

β -glucan 첨가물 (이문글루®) 급이를 통한 북방전복 (*Nordotis discus hannai*) 의 비특이 면역력과 생존율 증대 효과

김승현, 박경일

군산대학교 해양과학대학 해양생명응용과학부 수산생명의학전공

Effects of β -glucan (Immuneglu®) on the modulation of non-specific immune parameters and survival rates of cultured abalone *Nordotis discus hannai*

Seung-Hyeon Kim and Kyung-II Park

Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Republic of Korea

ABSTRACT

The present study aimed to understand the effects of a β -glucan-added abalone feed (Immuneglu™) on the immune parameters, survival rate, and anti-bacterial activity of the abalone *Nordotis discus hannai*. During the study, spat and adult abalones were fed 0, 0.1, and 1% of Immuneglu™ mixed with artificial feed for 2 weeks, and their immune parameters, survival rate, and anti-bacterial activity were measured. The results showed that abalones fed on Immuneglu™-added feed showed a higher phagocytic rate, survival rate, and anti-bacterial activity against *Vibrio alginolyticus*, than those with the control treatment. In addition, the nitric oxide concentration, which indicates an inflammatory response, increased in the treatment group. Our study suggests that Immuneglu™ might be a useful additive for increasing the immunity and survival rates of abalones during mass culture.

Key words: β -glucan, *Nordotis discus hannai*, immunity, anti-bacterial activity, survival rate

서 론

우리나라의 전복은 산업적으로 매우 중요한 종으로서 제주도 근해에서 서식되는 난류계인 말전복 (*Nordotis gigantea*), 까막전복 (*N. discus*), 시볼트 전복 (*N. sieboldii*) 과 전라남도 돌산도를 중심으로 생산되는 북방전복 (*N. discus hannai*) 등이 있다. 이들 중 전복 양식은 북방전복이 주를 이루고 있으며, 전체 양식 생산량은 약 7,000여 톤에 이른다 (KNSO, 2015).

그러나 국내·외적으로 점증하는 전복 양식의 집단화, 밀식, 수질 환경악화 및 전염성 질병의 확산 등으로 인해 전복의 대량 폐사가 발생하고 있다 (Liu *et al.*, 2001; Park, 2012; Bower, 2011; Wu *et al.*, 2016). 이러한 전복의 폐사를 최소화하기 위해서는 면역력 강화를 통한 환경내성의 증진이 중요한 과제로 제시되고 있다 (Park, 2012, Wu *et al.*, 2016).

우리나라에서 수행된 전복의 면역력 강화 시도는 천연물의 사료첨가제 개발이 주를 이루고 있다 (KIPO, 2016). 선천성 비특이 면역기작만 보유하고 있는 무척추동물의 면역기능은 면역세포가 보유하고 있는 PRR (pattern recognition receptors) 단백질이 병원체의 병원체-연관 분자패턴 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 을 인식함으로써 수행된다 (Medzhitov and Janeway Jr. 1997). 즉, 무척추동물의 면역반응은 병원체의 PAMP에 대한 인식이 중요하며 PAMP 중 대표적인 물질은 β -glucan이다 (Aderem and Ulevitch, 2000).

Received: June 1, 2016; Revised: June 26, 2016; Accepted: June 30, 2016

Corresponding author : Kyung-il Park

Tel: +82 (63) 469-1882, e-mail: kipark@kunsan.ac.kr
1225-3480/24618

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

면역 증강제로 이용하는 β -glucan은 강력한 면역조절능력을 보이면서도 과도한 염증 등 부작용은 적은 것으로 알려져 있어 어류의 사료첨가제로서 널리 이용되고 있다 (Park and Kim, 2012; Diao *et al.*, 2013; Sirimanapong *et al.*, 2015; Brogden *et al.*, 2014; Ainsworth, 1994; Ghaedi *et al.*, 2015; Wongsasak *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2011). 그러나, 패류의 경우 Carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) 과 바지락 (*R. philippinarum*) 에서 효과가 있으나 (Nam and Park, 2015), 지중해담치 (*Mytilus galloprovincialis*) 에선 면역력 증강 효과가 미약한 것으로 확인되었다 (Costa *et al.*, 2008). 이러한 사실은 연체동물의 경우 β -glucan의 면역력 증강 효과는 종에 따라 차이가 있음을 시사한다. 그러나 현재까지 복방전복에 대한 β -glucan의 면역력 조절 기능에 대한 연구는 매우 부진한 실정이다.

