ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การประมง ชีววิทยาประมง

สาขา **ภาควิชา**

เรื่อง การเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์

Growth, Survival, Non-Specific Immune Characteristics and Resistance to *Vibrio harveyi* of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Fed with Yeast Cell Debris

นามผู้วิจัย นางสาวอริสา ศรีหมากสุก

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์ชลอ ลิ้มสุวรรณ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล, ปร.ด.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์ณรงค์ วีระไวทยะ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์

Growth, Survival, Non-Specific Immune Characteristics and Resistance to *Vibrio harveyi* of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Fed with Yeast Cell Debris

โดย

นางสาวอริสา ศรีหมากสุก

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)
พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อริสา ศรีหมากสุก 2555: การเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง) สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ชลอ ลิ้มสุวรรณ, Ph.D. 114 หน้า

การศึกษาผลของเศษเซลล์ยีสต์ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ การทดลองที่ 1 ทดลองโดยใช้กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 12 แบ่งการทดลองออกเป็น 7 ชุดการทดลองให้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ที่แตกต่างกัน 3 ผลิตภัณฑ์ คือ A, B และ C ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 45, 38, 56% ตามลำดับ โดยแต่ละผลิตภัณฑ์ผสมกับอาหารกุ้งปกติที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมที่ไม่ได้ผสมเศษเซลล์ยีสต์ หลังจาก 60 วันของการให้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C5% มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 6.77±0.31 กรัม ซึ่งมีค่าสูงกว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมผลิตภัณฑ์ A1%, A5%, B1%, B5%, C1% และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กุ้งที่ได้รับอาหารผสมผลิตภัณฑ์ C5% มีอัตราการรอดตายสูงสุดคือ 94.54±1.82% ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับอาหารผสมผลิตภัณฑ์ C1% อย่างไรก็ตามกุ้งที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 2 ผลิตภัณฑ์นี้มีอัตราการรอดตายสูงกว่ากุ้งชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อนำกุ้งจากการทดลองที่ 1 มาทดสอบความทานต่อเชื้อ *V. harveyi* พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C5% มีอัตราการรอดตายสูงสุด 72.17±1.00% ตามด้วยกุ้งที่ได้รับอาหารผสมผลิตภัณฑ์ A5% (70.83±0.58%)ซึ่งกุ้งที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 2 ผลิตภัณฑ์นี้มีอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การทดลองที่ 2 ทดลองโดยใช้กุ้งขาวแวนนาไมขนาด 8-10 กรัม แบ่งชุดการทดลองเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 หลังจากให้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์เป็นระยะเวลา 50 วัน พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทุกชุดการทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกุ้งในชุดควบคุม อัตราการรอดตายของกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C5% มีค่าสูงสุดคือ 91.11±1.92% และกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์มีอัตราการรอดตายสูงกว่ากุ้งในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมและกิจกรรมกระบวนการทำลายแบคทีเรียของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase กิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดีกว่ากุ้งในชุดควบคุม และกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมผลิตภัณฑ์ C5% มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันสูงสุดและสูงกว่ากุ้งในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการให้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C5% เป็นเวลาอย่างน้อย 30 วัน สามารถเพิ่มการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมได้

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Arisa Srimarksuk 2012: Growth, Survival, Non-Specific Immune Characteristics and Resistance to *Vibrio harveyi* of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Fed with Yeast Cell Debris. Master of Science (Fisheries Science), Major Field: Fisheries Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Associate Professor Chalor Limsuwan, Ph.D. 114 pages.

Effect of yeast cell debris on growth, survival and immune characteristics of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was studied under different experimental set up in laboraratory. In experiment 1 the post larvae (PL12) were studied. Seven treatment diets were designed with yeast cell debris of products A, B and C respectively. Each the product contained 45, 38, 56% crude protein, respectively and each formulation was mixed with commercial feed at the concentrations of 1% and 5% yeast cell debris. Commercial shrimp feed without the supplementation of yeast cell debris was used as the control. After 60 days of dietary administration, shrimp fed with 5% yeast cell debris of product C had an average body weight 6.77 ± 0.31 g. which was significantly higher ($P < 0.05$) than shrimp fed with 1% and 5% yeast cell of products A1%, A5%, B1%, B5%, C1% and the control group. The shrimp fed with 5% yeast cell debris of product C also showed the highest percentage survival rate that is, 94.54±1.82% which was not different from shrimp fed with 1% yeast cell in product C but percent of survival rate of these two treatments were significantly higher ($P < 0.05$) than other treatments. After challenged with a virulent strain of *Vibrio harveyi* (LD_{50} in 48 h), the percentage survival rate of shrimp fed with 5% yeast cell in product C showed the highest percent survival rate of 72.17±1.00% followed by 70.83±0.58% of the group that was fed 5% yeast cell of product A. The percent survival rate of these two treatments were significant higher ($P < 0.05$) than other treatment groups. In experiment 2, White shrimp of size 8-10 grams were used and divided into seven treatments like experiment 1. After 50 days of feeding with three formulations of yeast cell, There was no difference among the average body weight of shrimp of the all treatment groups and the control group. However, the percent survival rate of shrimp from the group that was given with commercial feed mixed with 5% yeast cell in product C diet showed the highest survival rate (91.11 ± 1.92%). The survival rate of shrimps from all treatment groups were significantly higher ($P < 0.05$) than the control group. For immunological study, shrimp of all treatment groups also showed better immune response in respect to all immune parameters (total hemocyte, phagocytic activity, bactericidal activity, phenoloxidase activity and superoxide dismutase activity) compare to the control group. Shrimp in the group fed 5% yeast cell of product C exhibited the highest immune response which was significantly higher than the control group. The present study indicated that oral administration of 5% yeast cell debris of product C for at least 30 days could increase the growth, survival and enhance immune respone of *L. vannamei.*

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชลอ ลิ้มสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิติ ชูเชิด และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้คำปรึกษาในด้านการทดลองและการตรวจแก้ไขข้อมูลต่างๆ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้านจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณบริษัท Thai foods international จำกัด ที่ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณเจ้าของฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม จุรีย์ฟาร์ม จังหวัดจันทบุรีที่ให้ความอนุเคราะห์กุ้งขาวแวนนาไมที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณพี่ๆ ทุกคนที่ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีในระหว่างทำการวิจัย ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่องานวิจัยซึ่งทำให้การทำวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้องทุกท่านที่ได้ให้กำลังใจในการทำงานจนสำเร็จลุล่วงและสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

อริสา ศรีหมากสุก

มกราคม 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	42
ผลการทดลอง	60
วิจารณ์ผลการทดลอง	85
สรุปและข้อเสนอแนะ	90
สรุป	90
ข้อเสนอแนะ	91
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	92
ภาคผนวก	109
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	114

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	หน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆ ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง	15
2	ส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เศษเซลล์ยีสต์	44
3	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 วัน	61
4	อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 วัน	62
5	อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 1.38 $\times 10^7$ CFU/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	63
6	คุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการเป็นระยะเวลา60 วัน	66
7	น้ำหนักตัวเฉลี่ย อัตราการรอดตาย และผลผลิตรวมของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นระยะเวลา 50 วัน	69
8	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน	73
9	ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมเมื่อได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน	75

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
10	ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม หลังจากได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน	77
11	กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน	79
12	ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน	81
13	คุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการเป็นระยะเวลา50 วัน	83

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ระบบทางเดินอาหาร (digestive system) ของกุ้ง	6
2	ช่องท้องบริเวณทางเดินอาหาร (proventricular) ของกุ้งสกุลพีเนียส	7
3	กลไกการป้องกันตัวเองของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง	12
4	สูตรโครงสร้างของเบต้ากลูแคน	37
5	ลักษณะของเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B และ C เป็นผงละเอียดและมีสีแตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์	45
6	ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานของชุดทดลองสำเร็จรูป RANSOD@superoxide dismutase	56
7	น้ำหนักตัวเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมหลังเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30, 40, 50 และ 60 วัน ของการให้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์	61
8	เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 วัน	62
9	การฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว	64
10	เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 1.38×10^7 CFU/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	64
11	ลักษณะภายนอกของกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* พบจุดสีดำบนเปลือกและรยางค์กร่อน	65
12	น้ำหนักตัวเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมหลังเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน ของการให้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์	70
13	เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน	70
14	กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์และชุดควบคุมเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 50 วัน	71

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	ชั่งน้ำหนักของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 50 วัน	71
16	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน	74
17	ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมเมื่อได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน	76
18	กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน	80
19	ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นระยะเวลา 50 วัน	82

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์

Growth, Survival, Non-Specific Immune Characteristics and Resistance to *Vibrio harveyi* of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Fed with Yeast Cell Debris

คำนำ

ปัจจุบันประเทศไทยสามารถผลิตสารสกัดที่มีคุณค่าจากยีสต์มาทำเป็นอาหารเสริม สารทดแทนผงชูรส ยาและเครื่องสำอาง รวมถึงอาหารเสริมภูมิคุ้มกันในสัตว์เศรษฐกิจทั้งไก่ สุกร โคนม และกุ้ง ในกระบวนการผลิตยีสต์สกัดมีเศษเซลล์ยีสต์เป็นจำนวนมาก และประกอบกับการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)ในปัจจุบันมีการปล่อยกุ้งในอัตราความหนาแน่นสูง ต้องให้อาหารสำเร็จรูปในปริมาณมาก ดังนั้นถ้าผู้ประกอบการเลี้ยงกุ้งมีการจัดการด้านการเลี้ยงไม่ดี พออาหารที่เหลือและของเสียจากการขับถ่ายของกุ้งจะมีปริมาณมากตามไปด้วยซึ่งจะมีผลทำให้สภาพแวดล้อมในบ่อเสื่อมโทรม ปัจจัยเหล่านี้ล้วนก่อให้เกิดความเครียดและความอ่อนแอให้กับกุ้ง ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งลดลง จึงเกิดการติดเชื้อได้ง่ายขึ้น การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulant) เป็นวิธีหนึ่งในการเสริมสุขภาพให้กุ้งมีระดับภูมิคุ้มกันสูงขึ้น เพิ่มความสามารถในการป้องกันและกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ส่วนปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่ทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโตดี และแข็งแรงคืออาหารที่นำมาเลี้ยงกุ้งนั้นต้องมีโภชนาการต่างๆ ที่เหมาะสม ครบถ้วน และเพียงพอต่อความต้องการของกุ้ง โดยเฉพาะโปรตีนนับเป็นโภชนาการที่สำคัญอย่างยิ่งที่สัตว์น้ำต้องการเพื่อใช้เป็นสารอาหารสำหรับร่างกายในการสร้างเนื้อ และอวัยวะต่างๆ รวมถึงเอนไซม์ ฮอร์โมน สารภูมิคุ้มกันและสารพันธุกรรม (อมรรัตน์ และคณะ, 2548) โดยความต้องการโปรตีนของกุ้งจะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิด อายุ และปัจจัยต่างๆ (Akiyama *et al*., 1992) โภชนาการที่มีผลต่อราคาอาหารกุ้งมากที่สุดนั้นคือ โปรตีน ในภาวะที่วัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารสัตว์มีราคาแพงขึ้นโดยเฉพาะปลาป่น (fish meal) หลายประเทศหันมาสนใจโปรตีนจากยีสต์ (single cell protein) เพื่อเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ เนื่องจากสามารถผลิตได้ในช่วงเวลาที่สั้น ต้นทุนในการผลิตและพื้นที่ที่ใช้ในการผลิตก็น้อยกว่าการผลิตโปรตีนจากพืชและสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบที่หาได้ง่าย และราคาถูก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในปัจจุบันได้มีการนำส่วนประกอบของยีสต์ ที่เป็นผลพลอยได้จากโรงเบียร์ หรือที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตยีสต์มาใช้ประโยชน์ด้วยกันหลากหลายรูปแบบ อาทิ นำมาทำปุ๋ย นำมาทำเป็นอาหารสัตว์ ซึ่งจะมีทั้งในรูปแบบของเหลว และรูปแบบแห้ง ยีสต์ที่ได้เป็นยีสต์ที่มีประโยชน์ และเป็นยีสต์ที่ตายแล้วคงเหลือแต่ผนังเซลล์ของยีสต์ ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนคุณภาพ ย่อยสลายได้ทันที เหมาะอย่างยิ่งที่จะนำมาทำเป็นอาหารสัตว์ (Barnes *et al*., 2006) ในปัจจุบันนี้ได้มีการนำยีสต์มาเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ เพื่อประโยชน์ใน 2 ทางด้วยกันคือ เป็นแหล่งโปรตีนที่เราเรียกว่าโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) และในอีกแง่หนึ่งคือเป็นตัวช่วยเสริมสุขภาพของสัตว์ซึ่งจะทำให้สัตว์แข็งแรง และมีภูมิต้านทานโรคสูงขึ้น โอกาสที่จะป่วยจากการติดเชื้อแบคทีเรียลดลง (Raa *et al*., 1996)

สำหรับการศึกษาครั้งนี้เป็นการนำเศษเซลล์ยีสต์แห้งซึ่งเป็นวัตถุดิบเหลือใช้จากอุตสาหกรรมการผลิตผงชูรส เพื่อนำมาใช้เป็นอาหารเสริมในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเศษเซลล์ยีสต์ดังกล่าวมีโปรตีนที่สำคัญและมีสารเบต้ากลูแคนอยู่สูง จึงน่าจะช่วยในการกระตุ้นการเจริญเติบโต กระตุ้นภูมิคุ้มกันเพิ่มความสามารถของกุ้งในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นแนวทางเบื้องต้นในการพิจารณานำโปรตีนจากเศษเซลล์ยีสต์ที่เหลือใช้จากอุตสาหกรรมต่างๆ มาใช้เพื่อผลิตอาหารกุ้งซึ่งจะสามารถลดต้นทุนการผลิต ลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมทำให้อุตสาหกรรมกุ้งของไทยมีความมั่นคง และยั่งยืนต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของเศษเซลล์ยีสต์สามผลิตภัณฑ์ที่ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 2 ระดับต่อการเจริญเติบโต และการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วาในห้องปฏิบัติการ

2. เพื่อศึกษาผลของเศษเซลล์ยีสต์สามผลิตภัณฑ์ที่ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 2 ระดับต่อความต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

3. เพื่อศึกษาผลของเศษเซลล์ยีสต์สามผลิตภัณฑ์ที่ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 2 ระดับต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

กุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*) หรือที่นิยมเรียกกันว่า กุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งพื้นเมืองในทวีปอเมริกาใต้ (Holthuis, 1980) มีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในประเทศเอกวาดอร์ เม็กซิโก เปรู ปานามา ฮอนดูรัส โคลอมเบีย บราซิล เป็นต้น (Rosenberry, 1993) ในทวีปเอเชียมีการนำเข้ากุ้งชนิดนี้เข้ามาเลี้ยงครั้งแรกที่ประเทศไต้หวันในปี พ.ศ. 2539 สำหรับประเทศไทยกรมประมงอนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวที่ปลอดเชื้อ (specific pathogen free, SPF) จากต่างประเทศเข้ามาทดลองเลี้ยงในปี พ.ศ. 2545 โดยอนุญาตให้นำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวได้จากแหล่งที่กรมประมงรับรองแล้วเท่านั้น (มาลินี และสมยศ, 2548) มีการศึกษาวิถีชีวิตของกุ้งขาวในถิ่นกำเนิดและปรับปรุงระบบการเลี้ยงจนประสบความสำเร็จในระดับหนึ่ง โดยประเทศไทยสามารถเลี้ยงกุ้งได้ทั้งปี สามารถเลี้ยงได้ดี อัตรารอดสูงกว่ากุ้งกุลาดำ เนื่องจากลักษณะพิเศษของกุ้งขาวที่หากินได้ทุกระดับความลึกของน้ำ มีอัตราการเจริญเติบโตดี ทำให้เกษตรกรจำนวนมากหันมาเลี้ยงกุ้งขาวกันมากขึ้น (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

การเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม

การฟักตัวเพื่อเข้าสู่ระยะนอเพลียส (nauplius) จะเกิดขึ้นหลังจากการวางไข่ ประมาณ 14 ชั่วโมง การพัฒนาในระยะวัยอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมจะแบ่งเป็นระยะต่างๆ ดังนี้ระยะนอเพลียสมี 6 ระยะ (N1-N6) ระยะโปรโตซูเอีย (protozoea) มี 3 ระยะ (Z1-Z3) และระยะไมซิส (mysis) 3 ระยะ (M1-M3) หลังจากนั้นเข้าสู่ระยะโพสลาวาร์ (postlarvae) ซึ่งเป็นระยะวัยอ่อนขั้นสุดท้าย ลูกกุ้งระยะนี้มีลักษณะคล้ายกุ้งโตมากขึ้น มีการลอกคราบทุกวัน ซึ่งการเรียกลูกกุ้งระยะนี้จะระบุเป็นจำนวนวันคือ P1, P2, P3 ถึง P15 ตัวเลขที่กำกับคือจำนวนวันที่ลูกกุ้งเข้าระยะโพสลาร์วา นอกจากนี้ Lee *et al*. (1995) ยังกล่าวอีกว่า อัตราการเจริญเติบโตขึ้นกับความถี่ของการลอกคราบ และมีการเพิ่มขนาดในแต่ละครั้งที่ลอกคราบ ทั้งยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น สารอาหาร และสิ่งแวดล้อม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระบบการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทย

ชลอ และพรเลิศ (2547) กล่าวถึงรูปแบบการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทย โดยแบ่งความเค็มของน้ำได้ 2 แบบ

1. การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยน้ำความเค็มต่ำ

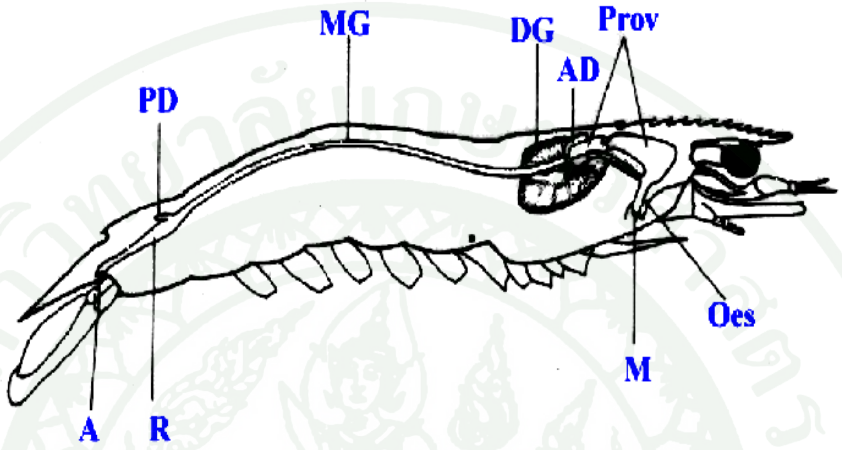
เป็นการเลี้ยงในเขตพื้นที่น้ำจืด เช่น พื้นที่ทางภาคกลาง ใช้น้ำความเค็มต่ำมากจนเกือบจะเป็นระดับที่ถือว่าเป็นน้ำจืด โดยจะใช้น้ำเค็มจากนาเกลือที่มีความเค็ม 100-200 พีพีที มาเติมในน้ำจืดเพื่อให้ได้ระดับความเค็มประมาณ 3-4 พีพีที แล้วทำการเลี้ยงในระบบปิด มีการถ่ายน้ำน้อย ส่วนใหญ่จะกั้นคอกก่อน โดยใช้พลาสติกพื้นที่ประมาณ 100 ตารางเมตร ความลึกประมาณ 80 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำจากนาเกลือเข้าไปในคอกจนได้ความเค็มประมาณ 8-10 พีพีที หลังจากนั้นก็จะใช้ลูกกุ้งซึ่งปรับความเค็มจากโรงเพาะฟักมาแล้วโดยลูกกุ้งระยะโพสลาร์วา 10-12 มาปล่อยในคอก อนุบาลประมาณ 3-4 วัน ก็เปิดคอกออก จะไม่นิยมอนุบาลนานเกินไปเพราะอาจจะมีการกินกันเอง ส่วนอีกวิธีหนึ่งเกษตรกรจะไม่ทำคอกเหมือนกุ้งกุลาดำ คือเตรียมน้ำความเค็มประมาณ 3-5 พีพีที ทั้งบ่อแล้วให้ทางโรงเพาะฟักปรับความเค็มของลูกกุ้งอยู่ที่ความเค็มต่ำที่สุดประมาณใกล้เคียงกับที่ปล่อยในบ่อ แล้วนำลูกกุ้งมาปล่อย

2. การเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มปกติ

การเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มปกติ คือ น้ำที่มีความเค็ม 10 พีพีทีขึ้นไป ในพื้นที่ริมชายฝั่งทะเลโดยเฉพาะการเลี้ยงทางภาคใต้และภาคตะวันออก ส่วนใหญ่จะมีการปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่นมากกว่า 120,000 ตัวต่อไร่ ทำให้ผลผลิตของกุ้งขาวแวนนาไมสูงมากกว่า 2 ตันต่อไร่ โดยการเลี้ยงด้วยน้ำความเค็มปกตินั้นจะได้ผลดีกว่าน้ำความเค็มต่ำ เนื่องจากมีการถ่ายน้ำในปริมาณที่มากในช่วงท้ายๆ ของการเลี้ยงได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อวัยวะในการย่อยอาหาร (Digestive organs) ของกุ้ง



ภาพที่ 1 ระบบทางเดินอาหาร (digestive system) ของกุ้ง

A = anus **AD** = anterior diverticulum of midgut **DG** = digestive gland

M = mouth **MG** = midgut **Oes** = oesophagus

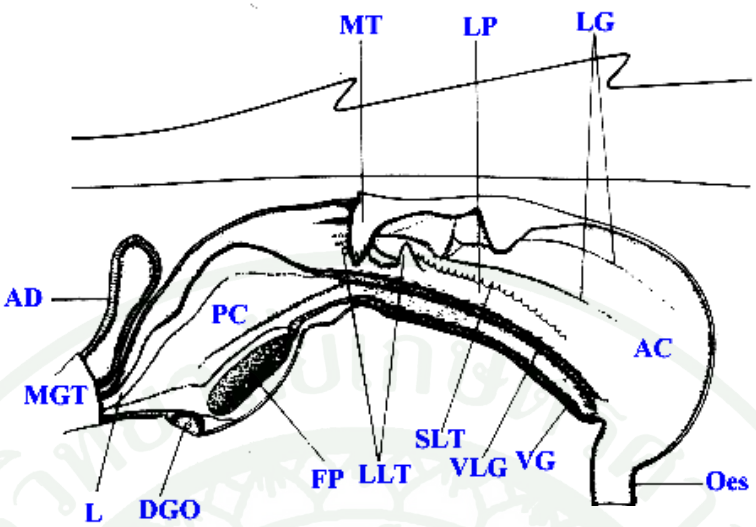
PD = posterior diverticulum of midgut **Prov** = proventriculus **R** = rectum

ที่มา: Dall *et al*. (1990)

Foregut จะมีต่อมน้ำย่อยขับสารเข้าไปใน proventriculus ส่วนหน้า ส่วนร่องกลางทำหน้าที่ในการส่งผ่านน้ำย่อยให้ผ่านไปทางด้านหลังโดยผ่าน gastric mill อาหารจะถูกดักโดยตะแกรงที่ทำหน้าที่ในการกรองเอาเฉพาะของเหลว และชิ้นส่วนที่ละเอียดผ่านเข้าไปที่ต่อมน้ำย่อยเพื่อการย่อยครั้งสุดท้ายแล้วจึงมีการดูดซึม

อาหารเหลวจะถูกนำมาที่ ventral setose groove ของช่องลำไส้ส่วนหน้า ซึ่งจะมีขนแข็ง ๆ ดักอาหารชิ้นใหญ่แยกออกจากของเหลว และส่งต่อไปด้านหลังที่ filter press ทำหน้าที่แยกอาหารขนาดใหญ่กว่า 1 ไมโครเมตร ผ่านไปทางช่องเปิดของต่อมน้ำย่อย จากนั้นน้ำย่อยจะถูกปั๊มแล้วฉีดจากด้านหลังเข้าไปที่ร่องด้านข้าง เชื่อมกับของเหลวที่แยกจากอาหารทางส่วนท้ายของลำไส้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 ช่องท้องบริเวณทางเดินอาหาร (proventricular) ของกุ้งสกุลพีเนียส

AC = anterior chamber **AD** = anterior diverticulum

DGO = digestive gland opening **FP** = filter press (pyloric press)

L = lappets **LG** = lateral grooves

LLT = large lateral teeth **LP** = lateral plate (cardiac plate)

MGT = tubular part of midgut **MT** = medial tooth (prephloric ossicle)

Oes = oesophagus **PC** = posterior chamber

SLT = minor lateral teeth (cardiac teeth) **VG** = ventral setose groove

VLG = ventro-lateral setose groove

ที่มา: Dall *et al*. (1990)

ในส่วน midgut ของเหลวที่รวมกันแล้ว จะผ่านไปที่ช่องลำไส้ส่วนหน้าผ่าน filter press ร่องด้านข้างของช่องลำไส้ส่วนหน้า ทำหน้าที่ในการไหลเวียนของของเหลว ภายหลังจากที่อาหารเหลวเข้าไปที่ digestive gland สารอาหารที่ละลายแล้วจะถูกดูดซึม ส่วนอาหารเหลวจะรวมกับเอนไซม์เพิ่มขึ้น แล้วกลับออกไปที่ proventriculum อีกครั้ง และไหลเวียนหลายๆ รอบก่อนที่จะเข้าไปในท่อเล็กๆ ภายในต่อมน้ำย่อย การดูดซึมและการขับออกจะเกิดขึ้นสลับกัน บริเวณ midgut ของครัสเตเซียชั้นสูงการย่อยเกิดขึ้นรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ เพราะที่เยื่อบุผนังของ midgut จะมีต่อมสร้างน้ำย่อยที่จำเป็นพวก propionic acid

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Midgut มีหน้าที่หลัก 2 ประการ คือ การหลั่งเอนไซม์ และการดูดซึมอาหารที่ย่อยแล้วซึ่งคาดว่าเยื่อบุผิวจะแตกต่างกัน ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิด ชนิดแรก microvilli หน้าที่ในการดูดซึมอาหาร และ vesicular cell หรือเรียกว่า digestive gland ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์และหลั่งเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยอาหาร (digestive enzyme) และรวมถึงหน้าที่ในการดูดกลับสารอาหาร เป็นบริเวณที่เก็บพลังงานด้วย เมื่อร่างกายทำการย่อยอาหารแล้วส่วนที่ไม่สามารถย่อยได้จะถูกรวบรวมเป็นอุจจาระใน midgut และส่งต่อไปยังส่วน hindgut กล้ามเนื้อส่วนนี้จะปั๊มน้ำเข้าไปในลำไส้เพื่อช่วยในการถ่ายอุจจาระ

Hepatopancreas คือต่อมสร้างน้ำย่อยที่พบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ทำหน้าที่คล้ายคลึงกับตับ (liver) และตับอ่อน (pancreas) ในสัตว์ชั้นสูง จึงทำหน้าที่เป็นทั้งตับและตับอ่อนรวมกันในสัตว์พวกกุ้งนั้น hepatopancreas ประกอบด้วยท่อตันหรือถุงตัน (diverticula) เปิดออกสู่ท่อที่จะทำหน้าที่หลั่งน้ำย่อย แล้วไปเปิดออกที่ท่ออันแรก หรือ collecting ducts น้ำย่อยที่หลั่งออกมาจะไหลลงสู่ midgut ใกล้ๆ กับกระเพาะส่วนหลัง (ประจวบ, 2537) hepatopancreas เป็นอวัยวะที่มีการหลั่งกรดน้ำดี เป็นแหล่งที่มีการสะสมไกลโคเจน ไขมัน และแคลเซียม รวมทั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเผาผลาญโปรตีน

ความต้องการอาหาร และโปรตีนของกุ้ง

อาหารเป็นสิ่งที่สัตว์น้ำกินและเกิดประโยชน์ต่อร่างกาย เพื่อซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ สร้างความเจริญเติบโตให้แก่ร่างกาย และช่วยทำให้กระบวนการต่างๆ ในการดำเนินชีวิตดำเนินไปได้อย่างปกติ (เวียง, 2543) ในอาหารกุ้งจะมีส่วนประกอบที่แตกต่างกันในทางเคมีที่เรียกว่าสารอาหาร ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามิน และเกลือแร่ อาหารแต่ละชนิดก็มีสารอาหารที่แตกต่างกันไป (อิทธิพร, 2532) ความต้องการอาหารของกุ้งโดยทั่วไปก็เช่นเดียวกับสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ คือต้องการโปรตีนเพื่อใช้ในการบำรุงร่างกายให้อยู่ในสภาพปกติ และสร้างความเจริญเติบโตให้แก่ร่างกาย นอกจากนี้ร่างกายยังต้องการคาร์โบไฮเดรตและไขมันเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน พลังงานในอาหารนั้นได้จากโปรตีน แป้ง และไขมัน เดิมไม่ค่อยได้กล่าวถึงพลังงานมากนัก แต่ปัจจุบันในการคำนวณสูตรอาหารต้องคำนึงถึงพลังงานด้วย เนื่องจากมีความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับพลังงาน ซึ่งจะเป็นจุดที่สามารถลดต้นทุนหรือลดการใช้โปรตีนได้บางส่วน เนื่องจากพลังงานเป็นสารอาหารที่ใช้เพื่อการดำรงชีวิต เช่น การหายใจ การว่ายน้ำ และการเจริญเติบโต โดยที่สัตว์น้ำจำเป็นต้องได้รับพลังงานเพื่อการดำรงชีวิตเพียงพอเสียก่อนที่จะเหลือใช้เพื่อการเจริญเติบโต ระดับพลังงานใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อาหารที่เหมาะสมเพื่อให้สัตว์น้ำเจริญเติบโตดีควรมีค่าระหว่าง 8-10 กิโลแคลอรี/น้ำหนักโปรตีน 1 กรัม (อมรรัตน์ และคณะ, 2548)

