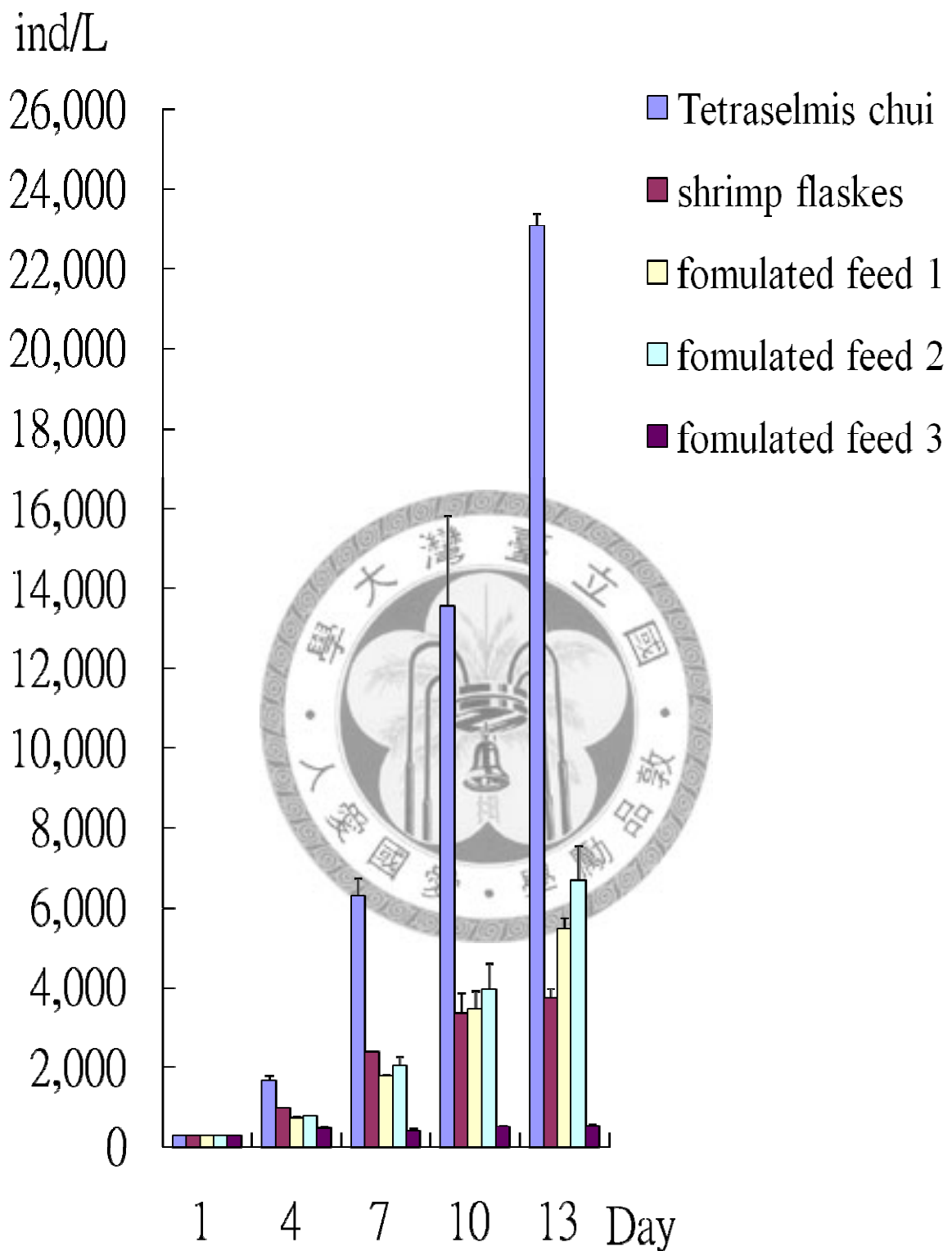
A



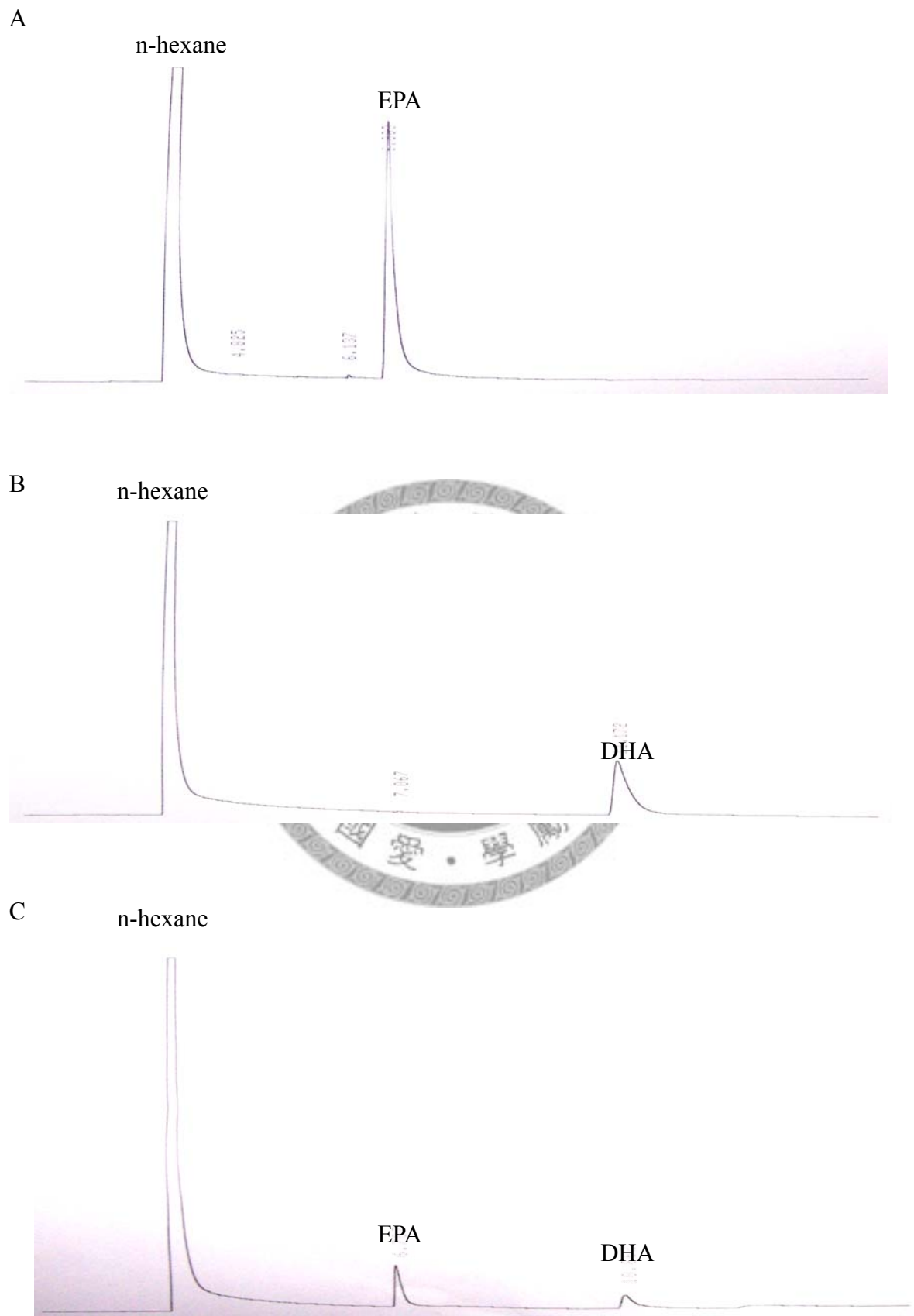
B



**Figure 5.** Population growth of *Apocyclops royi* fed with formula 3. (A) Growth rate of *A. royi* in different culture days. (B) Percentage of egg sac-bearing female, copepodid and naupli of *A. royi* in different culture days.

