

中華民國第四十八屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 化學科

040209

利用二氧化鈦降解膠原蛋白的探討

學校名稱：國立彰化高級中學

作者： 高二 蕭崇哲 高二 黃鈺笙 高二 蘇育弘	指導老師： 劉曉倩 蔡孟祐
---	-----------------------------

關鍵詞： 膠原蛋白、二氧化鈦、降解

利用二氧化鈦降解膠原蛋白的探討

摘要

本實驗使用奈米級二氧化鈦能經紫外線催化，分解空氣中的水分子產生自由基，攻擊膠原蛋白鍵結的部份，使膠原蛋白的分子量成功的從 300000 減少至少到 20000 以下。其次，利用紫外線波長或酸鹼值的變因之下，控制降解出來的分子量大小。利用此法可在 4 個小時內得到很好的降解效果，不僅可以節省反應所需的時間，所需的成本也比當今所使用的酵素降解法來得低。

其次，檢測降解完後膠原蛋白的活性，發現只要不照光超過 2 小時，膠原蛋白所剩的活性還不錯。如此一來，就可以利用此法快速的製造出有用的膠原蛋白了。

壹、研究動機

膠原蛋白，因為具有特別的機械性質，可以提供結締組織所需的張力與拉力強度，也可控制分子通透、參與組織修復，是一種在醫學上對於皮膚受傷的人很好的修補材料。在化妝品、製藥、化工等等都有很大的發展空間。(黃彥富、湯正明、徐善慧，2003) 而現在市面上有許多利用膠原蛋白來做養顏美容的化妝品，但是膠原蛋白的分子量過大，約為 283000 道爾頓(daltons)，皮膚根本不易吸收。顯然的膠原蛋白適度的改善，使其分子量減小，將可發揮其最大效益，讓人體皮膚更好吸收。降解是一種化學反應，使大分子變成小片段，有利於分子量的減少。本研究希望透過實驗，在利用二氧化鈦催化紫外線分解空氣中的水分子產生自由基，攻擊膠原蛋白鍵結的部份使其降解，試著把膠原蛋白降解到可以讓人體皮膚達到易吸收的效果，本研究也希望在不同的變因下，探討膠原蛋白降解速率，找出較高的降解速率，以利膠原蛋白的降解。

貳、研究目的

- 一、探討使用不同紫外線波長照射下，TiO₂對膠原蛋白降解速率的影響
- 二、探討不同pH值下、TiO₂對膠原蛋白降解速率的影響
- 三、檢測膠原蛋白的分子量
- 四、測試降解後膠原蛋白的活性

參、實驗設備及藥品

一、降解膠原蛋白：

紫外線照射儀(圖 4-2)、PH meter、超音波震盪機、離心機、量筒、燒杯、試管、蒸發皿、溫度計、膠原蛋白(感謝普立德公司贊助，見圖 4-3)、奈米級二氧化鈦、醋酸、氨水。

二、測分子量&測活性：

電泳槽、電源供應器(圖 4-4)、丙烯醯胺、N,N-甲叉雙丙烯醯胺、氨丁三醇三(羥甲基)氨基甲烷、甘氨酸、1N 的鹽酸、10% SDS、10% 過硫酸胺、甘油、2-氫硫乙醇、溴酚藍指示劑溶液、四甲基乙二胺、玻璃管、鐵架、半透膜、生理食鹽水。

肆、研究過程及方法

一、實驗原理

(一)光觸媒：

『從化學作用來看，光觸媒是一種半導體結晶材料，被光照射以後，材料中的電子會跳出來，並留下一個具有強大氧化能力的帶正電孔洞，這些電子與電洞在化學上稱為「電子洞對」。當電子與空氣中的氧分子（ O_2 ）相遇時，即生成反應性很強的超級氧分子（ $\cdot O_2$ ）；當電洞與空氣中的水氣（ H_2O ）相遇時，會透過光化學反應搶奪水中氫氧基的電子，此時，失去電子的氫氧基立刻變成不安定的氫氧自由基（ $\cdot OH$ ）。一旦不安定的氫氧自由基遇到外來的、附在物體表面上的有機物時，又會藉由搶奪對方電子的方式使自己趨於穩定。如此一來，有機物即被氧化，變成水和二氧化碳，消散在空氣中。倘若以光觸媒淨化水質，則從光化學反應中產生的氫氧自由基，也會與水中的不純物發生反應，變成水、二氧化碳或沉澱物。』（張志玲，2004）

(二)膠原蛋白：

『膠原蛋白的結構(圖 4-1)類似繩索，由無數根膠原纖維束所組合而成。膠原蛋白最基本的單位為原膠原，是由三條多胜肽（polypeptides）鏈所組成的，而此三條多胜肽鏈則以平行及鏈間的氫鍵緊密地結合在一起，形成穩定的三股螺旋結構。由多個原膠原聚集成膠原分子，而平行排列的膠原分子形成束形的膠原蛋白微纖維，膠原蛋白微纖維再糾集成較大的纖維束。由於每一條多胜肽鏈（稱為 α 鏈）的組成相似，但不一定完全相同，所組成的膠原蛋白形式也不相同，有由三條完全相同的 α 鏈所組成的（如第二型），也有由完全不同的 α 鏈所組成的（如第四型）。到目前為止，已發現的動物膠原蛋白可分成 21 種型式，依著組織的不同而有不同的膠原蛋白，其中以第一型膠原蛋白的含量最多，約占全部膠原蛋白含量的 90%，也是用途最廣的膠原蛋白。膠原蛋白的分子量約為 283,000 道爾頓（daltons），長約 280 奈米，直徑 1.5 奈米，具有特別的機械性質，例如具有方向性的膠原蛋白纖維抗拉強度可高達 5 ~ 10 公斤/毫米平方（ kg/mm^2 ），因此提供結締組織所需的張力、拉力強度等。在生化性質方面，它可促使血小板凝集而催化血塊的形成，另外膠原蛋白的功用包括可控制分子通透、促進傷口癒合與組織修復、調控細胞與組織的生理功能等。』（黃彥富、湯正明、徐善慧，2003）

