

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

期中進度報告

台灣產鸚哥魚的食性與消化機制 - I 醣酶與蛋白酶

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 91-2313-B-019-025

執行期間：91年 8月 1日至 92年 7月 30日

計畫主持人：孫寶年

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

 涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：國立台灣海洋大學食品科學系

中華民國 92年 10月 7日

中文摘要

鸚哥魚是珊瑚礁裡優勢的魚類，俗稱青衣，為高價的活海鮮，因而造成過漁而造成資源銳減，連帶使附著的藻類因無法被鸚哥魚刮食而加速了珊瑚因被藻類覆蓋而衰敗。近年來台灣雖有珊瑚礁的體檢及鸚哥魚的生態研究，但其食性與消化機制則尚有待探討或有助於發展鸚哥魚的養殖。

藍點鸚哥魚初期型成魚消化道依特殊的肌肉組織型態差異分為食道 (I)、小腸囊組織 (II)、前腸 (III)、小腸 (IV)、粉紅色腸段 (V)、直腸 (VI) 六段，內含至少三種蛋白酶，其最適 pH 分別為 3.0、7.0、9.0，最適作用溫度為 55 °C，以合成基質鑑定發現有內切酶 trypsin-like、chymotrypsin-like 及外切酶 carboxypeptidase B。醣酶中 amylase 有中性 (pH 7.0) 及鹼性 (pH 9.0) 兩種，最適反應溫度為 50~55 °C；exo-1,4- β -glucanase 與 laminarinase 則皆於 pH 5.0、8.0 有活性峰，laminarinase 於 pH 3.0 亦有活性峰，其最適作用溫度為 50 °C。

成魚咽喉囊袋與食道 (I) 之消化酶活性顯著低於腸道者，腸組織中由小腸囊 (II) 至後腸 (V) 部位有蛋白酶及 laminarinase 活性，消化蛋白質及藻類中 β -1,3-polysaccharide 結構性多醣類；於前腸 (III)、中腸 (IV) 部位則有 exo-1,4- β -glucanase 泌出，破壞藻類細胞壁上的 β -1,4-polysaccharide 結構，使紅藻細胞膜類囊體中的水溶性藻膽蛋白色素釋出，經蛋白酶作用釋出藻紅色素，於後腸 (V) 吸收呈色，amylase 活性亦在後腸 (V) 部位達到最高，組織中之絨毛細胞亦較中腸 (IV) 大，邊緣皺摺較多，吸收表面積較大，為主要消化藻類貯藏性多醣類之腸段。

初期型成魚之醣酶/蛋白酶之活性比值為 27.55，腸道長 (RGL) 為 1.40，應為雜食性。

關鍵詞：鸚哥魚、食性、消化酶、消化機制

Abstract

Parrotfish (*Scaridae*) is a dominant fish species living in coral reefs. It is considered a high priced live fish for food uses. Due to the market demand and overfishing, parrotfish have been endangered in nature. Thus created stress to the coral reef by overgrowth of algae on coral, otherwise are cleaned up and consumed by parrotfish. Although, the health of coral reef has gone through annual survey in Taiwan, and the ecology of parrotfish has also been investigated in recent years, the feeding habit and the digestive mechanism of parrotfish has not been much studied. It is the objective of this study to understand how the food intake is digested, and whether the parrotfish is herbivore. These informations may be applicable to parrotfish culturing.

According to the morphological and muscular structure differences, the digestive tract can be divided into 6 segments esophagus (I), intestine bulb (II), duodenum (III), ilium (IV), pink segment of ilium (V), rectum (VI). Three proteases were found in the crude extract of digestive tract in Scaridae at initial adult phase. The optimal pH was found at 3.0, 7.0, and 9.0, the optimal temperature was 55 °C. Trypsin-like, chymotrypsin-like and carboxypeptidase B

were identified in gut using synthetic substrates. Maximal amylase activities were found at pH 7.0 and 9.0, and the optimal temperature was 50 ~ 55 °C using soluble starch as substrate. Both exo-1,4- β -glucanase and laminarinase showed maximal activity at 50 °C, and two activity peaks at pH 5.0 and 8.0. Laminarinase had an additional activity peak at pH 3.0.

The digestive enzyme activity was lower in pharyngeal mill pouch and oesophagus (I) than in intestine of Scaridae. Protease and laminarinase were active between intestine bulb (II), and posterior intestine (V) where protein and structural β -1,3-polysaccharides of algae are digested. High levels of exo-1,4- β -glucanase activity occurred on the anterior intestine (III) and mid-intestine (IV), where gross breakage of structural β -1,4-polysaccharides of the cell walls took place. The thylakoid membrane of Rhodophyta were digested and the hydrophilic phycobiliprotein released. Proteolytic activities hydrolyzed the protein moiety and resulted in free phycoerythrin which was absorbed in the posterior intestine (V), where the tissues appeared red. Amylase activity was the highest in the posterior intestine (V). Histochemical observation showed that the villi of this gut segment V appeared in larger size and more finger-like papillae than mid-intestine (IV) and provided larger absorption surface. Posterior intestine (V) seemed to be the main digestion and absorption site for algal storage polysaccharides.

Parrotfish had a ratio of amylase to protease activity of 27.55 and relative gut length 1.40. The two indices were in the range between omnivorous and carnivorous suggesting that Scaridae is omnivorous.

Keywords : parrotfish, feeding habits, digestive enzyme, digestive mechanism

一、前言：

鸚哥魚(Parrotfish, Scaridae)，俗稱青衣，在台灣的年捕獲量約 29 公噸（漁業年報，2000 年），此種魚被各地華人視為海中極品，以生猛海鮮的方式高價販售，並自東南亞地區以活魚運輸銷港台，因而引起不法或無知漁民以化學藥劑致魚於昏迷而捕撈，造成鸚哥魚的棲地—珊瑚礁的生態環境被藥品破壞。

鸚哥魚是珊瑚礁裡優勢的草食性魚類（Horn, 1989; Choat and Clement, 1998），能以堅固的齒板刮食碎石或死珊瑚表面蓄積的碳酸鹽及所附著的藻類，對於碳酸鹽再釋出亦即生物分解（bioerosion）極為重要，而刮食後所附帶造成的沈積物及產生的外露空間，有利於珊瑚及其他附著性底棲生物的幼苗著床，增加整個珊瑚礁生態系的歧異度變化（Horn, 1989; Bellwood, 1995; Bellwood and Choat, 1990）。由於鸚哥魚因過漁而減少，無法充分刮食去除珊瑚礁表面之藻類，則使珊瑚礁無法健康成長（Hughes, 1994）。

近年來研究鸚哥魚之腸道內容物分析，顯示鸚哥魚腸道中以有機碎屑為主要成份，並具有共生菌利用代謝多醣類產生發酵產物，由此推測其食性類別可能並非為單純草食性？有待進一步探討。本研究將藍點鸚哥魚初期型成魚之消化道依特殊的肌肉組織型態差異分為咽喉囊袋（PMP）、食道（I）、小腸囊（II）、前腸（III）、中腸（IV）、後腸段（V）、直腸（VI）等部位，分析腸道各段中醣酶包括 amylase、exo-1,4- β -glucanase、laminarinase 與內、外切蛋白酶活性的變化，利用醣酶／蛋白酶活性比值及腸長比（RLG）與其他不同食性的魚種比較，確認其食性。以合成基質分別測定內切酶 trypsin、chymotrypsin 及外切酶 carboxypeptidase B 之活性，分析其消化能力。並做腸道組織切片，觀察組織結構變化，推

測出消化吸收之主要作用部位。另外發現腸道後腸部位 (V) 為粉紅色，故鑑定第 V 段腸組織與內容物中呈粉紅色之色素，探討其生理意義，以瞭解鸚哥魚之消化機制；本實驗結果可供未來研發具經濟性供食用的養殖鸚哥魚餌料配方之參考，若成功後可降低人類對其自然族群的需求，也可作為放流供復育珊瑚礁天然族群之用。

二、研究方法：

(一) 粗酵素液之製備

依腸道結構型態差異，分 I ~ VI 段 (圖四)，解剖後以 pH 試紙 (Spezialindikator pH 6.5-10.0, E. Merck KGaA, Darmstadt, Germany)，測定腸道內 pH；以 4 °C 預冷的 10 倍去離子水沖洗腸道，將內容物與各段腸組織分別萃粗酵素液。組織各加入約 10 倍量 (v/w) 4 °C 預冷之 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)，於 15000 rpm 均質 (Polytron PT 3000, Littau, Switzerland) 1.5 分鐘，均質液於 4 °C、以 5000 x g 離心 30 分鐘，上澄液即為粗酵素液，以 Lowry 等 (1951) 之方法測定其蛋白量。

(二) 消化酶活性分析

1. 基質配製

取酪蛋白 (casein, E. Merck, Darmstadt, Germany) 1 g 於 50~60 °C 溶解於 0.05 M sodium-phosphate 緩衝液 (pH 7.5) 100 ml 中，配製成 1% 酪蛋白。以相同緩衝溶液製備 1% azocasein、2% 之牛血紅蛋白 (Sigma, St. Louis, Mo, USA)，供蛋白酶活性分析。

取 Soluble starch (F963557, acc. to Zulkowsky GR, E. Merck, Darmstadt, Germany)、carboxymethyl cellulose、laminarin (Sigma, St. Louis, Mo, USA) 各 2 g，分別溶於 100 ml 蒸餾水，配製成 2% 溶液，供測定 amylase, cellulase, laminarinase 活性之用。

2. 緩衝溶液配製

配製 0.2 M 緩衝液，pH 2.0 為 KCl-HCl；pH 3.0 為 glycine-HCl；pH 4.0 ~ 6.0 為 citric acid-Na₂HPO₄；pH 7.0 ~ 8.0 為 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄；pH 9.0 ~ 10.0 為 KCl, H₃BO₃-NaOH。

(三) 蛋白酶之活性測定

1. 作用時間及溫度

參照 Walter (1984) 之方法，取 pH 7.0 之 0.05 M 磷酸緩衝液 3 ml，加入 1% azocasein 1 ml，於 25 °C 靜置 5 分鐘，再加入 1 ml 粗酵素液 (蛋白量約 3~5 mg/ml)，於 20~60 °C 定溫反應，經預定作用時間後，再以 10% 三氯醋酸 (TCA) 5 ml 終止反應，過濾 (Toyo 5C 濾紙)，於 280 nm 測濾液之吸光值 (A_{280nm})。以 A_{280nm} 增加 1.0 為一活性單位，比活性為粗酵素液中每 mg 蛋白質所含蛋白酶之活性單位數。蛋白酶以 A_{280nm} 增加 1.0 為一活性單位，比活性為粗酵素液中每 mg 蛋白質所含之活性單位數。

2. pH

取 1% azocasein 1 ml，於上述 0.2 M 上述不同 pH 緩衝液 (pH 2.0~10.0) 液 3 ml，於 25 °C 靜置 5 分鐘，再加入 1 ml 粗酵素液 (蛋白量約 3~5 mg/ml)，於 37 °C 反應 30 分鐘，以 TCA 終止反應，測 A_{280nm}。

(四) 醣酶活性測定

1. 作用時間及最適溫度

依 Bernfeld (1955) 方法，取 pH 7.0 之 0.05 M 磷酸緩衝液 1 ml，加 2% (w/v) 澱粉溶液 1 ml，於 25 °C 恆溫 5 min，加入粗酵素粗液 0.1 ml (蛋白量約 3~5 mg/ml)，於 20~60 °C 定溫反應，經預定作用時間後，加入 dinitrosalicylic acid reagent 2 ml (Rochelle salt 30 g / 50 ml 蒸餾水，加 2 N NaOH 20 ml 及 3,5-dinitrosalicylic acid 1 g，蒸餾水定容到 100 ml)，沸水浴 5 min 終止反應，以流水冷卻 15 min (使呈色穩定)，測 $A_{550\text{nm}}$ 。分別取 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml maltose 及 glucose 作標準曲線。腸道 amylase 比活性為每毫克蛋白質每分鐘產生 maltose 量 (μg)，exo-1,4- β -glucanase 及 laminarinase 則是以每毫克蛋白質每分鐘產生 glucose 量 (μg) 定義比活性。

2. 最適作用 pH

取 2% 多醣類溶液 1 ml，及上述 0.2 M 不同 pH 緩衝溶液 1 ml，於 25 °C 靜置 5 分鐘，再加入 0.1 ml 粗酵素液 (蛋白量約 3~5 mg/ml)，於 37 °C 反應 30 分鐘，以 dinitrosalicylic acid reagent 2 ml 終止反應，測 $A_{550\text{nm}}$ 。

