

國立台東大學生命科學研究所

Institute of Life Science National Taitung University

碩士論文

Master Thesis

指導教授: 李炎博士

Advisor: Lee, Yen. Ph.D.

用一種新方法由雞冠中萃取膠原蛋白與玻尿酸之特性
分析

Characterization of collagen and hyaluronic acid extracted
from cock combs by a new method

研究生: 徐于

Graduate Student: Hsu, Yu

中華民國九十七年六月

June 2008

國立台東大學
學位論文考試委員審定書
系所別：生命科學研究所

本班 徐 于 君

所提之論文 用一種新方法由雞冠中萃取膠原蛋白與玻尿酸之特性
分析

業經本委員會通過合於 碩士學位論文 條件
 博士學位論文

論文學位考試委員會：

李德金

(學位考試委員會主席)

許振宏

李英

(指導教授)

論文學位考試日期：97年6月11日

國立台東大學

- 附註：1. 本表一式二份經學位考試委員會簽後，送交系所辦公室及註冊組或進修部存查。
2. 本表為日夜學制通用，請依個人學制分送教務處或進修部辦理。

致謝

兩年的研究所生涯，終於告一段落。回首剛回到校園進修時的期待，

以及現在收成的喜悅，這一切都要感謝許多人對我的提攜與幫助。

首先誠摯的感謝指導李炎老師，老師悉心的教導，不時的討論並指點

我正確的方向，使我在這些年中獲益匪淺，老師對學問的嚴謹更是我

輩學習的典範。此外要感謝母校黃中宜老師，再來要感謝我的口試委

員蘇德銓老師與許振宏老師，在口試時對於我的指導，惠予寶貴意見

及諸多指教，而得以順利完成論文，在此致以由衷的謝忱。

兩年裡的日子，實驗室裡共同的生活點滴，眾位學長姐、同學、學弟，

你/妳們的陪伴讓兩年的研究生生活變得絢麗多彩。最後由衷地感謝我

最親愛的家人及我的好友們，給予我無限的關懷與付出。

最後，謹以此文獻給我摯愛的雙親。

中文摘要

在動物組織中以雞冠萃取膠原蛋白(collagen)和玻尿酸(hyaluronic acid-HA)的含量為最高，但在台灣雞冠幾乎都被當成廢棄物處理，而台灣每月約可產生 24 餘噸的雞冠，故有不少研究從事自雞冠中萃取膠原蛋白與玻尿酸，但萃取方法過程繁複，耗費人力時間，本實驗室李炎老師於 2006 年發明新萃取技術，過程簡單省時，是以本研究在探討此新法所萃取的膠原蛋白和玻尿酸的類型與特性。經薄層層析(thin layer chromatography)測試，可發現萃取出來的玻尿酸和玻尿酸標準品呈現相似的狀態，萃取的膠原蛋白經由 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)得知為均含有相異的 α -chain, $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ ，由此可知為 collagen Type I 型，而分子量為 121 KDa~212 KDa，經由光譜分析測得膠原蛋白和玻尿酸濃度分別為 4mg/mL 及 2.69mg/mL。使用黏度法測定玻尿酸分子量為 4.3×10^5 Da 而此新方法最主要是步驟簡便，可節省人力與時間成本。

Abstract

The yield of hyaluronic acid (HA) and collagen that extracted from cock combs had the highest amount among all animal tissues investigated. In Taiwan, cock combs production was approximate 24 tons annually, most of which were wasted. Therefore, many researches have been focused on elevating HA and collagen extraction from cock combs. However, traditional preparation methods were complicated, time-consuming, and too much human labor required.

Dr. Lee, Yen 2006, invented a simple and time-saving method to extract collagen and HA. This study was to characterize the HA and collagen extracted from cock combs by this method. By TLC(thin layer chromatography), and by SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), we found that the extracted collagen showed two different types of α -chains-- $\alpha 1$ & $\alpha 2$, which indicated that they belong to type I collagen. The molecular weight is 121 KDa~212 KDa By means of

spectrophotometry .We got collagen concentration 4mg/mL and HA 2.69mg/mL. By using viscosity method determined the HA molecular weight is 4.3×10^5 Da This brand new method has advantages such as simple and time-saving processes compared to other methods ◦



總目錄

致謝	I
中文摘要	II
英文摘要	III
總目錄	V
圖目錄	IX
表目錄	X

第一章 緒論

1-1 前言	1
--------------	---

1-2 預期目標.....	2
---------------	---

第二章 文獻回顧

2-1 雞冠的構造.....	3
----------------	---

2-2 膠原蛋白之性質.....	3
------------------	---

2-2-1 膠原蛋白結構.....	3
-------------------	---

2-2-2 膠原蛋白的種類.....	5
--------------------	---

2-2-3 膠原蛋白的纖維構造.....	8
----------------------	---

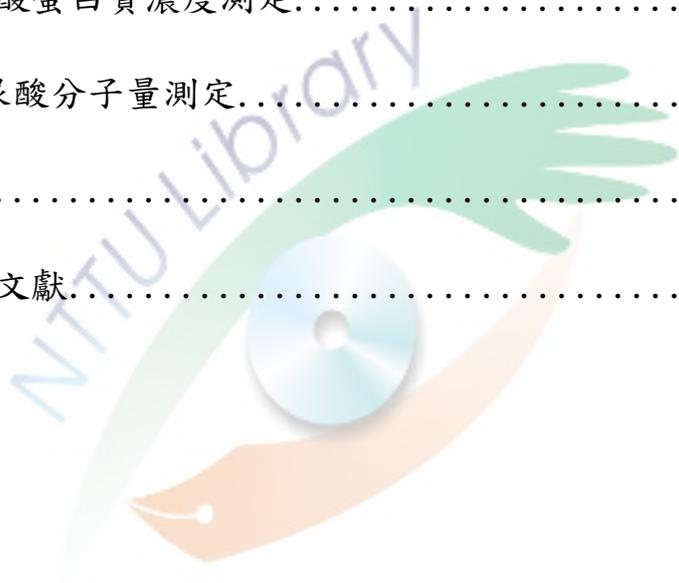
2-2-4 膠原蛋白的生化合成.....	10
----------------------	----

2-2-5 膠原蛋白的應用.....	12
--------------------	----

(1) 醫學與藥品方面應用.....	12
(2) 化妝品方面上的應用.....	14
(3) 食品工業上的應用.....	15
2-2-6 膠原蛋白萃取相關研究.....	15
2-3 玻尿酸之性質.....	17
2-3-1 玻尿酸的結構.....	17
2-3-2 玻尿酸的生化合成.....	20
2-3-3 玻尿酸的應用.....	22
(1) 醫學與藥品方面應用.....	22
(2) 化妝品方面上的應用.....	24
(3) 食品工業上的應用.....	25
2-3-4 玻尿酸的由來與萃取相關研究.....	26
第三章 材料與方法.....	29
3-1 實驗架構.....	29
3-2 原料來源及處理.....	30
3-3 雞冠一般化學組成分析.....	30
3-4 萃取實驗.....	33
3-4-1 膠原蛋白之萃取.....	33
3-4-2 玻尿酸之萃取.....	36

3-4-3 產物分析.....	38
(1) 玻尿酸薄層層析.....	38
(2) 膠原蛋白薄層層析.....	39
3-5 膠原蛋白特性分析.....	39
(1) 膠原蛋白含量測定.....	39
(2) 熱殘留性羥脯胺酸含量.....	41
(3) 膠原蛋白SDS-PAGE電泳分析.....	42
(4) 膠原蛋白中蛋白質含量測定.....	44
(5) 膠原蛋白等電點測定.....	45
3-6 玻尿酸特性分析.....	45
(1) 玻尿酸濃度分析方法.....	45
(2) 玻尿酸蛋白質含量分析.....	46
(3) 玻尿酸分子量分析.....	47
第四章 結果與討論.....	49
4-1 雞冠一般化學特性.....	49
4-2 薄膜層析.....	50
4-3 膠原蛋白濃度測定.....	51
4-4 膠原蛋白蛋白質濃度測定.....	53
4-5 膠原蛋白等電點測定.....	54

4-6 蛋白質電泳 (SDS - PAGE)	55
(1) 膠原蛋白類型鑑定.....	55
(2) 膠原分子量鑑定.....	56
(3) 膠原終端胜肽去除測定.....	57
4-7 膠原蛋白之熱穩定性.....	58
4-8 玻尿酸濃度測定.....	59
4-9 玻尿酸蛋白質濃度測定.....	61
4-10 玻尿酸分子量測定.....	61
第五章 結論.....	64
第六章 參考文獻.....	66



圖目錄

圖 2-1 膠原蛋白結構圖.....	7
圖 2-2 膠原蛋白分子量及分子長度圖.....	7
圖 2-3 膠原蛋白的微纖維構造.....	9
圖 2-4 膠原纖維束電顯影圖.....	10
圖 2-5 膠原蛋白的生化合成.....	11
圖 2-6 玻尿酸的一級結構.....	18
圖 2-7 玻尿酸的二級結構.....	19
圖 2-8 玻尿酸的網狀結構.....	20
圖 2-9 玻尿酸合成圖.....	22
圖 3-1 膠原蛋白萃取流程圖.....	35
圖 3-2 玻尿酸萃取流程圖.....	37
圖 3-3 Ubbelohde 黏度計.....	48
圖 3-4 應用外插法求極限黏度.....	48
圖 4-1 總糖標準曲線.....	49
圖 4-2 薄膜層析.....	51
圖 4-3 羥脯胺酸標準曲線.....	52
圖 4-4 雞冠中萃取出膠原蛋白濃度.....	53
圖 4-5 蛋白質標準曲線.....	54

圖 4-6 SDS-PAGE 膠原蛋白類型鑑定.....	56
圖 4-7 SDS-PAGE 與分子量鑑定和膠原終端胜肽去除測定.....	58
圖 4-8 羧脯氨酸經加熱後與吸光值的關係圖.....	59
圖 4-9 葡萄糖醛酸(glucuronic acid)檢量線.....	60
圖 4-10 玻尿酸濃度與黏度關係圖.....	62

表目錄

表 2-1 膠原蛋白之種類及在組織中的分布.....	8
表 4-1 雞冠之一般化學組成.....	50
表 4-2 膠原蛋白與玻尿酸純度及回收率.....	61
表 4-3 雞冠中膠原蛋白及玻尿酸的含量.....	63
表 4-4 膠原蛋白特性分析結果.....	63
表 4-5 玻尿酸特性分析結果.....	63

第一章 緒論

1-1 前言

膠原蛋白與玻尿酸在化妝品以及生醫材料等應用非常廣泛，膠原蛋白存在組織中能維持組織的強度，全部人體內的膠原有近一半存在於皮膚中，在真皮與肌鍵中非水物質有百分之七十左右為膠原，其中type I 是真皮結構組織的主要細胞外基質(Jiao *et al.*, 1998)。膠原蛋白為生體組織固有之成分，具良好生物相容性、生物可降解(biodegradability)、促進凝血及低免疫性等特性，膠原有最適宜的微孔徑，一般為20~120 μm ，有足夠的內部表面供細胞貼附，有大量的空間供細胞外基質累積(Olsen *et al.*, 1989)。玻尿酸存在自然裡如同一個水合的膠凝體，普遍存在人和動物組織中，這大分子在身體中可影響細胞行為及重要的構造，如生理和生物功能，玻尿酸是大葡萄糖胺聚糖，不僅是細胞外間質一個結構成分，而且與細胞表面接受器相互作用促進細胞擴散、遷移，和細胞內間質信號，其特殊黏性物質及它具有的低免疫性或無毒性在化妝和工業製品上可產生廣泛的應用(Li *et al.*, 2007)。

1-2 研究目標

台灣的養雞業非常發達，我國肉雞生產可分為白肉雞及有色雞(土雞)二類，年產3億5千萬隻，近年來國人的雞肉消費量，年平均大約將近30kg(張, 2002)，由於雞冠在國人飲食習慣較不被接受，所以雞冠幾乎都被當成廢棄物處理，若能以雞冠作為膠原蛋白與玻尿酸萃取來源，不僅能提升經濟價值，且能有效減少廢棄物處理時產生的環境問題。本研究是以李炎(專利申請號P-079418)所發明之新方法，以兩階段式方法所能萃出的膠原蛋白與玻尿酸加以分析，以瞭解其特性並探討之。

第二章 文獻回顧

2-1. 雞冠的構造

雞冠是一種特化的皮膚器官，其與一般皮膚一樣可分為5層細胞，而在真皮部分可分為中心層(central layer)、中間層(intermediate layer)與周邊層(peripheral layer)。所以雞冠從外到內的構造依序為表皮、周邊層、中間層及中心層。中心層是由縱走的粗大膠原纖維束組成，與頭骨的骨外膜相接。大動脈、靜脈以及一些神經會穿過此層，健康雞隻的中心層會含有相當多的體脂肪，尤其是在底部的位置。中間層主要是由網狀纖維、膠原蛋白纖維與彈性纖維所組成，其間充滿了透明的膠樣物質，所以又稱為黏液-彈性層(muco-elastic layer)，這些黏液是由纖維母細胞所分泌的。周邊層是由膠原蛋白纖維與彈性纖維組成，具有發達的微血管網，表皮下的微血管口徑特別大，當血液流動時會使雞冠呈現鮮紅色（李等, 1977）。

2-2 膠原蛋白之性質

2-2-1 膠原蛋白結構

膠原蛋白是人和動物的主要結構蛋白，約佔人體內蛋白質總量的三

分之一(Cheng, 1996)，膠原蛋白源自胚胎之中胚層星狀細胞，依構成不同的結締組織逐漸發育為骨母細胞、軟骨母細胞、和纖維母細胞，再分別形成骨基質、軟骨基質、與纖維基質膠原蛋白。骨基質與軟骨基質膠原蛋白構成骨組織、軟骨組織。纖維基質膠原蛋白分佈於皮、腱、血管、肌肉及內臟中的結締組織 (Price and Schweight, 1971; Woodhead-Galloway, 1980)。膠原蛋白的胺基酸結構以Gly-Xaa-Yaa規則排列形成 α 螺旋鏈，圖2-1三條 α 螺旋鏈彼此纏繞形成三股螺旋的膠原蛋白分子。其Gly為甘胺酸(glycine)、Xaa為脯胺(proline)、Yaa為羥脯胺酸(hydroxyproline)，而脯胺酸是經由後轉錄修飾(post-translational modification)，就是脯胺酸經由脯胺酸加羥基酵素(prolyl hydroxylase)作用成羥脯胺酸(hydroxyproline)。脯胺酸加羥基作用是形成與穩定膠原蛋白三螺旋體的重要反應，否則膠原蛋白之三螺旋體結構將在室溫下解體成膠質。膠原蛋白胺基酸結構的規則排列(Gly-Xaa-Yaa)_n中，Xaa、Yaa位置胺基酸的不同，其蛋白質排列也會不同，而形成不同的 α 鏈，因此隨著三股 α 鏈的不同組合，構成了不同型的膠原蛋白(Sikorski *et al.*, 1984)。圖2-2三股螺旋之分子重量平均約285000kDa。長280nm(約1000個胺基酸)、寬1.5 nm。膠原蛋白之胺基酸組成，其含甘胺酸(glycine)約33%、

脯氨酸(proline)12% 與丙氨酸(alanine)12.5%、羥脯氨酸(hydroxy-proline) 12.5%，此四種胺基酸即佔膠原蛋白中總胺基酸量約69%，而其中羥脯氨酸僅存於膠原蛋白與彈力蛋白(elastin)中，因此可作為膠原蛋白含量的指標 (Edward and O'Brien, 1980)。

