

β -glucan이 바지락의 면역력에 미치는 영향

남기웅, 박경일

군산대학교 해양과학대학 해양생명응용과학부 수산생명의학전공

Effect of β -glucan on immune parameters in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*

Ki-Woong Nam and Kyung-il Park

Faculty of Applied Marine Biosciences, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Republic of Korea

ABSTRACT

β -Glucan is a polysaccharide that is widely used as an additive in fish feed to facilitate immune stimulation. This study aimed to investigate the effect of β -glucan on immune responses in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. For this purpose, three groups of *R. philippinarum* were exposed to 0%, 0.1%, or 1% β -glucan in sea water for 1 hr/day for 2 weeks using an immersion method. Thereafter, two immune parameters—phagocytic rate and antibacterial activity—were measured. *R. philippinarum* exposed to 1% β -glucan showed an approximate 30% significant increase in phagocytic rate. In addition, β -glucan significantly limited the growth of the pathogenic bacteria *Vibrio tapetis*, *V. parahaemolyticus*, and *V. ordalii*. Moreover, the mortality rates of β -glucan-treated clams decreased during a 17-day experiment. Our study suggests that treatment with β -glucan significantly increases the immune responses in *R. philippinarum*, and that immersion is a simple and effective method for immune stimulation in this species.

Key words: β -lucan, *Ruditapes philippinarum*, immune stimulation, antibacterial activity

서론

비특이면역기작은 병원체가 갖고 있는 병원체-연관 분자 패턴 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)을 인식할 수 있으며 (Medzhitov and Janeway Jr. 1997), 이러한 인식작용은 숙주의 면역세포가 구비하고 있는 패턴인식 수용기 (pattern recognition receptors, PRR)라는 단백질에 의해 이루어진다. 이렇게 면역반응을 유발하는 PAMP 중 대표적인 물질이 β -glucan이며, 효모의 세포벽이 주로 β -glucan으로 구성되어 있다 (Aderem and Ulevitch, 2000). 포유류의 경우 체내로 유입된 β -glucans은 다양한 사이토카

인의 분비를 촉진시키고, monocytes나 macrophages의 증식을 유도하거나 바이러스, 진균 및 세균 등 감염성 질환에 대한 비특이 면역 기작을 강화하는 것으로 알려져 있다 (Tzianabos, 2000; Hetland *et al.*, 2013). 이러한 β -glucan의 면역 증강 효과는 무척추동물에서도 나타나고 있다. 특히 최근 연구에 의하면 해산 이매패 역시 PRR으로서 β 1,3-glucan-binding proteins을 갖고 있는 것으로 보고 된 바 있다 (Review, Allam and Raftos, in press).

최근 항생제 오남용에 대한 대응책으로 다양한 면역 증강제에 대한 연구가 진행되고 있다. 특히 면역증강제 중 β -glucan은 강력한 면역조절능력을 보이면서도 과도한 염증 반응이나 부작용이 거의 보고 되지 않아 다양한 방면에서 그 활용이 연구되고 있다 (Park and Kim, 2012). β -Glucan을 이용한 해산동물의 사료첨가제는 넙치 (Diao *et al.*, 2013), 틸라피아 (Sirimanapong *et al.*, 2015), 잉어 (Brogden *et al.*, 2014), 차넬메기 (Ainsworth, 1994), 무지개 송어 (Ghaedi *et al.*, 2015) 등 어류뿐만 아니라 흰다리새우 (Wongsasak *et al.*, 2015)와 해삼 (Zhao *et al.*, 2011) 등에서도 이용되어 면역력의 증강과 질병의 예방 효과가 있다는 것이 알려져 있다.

한편, 해산 연체동물의 경우에도 β -glucan이 활성산소나

Received: June 22, 2015; Revised: June 25, 2015;
Accepted: June 29, 2015

Corresponding author : Kyung-Il Park

Tel: +82 (63) 469-1882 e-mail: kipark@kunsan.ac.kr
1225-3480/24574

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.