(五) 粗酵素液蛋白質定量

以 Lowry 等 (1951) 方法定量之。取 1 ml 鹼性銅試劑 (A 試劑: 50 g Na_2CO_3 定容至 500 ml 之 0.5 N NaOH; B 試劑: 0.5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 以蒸餾水定容至 50 ml; C 試劑: Potassium tartrate 1 g 以蒸餾水定容至 50 ml。A : B : C = 20 : 1 : 1 v/v/v)，加入經去離子水稀釋 10 倍的粗酵素液 1 ml，於室溫反應 15 分鐘後，再加入 3 ml Folin's 試劑 (1 ml Folin-phenol reagent 加 10 ml 蒸餾水) 反應 45 分鐘，於 540 nm 測吸光值。分別取 0.06、0.12、0.18、0.24、0.3 mg/ml 牛血清蛋白 (Sigma, St. Louis, Mo, USA) 做標準曲線。

(六) 以合成基質測定蛋白酶活性

1. 腸粗酵素液

第 V 段腸道組織加入 10 倍量 (w/v) -40 °C 丙酮，於 15000 rpm 均質 (Polytron PT 2000, Kinematica, Littau, Switzerland) 5 分鐘，以玻璃瓷濾器過濾，再以 -40 °C 丙酮多次沖洗瓷濾器上的沈澱物，至丙酮被濾乾，再將多餘的丙酮抽乾，此為丙酮粉 (acetone powder)；將之貯藏於 -80 °C 備用。使用時，取適量丙酮粉溶於緩衝溶液中 (蛋白量約 0.9~1.0 mg/ml)，調配成粗酵素液，其蛋白質以 Lowry (1951) 法測定之。粗酵素液製備成丙酮粉，可去除脂溶性雜質，減低對吸光值測定之干擾。

2. 胰蛋白酶 (trypsin)

參照 Schwert and Takenada (1955) 方法。取 1.5 ml 0.5 mM BAEE (Benzoyl arginine ethyl ester, Sigma, St. Louis, Mo, USA) 溶於 50 mM pH 6.0-11.0 之緩衝溶液，置於試管中，加入 50 mM pH 6.0-11.0 上述緩衝溶液 (內含 0.02 M CaCl_2) 1.35 ml，再加入 0.1 ml 腸道酵素液 (蛋白量約 0.6-0.8 mg/ml) 迅速攪勻後，立即倒入 Cuvette 中，於 25 °C、每 30 秒記錄 253 nm 吸光值，以吸光值每分鐘增加 1.0，定為一個活性單位。

3. 胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin)

參照 Rick (1965) 方法。取 1.07 mM (溶於 50% 甲醇溶液) BTEE (Benzoyl tyrosine ethylether, Sigma, St. Louis, Mo, USA) 溶液 1.5 ml，加入 50 mM pH 4.0-10.0 上述緩衝溶液 (內含 0.2 M CaCl_2) 1.35 ml，再加入 0.15 ml 腸道酵素液 (蛋白量約 0.6-0.8 mg/ml) 迅速攪勻後，立

即倒入 Cuvette 中，於 25°C、每 30 秒記錄 253 nm 吸光值，吸光值每分鐘增加 1.0，定為一個活性單位。

4. 羧基胜肽酶 B

參照 Folk 等(1960)方法。取 1 mM HA (Hippuryl L-arginine, Sigma, St. Louis, Mo, USA)溶液 1.5 ml，分別加入 0.05 M pH 2.0–6.0 緩衝溶液 1.35 ml，再加入腸道酵素液（蛋白量約 0.6–0.8 mg / ml）0.15 ml，迅速攪勻後，立即倒入 Cuvette 中，於 25 °C、每 30 秒記錄 254 nm 吸光值，吸光值每分鐘增加 1.0，定為一個活性單位。

(七) 組織切片

取各段新鮮腸道組織 0.5 × 0.5 cm，經 Formaldehyde Acetic acid Calcium chloride dihydrate (FAACC) 固定液固定 72 小時後，取出改用 70 %酒精保存，再經 70、80、90、95、100 %酒精及 xylene 脫水、histoplast 蠟浸透及包埋 (embedding) 等步驟，完成蠟塊之製作，接著進行切片 (7 μm)，再以蘇木紫—伊紅染色 (Hematoxylin & Eosin stain)，最後封片保存，於顯微鏡下觀察 (小川，1964)。

(八) 第 V 段腸組織及內容物中色素之萃取與鑑定

分別秤取第 V 段腸道、新鮮紅藻各 5 g，個別加入 10 倍量體積 (w/v) 之水、甲醇及丙酮等不同極性之溶劑，於冰浴中以 15000 rpm 均質 (Polytron PT 3000, Littau, Switzerland) 2 分鐘，均質液於 4 °C、以 5000 x g 離心 30 分鐘，上澄液即為色素萃取液，取鸚哥魚血漿及色素萃取液於分光光度計 (Spectrometer, Hitachi U-2000, Tokyo, Japan) 做全波長掃描，紀錄波峰之波長及吸光值。

另取鸚哥魚血漿及腸道色素水萃出液，各加 12 滴溶血試劑 (Lot.No. Hematronix, Inc., Benicia, California)，反應 30 分鐘，於分光光度計測其吸收波峰。

三、結果與討論

(一) 消化道之型態特徵

鸚哥魚具有鳥嘴狀頷齒，刮食珊瑚礁區藻類，進入咽喉齒研磨，後方具有囊袋組織，再進入腸道，依其消化道組織型態差異，由食道至腸道可分為六段 (圖一)，緊接咽喉囊袋後方為食道 (I)、具似幽門垂作用的膨脹半球狀的小腸囊組織 (II)、前腸 (III)，由肉眼觀察小腸囊及前腸外形為平滑的組織、緊接其後之腸外形呈彎曲皺摺的小腸在此稱為中腸 (IV)，小腸後段仍呈彎曲皺摺且多呈粉紅色為後腸 (V)，最後段為直腸 (VI)，型態平滑、肌肉組織較薄。

(二) 蛋白酶之種類及分佈

1. 基質親和力

以 1 % (w/v) 之 Casein、Azocasein 或 2 % (w/v) Hemoglobin 三種基質，分別與腸道粗酵素於 pH 7.0 磷酸緩衝溶液，在 37 °C 作用，結果顯示腸組織之蛋白酶與 Casein 及 Azocasein 反應所得產物高於 Hemoglobin，而腸道內容物則以與 Azocasein 作用所得產物量最高、Casein 次之、Hemoglobin 最低 (圖二)。Casein 之 pI 為 4.7、Azocasein 亦會在 pH 1.5 ~ 4.5 沈澱析出，但 Hemoglobin 仍可均勻溶解，故以 Azocasein 測定中性蛋白酶之基質，Hemoglobin 作為酸性蛋白酶反應之基質。

Azocasein 濃度為 0.5 ~ 2.0 % 及 Hemoglobin 1.0 ~ 2.5 %，與鸚哥魚腸道組織及內容物蛋白

酶於 pH 7.5、37°C 反應，由雙倒數圖形 (Lineweaver Burk Plot)，及 Michaelis-Menten 方程式，得到酵素與基質親和力 (K_m 值) 及最大反應速率 (V_{max})。Azocasein 或 Hemoglobin 與腸組織蛋白酶之 K_m 值無顯著差異；而腸內容物蛋白酶和兩種基質反應，與 Azocasein 之 K_m 值約為 Hemoglobin 二分之一 (表一)，顯示腸內容物蛋白酶與 azocasein 反應親和力顯著高於 Hemoglobin，推測腸內容物中應具有較高的中性、鹼性蛋白酶活性。Azocasein 或 Hemoglobin 與腸內容物蛋白酶反應 K_m 值低於腸組織蛋白酶反應，表示基質與腸內容物蛋白酶親和力較大，以少量 0.5 ~ 1.0 % 基質即可與腸內容物蛋白酶達最大反應速率 0.09、0.06 unit / mg protein_min，腸組織蛋白酶則需使用較高基質濃度 1.15 ~ 1.35 % 時，才能達到最大反應速率 0.40、0.28 unit / mg protein_min。

2. 消化道中蛋白酶之分佈

● 咽喉囊袋

消化道中各部位蛋白酶之相對活性如圖六。咽喉囊袋 (pharyngeal mill pouch, PMP) 之蛋白酶活性顯著低於腸道，鸚哥魚具有咽喉齒可對食物進行機械研磨，因缺少唾液腺，故口腔中消化酶活性很低，其黏液主要作用為使食物表面光滑，便於吞嚥 (郭，1988)。

● 食道

消化道中咽喉囊袋 (PMP) 及食道 (I) 之蛋白酶活性顯著低於腸道組織 (圖六)。食物進入時，於咽喉囊袋進行研磨，通過食道，並會刺激膽汁及胰液由小腸囊 (II) 進入 (Gohar and Latif, 1959)，故食道之主要機能是運送食物至腸道內，進行消化吸收作用，食道佔消化道總長比例短，推測食物通過時間亦較短，非食物進行消化酵素水解之部位。

● 腸道組織

小腸囊 (II) 至後腸 (V) 之蛋白酶活性無顯著差異，但顯著高於食道 (I) 及直腸 (VI)。當腸腔內消化蛋白質時，肝、胰臟中的蛋白酶原會被活化 (Takii et al., 1986)，由小腸囊 (II) 進入，且其腸道外形為膨脹半球狀，可增加食物於小腸囊滯留時間，促進消化蛋白酶分泌；進而前腸 (III)、中腸 (IV)、後腸 (V) 約佔消化道全長 88 % (表二)，腸道中因胰液進入及酶原活化，誘發腸液中蛋白酶的分泌，尤以中腸 (IV) 及後腸 (V) 呈皺摺彎曲型態，使腸蠕動以分節運動方式，增加食糜與消化液混合機率，腸黏膜的表面積亦較前腸 (III) 及直腸 (VI) 大 (Gohar and Latif, 1959)，顯示中、後腸段可進行消化、吸收作用，而後腸 (V) 又有粉紅色物質蓄積，其蛋白酶活性又較高，顯示此部位之消化吸收作用高於中腸 (IV)，食糜最後至直腸 (VI) 時，其蛋白酶活性顯著較低，顯示蛋白質多已被消化吸收，故直腸之功能並非為消化吸收。

● 消化道內容物

咽喉囊袋內容物與組織中的蛋白酶活性並無顯著差異，內容物之蛋白酶活性亦顯著低於腸道中之蛋白酶活性，僅為後者之 27.0 %，顯示咽喉囊袋並非以分泌消化酶進行化學性消化作用。

腸內容物之蛋白酶活性顯著高於腸組織，腸內容物蛋白酶活性為 94.2 % 時，在腸組織 (II ~ V) 為 44.8 ~ 68.6 % 間，顯示食物刺激胰液及膽汁泌入腸道中，並可誘發腸液之蛋白酶泌出於內容物中，分解蛋白質。

3. 腸道中蛋白酶特性

鸚哥魚腸道蛋白酶於 pH 7.0 磷酸緩衝溶液中，與 1 % azocasein，在 37°C 反應 15 分鐘，產物量隨作用時間延長呈線性增加，超過 15 分鐘時，反應顯著趨緩 (圖四)，故測定蛋白酶時，作用時間定為 15 分鐘。在中性環境作用 15 分鐘，蛋白酶活性於 30 ~ 55 °C 恆溫，

隨溫度上升活性顯著增加(圖五),高於此溫度範圍時,活性明顯下降,最適作用溫度為 55 °C。利用 azocasein 為基質時,於 pH 4.0 以下此基質變性沈澱,因此以 azocasein 測 pH 5.0 ~ 10.0 範圍之活性,另以 hemoglobin 測定 pH 2.0 ~ 10.0 蛋白酶活性, pH 分別在 3.0、7.0、9.0 有活性高峰(圖六),顯示鸚哥魚腸道具有酸性、中性、鹼性三種蛋白酶;腸內容物中之蛋白酶活性皆高於腸組織,顯示三種酸性、中性、鹼性蛋白酶為泌外酵素;以 azocasein 測得中性蛋白酶活性顯著高於鹼性,基質為 hemoglobin 時,組織中三種蛋白酶活性相似,腸內容中則未觀察出鹼性蛋白酶;而鸚哥魚腸道中 pH 偏中性,顯示消化道中的消化作用,以中性蛋白酶為主。

4. 腸蛋白酶之種類

● 內切蛋白酶 (endopeptidases)

由鸚哥魚腸道中蛋白酶特性之結果(圖六),推測腸道中應至少有三種以上的蛋白酶,利用合成基質 BAEE、BTEE 分別鑑定鸚哥魚腸內切蛋白酶之種類(圖七),結果發現以 BAEE 為特異基質者,可切斷鹼性氨基酸(Arg)羧基側鏈肽鍵之胰蛋白酶(trypsin-like),分別在 pH 10.0 及 7.0 有兩個活性高峰,顯示有兩種,以鹼性蛋白酶(pH 10.0)為主。

