中華民國第 64 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

052204

Danio 的健康食品-探討樹葡萄的抗氧化力與對斑馬魚胚胎的影響

學校名稱： 臺中市私立新民高級中學

作者：	指導老師：
高二 文心琳 高二 邱韻慈	蔡文娟

關鍵詞： 樹葡萄、抗氧化、斑馬魚

Danio 的健康食品-探討樹葡萄的抗氧化力與對斑馬魚胚胎的影響

摘要

本實驗探討樹葡萄各部位超音波水萃液的抗氧化成分、抗氧化力，並試驗其對模式生物斑馬魚毛細胞的保護力。化學檢定結果顯示，樹葡萄中抗氧化成分之總多酚含量前三名的部位為種子、葉和花，總類黃酮含量前三名則為種子、花和樹皮；此外，無論是抗氧化能力測定之 ABTS 陽離子的清除率，或是 DPPH 自由基清除能力實驗，各部位的清除率都接近 100 %，證實樹葡萄各部分都含有很高的抗氧化成分、抗自由基能力。另一方面，我們使用基因改造的斑馬魚胚胎進行生物檢定，因其具有會發螢光的毛細胞，可觀察樹葡萄水萃液是否可減緩生物細胞的氧化毒性，結果顯示青果、熟果和葉的水萃液對斑馬魚胚胎皆無毒性，且對其毛細胞具有明顯的保護作用。

壹、前言(研究動機、目的、文獻回顧)

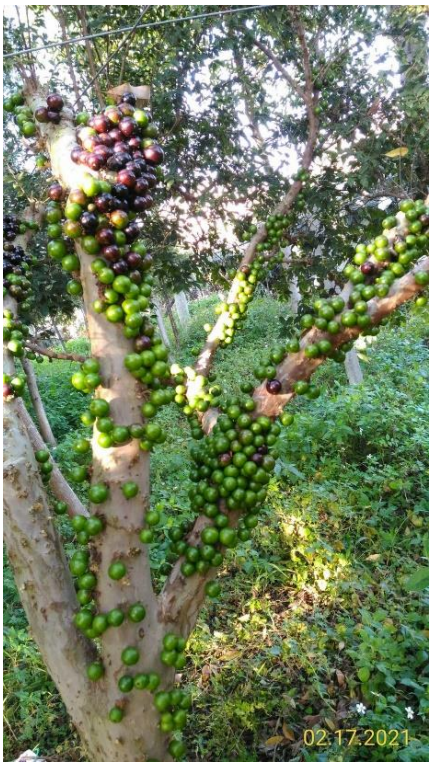
一、研究動機與文獻回顧

嘉寶果為熱帶植物，其果實類似葡萄又名樹葡萄(圖一、圖二)，故以下實驗均稱為樹葡萄，農試所 1962 年從巴西引進臺灣，至今也有 60 多年了，可能因生長緩慢、結果量不多，並沒有廣為人知，可算是相對新興的農作物，目前栽培地多分布於中南部，屬零星栽培（中央研究院數位文化中心，2014）。嘉寶果是桃金孃科 (*Myrtaceae*)，學名：*Myrciaria cauliflora*，屬常綠喬木或灌木，原產於南美洲巴西。樹高 10~12m，樹皮紅褐色或淺褐色，成熟枝幹樹皮或呈剝落狀。葉為對生橢圓形或長卵形，葉長 1.5~3cm，葉寬 1~1.5cm，葉面光滑，新葉淺綠或泛紅色，成熟葉為深綠色。花開於樹幹上，白色花直徑約 0.5cm，有多數雄蕊。紫黑色漿果，直徑 3~4cm。臺灣每年可以開花期結果約 4 次，熱帶地區可以有 5 次以上收穫期 (臺灣景觀植物；Conceição Soares，2019)。查尋網路資料發現除好吃外，具有下列功能有益健康：抗發炎、延緩衰老、改善頭髮健康、有助於減肥、幫助消化、提高營養成分、降低氣喘、預防癌症、改善腹瀉及預防心血管疾病(Health benefits of Jabuticaba，2020) ，臺灣癌症基金會也很推崇。樹葡萄果實香甜，果皮與籽則微酸，整顆一起吃下會有酸甜多層次風味；亦可以

做成果凍、蜜餞、果醬；樹葡萄除香甜多汁外，還能預防疾病、抗衰老；另外，樹葡萄本身病蟲害極少，加上終年常綠、樹型優美，很適合於庭園、盆栽內種植，供人觀賞。



圖一、樹葡萄植株(第一作者拍攝)



圖二、樹葡萄果實(第一作者拍攝)

我們研究對象嘉寶果，它更廣為人知的名稱是樹葡萄、木葡萄。在各大瀏覽器搜尋，皆可看到網上對它好評如潮，都稱讚它的抗氧化能力佳，因此我們想知曉樹葡萄的抗氧化能力，是否如網傳那般好，和樹葡萄各部位抗氧化能力之比較。

為了探討樹葡萄的抗氧化能力，我們選擇使用基因改造過的斑馬魚(Pvalb3b-Tag:GFP) 胚胎進行實驗，這種斑馬魚胚胎毛細胞會出現螢光，便於觀察且較容易受操縱變因影響。新黴素(Neomycin) 對毛細胞具有毒性，會使毛細胞的 ROS (Reactive oxygen species) 增加，破壞細胞內的平衡，促使毛細胞死亡，而我們想看看樹葡萄是否可有效的預防並降低毛細胞的死亡率。

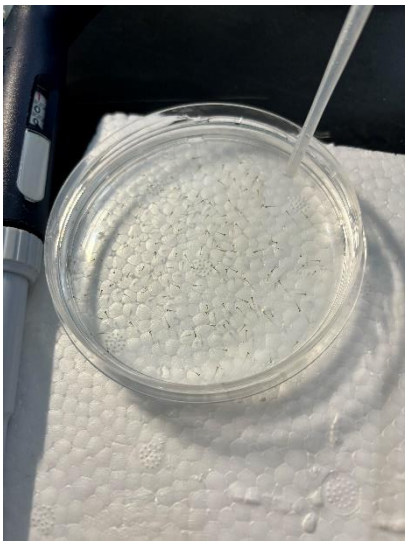
斑馬魚 (*Danio rerio*) 為小型熱帶淡水魚種，成魚體長約為二至五公分(如圖三)，能廣泛應用於不同科學領域，主要因為其具有諸多優點：一、斑馬魚為體外受精，胚胎透明無色，易於觀察其發育變化過程；二、成長快速，成熟期短 (約 3－6 個月)，且繁殖力強，一次可產出 100－300 個卵；三、體型小(1－1.5 英吋)，飼養方便，養殖設備簡單，所需成本較低；

四、胚胎發育快速，且發育機制與哺乳動物相似；五、具有近似人類的各種器官系統，例如：心臟血管系統、消化系統、神經系統，適合用來研究脊椎動物的胚胎及器官發育；六、已建立完整的基因資料庫，利於進行基因突變、基因功能和基因轉殖等研究(謝氏等人，2016)。

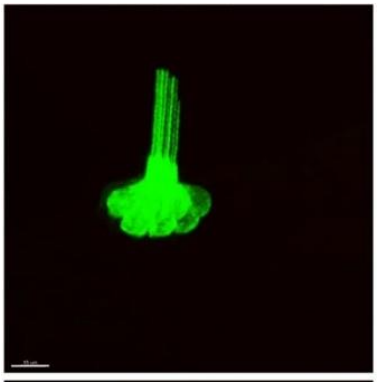
毛細胞 (hair cells) 是哺乳類聽覺與平衡的感覺接受器，皆位在內耳的腔室中，魚類也有內耳毛細胞用於感受聲波，產生聽覺，但大部分魚類的平衡覺是在身體兩側的側線系統(lateral line system)，也是由毛細胞負責偵測的（鍾氏等人，2005），內耳的毛細胞位於耳朵的深處不易觀察，所以這次實驗是以觀察分布在體表的側線系統上的毛細胞變化；人類毛細胞的數量於出生時便固定了不再增生，且無法再生；而斑馬魚毛細胞(如圖五)於受精一天後開始分化形成，約莫五天就有聽覺反應，且具有再生能力（Blanco-Sanchez, et. al. 2017; Kniss, et. al. 2016）。



圖三、基因改造過的斑馬魚(Pvalb3b-Tag:GFP)成魚(第一作者拍攝)



圖四、斑馬魚胚胎(第二作者拍攝)



圖五、斑馬魚毛細胞(本圖參引自 M. Li et al., (2021))

二、研究目的

(一)探討樹葡萄各部位(種子、葉、花、青果、熟果、青果皮、樹皮)，以超音波水萃取物之抗氧化成分多寡。

(二)探討樹葡萄各部位(種子、葉、花、青果、熟果、青果皮、樹皮)，以超音波水萃取物總抗氧化能力，對 ABTS 陽離子自由基清除能力。

(三)探討樹葡萄各部位(種子、葉、花、青果、熟果、青果皮、樹皮)，以超音波水萃取物

對 DPPH 自由基清除效能。

(四)探討樹葡萄青果、熟果、葉部位萃取物是否具有保護斑馬魚胚胎毛細胞的效果。

貳、研究設備及器材

一、研究藥品及材料

(一) 標準藥品：

藥品名	樣品濃度(mg/ml)	用途
兒茶素 (Catechin)	0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0	總類黃酮實驗標準品 清除 DPPH 標準品
沒食子酸 (Gallic acid)	0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0	總酚實驗標準品
維生素 E (Trolox)	0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0	$ABTS^{+}$標準品

(二) 測驗藥品：福林酚試劑(Folin-Ciocalteu)、二次蒸餾水(Double distilled water)、蛋水(Egg water)、甲磺酸三卡因(Tricaine)、甲醇(Methanol)、5%硝酸鈉($NaNO_3$)、10%氯化鋁($AlCl_3$)、1M 氫氧化鈉(NaOH)、碳酸鈉(Na_2CO_3)、過氧化氫(H_2O_2)、過氧化酶(Peroxidase)、新黴素(Neomycin)、瓊脂糖(Agarose)

(三) 實驗材料(樹葡萄) ：

青果	熟果	青果皮
		
(第二作者拍攝)	(第二作者拍攝)	(第二作者拍攝)

花	葉	種子
 (第二作者拍攝)	 (第二作者拍攝)	 (第二作者拍攝)

樹皮
 (第二作者拍攝)

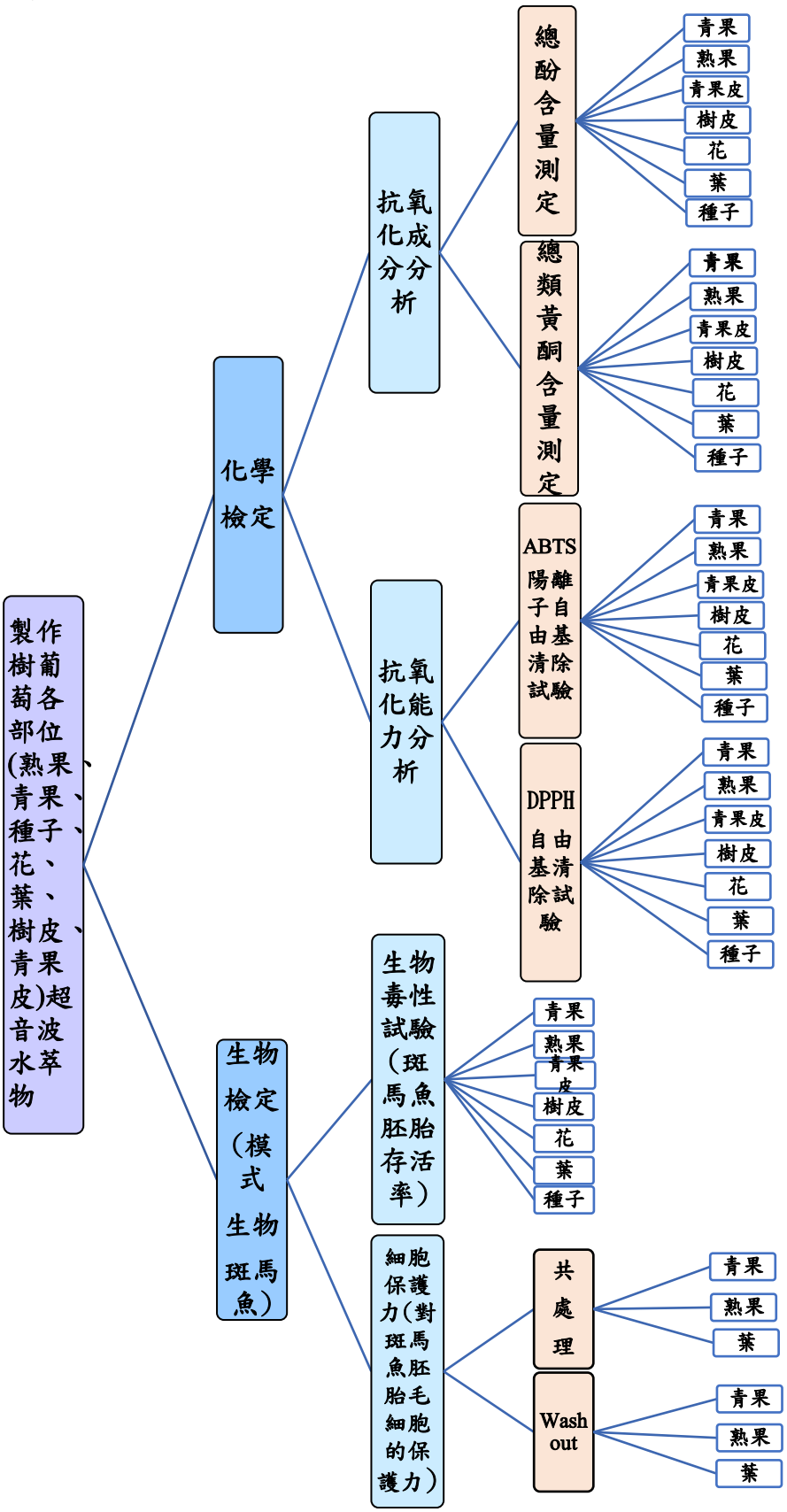
(四) 觀察對象：斑馬魚(Pvalb3b-Tag:GFP)受精 7 天後的胚胎。

二、研究設備：

微量試管架、定量滴管、微量吸管尖、塑膠滴管、量筒、超音波震盪儀、電動移液分注器、中藥包、鋼杯、電子秤、離心管震盪儀、離心管(1.5，1，50ml)、藥勺&稱量紙、離心機、純水製造機、9x6 孔吸光盤、微量盤分光光度計、6 孔盤、錐形瓶、28℃培養箱、解剖顯微鏡、倒立螢光顯微鏡、刀和砧板、乾浴池、平頭針。

參、研究過程或方法

一、研究架構



(第二作者繪圖)

二、研究方法

(一) 製作樹葡萄樣本(種子、葉、花、青果、熟果、青果皮、樹皮)水萃取液的步驟。

1.取 100 g 的樹葡萄樣本切碎，放入中藥布包內。

2.放入鋼杯中鋪平。

3.用量筒量 50 ml 的水加入鋼杯中用重物壓在上面。

4.放入超音波震盪儀震盪 99 分鐘。

5.靜置一夜後取出萃取液。

(二) 總酚含量測定

1.實驗原理

測定方式是採用 Folin-Ciocalteu 法，以沒食子酸 (Gallic acid) 當標準品進行測定。當 Folin-Ciocalteu 試劑被酚還原成藍綠色的複合物，其在 750 nm 擁有較強的吸光值，當吸光值越高，就代表著還原能力越佳，則酚的含量就越多。