NO의 활성을 유발함이 보고되고 있어 패류에서도 면역기능을 향상시키는데 β -glucan이 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다 (Pipe, 1992; Torreilles *et al.*, 1997). 그러나 현재까지 소수의 패류에서만 면역력 증강에 β -glucan이 미치는 영향이 보고되었으며, 또한 이러한 면역력에 미치는 β -glucan의 역할은 패류 종에 따라 차이가 있음이 보고된 바 있다 (Costa *et al.*, 2008). 따라서 본 연구는 산업적으로 유용한 패류인 바지락을 대상으로 β -glucan이 바지락의 면역력 증강에 작용하는지를 조사하고자 실시되었다.

실험방법

1. 바지락

본 연구에 사용한 바지락은 충남 태안군 소원면 파도리의 바지락 양식장에서 채집하였고, 군산대학교 해양생물교육센터내 어류기생충학 실험실에서 1달간 순치시킨 다음 실험에 이용하였다. 바지락 사육은 1개의 세트가 30 L 용량의 사육조와 동일 크기의 여과조로 구성된 순환 여과식 사육장치 3개 세트에 각각 30개체씩 수용하고 수온 20°C와 염분 30 psu를 유지하였다. 먹이 공급은 매일 먹이공급용 수조 (30 L) 로 바지락을 이동시킨 후 1시간씩 *Pavlova lutheri*와 *Isocrysis galbana*를 혼합하여 1×10^4 cell/mL/day의 양을 공급하였다.

2. 바지락 크기

바지락의 크기 및 습중량 측정은 실험전과 2주간의 실험 후 각 그룹에서 10개체씩 무작위로 선택한 바지락을 대상으로 이루어졌다.

3. 바지락의 β -glucan 노출

바지락을 수용성 사료 첨가제로 판매중인 β -glucan (이문글루TM: 10% β -glucan, 녹십자수의약품) 에 2주간 노출시키는 방법을 이용하였다. 노출방법은 매일 먹이 공급 시 먹이 공급용 사육조 (30 L) 에 이문글루TM 원액을 0%, 0.1%, 1% 농도로 해수에 희석하고, 여기에 바지락을 매일 1 시간동안 2주간 침지하는 방법을 사용하였다. 실험기간 동안의 폐사율 및 실험전과 실험 후의 phagocytic activity와 anti-biotic activity의 변화를 비교하여 β -glucan이 바지락의 면역력 및 세균의 증식에 미치는 영향을 확인하였다.

4. Phagocytic activity

식세포능력을 측정하기 위하여 그룹별로 무작위 10개체를 선택하여 후폐각근에서 혈림프를 채혈하였다. 식세포능력은 채혈한 혈액을 FITC로 코팅된 형광 bead (Polyscience, USA) 와 혼합하고 1시간 뒤 1% formalin로 고정된 다음 유세포분

석기 (Gallius, Beckman Coulter, USA) 를 이용하여 분석하였다. 유세포분석기의 분석은 FSC와 SSC를 기준으로 혈구 세포를 선택한 다음 FL1을 기준으로 식세포한 혈구세포와 식세포한 bead의 양을 확인하였다. 식세포능력은 식세포작용을 한 혈구세포 중 3개 이상의 형광비드를 접이한 세포의 수를 phagocytic activity (%) 로 표현하였다.

5. Antibacterial activity

바지락 혈구세포의 정균능력은 3종의 해산 비브리오 중 (*V. tapetis*, *V. parahaemolyticus*, *V. ordalii*) 과 후폐각근에서 채혈한 바지락의 혈림프액을 96 well plate에서 각각 100 μ l 씩 혼합하고 24시간 동안 반응시켰으며, 대조군은 혈림프액 대신 해수를 사용하였다. 바지락의 채혈은 마지막으로 바지락이 이문글루TM에 노출된 후 16시간 후에 이루어졌다. 세균의 정량은 초기 세균을 일정 비율로 희석하여 제작한 standard sample의 흡광도를 540nm 파장에서 측정 (Infinity M200, Techan, Korea) 하고 이를 기준으로 표준곡선을 제작하였다. 이 표준곡선을 이용해 대조그룹과 각 실험구의 세균량을 정량하였으며, 대조구 (해수) 의 세균량을 기준으로 이문글루TM에 노출된 바지락의 세균 감소량을 Antibacterial activity (%) 로 표현하였다.

