ผลของการเสริมส่าเบียร์ในอาหารต่อการเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน
ของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* วัยรุ่น

นางสาวสุรัตนา เจนธนานันท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EFFECTS OF BREWER'S YEAST SUPPLEMENTATION ON GROWTH, SURVIVAL AND IMMUNE RESPONSE IN *Macrobrachium rosenbergii* JUVENILE

Miss Surattana Janthananan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Marine Science

Department of Marine Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการเสริมส่าเบียร์ในอาหารต่อการเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* วัยรุ่น
โดย	นางสาวสุรัตนา เจนธนานันท์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……. ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ)

……....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

……. กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรณพ วิยกาญจน์)

……. กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ)

สุรัตนา เจนธนานันท์ : ผลของการเสริมส่าเบียร์ในอาหารต่อการเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* วัยรุ่น. (EFFECTS OF BREWER'S YEAST SUPPLEMENTATION ON GROWTH, SURVIVAL AND IMMUNE RESPONSE IN *Macrobrachium rosenbergii* JUVENILE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ.ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล, 68หน้า.

ศึกษาผลของอาหารสำเร็จรูปที่เสริมส่าเบียร์ระดับ 0, 0.2, 0.5, 1 และ2 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารกุ้งก้ามกรามที่มีระดับโปรตีน 38 เปอร์เซ็นต์ และระดับไขมัน 8 เปอร์เซ็นต์เท่ากันทุกสูตร เพื่อศึกษาผลของส่าเบียร์ต่อการเติบโต การรอด และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งก้ามกราม เริ่มเลี้ยงกุ้งก้ามกรามระยะวัยรุ่น มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 4.29±0.22 กรัม ความยาวเริ่มต้นเฉลี่ย 6.54±0.25 เซนติเมตร ในตู้กระจกขนาด 32×52×30 ลูกบาศก์เซนติเมตร อัตราความหนาแน่น 6 ตัวต่อตู้ ให้อาหารวันละ 3 ครั้ง (9:00, 13:00 และ17:00 น.) ในระบบหมุนเวียนน้ำตลอดเวลา เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าการเติบโตของกุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทดลองสูตรอื่นๆ การตอบสนองภูมิคุ้มกันในกุ้งก้ามกรามก่อนการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารเสริมส่าเบียร์ที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมและแอคติวิตีของฟีนอลออกซิเดส มีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทดลองสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การตอบสนองภูมิคุ้มกันในกุ้งก้ามกรามหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. Harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเวลา 4 วัน พบว่า อาหารเสริมส่าเบียร์ที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมและแอคติวิตีของฟีนอล ออกซิเดสมีค่าสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทดลองสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมส่าเบียร์ที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การตายสะสมที่น้อยที่สุด (13±0.5 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทดลองสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังนั้นจากการทดลองนี้สรุปได้ว่าการเสริมส่าเบียร์ที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเป็นระดับเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

5272602223 : MAJOR MARINE SCIENCE

KEYWORDS : *Macrobrachium rosenbergii* / growth / survival / immune response

SURATTANA JANTHANANAN : EFFECTS OF BREWER'S YEAST SUPPLEMENTATION ON GROWTH, SURVIVAL AND IMMUNE RESPONSE IN *Macrobrachium rosenbergii* JUVENILE. ADVISOR : ASSOC.PROF. SOMKIAT PIYATIRATITIVORAKUL, Ph.D., 68 pp.

Main purpose of this study effects of supplemented Brewer's yeast (0%, 0.2%, 0.5%, 1% and 2%) on growth, survival and immune responses of *Macrobrachium rosenbergii*. All diets were isonitrogenous with protein of 38% and lipid of 8%. Prawns with initial body weight (4.29±0.20 g.) and total length (6.54±0.25 cm.) were randomly sampled to rear in 32×52×30 cm^3. glass aquaria (with close recirculation water system) at the stocking rate of 6 prawn per aquarium. They were fed to apparent satiation three times for 16 weeks. The results showed that growth of prawn fed with 1% Brewer's yeast supplemented diet were significantly ($p<0.05$) higher than those of other treatments. Immune response before challenging the prawn with *Vibrio harveyi* strain 639 for 4 weeks showed that total hemocyte count and phenoloxidase activity of the prawn fed with 1% Brewer's yeast were significantly ($p<0.05$) higher than those of other treatments. Immune response after challenging the prawn with *Vibrio harveyi* strain 639 for 4 days showed that total hemocyte count and phenoloxidase activity of the prawn fed with 1% Brewer's yeast were significantly ($p<0.05$) higher than those of other treatments. Cumulative mortality of prawn fed with 1% Brewer's yeast (13%±0.5%) was lower than those of other treatments. The study concluded that Brewer's yeast supplemented for 1% in diet was an optimum rate for promoting growth, survival and immune response in *Macrobrachium rosenbergii*.

Field of Study : MARINE SCIENCE Student's Signature .....

Academic Year : 2011 Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล ที่ได้ให้คำแนะนำ เสนอแนะงานวิจัย ข้อคิดเห็น และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงยิ่ง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรณพ วิยกาญจน์ และดร.ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียชนิดวิบริโอ ขอขอบคุณคุณธรรมรัตน์ วาจาสัตย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ ส่าเบียร์ ของบริษัท โรงงานเบียร์ไทย 1991 จำกัดจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ขอขอบคุณคุณเสรี ดอนเหนือ ที่ให้ความช่วยเหลือ เสนอแนะแนวทางการปฏิบัติงานวิจัยและความอนุเคราะห์กุ้งก้ามกรามวัยรุ่นจังหวัดราชบุรี ขอขอบคุณคุณสรนันท์ ชัยคณารักษ์กูล และคุณปองจิตร ใจบุญ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการวางระบบเลี้ยง ขอขอบคุณคุณนพดล พหุสัจจธรรม ที่มีส่วนช่วยเหลือในการปฏิบัติงานวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล รวมทั้งเพื่อน พี่ และน้องนิสิตปริญญาโท พี่ปริญญาเอก ที่จบไปแล้วและกำลังศึกษาอยู่และท่านอาจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ที่คอยช่วยชี้แนะแนวทางและให้กำลังใจในทุกๆเรื่องเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ทำงานวิจัย รวมถึงเพื่อน พี่ และน้อง ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ที่ให้ทุนการศึกษาเป็นระยะเวลา 2 ปี ในการศึกษาครั้งนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสุเทพ คุณแม่วชิราภรณ์ และนางสาวลลิตา เจนธนานันท์ ที่ให้กำลังใจ ช่วยเหลือ สนับสนุนด้านกำลังทรัพย์ จนกระทั่งสำเร็จการศึกษาครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา…….. 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย……... 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย…….... 2

1.4 คำจำกัดความในการวิจัย…….. 2

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ…… 2

บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย……... 3

2.1 ชีววิทยาของกุ้งก้ามกราม……... 3

2.2 โรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย……..... 5

2.3 ระบบภูมิคุ้มกันโรคของสัตว์กลุ่มครัสเตเซียน…..……..…….. 6

2.4 องค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งก้ามกราม…… 7

2.5 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ส่าเบียร์หรือบริวเวอร์ยีสต์ (*S. cerevisiae*)…… 11

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย…… 19

3.1 วัสดุ และอุปกรณ์ที่สำคัญ..…….. 19

3.2 สารเคมีที่สำคัญ……..…….. 20

3.3 การวางแผนการทดลอง……..…… 20

3.4 สถานที่ทดลอง……..……. 20

3.5 การเตรียมอาหารทดลองและการผลิตอาหาร……..……. 21

3.6 การเตรียมหน่วยทดลอง การจัดการคุณภาพน้ำ สัตว์ทดลอง และเลี้ยงสัตว์ทดลอง……..……. 22

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.7 ศึกษาระบบภูมิคุ้มกันก่อนการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639..... 25
3.8 ศึกษาระบบภูมิคุ้มกันหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639..... 27
3.9 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ..... 28
บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 31
4.1 คุณภาพอาหารทดลอง..... 29
4.2 คุณสมบัติน้ำ..... 29
4.3 การเจริญเติบโต และการรอด..... 30
4.4 ระบบภูมิคุ้มกันก่อนการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639..... 32
4.5 ระบบภูมิคุ้มกันหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639..... 34
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง..... 38
5.1 อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตาย..... 38
5.2 ระบบภูมิคุ้มกันก่อนการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639..... 40
5.3 ระบบภูมิคุ้มกันหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639..... 41
5.4 อัตราการรอดกุ้งก้ามกรามหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *V. Harveyi* สายพันธุ์ 639..... 42
5.5 คุณภาพน้ำ..... 43
บทที่ 6 ข้อเสนอแนะ..... 44
รายการอ้างอิง..... 45
ภาคผนวก..... 54
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 68

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์เบียร์แห้ง.....	13
2.2	ปริมาณวิตามินบีในยีสต์เบียร์แห้ง.....	14
2-3	ปริมาณกรดอะมิโนในส่าเบียร์.....	15
3-1	ส่วนประกอบของอาหารทดลองทั้ง 5 ชุดการทดลอง.....	21
4-1	คุณภาพของอาหารทดลอง 5 สูตร.....	29
4-2	คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามระยะวัยรุ่น เวลา 16 สัปดาห์.....	30
4-3	ผลการทดลองของกุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ต่างกัน 5 ระดับ 16 สัปดาห์.....	32
4-4	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ ก่อนการชักนำให้เกิดโรค.....	33
4-5	แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg protein) ของกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ ก่อนการชักนำให้เกิดโรค.....	33
4-6	จำนวนกุ้งก้ามกรามวัยรุ่นที่ตายหลังใส่ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในน้ำเลี้ยงกุ้ง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง.....	34
4.7	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ หลังการชักนำให้เกิดโรค.....	35
4-8	แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg protein) ของกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ หลังการชักนำให้เกิดโรค.....	36
4-9	การตายสะสม (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ระยะเวลา 96 ชั่วโมง.....	36

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามกราม……..……..	4
2-2	วงจรชีวิตของกุ้งก้ามกราม……...	5
3-1	ขนาดเม็ดอาหาร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.2 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร เมื่ออบแห้ง……..…….....	22
3-2	ตู้กระจกที่มีระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด และสัตว์ทดลอง.....	23
3-3	การชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของกุ้งก้ามกรามวัยรุ่น…..…….	24
4-1	แสดงค่าความเข้มข้นของเชื้อที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 4.72×10^5 CFU/ml ……..…….....	34
4-2	กราฟแสดงการตายสะสม (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเวลา 4 วัน (24, 48, 72 และ96 ชั่วโมง)……...	37

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กุ้งก้ามกราม เป็นกุ้งน้ำจืดขนาดใหญ่ที่สุด เนื้อแน่น รสชาติดี มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ จากข้อมูลการส่งออกกุ้งก้ามกรามแช่แข็งในปี 2542 มีการส่งออกทั้งสิ้น 1,027 ตัน และเพิ่มขึ้นเป็น 2,964 ตัน รายงานขององค์การการค้าโลก ระบุว่าเมื่อปี 2543 ตลาดผลผลิตสินค้าเกษตรอินทรีย์ของโลกมีมูลค่ามากถึง 8 แสนล้านบาท ตลาดใหญ่ที่สุดคือกลุ่มสหภาพยุโรป ปีละ 250,000 ล้านบาท จากสถิติการประมงแห่งประเทศไทยในปี 2543 รายงานว่าปริมาณผลผลิตของกุ้งก้ามกรามของประเทศ จำนวน 10,000 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1,230.80 ล้านบาทโดยผลผลิตและมูลค่าของกุ้งก้ามกรามมีแนวโน้มการส่งออกเพิ่มมากขึ้นในอนาคต (กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, 2546) และในปีเดียวกันประเทศผู้ซื้อของกลุ่มสหภาพยุโรปมีมาตรการเข้มงวดในการตรวจสารตกค้างในกุ้งที่นำเข้า

จากปัญหาประเทศผู้ซื้อของกลุ่มสหภาพยุโรปตรวจพบสารตกค้างไนโตรฟูแลน ในสินค้ากุ้งก้ามกรามจากประเทศไทยทำให้เกิดอุปสรรคต่อการขยายตลาดการส่งออกกุ้งของไทย และปัจจุบันเกษตรกรประสบปัญหาต่างๆ ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามคือ ในปัจจุบันผลผลิตกุ้งก้ามกรามที่จับได้จากธรรมชาติมีปริมาณลดลง กุ้งที่เลี้ยงโตไม่เท่ากัน กุ้งโตช้า ขนาดกุ้งเล็กลง กุ้งกินกันเอง ราคากุ้งที่ไม่แน่นอน และกุ้งเป็นโรค ซึ่งปัญหาจากการที่กุ้งเป็นโรคนั้นเป็นอุปสรรคที่สำคัญโดยส่งผลกระทบต่อการเลี้ยงกุ้ง โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา ทำให้เกิดสารเคมีตกค้างต่างๆ ตามมา ซึ่งแนวทางในการป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นสามารถทำได้คือ การจัดการให้กุ้งมีสุขภาพแข็งแรง และมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดี โดยการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และการเสริมสารอาหารบางชนิด ที่เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และยังสามารถเพิ่มความต้านทานการติดเชื้อโรค (Raa, 1996) เป็นความพยายามในการแก้ปัญหาที่ต้นเหตุ

เชื้อแบคทีเรียนั้นเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีโครงสร้างแบบง่ายๆ เป็นเซลล์ที่มีลักษณะแบบโปรคาริโอต มีลักษณะโครงสร้างและสมบัติต่างๆ คล้ายกับพืช เชื้อแบคทีเรียที่มีบทบาทมากในโรคกุ้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio* sp.) ซึ่งมักจะเป็นแบคทีเรียเคลื่อนไหวได้ รูปร่างทรงกระบอกหรือท่อนโค้ง มักย้อมติดแกรมลบ เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้จะมีบทบาทเข้ามาทำลายเม็ดเลือดและการกระจายตัวไปตามระบบทางเดินโลหิต เคลื่อนตัวเข้าสู่ระบบของต่อมสร้าง

น้ำย่อย หรือตับอ่อน เมื่อเนื้อเยื่อเหล่านี้ถูกทำลาย การทำงานของต่อมน้ำย่อยก็จะเสียไป ทำให้กุ้งไม่กินอาหารและตายในที่สุด และเป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อที่ทำความเสียหายแก่ผู้เลี้ยงกุ้งทั่วโลก (Austin and Zhang, 2006) และนำความเสียหายมาให้เกษตรกรค่อนข้างสูง (Gabriel *et al*., 2000; Flegel, 2006) การศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* เป็นเชื้อเป้าหมายสำหรับการตรวจวัดความสามารถของกุ้งก้ามกรามระยะวัยรุ่น ในการเพิ่มความต้านทานโรค

วิทยานิพนธ์นี้จึงเน้นการพัฒนาการป้องกันโรค ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญที่สามารถลดความสูญเสียจากปัญหาการติดเชื้อโรค และการใช้สารเคมี โดยจัดให้กุ้งมีสุขภาพแข็งแรง และมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดี โดยการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และสารเสริมอาหารประเภทต่างๆ ในอาหาร เช่น วิตามิน กรดอะมิโน โปรไบโอติก และพรีไบโอติก ซึ่งส่าเบียร์หรือบริวเวอร์ยีสต์ (*S. cerevisiae*) เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติในอุตสาหกรรมการหมักเบียร์ ประกอบด้วยสารที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันหลายชนิด เช่น ß-glucan, nucleic acid รวมทั้ง mannan oligosaccharide สามารถช่วยเสริมระบบภูมิคุ้มกัน และยังสามารถทำให้สัตว์น้ำต้านทานโรคได้ดีขึ้น ด้วยเหตุนี้ยีสต์หลายชนิดจึงถูกนำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลการเสริมส่าเบียร์ ที่เหมาะสมในอาหารต่อการเติบโต การรอดตาย และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* วัยรุ่น

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาผลของอาหารสำเร็จรูปกุ้งก้ามกรามที่เสริมส่าเบียร์ ระดับต่างๆ ทั้ง 5 ระดับ (0, 0.2, 0.5, 1 และ2 เปอร์เซ็นต์) โดยการทดลองศึกษาผลของส่าเบียร์ที่ระดับต่างๆ ต่อการเติบโต การรอดและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งก้ามกราม เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

1.4 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

กุ้งก้ามกรามรุ่น ส่าเบียร์ การเติบโต การรอดตาย การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตอาหารสำเร็จรูปกุ้งก้ามกรามที่มีอัตราส่วนของการเสริมส่าเบียร์ที่เหมาะสมเป็นอาหารโดยให้ประสิทธิภาพสูงต่อการเติบโต การรอดตาย และเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อเพิ่มความต้านทานโรคได้สูงขึ้น

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืด มีชื่อสามัญคือ กุ้งนาง กุ้งหลวง กุ้งก้ามเกลี้ยง กุ้งแห และกุ้งใหญ่ เป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของประเทศไทย เปลือกสีเขียวอมฟ้าหรือม่วง ก้ามยาวสีม่วงเข้ม ตลอดทั้งก้ามมีปุ่มตะปุ่มตะป่ำ ธรรมชาติอยู่ในแม่น้ำ ลำคลองแทบทุกจังหวัดในภาคกลางและภาคใต้ ทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย วางไข่ในน้ำกร่อยที่ความเค็มประมาณ (10-15 ส่วนในพันส่วน) อาหารได้แก่ ไส้เดือน ตัวอ่อนของลูกน้ำ ลูกไรน้ำ ลูกปลาขนาดเล็ก ซากของสัตว์ต่างๆ และนอกจากนั้นยังกินพวกเดียวกันเอง (cannibalism) โดยเฉพาะในระยะที่กำลังลอกคราบกุ้งที่อ่อนแอกว่าจะถูกทำร้าย และเป็นเหยื่อของตัวที่แข็งแรงกว่า

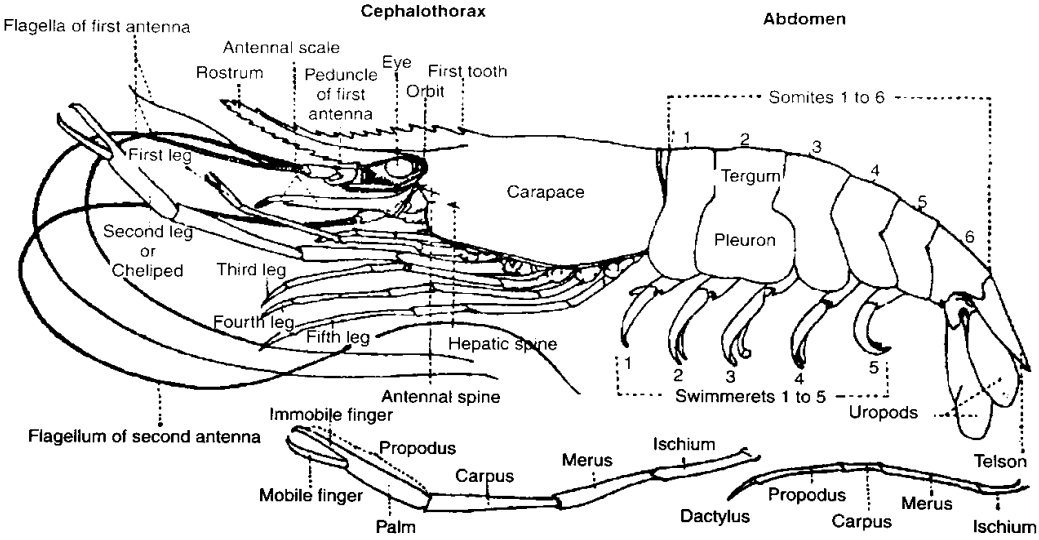
สามารถจัดลำดับหมวดหมู่ (classification) ทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้ (Holthius. 1980; Dore and Frimodt. 1987)

Phylum	Arthropoda
Subphylum	mandibulata
Class	Crustacea
Subclass	Malacostraca
Order	Decapoda
Infraorder	Caridea
Superfamily	Palaemonoidae
Family	Palaemonidae
Subfamily	Palaemoninae
Genus	*Macrobrachium*
Species	*rosenbergii*

ชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879)

กุ้งก้ามกรามจัดอยู่จำพวกสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลังแต่มีเปลือกหุ้มอยู่ภายนอกสัณฐานของลำตัว กุ้งแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนลำตัว และส่วนหาง (ภาพที่ 2-1) ส่วนหัวประกอบด้วยขาเดิน 3 คู่ และขาที่มีลักษณะเป็นก้ามอีก 2 คู่อยู่ทางส่วนหน้าคู่ที่ 2 มีขนาดความ

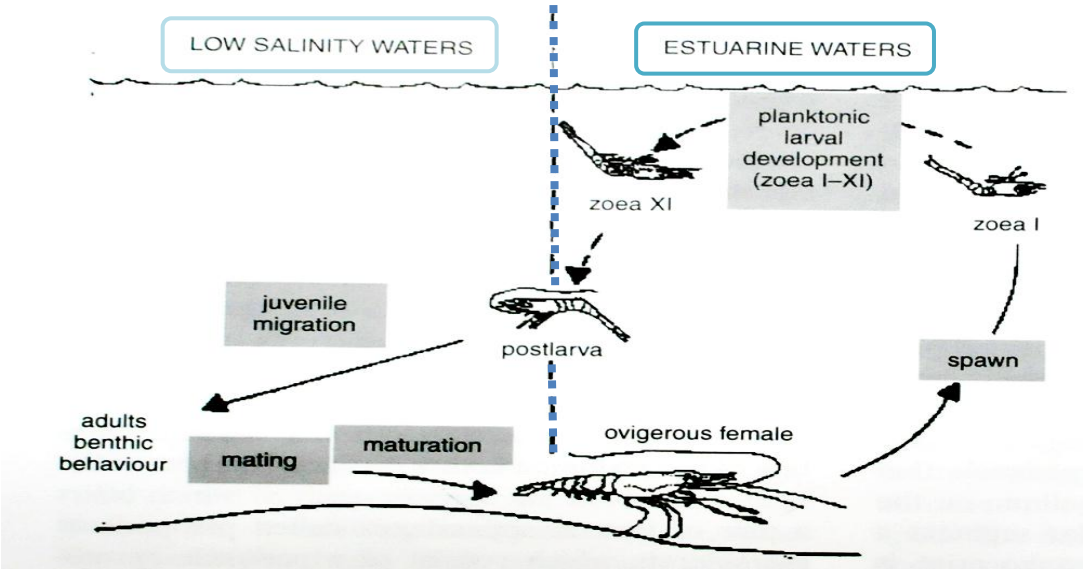
ยาวและใหญ่กว่าคู่ที่ 1 ซึ่งใช้ประโยชน์ในการต่อสู้และจับเหยื่อ ส่วนคู่ที่ 1 นั้น ใช้ป้อนอาหารเข้าปากและทำความสะอาดร่างกายส่วนปลายสุดของหัวประกอบด้วยกรีมีลักษณะแบนด้านข้าง ส่วนโคนหนาและนูนเรียวแหลมไปทางส่วนปลายตรงกลางกรีโค้งแอ่นลงส่วนปลายงอนขึ้นที่สันกรีด้านบนและล่างมีหยักหนามคล้ายฟันเลื่อยจำนวนหนามบนสันกรีล่างมี 8-14 ซี่ สันกรีบนมี 12-15 ซี่ตาอยู่บนก้านซึ่งยาวยื่นออกมาและเคลื่อนไหวได้ ส่วนลำตัวแบ่งออกเป็นปล้องๆ รวม 6 ปล้อง ด้านล่างของส่วนลำตัวมีขาว่ายน้ำจำนวน 5 คู่ ระหว่างปล้องที่ 1 ถึงปล้องที่ 5 ส่วนหางประกอบด้วยแพนหางข้างละ 1 คู่ตรงส่วนกลางเป็นปลายหางแหลม (New and Singholka, 2000)