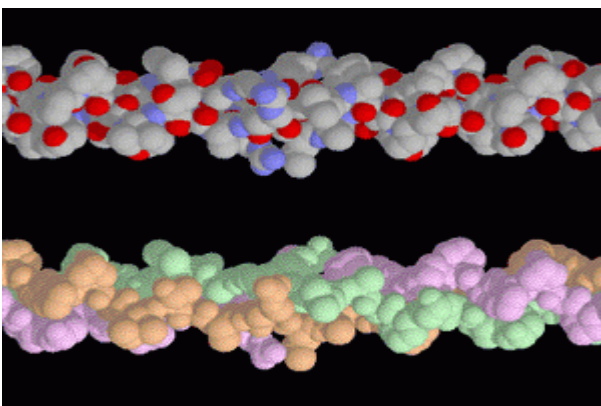


圖 4-1 膠原蛋白結構示意

（取自黃彥富、湯正明、徐善慧，2003）

(三)自組裝：

『自組裝為系統之構成元素(components)，如分子在不受人類外力之介入下自行聚集、網織成規則結構的現象，例如分子的結晶即是一種自組裝現象。自組裝程序的發生通常會將系統從一個無序(disordered)的狀態轉化成一個有序(ordered)的狀態，其可以發生在不同的尺度，例如分子首先聚集成奈米尺度的單元(如界面活性劑分子自組裝成微胞)，這些超分子單元間的作用力進而促使其在空間上做規則的排列，而使系統具有一種有層次的結構。

自組裝普遍存在於自然界中，如生物體的細胞即是由各種生物分子自組裝而成，而運用各種分子之自組裝亦是建構奈米材料非常重要的方法，這種所謂的「田下至上」(bottom-up)乃法目前被廣泛應用來製備具光、電、磁、感測與催化功能的奈米材料。自組裝的發生與系統能量商值有關，系統能量愈低或商值愈高，該狀態的自由能就愈低。另外，自組裝經常形成兩相或多相的結構，在兩相間的界面會有一個表面自由能(或表面張力)的存在，這也是誘導自組裝發生必須克服因素。』(奈米科技研發中心)

二、實驗步驟：

(一)使用不同紫外線波長照射下，TiO₂對膠原蛋白降解速率的影響：

取 16ml 的膠原蛋白，並加入奈米級二氧化鈦 0.016g。攪拌均勻後平均倒入 8 個蒸發皿內，其中 4 個用紫外線 254nm 分別照射 1、2、3 和 4 小時；另外 4 個用紫外線 365nm 也分別照射 1、2、3 和 4 小時，利用二氧化鈦催化空氣中的水分子而產生自由基，攻擊膠原蛋白中碳和氫鍵結的部份使其降解。取出溶液後裝入玻璃試管內。計算並比較在不同時間照射所獲得的分子量。

(二)不同PH值下、TiO₂對膠原蛋白降解速率的影響：

取 40ml 的膠原蛋白，並加入 0.04g 的奈米級二氧化鈦。攪拌均勻後平均倒入 20 個燒杯內，取每 4 個為一組，將各組的 PH 值分別以醋酸或氨水調到 4.5、5.5、6.5、7.5、8.5，再將其分別倒入 20 個蒸發皿中。每組用紫外線 254nm 分別照射 1、2、3 和 4 小時，利用二氧化鈦催化空氣中的水分子而產生自由基，攻擊膠原蛋白中鍵結的部份使其降解。取出溶液後裝入玻璃試管內。計算並比較在不同時間照射所獲得的分子量。



圖 4-2 紫外線照射儀



圖 4-3 大分子膠原蛋白(由普立德公司贊助)

(三)測分子量的方法：

1.梯度電泳法：

(1)下膠的製備：

a.以下為準備下膠所需的藥品及量：

蒸餾水 8.7ml 、30% 丙烯醯胺 2.5ml 、4X 下膠溶液 3.75ml、10% 過硫酸胺 0.15ml

b.插入梳子進入兩片夾著的玻璃片，然後在玻片上標示出在梳子牙下 1 cm 的位置

c.加入 15ul 的 TEMED 至下膠溶液中避免產生氣泡並均勻攪拌

d.把此溶液加入玻片間，並避免產生氣泡，加入時間盡可能越快越好，以免使膠變的太濃稠

e.在玻片中的膠上加入 1 ml 蒸餾水。此時蒸餾水不可與膠混合

(2)上膠的製備

a.所需藥品及量：

蒸餾水 4.2ml , 30%丙烯醯胺溶液 0.65ml, 4X 上膠溶液 1.6ml, 10%過硫酸胺 6.7ul

b.避免產生氣泡地攪拌上膠

c.把剛才下膠覆蓋上的蒸餾水倒掉，用蒸餾水潤洗膠

d.在上膠溶液中加入 6.7ul TEMED。用微量吸管把上膠加入玻片頂端

e.小心將梳子插入玻片中，確定沒產生氣泡

(3)去活性

a.準備要載入的蛋白質樣本，並使其與 4X 樣本緩衝液混合

b.水浴加熱蛋白質 2 分鐘以便去活性

c.把樣本放入離心機離心 20 秒

(4)載入樣本

a.把剛才的注膠器具放入電泳槽，正負極要與電泳槽相同

- b.在電泳槽中加入 1X 緩衝液
- c.把樣本放入膠中孔隙間，注意不能產生氣泡
- d.將其他沒有用到的孔全加入 1X 樣本緩衝液

(5)跑電泳

- a.把蓋子蓋上，連接電源供應器
- b.當染色樣本跑到膠片最下端時將電源關掉
- c.把跑膠器具拿出來，先把內部 buffer 排空至電泳槽，將兩片玻片分離，此時，膠可能黏在其中一片上，只要將其浸在 buffer 中即可分離了
- d.這樣膠即可開始分析

