

中華民國第 60 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

第三名

052202

「鱗」漓盡致 - 以阻尼震盪量測魚鱗膠原蛋白
凍彈力及螢光光譜應用於魚健康情形即時監控

學校名稱：臺北市私立復興實驗高級中學

作者： 高一 廖韋俐	指導老師： 馬瑪宣
---------------	--------------

關鍵詞：魚鱗膠原蛋白、螢光光譜、阻尼震盪

摘要

本實驗發現虱目魚魚鱗的膠原蛋白以沸水萃取率高，分為兩個階段，前十分鐘即能萃取63%總膠原蛋白量，降低萃取溶液之 pH 值，除了增加萃取效率外，亦能幫助其斷鍵成更小分子的蛋白質，更有利人體吸收。蛋白質電泳、X 光繞射、細胞毒性試驗分析中顯示自魚鱗萃取出來的膠原蛋白純度高，不會對細胞造成傷害。以自製 3D 列印光桿杆結合阻尼震盪量化了魚鱗膠原蛋白凍的 Q 彈程度，發現膠原蛋白凍在 $10.6^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、約 50mg/mL 時有最佳的彈性，提供凍狀類食品口感調製的新興途徑。本實驗發現以 325 nm 紫外光激發魚鱗表面螢光，出現藍光(410 nm)及綠光(490 nm)螢光，可以進而利用其兩光的相對強度，判斷魚鱗的健康情形。

壹、研究動機

台灣為海島國家，擁有豐富的漁業資源，然而行走於漁獲市場經常看到魚鱗得扔棄，由於魚鱗當中有許多的膠原蛋白，於是本實驗想透過簡單又高效率的方式來萃取。在成功萃取出膠原蛋白後，我們將之製成膠原蛋白凍，並且發現其彈性在不同濃度樣本中有所不同，於是我們想訂定一套能量測凍狀類產品彈性的檢測裝置，然而現今市面上並無能精準量化食品彈性口感的標準化方法。在物理課堂中，提及了阻尼震盪的動能衰退機制以及光槓桿放大微量距離的實驗原理促使我們想結合兩者，進而發展設計出自製簡易的彈性檢測儀。最後本實驗意外發現魚鱗的自體螢光性，希望能透過數據分析，運用於魚健康情形的檢測系統，取代利用採樣來檢測魚池中的魚感染疾病與否。

文獻探討

一、膠原蛋白 (collagen) 占人體內蛋白質含量的三分之一，主要存在於結締組織的細胞外間質中，並發揮支撐細胞的功用，於是當人體流失膠原蛋白將導致皮膚皺紋、骨骼生長不完全、肌肉鬆垮等問題。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。第一型膠原蛋白本身為一種三螺旋結構的分子，由兩條 α_1 鏈與一條 α_2 鏈透過氫鍵纏繞而成，主要存在於皮膚、肌腱與韌帶中。市面上所販售的膠原蛋白食品是由成本較高的

低溫酸萃取法及酵素萃取法萃取而得，於是可以完整保持其三螺旋結構。然而當膠原蛋白進入腸胃，三股螺旋的結構會被破壞，切斷成小分子，最後分解成胺基酸。若以 60°C 以上的高溫萃取法，將萃取出單體的明膠分子，進入人體後的功效和三螺旋結構是等同的，於是本實驗選擇透過高溫萃取魚鱗中的膠原蛋白。

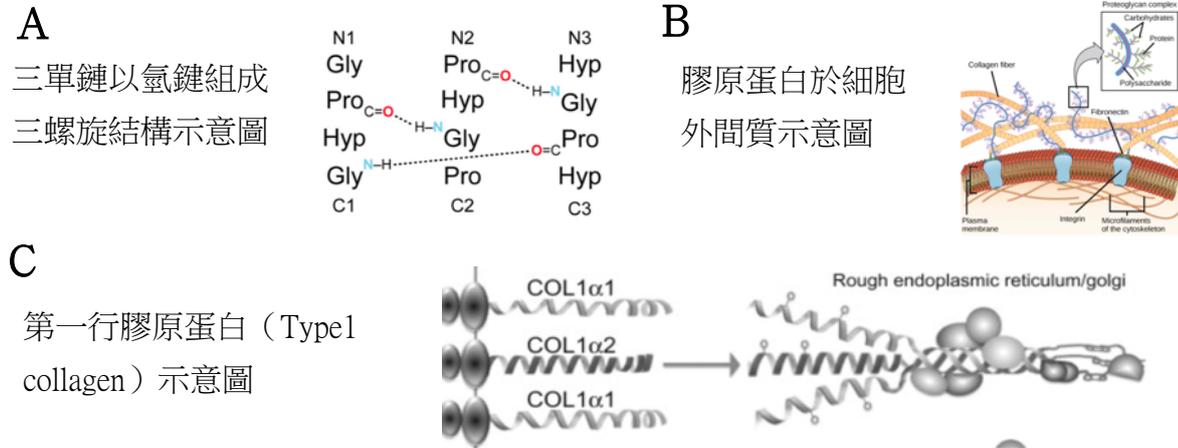


圖 1.A 圖自 (Matthew and Ronald, 2009) B 圖自 *OpenStax Biology*. C 圖自 (Neal S. Fedarko, in *Osteogenesis Imperfecta*, 2014)

二、阻尼所代指的意思是一種消耗能量的機制，一般的材料皆有阻尼效應，從微觀角度來講，一個材料構件因為受力而產生變形，使分子間有摩擦、撞擊或吸收導致能量損失，震動逐漸消逝，震盪動能漸漸轉換為其他形式的能量，即為「阻尼效應」。當施力於膠原蛋白凍可產生彈性形變。由於膠原蛋白凍具有黏滯性，因此所產生的振盪非體相性的簡諧運動而是一個振幅逐漸衰減的簡諧振盪。

(一) 欠阻尼情況(underdamped oscillator) $\gamma^2 < \omega^2_0$

欠阻尼表示系統將做振幅逐漸減小的週期性阻尼振動。系統的運動被不斷阻礙，所以振幅減衰，並且振動週期也是越來越長，經過較長時間後，振動停止。

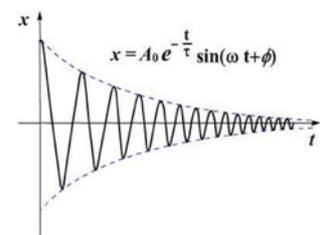


圖 2. 欠阻尼情況示意圖

貳、研究目的

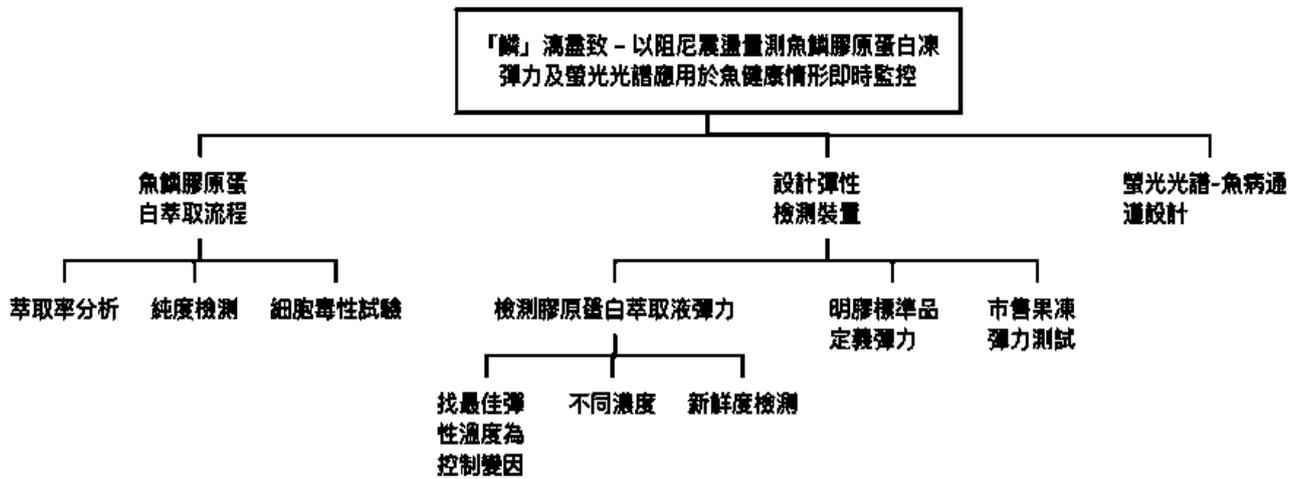


圖 3、本研究架構圖

- 一、魚鱗厚度、大小及顯微分析，探討最適宜萃取膠原蛋白的品種。
- 二、探討如何以家庭簡單設備最萃取出魚鱗中的膠原蛋白
 - (一) 以 100°C 沸水萃取
 - (二) 以 10%的梅子醋水溶液萃取
 - (三) 以 0.5M 之酸性溶液(醋酸、醋酸鈉)萃取
- 三、膠原蛋白萃取液吸收光譜、螢光光譜、分子量、X 光繞射、細胞存活率的檢測。
- 四、以自製阻尼震盪結合光槓桿裝置分析膠原蛋白凍的彈力效能。
 - (一) 不同溫度
 - (二) 不同濃度
 - (三) 不同放置時間
- 五、螢光光譜激發魚鱗自體螢光分析

參、研究設備及器材

<p>實驗生 物材料 及藥品</p>	<p>虱目魚魚鱗、檸檬(購自市場)、精鹽、梅子醋、醋酸、醋酸鈉、Acetone、tris、glycine、methanol、coomassie blue、glycerol、acrylamide、SDS、2-mercaptoethanol、bis-acrylamide、ammonium persulfate、Trypsin、Medium、trypan blue、L929 cell、Phosphate buffered saline、MTT、Dimethyl sulfoxide、DMSO</p>
<p>實驗器 皿及耗 材</p>	<p>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、塑膠盒、篩子、隔熱手套、培養盤、透明微量多孔盤、計數器、Tiefe depth profondeur 0.100 mm、蓋玻片、Pipet、Flask、Dish、Eppendorf、鐵板、砝碼、雷射筆、方格紙、市售果凍</p>
<p>實驗儀 器</p>	<p>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、加熱板、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、恆溫槽、螺旋測微器、螢光光譜儀、ELISA reader、迴轉式振盪器、額溫槍</p>
<p>軟體</p>	<p>spectra measurement、Kopa vision、OriginPro、tracker</p>

肆、研究過程或方法

一、魚鱗的觀察

(一) 解剖、複式顯微鏡觀察

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

1. 以螺旋測微器測虱目魚、龍膽石斑、烏魚、鱸魚魚鱗，每一片魚鱗測前、中、後六個樣區點，實驗三重複。
2. 以方格紙測量虱目魚魚鱗面積，實驗三重複。

二、魚鱗膠原蛋白萃取流程

(一) 魚鱗前置處理-泡鹽水去雜質

以 10%，1000mL 食鹽水置入 50g 的乾燥虱目魚鱗，以攪拌子攪拌 24 小時。

(二) 魚鱗前置處理-泡檸檬水去礦物質及腥味

以 10%，500mL，pH 值 3 的檸檬水，將魚鱗泡 0.5 小時後取出，以烘箱 40 °C 烘 24 小時。



圖 4. 以檸檬水清洗完的魚鱗置入烘箱將水分烘乾。

圖 5. 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

1. 以 100°C 純水將膠原蛋白溶出

以 200 mL 的去離子水，置於加熱板煮沸後，加入裝在茶包袋內的 10 克魚鱗及攪拌子，在加熱過程中以一分鐘 0.5 mL 的速度滴入純水，補充蒸發的水量。完成後用無菌水再將溶液加至 200mL，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。

2.以 100°C 醋水溶液將膠原蛋白溶出

將上方 1.步驟(以 100°C 純水將膠原蛋白溶出)中 200 L 的去離子水改為 180mL 的去離子水分別加上 10 % 的梅子醋 20mL、0.5M 醋酸、0.5M 醋酸鈉，煮 1、5、12 分鐘。

