รายงานการวิจัย

การพัฒนาศักยภาพของยีสต์โปรไบโอติกในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

The potential development of probiotic yeast to stimulate the growth and immunity of white leg shrimp

ชาคริยา ฉลาด Chakhriya Chalad

ลักษมี วิทยา Luksamee Vittaya

วิกิจ ผินรับ Wikit Phinrub

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2565

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

รายงานการวิจัย

การพัฒนาศักยภาพของยีสต์โปรไบโอติกในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

The potential development of probiotic yeast to stimulate the growth and immunity of white leg shrimp

ชาคริยา ฉลาด Chakhriya Chalad

ลักษมี วิทยา Luksamee Vittaya

วิกิจ ผินรับ Wikit Phinrub

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2565

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2565 เป็นงานวิจัยเพื่อก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ในการพัฒนาศักยภาพของยีสต์โปรไบโอติกในการกระตุ้นการเจริญเติบโต และภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม เพื่อเป็นแนวทางการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เป็นการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน เพื่อผลิตอาหารปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคและเพิ่มมูลค่าผลผลิตสัตว์น้ำ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยที่ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่ายที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ทั้งความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือ ตลอดจนสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้การช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกด้วยดี ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยที่ช่วยในการทำวิจัยครั้งนี้ลุล่วงได้ด้วยดี ตลอดจนครอบครัวและผองเพื่อนที่ให้ความห่วงใยให้กำลังใจเสมอมา ประโยชน์อันใดที่เกิดจากงานวิจัยนี้ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของท่านและหน่วยงาน ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณมา ณ โอกาส นี้

ชาคริยา ฉลาด
ลักษมี วิทยา
วิกิจ ผินรับ
กันยายน 2566

การพัฒนาศักยภาพของยีสต์โปรไบโอติกในการกระตุ้นการเจริญเติบโต และภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

ชาคริยา ฉลาด[1], ลักษมี วิทยา[1] และ วิกิจ ผินรับ[2]

บทคัดย่อ

การศึกษาศักยภาพของยีสต์โปรไบโอติก *Yarrowia lipolytica, Saccharomyces cerevisiae* และ *Wickerhamomyces anomalus* เสริมอาหารเม็ดสำเร็จรูป และชุดควบคุมไม่เสริมยีสต์เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่า น้ำหนักของกุ้งขาวที่เพิ่มขึ้น เท่ากับ 9.23 ± 0.12, 9.02 ± 0.06, 7.90 ± 0.07 และ 7.54 ± 0.13 กรัม ตามลำดับ ความยาวที่เพิ่มขึ้น เท่ากับ 8.70 ± 0.17, 8.56 ± 0.19, 7.77 ± 0.13 และ 7.73 ± 0.13 เซนติเมตร ตามลำดับ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน เท่ากับ 4.52 ± 0.09, 4.50 ± 0.05, 4.35 ± 0.05 และ 4.30 ± 0.07 ตามลำดับ อัตราการรอดตาย เท่ากับ 87.00 ± 4.36, 83.33 ± 2.89, 74.33 ± 3.51 และ 72.00 ± 2.65 ตามลำดับ และอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ เท่ากับ 2.56 ± 0.04, 2.69 ± 0.05, 3.10 ± 0.09 และ 3.22 ± 0.13 ตามลำดับ โดยกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica* และ *S. cerevisiae* มีการเจริญเติบโตแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *W. anomalus* และชุดควบคุม และเมื่อตรวจวัดปริมาณเม็ดเลือดรวมและกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งขาวที่ 30, 60 และ 90 วัน พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica* มีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงสุด เท่ากับ $8.20 \pm 0.05 \times 10^6$, $8.66 \pm 0.02 \times 10^6$ และ $8.90 \pm 0.01 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงสุด เท่ากับ 0.78 ± 0.03, 0.88 ± 0.01 และ 0.91 ± 0.03 ยูนิตต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดรวม เท่ากับ $8.00 \pm 0.03 \times 10^6$, $8.15 \pm 0.01 \times 10^6$ และ $8.26 \pm 0.03 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส เท่ากับ 0.75 ± 0.02, 0.82 ± 0.04 และ 0.87 ± 0.02 ยูนิตต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *W. anomalus* และชุดควบคุม จากการทดลองครั้งนี้จึงเป็นไปได้ที่จะใช้ยีสต์ *Y. lipolytica* และ *S. cerevisiae* กระตุ้นการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

คำสำคัญ: ยีสต์โปรไบโอติก, การเจริญเติบโต, ภูมิคุ้มกัน, กุ้งขาวแวนนาไม

---

[1]อาจารย์ สาขาศึกษาทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง 92150

[2]อาจารย์ สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์ประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง 92150

The potential development of probiotic yeast to stimulate the growth and immunity of white leg shrimp

Chakhriya Chalad[1], Luksamee Vittaya[1] and Wikit Phinrub[2]

Abstract

A study on the potential of probiotic yeast *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Wickerhamomyces anomalus* supplements to shrimp feed and the control group did not supplement with yeast to stimulate the growth and immunity of white leg shrimp, the experiment caries out 90 days. It was found that the weight gains of white leg shrimp were 9.23 ± 0.12, 9.02 ± 0.06, 7.90 ± 0.07 and 7.54 ± 0.13 grams, respectively. The length gains were 8.70 ± 0.17, 8.56 ± 0.19, 7.77. ± 0.13 and 7.73 ± 0.13 cm, respectively. The specific growth rates were 4.52 ± 0.09, 4.50 ± 0.05, 4.35 ± 0.05, and 4.30 ± 0.07, respectively. The survival rates were 87.00 ± 4.36, 83.33 ± 2.89, 74.33 ± 3.51 and 72.00 ± 2.65, respectively, and the feed conversion rates were 2.56 ± 0.04, 2.69 ± 0.05, 3.10 ± 0.09 and 3.22 ± 0.13, respectively. The growth of white leg shrimp fed with *Y. lipolytica* and *S. cerevisiae* was significantly different ($P<0.05$) from the white leg shrimp fed with *W. anomalus* and the control group. Moreover, the total hemocyte count and phenoloxidase activity of white leg shrimp at 30, 60, and 90 days. It was found that white leg shrimp fed with *Y. lipolytica* had the highest total hemocyte count, 8.20 ± 0.05 x. 10^6, 8.66 ± 0.02 x 10^6 and 8.90 ± 0.01 x 10^6 cells/ml and the highest phenoloxidase activity were 0.78 ± 0.03, 0.88 ± 0.01, and 0.91 ± 0.03 units/min/mg protein, respectively. Which were not significantly different ($P>0.05$) from white leg shrimp fed with *S. cerevisiae* that the total hemocyte counts were 8.00 ± 0.03 x 10^6, 8.15 ± 0.01 x 10^6, and 8.26 ± 0.03 x 10^6 cells/ml, respectively and the phenoloxidase activity were 0.75 ± 0.02, 0.82 ± 0.04 and 0.87 ± 0.02 units/min/mg protein, respectively, but were significantly different ($P<0.05$) from white leg shrimp fed with *W. anomalus* and the control group. Therefore, *Y. lipolytica* and *S. cerevisiae* can to stimulate the growth and immunity in white leg shrimp culture.

Keyword: probiotic yeast, growth, immunity, white leg shrimp

[1] Department of General Studies, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Sikao, Trang 92150.

