

五倍子精萃物對尖吻鱸鏈球菌感染症之抗病效力及成長之影響

郭錦朱* · 張博淵 · 賴哲翊 · 周瑞良

行政院農業委員會水產試驗所東港生技研究中心

摘 要

五倍子富含多醣化合物，具強抗菌力，唯嗜口性差，魚不喜食。瓶鼻海豚鏈球菌是尖吻鱸的主要病原菌，因此，本研究將五倍子藥材精萃，探討其在生體外對鏈球菌之抗菌力、對魚成長及拮抗鏈球菌感染症之抗病效力；結果發現五倍子生藥、科學中藥、生藥精萃物及科學中藥精萃物在生體外對鏈球菌皆具強抗菌力。五倍子精萃物之總酚含量比來源材料提高 1.5 倍；若以 0、0.5 及 1% 添加於飼料，投餵尖吻鱸 14 天及 21 天後以瓶鼻海豚鏈球菌攻擊，結果發現所有五倍子精萃物添加組之抗病力皆顯著優於對照組 ($p < 0.01$)，且投餵 14 天及 21 天之組間或自不同材料來源製備之精萃物間之抗病力皆無顯著差異 ($p > 0.05$)；此外，五倍子精萃物添加組之增重顯著高於對照組 ($p < 0.05$)。若將五倍子精萃物以 0、0.5、1 及 1.5% 添加於飼料投餵鱸魚 14 天，再以瓶鼻海豚鏈球菌進行攻擊，同樣地所有添加組之抗病力皆顯著優於對照組 ($p < 0.01$)，保護力依序各提高 $25.0 \pm 3.8\%$ 、 $50.0 \pm 2.3\%$ 及 $56.7 \pm 2.3\%$ ，且 1% 及 1.5% 添加組間無顯著差異 ($p > 0.05$)。所以，五倍子精萃物的建議用法為 1% 投餵 14 天，除能提高鱸魚對鏈球菌感染症之抗病效力，亦可促進成長。

關鍵詞：五倍子、尖吻鱸、瓶鼻海豚鏈球菌、抗菌活性

前 言

隨著全球人口激增及生活水準的提升，人類對優質動物性蛋白的需求與日俱增，尤以源自水產動物者為最。2000 - 2010 年間全球漁業年產量以 1.4% 成長，2010 - 2017 年間則提高至 2.5%；鑒於海洋漁業資源有限，世界各國積極發展水產養殖業，2017 年的漁業總產量有 46.4% 由水產養殖產業提供 (FAO, 2019)。然，為提升養殖效能及產量，水產動物在高度集約養殖下，易受病毒、細菌、寄生蟲等病原侵襲，造成大量死亡而損失慘重，業者為控制疫情，在大量或不當使用抗生素或化學藥品下，易衍生藥物殘留及抗藥菌滋生等問題，間接威脅人體健康及環境生態。

生藥具多種營養成分和生物活性物質，能全面調節動物的生理機能，兼具營養物質和疾病防

治的雙重功效，是新藥研發的重要來源。近年來，生藥在水產養殖的替代療法廣受重視，尤其是增強免疫力、促進成長、拮抗細菌及病毒性疾病等的相關研究 (Liu, 2010; Guo *et al.*, 2011, 2012, 2015; Wang *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2012; Bulfon *et al.*, 2014; Shakya and Labh, 2014; Akdemir *et al.*, 2016; Baldissera *et al.*, 2018; 郭, 2019)。五倍子 (*Galla rhois*; *G. chinensis*) 為五倍子蚜蟲 (*Schlechtendalia chinensis* Bell) 寄生於漆樹科 (Anacardiaceae) 植物鹽膚木 (*Rhus chinensis*)、青麩楊 (*R. potaninii*) 或紅麩楊 (*R. punjabensis*) 葉上所形成之蟲癭 (衛生福利部, 2018)。剛形成的蟲癭為綠色，轉變為黃褐色後採收，經沸水蒸煮 3 - 5 分鐘殺死其內蚜蟲呈灰色，曬乾即為五倍子，具清熱、解毒、收斂、止血、抗發炎、消腫、抗氧化、抑菌、抗病毒、抗腫瘤、抗癌及治腹瀉等作用 (Duan *et al.*, 2004; An *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2011; Cha *et al.*, 2013; Deiab *et al.*, 2015; Yim *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017)。主要的活性成分為可水解沒食子鞣質類 (又稱可水解單寧類；

