

張正芳^{1,3}，蘇茂森¹，陳宏遠³，廖一久²

¹ 台灣省水產試驗所 東港分所

² 台灣省水產試驗所

³ 國立中山大學 海洋生物研究所

(1996年6月27日接受)



由 *Schizophyllum commune* 萃取之多醣類 Beta-1,3-glucan 與多聚磷酸態維生素 C (Polyphosphorylated L-ascorbic Acid) 對強化草蝦抵抗弧菌與受傷組織復原能力之研究

摘要

本研究針對多醣類 (Beta-1,3-glucan from *Schizophyllum commune*, VST) 與多聚磷酸態維生素 C (Polyphosphorylated L-ascorbic acid, PAA)，以個別或混合方式添加於草蝦飼料中，對強化草蝦抵抗弧菌與受傷組織之復原能力的影響加以探討。含 PAA 0, 0.2, 1.0 g/kg diet 與 PAA 0.2 g/kg + VST 2.0 g/kg diet 及 VST 2.0 g/kg diet 等五種人工飼料，餵飼體重 8.2 ± 1.5 g 之草蝦 30 天。第 10 與 20 天時，每組各取 35 尾，以 *Vibrio damsela* 進行感染試驗；第 30 天，每組各取 24 尾進行割傷試驗，結果顯示，第 10 天時，只有添加 VST 之兩組，在試驗結束時之平均存活率分別為 25.0 與 27.38%，有較顯著之抗菌力 ($P < 0.0001$)。第 20 天時，以添加 VST 2.0 g/kg diet + PAA 0.2 g/kg diet 組之存活率 60.0% 為最高 ($P < 0.001$)。草蝦割傷組織之復原能力，以添加 PAA 1.0 g/kg diet 組為最快，而 VST 對草蝦受傷後之組織復原能力幫助不大。

關鍵詞：多醣類，多聚磷酸態維生素 C，草蝦

台灣的草蝦 *Penaeus monodon* 養殖，自 1988 年遭受草蝦桿狀病毒 (MBV) 與弧菌的嚴重感染發生大量死亡以來，產量即由 95,000 公噸大幅滑落，一度降至 9,000 公噸。雖然在 1991 年逐漸回升到 10,000 公噸以上，但自 1992 年起，又因白斑桿狀病毒 (WSBV) 與海水中的病原性弧菌之感染，又造成養殖草蝦大量死亡，而且本省其它養殖蝦種，如斑節蝦及紅尾蝦也無法倖免。因此，為克服養殖蝦類遭受病原的侵襲，一則必需設法維持良好的養殖環境以抑制養殖池中病原的滋生外，另則必需強化蝦體對病原的抵抗力。近年來，有不少的研究報告指出，魚蝦類餵予免疫賦活物質（例如多醣類）可增強其抗病性。由 *Schizophyllum commune* 萃取之 Schizophyllan 為多醣類的一種，根據研究報告⁽¹⁻⁴⁾指出，針對鯉魚、鰱魚、斑節蝦投予 Schizophyllan，

可增強其對細菌性疾病的抵抗力。

維生素 C (L-ascorbic acid, LAA) 之最重要生理功能參與組成膠原 (Collagen) 先驅物質的合成，對於組織受傷後之修補助益很大。餵飼足量的維生素 C 對 *Penaeus californiensis* 與 *P. stylirostris* 傷口之癒合有很大的幫助，同時，可防止蝦殼、蝦體腹部、鰓產生黑色素化病變，即所謂的黑死病的發生⁽⁵⁾。又，食用多量的維生素 C 能增加魚類對細菌之抵抗力與魚體內抗體的形成⁽⁶⁻⁸⁾。

台灣的草蝦養殖係採用高密度集約方式，所以草蝦賴以成長之營養，完全仰賴人工配合飼料提供。一般而言，飼料在加工混合、擠壓、運送及貯藏過程中，維生素 C 極易氧化或與其他物質結合⁽⁹⁻¹¹⁾，因而降低了飼料中的含量，導致草蝦無法攝取足量之維生素 C，以致影響其成長及許多生理功能無法進行順暢，而易罹患疾病。因此，許多關於包覆態

張正芳，蘇茂森，陳宏遠，廖一久 (1996) 由 *Schizophyllum commune* 萃取之多醣類 Beta-1,3-glucan 與多聚磷酸態維生素 C (Polyphosphorylated L-ascorbic acid) 對強化草蝦抵抗弧菌與受傷組織復原能力之研究. 水產研究, 4(1): 43-54.

