

投稿類別：工程技術類

篇名：

輻射氧化一把罩

作者：

張辰珮。國立蘭陽女中。二年十三班

林昀宣。國立蘭陽女中。二年十三班

指導老師：

陳美蓮老師

壹●前言

一、研究動機

人體以氧化反應代謝所產生的自由基易造成人體慢性疾病，身體機能老化甚至形成癌症。如，皮膚的老化是產生皺紋、斑點、粉刺等，而內在器官與血管也會因氧化產生心臟血管疾病、高血壓、糖尿病等相關疾病。因此在民生富足的現代，人們對於「抗氧化」產生極大興趣和盼望，也成為間接追求長生不老的目標。目前較常見的抗氧化物質有維生素C、E， β -胡蘿蔔素，超氧化物歧化酶(Super Oxide Dismutase, SOD)等。根據2001年顏的研究論文提出抗輻射奇異球菌 (*Deinococcus radiodurans*)之抗輻射的能力與它具有多種觸媒(Catalase)與超氧化物歧化酶(SOD)有關^[1]；而前人已對抗輻射奇異球菌之抗輻射能力有了一番的研究^[2]。然而，我們在收集文獻的過程中發現抗輻射奇異球菌之「抗氧化」的研究鮮少，因此本研究目的為探討抗輻射奇異球菌之抗氧化能力，並尋求其抗氧化能力的最佳條件，進而嘗試製造具有抗氧化與防紫外線能力之雙效美白與抗老化產品，以造福人類。

二、抗輻射奇異球菌簡介

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，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、超氧化物歧化酶(SOD)等^[3]。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。然而 *D. radiodurans* 含具有3種 catalases 與多種超氧化物歧化酶(SOD)^[1]，設想當菌體受到自由基的攻擊時能利用這些酵素將自由基快速移除，以減少自由基對菌體的破壞，加上目前 *D. radiodurans* 抗氧化的研究佔總研究1%，而引起我們想要進一步探討其抗氧化力的興趣。

三、認識自由基與抗氧化物

(一)何謂自由基^[4]：

人體代謝以「氧化反應」為主而產生的自由基，是一種帶有「不成對」電子的物質。電子須成對才能使分子處於安定狀態，因此自由基必須搶奪其它分子的電子或放出電子以求安定，所以會不斷攻擊或破壞人體各器官的細胞。醫學上多以補充外來抗氧化物降低人體內過多的自由基，以免其毒素對細胞、器官的破壞，達到預防及消除疾病的效果。

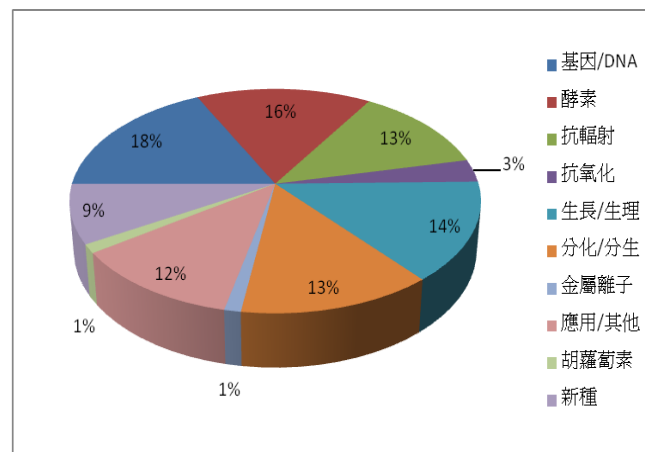
(二)自由基的剋星—抗氧化物^[4]：

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（Super Oxide 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質，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、研究背景及目的

(一)目前抗輻射奇異球菌的研究現況



圖一、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」資訊網站和「BCBI/PubMed」世界最大的公共生物資料庫，獲得 797 筆相關文獻資料，我們欲研究之抗氧化力只佔了 3%。

(二)研究目的

根據 2002 年顏發表的碩士論文已整理出抗輻射奇異球菌的特性，其中抗輻射奇異球菌具有多種類胡蘿蔔素(carotenoids)，而類胡蘿蔔素可以抑制氧原子與具有氧化力的自由基(free radicals)，可以保護細胞免於受到紫外光或輻射所引起的光氧化傷害(photooxidative damage)；另外它具有 3 種 Catalases 與多種 superoxide dismutase，可快速

