

緩解四絲馬鮫低溫緊迫之營養添加物篩選

郭錦朱* · 張博淵 · 賴哲翊 · 林如謙 · 周芷儀 · 周瑞良 · 吳豐成

行政院農業委員會水產試驗所東港生技研究中心

摘要

四絲馬鮫 (*Eleutheronema tetradactylum*) 是我國重要的高經濟養殖魚類之一，不耐低溫緊迫，遇寒害易大量死亡，因此，本研究旨在篩選能提高其對低溫緊迫耐受力之營養添加物。選用的營養添加物包括維生素 E、膽鹼、維生素 C、色胺酸與維生素 C 和 E 合劑等 5 種，投餵四絲馬鮫 4 週後，進行低溫緊迫 (在 14°C 放置 25 分鐘) 處理，結果發現試驗魚對冷緊迫的耐受力依序分別增強 18、55、64、68 及 59% ($p < 0.01$)。根據上述試驗結果，選擇表現較佳之膽鹼、維生素 C 和色胺酸 3 種單營養素，分別投餵四絲馬鮫 1、2 及 3 週後，進行低溫緊迫處理，結果顯示，投餵 1 週時，各組魚隻對冷緊迫的耐受力未顯現差異；2 週時，膽鹼及維生素 C 添加組顯著優於對照組 ($p < 0.05$)，但與色胺酸添加組間無差異；3 週時，所有添加組皆優於對照組 ($p < 0.01$)，耐受力依序分別增強 64、50 及 55%。此外亦發現，上述 5 種營養添加物均可顯著提升魚的增重 ($p < 0.01$)；另，膽鹼、維生素 C 和色胺酸則皆能顯著降低魚血中的皮質醇含量 ($p < 0.01$)。

關鍵詞：低溫緊迫、四絲馬鮫、營養素、皮質醇

前言

緊迫 (stress) 是指動物體受到外界不良因子刺激後，在沒有發生特異的病理性損害前所產生的非特異性應答反應。近年來，魚類的緊迫研究明顯增加，因其與動物福祉及養殖收益密切相關，一般普遍認為良好的魚類福祉可以確保魚的成功養殖；反之，惡劣的養殖條件，魚類的生存和成長等都會顯著低下 (Read, 2008)。此外，魚遭受緊迫時，血液皮質醇 (cortisol) 含量會上升 (Wendelaar Bonga, 1997; Abreu *et al.*, 2009)，所以，皮質醇的含量常被作為魚類是否面臨緊迫的評估指標之一 (Martinez-Porchas *et al.*, 2009)。

很多文獻皆證實，功能性食品除提供動物生存及成長所需營養外，還能提高動物對緊迫的耐受力，為一種改善動物總體健康 (含福祉) 之既簡單而又實用的飼養策略 (Olmos-Soto, 2015)。近數十年來，緊迫反應已應用於探討營養需求課題上，如飼料中添加不同濃度和配比的蛋白質、脂質、碳

水化合物、維生素、胺基酸等營養添加物之相關研究 (Morrow *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2013; Hooley *et al.*, 2015; Azeredo *et al.*, 2017; Forsatkar *et al.*, 2017; Herrera *et al.*, 2017; Imanpoor *et al.*, 2017; Jia *et al.*, 2017; Cabanillas-Gómez *et al.*, 2018)，這也證實了飼料營養添加物可影響魚類緊迫反應 (Fletcher, 1997)。能提供魚對水溫變化緊迫保護作用的營養素很多；Cheng *et al.* (2018) 發現河豚 (*Takifugu obscurus*) 餵食維生素 C 可有效降低魚在低溫緊迫下細胞凋亡和 DNA 損傷的比率，且可增加與能量代謝、免疫反應和細胞骨架相關的表達蛋白。此外，水溫降低會影響魚類對維生素 E 的需求和新陳代謝，魚類可以通過細胞膜雙層流動性的生化調節作用來適應寒冷，這對於低溫下的細胞功能至為重要，Gieseg *et al.* (2000) 發現南極魚類的血漿維生素 E 的含量比溫帶魚類高 5 - 6 倍，這顯示暴露在寒冷環境中的魚類可能需要更多的維生素 E。維生素 E 及維生素 C 皆為抗氧化力強的營養素，二者合用具協同作用 (El-Sayed and Izquierdo, 2021)。另，Varghese *et al.* (2021) 指出色胺酸 (tryptophan) 可緩解南亞野鯪 (*Labeo rohita*) 對熱緊迫的耐受力，並可促進魚成長及免疫力，且魚體內的膽鹼在

*通訊作者 / 屏東縣東港鎮豐漁街 67 號; TEL: (08)8324-121 轉 270; FAX: (08)8320-234; E-mail: jjguo@mail.tfrin.gov.tw