以 BTEE 為基質時,作用於芳香族胺基酸(tyrosine)之羧基側鏈肽鍵,為類胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin-like),分別於 pH 5.0、7.0、8.0 有活性峰,以偏酸性 pH 5.0 時活性峰最高,推測可能為 Cathepsin C 或 L。由海洋動物消化腺中之溶酶體可分離出不同型態的組織蛋白酶(Cathepsin),其作用 pH 範圍可從 3.5 ~ 8.0 (Simpson, 2000),其中可作用芳香族氨基酸(phenylalanine)者,為組織蛋白酶 C 及 L,於鯉魚內臟、烏賊肝胰臟組織及豐年蝦孵化過程中,其消化腺內皆有組織蛋白酶 C 活性(Simpson, 2000; 藍, 1991);由鯉魚之肝胰臟組織純化出的組織蛋白酶 L,其最適 pH 為 5.5 ~ 6.0,最適反應溫度為 55 °C (Aranishi et al., 1997)。鸚哥魚腸道中兩種內切蛋白酶活性 chymotrypsin-like 顯著高於 trypsin-like, chymotrypsin-like 作用位置屬於疏水性芳香族胺基酸、trypsin-like 作用親水性的鹼性胺基酸,顯示鸚哥魚對於表面暴露越多芳香族胺基酸之蛋白質,消化能力愈強。

● 外切蛋白酶

另以 HA 特異基質,鑑定鸚哥魚腸道外切蛋白酶 carboxypeptidase B,主要作用胺基酸長鏈基端之精胺酸或鹼性胺基酸,最適作用 pH 為 5.0 (圖八)。

鸚哥魚腸道中消化蛋白質,具有兩種內切酶活性 chymotrypsin-like 切芳香族胺基酸、trypsin-like 及外切酶 carboxypeptidase B 可作用鹼性胺基酸,顯示鸚哥魚消化道中對於疏水或親水性胺基酸皆可作用,此結果可供未來養殖鸚哥魚時,飼料調配加工上,若能利用凍乾方式,降低疏水性芳香族胺基酸造成蛋白質的凝聚現象,則可提高其蛋白質消化率。

(三) 醣酶種類及分佈

1. 基質親和力

利用 Lineweaver-Burk plot 法,以基質濃度 soluble starch 0.5 ~ 2 %,與鸚哥魚之腸道組織及內容物中醣酶(amylase)活性,於 pH 7.0、37 °C 腸組織中 amylase 反應 Km 值為 1.10 % 高於腸內容物 0.67 % (表三),顯示內容物中 amylase 與基質之親和力高於組織中 amylase,其最大反應速率各別為 0.04, 0.05 unit / mg protein_min,故腸組織與內容物中 amylase 之最大反應速率差異不大,但自腸組織分泌至內容物中之 amylase 與基質之親和力較大。

2. 消化道中醣酶分佈

●咽喉囊袋

鸚哥魚消化道中各部位之醣酶相對活性如圖九。咽喉囊袋之 amylase 活性顯著較腸道低，顯示鸚哥魚口腔以機械性消化為主，黏液僅幫助吞嚥食物之用，於腸中則以化學性消化為主。

●腸道組織

amylase 活性於食道 (I)、小腸囊 (II)、前腸 (III) 無顯著差異，但顯著低於腸道後段 (IV~VI)，如圖九所示。鸚哥魚腸道前段部位 amylase 活性顯著較低，而魚類要利用藻類中之貯藏性多醣類 amylose (Foster et al., 1999)，需先將藻類之細胞壁纖維質破壞 (Zemke-White and Clements, 1999)，藻類進入鸚哥魚消化道內，推測前段腸道會先分泌其他水解結構性多醣類之消化酶；於中腸部位 (IV) amylase 相對活性顯著增加為後腸 (V) 活性的 43%，至後腸 (V) 時 amylase 活性達到最高，中、後腸道外形結構型態為皺摺彎曲，增加對食物消化、吸收的表面積，亦可增加共生菌存在的機會，共生菌會分泌 amylase 幫助消化碳水化合物 (James et al., 1989)；共生菌亦會分佈至直腸 (VI) 並分泌 amylase 活性為，但直腸並非為主要消化、吸收部位，其腸組織分泌 amylase 活性顯著低於後腸 (V) 部位，與腸內容物中的 amylase 活性相似，其相對活性降至 28~32%。

鸚哥魚腸道中 exo-1,4- β -glucanase 活性很低，食道 (I)、小腸囊 (II)、直腸 (VI) 等部位皆未測得，以前腸 (III)、中腸 (IV) 段 exo-1,4- β -glucanase 活性顯著較後腸 (V) 及腸內容物高 (圖十)，顯示鸚哥魚對於藻類細胞壁 cellulose 的分解作用很低，主要於中腸 (IV) 部位作用，因腸彎曲皺摺形態結構，腸腺可分泌較多消化酶；當攝食食源含藻類時，腸道中會有較多的共生菌分泌 cellulase (Lindsay and Harris, 1980; Luczkovich and Stellweg, 1993)，幫助分解藻類結構性多醣類 cellulose；而 exo-1,4- β -glucanase 作用 cellulose 產生的是大分子的寡醣型態，能直接被分解出 cellobiose 較少，故可測得之還原基較少，其 exo-1,4- β -glucanase 活性低。鸚哥魚消化道中是否具有 endo-1,4- β -glucanase 活性分解細胞壁，則有待進一步探討。

腸組織各部位 laminarinase 活性皆無顯著差異，以第 VI 段 (直腸) 之 laminarinase 活性顯著低於腸內容物中 (圖十)，顯示鸚哥魚腸內 laminarinase 活性，可能來自藻類細胞經咽喉齒研磨被破壞後，使其藻類中的 laminarinase 釋出，另亦有腸內共生菌分泌外消化酶作用 (Sturmbauer, 1991)，可分解鸚哥魚腸腔內微量褐藻及矽藻 (Choat, 2001) 的貯藏性海藻多醣。

醣酶 amylase 活性顯著高於 exo-1,4- β -glucanase 及 laminarinase (圖十)。腸組織上皮細胞膜中之若有 exo-1,4- β -glucanase 及 laminarinase 活性時，加入非離子性之介面活性劑 triton，可使其活性增加 (Kuz'mina and Nevalenny, 1983)，結果 triton 對腸組織中 amylase 比活性雖較高，但並無顯著差異，exo-1,4- β -glucanase、laminarinase 活性顯著下降 (圖十一)，顯示 triton 與細胞膜作用，因介面活性劑加入，使 exo-1,4- β -glucanase、laminarinase 活性降低，可能係來自腸道微生物受 triton 抑制，表示此酶與 amylase 來源有別。

3. 腸道中醣酶特性

●澱粉酶 (amylase)

鸚哥魚腸道醣酶 amylase、laminarinase、cellulase 隨反應時間變化如圖十二所示。在反應 15 分鐘內迅速上升，產物量之後趨緩。

amylase 於 pH 7.0 磷酸緩衝溶液中與水溶性澱粉反應 30 分鐘，在 20~50 °C 間恆溫，

活性隨溫度上升顯著增加，至 55 °C 時活性持平，超過 55 °C 以上時，amylase 活性開始下降，最適作用溫度為 50~55°C (圖十三)。將腸粗酵素液於 37 °C、pH 2~10 與 1% soluble starch 反應，amylase 在 pH 7.0 及 9.0 有活性峰 (圖十四)，顯示鸚哥魚腸道中澱粉酶至少具有中性及鹼性兩種；於擬鯉 (roach)、嘉臘魚 (breem) 及梭魚 (pike) 消化道中 α -amylase 及 maltase 之最適 pH 為 7.0 - 8.0 (Kuz'mina and Nevalenny, 1983)；測定澱粉酶時是以水溶性澱粉為基質，最後利用水楊酸定量其還原糖。因水溶性澱粉經 β -amylase 作用後釋出 maltose 及部分 dextrin，若有 maltase 時可繼續作用分解 maltose，形成 glucose，釋出更多的還原基，故推測應為 amylase 及 maltase。

●纖維素酶 (cellulase)

鸚哥魚腸道中 cellulase 與基質 carboxymethylcellulose 反應，亦於 15 分鐘後反應速率顯著趨緩 (圖十二)，最適作用溫度則在 50 °C (圖十三)，pH 於 5.0、8.0 有兩個活性峰 (圖十五)，推測為 exo- 或 endo- β -1,4-glucanase 兩種異構酶，鯰魚消化道中 cellulase 最適 pH 為 4.0~5.0 (Xue, et al., 1999)，當以微生物培養之 endo- β -1,4-glucanase 最適 pH 為 5.0，但多數 endoglucanase 最適 pH 則為 7.0 (Buchholz, et al., 1981)。

●海藻多醣酶 (laminarinase)

Laminarinase 與基質作用 120 分鐘內有，分別有兩段式反應速率 (圖十二)，於 15 鐘內反應速率最大，反應 15 分鐘後活性趨緩，但亦以線性增加，故反應時間定為 15 分鐘以內。在 20 - 50 °C 間，隨溫度升高反應速率增加，最適作用溫度為 50°C (圖十三)。腸組織中 laminarinase 在 pH 3.0、5.0、8.0 有三個活性峰，內容物中之 laminarinase 在 pH 3.0 及 5.0 - 8.0 有活性峰，顯示 laminarinase 至少應有三種 (圖十三)；推測鸚哥魚腸道中分解海藻多醣之消化酶應有 endo-及 exo- β -1,3-glucan-glucanohydrolase 兩種異構酶 (紀, 1997)。而海藻多醣結構主要以 β -1,3-polysaccharides，但亦有少量枝鏈以 β -1,6-polysaccharides，laminarinase 活性包含 β -1,3 及 β -1,6-glucohydrolase 兩種，於鯉科 (Cyprinidae) 魚類消化道中僅有 β -1,3-glucohydrolase 活性，不具 β -1,6-glucohydrolase，無法完全分解海藻多醣；慈鯛科 (Cichlidae) 魚類消化道內則含有 β -1,3 及 β -1,6-glucohydrolase，活性可充分利用海藻多醣 (Sturmbauer, 1991)。

(四) 第 V 段腸道粉紅色物質之鑑定

粉紅色物質僅存在於後腸部位 (V)，當天捕獲之鸚哥魚才有呈色。此紅色素可溶於水、不溶於甲醇及丙酮。由於後腸 (V) 組織之微血管分佈較密，故推測食物正在進行消化、吸收作用時，微血管擴張使後腸部位呈色，則紅色物質可能是血紅素；另一方面鸚哥魚腸道內容物中，含高量有機碎屑，與少量紅藻，未見綠藻或矽藻及細小沈積物等 (Choat, 2002)，則鸚哥魚第 V 段腸道之粉紅色物質亦可能為紅藻色素之吸收，故就此二種可能性做初步鑑定。

以血紅素為對照組，取腸道粉紅色之水萃出液加入溶血試劑 (Lot.No. Hematronix, Inc., Benicia)，結果腸道粉紅色萃出液無溶血反應，故非血紅素。將腸道粉紅色萃出液作全波長掃描，於 260、490、530、560 nm 有吸收波峰 (圖十六)，與血紅素之吸收光譜有異，其吸收波峰為 260、410、540、570 nm。

紅藻中的藻紅蛋白其最大之吸收波長 280、495、540、565 nm，與腸道粉紅色萃取物之可見光譜相似，因此初步鑑定此粉紅色物質為紅藻之水溶性色素成份藻紅質。紅藻之水

溶性色素光活性中心由藻色蛋白 (phycobiliprotein) 與葉綠素組成，藻色蛋白存於藻類細胞壁類囊體膜內，主要作用為捕捉光能傳遞至色素中心葉綠素 a，幫助進行植物光合作用及電子轉移提供生長所需能量，其發色團結構為開鏈四 吡咯 (linear tetrapyrroles) 與蛋白質以共價鍵結合，其吸收光譜差異分三種，於 500、545、563 nm 時為藻紅質 (phycoerythrin)、藻青質 (phycocyanonin) 則在 550 及 617 nm 有吸收波峰與異藻青質 (allophycocyanin) 吸收光譜為 650 nm，依其蛋白質鍵結位置變化而具有多種型態變化 (Gantt, 1990)。

鸚哥魚 (IP) 刮食礁區紅藻及碎屑後，經咽喉齒研磨，進入腸道消化酶作用，破壞藻類細胞膜，使類囊體中的藻膽蛋白能釋出，於後腸 (V) 主要消化吸收之部位，被蛋白酶作用，去除蛋白質之藻紅質後，被吸收呈色於後腸 (V) 部位，此粉紅色物質以何種呈色型態的色素被吸收，及其所具生理意義，則需與棲息水域之藻類相對照，作進一步分離與鑑定探討。