6. Mortality

매일 8시간마다 수조를 확인하여 폐사한 개체는 즉시 수조에서 제거 하였다.

7. 통계분석

각 그룹간의 유의성은 SPSS12.0 통계분석프로그램의 one-way ANOVA를 실시 후 Duncan's multiple range test로 평균 간의 유의성을 95% 신뢰수준에서 확인하였다.

결과 및 고찰

본 연구에 이용된 바지락의 각 그룹별 크기와 습중량은 β -glucan (이문글루TM) 공급여부와는 상관없이 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (Table 1).

바지락의 식세포율 측정결과 실험전에는 각 그룹별로 $20.60 \pm 5.95\%$ (0% 이문글루TM), $22.82 \pm 9.94\%$ (0.1% 이문글루TM 투여 예정그룹), $19.97 \pm 9.14\%$ (1% 이문글루TM 투여 예정그룹)로 각 그룹간의 차이가 없었으며 (Fig. 1), 2주 동안 0%와 0.1% 이문글루에 노출된 그룹 역시 각각 $20.80 \pm 3.20\%$ 와 $21.39 \pm 4.08\%$ 로 실험전과 유사하였다. 그러나 1%의 이문글루TM에 노출된 그룹은 $30.02 \pm 7.72\%$ 로 실험전 보다 1.5배가량 증가하였으며, 이는 통계적으로 유의한 결과였다.

Table 1. Sizes and weights of *R. philippinarum* before and after exposed to Immunglu™ (β-glucan)

		Shell Length	Shell height	Shell thickness	Tissue wet weight	Shell weight
prior to exposure		40.30 ± 1.75	27.32 ± 1.15	18.60 ± 1.34	2.82 ± 0.31	7.29 ± 1.08
2 weeks later	0%	38.20 ± 2.33	25.30 ± 1.08	18.10 ± 1.67	2.33 ± 0.37	7.04 ± 1.93
	0.1%	39.4 ± 3.02	26.62 ± 1.50	18.60 ± 0.89	2.66 ± 0.44	7.15 ± 0.79
	1%	40.4 ± 2.38	26.82 ± 1.48	18.80 ± 0.83	2.75 ± 0.45	6.87 ± 0.50

바지락 혈림프액의 정균능력 (세균 감소량, %) 은 2주일간 이문글루™에 노출된 그룹에서 모든 종류의 세균에 대해 유의적으로 증가하였으며, 이러한 정균력은 세균의 종류에 따라 다르게 나타났다 (Fig. 2). 본 실험기간동안 β-glucan에 노출되

지 않은 바지락이라 하더라도 정균력은 15.32±5.42% - 19.66 ± 16.58%였다. 그러나 0.1%의 이문글루™에 노출된 바지락은 *V. tapetis*에 감염되었을 경우 정균력이 22.18 ± 21.27%로 상승하였고, *V. parahaemolyticus*에 대한 정균력은 47.95 ± 15.10%까지 상승하였으며, *V. ordalii*에 대한 정균력은 36.04 ± 24.43%로 상승하였다. 이러한 정균력의 상승은 이문글루™의 농도가 1%로 상승 시 더욱 증가하는 경향을 나타내어 *V. tapetis*에 감염 시 34.78±12.79%로 증가하였고, *V. parahaemolyticus*와 *V. ordalii*에 대해서는 각 48.87 ± 13.38%, 49.26 ± 20.90%로 정균력이 향상되었다.

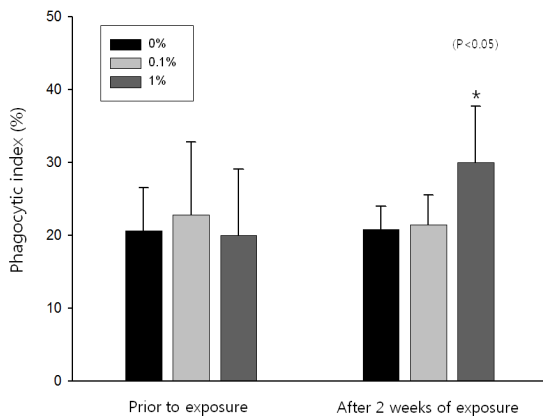


Fig. 1. Phagocytic rates in *R. philippinarum* before and after exposed to Immunglu™ (β-glucan).

