

養殖烏魚消化道粗酵素液蛋白酶之特性和其 對飼料蛋白質之體外消化能力

陳翠瑤^{1*} 保愛貞¹ 蘇崇文² 孫寶年³

1.國立宜蘭大學食品科學系

2.北台科學技術學院餐飲管理系

3.國立台灣海洋大學食品科學系

摘 要

本研究目的是探討養殖烏魚消化道蛋白酶之特性，並另以添加紅魚粉、白魚粉、黃豆粉、及蝦皮糠，調配成蛋白質含量約為32%的六種不同飼料，模擬消化道蛋白酶消化之體外試驗。發現養殖烏魚胃中粗酵素液含有兩種胃蛋白酶，最適作用 pH 為 2.0 和 3.5。腸道中至少有胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、羧基胜肽酶 A、羧基胜肽酶 B、及胺基胜肽酶；其中胰凝乳蛋白酶最適作用 pH 為 7.5，是腸道中最主要的消化蛋白酶。體外消化作用結果發現蛋白質消化率依序是紅魚粉高劑量 (BFHM) > 白魚粉高劑量 (WFHM) > 白魚粉低劑量 (WFLM) > 黃豆粉 (SM) > 白魚粉和黃豆粉混合組 (WFSM) > 黃豆粉和蝦皮糠混合組 (SSM) 而且蛋白質消化率以腸道消化階段高於胃消化階段。消化率與飼料中環狀胺基酸含量 (tyrosine + phenylalanine) 成正相關 ($r^2 = 0.746$) 但是 SSM 組卻例外。

關鍵詞：蛋白酶，消化率，體外試驗，烏魚

Characteristic of Proteases in Crude Extract from Digestive Tract of Cultured Grey Mullet (*Mugil cephalus*) and the in Vitro Digestibility on Feed Protein

Tusi-Yao Chen^{1*} Ai-Chen Pao¹ Chung-Wen Su² Bonnie Sun Pan³

1. Department of Food Science, National Ilan University
2. Department of Restaurant Management, Northern Taiwan Institute of Science and Technology
3. Department of Food Science, National Taiwan Ocean University

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the characteristic of proteases in crude extract from the digestive tract of cultivated Grey Mullet. Besides, an in vitro proteolysis simulating digestion of six formulas with 32% protein, which consist of brown fish meal, white fish meal, soybean powder mixed meal or shrimp shell meal were also investigated. The result showed that there were two pepsins in the crude extract of stomach and their optimal pH is 2.0 and 3.5, respectively. The protease species from intestine tissue were trypsin, chymotrypsin, carboxypeptidase A, carboxypeptidase B and aminopeptidase when crude enzymes were evaluated with synthetic specific substrates. Chymotrypsin was the major digestive protease in intestine tract and the optimal pH is 7.5. In vitro protein digestibility showed the order: brown fish high content meal (BFHM) > white fish high content meal (WFHM) > white fish low content meal (WFLM) > soybean powder meal (SM) > white fish and soybean powder mixed meal (WFSM) > soybean powder and shrimp shell mixed meal (SSM). The protein digestive efficiency was positively correlated to the total content of tyrosine and phenylalanine ($r^2=0.746$) in feeds except SSM.

Key words: protease, digestibility, in vitro, mullet

* Corresponding author E-mail: tychen@niu.edu.tw

前言

烏魚為河口性魚類，於海水及淡水水域皆可棲息，屬雜食性魚種，體型大、肉多、成長快，其卵巢可作為烏魚子，價格高，故又稱烏金。烏魚每年冬季由北方洄游南下，在台灣沿岸可大量捕獲，現今因遭大量濫捕，已造成過漁現象。又因大陸沿岸漁民之非法炸魚，洄游台灣烏魚逐年減產。烏魚魚苗來源豐富，已成功建立人工繁殖技術 (Lee and Menu, 1981)；國內也早已大量繁殖，養殖產量並有逐年增加之趨勢。養殖方式包括有在泥土池中單養，或與虱目魚等其他魚種混養，直接投以米糠為飼料，或投餵虱目魚飼料，也有一些養殖戶自行配製烏魚飼料，但截至目前市面上仍尚未有養殖烏魚專用之飼料銷售。有關烏魚的研究，多僅針對其生態、烏魚卵加工、蛋白酶活性、及內臟蛋白酶純化之應用等 (劉, 1991; Katselis *et al.*, 2005; Rogdakis, 1994; Guizani *et al.*, 1991)，然而對烏魚消化系統