(五) 食性評估

鸚哥魚依其刮食礁區藻類之攝食行為，及腸道內容物中組成含大量藻絲碎片等，而被歸類於海洋草食性魚類 (Horn, 1989)。食物滯留於鸚哥魚消化道的時間約為 4 ~ 6 小時 (Smith and Paulson, 1974)，依其高頻率刮食、排遺之攝食行為 (Polunin and Klumpp, 1992)，配合本實驗所觀察腸內消化酶之活性分佈，推斷食物進入腸道內迅速活化酶原，泌出蛋白酶至內容物中 (圖三)，將有機碎屑中可消化的蛋白質分解吸收，另利用海藻多醣酶及纖維酶消化藻類細胞壁之結構性多醣類，不能消化之藻類碎片仍存在於腸道中；至腸道第 IV 段澱粉酶活性明顯增高，至第 V 段澱粉酶活性達到最高 (圖四)，作用藻類碎片內貯藏性多醣類，及蛋白酶消化，腸道第 V 段為吸收營養之主要部位。

鸚哥魚腸組織中醣酶以 amylase 活性顯著高於 *exo-1,4-β-glucanase*、*laminarinase*，於後腸 (V) 部位活性最高，故以鸚哥魚第 V 段腸道之 amylase 代表醣酶活性，其醣酶/蛋白酶之活性比值為 27.55、腸道長比 (RLG) 約為 1.40 (表四)，與藻食性鯽魚、雜食性鯉魚、肉食性鰻魚及鱒魚比對 (Hidalgo et al., 1999; Hsu and Wu, 1979)，顯示鸚哥魚之介於鰻魚與鯉魚之間，亦即介於肉食性與雜食性之間，具有雜食性魚類之消化生理能力。另由 Crossman et al., (unpublished) 之結果觀察發現鸚哥魚攝取食物同化作用後，其腸內容物營養分析，消化動物性食源可產生高比例胺基酸含量，與消化少量藻類含低比例碳水化合物，亦顯示其腸道內消化食物之能力介於雜食及肉食性魚種之間，可確認鸚哥魚除刮食珊瑚礁石表面的藻類 (Epilithic Algal Community) 並以攝取生物碎屑為其主要食源。

(七) 消化道 pH 與腸道形態

初期型藍點鸚哥魚腸道內容物為中性，食道 (I) 至後腸 (V)，pH 有上升趨勢 (圖十七)。當第 V 段腸道不呈粉紅色，食道 (I) pH 為 6.75、小腸囊 (II) 與前腸 (III) pH 相似分別為 6.81、6.85，至中腸 (IV) pH 上升至 7.03，於後腸 (V) pH 達最高為 7.28，至直腸 (VI) 降至 pH 7.15。而第 V 段腸道呈粉紅色時，除食道 (I) 外，各段 pH 均高於不呈粉紅色，尤以第 IV 及 VI 顯著較高；第 I 段食道 pH 較低 6.61，至第 II 段小腸囊 pH 顯著上升至 7.05，至前腸 (III) pH 上升趨緩為 7.10，於中 (IV)、後腸 (V) 明顯上升至 7.46、7.71，直腸 (VI) 之 pH 上升持平為 7.76。

第 V 段腸道呈粉紅色時，腸道內容物較多，食物刺激膽酸 (pH 6.9) 分泌，及消化藻類產生氫離子 (Smith and Paulson, 1974)，使腸道前段 pH 下降；食物亦誘發弱鹼性膽汁及

胰液，由小腸囊（II）進入腸道中，使其 pH 顯著上升；中、後腸道彎曲皺摺形態，使食物滯留時間較長，刺激腸液分泌消化酶，pH 更明顯升高；而另一方面鸚哥魚刮食礁區藻類時附帶大量碎屑及碳酸鈣進入消化道中，碳酸鹽進入腸腔遇到弱酸會轉變為二氧化碳進入腸黏膜，經腸黏膜與內容物中碳酸酐酶（carbonic anhydrase）作用，產生氫離子，亦使前段腸道 pH 降低，而氫離子會增進腸道黏膜與血漿中 Na^+/Cl^- 及 $\text{HCO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 離子交換，使腸道內 NH_3 濃度增加，腸道後段之 pH 上升（Smith and Paulson, 1975），造成各段腸道內容物中 pH 變異較大。

鸚哥魚消化道由食道至腸道分六段，其管壁由黏膜層（mucosa）、黏膜下層（submucosa）、肌層（muscularis）、及漿膜（serosa）等構成，其腸黏膜及黏膜下層具有環狀皺摺、柱狀絨毛細胞及紋狀邊緣，增加表面積，為典型消化、吸收組織特徵（圖十八）。尤以腸道外形呈彎曲皺摺之中（IV）、後腸（V）較其他消化道部位有最大的表面積（Gohar and Latif, 1959）。組織切片觀察，其內部腸黏膜亦具有典型柱狀絨毛細胞，以後腸（V）之絨毛細胞較中腸（IV）部位大，由絨毛橫切面觀察其邊緣皺摺亦較多，可增加其表面積，顯示後腸（V）為其主要消化、吸收部位。鸚哥魚腸道內容較多時，後腸（V）呈粉紅色，其絨毛細胞較不呈色時大，顯示其消化道中應有消化、吸收作用正在進行。

四、結論 - 鸚哥魚成魚的消化機制

綜合鸚哥魚消化酶之分佈及其特性，可推測鸚哥魚成魚之消化機制，食物先經由咽喉齒進行機械性研磨作用，破壞藻類細胞壁，迅速通過咽喉囊袋及食道（I），而後在小腸囊至後腸（II ~ V）部位中由泌外蛋白酶，消化含蛋白質之碎屑，並分泌 $\text{exo-1,4-}\beta\text{-glucanase}$ 與 laminarinase 分別水解藻類之細胞壁等結構性多醣類，藻類 $\beta\text{-1,3-}$ 鍵結之海藻多醣。 Laminarinase 與 $\text{exo-1,4-}\beta\text{-glucanase}$ 皆屬於 $\beta\text{-glucanases}$ 其活性部位皆為 Glu-231 殘基，對基質立體化學結構之選擇性相同（Chen et al., 1995），故鸚哥魚腸道前段 $\text{exo-1,4-}\beta\text{-glucanase}$ 活性雖低，但 laminarinase 可破壞將藻類之結構性多醣，至第 V 段腸組織再由 amylase 作用藻類細胞中的貯藏性多醣類，以分解 amylose 做為碳水化合物之營養吸收來源。

鸚哥魚攝入的紅藻，其水溶性色素因細胞膜被破壞後，可釋出類囊體中的藻紅質，經由蛋白酶消化藻紅質上的蛋白質，並產生游離呈色團，在後腸（V）部位被腸黏膜吸收，使腸道呈粉紅色，已消化吸收完畢之殘渣最後經直腸（VI）由肛門排出；後腸（V）之絨毛細胞顯著較中腸（IV）大，絨毛邊緣皺摺亦較多，絨毛之表面積較大，確認鸚哥魚後腸（V），為其主要消化、吸收之部位。

鸚哥魚腸道中含有酸性、中性、鹼性三類蛋白酶，pH 為 3.0、7.0、9.0。腸內容物 pH 為中性，蛋白酶消化作用，具有 chymotrypsin-like 切疏水性芳香族胺基酸及 trypsin-like 、 $\text{carboxypeptidase B}$ 作用親水性的鹼性胺基酸之能力。

腸道中醣酶包括 amylase 、 $\text{exo-1,4-}\beta\text{-glucanase}$ 、 laminarinase 等， amylase 分解 $\alpha\text{-1,4}$ 糖苷鍵之 pH 為 7.0 及 9.0 有活性峰，最適反應溫度於 50 ~ 55 °C；作用於 $\beta\text{-}$ 糖苷鍵的 $\text{exo-1,4-}\beta\text{-glucanase}$ 及 laminarinase pH 則在 5.0 及 8.0 皆有活性峰， laminarinase 於 pH 3.0 亦有活性峰，二類之最適作用溫度均為 50 °C。此等酵素在體外實驗之最適溫度為 50 ~ 55 °C，遠高於水域溫度，推測在活體中有其他活化因子促進其消化作用。

由鸚哥魚成魚腸道中之醣酶／蛋白酶比值與腸道長，應為雜食性魚類，配合其腸道內 pH 變化，於未來鸚哥魚養殖時，飼料配方中可提高其蛋白質量，但飼料加工時應避免疏水性胺基酸造成蛋白質凝聚程度，即可提高其消化率。

鸚哥魚後腸 (V) 部位呈粉紅色物質，初步鑑定為紅藻中的水溶性色素藻膽蛋白，需對照鸚哥魚不同棲息環境之藻相，作進一步之分析、比對，可確認後腸部位之色素與其消化吸收之機制，作為鸚哥魚與珊瑚礁復育之參考指標。

五、參考文獻

紀明侯。1997。藻類脂肪酸。海藻化學。科學出版社。北京。中國。pp. 508-571。

藍群傑、孫寶年。1991。基質對草蝦中腸腺蛋白 活性之影響。中國農化學會誌, 29: 33-42。

郭欽明。1988。以生理觀點探討魚類的營養需求。水產飼料研討會專輯。Pp. 25-45。

小川和朗。1964。觀察法。組織培養—基礎之應用。中井準之助、岡本道雄編。朝倉書店。東京。日本。Pp. 144-204。

Aranishi, F., H. Ogata, K. Hara, K. Osatomi and T. Ishihara. 1997. Purification and characterization of cathepsin L from hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Physiol.* 118B:531-537.

Bellwood, D.R. 1995. Carbonate transport and within-reef pattern of bioerosion and sediment release by parrotfishes (family: Scaridae) on the Great Barrier Reef. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 117:127-136.

Bellwood, D.R. and J.H. Choat. 1990. A functional analysis of grazing in parrotfishes (family: Scaridae): the ecological implications. *Environ. Biol. Fishes.* 28:189-214.

Bernfeld, P. 1955. Amylase, α and β . In "Methods in Enzymology P". S.P. Colowick and N.O. Kaplan (Eds.), Academic Press, New York. Pp. 149-158.

Chen, L., M. Sadek, B.A. Stone, R.T.C. Brownlee and G. Fincher, 1995. Stereochemical course of glucan hydrolysis by barley (1 \rightarrow 3) - and (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4) - β -glucanases. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1253:112-116.

Choat, J.H. and K.D. Clements. 1998. Vertebrate herbivores in marine and terrestrial environments: a nutritional ecology perspective. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29:375-403.

Choat, J.H., K.D. Clements and W.D. Robbins. 2002. The trophic status of herbivorous fishes on coral reefs. *Mar. Biol.* 140:613-623.

Folk, J.E., K.A. Pize, W.R. Carrol and J.A. Glander. 1960. Carboxypeptidase B IV. Purification and characterization of the porcine enzyme. *J. Biol. Chem.* 235:2435-2459.

Foster, G.G., A.N. Hodgson and C.S. Boyd. 1999. Polysaccharolytic activity of the digestive enzymes of the macroalgal herbivore, *Turbo sarmaticus* (Mollusca: Vetigastropoda: Turbinidae). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 122:47-52.

- Gantt E. 1990. Pigmentation and photoacclimation. In "Biology of the red algae". Cole, K.M. and R.G. Sheath (Eds.). Cambridge University Press. New York, USA. pp. 203-220.
- Gohar, H.A.F. and A.F.A. Latif. 1959. Morphological studies on the gut of some scarid and labrid fishes. *Publ. Mar. Biol. Stn. Ghardaqa*. 1:145-189.
- Hidalgo, M.C., E. Urea and A. Sanz. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170:267-283.
- Horn, M.H. 1989. Biology of marine herbivorous fishes. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 27:167-272.
- Hsu, Ya-Li and Jen-Leih Wu. 1979. The relationship between feeding habits and digestive proteases of some freshwater fishes. *Bull. Inst. Zool. Academia Sinica* 18:45-53.
- Hughes, T.P. 1994. Catastrophes, phase-shift and large-scale degradation of a Caribbean coral reef. *Science*. 265:1547-1551.
- James, A.G. T. Probyn and L. Seiderer. 1989. Nitrogen excretion and absorption efficiencies of the Cape anchovy *Engraulis capensis* Gilchrist fed upon a variety of plankton diets. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 131:101-124.
- Kuz'mina, V.V. and A.N. Nevalenny. 1983. Effect of hydrogen ion concentration on the activity of some carbohydrases in the fish digestive tract. *J. Ichthyol.* 23:114-123.
- Lindsay, G.J.H. and J.E. Harris. 1980. Carboxymethylcellulase activity in the digestive tracts of fish. *J. Fish Biol.* 16:219-233.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-280.
- Luczkovich, J.J. and E.J. Stellwag. 1993. Isolation of cellulolytic microbes from the intestinal tract of the pinfish, *Lagodon rhomboides*: size-related changes in diet and microbial abundance. *Marine Biology*. 116:381-388.
- Polunin, N.V.C. and D.W. Klumpp. 1992. Algal food supply and grazer demand in a very productive coral-reef zone. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 164:1-15.
- Rick, W. 1965. Trypsin and chymotrypsin. In "Method of Enzymatic Analysis". H.U. Bergmeyer (Eds.) Verlag Chemie. Weinheim. New York and London. Pp. 800-815.
- Schwert, G.M. and Y. Takenada, 1955. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochem. Biophys. Acta.* 16:570-575.
- Simpson, B.K. 2000. Digestive proteinases from marine animals. In "Seafood Enzymes". N.F. Haard and B.K. Simpson (Eds.) Marcel Dekker, Inc. New York. Pp. 191-213.
- Smith, R.L. and A.C. Paulson. 1974. Food transit time and gut pH in two Pacific parrotfishes.