(Coated) 與複合型態維生素 C 的研究與發展乃因應而生。Shigueno and Itoh⁽¹²⁾ 用 Mg-L-ascorbyl-2-phosphate 取代原來常用於斑節蝦人工飼料中之維生素 C (LAA) 之結果發現，除在飼料的配製、貯藏、浸泡過程安定外，只需 LAA 的 1/10 添加量，就能維持良好的成長並可避免黑死病。另外，在草蝦養殖過程中，常因為脫殼不完全或脫殼時之意外碰撞或池蝦相互咬傷而產生之傷口，在維生素 C 攝取量不足的情形下，受傷組織不易復原，而且容易遭受細菌的二度感染，嚴重時會造成池蝦之死亡。本研究擬以多醣類 (Beta-1,3-glucan from *Schizophyllum commune*, VST) 與多聚磷酸態維生素 C (Polyphosphorylated L-ascorbic acid, PAA)，以個別或混合方式添加於草蝦飼料中，以探討草蝦攝取後，對弧菌之抵抗力與受傷組織復原能力的影響，期能提供且能提高草蝦養殖活存率之方法。

材料與方法

一、材料

(一) 供試添加物：多醣類 (Beta-1,3-glucan from *Schizophyllum commune*, VST)，日本台糖株式會社產品。多聚磷酸態維生素 C (Polyphosphorylated L-ascorbic acid, PAA)，羅仕 (Hoffmann La Roche) 公司製造，純度為15%。

(二) 供試菌株：*Vibrio damsela* (No: 12906)，購自臺灣食品工業研究所菌種保存中心。

(三) 供試草蝦：本所東港分所自行人工繁殖之草蝦，養成至體重 8.2 ± 1.5 g。

(四) 供試飼育水：鹽度 30.0 ± 1.0 ppt，pH 8.0 ± 0.5 ，水溫保持 29 ± 1 °C。

(五) 供試容器：500 l 之玻璃纖維 (FRP) 桶。

(六) 供試人工飼料：根據美國國家研究委員會 (National Research Council, 1982) 建議的對蝦類飼料配方為基礎，再經本所東港分所自行研發之配方 (Table 1)，製成粒狀人工飼料，做為對照組飼料。另外，以同樣配方去除一般型態維生素 C 後，再添加不同濃度之 PAA 0.2 g/kg diet、PAA 1.0 g/kg diet 與 PAA 0.2 g/kg + VST 2.0 g/kg diet 及 VST 2.0 g/kg diet 共五組，製成粒狀人工飼料，做為試驗組飼料。

Table 1. The basal diet composition.

Ingredients	g/kg
Fish meal	300
Soybean meal	100
Squid soluble	100
Squid oil	20
Wheat flour	250
Shrimp shell meal	150
Vitamin mixture ^a	12
Mineral mixture ^b	10
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	20
Gluten	20
Cellulose	18

^a: In mg/100g of dry diet: p-aminobenzoic acid, 20; biotin, 0.3; inositol, 200; Ca-pantothenate, 15; nicotinic, 40; pyridoxine-HCl, 3; riboflavin, 10; thiamin-HCl, 3; menadione, 2; β-carotene, 2; α-tocopherol, 20; califerol, 0.3; folic acid, 0.75; choline chloride, 400; cyanocobalamine, 0.02; ascorbic acid, 500.

^b: In mg/100g of dry diet: K₂HPO₄, 100; NaH₂PO₄·H₂O, 215; Ca (H₂PO₄)₂·H₂O, 265; CaCO₃, 105; Ca-lactate, 165; KCl, 28; MgSO₄·7H₂O, 100; Fe-citrate, 12; AlCl₃·6H₂O, 0.24; ZnSO₄·7H₂O, 4.76; MnSO₄·4-6H₂O, 1.07; CuCl₂, 0.15; KI, 0.23; CoCl₂·6H₂O, 1.4.

二、方法

(一) 菌株之活化

菌株購回後，以 TSB (Tryptic Soy Broth) + 1% NaCl 在 28°C 培養 24 - 48 小時，使之活化。經注射菌液入草蝦體內，在該蝦剛死亡時立即由其血淋巴液與淋巴結，分離出菌株，再經反覆培養、感染數次，使菌株之毒性增強後，進行各項感染試驗。

(二) 供試菌液之配製

菌株由 TSB + 1% NaCl 轉接至 TSA (Tryptic Soy Agar) + 1% NaCl 培養 24 小時後，以白金耳取出大量菌落，用已滅菌之生理食鹽水稀釋成不同濃度，注射未經試驗之同批草蝦各 5 尾，每尾注射 0.1 cc 並配合平板生菌計數法，計算各濃度之生菌數，求出 LD50 之菌量，作為正式感染試驗注射量之依據。

(三) 感染試驗

將供試草蝦，隨機分為五組，每組三重覆，放入 15 個圓形 2.5 噸的玻璃纖維桶中，每桶 140 尾。五組草蝦分別餵飼，未添加及含不同濃度之 PAA 與 VST 人工飼料，在第 10 與第 20 天時，各進行一次感染試驗。

每次感染試驗時，15 個桶分別隨機採取 70 尾蝦，其中 35 尾注射同一濃度之菌液 0.1 cc 為感染組。另外 35 尾作為空白組，注射生理食鹽水 0.1 cc。注射部位在腹側第四、五節間之肌肉。注射後，以手指輕按注射部位，防止菌液流出。

注射後之草蝦，各組分別放入長方形 0.5 噸的玻璃纖維桶中，內含 300 l 經沙層過濾之海水。每隔 8 - 12 小時觀察一次，每日依其活動情形變化投餌量，並更換部份飼育水。當蝦死亡時，立即取出淋巴結，先經 70% 酒精浸洗一分鐘，剪碎後塗抹於培養基上，來分離判斷是否為原來注射之菌株。觀察 8 - 10 天後，將未死亡及空白組之草蝦，隨機取 2 - 3 尾，分別取出淋巴結做細菌培養，確定原先注射之細菌是否仍存在蝦體內，以判斷活存蝦之健康情況。最後，以變方分析 (Analysis of variance) 與特奇公正顯著差異 (Tukey's honest significant difference, HSD) 分析法，統計分析全部處理組及各組間是否有明顯差異。