따라서, 본 연구는 녹십자수의약품(주)에서 제조한 β -glucan 첨가 면역증강제인 이문글루TM를 전복 사료에 첨가하였을 때 전복의 비특이 면역력의 증강 효과와 병원성 비브리오 감염에 따른 생존율의 변화를 확인하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 이문글루TM 급이를 통한 복방전복 (*Nordotis discus hannai*) 성체의 면역력 증강효과

1) 시료

본 연구에 사용된 전복 (평균 12.15 \pm 0.07 cm, 전중량 80 \pm 0.04 g) 은 전라남도 진도산으로 전라북도 군산시에 위치한 수산시장에서 건강한 개체를 구입하여, 군산대학교 해양생물교육연구센터 내 어패류기생충학실험실에서 2주 간 순치 후 실험에 사용하였다. 전복 사육은 30 L 용량의 사육수조 3개에 각각 15개체 씩 수용하고, 실험 기간 동안 aeration을 하였으며, 20 $^{\circ}$ C, 30 psu의 환경을 유지하였다. 사료의 공급은 수조 당 5 g씩 공급하였으며 (NFRDI, 1998), 급이 1시간 뒤 잔여 사료는 전부 제거하였다.

2) 면역력

실험에 사용된 β -glucan 첨가제는 수용성 사료 첨가제로 시판되고 있는 이문글루TM, 녹십자수의약품(주)을 사용하였으며, 이를 β -glucan이 첨가되지 않은 전복사료 (Ewha abalone, Korea) 에 각각 0 (대조구), 0.1, 1% (w/w) 의 농도가 되도록 첨가한 다음 desiccator에서 건조시켰다. 그 다음 이문글루TM가 수용성임을 감안하여 fish oil (Sigma, USA) 로 코팅하였다. 이문글루를 급이 함에 따라 나타나는 면역력의 변화는 14일 동안 7일 간격으로 관찰하였다. 혈림프액은 각 그룹 별로 3개체 씩 선택 후 심장에서 채취하였으며, 각 면역지

표 측정은 아래와 같다. 각 그룹간의 유의성은 통계분석프로그램 (SPSS12.0) 의 one-way ANOVA를 실시한 후 Duncan's multiple range test로 평균 간의 유의성을 95% 신뢰수준에서 확인하였다.

(1) Phagocytic activity

혈림프 100 μ l 를 30 μ l 의 FITC 코팅된 형광 bead (working solution = 1.5 ml sea water + 30 μ l stock solution, Polyscience, USA) 와 혼합하고, 실온에서 1시간 동안 incubation 후, Flow cytometer (Gallius, Beckman Coulter, USA) 를 이용하여 식세포율을 분석하였다. 분석은 FSC (forward scatter) 와 SSC (side scatter) dot plotting 한 다음 bead를 식작용한 혈구세포 집단을 선택하고, 각 영역의 FL1에서 형광량을 바탕으로 식작용 한 혈구 내 bead의 수를 확인하였다. 식세포 능력은 식세포 작용을 한 혈구세포 중 2개 이상의 형광 bead를 섭취 한 세포의 수를 phagocytic index (%) 로 표현하였다.

(2) Nitric oxide (NO)

측정은 Nam *et al.* (2013) 의 DAF assay에 따라 혈림프액과 DAF working solution (2.5 mM) 을 실온에서 10분간 incubation 후, Flow cytometer (Gallius, Beckman Coulter, USA) 를 이용하여 형광량을 측정하였다. NO의 생성량에 대한 분석은 FSC와 SSC를 기준으로 혈구세포를 선택한 후, 혈구 세포의 NO는 FL1 기준으로 측정 하였다.

(3) Apoptosis와 Necrosis

Apoptosis와 necrosis는 Annexin V-FITC apoptosis detection Kit (BD science, USA) 를 이용하였다. 100 μ l의 혈림프에 10 μ l의 PI mixture (FITC conjugated Annexin V: Propidium = 1 : 1) 와 혼합하고 실온에서 15분간 incubation 후, 10x binding buffer (0.1 M HEPES, pH 7.4; 1.4 M NaCl; 25 mM CaCl₂) 를 첨가하였다. 혈구의 apoptosis와 necrosis는 flow cytometer를 이용하여 측정하였다. 이를 위하여 FSC와 SSC의 dot plot에서 혈구를 선택하고, 혈구의 apoptosis와 necrosis를 FL1과 FL3의 quadrant 환경에서 정량하였다 (Park *et al.*, 2006).