中之消化蛋白酶特性、消化機制等，均尚未有深入之研究。

魚類對蛋白質的利用，雖可由長期飼餵試驗得知 (Allan *et al.*, 2000; Peresa *et al.*, 2003)，但此法頗為耗時費資。以市售單一或混合的蛋白酶進行魚類飼料蛋白質的水解試驗，探討飼料蛋白質被水解的情形，實際上並不足以代表魚類消化道真正的消化作用 (Hsu *et al.*, 1977; Buchanan, 1969; Francisco *et al.*, 2001; Ezquerro *et al.*, 1998)。Eid 和 Matty (1989) 曾探討鯉魚消化道粗酵素抽出液之蛋白酶特性，並模擬體內消化器官中內容物的水分含量、pH、溫度，進行體外消化試驗，測定蛋白質的消化率，據以代表該魚種對蛋白質的消化率，也證實了鯉魚的體外模擬試驗與體內消化率有很高的相關性。另又有以鱒魚的幽門垂蛋白酶特性進行飼料蛋白質的體外消化試驗，發現其消化率與餵食後成長率具有很好的相關性 (Dimes *et al.*, 1994a)。但烏魚有胃，與無胃的鯉魚之消化機制應不相同，故須為烏魚建立一消化機制，以便進行烏魚的體外模擬試驗。

本研究首先瞭解養殖烏魚消化道蛋白酶的分布與特

性，進一步以養殖烏魚消化道中的粗酵素抽出液，模擬養殖烏魚消化道的消化作用進行體外消化試驗，並自市售飼料中找出消化率較高的蛋白質來源，以供配製烏魚飼料之參考。

材料與方法

一、原料

本研究所用之二年烏魚 (*Mugil cephalus*)，直接取自台南七股鄉養殖場，眷養池 (長 25 m、寬 8 m、高 2.1 m) 蓄養 100 尾，養殖密度 0.5 尾/m²，鹽度約 15~20 ppt。飼料以白魚粉和黃豆粉為主要蛋白質來源，蛋白質含量約 32 %。飼育期中每天早晚各餵食一次，採樣之前須淨養絕食一天，以圍網方式將魚打撈上來，再以麻醉劑麻醉之後予以解剖。將消化道之胃、腸分別秤重後，以採樣箱冰浴運回實驗室凍藏於 -20°C 待用。

二、養殖烏魚消化道內容物 pH 之測定

將烏魚消化道之胃與腸剪開，分別取出其內容物，依 AOAC (1995) 之方法，加入 9 倍之去離子水均質之，經過濾後測其濾液之 pH 值。

三、粗酵素抽出液之製備

從 -20°C 凍藏庫取出消化道，並在半解凍狀態下取出胃和腸小心地將其內容物與組織分開。胃加入 10 倍量 (v/w) 預冷的去離子水，腸則加入 20 倍量 (v/w) 預冷之 0.05 M Tris-HCl (pH=7.5) 緩衝溶液，以均質機 (Polytron PT 2000, Kinematica AG, Switzerland) 均質之，均質液以 5000 xg 在 4 °C 離心 30 min，上層液即為粗酵素液，其蛋白質含量以 Bradford (1976) 法測定之。

四、粗酵素蛋白質之定量

以 Bradford (Bradford, 1976) 方法定量之。取 0.2 ml 染液 (protein assay reagent, Bio-Rad, USA)，加入經去離子水稀釋 100 倍的粗酵素抽出液 0.8 mL，經震盪後靜置 5 min，測定波長 595 nm 的吸光值 ($A_{595\text{nm}}$)。以不同濃度之牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, Sigma, St Louis, MO,

