

中華民國第 62 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高級中等學校組 農業與食品學科

佳作

052207

兒茶素新天地-兒茶素與熱量限制對酵母菌壽命
之影響

學校名稱：高雄市立高雄女子高級中學

作者： 高二 周子喬 高二 余奐錚 高二 朱逸庭	指導老師： 陳芳誼 馬世璋
-----------------------------------------------	-----------------------------

關鍵詞：兒茶素、熱量限制、酵母菌

摘要

本研究探討熱量限制與兒茶素對酵母菌的影響，熱量限制（CR）可能具有延壽效果，而兒茶素被認為是潛在熱量限制模擬物（potential CRM）。以 2%、0.5%和 0.05%葡萄糖作為正常醴濃度、熱量限制與極端熱量限制進行實驗。結果指出酵母菌生長情形以 CR 組最佳，而加入 50ppm 兒茶素可提高其生長速率；醱酵實驗中兒茶素對酵母菌的產氣量影響不大；熱量限制與兒茶素的共同處理能增加其複製壽命；在 *SIR2* 基因實驗中發現在極端 CR 與 CR 加入兒茶素的組別，皆能增加其基因表現，此結果顯示在熱量限制下 *SIR2* 基因可能參與兒茶素增加複製壽命的作用。由此推測兒茶素具成為 CRM 的潛力，也發現 CR 搭配 CRM 可能有最佳的延壽效果，希望此研究能成為探討熱量限制模擬物之模型，作為研究人類延壽的基礎。

壹、前言

一、研究動機與文獻探討

許多人熱愛飲食，但在暴飲暴食後，須面對的是潛在的健康問題。在控制體重的一種方法中提到熱量限制（Caloric Restriction, CR），即在有限度、仍可維持生理機能的限制熱量供給下，使生物體延緩衰老、促進長壽，在許多生物上皆有延長壽命、提升健康的效果（Giusi Taormina 等人, 2014）（Lin, SJ 等人, 2002）。但若一味地追求少吃一點，對於很多人而言是相當難做到的挑戰，飲食的慾望和健康與長壽間的平衡相當難拿捏，在實際應用上也可能有身體不適感。

所以科學家們積極發掘熱量限制模擬物（Caloric Restriction Mimetic, CRM），例如現今已發現的亞精胺（Spermidine）和白藜蘆醇（Resveratrol），可在不進行熱量限制下，促進健康長壽的傳訊路徑，達成 CR 對生物體的效果。在 2021 年的一篇文獻（Sebastian J. Hofer, 2021）中，也以飲食 CRM 作為日後新興膳食領域的發展方向探究，可見 CRM 已為營養研究和臨床試驗的主題之一，由此可知，只要服用特定物質，便能在不須挨餓的情況下，擁有健康長壽的效果，這真是令人雀躍的消息。本研究著重在文獻中（Madeo, F.等人, 2019）提及的潛在熱量限制模擬物（potential CRM）——兒茶素（Catechin）。

許多國人喜歡飲用綠茶，在期刊中（顏兆熊, 2021）也提到兒茶素長期被人們認為有益健康，它最為人熟知的抗氧化作用能力，在血壓、總膽固醇、心血管疾病等層面都可能正向影響。但本組好奇兒茶素作為綠茶之中的重要化合物，除了上述帶來的健康效果，是否可能有與 CR 有關的作用機制，以模擬 CR 的方式達到延壽效果？

另外，在文獻（Schleit, J.等人, 2012）中，其他學者以酵母菌作為模型，探討基因型和熱量限制的相互作用，研究顯示，去乙酰化酶的 Sirtuin 家族在酵母菌的抗衰老中發揮作用，且與其他哺乳動物可能有部分相同的下游傳導路徑。目前的文獻中，酵母菌已被證明是研究衰老途徑的模式生物，這使本研究選擇以酵母菌作為研究生物。而在研究酵母菌壽命的實驗方法中，複製壽命（Replicative Life Span, RLS）實驗是許多學者採用的方式。複製壽命的定義為母細胞抵達壽命終點前可產生的子代數量，一般測量複製壽命的方式須使用顯微操作，每隔一段時間，運用顯微探針將母細胞分裂出的子代與其分離，難度高且耗時長，因此，此研究以 RLS 實驗的濃縮程序 MEP（The Mother Cell Enrichment Program），簡化 RLS 的流程而更易操作，藉此推斷酵母菌的複製壽命（Steffen, K. K 等人, 2009）。

最後，文獻指出熱量限制可能透過開啟酵母菌 *SIR2* 基因延長其壽命（Guarente, L.等人, 2005），在另一篇文獻指出（Lin.等人, 2000），刪除酵母菌 *SIR2* 基因後再給予熱量限制無法延長酵母菌壽命，綜合以上兩篇研究可知熱量限制受 *SIR2* 基因的調節。酵母菌 *SIR2* 基因是從細菌到哺乳動物的生物體中發現的一大類保守基因——Sirtuin 中的成員，*SIR2* 蛋白是一種負責移除組織蛋白上乙酰基的酶。當核糖體 DNA 脫離基因組後，染色體外會形成多個核糖體 DNA 環，這些重複序列的核糖體 DNA 穩定性差，有彼此重組的傾向，容易使酵母菌老化而死亡，若移除組蛋白上的乙酰基，可使其纏繞更加緊密，使核糖體 DNA 無法脫離染色體，如此基因組上重複序列基因段就不會活化，藉此延長酵母菌壽命（Kaeberlein M 等人, 1999）。而該家族的標誌是一個由大約 260 個胺基酸組成的結構域（domain），在所有 Sirtuin 中都具有高度的序列相似性。酵母菌 *SIR2* 基因在哺乳動物有七個 *SIR2* 同源物（Sirtuins, *SIRT1-7*），其直系同源物為人類 *SIRT1* 基因，相關資訊如圖一所示（Brian J North 等人, 2004）。又因此基因家族的相似性和同源性，故可將本實驗結

果作為人類熱量限制與攝取兒茶素的相關研究。

Classification and chromosomal locations of human sirtuin genes

Name	Class	Chromosomal location	OMIM ID	Orthologs	
				Yeast	Mouse
<i>Sirt1</i>	Ia	10q21.3	604479	<i>Sir2, Hst1</i>	<i>Sir2β</i>
<i>Sirt2</i>	Ib	19q13.2	604480	<i>Hst2</i>	<i>Sir2l2</i>
<i>Sirt3</i>	Ib	11p15.5	604481	<i>Hst2</i>	<i>Sir2l3</i>
<i>Sirt4</i>	II	12q24.31	604482		<i>Sirt4</i>
<i>Sirt5</i>	III	6p23	604483		<i>Sirt5</i>
<i>Sirt6</i>	IVa	19p13.3	606211		<i>Sirt6</i>
<i>Sirt7</i>	IVb	17q25.3	606212		<i>Sirt7</i>

Mouse orthologs of human *Sirt4-7* have not been characterized but are found in sequence databases.

圖一 人類 sirtuin 基因的分類和染色體定位

(North, B. j, & Verdin, eric . (2004) . Sirtuins: *SIR2*-Related NAD-Dependent Protein Deacetylases. Genome Biol, 5 (5) , 224.<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15128440/>)

二、研究目的

- (一) 探討在不同葡萄糖濃度下酵母菌的生長情況
- (二) 探討在不同葡萄糖濃度下加入兒茶素後酵母菌的生長情況
- (三) 探討在不同葡萄糖濃度下酵母菌的醱酵速率
- (四) 探討在不同葡萄糖濃度下加入兒茶素後酵母菌的醱酵速率
- (五) 探討在不同葡萄糖濃度下酵母菌的複製壽命
- (六) 探討在不同葡萄糖濃度下加入兒茶素後酵母菌的複製壽命
- (七) 探討不同葡萄糖濃度對酵母菌 *SIR2* 基因表現量的影響
- (八) 探討在不同葡萄糖濃度下加入兒茶素後對酵母菌 *SIR2* 基因表現量的影響

貳、研究設備與器材

一、研究材料

兒茶素 ((+) -Catechin hydrate) CAS No.: 225937100、雌二醇 (β -Estradiol) CAS No.: 50-

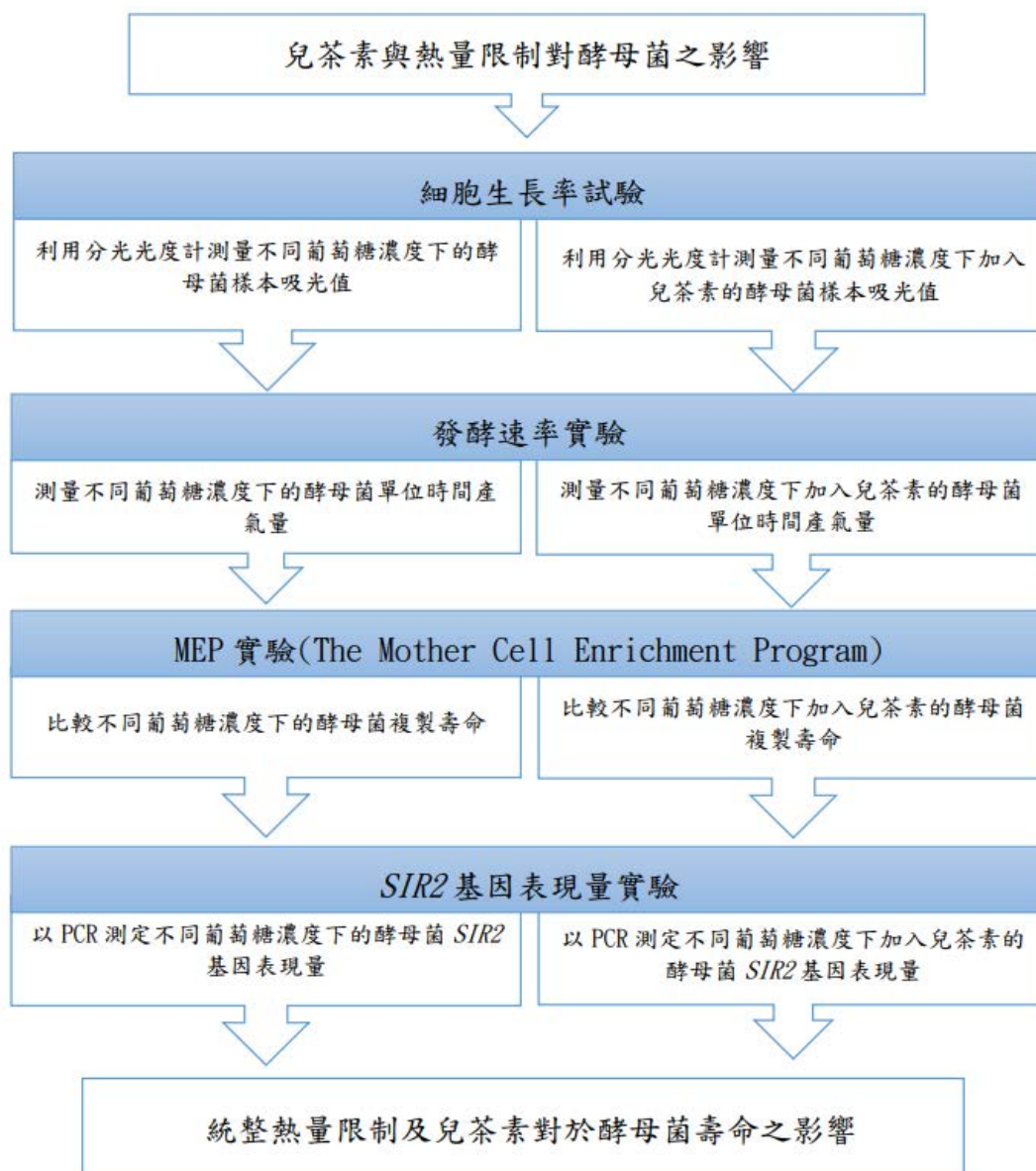
28-2、DMSO、酵母菌萃取物、即醱酵母、葡萄糖、Peptone、Agar、RNeasy Mini Kit、Thermo Scientific™ RevertAid RT Reverse Transcription Kit QuantiNova™ SYBR® Green PCR Kit。

二、研究設備

針筒、石蠟封膜、橡皮塞、培養皿、離心機、試管振盪器、旋轉式混合器、震盪培養箱、高壓滅菌釜、分光光度計、Gen5 3.04、EPOCH₂ Plate Reader、MiniAmp™ Plus Thermal Cycler、StepOnePlus™ Real-Time PCR System、ENDURO™ GDS Gel Documentation System。

參、研究過程或方法

一、實驗架構



二、實驗方法

(一) 配製 50mg/L、100mg/L 兒茶素 Stock

1. 取 0.05 克兒茶素，放置於離心管。
2. 加入 1000 μ L DMSO，得到 100mg/L 兒茶素溶液。
3. 取 300 μ L 100mg/L 兒茶素溶液，放置於另一離心管內。
4. 加入 300 μ L DMSO，得到 50mg/L 兒茶素溶液。