Table 1 Composition approximative of the experimental diets

Proximate composition	Control	Treatment				
		+0.2% Vit C	+0.1% Vit E	+0.2% Vit C +0.1% Vit E	+1.7% Tryptophan	+0.3% Choline chloride
Ash (%)	11.4	11.3	11.3	11.2	11.2	11.3
Crude protein (%)	48.4	48.9	50.4	50.4	48.4	48.4
Crude lipid (%)	6.9	6.3	6.3	6.5	6.5	6.2
Calculated energy (kcal/g diet)	4.5	4.6	4.6	4.5	4.6	4.5

維持細胞膜結構完整性、膽鹼性神經傳遞 (cholinergic neurotransmission)、跨膜信號傳導、脂質和膽固醇的運輸及新陳代謝方面具有重要作用 (Das *et al.*, 2021)，儲存在魚體內的膽鹼會依生理機能異化成所需之膽鹼衍生物；Hebb *et al.* (1972) 發現冷適應之金魚之膽鹼乙醯轉移酶 (choline acetyltransferase) 對膽鹼的親和力隨水溫的下降而提高，推測在低溫下需要較多的膽鹼來合成乙醯膽鹼 (acetylcholine) 神經傳遞物質。

馬鮫科魚類是我國重要的高經濟養殖魚類之一，2021 年產值達新臺幣 18.5 億元，約佔內陸養殖漁業總產值 (新臺幣 271.9 億元) 的 6.8% (漁業署, 2022)，其中又以四絲馬鮫 (*Eleutheronema tetradactylum*) 為主要養殖對象。

四絲馬鮫為廣鹽性魚種，在鹽度 0.3 – 35 psu 下都可存活，但對低溫的耐受性差，水溫低於 14°C 就會死亡。2022 年 2 月寒流襲擊南台灣，東港地區的養殖池水溫自 25°C 驟降至 13°C，即有不少四絲馬鮫因而死亡。近年來極端氣候發生頻度日增，在寒害緊迫的威脅下，養殖魚會因免疫力低下而容易罹病，進而導致大量死亡。本研究在商業飼料中添加維生素 C、維生素 E、色胺酸、膽鹼等，並從中篩選出具調節或減緩四絲馬鮫對冷緊迫反應之營養添加物，同時建立最符合效益之投餵期間及濃度供養殖業者參考。

材料與方法

一、供試魚隻培育

四絲馬鮫吋苗購自屏東枋寮種苗業者，購回後蓄養在 1.8 ton FRP 桶，採流水、飽食方式馴養

5 – 12 個月。馴養期間養殖用水的水溫、鹽度、pH、溶氧 (DO) 及亞硝酸鹽氮 ($\text{NO}_2\text{-N}$) 分別為 25 – 28°C、30 psu、7.9 – 8.0、7.1 – 7.4 ppm 及 0.15 ppm。採用的飼料為海產種苗用飼料 (日清, 日本) 及鰻魚 (午魚) 浮性飼料 (東立, 臺灣)。

二、供試飼料製備

參考 Herrera *et al.* (2019) 對緩解魚類緊迫反應之營養添加物試驗結果，本研究選用了 5 種營養添加物，分別為 0.1% 維生素 E (α -tocopherol; Vit E, Sigma-Aldrich, USA)、0.3% 膽鹼 (choline chloride, Sigma-Aldrich)、0.2% 維生素 C (L-ascorbic acid; Vit C, Sigma-Aldrich)、1.7% 色胺酸 (L-tryptophan; Sigma-Aldrich) 與 0.2% 維生素 C + 0.1% 維生素 E 合劑等。將該 5 種營養配方分別加入鰻魚粉混合均勻，加水，以絞肉機擠成條狀後製粒，40°C 烘乾 24 hr，即得供試飼料，於 4°C 保存，供日後餵食及飼料分析用；同時以鰻魚粉作為對照組。飼料的一般成份分析 (AOAC, 2003) 如 Table 1 所示，其粗蛋白、粗脂肪、灰份及能量之含量分別為 48.4 – 50.4%、6.2 – 6.9%、11.2 – 11.4% 及 4.5 – 4.6 kcal/g。

三、建立急降溫處理模式

將四絲馬鮫 (均重 47.1 ± 1.3 g) 自室溫 26°C 分別在 16 L 海水中急降溫至 13、14 及 15°C 後放置 15、20、25 及 30 min (處理試驗期間打氣但不流水)，再移回室溫海水中，觀測經急冷緊迫處理試驗後魚隻之死亡率，並分析急冷緊迫時間及魚隻死亡率之關係，建立供試魚之死亡率在 70 – 80% 之急降溫模式。

四、耐低溫緊迫之營養添加物篩選

(一) 投餵時間 4 週

將供試四絲馬鮫 (均重 25.6 ± 1.0 g) 隨機飼養在 0.5 ton FRP 桶中, 每桶 10 尾, 試驗添加有維生素 E、膽鹼、維生素 C、色胺酸、維生素 C+E 合劑及對照組等 6 種供試飼料, 每組 3 重複, 共 18 桶, 投餵供試飼料 4 週, 採流水式飼養, 海水鹽度 30 ± 1 psu, 水溫 $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 飼料投餵量為魚體重之 3%。投餵 4 週後以急降溫模式進行處理, 觀測 7 天期間之死亡率, 依此篩選能提高四絲馬鮫對低溫緊迫耐受力之飼料營養添加物, 並計算其相對活存率 (relative percent survival, $\text{RPS} = [1 - (\text{處理組死亡率} / \text{對照組死亡率})] \times 100$) 及增重比 (percent weight gain; $\text{WG}\% = (\text{最後體重} - \text{初重}) / \text{初重} \times 100$)。

