

## I、摘要

本研究係利用國產極豐富且價廉之豬皮為材料，萃取其膠原蛋白並製成粉末(collagen powder)後，經不同溫度預熱及鳳梨酶(bromelain)、木瓜酶(papain)、胃蛋白酶(pepsin)等進行不同時間水解，以期獲得具良好紫外線吸收能力及乳化能力之膠原蛋白水解物，使可應用於保養品中作為一天然防曬素材。結果顯示，所得之水解液均對短波紫外線(ultraviolet C)吸收能力最佳，其次為中波紫外線(ultraviolet B)，惟三者仍以木瓜酶及胃蛋白酶組較佳。其中，0.5%膠原蛋白經65°C預熱30分鐘，再以1%木瓜酶水解1小時或以0.5%膠原蛋白經95°C預熱30分鐘，再以1%胃蛋白酶水解5小時，可獲致最佳紫外線之吸收能力。如提高膠原蛋白濃度則有助於提升紫外線之吸收能力，但提高酵素濃度則否。在乳化試驗中，木瓜酶與胃蛋白酶組之乳化容量(emulsifying capacity)均是隨著pH值上升而增加並於pH 7有最佳之乳化容量，但於乳化安定性(emulsion stability)上木瓜酶組則反之，而胃蛋白酶組則無顯著差異。經木瓜酶處理之水解液於乳化能力上較經胃蛋白酶處理者差。另將膠原蛋白水解液添加於一般防曬產品中，發現其具備彌補防曬產品於短波紫外線吸收不佳之缺憾，而使得防曬產品對於紫外線之防護更為完善。

## II、前言

近年來地球的環境污染日趨嚴重，不僅臭氧層已受到嚴重的破壞、造成了溫室效應以及整個生態遭受極大的改變，導致紫外線到達地表的量正逐年增加中，其中亦包含了能量最強之短波紫外線，也使得我們在生活中不時會受到過量的紫外線傷害，這將加速皮膚曬傷及老化，進而增加罹患皮膚癌之機率，因此防曬用品自然成為戶外時不可或缺的一項保養品。各類防曬品依其組成分及功效可將之分為紫外線吸收及紫外線反射兩大類，其中紫外線吸收之成分為水楊酸酯(salicylate ester)，肉桂酸酯(cinnamate ester)、Oxybenzone、Avobezone 及 PABA(para-aminobenzoic acid)衍生物等。紫外線反射之成分則為氧化鋅(ZnO)及二氧化鈦(TiO<sub>2</sub>)，其性較溫和但質地較濃稠。由於合成之防曬用品對皮膚較易產生不良的影響(Hu and Wang, 1998)，所以尋求天然抗紫外線材料已成未來之趨勢。

膠原蛋白是一種普遍存在於動物體內之蛋白質，於多年來研究發現豬皮膠原蛋白本質上即具有良好之保水性、膨潤性(swelling)、重組織化性與成膜性等機能性而被廣泛的應用，如生醫材料、美容保養品、機能性食品及可食用腸衣等(周，1980；Asghar and Henrickson, 1982；周，1987)。豬皮為膠原蛋白豐富來源之一，國產者除了少部分作為皮革及明

膠原料外，其餘則多因傳統消費習慣而隨著豬肉被切割販賣，未能受到妥善的利用。

有研究指出膠原蛋白具有吸收紫外線的能力(野田等，1975；王，1994)，啟迪吾人期利用本省極為豐富之豬皮製成膠原蛋白粉末作為原材料，運用不同酵素將其水解，藉探究不同種類酵素之濃度及反應時間等水解條件，期製成一具有良好紫外線吸收能力之膠原蛋白水解物，俾便作為保養或防曬產品中之天然吸收紫外線材料。

### III、文 獻 檢 討

台灣每年宰殺千萬頭以上的豬隻以供市場需求，豬皮除了少部分用於製造皮革、可食用人工腸衣及明膠方面之利用外，大部分皆被消費者隨著豬肉切割成零碎皮片，於購買後丟棄，殊為可惜，因為豬皮含有極豐富之膠原蛋白可資應用。為尋求此豐富資源更具價值之多用途利用性，特就有關膠原蛋白分子結構、物理化學特性及其酵素水解物作為天然吸收紫外線材料之可行性逐一探討，俾益於提高豬皮膠原蛋白之利用性。

#### 一、豬皮之組織構造及化學組成

##### (一) 皮之組織構造

一般動物的皮是由外層的表皮層(epidermis)及內層的真皮層(dermis)所組成的。表皮層是由外胚層分化，主要由角質細胞(keratinocyte)組成，無血管分布，係由具有防水及保護作用的角蛋白(keratin)構成。真皮層是由中胚層逐步分化而來，主要由膠原蛋白組成，內亦含有無數的血管、淋巴管、神經、汗腺、皮脂腺、豎毛肌及色素細胞等。真皮層又可分為兩層，與表皮層接觸之突出乳突體及乳突體以下稱為乳突層(papillary layer)，內含有血管及神經等，能運送表皮所需之養分，其最外部為俗稱的銀面，即一般皮革之表面。乳突

層之下為網狀層(reticular layer)，主要由膠原蛋白所組成。真皮層之下層為皮下組織(subcutaneous tissue)，是由纖維交錯之疏松結締組織所構成，內含有大量的脂肪細胞，並延伸充滿於毛囊中(圖 1)(Frandsen and Spurgeon, 1992)。

## (二) 豬皮之化學組成

新鮮豬皮的一般化學組成，其水分介於 55—56%；粗脂肪的含量 10—14%；粗蛋白質的含量約 25~27%；在含氮化合物中，膠原蛋白在於皮約佔其總蛋白質之 74~76%，而於真皮層則高達 91~92%(周，1987)，其餘則為鹽溶性蛋白質、彈性蛋白(elastin)及角蛋白態氮。由其一般組成觀之，豬皮含有極為豐富的之膠原蛋白，且主要存在於真皮層中(Woodhead-Galloway, 1980)。

## 二、膠原蛋白

膠原蛋白是一種普遍存在於動物體內之蛋白質，於脊椎動物中更佔動物體總蛋白質的 30%，即使在軟體動物中亦有微量存在，為其體壁的重要組成之一。膠原蛋白主要分佈於結締組織，為皮膚、骨骼、血管及軟骨的基質，由於膠原蛋白具有聚合細胞形成組織的功能，故當結締組織與肌肉或器官行各種新陳代謝機能時，膠原蛋白提供了支持及保護，以

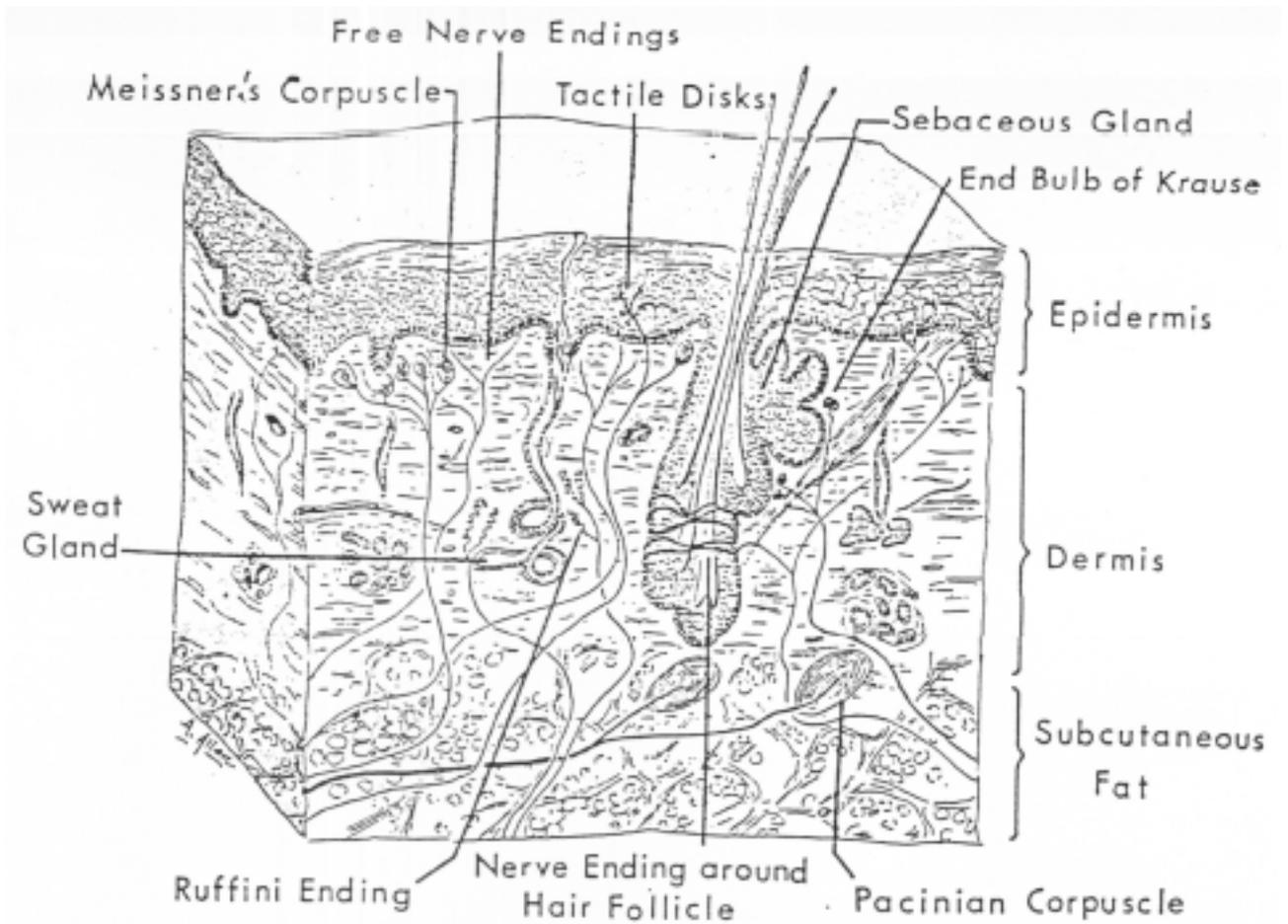


圖 1. 哺乳動物皮之構造。

Fig. 1. Structure of mammalian skin.

(Franson and Spurgeon, 1992)

及扮演攸關水分及離子等吸附或輸送之角色 (Lehninger, 1970 ; Woodhead- Galloway, 1980)。

### (一) 膠原蛋白之結構及纖維構造

膠原蛋白源於胚胎之中胚層星狀細胞 (mesenchymal star-shaped cell)，依其所構成結締組織的不同而逐漸發育為骨母細胞 (osteoblast)、軟骨母細胞 (chondroblast) 與纖維母細胞 (fibroblast)，再分別形成骨基質、軟骨組織與纖維基質膠原蛋白。前兩者則構成骨組織及軟骨組織，後者則又分別構成皮、腱、韌帶及血管之膠原蛋白與構成肌肉及內臟中結締組織之網狀膠原蛋白 (Prince and Schweight, 1971 ; Woodhead-Galloway, 1980)。

膠原蛋白係由水溶性極差的平行線型鏈 (parallel linear bundles) 組成，由於高含量的甘胺酸 (glycine)、脯胺酸 (proline) 及羥脯胺酸 (hydroxyproline) 的 helix-breaker 存在，故  $\alpha$ -螺旋均不發生 (Lehninger, 1970)。每一條線型鏈具三條聚肽鏈，每條聚肽鏈又扭曲呈左旋鏈，三條聚肽鏈間以氫鍵緊密結合而互相纏繞，形成極強的右旋三絲螺旋 (triple helix) 結構 (Fennema, 1985)。

天然膠原蛋白分子由直徑 1.4 nm、長約 294 nm，分子量約 30 萬之圓柱型原膠原 (tropocollagen) 分子構成，原膠原之構造與膠原蛋白分子完全相似。無數的原膠原以頭對尾方式相結合成膠原蛋白分子後，即以 D-stagger 五線重疊纏繞模式

組成膠原微纖維(周及林, 1985)。在電子顯微鏡觀察時, 膠原微纖維每間隔 67 nm 即呈現一明暗之橫紋週期。膠原蛋白是由無數直徑 1-5 nm, 長數百至數千 nm 之膠原微纖維(collagen fibril)組成膠原蛋白纖維(collagen fiber), 無數的膠原蛋白纖維集結排列構成膠原蛋白(圖 2)(Prince and Schweight, 1971; 周及林, 1985)。

## (二) 膠原蛋白之種類

膠原蛋白的基本結構於數十年前即已大致了解, 但在十幾年前才觀察到其化學組成上差異, 因而才了解膠原蛋白在生物學功能上的不同變化及類型。膠原蛋白皆由三條螺旋狀聚肽鏈所構成, 惟經層析法分離純化後, 此三條聚肽鏈之胺基酸組成完全相似則稱為  $\alpha_1$  鏈; 若其中含一條聚肽鏈的胺基酸組成不同, 而此不同者又以組胺酸(histidine)、纈草胺酸(valine)與異白胺酸(isoleucine)含量差異較大者則稱為  $\alpha_2$  鏈(周及林, 1985; 王, 1994)。如豬皮真皮層之膠原蛋白具有兩條  $\alpha_1$  鏈及一條  $\alpha_2$  鏈, 其分子式可寫成 $[\alpha_1]_2\alpha_2$ , 此又可稱為 $[\alpha_1(\quad)]_2\alpha_2(\quad)$ 型膠原蛋白。在當膠原蛋白三條聚肽鏈為完全相似的  $\alpha_1$  鏈時, 可依其聚肽鏈中所含特異胺基酸之含量再作區分為 11 種不同類型(表 1)(Pearson *et al.*, 1985)。

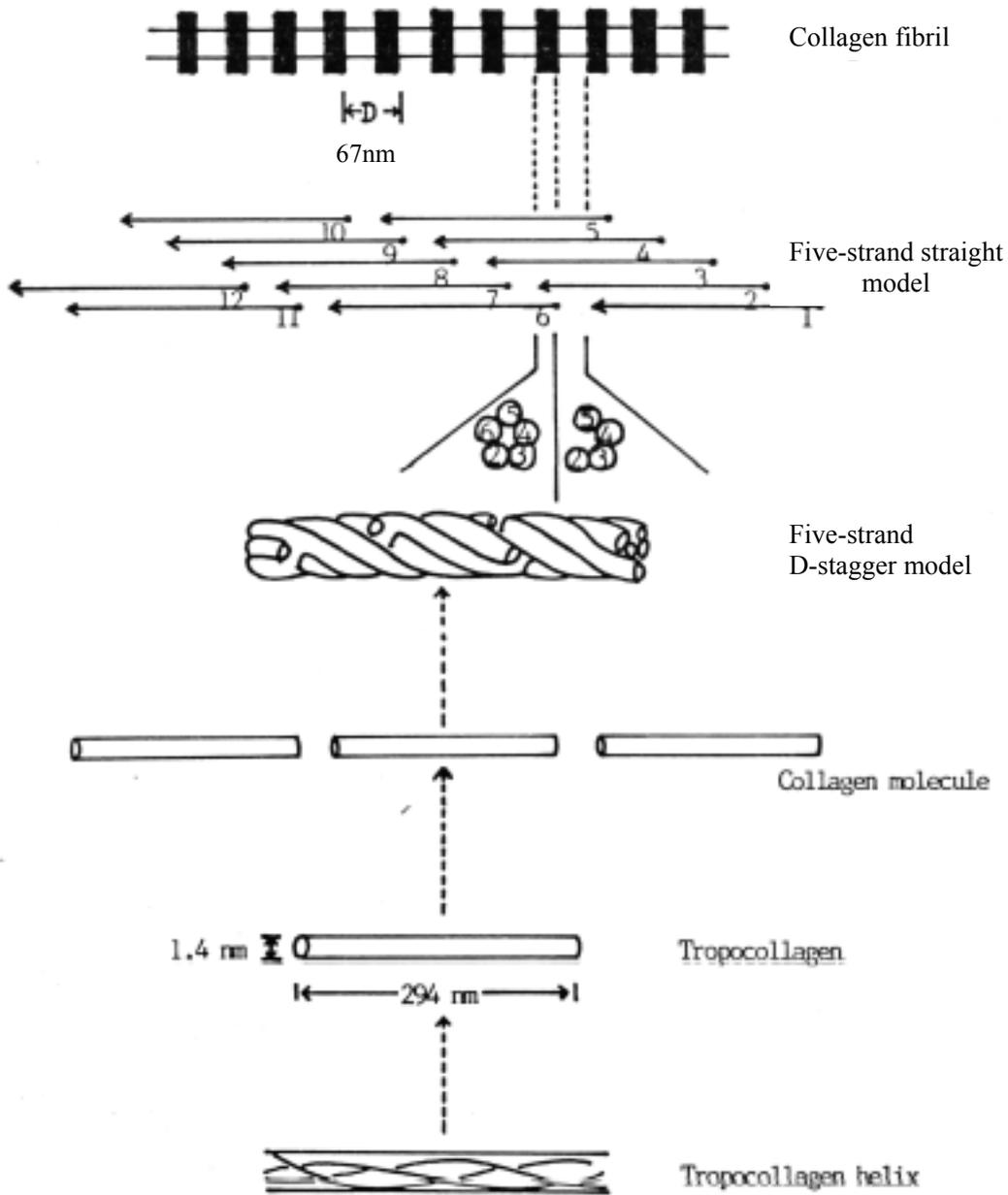


圖 2. 膠原蛋白微纖維之微細結構。

Collagen molecule

Fig. 2. The microstructure of collagen fibril.