(二) 配製固態酵母菌培養基 YEPD

1. 取 10 克 Yeast Extract、20 克 Peptone、20 克 Agar，溶入 900mL ddwater 中。
2. 取 20 克葡萄糖溶入 100mL ddwater 中。
3. 分別放入滅菌釜滅菌 20 分鐘。
4. 將培養基與糖水混合。
5. 將混合液體倒入培養皿中，待冷卻，得到 2%固態 YEPD。

(三) 配製液態酵母菌培養基 YEPD

1. 取 10 克酵母菌萃取物、20 克 Peptone，溶入 900mL ddwater。
2. 取 20 克葡萄糖溶入 100mL ddwater 中，得到 20%糖水。
3. 分別放入滅菌釜滅菌 20 分鐘。
4. 取適量 20%糖水，分別稀釋為 5%、0.5%。
5. 將培養基與糖水分別以 9:1 混合，得到 2%、0.5%、0.05%液態 YEPD。

(四) 細胞生長率實驗

此實驗分成兩個子實驗，第一個為實驗一，是為了評估培養於不同葡萄糖濃度下的酵母菌生長情形；第二個為實驗二，則是進一步了解兒茶素這個潛在的熱量限制模擬物對於培養於不同葡萄糖濃度下的酵母菌生長情形的影響，此實驗在 2%、0.5%和 0.05%葡萄糖濃度培養液內，各別加入 0、50 和 100ppm 的兒茶素。將酵母菌置於不同實驗組別的培养液中培養 24 小時，並在 0、4 和 24 小時利用分光光度計分析不同時間點培養液的 600nm 吸光值 (OD600) 以評估酵母菌的生長情形。我們以 0 小時的數據為基準值，計算不同時間點的相對細胞生長率，藉此推估酵母菌生長情形。

1. 養菌

(1) 將 13.5ml 培養基、30 μ L 兒茶素 Stock、1mL 0.2% 菌液加入錐形瓶，用鋁箔包覆瓶口。

(2) 將各樣本放入震盪培養箱，以溫度 30 $^{\circ}$ C、轉速 100rpm，進行培養。

2. 分光光度計測定濃度

(1) 取 1 mL 培養基 (YEPD、YEPD+50ppm 兒茶素、YEPD+100ppm 兒茶素)，放入分光光度計測量，作為空白樣本。

(2) 取各樣本中菌液 1 mL 放入分光光度計，利用波長 600nm 測定 0 小時的濃度，作為初始濃度，重複三次，取平均值。

(3) 分別取出已培養 4、24、48 小時的樣本 1 mL 放入分光光度計，利用波長 600nm 測定濃度，重複三次，取平均值。

3. 將各時間點測定的細胞濃度與 0 小時測定的細胞濃度相除，取得相對細胞生長率，比較其生長情形。



圖二 在無菌操作台種菌且抽取樣本

(五) 醱酵速率實驗

酵母菌可藉由進行醱酵作用，產生酒精與二氧化碳及 ATP，為酵母菌產生能量的重要方式，也可顯示其生理活性。此實驗藉由分析單位時間酵母菌的產氣量，推算酵母菌在不同狀況下的醱酵速率，以此作為判斷其生理作用活性與效率的依據。

此實驗分為兩個子實驗，第一個為實驗三，想了解培養於不同葡萄糖濃度下的酵母菌醱酵情形；第二個為實驗四，想了解若是加入不同濃度的兒茶素是否會影響在不同葡

萄糖濃度下酵母菌的醱酵情形。

1. 將三種不同糖濃度（2%、0.5%、0.05%）的 YEPD 3mL 分別加入三個 50mL 的燒杯，並秤取 0.6g 酵母菌粉配置 50mL 酵母菌溶液。
2. 各組都先加 20 μ L DMSO 或 Catechin 在 10mL 針筒底部，在各濃度 YEPD 燒杯中加入 1mL 上述配置的酵母菌溶液，並適度抽吸使菌液與培養基混合均勻。
3. 各組再以 10mL 針筒頭吸取所對應糖濃度的培養基至刻度 3mL，並且即刻以石蠟封住管口，將針頭插入橡皮塞，記錄時間後置入培養箱中培養（30°C）。
4. 等待 24 小時後，將針筒取出，比較各組針筒內體積變化量，推算各組醱酵作用的速率。



圖三 將針頭插入橡皮塞，觀測醱酵作用產氣量

（六）MEP 實驗

MEP 實驗以雌二醇抑制酵母菌子細胞生長，分別在 0、24、48 小時收集細胞樣品，清洗細胞並接種到不含雌二醇的培養基中，去除雌二醇後，僅有母細胞仍然具有複製能力，且會在培養基上分裂形成一個菌落，在對菌落數進行統計後，計算細胞存活率，細胞存活率越高，即代表複製壽命越長。

此實驗分成兩個子實驗，第一個是實驗五，想推估酵母菌在不同葡萄糖濃度下的複製壽命；根據實驗五的結果，進一步進行第二個實驗——實驗六，此實驗在不同葡萄糖濃度培養下，各別加入兒茶素（濃度 50ppm、100ppm）以了解兒茶素對酵母菌複製壽命的影響。

1. 養菌

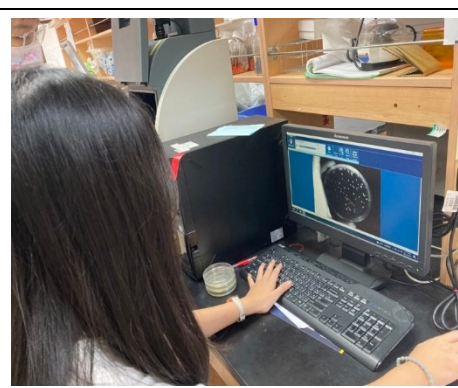
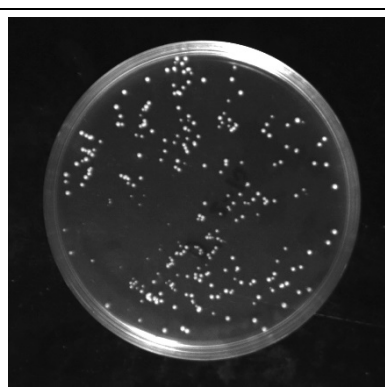
- (1) 在每根養菌管內分別加入 4.5mL 培養基、30 μ L 兒茶素 Stock、5 μ L Estradiol Stock (1mM)。
- (2) 置於旋轉式混合器培養。
- (3) 於 0 小時、24 小時、48 小時取出塗盤。

2. 塗盤

- (1) 分別取 500 μ L 菌液，放置於離心管。
- (2) 離心菌液 (800 rcf, 1min)，移除上清液。
- (3) 加入 1000 μ L ddwater，混合均勻。
- (4) 離心 (800 rcf, 1min)，移除上清液。
- (5) 將離心管內剩餘液體塗盤於固態培養基。

3. 計數

- (1) 開啟 ENDURO™ GDS Touch 軟體，調整倍率。
- (2) 使用 ENDURO™ GDS Gel Documentation System 拍攝，匯入軟體計算菌落數。
- (3) 以肉眼確認電腦無法判斷的菌落，加於最終菌落總數。



圖四

將培養皿置入鏡頭下，以 ENDURO™ GDS Gel Documentation System 拍攝

圖五

ENDURO™ GDS Gel Documentation System 所拍攝之樣本照片

圖六

以 ENDURO™ GDS Touch 讀取樣本菌落數目，再以肉眼進行數目的校正

(七) *SIR2* 基因表現量實驗

實驗六的結果顯示，熱量限制與兒茶素的共同存在能增加酵母菌的複製壽命，接下來的實驗想了解熱量限制如何影響酵母菌複製壽命的胞內傳訊路徑，在查閱文獻後，本組實驗決定分析酵母菌 *SIR2* 這個常和酵母菌複製壽命相關的基因表現量。依照實驗結果繪製圖表，分別以不同葡萄糖濃度為 X 軸，Y 軸以 *SIR2* 基因的 Ct 值減去控制基因 (*ACT1*) 的差值倒數作為基因表現量的指標，數值越高代表基因表現量越高。

此實驗分為兩個子實驗，第一個為實驗七，目的是探討不同葡萄糖濃度下 *SIR2* 基因的表現量差異；第二個為實驗八，欲了解不同葡萄糖濃度下兒茶素的處理對酵母菌 *SIR2* 基因表現量的影響，進而確認兒茶素是否會透過此基因的傳訊路徑而延長複製壽命。

1. RNA 萃取 (RNeasy Mini Kit)

- (1) 將各組已培養過夜的酵母菌菌液收集到離心管，並置入離心機離心 (3000rpm, 5 min)。
- (2) 抽乾樣品液體，加入 Buffer RLT 與 70% 乙醇各 1200 μ L。
- (3) 使溶液均勻混合後取 700 μ L 置入小離心管。
- (4) 離心 (8000rcf, 30sec) 後將下層液體倒掉。
- (5) 重複步驟 (3)、(4) 一次
- (6) 加入 700 μ L Buffer RW1。
- (7) 重複步驟 (4)，加入 500 μ L Buffer RPE，此步驟 (步驟 7) 需重複、共兩次。
- (8) 離心 (8000rcf, 2min) 後更換新的外層離心管，再離心 (8000rcf, 1min)，將原內層離心管置入另一有蓋的離心管中。
- (9) 加入 30 μ L nuclease-free water，離心 (8000rcf, 1min)，此步驟可重複。
- (10) 用 Gen5 3.04 及 EPOCH2 Plate Reader 測量 RNA 純度及濃度，若 260/280 大於 1.8、濃度約大於 60ng/ μ L，則可進行 RT。

2. Reverse Transcription (Thermo Scientific™ RevertAid RT Reverse Transcription Kit)

- (1) 以濃度計算個實驗組須加入到微量離心管的體積，使每組 RNA 量相同。
- (2) 加入適量 nuclease-free water，使各組總體積為 11 μ L。
- (3) 加入 Random Primer 1 μ L。

(4) 加 10 倍的 5X Reaction Buffer 4 μ L、RiboLock Nase Inhibitor 1 μ L、10 mM dNTP Mix 2 μ L、RevertAid RT (200 U/ μ L) 1 μ L 到另外一個離心管，並使其均勻後，每一組加此溶液 8 μ L 再使其均勻。

(5) 將離心管置入 MiniAmp™ Plus Thermal Cycler 並以 RevertAid RT 處理後置入-20 度冰箱。

3. PCR (QuantiNova™ SYBR® Green PCR Kit)

(1) 將已完成反轉錄、冰在-20°C 冰箱的樣品取出，並各加入 198 μ L nuclease-free water 並開始避光、加入 2 μ L Yellow Template Dilution Buffer。

(2) 將各 28 μ L *SIR2* 的前置引子 (forward primer) 與反置引子 (reverse primer) 加入另一個微量離心管中，總共 54 μ L；ACT1 重複相同步驟。

(3) 在裝有 *SIR2* 和 *ACT1* 引子的離心管裡各加入 56 μ L QN Rox Dye、280 μ L SYBR Green PCR Master Mix，並使其混合均勻。

(4) 在 96 孔盤內相對應基因的孔格加入各 14 μ L 已加入引子和 QN Rox Dye、SYBR Green PCR Master Mix 的溶液。

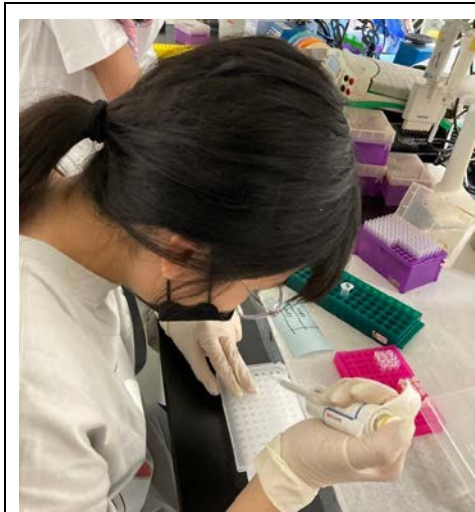
(5) 將有 DNA 的樣品組別加 6 μ L 到相對應孔格。

(6) 離心 1 分鐘後，置入 StepOnePlus™ Real-Time PCR System，處理過程如圖二所示。

(7) 等待完成後，將樣品取出，並存取數據。

Step	Time	Temperature	Ramp rate
PCR initial activation step	2 min	95°C	Maximal/ fast mode
2-step cycling			
Denaturation	5 s	95°C	Maximal/ fast mode
Combined annealing/ extension	10 s*	60°C	Maximal/ fast mode
Number of cycles	35–40 [†]		
Melting curve analysis[§]			