*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

gallotannins)、類黃酮 (flavonoids)、鞣酸 (又稱單寧酸; tannic acid)、沒食子酸甲酯 (methyl gallate) 等, 其中可水解沒食子鞣質類佔 50 - 70%; 來自五倍子的可水解沒食子鞣質類是由一個葡萄糖核心環繞幾個沒食子酸單元組成, 且沒食子酸單元間可以沒食子醯基殘基鍵結形成含 1 - 14 個沒食子醯基殘基的結構, 產生三、四、五、七、九等沒食子醯基葡萄糖, 其中, 以 5-沒食子醯基葡萄糖 (pentagalloylglucose)、3-沒食子醯基沒食子酸 (3-galloyl-gallic acid) 和 4-沒食子醯基沒食子酸 (4-galloyl-gallic acid) 異構物最具生物活性 (Feldman *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2002; 陳, 2004; Tian *et al.*, 2009a; Djakpo and Yao, 2010; Mun *et al.*, 2019)。對轉糖鏈球菌 (*Streptococcus mutans*)、遠緣鏈球菌 (*S. sobrinus*)、金黃葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Sta. epidermidis*)、腐生葡萄球菌 (*Sta. saprophyticus*)、痤瘡桿菌 (*Propionibacterium acnes*)、仙人掌桿菌 (*Bacillus cereus*)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、陰溝腸桿菌 (*Enterobacter cloacae*)、幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*)、產酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*)、德貝沙門氏桿菌 (*Salmonella derby*)、明尼蘇達沙門氏菌 (*Sal. minnesota*)、鼠傷寒沙門氏桿菌 (*Sal. typhimurium*)、腸炎沙門氏桿菌 (*Sal. enteritidis*)、痢疾志賀氏桿菌 (*Shigella dysenteriae*)、溶尿尿漿菌 (*Ureaplasma urealyticum*)、青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*)、斑點病菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*)、瓜類果斑病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) 等動植物病原菌皆具抗菌效果 (鄭, 2005; 鄒, 2006; Tian *et al.*, 2009b; 謝, 2010; Yang *et al.*, 2017)。唯, 五倍子因也富含樹脂 (resin)、蠟 (wax) 等物質, 加入飼料之嗜口性差, 魚不喜食。

鱸魚肉質細嫩, 深為消費者喜愛, 2018 年我國鱸魚的內陸養殖面積為 1,158.83 ha, 主要產區為嘉義、高雄、屏東及雲林等, 年產量為 23,160 mt, 佔內陸養殖總產量的 8.9%, 為我國重要的養殖魚類之一, 尖吻鱸 (俗稱金目鱸; *Lates calcarifer*) 為其主要養殖魚種, 產量約佔 62.1% (漁業署, 2019)。鏈球菌感染症 (streptococcosis) 是養殖鱸魚易罹患的細菌性疾病, 瓶鼻海豚鏈球菌 (*S. iniae*) 為其主要致病原, 病魚有體色變黑、食慾減退、鰓絲

灰白及紅色腹水等病徵。為提供養殖業者除法定抗菌劑外的另類魚類保健及疾病預防方法, 本研究將五倍子藥材精萃, 探討其對魚之成長及對魚鰓細胞增殖之影響, 評估其嗜口性及安全性, 此外, 也評估其對瓶鼻海豚鏈球菌之抗菌活性及提高尖吻鱸拮抗瓶鼻海豚鏈球菌感染症之抗病力, 並建立有效的應用方法。

材料與方法

一、製備五倍子精萃物

五倍子之生藥 (crude herb) 及科學中藥 (modern herbal medicine) 均購自勝昌製藥 (中華民國、臺灣), 各取 50 g, 分別加水攪拌均勻並煮沸 2 hr, 以 9,000 rpm 離心 10 min, 取上清水液; 水液加氯仿 (chloroform, Merk) 劇烈震盪後, 倒入分液漏斗, 靜置分層, 收集水層加入乙酸乙酯 (ethyl acetate, Merk), 在 45°C 恆溫箱振盪 30 min, 然後倒入分液漏斗, 靜置分層, 收集乙酸乙酯層, 以流水式減壓濃縮法去除乙酸乙酯至乾, 再以水回溶, 所得之水溶液以冷凍乾燥機 (Labconco, USA) 凍乾, 即得五倍子精萃物粉末, 秤其重量與製備來源材料重量之比值 100% 即為產率。

二、總酚含量測定

以 Folin-Ciocalteu 比色法測定總酚含量 (Yang *et al.*, 2017); 將 400 μ l 待測五倍子樣品及沒食子酸 (gallic acid, Sigma-Aldrich) 標準品與 200 μ l Folin-Ciocalteu 試劑 (Sigma-Aldrich) 及 2 ml 水均勻混合, 然後加 10.75% 碳酸鈉 (sodium carbonate, Merk) 溶液至 5 ml, 於室溫作用 30 min 後, 以波長 760 nm 測吸光值。由沒食子酸檢量線計算五倍子樣品的總酚含量。

三、五倍子對瓶鼻海豚鏈球菌的抑菌環 (inhibitory zone, IZ) 測定

將瓶鼻海豚鏈球菌刮入外加 1.5% 氯化鈉的米勒培養液 (Mueller Hinton broth, Difco), 調整菌液濃度至波長 540 nm 的吸光值為 1 (菌液濃度為

3.5×10^9 cfu/ml) 後, 取 0.1 ml 塗抹於外加 1.5% 氯化鈉的米勒培養基 (Mueller Hinton agar, Difco), 並以滅菌吸管挖洞, 再將供試五倍子水液加入洞中, 並以滅菌水取代五倍子水液作為對照組, 每組 3 重覆, 在 28°C 培養 24 - 48 hr, 觀測抑菌環直徑。