1.4nm

Tropocollagen

294nm

(周及林, 1985)

Tropocollagen helix

表 1. 膠原蛋白之種類及其於組織之分布

Table 1. Type of collagen and their tissue distribution

Type	Molecular formula	Tissue
	$[\alpha_1(\text{I})]_2\alpha_2(\text{I})$	Intramuscular, skin, bone, tendon, dentin, cornea
	$[\alpha_1(\text{II})]_3$	Cartilage, disc, vitreous humour
	$[\alpha_1(\text{III})]_3$	Intramuscular, vascular, skin, intestine
	$[\alpha_1(\text{IV})]_2\alpha_2(\text{IV}) + \alpha_3(\text{IV})$	Basement membranes
	$[\alpha_1(\text{V})]_2\alpha_2(\text{V}) + [\alpha_1(\text{V})\alpha_2(\text{V})\alpha_3(\text{V})]$ +other combinations	Intramuscular, embryonic tissues, skin
	$[\alpha_1(\text{VI})\alpha_2(\text{VI})\alpha_3(\text{VI})]$	Vascular system
	$[\alpha_1(\text{VII})]_3$	Skin, anchoring fibrils, amniotic membrane
	$[\alpha_1(\text{VIII})]_3 + [\alpha_1(\text{VIII})]_2\alpha_2(\text{VIII})$	Aortic endothelium
	$[\alpha_1(\text{IX})\alpha_2(\text{IX})\alpha_3(\text{IX})]$	Cartilage
	$[\alpha_1(\text{X})]_3$	Cartilage
XI	$[\alpha_1(\text{XI})\alpha_2(\text{XI})\alpha_3(\text{XI})]$	Cartilage

(Pearson *et al.*, 1985)

膠原蛋白之胺基酸組成亦極具特色而易與其他蛋白質

區分。其含甘胺酸約 33%、脯胺酸約 12%與丙胺酸(alanine)、羥脯胺酸各 11%，羥離胺酸(hydroxylysine) 1%，上述之胺基酸組成在不同物種及存在部位而有些許差異。而一般動物蛋白質羥脯胺酸僅含微量，並不含羥離胺酸。另外，膠原蛋白尚缺乏色胺酸(tryptophan)(表 2)( Peterson and Johnson, 1978)。

膠原蛋白分子的初級結構極為簡單且專一，但藉已鑑定出的微小變化，造成膠原蛋白分類成不同的類型。然而，膠原蛋白分子與纖維兩者皆有經無數的轉譯後化學修飾(post-translational chemical modification)反應，此始能承擔與其它巨大分子的不同化學與物理交互作用，而造成膠原蛋白於功能特性上的變化(Woodhead-Galloway, 1980)。

### (三) 膠原蛋白分子之鍵結

Woodhead-Galloway(1980)將造成膠原蛋白分子特殊結構之鍵結依其所含胺基酸之 R 基團(R-group)的極性與所帶電荷而區分為三大類(表 3)。第一類為甘胺酸、丙胺酸、脯胺酸與羥脯胺酸等不帶電荷之胺基酸，將膠原蛋白分子之三條聚肽鏈緊密結成一股穩定三絲螺旋結構之分子內氫鍵(intramolecular hydrogen bond)。第二類為一些強疏水性(strongly hydrophobic)胺基酸與一些帶正電荷或負電荷之胺基酸所形成的分子間自我裝配鍵(self-assembly bond)，亦即構成膠原蛋白微纖維 D-stagger 結構之鍵結。第三類係由離胺酸與

表 2. 各類型膠原蛋白之胺基酸組成

Table 2. Amino acid compositions of the component chains of various collagens

Amino acid	$\alpha_1(\ )^A$	$\alpha_2(\ )^A$	$\alpha_1(\ )^B$	$\alpha_1(\ )^C$	$\alpha_1(\ )^D$
3- Hydroxyproline	1	---	2	---	11
4-Hydroxyproline	93	86	99	121	130
Aspartic acid	43	48	42	48	51
Threonine	16	17	20	15	23
Serine	31	34	27	41	37
Glutamic acid	75	72	89	71	84
Proline	133	116	121	102	61
Glycine	332	330	333	355	310
Alanine	121	102	100	92	33
Cystiene	---	---	---	2	8
Valine	17	31	18	16	29
Methionine	7	4	9	7	10
Isoleucine	8	16	9	13	30
Leucine	20	32	26	21	54
Tyrosine	2	3	1	2	6
Phenylalanine	13	14	13	8	27
Hydroxylysine	5	9	14	5	44
Lysine	31	23	22	36	10
Histine	2	8	2	6	10
Arginine	50	55	51	46	33
Total amino acid residues	1000	1000	1000	1000	1000

(A) Calf skin

(B) Human cartilage

(C) Human skin

(D) Human basement membranes

(Peterson and Johnson, 1978)

表 3. 膠原蛋白分子之胺基酸鍵結功能

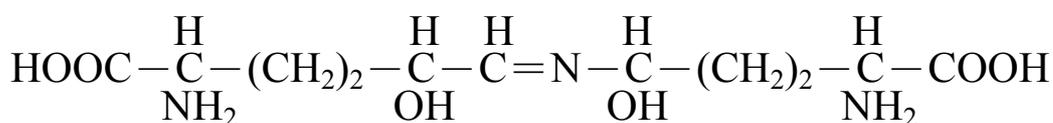
Table 3. Known bonding functions of some amino acid in the collagen molecular

胺基酸	R-基性質	鍵結功能
Amino acid	R-group character	Bonding function
Glycine	不帶電荷	三絲螺旋分子內鍵結
Alanine		
Proline		
Hydroxyproline		
Valine	強疏水性	D-stagger 自我裝配鍵
Leucine		
Isoleucine		
Methionine		
Phenylalanine	帶負電荷	D-stagger 自我裝配鍵
Aspartic acid		
Glutamic acid	帶正電荷	D-stagger 自我裝配鍵
Arginine		
Lysine + Hydrolysine		
Lysine + Hydrolysine	帶正電荷	分子間共價交叉 結合 鍵

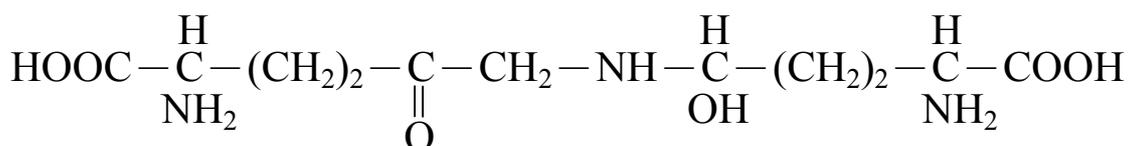
(Woodhead-Galloway, 1980)

羥離胺酸經 lysyl oxidase 催化形成醛類後，在與鄰近離胺酸或羥離胺酸之胺基作用形成的分子間共價交叉鍵結

(intermolecular covalent cross-link)。此鍵結又分兩型，其一為 Schiff's bases 型：



，易為酸膨脹及溶解，如皮與尾腱之膠原蛋白；另一則為 Ketoimine 型：



，能耐強酸，如骨與腸之膠原蛋白(周，1987)。

#### (四) 膠原蛋白之一般性質

天然膠原蛋白不溶於水，除非先經由 6M 的尿素處理使其變性，亦不易溶於弱酸、鹼及中性鹽溶液。且除了木瓜酶、鳳梨酶、無花果酶、胃蛋白酶及微生物膠原蛋白酶(collagenase)外，幾乎能抵抗其他所有蛋白質分解酵素之作用(Prince and Schweight, 1971)。膠原蛋白對於化學物質之抵抗性又依動物種類與年齡而異，隨著年齡的增加則膠原蛋白分子間的共價交叉結合程度也越高，則其抵抗力越強(Hill, 1966)，亦使膠原蛋白之膨潤能力受限制(Langmaier *et al.*, 2001a)。

在肌腱及皮之膠原蛋白具有膨潤之特性，此與蛋白質上的正電荷及負電荷相關，於 pH 2.5 及 12.5 時可產生最大膨

潤，此時纖維的寬度可增加 1-4 倍，長度則縮短了百分之三十(Glicksman, 1969；周，1987)。而在更極端的 pH 時，則離子濃度增加電荷效應減小，會導致膨潤程度再次減少。在中性鹽溶液中有著不同的效應，纖維的長度雖然沒有改變但是微纖維之間的凝聚力則減少。由於鹽類引起水分攝入的變化極大，而增加了膠原蛋白分子間氫鍵破裂的趨勢(Ward and Courts, 1977)。無機離子對膠原蛋白之膨潤能力依其陽離子  $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+、\text{K}^+$ ，陰離子  $\text{CNS}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-}$  而排列(Veis, 1964)。

在檢驗上，未變性的膠原蛋白纖維可被酸性紅(acid fuchsin)染成紅色，而變性者則否，但卻可以被三硝基酚(picric acid)染成黃色(Prince and Schweight, 1971)。

#### (五) 膠原蛋白之變性作用 (denaturation) 及復性作用 (renaturation)

在變性作用則以膠原蛋白之熱變性被研究最多，而其熱變性溫度(denaturation temperature)以及熱收縮溫度(shrinkage temperature)與膠原蛋白分子間交叉共價鍵結合之程度，以及其中脯胺酸和羧脯胺酸的含量呈正相關(Woodhead-Galloway, 1980)。可溶性膠原蛋白之變性是由溫和的加熱(40 )所造成，且僅牽涉到非共價鍵的斷裂。哺乳動物不可溶性膠原蛋白在此加熱條件不會引起其結構有實質的改變，但更高的溫度即會造成組織的物理性收縮(physical shrinkage)。經酸或鹼

膨潤過之皮膠原蛋白於 60°C 熱水中其三絲螺旋結構將崩解，而呈不可逆的變性，使不溶於水之膠原蛋白轉變為親水強之明膠(Glicksman, 1969；松田，1981；周，1983)。但亦可適當之熱變性使其三絲螺旋結構將解繞，而有利於酵素裂解膠原蛋白之進行及獲得分子量較小之水解物，使膠原蛋白之應用更為廣泛(Langmaier *et al.*, 2001b；Langmaier *et al.*, 2002)。

蛋白質的天然結構為其於生物情況下之最穩定形式，亦即在此狀態下具有最低自由能(free energy)，惟有些蛋白質經變性後，其已展開或斷裂之蛋白質分子於試管內可回復其天然或類似天然形式之過程則稱為復性作用。膠原蛋白於 pH 4 以下之冷酸或冷鹽溶液中即行膨潤，然後天然具周期性整齊排列之原膠原則釋出(Prince and Schweight, 1971；周，1987)。利用膠原蛋白此等之復性作用，可製成可食用膠原蛋白腸衣(edible collagen casing)、固定化酵素擔體(immobilized enzyme carrier)、人造血管、人造皮膚、外科用手術縫線與止血劑等高價值產品(周，1987；Miyata *et al.*, 1992)。

### 三、膠原蛋白吸收紫外線之特性

## (一) 紫外線之一般性質

紫外線照射一般廣泛應用於殺菌，紫外光區一般為波長 200~400nm 之範圍，而波長 200~290nm 為短波紫外線 (UVC)，其能量最高也對於皮膚的傷害最大。緣自陽光之短波紫外線在正常情形下大部分會被臭氧層 (ozonosphere) 過濾掉，但隨著環境被污染及臭氧層之破壞，越來越多的短波紫外線可散射至地球表面。波長介於 290~320nm 為中波紫外線 (UVB)，由於此波長穿透主要集中於皮膚之表皮層，故短時間曝曬即有曬紅或曬傷的危險，UVB 亦會抑制 DNA、RNA 及蛋白質之合成。波長於 320~400nm 為長波紫外線 (ultraviolet A; UVA)，其波長較長能量較弱，短期曝曬會使色素形成及肌膚對陽光耐受力變差，長期影響使得色素沉澱，是皮膚老化及皮膚癌的主因 (Pathak, 1982; Santos *et al.*, 1999)。此外，此波長光可穿透至真皮層，亦對肌膚漸增累積傷害並可能造成不可逆的影響。另外，紫外線會造成細胞抗氧化物及抗氧化酶 (超氧歧化酶和過氧化氫酶) 的消耗 (Lavker, 1979)，增加從變異皮膚細胞中前發炎調節物質 (pro-inflammatory mediators) 的合成及釋出，活化神經內分泌系統致使免疫力之抑制及神經內分泌調節物質之釋出 (Pillai *et al.*, 2005)。

## (二) 蛋白質、胺基酸與紫外線間之關係

有研究指出膠原蛋白具有吸收紫外線之能力(野田等, 1975), 而且明膠亦能吸收波長 240-280nm 之紫外線(Ward and Courts, 1977)。此外, 當分子具有雙鍵或共軛結構的存在時, 亦具有吸收紫外線之能力, 進而導致一些化學結構上的改變, 如分子內及分子間氫鍵的斷裂(Kamińska and Sionkowska, 1996; 呂, 1998)。有研究指出, 當豬肉蛋白質經紫外線照射處理三十分鐘以上, 將使得豬肉於加熱過程中較未照射紫外線者易成膠(Ishizaki *et al.*, 1993)。另外, McLaren 等人(1964)亦指出肌肉中若有胱胺酸(cystine)、肽鍵及芳香族胺基酸(aromatic amino acids)等, 如酪胺酸(tyrosine)及苯丙胺酸(phenylalanine)大量出現在蛋白質分子中時, 則對紫外線尤其敏感。Mittal *et al.*(1973) 研究指出, 由去羧作用(decarboxylation)發現芳香族胺基酸及肽的光氧化作用(photo-oxidation)。此作用是因其電荷會由芳香基轉移至羧基(carboxyl group)上。

### (三) 紫外線對膠原蛋白之影響

Kato *et al.*(1992) 指出膠原蛋白經紫外線照射後會裂解而形成許多小片段, 推測可能係膠原蛋白中脯胺酸發生氧化所造成的。膠原蛋白是一種富含脯胺酸的蛋白質, 且在紫外線照射之後發現其中的脯胺酸殘基有明顯減少之現象。有研究指出, 第一型膠原蛋白在經過紫外光照射一小時後, 即發生光降解作用(photodegradation)及光氧化作用(Fujimori,

1985)，此際膠原蛋白分子的結構狀態幾乎全部改變，而且過程中亦會產生新的氧化物，如二酪胺酸（dityrosine）（Sionkowska, 1999; Sionkowska, 2001）。另外，膠原蛋白中大量的甲硫胺酸(methionine)、酪胺酸、苯丙胺酸及羥脯胺酸亦會隨著紫外線照射而減少，這些結果也可說明膠原蛋白中的胺基酸對紫外線之敏感性(Kato *et al.*, 1992)。

膠原蛋白在纖維中藉著極大數目的分子間及分子內氫鍵之交互作用來維持穩定，且於膠原蛋白三絲螺旋結構中，氫鍵則扮演穩定其結構的重要角色(Weadock *et al.*, 1995)。Sionkowska and Wess (2004) 指出，膠原蛋白受紫外線照射的時間，對其機械學上之特性有極大的影響。膠原蛋白纖維束的最大抗張強度及最大伸長百分比會隨著紫外線照射時間增加而減少，推測應為膠原蛋白經紫外線照射後，其分子內及分子間氫鍵發生斷裂及誘發光交鏈化(photocrosslinking)的結果。在老化的皮膚顯示，增加的蛋白質水解活性及異常細胞外基質(extracellular matrix)之轉換致使真皮之膠原蛋白及彈性纖維的降解增加，此亦造成皮膚失去部分抗拉伸的能力(Pillai *et al.*, 2005)。

#### (四) 市售防紫外線產品之型式

一般防曬用品上都可以看到防曬係數 SPF(Sun protection factor)的標示，主要是用以評估對紫外線中之 UVB 防曬能力的標準。SPF 代表延長肌膚在紫外線下不被曬紅的時間之倍

數。所以，SPF 越高，表示可以延長皮膚被曬紅的時間，而非隔離紫外線的效果加倍。在評估防曬係數可直接對皮膚進行測試，亦可利用分光光度計(spectrophotometer)對防曬產品作測試，是一種既快速又節省成本之篩選方法，提供應用於人體試驗前的初步資料(Ramos *et al.*, 1996)。Santos *et al.* (1999) 研究顯示在防曬產品之檢測上，體內試驗與人體試驗結果之間有著高度關聯性。

一般防曬產品的成分，可分為化學性及物理性防曬兩類：

1. 紫外線吸收劑(化學性防曬)：是透過化學分子所含的化學鍵吸收，轉化為熱能或可見光，常見的水楊酸酯，肉桂酸酯及 PABA 衍生物等，上述成分只能吸收 UVB，Oxybenzone 及 Avobenzone 等則具有吸收長波紫外線 UVA 之能力。化學性防曬品使用上較為清爽，但有可能會造成皮膚過敏等不良之影響(Hu and Wang, 1998)。

2. 紫外線反射劑(物理性防曬)：採用不透光粉體覆蓋肌膚形成保護膜，例如產品中加入氧化鋅(ZnO)、二氧化鈦(TiO<sub>2</sub>)、滑石粉等無機覆蓋劑，它們可不具選擇性的使紫外線 UVB 及部分 UVA 散射或反射，來達到防曬效果。物理性防曬品則較為溫和不易引起過敏，但其質地較為濃稠。

#### 四、蛋白質的酵素修飾

蛋白質依其固有胺基酸配列之不同而決定其分子結構，並產生各種特異的物理性而此等物理性與蛋白質之機能性間有極為密切之相關(周，1987)。蛋白質進行酵素修飾之主要目的，係使蛋白質分子上特定胺基酸側鏈官能基所賦予之異常反應性發生變化，進而達到消除或激發該蛋白質之特異機能性(大野等，1981)；或利用酵素將蛋白質降解為不同分子大小的肽，亦即其酵素水解物，進而使其在物理及化學特性上符合預期之改變。