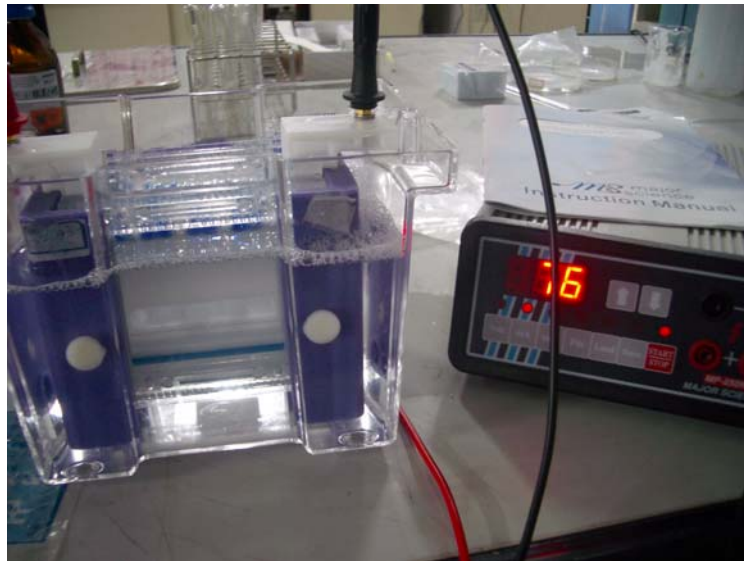


圖 4-4 電泳槽及電源供應器

此法原本是首選，利用台鹽公司提供的顆粒狀膠原蛋白（感謝台鹽公司贊助）投入許多時間、人力，做了多次試驗，但跑出來的結果品質較差，因此最後只好放棄這個方法。

2.凝固點下降法:

利用溶液凝固點下降公式: $\Delta T_f = K_f \cdot m$ 求其分子量。因膠原蛋白在 32°C 以上就會變質，不適合沸點上升法。但因膠原蛋白溶液太稀薄(1mg/ml)，且其原分子量過大，使得凝固點變化量太小不易測量，因此本實驗沒有採用這個方法。

3.滲透壓:

利用凡特荷夫定律: $\pi = CRT = (n/V)RT$

其中 π 為滲透壓， n 為溶質的莫耳數， V 是體積(單位為升)， R 為常數=0.082， T 為絕對溫度。

將玻璃管底部用 2cm 的橡皮管套上一層半透膜，放入中有已照過紫外光的膠原蛋白溶液中，玻璃管內再放入同濃度溶解膠原蛋白的溶液，使內外高度相同。並每天觀察氣壓、溫度及液面高差，再將其代入公式求得分子量。(圖 4-5)

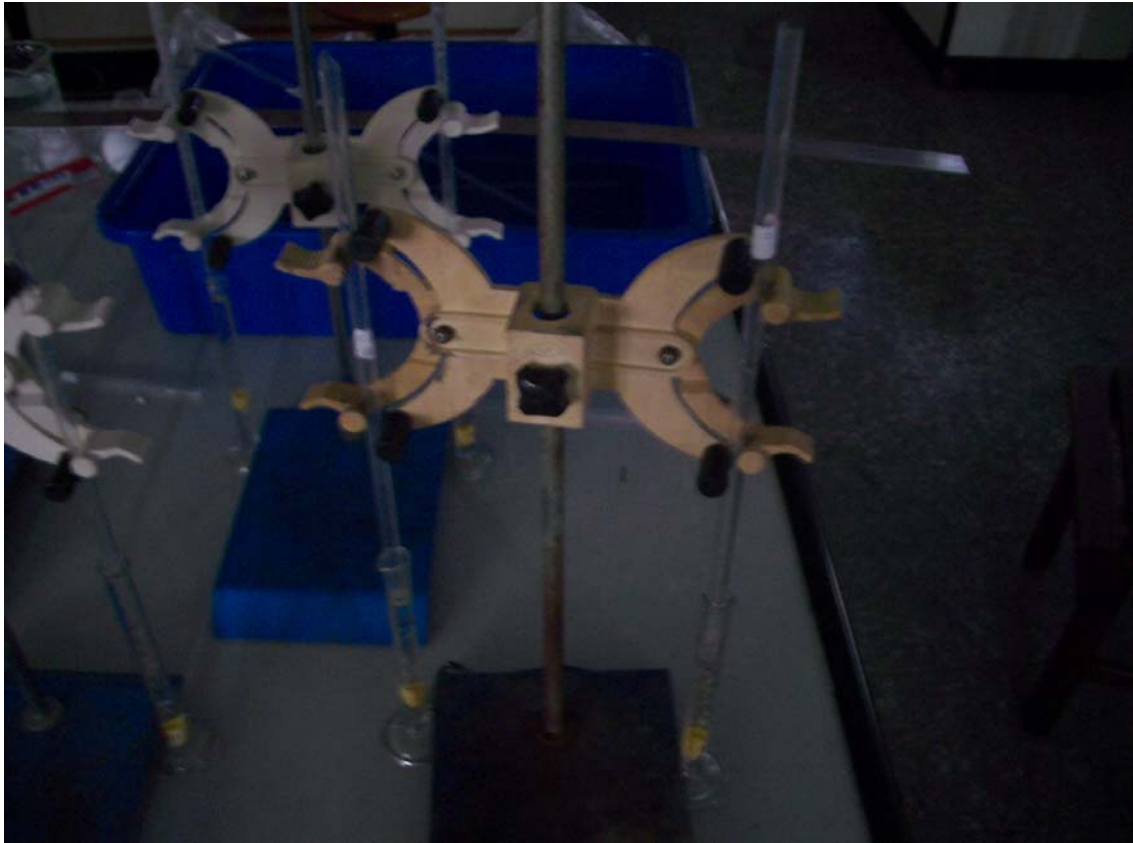


圖 4-5 自製測分子量實驗

(四)測膠原蛋白的活性

原理：膠原蛋白在中性和溫度控制下發生自組裝反應，使膠原蛋白纖維顯現出來。

步驟：在膠原蛋白水溶液中加入生理食鹽水，使其成為溶在等張的 0.9%食鹽水中，成為膠原蛋白" isotonic solution"。將此膠原蛋白" isotonic solution"放在 30-32 度的烘箱 2 小時以上，若有成膠(流動性減少,甚至像果凍)便可證明其有活性存在。