Smith, R.L. and A.C. Paulson. 1975. Carbonic anhydrase in some coral reef fishes: adaptation to carbonate ingestion? *Comp. Biochem. Physiol.* 50:131-134.

Smith, R.L. and A.C. Paulson. 1975. Carbonic anhydrase in some coral reef fishes: adaptation to carbonate ingestion? *Comp. Biochem. Physiol.* 50:131-134.

Takii, K., S. Shimeno, M. Takeda and S. Kanejawa. 1986. The effect of feeding stimulants in diet on digestive enzyme activities of eel. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 52:1449-1454.

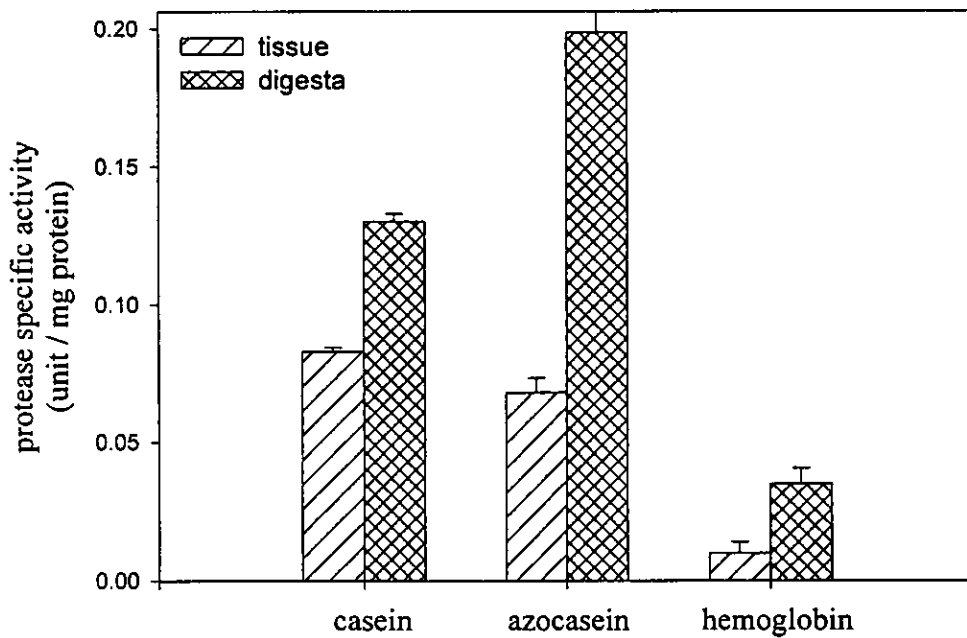
Walter, H.E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrate. In "Methods of Enzymatic Analysis". H.U. Bergmeyer (Ed.) Verlag Chemie. Weinheim. New York and London. pp. 270-275.

Xue, X.M., A.J. Anderson, N.A. Richardson, A.J. Anderson, G.P. Xue, and P.B. Mather. 1999. Characterisation of cellulase activity in the digestive system of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Aquaculture*. 180:373-386.

Zemke-White, W.L. and, K.D Clements. 1999. Chlorophyte and rhodophyte starches as factors in diet choice by marine herbivorous fish. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 240:137-149.



圖一、藍點鸚哥魚初期型成魚消化道型態差異之分段 (I~VI) 圖。

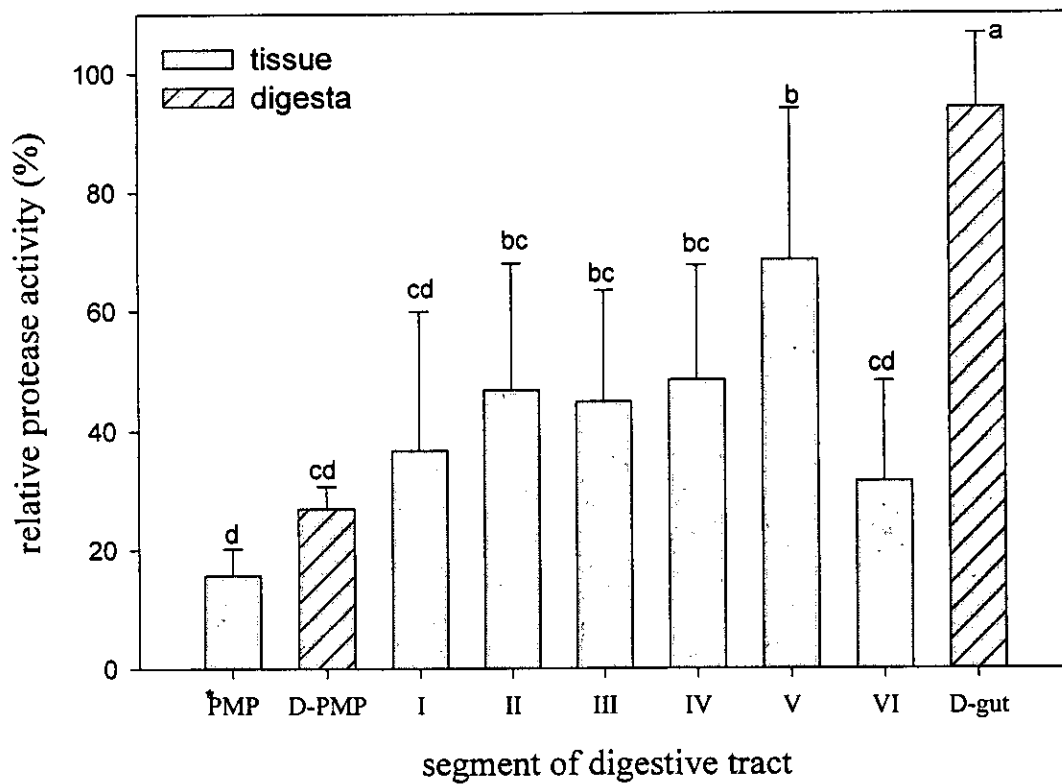


圖二、紅紫鸚哥魚初期型成魚腸道蛋白酶之基質特異性。(以 casein、azocasein、hemoglobin 為基質，於 37°C、pH 7.0 磷酸緩衝液，反應 30 分鐘。)

表一、雜紋鸚哥魚終期型成魚第 V 段腸道蛋白酶之 Km 及 Vmax 值*

Source	Substrate	Km (g / 100 ml)	Vmax (unit / mg protein_min)
Tissue	azocasein	1.35	0.40
	hemoglobin	1.15	0.28
Digesta	azocasein	0.46	0.09
	hemoglobin	1.00	0.06

*以 0.5 ~ 2.5 % azocasein 及 hemoglobin 為基質，於 37 °C、pH 7.0 反應。



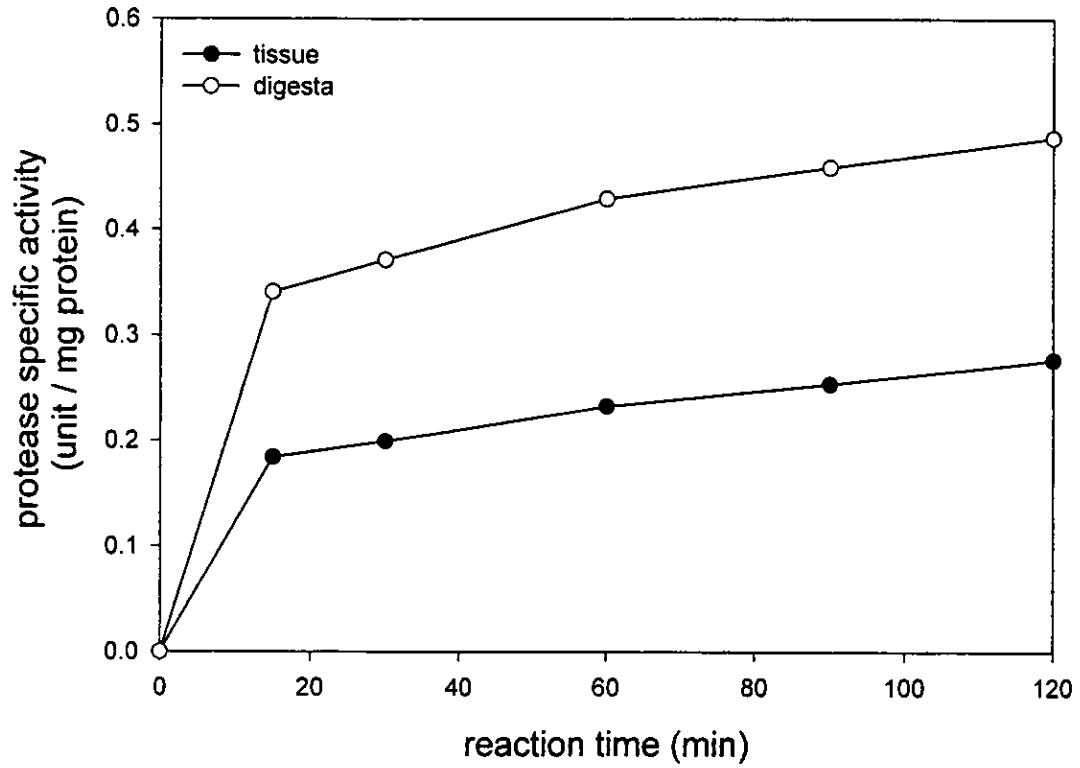
圖三、藍點鸚哥魚初期型成魚消化道各段組織與內容物之蛋白酶活性變化。以 Azocasein 為基質，於 37°C、pH 7.0 磷酸緩衝液中反應 30 分鐘。*PMP is pharyngeal mill pouch. digesta (D) in PMP, and in gut.

表二、藍點鸚哥魚初期型成魚之大小與六段腸道佔腸道總長之比例。

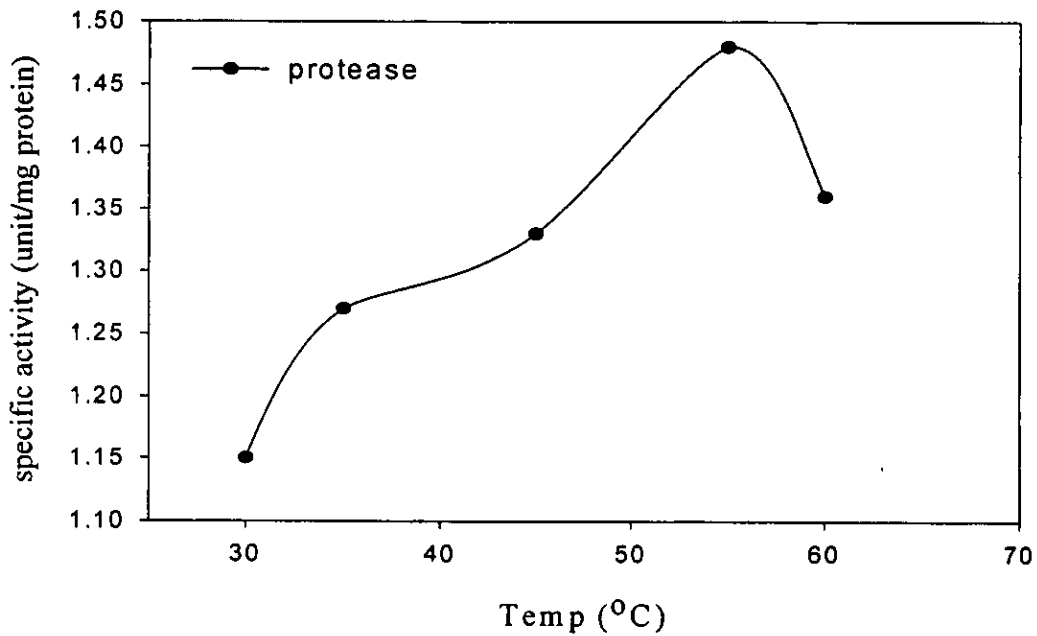
		ratio of segment length to total gut length (%)					
body wt. (g)	N	I	II	III	IV	V	VI
334.0 ± 105.2	13	1.98 ± 0.84 ^a	1.88 ± 1.14 ^a	16.89 ± 2.44 ^a	44.24 ± 3.90 ^a	28.54 ± 4.07 ^a	4.21 ± 1.94 ^a
762.4 ± 120.4	8	2.76 ± 0.80 ^a	1.50 ± 0.60 ^a	17.11 ± 1.95 ^a	39.84 ± 15.83 ^a	28.22 ± 9.14 ^a	3.60 ± 1.37 ^a
1480.8 ± 230.9	9	1.88 ± 0.51 ^b	1.90 ± 0.52 ^a	18.08 ± 1.84 ^a	45.78 ± 4.13 ^a	24.52 ± 3.51 ^a	4.84 ± 1.42 ^a