(四) 製作膠原蛋白樣品

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。將剩餘的魚鱗膠原蛋白萃取液，置入實驗需求的果凍盒，冰入 4°C 冰箱，製成膠原蛋白凍。



圖 6. 烘乾程序完畢



圖 7. 烘完之魚鱗膠原片正面

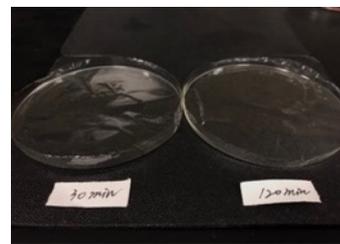


圖 8. 烘完之魚鱗膠原片側面



圖 9. 烘完之各組魚鱗膠原片，裝於夾鏈袋中保存



圖 10. 不同濃度之魚鱗膠原蛋白凍

三、純度檢測

(一) 魚鱗膠原蛋白萃取液的 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。

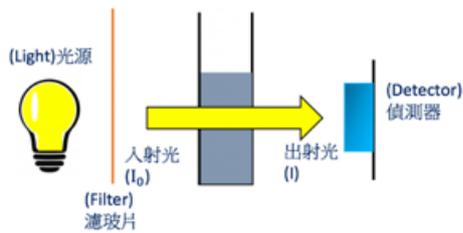


圖 11. 吸收光譜實驗以穿透式進行
圖為實驗架設示意圖

(二) 魚鱗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

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。

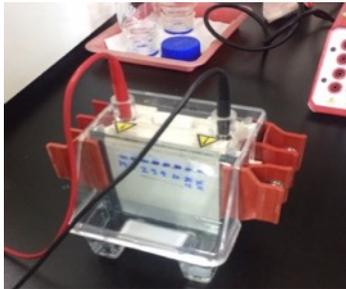


圖 12. 開始跑膠，先以 50V 跑 40 min，之後以 125V 跑 65 min

(三) 魚鱗膠原蛋白萃取液的 X 光繞射(XRD)測試



圖 13. 剪成 1X1 cm 的
魚鱗膠原蛋白片

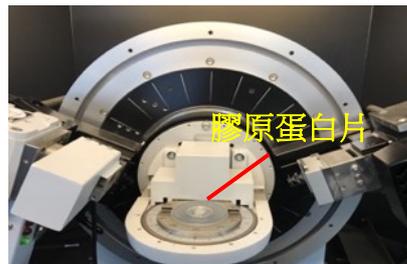


圖 14. Bruker D8-Advanced X 光繞
測儀及樣本擺放位置

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峰，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。

四、魚鱗膠原蛋白的細胞毒性測試

(一) 細胞培養程序-Day1:

1. 用滴管吸取 6ml PBS 溶液，加入至 T75 Flask 中，以輕微搖晃的方式潤洗細胞層。
2. 取 2 ml trypsin，加入至 Flask 當中，放入培養箱中培養 5 分鐘。
3. 用滴管加入 2 ml medium 於 Flask 中，取出所有溶液，置於一乾淨離心管。
4. 將離心管放置於離心機中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘。
5. 此時視分盤狀況需要，加入適量 medium，將全數溶液平均分配至分盤的容器當中。
6. 放入培養箱中繼續培養。



圖 15.(A)抽去所有溶液 (B)PBS 潤洗細胞層 (C)取 2 ml trypsin 加入 Flask (D)以 1500 rpm 離心 5 分鐘。

(二) 細胞計數程序-Day2 :

1. 取出 Tieve depth profondeur，擦拭其玻片與蓋玻片表面。
2. 取 Trypan blue 60 μ l 至於透明微量多孔盤中。
3. 將 20 μ l 準備液和 Trypan blue 混合均勻。
4. 此時將 Tieve depth profondeur 用倒立顯微鏡以 10X 物鏡觀看。
5. 數算區塊 1、2、3、4、5 中的細胞數目之後平均。
6. 此估計法為 A 在 100–200 之間時估計較準確。

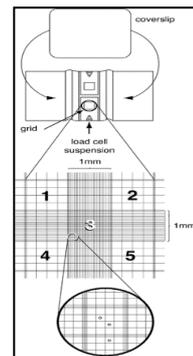


圖 16. 細胞計數概念圖

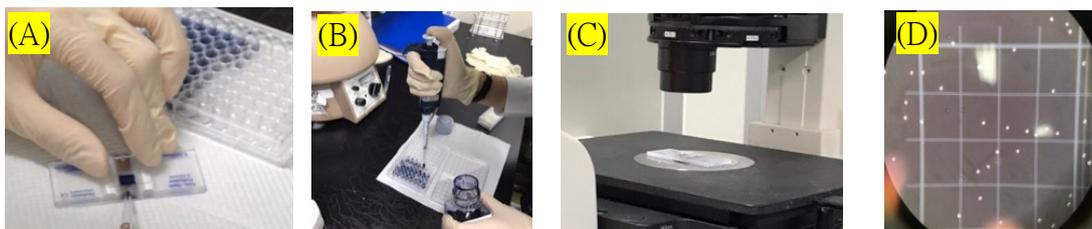


圖 17. (A) 取 Tieve depth profondeur 0.100 mm，於玻片 (B) 取 Trypan blue 60 μ l 於透明微量多孔盤 (C) 將 Tieve depth profondeur 用倒立顯微鏡以 10X 物鏡觀看 (D) 細胞計數

(三) 細胞置入實驗樣本程序-Day2 :

- 1.先將 200 μl PBS 倒入白色平底小盒。
- 2.把透明微量多孔盤中的 medium 抽去。
3. 將 1ml medium 置入 **Pipette Tips** 中，以 **Pipetting** 的方式稀釋不同濃度母液。
- 4.用八爪 Eppendorf 抽取 PBS 沖洗 medium。
- 5.將上方泡泡吸出後，由低濃度至高濃度分序加入 100 μl 實驗樣本（膠原蛋白片）。
- 6.於顯微鏡下觀察細胞是否完善，放入培養箱中繼續培養。



圖 18. (A) 取 PBS 沖洗 medium (B) 低濃度至高濃度分序加 100 μl 實驗樣本 (C) 顯微鏡下觀察 L929 細胞 (D) 放入培養箱中繼續培養

(三) 細胞測試吸光度程序-Day3 :

- 1.將 medium 抽去，200 μl PBS 洗一次。
- 2.（避光下）加 MTT 液（MTT: medium=1:9）每格 200 μl 。
- 3.用鋁箔紙包起透明微量多孔盤放進培養箱等 3~4 小時。
- 4.抽出溶液丟掉後，加入 200 μl DMSO。
- 5.用迴轉式振盪器 轉速 100 rpm 晃 10 分鐘。
- 6.以 ELISA reader 測試吸光度值。



圖 19. (A) 避光下加 MTT 液 (B) 以 ELISA reader 測試吸光度值

五、自製 3D 列印光桿杆彈力擺動振盪膠原蛋白凍彈力效能分析

1. 在鐵板下放四個黏土圓柱體以吸震。
2. 將平衡裝置固定於鐵板上，裝上反射面鏡。調整雷射入射光源位置使與待測物未移動前的高度相同，並使入射光徑垂直入射反射鏡面，使光源的入射角 $\theta = 0^\circ$ 。
3. 利用額溫槍確認帶側凍狀樣本濃度，放於定溫系統中。
4. 使光槓桿投影在屏幕同一出發線後，使之自由落下，錄製投影位置在方格紙上的變化情形，再利用 tracker 繪製走勢圖再後製成 origin。

自製 3D 列印光槓桿彈力震盪架設：

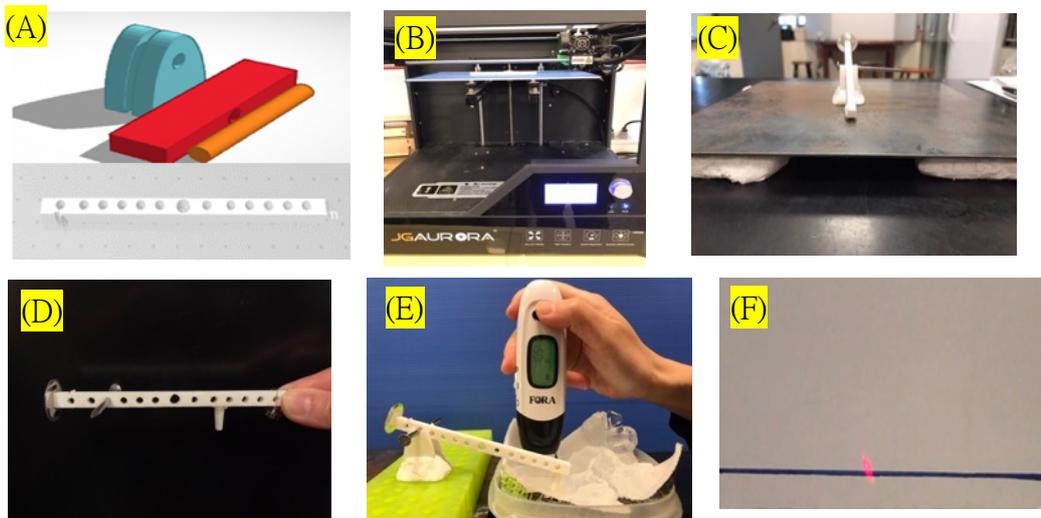


圖 20. (A) 改造 tinkercad 的樣本 (B) 3D 列印過程 (C) 置黏土圓柱體以吸震 (D) 3D 列印桿及反射鏡 (E) 控溫之阻尼測量系統 (F) 投影於前 3.2m 方格紙屏幕

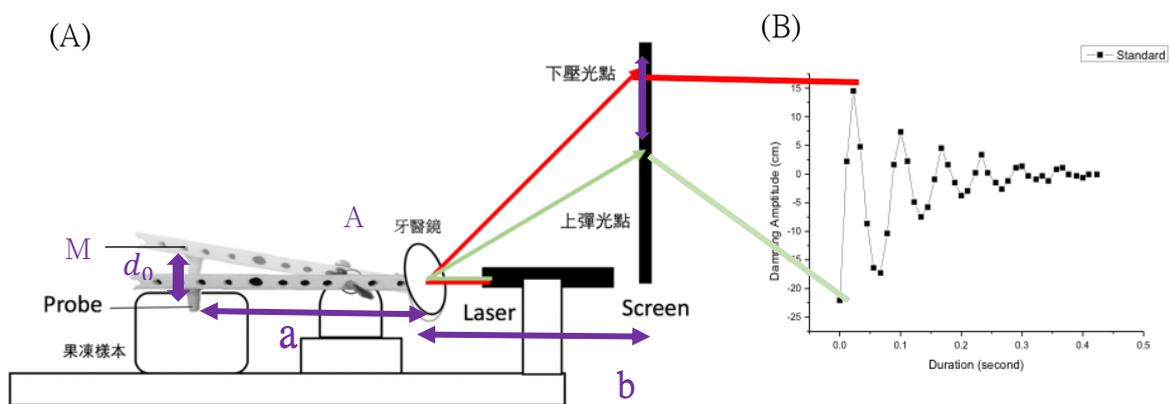


圖 21. (A) 自製 3D 列印光桿杆阻尼分析架設 (B) Origin 繪製出光點移動方式

$$\frac{D}{b} \approx \frac{2d_0}{a} \Rightarrow d_0 \approx \frac{aD}{2b}$$

d_0 :帶測物移動的實際距離。

D:帶測長度 d_0 在屏幕上幾近線性放大的長度量。

a:反射鏡面與 probe 間的距離。

b:反射鏡面與光徑投影屏幕間的距離。

本實驗的自製光槓桿，將帶測物移動的實際距離放大 35 倍於投影幕上以便精密測量。

說明：光槓桿能將微小的差距透過反射定律極大化，幫助精密測量。圖 20 為架設示意圖，將合適的鐵釘插入 3D 列印桿的孔洞，調整擺放平衡後，將 3D 列印桿抬起約 1.5 公分，使之對準屏幕起始線後自由落下。當探針下壓果凍樣本時，反射鏡會反射雷射筆光源，產生較高的反射光點於屏幕上，當探針上彈時，則會產生較低的反射光點。A 設為支點，雷射筆即打燈處，鏡面因儀器受到振動會擺幅至 M，實際差距為 d_0 ，反射出來的差距為 D，利用雷射光打到鏡面在牆上投影來放大膠原蛋白凍的微小形變。並使用攝影機將光點的運動情形錄下後，放入電腦中，利用 tracker 軟體繪製出光點位移對時間的圖形。此裝置能將微小的差距，放大為可以量測的距離，增加穩定性並減小誤差。