(四) 割傷復原試驗

將供試草蝦隨機分為四組，每組三重覆，放入 12

個長方形 0.5 噸的玻璃纖維桶中，每桶 24 尾。四組草蝦分別餵飼，未添加及含不同濃度之 PAA 與 VST 人工飼料，飼育 30 天後，進行割傷試驗。

割傷試驗時，四組之每桶供試蝦均由第二腹節側面以解剖刀，劃一道約 1 cm 長，0.3 cm 深之傷口。割傷後之第 1、2、4、8、16 與 24 天，每桶各取 3 尾供試蝦進行傷口部位採樣，經 Davidson's 固定液固定，再經酒精脫水、石蠟包埋、切片，組織以 H-E 染色觀察，比較各組草蝦傷口恢復情形。

結果

一、感染試驗

五組草蝦餵飼未添加及含不同濃度之 PAA 與 VST 人工飼料。而在第 10 天時，先以 6×10^6 菌數/每克蝦體重進行注射感染，其結果如 Table 2 所示，未添加組在注射後 96 小時，供試蝦全部死亡，而添加 PAA 0.2 與 1.0 g/kg diet 之兩組，在試驗結束時之平均活存率分別為 5.95 與 7.14%，其與未添加組一樣均無抗菌效果 ($P > 0.05$)。而添加 VST 之兩組，在試驗結束時之平均活存率分別為 25.0 與 27.38%，具有顯著之抗菌力 ($P < 0.0001$)。第 20 天時，以 1×10^7 菌數/每克蝦體重進行注射感染，其結果如 Table 3 所示，試驗結束時之平均活存率以添加 VST 2.0 g/kg + PAA 0.2 g/kg diet 組之 60% 為最高，而且比其餘四組有較高之抗菌力 ($P < 0.001$)。添加 VST 2.0 g/kg 組之活存率 37.33% 次之，但與添加 PAA 1.0 g/kg diet 二組間之抗菌力則無顯著差別 ($P > 0.05$)。添加 PAA 1.0 g/kg diet 組之活存率為 34.67%，與對照組比較，具有顯著之抗菌力 ($P < 0.05$)。試驗期間，各組注射生理食鹽水之空白組並無死亡情形。由兩次感染試驗之結果判斷，餵飼添加 VST 組在較短之時間內，即能增強草蝦之免疫系統，加強其抗菌能力。至於 PAA 則必經過較長之時間後，才能增強其免疫系統之功效。另外，添加 PAA 1.0 g/kg diet 組與添加 VST 2.0 g/kg diet 之抗菌能力相似，但是，二者之共同添加組卻有更好之抗菌力，顯示其對增強草蝦之免疫系統具有相乘之效果。

二、割傷復原試驗

四組草蝦餵飼未添加及含不同濃度之 PAA 與

VST 人工飼料，而在第 30 天時，進行割傷試驗。經定期採樣製作組織切片及觀察，其結果如 Table 4 所示。草蝦割傷組織之復原能力，以添加 PAA 1.0 g/kg diet 組為最快 (Fig. 1)。割傷後第 4 天，割傷處之肌肉組織即開始進行修補癒合 (Fig. 2)，第 16 天，試驗蝦之割傷部位已完全復原 (Fig. 3)，而且割傷部位完全無痕跡存在。而添加 PAA 0.2 g/kg diet 組，雖割傷後第 4 天，其傷處之肌肉組織也進行修補癒合，但復原能力較為遲緩，到第 24 天左

右才完全復原，不過割傷部位，尚可見其痕跡 (Fig. 4)。添加 VST 2.0 g/kg diet 組，雖割傷處之肌肉組織亦進行修補但非常慢，第 24 天，尚未完全復原 (Fig. 5)。對照組缺乏維生素 C，其割傷處之肌肉組織，在試驗終結前，均未見有修補之現象 (Fig. 6)，部份供試蝦之肌肉組織呈現潰爛與腫脹。由此可知，VST 對草蝦受傷組織之復原能力之幫助不大。但是多量之多聚磷酸態維生素 C，卻對草蝦受傷後之組織復原能力有很大的幫助。

Table 2. The survival rates of *Penaeus monodon* (8.2±1.5 g) challenged with *Vibrio damsela* (6×10^6 cells/g bw) after fed artificial diets containing graded levels of PAA and VST for 10 days.