#### (一) 酵素修飾對蛋白質之影響

應用酵素修飾蛋白質品質之最大優點是其反應條件溫和，較少衛生安全上的顧慮，且在製程中較化學修飾更能得到良好的控制。一般食品蛋白質的酵素修飾技術可循三種不同途徑進行。第一種係藉特種酵素將蛋白質部分水解以改善其水溶性、起泡性與質地性等，其產品可應用於烘培食品或蛋白飲料(黃及林，1984)。蛋白質酵素水解物亦具營養上的功能，其含有更小的肽(雙肽及三肽)比蛋白質及胺基酸在消化道吸收上都要快。第二種為藉過氧化氫酶(oxidase)或 $\gamma$ -transglutaminase等使蛋白質發生交鏈反應，進而改善凝膠性與營養性(Ikura *et al.*, 1980；Ikura *et al.*, 1981；周，1987)。第三種係藉酵素進行普拉斯丁反應(plastein reaction)，將蛋白質中胺基酸重組或導入甲硫胺酸、離胺酸或麩胺酸，以增加營養價值、改善水溶性、延展性(expansion)或黏彈性(Arai *et al.*,

1975；Sukan and Andrews, 1982；黃及林，1984)。如木瓜酶係一種特異的酵素，其於中性或微酸性範圍內能水解蛋白質，而於鹼性範圍內則呈轉酯酶(*transesterase*)及催化醯化反應之活性(*Glazer, 1966*)。有許多研究利用此等特性將疏水性甲硫胺酸乙酯(*methionine ethyl ester*)及白胺酸烷基酯(*leucine alkyl ester*)導入各種蛋白質，而改善了蛋白質之機能性(*Arai et al., 1979*；*Yamashita et al., 1979*；*Watanabe et al., 1981*；周，1987)。

## (二) 膠原蛋白之酵素修飾

膠原蛋白具備良好的保濕性、膨脹性、重塑性與成膜性，可應用於外科創傷、人造皮膚、人造血管及止血劑(*Stenzel et al., 1975*；*Burke and Yannas, 1981*)，並可利用酵素修飾的方法提升其適用性，如增加機械強度、被生物分解性、生物吸收效力及降低免疫反應等。另外，由於膠原蛋白結構中含有一小段非三絲螺旋結構之終端肽(*telopeptide*)(*Dufour et al., 1996*)，可能對人體引起過敏等不良反應。在消除終端肽上最常用、最有效的方法有兩種：其一，在酸性條件下以胃蛋白酶(*pepsin*)處理；其二，在中性條件下以木瓜酶處理(永井及藤本，1985)，則醯胺鍵(*-CO-NH-*)大部分被水解而斷裂，亦即*tropocollagen* 兩端終端肽突出物被消除，生成水溶性低終端肽膠原蛋白。經純化後的低終端肽膠原蛋白，其紅外線光譜顯示仍保留了三次元構造且未變性，應用於製藥工業及生醫材料上，將可消除對人體引起過敏之疑慮(吳等，1998)。有研究

指出，分離純化之膠原蛋白經熱變性後，再以微生物性酵素於溫和條件下適度水解後，可獲得適合作為護髮及護膚之化妝品原料之低分子量膠原蛋白水解物(Langmaier *et al.*, 2001b；Langmaier *et al.*, 2002)。

而肉類的柔嫩度(tenderness)主要是受肉中膠原蛋白和彈性硬蛋白含量的影響，在肉品加工上則常利用酵素來改善肉的嫩度亦獲得良好的結果，其主要的機制即在於裂解膠原蛋白，使其交叉結合鍵斷裂，而嫩化用之酵素亦可應用於作為製作膠原蛋白水解物之分解酵素，依其來源可分為植物性與動物性二類(王，1994)：

#### 1、植物性蛋白酵素

##### (1) 無花果酶(ficin)

無花果酶分子量約為 25,000，通常無法水解膠原蛋白，但經加熱、低 pH 處理或提高食鹽濃度等條件後，即可水解膠原蛋白(黃，1976)。其最適作用溫度為 32~50，最適 pH 為 5.8~7.0，至 58°C 即會失去活性(Kang and Rice, 1970)。

##### (2) 木瓜酶

木瓜酶分子量約為 21,000~30,000，可被氫硫基(sulfhydryl)及氫化物(cyanide)等還原劑所致活，較常使用於木瓜酶活化劑有半胱胺酸、亞硫酸鹽及還原的 glutathione 等，而易被氧化劑所抑制(王，1994)。其具有廣大的專一性，亦具

有膠原蛋白酶(collagenase)及彈性硬蛋白酶(elastase)之活性，另外亦具有合成蛋白質之活性，但不耐熱(陳，1988)。其對肉嫩化最適 pH 為 5.0~7.0，最適之溫度為 32~60 (Rattrie and Regenstein, 1977; Brooks *et al.*, 1985)。

### (3) 鳳梨酶(bromelain)

鳳梨酶之分子量約為23,800(Vanhoof and Cooreman, 1997)，耐熱性較強，活性易受pH值影響，活性隨著果實的成熟度增加(黃，1976)。為一種葡萄糖性蛋白質(glucoprotein)，具有活性之硫醇基(thiol groups)可嫩化肉，在活化作用及抑制作用的機轉與前兩種酵素相似。而在反應物之專一性上不同，可水解精胺酸酯類及醯胺類，與胰蛋白酶(trypsin)的反應物類似。其最適作用溫度為60°C，最適pH為6.0~7.0(陳，1988; Choi *et al.*, 1992)。

上述三種植物性蛋白酵素，由於取得容易且利用性大及成本較低的因素，故最廣泛的被應用在肉的嫩化上。

## 2、動物性蛋白酵素

此類中以胃蛋白酶對膠原蛋白較具特異之裂解能力，分子量約為33,000~39,200，其熱安定性佳，於60°C時仍然安定具有活性。對於生蛋白(native protein)或變性蛋白(denatured protein)及簡單肽均能作用。其專一性廣泛，會優先裂解那些與具有苯環胺基酸鍵結的鍵，亦可水解麩胺酸及白胺酸等胺

基酸，除了纈草胺酸、丙胺酸及甘胺酸。其最適作用pH為1~4之間，於pH 6以上則活性較差(Konigsberg *et al.*, 1963；Sachdev and Fruton, 1970；陳，1988)。

## 五、蛋白質之乳化特性

### (一) 乳化現象之形成

當兩種或兩種以上互不相溶之液體藉由乳化劑(emulsifiers)、安定劑(stabilizers)及外力之作用，使其中一種液體形成小滴狀(droplets)分散在另一液體中，並產生某種程度之安定性，此現象稱之為乳化(emulsification) (Dickinson and Stainsby, 1982)。由乳化作用所形成之混合物稱之為乳化物(emulsions)，在熱力學上是屬於一種不安定的狀態，分散相(dispersed phase)中之小滴狀液體傾向於聚集在一起以減少與連續相(continuous phase)接觸之面積，以便能釋出多餘的能量而形成熱力學上較安定之油水分離狀態(Das and Kinsella, 1990；張，2001)。而油水分離的狀態主要表現在三種現象上：浮油(creaming)、凝聚(flocculation)及併合(coalescence)，是故乳化物必需同時藉助外力、乳化劑及安定劑的使用才能達成。乳化劑為具有兩極性(親水性及親油性)之物質，且擁有很好的界面活性。安定劑則不具兩極性或只具微弱之界面活性，能與油滴或水滴表面之膜作用，結合在一起而阻礙油滴或水滴間之相互作用，亦即增加連續相的黏度，以不同分子

量之安定劑來改變蛋白質、安定劑及乳化小滴間交互作用的條件(Tesch and Schubert, 2002)。許多的蛋白質可同時具有乳化劑及安定劑之作用(張, 2001), 如明膠及酪蛋白形成一層薄膜被覆在油滴表面, 使油滴懸浮及分散於水溶液中, 不會聚集在一起。

## (二) 蛋白質吸附作用

蛋白質安定型(protein-stabilized)乳化液之特性是依賴界面材料。由於疏水性側鏈會接近於油表面而親水性殘基會偏好水相, 因此這亦受蛋白質中胺基酸種類分布之限制(Dalgleish, 1997), 在吸附期間蛋白質會改變其天然結構, 形成主要依賴蛋白質表面和其胺基酸側鏈間疏水性的交互作用。即蛋白質形成一層薄膜被覆在油滴表面, 使油滴懸浮及分散於水溶液中, 不會聚集在一起。明膠對於許多乳化液及泡沫而言, 是一個出色的乳化劑及安定劑。在許多製藥及化妝品乳化液會利用明膠具安定作用之特性, 尤其在低黏度產品的需求上。蛋白質之吸附層是受小分子界面活性劑的影響, 如在酪蛋白安定型(casein-stabilized)乳化液中, 膽鹼磷脂(phosphatidyl choline)之吸附會造成酪蛋白結構上的改變(Fang and Dalgleish, 1993)。有研究指出, 小分子界面活性劑並不會直接取代蛋白質但仍會與其發生交互作用, 至少在它的吸附狀態時(Dalgleish *et al.*, 1995)。一般而言, 以親水性乳化劑與親油性乳化劑做適當比例混合之混合型乳化劑, 其能

弱化界面層且可促進併合或部分的併合，而小分子乳化劑則減少蛋白質界面層之黏度，因其可移開蛋白質並減少蛋白質間的吸引力 (Courthaudon *et al.*, 1991)。

綜合上述，膠原蛋白為具多重機能性質之蛋白質，而富含膠原蛋白之豬皮副產物經適當萃取及處理後，如能發揮其吸收紫外線及乳化性能，即可應用其作為保養品中天然之防曬護膚素材。

#### IV、材料與方法

## 一、實驗材料

### (一)豬皮

購自市售背肩部至腰部之燙皮脫毛豬皮，除去皮下脂肪層，續於 20~25 度流水沖洗 24 小時後備用。

### (二)實驗試藥

#### 1、供試酵素

(1)木瓜酶：力價 3.0 units/mg solid (25°C，pH 6.2)以 N-benzoyl-L-arginine ethyl ester 為基質(Sigma, P 3375)。

(2)鳳梨酶：力價 2.84 units/mg solid (25°C，pH 4.6)以 N $\alpha$ -Z-L-lysine p-nitrophenyl ester 為基質(Sigma, B 4882)。

(3)胃蛋白酶：力價 51units/mg solid(37°C，pH2.0)以 hemoglobin 為基質(Sigma，P 7125)。

#### 2、乳化用油

純橄欖油：購自佳格食品股份有限公司。

#### 3、吸收紫外線對照物質

(1)防曬乳液：主要成分為 Octyl methoxycinnamate 7%、Benzophenond-3 2.5%、Butyl methoxy-dibenzoylmethane 2%，防曬係數為 SPF30 及 PA+++ (盛香堂化工廠，台灣)。

(2)防曬乳(Neutrogena Fine Fairness UV Block): 主要成

分為 TiO<sub>2</sub> 4%及 Octyl methoxycinnamate 5%，防曬係數為 SPF30 及 PA+( Neutrogena Crop., U.S.A. )。

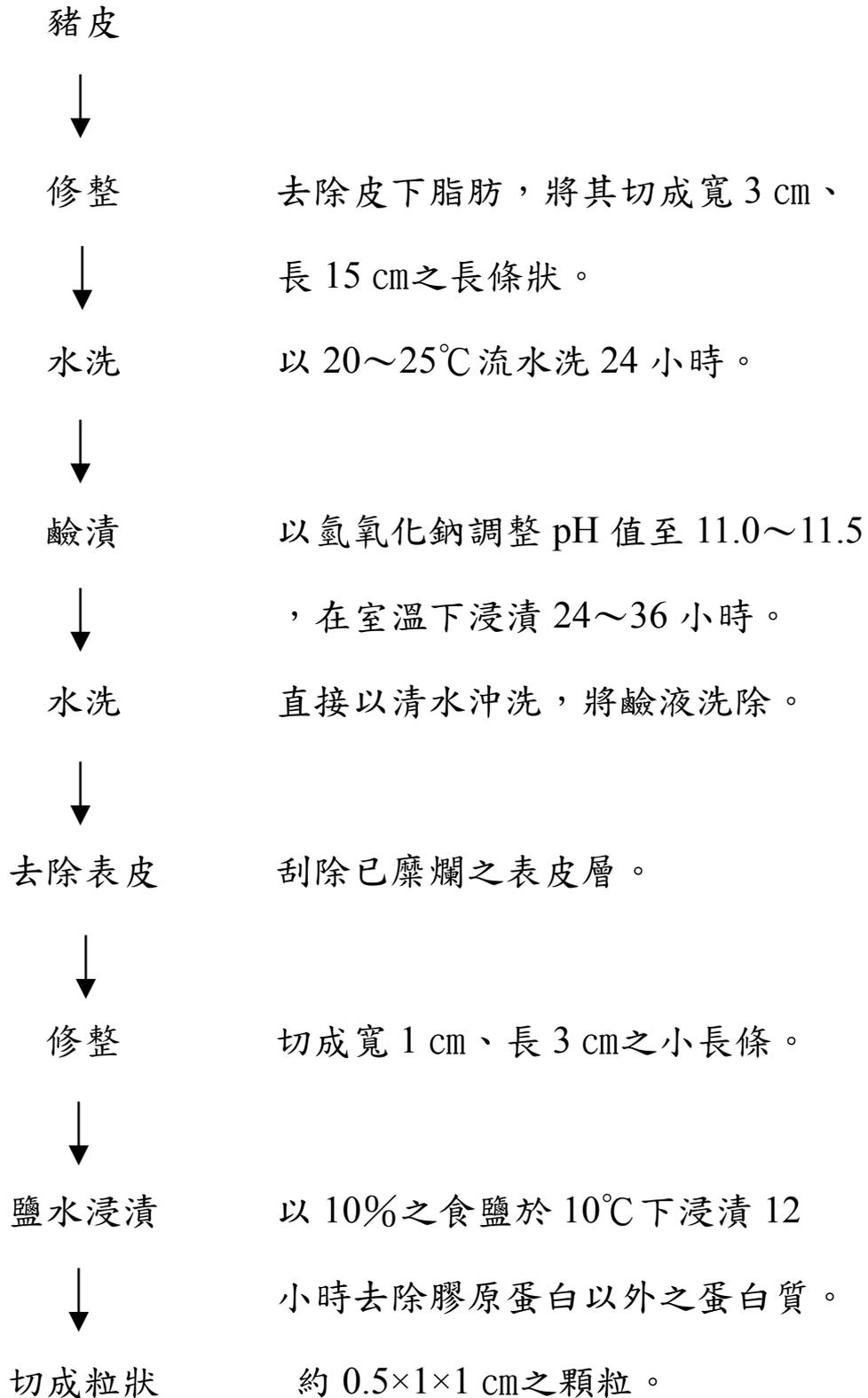
### (三)實驗儀器

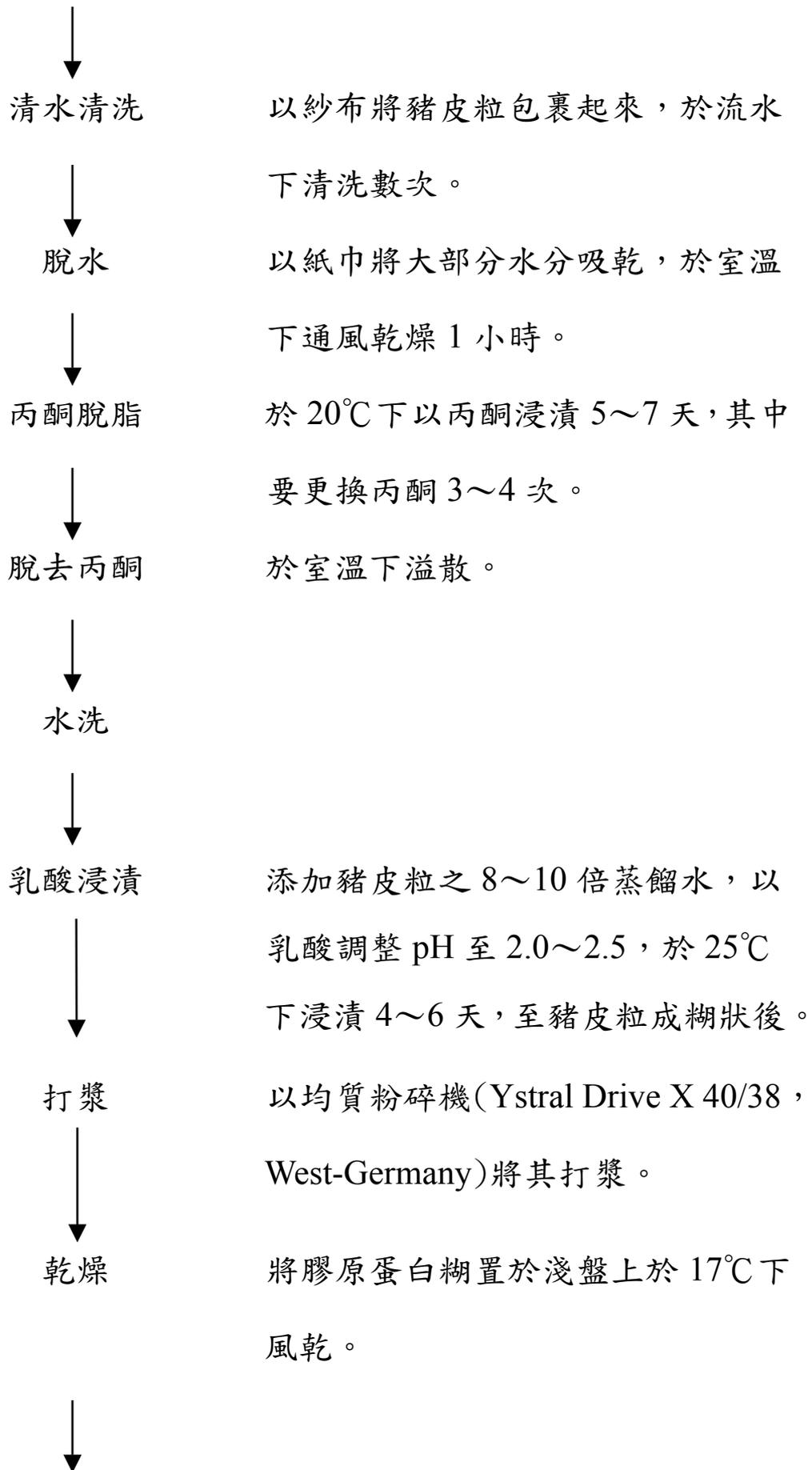
- 1、恆溫震盪水浴槽(FIRSTEK model:B602D, Taiwan)。
- 2、真空濃縮機(Heidolph VV2000/WB2000, Germany)。
- 3、高壓粉碎均質機(Ystral Drive X 40/38, West-Germany)。
- 4、高壓粉碎均質機(Ystral Drive X 1020, West-Germany)。
- 5、紫外光-可見光分光光度計(Jasco VB-530, Japan)。
- 6、氫離子濃度計(Mettler Toledo MP-225, U.S.A)。
- 7、三用電極表(Yu Fung YF-370N, Taiwan)。