ในสัตว์น้ำทุกชนิดมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 20% และแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน คือ คาร์บอน (50-55%), ไฮโดรเจน (6.57%), ไนโตรเจน (15.5-18% โดยเฉลี่ย 16%), ออกซิเจน (21.5-23.5%) และซัลเฟอร์ (0.5-2.0%) สัตว์น้ำต้องการโปรตีนมากถึง 30-50% ของน้ำหนักอาหาร เพราะเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย ในการสร้างเนื้อ หนัง อวัยวะต่างๆ เอนไซม์ ฮอร์โมน สารภูมิคุ้มกัน และสารพันธุกรรม โดยโปรตีนประกอบด้วยส่วนย่อยที่เรียกว่า กรดอะมิโน (amino acid) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acid) ที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ และกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น (non-essential amino acid) ที่ร่างกายสังเคราะห์ขึ้นเองได้ จึงไม่จำเป็นต้องมีในอาหาร สัตว์น้ำต้องได้รับกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทุกตัวในปริมาณที่พอเหมาะจึงจะทำให้ร่างกายสร้างโปรตีนได้ โปรตีนที่ดีจะทำให้สัตว์น้ำเจริญเติบโตดี และควรมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้ง 10 ชนิดในปริมาณที่สมดุล (อมรรัตน์ และคณะ, 2548) สำหรับกุ้งขาวแวนนาไมต้องการโปรตีนประมาณ 25-35% ซึ่งต่ำกว่า *P. chinensis* และ *P. monodon* (Wyban, 1992)

การประเมินคุณค่าโปรตีนและกรดอะมิโน

คุณภาพของโปรตีนและกรดอะมิโนเป็นกลไกที่ดีในการตรวจสอบว่าอาหารมีคุณค่าเหมาะสมกับความต้องการของสัตว์หรือไม่ อาหารไม่ได้ประกอบเพียงแค่โภชนะต่างๆ ตามสัดส่วนที่คำนวณไว้แต่ต้องติดตามถึงความสามารถในการย่อยได้ และการดูดซึมได้ของสารอาหารในรูปแบบต่างๆ ด้วย ซึ่งจะอยู่ในรูปที่สัตว์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ความสามารถในการย่อยอาหาร (digestibility) ถูกใช้ในการประเมินการนำสารอาหารไปใช้ประโยชน์ได้ของสัตว์ (bioavailability) ปัญหาหลักที่พบในการใช้ความสามารถในการย่อยอาหารในการประเมินการใช้ประโยชน์ของสารอาหารคือ ความแตกต่างในการย่อยอาหารได้ขึ้นกับชนิดของสัตว์ แหล่งของวัตถุดิบ อุณหภูมิที่ใช้ในการแปรรูปอาหาร (วีรพงศ์, 2536)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรดอะมิโน

กรดอะมิโนเป็นตัวกำหนดคุณภาพของโปรตีนถ้าโปรตีนมีกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้ง 10 ชนิด ครบถ้วนในปริมาณมากพอเรียกว่า โปรตีนชนิดสมบูรณ์ (complete protein) หรือโปรตีนที่มีคุณภาพดีสำหรับสัตว์น้ำ ส่วนโปรตีนที่มีกรดอะมิโนที่จำเป็นไม่ครบทุกชนิดหรือมีครบแต่มีในปริมาณจำกัดเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพไม่ดีหรือเรียกว่า โปรตีนชนิดไม่สมบูรณ์ (incomplete protein) โปรตีนชนิดสมบรูณ์พบในเนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์จากสัตว์และถั่วเหลือง สำหรับโปรตีนที่พบในพืชอื่นๆ เป็นโปรตีนที่ไม่สมบูรณ์ (เวียง, 2543) โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนในสัดส่วนที่ไม่ตรงกับความต้องการของสัตว์จะทำให้สัตว์นำไปสังเคราะห์เป็นโปรตีนให้กับร่างกายได้อย่างไม่มีประสิทธิภาพ แม้ว่าโปรตีนนั้นถูกย่อยได้ง่ายในร่างกาย

Hird (1986) รายงานว่าอาร์จีนีนเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นในกลุ่มครัสเตเซียน ซึ่งทำหน้าที่เป็น phosphogen สำหรับการยืดหดกล้ามเนื้อ ถ้าขาดอาร์จีนีนจะทำให้กุ้งสกุลพีเนียสเจริญเติบโตช้า การเสริมอาร์จีนีน ฟีนิลอะลานีน ลิวซีน หรือไอโซลิวซีน 1% ในอาหารกุ้งก้ามกรามจะทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตดี (Leuteio, 1979) ถ้ามีการเสริม crystalline amino acid ในอาหารกุ้งขาวจะทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น (Lim, 1993) เมื่อทำการศึกษาโดยติดตามการฉายรังสีทำให้ทราบว่าซิสตีนสามารถถูกสังเคราะห์จากเซอรีนและเมทไธโอนีน ส่วนไทโรซีนสามารถถูกสังเคราะห์มาจากฟีนิลอะลานีนโดยปฏิกิริยา hydroxylation

การย่อยโปรตีน

มีหลักฐานว่าระบบการย่อย และการดูดซึมอาหารของกุ้งจะแตกต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลังคือไม่มีเปปซิน แต่มีทริปซินหรือ trypsin-like serine protease ใน hapatopancreas ของกุ้งจะมีเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ carboxy peptidase, trypsin-like และ cathepsin-c นับว่ามีปริมาณมากและมีบทบาทมากในการย่อย

Lee *et al.* (1984) พบว่าการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในกุ้ง *L. vannamei* จะเพิ่มมากขึ้น ถ้าคุณภาพและระดับโปรตีนสูงขึ้น ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ อาหารที่กุ้งกิน การเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะ ขนาดกุ้ง และการเปลี่ยนแปลงในรอบวัน การทำงานของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนในกุ้ง *L. vannamei* ลดลงเมื่อมีการเจริญเติบมากขึ้น จากการศึกษาพบว่ากุ้งขนาดเล็ก (4 กรัม) จะมีความสามารถใช้โปรตีนได้ดีกว่ากุ้งขนาดใหญ่ (10-20 กรัม)

Le Moullau *et al.* (1994) พบว่าการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในกุ้ง *L. vannamei* ระยะวัยอ่อนจะสูงขึ้นเมื่อระดับโปรตีนในอาหารสูง แต่การทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินลดลง สำหรับกุ้งสกุลพีเนียสนั้นพบว่าเอนไซม์ชนิดแรกที่มีความเข้มข้นสูงและทำงานก่อนคือเอนไซม์อะไมเลส ต่อมาเอนไซม์โปรติเอสจะค่อยๆ ทำงานแทนเอนไซม์อะไมเลสในช่วงกลางของระยะวัยอ่อน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นพร้อมกับการกินอาหารด้วย

ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไมเป็นสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในกลุ่ม arthropod มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immune response) เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Bachère *et al*., 2000) โดยจะไม่มีการตอบสนองและการสร้างสารน้ำที่เรียกว่า แอนติบอดี (antibody) หรืออิมมูโนโกลบูลิน (immnoglobulin) (กิจการ และคณะ, 2543 จ) เนื่องจากระบบหมุนเวียนเลือดของกุ้งเป็นระบบเปิด (Söderhäll *et al*., 1996) ประกอบด้วยหัวใจ แอ่งเลือด และน้ำเหลือง เลือดจากหัวใจจะไหลเข้าไปในแอ่งเลือด จากนั้นจะไหลไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกาย อวัยวะในการสร้างเม็ดเลือด เรียกว่า hematopoietic tissue พบที่ตำแหน่งด้านบนของกระเพาะอาหาร และโคนขาเดิน พบอยู่เป็นชุดๆ ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และบริเวณใกล้กับแอ่งเลือด น้ำเลือดกุ้งมีแร่ธาตุคาร์บอน (C), ไนโตรเจน (N), ไฮโดรเจน (H), ซัลเฟอร์ (S) และคอปเปอร์ (Cu) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ โดยแร่ธาตุคอปเปอร์ ทำให้น้ำเลือดของกุ้งมีสีน้ำเงิน ในน้ำเลือดกุ้งมีรงควัตถุที่ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ คือ hemocyanin (Ratcliffe *et al*., 1985) โดยมีประมาณ 60-95 เปอร์เซ็นต์ในน้ำเลือดทั้งหมด (Djangmah, 1970) ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงตามเพศ ขนาดของตัวกุ้ง และวงจรการลอกคราบของตัวกุ้ง (Chen and Cheng, 1993)

Lackie (1980) ได้กล่าวถึงลักษณะสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไว้ 4 ลักษณะ คือ

1. ไม่มีการสร้างสารอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin; Ig)

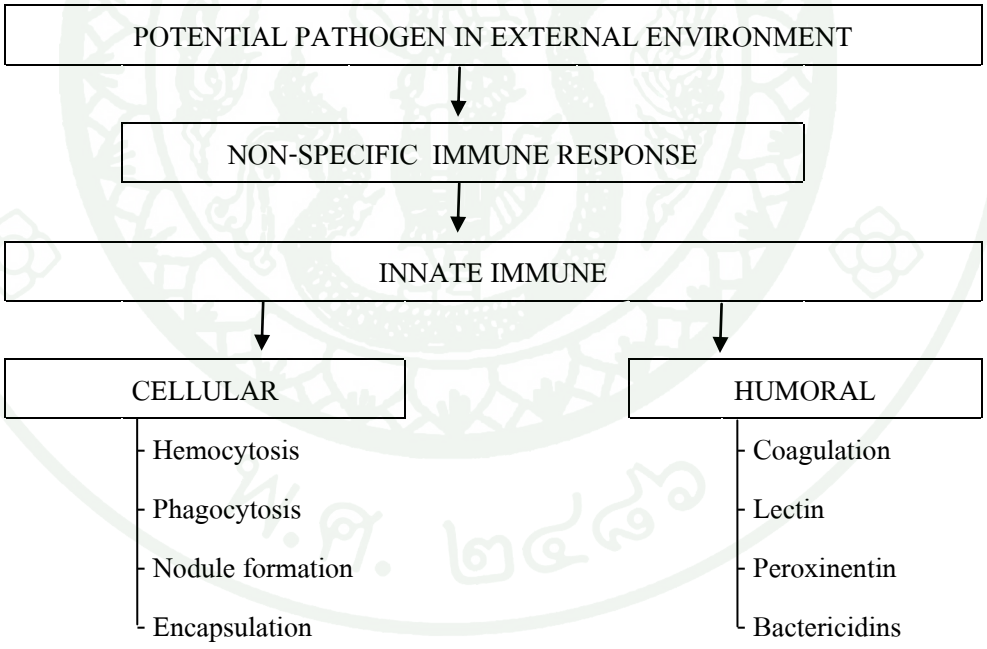
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. มีความสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสิ่งที่เป็นของตัวเองกับสิ่งแปลกปลอม

3. สัตว์ในกลุ่มไม่มีกระดูกสันหลังเป็นสัตว์ที่มีระบบเลือดแบบเปิด จึงจำเป็นต้องมีกลไกในการป้องกันตัวทันทีที่สิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย โดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด ทำให้เกิดกระบวนการ phagocytosis, encapsulation และ coagulation เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดขณะเกิดบาดแผล

4. มีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเลือดมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย

สัตว์ไม่มีกระดูกสันมีการตอบสนองของร่างกายเมื่อสิ่งแปลกปลอมจากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่ร่างกาย โดยจะมีกลไกในการป้องกันตนเองทั้งการตอบสนองที่ทำงานโดยเซลล์ และองค์ประกอบในน้ำเลือด (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 กลไกการป้องกันตัวเองของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sindermann (1990)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กุ้งมีกลไกการป้องกันตนเองจากสิ่งแปลกปลอมหรือสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค โดยเม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สำคัญเกิดจากกิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือด น้ำเลือด และเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกาย (Söderhäll and Cerenius, 1992) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลไก คือ

1. กลไกการป้องกันตนเองโดยโครงสร้างภายนอกของร่างกาย (external defence mechanism) กุ้งมีโครงสร้างแข็งภายนอก (exoskeleton structure) เป็นสารพวก chitin และ chitosan โดยบริเวณเนื้อเยื่อภายใต้โครงสร้างปกคลุมที่เรียกว่า เปลือก จะมีเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสารเมือก (mucopolysaccharide หรือ mucous) และหลั่งสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเอส (protease inhibitor) ที่สร้างจากเชื้อก่อโรคได้ นอกจากนี้ในขณะที่กุ้งลอกคราบ (molting) เพื่อการเจริญเติบโต กุ้งก็จะสามารถกำจัดพวกปรสิตบริเวณผิวตัวออกไปพร้อมกับเปลือกแข็งด้วย

2. กลไกการป้องกันตนเองภายในร่างกาย (internal defence mechanism) เมื่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ กุ้งจะมีการตอบสนองภายในร่างกาย 2 ระบบ คือ

2.1 ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular defense mechanism)

ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular defence mechanism) เป็นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดในการทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) 3 ชนิด คือ hyaline cell, semi-granular และ large granular (Martin and Graves, 1985; Hose *et al*., 1987) กระจายอยู่ทั่วไปตามเนื้อเยื่อ ภายในกระแสเลือด ต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) กล้ามเนื้อหัวใจ hepatopancreas และอวัยวะอื่นๆ

กิจการ และคณะ (2543 ง) พบว่า เหงือก ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ ตับ และตับอ่อน รวมถึงเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดี ส่วนกล้ามเนื้อและระบบประสาทกำจัดได้เพียงเล็กน้อยโดยพบเซลล์เม็ดเลือด และเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ทำหน้าที่ในการดักจับสิ่งแปลกปลอมในเนื้อเยื่อดังกล่าว กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้นโดยเริ่มจากมีเซลล์เดี่ยวเข้ามาล้อมจับแล้วมีเซลล์เม็ดเลือดเข้ามารายล้อมมากขึ้นจนกลายเป็นลักษณะที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation สุดท้ายมีการสร้างเมลานินขึ้นและถูกกำจัดออกนอกร่างกาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิจการ และคณะ (2543 จ) รายงานว่า เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งสามารถจำแนกได้ 3 ชนิด โดยใช้การมีหรือไม่มีกรานูล (granules) ในเซลล์เป็นหลัก คือ

1) hyaline cell หรือ hyaline hemocyte (hyalinocyte) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด รูปร่างแบน กลม ผิวเรียบ บางครั้งอาจพบคล้ายรูปกระสวย หรือพระจันทร์เสี้ยว มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ มีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) smooth endoplasmic reticulum (SER) และ rough endoplasmic reticulum (RER) น้อย พบ cytoplasmic granules ในปริมาณน้อยมาก หรือไม่พบเลยและไม่พบ microvilli หรือเท้าเทียม (pseudopodium) ที่ผิวเซลล์ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.4-8.3 ไมโครเมตร (ในกรณีที่เป็นเซลล์กลม) หรือมีความกว้าง 2.5-3.6 ไมโครเมตร ยาว 6.8-13.9 ไมโครเมตร (ในกรณีที่เป็นเซลล์รูปรีหรือรูปกระสวย) (กิจการ และคณะ, 2543 ก) หน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยกระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) (Söderhäll and Smith, 1986)

2) semi-granular cell หรือ semi-granular hemocyte (semi-granulocyte) มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปกระสวย นิวเคลียสอยู่ตรงกลางหรือขอบ เซลล์พบ SER และ RER ได้มาก มี cytoplasmic granules ขนาดเล็ก และจำนวนน้อย บริเวณผิวเซลล์อาจพบ microvilli ได้เล็กน้อย ขนาดของเซลล์มีความกว้าง 4.2-6.8 ไมโครเมตร และยาว 9.0-14.2 ไมโครเมตร ลักษณะของ cytoplasmic granules ภายในไซโทพลาซึม (cytoplasm) มีขนาดเล็กและพบจำนวนน้อย สังเกตเห็นได้ไม่ชัดเจนจากผิวภายนอก (กิจการ และคณะ, 2543 ก) ทำหน้าที่โดยตรงในการห้อมล้อม และทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคได้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation รวมทั้งในกระบวนการ prophenoloxidase activating system และเซลล์เม็ดเลือดชนิด semi-granular cell นี้ ยังสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการกลืนกินได้อีกด้วย (Söderhäll and Cerenius, 1992)

3) large granular cell หรือ large granular hemocyte (granulocyte) มีขนาดใหญ่ที่สุด รูปร่างเป็นรูปไข่ คล้ายกับ semi-granular cell แต่ขนาดของเซลล์จะโตกว่า นิวเคลียสอยู่บริเวณขอบเซลล์มี SER และ RER ปานกลางและพบ cytoplasmic granules มาก ขนาดของกรานูลในไซโทพลาซึมมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-1 ไมโครเมตร (กิจการ และคณะ, 2543 ก) ซึ่งใหญ่กว่ากรานูลใน semi-granular cell ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-10 ไมโครเมตร ความยาว 12.2-14.6 ไมโครเมตร และความกว้าง 7.2-7.8 ไมโครเมตร มีหน้าที่หลักในการทำงานในกระบวนการ prophenoloxidase activating system รวมทั้งยังสามารถทำการล้อมและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เชื้อก่อโรคได้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation (Söderhäll and Cerenius, 1992)

โครงสร้างของเซลล์เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด ของพวกครัสเตเซีย พบว่าเซลล์เม็ดเลือดชนิด hyaline cell ทำหน้าที่ในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ส่วนเซลล์เม็ดเลือดชนิด semigranular cell และ granular cell เป็นส่วนประกอบสำคัญของระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase: proPO) และยังมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่ทำงานโดยเซลล์ด้วย (Söderhäll and Smith, 1983 a) ต่อมา Söderhäll and Cerenius (1992) ได้ทำการศึกษาหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 หน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

Hemocyte type	Phagocytosis	Encapsulation	Cytotoxicity	proPO activating system
Hyaline	Yes	No	Not done	No
Semigranular	Limited	Yes	Yes	Yes
Granular	No	Very limited	Yes	Yes

ปริมาณเม็ดเลือดรวมที่เพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันจะมีค่าสูงขึ้น (พรรณวไล, 2551) ร่างกายของสัตว์น้ำจะสามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคที่จะเข้าสู่ร่างกาย ได้อย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางในการตอบสนองแบบไม่จำเพาะของกุ้ง โดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดและสารน้ำในการกำจัดแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย

การศึกษาเม็ดเลือดของกุ้งโดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล (molecular technique) ร่วมกับเทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกันมาศึกษาโปรตีนในเม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด โดยใช้เทคนิค *in situ* hybridization (Keyser, 1999), enzyme activity (Söderhäll and Smith, 1983), immunogold (Liang *et al*., 1992), immunofluorescence (Johansson *et al*., 1999) และ immunoprecipitation (Liang *et al*., 1992) โปรตีนชนิด prophenoloxidase (proPO) และ peroxinectin สามารถพบได้ในเม็ดเลือดชนิด semi-granular cell และ large granular cell ส่วนโปรตีนชนิด cell-surface superoxide dismutase และ α-macroglobulin พบมากในเม็ดเลือดชนิด semi-granular cell และ large granular cell แต่พบน้อยใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เม็ดเลือดชนิด hyaline cell ส่วนโปรตีนชนิด transglutaminase พบได้ในเม็ดเลือดชนิด hyaline cell และ semigranular cell แต่ไม่พบในเม็ดเลือดชนิด large granular cell เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดนี้จะไหลเวียนไปกับเลือดทั่วร่างกาย ปริมาณเม็ดเลือดภายในตัวกุ้งมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา และจะมีปริมาณลดลงเมื่อกุ้งเกิดการติดเชื้อโรค จากนั้นเม็ดเลือดใหม่จะถูกสร้างขึ้นมาทดแทนเม็ดเลือดที่ตายไปในปริมาณที่เหมาะสม

ภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ มีกระบวนการป้องกันและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรค โดยมีกระบวนการหลักๆ 3 แบบ ได้แก่

1) กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

เป็นกลไกพื้นฐานในการทำลายหรือกำจัดเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมผ่านชั้นผิวปกคลุมเข้ามาสู่ร่างกาย โดยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด hyaline cell เป็นหลัก และมีการทำงานร่วมกับ semi-granular cell บ้าง โดยกระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่ไม่จำเพาะ ซึ่งจะเริ่มจากการยึดกันระหว่างสิ่งแปลกปลอมกับผิวของเซลล์เม็ดเลือด หลังจากนั้นผิวของเซลล์จะเว้าเข้าไปหรือมีการโอบล้อมโดยการใช้ไซโทพลาซึมยืดออกเป็นเท้าเทียม เกิดเป็น phagosome ซึ่งจะสัมผัสกับ lysosome ที่อยู่ภายในเซลล์ ได้เป็น phago-lysosome ภายใน lysosome บรรจุเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย เรียกว่า acid hydrolases รวมถึงเอนไซม์ที่สามารถทำลายสารพันธุกรรมทั้ง deoxyribonucleic acid (DNA) ได้แก่ เอนไซม์ DNases, เอนไซม์ที่ทำลายสาร ribonucleic acid (RNA) ได้แก่ เอนไซม์ RNases, เอนไซม์ที่สามารถทำลายสารโปรตีน ได้แก่ proteases, เอนไซม์ที่สามารถทำลายสารจำพวกฟอสเฟต ได้แก่ phosphatases และเอนไซม์ที่สามารถทำลายสารพวกไขมัน ได้แก่ lipases ที่สามารถไปลดขนาดของโมเลกุลสิ่งแปลกปลอมทั้งหลายให้เหลือเป็นหน่วยย่อยๆ และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ hydrolysis ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจำแนกได้เป็น 6 ชนิดได้แก่ c-type, g-type, plant lysozyme, phage lysozyme, i-type, bacteria-lysozyme (Hikima *et al.*, 2003)

การที่สิ่งแปลกปลอมเกาะบนผนังเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือด และมีการยื่นไซโทพลาซึมล้อมรอบสิ่งแปลกปลอม นำไปสู่การเพิ่มการนำออกซิเจน (O_2) เข้าสู่เซลล์ (respiratory burst) ซึ่งออกซิเจนเหล่านี้จะถูกรีดิวซ์ (reduce) เป็น superoxide anion (O_2^-) ด้วยเอนไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase) ต่อจากนั้น superoxide anion จะถูก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอ็นไซม์ superoxide dismutase (SOD) (สมบัติ, 2542) ดังสมการต่อไปนี้

$$2O_2 + NADPH \xrightarrow{\text{NADPH oxidase}} 2O_2^- + NADP^+ + H^+$$

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

superoxide anion อาจถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide ได้อีกทางหนึ่งโดยการเกิดเองตามธรรมชาติไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ และได้ออกซิเจน 1 โมเลกุล (singlet oxygen; $^1O_2$) เป็นผลผลิตร่วมกับ hydrogen peroxide นอกจากนี้ superoxide anion ยังทำปฏิกิริยาร่วมกับ hydrogen peroxide เกิดเป็น hydroxyl radicle (OH) (สมบัติ, 2542) ดังสมการต่อไปนี้

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + {}^1O_2$$

$$O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow OH + OH^- + O_2$$

จากปฏิกิริยาข้างต้น superoxide anion , hydrogen peroxide , ออกซิเจน 1 โมเลกุล และ hydroxyl radical มีบทบาทสำคัญในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่ถูกเซลล์เม็ดเลือดนำเข้าสู่เซลล์ ซึ่งมีผู้รายงานไว้ในกุ้งกุลาดำ (สมบัติ, 2542; Song and Hsieh, 1994; Sung and Song, 1996)

ระยะเวลาในการเกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมตั้งแต่เริ่มจนถึงการเกิด phagolysosome และการกระตุ้นการเกิดกระบวนการแตกตัวของออกซิเจนจะใช้เวลาหลายชั่วโมง เวลาสำหรับการเกิดการแตกตัวของอนุภาคสิ่งแปลกปลอมจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของสิ่งแปลกปลอมที่เข้าไป ระดับของการกระตุ้นเซลล์ที่ทำหน้าที่กลืนกินสิ่งแปลกปลอม กระบวนการนี้บางครั้งสามารถเกิดได้ในเวลาไม่กี่ชั่วโมง หรือบางครั้งอาจใช้เวลาเป็นวัน (Terry, 2001)

superoxide anion ถูกสร้างขึ้นในขั้นตอนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด O^-_2 ที่วัดได้เป็นหนึ่งในหลายชนิดของ reactive oxygen ที่เซลล์สร้างขึ้นในระหว่างการจับกินสิ่งแปลกปลอม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(Bell and Smith, 1993) ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม crustaceans และหอยก็ได้มีการศึกษากระบวนการดังกล่าวของเม็ดเลือด และพบว่า reactive oxygen ที่เซลล์สร้างขึ้นสามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมที่เป็นเชื้อโรคได้ดี (Dikkeboom *et al.*, 1987; Bell and Smith, 1993) กิจการ และคณะ (2543 จ) กล่าวว่าการวัดปริมาณการสร้าง O^-_2 ของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ น่าจะประยุกต์ใช้ได้ดีกว่าการวัดความว่องไวของ phagocytosis ของเม็ดเลือดโดยให้มีการจับกินเม็ดพลาสติก เนื่องจากขั้นตอนการศึกษาความว่องไวของ phagocytosis จะขึ้นอยู่การตัดสินใจของผู้ตรวจนับเม็ดเลือดทำให้เกิดข้อผิดพลาดได้ง่าย

2) กระบวนการ nodule formation

เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่มีขนาดเล็กบุกรุกเข้ามาเป็นจำนวนมากเกินกว่าความสามารถที่กระบวนการกลืนทำลายจะกำจัดได้ (Jiravanichpaisan *et al*., 2006) โดยจะมีการล้อมสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์เม็ดเลือด ทำให้เกิดเป็น nodule จะเกิดขึ้นเพื่อป้องกันไม่ให้สิ่งแปลกปลอมกระจายทั่วร่างกาย มักพบการสร้าง nodule ที่เหงือก และ hepatopancreas พร้อมทั้งการสร้างเม็ดสี melanin ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system ซึ่งเป็นกระบวนการตอบสนองทางด้านระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด เซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ semi-granular cell และ large granular cell (Johansson and Söderhall, 1989)

Fontaine and Lightner (1975) ศึกษาเกี่ยวกับระบบการตอบสนองของเซลล์ต่อการบาดเจ็บของกุ้งสกุล *Penaeus* พบว่าเมื่อกุ้งได้รับอันตรายจากสิ่งแปลกปลอมโดยมีการทำให้เกิดการบาดเจ็บหรือเป็นแผลขึ้นปฏิกิริยาแรกที่กุ้งมีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม ที่เกิดขึ้นคือ มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดไปยังบริเวณที่เกิดบาดแผล จากนั้นเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งจะเกิดกระบวนการ phagocytosis ขึ้นซึ่งเป็นการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในขั้นตอนแรก จากนั้นจะเกิดกระบวนการ encapsulation ซึ่งจะพบเห็นเซลล์เม็ดเลือดบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ หลังจากนั้นจะมี cellular infiltration และ encapsulation แล้วจะเกิดโครงข่ายของ fibroblast หนาแน่นขึ้นและมี collagen like fibers เกิดเป็นบาดแผลถาวรและมีการสร้างรงควัตถุสีดำจากกระบวนการ melanization

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3) กระบวนการ encapsulation

เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่มีขนาดใหญ่มากกว่า 10 ไมโครเมตร (Lackie, 1980) เช่น เชื้อรา หนอนตัวกลม ไข่ของปรสิต และสัตว์เซลล์เดียวขนาดใหญ่ เป็นต้น (Jiravanichpaisan *et al*., 2006) จนเซลล์เม็ดเลือดไม่สามารถกำจัดได้ทันนอกจากนี้ กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการ encapsulation จะอาศัยองค์ประกอบในกระบวนการ prophenoloxidase activating system พร้อมกับการเกิดเม็ดสี melanin (Ratcliff *et al*., 1985) เซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมเป็นชนิดเดียวกันกับการเกิดกระบวนการ nodule formation จากการศึกษาของ กิจการ และคณะ (2543 ง) ได้ทำการทดลองโดยใช้ยีสต์ (*Sacharmyces cerevisiae*) เป็นสิ่งแปลกปลอมเพื่อติดตามและตรวจสอบการตอบสนองของเซลล์และเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งกุลาดำ ด้วยวิธีนับเม็ดเลือดรวมและเนื้อเยื่อวิทยา จากการทดลองหลังจากฉีดเซลล์ยีสต์เข้าสู่ตัวกุ้ง 1 ชั่วโมง ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง หลังจากนั้นปริมาณเม็ดเลือดค่อยๆ เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง และผลการศึกษาเนื้อเยื่อพบว่า เหงือก ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ hepatopancreas และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดี ส่วนกล้ามเนื้อและระบบประสาทกำจัดได้เพียงเล็กน้อย โดยพบเซลล์เม็ดเลือดและเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ (fixed phagocyte) ทำหน้าที่ในการดักจับสิ่งแปลกปลอมในเนื้อเยื่อดังกล่าว กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้นโดยเริ่มจากมีเซลล์เดี่ยวเข้ามาล้อมจับ หลังจากนั้นชั่วโมงที่ 3-9 พบว่ามีเซลล์เม็ดเลือดเข้ามารายล้อมมากขึ้นจนกลายเป็นลักษณะที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลงและสุดท้ายมีการสร้างเม็ดสี melanin ขึ้น และถูกกำจัดออกนอกร่างกาย

เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งขาว

กิจการ และคณะ (2543 ง) พบว่า เหงือก ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ hepatopancreas และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดี ส่วนกล้ามเนื้อและระบบประสาทกำจัดได้เพียงเล็กน้อย โดยพบเซลล์เม็ดเลือด และเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ทำหน้าที่ในการดักจับสิ่งแปลกปลอมในเนื้อเยื่อดังกล่าว

ระบบภูมิคุ้มกันโรคของสิ่งมีชีวิตกลุ่ม crustacean ในการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมมีทั้งกิจกรรมที่เกิดขึ้นโดยการตอบสนองของเซลล์และของเหลวในร่างกาย (cellular and humoral