圖七 StepOnePlus™ Real-Time PCR System 流程



圖八
qPCR 實驗操作



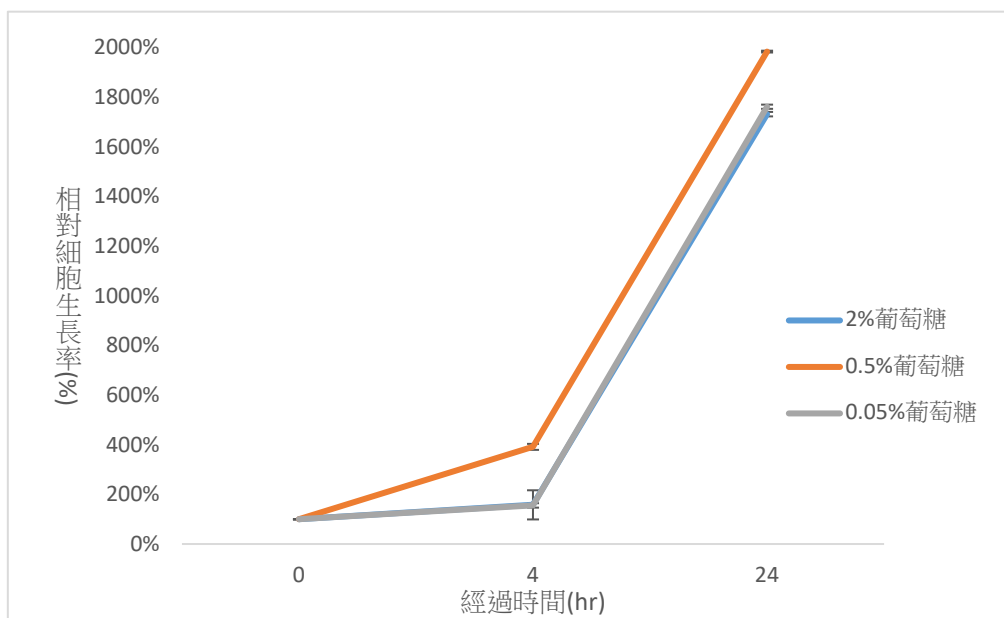
圖九
MiniAmp™ Plus Thermal
Cycler



圖十
StepOnePlus™ Real-Time
PCR System

肆、研究結果

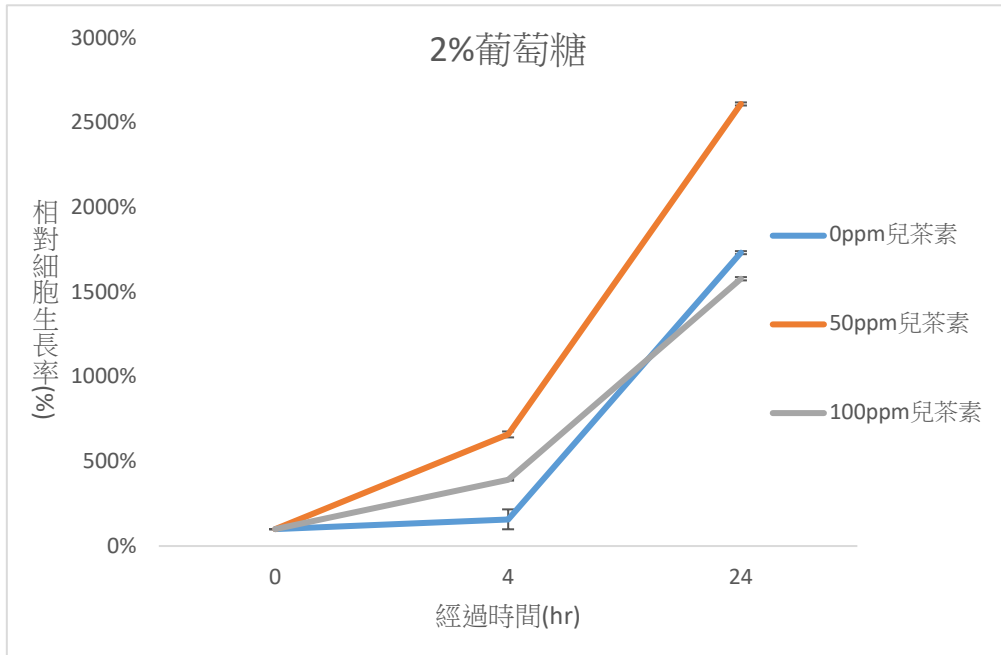
實驗一、探討在不同葡萄糖濃度下酵母菌的生長情況



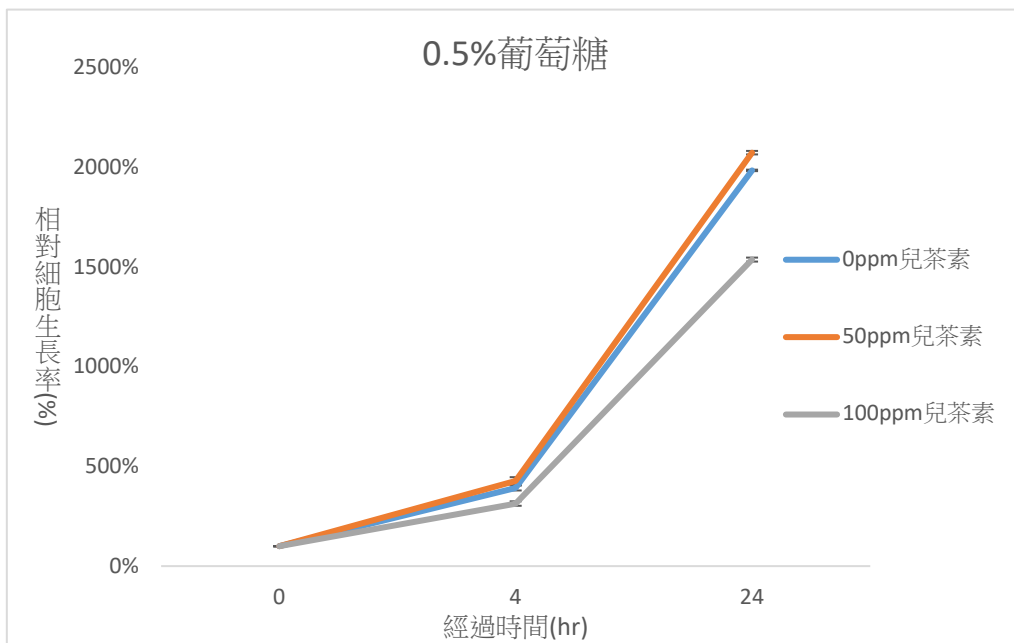
圖十一 不同葡萄糖濃度下酵母菌數量增長趨勢圖

由圖十一可得，在三種葡萄糖濃度培養液的酵母菌培養至 24 小時，都有明顯的生長情形，其中在 0.5%葡萄糖下酵母菌的細胞數量增加速度最快，且培養 24 小時的細胞數量增加倍率最大，代表其生長情形最佳，再接著依序是 0.05%葡萄糖和 2%葡萄糖的組別。

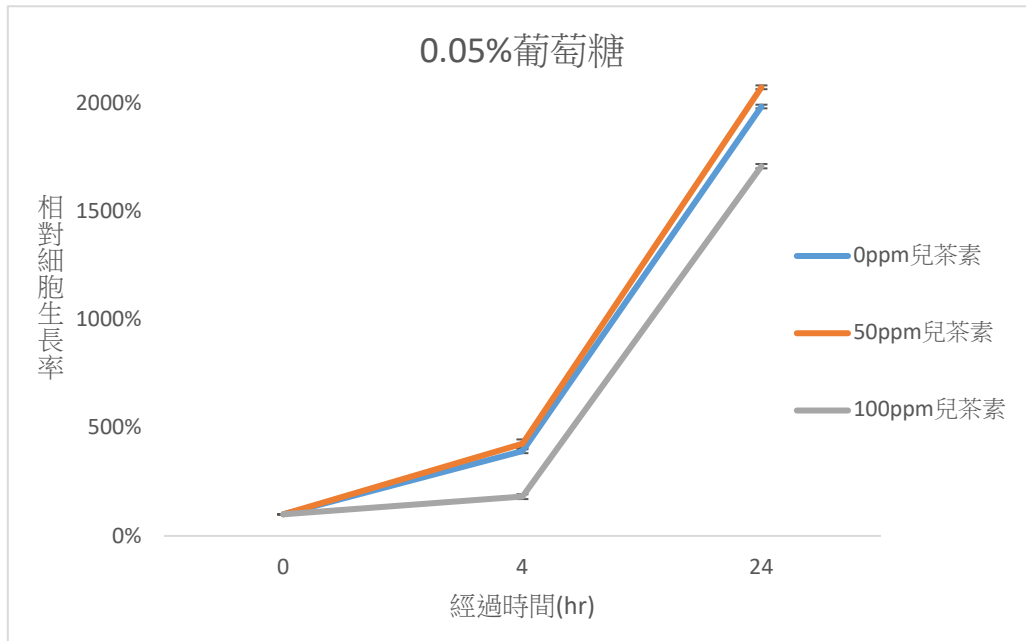
實驗二、探討在不同葡萄糖濃度下加入兒茶素後酵母菌的生長情況



圖十二 2%葡萄糖濃度下加入兒茶素酵母菌數量增長趨勢圖



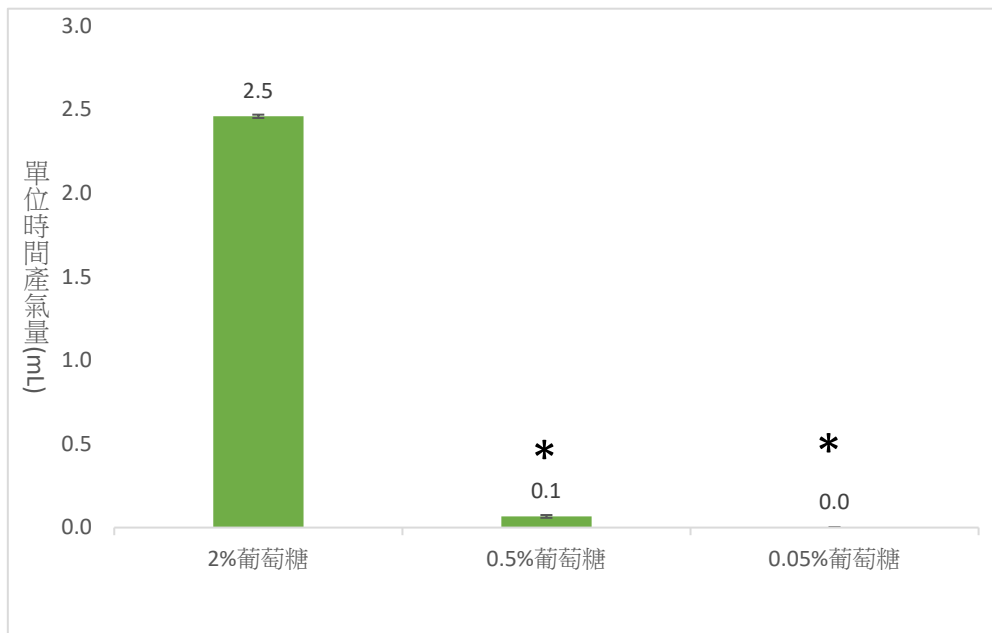
圖十三 0.5%葡萄糖濃度下加入兒茶素酵母菌數量增長趨勢圖



圖十四 0.05%葡萄糖濃度下加入兒茶素酵母菌數量增長趨勢圖

由圖十二、圖十三、圖十四可發現在 2%、0.5%、0.05%葡萄糖濃度下，相較於不加入兒茶素的控制組，加入 50ppm 兒茶素後酵母菌的生長速率增加；而加入 100ppm 兒茶素後，相較於不加入兒茶素的控制組，酵母菌的生長速率有下降的趨勢。