四、五倍子對瓶鼻海豚鏈球菌的最小抑菌濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 及最小殺菌濃度 (minimum bactericidal concentration, MBC)

將瓶鼻海豚鏈球菌刮入外加 1.5% 氯化鈉的米勒培養液中, 調整菌液濃度至波長 540 nm 的吸光值為 1, 再以米勒培養液稀釋 1,000 倍, 取 90 μ l 植入 96 孔盤孔槽, 接著加入 10 μ l 不同濃度的五倍子水液; 此外, 也以滅菌水取代五倍子水液為正對照組, 滅菌水取代菌液加入米勒培養液為負對照組, 每組 3 重覆; 96 孔盤在 28°C 培養 24 及 48 hr, 觀測其澄清度, 溶液呈澄清者的最小濃度即為 24 及 48 hr 的最小抑菌濃度。此外, 將未長菌孔槽內的培養液取 10 μ l 均勻塗抹於米勒培養基上, 在 28°C 培養 48 hr 後, 未長菌者的最小濃度即為 24 及 48 hr 的最小殺菌濃度。

五、細胞增殖之測定

以 WST-1 細胞增殖呈色分析套組 (WST-1, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 進行細胞活性分析; 首先將以 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Sigma-Aldrich) 培養良好之 G1B (BCRC 60559) 鯨魚鰓細胞, 移除舊培養液後, 加 5 ml 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液 (trypsin-EDTA, Sigma-Aldrich) 反應 5 min 使細胞懸浮, 再加 5 ml 培養液中和反應, 移至 50 ml 離心管, 以 3,000 rpm 在 4°C 離心 10 min, 移除上清液, 加 3 ml 培養液使細胞懸浮, 再以血球計數器計算細胞密度, 並將細胞數調整為 10^5 cell/ml。接著, 將細胞加入 96 孔盤孔槽中, 每孔 100 μ l, 另將五倍子精萃物以細胞培養液配製成不同濃度的五倍子溶液, 每孔加 100 μ l, 每種濃度 4 重覆, 置於 25°C 培養箱培養, 24 hr 後移除培養液, 每孔加入 100 μ l 磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (phosphate

buffered saline, Sigma-Aldrich) 清洗細胞, 重覆 3 次之後, 每孔加 100 μ l 培養液及 10 μ l WST-1 細胞增殖檢測試劑, 在 37°C 培養箱反應 4 hr, 以多功能微量盤檢測儀 (multi-mode microplate reader, BioTek) 於 450 nm 測定吸光值。

六、五倍子對尖吻鱸感染瓶鼻海豚鏈球菌之抗病效力及應用方法

購入 2 批尖吻鱸, 先在 1.8 噸 FRP 桶蓄養 2 週後, 移至半噸的 FRP 桶馴餌 1 週。第 1 批供試魚均重 12.1 ± 0.3 g, 每桶 25 尾, 共 30 桶, 採流水式飼養, 海水鹽度 30 ± 1 psu, 水溫 27.4 ± 0.6 °C。以五倍子生藥及其科學中藥精萃物分別加入鰻魚粉製備供試飼料, 添加劑量分為 0.5 及 1.0% 二組, 並以未添加生藥者為對照組, 每組 3 重覆, 每天飼料投餵量為魚體重的 3%, 經 14 天及 21 天投餵後秤重, 再以瓶鼻海豚鏈球菌 8.8×10^6 cfu/ml 腹腔注射進行攻擊, 每尾 0.05 ml, 觀測其死亡數, 並計算其相對活存率 (relative percent survival, 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; WG% = $(\text{最後體重} - \text{初重}) / \text{初重} \times 100$), 比較不同五倍子源製備的精萃物對魚體成長及抗病力之影響。第 2 批供試魚均重 3.5 ± 0.2 g, 每桶 25 尾, 共 16 桶, 採流水式飼養, 海水鹽度 30 ± 1 psu, 水溫 26.5 ± 0.5 °C。以五倍子精萃物製備供試飼料, 添加劑量分為 0、0.5、1.0 及 1.5% 四組, 每組 4 重覆, 每天飼料投餵量為魚體重的 5%, 經 14 天投餵後, 以瓶鼻海豚鏈球菌 2.9×10^6 cfu/ml 腹腔注射進行攻擊, 每尾 0.05 ml, 觀測其死亡數, 並計算其相對活存率, 評估五倍子精萃物最佳的使用劑量及抗病效力。