USA) 做為定量之標準曲線，以內插法求出粗酵素蛋白質濃度 ($\mu\text{g/mL}$)。

五、蛋白質基質之製備

酪蛋白 (casein, 林純公司, 日本) 1 g 溶解於 0.05 M, pH=7.5 之熱 (50~60°C) Tris-HCl 緩衝溶液 100 ml 中，配製成 1 % 之酪蛋白基質溶液。取牛血紅蛋白 (hemoglobin, Sigma, St Louis, MO, USA) 2 g 溶解於 100 ml 相同緩衝液中，配置成 2 % 之牛血紅蛋白基質溶液。

六、蛋白酶最適作用溫度之測定

依據 Walter (1984) 方法，取已製備之 1 % 酪蛋白溶液 1 mL 或 2 % 牛血紅蛋白溶液 1 mL，加入 3 mL、0.2 M 磷酸緩衝溶液 (pH 7.5) 於不同溫度恆溫 5 分鐘後，加入 1 mL 之粗酵素抽出液 (蛋白質含量約 0.6~0.8 mg/mL)，在 15~60°C 間定溫下反應 30 min 後 (經預備試驗證實在 60 min 的反應時間內，各蛋白質基質溶液的蛋白酶水解物生成量，以 $A_{280\text{nm}}$ 表示，均呈線性上升，故本研究以 30 min 定為測試最適作用溫度、最適作用 pH 值、及其他相關測試之時間)，以 20 % 三氯醋酸 (TCA) 5 mL 終止反應，反應液經過濾 (TOYO 5C 濾紙) 大分子蛋白質後，以波長 280 nm，測濾液之吸光值 ($A_{280\text{nm}}$)。

七、蛋白酶最適作用 pH 值之測定

依據 Clark et al. (1985) 之方法，取已製備之酪蛋白或牛血紅蛋白基質溶液 1 ml，添加 0.2 M 的緩衝溶液 3.0 mL (pH=1.5~2.0 為 KCl-HCl 緩衝液；pH=2.5~3.5 為 glycine-HCl 緩衝液；pH=4.0~6.0 為 sodium acetate -acetate 緩衝液；pH=6.5~7.0 為 imidazole-HCl 緩衝液；pH=7.5~8.5 為 tris-HCl 緩衝液；pH=8.5~10.0 為 boric acid - sodium hydroxide 緩衝液) 於 30 °C 恆溫 5 分鐘，再加入 1 mL 粗酵素抽出液於 30 °C 反應 30 min，再以 20 % TCA 溶液 5 mL 終止反應，經過濾後取濾液測定波長 280 nm 處之吸光值 ($A_{280\text{nm}}$)。

八、以合成特異基質分析腸道蛋白酶之特性

(一) 胰蛋白酶 (trypsin)

依據 Rick (1965) 之方法。以 0.5 mM 之 BAEE (benzoyl arginine ethylester, Sigma, St Louis, MO, USA) 為特

異基質，分別溶於含 0.02 M CaCl₂ 之 0.05 M 上述不同 pH 之緩衝溶液，取 3 mL 之基質溶液，加入 0.1 mL 之粗酵素（蛋白質含量約 0.6~0.8 mg/mL），於 25°C 作用，測定波長 253 nm 吸光值之變化，吸光值每分鐘增加 1，定為一個活性單位。

（二）胰凝乳蛋白酶（chymotrypsin）

依據 Rick (1965) 之方法，以 0.25 mM 之 BTEE (benzoyl tyrosine ethylether, Sigma, St Louis, MO, USA) 為特異基質，分別溶於含 0.45 M CaCl₂ 之 0.05 M 上述不同 pH 之緩衝溶液，取 3 mL 之基質溶液，加入 0.1 mL 之粗酵素（蛋白質含量約 0.6~0.8 mg/mL），於 25°C 作用，測定波長 253 nm 吸光值之變化，吸光值每分鐘增加 1，定為一個活性單位。

（三）羧基胜肽酶 A (carboxypeptidase A)

依據 Folk 和 Schirmer (1963) 之方法，以 HP (hippuryl L-phenylalanine, Sigma, USA) 為特異基質，作用條件與八、（一）相似，於 25°C 作用，測定波長 254 nm 吸光值變化，吸光值每分鐘增加 1，定為一個活性單位。