β-glucan을 공급한 바지락의 폐사율을 18일간 관찰한 결과 이문글루™에 매일 1시간동안 노출되었던 바지락이 그렇지 않은 바지락에 비해 폐사율이 낮았으며, 이러한 경향은 0.1%에 노출된 바지락보다 1% β-glucan에 노출된 바지락이 더 낮은 폐사율을 나타냈다 (Fig. 3). 그러나 1주일 이후부터는 전혀 폐사가 발생하지 않았으며, 이문글루™의 공급을 중단한 후에도 폐사가 발생하지 않았다.

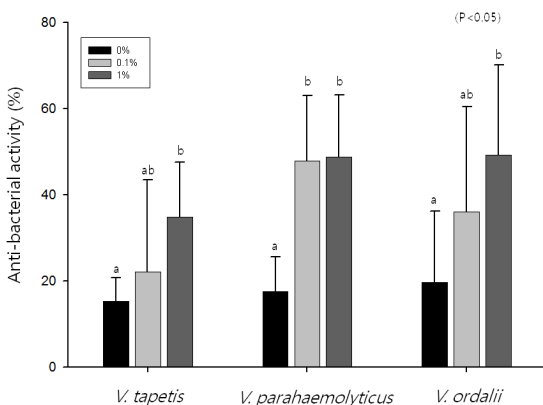


Fig. 2. Antibacterial activity in *R. philippinarum* exposed to Immunglu™ (β-glucan).

Costa *et al.* (2008) 은 해산이패의 β-glucan에 의한 면역증강 효과를 조사하고자 Carpet shell clam (*Ruditapes*

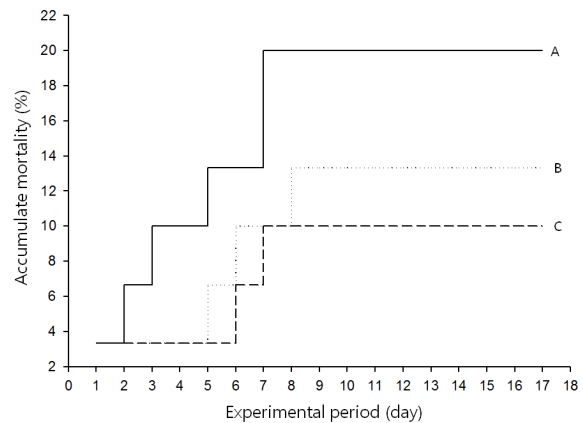


Fig. 3. Accumulated mortality of *R. philippinarum* exposed to β-glucan. A, 0%; B, 0.1%; C, 1% Immunglu™ in sea water.

decussatus) 과 지중해담치 (*Mytilus galloprovincialis*) 에 β -glucan을 노출시킨 다음 활성산소, nitric oxide (NO) 및 박테리아에 대한 정균력을 비교한 결과 *R. decussatus*의 NO와 정균력이 상승하였으며, 지중해담치 (*Mytilus galloprovincialis*) 의 경우 NO와 ROS는 상승하였으나 정균력에 미치는 효과는 없음을 확인하였다. 이러한 결과는 β -glucan에 동일하게 노출된다 하더라도 패류 종에 따라 면역반응은 다르게 나타날 수 있음을 시사하는 것으로써 β -glucan에 의한 면역증강 효과를 확인하기 위해서는 패류종마다 면역반응의 확인 필요하다. 따라서 본 연구에서는 바지락의 β -glucan에 의한 면역력 증가 여부를 조사하였으며, 그 결과 Costa et al. (2008) 가 조사한 종 (*R. decussatus*) 과 같은 *Ruditapes* 속에 속하는 바지락은 β -glucan에 의해 식세포율과 정균력의 증가가 관찰되었다. 뿐만 아니라 실험기간 중 대조군에 비해 폐사율이 낮게 나타남을 확인하였다. 이러한 생존력의 상승은 β -glucan이 바지락의 면역력 증가에 기인한 것으로 판단된다.