2.實驗步驟

(1)取樣品 10 µl 放到 1.5 ml 離心管中。

(2)加 200 µl 的滅菌水。

(3)加 100 µl Folin-Ciocalteu 's reagent 。

(4)加 500 µl 10%Na_2CO_3 。

(5)避光靜置 20 分鐘。

(6)測量在 735 nm 下的吸光值。

3.總酚含量計算方式

取不同濃度之沒食子酸(Gallic acid)製作標準曲線，利用內插法求出樹葡萄果實萃取液的總酚含量。若吸光值越高則表示樣品總酚類化合物含量越多。

(三) 總類黃酮含量測定

1.實驗原理

含有類黃酮之物質會與三氯化鋁反應產生絡合物，呈現黃色，顏色深淺與類黃酮含量成正比。本實驗以兒茶素(Catechin)為標準品，作為樣本濃度參考及含量換算依據。

2.實驗步驟

(1)取樣品 100 µl 放到 1.5 ml 離心管中。

(2)加 500 µl 的滅菌水。

(3)加 30 µl 5% $NaNO_2$，均勻混合後靜置 6 分鐘。

(4)加 60 µl 10% $AlCl_3$，均勻混合後靜置 5 分鐘。

(5)加 200 µl 1M NaOH。

(6)加 110 µl 的水。

(7)測量在 510 nm 下的吸光值。

3.總類黃酮含量計算方式

取不同濃度的兒茶素(Catechin)檢測製作標準曲線，利用內插法求出樹葡萄果實萃取液的總類黃酮含量。

(四) 總抗氧化能力測定

1.實驗原理

ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) 在過氧化酶 (peroxidase) 的催化下會與雙氧水 (H_2O_2) 反應，形成穩定的藍綠色 ABTS+陽離子自由基溶液。 ABTS+會與擁有抗氧化能力的反應物結合，造成吸光值降低，也就是測出來的吸光值越低，代表著抗氧化物清除 ABTS+這個自由基離子的能力越佳，即有著較佳的抗氧化能力。

2.實驗步驟

(1)ABTS+溶液為 Peroxidase、ABTS 試劑與 H_2O_2 以 1：1：1 的體積混合，

(2)避光反應後，測定 734 nm 吸光值為 0.7±0.02 即可使用。

(3)取樣品 30 µl 到 1.5 ml 離心管。

(4)加入 ABTS+溶液 970 µl。

(5)混合均勻後反應 1 分鐘。

(6)測量在 734 nm 下的吸光值。

3.總抗氧化能力計算方式

取不同濃度之 Trolox（一種水溶性維他命 E）作為標準品，所得吸光值取平均後，減去

ABTS+原液吸光值，除以 ABTS+原液吸光值即可得 ABTS+清除率。

(五) 清除 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)自由基能力測定

1.實驗原理

DPPH 自由基可溶於甲醇或是乙醇溶液中，形成一穩定的自由基溶液。DPPH 自由基溶液在波長 517 nm 下，呈現藍紫色，若有抗氧化能力物質和藍紫色的 DPPH 自由基反應，會形成黃色的 DPPH，進而造成在 517 nm 的吸光值下降。當抗氧化物質的抗氧化能力越強時，被反應掉的 DPPH 越多，517 nm 的吸光值就越低，也就表示抗氧化物質清除自由基的能力越好。

2.實驗步驟

(1)取樣品 50 µl 到 1.5 ml 離心管。

(2)加 200 µl 100% DPPH-甲醇溶液。

(3)避光靜置 30 分鐘。

(4)測量在 517 nm 下的吸光值。

3.清除 DPPH 自由基能力計算方式

取不同濃度之兒茶素作為標準品，所得吸光值取平均後，減去 DPPH 原液吸光值，除以 DPPH 原液吸光值即可得 DPPH 自由基清除率。

(六) 斑馬魚胚胎存活率測試

1.取 10 個斑馬魚胚胎，將水抽乾後加入 5 ml 蛋水。

2.加入樹葡萄樣本萃取液 100 µl 後放入 28℃ 培養箱靜置 60 分鐘。

3.加入 12.5 µM 新黴素(Neomycin)，靜置 30 分鐘。

4.以解剖顯微鏡觀察斑馬魚胚胎存活數量。

(七) 斑馬魚胚胎毛細胞保護能力測試

1.共處理方式

(1)在六孔盤中放 10 個斑馬魚胚胎，將水抽乾後加入 5 ml 蛋水。

(2)加入樹葡萄樣本萃取液 100 µl 後放入培養箱靜置 1 小時。

(3)再加入 12.5 µM 新黴素(Neomycin)，靜置 30 分鐘。

(4)將孔盤內的藥物混合液吸出，加入蛋水終止反應並反覆清洗盤內殘留藥物，重複三次。

(5)使盤內的水為 3 ml 後加入 50 µl 的 tricaine，靜置 3 分鐘。

(6)斑馬魚胚胎包埋觀察

①把斑馬魚胚胎放到 96 孔盤的蓋子上並吸除多餘水分。

②把斑馬魚胚胎用平頭針翻到側面。

③等 Agarose 凝固後用倒立螢光顯微鏡觀察毛細胞數量。

2.Wash out 測試

(1)在六孔盤中放 10 個斑馬魚胚胎，將水抽乾後加入 5 ml 蛋水。

(2)加入樹葡萄樣本萃取液 100 µl 後放入培養箱靜置 1 小時。

(3)將孔盤內的樹葡萄水萃液液吸出，加入蛋水終止反應並反覆清洗盤內殘留水萃液，重複三次。

(4)再加入 12.5 µM 新黴素(Neomycin)，靜置 30 分鐘。

(5)將孔盤內的藥物混合液吸出，加入蛋水終止反應並反覆清洗盤內殘留藥物，重複三次。

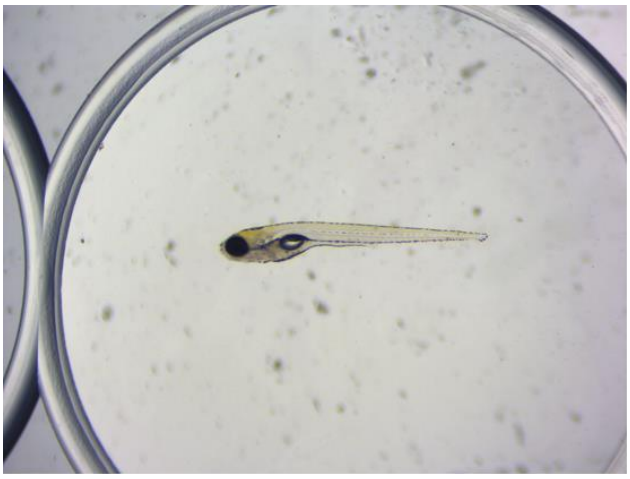
(6)使盤內的水為 3 ml 後加入 50 µl 的 tricaine，靜置 3 分鐘。

(7)斑馬魚胚胎包埋觀察(如圖六、圖七)

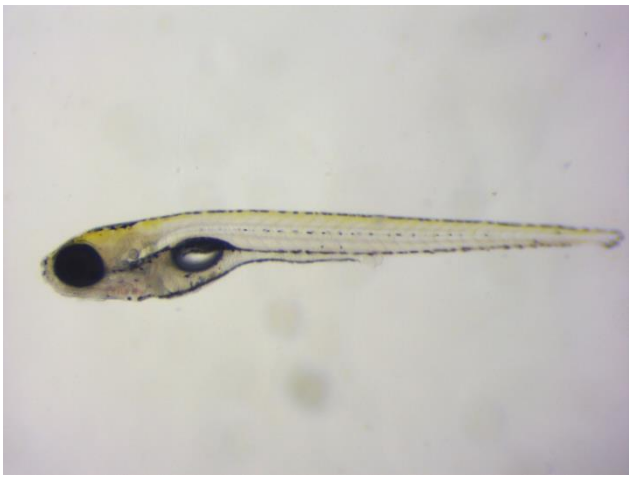
①把斑馬魚胚胎放到 96 孔盤的蓋子上並吸除多餘水分。

②把斑馬魚胚胎用平頭針翻到側面。

③等 Agarose 凝固後用倒立螢光顯微鏡觀察毛細胞數量。



圖六、斑馬魚胚胎 Agarose 包埋(大視野)
(第一作者拍攝)



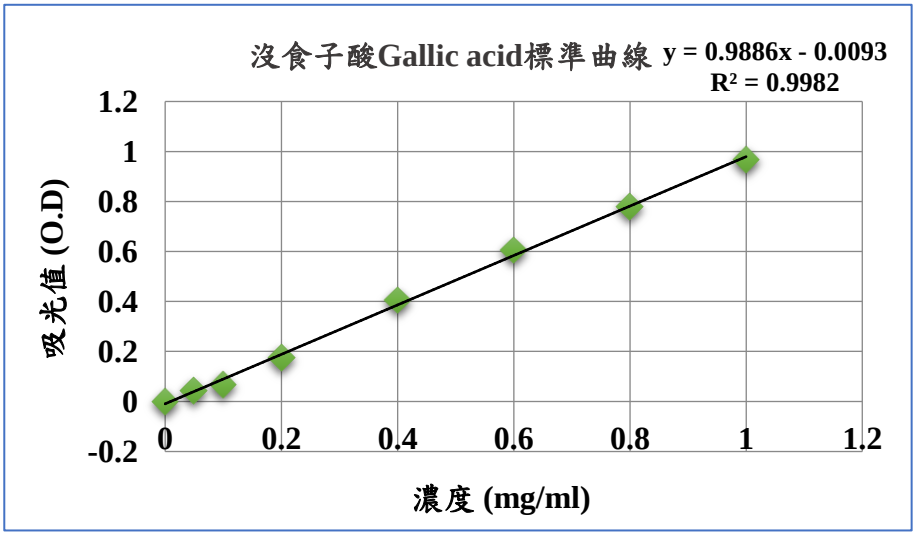
圖七、斑馬魚胚胎 Agarose 包埋(小視野)
(第一作者拍攝)

肆、研究結果

一、樹葡萄各部位樣本總多酚含量測定

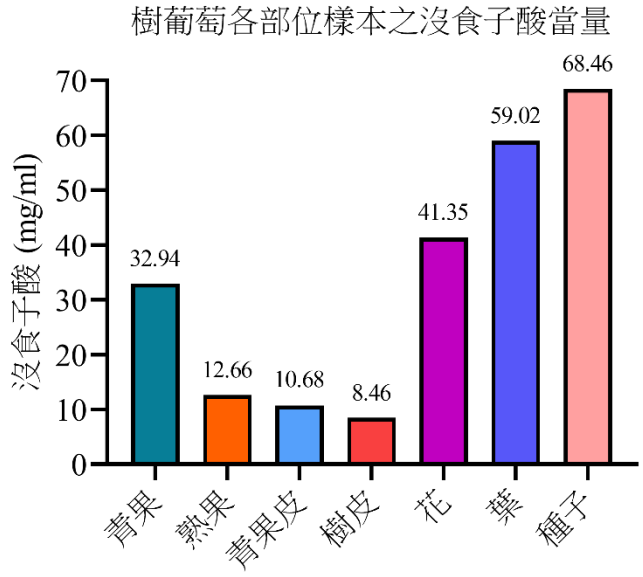
圖八為沒食子酸 (Gallic acid) 作為多酚之標準品，分別配置 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/ml 等標準濃度，以吸光值法進行測定，將所得之吸光值與測試濃度繪製標準曲線作為後續樣本之總多酚含量換算參照。試驗結果得知，標準曲線之相關係數 (R^2) 為 0.9982，直線方程式為 y = 0.9886x - 0.0093。由此得知，樹葡萄各樣本總多酚含量之計算可依照下列方程式進行計算：

$$\frac{\text{樹葡萄樣本吸光值}+0.0093}{0.9886}=\text{樣本沒食子酸當量}$$



圖八、沒食子酸標準曲線圖(第一作者繪圖)

圖九為樹葡萄各部位樣本依照標準步驟依序加入反應試劑，測定其於 735 nm 波長之吸光值並以沒食子酸標準曲線圖及其方程式計算各部位樣本之超音波水萃取物中總多酚之相對含量。由結果得，各部位樣本萃取液皆富含多酚物質，總多酚含量由高至低依序為種子 (68.46 mg/ml)、葉 (59.02 mg/ml)、花 (41.35 mg/ml)、青果 (32.94 mg/ml)、熟果 (12.66 mg/ml)、青果皮 (10.68 mg/ml)、樹皮 (8.46 mg/ml)，其中以種子之總多酚含量為最高，相當於每 1ml 樹葡萄種子水萃取物中含有 68.46 mg 之沒食子酸。

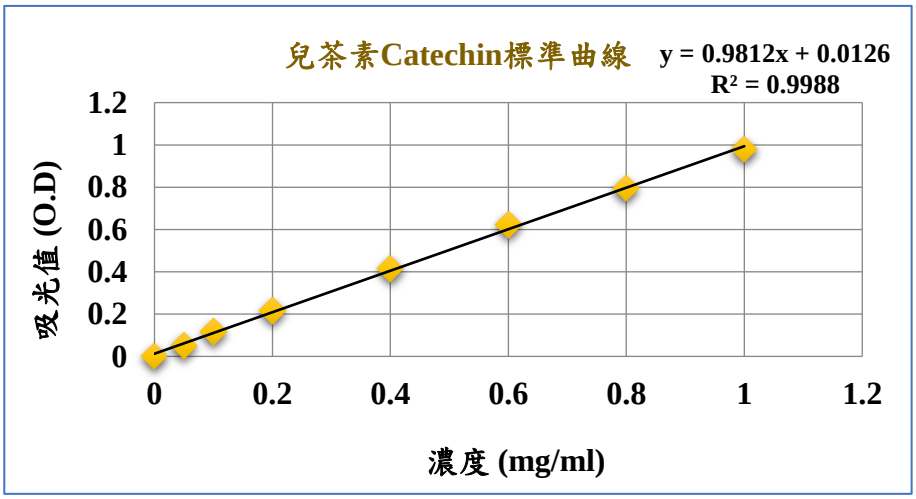


圖九、樹葡萄各部位樣本之沒食子酸當量(第一作者繪圖)

二、樹葡萄各部位樣本總類黃酮含量測定

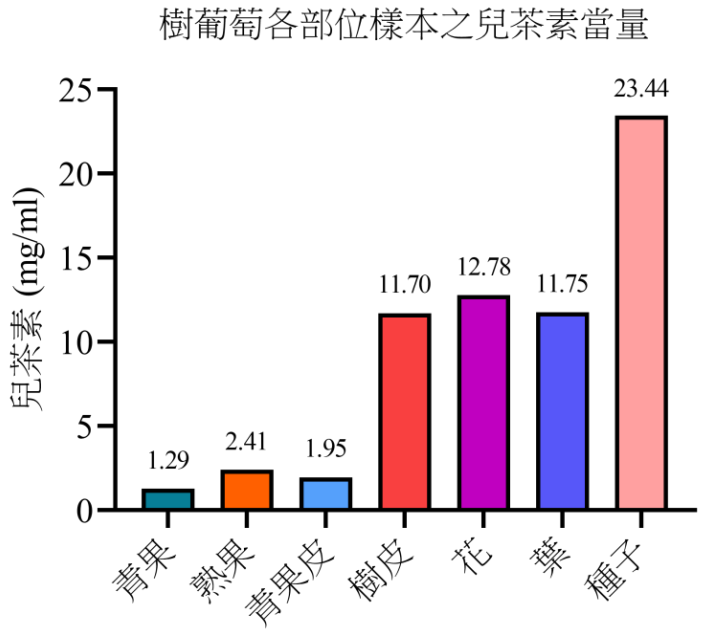
圖十為兒茶素 (Catechin) 作為類黃酮之標準品，分別配置 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/ml 等標準濃度，以吸光值法進行測定，將所得之吸光值與測試濃度繪製標準曲線作為後續樣本之總類黃酮含量換算參照。試驗結果得知，標準曲線之相關係數 (R^2) 為 0.9988，直線方程式為 y = 0.9812x + 0.0126。由此得知，樹葡萄各樣本總類黃酮含量之計算可依照下列方程式進行計算：

$$\frac{\text{樹葡萄樣本吸光值} - 0.0126}{0.9812} = \text{樣本兒茶素當量}$$



圖十、兒茶素標準曲線圖(第二作者繪圖)

