

中華民國第 59 屆中小學科學展覽會 作品說明書

國中組 生物科

佳作

030321

節能簡易高效率膠原蛋白萃取法--海水魚淡水魚
魚鱗結構比較、膠原蛋白萃取率及螢光效能分析

學校名稱：臺北市私立復興實驗高級中學(附設國中)

作者： 國三 廖韋俐 國三 簡筱潔	指導老師： 馬瑪宣
---------------------------------	------------------

關鍵詞：魚鱗、膠原蛋白、螢光光譜

摘要

魚鱗為氫氧基磷灰石及膠原蛋白所組成。本實驗比較各兩種海水及淡水魚魚鱗結構，用簡易水煮法萃取膠原蛋白。實驗發現淡水魚-虱目魚膠原蛋白萃取效率最好，1~40 分鐘約能溶出 0.2g 膠原蛋白 / g 魚鱗，次為鱸魚、烏魚，龍膽石斑的溶出率最差，與魚鱗結構相關。SDS、X 光繞射分析顯示膠原蛋白純度高，且加醋煮能提高溶出率 2~6 倍。螢光光譜結果顯示膠原蛋白在 325 nm 雷射光激發下即能偵測訊號強度大的藍光(410 nm) 及綠光(490 nm)，為偵測物質膠原蛋白含量的好方法。本實驗 1 分鐘加醋水煮虱目魚魚鱗的膠原蛋白成本 1.5 元 / 1000 mg 為市售的 2~3%，為簡易高效能的膠原蛋白萃取方式。

壹、研究動機

在醫美產業蓬勃發展的世代，各式膠原蛋白產品如雨後春筍般，商機可觀，在資料查詢的過程中，我們發現在魚市場被丟棄的魚鱗中，含有大量的膠原蛋白，在生物課中有提及膠原蛋白是我們皮膚重要的成分；文獻中也指出利用加酵素、加酸性物質等方法可以將魚鱗中的膠原蛋白溶出。但是要用什麼魚的魚鱗及方法萃取呢？我們想找到簡易、高效率、低價格的膠原蛋白萃取方法及魚鱗來源，並透過各式實驗，證明我們萃取的膠原蛋白純度。

貳、研究目的

- 一、用解剖顯微鏡、複式顯微鏡觀察兩種海水魚及兩種淡水魚魚鱗。
- 二、探討如何以最高效率的簡易的萃取法溶出魚鱗中的膠原蛋白
 - (一) 以 100°C 沸水萃取。
 - (二) 以 10% 的蘋果醋水溶液萃取。
 - (三) 在萃取液加入 0.5M 之酸性溶液(醋酸、蘋果醋、醋酸鈉)。
- 三、比較不同濃度萃取液之熔點。

四、比較不同膠原蛋白萃取液吸收光譜的差異。

五、比較不同膠原蛋白萃取液蛋白質分子量的差異。

六、比較不同膠原蛋白萃取液 X 光繞射的差異。

七、比較不同膠原蛋白萃取液蛋白質螢光光譜的差異。

參、研究設備及器材

實驗生物材料及藥品	虱目魚魚鱗、鱸魚魚鱗、烏魚魚鱗、龍膽石斑魚鱗(購自市場)、檸檬(購自市場)、精鹽、蘋果醋、鹽酸、醋酸、醋酸鈉、Acetone、tris、glycine、methanol、coomassie blue、SDS、2-mercaptoethanol、glycerol、acrylamide、bis-acrylamide、ammonium persulfate
實驗器皿及耗材	培養皿、攪拌子、電子溫度計、燒杯(500ml)、燒杯(250ml)、量筒(500ml)、量筒(10ml)載玻片、蓋玻片、玻棒、標籤貼、酒精(70%)、石英管、玻璃試管、試管架、茶包、透明塑膠盒、食鹽、篩子、隔熱手套
實驗儀器	筆記型電腦、解剖顯微鏡(MICROTECH S-730L-SY)、四位數電子天秤、烘箱、電動滴管、水浴槽無菌操作台、超純水製造機 Easypure LF、逆滲透純水機 RO-50GPD、無菌操作台、紫外光/可見光分光光譜儀 JASCO V-630、加熱版、電晶爐、水浴槽、電泳玻片、間隔條(Spacer, 0.75 mm)、樣本梳(Comb, 12well)、垂直電泳槽(Cleaver OmniPAGE Mini)、電源供應器(Minis 150V Power Supply)、微量滴管(Research Plus)、螺旋測微器、乾式恆溫槽、BCA 吸收光光譜儀、螺旋測微器、螢光光譜儀
軟體	spectra measurement、Kopa vision、OriginPro

肆、研究過程及方法



圖 1、研究過程概念圖

一、魚鱗的觀察

(一) 解剖、複式顯微鏡觀察

目的：觀察比較四種不同魚鱗的外觀及構造

- 步驟：1. 以解剖及複式顯微鏡觀察並拍攝魚鱗的構造。
2. 在同一倍率下拍刻劃玻片上的刻度，作為顯微相片的比例尺。
3. 比對文獻，標記並畫下魚鱗於顯微鏡下的構造圖。
4. 在解剖顯微鏡下將魚鱗橫切，並用複式顯微鏡觀察及拍照。

(二) 魚鱗厚度及面積測量

- 步驟：1.以螺旋測微器測四種魚鱗，每一片魚鱗測前、中、後六個樣區點，實驗三重複。
2. 以方格紙測量四種魚鱗面積，實驗三重複。

二、魚鱗膠原蛋白萃取液的製備

(一) 魚鱗前置處理-泡鹽水

目的：為去除魚鱗表面除了膠原蛋白以外，其他不相關的蛋白質及魚腥味。

步驟：以 1000 ml 的燒杯，950 ml 的 10% 食鹽水置入 50g 的乾燥虱目魚鱗，在室溫下，以攪拌子攪拌 24 小時，再以去離子水沖洗魚鱗 3 次，重複此動作 2 次。

(二) 魚鱗前置處理-泡檸檬水

目的：去除魚鱗多餘的礦物質及腥味。

步驟：以 1000 ml 的燒杯，裝 950 ml 的 10% 檸檬水，及 50g 的魚鱗泡 0.5 小時後取出，把檸檬水濾掉，檸檬水的 pH 值約為 3，把魚鱗拿去烘箱以 40 °C 烘 24 小時後取出完成魚鱗前置動作。



圖 2. 以 10% NaCl，攪拌子攪拌魚鱗 24 小時



圖 3. 以檸檬水清洗完的魚鱗置入烘箱將水分烘乾



圖 4. 以磚塊及鋁箔紙包圍煮魚鱗裝置，用滴定管每分鐘注入約 0.5 ml 熱水

(三) 煮魚鱗-簡易魚鱗膠原蛋白萃取

目的：在不同時間及變因下，將膠原蛋白溶至水中。

步驟：(a) 以 100°C 純水將膠原蛋白溶出

以 250 ml 的燒杯，200 ml 的去離子水，四周放置磚頭蓋上鋁箔紙，放置於加熱板上煮沸後，加上裝在茶包袋內的 10 克魚鱗片及攪拌子，分別煮不同時間(1、2、5、7、10、12、15、20、30、40、60、80、100、120 分鐘，共 14 組)，在加熱過程中以一分鐘 0.5 mL 的

速度滴入純水，補充蒸發掉的水量。完成後用無菌水再將溶液加至 200mL，攪拌過後將魚鱗膠原蛋白萃取液以電動吸管無菌分裝至已滅菌的玻璃試管中，避免汙染。

(b) 以 100°C 醋水溶液將膠原蛋白溶出

將上方(a)步驟(以 100°C 純水將膠原蛋白溶出)中 200ml 的去離子水改為 180mL 的去離子水加上 10 % 的蘋果醋 20mL，分別煮 1、5、12 分鐘。

(c) 以 100°C 水煮後加入醋酸、蘋果醋、醋酸鈉

依照上方(a)步驟(以 100°C 純水將膠原蛋白溶出)後，將溶液分裝成四份(等份量)，分別加入蘋果醋、醋酸、醋酸鈉，將醋酸、醋酸鈉配置成 50mL 0.5M 的溶液(醋酸水溶液 pH=2.6、醋酸鈉水溶液 pH=6.8)，蘋果醋配置成 10% 溶液(pH=2.9)。

(四) 製作膠原蛋白片及計算溶出率

目的：了解定量、不同濃度的膠原蛋白萃取液中的膠原蛋白含量。

步驟：在無菌操作台中，以電動滴管量取 30 ml、不同濃度的膠原蛋白萃取液，放置於已量取重量的耐高溫容器中，置於烘箱中，以 40°C 烘 24 小時，量取膠原片重量。



圖 5. 烘完之魚鱗膠原片正面



圖 6. 烘完之魚鱗膠原片側面

三、膠原蛋白萃取液物熔點測試

目的：了解不同樣本的膠原蛋白凍的熔點，為了實驗的準確度，我們設計了密閉、不需移動的器材，並以較少量的樣品以及較薄的毛細管進行實驗。

步驟：取一支兩端開口的毛細管，將其中填充一公分的萃取液，將萃取液移至中央，將毛細管放在 4°C 冰箱 30 分鐘，使其變成凝固凍狀，紀錄膠原蛋白凍的上下端。將毛細管與溫度計以橡皮圈綁緊，穿過橡皮塞後，固定於試管上，並以鐵夾固定於鐵架上。以大小燒杯以隔水加熱的方式，置於加熱板上，將試管置入小燒杯中，開始以低溫加熱。以溶液開始移動紀錄為開始融化，紀錄當時的溫度。

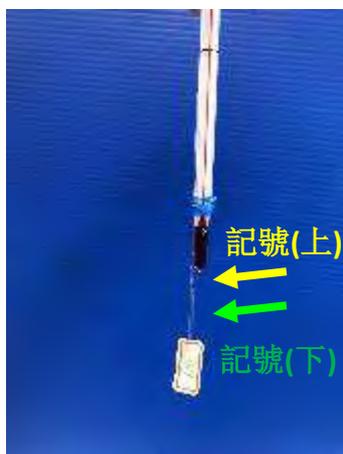


圖 7. 熔點實驗進行圖-1



圖 8. 熔點實驗進行圖-2

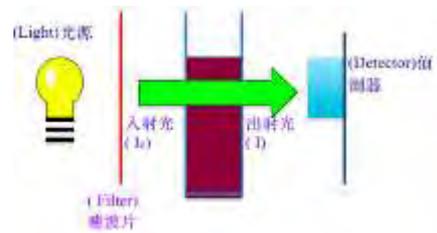


圖 9. 吸收光譜實驗以穿透式進行，圖為實驗架設示意圖

四、膠原蛋白萃取液的吸光度測試

目的：以吸收光譜了解膠原蛋白萃取液內蛋白及胜肽的量

步驟：

(一) UV-可見光全波段吸光度測試

拿兩個乾淨的石英管，以 70°C 濃度的酒精裝在洗滌瓶內緩慢滴入，並以拭鏡紙擦拭其表面後，將其一放在 baseline 槽以作樣本的對照組，另外一個裝入待測樣本後放入 sample 槽中，開啟 spectra Measurement 的程式並開始進行波長掃描。

(二) BCA 蛋白質濃度定量法

1. 將 100 μ l 每種 BSA 標準品和蛋白質樣品加入 4 ml 試管中。
2. 加入 2 ml BCA 工作試劑並充分混合。

3. 蓋上試管並放置於 37°C ，30 分鐘（分析範圍為 25-2000 $\mu\text{g/ml}$ ）。
4. 將分光光度計的吸光度波長設置為 562 nm 。僅使用水或稀釋劑清空儀器。
5. 讀取所有標準品和樣品的吸光度，計算 BSA 標準曲線，代入膠原蛋白粹取液吸光度值，推算其蛋白質濃度。

（三）螢光光譜測定

1. 先將膠原蛋白片剪成一平方公分的大小
2. 將其用膠帶固定於附有矽片的載玻片上
3. 以波長 325 奈米的紫外光激發樣本
4. 產生螢光後以 origin 軟體製圖

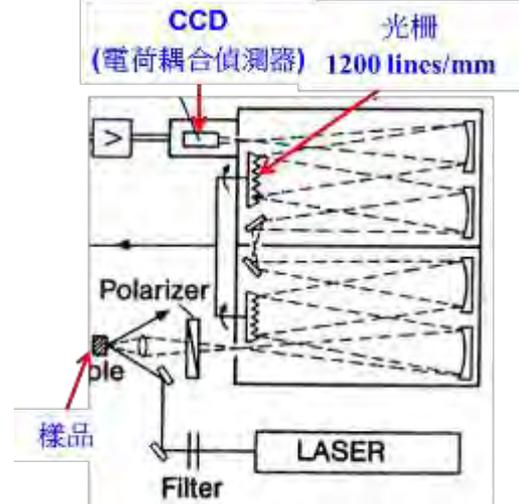


圖 10. 螢光光譜測定裝置示意圖

五、膠原蛋白萃取液十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠(SDS)電泳測試

目的：為了了解煮不同時間以及改變酸鹼值以及加入化學物質對於萃取液中蛋白質的影響，我們使用學校現有的 SDS 套組，在老師的指導下進行實驗。

步驟：

1. 組裝膠台，並在玻璃片上標記出 well 的位置，以及該位置預計 loading 樣本的名稱。
2. 依照 7.5% 的配方調配下層膠，倒入膠台後，在上方倒入異丙醇壓膠。
3. 在下層膠凝固以後，倒掉異丙醇後倒入上層膠，將 comb 插入膠台。
4. 在每一個 well 裡 loading 處理好的樣本，若太濃則用適量 sample buffer 稀釋。