Diet group	Group	Survival rate %						Mean survival rate*%
		24	48	96	134	182	240	
Control	A1	39.3	21.4	0	0	0	0	0 ^a
	A2	53.6	10.7	7.1	0	0	0	
	A3	60.7	14.3	0	0	0	0	
PAA 0.2 g/kg diet	B1	42.9	10.7	3.6	3.6	3.6	3.57	5.95 ^a
	B2	67.9	35.7	17.9	10.7	10.7	10.7	
	B3	75	21.4	14.3	10.7	3.6	3.6	
PAA 1.0 g/kg diet	C1	75	35.7	17.9	10.7	7.1	7.1	7.14 ^a
	C2	64.3	28.6	17.9	10.7	10.7	10.7	
	C3	57.1	14.3	7.1	7.1	3.6	3.6	
VST 2.0 g/kg diet	D1	75	39.3	28.6	25	25	25	25 ^b
	D2	78.6	35.7	32.1	32.1	32.1	32.1	
	D3	67.9	28.6	17.9	17.9	17.9	17.9	
VST 2.0 g/kg + PAA 0.2 g/kg diet	E1	64.5	39.3	32.1	28.6	28.6	28.6	27.38 ^b
	E2	85.7	53.6	35.7	32.1	32.1	32.1	
	E3	82.1	42.9	25	21.4	21.4	21.4	

*: Figures in the same column having different superscript are significantly different. ($P < 0.0001$)

Table 3. The survival rates of *Penaeus monodon* (8.2±1.5 g) challenged with *Vibrio damsela* (1×10^7 cells/g bw) after fed artificial diets containing graded levels of PAA and VST for 20 days.

Diet group	Group	Survival rate %						Mean survival rate*%
		24	48	96	134	182	240	
Control	A1	68	40	16	12	12	12	10.67 ^a
	A2	60	48	20	16	12	12	
	A3	76	24	24	12	8	8	
PAA 0.2 g/kg diet	B1	80	56	24	20	20	20	22.67 ^b
	B2	92	60	32	28	28	28	
	B3	88	68	36	24	20	20	
PAA 1.0 g/kg diet	C1	88	56	40	36	36	36	34.67 ^c
	C2	96	68	56	32	28	28	
	C3	92	76	68	48	40	40	
VST 2.0 g/kg diet	D1	96	60	40	36	36	36	37.33 ^c
	D2	96	64	52	44	44	44	
	D3	92	72	48	36	32	32	
VST 2.0 g/kg+	E1	96	80	76	56	56	56	60 ^d
PAA 0.2 g/kg diet	E2	100	80	72	64	64	64	
	E3	92	72	72	60	60	60	

* : Figures in the same column having different superscript are significantly different. (P<0.0001)

Table 4. The wound healing ability of *Penaeus monodon* (8.2±1.5 g) after fed artificial diets containing graded levels of PAA and VST for 30 days.

Diet group	Elapsed time (day)					
	1	2	4	8	16	24
Control	-	-	-	-	-	-
PAA 0.2 g/kg diet	-	-	-+	-+	+ -	+
PAA 1.0 g/kg diet	-	-	-+	+ -	+	+
VST 2.0 g/kg diet	-	-	-	-+	-+	+ -

- : Tissue has not healing yet.

-+ : Part of tissue healed.

+ - : Most part of tissue healed.

+ : Tissue recovered.

討論

許多微生物之細胞壁，如真菌 (Fungi)、酵母菌 (Yeast) 與部分藻類之細胞壁的抽出物—多醣類 (Polysaccharides; beta-glucans, beta-1,3-glucans and beta-1,6-linkage polyglucose) 都能誘發哺乳類、魚類與甲殼類，甚至於植物等非專一性免疫系統產生防禦反應及加強其抗病力⁽²⁾。對於免疫刺激物的研究以 Glucans 為最多，使用後之效果也最佳。在魚類方面，如 Beta-glucans 能激活 Brook trout 的巨噬細胞 (Macrophages)、淋巴球 (Lymphocytes) 和自然殺手細胞 (Natural killer cells) 等的作用，而有效降低受 *Aeromonas salmonicida* 感染引起的死亡率⁽¹³⁾。鯉魚 *Cyprinus carpio* 注射由酵母菌、真菌與其他植物抽出之 Glucan 後，注射 *Edwardsiella tarda* 加以感染，未處理之組，在 3 天內全部死亡，而以

真菌抽出之 Glucan 處理組之活存率則達60%；在甲殼類方面，Glucans 能活化 Horseshoe crab 血球細胞的凝血作用⁽¹⁴⁾及有效增加 Fresh-water crayfish 與 Shore crab 血球細胞的吞嚥能力⁽¹⁵⁾。Itami等⁽¹⁶⁾之研究發現，斑節蝦 *Penaeus japonicus* 投給 Schizophyllan (SPG, a beta-1,3-glucan with a beta-1,6-linked D-glucose residue) 7-10 天後，可增強其對海水弧菌的抵抗力與其血球細胞的吞嚥能力。這與本次試驗比較，雖然研究之蝦種不同，但其結果卻相似。又依據 Song and Hsieh⁽¹⁷⁾ 之研究，草蝦具有原酚氧化酵素激活系統，以免疫刺激物 Beta-glucans等刺激血球細胞後，血球細胞會產生含有類似人類的 Myeloperoxidase (MPO) 的酵素活性，並且會產生殺菌物質 H_2O_2 與 O_2^- 。三種刺激物中以 Beta-glucans 對 H_2O_2 與 O_2^- 之刺激效果最好。因此，在飼料中添加 VST，在短時間內，即能增強草蝦之免疫系統，並可加強其抗菌能力。



Fig. 1. Photomicrograph of a cross section through a wound (✓) in a group of PAA 1.0 g/kg diet 1 day post-wounding.

