การใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนในอาหารต่อการเจริญเติบโต การตอบสนองทางโลหิตวิทยา และภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

DIETARY SINGLE CELLS PROTEIN ON GROWTH PERFORMANCE, HEMATOLOGY AND IMMUNE RESPONSE IN PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)

เดชวัฒน์ พูนนวล

DACHAWAT POONNUAL

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2561

KMITL-2018-AG-M-081-282

การใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนในอาหารต่อการเจริญเติบโต การตอบสนองทางโลหิตวิทยา และภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

DIETARY SINGLE CELLS PROTEIN ON GROWTH PERFORMANCE, HEMATOLOGY AND IMMUNE RESPONSE IN PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)

เดชวัฒน์ พูนนวล

DACHAWAT POONNUAL

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2561

KMITL-2018-AG-M-081-282

DIETARY SINGLE CELLS PROTEIN ON GROWTH PERFORMANCE, HEMATOLOGY AND IMMUNE RESPONSE IN PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)

DACHAWAT POONNUAL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FISHERIES SCIENCE

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2018

KMITL-2018-AG-M-081-282

COPYRIGHT 2018

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนในอาหารต่อการเจริญเติบโต การตอบสนองทางโลหิตวิทยาและภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)
นักศึกษา	นายเดชวัฒน์ พูนนวล
รหัสประจำตัว	59604032
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การประมง
พ.ศ.	2561
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา ทวีกิจการ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.นรธัช ประชุม

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของซิงเกิลเซลล์โปรตีน (Single cells protein; SCP) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการหมักเพื่อผลิตไลซีนสังเคราะห์ ผงชูรสและเอทานอลในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยทำการทดลองในระดับต่างๆ ดังนี้ 0 (กลุ่มควบคุม), 2.5, 5, 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแต่ละการทดลองใช้สูตรอาหารที่มีระดับโปรตีนและไขมันใกล้เคียงกัน (38-40 เปอร์เซ็นต์โปรตีน และ 8-10 เปอร์เซ็นต์ไขมัน) ทำการเลี้ยงในระบบน้ำหมุนเวียน ให้อาหารแบบเต็มอิ่มวันละ 4 มื้อ

การใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในกุ้งขาว น้ำหนักเริ่มต้น 5.79±0.14 กรัมต่อตัว เป็นระยะเวลา 45 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ที่ระดับการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ 5 เปอร์เซ็นต์ กุ้งขาวมีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยมีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (WG) อัตราการแลกเนื้อ (FCR) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) การใช้ประโยชน์ได้จากอาหารและองค์ประกอบทางเคมีในกุ้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเลี้ยงกุ้งขาวด้วยอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์เพิ่มขึ้น พบว่า อัตราการแลกเนื้อมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และการเจริญเติบโตมีแนวโน้มลดลง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) นอกจากนี้ ที่ระดับการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีน

สังเคราะห์ 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาเซลล์ (SGC) และกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) สูงกว่ากลุ่มควบคุม (P<0.05)

การใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในกุ้งขาว น้ำหนักเริ่มต้นระหว่าง 10.16-10.28 กรัมต่อตัว เป็นระยะเวลา 45 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ที่ระดับการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส 2.5 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตในกุ้ง โดยมีค่าน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ดีกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มการทดลองอื่นๆ (P<0.05) ที่ระดับ 2.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมีแนวโน้มสูงขึ้น โดยมีจำนวนเม็ดเลือดรวม (THC) เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ (HC) เม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลลาร์เซลล์ และกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม (P<0.05)

การใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการหมักเอทานอล (YP) ในกุ้งขาว น้ำหนักเริ่มต้น 1.02±0.01 กรัมต่อตัว เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ที่ระดับการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการหมักเอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์ได้จากอาหารและองค์ประกอบทางเคมีในกุ้ง (P>0.05) ในขณะที่ค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองต่อค่าภูมิคุ้มกันมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยมีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวม เม็ดลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ เม็ดเลือดชนิดลาร์จแกรนูลาร์เซลล์ (LGC) กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และประสิทธิภาพการกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากระบบไหลเวียนเลือด (clearance efficiency) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม (P<0.05)

ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากผลพลอยได้ในกระบวนการผลิตจากโรงงานอุตสาหกรรมทั้ง 3 ชนิด มาใช้เป็นแหล่งโปรตีนในสูตรอาหารกุ้งขาวและอุตสาหกรรมอาหารสัตว์น้ำได้ โดยผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ สามารถใช้ได้ไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์ ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสสามารถใช้ได้ไม่เกิน 2.5 เปอร์เซ็นต์ และผลพลอยได้จากกระบวนการหมักเอทานอลสามารถใช้ได้ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากความสมดุลของกรดอะมิโนในซิงเกิลเซลล์โปรตีนมีความแตกต่างกัน ซึ่งในการศึกษาครั้งต่อไปควรทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏของสารอาหารรวมถึงกรดอะมิโน

Thesis Title	Dietary single cells protein on growth performance, hematology and immune response in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)
Student	Mr. Dachawat Poonnual
Student ID	59604032
Degree	Master of Science
Program	Fisheries Science
Year	2018
Thesis Advisor	Paveena Taveekijakarn, Asst. Dr.
Thesis Co-Advisor	Noratat Prachum, Dr.

ABSTRACT

In this study, the single cells protein (SCP), by-product from fermentation process of (i) Synthetic lysine by-product (SLP), (ii) Monosodium glutamate by-product (MSGP) and (iii) Dried yeast ethanol by-product (YP), were investigated in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) diet. Five isonitrogenous and isolipidic (38-40% CP and 8-10% CL) diets were formulated using different inclusion levels of SCP meal (0, 2.5, 5, 7.5 and 10 %, respectively). Shrimps were fed four times a day until the visual satiation.

The first experiment, SLP was tested in shrimp with an average body weight of 5.79±0.14 g shrimp^{-1} for 45 days. At the end of study, the results showed that a group of shrimps fed with 5% of SLP had the highest growth performance. Moreover, there was not a significant difference in the weight gain (WG), feed conversion ratio (FCR), specific growth rate (SGR), feed utilization and chemical compositions in carcass of shrimps compared to control ($P>0.05$). However, the results indicate that increased dietary SLP affected to feed FCR and growth performance ($P>0.05$). Morever, the shrimp treated with 5% dietary SLP which displayed semi-granulocyte (SGC) and superoxide anion activity (O_2^-) higher then control ($P<0.05$).

The second experiment, the using of MSGP in shrimps diet (10.16-10.28 g shrimp^{-1} initial weight) were used and were randomized fed at five different diets for 45 days. At the end of study, a group of shrimps fed of 2.5% MSGP had higher in final weight (FW), weight gain, and specific growth rate than other treatment ($P<0.05$). Moreover, the hematology and immune

responses of 2.5% MSGP increased and higher than control (i.e. THC, HC, SGC and O_2^-) (P<0.05).

The final experiment, the YP was utilized to use the ingredeint. A 12-week feeding trial was conducted with shrimp (mean weight, 1.02±0.01 g shrimp^{-1}) in tank. This study showed all treatments had no significant differences on growth, feed utilization and chemical compositions in carcass (P>0.05). Moreover, increases of hematology and immune response (i.e. THC, LGC, O_2^- and clearance efficiency) were observed in the group of shrimps fed with 10% YP (P<0.05).

In summary, all 3 type of SCP by-product meal can be used instead of exiting protein sources in shrimp diet and aquafeeds. The results of 3 experimental showed that SLP can be used 5%, MSGP 2.5 % and YP 10% respectively of dietary inclusion. The suggestion that were tested apparent digestibility of nutrient and amino acid profile.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา ทวีกิจการ ซึ่งได้กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ให้แก่ข้าพเจ้าและได้ให้คำแนะนำในการวางแผนการดำเนินงานทดลองการแก้ปัญหา และช่วยตรวจสอบแก้ไขจนกระทั่งสำเร็จออกมาเป็นรูปเล่มวิทยานิพนธ์อย่างสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ดร.นรธัช ประชุม ได้สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการเรียนตลอดจนวัสดุอุปกรณ์สำหรับใช้ในการดำเนินงานและให้คำแนะนำในการศึกษาครั้งนี้ตลอดมา จนกระทั่งการทดลองสำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณ คุณบุปผา จงพัฒน์ และว่าที่ร้อยตรีหญิงสุรีวัลย์ ศรีจาด ซึ่งได้กรุณาให้ความช่วยเหลือและให้ความรู้เกี่ยวกับการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์และสารเคมีต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องสมุด ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในการศึกษา ค้นคว้าข้อมูลเอกสารอ้างอิง และมีส่วนช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องซึ่งได้สนับสนุนทุนทรัพย์ในการศึกษาเล่าเรียนมาโดยตลอดและขอขอบพระคุณทุกๆ คนในครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจให้ตลอดระยะเวลาในการศึกษา

เดชวัฒน์ พูนนวล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ III
กิตติกรรมประกาศ V
สารบัญ VI
สารบัญตาราง IX
สารบัญภาพ XI
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ 3
1.3 ขอบเขตของการศึกษา 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 กุ้งขาวแวนนาไม (*L. vannamei*) 4
2.2 ความต้องการอาหารและโปรตีนของกุ้ง 4
2.3 ซิงเกิลเซลล์โปรตีน (Single cells protein) 5
2.3.1 ชนิดของซิงเกิลเซลล์โปรตีน 6
2.3.2 ขั้นตอนการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีน 8
2.3.3 คุณค่าทางโภชนาการของซิงเกิลเซลล์โปรตีน 11
2.4 ผลของซิงเกิลเซลล์โปรตีนในอาหารสัตว์น้ำต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏ 14
2.4.1 ผลของซิงเกิลเซลล์โปรตีนในอาหารสัตว์น้ำต่อการเจริญเติบโต 14
2.4.2 ผลของซิงเกิลเซลล์โปรตีนในอาหารสัตว์น้ำต่อประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏ 16
2.5 ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม 17
2.5.1 กลไกการป้องกันตัวเองโดยโครงสร้างภายนอกร่างกาย (external defense mechanism) 18

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.2 กลไกการป้องกันตัวเองโดยโครงสร้างภายในร่างกาย (internal defense mechanism) 18
2.6 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง 28
2.6.1 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) 28
2.6.2 อนุพันธุ์หรือสารประกอบที่ได้จากยีสต์ (yeast derivative) 31
2.6.3 สารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ (nutritional factors) 32
2.6.4 สารสกัดจากสัตว์ (animal extract) 33
2.6.5 สารสกัดจากพืช (plant extract) 33
2.7 ผลของการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนในอาหารสัตว์น้ำต่อค่าทางโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน 35

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 37
3.1 อุปกรณ์ 37
3.2 สารเคมี 38
3.3 สัตว์ทดลอง 39
3.4 เชื้อแบคทีเรีย 39
3.5 ซิงเกิลเซลล์โปรตีนที่ใช้ในสูตรอาหารทดลอง 39
3.6 สถานที่ทำการวิจัย 39
3.7 วิธีการ 39
3.7.1 การวางแผนการทดลอง 39
3.7.2 ขั้นตอนการดำเนินงาน 40
3.7.3 การวิเคราะห์ข้อมูล 45

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 53

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1 การใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียในสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว ……………………......... 53

4.1.1 การทดลองที่ 1 การใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ในอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว …... 53

4.1.2 การทดลองที่ 2 การใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสในอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว ……….. 60

4.2 การใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากกากยีสต์ในสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว ..…………………………………... 70

4.2.1 การทดลองที่ 3 การใช้กากยีสต์ในสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว …………………………........... 70

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ ……………………………………………… 79

บรรณานุกรม ……………………………………………………………………………. 80

ภาคผนวก ……………………………………………………………………………….... 94

ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์ ……………………………………………………………. 95

ภาคผนวก ข คุณภาพน้ำ ………………………………………………………………… 122

ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลอง ………………………………………………………. 125

ประวัติผู้เขียน ……………………………………………………………………………. 156

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณค่าทางโภชนาการของซิงเกิลเซลล์โปรตีน (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) ………..	12
2.2	องค์ประกอบทางเคมีของซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากจุลินทรีย์ (%, as dry basis)…..:	13
3.1	องค์ประกอบทางเคมี และกรดอะมิโน ของแหล่งโปรตีนที่ใช้ในอาหาร ทดลอง (%, as dry basis) ………………………………………………………...	46
3.2	สูตรอาหารและองค์ประกอบทางเคมีในอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน (%, as dry basis) …..…………………………………………	47
3.3	กรดอะมิโนในอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน …………...	48
3.4	สูตรอาหารและองค์ประกอบทางเคมีในอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในระดับที่แตกต่างกัน (%, as dry basis) …..…………………………………………...……….	49
3.5	กรดอะมิโนในอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในระดับที่แตกต่างกัน ………….…………..	50
3.6	สูตรอาหารและองค์ประกอบทางเคมีในอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่มีการใช้กากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน (%, as dry basis) …………...……	51
3.7	กรดอะมิโนในอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่มีการใช้กากยีสต์ (YP)ในระดับที่แตกต่างกัน ………………………………………………………………	52
4.1	ผลของการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว ระยะเวลาการเลี้ยง 45 วัน (mean ± SD, n = 3) ……...	54

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.2	องค์ประกอบทางเคมีในกุ้งที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน (%, wet weight, mean ± SD, n = 3) …………………………………………………………	54
4.3	ผลของการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว ระยะเวลาการเลี้ยง 45 วัน (mean ± SD, n = 3) ……………...	61
4.4	องค์ประกอบทางเคมีในกุ้งที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ใน ระดับที่แตกต่างกัน (%, wet weight, mean ± SD, n = 3) ……	61
4.5	ผลของการใช้กากยีสต์ (YP) ต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาวระยะเวลาการเลี้ยง 12 สัปดาห์ (mean ± SD, n = 3) ………………………………………………	70
4.6	องค์ประกอบทางเคมีในกุ้งที่ได้รับอาหารที่มีกากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน(%, wet weight mean ± SD, n = 3) ……………………........………	71

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ขั้นตอนการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีน	10
2.2	ขั้นตอนการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากยีสต์สายพันธุ์ *Yerrowea lipolytica*	11
2.3	กลไกการป้องกันตัวของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง	19
2.4	ลักษณะ รูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆ ของกุ้ง A; ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ×280 B; ย้อมด้วย Geimsa' strain x560 (H = hyaline cell, LGC = large granular cell และ SGC = semi-granular cell)	20
2.5	การทำงานของโปรตีนเพอร์รอคซิเนคติน (peroxinectins)	25
2.6	ระบบป้องกันตัวของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนเมื่อได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน	29
2.7	โครงสร้างของเปปติโดไกลแคน	31
2.8	โครงสร้างของเบต้ากลูแคน	32
4.1	จำนวนเม็ดเลือดรวม (THC) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n=3)	55
4.2	A; เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ (HC), B; เม็ดเลือดชนิดลาร์จแกรนูลาเซลล์ (LGC) และ C; เม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาเซลล์ (SGC) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n=3)	56
4.3	กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n=3)	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.4	กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n=3) ………………………………...……	57
4.5	กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytosis activity) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n=3) ……………………	58
4.6	กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง (bactericidal activity) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n=3)..………………………………..	58
4.7	จำนวนเม็ดเลือดรวม (THC) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n=3) ……	62
4.8	A; เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ (HC), B; เม็ดเลือดชนิดลาร์จแกรนูลาเซลล์ (LGC) และ C; เม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาเซลล์ (SGC) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3) ………………………………………………………...	63
4.9	กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3) ……………..……………………….…….	64
4.10	กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3) ……………………...……………………....	64

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.11 กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytosis activity) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3) 65

4.12 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง (bactericidal activity) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3) 65

4.13 จำนวนเม็ดเลือดรวม (THC) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการใช้กากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3) 71

4.14 A; เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ (HC), B; เม็ดเลือดชนิดลาร์จแกรนูลาเซลล์ (LGC) และ C; เม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาเซลล์ (SGC) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการใช้กากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3)...... 72

4.15 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการใช้กากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3) 73

4.16 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการใช้กากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3) 74

4.17 กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytosis activity) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการใช้กากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3) 74

4.18 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง (bactericidal activity) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการใช้กากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3).... 75

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.19	ความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง (clearance efficiency) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการใช้กากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3)	75

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งมีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากได้รับความนิยมจากผู้บริโภคอย่างกว้างขวาง ซึ่งสามารถทำเงินรายได้เข้าสู่ประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท โดยในปี พ.ศ. 2559 มีการส่งออกกุ้งเป็นสินค้าลำดับต้นๆ ของประเทศ ซึ่งมีปริมาณการส่งออกที่สูงถึง 3.8 แสนตัน และนำเงินเข้าสู่ประเทศสูงถึงประมาณ 9 หมื่นล้านบาท ประเทศผู้ซื้อที่สำคัญของไทย ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น แคนาดา สหภาพยุโรป ออสเตรเลีย และอีกหลายประเทศในภูมิภาคเอเชีย (สมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย, 2559) โดยกุ้งที่ส่งออกเกือบทั้งหมดเป็นกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งกรมประมงได้อนุญาตให้นำเข้ามาเลี้ยงในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 และมีการขยายตัวด้านการเพาะเลี้ยงอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งปัจจุบันเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่เปลี่ยนจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำมาเลี้ยงกุ้งขาว เนื่องจากกุ้งขาวสามารถเจริญเติบโตรวดเร็ว เลี้ยงได้หนาแน่น ต้องการโปรตีนจากอาหารต่ำ ทนต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มและอุณหภูมิต่ำได้ดี รวมทั้งสมบูรณ์พันธุ์ได้ในบ่อดินและตอบสนองต่อการปรับปรุงพันธุ์ได้ดี ในปัจจุบันเกษตรกรมีการปล่อยลูกกุ้งในอัตราความหนาแน่นสูง จึงจำเป็นต้องให้อาหารสำเร็จรูปในปริมาณมาก แต่อย่างไรก็ตาม กุ้งขาวสามารถเลี้ยงได้เกือบทั่วโลกทำให้เกษตรกรมีผลตอบแทนไม่สูงนัก ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลตอบแทนที่สูงขึ้นเกษตรกรจึงจำเป็นต้องลดต้นทุนให้ได้มากที่สุด โดยเฉพาะค่าอาหารซึ่งคิดเป็นร้อยละ 30-70 ของต้นทุนรวม แต่เป็นที่ทราบกันดีว่าอาหารมีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโต อัตรารอดและผลผลิตของสัตว์น้ำรวมทั้งกุ้ง ซึ่งหากมีการจัดการไม่ถูกต้องอาจทำให้กุ้งเจริญเติบโตช้าและทำให้ต้นทุนการผลิตต่อหน่วยสูงขึ้น

ปัจจัยสำคัญที่ทำให้การเลี้ยงกุ้งขาวมีการเจริญเติบโตดี และแข็งแรง คือ อาหารที่นำมาเลี้ยงกุ้งนั้นต้องมีคุณค่าทางโภชนาการต่าง ๆ ที่เหมาะสมครบถ้วน และเพียงพอต่อความต้องการของกุ้ง โดยเฉพาะโปรตีนนับเป็นโภชนาการที่สำคัญอย่างยิ่งที่สัตว์น้ำต้องการเพื่อใช้เป็นสารอาหารสำหรับร่างกายในการสร้างเนื้อ และอวัยวะต่างๆ รวมถึงเอนไซม์ ฮอร์โมน สารภูมิคุ้มกันและสารพันธุกรรม (อมรรัตน์ และคณะ, 2548) โดยความต้องการโปรตีนของกุ้งจะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิด อายุ และปัจจัยต่างๆ ซึ่งวัตถุดิบหลักที่นิยมใช้เป็นแหล่งโปรตีนส่วนใหญ่ได้จากสัตว์ เช่น วัตถุดิบจากปลาป่น (fish meal) เนื่องจากมีโปรตีนสูง มีรสชาติที่สัตว์น้ำชอบ มีการย่อยได้สูง มีความสมดุลของกรดอะมิโนและกรดไขมันที่จำเป็น แต่ปัจจุบันปริมาณปลาป่นที่ผลิตได้ในปี พ.ศ.

2553 มีเพียง 12 เปอร์เซ็นต์ ของแหล่งโปรตีนทั้งหมด ซึ่งลดลงเหลือเพียง 8 เปอร์เซ็นต์ ในปี พ.ศ. 2558 และมีแนวโน้มลดลงเหลือเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ ในปี พ.ศ. 2563 ตามลำดับ (Tacon and Metain, 2008) ส่งผลให้ปลาป่นมีแนวโน้มหาได้ยากขึ้น ประกอบกับมีราคาที่เพิ่มสูงขึ้นตามผลผลิตปลาป่นที่ลดลง ทำให้คุณภาพไม่คงที่ มีการปลอมปน และยังเป็นสาเหตุของปัญหาการเกิด overfishing หลาย ๆ ประเทศจึงให้ความสนใจกับแหล่งโปรตีนใหม่เพื่อใช้ในสูตรอาหาร หนึ่งในแหล่งโปรตีนที่น่าสนใจ คือ ซิงเกิลเซลล์โปรตีน หรือโปรตีนเซลล์เดียว เป็นโปรตีนที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ ยีสต์ (yeast) แบคทีเรีย (bacteria) รา (fungi) และสาหร่าย (algae) (Adedayo et al., 2011) ซึ่งไม่จำเป็นจะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีเซลล์เดียว (unicellular cell) แต่รวมถึงจุลินทรีย์ที่มีหลายเซลล์ (multicellular cell) (ชุตินุช และคณะ, 2557) ซึ่งโปรตีนในวัตถุดิบที่เป็นซิงเกิลเซลล์โปรตีน พบว่า แบคทีเรีย มีโปรตีนสูง (50-65 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ ยีสต์ (45-55 เปอร์เซ็นต์) และเชื้อรา (30-45 เปอร์เซ็นต์) (Adedayo et al., 2011) เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ เนื่องจากสามารถผลิตได้ในช่วงระยะเวลาที่สั้น ต้นทุนในการผลิตและพื้นที่ที่ใช้ในการผลิตน้อยกว่าการผลิตโปรตีนจากพืชและสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบที่หาได้ง่ายและราคาถูก

ปัจจุบันได้มีการนำส่วนประกอบแบคทีเรียและยีสต์ที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมการผลิตต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์ด้วยกันหลายรูปแบบ เช่น นำมาทำเป็นปุ๋ย นำมาทำเป็นอาหารสัตว์น้ำ ซึ่งมีทั้งในรูปแบบของเหลว และรูปแบบแห้ง แบคทีเรียและยีสต์ที่ใช้เป็นเซลล์ที่ตายแล้วคงเหลือไว้แต่ผนังเซลล์ ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพ ย่อยสลายได้ทันที เหมาะอย่างยิ่งที่จะนำมาเป็นอาหารสัตว์น้ำ (Barnes et al., 2006) ในปัจจุบันได้มีการนำแบคทีเรียและยีสต์มาเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ หรือใช้เป็นแหล่งโปรตีนทางเลือก เพื่อประโยชน์ 2 ทางด้วยกัน คือ เป็นแหล่งโปรตีน และในอีกแง่หนึ่งคือเพื่อเป็นตัวช่วยเสริมสุขภาพของสัตว์น้ำซึ่งจะทำให้สัตว์น้ำแข็งแรง และมีภูมิต้านทานโรคสูงขึ้นเพื่อลดโอกาสที่จะป่วยจากอาการติดเชื้อโรค (Raa et al, 1996)

การศึกษาผลของการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีน ในอาหารสัตว์น้ำรวมทั้งกุ้งขาวยังมีไม่มากนัก การศึกษาในครั้งนี้จึงมีการนำซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและยีสต์) เพื่อใช้ในสูตรอาหารสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาวในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียและกากยีสต์ดังกล่าวมีโปรตีนที่สำคัญและมีสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ไลโพโพลีแซคคาร์ไรด์ (lipopolysaccharide) เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) และเบต้ากลูแคน (β-glucan) ในปริมาณสูง จึงอาจช่วยในการกระตุ้นการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน เพื่อเพิ่มความสามารถของกุ้งในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นแนวทางเบื้องต้นในการพิจารณานำโปรตีนจากจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและยีสต์) ที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมต่าง ๆ ดังนี้ ผลพลอยได้จากการผลิตไลซีนสังเคราะห์ ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส และผลพลอยได้จากกระบวนการหมักเอทานอลโดยยีสต์

(*Saccharomyces cerevisiae*) มาใช้เป็นแหล่งโปรตีนในสูตรอาหารกุ้ง ซึ่งสามารถลดต้นทุนการผลิต และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มการเจริญเติบโต และความแข็งแรงให้แก่กุ้งขาวแวนนาไมในระดับฟาร์มเพาะเลี้ยงต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียและยีสต์ในสูตรอาหารต่อ

1) ประสิทธิภาพการใช้อาหารและการเจริญเติบโตของกุ้งขาว
2) ค่าโลหิตวิทยาของกุ้งขาว
3) การตอบสนองทางค่าภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

ศึกษาการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียและยีสต์ในสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) โดยใช้อาหารที่มีการคำนวณให้มีระดับโปรตีนและไขมันใกล้เคียงกัน แบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ดังนี้ 0 (กลุ่มควบคุม), 2.5, 5.0, 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนในสูตรอาหาร สามารถเพิ่มการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) และสามารถนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการผลิตอาหารกุ้งขาวในระดับฟาร์มเพาะเลี้ยงต่อไป

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

กุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*) หรือที่นิยมเรียกกันว่า กุ้งขาวไวนาไม เป็นกุ้งทะเลเขตร้อนที่มีถิ่นกำเนิดบริเวณชายฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิกตั้งแต่ตอนเหนือของประเทศแมกซิโกไปจนถึงตอนเหนือของประเทศเปรู (Sookying, 2010) มีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในประเทศเอกวาดอร์ แมกซิโก เปรู ปานามา ฮอนดูรัส โคลัมเบีย บราซิล เป็นต้น (Rosenberry, 1993) กุ้งชนิดนี้มีลำตัวและขาสีขาว หางและหนวดสีแดง สำหรับประเทศไทยกรมประมงได้อนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ จากต่างประเทศมาทดลองเลี้ยงใน ปี พ.ศ. 2545 และมีการศึกษาการดำรงชีวิตและปรับปรุงระบบการเพาะเลี้ยงจนสำเร็จ โดยประเทศไทยสามารถเลี้ยงกุ้งได้ทั้งปี มีอัตรารอดสูงเจริญเติบโตได้รวดเร็ว เลี้ยงได้หนาแน่น อีกทั้งทนต่อความเค็มและอุณหภูมิต่ำได้ดีทำให้เกษตรกรจำนวนมากหันมาเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมากขึ้น

2.2 ความต้องการอาหารและโปรตีนของกุ้ง

อาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่สัตว์น้ำกินเข้าไปแล้วเกิดประโยชน์ต่อร่างกาย เพื่อใช้ซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ เสริมสร้างการเจริญเติบโตให้แก่ร่างกาย และช่วยให้กระบวนการต่าง ๆ ในการดำเนินชีวิตเป็นไปได้อย่างปกติ ในอาหารของกุ้งมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งเรียกว่าสารอาหาร ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามิน และเกลือแร่ ซึ่งในอาหารแต่ละชนิดจะมีปริมาณสารอาหารที่แตกต่างกัน ความต้องการอาหารของกุ้งโดยทั่วไปเช่นเดียวกับสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ คือ มีความต้องการโปรตีนเพื่อใช้บำรุงร่างกายให้อยู่ในสภาพที่ปกติ และสร้างความเจริญให้แก่ร่างกาย (อมรรัตน์ และคณะ, 2548) สัตว์น้ำมีความต้องการโปรตีนมากถึง 30-50 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักอาหาร (NRC, 2011) เพราะเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย ในการสร้าง เนื้อ หนัง อวัยวะต่าง ๆ เอนไซม์ ฮอร์โมน สารภูมิคุ้มกัน และสารพันธุกรรม โดยโปรตีนประกอบด้วยส่วนย่อยที่เรียกว่า กรดอะมิโน (amino acid) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acid) ที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ และกรดอะมิโนไม่จำเป็น (non-essential amino acid) เป็นกรดอะมิโนที่ร่างการสามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ จึงไม่จำเป็นต้องมีในอาหารสัตว์น้ำ สัตว์น้ำต้องได้รับกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทุกตัวในปริมาณที่เพียงพอ จึงทำให้

ร่างกายสร้างโปรตีนได้ โปรตีนที่ดีจะทำให้สัตว์น้ำเจริญเติบโตดี และควรมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้ง 10 ชนิดในปริมาณที่สมดุล (อมรัตน์ และคณะ, 2548) สำหรับกุ้งขาวมีความต้องการโปรตีนประมาณ 35-50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร (Vijayakumar et al., 2009)

ปัจจุบันการใช้แหล่งโปรตีนทางเลือกชนิดอื่น ๆ สำหรับการผลิตอาหารเลี้ยงกุ้งเป็นหัวข้อที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เนื่องจากราคาของปลาป่นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นตามปริมาณผลผลิตปลาป่นที่ลดลง ซึ่งสถานการณ์การผลิตปลาป่น ในปี พ.ศ. 2559 มีปริมาณลดลง และยังประสบกับปัญหาจากการทำประมงที่ผิดกฎหมาย (IUU) ส่งผลให้เกิดปัญหา overfishing ทำให้ผลผลิตปลาป่นมีแนวโน้มไม่เพียงพอต่อความต้องการ (สมาคมผู้ผลิตปลาป่นไทย, 2559) และในปัจจุบัน Tacon and Metain (2008) กล่าวว่า ปริมาณปลาป่นที่ผลิตได้ลดลงจาก 12 เปอร์เซ็นต์ ในปี พ.ศ. 2553 เหลือเพียง 8 เปอร์เซ็นต์ ในปี พ.ศ. 2558 และมีแนวโน้มลดลงเหลือเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ ในปี พ.ศ. 2563 ตามลำดับ แม้ว่ามีงานวิจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้ด้วยแหล่งโปรตีนทางเลือกต่าง ๆ หลายชนิด เช่น แหล่งโปรตีนจากเนื้อและกระดูกป่น ผลพลอยได้จากสัตว์ปีก (Yang et al., 2004) กากถั่วเหลือง (Davis and Arnold, 2000) แหล่งโปรตีนจากเนื้อหมู (Hernádez et al., 2008) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามวัตถุดิบบางชนิดไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตอาหารเชิงพาณิชย์ เนื่องจากไม่สะดวกในการจัดหาทั้งปริมาณและระยะเวลา อีกทั้งยังมีสารต้านโภชนศาสตร์ และแหล่งวัตถุดิบประการหนึ่งที่หลาย ๆ ประเทศ ให้ความสนใจเพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนทางเลือกในสูตรอาหาร คือ แหล่งโปรตีนจากโปรตีนเซลล์เดียว หรือที่เรียกว่า ซิงเกิลเซลล์โปรตีน (single cells protein)

2.3 ซิงเกิลเซลล์โปรตีน (Single cells protein)

ซิงเกิลเซลล์โปรตีน หรือโปรตีนเซลล์เดียว เป็นโปรตีนที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตในลักษณะเซลล์เดียวหรือเส้นใย จุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นแหล่งซิงเกิลเซลล์โปรตีน ได้แก่ ยีสต์ แบคทีเรีย รา และสาหร่าย (Adedayo et al, 2011) ซึ่งไม่จำเป็นจะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีเซลล์เดียว (unicellular cell) แต่รวมถึงจุลินทรีย์ที่มีหลายเซลล์ (multicellular cell) (ชุตินุช และคณะ, 2557) จากการวิเคราะห์โปรตีนในวัตถุดิบ พบว่า แบคทีเรีย มีโปรตีนสูงสุด (50-65 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ ยีสต์ (45-55 เปอร์เซ็นต์) และรา (30-45 เปอร์เซ็นต์) (Adedayo et al., 2011)

2.3.1 ชนิดของซิงเกิลเซลล์โปรตีน

1) แบคทีเรีย (bacteria)

แบคทีเรียที่ใช้สำหรับการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีน ต้องมีคุณสมบัติที่เหมาะสม คือ จะต้องเจริญเติบโตได้รวดเร็วในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เป็น 2 เท่า ในระยะเวลา 20 นาที ถึง 2 ชั่วโมง และสามารถเจริญเติบโตได้จากคาร์โบไฮเดรตจากวัตถุดิบที่หลากหลาย เช่น แป้งและน้ำตาลจากการหมัก และไฮโดรคาร์บอนเหลว ซึ่งรวมไปถึงมีเทน (methane) และวัตถุดิบที่ได้จากการผลิตปิโตรเลียม ปิโตรเคมี (petrochemicals) เช่น เมทานอล (methanol) และ เอทานอล (ethanol) แหล่งของไนโตรเจน โดยแบคทีเรียสามารถใช้สำหรับการเจริญเติบโตได้รวมถึง แอมโมเนีย (ammonia) แอมโมเนียม (ammonium) ยูเรีย (urea) ไนเตรท (nitrate) ซึ่งเหล่านี้เป็นสารอินทรีย์ในของเสีย (Bamberg, 2000) และจากการรายงานของ Arora et al. (1991) กล่าวว่า การใช้แบคทีเรียที่สามารถใช้แก๊สมีเทนได้ และแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ เพื่อใช้สำหรับการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีนจะใช้ระยะเวลาในการ methylophilusis ประมาณ 2 ชั่วโมง ซึ่งมีการนำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์และเป็นโปรตีนที่ดีกว่ายีสต์และรา แต่อย่างไรก็ตาม Bamberg, (2000) รายงานว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีการสังเคราะห์แสงได้เองนั้นสามารถนำมาใช้ในการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีนได้เช่นกัน

มีงานวิจัยหลายฉบับที่ศึกษาการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนที่ได้จากแบคทีเรียในอุตสาหกรรมการผลิตต่าง ๆ เช่น แบคทีเรียสายพันธุ์ *Brevibacterium* ที่เลี้ยงโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์และไนโตรเจนจากกระบวนการหมักเมทานอล (Adedayo et al., 2011) แบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylopilus methylitropous, Acromobacter delvaeate, Acinetobacter calcoacenticus, Aeromonas hydrophilla, Bacillus megaterium*, *B. subtilis* (Gomashe et al., 2014) *Lactobacillus species, Cellulomonas species, Methylomonas methylotropus* (Piper, 2004) *Psudomonas fluorescens, Rhodopsudomonas capsulate, Flavobacterium species, Thermomonospora fusca* (Dhanasekaran et al., 2011) ที่เลี้ยงโดยใช้แหล่งพลังงาน คาร์บอนไดออกไซด์ ไนโตรเจน แอมโมเนียม แอมโมเนีย และยูเรียจากของเสียในอุตสาหกรรมการเกษตร แบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylococcus copsulatus* ที่เลี้ยงโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์และไนโตรเจนจากกระบวนการผลิตมีเทน (Aas et al., 2006a,b) แบคทีเรียสายพันธุ์ *M. copsulatus, Alcaligenus acidovorans, B. brevis* และ *B. firmus* ที่เลี้ยงโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์และไนโตรเจนจากกระบวนการผลิตโปรตีนสังเคราะห์ (Berge et al., 2005) แบคทีเรียสายพันธุ์ *Microccocus glutamicus, Artrobacter, B. lactofermentum, Corynebacterium glutamicum, C. calcunae, C. herculis, B. falvum, B. divericarium, B. thiogenitalis, Microbacterium ammoniphilum* ที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (Abe et al., 1967)

และแบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia coli* และ *Aerobector aerogenes* ที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (Marrakchi et al., 2008) เป็นต้น

2) ยีสต์ (yeast)

ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากยีสต์เป็นแหล่งโปรตีนที่มีสารอาหารสูงและเป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพ และยังมีคุณสมบัติการเป็นอาหารเสริมชีวนะ (prebiotic) (Burgents et al., 2004) อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (Raa et al., 1996) เนื่องจากผนังเซลล์ของยีสต์ประกอบด้วย แมนแนน (mannan) 30 เปอร์เซ็นต์ เบต้ากลูแคน (bata- glucan) 55 – 60 เปอร์เซ็นต์ ไคติน (chitin) 1-2 เปอร์เซ็นต์ (Klis et al., 2002, Zhao et al., 2017) เหมาะสำหรับนำมาผลิตอาหารสัตว์ ซึ่งมีการใช้ยีสต์หลายสายพันธุ์ในการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีน เช่น ยีสต์สายพันธุ์ *Candida* (Bozakouk, 2002 และ Øverland et al., 2013) *Hansenula, Pitchia, Torulopsis Saccharomyces, Kluyveromyces marxianus* (Tacon et al., 2009; Tanveer, 2010 และ Øverland et al., 2013) จากกระบวนการผลิตเอททานอล สุรา และเบียร์ จากการรายงานของ Tanveer, (2010) ได้ทำการศึกษาโดยการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีน โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* เลี้ยงในกากผลไม้ (fruit waste) ซึ่งเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่นเดียวกับ Sengupta et al. (2006) ได้ศึกษาการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งทำการผลิตโดยใช้แตงกวาและเปลือกส้มเป็นตัวตั้งต้นในกระบวนการผลิตโดยวิธีการหมักในอาหารเหลว (submerged fermentation)

3) สาหร่าย (algae)

สาหร่ายที่นิยมนำมาใช้สำหรับการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีน คือ สาหร่ายสไปรูลิน่า (*Spirulina*) เนื่องจากทำการเพาะเลี้ยงได้ง่าย มีการเจริญเติบโตได้รวดเร็ว และมีปริมาณโปรตีนสูง (Raja et al., 2008) อีกทั้งยังอุดมไปด้วย วิตามิน แร่ธาตุ กรดไขมันที่จำเป็น (essential fatty acid) เช่น แกรม่าไลโนเลอิกแอซิด (grama-linolenic acid) และ สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เช่น แคโรทีนอยด์ (carotenoid) อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียในอาหารสัตว์น้ำได้ (Macias-Sancho et al., 2014) จึงสามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้หลายๆ งานวิจัยได้ทำการศึกษาโดยใช้สาหร่ายในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เช่น การใช้สาหร่ายสไปรูลิน่า *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) และ การใช้ *Haematococus pluvialis* จากผลพลอยได้จากการสกัดแอสตาแซนทิน (astaxanthin) ในสูตรอาหารกุ้ง (Macias-Sancho et al., 2014 และ Ju et al., 2012) อีกทั้งยังมีการศึกษาการใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าในสูตรอาหารของปลาหลายชนิด เช่น Parrot fish (*Oplegnathus faciatus*) ปลาสเตอร์เจียน (*Asipenser baeri*) ปลาคาร์ป (*Cyprinus carpio* L.)