รูปที่ 2-1 ลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามกราม (Cowles, 1914)

กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งที่มีวงจรชีวิต 2 ช่วงน้ำ (ภาพที่ 2-2) คือ ฤดูวางไข่ กุ้งตัวเมียจะเดินทางจากแหล่งน้ำจืดไปยังบริเวณปากแม่น้ำหรือปากทะเลสาบเพื่อวางไข่ ระยะแรกตัวผู้และตัวเมียมีอัตราการเจริญเติบโตเท่ากัน ตัวผู้จะเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องส่วน ตัวเมียจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าตัวผู้มาก เนื่องจากเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ต้องใช้อาหารไปในกระ บวนการสร้างรังไข่ตัวผู้จะมีช่องเปิดของน้ำเชื้ออยู่ที่โคนขาเดินคู่ที่ 5 ตัวเมียจะมีขนาดเล็กกว่าและมีช่องเปิดของอวัยวะเพศอยู่ที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ตัวเมียเมื่อพร้อมผสมพันธุ์จะมีรังไข่สุก ภายในเปลือกคลุมหัวจะเป็นสีส้มลักษณะนี้ชาวบ้านทั่วไปเรียก กุ้งแก้ว ก่อนการผสมพันธุ์ตัวเมียจะลอกคราบก่อนครั้งหนึ่งและจะปล่อยฟีโรโมนดึงดูดตัวผู้ให้เข้าหาและผสมพันธุ์ หลังจากผสมพันธุ์แล้ว 6-10 ชั่วโมง ตัวเมียจะวางไข่บริเวณหน้าท้องปกติแล้วตัวเมียน้ำหนัก 80 กรัม และยาว 18 เซนติเมตร สามารถผลิตไข่ได้ประมาณ 60,000 ฟอง ถ้ามีขนาดใหญ่กว่านี้อาจมีไข่ได้ถึง 100,000 ฟองต่อตัว ไข่ที่ผสมแล้วตัว

เมียจะปล่อยไข่ออกมาติดไว้ที่หน้าท้องแล้วฟักภายใน 19-20 วัน ที่อุณหภูมิ 26-28 องศาเซลเซียส ลูกกุ้งที่ฟักใหม่ คือระยะวัยอ่อนมีขนาดเล็กเป็นพวกชอบแสง ล่องลอยไปตามกระแสน้ำหรือเคลื่อนที่ไปตามคลื่นลม ในลักษณะว่ายไปข้างหลังในท่าตีลังกาเฉียงคล้ายลูกยุง ส่วนหัวค่อนข้างโต ลำตัวเรียวเล็กไปทางหางขณะที่ลอยอยู่ในน้ำ ส่วนหัวอยู่ด้านล่าง และหางชี้ขึ้นข้างบน ลูกกุ้งวัยอ่อนต้องอาศัยอยู่ในน้ำเค็มประมาณ 10-15 ส่วนในพันส่วนจนอายุครบ 35 วันโดยประมาณ ลูกกุ้งวัยอ่อนที่อยู่ในน้ำจืดจะตายภายใน 5 วัน ลูกกุ้งวัยอ่อนจะกินตลอดเวลา อาหารของลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนได้แก่ไรแดง และไรน้ำอื่นๆ รวมทั้งซากพืช ลูกกุ้งวัยอ่อนมีการลอกคราบจนครบ 12-13 ครั้ง ใช้เวลาประมาณ 45-60 วัน กว่าจะเจริญเติบโตเป็นกุ้งวัยรุ่นขนาดตัว 1-2 เซนติเมตร ซึ่งกุ้งวัยรุ่นมีลักษณะทั่วไปเหมือนพ่อแม่ และจะเปลี่ยนไปอาศัยอยู่ในเขตพื้นที่น้ำจืด กุ้งวัยรุ่นจะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์โดยใช้เวลา 4-5 เดือน จะกลายเป็นพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามต่อไป (Ling, 1969)



รูปที่ 2-2 วงจรชีวิตของกุ้งก้ามกราม (New and Singholka, 2000)

2.2 โรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีโครงสร้างแบบง่ายๆ เป็นเซลล์ที่มีลักษณะแบบ Procaryotic cell มีลักษณะโครงสร้างและสมบัติต่างๆ คล้ายพืช เชื้อแบคทีเรียที่มีบทบาทมากในโรคกุ้งคือ เชื้อวิบริโอ (*Vibrio* sp.) เป็นแบคทีเรียที่เคลื่อนไหวได้ รูปร่างทรงกระบอกหรือท่อนโค้ง มักย้อมติดแกรมลบ (ชลอ, 2543; Jayabalan and Pillai, 1994) เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้มีบทบาทเข้าทำลายเม็ดเลือด และการกระจายตัวไปตามระบบทางเดินโลหิต เคลื่อนตัวเข้าสู่ระบบของต่อม

สร้างน้ำย่อย หรือตับอ่อน เมื่อเนื้อเยื่อเหล่านี้ถูกทำลาย การทำงานของต่อมสร้างน้ำย่อยก็จะเสียหายทำให้กุ้งไม่กินอาหาร และตายในที่สุด

โรคติดเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุการตายของกุ้งที่สำคัญ และพบการติดเชื้อก่อโรคเกิดการดื้อยาสูงขึ้น วิบริโอซีส (Vibriosis) เป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งที่เกิดจากแบคทีเรียสกุล Vibrio ได้แก่ *V. harveyi* (โรคเรืองแสง), *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* (โรคเสี้ยนดำ), *V. splendidus* นอกจาก *Vibrio* sp. แล้วอาจเกิดจาก *Aeromonas* sp. ได้แต่เล็กน้อย

โรคแบคทีเรียเรืองแสง หรือชื่อที่รู้จักกันในเกษตรกรคือ โรคดาวเรือง หรือโรคเพชรพลอย มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง (*Vibrio harveyi*) (ลิลา และคณะ, 2540) พบอัตราการตายสูงในกุ้งระยะอ่อนถึงวัยรุ่น การแพร่กระจายของโรคเรืองแสงมีรายงานทั้งในโรงเพาะฟักกุ้งก้ามกรามและกุ้งทะเล ในเขตร้อนของทวีปเอเชีย และออสเตรเลีย (Vattanaviboon *et al*., 2003) ประเทศอินโดนีเซีย ประเทศไทย (Lin and Nash, 2000) ลิลา และคณะ (2540) รายงานว่าที่ผ่านมาเกษตรกรที่เลี้ยงกุ้งได้รับความเสียหายจากโรคเรืองแสงเป็นอย่างมาก เกษตรกรที่ประสบปัญหานี้มักใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา แต่บางครั้งก็ให้ผลที่ไม่แน่นอนในการรักษา เนื่องจากการดื้อยาของเชื้อ หรือบางครั้งวิธีการรักษาไม่ถูกวิธีเนื่องจากขาดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับสาเหตุของโรคที่เกิดขึ้น ลูกกุ้งจะมีอัตราการติดเชื้อและการตายสูงในระยะเวลาอันสั้น เชื้อแบคทีเรียที่สามารถเรืองแสงได้ มิได้มีเพียงสกุล *Vibrio* sp. เท่านั้น (Wegrzyn and Czyz, 2002)

อาการที่พบคือ กุ้งลอยหัวมีแสงเรืองได้ในเวลากลางคืน หรือในที่มืด ว่ายน้ำขึ้นผิวน้ำขอบบ่อ กุ้งกินอาหารลดลงหรือไม่กินอาหาร พบเชื้อแบคทีเรียนี้ในกระแสเลือดและกล้ามเนื้อ

การติดต่อโดยผ่านทางน้ำเป็นหลัก โดยส่วนใหญ่การเข้าทำลายกุ้งของเชื้อแบคทีเรียนั้นต้องมีสาเหตุหลักเช่น กุ้งอ่อนแอ ภายในบ่อเลี้ยงมีเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นอยู่ทำให้สามารถติดเชื้อแบคทีเรียต่อไปได้ แต่สาเหตุหลักเกิดจากการไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมภายในบ่อได้

การทำลายเชื้อแบคทีเรียสามารถทำได้ทั้งทางกายภาพ และทางเคมี oxidizing agent เป็นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆได้ดี ที่นิยมใช้ได้แก่ คลอรีน ไอโอดีน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) นอกจากนี้กุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียยังสามารถรักษาได้ด้วยยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมได้อีกด้วย

2.3 ระบบหมุนเวียนเลือดของสัตว์กลุ่มครัสเตเซียน

ระบบหมุนเวียนเลือดของสัตว์กลุ่มครัสเตเซียนเป็นระบบเปิด มีอวัยวะในการสร้างเม็ดเลือด (hemopoietic tissue) อวัยวะนี้ตั้งอยู่ใกล้หลอดเลือดเอออร์ต้าส่วนหน้า (anterior aorta) ใต้

กรี น้ำเลือดกุ้งจะมีรงควัตถุฮีโมไซยานิน (hemocyanin) ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนแก๊ส ส่วนเม็ดเลือด (hemocyte) จะทำหน้าที่ทางภูมิคุ้มกันเท่านั้น (Ratchiffe *et al*., 1985)

เม็ดเลือดของกุ้งแบ่งออกเป็น 3 แบบ (Hose *et al*., 1990) ได้แก่

1. **ไฮยาลินเซลล์ (hyaline cells)** เป็นเม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กไม่มีแกรนูล (granule) ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศ์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน จะพบแกรนูลขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 50 นาโนเมตร) ได้เล็กน้อย และพบว่าเซลล์ชนิดนี้จะมีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ของผิวนิวเคลียสต่อพื้นที่ของเซลล์ สูงกว่าเซลล์เม็ดเลือดอีกสองชนิดนั้นหมายถึงไฮยาลินเซลล์จะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ และมีไซโตพลาสซึม

2. **เซมิแกรนูลาร์เซลล์ (semi-granular cell)** เป็นเม็ดเลือดที่มีแกรนูลขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง ≤ 1.0 ไมโครเมตร) ในไซโตพลาสซึมขนาดของเซลล์จะมีขนาดใหญ่กว่าไฮยาลินเซลล์ และมีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ของนิวเคลียสต่อพื้นที่ของเซลล์น้อยกว่าไฮยาลินเซลล์

3. **แกรนูลาร์เซลล์ (granular cell)** เป็นเม็ดเลือดที่มีแกรนูลขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.3-2.0 ไมโครเมตร) อัดแน่นในไซโตพลาสซึม เซลล์ชนิดนี้จะมีขนาดใหญ่ และมีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ของนิวเคลียสต่อพื้นที่ของเซลล์น้อยกว่าไฮยาลินเซลล์เม็ดเลือดกุ้งแต่ละชนิดมีหน้าที่การทำงานแตกต่างกัน การตอบสนองของเซลล์ที่สำคัญในกุ้งได้แก่การทำงานของเอมไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ซึ่งเป็นเอมไซม์ที่ทำเกิดกระบวนการ melanisation ที่ใช้ในการห้อมล้อมสิ่งแปลกปลอมไม่ให้กระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย (Vargas, 1995) และการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion production) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่ผลิตจากเซลล์เม็ดเลือดขณะที่เกิดกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมที่สามารถทำลายเชื้อโรคได้

2.4 ระบบภูมิคุ้มกันโรคของสัตว์กลุ่มครัสเตเซียน

ทั้งองค์ประกอบเลือด (Blood components) และระบบภูมิคุ้มกันโรค (Immune system) เป็นพื้นฐานสำคัญในการควบคุมและแก้ไขปัญหาโรคติดเชื้อในสัตว์น้ำ (Bachere, 2000; Rodryguez and Moullae, 2000) กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์น้ำกลุ่มครัสตาเซียนที่มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) และสามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างตัวเองและสิ่งแปลกปลอม (self and non-self) (Mckay *et al*., 1969; Ratcliffe *et al*., 1985)

ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์กลุ่มครัสเตเซียนแบ่งเป็น 2 ระบบ (Lackie, 1980; Ratcliffe *et al*., 1985; Smith and Chisholm, 1992) คือ มีการตอบสนองที่เกิดขึ้นโดยเซลล์ (cellular defense) และสารน้ำ (humoral defense) เซลล์เม็ดเลือดเป็นองค์ประกอบเลือดที่เกี่ยวกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์โดยตรง และสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้สุขภาพกุ้งได้

1. ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ (cellular defenses)

ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ในครัสเตเซียน จะเกิดขึ้นทันทีหลังจากได้รับสิ่งแปลกปลอม ซึ่งการตอบสนองจะเป็นแบบไม่จำเพาะ (non-specific defense) และไม่ต้องการการชักนำ (Johansson and Soderhall, 1989; Lackie, 1980; Smith and Soderhall, 1983) ประกอบด้วย 5 แบบ โดยมีเซลล์เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด ทำหน้าที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2-1)

1.1 การแข็งตัวของเลือด (hemolymph clotting)

เป็นกระบวนการแรกที่เกิดขึ้นภายหลังที่ได้รับบาดแผล เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือด และป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคผ่านบาดแผล (Johansson and Soderhall, 1983) ระบบการแข็งตัวของเลือดในครัสเตเซียน จะมีการทำงานร่วมกันระหว่างเม็ดเลือดไฮยาลินเซลล์ และโคแอคกลูโลเจน (coagulogen) ที่เป็นองค์ประกอบในสารน้ำ (Hose *et* al., 1990; Ratcliffe *et al*., 1985; Vargas-Albores *et al*., 1998) และพบว่าการแข็งตัวของเลือดจะเกิดขึ้นพร้อมกับการสร้างเม็ดสีดำ (melanin) ที่เกิดขึ้นในระบบโพรฟีนอลออกซิเดส (Johansson and Soderhall, 1989; Ratcliffe *et al*., 1985)

1.2 กระบวนการกลืนทำลาย (phagocytosis)

กระบวนการกลืนทำลายในกุ้งน้ำจืด *Parachaeraps bicarinatus* และ*Astacus astacus* เกิดขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดชนิด ไฮยาลินเซลล์ ทำหน้าที่กลืนทำลาย (McKay and Jenkin, 1970; Smith and Soderhall, 1983) กระบวนการกลืนทำลายเป็นหน้าที่สำคัญของเม็ดเลือดในการทำลายหรือลบล้างสิ่งแปลกปลอมทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตที่บุกรุกเข้าไปในร่างกาย (McKay and Jenkin, 1970; Reade, 1968) โดยขั้นตอนแรกของการกลืนทำลายคือ การที่สิ่งแปลกปลอมเกาะบนเซลล์เมมเบรนของเม็ดเลือด และมีการยื่นไซโตพลาสซึมล้อมรอบสิ่งแปลกปลอม นำไปสู่การเพิ่มการนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ กระบวนการกลืนทำลายเซลล์เป็นกลไกพื้นฐานที่สำคัญในการป้องกันโรคของครัสเตเซียนส่วนใหญ่โดยอาศัยสารน้ำในการช่วยเสริมการทำงาน (Sindermann, 1971) กระบวนการนี้เป็นด่านแรกในการป้องกันเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมผ่านชั้นผิวปกคลุมร่างกาย

1.3 **การสร้างโนดูล** (nodule formation)

กระบวนการสร้างโนดูลนี้จะเกิดขึ้นเมื่อมีเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมบุกรุกเป็นจำนวนมาก จนเกินความสามารถของกระบวนการกลืนทำลายไม่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นได้หมด การสร้างโนดูลเป็นกลุ่มก้อนเซลล์รอบๆสิ่งแปลกปลอมจะเกิดขึ้นเพื่อไม่ให้สิ่งแปลกปลอมกระจายลุกลามทั่วร่างกาย ซึ่งเป็นระบบที่มีการกำจัดขอบเขตของการแพร่กระจายของเชื้อโรคได้มาก (Smith and Soderhall, 1986) พบกระบวนการสร้างโนดูลบริเวณเหงือก และเฮปพาโทแพนเครียส (Ratcliffe *et al*., 1985) พร้อมกับการเกิดเม็ดสีดำ (melanin production) ในระบบโพรฟีนอลออกซิเดส (Johansson and Soderhall, 1989)

1.4 **การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม** (encapsulation)

กระบวนการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมจะเกิดในกรณีที่มีสิ่งแปลกปลอมขนาดใหญ่มากกว่า 10 ไมโครเมตร (Lackie, 1980) จนเม็ดเลือดเซลล์เดียวไม่สามารถกลืนทำลายได้ ต้องอาศัยเม็ดเลือดจำนวนมากมาล้อมจับกระจายหุ้มสิ่งแปลกปลอมซึ่งมีขนาดใหญ่ เช่น พยาธิ, เชื้อรา และสัตว์เซลล์เดียวขนาดใหญ่ เซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมได้แก่ เซมิแกรนูลาและแกรนูลาร์เซลล์ โดยที่เซมิแกรนูลาเซลล์จะมีบทบาทมากกว่าแกรนูลาเซลล์ (Hose *et al*., 1990) นอกจากนี้กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่ถูกห่อหุ้มจะอาศัยองค์ประกอบในระบบโพรฟีนอลออกซิเดส พร้อมกับมีการเกิดเม็ดสีดำ (Ratcliffe *et al*., 1985)

1.5 **ระบบโพรฟีนอลออกซิเดส** (prophenoloxidase system)

การสร้างเม็ดสีดำในระบบโพรฟีนอลออกซิเดส บริเวณบาดแผลที่ปิดแล้ว หรือบริเวณโนดูล หรือภายในกลุ่มก้อนเม็ดเลือดที่ห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมเพื่อฆ่าพยาธิ (Nappi, 1973) เป็นกลไกการป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ที่สำคัญในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Ratcliffe *et al*., 1985) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มครีสเตเซียน (Johansson and Soderhall, 1989) พบว่าเม็ดเลือดจำพวกเซมิแกรนูลาเซลล์ จะเป็นแหล่งสร้าง และเก็บเอนไซม์ต่างๆ ในระบบนี้ โดยเก็บอยู่ในเม็ดเลือดแกรนูล (Hose *et al*., 1990; Smith and Soderhall, 1991)

ระบบโพรฟีนอลออกซิเดส แอคติเวทติง ซิสเตม (Prophenoloxidase activating system) เป็นระบบการทำลายเชื้อโรคและควบคุมการกระจายของเชื้อโรคภายในตัวกุ้ง ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญ โดยมีเอมไซม์โพรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase; proPO) เป็นสารเริ่มต้นของระบบที่พบได้ในแกรนูลที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือด (Smith and Soderhall, 1986) ระบบ

proPO เป็นระบบที่มีความซับซ้อนขององค์ประกอบต่างๆ ของเอนไซม์ ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการแข็งตัวของเลือด ช่วยในการทำลายสิ่งแปลกปลอมรวมทั้งจุลชีพ โดยทำการเปลี่ยนเอนไซม์เป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่สามารถทำปฏิกริยากับ phenol แล้วให้สารประกอบ quinone ที่สามารถเปลี่ยนเป็นเมลานิน (melanin) ได้ซึ่งปฏิกริยาเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับระบบการป้องกันโรคในกลุ่มครัสเตเซียนนอกจากนี้เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการรับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมที่จะเข้าสู่ร่างกาย (Soderhall, 1982) หน้าที่ของเมลานินจะช่วยในการยับยั้งและป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยการยับยั้งเอนไซม์ proteinase และ chitinase ที่อยู่ภายนอกเซลล์ทำให้เชื้อแบคทีเรียนั้นไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจะถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นได้เมื่อได้รับสารจำพวกไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide ; LPS) หรือ บีตา-1,3-กลูแคน (ß-1,3-glucan) ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา รวมทั้ง peptidoglycan ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์จุลชีพ ระบบ proPO ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นใน vesicle ของเซลล์เม็ดเลือดชนิด เซมิแกรนูลา (semigranular cell) และแกรนูลาร์เซลล์ (granular cell) ทำให้เกิดการหลั่งสาร proPO ออกมานอกเซลล์ การควบคุมกิจกรรมของระบบ proPO ไม่ให้อยู่ในสภาวะถูกกระตุ้น โดยมีตัวยับยั้งได้แก่ Proteinase inhibitor และtrypsin inhibitor ส่วนตัวยับยั้งที่ได้มีการศึกษาแล้วได้แก่ α_2-macroglubulin สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้เพียงบางส่วน ลักษณะของ α_2-macroglubulin ในสัตว์ไม่มีกระดูกทั้งหมดเป็น dimer ซึ่งต่างจากพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เป็น Tetramer (Smith and Chisholm, 1992; Soderhall and Cerenius, 1992; Bachere *et al*., 1995; Sritunyalucksana, 1995)

2. **ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (humoral defenses)**

ซีรัมของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจะไม่พบอินมูโนโกลบุลิน (immunoglobulin) (Lackie, 1980 ; Ratcliffe *et al*., 1985; Thornqvist and Soderhall 1997) แต่มีองค์ประกอบหลายชนิดที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity), แอคกลูตินิน (agglutinin), สารคล้ายไซโตไคน์ (cytokine-like factor), โทดูเลเตอร์ (modulators) และสารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clotting factor) องค์ประกอบเหล่านี้เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ (Chisholm and Smith, 1995; McKay *et al*., 1969; Stewart and Zwicker, 1972) หรืออาจถูกชักนำให้สร้างขึ้น (Adams, 1991; Evans *et al*., 1968, 1969a, 1969b; Stewart and Zwicker, 1972) การถูกชักนำนี้ไม่แสดงคุณสมบัติของอินมูโนโกลบุลินที่สามารถจดจำแอนติเจนและตอบสนองต่อแอนติเจนนั้นๆ เมื่อพบแอนติเจนเป็นครั้งที่สองอย่างเฉพาะเจาะจง (anamnestic properties of immunoglobulin) (Lackie, 1980 and Ratcliffe *et al*., 1985)

2.5 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ส่าเบียร์หรือบริวเวอร์ยีสต์ (*S. cerevisiae*)

การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) ในการป้องกันโรคติดเชื้อในสัตว์น้ำเป็นวิธีที่ดีกว่าการใช้สารปฏิชีวนะ เนื่องจากไม่ก่อปัญหาสารปฏิชีวนะตกค้าง (Siwicki *et al*., 1994) สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ใช้กันในสัตว์น้ำอื่นๆ ได้แก่ trace mineral, วิตามินรวม และสารธรรมชาติจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น บีตา-กลูแคน, ไลโปโพลีแซคคาไลด์, ไซโมแซน และเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตหรือทำให้ตายแล้ว (Evans *et al*., 1968 and Siwicki *et al*., 1994)

ยีสต์สำหรับหมักเบียร์ (ส่าเบียร์) หรือบริวเวอร์ยีสต์ (*S. cerevisiae*) เนื่องจากยีสต์ชนิดนี้เป็นจุลลินทรีย์ที่กระจัดกระจายทั่วไปในธรรมชาติอยู่ในกลุ่มของรา ซึ่งส่วนใหญ่มีการดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยวอยู่ในชั้นแอสโคไมซีส (Class Ascomycetes) (พวงพร โชติกไกร, 2541) ยีสต์เป็นเซลล์เดี่ยว ไม่มีคลอโรฟิลล์และออร์กาเนลที่ใช้ในการเคลื่อนที่ มีลักษณะใส ไม่มีสี แต่เมื่อเลี้ยงบนอาหารจะมีสีขาว ยีสต์บางชนิดมีเม็ดสีภายในเซลล์ ทำให้สีของโคโลนีแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับเม็ดสีที่มีอยู่ เช่น เหลือง ชมพู ส้ม เป็นต้น มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม รีหรือรูปไข่ สามเหลี่ยม รีแล้วปลายด้านหนึ่งแหลม รูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง คนโฑหรือฟลาสก์ เป็นต้น ยีสต์มีรูปร่างใหญ่กว่าแบคทีเรีย ขนาดของเซลล์ยีสต์มีรูปร่างผันแปร บางชนิดมีความยาวของเซลล์ 2-3 ไมโครเมตร ในขณะที่บางชนิดยาว 20-50 ไมโครเมตร ส่วนความกว้างของเซลล์ผันแปรน้อยกว่า คือ ระหว่าง 1-10 ไมโครเมตร (Phaff *et al*, 1978) สำหรับ *S. cerevisiae* เซลล์มีรูปร่างรี มีความกว้างของเซลล์ 1-7 ไมโครเมตร และความยาวของเซลล์ 5-10 ไมโครเมตร

การเจริญและการสืบพันธุ์ของยีสต์ๆ ต้องการอุณหภูมิในช่วง 25-40 องศาเซลเซียส ทนสภาพความเป็นกรดได้สูง คือ pH 3.5 ยีสต์เป็นพวกที่สามารถเจริญเติบโต ได้ทั้งในสภาพที่มีแก๊สออกซิเจน และไม่มีแก๊สออกซิเจน ซึ่งเป็นขบวนการทางชีวเคมีที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมการหมัก (Cambell and Duffus, 1998) ยีสต์ส่วนใหญ่เพิ่มจำนวนแบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) มีน้อยชนิดที่มีการเพิ่มจำนวนโดยการแบ่งเซลล์แบบฟิสชัน (fission) หรือวิธีอื่นๆ มีทั้งชนิดที่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ ที่เรียกว่า แอสโคมัยซีตัสยีสต์ (ascomycetous yeast) และชนิดที่สร้างแบสิดิโอสปอร์ ที่เรียกว่า แบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ (basidiomycetous yeast) ซึ่งอาจจะยังไม่พบระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการสร้างสปอร์แบบมีเพศที่สร้างขึ้นไม่ได้อยู่ในฟรุติ้งบอดี (fruiting body) (Spencer and Spencer, 1997) ซึ่งยีสต์จะกระจายอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดินสวนผลไม้ ผลไม้ อากาศ ในน้ำจืด น้ำเค็ม ผิวหนัง อาหาร ในส่วนต่างๆของพืช ยีสต์บางชนิดพบอยู่กับแมลง และในกระเพาะของสัตว์บาง

ชนิด แต่แหล่งที่พบยีสต์มากสุดคือ แหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้รสหวาน ยีสต์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติมักปนลงไปในอาหารเป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสียได้

โครงสร้างภายในเซลล์ยีสต์ค่อนข้างซับซ้อน ประกอบด้วยโครงสร้างต่างๆ ดังนี้คือ ผนังเซลล์ (cell wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (cell Membrane หรือ plasma membrane) เพอริพลาสซึม (periplasm) ไซโทพลาสซึม (cytoplasm) นิวเคลียส (nucleus) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) แวคิวโอ (vacuole) และเอนโดพลาสมิกเรทิคิวลัม (endoplasmic reticulum) (Mitile, Moor and Robinow, 1969; Walker, 1998) องค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ชนิด (*Saccharomyces cerevisiae*) ประกอบด้วย Glucan 29, Mannan 31, Protein 13, lipid 8.5 และchitin 0 (Reed and Nagodawithna, 1991) ซึ่งสามารถสกัดสารบีต้ากลูแคนเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำได้ (มลฤดี สิทธิพันธ์ และคณะ, 2543)

เบต้ากลูแคนจากผนังเซลล์ยีสต์และรามีความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในสิ่งมีชีวิตพวกไม่มีกระดูกสันหลัง (Francisco, Flor and Gloria, 1997) และสามารถใช้เป็น immunoadjuvant, antitumor และ radioprotective agent ได้ (Sandula *et al*, 1999) มีการทดลองแช่กุ้งกุลาดำในสารละลาย 1,3-เบต้ากลูแคน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าปริมาณความเข้มข้นของสารละลายเบต้ากลูแคนที่ทำให้กุ้งมีการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตได้ คือ 0.5, 1.0 และ2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ถ้าความเข้มข้นสูงกว่านี้จะไม่มีผลต่อการเพิ่มอัตราการเติบโตและเมื่อนำกุ้งที่ผ่านการแช่สารละลายเบต้ากลูแคนไปแช่ในสารละลายที่มีเชื้อ *Vibrio vulnificus* ความเข้มข้น 5×10^{7} โคโลนีต่อมิลลิเมตรนาน 12 ชั่วโมง พบว่ากุ้งที่ผ่านการแช่สารละลายเบต้ากลูแคน 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมสามารถป้องกันการติดเชื้อได้ 18 วัน หลังจากเริ่มแช่ในสารละลายที่มีเชื้อ

ไคตินเป็นองค์ประกอบอยู่ในส่วนผนังเซลล์ชั้นในของเซลล์ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ พบมากที่ผนังกั้นแยกหน่อออกจากเซลล์แม่ และที่บริเวณรอยแผลจากการแตกหน่อ พบประมาณร้อยละ 1-2 น้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ (Kapteyn *et al*., 1999)

แมนแนนเป็นพอลิเซ็กคาไรด์ที่มีแมนโนสเป็นองค์ประกอบอยู่เป็นส่วนใหญ่ เกิดจากการเรียงต่อขนานของน้ำตาลแมนโนส ด้วยพันธะไกลโคซิดิก โดยสูญเสียน้ำ 1 โมเลกุล ต่อการสร้างพันธะระหว่างน้ำตาลแมนโนส 2 โมเลกุล (วรัญญา พรเจริญ, 2549) แมนแนนทำหน้าที่ยึดเกาะส่วนประกอบต่างๆ ของผนังเซลล์ให้คงอยู่ด้วยกัน (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

นอกจากพอลิเซ็กคาไรด์แล้วองค์ประกอบส่วนน้อยที่พบในผนังเซลล์ยีสต์คือ โปรตีน ไขมัน และสารอนินทรีย์ฟอสเฟต เช่น ยีสต์สำหรับหมักเบียร์ (ส่าเบียร์) หรือบริวเวอร์ยีสต์ พบโปรตีนร้อยละ 12 และไขมันร้อยละ 6 (Calleja, 1987)

ยีสต์หลายชนิดสามารถเลี้ยงโดยของเสียที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งเป็นการลดมลภาวะ และผลผลิตยีสต์ที่ได้สามารถเป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์ เนื่องจากยีสต์ประกอบด้วย ไนโตรเจนประมาณร้อยละ 7-9 ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของโปรตีน (วิลาวัณย์ เจริญจิระตะกูล, 2539) ยีสต์ที่นิยมใช้เป็นอาหารได้แก่ *Candida utilis* (torula yeast), *S. cerevisiae*, *S. fragilis* และ *S. carlsbergensis* (brewer's yeast) ยีสต์มีโปรตีนประมาณร้อยละ 40-60 ของน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 2-1) ในปริมาณนี้มีไนโตรเจนบางส่วนเป็นองค์ประกอบของสารที่ไม่มีคุณค่าทางอาหาร ซึ่งได้แก่ เพียวรีน พิริมิดีน และอื่นๆ (Synder, 1970) กรดอะมิโนของยีสต์มีลักษณะเด่นคือ มีไลซีนสูงแต่มีเมทไธโอนินต่ำ (Reed and Pepler, 1973) นอกจากยีสต์จะเป็นแหล่งโปรตีนแล้ว ยังเป็นแหล่งของวิตามินโดยเฉพาะวิตามินบีที่มีมากคือ ไธอามีน ไรโบเฟลวิน และไนอาซิน (ตารางที่ 2-2) นอกจากนี้ยังมีไพริดอกซิน กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก กรดแพนโทเทนิก และไบโอติน (Peppler, 1986)

ข้อจำกัดในการใช้ยีสต์เป็นแหล่งอาหาร อยู่ที่ผนังเซลล์ของยีสต์ไม่สามารถย่อยได้ด้วยเอนไซม์ภายในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ชั้นสูง ดังนั้นการที่จะได้รับคุณค่าทางอาหารจากการบริโภคยีสต์จะต้องทำให้ยีสต์ตาย เพื่อให้สารต่างๆ ภายในเซลล์ไหลออกมาภายนอกเซลล์จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Synder, 1970)

ตารางที่ 2-1 องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์เบียร์แห้ง

องค์ประกอบทางเคมี	ยีสต์เบียร์แห้ง (เปอร์เซ็นต์)
โปรตีน	48
คาร์โบไฮเดรต	36
เถ้า	8
ไขมัน	1
ความชื้น	7

ที่มา : Thornton (1992)

ตารางที่ 2-2 ปริมาณวิตามินบีในยีสต์เบียร์แห้ง

วิตามิน	ปริมาณ (ไมโครกรัมต่อกรัม)
ไทอามีน (บี 1)	120
ไรโบฟลาวิน	40
ไนอาซิน	300
ไพริดอกซิน (บี 6)	28
กรดแพนโทธินิค	70
ไบโอติน	1.3
กรดโฟลิค	13
วิตามินบี 12	0.001

ที่มา : Reed and Nagodathana (1991)

ส่าเบียร์หรือบริวเวอร์ยีสต์ (*S. cerevisiae*)

ส่าเบียร์หรือบริวเวอร์ยีสต์ เป็นยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเบียร์และไวน์ เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการผลิตเบียร์ มีรสชาติค่อนข้างรุนแรง แต่เนื่องจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านกระบวนการบ่มเพาะภายใต้สภาวะการหมักจะอุดมไปด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์มากมาย ได้แก่ ธาตุอาหารจำนวนมาก กรดอะมิโน 16 ชนิด ที่จำเป็นต่อร่างกาย (ตารางที่ 2-3) เกลือแร่ 14 ชนิด วิตามิน 17 ชนิด นอกจากนี้ยังมีเกลือแร่สูง คือ โครเมี่ยม สังกะสี เหล็ก ฟอสฟอรัส และเซเลเนียม นอกจากนี้ยังจัดเป็นแหล่งของวิตามินบีรวม ประกอบด้วย วิตามินบี 1 (thiamine) วิตามินบี 9 (folic acid) และไบโอติน (biotin) (วรัญญา พรเจริญ, 2549) ส่าเบียร์หรือบริวเวอร์ยีสต์ ยังเป็นแหล่งสำคัญของโปรตีนถึง 16 กรัมต่อปริมาณยีสต์ 30 กรัม มีมากถึง 50-55 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์หรือส่าเบียร์สำหรับหมักเบียร์ พบโปรตีนร้อยละ 12 และไขมันร้อยละ 6 (Calleja, 1987)

การใช้ประโยชน์จากส่าเบียร์หรือบริวเวอร์ยีสต์ เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการหมักก่อให้เกิดประโยชน์ในอุตสาหกรรมที่หลากหลาย ไม่ว่าจะใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารหรือสารปรุงรสอาหารและการผลิตสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ซึ่งจะให้คุณลักษณะของกลิ่นรสที่พิเศษ เพิ่มความอร่อยให้กับอาหาร และองค์ประกอบของสารอาหารที่อยู่ในเซลล์ยีสต์สามารถนำมาใช้ประโยชน์กับอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ คือใช้เป็นแหล่งโปรตีนที่เรียกว่า โปรไบโอติก (probiotic) ให้กับสัตว์เลี้ยงโดยใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทำให้สัตว์มีสุขภาพแข็งแรงและมีภูมิคุ้มกันโรคสูงขึ้น (Rengpipat *et al.*, 2000)

ตารางที่ 2-3 ปริมาณกรดอะมิโนในส่าเบียร์

กรดอะมิโน	ปริมาณ (ร้อยละของส่าเบียร์โปรตีน)				
	S. Cerevisiae[a]	*S. Cerevisiae*[b]	*K. Marxianus*[c]	*C. Rugosa*[d]	*C. Utilis*[e]
อะลานีน	9.1	-	-	7.6	5.5
อาร์จินีน	-	5.0	-	4.7	5.4
กรดแอสพาร์ติก	-	-	-	10.4	8.8
ซีสเตอีน	1.8	1.6	-	1.3	0.4
กรดกลูตามิก	21.0	-	-	15.4	14.6
ไกลซีน	5.8	-	-	5.4	4.5
ฮีสติดีน	3.5	4.0	2.1	2.2	2.1
ไอโซลิวซีน *	5.8	5.5	4.0	4.4	4.5
ลิวซีน *	9.0	7.9	6.1	7.7	7.1
ไลซีน *	9.4	8.2	6.9	7.4	6.6
เมทไธโอนีน *	-	2.5	1.9	1.7	1.4
ฟีนิลอะลานีน *	-	4.5	2.8	3.7	4.1
โพรลีน	5.5	-	-	9.4	3.4
ซีรีน	5.6	-	-	5.4	4.7
ทรีโอนีน *	5.8	4.8	5.8	5.4	5.5
ทริปโตฟาน *	1.2	1.2	1.4	-	1.2
ไทโรซีน	5.4	5.0	2.4	3.7	3.3
วาลีน *	7.4	5.5	5.4	4.7	5.7

* กรดอะมิโนจำเป็น

a : Reed and Nagodathana (1991)

b : Reed and Peppler (1973)

c : Bernstein and Plantz (1997)

d : Lee and Lee (1996)

e : Amoco Food Co. (1985)

ส่าเบียร์หรือบริวเวอร์ยีสต์เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์เป็นสารจากธรรมชาติซึ่งทำให้ระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะ (non-specific immune responses) ในสัตว์น้ำบางชนิดสูงขึ้น (Siwicki et al, 1994)

ส่าเบียร์แห้งหรือบริวเวอร์ยีสต์แห้ง ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้เป็นผลพลอยได้จากการผลิตเบียร์ ในการหมักเบียร์ได้ยีสต์ความเข้มข้นสูงออกมาด้วย โดยพบว่าความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้น 3-8 เท่าของปริมาณยีสต์ที่เพาะลงไปในระหว่างการหมัก เมื่อแยกเซลล์ยีสต์ออกจากเบียร์โดยปล่อยให้ตกตะกอนหรือเซนตริฟิวจ์ ถ้าต้องการยีสต์สำหรับเป็นอาหารสัตว์ทำได้โดยนำยีสต์ครีมที่มี 10-15 เปอร์เซ็นต์ของแข็งที่เป็นยีสต์มาทำให้แห้งโดยตรงด้วย drum drier หรือ spray drier ส่วนการผลิตยีสต์อาหารคนต้องทำให้รสขมหายไปโดยการล้างด้วยด่างที่มีพีเอชเท่ากับหรือมากกว่า 8 จากนั้นจึงล้างด้วยน้ำและปรับพีเอชให้เหลือ 5.5-5.7 ปกติส่าเบียร์แห้งหรือบริวเวอร์ยีสต์แห้ง ใช้มากในอาหารสัตว์เพื่อเป็นแหล่งโปรตีนและวิตามินบี โดยกำหนดให้มีโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นอาจใช้เป็นแหล่งของซีลีเนียม ซึ่งช่วยในการเจริญพันธุ์และการเจริญเติบโตของสัตว์ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

ส่าเบียร์สกัดหรือบริวเวอร์ยีสต์สกัด (Yeast extract)

ส่าเบียร์สกัดหรือบริวเวอร์ยีสต์สกัด คือยีสต์ที่ผ่านกระบวนการสกัดด้วยวิธี autolysis หรือ plasmolysis หรือ hydrolysis ทำให้สารภายในเซลล์ไหลออกมาอยู่ในสารละลาย หลังจากนั้นจึงนำของเหลวที่ได้มาระเหยจนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ พบว่ายีสต์สกัดเป็นแหล่งของโปรตีน (กรดอะมิโนจำเป็น) วิตามินบี และแร่ธาตุรอง (trace minerals) (ชนิกา คงสวัสดิ์, 2546) การย่อยสลายตัวเองของยีสต์ (self digestion หรือ autolysis) สามารถเกิดขึ้นเองได้ตามธรรมชาติ แต่สามารถกระตุ้นให้เกิดเร็วขึ้นได้โดยการควบคุมสภาวะต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง เวลา และความเข้มข้นให้เหมาะสม ซึ่งภายใต้สภาวะที่เหมาะสมแก่การย่อยสลายตัวเองของยีสต์ ระบบเอมไซม์สำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมเมตาบอลิซึมปกติของยีสต์จะทำงานผิดปกติ เอนไซม์ภายในแวคิวโอซึ่งอยู่ภายในไซโทพลาสซึมจะถูกปล่อยออกมาย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีนและกรดนิวคลีอิกไปเป็นสารโมเลกุลที่สามารถละลายน้ำได้ ผนังเซลล์จะสูญเสียสภาพที่เป็นเยื่อเลือกผ่าน และปล่อยสารประกอบต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ออกมา (Reed and Nagodawithana, 1991) การย่อยสลายตัวเองของยีสต์ เริ่มจากการทำงานของเอมไซม์ ß-(1-3) glucanase และ protease โดยมี ß-(1-6) glucanase และ mannanase เป็นเอมไซม์ที่ยีสต์ใช้ในการย่อยผนังเซลล์ในกระบวนการแตกหน่อ ส่วนเอมไซม์ protease มีหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนที่เซลล์ไม่ต้องการเป็นกรดอะมิโนเพื่อใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ต่อไป เอนไซม์นิวคลีเอส

ภายในเซลล์จะย่อยสลายอาร์เอ็นเอ และดีเอ็นเอให้เป็นสารโพลีนิวคลีโอไทด์ โมโนนิวคลีโอไทด์ และนิวคลีโอไทด์ ละลายน้ำออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (Hough and Maddox, 1970; Nagodawithana, 1994) การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสทที่ได้จากการย่อยสลายเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง พบว่าความชื้นลดลงจากร้อยละ 52.36 เป็นร้อยละ 33.37 มีโปรตีนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 16.35 เป็นร้อยละ 42.0 น้ำตาลเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 5.85 เป็นร้อยละ 7.38 ไขมันเพิ่มขึ้นน้อยมากเป็นร้อยละ 0.7 และเถ้าลดลงจากร้อยละ 24.92 เป็นร้อยละ 16.08 จำนวนของแข็งที่สกัดได้ คือ อะมิโนไนโตรเจน กรดอะมิโน โดยเฉพาะ กรดกลูตามิก อะลานีน และไลซีน จะเพิ่มสูงขึ้น เป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยส่วนประกอบภายในเซลล์ยีสต์ ได้แก่ กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ โพลีเปปไทด์ ไกลโคเจน น้ำตาล วิตามินบี ทรีฮาโลส และสารให้กลิ่นรส (Goossens, 1974)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเสริมยีสต์ในสัตว์น้ำ

ยีสต์มีประโยชน์ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโรค อีกทั้งช่วยในการต่อต้านเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกายและช่วยทำให้สัตว์มีความต้านทานโรคมากขึ้น (Gatesoupe, 1999)

กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมสารบีต้ากลูแคน ที่สกัดจากยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) 0.25-1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดดีกว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่เสริมสารบีต้ากลูแคน (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2543)

ผลของเบต้ากลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ โดยให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนที่ระดับ 0, 1, 2, 10 และ20 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 20 วันหลังจากนั้นฉีดเชื้อ white spot syndrome virus แล้วทำการตรวจวัดปริมาณเม็ดเลือดรวม และกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดส พบว่ากลุ่มที่ได้รับ เบต้ากลูแคน 2, 10, 20 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตรารอด 55, 65 และ 65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาณเม็ดเลือดรวม และกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดส ลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากได้รับเชื้อ จากนั้นก็กลับสู่ภาวะปกติ (Chang *et al*., 2003)

ศึกษาผลของบริวเวอร์ยีสต์ (Brewer's yeast) 1 และ2 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารของ juvenile striped bass หลังจาก 7 สัปดาห์ จะมี weight gain และ feed efficiency เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการรอดชีวิตจากการติดเชื้อ *Streptococcus iniae* ในปลาที่เลี้ยงด้วย บริวเวอร์ยีสต์ หลังจาก 4 สัปดาห์ มีการรอดชีวิตสูงกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารมาตรฐาน อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) (Peng and Gatlin, 2004)

การใช้ยีสต์เพิ่มประสิทธิภาพอาหารกุ้งก้ามกรามโดยมีอาหารเสริมยีสต์ 0, 2, 4 และ6 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมยีสต์ 4 เปอร์เซ็นต์มีผลต่อการเพิ่มอัตราการ

เติบโตดีกว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมยีสต์ 0 และ2 เปอร์เซ็นต์ (สุพัตร์ ศรีพัฒน์ และคณะ, 2551)

การเสริมบริวเวอร์ยีสต์ (Brewer's yeast) ในหอยหวาน *Babylonia areolata* (ชัชรียา เชยชม, 2551)

การเสริมบริวเวอร์ยีสต์ (Brewer's yeast) ในหอยหวาน *Babylonia areolata* (ธรรมรัตน์ วาจาสัตย์, 2553)

การเสริมบริวเวอร์ยีสต์ (Brewer's yeast) ในปลากระพงขาว *Lates calcarifer* (ธัชนนท์ พุ่มโภคัย, 2551)

การเสริม (Baker's yeast) ในปลานิล *Oreochromis niloticus* (Abdel-Tawwab *et al*., 2008)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ และอุปกรณ์ที่สำคัญ

- เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น PT 1200 บริษัท Sartorius, Germany
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) บริษัท Orion, USA
- สไลด์นับเม็ดเลือด (Hemacytometer)
- กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) บริษัท Olympus, USA
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 3K18 (Sigma Osterode and Germany)
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixture) รุ่น G650E บริษัท Scientific Industries, Inc., USA
- หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan
- ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) บริษัท Hepaire, England
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น RO-8 บริษัท Memmert, Western Germany
- เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น 2100 บริษัท Innova, USA
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS agar) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt.Ltd. และอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt.Ltd.
- จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ได้รับความอนุเคราะห์จุลินทรีย์ จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คัดสายพันธุ์และปลูกเชื้อแบคทีเรียโดย นางสาวรจนา บุญมี ใช้สำหรับการทดสอบความต้านทานของกุ้งก้ามกรามวัยรุ่นต่อการชักนำให้เกิดโรค
- ส่าเบียร์ที่ใช้ในการวิจัย ทำอาหารทดลองครั้งนี้ เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการผลิตเบียร์ ซึ่งเป็นส่าเบียร์แห้ง เป็นยีสต์ตายแล้วเนื่องจากกระบวนการผ่านความร้อนจากการทำแห้ง ซึ่งมีลักษณะเป็นผงละเอียดขนาดเล็กและมีสีน้ำตาล เซลล์ส่าเบียร์จะมีขนาดประมาณ 5-10 ไมครอน เมื่อละลายน้ำแล้วจะมีลักษณะเป็นสารแขวนลอย

3.2 สารเคมีที่สำคัญ

- โซเดียมคลอไรด์ บริษัท Sigma Chemical Co., USA
- แมกนีเซียมคลอไรด์ บริษัท Sigma Chemical Co., USA
- แคลเซียมคลอไรด์บริษัท Sigma Chemical Co., USA
- โซเดียมคาโคดีเลทบริษัท Sigma Chemical Co., USA
- L-DOPA (L-dihydroxyphenyl-Alanine) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
- MBTH (3-Methyl-2-Benzothaizolinone Hydrazone) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
- ทริปซิน บริษัท Sigma Chemical Co., USA
- โปรตีนมาตรฐานจากไข่ขาว (Bovin Serum Albumin) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
- น้ำยาสำเร็จรูปวัดความเข้มข้นโปรตีน บริษัท Bio-Rad, USA
- กรดเปอร์คลอริก บริษัท Sigma Chemical Co., USA

3.3 การวางแผนการทดลอง

ศึกษาผลของการเสริมส่าเบียร์ในอาหารต่อการเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* วัยรุ่น ออกแบบการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) โดยแต่ละชุดการทดลองเสริมส่าเบียร์ในอาหารแตกต่างกัน (ตารางที่ 3-1) ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 สูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0 เปอร์เซ็นต์ (สูตรควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 สูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.2 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 3 สูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.5 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 4 สูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 1 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 5 สูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 2 เปอร์เซ็นต์

โดยการศึกษาในครั้งนี้ประกอบด้วยอาหาร 5 ชุดการทดลอง และชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ ซึ่งอาหารแต่ละชุดการทดลองมีระดับโปรตีนในอาหาร 38 เปอร์เซ็นต์ และระดับไขมัน 8 เปอร์เซ็นต์ เท่ากันทุกสูตร เริ่มดำเนินการทดลองเลี้ยงระหว่าง วันที่ 2 กันยายน 2554 ถึงวันที่ 29 ธันวาคม 2554 เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

3.4 สถานที่ทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้ดำเนินงาน ณ สถานที่ โดยการผลิตอาหารทดลอง และศึกษาด้านภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกรามระยะวัยรุ่น ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทาง

ทะเล และการทดลองเลี้ยงพร้อมวิเคราะห์อาหาร ณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 การเตรียมอาหารทดลองและการผลิตอาหาร

3.5.1 การเตรียมอาหารทดลอง

ส่วนประกอบที่ใช้ในอาหารทดลอง เป็นอาหารสำเร็จรูปอัดเม็ด (ตารางที่ 3-1) การผลิตอาหารทำขึ้น ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ผลิตด้วยเครื่องอัดเม็ดอาหาร (pelleting machine) จากบริษัท CPM ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 3-1 ส่วนประกอบของอาหารทดลองทั้ง 5 ชุดการทดลอง

วัตถุดิบ	อาหารสำเร็จรูปเสริมส่าเบียร์ (กรัมต่อ 100 กรัม)				
	0%	0.2%	0.5%	1%	2%
ปลาป่น[1]	24	24	24	24	24
หัวกุ้งป่น	10	10	10	10	10
กากถั่วเหลืองป่น	21	21	21	21	21
แป้งสาลี	27	27	27	27	27
สารเหนียว	5	5	5	5	5
น้ำมันปลา	3	3	3	3	3
น้ำมันข้าวโพด	3	3	3	3	3
เลซิติน	1	1	1	1	1
วิตามินรวม[2]	2	2	2	2	2
แร่ธาตุรวม[3]	2	2	2	2	2
เซลลูโลส	2	1.8	1.5	1	0
ส่าเบียร์[4]	0	0.2	0.5	1	2
ปริมาณรวม	100	100	100	100	100

[1]บริษัท PC ยูเนี่ยน จำกัด (โปรตีนร้อยละ 70.00)

[2]คอมพลีทดีวี บริษัทโคเดล (ประเทศไทย) จำกัด ประกอบด้วย วิตามินเอ 10,000,000 IU วิตามินดี 1,000,000 IU วิตามินอี 1,000 IU วิตามินเค 1,000 มิลลิกรัม วิตามินบี1 500 มิลลิกรัม วิตามินบี2 1,500 มิลลิกรัม วิตามินซี 10,000 มิลลิกรัม โฟเลท 1,000 มิลลิกรัม และดีเมทไธโอนีน 16,038 มิลลิกรัม ในปริมาณ 1 กิโลกรัม

[3]แคลพลัสบริษัทโคเดล (ประเทศไทย) จำกัด ประกอบด้วยแคลเซียม 147 กรัม ฟอสฟอรัส 147 กรัม เหล็ก 2,010 มิลลิกรัม ทองแดง 3,621 มิลลิกรัม สังกะสี 6,424 มิลลิกรัม แมงกานีส 10,062 มิลลิกรัม โคบอลต์ 105 มิลลิกรัม ไอโอดีน 1,000 มิลลิกรัมและซีลีเนียม 60 มิลลิกรัมในปริมาณ 1 กิโลกรัม

[4]โรงงานเบียร์ไทย 1991 จำกัด (มหาชน) อำเภอบางบาล จังหวัด พระนครศรีอยุธยา

3.5.2 การผลิตอาหารทดลอง

การผสมอาหารทดลอง โดยนำวัตถุดิบที่เป็นส่วนประกอบของอาหารนำมาบดให้ละเอียด ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 200 ไมครอน ชั่งน้ำหนักวัตถุดิบแต่ละชนิดตามสูตร (ตารางที่ 3-1) ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวประมาณ 20 นาที นำวัตถุดิบที่ผสมแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร ปรับขนาดเม็ดอาหารให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.2 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร (รูปที่ 3-1) อาหารที่ได้มีลักษณะเป็นเม็ดกึ่งชื้น จากนั้นนำไปอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำอาหารที่ได้เข้าตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น คัดขนาดอาหารอัดเม็ดที่ต้องการผ่านตะแกรงคัดขนาด บรรจุอาหารใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส

รูปที่ 3-1 ขนาดเม็ดอาหาร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.2 มม. ยาวประมาณ 3 มม. เมื่ออบแห้ง

3.5.3 วิเคราะห์คุณภาพอาหาร โดยหาค่า Proximate composition ตามวิธีของ AOAC (1990) ตามขั้นตอนที่แสดงใน ภาคผนวก ก

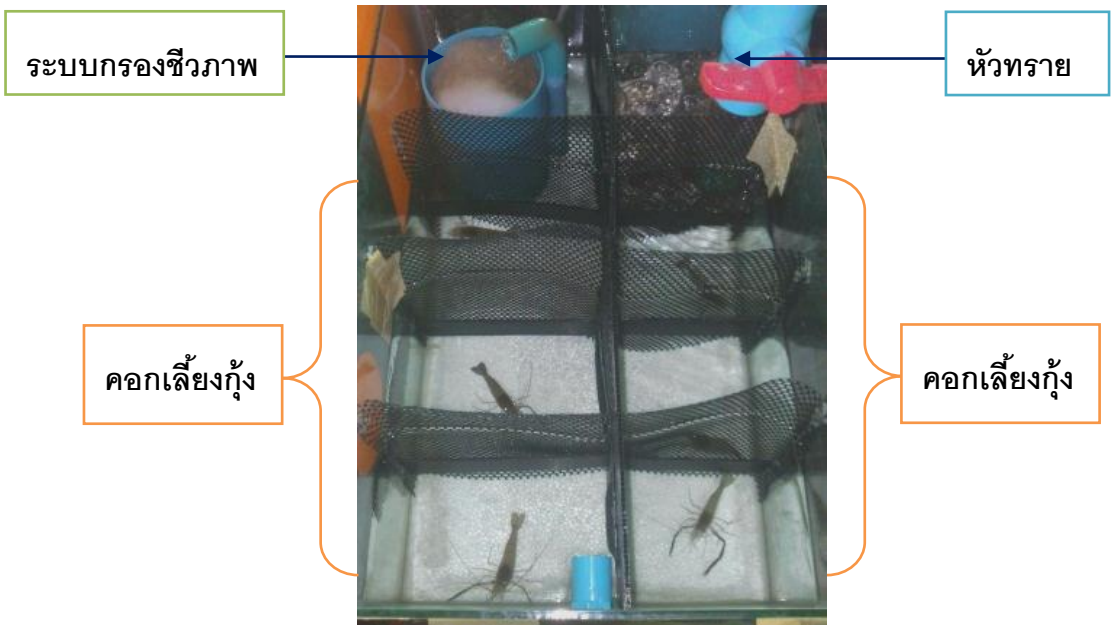
- การวิเคราะห์โปรตีนใช้วิธี Semimicro-kjedahl โดยใช้เครื่อง Kjeldahltherm
- การวิเคราะห์ไขมันใช้วิธี Ether Extraction Method โดยใช้เครื่อง Soxtherm
- การวิเคราะห์เถ้าใช้เครื่อง Electric Muffle Furnace
- การวิเคราะห์ความชื้นใช้เครื่อง Hot air oven
- การวิเคราะห์เส้นใยใช้วิธี Acid Alkali digestion

3.6 การเตรียมหน่วยทดลอง การจัดการคุณภาพน้ำ สัตว์ทดลอง และเลี้ยงสัตว์ทดลอง

3.6.1 การเตรียมหน่วยทดลอง และการจัดการคุณภาพน้ำ

เตรียมตู้ทดลองและจัดการคุณภาพน้ำที่ใช้ในการทดลอง โดยใช้ตู้กระจกขนาด 32×52×30 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่มีระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด ใช้ระบบปั๊มน้ำด้วยอากาศ โดยใช้

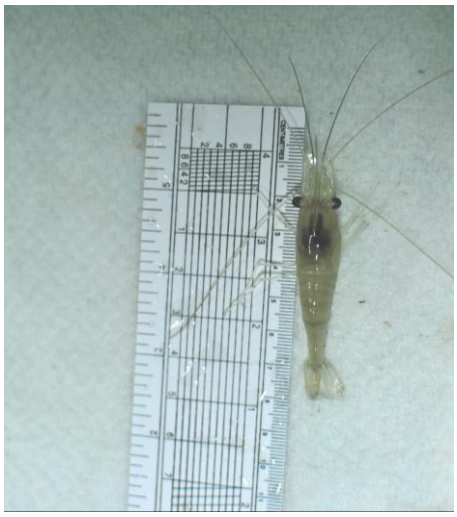
อากาศดันน้ำเข้าสู่ระบบผ่านตัวกรองชีวภาพที่ประกอบด้วยเปลือกหอย ซากปะการัง หนา 2-3 นิ้ว และใยสังเคราะห์ ให้อากาศตลอดเวลา ปริมาณน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงประมาณ 40 ลิตร โดยน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงมาจากน้ำประปาที่ไล่คลอรีนออกหมดแล้วประมาณ 1 อาทิตย์ และมีการให้อากาศตลอดเวลา อุณหภูมิของน้ำ 26-28 องศาเซลเซียส กำจัดตะกอนและสิ่งแขวนลอยต่างๆ ก่อนเริ่มการทดลองเลี้ยง และภายในตู้กระจกมีการกั้นระบบย่อยออกเป็น 8 ช่อง โดยแยกระบบกรอง หัวทรายเพื่อให้อากาศตลอดเวลา และกุ้งก้ามกรามวัยรุ่น ออกจากกันในแต่ละช่องเป็นส่วนๆ ซึ่งใช้ตาข่ายที่มีรูให้น้ำไหลผ่านภายในตู้ได้อย่างทั่วถึง และสูงเท่าระดับความสูงของตู้กระจก เพื่อป้องกันกุ้งไต่หากันระหว่างตู้ (รูปที่ 3-2) ดังนี้



รูปที่ 3-2 ตู้กระจกที่มีระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด และสัตว์ทดลอง

3.6.2 สัตว์ทดลอง

การทดลองนี้นำกุ้งก้ามกรามวัยรุ่น จำนวน 600 ตัว จากฟาร์มเอกชน จังหวัดราชบุรี ปรับสภาพกุ้งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร โดยให้อาหารสูตรควบคุม วันละ 3 เวลา (9.00, 13.00 และ17.00 น.) ในปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัว โดยเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน วันละ 50 เปอร์เซ็นต์ ก่อนให้อาหารมื้อแรก 2 ชั่วโมง เมื่อปรับสภาพกุ้งแล้วจึงสุ่มคัดขนาด กุ้งที่แข็งแรงสมบูรณ์ลงในหน่วยทดลอง ชั่งน้ำหนัก วัดความยาว (รูปที่ 3-3) โดยมีน้ำหนักและความยาวเริ่มต้นเฉลี่ย 4.29±0.22 กรัม และ6.54±0.25 เซนติเมตร ตามลำดับ



รูปที่ 3-3 การชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของกุ้งก้ามกรามวัยรุ่น

3.6.3 การเลี้ยงสัตว์ทดลอง

โดยสุ่มกุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงปรับสภาพในถังไฟเบอร์กลาส ลงเลี้ยงในตู้กระจกที่เตรียมไว้ ตู้ละ 6 ตัว โดยใช้อาหารทดสอบที่แตกต่างกัน 5 สูตร ที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมอาหารทดลองและการผลิตอาหาร ในแต่ละสูตรอาหาร ทำ 4 ซ้ำ ให้อาหารวันละ 3 เวลา (9.00, 13.00 และ17.00 น.) บันทึกปริมาณการให้อาหารทุกๆ สัปดาห์ ให้อากาศอย่างเพียงพอตลอดการทดลอง ดูดตะกอนทุกวัน เปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ วันเว้นวัน ตรวจสอบการเติบโตและการรอดในแต่ละตู้ทุก 4 สัปดาห์ จนครบ 16 สัปดาห์ ระหว่างเลี้ยงบันทึกผลคุณภาพน้ำทุก 7 วัน ค่าที่ตรวจวัด ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ อัคคาไลนิตี้ ปริมาณไนไตรท์ และปริมาณแอมโมเนียม

3.6.4 ประเมินผลการเลี้ยง

- น้ำหนักเฉลี่ย = น้ำหนักรวมของน้ำหนักกุ้งทุกตัว / จำนวนตัว
- ความยาวเฉลี่ย = ความยาวรวมของความยาวกุ้งทุกตัว / จำนวนตัว
- น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว) = น้ำหนักสุดท้าย (กรัม) – น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)
- อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวัน $= \dfrac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)} \times \text{จำนวนวันที่เลี้ยง (วัน)}}$
- ปริมาณอาหารที่กิน $= \dfrac{\text{น้ำหนักอาหารทั้งหมดที่กุ้งกิน}}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}$
- อัตราการแลกเนื้อ $= \dfrac{\text{อาหารที่กุ้งได้รับทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}$

- อัตราการรอด (เปอร์เซ็นต์) $= \frac{\text{จำนวนกุ้งที่เหลือเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อเริ่มการทดลอง}}$

3.6.5 วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ระหว่างการดำเนินการทดลองเลี้ยงกุ้ง ได้ทำการวัด อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ อัคคาไลนิตี้ ปริมาณไนไตรท์ และปริมาณแอมโมเนียม ก่อนให้อาหารมื้อแรก และเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อตรวจสอบคุณภาพน้ำในแต่ละเดือนโดย ตรวจวัดปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ และอุณหภูมิของน้ำ ด้วยเครื่อง YSI model 57 (มิลลิกรัมต่อลิตร) ตรวจสอบค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ด้วยเครื่อง pH meter รุ่น HI 8424 microcomputer ตรวจสอบปริมาณแอมโมเนียม อัคคาไลนิตี้ และไนไตรท์ ด้วยชุดทดสอบคุณภาพน้ำ (test kit) Aqua-VBC ของคณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7 ศึกษาระบบภูมิคุ้มกันก่อนการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639

หลังการเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 16 สัปดาห์ สุ่มกุ้ง 3 ตัวจากแต่ละชุดการทดลองเพื่อตรวจวัดค่าต่างๆ ดังต่อไปนี้ นำไปตรวจนับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวม (total haemocyte count) วิเคราะห์หากิจกรรมของฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ทุกสัปดาห์ ตรวจวัดวันที่ 7, 14, 21 และ28 และหาปริมาณโปรตีนรวม

3.7.1 ตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งก้ามกราม (total haemocyte count)

โดยเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งจากการเจาะบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 27 G ผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 0.6 มิลลิลิตร (อัตราส่วนเลือดกุ้งต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 1:2) ผสมให้เข้ากันเบาๆ หยดเลือดปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ haemacytometer นับจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมดด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า คำนวณปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้ มีหน่วยเป็น เซลล์ต่อมิลลิตร

3.7.2 ประเมินผลการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยคำนวณปริมาณเม็ดเลือด

ปริมาตรของ Haemacytometer = กว้าง×ยาว×ลึก

จำนวนเซลล์เม็ดเลือด/ mm^3 = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้

จำนวนเซลล์เม็ดเลือด/ ml = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้× 10^4× ค่า dilution

3.7.3 ตรวจวิเคราะห์หากิจกรรมของฟีนอลออกซิเดส ด้วยวิธี MBTH Assay

โดยเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งจากการเจาะบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 27 G ผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 0.6 มิลลิลิตร (อัตราส่วนเลือดกุ้งต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 1:2) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,600 เวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนเซลล์เม็ดเลือดที่ได้มาละลายในสารละลายคาโคดีเลท-บัฟเฟอร์ (cacodylate buffer, CAC buffer) pH 7.4 แล้วทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตกโดยนำไปแช่เข็งแล้วทำให้ละลายทันทีเป็นจำนวน 2 รอบ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ มาหมุนเหวี่ยงที่ 15,900 g เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสซึ่งเป็น HLS นำมาวิเคราะห์ระดับแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส และปริมาณโปรตีนทันที โดยนำ HLS (hemocyte lysate supernatant) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาบ่มในสารละลาย CAC buffer 30 ไมโครลิตร ในไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม เวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลายทริปซิน 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย MBTH (3-Methyl-2-Benzothaizolinone Hydrazone) เข้มข้น 20.7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร สารละลาย CAC buffer ปริมาตร 55 ไมโครลิตร และสารละลาย L-DOPA (L-dihydroxyphenylalanine) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เวลา 15 นาที จากนั้นเติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 2.4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปต่อนาทีต่อมิลลิกรัมของโปรตีน (Smith and Soderhall, 1991)

3.7.4 ประเมินผลการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยการคำนวณกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดส (phenaoloxidase activity)

หนึ่งหน่วยของเอนไซม์ = ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น 0.001/ 1 นาที/ มิลลิกรัมโปรตีน

3.7.5 ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนรวม (total protein assay)

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี (dye-binding assay) ปิเปต HLS 160 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม เติมน้ำยาทดสอบโปรตีนสำเร็จรูป (Bio-Rad) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ภายใน 1 ชั่วโมง โดยใช้สารละลาย CAC buffer แทน HLS ตามขั้นตอนขั้นต้น เป็น blank (Bradford, 1976) และคำนวณโปรตีนเป็น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับเส้นกราฟโปรตีนมาตรฐาน BSA (ภาคผนวก ง)

3.8 ศึกษาระบบภูมิคุ้มกันหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639

3.8.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

เตรียม *V. harveyi* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย ที่เตรียมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เก็บเซลล์สด และหาจำนวน *V. harveyi* ในเซลล์สด 1 กรัม ด้วยวิธี Total plate count โดยใช้อาหารแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส เพื่อใช้คำนวณ *V. harveyi* ที่ต้องการเติมในน้ำเลี้ยงกุ้ง โดยปรับ *V. harveyi* ให้มีความเข้มข้น 10^7 CFU/ml (ความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 96 ชั่วโมง) ในน้ำเลี้ยงกุ้ง

3.8.2 ทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (50 เปอร์เซ็นต์ lethal concentration ; LC_{50}) (Greenberg *et al*., 1992)

กุ้งก้ามกรามจำนวน 90 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 10.24 กรัม แบ่งเลี้ยงในถังพลาสติก ในถังพลาสติกขนาด 38×45×28 (กว้าง×ยาว×สูง) เซนติเมตร ในน้ำเลี้ยงกุ้ง ปริมาตร 40 ลิตร ให้อากาศตลอดเวลา ถังละ 5 ตัว จำนวน 18 ถัง แยกเป็น 6 กลุ่มๆละ 3 ซ้ำ เติม *V. harveyi* ที่เตรียมจากข้อ 3.8.1 ลงในน้ำเลี้ยงกุ้งปรับให้มีความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับใน 5 กลุ่มการทดลอง และอีก 1 กลุ่มเป็นกลุ่มควบคุม ไม่มีการเติม *V. harveyi* เก็บตัวอย่างน้ำจากทุกถังหลังการเติม *V. harveyi* เพื่อหาจำนวน *V. harveyi* ที่แน่นอนในน้ำด้วยวิธี Total plate count โดยใช้อาหารแข็งไทโอซัลเฟตซิ-เตรทบายซอลท์ซูโครส

ตลอดการทดลอง กุ้งก้ามกรามทุกกลุ่มการทดลองจะได้รับอาหารสำเร็จรูปชนิดเดียวกัน โดยให้อาหารสูตรควบคุม วันละ 3 เวลา (9.00, 13.00 และ17.00 น.) ต่อวัน บันทึกจำนวนกุ้งที่ตายในแต่ละกลุ่ม ที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ96 ชั่วโมง (Chen *et al*., 1996)