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

response) (กิจการ และคณะ, 2543 ง) ซึ่งกิจกรรมที่เกิดขึ้นมีหลายแบบคือโปรตีนชนิดต่างๆ ในซีรั่ม เช่น แอกกลูตินิน (agglutinin) ฮีโมไลซิน (hemolysin) ไลโซซายม์ (lysozyme) และโปรตีนที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือด (clotting protein) เซลล์เม็ดเลือดซึ่งจะก่อให้เกิดกระบวนการเกาะกลุ่ม (adhesion) phagocytosis การห่อหุ้มโดยวิธี encapsulation, melanization และระบบอื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น การแข็งตัวของเลือด, สมานแผล และ prophenoloxidase activating system (Martin *et al.,* 1993)

จากการศึกษาของ กิจการ และคณะ (2543 ง) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งหลังจากที่ได้รับสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายโดยจำนวนเม็ดเลือดจะลดลงทันทีในชั่วโมงแรกหลังจากที่ได้รับสิ่งแปลกปลอม ซึ่งในชุดควบคุมนับได้ $3.36 \pm 1.85 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร ในขณะที่ชุดที่ได้รับการฉีดเซลล์ยีสต์มีจำนวนเม็ดเลือด $2.12 \pm 1.96 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร และจำนวนเม็ดเลือดในชุดทดลองจะลดลงอย่างต่อเนื่องในชั่วโมงที่ 2 และที่ 3 คือมีค่า $1.95 \pm 1.21 \times 10^4$ และ $1.28 \pm 0.44 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ และหลังจากชั่วโมงที่ 4 เป็นต้นไป ปริมาณเม็ดเลือดจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง และจะอยู่ในระดับต่ำคงที่เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยที่ปริมาณเม็ดเลือดในชุดควบคุมจะปกติอยู่ในระดับ $3.28 \pm 1.26 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร จากนั้นปริมาณเม็ดเลือดในกุ้งที่ได้รับเซลล์ยีสต์จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากฉีดยีสต์ และจะเข้าสู่ระดับปกติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมภายใน 48 ชั่วโมง นอกจากนั้นพบว่าเหงือก หัวใจ และต่อมน้ำเหลือง เป็นบริเวณที่มีการกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดี โดยเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการดักจับสิ่งแปลกปลอมจะมีเซลล์เม็ดเลือด และเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ โดยเมื่อฉีดยีสต์เข้าไปในตัวกุ้ง จะพบเซลล์ของยีสต์ในเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าวภายใน 1 ชั่วโมง ในระยะแรกของการจับกินจะมีเซลล์จับกินที่อยู่กับที่ และเซลล์เม็ดเลือดเดี่ยวๆ เข้ามาจับกิน หลังจากผ่านไป 3-9 ชั่วโมง มีเซลล์เม็ดเลือดเข้ามาห้อมล้อมส่วนที่ถูกจับกินมากยิ่งขึ้น จนเห็นเป็นกลุ่มใหญ่ขึ้นที่เรียกว่า nodule formation ซึ่งจากปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นจะมีผลทำให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดน้อยลงและเมื่อเวลาผ่านไป 24-48 ชั่วโมง หลังจากฉีดยีสต์เข้าสู่ตัวกุ้งหรือมากกว่านั้น จะพบว่ามีเม็ดเลือดเข้ามาห้อมล้อมในส่วนที่ถูกจับกินมากยิ่งขึ้นจนกลายเป็นแคปซูลขนาดใหญ่ ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะค่อยๆ ถูกกำจัดออกไป เมื่อสิ่งแปลกปลอมถูกกำจัดออกนอกร่างกายเม็ดเลือดที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่ก็กลับเข้าไปในระบบหมุนเวียน ปริมาณเม็ดเลือดจึงค่อยๆ เพิ่มมากขึ้นจนเข้าสู่สภาวะปกติ พบลักษณะของ nodule formation หรือ encapsulation กระจายอยู่ทั่วไปตามเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ต่อมน้ำเหลือง hepatopancreas หัวใจ เหงือก ซึ่งกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะมีเซลล์เม็ดเลือดในระบบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไหลเวียน และเซลล์จับกินกับที่ เข้ามาเกี่ยวข้องเป็นหลัก ในระยะสุดท้ายของการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะมีการสร้าง melanin ขึ้น เนื่องจากกระบวนการของ prophenoloxidase

Fontaine and Lightner (1975) พบว่าหลังจากฉีดอนุภาคของสีคาร์มีน (carmine) เข้าไปในเนื้อเยื่อกุ้ง Atlantic white shrimp (*Penaeus setiferus*) ภายใน 1 ชั่วโมง จะมีการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดเข้ามาห้อมล้อมอนุภาคสี เซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุภาคสีก็จะมีทั้งเม็ดเลือดและเซลล์จับกินกับที่ในเนื้อเยื่อต่างๆ โดยอนุภาคสีสามารถตรวจพบคงอยู่ในตัวกุ้งได้นาน 33 วัน

กิจการ และคณะ (2543 ง) รายงานว่า เซลล์จับกินกับที่เมื่อตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบว่ากระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อหลายส่วน เช่น หัวใจ เหงือก ทางเดินอาหาร ลักษณะของเซลล์จับกินกับที่ต่างจากเม็ดเลือดกุ้งคือไม่พบแกรนูลภายในไซโทพลาซึม มี vacuole ขนาดใหญ่อยู่ในไซโทพลาซึม และมักพบเศษเซลล์ และลักษณะของ myelin figure ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการจับกินสิ่งแปลกปลอม และเกิดจากโครงสร้างที่พบแสดงให้เห็นว่ากระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมจากตัวกุ้งเกิดขึ้นได้ในเนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของร่างกาย ในกรณีที่สิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายเป็นสิ่งไม่ก่อให้เกิดโรคและไม่มีผลทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ ที่ตอบสนองสิ่งแปลกปลอมนั้นกุ้งก็สามารถจะทำลายและขับออกมาภายนอกตัวได้ แต่ถ้าสิ่งแปลกปลอมนั้นเป็นเชื้อโรค เช่นแบคทีเรียหรือไวรัสที่สามารถสร้างสาร hemolysin ย่อยสลายเม็ดเลือด สร้างเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) ย่อยสลายเปลือกกุ้งรวมถึงอนุภาคของไวรัส เชื้อรา และโพรโทซัวชนิดต่างๆ ที่เข้าทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อโดยตรง หรือสร้างสารรบกวนกิจกรรมของเซลล์และเนื้อเยื่อในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายกุ้งลดลงและก่อให้เกิดโรคได้

2.2 ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันโดยสารน้ำ (humoral defenses)

มีการทำงานต่อหรือพร้อมกับระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ โดยเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งจะมีการผลิตสารโปรตีนทำหน้าที่ช่วยในการจดจำและเข้าจับกันได้กับโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรค ซึ่งมีชื่อเรียกว่า pattern recongition protein (PRPs) มีน้ำหนักประมาณ 100 กิโลดาลตัน (kDa) จะไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด โดย PRPs มีชื่อเรียกต่างๆ กันตามความสามารถในการจับกับโมเลกุลของเชื้อก่อโรค เช่น ถ้า PRPs จับกับโมเลกุลของเบต้ากลูแคนซึ่งสามารถสกัดได้จากผนังเซลล์ (cell wall) ของยีสต์ (yeast) และ hyphae ของเชื้อรา จะมีชื่อเรียกว่า β -glucan binding protein (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) ในส่วนของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปปติโดกลัยแคนสามารถสกัดได้จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก จะมีชื่อเรียกว่า peptidoglycan binding protein และไลโพโพลีแซคคาร์ไรด์ สามารถสกัดได้จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ จะมีชื่อเรียกว่า lipopolysaccharide binding protein (ชัยชาญ, 2545)

โดยโมเลกุลของสารเบต้ากลูแคน, ไลโพโพลีแซคคาร์ไรด์ และเปปติโดกลัยแคน เรียกรวมๆ ว่า pathogen associated molecular pattern (PAMPs) เมื่อ PAMPs แต่ละชนิดเข้ามาในกระแสเลือดกุ้ง โมเลกุลของ PRPs จะเคลื่อนที่เข้าไปจับกับ PAMPs ส่งผลให้ได้เป็นโมเลกุลเชิงซ้อน (protein complex) ได้แก่ β -1,3-glucan-binding protein complex (Sritunyalucksana *et al*., 1999) lipopolysaccharide -binding protein complex และ peptidoglycan -binding protein complex (ชัยชาญ, 2545) โมเลกุลเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดให้เคลื่อนที่เข้ามา (migration) ซึ่งบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดชนิด semi-granular cell และ large granular cell มีส่วนรองรับแบบจำเพาะ (receptor) ซึ่งสามารถรองรับโมเลกุลเชิงซ้อน และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ degranulation ของเม็ดเลือด (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) ซึ่งภายในกรานูลจะประกอบไปด้วยเอนไซม์และสารประกอบโปรตีนต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์ transglutaminase (TGase), lectin, peroxinectin, protein released และเอนไซม์ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system โดยสารทั้งหมดที่หลั่งออกมากระตุ้นให้เกิดกระบวนการต่างๆ ดังนี้

1. กระบวนการแข็งตัวของเลือด

เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญเพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดจากบาดแผล โดยเอนไซม์ transglutaminase จะไปกระตุ้นโปรตีนหลักที่เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด (clotting protein) ซึ่งไหลเวียนอยู่ในน้ำเลือดกุ้ง (วัชริยา, 2549) โดย transglutaminase จะทำงานร่วมกับ calcium ion (Ca+) กระตุ้น clotting protein monomer ส่งผลให้เกิดกระบวนการทางชีวเคมี ได้เป็นสารที่เกิดการจับตัวเป็นก้อน (clot polymer) ทำให้เม็ดเลือดเกิดการแข็งตัว (blood clotting)

Iwanaga (1993) ได้ทำการศึกษาระบบการแข็งตัวของเลือดในกลุ่ม Chelicerate โดยศึกษา horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* พบว่าระบบที่ทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน (coagulation system) ประกอบไปด้วยโปรตีน 5 ชนิด ซึ่งทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดได้ ได้แก่ serine proteinase zymogen factors C, B, G, proclotting enzyme และ clottable protein coagulogen ซึ่ง factors C จะเป็นโปรตีนที่ไวต่อการกระตุ้นของ Lipopolysaccharide (LPS) และ factors G จะเป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โปรตีนที่ไวต่อการกระตุ้นของ β-1,3-glucan

Wang *et al.* (2006) ได้ศึกษากลไกการแข็งตัวของเลือดในกุ้ง crayfish พบว่า ในเม็ดเลือดทั้งชนิด semi-granular cell และ large granular cell รวมถึงเนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อมีกิจกรรมที่เกิดการแข็งตัวของเลือดอันเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ TGase แต่กิจกรรมดังกล่าวกลับไม่พบใน hepatopancreas และน้ำเลือด เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของ nucleotide พบว่าลำดับเบสของเอนไซม์ TGase ของกุ้ง crayfish มีความคล้ายคลึงกันมากกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

Huang *et al.* (2004) ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ TGase ในกุ้งกุลาดำพบว่ามีความคล้ายกับกุ้ง crayfish สัตว์มีกระดูกสันหลัง และไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ และสามารถตรวจสอบพบได้ในทุกอวัยวะ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกมาในปริมาณสูงในเนื้อเยื่อส่วน hematopoietic tissue อีกด้วย

2. การหลั่งสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Bactericidin)

Bactericidin พบในส่วนของพลาสมา ซีรัม และสารละลาย HLS (hemocyte lysate supernatant) สามารถถูกชักนำให้สูงขึ้นเมื่อได้รับสารกระตุ้น ไม่ทนความร้อน และมีความจำเพาะต่อเชื้อบางชนิด (ชัยชาญ, 2545)

2.1 การหลั่งสาร Lectin

พบโดยธรรมชาติในเลือดของครัสเตเซียน เป็นสารชนิดโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน (glycoproteins) ที่มีคุณสมบัติในการจับได้อย่างจำเพาะกับสารพวกคาร์โบไฮเดรทบนผนังเซลล์แบคทีเรีย โดยเรียกว่า carbohydrate recognition domain (CRD) มี 2 ชนิด คือ C-type lectins และ S-type lectins (Freire Marques and Barracco, 2000) โดย lectin มีลักษณะเป็น bivalent จึงสามารถเชื่อมต่อกับเซลล์แบคทีเรียได้ถึง 2 เซลล์ ทำให้เกิดการตกตะกอนของเซลล์แบคทีเรียได้ รวมทั้งทำหน้าที่ opsonin ได้อีกด้วย (เสาวลักษณ์, 2550) สาร lectin สามารถพบได้ทั้งในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังพบว่ามีบทบาทสำคัญในการตอบสนองแบบไม่จำเพาะของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Vasta *et al.*, 1994)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 การหลั่งสาร Peroxinctin

เป็นสารที่คล้ายไซโทไคน์ (Cytokine-like factor) มีหน้าที่ช่วยรักษาความสมดุลของเลือดในระบบภูมิคุ้มกัน และช่วยในการประสานงานระหว่างระบบภูมิคุ้มกันระบบอื่นๆ ในร่างกาย cytokine-like factor ในกุ้งได้แก่ โปรตีนขนาด 76 kDa ซึ่งมีหน้าที่ช่วยกระตุ้นกระบวนการ phagocytosis ช่วยในการยึดติดระหว่างเม็ดเลือดกับสิ่งแปลกปลอม (Smith and Chisholm, 1992) นอกจากนี้ยังส่งเสริมการทำงานของ prophenoloxidase โดยช่วยเม็ดเลือดชนิด semigranular และ large granular เกิด degranulation มากขึ้น ทำให้เอนไซด์ในระบบ prophenoloxidase ถูกปล่อยออกมามากขึ้น (Johansson and Soderhall, 1989)

Phenoloxidase activating system

เป็นระบบที่สำคัญมากในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเป็นการทำลายเชื้อโรคและควบคุมการกกระจายตัวของเชื้อโรคภายในตัวกุ้ง ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญ โดยมีเอนไซด์ phenoloxidase (PO) ที่อยู่ในรูป pro-enzyme ที่เรียกว่า prophenoloxidase (proPO) และเอนไซด์ในกลุ่มเซอรีนโปรติเอส โดยการทำงานร่วมกันอย่างมีระบบ (Söderhäll *et al*., 1996) กระบวนการที่สำคัญระบบนี้เริ่มจาก prophenoloxidase เปลี่ยนเป็น phenoloxidase จะไปออกซิไดซ์สารกลุ่มฟีนอล (phenol) ให้เป็นสารประกอบควิโนน (quinone) แล้วเปลี่ยนไปเป็นเมลานินได้ในที่สุด หน้าที่ของเมลานินจะช่วยในการยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย สารต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial substance) เป็นสารประกอบขั้นสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการนี้ (Hose *et al*., 1987)

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (PO) ในกุ้งกุลาดำ กุ้งก้ามกราม และกุ้งขาว ส่วนใหญ่พบเอนไซม์ phenoloxidase ในไซโทพลาซึมของเซลล์เม็ดเลือดชนิด granular cell โดยพบว่าความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ที่พบในเซลล์เม็ดเลือดมีค่าสูงกว่าในน้ำเลือดกุ้ง (Perazzolo and Barracco, 1997) นอกจากนี้มีการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ในเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง *Penaeus stylirostris* พบว่าปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase ที่วัดได้จากเซลล์เม็ดเลือดในช่วงที่มีการลอกคราบ (intermoult) สูงกว่าระยะก่อนการลอกคราบ (premoult) อย่างมีนัยสำคัญ (Moullac *et al*., 1997)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทวีศักดิ์ (2547) รายงานว่าปริมาณเอนไซม์ prophenoloxidase ในกุ้งกุลาดำอายุ 1-4 เดือน พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 14.22-36.44 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนว่ากุ้งกุลาดำอายุ 4 เดือน มีปริมาณเอนไซม์ prophenoloxidase สูงที่สุด

Sung *et al*. (1996) พบว่า prophenoloxidase ของกุ้งกุลาดำ กุ้งก้ามกราม และกุ้งขาว ส่วนใหญ่จะอยู่ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดทั้ง semigranulocyte และ granulocyte นอกจากนี้แล้วยังพบเอนไซด์ชนิดนี้แพร่กระจายอยู่ในเนื้อเยื่อหลายส่วนของตัวกุ้ง และจากการศึกษาของกิจการ และคณะ (2543ก) พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase จากเม็ดเลือด และน้ำเลือดกุ้งกุลาดำมีค่าแตกต่างกัน โดยในเม็ดเลือดจะมีปริมาณค่อนข้างสูง และในน้ำเลือดจะมีปริมาณค่อนข้างต่ำ

ปัจจัยที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

คุณภาพน้ำสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงกุ้งที่ไม่เหมาะสมเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียดมีการลดลงของการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้ง ส่งผลให้กุ้งอ่อนแอ ง่ายต่อการติดเชื้อ โดยคุณภาพน้ำที่สำคัญมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม ได้แก่

1. ความเป็นกรดเป็นด่างหรือพีเอชของน้ำ ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงมากในรอบวันหรือมีค่าต่ำหรือสูงเกินไปจะส่งผลให้ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดลดลง แต่จะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดรวมและความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase (กิจการ และคณะ, 2543 จ)

2. ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ในสภาวะที่ออกซิเจนที่ละลายน้ำต่ำ จะมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งและพฤติกรรมการดำรงชีวิต โดยกุ้งจะเคลื่อนที่ช้าลงเพื่อลดกิจกรรมการใช้ออกซิเจนในร่างกาย และจะว่ายน้ำสู่ผิวน้ำเพื่อรับออกซิเจน ปริมาณออกซิเจนที่ละลายต่ำลงส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด และความสามารถของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา Seidman and Lawrence (1986) พบว่าที่ระดับออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้กุ้งกุลาดำ กุ้งแชบ๊วย และกุ้งขาวแวนนาไมมีอัตราการเจริญเติบโตและน้ำหนักตัวลดลง (Martinez-Palacios *et al*., 1996)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. อุณหภูมิของน้ำ เนื่องจากกุ้งเป็นสัตว์เลือดเย็น ดังนั้นอุณหภูมิของน้ำจะมีผลต่อระดับภูมิคุ้มกัน พบว่าในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ (25 องศาเซลเซียส) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของ phenoloxidase และค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดลดลง กว่ากุ้งที่เลี้ยงในสภาวะที่อุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส) จากการศึกษาของ Yu (1993) เมื่ออุณหภูมิต่ำลงและมีการเลี้ยงกุ้งในอัตราความหนาแน่นที่สูง ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดรวมจะลดลง ซึ่งทำให้กุ้งมีอัตราการหายใจและน้ำหนักตัวลดลง โดยกุ้งที่เลี้ยงในตู้ทดลองที่มีอุณหภูมิค่อนข้างต่ำและมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในรอบวันมาก ส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียดและมีผลต่อโปรตีนในซีรัมมากที่สุด

4. ความเค็มของน้ำ เนื่องจากความเค็มที่เปลี่ยนแปลงไปส่งผลต่อความเข้มข้นของแร่ธาตุในน้ำ โดยน้ำที่มีความเค็ม 25 พีพีที มีค่า osmolality ใกล้เคียงกับในตัวกุ้ง เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไมมีค่า isoosmotic point (IOP) เท่ากับน้ำความเค็ม 24.7 พีพีที จึงทำให้กุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 25 พีพีที ไม่ต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ส่งผลให้พลังงานและสารอาหารที่ได้รับมาจากอาหาร สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ ซึ่งแตกต่างจากกุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำหรือสูงเกินไป กุ้งต้องนำพลังงานที่ได้มาใช้ในการปรับตัวเป็นส่วนใหญ่ ส่งผลให้เหลือพลังงานที่ใช้ในการเจริญเติบโตมีน้อยลง

Chen and Cheng (1993) ได้ทำการศึกษาในกุ้ง *P. chinensis* ที่อาศัยอยู่ในน้ำที่มีค่าแอมโมเนียสูง (มากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะทำให้ค่าโปรตีนในซีรัมลดต่ำลงกว่ากุ้งที่อาศัยในน้ำปกติ

Vargas-Albores *et al*. (1998) ได้ทำการศึกษาในกุ้ง *Penaeus californiensis* ที่อาศัยอยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิและความเค็มของน้ำสูงหรือต่ำกว่าปกติจะมีผลให้ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase และค่าโปรตีนในน้ำเลือดลดลง

Martin and Graves (1985) ได้รายงานว่าที่อุณหภูมิต่ำ ส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดลดลงและมีผลให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ต่ำลงด้วย

กิจการ และคณะ (2543 ข) ได้ทำการศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการต่อองค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ พบว่าในสภาพที่พีเอชของน้ำต่ำกว่าค่าปกติ (6.0) ไม่มีผล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดรวม และความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase แต่มีผลให้ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมที่พีเอชปกติ (7.8) จากการศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันพบว่าในสภาวะที่ออกซิเจนละลายน้ำต่ำ (0.9-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด และความสามารถของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมลดลงเมื่อเทียบกับสภาวะที่มีออกซิเจนละลายน้ำปกติ (5.0-5.8 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่วนผลของอุณหภูมิต่อระบบภูมิคุ้มกันพบว่าในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ (25 องศาเซลเซียส) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase และค่าความสามารถการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดต่ำลงกว่าชุดควบคุมที่เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิสูง

โรคแบคทีเรียเรืองแสง

โรคเรืองแสงเกิดจาก *Vibrio harveyi* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในน้ำเค็มและน้ำกร่อย (พรเลิศ และคณะ, 2537) แบคทีเรียชนิดนี้มีการแพร่ระบาดได้เป็นบริเวณกว้างทั่วโลก (Lavilla-Pitogo *et al*., 1998) เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม microflora พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและบ่อเลี้ยงกุ้ง (Sindermann, 1990) เป็นแบคทีเรียที่ฉวยโอกาส (opportunistic bacteria) ซึ่งแบคทีเรียจะเข้าทำอันตรายเมื่อกุ้งเครียดและอ่อนแอก่อให้เกิดโรคแบบ secondary infection ทำให้กุ้งป่วยและตายในที่สุด โดยเชื้อชนิดนี้สามารถย่อยสลายสารพวก chitin ในเปลือกของสัตว์พวก crustacean แล้วแพร่กระจายภายในร่างกาย ถ้ากุ้งแข็งแรงจะสามารถกำจัดแบคทีเรียนี้ได้หรือกลายเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronic infection) เชื้อ *V. harveyi* สามารถปรับตัวให้ทนต่ออุณหภูมิและความเค็มช่วงกว้างได้ (Baumann *et al*., 1984; Jiravanichpaisan *et al*., 1994; Suwanto *et al*., 1998) โดยช่วงความเค็มและอุณหภูมิที่เหมาะสมของการเจริญเติบโตของเชื้ออยู่ระหว่าง 0-40 พีพีที และ 25-35 องศาเซลเซียส (ชลอ, 2534; สุภฎา และคณะ, 2543) จึงเป็นเหตุให้ช่วงฤดูร้อนมีปริมาณเชื้อมากกว่าในฤดูฝนหรือฤดูหนาว (Buchanan and Gibbons, 1974)

ลักษณะของแบคทีเรีย *V. harveyi*

เชื้อ *V. harveyi* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้นๆ มีขนาดกว้าง 0.5-0.8 ไมโครเมตร ยาว 1.4-2.6 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยใช้ flagella มี lateral flagella เติบโตได้ทั้งในสภาวะมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) (สุภฎา และคณะ, 2543)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เชื้อนี้สามารถให้แสงสีเขียวแกมเหลืองออกมา โดยปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดจากเอนไซม์ luciferase โดยสารตั้งต้นเป็น long chain aldehyde (tetradecanal) สารดังกล่าวได้มาจากการสังเคราะห์ของกรดไขมัน ระหว่างปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ของ aldehyde และการรีดิวซ์ของ flavin ($FMNH_2$) โดยเอนไซม์ luciferase จะทำให้เกิดการเรืองแสงของแบคทีเรียขึ้น สามารถเรืองแสงได้ในที่มืด เชื้อ *V. harveyi* สามารถสร้างสารพิษชนิด endotoxin ที่ร้ายแรงมากอยู่ภายในไซโทพลาซึมของเซลล์และละลายปนไปกับน้ำเลือด (ยอดยิ่ง, 2540) แบคทีเรียในสกุลนี้มีความต้องการโซเดียมอิออน ในการกระตุ้นการเจริญเติบโต เชื้อสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเค็ม sea water agar (SWA) และมีสภาพพีเอชเท่ากับ 9 อาหารเฉพาะของแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose agar (TCBS agar) พบโคโลนีของเชื้อเป็นสีเขียว ความรุนแรงของเชื้อ *V. harveyi* ไม่ขึ้นกับลักษณะทางพันธุกรรม แต่ขึ้นอยู่กับ plasmid หรือ lysogenic bacteriophage โดยมีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างกันโดยผ่านทาง mobile element ซึ่งได้แก่ plasmid ในกระบวนการเจริญเติบโต (Pizzutto and Hirast, 1995) โดยส่วนของ bacteriophage ช่วยเพิ่มความรุนแรงของเชื้อ เชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์(isolate) ที่มีการเรืองแสงมีการดื้อต่อสารปฏิชีวนะสูงกว่าชนิดที่ไม่เรืองแสง (Abraham *et al*., 1997)

พฤติกรรมภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi*

กุ้งที่ติดเชื้อเริ่มแสดงอาการเซื่องซึม ว่ายน้ำเกยขอบบ่อ เรืองแสงในที่มืด และเริ่มมีการตายมากขึ้นตามระยะเวลาการติดเชื้อ ลักษณะเด่นภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อ คือ ตัวหลวมกุ้งมีสีเข้ม มีลำตัวสีแดง (จรีพร และคณะ, 2546) บางตัวพบลักษณะตัวขาวขุ่น ว่ายน้ำไม่สะดวก เหงือกมีสีแดงหรือน้ำตาล มีจุดสีดำบนเปลือกและรยางค์กร่อน กุ้งที่ติดเชื้ออย่างรุนแรงจะพบอัตราการตายสูงโดยเฉพาะระยะโพสลาร์วาในโรงเพาะฟักและกุ้งที่มีขนาดเล็กในบ่อเลี้ยง (Lightner, 1988; Graindorge and Flegel, 1999) กุ้งที่ป่วยจะมีลักษณะตัวเรืองแสงมองเห็นชัดในที่มืด กุ้งที่ติดเชื้อรุนแรงจะพบบริเวณขอบบ่อ (ชลอ, 2534) และเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่กระแสเลือด จะใช้โปรตีนและสารอาหารต่างๆ ในน้ำเลือดเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ และในกระบวนการเมทาบอลิซึม (metabolism) ต่างๆ (ยอดยิ่ง, 2541) ส่วน Luo (1996) ได้ทำการศึกษาในกุ้ง *P. chinensis* ที่ถูกฉีดด้วยเชื้อ*V. harveyi* มีปริมาณกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้นและปริมาณของโปรตีนในซีรัมลดลงเล็กน้อย

กิจการ (2543 ข) รายงานว่าการติดเชื้อแบคทีเรียส่งผลทำให้ระบบภูมิคุ้มกันโรคของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กุ้งจะลดลงทั้งปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase และความว่องไวของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

การเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi*

จากศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือด กุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* พบว่ามีปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนต่ำกว่ากุ้งปกติมาก เนื่องจากเชื้อ *V. harveyi* เมื่อเข้าสู่ตัวกุ้ง เม็ดเลือดกุ้งจะเข้ามาล้อมรอบเพื่อจับและกำจัดออกนอกตัว ส่งผลให้เม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง และเมื่อแบคทีเรียเข้าในกระแสเลือด แบคทีเรียจะใช้เลือดซึ่งมีโปรตีนและสารอาหารต่างๆ เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ และในกระบวนการเมทาบอลิซึม (metabolism) ต่างๆ (ยอดยิ่ง, 2541) ส่วน Luo (1996) ได้ทำการศึกษาในกุ้ง *Penaeus chinensis* ที่ถูกฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* มีปริมาณกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้นและปริมาณของโปรตีนในซีรัมลดลงเล็กน้อย

กิจการ (2543 ข) รายงานว่าการติดเชื้อแบคทีเรียส่งผลทำให้ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งจะลดลงทั้งปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase และความว่องไวของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi*

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ในช่วงแรกของการติดเชื้อ เกิด การฝ่อ (atrophy) tubular lumen ของ hepatopancreas (จรีพร และคณะ, 2546) และต่อมน้ำเหลืองขยายใหญ่ขึ้น เซลล์ในส่วนของ hepatopancreas และต่อมน้ำเหลืองตาย ทำให้การย่อยอาหารไม่เป็นปกติ อาหารที่สะสมไว้ใน hepatopancreas ลดลง พบการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุผิวในท่อ hepatopancreas และลำไส้ hepatopancreas ถูกทำลาย พบเม็ดเลือดเข้ามาล้อมจับเซลล์ที่ตายชัดเจน กุ้งที่ติดเชื้อนาน 7 วัน พบเซลล์ hepatopancreas ต่อมน้ำเหลือง เหงือก อวัยวะสร้างเม็ดเลือด ตายเป็นบริเวณกว้างมีเม็ดเลือดเข้ามาล้อมจับมากขึ้น กุ้งทยอยตาย กุ้งที่ติดเชื้อนาน 14 วัน เซลล์ของ hepatopancreas และต่อมน้ำเหลืองเกือบทั้งหมดตายเกิดเป็นลักษณะ hepatopancreatic tubular necrosis กุ้งไม่กินอาหารอ่อนแอและตายในที่สุด สำหรับ systemic vibriosis จะพบการรวมตัวกันของเม็ดเลือดเป็นชุดกระจายอยู่ทั่วไป (generalized hemocytic nodules) ในส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อ (Jiravanichpaisan *et al*., 1994)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ส่งผลให้กระบวนการต่างๆ ในร่างกายเปลี่ยนแปลง เพราะการอักเสบของเหงือก แอ่งเลือด อาจทำให้การแลกเปลี่ยนออกซิเจน ความสามารถในการจับออกซิเจนของเม็ดเลือดลดลง มีผลให้ปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอในการเลี้ยงเซลล์ หรือในกระบวนการหายใจของเซลล์ ส่วนการอักเสบและตายของเซลล์ต่างๆ ที่เห็นได้ชัด คือ เซลล์ hepatopancreas และต่อมน้ำเหลือง จะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันโรคของตัวกุ้งลดลง กินอาหารลดลง อ่อนแอ มีการแทรกซ้อนของเชื้ออื่นได้ง่าย