[2] Department of Aquaculture and Fishery product, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Sikao, Trang 92150.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทนำ	1
- ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
- หลักการ แนวคิด ทฤษฎี หรือสมมติฐาน	2
- การทบทวนวรรณกรรม เอกสาร งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วัตถุประสงค์	8
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
วิธีการดำเนินงานวิจัย	9
ผลการวิจัยและอภิปรายผล	13
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	22
บรรณานุกรม	23
ภาคผนวก	27

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae*, W. *anomalus* และกุ้งขาวชุดควบคุม ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 90 วัน 17

ตารางที่ 2 ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae*, *W. anomalus* และกุ้งขาวชุดควบคุม ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 30, 60 และ 90 วัน 19

ตารางที่ 3 กิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica, S. cerevisiae*, *W. anomalus* และกุ้งขาวชุดควบคุม ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 30, 60 และ 90 วัน 20

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ยีสต์โปรไบโอติก *Yarrowia lipolytica* (ก และ ข) *Saccharomyces cerevisiae* (ค และ ง) และ *Wickerhamomyces anomalus* (จ และ ฉ) 13
ภาพที่ 2 อาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica, S. cerevisiae* และ *W. anomalus* 14
ภาพที่ 3 น้ำหนักของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica, S. cerevisiae*, *W. anomalus* และกุ้งขาวชุดควบคุม ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 0, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน 15
ภาพที่ 4 ความยาวของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica, S. cerevisiae*, *W. anomalus* และกุ้งขาวชุดควบคุม ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 0, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน 16

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ตามยุทธศาสตร์ชาติด้านการสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ตัวชี้วัดประกอบด้วย (1) พื้นที่สีเขียวที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (2) สภาพแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติที่เสื่อมโทรมได้รับการฟื้นฟู (3) การเติบโตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และ (4) ปริมาณก๊าซเรือนกระจก มูลค่าเศรษฐกิจฐานชีวภาพ ประเด็น 1. สร้างการเติบโตอย่างยั่งยืนบนสังคมเศรษฐกิจสีเขียว โดย (1) เพิ่มมูลค่าของเศรษฐกิจฐานชีวภาพให้สอดคล้องกับยุทธศาสตร์ด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขัน (2) อนุรักษ์และฟื้นฟูความหลากหลายทางชีวภาพในและนอกถิ่นกำเนิด (3) อนุรักษ์และฟื้นฟูแม่น้ำลำคลองและแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วประเทศ (4) รักษาและเพิ่มพื้นที่สีเขียวที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และ (5) ส่งเสริมการบริโภคและการผลิตที่ยั่งยืน ยุทธศาสตร์วิจัย วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) (2) การสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ยุทธศาสตร์มหาวิทยาลัย (1) สร้างความโดดเด่นและเป็นเลิศเฉพาะทางตามอัตลักษณ์เชิงพื้นที่ และยุทธศาสตร์จังหวัด (1) สร้างฐานเศรษฐกิจของจังหวัดด้านเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมที่มั่นคงและยั่งยืน

ประเทศไทยนับว่าเป็นหนึ่งในประเทศผู้นำทางด้านการประมงของโลก โดยผลผลิตสัตว์น้ำเฉลี่ยสูงถึงปีละ 3.7 ล้านตัน และในช่วงปี พ.ศ. 2554 - 2557 ทั้งสัตว์น้ำจืดและน้ำเค็มถือเป็นสัตว์เศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย กุ้งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่ทำรายได้ให้กับประเทศและเกษตรกรได้เป็นอย่างดี มีผู้นิยมเลี้ยงเป็นจำนวนมากในหลายพื้นที่ของประเทศไทย เช่น ภาคตะวันออก ภาคกลาง ภาคใต้ (Srithaworn, *et. al*., 2015) คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง มีพื้นที่ตั้งอยู่บริเวณชายฝั่งอันดามัน โดยคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมงมีงานฟาร์มที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวตลอดทั้งปีเพื่อเป็นช่องทางการสร้างรายได้ให้คณะ รวมทั้งชาวบ้านบริเวณใกล้เคียงมีการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวซึ่งเป็นอีกหนึ่งอาชีพที่สร้างรายได้มาเป็นเวลานาน แต่การเพาะเลี้ยงกุ้งในปัจจุบัน มักมีโรคระบาด ซึ่งปัญหาเกี่ยวกับโรคในการเพาะเลี้ยงกุ้งส่งผลให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างรุนแรง (Balcazar *et al*., 2006) จากสถิติปริมาณผลผลิตสัตว์น้ำรวมของประเทศเริ่มมีอัตราการเปลี่ยนแปลงที่ลดลงตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549 พบว่ามีอัตราการเปลี่ยนแปลงระหว่างปี พ.ศ. 2549 - 2554 ลดลงเฉลี่ยร้อยละ 5.55 ต่อปี โดยมีสาเหตุหนึ่งมาจากการเกิดโรค (Srithaworn, *et. al*., 2015) การควบคุมโรคโดยการใช้ยาปฏิชีวนะแม้จะได้ผล แต่การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นจำนวนมากทำให้แบคทีเรียสามารถพัฒนาสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ในที่สุด (Moriarty, 1997) และส่งผ่านยีนที่มีคุณสมบัติดื้อยาไปยังสายพันธุ์อื่น ๆ ทำให้ต้องเพิ่มปริมาณการใช้ยามากขึ้นเรื่อย ๆ ส่งผลทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ยิ่งกว่านั้นการใช้ยาปฏิชีวนะก่อให้เกิดปัญหาสารตกค้างในกุ้งซึ่งกระทบต่อการส่งออก ไม่เป็นที่ยอมรับในตลาดต่างประเทศ รวมถึงส่งผลต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค (Kumar *et al*., 2016) คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาศักยภาพของยีสต์โปรไบโอติกที่มีความสามารถในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus* ไม่เป็นพิษ สามารถรอดชีวิต และยึดเกาะกับลำไส้

กุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งเป็นผลงานวิจัยจากโครงการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2564 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย โดยศึกษาต่อยอดเพื่อพัฒนาศักยภาพยีสต์โปรไบโอติกดังกล่าวในการเสริมอาหารเม็ดสำเร็จรูปเพื่อศึกษาการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม เป็นแนวทางการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เป็นการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบยั่งยืน เพื่อผลิตอาหารปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคและเพิ่มมูลค่าผลผลิตสัตว์น้ำต่อไป