3.8.3 ศึกษาระบบภูมิคุ้มกันหลังการชักนำให้เกิดโรค

นำกุ้งที่เหลือจากตู้กระจกมาชักนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ที่ปรับความเข้มข้น 1×10^7 CFU/ml (ปริมาณความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 96 ชั่วโมง) ในน้ำเลี้ยงกุ้งแล้ว ในถังขนาด 38×45×28 (กว้าง×ยาว×สูง) เซนติเมตร จากนั้นทำการตรวจนับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวม และวิเคราะห์หากิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสทุกวัน ระยะเวลา 4 วัน ตรวจวัดที่ 24, 48, 72 และ96 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดการทดลองสูตรควบคุม

3.8.4 **ติดตามการตายสะสม** (cumulative mortality)

บันทึกผลการตายของกุ้งก้ามกราม จากแต่ละชุดการทดลอง ที่ 24, 48, 72 และ96 ชั่วโมง

3.8.5 **ทดสอบหลังการชักนำให้เกิดโรค**

โดยการสุ่มตัวอย่างกุ้งที่ตาย มาทดสอบยืนยันผลว่ากุ้งตายเนื่องจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 โดยการแยกเชื้อจาก เฮปพาโทแพนเครียส (hepatopancreas) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 18-24 ชั่วโมง เป็นการยืนยันว่ากุ้งตายโดยแบคทีเรียชนิดนี้จริง

3.9 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

รวบรวมและนำข้อมูลที่ได้จากการวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของส่าเบียร์ ต่อการเติบโตของกุ้งก้ามกรามระยะวัยรุ่น การประเมินผลทางสถิติ โดยวิธี Analysis of variance (one-way) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Duncan's new Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 คุณภาพอาหารทดลอง

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลองวิเคราะห์โดยใช้วิธี proximate analysis (ตารางที่ 4-1) พบว่าระดับโปรตีนมีค่าใกล้เคียงกับสูตรอาหารที่กำหนด โดยอาหารทดลองมีค่า โปรตีน 38.85-38.95 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 8.07-8.58 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 10.44-11.36 เปอร์เซ็นต์ เส้นใย 2.35-2.57 เปอร์เซ็นต์ และความชื้น 7.44-8.31 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเสริมส่าเบียร์ 0, 0.2, 0.5, 1 และ2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในอาหารทั้ง 5 สูตร

ตารางที่ 4-1 คุณภาพของอาหารทดลอง 5 สูตร

สารอาหาร (ร้อยละ)	สูตรอาหารเสริม (เปอร์เซ็นต์)				
	สูตรควบคุม	ส่าเบียร์ 0.2	ส่าเบียร์ 0.5	ส่าเบียร์ 1	ส่าเบียร์ 2
โปรตีน	38.85±0.20	38.87±0.28	38.89±0.11	38.83±0.12	38.95±0.22
ไขมัน	8.07±0.04	8.25±0.06	8.46±0.07	8.52±0.07	8.58±0.05
เถ้า	10.44±0.23	10.46±0.23	10.58±0.04	11.25±0.05	11.36±0.05
เส้นใย	2.35±0.02	2.38±0.05	2.43±0.05	3.55±0.05	2.57±0.10
ความชื้น	7.44±0.05	7.89±0.07	7.86±0.08	8.29±0.09	8.31±0.21

4.2 คุณสมบัติน้ำ

การวิเคราะห์ข้อมูลคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้ง เป็นเวลา 16 สัปดาห์ ตรวจสอบผลทุกสัปดาห์ พบว่า อุณหภูมิน้ำ มีค่าอยู่ระหว่าง 25.9-27.9 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดเป็นด่าง มีค่าอยู่ระหว่าง 7.83-8.16 ออกซิเจนละลายในน้ำ มีค่าอยู่ระหว่าง 7.1-8.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนไตรต์ มีค่าอยู่ระหว่าง 0-0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร แอมโมเนีย มีค่าอยู่ระหว่าง 0-0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และอัคคาไลนิตี้ มีค่าอยู่ระหว่าง 90-120 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4-2) จากการเก็บข้อมูลคุณภาพน้ำตั้งแต่เดือนกันยายน 2554 จนถึง เดือนธันวาคม 2554

ตารางที่ 4-2 คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามระยะวัยรุ่น เวลา 16 สัปดาห์

พารามิเตอร์	เดือน			
	กันยายน	ตุลาคม	พฤศจิกายน	ธันวาคม
อุณหภูมิ (°ซ)	27.9-28.5	26.9-28.0	25.9-28.1	25.2-27.5
ความเป็นกรดเป็นด่าง	7.83-8.16	7.89-8.03	7.98-8.07	7.95-8.02
ออกซิเจนละลายน้ำ (มก./ลิตร)	7.10-7.60	7.50-8.10	7.30-8.20	7.90-8.10
ไนไตรต์ (มก./ลิตร)	0.00-0.25	0.00-0.25	0.00-0.30	0.00-0.25
แอมโมเนีย (มก./ลิตร)	0.05-0.10	0.05-0.10	0-0.25	0.04-0.12
อัลคาไลนิตี้ (มก./ลิตร)	110-120	110-120	90-120	90-110

4.3 การเจริญเติบโตและการรอด

4.3.1 น้ำหนักเฉลี่ย

กุ้งก้ามกรามน้ำหนักตัว เริ่มต้นเฉลี่ยเท่ากับ 4.29±0.22 กรัม เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0, 0.2, 0.5, 1 และ2 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ย (ตารางที่ 4-3 และภาคผนวก ค ภาพที่ 1) เมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ยสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0, 0.2, 0.5 และ2 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 2 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.2 และ0.5 เปอร์เซ็นต์ แต่มีค่าสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งนี้กุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0, 0.2 และ0.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

4.3.2 ความยาวเฉลี่ย

กุ้งก้ามกรามความยาว เริ่มต้นเฉลี่ยเท่ากับ 6.54±0.25 เซนติเมตร เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0, 0.2, 0.5, 1 และ2 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวสุดท้ายเฉลี่ย (ตารางที่ 4-3 และภาคผนวก ค ภาพที่ 2) เมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ทั้ง 0, 0.2, 0.5, 1 และ2 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวสุดท้ายเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

4.3.3 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

กุ้งก้ามกรามมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 4-3) เมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 1เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0, 0.2, 0.5 และ2 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 2 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.2 และ0.5 เปอร์เซ็นต์ แต่มีค่าสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งนี้กุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0, 0.2 และ0.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

4.3.4 อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวัน

กุ้งก้ามกรามมีอัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 4-3) เมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0, 0.2, 0.5 และ2 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 2 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.2 และ0.5 เปอร์เซ็นต์ แต่มีค่าสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งนี้กุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0, 0.2 และ0.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

4.3.5 ปริมาณอาหารที่กิน

กุ้งก้ามกรามมีค่าปริมาณอาหารที่กินเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 4-3) เมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าปริมาณอาหารที่กินสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0, 0.2, 0.5 และ2 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 2 เปอร์เซ็นต์ มีค่าปริมาณอาหารที่กินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แต่มีค่าสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งนี้กุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0, 0.2 และ0.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าปริมาณอาหารที่กินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

4.3.6 อัตราการแลกเนื้อ

กุ้งก้ามกรามมีอัตราการแลกเนื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 4-3) เมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการแลกเนื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 2 เปอร์เซ็นต์ แต่มีค่าดีกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0, 0.2 และ0.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งนี้กุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0, 0.2 และ0.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการแลกเนื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

4.3.7 อัตราการรอด

กุ้งก้ามกรามมีอัตราการรอดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 4-3) เมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0, 0.2, 0.5, 1 และ2 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 4-3 ผลการทดลองของกุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ต่างกัน 5 ระดับ 16 สัปดาห์

ประเมินผลการเลี้ยง	สูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ (เปอร์เซ็นต์)				
	สูตรควบคุม	ส่าเบียร์ 0.2	ส่าเบียร์ 0.5	ส่าเบียร์ 1	ส่าเบียร์ 2
น้ำหนักตัวเริ่มต้น(ก.)	4.29±0.22	4.29±0.22	4.29±0.22	4.29±0.22	4.29±0.22
น้ำหนักตัวสุดท้าย(ก.)	8.82±0.37^{a}	9.67±0.19^{ab}	9.69±0.20^{ab}	12.53±0.91^{c}	10.46±0.15^{b}
ความยาวเริ่มต้น(ซ.ม.)	6.54±0.25	6.54±0.25	6.54±0.25	6.54±0.25	6.54±0.25
ความยาวสุดท้าย(ซ.ม.)	9.09±0.26	9.21±0.36	9.23±0.38	10.17±0.68	9.92±0.45
น้ำหนักที่เพิ่ม(ก./ตัว)	4.53±0.34^{a}	5.38±0.16^{ab}	5.40±0.17^{ab}	8.24±0.88^{c}	6.17±0.12^{b}
อัตราเติบโตสัมพัทธ์(ก./วัน)	0.0088±0.006^{a}	0.0105±0.003^{ab}	0.0105±0.005^{ab}	0.016±0.01^{c}	0.012±0.002^{b}
ปริมาณอาหารที่กิน	8.9±0.52^{a}	10.16±0.83^{ab}	10.18±0.85^{ab}	12.87±1.25^{c}	11.01±0.65^{b}
อัตราการแลกเนื้อ	2.08±0.19^{b}	1.96±0.16^{b}	1.98±0.17^{b}	1.62±0.08^{a}	1.86±0.15^{ab}
อัตราการรอด(%)	86.02±1.99	88.69±2.30	88.71±2.31	87.35±4.15	86.00±6.42

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 95 เปอร์เซ็นต์

4.4 ระบบภูมิคุ้มกันก่อนการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639

4.4.1 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวม (total hemocytes)

ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมของกุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงสุดแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 4-4) กับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรอื่นๆ ในทุกสัปดาห์

ตารางที่ 4-4 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวม (×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ ก่อนการชักนำให้เกิดโรค

สูตรอาหาร	ช่วงเวลาการเลี้ยงแต่ละสัปดาห์			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
สูตรควบคุม	5.72±3.41^b	3.40±2.18^b	4.01±2.57^b	4.05±2.25^b
0.2% ส่าเบียร์	6.65±3.27^b	4.93±4.47^b	5.42±2.16^b	5.97±2.05^b
0.5% ส่าเบียร์	7.66±3.28^b	5.94±4.48^b	6.43±2.17^b	6.98±2.06^b
1.0% ส่าเบียร์	16.22±9.39^a	9.00±4.94^a	8.88±3.97^a	10.94±4.48^a
2.0% ส่าเบียร์	7.67±3.29^b	5.95±4.49^b	6.44±2.18^b	6.99±2.07^b

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 95 เปอร์เซ็นต์

4.4.2 **แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส** (phenoloxidase activity)

แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตร ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) ในสัปดาห์ที่ 1 อย่างไรก็ตามในสัปดาห์ที่ 2 พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีแอคทิวิตี้ของฟีนอลออกซิเดสแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) จากกุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.2, 0.5 และ2 เปอร์เซ็นต์ สัปดาห์ที่ 3 พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.2, 0.5, 1 และ2 เปอร์เซ็นต์ มีแอคทิวิตี้ของฟีนอลออกซิเดสแตกต่างทางสถิติกับสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) สัปดาห์ที่ 4 พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีแอคทิวิตี้ของฟีนอลออกซิเดสที่สูงสุดแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 4-5) กับอาหารทดลองชุดอื่นๆ

ตารางที่ 4-5 แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg protein) ของกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ ก่อนการชักนำให้เกิดโรค

สูตรอาหาร	ช่วงเวลาการเลี้ยงแต่ละสัปดาห์			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
สูตรควบคุม	2834.71±535.12^a	3757.94±1710.53^b	3347.82±1068.21^b	3944.54±1180.63^b
0.2% ส่าเบียร์	5904.22±2274.4^a	8778.46±4308.39^{ab}	5510.62±1024.69^a	5008.98±942.25^b
0.5% ส่าเบียร์	5905.23±2275.5^a	8779.47±4309.40^{ab}	5511.63±1025.70^a	5009.99±943.26^b
1% ส่าเบียร์	6889.79±3917.44^a	10386.78±3810.36^a	6899.22±1509.35^a	7078.01±941.69^a
2% ส่าเบียร์	5905.24±2275.6^a	8779.48±4309.41^{ab}	5511.64±1025.71^a	5009.10±943.27^b

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 95 เปอร์เซ็นต์

4.5 ระบบภูมิคุ้มกันหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639

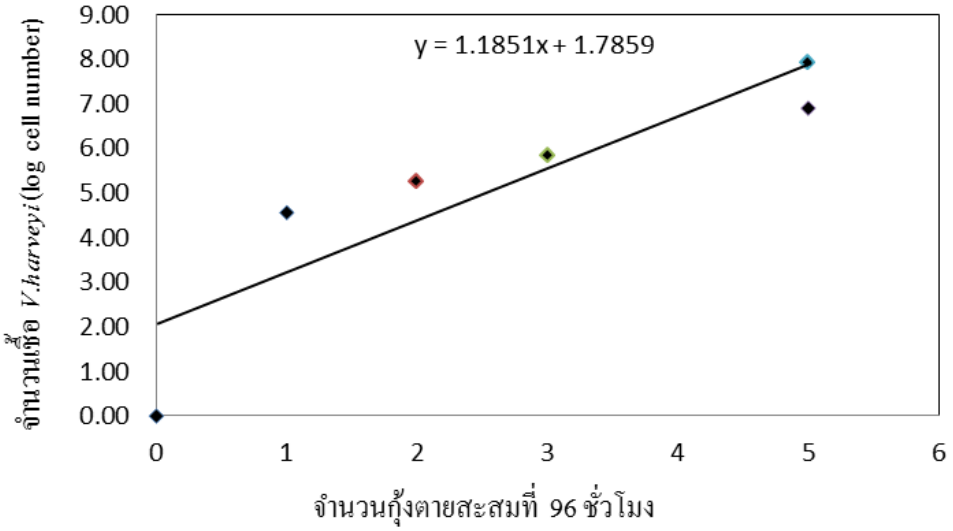
4.5.1 การหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50})

กุ้งที่ใช้ทดลองนี้มีน้ำหนักเฉลี่ย 10.24 กรัม ตรวจนับจำนวนกุ้งที่ตายในแต่ละกลุ่ม ความเข้มข้นของ *V. harveyi* นำไปวิเคราะห์หาค่า LC_{50} ได้ค่า LC_{50} ของ *V. harveyi* เท่ากับ 2.12×10^{4}, 9.73×10^{5}, 3.85×10^{6}, 4.30×10^{7} CFU/ml ที่ 24, 48, 72 และ96 ชั่วโมง ตามลำดับที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4-6 จำนวนกุ้งก้ามกรามวัยรุ่นที่ตายหลังใส่ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในน้ำเลี้ยงกุ้ง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

V. harveyi สายพันธุ์ 639	Log cell number	จำนวน (ตัว)	จำนวนกุ้งตายสะสม (ตัว)
			96 ชม.
2.12×10^{4}	4.56	5	1
9.73×10^{5}	5.27	5	2
3.85×10^{6}	5.85	5	3
4.30×10^{7}	6.90	5	5
4.57×10^{8}	7.93	5	5

นำค่า LC_{50} หาความสัมพันธ์กับเวลาต่างๆ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4-1



รูปที่ 4-1 แสดงค่าความเข้มข้นของเชื้อที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 4.72×10^{5} CFU/ml

4.5.2 **ปริมาณเม็ดเลือดรวม** (total hemocytes)

หลังการชักนำให้เกิดโรค (challenge test) ด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 พบว่า ในชั่วโมง ที่ 24 กับ ชั่วโมงที่ 72 กุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเม็ดเลือดรวมที่สูงสุดและแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารทดลองชุดอื่นๆ ทั้งนี้ ในชั่วโมงที่ 96 พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีปริมารเม็ดเลือดรวมสูงสุดแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) จากกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองชุดอื่นๆ และ กุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.2, 0.5 และ2 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเม็ดเลือดรวมที่สูงแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 4-6) กับกุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4-7 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ หลังการชักนำให้เกิดโรค

สูตรอาหาร	ช่วงเวลาหลังการให้เชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639			
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
สูตรควบคุม	2.48±1.47^{b}	2.09±1.72^{b}	2.1±1.21^{b}	1.93±1.34^{c}
0.2% ส่าเบียร์	3.55±1.53^{b}	4.95±2.13^{b}	3.33±1.51^{b}	4.10±1.51^{b}
0.5% ส่าเบียร์	4.56±1.54^{b}	5.96±2.14^{b}	4.34±1.52^{b}	5.11±1.52^{b}
1.0% ส่าเบียร์	6.12±1.91^{a}	7. 09±2.19^{a}	6.96±2.75^{a}	7.12±1.92^{a}
2.0% ส่าเบียร์	4.57±1.55^{b}	5.97±2.15^{b}	4.35±1.53^{b}	5.12±1.53^{b}

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 95 เปอร์เซ็นต์

4.5.3 **แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส** (phenoloxidase activity)

ในชั่วโมงที่ 24 กุ้งที่เลี้ยงอาหารทดลองทั้ง 5 สูตร มีแอคทิวิตี้ของฟีนอลออกซิเดสไม่แตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) ชั่วโมงที่ 48 พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีแอคทิวิตี้ของฟีนอลออกซิเดสแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) กับสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.2, 0.5 และ2 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) และชั่วโมงที่ 72 กับชั่วโมงที่ 96 พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีแอคทิวิตี้ของฟีนอลออกซิเดส สูงสุดแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารทดลองชุดอื่นๆ และสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.2, 0.5 และ2 เปอร์เซ็นต์ มีแอคทิวิตี้ของฟีนอลออกซิเดสที่สูงแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 4-7) กับกุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4-8 แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg protein) ของกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ หลังการชักนำให้เกิดโรค

สูตรอาหาร	ช่วงเวลาหลังการให้เชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639			
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
สูตรควบคุม	2460.71±972.71[a]	1848.66±1251.10[b]	2050.92±492.57[c]	2152.25±251.94[c]
0.2% ส่าเบียร์	3914.05±845.21[a]	4067.46±422.60[ab]	3348.76±335.63[b]	3761.44±543.82[b]
0.5% ส่าเบียร์	3915.06±846.22[a]	4068.47±423.61[ab]	3349.77±336.64[b]	3762.45±544.83[b]
1% ส่าเบียร์	5138.15±432.93[a]	5066.85±304.89[a]	5111.57±342.20[a]	5646.66±336.41[a]
2% ส่าเบียร์	3915.07±846.23[a]	4068.48±423.62[ab]	3349.78±336.65[b]	3762.46±544.84[b]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 95 เปอร์เซ็นต์

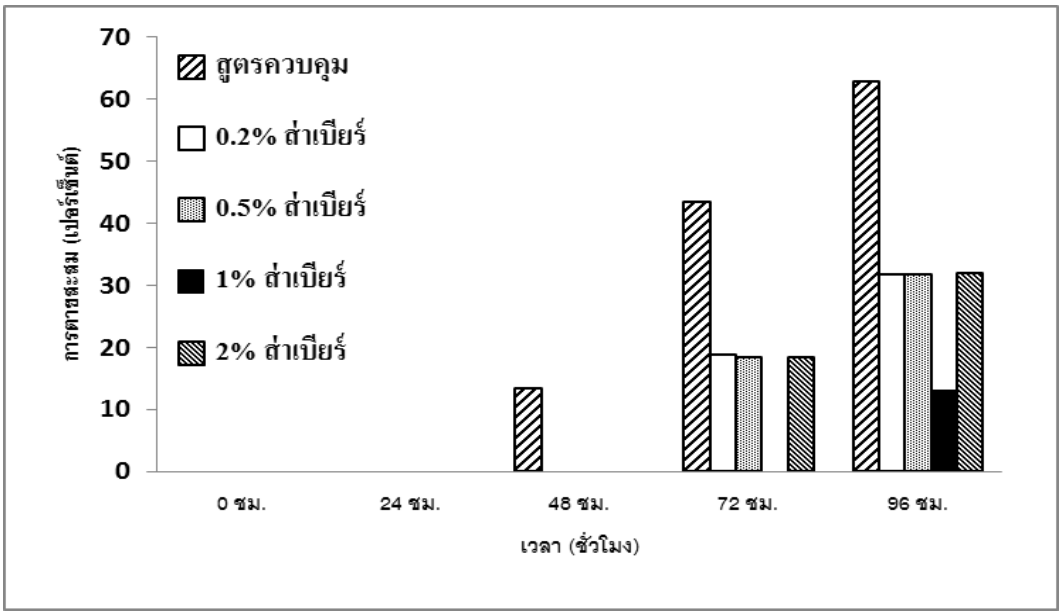
4.5.4 **การตายสะสม** (cumulative mortality)

หลังการชักนำให้เกิดโรค (challenge test) ด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 พบว่าในระยะเวลา 96 ชั่วโมง กุ้งที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีการตายสะสมที่น้อยที่สุดแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารทดลองชุดอื่นๆ และสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.2, 0.5 และ2 เปอร์เซ็นต์ มีการตายสะสมแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 4-8 ภาพที่ 4-2) กับสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4-9 การตายสะสม (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ระยะเวลา 96 ชั่วโมง

สูตรอาหาร	การตายสะสม (เปอร์เซ็นต์)
สูตรควบคุม	63.00±0.50[c]
0.2% ส่าเบียร์	31.75±9.84[b]
0.5% ส่าเบียร์	31.85±9.85[b]
1% ส่าเบียร์	13.00±0.50[a]
2% ส่าเบียร์	31.95±9.86[b]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 95 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4-2 กราฟแสดงการตายสะสม (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเวลา 4 วัน (24, 48, 72 และ96 ชั่วโมง)

4.5.5 การทดสอบหลังการชักนำให้เกิดโรค

สุ่มกุ้งตัวอย่างที่ตาย มาทดสอบยืนยันผลว่ากุ้งตายเนื่องจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 โดยการแยกเชื้อจาก เฮปพาโทแพนเครียส (hepatopancreas) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอ-ซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส (TCBS) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 18-24 ชั่วโมง พบว่าเกิดโคโลนีสีเขียวของ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นการยืนยันว่ากุ้งตายด้วยแบคทีเรียชนิดนี้จริง

