

中華民國第 51 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高中組 生活與應用科學科

第一名

最佳創意獎

040809

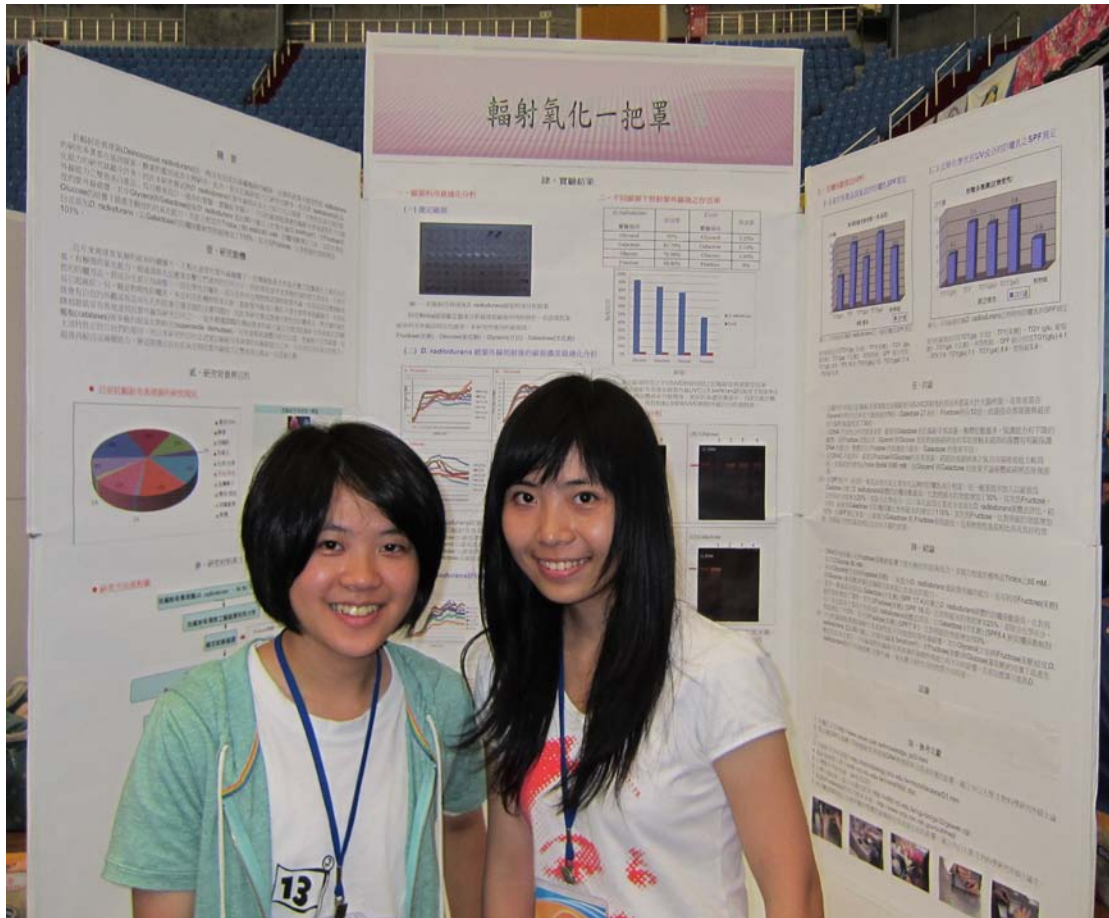
輻射氧化一把罩

學校名稱：國立蘭陽女子高級中學

作者： 高二 張辰珮 高二 林昀宣	指導老師： 陳美蓮
-------------------------	--------------

關鍵詞：抗輻射奇異球菌(*Deinococcus radiodurans*)、
抗輻射、抗氧化

得獎感言



科展就像一把鑰匙，不僅開啟我們對科學研究的熱忱，更幫助我們在課業及科展的沉重壓力下，找到自己沒有發現的堅毅——我們永遠不會忘記在段考前揪著一顆心熬夜到凌晨，只為了將報告整理得更詳盡；不會忘記實驗不順的沒自信如重石緊壓胸口，心臟卻因而越壓越有力；不會忘記和伙伴花了一整天在實驗室測試樣品的革命情感；不會忘記準備口試的緊張及兩人配合度百分百的默契……。科展在我心裡烙下深刻的回憶，並非每一份都甜美，回想起來卻有回甘的滋味！我們真的非常幸運，有辛苦盡責的老師、外校和助教不遺餘力的幫助，感謝他們的無私為我們換來在台上受獎的榮耀。觀摩許多精采作品後，我們更深感人外有人而應更加謙卑，帶著這份謙卑，我們不僅在科學，也在人生旅途中懷抱科學實驗的精神，展開更多探索之旅！

摘要

抗輻射奇異球菌(*Deinococcus radiodurans*)是一株具有高度抗游離輻射的細菌，由資料收集中發現對*D. radiodurans*的研究多著墨在基因探索、酵素的鑑別或其生理研究，此外，對其抗輻射能力之研究也頗多，但在*D. radiodurans*抗氧化能力的研究就顯少許多。因此本研究嘗試將*D. radiodurans*抗紫外線與抗氧化力結合並以開發「生物性抗氧化與防紫外線能力之雙效美白產品」為目標來設計一連串的實驗。實驗結果顯示：不同的碳源能誘發抗輻射奇異球菌對抗不同強度的紫外線破壞，其中Glycerol與Galactose能使*D. radiodurans*抵抗60分鐘以上的紫外線(3.3mW/cm²)；在Fructose與Glucose的培養下能產生較佳的抗氧化能力，其能力相當於Trolox之65 mM和60 mM。防曬係數測定方面，去除化學成份並添加*D. radiodurans*，以Galactose的防曬係數較對照組增加了115%；其次為Fructose，比對照組的效能增加103%。

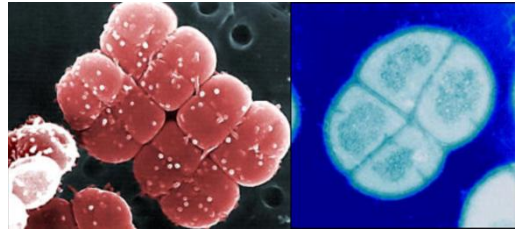
壹、研究動機

近年來地球臭氧層的破洞持續擴大，人類在過度的紫外線曝曬下，皮膚細胞產生的氧化壓力加劇產生大量的自由基，而自由基是具有高度破壞力的分子，性質活潑，有極強的氧化能力，能通過氧化反應來攻擊它們遇到的任何分子，因此導致衰老或多種疾病的產生與惡化，如自由基激活人體免疫系統而產生過敏反應或出現紅斑狼瘡等自體免疫疾病、自由基破壞細胞使皮膚細胞色素沉積(老年斑)並皮膚失去彈性產生皺紋、使微血管脆性增加容易破裂血管或因自由基攻擊複製中的基因，造成基因突變，誘發癌症發生。目前對抗紫外線的方式除了利用工具遮蔽外，在皮膚上則會塗抹防曬用品來防範。目前市售的防曬用品雖然不斷地推陳出新，而其成分主要分為兩類，一為化學性防曬乳，成分是利用化學物質直接吸收紫外線，但易造成皮膚過敏或易引起癌症；另一種是物理性防曬乳，多是利用無機物質來反射、散射紫外線或以類似不透光物質來遮蔽陽光，而塗抹後會有白色的外觀或易造成毛孔的阻塞引發其他的皮膚問題^[1]。因此本研究嘗試開發生物性的防曬產品，將皮膚的傷害降到最低並有效地達到抗紫外線為研究目的之一。此外根據2002年顏^[2]發表的碩士論文中提到抗輻射奇異球菌具有3種觸酶(catalases)與多種的超氧化物歧化(superoxide dismutase)，可快速移除菌體內的自由基，使細胞不受到破壞。而上述特性正符合我們的期待，所以本研究的目的是證實抗輻射奇異球菌的抗輻射能力之外，另外再評估其抗氧化的能力，最後再綜合這兩種能力，嘗試開發出具有抗氧化與防紫外線能力之雙效美白產品，以造福人類。

貳、研究背景與目的

一、抗輻射奇異球菌簡介^[3]

抗輻射奇異球菌(*Deinococcus radiodurans*)於1956年被美國人在經過 X 射線滅菌處理的肉罐頭中被分離出來，其菌落為紅色、好氧、不具有運動性的四聯球菌(如右圖所示)，不會產生孢子也無致病性，細胞為直徑 0.5~3.5 μm 。嗜溫性，最適生長溫度 25-35 $^{\circ}\text{C}$ ，最高只能到 41-44 $^{\circ}\text{C}$ ；最低到 4 $^{\circ}\text{C}$ 。為革蘭氏陽性菌，但卻有部分性質類似革蘭氏陰性菌，如此株菌具有外套膜、S-layer 等。它在自然界分佈甚廣，幾乎無所不在，從養分貧瘠的乾燥氣候，到有潮濕的環境中皆可尋求。此菌所能承受的 γ 射線劑量是人類致死率的 1000 倍，為目前地球上抗輻射能力最強的微生物，其抗輻射能力的可能原因是具有多套的染色體，使得受損的 DNA 具有高效率的修補能力。



(圖片來源: <http://images.google.com.tw>)

二、認識輻射能^[4]

輻射其實只是能量傳遞的一種方式，輻射依能量的強弱可分為三種：

1. 游離輻射：能量最強，可破壞生物細胞分子，如 α 、 β 、 γ 及 X 射線。
2. 非游離輻射(有熱效應)：能量弱，不會破壞生物細胞分子，但會產生溫度，如微波、可見光、紅外線及紫外線。
3. 非游離輻射(無熱效應)：能量最弱，不破壞生物細胞分子，也不會產生溫度，如無線電波、電力電磁場。

三、認識自由基與抗氧化物^[5]