圖 11. 開始跑膠，先以 50V 跑 40 min，之後以 125V 跑 5 min

六、膠原蛋白萃取液的 X 光繞射(XRD)測試

目的：為了瞭解魚鱗膠原蛋白萃取液的純度，我們請其他領域的老師協助，將萃取液與第一型膠原蛋白標準品進行結構的對比。

原理：魚鱗中原子與原子的距離在次奈米(sub nanometer)等級，波長為在 10-10m 範圍的 X 光，可以用來探測魚鱗中分子的結構。X 光繞射的原理乃是布拉格定律(Bragg's law): $2d\sin\theta = n\lambda$ ，式中的 d 為晶面間距， θ 為入射角度， n 為繞射級數， λ ：X 光波長，架設如圖。

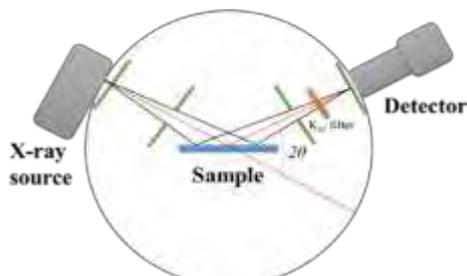


圖 12. X 光繞射儀及其基本架設圖



膠原蛋白片
1 x 1 cm

圖 13. Bruker D8-Advanced X 光繞射儀
及樣本擺放位置

- 步驟：1. 將做好的魚鱗膠原蛋白片樣品剪成 1 cm x 1 cm 的小方塊。
2. 將樣本疊成一小疊放置於載物台上。
3. 調整 X 光以不同的角度入射樣品。
4. 入射光束射入樣品後會產生繞射鋒，利用儀控電腦紀錄繞射譜圖數據。
5. 比較不同樣本的繞射峰位置、強度、及峰寬的差別。

伍、研究結果

一、魚鱗顯微照片比較

(一) 解剖顯微鏡下魚鱗外觀

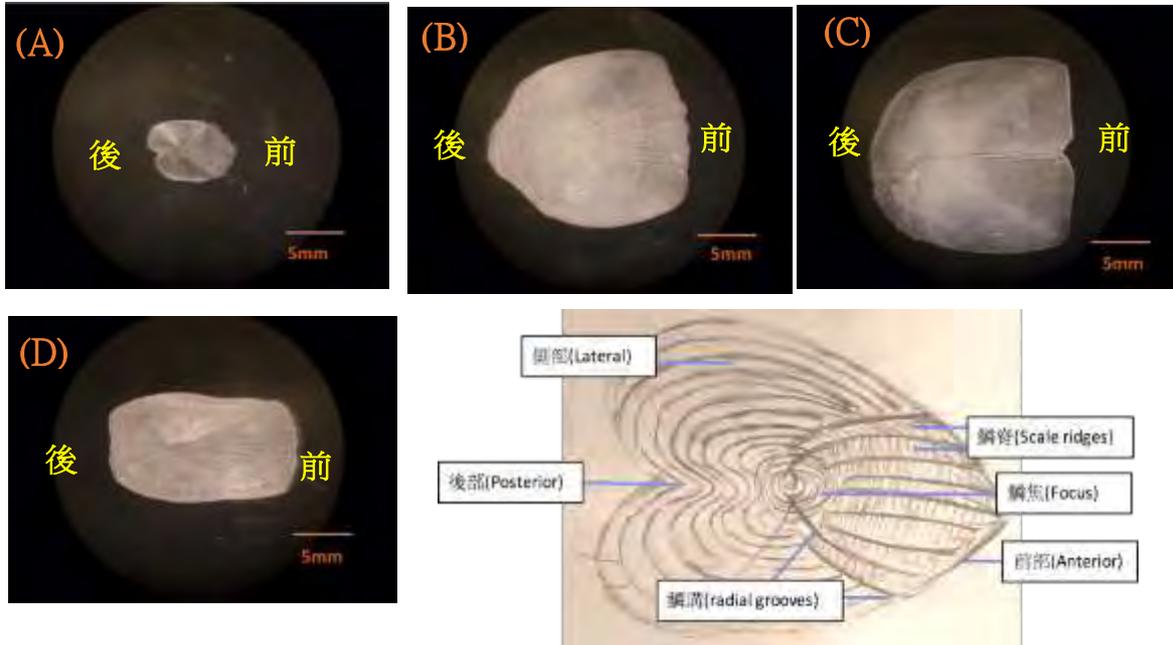


圖 14.虱目魚(A)、鱸魚(B)、烏魚(C)、龍膽石斑(D)魚鱗特寫照片，右邊面向魚的頭部，左邊面向魚的尾部

圖 15. 魚鱗片構造示意圖
以虱目魚為例按照參考資料 9 手繪

(二) 複式顯微鏡下魚鱗橫切

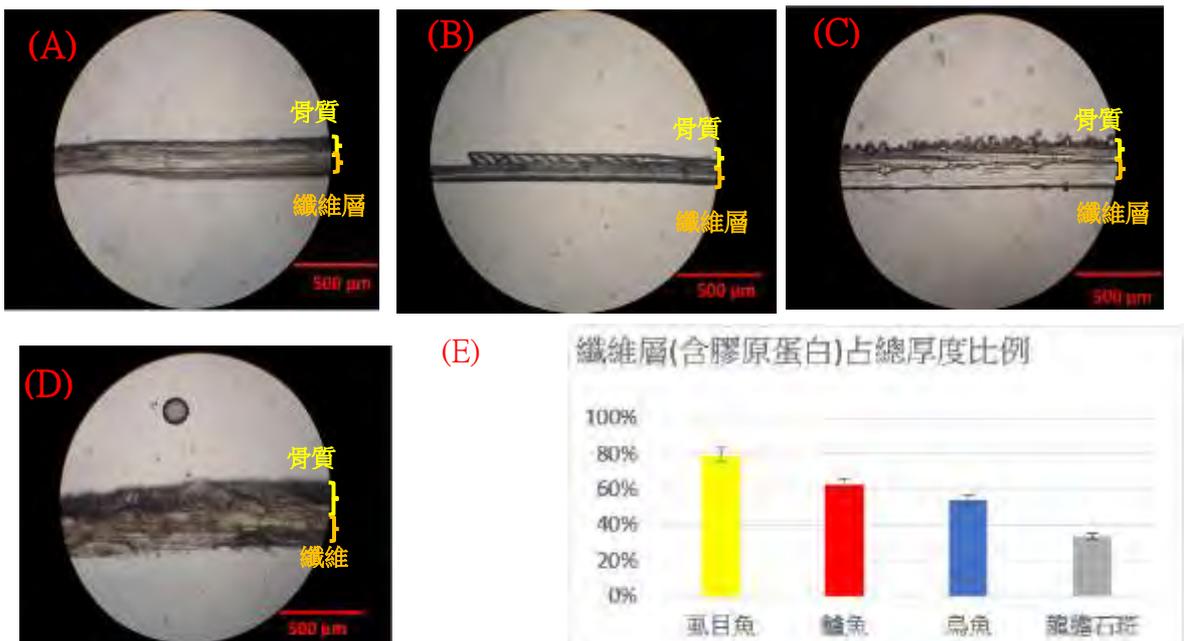


圖 16.虱目魚(A)、鱸魚(B)、烏魚(C)、龍膽石斑(D)魚鱗橫切顯微照片(E)纖維層厚度比

(三) 煮過的魚鱗顯微觀察

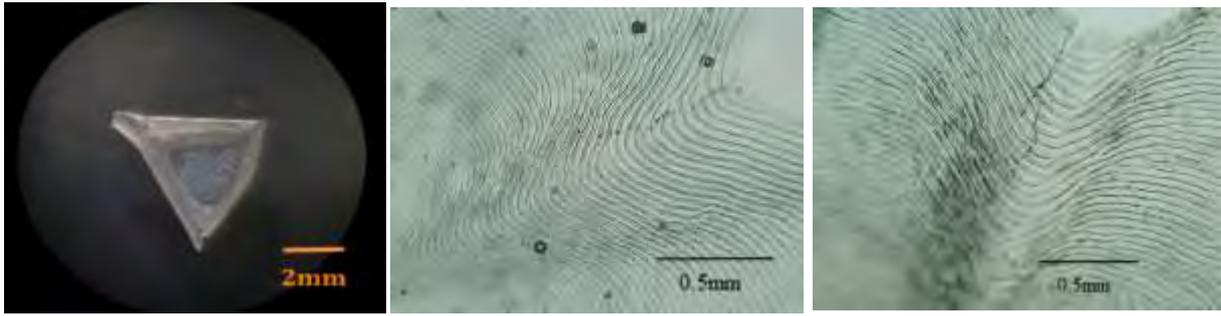


圖 17. 魚鱗煮 120min 解剖顯微照片

圖 18. 未煮過(左)、煮 40min 後(右)的魚鱗表

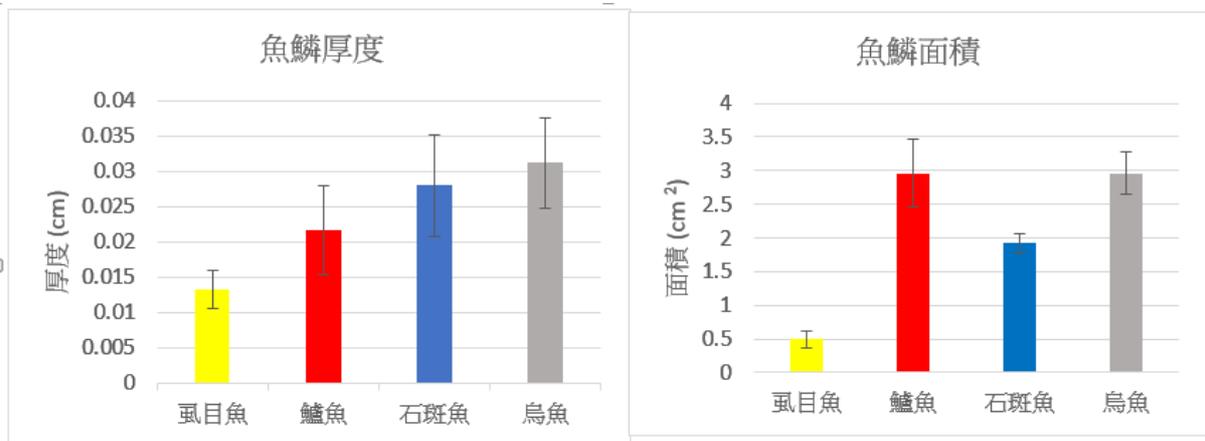


圖 19. 魚鱗厚度比較

圖 20. 魚鱗面積比較

說明：

1. 四種魚鱗的顯微構造皆符合依據論文所示的分區位置繪製成手繪圖，近頭部一側的魚鱗端較平整且薄，可以平鋪黏在魚皮上。
2. 靠近魚皮那一面的觸感較光滑，為纖維層含膠原蛋白，上層為骨質層。
3. 魚鱗的大小與魚的體型及年紀有關，本實驗使用的魚鱗大小為：烏魚 ~ 鱸魚 > 龍膽石斑 > 虱目魚。厚度為：烏魚 > 龍膽石斑 > 鱸魚 > 虱目魚。
4. 膠原蛋白層厚度為：虱目魚 > 鱸魚 > 龍膽石斑 > 烏魚。剛好與魚鱗厚度相反。
5. 魚鱗煮完之後，因為膠原蛋白溶出，沒有膠原蛋白纖維束的支撐，就會捲曲成三角形(圖 17)，且紋路變為平整(圖 18)。

二、魚鱗膠原蛋白萃取液的效率

(一) 不同魚種魚鱗的膠原蛋白萃取效率

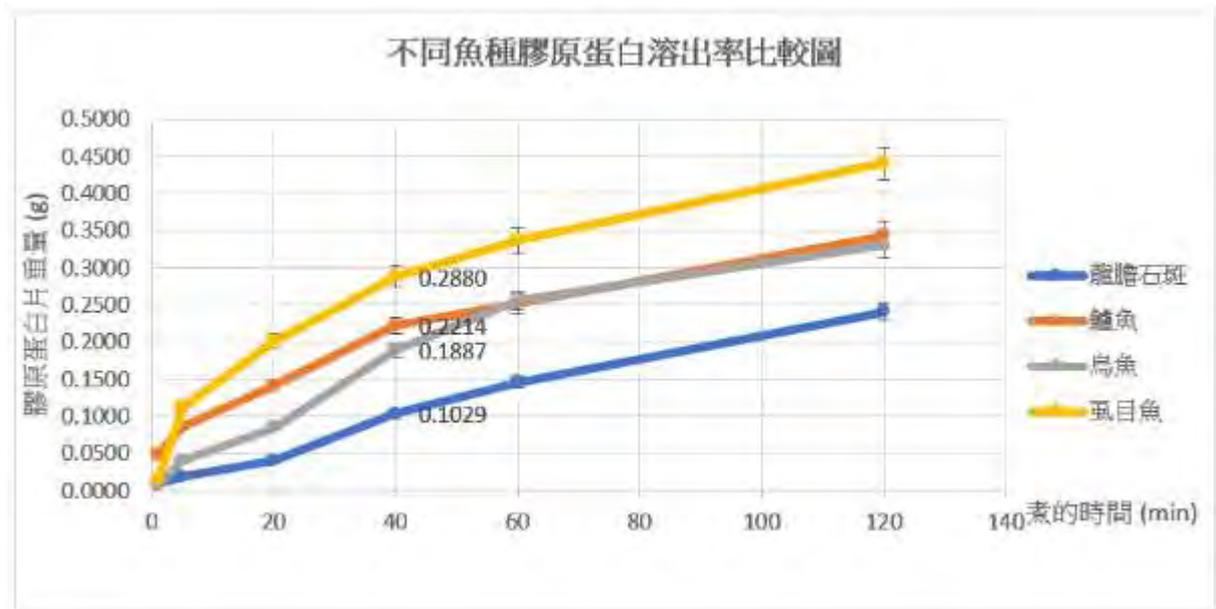


圖 21. 煮不同魚鱗膠原蛋白萃取率分析(萃取液為 30 ml)