魚蝦類對維生素 C 之需求，因魚蝦種類、大小、水質環境與魚蝦體的健康狀況而有所不同。在魚類方面，虹鱒維持其正常之成長時需 70 - 100 mg/kg diet，而受傷時，則需 500 mg/kg diet⁽¹⁸⁾，抵抗 *Vibrio anguillarum* 之感染，則需 5 或 10 倍於成長之需求量⁽¹⁹⁾；鯰魚在 29-32°C，維持正常的成長需 30 mg/kg diet，為抵抗細菌感染，則需 150 mg/kg diet⁽²⁰⁾。蝦類方面，草蝦對多聚磷酸態維生素 C 的最適需求量介於 208.95 - 220.24 mg/kg diet 之間⁽²¹⁾，低於對 LAA 之需求量 2000 - 2500 mg/kg diet⁽²²⁾。有關維生素 C 與增強抗菌力間之研究並不多見。本次試驗用來添加之抗菌劑量為草蝦成長需求量之 5 倍，而且在連續投飼 20 天後，草蝦才有抗菌力，其抗菌之生理機制與作用標的尚待進一步之研究。

蝦類受傷後之組織修補過程，先由淋巴球的進入開始，浸潤於受傷組織間→引起聚酯絲狀物 (Polyester thread) 之產生→形成受傷栓 (Wound plug)→Melanization→形成細胞內間質→最後新表皮與外殼生成^(5,23)。依據 Lightner et al.⁽⁵⁾對 *Penaeus californiensis* 與 *P. stylirostris* 割傷組織之復原能力

試驗，以添加足量之維生素 C 組，在割傷第 4 天，淋巴球浸潤組織之比率達最高點；第 11 天受傷栓開始消散；第 14 天後新表皮與外殼生成。而維生素 C 缺乏組，在割傷後第 15 天，受傷栓還未消失，反而出現肉牙腫組織。此項結果與本試驗添加 PAA 1.0 g/kg diet 組之結果類似。Yu et al.⁽²⁴⁾之研究發現，天竺鼠背部經割傷後 4 天，受傷組織比正常組織含有較多之 Dehydroascorbic acid (維生素 C 之氧化型態)。由此可知，受傷後之組織需較多量之維生素 C 幫助組織復原；而 VST 主要在刺激免疫功能發揮作用對受傷後組織，只能增加抵抗侵入外來生物之能力，無法直接作用於幫助組織之復原。本試驗結果顯示，多醣類與多聚磷酸態維生素 C 均能有效的強化草蝦之免疫系統，而且多聚磷酸態維生素 C 對草蝦受傷後之組織復原能力具有很大的幫助。因此，未來對於多醣類與多聚磷酸態維生素 C 應用於草蝦種蝦之培育、蝦苗培養以及大蝦之養成有必要再作進一步之探討，期能培育出抗菌力強之優良種蝦及高品質之無節幼蟲。同時，亦應多方探討添加於養蝦飼料中之最適劑量，藉以提高草蝦對病害之抵抗能力及活存率。

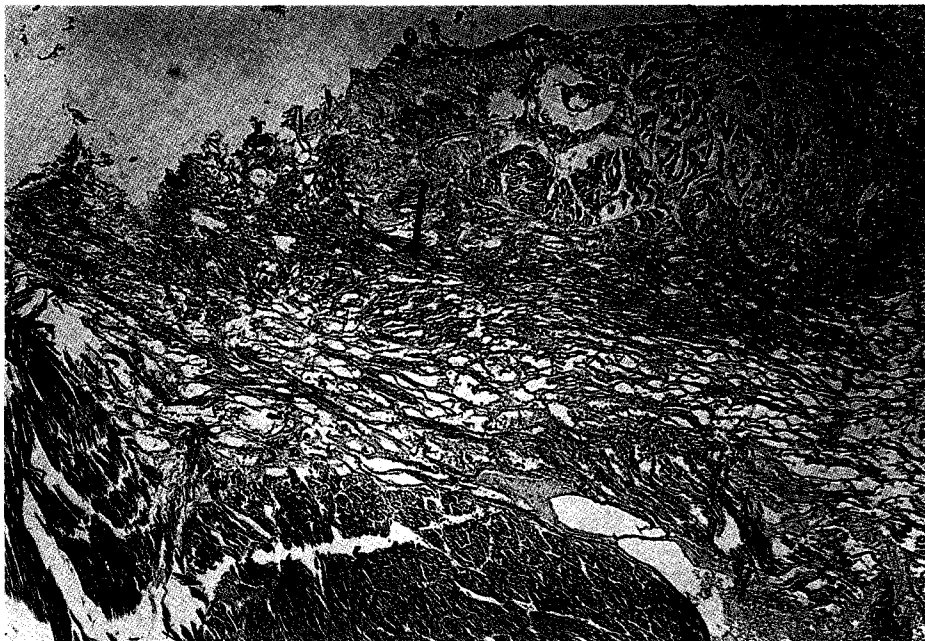


Fig. 2. Photomicrograph of a cross section through a wound in a group of PAA 1.0 g/kg diet 4 days post-wounding. The hemocyte infiltrated to the wound vicinity and the polyester thread and wound plug had been formed (↓).

