

飼料中添加幾丁質對斑節蝦成長及免疫力之影響

摘要

本研究以兩次實驗的結果來評估飼料添加幾丁質對斑節蝦 *Penaeus japonicus* 成長及免疫力的影響。實驗一：於飼料中添加 0、200、400、600、800 及 1000 mg/kg 幾丁質分組餵飼四十天後，發現餵食 400、600、800 及 1000 mg/kg 幾丁質添加飼料的斑節蝦成長率顯著 ($P < 0.05$) 優於餵食 0 及 200 mg/kg 幾丁質添加飼料者。同樣餵食四十天的斑節蝦以肌肉注射 5×10^5 CFU/g BW *Vibrio vulnificus* P1 進行感染試驗，連續觀察二週，記錄死亡情形。餵食 400、200 及 600 mg/kg 幾丁質添加飼料的斑節蝦活存率顯著 ($P < 0.05$) 高於餵食 0、800 及 1000 mg/kg 幾丁質添加飼料者。餵食 400、600 及 800 mg/kg 幾丁質添加飼料的斑節蝦血淋巴酚氧化酵素 (Phenoloxidase, PO) 活性亦高於餵食 200 及 1000 mg/kg 者，而餵食 0 mg/kg 者其血淋巴 PO 活性最低。實驗二：以 400 mg/kg 幾丁質添加飼料連續餵食不同天數後再改餵未添加幾丁質的飼料，以探討飼料中添加幾丁質的最適餵養天數之結果顯示，需連續餵食 10 天才有提高斑節蝦抵抗力的效果，而效期至少可持續 5 天。

關鍵詞：斑節蝦，幾丁質，酚氧化酵素

本省養蝦產業於 1987 年達到巔峰，年產量高達 95,000 公噸。但自 1988 年起，發生大量死亡，產量銳減 70%。至今，整體養蝦產業依然無法恢復⁽¹⁾。經過國內外專家學者多年來的努力，威信養殖蝦類大量死亡原因，舉凡種蝦健康、蝦苗品質、養殖環境、用藥管理及飼料良窳等皆是可能的原因，不過最常造成養殖蝦類大量死亡的直接主因，卒為病毒與細菌的混合感染⁽²⁻⁵⁾。由於蝦類在幼蝦期成長迅速，罹病率高⁽⁶⁾，業者習慣使用藥物以提高蝦苗活存率，但頻繁使用藥物的結果，除使蝦苗本身抵抗力減弱，在入池後反而更容易死亡之外，更可能促使養殖環境中之微生物產生抗藥性，不但非治本之道，而且會衍生出更嚴重的公共衛生問題，實不足取。比較起來，於飼料中添加可提高蝦類免疫活性的免疫賦活劑 (Immunostimulant)，從改善蝦苗品質來提高其活存率，應為一較適當可行的作法⁽⁷⁾。目前，試用於水產養殖的免疫賦活劑種類以多醣類為主⁽⁸⁻¹⁰⁾；幾丁質是白色不溶於水的角質多醣，在自然界中含量僅次於纖維素，廣泛存在於昆蟲、線蟲、蝦及蟹等甲殼類之甲

殼及真菌類的細胞壁中⁽¹¹⁻¹³⁾。早在 1981 年，Austin 等⁽¹⁴⁾的報告就指出，幾丁質添加於飼料中可促進家畜、家禽的成長。近年來，Suzuki⁽¹⁵⁻¹⁷⁾等學者更證實，幾丁質和幾丁聚醣 (Chitosan) 亦具有增進免疫力效果。不過上述研究均未曾以斑節蝦為實驗對象。

甲殼類的抗病機轉以非專一性反應為主⁽¹⁸⁾，在這種免疫系統中，由原酚氧化酵素 (Prophenoloxidase, proPO) 活化後產生的一連串連鎖反應 (Cascade reactions)，負責許多無脊椎動物防禦系統中識別與聯繫的任務。相關研究報告亦指出⁽¹⁹⁻²¹⁾，proPO 活化系統被認為是甲殼類辨認外來物及抵抗入侵者的重要反應，與 proPO 系統相關連的一些蛋白質亦被證實與蟹蝦體腔內外來異物的排除有直接的關係⁽²²⁾。近來的研究顯示，某些多醣類的免疫賦活劑，具有誘發甲殼類體內 proPO 活化系統的功能⁽²³⁻²⁵⁾。