七、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 $p < 0.05$ 。

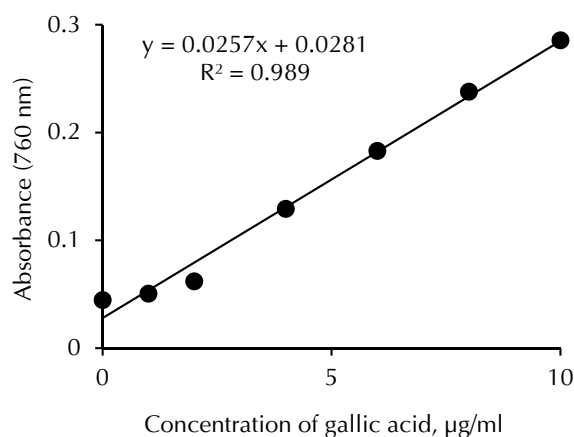
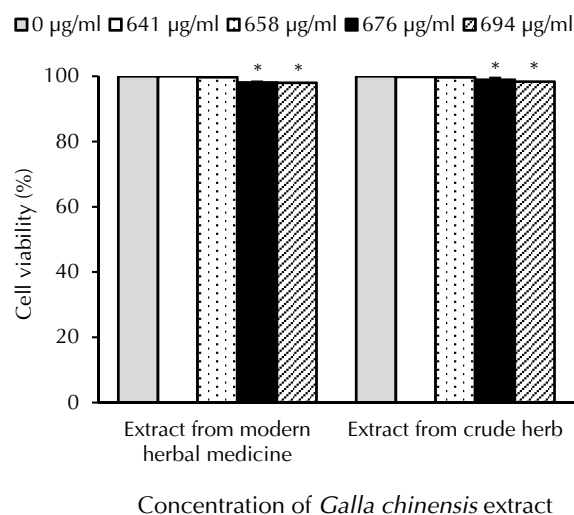
Table 1 The inhibitory zone (IZ), minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of four *Galla chinensis* preparations against *Streptococcus iniae*

Preparations of <i>Galla chinensis</i>	IZ (mm)	MIC (mg/ml)		MBC (mg/ml)	
		24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
Crude herb	25.7±0.6	0.8	1.6	0.8	1.6
Modern herbal medicine	27.7±0.6	0.8	0.8	0.8	0.8
Extract from crude herb	29.7±1.5	0.4	0.8	0.8	0.8
Extract from modern herbal medicine	30.0±1.0	0.4	0.8	0.8	0.8

結果與討論

五倍子生藥及其科學中藥以熱水萃取及有機溶媒精製後獲得的精萃物粉末之產率分別為 $36.8 \pm 0.6\%$ 及 $34.2 \pm 2.8\%$ 。五倍子生藥、科學中藥、生藥精萃物 (extract from crude herb) 及科學中藥精萃物 (extract from modern herbal medicine) 對瓶鼻海豚鏈球菌的 IZ 直徑分別為 25.7 ± 0.6 、 27.7 ± 0.6 、 29.7 ± 1.5 及 30.0 ± 1.0 mm；24 hr 的 MIC 分別為 0.8、0.8、0.4 及 0.4 mg/ml；24 hr 的 MBC 則皆為 0.8 mg/ml；而 48 hr 的 MIC 及 MBC 相同，分別為 1.6、0.8、0.8 及 0.8 mg/ml (Table 1)。以 Folin-Ciocalteu 比色法測定五倍子之多酚含量，其檢量線 (Fig. 1) 為 $y = 0.0257x + 0.0281$ ($R^2 = 0.989$)，測得五倍子生藥、科學中藥、生藥精萃物及科學中藥精萃物之總酚含量分別為 577、598、895 及 946 mg gallic acid/g，精製後之五倍子精萃物之總酚含量皆比來源材料提高 1.5 倍以上，IZ 也顯著提高 ($p < 0.05$)。另，以魚鰓細胞增殖試驗進行毒性評估，結果如 Fig. 2 所示，生藥及科學中藥精萃物之濃度 ≤ 658 $\mu\text{g/ml}$ 對細胞增殖不具影響 ($p > 0.05$)；Yang *et al.* (2017) 也報告五倍子熱水精萃物之口投劑量達 6300 mg/kg 對老鼠也不具毒性；顯見五倍子熱水精萃物之毒性很低。

將自五倍子生藥及其科學中藥製備之精萃物分別以 0、0.5 及 1% 添加於飼料，投餵尖吻鱸 14 天及 21 天後，觀測其增重比並以瓶鼻海豚鏈球菌進行攻擊，結果發現所有五倍子添加組之抗病力 (Fig. 3) 皆顯著優於對照組 ($p < 0.01$)，且投餵 14 天及 21 天之組間或自不同材料來源製備之精萃物間之抗病力皆無顯著差異 ($p > 0.05$)；二種五倍子精萃物之 0.5% 及 1% 添加組對魚之保護力分別提高 $29.9 \pm 4.4\%$ 及 $53.4 \pm 5.5\%$ 。此外，

**Fig. 1** A standard curve of gallic acid determined by using the Folin-Ciocalteu method.**Fig. 2** Effects of *Galla chinensis* preparations on cell viability as measured by MTT assay ($p < 0.05$).