Lee *et al.* (1995) ได้ทำการศึกษาเชื้อ *V. harveyi* พบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถผลิตสารย่อยสลายเม็ดเลือด (hemolysin) ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดลดลง เมื่อกุ้งได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายเซลล์เม็ดเลือดจะเข้ามาล้อมจับเชื้อโรค ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง และเมื่อนำกุ้งป่วยมาแยกเชื้อจาก hepatopancreas หรือจากน้ำเลือด จะพบเชื้อแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก กุ้งป่วยจะมีกล้ามเนื้อขุ่น เลือดแข็งตัวช้า (วรณัฏฐ์, 2545) ในกุ้งที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรังอวัยวะส่วน hepatopancreas มีขนาดเล็กลง (ชลอ, 2534)

สำหรับผลของ *V. harveyi* ต่อปริมาณเม็ดเลือดกุ้ง มีการศึกษาโดย ชัยชาญ (2545) ในกุ้งกุลาดำ โดยการฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าสู่กล้ามเนื้อกุ้ง พบว่าที่ 3 และ 6 ชั่วโมงหลังจากฉีดเชื้อกุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดต่ำกว่ากุ้งที่ไม่ได้ฉีดเชื้อและตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป จำนวนเซลล์เม็ดเลือดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและมีจำนวนไม่แตกต่างจากกุ้งปกติซึ่งแตกต่างจาก Martin *et al*. (1993) พบว่าปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนของกุ้ง *Sicyonia ingentis* ลดลง 20 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการฉีดเชื้อ *V. harveyi* 24 ชั่วโมง

การระบาดของโรคเรืองแสง

การระบาดจะพบมากในพื้นที่ที่มีการปล่อยกุ้งอย่างหนาแน่น มีการให้อาหารมากทำให้ภายในบ่อมีปัญหาเรื่องปริมาณอินทรีย์สารมาก พื้นบ่อสกปรก มีสาหร่ายบริเวณพื้นบ่อเคลือบตามแนวหว่านอาหาร ในบ่อที่ปริมาณแพลงก์ตอนมีการตายบ่อยๆ เนื่องจากพีเอชของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงในรอบวันสูง เชื้อสามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว กุ้งที่ติดเชื้อจะได้รับความเสียหายมาก (ชลอ, 2534) ในขณะที่ Lavill - Pitogo *et al.* (1990) รายงานว่า กุ้งจะเกิดโรคนี้ได้ทุกช่วงอายุ โดยความเสี่ยงของการเกิดโรคขึ้นอยู่กับความเครียดที่กุ้งได้รับ

ยีสต์ (yeast)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยีสต์ หรือ ส่าเหล้า คือ รากลุ่มหนึ่งที่ส่วนใหญ่เป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม รี สามเหลี่ยม ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีการแตกหน่อ พบทั่วไปในธรรมชาติในดิน น้ำ และส่วนต่างๆ ของพืช ยีสต์บางชนิดพบอยู่กับแมลง และในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แต่แหล่งที่พบยีสต์อยู่บ่อยๆ คือแหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ที่มีรสหวาน

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่รู้จักกันมาตั้งแต่สมัยโบราณถึงกับมีผู้กล่าวว่า ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มนุษย์นำมาใช้ รายงานแรกเกี่ยวกับการใช้ยีสต์ คือการผลิตเบียร์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Boozah เมื่อประมาณ 6,000 ปีก่อนคริสต์ศักราช คนไทยรู้จักใช้ประโยชน์จากยีสต์มาเป็นเวลานาน เช่น ในการทำอาหารหมักบางชนิด เครื่องดองของเมาหลายชนิด ปัจจุบันมีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เป็นต้นว่าการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เช่น เบียร์ ไวน์ และวิสกี้ การผลิตเอธิลแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นสารเคมี และเชื้อเพลิง การผลิตเซลล์ยีสต์เพื่อใช้เป็นยีสต์ขนมปังและเป็นโปรตีนเซลล์เดียว

ยีสต์ มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ได้ โดยหลักการทำงานของยีสต์ หรือ "เบเกอร์ ยีสต์" (Baker yeast) ที่ใส่ให้ขนมปังฟู เนื่องมาจากยีสต์ที่ใส่ลงไปมีการใช้น้ำตาลในแป้งขนมปัง หรือที่เรียกกันว่า "โด" (dough) เป็นอาหาร และระหว่างที่มันกินอาหารมันก็จะหายใจเอาออกซิเจนเข้าไป และหายใจเอาคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา และเมื่อเราเอาแป้งไปอบ ก๊าซที่มันคายออกมาก็ผุดขึ้นมาระหว่างเนื้อขนมปังทำให้เกิดรูพรุนจนฟูขึ้นมา

ส่วนพวก "บริวเวอร์ ยีสต์" (Brewer yeast) ซึ่งเป็นยีสต์ที่นำมาหมักทำเบียร์และไวน์ มีรสชาติค่อนข้างรุนแรง บริวเวอร์ยีสต์ ประกอบไปด้วย ธาตุอาหารมากมีกรดอะมิโน 16 ชนิด เกลือแร่ 14 ชนิด วิตามิน 17 ชนิด นอกจากนี้ยังมีเกลือแร่สูง คือ โครเมี่ยม สังกะสี เหล็ก ฟอสฟอรัส และเซเลเนียม อีกทั้งบริวเวอร์ยีสต์ยังเป็นแหล่งสำคัญของโปรตีนถึง 16 กรัมต่อปริมาตรยีสต์ 30 กรัม มีมากถึง 50-55 เปอร์เซ็นต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่เหมาะสมและนิยมใช้ผลิตจุลินทรีย์โปรตีนในทางอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่เลี้ยงง่าย ไม่ต้องการปัจจัยการเจริญเติบโตมากมายนักและมีคุณค่าทางอาหารที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นทั้งอาหารคนและอาหารสัตว์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

องค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ (Foury *et al*., 1998)

1. แคปซูล (capsule)

ยีสต์บางชนิดมีสารเมือก เหนียว ที่ขับออกสู่ภายนอกเซลล์ที่เรียกว่าแคปซูล แคปซูลส่วนใหญ่ประกอบด้วยโพลีแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีทั้งเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ แมนโนส (mannose) และสารที่คล้ายแป้ง

2. ผนังเซลล์ (cell wall)

ผนังเซลล์ของยีสต์จะบางในเชื้ออายุน้อยและจะหนาขึ้นตามอายุ องค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* มีโพลีแซ็กคาไรด์ 2 ชนิด คือ กลูแคน (glucan) 30-34 เปอร์เซ็นต์ และแมนแนน (mannan) 30 เปอร์เซ็นต์ กลูแคน (ประกอบด้วย ดี-กลูโคส) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในยีสต์ต่างๆ แต่แมนแนน (ประกอบด้วย ดี-แมนโนส) จะไม่พบในผนังเซลล์ของ *Schizosaccharomyces, Nadsonia, Rhodotorual* และราที่มีเส้นใยทุกชนิด ผนังเซลล์ของยีสต์มีโปรตีนประกอบอยู่ด้วย โปรตีนบางชิดทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ ไขมันมีอยู่ 8.5 – 13.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไคติน (chitin) เปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของยีสต์

3. เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane)

เยื่อหุ้มเซลล์มีความหนาประมาณ 8 ไมโครเมตร ประกอบด้วยชั้น 3 ชั้น ที่ทึบต่อแสงอิเล็กตรอน 2 ชั้น คือ ชั้นนอกและชั้นในสุด เยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วยไขมัน (รวมทั้งฟอสโฟลิพิด) โปรตีน และ โพลิแซ็กคาไรด์

4. องค์ประกอบในโพรโทพลาซึม (protoplasm)

เซลล์ยีสต์ประกอบด้วยไซโทพลาซึม ซึ่งเป็นสารกึ่งเหลว ภายในมีไรโบโซมที่มี RNA มาก และออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้ม ได้แก่ เอนโดพลาสมิกเรติคิวลัม ซึ่งเชื่อมตอดต่อกับเยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นนอก และอาจติดต่อกับเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย ในไซโทพลาซึมมีเอนไซม์หลายชนิด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. นิวเคลียส (nucleus)

เป็นออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสล้อมรอบ เยื่อหุ้มนิวเคลียสมีสมบัติยอมให้สารบางอย่างผ่านได้เท่านั้น (semipermeable membrane) นิวเคลียสมีหน้าที่เกี่ยวกับเมแทบอลิซึม และการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต

6. ไมโทคอนเดรีย (mitochondria)

เป็นออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้ม มีลักษณะคล้ายเส้นด้ายพับกันอยู่ ไมโทคอนเดรียมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.3-1 ไมโครเมตร และความยาวถึง 3 ไมโครเมตร มีเยื่อหุ้มสองชั้น ชั้นในจะพับเว้าเข้าข้างในเป็นคริสตี (cristae) ไมโทคอนเดรียประกอบด้วยลิโพโปรตีนจำนวนมาก และมี RNA และ DNA เล็กน้อย DNA นี้ต่างจาก DNA ของนิวเคลียส เนื่องจากไมโทคอนเดรียมีเอนไซม์เกี่ยวกับการหายใจ จึงเรียกว่าเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์

7. แวคิวโอล (vacuole)

ภายในเซลล์ยีสต์จะมีแวคิวโอลอยู่หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งแวคิวโอล ซึ่งมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเมื่อย้อมสี ในเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตภายในแวคิวโอลจะไม่มีโครงสร้างที่เป็นชิ้นส่วน แต่เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ “stationary phase” แวคิวโอลจะมีสารแกรนูลเพิ่มขึ้น อาจเป็น เมตาฟอสเฟต (metaphosphate) พอลิฟอสเฟต (polyphosphate) หรือลิพิด สารที่อยู่ในแวคิวโอลที่เคยแยกได้ ได้แก่ เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการไฮโดรไลซ์ปฏิกิริยาต่างๆ เช่น โปรตีนเอส (protease) ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease) และเอสเทอเรส (esterase) จากการที่พบเอนไซม์ไฮโดรเลสในแวคิวโอล จึงคิดว่าแวคิโอลเปรียบเหมือนไลโซโซม

8. อินคลูชันต่างๆ (inclusion)

เซลล์ยีสต์ที่แก่จะมีผนังเซลล์หนาขึ้นและสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น ความร้อน ความแห้งแล้ง และสารเคมี ยีสต์บางชนิดสะสมสารต่างๆไว้จำนวนมาก เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือโปรตีน บางชนิดมีรงควัตถุมีเหลือง ส้ม ชมพู น้ำตาลหรือดำ รงควัตถุเหล่านี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนใหญ่เป็นคาโรทีนอยด์ที่ละลายในไขมัน นอกจากนี้รงควัตถุ เช่น ไซโทโครม เฟลวิน ฮีโมโกลบิน และอื่นๆ ที่พบในเซลล์พืชและสัตว์ชั้นสูงก็พบในยีสต์ด้วย

ยีสต์สกัด

เมื่อเซลล์ยีสต์ตายจะเกิดกระบวนการย่อยสลายตังเองขึ้นตามธรรมชาติ เรียก ออโตไลซิส (autolysis) ในระหว่างกระบวนการดังกล่าว เอนไซม์ของยีสต์จะย่อยโปรตีนและส่วนต่างๆ ของเซลล์และปลดปล่อยเพปไทด์ (peptide) กรดอะมิโน (amino acid) วิตามิน (vitamin) รวมถึงส่วนประกอบอื่นๆ ของเซลล์ออกมา และเมื่อแยกเอาส่วนที่ไม่ละลายน้ำหรือส่วนที่เป็นกากเซลล์ออกไปก็จะได้เป็นยีสต์สกัด ยีสต์สกัด คือ ส่วนของยีสต์เซลล์ที่ละลายน้ำได้ ประกอบไปด้วย กรดอะมิโน เพปไทด์ คาร์โบไฮเดรตและเกลือ ยีสต์สกัดได้จากการสลายพันธะเพปไทด์ภายในเซลล์ยีสต์ ซึ่งเกิดขึ้นโดยธรรมชาติโดยกิจกรรมของเอนไซม์จากภายในเซลล์ยีสต์เองหรืออาจเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์เกรดสำหรับอาหาร (food grade enzyme) ที่เติมในกระบวนการผลิต (Querol and Fleet, 2006)

การสกัดสารจากเซลล์ยีสต์เพื่อนำมาใช้เป็นเครื่องปรุงแต่งกลิ่นรสของอาหารนั้น สามารถทำได้หลายวิธีดังนี้ (Gerald and Tilak, 1991)

1. การสกัดหรือย่อยเซลล์ยีสต์ด้วยกรดแก่ (hydrolysis) ที่นิยมใช้กีคือ กรดเกลือ (hydrochloric acid) ร่วมกับการใช้ความร้อนเพื่อย่อยผนังเซลล์ และสารโมเลกุลใหญ่ในเซลล์ยีสต์ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และกรดนิวคลีอิก ให้เป็นสารโมเลกุลเล็กๆ ที่ละลายน้ำได้ โดยนำเซลล์ยีสต์สดหรือแห้งมาเติมกรดเกลือลงไป แล้วให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ทำการย่อยจนปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดถูกเปลี่ยนไปเป็น อัลฟาอะมิโนไนโตรเจน (a-aminonitrogen) 50-60% จากนั้นทำให้เป็นกลางด้วยด่างโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) แล้วกรองเอาตะกอนออก สารละลายที่ได้นำไปทำให้เข้มข้นขึ้น แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer) ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า ยีสต์ไฮโดรไลเสท (hydrolysate yeast) สามารถเก็บไว้ปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารได้ดี

2. การสกัดด้วยสารเคมี (plasmolysis) เป็นการสกัดส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ยีสต์ด้วยเกลืออนินทรีย์ หรือตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว เช่น เกลือ, น้ำตาล, แอลกอฮอล์, อีเธอร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ether), คลอโรฟอร์ม (chloroform) และอะซิเตตอีเธอร์ (acetate ether) ที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งที่ภาวะนี้จะทำให้ยีสต์สูญเสียน้ำในเซลล์มากขึ้น ทำให้ผนังเซลล์ชั้นในแยกตัวออกจากผนังเซลล์ชั้นนอก และแตกออก สารอาหารต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ก็จะไหลออกมา แล้วจึงแยกเอากากออก ทำสารละลายที่ได้ให้เข้มข้นขึ้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า ยีสต์พลาสโมไลเสท (plasmolysate yeast) ซึ่งมักจะมีปริมาณเกลืออยู่สูง ทำให้มีขีดจำกัดในการใช้กับอาหาร

3. การสกัดด้วยเอนไซม์ที่มีอยู่ในเซลล์ยีสต์ (autolysis) จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า ยีสต์ออโตไลเสท (autolysate yeast) ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพที่ดีกว่าจาก 2 วิธีแรก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีกลิ่นรสใกล้เคียงกับสารสกัดจากเนื้อสัตว์ (meat extract) ดังนั้นจึงเป็นวิธีการที่ได้รับความสนใจมากกว่าวิธีอื่น

การย่อยสลายตัวเองของเซลล์ยีสต์โดยปกติจะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติอยู่แล้ว เมื่อเซลล์มีอายุมากและตายไป เอนไซม์ในเซลล์จะย่อยสลายผนังเซลล์และสารต่างๆ ที่มีอยู่ในเซลล์ แต่เป็นการย่อยตัวเองแบบค่อยเป็นค่อยไปทีละเล็กทีละน้อย ซึ่งต่างจากวิธีการนี้ที่จะเป็นการเร่งเซลล์ยีสต์ให้เกิดการย่อยตัวเองอย่างรวดเร็ว และเกิดในปริมาณมาก ด้วยการปรับสภาวะต่างๆ ทำให้สารประกอบเหล่านั้นออกมาภายนอกได้อย่างอิสระ

การย่อยสลายเซลล์ยีสต์วิธีนี้ ทำได้โดยนำเซลล์ยีสต์ที่ยังมีชีวิตอยู่มาทำเป็นสารแขวนลอยที่มีเซลล์ยีสต์อยู่ 15-20 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.5 แล้วให้ความร้อนที่ 40-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งได้ อัลฟาอะมิโนไนโตรเจน 50-60 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้สารละลายเย็นลง แล้วกรองหรือเหวี่ยงแยกเอากากผนังเซลล์ออก ก่อนนำไปพาสเจอร์ไรซ์ที่ 80-90 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการระเหยน้ำออกบางส่วน แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย

ในการย่อยตัวเองของเซลล์ยีสต์ บางครั้งก็มีการเติมเอนไซม์จากแหล่งอื่นลงไป เพื่อให้ได้ผลผลิตปริมาณมากขึ้น และคุณภาพของกลิ่นรสดี โดยใช้เวลาสั้นๆ หรือไม่ก็อาจมีการใช้เทคนิคทางกายภาพเข้าช่วยเพื่อให้ผนังเซลล์แตกออก ทำให้เอนไซม์ย่อยสารได้เร็วขึ้น เช่น ใช้ความดันความถี่สูง หรือการตีปั่นให้เซลล์แตก และใช้การแช่แข็งสลับกับการละลายเป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เศษเซลล์ยีสต์ (Yeast cell debris)

เศษเซลล์ยีสต์ คือ เซลล์ยีสต์ที่ตายแล้วคงเหลือแต่ผนังเซลล์ โดยจะถูกแยกออกจากส่วนประกอบของเซลล์ยีสต์ในกระบวนการผลิตยีสต์สกัด โดยผนังเซลล์ของยีสต์ประกอบด้วย กลูแคน (glucan) 30-34 เปอร์เซ็นต์ และแมนแนน (mannan) 30 เปอร์เซ็นต์

Vargas-Albores *et al.* (1998) พบว่าสารประกอบจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียและเชื้อรา คือ ไลโพโพลีแซคคาร์ไรด์และสารเบต้ากลูแคน สามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ ได้แก่ กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม, nodule formation, encapsulation และการแข็งตัวของเลือดกุ้งสูงขึ้น โดยไลโพโพลีแซคคาร์ไรด์และเบต้ากลูแคนจะกระตุ้น PRPs ในน้ำเลือดให้เกิดการเชื่อมต่อของไลโพโพลีแซคคาร์ไรด์และ β -1,3 glucan กับ lipopolysaccharide -binding protein และ β -1,3 glucan binding protein เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนไปกระตุ้นที่ membrane receptor ที่จำเพาะของเม็ดเลือดชนิด semi-granular cell ส่งผลให้เกิดการหลั่งสารต่างๆ ออกมาในระบบภูมิคุ้มกัน

Scholz *et al.* (1999) ได้ทดลองเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่
อาหารสูตรที่ 1 อาหารผสมยีสต์ *S. cerevisiae* 1 เปอร์เซ็นต์
อาหารสูตรที่ 2 อาหารผสมเบต้ากลูแคนที่สกัดได้จาก *S. cerevisiae* 1 เปอร์เซ็นต์
อาหารสูตรที่ 3 อาหารผสมยีสต์ *Phaffia rhodozyma* 1 เปอร์เซ็นต์
อาหารสูตรที่ 4 อาหารผสม experimental yeast (HPPR 1) 1 เปอร์เซ็นต์
อาหารสูตรที่ 5 อาหารปกติ (ชุดควบคุม)

โดยให้อาหารเป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์ พบว่าไม่มีความแตกต่างของการเจริญเติบโตในกุ้งที่ได้รับอาหารชนิดต่างๆ แต่อัตรารอดของกุ้งที่เลี้ยงด้วย *S. cerevisiae, P. rhodozyma* และ experimental yeast มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยเบต้ากลูแคนอย่างมีนัยสำคัญสถิติ (P=0.006) และสูงกว่าชุดควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.006) ส่วนการศึกษาทางด้านน้ำหนักรวม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยกุ้งที่เลี้ยงด้วยยีสต์ (*P. rhodozyma*) มีน้ำหนักดีกว่าชุดที่ได้รับเบต้ากลูแคนชนิดเดียว และความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดโดยการแช่กุ้งในสารละลายเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ BP05 หลังจากการแช่ 27 ชั่วโมง กุ้งที่ได้รับอาหารผสม *S. cerevisiae, P. rhodozyma,* experimental yeast และชุดควบคุม ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ

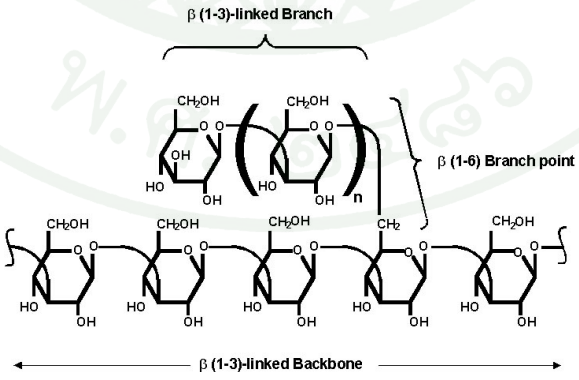
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กุ้งที่ไม่ได้แช่เชื้อ ส่วนการศึกษากระบวนการ prophenoloxidase activity ในแต่ละชุดแตกต่างกัน โดยกุ้งที่ได้รับอาหารผสม *P. rhodozyma* มีค่าต่ำกว่าชุดที่ได้รับเบต้ากลูแคนชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.003)

Chotikachinda *et al.* (2008) รายงานว่าผลของผนังเซลล์ยีสต์ต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ใช้ผนังเซลล์ยีสต์ที่ 3 ระดับความเข้มข้น (0, 1 และ 2 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นของกุ้งขาวแวนนาไมที่ใช้ทดลองคือ 7.15 ± 0.05 กรัม เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งที่ได้รับผนังเซลล์ยีสต์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตามกุ้งที่ได้รับผนังเซลล์ยีสต์ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 2 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีประสิทธิภาพการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดีกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

เบต้ากลูแคน

เบต้ากลูแคน เป็นองค์ประกอบหลักในผนังเซลล์ของยีสต์ โครงสร้างของ เบต้ากลูแคน ประกอบด้วยส่วนที่เป็นโซ่หลักมีการเรียงตัวต่อกันของกลูโคสที่ตำแหน่ง beta 1-3 และระหว่างโมเลกุลจะเชื่อมกันที่ตำแหน่ง beta 1-6 (Bacon *et al*., 1969) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 สูตรโครงสร้างของเบต้ากลูแคน

ที่มา : Immunity Information Network (n.d.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เบต้ากลูแคน สามารถสกัดได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น รา แบคทีเรีย และ ยีสต์ โดยมากนิยมสกัดจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ผนังเซลล์ของยีสต์ประกอบด้วยกลูแคน 30-35 เปอร์เซ็นต์ แมนแนน 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ เป็นไขมัน 10 เปอร์เซ็นต์ และ เป็นไคติน 1-2 เปอร์เซ็นต์ และสารอินทรีย์อื่นๆ อีกเล็กน้อย (กำเนิด, 2534) มลฤดี และคณะ (2543) ได้ทำการสกัดสารเบต้ากลูแคนจากผนังเซลล์ของยีสต์ ด้วยวิธีการสกัด 2 วิธี วิธีแรกสกัดผนังเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 5.0 โมลาร์ พีเอช 8 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และวิธีที่ 2 สกัดผนังเซลล์กับสารละลายโซเดียมไฮโดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.75 โมลาร์ อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส พบว่าวิธีแรกให้สารเบต้ากลูแคน 20 เปอร์เซ็นต์ วิธีที่ 2 ให้สารเบต้ากลูแคน 30 เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์

บทบาทของเบต้ากลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ

กิจการ และคณะ (2543 ก) ศึกษาผลของเบต้ากลูแคน ต่อการเจริญเติบโต ภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ โดยทดลองในกุ้งน้ำหนักเฉลี่ย 0.6, 1.5 และ 6.5 กรัม ให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนต่างกัน 4 ระดับคือ 0, 0.25, 0.5 และ 1 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ของกุ้งที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ในกุ้งกุลาดำขนาดเล็กและ 5 สัปดาห์ในกุ้งกุลาดำขนาดใหญ่ พบว่ากุ้งกุลาดำมีอัตรารอดสูงขึ้นเมื่อได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนในปริมาณที่สูงขึ้น โดยกุ้งกุลาดำขนาดเล็กที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน 0, 0.25, 0.50 และ 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตรารอด 50, 68, 69 และ 81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกุ้งขนาดใหญ่มีอัตรารอด 33, 33, 60 และ 73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาณเม็ดเลือดรวมและการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออนของเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนในระดับต่างๆ พบว่าค่าสูงสุดได้จากชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

มลฤดี และคณะ (2543) ได้ทำการสกัดสารเบต้ากลูแคนจากยีสต์ *S. cerevisiae* ในแต่ละวิธีซึ่งให้ปริมาณสารเบต้ากลูแคนแตกต่างกัน และนำเบต้ากลูแคนที่ได้ไปเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 15 กรัม โดยมีอาหาร 4 สูตร ดังนี้ คือ อาหารชุดควบคุม อาหารที่ผสมผนังเซลล์ยีสต์ 8.4 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม อาหารที่ผสมสารเบต้ากลูแคน ก่อนการทำให้บริสุทธิ์1.7 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และอาหารที่ผสมสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 1.0 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบต้ากลูแคน ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ให้ผลการทดลองดีที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยให้ค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงที่สุด และมีความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* โดยคิดเป็นอัตรารอดตายเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์

Knaap (1993) รายงานว่าสารพวกเปปติโดกลัยแคน ไลโปโพลีแซคคาไรด์ และเบต้ากลูแคน จะมีผลในการกระตุ้นให้เกิดการเชื่อมต่อของ beta –1,3 glucan และ beta –1,3 glucan binding protein ให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนแล้วไปกระตุ้นที่ membrane receptor ของ semigranulocyte ให้เกิดการหลั่งของสารต่างๆ ออกมาเช่น เอนไซม์ phenoloxidase ซึ่งทำให้เกิดการออกซิไดซ์สารฟีนอล ให้เป็นควิโนน แล้วเปลี่ยนเป็นเมลานินที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย

Devaraja *et al*. (1998) รายงานว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน ระดับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพียงวันเดียวสามารถชักนำให้เม็ดเลือดกำจัดไวรัสได้สูงขึ้น

Vargas-Albores *et al*. (1998) พบว่าสารประกอบจากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และฟังไจ คือ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ และเบต้า-กลูแคน มีผลให้ระบบภูมิคุ้มกันแบบเซลลูลาร์(cellular immunity) เช่น phagocytosis melanization และ encapsulation สูงขึ้น

Campa-Cordova *et al.* (2002) ศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ของกุ้ง *Litopenaeus vannamei* โดยนำกุ้งขาว แช่ในสารละลายเบต้ากลูแคน ที่ผสมกับสารละลาย Sulfate polysaccharide ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เป็นเวลา 6 ชม. ตรวดวัดระดับการทำงานของ SOD ในเม็ดเลือด และที่ 24 ชม. สามารถตรวดวัดระดับการทำงานของ SOD ใน กล้ามเนื้อของกุ้งที่แช่ในสารละลายทั้ง 2 ชนิด มีค่าเพิ่มขึ้นในระดับ 1.5 และ 1.4 เท่าของกลุ่มที่ไม่ได้แช่สารละลายตามลำดับ และเมื่อทดสอบโดยการฉีดสารละลายทั้ง 2 ชนิดแก่กุ้ง พบว่าค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลงหลังจากฉีดสารละลายแล้ว 24 ชม. แต่พบว่าที่ 48-120 ชม. ค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมและโปรตีนในเม็ดเลือดจะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสามารถสรุปว่าการให้เบต้ากลูแคนที่ผสมกับสารละลาย sulfate polysaccharide ตามความเข้มข้นดังกล่าว สามารถกระตุ้นให้กุ้งมีการสร้าง SOD ได้สูงขึ้น โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะมีหน้าที่สำคัญในการเป็น antioxidant และป้องกันการเกิด oxidative stress ซึ่งจะทำให้เนื้อเยื่อไม่ถูกทำลายจากพวกอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Suphantharika (2003) ทำการสกัดสารเบต้ากลูแคน จากยีสต์ที่ใช้แล้วจากอุตสาหกรรมผลิตเบียร์ โดยสกัดด้วย NaOH ที่ความเข้มข้น 1 N ที่ 90 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้สารเบต้ากลูแคนที่มีความบริสุทธิ์ประมาณ 51 เปอร์เซ็นต์ และนำมาทดลองใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ โดยให้กุ้งกุลาดำได้รับอาหารที่ไม่ผสมเบต้ากลูแคน อาหารผสมเบต้ากลูแคนที่มีความบริสุทธิ์ 51 เปอร์เซ็นต์ และอาหารผสมผนังเซลล์ของยีสต์ เป็นเวลาติดต่อกัน 3 วัน แล้วทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase พบว่า เลือดของกุ้งกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนบริสุทธิ์ 50 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรม phenoloxidase สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นใดๆ เลย และกลุ่มที่ได้รับสารผสมเซลล์ยีสต์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์

Chang *et al*. (2003) ได้ศึกษาผลของเบต้ากลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ โดยศึกษาในกุ้งที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 6.5 กรัม ให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนที่ระดับ 0, 1, 2, 10 และ 20 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 20 วัน หลังจากนั้นฉีดเชื้อ White Spot Syndrome Virus (WSSV) แล้วทำการตรวจวัด total hemocyte count, phenoloxidase และ superoxide anion ในวันที่ 0, 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 หลังจากฉีดเชื้อ พบว่า กลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคน 2, 10, 20 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตรารอด 55, 65 และ65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ total hemocyte count, phenoloxidase และ superoxide anion ลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากได้รับเชื้อและหลังจากนั้นก็กลับสู่สภาวะปกติ ระดับเบต้ากลูแคนที่เหมาะสมในการเสริมภูมิคุ้มกันและเพิ่มอัตรารอดหลังจากได้รับเชื้อคือ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม

แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์

แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ยีสต์ชั้นนอก โดยพบในส่วนของแมนโนโปรตีน (mannoprotein) ซึ่งทำหน้าที่ในการยึดเกาะองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ให้คงอยู่ด้วนกัน ซึ่งสกัดได้จากผนังเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ด้วยการนำเซลล์ยีสต์มาทำให้เกิดการแตกตัวโดยวิธีการปั่นแยก (Sipring *et al*., 2000) หรือโดยการใช้เอนไซม์ในการสกัด (Parodi, 1979) จากบางรายงานพบว่าใช้ α-mannoside ในการสกัด (Jones and Ballou, 1969) และในบางครั้งการสกัดกลูแคนจากยีสต์ก็ทำให้ได้แมนแนนโอลิโกแซคคาไรต์ออกมาพร้อมกันด้วย (Freimund *et al*., 2003)

จากการศึกษาพบว่าแมนแนนโอลิโกแซคคาไรต์มีคุณสมบัติที่น่าสนใจต่อสิ่งมีชีวิตอยู่หลายประการ ดังการศึกษาในกลุ่มของสัตว์บกจากการอนุบาลลูกหมู (Miguel *et al*., 2004) และลูกหมูที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพิ่งหย่านม (White *et al*., 2002) พบว่าการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารส่งผลให้ลูกหมูมีน้ำหนักเพิ่มมากขึ้น และมีความแข็งแรงมากกว่าลูกหมูที่ไม่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหาร การศึกษาการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารให้กับลูกวัว (Terre *et al*., 2007) ไก่ (Vesna *et al*., 2007) และไก่งวง (Fritts and Waldroup, 2003) ก็ให้ผลการทดลองที่คล้ายกันกับการศึกษาในลูกหมู

นอกจากนั้นแล้ว จากการศึกษาของ Torrecillas *et al*. (2007) ยังพบว่ากิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาวบริเวณไตส่วนหน้าของปลากะรังที่ทดสอบกับเชื้อ *V. alginolyticus* มีปริมาณสูงถึง 32.4% และ 26.9% เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 4 และ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ทีเพียง 23.8% ซึ่งสอดคล้องกับระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลา European sea bass (*Dicentrarchus* labrax) คือที่ระดับ 2 และ 4 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

Genc *et al*. (2007) พบว่าในกุ้ง *P. semisulcatus* ที่ได้กินแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถเสริมการเจริญเติบโตและอัตราแลกเนื้อของกุ้ง *P. semisulcatus* ที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 48 วัน คล้ายกับการศึกษาใน European lobster (*Homarus gammarus*) ระยะวัยอ่อน (Taylor, 2005) ยิ่งไปกว่านั้นแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์และเบต้ากลูแคนสามารถเสริมการทำงานของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด และเมื่อให้กุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) กิน 0.2 % เบต้ากลูแคนที่ได้จากส่วนเหลือของ brewer's yeast เป็นเวลา 3 วัน พบว่า phenol oxidase, total haemocyte และการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* มีค่าเพิ่มขึ้น (Thanardkit *et al*., 2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาผลของเศษเซลล์ยีสต์ต่อการเจริญเติบโตและการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาร์วา ที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้งสามผลิตภัณฑ์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 7 ชุดการทดลอง (treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ (replication)

ชุดการทดลองที่ 1 ผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A ในอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับเศษเซลล์ยีสต์ 10 กรัมผสมกับอาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 2 ผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A ในอัตราส่วน 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับเศษเซลล์ยีสต์ 50 กรัมผสมกับอาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ B ในอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับเศษเซลล์ยีสต์ 10 กรัมผสมกับอาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ B ในอัตราส่วน 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับเศษเซลล์ยีสต์ 50 กรัมผสมกับอาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 5 ผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ในอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับเศษเซลล์ยีสต์ 10 กรัมผสมกับอาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 6 ผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ในอัตราส่วน 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับเศษเซลล์ยีสต์ 50 กรัมผสมกับอาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 7 เป็นชุดควบคุมโดยเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 9 (พี 9) จำนวน 1,500 ตัวจากโรงเพาะฟักกุ้งขาในจังหวัดฉะเชิงเทรามาปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นระยะเวลา 3 วันในห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยนำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 500 ลิตร จำนวน 1 ถัง ในน้ำความเค็ม 25 พีพีทีเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนไม โดยให้อาหารสี่ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 08.00 น. 11.00 น. 14.00 น. และ 17.00 น. มีการติดตั้งเครื่องให้อากาศอย่างเพียงพอ เมื่อครบ 3 วันลูกกุ้งเข้าสู่ระยะโพสลาร์วา 12 (พี 12) จึงนำมาเลี้ยงในถังทดลองขนาดความจุ 500 ลิตร จำนวน 21 ถัง โดยจะใส่กุ้งจำนวนถังละ 50 ตัว (100 ตัวต่อตารางเมตร) ความเค็มของน้ำในถัง 25 พีพีที

3. อาหารและการให้อาหาร

การศึกษาครั้งนี้ใช้เศษเซลล์ยีสต์ จากบริษัท Thai foods international จำกัด ลักษณะของเศษเซลล์ยีสต์ เป็นผงละเอียดและมีสีแตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์ (ภาพที่ 5) ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ A เป็นส่วนผนังเซลล์ยีสต์ (*S. cerevesiae*) ที่ผ่านกระบวนการสกัดโดยการใช้เอนไซม์เข้มข้นผลิตภัณฑ์ B ส่วนผนังเซลล์ยีสต์ (Torula yeast) ที่ผ่านกระบวนการสกัดโดยการใช้เอนไซม์ผลิตภัณฑ์ C เป็นส่วนผนังเซลล์ยีสต์ (*S. cerevesiae*) ที่ผ่านกระบวนการสกัดไม่ใช้เอนไซม์โดยเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์มีส่วนประกอบที่สำคัญต่างๆ ดังตารางที่ 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เศษเซลล์ยีสต์

Analysis Item		Formula A	Formula B	Formula C	Unit
General	Moisture	5.98	5.94	7.99	%
	Solid	94.02	94.06	92.01	%
	Ash	3.72	5.18	4.45	%
	Salt (Direct Mohr)	-	-	2.06	%
	Salt (Ash Mohr)	0.96	0.82	1.66	%
	Fat	7.60	0.60	0.17	%
	T-N	7.33	6.22	9.03	%
	Protein (F=6.25)	45.81	38.88	56.44	%
Other	F-N	2.96	0.60	0.979	%
	T-S	12.90	21.40	11.70	%
	MSG	-	-	0.700	%
Minerals	Fe	8.60	22.60	8.59	mg/100g
	Na	750	284	629	mg/100g
	K	355	356	886	mg/100g
	Ca	60	508	148	mg/100g
	Mg	101	152	183	mg/100g
	Zn	43	37	48	mg/100g
	Cu	0.17	0.09	0.34	mg/100g
	Mn	0.61	2.33	2.35	mg/100g
	P	694	1228	952	mg/100g
Organic acid	H_2PO_4	0.68	1.10	0.76	%/solid
	Citric acid	0.02	0.00	0.04	%/solid
	DL-Tartaric acid	0.00	0.00	0.00	%/solid
	DL-Malic acid	0.00	0.00	0.01	%/solid
	Succinic acid	0.41	0.04	0.12	%/solid
	DL-Lactic acid	0.62	0.06	0.00	%/solid
	Acetic acid	0.20	0.04	0.02	%/solid
	DL-Pyroglutamate	0.45	0.08	0.07	%/solid
Vitamin	Thiamine	0.27	0.05	2.228	mg/100g
	Riboflavin	0.84	0.81	1.56	mg/100g
	Niacin	9.79	4.96	17.58	mg/100g
	Vitamin B6	0.25	0.55	0.709	mg/100g
	Folic acid	95.00	0.52	11.99	ug/100g
	Corrin	0.53	0.54	330	mg/100g
	Vitamin B12	ND	ND	0.030	ug/100g
	Pantothenic acid	1.29	1.39	22.88	ug/100g
	Food fiber	23.60	29.70	24.5	g/100g

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 (ต่อ)

	Analysis Item	Formula A	Formula B	Formula C	Unit
Total amino Acid	L-Aspartic Acid	2267.40	1519.40	6371.54	mg/100g
	L-Threonine	1251.00	962.40	3069.80	mg/100g
	L-Serine	10445.10	8242.20	2964.74	mg/100g
	L-Glutamic Acid	2913.90	1947.70	8290.51	mg/100g
	Glycine	1072.60	694.50	2730.99	mg/100g
	L-Alanine	1421.50	942.50	3584.27	mg/100g
	L-Valine	435.40	256.90	3830.84	mg/100g
	L-Cystine	1622.40	1180.10	743.41	mg/100g
	L-Methionine	586.40	408.30	1138.20	mg/100g
	L-Isoleucine	1274.80	867.30	3344.61	mg/100g
	L-Leucine	1922.90	1337.00	5021.22	mg/100g
	L-Tyrosine	935.60	695.90	1791.48	mg/100g
	L-Phenylalanine	1143.50	787.20	2955.53	mg/100g
	L-Lysine	1887.30	1086.60	5464.28	mg/100g
	L-Histidine	522.50	333.90	1441.66	mg/100g
	L-Arginine	1320.40	870.70	3531.09	mg/100g
	L-Proline	870.00	525.90	2253.07	mg/100g
	Total	31892.70	22658.50	58527.24	mg/100g

ภาพที่ 5 ลักษณะของเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B และ C เป็นผงละเอียดและมีสีแตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์

การเตรียมอาหารทดลองผสมเศษเซลล์ยีสต์ในระดับความเข้มข้นที่กำหนด โดยทำการคลุกเคล้าเศษเซลล์ยีสต์กับอาหารสำเร็จรูปปกติ และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลาหมึก ส่วนชุดการทดลองที่ 7 (กลุ่มควบคุม) จะทำการเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึกในปริมาณที่เท่ากับชุดการทดลองที่ 1 ถึง 6 จากนั้นผึ่งให้แห้ง ก่อนจะนำไปให้กุ้งที่ทดลองกิน โดยให้กิน 4 มื้อ ในเวลาประมาณ 07.00 น. 11.00 น. 15.00 น. และ 19.00 น. ปรับอาหารตามน้ำหนักของกุ้งตามวิธีของ ชลอ และพรเลิศ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(2547) ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงนาน 60 วัน อาหารที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะมีการเตรียมใหม่ทุกวัน

4. การศึกษาการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

สุ่มชั่งน้ำหนักกุ้งของทุกกลุ่มการทดลองเพื่อบันทึกการเจริญเติบโตทุกวันที่ 30, 40, 50 และ 60 วัน ของการทดลอง ส่วนอัตราการรอดตายบันทึกหลังสิ้นสุดการทดลองที่ 60 วัน

5. การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ

ระหว่างทำการทดลองมีการเก็บน้ำจากถังทดลองมาทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทุกสัปดาห์ และมีการระบายตะกอนของเสียออกอย่างสม่ำเสมอ พร้อมทั้งเติมน้ำที่ผ่านการพักและปรับความเค็มใกล้เคียงกับในถังทดลองเข้าไปทดแทน โดยมีการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำทุกสัปดาห์ดังนี้

5.1 พีเอช วัดโดยใช้เครื่องวัดพีเอชรุ่น Ecoscan pH 5

5.2 อุณหภูมิ วัดโดยใช้เครื่อง YSI DO 200-4M

5.3 ความเค็ม วัดโดยใช้เครื่อง YSI 30/10 FT

5.4 ปริมาณแอมโมเนียรวม ใช้วิธี phenol-hypochlorite method ตามวิธีของ APHA *et al*. (1995)

5.5 ปริมาณไนไตรท์ ใช้วิธี Colorimetric Method ตามวิธีของ APHA *et al*. (1995)

5.6 ความเป็นด่างและความกระด้างใช้วิธี titration ตามวิธีของ APHA *et al*. (1995)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การศึกษาความต้านทานต่อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 60 วันนำกุ้งจากการทดลองที่ 1 มาทดสอบโดยทำให้ติดเชื้อ *V. harveyi* แล้วทำการศึกษาเปรียบเทียบอัตราการรอดตายของกุ้งในชุดการทดลองทั้ง 7 ชุดการทดลอง มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

6.1 สุ่มกุ้งจากการทดลองที่ 1 จำนวนชุดการทดลองละ 30 ตัว มาเลี้ยงในตู้กระจกขนาดความจุ 100 ลิตร บรรจุน้ำความเค็ม 25 พีพีที ปริมาตร 80 ลิตร โดยใส่กุ้ง 10 ตัวต่อตู้ ชุดการทดลองละ 3 ตู้ ควบคุมปริมาณแสงโดยการใช้พลาสติกสีดำคลุมรอบตู้มีการให้อากาศตลอดเวลา ดูดตะกอนและระบายของเสียออกจากตู้ทุกวัน

6.2 ทำให้กุ้งติดเชื้อโดยฉีดสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในปริมาณที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับการเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียนั้นทำโดยนำเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งแยกจากกุ้งป่วยแล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ก่อนที่จะนำมาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ได้ค่า OD ประมาณ 0.033 ซึ่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.38×10^7 CFU/มิลลิลิตร

6.3 ฉีดสารละลายเชื้อ *V. harveyi* ที่เตรียมไว้ฉีดเชื้อเข้าทางกล้ามเนื้อลำตัวของกุ้งทดลองทุกตัวในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว สำหรับชุดควบคุมซึ่งใส่กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ จำนวน 1 ตู้ ฉีดน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาณและตำแหน่งที่ฉีดเท่ากับชุดการทดลองอื่นๆ (เพื่อเปรียบเทียบระหว่างทำการทดลองว่ากุ้งในทุกชุดการทดลองตายเนื่องจากติดเชื้อ *V. harveyi* ไม่ได้ตายเนื่องจากขั้นตอนการฉีด) ไม่มีการให้อาหารแก่กุ้งในชุดการทดลองหลังจากฉีดเชื้อ

6.4 จดบันทึกการตายของกุ้งทุกชุดการทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเพาะเชื้อแบคทีเรียจาก hepatopancreas ของกุ้งที่แสดงอาการป่วยและใกล้ตาย ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar เพื่อเป็นการยืนยันว่ากุ้งที่แสดงอาการป่วยตายด้วยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้

6.5 นำตัวอย่างกุ้งที่แสดงอาการป่วยและใกล้ตาย ตรวจยืนยันผลทางพยาธิสภาพของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เนื้อเยื่อ โดยการเก็บตัวอย่างกุ้งมาฉีดน้ำยา Davidson's fixative เข้าบริเวณ hepatopancreas และกล้ามเนื้อ แช่ตัวอย่างในน้ำยา Davidson's fixative นานประมาณ 24 ชั่วโมงหลังจากนั้น นำไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพต่อไป ตามวิธีของ Bell and Lightner (1984)

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลการเจริญเติบโต, อัตราการรอดตาย และการศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

2. การศึกษาผลของเศษเซลล์ยีสต์ต่อการเจริญเติบโต การรอดตายและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์สามผลิตภัณฑ์ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 7 ชุดการทดลอง (treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ (replication)

ชุดการทดลองที่ 1 ผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A ในอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับเศษเซลล์ยีสต์ 10 กรัมผสมกับอาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 2 ผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A ในอัตราส่วน 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับเศษเซลล์ยีสต์ 50 กรัมผสมกับอาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ B ในอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับเศษเซลล์ยีสต์ 10 กรัมผสมกับอาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุดการทดลองที่ 4 ผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ B ในอัตราส่วน 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับเศษเซลล์ยีสต์ 50 กรัมผสมกับอาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 5 ผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ในอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับเศษเซลล์ยีสต์ 10 กรัมผสมกับอาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 6 ผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ในอัตราส่วน 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับเศษเซลล์ยีสต์ 50 กรัมผสมกับอาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 7 เป็นชุดควบคุมโดยเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไมปลอดเชื้อที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 8-10 กรัม จำนวน 1,500 ตัวจากจุรีฟาร์มจังหวัดจันทบุรีมาปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นระยะเวลา 14 วันในห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยนำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 3 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 2 ถัง ในน้ำความเค็ม 25 พีพีที เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนไม ให้อาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวโดยให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 08.00 น. 12.00 น. และ 17.00 น. มีการติดตั้งเครื่องให้อากาศอย่างเพียงพอ เมื่อครบ 14 วัน คัดเลือกกุ้งขาวแวนนาไมที่มีขนาดไล่เลี่ยกันและมีสุขภาพแข็งแรงมาเลี้ยงในถังทดลองขนาดความจุ 500 ลิตร จำนวน 42 ถัง โดยใช้ศึกษาการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายจำนวน 21 ถัง และอีก 21 ถังใช้ศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยจะใส่กุ้งถังละ 35 ตัว ความเค็มของน้ำในถัง 25 พีพีที ดูดตะกอนเพื่อระบายของเสียและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกสัปดาห์

3. อาหารและการให้อาหาร

การศึกษาครั้งนี้ใช้เศษเซลล์ยีสต์จากบริษัท Thai foods international ลักษณะของเศษเซลล์ยีสต์ เป็นผงละเอียดและมีสีแตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ A เป็นส่วนผนังเซลล์ยีสต์ (*S. cerevesiae*) ที่ผ่านกระบวนการสกัดโดยการใช้เอนไซม์เข้มข้นผลิตภัณฑ์ B ส่วนผนังเซลล์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยีสต์ (Torula yeast) ที่ผ่านกระบวนการสกัดโดยการใช้เอนไซม์ผลิตภัณฑ์ C เป็นส่วนผนังเซลล์ยีสต์ (*S. cerevesiae*) ที่ผ่านกระบวนการสกัดไม่ใช้เอนไซม์

การเตรียมอาหารทดลองผสมเศษเซลล์ยีสต์ในระดับความเข้มข้นที่กำหนด โดยทำการคลุกเคล้าเศษเซลล์ยีสต์กับอาหารสำเร็จรูปปกติ และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลาหมึก ส่วนชุดการทดลองที่ 7 (กลุ่มควบคุม) จะทำการเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึกในปริมาณที่เท่ากับชุดการทดลองที่ 1 ถึง 6 จากนั้นผึ่งให้แห้ง ก่อนจะนำไปให้กุ้งที่ทดลอง 3 เวลา ในเวลาประมาณ 08.00 น. 12.00 น. และ 17.00 น. เริ่มต้นให้อาหารในอัตราส่วน 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวกุ้งต่อวันหลังจากนั้นในระหว่างการทดลองจะมีการปรับอาหารตามน้ำหนักของกุ้งตามวิธีของ ชลอ และพรเลิศ (2547) ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงนาน 50 วัน อาหารที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะมีการเตรียมใหม่ทุกวัน

4. การศึกษาการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

สุ่มชั่งน้ำหนักกุ้งและบันทึกอัตราการรอดตายของกุ้งในแต่ละชุดการทดลองทุกๆ สัปดาห์จนสิ้นสุดการทดลองที่ 50 วัน

5. การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ

ระหว่างทำการทดลองมีการเก็บน้ำจากถังทดลองมาทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทุกสัปดาห์ และมีการระบายตะกอนของเสียออกอย่างสม่ำเสมอ พร้อมทั้งเติมน้ำที่ผ่านการพักและปรับความเค็มใกล้เคียงกับในถังทดลองเข้าไปทดแทน โดยมีการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำทุกสัปดาห์ ดังนี้

5.1 พีเอช วัดโดยใช้เครื่องวัดพีเอชรุ่น Ecoscan pH 5

5.2 อุณหภูมิ วัดโดยใช้เครื่อง YSI DO 200-4M

5.3 ความเค็ม วัดโดยใช้เครื่อง YSI 30/10 FT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.4 ปริมาณแอมโมเนียรวม ใช้วิธี phenol-hypochlorite method ตามวิธีของ APHA *et al*. (1995)

5.5 ปริมาณไนไตรท์ ใช้วิธี Colorimetric Method ตามวิธีของ APHA *et al*. (1995)

5.6 ความเป็นด่างและความกระด้างใช้วิธี titration ตามวิธีของ APHA *et al*. (1995)

6. การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันในแต่ละชุดการทดลอง ทำการสุ่มกุ้งในแต่ละชุดการทดลองซ้ำละ 9 ตัว โดยเจาะเลือดจากแอ่งเลือด (ventral sinus) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 25G ซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) (อัตราส่วนเลือดต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 1:2) โดยเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งทุกๆ ที่ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน โดยระหว่างที่ทำการทดลองมีการให้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณของเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง (phagocytic activity) กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (phenoloxidase activity) และ การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase (superoxide dismutase activity) ตามวิธีดังนี้

6.1 การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง

6.1.1 ดูดเลือดจากแอ่งเลือด โดยในหลอดฉีดยาบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดในอัตราส่วน 2:1 นำเลือดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ลงในน้ำแข็งเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือดช้าลง

6.1.2 ใช้ micropipette ดูดสารละลายเลือดกุ้งจำนวน 20 ไมโครลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemocytometer คำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็นจำนวนเซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิลิตร โดยหาค่าได้จาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาตรของ Hematocytometer = กว้าง x ยาว x สูง

= 1 มิลลิเมตร x 1 มิลลิเมตร x 0.1 มิลลิเมตร

= 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อลูกบาศก์มิลลิลิตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ x 10^4 x ค่า dilution

6.2 กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง ตามวิธีของ Itami *et al*. (1994) โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

6.2.1 เจาะเลือดจากแอ่งเลือด โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน (เลือดกุ้ง : anticoagulant) 1:2 โดยดูดเลือดกุ้ง 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดฉีดยาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร

6.2.2 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง โดยนำส่วนใสด้านบนทิ้ง ทำการล้างตะกอนเม็ดเลือด โดยเติม shrimp saline 2-3 มิลลิลิตร โดยใช้ pipette ดูดขึ้นลง เบาๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

6.2.3 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที โดยมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส โดยทำเช่นนี้ 2 ครั้ง

6.2.4 ละลายตะกอนเม็ดเลือดใน shrimp saline 1 มิลลิลิตร และ ใช้ pipette ดูดขึ้นลง เบาๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

6.2.5 นำสารละลายที่ได้ผสมกับ trypan blue ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยใช้ trypan blue 50 ไมโครลิตร และสารละลายเม็ดเลือด 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมา 50 ไมโครลิตร นับจำนวนเม็ดเลือดกุ้งใน hemocytometer แล้วนำมาคำนวณให้ได้เซลล์ประมาณ 1 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

6.2.6 นำสารละลายเซลล์เม็ดเลือดปริมาตร 200 ไมโครลิตร เลี้ยงบน cover glass โดย spread ทิ้งไว้ 20 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.2.7 ล้างด้วย shrimp saline 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

6.2.8 หยดสารละลาย heat-killed yeast 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6.2.9 ล้างด้วย shrimp saline 5 ครั้ง

6.2.10 หยดน้ำยา fixative 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที

6.2.11 ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

6.2.12 ทิ้งให้แห้ง 20-60 นาที

6.2.13 ย้อมด้วยสี Giemsa stain 5 นาที

6.2.14 ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

6.2.15 ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งข้ามคืน

6.2.16 ปิดสไลด์ด้วย permout

นำไปวิเคราะห์ข้อมูลโดยการนับจำนวนเซลล์ โดยสุ่มนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด 200 เซลล์ ในแต่ละ cover glass นับเซลล์เม็ดเลือดที่กินเซลล์ยีสต์ และไม่กินเซลล์ยีสต์เข้าไป คำนวณค่าได้จาก

ร้อยละของเม็ดเลือดกุ้งที่เกิดกระบวนการ = $\frac{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่กินเซลล์ยีสต์เข้าไป}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด}} \times 100$
กลืนกินสิ่งแปลกปลอม (% phagocytosis)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.3 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง ตามวิธีของกิจการ และคณะ (2543 ฉ)

6.3.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* บริสุทธิ์ โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (Tryptic Soy Agar) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (เนื่องจากเชื้อที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA สามารถที่จะนำไปละลายในน้ำเกลือได้ง่ายกว่าเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร TCBS จึงนิยมเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA)

6.3.2 เตรียมสารละลายเชื้อ *V. harveyi* โดยนำเชื้อที่เป็น colony เดี่ยวละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียมน้ำเกลือประมาณ 10 มิลลิลิตร (หรือมากจนเกินพอ สำหรับใช้ในการทดลองครั้งนั้นๆ) จากนั้นนำสารละลายเชื้อที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.08 - 0.1 บันทึกค่า OD ที่เลือกใช้

6.3.3 เจาะเลือดจากกุ้งจากแอ่งเลือด โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน 1:1 โดยดูดเลือดกุ้ง 1 มิลลิลิตร ในหลอดฉีดยาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร

6.3.4 นำมาแยกซีรัมออกจากเม็ดเลือดกุ้ง โดยหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1,000 rpm. นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสด้านบนมาใช้

6.3.5 นำซีรัมมาเจือจางโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเจือจางในระดับ 1:2 1:4 1:8 1:16 และ 1:32 โดยปรับปริมาตรในการเจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

6.3.6 นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้อ 6.3.2. มาเติมในหลอดทดลองที่เจือจางซีรัม ในแต่ละความเข้มข้นไว้แล้ว เติมสารละลายเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

6.3.7 นำส่วนผสมแต่ละหลอดมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ทำการเจือจางส่วนผสมแต่ละหลอด โดยใช้น้ำเกลือปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้วิธี spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar จดบันทึกค่าของการเจือจางซีรัม ที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตรรวมกับสารละลายแบคทีเรีย 0.1 มิลลิลิตร

6.4 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

การเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งและการเตรียม hemocyte lysate (HLS) ตามวิธีของกิจการและคณะ (2543 ฉ)

6.4.1 เก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากบริเวณแอ่งเลือด ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว จนได้ปริมาณครบ 1 มิลลิลิตร

6.4.2 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 rpm. เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.4.3 นำส่วนใสด้านบนทิ้ง นำส่วนตะกอนเม็ดเลือดที่ได้นำมาล้างในสารละลาย K-199 และละลายในสารละลาย cacodylate buffer พีเอช 7.4

6.4.4 ทำให้ส่วนของเซลล์เม็ดเลือดแตก โดยใช้ sonicator : vibracell ที่แอมพลิจูด 30 เป็นเวลา 5 วินาที

6.4.5 นำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 10,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.4.6 แยกส่วนใสด้านบนซึ่งเป็น hemocyte lysate (HLS) เก็บไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป การวิเคราะห์ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Söderhäll and Hall (1984) มีวิธีการดังต่อไปนี้

1) นำ HLS ที่เตรียมได้ 200 ไมโครลิตร ผสมรวมกับสารละลายทริปซิน (0.1 เปอร์เซ็นต์ ใน cacodylate buffer) 200 ไมโครลิตร ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาประมาณ 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2) เติมสารละลาย L-dihydroxyphenylalanine (L–DOPA 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 200 ไมโครลิตร และทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

3) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุก ๆ 2 นาที โดยเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม (blank) ซึ่งใช้น้ำกลั่นผสมกับสารป้องกันเลือดแข็งตัวสารละลาย K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับทริปซิน L-dihydroxyphenylalanine และ cacodylate buffer แทนการใช้ HLS ทำการวัดค่า OD จนปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์

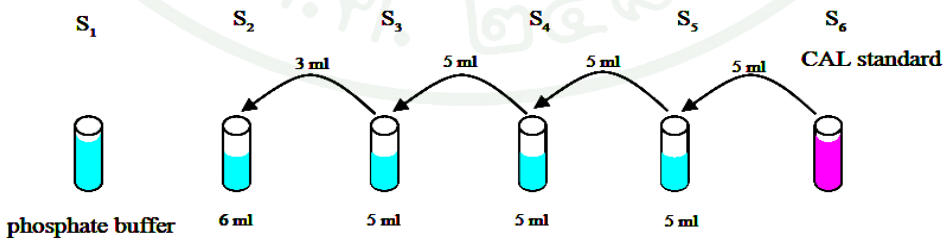
4) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน HLS โดยวิธีของ Lowry *et al.* (1951) นำค่าที่ได้มาคำนวณหน่วย (unit) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยคำนวณหาค่าดังนี้

1 หน่วยของฟีนอลออกซิเดส = Δ OD_{490}/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน

6.5 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase

ทำการศึกษาโดยใช้ชุดการทดลองสำเร็จรูป (test kit) RANSOD@ superoxide dismutase โดยเตรียมชุดมาตรฐานใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อหาปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ในตัวอย่างเม็ดเลือดกุ้ง

6.5.1 เตรียมสารมาตรฐาน S_1-S_6 จากสารละลาย CAL standard และ สารละลาย phosphate buffer 0.01 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานของชุดทดลองสำเร็จรูป RANSOD@superoxide dismutase

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.5.2 นำสารละลายมาตรฐาน S_1-S_6 เตรียมได้ 50 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ R_1 1,700 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย R_2 250 ไมโครลิตร มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร โดยจดบันทึกค่า A_1 ที่ 30 วินาที และจดบันทึกค่า A_2 ที่ 3 นาที 30 วินาที โดยเปรียบเทียบกับ air blank

วิธีการหาปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ในตัวอย่างเม็ดเลือดกุ้ง

1) เก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากบริเวณแอ่งเลือด ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว จนได้ปริมาณครบ 1 มิลลิลิตร

2) หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3) นำส่วนใสด้านบนทิ้ง นำส่วนตะกอนเม็ดเลือดที่ได้ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ 3 มิลลิลิตร ผสมด้วย dropper แก้วเบาๆ

4) หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5) ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 4 ครั้ง (ทำซ้ำข้อ 3-4) นำสารละลายละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง

6) ละลายตะกอนเม็ดเลือดด้วยน้ำกลั่นชนิด tri-distilled water ที่เย็น ปริมาตรมิลลิลิตร

7) นำสารละลายเม็ดเลือดที่เตรียมได้ 50 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ R_1 1,700 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย R_2 250 ไมโครลิตร

8) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร โดยจดบันทึกค่า A_1 ที่ 30 วินาที และจดบันทึกค่า A_2 ที่ 3 นาที 30 วินาที โดยเปรียบเทียบกับ air blank