（四）羧基胜肽酶 B (carboxypeptidase B)

依據 Folk et al. (1960) 之方法，以 HA (hippuryl L-arginine, Sigma, USA) 為特異基質，作用條件與八、（一）相似，於 25°C 作用，測定波長 254 nm 吸光值之變化，吸光值每分鐘增加 1，定為一個活性單位。

（五）胺基胜肽酶 (aminopeptidase)

依據 Vo et al. (1983) 之方法，以 LNA (L-leucine β -naphthylamide, Sigma, USA) 為特異基質，作用條件與八、（一）相似，經 25°C 作用，測定波長 570 nm 吸光值之變化，吸光值每分鐘增加 1，定為一個活性單位。

九、養殖烏魚飼料之調配

烏魚飼料中蛋白質來源以麵筋 (gluten) 為基礎，另以阿拉斯加白魚粉、紅魚粉、黃豆粉、及蝦皮糠取代不等量之麩蛋白，調配出六種相同總蛋白質含量約 32 % 之飼料，包括紅魚粉高劑量 (brown fish meal high content feed, BFHM)、白魚粉高劑量 (white fish meal high content feed, WFHM)、白魚粉低劑量 (white fish meal low content feed,

WFLM)、黃豆粉 (soybean meal feed, SM)、白魚粉/黃豆粉 (1:1) 混合組 (white fish meal/soybean meal feed, WFSM)、黃豆粉/蝦皮糠 (4:1) 混合組 (soybean meal/shrimp shell meal feed, SSM) 飼料以粉碎機粉碎後，經 80 mesh 篩網過篩後備用。飼料、魚粉、黃豆粉、及蝦皮糠之粗蛋白質含量依 AOAC (1995) 方法分析。

十、飼料胺基酸分析

取 0.05 g 乾重之飼料放入分解管中，加入 6 N 的 HCl 5 mL 後，抽真空封管，於 110°C 分解 24 hr 後，在 40°C 減壓濃縮後，以去離子水洗兩次，再經減壓濃縮，以 0.2 M citrate 緩衝溶液定容至 10 mL，以濾紙 (0.45 μ m) 過濾之，濾液保存於 -20°C，以胺基酸自動分析儀 (amino acid analyzer, LKB 4150 型) 進行分析。

十一、飼料蛋白質之體外試驗

六種調配好之烏魚飼料分別均勻分散於 pH 3.5 之 0.05 M citric acid-potassium citrate 緩衝溶液中，依飼料蛋白質含量調配成蛋白質量約 10 mg/mL 之溶液，供為體外消化試驗之蛋白質基質。取此基質溶液 60 mL，於 25°C 先加入胃粗酵素抽出液 5 mL 作用 1.5 hr 後，再加入腸道粗酵素液 5 mL 作用至 3.5 hr。每 0.5 hr 取出 2 mL 反應液，加入 10 % TCA 5 mL 終止反應，經 3000 \times g 離心 10 分鐘後，取上層液測定 A_{280 nm}。A_{280 nm} 愈高，代表消化率愈佳。

結果與討論

一、養殖烏魚消化道蛋白酶種類分佈與特性

表一為養殖烏魚胃和腸道之內容物 pH 值、粗酵素液中蛋白酶之最適 pH 值、及最適作用溫度。台灣夏季水溫約為 25~30°C 左右，故以 30°C 為本研究測定蛋白酶活性之反應溫度。烏魚在前一天餵食後，採樣當天早上即無投餵飼料，胃中內容物之 pH 值為 3.0~4.2，造成各魚體胃中內容物 pH 值之差異，可能是有些養殖烏魚仍有攝食池底有機物之殘渣，胃中仍有內容物，且 pH 值偏低，胃的蛋白酶最適作用 pH 值應以酸性為主。另將腸道等分為四

段，每段約 30 cm，分別測定其內容物之 pH 值，從 6.6 及 7.5，顯示在腸道中作用的蛋白酶應以中性蛋白酶為主。距離胃最接近處開始，pH 值依序為 6.6、6.9、7.25、7.5。

表 1 養殖烏魚消化道組織粗酵素液之蛋白酶最適作用 pH 值、最適作用溫度及其內容物之 pH 值

Table 1 The optimal pH and temperature of proteases in crude enzymes form cultured grey mullet digestive tract tissue and the pH value of its content in digestive tract.