หลักการ แนวคิด ทฤษฎี หรือสมมติฐาน

ผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดในการใช้องค์ความรู้โปรไบโอติกเข้ามาแก้ปัญหา ซึ่งโปรไบโอติก (Probiotic) มีความหมายว่า เพื่อชีวิต (For life) (Gismondo *et al*., 1999; Farzanfar, 2006) ซึ่งตรงข้ามกับสารปฏิชีวนะ (Antibiotic) ที่หมายถึงการต้านชีวิต โปรไบโอติกเป็นเทคโนโลยีชีวภาพในการใช้จุลินทรีย์ที่มาจากธรรมชาติไม่เป็นภัยต่อสิ่งแวดล้อมมาทดแทนการใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะด้วยหลักการการใช้จุลินทรีย์ที่ดีไปควบคุมจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ผู้วิจัยสนใจการนำยีสต์โปรไบโอติกมาทำการศึกษาในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม เพราะการผลิตยีสต์สดสามารถผลิตได้ง่าย มีต้นทุนต่ำ ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลหรือหากต้องการผลิตยีสต์ในปริมาณมากสามารถผลิตยีสต์ในกากน้ำตาล ซึ่งกากน้ำตาลมีราคาแกลลอนละ 340 บาท สามารถใช้ได้กับบ่อเลี้ยงกุ้ง ขนาด 1 ไร่ รวมทั้งยีสต์โปรไบโอติกมีความคุ้มค่าสูง เนื่องจากยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ถือได้ว่ามีความปลอดภัย ไม่เป็นพิษ ไม่ก่อให้เกิดการแพ้ และไม่ก่อให้เกิดโรค (Fredlund *et al*., 2002) ยีสต์สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น โปรตีน กรดอะมิโน วิตามิน โพลีแซคคาไรด์ กรดไขมัน ฟอสโฟลิพิด โพลีเอมีน แอสตาแซนทิน แคโรทีนอยด์ ทรีฮาโลส กลูตาไธโอน และเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น ไลเปส โปรตีเอส อินเวอร์เทส ไฟเทส ไคติเนส และ ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (Zhenming *et al*., 2006; Nayak, 2011) ส่งเสริมให้ยีสต์มีกิจกรรมออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity) ที่หลากหลาย และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ยีสต์มีศักยภาพสูงในกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เนื่องจากยีสต์มีองค์ประกอบหลายชนิดที่มีผลโดยตรงต่อการต้านทานโรค เช่น เบต้ากลูแคน กรดนิวคลีอิก ไคติน โพลีเอมีน แมนโนโปรตีน แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ รวมทั้ง secondary metabolite เช่น แอสตาแซนทิน ที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโฮสต์ ซึ่งสามารถป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีเรียก่อโรค (Navarrete และ Tovar-Ramírez, 2014) นอกจากนี้ยีสต์มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานโรค เพิ่มอัตรารอดตาย และส่งเสริมการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำได้ (Chi *et al*., 2010) เป็นการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เป็นการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบยั่งยืน เพื่อผลิตอาหารปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคและเพิ่มมูลค่าผลผลิตสัตว์น้ำต่อไป อีกทั้งจุดเด่นของการนำยีสต์โปรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม เนื่องจากไม่มีรายงานการถ่ายโอนยีนดื้อยาระหว่างในยีสต์โปรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรค แต่ในการนำแบคทีเรียโปรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยง

กุ้งขาวแวนนาไมซึ่งมีอย่างกว้างขวางและมีมายาวนานแล้วนั้น จากการศึกษาพบว่าเกิดปัญหาการถ่ายโอนยีนดื้อยาระหว่างแบคทีเรียโปรไบโอติกกับแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งเป็นปัญหาและเป็นที่กังวลสำหรับผู้เพาะเลี้ยงและผู้บริโภคกุ้งขาวแวนนาไม

คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาศักยภาพของยีสต์โปรไบโอติกที่มีความสามารถในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus* ไม่เป็นพิษ สามารถรอดชีวิต และยึดเกาะกับลำไส้กุ้งขาวแวนนาไม มาเสริมอาหารเม็ดสำเร็จรูปเพื่อศึกษาการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม เพื่อเป็นแนวทางการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เป็นการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบยั่งยืน เพื่อผลิตอาหารปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคและเพิ่มมูลค่าผลผลิตสัตว์น้ำต่อไป

การทบทวนวรรณกรรม เอกสาร งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ยีสต์ (Yeast) คือ ราที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นจุลินทรีย์ขนาดเล็กที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส หรือ eukaryotic microorganism มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อ (Budding) หรือแบ่งตัว (Fission) เนื่องจากเป็นเซลล์เดี่ยวจึงเจริญและสืบพันธุ์ได้เร็วกว่าเชื้อราที่เป็นเส้นสาย และมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้ดีกว่า เนื่องจากมีอัตราส่วนของพื้นผิวต่อปริมาตรสูงกว่า (Kurtzman and Fell, 2000) ยีสต์ต่างจากสาหร่ายเนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ และไม่เหมือนโปรโตซัวเพราะมีผนังเซลล์ที่แข็งแรง นอกจากนี้ยังแตกต่างไปจากแบคทีเรียส่วนใหญ่ เพราะมีขนาดใหญ่กว่า และสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน ขนาดของยีสต์แตกต่างกันตั้งแต่ ความกว้าง 1-5 µm และความยาว 5-30 µm หรือมากกว่า มักมีรูปไข่ แต่บางชนิดมีรูปร่างยาวและบางชนิดเป็นทรงกลม ยีสต์ไม่มีแฟลกเจลลาหรืออวัยวะอื่นที่ใช้ในการเคลื่อนที่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม โคโลนีของยีสต์มีขนาด รูปร่าง โครงสร้าง และขอบแตกต่างกัน บางชนิดอาจมีโคโลนีเรียบ บางชนิดย่น ขรุขระ บางชนิดแบนราบ หรือนูนสูงขึ้น บางชนิดขอบเรียบ บางชนิดขอบไม่แน่นอนหรือคล้ายเส้นขน โคโลนีอายุน้อยมีความหนืดคล้ายแป้งเปียก เมื่ออายุมากขึ้นจะยิ่งหนาและแห้งมากขึ้น และอาจสร้างรงควัตถุด้วย การเจริญในอาหารเหลวมีลักษณะสำคัญบางชนิดเจริญที่ก้นหลอดตกตะกอน บางชนิดเจริญอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งหลอด บางชนิดเจริญเฉพาะผิวหน้าอาหาร เป็นแผ่นหรือฟิล์มปกคลุม ยีสต์บกหรือ terrestrial yeast มีการนำมาใช้อย่างหลากหลายในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ขนมอบ เครื่องดื่ม ไวน์ ไบโอเอทานอล และอุตสาหกรรมยา ในขณะที่ยีสต์ทะเลหรือ marine yeast ซึ่งพบกระจายในสิ่งแวดล้อมทางทะเล ได้แก่ น้ำทะเล ตะกอนดิน ตะกอนดินทะเล ปากอ่าว วัชพืช สาหร่าย สัตว์ทะเล และระบบนิเวศของป่าชายเลน และมีรายงานถึงประโยชน์ในด้านต่าง ๆ และผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากยีสต์ทะเล พบว่า ยีสต์ทะเลใช้เป็น biocontrol agents ได้แก่ probiotic, immuno-stimulants, siderophores, killer toxins และ vaccine ยีสต์ทะเลสามารถใช้เป็นผู้ผลิต bio-products ต่าง ๆ เช่น industrial enzyme, riboflavin, single cell protein, single cell oil และ nanoparticle นอกจากนี้สามารถใช้กำจัดมลพิษจากสิ่งแวดล้อมทางทะเล (Chi *et al*., 2010)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่กำลังได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นจากนักอุตสาหกรรมและนักวิทยาศาสตร์เนื่องจากยีสต์มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity) ที่หลากหลาย สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอาหารได้อย่างกว้างขวาง ซึ่งนอกจากยีสต์จะมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกแล้ว ยีตส์ยังมีคุณสมบัติต้านจุลินทรีย์ได้อีกด้วย โดยมีการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ เช่น แบคทีเรีย และเชื้อราได้ ซึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้ของยีสต์เกี่ยวข้องกับ สารอาหาร ความเป็นกรดด่างในอาหารที่ยีสต์เจริญ การทนต่อเอธานอลความเข้มข้นสูง และการปลดปล่อยสารต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial compound) เช่น สารพิษต้านเชื้อรา (Antifungal killer toxin) และสารต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของยีสต์ มีความเกี่ยวข้องกับการผลิต secondary metabolites ที่เรียกว่า killer toxin หรือ mycocins (Hatoum *et al*., 2012) โดยนักวิทยาศาสตร์นิยมเรียกยีสต์ที่สร้าง killer toxin ได้ว่า killer yeast จากการศึกษาของทีมนักวิจัยจาก Ocean University of China พบว่า *Aureobasidium purpullans* HN2.3, *Debaromyces hansenii* hex-1, *Pichia guilliermondii* GZ1, *P. anomala* YF07b และ *Williopsis saturnus* WC91-2 ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมทางทะเล สามารถสร้างสาร killer toxin ที่ยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่ก่อโรคในปู ส่วน *A. pullulans* HN2.3 สร้างสารต้นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็น siderophore และสามารถฆ่าแบคทีเรีย *Vibrio anguillaram* และ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคในกุ้งได้ แต่ไม่มีผลต่อยีสต์ที่ก่อโรคโรคในปู (Wang *et. al*., 2009) ยีสต์ถือว่าเป็นหนึ่งในโปรไบโอติกที่ช่วยในเรื่องการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์ได้ของอาหาร จึงถูกนำไปใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำกันอย่างแพร่หลาย เช่น ในปลา Catla carp, ปลา Mrigal carp, ปลาลูกผสม Striped bass, ปลา Japanese flounder, ปลา Grouper (*Epinephelus coioides*) ตลอดจนปลานิลและปลา Galilee tilapia (*Sarotherodon galilaeus*) (นันทพร และคณะ, 2561) เนื่องจากผนังเซลล์ของยีสต์มีสารพวก β-glucans สาร mannan และสาร nucleic acid ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของโฮสต์ (Kühlwein *et al*., 2014) นอกจากนี้ Chang และคณะ (2003) รายงานว่าการให้อาหารกุ้งที่มีส่วนผสมของเบต้ากลูแคนในระดับ 10 กรัม/กิโลกรัมของอาหารกุ้ง เป็นเวลา 20 วัน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำได้ และจากงานวิจัยของ Zhenming และคณะ (2006) พบว่า ยีสต์สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น polyamine ทำให้กุ้งมีอัตรารอดสูงขึ้นรวมทั้งผลิตเม็ดเลือดได้มากขึ้น รวมทั้งการนำ astaxantrin และ carotenoid ใส่ในอาหารสัตว์สามารถเป็นสารตั้งต้นในการผลิตวิตามินเอได้ และจากรายงานการใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว โดยประเมินจากองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ได้แก่ total haemocyte count, phenoloxidase, bactericidal activity และความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับเบต้ากลูแคน ความเข้มข้น 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 14 วัน มีระดับภูมิคุ้มกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) จากกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคน 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมและกลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคน 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม (ฉัทชนัน และคณะ, 2549) รวมทั้งจากรายงานการศึกษาผลของการใช้กากยีสต์ในสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่ระดับ 0 (กลุ่มควบคุม)