本篇報告以不同濃度之幾丁質添加於飼料中餵食斑節蝦，比較其成長情形、病原性試驗結果及蝦血中酚氧化酵素活性，其目的旨在探討幾丁質對斑節蝦成長率、抗菌能力及非專一性免疫活性之影響。

材料與方法

(一) 飼料中幾丁質添加量對斑節蝦成長及活存率影響試驗

1. 實驗蝦

購自宜蘭縣蝦類繁殖場之斑節蝦後期幼蝦 PL15，飼養於五百公升玻璃纖維桶，先以豐年蝦及人工餌料 (NOSAN R-2, 日本農產工業株式會社) 餵飼，再配合斑節蝦幼蝦飼料 (台榮飼料公司)，飼養期間二個月後，進行後續之各項試驗工作。

2. 飼料調配

於幼蝦飼料 (配方如 Table 1，委託台榮公司配製) 中添加 200、400、600、800、1000 mg/kg 等不同含量幾丁質 (Chitin, purified powder from shrimp shells, Sigma)，製成粒狀飼料，原餵食之斑節蝦幼蝦飼料，亦打粒作為對照組飼料。

Table 1. Composition of the basal diet.

Ingredients	Contain (%)
Fish meal	30.0
Flour	28.0
Defatted soybean meal	13.5
Squid meal	7.0
Squid oil	6.0
Shrimp shell meal	5.0
Vitamin mix	3.0
Mineral mix	2.0
Yeast powder	2.0
Others*	3.5
Total	100.0

* Cellulose and wheat gluten mixture.

3. 蓄養條件及成長試驗

將幼蝦 (長約 2.5-3.5 公分，重約 0.08-0.15 公克) 飼養於長 60 公分 × 寬 30 公分 × 高 30 公分水族箱中，內鋪有三公分厚細砂，每缸放 40 尾，分別投餵含有 200、400、600、800、1000 mg/kg 幾丁質的幼蝦飼料及對照組飼料，二重覆實驗。飼養時間為四十天，每十天測量一次體重。

4. 感染試驗：

感染試驗之供試菌株係本實驗室自罹患弧菌症 (Vibriosis) 之斑節蝦分離出的病原菌，命名為 PJ1，其生理生化特性如下：具運動性，對 10 及 150 μg vibrio static agent 0/129 敏感，在 TCBS (Thiosulphate Citrate Bile salt Sucrose agar, Difco) 選擇性培養基上，可成長為綠色菌落。對葡萄糖的利用屬於發酵性，可利用 Glucose，Mannitol，Amygdalin 產生酸，無法發酵 Inositol，Sorbitol，Rhamnose，Sucrose，Melbiose，Arabinose。可分解明膠 (Gelatin) 產生 lysin decarboxylase，Ornithine decarboxylase，不具 Arginine dihydrolase，具氧化酵素 (Oxidase-positive reaction)，可產生 Indole，利用檸檬酸鹽 (Citrate)，不產生硫化氫 (H_2S)，有 Catalase 存在，硝酸鹽可被還原，ONPG 及 Voges-Proskauer 測定為陽性反應，TDA (Tryptophane) 為陰性反應，不能利用 Urea。對 Novobiocin，Chlortetracycline，Nitrofurantoin，Streptomycin 等藥物具感受性。經比對 Bergey's Manual⁽²⁶⁾ 後，將其鑑定為 *Vibrio vulnificus*。

於成長試驗結束後，每缸選出 16 尾體重大小相似的斑節蝦，進行感染及活存率試驗。供試菌株以生理食鹽水調整成 5×10^7 CFU/ml 的懸浮液，採肌肉注射，每尾斑節蝦注射劑量為體重的 1% (v/w)，實驗時間為二星期，二重覆試驗，每天觀察並記錄實驗蝦死亡情形。

活存率計算方法如下：

$$\% \text{ of survival} = \frac{\text{Nos. of survival shrimp}}{\text{Total nos. of shrimp-A}} \times 100$$

A: 代表第一天死亡數目，似因感染注射對試驗蝦造成壓迫之故。

5. 非專一性免疫活性影響分析

成長試驗完成後，自未被挑選做感染試驗的斑節蝦中，隨機挑選 16 尾，另進行非專一性免疫活性分析；本實驗採用酚氧化酵素 (Phenoloxidase, PO) 活性指標，其測定方法如下：

以含有 50 μl 抗凝劑 (Glucose 0.1M, Trisodium citrate 30 mM, Citric acid 26 mM, EDTA 10 mM, pH 4.6 溶於鹽度 20 ppt 的海水，以 121 $^{\circ}\text{C}$ ，15 min 高溫高壓滅菌) 的注射針 (23G \times 1.25") 抽取斑節蝦血淋巴液 300 μl ，於 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 10 分鐘後取得血球細

