

多醣對海鱸非特異性免疫反應之影響研究

張正芳* · 楊佳宏 · 周瑞良 · 何碧月 · 張賜玲 · 許家惠 · 陳紫嫻

行政院農業委員會水產試驗所東港生技研究中心

摘 要

本研究探討飼料添加多醣 (β -1,3-1,6-glucan from *Schizophyllum commune*) 對海鱸免疫酵素活性之影響。平均體重 50 ~ 80 g 之海鱸投餵含 0.5% 多醣之飼料與不含多醣之飼料 60 天，並於投餵飼料後之第 0、1、3、6、12、20、30、40、50 與 60 天，進行超氧陰離子 (O_2^-)、超氧歧化酶 (SOD)、溶菌酶 (lysozyme) 之測定。結果顯示，海鱸飼料添加多醣類飼料後，試驗魚之超氧陰離子與超氧歧化酶產生量及溶菌酶活性均較未添加組明顯地上升 ($p < 0.001$)，並分別於餵飼後之第 12、20 與 24 天達到最高點；但超氧陰離子與超氧歧化酶之產生量分別於投餵後之第 30、40 天開始降低，溶菌酶活性亦於第 40 天後出現減弱現象，而與未添加組無顯著差別 ($p > 0.05$)。從本研究的結果來看，使用多醣 0.5%，餵食 6 天以上，即可明顯增強海鱸的免疫能力，但長時間連續投餵，反而使海鱸免疫系統的活化力會降低，因此多醣的使用必須配合適當的投餵時間。

關鍵詞: 海鱸、多醣、超氧陰離子、超氧歧化酶、溶菌酶

前 言

台灣目前已確立完全養殖技術之養殖魚種中，海鱸 (*Rachycentron canadum*) 是成長最快速的魚種，養殖一年，平均體重可達六至八公斤，是台灣地區相當具有潛力的海洋箱網養殖魚種。依據行政院農業委員會漁業署 (2005) 之漁業年報，海鱸年產量已達 4,268 ton，主要提供內銷或部分外銷至歐盟、韓國及日本等各地供魚排及生魚片使用，其魚肉富含不飽和脂肪酸，相當受到市場歡迎，具有極高之經濟價值，台灣因產業鏈有良好的分工，在養殖產業上具有競爭優勢。然而，箱網養殖之海鱸常受到細菌性病原菌如發光菌 (*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) 與鏈球菌 (*Streptococcus iniae*) 等感染造成高死亡率 (Liu *et al.*, 2003)，業者一般都會使用化學藥物或抗生素來治療，但又缺乏正確之藥物使用觀念，常造成嚴重的損失。

有不少的研究報告指出，對魚蝦類授予免疫賦活物質可增強其抗病性，如 Sakai (1999) 研究發現免疫賦活劑 (immunostimulant) 如葡聚醣 (glucan)、幾丁質 (chitin)、levamisole、乳鐵蛋白 (lactoferrin) 及營養因子之維他命 C、E 或成長荷爾蒙 (growth hormones) 之使用，能增強魚類之巨噬細胞的活性及抗菌的能力，並刺激殺手細胞、溶菌酶及抗體的產生。另外也有不少的報告研究證實對魚蝦類授予免疫賦活物質可增強其免疫活性 (Li *et al.*, 2003; Misra *et al.*, 2006)，如自 *Schizophyllum commune* 萃取之多醣 (β -1,3-1,6-glucan) 作為免疫賦活劑的相關研究報告也證實口投多醣可增強鯉魚 (*Cyprinus carpio*)、紅魴鰱 (*Seriola dumerili*)、青魴鰱 (*S. quinquerediata*) 及斑節蝦 (*Marsupenaeus japonicus*) 等對細菌性疾病的抵抗力 (Robertson *et al.*, 1990; Yano *et al.*, 1991; Matsuyama *et al.*, 1992; Jeney and Anderson, 1993; Itami *et al.*, 1994)。本中心利用相同之多醣進行研究；在蝦類方面，證實可增強草蝦 (*Penaeus monodon*) 與草蝦苗對弧菌 (*Vibrio damsela*) 與白點桿狀病毒 (WSSV) 感染的抵抗力 (蘇等, 1995; 張等, 1996, 2002; Liao *et al.*, 1996; Chang *et al.*,

*通訊作者 / 屏東縣東港鎮豐漁里 67 號, TEL: (08) 832-4121 轉 272; FAX: (08) 832-0234; E-mail: changch@ms3.hinet.net

1999, 2003)。在魚類方面，添加 0.5% 多醣在飼料中，投餵海鱷 10 天，對發光菌與鏈球菌的感染即有抵抗效果，且不影響其成長 (張等, 2006)。

近年來，疫苗成為疾病防治上最有效的方法，但對於病毒性及海鱷之病原菌感染，仍尚未能研發出有效疫苗，若能了解其體內免疫酵素變化及抗病機轉，利用多醣的添加來強化魚體本身對病原的抵抗力，應是未來發展的方向。自虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*) 頭腎純化出溶菌酶，已證實對七種魚類之革蘭氏陰性病原菌有很強的殺菌效果 (Grind, 1989)，另外餵食含 0.09% β -1,3-glucan 飼料八週後，證實能增強大黃魚 (*yellow croaker*, *Pseudosciaena crocea*) 體內溶菌酶活性、細胞吞噬能力與提高成長率 (Ai *et al.*, 2007)，因此，開發免疫賦活物質，可以補償有關疫苗及化學藥劑使用發展上的限制。