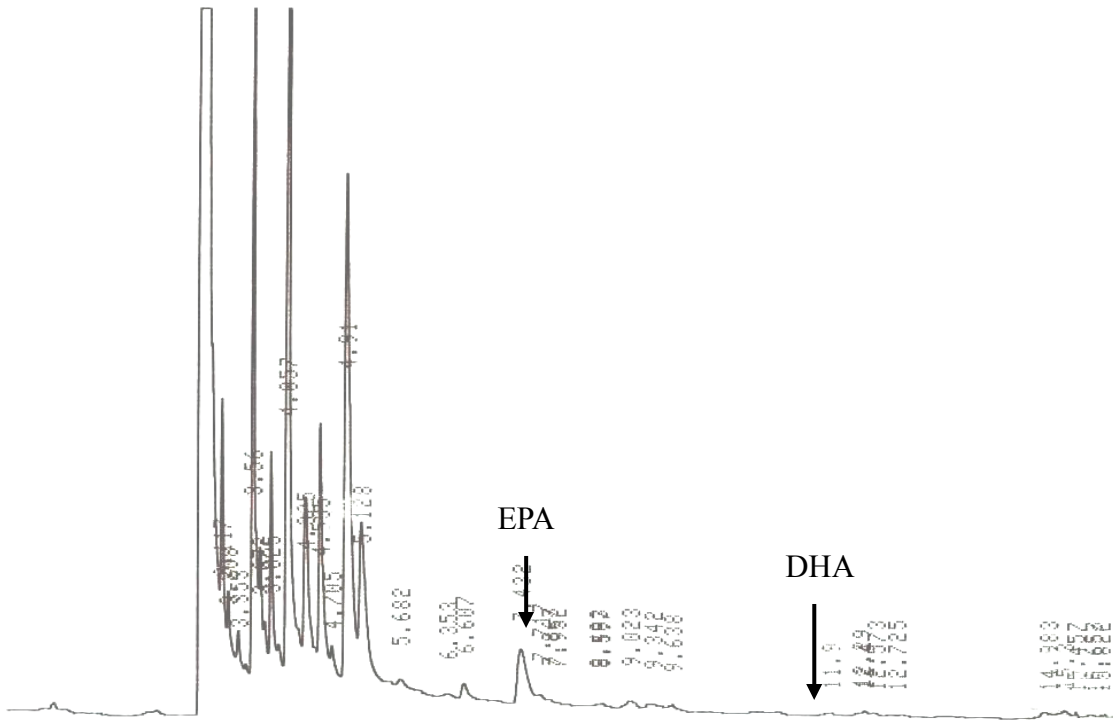


**Figure 6.** Population growth of *Apocyclops royi* fed with different kinds of food.

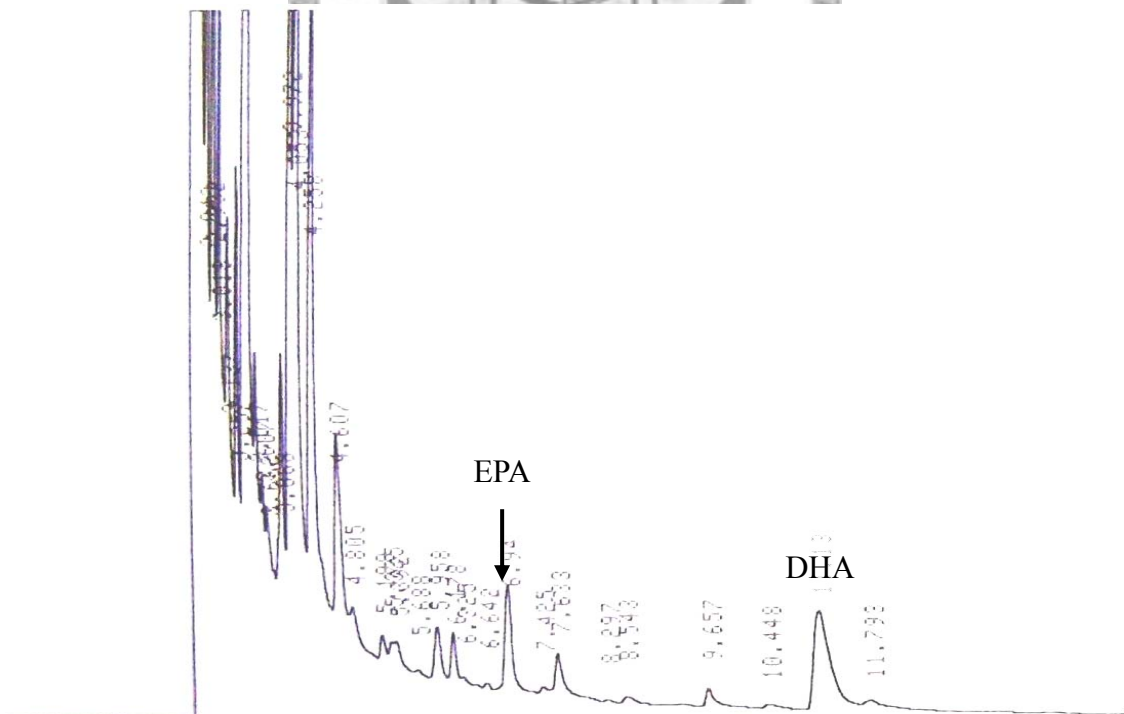


**Figure 7.** Gas Chromatograph of standards. (A) EPA. (B) DHA. (C) EPA/DHA 2:1.

A



B



**Figure 8.** Comparison of Gas Chromatograph data. (A)*Tetraselmis chui*.

(B)*Apocyclops royi* fed with *T. chui*.





