

2025年臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

作品編號	070005
參展科別	微生物學
作品名稱	碳源調控對酵母菌抵抗脫水能力及存活率影響

就讀學校	國立新竹女子高級中學
指導教師	許庭嘉
作者姓名	徐嘉妤

關鍵詞	<u>carbon source regulation、mitochondrial morphology、dehydration</u>
-----	--

作者簡介



我是目前就讀新竹女中三年級的徐嘉妤，從小對生物領域的研究和知識充滿熱愛，同時也十分熱衷於實驗操作，因此毅然決然在高中踏上生物的科研之路。感謝一路上老師和學長姐們的教導和支持，提供這個寶貴的學習機會，使我能義無反顧的探索嚮往已久的生物研究，並在過程中探索生命的奧妙及美好。而我也希望透過這次的實驗結果，能對相關領域有所貢獻，進而為人們和社會帶來經濟效益與福祉。

2025 年臺灣國際科學展覽會

研究報告

區別：

科別：微生物學科

作品名稱：碳源調控對酵母菌抵抗脫水能力及存活率影響

關鍵詞：carbon source regulation、mitochondrial morphology、dehydration

編號：

摘要

脫水技術在酵母菌應用方面則對保存和傳播重要的菌株十分有益。然而，脫水處理的酵母菌常常出現存活率過低的問題，若將生產規模擴大，導致的損失將不堪設想。

本研究探討脫水逆境下碳源調控對酵母菌抵抗脫水能力及存活率的影響。發現酵母菌面臨脫水生存逆境，會透過粒線體分裂與融合維持活性，此機制與 DNM1 密切相關。脫水前階段提供葡萄糖碳源可使酵母菌抵抗脫水逆境能力最佳，反之乙醇最差。甘油調節細胞內氧化還原平衡和滲透壓有助於細胞存活。脫水後復水階段提供葡萄糖可使酵母菌存活率最高，乙醇最差。脫水前碳源改變對存活率的影響更為顯著，而 SNF1 機制調控是影響酵母菌代謝養分及存活率的重要因素。

本實驗成果可提供酵母菌在食品工業、製藥、化工及生物燃料等領域的培養和保存技術，提高酵母菌的存活率和利用效率以減少浪費，具廣泛應用前景和經濟效益。

Abstract

Dehydration technology is highly beneficial for the preservation and dissemination of important yeast strains. However, dehydrated yeast often suffers from low survival rates, leading to significant losses when production is scaled up. This study investigates the impact of carbon source regulation under dehydration stress on the resistance and survival rates of yeast.

The findings reveal that yeast facing dehydration stress maintains its viability through mitochondrial fission and fusion, a mechanism closely associated with DNM1. Providing glucose as a carbon source before dehydration optimally enhances the yeast's ability to resist dehydration, while ethanol demonstrates the least effectiveness. Glycerol helps regulate intracellular redox balance and osmotic pressure, contributing to cell survival. During the rehydration phase after dehydration, providing glucose significantly increases yeast survival rates, whereas ethanol is the least effective. The influence of pre-dehydration carbon source changes on survival rates is particularly pronounced, with SNF1 regulation being a critical factor affecting yeast metabolism and survival.

The results of this study can provide valuable insights for the cultivation and preservation of yeast in the food industry, pharmaceuticals, chemicals, and biofuels, improving yeast survival rates and utilization efficiency to reduce waste. This research presents broad application prospects and economic benefits.

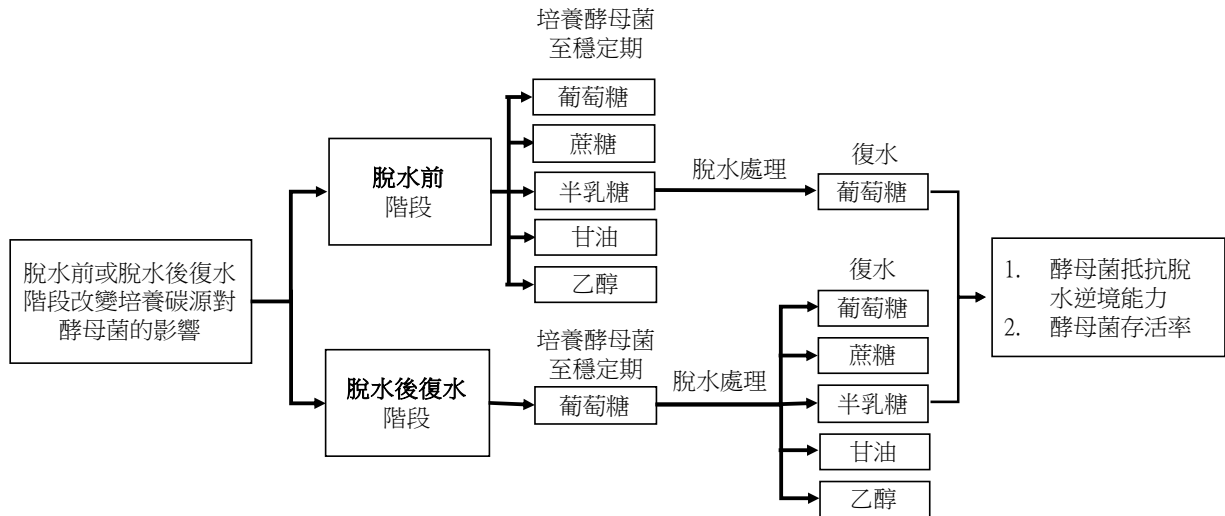
壹、研究動機

脫水技術是食品、製藥和化工等領域廣泛應用的加工方法。在酵母菌應用方面，透過這項技術去除水分，對保存和傳播重要的酵母菌菌株十分有益。而復水技術則是透過給予酵母菌充足的水分及養分，使酵母菌從乾燥狀態恢復活性以進行後續的應用。

然而，經過脫水處理的酵母菌常常出現存活率過低的問題。如製作麵包或釀酒時，常因酵母菌存活率不佳導致發酵結果不如預期，若將生產規模擴大，導致的損失將不堪設想。觀察到這個現象後，我開始思考影響酵母菌發酵結果的主因是脫水前或是復水時提供的養分不適合酵母菌所致。而在一次生物課的實驗中，發現碳源種類是影響酵母菌發酵速率的重要因素，且在定量的酵母菌粉和碳源條件時，二氧化碳產量竟有所差異。高中選修生物一課本中提到，酵母菌的能量工廠粒線體會利用不同養分作為碳源進行有氧呼吸以產生能量（于宏燦等，2023）若提供的養分不利於酵母菌維持生理功能，不僅影響當時的生長狀況，也可能導致酵母菌在脫水後復水時的存活率降低。這表明酵母菌存活率與碳源的選擇密切相關。而諾貝爾生醫獎得主大隅良典提出酵母菌對抗生存逆境的自噬作用，及文獻中酵母菌抵抗脫水逆境的能力(Mendl, Occhipinti et al. 2011)，則和粒線體分裂與融合導致的粒線體形態變化有關(Weber and Reichert 2010)。這凸顯了粒線體形態也是影響酵母菌存活率的關鍵因素之一。基於以上發現，我推測酵母菌存活率可能是影響其生長發酵的關鍵因素之一，且存活率及抵抗脫水逆境能力可能受到脫水前和脫水後復水時提供碳源種類的影響。

本研究旨在找出提高酵母菌存活率的培養方法，以及脫水前後提供碳源種類的不同對酵母菌影響之差異性。並期望將此發現應用於提升食品工業酵母菌加工方法與保存技術，增進生物醫學運送及保存特殊載體的穩定性，以及提高酵母菌生物燃料產能效率等領域。