2.5, 5, 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ของสูตรพบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีค่าการเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ได้ของโปรตีนจากอาหาร ดัชนีตับ องค์ประกอบทางเคมีในกุ้ง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และมีอัตราการรอดมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ในทุกชุดการทดลอง ในส่วนของค่าโลหิตวิทยาและค่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน พบว่า มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระดับการใช้กากยีสต์ (เดชวัฒน์ และคณะ, 2562)

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) อนุกรมวิธานของกุ้งขาวแวนนาไม จัดจำแนกโดย Perez Farfante และ Kensley (1997)

Phylum Arthropoda
Class Crustacea
Subclass Malacostraca
Order Decapoda
Suborder Dendrobrachiata
Family Penaeoidea
Litopenaeus vannamei (Boone, 1931)

กุ้งขาวแวนนาไม เป็นสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยทั่วไปเมื่อสมบูรณ์เต็มที่ตัวเมียจะใหญ่กว่าตัวผู้ มีลักษณะรูปร่าง คือ ลำตัวมี 8 ปล้อง มีสีขาว หน้าอกใหญ่ การเคลื่อนไหวเร็ว โดยแบ่งเป็นส่วนหัวมี 1 ปล้อง มีกรีอยู่ในระดับยาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวเปลือกหัว สันกรีสูง ปลายกรีแคบ ส่วนของกรีมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมมีสีแดงอมน้ำตาล กรีด้านบนมี 8 ฟัน กรีด้านล่างมี 2 ฟัน ร่องบนกรีมองเห็นได้ชัด มีหนวดสีแดง 2 เส้นยาว ตาแดงเข้ม ส่วนลำตัว มี 6 ปล้อง เปลือกตัวสีขาวอมชมพูถึงแดง เปลือกบาง ขาว่ายน้ำ 5 คู่ มีสีขาวข้างในที่ปลายมีสีแดง ส่วนหางมี 1 ปล้อง ปลายหางมีสีแดงเข้ม แพนหางมี 4 ใบ และมี 1 กรีหาง กุ้งขาวแวนนาไมหากินทุกระดับความลึกของน้ำ ชอบว่ายน้ำ ล่องแก่ง ลอกคราบเร็วทุก ๆ สัปดาห์ ไม่หมกตัว มีความแข็งแรง แต่มีนิสัยตื่นตกใจง่าย สามารถสร้างความคุ้นเคยหรือปรับลักษณะนิสัยภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงได้ดี สามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งในระบบธรรมชาติและระบบกึ่งหนาแน่น ทั้งในบริเวณพื้นที่ชายฝั่งหรือบริเวณพื้นที่ที่มีความเค็มต่ำ แต่ระดับความเค็มที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี คือ 10 – 22 ppt อุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ดี คือ 26 – 29 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดและด่างควรอยู่ระหว่าง 7.2 – 8.6 ระดับออกซิเจนที่ละลายในน้ำควรมีค่า 4 – 9 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยกุ้งขาวแวนนาไมชอบน้ำที่มีความกระด้างรวม 120 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าอัลคาไลน์ในช่วง 80 - 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (ธวัชชัย, 2545) กุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งที่กินได้ทั้งพืชและสัตว์ จุลินทรีย์ รวมทั้งซากเน่าเปื่อย พฤติกรรมการกินอาหารจะชอบกินอาหารกลางน้ำ อาหารที่ตกลงไปอยู่ที่พื้นบ่อแล้ว กุ้งจะลงไปโฉบและอุ้มขึ้นมาแทะกินกลางน้ำ ซึ่งกุ้งขาวแวนนาไมจะกินอาหารได้ดีในช่วงเวลาตั้งแต่ 08.00 น. ถึง 20.00 น. โดยเฉพาะช่วงบ่ายแก่ ๆ กุ้งจะกินสาหร่าย ผักบุ้งเมื่ออาหารไม่เพียงพอ (ภิญโญ, 2545) ใน