五倍子精萃物添加組之增重比 (Fig. 4) 顯著高於對照組 ($p < 0.05$)，除改善五倍子嗜口性差之問題，還有促進魚成長之效果。若將五倍子精萃物以 0、0.5、1 及 1.5% 添加於飼料投餵尖吻鱸 14 天，再以瓶鼻海豚鏈球菌進行攻擊，同樣地所有添加

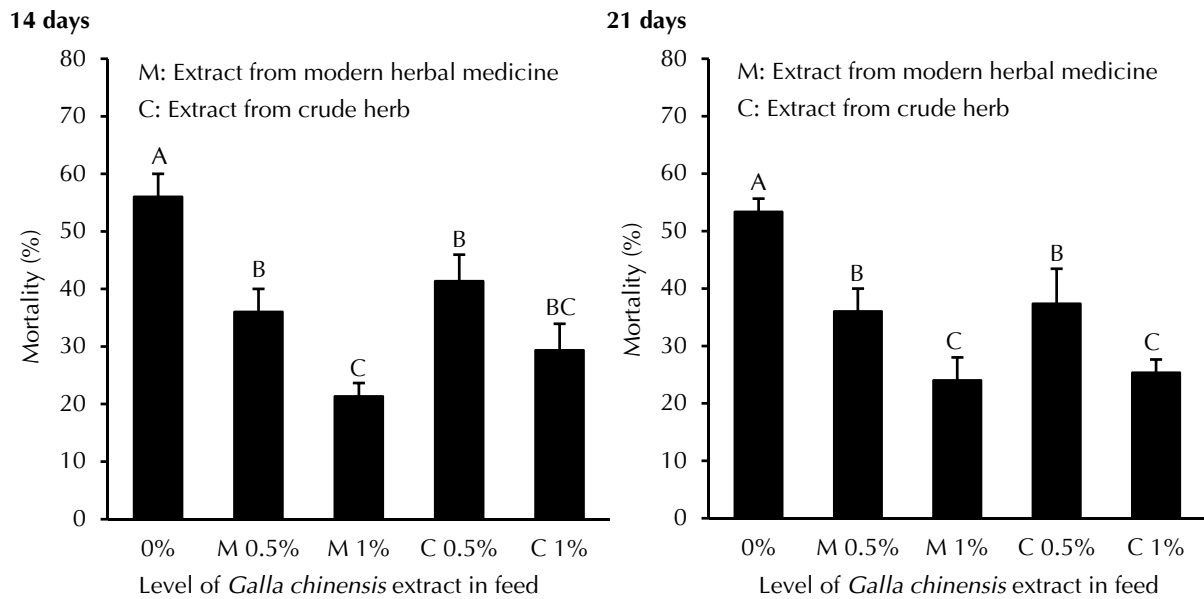


Fig. 3 Mortalities of Asian seabass (*Lates calcarifer*) challenged with *Streptococcus iniae* after being fed diets supplemented with *Galla chinensis* extracts from crude herb and modern herbal medicine, respectively, at doses of 0, 0.5 and 1.0% for 14 and 21 days. Data are presented as means \pm standard deviations. Different letters are significantly different ($p < 0.05$).

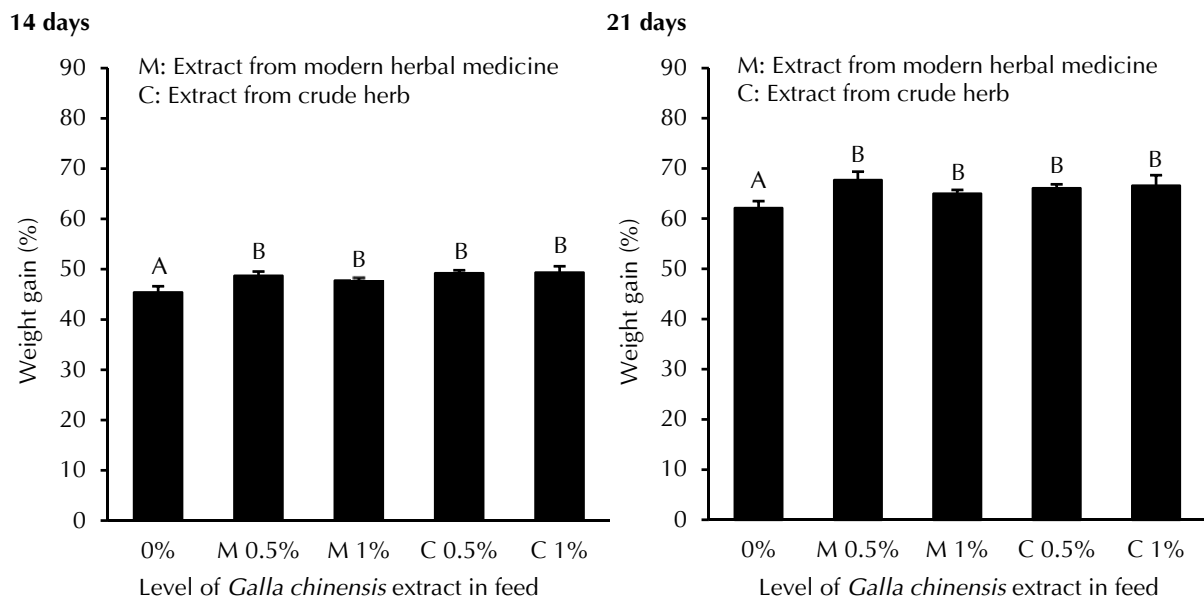


Fig. 4 Percent weight gain of Asian seabass (*Lates calcarifer*) fed diets supplemented with *Galla chinensis* extracts from crude herb and modern herbal medicine, respectively, at doses of 0, 0.5 and 1.0% for 14 and 21 days. Data are presented as means \pm standard deviations. Different letters are significantly different ($p < 0.05$).