貳、研究目的

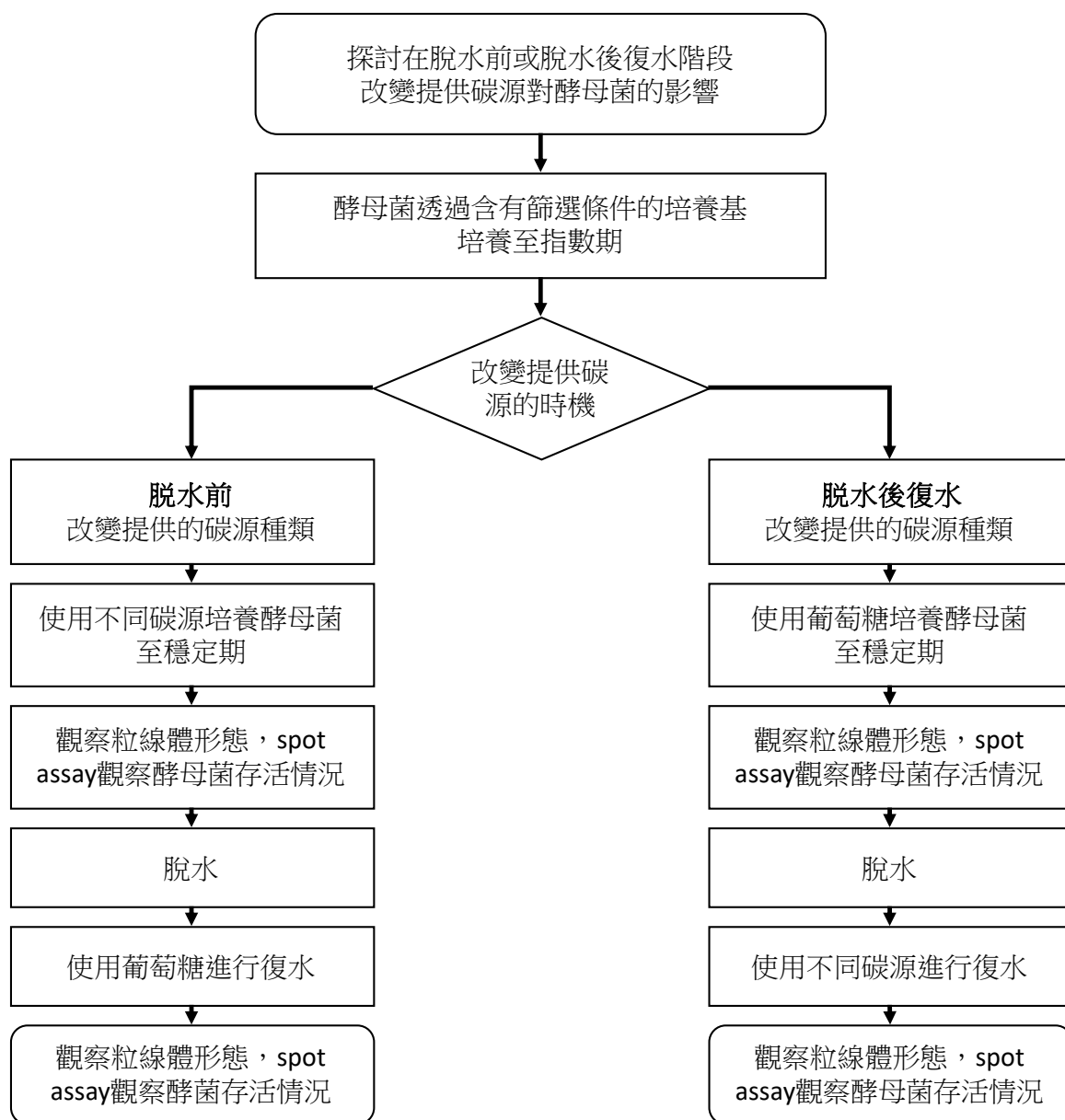


圖一、研究目的架構圖 (資料來源:作者自繪)

1. 探討脫水處理對酵母菌粒線體形態及存活率之影響。
2. 探討提供酵母菌不同**碳源**種類時抵抗脫水逆境能力及存活率之差異性。
3. 探討不同**時機**改變提供酵母菌的碳源種類，對於酵母菌抵抗脫水逆境能力及存活率影響之差異。
4. 探討酵母菌存活率與抵抗脫水逆境能力之關聯性。

參、研究方法

一、實驗流程



圖二、實驗流程圖 (資料來源:作者自繪)

二、實驗器材與藥品

(一) 器材 (所有器材皆經過滅菌)

分光光度計	離心機	微量吸管	螢光顯微鏡 及電腦	攪拌機 及攪拌子	試管振盪器
無菌操作台	滅菌鍋	30°C 培養箱	電動移液器	離心管	試管
錐形瓶	燒杯	血清瓶	酒精燈	培養皿	血清瓶 過濾組

圖三、實驗器材清單 (資料來源:作者自繪)

(二) 藥品 (所有藥品皆經過滅菌處理)

YPD medium (yeast extract, peptone, 20% dextrose, ddH ₂ O, agar)	SC Ura ⁻ medium (YNB, Drop-out powder, 20% dextrose, Amino acid (His, Leu, Trp), ddH ₂ O, agar)	磷酸緩衝生理食鹽水 (PBS)
20% 葡萄糖溶液	20% 蔗糖溶液	20% 半乳糖溶液
20% 甘油溶液	20% 乙醇溶液	二次水

圖四、實驗藥品清單 (資料來源:作者自繪)

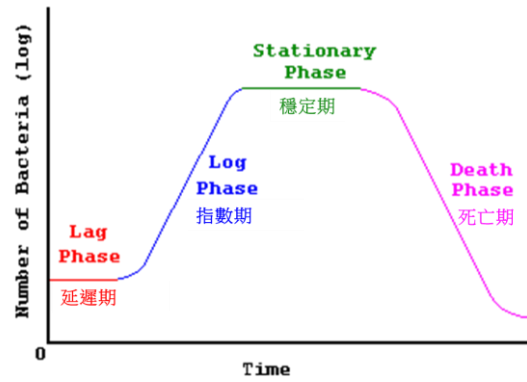
(三) 酵母菌菌株

- 1、Wild type 實驗室用野生型酵母菌 W303。
- 2、含有 pVT100U-mtGFP 基因載體之 W303 酵母菌。

三、實驗方法與步驟

(一) 觀察酵母菌生長週期選擇

本實驗的第一步即是選擇以何種生長週期階段的酵母菌作為實驗對象，透過文獻探討，我了解酵母菌的生長週期曲線如圖五所示，以及酵母菌生長週期階段和抵抗脫水能力之關聯性。發現無論生長環境是否促使酵母菌開始利用乙醇進行有氧呼吸，在脫水後復水時，從穩定期 (stationary phase) 採集的酵母菌比指數期 (log phase) 酵母菌有更高的存活率 (Chen, Chen et al. 2021)。因此本研究選擇培養至穩定期的酵母菌作為實驗對象。



圖五、酵母菌生長週期示意圖 (Emily Spiers, 2015)

(二) 提供碳源種類選擇

對於酵母菌而言，產生能量及代謝的碳源大致可分為非發酵碳源及發酵碳源 (Turcotte, Liang et al. 2010)。而非發酵碳源中，又以可以直接進入糖解作用開始產生能量的葡萄糖為酵母菌最優先利用的碳源。且先前研究指出，酵母菌粒線體動態平衡的變化可能受培養基內不同碳源而有所差異，推測葡萄糖可能是培養的關鍵成份之一 (Chen, Chen et al. 2021)。因此我將提供葡萄糖的酵母菌作為實驗的對照組，以及酵母菌抵抗脫水能力及存活率的指標。

當生存環境缺乏葡萄糖時，酵母菌也可以利用其他替代碳源如非發酵碳源的蔗糖與半乳糖產生能量，而酵母菌利用這兩種碳源前會牽涉到一連串複雜的酵素分解和基因調控才能加以利用。此外酵母菌也能透過不同調控基因 (Gasmi, Jacques et al. 2014) 和轉錄因子 (Weinhandl, Winkler et al. 2014)，來幫助其利用屬於發酵碳源的甘油和乙醇產生能量。

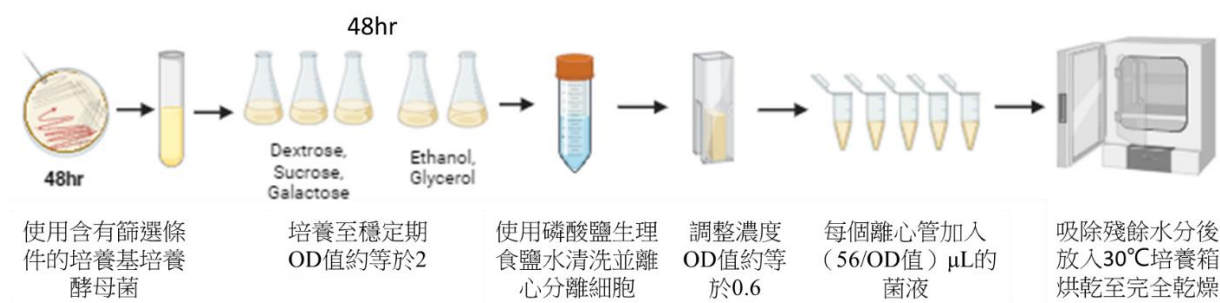
(三) 使用螢光蛋白標示酵母菌粒線體

轉殖 pVT100U-mtGFP 質體至酵母菌 W303 菌株，該質體會表現移動到粒線體基質的 Su9 蛋白，使粒線體表現綠色螢光 (Green fluorescent)，以便使用螢光顯微鏡觀察粒線體形態。

(四) 培養酵母菌

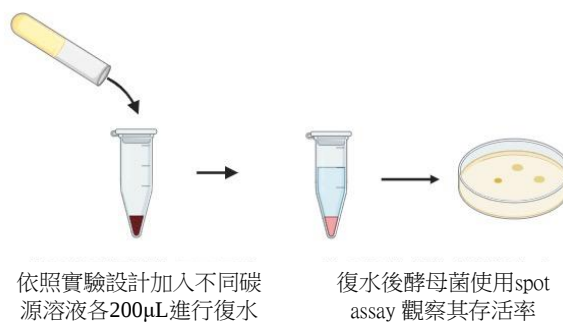
- 1、培養酵母菌單一菌落：將野生型且帶有螢光載體的酵母菌 (Wild type pVT100) 凍管從 -80°C 冰箱取出退冰，以 $10\mu\text{L}$ 菌液塗盤，放入 30°C 培養箱中培養兩天。
- 2、挑菌：將養好的菌用微量吸管頭挑起後放入 3ml 具有篩選條件的培養液中培養至指數期 (log phase)，測量 OD_{600} 值¹並定為初始 OD_{600} 值。
- 3、脫水前改變碳源組：取 20%葡萄糖、半乳糖、蔗糖、乙醇及甘油溶液各 5ml 與 YP 培養液 45ml 混合後，加入由公式²計算出的所需菌液體積，放入 30°C 培養箱中培養 48 小時至穩定期。
- 4、脫水後復水改變碳源組：取 20%葡萄糖溶液 5ml ，與 YP 培養液 45ml 混合後加入公式³計算出所需加入的菌液體積，放入 30°C 培養箱中培養 48 小時至穩定期。