(一) 何謂自由基：

人體代謝是以「氧化反應」為主，因此會產生許多自由基。自由基是一種帶有「不成對」電子的物質。由於電子必須成雙成對才能使分子處於安定狀態，因此自由基非常不安定，必須到處搶奪其它分子的電子或放出電子，以求得自己安定，所以會不斷攻擊或破壞人體各器官的細胞。在醫學上，利用外來抗氧化物的補充來降低人體內過多的自由基，免除不安定的自由基毒素對細胞、器官的破壞，預防及消除疾病。

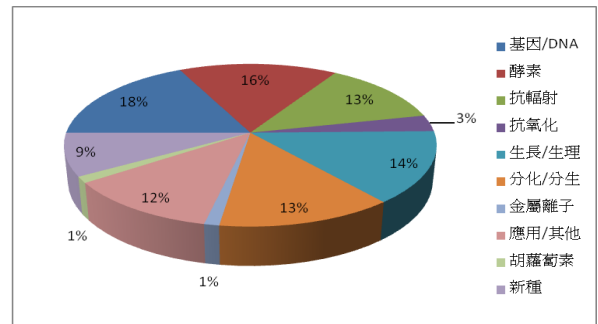
(二) 自由基的剋星—抗氧化物：

抗氧化物可以避免不穩定的氧分子和其他分子的交互作用，進而避免自由基的連鎖反應，因此自由基醫學界利用與人體防禦機制相同的抗氧化物，來中和過多的自由基。人體主要的抗氧化物包括：

1. 大分子物質—酵素型，如過氧化氫酶（catalase）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD），可分解這些人體內因能量轉換產生而傷害細胞的過氧化物，使其無毒化，發揮防衛身體的作用。
2. 小分子物質—非酵素型，如維生素 C、E、β-胡蘿蔔素、硒。

四、目前抗輻射奇異球菌的研究現況

利用關鍵字「*Deinococcus radiodurans*」搜尋「台灣全國碩博士論文」^[6]資訊網站和「BCBI/PubMed」^[7]國際公共生物資料庫，獲得 797 筆相關文獻資料，經過資料分析可將文獻資料分為下列幾種類別：以抗輻射奇異球菌的「基因/DNA」之研究為最大宗佔 18%；其次為酵素佔 16%；再者菌體生長與生理之探討有 14%；*D. radiodurans* 抗輻射和分生/分化的研究也各達 13%，而抗氧化力則只佔了 3%。



五、研究目的

抗輻射奇異球菌所能承受的 γ 射線劑量是人類致死率的 1000 倍，為目前地球上抗輻射能力最強的微生物，而抗輻射奇異球菌的抗輻射原因已被歸納^[2]，其中本研究較有興趣的除了其抗輻射的能力之外，其具有 3 種觸酶(catalases)與多種的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)，可快速移除菌體內的自由基，使不細胞不受到破壞的能力也是本研究的重點。綜合以上的特性本研究除了證實其抗輻射的能力之外，並檢測其抗氧化的能力，最後再結合抗輻射奇異球菌的這兩種特殊能力，嘗開發出具有抗氧化與防紫外線能力之雙效美白產品，以造福人類。

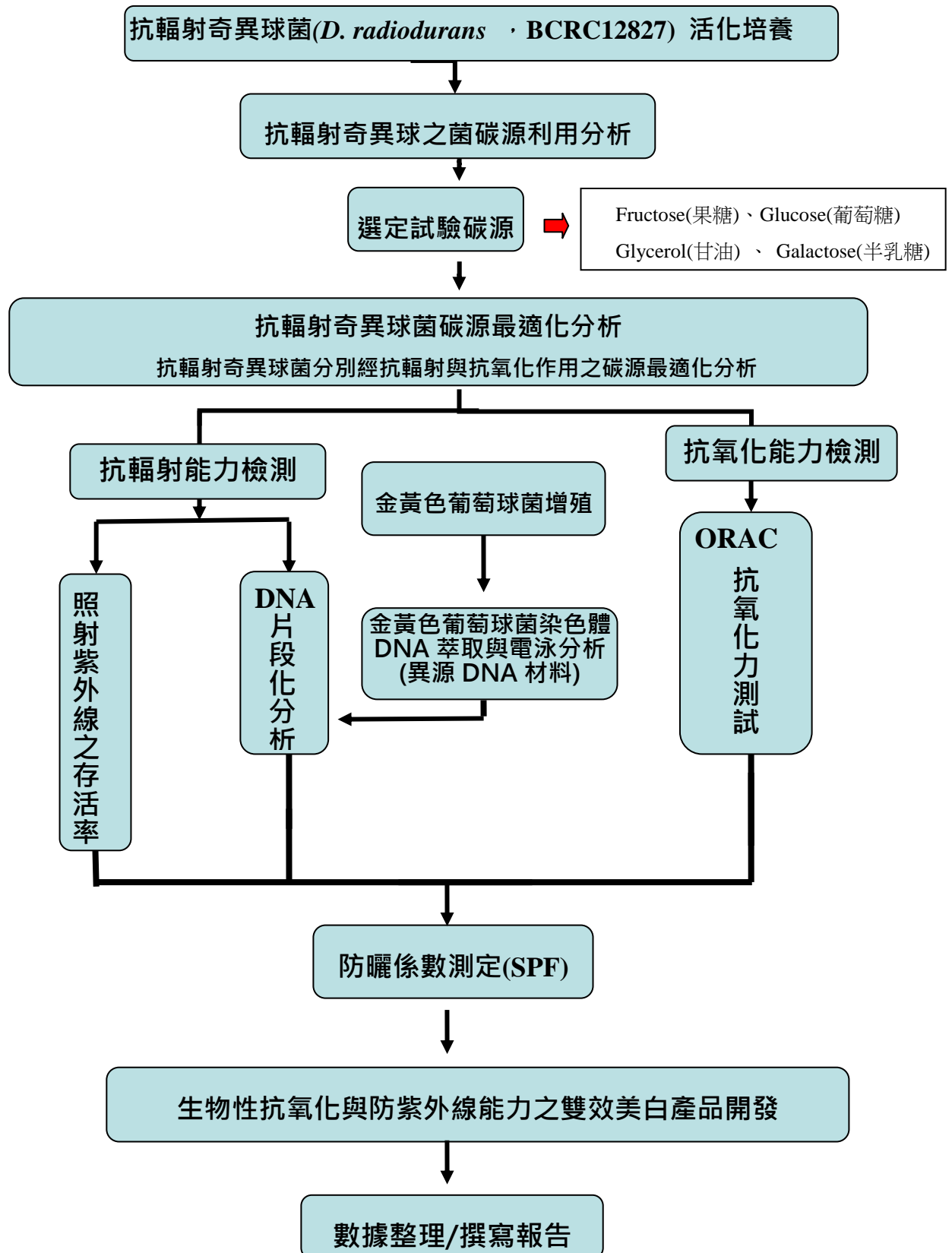
本研究之實驗設計：

- (一). 利用碳源鑑定套組了解抗輻射奇異球菌對碳源的利用情形。
- (二). 利用微生物自動培養增殖分析機檢測抗輻射奇異球菌分別經照射紫外線及 H_2O_2 處理後之碳源利用率最佳化分析。
- (三). 抗輻射能力檢測:
 1. 照射紫外線 UVC 不同時間下的 *D. radiodurans* 存活率
 2. 進行 DNA 片段化分析來取得抗輻射奇異球菌保護外源 DNA 抗輻射的直接證據。

- (四). 利用氧自由基吸收能力(Oxygen Radical Absorbance Capacity , ORAC)測試抗輻射奇異球菌之抗氧化能力。
- (五). 添加抗輻射奇異球菌菌體以製作簡易防曬塗劑並測量其防曬係數 (SPF) 。
- (六). 未來目標：開發生物性抗氧化與防紫外線能力之雙效美白產品。

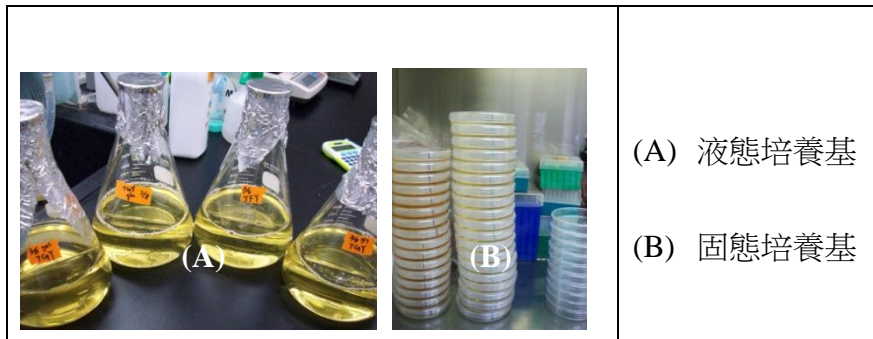
參、研究材料與方法

一、研究方法流程圖



二、實驗材料與方法

(一) 固/液態培養基製備



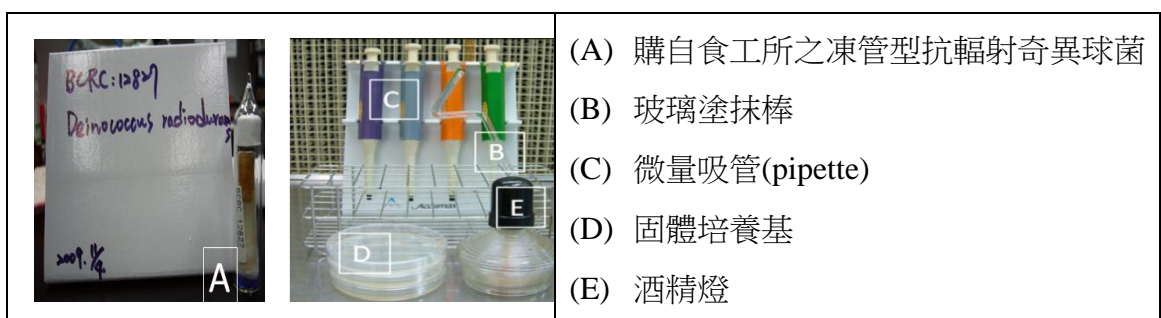
1、液態培養基製備：

- (1). 量取醣類：glucose、glycerol、fructose、galactose 各 2.5 克，配成 5% 溶液，以及 yeast extract 0.5 克 400 毫升待用。
- (2). 取 5 毫升的 5% tryptone 及 40 毫升 yeast 混合，再分別加入 5ml 欲實驗之糖類 glucose、glycerol、fructose、galactose，共配出 TGY(glu)、TGY(gly)、TGY(gal)、TFY 四種培養基。
- (3). 經高壓滅菌釜(1.5 kg/cm²，121°C) 滅菌 15 分鐘，液態培養基製備完成。