(4) DNA 손상도

전복 혈림프액 200 μ l 를 냉각된 99.9% ethanol 1000 μ l 와 섞은 후 - 20 $^{\circ}$ C에서 20분간 permeabilization 하였으며, 원심분리 (3,000 rpm, 5 min) 하여 상등액을 1000 μ l 의 PBS로 교환하고 5 μ l 의 RNase (10 mg/ml) 와 25 μ l 의 propidium iodide (2 mg/ml) 를 첨가하였다. 30분간 반응

후, DNA 손상도는 유세포 분석기의 SS Lin/FS Lin dot plot에서 혈구만을 선택하고 FL-3/Aux (FL-3 peak) dot plot에서 singlet 혈구만을 선택한 다음 최종 FL-3/counts histogram을 이용하여 손상 혈구를 정량하였다. DNA 손상도는 정상 혈구와의 비로 나타났다.

(5) 정균력 (Anti-bacterial activity)

이문글루™를 섭취한 전복과 대조구 전복의 혈림프액과 marine broth에서 배양된 *Vibrio alginolyticus*을 96 well plate에서 각각 100 µl 씩 혼합하여 20℃에서 24시간 동안 배양한 다음 비브리오의 성장을 측정하였다. 음성대조군의 경우 혈림프액 대신 멸균 해수의 정균력을 측정하였다. 비브리오의 정량은 분광광도계 (infinity M200, Techan) 를 이용하여 흡광도 540 nm 에서 측정된 각 시료의 optical density로 결정하였다. 정균력은 음성 대조군 대비 각 실험구의 세균성장을 측정하여 세균 성장 억제율을 Anti-bacterial activity (%) 로 표현하였다.

2. 이문글루™ 급이를 통한 복방전복 치패의 면역력 증강효과

1) 시료

본 연구에 사용된 전복 (평균 2.04 ± 0.04 cm, 전중량 0.45 ± 0.04 g) 은 전라남도 진도의 전복 양식장에서 가져와 군산대학교 해양생물교육센터 내 어패류기생충학실험실에서 2주간 순치 시킨 후 실험에 이용하였다. 전복 사육은 30 L 용량의 사육수조 3개에 각각 300개체 씩 수용하고, 실험 기간 동안 aeration을 하였으며, 수온 20℃ 염분 30 psu를 유지하였다. 사료의 공급은 해수부 전복종묘생산 지침에 따라 수조 당 4.2 g 을 공급하였다 (NFRDI, 1998). 사료 급이 1시간 뒤 잔여 사료는 제거하였다.

2) 혈액 지표에 따른 면역력 검사

치패의 사육에 이용된 사료 제작은 성패의 경우와 동일하게 이루어졌으며, 매일 사육수를 전량 교환하였다. 면역력은 각 그룹으로부터 10개의 치패로부터 추출된 혈림프액을 pool하여 phagocytic activity, nitric oxide 및 anti-bacterial activity의 변화를 15 일 동안 측정하였다. 면역력 측정은 성 패와 동일한 측정 방법을 이용하였다.

3. *V. alginolyticus* 공격실험

각 그룹당 500개체의 전복을 2주간 이문글루™ 함량이 0% 와 1%로 제조된 사료를 수조 당 5 g 씩 공급하였으며, 사료 급이 1시간 뒤 잔여 사료는 제거하였다. *V. alginolyticus* 공격 실험은 각 그룹의 전복을 *V. alginolyticus* (O.D. 2.7, 300 µl) 에 30분 동안 침지하는 방법을 이용하였으며, 이후 전복을