(五) 酵母菌脫水處理流程



圖六、酵母菌脫水處理流程圖 (資料來源: Created with BioRender.com)

(六) 酵母菌復水處理流程



圖七、酵母菌復水處理流程圖 (資料來源: Created with BioRender.com)

¹ OD_{600} 值的意義：使用分光光度計測量吸光值 (OD_{600} 值) 確保加入每個實驗組的酵母菌量皆一致

² 菌液體積計算公式：初始 OD_{600} 值 * 需加入菌液體積 * $2^{n/2}$ (n =培養小時數) = OD_{600} 值 (接近 2) * 體積 50ml

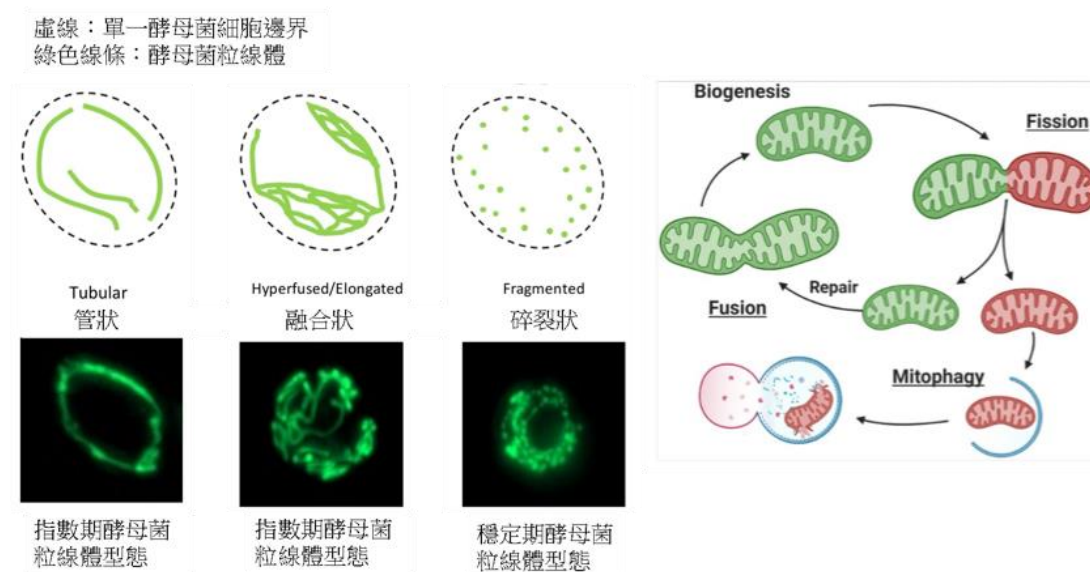
³ 菌液體積計算公式：初始 OD_{600} 值 * 需加入菌液體積 * $2^{n/2}$ (n =培養小時數) = OD_{600} 值 (接近 2) * 體積 50ml

(七) 連續稀釋菌群生長 (spot assay)

選用連續稀釋菌群生長作為判斷酵母菌存活率的指標，進行三重複實驗以觀察不同條件下酵母菌存活率高低的差異並對其存活率進行評分。使用分光光度計測量吸光值 (OD 值) 來確保加入每個實驗組的酵母菌量皆一致，由左至右稀釋使每個圓點內的酵母菌菌液稀釋倍數由左至右分別為 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 。

(八) 酵母菌抵抗脫水逆境能力指標選擇

文獻指出酵母菌粒線體形態和抵抗脫水逆境的能力相關(Mendl, Occhipinti et al. 2011)，以 GFP 螢光標定粒線體時可發現其形態在指數期大多呈管狀，少部份呈融合狀，穩定期多呈碎裂狀(Chen, Chen et al. 2021)如圖八所示。且目前已知粒線體可以透過分裂與融合產生相關基因產物恢復呼吸作用進行(Westermann 2012)，以維持自身的活性(Narendra, Jin et al. 2010)。此外粒線體碎裂時會產生去極化的粒線體，誘導粒線體碎裂分離使膜電位降低且功能受損(Twig, Hyde et al. 2008)，促使雙層膜吞噬其產生自噬體(Weber and Reichert 2010)進行自噬作用。基於以上發現，我推論碎裂形態粒線體比例與酵母菌抵抗脫水逆境相關，故選擇粒線體形態作為判定酵母菌抵抗脫水逆境能力之指標。並在顯微鏡 63 倍視野下以 100 顆酵母菌為樣本數，重複三次取酵母菌之碎裂形態粒線體比例之平均值為實驗結果。



圖八 (左)、標準狀態酵母菌粒線體形態示意圖 (資料來源：研究者整理)

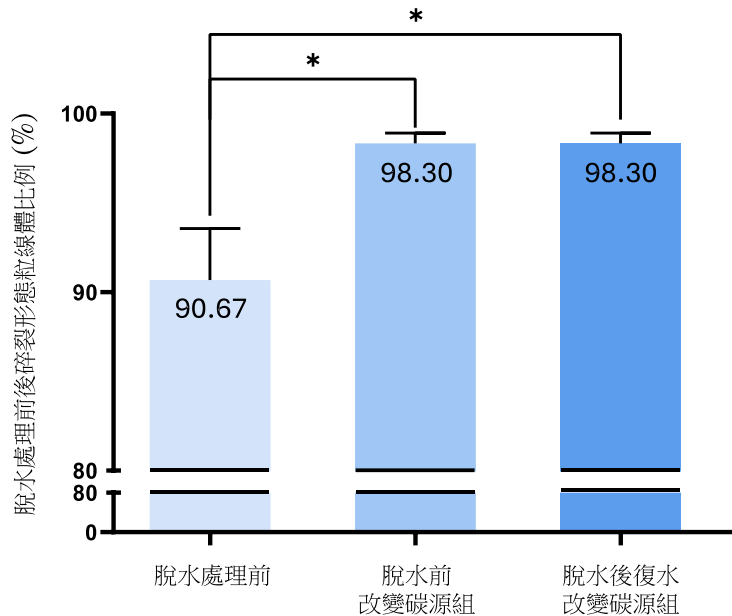
圖九 (右)、粒線體分裂與融合及自噬作用示意圖 (Fisher, Shaaeli et al. 2022)

肆、研究結果

一、脫水處理對於酵母菌為逆境且會降低酵母菌的存活率

(一) 抵抗脫水逆境能力差異

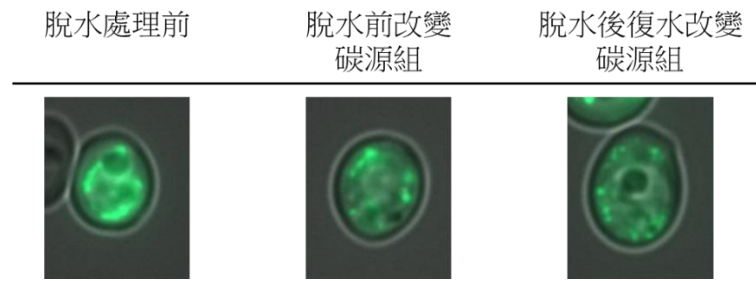
透過螢光顯微鏡，觀察提供葡萄糖作為碳源的酵母菌粒線體形態，將觀察到的粒線體形態分成管狀、融合狀以及碎裂狀三種形狀。發現脫水處理前、脫水前改變碳源組和脫水後復水改變碳源組中皆觀察到碎裂形態粒線體佔多數，比例差異如圖十、十一所示。脫水處理後的碎裂形態粒線體比例由 90.67% 大幅上升至 98.3%，且在兩組實驗組皆有相同的現象。這顯示酵母菌在復水時大多處於生長週期的穩定期，且脫水處理對於酵母菌為生存逆境，當其透過粒線體分裂與融合維持自身活性，即可觀察到碎裂形態粒線體比例增加。



圖十、脫水處理前後碎裂形粒線體比例 N=3 (資料來源：研究者整理)

(* : $p < 0.05$, * * : $p < 0.01$, * * * : $p < 0.001$)

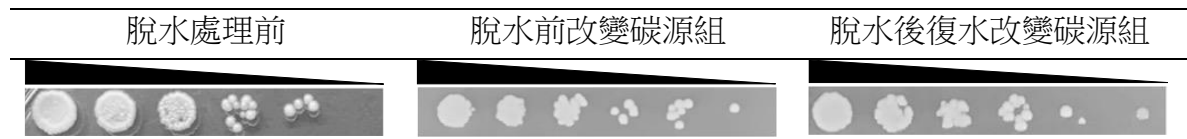
脫水處理後相較脫水處理前碎裂形態粒線體比例明顯上升，顯示酵母菌處於穩定期且脫水對酵母菌而言為生存逆境，促使酵母菌透過粒線體分裂融合維持自身活性。



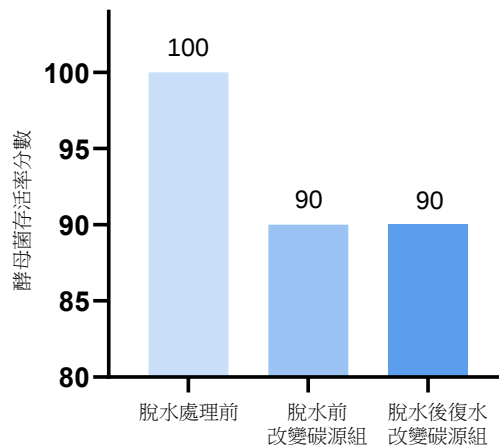
圖十一、脫水處理前後碎裂形粒線體圖 (資料來源：研究者整理)