2、固態培養基製備：

另外將液態培養基添加洋菜膠粉(Agar)15 克/每公升，經高壓滅菌釜滅菌後待冷卻至 45°C 時，於無菌操作臺中將培養基倒入無菌培養皿中，使其凝固，固態培養基製備完成備用。

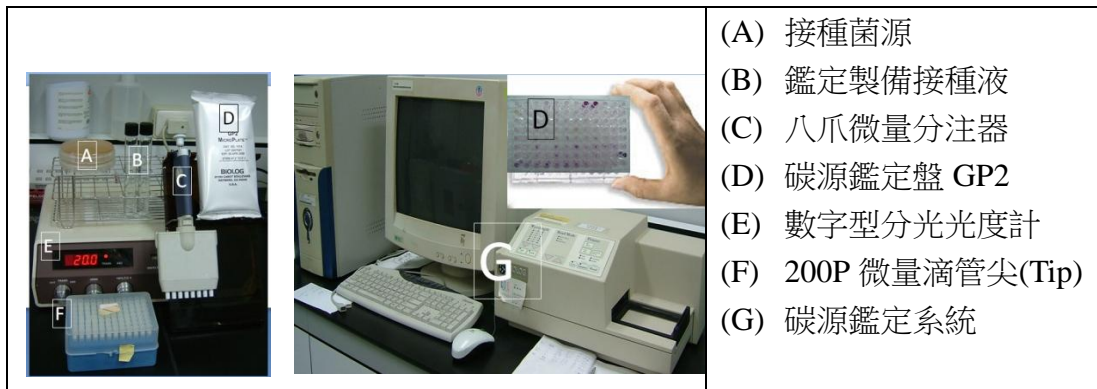
(二) 抗輻射奇異球菌之活化培養



1. 將購自於食品工業研究所的奇異球菌的冷凍乾燥管，利用棉花沾有 70% 酒精擦拭外管，在火焰上加熱外管之尖端。

2. 滴數滴無菌水在加熱處使外管破裂，再以硬棒敲破尖端。
3. 取出隔熱纖維和內管，已滅菌過的鑷子取出內管之棉塞。
4. 加0.5 ml培養液於內管中，並輕微震盪使菌體溶解成懸浮菌液。
5. 取0.1 ml懸浮菌液培養於指定平板培養基上，作劃線分離培養並經系列稀釋，再利用無菌 L 型玻棒均勻塗抹，同時將兩者置於37°C 之定溫培養箱培養。

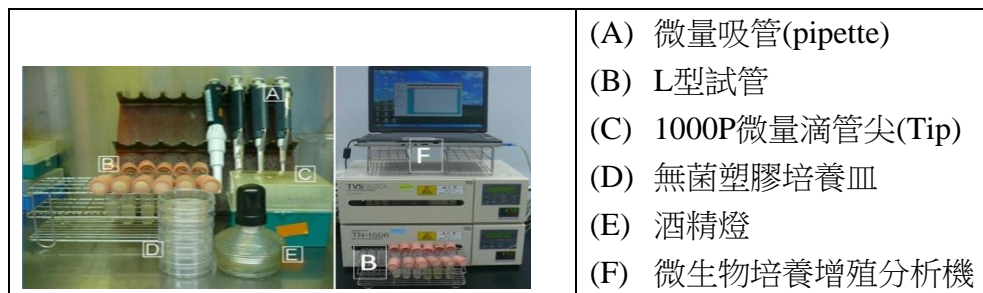
(三) 碳源鑑定分析



1. 將抗輻射奇異球菌培養在碳源鑑定專用之培養基BUG，待2天菌落生長後再利用BUG培養基活化更新一次。
2. 將菌落利用棉棒刮下，利用數字式分光光度計在波長600nm的條件下，將菌液濁度調整為20%，此菌液作為樣品比色用的標準品。
3. 在操作台將新活化好的奇異球菌，利用無菌棉棒將菌落刮下，接種至碳源鑑定專用接種液，利用比色法將此接種液的濁度調整至20%。
4. 利用八爪微量低滴管取150 μ l接種液於GP2鑑定盤的每一個well中，完成後將之置於37°C培養箱培養24小時後，利用Biolog鑑定讀值機讀取鑑定盤上的反應結果並利用其軟體分析其碳源利用的情形。

(四) 碳源最適化分析

1. 分別經紫外線照射與 H₂O₂ 處理後的碳源濃度最適化分析



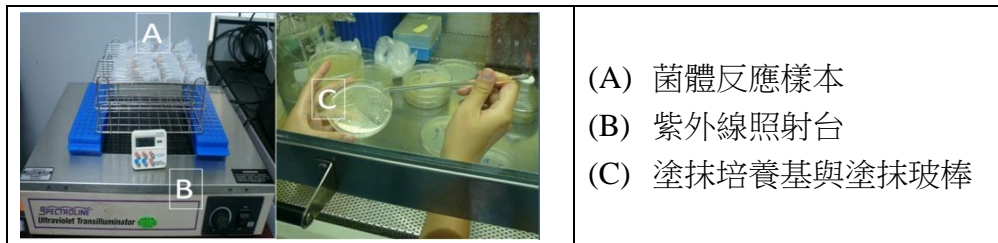
- (1). 利用微生物培養增殖分析機自動偵測樣品在吸收光600 nm下的生長曲線。
- (2). 將基礎培養液與事先配製好的碳源溶液，依比例調配出0、0.5%、1%、1.5%、

2%、2.5%、3%之不同濃度的碳源培養液。

- (3). 在無菌操作台中，將不同濃度之液態培養液注入L型試管並加入預先培養的菌液(OD_{600} 為0.6，菌數為 1×10^{10} 個/毫升)。
- (4). 將L型置於微生物培養增殖分析機，以 37°C ，40 rpm震盪培養並以可見光600 nm，每小時偵測奇異球菌菌體生長的變化情形。
- (5). 於24小時後，將L型試管暫停作用並取出照射紫外線UVC($3.3\text{mW}/\text{cm}^2$)，5分鐘，再將L型試管置微生物培養增殖分析機繼續作用至48小時後停止反應。
- (6). 重複(1)~(4)步驟，於24小時後，將L型試管暫停作用並加入 $100\ \mu\text{l}$ 3% H_2O_2 ，在 37°C 下反應30分鐘後，再將L型試管置微生物培養增殖分析機繼續作用至48小時後停止反應。

(五) 抗輻射奇異球菌經不同時間照射紫外線UVC之存活情形

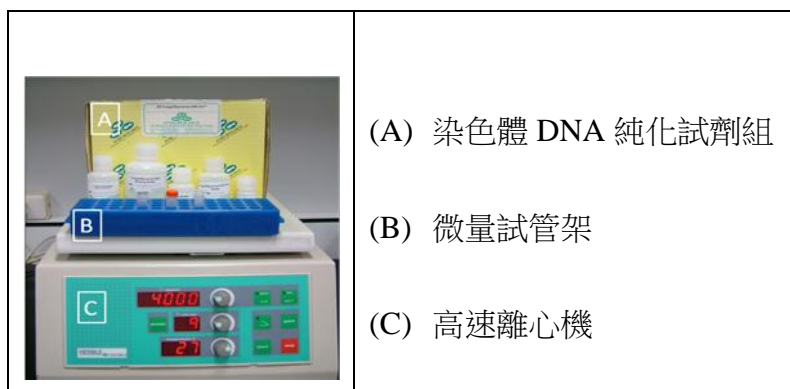
1. 最佳碳源培養下經不同時間照射紫外線UVC之抗輻射奇異球菌存活率



- (1). 根據「碳源濃度最適化試驗」所得到之抗輻射奇異球菌抗紫外線UVC最佳之碳源濃度，配製該濃度培養基並加入預先培養的菌液(OD_{600} 為0.6，菌數為 1×10^{10} 個/毫升)。
- (2). 將抗輻射奇異球菌添加不同種碳源使之增殖培養，使用的碳源有：Fructose(果糖)、Glucose(葡萄糖)、Glycerol(甘油)、Galactose(半乳糖)。
- (3). 取菌液 $1500\ \mu\text{l}$ 至微量試管中，以轉速7,000 rpm 離心10分鐘，倒除上清液，加入 $100\ \mu\text{l}$ 無菌水使菌體懸浮。
- (4). 將菌體照射紫外線UVC(能量強度為 $3.3\ \text{mW}/\text{cm}^2$)，反應時間分別為0、5、10、15、20、25、30、45、60分鐘。
- (5). 照射後利用連續稀釋法將菌體稀釋至 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} ，再將菌液以L型玻棒塗抹於培養基中，置於 37°C 定溫培養箱培養。
- (6). 2日後計數奇異球菌菌數，並將不同照射時間之菌數/對照組(UVC照射為0分鐘)之比較值來了解抗輻射奇異球菌在不同紫外線強度之抗性情形(存活率)。