圖十一為樹葡萄各部位樣本依照標準步驟依序加入反應試劑，測定其於 510 nm 波長之吸光值並以兒茶素標準曲線圖及其方程式計算各部位樣本之超音波水萃取物中總類黃酮之相對含量。由結果得，各部位樣本萃取液皆富含類黃酮物質，總類黃酮含量由高至低依序為種子 (23.44 mg/ml)、花 (12.78 mg/ml)、葉 (11.75 mg/ml)、樹皮 (11.7 mg/ml)，熟果 (2.41 mg/ml)、青果皮 (1.95 mg/ml)、青果 (1.29 mg/ml)，其中以種子之總類黃酮含量為最高，相當於每 1ml 樹葡萄種子水萃取物中含有 23.44 mg 之兒茶素。

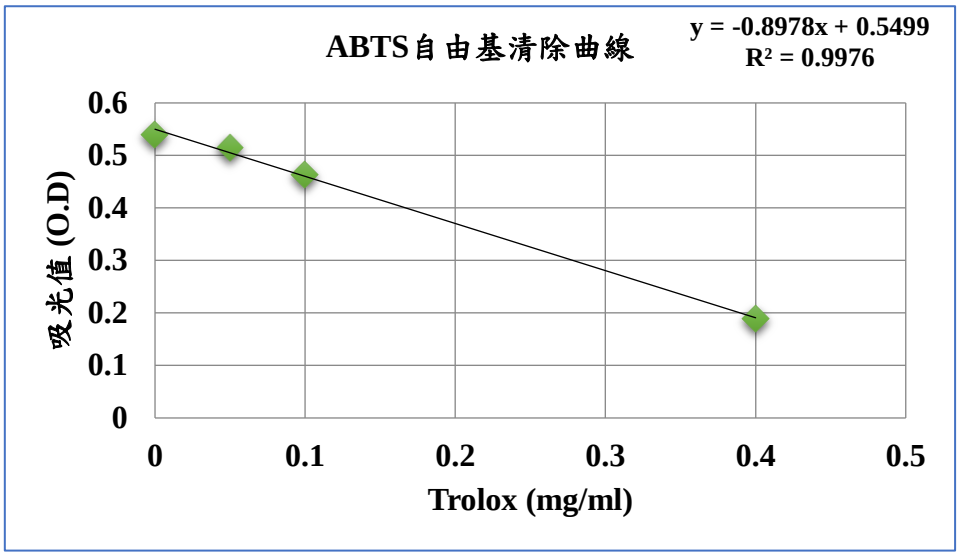


圖十一、樹葡萄各部位樣本之兒茶素當量(第一作者繪圖)

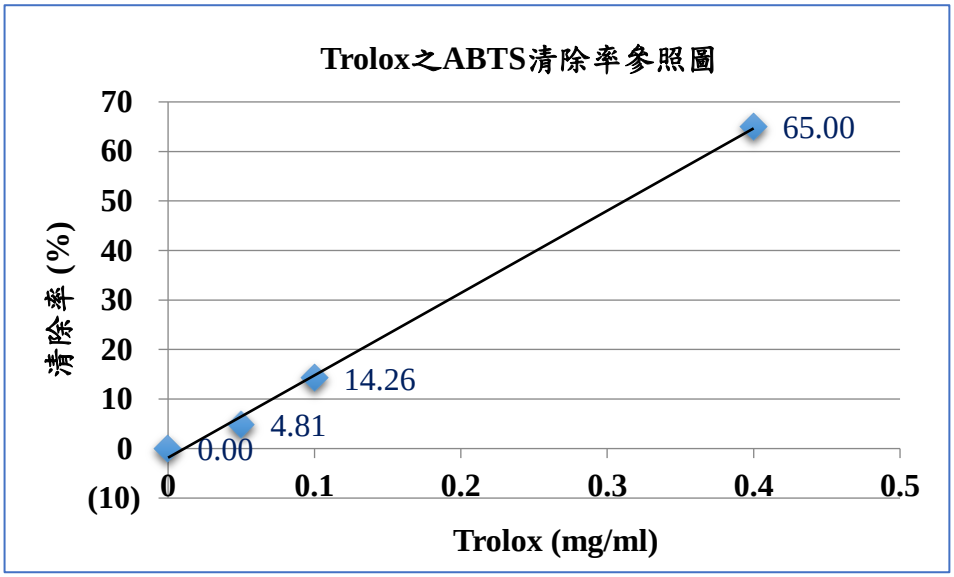
三、樹葡萄各部位樣本 ABTS 陽離子自由基清除試驗

圖十二與圖十三為 Trolox (維生素 E 水溶性類似物) 作為抗氧化劑之標準品，利用 Trolox 可提供額外電子達到清除陽離子自由基目的。分別配置 0.05、0.1、0.4 mg/ml 等標準濃度，以吸光值法進行測定，將所得之吸光值用以繪製標準曲線並換算 ABTS 陽離子自由基清除率與 Trolox 當量濃度。自由基清除能力可依照下列方程式進行計算：

$$\frac{\text{ABTS 控制組溶液吸光值} - \text{樣本吸光值}}{\text{ABTS 控制組溶液吸光值}}\% = \text{樣本自由基清除率}$$

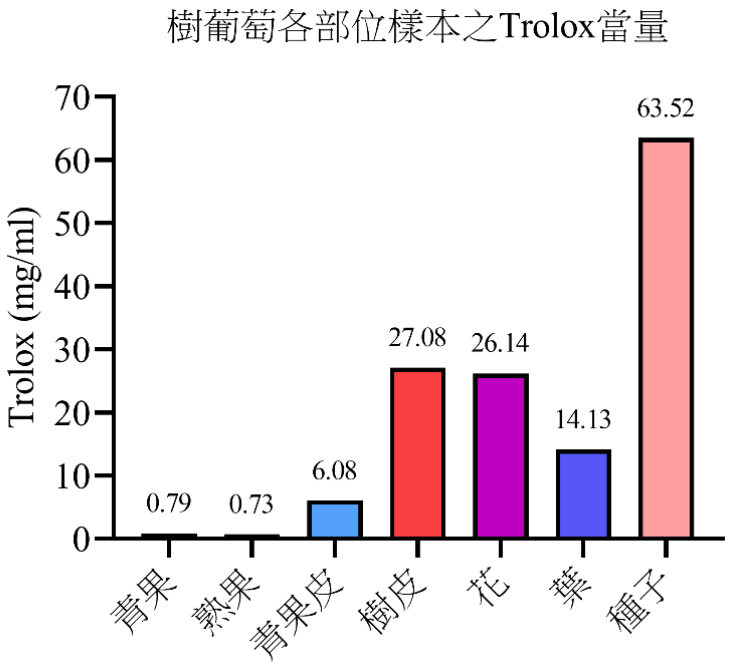


圖十二、Trolox 之 ABTS 陽離子自由基清除曲線圖(第一作者繪圖)



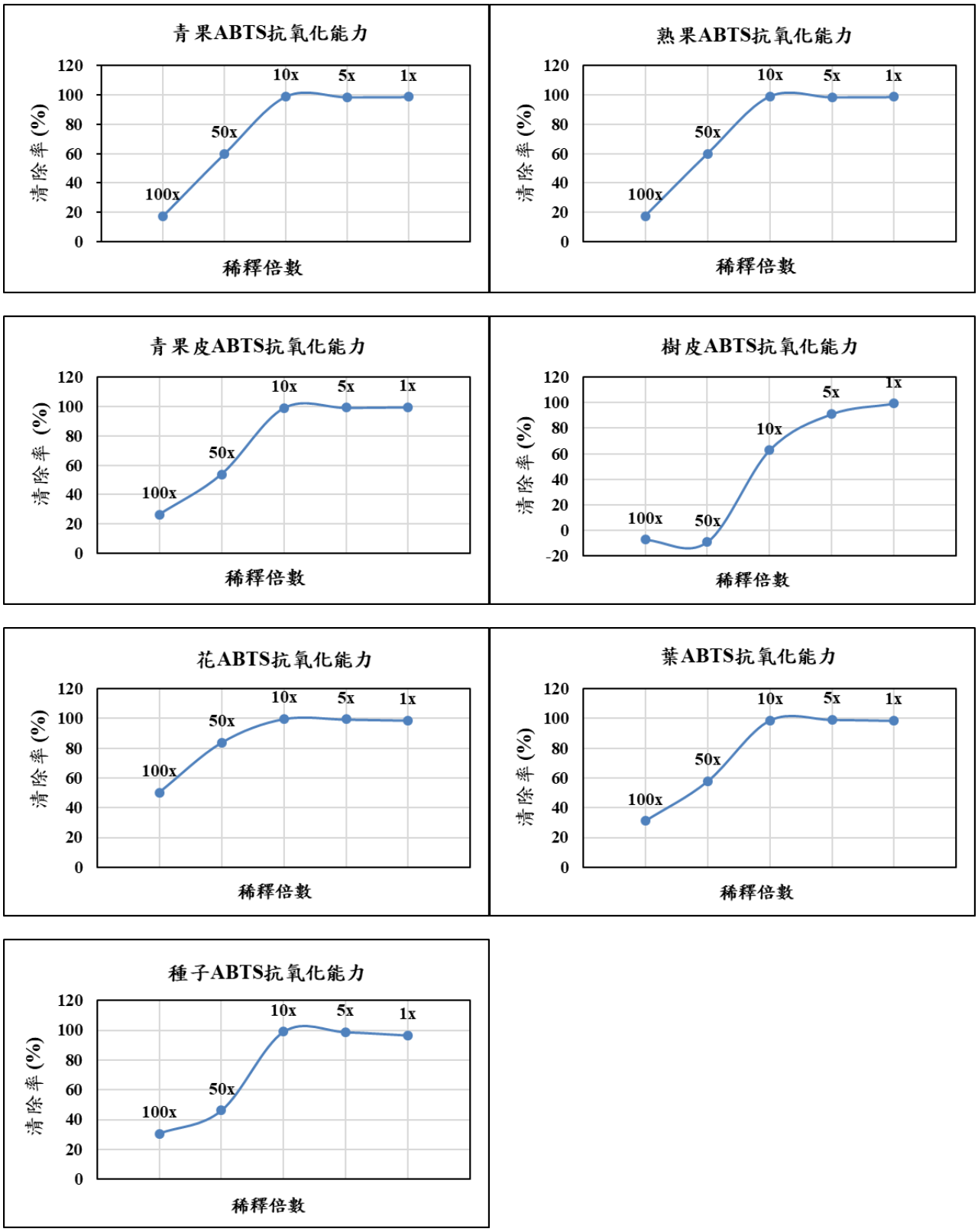
圖十三、Trolox 之 ABTS 陽離子自由基清除率參照圖(第二作者繪圖)

圖十四為樹葡萄各部位樣本依照標準步驟依序加入反應試劑，測定其於 734 nm 波長之吸光值並以 Trolox 標準曲線圖及其方程式計算各部位樣本之超音波水萃取物清除陽離子自由基之相對能力。由結果得，各部位樣本萃取液之 Trolox 當量由高至低依序為種子 (63.52 mg/ml)、樹皮 (27.08 mg/ml)、花 (26.14 mg/ml)、葉 (14.13 mg/ml)、青果皮 (6.08 mg/ml)、青果 (0.788 mg/ml)、熟果 (0.732 mg/ml)，其中以種子之 Trolox 當量為最高，相當於每 1ml 樹葡萄種子水萃取物中具有 63.52 mg 之 Trolox 抗氧化能力。



圖十四、樹葡萄各部位樣本之 Trolox 當量(第一作者繪圖)

此外，另分別配置樹葡萄各樣本 1X、5X、10X、50X、100X 之稀釋液，測定不同稀釋倍數之抗氧化能力，並以清除率方程式計算且繪製 ABTS 清除率曲線圖。由圖十五結果得知，各部位樣本皆具有陽離子自由基清除能力，於 1X、5X、10X 稀釋下，青果、熟果、青果皮、葉、花、種子樣本之 ABTS 清除率皆可達到 100%，而樹皮則於 1X 稀釋倍數時其清除率為 100%。

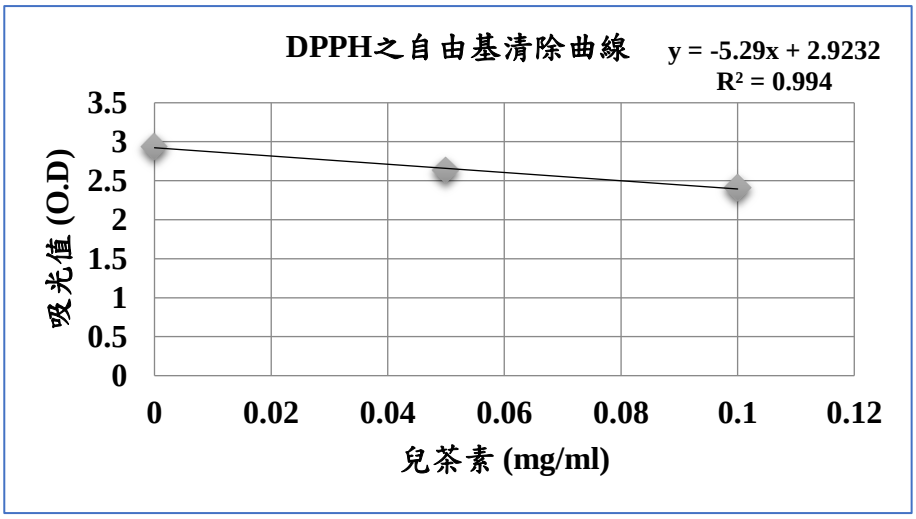


圖十五、樹葡萄各部位樣本之 ABTS 清除率(第一作者繪圖)