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

5.1 อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตาย

จากการทดลองเลี้ยงกุ้งก้ามกรามด้วยอาหารเสริมส่าเบียร์ต่างกัน 5 ระดับคือ 0, 0.2, 0.5, 1 และ2 เปอร์เซ็นต์ ในกุ้งก้ามกรามวัยรุ่นที่มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 4.29±0.22 กรัม ความยาวเริ่มต้นเฉลี่ย 6.54±0.25 เซนติเมตร เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริมส่าเบียร์ที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการเจริญเติบโตดีที่สุดในด้านน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ ปริมาณอาหารที่กิน และอัตราการแลกเนื้อ มีค่าดีกว่ากุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.2, 0.5 และ2 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) อัตราการรอดพบว่ากุ้งทุกชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) รวมทั้งมีแนวโน้มการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามระดับส่าเบียร์ที่เพิ่มขึ้นในอาหาร แต่ลดลงที่อาหารเสริมส่าเบียร์ระดับ 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเป็นผลจากปริมาณอาหารที่กินต่อตัว โดยกุ้งที่ได้รับอาหารที่เสริมส่าเบียร์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่ามากที่สุด และปริมาณอาหารที่กินต่อตัวมีค่าต่ำสุดในกุ้งชุดที่ได้รับสูตรอาหารที่ไม่ได้เสริมส่าเบียร์ Akiyama *et al*. (1991) กล่าวว่าส่าเบียร์ (บริวเวอร์ยีสต์) มีข้อจำกัดที่ส่งผลต่อความน่ากิน (palatability) อันเนื่องจากมีกลิ่นฉุนเฉพาะตัวรวมไปถึงรสชาติของส่าเบียร์ (บริวเวอร์ยีสต์) ที่ทำให้เกิดความขม และจากการสังเกตพบว่ากุ้งก้ามกรามพยายามกินอาหารโดยกุ้งจะกัดแทะอาหารแล้วปล่อยทิ้ง แล้วจับอาหารมากินใหม่ ซึ่งเห็นได้ว่าปัจจัยจากรสชาติอาหารมีความสำคัญมากในอาหารสำหรับกุ้งก้ามกราม จากผลการทดลองครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าการเสริมส่าเบียร์ในอาหารด้วยปริมาณที่เหมาะสมส่งผลให้กุ้งก้ามกรามมีการเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการใช้ส่าเบียร์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารกุ้งก้ามกรามใช้อาหารเสริมส่าเบียร์ 0, 2, 4 และ6 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมส่าเบียร์ 4 เปอร์เซ็นต์ มีค่าดีที่สุดทั้งในด้านการเจริญเติบโตและอัตราการรอด (สุพัตร์ ศรีพัฒน์ และคณะ, 2551) ส่าเบียร์มีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของกุ้งก้ามกรามวัยรุ่น จากงานวิจัยฉบับดังกล่าวสามารถบอกถึงการเสริมส่าเบียร์ในระดับที่เหมาะสมสามารถกระตุ้นให้เกิดการเติบโตที่สูงขึ้นได้ แต่ถ้าใช้ในระดับที่มากเกินไปก็จะส่งผลเสียต่อการเติบโตของสัตว์ทดลองได้ และสอดคล้องกับการศึกษาการเสริมยีสต์ในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* มีผลช่วยให้การเจริญเติบโตดีขึ้น (Sung *et al*., 1994)

งานวิจัยที่เกี่ยวกับผลของการเสริมส่าเบียร์ต่อการเติบโตของสัตว์น้ำอื่น ได้แก่ การศึกษาการเสริมส่าเบียร์ (บริวเวอร์ยีสต์) พบว่าปฏิสัมพันธ์ต่อการเติบโตจำเพาะโดยความยาวเปลือกและน้ำหนัก ของหอยหวานระยะลงพื้น *Babylonia areolata* ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมส่าเบียร์ (บริว-เวอร์ยีสต์) ที่ 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงสุด (ธรรมรัตน์ วาจาสัตย์, 2553) การศึกษาผลของส่าเบียร์ (บริวเวอร์ยีสต์) ของหอยหวานระยะวัยรุ่น *Babylonia areolata* เมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน พบว่าอาหารผสมส่าเบียร์ (บริวเวอร์ยีสต์) ที่ 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าการเติบโตโดยน้ำหนักเฉลี่ยในหอยหวานขนาดตลาดสูงกว่าชุดควบคุม (ชัชรียา เชยชม, 2551) การศึกษาผลของส่าเบียร์ (บริวเวอร์ยีสต์) ของปลากระพง *Oreochromis niloticus* พบว่าอาหารผสมส่าเบียร์ (บริวเวอร์ยีสต์) ที่ระดับ 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ สามารถส่งเสริมให้การเติบโตของปลากระพงที่สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ธัชนนท์ พุ่มโภคัย, 2551) การศึกษาผลของส่าเบียร์ (บริวเวอร์ยีสต์) ชนิด *Saccharomyces cerevisiae* ของปลานิล *Oreochromis niloticus* พบว่าชุดการทดลองที่เสริมส่าเบียร์ (บริวเวอร์ยีสต์) มีการเติบโตสูงกว่าทุกกลุ่มการทดลอง (Lara-Flores *et al*., 2003) และสุดท้ายการศึกษาผลการเสริมส่าเบียร์ (บริวเวอร์ยีสต์) ชนิด *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหารที่ระดับ 0, 0.25, 0.5, 1, 2 และ5 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงปลานิล *Oreochromis niloticus* พบว่าอาหารที่เสริมส่าเบียร์ (บริวเวอร์ยีสต์) ที่ระดับปริมาณ 1-5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถส่งเสริมให้ปลานิลมีการเติบโตที่ดีขึ้น จากผลงานวิจัยดังที่กล่าวมานั้นสามารถสรุปได้ว่า ส่าเบียร์แห้ง (บริวเวอร์ยีสต์แห้ง) มีองค์ประกอบทางเคมีด้านโปรตีน 48 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งจะเห็นได้ว่าส่าเบียร์แห้ง (บริวเวอร์ยีสต์แห้ง) เป็นแหล่งโปรตีนที่ดี (Dziezak, 1987) ส่าเบียร์แห้ง (บริวเวอร์ยีสต์แห้ง) เป็นแหล่งของวิตามินโดยเฉพาะวิตามินบี 1 วิตามินบี 2 และไนอาซิน และยังประกอบไปด้วยกรดอะมิโนในปริมาณที่สูง (ธีรวุฒิ ฤทธิ์เดชา, 2544) จึงเป็นที่มาของการนำส่าเบียร์แห้ง (บริวเวอร์ยีสต์แห้ง) มาใช้แทนอาหารในการผลิตอาหารสัตว์น้ำหลายชนิด และมีศักยภาพที่สามารถใช้แทนปลาป่นได้ด้วย (Oliva Teles and Goncalves, 2001)

ในงานวิจัยนี้พบว่า การให้อาหารเสริมส่าเบียร์ที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการทดลองมีค่าดีกว่ากุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.2, 0.5, 2 เปอร์เซ็นต์ และสูตรอาหารที่ไม่ได้เสริมส่าเบียร์ ในด้านการเจริญเติบโตและอัตราการรอด อาจเนื่องจากองค์ประกอบของส่า-เบียร์ (บริวเวอร์ยีสต์) เป็นการใช้เซลล์ของยีสต์ทั้งเซลล์ที่ยังมีส่วนประกอบของผนังเซลล์อยู่ซึ่งมีสารเบต้ากลูแคน ประมาณ 55-65 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักทั้งหมด (Klis *et al*., 2002)

5.2 ระบบภูมิคุ้มกันก่อนการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639

ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมและกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสของกุ้งก้ามกรามวัยรุ่น

ด้านระบบภูมิคุ้มกันก่อนการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 จากการทดลองเลี้ยงกุ้งก้ามกรามด้วยอาหารเสริมส่าเบียร์ต่างกัน 5 ระดับ พบว่าปริมาณเม็ดเลือดแดงรวมของกุ้งก้ามกรามมีแนวโน้มสูงขึ้น เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเสริมส่าเบียร์ที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารทดลองสูตรอื่นๆ ส่วนอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.2, 0.5 และ2 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีปริมาณเม็ดเลือดรวมไม่แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) กับสูตรอาหารที่ไม่ได้เสริมส่าเบียร์แต่มีแนวโน้มที่สูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยในกุ้งก้ามกราม โดยศึกษาผลการใช้ส่าเบียร์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารกุ้งก้ามกราม ที่ระดับอาหารเสริมส่าเบียร์ 0, 2, 4 และ6 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณเม็ดเลือดแดงรวมของกุ้งก้ามกรามมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมส่าเบียร์ และกุ้งที่ได้รับอาหารที่เสริมส่าเบียร์ 4 และ6 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกุ้งชุดที่ได้รับอาหารเสริมส่าเบียร์ 0 และ2 เปอร์เซ็นต์ (สุพัตร์ ศรีพัฒน์ และคณะ, 2551) แสดงให้เห็นว่าการเสริมส่าเบียร์ในอาหารด้วยปริมาณที่เหมาะสมส่งผลให้กุ้งก้ามกรามมีการเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น มลฤดี สิทธิพันธ์ และคณะ (2543) ระบุว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมที่มากขึ้นแสดงให้เห็นว่ากุ้งมีภูมิคุ้มกันโรคที่สูงขึ้น การที่กุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดที่สูงนั้น ส่งผลให้กุ้งสามารถกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวกุ้งได้อย่างเพียงพอ และมีประสิทธิภาพโดยอาศัยเซลล์เม็ดเลือด (hemocytes) ซึ่งจะทำหน้าที่กำจัดเซลล์สิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกาย โดยอาศัยกระบวนการกลืนทำลาย กระบวนการกักล้อม และระบบโปรพีโอในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมซึ่งเข้าสู่ร่างกายของกุ้ง (Smith and Ratcliffe, 1980)

Le Moullac *et al*. (1997) รายงานว่าเซลล์เม็ดเลือดกุ้งมี 3 แบบ ได้แก่ ไฮยาลินเซลล์ (Hyaline cells) เซมิแกรนูลาร์เซลล์ (Semi-granular cell) และแกรนูลาร์เซลล์ (Granular cell) ซึ่งเม็ดเลือดแต่ละชนิดทำหน้าที่แตกต่างกัน การตอบสนองของเซลล์ที่สำคัญในกุ้ง ได้แก่ การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่สามารถทำลายเชื้อโรคได้ ค่าการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีความสัมพันธ์กับปริมาณเม็ดเลือด การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ที่เกิดขึ้นในตัวกุ้งจะพบในเมม็ดเลือด 90 เปอร์เซ็นต์ และในน้ำเลือด 10 เปอร์เซ็นต์ (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2543) จึงเป็นเหตุผลให้ปริมาณเม็ดเลือดมีความสัมพันธ์กับการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยกุ้งที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูง เป็นกุ้งที่มีปริมาณเม็ดเลือดสูงด้วยเช่นกัน ทั้งนี้เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเกิดขึ้นโดยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดเป็นหลัก (Johansson *et al*., 2000; Sritunyalucksana and Soderhall, 2000; Adachi *et al*., 2003) จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่า

แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมส่าเบียร์ที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ มีแอคทิวิตี้ของฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุดแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารทดลองสูตรอื่นๆ ส่วนอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.2, 0.5 และ2 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสไม่แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) กับสูตรอาหารที่ไม่ได้เสริมส่าเบียร์แต่มีแนวโน้มที่สูงกว่า ดังนั้นการเสริมส่าเบียร์ในอาหารสำเร็จรูปกุ้งก้ามกรามครั้งนี้ส่งผลต่อการตอบสนองของภูมิคุ้มกันด้านเซลล์เม็ดเลือด และยังเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสอีกด้วย

5.3 ระบบภูมิคุ้มกันหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639

ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมและกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสของกุ้งก้ามกรามวัยรุ่น

ด้านระบบภูมิคุ้มกันหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 จากการทดลองเลี้ยงกุ้งก้ามกรามด้วยอาหารเสริมส่าเบียร์ต่างกัน 5 ระดับ พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมส่าเบียร์ที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเม็ดเลือดรวมและแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทดลองสูตรอื่นๆ ส่วนอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.2, 0.5 และ2 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเม็ดเลือดรวมและแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) กับสูตรอาหารที่ไม่ได้เสริมส่าเบียร์ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเม็ดเลือดรวมและแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสของกุ้งก่อนและหลังชักนำให้เกิดโรค พบว่าก่อนการชักนำให้เกิดโรคมีปริมาณที่สูงกว่าหลังการชักนำให้เกิดโรค และพบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมและแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมส่าเบียร์ที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสูงที่สุดแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารทดลองสูตรอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าแบคทีเรีย *V. Harveyi* สามารถผลิตสารย่อยสลายเม็ดเลือด hemolysin ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดลดลง และเป็นไปได้ว่าเมื่อกุ้งได้รับสิ่งแปลกปลอมเข้าไปในร่างกาย ทำให้เซลล์เม็ดเลือดในระบบไหลเวียนของร่างกายลดลง เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดจะเข้ามาล้อมจับสิ่งแปลกปลอม (Lee *et al*., 1995) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Smith and Soderhall (1983) ได้รายงานว่า กุ้งน้ำจืด *Astacus astacus* มีจำนวนเม็ดเลือดรวมลดลง เมื่อฉีดสิ่งแปลกปลอมเข้าไปในตัวสัตว์ และผลทั้งหมดแสดงถึงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอมในตัวกุ้ง และสอดคล้องกับการศึกษา ผลของบีตากลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ โดยให้อาหารที่ระดับ 0, 1, 2, 10 และ20 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 20 วัน หลังจากนั้นฉีดเชื้อไวรัส White Spot Syndrome Virus พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวมและแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส ลดลงหลังจากได้รับเชื้อ (Chang *et al*., 2003) เนื่องจากผนังเซลล์ของยีสต์ประกอบด้วยโพลิแซคคาไรด์ อยู่ 2 ใน 3 ของผนังเซลล์ส่วนที่เหลือเป็นโปรตีน ไขมัน เถ้า กลูโคซามีน และเอนไซม์ ชนิดของโพลิแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบได้แก่สารเบต้ากลูแคนและอัลฟาแมน

แนน (Manners *et al*., 1973) ยีสต์ชนิด *S. Cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีสารเบต้ากลูแคนเป็นองค์ประกอบประมาณ 29 เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์ซึ่งสามารถสกัดสารเบต้ากลูแคนเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำได้ (มลฤดี สิทธิพันธ์ และคณะ, 2543)

5.4 อัตราการรอดกุ้งก้ามกรามหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *V. Harveyi* สายพันธุ์ 639

อัตราการรอดของกุ้งก้ามกรามหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *V. Harveyi* สายพันธุ์ 639 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมส่าเบียร์ที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดที่สูงที่สุด คือ 87.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของกุ้ง *Penaeus japonicus* ที่ได้รับอาหารผสมบีตากลูแคน 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 วัน หรือระดับ 0.005 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 วัน มีค่าสูงขึ้นและมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อโรคได้สูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม (ITami *et al*., 1994) ส่วนอาหารอาหารเสริมส่าเบียร์ 0.2, 0.5 และ2 เปอร์เซ็นต์ และสูตรอาหารที่ไม่ได้เสริมส่าเบียร์ มีอัตราการรอด 67.95, 68.15, 68.25 และ37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากส่าเบียร์ (บริวเวอร์ยีสต์) ที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ เป็นสารจากธรรมชาติซึ่งทำให้ระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะ (non-specific immune responses) ในสัตว์น้ำบางชนิดสูงขึ้น (Siwicki, Anderson and Rumsey, 1994) ส่าเบียร์ (บริวเวอร์ยีสต์) เป็นแหล่งของกรดนิวคลีอิกและพอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิดรวมทั้ง กลูแคน (Yoshida *et al*., 1995) ซึ่งสาร β-1,3-กลูแคน มีผลทำให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มสูงขึ้นในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหลายชนิดได้แก่ African catfish, Atlantic salmon (Engated *et al*., 1992) rainbow trout (Jorgensen *et al*., 1993; Siwicki *et al*., 1994) ในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* (Thanardkit *et al*., 2002) Gatlin (2002) พบว่าเบต้ากลูแคนที่ได้จากส่าเบียร์ (บริวเวอร์ยีสต์) สามารถเพิ่มการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันให้สูงขึ้นและทำให้สัตว์น้ำหลายชนิดมีความทนทานต่อโรคมากขึ้น Hussein and Brasel (2001) รายงานว่าผลของสารเบต้ากลูแคนจะทำให้ร่างกายสร้างสารไซโตไคน์ (cytokines) ซึ่งเป็นเซลล์ที่สร้างในระบบภูมิคุ้มกัน โดยไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาทำหน้าที่สื่อสัญญาณให้เซลล์เม็ดเลือดขาวมารวมกันตรงตำแหน่งที่มีสิ่งแปลกปลอมและทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ส่าเบียร์ (บริวเวอร์ยีสต์) เป็นแหล่งของกรดนิวคลีอิก และพอลิแซกคาไลด์หลายชนิด รวมถึง β-1,3-กลูแคน ซึ่งสารนี้มีผลต่อการเพิ่มการทำงานของภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น Afican trout (Jorgensen *et al*., 1995) และกุ้ง *Penaeus monodon* (Thanardkit *et al*., 2002) ส่าเบียร์ (บริวเวอร์ยีสต์)จะมีผนังเซลล์ของยีสต์มีสารที่ไม่สามารถย่อยได้ที่สำคัญ ซึ่งอาจมีผลต่อสุขภาพของสัตว์น้ำหลายชนิดรวมทั้งกุ้งด้วย เช่น แมนโนส แมนโน-โปรตีน กลูโคสพอลิเมอร์ (กลูแคน) และไคติน (Cabib *et al*., 1982) รวมถึงกรดนิวคลีอีก (Rumsey *et al*., 1992) ในขณะที่ Rumsey *et al*. (1992) และ Cabib *et al*. (1982) กล่าวว่า

เซลล์ยีสต์จะประกอบด้วย กลูแคนประมาณ 7.7 เปอร์เซ็นต์ และไคติน 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกลูแคนสามารถช่วยเพิ่มการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด (innate immune) และซีรัมไลโซโซม (Jorgensen *et al*., 1993)

การศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าอาหารเสริมส่าเบียร์ที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันดีที่สุด ซึ่งทำให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนเลือดเพิ่มขึ้น และส่งผลให้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ ได้แก่การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงขึ้นด้วย สอดคล้องกับผลของปริมาณเม็ดเลือดรวม แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส และอัตราการรอดหลังการชักนำให้เกิดโรคดีที่สุด เนื่องจากเม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางในการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้ง โดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดและสารน้ำในน้ำเลือด ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายด้วยกระบวนการต่างๆ เช่น แอคทิวิตี้ของฟีนอลออกซิเดส ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย กระบวนการกลืนทำลาย การสร้างโนดูล การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม และการแข็งตัวของเลือด ดังนั้นหากพบว่าปริมาณเม็ดเลือดยิ่งมากขึ้น หมายถึง ประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันจะสูงขึ้นร่างกายก็จะสามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคที่จะเข้าสู่ร่างกายได้มีประสิทธิภาพด้วย (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2543) ดังนั้นจึงเห็นว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมมีความสัมพันธ์กับปริมาณแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส

5.5 คุณภาพน้ำ

พบว่ามีค่าเปลี่ยนแปลงของน้ำไม่มากนัก เนื่องจากบ่อทดลองมีระบบกรองระบบปิดที่ดีและให้ออกซิเจนตลอดเวลาการทดลอง ซึ่งช่วยในการบำบัดน้ำ ทำให้คุณภาพน้ำมีค่าใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง การที่ทำให้มีออกซิเจนมากเพียงพอเป็นการทำให้แอมโมเนีย (NH_3) เปลี่ยนเป็นไนไตรต์ (NO^{2-}) และไนเตรท (NO^{3-}) ตามลำดับ ซึ่งเมื่อสารอินทรีย์อยู่ในรูปของไนเตรทจะไม่มีพิษต่อกุ้ง ขณะที่แอมโมเนียและไนไตรต์จะมีผลต่อการเติบโตของกุ้ง และทำให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งลดลงและมีความเป็นพิษมากขึ้นถ้าเกินค่ามาตรฐาน

บทที่ 6

ข้อเสนอแนะ

6.1 การทดลองครั้งนี้ทำการทดลองโดยเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในตู้กระจกขนาด 32×52×30 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่มีระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด ประกอบด้วยตัวกรองชีวภาพอยู่ในตู้กระจกเลี้ยง แต่เมื่อเทียบกับสถานที่เลี้ยงกุ้งเพื่อการค้า เป็นบ่อดินขนาดใหญ่ ซึ่งจะให้ผลผลิตของกุ้งในด้านการเจริญเติบโต การรอด และระบบภูมิคุ้มกันดีกว่าเลี้ยงในระบบตู้กระจกและมีพื้นที่แคบ โดยเฉพาะระยะที่กำลังทำการลอกคราบ กุ้งตัวที่อ่อนแอกว่า จะถูกทำร้าย และเป็นเยื่อของตัวที่แข็งแรงกว่า ในระบบบ่อดินยังมีแพลงก์ตอนตามธรรมชาติซึ่งเป็นระบบที่เหมาะสมกับตัวกุ้งมากกว่าระบบแบบตู้กระจกทดลอง เป็นต้น

6.2 จากเหตุการณ์กุ้งกินพวกเดียวกันเอง (Carnibalism) โดยเฉพาะระยะที่มีการลอกคราบบ่อยครั้งในช่วงที่มีการพัฒนาการเจริญเติบโตของกุ้งทำให้เกิดปัญหาตัวอย่างกุ้งในการทำการทดลองมีไม่เพียงพอในการเก็บผลตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ข้อมูล จึงควรให้มีการเลี้ยงแยกกุ้งออกเป็นระบบเลี้ยงเดียว ดังแสดงในบทที่ 3 หัวข้อที่ 3.6.1 การเตรียมหน่วยทดลองและการจัดการคุณภาพน้ำ เพื่อป้องกันการกินพวกเดียวกันเองของกุ้งทดลอง

6.3 ควรทำการตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ที่นำมาจากเฮปพาโทแพนเครียส (hepatopancreas) ของกุ้งที่ตายหลังการชักนำให้เกิดโรค เพื่อเป็นการยืนยันการเกิดโรคของกุ้งก้ามกรามวัยรุ่น ว่ากุ้งตายโดยแบคทีเรียชนิดนี้จริง

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. 2546. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2543. ศูนย์สารเทศ, กรมประมง เอกสารฉบับที่ 4 (2546) : 91.

กิจการ ศุภมาตย์, จูอะดีพงศ์ พงศ์มณีรัตน์ และธนาวุฒิ กล่าวเกลี้ยง. 2543. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ : III ผลของบีต้ากลูแคน (Macrogard®) ต่อการเจริญเติบโต ภูมิคุ้ม กัน และความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์ 22 ฉบับพิเศษ : 677-687.