由圖可知，膠原蛋白的溶出率為：虱目魚 > 鱸魚 > 烏魚 > 石斑魚，而且溶出率約略以 1~40 分鐘為第一階段，40~120 分鐘為第二個階段，第一階段的溶出率較快，40 分鐘時，虱目魚魚鱗溶出率約為石斑魚的 3 倍。

(二) 虱目魚魚鱗的膠原蛋白萃取效率

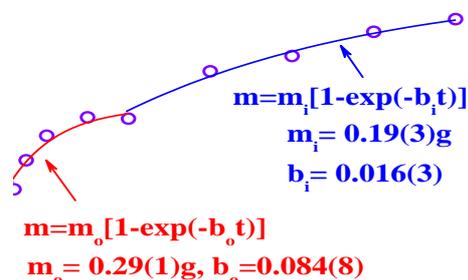


圖 22. 煮不同時間虱目魚魚鱗膠原蛋白萃取率分析(萃取液為 30 ml)

b : 每分鐘之萃取率, (o : outer ; i : inner) $b_o = 0.084$, $b_i = 0.016$ --> outer is faster

1. 由不同魚鱗的膠原蛋白溶出率得到結論：以虱目魚鱗萃取膠原蛋白效率最高。因此我們用了 14 組時間點萃取，得到上圖結果。由圖可知，煮不同時間溶出膠原蛋白速率可分為兩個階段，且以 40 分鐘作一個分界點。

2. 第一階段為煮 0~40 分鐘，外層魚鱗膠原蛋白的萃取率為 0.084 g / 分鐘，顯示在 100 °C 下魚鱗外層的膠原蛋白較容易溶出至鄰近的沸水中。

3. 煮 40 分鐘後膠原蛋白的溶出率大幅減小，意思是煮越久膠原蛋白的溶出率越小。

40~120 內層魚鱗膠原蛋白的萃取率為 0.016 g / 分鐘。

4. 1~40 分鐘比 40~120 分鐘的膠原蛋白萃取比較：

$[1-\exp(-0.084)] / [1-\exp(-0.016)] = 5.07$ 意指此外層比內層魚鱗膠原蛋白萃取速率高

5.07 倍，根據魚鱗結構分析，因受到周圍的氫氧機磷灰石牽制所致。

5. 萃取效率：1~40 分鐘 30ml 萃取液萃取 0.29 g 膠原蛋白，故 200 ml 萃取液中共有 1.93 g 膠原蛋白，一共用了 10 g 魚鱗，因此共萃取出 19.3% 魚鱗中的膠原蛋白。每 g 魚鱗 0.3 元，因此 40 分鐘萃取 1000 mg 純化的膠原蛋白只要 1.5 元！

6. 同第 5 點算法，40~120 分鐘萃取 1000 mg 純化的膠原蛋白只要 2.3 元，全部 1~120 分鐘萃取 1000 mg 純化的膠原蛋白只要 0.93 元

(三)以 100°C 醋水溶液將膠原蛋白溶出



圖 23.用醋水溶液煮不同時間魚鱗膠原蛋白與純水萃取重量比較

主要結論：

1. 本實驗的數據已經扣除 10% 蘋果醋之溶質重量 20mg。

2. 由圖 36 可知，加了醋的胜肽片重量皆較重，因此我們推測降低 pH 值，酸度增加會增加膠原蛋白的溶出速率，也會使膠原蛋白變成分子較小的膠原胜肽。

三、熔點

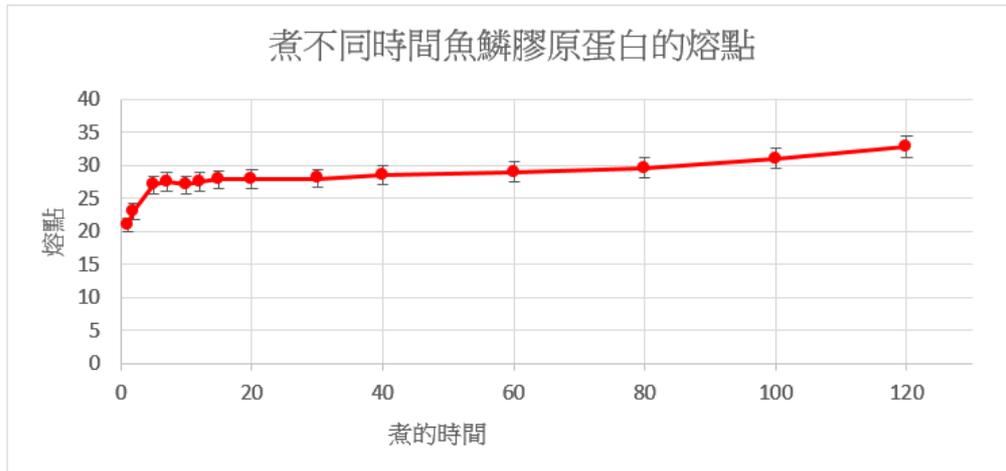


圖 24.煮不同時間魚鱗膠原蛋白萃取液熔點分析

由圖可知，膠原蛋白的熔點隨著煮魚鱗的時間增長而上升，但是一開始的前 7 分鐘，熔點的幅度改變最大。

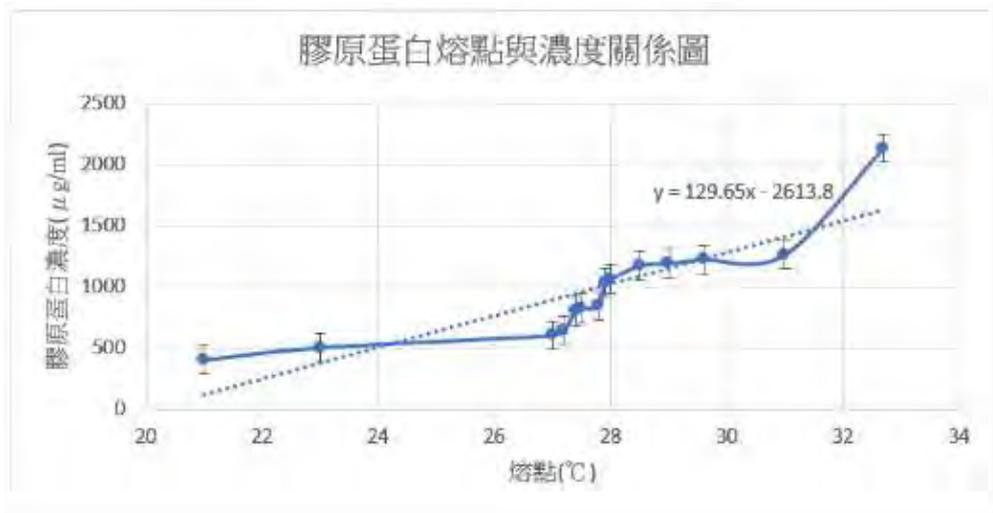


圖 25.魚鱗膠原蛋白萃取液熔點與膠原蛋白濃度分析

由圖可知，膠原蛋白的熔點隨著膠原蛋白的濃度變高而上升，而且對應由吸收光譜做出的膠原蛋白濃度，可以求得一個關係式如圖： $y = 129.65x - 2613.8$ (y：膠原蛋白濃度；x = 熔點)。

四、膠原蛋白萃取液的吸收光譜

(一) 100°C 水煮魚鱗 1~120 分鐘的吸收光譜

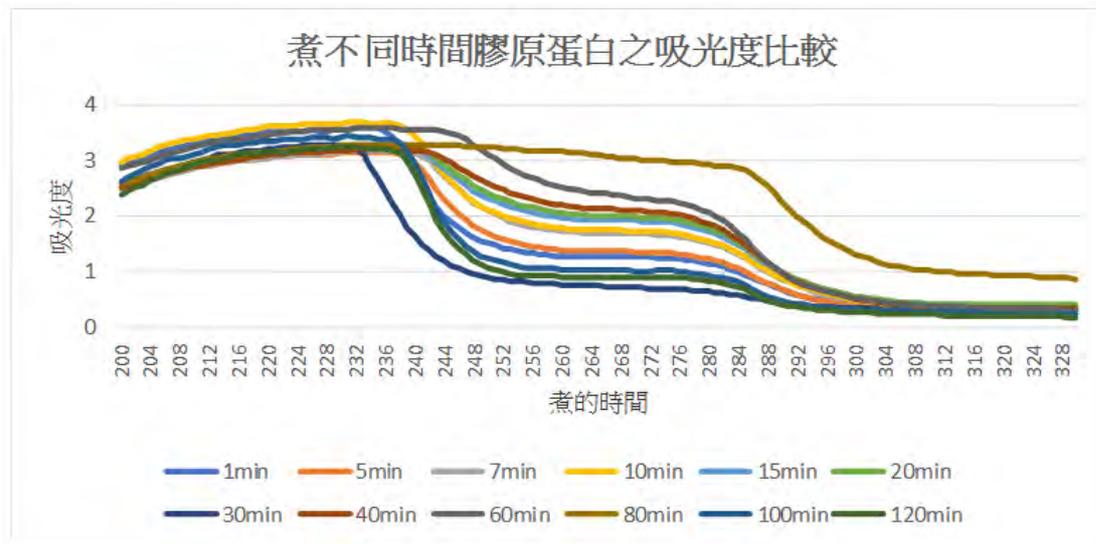


圖 26. 虱目魚魚鱗膠原蛋白萃取液吸於波長 200 nm~ 330 nm 之吸收光譜

說明：

1. 由於蛋白質所擁有的兩中芳族胺基酸(色氨酸和酪氨酸)會在 280nm 附近顯示出吸光度峰值，因此比較 260 nm 和 280nm 的吸光度，可以透過下列公式(根據參考文獻 4)

$$c_{\text{prot}} (\text{mg/mL}) = 1.55 * A_{280\text{nm}} - 0.76 * A_{260\text{nm}}$$

計算出較準確的蛋白質濃度。且由於蛋白質和胜肽也會在 220 nm 以及 240 nm 之間顯示出源自於肽鍵和羧基的較高吸光度，且我們的魚鱗膠原胜肽萃取液為較純淨無雜質的溶液，因此我們也可以透過此範圍的吸光度進行判斷。

時間(min)	1	5	7	10	15	20	30	40	60	80	100	120
$\mu\text{g/ml}$	800	840	1030	1060	1170	1190	400	1220	1260	2130	640	600

2. 於吸收峰 260 nm ~ 280 nm，有煮的時間越久吸光度越高的趨勢，比對 XRD 及 SDS 結果，推測其為較小分子的膠原比例較多的緣故。依照比爾朗伯定律(光的吸收度 A 與吸收係數 α 、光徑長 l、濃度 c 三者均呈正比)說明，對於溶液，吸光度和濃度成正比，因此我們可以得知其為濃度較高而影響吸光度值。

- 233 nm 吸收峰是三螺旋膠原蛋白的特徵峰(參考文獻 3)，煮的時間長，會讓膠原蛋白三螺旋結構因為受熱破壞而於此波長的吸光度變小，本實驗數據於 100°C 水煮 1 分鐘後，膠原蛋白的三螺旋便被破壞，且隨著水煮的時間增加，顯示於 233 nm 吸光度有變小的趨勢。
- 綜合 1~3，煮的時間越久，魚鱗溶出的膠原蛋白越多，而且有較高比例的膠原蛋白，分子鍵斷裂成不同較小分子量的膠原蛋白。

表 1、100°C 加醋水煮魚鱗膠原蛋白萃取液吸於波長 562 nm 的吸光度與總蛋白濃度

	1 min	1 AV	5 min	5 AV	12 min	12 AV
吸光度(X)	0.19	1.55	0.753	1.376	0.542	0.633
總蛋白質濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	395.3	2415.2	1231.5	2156.7	918	1053.3
比例	1a	6.1a	1b	1.75b	1c	1.14c