(二) 連續稀釋菌群生長 (spot assay) 之差異

使用連續稀釋菌群生長，比較脫水前改變碳源組、脫水後復水改變碳源組與未經脫水處理酵母菌細胞的生長狀況，採取半定量方式，以菌落數目與大小將脫水處理前的存活率定為標準，訂定其存活率為滿分，並依據圖十二中的實驗結果照片評分各組存活率，評分結果如圖十三所示。結果顯示脫水前改變碳源組和脫水後復水改變碳源組的存活率分數均為 90 分，即存活細胞數相較對照組約少十倍。這表明脫水處理對酵母菌而言屬於生存逆境，使其存活率受到影響而明顯降低。



圖十二、連續稀釋菌群生長實驗結果照片 (資料來源：研究者整理)



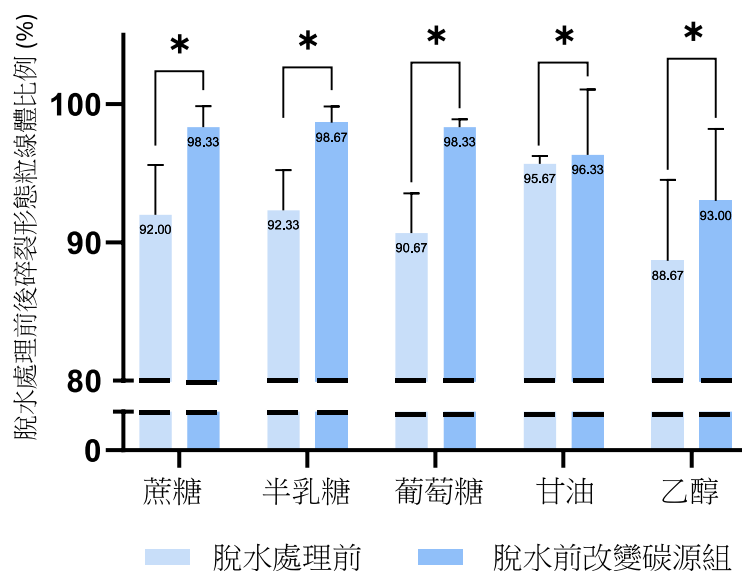
圖十三、脫水處理前後酵母菌存活率分數 N=3 (資料來源：研究者整理)

脫水處理後相較脫水處理前存活率分數下降，顯示脫水處理會降低酵母菌的存活率。

二、脫水處理前階段提供不同碳源養分種類對於酵母菌抵抗脫水逆境能力和存活率有差異

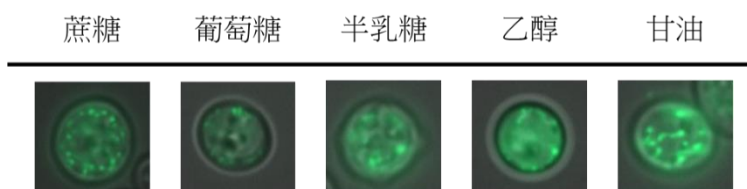
(一) 抵抗脫水逆境能力差異

透過螢光顯微鏡觀察在脫水前階段提供不同碳源的酵母菌粒線體形態，將觀察到的粒線體形態分成管狀、融合狀以及碎裂狀三種形狀。發現碎裂形態粒線體佔多數，且五種碳源培養的酵母菌在復水後碎裂形態粒線體比例皆呈現上升的趨勢。顯示酵母菌在不同碳源環境下培養，脫水處理時皆有抵抗脫水逆境的能力，而能力強弱會因提供碳源種類不同有所差異。根據圖十四、十五所示，其碎裂形態粒線體比例較脫水前增加百分比分別為葡萄糖 7.63%、蔗糖與半乳糖 6.3%、乙醇 4.33%以及甘油 0.63%。依增加之百分比大小可推論抵抗脫水逆境能力排序為葡萄糖>蔗糖 $\approx$ 半乳糖>乙醇>甘油。



圖十四、不同碳源條件下的碎裂形粒線體比例 N=3 (資料來源：研究者整理)
(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$)

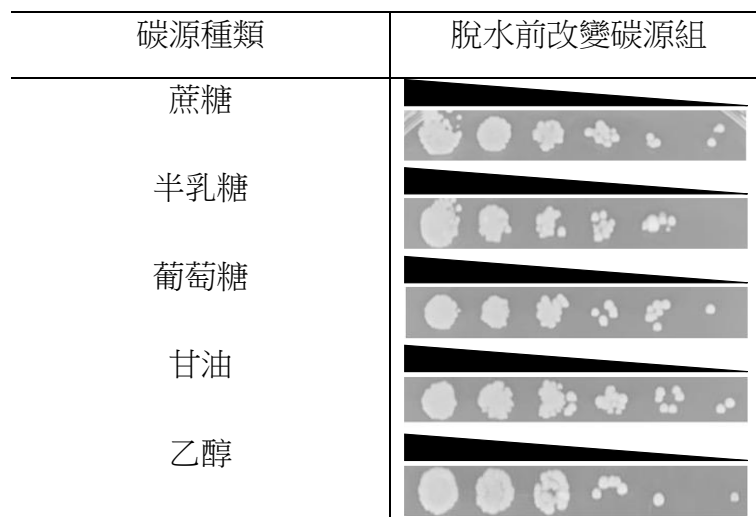
脫水前改變碳源組的酵母菌在復水後碎裂形態粒線體比例皆增加，依增加的比例大小可得知脫水前不同碳源培養的酵母菌抵抗脫水逆境能力排序為葡萄糖>蔗糖 $\approx$ 半乳糖>乙醇>甘油。



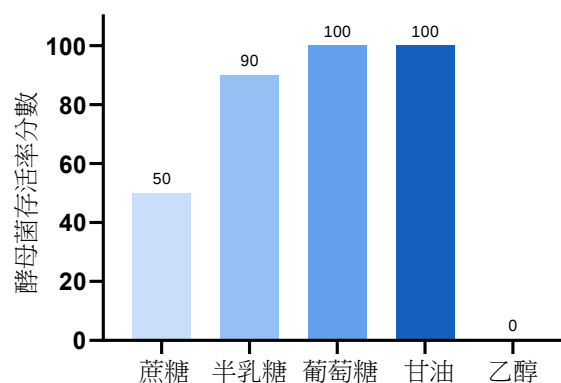
圖十五、不同碳源條件下的碎裂形粒線體圖 (資料來源：研究者整理)

(二) 連續稀釋菌群生長 (spot assay) 之差異

透過連續稀釋菌群生長，將脫水前改變碳源組中不同碳源培養的酵母菌與脫水處理前後皆使用葡萄糖作為碳源的酵母菌進行存活率比較。採取半定量方式，以菌落的數目與大小將脫水前後皆使用葡萄糖作為碳源的酵母菌為標準，訂定其存活率為滿分。依據圖十六中的實驗結果照片評分各組存活率，評分結果如圖十七所示。其中乙醇為 0 分，即比對照組存活細胞數量少約 100 倍。蔗糖為 50 分，即比對照組存活細胞數量少約 50 倍。半乳糖為 90 分，則比對照組存活細胞數量少 10 倍，而以葡萄糖及甘油作為碳源的酵母菌則有相近的存活細胞數。因此可得知在脫水前階段提供酵母菌不同碳源時，酵母菌存活率高低排序為葡萄糖 $\cong$ 甘油>半乳糖>蔗糖>乙醇。



圖十六、連續稀釋菌群生長實驗結果照片(資料來源：研究者整理)

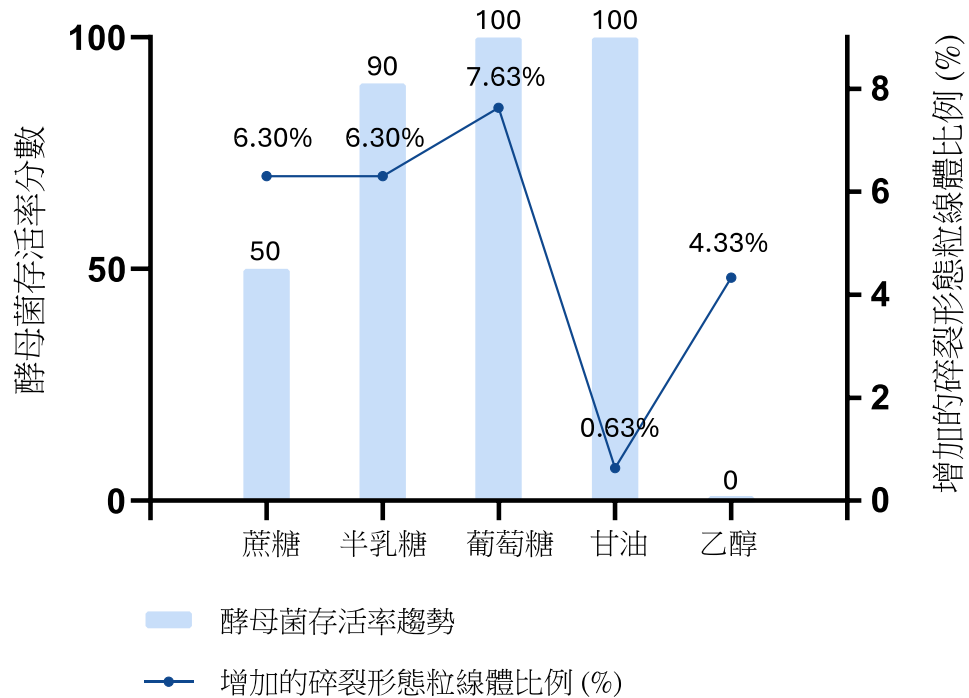


圖十七、不同碳源條件下酵母菌存活率分數 N=3 (資料來源：研究者整理)