組之抗病力 (Fig. 5) 皆顯著優於對照組 ($p < 0.01$), 保護力依序各提高 $25.0 \pm 3.8\%$ 、 $50.0 \pm 2.3\%$ 及 $56.7 \pm 2.3\%$, 且 1% 及 1.5% 添加組間無顯著差異 ($p > 0.05$)。

很多研究報告都顯示五倍子因富含多酚化

物而具強抗菌活性, 且五倍子的生物活性及活性成分與萃取方法密切相關; 其中, 抗氧化活性成分之萃取率以 80% 乙醇萃取者最佳; 80% 乙醇萃取物之 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 自由基清除率較 80% 甲醇及熱水萃取物者高, 還

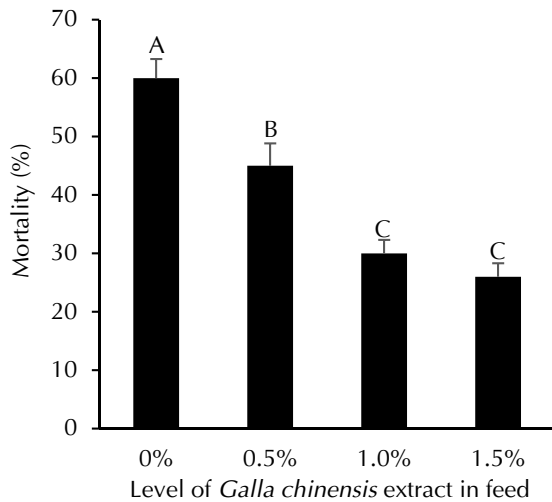


Fig. 4 Mortality of Asian seabass (*Lates calcarifer*) challenged with *Streptococcus iniae* after being fed diets supplemented with *Galla chinensis* extract at doses of 0, 0.5, 1.0 and 1.5% for 14 days. Data are presented as means \pm standard deviations. Different letters are significantly different ($p < 0.05$).

原力及螯合亞鐵離子能力以 80% 甲醇萃取物較佳，而熱水萃取物之總酚含量則最高，為 797.0 mg gallic acid/g (鄭, 2007; Tian *et al.*, 2009b; 謝, 2010); 本研究是應用五倍子拮抗魚之鏈球菌感染症，因此，採熱水萃取法製備五倍子精萃物，此外，因蟲癭富含樹脂、蠟等非極性物質，加入飼料製粒，飼料彈韌不易崩解，除魚不喜食外也不易消化，為改善該問題，於是將五倍子熱水萃取液以氯仿移除這些非極性物質，此外為廣得材料來源，同時將生藥及科學中藥列為來源材料，結果也顯示二者製得之五倍子精萃物之品質及效力皆無顯著差異 ($p > 0.05$)，總酚含量達 920.5 ± 36.1 mg gallic acid/g。另，從五倍子精萃物促進成長的結果也發現魚不厭食五倍子精萃物飼料，已明顯改善五倍子嗜口性不佳之問題。

綜上結果可知，本萃取法製備之五倍子精萃物在生體外對鏈球菌具強殺菌活性；添加於飼料投餵尖吻鱸，魚喜食且對鏈球菌感染症之抗病力提高 50% 以上，對魚之成長也有促進效果，建議用法為五倍子精萃物 1% 添加於飼料投餵 14 天。

參考文獻

漁業署 (2019) 中華民國 107 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.

衛生福利部 (2018) 臺灣中藥典 (第3版). 行政院衛生福利部. 臺北, 臺灣, 43-44.

郭錦朱 (2019) 中草藥在魚類養殖的應用. 水產試驗所技術手冊 13, 行政院農業委員會水產試驗所, 基隆, 臺灣, 57 pp.

陳坤鍾 (2004) 五倍子化學成份及其生物活性之研究. 國立清華大學生命科學研究所 碩士論文, 120 pp.

謝芳穎 (2010) 中藥萃取液及五倍子有效成分對痤瘡桿菌及皮膚表棲菌的抑菌作用. 大仁科技大學生物科技研究所 碩士論文, 60 pp.

鄒依蓉 (2006) 五倍子萃取液對茄科細菌性斑點病之抑菌作用及對茄科細菌斑點病之防治效果評估. 國立屏東科技大學植物保護系 碩士論文, 96 pp.