และปลาดุกแอฟริกัน (*Clarias gariepenus*) (Kim et al., 2013; Palmegiano et al., 2008; Abdulrahman and Hamad Ameen, 2014 และ Promya and Chitmanat, 2011) เป็นต้น

4) รา (fungi)

รา หรือ เส้นใยของรา หลายสายพันธุ์มีการนำมาใช้สำหรับผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีน เช่น *Chaetomium celluloliticum* , *Fusarium graminearum* (Zubi, 2005) *Aspergillus niger*, *Aspergilus fumigates, Aspergilus oryzae, Cephalosporium cichorniae, Penicillium cyclopium, Rhizopus chinensis, Scytalidum aciduphlium, Tricoderma virudae, Tricoderma alba, Paecilomyces varioti* (Yousuf, 2012 และ Jaganmohan et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตาม จากการรายงานของ Suman et al. (2015) กล่าวว่า *Actinomycetes* และเส้นใยของรา สามารถผลิตโปรตีนจากสารตั้งต้น (substrate) ได้หลายชนิด แต่อย่างไรก็ตาม ราหรือเส้นใยของราบางสายพันธุ์ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ เช่น *Aspergillus niger*, *Aspergilus fumigates* และ *Fusarium graminearum* เชื้อราดังกล่าวจึงไม่มีการนำมาใช้หรือจำเป็นต้องมีการประเมินพิษวิทยาก่อนนำมาผลิตเป็นซิงเกิลเซลล์โปรตีน

2.3.2 ขั้นตอนการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีน

ผลผลิตของซิงเกิลเซลล์โปรตีนเกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก (Chandrani-Wijeyaratne and Tayathilake, 2000) โดยทำการเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับวัตถุดิบในกระบวนการผลิตโดยมีเทคนิคในการมุ่งเน้นของการเจริญเติบโตและปริมาณของเซลล์ แล้วนำเข้าสู่กระบวนการแยกเซลล์ ซึ่งในการพัฒนากระบวนการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีนเริ่มต้นด้วยการคัดเลือกจุลินทรีย์ ซึ่งสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมอาจได้มาจากตัวอย่างดิน น้ำ อากาศ สารอนินทรีย์ กระบวนการทางชีวภาพ และการคัดเลือกสายพันธุ์ เช่น การกลายพันธุ์หรือ พันธุกรรมอื่นๆ เป็นต้น นอกจากนี้กระบวนการทางวิศวกรรมและเทคโนโลยีอุปกรณ์ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มความสามารถของกระบวนการผลิตให้ได้ผลผลิตในปริมาณที่สูง ซึ่งเหล่านี้เป็นปัจจัยสำคัญทางเศรษฐกิจ (พลังงานและต้นทุน) ขณะเดียวกันในการผลิตต้องคำนึงถึงความปลอดภัยและสิ่งแวดล้อม ซึ่งถือว่าเป็นเรื่องสำคัญในการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีนทั้งในกระบวนการผลิตและผลผลิต โดยความปลอดภัยและการป้องกันควบคุมการใช้นวัตกรรมที่ก่อให้เกิดปัญหาด้านกฎหมาย ได้แก่ ใบอนุญาตดำเนินงาน การอนุมัติผลิตภัณฑ์ และการคุ้มครองตามกฎหมายของกระบวนการใหม่และสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

ซิงเกิลเซลล์โปรตีนสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักหลายวิธี ได้แก่

1) การหมักด้วยอาหารเหลว (submerged fermentation)

ในกระบวนการหมักด้วยอาหารเหลว สารตั้งต้นที่ใช้สำหรับกระบวนการหมักอยู่ในสถานะของเหลวที่มีสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต ซึ่งเครื่องหมักมีการทำงานตลอดเวลาและผลิตได้อย่างต่อเนื่อง โดยมีเทคนิคแตกต่างกันผลผลิตที่ได้จะผ่านการกรองหรือปั่นเหวี่ยงและทำให้แห้ง มักมีการเติมอากาศเป็นส่วนสำคัญในการเพาะเลี้ยง และอาจเกิดความร้อนในขณะเลี้ยงโดยมีวิธีกำจัดออกด้วยเครื่องทำความเย็น (Varavinit et al., 1996) การเก็บผลผลิตจุลินทรีย์นั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ซิงเกิลเซลล์โปรตีน จำพวกยีสต์ และแบคทีเรีย สามารถเก็บโดยการปั่นเหวี่ยง ในขณะที่ ซิงเกิลเซลล์โปรตีน จำพวกราเก็บเกี่ยวโดยการกรอง และปัจจัยสำคัญในการเก็บเกี่ยวจำเป็นต้องนำน้ำออกให้มากที่สุดก่อนน้ำไปทำให้แห้งและต้องคำนึงถึงความสะอาดและถูกสุขลักษณะ (Kargi et al., 2005) (ภาพที่ 2.1) อย่างไรก็ตาม อาหารหมักแบบเหลวเหมาะสำหรับการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีน เนื่องจากเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย หรือ ยีสต์ เป็นต้น (Capalbo et al., 2001)

2) การหมักด้วยอาหารกึ่งแข็ง (semisolid fermentation)

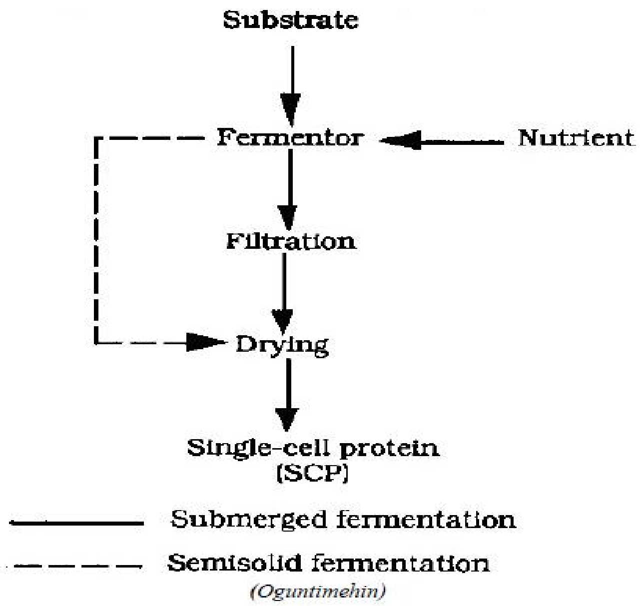
ในกระบวนการหมักด้วยอาหารกึ่งแข็งมีการใช้กากมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้นในการทำอาหารแข็ง ในกระบวนการหมักด้วยอาหารเหลวมักมีต้นทุนในการผลิตสูง (Adedayo et al., 2011) ในกระบวนการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีนเกี่ยวข้องกับการผสม การคน ระบบมัลติเฟส (multiphase system) การขนส่งออกซิเจนผ่านของเหลวไปยังจุลินทรีย์ และกระบวนการส่งผ่านความร้อนจากของเหลวไปยังรอบๆ ไบโอรีแอคเตอร์ (bioreactor) (Anderson and Jorgensen, 2005) ซึ่งถูกออกแบบมาเพื่อช่วยในการขนส่งมวลและพลังงานเรียกว่า UV-loop fermentor ในการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีนนั้นเกี่ยวข้องกับการเตรียมอาหารให้เหมาะสมกับแหล่งคาร์บอนและตัวหมัก (fermentor) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก (Soland, 2005) โดยแหล่งคาร์บอนที่สามารถนำมาใช้ในกระบวนการหมักได้ เช่น อัลคีน ไฮโดรคาร์บอน เมทานอล และเอทานอล ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สามารถนำมาใช้ได้เช่นเดียวกับคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) โพลีแซคคาร์ไรด์ (polysaccharide) น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์ และสารตั้งต้นจากของแข็งอื่นๆ (Talebnia, 2008) (ภาพที่ 2.1)

3) การหมักด้วยอาหารแข็ง (solid state fermentation)

กระบวนการหมักด้วยอาหารแบบแข็งมีการศึกษาอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับประเภทของไบโอรีแอคเตอร์ (bioreactor) ที่ใช้ในกระบวนการผลิตและการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์

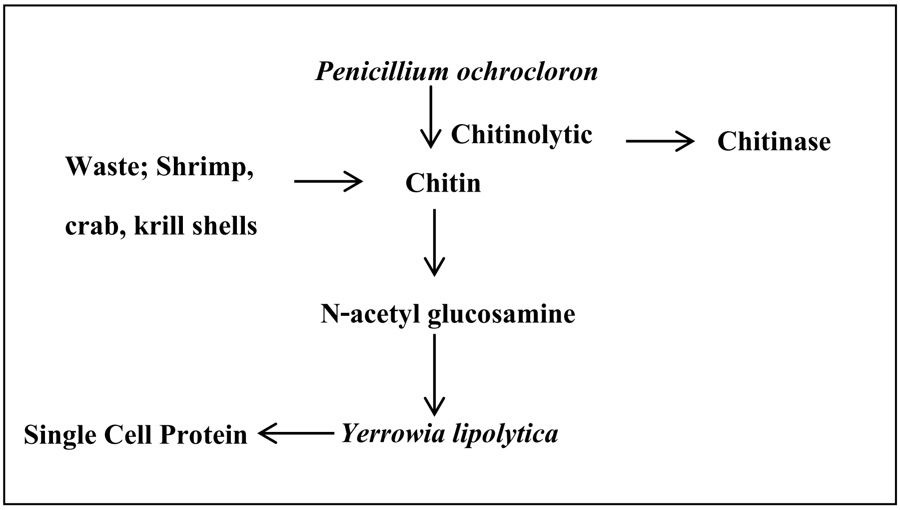
เช่น ซิงเกิลเซลล์โปรตีน อาหาร เอนไซม์ เอทานอล (ethanol) กรดอินทรีย์ (organic acid) วิตามินบีรวม (B-complex vitamins) เม็ดสี (pigment) และ สารเพิ่มกลิ่น (flavours) (Singhania et al., 2009) เป็นต้น

จากการศึกษาของ Patil and Jadhav (2014) ในการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีน โดยการใช้เอนไซม์ไคตินเนสจากรา *Penicillium ochrocloron* เพื่อย่อยไคตินจากเปลือกกุ้งซึ่งเป็นของเสียในอุตสาหกรรมอาหารทะเล ได้เป็น N-acetylglucosamine ที่เป็นองค์ประกอบของไคตินในเปลือกกุ้ง และมีการใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Yerrowia lipolytica* ในการใช้ประโยชน์จาก N-acetylglucosamine เพื่อผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีน (ภาพที่ 2.2) และใช้ในสูตรอาหารปลา *Lipidocephalus thermasis*



ภาพที่ 2.1 ขั้นตอนในการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีน

ที่มา : Adedayo et al. (2011)



ภาพที่ 2.2 ขั้นตอนในการผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากยีสต์สายพันธุ์ *Yerrowia lipolytica*
ที่มา : Patil and Jadhav (2014)

2.3.3 คุณค่าทางโภชนาการของซิงเกิลเซลล์โปรตีน

การประเมินคุณค่าทางโภชนาการของซิงเกิลเซลล์โปรตีน ปัจจัยที่สำคัญ คือ องค์ประกอบทางเคมีของสารอาหาร กรดอะมิโน วิตามิน และกรดนิวคลีอิก รวมทั้งรสชาติ กลิ่น และ ประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏ ปริมาณที่เหมาะสม และระยะเวลาในการเลี้ยง เนื่องจากอาจจะส่งผลทางด้านพิษวิทยา (Toxicological) และอาจก่อให้เกิดการเป็นมะเร็ง (carcinogenesis) ได้ (Adedayo et al., 2011) คุณค่าทางโภชนาการของซิงเกิลเซลล์โปรตีนจะแตกต่างกันตามชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิต โดยทั่วไปประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เถ้า น้ำ และแร่ธาตุอื่น ๆ เช่น ฟอสฟอรัส (phosphorus) และโพแทสเซียม (potassium) ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิต และยังมีองค์ประกอบทางเคมีบางชนิดใกล้เคียงกับถั่วเหลือง (soybean meal) และ ปลาป่น (fish meal) โดยมีปริมาณโปรตีนสูง ปริมาณไขมันต่ำและเป็นแหล่งของวิตามิน โดยเฉพาะ วิตามินบีรวม (B complex) อีกทั้งยังมีองค์ประกอบของกรดอะมิโน ไทอามีน (thiamine) ไรโบฟลาวิน (riboflavin) กลูต้าไทโอล (glutatione) กรดฟอลิก (folic acid) และ กรดอะมิโนอื่น ๆ ซึ่งซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากยีสต์และรามีโปรตีนสูงถึง 50-55 เปอร์เซ็นต์ และมีคาร์โบไฮเดรตเทียบเท่ากับอาหารสัตว์ อีกทั้งยังมีปริมาณไลซีน (lysine) สูง แต่มีประมาณเมทไทโอนีน (methionine) และซีสทีอีน (cysteine) ต่ำ ในขณะที่ Suman et al. (2015) กล่าวว่า ซิงเกิลเซลล์โปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรียมีโปรตีนสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าจะมีกรดกำมะถัน (sulphur) และยังมีปริมาณกรดนิวคลีอิกสูง แต่อย่างไรก็ดี ปัจจุบันซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากยีสต์มีบทบาทมากขึ้นในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากมีองค์ประกอบของสารอาหาร

ที่สมบูรณ์และยังสามารถผลิตได้จำนวนมาก โดยซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากยีสต์มีการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Olivera-Novoa et al., 2002 และ Li and Gatlin, 2003) และบางสายพันธุ์สามารถใช้เป็นโปรไบโอติกได้ เช่น *S. cerevisiae* (Olive-Teles and Goncalves, 2001) และ *Debaryomyces hansenii* (Tovar et al., 2002)

จากการรายงานของ Adedayo et al., (2011) ได้ทำการวิเคราะห์โปรตีนในวัตถุดิบ พบว่า แบคทีเรีย มีโปรตีนสูงสุด (50-65เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ สาหร่าย (40-60 เปอร์เซ็นต์) ยีสต์ (45-55 เปอร์เซ็นต์) และเชื้อรา (30-45 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (ตารางที่ 2.1) โดยปริมาณสารอาหารจากซิงเกิลเซลล์โปรตีนอาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และสารตั้งต้นที่นำมาใช้เพื่อผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีนด้วย (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางโภชนาการของซิงเกิลเซลล์โปรตีน (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)

Nutrients	Fungi	Algae	Yeast	Bacteria
Protein	30-45	40-60	45-55	55-60
Fat	2-8	7-20	2-6	1.5-3.0
Ash	9-14	8-10	5-9.5	3-7
Nucleic Acid	7-10	3-8	6-12	8-12

ที่มา: Adedayo et al. (2011)

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีของซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากจุลินทรีย์ (%, as dry basis)

Ingredients	Crude protein	Crude Lipid	Crude Fiber	Ash	Moisture	Reference
Bacteria						
Aneurinibacillus sp.	70.20	10.30	N/A	8.10	4.10	Skrede et al. (1998)
Methylococcus copsulatus	67.00	9.90	N/A	6.40	5.70	Aas et al. (2006a)
Methylococcus copsulatus	69.50	8.10	N/A	6.20	6.50	Aas et al. (2006b)
Yeast						
Brewer's yeast	44.00	9.50	3.00	3.57	8.00	NRC (2011)
Brewer's yeast	46.10	1.30	2.90	8.10	7.60	Tacon et al. (2009)
Brewers' dried	42.60	1.00	3.20	6.60	7.00	NRC (2011)
Candida utilis	56.00	0.3	N/A	5.4	6.30	Øverland et al. (2013)
Kluyveromyces marxianus	51.10	0.8	N/A	7.6	6.10	Øverland et al. (2013)
Saccharomyces cerevisiae	46.00	0.2	N/A	6.4	3.20	Øverland et al. (2013)
Torula dried	49.00	1.50	2.20	7.70	7.00	NRC (2011)
Yeast extract	62.95	0.90	N/A	22.59	9.00	Zhao et al. (2017)
Algae						
Artrospira platensis (*Spirulina*)	66.93	1.75	1.77	8.70	N/A	Macias-Sancho et al.(2014)
Spirulina	57.50	7.70	3.60	6.20	7.00	NRC (2011)
Fungi						
Curcuma sp.	30-70	5-13	N/A	N/A	4.5-6.0	Srividya et al. (2013)
Aspergillus oryzae MCCT1846	43.00	N/A	N/A	N/A	N/A	Ravindra et al. (2009)
Aspergillus oryzae MCCT1842	39.20	N/A	N/A	N/A	N/A	Ravindra et al. (2009)
Trichoderma viride NRRL1186	44.00	N/A	N/A	N/A	N/A	Ravindra et al. (2009)
Rhizopus oligosporus	41.02	2.35	5.12	5.90	2.88	Yunus et al. (2015)

2.4 ผลของซิงเกิลเซลล์โปรตีนในอาหารสัตว์น้ำต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏ

2.4.1 ผลของซิงเกิลเซลล์โปรตีนในอาหารสัตว์น้ำต่อการเจริญเติบโต

จากการรายงานของ Zhao et al. (2017) ได้ทำการทดลองโดยใช้แหล่งโปรตีนจากยีสต์สกัด (yeast extract) ในสูตรอาหารเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) น้ำหนักเฉลี่ย 6.33±0.33 กรัมต่อตัว ซึ่งทำการเลี้ยงในกระชัง ระยะเวลาการเลี้ยง 42 วัน โดยมีระดับโปรตีนในอาหาร 40 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 7 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สามารถใช้ยีสต์สกัดในสูตรอาหารได้ 13 เปอร์เซ็นต์ โดยมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการรอดไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ยีสต์สกัดในระดับที่สูงขึ้น การเจริญเติบโตมีแนวโน้มลดลง ในขณะที่ Patil and Jadhav (2014) ได้ทำการศึกษาโดยการใช้เอนไซม์ไคติเนสของ *Penicillium ochrocloron* ในการย่อยไคตินจากเปลือกกุ้ง โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Yerrowia lipolytica* เพื่อผลิตซิงเกิลเซลล์โปรตีนสำหรับใช้ในสูตรอาหารปลา *Lipidocephalus thermasis* พบว่า สามารถใช้ในสูตรอาหารได้ 23.2 เปอร์เซ็นต์ โดยแสดงค่าการเจริญเติบโตของปลา *L. thermasis* สูงสุดซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$)

จากการรายงานของ Aas et al. (2006b) ได้ทำการศึกษาผลของโปรตีนจากแบคทีเรีย (bacterial protein meal; BPM) สายพันธุ์ *Methylopilus copsulatus* ซึ่งทำการเลี้ยงโดยใช้แหล่งพลังงานจากแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียจากกระบวนการผลิตมีเทน และนำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนในสูตรอาหารปลาเรนโบว์เทร้า น้ำหนักเฉลี่ย 361±0.8 กรัมต่อตัว ระยะเวลาการเลี้ยง 83 วัน โดยมีระดับโปรตีนในอาหารเป็นแบบ isonitrogenous (50 เปอร์เซ็นต์โปรตีน) และระดับพลังงานเป็นแบบ isoenergetic (25 MJ/Kg) รายงานว่า สามารถใช้ในสูตรอาหารปลาเรนโบว์เทร้าได้ถึง 27 เปอร์เซ็นต์ โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด และประสิทธิภาพการกินอาหาร ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Aas et al. (2006a) ได้ทำการศึกษาผลของโปรตีนจากแบคทีเรีย สายพันธุ์ *Methylopilus copsulatus* จากกระบวนการผลิตมีเทนเช่นกัน โดยนำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนในสูตรอาหารปลา Atlantic salmon รายงานว่า สามารถใช้ในสูตรอาหารได้ 18 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม การใช้แหล่งโปรตีนจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylopilus copsulatus* จากกระบวนการผลิตมีเทนในระดับที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มของค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและประสิทธิภาพการกินอาหารลดลง เช่นเดียวกับ Berge et al. (2005) ได้ทำการศึกษาโดยใช้แหล่งโปรตีนจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylopilus copsulatus* ซึ่งทำการเลี้ยงโดยใช้แหล่งพลังงานจาก

แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียจากกระบวนการผลิตโปรตีนสังเคราะห์ในสูตรอาหารของปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) พบว่า สามารถใช้ได้ในสูตรอาหารเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่ส่งผลในเชิงลบต่อการเจริญเติบโต โดยมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการแลกเนื้อไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม (P>0.05) นอกจากนี้ Storebakken et al. (2004) ใช้แหล่งโปรตีนจากแบคทีเรียในสูตรอาหารปลา Atlantic salmon เปรียบเทียบกับปลาป่น พบว่า ที่ระดับการใช้โปรตีนจากแบคทีเรีย 20 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) แต่อัตราการแลกเนื้อ ไม่มีความแตกต่างกัน (P>0.05)

Vijayakumar et al. (2009) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากรา (fungi) สายพันธุ์ *Aspergillus* ในการหมักแป้งถั่วเหลือง แป้งสาลี น้ำมันถั่วเลือง และน้ำมันงา ในสัดส่วน 4:3:2:1 และมีการเติมเชื้อ *Aspergillus* 10 มิลลิลิตรต่อสารตั้งต้น 50 กรัม ทำการหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใช้ในสูตรอาหารกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) น้ำหนักเฉลี่ย 0.33±0.07 กรัมต่อตัว ระยะเวลาการเลี้ยง 52 วัน โดยมีระดับโปรตีนในอาหาร 39.95±0.38 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สามารถใช้ในสูตรอาหารได้ 25 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ เพิ่มขึ้น และอัตราการแลกเนื้อดีที่สุด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม (P<0.05)

จากการรายงานของ Ju et al. (2012) ได้ทำการทดลองโดยใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากสาหร่ายขนาดเล็ก *Microalgae (Haematococcus pluvialis)* meal โดย *Haemotococcus pluvialis* เป็นผลพลอยได้จากการสกัดแอสตาแซนทินและนำมาใช้ในสูตรอาหารกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 1.0 กรัมต่อตัว ระยะเวลาการเลี้ยง 56 วัน พบว่า สามารถใช้ในสูตรอาหารได้เพียง 3 เปอร์เซ็นต์ โดยแสดงค่า น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเพิ่มขึ้น และอัตราการแลกเนื้อดีที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ในขณะที่ Kim et al. (2013) ได้ทำการศึกษาโดยใช้แหล่งโปรตีนเซลล์เดียวจากสาหร่าย *Spirulina pacifica* ในสูตรอาหารของ Parrot fish (*Oplegnathus faciatus*) น้ำหนักเฉลี่ย 57±0.1 กรัมต่อตัว ระยะเวลาการเลี้ยง 56 วัน โดยมีระดับโปรตีนในอาหารเป็นแบบ isonitrogenous (48 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน) และ isocaloric (17.1 MJ/Kg gross energy) พบว่า สามารถใช้ในสูตรอาหารได้ 3.4 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน ประสิทธิภาพการกินอาหารเพิ่มขึ้น และมีค่าอัตราการแลกเนื้อดีที่สุด

จากการศึกษาของ Gamboa-Delgado et al. (2016) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ทอรูล่ายีสต์ (*Candida utilis*) ในสูตรอาหารกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) รายงานว่า สามารถใช้ในสูตรอาหารได้ได้ถึง 50.9 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่า น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตรารอด ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม (P>0.05)

Ozório et al. (2012) รายงานถึงผลของการใช้กากยีสต์ (*Saccharomyces cerevisae*) ในสูตรอาหารปลานิล (*Oreochomis niloticus*) ระยะ juvenile น้ำหนักเฉลี่ย 7.6±0.3 กรัมต่อตัว โดยมีการให้อาหารที่มีระดับโปรตีนในอาหารเป็นแบบ isonitrogenous (27 เปอร์เซ็นต์โปรตีน) และ isoeneretic (19 kJ/g) รายงานว่า สามารถใช้กากยีสต์ในสูตรอาหารปลานิลได้ 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่ส่งผลในเชิงลบต่อการเจริญเติบโต ขณะที่ Øverland et al. (2013) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจาก *Candida utilis, Kluyeromy marxianus* และ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นแหล่งโปรตีนในสูตรอาหารปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) พบว่า สามารถใช้ *Candida utilis, Kluyeromy marxianus* และ *S. cerevisiae* ในสูตรอาหารได้ (28.3, 30.2 และ 34.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) โดยมีค่าน้ำหนักสุดท้าย อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการแลกเนื้อแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับปลาป่น (P<0.05) อย่างไรก็ตาม Hoseinifar et al. (2011) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ยีสต์ (*S. cerevisiae* ver. *ellipsoideus*) ในปลาสเตอร์เจียน (*Hosu huso*) โดยเสริมในอาหารที่ระดับ 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีค่าน้ำหนักสุดท้าย อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเพิ่มขึ้นและอัตราการแลกเนื้อดีที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (P<0.05) อย่างไรก็ดีมีรายงานการเสริมยีสต์ (brewer's yeast) และ GroBiotic®-A ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) พบว่า ที่ระดับการเสริมยีสต์ 5 เปอร์เซ็นต์ ไม่ส่งผลในเชิงลบต่อการเจริญเติบโต (Li et al., 2009)

2.4.2 ผลของซิงเกิลเซลล์โปรตีนในอาหารสัตว์น้ำต่อประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏ

จากการศึกษาของ Aas et al. (2006a) ได้ทำการศึกษาผลของซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylopilus copsulatus* ในสูตรอาหารปลาเรนโบว์เทร้า น้ำหนักเฉลี่ย 361±0.8 กรัมต่อตัว ระยะเวลาการเลี้ยง 83 วัน พบว่า ที่ระดับการใช้ 27 เปอร์เซ็นต์ มีค่าประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏของอาหาร (โปรตีน) มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม (P<0.05) ในขณะที่ Kaushik and Luquet (1980) ได้ทำการศึกษาโดยใช้แหล่งโปรตีนจากแบคทีเรียในสูตรอาหารปลาเรนโบว์เทร้า (*Salmo gairdnerii*) น้ำหนักเฉลี่ย 16-17 กรัมต่อตัว ระยะเวลาการเลี้ยง 16 สัปดาห์ พบว่า ที่ระดับการใช้แหล่งโปรตีนจากแบคทีเรียในระดับที่สูงขึ้นมีแนวโน้มของประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏของโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (P>0.05) แต่อย่างไรก็ตาม Berge et al. (2005) ได้ทำการศึกษาผลของโปรตีนจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *M. copsulatus*, *Alcaligenes acidovorans, Bacillus brevis* และ *Bacillus firmus* จากกระบวนการหมักแก๊สธรรมชาติเพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนจากแบคทีเรียในสูตรอาหารปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) น้ำหนักเฉลี่ย 1.4 กิโลกรัมต่อตัว ระยะเวลาการเลี้ยง 5 เดือน พบว่า ที่ระดับการใช้ 20

เปอร์เซ็นต์ มีค่าประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏของโปรตีน (83.1 เปอร์เซ็นต์) ไขมัน (84 เปอร์เซ็นต์) และพลังงาน (78.6 เปอร์เซ็นต์) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม (P>0.05)

Vijayakumar et al. (2009) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากราสายพันธุ์ *Aspergillus* sp. ในการหมักแป้งถั่วเหลือง แป้งสาลี น้ำมันถั่วเลือง และน้ำมันงา เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในสูตรอาหารกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) น้ำหนักเฉลี่ย 0.33±0.07 กรัมต่อตัว ระยะเวลาการเลี้ยง 52 วัน พบว่า การใช้แหล่งโปรตีนจากรามีค่าประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏของโปรตีนและไขมันเพิ่มขึ้น (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม (P<0.05)

ในขณะที่ Zhao et al. (2017) ได้ทำการทดลองโดยใช้แหล่งโปรตีนจากยีสต์สกัดในสูตรอาหารกุ้งขาว น้ำหนักเฉลี่ย 6.33±0.33 กรัมต่อตัว ซึ่งทำการเลี้ยงในกระชัง ระยะเวลาการเลี้ยง 42 วัน โดยมีระดับโปรตีนในอาหาร 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การใช้แหล่งโปรตีนจากยีสต์สกัดในสูตรอาหารมีค่าประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏของโปรตีนเพิ่มขึ้นตามระดับการใช้ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม (P<0.05) ขณะที่ Øverland et al. (2013) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากยีสต์สายพันธุ์ *Candida utilis, Kluyveromyces marxianus* และ *Saccharomyces cerevisiae* ในสูตรอาหารปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) น้ำหนักเฉลี่ย 28 กรัมต่อตัว ระยะเวลาการเลี้ยง 89 วัน พบว่า แหล่งโปรตีนจากยีสต์สายพันธุ์ *Candida utilis, Kluyveromyces marxianus* ประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏของโปรตีนมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม (P>0.05) ในขณะที่ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากยีสต์สยพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* มีประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏของโปรตีนเพียง 72.6 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05) แต่อย่างไรก็ดี Oliva-Teles and Gonçalves (2001) รายงานการใช้ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisae*) ในสูตรอาหารปลากะพง (*Dicentrarchus labrax*) ระยะ juvenile น้ำหนักเฉลี่ย 12 กรัมต่อตัว ระยะเวลาการเลี้ยง 12 สัปดาห์ พบว่า การใช้ในสูตรอาหารในระดับที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มของประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏของโปรตีนลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และสามารถใช้ในสูตรอาหารได้ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏของโปรตีน (มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์) ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม (P>0.05)

2.5 ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวเป็นสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในกลุ่มครัสเตเชียน (crustacean) มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immune response) เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune response) ในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย สิ่งมีชีวิตในกลุ่มนี้มีระบบเลือดแบบเปิด (open circulatory system) รายงานว่า เมื่อสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายจะมี

ระบบภูมิคุ้มกันและกลไกในการป้องกันตัวเองทั้งการตอบสนองที่ทำงานโดยเซลล์ (cellular immune response) และของเหลวในน้ำเลือด (humeral immune response) (Chen et al., 2014)

กุ้งมีกลไกในการป้องกันตัวเองจากสิ่งแปลกปลอมหรือสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค โดยมีเม็ดเลือดเป็นศูนย์กลาง การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สำคัญเกิดจากกิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือด น้ำเลือด และเนื้อเยื่อ (Söderhäll and Cerenius, 1992) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลไก คือ

2.5.1 กลไกการป้องกันตัวเองโดยโครงสร้างภายนอกของร่างกาย (external defense mechanism)

กุ้งมีโครงสร้างแข็งภายนอกเป็นสารพวกไคติน (chithin) และไคโตซาน (chitosan) โดยบริเวณเนื้อเยื่อภายใต้โครงสร้างปกคลุมที่เรียกว่า เปลือก จะมีเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างเมือก (mucopolysaccharide หรือ mucous) และหลั่งสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส (protease inhibitor) ที่สร้างจากเชื้อก่อโรคได้ นอกจากนี้ในขณะที่กุ้งลอกคราบ (moulting) เพื่อการเจริญเติบโต กุ้งก็สามารถกำจัดปรสิตบริเวณผิวตัวออกไปพร้อมกับเปลือกแข็งด้วย (Söderhäll and Cerenius, 1992)

2.5.2 กลไกการป้องกันตัวภายในร่างกาย (internal defense mechanism)

เมื่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคเข้าสู่ร่างกายของกุ้ง กุ้งจะมีการตอบสนองภายในร่างกาย 2 ระบบ คือ (ภาพที่ 2.3)

2.5.2.1 การตอบสนองภูมิคุ้มกันโดยอาศัยเซลล์ (cellular immune response)

การตอบสนองภูมิคุ้มกันโดยอาศัยเซลล์ อาศัยการทำงานของเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ซึ่งเม็ดเลือดเป็นองค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์โดยตรงและสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงสุขภาพกุ้งได้ดี Hose et al. (1990) และ Moullac et al. (1997) ได้จำแนกเม็ดเลือดกุ้งออกเป็น 3 แบบ ตามการมีหรือไม่มีแกรนูล ขนาดของเซลล์ การติดสีและโครงสร้างของแกรนูลในไซโตพลาสซึม ได้แก่ (ภาพที่ 2.4)

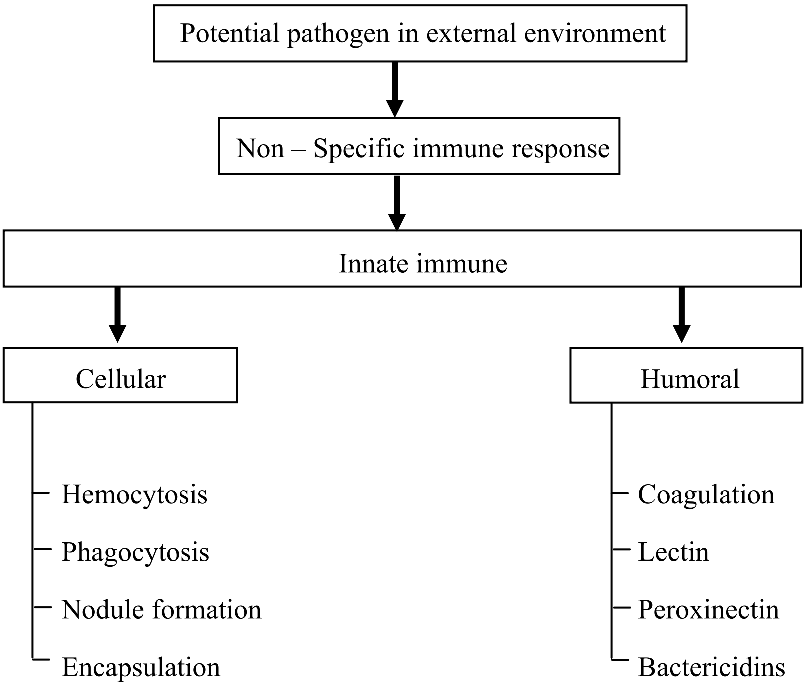
1) ไฮยาลินเซลล์ (hyaline cells) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด รูปร่างแบน กลม ผิวเรียบ บางครั้งอาจพบคล้ายรูปกระสวย หรือเสี้ยวพระจันทร์ มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ตรงกลางเซลล์ ทำหน้าที่เกี่ยวกับการกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยกระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) (Söderhäll and smith, 1986)

2) เซมิแกรนูลาร์เซลล์ (semi-granular cells) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีรูปร่างเป็นรูปไข่ หรือกระสวย นิวเคลียสอยู่ตรงกลางหรือขอบ ทำหน้าที่โดยตรงในการห้อมล้อมและทำลายสิ่ง

แปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคได้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation รวมทั้งในกระบวนการ prophenoloxidase activating system และเซลล์เม็ดเลือดชนิดนี้ ยังสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการกลืนกินได้ด้วย (Söderhäll and Cerenius, 1992)

3) ลาร์จแกรนูลาร์เซลล์ (large granular cells) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด รูปร่างเป็นรูปไข่คล้ายเซมิแกรนูลาร์เซลล์ แต่ขนาดของเซลล์จะใหญ่กว่า มีนิวเคลียสอยู่บริเวณขอบเซลล์มีหน้าที่หลักในการทำงานในกระบวนการ prophenoloxidase activating system รวมทั้งยังสามารถห้อมล้อมและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคได้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation เช่นกัน (Söderhäll and Cerenius, 1992)

โดยในเลือดกุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์มากที่สุด คิดเป็น 82.6 เปอร์เซ็นต์ และมีเซมิแกรนูลาร์เซลล์และลาจน์แกรดูลาร์เซลล์ คิดเป็น 17.4 เปอร์เซ็นต์ (Owens et al., 1997)



ภาพที่ 2.3 กลไกการป้องกันตัวของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง
ที่มา : ดัดแปลงจาก Söderhäll and Cerenius, 1992

2.5.2.1 การตอบสนองภูมิคุ้มกันโดยอาศัยเซลล์ (cellular immune response)

การตอบสนองภูมิคุ้มกันโดยอาศัยเซลล์ อาศัยการทำงานของเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ซึ่งเม็ดเลือดเป็นองค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์โดยตรงและสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงสุขภาพกุ้งได้ดี Hose et al. (1990) และ Moullac et al. (1997) ได้จำแนก

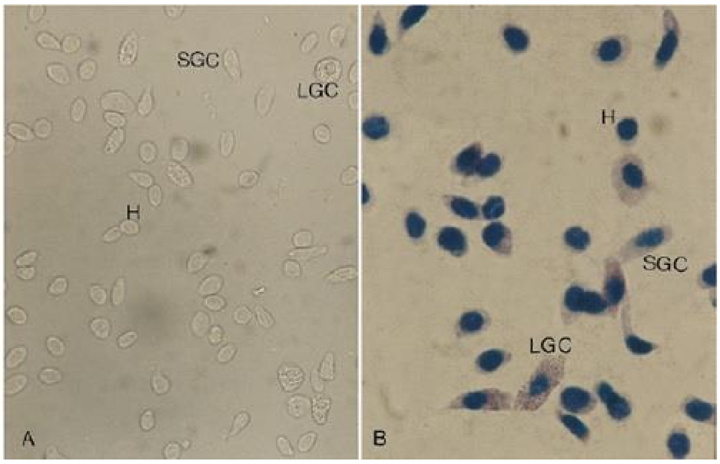
เม็ดเลือดกุ้งออกเป็น 3 แบบ ตามการมีหรือไม่มีแกรนูล ขนาดของเซลล์ การติดสีและโครงสร้างของแกรนูลในไซโตพลาสซึม ได้แก่ (ภาพที่ 2.4)

1) ไฮยาลินเซลล์ (hyaline cells) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด รูปร่างแบนกลม ผิวเรียบ บางครั้งอาจพบคล้ายรูปกระสวย หรือเสี้ยวพระจันทร์ มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ตรงกลางเซลล์ ทำหน้าที่เกี่ยวกับการกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยกระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) (Söderhäll and smith, 1986)

2) เซมิแกรนูลาร์เซลล์ (semi-granular cells) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือกระสวย นิวเคลียสอยู่ตรงกลางหรือขอบ ทำหน้าที่โดยตรงในการห้อมล้อมและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคได้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation รวมทั้งในกระบวนการ prophenoloxidase activating system และเซลล์เม็ดเลือดชนิดนี้ ยังสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการกลืนกินได้ด้วย (Söderhäll and Cerenius, 1992)

3) ลาร์จแกรนูลาร์เซลล์ (large granular cells) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด รูปร่างเป็นรูปไข่คล้ายเซมิแกรนูลาร์เซลล์ แต่ขนาดของเซลล์จะใหญ่กว่า มีนิวเคลียสอยู่บริเวณขอบเซลล์มีหน้าที่หลักในการทำงานในกระบวนการ prophenoloxidase activating system รวมทั้งยังสามารถห้อมล้อมและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคได้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation เช่นกัน (Söderhäll and Cerenius, 1992)

โดยในเลือดกุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์มากที่สุด คิดเป็น 82.6 เปอร์เซ็นต์ และมีเซมิแกรนูลาร์เซลล์และลาจน์แกรลูลาร์เซลล์ คิดเป็น 17.4 เปอร์เซ็นต์ (Owens et al., 1997)



ภาพที่ 2.4 ลักษณะ รูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆ ของกุ้ง A; ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ × 280 B; ย้อมด้วย Geimsa' strain × 560 (H = hyaline cell, LGC = large granular cell และ SGC = semi-granular cell)

ที่มา : Moullac et al. (1997)

ภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ มีกระบวนการป้องกันและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคโดยมีกระบวนการหลัก ๆ 3 กระบวนการ ได้แก่

1) กระบวนฟาโกไซโทซิส (phagocytosis)

กระบวนการฟาโกไซโทซิส เป็นกลไกพื้นฐานในการทำลายหรือกำจัดเมื่อสิ่งแปลกปลอมผ่านชั้นผิวปกคลุมเข้ามาในร่างกาย โดยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์เป็นหลักและมีการทำงานร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์เซลล์บ้าง โดยกระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่ไม่จำเพาะ ซึ่งจะเริ่มมีการยึดกันระหว่างสิ่งแปลกปลอมกับผิวเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือด หลังจากนั้นผิวของเซลล์เม็ดเลือดจะเว้าเข้าไปหรือมีการโอบล้อมโดยการใช้ไซโทพลาสซึมยืดออกเป็นเท้าเทียม เกิดเป็นฟาโกโซม (phagosome) ซึ่งจะสัมผัสกับไลโซโซม (lysosome) ที่อยู่ภายในเซลล์ได้เป็นฟาโกไลโซโซม (phago-lysosome) ซึ่งภายในไลโซโซม บรรจุเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าย่อยสลาย เรียกว่า แอซิดไฮโดรเลส (acid hydrolases) รวมถึงเอนไซม์ที่สามารถทำลายสารพันธุกรรมทั้ง คือออกซีไรโบนิวคลิอิก (deoxyribonucleic acid; DNA) ได้แก่ เอนไซม์ DNases รวมถึงเอนไซม์ที่ทำลายสาร ไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid; RNA) ได้แก่ เอนไซม์ RNases เอนไซม์ที่สามารถทำลายสารโปรตีน ได้แก่ โปรติเอส (proteases) เอนไซม์ที่สามารถทำลายสารจำพวกฟอสเฟต ได้แก่ ฟอสฟาเทส (phosphatases) และเอนไซม์ที่สามารถทำลายสารพวกไขมัน ได้แก่ ไลเปส (lipases) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้สามารถลดขนาดของโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมทั้งหลายให้เหลือเป็นหน่วยย่อย ๆ และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียหรือสิ่งแปลกปลอม โดยจำแนกได้เป็น 6 ชนิด ได้แก่ C-type, G-type, Plant lysozyme, Phage-lysozyme, I-type, Bacteria-lysozyme (Hikima et al., 2003)

เมื่อฟาโกโซมรวมกับไลโซโซมเกิดเป็นฟาโกไลโซโซม (phagolysosome) นำไปสู่การเพิ่มออกซิเจน (O_2) เข้าสู่เซลล์และมีการแตกตัวของออกซิเจน (respiratory burst) ซึ่งออกซิเจนเหล่านี้จะถูกรีดิวซ์ (reduce) เป็นซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ด้วยเอนไซม์ nicotonamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase) จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) (สมการ 1)

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

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2 \qquad (1)$$

Superoxide anion อาจถูกเปลี่ยนเป็น Hydrogen peroxide ได้อีกทางหนึ่งโดยการเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติไม่ต้องอาศัยเอนไซม์และได้ออกซิเจน 1 โมเลกุล (singlet oxygen; $^1O_2$) เป็นผลผลิตร่วมกับ hydrogen peroxide นอกจากนี้ superoxide anion ยังทำปฏิกิริยาร่วมกับ hydrogen peroxide เกิดเป็น hydroxyl radicle (OH) (สมการ 2)

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

$$O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow OH + OH^- + O_2 \qquad (2)$$

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

2) กระบวนการโนดูลฟอร์เมชัน (nodule formation)

กระบวนการโนดูลฟอร์เมชัน เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่มีขนาดเล็กบุกรุกเข้ามาเป็นจำนวนมากเกินกว่าความสารมารถที่กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมจะกำจัดได้ (Jiravanichpaisan et al., 2006) โดยจะมีการห้อมล้อมสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์เม็ดเลือด ทำให้เกิดเป็นปม (nodule) ซึ่งเป็นการป้องกันไม่ให้สิ่งแปลกปลอมกระจายไปทั่วร่างกาย มักพบการสร้างปมที่เหงือก และ hepatopancreas พร้อมทั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanin) ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system ซึ่งเป็นกระบวนการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด โดยเซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ เม็ดเลือดชนิด เซมิแกรนูลาเซลล์ และ เม็ดเลือดชนิดลาร์จแกรนูลาเซลล์ (Söderhäll and Cerenius, 1992)

3) กระบวนการเอนแคปซูเลชัน (encapsulation)

กระบวนเอนแคปซูเลชัน เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่มีขนาดใหญ่มากกว่า 10 ไมโครเมตร เช่น เชื้อรา หนอนตัวกลม ไข่ของปรสิต และสัตว์เซลล์เดียวขนาดใหญ่ เป็นต้น (Jiravanichpaisan et al., 2006) ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดไม่สามารถกำจัดได้ทัน นอกจากนี้กลไกกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการเอนแคปซูเลชัน จะอาศัยองค์ประกอบในกระบวนการ prophenoloxidase activating system พร้อมกับการเกิดเม็ดสีเมลานิน (melanin) (Ratcliff et al., 1985) เซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการโอบล้อมสิ่งแปลกปลอมเป็นเม็ดเลือดชนิดเดียวกับการเกิดกระบวนการโนดูลฟอร์เมชั่น

2.5.2.2 การตอบสนองภูมิคุ้มกันโดยอาศัยสารน้ำภายในเซลล์ (humeral immune response)

เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีการทำงานต่อ หรือพร้อมกันกับระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ โดยเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งจะมีการผลิตสารโปรตีนทำหน้าที่ในการช่วยในการจดจำและเข้าจับกันได้กับโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรค ซึ่งมีชื่อเรียกว่า pattern recognition protein (PRPs) ซึ่งจะไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด โดยสามารถจับกับโมเลกุลของเบต้ากลูแคนที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของยีสต์ hyphae ของเชื้อรา เปปติโดไกลแคนที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก และไลโพโพลีแซคคาไรด์ ที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อโมเลกุลเหล่านี้เข้าสู่กระแสเลือดกุ้ง จะกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดให้เคลื่อนที่เข้ามาบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์เซลล์ และลาร์จแกรนูลาร์เซลล์ มีส่วนที่รองรับแบบจำเพาะ (receptor) สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ degranulation ของเม็ดเลือด ซึ่งภายในแกรนูลาร์จะประกอบด้วยเอนไซม์และสารประกอบโปรตีนต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์ transglutaminase (TGase), lectin, peroxinectin, protein released และเอนไซม์ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) โดยสารทั้งหมดที่หลั่งออกมากระตุ้นให้เกิดกระบวนการต่างๆ ได้แก่ กระบวนการแข็งตัวของเลือด กระบวนการหลั่งสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (bactericidin) ซึ่งพบในส่วนของพลาสมา ซีรัม และ HLS (hemocyte lysate supernatant) สามารถถูกชักนำให้สูงขึ้นเมื่อได้รับสารกระตุ้น ไม่ทนความร้อน และมีความจำเพาะต่อเชื้อบางชนิด (ชาญชัย, 2545) เช่น การหลั่งสารแลคติน (lectin) และการหลั่งสาร peroxinctin กระบวนการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activating system)