Costa et al. (2008) 은 β -glucan에 의한 carpet shell clam (*R. decussatus*) 과 지중해담치 (*M. galloprovincialis*) 의 면역반응을 유도하고자 패류에 β -glucan을 주사하는 방식을 취하였다. 그러나 본 연구에서는 바지락이 먹이 섭취를 하는 매일 1시간동안 수용성 β -glucan을 사육수조에 희석하여 바지락의 체내로 먹이와 함께 유입될 수 있도록 침지 방식을 이용하였다. 주사제 방법은 β -glucan을 이용한 면역력의 증강을 유도하기 방법으로써 초기 연구에서 주로 쓰이던 방법이었지만, 최근에는 분자량이 높을수록 오히려 활성이 높다는 것 (Mueller et al., 2000; Park and Kim, 2012) 이 알려지면서 β -glucan을 손쉽고 효과적으로 이용하기 위한 다양한 기술 개발이 이루어지고 있다. 본 연구에서 이용된 침지 방법은 바지락이 0.05-0.1 mg/ml의 β -glucan에 노출된 것으로써 Costa et al. (2008) 이 사용한 농도 (0.05-1mg/ml) 보다 소량의 β -glucan으로도 바지락의 면역력이 상승함을 보여주고 있다.

일반적으로 면역반응을 증가시키면 염증의 증가가 동반된다. Costa et al. (2008) 의 보고에 의하면 β -glucan에 노출된 *R. decussatus*와 *M. galloprovincialis*의 NO량이 소량이긴 하였으나 유의하게 증가하였다. 최근 Park (2013) 에 의하면 바지락의 NO 발생은 염증반응과 연관성이 있을 가능성을 보고한 바 있어 Costa et al. (2008) 의 보고에서 상승한 NO량은 β -glucan 주사에 의한 염증반응의 결과로 추정된다. 따라서 향후 β -glucan의 침지 노출에 의한 바지락의 염증반응에 대한 조사가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 β -glucan의 정균 능력을 확인하기 위하여 3종류의 병원성 세균을 선택하였다. *V. tapetis*는 유럽산 바지

락에서 brown ring disease를 유발하는 세균으로 우리나라 서해안 바지락에서 발생하고 있으며 (Park et al., 2006), *V. parahaemolyticus*는 해산이매패에 널리 분포하며 인간의 장염을 일으키는 세균이고 (Lopez-Joven et al., 2011), *V. ordalii*는 어류에서 질병을 일으키는 세균이다 (Ruiz et al., 2015). 본 조사 결과 β -glucan에 침지된 바지락은 상기의 모든 세균에 대한 저항성이 증가한 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 바지락 자체에 병원성을 갖고 있는 세균의 증식을 억제함으로써 바지락의 생존력을 높이는데 β -glucan이 기여할 수 있을 뿐만 아니라 바지락이 인간이나 타 수서생물에 병원체를 전파할 수 있는 가능성을 낮추는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

결론적으로 본 조사는 수용성 β -glucan에 바지락을 침지시킨 후 면역반응과 세균 증식 억제율을 조사한 결과 면역반응이 상승하고 세균 증식율이 감소하였으며, 조사 기간 동안 바지락의 폐사율이 감소함을 확인하였다. 이러한 바지락에 대한 β -glucan의 작용은 바지락 뿐만 아니라 다양한 패류에 대한 β -glucan의 면역기능 향상에 대한 연구의 필요성을 보여주고 있으며, 패류양식에서 발생하고 있는 대량 폐사 현상을 저감하기 위한 기반기술로서의 가능성을 시사하고 있다.