在前階段試驗結果 (張等, 2006)，發現海鱷餵食含多醣 0、0.1、0.2、0.4、0.8 與 1.6% 飼料 10、20、30 與 40 天後，分別用發光菌進行人工感染，其中以餵食含多醣 0.4、0.8 與 1.6% 組之存活率較高。再以多醣添加量為 0、0.5、1.0 與 2.0% 四組飼料餵食海鱷 10、20 與 30 天後，也分別以發光菌及鏈球菌進行人工感染，其中發光菌攻毒試驗結果，以餵食含多醣 0.5% 組存活率較高。而鏈球菌在第 10 天之攻毒試驗結果，也以餵食含多醣組存活率較高，但餵食 20 與 30 天經攻毒試驗後，多醣添加組與未添加組間之存活率無顯著差異。因此本計畫延續上述結果，添加 0.5% 多醣於飼料中，了解海鱷體內免疫酵素變化及抗病機轉，找出口投多醣與強化魚體本身免疫酵素之變化情形，作為養殖時添加劑量與投飼時間之參考，來提高海鱷對病原的抵抗能力，增加箱網養殖存活率。

材料與方法

本試驗之多醣萃取自 *S. commune*，為前日本台糖株式會社產品。對照組飼料依據本中心自行調配之海鱷基礎飼料配方作為對照組飼料，另外，以同樣配方，添加含多醣 0.5% 劑量，製成粗粒狀飼料，做為試驗組飼料，試驗期間一天觀察二次，每日依其活動與攝餌情形調整，投餌量為魚體重之 3~5%。

選取平均體重 50 ~ 80g 之海鱷，分為二組，

分別飼養於 1.8 ton 方形 FRP 桶中各 100 尾，試驗用水之溫度控制在 28 °C，鹽度為 28 ~ 30 psu。A 組連續投飼含多醣之飼料，B 組連續投飼不含多醣之飼料，二組海鱷共蕃養 60 天，並於投飼人工飼料後之 0、1、3、6、12、20、30、40、50 與 60 天，分別採取四尾試驗魚之全血及頭腎，利用梯度離心將頭腎巨噬細胞分離出進行超氧陰離子 (superoxide anion, O_2^-)、超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 與溶菌酶之定量測定。

一、海鱷巨噬細胞產生超氧陰離子之定量分析

參照 Secombes (1990) 之方法修正後實施。取出海鱷頭腎組織置於已加入 1 ml 之 0.9% NaCl 培養皿中水浴，再放在細篩選濾器 (孔徑 100 μ m) 上，以 1 ml 冰冷的 leibovitz's L-15 Medium (L-15) (Gibco-BRL, Rockville, USA) 沖洗，並加以研磨。再以 1 ml 含有抗生素、抗凝血劑與牛血清的 L-15 培養液 (40 IU/ml heparin/EDTA、0.5% FCS 與 100IU/ml penicillin/streptomycin) 清洗篩選濾器三次，收集所有細胞懸浮液，緩慢注入含 percoll (Sigma) 34%/51% (V/V, density: 1.048/1.07) 的玻璃離心管中，離心 30 min (400g、4 °C) 後，抽取位於 34%/51% 界面之巨噬細胞液，置於另一離心管並加入 2 倍體積 L-15 培養液 (含有抗生素、抗凝血劑與牛血清)，即為頭腎巨噬細胞懸浮液。再依據 Song and Hsieh (1994) 方法，加入 96 槽之平底微量滴定盤，每槽 100 μ l 再加入 100 μ l 之 L-15 培養液，在 1500 rpm 4 °C 下離心 5 min，去除上清液後，加入 0.3% NBT (nitroblue tetrazolium) 100 μ l，在 37 °C 下作用 30 min，再去除上清液加入 100% methanol 固定，並以 70% methanol 沖洗二至三次，風乾後加入 2M KOH 120 μ l 與 DMSO 140 μ l，混合均勻後，以自動微量吸盤判讀儀 (automatic microplate reader, MRX, Dynex Technologies, Inc., Virginia) 測量 formazon 在波長 630 nm 之吸光值，將處理組之吸光值，除以未處理組之吸光值後所得之比值來定量海鱷血球細胞產生殺菌物質超氧陰離子量之增減。

二、海鱷血球細胞產生超氧歧化酶之測定

依據 Lin and Lin (1997) 與林 (1998) 之方法經小部分修正後使用。利用 Randox 公司開發之超氧歧化酶試劑 (Ransod, Randox Lab. Ltd., UK) 進行測定，每次測定超氧歧化酶前，均先製作標準曲線，由標準品原液以二次蒸溜水稀釋成不同倍數，依稀釋倍數由大而小為 S6、S5、S4、S3、S2，而 S1 為稀釋樣品用之溶劑。取 850 μ l 的 mixed substrate 與 25 μ l 的不同稀釋倍數的標準品 (S6~S2) 或 S1 混合均勻，再加入 xanthine oxidase，以分光光度計 (DU 500, Beckman Instruments, Inc., USA) 於 37 $^{\circ}$ C 下，分別於 30 sec 與 3 min 30 sec 的時候測波長 OD₅₀₅ nm 的吸光值分別為 A1 與 A2，由下列公式計算即可得標準品或 S1 的抑制百分比：