2.5.2.2.1 กระบวนการแข็งตัวของเลือด (blood clotting)

กระบวนการแข็งตัวของเลือดเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังเพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดจากบาดแผล เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นจากเม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ ซึ่งมีแกรนูลอยู่ภายใน เมื่อแกรนูลถูกปล่อยออกมา จะไปกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีโคแอคกลูโลเจน (coagulogen) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการจับตัวกันเป็นก้อน โดยเป็นโปรตีนหลักที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือดซึ่งอยู่ในน้ำเลือดของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนหลายชนิด ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือด การที่เลือดไม่สามารถแข็งตัวได้ อาจเกิดจากเม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์มีปริมาณลดลงจากการติดเชื้อจุลินทรีย์

การแข็งตัวของเลือดเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญเพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดจากบาดแผล โดยเอนไซม์ทรานกลูทามิเนส (transglutaminase) จะไปกระตุ้นโปรตีนหลักที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clotting protein) ซึ่งไหลเวียนอยู่ในน้ำเลือดของกุ้ง โดยเอนไซม์ทรานกลูทามิเนส จะทำงานร่วมกับแคลเซียมไอออน (Ca^{+}) กระตุ้น clotting protein monomer ส่งผลให้เกิดกระบวนการ

ทางชีวเคมี ได้เป็นสารที่เกิดการจับตัวกันเป็นก้อน (clot polymer) ทำให้เลือดเกิดการแข็งตัว (blood clotting) โดยในระบบที่ทำให้เกิดการจับการเป็นก้อน (boagulation system) ประกอบด้วยโปรตีน 5 ชนิด ซึ่งทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือด ได้แก่ serine proteinase zymogen factor C, B, G, proclotting enzyme และ clotting protein coagulogen ซึ่ง factors C จะเป็นโปรตีนที่ไวต่อการกระตุ้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) และ factor G เป็นโปรตีนที่ไวต่อการกระตุ้นของเบต้ากลูเคน (β-glucan) (Iwanaga, 1993) (สมการ 3)

transglutaminase; TGase

clotting protein monomer ⟶ clotting polymer

Ca^{+}

serine proteinase zymogen factor C,B,G, procloting enzyme และclottable protein coagulogen

↓ ↓ ↓

blood clotting

(coagulation system) (3)

2.5.2.2.2 การหลั่งสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (bactericidin)

การหลั่งสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ซึ่งพบในส่วนของพลาสมา ซีรัม หรือ hemocyte lysate supernatant (HLS) สามารถถูกชักนำให้สูงขึ้นเมื่อได้รับสารกระตุ้น ไม่ทนความร้อน และมีความจำเพาะต่อเชื้อบางชนิด (ชาญชัย, 2545)

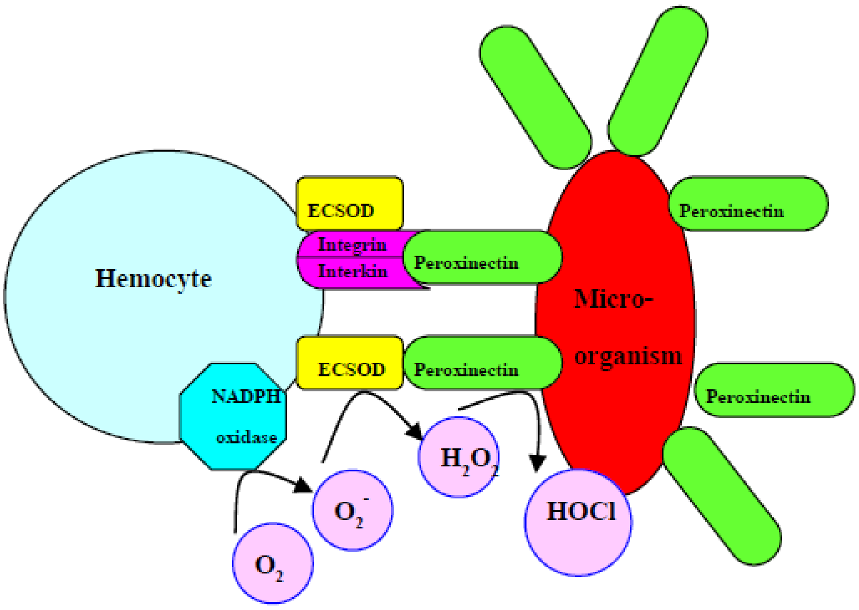
1) การหลั่งสารเลคติน (lectin)

การหลั่งสารเลคติน ซึ่งพบได้โดยธรรมชาติในเลือดของครัสเตเชียน เป็นสารชนิดโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน (glycoproteins) ที่มีคุณสมบัติในการจับอย่างจำเพาะกับสารคาร์โบไฮเดรตบนผนังเซลล์แบคทีเรีย โดยเรียกว่า carbohydrate recognition domain (CRD) มี 2 ชนิด คือ C-type lectins และ S-type lectins โดยแลคตินมีลักษณะเป็นไบวาแลนท์ (bivalent) จึงสามารถเชื่อมต่อกับเซลล์แบคทีเรียได้ถึง 2 เซลล์ ทำให้เกิดการตกตะกอนของแบคทีเรียได้ รวมทั้งทำหน้าที่ opsonin ได้อีกด้วย

2) การหลั่งสารเพอร์รอคซิเนคติน (peroxinectin)

เพอร์รอคซิเนคติน เป็นสารที่คล้ายไคโทไคน์ (cytokine-like factor) ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ทำหน้าที่ในการช่วยประสานงานระหว่างระบบภูมิคุ้มกันอื่น ๆ และรักษาสมดุลของเลือดในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งสารเพอร์รอคซิเนคตินเป็นสารโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น

opsonin เคลือบผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคให้อยู่ในกระแสเลือด โดยจะกระตุ้นให้เม็ดเลือดเคลื่อนที่เข้าไปและเกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือด ในดูลฟอร์เมชันและเอนแคปซูเลชัน โดยช่วยในการยึดระหว่างเซลล์เม็ดเลือดและเชื้อก่อโรค และช่วยให้เม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์และลาร์จแกรนูลาร์เกิดกระบวนการดีแกรนูลเลชัน (degranulation) มากขึ้น ส่งผลให้เอนไซม์และโปรตีนต่างๆ ภายในแกลนูลถูกปล่อยออกมามากขึ้น โดยเฉพาะเอนไซม์ในกระบวนการโปรฟีนอลออกซิเดส แอคติวิติ้ง ซิสเต็ม (prophenoloxidase activating system) (Smith and Crisholm, 1992) บนผนังเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งมีตัวรับ (receptor) แบบจำเพาะกับสารเพอร์รอคซิเนคติน (peroxinectin) ที่เรียกว่า intigrin, interkin และ extracellular superoxide dismutase (ESOD) ทำหน้าที่เป็นส่วนรองรับกับเซลล์เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ทำให้เกิดกระบวนการทำให้เกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมและหลั่งเอนไซม์ NADPH oxidase ออกสู่ผิวนอกเซลล์เม็ดเลือดทำให้มีการใช้ออกซิเจนสูงภายในเซลล์ ทำให้ได้ผลผลิตเป็น reactive oxygen intermediates (ROI) ชนิดต่างๆ ได้แก่ ซุปเปอร์ออกไซม์แอนไอออน (superoxide anion) ไฮโดรเจนเปอร์ครอกไซม์ (hydrogen peroxide) และ ไฮเปอร์คลอรัส แอซิด (hyperchlorous acid) ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรค โดยเฉพาะไฮเปอร์คลอรัส แอซิด ซึ่งมีสภาพเป็นกรดรุนแรง ส่งผลให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกออกได้ (ภาพที่ 2.5)



ภาพที่ 2.5 การทำงานของโปรตีนเพอร์รอคซิเนคติน (peroxinectins)

ที่มา : ชยพร (2552)

3) แอคกูตินิน (agglutinin)

แอคกูตินิน เป็นโปรตีนที่พบในน้ำเลือดของครัสเตเชียน ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการจับตัวของสิ่งแปลกปลอม และยังมีหน้าที่เป็น opsonin กระตุ้นกระบวนการฟาโกไซโตซิส ของเซลล์ด้วย (Varges-Albores, 1995)

4) การหลั่งสารโปรตีน (protein release)

สารพวกโปรตีนสามารถพบได้ทั้งในน้ำเลือด ซีรั่ม และในสารละลายเม็ดเลือดที่แตก (HLS) โดยสารโปรตีนทำหน้าที่ ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (antimicrobial peptide) ซึ่งจะมีการหลั่งอย่างรวดเร็วเมื่อเกิดกระบวนการดีแกรนูเลชันของเซลล์เม็ดเลือดและมีการตอบสนองอย่างรวดเร็วต่อแบคทีเรีย โดยมีโมเลกุลโปรตีนขนาด 6.5 kDa สารโปรตีนบางชนิดที่หลั่งออกมานั้นมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียบางชนิดเช่น

Lysozyme type – C ทำหน้าที่ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยทำลาย osmoregulation บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้ผนังเซลล์แบคทีเรียถูกทำลาย

Penedin เป็นสารโปรตีนที่มีประจุบวก (cationic antibacterial peptide) ทำหน้าที่เข้าไปเคลือบผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ทำให้ประจุจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมีสภาวะเป็นกลางและหมดความสามารถในการก่อโรค (Destoumieux et al., 1997)

แอลฟา-2 macroglobulin ทำหน้าที่ในการยับยั้งหรือทำให้พิษจากเชื้อก่อโรคเป็นกลาง (neutralization) รวมทั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และทำหน้าทีควบคุมการสร้างโปรติเอสในกระบวนการ prophenoloxidase activating system อีกด้วย (Aspan et al., 1990 และ Dieguez-uribeondo and Cerenius, 1998)

Crustin ทำหน้าที่ เข้าไปเคลือบผนังเซลล์ทำให้เกิดการจับกันเป็นก้อน (nodule) เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย (Cuthberson et al., 2002)

5) เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme)

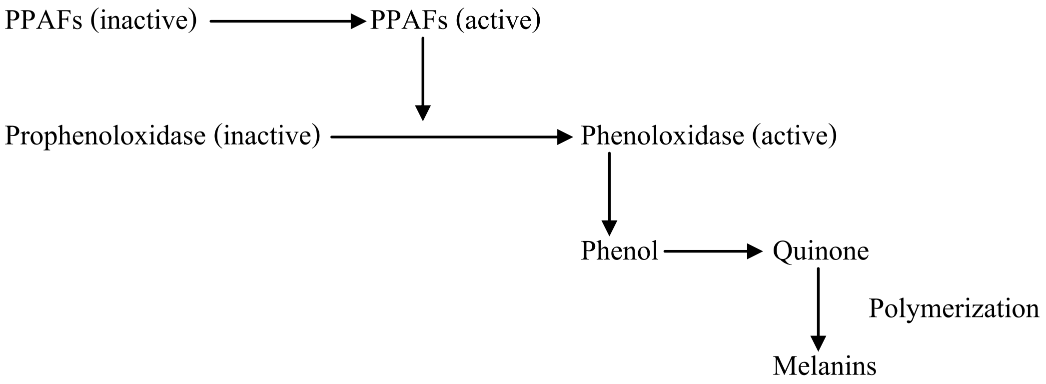
เอนไซม์ไลโซไซม์สามารถพบได้ในเซลล์เม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์เซลล์ ซึ่งจะถูกปล่อยออกสู่กระแสเลือดเมื่อมีการกระตุ้น โดยเอนไซม์ไลโซไซม์มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียชนิด *Micrococcus lysodeikticus* และเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ด้วย เอนไซม์ไลโซไซม์ สามารถออกฤทธิ์กับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนแบคทีเรียแกรมลบเอนไซม์ไลโซมีฤทธิ์เพียงเล็กน้อย ไม่สามารถทำให้เกิดการแยกของผนังเซลล์ได้ ความสามารถในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียของเอนไซม์ไลโซไซม์ โดยทำให้ β-1, 4 glycosidic bond ระหว่าง N-acetylmuramic และ N-

acetylglucosaminme แยกออกจากกันส่งผลให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตก เนื่องจากชั้นของเปปติโดไกลแคนถูกทำลายจนไม่สามารถทนแรง osmotic pressure ได้ (Smith et al., 2003)

2.5.2.2.3 ระบบโปรฟีนอลออกซิเดสแอคติเวติ้งซิสเตม (Prophenoloxidase activating system)

ระบบโปรฟีนอลออกซิเดสแอคติวิติ้งซิสเตม เป็นระบบที่สำคัญมากในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเป็นการทำลายเชื้อโรคและควบคุมการกระจายตัวของเชื้อโรคภายในตัวกุ้ง ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญ โดยมีเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase; PO) ที่อยู่ในรูปของ โปรเอนไซม์ (pro-enzyme) ที่เรียกว่า โปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase; proPO) และเอนไซม์ในกลุ่มเซอรีนโปรติเอส (serine protease) โดยมีการทำงานร่วมกันอย่างมีระบบ (Söderhäll et al., 1996) กระบวนการที่สำคัญของระบบนี้เริ่มจาก โปรฟีนอลออกซิเดส เปลี่ยนเป็นฟีนอลออกซิเดส และจะออกซิไดซ์สารกลุ่มฟีนอล (phenol) ให้เป็นสารประกอบควิโนน (quinone) แล้วเปลี่ยนเป็นเมลานิน ในที่สุด ซึ่งหน้าที่ของเมลานินจะช่วยในการยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย สารต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial substance) เป็นสารประกอบขั้นสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการนี้ (Hose et al., 1987; Smith and Crisholm, 1992; Söderhäll and Cerenius, 1992 และ Bachère et al., 1995)

ระบบโปรฟีนอลออกซิเดสเอคติวิติ้งซิสเตม เป็นกระบวนการที่สำคัญในการทำลายสิ่งแปลกปลอม และควบคุมการกระจายของเชื้อโรคภายในตัวกุ้ง เมื่อเกิดกระบวนการดีแกรนูเลชัน ซึ่งส่งผลให้เกิดการหลั่งสารพวกโปรเอนไซม์ (pro-enzyme) และ substrate ได้แก่ เอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นสารที่ยังอยู่ในรูปที่ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้ (inactive) จะถูกกระตุ้นด้วยสารที่มีชื่อว่า เซอรีนโปรติเอส (serine protease; SP) หรือเรียกว่า prophenoloxidase activating factor/ enzyme (PPAFs) (Söderhäll and Cerenius, 1998) และมีการทำงานร่วมกันกับแคลเซียมไอออน (Ca^{+}) ส่งผลให้เอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้ (active) (Hose et al., 1987) โดยเปลี่ยนสารที่เรียกว่า เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารกลุ่มฟีนอล (phenol) ให้เปลี่ยนเป็นสารกลุ่มควิโนน (quinone) และเกิดเป็นกระบวนการ polymerization ของสารคิวโนน เกิดเป็นเมลานิน (melanin) โดยกระบวนการเมลานิลมีชื่อเรียกอีกชื่อว่า melanin formation หรือ melanization (สมการ 4)

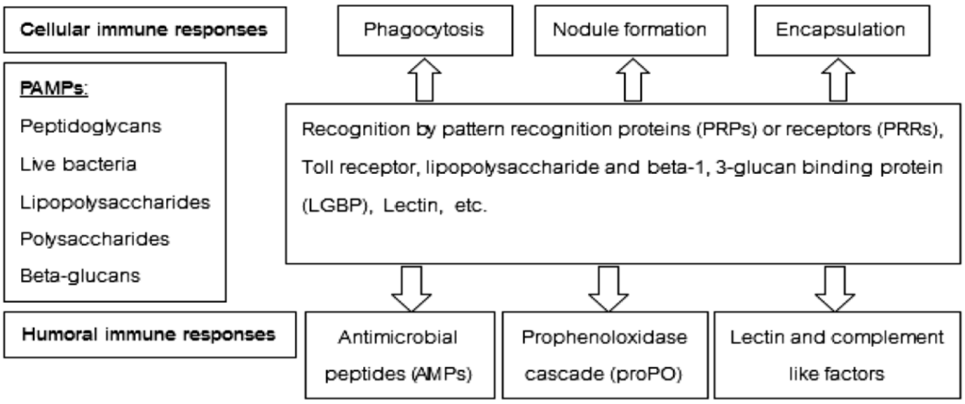


(4)

2.6 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

2.6.1 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants)

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือ สารประกอบใด ๆ ก็ตาม ที่ส่งผลต่อกลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ โดยการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อวัตถุประสงค์ในการส่งเสริมประสิทธิภาพการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน รักษาระดับและเพิ่มระยะเวลาในการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน รวมทั้งลดภาวะของการกดภูมิคุ้มกันเนื่องจากสาเหตุต่างๆ เช่น สาเหตุจากความเครียดในระหว่างการเลี้ยง (Barman et al., 2013) และการที่สัตว์น้ำมีความแข็งแรงและมีภูมิคุ้มกันในการป้องกันโรคสูง สามารถช่วยลดความเสี่ยงที่ก่อให้เกิดความสูญเสียอันเนื่องมาจากการระบาดของโรค หรือฤดูกาลที่เปลี่ยนแปลงไป รวมทั้งการระบาดของโรคประจำถิ่นและเชื้อก่อโรคแฝงในตัวสัตว์น้ำได้ ซึ่งการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันใช้หลักการเลียนแบบการติดเชื้อของกุ้ง หรือการให้สิ่งแปลกปลอมเข้าไปในร่างกายกุ้ง แต่เชื้อที่ใช้จะไม่สามารถก่อโรคในกุ้งได้ เช่น การใช้เชื้อตาย เชื้ออ่อนกำลังลง หรือเชื้อที่ไม่ก่อโรค เป็นต้น (Smith et al., 2003) กุ้งจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือด โปรตีน หรือเอนไซม์ ต่างๆ ในขณะนั้นเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย (ภาพที่ 2.6) เมื่อมีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ จะเกิดกลไกการตอบสนองภูมิคุ้มกันในกุ้ง โดยเริ่มจากปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) ผ่านตัวรับ pattern recognition protein (PRPs) หรือ pattern recognition receptor (PRRs) ที่อยู่บนผนังเซลล์ของเม็ดเลือดกุ้งทำให้ภูมิคุ้มกันสามารถจำแนกได้ว่าสิ่งนี้เป็นสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย จากนั้นโมเลกุลหรือเซลล์จะกระตุ้นให้เกิดการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันได้



ภาพที่ 2.6 ระบบป้องกันตัวของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนเมื่อได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน
ที่มา : มลฤดี (2559)

มีหลายๆ งานวิจัย ที่ประสบความสำเร็จในการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งเพื่อเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันและควบคุมการติดเชื้อโรคของกุ้ง ซึ่งสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยส่วนใหญ่ได้มาจากสิ่งมีชีวิต (biological substances) ได้แก่ แบคทีเรียหรืออนุพันธ์หรือสารประกอบที่ได้จากแบคทีเรีย (bacterial derivatives) โดยได้มีการนำเซลล์แบคทีเรียและสารประกอบจากแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบมาใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เพื่อใช้ในการป้องกันและควบคุมโรคในกุ้ง เซลล์แบคทีเรียและสารประกอบหรืออนุพันธ์สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากโมเลกุลของโปรตีนตัวรับ PRPs ที่มีชื่อว่า lipopolysaccharide binding proteins (LGBPs) และ peptidoglycan recognition protein (PGRPs) อยู่บนผนังเซลล์ของเม็ดเลือดกุ้ง (Tassanakajion et al., 2013) ในปัจจุบันมีการใช้แบคทีเรียเพื่อเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลายๆ รูปแบบ เช่น แบคทีเรียที่มีชีวิตกลุ่มโปรไบโอติก แบคเทอรินที่ผลิตได้จากเซลล์แบคทีเรีย และสารสกัดที่ได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

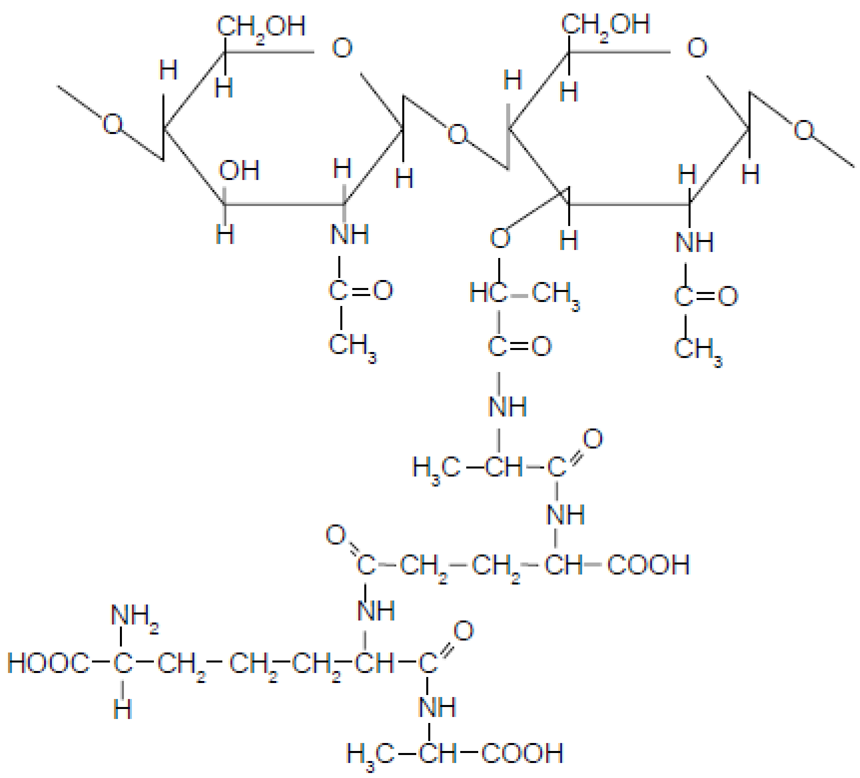
1) แบคทีเรียที่มีชีวิต (live bacteria) ในกลุ่มของโปรไบโอติกที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ เช่น จากการศึกษาของ Rengpipat et al. (2000) รายงานว่า กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่ได้รับอาหารที่ผสมแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* S11 ในสัดส่วน 1:3 (น้ำหนักเปียก) โดยการสเปรย์ลงในอาหาร ระยะเวลาการเลี้ยง 90 วัน พบว่า กุ้งกุลาดำสามารถเพิ่มกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมได้ และมีอัตรารอดสูงกว่ากลุ่มที่ไม่มีการผสมด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* S11 (54.3 เปอร์เซ็นต์) เมื่อกุ้งกุลาดำได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* ($P<0.05$) ในขณะที่ Chiu et al. (2007) รายงานว่า กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับอาหารที่ผสมแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* ในสัดส่วน 10^{10} CFU ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีกิจกรรมการทำงานของ

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์เดสมิวเทส (Superoxide dismutase activity) และประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* เพิ่มขึ้น

2) แบคเทอริน (bacterin) คือ แบคทีเรียที่มีชีวิต แต่ทำให้อ่อนกำลังลง (attenuated bacterin) หรือแบคทีเรียที่ทำให้ตาย (killed bacterin) การใช้แบคเทอรินที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* sp. มีรายงานว่าให้ผลดีในระดับห้องปฏิบัติการ เช่น การใช้แบคเทอรินที่เตรียมจากเชื้อ *Vibrio harviyi* พบว่า สามารถเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในเลือดกุ้งกุลาดำได้ (Pais et al., 2008) ในขณะที่ Powell et al. (2011) รายงานว่า กุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคเทอรินที่เตรียมจากเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ในปริมาตร 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ผสมลงในอาหาร พบว่า กุ้งขาวมีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และกิจกรรมการต้านเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้นได้

3) ไลโพโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) คือส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ จากการรายงานของ Srituyalucksana et al. (1999) ได้ทำการศึกษา โดยใช้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ *Escherichia coli* Serotype 055:B5 (Sigma) พบว่า การใช้ไลโพโพลีแซคคาไรด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immune response) ในกุ้งได้โดยผ่านระบบการทำงานของโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase, ProPO) ได้ จากการศึกษาของ Xian et al. (2009) ได้ทำการศึกษาในกุ้งขาว รายงานว่า กุ้งขาวที่ได้รับไลโพโพลีแซคคาไรด์ ปริมาตร 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า มีปริมาณเม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์ และแกรนูลาร์ลดลง กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และอัตราการรอดเพิ่มขึ้น

4) เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan; PG) (ภาพที่ 2.7) คือส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก ที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งได้ เช่น จากการรายงานของ Rattnachai et al. (2005) ได้ทำการทดลองโดยการสกัดเปปติโดไกลแคนจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bifidobacterium thermophilum* ผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งสายพันธุ์ *Marsupenenaus japonicas* ในสัดส่วน 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่า สามารถเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซอรีนโปรติเอส (serine protease) ในเม็ดเลือดเพิ่มขึ้น ซึ่งเอนไซม์นี้ส่งเสริมกลไกการทำงานในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส



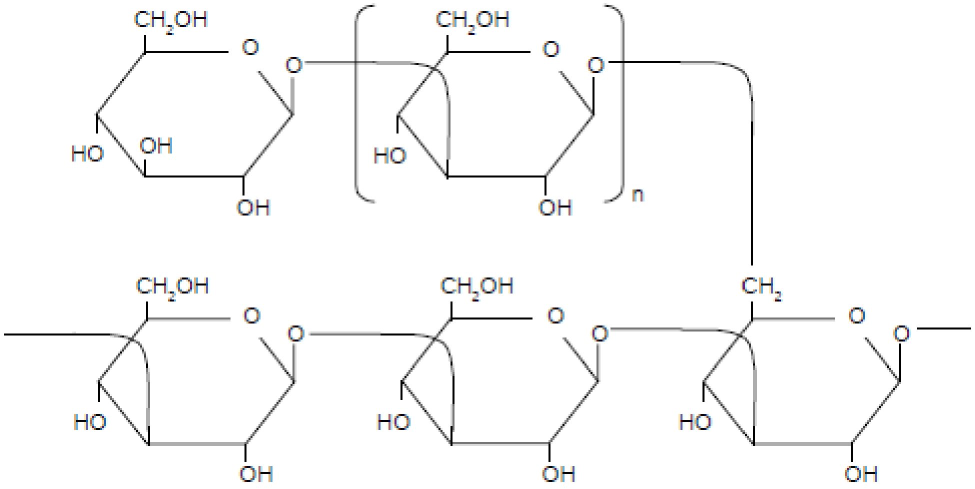
ภาพที่ 2.7 โครงสร้างของเปปติโดไกลแคน

ที่มา : Heidrich and Vollmer (2002)

2.6.2 อนุพันธุ์หรือสารประกอบที่ได้จากยีสต์ (yeast derivative)

จากการค้นพบโมเลกุลของโปรตีนตัวรับ (PRPs) ที่มีชื่อว่า β-glucan binding proteins (βGBPs) (ภาพที่ 2.8) ที่อยู่บนผนังเซลล์ของเม็ดเลือดกุ้ง (Söderhäll and Cerenius, 1992) หลายๆ นักวิจัยจึงให้ความสนใจในการนำมาเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งมากขึ้น ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้เบต้ากลูแคน (β-glucan) จากยีสต์ในรูปแบบต่างๆ เช่น การใช้เบต้ากลูแคนบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของยีสต์ และการใช้ยีสต์ทั้งเซลล์เพื่อใช้เป็นเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาของ Bai et al. (2014) ได้ทดลองใช้เบต้ากลูแคน (β-glucan) ที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerivisiae* ผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาว พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนที่ระดับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหารสามารถเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และ ความสามารถในการต้านเชื้อ *Vibrio harviyi* และไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot Syndrome, WSSV) เพิ่มขึ้นได้ ในขณะที่ Babu et al. (2013) ได้ทำการทดลองในกุ้งกุลาดำ โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Candida aquaetextoris* S527 ผสมในอาหารเช่นกัน พบว่า ที่ระดับการผสมยีสต์สาย

พันธุ์ *Candida aquaetextoris* S527 10 เปอร์เซ็นต์ มีการแสดงออกของสารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของเบต้ากลูแคน

ที่มา : Dijkgraaf et al. (2002)

2.6.3 สารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ (nutritional factors)

สารที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่ใช้เสริมในอาหารที่มีส่วนช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และมีรายงานในการใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มในกุ้ง ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี แอสตาแซนทิน เป็นต้น

1) วิตามิน (vitamins) เป็นสารอาหารที่มีความจำเป็นสำหรับสัตว์น้ำรวมทั้งกุ้ง และยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ส่งเสริมการเจริญเติบโตในสัตว์น้ำ อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำได้ เช่น จากการรายงานของ Quiao et al. (2011) ทำการศึกษาโดยใช้วิตามินซีผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาว พบว่า ที่ระดับการใช้วิตามินซี 0.2 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส เช่นเดียวกับ Lee and Shiau (2002) ทำการศึกษาโดยเสริมวิตามินซีในสูตรอาหารกุ้งกุลาดำ พบว่า วิตามินซีส่งผลให้ระดับภูมิคุ้มของกุ้งกุลาดำเพิ่มขึ้น ในขณะที่ Lee and Shiau (2004) ได้ทำการศึกษาโดยใช้วิตามินอีผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่า ที่ระดับการเสริมอาหารด้วยวิตามินอี 50-400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีผลต่อการทำงานของอินเตอร์ฟีรอน (interferon) ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์เดสมิวเทส (superoxide dismutase) ในกุ้งได้

2) แอสตาแซนทิน (astraxantin) เป็นสารสีชนิดหนึ่งในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid pigments) ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันเนื้อเยื่อไม่ให้ถูกทำลายเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายของสัตว์ จากหน้าที่ดังกล่าวส่งผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำด้วย จากการรายงานของ นนทวิทย์ และคณะ (2549) ได้ทำการศึกษาโดยใช้แอสตาแซนทินจากยีสต์สายพันธุ์ *Phaffia rhodozyma* และ *Dunaliella* sp. โดยผสมลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับแอสตาแซนทินจากยีสต์สายพันธุ์ *Phaffia rhodozyma* และ *Dunaliella* sp. ปริมาณ 161.60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* และอัตราการรอดได้

2.6.4 สารสกัดจากสัตว์ (animal extract)

สารสกัดจากสัตว์ เช่น ไคติน (chitin) ไคโตซาน (chitosan) ซึ่งไคตินเป็นสารประกอบจำพวกโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) พบมากในสิ่งมีชีวิตที่มีเปลือกหรือผนังแข็งหุ้มลำตัว เช่น กุ้ง หอย ปู แมลง Tassanakajion et al. (2013) รายงานว่า สารประกอบโพลีแซคคารไรด์หรือคาร์โบไฮเดรต เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยจะจับกับโมเลกุลของโปรตีนตัวรับ ที่มีชื่อว่า lectin receptor ที่อยู่บนผนังเซลล์ของเม็ดเลือดกุ้ง จากการศึกษาของ Niu et al. (2013) ได้ทำการศึกษาผลของไคตินและไคโตซานในกุ้งกุลาดำ พบว่า สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำได้ และสามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ในกุ้งขาวได้ (Wang and Chen, 2005)

2.6.5 สารสกัดจากพืช (plant extract)

1) สารสกัดจากสมุนไพร (herbal extracts) ในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทยได้ประสบความสำเร็จในการใช้สมุนไพรในการควบคุมโรคในกุ้งได้เป็นอย่างดี พืชและสมุนไพรมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในสัตว์น้ำได้ เนื่องจากมีองค์ประกอบของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ลิควิริติน (liquiritin) ไกลซีไรซิน (glycyrrhizin) และ กลาบริดิน (glabridin) รวมทั้งสารออกฤทธิ์อื่นๆ เช่น ซาโปนิน (saponin) แอนทราควิโนน (anthraquinone) อะซาไดแรคติน (azadirachtin) เป็นต้น (Hai, 2015 และ ชนกันต์, 2556) โดยมีหลายงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาโดยใช้สมุนไพร เช่น จากการรายงงานของ Cheng et al. (2012) มีการใช้สารกลุ่ม phenolic alkanon ที่สกัดได้จากขิง (*Zingerone officinale*) ผสมในอาหารกุ้งขาว 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวได้ โดยมีค่าปริมาณเม็ดเลือด กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิดเดส กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์ กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม และความต้านทานเชื้อ *Vibrio alginolyticus* เพิ่มขึ้น ในขณะที่ Wu et al. (2015) ศึกษา

การใช้สารซาโปนินที่สกัดได้จากว่านท้องใบม่วง (*Gynura bicolor*) ผสมในอาหารกุ้งขาวที่ระดับ 0 (กลุ่มควบคุม) 0.5 1.0 และ 2.0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่า ที่ระดับการใช้ว่านท้องใบม่วง 0.5 1.0 และ 2.0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันได้ โดยมีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไออนและกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์เพิ่มขึ้น และจากการศึกษาของ Yang et al. (2015) ได้ทำการศึกษาโดยใช้สารโพลีแซ็คคาร์ไรด์และโพลีฟีนอล (polyphenols) ที่สกัดที่ได้จากใบยัคคา (*Yacca scidigera*) ที่ผสมในอาหารของกุ้งขาวที่ระดับ 0 (กลุ่มควบคุม), 0.1, 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ที่ระดับหารเสริมสารสกัดที่ได้จากใบยัคคา 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และความต้านต่อเชื้อแบคทีเรียและไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ เช่นเดียวกับการรายงานของ Direkbusarakom et al. (1996) ได้ทำการศึกษาในกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสาร polyvinylpyrolidone ซึ่งสกัดจากพญายอ (*Chinacanthus nutans*) พบว่า ที่ระดับการผสมอาหารด้วยสารสกัดจากพญายอ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำได้ โดยมีประสิทธิภาพในการป้องกัน 57.4 เปอร์เซ็นต์ และ Pholdaeng and Pongsamart (2010) ได้ทำการศึกษาโดยใช้สารโพลีแซ็คคาร์ไรด์ที่สกัดได้จากเปลือกทุเรียน (*Durio zibethinus*) ผสมในอาหารกุ้งกุลาดำ พบว่า ที่ระดับการเสริมด้วยสารสกัดจากเปลือกทุเรียนที่ระดับ 1-3 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มมีปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และความต้านทานเชื้อแบคทีเรียและไวรัสตัวแดงดวงขาวได้

2) สารสกัดจากสาหร่าย (seaweed extracts) สาหร่ายประกอบด้วยสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต และมีสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น n-3 และ n-6 polyunsaturated fatty acid (PUFA) โพลีแซคคาไรด์ วิตามิน แร่ธาตุ และสารประกอบโพลีฟีนอล (Britin, 2003) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฟูคอยแดน (fucoidan) ลามินาริน (larminarin) โซเดียมแอลจิเนส (sodium alginate) ซัลเฟตกาแลคแทน (sulfated galactans) และ คาราจีแนน (carraginan) มีงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาการใช้สารสกัดจากสาหร่ายในกุ้ง เช่น จากการศึกษาของ Wongprasert et al. (2014) ทำการศึกษาโดยใช้สารซัลเฟตกาแลคแทน (sulfated galactans) ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีแดง *Glacilaria fisheri* ผ่านอาทีเมีย (*Artemia salina*) สำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำในปริมาณ 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สามารถเพิ่มการผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียและไวรัสตัวแดงดวงขาวเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับการรายงานของ Kittikiew et al. (2013) ซึ่งทำการศึกษาโดยใช้สารฟูคอยแดน (fucoidan) ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล (*Sargassum* sp.) ผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาว พบว่าที่ระดับการใช้สารฟูคอยแดน 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีค่าการผลิตซูเปอร์ออกไซม์แอนไอออน กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio*

alginolyticus ในขณะที่ Immanel et al. (2012) ได้ทำการศึกษาโดยใช้สารฟูคอยแดน (fucoidan) ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล (*Sargassum wightii*) เสริมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่า ที่ระดับการเสริมสารฟูคอยแดน 3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 21 วัน สามารถเพิ่มระดับภูมิคุ้มกัน โดยเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดรวม กิจกรรมโปรฟีนอลออกซิเดส กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน กิจกรรมการทำงานของแอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์เดสมิวเทส กิจกรรมการทำงานของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด และสามารถเพิ่มความต้านทานของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้

2.7 ผลของการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนในอาหารสัตว์น้ำต่อค่าทางโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ยีสต์ และรา มีสารประกอบของไลโพโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) และสารเบต้ากลูแคน (β-glucan) สามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ ได้แก่ กระบวนการฟาโกไซโทซิส นูลดูลฟอร์เมชัน เอนแคปซูเลชัน และการแข็งตัวของเลือดกุ้งสูงขึ้น โดย ไลโพโพลีแซคคาไรด์และเบต้ากลูแคนจะกระตุ้น PRPs ในน้ำเลือดให้เกิดการเชื่อมต่อของโพลีแซคคาไรด์และ β-1,3 glucan กับ lipopolysaccharide-binding protein และ β-1,3 glucan -binding protein เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนไปกระตุ้นที่ membrane receptor ที่จำเพาะของเม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์เซลล์ส่งผลให้เกิดการหลังสารต่าง ๆ ออกมาในระบบภูมิคุ้มกัน (Vagas-Albores et al., 2000)

จากการศึกษาของ Chotikachinda et al. (2008) ทำการทดลองโดยใช้ผนังเซลล์ยีสต์ที่ 3 ระดับ (0, 1 และ 2 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) เลี้ยงกุ้งที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 7.15±0.05 กรัมต่อตัว เป็นระยะเวลา 28 วัน รายงานว่า การตอบสนองต่อระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว ที่ความเข้มข้นของผนังเซลล์ยีสต์ 1 และ 2 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีประสิทธิภาพการตอบสนองภูมิคุ้มกันดีกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม ($P<0.05$)

แต่อย่างไรก็ดี Li and Gatlin III (2004) ได้ทำการศึกษาการใช้ยีสต์ (brewer's yeast) เสริมในสูตรอาหารปลากะพง (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) น้ำหนักเฉลี่ย 91.4±4.3 กรัมต่อตัว ระยะเวลาการเลี้ยง 49 วัน โดยมีระดับโปรตีนในอาหาร 40 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ที่ระดับการเสริมยีสต์ (brewer's yeast) 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่ม neutrophil oxidative production (NBT) ให้มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ He et al. (2009) ที่ได้ทำการศึกษาโดยใช้ยีสต์ สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ในสูตรอาหารปลานิล (hybrid tilapia) ระยะเวลาการเลี้ยง 42 วัน พบว่า กลุ่มที่ได้รับ *Saccharomyces cerevisiae* มีการตอบสนองต่อระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มควบคุม

Manoppo et al. (2015) ศึกษาถึงผลของยีสต์ (Brewer's yeast) เช่นกัน โดยเสริมในสูตรอาหารปลานิล (*O. niloticus*) ที่ระดับ 0, 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อกิโลกรัม ปลานิลน้ำหนักเฉลี่ย 28.78 กรัมต่อตัว ระยะเวลาการเลี้ยง 30 วัน โดยมีการให้อาหาร 5 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัว พบว่า ที่ระดับการเสริมยีสต์ 5 กรัมต่อกิโลกรัมสามารถเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวและกิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytosis activity) ได้

Li et al. (2009) ได้ศึกษาถึงผลของการเสริมยีสต์ (brewer's yeast) และ GroBiotic®-A ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) พบว่า ที่ระดับการเสริมยีสต์ (brewer's yeast) และ GroBiotic®-A 5 เปอร์เซ็นต์ ไม่ส่งผลต่อระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม โดยมีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวม โปรตีนในเม็ดเลือด กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์เอนไอออน (superoxide anion production) และกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง (clearance efficiency) การทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม($P>0.05$)

Berge et al. (2005) ได้ทำการศึกษาโดยใช้แหล่งโปรตีนจากแบคทีเรียในสูตรอาหารปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) รายงานว่า ที่ระดับการใช้แหล่งโปรตีนจากแบคทีเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหาร ไม่ส่งผลต่อค่าโลหิตวิทยาและภูมิคุ้มกันของปลาแอตแลนติกแซลมอน (*Salmo salar*) ในขณะที่ Andrews et al. (2011) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ยีสต์สกัด บีเวอร์ยีสต์ (brewer's yeast) และสาหร่ายสไปรูลิน่า (*Spirulina*) ในสูตรอาหารปลา *Labeo rohita* พบว่าสามารถเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันได้ แต่อย่างไรก็ดี Hoseinifar et al. (2011) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ยีสต์ (*Saccharomyces cerevesiae ver. Ellpsoideus*) ในปลาสเตอร์เจียน (*Hosu huso*) พบว่า ที่ระดับการเสริมยีสต์ 2 เปอร์เซ็นต์ไม่ส่งผลต่อระดับภูมิคุ้มกันของปลาสเตอร์เจียน

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 กล้องจุลทรรศน์

3.1.2 เครื่องชั่งสาร 2 ตำแหน่ง

3.1.3 เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง

3.1.4 Laminar flow

3.1.5 Hot air oven

3.1.6 Incubator

3.1.7 Autoclave

3.1.8 Spectrophotometer

3.1.9 Microplate reader

3.1.10 Centrifuge

3.1.11 Vortex

3.1.12 DO meter

3.1.13 Salinometer

3.1.14 Hemocytometer

3.1.15 Auto pipetted ขนาด 20 200 และ 1000 ไมโครลิตร

3.1.16 กระบอกฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร

3.1.17 เข็ม ขนาด 25 G×1นิ้ว

3.1.18 96-well plate

3.1.19 Plate

3.1.20 Slide

3.1.21 Cover slip

3.1.22 Appendrof

3.1.23 ขวดเก็บสารและน้ำตัวอย่าง

3.1.24. หลอดทดลองและอุปกรณ์เครื่องแก้ว

3.1.25 ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.1.26 ตู้กระจกขนาด 60×30×35 เซนติเมตร

3.1.27 ถังพลาสติกขนาด 43×63×36 เซนติเมตร

3.1.28 กล่องเก็บความเย็น

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.1 Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS)

3.2.1.2 Tryptic soy agar (TSA)

3.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาภูมิคุ้มกัน

3.2.2.1 10 % Tri-sodium citrate

3.2.2.2 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.2.2.3 0.3% NBT (Nitroblue tetrazolium)