實驗三、探討在不同葡萄糖濃度下酵母菌的發酵速率

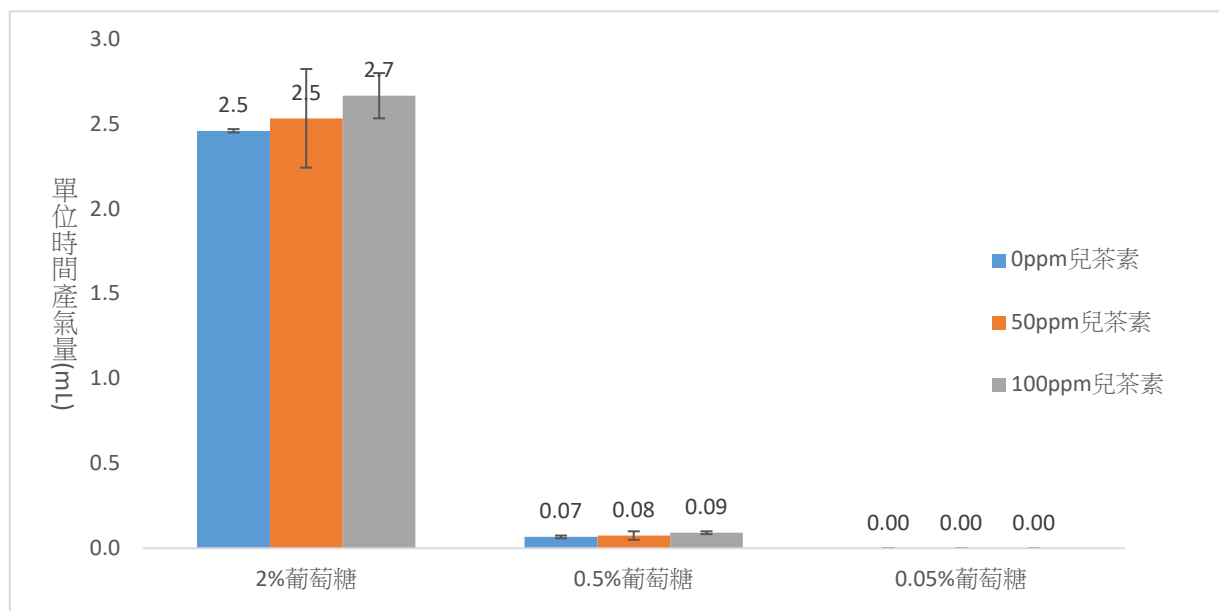


圖十五 不同葡萄糖濃度下的酵母菌單位時間產氣量

(*表示與 2%葡萄糖的產氣量相比有顯著差異(單尾 T 檢定), *: $p < 0.05$ 。)

由圖十五可知，只有 2% 葡萄糖的組別才有明顯的產氣，而在 0.5% 與 0.05% 葡萄糖濃度下的組別僅產生些微氣泡，產氣效果不明顯。

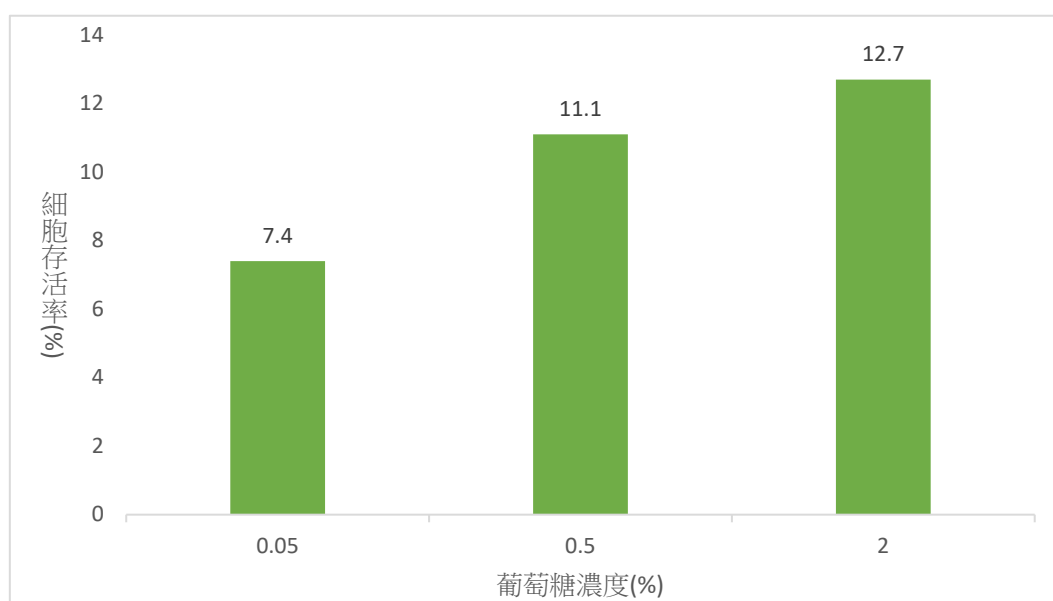
實驗四、探討在不同葡萄糖濃度下加入兒茶素後酵母菌的醱酵速率



圖十六 不同葡萄糖濃度下加入兒茶素的酵母菌單位時間產氣量比較圖

由圖十六可知，相較於不加兒茶素的組別，加入兒茶素後醱酵作用的單位時間產氣量在統計上 P 值皆大於 0.05，未達顯著差異，可知加入兒茶素對於在不同糖濃度下的酵母菌醱酵作用沒有明顯影響。

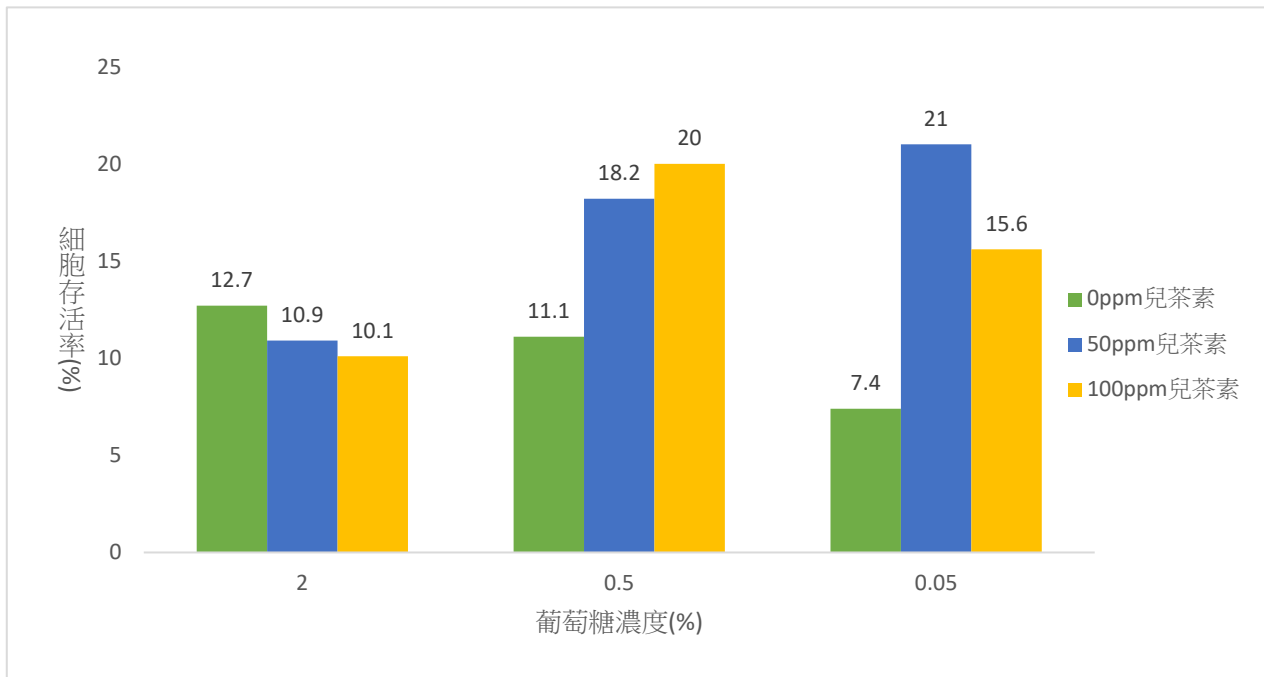
實驗五、探討在不同葡萄糖濃度下酵母菌的複製壽命



圖十七 不同葡萄糖濃度下的酵母菌培養經 48 小時存活率（複製壽命指標）

由圖十七酵母菌存活率的實驗結果可知道，培養在不同葡萄糖濃度的酵母菌，其複製壽命由長到短的順序為葡萄糖濃度 2%組別 > 0.5%組別 > 0.05%組別，此結果顯示在一定範圍內，隨著葡萄糖濃度的提高可以增加酵母菌的複製壽命。

實驗六、探討在不同葡萄糖濃度下加入兒茶素後酵母菌的複製壽命

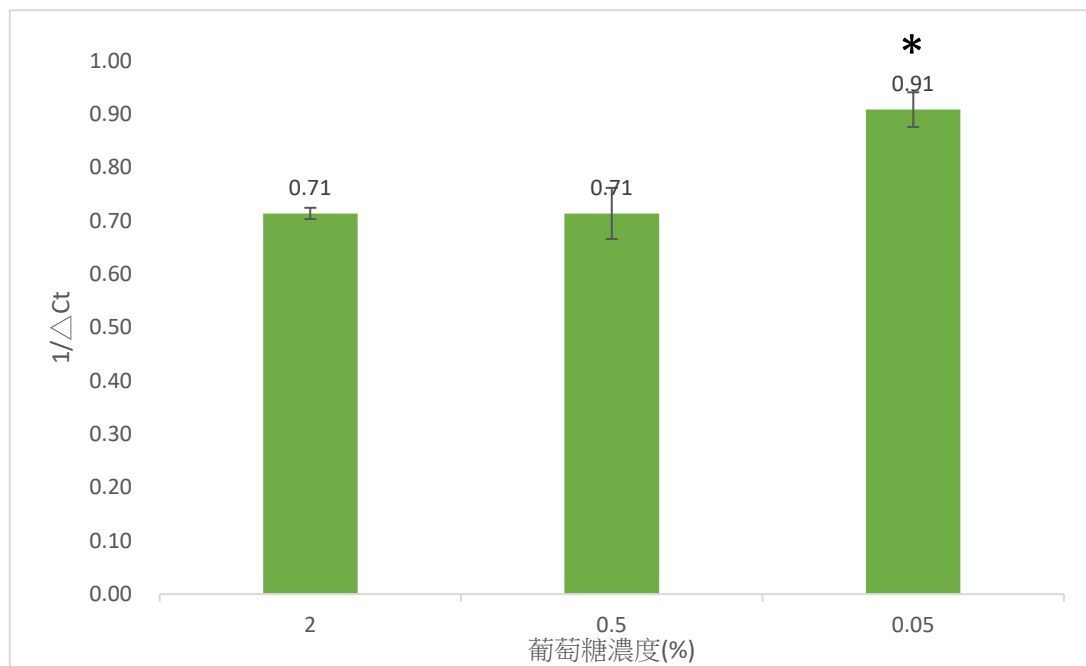


圖十八 在不同葡萄糖濃度下加入兒茶素後酵母菌培養經 48 小時存活率（複製壽命指標）

由圖十八可知，在 2%葡萄糖濃度下，相較於控制組，加入 50 和 100ppm 的兒茶素對酵母菌複製壽命沒有明顯影響。在 0.5%和 0.05%葡萄糖濃度下，相較於控制組，加入 50 和 100ppm 的兒茶素會使酵母菌複製壽命明顯提高。

整體而言，在 0.5%和 0.05%的葡萄糖濃度下，加入 50ppm 與 100ppm 的兒茶素對於酵母菌複製壽命都有明顯的提升效果。由此結果，本實驗推測若要增加酵母菌的複製壽命可以透過同時給予熱量限制（0.5 和 0.05%的葡萄糖濃度）和兒茶素（50ppm 和 100ppm）這兩個條件來達成。

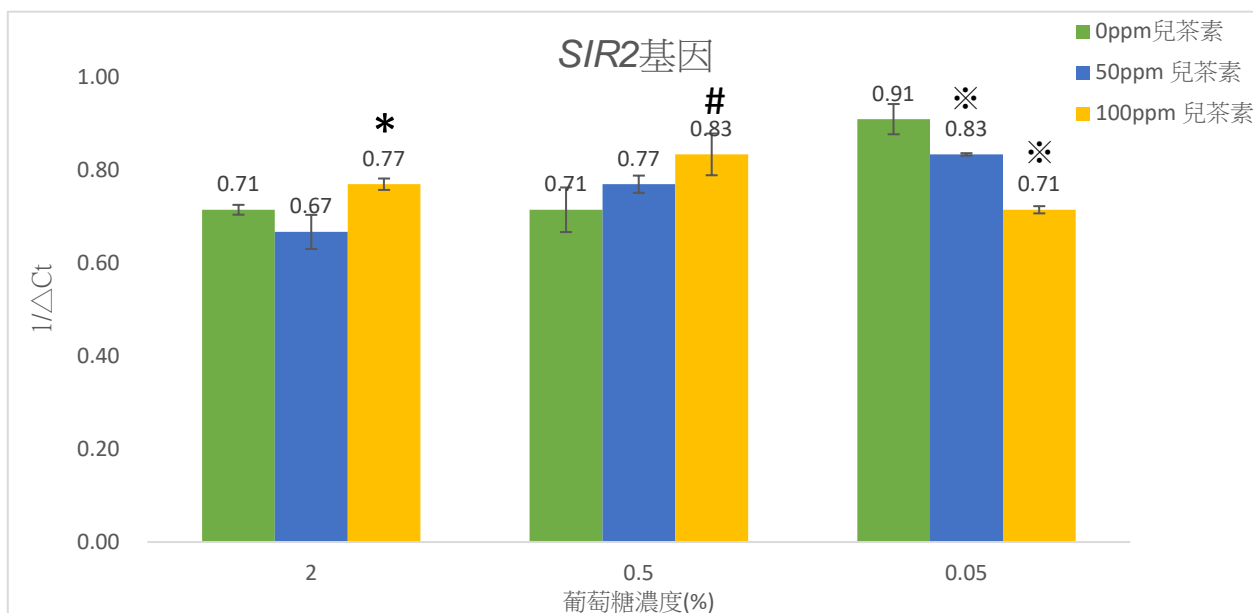
實驗七、探討不同葡萄糖濃度對酵母菌 *SIR2* 基因表現量的影響



圖十九 不同葡萄糖濃度下的酵母菌 *SIR2* 基因表現量
 (*表示與 2%葡萄糖的 1/ΔCt 值相比有顯著差異(單尾 T 檢定), *: p<0.05。)

