

中華民國第 65 屆中小學科學展覽會
作品說明書

科 別：生物組

組 別：國中組 高中組

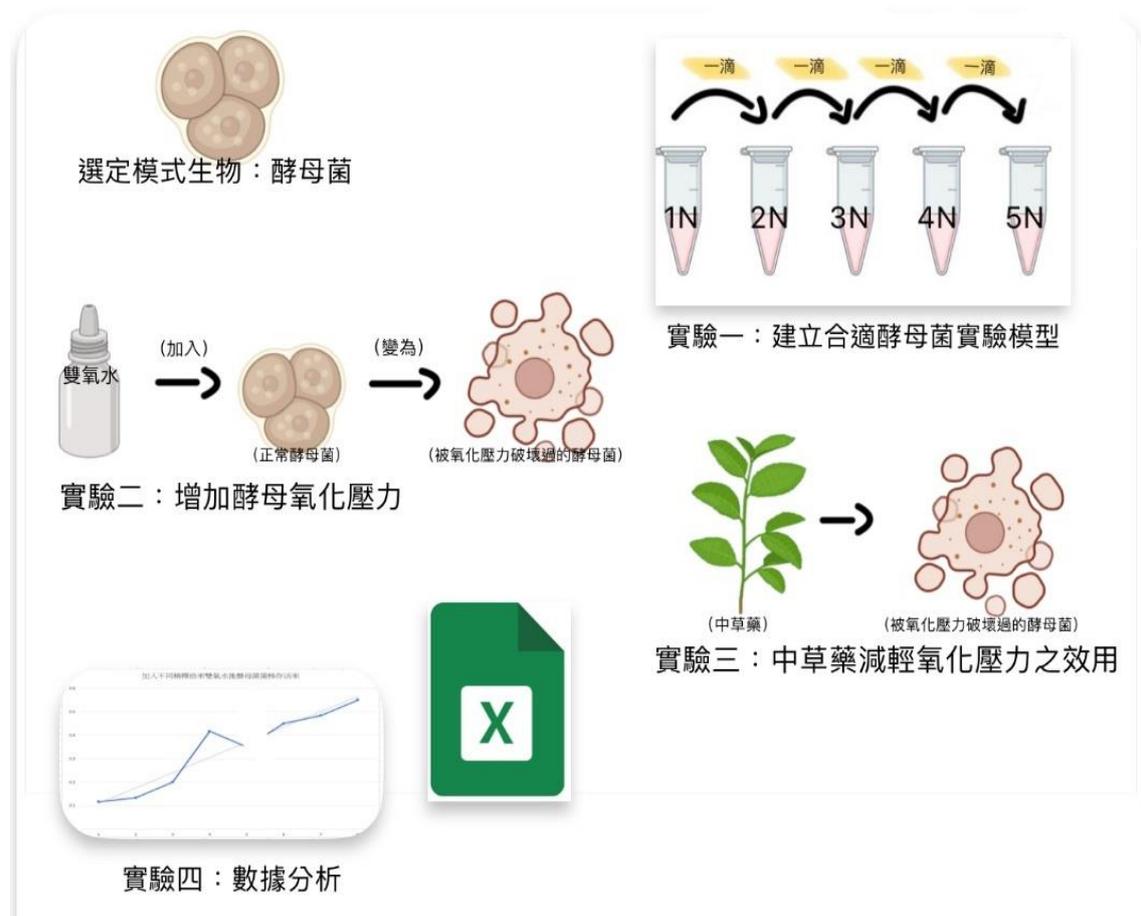
作品名稱：建立快速篩選抗氧化中草藥的模式

關 鍵 詞：酵母菌、雙氧水、氧化壓力

編 號：_____

摘要

因為酵母菌與人體細胞在細胞結構及代謝機制上具有高度相似性，因此我們選擇單細胞真核生物 — 酵母菌來模擬人體細胞面對氧化壓力反應的模型。實驗首先以不同濃度的雙氧水（ H_2O_2 ）對酵母菌施加氧化壓力，建立氧化壓力模式，觀察在不同程度的氧化壓力下酵母菌存活率變化。我們採用雙氧水半數抑制濃度（ IC_{50} ）作為指標，建立快速篩選抗氧化中草藥的模式。