伍、研究結果及討論

一、使用不同紫外線波長照射下，TiO₂對膠原蛋白降解速率的影響：

(一)使用紫外線波長 254nm 照射結果如表 5-1 所示，其曲線圖則如圖 5-1 所示：在照光時數第 1 小時，膠原蛋白的分子量從 300000 急降至 25147。從第 2 個小時以後，其分子量分別降至 31434、27941、19344。

表 5-1 紫外線波長 254nm 照射結果

照光時數	氣壓 (百帕)	溫度 (K)	液面差 (mm)	膠原蛋白 質量(g)	溶液體積 (ml)	分子量
1	1016.5	296.7	1.00	0.001	10	25147
2	1016.5	296.7	0.80	0.001	10	31434
3	1016.5	296.7	0.90	0.001	10	27941
4	1016.5	296.7	1.30	0.001	10	19344

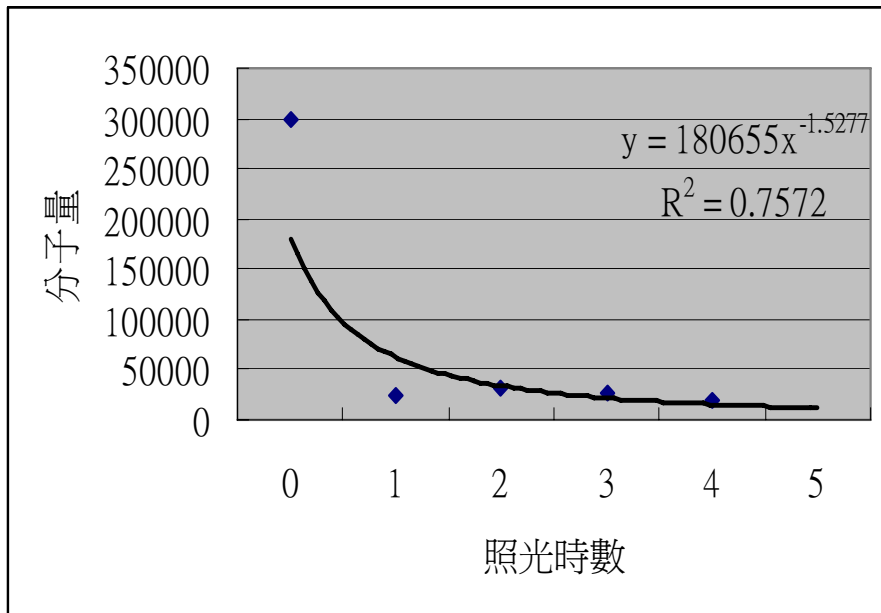


圖 5-1 紫外線波長 254nm 照射結果

(二)使用紫外線波長 365nm 照射結果如表 5-2 所示，其曲線圖則如圖 5-2 所示：

在照光的第 1、2 小時，分子量分別為 251469、125734。而第 3、4 小時的時候分子量為 16765、6985。由圖可見降解時分子量呈現緩和遞減的狀態。

表 5-2 使用紫外線波長 365nm 照射結果

照光時數	氣壓 (百帕)	溫度 (K)	液面差 (mm)	膠原蛋白 質量(g)	溶液體積 (ml)	分子量
1	1016.5	296.7	0.10	0.001	10	251469
2	1016.5	296.7	0.20	0.001	10	125734
3	1016.5	296.7	1.50	0.001	10	16765
4	1016.5	296.7	3.60	0.001	10	6985

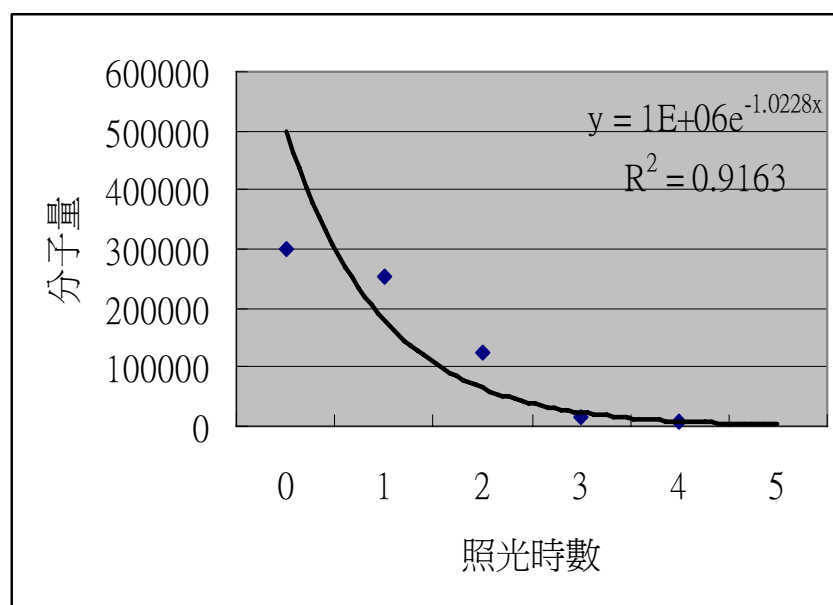


圖 5-2 使用紫外線波長 365nm 照射結果

二、不同pH值下、TiO₂對膠原蛋白降解速率的影響：

(一)在 pH 值=4.5 照射結果如表 5-3 所示，其曲線圖則如圖 5-3 所示：

可見其在降解第 1 小時內分子量由 300000 迅速減少至 7858。而後 3 小時的分子量則呈現緩慢的遞減。

表 5-3 pH 值=4.5 照射結果

照光時數	氣壓 (百帕)	溫度 (K)	液面差 (mm)	膠原蛋白 質量(g)	溶液體積 (ml)	分子量
1	1016.5	296.7	3.20	0.001	10	7858
2	1016.5	296.7	4.00	0.001	10	6287
3	1016.5	296.7	3.80	0.001	10	6618
4	1016.5	296.7	7.10	0.001	10	3542