由圖十二可知，在 2%及 0.5%葡萄糖濃度的組別其 *SIR2* 基因表現量相近，而在 0.05%葡萄糖濃度的 *SIR2* 基因表現量具有顯著差異的上升情形。

實驗八、探討在不同葡萄糖濃度下加入兒茶素後對酵母菌 *SIR2* 基因表現量的影響



圖二十 在不同葡萄糖濃度下加入兒茶素後酵母菌 *SIR2* 基因表現量比較圖
 (*表示與 2%葡萄糖的 1/ΔCt 值相比有顯著差異(單尾 T 檢定), *: p<0.05。
 #表示與 0.5%葡萄糖的 1/ΔCt 值相比有顯著差異(單尾 T 檢定), #: p<0.05。
 ※表示與 0.05%葡萄糖的 1/ΔCt 值相比有顯著差異(單尾 T 檢定), ※: p<0.05。)

由圖二十可知：

- (一) 在 2%葡萄糖濃度下加入不同濃度的兒茶素，相較於控制組，加入 100ppm 兒茶素 *SIR2* 基因表現量的上升具有顯著差異。
- (二) 在 0.5%葡萄糖濃度下加入不同濃度的兒茶素，相較於控制組，加入 50ppm 和 100ppm 兒茶素時會使酵母菌的 *SIR2* 基因表現量有上升的趨勢，且加入 100ppm 兒茶素 *SIR2* 基因表現量的上升具有顯著差異。綜合實驗六，在熱量限制下加入兒茶素使酵母菌複製壽命增加的結果，顯示 *SIR2* 基因可能參與在熱量限制下加入兒茶素增加複製壽命的作用。
- (三) 在 0.05%葡萄糖下加入不同濃度的兒茶素，相較於控制組，加入 50ppm 和 100ppm 兒茶素時會使酵母菌的 *SIR2* 基因表現量有下降的趨勢，且皆具有顯著差異。然而由實驗六的結果可得，在極端熱量限制下加入兒茶素能增加酵母菌複製壽命，推測仍可能有其他機制共同參與極端熱量限制和兒茶素延長壽命的過程。

伍、討論

一、關於熱量限制與兒茶素對酵母菌生長速率的影響

- (一) 從實驗一中可以看到 2%、0.5%、0.05%三種葡萄糖濃度的組別，酵母菌在 0.5%葡萄糖的生長情況最佳，推測熱量限制有助於酵母菌生長；在 2%和 0.05%葡萄糖濃度下，其生長速率較低，猜測極端熱量限制會使酵母菌生長速率受限制，不過依據所參考的熱量限制相關文獻((Schleit, J.等人, 2012))也有以 0.05%葡萄糖視為熱量限制的條件，所以是否因為醣類濃度過低而降低生長速率，仍需要更多的研究才能確認。
- (二) 從實驗二中在 2%、0.5%、0.05%三種葡萄糖濃度下與兒茶素共同處理的組別中，加入 50ppm 兒茶素後酵母菌的生長速率，相較於沒有加入兒茶素的組別，皆有些微上升顯示加入兒茶素有助於提升酵母菌生長速率，且與熱量限制並行有加乘的效果。
- (三) 綜合實驗一、實驗二，2%葡萄糖加入特定兒茶素濃度和熱量限制(0.5%葡萄糖)的組別皆有較好的生長情形，推測兒茶素作為熱量限制模擬物之潛力。

二、關於熱量限制與兒茶素對酵母菌醱酵作用的影響

- (一) 由實驗三結果可知，在葡萄糖 2%、0.5%、0.05%三個組別中，2%葡萄糖的產氣量最為明顯，推測是因為低糖組別的酵母菌，缺少行醱酵作用所需的主要原料——醣類，因此醱酵作用效率不佳。
- (二) 由實驗四的結果可知，在 2%、0.5%、0.05%葡萄糖濃度下加入兒茶素後，酵母菌的單位時間產氣量相較於控制組，皆沒有明顯差異(P 值>0.05)，推測兒茶素對酵母菌的醱酵作用沒有明顯影響。

三、熱量限制與兒茶素的共同處理能有效延長酵母菌的複製壽命

- (一) 在未加兒茶素的 2%、0.5%、0.05%葡萄糖三個組別中，複製壽命以 2%葡萄糖為最高，並隨糖濃度減少而遞減，顯示在熱量限制的狀況下，無法顯著延長複製壽命。
- (二) 在 2%葡萄糖組別中加入兒茶素並未提高複製壽命，但在 0.5%及 0.05%葡萄糖的組別中，進行熱量限制且加入兒茶素的組別複製壽命較高，其中 0.05%葡萄糖+50ppm 兒茶素的組別有最高的複製壽命，顯示 CR+CRM 組合的複製壽命明顯更高於 CR、正常醣加入 CRM 與正常醣的組別，因此推測只對酵母菌進行 CR 或是只加入兒茶素時，無法顯著延長其複製壽命，但在 CR 與 CRM 兼具時，對酵母菌複製壽命的延長效果最佳，推斷兩者共同處理更能有效延長酵母菌複製壽命。
- (三) 根據文獻資料 (Lindstrom,D.L.,2009) 指出，MEP 實驗在 24 小時過後，會因培養基營養耗盡而影響酵母菌複製壽命，若為傳統 RLS 測量實驗，可藉由降低細胞密度避免培養基營養耗盡，在 MEP 實驗時，可根據目標年齡做出所需濃度之培養基，但這與此實驗想觀察在特定葡萄糖濃度下酵母菌之壽命的目標不符，所以若要精準測量熱量限制時酵母菌複製壽命，傳統 RLS 實驗將比較適合，未來希望可以進行 RLS 實驗進而確認此研究的結果。

四、酵母菌在熱量限制或加入兒茶素時 *SIR2* 基因表現量相較於對照組大多上升

- (一) 在實驗七中，比較未加兒茶素的 2%、0.5%、0.05%葡萄糖三個組別中，0.05%葡萄糖 *SIR2* 基因表現量最高，且將其數據與 2%、0.5%的 ΔCt 值（兩組數據相近）比較，達統計上 $p<0.05$ 的顯著差異，可見在極端 CR 情況下 *SIR2* 基因表現較多，而這樣的結果和我們所找到的參考文獻相符。

- (二) 由於在 0.5%葡萄糖加入兒茶素的組別中，有隨著兒茶素濃度提高而 *SIR2* 基因表現量也提升的趨勢，此結果與在 0.05%葡萄糖 *SIR2* 基因表現量較高的情況類似，因此，推測加入兒茶素與極端熱量限制在開啟 *SIR2* 基因上有相似效果，更確定兒茶素可作為熱量限制模擬物之潛力。
- (三) 由實驗八結果可知，0.5%葡萄糖加入兒茶素的組別，隨著兒茶素濃度提高，基因表現量上升，然而在 0.05%葡萄糖加入兒茶素時，趨勢與前者相反，此結果與在複製壽命實驗中，0.5%、0.05%葡萄糖加入兒茶素時複製壽命皆上升的情形不符，於是推測除了 *SIR2* 基因外，可能還有其他基因會影響酵母菌複製壽命，例如 *AMPK* 的激活同樣可以造成蛋白質去乙酰化，延長酵母菌複製壽命；以及細胞自噬抑制因子 *mTOR*，*mTOR* 的抑制可以減緩酵母菌的老化，達到延長壽命的效果 (Lu, J. Y.等人,2011)。
- (四) 綜合實驗七、八，加入兒茶素能提升酵母菌 *SIR2* 基因的表現量，依據文獻 (Hofer, sebastian J,2021) *SIR2* 基因的開啟將能延長生物體壽命，且 *SIR2* 基因與人類 *SIRT1* 基因為同源基因 (Guarente, L.,2005)，希望此研究能成為研究人類延壽的基礎，為人類社會帶來福祉。

陸、結論

- 一、在實驗一與實驗二的存活率實驗中，在不同醣類濃度下酵母菌生長情況以熱量限制 (0.5%葡萄糖) 組別最佳，而在 2%、0.5%及 0.05%葡萄糖下加入 50ppm 兒茶素濃度能提升酵母菌的生長速率。
- 二、在實驗三與實驗四的醱酵實驗中，相較於熱量限制的組別，2%葡萄糖的組別醱酵效率最佳，而加入兒茶素對於酵母菌的醱酵情形無顯著影響。
- 三、在實驗五與實驗六的複製壽命實驗中，酵母菌的複製壽命並沒有因為熱量限制而顯著延長，然而同時給予熱量限制 (0.5%和 0.05%葡萄糖) 和兒茶素 (50ppm 和 100ppm)，則有增加複製壽命的效果。
- 四、在實驗七與實驗八的 *SIR2* 基因表現量實驗中，在極端熱量限制 (0.05%葡萄糖)、熱量限制 (0.5%葡萄糖) 時加入兒茶素和 2%葡萄糖濃度加入 100ppm 兒茶素這三個組別能顯著增加酵母菌 *SIR2* 基因的表現量，結合實驗六在熱量限制下加入兒茶素提升酵母菌複製

壽命的結果，顯示在熱量限制（0.5%葡萄糖）情況下，*SIR2* 基因可能參與兒茶素增加複製壽命的作用。

五、由 CR 搭配加入兒茶素（potential CRM）對酵母菌的細胞生長速率與複製壽命皆有較佳的影響，推測進行一定限度的限制熱量搭配兒茶素--潛在熱量限制模擬物，在 CR 與 CRM 兩者具備的情況下，可能對生物體有增益健康、延長壽命的效果。

六、加入兒茶素與熱量限制能使細胞生長速率上升及 *SIR2* 基因表現量上升，由此推測兒茶素作為熱量限制模擬物的潛力；且因 *SIR2* 基因的開啟能延長生物體壽命，又酵母菌 *SIR2* 基因為人類 *SIRT1* 基因的同源基因，希望此研究能成為探討熱量限制模擬物之模型，進而作為研究人類延壽的基礎。

柒、參考資料及其他

一、參考文獻

(一) 顏兆熊.(2021). *喝茶與健康*. Taiwan Medical Journal, 64(7), 388 – 393.

(二) Guarente, L., & Picard,Frédéric. (2005). Calorie Restriction— the *SIR2* Connection. Cell, 120(4), 473 – 482. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.029>

(三) Hofer, Sebastian J, Davinelli, S., Bergmann, M., Scapagnini, G., & madeo, frank.(2021). Caloric Restriction Mimetics in Nutrition and Clinical Trials. Front Nutr., 8(717343). <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.717343>

(四) Hwangbo, D. S., Lee, H. Y., Abozaid, L. S., & Min, K. J. (2020). Mechanisms of Lifespan Regulation by Calorie Restriction and Intermittent Fasting in Model Organisms. Nutrients, 12(4). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32344591/>

(五) Kaeberlein , M. (2010). Lessons on Longevity from Budding Yeast. Nature, 464(7288), 513 – 519

(六) Kaeberlein M, McVey M, Guarente L.(1999) The *SIR2/3/4* complex and *SIR2* alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. Genes Dev,13(19), 2570-80. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10521401/>

(七) Lin, S. J., Defossez, p A , & Guarente, L. (2000). Requirement of NAD and *SIR2* for Life-Span Extension by Calorie Restriction in *Saccharomyces Cerevisiae*. Science, 289(5487), 2126 – 2128.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11000115/>

(八) Lin, S.J., Kaeberlein, M., Andalis, A. et al. (2002). Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature*, 418(6895), 344 – 348.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12124627/>

(九) Lindstrom, D. L., & Gottschling, D. e. (2009). The Mother Enrichment Program: A Genetic System for Facile Replicative Life Span Analysis in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics*, 183(2), 413 – 422. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19652178/>

(十) Lu, J. Y., & Lin, Y. Y. (2011). Acetylation of Yeast AMPK Controls Intrinsic Aging Independently of Caloric Restriction. *Cell*, 146(6), 969 – 979.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21906795/>

(十一) Madeo, F., Gutierrez, D. C., Hofer, S. J., & Kroemer, G. (2019). Caloric Restriction Mimetics against Age-Associated Disease: Targets, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Cell Metabolism*, 29(3), 592 – 610. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30840912/>

(十二) North, B. J., & Verdin, Eric . (2004). Sirtuins: *SIR2*-Related NAD-Dependent Protein Deacetylases. *Genome Biol*, 5(5), 224. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15128440/>