胞，再以 Cacodylate-citrate 緩衝液 (Sodium cacodylate 0.01 M; Sodium chloride 0.45 M; Trisodium citrate 0.1 M; pH 7.0) 清洗細胞一次後，將細胞懸浮於 10 倍體積 4 °C 之 Cacodylate 緩衝液 (CAC, Sodium cacodylate 0.01 M; Sodium chloride 0.45 M; Calcium chloride 10 mM; Magnesium chloride 26 mM; pH 7.0)，以細胞破碎機 (BioNeb™, Glas-Col®, USA)，15 psi，30 sec，將血球細胞擊碎後，再以 43,000 g 於 4 °C 離心 20 分鐘，取上清液即為 HSL (Hemocyte lysate supernatant)，再依據 Bradford⁽²⁷⁾的方法配合 Bio-Rad® Protein Assay Kit II，將 HLS 以 CAC 緩衝液將蛋白質濃度調整為 3-6 mg/ml，置於 -20 °C 備用。

參考 Sung⁽²⁸⁾ 的做法，以 L-dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine, Sigma) 為 PO 的受質。取 200 µl 的 HLS 在 37 °C 培養 15 分鐘，加入 400 µl 的 L-dopa (濃度為 1.6 mg/ml，以 CAC 緩衝液配置) 作用一分鐘後，立即加入 40 µl 之 Cacodylate 緩衝液，將混合液以 490 nm 波長測定吸光值。依照 Soderhall 及 Unestam⁽²³⁾ 的定義，於每分鐘使每毫克蛋白質之吸光值增加 0.001 者，為一單位活性。

(二) 飼料中添加幾丁質的最適餵養天數試驗

將實驗一所得之最適幾丁質添加量 (400 mg/kg diet) 加入飼料，設計不同的餵食天數，以探究可達抗病效果又符合經濟效益的最佳模式。

1. 實驗蝦

來源與前述實驗同，體長 4.2 ~ 7.7 公分，體重 0.49 ~ 1.77 公克。

2. 飼料

使用前述試驗效果最佳的幾丁質添加飼料，對照組飼料則未添加幾丁質。

3. 蓄養條件

蓄養設備同前，共分為五組，每缸蓄養 25 尾，二重複試驗。第 1 組：1-15 天餵食對照組 (未添加幾丁質) 飼料。第 2 組：1-5 天餵食最適幾丁質添加量飼料，6-15 天餵食對照組飼料。第 3 組：1-10 天餵食最適幾丁質添加量飼料，11-15 天餵食對照組飼料。第 4 組：1-5 天餵食最適幾丁質添加量飼料，6-10 天餵食對照組飼料，11-15 天餵食最適幾丁質添加量飼料。第 5 組：1-15 天餵食最適幾丁質添加量飼料。

4. 感染及活存率試驗

試驗方法同前，實驗時間為二星期。

(三) 統計方法

試驗所得數據，以 SAS (SAS Institute Inc.)⁽²⁹⁾ 進行統計分析，先以變方分析 (ANOVA) 分析各組間是否有顯著差異，若差異達顯著水準，再以 Tukey's test 檢定，顯著水準設定為 5%。

結果

(一) 飼料中添加幾丁質對斑節蝦成長及活存率影響試驗

1. 成長試驗

飼料中添加幾丁質對斑節蝦成長率的影響如 Fig. 1 所示。自餵飼第十天起，添加 400 mg/kg 幾丁質組較其他組成長迅速，餵飼 600、800 及 1000 mg/kg 幾丁質組成長率則比 200 mg/kg 幾丁質組及對照組為佳；第二十天後，其累積成長率差異愈形顯著。至四十天實驗結束時，餵飼 400 mg/kg 幾丁質添加飼料組累積成長率達 289.46±2.38% (Table 2)，明顯優於其他各組 (p<0.05)，統計上累積成長率次高的群組為添加 600、800 及 1000 mg/kg 幾丁質組者，其累積成長率依序為 248.39±1.47、236.58±10.25 及 230.83±7.83%，餵飼 200 mg/kg 幾丁質添加飼料組之成長率則與對照組無顯著區別 (p>0.05) 依序為 178.97±5.26 與 167.67±1.98%。