依存活率分數可得知脫水前改變碳源酵母菌存活率排序為葡萄糖 $\cong$ 甘油>半乳糖>蔗糖>乙醇。

(三) 趨勢比較

比較不同碳源培養的酵母菌之碎裂形態粒線體比例以及存活率的差異，可以發現兩者的趨勢存在差異，比較結果如圖十八所示。其中使用甘油培養的酵母菌其增加碎裂形態粒線體比例較乙醇少 3.7%，但存活率分數較乙醇培養的酵母菌高 100 分。此外使用半乳糖及蔗糖培養的酵母菌雖然碎裂形態粒線體比例皆為 6.30%，但存活率分數卻相差了 40 分。



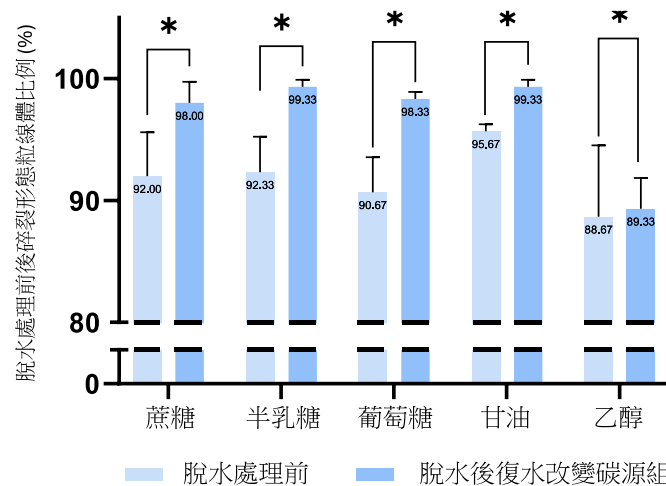
圖十八、脫水前階段不同碳源條件下酵母菌碎裂形態粒線體增加比例與存活率分數趨勢比較 (資料來源：研究者整理)

碎裂形態粒線體比例以及存活率趨勢之間存在差異，又以甘油與乙醇，蔗糖與半乳糖之間較為顯著。

三、脫水後復水階段提供不同碳源養分種類對於酵母菌抵抗脫水逆境能力和存活率有差異

(一) 粒線體形態比例差異

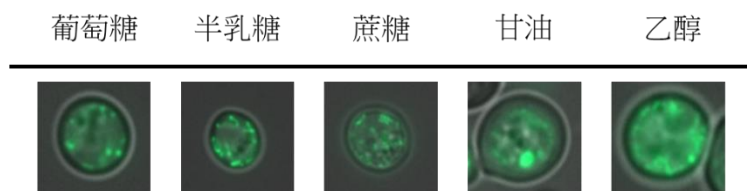
透過螢光顯微鏡觀察在脫水後復水階段提供不同碳源的酵母菌粒線體形態，將觀察到的粒線體形態分成管狀、融合狀以及碎裂狀三種形狀。發現碎裂形態粒線體佔多數。且五種碳源復水的酵母菌在復水後碎裂形態粒線體比例皆有上升的趨勢。這表明酵母菌在不同碳源環境下，脫水處理時皆有抵抗脫水逆境的能力。其中能力強弱則會因為提供碳源不同而有所差異。根據圖十九、二十所示，其碎裂形態粒線體比例增加百分比分別為葡萄糖 7.63%、半乳糖 6.97%、蔗糖 6.00%、甘油 3.63%以及乙醇 0.63%。依增加之百分比大小可推論抵抗脫水逆境能力排序為葡萄糖>半乳糖>蔗糖>甘油>乙醇。



圖十九、不同碳源條件下的碎裂形粒線體比例 N=3 (資料來源：研究者整理)

(* : $p < 0.05$, * * : $p < 0.01$, * * * : $p < 0.001$)

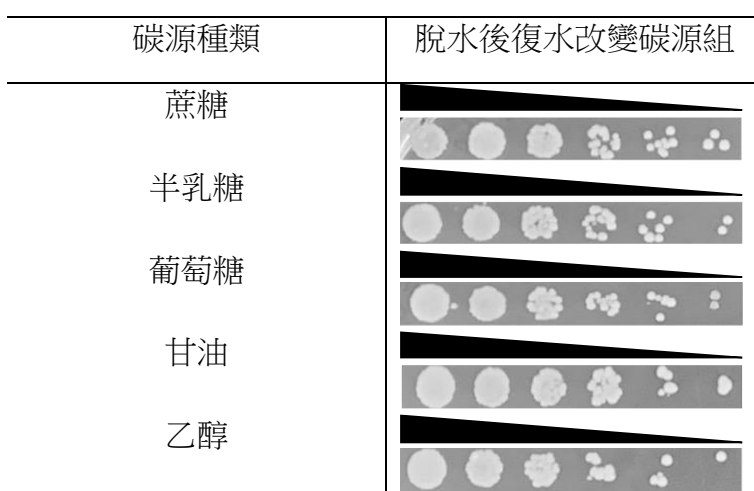
五種碳源復水的酵母菌在復水時碎裂形態粒線體比例皆增加，依增加的比例可得知不同碳源復水的酵母菌抵抗脫水逆境能力排序為葡萄糖>半乳糖>蔗糖>甘油>乙醇。



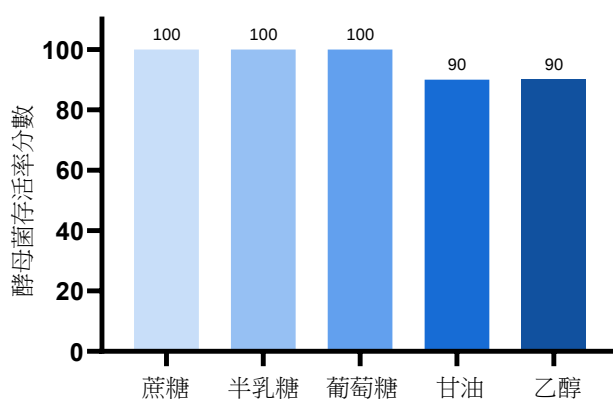
圖二十、不同碳源條件下的碎裂形粒線體圖 (資料來源：研究者整理)

(二) 連續稀釋菌群生長 (spot assay) 之差異

透過連續稀釋菌群生長，將脫水後復水改變碳源組中不同碳源復水的酵母菌與脫水處理前後皆使用葡萄糖作為碳源的酵母菌進行存活率比較。採取半定量方式，以菌落的數目與大小將脫水前後皆使用葡萄糖作為碳源的酵母菌定為標準，訂定其存活率為滿分。依據圖二十一中的實驗結果照片評分各組存活率，評分結果如圖二十二所示。其中乙醇及甘油為 90 分，即比對照組存活細胞數少約 10 倍，而葡萄糖、半乳糖、蔗糖則有相近的存活細胞數目。因此可得知在脫水後復水階段提供酵母菌不同碳源時，酵母菌存活率高低排序為葡萄糖 $\cong$ 半乳糖 $\cong$ 蔗糖>甘油 $\cong$ 乙醇。



圖二十一、連續稀釋菌群生長實驗結果照片 (資料來源：研究者整理)

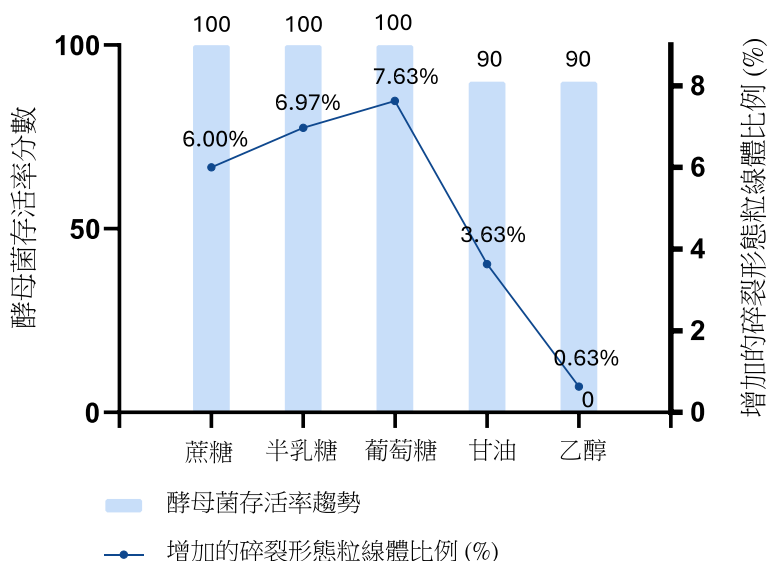


圖二十二、不同碳源條件下酵母菌存活率分數 N=3 (資料來源：研究者整理)

依存活率分數可得知不同碳源復水的酵母菌存活率排序為葡萄糖 $\cong$ 蔗糖 $\cong$ 半乳糖>甘油 $\cong$ 乙醇。

(三) 趨勢比較

比較不同碳源復水的酵母菌之碎裂形態粒線體比例以及存活率的差異，可以發現兩者趨勢存在差異，比較結果如圖二十三所示。其中使用蔗糖、半乳糖以及葡萄糖培養的酵母菌其增加碎裂形態粒線體比例雖有所差異，但存活率分數卻同為 100 分。此外使用甘油及乙醇培養的酵母菌其增加碎裂形態粒線體比例雖相差了 3.00%，但存活率分數同為 90 分。