ชัชรียา เชยชม. 2551. ผลของบริวเวอร์ยีสต์และนิวคลีโอไทด์ในอาหารต่อการเติบโตและอัตรารอดของหอยหวาน *Babylonia areolata*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชนิกา คงสวัสดิ์. 2546. ผลของการใช้ยีสต์สกัดแทนปลาป่นบางส่วนในอาหารต่อการเติบโตของกุ้งกุลาดำ Penaeus monodun. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543. กุ้งไทย 2000. กรุงเทพมหานคร : เจริญรัฐการพิมพ์,

ธัชนนท์ พุ่มโคภัย. 2551. ผลของบริวเวอร์ยีสต์และนิวคลีโอไทด์ในอาหารต่อการเติบโตและอัตรารอดของปลากะพงขาว. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธรรมรัตน์ วาจาสัตย์. 2553. ผลของการเสริมบริวเวอร์ยีตส์ และบาซิลัส สายพันธุ์ S11 ต่อการเติบโต และการรอดตายของหอยหวาน *Babylonia areolata* วัยอ่อน. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธีรวุฒิ ฤทธิ์เดชา. 2544. การเลียนแบบกลิ่นรสเนื้อโดยใช้ยีสต์ออโตไลเสทเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมังสวิรัติ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พวงพร โชติกไกร. 2541. ยีสต์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร. จุลชีววิทยาของอาหารและนม, กรุงเทพมหานคร : แสงจันทร์การพิมพ์. หน้า 43-57.

มลฤดี สิทธิพันธ์, อรัญ หันพงศ์กิตติกูล และ กิจการ ศุภมาตย์. 2543. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และการใช้วัคซีนวัคซีนในกุ้งกุลาดำ: I. การสกัดสาร บีต้ากลูแคนจากยีสต์ และการประยุกต์ใช้ในกุลาดำ *Penaeus monodon*. วารสารสงขลานครินทร์ 22 ฉบับพิเศษ : 653-662.

วรัญญา พรเจริญ. 2549. การผลิตกลูแคนจากกากยีสต์หมักแอลกอฮอล์และสมบัติเชิงหน้าที่ของกลูแคน.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล เมตตา องค์สกุล และผกาพรรณ สิงห์ชัย. 2539. ผลการยับยั้งของ *Lactobacillus* spp. จากนมเปรี้ยวพร้อมดื่มที่มีต่อ *Staphylococus aureus, Salmonella typhimurium* และ *Escherichia coli* เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน. วารสารสงขลานครินทร์ 18 : 301-305.

ลิลา เรืองแป้น, ชัยวุฒิ สุดทองคง และยุบลรัตน์ ศรีแก้ว. 2540. แบคทีเรียเรืองแสงในแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ จังหวัดสงขลา. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. เอกสารวิชาการฉบับที่ 18.

สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549. ยีสต์ : ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุพัตร์ ศรีพัฒน์, อนุวัติ อุปนันไชย, เอกพจน์ เจริญศิริวงศ์ธนา, สุจิตรา สรสิทธิ์ และ พิสมัย สมสืบ. การใช้ยีสต์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารกุ้งก้ามกราม. วารสารการประมง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 10 (2551) : 3-17.

ภาษาอังกฤษ

Abdel-Tawwab, M., A.M. Abdel-Rahman and N.E.M. Ismael. 2008. Ealuation of commercial live bakers yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged *in situ* with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture, 280 : 185-189.

Adachi, K., T. Hirata, T. Nishioka and M. Sakaguchi. 2003. Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. Comprative Biochemistry and Physiology B 134 : 135-141.

Adams, A. 1995 Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species. Fish Shellfish Immunol, 1 : 59-70.

Akiyama D.M., W. G. Dominy and A. L. Lawrence. 1991. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry: revised. In: A. M. Akiyama and R. K. H. Tan. Proc. The Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. Thailand and Indonesia 19-25 (September 1991) : 80-98.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. Verginia : Association of Official Analytical Chemists.

Austin, B. and X. H. Zhang. 2006. *Vibrio harveyi* : a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. Letters in Applied Microbiology 43 : 119-124.

Bachere, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. Aquaculture 191 : 3-11.

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

Bernstein,S. and Plantz, P.E. 1997. Production of yeast from whey. Food Eng. 49(11) : 74-75.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantitives of protein utilizing the principle of dye binding. Anal.Biochem. 72: 248-254.

Cabib, E., Roberts, R. and Bower, B. 1982. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. Annu. Rev. Biochem. 51 : 763-793.

Calleja, G.B. 1987. Cell aggregation. In A.H. Rose and J.S. Haarison (eds). The Yeast Vol 2 Yeast and the Environment, Pp 265-238. London : Academic Press.

Campbell, I. and duffus, JH. 1998. Yeast a practical approach. England : Printing Ltd, Oxford.

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

Chen, J.C., Chen, K.W. and Chen, J.M. 1996. Effects of saponin on survival, growth, molting and feeding of *Penaeus japonicas* juveniles. Aquaculture 144 : 165-175.

Chisholm, J.R.S. and Smith, V.J. 1995. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. Comp. Biochem. Physiol. 110A : 39-45.

Cowles, R.P. 1914. Palaemons of the Philippine Islands. Philippine Journal of Science 9 : 319-403.

Engatad, R.E., Robertsen, B. and Frivold, E. 1992. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-medicated haemolytic activity in atlantic salmon blood. Fishand Shellfish Immunol. 2 : 287-297.White shrimp (*Penaeus monodon*). Biochemistry and Molecular Biology 116 : 453-458.

Evans, E.E.,Cushing, J.E., Sawyer, S., Weinheimer, P.F., Acton, R.T. and McNeely, J.L. 1969a. Induced bactericidal response in the california spiny lobster *Panulirus interruptus*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132 : 111-113.

Evans, E.E., Painter, B., Evans, M.L., Weinheimer, P. and Acton, R.T. 1968. An induced bactericidal in the spiny Lobster, *Panulirus argus*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128 : 394-397.

Evans, E.E., Weinheimer, P.F., Painter, B., Acton, R.T. and Evans, M.L. 1969b. Secondary and tertiary responses of the induced bactericidin from the west indian spiny lobster, *Panulirus argus*. J. Bacteriol. 98 : 943-946.

Flegel, T. W. 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. Aquaculture 258 : 1-33.

Francisco, V.A., Flor, J.V., and Gloria, M. 1997. Purification and comparision of β-1,3-glucan binding protein from White shrimp (*Penaeus monodon*). Biochemistry and Molecular Biology 116 : 453-458.

Gabriel, A. G. and A. V. Felipe. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. Resent Research and Development Microbiology 4 : 333-348.

Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180 : 147-165.

Goossens, A.E. 1974. Protein food-flavors and off-flavors. Food Eng 10 : 59-60.

Greenberg, A.E., Clesceri, L.S. and A.D. 1992. Standard methods for examination of water and wastewater. 18th ed., part 8000 toxicity. Washington : American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation.

Hose, J.E., Martin, G.G. and Gerard, A.S. 1990. A decapod hemocyte classification scheme Integrating morphology, cytochemistry and function. Biol. Bull, 178 : 33-45.

Hough, J.S., and Maddox, I.S. 1970. Yeast autolysis. Process Biochemistry 210 : 50-52

ITami, T., Takahashi, Y., Tsuchihira, E. and Igusa, H. 1994. Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicas* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β-1,3-glucan (Schizophyllan). In Chou, L.M. et al (eds), The third Asian fisheries forum, pp. 375-379. Manila : Asian Fisheries Society.

Jayabalan, N. and Pillai, D. 1994. Panaeid prawns and associated luminous bacteria. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 41(4) : 415-421.

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

Jonanssoon, M. W., P. Keyser, K. Sritunyalucksana and K. Soderhall. 2000. Crustacean hemocytes and haematopoiesis. Aquaculture 191 : 45-52.

Kapteyn, J.C., Van Den Ende H., and Klis, F.M. 1999. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) 1426 : 373-383.

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

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

Lara-Flores M., Olvera-Novoa M.A., Guzman-Mendez B.E. and W. Lopez-Madrid. 2003. Use of the Bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 216 : 193-201

Le Moullac, G., M. Le Groumellwc, D. Ansquer, S. Forissard, P. Levy amd P. Aquacop. 1997. Hawmatological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. Fish and Shellfish Immunology. 7 : 227-234.

Lee, K. and Lee, Y. 1996. Continuous process for yeast biomass production from sugar beet stillage by a novel strain of *Candida rugosa* and protein profile of the yeast. J.Chem. Tech.Biotechnol. 66: 344-354.

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

Lin, C.K and Nash, G.L. 1996. Luminous Bacteral Infection in Pond Reared *Penaeus monodon*. Asian Shrimp News Collected Volume 1989-1995. Published By Asian Shrimp Culture Council. 182-184.

Ling, S.W. 1969. "The general biology and development of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man)." In Proceeding of the World Scientific Conference on the Biology and Culture of Shrimps and prawns, F.A.O. Fisheries Report, (57) Vol. 3 : 589 – 606.

Mannners, D.J. and Massos, A.J. 1973. The structure of a β-1,3-D glucan from yeast cell wall.

Matile, P.H., H Moor and C.F. Robinow. 1969. Yeast cytology. pp 210=9-302 In A.H. Rose and J.S. Harrison. The Yeasts Vol.1. Biology of Yeast. 1st edition. Academic Press, London.

Mckay, D. and Jenkin, C.R. 1969. Immunity in the invertebrates. II. Adaptive immunity immunity in the crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). Immunology. 17 : 127-137.

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

Nagodawithana, T.W. 1994. Savory Flovor. In Nagodawithana, T.W.(ed) Bioprocess Production of Flavor, Fragrance and Color Ingredient. New York : John Wiley & Sons.

Nappi, A.J. 1973. The role of melanization in the immune reaction of larvae of *Drosophila algoquin* against *Pseudeucoila bochei*. Parasitology 66 : 23-32.

New, M.B. and Singholka, S. 2000 Freshwater Prawn Culture The farming of *Macrobrachium rosenbergii*. Oxford : Blackwell Science Ltd.

Oliva-Teles, A. and Goncalves, P. 2001. Partial replacement of fishmeal by brewers yeast *Saccharomyces cerevisiae* in diet for sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles. Aquaculture. 202 : 269-278.

Peppler, H.J. 1986. Single cell protein I. 242 pp. Massachusetts : The MIT Press.

Phaff,H., Miller, M.W.,and Marak, E.1978. The Life of Yeast. 2nd edition Harvard University Press : Cambridge.

Raa, J. 1996. The Use of Immunostimulatory Substances in Fish and Shellfish Farming. Reviews in Fisheries Science. 4(3) : 229-288.

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

Reade, P.C. 1968. Phagocytosis in invertebrates. Aust. J. exp. Biol. Med. Sci. 46 : 183-350.

Reed, G. and H.J. Peppler. 1973. Yeast technology. Avi Publishing Company, Inc : Westport, Conn.

Reed, G. and Nagodowithana, T.W. 1991. Yeast Technology. 2nd. New York : Van nostrand reinhold.

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

Rodryguez, J. and Moullac, G. L. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. Aquaculture 191 : 101–119.

Rumsey, G.L., Winfree, R.A. and Hughes, S.G. 1992. Nutritional values of dietary nucleic acids and purine bases to rainbow trout. Aquaculture 108 : 97-110.

Sandula, J., Kogan, G., Kacurakova, M., and Machova, E. 1999. Microbial Beta-1,3-D-glucan their preparation, physio-chemical characterization and immunemodulatory activity. Carbohydrate polymer 38 : 247-253.

Sindermann, C.J. 1971. Internal defences of Grustacea: A review. Fisheries Bulletin 69 : 455-489.

Siwicki, A.K., Anderson., D.P., and Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affect non-specific immunity and protection against furuncolosis. Veterinary Immunolog Immunopathology 41 : 125-139.

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

Smith, V. J. and Ratcliffe, N.A. 1980. Cellular defense reactions the shore crab. Carinus maenas. Journal Invertebrates. Pathol. 35 : 65-75.

Smith, V. J. and Soderhall, K. 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods and phenoloxidase distribution. Dev. Comp. Immunul. 7 : 229-239.

Smith, V. J. and Soderhall, K. 1986. Cellular immune mechanism in the crustacea. Symposium of the Zoological Society of London. 56 : 59-79.

Smith, V. J. and Söderhall, K. 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of Marine invertebrates. Dev. Comp. Immunol. 15 : 251-261.

Soderhall, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization a recognition Mechanism in arthopods. A review. Dev. Comp. Immunol. 6 : 601-611.

Soderhall, K. and L. Cerenius. 1992. Crustracean immunity. Annual Rev. of Fish Diseases. 2 : 3-23.

Spencer, J.F.T and D.M. Spencer. 1997. The Yeast: Sex and non sex, life cycles, sporulation and genetics. pp. 133-135. In J.F.T. Spencer and D.M. Spencer (eds). Yeast in Natural and Artificial Habitats. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag.

Sritunyalucksana, K. 1995. Study of the humoral defense factors in the black tiger prawn *Penaeous monodon*. Master thesis, Mahidol University.

Sritunyalucksana, K. and K. Soderhall. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. Aquaculture 191 : 53-69.

Stewart, J.E. and Zwicker, B.M. 1972. Natural and indiced bactericidal activities in the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*: products of hemocyte-plasma interaction. Can. J. Microbiol. 18 : 1499-1508.

Sung, H.H., Yang Y.L. and Song, Y.L. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in the Tiger shrimp (*Penaeous monodon*). Fish Pathology 29 : 11-17.

Synder, H.E. 1970. Advance in Food Research. pp.140. New York : Academic Press.

Thornton,. J. 1992. Brewer's yeast extract-a survey of the available to the food processor. Food ingredient. 2 : 40-43.

Thornqvist, P.-O. and Soderhall, K. 1997. Crustacean immune reactions, a short review. In flegel, T.W. and Macrae, I.H. (eds.), Diseases in Asian aquaculture III, pp.203-218. Manila : Asian Fisheries Society.

Vargas, A. F. 1995. Thedefence system of brown shrimp *Penaeus californiensis* : humoral recognition and cellular responses. Journal of Marine Biotechnology 3 : 153-156.

Vargas-Albores, F., Hermandez-Lopez, J., Gollas-Galvan, T., Montano-Perez, K., Jimenez-Vega, F. and Yepiz-Plascencia, G.1998. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products. In Flegel, T.W. (ed), Advances in shrimp biotechnology, pp. 161-166. Bangkok : National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

Vattanaviboon, P., Panmanee, W., and Mongkolsuk, S. 2003. Induction of peroxide and superoxide protective enzymes and physiological cross-protection against peroxide killing by a superoxide generator in *Vibrio harveyi*. FEMS Microbiol. Let. 221 : 89-95.

Walker, G.M. 1998. Yearst Physiology and Biotechnology. Chichester : John Wiley and Sons.

Wegzyn, G. and Czyz, A. 2002. Invited paper How do marine bacteria produce light, why are they luminescent, and can we employ bacterial biolumines in aquatic biotechnology. Oceanologia 44 : 291-305.

Yoshida, T., R. Kruger, and V. Inglis. 1995. Augmention of non-specific protection in Afican catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long term oral administration of immunostimulants. J.fish Dis 18 : 195-198.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์อาหารแบบ Proximate analysis (AOAC,1990)

1. การวิเคราะห์โปรตีน (crude protein) ในอาหารสัตว์

หลักการ

วิธีการหาปริมาณไนโตรเจนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนซึ่งโดยทั่วไปโปรตีนประกอบด้วยไนโตรเจนประมาณร้อยละ 16 ดังนั้นเมื่อทราบปริมารไนโตรเจนแล้วนำมาคูณกับแฟคเตอร์ 6.25 ผลที่ได้คือโปรตีนทั้งหมด ในอาหารสัตว์ ขั้นตอนการวิเคราะห์มี 3 ขั้นตอนคือ

1. การย่อยตัวอย่างอาหารให้อยู่ในรูปสารละลาย
2. การหาปริมาณโปรตีนโดยการกลั่นสารละลายที่ได้จากข้อ 1
3. การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของกรด H_2SO_4

อุปกรณ์

1. เครื่อง erhardt kjeldathern digestion unit
2. เครื่อง erhardt vapodast 1
3. ชุดไตเตรท

สารเคมี

1. สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น
2. สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.1 N
3. สารละลาย NaOH เข้มข้นร้อยละ 50
4. สารละลายกรด Boric เข้มข้นร้อยละ 4
5. protein catalyst
6. tastiro indicator

การเตรียมสารเคมี

1. Protein catalyst เตรียมจาก $CuSO_4$ 7 กรัม ผสมกับ K_2SO_4 100 กรัม
2. boric acid ร้อยละ 4 เตรียมจาก boric acid 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร
3. tashiro indicator เตรียมจาก methyl red : methylene blue สัดส่วน 3 ต่อ 2 โดยละลายใน methyl red 1 กรัม ใน NaOH เข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 37 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรรวมเป็น 1 ลิตร ผสมกับสารละลาย methylene blue 1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร
4. 0.5 NH_2SO_4 เตรียมจากสูตร

$$V = (100 \times M \times N)/ a \times p \times d$$

เมื่อ V = ปริมาตรของสารที่ใช้เตรียมสารละลาย 1 ลิตร

M = น้ำหนักโมเลกุลของสาร

N = ความเข้มข้นเป็นนอร์มอล

a = จำนวนโปรตอนของกรดที่ทำปฏิกิริยาได้

p = เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์

d = ความหนาแน่นของสาร

5. การเตรียม 0.5 N Na_2CO_3 ชั่ง Na_2CO_3 26.5 g อบที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงเพื่อไล่ความชื้น ละลายในน้ำกลั่นอุ่นที่ต้มไล่ CO_2 ออกแล้ว ทำเป็น 1 ลิตร

6. การเตรียม 0.131 N NaOH เตรียมจากสูตร

$$V = (100 \times M \times N)/ a \times p \times d$$

เมื่อ V = ปริมาตรของสารที่ใช้เตรียมสารละลาย 1 ลิตร

M = น้ำหนักโมเลกุลของสาร

N = ความเข้มข้นเป็นนอร์มอล

a = จำนวนโปรตอนของกรดที่ทำปฏิกิริยาได้

p = เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์

d = ความหนาแน่นของสาร

การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของกรด H_2SO_4 (Skoog and West,1986)

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลาย 0.5 N H_2SO_4 และ 0.5 N Na_2CO_3

2. ปิเปต 0.5 N Na_2CO_3 25 ml ใส่ใน flask หยด methyl orange 2-3 หยด ไตเตรทกับ 0.5 N H_2SO_4 จนถึงจุดยุติ จะได้สีชมพูเหลือง คำนวณความเข้มข้นของ H_2SO_4 จาก

$$N_{acid} = (N_{base} \times V_{base})/ V_{acid}$$

โดย N_{acid} = ความเข้มข้นของสารละลาย H_2SO_4 เป็นนอร์มอล

N_{base} = ความเข้มข้นของสารละลาย Na_2CO_3 เป็นนอร์มอล

V_{base} = ปริมาตรของสารละลาย Na_2CO_3 เป็นมิลลิเมตร

V_{acid} = ปริมาตรของสารละลาย H_2SO_4 เป็นมิลลิเมตร

การย่อยตัวอย่างอาหาร (Kjeldatherm digestion)

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างอาหารแห้งประมาณ 2 กรัม ใส่ใน digestion tube

2. เติม catalyst 10.01 กรัม ลงไปแล้วเติม H_2SO_4 เข้มข้น 25 มิลลิลิตร

3. นำ digestion tube ใส่ใน rack ไปใส่ใน Kjeldatherm digestion block พร้อมทั้งประกอบ ท่อดูดควันระบบสุญญากาศทิ้งให้เกิดการย่อยจนได้สารประกอบสีดำประมาณ 20 นาที

4. เริ่มตั้งอุณหภูมิเครื่อง Kjeldatherm digestion block ไว้ที่ประมาณ 100 องศา-เซลเซียสแล้วเพิ่มอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ทุกๆประมาณ 15-20 นาที จนอุณหภูมิถึง 380 องศาเซลเซียส

5. ปล่อยให้เกิดการย่อยสมบูรณ์ (โดยสีของสารละลายใน digestion tube จะขึ้นกับชนิดของ catalyst ในการย่อยนี้จะได้สีฟ้า)

6. ปล่อยทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้อง

7. เติมน้ำกลั่นลงใน digestion tube ให้น้ำใน tube มีปริมาตรมากพอที่จะนำน้ำไปกลั่นได้ (เติมประมาณ 100-150 องศาเซลเซียส)

การกลั่นสารละลายเพื่อนำไปหาโปรตีน

วิธีการทดลอง

1. เปิดเครื่องมือ vapodest 1 โยกคันโยกมาที่ตำแหน่ง fill เพื่อปล่อยน้ำเข้าสู่ boiler จนได้ระดับน้ำประมาณ 6/10 ของ boiler แล้วโยกคันโยกมาที่ตำแหน่ง stand by น้ำใน boiler จะเริ่มเดือด ไม่ควรเติมน้ำมากเกินไปเพราะเวลาน้ำเดือดจะล้นเข้ามาอยู่ใน digestion tube

2. เติม 4 เปอร์เซ็นต์ boric acid 100 มิลลิลิตร ลงใน Eelenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร หยด tashiro indicator ลงไป 5-6 หยด จะได้สารละลายสีม่วง วาง flask ที่มี boric acid ไว้ในตำแหน่งที่มี digestion tube โดยปล่อยให้ปลาย digestion tube จุ่มในสารละลาย boric acid ตลอดเวลา

3. นำ digestion tube ที่มีตัวอย่างที่ dilute แล้วไปวางบน clamp โดยให้ส่วนปลายของ tube แนบสนิทกับ cone-shape rubber stopper

4. เมื่อน้ำเริ่มเดือดเป็นไอให้กดปุ่ม “added NaOH” เพื่อให้ 50 เปอร์เซ็นต์ NaOH solution ไหลเข้าสู่ digestion tube สารละลายใน digestion tube จะเกิดฟองก๊าซขึ้น กดปุ่ม added NaOH ไปเรื่อยๆ จนไม่เกิดฟองขึ้น (สารละลายใน digestion tube จะขุ่นมีตะกอน) เติม 50 เปอร์เซ็นต์ NaOH solution ให้มากเกินพออีกประมาณ 10 มิลลิลิตร ถ้าในตัวอย่างอาหารมีสารประกอบไนโตรเจนมาก สีของสารละลาย boric acid และ tashiro indicator จะเริ่มเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเขียว ในขั้นตอนนี้จะต้องปล่อยน้ำให้ไหลเข้า condenser เพื่อให้ก๊าซ NH_3 ควบแน่นไหลเข้าสู่ flask ที่บรรจุ boric acid

5. โยกคันโยกมาที่ตำแหน่ง distillation เพื่อให้ไอน้ำเข้าไปใน digestion tube และปล่อย

ให้เกิดการกลั่นจนได้สารละลายใน flask ที่มี boric acid จนได้ปริมาณเป็น 300 มิลลิลิตร แล้วให้โยกคันโยกมาที่ตำแหน่ง stand by ถอด digestion tube ออก

6. นำ flask ที่มี boric acid และ tashiro indicator ไปไตรเตรทกับสารละลาย standard H_2SO_4 ความเข้มข้นประมาณ 0.5 N จนถึงจุดยุติซึ่งสารละลายใน flask จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอ่อน

การคำนวณหาปริมาณโปรตีน

$$\text{โปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{1400 \times V_s \times N_s \times N_p}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)} \times 100}$$

โดย V_s = ปริมาตรของ H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตรเตรท เป็นมิลลิลิตร