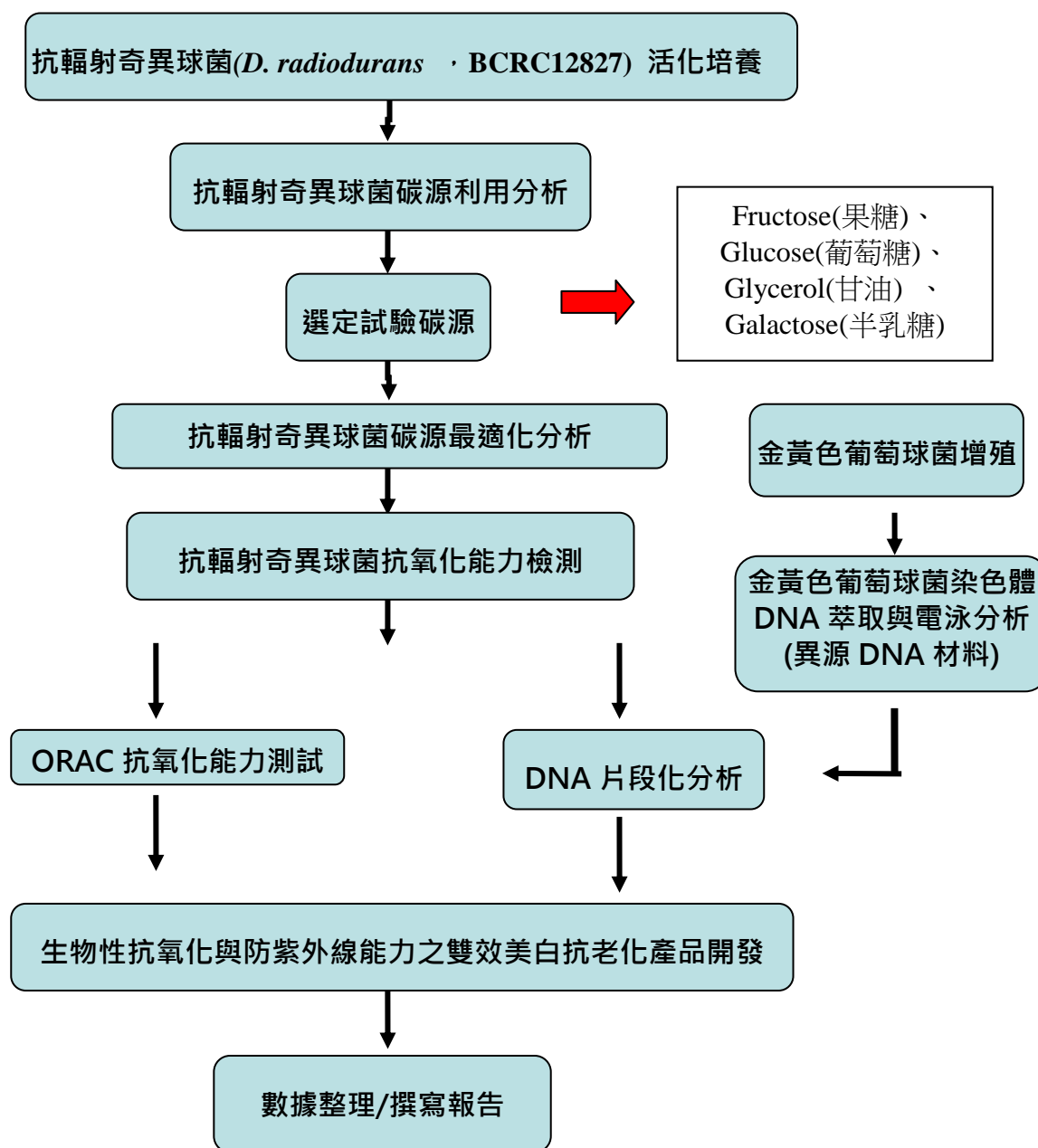
移除菌體內的自由基，免於其破壞。綜合以上的原因使我們想進一步探討抗輻射奇異球菌的抗氧化力是有如它的抗輻射能力一樣好，加上其抗氧化力並未被更深入的探討，因此我們設計了以下實驗，希望可以更清楚了解其抗氧化效力，希望開發生物性抗氧化與防紫外線能力之雙效美白抗老化產品。