$$\frac{(A2 - A1)}{3} = \Delta A / \text{min of standard or sample}$$

$$100 - (\Delta A_{\text{std/min}} \times 100 / \Delta A_{\text{SI/min or sample/min}}) \times 100 =$$

$$\% \text{ inhibition}$$

以標準品 S2~S6 比活性取對數值當橫軸，抑制百分比當縱軸，利用線性迴歸可畫出一直線，作為標準曲線。

海鱷血球細胞產生樣品檢測方式：由海鱷之尾部動脈抽出血液，置於 1.5 ml 微量離心管中，每管 20 μ l，再加入 480 μ l 之 PBS (phosphate buffer saline) 混和後，以超音波細胞粉碎機 (sonicator, Microson XL-2020, Misonix Inc., NY) 震碎一分鐘，經 13000 rpm、4 $^{\circ}$ C 下、離心 30 min，取上層液以分光光度計於 37 $^{\circ}$ C 下，分別於 30 sec 與 3 min 30 sec 的時候測波長 OD₅₀₅ nm 的吸光值分別為 A1 與 A2，由上述公式計算即可得樣品的抑制百分比。如抑制百分比未落在 30 ~ 60%，則需對樣品再稀釋或濃縮，樣品抑制百分比可利用標準曲線內插而求出超氧歧化酶比的活性。

三、溶菌酶活性之測定

實驗方法參考 Ellis (1990)，溶菌酶活性單位 (U) 之定義為每 0.001 min 使含菌溶液吸光值減少的能力。以雞蛋白溶菌酶 (Sigma) 溶於 pH6.2，0.05M sodium phosphate buffer 配製標準溶菌酶溶液，其濃度分為 0、2、4、8 與 16 μ g/ml，之後再以 pH6.2，0.05M sodium phosphate buffer 配製

0.2 mg/ml *Micrococcus luteus* 之菌液，取溶菌酶之標準溶液 50 μ l，加入 1 ml 0.2 mg/ml *M. luteus* 溶液，於加入後第一分鐘及第六分鐘分別記錄波長 530 nm 之吸光值，根據不同濃度溶菌酶之標準溶液其每分鐘吸光值的改變量對溶菌酶濃度做圖，即得到檢量線。再以海鱷血清代替溶菌酶之標準溶液重複以上步驟，記錄第一分鐘及第六分鐘之吸光值，依據其吸光值的改變量由檢量線推估血清中溶菌酶之濃度。

四、統計分析方法

各試驗結果，均以 SAS 套裝軟體，作變異數 (ANOVA)、t 分配與多項式曲線迴歸分析統計方法，測試全部處理組及二組間是否有顯著差異。

結 果

一、超氧陰離子產生量

海鱷餵飼含不同多醣添加量之飼料 60 天期間，試驗魚巨噬細胞中之超氧陰離子產生量變動情形如 Fig. 1 與 Fig. 2 所示。添加組餵飼後第 3 天，試驗魚之超氧陰離子產生量均較未添加組，明顯地上升 ($p < 0.001$)；第 12 天，添加組之超氧陰離子產生量達到最高點與未添加組比較，呈現出顯著差異 ($p < 0.0001$)；但隨後持續餵飼至 30 天後，添加多醣組之超氧陰離子產生量會降低，而與未添加組無顯著差別 ($p > 0.05$)。由相對超氧陰離子值來看 (Fig. 2B)，餵飼多醣組試驗魚之超氧陰離子產生量，在第 12 天時較對照組高約 3.2 倍，並由多項式曲線迴歸分析可知，持續添加多醣於飼料中 20 天後，對海鱷之超氧陰離子產生量會明顯下降，亦即免疫促進效果會降低。

二、超氧歧化酶產生量

海鱷餵飼含不同多醣添加量之飼料 60 天期間，試驗魚血球細胞中之超氧歧化酶產生量變動情形如 Fig. 3 所示。添加組餵飼後第 6 天，試驗魚之超氧歧化酶產生量均較未添加組，明顯地上升 ($p < 0.01$)；第 20 天，添加組之超氧歧化酶產生量達到最高點與未添加組比較，呈現出顯著差

Fig. 1 Superoxide anion (O_2^-) production of cobia (78 ± 2.5 g) phagocytes after being fed on diets with or without β -1,3-1,6-glucan for 60 days. Values are means $\pm$ SEM, $n = 4$. ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