* 依消化道型態分六段

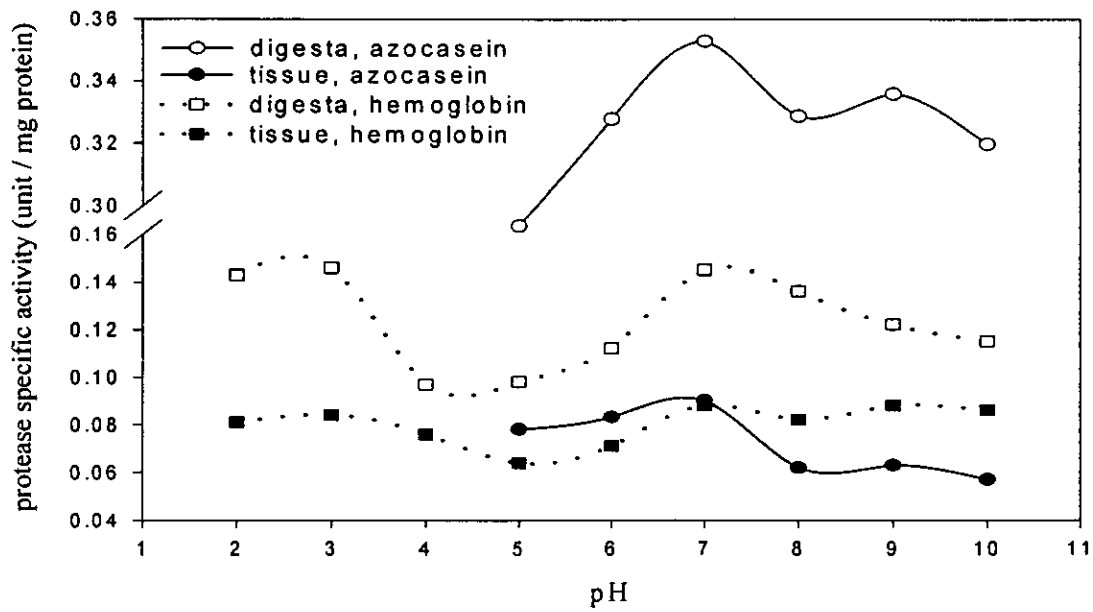
^{a, b} Mean values within a column not sharing the different superscript were significantly different at 95 %.



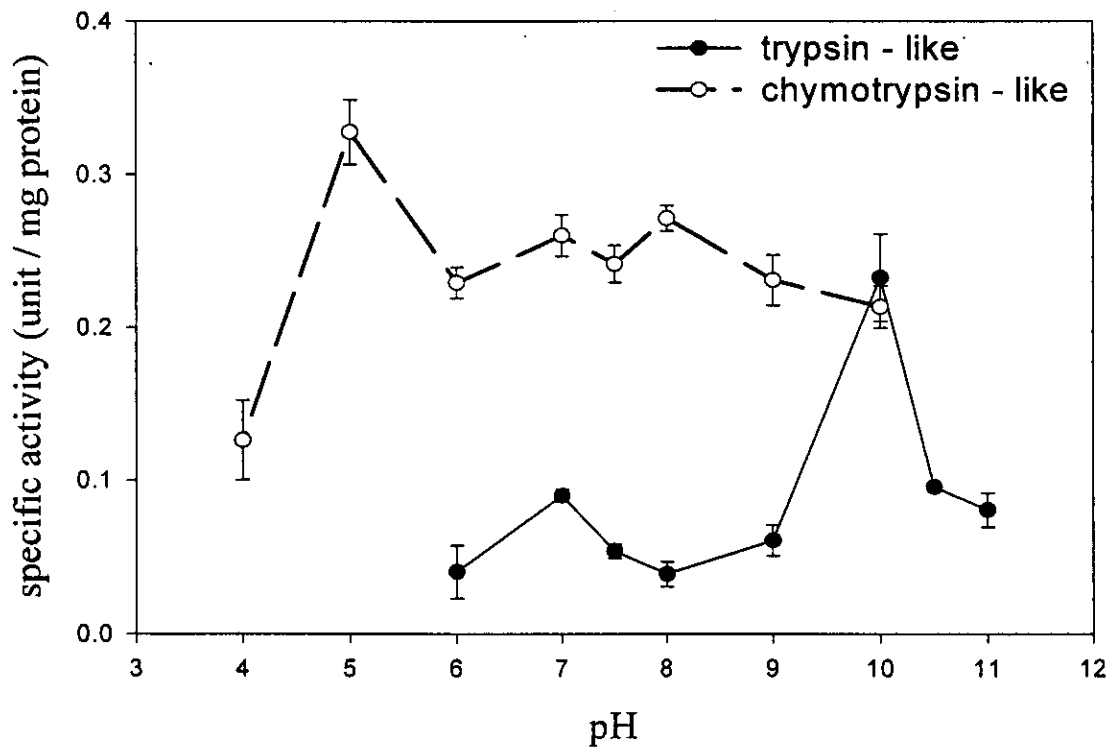
圖四、藍點鸚哥魚初期型成魚腸道組織及內容物蛋白酶活性隨作用時間之變化。於 pH 7.0、37 °C 以 azocasein 為基質。



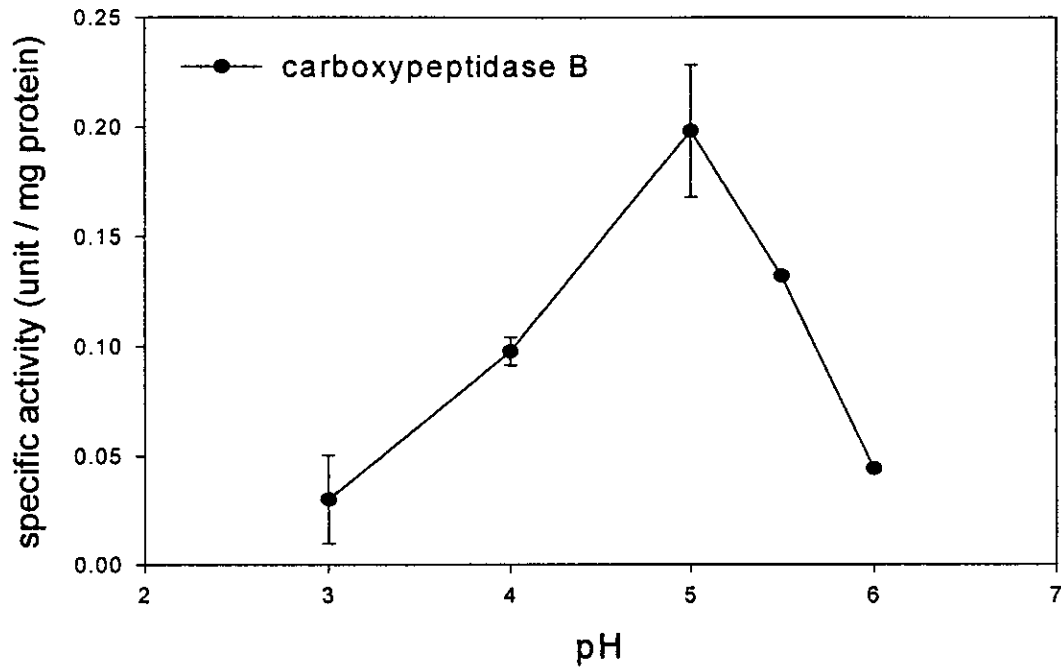
圖五、藍點鸚哥魚初期型成魚腸道組織中蛋白酶活性隨作用溫度之變化。



圖六、pH 對藍點鸚哥魚初期型成魚腸道 protease 活性之影響。以 1% azocasein、hemoglobin 為基質，於 37°C、pH 2~10 反應 15 分鐘。



圖七、藍點鸚哥魚初期型成魚腸道胰蛋白酶與胰凝乳蛋白酶活性隨 pH 之變化。

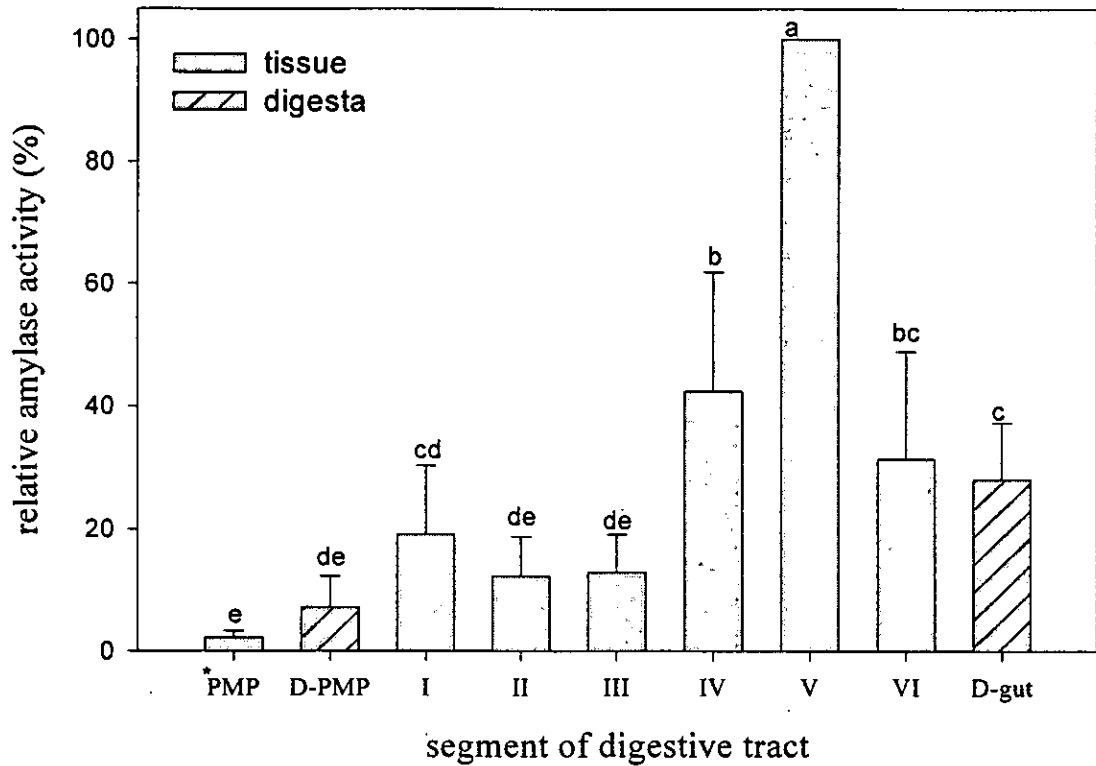


圖八、藍點鸚哥魚初期型成魚腸道酶基蛋白酶 B 活性隨 pH 之變化。

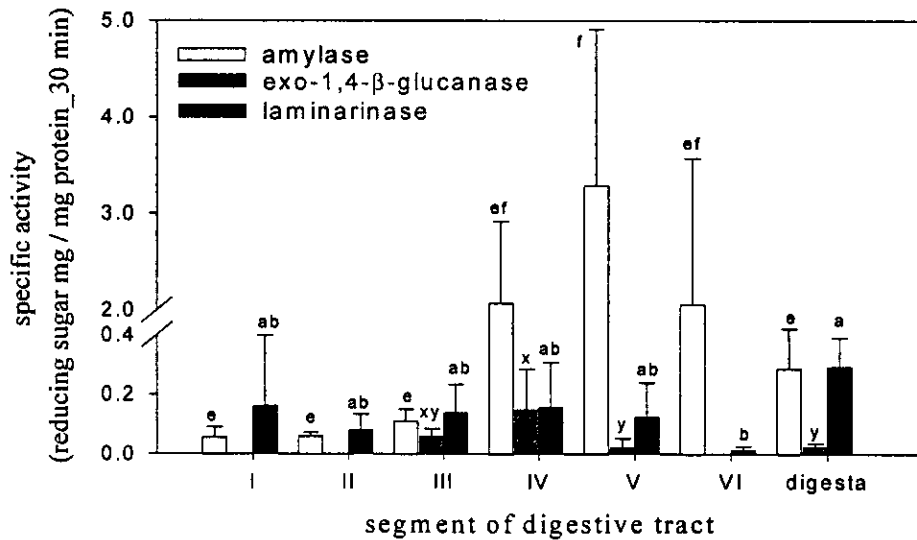
表三、藍點鸚哥魚初期型成魚腸道第 V 段中 amylase 之 K_m 與 V_{max} 值*。

source	K_m (g / 100 ml)	V_{max} (unit / mg protein - min)
Tissue	1.01	0.04
Digesta	0.67	0.05