2-2-2 膠原蛋白種類

膠原蛋白依結構胜肽鏈組成或基因座位置區分為21種類型，其中以最早被發現的type I、II、III、IV、V五種研究較多。其中以第一型膠原蛋白的含量最多，約佔全部膠原蛋白含量的90%，也是用途最廣的膠原蛋白 (Kucharz, 1992; Miller and Rhodes, 1982)。根據其結構上的不同可以大致分為幾類，(一)纖維膠原蛋白(fibrillar collagens)包含 type I、II、III、V、XI；(二)為網狀構造的膠原蛋白包含type IV、VIII、X；(三)為位於纖維狀膠原蛋白表面(fiber associated collagens with interrupted triple helices-FACIT)，包含type IX、XII、XIV、XIX；(四)為珠狀纖維包含type VI；(五)為與基底膜連接的膠原蛋白包含type VII；(六)為穿膜區域膠原蛋白(transmembrane domain collagen)包含type XIII、XVII；剩下的則尚未清楚定義其特徵之膠原蛋白(Deyl and Miksik, 2000)。在人體各

部位的膠原蛋白，隨著組織的特異性，含量與類型有所差異，如第一型膠原蛋白(type I collagen)；第二型膠原蛋白(type II collagen)存於軟骨(cartilage)、眼球玻璃體(vitreous body)、椎間(intervertebral discs)；第三型膠原蛋白(type III collagen)主要存在皮(skin)、血(blood vessels)、內臟(internal organs)及腸(gastrointestinal tract)的平滑肌層(smooth muscle layers)；第四型膠原蛋白(type IV collagen)主要存在基底膜(basement membrane)第五型膠原蛋白(type V collagen)含量較少，只佔全部膠原蛋白的10%，常伴隨著collagen type I 與type III被發現，如硬骨(bone)、肌腱(tendon)、角膜(cornea)、皮膚(skin)、血管(blood vessels)、與發育胎兒的基底膜(basement membrane)(Deyl and Miksik, 2000)。

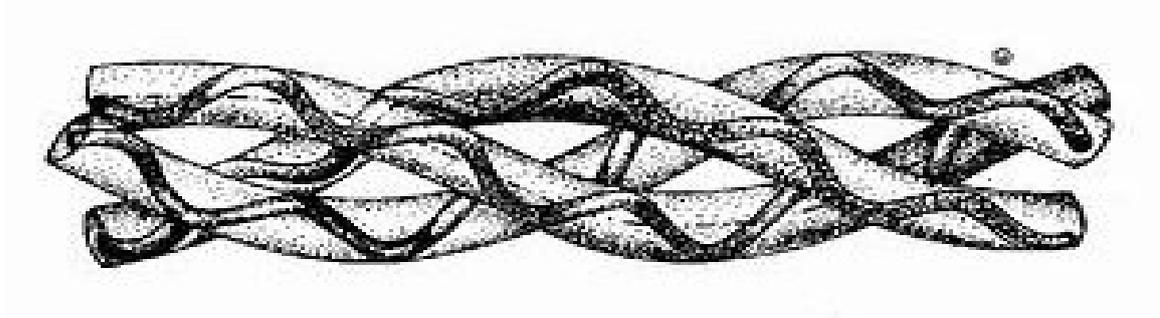


圖 2-1 膠原蛋白結構圖 (Bailey and Light, 1989)

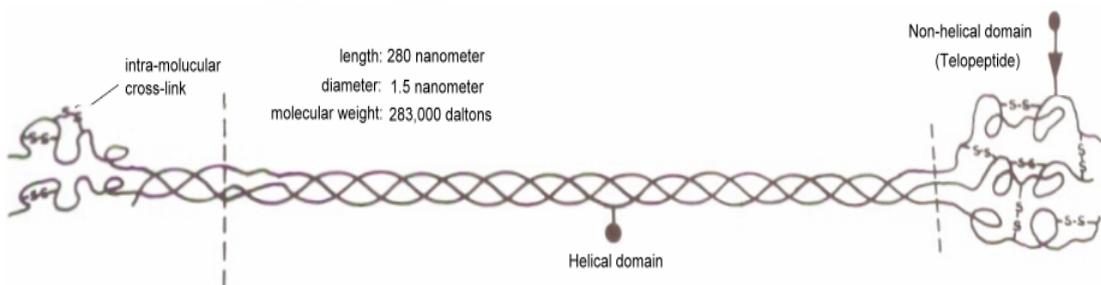


圖 2-2 膠原蛋白分子量及分子長度圖(Sikorski *et al.*, 1984)

表 2-1 膠原蛋白之種類及在組織中的分布

種類	分子式	組織
Type	Molecular formula	Tissue
I	$[a_1(I)]_2 a_2(I)$	Intramuscular, skin, tendon, bone, dentin
II	$[a_1(II)]_3$	Cartilage, disc, vitreous humour
III	$[a_1(III)]_3$	Intramuscular, skin, vascular, intestine
IV	$[a_1(IV)]_2 a_2(IV) + a_3(IV)$	Basement membranes
V	$[a_1(V)]_2 a_2(V) + [a_1(V) a_2(V) a_3(V)] +$ $other combination$	Intramuscular, skin, embryonic tissues
VI	$[a_1(VI) a_2(VI) a_3(VI)]$	Vascular system
VII	Unknow	Skin, amniotic membrane
VIII	Unknow	Aortic endothelium
IX	$[a_1(IX) a_2(IX) a_3(IX)]$	Cartilage
X	$[a_1(X)]_3$	Cartilage

(Pearson *et al.*, 1985)

2-2-3 膠原蛋白的纖維構造

在生理狀態下，五個膠原蛋白元會自發聚集(self-assemble)形成微纖維(microfibrils)，而微纖維再與前後及側邊方向之微纖維聚集組成細纖維(fibrils)，直徑約20~90 nm。最後依其所在組織及功能需

求不同，再進一步形成更粗大膠原蛋白纖維(collagen fibers)，其直徑可達 $10\mu\text{m}$ 以上，圖 2-4在電子顯微鏡下觀察，膠原微纖維每間隔 67 nm 即呈現一明暗之橫紋週期 (Price and Schweight, 1971)。原膠原之構造與膠原蛋白分子完全相似，原膠原以頭對尾方式結合成膠原蛋白分子後，即以D-stagger五線重疊纏繞形成膠原微纖維。每條微纖維上有5個原膠原分子重疊時，此部份產生色深之暗帶，若只有4個則產生色淺之明帶 (Peterson and Johnson, 1978)。

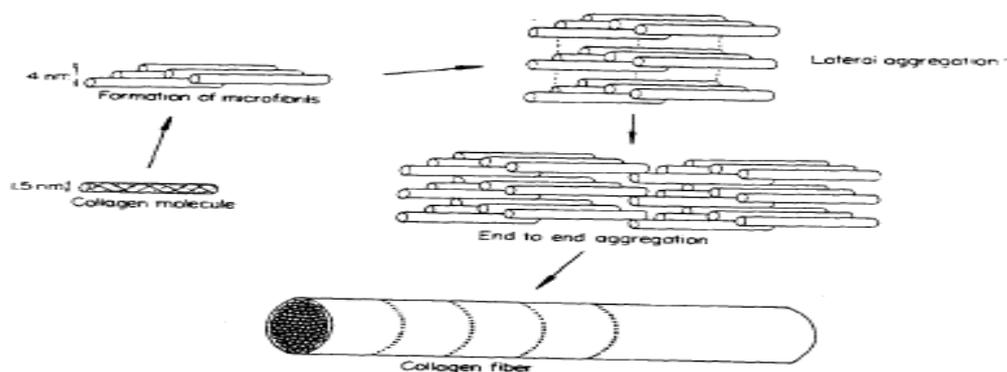


圖 2-3 膠原蛋白的微纖維構造(Nimni *et al.*, 1988)

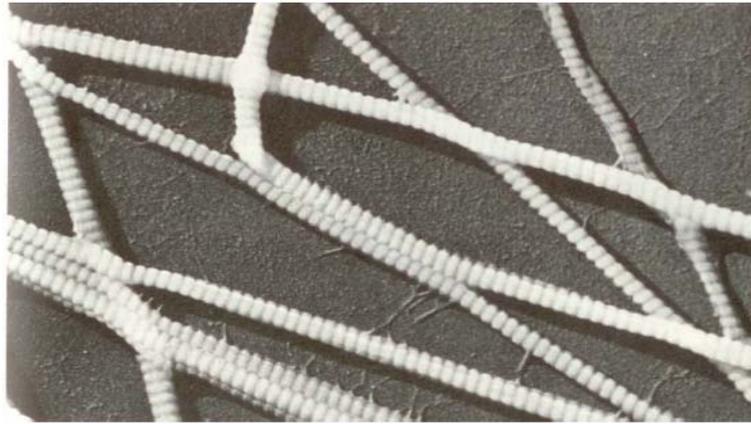
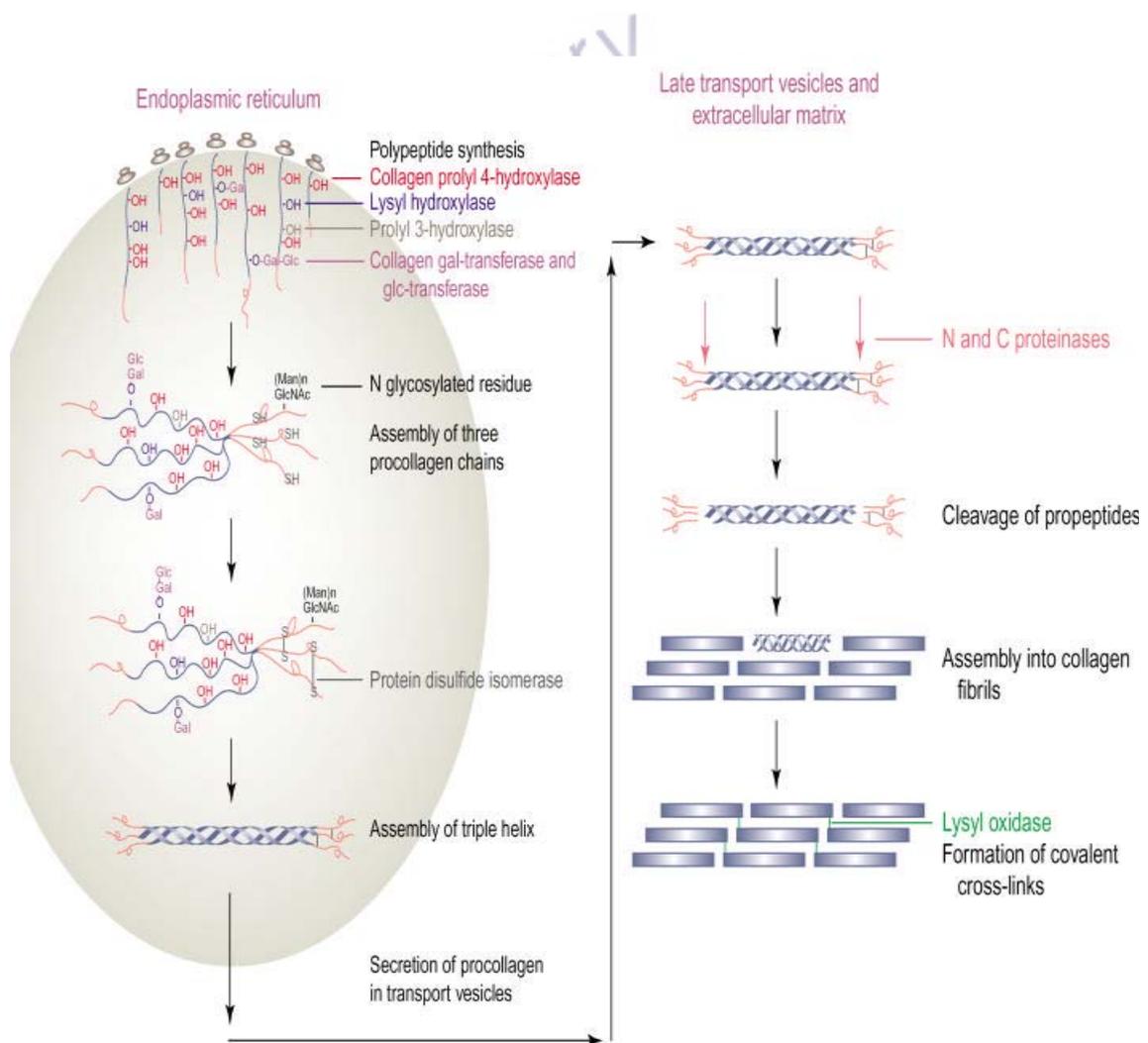


圖 2-4 膠原纖維束電顯影圖(John, 1980)

2-2-4 膠原蛋白生化合成

膠原蛋白生化合成中膠原蛋白分子是複合體的狀態，要經過多重的步驟才合成，其中大部份研究是在微纖維構型的膠原蛋白，這個生化合成是，首先由專一性的mRNA 轉錄後轉譯，接著在特定母細胞內合成的肽鏈會進入內質網進行羥化 (hydroxylation) 反應生成離胺酸及羥離胺酸，再進入高基氏體內行醣化 (glycosylation) 反應使聚肽鏈接上六碳醣後形成三股螺旋狀原膠原(procollagens)此原膠原分子乃膠原蛋白合成的先驅物質。單一多肽經由轉錄後修飾作用，將

Xaa、Yaa位置部分的脯氨酸(proline)及離胺酸(lysine)進行修飾，
 得到修飾後的胺基酸如羥脯氨酸(hydroxyproline)、羥離胺酸
 (hydroxylysine)、glycosylated hydroxylysine。(Bailey and
 Light, 1989; Myllyharju *and* Kivirikko, 2004)。



TRENDS in Genetics

圖 2-5 膠原蛋白的生化合成(Myllyharju and Kivirikko, 2004)

2-2-5 膠原蛋白之應用

(1) 醫學與藥品方面應用

A. 膠原蛋白於傷口癒合的應用

膠原蛋白常用於創傷被覆材上，當皮膚受到外力損傷時，需要一些保護材來代替皮膚，以防護身體免遭受外物的入侵，所以創傷覆材是熱門的生醫材料(黃等, 2003)。膠原敷料有多種形式，如薄膜、海綿狀及粒狀等，能重新溶解，並吸收創傷滲出液，可與宿主細胞外基質相互作用，以促進細胞在新結締組織上的粘附、移動、生長和沉積，能誘導分化及成纖維細胞的趨化性，延遲傷口收縮，加速創傷修復，未來在此有極大的潛力來開發。

膠原蛋白創傷覆蓋材，對傷口的治療具有對傷口較清潔、減緩細菌感染現象、減少傷口流膿、增加肉芽組織的形成、癒合的傷口不會產生收縮、協助壓力褥瘡傷口的癒合，不致產生免疫反應(洪, 2004)。而目前以膠原蛋白為基質已普遍使用於重度灼傷之傷口覆蓋方面。此人造皮膚可結合不同的生長促進劑，以加速傷口細胞的生長，且臨床試驗證實不會產生毒性，也可避免患者經歷反覆的取皮手術(Li, 1993；許等, 1998)。

B. 膠原蛋白血管裝置材料的應用

由於心血管疾病日益增加，對替換血管裝置的要求越來越多，應用生物組織心血管裝置的主要優勢，與合成材料相比，膠原蛋白基材還具有感染性低、宿主組織能向裝置中滲入生長，而不需要高密度孔結構以及可與天然血管在物理性質上較好的匹配等優點。膠原蛋白基材可引發血小板之吸附與凝集(aggregation)，進而促進凝血之功能，此一止血之特性在組織修復過程中扮演著相當重要的角(Miyata *et al.*, 1992)。