六、魚鱗螢光光譜測定

- 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

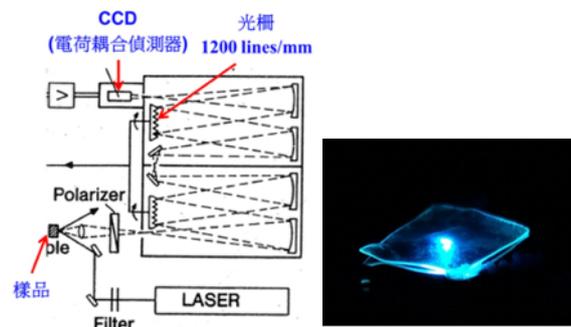


圖 22.螢光光譜測定裝置示意圖及螢光激發實際情形

伍、研究結果

一、魚鱗的觀察

(一) 解剖、複式顯微鏡觀察

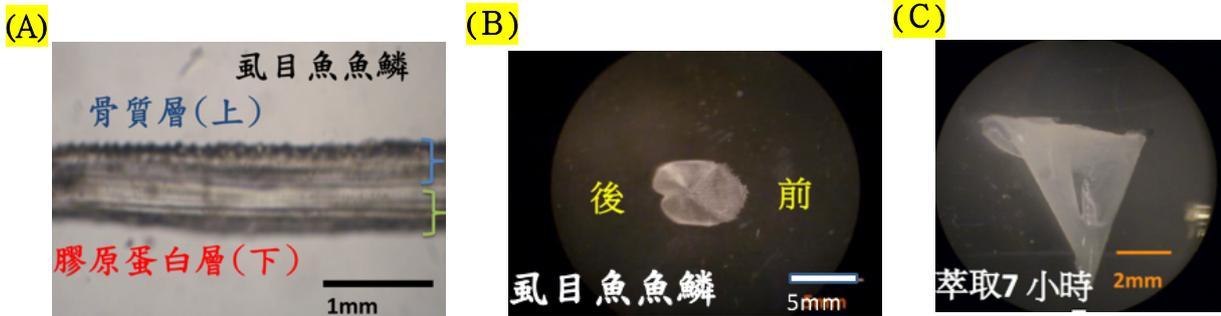


圖 23.虱目魚魚鱗(A)縱切面(B)正面觀(C)萃取七小時後變形情形(D)手繪魚鱗構造

1.魚鱗橫切圖顯示可區分為兩種層狀結構(圖 23-

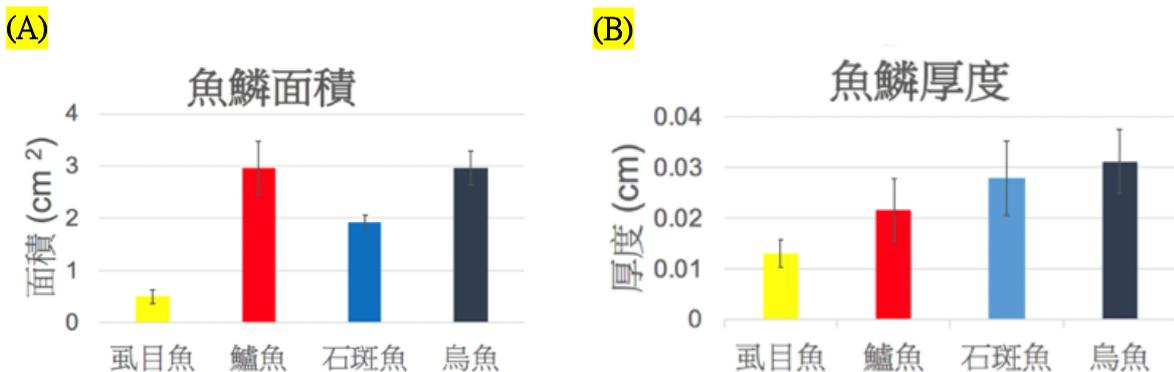
A)，下層主要成分為膠原蛋白，上層外圍呈鋸齒狀，由膠原蛋白支撐氫氧基磷灰石所組成。

2.魚鱗表面平整(圖 23-B)，萃取 7 小時後，魚鱗的

測部、後部、前部呈現明顯捲曲(圖 23-C)，顯示膠原蛋白溶出後，氫氧基磷灰石失去支撐，由邊緣向中心捲成質地脆易碎三角形。

圖 23. 魚鱗(A) 側面觀 (B) 正面觀 (C)萃取 7 小時 (D) 魚鱗手繪各部位示意圖

(二) 不同魚種厚度、大小、萃取率分析



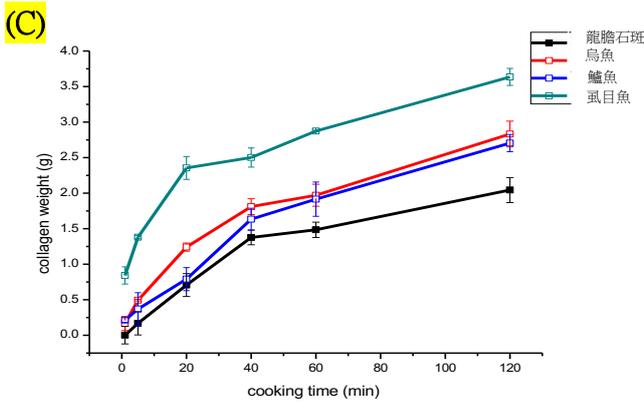


圖 24.不同品種魚鱗(A)平均面積比較、(B)平均厚度比較、(C)膠原蛋白萃取率比較

說明：由這三個實驗的結果，可以得知虱目魚魚鱗面積最小，厚度最薄，且每分鐘的萃取率最高，因此最適合來做膠原蛋白彈力凍，因此選用虱目魚魚鱗做以下實驗。

二、魚鱗膠原蛋白萃取液的效率分析

(一) 以純水萃取虱目魚魚鱗的膠原蛋白萃取效率

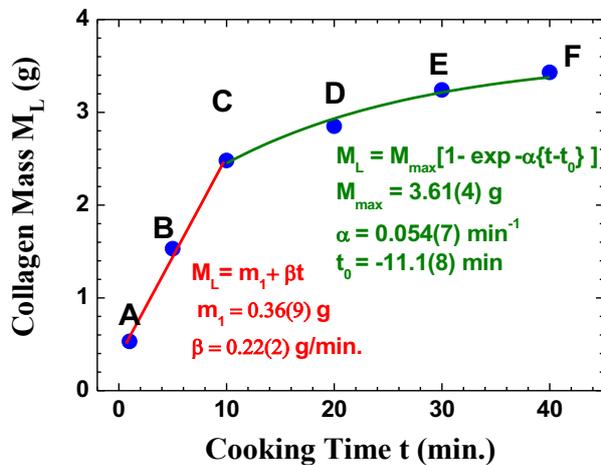


圖 25.煮不同時間虱目魚魚鱗膠原蛋白萃取率分析(原始魚鱗重 10 g)
 A = 1 min ; B = 5 min ; C = 10 min ;
 D = 20 min ; E = 30 min ; F = 40 min
 $\beta = 0.22 \text{ g/min}$ ，1~10 分鐘，每分鐘之萃取率； $\alpha = 0.054 \text{ g/min}$ ，10~40 分鐘，每分鐘之萃取率。分析：0~10 分鐘萃取率為 10~40 分鐘之 4.07 倍。

1. 由圖 25 可知，100°C 水煮萃取膠原蛋白可以分成兩階段。第一階段為 0~10 分鐘，溶出速率為線性曲線，第二階段為 10~40 分鐘，溶出率為自然對數但漸趨飽和之成長曲線。
2. 0~10 分鐘第一階段溶出率為 0.22 g/min，而且第 1 分鐘就以溶出 0.36 g 膠原蛋白，根據實驗數據，10g 魚鱗總共可煮出 3.84 g 膠原蛋白，因此 1 分鐘就可煮出約 10%魚鱗膠原蛋白，10 分鐘可煮出 2.45 g，佔 63%總膠原蛋白量。
3. 萃取 10 分鐘為最大經濟效益之快速萃取廢棄魚鱗的膠原蛋白。

(二)以 100°C 醋水溶液將膠原蛋白溶出

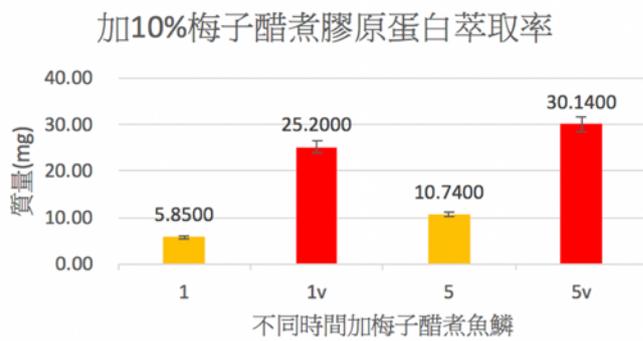


圖 26.用 10%梅子醋水煮 1、5 分鐘魚鱗膠原蛋白與純水萃取重量比較。

1. 本實驗的數據已經扣除 10%梅子醋之溶質重量 2mg。
2. 由圖 26 可知，加了梅子醋膠原蛋白萃取效率皆比純水萃取的對照組好約 2~5 倍，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。

三、 純度檢測

(一) 膠原蛋白萃取液的吸收光譜

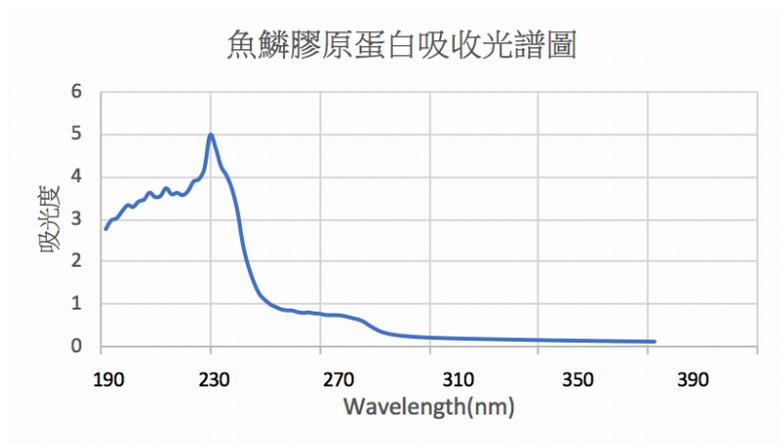


圖 27. 虱目魚魚鱗膠原蛋白萃取液吸於波長 200 nm~ 390 nm 之吸收光譜

1. 233 nm 吸收峰是三螺旋膠原蛋白的特徵峰(參考文獻 3)，本實驗數據顯示於 100°C 水煮虱目魚鱗後，溶於水中之物質以膠原蛋白為最多，純度高，在波長 233nm 有最高吸收峰。

2. 因 100°C 煮的時間較久，魚鱗溶出的膠原蛋白越多，結合 SDS 蛋白質電泳結果，有些膠原蛋白分子鏈斷裂成不同較小分子量的膠原蛋白，因此在紫外線其他的波長範圍(190~230 nm) 也有吸收峰。

(二) 膠原蛋白萃取液的蛋白質電泳(SDS PAGE)