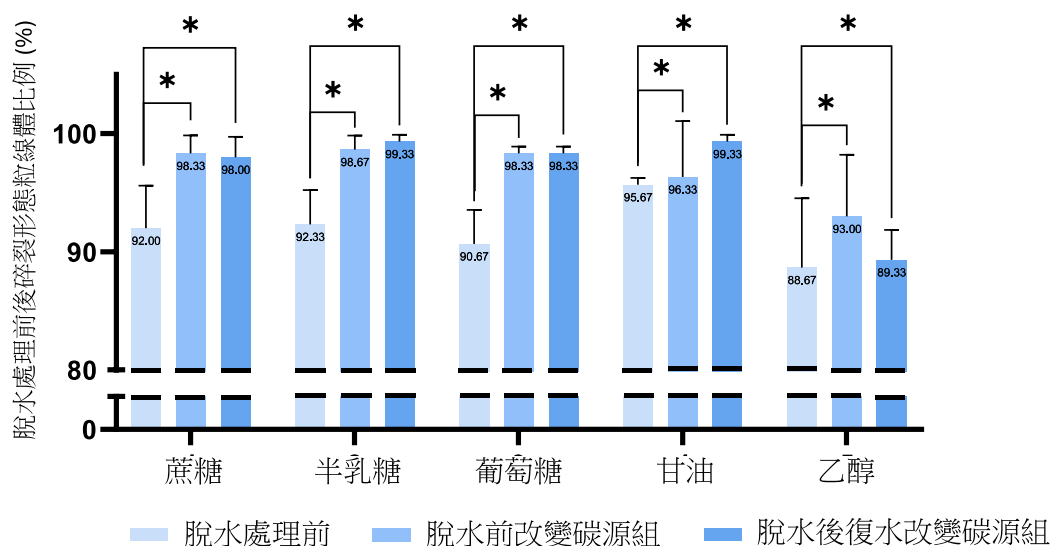
圖二十三、脫水後復水階段不同碳源條件下酵母菌碎裂形態粒線體增加比例與存活率分數趨勢比較圖 (資料來源：研究者整理)

酵母菌碎裂形態粒線體增加比例與存活率分數趨勢之間存在差異，又以蔗糖、半乳糖與葡萄糖之間，甘油與乙醇之間較為顯著。

四、不同時機改變提供碳源對於酵母菌抵抗脫水逆境能力和存活率有差異

(一) 粒線體形態比例差異

透過螢光顯微鏡觀察脫水前改變碳源組以及脫水後復水改變碳源組的酵母菌粒線體形態，將觀察到的粒線體形態分成管狀、融合狀以及碎裂狀三種形狀。觀察到碎裂形態的粒線體佔多數，且無論在脫水前或脫水後復水階段改變提供的碳源種類，碎裂形態粒線體比例皆比脫水處理前的酵母菌高。顯示兩種時機改變提供的碳源，脫水處理時皆有抵抗脫水逆境的能力。而能力強弱則會因為不同時機改變提供碳源種類有所差異，如圖二十四所示。脫水前提供蔗糖和乙醇作為碳源時，酵母菌碎裂形態粒線體比例分別為 98.33%和 93.00%，比脫水後復水組的 98.00%和 89.33%分別高出 0.33%和 3.67%，指出在脫水前階段提供這兩種碳源，對酵母菌影響較大使其抵抗脫水能力較佳。脫水後復水階段提供半乳糖和甘油作為碳源時，酵母菌碎裂形態粒線體比例皆為 99.33%，比脫水前組的 98.67%和 96.33%分別高出 0.63%和 3.00%。指出在脫水後復水階段使用提供這兩種碳源，對酵母菌影響較大使其抵抗脫水能力較佳。



圖二十四、不同時機改變提供碳源種類時酵母菌的碎裂形態粒線體比例圖 N=3

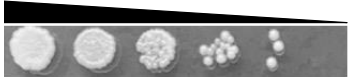
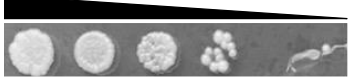
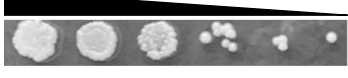
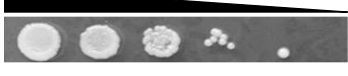
(資料來源：研究者整理)

(* : $p < 0.05$, * * : $p < 0.01$, * * * : $p < 0.001$)

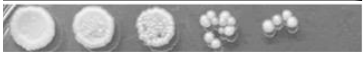
兩組實驗組中提供五種碳源的酵母菌，脫水處理後碎裂形態粒線體形態比例皆增加，且依增加的比例可得知，脫水前階段提供蔗糖和乙醇作為碳源對酵母菌影響較大，脫水後復水階段提供半乳糖及甘油作為碳源對酵母菌影響較大。

(二) 連續稀釋菌群生長 (spot assay) 之差異

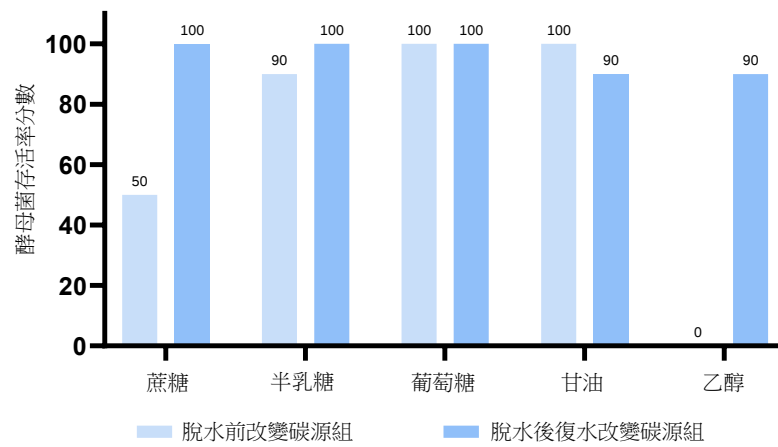
透過連續稀釋菌群生長，分別將脫水前改變碳源組以及脫水後復水改變碳源組中提供不同碳源的酵母菌與脫水處理前後皆提供葡萄糖作為碳源的酵母菌進行存活率比較。採取半定量方式，將脫水前後皆使用葡萄糖作為碳源的酵母菌存活率為標準，訂定其存活率為滿分。依據圖二十五及圖二十六中的實驗結果照片進行評分各組存活率，評分結果如圖二十七所示。發現脫水前階段改變提供的碳源種類會使酵母菌存活率差異性更顯著。因此可以推論脫水前培養酵母菌的碳源是影響其存活率的重要因素。

碳源種類	脫水處理前	脫水前改變碳源組
蔗糖		
半乳糖		
葡萄糖		
甘油		
乙醇		

圖二十五、脫水前階段改變提供碳源時連續稀釋菌群生長實驗結果照片
(資料來源：研究者整理)

碳源種類	脫水處理前	脫水後復水改變碳源組
蔗糖		
半乳糖		
葡萄糖		
甘油		
乙醇		

圖二十六、脫水後復水階段改變提供碳源時連續稀釋菌群生長實驗結果照片
(資料來源：研究者整理)

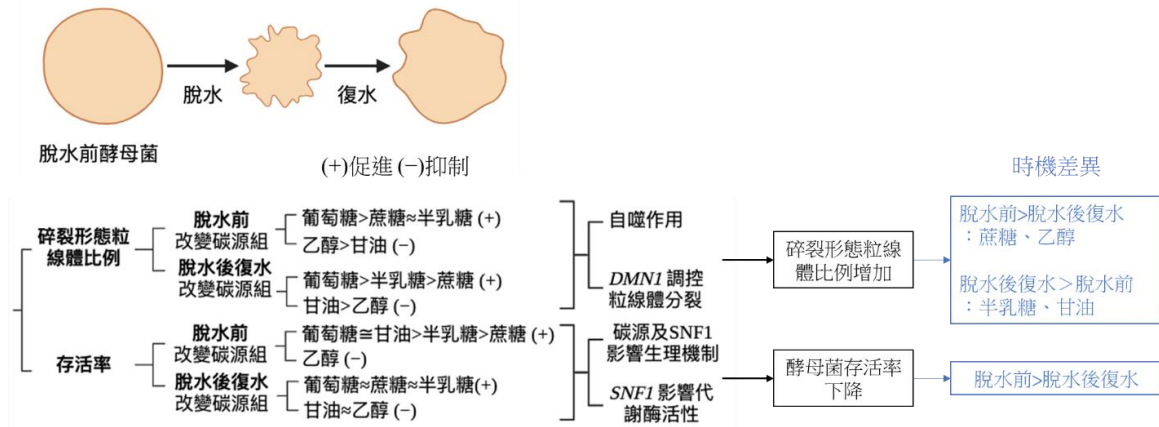


圖二十七、不同時機改變提供碳源時酵母菌存活率分數 N=3
(資料來源：研究者整理)

依存活率分數可得知脫水前階段改變碳源會使酵母菌存活率差異更顯著，推論脫水前階段使用不同碳源是影響酵母菌存活率的重要因素。

伍、討論

一、實驗建模



圖二十八、實驗建模架構圖 (資料來源:作者自繪)