膠原蛋白作為血管植入材料已充分被研究，但因膠原蛋白與血小板會產生交互作用而造成凝血，故膠原蛋白需經修飾才能適用於血管植入手術，將肝素以共價鍵結於膠原蛋白表面的修飾物，具有良好的抗凝血特性，且肝素不易脫落，可使其成為理想的血管植入材料(Li, 1993)。

C. 膠原蛋白於骨組織填補材料的應用

骨基質蛋白中約90%是由膠原蛋白所組成，除了幫助骨組織分散應力並提供適當之抗拉強度外，膠原蛋白亦是供細胞吸附之重要細胞外基質，與骨細胞的生長、分化、生理功能及基因表現有著密切的關係。

(Partridge *et al.*, 2002)。膠原蛋白含有RGD(Arg-Gly-Asp)及DGEA (Asp-Gly-Glu-Ala)兩段特殊的胺基酸序列，可與細胞膜上之整合蛋白做專一性之結合進而引發特定之訊息傳導途徑以調控細胞之分化及生理功能(藍, 2003)，當因外傷或腫瘤造成骨組織缺陷時，需填入適當材料使骨組織回復原有的功能。自體骨組織為移植的最佳材料，但如果體內的骨組織不足時，就需移植異體同種的骨組織或合成的填補材料。目前去礦物化的骨膠原蛋白已成功使用於填補顱頤的骨組織缺陷(Li, 1993)。

(2) 化妝品方面應用

皮膚真皮裡75%由膠原蛋白組成，纖維狀的膠原蛋白形成網狀結構。一方面提供皮膚的張力和彈性，同時還向表皮和毛髮供給營養，皮膚的老化主要是發生在結締組織中，其原因是占結締組織70%以上的膠原蛋白，在年齡增長的過程中逐漸老化流失，造成皮膚失去彈性，保水能力下降，皺紋及細紋逐漸浮現(陳, 2004)。膠原蛋白目前廣泛運用在化妝品中，特別是作為天然的保濕劑(Morganti *et al.*, 1996)，分子周圍具有大量排列整齊之水合網狀結構，且能與皮膚表面結合，所以有高度的實效性(Bella *et al.*, 1995)。

(3) 食品工業方面

血漿中來自膠原蛋白的羥脯胺酸是將血漿中的鈣運輸到骨細胞的運載工具，骨細胞中的膠原蛋白則是羥基磷灰石的粘合劑，它與羥基磷灰石共同構成了骨骼的主體，因此只要攝入足夠的膠原蛋白，就能保證正常的鈣質攝入量，因此膠原蛋白可以製成一種補鈣的保健食品（蔣, 2006），目前以膠原蛋白為主的保健食品飲料也是相當的風行，而保健飲料所訴求的目標是提高免疫機能、身體機能及美容等。膠原蛋白於食品加工方面應用非常廣泛。將膠原蛋白添加到肉製品中，不僅能改善產品品質，而且能提高產品的蛋白質含量，並且無不良氣味。膠原蛋白還可作為肉製品腸衣材料，膠原蛋白膜在抽取或染色前，用木瓜蛋白酶對其進行處理，可提高腸衣的拉伸強度和嫩度（Miller, 1983）。

2-2-5 膠原蛋白萃取相關研究

目前工業上生產膠原蛋白主要來自雞冠、牛、豬、及魚的皮膚、魚鱗等。一般可以採用酸法、鹼法、和酶法，酸法和鹼法技術簡單且成本較低，但由於酸法和鹼法對膠原蛋白的分子結構會產生破壞，目前以胃蛋白酶/0.5M醋酸溶液為萃取率最高的方式，是近年來萃取動物組

織膠原蛋白最常使用方法，其產物穩定，分子大小均一。在 I 型膠原的三股螺旋間沒有雙硫鍵，前膠原C-末端的5個鏈間雙硫鍵在顆粒內質網中形成，然後三條多肽鏈由C→N方向盤繞形成三股螺旋，鏈間雙硫鍵在三股螺旋形成對穩定前膠原三條多肽鏈的聯繫起重要作用 (Nimni *et al.*, 1988)。Pepsin則在Cystine產生的雙硫鍵部位進行除去抗原活性(antigenicity)之終端胜肽(telopeptide)。

哺乳動物之膠原蛋白三股螺旋結構於39°C時開始瓦解，膠原蛋白於58°C開始收縮，此時膠原蛋白纖維開始變性，多數膠原蛋白水解，且於63°C左右開始形成明膠(gelatin) (Jones, 1977)。在萃取溫度方面觀察不同萃取溫度與時間對膠原蛋白纖維重組速率影響，結果顯示隨萃取時間延長，膠原蛋白纖維重組速率有逐漸降低之現象 (Lin *et al.*, 2005)而以4°C~10°C分解12-24小時的所萃取的膠原蛋白為較高分子量且可避免微生物分泌的蛋白酶破壞膠原蛋白構形和溶解度的降低(Miller and Rhodes, 1982)。

近年來也有以分子生物技術，利用基因轉殖方法，將Hsp47(heat shock protein47)轉殖至小鼠胚胎纖維細胞，最後結果為 I 型膠原蛋白的表達明顯升高，故HSP47可以調控 I 型膠原蛋白的表(Yoshihito *et al.*, 2006)。此外也有膠原蛋白(collagen)之基因轉殖至動物身

上，借由牛乳或羊乳的分泌，可由乳汁中萃取得到膠原蛋白，這種以基因轉殖動物（transgenic animals）來生產膠原蛋白的方法，但目前仍處於研發階段，尚未工業生產。而目前有報告指出基質受到損傷的結締組織給予連續模式的超音波可刺激纖維母細胞分泌膠原蛋白的增生(Ramirez *et al.*, 1997)。

膠原蛋白萃取方法依文獻為下列介紹，雞冠切塊後加入10倍的20%乙醇，於4°C下攪拌24小時，再離心，沈澱物加入10倍0.2N NaOH溶液中，於4°C下攪拌24小時，離心，沈澱物溶於5倍的0.5M醋酸溶液中，加入5% pepsin後，於4°C下分解24小時，之後離心收集上清液加入NaCl，於4°C下攪拌12小時，使膠原蛋白鹽析、沈澱，離心取沈澱物並溶於0.5M的醋酸溶液，以0.05M醋酸溶液透析72小時(每24小時更換一次透析液)，即得膠原蛋白(Miller, 1982)。

依上述方法其原理主要是將組織以氫氧化鈉或是乙醇等，去除脂肪及雜蛋白，在經酵素處理後再以鹽析、透析等方式得到膠原蛋白。

2-3 玻尿酸之性質

2-3-1 玻尿酸結構

(1) 一級與二級結構-重複雙糖單位

在玻尿酸的雙糖結構中，糖醛酸單位與胺基糖單位D-葡萄糖醛酸 (D-glucuronic acid)及D-N-乙醯葡萄糖(D-N-acetylglucosamine)，這兩種單糖為玻尿酸的一級結構，這兩個糖基藉由交替的出現的 β -1,4 與 β -1,3 糖鍵(glycosidic bond)互相重複結合而形成一條直鏈的分子，分子式為 $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$ ，此為玻尿酸的二級結構。(Balazs *et al.*, 1986)。

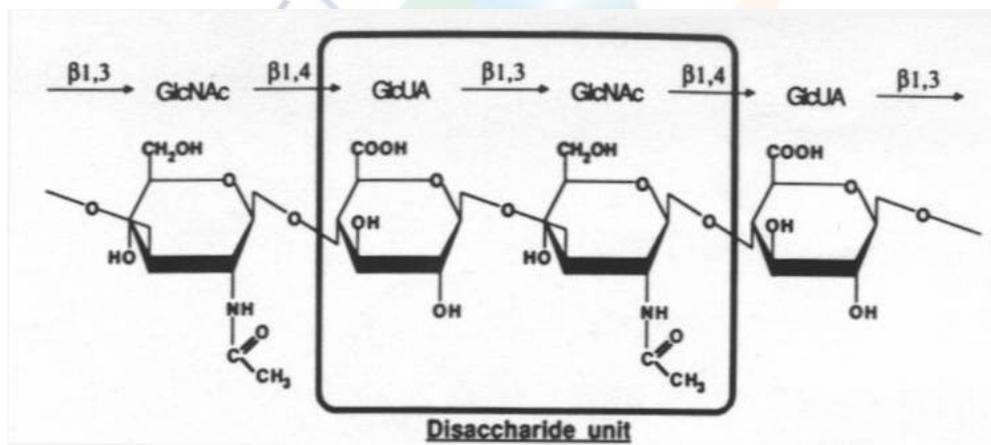


圖 2-6 玻尿酸的一級結構(Laurent and Fraser, 1992)

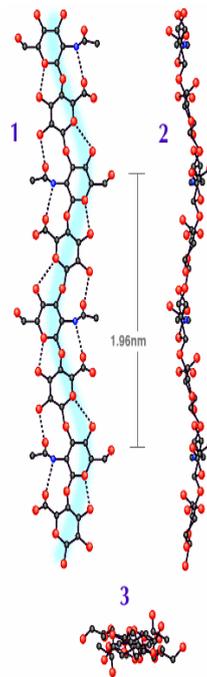


圖 2-7 玻尿酸的二級結構(Scott, 1998)

(2) 三級結構-玻尿酸在水溶液中的網狀結構

玻尿酸分子在生理等張溶液中，雙醣單位會形成平行於分子軸鏈的氫鍵而結合(Scott, 1992)，但因為其間的羰基會彼此排斥，而產生許多不規則的局部螺旋(helix)，並使得玻尿酸分子全鏈形成纏繞(coil)，這種存在的形式，有助於其分子結構的穩定。當濃度更高時玻尿酸分子所佔的空間會互相重疊，分子間也開始互相糾纏，而形成一種網狀的結構(Bothner and Wik, 1987)。這種螺旋狀的巨大分子，在水溶液中會佔有一個很大的領地式(domain)的線圈狀結構，因此尺

寸比較小的分子，如水、電解質或營養物質，可以在溶劑中進出但大分子如蛋白質在玻尿酸分子聚合形成的網狀結構中，大分子活動的範圍小只能緩慢的擴散。

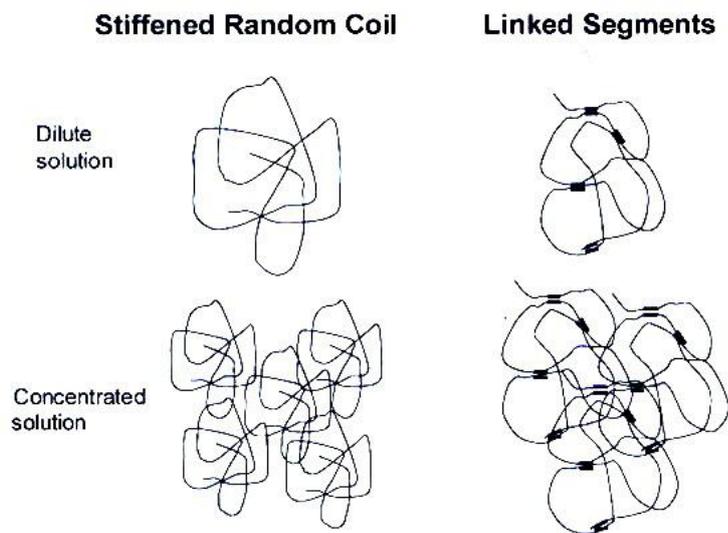


圖 2-8 玻尿酸的網狀結構(Hardingham, 2004)

2-3-2 玻尿酸的生化合成

玻尿酸為直鏈聚合無支鏈，且為聚陰離子之雙糖的重複結構，在聚合多糖分子的過程中所需要的碳原子需要大約佔生長代謝的10%，需要5個ATP參與，2個NAD當輔因子，1個acetyl-CoA當作重複的單元鍵結，玻尿酸在細胞膜上進行生化合成(Chong and Nielsen, 2003)。玻尿

酸是 D-glucuronic acid 及 N-acetyl-D-glucosamine 合成而來，玻尿酸分子在生物體內通常多以陰離子的形式存在。主要是藉助於一種位於細胞膜上玻尿酸合成酵素(hyaluronan synthase)來合成製造玻尿酸這類酵素在脊椎動物身上有:HAS1、HAS2和HAS3三種類型，主要是以雙糖的活化核酶酸糖基、UDP-葡萄糖醛酸和 UDP-N-乙醯葡萄糖胺做為原料，將兩者交替鍵結在一起，以形成長鏈的玻尿酸分子，此時多糖鏈的還原末端所生成的HA鏈將不受限制地延伸。通常在一個完整的玻尿酸分子中，雙糖體的重複次數可達到一萬次以上時 每個雙糖體的分子量大約為四百萬道爾頓(生物體內大約介於10萬到一千萬道爾頓之間)(Laurent, 1987)。許多因素可調控HA的合成，通過調節HA合成酶分子中大小，亞基的磷酸化程度以調節HA合成酶活性，當存在合成HA前驅物UDP-GlcNAc、UDP-GlcA時，合成酶的大亞基內的酪氨酸(tyrosine)則發生自動磷酸化，會強制玻尿酸合成進行，這是引發HA合成的必經步驟。小亞基內絲胺酸也可磷酸化，當絲胺酸(serine)磷酸化程度增高時，則會將低酵素的活性激發、炎症因數、生長因數、細胞活性物質、腺苷酸環化酶、腫瘤細胞等均可通過調整HA合成酶的活性來調節HA

的合成 (凌, 2000)。

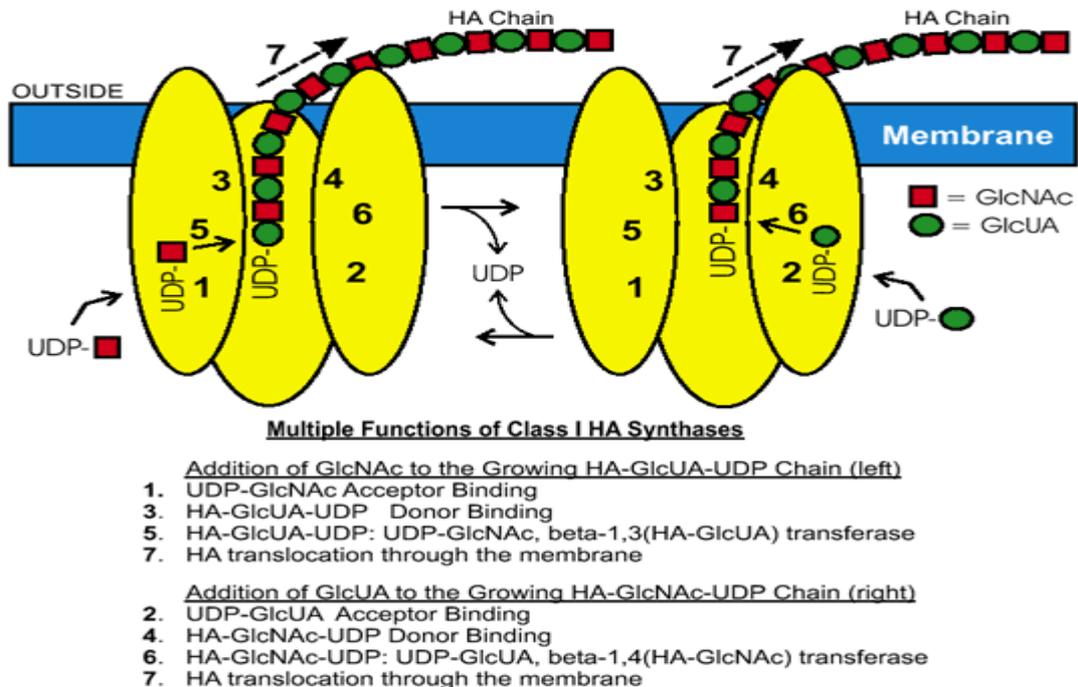


圖 2-9 玻尿酸生化合成圖 (Heldermon *et al.*, 2001)