(二) 100°C 加醋水煮魚鱗 1、5、12 分鐘膠原蛋白萃取液的吸收光譜

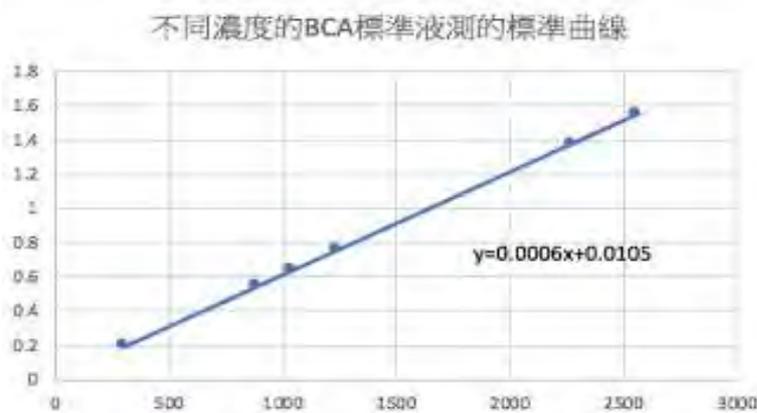


圖 27. 以 BCA 總蛋白質定量套組之不同濃度的 BCA 標準液測的標準曲線

圖片說明：

- 以 BCA 標準曲線算出總蛋白質濃度與吸光度的公式： $Y=0.0006X+0.0105$ (X:蛋白質濃度；Y:於波長 562 nm 的吸光度, O.D.₅₆₂)，計算 100°C 加醋水煮魚鱗組的總蛋白質濃度如(表 1)所示。
- 數據顯示，加 10% 蘋果醋能有效使膠原蛋白溶出，以 1 分鐘時加入時相對於對照組差異最大，溶出率差異高達 6.1 倍。
- 以 SDS 結果判斷，100°C 加醋水煮魚鱗溶出的物質為膠原蛋白，且純度相當高，因此可以此 BCA 總蛋白質吸光度法定量魚鱗溶出的膠原蛋白濃度。

五、 膠原蛋白萃取液的 SDS

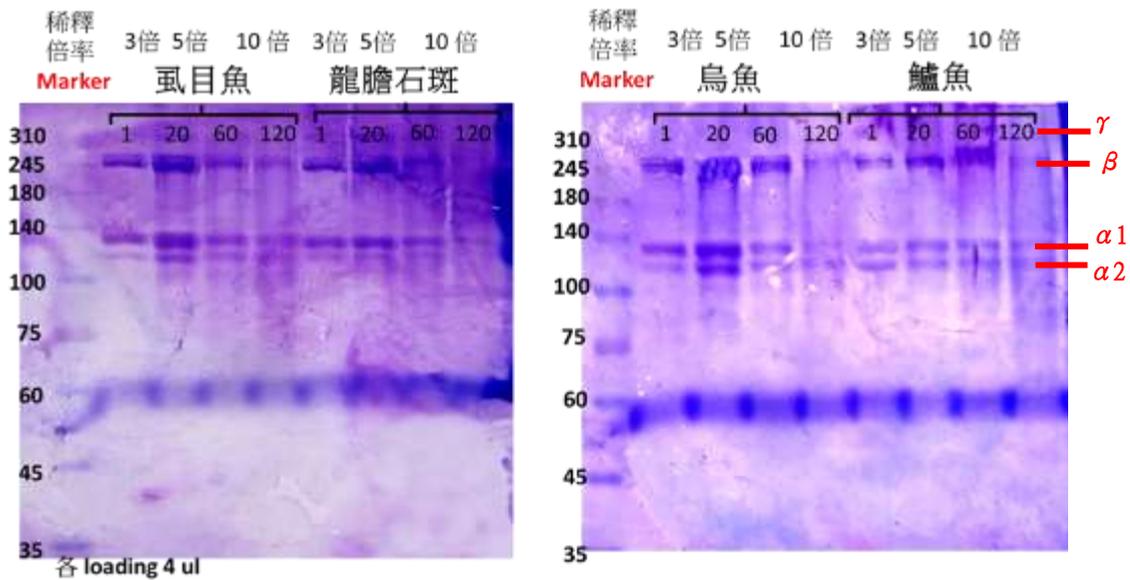


圖 28. 煮不同魚鱗膠原蛋白 SDS PAGE。M : Marker ; 1、20、60、120 : 100°C 水煮的分鐘數。α1 : α1 chain(monomer, 單體), α2 : α2 chain(monomer, 單體), β : β chain(dimer, 雙聚體), γ : γ chain(triplet) (三聚體)。

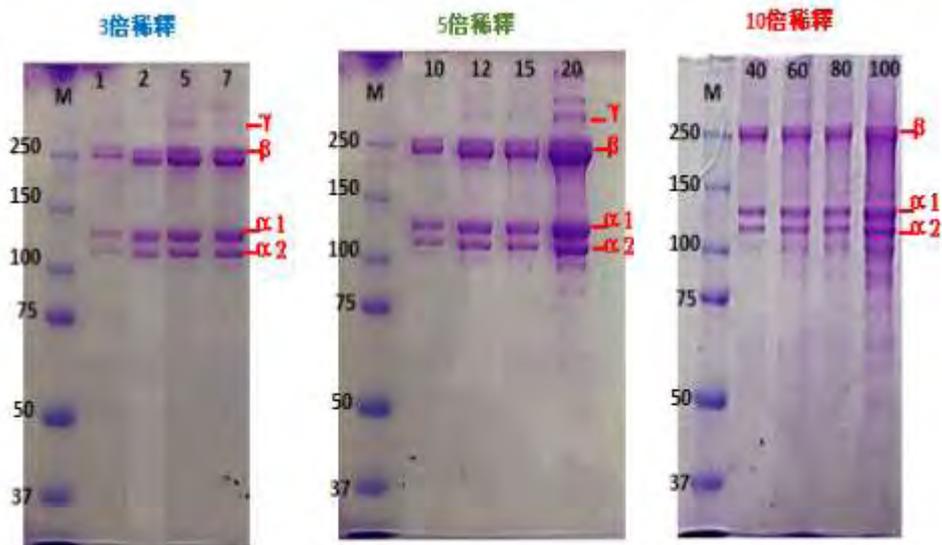


圖 29. 煮不同時間虱目魚魚鱗膠原蛋白 SDS PAGE。M : Marker ; 1、2、5、7、10、12、15、20、40、60、80、100 : 100°C 水煮的分鐘數。α1 : α1 chain(monomer, 單體), α2 : α2 chain(monomer, 單體), β : β chain(dimer, 雙聚體), γ : γ chain(triplet) (三聚體)。

圖片說明：

- 1.根據 tracker 程式計算，各個 bands 的分子量為： $\alpha 1$ chain = 127 kD, $\alpha 2$ chain = 115 kD, β chain = 248 kD, γ chain = 329。此為第一型膠原蛋白三個螺旋鏈單體 α 、雙聚體 β 、及三聚體 γ 的分子量特徵分布。
- 2.膠原蛋白三螺旋分子為兩個 $\alpha 1$ 鏈，加上一個 $\alpha 2$ 鏈所組成，因此在 SDS 圖中的 $\alpha 1$ band 比 $\alpha 2$ 顏色深。
- 3.因為 loading 的樣本是由很多膠原蛋白組成，加熱使三螺旋的氫鍵打開，在 sample buffer 作用之下，三螺旋分子打開的程度不同，因此有 γ 。
- 4.隨著 100°C 水煮魚鱗的時間增長，膠原蛋白溶出率增加，但是煮 1~40 分鐘時，大部膠原蛋白分依然維持較為完整的單體、雙聚體及三聚體結構，並沒有斷成小分子的蛋白質多肽鏈。可是煮的時間在 60 分鐘之後，有小分子的膠原蛋白出現，推測因為加熱提供的能量足夠時，可以將大分子膠原蛋白/明膠，分子間的鍵結破壞而變成小分子。
- 5.由上兩圖可知：虱目魚、鱸魚、烏魚、龍膽石斑魚鱗，以 100°C 水煮的魚鱗膠原蛋白純度高，鮮少有其他雜蛋白，因此我們以煮出並烘乾的膠原蛋白片定量，確實可行。

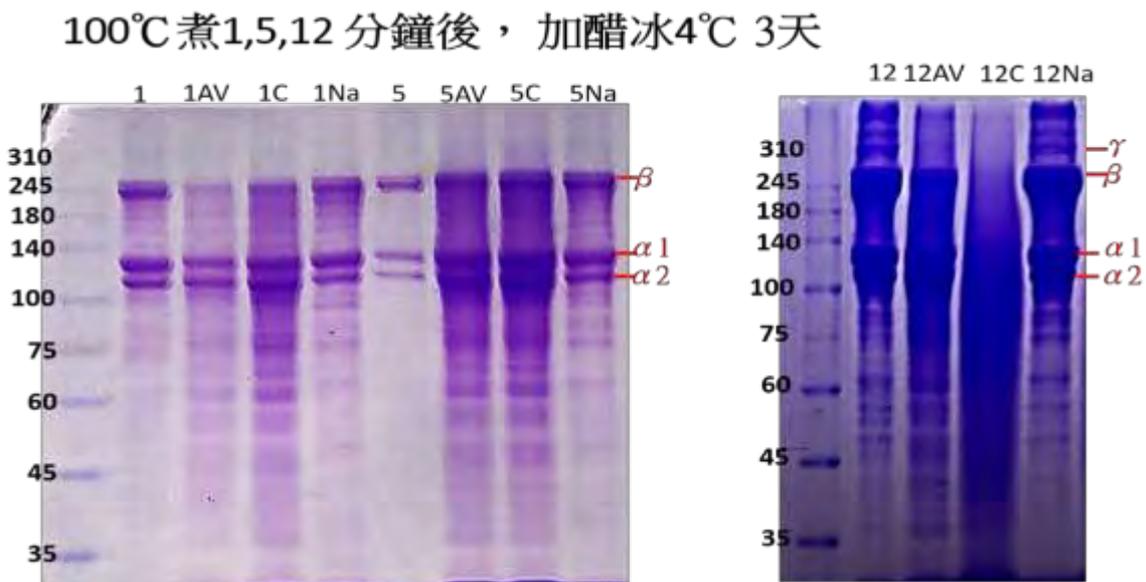


圖 30. 100°C 水煮魚鱗 1、5、12 分鐘後，再加醋冰 4°C 3 天後溶出之 SDS PAGE 結果

註：1、5、12：100°C 水煮魚鱗 1、5、12 分鐘

1AV、5AV、12AV：100°C 水煮魚鱗 1、5、12 分鐘後，加 10% 蘋果醋冰 4°C 3 天

1C、5C、12C：100°C 水煮魚鱗 1、5、12 分鐘後，加 0.5M 醋酸冰 4°C 3 天

1NA、5NA、12NA：100°C 水煮魚鱗 1、5、12 分鐘後，加 0.5M 醋酸鈉冰 4°C 3 天

圖片說明：

1. 根據 100°C 水煮 1~120 分鐘不同時間魚鱗膠原蛋白溶出率的結果，選出 1、5、12 三個具有快速溶出第一、第二、第三、階段代表的時間，進行煮後加醋的實驗。
2. 實驗結果發現，加 10% 蘋果醋、0.5M 醋酸、0.5M 醋酸鈉，不管是煮 1、5、12 分鐘，相較於不加的對照組，皆能增加魚鱗膠原蛋白的溶出，且使之分解成分子量小於 100 kD 的多種片段組合的蛋白質。
3. 以煮 100°C 1 分鐘為例，加 10% 蘋果醋、0.5M 醋酸、0.5M 醋酸鈉，膠原蛋白的 β 鏈、 $\alpha 1$ 鏈、 $\alpha 2$ 鏈被分解的片段形式類似，推測 type 1 膠原蛋白三螺旋於轉折處有鍵結較弱的部分，因此加酸類或鹽類（增加溶劑離子濃度）有助於膠原蛋白從較弱鍵結的地方斷裂，但是溶出的膠原蛋白依然以 β 鏈、 $\alpha 1$ 鏈、 $\alpha 2$ 鏈為主。
4. 比較煮 1 分鐘的四個組，膠原蛋白的溶出率及斷鏈成小分子的程度為：0.5M 醋酸（1C）> 10% 蘋果醋（1AV）> 0.5M 醋酸鈉（1NA）> 對照組（1）。且 β 鏈被解開的程度比 $\alpha 1$ 鏈、 $\alpha 2$ 鏈多，以（1C）最多。

100°C 加醋煮 1, 5, 12 分鐘

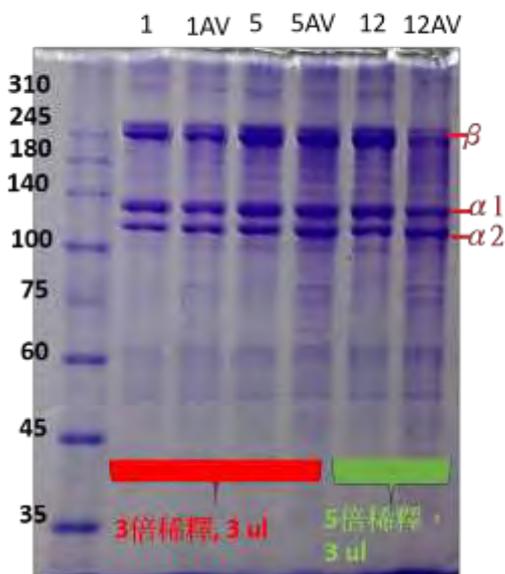


圖 31. 100°C 加醋水煮魚鱗 1、5、12 分鐘後，之 SDS PAGE 結果

註：1、5、12：100°C 水煮魚鱗 1、5、12 分鐘；1AV、5AV、12AV：100°C，10% 蘋果醋水煮魚鱗 1、5、12 分鐘

說明：

加醋直接煮的結果類似於煮後再加醋，可以在家裡製作魚鱗膠原蛋白凍時，一起加 10% 蘋果醋煮比較方便。

六、膠原蛋白萃取液的 X 光譜繞射譜圖

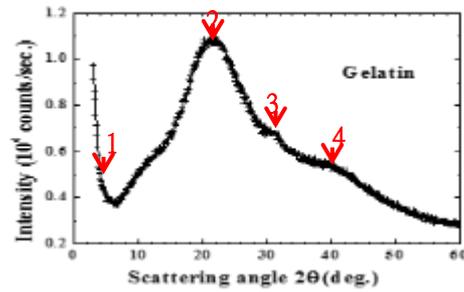
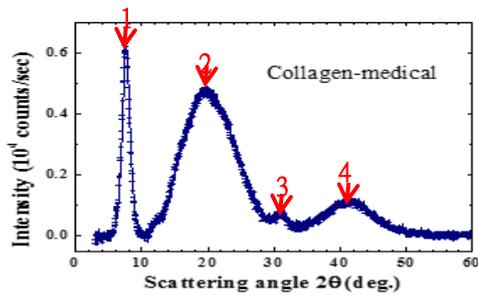