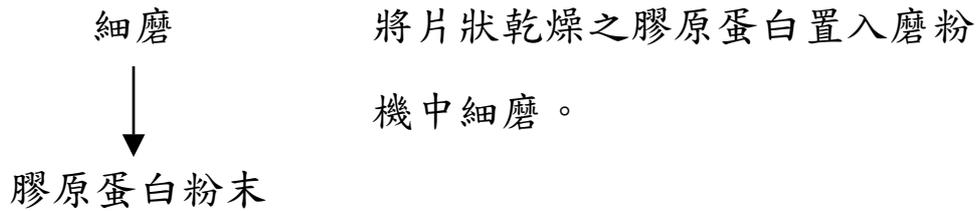
## 二、實驗方法

### (一) 豬皮膠原蛋白粉末之製備

依周(1987)之方法修飾敘述如下：





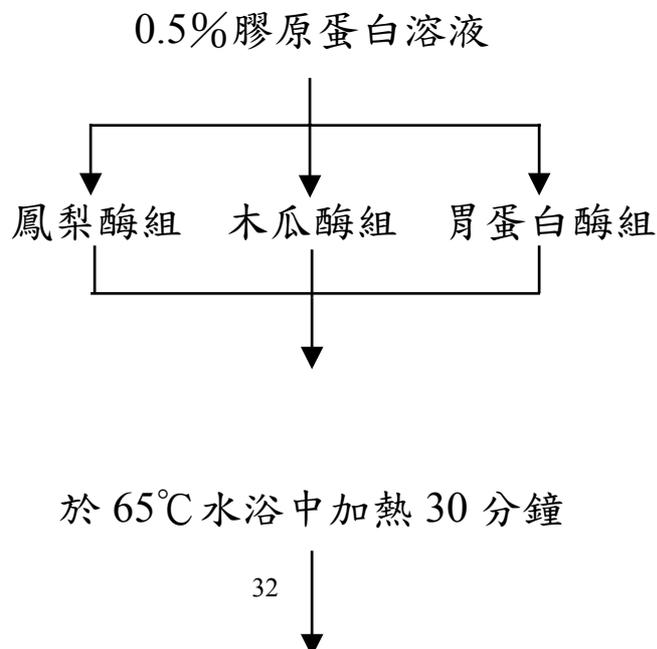


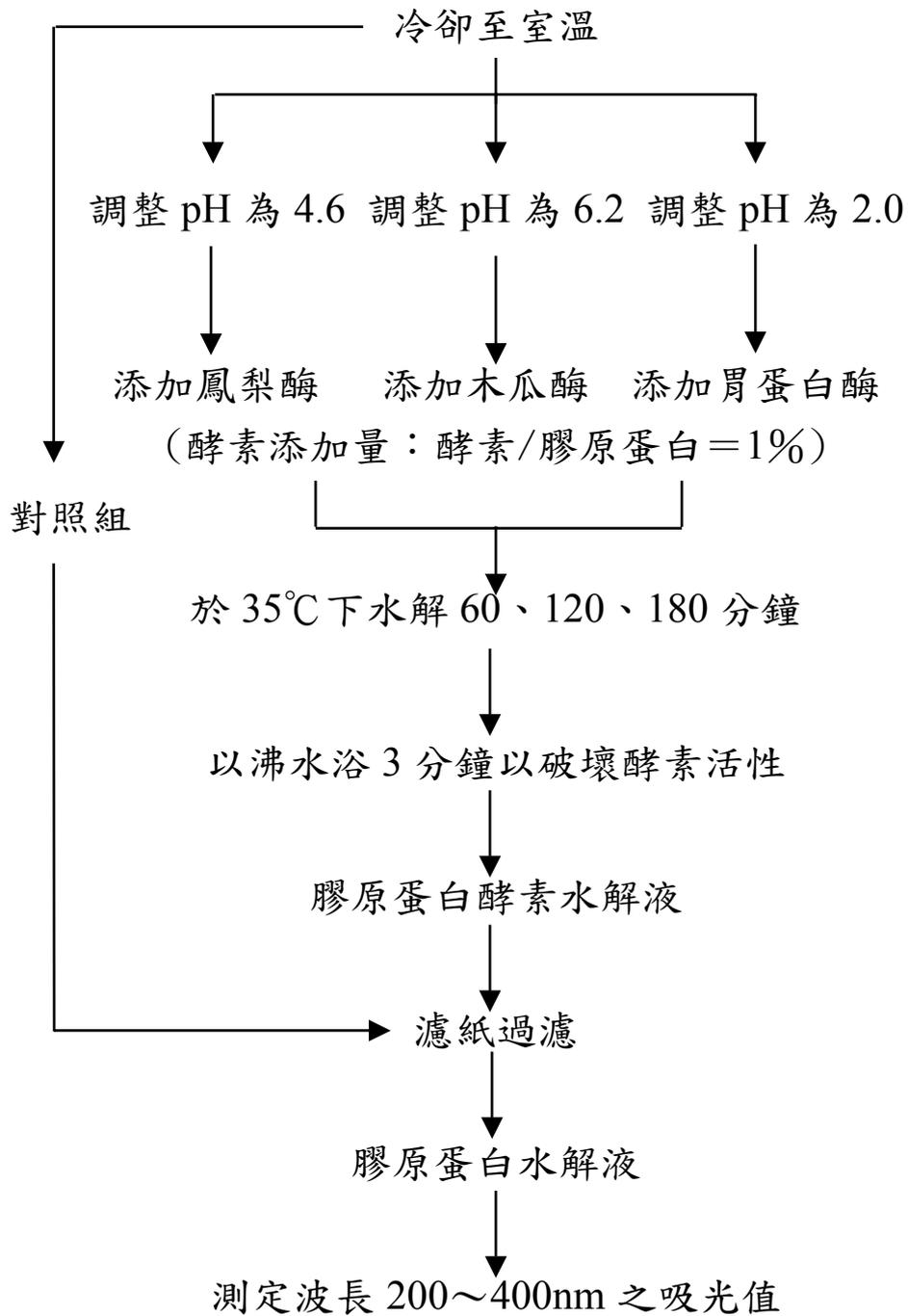
## (二)一般成分分析

膠原蛋白粉末之水分、粗脂肪及粗蛋白質分別依 A.O.A.C.(1980)方法測定，皮之氮係數(nitrogen factor)為 5.62 (O’Flaherty and Roddr, 1977)。

## (三)不同酵素對膠原蛋白紫外線吸收能力之影響

依周與王(1995)之方法修飾如下。秤取 0.1g 豬皮膠原蛋白粉末，以蒸餾水定量至 20mL 為膠原蛋白溶液。配製 9 組前述之 0.5%之膠原蛋白溶液，將之分成鳳梨酶、木瓜酶及胃蛋白酶等三種酵素實驗組，每一個酵素實驗組又分 3 個不同水解時間之實驗分組，依下列流程處理。





(四) 不同加熱溫度、水解時間及酵素濃度之影響

配製 0.5% 膠原蛋白溶液(w/v)後，以不同的加熱溫度 65、80 或 95 處理 30 分鐘，續以乳酸或氫氧化鈉調整溶液至酵素反應之 pH 值後，每組添加 1%(酵素/基質(w/w))之水解酵素，分別於 35 下水解 60、120、180 分鐘，而成不同加熱溫度×不同水解時間之 3×3 複因子之設計。另一試驗為 0.5% 膠原蛋白溶液(w/v)以不同的加熱溫度分為 65、80 及 95 處理 30 分鐘三個實驗組，以乳酸或氫氧化鈉調整溶液至酵素反應之 pH 值後，每組分別添加 1、3 或 5%(酵素重(g)/基質重(g))之水解酵素，於 35°C 下水解 60 分鐘，而成 3×3 複因子之設計。上述兩試驗水解完成者取出以沸水浴 3 分鐘，使酵素失去活性，冷卻至室溫後，測其於波長 200~400nm 之吸光值。

#### (五)不同膠原蛋白濃度之影響

配製不同濃度 0.5、1.0 及 1.5% 之膠原蛋白溶液，於前述方法(三)(四)所得之最佳水解條件下進行，測其於波長 200~400nm 之吸光值。

#### (六)乳化性試驗

1. 乳化容量：依 Swift *et al.*(1961)方法修飾如下，取 0.5% 膠原蛋白水解液 40mL，於 200mL 高腳燒杯內沿內壁插入三用電極表(Yu Fung YF-370N，台灣)之電極，調整導電值於可適用範圍，用均質機(Ystral Drive X 1020，West-Germany)一面於定速下均質攪拌，一面以約每秒 0.5mL 之速度添加橄

攪油。當乳化液之電阻值突然上升，此即代表乳化相由 o/w 型轉相成 w/o 型，記錄達轉相點所添加之油量。乳化容量係以每 g 蛋白質樣品所吸附橄欖油 mL 數計算。

2. 乳化安定性：依 Acton and Saffle(1970)方法測定。取 0.5% 膠原蛋白溶液 32.5mL，加 17.5mL 橄欖油，同上法於均質機於定速下乳化 1 分鐘，各取 5mL 放入兩支試管，其一立刻取底層 2.5mL 測定水分含量(Mo%)，另一則於 25℃ 靜置 30 分鐘後，再依同法取樣測定水分含量(Mt%)。乳化安定性(%) =  $(100 - Mt) / (100 - Mo) \times 100$ 。

#### (七) 添加膠原蛋白水解液於合成防曬乳之試驗

一般合成防曬產品皆屬較濃稠之乳霜或乳膏類，需先經稀釋後方能進行測試。依 Santos *et al.*(1999)之方法修飾如下，取欲測試防曬產品以乙醇稀釋兩次至濃度 0.03% 稀釋液 2.0mL，再添加經 95°C 加熱後以胃蛋白酶水解 5 小時之膠原蛋白水解液 0.5mL 混合均勻，分別測定其添加前後於波長 200~400nm 之吸光值。

## V、結果與討論

本論文研究之主要材料為取自市售新鮮豬皮所萃製的膠原蛋白，探討豬皮膠原蛋白經不同加熱處理及不同酵素水解後其水解物對紫外線吸收之能力，並比較此膠原蛋白水解液經不同處理後之乳化容量及乳化安定性，便有助於豬皮膠原蛋白水解物作為天然吸收紫外線材料之可行性。

### 一、膠原蛋白經不同酵素水解後之紫外線吸收能力

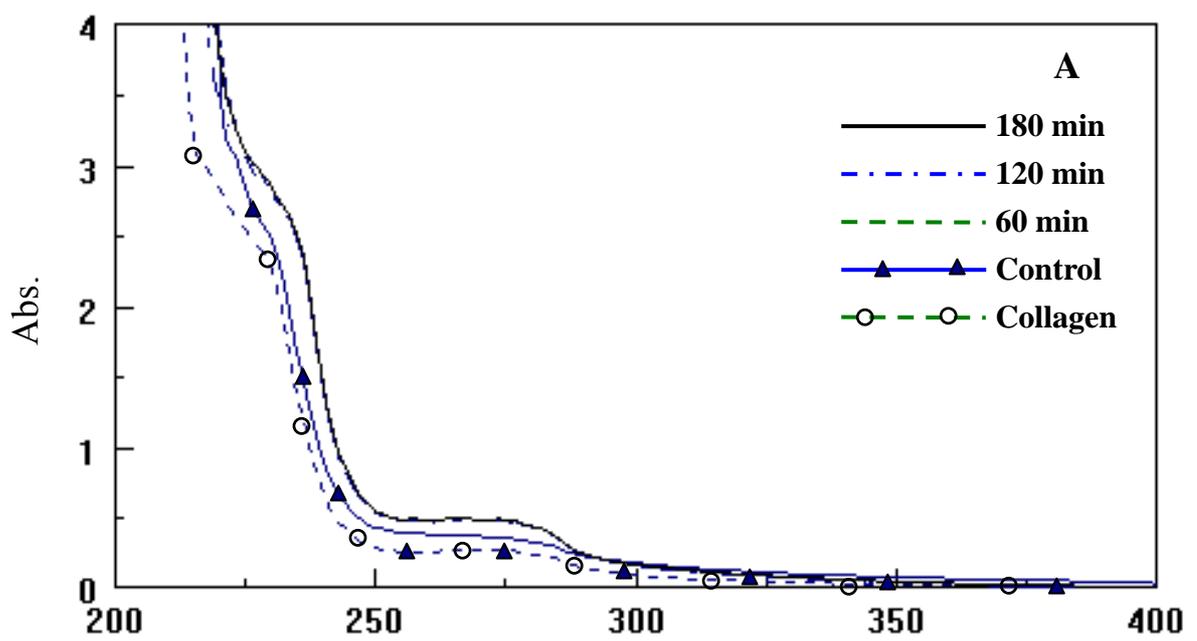
膠原蛋白因具緊密三絲螺旋結構而使酵素不易對其作用。有研究指出，膠原蛋白經加熱後可弱化其交叉結合鍵(cross-linkage)，使緊密之三絲螺旋結構解繞；周(1987)也指出經酸或鹼膨潤過之皮膠原蛋白於 60°C 熱水中其三絲螺旋結構將鬆解。由此可知膠原蛋白經溫度 60°C 以上加熱後，應可使其三絲螺旋結構受到破壞，而有利於被酵素水解，惟不宜加熱過度而使膠原蛋白轉變成明膠。明膠為一種變性蛋白質，其構造並不均一，有單鏈、雙鏈及參鏈等混合之開旋繞者。王(1994)指出明膠於低濃度即有增黏的現象，不利於酵素作用，故並不適合作為本研究之材料。此外，天然膠原蛋白分子是由分子量約 30 萬之圓柱型原膠原(tropocollagen)分子構成，在應用上不易穿透皮膚被吸收，而依 Langmaier 等人(2001)研究顯示，於適當之熱處理後再進行酵素水解可獲得分子量較小之膠原蛋白水解物，並有利於皮膚的吸收。

依照實驗方法(一)所製得之豬皮膠原蛋白粉末(圖 3)經分析得水分 13.6%，粗蛋白質 81.2%(N×5.62)及粗脂肪 3.8%。續以實驗方法(三)所得之各組膠原蛋白水解物，經紫外光波長 200~400nm 檢測其吸光值，發現經鳳梨酶水解不同時間之膠原蛋白水解物對於波長 200~280nm 之紫外線具有較佳的吸收能力，於紫外光短波長 200~225nm 之吸光值幾乎皆達滿點(圖 4.A)，而於紫外光中波長 250~280nm 光區之吸光值則介於 0.3 到 0.6 之間(圖 4.B)。相較於對照組(未經酵素水解者)，經鳳梨酶水解者均具較佳之吸收紫外線之能力，惟水解 60、120 或 180 分鐘三者間則差異不顯著。

圖 5 是膠原蛋白經木瓜酶水解不同時間後，其水解液吸收紫外線能力之影響。結果顯示，經木瓜酶水解所得之膠原蛋白水解物在紫外線吸收能力上，與經鳳梨酶水解之膠原蛋白水解物相似，皆對於波長 200~280nm 之紫外線具有較佳的吸收能力，於波長 200~230nm 之吸光值幾乎皆達滿點(圖 5.A)，而於波長 250~280nm 之吸光值約在 0.6 到 0.9 之間(圖 5.B)。而經木瓜酶水解之膠原蛋白水解液，其吸收紫外線的能力會隨著水解時間的增加而減小。

圖 3. 豬皮膠原蛋白粉末。

Fig. 3. Pig skin collagen powder.