2-3-3 玻尿酸的應用

(1) 醫學與藥品方面應用

A. 眼科方面的應用

眼玻璃體主要由 HA、膠原纖維和一些可溶性蛋白質組成。膠原的網狀結構作為支架，HA 的網狀結構結合大量的水形成的凝膠填充於其中，研究證實 HA 是目前眼用製劑最好的載體，既可增加藥物的生物利用度，還可減輕

藥物對眼睛的刺激，促進眼部創傷癒合，迅速緩解眼部不適症狀(Madsen, 1982)。HA溶液用於眼科手術具有以下特點：(1)塗布於角膜內皮，形成保護膜，可保護角膜內皮免受手術過程中的器械損傷；(2)維持眼前房適宜的深度和形狀，便於手術操作(3)在前房內提供一粘彈性空間，利於晶體、角膜植入物的著位和調整，減緩手術過程器械及晶體的運動速度，減少可能造成的組織損傷；(4)塗布於晶體的表面，可避免晶體植入時其表面對眼內組織的摩擦所致的創傷作為聚陰離子，可中和晶體表面的正電荷，降低炎症反應(5)清除晶體可能產生的會造成細胞損傷的遊離基；(6)粘附於較小的出血點可起到止血作用(7)為手術者提供了清晰的手術視野(Pape and Balazs, 1980)此外，HA還有顯著的親水能力及潤滑作用，對乾眼症具有明顯的緩解作用。臨床上已廣泛應用治療乾眼症的製劑0.1%HA滴眼液，並取得了較好的療效(Bertchez *et al.*, 1993)。

B. 關節炎方面的應用

玻尿酸(hyaluronan, HA)是由葡萄糖醛酸(glucuronic acid

和N-乙酰基葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine) 合成的黏多糖，廣泛存在人體結締組織細胞外間質中，是人體關節滑液和軟骨基質的主要成分之一 (Douglas *et al.*, 2008)，對關節生理功能的發揮起著重要的作用，HA用於膝、腕、肘及踝等關節的類風濕性關節炎治療 (rheumatoid arthritis, RA) (Isdale *et al.*, 1991)。而有研究發現，當發生骨性關節炎 (osteoarthritis, OA) 以及 RA 等關節疾病病時，滑液中 HA 濃度及相對分子量 (relative molecular weight, *Mr*) 均降低 (Balazs *et al.*, 1967)。

玻尿酸首次應用於醫藥方面，就是來取代關節滑液 (synovial fluid) 以減緩關節炎患者的疼痛，並改善關節的活動性。但注射玻尿酸溶液至關節中，只能一時提高關節的潤滑度，而無法持續地增加患者關節中玻尿酸的濃度。此乃因為患者的關節中，玻尿酸合成與分解的平衡被破壞，以致於玻尿酸被去聚合 (depolymerization) 的量高於合成的量。所以近來已使用經過交聯作用之玻尿酸水膠來作為患者關節的黏性補充劑，可延長其在關節中的潤滑效果 (Balazs, 1990)。

(2) 化妝品方面上應用

人體表皮組織和真皮組織層中含有高濃度的玻尿酸，皮膚中的含水量和玻尿酸含量的多寡有明顯的直接相關，隨著年齡增長，皮膚趨於老化，可能是皮膚組織中玻尿酸含量下降改變所造成的(Balazs and Band, 1984)。玻尿酸具有保濕性、潤滑性、也可促進細胞的增生與遷移，且玻尿酸小分子也可提供營養的性質(黃，2001)。而在玻尿酸的保濕性與其 M_r 有關， M_r 越高，保濕性能就越好，玻尿酸也可促進受傷部位的皮膚再生，由於皮膚受到陽光曝曬產生脫皮、紅腫等現象主要是因為紫外線的作用，而玻尿酸可促使表皮細胞增殖與分化，以及清除自由基的作用，於是可對受損的皮膚進行修復(凌，2000)。

(3) 食品工業上的應用

在1980年左右在日本出現玻尿酸保健食品，其理論玻尿酸經過口服經消化吸收增加體內玻尿酸合成前驅體，使得皮膚和其他組織中的玻尿酸合成量增加，使得皮膚的保水性增加使肌膚富有彈性及減少皺紋(Yamamoto, 1998)。口服玻尿酸產品是全身性的，是由真皮至表皮增加內源性玻尿酸的含量，使細胞活化。對於一些缺乏玻尿酸時會產生疾病的組織與器官，補充玻尿酸可維持這些組織與器官之健康。保健品用的玻尿酸一般從雞冠提取製備，純度要求較低，通常在10%以下。

2-3-4 玻尿酸的由來與萃取相關研究

1934 年美國哥倫比亞大學眼科教授 Meyer 等首先從牛眼玻璃體中分離出玻尿酸並分析其結構。由於是從希臘文 hyaloid (玻璃體) 萃取的 uronic acid (糖醛酸) 所以命名為 hyaluronic acid (玻尿酸)，此後開始以人和動物的組織中提取 HA。主要是以雞冠、臍帶、眼玻璃體、豬皮等為原料，不同組織中的 HA 的含量和提取難易程度各有差異 (Meyer, 1947)，而玻尿酸在軟結締組織的量為最高，其中以雞冠的濃度為最高 (Reed *et al.*, 1988)。

玻尿酸萃取方式依文獻為下列介紹，傳統萃取法以雞冠為原料在 58~60°C 下加乙醇脫脂，反應 6~9hr (pH 值為 6~6.5)，加入胰蛋白酶反應 10~11hr 再以酒精沉澱，過濾，以 P₂O₅ 乾燥後，或是在雞冠加入氯化鈉，加熱至 90°C 保溫 10min 再冷卻 50°C，pH 8.5~9.0 加入胰蛋白酶，45°C~50°C 進行反應 5hr~7hr。以矽藻土過濾，取濾液，再使用乙醇沉澱取出沉澱物，融於鹽水，氯仿分離蛋白，37°C 下鏈黴蛋白水解 24hr，用氯化十六烷基吡啶沉澱，沉澱物用 0.4 mol/L 的 NaCl 溶液攪拌解離，再以 95% 乙醇沉澱、脫水，乾燥即得 HA (Li *et al.*, 2000; Elson and Morgan, 1933)。

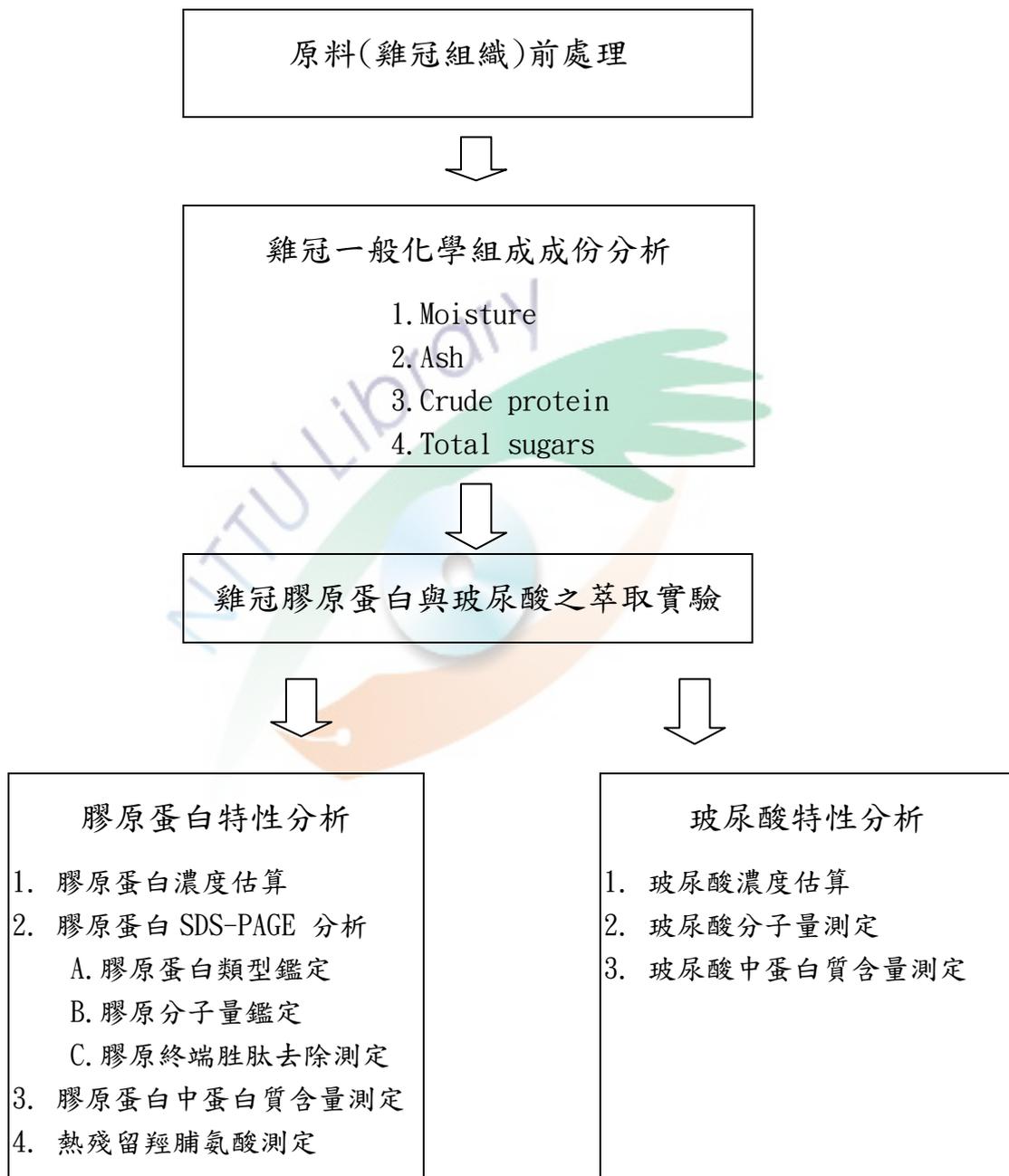
目前以微生物醱酵生產玻尿酸是很主流的作法, 在1937年就發現鏈球菌可生產玻尿酸(Kendall *et al.*, 1937), 而以 *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 醱酵生產玻尿酸時不同階段採用不同溶氧量會有效提高發酵產量(Nimrod *et al.*, 1988), 其原因為不受動物組織來源的影響, 動物組織中之玻尿酸與某些蛋白質或其他黏性多醣類形成複合物, 因此需要繁複的分離及純化步驟, 以致於動物萃取的玻尿酸製程非常的複雜, 造成成本非常的高, 在大部分的情況下, 萃取的混合物中含有玻尿酸分解酵素(hyaluronidase), 也有可能在萃取與純化的過程將玻尿酸分解而降低其分子量, 使得玻尿酸之黏度及含水能力下降。而我們在測定玻尿酸的分子量是採用黏度法, 原理是利用Mark-Houwink方程式 $[\eta] = KM^a$, 從黏度來推算出玻尿酸的 M_r , K 和 a 值則因不同高分子、不同溶劑及溫度而不同。試驗所用的尤伯洛德黏度計(Ubbelohde viscometer), 是一種用來測定牛頓性液體(Newtonian fluid)之運動黏度(kinetic viscosity)黏度計。所謂的牛頓性液體, 是指此液體流動時剪切力(shear stress)與剪切速率(shear rate)會成正比關係。而在測定濃度時由於玻尿酸為非均一物質, 是由多種不同相對 M_r 的玻尿酸分子組成, 故不能以一般均一物

質測定方式進行含量和純度的測定。其結構和組成都是一樣，由D-葡萄糖醛酸（glucuronic acid）和N-乙酰基-D-葡萄糖胺（N-acetylglucosamine）以等值莫耳比組成，而葡萄糖醛酸含量測定是最常使用的carbazole（卡唑）法(Bitter and Muir, 1962)。



第三章 材料與方法

3-1 實驗架構



3-2 原料來源及處理

本試驗所使用的雞冠，購自台東市場，將所購買的雞冠於自來水中清洗，把血液以及髒污的部位去除後，將雞冠切成直徑大約1至1.5公分，分袋包裝，於-20°C下保存。

3-3 雞冠一般化學組成分析

(1)水份測定(A. O. A. C., 1984)。

- A. 洗淨坩鍋後置於105°C烘箱乾燥1小時以上，取出恢復到室溫，測量、紀錄乾燥後重量。
- B. 精確秤取樣品5克，再放入105°C烘箱乾燥3~5小時，取出恢復至室溫秤重，測量並紀錄之。

$$\text{水分}(\%) = \frac{b-c}{b-a} \times 100$$

a：坩鍋之重量 (g)

b：坩鍋加樣品之重量 (g)

c：坩鍋加樣品乾燥至恆重時之重量 (g)

(2)灰份測定(A. O. A. C., 1984)。

- A. 將坩鍋洗淨，置於500°C灰化爐中至少加熱5小時。

- B. 稱取坩鍋重量, 精確秤取樣品, 蓋上坩鍋蓋, 移入灰化爐。
- C. 分段加溫, 先加熱至105°C 乾燥5小時, 在移入灰化爐後加熱至500°C、12小時, 直至所有樣品均呈白色灰燼。
- D. 將坩鍋取出放入乾燥器, 恢復至室溫稱取坩鍋+白色灰燼重量。
- 灰分(%) = 殘留物重+坩鍋 / 樣品重 × 100。

(3)粗蛋白質測定(A. O. A. C., 1984)。

凱氏法 (Kjedhl method)

實驗試劑

1. 指示劑 (0.2% methyl red : 0.2% bromocresol green = 1 : 5)
2. 4%硼酸溶液
3. 32 %氫氧化鈉溶液
4. 0.1N 硫酸標準溶液

實驗流程

- A. 精秤樣品置入分解瓶內並記錄之, 加入微量硒粉作為催化劑, 再加入 20mL 之濃硫酸, 置於自動分解裝置上分解360°C, 2小時直至透明。
- B. 取出分解瓶待冷卻後, 將分解瓶置於蒸餾裝置, 取4%硼酸溶液

50mL，放入250mL 三角燒瓶。

C. 加入3~5滴指示劑（0.2% methyl red：0.2% bromocresol green(1：5)），連接蒸餾裝置，使冷凝器下端浸入三角瓶之硼酸溶液內，將32%氫氧化鈉溶液100mL~150mL慢慢加入分解瓶內，使其內容物呈強鹼性，立即蒸餾6分鐘。

D. 再以0.1N硫酸標準溶液滴定至還原色，其所得之值經計算即為粗蛋白質含量。另與本試驗同時做空白試驗。

粗蛋白質計算方式：

$$\text{粗蛋白質(\%)} = (V_2 - V_1) \times F \times 0.001401 \times N.F \times 100 / S$$

S：樣品重 (g)

V₁：空白試驗之0.1N 鹽酸 溶液滴定值 (mL)

V₂：本試驗之0.1N鹽酸溶液滴定值 (mL)

N.F：氮係數 6.25

F：0.1N 鹽酸力價

(4) 總糖(李, 2003)

實驗試劑

1. 酚(phenol) 5%

2. 濃硫酸98%

3. 葡萄糖標準工作溶液:精秤0.1g葡萄糖, 定量到100mL, 此為1mg/mL

葡萄糖標準工作溶液

葡萄糖標準曲線配製

取為2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 葡萄糖溶液, 取上述不同濃度的1mL葡萄糖溶液, 各加入1mL 5% 酚溶液, 於10~20秒內加入5mL 濃硫酸溶液, 混合均勻放入水浴槽於25°C 水浴15分鐘, 以分光光度計在490 nm波長處測定吸光度, 繪製標準曲線。