圖 32.第一型膠原蛋白標準品 X 光譜繞射譜圖 圖 33. 明膠標準品 X 光譜繞射譜圖

圖片說明：

1. 由圖 31、32 第一型膠原蛋白及明膠標準品 XRD 結果帶入布拉格定律($2d\sin\theta = n\lambda$)計算， $2\theta = 7.5^\circ$ 時， $d_1 = 1.17\text{ nm}$ ， $2\theta = 14^\circ$ 時， $d_2 = 0.63\text{ nm}$ ， $2\theta = 32^\circ$ 時， $d_3 = 0.28\text{ nm}$ ， $2\theta = 40^\circ$ 時， $d_4 = 0.25\text{ nm}$ ，比對文獻符合膠原蛋白的特徵峰。
2. 比較第一型膠原蛋白及明膠標準品 XRD 的結果，可知兩者的差異在於(1)第一型膠原蛋白有小角度 $2\theta = 7.5^\circ$ 的較窄的特徵峰，此為三螺旋的分子結構。(2) 膠原蛋白與明膠皆有 $2\theta = 14^\circ$ 、 20° 、 32° 、 40° 的特徵峰，只是質量的比例不相同。
3. 已知明膠為變性的膠原蛋白（根據參考資料 5），差異在於分子結構不同但本質相同

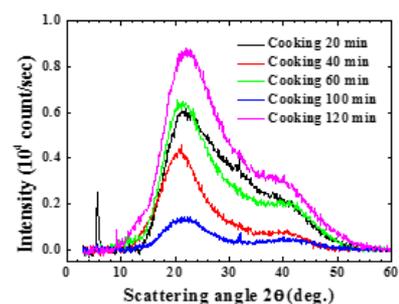
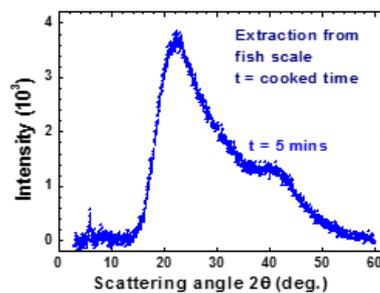
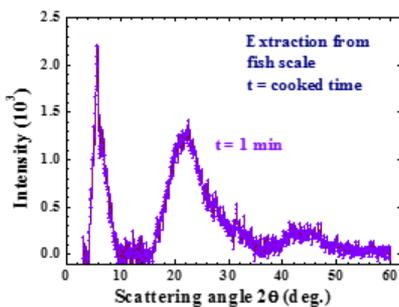


圖 34. 100°C 煮魚鱗，1 分鐘的 X 光譜繞射譜圖

圖 35. 100°C 煮魚鱗，煮 5 分鐘的 X 光譜繞射譜圖

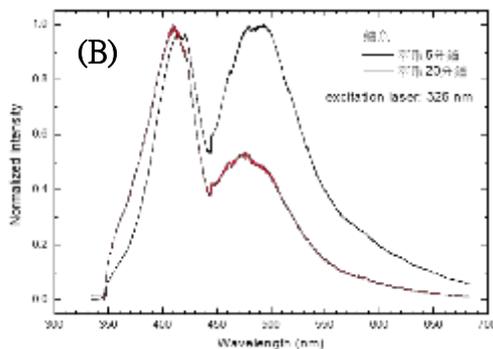
圖 36. 100°C 煮魚鱗，煮 20、40、60、120 分鐘的 X 光譜繞射譜圖

圖片說明：

1. 比對膠原蛋白與明膠標準品 XRD(圖 32,33)，以 100°C 煮魚鱗一分鐘後(圖 34)，依然有明顯的 $2\theta=7.5$ 度特徵峰(三螺旋分子鏈)，除了與第一型膠原蛋白、明膠的特徵峰外，鮮少有其他的雜質出現，與 SDS-PAGE 的結果一致，而煮 5 分鐘(圖 35)及 20、40、60、100、120(圖 36)之後， $2\theta=7.5$ 度的三螺旋已不明顯而逐漸消失，而隨著煮的時間增長，短鏈分子增多，也就是小分子膠原蛋白濃度增大。
2. 100°C 水煮魚鱗可溶出第一型膠原蛋白及其變性所產生的明膠，且純度相高。

七、膠原蛋白萃取液的螢光光譜及其可能應用

(A)



(C)

圖 37 膠原蛋白萃取液及魚鱗之螢光光譜比較

1. 除了在 410 nm 藍光區出現螢光峰外，在 490 nm 綠光區也出現螢光峰，且 490 nm 的螢光峰明顯較寬，顯示萃出物至少含有 2 種發螢光分子(圖 A、B、C)。
2. 螢光光譜係以 325 nm 雷射激發，雷射功率 0.1 mW，CCD 偵測積分時間 0.1 s，即可測得強螢光訊號，顯示所萃取膠原蛋白發光效率佳。
3. 萃取時間短：410 nm 及 490 nm 螢光峰強度相當(圖 A)。
4. 萃取時間較長：490 nm 螢光峰增強率相對減弱許多(圖 B)。
5. SDS 偵測到萃取物明確含有 type-I 膠原蛋白，有兩個次單元：2 個 $\alpha 1$ + 1 個 $\alpha 2$ chains。100°C 水煮後，可能溶出螺旋單體 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ，或螺旋雙聚體 β ，或三螺旋 γ 。
6. 由圖(A)(B)(C)可知，萃取時間變長時，490nm 的螢光峰強度減弱，推測為三螺旋的結構因受熱被破壞所致。

陸、討論

一、第一型膠原蛋白佔健康人體總膠原蛋白約 80~85%，也是動物體內含量最多的蛋白質，骨骼、軟骨、韌帶、皮膚、角膜等都有膠原蛋白(參考文獻 1)。

二、魚鱗是高度有序的第一型膠原蛋白和氫氧基磷灰石 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ 的生物複合材料。第一型膠原蛋白其變性溫度比豬皮膚膠原蛋白低，且有較豬皮少的油脂與膽固醇。在魚的加工過程中，大量的魚鱗被倒掉，這是一個很大的浪費，因為魚鱗中大量的第一型膠原蛋白，是人類建構皮膚的重要原料(參考文獻 8)。

三、比較海水魚淡水魚的魚鱗外觀、結構、面積與纖維層所占橫切面比例，結果發現 4 種魚魚鱗結構類似，海水魚的魚鱗較厚，淡水魚的纖維層佔整個魚鱗的比例較高。如此的魚鱗結構，與膠原蛋白的溶出率大小一致，溶出率：虱目魚 > 鱸魚 > 烏魚 > 龍膽石斑。推測海水魚的生長環境，使其魚鱗較為厚以及骨質層厚度較大，有較多的保護力，可以面對高濃度的海水與可能的洋流等。

四、我們在做橫切切片時遭遇到了極大的困難，魚鱗相當堅韌，以海水魚之龍膽石斑、烏魚尤其難切，且切面可以看到許多細小的纖維。龍膽石斑的骨質層尚有許多波浪狀的突起。

五、魚鱗是皮膚表層的礦化板。硬骨魚的魚鱗主要是由缺鈣的氫氧基磷灰石和第一型膠原蛋白組成，組成一個排列整齊有序的完整結構。魚鱗表層分成三個部分，前面、側面、和後面(圖 14,15)。以垂直方向來看，魚鱗通常呈現兩到二種不同的層面：具有隨機定向纖維的氫氧基磷灰石晶體組成的外部骨質層、內部纖維板。纖維層主要為氮、碳、氧等膠原蛋白的組成成分(參考文獻 10)。而本實驗的“煮不同時間虱目魚鱗溶出膠原蛋白片質量”結果顯示魚鱗可以溶出結構部分至少分為兩層，外層在煮 1~40 分鐘膠原蛋白的溶出率約為煮 40~120 分鐘的 5.7 倍，且皆呈自然指數遞減，意指此煮越久膠原蛋白

的溶出率越少，從內層的魚鱗溶出率較小是因受到周圍的氫氧機磷灰石牽制。我們的膠原蛋白溶出率實驗結果推論符合論文的魚鱗結構分析。(圖 38)

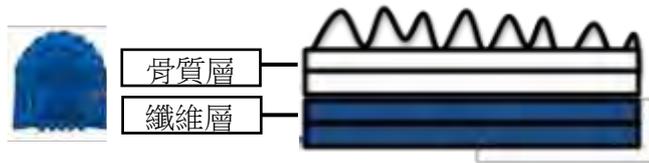


圖 38. 魚鱗的縱切結構

(圖片改繪自：參考文獻 10)

六、UV-可見光吸收光譜

膠原蛋白萃取液的吸收波長範圍約為 200~300 nm，在紫外光範圍內(10~400 nm)。

233nm 為膠原蛋白三螺旋結構的吸收峰(參考文獻 3)。本實驗之吸收光譜結果顯示煮的時間長，會讓膠原蛋白三螺旋結構因為受熱破壞而於此波長 233 nm 的吸光度變小，本實驗數據於 100°C 水煮 1 分鐘後，膠原蛋白的三螺旋便被破壞，且隨著水煮的時間增加，於 233 nm 吸光度有變小的趨勢。然而，煮的時間加長，膠原蛋白溶出率增加，於波長 260~280 nm 的吸光度較高，總蛋白增加。加醋煮的總蛋白質質量皆大於不加醋的對照組 2~6 倍。

七、SDS-PAGE

(一) 本實驗 SDS-PAGE 結果顯示，所萃取的膠原蛋白為第一型膠原蛋白，有螺旋鏈單體 α 、雙聚體 β 、及三聚體 γ 的分子量特徵 band 分布。(參考文獻 2)

(二) 圖中 bands 清晰、雜帶少，說明以 100°C 水煮的魚鱗膠原蛋白純度高，鮮少有其他雜蛋白，由此結果，我們可以萃取並去除水分的膠原蛋白片總重計算萃取效率。

(三) 隨著 100°C 水煮魚鱗的時間增長，膠原蛋白溶出率增加，但是煮 1~40 分鐘時，大部膠原蛋白分依然維持較為完整的單體、雙聚體及三聚體結構。可是煮的時間在 60 分鐘之後，有小分子(30~100 kD)的膠原蛋白出現，推測因為加熱提供的能量足夠時，可以將大分子膠原蛋白分子間的鍵結破壞而變成小分子。

(四) 加 10%蘋果醋、0.5M 醋酸、0.5M 醋酸鈉，不管是煮 1、5、12 分鐘，相較於不加的對照組，皆能增加魚鱗膠原蛋白的溶出，且使之分解成分子量小於 100 kD 的多種片段組合的蛋白質。

八、X 光繞射結果探討 (XRD)

(一) X 光繞射的數據顯示，我們所萃取的膠原蛋白為第一型膠原蛋白，並具有四個特徵峰，於 $2\theta = 7.5^\circ$ 的較窄的特徵峰， $d = 1.77 \text{ nm}$ ，此為三螺旋膠原蛋白的直徑。(參考文獻 5)

(二) 100°C 煮魚鱗於 1~120 分鐘皆可溶出明膠（變性的膠原蛋白），但只煮一分鐘時才可見到清晰的三螺旋蛋白。

(三) 除了與第一型膠原蛋白、明膠的特徵峰外，鮮少有其他的雜質出現，與 SDS-PAGE 的結果一致，而煮 5 分鐘之後， $2\theta = 7.5^\circ$ 度的三螺旋已不明顯而逐漸消失，而隨著煮的時間增長，短鏈分子增多，也就是明膠濃度增大。

九、膠原蛋白螢光光譜

(一) 螢光光譜係以 325 nm 雷射激發，雷射功率 0.1 mW，CCD 偵測積分時間 0.1 s，即可測得強螢光訊號，顯示所萃取膠原蛋白發光效率佳。

(二) 四種魚鱗萃取的膠原蛋白皆於 410 nm (藍光)及 490 nm (綠光)出現螢光峰，隨著煮的時間越久，490 nm 螢光峰質強度減弱，推測因膠原蛋白三螺旋結構被熱破壞所致。