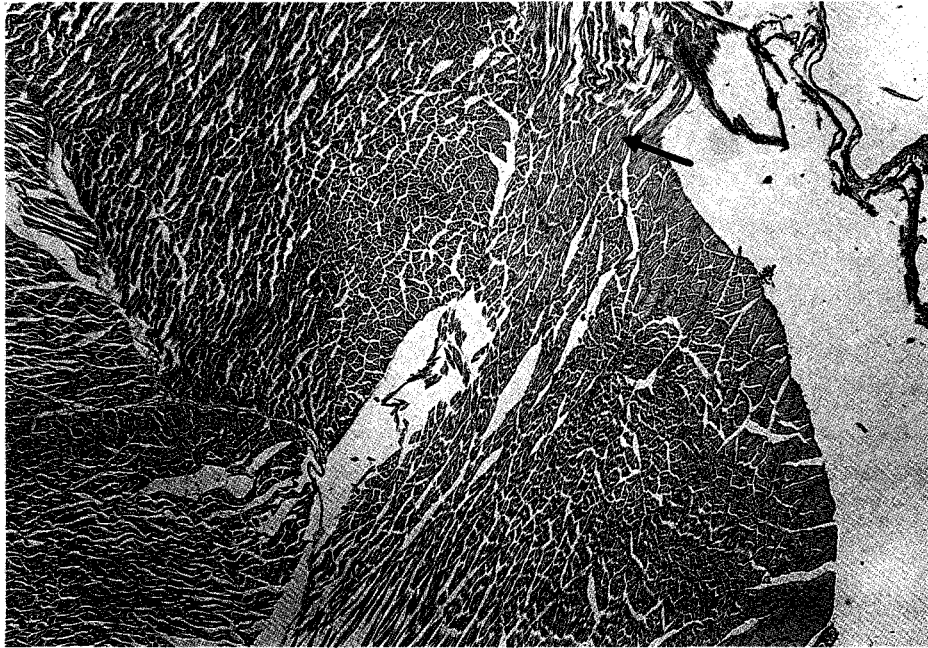


Fig. 3. Photomicrograph of a cross section through a wound in a group of PAA 1.0 g/kg diet 16 days post-wounding. Wound healing (↖) is complete recovery.

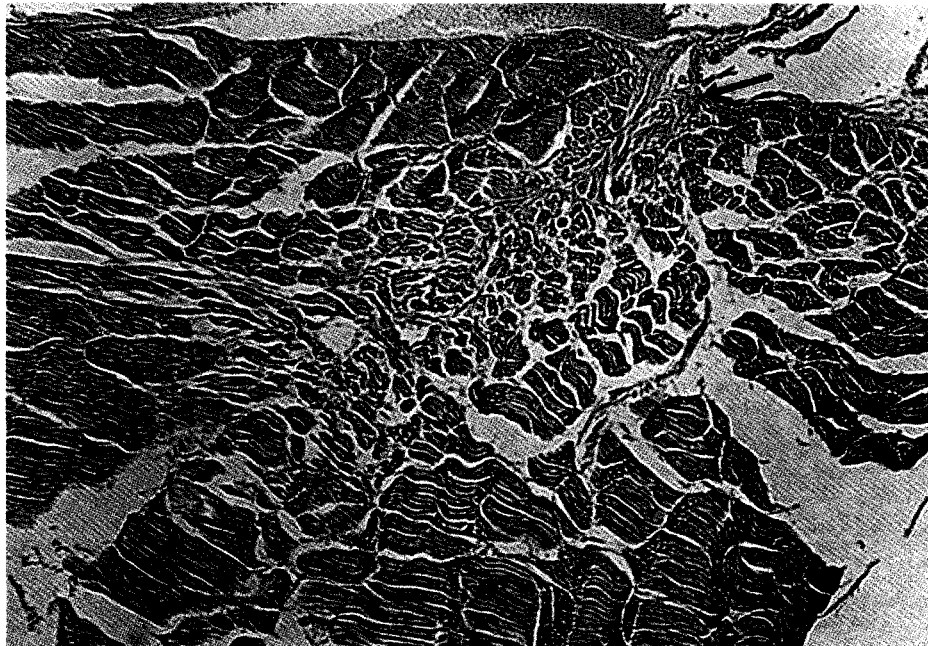


Fig. 4. Photomicrograph of a cross section through a wound in a group of PAA 0.2 g/kg diet 24 days post-wounding. Healing is progressing well but still remains some wound track (↙).

