

# 2024年【科學探究競賽-這樣教我就懂】

## 國中組 成果報告表單

題目名稱：醇傲啡因——探討酵母菌在降解臺灣水源污染扮演的角色

### 一、摘要

咖啡在現代人生活中已是少不了的飲品，但其中的咖啡因會引發睡眠障礙、心悸、焦慮、易怒、並影響健康，甚至可能影響懷孕婦女的胎兒。雖然讓人提神，但人類都不一定能負荷它的副作用。那麼排出去的咖啡因，環境怎麼能負荷呢？於是我們想到生物課上學過酵母菌分解糖的能力，設計實驗並觀察酵母菌是否可以降解溪水裡的咖啡因，解決污染問題。

經過實驗後，我們發現，我們分離出的兩種不同菌落，橘色菌落的表現不穩定，但降解咖啡因的能力較白色菌落佳，且含咖啡因濃度較高的液體越利於酵母菌進行降解。越利於酵母菌生長的环境，則越利於降解能力的作用，可能與酵母菌的活性及基因型有關係。但是否能實際運用在溪水咖啡因污染的降解是我們依舊很好奇的地方。

### 二、探究題目與動機

上學的時候發現，老師們的手上或桌上總是有一杯咖啡，甚至一起出去的時候老師也只買咖啡。但大人們都告訴我們：「喝咖啡對身體不好，而且會睡不著，你們不可以喝」。這不禁讓我們開始好奇老師們的身體及精神狀況。經過查詢資料，我們在《泛科學》網站上看到了一篇文章：〈每天能喝多少杯咖啡？每日又能攝取多少的咖啡因？〉其中提到：咖啡雖有提神的效果，但副作用會讓人心悸、引發睡眠障礙、焦慮、易怒、影響骨骼健康和腸胃功能，甚至影響懷孕婦女的胎兒健康。若是咖啡因排出至環境中，我們的環境怎麼能負荷呢？

在更進一步的查詢資料後，我們在《Mongabay》網站上看到一篇指出有咖啡因污染的河川已超過採集點的50%的文章。同篇文章指出，即便在低濃度的咖啡因污染溪水下，生物接觸也會對其產生有害影響。縮小範圍來看，我們發現附近的新店溪因為不當排水，導致了溪水的咖啡因污染，危害了溪水裡的生物健康。有研究指出，咖啡因可能改變水生生物的代謝，進而影響他們的生殖及發育，最後死亡，改變整個水生生態。

討論過後，我們發現巴西的坎皮納斯州立大學在2001年有一篇報告，旨在討論微生物對咖啡外果皮和咖啡果肉中咖啡因的降解。我們想到在七年級下學期的生物課有教到酵母菌對糖的分解。我們就很好奇，我們常見的酵母菌是不是也能分解溪水裡的咖啡因呢？

### 三、探究目的與假設

我們先在網路上查詢相關的研究，發現有一篇報告指出釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 可以降解土壤中的咖啡因。我們希望可以延續其中的研究內容來探討釀酒酵母是否有辦法降解溪水中的咖啡因，因此設計了以下三點探究目的

- (一)、觀察不同菌落對於不同濃度咖啡因溶液的降解能力影響
- (二)、觀察不同水溫對於不同菌落的降解能力影響
- (三)、觀察不同菌落對於不同溪水樣本內咖啡因的降解能力影響

#### 四、探究方法與驗證步驟

##### 一、前置作業：

##### (一) 培養基製作

##### 固態培養基製作

- (1) 加入 LB 培養基調配粉 2.5g
- (2) 加入 agar 1.5g
- (3) 加入純水100ml
- (4) 以玻棒攪拌至溶解
- (5) 放入高溫高壓滅菌釜滅菌 60 分鐘，待涼後取出
- (6) 每個培養皿加入 20ml 的培養基

##### (二) 酵母菌培養

##### 固態培養基培養

- (1) 調製酵母菌原液，在0.2g的 *Saccharomyces cerevisiae* 粉末內加入25ml之純水。調製出溶液為 0.8%的酵母原液。
- (2) 以十倍稀釋法調製出 0.08%, 0.008%, 0.0008% 之菌液
- (3) 在培養皿各加入0.5 ml 不同濃度的酵母菌液

##### (三) 分離酵母菌

在培養酵母菌的過程中，我們發現*Saccharomyces cerevisiae* 溶液培養出了兩種不同顏色的菌，分別為白色菌落及橘色菌落，並以塗菌法分離兩菌落。兩種不同顏色菌落為同一種菌，但基因表現型不同。

##### (四) 配製咖啡因溶液

根據USDA(美國農業部)，一杯100g的咖啡裡含有40mg 的咖啡因，於是我們配製了 0.03%、0.04%及0.05%咖啡因水溶液(即100g的水溶液內含有30mg、40mg、50mg的咖啡因)。

## (五) 溪水取樣

為了測試*Saccharomyces cerevisiae*是否真的能降解溪水內的咖啡因，我們針對了學校附近新店溪的中游及下游來採集溪水，兩點直線距離相隔約為9.73公里。採集點分別為：