摘要圖(作者自製)

壹、研究動機

我們對中草藥的功效充滿好奇，特別是氧化壓力所造成的細胞損傷。根據科學文獻，許多中草藥成分如：多酚類與黃酮類化合物，具有良好的抗氧化與抗發炎特性，能協助細胞對抗氧化壓力。為了驗證這些成分是否具備保護細胞的能力，我們選擇了易於取得且適合觀察的單細胞真核生物—酵母菌作為實驗模型。酵母菌與人類細胞在代謝途徑上具有高度相似性，適合模擬人體細胞在氧化壓力下的反應。我們以雙氧水模擬自由基對人體的傷害，於酵母菌上施加氧化壓力，以模擬細胞在「生病」狀態下所承受的氧化壓力，這種損傷機制與多種人類疾病（如心血管疾病、白內障等）相關。透過本實驗所建立的模型，我們希望未來能以此模型，快速了解中草藥成分是否具有減緩雙氧水造成的細胞損傷之潛力，進而思考其在未來人類疾病預防與治療上的應用可能性。

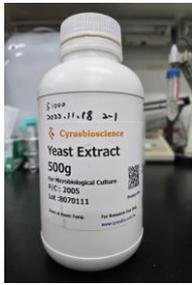
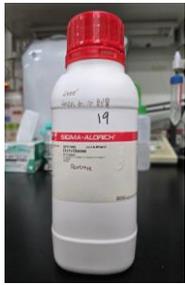
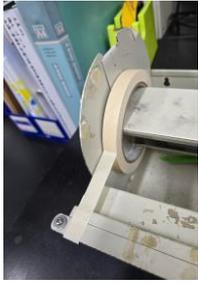
貳、研究目的

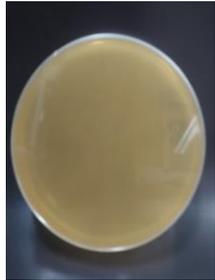
建立酵母菌的氧化壓力實驗模型

（一）使用 YPD broth（酵母提取物、蛋白胨 peptone、葡萄糖培養基）對酵母菌進行稀釋，找出適合觀察且數量均勻的酵母菌群體，確保實驗結果的可比性與可靠性（請見實驗 1-1 至 1-5）。

（二）透過不同濃度的雙氧水誘導氧化壓力，藉此找出雙氧水半數抑制濃度（ IC_{50} ，是指在特定實驗條件下，藥物使目標生物生長抑制 50%的濃度），以建立酵母菌氧化壓力模型（請見實驗 2-1 至 2-2）。

參、研究設備及器材

				
(一) 去離子水	(二) 量筒	(三) 錐形瓶	(四) 血清瓶	(五) 磅秤
				
(六) Yeast extract	(七) Peptone	(八) Glucose	(九) Agar	(十) 磁石
				
(十一) 攪拌機	(十二) 滅菌膠帶	(十三) 滅菌機器	(十四) 微量滴管	(十五) 震盪機

				
(十六) 酒精燈	(十七) 滅菌滴管	(十八) 酵母菌粉	(十九) YPD Broth	(二十) YPD Plate
				
(二十一) 玻璃棒	(二十二) 滅菌牙籤	(二十三) 封膠 Parafilm	(二十四) 3%雙氧水	(二十五) 養菌管

肆、研究過程及方法

實驗 1-1：製備 YPD 培養基 (YPD broth)