(三)本研究之實驗設計與目的：

- 1、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。
- 2、利用微生物自動培養增殖分析機檢測抗輻射奇異球菌對 H₂O₂ 之碳源利用率最佳化分析。
- 3、利用氧自由基吸收能力(Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC)測試抗輻射奇異球菌中抗氧化物的含量。
- 4、在防曬基質中添加抗輻射奇異球菌菌體，製作簡易塗劑並測量防曬係數(SPF)。
- 5、DNA 片段化分析取得抗輻射奇異球菌保護外源 DNA(模擬對人)抗氧化的直接證據。
- 6、未來目標：生物性抗氧化與防紫外線能力之雙效美白抗老化產品開發。

五、研究材料與方法

(一)研究方法流程表



貳●正文

一、抗輻射奇異球菌之活化培養

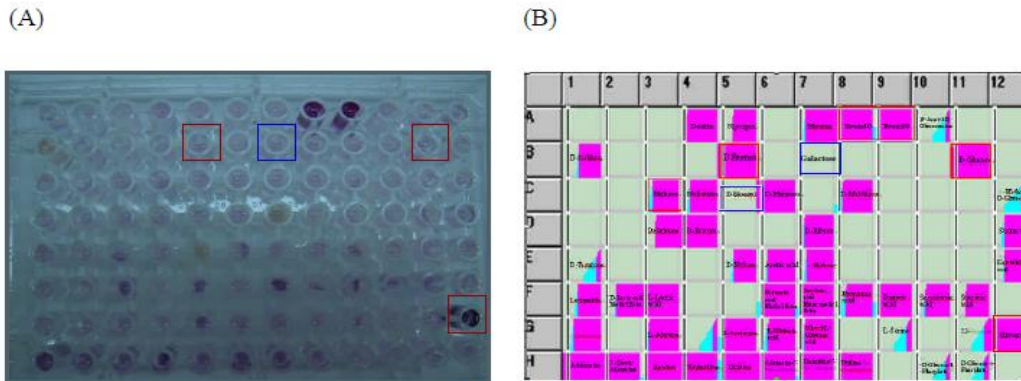
圖二為抗輻射奇異球菌*Deinococcus radiodurans*生長於Nutrition固體培養基的菌落生長形態。此菌生長於37℃，2天後會產生紅色色素。



圖二、抗輻射奇異球菌

二、碳源利用分析——選定試驗碳源

圖三(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為：Fructose(果糖)、Glucose(葡萄糖)、Glycerol(甘油)Galactose(半乳糖)。



圖三、抗輻射奇異球菌*D. radiodurans*碳源利用分析結果與資料庫圖

三、碳源利用最適化分析

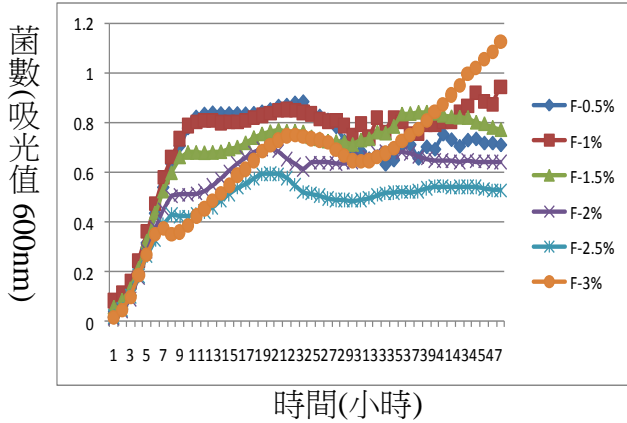
(一)觀察圖四~七，我們得知(A)Fructose:以碳源濃度3%可使菌數達OD₆₀₀₀近1.2；(B) Glucose:以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀為0.7；(C)Glycerol:DR以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀為0.8；(D)Galactose:DR以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀為0.8。

(二)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」^[7]；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：