實驗流程

取雞冠1克加入10克純水於均質機內打碎均勻, 取1mL樣品溶液放入試管, 依照上述步驟求得吸光值代入標準曲線求總糖量。

3-4 萃取實驗

3-4-1 膠原蛋白之萃取

實驗試劑的配製

1. 胃蛋白酶(pepsin)溶液: 秤取10克胃蛋白酶加蒸餾水定容至250mL, 使其濃度為4(w/v)%

2. 醋酸溶液(acetic acid solution):250ml的醋酸加蒸餾水定容至

4000ml，使其濃度為0.5 mol。

3. 丙酮(acetone)

4. 99.5%乙醇(alcohol)

實驗流程

- A. 秤取回溫的250克雞冠並去除多餘水分，而後加入胃蛋白酶溶液及醋酸溶液，先以果汁機高速攪均作用大約10至15分鐘後取出。
- B. 將液體移入大型三角錐瓶並架設攪拌裝置(SHIN KWANG DC-15)，移至冷藏櫃10°C中持續攪拌24小時(轉速調至6)，使醋酸溶液和胃蛋白酶溶液和雞冠完全作用。
- C. 膠原蛋白粗萃取液以高速離心機離心以分離雜質，離心轉速為5000 xg 、時間為30分鐘、溫度為10°C，離心後取上層液。
- D. 把膠原蛋白粗萃取液加入等量的丙酮溶液，將丙酮相(acetone phase)及水相(water phase)，兩相液體分別收集分裝之。
- E. 懸浮的白色膠原蛋白取出後加入百分之99.5%的乙醇浸泡大約10分鐘後，再以高速離心機離心以去除乙醇，離心設定的條件是，轉速為 5000 xg ，10分鐘，10°C，離心後去除上層液體得可得膠原蛋白。

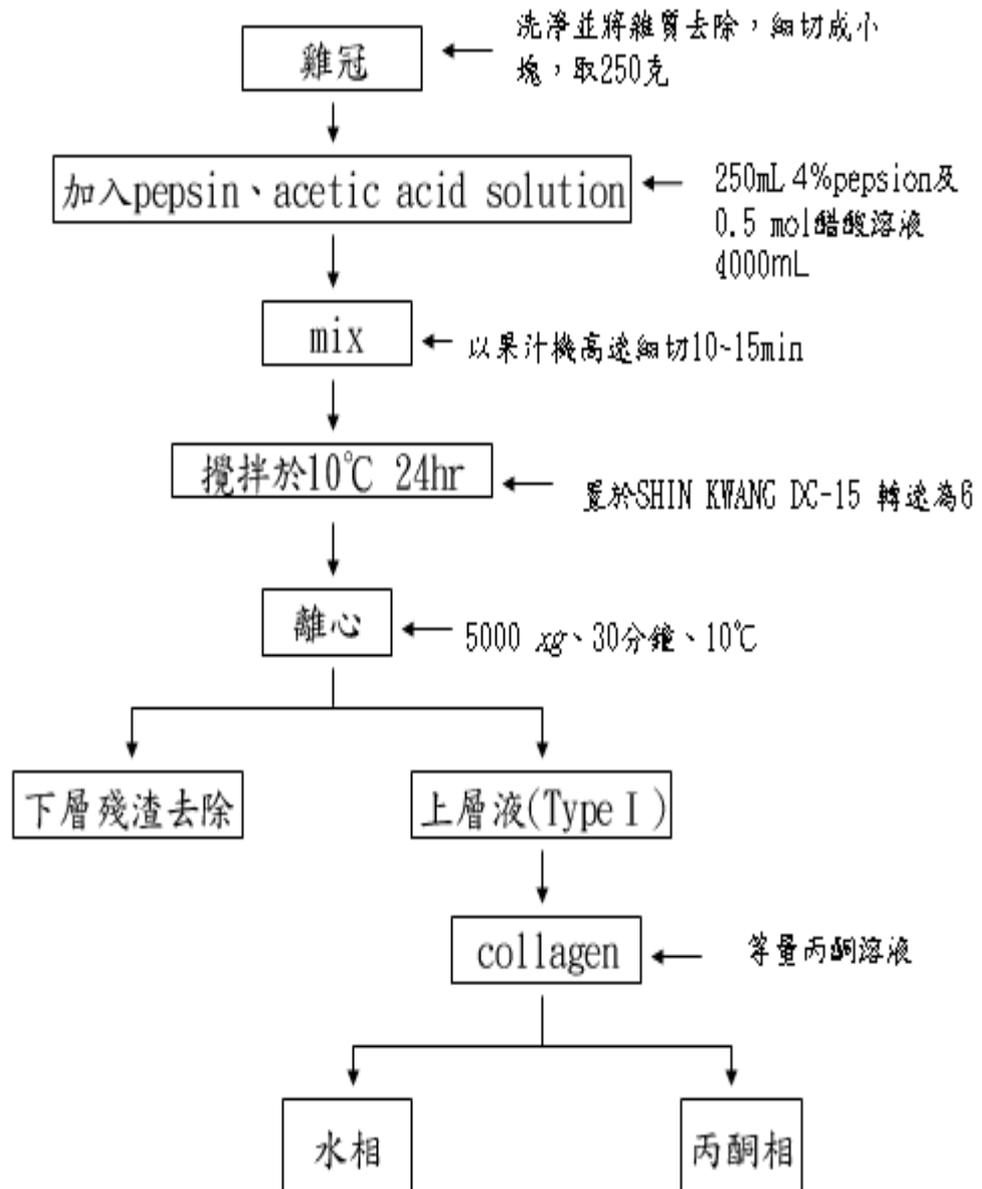


圖 3-1 膠原蛋白萃取流程圖

註：丙酮相(acetone phase)及水相(water phase)，兩相液體分別收

集分裝之。

3-4-2 玻尿酸萃取

實驗試劑的配製

1. 95%乙醇(alcohol)
2. 氫氧化鈉(sodium hydroxide)5M
3. 丙酮(acetone)

實驗流程

- A. 將丙酮相(acetone phase)液體取出後倒入分液漏斗，再加入等量的丙酮，靜置1小時等待其分層，取上層使用。
- B. 把上層的液體100mL加入三倍量的95%乙醇，再加入5M氫氧化鈉4mL，在室溫下攪拌12小時使玻尿酸沉澱。
- C. 將玻尿酸粗萃取液使用高速離心機離心，離心轉速為5000 xg 、時間為10分鐘、溫度為10°C，離心後去除上層液體得可得玻尿酸。

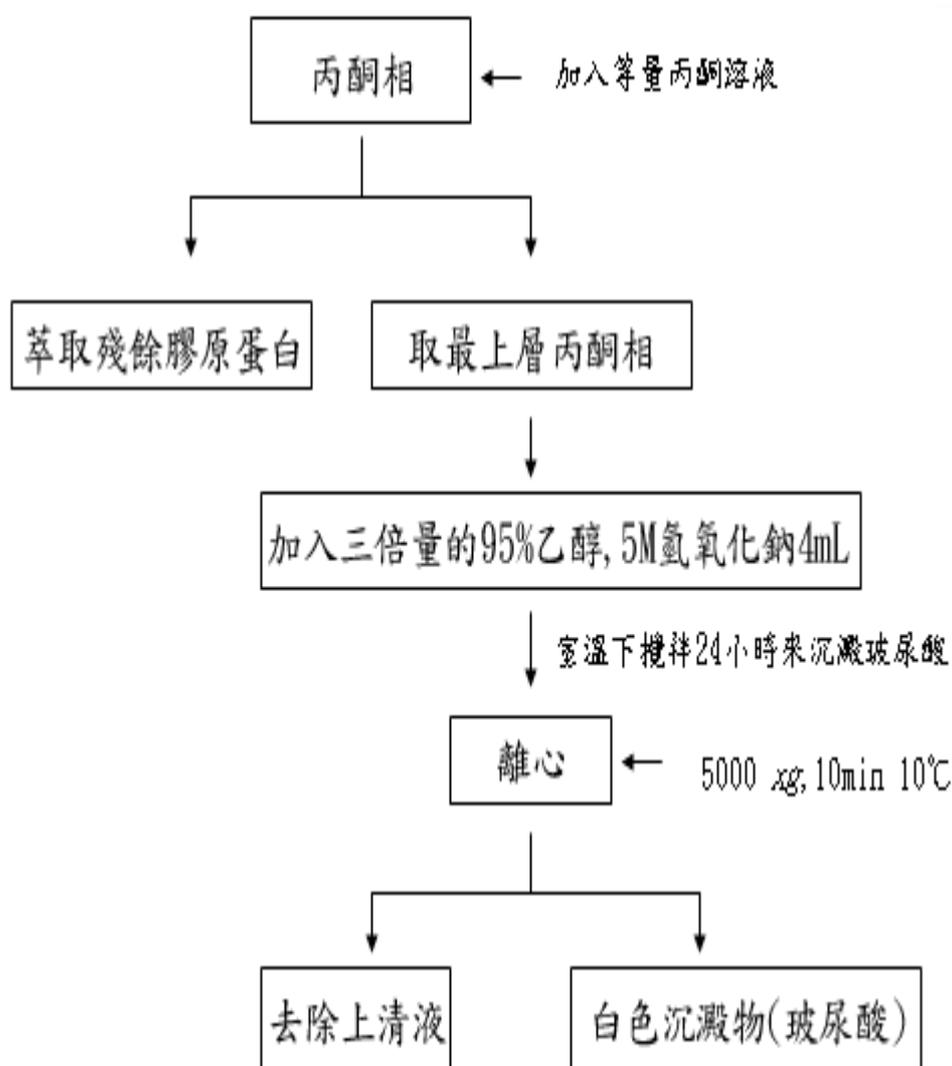


圖 3-2 玻尿酸萃取流程圖

3-4-3 產物分析

(1) 玻尿酸薄層層析(Macherey, 1990)

實驗試劑

1. 展開劑: methanol/0.01M potassium phosphate buffer(1:1)
2. 染劑:(0.1% alcian blue、50% alcohol、10mL acetic acid加入蒸餾水定量至300mL / 0.04g bromocresol green加入95% alcohol 定量到100ml. (1:1 v/v))

實驗流程

- A. 取矽膠薄層板(silica gel TLC)裁切適當大小在由底部向上三公分處及12公分處劃上各一水平線。
- B. 將兩相液體water phase、acetone phase與膠原蛋白標準品溶液以毛細管在底部三公分處，滴上水溶液等待其乾燥。
- C. 將矽膠薄層板放入玻璃層析槽，蓋起玻蓋展開液面須低於鉛筆水平線下。
- D. 當展開液升至板上12公分鉛筆水平線時，取出後染色15分鐘後以5%醋酸脫色後吹乾，計算Rf值，Rf值為自起始點起樣品中心點上升高度除以溶劑上升高度的比值。

(2) 膠原蛋白薄層層析(Macherey, 1990)

實驗試劑

1. 展開劑: 1M acetic acid / 1M hydrochloric acid(1:1)、0.5M sodium acetate, 加入water/methanol(20%)
2. 染劑: 添加1% ninhydrin至pyridine/glacial acetic (5:1, v/v)

實驗流程

- A. 取矽膠薄層板裁切適當大小在由底部向上三公分處及12公分處劃上各一水平線。
- B. 將分層的兩相溶液water phase、acetone phase與膠原蛋白 type 1標準品水溶液以毛細管在底部三公分處，滴上水溶液等待其乾燥。
- C. 將矽膠薄層板放入玻璃層析槽，蓋起玻蓋展開液面須低於鉛筆水平線下。
- D. 當展開液升至板上12公分鉛筆水平線時，取出染色15分鐘後，100°C加熱五分鐘，計算Rf值。

3-5 膠原蛋白特性分析

(1) 膠原蛋白含量測定

羥脯胺酸含量分析(hydroxyproline assay) (藍等, 2006)

實驗試劑

1. Citrate buffer solutions pH 6.8 : 26g citrate , 14g sodium hydroxide和78g sodium Acetate溶於500ml蒸餾水中，加入250ml n-propyl alcohol，用蒸餾水定量1000mL。此液於4°C在深色瓶中保存，可穩定幾個星期。
2. Chloramine T 試劑：溶解1.41g chloramine T於100mL citrate buffer solutions (現配現用)。
3. P-dimethylaminobenzaldehyde reagent : 35mL perchloric acid. [60% (m/m)]，稱取10g p-dimethylaminobenzaldehyde，緩慢加入65mL isopropyl alcohol (現配現用)。
4. Hydroxyproline.標準儲備液，500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ：準確稱hydroxyproline標準品50.0mg，用少量水溶解於100mL容量瓶中，加入一滴3 mol/L 硫酸定容至刻度。該溶液在4°C下能穩定至少一個月。
5. Hydroxyproline標準工作液：吸取5mL hydroxyproline標準儲備液500ml容量瓶中，用蒸餾水稀釋定容 (臨用前配)，濃度5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

羥脯胺酸(hydroxyproline)標準曲線配製

配製羥脯胺酸濃度分別為0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。吸取4mL上述稀釋好的溶液於具塞試管中，加入2mL chloramine T，搖

勻後在室溫下放置20min，加入2mL p-dimethylaminobenzaldehyde reagent，搖勻後迅速將試管移至60°C的水浴鍋中，保溫20min，再用流動的自來水冷卻試管至少3min，室溫下放置30min，後用分光光度計在558nm處測量各個不同濃度標準溶液的吸光值，然後以濃度對吸光值作圖，即可得到羥脯胺酸濃度標準曲線。

實驗流程

- A. 稱取樣品4g左右於錐形瓶中，於鹽酸溶液中120°C水解3小時，定容00250ml容量瓶中。
- B. 稀釋該溶液中的羥脯胺酸濃度至0.5~2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，再經chloramine T氧化，最後根據氧化後的羥脯胺酸與對二甲氨基苯甲醛 (p-dimethylamino- benzaldehyde)反應生成的紅色化合物，在558nm測定吸光值，將之代入標準曲線後，再乘以稀釋倍率，可得羥脯胺酸濃度。

(2)熱殘留性羥脯胺酸含量 (thermal residual hydroxyproline content) (Schaub, 1963)

實驗試劑

1. 林格試液：(860mg sodium chloride, 30mg potassium chloride

和33mg calcium chloride 加蒸餾水定量至100mL pH 7.0。

實驗流程

- A. 取5g樣品加入15mL林格試液於4°C 浸泡1小時使樣品充分膨潤。置入水浴槽中以不同溫度加熱1小時。
- B. 以3000 \times g 離心30分鐘，棄卻上層液，留下殘渣作為樣品，以上述測定羧脯胺酸含量方法測定，所得之測量值即為熱殘留性羧脯胺酸含量。

(3) 膠原蛋白SDS-PAGE 電泳分析(Nagai, *et al.*, 2000)

實驗試劑

1. 5X running buffer pH 8.3: Tris 90 mM 54.5 g、EDTA·2Na 2.5 mM 4.7 g、Boric acid 80 mM 24.8 g、加水800 mL 溶解，以NaOH 調pH至8.4後，加水至1000 mL，室溫保存。使用時以蒸餾水稀釋五倍。
2. 蛋白質變性液(protein denaturing solution): 取distilled water 4mL，pH6.8的0.5M tris-HCl 1mL，glycerol 1mL，10%SDS 1.6mL，2- β -mercaptoethanol 0.4mL，0.05%(w/v) bromophenol blue 0.2mL移入褐色瓶並貯存於4°C下備用。
3. Fixing solution

取250mL isopropanol，100mL glacial acid，以去離子水定量至650mL，並貯存於4°C下備用。

4. 膠片染色液(CBR R250)