Digestive tract	pH value of content	Optimal pH of protease in tissue	Optimal temperature of protease in tissue
Stomach	3.0 ~ 4.2	2.0, 3.5	45°C
Intestine	6.6 ~ 7.5	4.0, 6.5, 7.5, 9.5	55°C

以牛血紅蛋白為基質，胃粗酵素液作用 30 min 後，發現蛋白酶在 pH 值為 2.0 及 3.5 有活性峰，證實了養殖烏魚胃中蛋白酶確實是以酸性蛋白酶為主，與鯰魚、鰻魚、鮭魚等相似 (Uys et al., 1987; Chiu and Pan, 2002; Dimes et al., 1994b)；且含有兩種以上的胃蛋白酶 (pepsin) 鰻魚、鯰魚胃中也純化出兩種型式的胃蛋白酶 (Chiu and Pan, 2002; Squire et al., 1986)，養殖烏魚可能含有兩種胃蛋白酶異構酶。進一步以接近胃內容物 pH 值之 3.5 為反應 pH 值，觀察胃粗酵素液分別在 25~60°C 間，水解牛血紅清蛋白質 30 分鐘，測定 TCA 可溶部分的 A_{280nm}，吸光值愈高，反映胃粗酵素液活性愈強。表一顯示，胃蛋白酶的最適作用溫度為 45°C，但胃蛋白酶在 25 ~ 30°C 仍具有活性。

腸道粗酵素液以牛血紅蛋白及酪蛋白為作用基質，分別在 pH 為 4.0、6.5、7.5、9.5，和 6.5、7.5、9.5 有活性峰，顯示腸道中蛋白酶含有酸性、中性、及鹼性蛋白酶，但是腸道中的 pH 值接近中性，顯示腸道中蛋白酶的消化作用，應以中性蛋白酶為主。以接近腸道 pH 值的中性 pH 值環境下，以酪蛋白為作用基質，觀察在 25~65°C 間粗酵素液分解蛋白質基質之效果，發現在 55°C 是腸道蛋白酶最佳的作用溫度，但是在養殖溫度 (25 ~ 30°C) 腸道粗酵素液仍有蛋白酶的活性。

二、腸道蛋白酶種類之鑑定

由上述結果得知腸道中蛋白酶可能有四種以

上，故以魚類腸道中常見之蛋白酶的合成特異基質來鑑識其種類。圖一以 BAEE、BTTEE、HP、HA、及 L-LNA 五種分別為胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、羧基胜肽酶 A、羧基胜肽酶 B 及胺基胜肽酶之特異基質，觀察粗酵素液分別作用五種特異基質在不同 pH 值下之活性表現，結果分別在 pH 為 9.0、7.5、4.0、4.0、及 4.5 有活性峰，證實腸道蛋白酶有胰蛋白酶 (trypsin) 胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin) 羧基胜肽酶 A (carboxypeptidase A) 羧基胜肽酶 B (carboxypeptidase B) 及胺基胜肽酶 (aminopeptidase) 的存在，且其最適作用 pH 分別為 9.0、7.5、4.0、4.0、及 4.5；其中前二者是屬於內切酶，後三者是屬於外切酶。然而，養殖烏魚腸道所測得的 pH 值介於 6.6~7.5 間，此 pH 範圍內酸性蛋白酶幾乎沒有活性，是以胰凝乳蛋白酶的比活性最高，因此，腸道中蛋白酶水解蛋白質作用應以屬於內切酶的胰凝乳蛋白酶為主。