(十三) Schleit, J., Wasko, B. M., & Kaeberlein, M. (2012). Yeast as a Model to Understand the Interaction between Genotype and the Response to Calorie Restriction. *FEBS Lett*, 586(18), 2868 – 2873. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22828279/>

(十四) Shi, X., Zou, Y., Chen, Y., & Ying, H. (2018). Overexpression of *THI4* and *HAP4* Improves Glucose Metabolism and Ethanol Production in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Front Microbiol*. 9:1444. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29997610/>

(十五) Steffen, K. K., Kennedy, B. K., & Kaeberlein, M. (2009). Measuring Replicative Life Span in the Budding Yeast. *JoVE*, (28), 1209. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19556967/>

(十六) Taormina, G., & Mirisola, M. G. (2004). Calorie Restriction in Mammals and Simple Model Organisms. *Biomed Res Int.*, 308690. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24883306/>

(十七) Wierman, M. b., & Smith, J. s. (2014). Yeast SIRTuins and the Regulation of Aging. *FEMS Yeast Res*, 14(1), 73 – 88. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24164855/>

二、附錄

(一) *SIR2* 之引子序列

<i>SIR2</i>	Forward	5' -GGC AGT GTC AGC AGC TTC AG- 3'
	Reverse	5' -GGG CGT CTC TGG TTT CAA AA- 5'

(二) *ACT1* 之引子序列

<i>ACT1</i>	Forward	5' -TGG ATT CCG GTG ATG GTG TT- 3'
	Reverse	5' -TGG CGT GAG GTA GAG AGA AAC C- 3'

【評語】 052207

1. 本作品探討熱量限制與兒茶素對酵母菌生長的影響。結果發現0.5%葡萄糖與加入50 ppm 兒茶素濃度能提升酵母菌的生長速率，而同時給予熱量限制(0.5%和0.05%葡萄糖)和兒茶素(50 ppm 和 100ppm)，則有增加複製壽命的效果。
2. 複製壽命的定義宜再加強說明；建議可針對兒茶素濃度進行試驗，因兒茶素也具有抑制微生物生長的作用。
3. 部分實驗結果顯著差異分析標示宜加強。

作品簡報

兒茶素新天地 ——

兒茶素與熱量限制對酵母菌壽命之影響

科別：農業與食品學科

組別：高級中等學校組

前言

- **熱量限制**(Caloric Restriction, CR)：有限度限制熱量供給能使生物體延緩衰老、促進長壽。**熱量限制模擬物**(Caloric Restriction Mimetic, CRM)：不進行CR，也能達成CR對生物體的影響。
 - 糖濃度：2%、0.5%和0.05% 對應正常、CR與極端CR。
 - 兒茶素 (Catechin)：潛在熱量限制模擬物(potential CRM)
- **複製壽命**：以酵母菌母細胞抵達壽命終點前可產生的子代數量作為指標。
- **SIR2基因**：由文獻可知熱量限制可能透過開啟酵母菌SIR2基因延長其壽命 (Guarente, L.等人, 2005)。

研究架構

兒茶素與熱量限制對酵母菌之影響

細胞生長率試驗

利用分光光度計測量不同葡萄糖濃度下的酵母菌樣本吸光值

利用分光光度計測量不同葡萄糖濃度下加入兒茶素的酵母菌樣本吸光值

發酵速率實驗

測量不同葡萄糖濃度下的酵母菌單位時間產氣量

測量不同葡萄糖濃度下加入兒茶素的酵母菌單位時間產氣量

MEP 實驗(The Mother Cell Enrichment Program)

比較不同葡萄糖濃度下的酵母菌複製壽命

比較不同葡萄糖濃度下加入兒茶素的酵母菌複製壽命

SIR2 基因表現量實驗

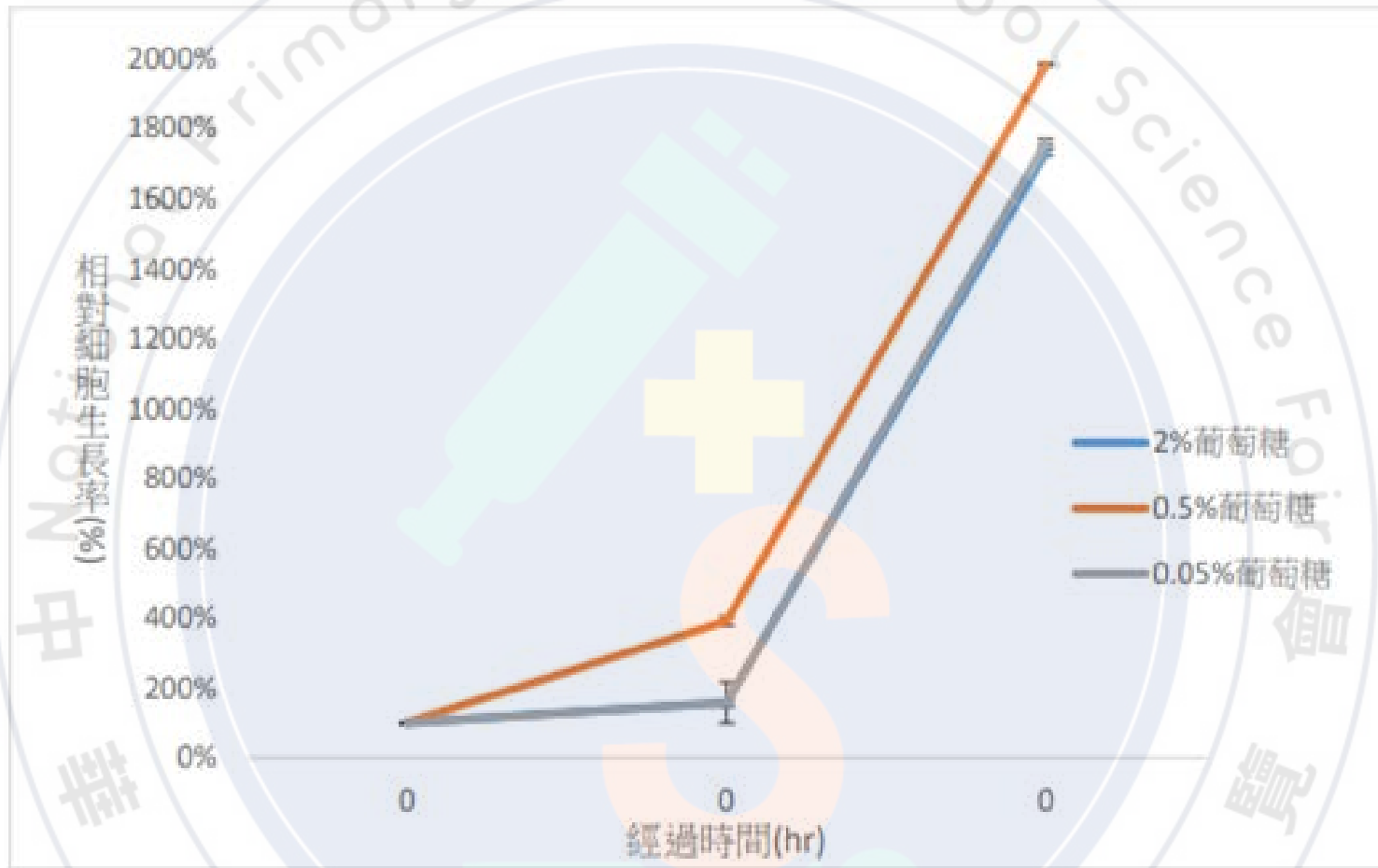
以 PCR 測定不同葡萄糖濃度下的酵母菌 *SIR2* 基因表現量

以 PCR 測定不同葡萄糖濃度下加入兒茶素的酵母菌 *SIR2* 基因表現量

統整熱量限制及兒茶素對於酵母菌壽命之影響

研究結果與討論

不同葡萄糖濃度下酵母菌的生長情況



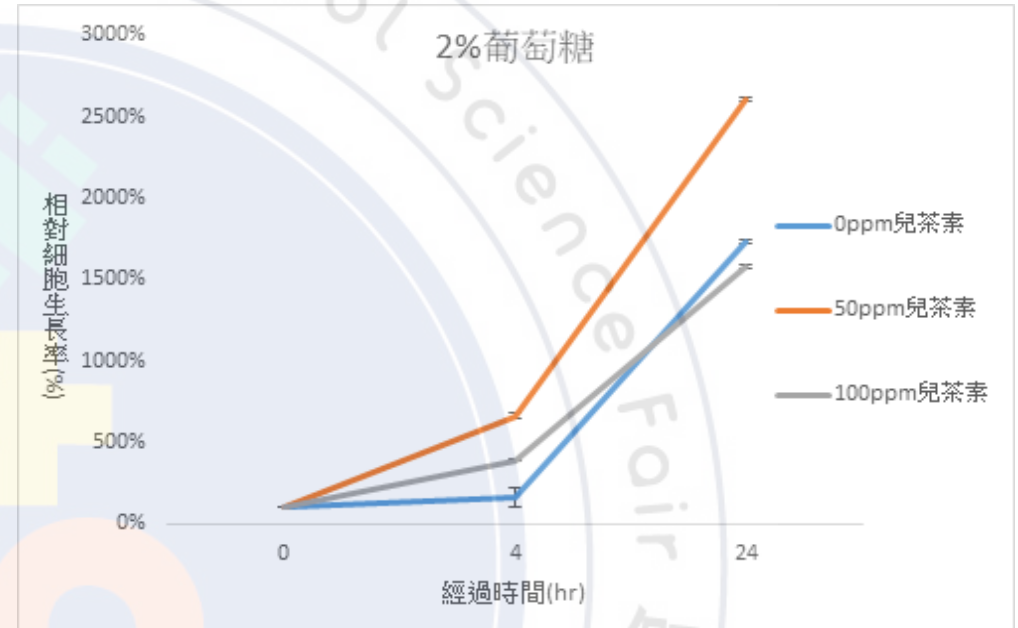
圖一 不同葡萄糖濃度下酵母菌數量增長趨勢圖

- 酵母菌在0.5%葡萄糖的生長情況最佳，推測熱量限制有助於酵母菌生長。
- 在2%和0.05%葡萄糖濃度下，生長速率較低，猜測極端熱量限制會使酵母菌生長速率受限制。

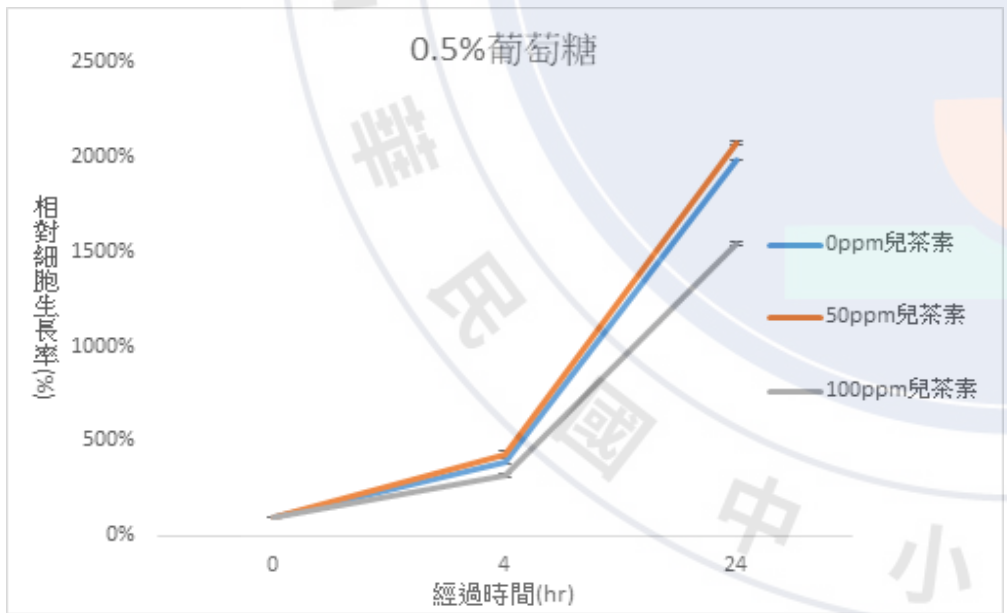
研究結果與討論

不同葡萄糖濃度下加入兒茶素後酵母菌的生長情況

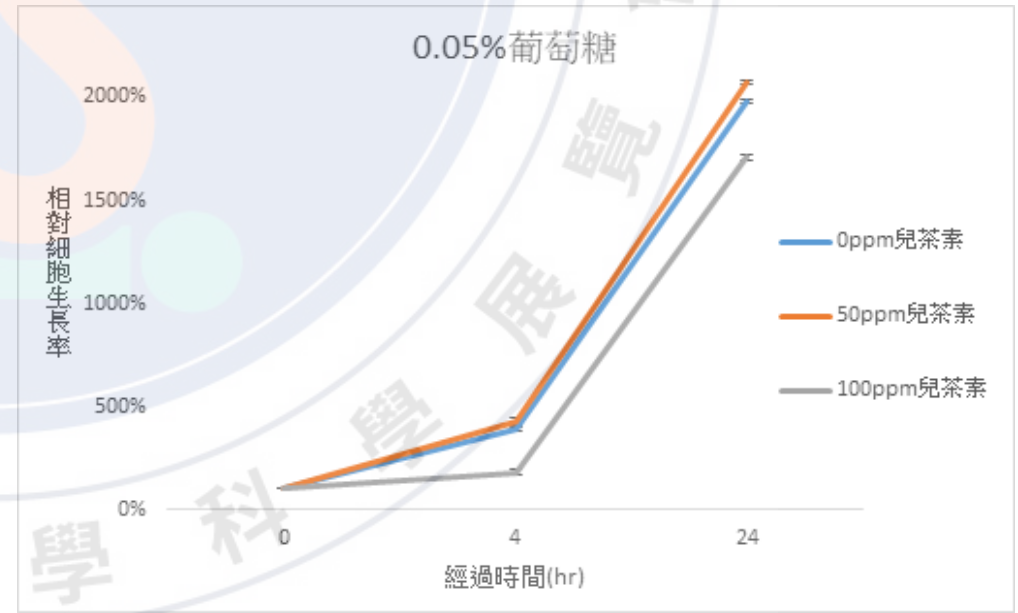
- 在 2%、0.5%、0.05% 葡萄糖濃度下加入 50ppm 兒茶素後酵母菌的生長速率，相較於沒有加入兒茶素的組別，皆有些微上升。
- 加入兒茶素有助於提升酵母菌生長速率，且與熱量限制並行有加乘的效果。