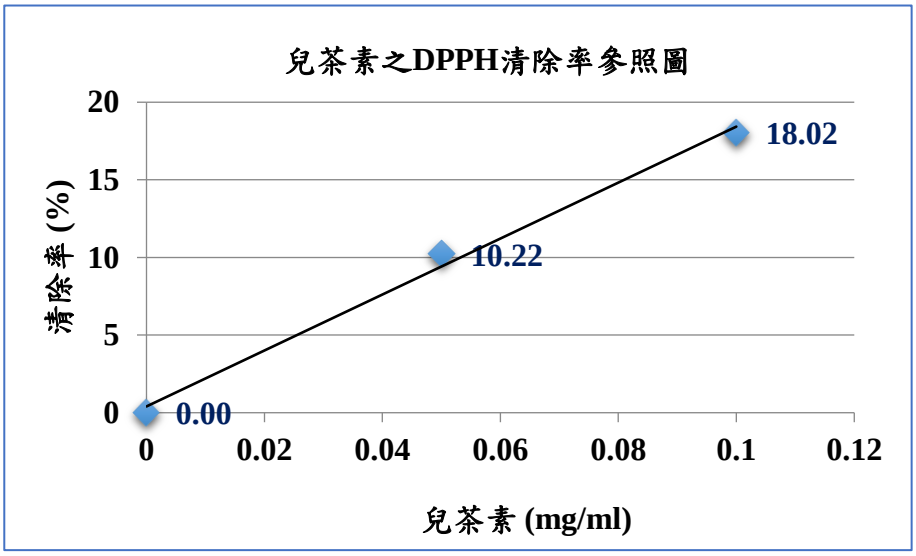
四、樹葡萄各部位樣本 DPPH 自由基清除試驗

圖十六與圖十七為兒茶素 (Catechin) 作為抗氧化劑之標準品，利用兒茶素可轉移氫原子達到清除自由基目的。分別配置 0.05、0.1 mg/ml 等標準濃度，以吸光值法進行測定，將所得之吸光值用以繪製標準曲線並換算 DPPH 自由基清除率與兒茶素當量濃度。自由基清除能力可依照下列方程式進行計算：

$$\frac{\text{DPPH 控制組溶液吸光值} - \text{樣本吸光值}}{\text{DPPH 控制組溶液吸光值}} \%=\text{樣本自由基清除率}$$

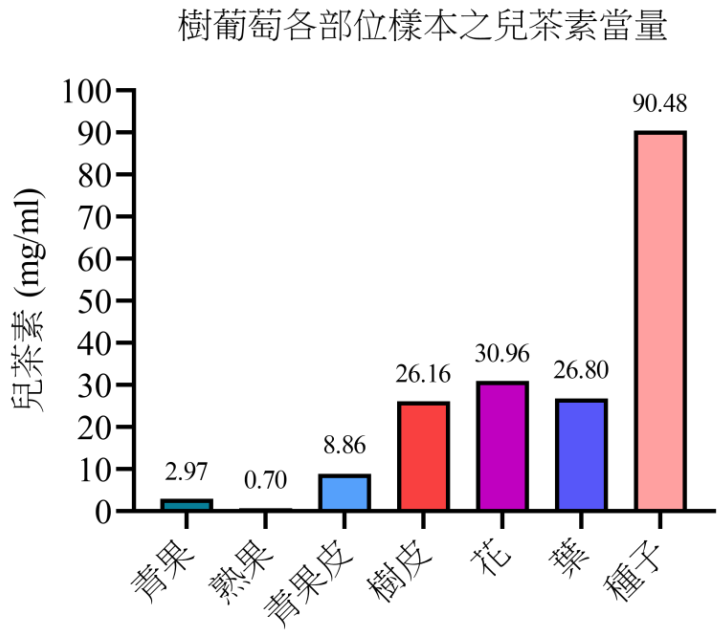


圖十六、兒茶素之 DPPH 自由基清除曲線圖(第一作者繪圖)



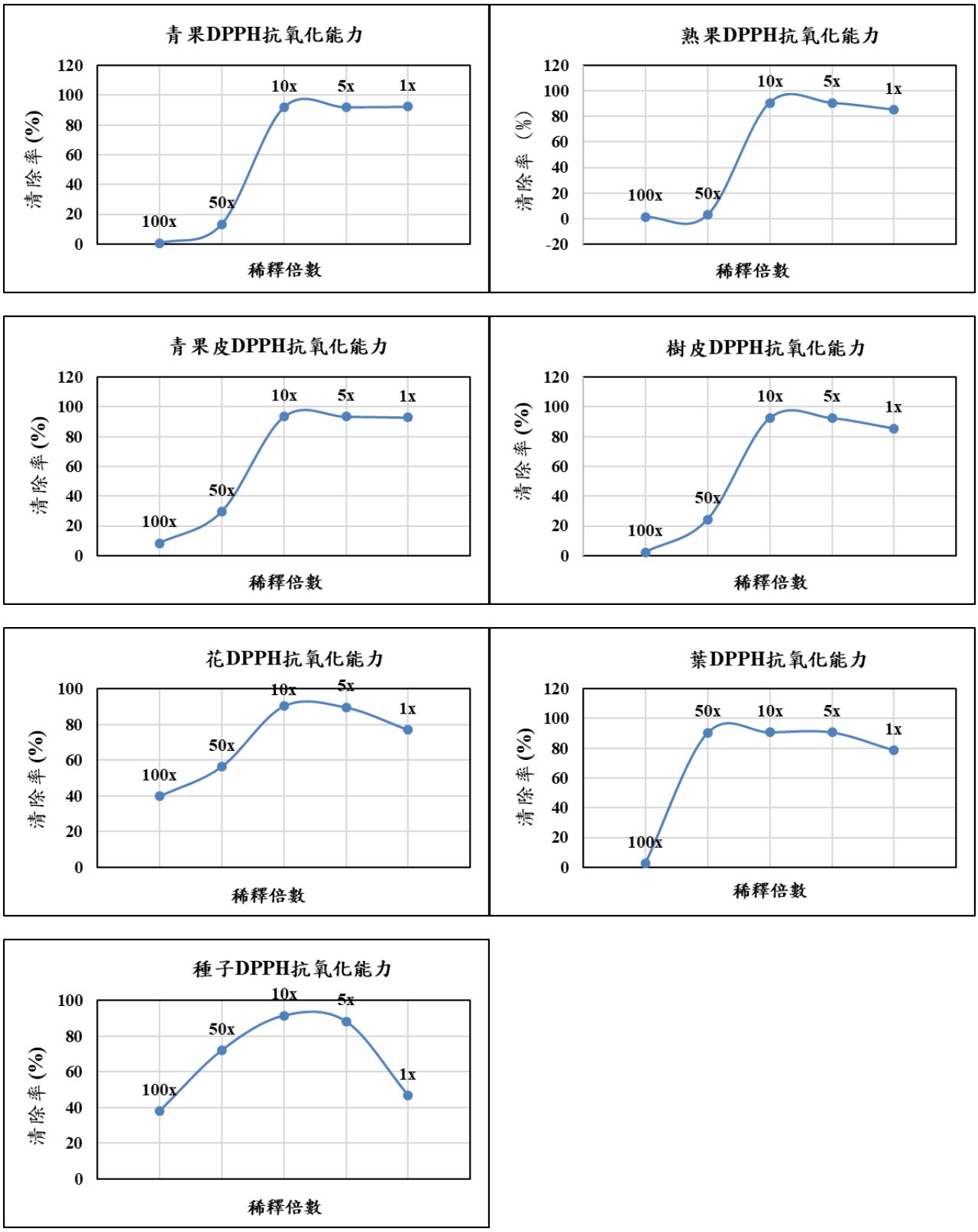
圖十七、兒茶素之 DPPH 自由基清除率參照圖(第二作者繪圖)

圖十八為樹葡萄各部位樣本依照標準步驟依序加入反應試劑，測定其於 517 nm 波長之吸光值並以兒茶素標準曲線圖及其方程式計算各部位樣本之超音波水萃取物清除陽離子自由基之相對能力。由結果得知，各部位樣本萃取液之兒茶素當量，由高至低依序為種子 (90.48 mg/ml)、花 (30.96 mg/ml)、葉 (26.8 mg/ml)、樹皮 (26.16 mg/ml)、青果皮 (8.85 mg/ml)、青果 (2.978 mg/ml)、熟果 (0.7 mg/ml)，其中以種子之兒茶素當量為最高，相當於每 1ml 樹葡萄種子水萃取物中具有 90.48 mg 之兒茶素抗氧化能力。



圖十八、樹葡萄各部位樣本之兒茶素當量(第一作者繪圖)

另分別配置樹葡萄各樣本 1X、5X、10X、50X、100X 之稀釋液，測定不同稀釋倍數之抗氧化能力，並以清除率方程式計算且繪製 DPPH 清除率曲線圖。由圖十九結果得知，各部位樣本皆具有自由基清除能力，於 10X 稀釋下，青果、熟果、青果皮、樹皮、花、葉、種子樣本已達到最佳清除 DPPH 自由基能力，清除率接近 100%。而熟果、種子、花、葉、樹皮等樣本在 1X 稀釋倍率下，其 DPPH 自由基清除率有下降的趨勢。

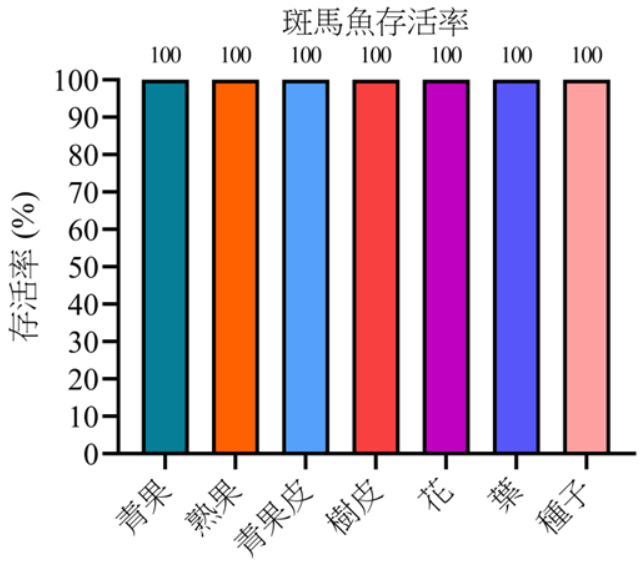


圖十九、樹葡萄各部位樣本之 DPPH 清除率(第一作者繪圖)

五、樹葡萄各部位樣本對於斑馬魚胚胎存活率之影響

圖二十為樹葡萄之各部位樣本對於斑馬魚胚胎存活率之影響。斑馬魚胚胎分別以 100 μl

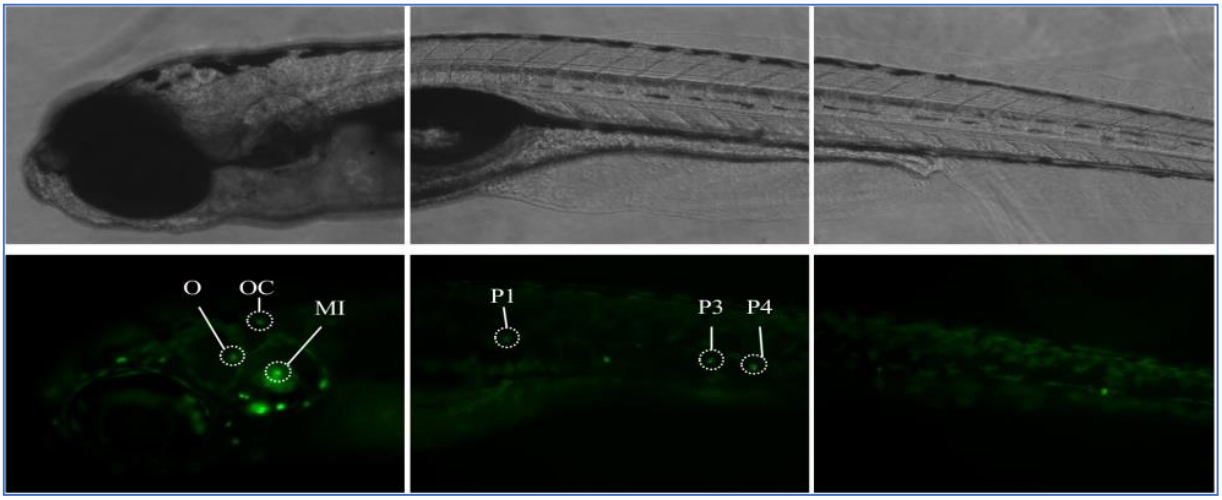
之樹葡萄各部位樣本進行前處理 60 分鐘，再以 12.5μM 之新黴素合併處理 30 分鐘後，以解剖顯微鏡觀察各組別斑馬魚胚胎存活數量並計數，結果以控制組作為對照。由結果得知，各實驗組別之斑馬魚胚胎存活率皆 100%，意即樹葡萄各部位對於斑馬魚胚胎不具有生物毒性。



圖二十、各試驗組別之斑馬魚胚胎存活率比較圖(第二作者繪圖)

六、樹葡萄對斑馬魚胚胎毛細胞的保護力

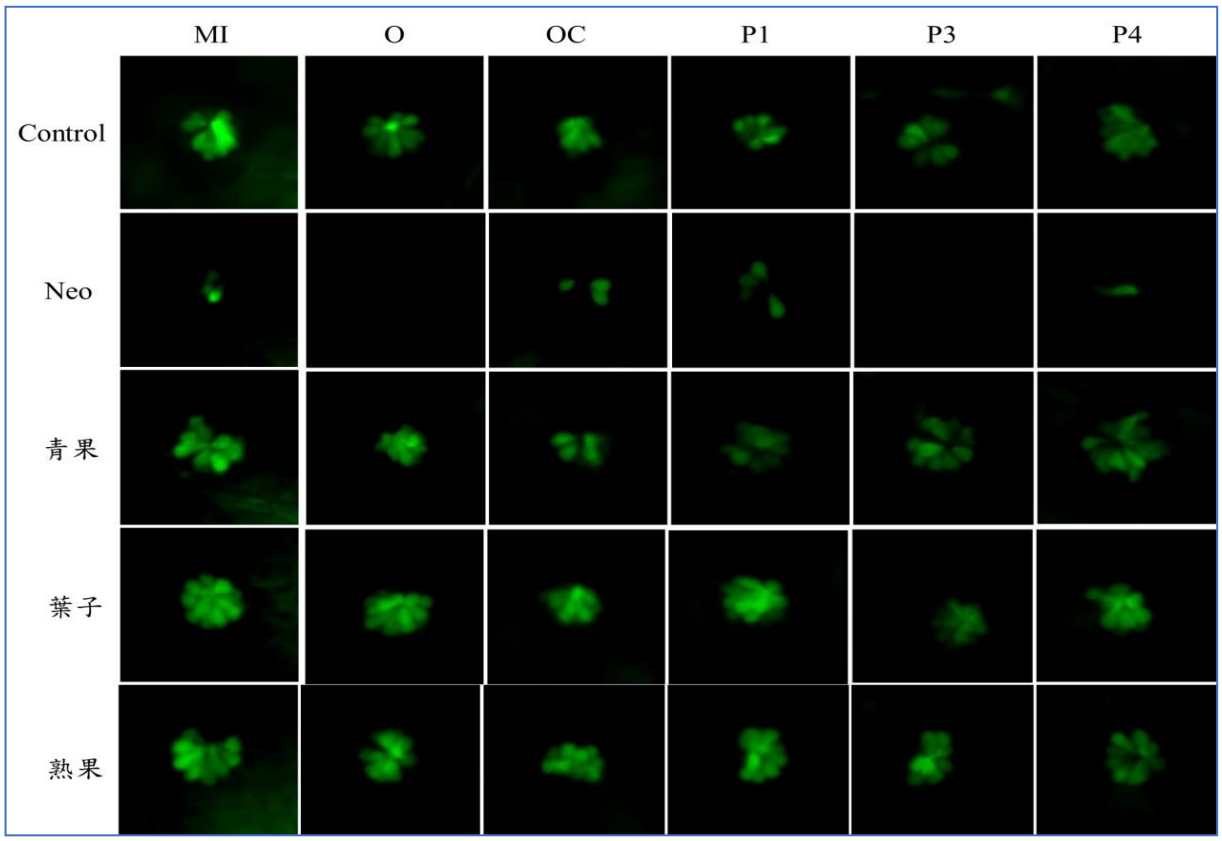
根據圖二十一可判斷斑馬魚的側線毛細胞分布位置，先根據內耳構造去尋找我們需要看的 middle (MI)，再依照相對位置找出需觀察的螢光側線毛細胞。