二、脫水處理對酵母菌影響之探討

文獻指出，脫水處理對酵母菌的細胞結構和代謝會產生負面影響，如造成細胞中膜狀胞器受損，以及細胞乾燥時更容易氧化導致其存活率降低(Pereira Ede, Panek et al. 2003)。此外酵母菌面對生存逆境時，可透過粒線體分裂與融合，避免細胞營養匱乏時蛋白質錯誤降解而破壞細胞。且粒線體短期的分裂融合和酵母菌的自噬作用密切相關(Sprenger and Langer 2019)，透過自噬作用分解需淘汰的胞器，並將胞器組成物質重新回收作為新胞器的原料。這顯示酵母菌粒線體分裂與融合有助於細胞調控生理機制，幫助其在生存逆境中維持活性。實驗結果中的圖十顯示，復水時酵母菌碎裂形態粒線體比例增加，驗證了酵母菌在面臨脫水生存逆境時，透過粒線體的分裂與融合來維持自身活性。

三、改變提供碳源對酵母菌的影響

(一) 抵抗脫水逆境能力

兩組實驗的結果中，發現以葡萄糖作為碳源的酵母菌抵抗脫水逆境的能力最強，透過文獻可以推論因為葡萄糖是酵母菌進行有氧呼吸最直接利用的碳源，故有助酵母菌進行自噬作用淘汰受損的胞器以維持活性。除此之外，我也發現酵母菌在葡萄糖、蔗糖及半乳糖條件下，碎裂形態粒線體比例明顯大於乙醇與甘油。推論因

DNM1(Dynamin-1)是調控粒線體分裂的關鍵基因，會促使酵母菌粒線體在葡萄糖碳源缺乏的幾分鐘內進行分裂(Otsuga, Keegan et al. 1998)。且使用非發酵碳源進行有氧呼吸時，酵母菌會產生較多的活性氧物質(Grant, MacIver et al. 1997)，導致其胞器受到損害。

此外在脫水前改變碳源組的實驗結果中，我發現甘油和乙醇雖然皆屬於非發酵碳源，卻觀察到乙醇增加的碎裂形態粒線體比例大於甘油。透過文獻探討，推論提供乙醇作為碳源時，其成分會破壞細胞胞器的膜狀構造，導致胞器受損(Kitagaki, Araki et al. 2007)，進而促使酵母菌進行自噬作用來淘汰受損胞器。反之脫水後復水改變碳源組，則可發現提供甘油作為碳源時增加的碎裂形態粒線體比例大於乙醇，推論甘油復水的酵母菌抵抗脫水逆境能力優於乙醇。

(二) 存活率

文獻中指出 *SNF1*(Sucrose Nonfermenting)對於酵母菌使用不同碳源代謝的機制極為重要，當酵母菌改為利用葡萄糖以外的碳源如蔗糖、半乳糖和乙醇時，*SNF1* 會透過調控基因組直接影響代謝酶活性(Hedbacker and Carlson 2008)。此外，*SNF1* 也會參與調節細胞在面臨生存環境壓力時的生理機制(Hedbacker and Carlson 2008)。基於以上我推論提供酵母菌不同碳源時，*SNF1* 的機制調控是影響酵母菌代謝養分及存活率的重要因素。

脫水前改變碳源組的實驗結果中，發現分屬於非發酵碳源的葡萄糖及發酵碳源的甘油所培養的酵母菌竟有相近的存活率，推論因甘油能在酵母菌缺乏葡萄糖時提供養分外，也能作為氧化還原平衡及滲透壓調節的因子(Pagliardini, Hubmann et al. 2013)，透過調節提高酵母菌耐受性使其存活率較高。反之同為發酵碳源的乙醇，因會損害細胞的 DNA 導致酶失去活性，增加不飽和脂肪酸的含量使細胞內膜狀胞器受損(You, Rosenfield et al. 2003)，還會影響酵母菌內養分的運輸(van Uden 1985)，被視為酵母菌生長的抑制劑，導致提供酵母菌乙醇作為碳源時存活率明顯下降。

在脫水後復水改變碳源組的實驗結果中，發現提供非發酵碳源的葡萄糖、半乳糖及蔗糖作為碳源的酵母菌，三者所復水的酵母菌有相近的存活率。顯示使用這三種碳源復水的酵母菌，對其存活率的影響差異不大。另外脫水後復水階段提供甘油及乙醇作為碳源的酵母菌，兩者所復水的酵母菌也有相近的存活率，顯示在脫水後復水階段使用這兩種碳源，影響酵母菌存活率的差異也不明顯。

（三） 提供不同碳源酵母菌抵抗脫水能力與存活率之關聯性

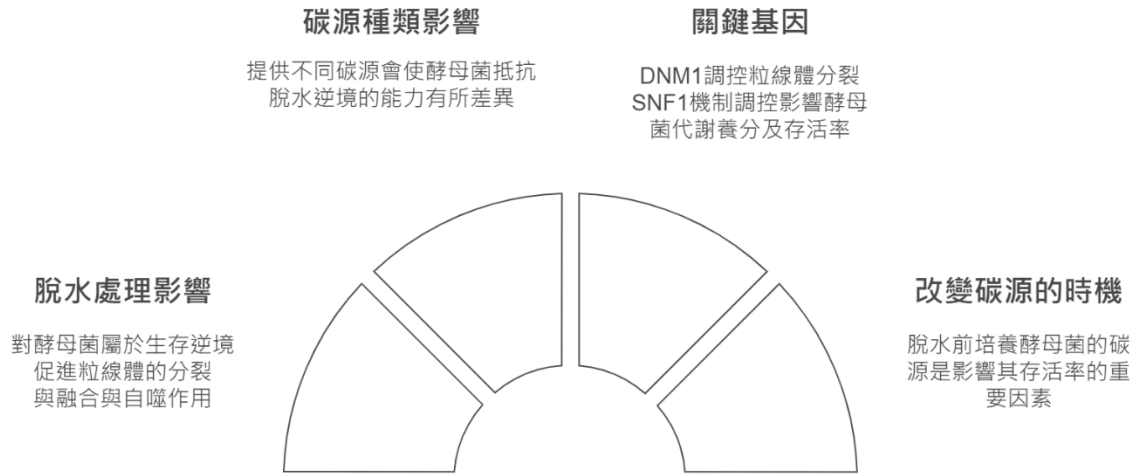
實驗結果圖十八與圖二十三中，觀察到增加的碎裂形態粒線體比例和存活率兩者趨勢具有差異性。推測粒線體形態無法直接作為存活率的判斷依據。碎裂形態粒線體比例主要反映酵母菌對外部環境壓力的適應性，無論提供的碳源是否適合酵母菌生存，酵母菌仍會通過調控粒線體的分裂與融合來維持活性。然而，酵母菌的存活率除了受抵抗脫水逆境能力影響，還需考慮細胞內生理調節機制和代謝途徑等多項因素。而存活率即能反映酵母菌在提供不同碳源時受各項變因的影響。

四、不同階段改變提供碳源種類對酵母菌的影響

依據圖二十四及圖二十七中的結果顯示，脫水前以及脫水後復水階段改變提供的碳源對酵母菌抵抗脫水逆境能力及存活率的影響不盡相同。推測在脫水前以及脫水後復水這兩個階段改變碳源種類對酵母菌有不同的意義和影響力。

脫水前不同碳源培養主要影響酵母菌利用碳源進行代謝及產生能量的效果，當酵母菌在脫水前處於有利於其生存的碳源環境下，會促使酵母菌在脫水時抵抗脫水逆境的能力較佳，因此在復水後會觀察到不同碳源條件下酵母菌碎裂形態粒線體比例和存活率的差異。而脫水後復水時提供不同碳源，則主要影響酵母菌從脫水狀態恢復活性的程度。若碳源不利於酵母菌恢復活性，就能在復水後觀察到不同碳源條件下酵母菌碎裂形態粒線體比例和存活率的差異。

陸、結論



圖二十九、結論架構圖 (資料來源:作者自繪)

一、脫水處理對酵母菌的影響

- (一) 酵母菌在脫水處理後，碎裂形態粒線體比例增加且存活率下降。顯示脫水處理對酵母菌屬於生存逆境，此時酵母菌會透過粒線體的分裂與融合維持活性，並透過自噬作用來淘汰受損胞器。

二、脫水前提供不同碳源對酵母菌的影響

- (一) 觀察復水後的酵母菌，大部分處於生長週期的穩定期。脫水前提供不同碳源會使酵母菌抵抗脫水逆境的能力有所差異。其中提供葡萄糖作為碳源時，酵母菌抵抗脫水逆境的能力最佳，推論因葡萄糖可直接參與有氧呼吸並促進自噬作用。反之提供乙醇作為碳源會對酵母菌的 DNA 和膜狀胞器造成損害，導致其抵抗脫水逆境的能力最低。且 *DNM1* 是調控粒線體分裂的關鍵基因，能促使粒線體進行分裂。
- (二) 脫水前階段提供不同碳源會使酵母菌存活率有所差異，且以葡萄糖與甘油作為碳源的酵母菌存活率最佳，推論甘油在提供養分的同時，能調節細胞內的氧化還原平衡和滲透壓，進而維持細胞存活。反之乙醇對酵母菌生長則具有抑制作用，使其存活率最低。且 *SNF1* 的機制調控是影響酵母菌代謝養分及存活率的重要因素。

(三) 脫水處理前提供不同碳源時，碎裂形態粒線體比例和存活率趨勢存在差異。其中又以甘油與乙醇，蔗糖與半乳糖之間較為顯著，推論酵母菌的存活率除了受抵抗脫水逆境能力影響，也會受到細胞內生理調節機制和代謝途徑等多項因素影響。