三、模擬養殖烏魚消化道之蛋白質消化率

本研究在預備試驗中，以固定的基質與粗酵素液濃度，在 30°C 下，分別模擬接近胃及腸道之 pH 值 3.5 及 7.5，以胃粗酵素液及腸道粗酵素液分別作用 1.5 hr 及 2.0 hr 後，發現代表小分子蛋白質產物量的 A_{280nm} 上升趨勢開始趨緩，代表粗酵素液分解蛋白質的速率開始變緩，故分別以這兩段作用時間供為進行蛋白質消化率之體外試驗。圖二為以魚飼料常用之蛋白質來源，調配成蛋白質含量相當 (約 32%) 之

六種魚飼料 BFHM、WFHM、WFLM、SM、WFSM、SSM，模擬消化道蛋白酶特性對不同飼料蛋白質之消化率變化。發現在作用 3.5 hr 後蛋白質消化率以 BFHM 最高， $A_{280\text{ nm}}$ 為 0.60；其次依序為 WFHM、SM、WFLM、WFSM、SSM， $A_{280\text{ nm}}$ 分別為 0.515、0.511、0.501、0.438、0.410。此外，所有飼料的蛋白質消化率中，均以腸道粗酵素液作用階段的反應速率高於胃粗酵素液，而且其 $A_{280\text{ nm}}$ 增加的幅度也都大於胃粗酵素液作用階段，顯示養殖烏魚消化道中對蛋白質的消化作用主要是在腸道中進行。

六種飼料蛋白質總量雖相同，但蛋白質來源不同，經各飼料蛋白質的胺基酸分析，其總胺基酸量差異不大，但是胺基酸組成卻有些差異。圖三是胰凝乳蛋白酶可以作用之環狀胺基酸，也就是苯丙胺酸(phenylalanine) 和酪胺酸(tyrosine) 的合計量與飼料體外蛋白質消化率進行之迴歸

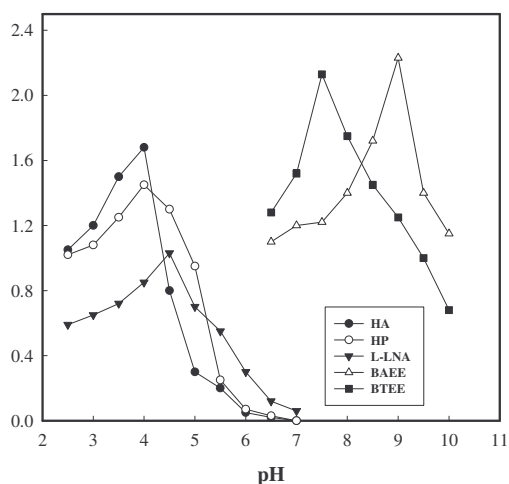


圖 1 以合成特異基質測定養殖烏魚腸道粗酵素液之蛋白酶的最適作用 pH 值

Fig. 1 The pH profiles of proteases activities in crude enzymes from cultured grey mullet intestine tissue using synthetic specific substrate.

HP : hippuryl L-phenylalanine, HA : hippuryl L-arginine, L-LNA : L-leucine β -naphthylamide, BAEE: benzoyl arginine ethylester, BTEE: benzoyl tyrosine ethylether.

分析。發現除了 SSM 組外，兩者有明顯正相關，迴歸方程式為 $Y = 0.1439X + 0.1006$ ， $r^2 = 0.746$ ，顯示苯丙胺酸和酪胺酸合計量愈高，被胰凝乳蛋白酶作用的機率也愈高，其蛋白質消化率也就愈高。但是 SSM 組的環狀胺基酸含量最高，蛋白質消化率卻是最低，推測原因，可能是 SSM 飼料含有較高量的疏水基，反而造成較強的疏水性交互作用，而包覆在蛋白質構形的內部，導致胰凝乳蛋白酶不易水解蛋白質。