(一) 實驗目的：取得酵母菌培養基底

(二) 實驗設備：

1.量筒

2.去離子

3.血清瓶

4.磅秤

5.粉末

(1) Yeast extract

(2) Peptone

(3) Glucose

6.磁石和攪拌機

7.滅菌膠帶和滅菌機器

(三) 實驗步驟：

1.秤量粉末

(1) Yeast extract 4 g

(2) Peptone 8 g

(3) Glucose 8 g

2.加入二次水至 400 ml

3.放入磁石並至攪拌機上，攪拌均勻

4.貼上滅菌標籤，放入滅菌機器

5.滅菌 20 分鐘（等待兩小時的降溫及降壓）

6.分裝並放置於 4°C 冰箱保存

實驗 1-2：調配 YPD 固態培養基（YPD plate）

(一) 實驗目的：取得酵母菌固態培養基

(二) 實驗設備：

1.量筒

2.去離子水

3.錐形瓶和血清瓶

4.磅秤

5.粉末

(1) Yeast extract

(2) Peptone

(3) Glucose

(4) Agar

6.磁石和攪拌機

7.滅菌膠帶和滅菌機器

(三) 實驗步驟：

1.秤量粉末

(1) Yeast extract 4 g

(2) Peptone 8 g

(3) Glucose 8 g

(4) Agar 8 g

2.加入二次水至 400 ml

3.放入磁石並至攪拌機上，攪拌均勻

4.貼上滅菌標籤，放入滅菌機器

5.滅菌 20 分鐘（等待兩小時的降溫及降壓）

6.倒入養菌盤（約 20 ml/盤）

7.放置室溫冷卻

8.放置於 4°C 冰箱保存



圖（一）配置 YPD plate 及 YPD broth(作者自攝)



圖（二）加入磁石並放上機器攪拌(作者自攝)

實驗 1-3：酵母菌養菌 — 三區畫法（參考圖三）

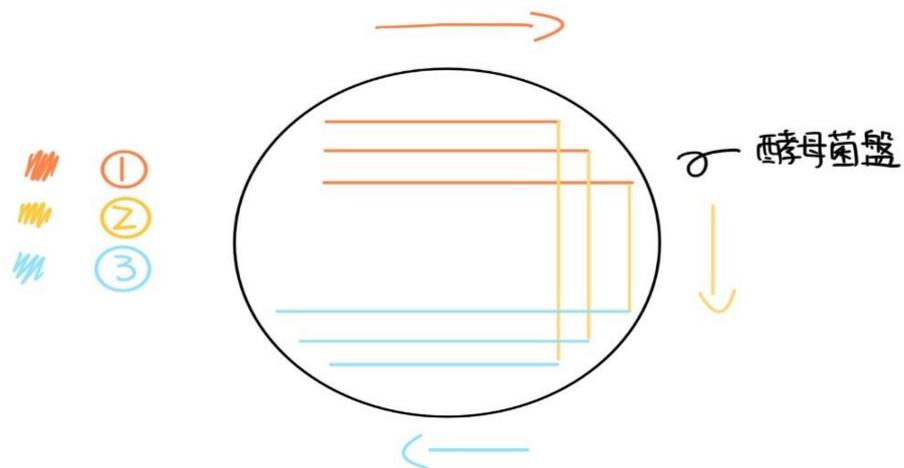
（一）實驗目的：挑選單顆的酵母菌後續進行培養

（二）實驗設備：

1. 微量滴管
2. 震盪機
3. 酒精燈
4. 一次性滴管
5. YPD broth 和 YPD plate
6. 玻璃棒
7. 無菌牙籤
8. 封膠

（三）實驗步驟：

1. 點起酒精燈
2. 調配原液（0.1 g 酵母菌粉 + 1 ml YPD broth）
3. 酒精燈燒無菌牙籤前端，並在 YPD plate 的邊緣戳鈍及冷卻
4. 用牙籤沾取原液，畫三條線
5. 第二支牙籤燒前端，不沾取原液，直接再畫三條線
6. 第三支牙籤，重複第二支動作



圖（三）三區示意圖(作者自繪)