3.2.2.4 Absolute methanol

3.2.2.5 70% methanol

3.2.2.6 2M KOH

3.2.2.7 MHBSS (modified complete Hank's balanced salt solution)

3.2.2.8 Cacodylate buffer (10nM sodium cacodylate, 10mM $CaCl_2$, pH7)

3.2.2.9 Trypsin (0.1% ใน cacodylate buffer)

3.2.2.10 L-dihydroxyphenylanine (L-DOPA)

3.2.2.11 0.1M NaOH

3.2.2.12 2.6% NaCl

3.2.2.13 RMPI medium

3.2.2.14 Shrimp saline (0.9% NaCl ละลายในน้ำกลั่น)

3.2.2.15 Latex beads

3.2.2.16 Wright stain

3.2.2.17 Giemsa stain

3.2.2.18 Permout

3.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

3.2.3.1 ฟีนอฟทาลีน อินดิเคเตอร์ (phenolphthalein indicator)

3.2.3.2 เมทิลออร์เรนจ์ อินดิเคเตอร์ (methyl orang indicator)

3.2.3.3 0.02 นอร์มอล ซัลฟูริก แอซิด (0.02N H_2SO_4)

3.2.3.4 สารละลายฟีนอล (phenol solution)

3.2.3.4 สารละลายออกซิเดซิ่ง (oxidizing solution)

3.2.3.5 สารละลายซัลฟานิลาไมด์ (sulfanilarmind solution)

3.2.3.6 สารละลายแนฟทิล เอทิลลีนไดอะมีน ไดไฮโดรคลอไรด์ (NED)

3.2.3.7 สารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ (sodium nitropluside solution)

3.3 สัตว์ทดลอง

3.3.1 กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

3.4 เชื้อแบคทีเรีย

3.4.1 *Vibrio harveyi*

3.5 ซิงเกิลเซลล์โปรตีนที่ใช้ในสูตรอาหารทดลอง

3.5.1 ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (Synthetic lysine by-product, SLP)

3.5.2 ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (Monosodium glutamate by-product, MSGP)

3.5.3 ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* (Dride yeast by-product, YP)

3.6 สถานที่ทำการวิจัย

หลักสูตรวิชาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.7 วิธีการ

3.7.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยนำกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) จากฟาร์มเลี้ยงของเกษตรกรซึ่งผ่านการตรวจสุขภาพและปลอดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัสมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ หลังจากปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาพห้องทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จึงนำไปเลี้ยงในตู้กระจกที่มีระบบน้ำหมุนเวียนขนาด 60×30×35 เซนติเมตร ปริมาตรน้ำ 60 ลิตร จำนวน 15 ตู้ โดยการทดลองที่ 1 การใช้ผลพลอยได้จาก

กระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม โดยเลี้ยงกุ้งขาวน้ำหนักเริ่มต้น 5.70-5.87 กรัมต่อตัว จำนวน 15 ตู้ ตู้ละ 15 ตัว ระยะเวลาการเลี้ยง 45 วัน การทดลองที่ 2 การใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม เลี้ยงกุ้งขาวน้ำหนักเริ่มต้น 10.16-10.28 กรัมต่อตัว ตัว จำนวน 15 ตู้ ตู้ละ 15 ตัวระยะเวลาการเลี้ยง 45 วัน และการใช้กากยีสต์จากกระบวนการหมักเอทานอลต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม กุ้งขาวน้ำหนักเริ่มต้น 1.01-1.03 กรัมต่อตัว ตัว จำนวน 15 ตู้ ตู้ละ 20 ตัวระยะเวลาการเลี้ยง 12 สัปดาห์ โดยแต่ละการทดลองแบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยให้อาหารที่มีการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและยีสต์) ในสูตรอาหารในระดับที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ดังนี้ 0 (กลุ่มควบคุม), 2.5, 5, 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3.7.2 ขั้นตอนการดำเนินการ

3.7.2.1 การเตรียมอาหารทดลองและการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร

เตรียมอาหารทดลองโดยมีการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและยีสต์) ในสูตรอาหารในระดับที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ดังนี้ 0 (กลุ่มควบคุม), 2.5, 5, 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยมีโปรตีนและไขมันในอาหารใกล้เคียงกัน ทำการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร ดังนี้ (ตารางที่ 3.1-3.7)

1) โปรตีน ตามวิธีการ Kjeldahl method (AOAC, 1995)

คำนวณจากสูตร เปอร์เซ็นต์โปรตีน $= [1.4(V2-V1)\ N \times 6.25] / W$

V1 = ปริมาตรของกรดซัลฟูริกที่ใช้ไตเตรท blank

V2 = ปริมาตรของกรดซัลฟูริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

N = ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก

W = น้ำหนักตัวอย่างอาหาร

2) ไขมัน ตามวิธีการ Soxhlet extraction method (AOAC, 1995)

คำนวณจากสูตร เปอร์เซ็นต์ไขมันในอาหาร $= [(b-a)] \times 100/W$

a = น้ำหนักของถ้วยสกัด

b = น้ำหนักของถ้วยสกัด และไขมันหลังอบ

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

3) วิเคราะห์วัตถุแห้งหรือความชื้น โดยอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง (AOAC, 1995)

คำนวณจากสูตร เปอร์เซ็นต์ความชื้น = $[(a-b)] \times 100/W$

a = น้ำหนักขวดชั่งและตัวอย่างก่อนอบ

b = น้ำหนักขวดชั่งและตัวอย่างหลังอบ

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

คำนวณจากสูตร เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง = $[(b-c)] \times 100/W$

b = น้ำหนักขวดชั่งและตัวอย่างหลังอบ

c = น้ำหนักขวดชั่ง

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

4) เถ้า โดยอบแห้งที่อุณหภูมิ 550-600 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง (AOAC, 1995)

คำนวณจากสูตร เปอร์เซ็นต์เถ้าทั้งหมดในอาหาร = $[(b-a)] \times 100/W$

a = น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง

b = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องและตัวอย่างหลังเผา

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

5) เยื่อใย (AOAC, 1995)

คำนวณจากสูตร เปอร์เซ็นต์เยื่อใย = $[(A + D - B) - E] \times 100/C$

A = น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง

B = น้ำหนัก fiber bag

C = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

D = น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง

E = น้ำหนัก fiber bag

6) คาร์โบไฮเดรต และ Nitrogen-free extracts (NFE) (NRC, 2011)

คำนวณจากสูตร NFE = 100 - (%โปรตีน + %ไขมัน + %เยื่อใย + %เถ้า + %ความชื้น)

3.7.2.2 การเลี้ยงกุ้งทดลองและการให้อาหาร

เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารทดลองที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือที่ระดับการการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีน 0 (กลุ่มควบคุม), 2.5, 5, 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 45 วัน โดยให้อาหารจนอิ่มทุกวัน ๆ วันละ 4 ครั้ง (08.00น. 12.00น. 16.00น. และ 20.00น.)

3.7.2.3 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ทำการตรวจคุณภาพน้ำ ได้แก่ ความเค็ม(salinity) อุณหภูมิ (temperature) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen) ทุกวัน (8.00 น. และ 16.00 น.) และเปลี่ยนถ่ายน้ำ 2 ครั้งต่อสัปดาห์ ครั้งละ 50 เปอร์เซ็นต์ ก่อนเปลี่ยนถ่ายน้ำมีการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ได้แก่ ความเป็นด่าง (alkalinity) ตามวิธีการของ APHA, AWWA and WEF (1998) อ้างโดย สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2551) แอมโมเนียรวม (total ammonia, TAN) และ ไนไตรท์ (nitrite) ตามวิธีการของ Strickland and Parsons (1972) อ้างโดย สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2551)

3.7.2.4 การเก็บตัวอย่างกุ้งเพื่อประเมินการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์จากอาหาร

ในระหว่างการศึกษา ทำการชั่งวัดน้ำหนักกุ้งทุก ๆ 2 สัปดาห์ เพื่อประเมินการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์จากอาหาร ดังนี้ (ตามวิธีการของ Prachom et al., 2013)

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain; WG)

คำนวณจากสูตร น้ำหนักสุดท้าย (กรัม) – น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)

อัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio; FCR)

คำนวณจากสูตร น้ำหนักอาหารที่กุ้งกิน (กรัม)/น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น (กรัม)

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate; SGR)

คำนวณจากสูตร

SGR = [In (น้ำหนักสุดท้าย (กรัม) – น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม))] × 100/ จำนวนวันที่เลี้ยง

อัตราส่วนประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio; PER)

คำนวณจากสูตร

PER = น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)/ น้ำหนักโปรตีน (กรัม)

อัตราการรอด (survival)

คำนวณจากสูตร

survival = จำนวนกุ้งหลังสิ้นสุดการทดลอง(ตัว) × 100/ จำนวนกุ้งเริ่มการทดลอง(ตัว)

3.7.2.5 การเก็บตัวอย่างกุ้งเพื่อประเมินค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ซึ่งภายในกระบอกฉีดยาบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (10 เปอร์เซ็นต์ Tri-sodium citrate) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เจาะบริเวณแอ่งเลือด (sinus vinous) หรือโคนขาเดินคู่ที่ 5 เพื่อประเมินค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดังนี้

1) การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocytes count; THC) และจำนวนเม็ดเลือดแต่ละชนิด (differential hemocyte count) ตามวิธีการของ Moullac et al. (1997) โดยหยดตัวอย่างเลือดกุ้ง 20 ไมโครลิตรลงบน hemocytometer ทำการส่องนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า

2) การหากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion production; O_2^-) โดยวัดการลดลงของ NBT (nitroblue tetrazolium) จากความสามารถของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์เอนไอออนที่สามารถเปลี่ยน NBT ไปเป็น Formazan ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ตามวิธีการของ Munoz et al. (2000)

3) การทดสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity; PO) โดยวัดความสามารถของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่สามารถเปลี่ยน L-dihydroxyphenylanine (L- DOPA) ไปเป็นโดปามีน (dopamine) ด้วยการดูดกลืนแสงของสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ตามวิธีการของ Söderhäll and Häll (1984) และ Hernández-López et al. (1996)

4) กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง (phagocytic activity) ตามวิธีการของ Itami et al. (1994) โดยดูดเลือดกุ้ง 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดฉีดยาที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัวของเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบ 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นนำเม็ดเลือดที่ตกตะกอนมานับจำนวนเซลล์และปรับให้ได้ 2×10^7

เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย RPMI medium หลังจากนั้นดูดเม็ดเลือด 0.2 มิลลิลิตร หยดลงบน cover slip โดยเกลี่ยให้ทั่ว ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วล้างออกด้วย shrimp saline จากนั้นหยดลาเทคบีด (latex beads) ที่มีจำนวน 2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ล้างออกด้วย shrimp saline แล้วย้อมด้วยสี wright และ giemsa stain 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น และทิ้งไว้ให้แห้งจึงทำการปิดสไลด์ด้วย permount นำไปวิเคราะห์ข้อมูลโดยการสุ่มนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือด 200 เซลล์ และนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่กินเม็ดบีดเข้าไปคำนวณค่าจากสูตร

%Phagocytosis = จำนวนเม็ดเลือดที่กินเม็ดบีดเข้าไป × 100/จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด

5) กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง (bactericidal activity) ตามวิธีการของ กิจการ และคณะ (2543) โดยนำเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่แยกบริสุทธิ์มาเพิ่มจำนวนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ผสมเกลือ (NaCl) 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาเจือจางในน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.1 และนำไปเพาะเชื้อบนอาหาร TCBS agar ด้วยวิธี Spread plate เพื่อนับจำนวนโคโลนีเริ่มต้น จากนั้นทำการดูดเลือดกุ้งจากแอ่งเลือด และนำตัวอย่างเลือดไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 รอบ นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้น ดูดซีรั่มที่เป็นส่วนใสด้านบนมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 % แบบ two-fold dilution ในระดับ 1:2 1:4 1:8 1:16 และ 1:32 โดยปริมาตรการเจือจางเป็น 0.5 มิลลิลิตร นำเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* บริสุทธิ์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเติมในแต่ละหลอดที่เจือจางซีรั่มไว้แล้วในปริมาตรที่เท่ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำส่วนผสมแต่ละหลอดปริมาตร 10 ไมโครลิตรมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Drop plate ใน TCBS agar บันทึกค่าของการเจือจางซีรั่มที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง

6) กระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากระบบหมุนเลือด (clarence efficiency) ตามวิธีการของ Adams (1991) โดยฉีดเชื้อ *Vibrio harveyi* เข้าบริเวณกล้าม ที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และกลุ่มควบคุมใช้น้ำเกลือ (0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl) หลังจากฉีดเชื้อ 3 ชั่วโมง ทำการดูดเลือดกุ้ง 0.5 มิลลิลิตร และนำไป spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar ปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.7.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว วิเคราะห์ความแปรปรวน ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย (one-way ANOVA) โดยใช้วิธี Dancan's New multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 16.0

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบทางเคมี และกรดอะมิโน ของแหล่งโปรตีนที่ใช้ในอาหารทดลอง (%, as dry basis)

Ingredients	FM65[1]	FM60[2]	FM55[3]	PBM[4]	SBM[5]	FSBM[6]	SLP[7]	MSGP[8]	YP[9]
Moisture	8.0	6.0	8.0	11.0	11.0	8.4	5.3	6.8	5.7
Ash	14.3	21.6	26.0	7.5	6.3	7.0	2.1	3.6	13.6
Crude protein	65.4	63.9	55.8	62.1	44.0	53.5	78.0	69.7	35.3
Crude Lipid	7.6	8.8	8.0	19.8	1.5	1.7	0.9	3.6	2.1
Fiber	1.0	0.3	1.0	-	7.3	4.2	0.2	1.7	3.7
Amino acid composition (AA)									
Essential AA									
Arginine	3.7	3.5	3.4	4.6	3.6	4.6	3.8	3.2	1.2
Histidine	1.6	1.3	1.2	0.9	1.3	1.4	1.4	1.4	0.7
Isoleucine	3.1	2.6	1.9	2.6	2.6	2.3	3.1	2.7	1.3
Leucine	5.0	4.2	3.4	4.8	3.8	4.1	5.2	4.5	2.0
Lysine	5.1	4.6	3.5	2.3	2.2	3.0	8.8	2.6	2.1
Methionine	2.0	1.6	1.4	4.0	0.7	0.6	1.6	0.9	0.4
Phenylalanine	2.7	2.1	1.9	2.8	2.7	2.8	2.7	2.3	1.2
Threonine	2.8	2.4	2.1	2.7	1.3	2.5	2.9	2.8	1.5
Tryptophan	0.8	0.6	0.5	0.5	0.6	0.8	-	0.6	1.0
Valine	3.5	3.0	2.4	3.8	2.7	2.0	3.8	3.4	1.7
Non-Essential AA									
Alanine	6.3	5.9	3.8	-	4.4	2.4	4.4	5.5	1.8
Aspartic acid	9.9	9.1	4.5	4.7	12.3	6.1	6.4	5.2	3.3
Glutamic acid	13.0	12.7	6.4	7.5	19.7	9.8	7.0	10.5	3.7
Tyrosine	2.2	1.9	1.5	1.8	2.0	2.1	2.3	1.6	0.3
Glycine	5.6	5.3	5.0	6.6	4.2	2.4	3.0	2.6	1.2
Proline	4.6	4.1	2.9	6.1	5.3	3.0	2.2	2.5	1.0
Serine	3.8	3.1	2.0	5.3	5.0	2.5	2.2	2.1	1.6
Cysteine	0.6	0.5	0.4	2.0	0.7	0.7	0.5	1.0	0.2

[1] FM65; Fishmeal grade 65, [2] FM60; Fishmeal grade 60, [3]FM; Fishmeal grade 55, [4]PBM; Poultry by-product meal, [5]SBM; Soybean meal, [6]FSBM; Ferment soybean meal, [7]SLP; Synthetic lysine by-product (AJINOMOTO CO. LTD.), [8] MSGP; Monosodium glutamate by-product (TONGLIA MEIHUA BIOLOGICAL SCI-TECH CO., LTD.), [9] YP; Dride yeast by-product (MITR PHOL Bio Fuel): Analytical data (*n*=3), AOAC (1995) and NRC (2011).

ตารางที่ 3.2 สูตรอาหารและองค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน (%, as dry basis)

Ingredients/treatments	SLP-0 (Control)	SLP-2.5	SLP-5.0	SLP-7.5	SLP-10.0
Fishmeal (65% CP)	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00
Fishmeal (60% CP)	10.00	7.50	5.00	2.50	0.00
SLP[1]	0.00	2.50	5.00	7.50	10.00
Soybean meal	28.50	28.50	28.50	28.50	28.50
Wheat flour	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00
Fish solubles	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Fish oil	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
Vitamin-mineral mix[2]	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Binder	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Lecithin	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
NaCl	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Antioxidants[3]	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Antimicrobial agents[4]	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Proximate compositions (Analysis) %					
Moisture	5.66	5.37	5.73	5.71	5.28
Ash	12.39	12.21	11.87	11.48	11.71
Crude protein	39.10	39.24	39.31	39.36	39.41
Crude Lipid	9.52	9.51	9.44	9.62	9.70
Fiber	4.36	4.35	4.51	4.38	4.26
NFE[5]	28.97	29.32	29.14	29.99	29.64
Gross Energy (KJ/g)[6]	1797.08	1806.01	1801.81	1824.72	1823.04

[1] Synthetic lysine by-product, [2] Vitamin-mineral premix (vitamin (unit/kg), mineral (mg/kg)): vitamin A 12,000,000 IU; vitamin D3 2,200,000 IU; vitamin E 100,000 mg; vitamin K3 12,000 mg; vitamin B1 25,000 mg; vitamin B2 25,000 mg; vitamin B6 23,000 mg; vitamin B12 43 mg; Pantothenic 75,000 mg; Niacin 125,000 mg; Folic 4,000 mg; Biotin 800 mg, vitamin 150,000 mg; Potassium 8,000; Magnesium 600; Cobalt 0.05; Copper 5; Iron 50; Iodine 5; Manganese 5; Selenium 0.3; Zinc 37. [3] Antimicrobial agent (%): formic acid 63; propionic acid 32; benzoic acid 5; [4] Antioxidant: ethoxyquin and butylated hydroxytoluene; [5] NFE; Nitrogen free extract: 100 - (Moisture+Ash+Crude protein+Crude lipid+Fiber), [6] Gross energy; protein × 23.6 + Fat × 39.5 + NFE × 17.2 (NRC, 2011)

ตารางที่ 3.3 กรดอะมิโนในอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน

Ingredients/treatments	SLP-0 (Control)	SLP-2.5	SLP-5.0	SLP-7.5	SLP-10.0
Amino acid composition (Calculate) %					
Essential AA					
Arginine	2.85	2.79	2.72	2.66	2.60
Histidine	1.12	1.12	1.11	1.11	1.11
Isoleucine	1.86	1.86	1.87	1.87	1.87
Leucine	2.89	2.89	2.90	2.90	2.91
Lysine	2.48	2.57	2.66	2.75	2.85
Methionine	0.85	0.84	0.84	0.83	0.82
Phenylalanine	1.78	1.78	1.78	1.78	1.78
Threonine	1.62	1.62	1.63	1.63	1.63
Tryptophan	0.50	0.58	0.65	0.72	0.79
Valine	2.08	2.08	2.08	2.09	2.09
Non-Essential AA					
Alanine	3.15	3.47	3.42	3.37	3.33
Aspartic acid	6.99	6.90	6.81	6.73	6.64
Glutamic acid	10.40	10.25	10.10	9.95	9.81
Tyrosine	1.14	1.14	1.15	1.15	1.15
Glycine	3.63	3.57	3.50	3.44	3.37
Proline	3.19	3.14	3.09	3.04	2.99
Serine	2.83	2.79	2.75	2.71	2.67
Cysteine	0.47	0.46	0.46	0.45	0.45

ตารางที่ 3.4 สูตรอาหารและองค์ประกอบทางเคมีในอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในระดับที่แตกต่างกัน (%, as dry basis)

Ingredients/treatments	MSGP-0 (Control)	MSGP-2.5	MSGP-5.0	MSGP-7.5	MSGP-10.0
Fishmeal 65	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00
Fishmeal 60	10.00	7.50	5.00	2.50	0.00
MSGP[1]	0.00	2.50	5.00	7.50	10.00
Soybean meal	28.50	28.50	28.50	28.50	28.50
Wheat flour	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00
Fish solubles	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Fish oil	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
Vitamin-mineral mix[2]	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Binder	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Lecithin	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
NaCl	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Antioxidants[3]	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Antimicrobial agents[4]	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Proximate compositions (Analysis) %					
Moisture	5.40	5.30	5.49	5.53	5.35
Ash	14.69	14.14	14.17	14.32	14.41
Crude protein	38.67	37.59	38.68	37.99	37.88
Crude Lipid	8.69	8.60	8.72	8.86	8.61
Fiber	5.58	5.35	5.53	5.41	5.31
NFE[5]	26.97	29.02	27.72	27.83	28.45
Gross Energy (KJ/g)[6]	1717.78	1726.04	1726.73	1727.04	1723.11

[1] Monosodium glutamate by-product, [2] Vitamin-mineral premix (vitamin (unit/kg), mineral (mg/kg)): vitamin A 12,000,000 IU; vitamin D3 2,200,000 IU; vitamin E 100,000 mg; vitamin K3 12,000 mg; vitamin B1 25,000 mg; vitamin B2 25,000 mg; vitamin B6 23,000 mg; vitamin B12 43 mg; Pantothenic 75,000 mg; Niacin 125,000 mg; Folic 4,000 mg; Biotin 800 mg, vitamin 150,000 mg; Potassium 8,000; Magnesium 600; Cobalt 0.05; Copper 5; Iron 50; Iodine 5; Manganese 5; Selenium 0.3; Zinc 37. [3] Antimicrobial agent (%): formic acid 63; propionic acid 32; benzoic acid 5; [4] Antioxidant: ethoxyquin and butylated hydroxytoluene; [5] NFE; Nitrogen free extract: 100 - (Moisture + Ash + Crude protein + Crude lipid + Fiber), [6] Gross energy; protein × 23.6 + Fat × 39.5 + NFE × 17.2 (NRC, 2011)

ตารางที่ 3.5 กรดอะมิโนในอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในระดับที่แตกต่างกัน

Ingredients/treatments	MSGP-0 (Control)	MSGP-2.5	MSGP-5.0	MSGP-7.5	MSGP-10.0
Amino acid composition (Calculate), %					
Essential AA					
Arginine	2.54	2.54	2.54	2.54	2.53
Histidine	1.13	1.12	1.11	1.08	1.06
Isoleucine	1.79	1.81	1.82	1.83	1.85
Leucine	2.75	2.77	2.79	2.81	2.82
Lysine	2.37	2.34	2.31	2.28	2.25
Methionine	0.80	0.81	0.82	0.83	0.84
Phenylalanine	1.72	1.73	1.73	1.74	1.74
Threonine	1.56	1.57	1.59	1.60	1.61
Tryptophan	0.51	0.51	0.52	0.53	0.53
Valine	1.99	1.99	1.99	1.97	1.96
Non-Essential AA					
Alanine	3.45	3.41	3.37	3.32	3.28
Aspartic acid	6.86	6.77	6.68	6.58	6.49
Glutamic acid	10.31	10.27	10.23	10.19	10.15
Tyrosine	1.09	1.08	1.07	1.07	1.06
Glycine	3.72	3.61	3.50	3.40	3.29
Proline	3.21	3.15	3.08	3.02	2.95
Serine	2.79	2.74	2.69	2.65	2.60
Cysteine	0.45	0.50	0.55	0.60	0.65

ตารางที่ 3.6 สูตรอาหารและองค์ประกอบทางเคมีในอาหารทดลองเลี้ยงสำหรับกุ้งขาวที่มีการใช้กากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน (%, as dry basis)

Ingredients/treatments	YP-0(Control)	YP-2.5	YP-5.0	YP-7.5	YP-10.0
Fishmeal (60 % CP)	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
Fishmeal (55 % CP)	9.00	8.00	7.00	6.00	5.00
YP[1]	0.00	2.50	5.00	7.50	10.00
DSBM[2]	29.50	29.50	29.50	29.50	29.50
FSBM[3]	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
Wheat flour	22.00	20.50	19.00	17.50	16.00
Poultry meal	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
Fish solubles	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Squid liver powder	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Fish oil	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
Vitamin-mineral mix[4]	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
Binder	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Antimicrobial [5]	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Antioxidant[6]	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Proximate compositions (Analysis) %					
Moisture	6.03	6.16	6.11	6.17	6.11
Ash	10.57	10.58	10.70	10.60	10.62
Crude protein	40.01	40.63	40.53	40.48	40.64
Crude Lipid	10.64	10.77	10.63	10.70	10.67
Fiber	1.78	1.84	1.84	1.88	1.88
NFE[7]	30.97	30.02	30.19	30.17	30.07
Gross Energy(KJ/g)[8]	1897.22	1900.44	1895.59	1897.07	1898.24

[1] Dry yeast, [2] Dehulled soybean meal, [3] Fermented soybean meal, [4] Vitamin-mineral premix (vitamin (unit/kg), mineral (mg/kg)): vitamin A 12,000,000 IU; vitamin D3 2,200,000 IU; vitamin E 100,000 mg; vitamin K3 12,000 mg; vitamin B1 25,000 mg; vitamin B2 25,000 mg; vitamin B6 23,000 mg; vitamin B12 43 mg; Pantothenic 75,000 mg; Niacin 125,000 mg; Folic 4,000 mg; Biotin 800 mg, vitamin 150,000 mg; Potassium 8,000; Magnesium 600; Cobalt 0.05; Copper 5; Iron 50; Iodine 5; Manganese 5; Selenium 0.3; Zinc 37. [5] Antimicrobial agent (%): formic acid 63; propionic acid 32; benzoic acid 5; [6] Antioxidant: ethoxyquin and butylated hydroxytoluene; [7] NFE; Nitrogen free extract: 100 - (Moisture + Ash + Crude protein + Crude lipid + Fiber), [8] Gross energy; protein × 23.6 + Fat × 39.5 + NFE × 17.2 (NRC, 2011)

ตารางที่ 3.7 กรดอะมิโนในอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่มีการใช้กากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน

Ingredients/treatments	YP-0(Control)	YP-2.5	YP-5.0	YP-7.5	YP-10.0
Amino acid composition (Calculate) %					
Essential AA					
Arginine	2.77	2.76	2.74	2.73	2.71
Histidine	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94
Isoleucine	1.66	1.67	1.68	1.68	1.69
Leucine	2.68	2.69	2.69	2.69	2.69
Lysine	2.03	2.04	2.05	2.06	2.07
Methionine	0.66	0.66	0.65	0.64	0.64
Phenylalanine	1.64	1.64	1.64	1.65	1.64
Threonine	1.49	1.51	1.52	1.54	1.55
Tryptophan	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Valine	1.84	1.85	1.86	1.86	1.87
Non-Essential AA					
Alanine	4.15	4.16	4.16	4.17	4.18
Aspartic acid	9.67	9.71	9.75	9.79	9.83
Glutamic acid	15.32	15.35	15.38	15.41	15.44
Tyrosine	0.92	0.94	0.95	0.96	0.98
Glycine	3.27	3.25	3.23	3.21	3.19
Proline	3.27	3.26	3.26	3.25	3.25
Serine	2.82	2.84	2.86	2.88	2.90
Cysteine	0.70	0.69	0.69	0.69	0.68

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียในสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว

4.1.1 การทดลองที่ 1 การใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ในสูตรอาหาร ต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว

1) ผลต่อการเจริญเติบโต

การศึกษาการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ในสูตรอาหารกุ้งขาวแวนไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่ระดับ 0(กลุ่มควบคุม), 2.5, 5, 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.2) กุ้งน้ำหนักเริ่มต้น 5.79±0.14 กรัมต่อตัว (P>0.05) ระยะเวลาการเลี้ยง 45 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ทุกระดับการใช้ผลพลอยได้จากการผลิตไลซีนสังเคราะห์ มีค่าน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ได้ของโปรตีนในอาหารกุ้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม (P>0.05) ยกเว้นค่าอัตราการแลกเนื้อ มีค่าเพิ่มขึ้นตามระดับการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ โดยที่ระดับ 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมและชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และมีค่าอัตรารอดมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ในทุกกลุ่มการทดลอง (P>0.05) (ตารางที่ 4.1) และองค์ประกอบทางเคมีในกุ้งของทุกกลุ่มการทดลอง มีค่าความชื้น เถ้า โปรตีน และไขมัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) เช่นกัน (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.1 ผลของการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว ระยะเวลาการเลี้ยง 45 วัน (mean ± SD, n = 3)

Parameters	Treatments (%)					P-value
	SLP-0	SLP-2.5	SLP-5.0	SLP-7.5	SLP-10.0	
IW(g/shrimp)	5.77±0.16	5.70±0.06	5.79±0.20	5.83±0.21	5.87±0.10	ns.
FW(g/shrimp)	13.21±0.59	14.14±0.22	14.10±1.14	13.56±0.99	13.05±0.62	ns.
FI (g/shrimp)	12.09±0.35	13.92±0.12	13.87±1.75	13.48±1.74	12.83±1.15	ns.
WG (g/shrimp)	7.44±0.43	8.44±0.27	8.31±1.10	7.73±1.11	7.18±0.69	ns.
FCR	1.63±0.05[a]	1.65±0.04[ab]	1.67±0.08[ab]	1.75±0.04[ab]	1.79±0.02[c]	sig.
SGR (%/day)	1.84±0.04	2.01±0.06	2.03±0.09	1.87±0.21	1.78±0.18	ns.
PER (%/day)	1.35±0.05	1.35±0.03	1.39±0.13	1.27±0.17	1.23±0.08	ns.
PRE (%/day)	0.79±0.26	0.85±0.21	1.02±0.30	0.96±0.34	0.99±0.24	ns.
Survival (%)	91.11±3.85	82.22±3.85	86.67±6.67	86.67±6.67	84.44±3.85	ns.

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

sig. หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางถิติ ($P<0.05$)

ns. หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

IW; Initial weight, FW; Final weight, FI; Feed intake, WG; Weight gain, FCR; Feed conversion ratio, SGR; Specific growth rate, PER; Protein efficiency ratio and PRE; Protein retention efficiency, $P<0.05$ significant

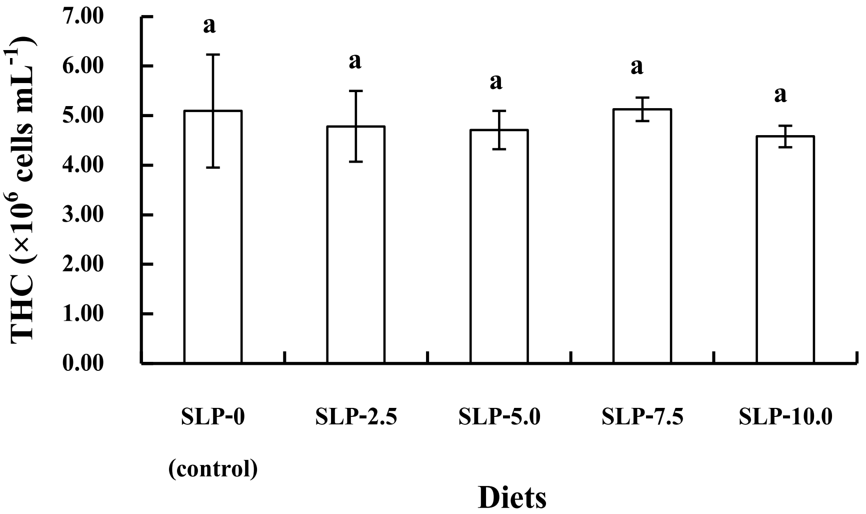
ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบทางเคมีในกุ้งที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน (%, wet weight, mean ± SD, n = 3)

Parameters	Initial body composition	Treatments (%)					P-value
		SLP- 0	SLP- 2.5	SLP- 5.0	SLP- 7.5	SLP- 10	
Moisture	78.25±0.91	77.43±0.81	76.03±0.99	76.61±1.21	75.53±0.89	76.26±0.99	ns.
Ash	2.22±0.11	3.07±0.42	3.02±0.02	2.80±0.53	3.07±0.54	3.12±0.36	ns.
Protein	12.36±0.23	16.71±1.49	17.68±1.27	18.67±1.62	18.22±2.03	18.17±1.56	ns.
Lipid	5.19±1.10	5.15±0.87	5.14±0.14	5.39±0.17	5.30±0.54	5.36±0.45	ns.

ns. หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

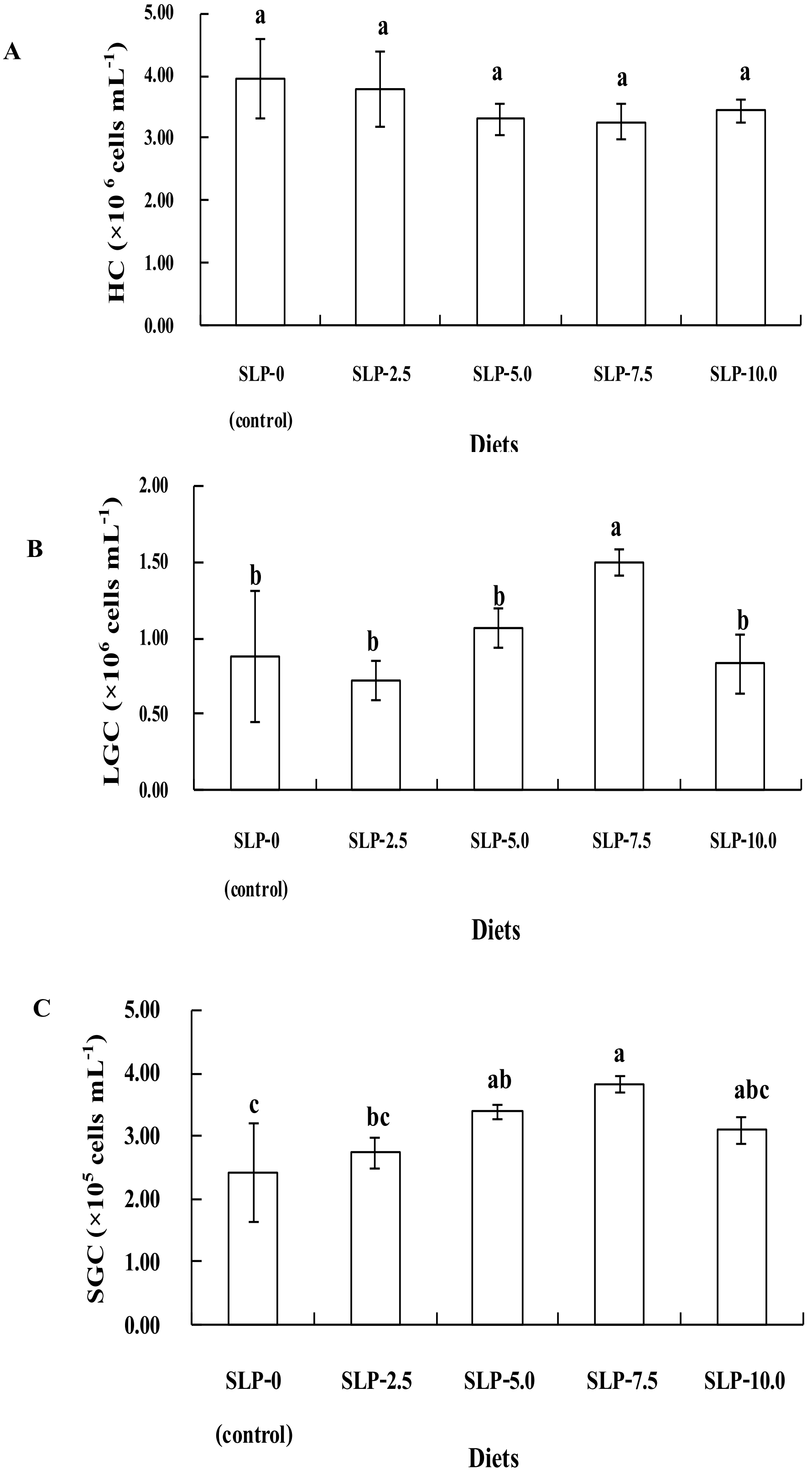
2) ผลต่อค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน

จากการศึกษาผลของการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ในสูตรอาหารต่อค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า ที่ระดับการใช้ผลพลอยได้จากการผลิตไลซีนสังเคราะห์ในระดับต่างๆ ไม่ส่งผลต่อค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันอย่างชัดเจน โดยจำนวนเม็ดเลือดรวม และเม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ในทุกกลุ่มการทดลอง (ภาพที่ 4.1 และ 4.2A) ในขณะที่เม็ดเลือดชนิดลาร์จแกรนูลาเซลล์ เซมิแกรนูลาเซลล์ และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ที่ระดับการใช้ผลพลอยได้จากการผลิตไลซีนสังเคราะห์ 7.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงสุด ($1.49 \pm 0.09 \times 10^6$, $3.81 \pm 0.13 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 1.22 ± 0.02 ตามลำดับ) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม (P<0.05) (ภาพที่ 4.2B, C และ ภาพที่ 4.3) อย่างไรก็ตาม มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (ภาพที่ 4.4 และ 4.5) และกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียในน้ำเลือด (ภาพที่ 4.6) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง (P>0.05)



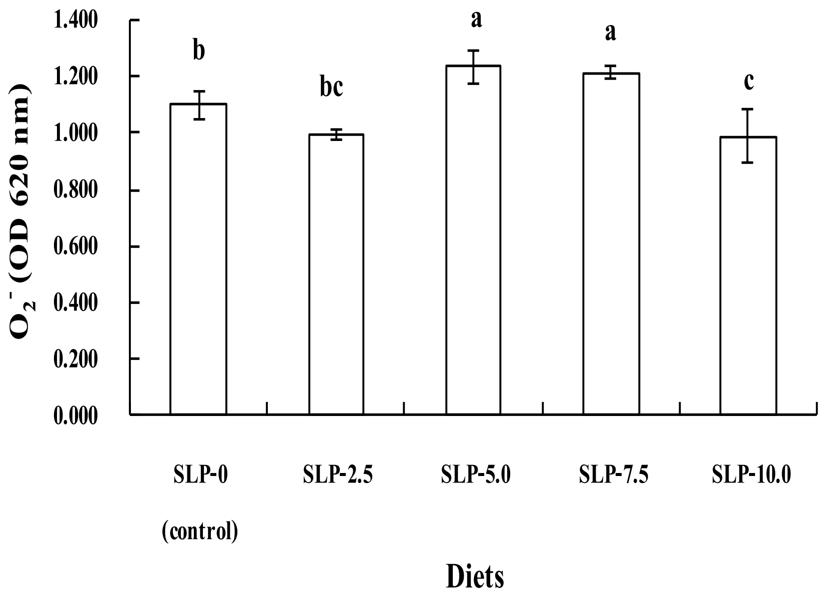
ภาพที่ 4.1 จำนวนเม็ดเลือดรวม (THC) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n=3)

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



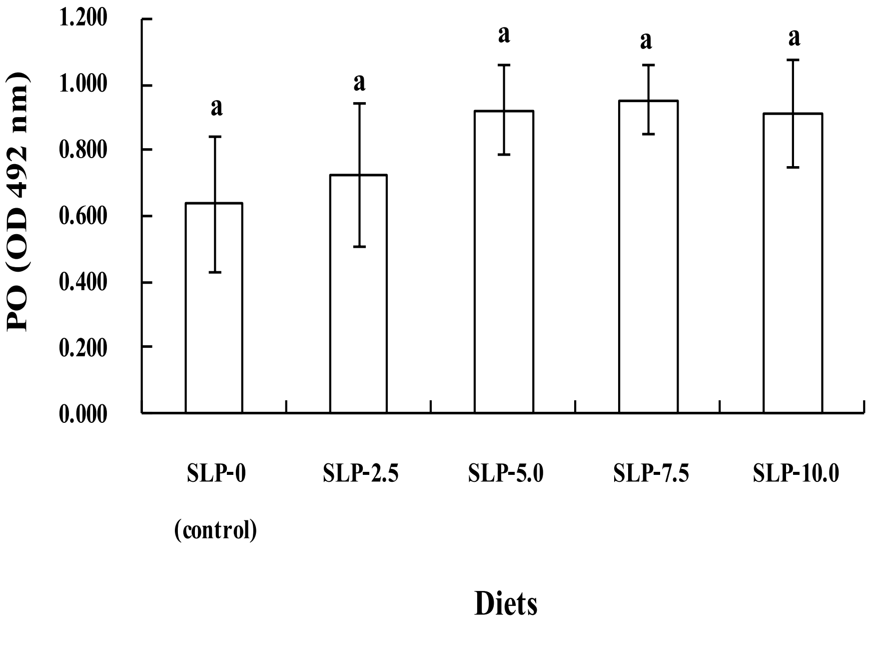
ภาพที่ 4.2 A; เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ (HC), B; เม็ดเลือดชนิดลาร์จแกรนูลาเซลล์ (LGC) และ C; เม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาเซลล์ (SGC) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน(mean ± SD, n=3)

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



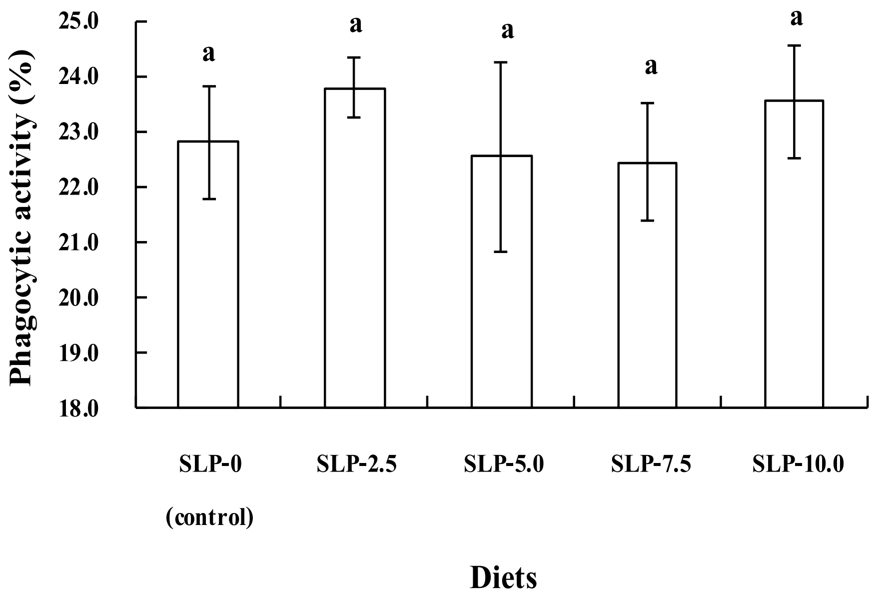
ภาพที่ 4.3 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n=3)

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



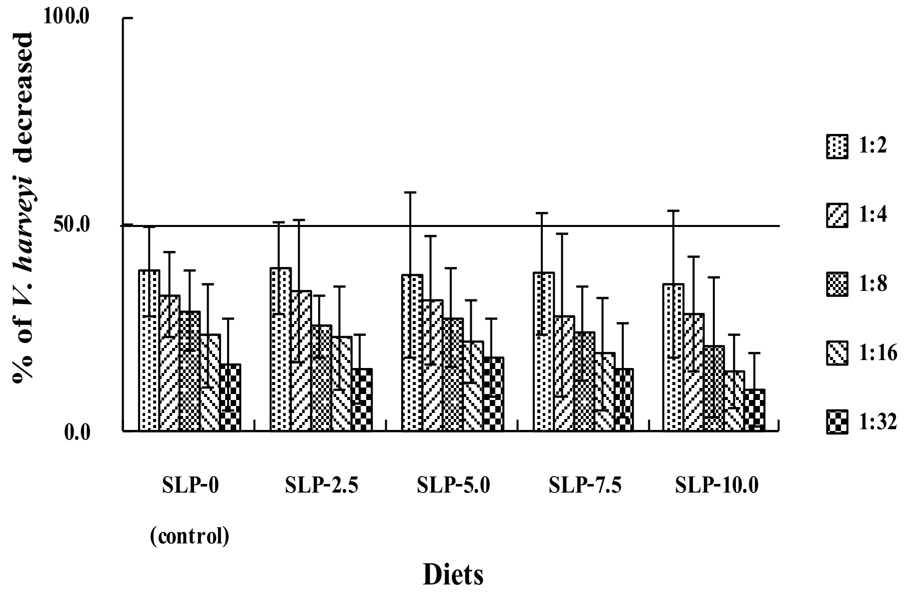
ภาพที่ 4.4 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n=3)

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 4.5 กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytosis activity) ในกุ้งขาว ที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n=3)

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



ภาพที่ 4.6 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง (bactericidal activity) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์(SLP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n=3)

3) คุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง

ผลของคุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง พบว่า มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำอยู่ในช่วง 4.98-6.37 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 6.69-7.40 อุณหภูมิ 26.8-28.8 องศาเซลเซียส ความเค็ม 5 พีพีที แอมโมเนีย 0-0.29 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนไตรท์ 0-0.28 มิลลิกรัมต่อลิตร และอัลคาไลน์ 108-186 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้ง (ตารางผนวกที่ 3)

4.1.2 การทดลองที่ 2 การใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสในสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว

1) ผลต่อการเจริญเติบโต

การศึกษาการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสในสูตรอาหารกุ้งขาวแวนไม น้ำหนักเริ่มต้น 10.22±0.11 กรัมต่อตัว (P>0.05) ระยะเวลาการเลี้ยง 45 วัน กุ้งในทุกกลุ่มการทดลองได้รับอาหารทดลองที่ระดับแตกต่างกัน คือ 0 (กลุ่มควบคุม), 2.5, 5, 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.4) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ค่าการเจริญเติบโตลดลงเมื่อมีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสในระดับที่เพิ่มขึ้น โดยกลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสที่ระดับ 2.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าสูงที่สุด รองลงมาเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่ อัตราการแลกเนื้อ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อมีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสในระดับที่เพิ่มขึ้น โดยที่ระดับการใช้ 2.5 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม (P>0.05) แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน ประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ได้ของโปรตีนในอาหารกุ้งในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ส่วนอัตรารอดของกลุ่มควบคุมมีค่าสูงสุด แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มการทดลองอื่นๆ (P>0.05) โดยมีค่าระหว่าง 61-75 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05) (ตารางที่ 4.3) และองค์ประกอบทางเคมีในกุ้งที่ระดับการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสที่ระดับ 2.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความชื้น เถ้า โปรตีน และไขมัน มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ (P>0.05) กับกลุ่มควบคุมเช่นกัน (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.3 ผลของการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว ระยะเวลาการเลี้ยง 45 วัน (mean ± SD, n = 3)

Parameters	Treatments (%)					P-value
	MSGP - 0	MSGP- 2.5	MSGP - 5.0	MSGP - 7.5	MSGP - 10.0	
IW(g/shrimp)	10.17±0.09	10.16±0.14	10.28±0.13	10.19±0.10	10.28±0.13	ns.
FW(g/shrimp)	15.30±0.12^{b}	15.80±0.32^{a}	14.89±0.09^{c}	14.48±0.13^{d}	14.57±0.25^{cd}	sig.
FI (g/shrimp)	7.80±0.40	9.26±0.44	7.94±0.82	7.66±0.42	8.11±0.89	ns.
WG (g/shrimp)	5.13±0.20^{b}	5.63±0.22^{a}	4.61±0.13^{c}	4.29±0.08^{c}	4.29±0.36^{c}	sig.
FCR	1.52±0.13^{a}	1.65±0.11^{ab}	1.72±0.21^{ab}	1.79±0.07^{b}	1.89±0.07^{b}	sig.
SGR (%/day)	0.91±0.04^{b}	0.98±0.03^{a}	0.82±0.03^{c}	0.78±0.01^{c}	0.77±0.06^{c}	sig.
PER (%)	1.71±0.13^{a}	1.62±0.07^{ab}	1.53±0.19^{abc}	1.47±0.05^{bc}	1.40±0.05^{a}	sig.
PRE (%)	0.38±0.07	0.35±0.06	0.36±0.07	0.31±0.03	0.27±0.02	ns.
Survival (%)	75.00±8.33	66.67±4.81	61.11±4.43	63.89±4.81	66.67±8.33	ns.