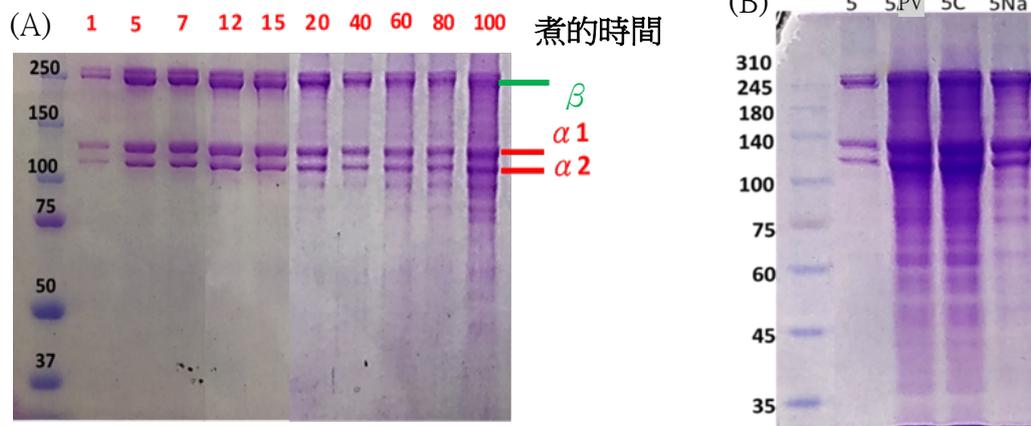


圖 28. (A)100°C 水煮魚鱗不同時間的 SDS PAGE 結果 (B) 100°C 加酸性溶液萃取魚鱗 5 分鐘 SDS-PAGE。5PV:以 10%梅子醋加熱萃取 5 分鐘; 5C:加 0.5M 醋酸加熱萃取 5 分鐘; 5Na:加 0.5M 醋酸鈉加熱萃取 5 分鐘。

圖 28(A) 說明：

1. tracker 程式計算分子量： $\alpha 1$ chain = 127kD， $\alpha 2$ chain = 115 kD， β chain = 248 kD， γ chain = 329。為第一型膠原蛋白三個螺旋鏈單體 α 、雙聚體 β 、三聚體 γ 分子量特徵。
2. 膠原蛋白三螺旋分子為兩個 $\alpha 1$ 鏈，一個 $\alpha 2$ 鏈組成，故圖中 $\alpha 1$ band 比 $\alpha 2$ 顏色深。
3. 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，大部份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。煮的時間在 60 分鐘之後，有小分子的膠原蛋白出現，推測加熱提供的能量足夠時，可以將大分子膠原蛋白/明膠，單鏈分子間的鏈結破壞而變成小分子。
4. 由膠原蛋白 SDS 圖可知：**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 28(B)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，萃取 5 分鐘，進行加入不同酸性溶液萃取的實驗。
- 2.實驗結果發現，加 10%梅子醋、0.5M 醋酸、0.5M 醋酸鈉，煮 5 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.以萃取 100°C 5 分鐘為例，加 10%梅子醋、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 5 分鐘的四個組，膠原蛋白的溶出率及斷鍵成小分子的程度為：0.5M 醋酸（5C）> 10%梅子醋（5PV）> 0.5M 醋酸鈉（5NA）> 對照組（5）。

（三）膠原蛋白萃取液的 X 光譜繞射譜圖

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 0.01 奈米到 10 奈米範圍的 X 光，可用來探測魚鱗中分子的結構。

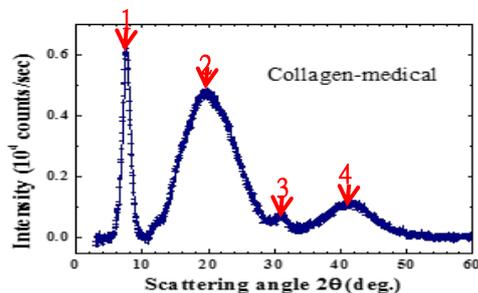


圖 29.第一型膠原蛋白標準品 X 光譜繞射譜圖

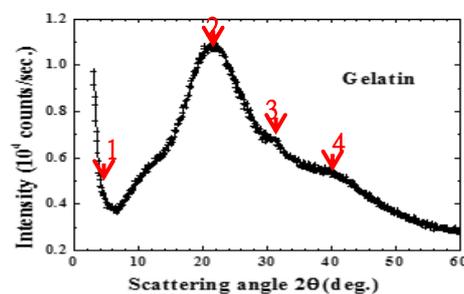


圖 30. 明膠標準品 X 光譜繞射譜圖

1. 由圖 29、30 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， $d_1 = 1.17$ nm， $2\theta = 14^\circ$ 時， $d_2 = 0.63$ nm， $2\theta = 32^\circ$ 時， $d_3 = 0.28$ nm， $2\theta = 40^\circ$ 時， $d_4 = 0.25$ 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 (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 1），差異在於分子結構不同但本質相同

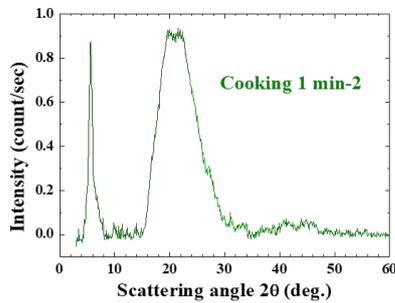


圖 31. 100°C 煮魚鱗，1 分鐘的 XRD 譜圖

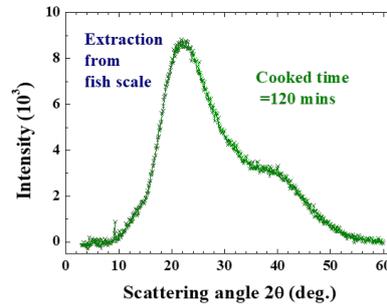


圖 32. 100°C 萃取魚鱗 5 分鐘的 XRD 譜圖

1. 比對膠原蛋白與明膠標準品 XRD(圖 29,30)，以 100°C 萃取魚鱗一分鐘後(圖 31)，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，而萃取 120 分鐘(圖 32)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。

四、不同濃度膠原蛋白對細胞存活率的影響

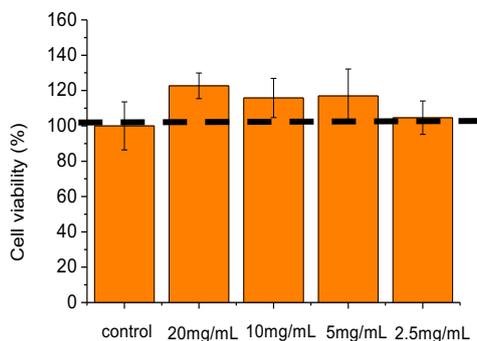


圖 33. 膠原蛋白細胞活性測試結果

MTT 細胞活性測試顯示，相較於對照組，濃度 2.5 mg/ml 之膠原蛋白並未造成細胞死亡，而且有增加 2~20%，濃度較高的含膠原蛋白培養液(20 mg/ml)促進細胞生的情形較佳。本實驗證實膠原蛋白並不會對細胞造成毒害。

五、自製 3D 列印光桿杆彈力擺動振盪膠原蛋白凍彈力效能分析

(一) 定義說明

1. Q 度(Q degree)：下壓阻尼震盪，下壓果凍時，震盪曲線反射向曲線上方光點(紅線)
2. 上彈(Elastic)：拖曳阻尼震盪，果凍上彈時，震盪曲線反射向曲線下方光點 (藍線)
3. 阻尼彈力公式： $A = A_m \exp(-\alpha t^\beta)$ ， α = 阻尼係數， β = 時間指數

α_Q =下壓 Q 度阻尼係數； α_E =上彈 阻尼係數

4. 下壓 Q 度：衰退較緩(α_Q 值較小)→若時間指數相同，凍反彈力較強→凍較 Q
5. 回彈程度：衰退較緩(α_E 值較小)→若時間指數相同，凍彈力較強→較彈牙

(二) 魚鱗膠原蛋白萃取凍彈力檢測

1. 不同溫度的凍彈力效能分析

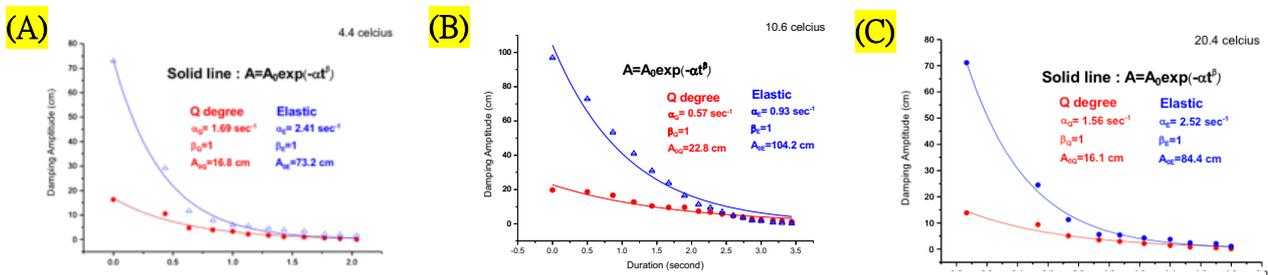


圖 34.(A)4.4°C (B) 10.6°C (C) 20.4°C 膠原蛋白凍阻尼分析

	4.4 °C	7.2 °C	10.6 °C	14 °C	16.7 °C	18.3 °C	20.4 °C
α_Q	1.69	2	0.57	0.97	1.08	1.36	1.56
α_E	2.41	2.04	0.93	1.44	1.44	2.05	2.52

表 1.不同溫度膠原蛋白凍阻尼係數

將溫度當作操縱變因，以萃取出濃度最高的 66mg/mL 的膠原蛋白凍樣品進行阻尼震盪分析，實驗結果顯示：

- (1) 10.6°C±0.5°C 時有最小的 α_Q 及 α_E 值，也就代表其動能消耗的最緩，彈力狀況佳。
- (2) 4.4°C±0.5°C 彈力狀況差，低溫時分子間氫鍵作用強，整體狀況偏硬，動能散失。
- (3) 20.4°C±0.5°C 彈力狀況差，高溫時氫鍵作用弱，整體狀況偏軟，動能被吸收。
- (4) 因此後續實驗決定選用 10.6°C±0.5°C 當作控制變因測量凍狀類產品彈性。

2.不同濃度的凍彈力效能分析

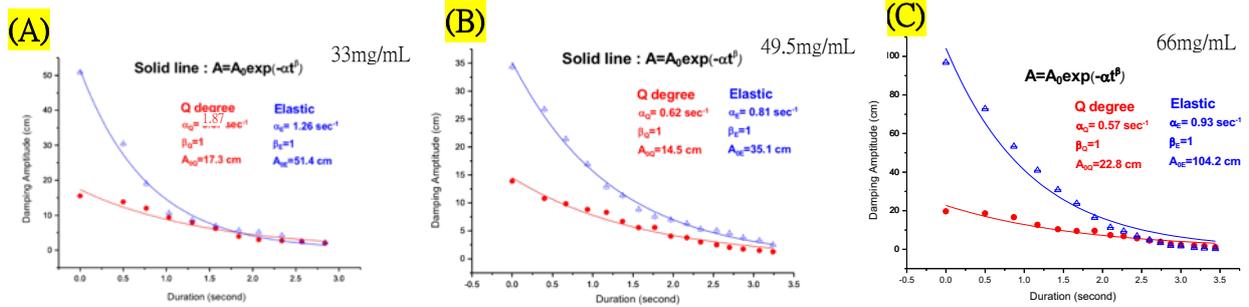
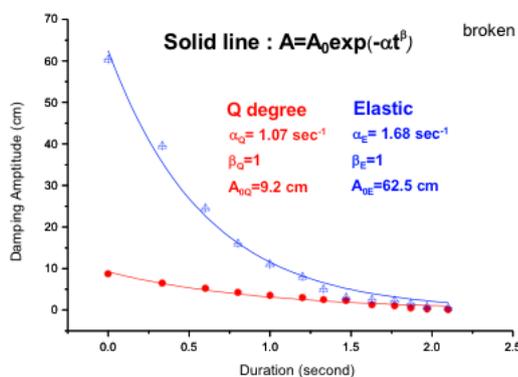