(二) 投餵時間 1 - 3 週

將供試四絲馬鮫 (均重 46.8 ± 1.5 g) 飼養在 0.5 ton FRP 桶中, 每桶 30 尾, 以前述投餵 4 週表現最佳之添加單種營養素的 3 組及對照組為供試飼料, 每組 3 重複, 共 12 桶, 採流水式飼養, 海水鹽度 30 ± 1 psu, 水溫 $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。投餵量為魚體重之 3%, 四絲馬鮫投餵供試飼料分別於 1、2 及 3 週後, 以急降溫模式進行處理, 而後觀測 7 天期間之死亡率, 以評估供試營養素在不同投餵時程於四絲馬鮫對冷緊迫耐受力之影響, 並計算其相對活存率及增重比。

五、營養素添加對四絲馬鮫冷緊迫時血中皮質醇含量之影響

將供試四絲馬鮫 (均重 189.8 ± 25.8 g) 飼養在 0.5 ton RP 桶中, 每桶 4 尾, 以前述添加維生素 C、膽鹼、色胺酸、對照組等 4 種為供試飼料, 每組 4 重複, 共 16 桶, 投餵供試飼料 4 週, 採流水式飼養, 海水鹽度 30 ± 1 psu, 水溫 $26.4 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。飼料餵飼量為魚體重之 3%, 投餵 4 週後以急降溫模式進行處理, 於尾靜脈採血, 採得之血液以 3000 g 離心 5 min 取得血漿, 血漿再以乙醚 (Merck, USA) 萃取, 取上層液, 重覆 3 次, 並將 3 次上層液合併, 以氮氣吹乾, 即得血漿樣品, 置

入 -80°C 冰箱中貯放備測。血漿樣品中的皮質醇含量用 Cortisol Elisa kits (Enzo, USA) 以酵素聯結免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 檢測。

六、統計分析

所有試驗結果皆以微軟 Excel 軟體內的單因子變異數分析法 (one-way ANOVA) 統計, 顯著水準設有 $p < 0.01$ 及 $p < 0.05$ 。

結果與討論

為因應極端氣候之寒流突襲下, 四絲馬鮫不耐低溫緊迫而大量死亡的產業需求, 本研究進行能提升四絲馬鮫對冷緊迫耐受力之飼料營養添加物篩選。為利人工冷緊迫處理試驗之進行, 首先確立四絲馬鮫對低溫的耐受極限及死亡率, 結果發現四絲馬鮫在 13、14 及 15°C 下冷緊迫放置 30 min 的死亡率分別為 100、100 及 0% (Table 2), 此外, 在 14°C 下冷緊迫放置 15、20、25 及 30 min, 死亡率則如 Fig. 1 所示, 四絲馬鮫在 14°C 下的冷緊迫時間與死亡率呈線性正相關, 線性迴歸方程式為 $y = 7.03x - 109.68$ ($R^2 = 0.95$), 且為將魚的冷緊迫處理試驗的死亡率控制在 60 - 70%, 選用 14°C 放置 25 min 作為冷緊迫處理模式, 帶入上述方程式, 推算其死亡率約為 66%。至於, 以 14°C 放置 25 進行冷緊迫處理期間之養殖用水的鹽度、pH、溶氧及亞硝酸鹽氮分別為 30 psu、7.9 - 8.0、8.3 - 8.6 ppm 及 0.15 ppm, 顯見冷緊迫處理試驗期間水質皆在良好範圍。

Table 2 Mortality of fourfinger threadfin (*Eleutheronema tetradactylum*) following a 30-minute cold-shock at 13°C to 15°C

Temperature, $^\circ\text{C}$	Mortality, %
13	100
14	100
15	0

本研究選用的營養添加物配方 (劑量) 有維生素 E (0.1%)、膽鹼 (0.3%)、維生素 C (0.2%)、色胺酸 (1.7%)、維生素 C (0.2%) + E (0.1%) 合計

5 種。本試驗先分別以試驗飼料餵養四絲馬鮫 4 週後，再轉置於 14°C 水中 25 min 進行冷緊迫處理試驗，結果如 Figs. 2 及 3 所示，結果顯示所有添加組皆能提升四絲馬鮫對冷緊迫的耐受力 ($p < 0.01$)，其耐受力依序分別增強 18、55、64、68 及 59%，且皆可促進四絲馬鮫成長 ($p < 0.01$)；其中，又以膽鹼、維生素 C、色胺酸、維生素 C+E 合劑 4 種營養添加物配方效果較好，對四絲馬鮫的增重效果均優於不補充營養添加物之對照組及僅補充維生素 E 供試組。