實驗 1-4：酵母菌養菌 — 挑菌

（一）實驗目的：培養酵母菌

（二）實驗設備：

1. 微量滴管
2. 震盪機
3. 酒精燈
4. 一次性滴管
5. YPD broth 和 YPD plate
6. 玻璃棒
7. 無菌牙籤
8. 封膠

（三）實驗步驟：

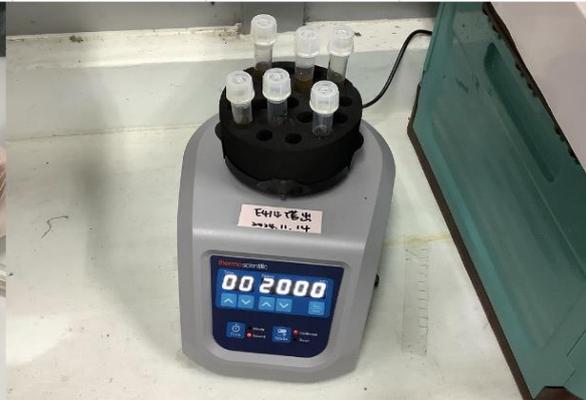
1. 點起酒精燈
2. 在養菌管加入 3 ml 的 YPD broth
3. 酒精燈燒無菌牙籤前端，並在 YPD plate 的邊緣戳鈍
4. 挑 1 顆酵母菌放入 YPD broth 養菌管中，將蓋子壓緊

5.封上封膠，放入震盪機於室溫中震盪至少 48 小時

6.照稀釋步驟進行塗盤（請見 1-5）



圖（四）挑菌(作者自攝)



圖（五）震盪 48 小時(作者自攝)

實驗 1-5：酵母菌活化與培養 — 稀釋塗盤

（一）實驗目的：找到合適數量的酵母菌數量

（二）實驗設備：

1.微量滴管

2.震盪機

3.酒精燈

4.一次性滴管

5.酵母菌粉 [成分：天然酵母、乳化劑（山梨醇酐單硬脂酸酯）和食品添
物加物名稱：抗氧化劑（維生素 C）]

6.YPD broth 和 YPD plate

7.玻璃棒

（三）實驗步驟：

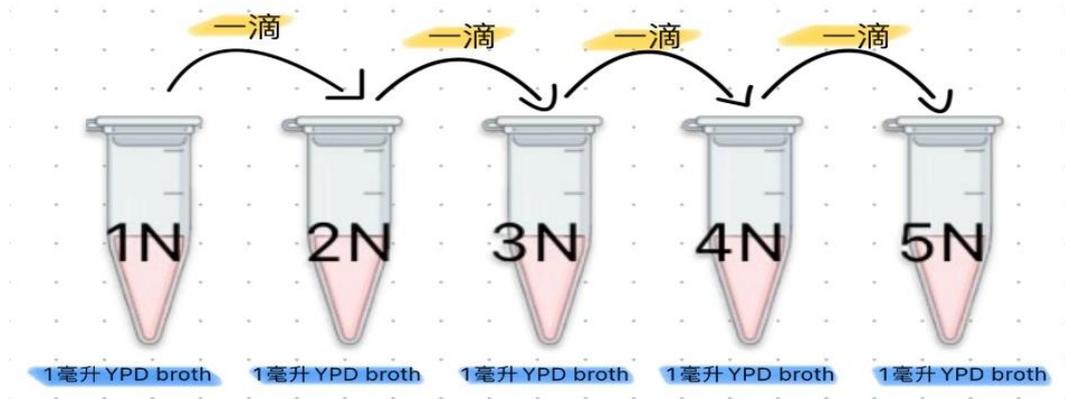
1.點起酒精燈

2.調配原液（請見實驗 1-4）

3.進行稀釋（請見圖六）

4.清洗玻璃棒，並泡入 90%的酒精中

- 5.用酒精燈燒玻璃棒
- 6.滴一滴稀釋好的 YPD broth 至 YPD plate 中
- 7.用放涼的玻璃棒進行塗盤
- 8.放置室溫下等待 2~3 天
- 9.進行封膠，放入 4°C 冰箱保存



圖（六）原液稀釋方式（作者自製）



圖（七）使用玻璃棒塗盤(作者自攝)



圖（八）分配 YPD broth 進行稀釋(作者自攝)

實驗 2-1：雙氧水誘導氧化壓力

(一) 實驗目的：用雙氧水對酵母菌生長施加氧化壓力

(二) 實驗設備：

1. 微量滴管
2. 震盪機
3. 酒精燈
4. 一次性滴管
5. YPD broth 和 YPD plate
6. 玻璃棒
7. 封膠
8. 離心機
9. 3% 雙氧水