(一) 新店溪華江堤外區停車場旁，座標位置:25.0298545053948, 121.4840067317227, 為下游，污染通常較高。

採集時間:一月十三日

(二) 碧潭風景區旁，座標位置:24.95626170535194, 121.53630933545823, 為中游，污染與下游比較相對較低。

採集時間:一月三日

## 二、實驗設計

### (一) 不同菌落對於不同濃度咖啡因溶液的降解能力影響

1. 分離出*Saccharomyces cerevisiae* 的白色菌落及橘色菌落
2. 調配白色菌落及橘色菌落之菌液
3. 對照組管內分別加入0.03%、0.04%及0.05%咖啡因水溶液 1ml
4. 以微量滴管取兩種菌落各0.5ml菌液，裝至微量離心管內，重複三組當作實驗組
5. 實驗組每組管內分別加入0.03%、0.04%及0.05%咖啡因水溶液 0.5ml
6. 混合後放入恆溫培養箱，定溫攝氏25度，三日後取出觀察
7. 燒杯內放入 99ml 純水
8. 以微量滴管取出微量離心管內1ml 溶液，加入燒杯內並攪拌使其充分混合
9. 以注射型過濾器過濾出*Saccharomyces cerevisiae*，剩下殘留的咖啡因溶液
10. 將殘留的咖啡因溶液放入分光比色槽
11. 將分光比色槽放入分光光譜儀內，取五組數據並以其配合軟體紀錄數據

### (二) 不同水溫對於不同菌落的降解能力影響

1. 以微量滴管取兩種菌落各0.5ml菌液，裝至微量離心管內，重複兩組
2. 每管內加入0.04%之咖啡因水溶液 0.5ml
3. 混合後放入恆溫培養箱，定溫攝氏25度、5度(為模擬下雨及溪水底部溫度)，三日後取出觀察
4. 燒杯內放入 99ml 純水
5. 以微量滴管取出微量離心管內1ml 溶液，加入燒杯內並攪拌使其充分混合

6. 以注射型過濾器過濾出*Saccharomyces cerevisiae*, 剩下殘留的咖啡因溶液
7. 將殘留的咖啡因溶液放入分光比色槽
8. 將分光比色槽放入分光光譜儀內, 取五組數據並以其配合軟體紀錄數據

(三) 不同菌落對於不同溪水樣本內咖啡因的降解能力影響

1. 以微量滴管取兩種菌落各0.5ml菌液, 裝至微量離心管內
2. 對照組管內分別加入中游及下游之溪水採樣 1ml
3. 實驗組每組管內分別加入分別加入中游及下游溪水採樣 0.5ml
4. 混合後放入恆溫培養箱, 定溫攝氏25度, 三日後取出觀察
5. 燒杯內放入 99ml 純水
6. 以微量滴管取出微量離心管內1ml 溶液, 加入燒杯內並攪拌使其充分混合
7. 以注射型過濾器過濾出*Saccharomyces cerevisiae*, 剩下殘留的咖啡因溶液
8. 將殘留的咖啡因溶液放入分光比色槽
9. 將分光比色槽放入分光光譜儀內, 取五組數據並以其配合軟體紀錄數據

三、以圖表的方式顯示降解能力

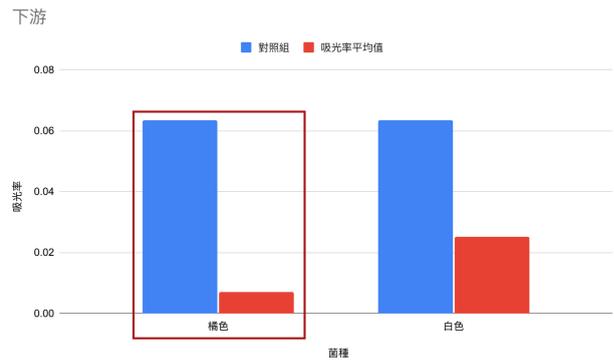
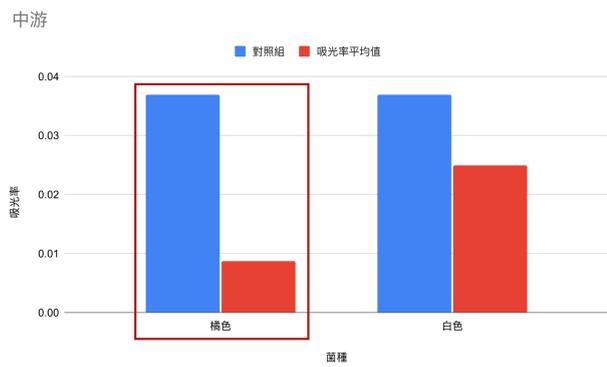
我們將每一組271奈米波長的光譜數值取平均值, 製作成柱狀圖來表示

