

# 果聚糖在水產養殖的應用

levan

黃美瑩、張志堅、黃詩涵、林金榮

水產試驗所水產養殖組

## 前言

果聚糖 (levan) 是一種果糖的聚合物 (fructan)，許多植物組織中有小分子量的果聚糖 (分子量通常  $< 5000$  Da) 存在，此外，已知有多種微生物可以產生果聚糖 (Han, 1989)。果聚糖具有低黏度高水溶性之特性，在食物加工上可作為乳化劑、成型劑、穩定劑、增稠劑及風味攜帶劑等 (Han, 1990; Jang et al., 2001; Leibovici and Stark, 1985)；且可做為血漿填充劑 (分子量為  $25 - 250$  KDa 者) (Han, 1990)；此外，亦具有抗腫瘤 (黃等, 2010; Calazans et al., 1997; Yoon et al., 2004)、降低膽固醇 (Kang et al., 2006; No et al., 2007) 及提升免疫能力 (Calazans et al., 2000; Liu et al., 2010; Yoo et al., 2004) 等保健功效。近年來已有學者將果聚糖應用在水產養殖研究上，茲分述如下。

## 提升魚類免疫調節功能

### 一、增加血液中白血球數量

Gupta et al. (2008) 於 *Labeo rohita* 稚魚飼料中添加 0, 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.0% 及 1.25% 的果聚糖，投餵 60 天後發現，餵食含

有 1% 以上果聚糖飼料的魚隻，總白血球數量隨著果聚糖含量的增加明顯上升，為控制組的 1.11—1.41 倍，其結果與 Selvaraj et al. (2005) 報導，鯉魚攝食  $\beta$ -葡聚糖後，血液中白血球數量增多之現象一致。

### 二、提高血液中總紅血球及血紅素含量

Rairakhwada et al. (2007) 研究發現，餵食添加 0.5% 果聚糖飼料組的 *Cyprinus carpio*，其血液中總紅血球及血紅素含量明顯較高 ( $p < 0.05$ )。Gupta et al. (2008) 指出，餵食含果聚糖 (0.25—1.25%) 飼料的各組 *L. rohita*，血液中總紅血球數量隨著果聚糖含量之增加有升高之趨勢；而 1% 以上果聚糖組的魚隻的血紅素含量亦隨著果聚糖含量的增加明顯上升，為控制組的 1.53—1.69 倍。紅血球是血液中數量最多的一種血細胞，同時也是脊椎動物體內通過血液將氧氣從鰓運送到身體各個組織的最主要的媒介。紅血球的主要功能分子是血紅蛋白 (紅血球的 90% 由血紅蛋白組成)。血紅蛋白是一種含有血紅素的蛋白質分子，它可以在鰓部與氧氣分子結合，然後在身體的組織中將結合的氧氣分子釋放。血紅素 (Heme) 是一種含鐵的輔因子，鐵原子位於被稱為卟啉 (porphyrin) 的大雜環化合

物中心；所以當血液中總紅血球及血紅素含量較高時，表示魚隻體內運送氧氣功能較強，健康情形佳。紅血球及血紅素含量於添加果聚醣組明顯升高，顯示魚隻的健康狀況較控制組好。

### 三、增加血清之總蛋白及球蛋白含量

Rairakhwada et al. (2007) 研究顯示，攝食添加 0.5% 果聚醣組的 *C. carpio*，其血清之總蛋白及球蛋白含量分別為控制組的 1.3 及 1.37 倍，可能是果聚醣可增進血液學免疫參數 (hemato-immunological parameters)。Gupta et al. (2008) 指出，餵食含有 1% 以上果聚醣組 *L. rohita*，血清中總蛋白及球蛋白含量隨著果聚醣含量的增加明顯上升，分別為控制組的 1.02—1.11 及 1.43—1.44 倍。此現象與 Siwicki et al. (1994) 在飼料中添加葡聚醣導致虹鱔血清中總蛋白含量上升之結果類似。又，Gupta et al. (2008) 亦發現，飼料中添加 1.25% 果聚醣之 *L. rohita*，血清中白蛋白/球蛋白的比例較控制組低 2.6 倍。白蛋白/球蛋白的比例為非特异性防禦反應體液成分的重要評估項目，白蛋白/球蛋白的比例下降可能是因為球蛋白增加，而球蛋白在魚類防禦機制上扮演很重要角色 (Misra et al., 2006)。Popov and Popova (1997) 認為，生物攝食連續重複的次單元分子，像葡聚醣及果聚醣等，可加速免疫球蛋白對於細菌及病毒的聚集，然後再由吞噬細胞去除它們。

而近期研究顯示，果聚醣具有刺激老鼠脾臟淋巴球之效果，且與果聚醣施用之劑量成正相關 (Liu et al., 2010)，淋巴球增生為細胞及體液免疫反應活化的決定性因子，因此，果聚醣與提升免疫反應有密切關係。