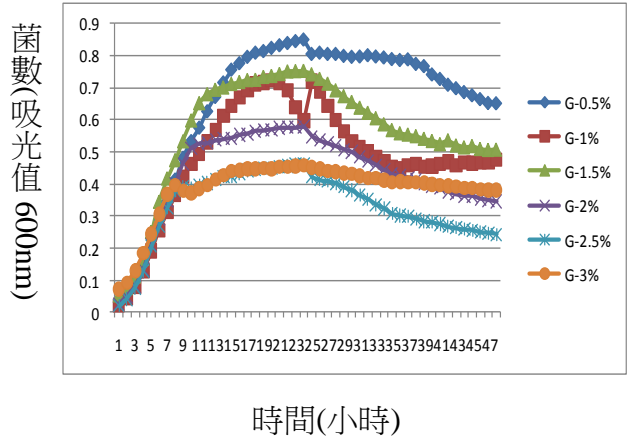
Fructose>Glycerol>Galactose>Glucose>TY

A. Fructose



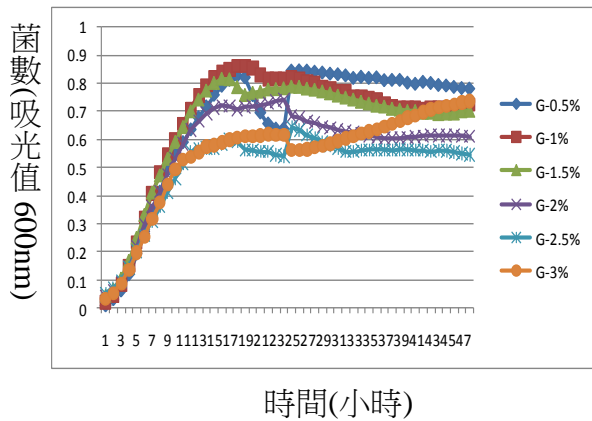
圖四、Fructose 濃度最適化分析之抗輻射奇異球菌菌體生長曲線

B. Glucose



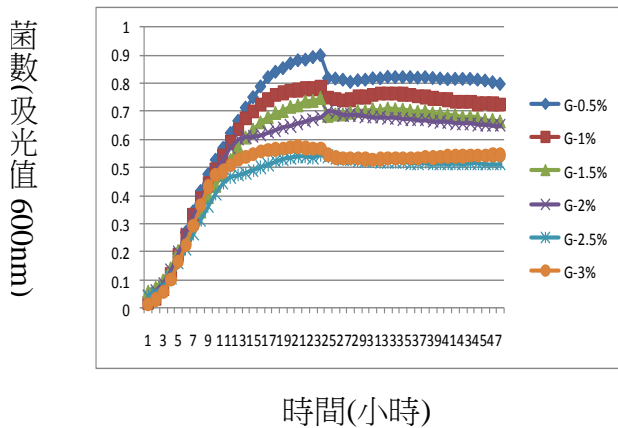
圖五、Glucose 濃度最適化分析之抗輻射奇異球菌菌體生長曲線

C. Glycerol



圖六、Glycerol碳源濃度最適化分析之抗輻射奇異球菌菌體生長曲線。

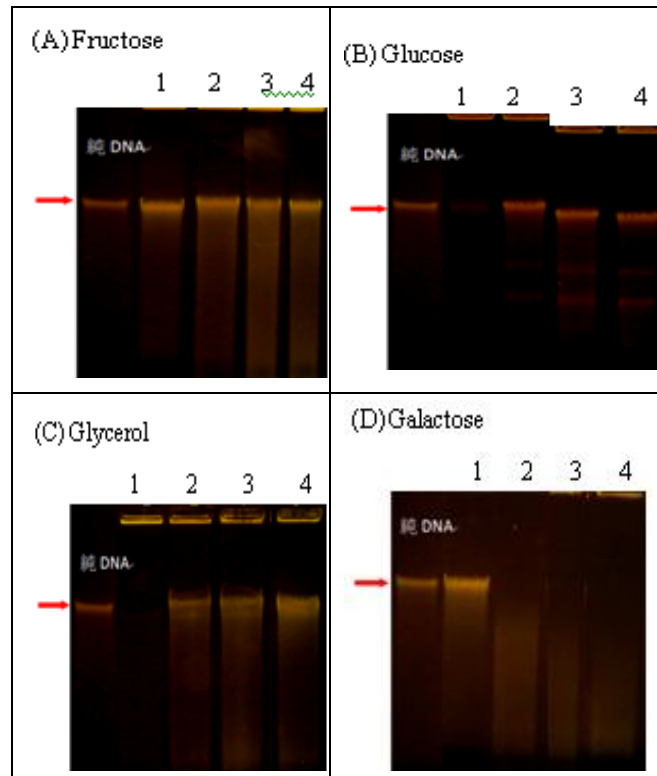
D. Galactose



圖七、Galactose碳源濃度最適化分析之抗輻射奇異球菌菌體生長曲線。

四、DNA片段化分析

由DNA 片段化分析的結果來看，我們發現碳源為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，其次為Glycerol 與Glucose 而Galactose 的效果不佳。