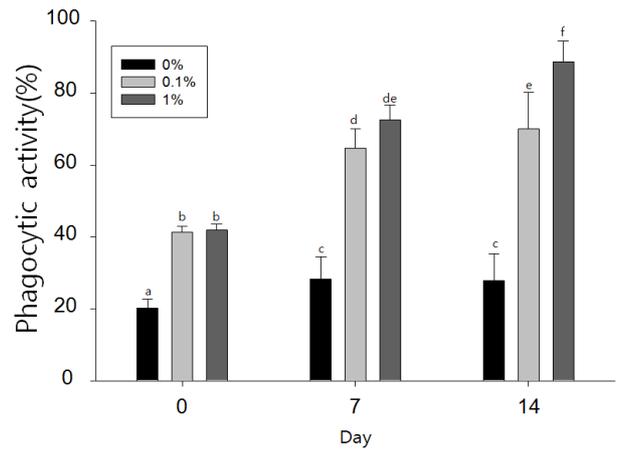


Fig. 1. Changes in the phagocytosis rate of adult abalones fed on Immune glue™ for 14 days. n=27

해수가 들어있는 사육조로 옮긴 후 공격실험전과 동일하게 이문글루™가 함유된 사료나 비 함유된 사료를 공급하면서 15일 동안 생존율을 측정하였다.

결 과

1. 참전복 성패의 면역력 증강효과

1) Phagocytic activity

2주일 간 0.1%와 1%의 이문글루™를 흡착 시킨 사료를 섭취한 전복은 이문글루™가 첨가되지 아니한 대조군과 비교하였을 때 14일 후 각각 30.52 ± 4.41%, 46.58 ± 5.42% 증가하였다 (Fig. 1).

2) Nitric oxide

이문글루™를 섭취한 전복의 NO 생성량은 14일 이후 대조구와 비교하여 0.1% 첨가한 경우 29.45 ± 5.25 RFU 상승하였고, 1% 첨가된 경우엔 39.35 ± 4.16 RFU 상승하였다 (Fig. 2).

3) Apoptosis와 Necrosis

이문글루™를 섭취한 전복의 apoptosis rate는 전 기간 동안 모든 그룹에서 0.5%이하를 나타내 각 그룹간 차이가 없었다. 그러나 necrosis rate는 대조구에 비하여 약 1%가량 상승하였다 (Fig. 3).

4) DNA 손상도

이문글루™가 첨가된 사료를 섭취한 전복 혈구의 DNA 손상도 (%) 를 확인한 결과 전 기간 동안 모든 실험구와 대조구가 0.5%이하를 나타내 그룹 간 유의한 차이를 나타내지 않았다.

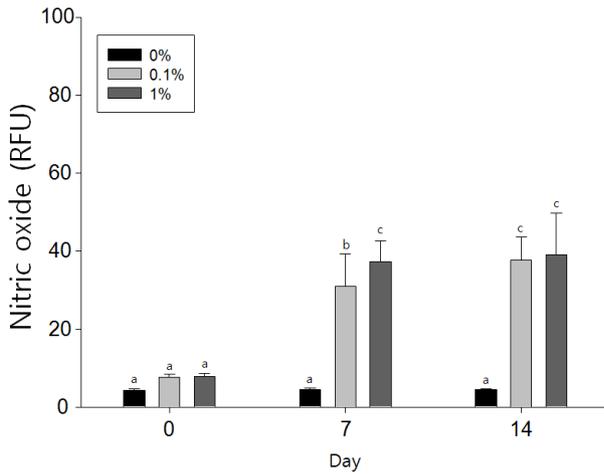


Fig. 2. Changes in the nitric oxide concentration in adult abalones fed on Immuneglu[™] for 14 days. n=27

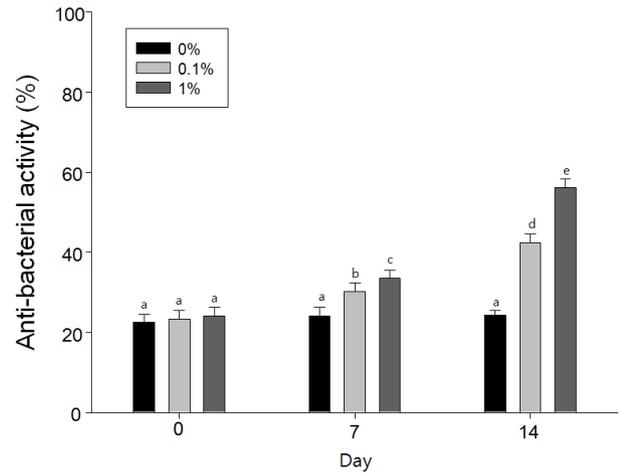


Fig. 4. Changes in the anti-bacterial activity of adult abalones fed on Immuneglu[™] for 14 days. n=27