### 四、加強呼吸爆裂活性 (respiratory burst activity, RBA)

呼吸爆裂活性的增加與吞噬細胞 (phagocytes) 殺死病原菌的能力成正相關。Rairakhwada et al. (2007) 與 Gupta et al. (2008) 研究中有關吞噬細胞的呼吸爆裂活性之測定，係利用白血球胞內超氧基之產生，將硝基藍四氮唑 (nitroblue tetrazolium, NBT) 還原之特性。前者研究結果顯示，攝食添加 0.5% 果聚醣飼料的魚隻，血液中吞噬細胞的呼吸爆裂活性最高，其 NBT 值為 0.6，明顯高於添加 0.1% (0.32)、0.2% (0.41)、1.0% (0.38) 及對照組 (0.31)。Gupta et al. (2008) 之研究也顯示，*L. rohita* 血液中呼吸爆裂活性亦隨著飼料中果聚醣含量的增加而升高，其中添加 1.25% 果聚醣組較控制組高 2.20 倍。這些研究之 NBT 值均較鯉魚投餵酵母菌的 RNA 及草蝦餵食  $\beta$ -葡聚醣的數值為高 (Sakai et al., 2001; Cheng et al., 2003)，顯示果聚醣所誘發出的呼吸爆裂活性較酵母菌的 RNA 及  $\beta$ -葡聚醣為強。果聚醣的作用方式可能是類似葡聚醣，利用吞噬細胞產生氧化及非氧化基刺激非特异性免疫作用。

### 五、增加血清中溶菌酶 (lysozyme) 之活性

血清中溶菌酶之數據顯示，餵食含有 0.5% 果聚醣組的 *C. carpio*，其血清中的溶菌酶活性最高，溶菌酶含量為控制組的 1.56 倍 (Rairakhwada et al., 2007)。Gupta et al. (2008) 研究也顯示，*L. rohita* 血清中溶菌酶之活性亦隨著飼料中果聚醣含量的增加而升高，其中添加 1.25% 果聚醣組較控制組高 1.64 倍。Misra et al. (2006) 指出，增長餵食  $\beta$ -葡聚醣

的時間可增加 *L. rohita* 血清之溶菌酶、補體及其他蛋白質的含量，增加溶菌酶與增強吞噬活性成正相關。鯉魚體內經由  $\beta$ -葡聚醣活化的吞噬細胞也誘發其他抗微生物之機制，例如：放出溶菌酶、補體及活性氧之產生 (Kwak et al., 2003)。

## 六、減輕魚隻內臟受病原菌攻擊後受傷之程度

*L. rohita* 稚魚以不同含量的果聚醣，0.25%、0.5%、0.75%、1.0%及 1.25%及未添加果聚醣之控制組等的飼養試驗 (60 天) 結束時，以病原菌 (*Aeromonas hydrophila*) 進行攻擊後，病理組織切片資料顯示，控制組之肝細胞出現嚴重水腫且白血球浸潤，腎臟出血，添加 0.25%果聚醣組的情形類似控制組，添加 0.5—1.0%果聚醣組其白血球有中程度浸潤，而添加 1.25%果聚醣組肝細胞的白血球有輕微浸潤現象，但腎臟只有腎小管稍有變化 (Gupta et al., 2008)。

## 七、提高魚隻抵抗病原菌之能力

有關以病原菌 (*A. hydrophila*) 進行攻擊已飼養 75 天含不同量果聚醣試驗之 *C. carpio* 方面，飼料中添加 0.5%果聚醣組明顯提升鯉魚對 *A. hydrophila* 病原菌之抵抗能力，其活存率為 100%，其餘依序為添加 0.2%果聚醣組 (83.33%) 及 1.0%果聚醣組 (66.67%) ( $p < 0.05$ ) (Rairakhwada et al., 2007)。*L. rohita* 稚魚飼食不同量的果聚醣 60 天後，以病原菌 (*A. hydrophila*) 進行攻擊後發現，飼食含 1.25% 果聚醣組的活存率最高 (60.4%)，次為添加 1.0% 果聚醣組 (47.2%)，添加 0.25% 及 0.5% 果聚醣組均為 20.0%，而控制組之活存率最低 (0%)。

## 增強魚隻高溫環境之耐受情形

Gupta et al. (2010) 將果聚醣添加 0% (控制組)、0.25%、0.5%、0.75%、1.0%及 1.25% 於 *L. rohita* 稚魚飼料中飼食 60 天 (26°C) 後，探討魚隻對於較高溫環境之耐受情形。試驗設計方面，將魚隻原來飼養的水溫 (26°C) 加溫，以每分鐘增加 0.3°C 的速度，直到魚隻失去平衡之溫度為最高危急溫度 (critical thermal maxima)，持續再加溫到魚隻鰓蓋無法動作之溫度為最高熱致死溫度 (lethal thermal maxima)；在次致死熱休克試驗方面，將魚隻置於 35°C 6 小時後，測定肝臟及肌肉中熱休克蛋白質 (heat shock protein, HSP) 之含量。