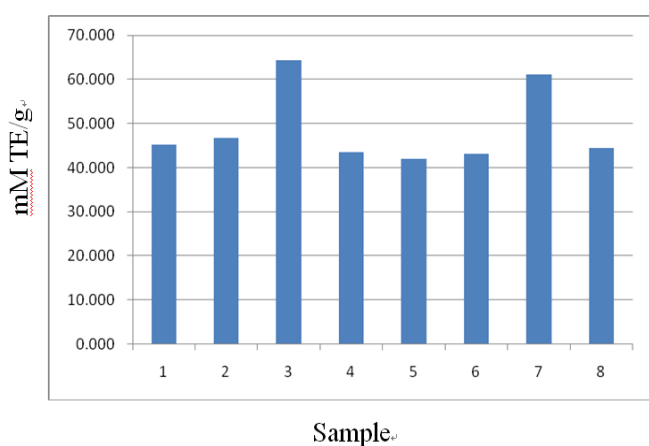


圖八、抗輻射奇異球菌經3% H₂O₂處理過之DNA片段化分析電泳圖。

五、氧自由基吸收能力ORAC

(一)圖九中，Sample 1、3、5、7為D.R.經超音波震盪器破碎細胞；Sample 2、4、6、8為D.R.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)。

(二)我們發現碳源Fructose與Glucose的奇異球菌，經超音波破碎之氧自由基吸收能力較佳，其值相當於標準品Trolox 65mM 與60 mM；Glycerol 與Galactose 的效果不論菌體破碎與否皆無差異。

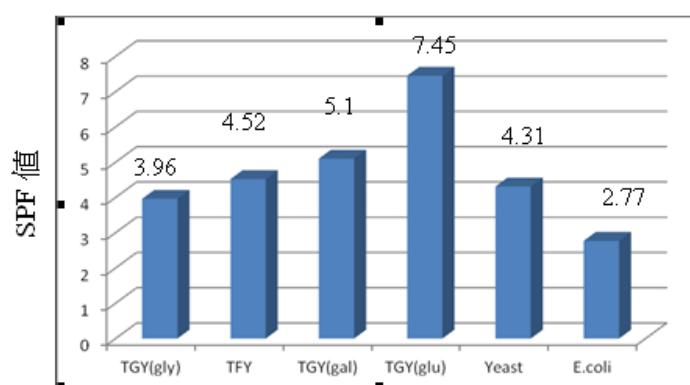


圖九、菌液/菌萃取液之氧自由基吸收能力(ORAC)。

六、防曬係數測定(SPF)

(一)使用不同碳源：TGY(gly, 甘油)、TFY(果糖)、TGY(gal, 半乳糖)、TGY(glu, 葡萄糖)作為培養基的抗輻射奇異球菌，與對照組Yeast(酵母菌)、*E. coli*大腸桿菌，SPF值分別為TGY(gly) 3.96、TFY 4.52、TGY(gal) 5.1、TGY(glu) 7.45、Yeast 4.31和*E. coli* 2.77。

(二)我們發現碳源為Glucose(葡萄糖)的防曬係數最高，其值為7.45為對照組Yeast的2倍，*E. coli*的3倍。其次為Galactose(半乳糖)，其值為5.1為對照組Yeast的1倍，*E. coli*的2倍。



圖十、利用不同碳源培養抗輻射奇異球菌之SPF測定比較。

參●結論

一、DNA片段化分析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、比較利用不同碳源來培養抗輻射奇異球菌之抗輻射與抗氧化情形，Glycerol(甘油)與Galactose(半乳糖)能使*D. radiodurans*抵抗60分鐘以上的紫外線(3.3 mW/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，顯示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。而半乳糖是兩者環境壓力下都有不錯表現的碳源。

三、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。

誌謝

感謝宜蘭大學生物技術研究所 林世斌教授、研究助理 王乃寬小姐，以及研究室的學長姐們給予的指導和協助；聖母醫護管理專科學校化妝品應用與管理科 洪桂彬 主任，以及學姐熱心指導；並且感謝宜蘭大學、聖母護校提供我們實驗環境與器材設備。

肆●引註資料

- 一、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。
- 二、中華民國第五十屆中小學科學展覽會高中組作品：揭開抗輻射奇異球菌的神秘面紗—初探抗輻射奇異球菌之抗紫外線機制
- 三、抗輻射奇異球菌簡介(<http://microbiology.scu.edu.tw/micro/bacteria/D1.htm>)
- 四、台灣醫界學術報導（34卷第2期）
- 五、台灣全國碩博士論文知識加值系統：<http://ndltd.ncl.edu.tw/cgi-bin/gs32/gswweb.cgi>
- 六、BCBI/PubMed國際期刊搜索系統：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- 七、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。