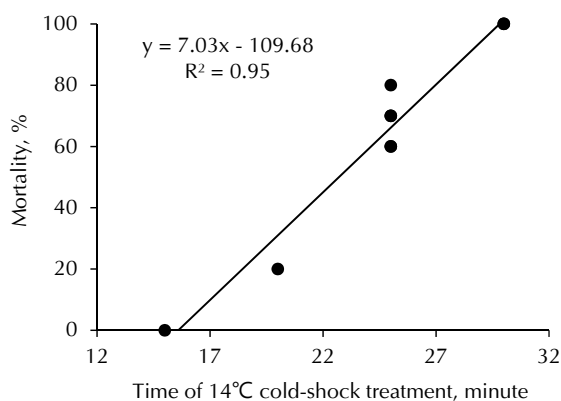


Fig. 1 A graph depicting the mortality of fourfinger threadfin (*Eleutheronema tetradactylum*) exposed to 14°C for 15, 20, 25, and 30 minutes ($n = 10$ for each data).

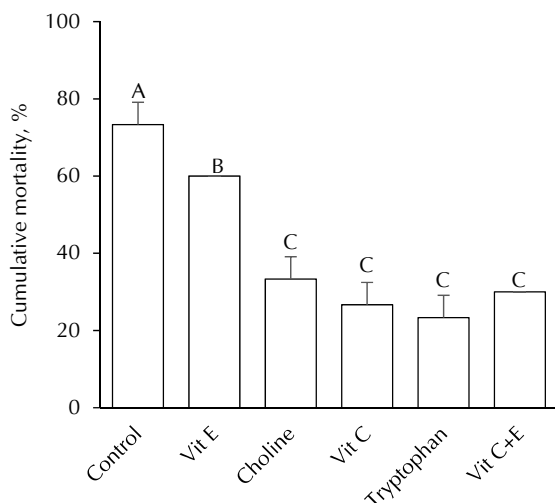


Fig. 2 Cumulative mortality of fourfinger threadfin (*Eleutheronema tetradactylum*) fed nutrient-supplemented diets (i.e., vitamin E, choline, vitamin C, tryptophan, and a mixture of vitamins C and E) for 4 weeks, followed by stress at 14°C for 25 minutes. The data are displayed as the mean \pm standard deviation ($n = 3$). Different letters differ significantly ($p < 0.05$).

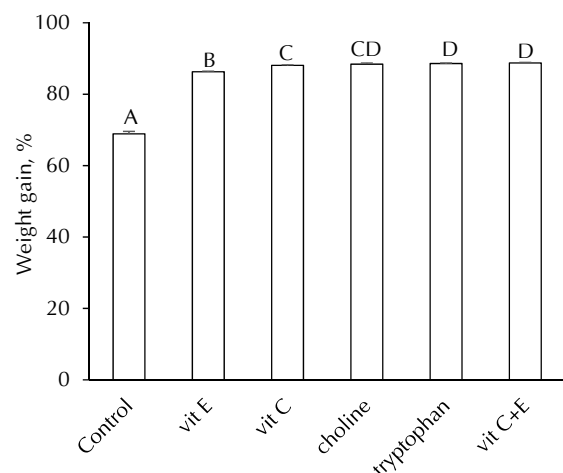


Fig. 3 Percent weight gain of fourfinger threadfin (*Eleutheronema tetradactylum*) fed nutrient-supplemented diets (i.e., vitamin E, vitamin C, choline, tryptophan, and a mixture of vitamin C and E) for 4 weeks, followed by 25 minutes of stress at 14°C. The data are displayed as the mean \pm standard deviation ($n = 3$). Different letters differ significantly ($p < 0.05$).

接著，再將膽鹼、維生素 C 和色胺酸 3 種營養素分別補充加於飼料投餵四絲馬鮫 1、2 及 3 週後，再以 14°C 放置 25 min 進行冷緊迫處理試驗，結果如 Figs. 4 及 5 所示；供試魚對冷緊迫的耐受力，投餵 1 週時各組間無差異；投餵 2 週時飼料中補充膽鹼及維生素 C 添加組魚對冷緊迫耐受力顯著優於對照組 ($p < 0.05$)，而與色胺酸添加組間則無顯著差異；經連續投餵不同供試飼料 3 週後，所有添加組皆優於不額外補充任何添加物之對照組 ($p < 0.01$)，對冷緊迫之耐受力依序分別增強 64、50 及 55%；至於營養添加物對四絲馬鮫成長的影響，結果顯示所有添加組在 1 - 3 週的投餵期間對四絲馬鮫的增重皆具顯著增進效果 ($p < 0.01$)。另，將攝食補充膽鹼、維生素 C 及色胺酸 3 種營養素之四絲馬鮫經轉置入 14°C 海水中 25 min 的冷緊迫後，再自尾靜脈採血 1cc，測其血中皮質醇，結果發現攝食補充任一營養素飼料之魚的血中皮質醇含量皆顯著低於飼料中不額外補充營養素之對照組 ($p < 0.01$) (Fig. 6)。