圖 35.(A)低濃度 33mg/mL (B) 中濃度 49.5mg/mL(C) 高濃度 66mg/mL 膠原蛋白凍阻尼分析

將溫度當作控制變因， $10.6^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 時，以萃取出濃度最高的 66mg/mL 的膠原蛋白凍樣品進行序列稀釋，稀釋成 75% 及 50%，進行阻尼震盪分析，實驗結果顯示：

- (1)圖 A(低濃度)，Q 度阻尼系數為 1.87，上彈阻尼系數為 1.26，衰退時間相較其他樣本快，又以下壓時間最快，凍太軟所造成，濃度為適合老人及孩童的綿密口感。
- (2)圖 B(中濃度)，Q 度阻尼系數為 0.62，上彈阻尼系數為 0.81，衰退時間相較其他樣本慢，下壓時間為全部樣本中最慢，其 Q 度最佳。咬下最初的口感豐富，阻尼震盪明顯。
- (3)圖 C(高濃度)，Q 度阻尼系數為 0.57，上彈阻尼系數為 0.93，衰退時間相較其他樣本快，但比低濃度來的慢，推測凍太硬所造成，濃度為類似羊羹類產品的口感。

3.新鮮度彈力效能分析



放置半個月的膠原蛋白凍上頭有明顯黴菌，凍的結構被破壞，似乎被黴菌所分解，表面成水狀，整體彈性狀態減弱。相較於原狀態(Q 度阻尼系數為 0.57，上彈阻尼系數為 0.93) 其 Q 度阻尼系數為 1.07，上彈阻尼系數為 1.68。

圖 36.壞掉的膠原蛋白凍阻尼分析

(二) 明膠標準品彈力檢測

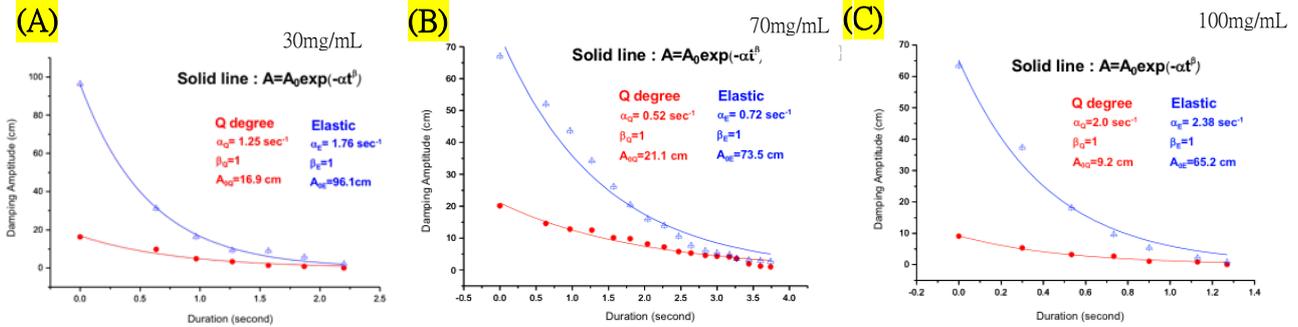


圖 37.(A)低濃度 30mg/mL (B) 中濃度 70mg/mL(C) 高濃度明膠凍阻尼分析 100mg/mL

將溫度當作控制變因， $10.6^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 時，量測不同濃度的明膠標準品。

- (1)圖 A(低濃度)，Q 度阻尼系數為 1.25，上彈阻尼系數為 1.76，衰退快，凍的質感較軟。
- (2)圖 B(中濃度)，Q 度阻尼系數為 0.52，上彈阻尼系數為 0.72，衰退慢，彈性最佳。
- (3)圖 C(高濃度)，Q 度阻尼系數為 2.0，上彈阻尼系數為 2.38，衰退快，凍的質感較硬。

mg/ml	30	40	50	60	70	80	90	100
α_Q	1.25	0.71	0.52	0.65	0.52	0.52	1.19	2
α_E	1.76	0.86	0.75	0.93	0.72	0.75	1.39	2.38

表 2.不同濃度明膠阻尼係數

(四) 市售果凍彈力檢測

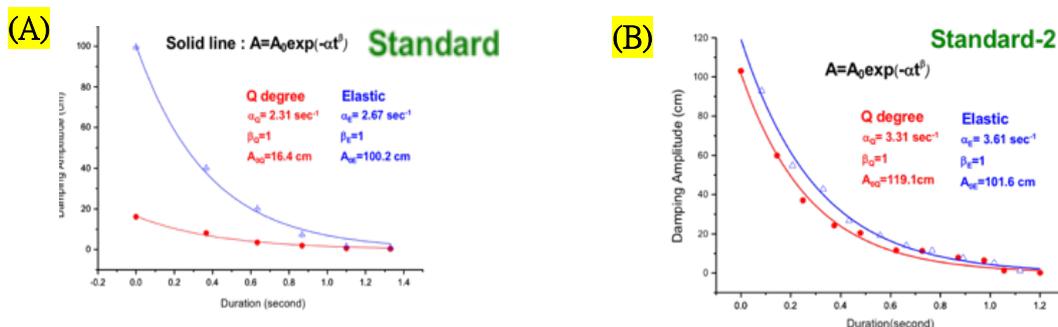


圖 38.市售標準品(A)未添加椰果(B)添加椰果阻尼分析

- (1) 市售一號果凍（未添加椰果）Q 度阻尼系數為 2.31，凍的 Q 彈口感較市售一號強，較 Q。上彈阻尼系數為 2.67，彈牙效應亦比市售一號強，以上結果證明不添加配料的市售果凍得已保持其原本支撐體結構，口感較佳。以下的自製膠原蛋白凍樣本已市售標準品為 Q 彈參考標準而分析。

(2) 市售二號果凍（添加耶果）Q 度阻尼系數為 3.31，衰退時間很短，凍的反彈力弱，不 Q。上彈阻尼系數為 3.61，彈牙效應不強烈。市售果凍一般多添加凝固劑，其在水中能緩慢水解為葡萄糖酸，降低溶液的 pH 值，在一定程度上中和蛋白質的負電荷，使其容易聚集，受到以疏水相互作用的影響，蛋白質同樣能形成網絡結構，得到凝膠，但 Q 彈口感則會因為內容物的添加，整體結構被破壞所影響。

六、 膠原蛋白螢光光譜分析

(一) 魚鱗本身及其膠原蛋白萃取液的螢光光譜分析

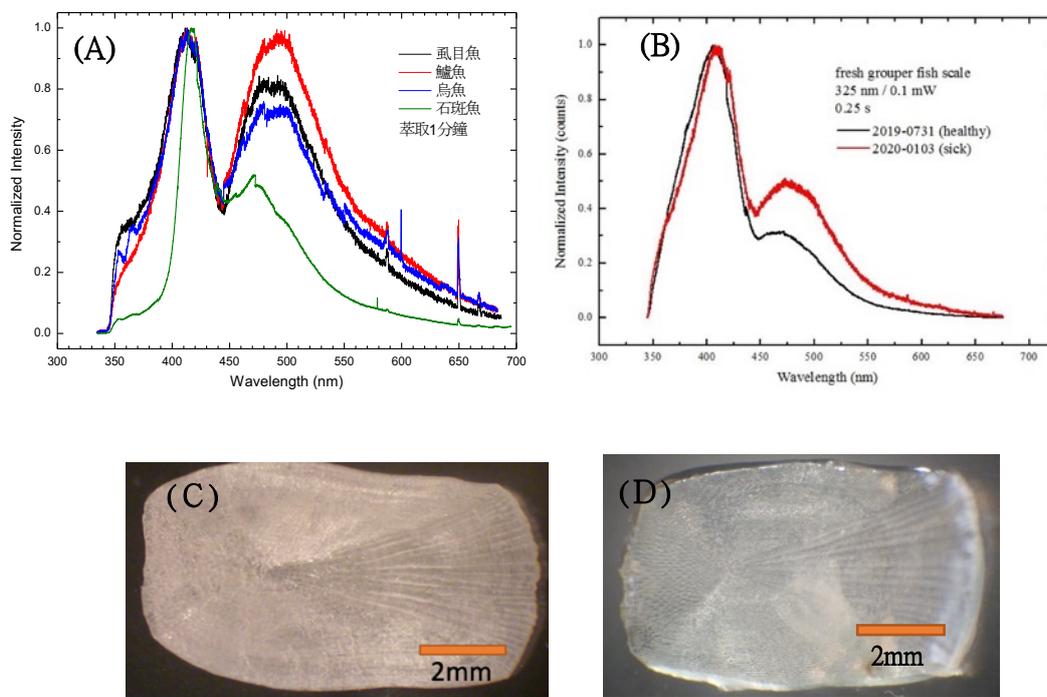


圖 39. 膠原蛋白萃取液及魚鱗之螢光光譜比較 (A) 四種魚鱗膠原蛋白萃取液螢光光譜 (B) 新鮮石斑魚魚鱗及生病之石斑魚魚鱗螢光光譜 (C) 新鮮石斑魚魚鱗 (D) 生病之石斑魚魚鱗，表面有粉紅色斑點，而且周圍有細微的毛毛絲。

1. 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。

2. 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，兩個吸收峰值顯示四種魚鱗膠原蛋白萃取物皆至少含有 2 種發螢光分子(圖 39A)。

3. 承 2，可以利用膠原蛋白發螢光的特性，利用已知膠原蛋白濃度配置標準液，檢測市面上的膠原蛋白產品實際含量，為檢測膠原蛋白純度的實際應用。

4. 取自屏東養殖魚場的生病石斑魚魚鱗有明顯紅斑，須再請專家鑑定疾病，可發現其與健康魚鱗螢光光譜不同，後者於 410 nm 吸收峰有明顯增強的趨勢，利用此特性可以設計一個檢測生病魚的自動偵測通道如圖 39(B)。

(二) 魚病自動化檢疫通道

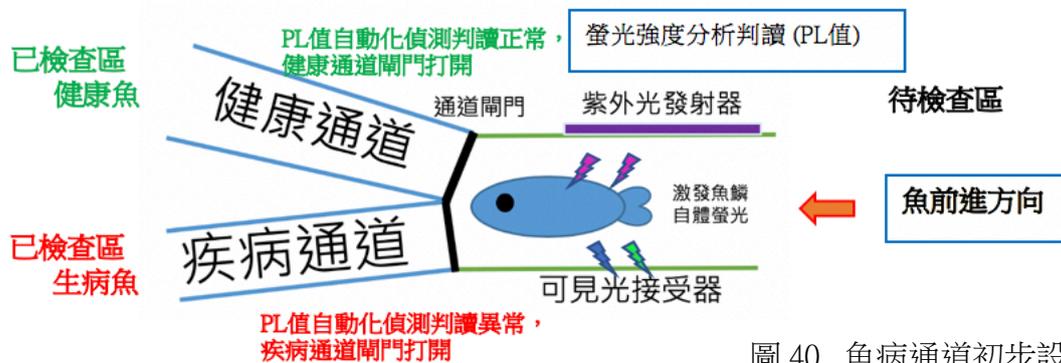


圖 40. 魚病通道初步設計

在魚塢水池中設計一個魚病自動檢測通道，魚塢分為三區，1.未檢查區，2.已檢查且判讀為健康魚區，3.已檢查病判讀為生病魚區。利用魚鱗螢光光譜的結果，在通道發光區一側用包含紫外線波長 325 nm(飛利浦 T 8 燈管)的燈管作為激發光源，另一側用光電二極體作為接收訊號端。自動化偵測器能夠判讀所接收的螢光光譜數據(以 Android Studio 開發程式)，設定判讀臨界點，定義健康魚與生病魚的螢光光譜讀值，判讀為健康，則健康通道閘門開啟，判讀為生病，則生病魚通道開啟，引導魚游向正確的魚塢分區。另外，在生病的魚塢區加入藥劑，隔離多日，等生病魚恢復之後，再放回健康魚塢。