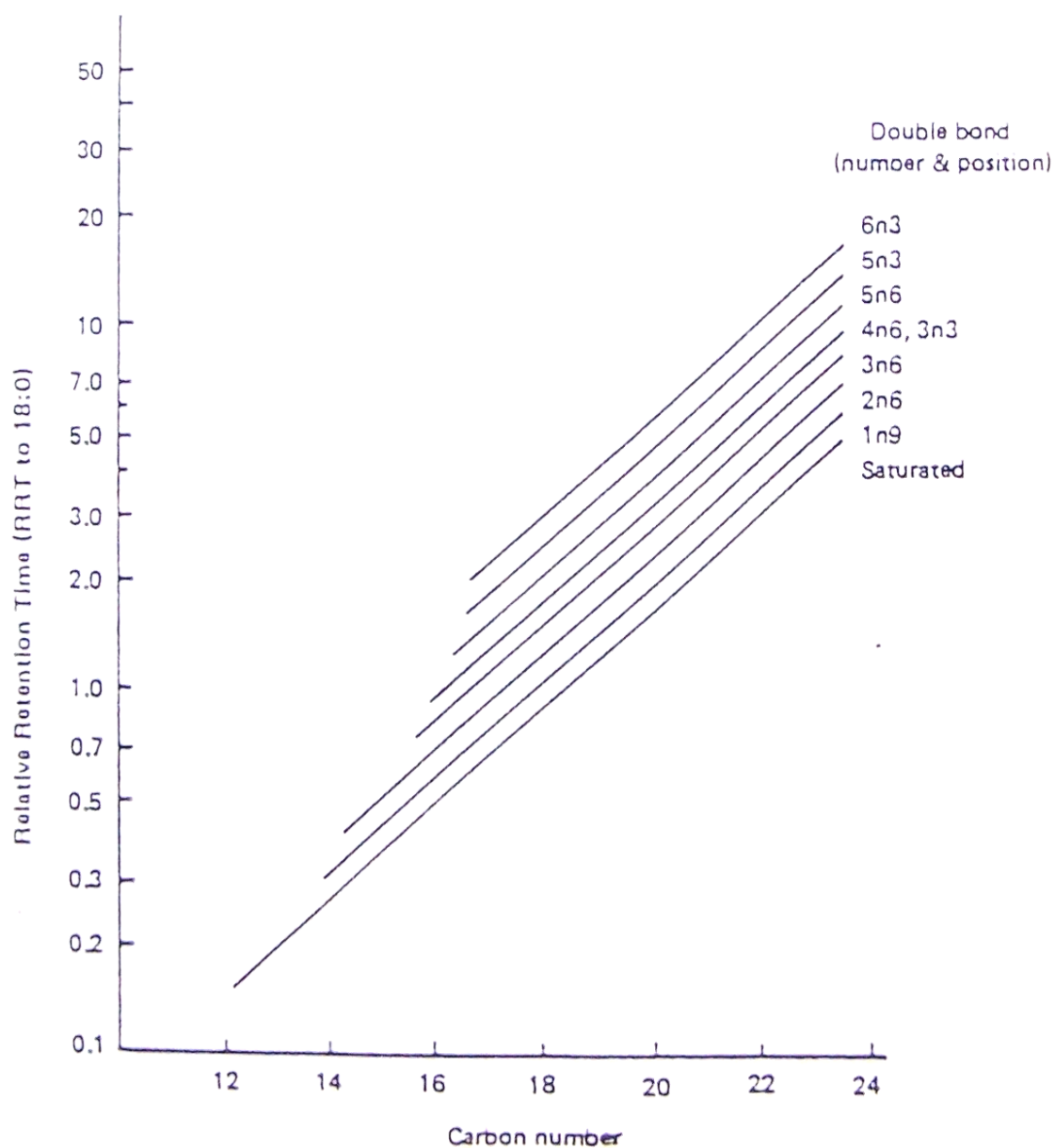


**Table 1.** Summary of changes in fatty acid composition of copepods fed with different kinds of food.

Fatty acid	<i>T. chui</i>	<i>A. royi</i> fed with <i>T. chui</i>	Shrimp flakes	<i>A. royi</i> fed with shrimp flasks	Formula 1	<i>A. royi</i> fed with formula 1	Formula 2	<i>A. royi</i> fed with formula 2
14:0	0.52	6.71	3.29	43.44	0.82	12.02	4.81	45.68
16:0	14.31	28.83	29.73	12.34	5.82	19.05	29.16	9.05
16:1	3.36	0.89	0.51	8.71	2.65	2.31	0.29	9.85
16:2n-6	4.98	0.24	-	0.35	-	0.14	0.62	0.25
16:3n-3	25.04	2.41	-	0.20	-	-	0.40	0.19
18:0	7.02	9.21	3.24	3.07	2.29	5.62	2.18	1.42
18:1n-9	7.01	13.75	27.71	10.22	12.97	13.28	18.98	12.86
18:2n-6	0.80	10.10	17.04	5.04	15.00	8.55	8.34	4.92
18:3n-3	19.20	2.77	1.65	0.89	59.18	13.11	1.63	0.57
18:4n-3	7.26	0.21	0.56	0.52	-	1.09	2.43	0.63
20:1	0.33	0.42	3.47	0.28	-	1.44	2.72	0.52
20:4n-6	0.66	0.61	0.63	0.52	-	0.50	0.63	0.14
20:5n-3 EPA	3.72	2.15	5.77	2.36	-	1.86	11.14	3.96
22:6n-3 DHA	0.17	4.44	4.33	4.00	-	15.08	10.61	7.09
Σ n-3	55.39	11.98	12.31	7.97	59.18	31.14	26.21	12.24
n-3 HUFA	3.89	6.59	10.10	6.36	-	16.94	21.75	11.05



## 附錄



**Figure 1.** Relationship between relative retention time and carbon number of fatty acid.

(Watanabe, 1988)