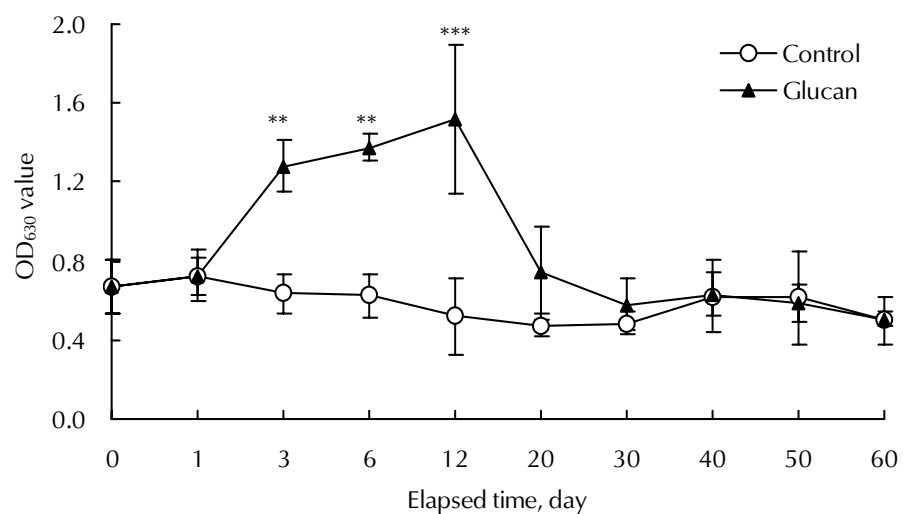
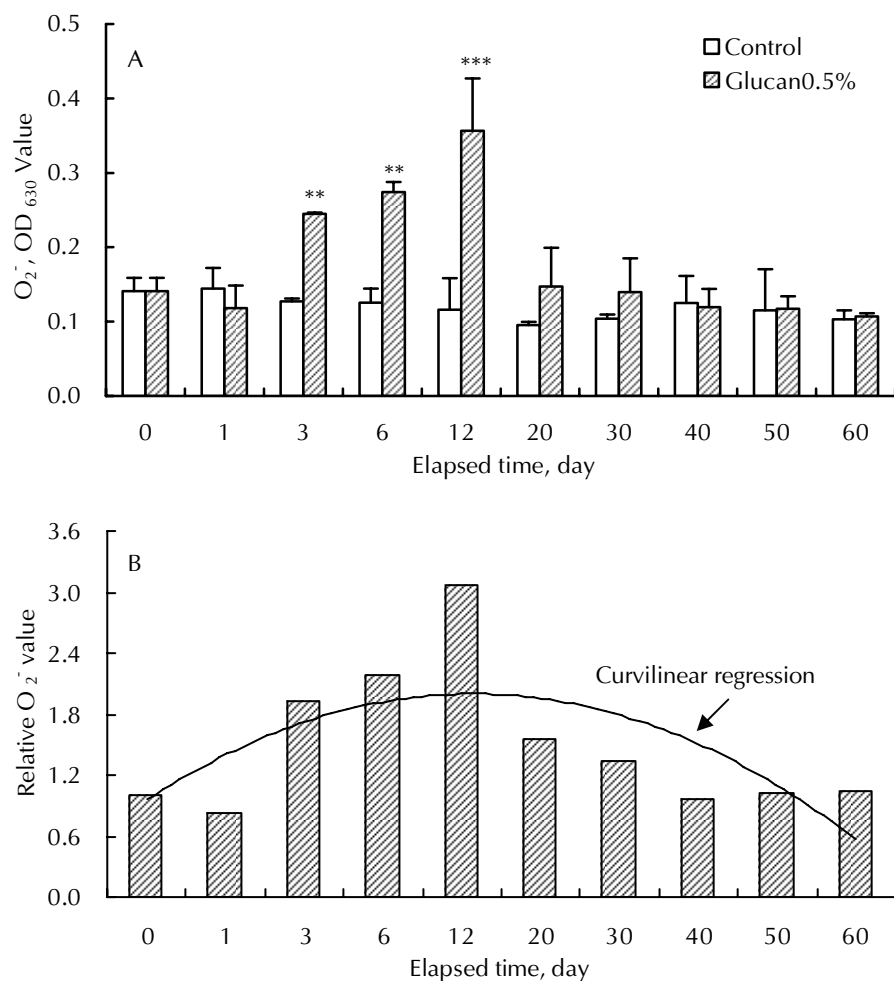


Fig. 2 Superoxide anion (O_2^-) production (A) and relative superoxide anion value (glucan group/control group) (B) of cobia (65 ± 2.5 g) phagocytes after being fed on diets with or without β -1,3-1,6-glucan for 60 days. Values are mean $\pm$ SEM, $n = 4$. ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.



異 ($p < 0.001$)；但持續餵飼至 40 天後，添加多醣組之超氧歧化酶產生量開始降低，而與未添加組無明顯差異 ($p > 0.05$)。由相對超氧歧化酶值來看 (Fig. 3B)，餵飼多醣組試驗魚之超氧歧化酶產

生量，在第 20 天時較對照組高約三倍，並由多項式曲線迴歸分析可知，持續添加多醣於飼料中 40 天後，對海鱸之超氧歧化酶產生量會明顯下降，亦即免疫促進效果會降低。