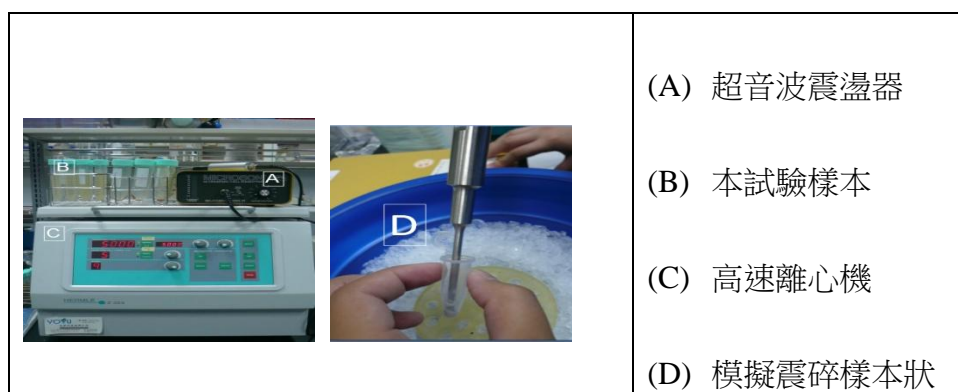
(六) 抗輻射奇異球菌之DNA片段化分析

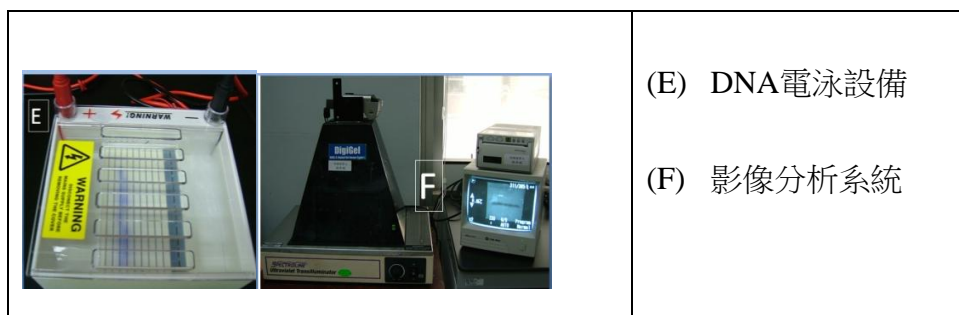
1. 金黃色葡萄球菌染色體 DNA 製備



- (1). 取 1.5 ml 菌於微量試管中，用離心機，以轉速 10,000 rpm，離心 10 分鐘後，去除上清液。
- (2). 加入 400 μ l 的 ZR BashingBead™ Lysis buffer 於微量試管中，使之懸浮後吸取樣品置於 ZR bashingBead™ Lysis Tube，利用振盪器振盪 5 分鐘後離心 1 分鐘 (10,000 rpm)。
- (3). 將 400 μ l 的上清液移至 ZR BashingBead™ IV spin Filter，以 7000 rpm，離心 1 分鐘，取之濾液。
- (4). 將濾液加入 1200 μ l 的 Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer，混合均勻後轉置 Zynio-spin™ IIC column，以 10,000 rpm，離心 1 分鐘後，倒除濾液。
- (5). 加入 200 μ l 的 DNA Pre-Wash Buffer 到 Zymo-spin™ IIC column，以 10,000 rpm，離心 1 分鐘。
- (6). 加入 500 μ l 的 Fungal/Bacterial DNA wash Buffer，以 10,000 rpm，離心 5 分鐘，置於 55°C 烘箱中風乾萃取管柱(約 20 分鐘)。
- (7). 加入 50 μ l 的無菌水，回溶 DNA。
- (8). 利用 0.8% Agarose 電泳洋菜膠分離 DNA 並使用分光光度計定量 DNA 濃度。

2. DNA 片段化分析樣本製備與分析

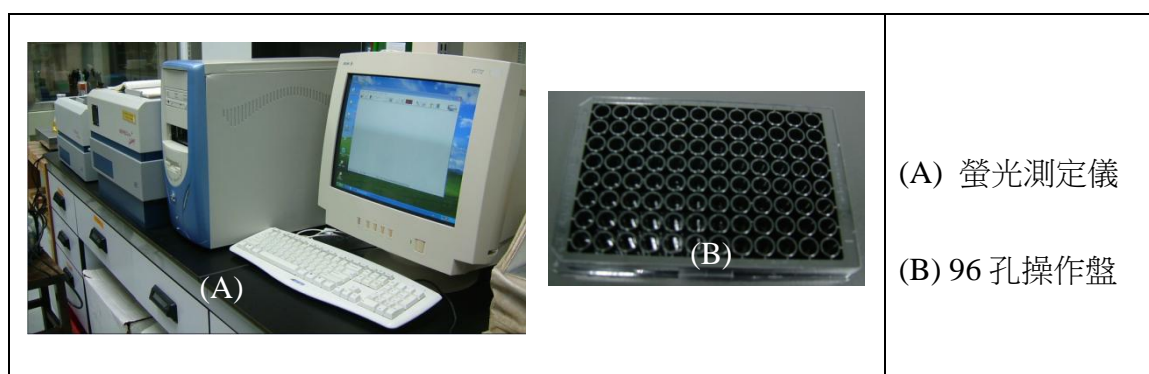




- (1). 將菌液利用離心機，以10,000 rpm，離心五分鐘，去除上清液，加入無菌水使菌體懸浮。
- (2). 將懸浮的菌液分成三組，其中兩組利用超音波震盪器來破碎菌體，以震盪10秒，休息10秒的方式，共反應一分鐘。
- (3). 將這三組樣品以無菌水稀釋為1倍(1X)、3倍(3X)、5倍(5X)後，照射紫外線UVC，能量強度為 $3.3\text{mW}/\text{cm}^2$ ，反應5分鐘，再將樣品利用0.8% Agarose核酸電泳膠(先行配製：0.8 g agarose+1X TBE buffer)，以電壓100V泳動30分鐘後經影像分析系統呈相。

(七) 氧化力分析(ORAC)

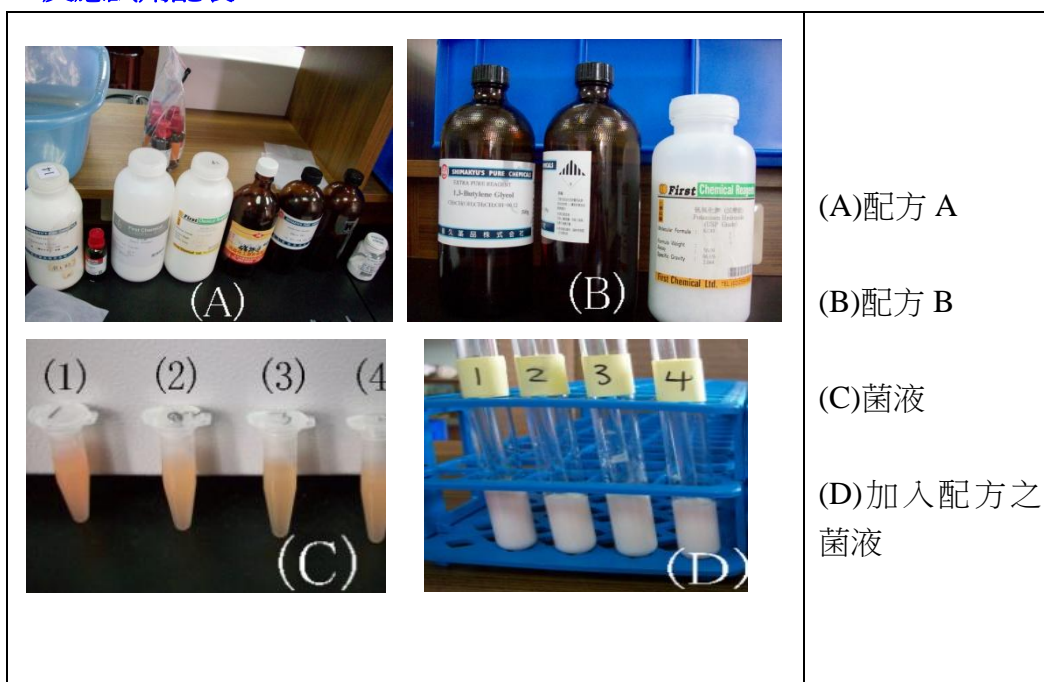
原理：以偶氮類化合物AAPH作為過氧自由基來源，Sodium Fluorescein為熒光指示劑，維生素E水溶性類似物Trolox為定量標準，使用熒光微孔板分析儀進行分析，用來測定樣品清除 $\text{ROO}\cdot$ 、 $\cdot\text{OH}$ 等自由基的能力。



- (1) 準備 phosphate buffer(濃度各為 0.01g/ml 的 NaH_2PO_4 及 Na_2HPO_4 混合成中性溶液)。
- (2) 加入 65 μl phosphate buffer 及 10 μl 萃取液至操作盤，每個樣本作三重複。
- (3) 取標準品 Trolox (10 μl Trolox + 990 μl buffer) 進行 2 倍稀釋 1 ml，共 6 個點。
- (4) 加入 65 μl phosphate buffer 及 10 μl 標準品，每個樣本作三重複。
- (5) 取熒光鈉鹽 70 μl (40 μl 50 ppm 熒光鈉鹽+9ml buffer)加入上述樣品中
- (6) 將(B)放置在機器內，以 37°C 預熱 15 分鐘。
- (7) 加入(AAPH：phosphate buffer)55 μl 。
- (8) 於放射波 570nm、激發波 540nm 下，每 5 分鐘測一次熒光波長。

(八) 以某市售產品為基底的防曬乳製作與防曬係數之測定 (SPF)