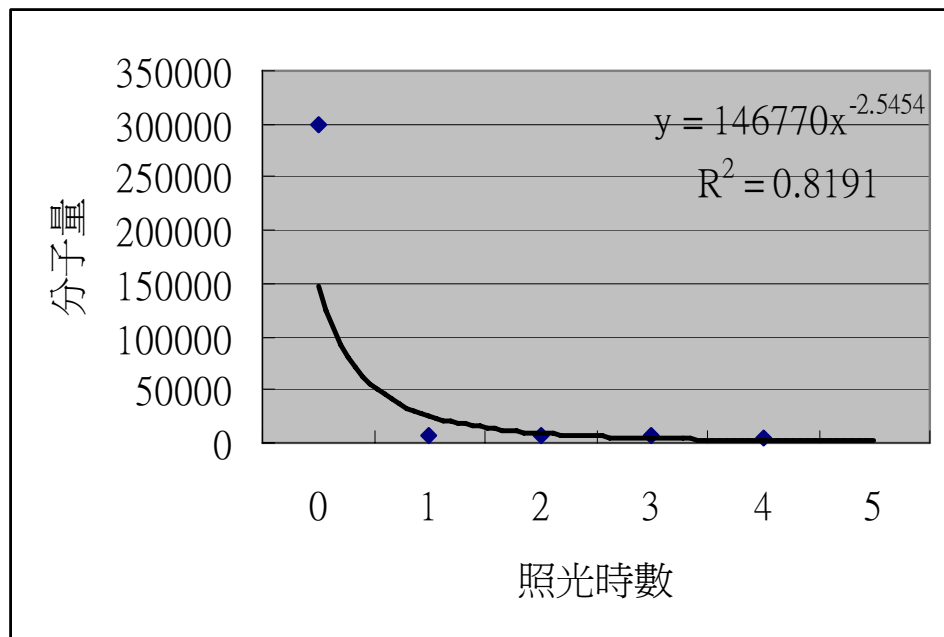


圖 5-3 pH 值=4.5 照射結果

(二)在 pH 值=5.5 照射結果如表 5-4 所示，其曲線圖則如圖 5-4 所示:由圖中可知
 膠原蛋白在降解第 1 小時內分子量由 300000 迅速減少至 50294。而後 3 小時的分子
 量則呈現緩慢的遞減。

表 5-4 pH 值=5.5 照射結果

照光時數	氣壓 (百帕)	溫度 (K)	液面差 (mm)	膠原蛋白 質量(g)	溶液體積 (ml)	分子量
1	1016.5	296.7	0.50	0.001	10	50294
2	1016.5	296.7	1.10	0.001	10	22861
3	1016.5	296.7	1.50	0.001	10	16765
4	1016.5	296.7	5.00	0.001	10	5029

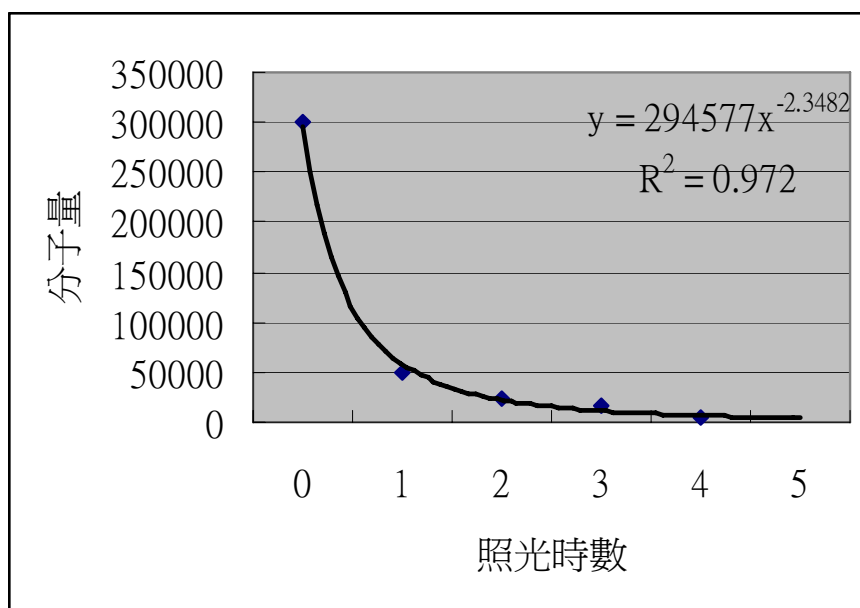


圖 5-4 pH 值=5.5 照射結果

(三)pH 值=6.5 照射結果如表 5-5 所示，其曲線圖則如圖 5-5 所示：

在照光時數第 1 小時，膠原蛋白的分子量從 300000 急降至 25147。從第 2 個小時以後，其分子量分別降至 31434、27941、19344。

圖 5-5 pH 值=6.5 照射結果

照光時數	氣壓 (百帕)	溫度 (K)	液面差 (mm)	膠原蛋白 質量(g)	溶液體積 (ml)	分子量
1	1016.5	296.7	1.00	0.001	10	25147
2	1016.5	296.7	0.80	0.001	10	31434
3	1016.5	296.7	0.90	0.001	10	27941
4	1016.5	296.7	1.30	0.001	10	19344