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

sig. หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางถิติ (P<0.05)

ns. หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

IW; Initial weight, FW; Final weight, FI; Feed intake, WG; Weight gain' FCR; Feed conversion ratio, SGR; Specific growth rate, PER; Protein efficiency ratio and PRE; Protein retention efficiency

ตารางที่ 4.4 องค์ประกอบทางเคมีในกุ้งที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในระดับที่แตกต่างกัน (%, wet weight, mean ± SD, n = 3)

Parameters	Initial body composition	Treatments (%)					P-value
		MSGP - 0	MSGP - 2.5	MSGP - 5.0	MSGP - 7.5	MSGP - 10.0	
Moisture	78.59±0.33	76.03±0.87	75.21±0.83	75.18±0.06	76.28±0.61	76.19±0.29	ns.
Ash	2.45±0.40	2.68±0.66	2.69±0.22	2.67±0.34	2.75±0.10	2.51±0.11	ns.
Protein	18.45±0.39	19.40±0.51	19.68±0.54	19.53±0.66	19.16±0.35	19.10±0.32	ns.
Lipid	1.72±0.17	2.35±0.08^{ab}	3.38±0.47^{a}	2.60±0.57^{ab}	1.81±0.30^{ab}	2.21±0.38^{ab}	sig.

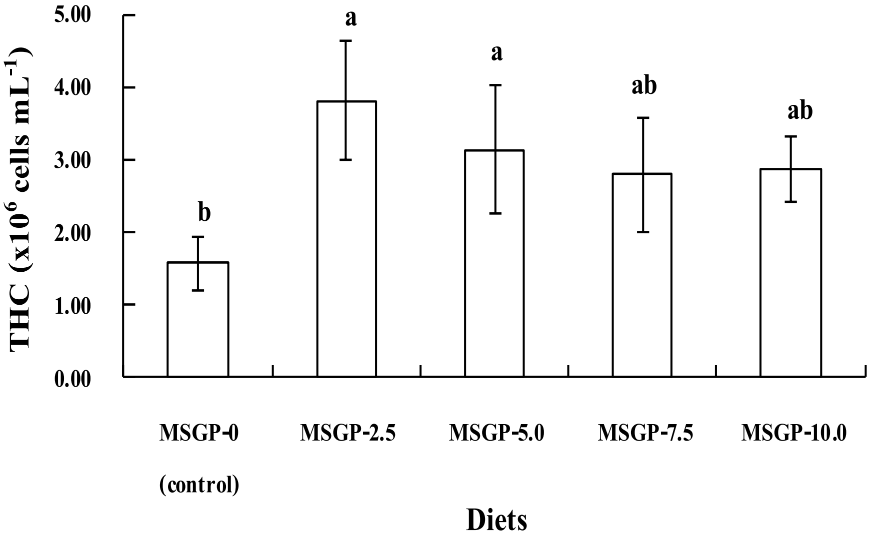
หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

sig. หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางถิติ (P<0.05)

ns. หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

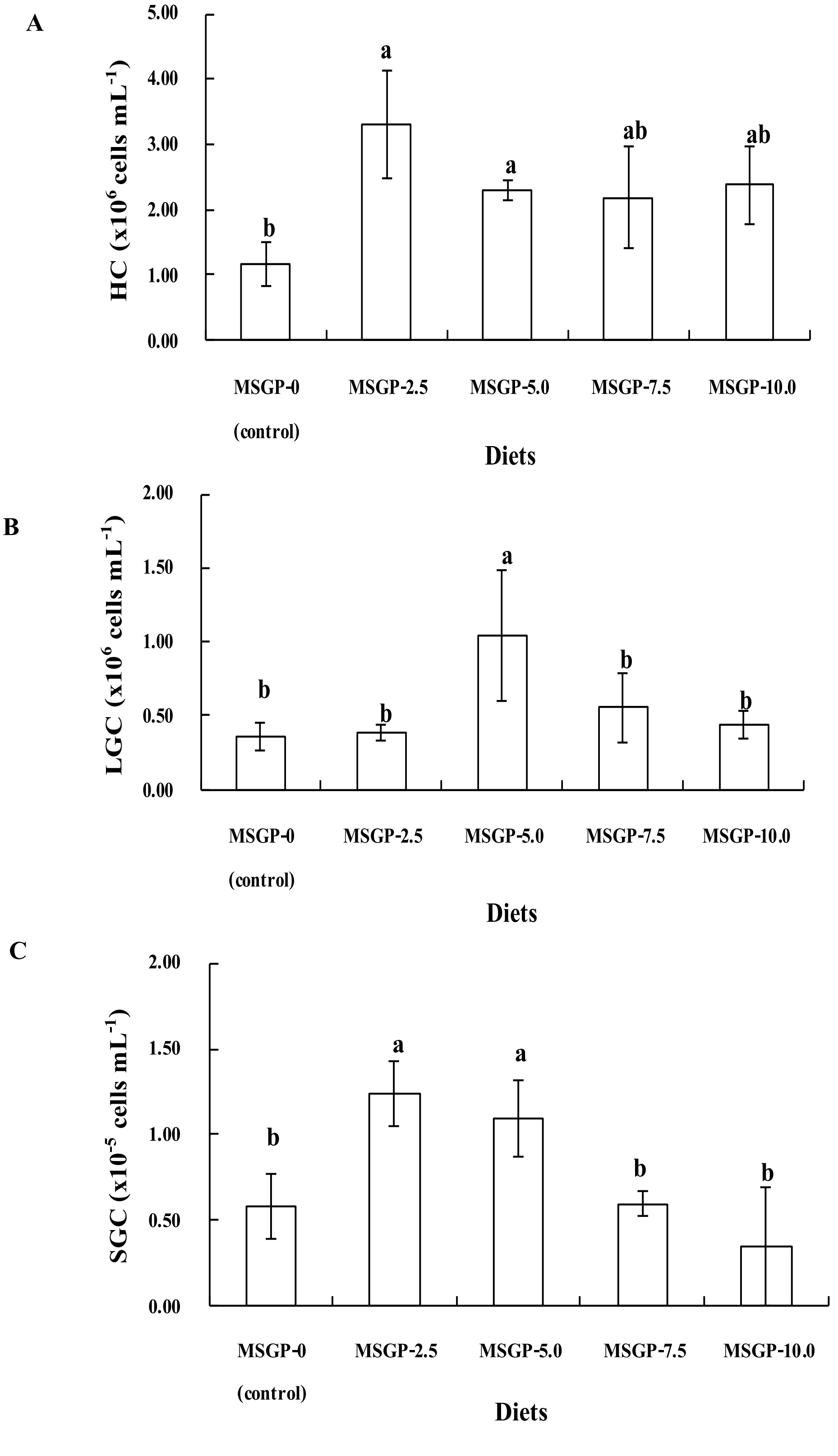
2) ผลต่อค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

จากการศึกษาผลของการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสในสูตรอาหารต่อค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว พบว่า ค่าจำนวนเม็ดเลือดรวม เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ เซมิแกรนูลาร์เซลล์ และกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ในกลุ่มการทดลองที่ระดับ 2.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) (ภาพที่ 4.7, 4.8A, 4.8C และ 4.9) โดยมีค่าสูงสุดที่ระดับการใช้ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ($3.80\pm0.82\times10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร, $3.31\pm0.83\times10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร, $1.24\pm0.19\times10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 2.11 ± 0.15 ตามลำดับ) รองลงมาที่ระดับการใช้ 5 เปอร์เซ็นต์ ($3.15\pm0.88\times10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร, $2.29\pm0.16\times10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร, $1.10\pm0.22\times10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 1.88 ± 0.04 ตามลำดับ) ในขณะที่ ค่าเม็ดเลือดชนิดลาร์จแกรนูลาร์เซลล์ พบว่า ที่ระดับการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส 5.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงสุด ($1.04\pm0.45\times10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ภาพที่ 4.8B) อย่างไรก็ตาม ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม และกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียในน้ำเลือด ไม่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนทางสถิติระหว่างทุกระดับการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสและกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) (ภาพที่ 4.10, 4.11 และ 4.12) ซึ่งหากดูจากการตอบสนองทางค่าโลหิตวิทยาและภูมิคุ้มจะเห็นว่าที่ระดับการใช้ 2.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีกว่ากลุ่มควบคุม แต่เมื่อพิจารณาร่วมกับการเจริญเติบโตจะเห็นว่าการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสที่ระดับ 2.5 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมที่สุด



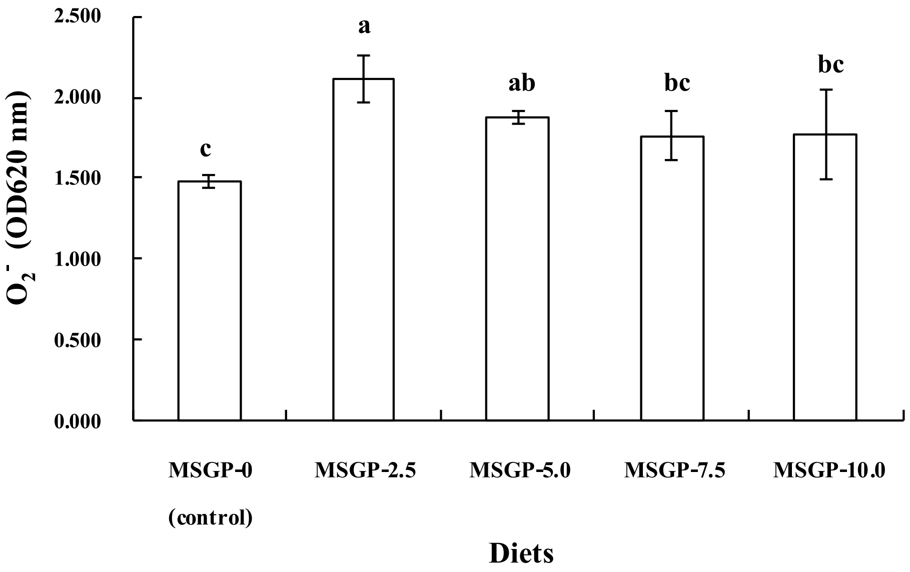
ภาพที่ 4.7 จำนวนเม็ดเลือดรวม (THC) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3)

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



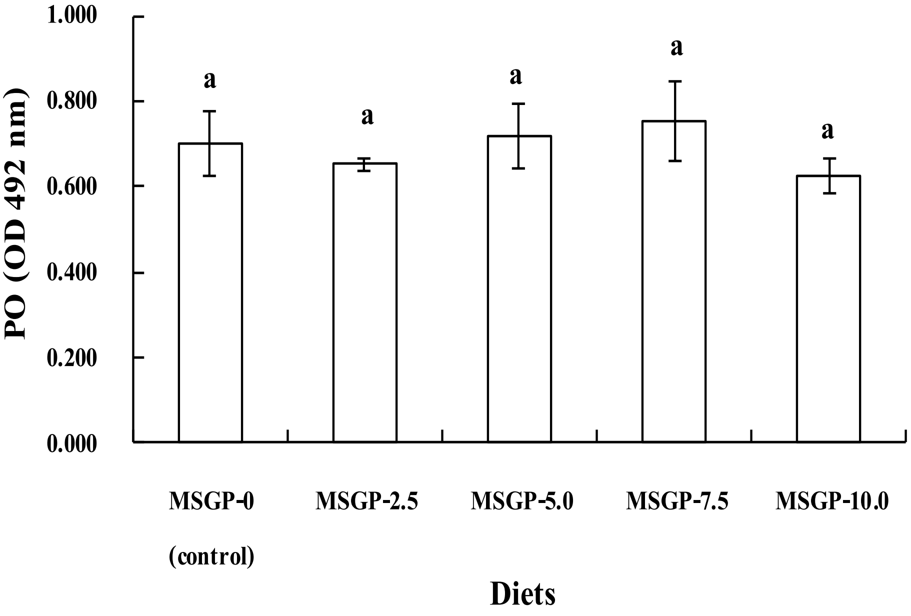
ภาพที่ 4.8 A; เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ (HC), B; เม็ดเลือดชนิดลาร์จแกรนูลาเซลล์ (LGC) และ C; เม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาเซลล์ (SGC) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3)

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



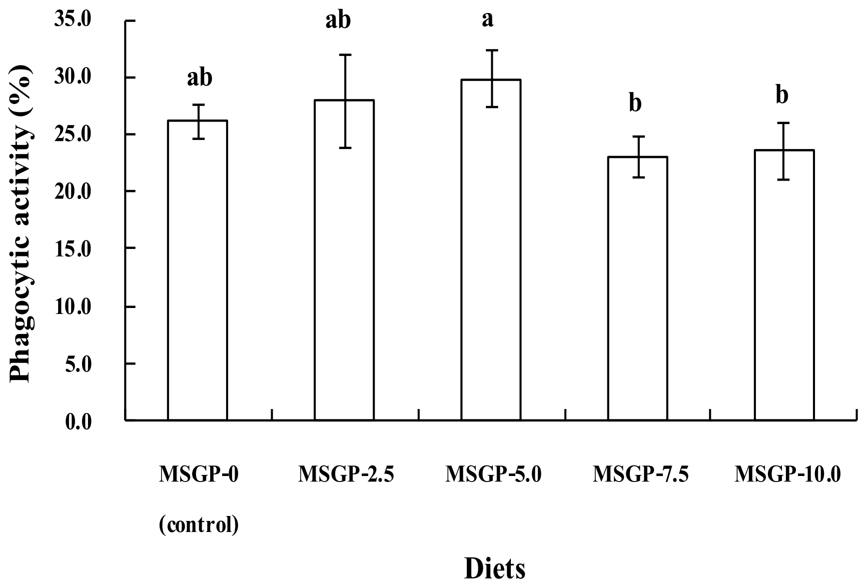
ภาพที่ 4.9 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3)

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



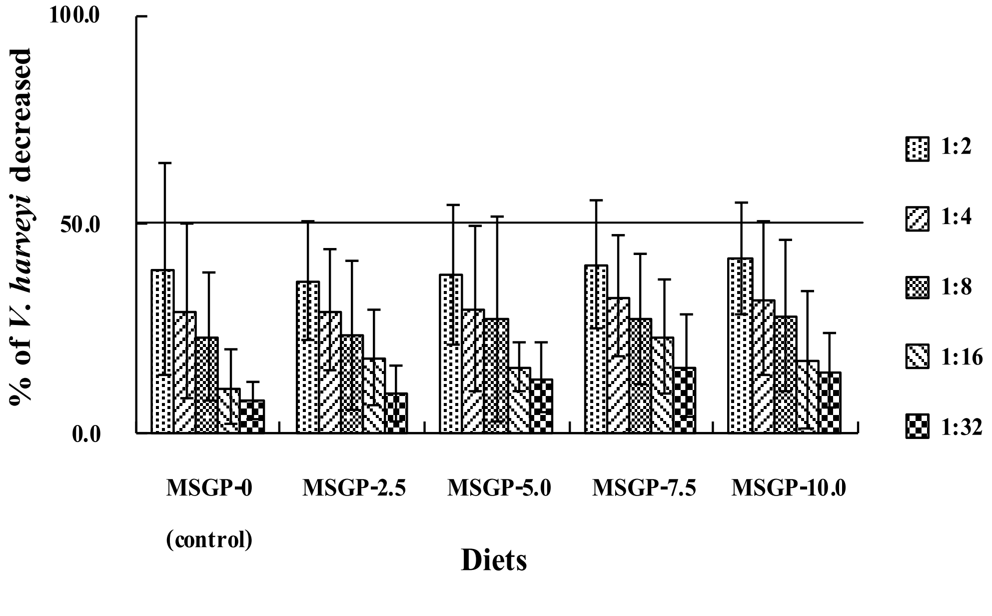
ภาพที่ 4.10 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3)

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 4.11 กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytosis activity) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3)

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



ภาพที่ 4.12 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง (bactericidal activity) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3)

3) คุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง

ผลของคุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง พบว่า มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำอยู่ในช่วง 4.96 - 5.32 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 7.26 - 7.27 อุณหภูมิ 27.8 - 27.9 องศาเซลเซียส ความเค็ม 10 พีพีที แอมโมเนีย 0.69 - 0.79 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนไตรท์ 0.35 - 0.38 มิลลิกรัมต่อลิตร และอัลคาไลน์ 122 - 125 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้ง (ตารางผนวกที่ 4)

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ สามารถใช้ในสูตรอาหารได้ถึงระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสสามารถใช้ในสูตรอาหารได้เพียง 2.5 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ระดับดังกล่าว ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ไม่ส่งผลด้านลบต่ออัตราการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์ของอาหาร จากการรายงานของ Berge et al. (2005) ได้ทำการศึกษาโดยใช้การใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylococcus capsulatus* (Bath), *Alcaligenes acidovorans*, *Bacillus brevis* และ *Bacillus firmus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้จากกระบวนการหมักโดยใช้แหล่งของพลังงานจากแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และแหล่งของไนโตรเจนจากแอมโมเนียจากกระบวนการผลิตโปรตีนสังเคราะห์ ในสูตรอาหารปลาแอตแลนติกแซลมอน (*Salmo gairdnerii*) โดยมีการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียในสูตรอาหารที่ระดับ 0 (ควบคุม) 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหาร พบว่า ที่ระดับการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียทั้ง 2 ระดับ มีแนวโน้มของค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ประสิทธิภาพการกินอาหารลดลง และอัตราการแลกเนื้อมีค่าสูงขึ้น ซึ่งเนื่องจากซิงเกิลเซลล์โปรตีนมีความไม่สมดุลของกรดอะมิโนที่จำเป็น ในขณะที่ Aas et al. (2006a,b) กล่าวว่า การใช้โปรตีนจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylococcus capsulatus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เลี้ยงโดยใช้แหล่งของพลังงานจากแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ จากกระบวนการผลิตมีเทนในสูตรอาหารปลาเรนโบว์เทร้า (Rainbow trout) และ ปลาแอตเลนติกแซลมอล (Atlantic salmon) โดยมีการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียที่ระดับ 0 (กลุ่มควบคุม), 9, 18 และ 27 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหาร พบว่า ที่ระดับการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนในสูตรอาหารในระดับที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏของอาหาร (โปรตีนและไขมัน) ลดลงเมื่อเทียบกับสูตรอาหารที่ใช้ปลาป่น (สูตรควบคุม) ($P<0.05$) ในขณะที่ Aas et al. (2007) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylococcus capsulatus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เลี้ยงโดยใช้แหล่งพลังงานและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จากกระบวนการผลิตมีเทนในสูตรอาหารปลา Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) ที่ระดับ 0 (กลุ่มควบคุม), 9 และ 18 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ที่ระดับการใช้ซิงเกิลโปรตีนจากแบคทีเรียทั้ง 2 ระดับ มีค่าการเจริญเติบ การใช้ประโยชน์ได้จากอาหารลดลงและประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏของ

โปรตีนและไขมันมีแนวโน้มลดลงเช่นกัน ทั้งนี้เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นซิงเกิลเซลล์โปรตีนนั้น มีองค์ประกอบของโพลีแซ็คคาไรด์ และเปปติโดไกลเคน ซึ่งผนังเซลล์ของแบคทีเรียส่งผลให้อาหารมีความหนืด อีกทั้งยังทนต่อเอนไซม์ที่ช่วยในกระบวนการย่อยอาหารของสัตว์น้ำ (Berge et al., 2005) ในขณะที่ Aas et al. (2007) กล่าวว่า กลิ่นและรสชาตของซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียอาจมีผลต่อประสิทธิภาพการกินอาหารของสัตว์น้ำลดลงได้เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยที่มีการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียในสูตรอาหารสัตว์น้ำ พบว่า ไม่ส่งผลด้านลบต่อการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์ได้ในอาหาร เช่น จากกาการรายงานของ Storebakken et al. (2004) และ Berge et al. (2005) มีการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียในสูตรอาหารปลาแอตเลนติกแซลมอน พบว่าสามารถใช้ในสูตรอาหารได้ 20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Aas et al. (2006b) สามารถใช้ได้เพียง 18 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตาม จากการรายงานของ Aas et al. (2007) ซึ่งทำการศึกษาในปลา Atlantic halibut (*Halibut hippoglossus*) พบว่า สามารถใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียในสูตรอาหารได้เพียง 9 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ รายงานของ Aas et al. (2006a) ได้ทำการศึกษาในปลาเรนโบว์เทร้า พบว่าสามารถใช้ในสูตรอาหารได้ 27 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น

องค์ประกอบทางเคมีในกุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ และผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส พบว่า มีค่าใกล้เคียงกับกุ้งที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ($P>0.05$) สอดคล้องกับการรายงานของ Aas et al. (2006a,b) พบว่าการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียในสูตรอาหารไม่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อของ ปลาเรนโบว์เทร้า (*Oncorhynchus mykiss*) และปลาแอตแลนติกแซลมอน (*Salmo salar*) (โปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น)

จากการศึกษาในครั้งนี้สังเกตเห็นว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากแบคทีเรียซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ และ ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส ระยะเวลาการเลี้ยง 45 วัน โดยผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ ส่งผลต่อค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ในแง่ของชนิดเม็ดเลือดกลุ่มแกรนูลาร์เซลล์ และเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนเท่านั้น ในขณะที่ ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสที่ระดับ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยมีปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวมากที่สุดซึ่งอยู่ในระดับที่เหมาะสม (3.83×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เนื่องจากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ มีการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia coli* และ *Aerobacter aerogenes* และกระบวนการผลิตผงชูรสมีการใช้แบคทีเรียกลุ่มของแอสพาติก (aspartic) และ กลูตามิค (glutamic) ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในแฟมมิลี่ Corynebacteriaceae (Abe et al., 1967) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผนังเซลล์มีองค์ประกอบของเปปติโดไกล

แคน และไลโพโพลีแซคคาร์ไรด์ ซึ่งมีการนำมาใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Söderhäll and Cerenius, 1992; Sung et al., 1996 และ Purivirojkul et al., 2006) โดยเปปติโดไกลแคน และไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immune response) ในกุ้งโดยผ่านการทำงานของระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Sritunyalucksana et al., 1999 และ Rattanachai et al., 2005) และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวอาศัยการทำงานของเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันสามารถบ่งชี้ถึงสุขภาพกุ้งได้ (Moullac et al.,1997) โดยปริมาณเม็ดเลือดของกุ้ง มีรายงานอยู่ในช่วง $2.0x10^6 – 4.0x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยมีปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อปริมาณเม็ดเลือดของกุ้ง ได้แก่ ระยะการลอกคราบ ระยะการเจริญพันธุ์ สภาวะติดเชื้อ และสารอาหารที่กุ้งได้รับ (Owens et al., 1997 และ Chen et al., 2014) และจากการรายงานของ Moullac et al. (1997) กล่าวว่า เม็ดเลือดกุ้งมี 3 ชนิด ได้แก่ ไฮยาลินเซลล์ ลาร์จแกรนูลาร์เซลล์ และเซมิแกรนูลาร์เซลล์ โดยในกุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์มากที่สุดในระบบไหลเวียนเลือด รองลงมาคือ ลาร์จแกรนูลลาร์เซลล์ และ เซมิแกลนูลาร์เซลล์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้

ส่วนผลต่อกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เกิดจากสารเปปติโดไกลเคน และไลโพโพลีแซคคาร์ไรด์ จะกระตุ้นให้ pattern recognition protein (PRPs) ในน้ำเลือดเปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อน peptidoglycan-binding protein และ lipopolysaccharide- binding protein ซึ่งเป็นกลุ่มของ pathogen associated molecular pattern (PAMPs) ไปกระตุ้น membrane receptor ที่จำเพาะของเม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์เซลล์ และลาร์จแกรนูลาร์เซลล์ เกิดเป็นโปรตีนเชิงซ้อน (protein complex) ส่งผลให้เกิดการหลั่งสารต่างๆ ออกมาในระบบภูมิคุ้มกัน (Vagas-albores, 1995) เช่น กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่สามารถทำลายเชื้อโรคได้ และจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ที่ระดับการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ 5.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงสุด (1.24±0.06 และ 0.95±0.11) ค่ารองลงมา คือ 7.5 เปอร์เซ็นต์ (1.22±0.02 และ 0.92±0.14) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์เซลล์ ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Suphantharika et al., 2003 และ Purivirojkul et al., 2006) ในขณะที่ การใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสในสูตรอาหาร พบว่า กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นที่ระดับการใช้ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ มะลิ และคณะ (2543) ได้ทำการศึกษาโดยใช้สารสกัดเปปติโดไกลแคนซึ่งสกัดได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย *Bifidobacterium thermophilium* นำมาผสมในอาหารกุ้งกุลาดำ 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารผสมเปปติโดไกลเคน มีความสามารถในการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ได้ดีกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับอาหารผสมเปปติโด

ไกลแคน เช่นเดียวกันกับ Purivirojkul et al. (2006) รายงานว่า การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดเปปติโดไกลแคนที่ได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ระดับ 0.18 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่า สามารถเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งขาวได้ จากการศึกษาในครั้งนี้กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ ค่าดังกล่าวมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น (P>0.05) สอดคล้องกับการศึกษาของ Xain et at. (2009) รายงานว่า กุ้งขาวที่ได้รับไลโพโพลีแซคคาร์ไรด์ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรผสมในอาหารสามารถเพิ่มค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส เช่นเดียวกับการรายงานของ Rattanachai et al. (2005) และ Purivirojkul et al. (2006) ที่มีการใช้เปปติโดไกลแคนที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย สามารถเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซอรินโปรติเอส (serine protease) ในเม็ดเลือดเพิ่มขึ้น ซึ่งเอนไซม์นี้จะส่งเสริมการทำงานของระบบโปรฟีนอลออกซิเดสได้

กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า อาหารที่มีการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ และผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสสามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ออกจากระบบเลือดได้ ไม่แตกต่างกันในทุกกลุ่มการทดลองโดยไม่สามารถลดปริมาณแบคทีเรียลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

4.2 การใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากกากยีสต์ในสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว

4.2.1 การทดลองที่ 3 การใช้กากยีสต์ในสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว

1) ผลต่อการเจริญเติบโต

การศึกษาการใช้กากยีสต์สูตรอาหารกุ้งขาว น้ำหนักเริ่มต้น 1.02±0.01 กรัมต่อตัว (P>0.05) ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 12 สัปดาห์ กุ้งในทุกกลุ่มการทดลองได้รับอาหารทดลองที่ระดับแตกต่างกัน คือ 0(กลุ่มควบคุม), 2.5, 5, 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.6) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ค่าน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการแลกเนื้อ ประมาณอาหารที่กุ้งกิน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ได้ของโปรตีนในอาหารของกุ้งที่ได้รับอาหารชุดควบคุมและอาหารที่มีการใช้กากยีสต์ทุกระดับ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และมีอัตราการรอดมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ในทุกกลุ่มการทดลอง (P>0.05) (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 ผลของการใช้กากยีสต์ (YP) ต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว ระยะเวลาการเลี้ยง 12 สัปดาห์ (mean ± SD, n = 3)

Parameters	Treatments (%)					P- value
	YP-0	YP-2.5	YP-5.0	YP-7.5	YP-10.0	
IW(g/shrimp)	1.02±0.01	1.03±0.01	1.02±0.00	1.01±0.01	1.03±0.01	ns.
FW(g/shrimp)	7.54±0.85	7.71±0.26	7.66±0.43	7.75±0.51	7.97±0.10	ns.
FI (g/shrimp)	9.33±0.27	9.54±0.14	10.05±0.34	9.96±0.42	10.19±0.63	ns.
WG (g/shrimp)	6.52±0.84	6.68±0.26	6.64±0.52	6.74±0.52	6.95±0.10	ns.
FCR	1.44±0.17	1.43±0.04	1.52±0.11	1.49±0.17	1.47±0.07	ns.
SGR (%/day)	2.37±0.12	2.39±0.05	2.40±0.07	2.42±0.09	2.44±0.02	ns.
PER (%/day)	1.75±0.20	1.72±0.04	1.62±0.12	1.68±0.19	1.68±0.06	ns.
PRE (%/day)	0.34±0.05	0.49±0.36	0.41±0.05	0.31±0.18	0.40±0.29	ns.
Survival (%)	70.0±0.0	70.0±0.0	71.67±2.89	70.0±0.0	70.0±5.0	ns.

ns. หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

IW; Initial weight, FW; Final weight, FI; Feed intake, WG; Weight gain' FCR; Feed conversion ratio, SGR; Specific growth rate, PER; Protein efficiency ratio and PRE; Protein retention efficiency

นอกจากนี้พบว่า องค์ประกอบทางเคมีในกุ้งของทุกกลุ่มการทดลอง มีค่าความชื้น เถ้า โปรตีน และ ไขมัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) เช่นกัน (ตารางที่ 4.6)

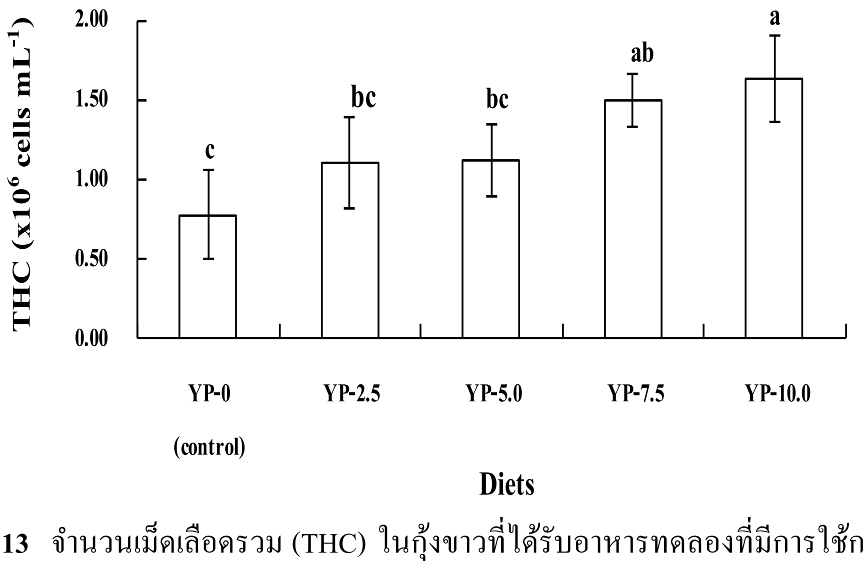
ตารางที่ 4.6 องค์ประกอบทางเคมีในกุ้งที่ได้รับอาหารที่มีกากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน (%, wet weight, mean ± SD, n = 3)

Parameters	Initial body composition	Treatments (%)					P-value
		YP- 0	YP- 2.5	YP- 5.0	YP- 7.5	YP- 10	
Moisture	81.23±0.26	79.48±0.53	79.87±1.57	79.09±0.88	79.75±0.20	79.73±0.75	ns.
Ash	2.75±0.21	2.68±0.17	2.57±0.18	2.93±0.62	2.67±0.35	2.76±0.24	ns.
Protein	12.89±0.78	14.15±0.17	14.76±1.38	14.55±0.12	14.13±0.71	14.07±1.92	ns.
Lipid	3.83±0.11	3.98±0.68	3.24±0.47	3.03±1.13	3.08±0.63	3.00±0.92	ns.

ns. หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

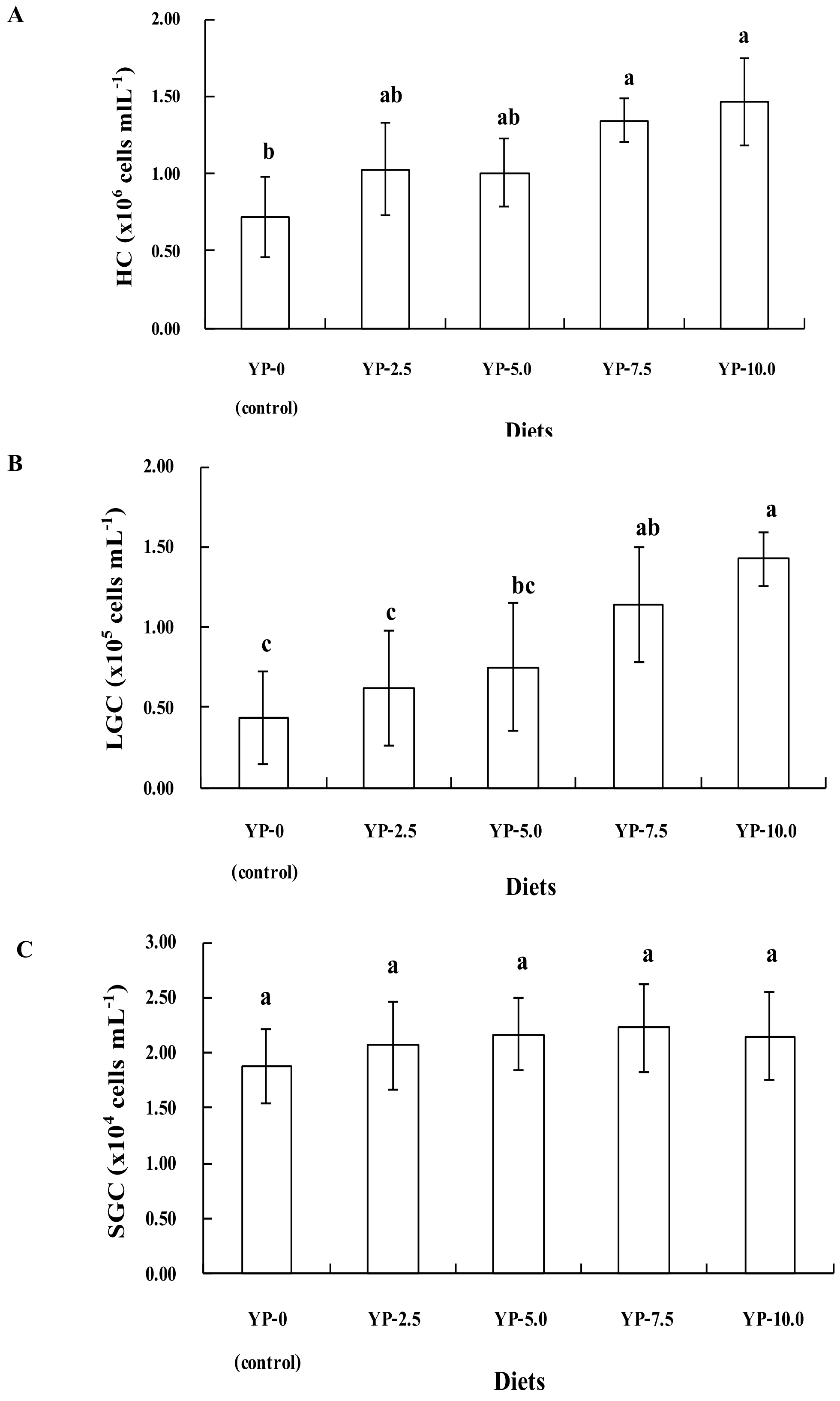
2) ผลต่อค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

จากการศึกษาผลของการใช้กากยีสต์ในสูตรอาหารต่อค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว พบว่า ค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมีค่าเพิ่มขึ้นตามระดับการใช้กากยีสต์ที่สูงขึ้น โดยที่ระดับการใช้กากยีสต์ 10 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหาร มีค่าจำนวนเม็ดเลือดรวม เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ เม็ดเลือดชนิดลาร์จแกรนูลาเซลล์ และกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ภาพที่ 4.13 และ 4.14A, 4.14B และ 4.15)



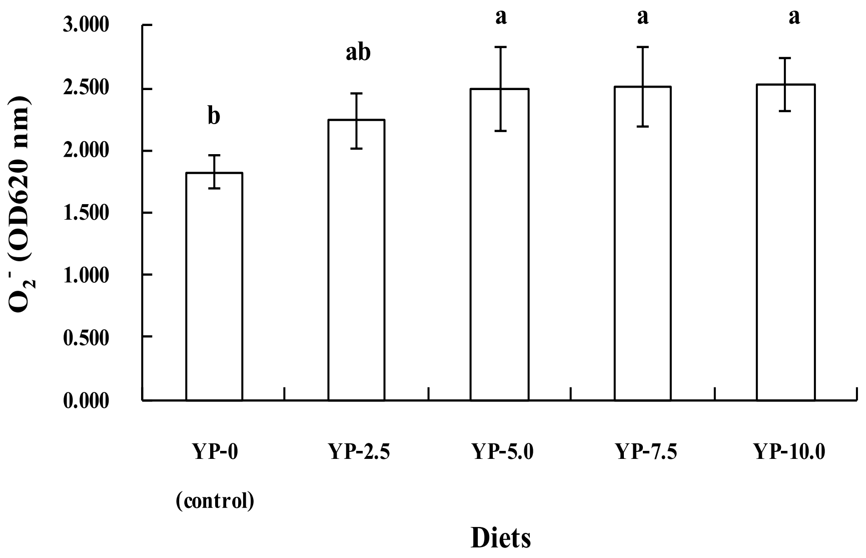
ภาพที่ 4.13 จำนวนเม็ดเลือดรวม (THC) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการใช้กากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3)