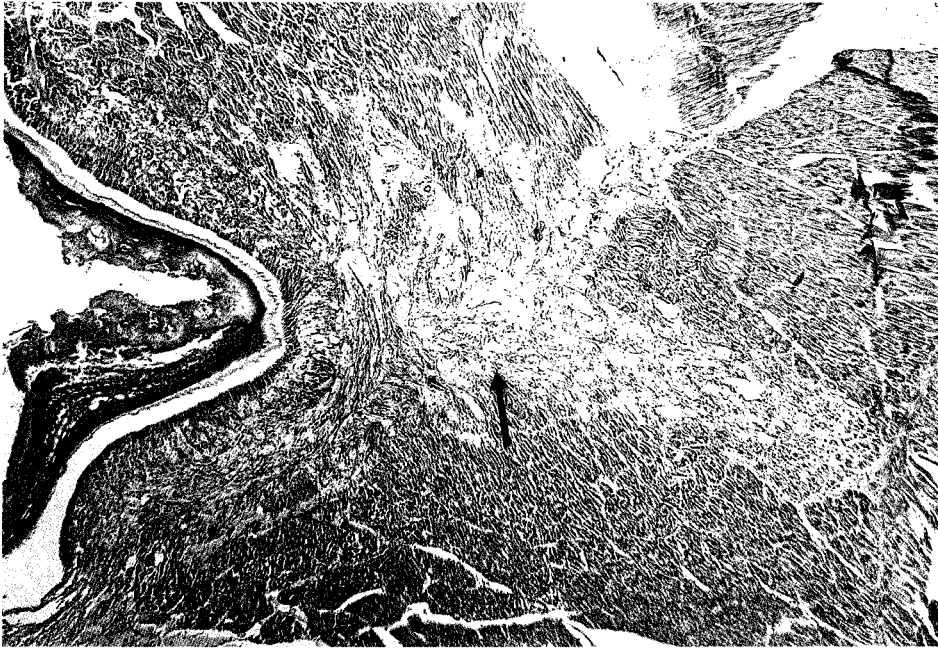


Fig. 5. Photomicrograph of a cross section through a wound in a group of VST 0.2 g/kg diet 24 days post-wounding. The hemocytic wound plug (↑) had essentially dissipated and it is only about 50% complete recovery.

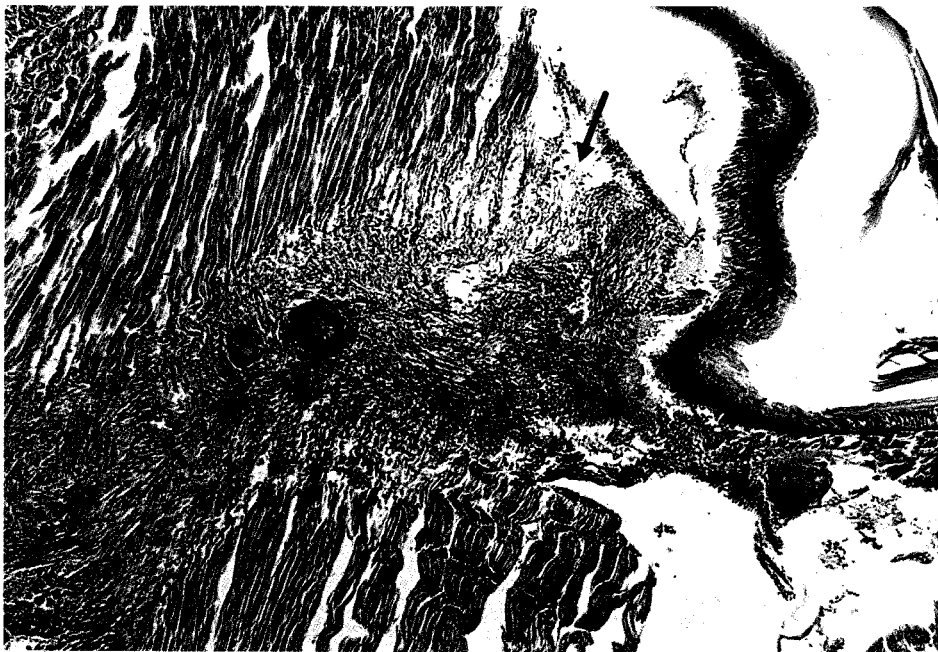


Fig. 6. Photomicrograph of a cross section through a wound in a group of PAA 0 g/kg diet 24 days post-wounding. Hemocyte cell infiltration occupied in the wound vicinity (✓) and composed of granulomatous tissue.

謝辭

感謝日本台糖株式會社提供多醣類 Beta-1,3-glucan 及東港分所許月娥、鄭梅蘭小姐協助切片及感染等工作。最後，本研究係在行政院國家科學委員會補助之專題研究計畫 (NSC85-2321-B-056-005) 項下完成，謹此誌之。