2. 感染試驗

飼料中添加不同濃度的幾丁質對斑節蝦存活率的影響，如 Table 2 所示。其中以添加幾丁質量為 200、400、600 mg/kg 的活存率較佳，分別為 68.75±8.84、78.13±4.42、65.63±13.29%，其中，又以 400mg/kg 組為最佳，而 800、1000 mg/kg 及對照組活存率較差，分別為 53.13±4.42、56.25±8.84、50.00±8.84%。

3. 飼料中添加幾丁質對斑節蝦非專一性免疫活性影響試驗

飼料中添加幾丁質對斑節蝦血淋巴之 PO 活性影響，如 Table 2 所示。飼料中添加不同濃度幾丁質確可顯著提高斑節蝦血淋巴之 PO 活性，其中，又以添加 400、600 及 800 mg/kg 幾丁質者最佳，PO 比活性 (試驗組蝦血 PO 活性/對照組蝦血 PO 活性)

分別為 4.28、4.56 及 4.47，其次為添加 200 及 1,000 mg/kg 者，PO 比活性分別為 2.45 及 3.03。

(二) 飼料中添加幾丁質的最適餵養天數試驗

以 400 mg/kg 幾丁質添加飼料配合對照組飼料，分別餵養不同天數，其結果如 Table 3 所示。第 3 組 (1-10 天餵食添加 400 mg/kg 幾丁質飼料，11-15 天餵食對照組飼料) 及第 5 組 (1-15 天餵食添加 400

mg/kg 幾丁質飼料) 的活存率顯著高於其他各組 ($p < 0.05$)，分別為 72.5 ± 3.5 及 $75.0 \pm 14.1\%$ 。活存率次高的群組為第 2 組 (1-5 天餵食添加 400 mg/kg 幾丁質飼料，6-15 天餵食對照組飼料) 及第 4 組 (1-5 天餵食添加 400 mg/kg 幾丁質飼料，6-10 天餵食對照組飼料，11-15 天餵食添加 400 mg/kg 幾丁質飼料)，分別為 60.0 ± 7.1 及 $62.5 \pm 10.6\%$ 。對照組 (1-15 天餵食未添加幾丁質飼料) 的活存率最低，為 $52.5 \pm 10.6\%$ 。

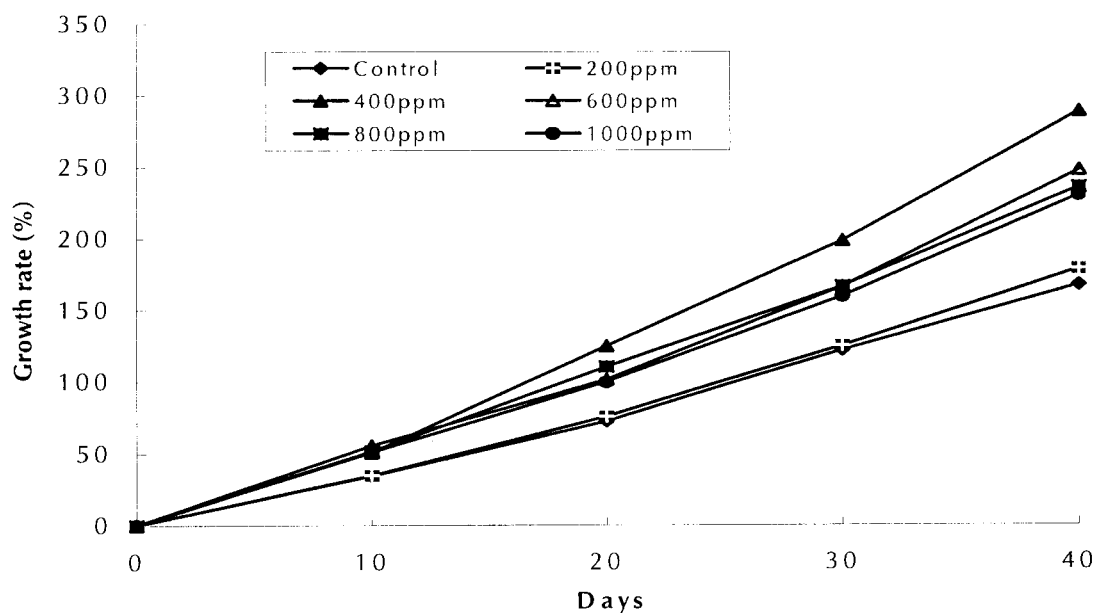


Fig. 1. The growth curve of kuruma shrimp *Penaeus japonicus* after fed with different chitin concentrations diets for 40 days.