요 약

β -glucan은 면역증강제의 하나로 어류를 비롯한 척추동물의 사료첨가제에 널리 이용되고 있는 다당체이다. 본 연구는 척추동물과는 다른 면역체계를 갖고 있는 바지락의 면역반응에 β -glucan이 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시되었다. 이를 위하여 식물플랑크톤이 공급된 해수에 0, 0.1, 1%의 β -glucan을 첨가하고 이 해수에 바지락을 매일 1시간 씩 2주간 노출시켜 먹이 섭취 시 β -glucan이 흡수되도록 하였다. 바지락의 면역력은 혈구의 식세포작용과 혈림프액의 병원성 세균에 대한 정균력을 실험전과 β -glucan을 급이한 2주 후 각 그룹별로 비교하였다. 실험결과 0.1%의 β -glucan에 노출된 바지락의 식세포율은 대조군과 비교하여 뚜렷한 증가가 관찰되지 않았으나 1%의 β -glucan에 노출된 경우 약 30%의 식세포율이 증가하였다. 또한 정균력에 관한 실험에서 β -glucan은 바지락 혈림프액에 *Vibrio tapetis*, *V. parahaemolyticus*, *V. ordalii* 등의 병원성 세균의 증식을 억제함도 확인되었다. 바지락의 사망률 역시 β -glucan에 노출된 바지락에서 낮았으며 이러한 경향은 β -glucan의 농도가 높을수록 낮았다. 본 연구를 통하여 바지락은 β -glucan에 의해 면역력이 상승하였으며, 주사방식이 아닌 해수 침지 시에도 발생함을 확인하였다.

사 사

본 연구의 실험과정에서 군산대학교 해양생명응용과학부 수산생명의학전공 김도영 양이 군산대학교 해양바이오특성화사업단의 “졸업인증제 지원 프로그램”의 지원을 받아 자료 분석에 많은 도움을 주었으며, 본 연구는 한국연구재단의 일반연구 자지원사업 (2010-0013304) 에 대한 연구비 지원으로 이루어졌습니다.

REFERENCES

- Ainsworth, A.J. (1994) A β -glucan inhibitable zymosan receptor on channel catfish neutrophils. *Veterinary immunology and immunopathology*, **41**: 141-152.
- Allam, B. and Raftos, D. (in press). Immune responses to infectious diseases in bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*.
- Aderem, A. and Ulevitch, R.J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, **406**: 782-787.
- 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., Xu, Y.F., La., Li, T.B. and 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., Keyvanshokoo, 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.
- Hetland, G., Johnson, E., Eide, D.M., Grinde, B., Samuelson, A.B.C. and Wiker, H. G. (2013) Antimicrobial effects of β -glucans and pectin and of the *Agaricus blazei* based mushroom extract, AndoSanTM. Examples of mouse models for pneumococcal-, fecal bacterial-, and mycobacterial infections. *In: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education Vol 2.* (ed. by Méndez-Vilas, A.). pp. 889-898. Formatex, Badajoz Spain.
- Lopez-Joven, C., de Blas, I., Ruiz-Zarzueta, I., Furones, M.D. and Roque, A. (2011) Experimental uptake and retention of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in two species of clams: *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Applied Microbiology*, **111**(1): 197-208.
- Medzhitov, R. and Janeway, Jr. C.A. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, **91**: 295-298.
- Mueller, A., Raptis, J., Rice, P.J., Kalbfleisch, J.H., Stout, R.D., Ensley, H.E., Browder, W. and Williams, D.L. (2000) The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1->3)- β -D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. *Glycobiology*, **10**(4): 339-46.
- Park, K.I. (2013) Variation of nitric oxide concentrations in response to shaking stress in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Korean Journal of Malacology*, **29**: 1-6.
- Park, K.-I., Paillard, C., Chevalier, P. and Choi, K.-S. (2006) Report on the occurrence of brown ring disease (BRD) in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, on the west coast of Korea. *Aquaculture*, **255**: 610-613.
- Park, S.O. and Kim, J. (2012) Functional food for immune regulation - β -glucan. *Food Science and Industry*, **45**: 39-47.
- Pipe, R.K. (1992) Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Developmental and Comparative Immunology*, **16**: 111-122.
- Ruiz, P., Poblete, M., Yáñez, A.J., Irgang, R., Toranzo, A.E. and Avendaño-Herrera, R. (2015) Cell-surface properties of *Vibrio ordalii* strains isolated from Atlantic salmon *Salmo salar* in Chilean farms. *Diseases of Aquatic Organisms*, **113**: 9-23.
- 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.
- Torreilles, J., Guerin, M.C. and Roch, P. (1997) Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, **21**: 267-275.
- Tzianabos, A.O. (2000) Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinical Microbiology Reviews*, **13**: 523-533.
- 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.
- 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.