0.25% comassie Brilliant R250，25% isopropanol 7% acetic acid
再以蒸餾水定量至1000mL，貯存於室溫下備用。

5. 膠片脫色液：取5% methanol 7.5% acetic acid 用蒸餾水定量至100mL，混和後貯存於室溫下備用。

6. 膠片保存液：取7% acetic acid，混和後貯存於室溫下備用。

蛋白質變性處理

取膠原蛋白和蛋白質變性液以1:1比例混合加熱至95°C加熱5分鐘。

電泳之操作

A . 膠片(PIERCE, 4~20% Precise™ GEL)以固定夾固定後，於電泳槽(Mini-protein，BIO-RAD)中注入running buffer。

B . 以微量注射器吸取10 μ L 樣品液，注入stacking gel 之凹槽中。

C. 啟動電源供應器，以110V之電力條件進行泳動。

D. 當藍色指示劑到達離膠片底部約0.5cm時即停止泳動。

E. 將膠片從裝置上取下，將膠片取出，將膠片置於有蓋之塑膠盒

，加入染色液後於震盪器染色30分鐘。

F. 將染色液倒出，再加入脫色液退染30分鐘，更換一次脫色液
後震盪隔夜退染。

H. 將退染完畢的膠片浸於保存液中保存。

(4)蛋白質濃度測定(Bradford, 1976)

實驗試劑

1. 牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)
2. Bio-Rad染劑(dye reagent)

蛋白質標準曲線配製

1. 以牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)為標準品，配置濃度
0.5~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 為標準品。
2. 取樣品以蒸餾水定量至200 μL ，在加入1000 μL 的Bio-Rad染劑
(dye reagent)，反應5分鐘，再用分光光度計在波長595nm測量各
個不同濃度標準溶液的吸光值，然後以濃度對吸光值作圖，即可得
到蛋白質濃度標準曲線。

實驗流程

取樣品以蒸餾水定量至200 μL ，在加入1000 μL 的Bio-Rad染劑，反應5

分鐘,再以利用分光光度計在波長595nm測量吸光值,將之代入標準曲線後,再乘以稀釋倍率,可得蛋白質濃度。

(5) 膠原蛋白等電點測定(王, 2001)

實驗試劑

1. 3%醋酸溶液
2. 6 mol/L 氫氧化鈉

實驗流程

將所萃取出之膠原蛋白溶解於3%醋酸溶液中,在緩慢滴入6 mol/L 氫氧化鈉,直至發生沉澱,此時用pH meter測定其pH值。

3-6 玻尿酸特性分析

(1) 玻尿酸濃度分析(Bitter, 1962)

實驗試劑

1. 硼砂硫酸液: 稱取2.38 g 四硼酸鈉(Sodium tetraborate), 溶於250 mL 濃硫酸中。
2. Carbazole試液: 稱取0.125 g carbazole 溶於100 mL 無水乙醇, 保存於4°C 冰箱(約可保存三個月)。

葡萄糖醛酸標準曲線配製

1. 精密稱取葡萄糖醛酸得0.01、0.02、0.03、0.04和0.05 $\mu\text{g/mL}$ 濃度。
2. 將試管置於冰水浴中4°C後，加入5 mL硼砂硫酸液，再加入1 mL 標準溶液，輕輕搖晃使其均勻混合。
3. 將均勻混合的試液放置於沸水中水浴10分鐘後，以冰水浴4°C冷卻。
4. 待上述試液冷卻之後，依序加入200 μl 之吡啶試液，混合均勻後再以沸水水浴15分鐘。
5. 將試管置於水中冷卻後，利用分光光度計在波長525nm下測量各個不同濃度標準溶液的吸光值，然後以濃度對吸光值作圖，即可得到葡萄糖醛酸濃度標準曲線。

實驗流程

稱取樣品依上述方法, 利用濃硫酸將玻尿酸水解成不穩定之己糖醛酸(hexuronic acid)衍生物後, 再與carbazole反應, 形成粉紅色的發色基團, 以分光光度計在波長525nm下測量其吸光值, 將之代入標準曲線後, 再乘以稀釋倍率, 可得葡萄糖醛酸濃度。

(2) 蛋白質含量測定 (Bradford, 1976)

依上述方法

(3) 玻尿酸分子量分析 (陳, 1996)

實驗流程

- A. 以玻尿酸溶於水溶液，配製不同的濃度(0~50mg/ml)。
- B. 把待測溶液倒入黏度計內，液面至A、B間。
- C. 用安全吸球把液體吸至C以上，測量液體流經刻度D、E間的時間，量測重覆3次或以上。將所求得之 η_{inh} (固有黏度, inherent viscosity) 對玻尿酸濃度(%)作圖後，以外插法求得濃度為零時之黏度，此數值為本質黏度 ($[\eta]$, intrinsic viscosity)。最後利用Mark-Houwink方程式 (陳, 1996) 來推算玻尿酸的分子量： $[\eta] = KM^a$ ，此時 $K=0.029$ ， $a=0.80$ 。

相對黏度 (relative viscosity) $\eta_{rel} = t / t_0$

比黏度 (specific viscosity) $\eta_{sp} = (t / t_0) - 1$

還原黏度 (reduced viscosity) $\eta_{red} = \eta_{sp} / C$

固有黏度 (inherent viscosity) $\eta_{inh} = \ln \eta_{red} / C$

極限黏度 (intrinsic viscosity) $[\eta] = (\eta_{red})_{C \rightarrow 0}$ or $(\eta_{inh})_{C \rightarrow 0}$

t：幾丁聚醣溶液通過毛細管b、d 兩處所需的時間

t₀：溶劑通過毛細管b、d 兩處所需的時間

C：樣品的濃度

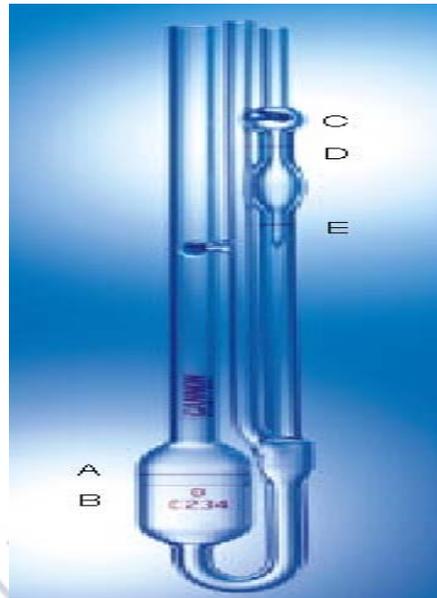


圖 3-2 Ubbelohde 黏度計

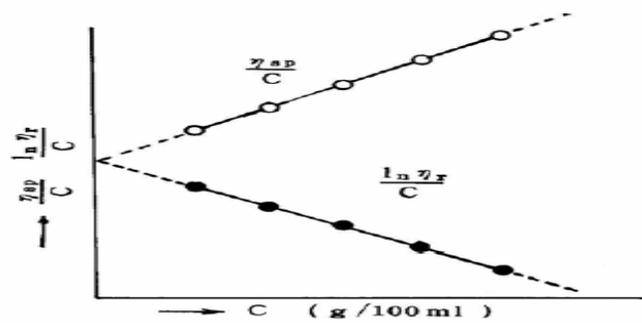


圖 3-3 應用外插法求極限黏度

四 結果與討論

4-1 雞冠一般化學特性

雞肉不可食部份 (inedible portion of meat) 含有大量之蛋白質如膠原蛋白、彈性纖維蛋白、角蛋白以及血液蛋白等 (陳, 2000)。

本實驗所使用的雞冠平均為 35g, 表 4-1 為雞冠的一般化學組成成份, 其水份、灰份、粗蛋白、總糖量分別為 83、0.2、9.25、5.92%, 由結果中發現雞冠中水分含量最高, 推論這是由於雞冠中富含黏液, 導致水分含量較高, 而粗蛋白在雞冠成分中也有 9.25%, 而灰份、總糖量在雞冠成分中所佔的百分比較低, 經換算雞冠內粗蛋白中含有 80% 的膠原蛋白, 而雞冠中總糖內含有 72% 的玻尿酸。

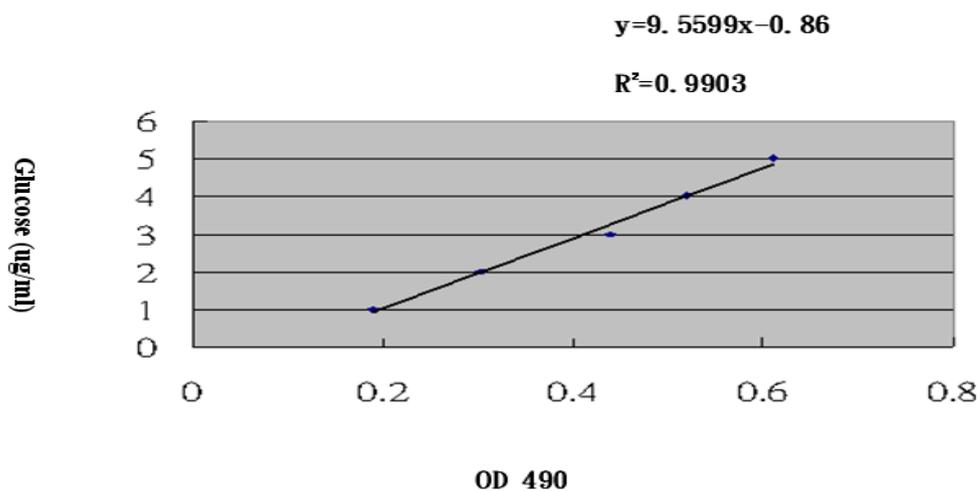


圖 4.1 總糖標準曲線

表 4-1 雞冠之一般化學組成

Items/source	Moisture (%)	Ash (%)	Crude protein (%)	Total Sugars (%)
Cocks combs	83	0.2	9.25	5.92

4-2 薄膜層析

由於雞冠是玻尿酸含量為最高的動物組織，所以萃取膠原蛋白後想測試是否在兩相液體中有玻尿酸的成分在，所以將玻尿酸及膠原蛋白的標準品分別配置與丙酮相與水相做薄膜層析，在圖 4-2 (A)可看出除了膠原蛋白標準品有跑出，但是在丙酮相與水相並無跑出，而在 4-2(B)中可發現玻尿酸與由丙酮相所萃取出之玻尿酸跑出的 Rf 值相同，於是可推測在萃取完膠原蛋白的上層液丙酮相中有玻尿酸的成分，於是之後便取丙酮相來做玻尿酸後續的萃取液。

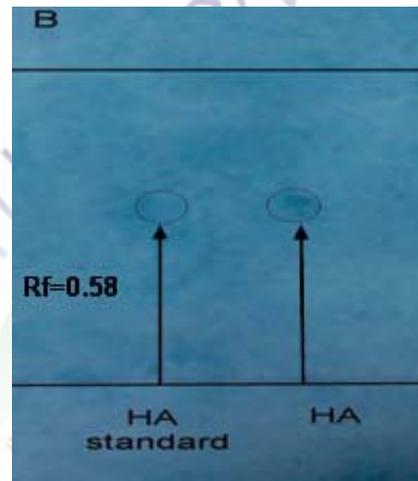
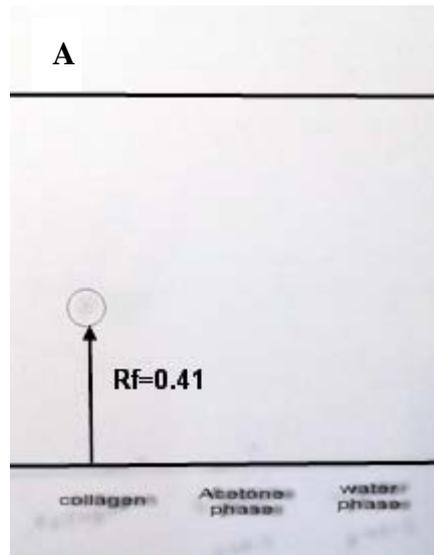


圖 4-2 薄膜層析

A. 膠原蛋白薄膜層析圖

B. 玻尿酸薄膜層析圖

4-3 膠原蛋白濃度測定

由於膠原蛋白中含有大量的羥脯胺酸(hydroxyproline)，這是這類蛋白特有的性質，故我們可以以此來根據來推論出膠原蛋白的含量，故以

羥脯氨酸(hydroxyproline)來做標準曲線，最後再回推即可得膠原蛋白濃度。以樣品所測出的吸光值帶入在圖 4-3 標準曲線，再乘以稀釋倍數，即得到羥脯氨酸的濃度 0.29 mg/mL，而羥脯氨酸在膠原蛋白內佔 12.5%故將所得到的濃度乘上 12.5，故樣品所測得的膠原蛋白濃度為以膠原蛋白粗萃取中所萃取出之膠原蛋白濃度為 3.6mg/mL，而在丙酮相中第二次所萃取出之膠原蛋白濃度為 0.4mg/mL，而兩次所萃取出之膠原蛋白濃度相加為 4 mg/mL，而經換算得到膠原蛋白的純度為 57%，而回收率為 85%，影響膠原蛋白的純度是由於不同的萃取方法所能萃出的膠原蛋白含量會有差異性，且本實驗所採用的方法中在後續處理方面並未有純化的過程，使得有非膠原蛋白的物質在其中，之後若能在此有後續的研究相信能提高膠原蛋白的純度。

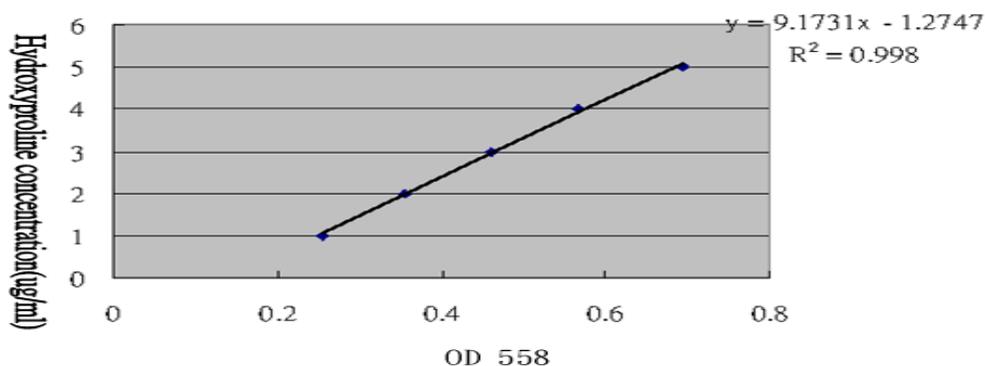


圖 4-3 羥脯氨酸(hydroxyproline)標準曲線

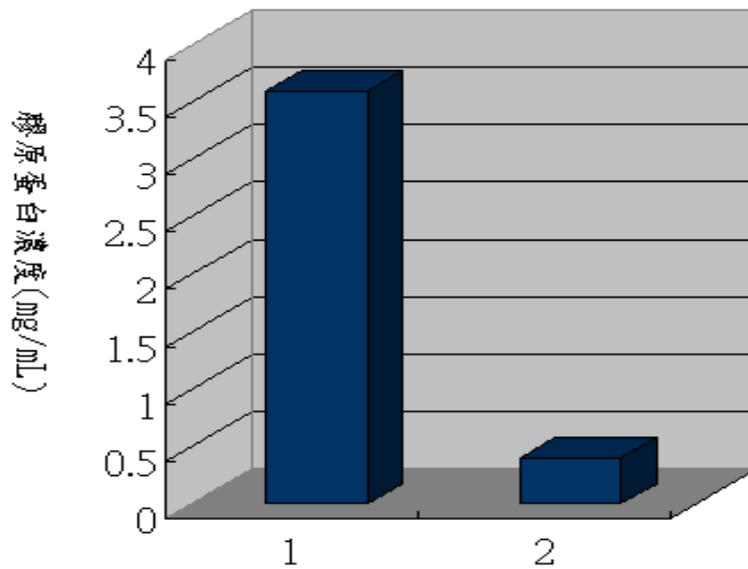


圖 4-4 雞冠萃取出膠原蛋白濃度(1)由膠原蛋白粗萃取液中第一次萃取出膠原蛋白(2)由丙酮相中第二次萃取出膠原蛋白

4-4 膠原蛋白蛋白質濃度測定

由於在雞冠的成分分析中可發現，雞冠除了水分之外其蛋白質含量為高，經由實驗測出萃取出膠原蛋白產物的總蛋白量，在比對膠原蛋白含量即可得知在萃取過程中雜蛋白去除是否完全，故我們測定所得到樣品的蛋白質濃度為 13.4mg/mL 與相同使用醋酸溶液處理 24 小時的 5.24mg/mL(傅等, 2004)相比來的高，而在此數據中可看出樣品中蛋白質濃度有 13.4mg/mL，但是在膠原蛋白濃度測定的結果中只 4mg/mL，由此數據可看出此樣品中雜蛋白去除的不夠完全，導致膠原蛋白的純度偏低。