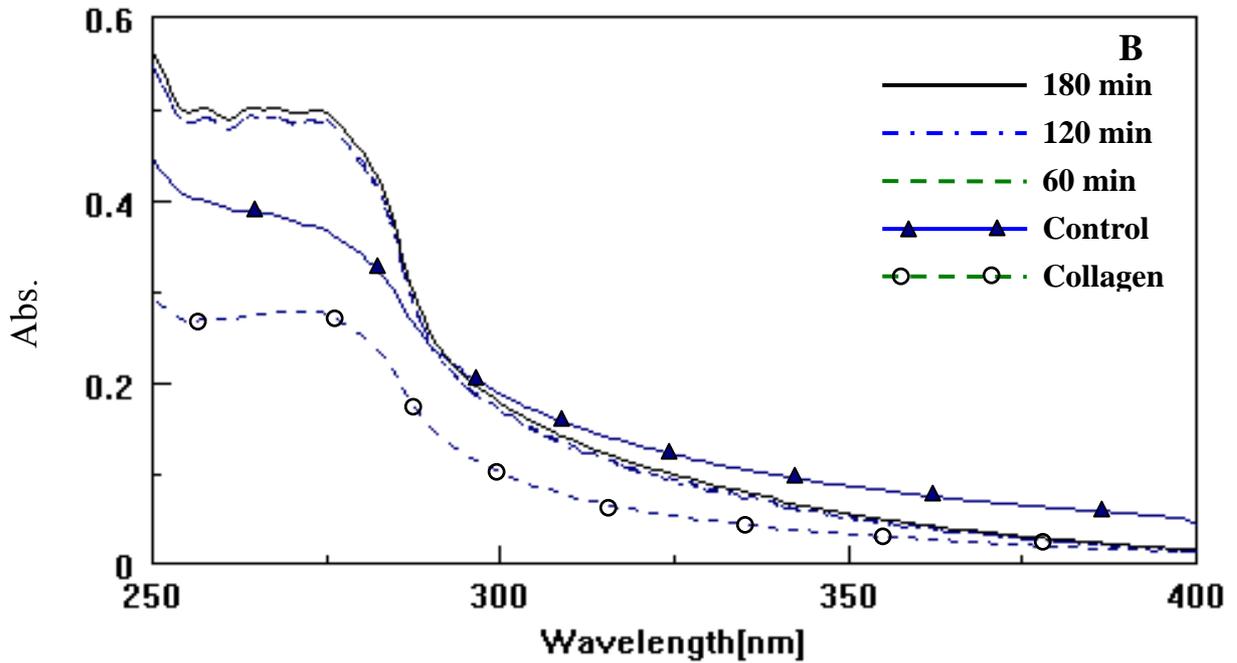


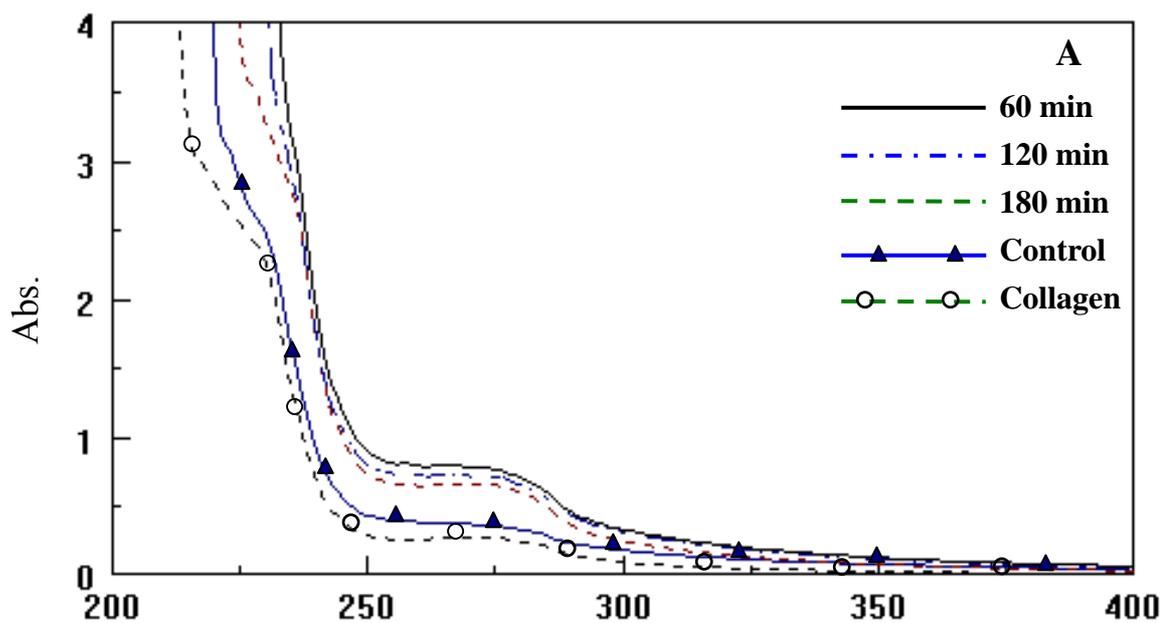
圖 4. 膠原蛋白經鳳梨酶水解不同時間後之紫外線吸收光譜。

Fig. 4. UV spectra of collagenous hydrolysate after bromelain treatment with various times.

Control: collagen solution after heating 30 min at 65°C.

Collagen: collagen solution without any treatment.

A and B mean spectra of wavelength from 200nm to 400nm and 250nm to 400nm, respectively.



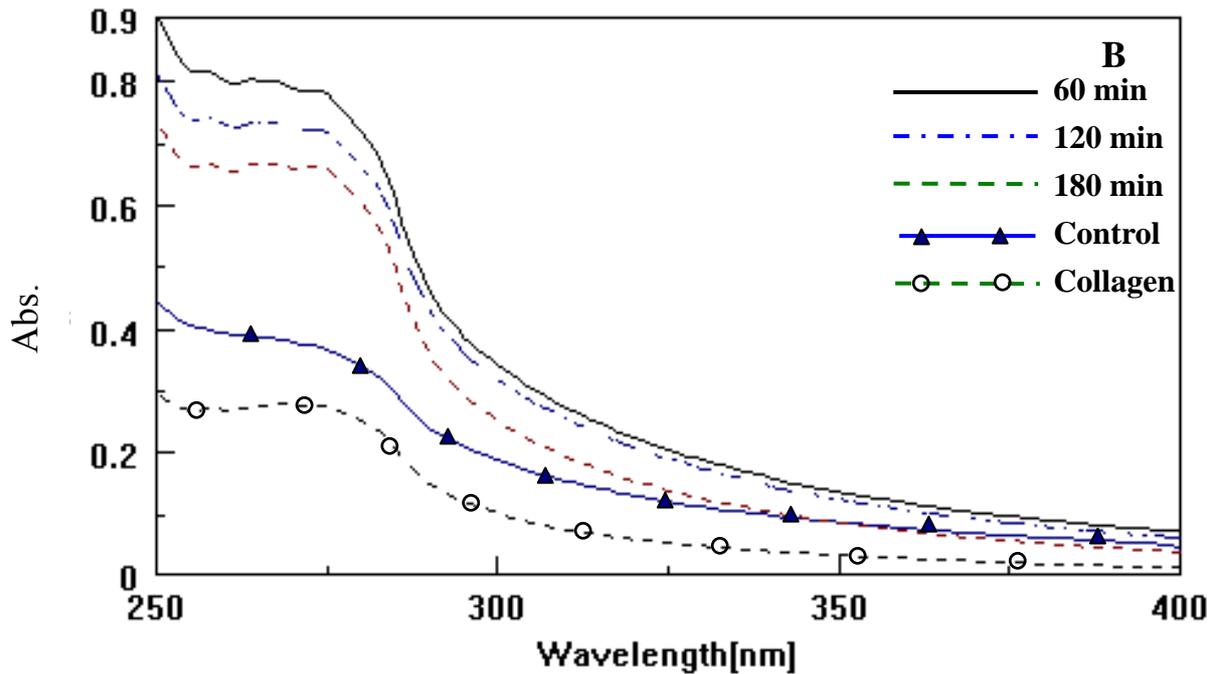


圖 5. 膠原蛋白經木瓜酶水解不同時間後之紫外線吸收光譜。

Fig. 5. UV spectra of collagenous hydrolysate after papain treatment with various times.

Control: collagen solution after heating 30 min at 65°C.

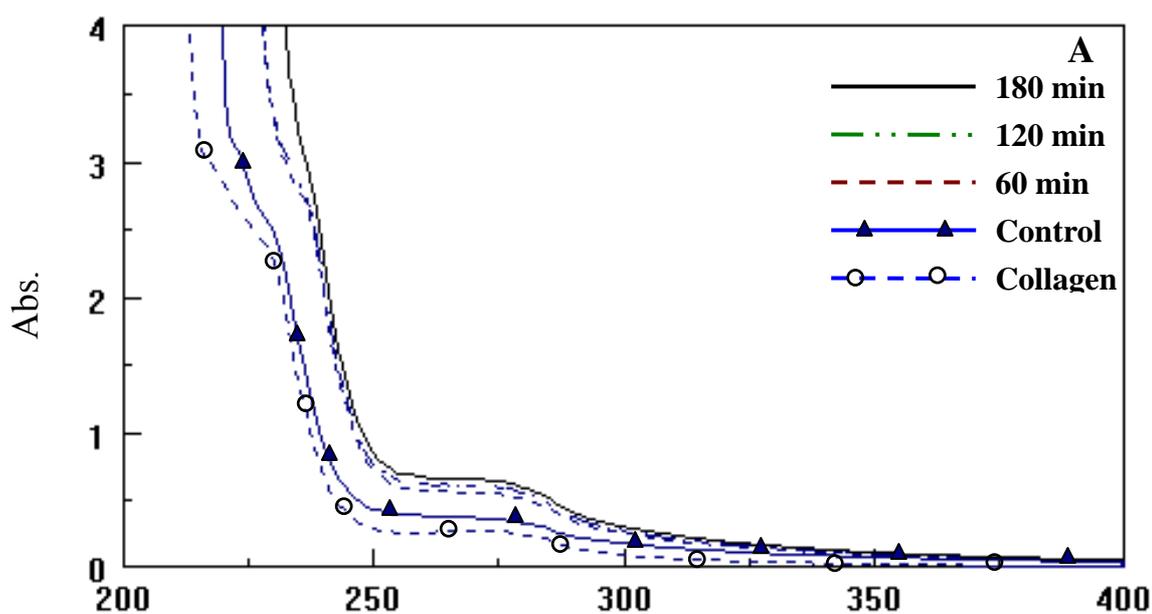
Collagen: collagen solution without any treatment.

A and B mean spectra of wavelength from 200nm to 400nm and 250nm to 400nm, respectively.

由圖 4 及圖 5 可知，膠原蛋白經鳳梨酶及木瓜酶水解後所得之水解液，其中以木瓜酶進行適度水解後，將使其水解液對紫外線之吸光值也隨之增加，並於紫外線短波區較未經加熱及酵素水解之膠原蛋白者佳。當膠原蛋白隨著水解時間之增加，將會使膠原蛋白水解物裂解成更小可溶性肽或游離胺基酸，而有伴隨其吸收紫外線之能力亦隨之下降的趨勢，依王(1994)指出，此可能係過度水解致分子太小所致，亦即適當水解程度所產生之肽應較小分子肽或胺基酸具更佳吸

收紫外線之能力。而膠原蛋白經 65°C 加熱以鳳梨酶水解不同時間後，其水解液吸收紫外線之能力並無明顯差異，惟所獲得之水解液其紫外線吸光值皆較木瓜酶組低。

而圖 6 為膠原蛋白於 65°C 加熱後，經胃蛋白酶水解不同時間，其水解液於紫外光區之吸光圖譜。由圖可知，經胃蛋白酶水解之膠原蛋白水解液亦是對 200~280nm 之紫外線具有較佳的吸收能力，對於波長 200~230nm 之吸光值皆到達滿點，且其吸收紫外線之能力也高於未經加熱及酵素水解之對照組膠原蛋白，此結果與鳳梨酶組及木瓜酶組相似，而於波長 250~280nm 之吸光值約在 0.5 到 0.8 之間。但胃蛋白酶組在水解 60 到 180 分鐘時，其對紫外線之吸光值是隨著水解時間增加而增加，這與經木瓜酶水解之結果是相反的。顯示經胃蛋白酶處理後，溶液中具吸收紫外線能力之肽隨著作用時間增加而逐漸被裂解出來，而木瓜酶處理組則無。



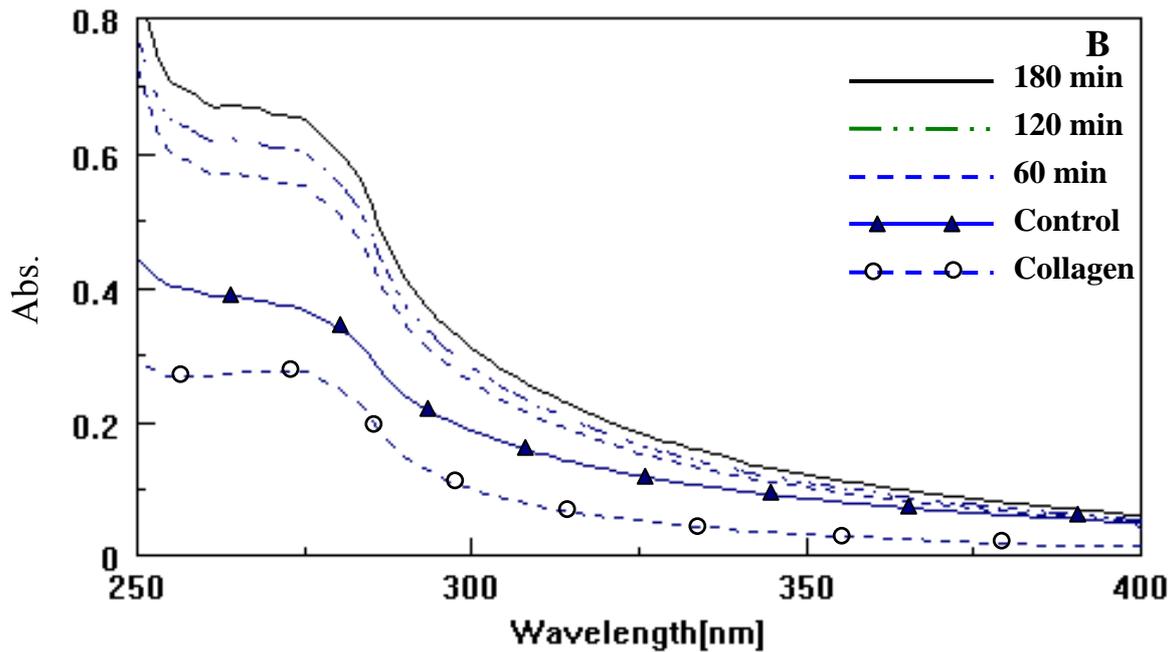


圖 6. 膠原蛋白經胃蛋白酶水解不同時間後之紫外線吸收光譜。

Fig. 6. UV spectra of collagen hydrolysate after pepsin treatment with various times.

Control: collagen solution after heating 30 min at 65°C.

Collagen: collagen solution without any treatment.

A and B mean spectra of wavelength from 200nm to 400nm and 250nm to 400nm, respectively.

圖 7 為比較膠原蛋白經鳳梨酶、木瓜酶及胃蛋白酶水解不同時間後於波長 275nm 之吸光值，Sionkowska(2001)指出膠原蛋白溶液於波長 275nm 具最大吸收能力且易於觀察，此亦為膠原蛋白中酪胺酸最主要的吸收波長。如圖所示，水解時間 0 分鐘者為未經加熱及酵素水解膠原蛋白溶液之吸光值，相較於經酵素水解之結果，顯示膠原蛋白在經加熱及酵素水解的過程是有助於提升其吸收紫外線之能力，亦即藉由加熱及酵素水解的過程可使得膠原蛋白溶液中可溶性肽及胺基酸的部分增加，進而使其對紫外線之吸收能力有所提

升，未經處理之膠原蛋白含可溶性部分極少，所以其在紫外線吸光值上也就低於膠原蛋白水解物。

木瓜酶組其吸光值隨著水解時間增加而下降，胃蛋白酶組之吸光值隨著水解時間增加而上升，這可能是膠原蛋白經不同酵素水解後所得水解物組成不同所致，或是蛋白分解酵素作用位置特性不同所造成。在此水解試驗中，以木瓜酶水解 60 分鐘所得水解物之紫外線吸光值為最高，但於水解完成後其水解液仍有許多不可溶沉澱殘渣，因此膠原蛋白若於更適當之酵素水解過程下，應可使膠原蛋白水解物能有更佳之紫外線吸收能力。

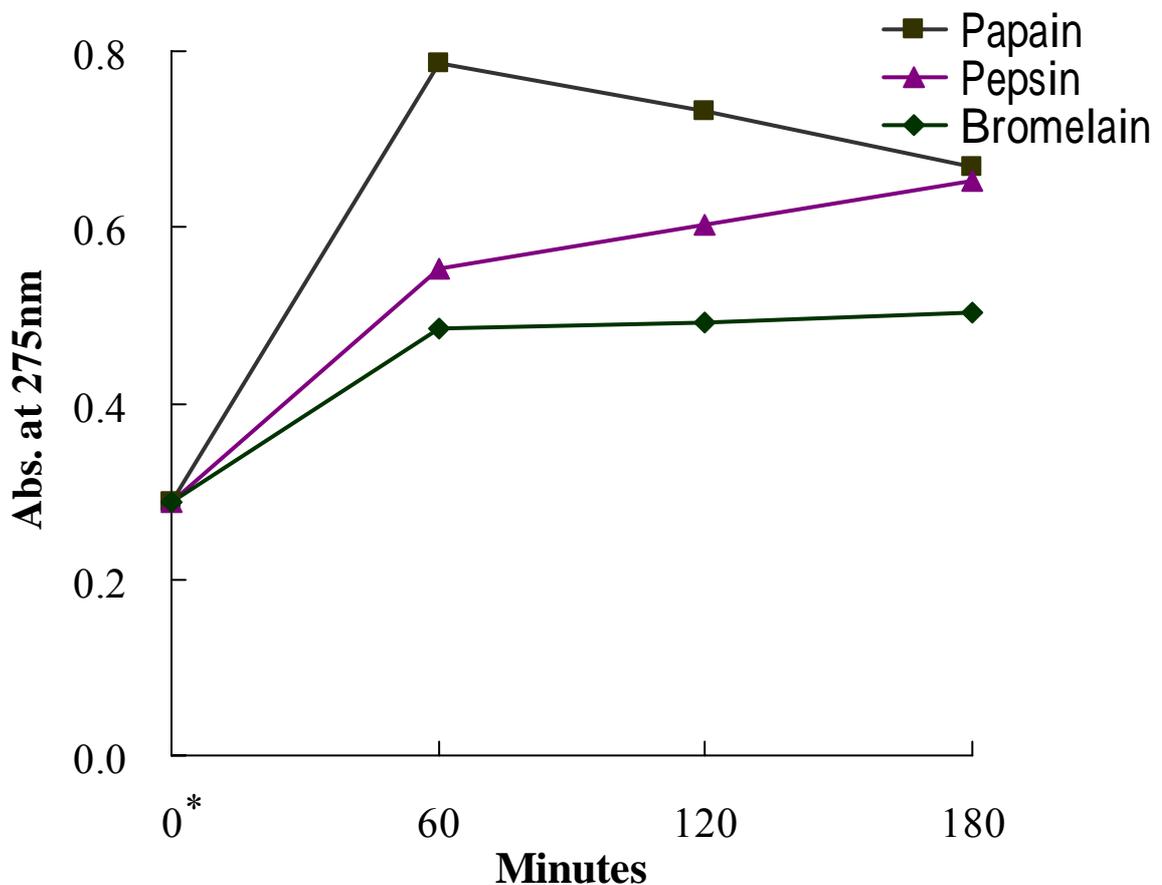


圖 7. 膠原蛋白經鳳梨酶、木瓜酶及胃蛋白酶水解不同時間後之 275nm 吸光值。

Fig. 7. The absorbance at 275 nm of collagen hydrolysate after various hydrolysis times of bromelain, papain and pepsin.