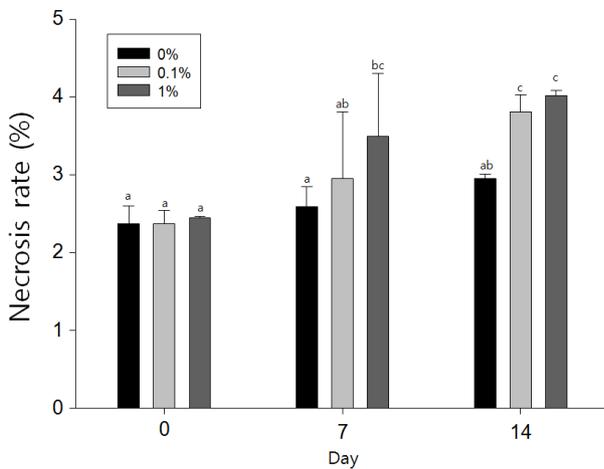


Fig. 3. Changes in the necrosis rate of adult abalones fed on Immuneglu[™] for 14 days. n=27

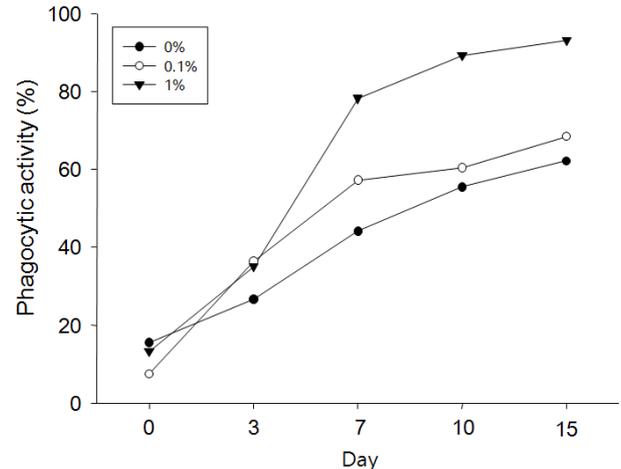


Fig. 5. Changes in the phagocytosis rate of spat abalones fed on Immuneglu[™] for 14 days. 10 specimens were pooled in each group.

5) Anti-bacterial activity

2주일간 이문글루[™]를 제공하면서 측정된 전복 성패의 *V. alginolyticus*에 정균력은 대조구와 비교하여 0.1%와 1% 그룹 모두 유의하게 증가 하였으며, 이문글루[™]의 농도가 높을수록 정균력은 더욱 상승하였다 (Fig. 4).

2. 참전복 치패의 면역력 증강효과

1) Phagocytic activity

이문글루[™]를 섭취한 전복 치패의 식세포 능력은 대조구와 비교하여 섭취 3일까지는 뚜렷한 차이가 없었으나 7일째는 현저히 증가하였으며, 이러한 차이는 실험 종료 시까지 이어졌다. 특히 이문글루[™]가 1% 함유된 전복은 0.1% 함유된 전복보다 현저히 높은 식세포율을 나타냈다 (Fig. 5).

2) Nitric oxide

실험에 이용된 모든 전복 치패의 NO량은 실험기간동안 지속적으로 증가하였다. 이 기간 동안 이문글루[™]가 0.1% 함유된 사료를 섭취한 실험구나 0%의 대조구는 모두 큰 차이가 없었으나, 1% 함유된 사료를 섭취한 전복의 경우 실험 3일째부터 타 그룹과 비교하여 NO량이 높게 나타났다 (Fig. 6).