ระบบการเลี้ยงแบบพัฒนาแล้วอาหารธรรมชาติที่มีในบ่อไม่เพียงพอต่อปริมาณกุ้งที่หนาแน่น จึงต้องมีการให้อาหารเพิ่ม สำหรับความต้องการโปรตีนจะแตกต่างกันตามช่วงอายุของกุ้ง โดยเปอร์เซ็นต์โปรตีนในอาหารจะลดลงเมื่ออายุของกุ้งเพิ่มขึ้น โดยในช่วงวันที่ 1 ถึง 40 ให้อาหารที่มีโปรตีนสูง 40% (วัฒนา, 2554) อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ปัจจัย คือ ความถี่ในการลอกคราบและขนาดที่เพิ่มขึ้น เพราะตัวกุ้งจะถูกห่อหุ้มด้วยเปลือกที่มีโครงสร้างแข็งแรง จึงต้องลอกคราบเก่าออกและสร้างคราบใหม่ที่ใหญ่ขึ้นเพื่อรองรับการขยายขนาดที่เพิ่มขึ้น ในช่วงก่อนการลอกคราบ กุ้งจะสร้างคราบใหม่ที่ยังนิ่มอยู่ไว้ภายในชั้น cuticle และ intercalary sclerite เมื่อถึงเวลาลอกคราบ กุ้งจะสลัดตัวหลุดออกจากคราบเก่าโดยใช้หาง คราบใหม่ที่ยังนิ่มอยู่ในช่วงแรกก็จะแข็งขึ้น พร้อมกับขนาดของกุ้งที่มีขนาดใหญ่ขึ้น การลอกคราบยังขึ้นอยู่กับอายุของกุ้ง อุณหภูมิของน้ำ ความอุดมสมบูรณ์ของอาหาร (ประจวบ, 2537)

ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) ไม่สามารถจดจำความแตกต่างของสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพต่าง ๆ ได้อย่างจำเพาะเจาะจง และไม่มีการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอม (มลฤดี, 2559) เนื่องจากระบบหมุนเวียนเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระบบเปิด (open circulatory system) ประกอบด้วย หัวใจ แอ่งเลือด และน้ำเหลือง เลือดจากหัวใจจะไหลเข้าไปในแอ่งเลือดจากนั้นจะไหลไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย อวัยวะในการสร้างเม็ดเลือด เรียกว่า hematopoietic tissue สามารถพบที่ตำแหน่งด้านบนของกระเพาะอาหาร และโคนขาเดิน โดยจะพบอยู่เป็นชุด ๆ ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและบริเวณใกล้กับแอ่งเลือด น้ำเลือดกุ้งมีแร่ธาตุคาร์บอน (C), ไนโตรเจน (N), ไฮโดรเจน (H), ซัลเฟอร์ (S) และคอปเปอร์ (Cu) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ โดยแร่ธาตุคอปเปอร์ ทำให้น้ำเลือดของกุ้งมีสีน้ำเงิน นอกจากนี้ในน้ำเลือดกุ้งยังมีรงควัตถุที่ทำ หน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ คือ hemocyanin โดยมีจำนวนประมาณ 60-95 เปอร์เซ็นต์ในน้ำเลือดทั้งหมด ซึ่งปริมาณของ hemocyanin จะมีการเปลี่ยนแปลงมากน้อยตามเพศ ขนาดของตัวกุ้ง และวงจรการลอกคราบของตัวกุ้ง กุ้งมีกลไกการป้องกันตนเองจากสิ่งแปลกปลอมหรือสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคโดยเม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สำคัญ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลไก คือ กลไกการป้องกันตนเองโดยโครงสร้างภายนอกของร่างกาย (external defence mechanism) กุ้งมีโครงสร้างแข็งภายนอก (exoskeleton structure) ซึ่งเป็นสารพวก chitin และ chitosan โดยบริเวณเนื้อเยื่อภายใต้โครงสร้างปกคลุม ที่เรียกว่า เปลือกจะมีเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสารเมือก (mucopolysaccharide หรือ mucous) และหลั่งสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเอส (protease inhibitor) ที่สร้างจากเชื้อก่อโรคได้ นอกจากนี้ในขณะที่กุ้งลอกคราบ (molting) เพื่อการเจริญเติบโต กุ้งก็จะสามารถกำจัดพวกปรสิต บริเวณผิวตัวออกไปพร้อมกับเปลือกแข็งด้วย อีกกลไก คือ การป้องกันตนเองภายในร่างกาย (internal defence mechanism) เมื่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ กุ้งจะมีการตอบสนองภายในร่างกาย 2 ระบบ (ทัศนีย์, 2555) คือ ระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีการตอบสนองโดยเซลล์ (cellular immune response) ซึ่งเป็นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด เช่น กระบวนการฟาโกไซโทซีส (phagocytosis) การผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion production) กระบวนการ