綜上結果可知，以補充 5 種營養素 (即維生素 E、膽鹼、維生素 C、色胺酸、維生素 C+E 合劑) 的供試飼料投餵四絲馬鮫 4 週，可提高四絲馬鮫對冷緊迫的耐受力及魚的增重，若再將緩解冷緊迫效力達 55% 以上的 3 種單營養素 (即維生素 C、

膽鹼、色胺酸) 投餵四絲馬鮫 1 - 3 週，結果發現投餵時程 1 週時，僅可促進魚成長，對魚冷緊迫的耐受力並無增強效果；然當持續投餵 2 週後，不僅可促進魚成長外，飼料補充膽鹼及維生素 C 亦可提升魚對冷緊迫的耐受力；持續投餵 3 週後，飼料補充維生素 C、膽鹼及色胺酸 3 種營養素不僅促進魚成長，皆可提升四絲馬鮫對冷緊迫的耐受力。由結果顯示 5 種營養素配方在有效的投餵時程下皆可提升四絲馬鮫對冷緊迫的耐受力並促進成長。

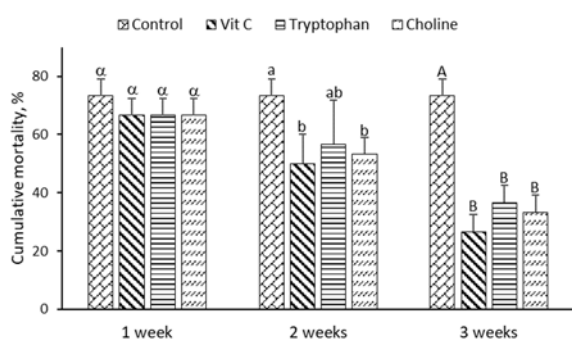


Fig. 4 Cumulative mortality of fourfinger threadfin (*Eleutheronema tetradactylum*) fed nutrient-supplemented diets (vitamin C, tryptophan, and choline) for 1, 2, and 3 weeks, respectively, followed by 25 minutes of stress at 14°C. The data are displayed as the mean ± standard deviation (n = 3). Different letters differ significantly ($p < 0.05$).

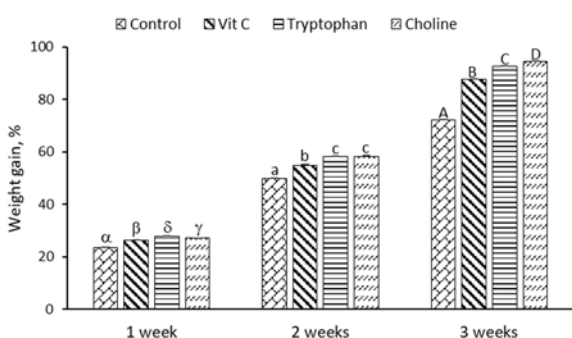


Fig. 5 Fourfinger threadfin (*Eleutheronema tetradactylum*) fed a diet supplemented with vitamin C, tryptophan, and choline for 1, 2, and 3 weeks, respectively. The data are displayed as the mean ± standard deviation (n = 3). Different letters differ significantly ($p < 0.05$).

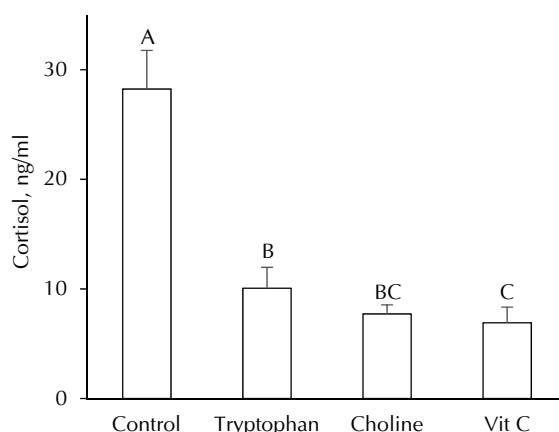


Fig. 6 Plasma cortisol of fourfinger threadfin (*Eleutheronema tetradactylum*) fed nutrient-supplemented diets (vitamin C, tryptophan, and choline) for four weeks and then stressed at 14°C for 25 minutes. The data are expressed as a mean ± standard deviation (n = 4). Different letters have statistically significant differences ($p < 0.05$).