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9) นำค่า A_1 และ A_2 ที่ได้มาคำนวณหาค่า เปอร์เซ็นต์ inhibition โดยคำนวณหาค่าดังนี้

$$\Delta A/\text{ min of standard or sample } (B_n) = \frac{A_2 - A_1}{3}$$

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{(B_n * 100)}{B_{S1}}$$

10) นำค่าเปอร์เซ็นต์ inhibition ของสารมาตรฐาน S_1-S_6 มาสร้างกราฟ log ฐาน 10 เพื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์ inhibition ของตัวอย่างเลือดกุ้งมาหาค่าปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ในหน่วยเอนไซม์ superoxide dismutase units ต่อมิลลิลิตร (SOD units/ml)

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละชุดการทดลองที่มีการให้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ ทั้ง 3 สูตรที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของขบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase ที่ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน หลังจากการเลี้ยง รวมทั้งอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งโดยการวิเคราะห์ความแตกต่างในการศึกษาครั้งนี้จะใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดทดลองโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

1. สถานที่ทำวิจัย

อาคารปฏิบัติการศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ระยะเวลาทำการวิจัย

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนพฤษภาคม-พฤศจิกายน พ.ศ. 2553

แหล่งทุนสนับสนุน

ได้รับทุนสนับสนุนจากบริษัท Thai foods international จำกัด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการทดลอง

1. การศึกษาผลของเศษเซลล์ยีสต์ต่อการเจริญเติบโตและการรอดตายของกุ้งขาวแวนนา ไม ระยะโพสลาร์วา ที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์สามผลิตภัณฑ์ที่ระดับความเข้มข้น แตกต่างกัน

1.1 การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย

การศึกษาการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วาที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ที่แตกต่างกัน 3 ผลิตภัณฑ์ (A, B และ C) ในระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมหลังจากให้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์เป็นเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงสุดตั้งแต่ 30 วัน จนถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 60 วัน ของการให้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 60 วัน พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยเท่ากับ 6.77 ± 0.31 กรัม ซึ่งสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์, ผลิตภัณฑ์ B ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์, ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 7

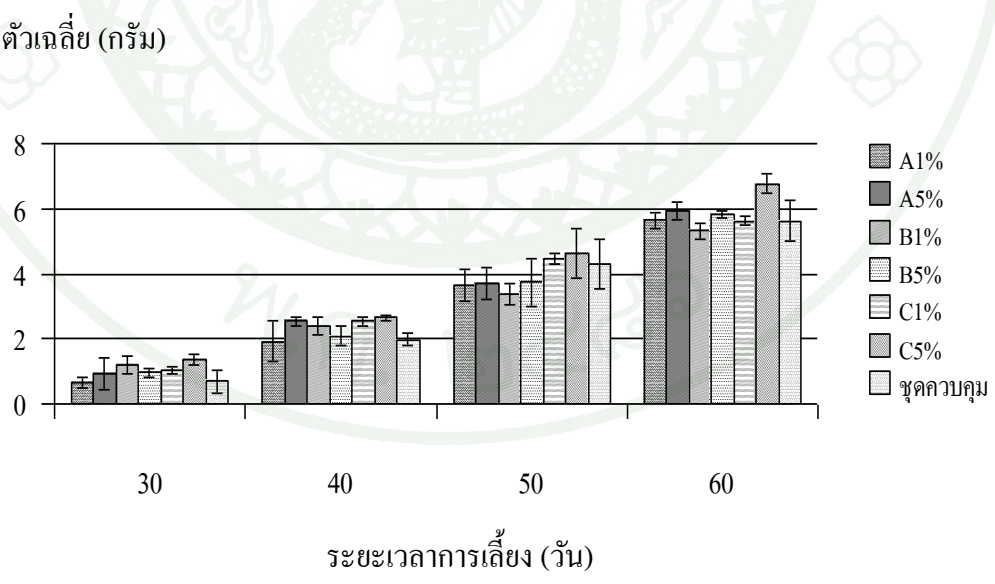
อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ที่แตกต่างกัน 3 ผลิตภัณฑ์ (A, B และ C) ในระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์และชุดควบคุม เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 60 วัน พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายสูงสุดเท่ากับ 94.54 ± 1.82 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แต่อัตรารอดตายของกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลองนี้ (C5% และ C1%) มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงไว้ในตารางที่ 4 และภาพที่ 8

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในอาหารระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 วัน

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาที่เลี้ยง (วัน)			
	30	40	50	60
ชุดการทดลองที่ 1 A1%	0.65±0.17^{c}	1.93±0.62^{c}	3.64±0.49^{ab}	5.64±0.26^{b}
ชุดการทดลองที่ 2 A5%	0.94±0.50^{bc}	2.53±0.13^{ab}	3.68±0.49^{ab}	5.93±0.26^{b}
ชุดการทดลองที่ 3 B1%	1.19±0.25^{ab}	2.41±0.28^{abc}	3.38±0.31^{b}	5.31±0.24^{b}
ชุดการทดลองที่ 4 B5%	0.96±0.14^{abc}	2.08±0.29^{abc}	3.75±0.73^{ab}	5.82±0.11^{b}
ชุดการทดลองที่ 5 C1%	1.04±0.12^{abc}	2.54±0.14^{ab}	4.45±0.17^{a}	5.62±0.13^{b}
ชุดการทดลองที่ 6 C5%	1.37±0.18^{a}	2.64±0.10^{a}	4.64±0.77^{a}	6.77±0.31^{a}
ชุดการทดลองที่ 7 ชุดควบคุม	0.68±0.36^{bc}	1.97±0.19^{bc}	4.28±0.77^{b}	5.62±0.64^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



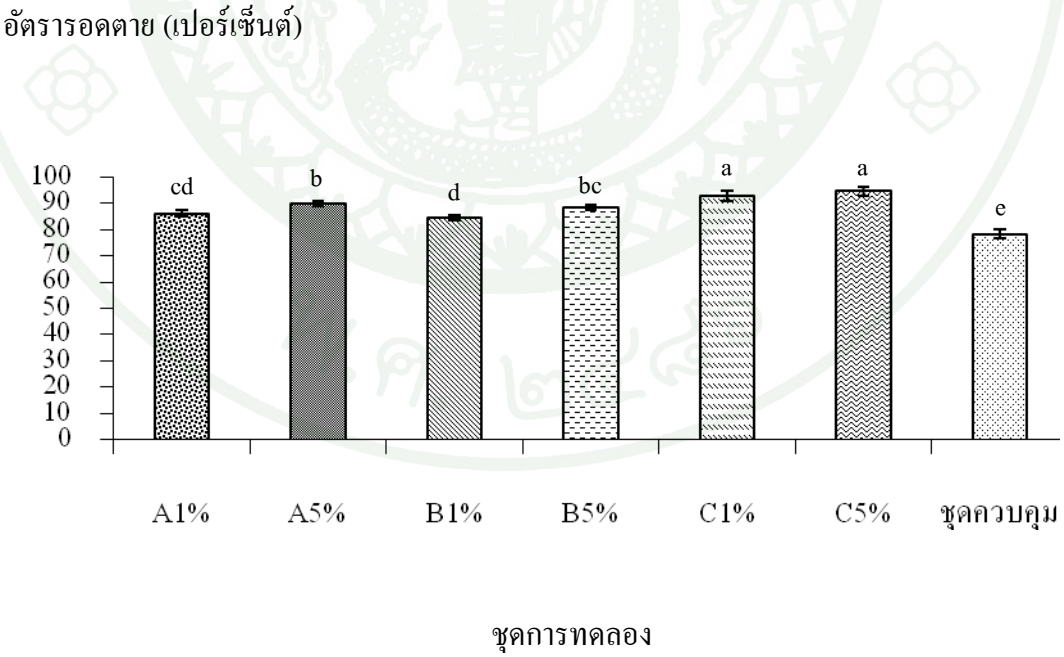
ภาพที่ 7 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมหลังเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30, 40, 50 และ 60 วัน ของการให้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ในทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 วัน

ชุดการทดลอง	อัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
A1%	86.06 ± 1.05^{cd}
A5%	89.70 ± 1.05^{b}
B1%	84.24 ± 1.05^{d}
B5%	88.48 ± 1.05^{bc}
C1%	92.73 ± 1.82^{a}
C5%	94.54 ± 1.82^{a}
ชุดควบคุม	78.18 ± 1.82^{e}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 8 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 60 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 การศึกษาความต้านทานต่อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

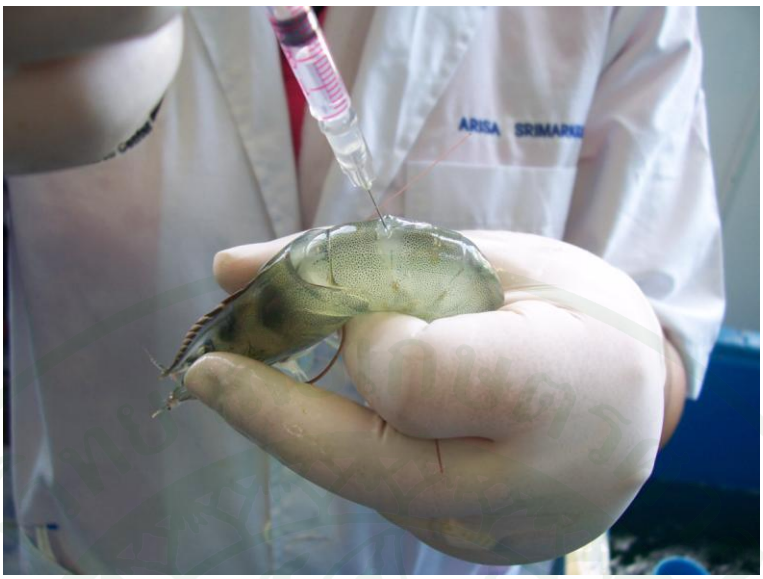
หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมโดยใช้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ต่างๆ เป็นระยะเวลา 60 วัน และฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อด้านหลังตัวกุ้งในปริมาณที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะ 48 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.38×10^7 CFU/มิลลิลิตร ฉีดตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ทุกชุดการทดลอง (ภาพที่ 9) บันทึกอัตรารอดตายหลังจากฉีดเชื้อเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายสูงสุด 72.17 ± 1.00 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผลิตภัณฑ์ A ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์เท่ากับ 70.83 ± 0.58 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 2 ชุดการทดลองนี้มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และพบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และผลิตภัณฑ์ B ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายสูงกว่ากุ้งในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงไว้ในตารางที่ 5 และภาพที่ 10

ตารางที่ 5 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 1.38×10^7 CFU/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

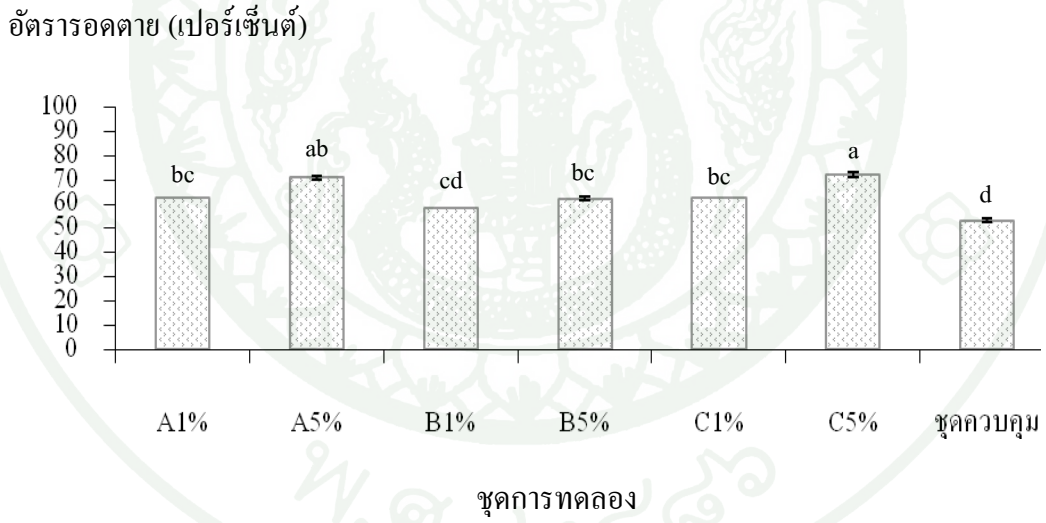
ชุดการทดลอง	อัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
A1%	62.50 ± 0.00^{bc}
A5%	70.83 ± 0.58^{a}
B1%	58.33 ± 0.00^{cd}
B5%	62.33 ± 1.00^{bc}
C1%	62.50 ± 0.00^{bc}
C5%	72.17 ± 1.00^{a}
ชุดควบคุม	53.33 ± 0.58^{d}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 การฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว



ภาพที่ 10 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 1.38×10^7 CFU/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

การศึกษาลักษณะภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* จะพบกุ้งเริ่มแสดงอาการป่วยเกิดขึ้นหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกุ้งป่วยมีสีเข้มขึ้นกว่าปกติ และไม่มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งเร้าต่างๆ ไม่ว่ายน้ำ และตายในที่สุด มีรอยแผลสีดำที่เปลือกและรยางค์กร่อนบางบริเวณ (ภาพที่ 11)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 11 ลักษณะภายนอกของกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* พบจุดสีดำบนเปลือกและรยางค์กร่อน

ผลการศึกษาคุณสมบัติของน้ำในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 60 วันได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเค็ม ค่าความเป็นด่างรวม ความกระด้าง แอมโมเนียรวม และไนไตรท์ แสดงไว้ในตารางที่ 6 พบว่าคุณสมบัติของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) และอยู่ในระดับที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม สอดคล้องกับรายงานของชลอ และพรเลิศ (2547)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 คุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการเป็นระยะเวลา 60 วัน

คุณสมบัติของน้ำ		ชุดการทดลอง ค่าเฉลี่ย			
		A1%	A5%	B1%	B5%
อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส)	เช้า	31.8 ± 0.17[a]	30.1 ± 0.17[a]	30.4 ± 0.15[a]	29.6 ± 0.16[a]
	บ่าย	30.7±0.24[a]	30.1±0.23[a]	31.4±0.26[a]	30.3±0.21[a]
พีเอช	เช้า	7.9±0.11[a]	7.9±0.11[a]	7.9±0.15[a]	8.1±0.25[a]
	บ่าย	7.9±0.15[a]	8.3±0.21[a]	7.9±0.15[a]	7.8±0.25[a]
ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เช้า	7.4±0.10[a]	7.3±0.10[a]	7.4±0.10[a]	7.5±0.16[a]
	บ่าย	7.1±0.11[a]	7.4±0.13[a]	7.3±0.13[a]	7.3±0.14[a]
ความเค็ม (พีพีที)		25.1±0.17[a]	25.3±0.14[a]	25.8±0.15[a]	25.4±0.14[a]
ความเป็นด่างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		110.9±5.7[a]	109.9±5.5[a]	110.5±6.8[a]	109.5±6.1[a]
ความกระด้างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		5495.0±113.5[a]	5500.0±123.5[a]	5512.5±131.6[a]	5542.5±141.3[a]
แอมโมเนียรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.10±0.04[a]	0.11±0.07[a]	0.14±0.09[a]	0.13±0.04[a]
ไนไตรท์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.02±0.01[a]	0.02±0.01[a]	0.02±0.01[a]	0.02±0.01[a]

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 (ต่อ)

คุณสมบัติของน้ำ		ชุดการทดลอง		
		ค่าเฉลี่ย		
		C1%	C5%	ชุดควบคุม
อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส)	เช้า	30.5 ± 0.20[a]	30.6 ± 0.11[a]	30.4 ± 0.11[a]
	บ่าย	30.8±0.17[a]	31.3±0.15[a]	31.1±0.16[a]
พีเอช	เช้า	7.9±0.11[a]	8.2±0.13[a]	8.1±0.11[a]
	บ่าย	8.3±0.11[a]	7.9±0.13[a]	7.9±0.12[a]
ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เช้า	7.3±0.10[a]	7.3±0.10[a]	7.1±0.10[a]
	บ่าย	7.3±0.10[a]	7.4±0.13[a]	7.1±0.10[a]
ความเค็ม (พีพีที)		25.3±0.14[a]	26.3±0.17[a]	25.8±0.15[a]
ความเป็นด่างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		110.5±6.0[a]	112.9±5.5[a]	110.5±6.0[a]
ความกระด้างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		5463.0±121.5[a]	5460.0±152.5[a]	5467.5±149.6[a]
แอมโมเนียรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.10±0.02[a]	0.10±0.06[a]	0.10±0.07[a]
ไนไตรท์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.01±0.01[a]	0.01±0.01[a]	0.02±0.01[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ผลของเศษเซลล์ยีสต์ต่อการเจริญเติบโต การรอดตายและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์แตกต่างกัน 3 ผลิตภัณฑ์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

2.1 การศึกษาการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย

น้ำหนักตัวเฉลี่ย อัตราการรอดตาย และผลผลิตรวมของกุ้งขาวแวนนาไมตลอดระยะเวลาการเลี้ยง แสดงไว้ในตารางที่ 7 และภาพที่ 12, 13

กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ที่แตกต่างกัน 3 ผลิตภัณฑ์ (A, B และ C) ในระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมพบว่าหลังจากให้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์เป็นระยะเวลา 21วัน กุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงสุด คือ 17.82 ± 0.53 กรัม ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกุ้งในชุดควบคุม ที่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 15.81 ± 1.80 กรัม แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 49 วัน พบว่าน้ำหนักตัวเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

เมื่อพิจารณาอัตราการรอดตาย พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ของผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ แสดงอัตรารอดตายสูงสุด คือ 91.11 ± 1.92 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผลิตภัณฑ์ A, B ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีอัตรารอดตายไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเทียบกับกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาผลผลิตรวมที่ได้จะเห็นว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีผลผลิตรวมสูงที่สุด คือ 649.87 กรัม รองลงมาได้แก่กุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีผลผลิตรวมเท่ากับ 633.08 กรัม ส่วนกุ้งในชุดควบคุมมีผลผลิตรวมต่ำที่สุด คือ 515.86 กรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

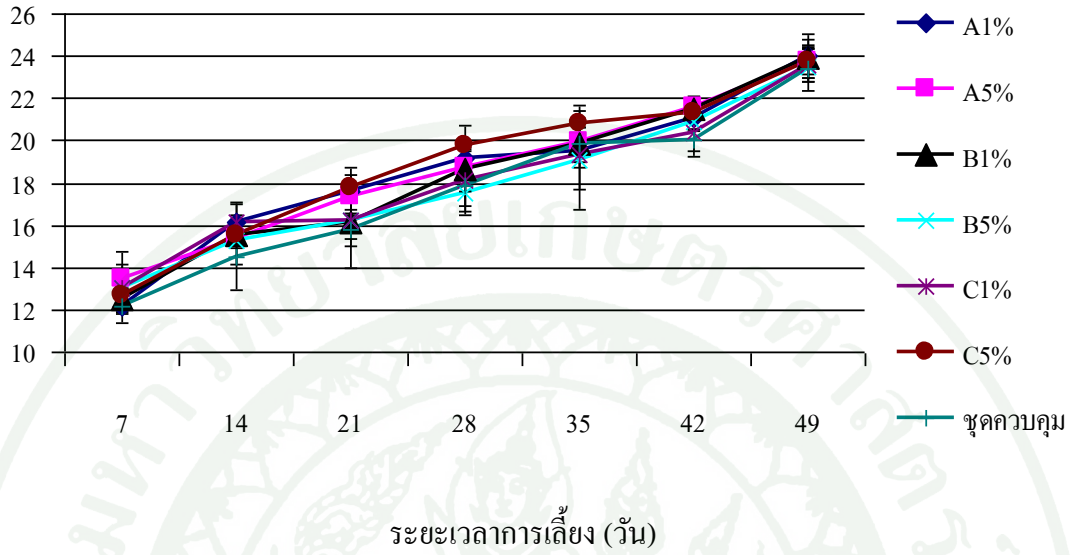
ตารางที่ 7 น้ำหนักตัวเฉลี่ย อัตราการรอดตาย และผลผลิตรวมของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นระยะเวลา 50 วัน

ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)	ชุดการทดลอง						
	A1%	A5%	B1%	B5%	C1%	C5%	ชุดควบคุม
	น้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม)						
7	12.20 ± 0.23^{a}	13.47 ± 1.29^{a}	12.55 ± 0.69^{a}	13.03 ± 1.13^{a}	13.01 ± 0.63^{a}	12.70 ± 0.29^{a}	12.19 ± 0.84^{a}
14	16.15 ± 0.98^{a}	15.37 ± 0.41^{a}	15.53 ± 0.03^{a}	15.31 ± 1.15^{a}	16.18 ± 0.79^{a}	15.54 ± 0.27^{a}	14.50 ± 1.54^{a}
21	17.61 ± 1.11^{ab}	17.35 ± 0.63^{ab}	16.14 ± 1.16^{ab}	16.24± 0.86^{ab}	16.26 ± 0.32^{ab}	17.82± 0.53^{b}	15.81 ± 1.80^{a}
28	19.19 ± 0.52^{ab}	18.70 ± 2.02^{ab}	18.68 ± 0.84^{ab}	17.55 ± 1.05^{a}	18.17 ± 0.54^{ab}	19.76 ± 0.18^{b}	17.85 ± 0.96^{ab}
35	19.49 ± 0.76^{a}	19.98 ± 0.64^{a}	19.85 ± 0.47^{a}	19.12 ± 2.34^{a}	19.36 ± 1.70^{a}	20.82 ± 0.86^{a}	19.83 ± 0.83^{a}
42	21.09 ± 0.54^{ab}	21.55 ± 0.56^{b}	21.49 ± 0.29^{b}	20.91 ± 0.41^{ab}	20.40 ± 1.18^{ab}	21.33 ± 0.28^{b}	20.02 ± 0.51^{a}
49	23.74 ± 1.03^{a}	24.04 ± 0.59^{a}	23.51 ± 0.54^{a}	23.93 ± 1.16^{a}	23.57 ± 0.78^{a}	23.78 ± 1.00^{a}	23.45 ± 1.08^{a}
อัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์)	84.44 ± 1.93^{b}	88.89 ± 1.92^{bc}	83.33 ± 3.34^{b}	86.67 ± 3.33^{bc}	88.89 ± 3.85^{bc}	91.11 ± 1.92^{c}	73.33 ± 3.34^{a}
ผลผลิตรวม(กรัม)	609.19	633.08	598.11	608.58	625.52	649.87	515.86

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

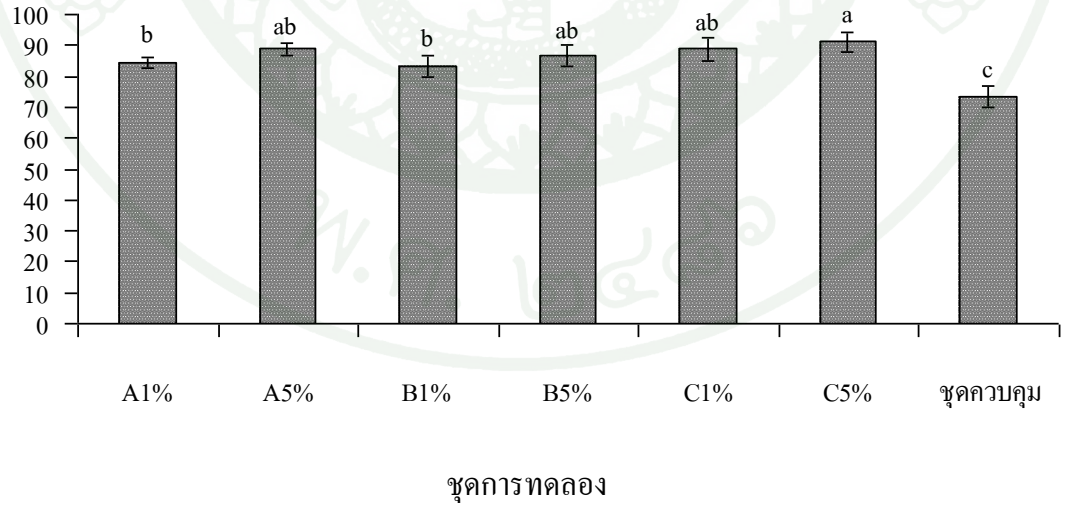
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม)



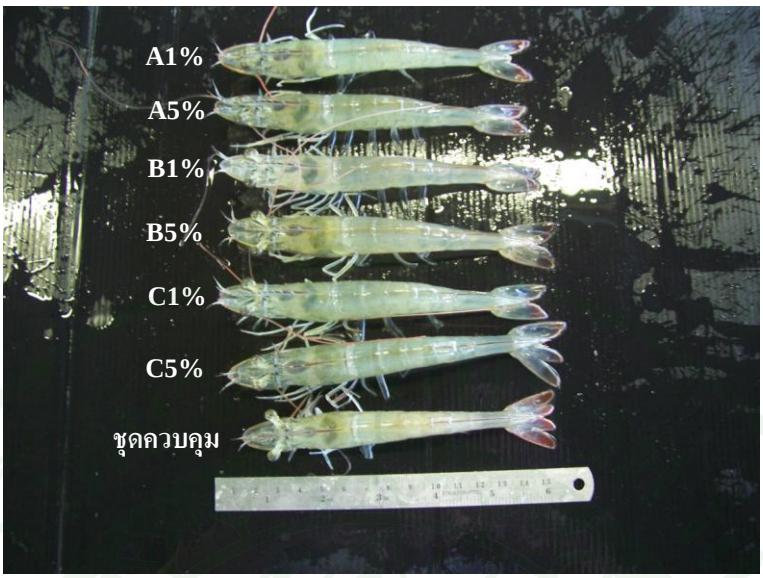
ภาพที่ 12 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมหลังเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน ของการให้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์

อัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์และชุดควบคุมเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 50 วัน

ภาพที่ 15 ชั่งน้ำหนักของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 50 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

จากการศึกษาทางด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมกับเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุม หลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน โดยวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ SOD ได้ผลการทดลองดังนี้

1) การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง

จากการศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์มาเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เริ่มมีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมแตกต่างจากกุ้งในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 50 วัน พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งสูงสุดเท่ากับ $41.17 \pm 2.06 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ($39.38 \pm 2.64 \times 10^5$เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และผลิตภัณฑ์ A ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ($37.00 \pm 1.58 \times 10^5$เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แต่มีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผลิตภัณฑ์ A ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์, ผลิตภัณฑ์ B ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม (ตารางที่ 8 และภาพที่ 16)

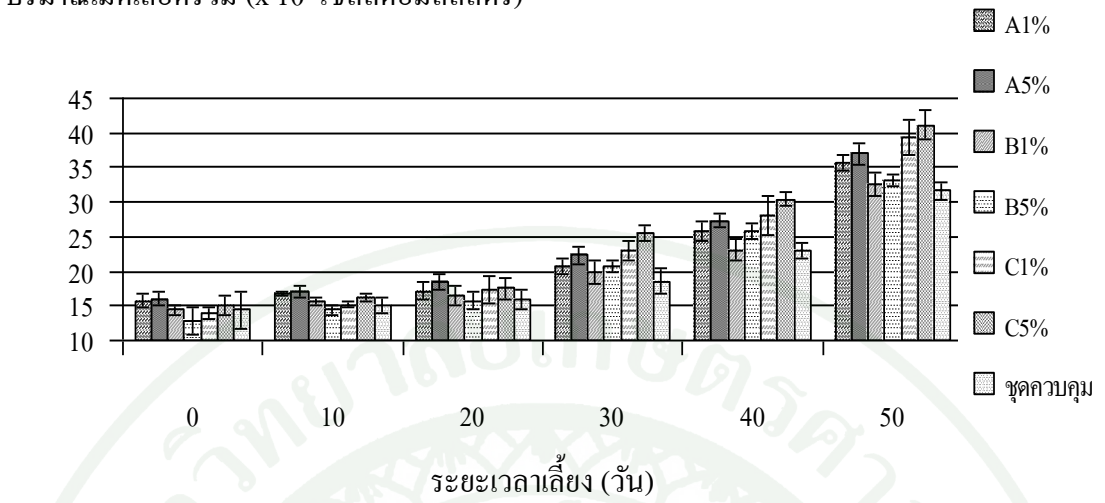
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน

ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)	THC (x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)					
	0	10	20	30	40	50
ชุดการทดลองที่ 1 A1%	15.17 ± 1.03^{a}	16.88 ± 0.31^{a}	17.17 ± 1.25^{a}	20.63 ± 1.17^{bc}	25.79 ± 1.36^{ab}	35.67 ± 1.09^{bcd}
ชุดการทดลองที่ 2 A5%	15.97 ± 1.02^{a}	17.13 ± 0.91^{a}	18.46 ± 1.08^{a}	22.30 ± 1.16^{abc}	27.33 ± 1.00^{ab}	37.00 ± 1.58^{abc}
ชุดการทดลองที่ 3 B1%	14.42 ± 0.78^{a}	15.75 ± 0.59^{ab}	16.54 ± 1.34^{a}	19.88 ± 1.71^{bc}	23.08 ± 1.52^{b}	32.54 ± 1.69^{bd}
ชุดการทดลองที่ 4 B5%	12.83 ± 2.07^{a}	14.38 ± 0.78^{b}	15.76 ± 1.32^{a}	20.75 ± 0.87^{bc}	25.83 ± 1.19^{ab}	33.13 ± 0.90^{bd}
ชุดการทดลองที่ 5 C1%	14.04 ± 0.80^{a}	15.17 ± 0.44^{ab}	17.29 ± 1.94^{a}	22.96 ± 1.31^{ab}	28.04 ± 2.85^{a}	39.38 ± 2.64^{ac}
ชุดการทดลองที่ 6 C5%	15.04 ± 1.34^{a}	16.17 ± 0.47^{ab}	17.54 ± 1.48^{a}	25.46 ± 1.09^{a}	30.42 ± 1.05^{a}	41.17 ± 2.06^{a}
ชุดการทดลองที่ 7 ชุดควบคุม	14.38 ± 2.68^{a}	15.04 ± 1.15^{ab}	15.92 ± 1.43^{a}	18.58 ± 1.74^{c}	23.00 ± 1.04^{b}	31.63 ± 1.29^{d}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 16 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน

2) กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง

การศึกษากิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมกับเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีร้อยละของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งสูงสุดคือ 28.44 ± 0.56 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์, ผลิตภัณฑ์ A ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีร้อยละของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งเท่ากับ 27.55 ± 0.75, 26.67 ± 0.67 และ 27.78 ± 0.62 ตามลำดับ แต่มีค่าร้อยละของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผลิตภัณฑ์ B ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม ซึ่งมีค่าร้อยละของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งเท่ากับ 24.00 ± 0.78, 25.78 ± 1.31 และ 23.56 ± 0.90 ตามลำดับ (ตารางที่ 9 และภาพที่ 17)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

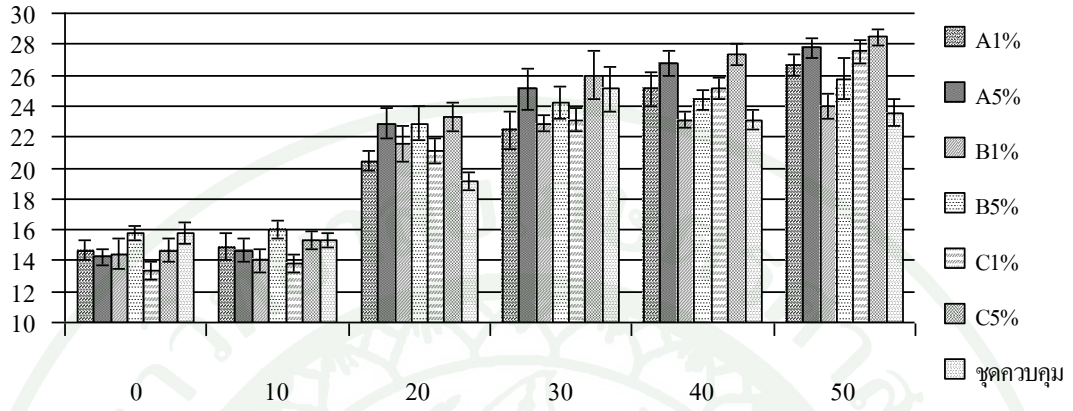
ตารางที่ 9 ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เมื่อได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน

ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)	ร้อยละของเม็ดเลือดกุ้งที่กลืนกินสิ่งแปลกปลอม					
	0	10	20	30	40	50
ชุดการทดลองที่ 1 A1%	14.67± 0.62^{ab}	14.89 ± 0.88^{ab}	20.44 ± 0.65^{ab}	22.44 ± 1.22^{ab}	25.11 ± 1.11^{ab}	26.67± 0.67^{ab}
ชุดการทดลองที่ 2 A5%	14.22 ± 0.52^{ab}	14.67 ± 0.76^{ab}	22.89 ± 0.94^{a}	25.11 ± 1.36^{ab}	26.77 ± 0.82^{a}	27.78 ± 0.62^{ab}
ชุดการทดลองที่ 3 B1%	14.44 ± 1.01^{ab}	14.00 ± 0.78^{ab}	21.56 ± 1.14^{ab}	22.89 ± 0.56^{ab}	23.11 ± 0.54^{b}	24.00 ± 0.78^{c}
ชุดการทดลองที่ 4 B5%	15.78 ± 0.49^{a}	16.00 ± 0.55^{a}	22.89 ± 1.11^{a}	24.22 ± 1.05^{ab}	24.44 ± 0.63^{b}	25.78 ± 1.31^{bc}
ชุดการทดลองที่ 5 C1%	13.33 ± 0.57^{b}	13.78± 0.60^{b}	21.11 ± 0.82^{ab}	23.11 ± 0.73^{ab}	25.11 ± 0.68^{ab}	27.55 ± 0.75^{ab}
ชุดการทดลองที่ 6 C5%	14.67 ± 0.73^{ab}	15.33 ± 0.62^{ab}	23.33 ± 0.94^{a}	26.00 ± 1.52^{a}	27.33 ± 0.73^{a}	28.44 ± 0.56^{a}
ชุดการทดลองที่ 7 ชุดควบคุม	15.78 ± 0.66^{ab}	15.33 ± 0.44^{ab}	19.11 ± 0.59^{b}	22.00 ± 1.45^{b}	23.11 ± 0.63^{b}	23.56± 0.90^{c}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ร้อยละของเม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการ
กลืนกินสิ่งแปลกปลอม



ระยะเวลาเลี้ยง (วัน)

ภาพที่ 17 ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เมื่อได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน

3) กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง

กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่ามีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำสุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากันคือ 1:4 ซึ่งไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม แต่เมื่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 20 วัน กุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากันคือ 1:8 แตกต่างจากชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A และ B ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 50 วัน พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำสุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 1:16 ซึ่งแตกต่างจากกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และชุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ควบคุมซึ่งมีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากันคือ 1:8 แสดงว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีความพร้อมที่จะตอบสนองเชื้อโรคได้ดีกว่าชุดควบคุม (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม หลังจากได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน

ระยะเวลาเลี้ยง (วัน)	กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง						
	ชุดควบคุม	A1%	A5%	B1%	B5%	C1%	C5%
0	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4
10	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4
20	1:4	1:4	1:8	1:4	1:8	1:8	1:8
30	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
40	1:8	1:8	1:16	1:8	1:16	1:8	1:16
50	1:8	1:8	1:16	1:8	1:16	1:8	1:16

4) กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

เมื่อเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase สูงสุด คือ 331.55 ± 7.98 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับอาหารผสมเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 321.10 ± 8.38 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน และกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลองนี้ (C5% และ C1%) มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และหลังจากสิ้นสุดการเลี้ยงที่ 50 วัน กุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase สูงสุด คือ 368.39 ± 8.86 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นัยสำคัญ (P > 0.05) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (352.48 ± 8.55 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน) และผลิตภัณฑ์ A ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (348.48 ± 5.47 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน) แต่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P > 0.05) กับกุ้งที่ได้รับอาหารผลิตภัณฑ์ A ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์, ผลิตภัณฑ์ B ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase คือ 344.42 ± 8.68, 318.49 ± 5.73, 328.20 ± 9.97 และ 297.73 ± 5.12 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน ตามลำดับ (ตารางที่ 11 และภาพที่ 18)

5) การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase

เมื่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารผสมเศษยีสต์ผลิตภัณฑ์ต่างๆ เป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่าปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงสุด คือ 31.00 ± 0.96 หน่วย SOD/มิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05) กับกุ้งในชุดควบคุม ซึ่งมีค่า 25.60 ± 1.93 หน่วย SOD/มิลลิลิตร เมื่อระยะเวลาผ่านไป 30 วัน พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, C ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และผลิตภัณฑ์ B ที่ระดับความเข้มข้น 5 มีค่าปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase สูงกว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ B ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05) และเมื่อเลี้ยงจนครบระยะเวลา 50 วัน พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase สูงสุด คือ 34.57 ± 0.36 หน่วย SOD/มิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05) เมื่อเทียบกับกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผลิตภัณฑ์ A, B ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม
(ตารางที่ 12 และภาพที่ 19)

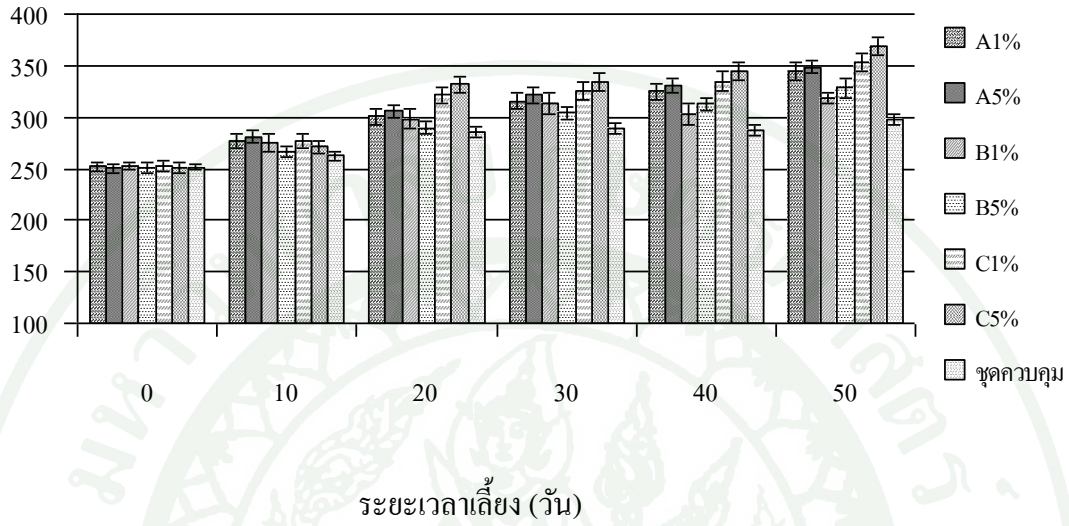
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน

ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)	Phenoloxidase activity หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน					
	0	10	20	30	40	50
ชุดการทดลองที่ 1 A1%	251.98± 3.93^{a}	276.39 ± 6.65^{a}	300.42 ± 7.22^{bc}	315.46 ± 7.95^{ab}	324.93 ± 8.19^{abc}	344.42 ± 8.68^{cd}
ชุดการทดลองที่ 2 A5%	250.27 ± 4.59^{a}	281.11 ± 6.01^{a}	305.56 ± 6.54^{bc}	321.11 ± 7.19^{ab}	330.75 ± 7.40^{ac}	348.48 ± 5.74^{acd}
ชุดการทดลองที่ 3 B1%	252.51 ± 3.83^{a}	274.48 ± 8.50^{a}	298.34 ± 9.23^{c}	313.18 ± 10.15^{ab}	302.58 ± 10.46^{bd}	318.49 ± 5.73^{b}
ชุดการทดลองที่ 4 B5%	251.11 ± 4.92^{a}	266.61 ± 4.89^{a}	289.79 ± 5.31^{c}	303.77 ± 5.84^{bc}	312.88 ± 6.02^{bcd}	328.20 ± 9.97^{bc}
ชุดการทดลองที่ 5 C1%	252.26 ± 5.17^{a}	276.73 ± 6.62^{a}	321.10± 8.38^{ab}	325.00 ± 8.71^{ab}	334.75 ± 8.97^{ac}	352.48 ± 8.55^{ad}
ชุดการทดลองที่ 6 C5%	251.06± 5.44^{a}	270.99 ± 6.74^{a}	331.55 ± 7.98^{a}	334.00± 8.71^{a}	344.02± 8.97^{a}	368.39 ± 8.86^{a}
ชุดการทดลองที่ 7 ชุดควบคุม	251.12 ± 2.82^{a}	262.67 ± 4.16^{a}	285.51 ± 4.52^{c}	289.06 ± 4.97^{c}	287.43 ± 5.12^{d}	297.73 ± 5.12^{e}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 18 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน

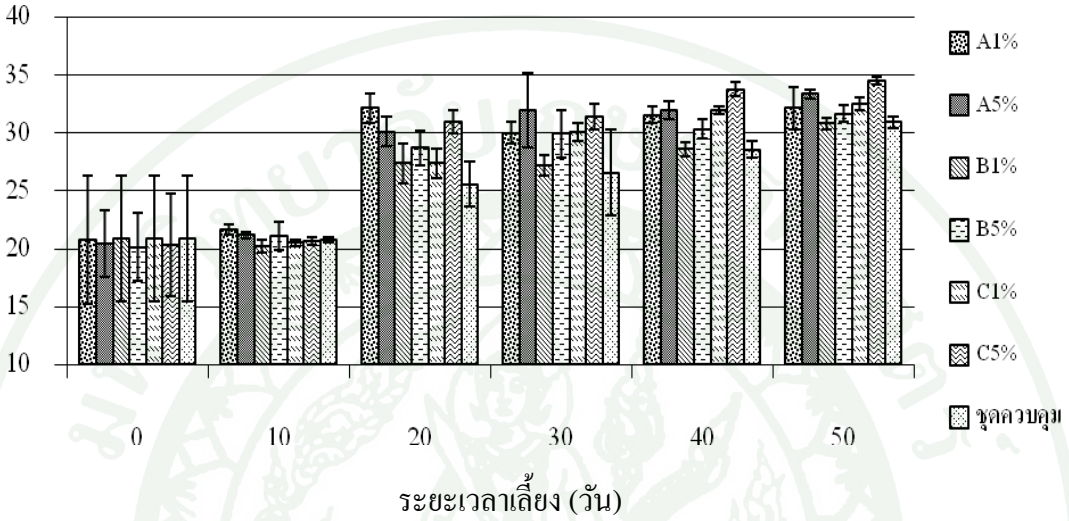
ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)	การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase หน่วย SOD/มิลลิลิตร					
	0	10	20	30	40	50
ชุดการทดลองที่ 1 A1%	20.82± 8.82^{a}	21.21 ± 0.44^{a}	28.19 ± 1.30^{c}	30.05 ± 0.93^{a}	31.60 ± 0.70^{b}	32.18 ± 1.80^{bc}
ชุดการทดลองที่ 2 A5%	20.48± 2.92^{a}	21.73 ± 0.30^{a}	30.15 ± 1.26^{abc}	31.48± 3.18^{a}	32.05 ± 0.78^{b}	33.40 ± 0.38^{bc}
ชุดการทดลองที่ 3 B1%	21.20 ± 3.70^{a}	20.23 ± 0.57^{a}	27.20 ± 1.70^{ab}	27.41 ± 0.91^{b}	28.66 ± 0.60^{c}	30.84 ± 0.50^{c}
ชุดการทดลองที่ 4 B5%	20.13 ± 2.94^{a}	21.16 ± 1.22^{a}	28.73 ± 1.53^{abc}	30.00 ± 2.05^{a}	30.35 ± 0.83^{ab}	31.70 ± 0.73^{c}
ชุดการทดลองที่ 5 C1%	19.76 ± 11.16^{a}	20.55 ± 0.27^{a}	28.40 ± 1.26^{ab}	30.15 ± 0.77^{a}	31.98 ± 0.30^{b}	32.58 ± 0.55^{bc}
ชุดการทดลองที่ 6 C5%	20.36 ± 4.41^{a}	20.68 ± 0.37^{a}	31.00 ± 0.96^{ac}	31.99 ± 1.13^{a}	33.83± 0.57^{a}	34.57 ± 0.36^{a}
ชุดการทดลองที่ 7 ชุดควบคุม	21.87 ± 7.69^{a}	20.77 ± 0.22^{a}	25.60 ± 1.93^{b}	26.61 ± 3.73^{b}	28.60 ± 0.69^{c}	30.95 ± 0.47^{c}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase

(หน่วย SOD/มิลลิลิตร)



ภาพที่ 19 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ ในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นระยะเวลา 50 วัน

ผลการศึกษาคุณสมบัติของน้ำในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 50 วันได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเค็ม ค่าความเป็นด่างรวม ความกระด้าง แอมโมเนียรวม และไนไตรท์ แสดงไว้ในตารางที่ 13 พบว่าคุณสมบัติของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) และอยู่ในระดับที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม สอดคล้องกับรายงานของชลอ และพรเลิศ (2547)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 คุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการเป็นระยะเวลา 50 วัน

คุณสมบัติของน้ำ		ชุดการทดลอง			
		ค่าเฉลี่ย			
		A1%	A5%	B1%	B5%
อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส)	เช้า	30.5 ± 0.18[a]	30.1 ± 0.18[a]	30.4 ± 0.11[a]	29.6 ± 0.21[a]
	บ่าย	30.3±0.21[a]	31.1±0.23[a]	31.4±0.26[a]	30.7±0.24[a]
พีเอช	เช้า	8.3±0.21[a]	7.9±0.11[a]	7.9±0.15[a]	8.1±0.25[a]
	บ่าย	8.3±0.21[a]	7.9±0.11[a]	7.9±0.15[a]	8.1±0.25[a]
ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เช้า	7.0±0.10[a]	7.3±0.10[a]	7.1±0.10[a]	7.5±0.16[a]
	บ่าย	7.1±0.11[a]	7.4±0.13[a]	7.3±0.13[a]	7.6±0.14[a]
ความเค็ม (พีพีที)		26.1±0.17[a]	25.3±0.14[a]	25.8±0.15[a]	25.4±0.14[a]
ความเป็นด่างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		105.9±5.7[a]	101.9±5.5[a]	110.5±6.8[a]	109.5±6.1[a]
ความกระด้างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		5363.0±113.5[a]	5433.0±123.5[a]	5412.5±131.6[a]	5442.5±141.3[a]
แอมโมเนียรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.20±0.04[a]	0.30±0.07[a]	0.40±0.09[a]	0.20±0.04[a]
ไนไตรท์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.02±0.01[a]	0.02±0.01[a]	0.02±0.01[a]	0.02±0.01[a]

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 (ต่อ)

คุณสมบัติของน้ำ		ชุดการทดลอง		
		ค่าเฉลี่ย		
		C1%	C5%	ชุดควบคุม
อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส)	เช้า	31.5 ± 0.20[a]	30.4 ± 0.11[a]	30.4 ± 0.11[a]
	บ่าย	31.8±0.27[a]	30.7±0.13[a]	31.1±0.23[a]
พีเอช	เช้า	7.3±0.11[a]	8.1±0.13[a]	7.9±0.15[a]
	บ่าย	7.3±0.11[a]	8.0±0.13[a]	7.9±0.15[a]
ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เช้า	7.3±0.10[a]	7.3±0.10[a]	7.1±0.10[a]
	บ่าย	7.3±0.10[a]	7.4±0.13[a]	7.1±0.10[a]
ความเค็ม (พีพีที)		25.3±0.14[a]	26.3±0.17[a]	25.8±0.15[a]
ความเป็นด่างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		110.5±6.8[a]	107.9±5.5[a]	110.5±6.8[a]
ความกระด้างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		5463.0±123.5[a]	5500.0±153.5[a]	5467.5±141.6[a]
แอมโมเนียรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.10±0.02[a]	0.30±0.06[a]	0.20±0.07[a]
ไนไตรท์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.01±0.01[a]	0.02±0.01[a]	0.02±0.01[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของเศษเซลล์ยีสต์ต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต แต่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตดีกว่ากุ้งในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เนื่องจากผลิตภัณฑ์ C มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณ 56.44 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกุ้งต้องการโปรตีนเพื่อการเจริญเติบโต ซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ และให้พลังงานในการดำเนินชีวิตของกุ้ง (ชนิกา, 2546) อีกทั้งวิตามินแร่ธาตุต่างๆ เป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของสัตว์น้ำ (Liu *et al*., 1993) ในผลิตภัณฑ์ C มีกรดโฟลิกในปริมาณมากกว่าผลิตภัณฑ์ A และ B ซึ่งกรดโฟลิกมีบทบาทในการสังเคราะห์กรดอะมิโนซึ่งจำเป็นสำหรับกระบวนการเจริญเติบโต (Cowey and Woodward, 1993) และความต้องการวิตามินในกุ้งขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ขนาด อายุ อัตราการเจริญเติบโต แต่ผลของเศษเซลล์ยีสต์ต่อการเจริญเติบโตในกุ้งขาวแวนนาไมขนาด 8-10 กรัม พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 50 วัน กุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยไม่แตกต่างจากกุ้งในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Peter (1999) พบว่ากุ้งแต่ละช่วงอายุมีความต้องการโปรตีนในปริมาณที่แตกต่างกัน กุ้งวัยอ่อนขนาดเล็กมีความต้องการโปรตีนมากกว่ากุ้งวัยรุ่นและกุ้งโตเต็มวัย การทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนในกุ้ง *L. vannamei* ลดลงเมื่อมีการเจริญเติบโตมากขึ้น จากการศึกษาพบว่ากุ้งขนาดเล็กจะมีความสามารถใช้โปรตีนได้ดีกว่ากุ้งขนาดใหญ่ (Lee *et al*., 1984)

สำหรับอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ทั้งสามผลิตภัณฑ์ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายสูงกว่ากุ้งในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Burgents *et al*. (2004) พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ให้อาหารผสมด้วย XP yeast culture® และอาหารที่ผสมยีสต์ *S. cerevisiae*, ยีสต์ *P. rhodozyma*, experimental yeast ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายสูงที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบกับในการทดลองที่มีรายงานส่วนใหญ่พบว่าสารเบต้ากลูแคนของผนังเซลล์ยีสต์มีผลเพิ่มอัตราการรอดตายของกุ้ง (Scholz *et al.*, 1999; Supamattaya *et al.*, 2000; Burgents *et al*., 2004) เนื่องจากเศษเซลล์ยีสต์มีกรดอะมิโนจำเป็น ได้แก่ arginine, histidine, isoleucine, luecine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, valine และ tryptophan

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นที่กุ้งต้องได้รับจากอาหาร (ชนิกา, 2546; Davis, 2000; Flicker,2002) รวมทั้งแร่ธาตุ เช่น calcium, magnesium, potassium และ chloride (เวียง, 2543) ส่งผลให้กุ้งแข็งแรงขึ้น สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี เมื่อกุ้งลอกคราบ พบว่าเปลือกสามารถแข็งตัวได้ในระยะเวลาอันสั้น และสามารถหลบหลีกการถูกกินจากกุ้งตัวอื่นที่เลี้ยงอยู่ร่วมกันได้ จึงทำให้มีอัตราการรอดตายที่สูงกว่าชุดควบคุม

จากการศึกษาถึงผลของเศษเซลล์ยีสต์เพื่อเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันโดยทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในปริมาณที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะ 48 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.38×10^7 CFU/มิลลิลิตร พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายสูงกว่ากุ้งในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เนื่องจากผนังเซลล์ของยีสต์ประกอบด้วยกลูแคน 30-35 เปอร์เซ็นต์ แมนแนน 30 เปอร์เซ็นต์ (กำเนิด, 2534) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของกิจการ และคณะ (2543 ก) ศึกษาผลของเบต้ากลูแคน ต่อการเจริญเติบโต ภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ พบว่ากุ้งกุลาดำมีอัตรารอดสูงขึ้นเมื่อได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนในปริมาณที่สูงขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ มลฤดี และคณะ (2543) ได้ทำการสกัดสารเบต้ากลูแคนจากยีสต์ *S. cerevisiae* และนำเบต้ากลูแคนที่ได้ไปเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 15 กรัม พบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบต้ากลูแคน ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ให้ผลการทดลองดีที่สุด โดยมีความต้านทานต่อเชื้อ *V. haveyi* คิดเป็นอัตรารอดตายเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาผลของเศษเซลล์ยีสต์ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม โดยประเมินจากองค์ประกอบต่างๆ ทางด้านภูมิคุ้มกันได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์มาเป็นระยะเวลา 10 วัน และ 20 วัน มีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกุ้งในชุดควบคุม แต่หลังจากการ 30 วัน จนสิ้นสุดการเลี้ยงที่ 50 วัน กุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งสูงสุดและแตกต่างจากกุ้งในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เนื่องจากผนังเซลล์ของยีสต์ประกอบด้วย เบต้า 1, 3 กลูแคน (β-1, 3 glucan) 50% เบต้า 1, 6 กลูแคน (β -1, 6 glucan) 10% แมนแนน (mannan) 40% และไคติน (chitin) 1-3% (Lipke and Ovalle, 1998) โดยมีองค์ประกอบหลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คือ เบต้ากลูแคนที่ได้จากยีสต์ชนิด *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นสารที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งได้ (กิจการ และคณะ, 2543 ค; ฉัทชนัน, 2549; วัชริยา, 2549; Sung *et al*., 1996; Burgents *et al*., 2004) และเบต้ากลูแคนเป็นสารโพลีแซคคาไรด์สายยาวของน้ำตาลกลูโคส (Dijkgraaf *et al*., 2002) สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด โดยเบต้ากลูแคนทำหน้าที่เป็น pathogen associated molecularpattern (PAMPs) (Sritunyalucksana *et al*., 1999) ไปกระตุ้นสารโปรตีนในตัวกุ้งที่ชื่อว่า β-glucanbinding protein (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) ที่ไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือดและทางเดินอาหาร ส่งผลให้ได้เป็นโมเลกุลเชิงซ้อนที่เรียกว่า β -1,3-glucan-binding protein complex (Sritunyalucksana *et al*., 2002) กระตุ้นที่ membrane receptor ที่จำเพาะของเม็ดเลือด (Vargas-Albores *et al*., 1998) ส่งผลให้มีการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันทั้งที่อาศัยเซลล์และระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด และผลการทดลองที่ได้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ ฉัทชนัน (2549) ที่พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนความเข้มข้น 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงสุดซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับเบต้ากลูแคนเป็นเวลาเพียงแค่ 2 และ 3 สัปดาห์ และเบต้ากลูแคนสามารถเสริมการทำงานของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด และเมื่อให้กุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) กิน 0.2 % เบต้ากลูแคนที่ได้จากส่วนเหลือของ brewer's yeast เป็นเวลา 3 วัน พบว่า phenol oxidase, total haemocyte และการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* มีค่าเพิ่มขึ้น (Thanardkit *et al*., 2002)

การตรวจสอบกิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมกับเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม หลังจากการเลี้ยงได้ 50 วัน ของการให้อาหารผสมกับเศษเซลล์ยีสต์ พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ แสดงเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Vargas-Albores *et al*. (1998) พบว่าสารประกอบจากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และฟังไจ คือ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ และเบต้า-กลูแคน มีผลให้ระบบภูมิคุ้มกันแบบเซลลูลาร์ เช่น phagocytosis melanization และ encapsulation สูงขึ้น ซึ่งกระบวนการ phagocytosis เป็นหน้าที่สำคัญของเม็ดเลือดในการทำลายสิ่งแปลกปลอมทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตที่เข้าไปในร่างกายซึ่งเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (McKay and Jenkin, 1970) แต่จากผลการทดลองพบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผลิตภัณฑ์ B ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และกุ้งในชุดควบคุมมีร้อยละของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งไม่มีความ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) เนื่องจากเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ B (Torula yeast) มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบในปริมาณ 0.09 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ขณะที่สูตร A และ C มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบในปริมาณ 0.17 และ 0.34 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ คอปเปอร์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ โดยแร่ธาตุคอปเปอร์ ทำให้น้ำเลือดของกุ้งมีสีน้ำเงิน และมีรงควัตถุ hemocyanin ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ (Ratcliffe *et al*., 1985) ซึ่งอาจไปมีผลต่อการกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง โดยมีบทบาทสำคัญในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่ถูกเซลล์เม็ดเลือดนำเข้าสู่เซลล์ ซึ่งมีผู้รายงานไว้ในกุ้งกุลาดำ (สมบัติ, 2542; Song and Hsieh, 1994; Sung and Song, 1996)

จากผลการศึกษาผลของเศษเซลล์ยีสต์ในครั้งนี้พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 50 วัน พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสและปริมาณการผลิต superoxide anion มีค่าสูงกว่ากุ้งในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาของ พรเลิศ และคณะ (2541) ให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนที่ระดับ 5 และ 10 กรัม มีผลช่วยเสริมเอนไซม์ phenoloxidase ให้มีกิจกรรมมากขึ้นรวมถึงการทำงานของ bactericidal activity ของน้ำเลือด อย่ามีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และจากการศึกษาของ Suphantharika *et al.* (2003) ได้ทดลองใช้ brewer's yeast ß-glucan (BYG) ซึ่งมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตและเบต้ากลูแคนอยู่สูง พบว่าการที่กุ้งกุลาดำได้รับ BYG 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในอาหารเป็นเวลา 3 วัน จะไปเพิ่ม phenoloxidase activity ในเลือดของกุ้งกุลาดำซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ไม่ได้ใช้ BYG และ Purivirojkul *et al*. (2006) พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสมเบต้ากลูแคนความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม วันละ 5 มื้อ เป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบ 7 วันแล้ว ทำการดูดเลือดจากกุ้งเพื่อตรวจสอบปริมาณ superoxide anion (หน่วย) พบว่าเมื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้อาหารผสมสารเบต้ากลูแคนปริมาณ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะมีค่าเฉลี่ยสูงสุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสมเบต้ากลูแคนปริมาณ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุม

รวมทั้งการศึกษาของ Supamattaya *et al.* (2000) ซึ่งได้ทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 0.6, 1.5 และ 6.5 กรัม โดยใช้อาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (β -glucan : MacroGard® ซึ่งได้มาจาก *S. cerevisiae* 4 ระดับ คือ 0, 0.25, 0.50 และ 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมพบว่าเมื่อกุ้งได้รับสารเบต้ากลูแคน 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะมีอัตรารอด ปริมาณเม็ดเลือดรวมการผลิต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

superoxide anion และ ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดได้ดี หลังจากได้รับอาหารผสมสารเบต้ากลูแคนเป็นเวลา 6 สัปดาห์ มะลิ และคณะ (2543) ได้ทำการทดลองให้กุ้งกุลาดำกินอาหารผสมสารเปปติโดกลัยแคนเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ มีความสามารถในการผลิต superoxide anion ได้ดีกว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารปกติ และมีความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากน้ำเลือดสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่ได้รับเปปติโดกลัยแคน มีความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากน้ำเลือดเพียง 50 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การทดลองให้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาผลของการเจริญเติบโต การรอดตาย ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วาในห้องปฏิบัติการ เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงสุด ซึ่งมีค่าสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีอัตราการรอดตายสูงที่สุดซึ่งไม่แตกต่างจากกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์แต่อัตรารอดตายของกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลองนี้ (C5% และ C1%) มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2. การทดลองให้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาความต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากให้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์แก่กุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. การทดลองให้อาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ เป็นระยะเวลา 50 วัน โดยผลการทดลองพบว่าน้ำหนักตัวเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาอัตราการรอดตาย พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ของผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตรารอดตายตายสูงสุด และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้แก่ ปริมาณของเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase และผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase สูงกว่ากุ้งในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาถึงผลของเศษเซลล์ยีสต์ ต่อการเจริญเติบโต และการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในระดับฟาร์ม โดยใช้เศษเซลล์ยีสต์ผลิตภัณฑ์ C ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับอาหารสำเร็จรูปอัดเป็นเม็ดมาจากโรงงานผลิตอาหารเพื่อความสะดวกในการใช้แก่เกษตรกร

2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านต้นทุนในการใช้เศษเซลล์ยีสต์เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารกุ้งขาวแวนนาไม และผลตอบแทนเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อาหารที่มีจำหน่ายทั่วไปในระดับฟาร์ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, สุภาพ เกียรติทับทิว และ Rudolf Hoffmann. 2543 ก. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: III. การศึกษาทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ. **ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22** (ฉบับพิเศษ): 589-596.