(三) 實驗步驟：

1. 點起酒精燈
2. 在養菌管加入 3 ml 的 YPD broth
3. 酒精燈燒無菌牙籤前端，並在 YPD plate 的邊緣戳鈍
4. 挑 1 顆酵母菌，放入 YPD broth 養菌管中，將蓋子壓緊
5. 封上封膠，放入震盪機室溫震盪至少 48 小時
6. 照稀釋步驟（請見圖九）進行塗盤

圖示								
成分	YPD broth 1.5 ml + 雙氧水 0.5 ml							
吸取 前一管 的量	3%雙氧水 0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
雙氧水的稀釋 倍數	4 倍	16 倍	64 倍	256 倍	1,024 倍	4,096 倍	16,384 倍	65,536 倍

圖（九）雙氧水的稀釋方法圖



圖（十）酵母菌離心及洗菌之過程(作者自攝)

實驗 2-2：菌落計數與分析

(一) 實驗目的：計算菌落數並計算 IC_{50}

(二) 實驗設備：

- 1.手套
- 2.奇異筆
- 3.長好的酵母菌盤

(三) 實驗步驟：

- 1.拿出完成培養之酵母菌盤
- 2.使用奇異筆於酵母菌盤上標記數過的酵母菌珠
- 3.根據不同雙氧水濃度下酵母菌的存活率計算 IC_{50}

伍、研究結果

一、建立合適的酵母菌實驗模型：

(一) 實驗前期，我們做了 5 種不同濃度的酵母菌盤，但在多次實驗後我們選擇使用酵母菌稀釋 2N 和 3N 的 YPD plate 相較其他盤較好數菌，並且考慮後期加上雙氧水後，菌數會減少，因此選擇使用稀釋 2N 和 3N 的 YPD plate 作為後續實驗模式。

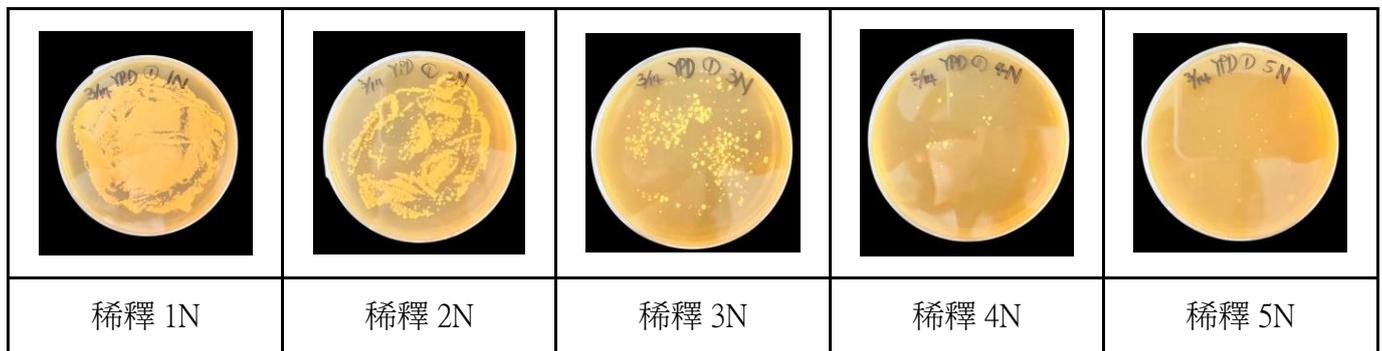


圖 (十一) 原液稀釋 1N~5N 之酵母菌菌落(作者自攝)

二、雙氧水誘導氧化壓力：

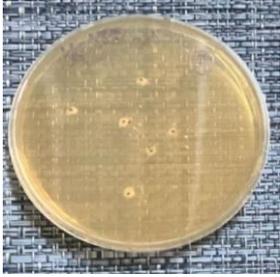
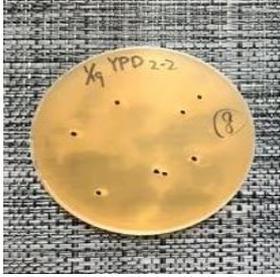
(一) 使用稀釋 2N 和 3N 的 YPD plate 來作為雙氧水誘導氧化壓力實驗中的實驗模型，發現稀釋 2N 的酵母菌盤長得太過於密集很難清點其數量，反之稀釋 3N 的酵母菌則剛剛好，所以我們選擇用稀釋 3N 的酵母菌作為接下來實驗的模型。