圖二十一斑馬魚胚胎側線毛細胞分布位置對比圖 otic (O), occipital (OC), middle (MI), and posterior-lateral regions (P1, P3 and P4) (第一作者拍攝)

(一)共處理試驗：

圖二十二為樹葡萄之青果、熟果、葉對於斑馬魚胚胎毛細胞影響的螢光實驗照片。斑馬魚胚胎先用樣本萃取液處理 60 分鐘，再以 12.5μM 之新黴素合併處理 30 分鐘，然後以倒立螢光顯微鏡觀察斑馬魚胚胎側線 MI、O、OC、P1、P3、P4 等位置的毛細胞螢光表現。由照片可明顯看出，單獨處理新黴素之傷害組的螢光亮點最少，甚至有的照片沒有螢光顯示，表示存活的毛細胞最少，而其他組別的毛細胞螢光表現與控制組相似，表示皆具有良好的毛細胞保護效果。

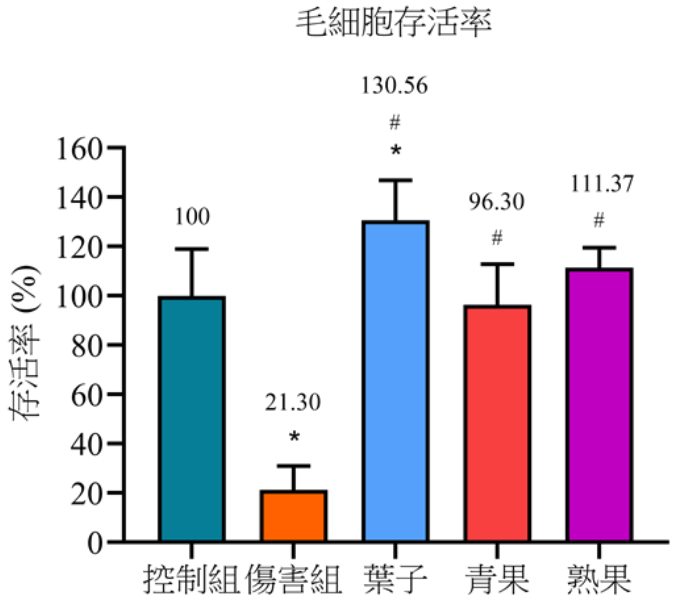


圖二十二、斑馬魚胚胎毛細胞實驗結果，螢光亮點代表毛細胞存活個體數

(第一作者拍攝&第二作者拍攝)

圖二十三為樹葡萄之青果、熟果、葉對於斑馬魚胚胎毛細胞活率之影響。斑馬魚胚胎分別以 100 μl 之青果、熟果、葉樣本進行前處理 60 分鐘，再以 12.5μM 之新黴素合併處理 30 分鐘後，以倒立螢光顯微鏡觀察斑馬魚側線 MI、O、OC、P1、P3、P4 等位置毛細胞數量並計數，以控制組作為對照。由結果得知，單獨處理新黴素之傷害組其毛細胞數量為 21.3%，而在前處理樹葡萄之青果、熟果、葉超音波水萃取物樣本之組別其毛細胞存活數量分別為 96.3%、111.37%、130.56%。以上各保護組別毛細胞數量皆接近控制組別，意即青果、熟果、

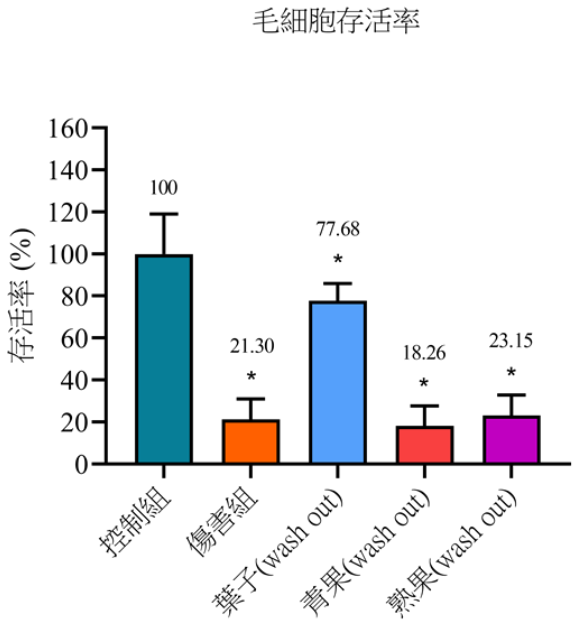
葉樣本具有相當良好毛細胞保護效果。



圖二十三共處理的斑馬魚胚胎毛細胞活率數量比較圖(第一作者&指導老師繪圖)

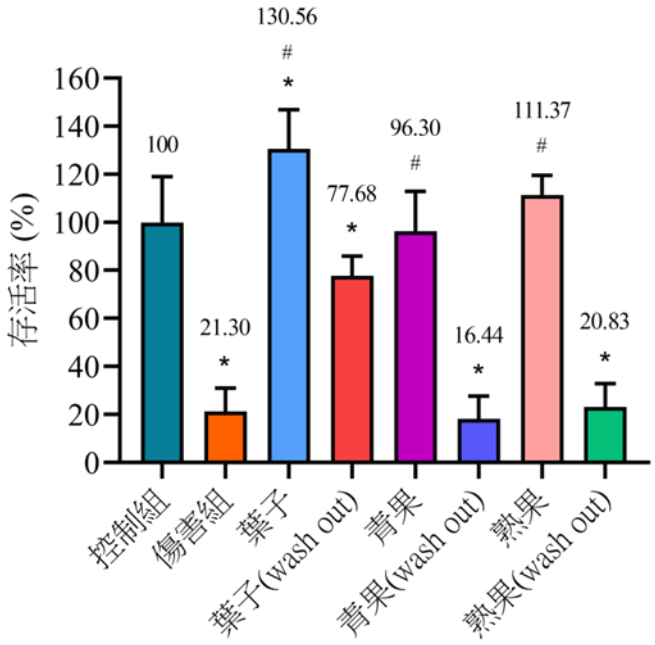
(二) wash out 試驗：

圖二十四為樹葡萄之青果、熟果、葉經 wash out 後對於斑馬魚毛細胞存活率之影響。在 wash out 的實驗中明顯看出，青果、熟果若先洗掉水萃液後再加入新黴素的結果，完全失去了保護力，葉子卻還有 77.68 %的保護力，與傷害組相比，葉子有明顯的修復效果，而果實較不明顯，這代表樹葡萄的葉子，同時有預防與修復的功效。



圖二十四 wash out 之斑馬魚胚胎毛細胞活率數量比較圖(第二作者&指導老師繪圖)

由圖二十五綜合比較圖中，更可明顯看出樹葡萄葉子的超音波水萃液，不管在共處理或 wash out 的保護效果都非常顯著，共處理結果顯現出可能刺激增生毛細胞的能力，wash out 的結果更是突出，一般的樣本經過 wash out 後都失去了保護作用，但葉子的水萃液卻還有高達 77.68 %的保護力，非常亮眼。



圖二十五各試驗組別之斑馬魚毛細胞存活率數量綜合比較圖(第一作者&指導老師繪圖)

伍、討論

我們的實驗成功建立了化學與生物結合且量化的抗氧化能力檢測方法，結果發現樹葡萄含有高濃度的抗氧化成分，高效的抗氧化能力和保護、甚至具有修復聽覺毛細胞的可能性。

在生物檢測的實驗中，得知青果、熟果和葉的樣本超音波水萃液對脆弱的斑馬魚胚胎皆不具生物毒性，存活率均為 100 %；對模式生物斑馬魚的毛細胞保護力實驗結果中，特別的是葉子水萃液樣本處理的毛細胞存活率高達 130.56 %，具有統計學上的差異，我們大膽推測樹葡萄葉子的超音波水萃液樣本，除了具有保護力外，也可能具有促進毛細胞增生的效果，未來可能可以應用在因內耳毛細胞受損而造成聽力障礙的治療上。

在分析抗氧化成分的結果，若用某款市售茶飲料中的兒茶素濃度（30 毫克／每 100ml 相當於 0.30mg/ml），也就是一寶特瓶 500 CC 的茶飲料中兒茶素的含量是 150mg ，相當於三顆樹葡萄的兒茶素含量，也就是說只要吃三顆樹葡萄就大於喝一瓶 500 CC 茶飲料所含的兒茶素濃度。若再和難以咬碎的葡萄籽比較，易於咬食的樹葡萄子的超音波水萃液的類黃酮含量也遠遠高於堅硬葡萄籽的甲醇萃的含量（類黃酮 67.4mg/100g，) (王氏，2000 年)，在清除自由基的能力上樹葡萄子水粹液也高於葡萄籽的甲醇萃液 (王氏，2000 年)，也就是吃樹葡萄絕對不要吐樹葡萄籽，效果才會更好，再加上樹葡萄籽有脆脆的咬感相較於硬如石頭的葡萄籽是更方便取食的。

樹葡萄各部位樣本超音波水萃取液皆富含多酚和類黃酮物質，其中以種子之總多酚和總類黃酮含量最高，相當於每 1ml 樹葡萄種子超音波水萃取物中含有 68.46 mg 之沒食子酸，及 23.44 mg 之兒茶素。植物中的酚類化合物(酚酸)、類黃酮、花青素、單寧、葉綠素等是人類食物中天然抗氧化物的來源，酚類物質的抗氧化活性主要來自於其氧化還原特性和化學結構，因此，在清除自由基上，常扮演重要的角色（Zheng and Wang, 2001；Borges *et al*., 2014）。

在 ABTS 陽離子自由基清除試驗中，各部位樣本超音波水萃取液之 Trolox 當量由高至低前三依序為種子＞樹皮＞花，以種子之 Trolox 當量為最高，相當於每 1ml 樹葡萄種子水萃取物中具有 63.52 mg 之 Trolox 抗氧化能力。游氏等人(2016)在 ABTS 自由基清除活性，則以葡萄籽萃取物活性明顯高於葡萄皮萃取物。

DPPH 自由基清除試驗中，各部位樣本萃取液之兒茶素當量前三由高至低依序為種子＞花 ＞葉，其中以種子之兒茶素當量為最高，實驗結果得知各部位樣本皆具有自由基清除能力，且於 10X 稀釋下，青果、熟果、青果皮、葉、樹皮、花、種子樣本皆達到最佳清除 DPPH 自由基的能力，清除率接近 100%，而熟果、種子、花、葉、樹皮等樣本在 1X 稀釋倍率下，其 DPPH 自由基清除率有下降的趨勢。游氏等人(2016)在在 DPPH 自由基清除活性，葡萄籽甲醇與蒸餾水萃取物有最佳的抑制效果。賴氏(2018)在樹葡萄果皮及種子上，在不同萃取條件下，萃取物抗氧化能力分析(DPPH)、抑制腫瘤細胞存活率試驗、細胞凋亡試驗以及、金屬蛋白酶(MMP-2 與 MMP-9)蛋白活性分析等試驗。結果顯示，樹葡萄果皮及籽萃取物在水萃物之抗氧化效果較佳；果皮與籽萃取物活性比較，則是籽萃取物抗氧化能力較果皮萃取物佳。

顯示抗氧化能力與本實驗結果相似，均以種子最佳。

樹葡萄三部位樣本(青果、熟果、葉)對於斑馬魚胚胎毒性(存活率)之影響上，由結果得知，各實驗組別之斑馬魚胚胎存活率皆為 100%，意即青果、熟果、葉對於斑馬魚胚胎不具有生物毒性。斑馬魚胚胎毛細胞活率，由結果得知，單獨處理新黴素之傷害組其毛細胞數量為 21.3%，而在前處理樹葡萄之青果、熟果、葉超音波水萃取物樣本之組別其毛細胞存活數量分別為 96.3%、111.37%、130.56%。以上各組別保護毛細胞數量皆接近控制組別，意即青果、熟果、葉樣本可以保護斑馬魚毛細胞，甚至可以刺激增生人類內耳毛細胞的潛力。在 wash out 的結果也顯現出，萃取液要一直留存細胞外液中，才能有效保護毛細胞，但最特別的是葉子超音波水萃取液，就算洗掉仍具有高達 77.68 %的保護力，令人難以置信，一般的抗氧化物樣本經過 wash out 後都失去了保護力，也就是說葉子萃取液對毛細胞的保護和促進增生能力，就本實驗結果而言，效果非常明顯且有效 ，是除了一般熟知的果實具抗氧化力之外，另一個值得推廣的健康食品。更積極的作法是，從葉子超音波水萃液中分析出保護或促進增生的成分，對人類的聽力保護、治療，將有很大的幫助。

陸、結論

隨著人類生活水準的提高，重視健康，因此對於生活飲食及醫藥需求上都要求以自然的植物為主要來源(吃原食物)。除營養需求外，強調利用植化素，如抗氧化成分目前在醫學界、預防醫學，甚至化妝品、食品等方面都已受到廣泛運用。許多慢性疾病最早均由細胞抗氧化不足造成，我們可預測自由基清除物和避免自由基產生的物質將成為治療或預防疾病的新主流。

本次實驗當中，我們採取 7 個部位：種子、葉、花、青果、熟果、青果皮、樹皮，作為樣本，得到的結論：

一、第一部分實驗為抗氧化成分的分析，我們選取總多酚與總類黃酮作為成分分析的基準試驗，各樣本在兩者實驗當中，皆以種子的當量為最高。

二、第二部分實驗為清除自由基的能力，我們使用 ABTS、DPPH 兩種不同的方法。 在 ABTS

陽離子自由基清除能力試驗中，各樣本在稀釋倍率為 10 倍時，就以達到最佳清除效果，除了樹皮之外，樹皮在稀釋倍率為 1 倍時，才達到了最佳清除效果。

三、而在 DPPH 自由基清除試驗中，與 ABTS 試驗結果一樣，各部位在稀釋倍率為 10 倍時，就已達到最佳清除效果，但 DPPH 試驗當中，葉在稀釋倍率為 50 倍時，就可以達到最佳清除效果。

四、最後一部分的生物測試是使用斑馬魚胚胎試驗，我們先將各部位做生物毒性試驗，此實驗結果中，各部位存活率皆為 100%，代表各樣本皆不具生物毒性。而在保護斑馬魚胚胎毛細胞試驗，我們採用葉、青果和熟果三部分做毛細胞保護實驗，由結果數據可知，各部位皆具有良好的毛細胞保護效果，特別值得注意的是葉子水萃液樣本處理的斑馬魚胚胎毛細胞存活率高達 130.56 %。在 wash out 的結果明顯看出，青果、熟果若先洗掉水萃液後再加入新黴素，是完全失去了保護力，葉子卻還有 77.68 %的保護力

綜合樹葡萄七種不同部位超音波水萃物，皆以種子的效果最佳，富含多酚類與類黃酮，具有優良還原力及清除 DPPH 自由基抗氧化活性，而且樹葡萄種子不似葡萄種子般堅硬，可直接咬碎吞入，方便攝取。其中青果、熟果、葉三部位樣本具有相當良好斑馬魚胚胎毛細胞保護效果，雖然樹葡萄一般食用部分為果肉，但與葡萄一樣可利用不同萃取，擴大可利用部位，有利抗氧化功能，達到促進健康目的。

柒、參考文獻資料

一、中央研究院數位文化中心(2014). 台灣生命大百科 https://taieol.tw/pages/43270

二、台北市瑠公農田水利會(2024). 台灣景觀植物 http://tlpg.hsiliu.org.tw/plant/view/121。

三、王子慶(2000). 葡萄子與皮抗氧化性之研究. 屏東科技大學食品科學系碩士論文 p120.