陸、討論

一、近年來，「膠原蛋白」在生技產業備受矚目，以然成為我們日常生活中常見的美容食品，而市售的膠原蛋白主要分為塗抹型、食用型以及注射型，然而這些真的能補充人體膠原蛋白的不足嗎？膠原蛋白主要存在於皮膚的真皮層，塗抹型膠原蛋白難以到達，頂多於生物體表面形成薄膜，然而由於膠原蛋白有吸收紫外光的功效（膠原蛋白萃取液的吸收波長範圍約為 200~300 nm，233nm 為膠原蛋白三螺旋結構的吸收峰），因此在吸收陽光紫外線的方面，確實有其實用性。市面上食用型的膠原蛋白大多由成本較高的酵素萃取法及酸萃取法所製得而成，較易保留膠原蛋白的三螺旋結構，但經由人體食用後，都將被分解成明膠、小分子胜肽及氨基酸，於是其功效和水煮萃取法是相同的，皆能提供人體較多製造膠原蛋白的來源。最後，注射型膠原蛋白為三螺旋結構，大多經過程序步驟以去除免疫端，而本實驗水煮萃取法在 5 分鐘內亦能從 X 光繞射發現其三螺旋結構，然而由於其末端為鬆散結構，容易導致人體免疫反應。

二、躋身在海島國家，台灣擁有著豐富的漁業資源，然而在食品加工過程中，往往有許多魚鱗被扔棄。在文獻資料中得知，魚鱗是高度有序的第一型膠原蛋白和氫氧基磷石 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ 的生物複合材料(參考文獻 2)。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、角膜等都有第一型膠原蛋白(參考文獻 5)。

三、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。而本實驗的“萃取不同時間虱目魚鱗溶出膠原蛋白質量”結果顯示魚鱗可以溶出率至少分為兩階段，外層在第一階段萃取 0~10 分鐘多為纖維層的膠原蛋白溶出率約為第二階段煮 10~40 分鐘的 4 倍，所以較有效率的萃取方法是利用大量的魚鱗，萃取較短的時間，約十分鐘內即可。(圖 41)

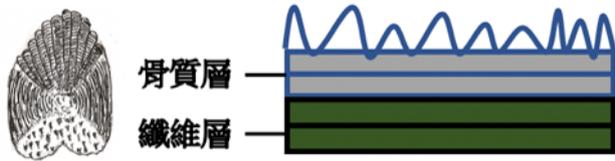


圖 41. 魚鱗的縱切結構

四、膠原蛋白的應用

100°C 水煮魚鱗可萃取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%。隨著萃取時間增長，小分子膠原蛋白比例增多，較有利於人體吸收，能消除皺紋。

- (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。

五、100 °C 水萃取虱目魚魚鱗膠原蛋白、加梅子醋水溶液 100 °C 萃取虱目魚魚鱗之膠原蛋白成本及其他市售廠牌價錢比較

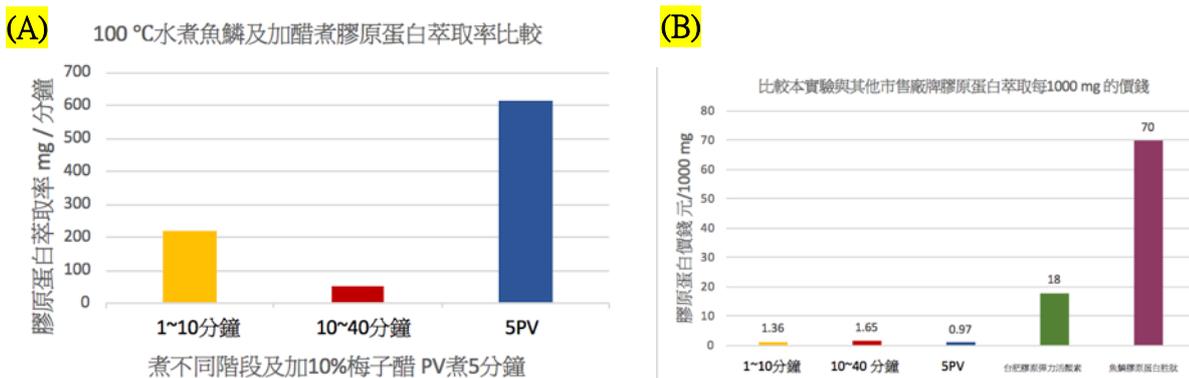


圖 42. (A) 魚鱗膠原蛋白萃取效率 (B) 魚鱗之膠原蛋白其他市售廠牌價錢比較

- (一) 以每分鐘之萃取效率而言，加 10%梅子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 5 分鐘萃取效率高，扣除梅子醋的溶質重，每分鐘可萃取 616mg，約為水煮 1~120 分鐘的 23 倍。
- (二) 100°C 水煮的效率以 1~10 分鐘最高，因為魚鱗層的膠原蛋白較易被溶出。

(三) 本實驗的 5 分鐘加醋煮魚鱗萃取膠原蛋白成本，約為市售的膠原蛋白價錢的 1%~5%。

六、在食用凍狀類食品時，口感往往是決定產品成功與否的一大要素，然而現今市面上卻沒有一套完整訂定彈性的機制或標準方法。目前市面上多以楊氏係數來判定一個材質的軟硬程度，然而往往不能精準的以數據方式呈現出產品的彈力。本實驗結合了阻尼震盪的物理原理，由於彈性機制本身即是一個保存動能的系統，若要定義一個物體的彈性越好，其動能保存率理應越高。而阻尼震盪系統正是一個能量衰退的機制，且從其公式上來看，當其阻尼係數越小時，就代表其能量衰退的越緩慢，能量保存狀態較良好。於是本實驗利用阻尼震盪的物理意義來檢測凍狀類食品的彈力性質，發展出一套標準系統，並以明膠標準品做出對照係數，提供食品科學產業定義產品彈性的新興途徑。

柒、結論

一、虱目魚魚鱗，纖維層比例多，魚鱗較薄較小，相較於其他品種更容易萃取出其當中的膠原蛋白。

二、魚鱗膠原蛋白萃取以 10 分鐘為分界點，第一階段萃取率為第二階段的 4.07 倍，這是由於第二階段的膠原蛋白多來自骨質層，被氫氧機磷灰石所牽制因此較不容易溶出。

三、加 10% 梅子醋、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，為 616 mg/分鐘，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，其成本約為市售的膠原蛋白價錢 1%~5%。

三、純度檢測-膠原蛋白萃取液吸收光譜、SDS-PAGE、XRD；細胞毒性試驗

(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。加醋萃取或萃取後加醋酸鈉、醋酸，能

有效促進膠原蛋白斷鍵為成分子量在 30~100 kD 之間的小分子膠原蛋白，以利人體消化及吸收。

(三) 自魚鱗萃取出的膠原蛋白並不會對細胞造成毒害。

五、自製阻尼震盪結合光槓桿裝置分析膠原蛋白凍的彈力效能

(一) 溫度會影響凍狀類產品的彈性，而其中又以 $10.6^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 時有佳的彈力狀況。

(二) 濃度也是口感的一大要素，而本實驗發現在 $10.6^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 時，中濃度 33mg/mL 的膠原蛋白凍擁有最佳的彈力狀況。

(三) 隨著膠原蛋白被黴菌分解，其表面會生水，而整體彈性機能亦會受到影響。

(四) 本實驗量測了一系列明膠凍在 $10.6^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 時的阻尼系數，以作為實驗數據之標準品。

(五) 本實驗透過阻尼震盪的科學原理，結合光槓桿，量化了食品的 Q 彈程度，提供凍狀類食品口感調製的新興途徑，不僅操作容易，更有極高的精準性，可完全依照食用者的喜好進行客製化的口感調製。

六、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，以及養殖漁業之魚健康情形即時監控系統。

捌、未來展望與應用

希望發展成熟的虱目魚早期病變檢測:以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。

玖、參考文獻

- 1.洪雅萍(民 93)。膠原蛋白產品的功效。科學發展，380，31-35。
- 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*. Department of Biomaterials, Faculty of Oral and Dental Medicine, Cairo University, 11562 Cairo, Egypt
- 3.FengxiangZhang, Anning Wang, Zhihua Li, Shengwen He, Lijun Shao .(2011). Preparation and Characterisation of Collagen from Freshwater Fish Scales. *Food and Nutrition Sciences*, 2, 818-823.
- 4.Jing Wang, Xinli Pei , Haiying Liu, Dan Zhou .(2018). *Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (Misgurnus anguillicaudatus)*. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, 214122, China
5. Matthew D. Shoulders, Ronald T. Raines .(2009). Collagen Structure and Stability. *Annu Rev Biochem*, 78.929 – 958.
- 6.Paul Lorrain.(1991). An optical lever for measuring very small rotational oscillations. *Département de Physique, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7*
- 7.Proksch,Schunck,Zague,Segger,Degwert,Oesser.(2014).*Oral Intake of Specific Bioactive Collagen Peptides Reduces Skin Wrinkles and Increases Dermal Matix Synthesis Skin Pharmacol Physiol. Skin Pharmacol Physiol*, 27(3),113-119.
- 8.Sneha,Sontakke,Jin-hee Jung, Zhe Piao,Hye Jin Chung.(2014) .Orally Available Collagen Tripeptide: Enzymatic Stability, Intestinal Permeability, and Absorption of Gly-Pro-Hyp and Pro-Hyp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*64(38)

【評語】 052202

1. 探討虱目魚魚鱗的膠原蛋白較適萃取方法，並以自製阻尼震盪結合光槓桿裝置分析膠原蛋白凍的彈力，另提出由魚鱗表面螢光判斷魚隻健康情形之構想，具創意性。
2. 不同分項之實驗，若能統一使用單一魚種之魚鱗，研究更具整體性。
3. 本研究比較新穎處是自製 3D 列印光桿杆彈力擺動振盪膠原蛋白凍彈力，驗證實驗變因與結果之關聯性，具創意。此自製測試食品彈力的儀器對其他食品的應用性可多著墨。
4. 魚鱗膠原蛋白濃度或純度會影響 XRD 結果。
5. 測試細胞毒性的細胞株與其背景訊息應有所著墨，例如：正常細胞、癌細胞、免疫細胞…。不同細胞屬性結果解讀會不同。
6. 由圖 28 SDS-PAGE 的結果，100°C 煮 5 分鐘跟延長加熱時間的結果差異不大。時間延長增加了一些較小分子量的蛋白質。在 SDS-PAGE 看到的螺旋單體 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 及雙聚體 β ，一大原因會是因為 SDS sample buffer 以及製備樣品(樣品加熱)造成的。
7. 本研究關於螢光光譜應用於魚健康情形即時監控本研究，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)，來用為養殖漁業之魚健康情形即時監控系統的論述，但因為缺乏有效數據著墨太少，無法知道可行性，但點子不錯。

8. 報告本文中與圖示之英文字大小寫要注意；大部分圖都太小，不易看清楚文字與數字。
9. 本研究報告內容很多，單一作者完成，看得出來很努力，很棒！！

簡介

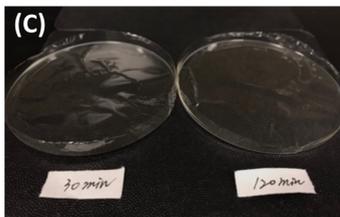
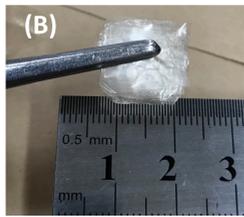
魚鱗由大量的膠原蛋白鋪設在氫氧基磷灰石骨架間所組成[1]，設計簡易高效能，自魚鱗萃取膠原蛋白的方法，並開發其螢光標示的應用。發現膠原蛋白溶出率較高的水煮時段為10分鐘，之後溶出率即大幅下降，且降低PH值亦能提高溶出率 2~5倍。以325nm的雷射光照所萃取的膠原蛋白，能激發出藍光(410nm)及綠光(490nm)利用螢光相對強度檢測魚健康與否。以自製3D列印光桿彈力擺盪振盪量測膠原蛋白凍的彈性係數。發現膠原蛋白凍在10.6°C、約50mg/mL時有最佳的彈性，提供凍狀類食品口感調製的新興途徑。