\* Collagen without heating and hydrolyzing by enzyme.

## 二、不同加熱溫度對膠原蛋白水解物吸收紫外線能力之影響

於本試驗中，擬將膠原蛋白溶液先經 65、80 及 95 加熱 30 分鐘再進行酵素水解，探討不同加熱溫度能否對鳳梨酶、木瓜酶及胃蛋白酶之水解效率，所得之膠原蛋白水解物吸收紫外線能力能否有所提升。由於並未延長加熱時間來增加加熱程度，故膠原蛋白尚不至於有發生熱變性成明膠之虞。

所得結果如表 4 所示，經不同加熱溫度之變性處理後，鳳梨酶組中以 95°C 加熱 30 分鐘在 275nm 之吸光值 0.573 為最高，木瓜酶組在三個不同處理溫度下顯示並無差異。胃蛋白酶組中亦以 95°C 加熱 30 分鐘在 275nm 之吸光值 0.972 為最高，且與 65 及 80°C 兩組相較呈現顯著差異，亦為此試驗

中於紫外線吸收表現上最佳之一組，而木瓜酶組以 65°C 熱處理為次之。綜合上述結果顯示，膠原蛋白若以 95°C 加熱 30 分鐘所留下之不可溶沉澱殘渣為最少，這可能為鳳梨酶組及胃蛋白酶組在 95°C 熱處理下之吸光值表現較其它加熱溫度高的原因之一。

表 4. 不同加熱溫度及不同酵素對膠原蛋白水解物於波長 275nm 吸光值影響

Table 4. Effect of various heat temperatures and enzymatic hydrolysis on the absorbance at 275 nm of collagen hydrolysate

	Heat temperature( )		
	65	80	95
Bromelain	0.484±0.004 <sup>Cb</sup>	0.492±0.040 <sup>Cb</sup>	0.573±0.017 <sup>Ca</sup>
Papain	0.786±0.017 <sup>Aa</sup>	0.746±0.058 <sup>Aa</sup>	0.739±0.013 <sup>Ba</sup>
Pepsin	0.552±0.025 <sup>Bc</sup>	0.629±0.005 <sup>Bb</sup>	0.972±0.009 <sup>Aa</sup>

A, B, C Different letters in the same column indicate significant difference (p<0.05).

a, b, c Different letters in the same row indicate significant difference (p<0.05).

### 三、不同加熱溫度及酵素水解時間對膠原蛋白水解物吸收紫外線能力之影響

為更進一步了解膠原蛋白究竟經何種程度之熱變性及酵素來裂解後，所生成之肽能對波長 275nm 之紫外線產生最佳之吸收能力，故再針對不同之酵素水解時間進行探討。

圖 8 為膠原蛋白經不同加熱溫度及木瓜酶水解不同時間後於波長 275nm 之吸光值。由圖可知，不同之加熱溫度對水解液於紫外線吸收上影響不明顯，雖然提高加熱溫度使不可溶之沉澱物減少即增進了酵素水解效益，但無法獲得具較佳紫外線吸收力之水解物，而其吸光值會隨著水解時間的增加而下降，且在三個不同之加熱溫度下皆有相同之趨勢，皆是以水解 60 分鐘後之吸光值為最高。

圖 9 為膠原蛋白經不同加熱溫度及胃蛋白酶水解不同時間後於波長 275nm 之吸光值。由圖可知，在同一加熱溫度下，水解液於波長 275nm 之吸光值有隨著水解時間增加而提升之趨勢，在不同加熱溫度下，其吸光值則隨著加熱溫度的提高而隨之增加，且以 95 加熱下之吸光值明顯高於 65°C 及 80 兩組處理。結果顯示，提高加熱溫度有利於提升胃蛋白酶水解效益，而使得水解物對於紫外線吸收能力也隨之增加，於不同水解時間之結果可知，經水解 180 分鐘之水解液於吸光值上較高於水解 60 及 120 分鐘兩組，且在三個不同之加熱溫度下皆有相似之趨勢。

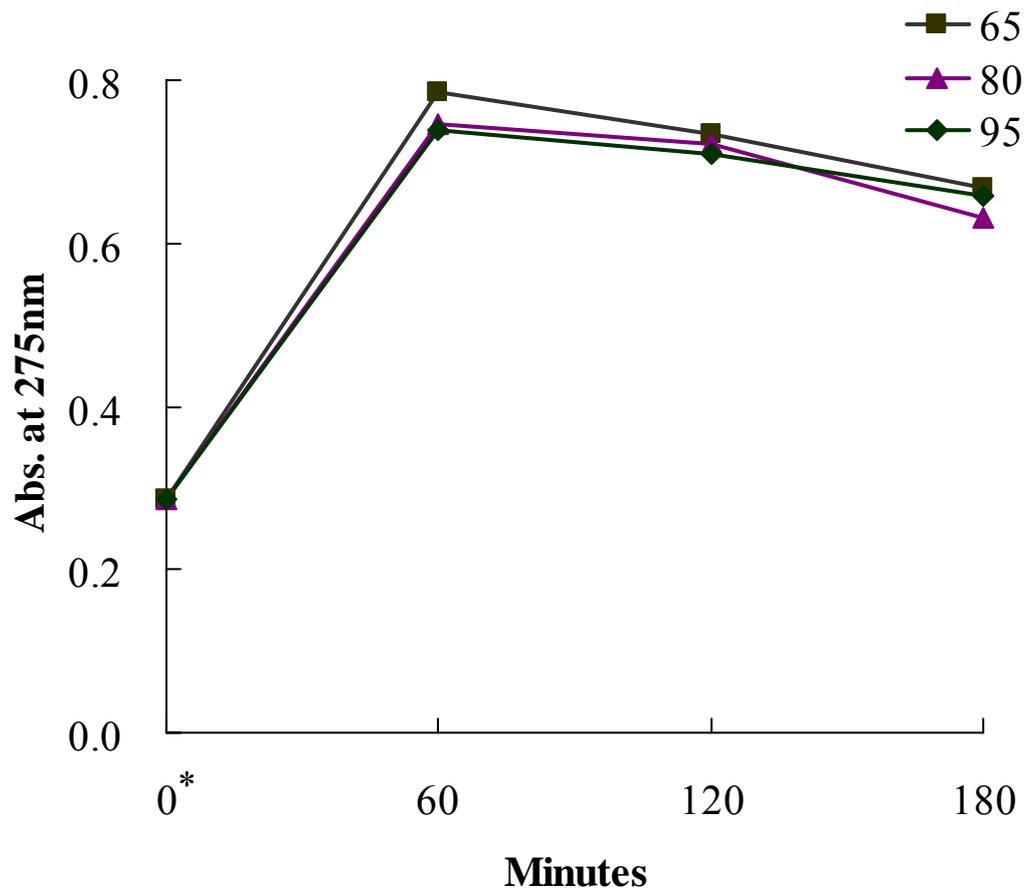


圖 8. 不同加熱溫度及木瓜酶不同水解時間對膠原蛋白水解物於波長 275nm 吸光值之影響。

Fig. 8. Effect of various heat temperatures and papain hydrolysis times on the absorbance at 275 nm of collagen hydrolysate.

\* The 275nm absorbance of collagen without heating and hydrolyzing.

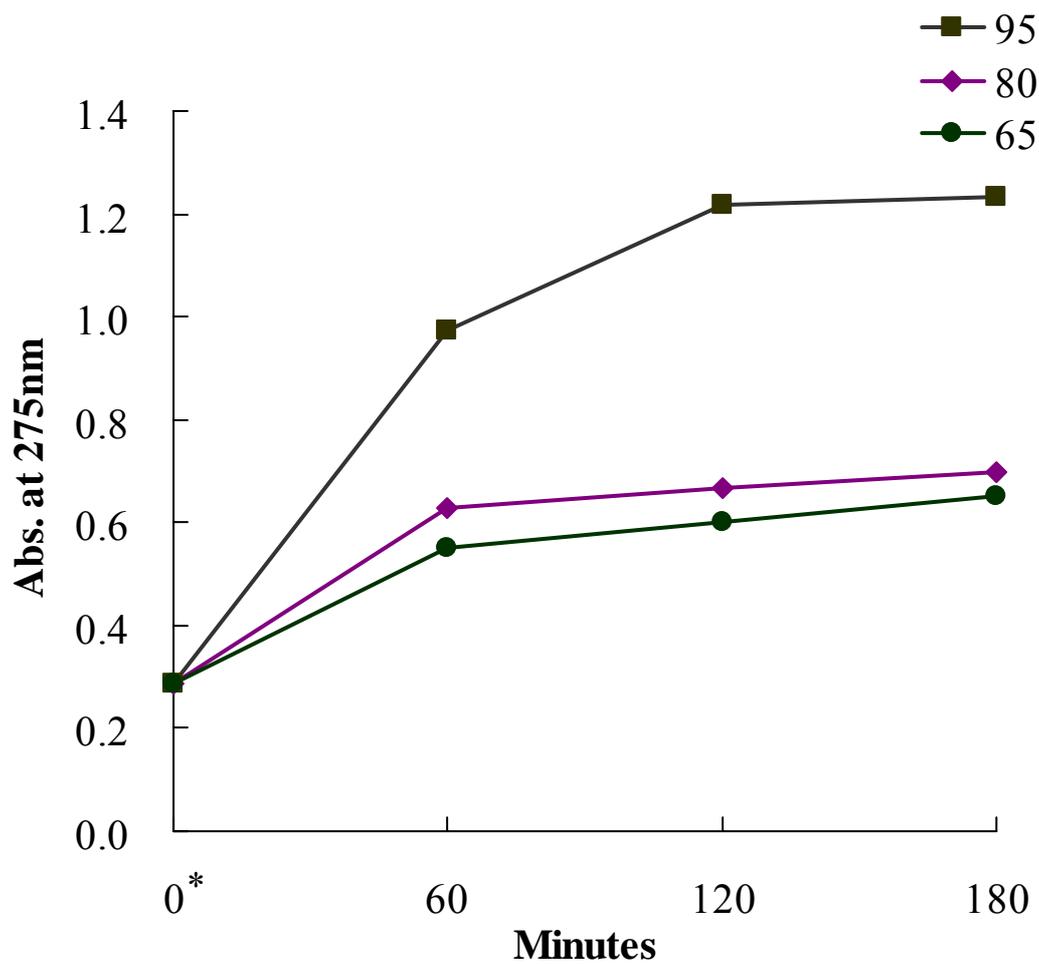


圖 9. 不同加熱溫度及胃蛋白酶不同水解時間對膠原蛋白水解物於波長 275nm 吸光值之影響。

Fig. 9. Effect of various heat temperatures and pepsin hydrolysis times on the absorbance at 275 nm of collagen hydrolysate.

\* The 275nm absorbance of collagen without heating and hydrolyzing.

綜合上述兩結果可知，膠原蛋白於不同加熱溫度後，經木瓜酶及胃蛋白酶水解 60 至 180 分鐘，所得結果有極大的差異。經木瓜酶水解之膠原蛋白，其紫外線吸光值是隨著水解時間增加而隨之減少，而加熱溫度的改變對其影響不明顯。經胃蛋白酶水解之膠原蛋白的吸光值，是隨著加熱溫度的上升及水解時間的增加而提高，且經 95°C 熱處理的皆高於木瓜酶組。Sachdev and Fruton(1970)指出胃蛋白酶對連結芳香族胺基酸之鍵結最具效力，可能於水解過程中具有芳香族胺基酸之可溶性肽會逐漸增加，且加熱處理將使膠原蛋白的三絲螺旋結構解開，亦有利於胃蛋白酶水解作用之進行。而木瓜酶在中性及微酸的環境下，主要對膠原蛋白中之醯胺鍵(-CO-NH-)進行水解，可能於此酵素濃度及水解條件下，無法獲得具較高吸光能力之水解物。

圖 10 為膠原蛋白經 95°C 加熱 30 分鐘後，以胃蛋白酶分別水解 1 到 9 個小時於波長 275nm 之吸光值。由結果可知，水解液之吸光值隨著水解時間的增加而提高，當水解時間為 5 小時時其吸光值 1.423 為最高，而與水解 6 小時之吸光值 1.421 結果相近。但當水解時間達 7 到 9 小時，其吸光值則有隨著水解時間增加而下降之趨勢。由此可知，膠原蛋白經 95 加熱後以胃蛋白酶水解 5 小時，所得之水解液能具有最高之吸光值，此即為胃蛋白酶對膠原蛋白的最佳水解時間。

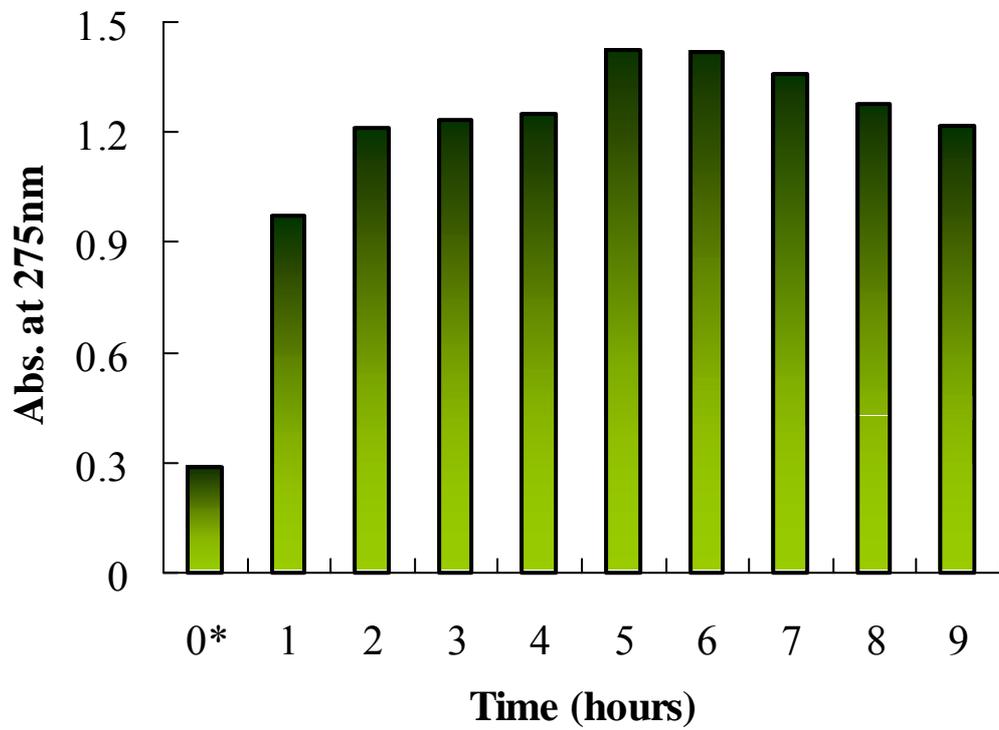


圖 10. 不同水解時間對膠原蛋白胃蛋白酶水解物於波長275nm吸光值之影響。

Fig. 10. Effect of hydrolysis time for pepsin on the absorbance at 275nm of collagen hydrolysate.

\* The 275nm absorbance of collagen without heating and hydrolyzing.

#### 四、不同酵素濃度對膠原蛋白水解物吸收紫外線能力之影響

本實驗以木瓜酶及胃蛋白酶來進行，將酵素濃度調整為 1、3 及 5%(酵素/基質)，以了解不同酵素濃度對膠原蛋白水解物吸收紫外線能力之影響。

從前面之試驗可了解不同加熱溫度及水解時間對膠原蛋白水解液於紫外線吸收上的影響，其對紫外線之吸光值會隨著木瓜酶水解時間增加而下降，接著就以不同之加熱溫度及木瓜酶濃度來進行，看對膠原蛋白水解液之影響及能否提升其吸收紫外線之能力。結果如表 5 所示，膠原蛋白水解液之吸光值是隨著木瓜酶濃度的增加而降低，且木瓜酶濃度為 1% 皆與濃度為 3 及 5% 之結果達差異顯著。在不同的加熱溫度方面，除了酵素濃度為 5% 一組中 65°C 對 80 及 95°C 有顯著差異外，當以酵素濃度為 1 及 3% 進行水解時，不同之加熱溫度對其紫外線吸光值上並無顯著的影響。

綜合所有以木瓜酶進行水解之結果，可以發現膠原蛋白水解液之吸光值主要受酵素濃度及水解時間的影響，並隨著酵素濃度及水解時間增加而降低，而不同的加熱溫度對其吸光值之影響較不顯著。

表 5. 不同加熱溫度及木瓜酶濃度對膠原蛋白水解物於波長 275nm  
吸光值影響

Table 5. Effect of various heat temperatures and papain concentration on  
the absorbance at 275nm of collagen hydrolysate

Heat temperature( )	Concentrate of papain(%)		
	1	3	5
65	0.786±0.017 <sup>Aa</sup>	0.601±0.022 <sup>Ab</sup>	0.577±0.003 <sup>Ab</sup>
80	0.746±0.058 <sup>Aa</sup>	0.557±0.035 <sup>Ab</sup>	0.486±0.029 <sup>Bc</sup>
95	0.739±0.013 <sup>Aa</sup>	0.589±0.028 <sup>Ab</sup>	0.509±0.029 <sup>Bc</sup>

<sup>A and B</sup> Different letters in the same column indicate significant difference  
(p<0.05).