1. 反應試劑配製



配方 A-1：氧化鋅 1g、二氧化鈦 1g、對甲氧基肉桂酸辛脂 7.5g、鯨蠟醇、硬脂酸、礦物油、橄欖油各 3g、鯨鯊烯 4g、對羥基苯甲酸甲酯 0.1g

配方 A-2：氧化鋅 1g、二氧化鈦 8.5g、鯨蠟醇、硬脂酸、礦物油、橄欖油各 3g、鯨鯊烯 4g、對羥基苯甲酸甲酯 0.1g

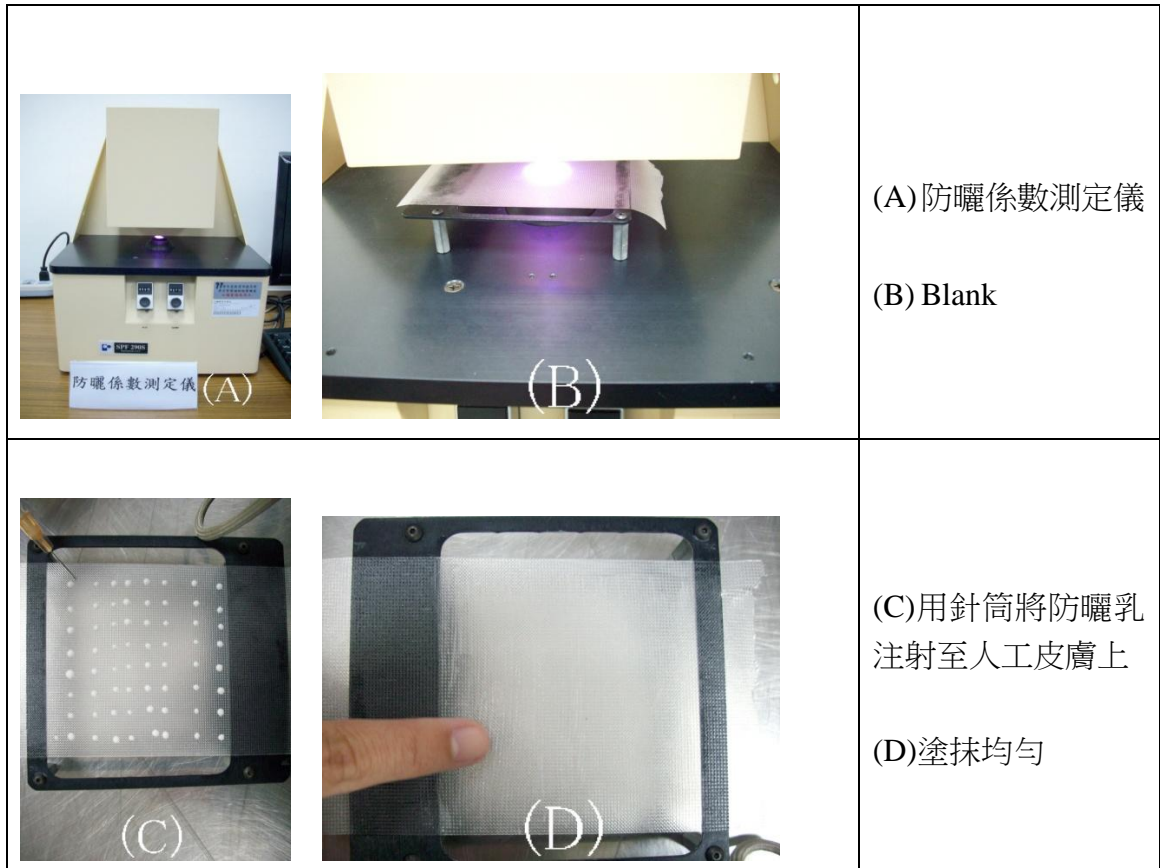
配方 B：1,3-丁二醇、丙二醇 各 2g、氫氧化鉀、對羥基苯甲酸甲酯各 0.2g、去離子水 70g

樣品：將不同碳源培養之菌液定量為相同菌數(10^8)，(1). TGY-gly；(2). TFY；(3). TGY-gal；(4). TGY-glu；(5). 對照組—去離子水

方法：

1. 將配方 A-1 秤入燒杯中，以水浴 75°C 加熱，攪拌至完全溶解。
2. 將配方 B 秤入燒杯中，以水浴 75°C 加熱，攪拌至完全溶解。
3. 將配方 A 倒入配方 B，攪拌均勻(完全乳化)，冷卻至室溫。
4. 將 $1\mu\text{l}$ 樣品，加入 $2\mu\text{l}$ 的基底中攪拌均勻
5. 重複以上步驟，但將配方 A-1 改為配方 A-2。

2. 樣品測定

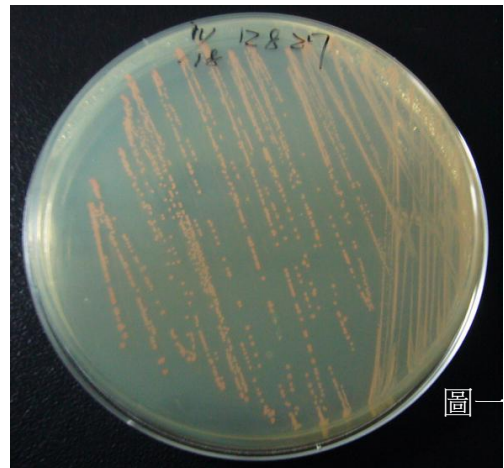


- (1). 把一塊人工皮膚放置在防曬係數測定儀下，測一個 Blank。
- (2). 以針筒將樣品 1 取 0.2μ 1 均勻注射在人工皮膚上再用手均勻塗佈
- (3). 將塗好的人工皮放在防曬係數測定儀下測 SPF 值，並紀錄數據。
- (4). 重複此步驟，分別測試兩種配方之樣品 2~5。

肆、實驗結果

一、圖一為抗輻射奇異球菌 *Deinococcus radiodurans* 生長於 Nutrition 固體培養基的菌落生長形態。此菌生長於 37°C ，2 天後會產生紅色色素。

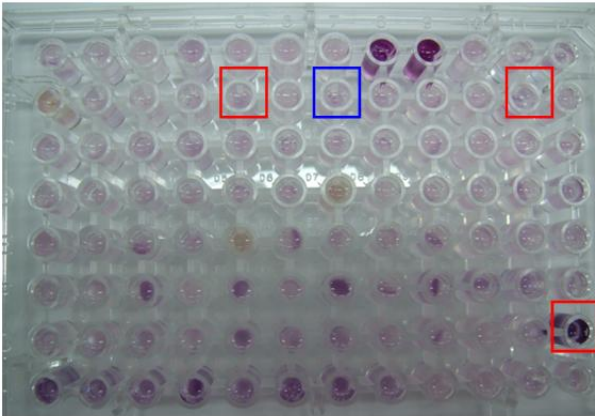
二、圖二(A)利用 Biolog 碳源鑑定盤來分析細菌對碳源利用的情形，若該菌對某碳源利用率高則會呈現紫色，顏色越深表利用率越高。將奇異球菌在營養培養基上活化後，再定量接種至碳源鑑定盤，反應 24 小時後的結果。結果可明顯看出其所利用的碳源與 Biolog 公司所提供的資料庫中抗輻射奇異球菌的碳源利用圖譜相當(圖B)。本研究所選用的碳源



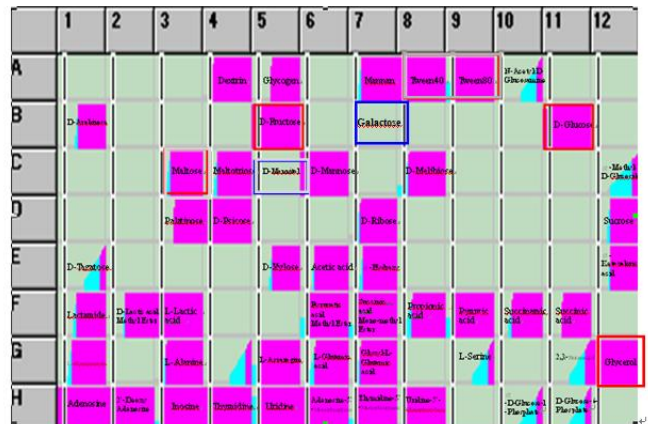
圖

為：Fructose(果糖)、Glucose(葡萄糖)、Glycerol(甘油)、Galactose(半乳糖)。

(A)



(B)



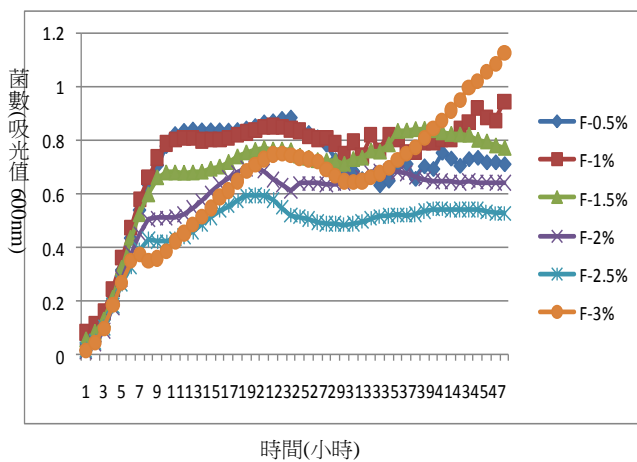
圖二、抗輻射奇異球菌*D. radiodurans*碳源利用分析結果與資料庫圖譜