四、游宜屏、施明智、張瀚、呂君萍、施明智 (2016). 。比較本土巨峰葡萄皮與籽其水與甲醇萃取物之抗氧化活性。華岡農科學報，9-23。

五、賴雲鈴(2018). 樹葡萄萃取物之抗乳癌細胞之增生研究. 南臺科技大學生物科技系碩士論文 p82.

六、謝淑秋、王俊堯、葉信利 (2016). 斑馬魚－水中毒性物質偵測家 水試專訊 55:52-54

七、鍾楊聰、張立、徐歷鵬、黃碧祈 2005 生物學(第六版) 偉銘圖書有限公司 p783.

八、Hasan, M. (2020). Health benefits of Jabuticaba https://worldofmedicalsaviours.com/benefits-of-jabuticaba/#google_vignette

九、Abe, F.R., Gravato, C., Soares, A.M.V.M., ＆ Oliveira, D.P. (2017). Biochemical approaches to assess oxidative stress induced by exposure to natural and synthetic dyes in early life stages in zebrafish. *J Toxicol Env Heal*. Part A 80(23–24), 1259–1268 https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1371091

十、Blanco-Sanchez, B., Clement, A., Phillips, J.B., ＆ Westerfield M. (2017). Zebrafish models of human eye and inner ear diseases. *Methods Cell Biol* 138, 415-467. https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.10.006

十一、Borges, L.L., Conceiçao, E.C., ＆ Silveira, D. (2014). Active compounds and medicinal properties of Myrciaria genus. *Food Chem*. 153, 224–233. https://doi.org/10.1016/j. foodchem.2013.12.064.

十二、Conceição Soares, D.S., Da Silva Florencio, M.N., Mendes de Souza, P., Pacheco Nunes T., ＆ Martins de Oliveira Junior, A. (2019). Research and development on jabuticaba (Myrciaria Cauliflora): overview on academic research and patents. *Food Sci. Technol, Campinas*, 39(4), 1005-1010.

十三、Kniss, J.S., Jiang, L., ＆ Piotrowski, T.(2016). Insights into sensory hair cell regeneration from the zebrafish lateral line. *Curr Opin Genet Dev* 40, 32-40. https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.05.012

十四、Zheng, W. ＆ Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem* 49, 5165-5170.

十五、M. Li et al., (2021)Naringin attenuates cisplatin- and aminoglycoside-induced hair cell injury in the zebrafish lateral line via multiple pathways. *J Cell Mol Med*.25,975–989.

十六、周科霖等(2019)。爭妍豆力-蝶豆花抗氧化能力探討及應用。中華民國第五十九屆中小

學科學展覽說明書。

十七、游黼上(2019)。「黑金」-醬油製程中廢棄黑豆汁之研究。中華民國第五十九屆中小學科學展覽說明書。

十八、徐可葳等(2017)。海梨柑的另一片天。中華民國第五十七屆中小學科學展覽說明書。

十九、連向澄等(2016) 。茶蠶砂萃取物之成分分析與活性探討。中華民國第五十六屆中小學科學展覽說明書。

【評語】052204

1. 本作品係探討樹葡萄各部位(種子、葉、花、青果、熟果、青果皮、樹皮)之超音波水萃液的抗氧化成分、抗氧化力，並試驗其對模式生物斑馬魚毛細胞的保護力。

2. 以民間種植之樹葡萄為試驗材料，探討各部位之機能成分與抗氧化能力，可提供保健產品之開發應用參考，具產業應用潛力。

3. 建議檢視檢量線範圍，適度濃縮或稀釋待測樣品，避免以外插方式取得數據。

4. 樣品之抗氧化物若能以萃出物固形物含量為基準，抗氧化能力以EC50表示來進行比較，較為合理。

作品簡報

Danio的健康食品-
探討樹葡萄的抗氧化力與
對斑馬魚胚胎的影響

壹、前言

一、研究動機與文獻回顧：

嘉寶果為熱帶植物，其果實類似葡萄又名樹葡萄(圖一、圖二)。我們想知曉樹葡萄是否具有抗氧化能力及抗自由基能力，並使用基因改造過的斑馬魚(Pvalb3b-Tag:GFP)胚胎(圖四)進行實驗，我們想了解樹葡萄是否可有效的預防並降低其毛細胞(圖五)的死亡率。



圖一、樹葡萄植株(第一作者拍攝)



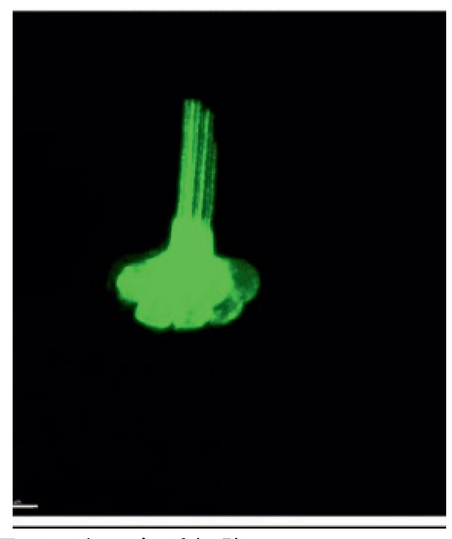
圖二、樹葡萄果實(第一作者拍攝)



圖三、斑馬魚成魚(第一作者拍攝)



圖四、斑馬魚胚胎(第一作者拍攝)



圖五、斑馬魚毛細胞(本圖參引自M. Li et al., (2021))

二、研究目的：

(一)探討樹葡萄各部位(種子、葉、花、青果、熟果、青果皮、樹皮)，以超音波水萃取物之抗氧化能力。

1.抗氧化成分多寡(總酚、總類黃酮含量)。

2.總抗氧化能力，對 ABTS 陽離子自由基清除能力。

3.總抗氧化能力，對 DPPH 自由基清除效能。

(二)探討樹葡萄青果、熟果、葉部位萃取物是否具有保護斑馬魚毛細胞的效果。

貳、研究材料

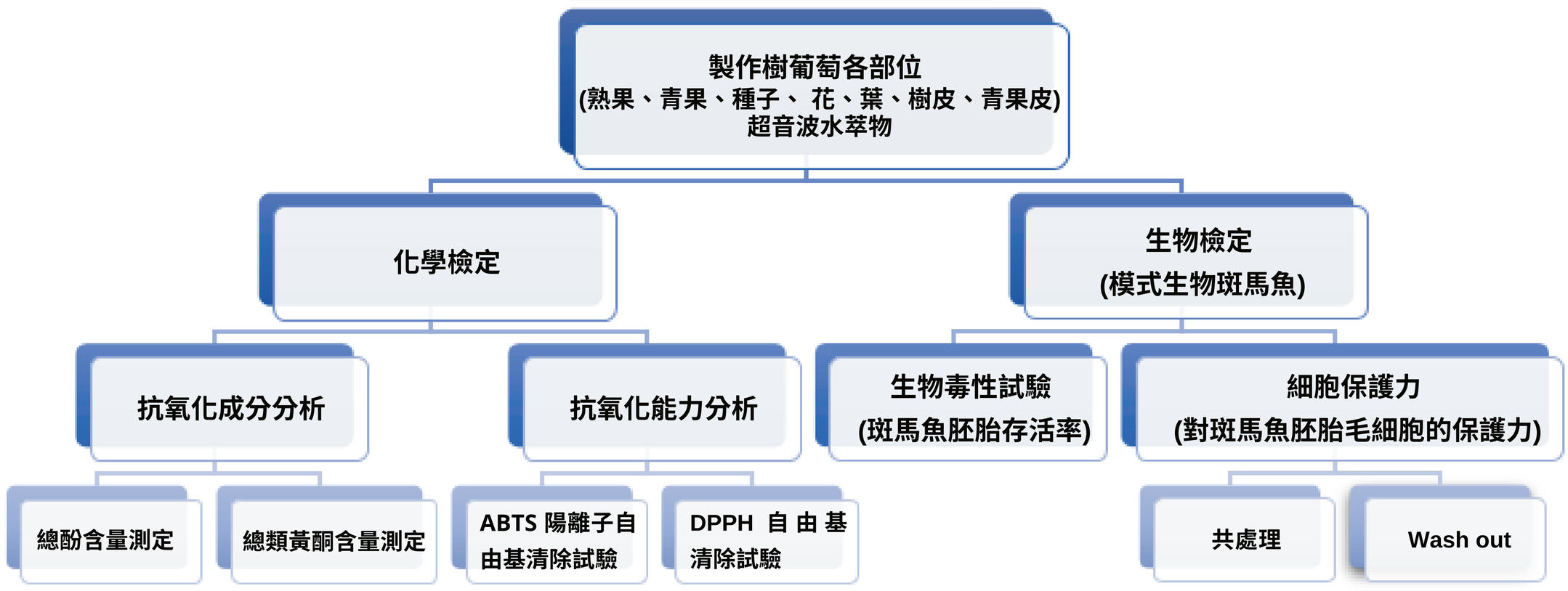
一、研究材料及對象：

(一)實驗材料(樹葡萄)：青果、熟果、青果皮、樹皮、花、葉、種子。

(二)觀察對象：斑馬魚(Pvalb3b-Tag:GFP)受精 7 天後的胚胎。

參、研究過程或方法

一、研究架構：



(第一作者繪圖)

二、研究方法：

(一)製作樹葡萄樣本(種子、葉、花、青果、熟果、青果皮、樹皮)水萃取液

(二)總酚含量測定：沒食子酸標準曲線製作(採用Folin-Ciocalteu 法測定製作標準曲線圖)→測量各部位樣本沒食子酸當量

(三)總類黃酮含量測定：兒茶素標準曲線製作→測量各部位樣本兒茶素當量(含類黃酮之物質會與三氯化鋁反應產生絡合物呈現黃色)

(四) ABTS 陽離子自由基清除試驗：**自由基清除能力可依照下列方程式進行計算：** $\frac{\text{ABTS 控制組溶液吸光值-樣本吸光值}}{\text{ABTS 控制組溶液吸光值}}$ **%=樣本自由基清除率**

實驗原理： ABTS 在過氧化酶的催化下會與雙氧水反應，形成穩定的藍綠色 ABTS+ 陽離子自由基溶液。 ABTS+ 會與擁有抗氧化能力的反應物結合，造成吸光值降低，代表著抗氧化物清除 ABTS+ 自由基離子的能力越佳。

(五) DPPH 自由基清除試驗：**自由基清除能力可依照下列方程式進行計算：** $\frac{\text{DPPH 控制組溶液吸光值-樣本吸光值}}{\text{DPPH 控制組溶液吸光值}}$ **%=樣本自由基清除率**

實驗原理： DPPH 自由基溶於甲醇或乙醇，形成穩定的自由基溶液。若有抗氧化能力物質和藍紫色的 DPPH 自由基溶液反應會形成黃色的自由基溶液，造成在 517nm 的吸光值下降，表示物質清除自由基的能力越好。

(六)斑馬魚胚胎存活率測試

(七)斑馬魚胚胎毛細胞保護能力測試：

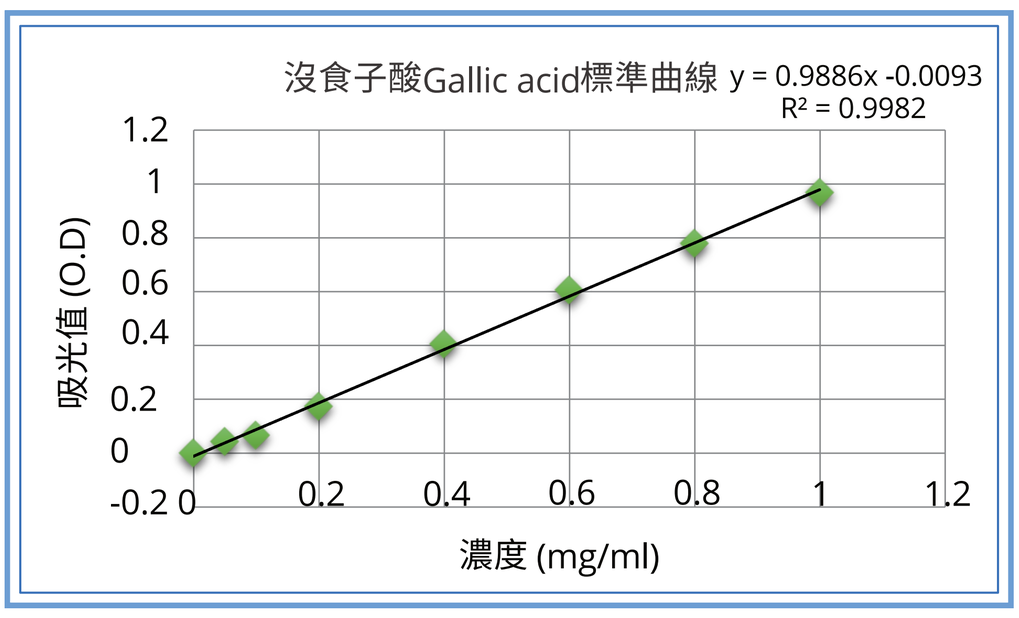
1.共處理測試

2. Wash out 測試

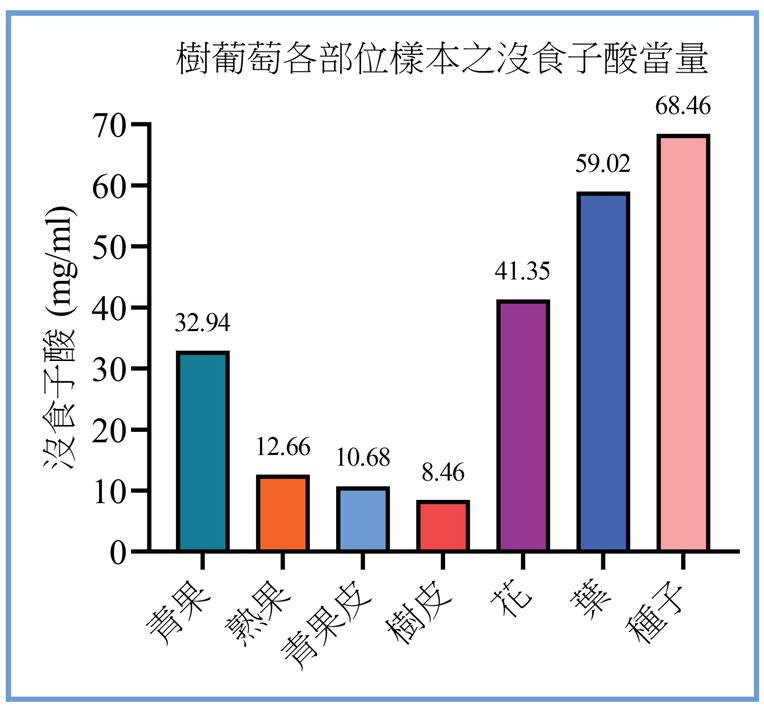
肆、研究結果

一、樹葡萄各部位樣本總多酚含量測定

測定其於 735 nm 波長之吸光值來計算各部位樣本總多酚之相對含量。由結果得知，**各部位樣本萃取液皆富含多酚物質，以種子之總多酚含量為最高。**



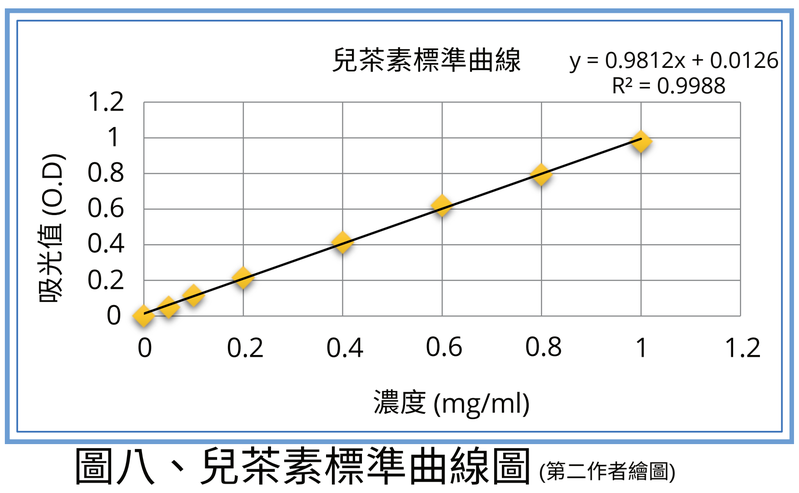
圖六、沒食子酸標準曲線圖(第一作者繪圖)