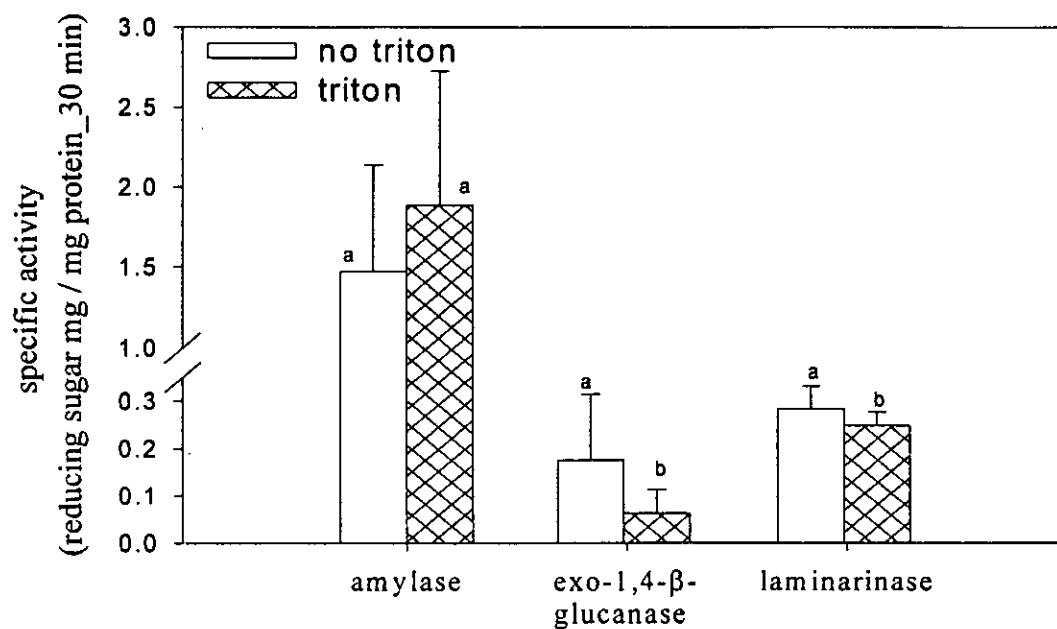
*以 0.5 ~ 2.0 % 水溶性澱粉為基質，於 37 °C、pH 7.0 作用。



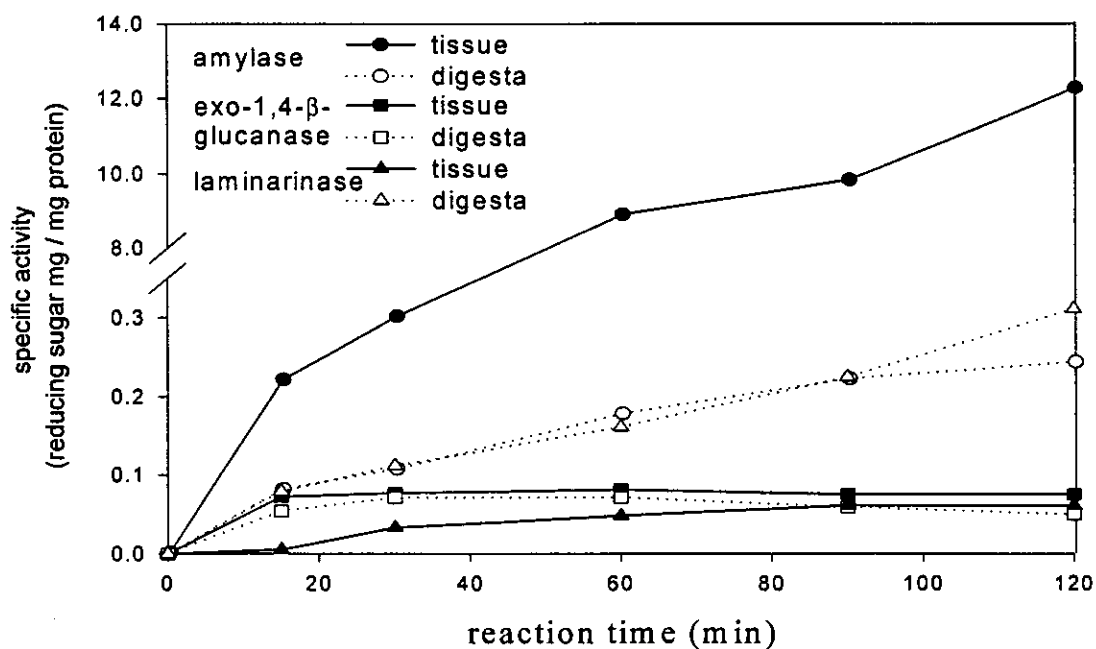
圖九、藍點鸚哥魚初期型成魚消化道各段組織與內容物之醣酶活性變化。分別以 Azocasein 及 Soluble starch 為基質，於 37°C、pH 7.0 磷酸緩衝液中反應 30 分鐘。*PMP is pharyngeal mill pouch. Digesta (D) in PMP, and in gut.



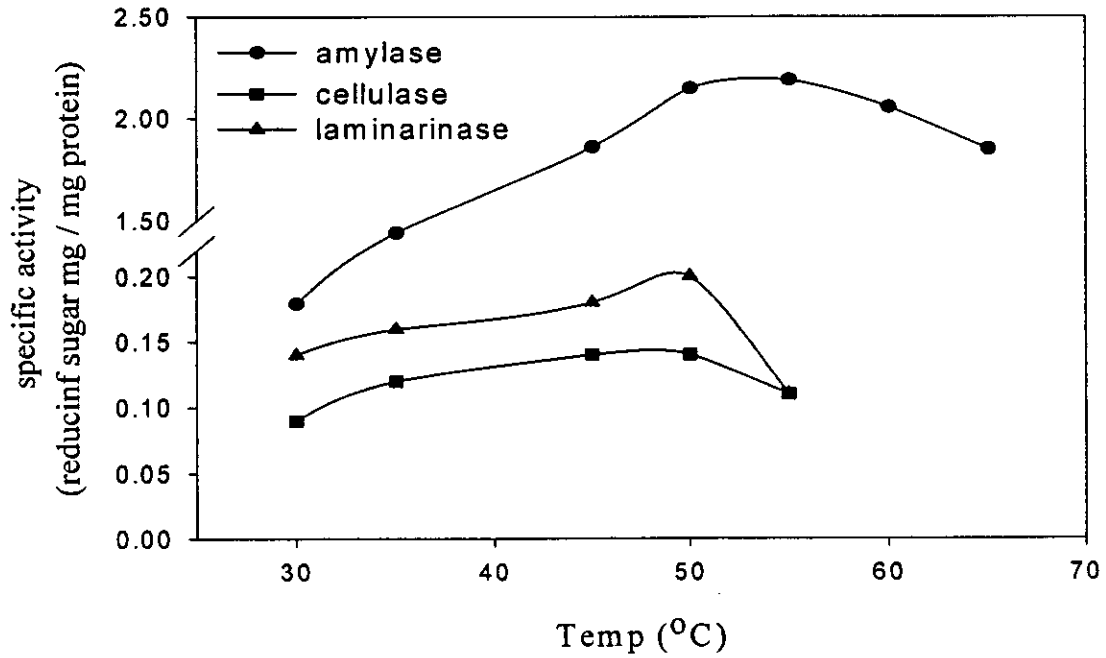
圖十、藍點鸚哥魚初期型成魚之六段 (I~VI) 腸道組織與腸道內容物 amylase, exo-1,4-β-glucanase, laminarinase 比活性。分別以 Soluble starch, carboxymethyl cellulose, laminarin 為基質，於 37°C、pH 7.0 磷酸緩衝液中反應 30 分鐘。



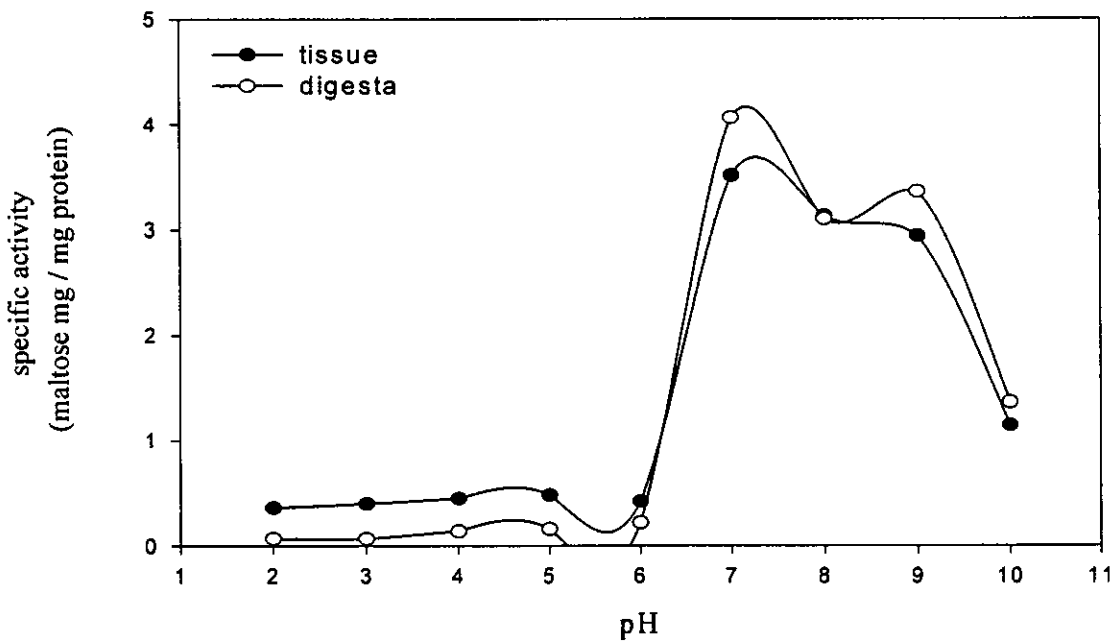
圖十一、藍點鸚哥魚初期型成魚第 IV 段腸道組織添加 triton (0.05%) 後，萃取醣酶活性。以 soluble starch, carboxymethyl cellulose, laminarin 為基質，於 pH 7.0 磷酸緩衝液 37°C。



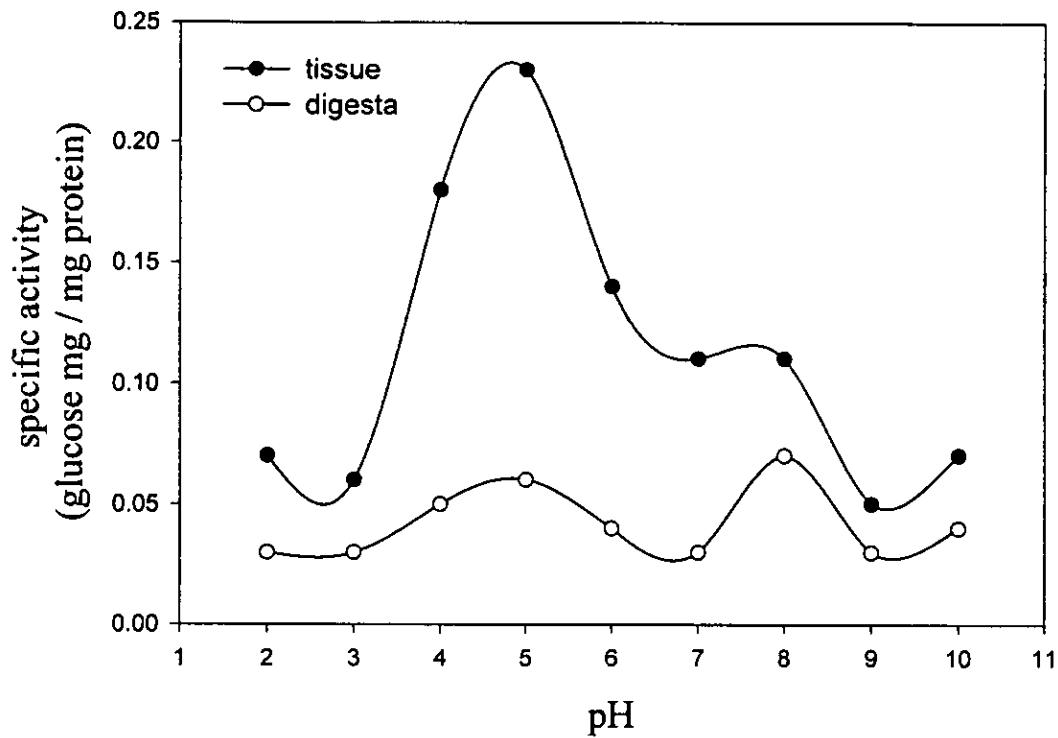
圖十二、藍點鸚哥魚初期型成魚腸道組織及內容物中 amylase、exo-1,4-β-glucanase、laminarinase 於 pH 7.0、37°C 隨作用時間之變化。