3) Anti-bacterial activity

대조군의 경우 조사 전 기간 동안 약 20% 내외의 정균력을 보였으나 0.1%의 이문글루[™]를 섭취한 전복의 경우 30% 내외의 정균력을 보였고, 1%의 이문글루[™]를 섭취한 전복은 섭취 3일째 약 40%의 정균력을 보인 이후 지속적으로 증가하여 실

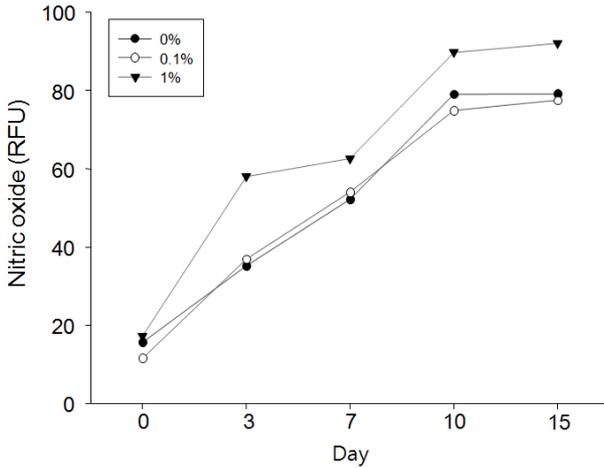


Fig. 6. Changes in the nitric oxide concentration in spat abalones fed on Immunegluce™ for 14 days. 10 specimens were pooled in each group.

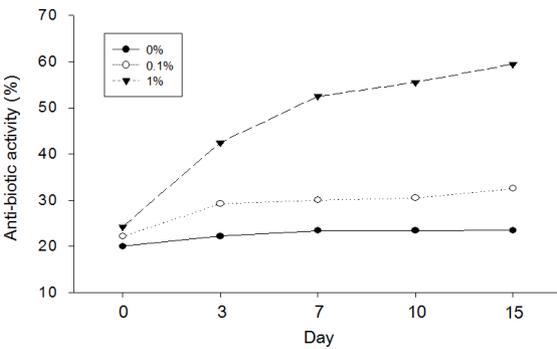


Fig. 7. Changes in the anti-bacterial activity of spat abalones fed on Immunegluce™ for 14 days. 10 specimens were pooled in each group.

험 종료시인 15일째에는 60%의 정균력을 나타냈다 (Fig. 7).

3. *V. alginolyticus* 공격실험

*V. alginolyticus*에 노출된 후 14일간 이문글루™가 1% 함유된 사료를 먹인 그룹에서는 생존율이 55%였으나 대조구는 27%에 불과하였다 (Fig. 8).

고 찰

β -glucan은 어류의 면역력을 향상시킴으로써 어류양식에서 발생하는 항생제 과다사용으로 인한 문제점을 완화시키는 데 유용한 물질이다. 따라서 현재 다양한 수산생물에서 β -glucan의 효과가 검증되고 있다. 그러나 패류의 경우 최근 소수의 종에서 그 효과에 대한 평가가 이루어지고 있으며, 특히 일부 종의 면역력은 β -glucan에 의해 조절되지 않은 경우도

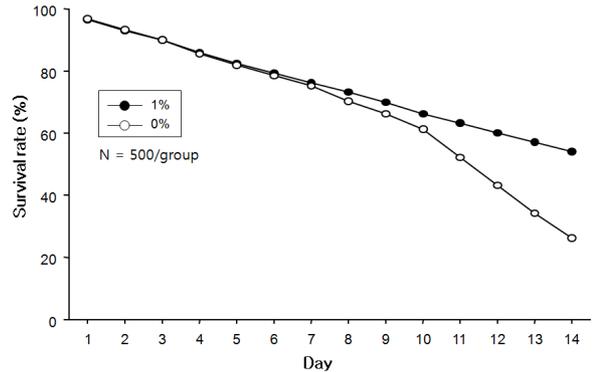


Fig. 8. Changes in the mortality rate of spat abalones fed on Immunegluce™ for 15 days after *Vibrio* challenge.

보고되고 있다 (Costa *et al.*, 2008). 따라서 β -glucan의 효과를 확인하기 위해서는 각 패류 종에 따른 검증이 필요하다.