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



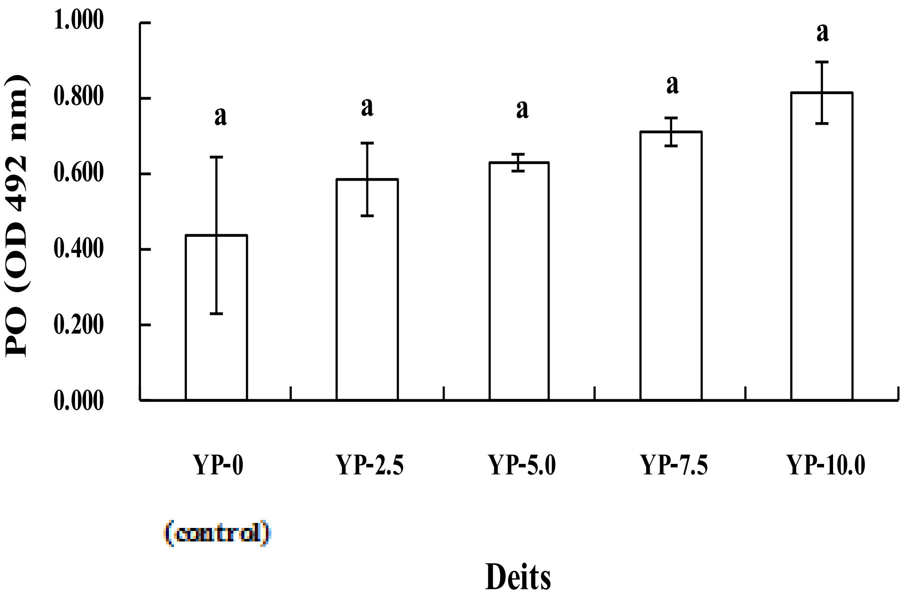
ภาพที่ 4.14 A; เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ (HC), B; เม็ดเลือดชนิดลาร์จแกรนูลาเซลล์ (LGC) และ C; เม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาเซลล์ (SGC) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการใช้กากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3)

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



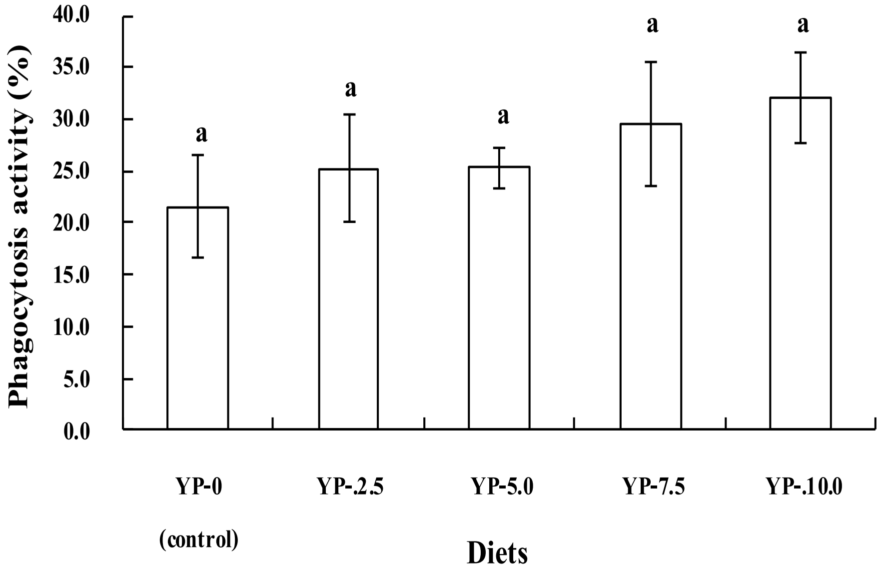
ภาพที่ 4.15 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการใช้กากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3)
หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ซึ่งสอดคล้องกับค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง ตั้งแต่ระดับการใช้กากยีสต์ 5 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป มีประสิทธิภาพดีกว่ากลุ่มควบคุม และที่ระดับ 2.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ภาพที่ 4.19) อย่างไรก็ตาม ค่าเม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์เซลล์ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ระหว่างกลุ่มการทดลองและกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ภาพที่ 4.14C, 4.16 และ 4.17) และกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้งที่ระดับการการใช้กากยีสต์ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีอัตราการเจือจางสูงที่สุดของซีรั่มที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 1:8 ในขณะที่กลุ่มควบคุมไม่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ทุกระดับการเจือจาง (P<0.05) (ภาพที่ 4.18)



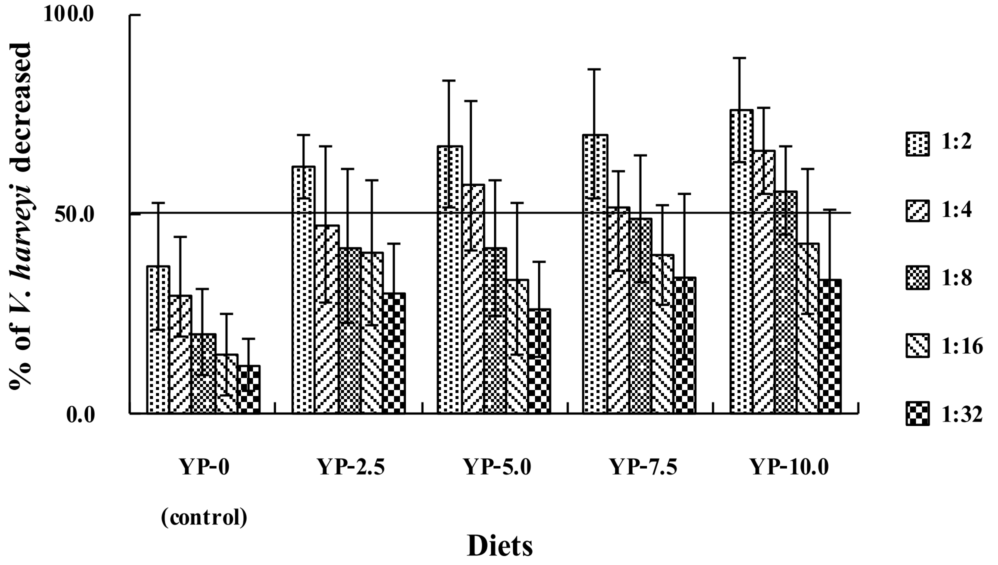
ภาพที่ 4.16 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการใช้กากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3)

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



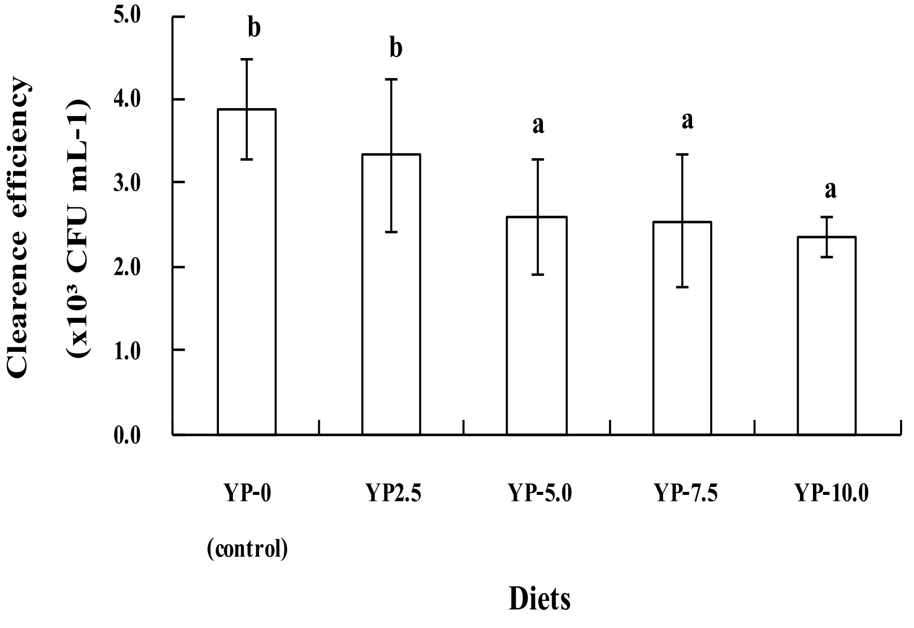
ภาพที่ 4.17 กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytosis activity) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการใช้กากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3)

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



ภาพที่ 4.18 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง (bactericidal activity) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการใช้กากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3)

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



ภาพที่ 4.19 ความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง (clearance efficiency) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการใช้กากยีสต์ (YP) ในระดับที่แตกต่างกัน (mean ± SD, n = 3)

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

จากการทดลองการใช้กากยีสต์จากกระบวนการหมักเอทานอล สามารถใช้ในสูตรอาหารกุ้งขาวได้จนถึงระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ส่งผลด้านลบต่ออัตราการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์ของอาหาร ซึ่งมีงานวิจัยที่มีการใช้ยีสต์ในรูปแบบต่างๆ ในสูตรอาหารกุ้งขาว พบว่า ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์ได้จากอาหารเช่นกัน (Zhao et al., 2017 และ Gamboa-Delgado et al., 2016) และจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า กุ้งขาวกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีการใช้กากยีสต์มีแนวโน้มของปริมาณอาหารที่กุ้งกินเพิ่มขึ้นอาจเนื่องจากกลิ่นของกากยีสต์ส่งผลต่อการกินอาหารเพิ่มขึ้น (Øverland et al., 2013 และ Zhao et al., 2017) แต่อย่างไรก็ตามจากการรายงานของ Sanderson and Jolly (1994) กล่าวว่า การใช้ยีสต์ในสูตรอาหารปลา salmonid fish (*Oncorhynchus keta*) สามารถใช้ได้ 15 – 30 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหาร ในขณะที่การใช้กากยีสต์ในปลา Tubot สามารถใช้ได้เพียง 17 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์ได้จากอาหารของสัตว์น้ำ Cui et al. (2011) และ Hauptman et al. (2014) รายงานว่า การใช้กากยีสต์ที่ระดับ 25 เปอร์เซ็นต์ในสูตอาหารปลา Tubot ส่งผลให้การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ได้จากอาหารลดลงได้ เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของยีสต์มีผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในระบบการย่อยอาหารได้ (Zhao et al., 2017) เช่น จากการรายงงานของ Lopez-Lopez et al. (2005) และ Pavasovic et al. (2007) ได้ทำการศึกษาในกุ้งก้ามแดง รายงงานว่ากุ้งก้ามแดงที่ได้อาหารที่มีการใช้ยีสต์จากกระบวนการผลิตเบียร์ในระดับที่ต่างกันส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ในระบบการย่อยอาหาร โดยมีเอนไซม์โปรติเอส ลดลง และเอนไซม์ไลเปสเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้น การใช้กากยีสต์ในสูตรอาหารสัตว์น้ำรวมทั้งกุ้งจึงมีข้อจำกัดในการใช้ให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม เนื่องจากผนังเซลล์ของยีสต์สามารถย่อยได้ด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ โดยผนังเซลล์ของยีสต์นั้นมีส่วนประกอบของเซลล์ยีสต์ในสัดส่วน 1 ต่อ 3 ของน้ำหนักยีสต์ทั้งหมดและเป็นสารจำพวกโพลีเมอร์ของน้ำตาล cross-link ด้วยพันธะไฮโดรเจน น้ำตาลดังกล่าวได้แก่ กลูโคซามีน (glucosamine) กลูโคส (glucose) แมนโนส (mannose) และไคติน (chitin) ดังนั้นการได้รับคุณค่าทางอาหารจากการบริโภคยีสต์จะต้องนำเซลล์ยีสต์ผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น กระบวนการออโตไลซิส (autolysis) กระบวนการพลาสโมไลซิส (plasmolysis) และกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) (Tannnenbaum, 1978) แต่อย่างไรก็ตาม ผนังเซลล์ของยีสต์มีส่วนประกอบของ ไบโอติน กรดไฟลิก กรดนิโคตินิก โคลีน กรดเพนโธเทนิกและวิตามินบี 1, 2, 6 และ 12 ในปริมาณสูง ซึ่งกุ้งมีความต้องการวิตามินบี 6 เพื่อนำไปสร้างโคเอนไซม์ pyridoxal phosphatase มีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดของกุ้ง เนื่องจาก โคเอนไซม์ pyridoxal phosphatase เป็นส่วนสำคัญในกระบวนการเมทาบอลิซึมของโปรตีนและกรดอะมิโนให้ดีขึ้น (Baker and Davies, 1995) ขณะที่ Zhao et al. (2017) รายงานว่า การใช้ยีสต์สกัดที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลเสต ซึ่งทำให้โมเลกุลของโปรตีนถูกย่อยเป็นเปปไทด์ที่มีลักษณะเป็นเปป

ไทด์สั้นๆ และมีปริมาณของกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยได้และการดูดซึมสารอาหารได้ดีขึ้นช่วยให้กุ้งสามารถนำโปรตีนไปใช้ในการเจริญเติบโตและซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอได้รวดเร็วกว่าแหล่งโปรตีนอื่นๆ เนื่องจากกุ้งจะใช้โปรตีนจากอาหารก่อนจะถูกขับออกจากลำไส้เพราะกุ้งมีลำไส้สั้นและตรง ทำให้ประสิทธิภาพการดูดซึมสารอาหารต่ำส่งผลให้ประสิทธิภาพการดูดซึมสารอาหารต่ำลงด้วยเช่นกัน

ในขณะที่ องค์ประกอบทางเคมีในกุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีการใช้กากยีสต์ พบว่า มีค่าใกล้เคียงกับกุ้งที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ($P>0.05$) สอดคล้องกับการรายงานของ Zhao et al. (2017) พบว่า การใช้กากยีสต์ในสูตรอาหารไม่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อกุ้ง (โปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น)

จากการศึกษาในครั้งนี้สังเกตเห็นว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้กากยีสต์ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ มีค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากกผนังเซลล์ยีสต์มีองค์ประกอบของ เบต้า 1,3 กลูแคน (β-1,3 glucan) 57 เปอร์เซ็นต์ เบต้า 1,6 กลูแคน (β-1,6 glucan) 10 เปอร์เซ็นต์ แมนแนน (mannan) 40 เปอร์เซ็นต์ และไคติน (chitin) 1-3 เปอร์เซ็นต์ (Zhao et al., 2017และ Lipke and Ovalle, 1998) โดยยีสต์ชนิด *S. cerevisiae* มีองค์ประกอบหลัก คือเบต้ากลูแคน ซึ่งเป็นสารที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งได้ (Gopalakannan and Arul, 2010 และ Li and Gatlin, 2006) และเบต้ากลูแคนเป็นสารโพลีแซคคาไรด์สายยาวของน้ำตาลกลูโคส สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดได้ (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000 และ Sritunyalucksana et al., 2002) โดยระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวเป็นแบบไม่จำเพาะอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเลือดที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงสุขภาพกุ้งได้ดี (Hose et al.,1990 และ Moullac et al.,1997) ปริมาณเม็ดเลือดของกุ้ง มีรายงานอยู่ในช่วง $2.0\times10^{6} – 4.0\times10^{7}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยมีปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อปริมาณเม็ดเลือดของกุ้ง ได้แก่ ระยะการลอกคราบ ระยะการเจริญพันธุ์ สภาวะติดเชื้อ และสารอาหารที่กุ้งได้รับ (Moullac et al., 1997)

จากการศึกษาในครั้งนี้กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้กากยีสต์ ระยะเวลาการเลี้ยง 12 สัปดาห์ พบว่า กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน มีค่าเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) ในขณะที่กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และกิจกรรมการทำงานของกระบวนการกลืนกินแปลกปลอม มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) อย่างไรก็ดี จากการรายงานของ Vagas-albores et al. (1995) กล่าวว่า การตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดที่สำคัญในกุ้ง ได้แก่ กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม โดยสารเบต้ากลูแคนจะกระตุ้นให้ PRPs ในน้ำเลือดเปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อน β-1,3 glucan-binding protein ไปกระตุ้น membrane receptor ที่จำเพาะของเม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์เซลล์ส่งผลให้เกิดการ

หลั่งสารต่างๆ ออกมาในระบบภูมิคุ้มกัน (Vagas-albores et al., 1995) เช่น กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่สามารถทำลายเชื้อโรคได้ ค่าเอนไซม์เหล่านี้มีความสัมพันธ์กับปริมาณเม็ดเลือด โดยการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนและเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่เกิดขึ้นในตัวกุ้ง พบว่า 90 เปอร์เซ็นต์จะพบในเม็ดเลือดและ 10 เปอร์เซ็นต์พบในน้ำเลือด (กิจการและคณะ, 2543) จึงเป็นเหตุผลให้ปริมาณเม็ดเลือดมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนและเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยกุ้งที่มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนและเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงเป็นกุ้งที่มีปริมาณเม็ดเลือดสูงเช่นกัน (Srituyalucksana and Söderhäll, 2002; Suphantharika et al., 2003 และ Purivirojkul et al., 2006) และสอดคล้องกับการรายงานของ กิจการ และคณะ (2543) รายงงานว่า การใช้เบต้ากลูแคนในสูตรอาหารกุ้งกุลาดำที่ระดับ 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่า กุ้งกุลาดำมีปริมาณเม็ดเลือดรวมและกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกันกับการรายงานของ มลฤดี และคณะ (2543) รายงานว่าการใช้ยีสต์ผสมในอาหารกุ้งกุลาดำ 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดรวมและความต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ แต่อย่างไรก็ตาม จากการรายงานของ Devaraja et al. (1998) รายงงานว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่ผสมเบต้ากูลแคนเพียง 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพียงวันเดียวก็สามารถชักนำให้เม็ดเลือดกำจัดไวรัสได้สูงขึ้นได้ ในขณะที่ Li et al. (2009) รายงานว่า การใช้บีเวอร์ยีสต์ (brewer's yeast) ในสูตรอาหารกุ้ง 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มระดับภูมิคุ้มในกุ้งขาวได้ โดยเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนได้เช่นกัน และ Manoppo et al. (2015) รายงานว่า การใช้บีเวอร์ยีสต์ในสูตรอาหารปลานิล ที่ระดับ 5 กรัมต่อกิโลกรัม สามารถเพิ่มกิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดได้

ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียหรือจุลชีพจากระบบไหลเวียนเลือดของกุ้งเป็นค่าหนึ่งที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Rodrýgez and Moullac, 2000) เนื่องจากในน้ำเลือดของกุ้งประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือดที่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ อีกทั้งยังมีโปรตีนและเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ในการทำลายสิ่งแปลกปลอม โดยทั่วไปกุ้งที่แข็งแรงสามารถกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดได้ดีกว่ากุ้งที่อ่อนแอ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าอาหารที่มีการใช้กากยีสต์ในระดับที่เพิ่มขึ้นมีความสามารถในกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ออกจากระบบเลือดได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Thanardkit et al. (2002)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตจากโรงงานอุตสาหกรรมทั้ง 3 ชนิด มาใช้เป็นแหล่งโปรตีนในสูตรอาหารกุ้งขาว โดยการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ และผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส สามารถใช้ในสูตรอาหารได้ที่ระดับ 5 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยไม่ส่งผลด้านลบต่อการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์ได้จากอาหาร ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาว ในขณะที่การใช้ซิงเกิลเซลล์โปรตีนจากกากยีสต์ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการหมักเอทานอล สามารถใช้ในสูตรอาหารได้ถึงระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยสามารถเพิ่มค่าโลหิตวิทยา และประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงมีความเป็นได้สำหรับการใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอุตสาหกรรมอาหารกุ้งได้ ซึ่งการศึกษาในครั้งต่อไปควรทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพการย่อยได้ปรากฏของสารอาหารรวมถึงกรดอะมิโน

บรรณานุกรม

กิจการ ศุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ตันติกิตติ และ Rudlf Hoffmamn. 2543. ภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ: II เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 581-588.

ชนกันต์ จิตมนัส. 2556. ผลของผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรต่อภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ. วารสารวิจัย มข. 18: 257-269.

ชยพร ทิพย์ศรีมงคล. 2552. ผลของ DV AQUA ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ อัตราการรอดตายและอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชาญชัย ไตรศรีศิลป์. 2545. ฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลำดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชุตินุช สุจริต, อุไรวรรณ วัฒนากล, วัฒนา วัฒนกุล และ สมรักษ์ รอดเจริญ. 2557. การลดปริมาณสารอินทรีย์โดยใช้ตัวทำละลายชีวภาพในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว. คณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย.

นนทวิทย์ อารีย์ชน, ดวงใจ กิตติปรีชากุล และชุมพล ศรีทอง. 2549. การใช้แอสตาแซนทินจากยีสต์ *Phaffia rhodozyma* กับกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius. น. 252-265. *ใน*: การประชุมวิชาการมหาวิทยลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 สาขาประมง 30 ม.ค.-2 ก.พ. 2549. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

มะลิ บุณยรัตผลิน, กิจการ ศุภมาตย์ และชูศักดิ์ บริสุทธิ์. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: VIII. ผลของสารสี (astaxanthine) ต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด ระบบภูมิคุ้มกันโรค และความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์ 22 (ฉบับพิเศษ): 633-639.

มลฤดี สิทธิพันธ์, อรัญ หันพงศ์กิตติกุล และกิจการ ศุภมาตย์. 2543. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ: I. การสกัดสารเบต้ากลูเคนจากยีสต์และประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 653-662.

มลฤดี สนธิ. 2559. การใช้สารกระตุ้มภูมิคุ้มกันในกุ้งทะเล. แก่นเกษตร 44(2): 373-382.

สมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย. 2559. สถิติการส่งออกกุ้งขาวไทย. หนังสือพิมพ์ฐานเศรษฐกิจ ปีที่ 36 ฉบับที่ 3,194 วันที่ 22-24 กันยายน 2559.

สมาคมผู้ผลิตปลาป่นไทย. 2559. ปริมาณการส่งออกปลาป่นประจำเดือนมกราคม-ธันวาคม 2559. ออนไลน์เข้าถึงได้จาก http://www.thaifishmeal.com/index.php?option=comcontent&view=article& id=1955:18-06-2014&catid=39&Itemid=104&lang=th. [24 มกราคม 2560].

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2551. วิธีวิเคราะห์คุณภาพน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงชายฝั่ง. กรุงเทพฯ: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 239หน้า.

อมรัตน์ เสริมวัฒนากุล, พิสมัย สมสืบ, นัขนรี ทองศรี และ สาวิตรี วงศ์สุวรรณ. 2548. อาหารและการผลิตอาหารสัตว์น้ำ. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

Aas, T.S., B. Grisdale-Helland, B. F. Terjesen and S. J. Helland. 2006. Improved growth and nutrient utilisation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing a bacterial protein meal. Aquaculture 259: 365-376.

Aas, T.S., B. Hatlen, B. Grisdale-Helland, B.F. Terjesen, A.M. Bakke-McKellep and S.J. Helland. 2006. Effects of diets containing a bacterial protein meal on growth and feed utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 261: 357-368.

Aas, T.S., B. Hatlen, B. Grisdale-Helland, B.F. Terjesen, M. Penn, A.M. Bakke-McKellep and S.J. Helland. 2007. Feed intake, growth and nutrient utilization in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed diets containing a bacterial protein meal. Aquaculture Research 38: 351-360.

Abdulrahman, M.N. and H.J. Hamad Ameen. 2014. Replacement of Fishmeal with Microalgae *Spirulina* on Common Carp Weight Gain, Meat and Sensitive Composition and Survival. Pakistan Journal of Nutrition 13(2): 93-98.

Abe, S., Takayama, K.L. and Kionshita, S. 1967. Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. Journal of Gerneral and Applied Microbiology 13: 279-301.

Adedayo M.R., E.A. Ajiboye, J.K. Akintunde and A. Odaibo. 2011. Single Cell Proteins: As Nutritional Enhancer. Advances in Applied Science Research 2 (5): 396-409.

Adams, A. 1991. Response of peneid shrimp to exposure to *Vibrio* species. Fish and Shellfish Immunology 1: 59-70.

Andersen, S.B., J. Jorgrnsen. 2005. U-loop reactor modeling for optimization, part 1: estimation of heat loos. Journal of Environmental Management 9: 88-90.

Anderwe, S.R., N.P. Sahu, A.K. Pal, S.C. Mukherjee and S. Kumar. 2011. Yeast extract, brewer's yeast and *spirulina* in diet for *Labeo rohita* fingerlings affect haemato-immunological responses and survival following *Aromonas hydrophilla* challenge. Research in Veterinary Science 91: 103-109.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis, 16th edn. AOAC International, Arlington, VA, USA.

Arora, D., K., Mukerji and E., Marth. 1991. Single cell protein in Hand book of applided mycology. Journal of American Science 18: 459-479.

Aspan, A., M. Häll and K. Söderhäll. 1990. The effect of endogenous proteinase inhibitions on the prophenoloxidase activating enzyme, a serine proteinase from crayfish haemocytes. Insect Biochemistry and Molecular Biology 20: 485-492.

Babu, D.T., S.P. Anthony, S.P. Joseph, A.R. Bright and R. Philip. 2013. Marine yeast *Candida aquaetexoris* S527 as a potential immunostimulant in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Journal of Invertebrate Pathology 112: 243-252.

Bachere, E., E. Mialhe and J. Rodriguez. 1995. Identification of defence effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicas* (Bate): prospects and applications. Fish and Shellfish Immunology 5: 597-612.

Bai, N., M. Gu, W. Zhang, W. Xu and K. Mai. 2014. Effects of β-glucan derivatives on the immunity of white shimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against white spot syndrome virus infection. Aquaculture 426-427: 498-503.

Baker, R.T.M and S.J. Davies. 1995. The effect of Pyridoxine Supplemention on Dietary Protein Utilization in Gilthead Sea Bream Fry. Animal Science 60:157-162.

Bamberg, J.H. 2000. British petroleum and global oil. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 6: 445-478.

Barman, D., P. Nen, S.C. Mandal and V. Kumar. 2013. Immunostimulants for aquaculture health management. Journal of Marine Science Research Development 3: 134. doi:10.4172/2155-9910.1000134.

Barnes, M.E., D.J. Durben, S.G. Reeves and R. Sanders. 2006. Dietary yeast culture supplementation improves initial rearing of McConaughy strain rainbow trout. Aquaculture Nutrition 12: 388-394.

Berge, G.M., G. Baeverfjord, A. Skrede and T. Storebakken. 2005. Bacterial protein grown on natural gas protein source in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar*, in saltwater. Aquaculture 244: 233-240.

Bozakouk, A.H. 2002. Acid hydrolysis of *Phragmites austral*: is powder for production of single cell protein by *Candida utilis*. African Journal of Biotechnology 98: 876-897.

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

Burtin, P. 2003. Nutritional value of seaweeds. Journol of Agricultural and Food Chemistry 2: 498-503.

Capalbo, F.H., I.O. Moraes and M.H. Pelizer. 2001. Solid-state fermentation of *Bacillus thuringiensistolworthi* to control fall armyworm in maize. Electronic Journal of Biotechnology 4(2): 1-5.

Chandrani-Wijeyaratne, S. and A.N. Tayathilake. 2000. Characteristics of two yeast strain (*Candida tropicalis*) isolated from *Caryotaurens* (Khitul) toddy for single cell protein production. Journal of the National Science Foundtion of Sri Lanka 28: 79-86.

Chen, Y.Y., J.C. Chen, Y.C. Lin, S.T. Yeh, K.P. Chao and C.S. Lee. 2014. White Shrimp *Litopenaeus vannamei* that have received *Petalonia binghamiae* Extract Activate Immunity, Increase Immune Response and Resistance against *Vibrio alginolyticus*. Aquaculture Research & Development 5: 1-7.

Cheng, Y.P., C.H. Liu, C.C. Wu, C.M. Chiang, J.L. Lian and S.L. Hsieh. 2012. Dietary administration of zingerone to enhance growth, non-specific immune response and resistance to *Vibrio alginolyticus* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juviniles. Fish and Shellfish Immunology 32: 284-290.

Chiu, C.H., Y.K. Guu, C.H. Liu, T.M. Pan and W. Cheng. 2007. Immune response and gene expression in white shrimp *Litopenaeus vannamei* induced by *Lactobacillus plantarum*. Fish and Shellfish Immunology 2: 364-377.

Cui, M., R. Guo and H. Xia. 2011. The effect of replacement of fishmeal by biological feed yeast for turbot. Feed Research 5: 65–68.

Chotikachinda, R., W. Lapjatupon, S. Chaisilapasung, D. Sanqsue 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 Journal of Science and Technology 30(6): 687-692.

Cuthbertson, B.J., E.F. Shepard, R.W. Chapman and P.S. Gross. 2002. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two specoes. Immunologenetics 54: 442-445.

Davis, D.A. and C.R. Arnold. 2000. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 185: 291-298.

Devaraja, T.N. S.K. Otta, G. Shubha, K. Indrani, P. Touro and K. Iddya. 1998. Immunostimulation of shrimp Thoungh Oral Administation of *Vibrio* bacterin and Yeast glucan. 167-170 pp. *In* T.W. Flegel, eds. Advance in shrimp Biotecnology, proceeding to the Special Sssion on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forunm 11-14 November 1998, Changmai, Thailand.

Destoumieux, D., P. Bulet, D. Loew, A.V. Dorsselaer, J. Rodriguez and E. Bachere. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). Journal of Biological Chemistry 272: 28398-28406.

Dieguez-uribeondo, J. and J. Cerenius. 1998. The inhibition of extracellular proteinase from *Aphanomyces* ssp. By three different proteinase inhibitors from Crayfish blood. Mycological Research 120: 820-824.

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

Direkbusarakom, S., A. Herunsalee, M. Yoshimizu and Y. Ezura. 1996. Protective efficacy of *Clinacanthus nutans* on yellow-head disease in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Pathology 33: 404-410.

Dhanasekaran, D., S.S. Lawanya, N.T. SaHa and A. Panneerselvam. 2011. Production of single cell protein from pineapple waste using yeast. International Conference on Food Science and Technology 8: 26-32.

Gamboa-Delgado, J., B. Fernández-Díaz, M. Nieto-López, and L.E. Cruz-Suárez. 2016. Nutritional contribution of toula yeast and fish meal to the growth of shrimp *Litopenaeus vannamei* as indicated by natural nitrogen stable isotope. Aquaculture 453: 116-121.

Gomashe, A.V., M.A. Pounikar and P.A. Gulhane. 2014. Liquid whey: a poteintial substrate for single cell protein production from *Bacillus subtilis* NCIM 2010. International Journal of Life Sciences Scientific Research 2(2): 119-123.

Gopalakannan, A. and V. Arul. 2010. Enhancement of the innate immune system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of β-glucan and whole cell yeast. Aquaculture research 41(6): 884-892.

Hai, V.N. 2015. The use of medicinal plants immunostimulants in aquaculture: A review. Aquaculture 446: 88-96.

Hauptman, B.S., F.T. Barrows, S.S. Block, T.G. Gaylord, J.A. Paterson, S.D. Rawles and W.M. Sealey. 2014. Evaluationof grain distillers dried yeast as a fish meal substitute in practical-type diets of juvenile rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Aquaculture 432: 7–14.

He, S., Z. Zhou, Y. Liu, P. Shi, B. Yao, E. RingØ, E. and I. Yoon. 2009. Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on growth performance, intestinal autochthonous bacterial community and non-specific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) cultured in cages. Aquaculture 294: 99-107.

Heidrich, C. and W. Vollmer. 2002. Murein (Peptidoglycan). 431-463 pp. *In*; E.J. Vandamme, S. De Baets and A.S. Üchel (eds). Biopolymers : Polysaccharides I. Polysaccharides from Prokaryotes. Wiley-VCH, Weinheim.

Hernández, C., M.A. Olvera-Novoa, K. Aquilar-Vejar, B. González-Rodíguez and I.A. Para. 2008. Partial replacement of fish meal by porcine meat meal in practical diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei)*. Aquaculture 277: 244-250.

Hernández-López, J., T. Gollas-Galván and F. Vargas-Albores. 1996. Activation of the Prophenoloxidase System of the Brown Shrimp (*Penaeus califoriensis* Holmes). Comparative Chemistry and Physiology 113: 61-66.

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

Hoseinifar, S.H., A. Mirvaghefi and D.L. Merrifield. 2011. The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* ver. *ellipsoideuson* the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga *(Huso huso).* Aquaculture 318: 90-94.

Hose, J.E., G.E. Martin and A.A. Grerard. 1990. A decapoda hemocyte classification scheme integration morphology cytichemistry and function. Biological Bulletin of Marine Biological 178: 53-45.

Hose, J.E., G.E. Martin, V.A. Nguyen, J. Lucus and T. Rusentein. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocyte. Biological Bulletin of Marine Biological 173: 178-187.

Immanuel, G., M. Sivagnanavelmurugan, T. Marudhupandi, S. Radhakrishnan and A. Palavesam. 2012. The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). Fish and Shellfish Immunology 32: 551-564.

Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira and H. Igusa. 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*). 375-378 pp. *In*; L.M. Chou, A.D. Munro, T. J. Lam, T. W. Chen, L. K. K. Cheong, J. K. Ding, K. K. Hooi, H. W. Khoo, V. P. E. Phang, K. F. Shim, C. H. Tan (eds.). The Third Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

Iwanaga, S. 1993. The limulus clotting reaction. Current Opinion in Immunology. 5: 74-82.

Jaganmohan, P., B. Purushottam and S.V. Prasad. 2013. Production of SCP with *Aspergillus terrus* using Solid State fermentation. European Journal of Biological Sciences 5(2): 38-45.

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

Ju, Z.Y., D-F. Deng and W. Dominy. 2012. A defatted microalgae (*Haematococcus pluvialis*) meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei,* Boone, 1931). Aquaculture 354-355: 50-55.

Kargi, F., M.L. Shuler, R. Vashon, H.W. Seeley, A. Henry and R.E. Austic. 2005. Continuous aerobic conversion of poultry waste into single cell protein using a single reactor: Kinetic analysis and determination of optimal conditions. Biotechnology and Bioengineering Journal 22: 1567-1600.

Kaushik and Luquet .1980. Influence of Bacterial protein incorporation and of sulphur amino acid supplementation to such diets on growth of Rainbow trout, *Salmo Gairdnerii* Richardson. Aquaculture 19: 163-175.

Kim, S.S., S. Rahimnejad, K.W. Kim and K.L. Lee. 2013. Partial Replacement of Fish Meal with *Spirulina Pacifica* in Diets for Parrot Fish (*Oplegnathus faciatus*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 13: 197-204.

Kittikiew, S., J.C. Chen, D.F. Putra, Y.C. Lin, S.T. Yeh and C.H. Liou. 2013. Fucoidan effectively provokes the innate immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against experimental *Vibrio alginolyticus* infection. Fish and Shellfish Immunology 34: 280-290.

Klis, F.M., P. Mol, K. Hellingwref and S. Brul. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews 26: 239-256.

Lee, M-S. and S-Y. Shiau. 2002. Dietary vatimin C and its derivatines affect immune response in grass shrimp, *Penaeus monodon*. Fish and Shellfish Immunology 12: 119-129.

Lee, M.S. and S-Y. Shiau. 2004. Vitamin E requirements of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses. Fish and Shellfish Immunology 16: 475-485.

Li, P. and D.M. Gatlin III. 2004. Dietary brewer's yeast and the prebiotic Grobiotic™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. Aquaculture 231: 445-456.

Li, P. and D.M Gatlin III. 2003. Evolution of Brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Moronechrysops* × *M. saxatilis*). Aquaculture 231: 445–456.

Li, P., X. Wang, S. Muethy, D.M. Gatlin III, F.L. Castille and A.L. Lawrence. 2009. Effect of Dietary Supplementation of Brewer's Yeast and GroBiotic®-A on Growth, Immune Responses and Low-Salinity Tolerance of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Culture in Recirculating Systems. Journal of Applied Aquaculture 21: 110-119.

Lipke, P.N. and R. Ovalle. 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. Journal of Bacteriology 180(15): 3735-3740.

Lopez-Lopez, S., H. Nolasco, H. Villarreal-Colmenares and R. Civera-Cerecedo. 2005. Digestive enzyme response to supplemental ingredients in practical diets for juvenile freshwater crayfish Cheraxquadric arinatus. AquacultureNutrition 11: 79–85.

Macias-Sancho, J., L.H. Poersch, W. Bauer, L.A Romano, W. Wasielesky and M.B. Tesser. 2014. Fishmeal substitution with *Arthrospira (Spirulina platensis)* in a practical diet for *Litopenaeus vannamei:* Effects on growth and immunological parameters. Aquaculture 426-427: 120-125.

Manoppo, H., U.N. Manurung and R.A. Tumbol. 2015. Effecacy of baker's yeast as immunostimulant in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). International Journal of chemTech Resesrch 8(3): 1396-1402.

Marrakchi, H., F. Bardou, M. Lanéelle and M. Daffé. 2008. A comprehensive overview of mycolic acid structure and biosynthethesis. The Mycobacterial cell Envelop 42-62.

Moullac, G.L., M.L. Groumellec, D. Ansquer, S. Froissard, P. Levy and Aquacop. 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus sttylirostris* in relation whit the moult cycle: protection against vibriosis. Fish and Shellfish Immunology 7: 227-234.

Munoz, M., R. Cedenob, J. Rodrýguez, W.P.W. Van der Knaap, E. Mialhe and E. Bachere. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture 191: 89-107.

Niu, J., H-Z. Lin, S-G. Jiang, X. Chen, K-C. Wu, Y-J. Liu, S. Wang and L-X. Tian. 2013. Comparison of effect of chitin, chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine on growth performance, antioxidant defenes and oxidative stress status of *Penaeus monodon*. Aquaculture 372-375: 1-8.

NRC (National Research Council). 2011. Nutrient requirements of fish and Shrimp. National Academy Press, Washington, D.C. 376 pp.

Olive-Teles, A. and P. Gonça. 2001. Partial replacement of fishmeal by brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juviniles. Aquaculture 202: 269-278.

Olivera-Novoa, M.A., C.A. Martínez-Palacios and L. Olivera-Castillo. 2002. Applications of Nutritional Biotechnology. Aquaculture 8: 257-264.

Øverland, M., A. Karlsson, L.T. Mydland, O.H. Romarheim and A. Skred. 2013. Evaluation of *Candida utilis, Kluyveromyces maxinus* and S*accharomyces cerevisiae* yeast as protein sources in diets of Atlandtic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 402-403: 1-7.

Owens, L. and A.O. Neill. 1997. Use of clinical flow cytometer differential counts of prawn *Penaeus monodon* haemocytes. Disease of Aquatic Organisms 31: 147-153.

Ozório, R.O. A., L. Portz, R. Borghesi and J. E. P. Cyrino. 2012. Effects of Dietary Yeast (*Saccharomyces cerevisia*) Supplementation in Practical Diets of Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Animals 2: 16-24.

Pais, R., R. Khushivamani, I. Karunasagar and I. Karunasagar. 2008. Effect of immunostimulant on the haemolymph haemagglutinins of tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture Researches 39: 1339-1345.

Palmegiano, G.B., F. Gai, F. Daprá, L. Gasco, M. Pazzaglia and P.G. Peiretti. 2008. Effects of *Spirulina* and plant oil on the growth and lipid traits of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) fingerlings. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01914.x.

Patill, N.S. and J.P. Jadhav. 2014. Single Cell Protein Production Using *Penicillium ochrochloron* Chitinase and Its Evaluation in Fish Meal Formulation. Microbial and Biochemical Technology 1-4.

Pavasovic, A., A.J. Anderson, P.B. Mather and N.A. Richardson. 2007. Effect of a variety of animal, plant and single cell-based feed ingredients on diet digestibility and digestive enzyme activity in red claw crayfish, Cheraxquadric arinatus(Von Martens 1868). Aquaculture 272: 564–572.

Pholdaeng, K. and S. Pongsamart. 2010. Studies on the immunomodulatory effect of polysaccharide gel extracted from *Durio zibethinus* in *Penaeus monodon* shrimp against *Vibrio harveyi* and WSSV. Fish and Shellfish Immunology 28: 555-561.

Piper, S. 2004. Continuous cultures of *Methylococcus capsulatus*. Center of Microbial Biotechnology (Biocentrum) Technical University of Denmark, Master' s thesis Saccharomyces cerevisiae, Ph.D. Thesis. Chalmers University Technology 90: 123-167.

Powell, A., E.C. Pope, F.E. Eddy, E.C. Roberts, R.J. Shields, M.J. Francis, P. Smith, S. Topps, J. Reid and A.F. Rowley. 2011. Enhanced immune defenses in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) post-exposure to a vibrio vaccine. Journal of Invertebrate Pathology 107: 95-99.

Prachom, N., Y. Haga and S. Satoh. 2013. Impact of dietary high protein distillers dried grains on amino acid utilization, growth response, nutritional health status and waste output in juvenile rainbow trout. Aquaculture Nutrition 19:62-71.

Promya, J. and C. Chitmanat. 2011. The effects of *Spirulina platensis* and *Cladophora* Algae on the Growth Performance, Meat Quality and Immunity Stimulating Capacity of the African Sharptooth Catfish (*Clarias gariepinus*). International Journal of Agriculture and Biology 13(1): 77-82.

Purivirojkul, W., N. Areechon and P. Srisapoome. 2006. The Effect of Peptidoglycan no Immune Response in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). Kasetsart Journal 40: 181-187.

Qiao, J., Z. Du, Y. Zhang, H. Du, L. Guo, M. Zhong, J. Cao and X. Wang. 2011. Proteomic identification of the related immune-enhancing proteins in shrimp *Litopenaeus vannamei* stimulated with vitamin C and Chinese herbs. Fish and Shellfish Immonology 31: 736-745.

Raa, J. 1996. The Use of Immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. Review Fisheries Science 4(3): 229-288.

Raja, R., N.A. Kumar and S. Sridhar. 2008. A perspective on biotechnological potential of microalgae. Microbiology 34: 77-88.

Ratcliff, N.A., A.F. Rowley, S.W. Fitzgerald and C.P. Rhodes. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. International Review of Cytology 97: 183-350.

Rattanachai, A., Hironoa, T. Ohiraa, Y. Takahashib and Aoki, T. 2005. Peptidoglycan incducible expression of a serine proteinase homologue from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonica*s). Fish and Shellfish Immunology 18: 39-48.

Ravindra, P., R. Ravinder, A.K. Chadel, R.L. Vankateshwara and Z.H. Yim. 2009. The effect of de-oiled rice bran for single cell protein production using fungal culture under solid state fermentation. International Journal of Food Engineering 5: 1-10.

Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul and P. Menasaveta. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture 191: 271-288.

Rodrýguez, J. and G.L. Moullac. 2000. State of the art of immunological toosls and health control of penaeid shrimp. Aquaculture 191: 101-119.