討論

許多甲殼類的消化道中均可檢測出具有水解幾丁質或幾丁聚醣活性的酵素⁽³⁰⁻³²⁾，足證幾丁質能被這些甲殼類消化利用。本試驗結果亦顯示，添加 400 mg/kg 幾丁質於斑節蝦飼料中，可使體重約 0.08–0.15 公克的幼蝦於 40 天的飼育期間內成長率顯著提高。在 Fox⁽³³⁾的報告中，幾丁質添加飼料對草蝦的成長及活存率並無顯著影響，此結論與本試驗的結果並不相符；值得探討的是，飼料中添加過量的幾丁質反而會對成長有不利的影響，如本試驗 Fig. 1 所示，餵食

400 mg/kg 幾丁質的斑節蝦成長最佳，而 600、800 及 1000 mg/kg 幾丁質組的成長率雖仍較對照組為佳，但均不及 400 mg/kg 組，而且隨幾丁質添加量的增加，斑節蝦成長率反有逐漸下降的趨勢。同樣的情形也發生在以 β -1,3-glucan 為免疫賦活劑時，根據 Sung⁽⁹⁾等的研究顯示，以 2 mg/ml β -1,3-glucan 刺激的草蝦蝦苗，其成長率反不及 0.5 及 1 mg/ml 組，而且前者經感染試驗的死亡率更顯著高於後二者。前述 Fox 的試驗，幾丁質的添加量是 4%~16%，遠高於本試驗的劑量，是否因過高的添加量導致效果不彰甚至產生副作用，值得深入探討。

免疫賦活劑所引發的非專一性免疫反應是一種

短效性的抵禦機轉^(9,28)。有鑑於多醣類成本昂貴，長期食用添加免疫賦活劑的飼料所費不貲，故除了適當添加量要掌握之外，在成本與免疫效果之間尋求最適餵養天數或最佳餵食策略亦是一值得探討的課題⁽⁷⁾。根據本研究的結果顯示，餵食幾丁質添加飼料 10 天後再餵食對照組飼料 (如 Table 3 之第 3 組) 與連續餵食 15 天幾丁質添加飼料 (如 Table 3 之第 5 組) 的斑節蝦，其抗菌能力並無顯

著差別;而若只餵 5 天幾丁質添加飼料 (如 Table 3 之第 2 組) 或在 15 天的試驗期間之後 5 天餵食幾丁質添加飼料，中間 5 天餵以對照組飼料 (如 Table 3 之第 4 組) 的斑節蝦，其抗菌能力就顯著下降許多。由此可見，若以 400 mg/kg 幾丁質為免疫賦活劑，至少須連續餵食 10 天方有顯著效果，至於此免疫效果能持續幾天 (本試驗結果顯示至少 5 天)，仍待進一步實驗探討。

Table 2. Growth rate and percent survival of kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in challenge test, and their phenoloxidase activity (PO) in the supernatants of hemocyte lysate after oral administration of chitin for 40 days.

<i>Chitin conc.</i> (mg/kg)	<i>Growth rate</i> (%) [*]	<i>Survival in challenge</i> <i>test (%)</i> [*]	<i>PO activity</i> (U/mg/min) [*]	<i>PO</i> <i>ratio</i> [¶]
0	167.67 ± 1.98 ^c	50.00 ± 8.84 ^c	1.54 ± 0.32 ^c	1.00
200	178.97 ± 5.26 ^c	68.75 ± 8.84 ^b	3.78 ± 0.78 ^b	2.45
400	289.46 ± 2.38 ^a	78.13 ± 4.42 ^a	6.59 ± 1.02 ^a	4.28
600	248.39 ± 1.47 ^b	65.63 ± 13.29 ^b	7.03 ± 0.93 ^a	4.56
800	236.58 ± 10.25 ^b	53.13 ± 4.42 ^c	6.88 ± 0.88 ^a	4.47
1000	230.83 ± 7.83 ^b	56.25 ± 8.84 ^c	4.66 ± 0.81 ^b	3.03

^{*}Means within a column not sharing the same superscripts are significantly different ($p < 0.05$).
[¶] PO ratio = PO activity in shrimp treated with chitin / PO activity in control group.

Table 3. Percent survival of kuruma shrimp *Penaeus japonicus* challenged with *vibrio vulnificus* PJ1 (5×10^5 CFU/g BW) after the different feeding schemes for 15 days.