ห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่ (encapsulation) กระบวนการสร้างสารเมลานินที่เปลือก (melanisation) ที่เกี่ยวข้องกับระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase cascade, proPO) (Soderhall and Cerenius, 1992) ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) 3 ชนิด คือ ไฮยาลิน เซลล์ (Hyaline cell) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีรูปร่างแบน กลม ผิวเรียบ , เซมิกรานูลลาร์ (Semigranular hemocyte) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่พบลักษณะของเม็ดกรานูลขนาดเล็กอยู่ในเซลล์ และกรานูลาร์ (Large granular hemocyte) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด (กิจการ, 2543) และระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีการตอบสนองโดยการหลั่งสารน้ำ (humoral immune response) ที่เป็นการทำงานของโปรตีนต่าง ๆ ที่อยู่ในน้ำเลือด เช่น แอคกลูตินิน (agglutinin) สารคล้ายไซโตไคน์และคอมพลีเมนต์ (cytokine and complement like factors) โมดูเลเตอร์ (modulators) สารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clotting proteins) และสารน้ำที่เป็นผลิตภัณฑ์จากระบบโปรฟีนอลออกซิเดสที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือด สารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide, AMPs) โดยทั้ง 2 ระบบนี้จะมีการทำงานร่วมกัน เพื่อทำหน้าที่ป้องกันและทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวกุ้ง (Soderhall and Cerenius, 1992) โดยเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งจะมีการผลิตสารโปรตีน ทำหน้าที่ช่วยในการจดจำ และเข้าจับกันได้กับโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรค ซึ่งมีชื่อเรียกว่า pattern recongition protein (PRPs) มีน้ำหนักประมาณ 100 กิโลดาลตัน (kDa) จะไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด โดย PRPs มีชื่อเรียกต่าง ๆ กันตามความสามารถในการจับกับโมเลกุลของเชื้อก่อโรค เช่น ถ้า PRPs จับกับโมเลกุลของเบต้ากลูแคน ซึ่งสามารถสกัด ได้จากผนังเซลล์ (cell wall) ของยีสต์ (yeast) และ hyphae ของ เชื้อราจะมีชื่อเรียกว่า β-glucan binding protein ในส่วนของ เปปติโดกลัยแคนสามารถสกัดได้จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก จะมีชื่อเรียกว่า peptidoglycan binding protein และไลโพโพลีแซคคาร์ไรด์สามารถสกัดได้จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ มีชื่อเรียกว่า lipopolysaccharide binding protein โดยโมเลกุลของสารเบต้ากลูแคน, ไลโพโพลีแซคคาร์ไรด์ และเปปติโดกลัยแคน เรียกรวม ๆ ว่า pathogen associated molecular pattern (PAMPs) เมื่อ PAMPs แต่ละชนิดเข้ามาในกระแสเลือดกุ้ง โมเลกุลของ PRPs จะเคลื่อนที่เข้าไปจับกับ PAMPs ส่งผลให้ได้เป็นโมเลกุลเชิงซ้อนproteincomplex) คือ β-1,3-glucan-binding protein complex , lipopolysaccharide -bindingproteincomplex และ peptidoglycan-bindingprotein complex โมเลกุลเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือด ให้เคลื่อนที่เข้ามา (migration) ซึ่งบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดชนิด semi-granular cell และ large granular cell มีส่วนรองรับแบบจำเพาะ (receptor) ซึ่งสามารถรองรับโมเลกุลเชิงซ้อนและกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ degranulation ของเม็ดเลือด ซึ่งภายในกรานูลจะประกอบไปด้วย เอนไซม์ และสารประกอบโปรตีนต่าง ๆ ได้แก่ เอนไซม์ transglutaminase (TGase), lectin, peroxinectin, protein released และเอนไซม์ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system โดยสารทั้งหมดที่หลั่งออกมากระตุ้นให้เกิดกระบวนการต่าง ๆ ซึ่งจะยับยั้งหรือทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวกุ้ง เช่น กระบวนการแข็งตัวของเลือด การหลั่งสาร lectin กระบวนการ prophenoloxidase activating system (ทัศนีย์, 2555)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อผลิตสูตรสำเร็จของยีสต์โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม
2. เพื่อใช้ยีสต์โปรไบโอติกเสริมอาหารเม็ดสำเร็จรูปต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ด้านวิชาการ ได้สูตรสำเร็จของอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโต (น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ความยาวที่เพิ่มขึ้น ร้อยละน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน) อัตราการรอดตาย อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน
2. ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์ ได้พัฒนาไปสู่การเพิ่มผลผลิตกุ้งขาวแวนนาไมทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ เป็นการเพิ่มมูลค่าผลผลิตสัตว์น้ำ
3. ด้านสังคมและชุมชน นำองค์ความรู้ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมแบบเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ผลิตอาหารปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค
4. ด้านการเผยแพร่ นำองค์ความรู้ไปถ่ายทอดให้นักศึกษา ผู้สนใจ และเผยแพร่ข้อมูลในการประชุมทางวิชาการ การตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติหรือนานาชาติ

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การใช้ยีสต์โปรไบโอติกเสริมอาหารเม็ดสำเร็จรูปต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

1.1 การวางแผนการทดลอง

- นำยีสต์โปรไบโอติก 3 สายพันธุ์ คือ *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Wickerhamomyces anomalus* ที่มีกิจกรรมยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ไม่เป็นพิษต่อกุ้งขาวแวนนาไม มีความสามารถในการรอดชีวิต และยึดเกาะกับลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมได้ (จากผลการดำเนินงานโครงการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2564 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย) มาทดสอบเสริมอาหารเม็ดสำเร็จรูปกระตุ้นการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

- วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design: CRD) มีชุดการทดลองทั้งหมด 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปไม่เสริมยีสต์ (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica* ความ ความเข้มข้น 10^8 CFU/g ของอาหารกุ้ง

ชุดการทดลองที่ 3 กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ความเข้มข้น 10^8 CFU/g ของอาหารกุ้ง

ชุดการทดลองที่ 4 กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *W. anomalus* ความเข้มข้น 10^8 CFU/g ของอาหารกุ้ง

1.2 การเตรียมอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่เสริมยีสต์โปรไบโอติก

- อาหารที่ใช้ทดลองเป็นอาหารเม็ดสำเร็จรูปเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม มีระดับโปรตีนไม่ต่ำกว่า 40% และไขมันไม่ต่ำกว่า 3%

- ทำการเลี้ยงยีสต์โปรไบโอติก *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae* และ *W. anomalus* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และปรับให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g ของอาหารกุ้ง ทำการสเปรย์ยีสต์โปรไบโอติกให้ทั่วอาหารเม็ดสำเร็จรูปกุ้งขาวแวนนาไม โดยเตรียมอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่เสริมยีสต์โปรไบโอติกมีชีวิตนำไปเลี้ยงกุ้งขาวแบบวันต่อวัน

1.3 การเตรียมระบบการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (Yeh *et al.*, 2008)

- ทำการทดลองในถังพลาสติก ขนาด 200 ลิตร จำนวน 20 ถัง เติมน้ำทะเลที่มีความเค็ม 27 - 30 ppt ลงไป 300 ลิตร แต่ละถังทำระบบน้ำหมุนเวียนภายในถัง โดยมีการให้อากาศด้วยหัวทรายตลอดเวลา และปิดปากถังด้วยตาข่ายหรือซาแลนเพื่อป้องกันการกระโดดของกุ้งออกจากถัง

- นำกุ้งขาวแวนนาไม ขนาด 2 กรัม จากฟาร์มเพาะฟักของบริษัทเอกชนมาปรับสภาพในถังเลี้ยงกุ้งพลาสติก ขนาด 500 ลิตร เป็นเวลา 5 วัน

- สุ่มกุ้งขาวแวนนาไมดังกล่าวไปเลี้ยงในถังพลาสติกใหม่ ขนาด 200 ลิตร ถังละ 100 ตัว จำนวน 20 ถัง ให้ความหนาแน่นประมาณ 100 ตัวต่อตารางเมตร

- การทดลองจะให้อาหารกุ้งตามชุดการทดลอง โดยให้วันละ 3 ครั้ง คือ ช่วงเวลา 07.00 น. 14.00 น. และ 19.00 น. และให้อาหารในปริมาณ 8% ของน้ำหนักกุ้งต่อวัน สังเกตอาหารที่ให้ในถังทดลองต้องเหลือเพียงเล็กน้อย ไม่ให้อาหารเผื่อเหลือ เพื่อให้ค่าที่ได้ใกล้เคียงความเป็นจริง ทำการบันทึกน้ำหนักอาหารที่กุ้งกิน เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ โดยปรับปริมาณอาหารตามปริมาณการกินของกุ้ง

- ทำการควบคุมคุณภาพน้ำ ให้อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 27 - 30 องศาเซลเซียส pH 7.5 - 8.0 และความเค็ม 27 - 30 ppt ปริมาณออกซิเจนในน้ำอยู่ที่ 4 - 5 ppm ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำปริมาตร 50% ของน้ำในถังเลี้ยงกุ้งเป็นประจำวันเว้นวัน อาหารที่เหลือและของเสียในถังเลี้ยงกุ้งทำการกำจัดด้วยวิธีกาลักน้ำเป็นประจำทุกวันในตอนเช้าก่อนการให้อาหารกุ้งตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 90 วัน

1.4 การทดสอบใช้ยีสต์โปรไบโอติกเสริมอาหารเม็ดสำเร็จรูปต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ของกุ้งขาวแวนนาไม