飼料中補充不同的營養素配製的功能性飼料，除提供動物生存及成長所需營養、增強免疫、抵抗病原外，還能拮抗環境壓力源，已有許多研究報導，為一種既簡單又實用的魚類飼養策略 (Olmos-Soto, 2015)。本研究用的營養添加物，維生素有維生素 C、維生素 E 及膽鹼 3 種；其中維生素 C 為水溶性維生素，是最早被作為維生素補充物以減輕魚緊迫的研究對象 (Thompson *et al.*, 1993)，其生理作用是透過降低多不飽和脂質的過氧化作用，抑制類固醇生成 (steroidogenesis) 和增強免疫系統 (Kitabchi, 1967; Blazer, 1992; Khassaf *et al.*, 2003)；Liu *et al.* (2008) 報導維生素 C 可緩解長吻鮠 (*Leiocassis longirostris*) 暴露在氨的慢性應激效應；Imanpoor *et al.* (2017) 則證明維生素 C 是一種有益的膳食補充物，可提高鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 苗的成長、存活率、骨骼發育和對鹽緊迫的耐受力。維生素 E 為油溶性維生素，是維持肉質、免疫力及紅血球對溶血的正常抵抗力，為維持毛細血管和心肌正常通透性所必需的營養素 (Halver, 2002)；Montero *et al.* (2001) 指出攝取缺乏維生素 E 飼料的金頭鯛 (*Sparus aurata*)，其對過度擁擠的慢性緊迫和重複追逐的急性緊迫的耐受力均會有明顯降低；Liu *et al.* (2014) 證實維生素 E 可緩解團頭魴 (*Megalobrama amblycephala*) 對過度擁擠的緊迫，並可抑制皮質

醇的分泌。膽鹼是一種水溶性維生素，為動物細胞膜的結構和維持生理機能所必需的低分子有機化合物，參與脂蛋白形成，可調節脂肪的代謝及轉化，添加在飼料中可增加魚體重，提高幼魚的成活率，增加飼料效率，防止脂肪肝，增強免疫力 (Das *et al.*, 2021)；Michael and Koshio (2013, 2016) 報導膽鹼可提升斑節對蝦 (*Marsupenaeus japonicus*) 幼苗對淡水及福馬林的緊迫耐受力；Shiu *et al.* (2014) 及 Yeh *et al.* (2015) 也分別證實膽鹼可提升點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 及龍膽石斑 (*E. lanceolatus*) 對氨緊迫之耐受力。本研究使用的胺基酸為色胺酸，胺基酸不僅可以作為蛋白質的組成成分和能源，且在體內可轉化為重要的生化活性物質；許多研究報告都顯示魚在緊迫的環境下飼養，會影響其胺基酸代謝 (Aragão *et al.*, 2008; Costas *et al.*, 2008)，且會增加對胺基酸的需求 (Conceição *et al.*, 2012)，因此，添加胺基酸可以減輕魚因緊迫引起的負面生理影響；色胺酸是一種必需胺基酸，在調節應激反應中具有重要作用，它可以轉化為與魚的下視丘-腦下體-腎間腺軸 (hypothalamus-pituitary-interrenal axis) 調控有關的血清素 (serotonin)，血清素的活性與血中皮質醇含量有關 (Winberg and Lepage, 1998)；Aragão *et al.* (2008) 及 Costas *et al.* (2008) 證實魚在緊迫飼養條件下，其血中的色胺酸濃度會下降；以色胺酸分別投餵大西洋鱈魚 (*Gadus morhua*) 7 天 (Höglund *et al.*, 2005) 和點帶石斑 10 天 (Hseu *et al.*, 2003) 可有效降低魚間的相互處理的殘食率；另，以色胺酸投餵大西洋鱈魚 7 天，也可減緩魚之離水、高溫及擁擠的緊迫，且其血中皮質醇含量顯著降低 (Herrera *et al.*, 2019)。

總之，飼料中補充功能性營養素對水產動物的健康管理是一種具有前景的營養策略。當四絲馬鮫面臨冷緊迫環境時，飼料中可分別添加 0.3% 膽鹼、0.2% 維生素 C 及 1.7% 色胺酸連續投餵 3 - 4 週，即可提高四絲馬鮫對冷緊迫的耐受力達 50% 以上。

參考文獻

漁業署 (2022) 中華民國111年台閩地區漁業統計年報。行政院農業委員會漁業署，臺北，臺灣。

- Abreu, J., L. Takahashi, M. Hoshiba and E. Urbinati (2009) Biological indicators of stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after capture. *Braz. J. Biol.*, 69: 415-421.
- A.O.A.C (1984) Official Methods of Analysis (16th ed.). Association of Official Analysis Chemists, Sidney Williams.
- Aragão, C., J. Corte-Real, B. Costas, M. T. Dinis and L. E. C. Conceição (2008) Stress response and changes in amino acid requirements in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Amino Acids.*, 34: 143-148.
- Azeredo, R., M. Machado, A. Afonso, C. Fierro-Castro, F. E. Reyes-López, L. Tort, M. Gestó, M. Conde-Sieira, J. M. Míguez, J. L. Soengas, E. Kreuz, S. Wuertz, H. Peres, A. Oliva-Teles and B. Costas (2017) Neuroendocrine and immune responses undertake different fates following tryptophan or methionine dietary treatment: tales from a teleost model. *Front Immunol.*, 8: 1226.
- Blazer, V. S. (1992) Nutrition and disease resistance in fish. *Annu. Rev. Fis. Dis.*, 2: 309-23.
- Cabanillas-Gámez, M., L. M. López, M. A. Galaviz, C. D. True and U. Bardullas (2018) Effect of L-tryptophan supplemented diets on serotonergic system and plasma cortisol in *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) juvenile exposed to acute stress by handling and hypoxia. *Aqua Res.*, 49: 847-857.
- Chen, M. Y., J. D. Ye, W. Yang and K. Wang (2013) Growth, feed utilization and blood metabolic responses to different amylose-amylopectin ratio fed diets in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aust. J. Anim. Sci.*, 26:1160-1171.
- Cheng, C. H., H. Y. Liang, S. W. Luo, A. L. Wang and C. X. Ye (2018) The protective effects of vitamin C on apoptosis, DNA damage and proteome of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under low temperature stress. *J. Therm. Biol.*, 71: 128-135.
- Conceição, L. E. C., C. Aragão, J. Dias, B. Costas, G. Terova, C. Martins and L. Tort (2012) Dietary nitrogen and fish welfare. *Fish Physiol. Biochem.*, 38: 119-141.
- Costas, B., C. Aragão, J. M. Mancera, M. T. Dinis and L. E. C. Conceição (2008) High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. *Aquacult Res.*, 39: 1-9.
- Das, S., A. Patra, A. Mandal, N. S. Mondal, S. Dey, D. Kole, A. K. Mondal and A. R. Ghosh (2021) Study on impacts of direct supplementation of choline into semi-intensive fish culture system based on