鄭順仁 (2007) 五倍子甲醇萃取物溶劑區分之抗氧化性質. 大同大學生物工程研究所 碩士論文, 66 pp.

鄭景峯 (2005) 六十種中藥熱水萃出物對痤瘡病原菌之抑菌性. 大同大學生物工程研究所 碩士論文, 106 pp.

Akdemir, F., C. Orhan, M. Tuzcu, N. Sahin, V. Juturu and K. Sahin (2016) The efficacy of dietary curcumin on growth performance, lipid peroxidation and hepatic transcription factors in rainbow trout *Oncorhynchus Mykiss* (Walbaum) reared under different stocking densities. *Aquac. Res.*, 48: 4012-4021.

An, R. B., H. OH and Y. C. Kim (2005) Phenolic constituents of *Galla rhois* with hepatoprotective effects on tacrine- and nitrofurantoin-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 28: 2155-2157.

Baldissera, M. D., C. F. Souza, C. C. Zeppenfeld, S. Descovi, V. S. Machado, R. C. V. Santos and B. Baldisserotto (2018) Efficacy of dietary curcumin supplementation as bactericidal for silver catfish against *Streptococcus agalactiae*. *Microb. Pathog.*, 116: 237-240.

Bulfon, C., D. Volpatti and M. Galeotti (2015) Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquac. Res.*, 46: 513-551.

Cha, C. N., E. A. Yu, E. K. Park, S. Kim and H. J. Lee (2013) Effects of dietary supplementation with *Galla rhois* on growth performance and diarrhea incidence in post weaning piglets. *J. Vet. Clin.*, 30(5): 353-358.

Choi, B. M., H. J. Kim, G. S. Oh, H. O. Pae, H. Oh, S. Jeong, T. O. Kwon, Y. M. Kim and H. T. Chung (2002) 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-beta-D-glucose protects rat neuronal cells (Neuro 2A) from hydrogen peroxide mediated cell death via the induction of heme oxygenase-1. *Neurosci. Lett.*, 328: 185-189.

Deiab, S., E. Mazzio, S. Eyunni, O. McTier, N. Mateeva,

- F. Elshami and K. F. Soliman (2015) 1,2,3,4,6-Penta-O-galloylglucose within *Galla chinensis* inhibits human LDH-A and attenuates cell proliferation in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2015: 276946. doi: 10.1155/2015/276946.
- Djakpo, O. and W. Yao (2010) *Rhus chinensis* and *Galla chinensis* – folklore to modern evidence: review. *Phytother. Res.*, 24(12): 1739-1747.
- Duan, D, Z. Li, H. Luo, W. Zhang, L. Chen and X. Xu (2004) Antiviral compounds from traditional Chinese medicines *Galla chinensis* as inhibitors of HCV NS3 protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 6041-6044.
- FAO (2019) FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2017. Rome, FAO, p. XXII.
- Feldman, K. S., K. S. Sahasrabudhe, M. D. Lawlor, S. L. Wilson, C. H. Lang and W. J. Scheuchenzuber (2001) *In vitro* and *in vivo* inhibition of LPS-stimulated tumor necrosis factor- α secretion by the gallotannin β -D-pentagalloylglucose. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11: 1813-1815.
- Guo, J. J., B. Y. Her, R. L. Chou and T. I. Chen (2011) Screening of modern herbal medicines in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, against *Vibrio harveyi* infection. *ISR J. Aquac.-Bamid.*, 63(2):1-7.
- Guo, J. J., C. M. Kuo, J. W. Hong, R. L. Chou, Y. H. Lee and T. I. Chen (2015) The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activities against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Streptococcus iniae* and on growth in cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 435: 111-115.
- Guo, J. J., C. M. Kuo, Y. C. Chuang, J. W. Hong, R. L. Chou and T. I. Chen (2012) The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activity against *Streptococcus iniae* and on growth in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, 364-365: 33-38.
- Kim, S. H., H. H. Park, S. Lee, C. D. Jun, B. J. Choi, S. Y. Kim, S. H. Kim, D. K. Kim, J. S. Park, B. S. Chae and T. Y. Shin (2005) The anti-anaphylactic effect of the gall of *Rhus javanica* is mediated through inhibition of histamine release and inflammatory cytokine secretion. *Int. Immuno. Pharmacol.*, 5: 1820-1829.
- Lee, H. J., N. J. Seo, S. J. Jeong, Y. Park, D. B. Jung, W. Koh, H. J. Lee, E. O. Lee, K. S. Ahn, J. Lü and S. H. Kim (2011) Oral administration of penta-O-galloyl- β -D-glucose suppresses triple-negative breast cancer xenograft growth and metastasis in strong association with JAK1-STAT3 inhibition. *Carcinogenesis*, 32: 804-811.
- Liu, B., X. Ge, Y. He, J. Xie, P. Xu, Y. He, Q. Zhou, L. Pan and R. Chen (2010) Effects of anthraquinones extracted from *Rheum officinale* Bail on the growth, non-specific immune response of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 310: 13-19.
- Mun, J. G., J. Y. Kee, Y. H. Han, S. Lee, S. H. Park, H. D. Jeon and S. H. Hong (2019) *Galla rhois* water extract inhibits lung metastasis by inducing AMPK-mediated apoptosis and suppressing metastatic properties of colorectal cancer cells. *Oncol. Rep.*, 41: 202-212.
- Shakya, S. R. and S. N. Labh (2014) Medicinal uses of garlic (*Allium sativum*) improves fish health and acts as an immunostimulant in aquaculture. *European J. Biotechnol. Biosci.*, 2: 44-47.
- Tian, F., B. Li, B. Ji, G. Zhang and Y. Luo (2009a) Identification and structure-activity relationship of gallotannins separated from *Galla chinensis*. *LWT-Food Sci. Technol.*, 42: 1289-1295.
- Tian, F., B. Li, B. Ji, J. Yang, G. Zhang, Y. Chen and Y. Luo (2009b) Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: the polarity affects the bioactivities. *Food Chem.*, 113: 173-179.
- Wang, Q. K., Chen, C. X., Guo, Y. J., Zhao, H. Y., Sun, J. F., Ma, S., Xing, K. Z. (2011) Dietary polysaccharide from *Angelica sinensis* enhanced cellular defence responses and disease resistance of grouper *Epinephelus malabaricus*. *Aquac. Int.*, 19: 945-956.
- Xie, J., P. Xu, Y. He, Y. Cui, J. Ming, Q. Zhou and L. Pan (2012) Effects of anthraquinone extract from *Rheum officinale* Bail on the physiological responses and HSP70 gene expression of *Megalobrama amblycephala* under *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish Shellfish Immunol.*, 32: 1-7.
- Yang, Y., H. Luo, X. Song, L. Yu, J. Xie, J. Yang, R. Jia, J. Lin, Y. Zou, L. Li, L. Yin, C. He, X. Liang, G. Yue and Z. Yin (2017) Preparation of *Galla chinensis* oral solution as well as its stability, safety, and antidiarrheal activity evaluation. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, ID 1851459, 8 pages; <https://doi.org/10.1155/2017/1851459>.
- Yim, N. H., M. J. Gu, Y. H. Hwang, W. K. Cho and J. Y. Ma (2016) Water extract of *Galla rhois* with steaming process enhances apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Integr. Med. Res.*, 5: 284-292.