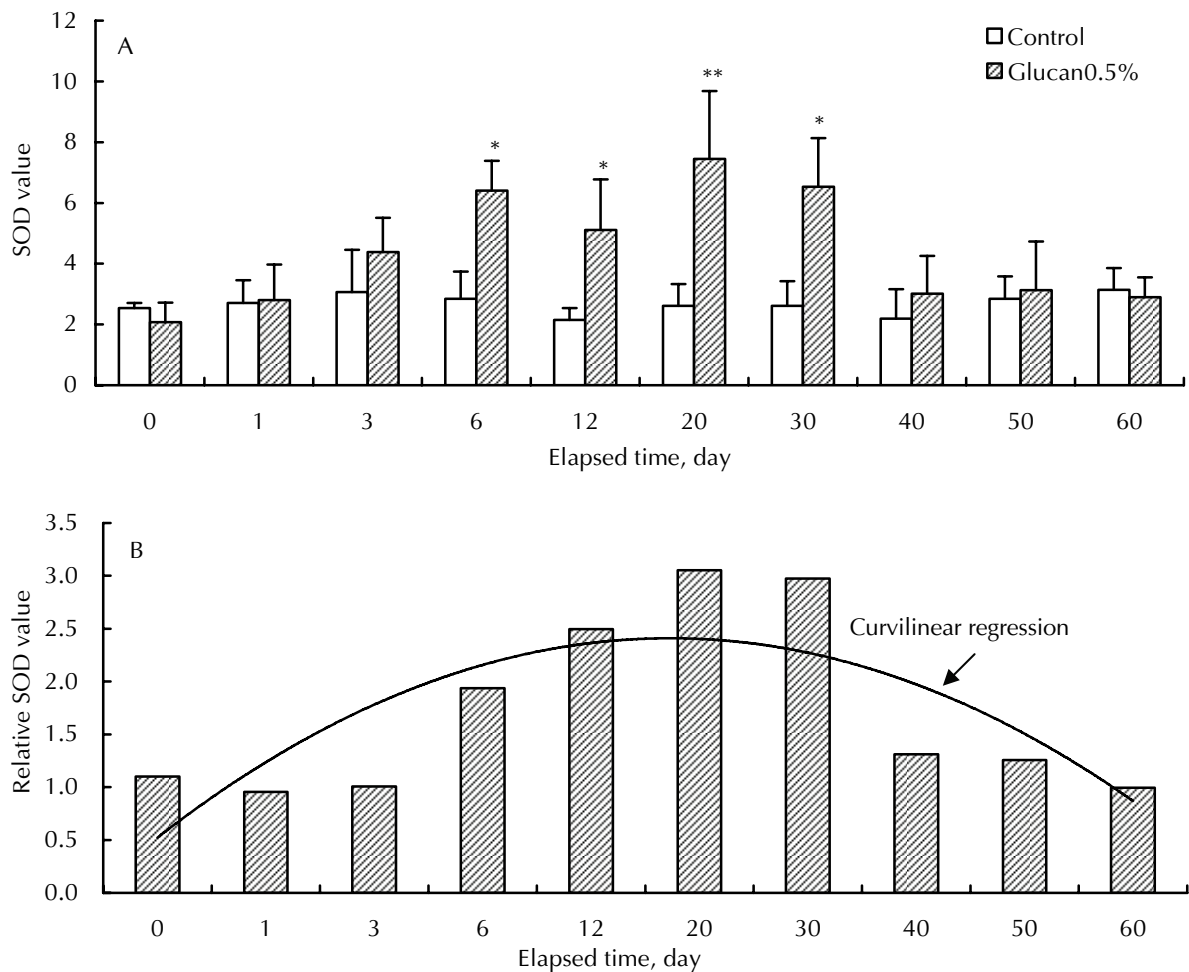


Fig. 3 The superoxide dismutase (SOD) production (A) and relative superoxide dismutase value (glucan group/control group) (B) of cobia (65 ± 2.5 g) liver cell after being fed on diets with or without β -1,3-1,6-glucan for 60 days. Values are means $\pm$ SEM, $n = 4$. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$.

三、溶菌酶活性

海鱺飼料含不同多醣添加量之飼料 60 天期間，試驗魚血液中之溶菌酶活性變動情形如 Fig. 4 所示。添加組飼料後第 8 天，試驗魚之溶菌酶活性均較未添加組，明顯地上升 ($p < 0.001$)；第 24 天，添加組之溶菌酶活性達到最高點，與未添加組比較，呈現出顯著差異 ($p < 0.0001$)；但持續飼料至 40 天後，添加多醣組之溶菌酶活性開始降低，與未添加組無顯著差別 ($p > 0.05$)。由相對溶菌酶活性值來看 (Fig. 4B)，飼料多醣組試驗魚之溶菌酶活性，在第 24 天時較對照組高約二倍，並由多項式曲線迴歸分析可知，持續添加多醣於飼料中 40 天後，對海鱺之溶菌酶活性會明顯下降，亦即免疫促進效果會降低。

討 論

魚類具有許多特異性免疫系統 (specific immune system) 和非特異性免疫系統 (non-specific immune system) 及細胞免疫機制 (cellular factors)，以對抗外在環境的病原。在非特異性細胞免疫防禦機制方面，以巨噬細胞為其重要的殺菌防禦工具，其中以嗜中性球和巨噬細胞為主，當病原菌入侵時，這些巨噬細胞經由許多細胞膜上的接受器和病原菌結合後吞噬至細胞內，藉由反應的中間及最終產物如超氧陰離子、超氧歧化酶、氧化氫 (H_2O_2)、次氯酸根 ($HOCl$) 及氯酸根 (OCl^-) 等活性氧物質毒殺作用進而將之殺滅 (Secombes, 1996; Ellis, 1999)。本研究，試驗魚巨噬細胞中之超氧陰離子、超氧歧化酶及