- haematopoietic alterations. *J. Environ. Sustain.*, 9: 100089.
- El-Sayed, A. F. M. and M. Izquierdo (2021) The importance of vitamin E for farmed fish—A review. *Rev. Aquac.* 00:1-16.
- Fletcher, T. C. (1997) Dietary effects on stress and health. *In Fish Stress and Health in Aquaculture* (G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter and C. B. Schreck eds.), Cambridge University Press, Cambridge, UK. 223-246.
- Forsatkar, M. N., M. A. Nematollahi, G. Rafiee, H. Farahmand and C. Lawrence (2017) Effects of the prebiotic mannan-oligosaccharide on the stress response of feed deprived zebrafish (*Danio rerio*). *Physiol. Behav.*, 180: 70-77.
- Gieseg, S., S. Cuddihy, J. Hill and W. Davison (2000) A comparison of plasma vitamin C and E levels in two Antarctic and two temperate water fish species. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.*, 125: 371-378.
- Halver, J. E. (2002) The vitamins. *In Fish Nutrition* (J. E. Halver and R.W. Hardy eds.), Academic Press, San Diego, CA, U.S.A., 61-141.
- Hebb, C., T. C. Stephens and M. W. Smith (1972) Effect of environmental temperature on the kinetic properties of goldfish brain choline acetyltransferase. *Biochem. J.*, 129: 1013-1021.
- Herrera, M., J. M. Mancera and B. Costas (2019) The use of dietary additives in fish stress mitigation: comparative endocrine and physiological responses. *Front. Endocrinol.*, 10: 447.
- Herrera, M., M. A. Hervas, I. Giráldez, K. Skar, H. Mogren, A. Mortensen and V. Puvanendran (2017) Effects of amino acid supplementations on metabolic and physiological parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua*) under stress. *Fish Physiol. Biochem.*, 43: 591-602.
- Höglund, E., M. J. Bakke, Ø. Øverli, S. Winberg and G. E. Nilsson (2005) Suppression of aggressive behaviour in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*), by L-tryptophan supplementation. *Aquaculture*, 249: 525-531.
- Hooley, C. G., F. T. Barrows, J. Paterson and W. M. Sealey (2014). Examination of the effects of dietary protein and lipid levels on growth and stress tolerance of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. World Aquacul. Soc.*, 45: 115-126.
- Hseu, J. R., F. I. Lu, H. M. Su, L. S. Wang, C. L. Tsai and P. P. Hwang (2003) Effect of exogenous tryptophan on cannibalism, survival and growth in juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, 218: 251-263.
- Imanpoor, M., M. R. Imanpoor and Z. Roohi (2017) Effects of dietary vitamin C on skeleton abnormalities, blood biochemical factors, haematocrit, growth, survival and stress response of *Cyprinus carpio* fry. *Aquacult Int.*, 25: 793-803.
- Jia, Y., Q. Jing, H. Niu and B. Huang (2017) Ameliorative effect of vitamin E on hepatic oxidative stress and hypoimmunity induced by high-fat diet in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immun.*, 67: 634-642.
- Khassaf, M., A. McArdle, C. Esanu, A. Vasilaki, F. McArdle, R. D. Griffiths, D. A. Brodie and M. J. Jackson (2003) Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. *J. Physiol.*, 549: 645-652.
- Kitabchi, A. E. (1967) Ascorbic acid in steroidogenesis. *Nature*, 215: 1385-1386.
- Kumar, P., S. Saurabh, A. K. Pal, N. P. Sahu, A. R. T. Arasu (2014) Stress mitigating and growth enhancing effect of dietary tryptophan in rohu (*Labeo rohita*, Hamilton, 1822) fingerlings. *Fish Physiol. Biochem.*, 40(5): 1325-1338.
- Liu, B., P. Xu, J. Xie, X. Ge, S. Xia, C. Song, Q. Zhou, L. Miao, M. Ren, L. Pan and R. Chen (2014) Effects of emodin and vitamin E on the growth and crowding stress of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish Shellfish Immunol.*, 40: 595-602.
- Liu, H., S. Xie, X. Zhu, W. Lei, D. Han and Y. Yang (2008) Effects of dietary ascorbic acid supplementation on the growth performance, immune and stress response in juvenile *Leiocassis longirostris* Günther exposed to ammonia. *Aqua Res.*, 39: 1628-1638.
- Martinez-Porchas, M., L. R. Martinez-Cordova and R. Ramos-Enriquez (2009) Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress?. *Pan-Am. J. Aquat. Sci.*, 4: 158-178.
- Michael, F. R. and S. Koshio (2013) Dietary choline improves the stress tolerance against freshwater and formalin in post larval Kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture*, World Aquaculture Society. 21-25 Feb., 2013, Nashville, Tennessee.
- Michael, F. R. and S. Koshio (2016) Effect of choline chloride as an osmoregulator as well as its role in growth and the biochemical content of postlarval kuruma shrimp; *Marsupenaeus japonicus* (Bate). *Aquac. Nutr.*, 22: 597-605.