Effects of *Galla chinensis* Extracts on Disease Resistance Against Streptococcosis and Growth in Asian Seabass (*Lates calcarifer*)

Jiin-Ju Guo*, Po-Yuan Chang, Chen-Yi Lai and Ruey-Ling Chou

Tungkang Biotechnology Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

Galla chinensis is rich in polyphenolic compounds and has strong antibacterial ability but has poor palatability and results in fish refusing to eat. *Streptococcus iniae* is the main pathogen of bacterial diseases of the Asian seabass (*Lates calcarifer*). Therefore, this study aimed to prepare extracts from the crude herb and modern herbal medicine of *G. chinensis* to examine the antibacterial abilities of *G. chinensis* extracts *in vitro* and their effects on the growth and disease resistance to *S. iniae* infection in the Asian seabass. The results revealed that all the preparations of *G. chinensis*, *i.e.*, the crude drug, the modern herbal medicine, and the extracts from the crude drug and modern herbal medicine, have strong antibacterial activity against *S. iniae* *in vitro*. The contents of total polyphenols in both *G. chinensis* extracts were 1.5 times higher than those in the source medicinal materials of *G. chinensis*. The Asian seabass were fed diets containing 0, 0.5 and 1% of extracts from the crude drug and modern herbal medicine of *G. chinensis*, respectively, for 14 and 21 days and then challenged with *S. iniae*. All the *G. chinensis* extract-added groups had significantly higher disease resistance ($p < 0.01$) and percent weight gain ($p < 0.05$) than the control group. There was no significant difference in disease resistance between the groups fed for 14 and 21 days or between the extracts prepared from different material sources ($p > 0.05$). If the Asian seabass were fed with *G. chinensis* extract at doses of 0, 0.5, 1 and 1.5% in feed for 14 days then challenged with *S. iniae*, the disease resistance of all the extract-added groups was significantly better than that of the control group ($p < 0.01$), with the protective abilities increased by $25.0 \pm 3.8\%$, $50.0 \pm 2.3\%$, and $56.7 \pm 2.3\%$, respectively. There was no significant difference between the 1% and 1.5% addition groups ($p > 0.05$). In conclusion, a diet containing *G. chinensis* extract at a dose of 1% in feed for 14 days is recommended to provide significant protection against *S. iniae* infection and promote growth in the Asian seabass.

Key words: *Galla chinensis*, Asian seabass, *Streptococcus iniae*, antibacterial activity

*Correspondence: No. 67, Fongyu St., Tungkang, Pingtung 92845, Taiwan. TEL: (08)8324-121 ext.270; FAX: (08)8320-234; E-mail: jjguo@mail.tfrin.gov.tw