三、 碳源利用最適化分析

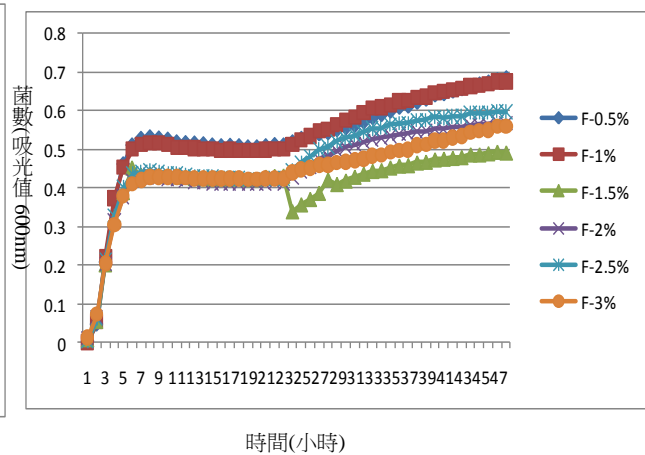
(一) *D. radiodurans* 經紫外線照射後的碳源濃度最適化分析

A. Fructose

(1) *D. radiodurans*

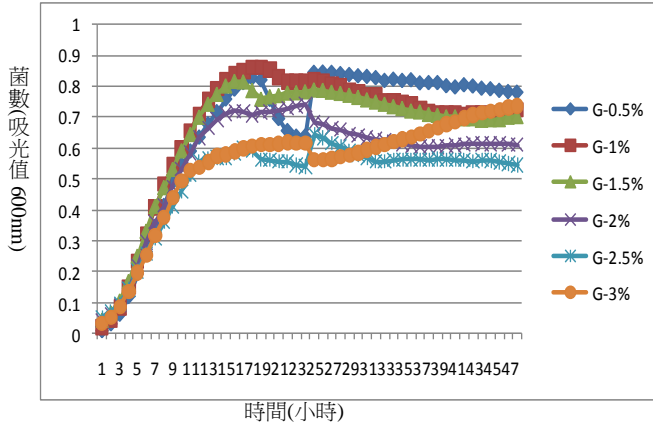


(2) *E. coli*

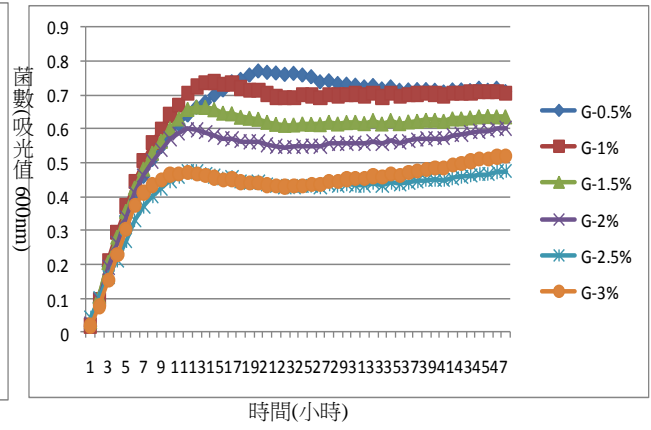


B. Glycerol

(1) *D. radiodurans*

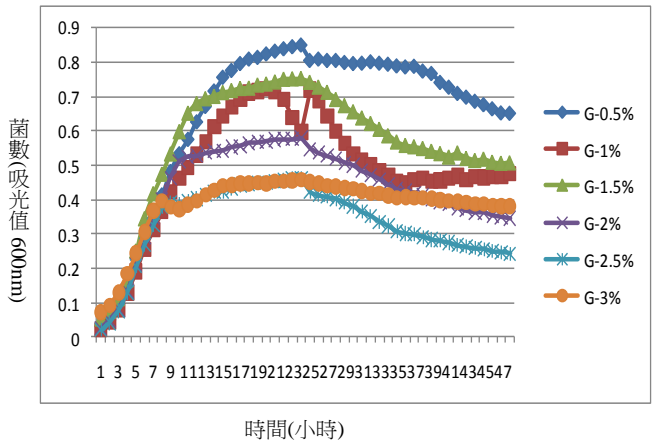


(2) *E. coli*

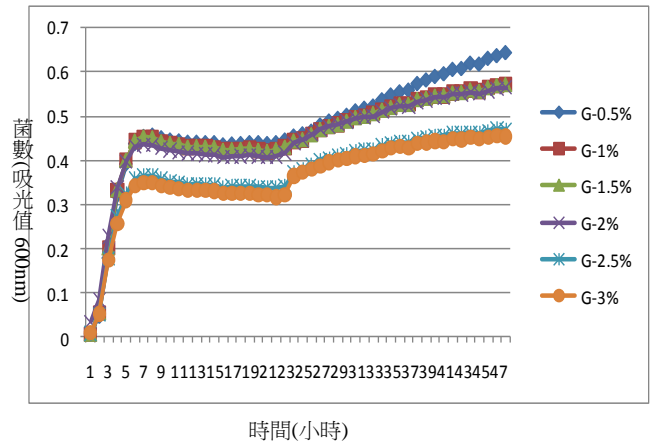


C. Glucose

(1) *D. radiodurans*

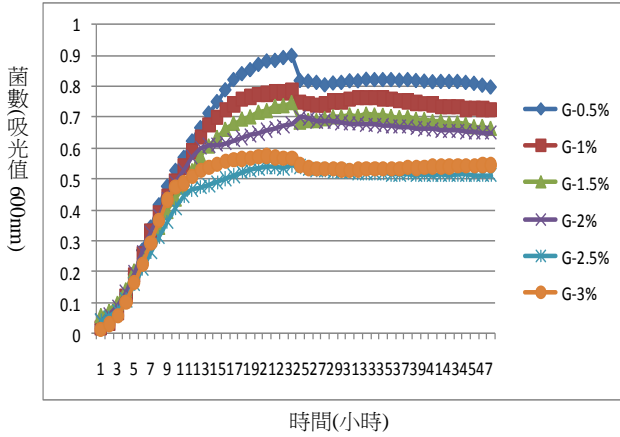


(2) *E. coli*

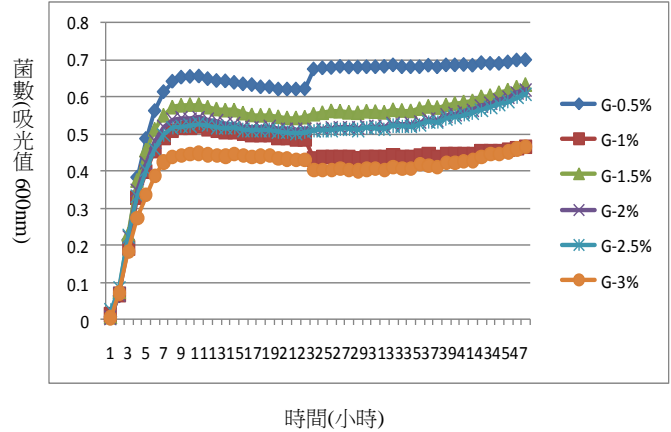


D. Galactose

(1) *D. radiodurans*



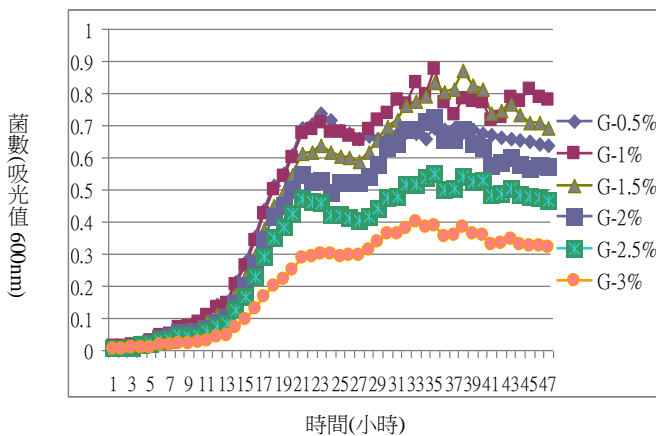
(2) *E. coli*



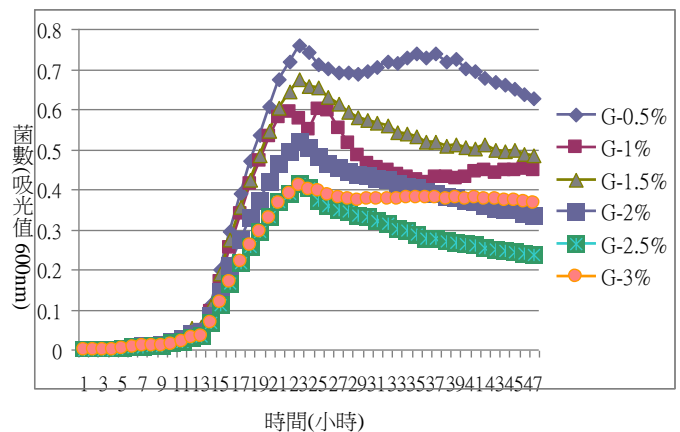
圖三、*D. radiodurans*經紫外線照射後的碳源濃度最適化分析之抗輻射奇異球菌菌體生長曲線。(A)Fructose:(1) *D. radiodurans*以碳源濃度3%可使菌數達OD₆₀₀近1.2；(2)*E. coli*以碳源濃度1%可使菌數達OD₆₀₀為0.7。(B)Glycerol:(1)*D. radiodurans*以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀為0.8；(2)*E. coli*以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀為0.7。(C)Glucose:(1)*D. radiodurans*以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀為0.7；(2)*E. coli*以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀為0.65。(D)Galactose:(1)*D. radiodurans*以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀為0.8；(2)*E. coli*以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀為0.7。