<sup>a, b, c</sup> Different letters in the same row indicate significant difference  
(p<0.05).

依胃蛋白酶進行水解之結果，可發現於加熱溫度以 95°C 為佳，由於其吸光值主要是受水解時間的影響，在水解時間為 1 至 5 小時，其吸光值是隨時間增加而提升，當水解時間為 6 至 9 小時，其吸光值是隨時間增加而降低(圖 10)。故設計以下的試驗以水解時間 4 至 6 小時及胃蛋白酶濃度 1、3 或 5% 來進行。其結果如表 6 所示，膠原蛋白經 1% 胃蛋白酶水解 5 及 6 小時水解液之吸光值皆高於 3 及 5% 胃蛋白酶組，且皆達差異顯著。由此可知，提高胃蛋白酶之濃度可能過度水解並而未能增加膠原蛋白水解物吸收紫外線之能力，基於成本考量，仍以胃蛋白酶濃度 1% 水解 5 小時為最佳水解條件。

##### 五、不同濃度之膠原蛋白水解物的紫外線吸收能力

本試驗以不同濃度 0.5、1.0 及 1.5% 之膠原蛋白溶液，經 1% 木瓜酶或胃蛋白酶水解後觀其紫外線吸收能力。結果顯示，不同濃度之膠原蛋白溶液經木瓜酶水解後，其水解液之紫外線吸收能力隨著膠原蛋白的濃度提高而增加，亦即相較濃度 0.5% 者，濃度至 1.0 至 1.5% 之吸光值於波長 250nm ~ 280nm 有極明顯的提升(圖 11. A)。而經胃蛋白酶水解後之不同濃度水解液，其結果與木瓜酶組有相同之趨勢，其紫外線吸收能力亦隨著濃度的提高而增加，且高於木瓜酶組甚多，但主要仍是集中在短波紫外線 200~280nm 的光區(圖

11. B)。

表 6. 不同水解時間及胃蛋白酶濃度對膠原蛋白水解物於波長 275nm 吸光值影響

Table 6. Effects of various hydrolysis times and pepsin concentration on the absorbance at 275nm of collagen hydrolysate

Hydrolysis time (hours)	Concentrate of pepsin(%)		
	1	3	5
4	1.250±0.046 <sup>Bb</sup>	1.213±0.040 <sup>Bb</sup>	1.332±0.053 <sup>Aa</sup>
5	1.423±0.046 <sup>Aa</sup>	1.246±0.063 <sup>Bb</sup>	1.220±0.033 <sup>Bb</sup>
6	1.421±0.029 <sup>Aa</sup>	1.315±0.057 <sup>Ab</sup>	1.217±0.042 <sup>Bc</sup>

A, B, C Different letters in the same column indicate significant difference (p<0.05).

a, b, c Different letters in the same row indicate significant difference (p<0.05).

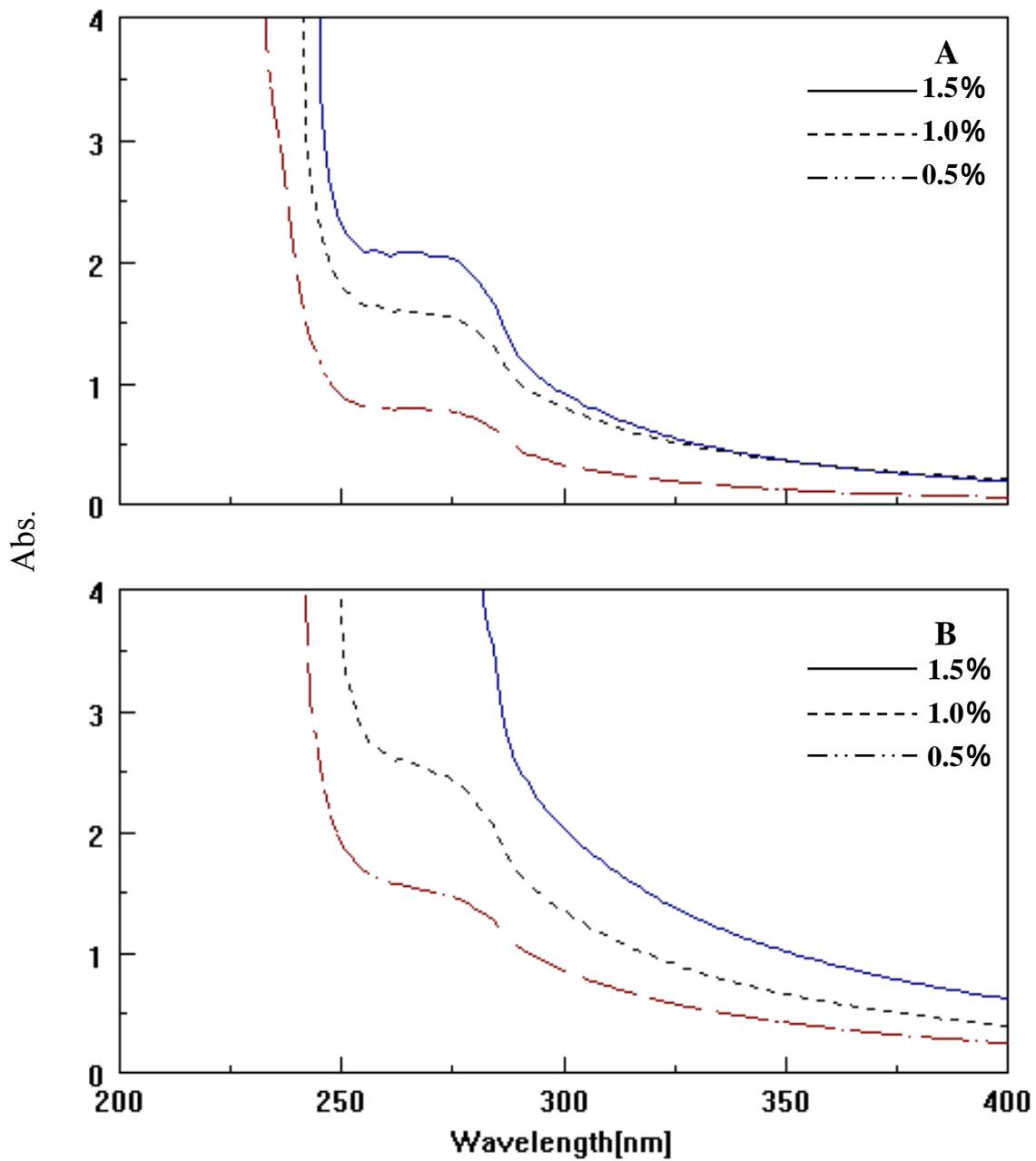


圖 11. 不同濃度之膠原蛋白經木瓜酶(圖 A)及胃蛋白酶(圖 B)水解不同時間後之紫外線吸收光譜。

Fig. 11. UV spectra of various concentration collagen hydrolysate after papain(A) and pepsin(B) treatment.

## 六、膠原蛋白水解物之乳化能力

在蛋白質之應用上，乳化為一極重要的性狀，而乳化性之形成則有賴於蛋白質介入而降低油及水分子間介面能量 (Philips, 1981；周，1987)，一般係以乳化容量及乳化安定性作為評估之指標。本試驗以 0.5% 膠原蛋白經 1% 木瓜酶或胃蛋白酶水解後，期獲得具有較佳紫外線吸收能力之水解物，再依實驗方法(六)來進行乳化試驗。

膠原蛋白經不同溫度加熱後，以木瓜酶水解 1 小時所得水解物於紫外線吸收上表現較佳，且於波長 275nm 吸光值上差異不顯著，以此三個不同加熱處理組為樣品，探究不同加熱溫度對膠原蛋白水解物之乳化容量及乳化安定性的影響。結果如表 7 所示，其中以調整至 pH 6 且未經加熱及酵素水解之膠原蛋白溶液作為對照，顯示水解物之乳化容量是隨著加熱溫度的提高而下降，但皆高於未經加熱及酵素水解之對照組，其中 65 及 80°C 組更與對照組達差異顯著 ( $p < 0.05$ )。於乳化安定性上，反以 95°C 組較 65 及 80°C 組高且達差異顯著 ( $p < 0.05$ )，但 65°C 組與 80°C 組之間則無明顯差異。

在此未探討不同加熱溫度對胃蛋白酶組水解物乳化能力之影響，由於加熱溫度為 65 及 80°C 兩處理組之紫外線吸收能力明顯低於經 95°C 處理之水解液。

表 7. 不同加熱溫度對木瓜酶之膠原蛋白水解物乳化容量及乳化安定性的影響

Table 7. Effect of various heat temperatures on emulsifying capacity and emulsion stability of collagen hydrolysate (papain treatment)

	Emulsifying capacity (mL oil/g protein)	Emulsion stability (%)
65	115.0±2.5 <sup>A</sup>	10.59±1.86 <sup>B</sup>
80	107.5±2.5 <sup>B</sup>	11.92±2.01 <sup>B</sup>
95	102.5±2.5 <sup>C</sup>	24.20±3.26 <sup>A</sup>
Control*	100.8±1.4 <sup>C</sup>	5.32±0.96 <sup>C</sup>

\* Collagen solution without heating and hydrolyzing only adjusted the pH to 6.0.

<sup>A, B, C</sup> Different letters in the same column indicate significant difference (p<0.05).

有研究指出，膠原蛋白之乳化能力會受到 pH 值高低所影響(周，1987)，亦即愈接近蛋白質等電點附近，其乳化容量及乳化安定性則愈低。從上述之結果，則以 65°C 組之水解液進行以下試驗，且可慮到其將來的應用性，將膠原蛋白水解液之 pH 調整至 5.0、6.0、7.0 三組，以了解不同 pH 對其乳化能力之影響。結果如表 8 所示，膠原蛋白水解物之乳化容量是隨著 pH 上升而增加，此一趨勢與周 (1987)之結果相同。其中 pH 6 及 pH 7 兩組之乳化容量則高於未經處理之膠原蛋白達差異顯著( $p < 0.05$ )。但於乳化安定性上，則是隨著 pH 上升而下降。

表 9 為不同 pH 對膠原蛋白胃蛋白酶水解物乳化能力之影響，本試驗以膠原蛋白經胃蛋白酶水解 5 小時之水解液來進行。由結果顯示，膠原蛋白水解物之乳化容量是隨著 pH 上升而增加，此趨勢與木瓜酶組相同，但其乳化容量皆高出木瓜酶組及未經處理之膠原蛋白甚多。經胃蛋白酶水解之水解液，於不同的 pH 對其之乳化安定性影響不顯著，但皆高於未經處理之膠原蛋白。

綜合上述結果，加熱及酵素處理能提升膠原蛋白之乳化能力，於乳化試驗中 pH 對水解液之乳化能力影響甚大，乳化容量是隨著 pH 上升而增加，而於此試驗中水解液之乳化安定性皆偏低，可能為溶液中膠原蛋白濃度太低所致。

表 8. 不同 pH 對木瓜酶之膠原蛋白水解物乳化容量及乳化安性的影響

Table 8. Effect of various pH value on emulsifying capacity and emulsion stability of collagen hydrolysate (papain treatment)

	Emulsifying capacity (mL oil/g protein)	Emulsion stability (%)
pH 5	95.8±5.2 <sup>C</sup>	19.67±3.11 <sup>A</sup>
pH 6	115.0±2.5 <sup>B</sup>	10.59±1.86 <sup>B</sup>
pH 7	135.0±2.5 <sup>A</sup>	9.50±2.43 <sup>B</sup>
Control*	100.8±1.4 <sup>C</sup>	5.32±0.96 <sup>C</sup>

\* Collagen solution without heating and hydrolyzing only adjusted the pH to 6.0.

<sup>A, B, C</sup> Different letters in the same column indicate significant difference (p<0.05).

表 9. 不同 pH 對胃蛋白酶之膠原蛋白水解物乳化容量及乳化安性的影響

Table 9. Effect of various pH value on emulsifying capacity and emulsion stability of collagen hydrolysate (pepsin treatment)

	Emulsifying capacity (mL oil/g protein)	Emulsion stability (%)
pH5	225.0±5.0 <sup>C</sup>	20.93±2.36 <sup>A</sup>
pH6	256.7±2.9 <sup>B</sup>	19.89±2.12 <sup>A</sup>
pH7	296.7±15.2 <sup>A</sup>	21.82±5.73 <sup>A</sup>
Control*	100.8±1.4 <sup>D</sup>	5.32±0.96 <sup>B</sup>

\* Collagen solution without heating and hydrolyzing only adjusted the pH to 6.0.

<sup>A~D</sup> Different letters in the same column indicate significant difference (p<0.05).

## 七、添加膠原蛋白水解液於合成防曬產品

由圖 12 顯示，只含化學成分之防曬乳(圖 12 A)與含有 TiO<sub>2</sub> 之防曬乳(圖 12 B)主要皆在吸收中波紫外線，且兩者之吸收能力相當接近，顯示於吸光值之表現可作為防曬係數的參考。當依實驗方法(七)將膠原蛋白水解液與防曬乳液以 1:4 比例混合，測其紫外線吸收能力，發現水解液可彌補防曬乳液於短波紫外線(200~290nm)之吸收不足，惟三者於長波紫外線之吸收上皆不佳。

有研究以植物萃取物與防曬乳中成分作紫外線吸收之比較，結果植物萃取物之吸收能力仍遠不及防曬乳，當進行防曬係數測試時兩者間的差距則縮小。作者指出防曬係數與光反應及生物反應兩者皆有相關，天然之植物萃取物有著合成防曬乳所缺乏的生物效應，如：減少因過度曝曬造成之紅斑及曬傷，並加快紅斑之恢復等(Hu and Wang, 1998)。而膠原蛋白與其它天然聚合物相較之下，具生物可降解性、較佳生物相容性(biocompatibility)及低抗原性(Maeda *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001)，且膠原蛋白經胃蛋白酶作用可進一步消除結構中含有具抗原性之終端肽，於使用上不同於一般化學成分對皮膚有引起過敏及刺激性之慮。

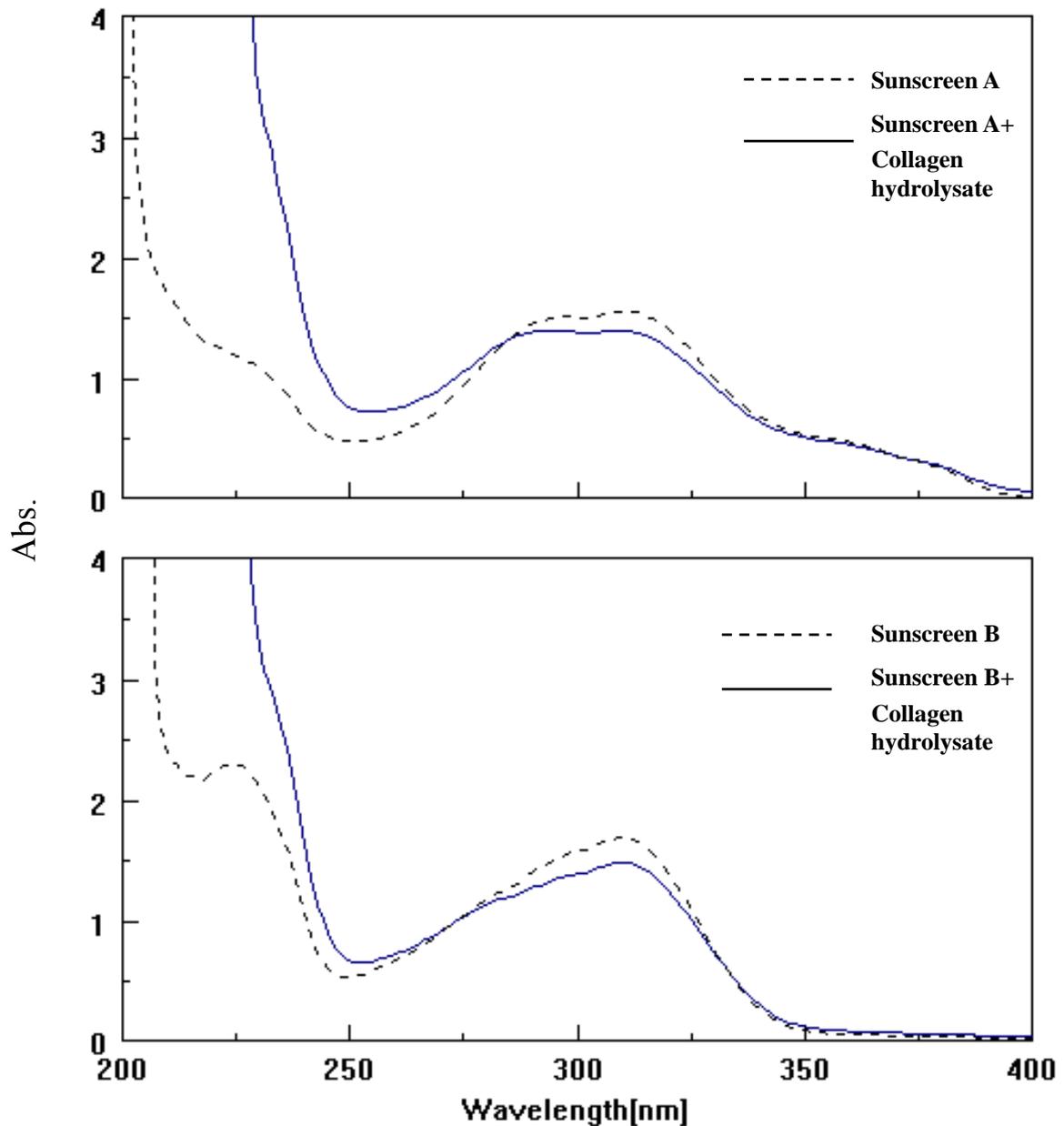


圖 12. 比較合成防曬乳添加膠原蛋白水解物前後之紫外線吸收光譜。  
 Fig. 12. Comparison of UV spectra of synthetic sunscreen before and after adding collagen hydrolysate.