N_s = ความเข้มข้นของสารละลาย H_2SO_4 ใช้ในการไตรเตรทเป็นนอร์มอล

N_p = conversion factor (มีค่า 6.25)

2. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น

หลักการ

ความชื้นของตัวอย่างอาหารสัตว์จะถูกดึงไปโดยการละเหยด้วยความร้อนจนกระทั่งได้น้ำหนักของอาหารที่เหลืออยู่คงที่ น้ำหนักที่สูญหายไปของอาหารก็คือความชื้นของอาหารนั่นเอง

อุปกรณ์

1. ตู้อบแห้ง (hot air oven)
2. โหลดูดความชื้น (desiccator)
3. ถ้วยอะลูมิเนียม
4. คีมคีบ (tong)

วิธีการทดลอง

1. อบถ้วยอะลูมิเนียมที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโหลดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักละเอียด
2. ชั่งตัวอย่างอาหาร (รู้น้ำหนักละเอียด) ประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียม
3. อบอาหารที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
4. ทิ้งให้โหลเย็นในโหลดูดความชื้นชั่งน้ำหนักละเอียด
5. คำนวณ ความชื้น (ร้อยละ) จากสูตร

$$\text{ความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{(\text{น้ำหนักอาหารก่อนอบ-น้ำหนักอาหารหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักอาหารก่อนอบ}}$$

3. การหาปริมาณเถ้า

หลักการ

เมื่อนำตัวอย่างอาหารสัตว์ไปเผาไหม้ที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส พวกสารอินทรีย์ทั้งหมดจะถูกเผาไหม้ไป ส่วนที่เหลืออยู่ คือ อนินทรีย์สาร โดยอนินทรีย์สารทั้งหมดที่ไม่ได้ละเหยไปในอุณหภูมิดังกล่าวเรียกว่าเถ้า (ash) เถ้าคือแร่ธาตุที่มีอยู่ในสารอาหารนั่นเอง

อุปกรณ์

1. เตาเผาอุณหภูมิความร้อนสูง (muffle furnace)
2. ถ้วยกระเบื้อง (porcelain crucibles)
3. โหลดูดความชื้น (desiccator)
4. ตู้ดูดควัน (fume hood)
5. เตาเผา (hot plate)
6. คีมคีบ (tong)

วิธีการทดลอง

1. อบ crucible ที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโหลดูดความชื้นชั่งน้ำหนักละเอียด
2. ชั่งน้ำหนักแห้ง (รู้น้ำหนักละเอียด) ประมาณ 2 กรัม ใส่ใน crucible
3. วาง crucible บน hotplate ปล่อยให้เกิดการ ignite ในตู้ควันจนหมดควัน
4. ย้าย crucible ไปเผาใน muffle furnace ที่ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
5. ทิ้งให้เย็นในโหลดูดความชื้นชั่งน้ำหนักละเอียด
6. คำนวณร้อยละความชื้นจากสูตร

$$\text{เถ้า (ร้อยละ)} = \frac{\text{ปริมาณเถ้าที่เหลือ} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง}}$$

4. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

หลักการ

อีเทอร์จะถูกระเหยเป็นไอติดต่อกันหลังจากนั้นไอของอีเทอร์กระทบความเย็นจากเครื่องควบแน่นแล้วกลั่นตัวเป็นของเหลว และไหลผ่านตัวอย่างอาหารสัตว์ พร้อมทั้งสกัดสารที่สามารถละลายได้ในอีเทอร์ออกมาด้วยจนกระทั่งกระบวนการเสร็จสิ้นอีเทอร์จะถูกระเหยหรือทำให้แห้งไปจนหมดสิ่งที่เหลืออยู่คือ ไขมัน (crude fat) หรือที่เรียกว่า ether extract

อุปกรณ์

1. เครื่องสกัดไขมัน (soxtherm automatic) รุ่น S-11 ของบริษัท erhardt ประเทศ

เยอรมนี ประกอบด้วย cooler, oil bate โดยมี silicone oil เป็นตัวถ่ายเทความร้อน pressure control pump และ condenser

2. Thimble ชนิด double layer ขนาด 28×80 มิลลิเมตร

3. ขวดสกัดไขมัน (extraction beaker)

4. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

5. โถดูดความชื้น (desiccator)

สารเคมี

1. petroleum ether (AR grade)

วิธีการทดลอง

1. อบขวดสกัดไขมันของเครื่องที่ 130 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ ใช้เวลาอบประมาณ 2-3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโหลอบความชื้นชั่งน้ำหนักละเอียด

2. ชั่งตัวอย่างแห้ง (รู้น้ำหนักละเอียด) ประมาณ 2 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

3. ใส่ตัวอย่างที่ห่อด้วยกระดาษกรองแล้วใส่ใน thimble หลังจากนั้นใส่ thimble ลงในขวดสกัดไขมันของเครื่อง แล้วเติม petroleum ether 90 มิลลิลิตร ลงไปในขวดสกัดไขมัน (ระวังอย่าให้ thimble แช่อยู่ใน petroleum ether)

4. นำขวดสกัดไขมันไปประกอบกับเครื่อง soxtherm เปิดสวิตช์ oil bath แล้วตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 150 องศาเซลเซียส แล้วเปิดสวิตช์ที่ pressure control pump เปิด cooler ให้น้ำเย็นไหลเข้าสู่ condenser ของเครื่อง soxtherm

5. เลื่อนคันโยกที่เครื่อง soxtherm มายังตำแหน่งที่จะทำให้เกิดการ reflux กลับของ petroleum ether ปล่อยให้เกิดการสกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

6. เลื่อนคันโยกที่เครื่อง soxtherm มาที่ตำแหน่งที่ทำให้เกิดการกลั่นเก็บของ petroleum ether รอจน petroleum ether แห้งเกือบหมด

7. นำขวดสกัดไขมันอบที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมงทิ้งให้เย็นใน desiccators

8. นำขวดสกัดไขมันไปชั่งน้ำหนักละเอียด

9. คำนวณร้อยละของไขมันจากสูตร

$$\text{ไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักของไขมัน} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง}}$$

5. การหาปริมาณเยื่อใย (fiber)

หลักการ

นำอาหารที่สกัดไขมันออกแล้วไปย่อยด้วยสารละลายกรดเจือจางหลังจากนั้นอาหารจะถูกย่อยต่อไปด้วยสารละลายด่างเจือจางสารที่เหลืออยู่ถูกกรองเก็บไว้ในกระดาษกรองใน crucible แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส น้ำหนักที่สูญหายไปในการเผาคือเยื่อใยทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหารนั่นเอง

อุปกรณ์

1. crude fiber digestion apparatus ประกอบด้วย digestion beaker และ condenser
2. กระดาษกรองชนิดไม่มีเถ้า (Whatman เบอร์ 41)
3. เตาเผาอุณหภูมิความร้อนสูง (muffle furnace)
4. ถ้วยกระเบื้อง (porcelain crucibles)
5. โหลดูดความชื้น (desiccators)
6. กรวยกรอง (funnel)
7. กระดาษลิตมัส

สารเคมี

1. H_2SO_4 เข้มข้น 0.225 N
2. NaOH เข้มข้น 0.313 N
3. 95 เปอร์เซ็นต์ ethyl alcohol

วิธีการทดลอง

1. อบกระดาษกรองเบอร์ 41 และ crucible ที่ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโหลดูดความชื้นจนได้น้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักละเอียด

2. นำตัวอย่างที่สกัดไขมันออกแล้ว (ทราบน้ำหนักละเอียดเริ่มต้นของตัวอย่างก่อนสกัดไขมัน) ใส่ลงใน beaker ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร เติม H_2SO_4 เข้มข้น 0.225 N ลงไป 200 มิลลิลิตร ต่อ condenser เข้ากับ beaker เพื่อรักษาระดับของกรดให้คงที่ เปิด heater ให้ความร้อนกับกรดจนเดือด ทำการย่อยต่อไปเป็นเวลา 30 นาที

3. กรองสารละลายที่ได้จากข้อ 2 ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 จนหมด (ไม่ควรให้มีตะกอนเหลือค้างอยู่ใน beaker) ล้างตะกอนที่ค้างอยู่บนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่นจนหมดความเป็นกรด

4. นำส่วนที่เหลือบนกระดาษกรองใส่ลงใน beaker ในข้อ 2 จนหมด เติมสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.313 N ลงไป 200 มิลลิลิตร ใช้สารละลายนี้ล้างสารตัวอย่างบนกระดาษกรองให้หมดแล้วจึงต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที

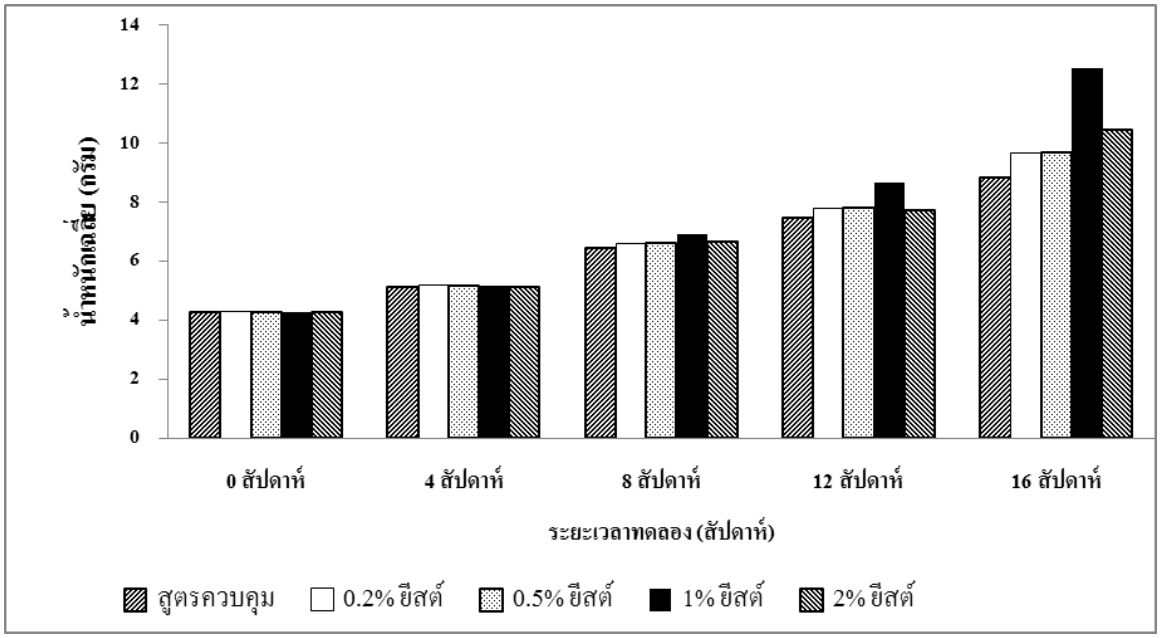
5. กรองสารละลายจากข้อ 4 ด้วยกระดาษกรองแผ่นเดิมแล้วล้างตัวอย่างจนหมดความเป็นด่างด้วยน้ำกลั่น ล้างตะกอนด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ ethyl alcohol ประมาณ 30 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่เหลือบนกระดาษกรองไปอบให้แห้งที่ 100 องศาเซลเซียส (ประมาณ 2 ชั่วโมง) ทิ้งให้เย็นใน desiccators จนได้น้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักละเอียด

6. นำตะกอนพร้อมกระดาษกรองไปเผาเพื่อหาเถ้าโดยใส่ไว้ใน crucible ที่ทราบน้ำหนักละเอียดแล้ว ทิ้งให้เย็นใน desiccators แล้วนำไปชั่งน้ำหนักละเอียด

7. คำนวณร้อยละของเยื่อจากสูตร

$$\text{เยื่อใย (ร้อยละ)} = \frac{[(\text{น้ำหนักตะกอน+กระดาษกรอง})-\text{น้ำหนักกระดาษกรอง}-\text{ปริมาณเถ้า}]}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง}} \times 100$$

ภาคผนวก ข

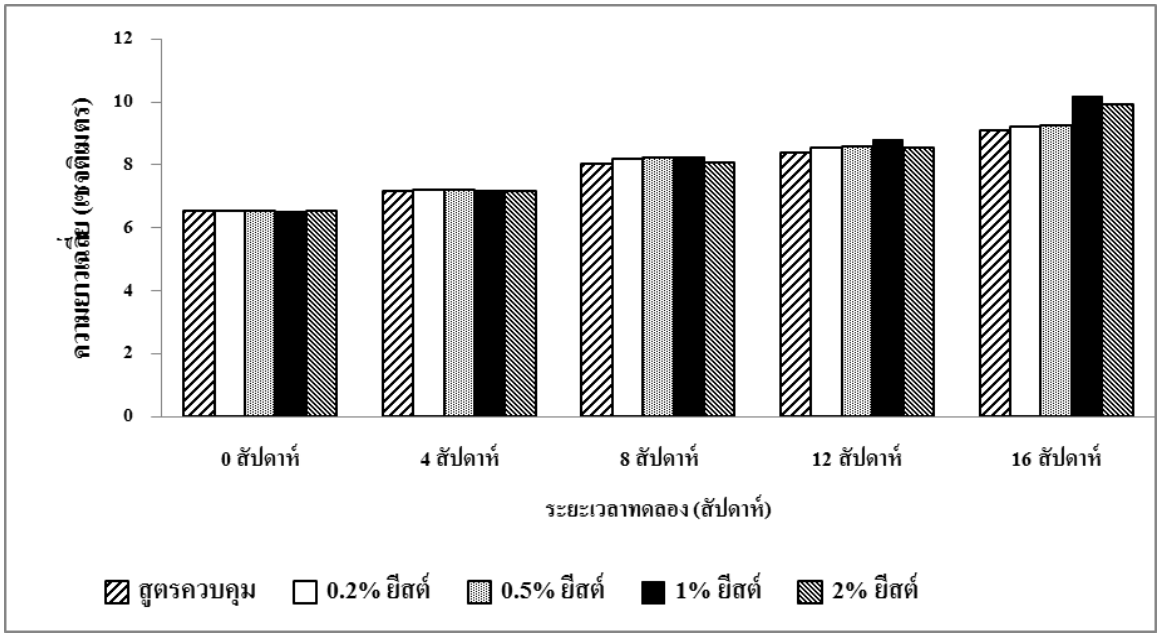


ภาพที่ 1 กราฟแสดงน้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมส่าเบียร์ต่างกัน 5 ระดับ 16 สัปดาห์

ตารางที่ 1 น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมส่าเบียร์ต่างกัน 5 ระดับ 16 สัปดาห์

สูตรอาหาร	0 สัปดาห์	4 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์	16 สัปดาห์
สูตรควบคุม	4.29±0.22^{a}	5.14±0.06^{a}	6.47±0.09^{a}	7.46±0.16^{a}	8.82±0.37^{a}
0.2% ยีสต์	4.29±0.22^{a}	5.17±0.04^{a}	6.60±0.18^{a}	7.81±0.37^{a}	9.67±0.19^{ab}
0.5% ยีสต์	4.29±0.22^{a}	5.19±0.05^{a}	6.62±0.19^{a}	7.83±0.38^{a}	9.69±0.20^{ab}
1% ยีสต์	4.29±0.22^{a}	5.17±0.05^{a}	6.92±0.20^{b}	8.66±0.80^{b}	12.53±0.91^{c}
2% ยีสต์	4.29±0.22^{a}	5.15±0.06^{a}	6.67±0.22^{ab}	7.74±0.04^{a}	10.46±0.15^{b}

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 2 กราฟแสดงความยาวเฉลี่ย (เซนติเมตร) ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมส่าเบียร์ต่างกัน 5 ระดับ 16 สัปดาห์

ตารางที่ 4-4 ความยาวเฉลี่ย (เซนติเมตร) ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมส่าเบียร์ต่างกัน 5 ระดับ 16 สัปดาห์

สูตรอาหาร	0 สัปดาห์	4 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์	16 สัปดาห์
สูตรควบคุม	6.54±0.25[a]	7.17±0.14[a]	8.01±0.04[a]	8.37±0.17[a]	9.09±0.26[a]
0.2% ยีสต์	6.54±0.25[a]	7.20±0.15[a]	8.19±0.19[a]	8.55±0.06[a]	9.21±0.36[a]
0.5% ยีสต์	6.54±0.25[a]	7.22±0.16[a]	8.21±0.20[a]	8.57±0.07[a]	9.23±0.37[a]
1% ยีสต์	6.54±0.25[a]	7.19±0.12[a]	8.25±0.13[a]	8.81±0.39[a]	10.17±0.68[a]
2% ยีสต์	6.54±0.25[a]	7.16±0.13[a]	8.07±0.13[a]	8.55±0.08[a]	9.92±0.45[a]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 95 เปอร์เซ็นต์

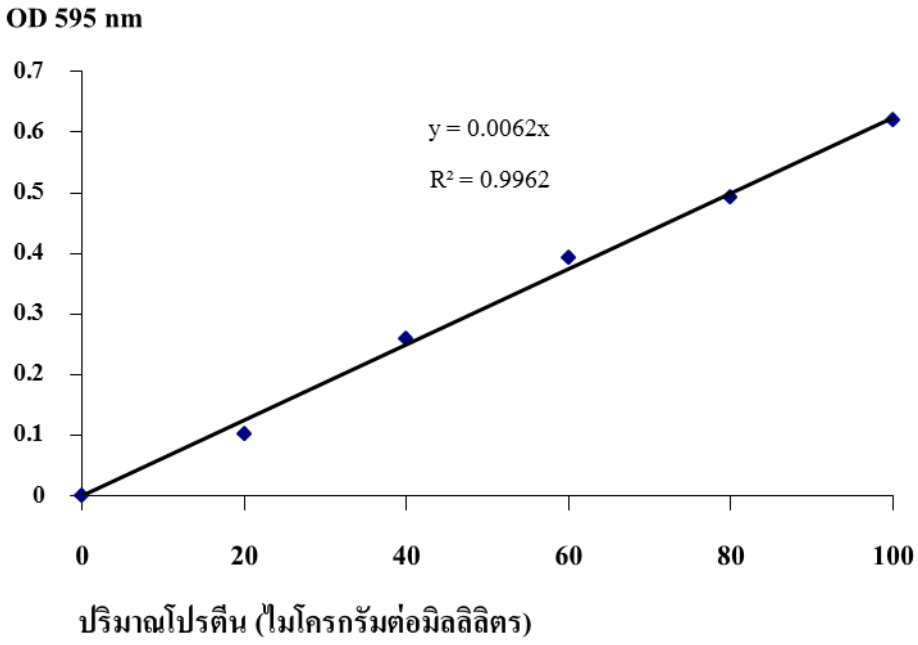
ภาคผนวก ค

สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

สารละลายบัฟเฟอร์ cacodylate		
โซเดียมคาโคดีเลต (sodium cacodylate)	10	มิลลิโมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	450	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์	10	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์	26	มิลลิโมลาร์

ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐานโปรตีน (bovine serum albumin) โดยวิธี Bradford



ภาคผนวก จ

จำนวนกุ้งก้ามกรามวัยรุ่น ที่ตายหลังใส่ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ที่ระดับความเข้มข้นประมาณ 10^7 CFU/ml ในน้ำเลี้ยงกุ้ง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

สูตรอาหาร	จำนวน (ซ้ำ)	*V. harveyi* สายพันธุ์ 639	จำนวน (ตัว)	จำนวนกุ้งตายสะสม (ตัว)				
				0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.
0% บริวเวอร์ยีสต์	1	$(2.10\pm0.70)\times10^6$	10	0	0	1	2	4
	2	$(2.14\pm0.67)\times10^6$	10	0	0	1	2	5
	3	$(2.13\pm0.69)\times10^6$	10	0	0	1	3	4
0.2% บริวเวอร์ยีสต์	1	$(2.34\pm0.46)\times10^6$	10	0	0	0	1	1
	2	$(2.16\pm0.59)\times10^6$	10	0	0	0	1	3
	3	$(2.25\pm0.45)\times10^6$	10	0	0	0	2	1
0.5% บริวเวอร์ยีสต์	1	$(2.24\pm0.56)\times10^6$	10	0	0	0	1	2
	2	$(2.06\pm0.69)\times10^6$	10	0	0	0	2	3
	3	$(2.06\pm0.58)\times10^6$	10	0	0	0	1	1
1% บริวเวอร์ยีสต์	1	$(2.26\pm0.56)\times10^6$	10	0	0	0	0	1
	2	$(2.21\pm0.60)\times10^6$	10	0	0	0	0	0
	3	$(2.20\pm0.59)\times10^6$	10	0	0	0	0	1
2% บริวเวอร์ยีสต์	1	$(2.24\pm0.36)\times10^6$	10	0	0	0	1	2
	2	$(2.06\pm0.49)\times10^6$	10	0	0	0	1	1
	3	$(2.25\pm0.39)\times10^6$	10	0	0	0	2	3

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุรัตนา เจนธนานันท์ เกิดเมื่อวันที่ 25 มีนาคม 2530 ภูมิลำเนา จังหวัดหนองคาย สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนปทุมเทพวิทยาคาร จังหวัดหนองคาย ในปีการศึกษา 2547 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2551 โดยได้รับทุนการศึกษาในโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ซึ่งให้ทุนสนับสนุนการศึกษาตลอดระยะเวลา 4 ปี ยังมีรางวัลที่เคยได้รับระดับอุดมศึกษาในการนำเสนอผลงานการวิจัยในการประชุมวิชาการ ดังนี้

ได้รับรางวัลดีเด่นจากการเข้าร่วมเสนอผลงานแบบบรรยายสาขา Biological Science เรื่อง การสำรวจพยาธิตัวจี๊ด (*Gnathostoma spinigerum*) ระยะติดต่อ L3 และพยาธิลำไส้ในปลาไหลนา (*Monopterus albus*) ในจังหวัดขอนแก่น ในการเข้าร่วมประชุมวิชาการคณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2551 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ได้เข้าร่วมเสนอผลงานแบบโปสเตอร์และแบบบรรยายสาขา Biological Science เรื่อง การสำรวจพยาธิตัวจี๊ด (*Gnathostoma spinigerum*) ระยะติดต่อ L3 และพยาธิลำไส้ในปลาไหลนา (*Monopterus albus*) ในจังหวัดขอนแก่น ในงานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อเยาวชน ครั้งที่ 4 ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค บางนา กรุงเทพมหานคร

เข้าศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2552 โดยได้รับทุนการศึกษาในโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ซึ่งให้ทุนสนับสนุนการศึกษาเป็นระยะเวลา 2 ปี ในระหว่างการศึกษาได้นำเสนอผลงานการวิจัยในการประชุมวิชาการดังนี้

ได้เข้าร่วมเสนอผลงานแบบบรรยายสาขา Marine Science เรื่องผลของการเสริมส่าเบียร์ในอาหารต่อการเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* วัยรุ่น ในงานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีเพื่อเยาวชน ครั้งที่ 7 ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค บางนา กรุงเทพมหานคร