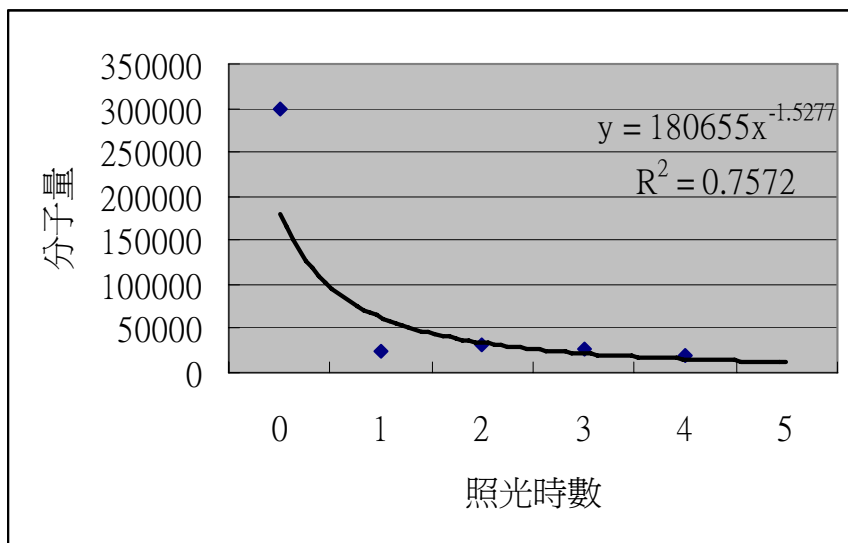


圖 5-5 pH 值=6.5 照射結果

(四) pH 值=7.5 照射結果如表 5-6 所示，其曲線圖則如圖 5-6 所示：

在照光的第 1、2 小時，分子量分別為 251469、125734。而第 3、4 小時的時候分子量為 16765、11975。由圖可見降解時分子量呈現緩和遞減的狀態。

表 5-6 pH 值=7.5 照射結果

照光時數	氣壓 (百帕)	溫度 (K)	液面差 (mm)	膠原蛋白 質量(g)	溶液體積 (ml)	分子量
1	1016.5	296.7	0.10	0.001	10	251469
2	1016.5	296.7	0.20	0.001	10	125734
3	1016.5	296.7	1.50	0.001	10	16765
4	1016.5	296.7	2.10	0.001	10	11975

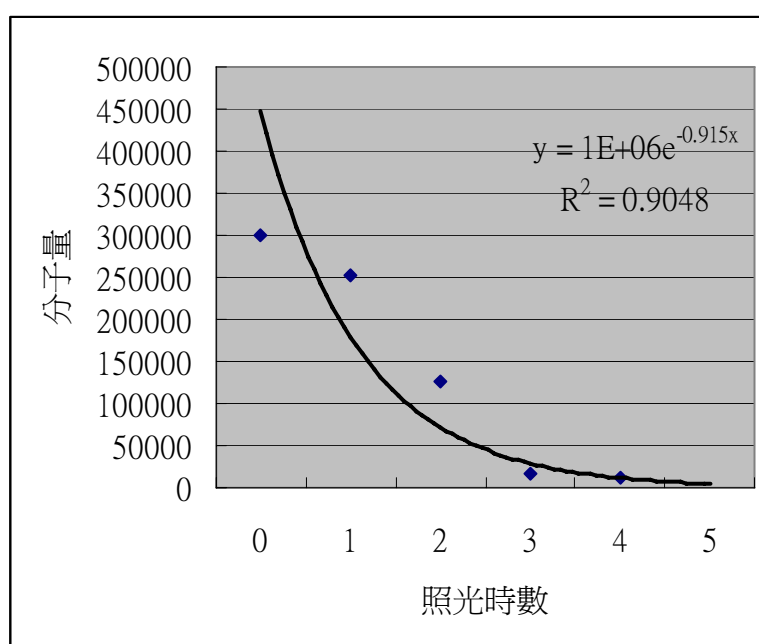


圖 5-6 pH 值=7.5 照射結果

(五)pH 值=8.5 照射結果如表 5-7 所示，其曲線圖則如圖 5-7 所示：

可見其在降解第 1 小時內分子量由 300000 迅速減少至 83823。而後 3 小時的分子量則呈現緩慢的均勻遞減。

照光時數	氣壓 (百帕)	溫度 (K)	液面差 (mm)	膠原蛋白 質量(g)	溶液體積 (ml)	分子量
1	1016.5	296.7	0.30	0.001	10	83823
2	1016.5	296.7	0.40	0.001	10	62867
3	1016.5	296.7	0.60	0.001	10	41911
4	1016.5	296.7	1.10	0.001	10	22861

表 5-7 pH 值=8.5 照射結果

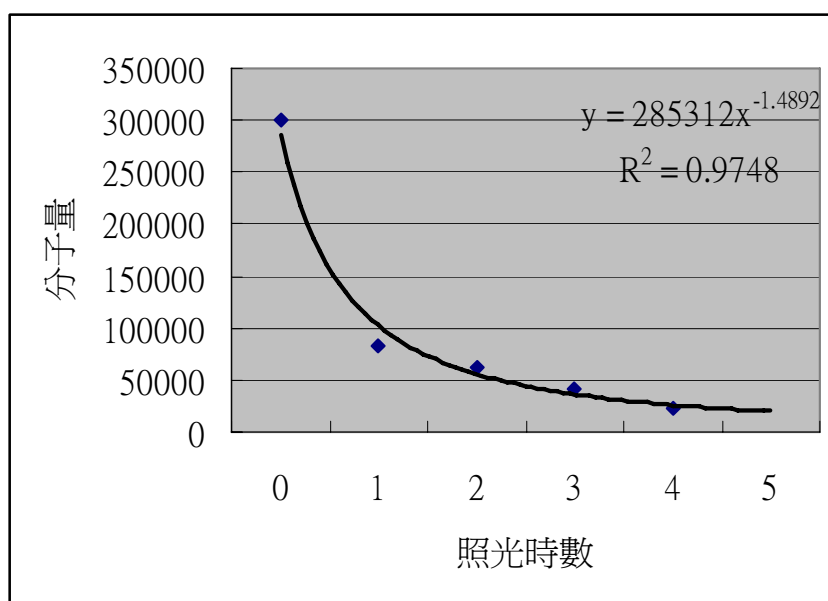


圖 5-7 pH 值=8.5 照射結果

三、進階研究

由使用紫外線波長 254nm照射結果(其pH值=6.5，為原膠原蛋白之酸鹼值)與在pH值=4.5 照射情況得知，其反應在第 1 小時內幾乎已完全完成，所畫出來的趨勢線的R²值(即關聯強度)不到 0.9，這引起我們研究的興趣。因次我們把反應時間縮短，得到的結果如下：(見討論第五點)