欲解問題

- 1.探討如何以高效率萃取出魚鱗中的膠原蛋白，並檢驗其純度。
- 2.發明量測彈性口感的工具，並以自製阻尼震盪裝置量測魚鱗膠原蛋白凍彈性係數。
- 3.發展台灣養殖漁業的自動化魚病監測系統。

材料

一、魚鱗膠原蛋白萃取樣本



- 膠原蛋白凍:用於吸收光譜、SDS及螢光光譜。(圖1A)
- 膠原蛋白片:計算溶出率及X光繞射。(圖1B、C)

二、膠原蛋白結構

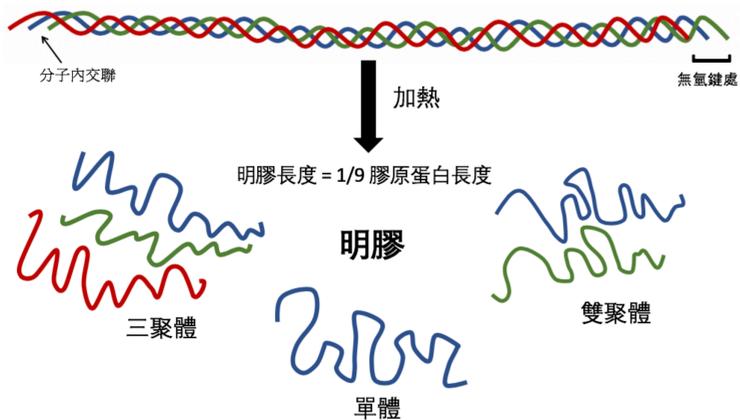


圖1.(A)魚鱗膠原蛋白凍(B)堆疊的膠原蛋白片(C) 剛剛烘乾的無水膠原蛋白片

- 用100度熱水煮魚鱗可以萃取出變性的膠原蛋白，也就是明膠，三螺旋的膠原蛋白變成單股的明膠散落於熱水中。
- 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]

圖2.膠原蛋白結構分析圖

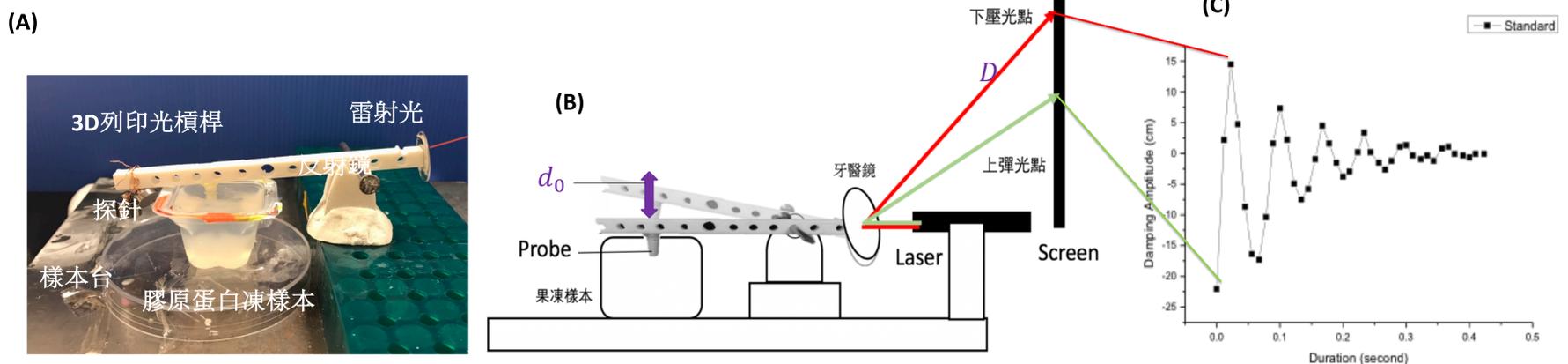
方法

一、特性量測

- 1.用吸收光譜、電泳(SDS-PAGE、X光繞射(XRD)判定萃取樣品成分及純度。
- 2.細胞毒性試驗：判斷L929細胞在魚鱗膠原蛋白萃取物下的存活率。
- 3.螢光光譜：以325nm雷射光激發出肉眼可見的藍-綠光，分辨健康魚和病魚魚鱗。

二、口感量測

- 鐵釘插入3D列印桿的孔洞，調整擺放平衡後，將3D列印桿抬起約1.5公分，使之自由落下。
- 當探針下壓果凍樣本時，反射鏡會反射雷射筆光源，產生較高的反射光點於屏幕上。
- 當探針上彈時，則產生較低的反射光點。此裝置能將微小的差距，放大為可以量測的距離，增加穩定性並減小誤差，以便精密測量。

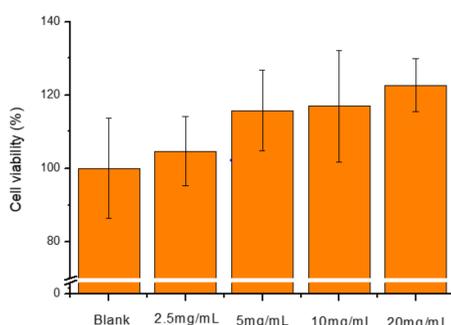


d_0 :帶測物移動的實際距離。 D :帶測長度 d_0 在屏幕上幾近線性放大的長度量。

圖3. (A)實際架設 (B)光槓桿架設(C)投影之彈力光點震盪的軌跡(右)

結果與討論

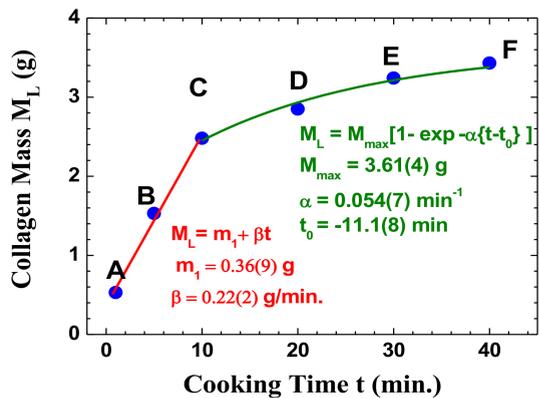
一、強化細胞生長



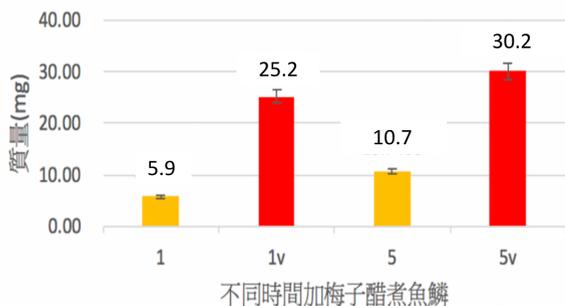
- MTT細胞活性測試顯示，相較於對照組，濃度20 mg/mL之膠原蛋白能增加老鼠纖維母細胞生長約20%，隨著濃度升高，膠原蛋白培養液促進細胞生的情形較佳。

圖4. 細胞存活率分析圖

二、魚鱗膠原蛋白萃取率分析



加10%梅子醋煮膠原蛋白萃取率



- 溶出率兩階段，以10分鐘為分界點，第一階段主要由膠原蛋白層溶出，第二階段為HAP骨架膠原蛋白溶出。(圖5A)
- 0~10分鐘萃取率為10~40分鐘之4.07倍，佔63%總膠原蛋白量。(圖5A)
- 以梅子醋萃取膠原蛋白，效率皆比純水萃取的對照組提高約2~5倍，推測降低pH值，酸度增加會增加膠原蛋白的溶出。(圖5B)

圖5. (A) 魚鱗膠原蛋白萃取率(B)降低pH值的萃取差異

三、純度分析

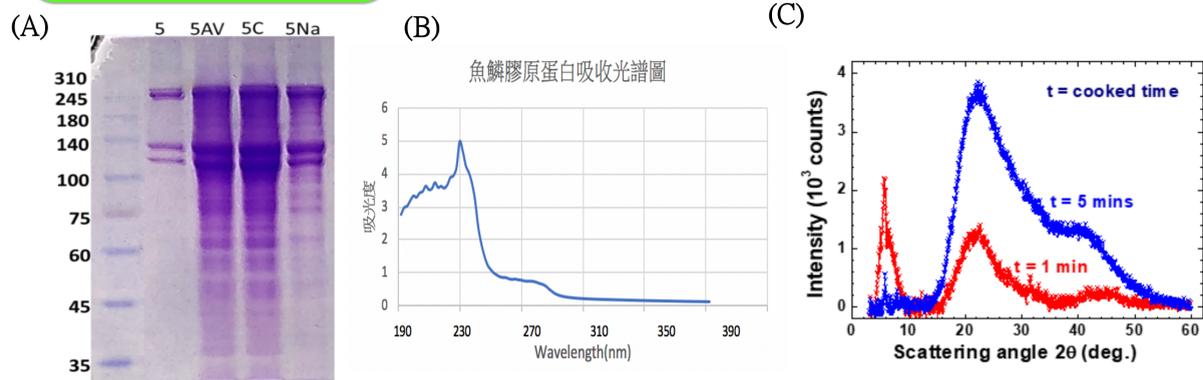


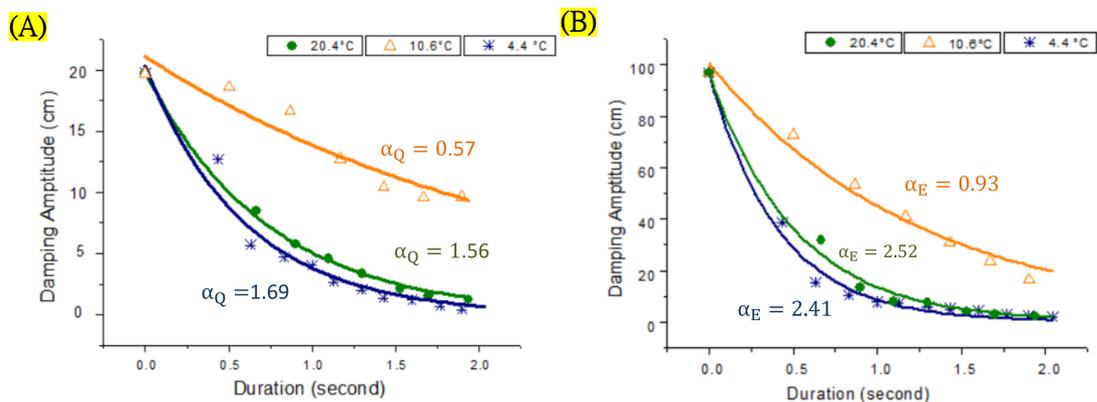
圖6. (A)SDS-PAGE比較(B)魚鱗膠原蛋白吸收光譜圖(C)萃取1、5 min的X光譜繞射譜圖

- 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。隨著煮的時間增長，第三型膠原蛋白和明膠比值例從0.35下降至0.025，短鏈分子增多，小分子膠原蛋白濃度增大。(圖6C)