Rosecberry, B. 1993. World shrimp farming 1993. Aquaculture Digest. December 1993.

Sanderson, G.W. and S.O. Jolly. 1994. The value of Phaffia yeast as a feed ingredient for salmonid fish. Aquaculture 124: 193–200.

Sengupta, S., J. Bhowal and U. Bhattacharya. 2006. The Association of official Analytical Chemists. The official methods of analysis of AOAC International, 18th (eds.). Journal of Environmental Management 6: 99-126.

Singhania, A.K., C.R. Soccol and A. Pandey. 2009. Recent advances in solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal 9: 667-789.

Skrede, A., G.M. Berge, T. Storebakken, O. Herstad, K.G. Aarstad and F. Sundstol. 1998. Digestibility of bacterial protein grown on natural gas in mink, pigs, chicken and Atlantic salmon. Animal Feed Science and Technology 76(1-2): 103-116.

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

Smith, V.J., J.H. Brown and C. Hauton. 2003. Immunostimulation in crustacean: dose it really protect against infection. Fish and Shellfish Immunology 15(1): 71-91.

Söderhäll, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. Annual Review of Fish Diseases Abbreviation 2: 3-23.

Söderhäll, K. and L. Cerenius and M.W. Johasson. 1996. Theprophenaloxidase activating system in invertebrates, P. 229-253. *In* New directions in invertebrate immunelogy. SOS publications, Fair Harven.

Söderhäll, K. and L. Cerenius. 1998. Role of the prophenaloxidase activating system in invertebrate immunity. Current Opinion in Immunology 10: 23-28.

Söderhäll, K. and L. Häll. 1984. Lipopolysaccharide induced activation prophenoloxidase activating system in crayfish hemocyte lysate. Biochimica et Biophysica 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 Arthopod. Journal Wiley and Sons, Inc., New York.

Sookying, D. 2010. Development and application of soybean based diet for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Dissertation. Auburn University, Albama, USA. 140 pp.

Soland, L. 2005. Charaterization of liquid mixing and dispersion in U-loop fermentor. American-Eurosian Journal of Agriculture and Environmental Science 67: 99-109.

Song, Y.L. and A. Hsieh. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodom*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. Developmental and Comparative Immunology 18: 201-209.

Sritunyalucksana, K., S.Y. Lee and K. Söderhäll. 2002. A β-1, 3-glucanbinding protein from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Developmental and Comparative Immunology 26: 237–245.

Sritunyalucksana, K., P. Sithisam, B. Withayachumnamkul and T. W. Flegel. 1999. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, Penaeus monodon, by immunostimulants. Fish and Shellfish immunology 9: 21-30.

Srividya, A.R., V.J. Vishuuvarthan, M. Murugappan and P.G. Dahake. 2013. Single cell protein. International Journal for Pharmaceutical Research Scholars 2(4): 472-485.

Storebakken T., I.S. Kvien , K.D. Shearer , B. Grisdale-Helland , S.J. Helland and G.M. Berge. 2004. The apparent digestibility of diets containing fishmeal, soybean meal or bacterial meal fed to Atlanticsalmon (*Salmo salar*): evaluation of different faucal collection methods. Aquaculture 169: 195-210.

Suman, G., M. Nuper, S. Aunradha and B. Pradeep. 2015. Single cell protein Production: A Review. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 4(9): 251-262.

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.

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

Tacon, A.G.J. and M. Metian. 2008. Global overview on the use of fishmeal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. Aquaculture 285(1-4): 146-158.

Tacon, A.G.J., M. Metian and M.R. Hasan. 2009. Feed ingredients and fertilizers for famed aquatic animals: sources and composition. FAO Fisheries and Aquaculture technical paper, 540. FAO, Roma, Italy.

Talebnia, F. 2008. Ethanol production from cellulosic biomass by encapsulated *Saccharomyces cerevisiae,* PhD. Thesis. Chalmers University Technology Gothenburg (Sweden) 334: 113-145.

Tannnenbaum, S.R. 1978. Single cell protein II. The MIT Press. Massachusettes. 454 pp.

Tanveer, A. 2010. Production of single cell protein from *Saccharomyces cerevisiae* by utilization fruit wastes. Journal of Environmental Management 1(2): 127-132.

Tassanakajon, A., K. Somboonwiwat, P. Supungul and S. Tang. 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. Fish and Shellfish Immunology 39: 954-967.

Tovar, D., J. Zambonino, C. Cahu, F.J. Gatesope, R. Vázquez-Juárez and R. Lésel. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture 204: 113–123.

Vargas-Albores, A.F. 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): humeral recognition and cellular response. Journal of Marine Biotechnology 3: 153-156.

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

Varavinit, S., P. Srithongkum, C. De-Eknamkul, A. Assavanidg and K. Charoensiri. 1996. Production of single cell protein from cassava strrch in air-lift fermenter by *Cephalosporium eichhorniae*. Food Technology and Biotechnology 48: 379-382.

Vijayakumar, M., Imelda-Joseph and R. Paul Raj. 2009. Efficacy of a fungal fermented product as fishmeal replacement in the diet of *Penaeus monodon* Fabricius post-larvae. Indian Journal of Fisheries 56(2): 115-121.

Wang, S.H. and J-C. Chen. 2005. The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology 19: 191-204.

Wongprasert, K., T. Rudtanatip and J. Praiboon. 2014. Immunstimulatory activity of sulfated galactans isolate from the red seaweed *Gracilaria fisheri* and development of resistance aqinst white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. Fish and Shellfish Immonology 36: 52-60.

Wu, C.C., Y.P. Chang, J.J. Wang, C.H. Liu, S.L. Wong, C.M. Jiang and S.L. Hsieh. 2015. Dietary administration of Gynura bicolor (Roxb. Willd) DC water extract enhance immune response and survival rate against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology 42: 25-33.

Xian, J.A., Wang, A.L., Tian J.X., Huang, J.W., Ye, C.X., Wang, W.N. and Sun, R.Y. 2009. Morphologic, physiological and immunological changes of haemocytes from *Litopenaeus vannamei* treated by lipopolysaccharide. Aquaculture 298: 139-145.

Yang, Q.H., B.P. Tan, X.H. Dong, S.Y. Chi and G.Y. Liu. 2015. Effect of different levels of *Yucca schidigera* extract on the growth and non-specific immunity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and on culture water quality. Aquaculture 439: 39-44.

Yang, Y., S. Xie, W. Lei, X. Zhu and Y. Yang. 2004. Effect of replacement of fish meal by meat and bone meal and poultry by-product meal in diets on the growth and immune response of *Macrobrachrium nipponense*. Fish and Shellfish Immunology 17: 105-114.

Yousuf, M.K. 2012. To determine protein content of single cell protein produced by using various combinations of fruit wastes in the production of SCP by using two standard food fungi *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oligospora*. International Journal of Advanced Biotechnology and Research 3(1): 533-536.

Yunus, F., M. Nadeem and F. Rashid. 2015. Single cell protein production through microbial conversion of lignocellosic residue (wheat bran) for animal feed. Institute of Brewing and Distilling 121: 533-557.

Zhao, L., W. Wang, X. Huang, T. Guo, W. Wen, L. Feng and L. Wei. 2017. The effect of replacement of fish meal by yeast extracts on the digestibility, growth and muscle composition of shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research 48: 311-320.

Zubi, W. 2005. Production of single cell protein from base hydrolyzed of date extract byproduct by the fungus *Fusarium graminearum*. M.Sc. Thesis, Garyounis University, Benghazi 19: 67-225.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (proximate composition analysis)

การวิเคราะห์ความชื้น (moisture)

ตามวิธีการของ AOAC (1995)

อุปกรณ์

1. ตู้อบ (hot air oven)
2. ถ้วยกระเบื้อง (crucible)
3. โถดูดความชื้น (desiccator)
4. ตาชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักถ้วยกระเบื้อง
2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงในถ้วยกระเบื้อง
3. นำไปอบในตู้อบความชื้นที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
4. จากนั้นนำมาทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักหลังอบ

วิธีคำนวณ

สูตร $\%$ ความชื้น = $[(a-b) \times 100]/ w$

เมื่อ a คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้องและน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

b คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้องและน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

W คือ น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

การวิเคราะห์เถ้า (ash)

ตามวิธีการของ AOAC (1995)

อุปกรณ์

1. เตาเผา
2. ถ้วยกระเบื้อง (crucible)
3. โถดูดความชื้น (desiccator)
4. ตาชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักถ้วยกระเบื้อง
2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงในถ้วยกระเบื้อง
3. นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550-600 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง
4. จากนั้นนำมาทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักหลังเผา

วิธีคำนวณ

สูตร % เถ้า = [(b-a) × 100]/ w

เมื่อ a คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง

b คือ ถ้วยกระเบื้อง และน้ำหนักตัวอย่างหลัง

W คือ น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

การวิเคราะห์โปรตีน (protein)

ตามวิธีการ Kjeldahl method (AOAC, 1995)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Hot plate
2. บิวเรต (berate)
2. ชุดวิเคราะห์โปรตีน
3. ตาชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4. กรดบอริก (boric acid)
5. คะตาไลท์มิกซ์ (catalyst mix)
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. คะตาไลท์มิกซ์ (catalyst mix)

ชั่งสารโปแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate) 100 กรัม และคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate) 7 กรัม ผสมให้เข้ากัน

2. 4 เปอร์เซ็นต์กรดบอริก (4% boric acid)

ชั่งสารกรดบอริก 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร โดยการต้มให้เดือดด้วย hot plate

3. 32 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (32% sodium hydroxide)

ชั่งสารโดเดียมไฮดรอกไซด์ 320 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4. 0.1 นอล์มอล กรดซัลฟูริก (0.1 N sulfuric acid)

ตวงกรดซัลฟูริกเข้มข้น 98% 3 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

วิธีการวิเคราะห์

ขั้นตอนที่ 1 การย่อยตัวอย่าง

1. ชั่งคะตาไลท์มิกซ์ ประมาณ 5 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน จากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน

2. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 98% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อยโปรตีนจากนั้นนำไปต่อเข้ากับเครื่องย่อยโปรตีน ย่อยจนตัวอย่างใส แล้วทิ้งให้เย็นในตู้ดูดควัน (hood)

ขั้นตอนที่ 2 การกลั่นตัวอย่าง

1. เตรียม 4 เปอร์เซ็นต์กรดบอริก ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร จากนั้นหยดมิกซ์อินดิเคเตอร์ 2-3 หยด

2. นำตัวอย่างจากขั้นตอนการย่อย ขวดรูปชมพู่ที่มี 4 เปอร์เซ็นต์กรดบอริก และ32 เปอร์เซ็นต์โซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อเข้ากับเครื่องกลั่นโปรตีน

3. เมื่อกลั่นเสร็จแล้ว นำตัวอย่างที่ได้ไปไตเตรทด้วย 0.1 นอล์มอล กรดซัลฟู จนเปลี่ยนเป็นสีชมพู (end point) จดบันทึกค่าเพื่อนำไปคำนวณโปรตีนในตัวอย่าง

4. สำหรับแบลงค์ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับตัวอย่าง

วิธีคำนวณ

สูตร % โปรตีน = $[1.4 (V_2 - V_1) N \times 6.25] / W$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของกรดซัลฟูริกที่ใช้ไตเตรทแบลงค์

V_2 = ปริมาตรของกรดซัลฟูริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

N = ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก

W = น้ำหนักตัวอย่าง

การวิเคราะห์ไขมัน (lipid)

ตามวิธีการ Soxhlet extraction method (AOAC, 1995)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ชุดวิเคราะห์ไขมัน
2. ตู้อบ (hot air oven)
3. ตาชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4. โถดูดความชื้น (desiccator)
5. ขวดก้นกลม (round bottom flask)
6. ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether)

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงในกระดาษกรองแล้วห่อให้มิดชิด
2. นำตัวอย่างที่ห่ออยู่ในกระดาษกรองใส่ลงในทิมเบิล (timble)
3. ชั่งน้ำหนักขวดก้นกลม จากนั้นเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลม
4. จากนั้นนำทิมเบิลใส่ลงใน soxhlet และต่อกับชุดวิเคราะห์ไขมันเพื่อทำการสกัดไขมัน โดยการให้ความร้อน นาน 2 ชั่วโมง
5. นำขวดก้นกลมที่สกัดไขมันแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำมาทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก

วิธีคำนวณ

สูตร % ไขมัน = (น้ำหนักไขมันที่สกัดได้ × 100)/น้ำหนักตัวอย่าง

การวิเคราะห์เยื่อใย (fiber)

ตามวิธีการของ AOAC (1995)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Fiber bag
2. Hot plate
3. เตาเผา
4. ชุดวิเคราะห์เยื่อใย
5. ตู้อบ (hot air oven)
6. ตาชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
7. โถดูดความชื้น (desiccator)
8. ถ้วยกระเบื้อง (crucible)
9. Octhanol
10. Acetone
11. กรดซัลฟูริก (sulfuric acid)
12. โซเดียมไฮดรกไซด์ (sodium hydroxide)

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. 0.128 โมลาร์ ซัลฟูริก (0.128 M H_2SO_4)

ตวงกรดซัลฟูริกเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 12.55 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

2. 0.313 โมลาร์ โซเดียมไฮดรกไซด์ (0.313 M NaOH)

ชั่งสารโซเดียมไฮดรกไซด์ 12.52 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งน้ำหนัก fiber bag จากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงใน fiber bag
2. นำตัวอย่างที่อยู่ใน fiber bag ต่อเข้ากับ spacer
3. เตรียม 0.128 โมลาร์ ซัลฟูริก ปริมาตร 360 มิลลิลิตร และ 0.313 โมลาร์ โซเดียมไฮดรกไซด์ 360 มิลลิลิตร ในลงในบีกเกอร์ ต้มให้เดือด
4. นำตัวอย่างที่ต่อเข้ากับ spacer แล้ว ไปต้มในกรด 0.128 โมลาร์ ซัลฟูริก อาจใช้ octanol เพื่อลดการเกิดฟอง ต้มนาน 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำร้อนจนกรดหมด (สามารถใช้กระดาษลิตมัตในการตรวจ)

5. จากนั้นนำตัวอย่างมาต้มในด่าง 0.313 โมลาร์ โซเดียมไฮดรกไซด์ อาจใช้ octanol เพื่อลดการเกิดฟอง ต้มนาน 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำร้อนจนด่างหมด (สามารถใช้กระดาษลิตมัตในการตรวจ)

6. ใช้อะซิโตนในการฉีดไล่น้ำ

7. นำตัวอย่างใส่ลงในถ้วยกระเบื้อง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องซาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

8. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ แล้วนำไปเผาในเตาเผา อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

9. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างหลังเผา บันทึกค่า เพื่อนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เยื่อใย

วิธีคำนวณ

สูตร % เยื่อใย $= [(C – D - E)/ A] \times 100$

เมื่อ A = น้ำหนักตัวอย่าง

B = น้ำหนัก Fiber bag

C = หนักตัวอย่างก่อนเผา

D = น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา

การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา และภูมิคุ้มกัน

(Hematology and Immune responses analysis)

การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง (Total Haemocytes Counts ;THC) และจำนวนเม็ดเลือดแต่ละชนิด (Differencetail Hemocytes Counts)

ตามวิธีการของ Moullac et al. (1997)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เข็มฉีดยา ขนาด 23G×1.5 นิ้ว
2. Eppendof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. ทิป (tip) ขนาด 200 ไมโครลิตร
4. กระบอกฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร
5. ฮีโมไซโตมิเตอร์ (hemocytometer)
6. กล้องจุลทรรศน์ (microscope compound)
7. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 2-20 ไมโครลิตร
8. ไตรโซเดียมซิเตรท (Tri-sodium citrate)

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

ชั่งสารไตรโซเดียมซิเตรท 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. ดูดเลือดจากแอ่งเลือด โดยใช้หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร เข็มขนาด 25 G ที่ภายในหลอดบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (10% Trisodium citrate) ในอัตราส่วน 1:1 นำเลือดใส่ในหลอด eppendof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ลงในน้ำแข็งเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือดช้าลง

2. ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเลือดกุ้งจำนวน 20 ไมโครลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์โดยใช้ฮีโมไซโตมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า (ภาพผนวกที่ 1-2)

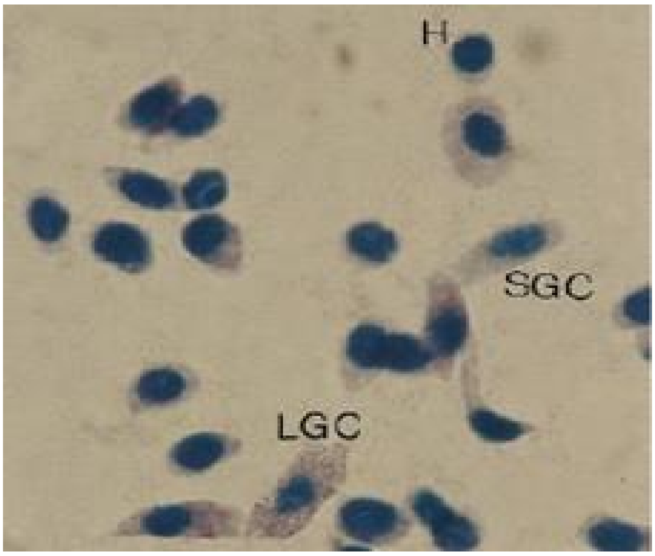
3. คำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็น จำนวนเซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิลิตร โดยหาค่าได้จาก

ปริมาตรของ Hemacytometer = กว้าง × ยาว × สูง

= 1 มิลลิเมตร × 1 มิลลิเมตร × 0.1 มิลลิเมตรx11

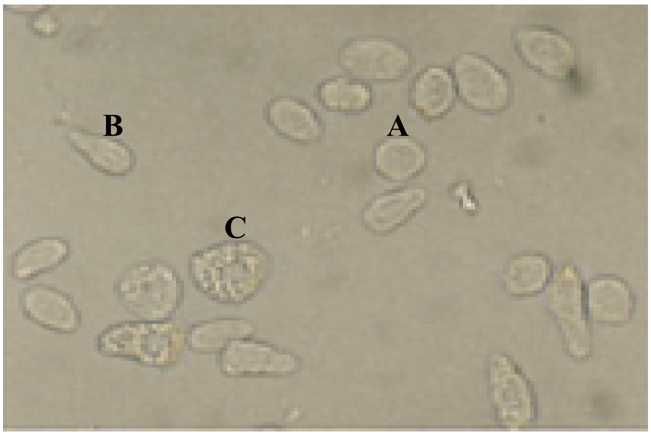
= 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อลูกบาศก์มิลลิลิตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้เฉลี่ย × 10 × 10^3 × ค่า dilution



ภาพผนวกที่ 1 ลักษณะรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ของกุ้ง ได้แก่ ไฮยาลินเซลล์ (A) เซมิแกรนูลาร์เซลล์ (B) และ ลาร์จแกรนูลาร์เซลล์ (C) ย้อมด้วย Geimsa’s strain)

ที่มา : Moullac et al. (1997)



ภาพผนวกที่ 2 ลักษณะรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ของกุ้ง ได้แก่ ไฮยาลินเซลล์ (A) เซมิแกรนูลาร์เซลล์ (B) และ ลาร์จแกรนูลาร์เซลล์ (C)

การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน

(Superoxide anion activity; O_2^-) ตามวิธีการของ Munoz et al. (2000)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. 96-well plate
2. Microplate reader
3. เข็มฉีดยา ขนาด 23G ×1.5 นิ้ว
4. กระบอกฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร
5. ทิป (tip) ขนาด 200 ไมโครลิตร
6. Eppendof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
7. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 10-100 ไมโครลิตร
8. เมทานอล (methanol)
9. โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์
10. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
11. Nitroblue tetrazolium (NBT)
12. ไตรโซเดียมซิเตรท (Tri-sodium citrate)
13. modified complete Hank's balanced salt solution (MHBSS)

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

ชั่งสารไตรโซเดียมซิเตรท 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2. สารละลาย 0.3 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรบูลเตตะโซเลียม (Nitroblue tetrazolium)

ชั่งสารไนโตรบูลเตตะโซเลียม 0.3 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3. สารละลาย 2 โมลาร์ โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (2M KOH)

ชั่งสารโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 11.82 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. ดูดเลือดกุ้งจากแอ่งเลือด โดยใช้หลอดฉีดยาที่ภายในหลอดบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (10% Trisodium citrate) ในอัตราส่วน 1:1 นำตัวอย่างเลือดกุ้งใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2. ใช้ไมโครปิเปต ดูดสารละลายเลือดกุ้งจำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate

3. เติม MHBSS 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

4. ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วหยด 0.3 เปอร์เซ็นต์ NBT 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นดูด 0.3 เปอร์เซ็นต์ NBT ทิ้ง

5. เติมเมทานอล 200 ไมโครลิตร แล้วดูดทิ้ง นาน 5 นาที

6. หยดเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วดูดทิ้ง 2 ครั้ง หลังจากดูดทิ้งครั้งที่ 2 แล้ว ปล่อยให้หลุมที่มีตัวอย่างแห้ง

7. เติม 2 โมลาร์ โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (2M KOH) 120 ไมโครลิตร และ Dimethyl sulfoxide (DMSO) 140 ไมโครลิตร นำไม่เขย่าด้วยเครื่อง microplate shaker ให้สารละลายเข้ากัน

8. นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

กิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity; PO)

ตามวิธีการของ Söderhäll and Häll (1984) และ Hernández-López et al. (1996)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Centrifuge
2. 96-well plate
3. ตู้บ่ม (incubator)
4. Microplate reader
5. เข็มฉีดยา ขนาด 23G ×1.5 นิ้ว
6. Eppendof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
7. ทิป (tip) ขนาด 200 ไมโครลิตร
8. กระบอกฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร
9. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร
10. RPMI medium
11. สารละลายทริปซิน (Trypsin)
12. L-dihydroxyphenylanine (L-DOPA)
13. ไตรโซเดียมซิเตรท (Tri-sodium citrate)
14. สารละลายคาร์โคดิเลทบัปเฟอร์ (cacodylate buffer)

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

ชั่งสารไตรโซเดียมซิเตรท 10 กรัม ละลายใน RPML ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายคาร์โคดิเลทบัปเฟอร์ (cacodylate buffer)

ชั่งสารโซเดียมคาร์โคดิเลท 11.5 กรัม และชั่งสารแคลเซียมคลอไรด์ 11.10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยกระดาษวัดพีเอช

3. สารละลายทริปซิน (trypsin) 0.1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งสารทริปซิน 0.1 กรัม ละลายในสารละลายคาร์โคดิเลทบัปเฟอร์ (cacodylate buffer) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายแอลโดปา (L-DOPA)

ชั่งสาร แอลโดปา 30 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. การเก็บตัวอย่างเลือดและเตรียม Haemocyte Lysate (HLS)

1.1 ดูดเลือดกุ้งจากแอ่งเลือด โดยใช้หลอดฉีดยาที่ภายในหลอดบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (RPMI ผสมกับ 10 เปอร์เซ็นต์ Tri-sodium citrate) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำตัวอย่างน้ำเลือดที่ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบ นาน 5 นาที

1.2 ดูดส่วนใสทิ้ง นำส่วนของเซลล์เม็ดเลือดมาล้างด้วยสารละลายคาร์โคดิเลทบัปเฟอร์ 200 ไมโครลิตร

1.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ นาน 20 นาที

1.4 แยกส่วนใสด้านบนซึ่งเป็น HLS เก็บไว้ใช้วิเคราะห์ต่อไป

2. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

2.1 นำ HLS ในข้อ 1.4 ใส่ลงถาดหลุมทดลอง 50 ไมโครลิตร

2.2 เติมสารละลาย Trypsin (0.1% ใน cacodylate buffer) 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที

2.3 เติม L-DOPA (3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทุก 2 นาที นาน 30 นาที ค่า optical density (OD) กิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีความสามารถเปลี่ยน L-DOPA เป็น dopamine มีลักษณะเป็นสารละลายสีแดง

กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง (phagocytic activity)

ตามวิธีการของ Itami et al. (1994)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Cover slip
2. Centrifuge
3. สไลด์ (Slide)
4. เข็มฉีดยา ขนาด 23G ×1.5 นิ้ว
5. Eppendof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
6. ทิป (tip) ขนาด 200 ไมโครลิตร
7. กระบอกฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร
8. ฮีโมไซโตมิเตอร์ (hemocytometer)
9. กล้องจุลทรรศน์ (microscope compound)
10. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20-200 ไมโครลิตร
11. Permount
12. RPMI medium
13. ลาเทคบีด (latex beads)
14. สารละลาย Wright และ Giemsa stain
15. ไตรโซเดียมซิเตรท (Tri-sodium citrate)

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

ชั่งสารไตรโซเดียมซิเตรท 10 กรัม ละลายใน RPML ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลาย shrimp saline

ชั่งสารโซเดียมคลอไรด์ 90 กรัม ลายลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. Wright stain

ชั่งสาร Wright stain 1 กรัม บดผงสี Wright stain ให้ละเอียด ผสมลงใน methyl alcohol เขย่าแรง ๆ ตั้งบน magnetic starrier ทิ้งไว้ 1 คืนเพื่อให้สีละลายดีขึ้น กรองก่อนใช้งานทุกครั้ง (เก็บได้นาน 1 ปี)

4. Giemsa stain

ชั่งสาร Giemsa powder 3.8 กรัม ผสมลงในกลีเซอรีน (glycerin) 25 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วจึงเติมเมทานอลแอลกอฮอล์ (Methyl alcohol) 75 มิลลิลิตรสารนี้เรียกว่า Giemsa stock จากนั้นเจือจาง Giemsa stock ในสัดส่วน 1 ต่อ 10 (Giemsa stock ต่อ methyl alcohol)

วิธีการวิเคราะห์

1. เจาะเลือดจากแอ่งเลือด โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (RPMI ผสมกับ 10% Trisodium citrate) ในอัตราส่วน 1:1 โดยดูดเลือดกุ้ง 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดฉีดยาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร

2. หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบ เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง โดยนำส่วนใสด้านบนทิ้ง

3. จากนั้นนำเม็ดเลือดที่ตกตะกอนไปนับจำนวนเซลล์และปรับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดให้ได้ 2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย RPMI medium

4. หลังจากนั้นดูดเม็ดเลือด 0.2 มิลลิลิตร มาหยดบน cover slip โดยการเกลี่ยให้ทั่ว ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วล้างเม็ดเลือดที่ไม่เกาะออกด้วย shrimp saline จำนวน 3 ครั้ง

5. หยด latex beads ที่มีจำนวนของ beads ประมาณ 2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงไป 0.2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ล้างออกด้วย shrimp saline 5 ครั้ง

6. ย้อมด้วยสี Wright และ Giemsa stain 1 นาที

7. ล้างด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

8. ปิดสไลด์ด้วย permout

9. นำไปวิเคราะห์ข้อมูลโดยการนับจำนวนเซลล์ โดยสุ่มนับจำนวนเซลล์ โดยสุ่มนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด 200 เซลล์ ในแต่ละ cover slip นับเซลล์เม็ดเลือดที่กินเซลล์ยีสต์เข้าไป คำนวณค่าได้จากสูตร

เปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิส = (จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่กินเม็ดบีด×100)/จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด

การศึกษากิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง (bactericidal activity)

ตามวิธีการของกิจการ และคณะ (2543)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Centrifuge
2. Hot plate
3. Autoclave
4. เพลท (Plate)
5. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
6. เข็มฉีดยา ขนาด 23G×1.5 นิ้ว
7. Eppendof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
8. ทิป (tip) ขนาด 200 ไมโครลิตร
9. กระบอกฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร
10. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
11. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20-200 ไมโครลิตร
12. *V. harveyi*
13. Tryptic soy agar (TSA)
14. ไตรโซเดียมซิเตรท (Tri-sodium citrate)
15. Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS)

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

ชั่งสารไตรโซเดียมซิเตรท 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2. Tryptic soy agar (TSA)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA 30 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นำไปต้มจนวุ้นละลาย จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในออโต้เครป ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำไปเทเพลทต่อไป

3. Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS 89.09 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นนำไปต้มด้วย hot plate จนวุ้นละลาย ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส เทลงเพลทที่ฆ่าเชื้อแล้ว

วิธีการวิเคราะห์

1. ดูดเลือดกุ้งจากแอ่งเลือด โดยใช้หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร เข็มขนาด 25 G ที่ภายในหลอดบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (10% Tri-sodium citrate) ในอัตราส่วน 1:1 นำเลือดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2. นำตัวอย่างเลือดไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 รอบ นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. ดูดซีรั่มที่เป็นส่วนใสด้านบนมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 % แบบ two-fold dilution ในระดับ 1:2 1:4 1:8 1:16 และ 1:32 โดยปริมาตรการเจือจางเป็น 0.5 มิลลิลิตร

4. นำเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* บริสุทธิ์ที่เลี้ยงในอาหาร TSA ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ นาน 15 นาที 3 ครั้ง

5. นำเชื้อที่ได้มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.08-0.1

6. นำเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตรเติมในแต่ละหลอดที่เจือจางซีรั่มไว้แล้วในปริมาตรที่เท่ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

7. นำส่วนผสมแต่ละหลอดปริมาตร 10 ไมโครลิตรมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Drop plate ใน TCBS agar

8. บันทึกค่าของการเจือจางซีรั่มที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง

กระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากระบบหมุนเลือด (clarence efficiency)

ตามวิธีการของ Adams (1991)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Hot plate
2. เพลท (plate)
3. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
4. เข็มฉีดยา ขนาด 23G ×1.5 นิ้ว
5. Eppendof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
6. ทิป (tip) ขนาด 200 ไมโครลิตร
7. กระบอกฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร
8. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
9. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20-200 ไมโครลิตร
10. *V. harveyi*
11. Tryptic soy agar (TSA)
12. ไตรโซเดียมซิเตรท (Tri-sodium citrate)
13. Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS)

วิธีการเตรียมสาร

1. สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

ชั่งสารไตรโซเดียมซิเตรท 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2. Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS 89.09 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นนำไปต้มด้วย hot plate จนวุ้นละลาย ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส เทลงเพลทที่ฆ่าเชื้อแล้ว

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมเชื้อ *V. harveyi* ความเข้มข้นเชื้อ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร โดยฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าบริเวณกล้ามเนื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และกลุ่มควบคุมใช้น้ำเกลือ (0.85%NaCl)
2. หลังจากฉีดเชื้อ 3 ชั่วโมง ทำการดูดเลือดกุ้ง 0.5 มิลลิลิตร และนำไป spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar ปริมาณ 100 ไมโครลิตร
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (Water quality analysis)

การวิเคราะห์ความเป็นด่าง (Alkalinity)

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.05 นอร์มอล

อบโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ประมาณ 3-5 กรัม ที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งสารที่ได้ประมาณ 2.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร สารละลายนี้มีอายุการใช้งานประมาณ 1 สัปดาห์

2. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล

เจือจางกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2.1 ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.05 นอร์มอล 40 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ (ทำ 3 ซ้ำ) ไตเตรทกับสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐาน 0.1 นอร์มอล จนสารละลายมีความเป็นกรดด่างประมาณ 5 จดบันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ไตเตรท

2.2 นำสารละลายที่ได้ไปต้มประมาณ 3-5 นาที (ขณะต้มสารละลายปิดด้วยกระจกนาฬิกา) ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ล้างสารละลายที่เกาะอยู่ตามกระจกนาฬิกาลงในขวดรูปชมพู่

2.3 นำไปไตเตรทด้วยกรดต่อ จนสารละลายเปลี่ยนสี (ความเป็นกรดด่าง = 4.5)

2.4 คำนวณความเข้มข้นของกรด (normality) ดังนี้

$$N = (A \times B)/(53 \times C)$$

เมื่อ A = น้ำหนักของโซเดียมคาร์บอเนตในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 1 ลิตร (เท่ากับ 2.5 กรัม)

B = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่นำมาไตเตรท (เท่ากับ 40.0 มิลลิลิตร)

C = จำนวนมิลลิลิตรของกรดที่ใช้ไตเตรท (ประมาณ 18.9 มิลลิลิตร)

53 = น้ำหนักโมเลกุลของโซเดียมคาร์บอเนต

ละลายกรดเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เท่ากับ 5 มิลลิลิตร ของแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

3. สารละลายกรดมาตรฐานเข้มข้น 0.02 นอร์มอล

ดูดสารละลายกรดมาตรฐานเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จำนวน 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้มีความเข้มข้น 0.02 นอร์มอล สารละลายนี้จำนวน 1 มิลลิลิตร เท่ากับแคลเซียมคาร์บอเนต 1 มิลลิลิตร

4. สารละลายฟีนอลฟ์ทาลีน (phenolpthalein indicator)

ละลายฟีนอลฟ์ทาลีน 1 กรัมในเอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 95 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 100 มิลลิลิตร

5. อินดิเคเตอร์ผสมระหว่างโบรโมครีซอลกรีนกับเมธิลเรด

5.1 ละลายเมธิลเรด (methyl red) 20 มิลลิลิตร และบรอมคลีซอลกรีน (bromcresol green) 100 มิลลิลิตร ด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 95 เปอร์เซ็นต์ หรือไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol) 100 มิลลิลิตร

5.2 ละลายโซเดียมเมธิลเรด (sodium methyl red) 20 มิลลิลิตร และโซเดียมบรอมคลีซอลกรีน (sodium bromcresol green) 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น100 มิลลิลิตร

6. สารละลายเมธิลออร์เรนจ์อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator)

ละลายเมธิลออร์เรนจ์อินดิเคเตอร์ 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. ตวงน้ำตัวอย่างที่อุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. หยดฟีนอลฟ์ทาลีนอินดิเคเตอร์ 4-5 หยด ถ้าสารละลายมีสีชมพู ไตเตรทจนสีชมพูหมดไป บันทึกค่า

3. หยดเมธิลออร์เรนจ์อินดิเคเตอร์ 3 หยด ถ้าตัวอย่างมีสีเหลืองไตรเตรทด้วยกรดจนสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีส้ม

4. บันทึกปริมาตร (มิลลิลิตร) ของกรดที่ใช้ในข้อ 2 และ 3 แล้วคำนวณหาความเป็นด่างดังนี้

Phenopthaline alkalinity (as mg $CaCO_3$/L) = (A x N x 50,000)/ปริตรน้ำตัวอย่าง (ml)

Methyl orange alkalinity (as mg $CaCO_3$/L) = (B x N x 50,000)/ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (ml)

Total alkalinity (T) = Phenopthaline alkalinity + alkalinity

เมื่อ A = มิลลิลิตรของกรดที่ใช้ไตเตรทน้ำตัวอย่างถึงพีเอช 8.3 (ตามข้อ 2)

B = มิลลิลิตรของกรดที่ใช้ไตเตรทน้ำตัวอย่างถึงพีเอช 4.5 (ตามข้อ 3)

N = นอร์มอลของกรด

การวิเคราะห์แอมโมเนีย (ammonia)

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. น้ำบริสุทธิ์

การวิเคราะห์แอมโมเนียควรใช้น้ำปราศจากอิออนหรือน้ำบริสุทธิ์ปราศจากสารอินทรีย์สำหรับเตรียมสารละลาย สารละลายมาตรฐานและแบลงค์

2. สารละลายฟีนอล

สารละลายฟีนอล (C_6H_5OH) 5 กรัม ในเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร

3. สารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์

สารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ ($Na_2FE(CN)_5NO.2H_2O$) 0.5 กรัม ในน้ำบริสุทธิ์ 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาสารละลายในขวดแก้วสีชา สารละลายนี้มีอายุ 1 เดือน

4. สารละลายอัลคาไลน์

สารละลายโซเดียมซิเตรทไดไฮเดรต ($Na_2C_6H_5O_7.2H_2O$) 20 กรัม และโซเดียมไฮดรกไซด์ (NaOH) 1 กรัมในน้ำบริสุทธิ์ 100 มิลลิลิตร

5. สารละลายออกซิเดซิ่ง

5.1 ละลายโซเดียมไดคลอโรไซยานูเรท (sodium dichloroisocyanurate, $C_3Cl_2N_3NaO_3$) หรือโปแทสเซียมไดคลอไรไซยานูเรท (potassium dichloroisocyanurate, $C_3Cl_3N_3KO_3$) ชนิดใดชนิดหนึ่งจำนวน 1 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม และไตรโซเดียมซิเตรทไดไฮเดรต ($Na_2C_6H_5O_7.2H_2O$) 50 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร สารละลายนี้มีอายุ 2-3 สัปดาห์

5.2 ผสมสารละลายอัลคาไลน์และสารละโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 4:1 สารละลายนี้ควรเตรียมใหม่ทุกวัน

6. สารละลายมาตรฐานของแอมโมเนีย

ละลายแอมโนเนียซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$ ที่อบแห้ง 105-110 องศาเซลเซียส นาน 1-24 ชั่วโมง 0.165 กรัม ด้วยน้ำบริสุทธิ์ ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้มีความเข้มข้นของแอมโมเนีย 35 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียกสารละลายนี้ว่า stock standard solution เก็บสารละลายนี้ในขวดสีชา สารละลายนี้มีอายุการใช้งาน 6 เดือน ถึง 1 ปี

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมกราฟมาตรฐาน

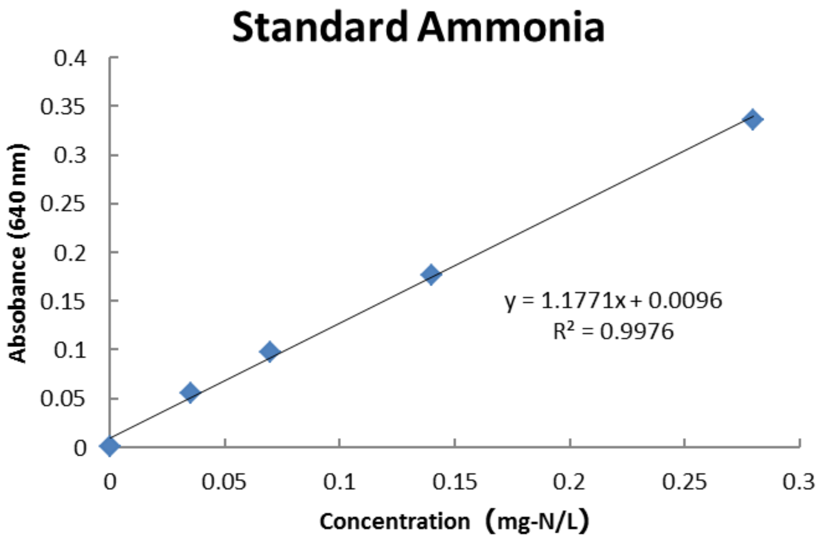
1.1 ดูดสารละลาย stock standard solution มา 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร สารละลายนี้มีความเข้มข้น 0.35 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2 ดูดสารละลายจากข้อ 1.1 มา 5, 10, 20 และ 40 มิลลิลิตร ด้วยปิเปตวัดปริมาตรใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำบริสุทธิ์ สารละลายนี้มีความเข้มข้น 0.035, 0.070, 0.140 แล 0.280 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับแบลงค์ให้ใช้น้ำบริสุทธิ์ให้สอดคล้องกับสารละลายมาตรฐาน

1.3 เติมสารละลายฟีนอล 2 มิลลิลิตร สารละลายออกซิเดซิ่ง 5 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากเติมน้ำยาเคมีแต่ละชนิดเขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 24 ชั่วโมง หรือใน water bath อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 30 นาที แต่ไม่เกิน 24 ชั่วโมง เช่นกัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร จดบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ (ตารางผนวกที่ 1) หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นด้วยวิธี linear regression (ภาพผนวกที่ 3)

ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์กราฟมาตรฐานของแอมโมเนีย

Concentration (mg-N/L)	Absorbance (OD 640nm)
0.000	0.000
0.035	0.056
0.070	0.097
0.140	0.177
0.280	0.336



ภาพผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานของแอมโมเนีย (ammonia)

2. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

2.1 ใช้ปิเปตแบบกระเปาะดูดน้ำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีฝาปิดเป็นเกลียวเพื่อป้องกันการระเหยของแอมโมเนีย

2.2 เติมสารละลายฟีนอล 0.4 มิลลิลิตร สารละลายออกซิเดซิ่ง 1 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ 0.4 มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากเติมน้ำยาเคมีแต่ละชนิดเขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง แต่ไม่เกิด 24 ชั่วโมง

2.3 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

2.4 จดบันทึกค่าความเข้มข้นที่ได้ หรือนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของแอมโมเนียในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้ (ภาพผนวกที่ 3)

การวิเคราะห์ไนไตรท์ (nitrite)

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารละลายซัลฟานิลาไมด์

สารละลายซัลฟานิลาไมด์ ($C_6H_8N_2O_2S$) 5 กรัม ในของผสมของ 50 มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นกับน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายที่ได้ให้มีปริมาตร 500 มิลลิลิตร

2. สารละลายแนฟทิล เอธิลลีนไดอะมีน ไดไฮโดรคลอไรด์ (NED)

ละลาย แนฟทิล เอธิลลีนไดอะมีน ไดไฮโดรคลอไรด์ ($C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH_2.2HCL.CH_3OH$) 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

3. สารละลายมาตรฐานของไนไตรท์

สารละลายโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) ที่อบแห้ง 105-110 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 0.345 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้มีความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายนี้เรียกว่า หtock nitrite standara solution เก็บสารละลายนี้ไว้ในขวดสีชาแล้แช่เย็น สารละลายนี้มีอายุ 1- 2 เดือน

วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. การเตรียมกราฟมาตรฐาน

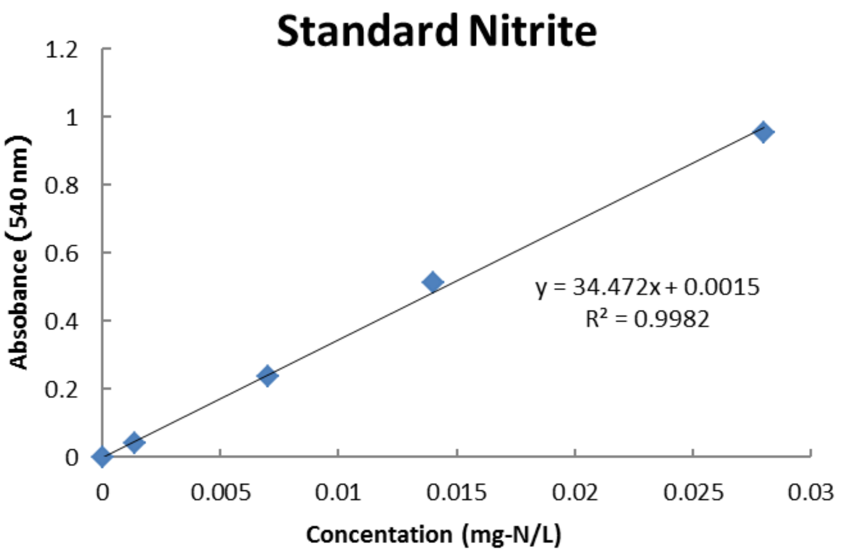
1.1 ดูดสารละลายไนไตรท์จาก stock standard solution 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมตร ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร สารละลายนี้มีความเข้มข้น 0.70 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายนี้เรียกว่า intermediate standard solution