- ทำการสุ่มตัวอย่างกุ้งทุก ๆ 15 วันของการทดลอง โดยสุ่มกุ้ง จำนวน 20 ตัวต่อถัง จากทุกชุดการทดลอง มาทำการศึกษาการเจริญเติบโต โดยตรวจวัดน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight Gain, WG) ความยาวที่เพิ่มขึ้น (Length Gain, LG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน (Specific Growth Rate, SGR, % ต่อวัน) และทำการศึกษาอัตราการรอดตาย (Survival Rate, %) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed Conversion Rate, FCR) โดยคำนวณตามสูตร (Zokaeifar *et al.*, 2012)

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม) (Weight Gain, WG) = W(2) – W(1)

W(1) = น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) เมื่อเริ่มต้นการทดลอง

W(2) = น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ความยาวที่เพิ่มขึ้น (เซนติเมตร) (Length Gain, LG) = L(2) – L(1)

L(1) = ความยาวเฉลี่ย (เซนติเมตร) เมื่อเริ่มต้นการทดลอง

L(2) = ความยาวเฉลี่ย (เซนติเมตร) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน (ร้อยละต่อวัน)

(Specific growth rate, SGR) = $\left[\frac{\ln W(2) - W(1)}{\text{ระยะเวลาการทดลอง (วัน)}}\right] \times 100$

W(1) = น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) เมื่อเริ่มต้นการทดลอง

W(2) = น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

อัตราการรอดตาย (ร้อยละ) (Survival rate) = $\frac{\text{จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อเริ่มการทดลอง}} \times 100$

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) = $\frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักกุ้งทั้งหมดที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}$

1.5 การทดสอบใช้ยีสต์โปรไบโอติกเสริมอาหารเม็ดสำเร็จรูปต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม (Ji *et al*., 2009)

- ทำการสุ่มตัวอย่างกุ้งที่มีอายุการเลี้ยง 30, 60 และ 90 วัน โดยสุ่มกุ้ง จำนวน 10 ตัวต่อถัง จากทุกชุดการทดลอง ทำการเจาะเลือดกุ้งจากบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ของกุ้งแต่ละตัว ด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร หัวเข็ม 26G นำเลือดที่ได้มาผสมกับสารป้องกันเลือดแข็งตัว (30 mM trisodium citrate, 340 mM NaCl, 10 mM EDTA, 120 mM glucose, pH 7.55) ในอัตราส วน 1:1 (Vargas-Albores *et al*., 1993) แล้วนำไปตรวจสอบปริมาณเม็ดเลือดรวมและกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

- ตรวจสอบปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocyte count, THC) นำเลือดกุ้งที่ผสมอยู่ในสารป้องกันเลือดแข็งตัวมาผสมกับ 10% ฟอร์มาดีไฮด์ ในอัตรา 1:1 เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปนับจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด โดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด (Hemacytometer) และคำนวณปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้โดยรายงานเป็นจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร

- ตรวจสอบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity, PO) (Jorge *et al*., 1996) นำเลือดกุ้งที่ผสมอยู่ในสารป้องกันเลือดแข็งตัวไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือด และนำเฉพาะส่วนของเม็ดเลือดจากกุ้งมาทำให้เซลล์แตก โดยใช้วิธีหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วสูง 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนใส (Hemolysate, HLS) ที่มีเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส มาวิเคราะห์ โดยใช้ L-DOPA (L- dihydroxyphenylalanine) เป็นสารตั้งต้นปฏิกิริยา โดยปิเปต HLS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมของ 96 well plate ตัวอย่างละ 3 หลุม หลังจากนั้นเติม Trypsin (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที และเติม L-PODA (3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตรต่อหลุม วางทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุก ๆ 2 นาที เป็นเวลา 20 นาที ปริมาณโปรตีนใน HLS วิเคราะห์โดยใช้วิธีของ Lowry *et al*., 1951 และนำค่าที่

ได้มาคำนวณค่าหน่วยต่อนาที (unit/min) ของเอนไซม์ โดยกำหนดให้ 1 หน่วยเท่ากับความสามารถของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่สามารถเปลี่ยน L-PODA ไปเป็นโดปามีน (dopamin) ด้วยการดูดกลืนแสง 0.001/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน

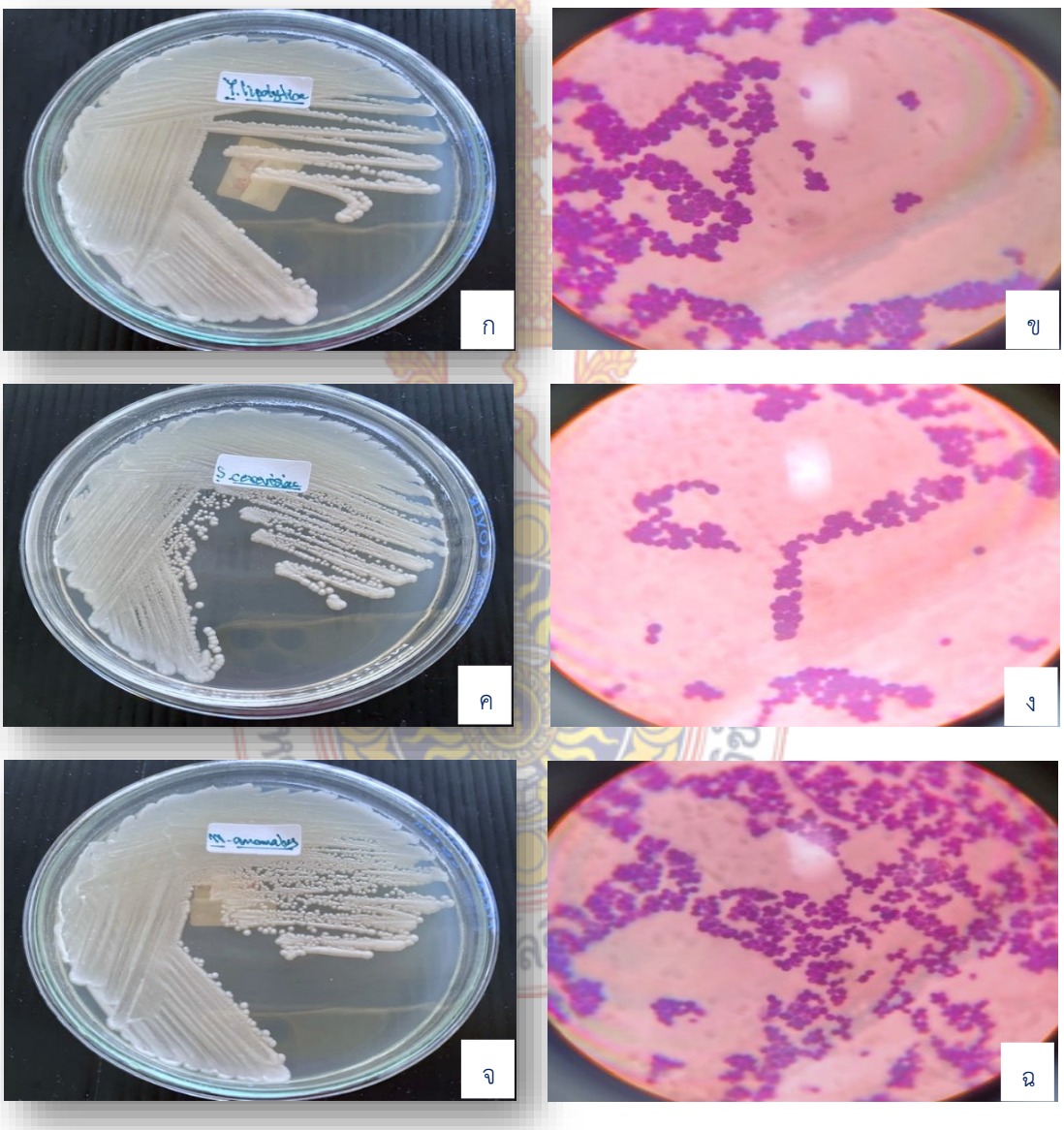
2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย Analysis of Variance (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของแต่ละพารามิเตอร์ระหว่างชุดการทดลองด้วย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