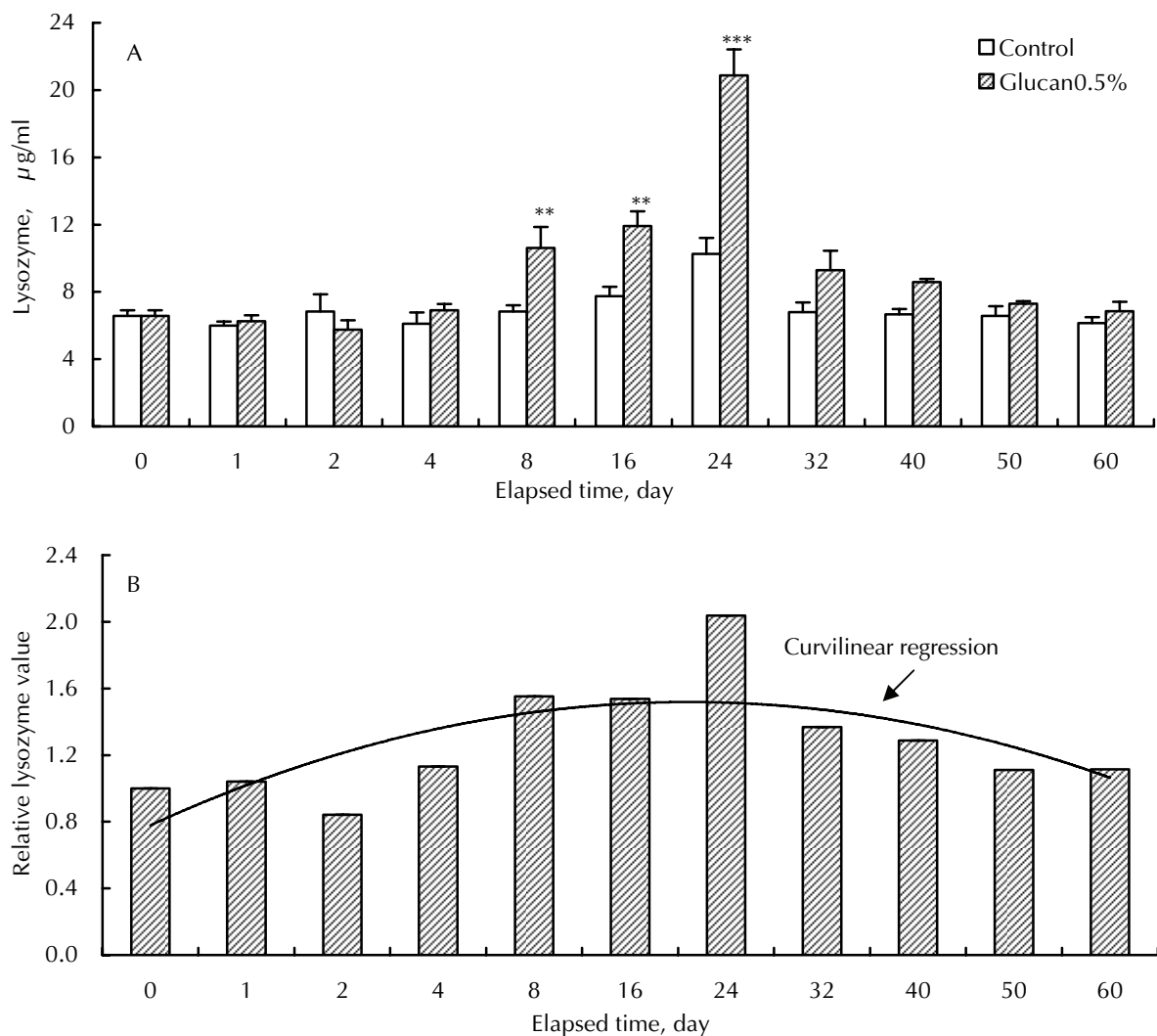


Fig. 4 The serum lysozyme activity (A) and relative lysozyme value (glucan group/control group) (B) of cobia (65 ± 2.5 g) after being fed on diets with or without β -1,3-1,6-glucan for 60 days. Values are means $\pm$ SEM, $n = 4$. ** $p < 0.001$. *** $p < 0.0001$.

血液中之溶菌酶活性產生量變動情形，添加組餵飼後分別在第 3 天、第 6 天及第 8 天較未添加組明顯地上升。在第 12 天、第 20 天及第 24 天，添加組之超氧陰離子產生量達到最高點，這與張等 (2006) 研究結果相互證實，由海鱸經投餵含 0.5% 多醣的飼料 10 天，對發光菌與鏈球菌之感染即有抵抗效果，但高濃度組並沒有非常顯著效果，因此本研究選擇多醣類 0.5% 濃度。另外，Ai *et al.* (2007) 使用葡聚醣 (β -1,3-glucan) 口投大黃魚發現溶菌酶、巨噬細胞與呼吸性爆發之活性，添加組皆高於未添加組；並指出低濃度的葡聚醣可以提高成長及免疫活性，而高濃度的葡聚醣雖不影響成長，對免疫活性也沒有促進的效果，顯示出

經由免疫刺激物 β -1,3-1,6-glucan 的刺激，確實能刺激魚類之非特異性體液免疫系統的提升，而過度刺激或刺激劑量太高卻不能達到提升免疫功能的效果。

魚類之免疫系統與高等脊椎動物一樣，具有許多特異性和非特異性體液免疫及細胞免疫機制，以對抗外在環境的病原，其中非特異性體液免疫機制在魚類的免疫系統中佔有相當重要的地位。由於魚類被感染時引發的初級免疫反應 (primary immune response) 和續發性免疫反應 (secondary immune response) 與溫血動物相比，不論在時間或規模上都比較晚、比較小，所以在抵抗外來感染原時，非特異性體液免疫的防禦系統