Sunscreen A: Active ingredient Octyl Methoxycinnamate, SPF 30 PA+++

Sunscreen B: Active ingredient  $\text{TiO}_2$  and Octyl Methoxycinnamate, SPF 30 PA+.

## VI、結 論

防曬保養品中除了不斷於配方上作改進外，尚在尋求一天然抗紫外線之原料，以避免或降低化學成分對於皮膚所引起之不良反應。自廉價豬皮中所萃取之膠原蛋白，利用酵素修飾改善其紫外線吸收能力及乳化能力後，於防曬產品中可作為一天然吸收短波紫外線之素材。綜觀本研究之結果可歸納成以下幾點：

一、膠原蛋白經酵素水解後，所得之水解物對於短波紫外線吸收能力為最佳，其次為中波紫外線。且酵素水解作用能提升膠原蛋白對紫外線之吸收能力。

二、不同加熱溫度處理之膠原蛋白溶液經鳳梨酶水解所得之水解物，其紫外線吸收能力是隨著加熱溫度上升而提高。但此酵素及水解條件對膠原蛋白紫外線吸收能力之提升有限。

三、由 0.5% 膠原蛋白於 65 加熱 30 分鐘後，經 1.0% 木瓜酶水解 1 小時，其水解物於波長 275nm 之吸光值為 0.786。其水解物之乳化容量隨著 pH (pH 5~pH 7) 上升而增加，但於乳化安定性則反之。

四、由 0.5% 膠原蛋白於 95°C 加熱 30 分鐘後，經 1.0% 胃蛋白酶水解 5 小時，其水解物於波長 275nm 之吸光值為 1.423。其水解物之乳化容量隨著 pH (pH 5~pH 7) 上升而增加，但於乳化安定性則無顯著差異，亦即於 pH 7 具最佳之乳化能力。

五、經胃蛋白酶水解之膠原蛋白水解物可作為天然吸收紫外線之素材，當添加於合成防曬乳中可彌補其於吸收短波紫外線之缺憾，且於適合皮膚之 pH 範圍內亦有不錯之乳化能力，經胃蛋白酶作用後，於使用上幾乎無引起過敏之虞。

## VII、參考文獻

- 王棣。1994。利用豬皮膠原蛋白酵素水解物試製機能性配料之研究。碩士論文，東海大學畜產學研究所。
- 呂紹壬。1998。紫外線照射對蛋白質形膠的影響。食品工業，30(11)：46~52。
- 吳安邦、鄭慧文、陳淑茹、林伶紅、呂炫堃、林慶文、陳朝洋。1998。豬皮中低終端肽膠原蛋白之製備。中華農學會報，187：93~99。
- 周繼發。1980。利用豬皮膠原蛋白試製可食用薄膜之研究。碩士論文，國立台灣大學畜牧學研究所。
- 周繼發。1983。自豬皮萃製明膠性質之研究。中畜會誌，12(1~2)：7~14。
- 周繼發、林慶文。1985。膠原蛋白分子結構之解析。科學農業，33(9~10)：347~350。
- 周繼發。1987。豬皮膠原蛋白及化學與酵素修飾物機能性之研究。博士論文，國立台灣大學畜牧學研究所。
- 周繼發、王棣。1995。利用豬皮膠原蛋白酵素水解物試製胺基酸機能性配料之研究。中畜會誌，24(3)：345-359。
- 陳自珍。1988。食品酵素學，pp. 135-188, 407-421。復文書局，台南市。

- 黃加成、林慶文。1984。酵素修飾化蛋白質與其機能性。科學農業，32(11~12)：391~396。
- 黃新田。1976。蛋白分解酶處理豬皮以作肉製品接著劑之利用。碩士論文，國立台灣大學畜牧學研究所。
- 張炳揚。2001。食品體系中乳化安定性之控制。食品工業月刊，33(6)：42~48。
- 大野素徳、金岡祐一、崎山文夫、前田 浩。1981。蛋白質の化學修飾(上)，pp. 1~3。學會出版センター，東京。
- 永井 裕、藤本大三郎。1985。コラーゲン實驗法。p. 3，講談社サイエンティフィ，東京。
- 松田 皓。1981。コラーゲンの食品への利用-ゼラチンおよびゼラチンおよびゼラチン分解物を主として。New Food Industry, 23(7): 4-9.
- 野田春彦、永井 裕、藤本大三郎。1975。コラーゲンの化學、生物學、醫學，pp. 251-280。南江堂株式會社，東京。
- A.O.A.C. 1980. Official methods of analysis of the association of the Association of Official Analytical Chemists, 13<sup>th</sup> edition, Washington, D.C.
- Acton, J. C. and R. L. Saffle. 1970. Stability of oil in water emulsions. 1.Effects of surface tension, level of oil, viscosity and type of meat protein. J. Food Sci., 35(6): 852-855.

- Arai, S., M. Yamashita and M. Fuzimaki. 1975. Plastein reaction for food protein improvement. *Cereal Foods World*, 20(1): 107-111.
- Arai, S., M. Yamashita and M. Fuzimaki. 1979. A novel one-step process for enzymatic of amino acids into proteins: papain-catalyzed polymerization of L- methionine ethyl ester and its regulation by adding a protein substrate. *Agric. Biol. Chem.*, 43(5): 1069-1074.
- Asghar, A. and R.L. Henrickson. 1982. Chemical, biochemical, functional and nutritional characteristics of collagen in food systems. *Adavan. Food Res.*, 28: 231-328.
- Brooks, B.A., K.C. Klasing and J.M. Regenstein. 1985. Effects of antemortem injected crude papain in chicken muscle. *J. Food Sci.*, 50: 1370-1374.
- Burke, J.F. and I.V. Yannas. 1981. Making skin from sharks. *Time*, 5: 59.
- Choi, C., G. M. Son, Y. J. Cho, S. S. Chun, S. I. Lim and Y. R. Seok. 1992. Purification and characteristics of bromelain from Korean pineapple. *J. Korean Agric. Chem. Sot.*, 35: 23-29.
- Courthaudon, J-L., E. Dickson, Y. Matsumura and D.C. Clark. 1991. Competitive adsorption of  $\beta$ -lactoglobulin + Tween 20 at the oil-water interface. *Colloids Surf.*, 56: 293-300.

- Dalgleish, D.G. 1997. Adsorption of protein and the stability of emulsions. *Trends in Food Sci. & Technol.*, 8: 1-6.
- Dalgleish, D.G., M. Srinivasan and H. Singh. 1995. Surface properties of oil-in-water emulsion droplets containing casein and Tween-60. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 2351-2355.
- Das, K.P. and J.E. Kinsella. 1990. Stability of food emulsions: physicochemical role of protein and non protein emulsifiers. *Adv. Food Nutr. Res.*, 34: 81-129.
- Dickson, E. and G. Stainsby. 1982. *Colloids in Foods*. Applied Science, London.
- Dufour, E., M. Dalgarrondo, G. Hervé, R. Goutefongea and T. Haertlé. 1996. Proteolysis of type III collagen by collagenase and Cathepsin B under high hydrostatic pressure. *Meat Sci.*, 42(3):261-269.
- Fang, Y. and D.G., Dalgleish. 1993. Casein adsorption on the surface of oil-in-water emulsions modified by lecithin. *Colloids Surf.*, B1: 357-364.
- Fennema, O.R. 1985. *Food Chemistry*, 2<sup>nd</sup> edition, pp. 746-750. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.
- Frandsen, R.D. and T.L. Spurgeon. 1992. *Anatomy and Physiology of Farm Animals*, pp. 202-211. 5th edition, Lea & Febiger, New York.

- Fujimori, E. 1985. Changes induced by ozone and ultraviolet light in type I collagen. Bovine Achilles tendon collagen versus rat tail tendon collagen. *Eur. J. Biochem.*, 152: 299-306.
- Glazer, A.N. 1966. Transesterification reactions catalyzed by papain. *J. Biol. Chem.*, 241(16): 3811-3817.
- Glicksman M. 1969. *Gum Technology in the Food Industry*, pp.437-455, Academic Press, San Diego.
- Hill, F. 1966. The solubility of intramuscular collagen in meat animals of various ages. *J. Food Sci.*, 31(2): 161-165.
- Hu, G. and X. Wang. 1998. Research on a natural sunscreen from Chinese herbs. *Int. J. Cosm. Sci.*, 20: 175-181.
- Ikura, K., T. Kometani, M. Yoshikawa, R. Sasaki and H. Chiba. 1980. Crosslinking of casein components by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.*, 44(7): 1567-1573.
- Ikura, K., M. Yoshikawa, R. Sasaki and H. Chiba. 1981. Incorporation of amino acids into food proteins by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.*, 45(11): 2587-2592.
- Ishizaki, S., M. Hamada, N. Iso, M. Tanaka and T. Taguchi. 1993. Conformational changes in actomyosins from fish and pork muscles by ultraviolet irradiation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59: 2071-2077.

- Kamińska, A. and A. Sionkowska. 1996. The effect of UV radiation on thermal parameters of collagen degradation. *Polym. Degradation Stab.*, 51: 15-18.
- Kang, C.K. and E.E. Rice. 1970. Degradation of various meat fractions by tenderizing enzymes. *J. Food Sci.*, 35: 563-567.
- Kato, Y., K. Uchida and S. Kawakashi. 1992. Oxidative degradation of collagen and its model peptide by ultraviolet irradiation. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 373-379.
- Konigsberg, W., J. Goldstein and R.J. Hill. 1963. The structure of human haemoglobin VII. The digestion of the beta chain of human haemoglobin with pepsin. *J. Biol. Chem.*, 238: 2028-2033.
- Langmaier, F. M. Mládek, K. Kolomazník and S. Sukop. 2001a. Collagenous hydrolysates from untraditional sources of proteins. *Int. J. Cosm. Sci.*, 23: 193-199.
- Langmaier, F. M. Mládek, K. Kolomazník and S. Sukop. 2001b. Collagenous hydrolysates from untraditional sources of proteins: reaction conditions and the yield of enzymatic hydrolysis of short cattle tendons. *Int. J. Cosm. Sci.*, 23: 201-206.
- Langmaier F., M. Mládek, K. Kolomazník and S. Sukop. 2002. Isolation of elastin and collagen polypeptides from long cattle tendons as raw material for the cosmetic industry. *Int. J. Cosmetic Sci.*, 24: 273-279.

- Lavker, R.M. 1979. Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. *J. Invest. Dermatol.*, 73: 559–566.
- Lee, C. H., A. Singla and Y. Lee. 2001. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.*, 221: 1-22.
- Lehninger, A.L. 1970. *Biochemistry*, pp. 113-114. The Johns Hopkins University, Sparks, Maryland.
- Maeda, M., S. Tani, A. Sano and K. Fujioka. 1999. Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen based drug delivery system for controlled release of protein drugs. *J. Controlled. Rel.*, 62: 313–324.
- McLaren, D.A. and D. Shugar. 1964. *Photochemistry of protein and nucleic acids*. Pergamon Press, New York. 110.
- Mittal, L. J., J. P. Mittal and E. Hayon. 1973. Flash photolysis study of aliphatic amino acids and peptides in aqueous solution. *Photochem. Photobio.*, 18 : 281-292.
- Miyata, T., T. Taira and Y. Noishiki. 1992. Collagen engineering for biomaterial use. *Clin. Mater.*, 9(3-4): 139-148.
- O’Flaherty, F. and W.T. Roddr. 1977. *The Chemistry and Technology of Leather*. Vol. IV, p.46. Robert E. Krieger Publishing Company, Huntington, New York.
- Pathak, M.A. 1982. Sunscreens: topical and systemic approaches for protection of human skin against harmful effects of solar radiation. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 7: 285-314.

- Pearson, A.M., T.R. Dutson and A.J. Bailey. 1985. Advance in Meat Research, volume 4, Collagen as a Food. pp. 210-213, 312-321. Nostrand Reinhold Company, Inc., New York.
- Peterson, M.S. and A.H. Johnson. 1978. Encyclopedia of Food Science, pp. 153-160. AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut.
- Philips, M.C. 1981. Protein conformation at liquid interfaces and its role in stabilizing emulsions and foams. Food Technol., 35(1): 50-57.
- Pillai, S., C. Oresajo and J. Hayward. 2005. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review. Int. J. Cosmetic Sci., 27: 17-34.
- Prince, J.F. and B.S. Schweigert. 1971. The Science of Meat and Meat Products, 2<sup>nd</sup> edition, pp. 112-120. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Ramos, M.F.S., Santos, E.P. *et al.*, 1996. Preliminary studies towards utilization of various plant extracts as antisolar agents. Int. J. Cosm. Sci., 18: 87-101.
- Rattie, N.W. and Regenstein J.M., 1977. Action of crude papain on actin and myosin heavy chains isolated from chicken breast muscle. J. Food Sci., 42: 1159-1163.

- Sachdev, G.P. and J.S. Fruton. 1970. Secondary enzyme-substrate interactions and the specificity of pepsin. *Biochemistry.*, 9: 4465-4470.
- Santos, E.P., Z.M. Freitas, K.R. Souza and S. Garcia. 1999. In vitro and vivo determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octymethoxycinnamate. *Int. J. Cosm. Sci.*, 21: 1-5.
- Sionkowska, A. 2001. The influence of glutathione on the photochemical stability of collagen. *Polym. Degradation Stab.*, 77: 107-112.
- Sionkowska, A. 1999. Photochemical transformations in collagen in the presence of melanin. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.*, 124: 91-94.
- Sionkowska A. and T.J. Wess. 2004. Mechanical properties of UV irradiated rat tail tendon collagen. *Int. J. Biol. Macromolecules.*, 34: 9-12.
- Stenzel, H.K., T. Miyata, I. Kohno, S.D. Schlear and A.L. Rubin. 1975. Collagen surface in biomedical applications. Cited by B. E. Barrier, 1975. *Applied Chemistry at Protein Interface*, pp.26-35. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Sukan, G., and A.T. Andrew. 1982. Application of the plastein reaction to caseins and to skim-milk powder. *J. Dairy Res.*, 49(2): 265-278.

- Swift, C. E., C. Lockett and A. J. Fryor. 1961. Comminuted meat emulsion – The capacity of meat for emulsifying fat. *Food Technol.*, 15(11): 468-472.
- Tesch, S. and H. Schubert. 2002. Influence of increasing viscosity of the aqueous phase on the short-term stability of protein stabilized emulsions. *J. Food Engineering*, 52: 305-312.
- Ward, A.G. and A. Courts, editors. 1977. *The Science and Technology of Gelatin*. Academic Press, New York.
- Watanabe, M., A. Shimada and S. Arai. 1981. Enzymatic modification of protein functionality: Implantation of potent amphiphilicity to succinylated proteins by covalent attachment of leucine alkyl esters. *Agric. Biol. Chem.*, 45(7): 1621-1625.
- Weadock K.S., E.J. Miller, L.D. Bellincampi, J.P. Zawadsky and M.G. Dunn. 1995. Physical crosslinking of collagen fibers: comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment. *J Biomed Mater Res.*, 29(11): 1373-1379.
- Woodhead-Galloway, J. 1980. *Collagen-The Anatomy of a Protein*, pp. 1-41. Edward Arnold Ltd, London.
- Veis, A. 1964. *The macromolecular chemistry of gelatin*, pp.30-31, pp. 144-149. Academic Press Inc., New York, London.

Vanhoof, G. and W. Cooreman. 1997. Bromelain in Pharmaceutical Enzymes. Marcel Dekker Inc, New York.

Yamashita, M., S. Arai, Y. amano and M. Fuzimaki. 1979. A novel one-step process for enzymatic of amino acids into proteins: Application to soy protein and flour for enhancing their methionine levels. Agric. Biol. Chem., 43(5): 1065-1068.

## VIII、英文摘要

### The Functionality of Porcine Skin Collagen Hydrolysate on Absorption of UV radiation

Zhi-Hao Chen

#### Abstract

This research relates to a method for preparing a natural UV radiation protection material from porcine skin which is plentiful and low-cost by-product in Taiwan. The collagen powder was extracted from porcine skin and followed by enzymatic treatment. Finally the hydrolysates were to determine the absorptive ability of UV radiation and emulsifying ability. The results showed that collagen solution preheated with various temperatures and then hydrolyzed with various times by bromelain, papain or pepsin, both the hydrolysates were most effective absorption in ultraviolet C(200~290nm) and next was ultraviolet B(290~320nm). However, papain and pepsin treatments were better than the other in three enzymes treatment. 0.5% collagen solution with preheating on 65°C for 30 min and then hydrolyzing by 1% papain for 1 hour or preheating on 95°C for 30 min and then hydrolyzing by 1% pepsin for 5 hours could

obtain the best absorptive ability of UV radiation. Increase of collagen concentration would increase absorptive ability of UV radiation but increase of enzyme concentration would not. In emulsifying ability test, emulsifying capacity of hydrolysates from papain and pepsin treatment would increase with increasing the pH value and both the maximum emulsifying capacity were at pH 7. The increase of emulsion stability of papain treatment was followed by decreasing the pH value and pepsin treatment was no significant difference. The emulsifying ability of collagen hydrolysate with papain was worse than pepsin treatment. When collagen hydrolysate added into commercial sunscreen, it could cover absence of ultraviolet C absorption obviously.

## IX、小 傳

作者陳志豪，台灣省屏東縣人，生於民國 70 年 5 月 22 日，先後畢業於高雄市立瑞祥國小、瑞祥國中與小港高中。民國 88 年考取私立東海大學畜產學系，於民國 92 年畢業，取得東海大學農學學士學位；同年並復考取母系之研究所加工組，隨恩師周繼發教授修習畜產品加工及副產物利用，承蒙恩師於求學期間之悉心指導與鼓勵，於民國 94 年 12 月順利完成此論文。