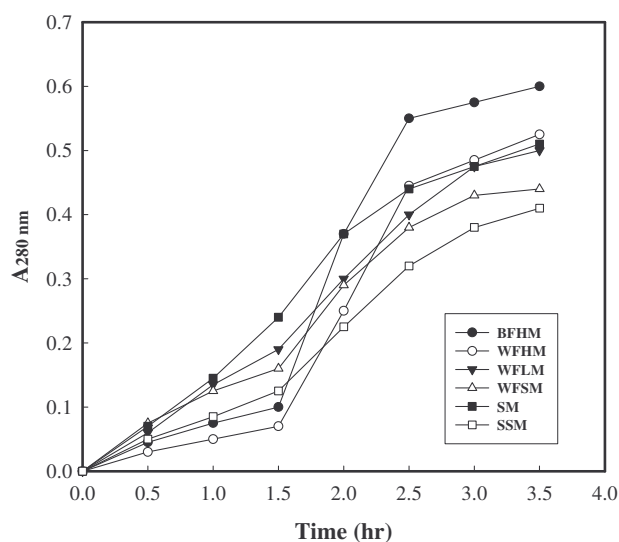


圖 2 於體外模擬養殖烏魚消化道蛋白酶作用於六種烏魚飼料之蛋白質消化率

Fig. 2 Evaluating the in vitro digestion efficiency of proteases extracted from the digestive tract of cultivated Grey Mullet in digesting six formulas of feeds.

BFHM: fish high content meal, WFHM: white fish high content meal

WFLM: white fish low content meal, WFSM: white fish and soybean powder mixed meal, SM: soybean powder meal, SSM: soybean powder and shrimp shell mixed meal.

結 論

養殖烏魚的消化道包括了胃及腸道兩部份，其中腸道才是蛋白質消化的主要發生器官，而且是以屬於內切酶之胰凝乳蛋白酶為主要之消化蛋白酶。同時也證實，飼料蛋白質來源會影響養殖烏魚的消化率，蛋白質來源應選擇其胺基酸組成中環狀胺基酸含量高者，方能提高其蛋白質消化率。藉由本研究對養殖烏魚消化道中蛋白酶的種類與特性已有重要的認識，應能提供給養殖業者在自行調配養殖烏魚飼料時之重要資訊，提昇其養殖效率。

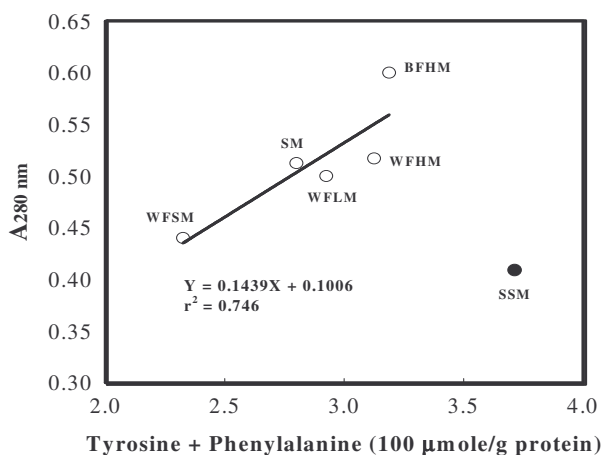


圖 3 養殖烏魚消化道粗酵素液水解 6 種飼料蛋白質之效率與飼料中酪胺酸和苯丙胺酸含量之關係

Fig. 3 The relationship between digestion efficiency of protease extracts in the digestive tract and total content of tyrosine and phenylalanine in six feeds.

BFHM: fish high content meal, WFHM: white fish high content meal

WFLM: white fish low content meal, WFSM: white fish and soybean powder mixed meal, SM: soybean powder meal, SSM: soybean powder and shrimp shell mixed meal