結果顯示，控制組、添加 0.25%、0.5%、0.75%、1.0%及 1.25%果聚醣組之最高危急溫度分別為 40.03、40.73、40.77、41.07、41.78 及 41.83°C，隨著果聚醣添加量之增加，魚隻失去平衡之溫度上升，其中尤其以添加 1.0% 及 1.25%果聚醣組的魚隻耐較高溫的能力提升最明顯 ( $p < 0.05$ )。而控制組、添加 0.25%、0.5%、0.75%、1.0%及 1.25%果聚醣組之最高熱致死溫度分別為 41.63、42.10、41.87、42.07、42.80 及 42.87°C，亦隨著果聚醣添加量之增加而上升，其中以添加 1.0%及 1.25%組與控制組有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

有關次致死熱休克方面，魚隻以 35°C 處理 6 小時後，添加 1.0%及 1.25%果聚醣組魚隻肝臟中 HSP70 之濃度明顯較控制組高 ( $p < 0.05$ )，分別為控制組的 1.41 及 1.50 倍，而肌肉中 HSP70 之濃度在 1.25%果聚醣組為控制組的 1.60 倍，也具有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



HSPs 在真核及原核生物是很重要的一群蛋白質，在一般生理狀況下正常表現，但在有壓力時（如熱休克）受誘發的 HSPs 會大量表現，因為壓力狀況下細胞內蛋白質易受損，而 HSP70 為主要的感知 (key sensor) 蛋白，它會導致更多的 HSP70 的生產 (Morimoto et al., 1996; Iwama et al., 1998)，HSP70 與其它 HSPs 可以修補折疊有誤之蛋白質，因此在加溫處理或饑餓之魚隻體內，其 HSP70 含量會上升 (Das et al., 2006; Yengkokpam et al., 2008)，作者認為增加 HSP70 的表現可能是魚隻為克服高溫壓力或饑餓的適當對策。

Gupta et al. (2010) 認為，魚隻飼料中添加 1.25%果聚醣可以誘導肝及肌肉中產生更多的 HSP70，以保護功能性蛋白質，使其更穩定，因此導致該組魚隻高溫耐受性上升。前人研究顯示，飼料中添加乳鐵蛋白 (lactoferrin) 可增加日本比目魚 (Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*) 於連續高溫及點帶石斑 (spotted grouper, *Epinephelus coioides*) 於低鹽度時 HSP70 的合成量 (Yokoyama et al., 2005, 2006)。β-glucan 可以增加海鱸 (sea bass, *Dicentrarchus labrax*) 鰓及肝組織的 HSP70 的表現 (Bagni et al., 2005)，這些報告認為飼食免疫刺激物有助於魚隻在壓力狀況下 HSP 的產生，且更進一步指出，提升 HSP 的含量有助於刺激吞噬細胞的作用。作者先前之研究 (Gupta et al., 2008) 顯示，*L. rohita* Hamilton 飼料含有 1.25%果聚醣之飼料者，其血液中總白血球數量及呼吸爆裂活性最高，因此作者認為 *L. rohita* 高溫耐受性增強可能是 HSP 刺激非特異性免疫機制所造成，又，Sung et al. (2008) 也發現，

次致死熱休克不僅會提升 HSP70 於豐年蝦體內之累積量，也會提高對熱致死休克之抵抗力。

## 結語

*C. carpio* 及 *L. rohita* 分別攝食含 0.5%及 1.25%果聚醣 75 與 60 天後，魚隻血液中之總紅血球數、血紅素含量、血清總蛋白、球蛋白含量、溶菌酶及呼吸爆裂活性均明顯提高，以病原菌 (*A. hydrophila*) 進行攻擊後，亦以該二組之活存率最高，可見適量果聚醣的添加顯著增加魚隻非特異性免疫功能，又，*L. rohita* Hamilton 飼料中添加 1.25%果聚醣亦有助於保護魚隻抵抗較高溫的不良環境；因此，有關果聚醣應用於水產養殖之潛力值得關注。

### 主要參考文獻：

1. Gupta, S. K., A. K. Pal, N. P. Sahu, R. Dalvi, V. Kumar and S. C. Mukherjee (2008) Microbial levan in the diet of *Labeo rohita* Hamilton juveniles: effect on non-specific immunity and histopathological changes after challenge with *Aeromonas hydrophila*. J. Fish Dis., 31: 649-657.
2. Gupta, S. K., A. K. Pal, N. P. Sahu, R. S. Dalvi, M. S. Akhtar, A. K. Jha and K. Baruah (2010) Dietary microbial levan enhances tolerance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles to thermal stress. Aquaculture, 306: 398-402.
3. Rairakhwada, D., A. K. Pal, Z. P. Bhathena, N. P. Sahu, A. Jha and S. C. Mukherjee (2007) Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. Fish Shellfish Immunol., 22: 477-486.