4-5 膠原蛋白等電點測定

當蛋白質溶液處於某一 pH 時，蛋白質游離成正、負離子的趨勢相等，即成為兼性離子(zwitterion, 淨電荷為 0)，此時溶液的 pH 值稱為蛋白質的等電點(isoelectric point, 簡寫 pI)。當到達等電點時蛋白質會沉澱，而樣品所測出的等電點為 pH 6.5，亦即再此 pH 下會產生沉澱，所以等電點可用來對於膠原蛋白分離的一個指標。

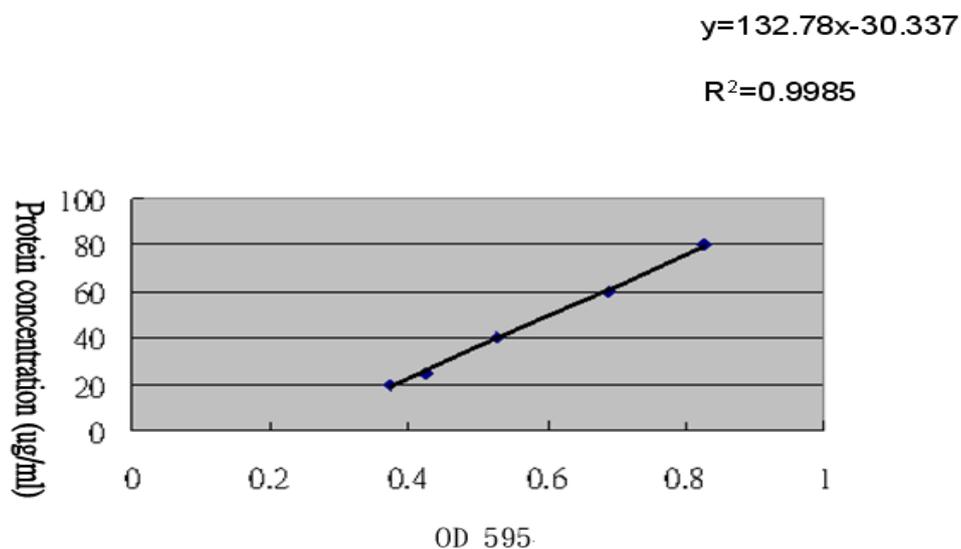


圖 4-5 蛋白質標準曲線

4-6 蛋白質電泳 (SDS - PAGE)

(1) 膠原蛋白類型鑑定

電泳是普遍來觀察膠原蛋白二級結構的工具(Deyl, *et al.*, 2000)並依樣品變性與否區分為非還原(non-reduction)及還原(reduction)兩大系統,目前以還原系統電泳廣泛應用於膠原蛋白之評估。

一般在雞冠中所萃取出來的膠原蛋白皆屬於第一型膠原蛋白,其組成第一型膠原蛋白結構是由兩條 α_1 chain 及一條 α_2 chain 所組成,即為 $\alpha_1(I)_2 \alpha_2(I)$ 。第I型膠原蛋白含量約佔全部膠原蛋白含量的90%,也是醫學上使用最多的膠原蛋白(李等,1993)。本實驗以購自Sigma第一型膠原蛋白與採用李炎專利方法所萃出的膠原蛋白,進行蛋白質電泳(SDS - PAGE),在圖4-6可發現明顯看到有兩條 α chain band,顯示其具有兩種不同分子量的 α chain 組成型態, α_1 chain 及 α_2 chain的band 的出現。在圖4-6中也可發現到在蛋白質電泳結果中可看有二聚體(dimer, 以 β 表示),這是由於膠原蛋白具有分子鏈內及分子鏈間的共價交聯鍵,因不易被破壞打斷,所以導致有二聚體的出現。



圖 4-6 膠原蛋白類型鑑定之SDS-PAGE分析結果

1. 牛皮膠原蛋白 (type I)
2. 雞冠膠原蛋白粗萃取產物

(2) 膠原分子量鑑定

不過萃取來源方式及膠原蛋白種類差異性不同而分子量會有差異，而膠原蛋白之胜肽鏈(α -chain)分子量大小約100KDa左右，故若膠片中出現低於此分子量的band，表示有其他雜蛋白的汙染或膠原蛋白降解(degradation)，本實驗電泳所使用的Marker分別為212KDa、121KDa、

100KDa、54KDa、38KDa、29KDa、20KDa，用以觀察由雞冠中所萃取出
膠原蛋白分子量，在圖4-7中可看見分子量121KDa~212 KDa與文獻
117KDa ~214KDa (Bellon, *et al.*, 1988)相符。

(3) 膠原終端胜肽去除測定

運用在製藥工業及生醫材料的膠原蛋白，若是由動物組織中萃取而
得，則會有致病、發炎的風險，若是在萃取膠原蛋白製程中將低終端
胜肽膠原蛋白(telopeptide-poor collagen)去除，則將不會引發人體
過敏反應之疑慮，而由於C-端肽及N-端肽分子量皆在50 kDa以下
(Leon and Dixie, 1987)，固以此為根據來觀察終端胜肽(telopeptide)
去除與否，而由於本法萃取過程並未要求同時完全達到去除終端胜肽
(telopeptide)為目的，固以此法所萃取出的膠原蛋白經SDS-PAGE，
電泳圖4-7顯示以pepsin處理之膠原蛋白於去端肽的結果，在圖中可
見有少量50kDa以下之分子量不同的小分子多肽產生，則代表在萃取
過程中pepsin並未完全切除終端胜肽(telopeptide)，之後若需運用
在藥用或生醫材料上，可由pepsin來處理將cystine 產生的雙硫鍵部
位進行端肽上過敏部位的切除，使終端胜(telopeptide)完全去除。

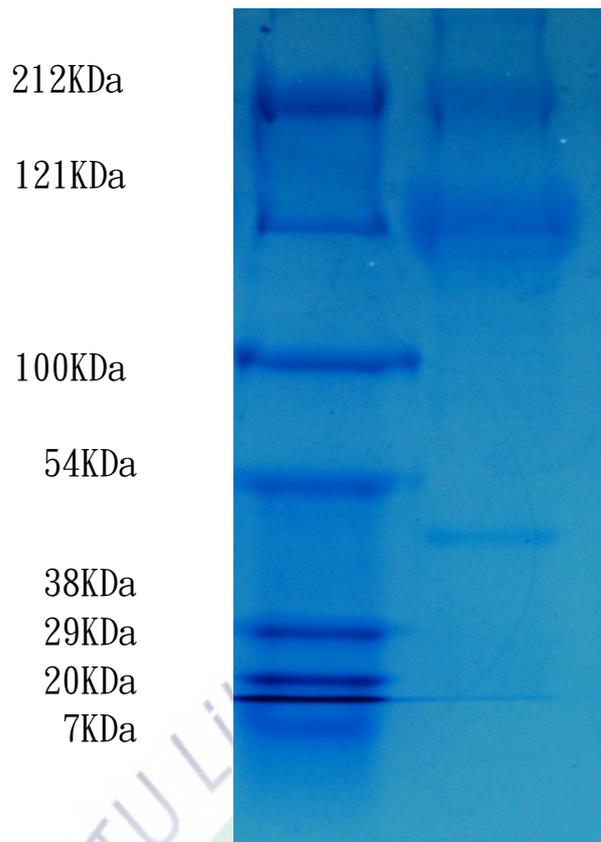


圖 4-7 膠原蛋白之 SDS-PAGE 分析結果與分子量鑑定
和膠原終端胜肽去除測定

4-7 膠原蛋白之熱穩定性

熱變性與與膠原蛋白中羧脯氨酸的含量有直接關聯 (Asghar and Henrickson, 1982 ; Bailey and Light, 1989) 。在實驗中把膠原蛋白分別經過30°C、33°C、36°C、39°C、41°C、44°C不同的溫度下加

熱，之後使用分光光度計去測Hyp的吸光值，在圖4-8中萃取出來的膠原蛋白經過30°C、33°C、36°C、39°C加熱時，其吸光值不變也就表示在所萃取出來的膠原蛋白在常溫下可維持其穩定性，而在41°C時其吸光值呈現明顯的下降，也就表示在經過41°C至44°C加熱時膠原蛋白三螺旋結構發生部分分離和斷裂。

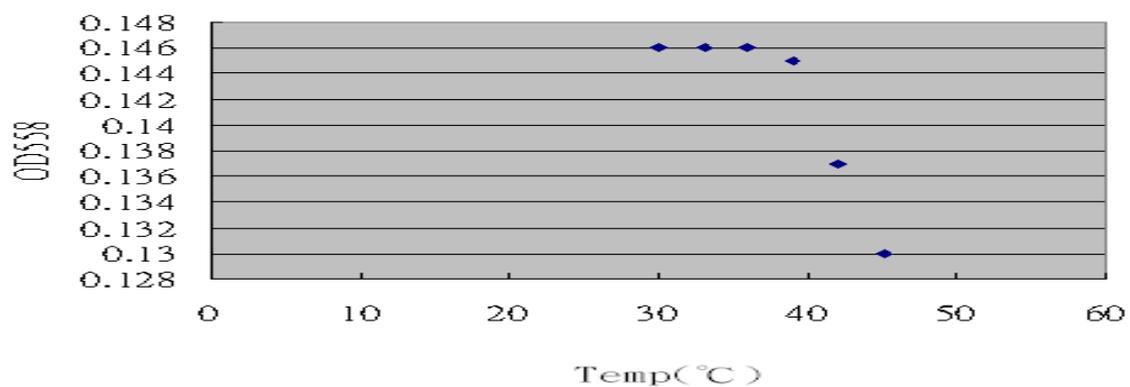


圖 4.8 羥脯氨酸(hydroxyproline)經加熱後與吸光值的關係圖

4-8 玻尿酸濃度測定

玻尿酸的結構與組成是由D-葡萄糖醛酸(D-glucuronic acid)及D-N-乙酰葡萄糖胺(D-N-acetylglucosamine)，根據玻尿酸結構計算，每100 mg純品玻尿酸完全水解後可產生葡萄糖醛酸48.38mg，因此得知

葡萄糖醛酸濃度後，再乘上2.07倍（玻尿酸和葡萄糖醛酸含量為100/48.38，約為2.07），即為玻尿酸的濃度。以樣品所測出的吸光值帶入再乘以稀釋倍數，即得到葡萄糖醛酸的濃度為1.3 mg/mL，而將所得到的濃度乘上2.07，故樣品所測得的玻尿酸濃度2.69mg/mL，經換算玻尿酸純度為45%，而回收率為83%，濃度的差距推測是由於實驗萃取步驟無純化過程所導致，樣品中有非玻尿酸物質存在。

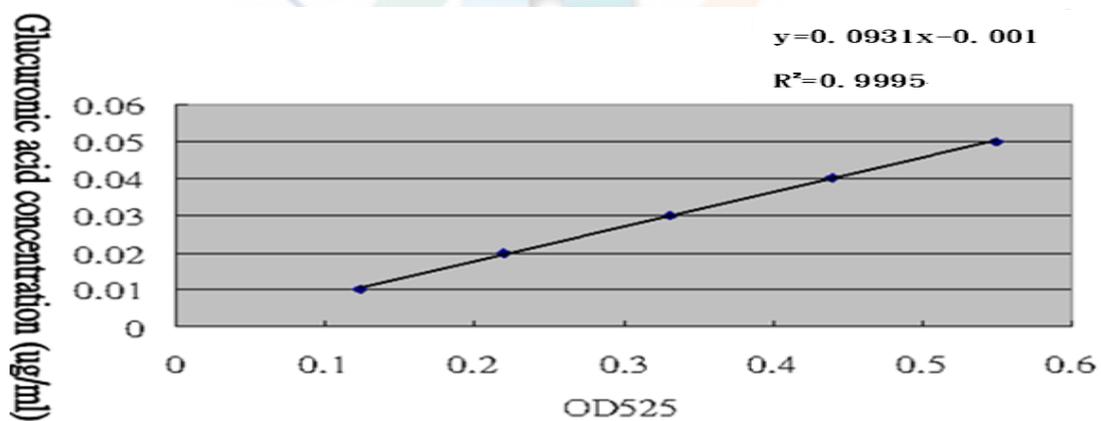


圖 4-9葡萄糖醛酸(glucuronic acid)標準曲線

表 4-2 膠原蛋白與玻尿酸純度及回收率

Items	Purity (%)	Recovery (%)
Collagen	57	85
Hyaluronic acid	45	83

4-9 玻尿酸蛋白質濃度測定

由於所測得樣品中玻尿酸濃度偏低，推測是有否蛋白質存在其中，經過測定蛋白質濃度來看，樣品中蛋白質濃度為 4.2mg/mL，和所推測樣品玻尿酸濃度偏低是有由於其他物質存在其中，故以此結果來看由於蛋白質去除的不完全導致玻尿酸的濃度偏低。

4-10 玻尿酸分子量測定

高黏度是玻尿酸最重要的物理性質之一，其分子量越大黏性越高，其實驗以濃度對固有黏度做圖，分別做線性迴歸公式，可由公式得知其截距，此截距即為極限黏度 $[\eta]$ 。 $[\eta]=KM^a$ ，K 和 a 為常數，在測定條件下只與聚合物的種類有關，每種聚合物都有特定的 K 和 a 值，對於玻尿酸來說，其 K 和 a 值主要和溶劑的離子強度跟測定溫度有關。

樣品測出的分子量為 4.3×10^5 與文獻(吳, 2002)的 1.445×10^6 相較較低，可能是由於在萃取過程玻尿酸分解酵素作用，使得分子量下降，而本實驗所使用的黏度管是由人工操作，若能以電腦測試的裝置則應可以獲得更精確的分子量，而分子量大於 10^5 的玻尿酸可抑制細胞的分化、移動，但卻有助於細胞的聚集、貼附，而玻尿酸的分子量愈大，即聚合的單體愈多，結構愈完整，保水力及黏彈力也愈強。