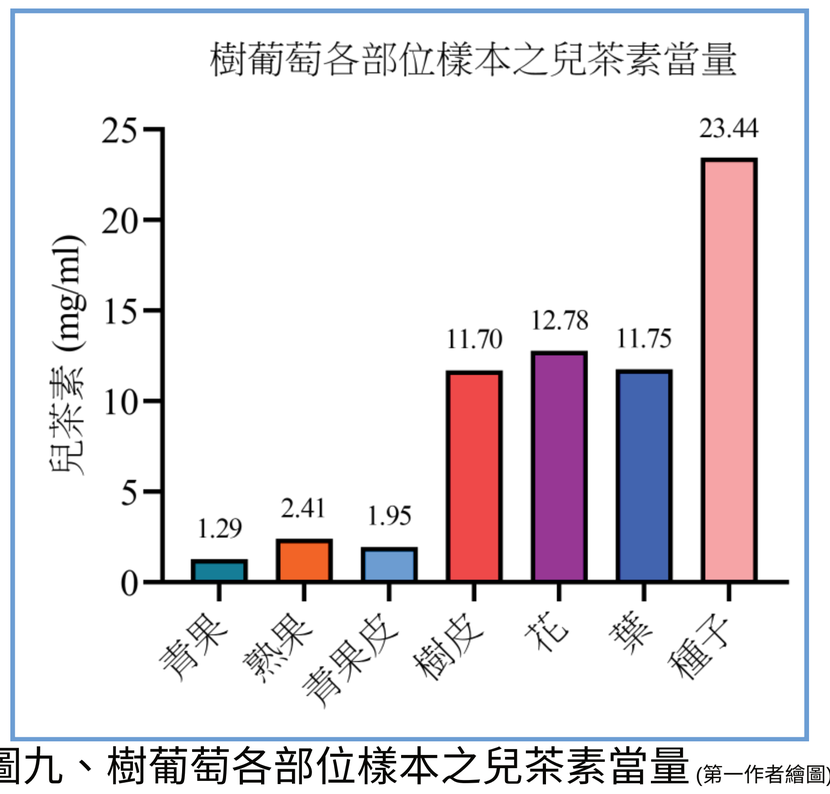
圖七、樹葡萄各部位樣本之沒食子酸當量(第一作者繪圖)

二、樹葡萄各部位樣本總類黃酮含量測定：

測定其於 510nm 波長之吸光值來計算各部位樣本總類黃酮之相對含量。由結果得知，**各部位樣本萃取液皆富含類黃酮物質，以種子之總類黃酮含量為最高。**



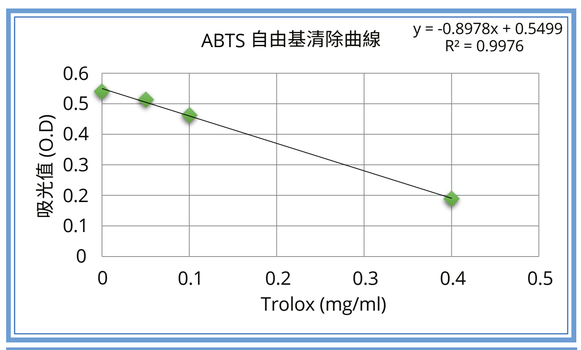
圖八、兒茶素標準曲線圖 (第二作者繪圖)



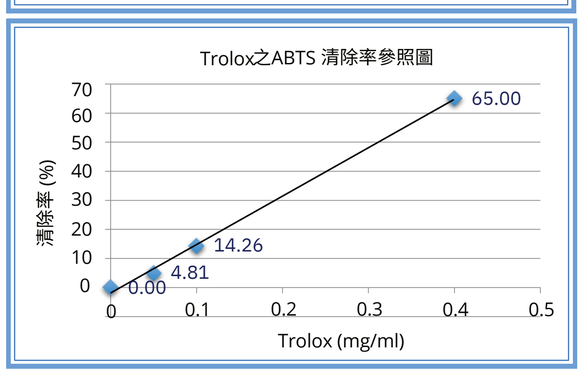
圖九、樹葡萄各部位樣本之兒茶素當量 (第一作者繪圖)

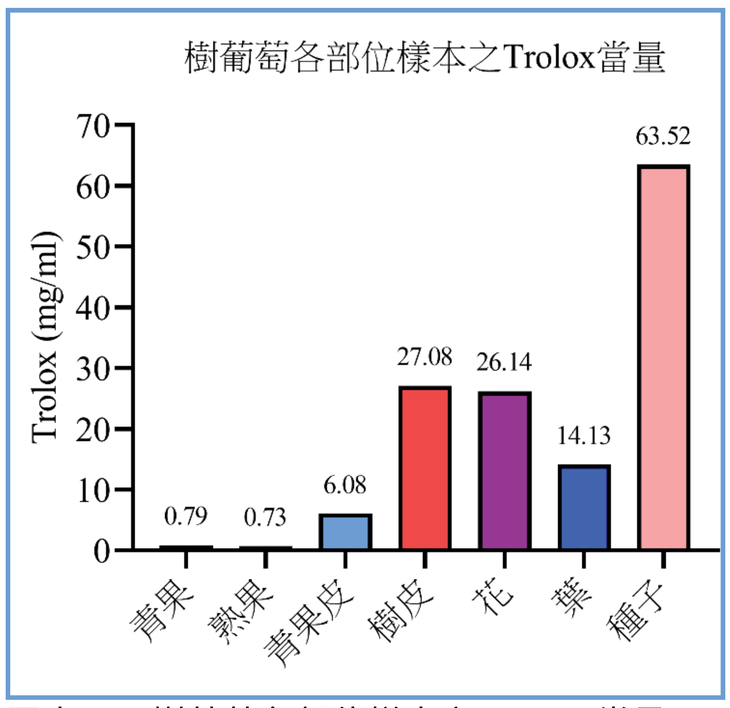
三 、樹葡萄各部位樣本 ABTS 陽離子自由基清除試驗：

圖十、Trolox 之 ABTS 陽離子自由基清除曲線圖(第一作者繪圖)



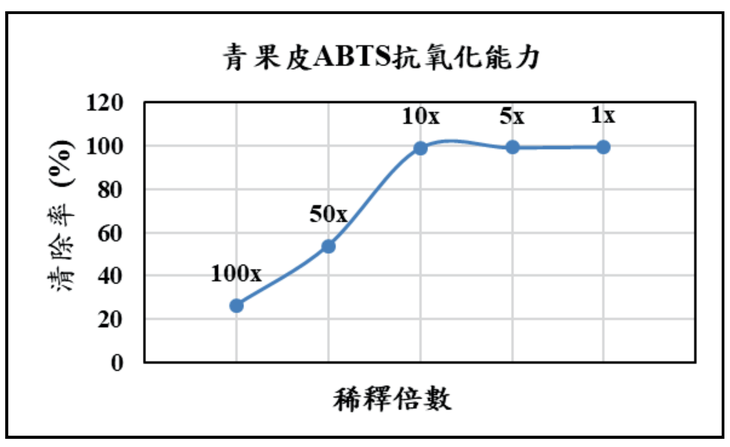
圖十一、 Trolox 之 ABTS 陽離子自由基清除率參照圖(第二作者繪圖)

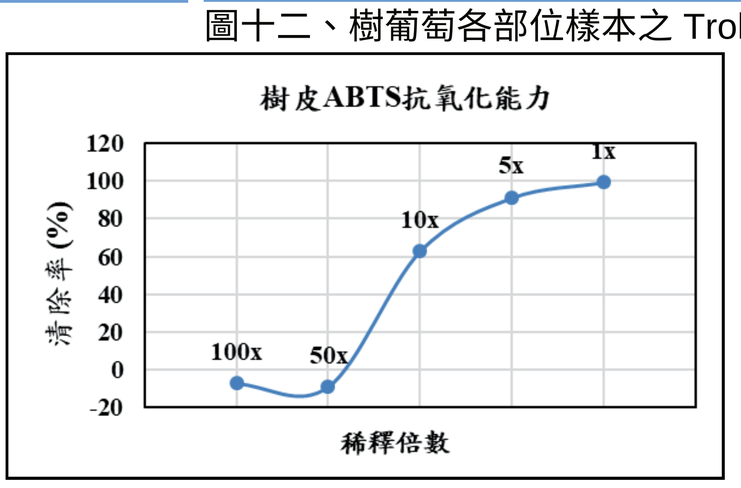




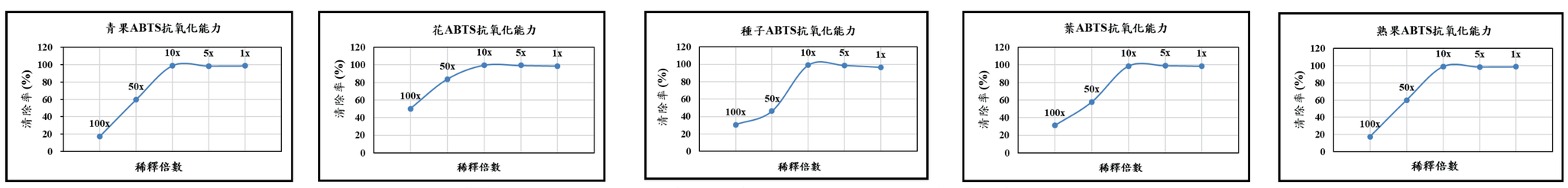
圖十二、樹葡萄各部位樣本之 Trolox 當量 (第一作者繪圖)

測定其於 734nm 波長之吸光值來得知清除陽離子自由基之相對能力。**以種子之 Trolox 當量為最高。**





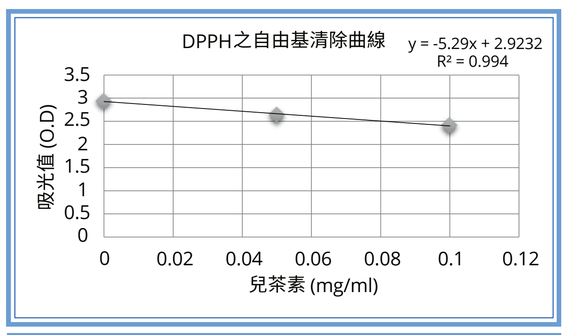
於 10X 稀釋下，**多數部位樣本的清除率皆可達到 100%** ，而樹皮則於 1X 稀釋倍數時其清除率為 100% 。



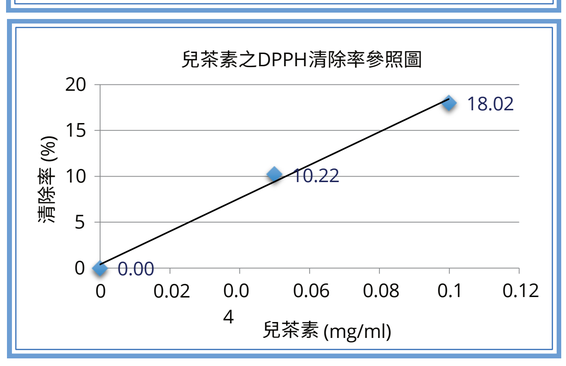
圖十三、樹葡萄各部位樣本之 ABTS 清除率 (第一作者繪圖)

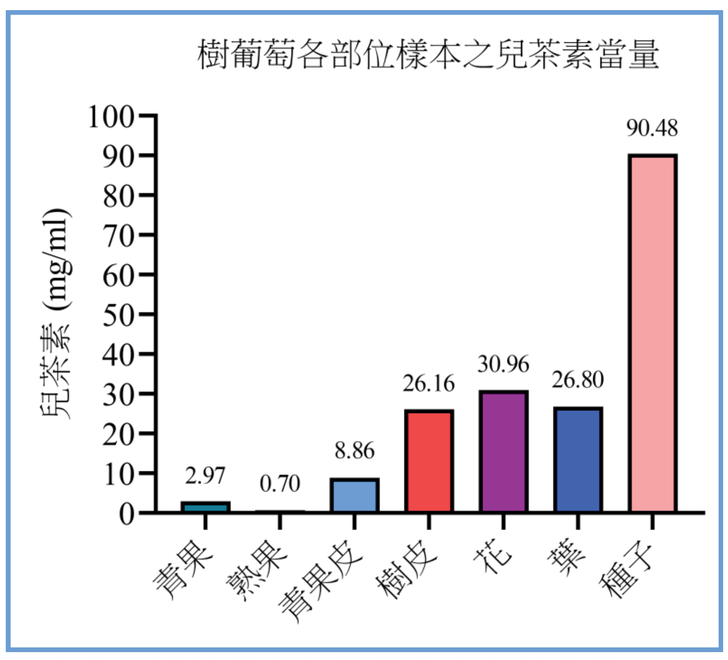
四 、樹葡萄各部位樣本 DPPH 自由基清除試驗：

圖十四、兒茶素之 DPPH 自由基清除曲線圖 (第一作者繪圖)



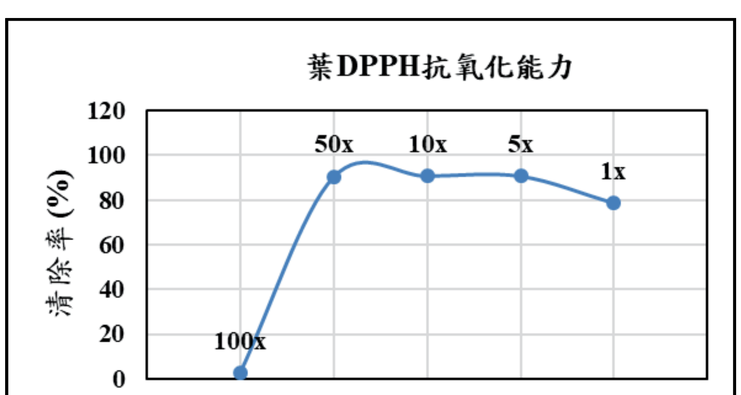
圖十五、兒茶素之 DPPH 自由基清除率參照圖(第二作者繪圖)