<i>Group</i>	<i>Days for feeding with</i>		<i>Survival</i> (%) [*]
	<i>400 mg/kg</i> <i>chitin diets</i>	<i>Control diets</i>	
1		1- 15	52.5±10.6 ^c
2	1 - 5	6 - 15	60.0± 7.1 ^b
3	1 - 10	11 - 15	72.5± 3.5 ^a
4	1 - 5; 11-15	6 - 10	62.5±10.6 ^b
5	1 - 15		75.0±14.1 ^a

^{*}Values within a column not sharing the same superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Sung^(9,28)的研究指出, 以 β -1,3-glucan 浸泡後的草蝦苗, 其抗菌能力可持續到 18 天, 但其血液內 PO 活性在 24 小時後即不顯著。本試驗結果亦顯示, 雖然飼料中添加 400 mg/kg 幾丁質飼養的斑節蝦活存率最高, 但其 PO 活性並不比添加 600 及 800 mg/kg 組為高; 其原因可能是甲殼類的非專一性抗病機轉, 除了 PO 系統外, 尚有沉澱素⁽³⁴⁾、殺菌素⁽³⁵⁾、凝集素⁽³⁶⁾、調理素及溶解酵素⁽³⁷⁾, 對蝦的防禦機轉是上述的共同表現, 而 Fange 也認為, 幾丁質可能經由激活與幾丁質水解酵素同為 N-acetyl-muramhydrolase 類結構的溶解酵素 (lysozyme), 來達到增強非專一性免疫的效果⁽³⁸⁾。故本試驗僅在證實飼料中添加幾丁質確可提高斑節蝦的非專一性免疫反應, 至於提高的程度如何, 或何種條件下可達最適之免疫反應, 則非僅測 PO 活性單一因子所能論斷的。

根據文獻記載, 許多種多醣類均能刺激甲殼類的 proPO 系統活化, 如 Peptidoglycan⁽²⁵⁾, lipopolysaccharide⁽²⁴⁾ 及 β -glucan⁽⁷⁾, 比較這些免疫賦活劑施用於養殖對蝦類對於提高其抗菌能力上的表現, 在用量方面, Peptidoglycan 添加 100 mg/kg⁽²⁵⁾, β -1,3-glucan 添加 500 mg/kg^(7,9) 可顯著提高活存率。本試驗幾丁質則以添加 400 mg/kg 為最佳。在效期方面, Sung⁽⁹⁾以 β -1,3-glucan 500 mg/kg 對 PL 30 草蝦苗浸泡處理 3 小時, 抗菌效果可持續到 18 天, 若對幼蝦採用口服 β -1,3-glucan 處理, Liao 等⁽⁷⁾的研究顯示, 添加 500 mg/kg β -1,3-glucan 於飼料中, 持續投餵 10 天後可明顯提高活存率, 但持續投餵 20 天後產生反效果。綜合言之, 本試驗所採用的幾丁質在用法及有效用量方面與其他多醣類免疫賦活劑相仿, 而在效期方面, β -1,3-glucan 的表現可能更佳。但若考慮製作成本, 取自細菌的 Peptidoglycan 及取自真菌的 β -glucan, 均需刻意培養所需的純種微生物, 且須在管理嚴苛不容許污染的微生物工廠生產, 再經繁複純化手續取得。另一方面, 甲殼類本身即是台灣重要的水產品及加工原料, 其廢棄物約佔體重之 80%⁽³⁹⁾, 而這些廢棄物中即含有乾重 20~58% 的幾丁質⁽⁴⁰⁾, 倘加以回收利用可能生產 1,500 公噸之幾丁質⁽⁴¹⁾, 不僅能解決引起惡臭的甲殼廢棄物環境污染問題; 亦大大提高了甲殼類的附加價值; 故以經濟效益的角度評估, 發展幾丁質做為養殖蝦類之飼料添加劑, 確實較諸其他價昂的