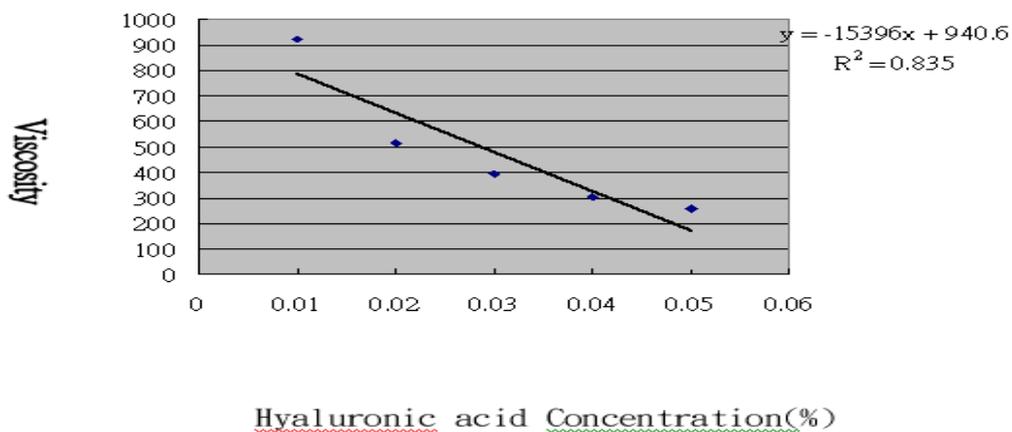


圖 4-10 玻尿酸濃度與黏度關係圖

表 4-3 雞冠中膠原蛋白及玻尿酸的含量

Items	雞冠中粗蛋白 含量 (100g)	雞冠中粗蛋白 含量內膠原蛋 白的含量 (%)	雞冠中總糖含 量 (100g)	雞冠中總糖內 玻尿酸含量 (%)
含量	9.25	80	5.92	72

表 4-4 膠原蛋白特性分析結果

Items/source	Hydroxyproline Concentration (mg/mL)	Collagen Concentration (mg/mL)	Collagen Concentration (mg/mL) sigma	Protein Concentration (mg/mL)	Isoelectric Point (PI)
Collagen	0.32±0.37	4±0.37	45±0.29	13.4±0.6	6.5

表 4-5 玻尿酸特性分析結果

Items/source	Glucronic Acid Concentration (mg/mL)	HA Concentration (mg/mL)	HA Concentration (mg/mL) flaka	Protein Concentration (mg/mL)	M.W (Da)
Hyaluronic acid	1.3	2.68	37	4.2	4.3*10 ⁵

第五章 結論

經由本實驗以李老師專利方法, 使用雞冠來萃取而得之膠原蛋白及和玻尿酸, 在特性分析方面其膠原蛋白熱穩定性大約在 40°C 左右, 和先前文獻資料魚類來源的膠原蛋白熱變性溫度 25~30°C 相比較則較為安定。本實驗所萃取出膠原蛋白、玻尿酸, 純度為 57、45%, 而本實驗所萃取出產物有一些雜蛋白存在而影響, 此為之後可再深入研究, 而在分子量方面 HA 分子量為 4.3×10^5 , 經由電泳可得之由雞冠所萃出的膠原蛋白為第一型膠原蛋白。

而比較先前萃取文獻, Miller 先將雞冠以乙醇、氫氧化鈉處理 48hr, 在加入胃蛋白酶/醋酸溶液處理 24hr, 在經過鹽析、透析的方式處理 84 小時, 才可得到膠原蛋白, 共需要 6.5 天的時間, 而 Li 和 Elson 是雞冠先經乙醇或是氯化鈉處理 50~60°C, 5~9hr, 再使用蛋白酶作用 5~7hr, 過濾後再使用鏈酶素處理 24 小時, 再以乙醇沉澱玻尿酸。而本法是胃蛋白酶/醋酸溶液處理 24hr, 在加入丙酮提取膠原蛋白, 丙酮液再加入氫氧化鈉與乙醇來沉澱玻尿酸, 而在先前的研究方面也沒有類似的方法可一次萃取出兩種物質, 目前玻尿酸以鏈球菌生產的技術相當成熟但是膠原蛋白以基因重組方式所生產的產率較

動物性低且單位成本高目前尚在研發階段, 綜觀以上結果本法萃取方法簡便及節省時間、人力及成本, 且只需要兩天的時間故以經濟效應來看是有其可行性。



第六章 參考文獻

- 王建輝、李琦、劉在群、林英杰、與孫允秀。2001。鹿皮膠原的提取與性質。吉林大學自然科學學報。1：106-108。
- 吳昌至。2002。雞冠與豬眼球中玻尿酸和膠原蛋白之抽取及純化。中興大學。碩士論文。
- 李丹。2003。苯酚-硫酸法測定食品總糖方法的作用和改進。中國衛生檢驗雜誌。13：4。
- 李良玉、況慧星、與徐錦和。1977。家禽組織學。藝軒圖書出版社。p 20-21。
- 李學孚、林亮全、與盧建仁。1993。台灣土雞與肉雞在旨味物質上之差異性研究。中國農業化學會誌。31(5)：605-613。
- 洪雅萍。2004。膠原蛋白產品的功效。科學發展。380：32-35。
- 凌沛學。2000。透明質酸。中國輕工業出版社。p 15-18。
- 張明聰。2002。加入 WTO 家禽產業因應策略與措施。中國畜牧雜誌 p 2 -18。
- 許富銀、鄭明鎮、與王盈錦。1998。膠原蛋白在醫學上的應用。生物產業。9：21-26。

陳士軒。1996。透明質酸之製備與傷口癒合應用。陽明大學。碩士論文。

陳世暉。膠原蛋白讓你水噹噹。2004。科學發展。380：12-17。

陳明造。2000。肉品加工理論與應用。藝軒圖書出版社。p 65。

黃定國。2001。透明質酸之開發與應用。菌種保存及研究簡訊 (14)
3：1-9。

黃彥富、湯正明、與徐善慧。2003。揭開膠原蛋白的神秘面紗。科學發展年刊。362：44-47。

傅燕風、沈月新、楊承剛、與張淵。2004。淡水魚魚皮膠原蛋白的提取。上海水產大學學報。13：2。

蔣挺大。2006。膠原與膠原蛋白。化學工業出版社。p 265。

藍正文。2003 膠原蛋白做為骨母細胞分離與生長基材之研究。陽明 0
大學。博士論文。

藍蔚青、王川、李燕、方欣、王慶紅、與周培。2006。豬皮中羧脯
氨酸含量的測定。國家食物與營養諮詢委員會。10：39-41。

A. O. A. C. (Association of Official American Chemistis). 1984. Official
Method of Analysis. Association of Official American chemistis.
14：447-454.

Asghar, A., and Henrickson, R. L. 1982. Chemical biochemical functi-
onal and nutritional characteristics of collagen in food systems.

Advances in Food Research. 28 : 231-372.

Bailey, A. J., and Light, N. D. 1989. Connective tissue in meat and meat products. Elsevier Science . p 3-18 .148-169. 205-208.

Balazs, E. A ., and Band, P. 1984. Hyaluronic acid:it is structure and use. Cosmetic Toil. 6 : 65-72.

Balazs, E. A., Laurent, T. C., and Jeanloz, R.W. 1986. Nomenclature of hyaluronic acid. Biochemistry J. 235 : 903.

Balazs, E. A., Watson, D., and Duff, I. F. 1967. Hyaluronic acid in synovial fluid:Molecular parameters of hyaluronic acid in normal and arthritic human fluids. Arthritis Rheum. 10 : 357-376.

Balazs, E. A.1990. Medical applications of hyaluronan and it's derivatives. Cosmetic and Pharmaceutical Applications of Polymers. p 293.

Bella, J. B., Brodsky, and Berman, H. M. 1995. Hydration structure of a collagen peptide. Structure. 3 : 893-906.

Bellon, G., Wegrowski, J., and Perreau, G. 1988. A Paralled between Two Technigues of Extraction of Connected Tissues. Macromolecules Analtical Biochemistry J. 1 : 263-273.

Bertchez, S. F., Camber, O., and Tabatabay, C. 1993. Use of hyaluronic acid in ocular therapy. Biopharmaceutics of Ocular Drug. 105-120.

Bitter, T., and Muir, H. M. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. Biochemistry J. 4 : 330-334.

Bothner, H., and Wik, O. 1987. Rheology of hyaluronate.Acta Otolaryngl. 442 : 25-30.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Biochemistry J.* 72 : 248–254.
- Cheng, J. 1996. *Molecular Biology and Clinical Disease of extracellular matrix.* Beijing medical university press. p 163.
- Chong, B. F., and Nielsen, K. L. 2003. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus Zooepidemicus*. *Biotechnology J.* 100 : 33–41.
- Deyl, Z., and Miksik, I. 2000. Advanced separation methods for collagen parent α -chains their polymers and fragments. *Chromatogr J.* 739 : 3–31.
- Douglas, S., Kalman, M. H., Anita, V., Howard, S., and Eric, S. 2008. Effect of a natural extract of chicken combs with a high content of hyaluronic acid (Hyal-JointR) on pain relief and quality of life in subjects with knee osteoarthritis: a pilot randomized - double - blind placebo controlled trial. *Nutrition.* 7 : 3.
- Edward, C. A., and O'Brien, W. D. 1980. Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate. *clinical chemistry J.* 104 : 161–167.
- Elson, L. A., and Morgan, W. T. J. 1933. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochemistry J.* 27 : 1824–1828.
- Hardingham, T. 2004. *Chemistry and biology of hyaluronan.* Elsevier Science. p 3.

- Heldermon, C., DeAngelis, P. L., and Weigel, P. H. 2001. Topological organization of the hyaluronan synthase from *Streptococcus pyogenes*. *Biochemistry J.* 276 : 2037–2046.
- Isdale, A. H., Hordon, L. D., and Bird, H. A. 1991. Intra-articular hyaluronate a dose range study in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *drug J.* 2 : 93–98.
- Jiao, X. Y., Kopp, J., and Tanczos, E. 1998. Cultured Keratinocytes suspended in fibrin glue to cover full thickness wound in athymic nude mice: a comparison of two brands of fibrin glue. *Eur J Plast Surg.* 21 : 72–77.
- John, W.G. 1980. Collagen: The anatomy of a protein. *biology J.* 117 : 1–53.
- Jones, S. B. 1977. Ultrastructural characteristics of beef muscle. *Food Technol J.* 5 : 82–85.
- Kendall, F. E., Heidlberger, M., and Dawson, M. H. 1937. A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of a hemolytic streptococcus. *Biochemistry J.* 118 : 61–69.
- Kucharz, J. E. 1992. *The Collagen: Biochemistry and Pathophysiology.* Springer-Verlag. 7–29.
- Laurent, T. C. 1987. Biochemistry of hyaluronan. *suppl.* 442 : 7–24 .
- Laurent, T. C., and Fraser, J. R. 1992. Hyaluronan. *FASEB J.* 6 : 2397–2404.

- Leon, W. C., and Dixie, W. F. 1987. Structural and Contractile Proteins: Extracellular Matrix. *Methods in Enzymology*. p 82.
- Li, S. T. 1993. Collagen biotechnology and its medical application *Bio-med Eng.* 5 : 646–657.
- Li, Yingcui., Bryan, P. T., Caroline, N. D., Robert, A., and Koshier. 2007. Hyaluronan in Limb Morphogenesis. *Dev Biol.* 305 : 411–420.
- Lin, Y. K., and Liu, D. C. 2005. Effect of pepsin digestion at different temperatures and time on properties of telopeptide-poor collagen from bird feet. *Food Chemistry.* 94 : 621-625.
- Li, Z. X., and Yuan, C. L. 2000. Preparation of refined hyaluronic acid. *Baoji College of Arts and Science.* 17 : 9-26.
- Macherey, N. 1990. thin layer chromatography. p 14–19.
- Madsen, K. 1982. Intraocular pressure development in the rabbit eye after aqueous humour exchange with different viscoelastic products: Highlights from the XVIth Congress. *European Society of Cataract and Refractive Surgeon.*Nice.
- Meyer, K. 1947. The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol Rev.* 27 : 333–59.
- Miller, A. T. 1983. Collagen sausage casing. US 4388331. p 6–14.
- Miller, E. J., and Rhodes, R. K. 1982. Preparation and characterization of the different types of collagen. *Methods in Enzymology.* 82 : 33–64.
- Miller, E. J., Epstein, E. H., and Piez, K. A. 1971. Identification of three genetically distinct collagens by cyanogen bromide cleavage of insoluble human skin and cartilage collagen. *Biochemistry J.* 42(6) : 1024–1029.

- Miyata, T., Taira, T., and Noishiki, Y. 1992. Collagen engineering for biomaterial use. *Clin Mater.* 9 : 139–148.
- Morganti, P., Randazzo, S. D., and Cardillo, A. 1996. Role of insoluble and soluble collagen as skin moisturizer. *Cosmetology J.* 4 : 141–152.
- Myllyharju, J., Kivirikko, K. I. 2004. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 20 : 33–43.
- Nagai, T., Worawattanamateekul, W., Suzuki, N., Nakamura, T., Fujiki, K., Nakao, M., and Yano, T. 2000. Isolation and characterization of collagen from rhizostomous jellyfish (*Rhopilema asamushi*). *Food Chemistry.* 70 : 205–208.
- Nimni, M., Cheung, D., Strates, B. K., Odama, M., and Sheikh, K. 1988. Bioprosthesis derived from cross-linked and chemically modified collagenous tissues. *Biotechnology.* 3 : 1–37.
- Nimrod, A., Greenman, B., and Kanner, D. 1988. High molecular weight sodium hyaluronate. USP 4784990.
- Olsen, D. R., Peltonen, A., and Jaakkola, S. 1989. Collagen gene expression by cultured human skin fibroblasts abundant steady-state levels of type VI procollagen message RNAs. *Clin Invest J.* 83 : 791–796.
- Partridge, X., Yang, N. M., Clarke, Y., Okubo, K., Bessho, W., Sebald, S. M., Howdle, K. M., and Shakesheff, R. O. 2002. 47 denoviral

- BMP-2 Gene Transfer in Mesenchymal Stem Cells: In Vitro and in Vivo Bone Formation on Biodegradable Polymercaffolds. *Biochem Biophys Res Commun.* 292 : 144–152.
- Pape, L. G., and Balazs, E.A. 1980. The use of sodium hyaluronate in human anterior segment surgery. *Ophthalmology J.* 87 : 699.
- Pearson, A. M., Dutson, T. R., and Bailey, A. J. 1985. Collagen as a food. *Advance in meat research.* 312–321.
- Peterson, M. S., and Johnson, A. H. 1978. *Encyclopaedia of food science.* AUI Publishing Company. p 153–160.
- Price, J. F., and Schweight, B. S. 1971. *The science of meat and meat Products.* W. H. Freeman and Company. p 112–120.
- Ramirez, A., Schwane, J. A., McFarland, C., and Starcher B. 1997. The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. *Med Sci Sports Exerc.* 29 : 326–332.
- Reed, R. K., Lijia, K., and Laurent, T. C. 1988. Hyaluronan in the rat with special reference to the skin. *Acta Physiol Scand.* 134 : 405–411.
- Schaub, M. C. 1963. The aging of collagen in the striated muscle. *Gerontologia.* 8 : 16–35.
- Scott, J. E. 1992. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *FASEB J.* 6 : 2639–2645.
- Scott, J. E. 1998. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution. Some biological consequences: *Glycoforum.* Science

of Hyaluronan. 8 : 16–35.

Sikorski, Z. E., Scott, D. N., and Buisson, D. H. 1984. The role of collagen in the quality and processing of fish. *Food Science and Nutrition*. 20(4) : 301–343.

Woodhead-Galloway, J. 1980. *Collagen: The Anatomy of a Protein*. London Edward Arnold . p 20–21.

Yamamoto, H. 1998. Antiaging and cosmetic effects of dietary hyaluronic acid. *New Food*. p 33–41.

Yoshihito, I., Hiroshi, K., Akitsugu, Y., Akira, K., Hans, P. B., and Kazuhiro, N. 2006. Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in endoplasmic reticulum and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. *Molecular biology of the cell*. 5 : 2346–2355.