1.2 ดูดสารสารละลายจากข้อ 1.1 มา 1, 5 ,10 และ 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร สารละลาย working standard นี้มีความเข้มข้น 0.0014, 0.0070, 0.014 และ 0.0280 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับแบลงค์ใช้น้ำกลั่นหรือน้ำทะเลเทียมให้สอดคล้องกับสารละลาย working standard

1.3 เติมสารละลายซัลฟานิลาไมด์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 2-8 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ แล้วเติมสารละลาย NED 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ถึง 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (ตารางผนวกที่ 2) หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับความเข้มข้นด้วยวิธี linear regression (ภาพผนวกที่ 4)

ตารางผนวกที่ 2 การวิเคราะห์กราฟมาตรฐานของไนไตรท์

Concentration (mg-N/L)	Absorbance (OD 640nm)
0.0000	0.000
0.0014	0.040
0.0700	0.238
0.0140	0.513
0.0280	0.945



ภาพผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานของไนไตรท์ (nitrite)

2. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

2.1 น้ำตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวงใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร หากกรองแล้วน้ำตัวอย่างยังขุ่นให้ตวงน้ำตัวอย่างใส่ขวดรูปชมพู่เพิ่มอีกหนึ่งขวด ขวดนี้ไม่ต้องเติมน้ำยาเคมี น้ำตัวอย่างในขวดนี้เรียกว่า turbidity blank

2.2 เติมสารละลายซัลฟานิลาไมด์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 2-8 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์

2.3 เติมสารละลาย NED 1 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างทันที แล้วทิ้งไว้ 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมง นำน้ำตัวอย่างทั้งที่เติมน้ำยาเคมีและไม่เติมน้ำยาเคมีไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2.4 สำหรับแบลงค์ใช้น้ำกลั่น แล้วทำเช่นเดียวกับน้ำตัวอย่าง

2.5 จดบันทึกค่าความเข้มข้นที่วัดได้หรือนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของไนไตรท์ในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้ (ภาพผนวกที่ 4)

ภาคผนวก ข
คุณภาพน้ำ

ตารางผนวกที่ 3 คุณภาพน้ำระหว่างการทดลองการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ (SLP) ในสูตรอาหารกุ้งขาว

Parameters	น้ำเข้าระบบ (สูงสุด-ต่ำสุด)	น้ำออกจากระบบ (สูงสุด-ต่ำสุด)
DO (mg L^{-1})	5.67±0.03 (6.37-4.98)	5.77±0.01 (6.28-5.15)
pH	7.02±0.02 (7.38-6.69)	7.02±0.01 (7.40-6.72)
Temperature (°C)	27.7±0.0 (28.4-26.8)	27.8±0.0 (28.8-26.8)
Salinity (ppt.)	5.0±0.0	5.0±0.0
Alkalinity (mg L^{-1})	137.8±20.5 (182-108)	143.2±21.3 (186-108)
Ammonia(mg L^{-1})	0.02±0.01 (0.25-0)	0.03±0.01 (0.29-0)
Nitrite (mg L^{-1})	0.13±0.07 (0.27-0)	0.14±0.08 (0.28-0)

ตารางผนวกที่ 4 คุณภาพน้ำระหว่างการทดลองการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรส (MSGP) ในสูตรอาหารกุ้งขาว

Parameters	Treatments				
	MSGP-0 (control)	MSGP-2.5	MSGP-5.0	MSGP-7.5	MSGP-10.0
DO (mg L^{-1})	5.32±0.40	5.07±0.18	5.14±0.35	5.18±0.15	4.96±0.17
pH	7.26±0.02	7.27±0.01	7.27±0.01	7.26±0.01	7.27±0.02
Temperature (°C)	27.8±0.1	27.8±0.0	27.8±0.2	27.8±0.0	27.9±0.1
Salinity (ppt)	10.1±0.1	10.1±0.1	10.0±0.1	10.0±0.1	10.0±0.1
Alkalinity (mg L^{-1})	122.73±8.86	122.46±0.29	122.20±5.74	122.63±8.50	125.40±6.76
Ammonia (mg L^{-1})	0.71±0.05	0.76±0.12	0.74±0.05	0.69±0.09	0.79±0.09
Nitrite (mg L^{-1})	0.35±0.02	0.37±0.03	0.36±0.03	0.37±0.05	0.38±0.04

ตารางผนวกที่ 5 คุณภาพน้ำระหว่างการทดลองการใช้กากยีสต์ (YP) ในสูตรอาหารเลี้ยงกุ้งขาว (*L vannamei*)

Parameters	น้ำเข้าระบบ (สูงสุด-ต่ำสุด)	น้ำออกจากระบบ (สูงสุด-ต่ำสุด)
DO (mg L^{-1})	6.75±0.14 (8.24-4.03)	6.72±0.02 (7.76-4.35)
pH	7.64±0.02 (8.25-6.91)	7.65±0.02 (8.21-6.95)
Temperature (°C)	26.2±0.0 (29.6-20.0)	26.4±0.0 (29.7-20.0)
Salinity (ppt.)	14.6±0.02 (17-12)	14.6±0.01 (16-12)
Alkalinity (mg L^{-1})	127.2±9.8 (144.0-115.3)	126.0±8.2 (134.0-112.7)
Ammonia (mg L^{-1})	0.02±0.01 (0.03-0.00)	0.03±0.01 (0.04-0.00)
Nitrite (mg L^{-1})	0.18±0.16 (0.41-0.05)	0.20±0.17 (0.43-0.05)

ภาคผนวก ค

ข้อมูลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

ตารางผนวกที่ 6 องค์ประกอบทางเคมีในอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ในระดับที่แตกต่างกัน (%, as is basis)

Treatments	Parameters					
	Moisture	Ash	Protein	Lipid	Fiber	NFE
SLP-0/1	5.40	12.50	38.88	11.08	1.06	31.09
SLP-0/2	5.20	12.40	38.80	9.21	1.18	33.22
SLP-0/3	4.98	12.27	39.61	8.28	0.99	33.88
Mean	5.19	12.39	39.10	9.52	1.07	32.73
SD	0.21	0.12	0.45	1.43	0.10	1.46
SLP-2.5/1	5.44	12.84	39.12	10.92	1.05	30.63
SLP-2.5/2	5.39	12.93	39.68	9.43	1.33	31.24
SLP-2.5/3	5.29	12.95	38.93	8.17	1.07	33.59
Mean	5.38	12.91	39.24	9.51	1.15	31.82
SD	0.07	0.06	0.39	1.38	0.16	1.57
SLP-5/1	5.89	12.66	39.11	8.71	0.96	32.67
SLP-5/2	5.78	11.50	39.80	8.30	1.16	33.46
SLP-5/3	5.52	11.46	39.17	11.31	1.30	31.25
Mean	5.73	11.87	39.36	9.44	1.14	32.46
SD	0.19	0.68	0.38	1.63	0.17	1.12
SLP-7.5/1	5.44	11.02	39.76	10.07	1.31	32.40
SLP-7.5/2	5.39	11.16	38.76	9.39	1.17	34.13
SLP-7.5/3	5.29	11.05	39.41	10.00	1.14	33.11
Mean	5.38	11.08	39.31	9.82	1.21	33.21
SD	0.07	0.07	0.51	0.37	0.09	0.87
SLP-10/1	5.07	10.66	39.61	9.87	1.21	33.58
SLB-10/2	5.04	10.86	39.77	9.91	0.98	33.43
SLB-10/3	5.46	10.63	38.86	9.31	1.30	34.44
Mean	5.19	10.72	39.41	9.70	1.17	33.82
SD	0.23	0.12	0.49	0.34	0.17	0.54

ตารางผนวกที่ 7 ผลการเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ในระดับที่แตกต่างกัน ระยะเวลาการเลี้ยง 45 วัน

Treatments	IW(g shrimp^{-1})	FW(g shrimp^{-1})	WG (g)	FI(g shrimp^{-1})	FCR	SGR (% day^{-1})	PER	PRE (%)	Survival (%)
SLP-0/1	5.60	12.61	7.02	11.79	1.68	1.81	1.31	0.61	93.33
SLP-0/2	5.93	13.80	7.88	12.48	1.58	1.88	1.40	0.67	86.67
SLP-0/3	5.78	13.21	7.43	12.00	1.61	1.84	1.34	1.09	93.33
Mean	5.77	13.21	7.44	12.09	1.63	1.84	1.35	0.79	91.11
SD	0.16	0.59	0.43	0.35	0.05	0.04	0.05	0.26	3.85
SLP-2.5/1	5.66	14.39	8.73	14.95	1.61	2.07	1.39	0.67	80.00
SLP-2.5/2	5.68	14.07	8.39	13.89	1.66	2.01	1.33	0.80	80.00
SLP-2.5/3	5.77	13.96	8.19	13.82	1.69	1.96	1.33	1.09	86.67
Mean	5.70	14.14	8.44	13.92	1.65	2.01	1.35	0.85	82.22
SD	0.06	0.22	0.27	0.12	0.04	0.06	0.03	0.21	3.85
SLP-5/1	5.57	14.04	8.47	13.33	1.57	2.06	1.41	1.27	86.67
SLP-5/2	5.86	13.00	7.14	12.38	1.73	1.93	1.25	0.69	93.33
SLP-5/3	5.94	15.27	9.32	15.77	1.69	2.10	1.51	1.11	80.00
Mean	5.79	14.10	8.31	13.83	1.67	2.03	1.39	1.02	86.67
SD	0.20	1.14	1.10	1.75	0.08	0.09	0.13	0.30	6.67

ตารางผนวกที่ 7 (ต่อ) ผลการเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ในระดับที่แตกต่างกัน ระยะเวลาการเลี้ยง 45 วัน

Treatments	IW(g/shrimp)	FW(g/shrimp)	WG (g)	FI(g/shrimp)	FCR	SGR (%/day)	PER	PRE (%)	Survival (%)
SLP-7.5/1	5.65	14.64	8.99	15.48	1.72	2.12	1.46	0.80	80.00
SLP-7.5/2	6.05	13.36	7.31	12.60	1.72	1.76	1.21	0.74	86.67
SLP-7.5/3	5.79	12.68	6.89	12.35	1.79	1.74	1.14	1.35	93.33
Mean	5.83	13.56	7.73	13.48	1.75	1.87	1.27	0.96	86.67
SD	0.21	0.99	1.11	1.74	0.04	0.21	0.17	0.34	6.67
SLP-10/1	5.82	12.69	6.86	12.41	1.81	1.73	1.20	0.77	86.67
SLB-10/2	5.80	13.76	7.96	14.13	1.77	1.92	1.32	1.25	80.00
SLB-10/3	5.99	12.69	6.71	11.95	1.78	1.69	1.16	0.95	86.67
Mean	5.87	13.05	7.18	12.83	1.79	1.78	1.23	0.99	84.44
SD	0.10	0.62	0.69	1.15	0.02	0.18	0.08	0.24	3.85

ตารางผนวกที่ 8 องค์ประกอบทางเคมีในกุ้งที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ในระดับที่แตกต่างกัน

Treatments	Parameters			
	Moisture	Ash	Protein	Lipid
Initial body/1	79.16	2.10	12.45	5.89
Initial body/2	77.35	2.32	12.10	5.77
Initial body/3	78.22	2.25	12.54	3.93
mean	78.24	2.22	12.36	5.19
SD.	0.91	0.11	0.23	1.10
Final body				
SLP-0/1	77.83	2.64	15.61	5.78
SLP-0/2	77.96	3.09	16.11	4.16
SLP-0/3	76.50	3.48	18.40	5.52
mean	77.43	3.07	16.71	5.15
SD.	0.81	0.42	1.49	0.87
SLP-2.5/1	77.07	3.03	16.57	5.19
SLP-2.5/2	75.10	2.99	17.40	5.24
SLP-2.5/3	75.92	3.03	19.06	4.99
mean	76.03	3.02	17.68	5.14
SD.	0.99	0.02	1.27	0.14
SLP-5/1	75.54	2.30	19.97	5.40
SLP-5/2	77.13	2.76	16.85	5.55
SLP-5/3	77.93	3.35	19.20	5.21
mean	76.87	2.80	18.67	5.39
SD.	1.22	0.53	1.62	0.17
SLP-7.5/1	76.49	2.94	17.27	4.78
SLP-7.5/2	75.37	2.60	16.84	5.85
SLP-7.5/3	74.74	3.66	20.55	5.27
mean	75.53	3.07	18.22	5.30
SD.	0.89	0.54	2.03	0.54

ตารางผนวกที่ 8 (ต่อ) องค์ประกอบทางเคมีในกุ้งที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จาก กระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ในระดับที่แตกต่างกัน

Treatments	Parameters			
	Moisture	Ash	Protein	Lipid
SLP-10/1	76.04	3.52	16.78	5.87
SLB-10/2	75.39	3.00	19.86	5.20
SLB-10/3	77.34	2.84	17.86	5.01
mean	76.26	3.12	18.17	5.36
SD.	0.99	0.36	1.56	0.45

ตารางผนวกที่ 9 ค่าโลหิตวิทยา และภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ในระดับที่แตกต่างกัน

Treatments	Parameters						
	THC ($\times10^6$ cell mL^{-1})	HC ($\times10^6$ cell mL^{-1})	LGC ($\times10^6$ cell mL^{-1})	SGC ($\times10^5$ cell mL^{-1})	superoxide anion (OD620nm)	Phenoloxidase (OD 492nm)	Phagocytosis activity (%)
SLP-0/1	6.03	4.43	1.29	3.07	1.159	0.409	22.67
SLP-0/2	5.43	4.24	0.92	2.61	1.067	0.691	23.89
SLP-0/3	3.82	3.24	0.43	1.55	1.074	0.808	21.89
Mean	5.09	3.97	0.88	2.41	1.100	0.636	22.81
SD	1.14	0.64	0.43	0.78	0.051	0.205	1.01
SLP-2.5/1	5.15	4.12	0.75	2.89	0.994	0.609	24.28
SLP-2.5/2	5.24	4.17	0.83	2.46	1.017	0.591	23.94
SLP-2.5/3	3.96	3.10	0.58	2.85	0.984	0.976	23.22
Mean	4.78	3.80	0.72	2.73	0.998	0.725	23.81
SD	0.71	0.60	0.13	0.24	0.017	0.217	0.54

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ) ค่าโลหิตวิทยา และภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ในระดับที่แตกต่างกัน

Treatments	Parameters						
	THC ($\times10^6$ cell mL^{-1})	HC ($\times10^6$ cell mL^{-1})	LGC ($\times10^6$ cell mL^{-1})	SGC ($\times10^5$ cell mL^{-1})	Superoxide anion (OD620nm)	Phenoloxidase (OD 492nm)	Phagocytosis activity (%)
SLP-5/1	5.15	3.58	1.22	3.51	1.178	0.766	24.44
SLP-5/2	4.43	3.11	0.99	3.32	1.300	1.022	21.06
SLP-5/3	4.55	3.22	0.99	3.32	1.231	0.578	22.17
Mean	4.71	3.30	1.07	3.38	1.236	0.789	22.56
SD	0.39	0.25	0.13	0.11	0.061	0.223	1.73
SLP-7.5/1	5.36	3.47	1.51	3.83	1.219	0.896	21.50
SLP-7.5/2	5.13	3.36	1.40	3.68	1.238	0.889	23.61
SLP-7.5/3	4.89	2.93	1.57	3.93	1.193	1.077	22.28
Mean	5.13	3.25	1.49	3.81	1.217	0.954	22.46
SD	0.24	0.29	0.09	0.13	0.022	0.107	1.07

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ) ค่าโลหิตวิทยา และภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ในระดับที่แตกต่างกัน

Treatments	Parameters						
	THC ($\times 10^6$ cell mL^{-1})	HC ($\times 10^6$ cell mL^{-1})	LGC ($\times 10^6$ cell mL^{-1})	SGC ($\times 10^5$ cell mL^{-1})	Superoxide anion (OD620nm)	Phenoloxidase (OD 492nm)	Phagocytosis activity (%)
SLP-10/1	4.33	3.29	0.71	3.33	1.096	0.763	22.83
SLP-10/2	4.68	3.66	0.73	2.91	0.953	1.089	23.11
SLP-10/3	4.73	3.38	1.05	3.05	0.917	0.884	24.72
Mean	4.58	3.34	0.83	3.10	0.988	0.912	23.56
SD	0.22	0.19	0.19	0.21	0.095	0.165	1.02

ตารางผนวกที่ 10 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง (bactericidal activity) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไลซีนสังเคราะห์ในระดับที่แตกต่างกัน

Dilutions	% *V. harveyi* decrease				
	SLP-0	SLP-2.5	SLP-5.0	SLP-7.5	SLP-10.0
1:2	38.70	39.24	37.61	38.16	35.44
1:4	32.73	33.82	31.65	27.85	28.39
1:8	28.93	25.14	27.31	23.51	20.25
1:16	22.97	22.42	21.34	18.63	14.29
1:32	15.91	14.83	17.54	14.83	9.95

การทดลองที่ 2 การใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

ตารางผนวกที่ 11 องค์ประกอบทางเคมีในอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสในระดับที่แตกต่างกัน (%, as is basis)

Treatments	Parameters						
	Moisture	Ash	Protein	Lipid	Fiber	NFE	GE (KJ g^{-1})
MSGP-0/1	5.81	14.40	38.33	8.93	5.25	27.28	1726.58
MSGP-0/2	5.19	14.70	38.34	8.62	5.87	27.28	1714.69
MSGP-0/3	5.20	14.98	39.34	8.51	5.61	26.35	1718.08
Mean	5.40	14.69	38.67	8.69	5.58	26.97	1719.78
SD	0.35	0.29	0.58	0.22	0.31	0.53	6.13
MSGP-2.5/1	5.15	13.31	37.32	8.48	5.11	30.62	1742.47
MSGP-2.5/2	5.10	14.40	36.71	8.40	5.10	30.29	1719.01
MSGP-2.5/3	5.64	14.72	38.73	8.93	5.83	26.16	1716.63
Mean	5.30	14.14	37.59	8.60	5.35	29.02	1726.04
SD	0.30	0.74	1.04	0.29	0.42	2.49	14.29
MSGP-5/1	5.81	13.89	38.76	8.41	5.17	27.96	1728.04
MSGP-5/2	5.40	14.97	38.18	9.12	5.85	26.47	1716.58
MSGP-5/3	5.26	13.64	38.15	8.63	5.58	28.73	1735.57
Mean	5.49	14.17	38.37	8.72	5.53	27.72	1726.73
SD	0.28	0.71	0.34	0.36	0.34	1.15	9.56
MSGP-7.5/1	5.44	13.54	38.32	8.68	5.77	28.25	1733.20
MSGP-7.5/2	5.56	14.72	37.18	8.38	5.03	29.12	1709.68
MSGP-7.5/3	5.59	14.69	38.48	9.61	5.44	26.19	1738.26
Mean	5.53	14.32	37.99	8.89	5.41	27.85	1727.04
SD	0.08	0.67	0.71	0.64	0.37	1.51	15.25
MSGP-10/1	5.06	14.39	37.81	9.03	5.31	28.38	1737.36
MSGP-10/2	5.64	14.76	38.10	8.60	5.41	27.49	1711.56
MSGP-10/3	5.34	14.07	37.71	8.19	5.22	29.48	1720.41
Mean	5.35	14.41	37.87	8.61	5.31	28.45	1723.11
SD	0.29	0.35	0.21	0.42	0.10	1.00	13.11

ตารางผนวกที่ 12 ผลการเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสในระดับที่แตกต่างกัน ระยะเวลาการเลี้ยง 45 วัน

Treatments	IW (g shrimp^{-1})	FW (g shrimp^{-1})	WG (g)	FI (g shrimp^{-1})	FCR	SGR (% Day^{-1})	PER	PRE (%)	Survival (%)
MSGP-0/1	10.25	15.16	4.91	8.17	1.67	0.87	1.57	0.32	66.67
MSGP-0/2	10.17	15.35	5.19	7.37	1.42	0.92	1.84	0.35	83.33
MSGP-0/3	10.08	15.38	5.30	7.86	1.48	0.94	1.71	0.46	75.00
Mean	10.17	15.30	5.13	7.80	1.52	0.91	1.71	0.38	75.00
SD	0.08	0.12	0.20	0.40	0.13	0.04	0.13	0.07	8.33
MSGP-2.5/1	10.08	15.46	5.38	9.32	1.73	0.95	1.55	0.36	58.33
MSGP-2.5/2	10.08	15.83	5.75	9.66	1.68	1.00	1.62	0.28	66.67
MSGP-2.5/3	10.33	16.11	5.77	8.80	1.52	0.99	1.69	0.40	58.33
Mean	10.17	15.80	5.63	9.26	1.65	0.98	1.62	0.35	61.11
SD	0.14	0.32	0.22	0.44	0.11	0.03	0.07	0.06	4.81
MSGP-5/1	10.25	14.98	4.73	6.99	1.48	0.84	1.74	0.42	83.33
MSGP-5/2	10.42	14.89	4.48	8.37	1.87	0.79	1.40	0.37	58.33
MSGP-5/3	10.17	14.80	4.63	8.45	1.82	0.83	1.44	0.29	58.33
Mean	10.28	14.89	4.61	7.94	1.72	0.82	1.53	0.36	66.67
SD	0.13	0.09	0.13	0.82	0.21	0.03	0.19	0.07	14.43

ตารางผนวกที่ 12 (ต่อ) ผลการเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสในระดับที่แตกต่างกัน ระยะเวลาการเลี้ยง 45 วัน

Treatments	IW (g shrimp^{-1})	FW (g shrimp^{-1})	WG (g)	FI (g shrimp^{-1})	FCR	SGR (% Day^{-1})	PER	PRE (%)	Survival (%)
MSGP-7.5/1	10.25	14.47	4.22	7.18	1.70	0.77	1.53	0.34	66.67
MSGP-7.5/2	10.08	14.36	4.27	7.88	1.84	0.79	1.46	0.30	58.33
MSGP-7.5/3	10.25	14.62	4.37	7.94	1.82	0.79	1.43	0.28	66.67
Mean	10.19	14.48	4.29	7.66	1.79	0.78	1.47	0.31	63.89
SD	0.10	0.13	0.08	0.42	0.07	0.01	0.05	0.03	4.81
MSGP-10/1	10.25	14.79	4.54	8.91	1.96	0.81	1.35	0.26	58.33
MSGP-10/2	10.42	14.29	3.88	7.15	1.84	0.70	1.42	0.30	75.00
MSGP-10/3	10.17	14.62	4.45	8.25	1.85	0.81	1.43	0.26	66.67
Mean	10.28	14.57	4.29	8.11	1.89	0.77	1.40	0.27	66.67
SD	0.13	0.25	0.36	0.89	0.07	0.06	0.05	0.02	8.33

ตารางผนวกที่ 13 องค์ประกอบทางเคมีในกุ้งที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสในระดับที่แตกต่างกัน (% wet weight)

Treatments	Parameters			
	Moisture	Ash	Protein	Lipid
Initial body1	78.28	2.46	18.80	1.65
Initial body2	78.93	2.04	18.04	1.61
Initial body3	78.56	2.83	18.51	1.92
mean	78.59	2.45	18.45	1.72
SD.	0.33	0.40	0.39	0.17
Final body				
MSGP-0/1	76.01	2.36	19.46	2.27
MSGP-0/2	75.18	3.44	19.45	2.42
MSGP-0/3	76.91	2.24	19.88	2.36
Mean	76.03	2.68	19.60	2.35
SD	0.87	0.66	0.25	0.07
MSGP-2.5/1	76.09	2.57	19.72	3.43
MSGP-2.5/2	75.09	2.55	19.44	3.83
MSGP-2.5/3	74.44	2.94	19.82	2.89
Mean	75.21	2.69	19.66	3.38
SD	0.83	0.22	0.19	0.47
MSGP-5/1	75.13	2.66	19.59	3.23
MSGP-5/2	75.25	2.34	19.63	2.45
MSGP-5/3	75.15	3.01	19.38	2.11
Mean	75.18	2.67	19.53	2.60
SD	0.07	0.33	0.13	0.58
MSGP-7.5/1	75.92	2.77	19.39	1.48
MSGP-7.5/2	75.94	2.84	19.33	2.08
MSGP-7.5/3	76.99	2.64	19.32	1.86
Mean	76.28	2.75	19.35	1.81
SD	0.62	0.10	0.04	0.30

ตารางผนวกที่ 13 (ต่อ) องค์ประกอบทางเคมีในกุ้งที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสในระดับที่แตกต่างกัน (% wet weight)

Treatments	Parameters			
	Moisture	Ash	Protein	Lipid
MSGP-10/1	76.43	2.56	19.31	1.95
MSGP-10/2	75.86	2.58	19.27	2.03
MSGP-10/3	76.27	2.38	19.27	2.65
Mean	76.19	2.51	19.29	2.21
SD	0.29	0.11	0.02	0.38

ตารางผนวกที่ 14 ค่าโลหิตวิทยา และภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสในระดับที่แตกต่างกัน

Treatments	Parameters						
	THC ($\times10^6$ cell mL^{-1})	HC ($\times10^6$ cell mL^{-1})	LGC ($\times10^6$ cell mL^{-1})	SGC ($\times10^5$ cell mL^{-1})	Superoxide anion (OD620nm)	Phenoloxidase (OD 492nm)	Phagocytosis activity (%)
MSGP-0/1	1.30	0.87	0.36	0.72	1.479	0.715	27.67
MSGP-0/2	1.45	1.12	0.27	0.65	1.521	0.621	26.17
MSGP-0/3	2.01	1.52	0.46	0.36	1.440	0.773	24.67
Mean	1.59	1.17	0.36	0.58	1.480	0.703	26.17
SD	0.37	0.33	0.10	0.19	0.041	0.077	1.50
MSGP-2.5/1	2.88	2.36	0.38	1.39	2.007	0.667	31.08
MSGP-2.5/2	4.34	3.90	0.34	1.03	2.055	0.644	29.42
MSGP-2.5/3	4.26	3.68	0.44	1.31	2.281	0.644	23.25
Mean	3.83	3.31	0.39	1.24	2.114	0.652	27.92
SD	0.82	0.83	0.05	0.19	0.146	0.013	4.13

ตารางผนวกที่ 14 (ต่อ) ค่าโลหิตวิทยา และภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสในระดับที่แตกต่างกัน

Treatments	Parameters						
	THC ($\times10^6$ cell mL^{-1})	HC ($\times10^6$ cell mL^{-1})	LGC ($\times10^6$ cell mL^{-1})	SGC ($\times10^5$ cell mL^{-1})	Superoxide anion (OD620nm)	Phenoloxidase (OD 492nm)	Phagocytosis activity (%)
MSGP-5/1	2.39	2.18	0.99	1.21	1.897	0.806	27.42
MSGP-5/2	4.12	2.47	1.51	1.24	1.833	0.696	29.75
MSGP-5/3	2.94	2.23	0.62	0.84	1.902	0.660	32.33
Mean	3.15	2.29	1.04	1.10	1.877	0.721	29.83
SD	0.88	0.16	0.45	0.22	0.038	0.076	2.46
MSGP-7.5/1	3.21	2.80	0.34	0.66	1.923	0.659	24.83
MSGP-7.5/2	1.89	1.32	0.52	0.52	1.628	0.761	23.08
MSGP-7.5/3	3.32	2.45	0.81	0.61	1.727	0.847	21.17
Mean	2.81	2.19	0.56	0.60	1.759	0.755	23.03
SD	0.80	0.77	0.24	0.07	0.150	0.094	1.83

ตารางผนวกที่ 14 (ต่อ) ค่าโลหิตวิทยา และภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสในระดับที่แตกต่างกัน

Treatments	Parameters						
	THC ($\times 10^6$ cell mL^{-1})	HC ($\times 10^6$ cell mL^{-1})	LGC ($\times 10^6$ cell mL^{-1})	SGC ($\times 10^5$ cell mL^{-1})	Superoxide anion (OD620nm)	Phenoloxidase (OD 492nm)	Phagocytic activity (%)
MSGP-10/1	3.22	2.81	0.39	0.18	1.962	0.585	22.58
MSGP-10/2	3.03	2.64	0.38	0.12	1.458	0.631	26.33
MSGP-10/3	2.36	1.69	0.55	0.75	1.904	0.666	21.67
Mean	2.87	2.38	0.44	0.35	1.775	0.627	23.53
SD	0.45	0.60	0.10	0.35	0.276	0.041	2.47

ตารางผนวกที่ 15 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง (bactericidal activity) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตผงชูรสในระดับที่แตกต่างกัน

Dilutions	% *V. harveyi* decrease				
	MSGP-0	MSGP-2.5	MSGP-5.0	MSGP-7.5	MSGP-10
1:2	39.24	36.53	38.16	40.33	41.95
1:4	29.48	29.48	30.02	32.73	32.19
1:8	22.97	23.51	27.31	27.31	28.39
1:16	11.03	18.08	15.91	22.97	17.54
1:32	7.78	9.40	13.20	15.91	14.83

การทดลองที่ 3 การใช้กากยีสต์ในอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

ตารางผนวกที่ 16 องค์ประกอบทางเคมีในอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่มีการใช้กากยีสต์ในระดับที่แตกต่างกัน (%, as is basis)

Treatments	Parameters						
	Moisture	Ash	Protein	Lipid	Fiber	NFE	GE (KJ/g)
YP-0/1	6.03	10.66	40.04	10.56	1.86	30.85	1892.80
YP-0/2	6.07	10.50	40.00	10.84	1.72	30.88	1903.37
YP-0/3	6.00	10.55	40.00	10.51	1.77	31.18	1895.47
Mean	6.03	10.57	40.01	10.64	1.78	30.97	1897.22
SD	0.03	0.08	0.03	0.18	0.07	0.18	5.50
YP-2.5/1	6.06	10.53	40.39	10.80	1.78	30.45	1903.46
YP-2.5/2	6.53	10.61	40.62	10.77	1.86	29.61	1893.35
YP-2.5/3	5.89	10.61	40.88	10.73	1.90	30.00	1904.51
Mean	6.16	10.58	40.63	10.77	1.84	30.02	1900.44
SD	0.33	0.05	0.24	0.03	0.06	0.42	6.16
YP-5/1	6.45	10.80	40.36	10.29	1.83	30.26	1879.57
YP-5/2	5.82	10.63	40.90	11.04	1.83	29.77	1913.48
YP-5/3	6.06	10.66	40.34	10.55	1.86	30.53	1893.72
Mean	6.11	10.70	40.53	10.63	1.84	30.19	1895.59
SD	0.32	0.09	0.32	0.38	0.02	0.38	17.03
YP-7.5/1	6.06	10.44	40.83	10.79	1.84	30.04	1906.62
YP-7.5/2	6.53	10.57	40.11	10.98	1.98	29.84	1893.45
YP-7.5/3	5.89	10.80	40.51	10.32	1.82	30.65	1891.14
Mean	6.16	10.60	40.48	10.70	1.88	30.18	1897.07
SD	0.33	0.18	0.36	0.34	0.09	0.43	8.35
YP-10/1	6.04	10.62	41.29	10.63	1.99	29.44	1900.79
YP10/2	6.09	10.54	40.13	11.05	1.96	30.23	1903.38
YP10/3	6.21	10.70	40.49	10.38	1.69	30.53	1890.56
Mean	6.11	10.62	40.64	10.69	1.88	30.07	1898.24
SD	0.09	0.08	0.59	0.34	0.16	0.56	6.78

ตารางผนวกที่ 17 ผลการเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้กากยีสต์ในระดับที่แตกต่างกัน ระยะเวลาการเลี้ยง 12 สัปดาห์

Treatments	IW (g shrimp^{-1})	FW (g shrimp^{-1})	WG (g)	FI (g shrimp^{-1})	FCR	SGR (% Day^{-1})	PER	PRE (%)	Survival (%)
YP-0/1	1.02	6.76	5.74	9.35	1.63	2.26	1.53	0.33	70.00
YP-0/2	1.04	8.44	7.41	9.59	1.29	2.50	1.93	0.29	70.00
YP-0/3	1.02	7.43	6.41	9.05	1.41	2.37	1.77	0.40	70.00
Mean	1.02	7.54	6.52	9.33	1.44	2.37	1.75	0.34	70.00
SD	0.01	0.85	0.84	0.27	0.17	0.12	0.20	0.05	0.00
YP-2.5/1	1.05	7.75	6.70	9.48	1.41	2.38	1.75	0.55	70.00
YP-2.5/2	1.03	7.44	6.41	9.44	1.47	2.35	1.67	0.82	70.00
YP-2.5/3	1.02	7.95	6.93	9.71	1.40	2.45	1.75	0.10	70.00
Mean	1.03	7.71	6.68	9.54	1.43	2.39	1.72	0.49	70.00
SD	0.01	0.26	0.26	0.14	0.04	0.05	0.04	0.36	0.00
YP-5/1	1.02	7.94	6.93	10.32	1.49	2.45	1.66	0.37	70.00
YP-5/2	1.01	7.08	6.07	10.12	1.67	2.31	1.47	0.40	75.00
YP-5/3	1.02	7.56	6.54	9.67	1.48	2.39	1.68	0.46	70.00
Mean	1.02	7.53	6.51	10.04	1.55	2.38	1.60	0.41	71.67

SD	0.00	0.43	0.43	0.34	0.11	0.07	0.12	0.05	2.89

ตารางผนวกที่ 17 (ต่อ) ผลการเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้กากยีสต์ในระดับที่แตกต่างกัน ระยะเวการเลี้ยง 12 สัปดาห์

Treatments	IW (g shrimp^{-1})	FW (g shrimp^{-1})	WG (g)	FI (g shrimp^{-1})	FCR	SGR (% Day^{-1})	PER	PRE (%)	Survival (%)
YP-7.5/1	1.02	7.74	6.72	9.65	1.43	2.41	1.71	0.49	70.00
YP-7.5/2	1.00	8.27	7.27	9.79	1.35	2.52	1.85	0.32	70.00
YP-7.5/3	1.02	7.25	6.23	10.43	1.67	2.33	1.47	0.12	70.00
Mean	1.01	7.75	6.74	9.96	1.49	2.42	1.68	0.31	70.00
SD	0.01	0.51	0.52	0.42	0.17	0.09	0.19	0.18	0.00
YP-10/1	1.03	7.88	6.85	9.48	1.38	2.42	1.75	0.35	75.00
YP10/2	1.04	8.08	7.04	10.70	1.52	2.45	1.64	0.70	65.00
YP10/3	1.01	7.96	6.95	10.40	1.50	2.46	1.65	0.13	70.00
Mean	1.03	7.97	6.95	10.19	1.47	2.44	1.68	0.40	70.00
SD	0.01	0.10	0.10	0.63	0.07	0.02	0.06	0.29	5.00

ตารางผนวกที่ 18 องค์ประกอบทางเคมีในกุ้งที่ได้รับอาหารที่มีการใช้กากยีสต์ในระดับที่แตกต่างกัน (%, wet weight)

Treatments	Parameters			
	Moisture	Ash	Protein	Lipid
Initial body 1	81.44	2.67	12.51	3.72
Initial body 2	80.95	2.99	13.78	3.94
Initial body 3	81.33	2.60	12.37	3.84
mean	81.24	2.75	12.89	3.83
SD.	0.26	0.21	0.78	0.11
Final body				
YP-0/1	79.91	2.84	14.12	4.51
YP-0/2	78.88	2.69	14.00	4.20
YP-0/3	79.64	2.50	14.33	3.22
Mean	79.48	2.68	14.15	3.98
SD	0.53	0.17	0.17	0.68
YP-2.5/1	79.87	2.75	14.99	2.70
YP-2.5/2	78.29	2.58	16.01	3.42
YP-2.5/3	81.44	2.39	13.29	3.59
Mean	79.87	2.57	14.76	3.24
SD	1.57	0.18	1.38	0.47
YP-5/1	78.11	2.49	14.44	3.05
YP-5/2	79.81	3.64	14.52	4.15
YP-5/3	79.36	2.64	14.68	1.89
Mean	79.09	2.93	14.55	3.03
SD	0.88	0.62	0.12	1.13
YP-7.5/1	79.66	2.29	14.82	3.55
YP-7.5/2	79.98	2.75	14.16	2.37
YP-7.5/3	79.61	2.97	13.41	3.34
Mean	79.75	2.67	14.13	3.08
SD	0.20	0.35	0.71	0.63

ตารางผนวกที่ 18 (ต่อ) องค์ประกอบทางเคมีในกุ้งที่ได้รับอาหารที่มีการใช้กากยีสต์ในระดับที่แตกต่างกัน (%, wet weight)

Treatments	Parameters			
	Moisture	Ash	Protein	Lipid
YP-10/1	80.50	2.76	14.27	2.04
YP10/2	79.00	2.52	15.89	3.88
YP10/3	79.69	3.00	13.44	3.08
Mean	79.73	2.76	14.53	3.00
SD	0.75	0.24	1.24	0.92

ตารางผนวกที่ 19 ค่าโลหิตวิทยา และภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้กากยีสต์ในระดับที่ แตกต่างกัน ระยะเวลาการเลี้ยง 12 สัปดาห์

Treatments	Parameters							
	THC ($\times 10^6$ cell mL^{-1})	HC ($\times 10^6$ cell mL^{-1})	LGC ($\times 10^5$ cell mL^{-1})	SGC ($\times 10^4$ cell mL^{-1})	Superoxide anion (OD620nm)	Phenoloxidase (OD492nm)	Phagocytosis activity (%)	Clearence efficiency ($\times 10^3$ cell mL^{-1})
YP-0/1	0.86	0.76	0.74	2.15	1.699	0.602	20.75	4.06
YP-0/2	0.46	0.43	0.17	1.50	1.967	0.442	17.13	3.40
YP-0/3	1.0	0.95	0.38	2.00	1.805	0.263	26.88	3.88
Mean	0.78	0.71	0.43	1.88	1.824	0.436	21.58	3.78
SD	0.23	0.24	0.24	0.28	0.110	0.139	4.02	0.28
YP-2.5/1	1.25	1.19	0.34	2.50	2.169	0.718	27.63	3.18
YP-2.5/2	1.30	1.21	1.03	1.70	2.491	0.349	29.00	2.68
YP-2.5/3	0.76	0.69	0.50	2.00	2.054	0.683	19.25	4.12
Mean	1.10	1.03	0.62	2.07	2.238	0.583	25.29	3.33
SD	0.24	0.24	0.29	0.33	0.185	0.167	4.31	0.60

ตารางผนวกที่ 20 (ต่อ) ค่าโลหิตวิทยา และภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้กากยีสต์ในระดับที่ แตกต่างกัน ระยะเวลาการเลี้ยง 12 สัปดาห์

Treatments	Parameters							
	THC ($\times 10^6$ cell mL^{-1})	HC ($\times 10^6$ cell mL^{-1})	LGC ($\times 10^5$ cell mL^{-1})	SGC ($\times 10^4$ cell mL^{-1})	Superoxide anion (OD620nm)	Phenoloxidase (OD492nm)	Phagocytosis activity (%)	Clearence efficiency ($\times 10^3$ cell mL^{-1})
YP-5/1	0.86	0.77	0.70	1.85	2.203	0.543	23.25	2.50
YP-5/2	1.31	1.21	0.76	2.15	2.412	0.697	27.13	2.63
YP-5/3	1.16	1.05	0.78	2.50	2.853	0.641	25.75	2.64
Mean	1.11	1.01	0.75	2.17	2.489	0.627	25.38	2.59
SD	0.19	0.18	0.03	0.27	0.271	0.064	1.60	0.06
YP-7.5/1	1.30	1.21	0.76	2.30	2.717	0.583	26.25	2.42
YP-7.5/2	1.52	1.35	1.46	1.80	2.672	0.810	26.13	2.29
YP-7.5/3	1.63	1.49	1.21	2.60	2.140	0.733	36.50	2.91
Mean	1.49	1.35	1.14	2.23	2.510	0.709	29.63	2.54
SD	0.14	0.12	0.29	0.33	0.262	0.094	4.86	0.02

ตารางผนวกที่ 20 (ต่อ) ค่าโลหิตวิทยา และภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวที่มีได้รับอาหารที่มีการใช้กากยีสต์ในระดับที่ แตกต่างกัน ระยะเวลาการเลี้ยง 12 สัปดาห์

Treatments	Parameters							
	THC ($\times10^6$ cell mL^{-1})	HC ($\times10^6$ cell mL^{-1})	LGC ($\times10^5$ cell mL^{-1})	SGC ($\times10^4$ cell mL^{-1})	Superoxide anion (OD620nm)	Phenoloxidase (OD492nm)	Phagocytosis activity (%)	Clearence efficiency ($\times10^3$ cell mL^{-1})
YP-10/1	1.60	1.43	1.53	1.81	2.287	0.564	36.13	2.36
YP10/2	1.91	1.77	1.24	2.05	2.569	0.864	32.88	2.36
YP10/3	1.38	1.21	1.52	2.60	2.707	1.010	27.50	2.36
Mean	1.63	1.47	1.43	2.15	2.521	0.812	32.17	2.36
SD	0.22	0.23	0.13	0.33	0.175	0.186	3.56	0.00

ตารางผนวกที่ 21 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง (bactericidal activity) ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้กากยีสต์ในระดับที่แตกต่างกัน

Dilutions	% *V. harveyi* decrease				
	YP-0	YP-2.5	YP-5.0	YP-7.5	YP-10
1:2	37.07	62.03	67.45	70.16	76.13
1:4	30.02	47.38	57.69	51.72	66.37
1:8	20.25	41.95	41.41	49.01	56.06
1:16	14.83	40.33	33.82	39.78	43.04
1:32	12.12	30.56	26.22	34.36	33.82

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	**นายเดชวัฒน์ พูนนวล**
วัน เดือน ปี เกิด	**20 กรกฎาคม 2536**
ที่อยู่	**161 ม.4 ต.สมหวัง อ.กงหรา จ.พัทลุง 93000**
ประวัติการศึกษา	**2558 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**