多醣類免疫賦活劑更具競爭力。

謝辭

本研究承所長廖一久博士的鼓勵與支持, 省府預算 (86 水試-養-32) 之經費補助, 及其他未具名審查者提供寶貴意見, 謹此誌謝。

參考文獻

1. Liao, I C. (1997) How can aquaculture help sustain world fisheries? In *Developing and Sustaining World Fisheries Resources the States of Science and Management*, 2nd World Fisheries Congress, (D. A. Hancock, D. C. Smith, A. Grant, J. P. Beumer eds.). CSIRO, Australia, 431-436.
2. Lightner, D. V. (1988) *Vibrio* disease. In *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*, (C. J. Sindermann and D. V. Lightner eds.). 2nd edn., Elsevier, New York, 42-47.
3. Song, Y. L., W. Cheng and C. H. Wang (1993) Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infections for cultured shrimp in Taiwan. *J. Invertebr. Pathol.*, **61**: 24-31.
4. Takahashi, Y., T. Itami, M. Kondo, M. Maeda, R. Fujii, S. Tomonaga, K. Supamattaya and S. Boonyaratpalin (1994) Electron microscopic evidence of Bacilliform virus infection in Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathol.*, **29**(2): 121-125.
5. Lo, C. F., J. H. Leu, C. H. Ho, C. H. Chen, S. E. Peng, Y. T. Chen, C. M. Chou, P. Y. Yeh, C. J. Huang, H. Y. Chou, C. H. Wang and G. H. Kou (1996) Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**: 133-141.
6. Crowder, B. (1982) Viral disease control study develop shrimp immunization techniques. *Aquacult. Mag.*, 12-14.
7. 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 beta-1, 3-glucan. *J. Fish. Soc. Taiwan*, **23**(2): 109-116.
8. 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**: 1815-1819.
9. Sung, H. H., G. H. Kou and Y. L. Song (1994) Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Pathol., **29**(1): 11-17.
10. Su, M. S., K. F. Liu, C. F. Chang and I. C. Liao (1995) Enhancement of grass prawn *Penaeus monodon* postlarvae viability by beta-1,3-glucan from *Schizophyllum commune*. J. Taiwan Fish. Res., **3**(2): 125-132.
11. Carroad, P. A and R. A. Tom (1978) Bioconversion of shellfish chitin wastes: process conception and selection of microorganisms. J. Food Sci., **43**: 1158-1161.
12. Young, M. E., R. L. Bell and P. A. Carroad (1985a) Kinetics of chitinase production I Chitin hydrolysis. Biotechnol. Bioeng., **27**: 769-775.
13. Young, M. E., R. L. Bell and P. A. Carroad (1985b) Kinetics of chitinase production II Relationship between bacterial growth, chitin hydrolysis and enzyme synthesis. Biotechnol. Bioeng., **27**: 776-780.
14. Austin, P. R., C. J. Brine, J. E. Castle and J. P. Zikakis (1981) Chitin: New facets of research. Science, **212**: 749-753.
15. Suzuki, K., A. Tokoro, Y. Okawa, S. Suzuki and M. Suzuki (1985) Enhancing effects of N-acetyl-chito-oligosaccharides on the active oxygen-generating and microbicidal activities of peritoneal exudate cells in mice. Chem. Pharm. Bull., **33**: 886-888.
16. Suzuki, K., T. Mikami, Y. Okawa, A. Tokoro, S. Suzuki and M. Suzuki. (1986) Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. Carbohydr. Res., **151**: 403-408.
17. Suzuki, S., T. Watanabe, T. Mikami, J. Matsumoto and M. Suzuki (1992) Advances in Chitin and Chitosan. (C. J. Brine, P. A. Sandford and J. P. Zikakis eds.). Elsevier, appl. Sci., London, 86-105.
18. Takahashi, Y., T. Itami and M. Kondo (1995) Immunodefense system of crustacea. Fish Pathol., **30**(2): 141-150.
19. Johansson, M. W. and K. Soderhall (1989) Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. Parasitol. Today, **5**: 171-176.
20. Smith, V. J. and K. Soderhall (1991) A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. Dev. Comp. Immunol., **15**: 251-261.
21. Soderhall, K., L. Cerenius and M. W. Johansson (1994) The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defense. Ann. NY Acad. Sci., **712**: 155-161.
22. Soderhall, K., A. Aspan and B. Duvic (1990) The proPO system and associated proteins: role in cellular communication in arthropods. Res. Immunol., **141**: 896-907.
23. Soderhall, K. and T. Unestam (1979) Activation of serum prophenoloxidase in arthropod immunity. The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins of crayfish phenoloxidase. Can. J. Microbiol., **25**: 406-414.
24. Soderhall, K. and L. Hall (1984) Lipopolysaccharid-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. Biochem. Biophysic. Acta., **797**: 99-104.
25. Boonyaratpalin, S., M. Boonyaratpalin, K. Supamattaya and Y. Toride (1995) Effects of peptidoglycan (PG) on growth, survival, immune response, and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. In Diseases in Asia Aquaculture II, (M. Shariff, J. R. Arthur and R. P. Subasinghe eds.). Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippine, 469-477.
26. Baumann, P., A. L. Furniss and V. L. John (1985) Genus I. *Vibrio* Pacini 1854, 411^{AL}. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (N. R. Krieg and J. G. Holt eds.). Vol. 1., Williams & Wilkins, 518-538.
27. Bradford, 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.
28. Sung, H. H., Y. L. Yang and Y. L. Song (1996) Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. J. Crust. Biol., **16**(2): 278-284.
29. SAS Institute Inc. (1985) SAS user's guide: Statistics, Veriam 5th ed. SAS Institute Inc., Cary, N. C., 956pp.
30. Koga, D., K. Mizuki, A. Ide, M. Kono, T. Matsui and C. Shimizu (1990) Kinetics of a chitinase from a prawn, *Penaeus japonicus*. Agric. Biol. Chem., **54**: 2505-2512.
31. Lynn, K. R. (1990) Chitinases and chitobiases from the