(一) 不同菌落的降解能力

白色菌落降解能力	n=10	橘色菌落降解能力	n=10
<p>白菌</p> <p>Control (藍) 平均值 (紅)</p> <p>降解率</p> <p>每一百公克咖啡因含量</p>		<p>橘菌</p> <p>Control (藍) 平均值 (紅)</p> <p>降解率</p> <p>每一百公克咖啡因含量</p>	
<p>40mg組的降解能力最佳, 咖啡因殘留剩下對照組的60%。其次是30mg組, 剩下對照組的66%。最後則是50mg組, 還剩下68%的殘留咖啡因。</p>		<p>30mg組是效果最好的, 跟對照組對比剩下67%的咖啡因殘留, 其次是40mg組, 殘留的咖啡因剩69%, 最後是50mg組, 剩下70%的殘留咖啡因。</p>	

(二) 不同菌落在上游與下游的降解能力

新店溪中游溪水	n=10	新店溪下游溪水	n=10
---------	------	---------	------



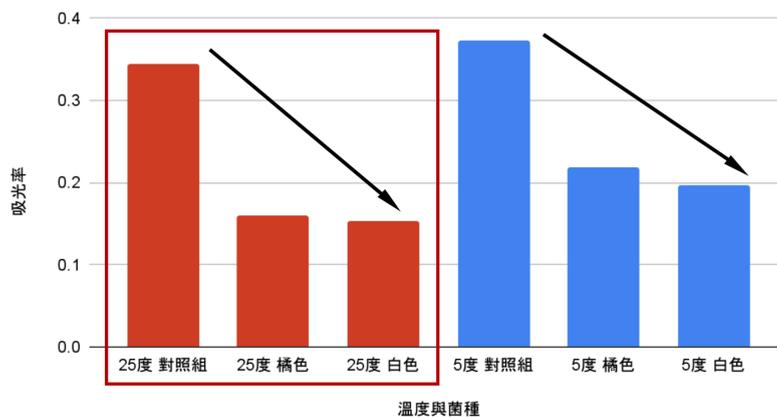
橘色菌落的降解能力比白色菌落強，橘色菌落與對照組比較殘留24%，白色菌落則殘留68%的咖啡因。

橘色菌落的效果比較好，與對照組對比，殘留的咖啡因僅剩下11%，白色菌落則剩下對照組的39%咖啡因殘留。

### (三) 不同溫度對降解能力的影響

n=10

溫度對降解效率的影響



我們觀察到在25度的環境下降解的效果會優於在五度的環境下的效果。25度橘色菌落咖啡因殘留46%，25度白色菌落殘留44%，5度橘色菌落殘留59%，5度白色菌落殘留53%。

## 五、結論與生活應用

根據實驗結果，觀察到釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)對於水中的咖啡因有一定的降解能力，能夠有效減少水中咖啡因的殘留，即使在實際的河水中也能減少咖啡因，以下是從實驗數據得出的結論。

- 一、咖啡因濃度較高的液體比較不利於*Saccharomyces cerevisiae*進行降解
- 二、白和橘菌在30mg和40mg環境下將解能力相似
- 三、橘色菌落降解咖啡因的能力較白色菌落佳

四、越利於酵母菌生長的環境，則越利於降解能力的作用，可能與酵母菌的活性有關係

五、在25度的環境下降解效率會高於在5度的環境下，可以推斷，冬季及下雨時酵母菌的降解能力會較夏季來得低。則天氣好壞及氣候都會影響河川內咖啡因的含量。

六、造成降解能力上的差異可能和基因型有關係

#### 參考資料

一、Purwoko T, Suranto, Setyaningsih R, Marliyana SD (2021). Chlorogenic acid and caffeine content of fermented robusta bean. <https://smujo.id/biodiv/article/view/9725>

二、Sean Mowbray (2022). Caffeine: Emerging contaminant of global rivers and coastal waters. <https://news.mongabay.com/2022/02/caffeine-emerging-contaminant-of-global-rivers-and-coastal-waters/>

三、中廣新聞 (2010). 民眾亂丟藥大漢、新店溪藥物污染嚴重

四、Lakshmi V. ,Nilanjana Das (2012). Bioremediation of Caffeine-Contaminated Soil by Immobilized Yeast – A Laboratory Based Study. [https://neptjournal.com/upload-images/NL-39-7-\(7\)B-1899.pdf](https://neptjournal.com/upload-images/NL-39-7-(7)B-1899.pdf)

五、Paulo Mazzafera (2001). Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding. <https://www.scielo.br/j/sa/a/MnqZKgZ6tydyNVc9FN6sBvg/>

六、L.R. Vieira, A.M.V.M. Soares, R. Freitas (2022). Caffeine as a contaminant of concern: A review on concentrations and impacts in marine coastal systems. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653521021470>

七、G.G. Stewart (2014). SACCHAROMYCES | Saccharomyces cerevisiae. <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/saccharomyces-cerevisiae>

八、社團法人台灣國際生命科學會 (2017). [https://pansci.asia/archives/120233#google\\_vignette](https://pansci.asia/archives/120233#google_vignette)