圖二 2% 葡萄糖濃度下加入兒茶素酵母菌數量增長趨勢圖



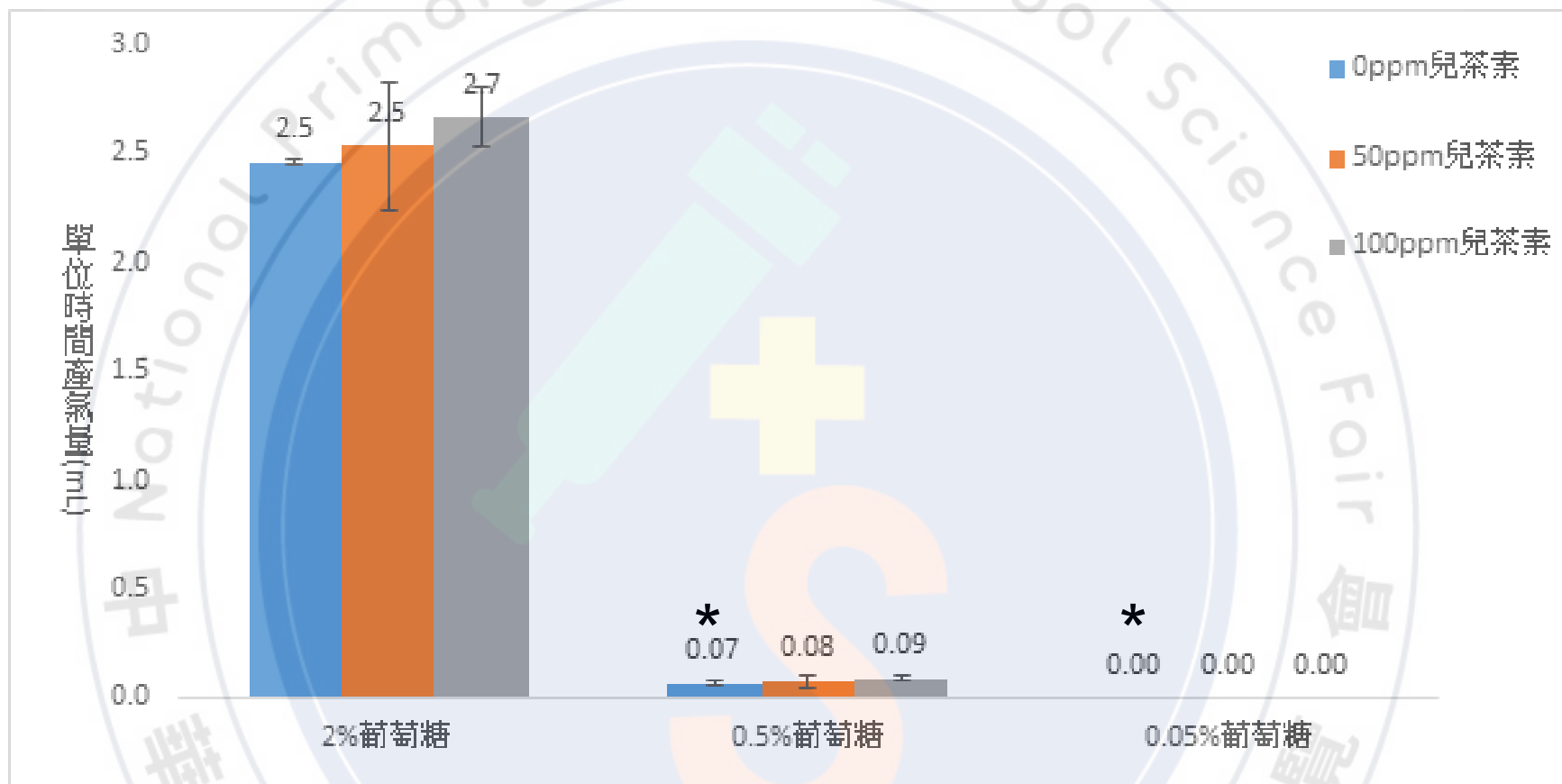
圖三 0.5% 葡萄糖濃度下加入兒茶素酵母菌數量增長趨勢圖



圖四 0.05% 葡萄糖濃度下加入兒茶素酵母菌數量增長趨勢圖

研究結果與討論

不同葡萄糖和兒茶素濃度對酵母菌發酵速率的影響

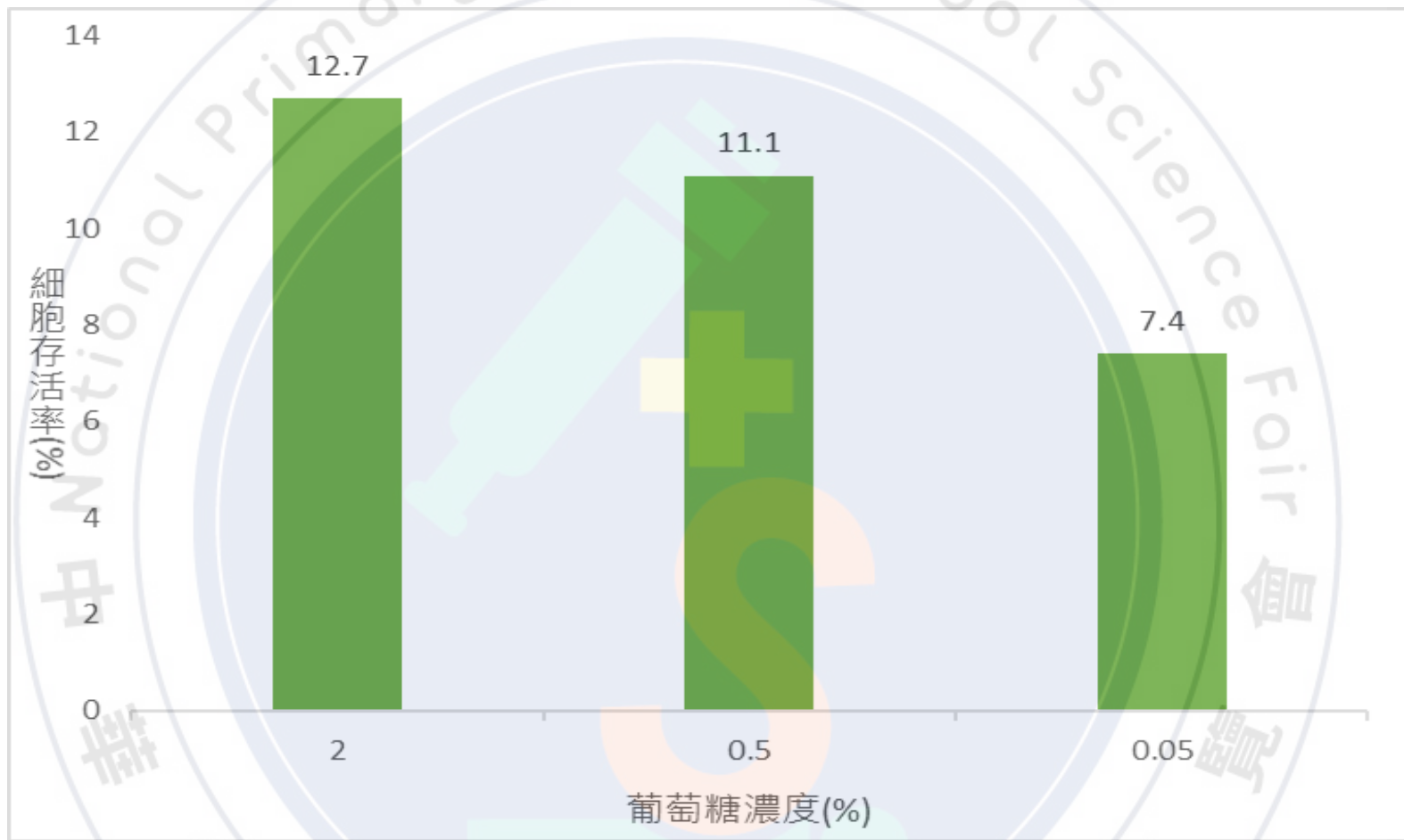


圖五 不同葡萄糖濃度下加入兒茶素的酵母菌單位時間產氣量比較 (*表示與2%葡萄糖的產氣量相比有顯著差異)

- 2%葡萄糖的產氣量最為明顯，推測是因為低糖組別的酵母菌，缺少行發酵作用所需的醣類。
- 在2%、0.5%、0.05%葡萄糖濃度下加入兒茶素後，對酵母菌的發酵作用沒有明顯影響。