必須首當其衝的擔負起防禦角色，以消滅外來之病原 (Blazer, 1991)。因其不需像特異性免疫需經過複雜的生理反應，而只是活化巨噬細胞或釋放過氧化物即可快速針對外來病原進行立即性之防禦反應 (Ainsworth *et al.*, 1991; Edagawa *et al.*, 1993; Stoskopf, 1993)。因此，可藉由偵測反應的中間或最終產物，作為評估魚體對病原防禦能力的方法 (廖, 2004)。

此外，目前水生生物免疫刺激物的種類大致可分為化學合成物、真菌衍生物、醣類植物萃取物、營養因子、荷爾蒙與細胞激素及其它等六大類 (Sakai, 1999)，可有效刺激水生生物免疫活性，提升其對細菌、濾過性病毒及寄生蟲的抵抗力，但並不是對所有致病微生物有效，有些細菌感染如 *Cytophaga* 等；病毒性感染如 VHS (viral haemorrhagic septicaemia) 及 IHN (infectious hematopoietic necrosis) 等就沒有加強防禦力的作用，且其抗病效力受免疫刺激物之使用時間、使用方法及使用劑量影響而有不同的結果。Sakai (1999) 也認為免疫刺激物雖可以降低魚類因疾病造成的損失，卻不能有效抵抗所有疾病，應視魚體之生理狀況考慮是否添加。本研究結果顯示，海鱸飼料含多醣類飼料後，超氧歧化酶、超氧陰離子及溶菌酶三者都有升高，然後再下降之趨勢，若持續投飼超過 30 天，超氧歧化酶與超氧陰離子產量會降低，溶菌酶活性也會降低。而張等 (2006) 之研究，進行口投多醣後以病原菌感染也有類似結果，若持續投飼 β -1,3-1,6-glucan 超過 30 天，對發光菌及鏈球菌就沒有特別的抗菌效果。原因可能是過度刺激，其免疫系統會產生負回饋控制 (negative feedback control) 的關係。陳 (2001) 指出，這是因為多數的免疫刺激物，主要藉由刺激魚類的非特異性免疫系統，提升對病原的抵抗能力，所以並沒有特異性免疫的記憶特性，因此反應持續時間也較短。

從本研究的結果來看，添加 0.5% 多醣，餵食 6 天以上，即可明顯增強海鱸體內產生超氧陰離子、超氧歧化酶與溶菌酶活性；但持續添加多醣於飼料中 20 天後，海鱸之超氧陰離子產生量會明顯下降；40 天後，超氧歧化酶產生量及溶菌酶活性也發生明顯下降情形。由上述三項指標來看，海鱸之免疫系統應有免疫疲乏現象。因此，海鱸飼料之多醣添加劑量，應以 0.5% 為主，在持續投

飼 20~30 天後，建議休息 7~10 天；亦即適時適量的使用，方可有效增強海鱸抵抗細菌感染的能力，提升海鱸在海上箱網養殖期間的活存率。

謝 辭

本研究係在行政院國家科學委員會補助之專題研究計畫 (NSC 91-2313-B-056A-001) 項下完成，謹此誌之。

參考文獻

- 行政院農業委員會漁業署 (2005) 漁業生產量. 漁業年報, 136.
- 林婉曼 (1998) 草蝦超氧歧化酵素之研究：病毒感染、純化與生物特性之研究. 國立台灣海洋大學水產生物技術研究所碩士論文, 17-20.
- 陳悠里 (2001) 幾丁聚糖和其衍生物對馬拉巴石斑魚免疫能力的影響. 國立中山大學海洋研究所碩士論文, 13.
- 廖如君 (2004) 飼料添加核苷酸對點帶石斑稚魚健康之影響. 國立中山大學海洋研究所碩士論文, 17.
- 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.
- 張正芳, 楊佳宏, 陳紫嫻, 蘇茂森 (2002) 多醣類 β -1,3-glucan (from *Schizophyllum commune*) 應用於強化草蝦抵抗白點症病毒之研究. 水產研究, 10(1 & 2): 7-20.
- 張正芳, 楊佳宏, 張賜玲, 周瑞良, 何碧月, 許家惠, 陳紫嫻 (2006) 多醣應用於強化海鱸抵抗發光菌與鏈球菌感染之研究. 水產研究, 14(2): 75-87.
- 蘇茂森, 劉冠甫, 張正芳, 廖一久 (1995) 由 *Schizophyllum commune* 萃取之 Beta-1,3-glucan 應用於強化草蝦苗活力之研究. 水產研究, 3(2): 125-132.
- Ai, Q., K. Mai, Z. Lu, B. Tan, W. Zhang, W. Xu and H. Li (2007) Effects of dietary β -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Fish Shellfish Immunol., 22: 394-402.
- Ainsworth, A., C. Dexiang and P. R. Waterstrat (1991) Changes in peripheral blood leukocyte percentages and function of neutrophils in stressed channel catfish. J. Aquat Animal health., 3: 41-47.