(二) *D. radiodurans*經H₂O₂處理後的碳源濃度最適化分析

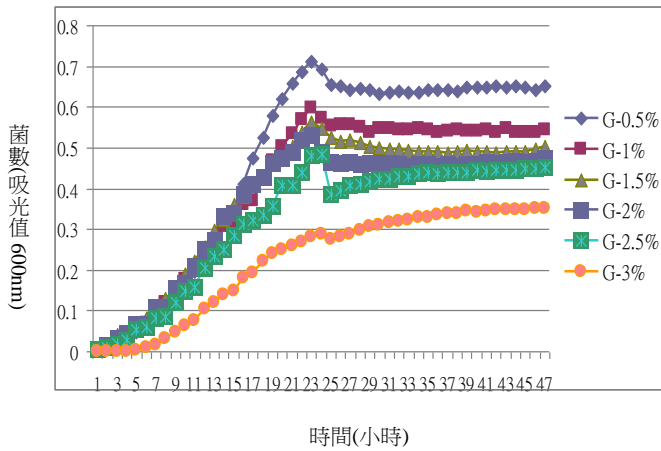
A. Fructose



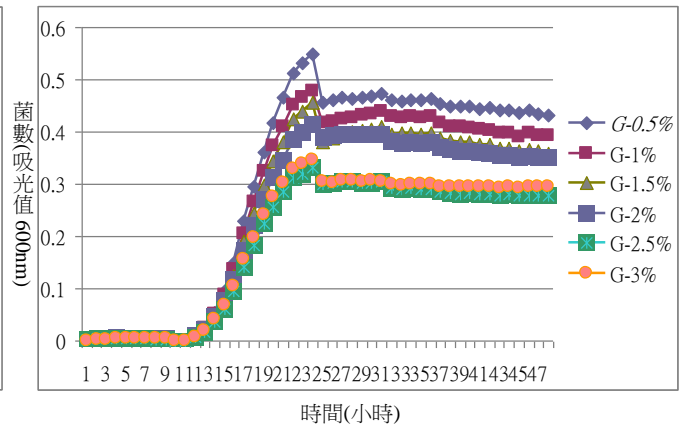
B. Glucose



C. Glycerol



D. Galactose

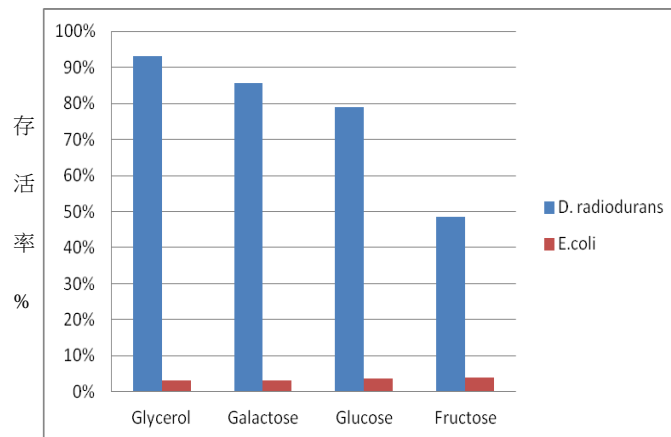


圖四、*D. radiodurans*經H₂O₂處理後的碳源濃度最適化分析之抗輻射奇異球菌菌體生長曲線。(A)Fructose:以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀近0.8；(B) Glucose:以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀為0.7；(C) Glycerol:以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀為0.65；(D)Galactose:以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀為0.55。

四、抗輻射奇異球菌最佳碳源作用之不同UVC照射時間之存活率

表一、抗輻射奇異球菌最佳碳源作用之不同UVC照射時間之存活率

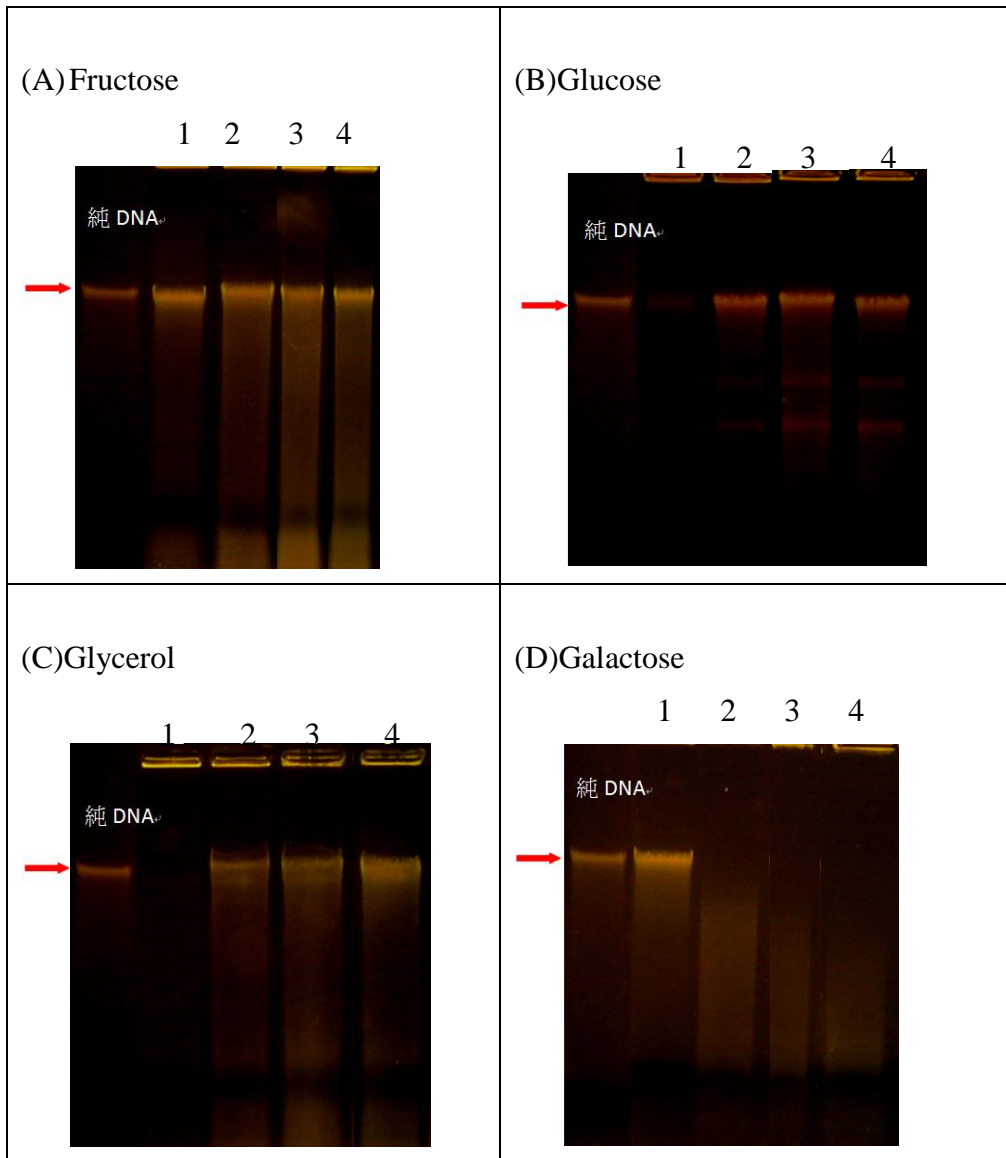
<i>D. radiodurans</i>	存活率	<i>E. coli</i>	存活率
實驗條件		實驗條件	
Glycerol	93%	Glycerol	3.20%
Galactose	85.70%	Galactose	3.10%
Glucose	78.90%	Glucose	3.80%
Fructose	48.40%	Fructose	4%



圖五、最佳碳源作用之不同UVC照射時間之抗輻射奇異球菌存活率

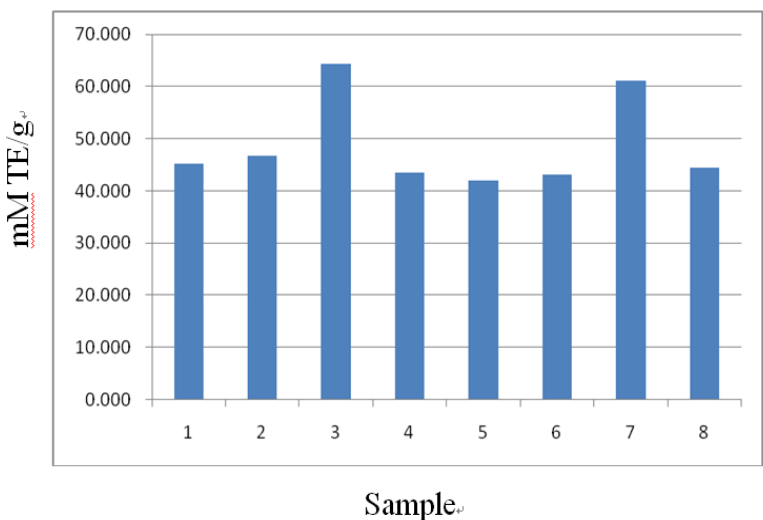
將抗輻射奇異球在經紫外線 UVC 以 $3.3\text{mW}/\text{cm}^2$ 的強度下照射 5 分鐘後，將菌體經系列稀釋後，塗抹於基礎培養基中。待 2 天後計數其菌數、與對照組(未照射 UVC) 相除所統計出的資料表。*D. radiodurans* 在 Glycerol 之存活率達 93%，其次為 Galactose 85.7%，Glucose 78.9%。*E.coli* 的存活率則遠低於抗輻射奇異球菌，大約在 5% 以下。

五、DNA 片段化分析



圖六、抗輻射奇異球菌經紫外線照射後之DNA片段化分析電泳圖。(A)-(D)分別使用不同碳源培養抗輻射奇異球菌，依序為Fructose(果糖)、Glucose(葡萄糖)、Glycerol(甘油)、Galactose(半乳糖)。樣品1-4為抗輻射奇異球菌原菌、經超音波震盪器破碎細胞再稀釋1倍(1X)、經超音波震盪器破碎細胞再稀釋3倍(3X)、經超音波震盪器破碎細胞再稀釋5倍(5X)。

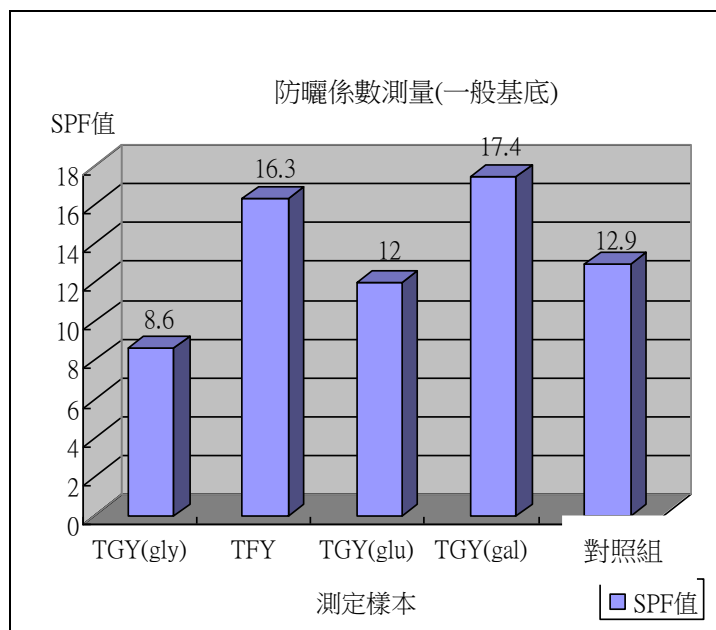
六、氧自由基吸收能力ORAC



圖七、菌液/菌萃取液之氧自由基吸收能力(ORAC)。Sample 1、3、5、7為抗輻射奇異球菌經超音波震盪器破碎細胞；Sample 2、4、6、8為抗輻射奇異球菌活菌；以兩組為單位，碳源依序為Glycerol(甘油)、Fructose(果糖)、Galactose(半乳糖)、Glucose(葡萄糖)。