三、脫水後復水提供不同碳源對酵母菌的影響

(一) 觀察復水後的酵母菌，大部分處於生長週期的穩定期，脫水後復水提供不同碳源會使酵母菌抵抗脫水逆境的能力有所差異，其中提供葡萄糖作為碳源時，酵母菌抵抗脫水逆境能力最強，推論因葡萄糖直接參與有氧呼吸並促進了自噬作用。此外使用甘油復水酵母菌其抵抗脫水逆境能力優於乙醇。且 *DNMI* 是調控粒線體分裂的關鍵基因，能促使粒線體進行分裂。

(二) 脫水後復水提供不同碳源會使酵母菌存活率有所差異，且以葡萄糖、蔗糖與半乳糖作為碳源的酵母菌存活率最佳，推論復水時使用這三種碳源有助於酵母菌恢復活性。反之甘油與乙醇則不利酵母菌恢復活性。且 *SNF1* 的機制調控是影響酵母菌代謝養分及存活率的重要因素。

(三) 脫水後復水提供不同碳源時，碎裂形態粒線體比例和存活率趨勢存在差異。其中又以蔗糖、半乳糖與葡萄糖，甘油與乙醇之間較為顯著。推論酵母菌的存活率除了受抵抗脫水逆境能力影響，也會受到細胞內生理調節機制和代謝途徑等多項因素影響。

四、不同時機改變提供碳源對於酵母菌抵抗脫水逆境能力和存活率的影響

(一) 脫水前階段提供蔗糖和乙醇作為碳源對酵母菌影響較大，有較佳的抵抗脫水逆境能力，反之脫水後復水階段提供半乳糖及甘油作為碳源對酵母菌影響較大而能力較強。

(二) 脫水前階段改變提供的碳源種類使不同碳源下的酵母菌存活率差異性較脫水後復水階段顯著，顯示脫水前培養酵母菌的碳源是影響其存活率的重要因素。

(三) 透過抵抗脫水能力及存活率趨勢差異，推測在脫水前以及脫水後復水兩階段改變碳源種類對酵母菌有不同的意義和影響力。

柒、應用及未來展望

一、研究應用

- (一) 透過瞭解脫水前階段改變培養碳源對酵母菌存活率的影響，能夠為使用酵母菌進行的食品、製藥及化工等工業提供培養方法使酵母菌存活率、利用效率提高，藉此降低生產成本及確保產品的品質穩定性。
- (二) 使消費者在復水酵母菌時，透過對適合酵母菌的碳源有更完善的了解，使自製麵包或釀酒時減少失敗機率，減少酵母菌菌株因存活率不佳造成浪費的問題，並降低製作之難易度。提供食品工業廠商提高復水時酵母菌存活率的方法，改進酵母菌的加工方法與保存技術，增加產品的穩定性與可重複性。
- (三) 了解酵母菌在不同碳源條件下的存活率和抵抗脫水能力，有助於增進生物醫學領域使用酵母菌作為運送及保存特殊載體的穩定性，以及利用酵母菌粒線體作為研究模式生物時，為研究針對粒線體的藥物潛在機制及粒線體功能障礙引起疾病領域有貢獻。
- (四) 有助於提高用於生物修復的功能有效淨化環境中的重金屬 (Rapoport, Turchetti et al. 2016)，及改進作為生物燃料酵母菌的培養過程，進而提高產能效率和降低成本。

二、未來展望

- (一) 探討酵母菌碳源代謝路徑相關基因，以深入瞭解提供酵母菌不同碳源時酵母菌的代謝路徑，以及脫水處理下對於代謝機制分子層次的影響，深入瞭解酵母菌在不同碳源條件下存活率差異的因素。
- (二) 探討在釀酒、製作麵包或其他食品中所需達到的目標存活率，透過本次實驗得知提高酵母菌抵抗脫水逆境能力與存活率最適合的碳源種類，未來找出使酵母菌達到目標存活率的條件，進而降低生產成本或確保產品的穩定性。
- (三) 使用輔助軟體分析螢光顯微鏡下粒線體形態，進而更精準判定所觀察到的粒線體形態。

(四) 透過探討酵母菌分子層次機制，對提供不同碳源酵母菌抵抗脫水能力與存活率之關聯性，以及不同階段改變提供碳源種類對酵母菌的影響有更深入的了解。

捌、參考資料

1. 于宏燦、黃偉邦、楊尚達、賴廷倫（2023 年 8 月）。普通型高級中等學校選修生物 I 全一冊
2. Chen, C. L., Y. C. Chen, W. L. Huang, S. Lin, R. Daugelavicius, A. Rapoport and C. R. Chang (2021). "A Crucial Role of Mitochondrial Dynamics in Dehydration Resistance in *Saccharomyces cerevisiae*." Int J Mol Sci **22**(9).
3. Fisher, C. R., A. A. Shaaeli, M. C. Ebeling, S. R. Montezuma and D. A. Ferrington (2022). "Investigating mitochondrial fission, fusion, and autophagy in retinal pigment epithelium from donors with age-related macular degeneration." Scientific Reports **12**(1): 21725.
4. Gasmi, N., P. E. Jacques, N. Klimova, X. Guo, A. Ricciardi, F. Robert and B. Turcotte (2014). "The switch from fermentation to respiration in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the Ert1 transcriptional activator/repressor." Genetics **198**(2): 547-560.
5. Grant, C. M., F. H. MacIver and I. W. Dawes (1997). "Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Letters **410**(2): 219-222.
6. Hedbacker, K. and M. Carlson (2008). "SNF1/AMPK pathways in yeast." Front Biosci **13**: 2408-2420.
7. Kitagaki, H., Y. Araki, K. Funato and H. Shimoï (2007). "Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway." FEBS Lett **581**(16): 2935-2942.
8. Mendl, N., A. Occhipinti, M. Müller, P. Wild, I. Dikic and A. S. Reichert (2011). "Mitophagy in yeast is independent of mitochondrial fission and requires the stress response gene WHI2." Journal of Cell Science **124**(8): 1339-1350.
9. Otsuga, D., B. R. Keegan, E. Brisch, J. W. Thatcher, G. J. Hermann, W. Bleazard and J. M. Shaw (1998). "The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast." J Cell Biol **143**(2): 333-349.
10. Pagliardini, J., G. Hubmann, S. Alfenore, E. Nevoigt, C. Bideaux and S. E. Guillouet (2013). "The metabolic costs of improving ethanol yield by reducing glycerol formation capacity under anaerobic conditions in *Saccharomyces cerevisiae*." Microb Cell Fact **12**: 29.
11. Pereira Ede, J., A. D. Panek and E. C. Eleutherio (2003). "Protection against oxidation during dehydration of yeast." Cell Stress Chaperones **8**(2): 120-124.
12. Sprenger, H. G. and T. Langer (2019). "The Good and the Bad of Mitochondrial Breakups." Trends Cell Biol **29**(11): 888-900.

13. Turcotte, B., X. B. Liang, F. Robert and N. Soontornngun (2010). "Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast." FEMS Yeast Res **10**(1): 2-13.
14. Twig, G., B. Hyde and O. S. Shirihai (2008). "Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: The bioenergetic view." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1777**(9): 1092-1097.
15. van Uden, N. (1985). Chapter 2 - Ethanol Toxicity and Ethanol Tolerance in Yeasts. Annual Reports on Fermentation Processes. G. T. Tsao, Elsevier. **8**: 11-58.
16. Weber, T. A. and A. S. Reichert (2010). "Impaired quality control of mitochondria: aging from a new perspective." Exp Gerontol **45**(7-8): 503-511.
17. Weinhandl, K., M. Winkler, A. Glieder and A. Camattari (2014). "Carbon source dependent promoters in yeasts." Microb Cell Fact **13**: 5.
18. Westermann, B. (2012). "Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1817**(10): 1833-1838.
19. You, K. M., C. L. Rosenfield and D. C. Knipple (2003). "Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content." Appl Environ Microbiol **69**(3): 1499-1503.

【評語】 070005

脫水技術，對於酵母菌的保存及其應用於食品及製藥等相關產業，具有相當的經濟重要性。本研究探討脫水逆境下，碳源對酵母菌抵抗脫水能力及存活率的影響。實驗動機良好，並獲初步結果，值得肯定。然而就研究內容及撰寫上，相關的對照組及獲得結論的描述可更詳實，以增加研究的說服力。

相關建議如下：

1. 酵母菌的保存及其應用，已相當廣泛及成熟，研究內容的撰寫應加入，並且結果應與現今流程及存活率進行比較及討論！
2. 圖十二實驗結果照片評分各組存活率，評分結果標示如圖十三，應呈現統計分析。
3. 圖 16 與圖 17 實驗結果，未能呈現一致性結果！圖 16 各組序列稀釋結果差異不大；而乙醇處理組圖 16 序列稀釋，仍有相當存活，而於圖 17 存活率分數為零，應提出解釋及說明。
4. 圖 15 與圖 20 實驗結果，碎裂形粒線體的判讀及計數，應提出說明，或更為客觀或輔以影像自動判讀。
5. 所有的圖表皆須有詳盡的說明，不宜僅列出標題。
6. 摘要中描述酵母菌能透過粒線體分裂與融合（與 DNM1 相關）維持活性。然實驗中並未針對 DNM1 及 SNF1 機制進行相關實驗，建議應強化討論部分。