參考文獻

- 劉振鄉。1991。鱈科魚類的生物學研究。國立台灣大學理學院動物學研究所博士論文。台北。
- Allan, G.L., Parkinson, S., Booth, M.A., Stone, D.A.J., Rowland, S.J., Frances, J., Warner-Smith, R. 2000. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients. *Aquaculture*.186: 293–310.
- AOAC, 1995. Official Methods of Analysis of AOAC, 16th edn. In: Helric, K. (Ed.), Association of Analytical Chemist, Inc., Arlington, VA.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Buchanan, R. A.1969. In vivo and in vitro methods of measuring nutritive value of leaf protein preparations. *Br. J. Nutr.* 23(3): 533-545.
- Chiu, S.T. and Pan, B.S. 2002. Digestive protease activities of juvenile and adult eel (*Anguilla japonica*) fed with floating feed. *Aquaculture*. 205:141-156.
- Clark, J., Macdonald, N. L. and Stark, J. R.1985. Metabolism in marine flatfish-II. Protein digestion in dover sole (*Solea Solea L.*) . *Comp. Biochem. Physiol.* 82B(1): 217-222.
- Dimes, L.E., Haard, N. F., Dong, F. M., Rasco, B. A., Forster, I. P., Fairgrieve, W. T., Arndt, R. and Har, R. W. 1994a. Estimation of protein digestibility-II. *In vitro* assay of protein in salmonid feeds. *Comp. Biochem. Physiol.* 108A (2-3): 363-370.
- Dimes, L.E., Garcia-Carreno, F. L and Haard, N. F. 1994b. Estimation of protein digestibility—III. Studies on the digestive enzymes from the pyloric ceca of rainbow trout and salmon. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A (2): 349-360.
- Eid, A. E. and Matty, A. J. 1989. A simple in vitro method for

- measuring protein digestibility. *Aquaculture*. 79: 111-119.
- Ezquerro, J.M., Garcia-Carreño, F.L. and Carrillo, O. 1998. In vitro digestibility of dietary protein sources for white shrimp (*Penaeus Íannamei*). *Aquaculture*. 163:123-136.
- Folk, J. E. and Schrimmer, E. W. 1963. The porcine pancreatic carboxypeptidase A system I. three forms the active enzyme. *J. Biol. Chem.* 238:3884-3894.
- Folk, J. E., Piez, K. A., Carroll, W. R. and Gladner, J. A. 1960. Carboxypeptidase B. IV. Purification and characterization of the porcine enzyme. *J. Biol. Chem.* 235:2272-2279.
- Francisco, J., Moyano, F.J. and Savoie, L. 2001. Comparison of in vitro systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 128A:359-368.
- Guizani, N., Rolle, E. S., Marshall, M. E. and Wei, C.I. 1991. Isolation, purification and characterization of a trypsin from the pyloric ceca of mullet (*Mugil cephalus*) *Comp. Biochem. Physiol.* 103B:809-815.
- Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. D. and Miller, G.A. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility *J. Food Sci.* 42:1269-1273.
- Katselis, G., Koutsikopoulos, C., Rogdakis, Y., Lachanas, T., Dimitriou, E. and Vidalis, K. 2005. A model to estimate the annual production of roes (*avgotaracho*) of flathead mullet (*Mugil cephalus*) based on the spawning migration of species. *Fish. Res.* 75:138-148.
- Lee, C. S. and Menu, B. 1981. Effects of salinity on the development and hatching in grey mullet *Mugil cephalus* L. *J. Food Sci.* 19:178-188.
- Peresa, H. Lim, C. and Klesius, P.H. 2003. Nutritional value of heat-treated soybean meal for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*. 225: 67-82.
- Rick, W. 1965. Trypsin and chymotrypsin, in "Methods of Enzymatic Analysis" , pp. 800-815. H.U. Bergmeyer, (Ed) Verlag Chemie. Weinheim New York and London.
- Rogdakis, Y. 1994. *Avgotaracho Messolonghiou*: a seafood product with designation of origin and protection. *Fishing News*. 153:90-97.
- Squires, E.J., Haard, N.F. and Feltham, L.A.W. 1986. Gastric protease of Greenland cod *Gadus ogac*. II. Structural properties. *Biochem. Cell Biol.* 64:215-222.
- Uys, W., Hecht, T. and Walters, M. 1987. Changes in digestive enzyme activities of *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae) after feeding. *Aquaculture*. 63: 243-250.
- Vo, V.T., Kusakabe, I. and Murakami, K. 1983. Purification and some properties two aminopeptidases from sardines. *Agric. Biol. Chem.* 47 (11): 2453-2459.
- Walter, H.E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrate. In "Methods of Enzymatic Analysis." pp. 270-275. H.U. Bergmeyer (Ed.) Verlag Chemie. Weinheim. New York and London.

95年01月10日投稿

95年03月03日接受