七、防曬係數測定(SPF)

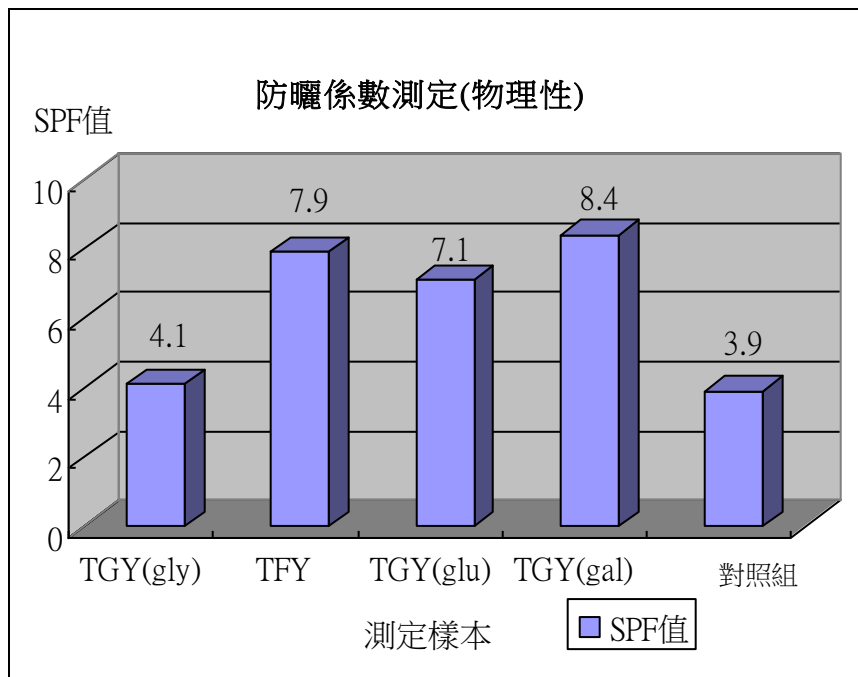
(一) 以某市售產品為基底調配的防曬乳之SPF測定



圖八、利用不同碳源培養抗輻射奇異球菌之一般防曬乳的SPF測定比較。所使用的

碳源依序為TGY(gly, 甘油) 、TFY(果糖) 、TGY (glu, 葡萄糖)·TGY(gal, 半乳糖) 、與對照組。SPF值分別為TGY(gly) 8.6 、TFY 16.3、TGY(glu) 12、TGY(gal) 17.4、對照組12.9

(二) 去除化學性抗UV成分的防曬乳之SPF測定



圖九、利用不同碳源培養抗輻射奇異球菌之物理性防曬乳的SPF測定比較。所使用的碳源依序為TGY(gly, 甘油) 、TFY(果糖) 、TGY (glu, 葡萄糖)·TGY(gal, 半乳糖) 、與對照組。SPF值分別為TGY(gly) 4.1、TFY 7.9、TGY(glu) 7.1、TGY(gal) 8.4、對照組3.9。

伍、討論

- 一、根據陳於 2000 年發表的碩士論文提到：「碳源為 Glucose、Fructose、Mannose、Maltose、Sucrose 時生長情況較為良好，而 Galactose、Lactose、Mannitol，則生長情況差」^[8]；這與本實驗的研究結果有些許不同，本研究發現抗輻射奇異球菌的生長情況：Fructose >Glycerol>Galactose>Glucose
- 二、由圖五的結果中，可看出抗輻射奇異球菌在各種碳源中經 UVC 照射後的存活率都遠大於大腸桿菌，其中奇異球菌在 Glycerol 中的存活率是大腸桿菌的 29 倍；Galactose 27.5 倍；Fructose 則有 12 倍。而最佳奇異球菌與最差的大腸桿菌還相差了 30 倍。

- 三、 由DNA 片段化分析的結果來看，碳源為Galactose 的抗輻射奇異球菌，稀釋倍數越多，保護能力有下降的趨勢，而Fructose 則無差異；Glycerol 與Glucose 則是將細胞破碎後的萃取液較未破碎的菌體有明顯保護DNA 的能力。整體而言以Fructose 的保護能力最佳，Galactose 的效果不佳。
- 四、 在ORAC 的結果中，碳源為Fructose(果糖)與Glucose(葡萄糖)的奇異球菌，經超音波破碎後之氧自由基吸收能力較為佳，其值相當於標準品Trolox 65mM 與60 mM；而Glycerol 與Galactose 的效果不論菌體破碎與否皆無差異。
- 五、 在SPF測定中，使用的一般基底與市面上某知名品牌的防曬乳成分相當，在一般基底中加入以碳源為Galactose (半乳糖)培養之*D. radiodurans*菌體的防曬係數最高，比對照組水的效能增加了35%。其次為Fructose(果糖)，比對照組的效能增加25%。當除去化學成分，以二氧化鈦為主要成分並添加*D. radiodurans*菌體去評比，結果發現：碳源為Galactose (半乳糖)的防曬係數比對照組水的增加了115%；其次為Fructose(果糖)，比對照組的效能增加103%。由SPF測定來看，以碳源為Galactose (半乳糖)和 Fructose(果糖)表現最佳，且與物理性基底相比具有良好的效能，而與綜合性的基底相比也具有不錯的表現。

陸、結論

- 一、 ORAC的結果顯示在Fructose(果糖)的影響下能有較好的抗氧化力，其能力相當於標準品Trolox之65 mM，其次為Glucose 60 mM。
- 二、 利用Glycerol(甘油)與Galactose (半乳糖)來提升*D. radiodurans* 抵抗紫外線的能力，並可利用Fructose(果糖)與Glucose (葡萄糖)來強化抗輻射奇異球菌之抗氧化的能力。
- 三、 使用一般基底並添加以Galactose (半乳糖)培養之*D. radiodurans*菌體的防曬係數最高，比對照組的效能增加了35%。其次為Fructose(果糖) (SPF 16.3)，比對照組水的效能增加25%。當除去化學成分，以二氧化鈦為主要成分並添加*D. radiodurans*菌體去評比，以Galactose (半乳糖) (SPF8.4)的防曬係數較對照組增加了115%；其次為Fructose(果糖) (SPF7.9)，比對照組的效能增加103%。
- 四、 不同的碳源能誘發抗輻射奇異球菌對抗不同強度的紫外線破壞，其中Glycerol(甘油)與Galactose (半乳糖)能使*D. radiodurans* 抵抗60分鐘以上的紫外線(3.3mW/cm²)；在Fructose(果糖)與Glucose(葡萄糖)的培養下能產生較佳的抗氧化能力。不同碳源對抗輻射奇異球菌的兩種特殊能力有不同的影響，其原因推測可能與*D. radiodurans*對於不同環境壓力(紫外線、氧化壓力)所作用的物質不同所致。


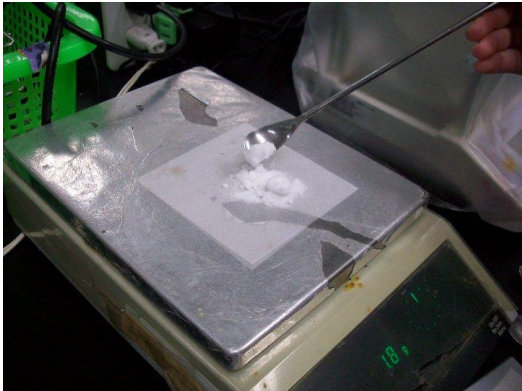
誌謝

感謝████大學生物技術研究所林教授、研究助理王小姐，以及研究室的學長姐們給予的指導和協助；████醫護管理專科學校化妝品應用與管理科洪主任，以及學姐熱心指導；並且感謝████大學、████護校提供我們實驗環境與器材設備，尤其是在UV照射使用上的安全與防護。

柒、參考文獻

1. 防曬乳成份 http://www.unsun.com.tw/knowledge_p03.html
2. 顏孟畿(2001)錳離子對耐輻射奇異球菌DNA修補原料及能量供應的影響。國立中山大學生物科學研究所碩士論文。
3. 抗輻射奇異球菌簡介<http://microbiology.scu.edu.tw/micro/bacteria/D1.htm>
4. 輻射線種類及簡介 omih.mc.ntu.edu.tw/creod/輻射.doc
5. 台灣醫界學術報導（34卷第2期）
6. 台灣全國碩博士論文知識加值系:<http://ndltd.ncl.edu.tw/cgi-bin/gs32/gswweb.cgi>
7. BCBI/PubMed國際期刊搜索系統：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
8. 陳君麟(2000)探討各種單醣與雙醣對耐輻射奇異球菌生長的影响。國立中山大學 生物科學研究所碩士論文。

捌、實驗實錄

	
液態培養基製作	量取材料



固態培養基製作



塗抹菌液



以分光光度計看其濃度



稀釋菌液



倒出培養液



製作基質



吸取基質



注入菌液



注射防曬乳至人工皮膚



用手均勻塗布

【評語】 040809

將抗輻射奈異球菌抗紫外線與抗氧化力結合來開發雙效美白產品，創意佳，實驗完整，並證明有良好的效果，具有商業價值及專利申請的可能，如能進一步探討其原因及明顯的效果，將會更有影響力。