(三) 可以根據樣本裡的膠原蛋白螢光峰質，與標準品比對，估算其純度。

十、膠原蛋白的應用

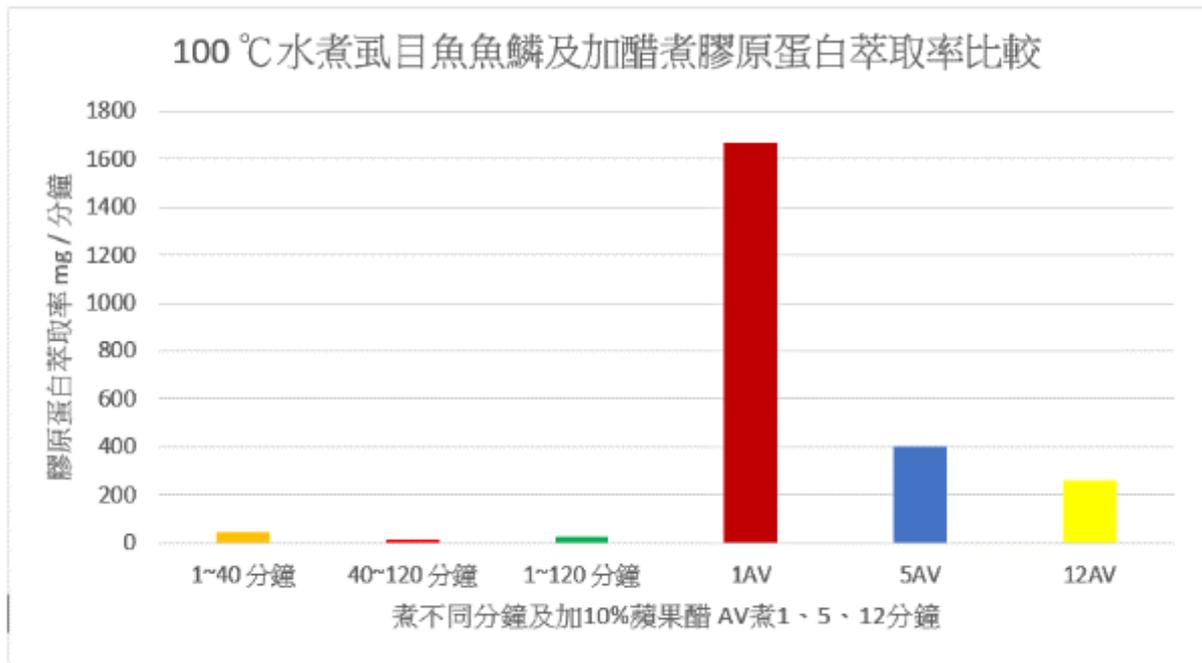
100°C 水煮魚鱗可溶出第一型膠原蛋白及其變性所產生的明膠，且純度相高達 98%。

小分子膠原蛋白好吸收，還可以消除皺紋

(一) 根據參考資料 6，藉由飲食攝入的生物活性膠原胜肽可以有效增加皮膚中第一型膠原蛋白以及彈性蛋白的生成並減少眼部皺紋。

(二) 根據參考資料 7 顯所寫，使用膠原酶所製備的魚鱗膠原胜肽與高分子量的膠原胜肽相比能更好的在胃腸道中吸收，並維持穩定的狀態，且能透過腸細胞單層運輸。

十一、100 °C 水煮虱目魚魚鱗、加蘋果醋 100 °C 煮虱目魚魚鱗之膠原蛋白萃取效率及其他市售廠牌價錢比較



(一) 以每分鐘之萃取效率而言，加 10% 蘋果醋組每分鐘膠原蛋白的萃取效率明顯高出許多，其中，以加醋組 1 分鐘萃取效率最高，扣除蘋果醋的溶質重，每分鐘可萃取 1666 mg，約為水煮 1~120 分鐘的 64 倍。

(二) 100°C 水煮的效率以 1~40 分鐘最高，因為魚鱗外層的膠原蛋白較易被溶出。

(三) 本實驗的 1 分鐘加醋煮魚鱗萃取膠原蛋白，約為市售的膠原蛋白價錢的 2%~3%。

(四) 綜合(一)、(二)、(三) 點，建議一般民眾可以在家以本實驗方法自製膠原蛋白食用，乾淨，純度高，且可以省下大筆鈔票。

柒、結論

一、以加 10% 蘋果醋、100°C 水煮淡水魚中的虱目魚魚鱗萃取膠原蛋白的效率最高，並且煮 40 分鐘即可，達到節能、簡易、高效能之膠原蛋白萃取法。

二、膠原蛋白萃取液熔點和凝固時間

魚鱗膠原蛋白萃取液的熔點約為室溫 25~30°C，在的冰箱中，大約靜置 35~50 分鐘會使玻璃管中 10 c.c 的魚鱗膠原蛋白萃取液凝固。加醋之後，會使之變成水狀較難凝固。且熔點會隨著膠原蛋白濃度增加而略微上升約 10°C。

三、虱目魚魚鱗膠原蛋白萃取液溶出率測試

(一) 100°C 沸水加醋煮 1 分鐘可有效使魚鱗膠原蛋白溶出，效率為 1666 mg/分鐘。

(二) 魚鱗外層膠原蛋白較內層膠原蛋白容易溶出，外層比內層魚鱗膠原蛋白萃取速率高 5.07 倍，此點與魚鱗兩大主要成分：膠原蛋白及氫氧機磷灰石，在外層與內層的組成結構不同相關。

(三) 本實驗的 1 分鐘加醋煮魚鱗萃取膠原蛋白，約為市售的膠原蛋白價錢 2%~3%。

三、膠原蛋白萃取液吸收光譜、SDS-PAGE、XRD、螢光光譜

(一) 吸收光譜、SDS-PAGE、XRD 的結果皆顯示，本實驗萃取出魚鱗膠原蛋白為第一型膠原蛋白，且純度相當高。

(二) 100°C 水煮 1 分鐘後，膠原蛋白的三螺旋便被破壞，變成螺旋單體 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 及雙聚體 β 。且隨著水煮的時間增加，膠原蛋白溶出率增加。但是真正能有效促進膠原蛋白斷鍵為較小分子的是加醋煮或煮後加醋，皆能有使膠原蛋白斷鍵成分子量在 30~100 kD 之間的小分子膠原蛋白，以利人體消化及吸收。

(三)以 325 nm 雷射光激發膠原蛋白，產生兩個螢光峰：410 nm (藍光)；490 nm (綠光)，可以做為鑑定樣本中膠原蛋白純度的良好方法。

捌、未來展望與應用

希望在未來能以便宜簡便的方式做出美味好吃、高純度的魚鱗膠原蛋白凍，也可以嘗試製作粉末方便食用，並且嘗試使用於醫療美白方面。另外我們目前在持續在研究膠原蛋白螢光光譜應用的可行性，且發現魚鱗其實也有膠原蛋白螺旋單體，希望在未來可以有機會做更多實驗解讀我們數據的秘密。

圖 39.按造本實驗方法所做出的養顏美味魚鱗膠原蛋白凍



玖、參考文獻

- 1.洪雅萍(2004)膠原蛋白產品的功效，科學發展，8月，380期。
- 2.Aiah A. El-Rashidya*, Ahmed Gadbc, Abd El-Hay G. Abu-Husseinc, Shaymaa I. Habiba, Nadia A. Badrd, Azza A. Hashem (2015) Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia(Oreochromis niloticas) fish scale collagen International Journal of Biological Macromolecules 79 618 – 626
- 3.FengxiangZhang, Anning Wang, Zhihua Li, Shengwen He, Lijun Shao (2011), Food and Nutrition Sciences, Preparation and Characterisation of Collagen from Freshwater Fish Scales, 818-823

4. György Hegyi, József Kardos, Mihály Kovács, András Málnási-Csizmadia, László Nyitrai, Gábor Pál, László Radnai, Attila Réményi, and István Venekei (2013) Introduction to Practical Biochemistry ELTE Faculty of Natural Sciences, Institute of Biology ,71
5. Jing Wang, Xinli Pei , Haiying Liu, Dan Zhou Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach International Journal of Biological Macromolecules 106 (2018) 544 - 550
6. Proksch, Schunck, Zague, Segger, Degwert, Oesser (2014) Oral Intake of Specific Bioactive Collagen Peptides Reduces Skin Wrinkles and Increases Dermal Matrix Synthesis Skin Pharmacol Physiol, 113-119
7. Sneha, Sontakke, Jin-hee Jung, Zhe Piao, Hye Jin Chung (2014) Oral intake of specific bioactive collagen peptides reduces skin wrinkles and increases dermal matrix synthesis
8. Weeraphat Pon-Ona, Panan Suntornsaratoon, Narattaphol Charoenphandhu, Jirawan Thongbunchoo, Nateetip Krishnamra, I. Ming Tan (2016), Materials Science and Engineering C, Hydroxyapatite from fish scale for potential use as bone scaffold or regenerative material, 183-189
9. Zhou Fang, Yukun Wang, Qingling Feng, Arne Kienzle, Werner E.G. Müller (2014), Materials Science and Engineering C, Hierarchical structure and cytocompatibility of fish scales from *Carassius auratus* , 145-152

【評語】 030321

這個研究主要利用水煮以及加醋的方法比較其萃取出不同魚鱗的膠原蛋白的效率。魚鱗具有大量的第一型膠原蛋白，目前已有幾個公司便是販售魚鱗萃取出之膠原蛋白作為產品。這個實驗基本上比較水煮跟酸性環境下膠原蛋白萃取的效力。實驗結果顯示虱目魚鱗的水煮法萃取膠原蛋白效率最高，加醋水煮能提高溶出率 2~6 倍。

1. 魚鱗膠原蛋白萃取與應用是近年來熱門題目，既然是為萃取法的設計，應與過去的實驗論文來做比對/探討(2011，張佩娟膠原蛋白抽出率 73.2%，殺菁+0.4M 鹽酸+酵素)，方能顯現出其簡易或高效率之處。本實驗同學們的萃取效果良好，在 SDS-PAGE 上也顯示膠原蛋白的純度，有趣的是，水煮一分鐘就有很好的萃取效果，不過要加長時間才會增加小分子膠原蛋白的比例。建議同學可以多比較幾個不同萃取方法，增加小分子膠原蛋白的產量及回收率。
2. 此研究主題與科學研究的方法能妥善運用上課所學，適時參考前人的文獻資料。惟有些儀器操作與計算分析，似乎超越一般國中生作者的理解程度。本研究利用了許多具有技術門檻的工具包括 SDS PAGE 蛋白質電泳、X 光繞射、BCA 蛋白質濃度測定等等，在報告中學生為什麼會想要用這些工具進行研究的原因及原理可能需要解釋清楚。

3. 建議整體的研究在文獻回顧與議題發想的部分可以加強。舉例來說，此作品沒有逐步交代清楚幾個相關性實驗間的邏輯關係，針對實驗結果的討論未見探討為何加醋可以增加膠原蛋白的萃取效果，以及增加加熱時間為何會增加小膠原蛋白的萃取效果。
4. 魚鱗膠原蛋白的萃取技術在商業上已有應用，例如台灣鯛魚鱗膠原蛋白相關產品，而此研究可以發展不同方法進行，同時對於萃取物進行物理性質評估，在研究成果具有實際應用性，建議在基本原理的探討可以加強，例如解釋為何酸性環境可以增加萃取量，以及有無其他方法及變因可以更進一步改善萃取效益。

簡介

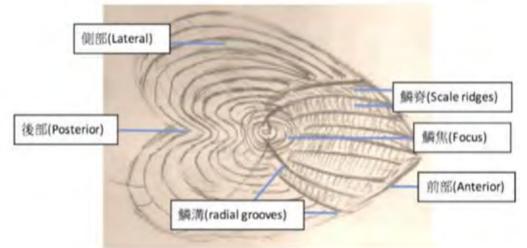
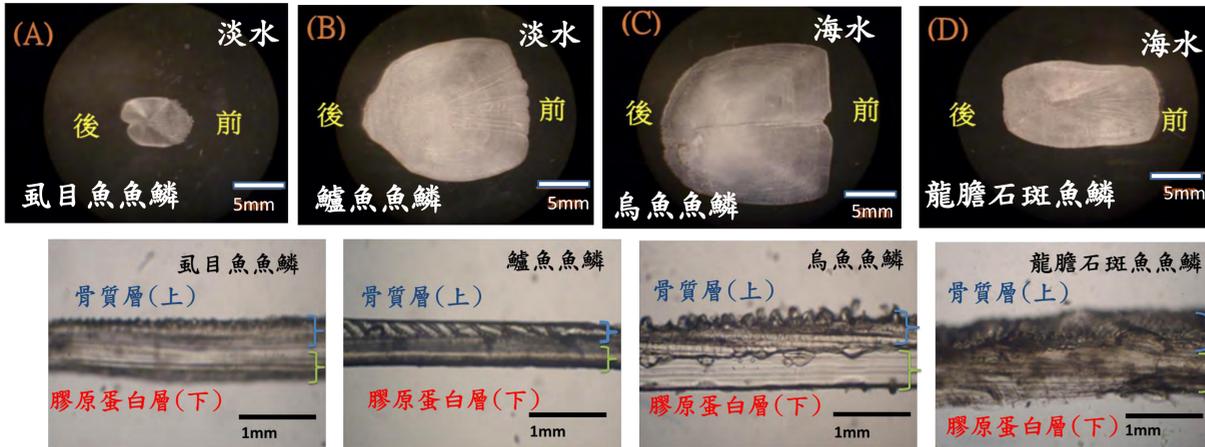
魚鱗由大量的膠原蛋白鋪設在氫氧基磷灰石骨架間所組成[1]，這種組成使得魚鱗成為萃取膠原蛋白的較佳材料。我們設計簡易高效能，自魚鱗萃取膠原蛋白的方法，並開發其螢光標示的應用。發現膠原蛋白溶出率較高的水煮時段為10分鐘，之後溶出率即大幅下降，且添加少許醋即能大幅提昇溶出率達6倍之多。在100°C加醋水煮虱目魚鱗10分鐘，萃取膠原蛋白每公克僅需成本1.5元，為市售價格的2~3%。SDS、X光繞射、吸收光譜分析顯示，魚鱗裡即存在有大量單體膠原蛋白、魚鱗中三聚體膠原蛋白在100 °C水中5分鐘即大部變性為單體或鬆散纏繞的雙體。以功率0.1mW、波長325nm的雷射光照射所萃取的膠原蛋白，能激發出肉眼可見藍光(410nm)及綠光(490nm)，可用來標示生化分子。