(一) 使用紫外線波長 254nm(pH 值=6.5)照射結果如圖 5-8 所示：

照光分數 (min)	測得之分子 量
0	300000
15	104779
30	66175
45	38678
60	25147

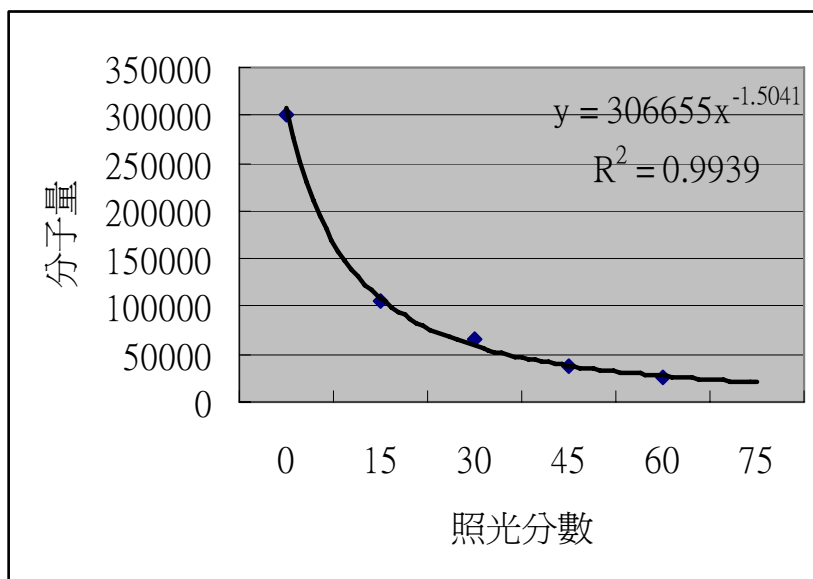


圖 5-8 紫外線波長 254nm(pH 值=6.5)照射結果

(二) 在紫外線波長 254nm (pH 值=4.5)照射結果如圖 5-9 所示：

照光分數 (min)	測得之分子 量
0	300000
15	89810
30	42621
45	23284
60	7858

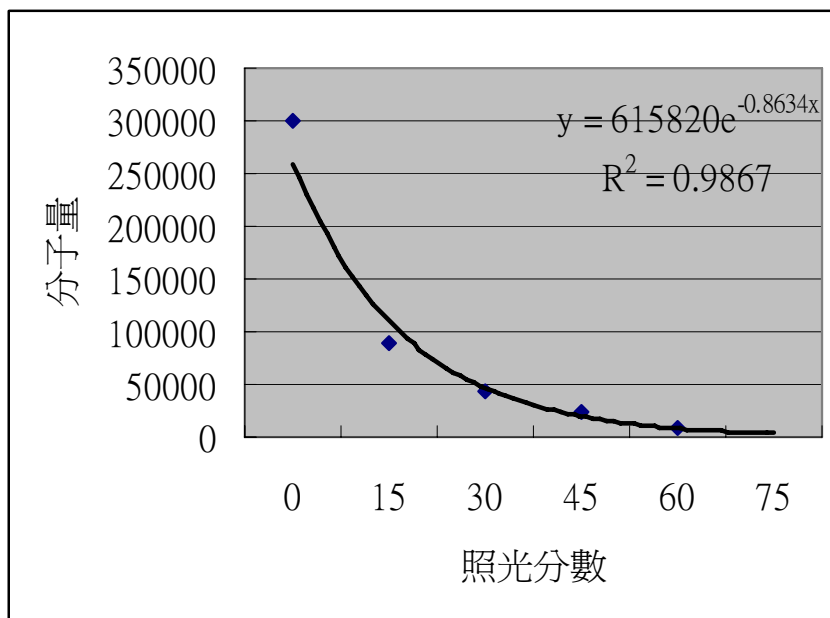


圖 5-9 紫外線波長 254nm(pH 值=4.5)照射結果

四、活性測量

(一)不同紫外線波長照射下，膠原蛋白的活性：

	0hr	1hr	2hr	3hr	4hr
254nm	○	○	○	△	△
365nm	○	○	○	○	△

(二)不同 pH 值下，膠原蛋白的活性：

	0hr	1hr	2hr	3hr	4hr
pH 值=4.5	○	△	×	×	×
pH 值=5.5	○	△	△	△	×
pH 值=6.5	○	○	○	△	△
pH 值=7.5	○	○	○	△	△
pH 值=8.5	○	○	○	△	△

(○：與原本樣品成膠情況類似； △：流動性減少，無成膠； ×：成膠反應不理想)



圖 5-10 膠原蛋白 "isotonic solution"

陸、討論

一、從不同波長的紫外線照射膠原蛋白的實驗顯示出，使用 254nm 照射第 1 小時內分子量遞減的數值遠超過 365nm 照射。但從第 3 個小時以後以波長 365nm 照射出來的分子量與使用波長 254nm 照射出來的分子量差別不大。