이에 따라 본 연구에서 수행된 β -glucan을 주성분으로 하는 이문글루™를 섭취한 전복의 면역력을 조사한 결과 치패와 성패 모두 식세포율이 증가함이 확인되었다. 식세포작용은 세포성면역반응의 가장 보편적인 작용으로 각종 스트레스에 노출된 패류의 생리적 상태를 잘 나타내는 것으로 알려져 있다. 따라서 이문글루™를 섭취한 전복은 전반적으로 면역력이 상승하였음을 의미한다. 식세포작용 이외에도 본 연구에서는 apoptosis와 혈구의 DNA 손상을 조사하였으나 이들의 상승작용은 확인되지 않아 이문글루™의 부정적 영향은 매우 제한적인 것으로 판단된다. 반면, necrosis와 NO는 이문글루™를 섭취한 그룹에서 상승하였다. NO의 경우 최근 본 연구진에 의하면 패류의 염증량을 대변하는 것으로 알려져 있으며 (Nam *et al.*, 2013), necrosis는 염증과 상호 의존적인 반응을 나타낸다 (Rock and Kono, 2008). 최근 보고에 의하면 β -glucan은 과도한 염증 반응을 나타내지 않는다는 장점이 있는 것으로 알려져 있으나 (Park and Kim, 2012), 본 연구에서는 성패와는 달리 치패의 경우 NO의 상승이 확인되었으며, 본 연구결과와 유사하게 β -glucan에 노출된 *R. decussatus*와 *M. galloprovincialis*에서도 NO량이 증가함이 보고되었다. 따라서 이문글루™를 섭취 시 소량이기에는 하나 염증의 발생이 이루어지는 것으로 판단된다. 그러나 본 연구에서는 이러한 NO의 상승이 대조구에서도 나타남에 따라 실험기간 중 사용환경의 악화도 NO 상승에 영향을 준 것으로 판단된다. 따라서 β -glucan 섭취에 따른 전복의 염증 증가에 대한 보다 심도 있는 조사가 요구된다.

현재 우리나라 양식 전복의 대량 폐사는 환경 악화와 함께 전염성 질병이 원인으로 지목되고 있다. 특히 *V. alginolyticus*는 대만에서 양식으로 생산되는 오분자기 (*Haliotis diversicolor supertexta*)의 대량폐사 원인균으로

규명된 바 있으며 (Liu *et al.*, 2001), 우리나라에서도 대량폐사가 발생한 전북 치패에서 *V. alginolyticus*가 검출되고 있다 (Park, 2012; 본 연구진의 미발표 자료). 따라서 이 종은 현재 우리나라 전북 치패에서 발생하고 있는 대량폐사와 밀접한 연관이 있는 것으로 판단된다. 본 연구에서 이문글루TM를 섭취한 전북의 치패와 성패는 *V. alginolyticus* 인위감염 시 급이 3일째부터 대조구에 비해 정균력이 상승하여 종료 시에는 약 2.5배의 정균력을 나타냈으며, 생존율은 약 1주일 후부터 대조구와 격차를 보였고, 실험 종료 시인 2주일 후에는 약 2배의 높은 생존율을 나타냈다. 따라서 β -glucan이 함유되어 있는 이문글루TM 섭취는 *V. alginolyticus* 감염 시 생존율을 높일 수 있을 것으로 기대된다. Wu *et al.* (2016) 에 의하면, beta-1,3-1,6-glucan을 섭취한 오분자기 (*H. diversicolor supertexta*) 는 *V. alginolyticus* 감염된다 하더라도 높은 생존율이 확인됨으로써 본 연구 결과와 유사한 β -glucan의 효과를 보고하였다.

결론적으로, β -glucan을 주성분으로 하는 이문글루TM를 첨가한 전북사료의 급이는 전북의 면역력 상승과 생존율 향상에 기여할 수 있는 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 β -glucan이 첨가된 사료첨가제 (이문글루TM) 급이 시 전북의 비특이 면역력의 증강 효과와 전염성 질병 감염 시 생존율의 변화를 확인하고자 수행되었다. 이를 위하여 참전복 치패와 성패를 대상으로 이문글루TM 0, 0.1, 1%가 함유된 사료를 14일간 급이 하면서 면역력, 정균력, 생존율 등을 조사하였다. 조사 결과 이문글루TM가 함유된 사료를 급이한 전북의 치패와 성패의 식세포작용이 증가하였으며 전복폐사 원인균인 *Vibrio alginolyticus*에 대한 정균력과 생존율이 상승하였다. 반면 염증량을 나타내는 NO량 역시 증가하였다. 따라서 β -glucan이 첨가된 사료첨가제 이문글루TM는 전북 사육 시 전북의 면역력을 높이고 폐사율을 낮추는데 유용한 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 녹십자수의약품(주)의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