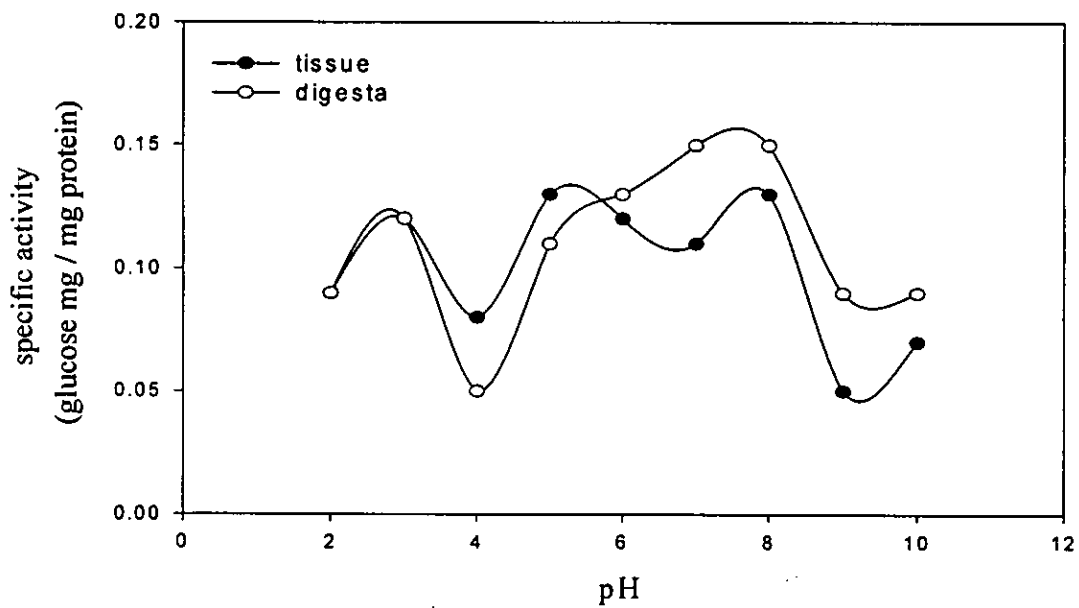
圖十三、藍點鸚哥魚初期型成魚腸道組織 amylase, cellulase, laminarinase 活性隨作用溫度之變化。腸粗酵素液於 pH 7.0 分解 soluble starch、carboxymethyl cellulose、laminarin。



圖十四、pH 對藍點鸚哥魚初期型成魚腸道粗酵素液 amylase 活性之影響。以 1% soluble starch 為基質於 37°C、pH 2~10 反應 30 分鐘。



圖十五、pH 對藍點鸚哥魚初期型成魚腸道粗酵素液 cellulase 活性之影響。以 1% carboxymethyl cellulose 為基質於 37°C、pH 2~10 反應 30 分鐘。



圖十六、pH 對藍點鸚哥魚初期型成魚腸道粗酵素液 laminarinase 活性之影響。以 1% laminarin 為基質於 37°C、pH 2~10 反應 30 分鐘。

表四、藍點鸚哥魚初期型成魚與其他魚種之生理指標比較。

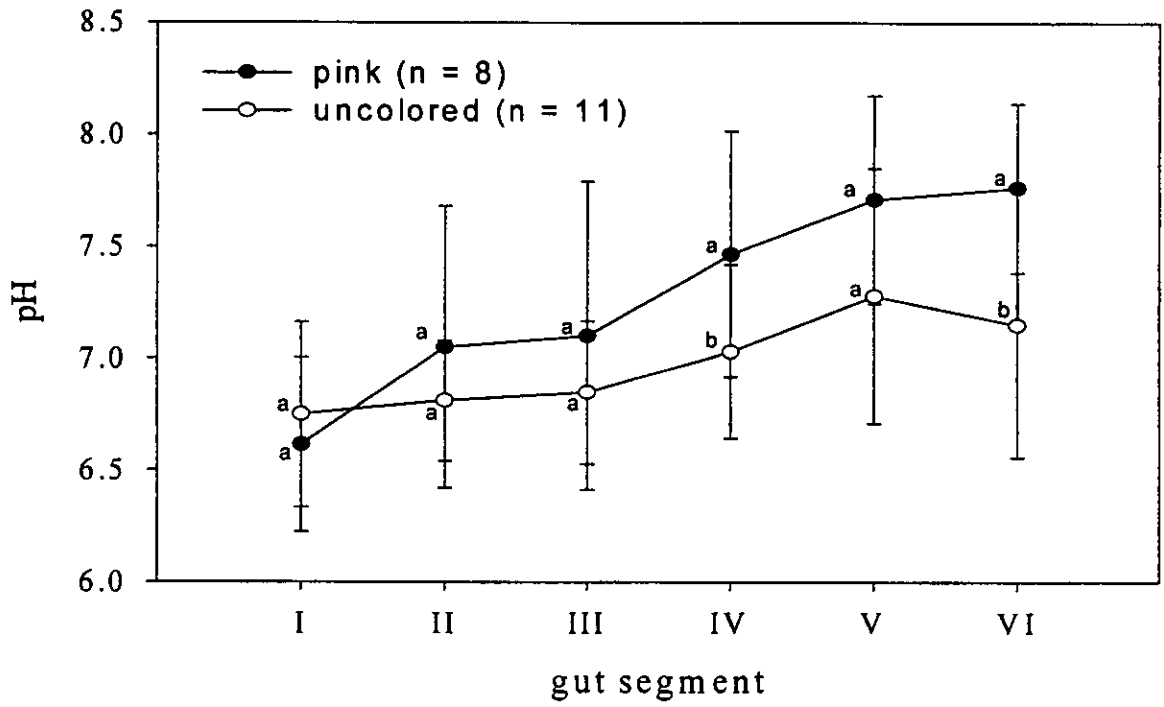
Species	Feeding type	HSI	DSI	RLG	$\frac{\text{amylase}}{\text{protease}}$	Ref
<i>Scarus ghobban</i> 鸚哥魚	Herbivorous	—	—	1.50 ± 0.10	—	a
<i>Carassius auratus</i> 鯽魚	Microphageous	—	2.18 ± 0.19	5.15 ± 0.95	37.55	b, c
<i>Cyprinus carpio</i> 鯉魚	Omnivorous	2.29 ± 0.18	3.08 ± 0.16	2.04 ± 0.35	29.01	b, c
<i>Scarus ghobban</i> 藍點鸚哥魚	Omnivorous	4.53 ± 2.50	2.28 ± 0.41	1.40 ± 0.15	27.55	
<i>Anguilla japonica</i> 鰻魚	Carnivorous	1.62 ± 0.07	1.98 ± 0.30	0.46 ± 0.05	3.04	b, c
<i>Oncorhynchus mykiss</i> 鱒魚	Carnivorous	1.47 ± 0.14	6.20 ± 0.32	—	0.38	b, c

a. Horn, 1989. b. Hsu and Wu, 1979. c. Hidalgo et al., 1999.

* Digestive somatic index (DSI) = (digestive tract wt / body wt) × 100

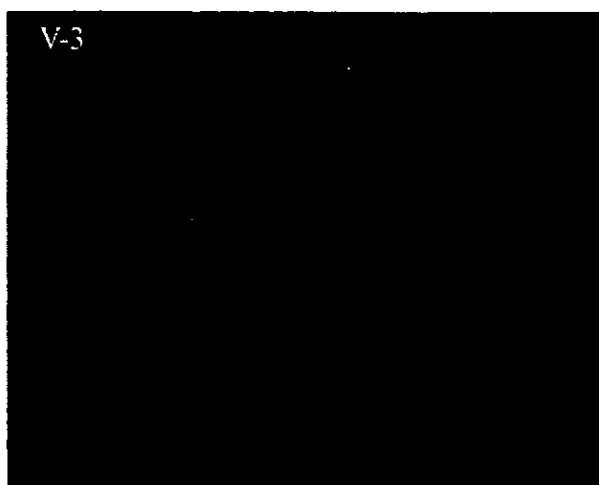
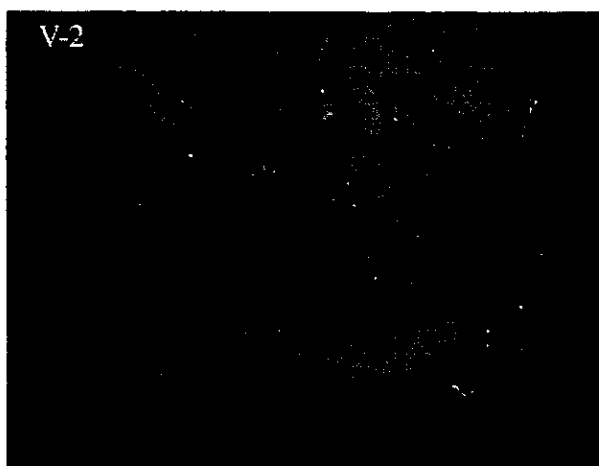
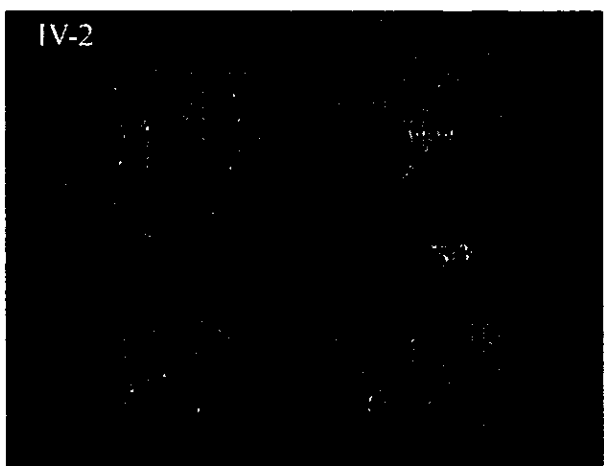
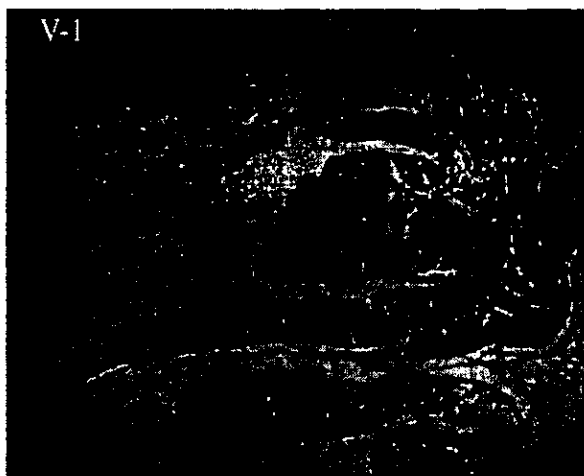
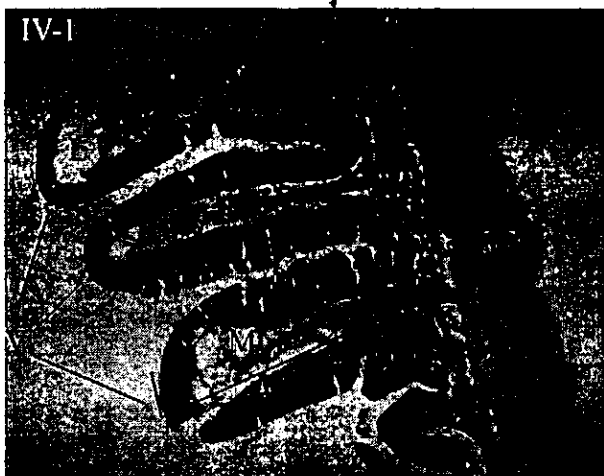
* Hepatosomatic index (HSI = (liver wt / body Wt) × 100)

* Relative length of the gut (RLG) = digestive tract length / body length.



圖十七、藍點鸚哥魚初期型成魚腸道內容物之 pH 變化。

MM



圖十八、藍點鸚哥魚初期型成魚中腸(IV)、後腸(V)部位組織切片圖(100 X)。

1 - 縱切面(uncolor); 2 - 橫切面(uncolor); 3 - 橫切面(pink)