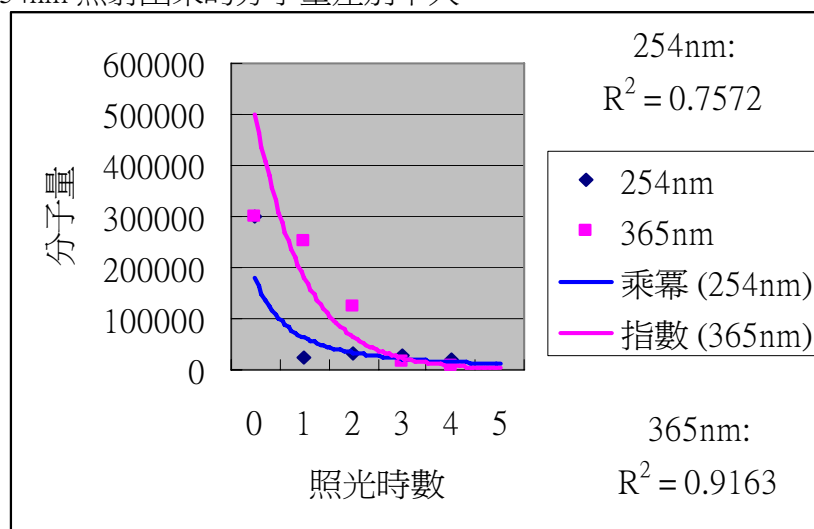


圖 6-1 不同紫外線波長照射結果

二、由在不同 pH 值下測得的膠原蛋白分子量得知，pH 值越小，膠原蛋白的降解速率越好。所以可知如果把膠原蛋白放在弱酸性的環境下進行降解，可以獲得最小的分子量。

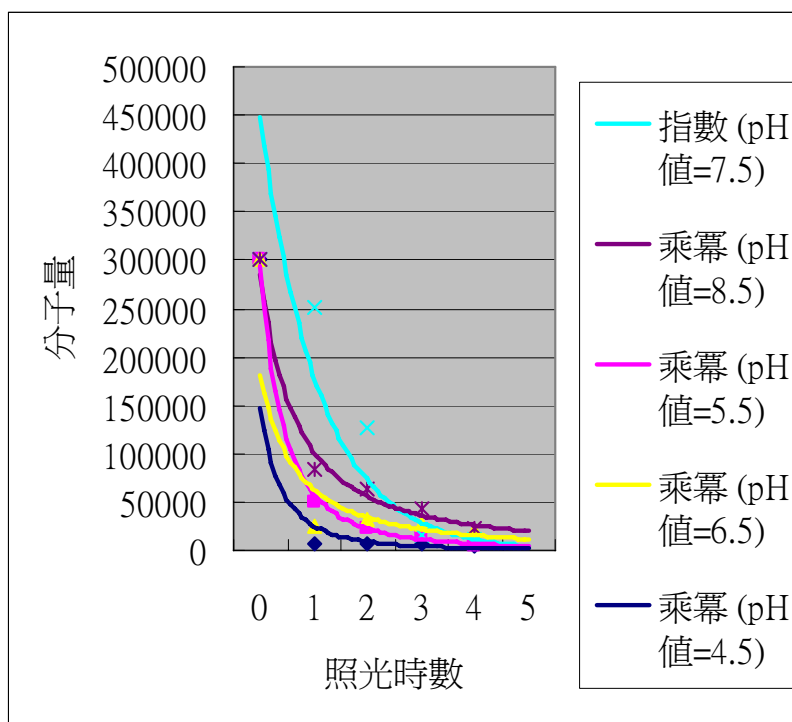


圖 6-2 不同 pH 值下照射結果

三、由以上的實驗可以得知，膠原蛋白降解時，以第 1 個小時的降解速率最為明顯，但接下來的 3 小時降解速率不明顯，可視其降解效果已達一個極限。原因可能有以下三點：

- (一)自由基的半生期短，且自由基表面被溶液所包覆，導致實驗後期幾乎無法作用
- (二)膠原蛋白分子已降解到不能切割
- (三)膠原蛋白降解至小分子後，會產生抗自由基效應，使其無法再進行降解

四、由以上的實驗得知，使用奈米級二氧化鈦與紫外光波長 254nm 照射膠原蛋白，可使其分子量從 300000 變成最小的 3542，有利於皮膚吸收。由此可知在控制不同紫外線波長、不同 pH 值及照射時間下，利用本實驗的方法，可由趨勢線上的公式 y 取得不同範圍的分子量。

五、由進階研究得知，在這兩種變因下，在 1 小時內所得的分子量畫出來的趨勢線，可得 R^2 值在 0.9 之內，如此一來，較可精確的可得到所需的分子量，且速度較快。

六、由以上的實驗可以得知，照射後 1 至 2 小時內，大致上活性還可以接受，但過了 3 至 4 小時後，活性普遍不佳。而在酸性環境降解的膠原蛋白，雖然是降解效果最好、可以把分子量降到最低，但是從活性實驗卻顯示出膠原蛋白的活性幾乎不存在；但是酸性環境會影響成膠反應，這部份可以再做深入的探討。

七、與現行的酵素生產法比較：

目前製備膠原蛋白的方式多為酵素生產法，但其萃取產物純度不高，容易引起發炎反應，且其在萃取過程中相對成本較高。反觀使用二氧化鈦在常溫下分解空氣中的水分子產生自由基，攻擊膠原蛋白中鍵結的部份。我們只需控制其不同紫外線波長或所處環境下不同的酸鹼值，在 4 個小時內就可以將其分子量降解至 3500 左右。利用此法可以在短時間內將膠原蛋白的分子量降解，而且也節省了萃取時所需的成本。

柒、結論

一、本實驗利用奈米級二氧化鈦照射紫外光對膠原蛋白進行降解，可以使膠原蛋白從原本的分子量 300000 降解至 3000 至 4000，更有利於其透過皮膚，達到吸收的主要目的，希望可以將膠原蛋白的利用性達到最大。

二、未來展望：

本實驗藉由降解，確實使膠原蛋白的分子量成功的下降不少，使人體皮膚更易吸收。不過自由基在進行降解的時候，很有可能使膠原蛋白的活性消失。在將來的相關實驗中，希望可以針對膠原蛋白降解後所剩餘的活性進行探討，使膠原蛋白的利用價值更高，除了使皮膚更輕易吸收外，還能發揮膠原蛋白其原本的功效。

捌、參考資料及其他

黃彥富、湯正明、徐善慧（2003）。揭開膠原蛋白的神秘面紗。科學發展，362，44~47。

謝曉雲（無日期）。膠原蛋白還給你 20 歲？。民 96 年 3 月 9 日，取自：

<http://www.books.com.tw/magazine/item/chealth1120.htm>

張志玲(2004)。原來光觸媒是這麼回事。科學發展，373，38~43。

奈米科技研發中心。自組裝(Self-assemble)。民 97 年 3 月 4 日，取自：

<http://www.ntrc.iti.org.tw/dict/content.jsp?newsid=191>

【評語】 040209

作品能應用化學方法解決跨領域問題且獲相當成果實屬不易；惟觀測方法及空白實驗部分宜再改進。