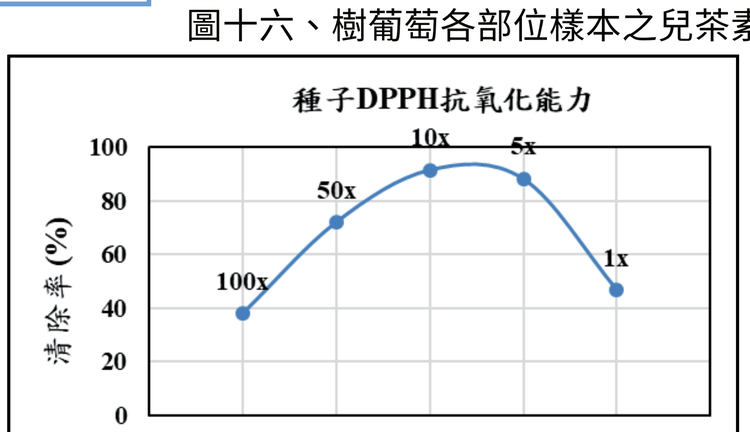




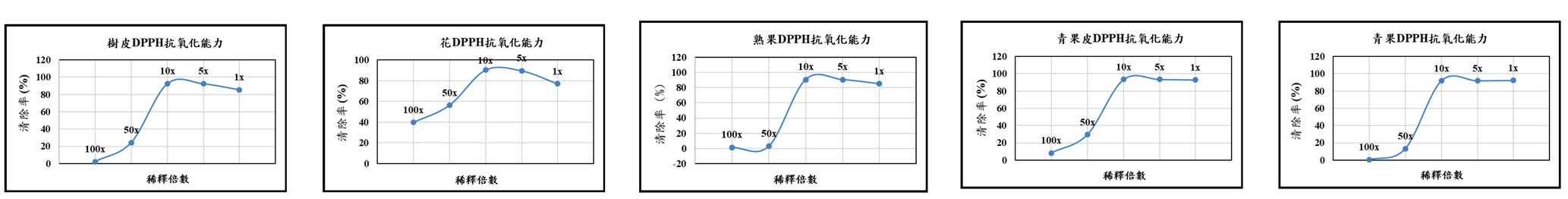
圖十六、樹葡萄各部位樣本之兒茶素當量(第一作者繪圖)

測定其於 517nm 波長之吸光值來得知清除陽離子自由基之相對能力。**以種子之兒茶素當量為最高。**



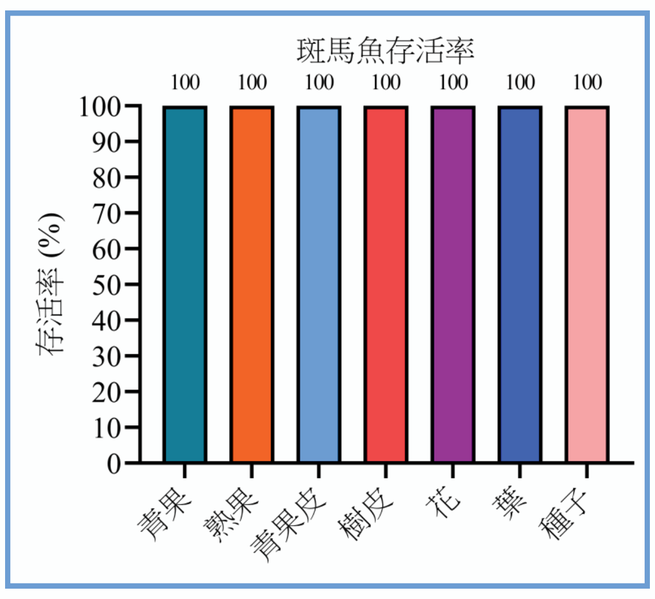


於 10X 稀釋下，**各部位樣本的清除率接近 100%** 。而各部位樣本在 1X 稀釋倍率下，其 DPPH 自由基清除率有下降的趨勢。



圖十七、樹葡萄各部位樣本之 DPPH 清除率(第一作者繪圖)

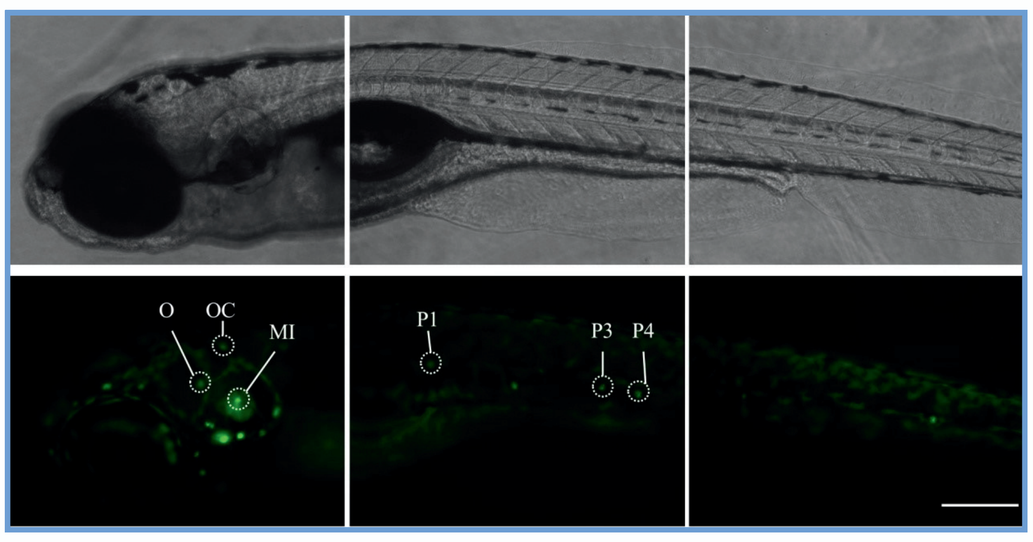
五、樹葡萄各部位樣本對於斑馬魚胚胎存活率之影響：



圖十八、各試驗組別之斑馬魚胚胎存活率比較圖
(第二作者繪圖)

各部位對於斑馬魚胚胎**不具有生物毒性。**

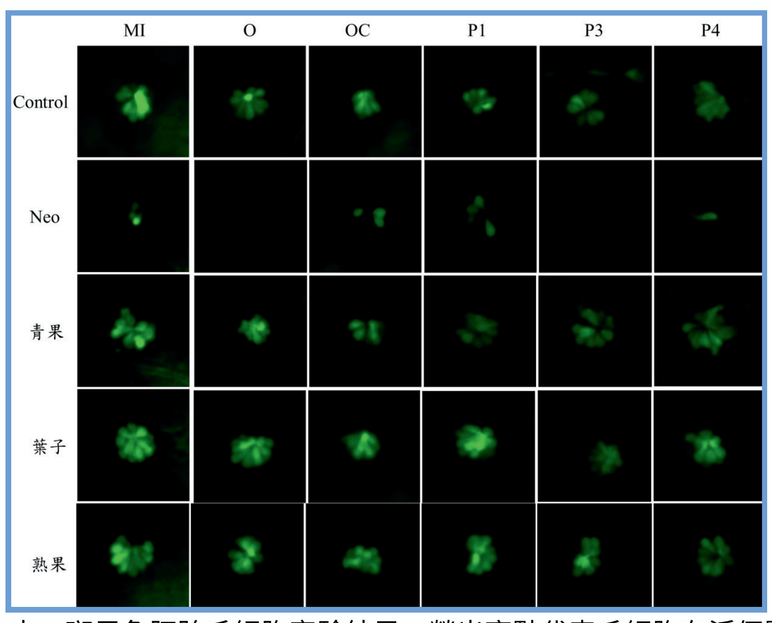
六、樹葡萄對斑馬魚胚胎毛細胞的保護力：



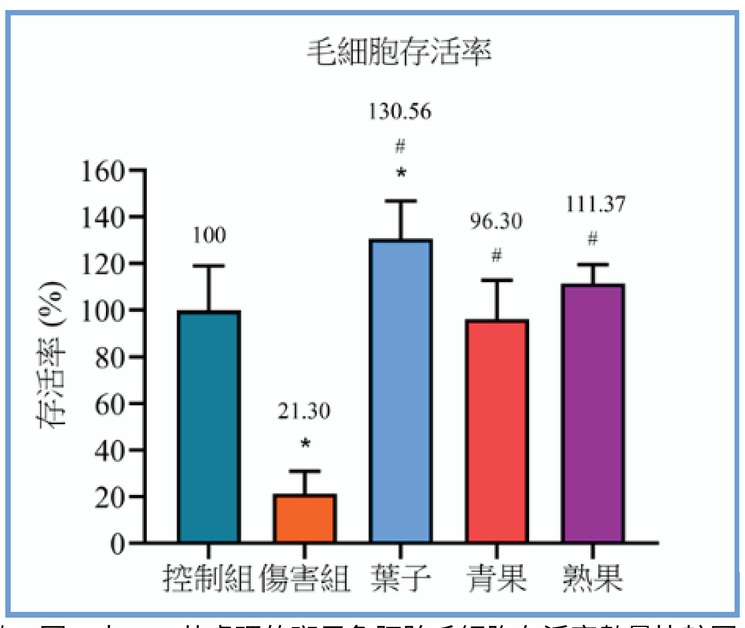
圖十九斑馬魚胚胎側線毛細胞分布位置對比圖
otic (O), occipital (OC), middle (MI), and posterior-lateral regions (P1, P3 and P4)
(第一作者拍攝)

(一)共處理試驗：

魚胚胎先用樣本萃取液處理，再以新黴素合併處理，觀察魚胚胎側線 6 個位置的毛細胞。照片可看出，**傷害組的螢光亮點最少，而其他組的毛細胞螢光表現與控制組相似。**



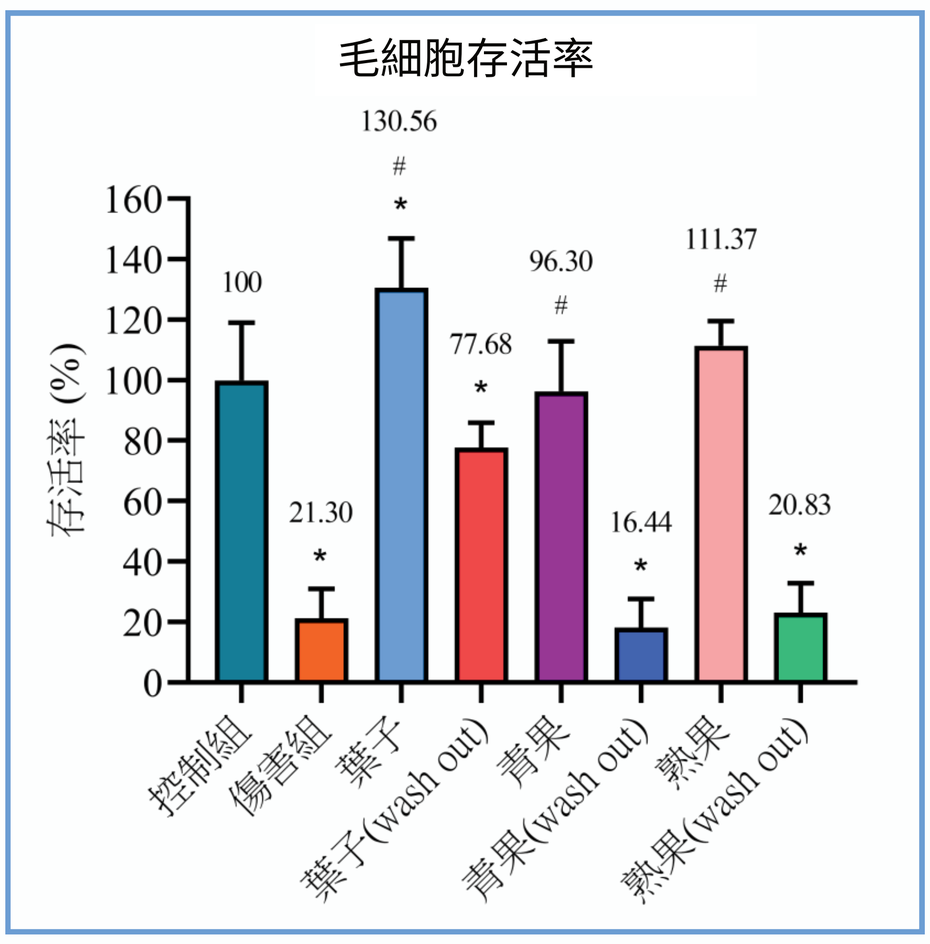
圖二十、斑馬魚胚胎毛細胞實驗結果，螢光亮點代表毛細胞存活個體數
(第二作者拍攝)



圖二十一、共處理的斑馬魚胚胎毛細胞存活率數量比較圖
(第一作者&指導老師繪圖)

3 種萃取液對魚胚胎毛細胞存活率之量化結果。傷害組其毛細胞數量為 21.3%，各保護組毛細胞數量皆接近控制組，意即 **3 種樣本皆具有相當良好的毛細胞保護效果。**

(二) wash out 試驗：



圖二十二、各試驗組別之斑馬魚毛細胞存活率數量綜合比較圖
(第一作者&指導老師繪圖)

青果、熟果若先洗掉水萃液後再加入新黴素，通常會完全失去了保護力，而葉子卻還有 77.68% 的保護力，與傷害組相比，葉子有明顯的修復效果，這代表樹葡萄的葉子，同時有預防與修復的功效。此比較圖更可明顯看出樹葡萄**葉子的超音波水萃液，不管在共處理或 wash out 的保護效果都非常顯著，共處理結果顯現出可能刺激增生毛細胞的能力。**

伍、討論

1.我們的實驗建立了化學與生物結合且量化的抗氧化能力檢測方法。
2.結果發現樹葡萄含有高濃度的抗氧化成分、高效的抗氧化能力，可以有效保護聽覺毛細胞，且具有修復的可能性。
3.生物檢測的結果中，萃取液皆對斑馬魚胚胎不具生物毒性；葉子水萃液，除了具有保護力外，也可能具有促進毛細胞增生的效果。
4.大部分抗氧化物樣本經過 wash out 後都失去了保護力，但是葉子萃取液對毛細胞的保護和促進增生能力，就結果而言，效果卻還是很明顯，未來應是值得推廣的保健食品。

陸、結論

綜合樹葡萄七種不同部位超音波水萃物的化學檢定方面，皆以種子的效果最佳，富含多酚類與類黃酮，具有優良還原力及清除 DPPH 自由基抗氧化活性，而且樹葡萄種子不似葡萄種子般堅硬，可直接咬碎吞入，方便攝取。其中青果、熟果、葉三部位樣本皆具有相當良好的斑馬魚毛細胞保護效果，可利用不同萃取方式，擴大可利用部位和增加抗氧化效果，達到促進健康的目的。

柒、參考文獻資料

一、中央研究院數位文化中心 (2014)台灣生命大百科。https://taieol.tw/pages/43270
二、M. Liet al., (2021)Naringin attenuates cisplatin- and aminoglycoside-induced hair cell injury in the zebrafish lateral line via multiple J Cell Mol Med.pathways.25,975–989.
三、游黼上(2019)。「黑金」-醬油製程中廢棄黑豆汁之研究。中華民國第五十九屆中小學科學展覽說明書。