- Blazer, V. S. (1991) Piscine macrophage function and nutritional influences: a review. *J. Aquat. Anim. Health*, 3: 77-86.
- Chang, C. F., M. S. Su, H. Y. Chen, C. F. Lo, G. H. Kou and I. C. Liao (1999) Effect of dietary beta-1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, 36: 163-168.
- Chang, C. F., M. S. Su, H. Y. Chen and I. C. Liao (2003) Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, 15: 297-310.
- Edagawa, T. M., M. Hattori, M. Onuma and H. Kodamat (1993) Cell surface C-reactive protein of rainbow trout lymphocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 17: 119-127.
- Ellis, A. E. (1990) Lysozyme assays. *In Techniques in Fish Immunology: Techniques in Fish immunology 1* (J. S. Stolen, T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Roberson, W. B. van Muiswinkel eds.), SOS Pub., 101-103.
- Ellis, A. E. (1999) Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 9: 291-343.
- Grind, B. (1989) Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an anti-bacterial agent against fish pathogens. *J. Fish. Dis.*, 12: 95-104.
- 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*). The Third Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society, Manila, 375-378.
- Jeney, G. and D. P. Anderson (1993) Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the nonspecific defense mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 116: 315-329.
- Li, G., Y. Kang, J. Sun and J. He (2003) The effect of yeast glucan on the *Squaliobarbus curriculus* non-specific immune response. *Acta Sci. Nat. Univ. Sunyatseni.*, 42(4): 55-58.
- Liao, I. C., M. S. Su, C. F. Chang, B. Y. Her and T. Kojima (1996) Enhancement of the resistance of grass prawn *Penaeus monodon* against *Vibrio damsela* infection by oral administration of β -1,3-glucan from *Schizophyllum commune*. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 23(2): 109-116.
- Lin, C. T. and M. T. Lin (1997) The distribution and properties of superoxide dismutase in different tilapia tissue. *J. Chinese Agric. Chem. Soc.*, 35: 107-111.
- Liu, P. C., J. Y. Lin and K. K. Lee (2003) Virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in cultured cobia *Tachycentron canadum*. *J. Basic. Microbiol.*, 43: 499-507.
- 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.
- Misra, C. K., B. K. Das, S. C. Mukherjee and P. Pattnaik (2006) Effect of multiple injections of beta-glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish shellfish Immunol.*, 20(3): 305-19.
- Robertsen, B., G. Rorstad, R. Engstad and J. Raa (1990) Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmon salar* L., by a glucan from *Saccaromyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish Dis.*, 13: 391-400.
- Sakai, M. (1999) Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.
- Secombes, C. J. (1990) Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. *In Techniques in Fish Immunology: Techniques in Fish Immunology 1* (J. S. Stolen, T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Roberson, W. B. van Muiswinkel eds.), SOS Pub., 137-153.
- Secombes, C. J. (1996) The non-specific immune system: cellular defenses. *In The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment* (G. Iwama and T. Nakanishi eds.), Academic Press, San Diego, California, USA, 63-103.
- Song, Y. L. and Y. T. Hsieh (1994) Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation opmental and of microbicidal substances: analysis of reactive oxyaen species. *Dev. Comp. Immunol.*, 18: 201-209.
- Stoskopf, M. K. (1993) Immunology. *In Fish Medicine* (M. K. Stoskopf, ed.), Latest Ed., WB Saunders Co, Philadelphia, 149-159.
- Yano, T., H. Matsuyama and R. E. P. Mangindaan (1991) Polysaccharide-induced protection of carp, *Cyprinus carpio* L., against bacterial infection. *J. Fish Dis.*, 14: 577-582.

Effects of Dietary β -1,3-1,6-glucan on Non-specific Immune Response of Cobia (*Rachycentron canadum*)

Cheng-Fang Chang^{*}, Jia-Horng Yang, Ruey-Ling Chou, Bih-Yueh Her,
Su-Lean Chang, Chia-Hui Hsu and Tzyy-Ing Chen

Tungkang Biotechnology Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The present study was conducted to investigate the effects of dietary β -1,3-1,6-glucan (BG) from *Schizophyllum commune* on the innate immune response in cobia (*Rachycentron canadum*). Cobia (50-80 g) were fed a basal diet and supplemented with either 0 (control group) or 0.5% BG (glucan group) for 60 days. The superoxide anion (O_2^-), superoxide dismutase (SOD) concentration and lysozyme activity were analyzed at days 0, 1, 3, 6, 12, 20, 30, 40, 50 and 60. The results showed that the concentration of O_2^- and SOD and activity of lysozyme in cobia at BG group was higher ($p < 0.001$) than those of the control group. They attained the highest levels at day 12, 20 and 24 after feeding, respectively. However, the concentration of O_2^- on day 30, SOD on day 40 and activity of lysozyme on day 40 of the fish at BG group, dropped back to the same levels as the control group ($p > 0.05$). The results in this study showed that oral administration of 0.5% BG for 6 days enhanced immunity of the cobia, but prolonged use of BG would not increase the immunity of the cobia. Care therefore must be taken to maximize its effectiveness with suitable period.

Key words: Cobia (*Rachycentron canadum*), β -1,3-1,6-glucan, superoxide anion (O_2^-), superoxide dismutase (SOD), lysozyme

^{*}Correspondence: Tungkang Biotechnology Research Center, Fisheries Research Institute, Tungkang, Pingtung 928, Taiwan. TEL: (08) 832-4121 ext. 272; FAX: (08) 832-0234; E-mail: changch@ms3.hinet.net