四、口感分析

(一) 膠原蛋白凍彈力效能分析

1. 不同溫度



阻尼彈力公式 $A = Am \exp(-\alpha t^\beta)$
 α = 阻尼係數, β = 時間指數

	Q 度(Q degree)	上彈(Elastic)
α 大	下壓力弱，凍不Q	反彈力弱，不彈牙
α 小	下壓力強，凍Q	反彈力強，彈牙

表1. 阻尼係數比較

圖7. 不同溫度膠原蛋白凍阻尼震盪彈力分析

溫度為操縱變因，萃取出濃度最高的66mg/mL的膠原蛋白凍樣品進行阻尼震盪分析，實驗結果顯示：

- (1) 10.6°C 時有最小的 α_Q 及 α_E 值，也就代表其動能消耗的最緩，彈力狀況佳。
- (2) 4.4°C 及 20.4°C 彈力狀況差，涉及氫鍵作用，前者動能散失，後者動能吸收過度。
- (3) 因此後續實驗決定選用 10.6°C ± 0.5°C 當作控制變因測量凍狀類產品彈性。

2. 不同濃度

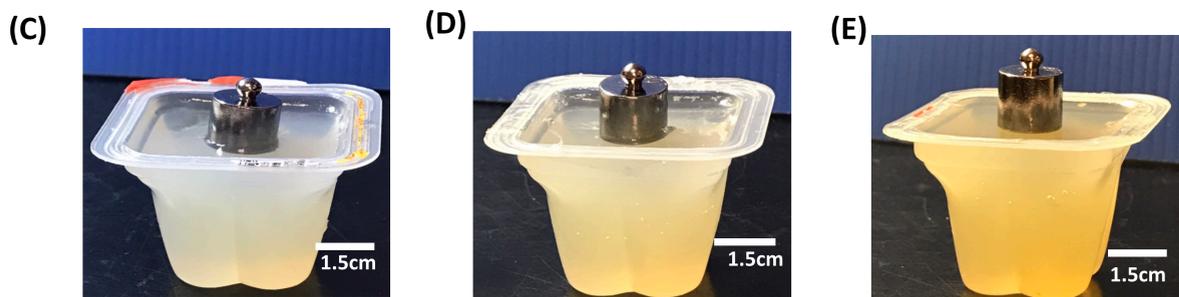
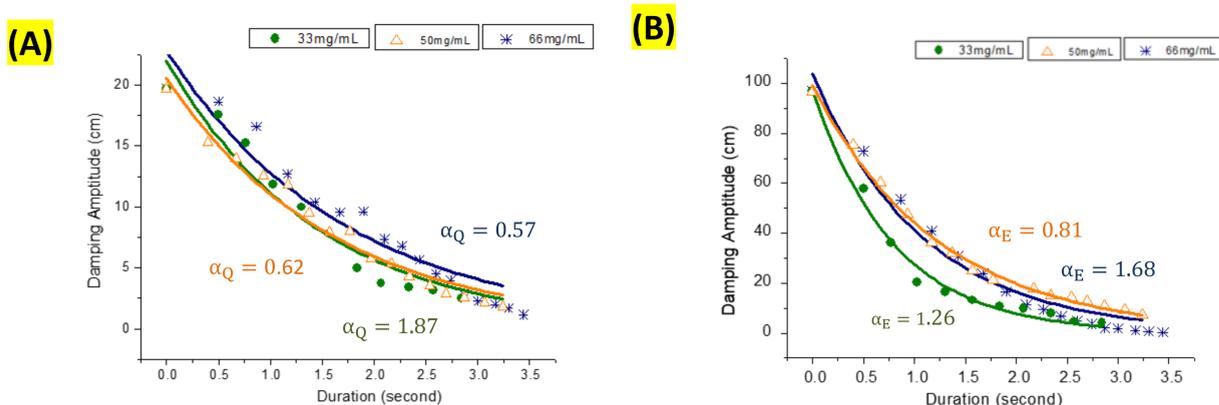


圖8. 膠原蛋白凍阻尼震盪恆溫裝置

- 上方砝碼質量25公克。
- 力常數大者需較大的力方產生形變。

圖9. 低濃度、中濃度、高濃度膠原蛋白凍阻尼震盪曲線彈力分析(A) α_Q (B) α_E (C) 低濃度 (D) 中濃度 (E) 高濃度 魚鱗膠原蛋白凍實體照片

表2. 低中高濃度膠原蛋白凍特性比較

濃度 mg/ml	低濃度 33mg/mL	中濃度 50mg/mL	高濃度 66mg/mL
口感及顏色	軟嫩、綿密/透明	Q彈/白	扎實/黃白
狀態	輕搖動表面晃動	咬下口感豐富	可以用刀子切
砝碼下陷	6 mm	3 mm	0.5 mm
力常數	0.04 N/mm	0.08 N/mm	0.48 N/mm

(三) 明膠標準品彈力檢測

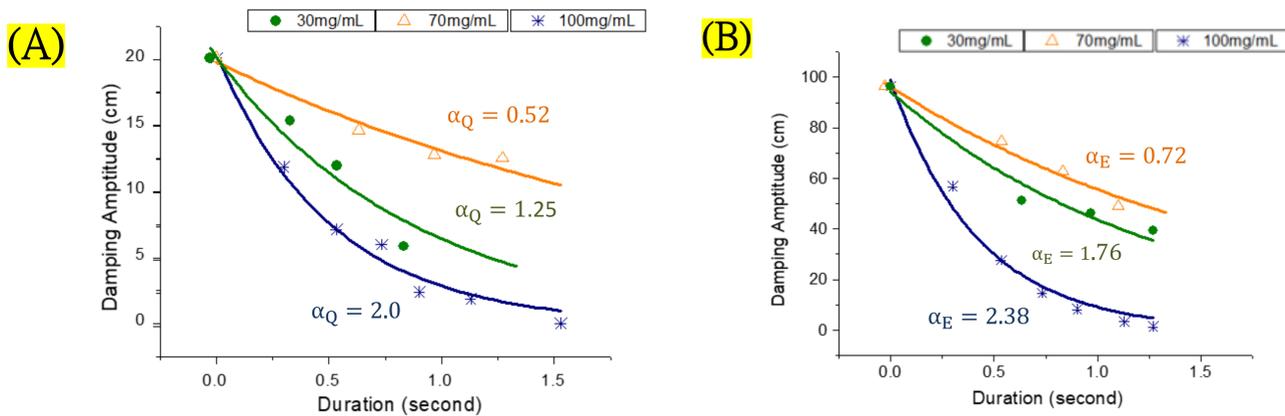


圖10. 低濃度 30mg/mL、中濃度 70mg/mL、高濃度 100mg/mL 明膠凍阻尼分析(A) α_Q (B) α_E

濃度 mg/ml	低濃度 30mg/mL	中濃度 70mg/mL	高濃度 100mg/mL
衰退時間	快	慢	快
彈性狀態	質感較軟，彈性差	彈性最佳	質感較硬，彈性差

表3. 不同濃度明膠凍特性狀態比較

	Coll(低)	Coll(中)	Coll(高)	Coll(高壞)	GEL(低)	GEL(中)	GEL(高)	cml.(椰果)	cml.(無)
α_Q	1.87	0.62	0.57	1.07	1.25	0.52	2.0	3.31	2.31
α_E	1.26	0.81	0.93	1.68	1.76	0.72	2.38	3.61	2.67

表4. 不同濃度膠原蛋白凍(Coll)、明膠凍(GEL)、市售果凍(cml.)阻尼係數比較

- 放置半個月的膠原蛋白凍上頭有明顯黴菌，凍的結構被破壞，似乎被黴菌所分解，表面成水狀，整體彈性狀態減弱。
- Q彈口感則會因為內容物的添加，整體結構被破壞所影響。

五、螢光光譜檢測-魚健康情形監測

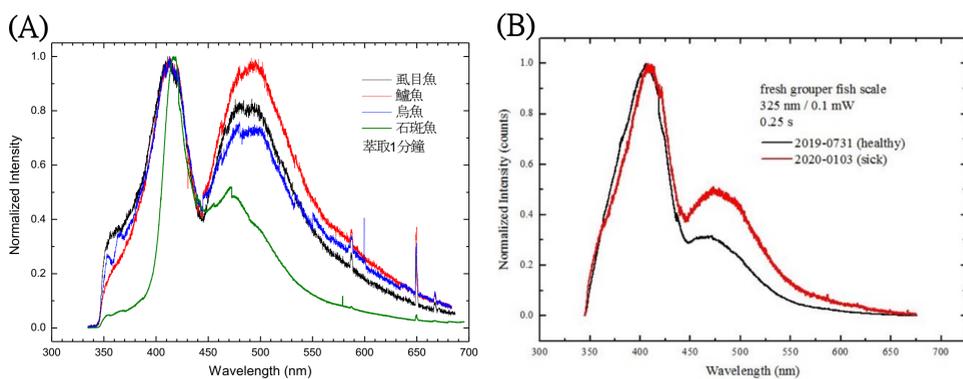


圖11. (A)四種健康魚鱗螢光譜圖(B)健康與疾病魚鱗螢光譜圖對照用以篩選健康魚

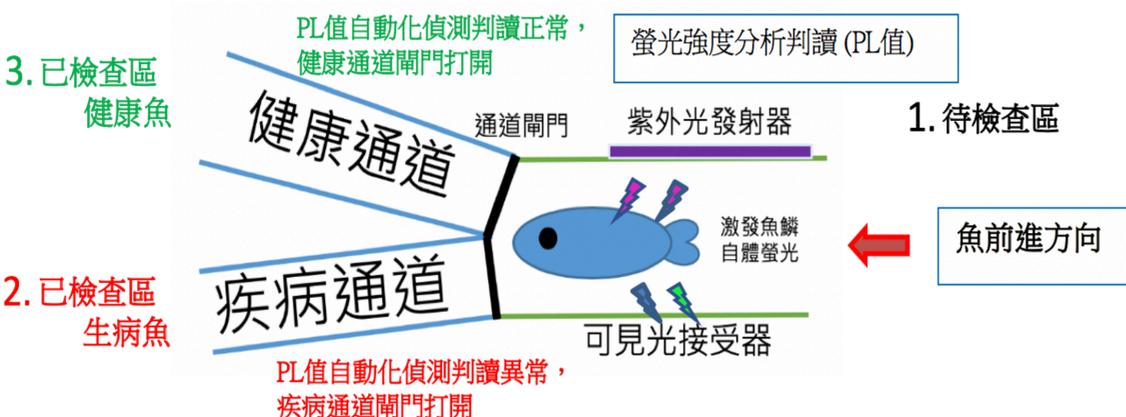
- 以325 nm 雷射激發，功率 0.1 mW，CCD偵測積分時間0.1 s，即可自魚鱗激發出肉眼可見的藍-綠螢光並且測得強螢光訊號。(圖7A)
- 四種魚鱗在410 nm藍光區及490 nm綠光區出現螢光峰，490 nm的螢光峰明顯較寬，顯示四種魚鱗皆至少含有2種發螢光分子。(圖7A)

- 由醫用性膠原蛋白亦得相同結果，可以利用其發螢光的特性，利用已知膠原蛋白濃度配置標準液，檢測市面上的膠原蛋白產品實際含量，為檢測膠原蛋白純度的實際應用。

結論

1. 20mg/mL的膠原蛋白可以強化老鼠纖維母細胞細胞生長20%。
2. 以100°C萃取虱目魚魚鱗，前10分鐘即可得到63%的膠原蛋白，過久的萃取會造成成本及能源浪費。
3. 降低萃取時的pH值1單位，能將魚鱗膠原蛋白分解成100kD的小分子蛋白質，並提升萃取量2-5倍。
4. 經過5分鐘萃取，第一型膠原蛋白和明膠質量比從35%下降2.5%。
5. 魚鱗膠原蛋白凍在10.6°C，50mg/mL有最佳彈性狀況，且當濃度提升兩倍時，嚼勁竟為12倍之多。
6. 魚鱗在紫外光激發下有產生410nm及490nm之螢光峰值，而病魚在490nm的螢光峰值較強，可透過螢光峰值比值區分病魚及健康魚。
7. 本實驗透過阻尼震盪結合光槓桿，以簡易高精準性的方式量化食品的Q彈程度，提供凍狀類食品口感調製的新興途徑。

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。

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.