參考文獻

1. Yano, T., R. E. P. Mangindaan and H. Matsuyama (1989) Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection by some β -1,3-glucans. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**(10): 1815-1819.
2. Robertsen, B., G. Rostad, R. Engstad and J. Raa (1990) Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic Salmon, *Salmon salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. fish. Dis.*, **13**: 391-400.
3. Matsuyama, H., R. E. P. Mangindaan and T. Yano (1992) Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture*, **101**: 197-203.
4. Jeney, G. and D. P. Anderson (1993) Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the nonspecific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **116**: 315-329.
5. Lightner, D. L., B. Hunter, P. C. Magarelli Jr. and I. B. Colvin (1979) Ascorbic acid: nutritional requirement and role in wound repair in penaeid shrimp. *Proc. World Maricult. Soc.*, **10**: 513-528.
6. Durve, V. S. and R. T. Lovell (1982) Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **39**(7): 948-951.
7. Liu, P. R., J. A. Plumb, M. Guerin and R. T. Lovell (1989) Effect of megalevels of dietary vitamin C on the immune response of channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds. *Dis. Aquat. Org.*, **7**(3): 191-194.
8. Haride, L. J., T. C. Fletcher and C. J. Secombes (1991) The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, **95**: 201-214.
9. Wanhinger, L. A. (1972) Mathematical model predicts stability of ascorbic acid in food products. *Food Technol.*, **26**: 42-45.
10. Hilton, J. W., C. Y. Cho and S. J. Slinger (1977) Factors affecting the stability of supplemental ascorbic acid in practical trout diets. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **34**: 683-687.
11. Soliman, A. K., K. Jauncey and R. J. Roberts (1987) Stability of L-ascorbic acid (vitamin C) and its forms in fish feeds during processing, storage and leaching. *Aquaculture*, **60**: 73-83.
12. Shigueno, K. and S. Itoh (1988) Use of Mg-L-ascorbic-2-phosphate as a vitamin C source in shrimp diets. *J. World Aquacult. Soc.*, **19**(4): 168-174.
13. Olivier, G., C. A. Eaton and N. Campbell (1986) Interaction between *Aeromonas salmonicida* and peritoneal macrophages of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **12**: 223-234.
14. Ohno, N., Y. Emori and T. Yadomae (1990) Reactivity of *Limulus* amoebocyte lysate towards (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans. *Carbohydr. Res.*, **207**: 311-318.
15. Smith, V. J and K. Soderhall (1983) β -1,3-Glucan activation of crustacean hemocytes in vitro and in vivo. *Biol. Bull.*, **164**: 299-314.
16. Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira, H. Igusa and M. Kondo (1994) Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β -1,3-glucan (Schizophyllan). *In The Third Asian Fisheries Forum*, (L. M. Chou, A. D. Munro, J. J. Lam, T. W. Chen, L. K. K. Cheong, J. K. Ding, K. K. Hooi, H. W. Khoo, V. P. E. Phang, K. F. Shim and C. H. Tan eds.). Asian Fisheries Society, Manila, Philippine, 375-378.
17. Song, Y. L. and Y. T. Hsieh (1994) Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.*, **18**(3): 201-209.
18. Halver, J. E. (1972) The role of ascorbic acid in fish disease and tissue repair. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **38**: 79-92.
19. Navarre, O. and J. E. Halver (1989) Disease resistance

- and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, **79**(1-4): 207-221.
20. Li, Y. and R. T. Lovell (1985) Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *J. Nutr.*, **115**: 123-131.
21. Cheng, H. Y. and C. F. Chang (1994) Quantification of vitamin C requirements for juvenile shrimp (*Penaeus monodon*) using polyphosphorylated L-ascorbic acid. *J. Nutr.*, **124**: 2033-2038.
22. Shiau, S. Y. and F. L. Jan (1992) Ascorbic acid requirement of grass shrimp *Penaeus monodon*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**(2): 363.
23. Hunter, B. (1979) Wound healing in ascorbic acid supplemented and deficient *Penaeus californiensis* and *Penaeus stylirostris*: evidence of ascorbic acid dependent collagen formation. M. S. Thesis, University of Arizona, Tucson.
24. Yu, R., T. Kurata, M. Kim and N. Arakawa (1991) The behavior of L-ascorbic acid in the healing process of dorsal wounds in guinea pigs. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **37**: 207-211.

Cheng-Fang Chang^{1,3}, Mao-Sen Su¹, Houng-Yung Chen³ and I Chiu Liao²

¹ Tungkang Marine Laboratory, Taiwan Fisheries Research Institute, Tungkang 928, Taiwan.

² Taiwan Fisheries Research Institute, Keelung 202, Taiwan.

³ Institute of Marine Biology, National Sun Yat-Sen University, Kaohsiung 804, Taiwan.

(Accepted 27 June 1996)



Vibriosis Resistance and Wound Healing Enhancement of *Penaeus monodon* by Beta-1,3-glucan from *Schizophyllum commune* and Polyphosphorylated L-ascorbic Acid

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the combined effectiveness of beta-1,3-glucan derived from *Schizophyllum commune* (VST) and polyphosphorylated L-ascorbic acid (PAA) in enhancing the vibriosis resistance and wound healing in *Penaeus monodon*. Five groups of *Penaeus monodon* (8.2±1.5 g) were fed purified diets for 30 days, each containing 0, 0.2, 1.0 g/kg PAA diet, 0.2 g/kg PAA + 2.0 g/kg VST diet and VST 2.0 g/kg diet, respectively. Thirty-five individuals from each dietary group were challenged by injection with *Vibrio damsela* at the 10th day and 20th. At the 30th day, a small surgical incision were made in the lateral of the second abdominal segment muscle. The results showed that the vibriosis resistance was enhanced in the two VST groups at the 10th day (survival rate was about 25 %) and the PAA+VST group at the 20th day (survival rate was 60%). The prawns fed diet containing PAA 1.0 g/kg diet showed enhancement in wound healing, but not the other dietary groups.

Keywords: Beta-1,3-glucan, Polyphosphorylated L-ascorbic acid, *Penaeus monodon*