(二) 我們一開始使用 2 倍連續稀釋法，往後稀釋到 1,024 倍，但後來發現雙氧水稀釋至 1,024 倍時，酵母菌的存活率僅剩 25%，尚未達成 IC_{50} 的結果，所以我們改用 4 倍連續稀釋法，往後稀釋到 65,536 倍，發現在 16,384 倍時，酵母菌的存活率為 48%，有達到半數抑制的概念。

(三) 在不同稀釋狀況稀釋倍率越高菌株數量就越多，也就是說隨著稀釋倍率的提高菌種存活率就越來越高，這顯示雙氧水的氧化壓力對酵母菌的影響具有濃度正相關性。

雙氧水稀釋倍率	菌株存活數量	菌株存活率
無雙氧水	60顆	
4倍	7顆	12%
16倍	8顆	13%
64倍	12顆	20%
256倍	25顆	42%
1024倍	21顆	35%
4096倍	27顆	45%
16384倍	29顆	48%
65536倍	33顆	55%

表（一）3N 的酵母菌+稀釋不同倍率的雙氧水之酵母菌菌株存活數及存活率

				
稀釋原液 3N 無加雙氧水 60 顆	稀釋原液 3N 雙氧水稀釋 4 倍 7 顆	稀釋原液 3N 雙氧水稀釋 16 倍- 8 顆	稀釋原液 3N 雙氧水稀釋 64 倍 12 顆	稀釋原液 3N 雙氧水稀釋 256 倍 25 顆
				
稀釋原液 3N 雙氧水稀釋 1,024 倍 21 顆	稀釋原液 3N 雙氧水稀釋 4,096 倍 27 顆	稀釋原液 3N 雙氧水稀釋 16,384 倍 29 顆	稀釋原液 3N 雙氧水稀釋 65,536 倍 33 顆	

圖（十二）稀釋 3N 的酵母菌+稀釋不同倍率的雙氧水之酵母菌菌株(作者自攝)

陸、討論及未來研究方向

一、討論

(一) 稀釋幾倍的原液較適合做為實驗模式

在實驗初期選擇適合的酵母菌濃度（菌落密度）時，我們發現稀釋 4N 的菌株數量最為適中，既不過於密集，也不會過於稀疏，適合進行觀察與紀錄。然而，在進行實驗二加入雙氧水模擬氧化壓力後，需進行「洗菌」步驟以移除殘留的雙氧水，此操作導致原先稀釋 4N 的酵母菌株在培養後菌株數量不足，無法順利進行後續觀察與分析。為解決此問題，我們改以稀釋 2N 與 3N 的菌液進行實驗二。實驗結果顯示，稀釋 2N 時菌落過於密集，影響觀察與計數的準確性；而稀釋 3N 則可獲得清晰、適中的菌落分布，利於後續數據分析與比對。因此，最終我們選定稀釋 3N 的酵母菌作為實驗的標準實驗模式。

(二) 雙氧水稀釋濃度

在這次實驗中，我們使用了 3% 的雙氧水，但對酵母菌而言，這個濃度過高，因此稀釋變得至關重要。我們原本打算直接稀釋原液，但與老師討論後發現，這種方法無法準確計算加入的雙氧水量，因此難以獲得精確的數據。為了解決這個問題，我們決定在稀釋時，以 0.5 毫升為單位來計量雙氧水的加入量，以確保數據的準確性，從而建立可靠的實驗平台。

確定稀釋方式後，接下來我們需要找出適當的稀釋倍數。首先，我們進行了一次初步測試（2 倍連續稀釋），選擇 4 種不同的稀釋倍率（1 倍、2 倍、4 倍和 8 倍）來觀察酵母菌的生長情況。實驗結果顯示，雙氧水的濃度仍然過高，導致酵母菌生長不明顯。因此，我們進行了第二次實驗（4 倍連續稀釋），擴大範圍至 8 種不同的稀釋倍率（1 倍、4 倍、16 倍、64 倍、256