欲解問題

1. 設計一個節能、實惠、高效率，自魚鱗萃取膠原蛋白的方法，提昇廢棄魚鱗的二次經濟價值。
2. 探討膠原蛋白在高溫水中的變性率，開發所萃取膠原蛋白螢光的應用。

材料

一、魚鱗光學顯微影像

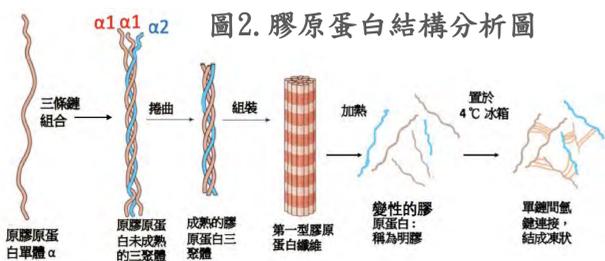


➢ 魚鱗前端離開魚身部，略呈三角形，皆較薄。可以看出扇形紋路，顯現出骨架。

圖1. 魚鱗光學顯微照片及結構圖。

- 魚鱗結構橫切可分為2層；近水面的骨質層(主含氫氧基磷灰石HAP)、近魚皮的膠原蛋白層。
- 骨質層的颜色較深，且有許多凸起，膠原蛋白層色淺且透明有排列整齊的膠原蛋白束。
- 4種魚鱗中以虱目魚的膠原蛋白層比例最大，且厚度、面積最小。

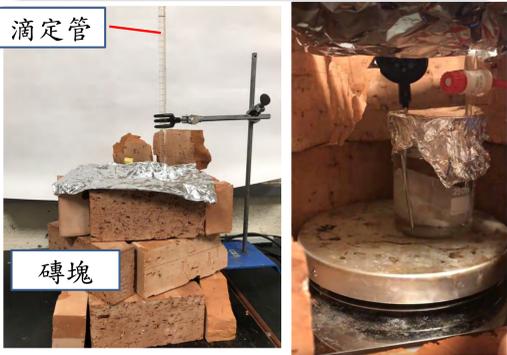
二、膠原蛋白結構



- 第一型膠原蛋白：兩個 α_1 [I]單體、一個 α_2 [I]單體以氫鍵接合。
- 第二型膠原蛋白：三個 α_1 [II]單體以氫鍵接合。
- 氫鍵能相當於35°C熱能，加熱可破壞氫鍵，使三螺旋結構鬆開，變性溫度為42°C。
- 明膠溶入水中時，膠原蛋白纖維纏繞，網狀三維結構可以容納大量的水，結成凍狀。[2]

方法

一、萃取裝置及樣本



- 外圍以磚塊及鋁箔紙包圍加熱裝置，使加熱均勻。
- 滴定管每分鐘滴入2ml的熱水，使溶液體積固定。

圖3. 萃取裝置圖(A)外部觀 (B)內部觀。

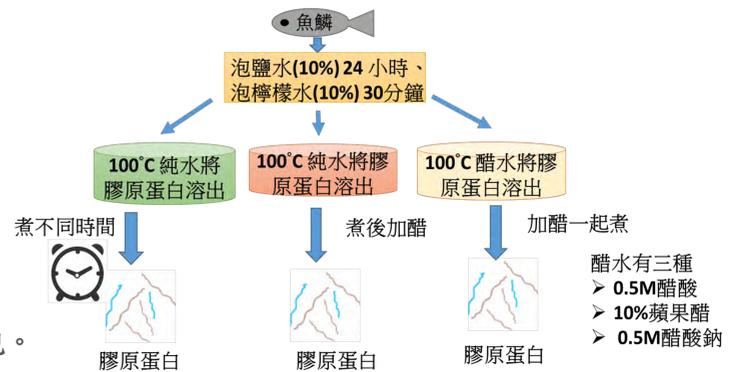


圖4. 萃取液的製備流程圖。

二、樣本



圖5. (A)自製膠原蛋白凍，樣品由左到右乳白色程度增加，顯示濃度越濃；(B)膠原蛋白片；(C)用量測X光繞射之膠原蛋白片。

- 在無菌操作台分裝樣品以防止細菌汙染
- 膠原蛋白凍:置於無菌玻璃試管4 °C 冰箱，用於吸收光譜、SDS及螢光光譜。
- 膠原蛋白片:置於直徑9cm的培養皿40°C烘箱烘48小時，計算溶出率及X光繞射。

三、特性量測

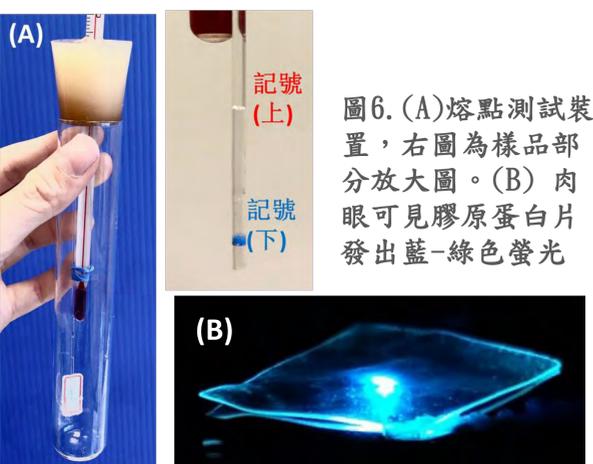


圖6. (A)熔點測試裝置，右圖為樣品部分放大圖。(B)肉眼可見膠原蛋白片發出藍-綠色螢光

1. 熔點:毛細管填充1cm長的膠原蛋白凍，隔水水浴加熱(0.5°C/min)，觀測凍液化之溫度即為熔點。
2. 吸收光譜:(1)以垂直穿透膠原蛋白片之架設，量測入射光(紫外-可見光)的穿透率。(2)量測樣本於562nm光穿透率，與小牛血清蛋白(BSA)標準曲線比較，計算萃取液蛋白質濃度。
3. 電泳(SDS-PAGE):以7.5% SDS-PAGE分析樣本中蛋白質分子量，判定膠原蛋白種類。
4. X光繞射(XRD):以反射式架設讀取X光繞射譜圖，判定萃取樣品成分。
5. 螢光光譜 :反射式架設，以325nm雷射光0.1mW為激發光源，以CCD偵測器積分時間0.1秒，激發出肉眼可見的藍-綠光。

結果與討論

一、魚鱗結構

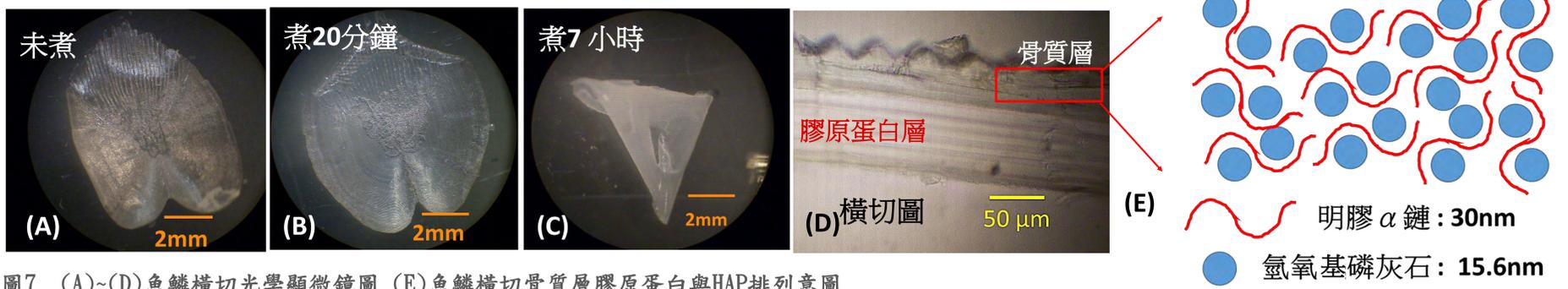


圖7. (A)~(D)魚鱗橫切光學顯微鏡圖 (E)魚鱗橫切骨質層膠原蛋白與HAP排列示意圖

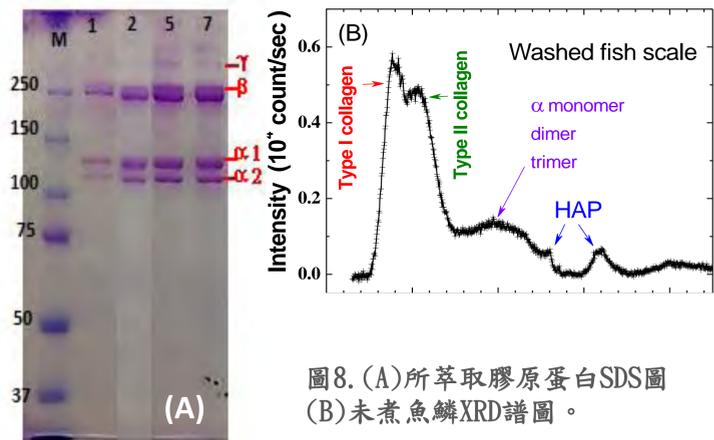


圖8. (A)所萃取膠原蛋白SDS圖 (B)未煮魚鱗XRD譜圖。

- 魚鱗表面平整(圖7A)，煮20分鐘後，連結魚身前部呈現捲曲(圖7B)，顯示膠原蛋白溶出後，HAP失去支撐，回復捲曲結構。
- 煮7小時後，由邊緣向中心捲成質地脆易碎三角形(圖7C)，XRD顯示是HAP。
- 魚鱗橫切圖顯示可區分為兩種層狀結構(圖7D)，下層的密度較低，顯示主要成分為膠原蛋白，上層外圍呈鋸齒狀，由膠原蛋白撐開HAP周邊所組成。
- 所萃取之膠原蛋白有 α_1 [I]、 α_1 [II]與 α_2 [II]單體(127kD與115kD)，且 α_1 [I]、 α_1 [II]含量較多。(圖8A)
- XRD顯示魚鱗本身含有兩種三螺旋膠原蛋白鏈，同時也含有較少量但不可忽略的明膠膠原蛋白單體、雙聚體及三聚體。(圖8B)
- 三螺旋膠原蛋白鏈質量:明膠質量=70:30。
- 虱目魚鱗含有第一型($2\alpha_1$ [I] + $1\alpha_2$ [I])、第二型($3\alpha_1$ [II])及明膠(膠原蛋白單體、雙聚體、及三聚體)，其中上層氫氧基磷灰石骨架由膠原蛋白束稱開鋪平。

二、膠原蛋白含量

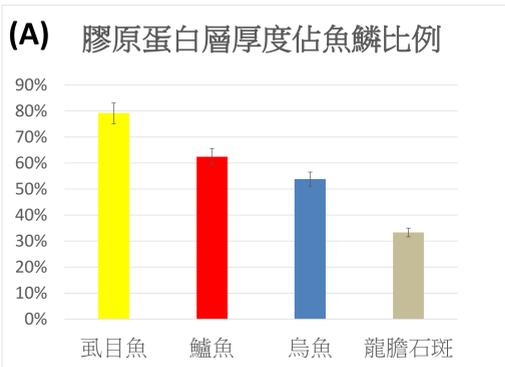
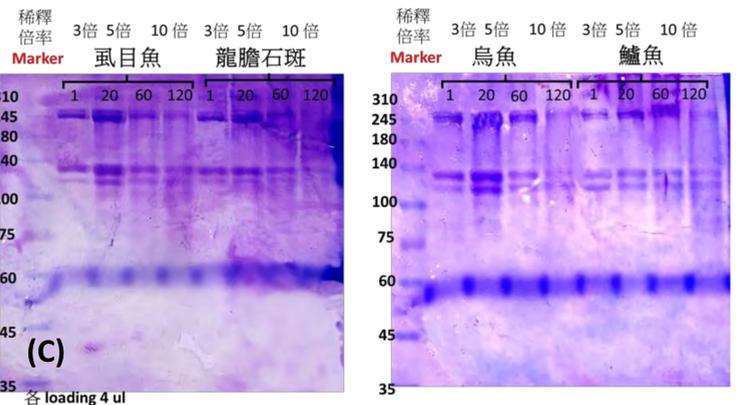


圖9. 四種魚鱗中(A)膠原蛋白厚度，(B)溶出量及(C)SDS-PAGE比較

- 膠原蛋白層佔魚鱗厚度比例及溶出率: 虱目魚 > 鱸魚 > 烏魚 > 龍膽石斑魚。(圖9A、B)
- 兩種淡水魚(虱目魚及鱸魚)的膠原蛋白層厚度比例皆大於兩種海水魚(烏魚及龍膽石斑)(圖9A)，且淡水魚鱗萃取初期(前20分鐘)的溶出率約為海水魚鱗者的3倍。(圖9B曲線斜率)
- 推測海水魚以及淡水魚魚鱗以及膠原蛋白層厚度的差別是受到環境中鹽分、壓力、海流等影響。
- 四種魚鱗萃取1分鐘即可明顯看出皆含有 α_1 [I]、 α_1 [II]、 α_2 [II]膠原蛋白單體，且 α_1 含量多於 α_2 。(圖9C)