Ainsworth, A.J. (1994) A β -glucan inhibitable zymosan receptor on channel catfish neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **41**: 141-152.
 Aderem, A. and Ulevitch, R.J. (2000) Toll-like receptors

in the induction of the innate immune response. *Nature*, **406**: 782-787.
 Bower, S.M. (2011) Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Table of Contents. <http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/toc-eng.html#aba>.
 Brogden, G., Krimmling, T., Adame, K.M., Naim, H.Y., Steinhagen, D. and von Kockritz-Blickwede, M. (2014) The effect of β -glucan on formation and functionality of neutrophil extracellular traps in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology*, **44**: 280-285.
 Costa, M.M., Novoa, B. and Figueras, A. (2008) Influence of β -glucans on the immune responses of carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Fish & Shellfish Immunology*, **24**(5): 498-505.
 Diao, J., Ye, H.B., Yu, X.Q., Fan, Y., Xu, L., Li T.B., Wang Y.Q. (2013) Adjuvant and immunostimulatory effects of LPS and β -glucan on immune response in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **156**: 167-175.
 Ghaedi, G., Keyvanshokoh, S., Azarm, H.M. and Akhlaghi, M. (2015) Effects of dietary β -glucan on maternal immunity and fry quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **441**: 78-83.
 KIPO. (2016) Korea Intellectual Property Rights Information Service. <http://www.kipris.or.kr/khome/main.jsp>.
 KNSO (2015) Korea National Statistical Office. Fishery Production Survey DB, Daejeon, Korea. http://kosis.kr/statisticsList/statisticsList_01List.jsp?vwcd=MT_ZTITL E&parentId=F.
 Liu, P.C., Chen Y.C., and Lee, k.k. (2001) Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Microbiosis*, **104**: 71-7.
 Medzhitov, R. and Janeway, Jr. C.A. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, **91**: 295-298.
 NFRDI (1998) Seed production and grow out culture of abalone. *Fisheries Technology of National Fisheries Research and Development Institute*, **3**: 30-43 [In Korean].
 Nam, K.W., Yang, H.S., and Park, K.I. (2013) Quantification of nitric oxide concentration in the hemocytes of Manila clam. *Korean Journal of Malacology*, **29**: 15-21. [In Korean with English abstract]
 Nam, K.W. and Park, K.I. (2015) Effect of β -glucan on immune parameters in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *The Korean Journal of Malacology*, **31**(2): 123-127. [In Korean with English abstract]
 Park, K.I., Park, H.S., K, J.M., Park, Y.J., Hong, J.S., and Choi, K.S. (2006) Flow cytometric assessment of immune parameters of the manila clam (*Ruditapes philippinarum*). *Journal of the Korean Fisheries Society*, pp. 123-131. [In Korean with

English abstract]

- Park, M.A. (2012) Current status of diseases and prevention technique for abalone in Korea and other countries. http://www.nifs.go.kr/fdcc/htm/disease03_02.jsp [In Korean]
- Park, S.O., and Kim, J. (2012) Functional food for immune regulation - beta-glucan. *Food Science and Industry*, **45**: 39-47.
- Rock, K.L., and Kono, H. (2008) The inflammatory response to cell death. *Annual Review of Pathology*, **3**: 99-126.
- Sirimanapong, W., Adams, A., Ooi E.L., Green, M.D., Nguyen, D.K., Browdy, L.C., Collet, B. and Kim, D.T. (2015) The effects of feeding immunostimulant β -glucan on the immune response of *Pangasianodon hypophthalmus*. *Fish & Shellfish Immunology*, **45**: 357-366.
- Wongsasak, U., Chaijamrus, S., Kumkhong, S. and Boonanuntanasarn, S. (2015) Effects of dietary supplementation with β -glucan and synbiotics on immune gene expression and immune parameters under ammonia stress in Pacific white shrimp. *Aquaculture*, **436**: 179-187.
- Wu, Y.S., Tseng, T.Y., and Nan, F.H. (2016) Beta-1,3-1,6-glucan modulate the non-specific immune response to enhance the survival in the *Vibrio alginolyticus* infection of Taiwan abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Fish & Shellfish Immunology*, **54**: 556-563.
- Zhao, Y., Ma, H., Zhang, W., Ai, Q., Mai, K., Xu, Wang, X. and Liufu, Z. (2011) Effects of dietary β -glucan on the growth, immune responses and resistance of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* against *Vibrio splendidus* infection, *Aquaculture*, **315**(3): 269-274