倍、1,024 倍、4,096 倍、16,384 倍和 65,536 倍)。結果顯示，當雙氧水稀釋至 16,384 倍時，酵母菌的生長情況較為理想，並成功找到 IC_{50} 。

(三) 雙氧水稀釋倍數對酵母菌死亡率的影響 — 誤差分析與實驗優化

多次實驗中，發現結果顯示誤差較大。除了通過多次實驗降低誤差外，可能的原因還包括測量儀器精度有限，以及環境因素（如溫度、濕度）的影響。

二、未來研究方向

本研究證實雙氧水確實會對酵母菌造成明顯的氧化壓力，並成功建立一套以酵母菌為基礎的氧化壓力實驗模型。在未來可作為初步篩選抗氧化中草藥效能的實驗平台，也為探討其可能的臨床應用奠定了基礎。

在本次實驗中，我們進一步利用 IC_{50} 作為評估指標，成功創建出一個能夠快速篩選抗氧化潛力的中草藥實驗模式，能為後續中草藥篩選提供平台。

未來，透過此實驗平台搭配更精密的實驗設計與實驗設備，我們可以更深入地理解中草藥在抗氧化層面的作用機制與效果。同時，此平台在未來也可以研究與氧化壓力相關的疾病，像是神經退化性疾病、心血管疾病、糖尿病等。

此外，我們期望未來能進一步篩選出更多具抗氧化功效的中草藥，例如古籍中記載含多酚類與黃酮類化合物的丹蔘、人蔘等藥材，或是現代已有臨床應用功效的「淨斯本草飲」等。藉由此平台的推廣與發展，未來希望做出一套結合中醫藥智慧與現代科學的抗氧化中草藥的篩選平台，為中草藥在現代醫療中的效用提供更具實證依據。

柒、結論

本研究探討了雙氧水誘導氧化壓力對酵母菌生長的影響，並進一步評估了中草藥在減輕氧化壓力方面的潛在功效。透過一系列實驗，我們成功建立了適合的酵母菌實驗模型，並驗證了雙氧水對酵母菌的氧化壓力影響及中草藥的保護作用。

一、首先，在建立酵母菌實驗模型的過程中，我們測試了五種不同濃度的酵母菌培養盤。由於實驗過程包含離心與洗菌步驟，可能導致菌株數量流失，因此我們選擇菌量較多的樣本進行稀釋比較。最終，我們確定稀釋 3N 的酵母菌樣本最為適合作為後續雙氧水誘導氧化壓力的實驗模型。

二、在雙氧水誘導氧化壓力的實驗中，我們發現雙氧水對酵母菌的生長具有明顯的抑制效果。當雙氧水的濃度稀釋至 16,384 倍時，酵母菌的存活率約為 48%，顯示其已達半數抑制。此外，隨著雙氧水濃度的降低（稀釋倍數增加），酵母菌的存活率提升，進一步證明了雙氧水對酵母菌的影響具濃度依賴性。

綜合以上結果，本研究證實了雙氧水對酵母菌的氧化壓力影響，並建立了一個穩定的酵母菌氧化壓力實驗模型。

捌、參考資料

(一) 如何使用 Microsoft Excel 計算 IC50、ED50 和 LD50? (2020)

取自：<https://reurl.cc/j9RLj1>

(二) 國立自然科學博物館 — 酵母菌知多少 (2023)

取自：<https://epub.nmns.edu.tw/e202311-1/>

(三) 衛生福利部食品藥物管理署 — 雙氧水的用途 (2021)

取自：<https://www.fda.gov.tw/tc/siteContent.aspx?sid=1959>

(四) 輝雄診所 — 維他命 C 終結自由基，抗氧力加倍

取自：https://www.care-u.com.tw/health_content_877

(五) 酵母作為模型生物 (1997)

取自：<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9297238/>

(六) 超氧化物歧化酶 (SOD) 是什麼?

取自：<https://pse.is/75qm8p>

(七) 國立臺灣大學化學系 — 離心機功效

取自：<https://pse.is/75vwxb>