研究結果與討論

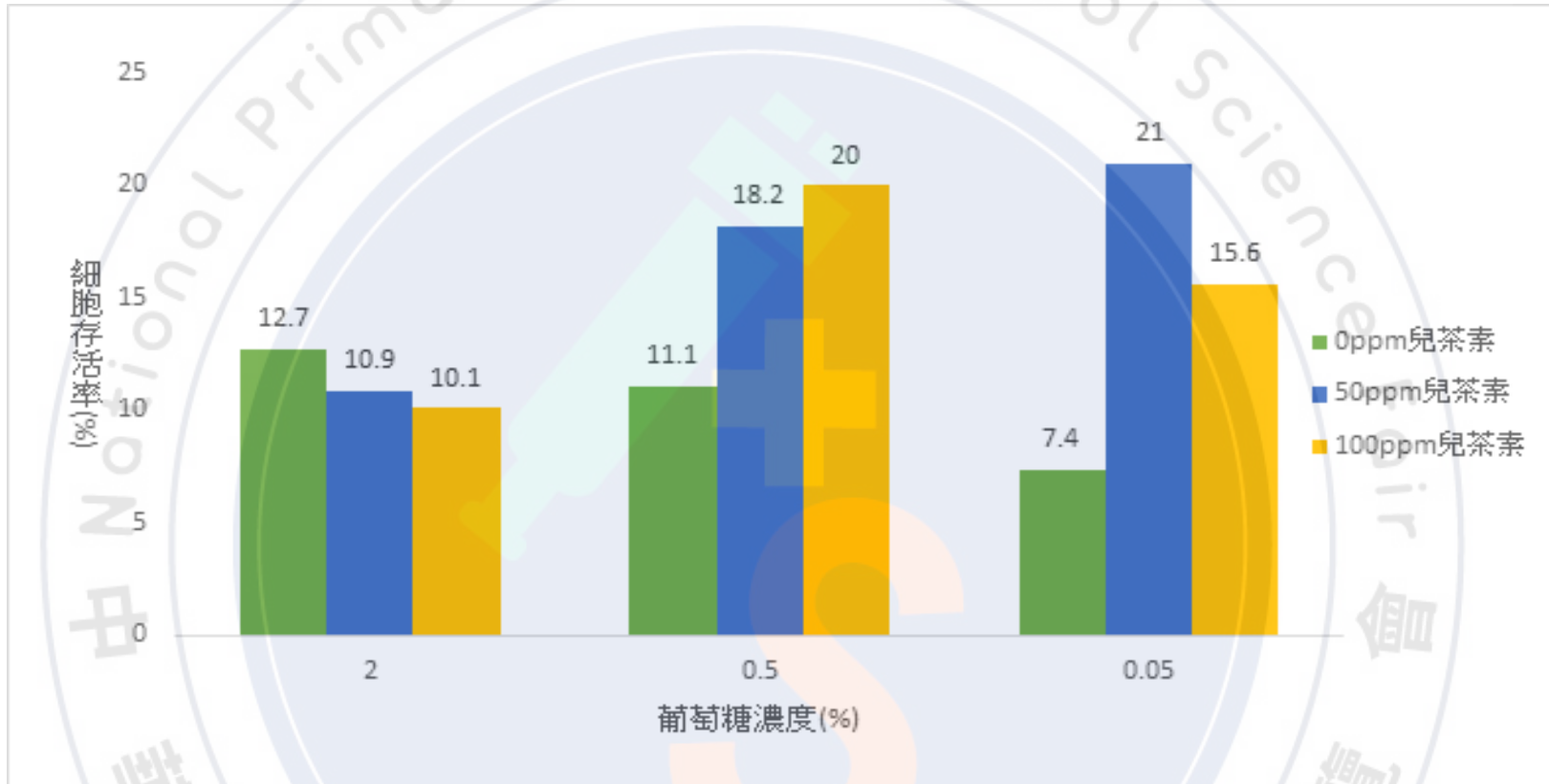
不同葡萄糖濃度下酵母菌的複製壽命



圖六 不同葡萄糖濃度下的酵母菌培養經48小時存活率（複製壽命指標）

- 複製壽命：葡萄糖濃度2%組別 > 0.5%組別 > 0.05%組別（由長到短）
- 在熱量限制的狀況下，無法顯著延長複製壽命。

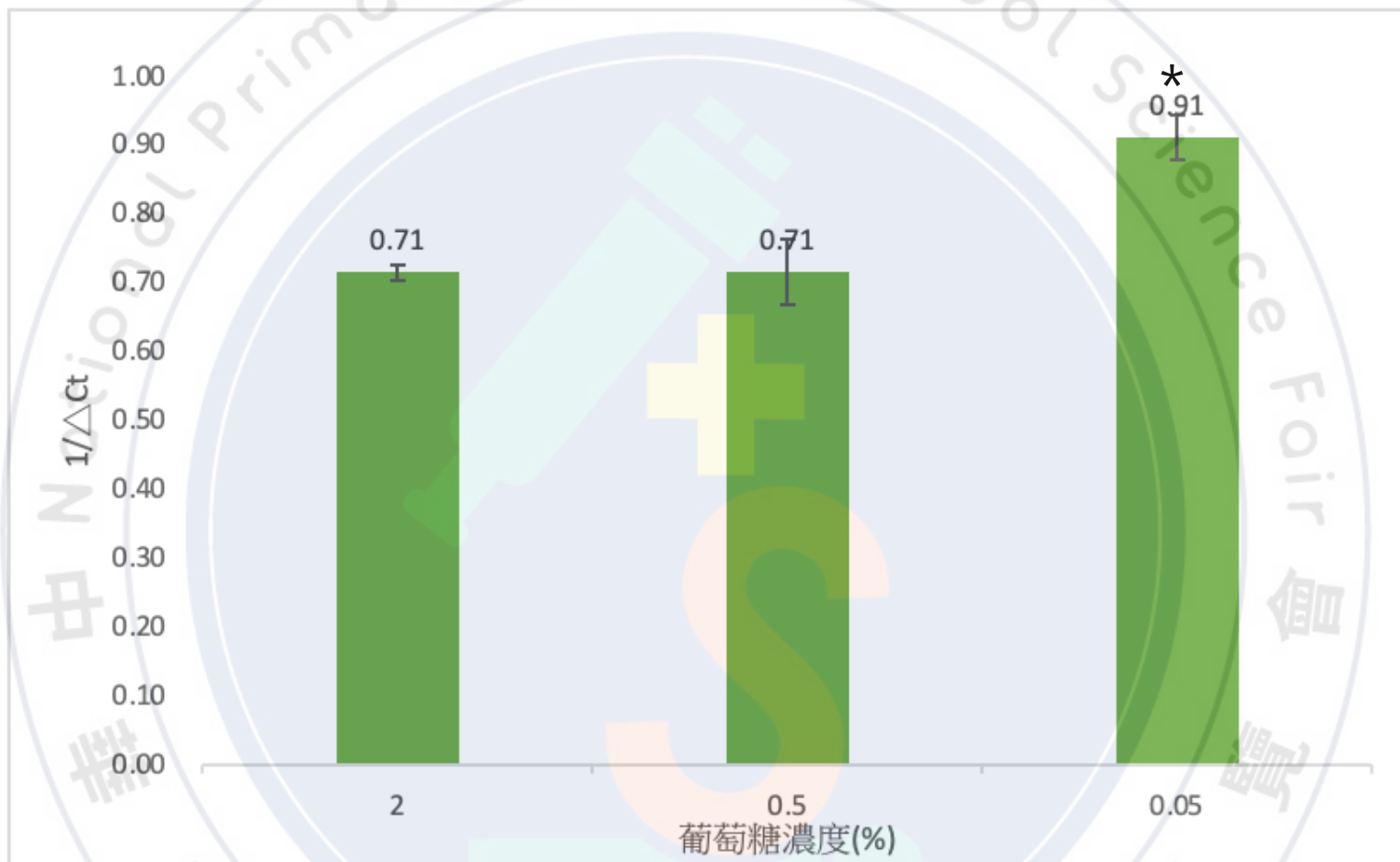
不同葡萄糖濃度下加入兒茶素後 酵母菌的複製壽命



圖七 在不同葡萄糖濃度下加入兒茶素後酵母菌培養經48小時存活率（複製壽命指標）

- 在2%葡萄糖組別中，加入兒茶素並未提高其複製壽命；0.5%、0.05%葡萄糖加入兒茶素的組別複製壽命皆提高。
- 推測只進行熱量限制或是只加入兒茶素時，無法顯著延長複製壽命，然而若熱量限制與兒茶素並行，能有效延長酵母菌壽命。

探討不同葡萄糖濃度對酵母菌*SIR2*基因表現量的影響

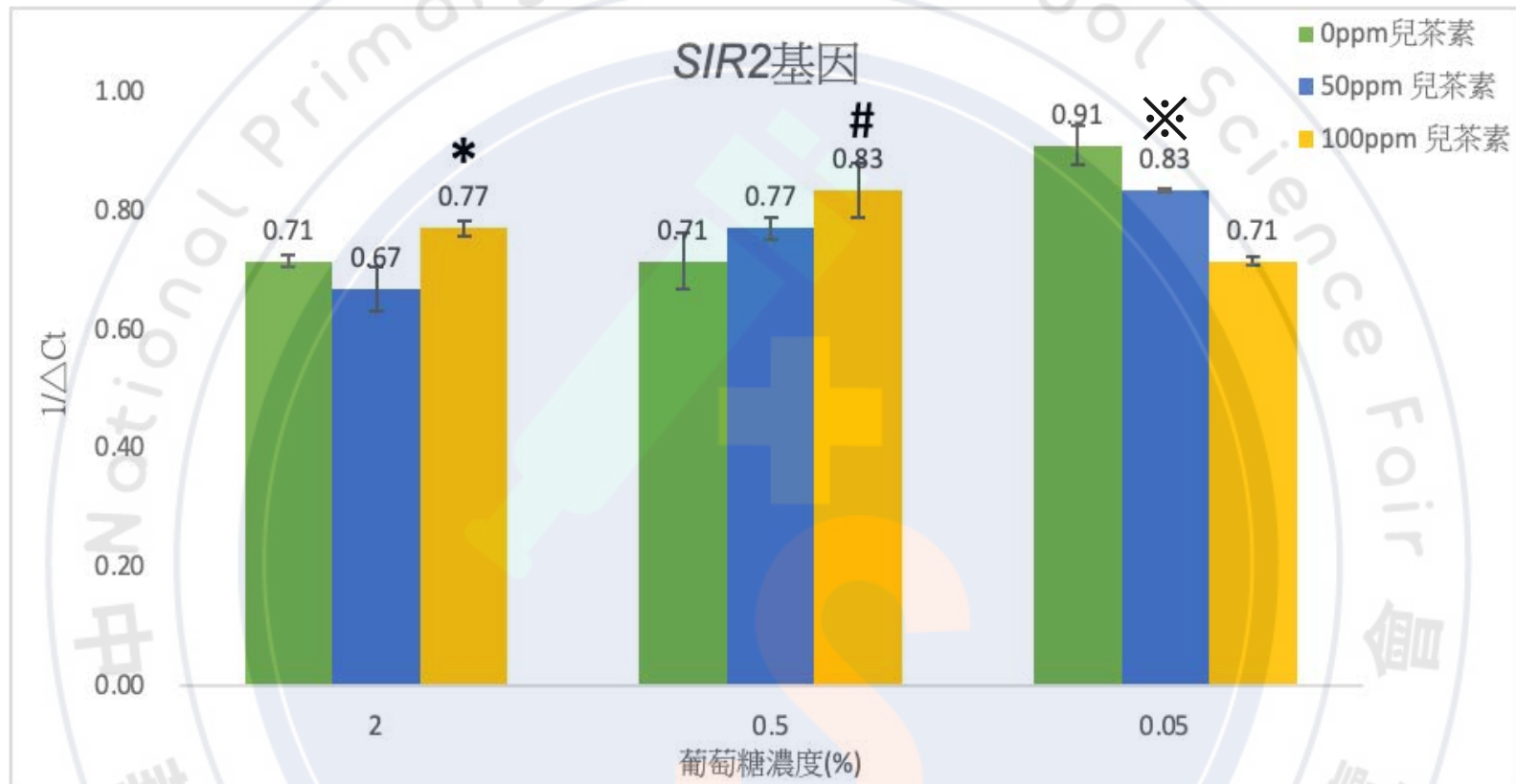


圖八 不同葡萄糖濃度下的酵母菌*SIR2*基因表現量 (*表示與2%葡萄糖的1/ΔCt值相比有顯著差異)

- 0.05% 葡萄糖組別*SIR2*基因表現量最高，且將其數據與2%、0.5% 葡萄糖組別的1/ΔCt值比較，達統計上的顯著差異。
- 在極端CR情況下，*SIR2*的基因表現量最高。

研究結果與討論

不同葡萄糖濃度下加入兒茶素後對酵母菌SIR2基因表現量的影響



圖九 在不同葡萄糖濃度下加入兒茶素後酵母菌SIR2基因表現量比較圖
(*表示與2%葡萄糖的1/ΔCt值相比有顯著差異、#表示與0.5%葡萄糖的1/ΔCt值相比有顯著差異、※表示與0.05%葡萄糖的1/ΔCt值相比有顯著差異)

- 0.5%葡萄糖加入兒茶素組別中，隨著兒茶素濃度提高，SIR2基因表現量提升，趨勢與在極端熱量限制的情況相反。
- 相較2%葡萄糖濃度不加兒茶素的組別，2%、0.5%葡萄糖加入兒茶素的組別，SIR2表現量較高。

結論

- 酵母菌生長情況以熱量限制組別為最佳，而在所有糖濃度下加入50ppm兒茶素濃度皆能提升酵母菌的生長速率。
- 相較於熱量限制的組別，2%葡萄糖組別醱酵效率最佳，而加入兒茶素對於酵母菌的醱酵情形無顯著影響。
- 酵母菌的複製壽命沒有因為熱量限制而顯著延長，然而同時給予極端熱量限制、熱量限制和兒茶素時，則有增加複製壽命的效果。
- 在極端熱量限制、熱量限制時加入兒茶素和2%葡萄糖濃度加入100ppm兒茶素時能增加酵母菌*SIR2*基因的表現量，結合複製壽命實驗的結果，顯示*SIR2*基因可能參與兒茶素增加複製壽命的作用。

- 由熱量限制搭配加入兒茶素對酵母菌的細胞生長速率與複製壽命皆有較佳的影響，推測進行一定限度的熱量限制搭配兒茶素，可能對生物體有增益健康、延長壽命的效果。
- 加入兒茶素與熱量限制能使細胞生長速率及*SIR2*基因表現量上升，推測兒茶素作為熱量限制模擬物的潛力。

參考文獻

- 顏兆熊.(2021). 喝茶與健康. *Taiwan Medical Journal*, 64(7), 388–393.
- Guarente, L., & Picard,Frédéric. (2005). Calorie Restriction— the *SIR2* Connection. *Cell*, 120(4), 473–482. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.029> /
- Lu, J. Y., & Lin, Y. Y. (2011). Acetylation of Yeast AMPK Controls Intrinsic Aging Independently of Caloric Restriction. *Cell*, 146(6), 969–979. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21906795/>
- Madeo, F., Gutierrez, D. C., Hofer, S. J., & Kroemer, G. (2019). Caloric Restriction Mimetics against Age-Associated Disease: Targets, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Cell Metabolism*, 29(3), 592–610. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30840912/>
- Steffen, K. K., Kennedy, B. K., & Kaeberlein, M. (2009). Measuring Replicative Life Span in the Budding Yeast. *JoVE*,(28), 1209. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19556967/>