- American lobster (*Homarus americanus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **96B**: 761-766.
32. Spinder-Bath, M., A. Van-Wormhoudt and K-D. Spindler (1990) Chitinolytic enzymes in the integument and midgut-gland of the shrimp *Palaemon serratus* during the moulting cycle. *Mar. Biol.*, **106**: 49-52.
33. Fox, C. J. (1993) The effect of dietary chitin on the growth, survival and chitinase levels in the digestive gland of juvenile *Penaeus monodon* (Fab.). *Aquaculture*, **109**: 39-49.
34. Stewart, J. E. and E. M. Foley (1969) A precipitin reaction of the lobster *Homarus americanus*. *J. Fish Res. Bd. Can.*, **26**: 1392-1397.
35. Stewart, J. E. and B. M. Zwicker (1972) Natural and induced bacterial activities of the lobster, *Homarus americanus*: products of hemocyte-plasma interaction. *Can. J. Microbiol.*, **18**: 1499-1509.
36. Cornick, J. W. and J. E. Stewart (1973) Partial characterization of a natural agglutinin in the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*. *J. Invertebr. Pathol.*, **21**: 255-262.
37. Hose, J. E. and G. G. Martin (1989) Defense functions of granulocytes in the fidgeback prawn *Sicyonia ingentis*. *J. Invertebr. Pathol.*, **53**: 335-346.
38. Fange, B., G. Lundblad and J. Lind (1976) Lysozyme and chitinase in blood and lymphomyeloid tissues of marine fish. *Mar. Biol.*, **36**: 277-282.
39. Bough, W. A., A. L. Shewfelt and W. L. Salter (1975) Use of chitosan for the reduction and recovery of solids in poultry processing waste effluents. *Poultry Sci.*, **54**: 992-1000.
40. Carroad, P. A. and R. A. Tom (1978) Bioconversion of shellfish chitin wastes: process conception and selection of microorganisms. *J. Food Sci.*, **43**: 1158-1161.
41. 臺灣省農林廳漁業局 (1997) 中華民國台灣地區漁業年報.

Chin-I Chang, Wu-Chung Lee, Shu-Ling
Chen and Chung-Zen Shyu

Department of Aquaculture, Taiwan Fisheries
Research Institute, 199 Hou-Ih Rd., Keelung 202,
Taiwan.

(Accepted 19 June 1997)



Effects of Diets Containing Chitin on Growth and Immunocompetence of the Kuruma Shrimp *Penaeus japonicus*

Abstract

Two series of experiments were conducted to evaluate the effectiveness of dietary chitin on the growth and immunocompetence of the kuruma shrimp *Penaeus japonicus*. In the first experiment kuruma shrimp were fed with diets containing graded levels of chitin (0, 200, 400, 600, 800 and 1000 mg/kg diet) for 40 days. The growth rate observed in the 400, 600, 800, 1000 mg/kg groups were significantly ($p < 0.05$) higher than those 0 and 200 mg/kg groups. When challenged by intramuscular injection of *Vibrio vulnificus* PJ1 at a dosage of 5×10^5 CFU/g body weight, the shrimp fed with 400, 200 and 600 mg/kg chitin showed survival rates significantly ($p < 0.05$) higher than the shrimp fed with 0, 800 and 1000 mg/kg chitin. Additionally, the shrimp fed with chitin at concentrations of 400, 600 and 800 mg/kg showed an enhanced phenoloxidase (PO) activity than the 200 and 1,000 mg/kg groups, and the group fed with 0 mg/kg chitin showed the lowest PO activity. In the second experiment shrimps were fed with diet containing 400 mg/kg chitin for various time periods to investigate the optimum duration to maximize the protection. The results revealed that the protective effect was highest after 10-day continuous administration and lasted for at least five more days.

Key words: Kuruma shrimp, Chitin, Phenoloxidase