- Montero, D., L. Tort, L. Robaina, J. M. Vergara and M. S. Izquierdo (2001) Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol.*, 11: 473-490.
- Morrow, M. D., D. Higgs and C. J. Kennedy (2004) The effects of diet composition and ration on biotransformation enzymes and stress parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Phys. C.*, 137: 143-154.
- Olmos-Soto, J. (2015) Functional feeds in aquaculture. *In Handbook of Marine Biotechnology* (S. W. Kim ed.), Springer press, Heidelberg, Germany, 1303-1319.
- Read, N. (2008) Fish farmer's perspective of welfare. *In Fish Welfare* (E. B. Branson ed.), Blackwell press, Oxford, UK, 101-110.
- Shiu, Y. L., S. T. Chiu, S. L. Wong and C. H. Liu (2014) Dietary choline improves ammonia-N stress tolerance of orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton). *J. Fish. Soc. Taiwan*, 41: 235-248.
- Thompson, I., A. White, T. C. Fletcher, D. F. Houlihan and C. J. Secombes (1993) The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture*, 114: 1-18.
- Varghese, T., S. Ebeneza, S. A. Dar, A. K. Pal (2021) Mitigation of stress in fish through nutraceuticals. *World J. Aquac. Res. Develop.*, 3(1): 1014.
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997) The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77: 591-625.
- Winberg, S. and O. Lepage (1998) Elevation of brain 5-HT activity, POMC expression and plasma cortisol in socially subordinate rainbow trout. *Am. J. Physiol.*, 43: R645-654.
- Yeh, S. P., P. J. Shiu, W. C. Guei, Y. H. Lin and C. H. Liu (2015) Improvement in lipid metabolism and stress tolerance of juvenile giant grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), fed supplemental choline. *Aquacult. Res.*, 46: 1810-1821.

Screening of Nutritional Additives for Cold-induced Stress Mitigation in Fourfinger Threadfin (*Eleutheronema tetradactyla*)

Jiin-Ju Guo^{*}, Po-Yuan Chang, Chen-Yi Lai, Ru-Chian Lin, Chih-Yi Chou,
Ruey-Ling Chou and Feng-Cheng Wu

Tungkang Biotechnology Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

In Taiwan, the fourfinger threadfin (*Eleutheronema tetradactylum*), which is not resistant to low temperatures and is susceptible to dying from cold damage, is an important high-value farmed fish. Therefore, the purpose of this study was to identify nutritional supplements that could improve the cold tolerance of the fourfinger threadfin. Five nutrient supplements, including vitamin E, choline, vitamin C, tryptophan, and vitamin C+E complex, were chosen and fed to the fourfinger threadfin for four weeks before the fish were subjected to cold stress (25 minutes at 14°C). Compared to the control group, the results showed that the cold tolerance of fish increased by 18, 55, 64, 68, and 59%, respectively ($p < 0.01$). On the basis of the above results, three single nutrients, namely choline, vitamin C, and tryptophan, were selected and fed to fish for 1, 2, and 3 weeks, respectively, before they were challenged with cold stress. The results showed that the tolerance of the fish to cold stress did not differ between all groups after feeding for 1 week; the choline and vitamin C supplemented groups were significantly better than the control group ($p < 0.05$), but had no difference with the tryptophan supplemented group when fish was fed for 2 weeks; all the supplemented groups were significantly better than the control group ($p < 0.01$), and as compared to the control group, In addition, the five nutritional supplements listed above can significantly increase fish weight gain ($p < 0.01$). Choline, vitamin C, and tryptophan can effectively reduce fish blood cortisol levels.

Key words: cold stress, *Eleutheronema tetradactylum*, nutrients, cortisol

*Correspondence: No. 67, Fongyu St., Tungkang, Pingtung 92845, Taiwan. TEL: (08)8324121 ext. 270; FAX: (08)8320234; E-mail: jjguo@mail.tfrin.gov.tw