三、高效率萃取膠原蛋白

圖10. (A)虱目魚鱗魚鱗膠原蛋白萃取率及(B)熔點與時間關係圖

- 溶出率有兩階段，以20分鐘為分界點，第一階段主要由膠原蛋白層溶出，第二階段由分散在HAP骨架膠原蛋白溶出。(圖10A)
- 膠原蛋白含量: 膠原蛋白層約為HAP骨架層的 $(0.29g/0.19g) = 1.5$ 倍之多。(圖10A)
- 高效率萃取膠原蛋白時間為20分鐘，可萃取 $0.29g/(0.29+0.19)g = 60\%$ 的膠原蛋白，大於20分鐘萃取率大幅降低，浪費能源。
- 虱目魚鱗中含 $(0.29+0.19)g/1.5g = 32\%$ 膠原蛋白。
- 萃取液的熔點隨著萃取時間增長而上升，前7分鐘，熔點的改變幅度最大，此時的膠原蛋白溶出率高，濃度變化大。(圖10B)

圖11. 魚鱗膠原蛋白萃取液吸光度

- 煮1分鐘後，膠原蛋白的三螺旋便被破壞，233 nm 吸光度減少。(圖11)
- 煮越久260~280 nm的吸光度越高，顯示溶出的蛋白越來越多。(圖11)

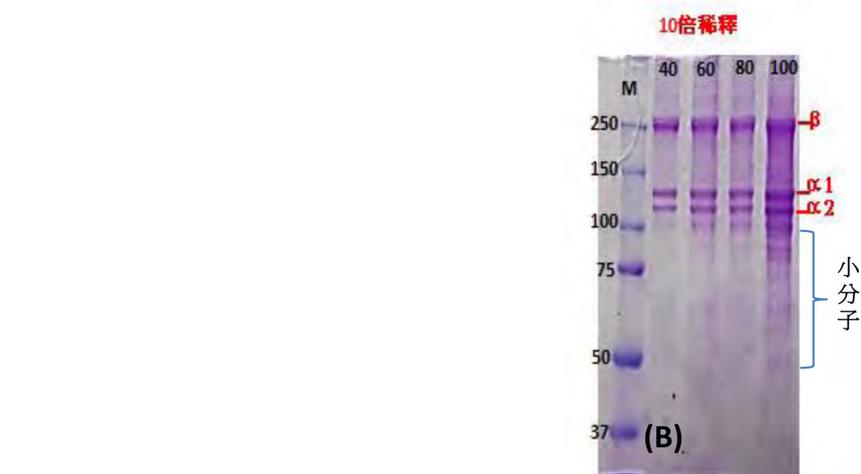


圖12. 煮1、5、120分鐘萃取液的(A)X光譜繞射譜圖、(B)萃取液SDS-PAGE

- 煮1分鐘時，萃取液裡明顯含有第一型與第二型膠原蛋白的三螺旋鏈，總量與單螺旋鏈相近。(圖12A 紫色曲線)
- 煮5分鐘之後，三螺旋結構的特徵峰已不明顯，顯示三螺旋結構已經大部分被分解。(圖12A 紅色與綠色曲線)
- 若需萃取三螺旋結構則須用短時間萃取。
- 與第一型膠原蛋白及明膠標準品比對，我們做出來的膠原蛋白萃取液有與其相同的特徵峰，且未出現雜蛋白。(圖12A、B)
- 隨著煮的時間增長，明膠越來越多，短鏈分子增多，小分子膠原蛋白濃度增大。

三、弱酸提升萃取率

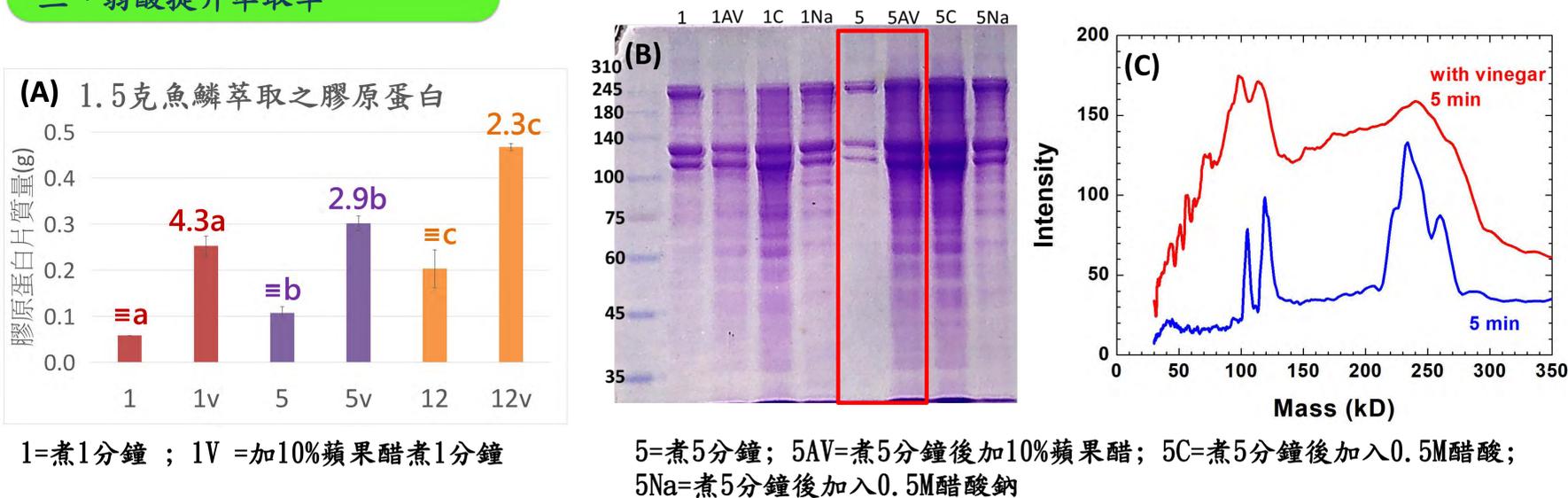


圖13. 加弱酸對所萃取膠原蛋白的(A)質量、(B)分子量、(C)濃度的影響。

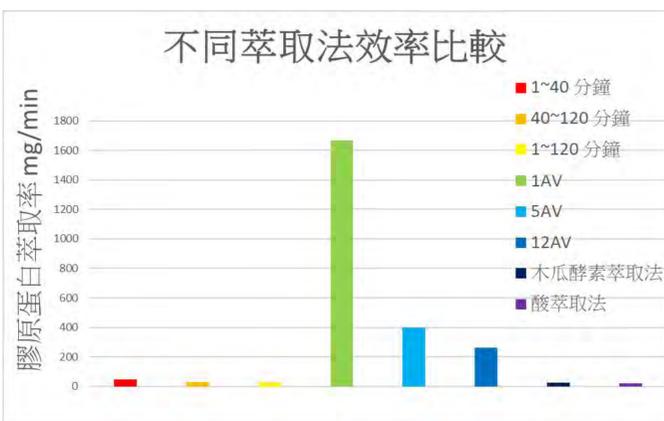
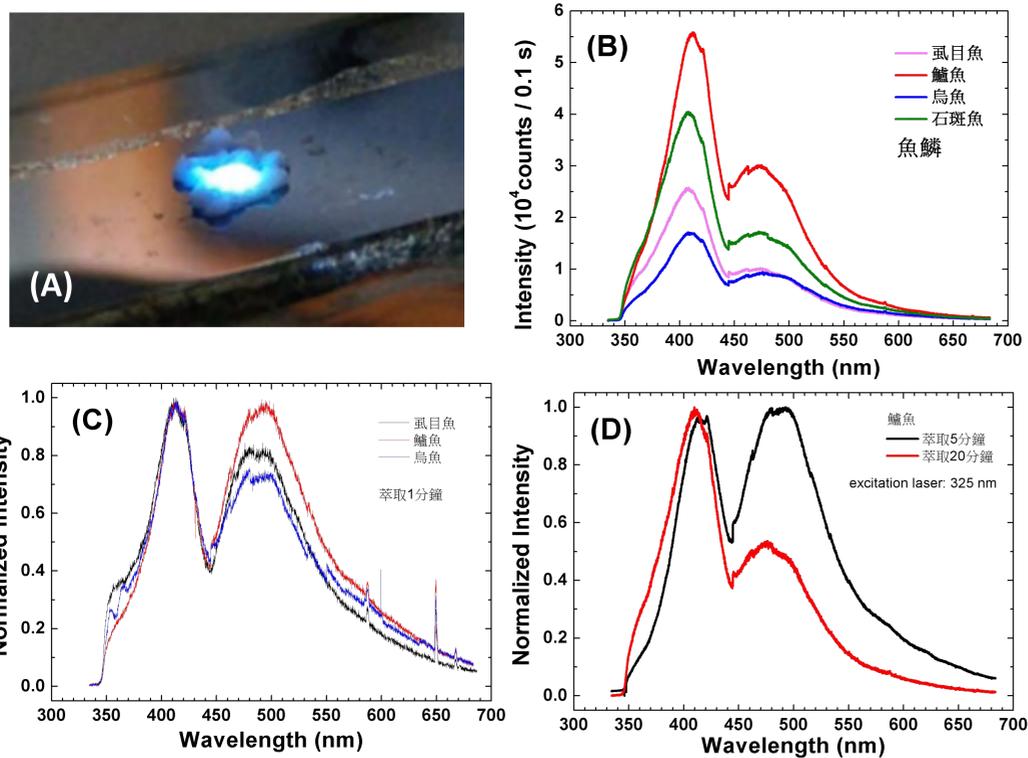


圖14. 本實驗不同組膠原蛋白萃取法、木瓜酵素分解法及酸分解法萃取效率比較

- 加了弱酸(10%蘋果醋)萃取率為沒有加的2~4倍，而且隨者萃取時間增加，加酸的強化效果逐漸降低。(圖13A)
- 加10%蘋果醋能增加魚鱗膠原蛋白的溶出，且使之分解成分子量小於100 kD的小分子蛋白質。(圖13B、C)
- 於煮5分鐘時加0.5M醋酸與加10%蘋果醋效果相似，加0.5M醋酸鈉效果不明顯。
- 溶出及膠原蛋白分解成小分子程度：0.5M醋酸 > 10%蘋果醋 > 0.5M醋酸鈉 > 對照組。
- 加10%蘋果醋煮1分鐘的萃取效率最高，效率為 1666 mg/分鐘，約為水煮120分鐘的64倍，木瓜酵素及酸萃取法的72倍。

四、強螢光激發



- 以325nm雷射光0.1mW即可自所萃取的膠原蛋白激發出肉眼可見的藍-綠螢光。(圖15A)
- 魚鱗本身在410nm藍光區和490nm綠光區都明顯出現螢光峰，顯示魚鱗含有至少2種螢光分子。(圖15B)
- 萃取時間短(小於5分鐘)：410nm及490nm螢光峰強度相近。(圖15C)
- 萃取時間較長：490nm螢光峰相對減弱許多。(圖15D)

圖15. 膠原蛋白萃取液(A)(C)(D)及魚鱗(B)之螢光光譜比較

結論

- 本實驗首度發現虱目魚魚鱗本身含除含有三螺旋的第一型膠原蛋白($2\alpha_1[\text{I}] + 1\alpha_2[\text{II}]$)外，還含有多量的第二型膠原蛋白($3\alpha_1[\text{II}]$)，及較少量但不可忽略的明膠(鬆散聚合的 α 單體、雙聚體及三聚體)。
- 魚鱗結構可區分為靠近魚身的膠原蛋白層與鄰近水域的骨質層，其中骨質層主要由氫氧機磷灰石奈米顆粒(~16 nm)與少部分明膠所組成，明膠作為氫氧機磷灰石顆粒間的交聯劑。
- 萃取虱目魚鱗膠原蛋白高效率節能的方法：100°C水煮20分鐘，即可萃取60%的膠原蛋白，若需萃取三螺旋膠原蛋白則水煮時間需小於5分鐘。加0.5M弱酸，可以提升萃取效率4倍之多。
- 虱目魚鱗所萃取的膠原蛋白，以0.1 mW、325 nm雷射光即可激發出肉眼可見的藍-綠螢光。

未來展望與應用

- 虱目魚早期病變檢測：
紫外線線型光源外側加可見光偵測器，掃描活體魚鱗所發出的螢光，以410 nm及490 nm螢光峰相對強度比例的改變，偵測魚體健康狀況。
- 癌症或發炎組織早期發現：
細胞在病變的早期，有些代表病變的marker會在細胞裡面與膠原蛋白結合，此種物質越多，膠原蛋白螢光越強，做為早期發現病變的微量檢測。

參考資料與文獻

1. A. A. El-Rashidy, A. Gad, A. El-Hay, G. Abu-Husseinc, S. I. Habiba, N. A. Badrd, A. A. Hashem, (2015) Inter. J Bio. Macromol. 79 618–626.
2. W. G John, (1980) Studies in biology 117 : 1-53.
3. Z. Fang, Y. Wang, Q. Feng, A. Kienzle, Werner, E.G. Mülle, (2014) Mater. Sci. Eng. C,145-152.