กิจการ ศุภมาตย์, จรีพร เรืองศรี, สุภฎา คีรีรัฐนิคม และ นเรศ ซ่วนยุก. 2543 ข. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: V. ผลของอุณหภูมิ ปริมาณ ออกซิเจนละลายน้ำและความเป็นกรด-ด่างของน้ำต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. **ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22** (ฉบับพิเศษ): 605-613.

กิจการ ศุภมาตย์, จรีพร เรืองศรี, สุภฎา คีรีรัฐนิคม และ นเรศ ซ่วนยุก. 2543 ค. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: VI. ผลของโรคติดเชื้อต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. **ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ)**: 581-588.

กิจการ ศุภมาตย์, จรีพร เรืองศรี, สุภฎา คีรีรัฐนิคม และ นเรศ ซ่วนยุก. 2543 ง. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: VII. องค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำบนพื้นฐานของเพศ และวงจรการลอกคราบ. **ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22** (ฉบับพิเศษ): 623-632.

กิจการ ศุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ตันติกิตติ และ Rudlf Hoffmann. 2543 จ. ภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : II. เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ. **ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22** (ฉบับพิเศษ): 581-588.

กิจการ ศุภมาตย์, อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์, Toshiaki Itami และจิราพร เกสรจันทร์. 2543 ฉ. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. **ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ)**: 567-580.

กำเนิด สุกัณวงษ์. 2534. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.** สำนักพิมพ์ โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จรีพร เรืองศรี, ไมตรี วรรณเดช, สุณีย์ หวันเหล็ม, อนิดา สงนุ้ย, สุพัตรา อรุณรัตน์, นพรัตน์ แท่นมาก, จิราพร เพชรรัตน์ และ กิจการ ศุภมาตย์. 2546. การเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อ *Vibrio harveyi* จากตอนใต้ของไทยในกุ้งกุลาดำ. **ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 26 (ฉบับที่ 1)**: 43-54.

ฉัทชนัน ศิริไพศาล. 2549. **การใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชนิกา คงสวัสดิ์. 2546. **ผลของการใช้ยีสต์สกัดทดแทนปลาป่นบางส่วนในอาหารต่อการเติบโตของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon***. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2534. **คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. ฐานเศรษฐกิจ, กรุงเทพฯ.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. **อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย.** บริษัทเมจิค พับบลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ. 206 น.

ชัยชาญ ไตรศรีศิลป์. 2545. **ฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*.** วิทยานิพน์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทวีศักดิ์ ศรีชนะ. 2547. **องค์ประกอบบางประการของระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) ที่ระยะต่าง ๆ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประจวบ หลำอุบล. 2537. **สรีรวิทยาของกุ้ง.** ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรรณวไล จันทรปาน. 2551. **การเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับอาหารผสม AQUANIN PLUS (Beta-Cyclodextrin Cyateamine Hydrochloride).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พรเลิศ จันทร์รัชกูล, เจ เอฟ เทอร์นบอล และ ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2537. **คู่มือการเลี้ยงและป้องกันโรคกุ้งกุลาดำ**. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง, เกษตรกลางบางเขน, กรุงเทพฯ.

พรเลิศ จันทร์รัชชกูล, นภดล ศุกระกาณจน์ และพัฒนพงศ์ ยั่งยืน. 2541. ผลของ ß-1-3-glucan ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune response) ของกุ้งกุลาดำ, น. 43-52. **ในรายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มลฤดี สิทธิพันธ์, อรัญ หันพงศ์กิตติกลู, และกิจการ ศุภมาตย์. 2543. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ : I. การสกัดสาร บีต้ากลูแคนจากยีสต์และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). **ว.สงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 ฉบับพิเศษ:** 653-662.

มาลินี วิชชาวุธ และ สมยศ สิทธิโชคพันธ์. 2548. การนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวตามระเบียบกรมประมง. **วารสารการประมง** 58(2): 170-171.

มะลิ บุณยรัตผลิน, กิจการ ศุภมาตย์, จูอะดี พงศ์มณีรัตน์, สิทธิ บุณยรัตผลิน และ Y. Toride. 2543. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ: IV. ผลของเปปติโดกลัยแคนโมเลกุลใหญ่และเล็กต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ. **ว.สงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ)**: 689-696.

ยอดยิ่ง เทพธรานนท์. 2540. **วัคซีนสำหรับกุ้งกุลาดำและกุ้งอื่นๆ ในสกุล *Penaeus*.** บางแคการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ยอดยิ่ง เทพธรานนท์. 2541. **วัคซีนสำหรับกุ้งกุลาดำและกุ้งอื่นๆ ในสกุล *Penaeus***: หลักการรายละเอียดของวัคซีนที่มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันและกำจัดโรคและผลของการใช้วัคซีกับกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการ, ทดลองและวิจัย, ศูนย์วิจัยกุ้งกุลาดำ มหาชัย.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วรณัฏฐ์ อนันตศิลป์. 2545. **การศึกษาประสิทธิภาพของ *Lactobacillus* ในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *Vibrio* spp. และความต้านทานโรคของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล. 2549. **การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. **อาหารปลา.** ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2543. **โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์น้ำ**. พิมพ์ครั้งที่ 2 ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมบัติ รักประธานพร. 2542. **การเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ด้วย Bacillus สานพันธุ์ S11.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุภฎา คีรีรัฐนิคม, จรีพร เรืองศรี, ไมตรี วรรณเดช, อภิญญา ส่งประดิษฐ์, นเรศ ซ่วยยุก, วีรพงษ์ เทพอักษร และ กิจการ ศุภมาตย์. 2543. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อวิบริโอเรืองแสง (*Vibrio harveyi*) ในน้ำทะเล. **ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ)**: 697-706.

เสาวลักษณ์ อ่อนมิ่ง. 2550. **การสืบค้นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้เทคนิค Expressed Sequence Tags (ESTs) ในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งก้ามกรามปกติและกุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนันต์ชัย เขื่อนธรรม. 2542. **หลักการวางแผนการทดลอง**. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล, พิสมัย สมสืบ, นัชนรี ทองศรี, สาวิตรี วงศ์สุวรรณ. 2548. **อาหารและการผลิตอาหารสัตว์น้ำ.** กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหหรณ์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อิทธิพร จันทร์เพ็ญ. 2532. **อาหารและการให้อาหารปลา, กุ้ง.** สำนักพิมพ์ช่อนนทรี, กรุงเทพฯ.

Abraham, T.J., R. Manley, R. Palaniappan and K. Dhevendaran. 1997. Pathogenicity and antibiotic sensitivity of luminous *Vibrio harveyi* isolated from diseased penaeid shrimp. **J. Aquacul. Tropics**. 12: 1-8.

Akiyama, D.M., W.G. Dominy, and A.L. Lawrence. 1992. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry. pp 388. In: A.L. Fast and L.J. Lester, (Eds.), **Marine Shrimp Culture;** Principles and Practices. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam. The Netherlands.

APHA, AWWA and AWCA. 1995. **Standard Methods for the Examination Water and Wastewater**. 20th ed. United Book Press, Maryland.

Bachère, E., D. Destoumieux and P. Bulet. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptide of shrimp: a comparison with other effect of innate immunity. **Aquaculture** 191: 71-88.

Bacon, J.S.D., V.C. Farmer, D. Jones and I.F. Taylor. 1969. The glucan componnts of the cell wall of Baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in relation to its ultrastructure. **Biochem. J.** 114: 557-567

Barnes, M.E., Durben, D.J., Reeves, S.G., Sanders, R., 2006. Dietary yeast culture supplementation improves initial rearing of McConaughy strain rainbow trout. **Aquacult. Nutr**. 12, 388–394.

Baumann, P., A.L. Furniss and J.V. Lee. 1984. Section 5 facultatively anaerobic gram-negative rods. Genus I *Vibrio pacini* 1954, pp. 411. *In* N.R. Krieg and J.G. Holt, eds. **Bergey's Manaul of Systematic Bacteriology**. Williams and Wilkins. Co., Baltimore

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bell, T.A. and D.V. Lightner. 1984. IHHN virus: Infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus sytlirostris* and *Penaeus vannamei*. **Aquaculture** 38: 185-194.

Bell, K.L. and V.J. Smith. 1993. *In vitro* superoxide production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). **Dev. Comp. Immunol.** 17: 211-219.

Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 8 th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Burgents, J.E., K.G. Burnett and L.E. Burnett. 2004. Disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of yeast culture food supplement. **Aquaculture** 231: 1-8.

Campa-Córdova, A.I., N.Y. Hernandez-Saavedra, R.D. Philippin and F. Ascencio. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β-glucans and sulphated polysaccharide. **Fish Shellfish Immunol** 12: 353-366.

Chang, M.S. Su, H.Y. Chen and I.C. Liao. 2003. Dietary β-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. **Fish Shellfish Immunol**. 15: 297-310.

Chen, J.C. and S.Y. Cheng. 1993. Studies on hemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. **Comp. Biochem. Physiol.** 106: 293-296.

Chotikachinda R., W. Lapjatupon, S. Chaisilapasung, D. Sangsue and C. Tantikitti. 2008. Effect of inactive yeast cell wall on growth performance, survival rate and immune parameters in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Songklanakarin J. Sci. Technol**. 30(6): 687-692

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dall, W., B.J. Hill, P.C. Rothlisberg and D.J. Sharples. 1990. **The Biology of the Penaeidae Advances in Marine Biology** Vol. 27. Academic Press. New York, USA.

Davis, D.A. 2000. Replacement of fishmeal in practical diet for the Pacific white shrimp. **Int. Aqua Feed**. 3: 35-37.

Devaraja, T.N., S.K. Otta, G. Shubha, K. Ingrani, P. Tauro and K. Iddya. 1998. Immunostimulation of shrimp thoungh oral administration of *Vibrio* bacterin and yeast glucan pp 167-170. In T.W. Flegel, eds. Advances in **Shrimp Biotechnology**, **Proceeding to the Special Session on shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum 11-14 November 1988,** Chiangmai, Thailand.

Dijkgraaf, G.J.P., H. Li and H. Bussey. 2002. Cell wall ß–glucans of *Saccharomyces cerevisiae*, pp. 179-213. *In* S. De Baets, E.J. Vandamme and A. SteinbÜchel,eds. **Biopolymers Polysaccharides II. Polysaccharides from Eukaryotes.** Wiley-VCH, Weinheim.

Dikkeboom, R., J.M. Tijnagel, E.C. Mulder and W.P.W. Knaap. 1987. Hemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* generate reactive forms of oxygen. **J. Invertebr. Pathol.** 49: 321-331.

Djangmah, J.S. 1970. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (Fabricius). **Comp. Biochem. Physiol.** 32: 709-731.

Flicker, J. 2002. Fish meal : High protein does not stand for high quality. **Feed Int**. 23: 13-16.

Fontaine, C.T. and D.V. Lightner. 1975. Cellular response to injury in penaeid shrimp. **Mar. Fish. Rev.** 37: 4 – 19.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Foury, F., T. Roganti, N. Lecrenier and B. Purnelle. 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 440: 325-331.

Freimund, S., M. Sauter, O. kappeli and H. Dutler. 2003. A new non-degrading isolation process for 1,3- β-D-glucan of high purity from Baker's yeast *Saccharomyes cerevisiae*. **Carbohydr Polym**. 54: 159-171.

Freire Marques, M.R. and M.A. Barracco. 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture** 191: 23–44.

Fritts, C.A. and P.W. Waldroup. 2003. Evaluation of bio-mos mannan-oliigosaccharide as a replacement for growth promoting antibiotics in diet for turkeys. **Poult. Sci**. 2: 19-22.

Genc, M.A., M. Aktas and E. Yilmaz. 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth, body composition and hepatopancreas histology of *Penaeus semisulcatus* (de Haan 1844). **Aquaculture Nutrition**.13, 156-161

Gerald, R. and W. Tilak. 1991. **Yeast-Derived Products.** Yeast Technology Second Edition. Van Nostrand Reinhold 115 Fifth Avenue New York.

Graindorge V. and T.W. Flegel. 1999. **Diagnosis of Shrimp Disease with Emphasis on the Black Tiger Prawn *Penaeus monodon***. Multimedia Asia.

Hikima, S., J.I. Hikima, J. Rojtinnakorn, I. Hirono and T. Aoki. 2003. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. **Gene**. 316: 187-195.

Hird, F.J.R. 1986. The importance of arginine in evolution. **CBP.** 859: 285-288.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Holthuis, L.B. 1980. **FAO A Species Catalogue Vol.1, Shrimp and Prawns of the World.** Food and Agriculture Organization of the United Nations. 271p.

Hose, J.E., G.E. Matin, V.A. Nguyen, J. Lucus and T. Rusentein. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocyte. **Biol. Bull. Mar. Biol.** 173(1): 178-187.

Huang, C.C., K. Sritunyalucksana, K. Söderhäll and Y.L. Song. 2004. Molecular cloning and characterization of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) transglutaminase. **Dev. Comp. Immunol.** 28: 279-294.

Itami,T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira, H. Igasu and M. Kondo. 1994. Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β –1,3-glucan (Schizophyllan). *In* **Proceeding of the Third Asian Fisheries Forum Singapore 26-30 October 1992**. The Asian Fisheries Society Manila, Philippines.

Iwanaga, S. 1993. The limulus clotting reaction. **Curr. Opin. Immunol.** 5: 74-82.

Jiravanichpaisan, P., B.L. Lee and K. Soderhall. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunology** 211: 213-236.

Jiravanichpaisan, P., T. Miyazaki and C. Limsuwan. 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn, *Penaeus monodon*. **J. Aquat. Anim. Health**. 6: 27-35.

Johansson, M.W., T. Holmblad, P.O. Thornqvist, M. Cammarata, N. Parrinello and K. Soderhall. 1999. A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin, a cell adhesive peroxidase in crayfish. **J. Cell Sci**. 112: 917–925.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Johansson, M.W. and K. Soderhall. 1989. A cell adhesion factor from crayfish haemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cell. **Insect. Biochem**. 19: 183-190.

Jones, G.H. and C.E. Ballou. 1969. Studies on the structure of yeast mannan. J. Biol. Chem. 244: 1043-1051.

Keyser, P. 1999. **Crustacean Immunity: Characterization of Some Crayfish Blood Proteins**. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology.

Knaap, W.V.D. 1993. **Defense in Invertebrate in Biotol (Biotechnology by open learning).** Butterworth-Heinemanm Ltd. Linaese House, Jordan Hill, Oxford.

Lackie, A.M. 1980. Invertebrate immunity. **Parasitology** 80: 393-412.

Lavilla-Pitogo, C.R., L.J. Albright and M.G. Paner. 1998. Will microbial manipulation sustain the ecological balance in shrimp (*Penaeus monodon*) hatcheries. pp. 185-192. *In* T.W. Flegel ed. **Advances in Shrimp Biotechnology, Proceedinggs to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5 th Asian Fisheries Forum 11-14 November**, Chiang Mai, Thailand.

Lavilla-Pitogo, C.R., M.C.L. Baticados, E.R. Cruz-Lacierda and L.D. de la Pena. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. **Aquaculture** 91: 1-13.

Lee., P.G., L.L. Smith and A.L. Lawrence. 1984. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone. Relationship between enzyme activity, size and diet. **Aquaculture** 42: 225-239.

Lee, K.K., F.R. Chen and P.C. Lui. 1995. A haemocytolytic assay for tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Fish Shellfish Immunol**. 5(5): 385-387.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Le Moullac, G., A. Van Wormhoudt and AQACOP. 1994. Adaptation of digestive enzyme to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae. **Aquatic Living Resources** 7: 203-210

Leuterio, T. 1979. Amino acid supplementation of feed pellets of the giant shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*). Proceeding of the **World Mariculture Society** 10: 674-688.

Liang, Z., P. Lindblad, A. Beauvais, M.W. Johansson, J.P. Latge, M. Hall, L. Cerenius and K. Söderhäll. 1992. Crayfish a-macroglobulin and 76 kD protein; their biosynthesis and subcellular localization of the 76 kD protein. **J. Insect Physiol.** 38: 987-995.

Lightner, D.V. 1988. Disease of cultured penaeid shrimp and prowns, pp. 8-127. *In* C.S. Sinderman and D.V. Lightner (eds) **Disaese Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture,** Elsevier, Amsterdam.

Lim, C. 1993. Effect of dietary pH on amino acid utilization by shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture** 114: 293-303.

Lipke, P.N. and R. Ovalle. 1998. Cell wall architecture in yeast. **J. Bacteriol.** 180: 3735-3740

Liu, T.B., Li, A.J., Zhang, J.M., 1993. Studies on vitamin nutrition for the shrimp *Penaeus chinensis*: 10.Studies on the choline chloride and inositol requirements in the shrimp *Penaeus chinensis*. **J. Ocean Univ**. 23 (4), 67–74.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.

Luo, R. 1996. Study on the contents of serum protein and glucose in the hemolymp of the shrimp *Penaeus chinensis*. Oceanol. Limnol. **Sin Haiyang Yu Huzhao**. 27: 476-480.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Martin, G.G. and L.B. Graves. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocyte. **J. Morphol**. 185: 339-349.

Martin, G.G., D. Poole, C. Poole, J.E. Hose, M. Arias, L. Reynolds, N. Mckrell and A. Whang. 1993. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the Penaeid shrimp, Sicyonia ingentis. **J. Inver. Pathol**. 62: 308-315.

Martinez-Palacios, C.A., L.G. Ross and V.L. Jimenez. 1996. The effects of temperature and body weight on the oxygen consumption of *Penaeus vannamei* Boone, 1931. **J. Aquacult. Trop.** 11(1): 59-65.

Mckay, D. and C.R. Jenkin 1970. Immunity in the invertebrates. The role of serum factors in phagocytosis of erythocytes by haemocytes of the freshwater crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.** 48: 139-150

Miguel, J.C., S. L. Rodriguez-Zas and J. E. Pettigrew. 2004. Efficacy of a mannan oligosaccharide (Bio-Mos) for improving nursery pig performance. **J. Swine health Prod**. 12: 296-307.

Moullac, G.L., C. Soyez, D. Sauliner, D. Ansqner, J. Avarre and P. Levy. 1997. The effect of hypoxic stress on the immune response and resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. **Fish Shellfish Immunol.** 8: 621 - 629.

Parodi, A.J. 1979. Biosynthesis of yeast glycoproteins. Processing of the oligosaccharides transferred from dolichol derivatives. **J. Biol. Chem**. 254: 10051-10060.

Perazzolo, L.M. and M.A. Barracco. 1997. The prophenoloxiase activating system of yhe shrimp penaeus paulensis and associated factors. **Dev. Comp. Immunol**. 21: 385-395.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Peter, V.W. 1999. Nutrition and feeding of *Litopenaeus vannamei* in intensive culture systems, pp. 125-139, *In* **Farming Marine Shrimp in Recirculation Freshwater Systems**. Florida Department of Agriculture and Consumer Service.

Pizzutto M. and R.G. Hirast. 1995. Classification of isolates of *Vibrio harveii* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M 13 DNA fingerprinting. **Dis Aquat. Org.** 21: 61-68.

Purivirojkul, W., N. Areechon and P. Srisapoome. 2006. The effect of peptidoglycan on immune response in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 40: 181-187.

Querol A. and G. Fleet. 2006. **Yeasts in Food and Beverages. The Yeast Handbook, Volume 2**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

Raa, J., 1996. The Use of Immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. Rev. **Fisheries Science** 4 (3), 229–288.

Ratcliffe, N.A., A.F. Rowley, S.W. Fitzgerald and C.P. Rhodes. 1985. Invertebrate immuneity: basic concepts and recent advances. **Inter. Rev. Cytology**. 97: 183 - 350.

Rosenberry, B. 1993. World Shrimp Farming 1993. **Aquaculture Digest,** December 1993.

Scholz, U., G. Garcia Diaz, D. Ricque, L.E. Cruz Suarez, F. Vargas Albores and J. Latchford. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Litopenaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. **Aquaculture** 176: 271-283.

Seidman, E.R. and A.L. Lawrence. 1986. Growth, feed digestibility, and proximate body composition of *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* growth at different dissolved oxygen levels. **J. World Maricult. Soc.** 16: 333-346.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sindermann, C.J. 1990. **Principlal and disease of Marine Fish and Shellfish, 2 ed**. Academic Press.

Sipring, P., C. Wenk, K.A. Dawson and M.E. Newman. 2000. The effect of dietary mannan oligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in cecal of *Salmonella* challenged broiler chick. **J. Poult**. **Sci.** 79: 205-211.

Smith, V.J. and J.R.S. Chisholm. 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. **Fish Shellfish Immunol.** 2 (1): 1-31.

Söderhäll, K. and V.J. Smith. 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenus* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. **Dev. Comp. Immunol**. 7: 229–239.

Söderhäll, K. and L. Hall. 1984. Lipopolysacchride induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish hemocyte lysate. **Biochem. Biophys. Acta.** 797: 99-104.

Söderhäll, K. and V.J. Smith. 1986. The prophenoloxidase activating cascade as a recognition in arthropod**,** p. 251-258. *In* A. P. Gupta, eds. **Hemolytic and Humoral Immune Response in Arthropod.** John Wiley & Sons, Inc., New York.

Söderhäll, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. Annu. Rev. **J. Fish. Dis**. 2: 3–23.

Söderhäll, K., L. Cerenius and M.W. Johasson. 1996. The prophenoloxidase activating system in Invertebrates, pp. 229-253. *In* **New Directions in Invertebrate Immunology**. SOS publications, Fair Harven.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Söderhäll, K. and V.J. Smith. 1983. The prophenoloxidase activating cascade as a recognition in arthropod**,** pp. 251-258. *In* A. P. Gupta, ed. **Hemolytic and Humoral Immune Response in Arthropod.** John Wiley & Sons, Inc., New York.

Song, Y.L. and Y.T. Hsieh. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. **Dev. Comp. Immunol.** 18: 201-209.

Sritunyalucksana, K., L. Cerenius and K. Söderhäll. 1999. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Dev. Comp. Immunol.** 23(3): 179 - 186.

Sritunyalucksana, K., S.Y. Lee and K. Söderhäll. 2002. A β-1, 3-gluacn binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Dev. Comp. Immunol.** 26: 237-245.

Sung, H.H. and Y.L. Song. 1996. Tissue location of *Vibrio* antigen delivered by immersion to tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture** 145: 41-45.

Sung, H.H., Y.L. Yung and Y.L. Song. 1996. Enhancement of microcidal activity in the black tiger shrimp prawn *Penaeus monodon* via immunostimulation. **J. Crust. Biol**. 16(2): 278-284.

Supamattaya, K., J. Pongmaneerat and T. Klowklieng. 2000. The effect of ß–glucan (MacroGard®) on growth performance, immune response and disease resistance in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 22: 677-688.

Suphantharika, M., P. Khunrae, P. Thanardkit and C. Verduyn. 2003. Preparation of spent brewer's yeast ß-glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Bioresource Technol.** 88 (1): 55-60.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Suwanto, A., M. Yahana, E. Herawaty and S.L. Angka. 1998. Genetic of luminous *Vibrio* isolated from shrimp larvae, pp. 217-224. *In* T.W. Flegel ed. **Advances in Shrimp Biotechnology**, Proceeding to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum 11-14 November, Chieng Mai, Thailand.

Taylor, D. 2005. Refinement and research lead to better rearing results at the UK's National Lobster Hatchery. **Hatchery International**. p.17-19.

Terre, M., M.A. Calvo and C. Adelantado. 2007. Effects of mannan oligosaccharides on performance and microorganism fecal counts of calves following an enhanced-growth feeding program. **Anim. Feed Sci. Technol**. 137: 115-125.

Terry, T. 2001. **Phagocytosis and bacterial pathogens**. Available Source: http://www.sp.uconn.edu/~terry/Common/phago053.html, April 25, 2011.

Thanardkit, P., Khunrae, P., Suphantharika, M. and C. Verduyn. 2002. Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 18(6), 527-539.

Torrecillas, A. Makol, M.J. caballero, D. Montero and R. Gines, L. Robaina, F. Real, J. Sweetman, L. Tort and M.S. Izquierdo. 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish Shellfish Immunol.** 23: 969-981.

Vargas-Albores, P. Hinojosa-Baltazar, G. Portillo-Clark and F. Magallon-Barajas. 1998. Influence of temperature and salinity on the yellow leg shrimp. *Penaeus californisis* Holmes, phenoloxidase system. **Aquaculture** 29(8): 549-553.

Vargas-Albores, F. and G. Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. **Aquaculture** 191: 13-21.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Vasta, G. R., H. Ahmed, N.E. Fink, M.T. Elola, A.G. Marsh, A. Snowden and E.W. Odom. 1994. Animal lectin as self/non-self recognition molecules. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 712: 55-73.

Vesna, T., M. Lazarevic, Z. Sinovec and A. Tokic. 2007. The influence of different feed additives to performances and immune response in broiler chicken**. Acta Vet.** 57: 217-229.

Wang, Y.C., P.S. Chang and H.Y. Chen. 2006. Tissue distribution of prophenoloxidase transcript in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei.* **Fish Shellfish Immunol.** 20: 414-418.

White, L.A., M.C. Newman, G.L. Cromwell and M.D. Lindemann. 2002. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. **J. Anim. Sci.** 80: 2619-2628.

Wyban, J. 1992. **Special Session on Shrimp Farming.** The World Aquaculture Society Florida, USA.

Yu, J. 1993. Hemocyte classification, density and percentage of the prawn *Penaeus japonicus*. **J. Ocean-Oniv. Qingdao-Qingdao-Haiyang-Dao-xeu-Xuedao**. 23(1): 107-114.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเตรียมสารเคมี

1. ส่วนผสม K-199 (อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด) (กิจการ และคณะ , 2543 ฉ) จำนวน 100 มิลลิลิตร

M-199 สั่งซื้อจากบริษัท ใช้จำนวน	50 มิลลิลิตร
Salt mixture	10 มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10 มิลลิลิตร
$CaCl_2 . 2H_2O$	10 มิลลิลิตร
L-glutamine	1 มิลลิลิตร
Hepes	0.238 กรัม
L-cystein	5 กรัม

De-ionized water ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นตัวทำละลายสาร (ทุกตัวที่ใช้เตรียมสารเคมี)

วิธีการเตรียมสารเคมีแต่ละตัว คือ

1.1 M-199 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ส่วนที่เหลือเก็บไว้ใช้ได้ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส) โดยวิธีเตรียมคือใช้ M-199 1 ซองกับ $NaHCO_3$ 2.2 กรัม ละลายด้วยน้ำ De-ionized water ปรับปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

1.2 Salt mixture ปริมาตร10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.4 กรัม
$MgCl . 6 H_2O$	3.3 กรัม
$MgSO_4 . 7 H_2O$	3.0 กรัม
$NaH_2PO_4 . 2 H_2O$	0.05 กรัม

ปรับปริมาตรด้วย De-ionized water ให้ได้100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 11 กรัม ในน้ำ De-ionized water ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.4 $CaCl_2 . 2 H_2O$ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ละลาย $CaCl_2 . 2 H_2O$ 0.9 กรัม ในน้ำ De-ionized water ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.5 L-glutamine ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

L-glutamine 0.015 กรัม ผสมกับน้ำ De-ionized water 1 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

1.6 Hepes จำนวน 0.238 กรัม

1.7 L-cystein จำนวน 5 กรัม

วิธีการเตรียม K-199 จำนวน 100 มิลลิลิตร โดย นำสารละลายจากข้อ 1.1- 1.7 ผสมกันตามลำดับ ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ De-ionized water ปรับพีเอช ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ให้พีเอชอยู่ในช่วง 7.3-7.6 กรองด้วยหัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตรใน Laminar flow

2. Shrimp saline

โซเดียมคลอไรด์	28.4	กรัม
$MgCl_2 \bullet 6H_2O$	1.0	กรัม
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	2.0	กรัม
$CaCl_2 \bullet 2H_2O$	2.25	กรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โพแทสเซียมคลอไรด์	0.7	กรัม
Glucose (Dextrose)	1.0	กรัม
Hepes	2.38	กรัม

ผสมสารทั้งหมดในน้ำ De-ionized water 1 ลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 ไมโครเมตรในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และอบให้แห้ง เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียม Heat-killed yeast

Baker's yeast
0.9 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์
shrimp saline

นำ Baker's yeast ละลายใน 0.9 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ ต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้าง yeast ด้วย shrimp saline ที่ 3,000 rpm. 5 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง shrimp saline : yeast เท่ากับ 1 : 1 หลังจากนั้นละลายด้วย shrimp saline เพื่อให้ได้สารละลายที่มีเซลล์จำนวน 5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมสารละลาย phosphate buffer 0.01 โมลต่อลิตร พีเอช 7.0

KH_2PO_4 1.3609 กรัม ปรับปริมาตรด้วย De-ionized water ให้ได้1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

5. การเตรียมสารในชุดการทดลองสำเร็จรูป (test kit) RANSOD$^{@}$ Superoxide dismutase

5.1) สารละลาย Reagent 1 (R_{1a}) ทำการเติมสารละลาย R_{1b} ลงในขวดสาร R_{1a} ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.2) สารละลาย Reagent 2 (R_2) ทำหน้าที่เป็น Xanthine oxidase (enzyme) โดยเติมน้ำกลั่นชนิด tri-distilled water ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

5.3) สารละลายมาตรฐาน CAL standard (S_6) โดยเติมน้ำกลั่นชนิด tri-distilled water ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวอริสา ศรีหมากสุก
วัน เดือน ปี ที่เกิด	11 มิถุนายน 2531
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์