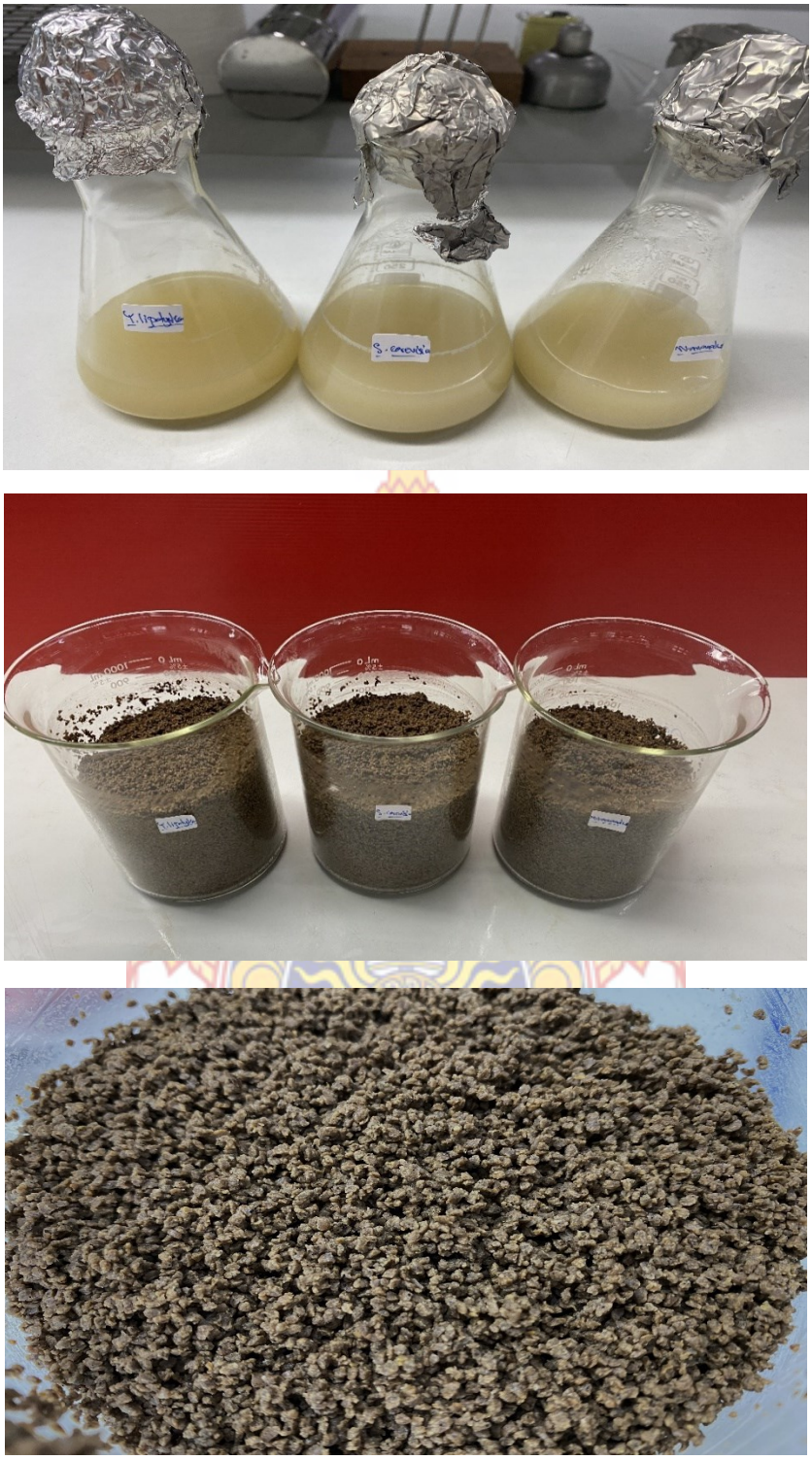
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. สายพันธุ์ยีสต์และการเตรียมอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์

นำยีสต์โปรไบโอติก 3 สายพันธุ์ คือ *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Wickerhamomyces anomalus* (ภาพที่ 1) มาเสริมอาหารเม็ดสำเร็จรูปให้มีความเข้มข้น 10^8 CFU/g ของอาหารกุ้ง (ภาพที่ 2)



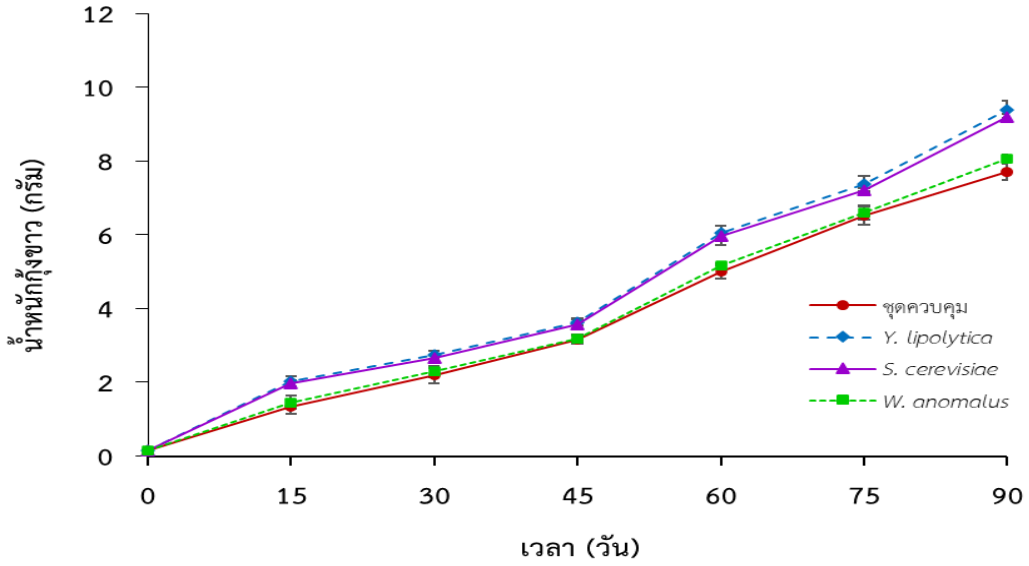
ภาพที่ 1 ยีสต์โปรไบโอติก *Yarrowia lipolytica* (ก และ ข) *Saccharomyces cerevisiae* (ค และ ง) และ *Wickerhamomyces anomalus* (จ และ ฉ)



ภาพที่ 2 อาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica, S. cerevisiae* และ *W. anomalus*

2. น้ำหนักของกุ้งขาว

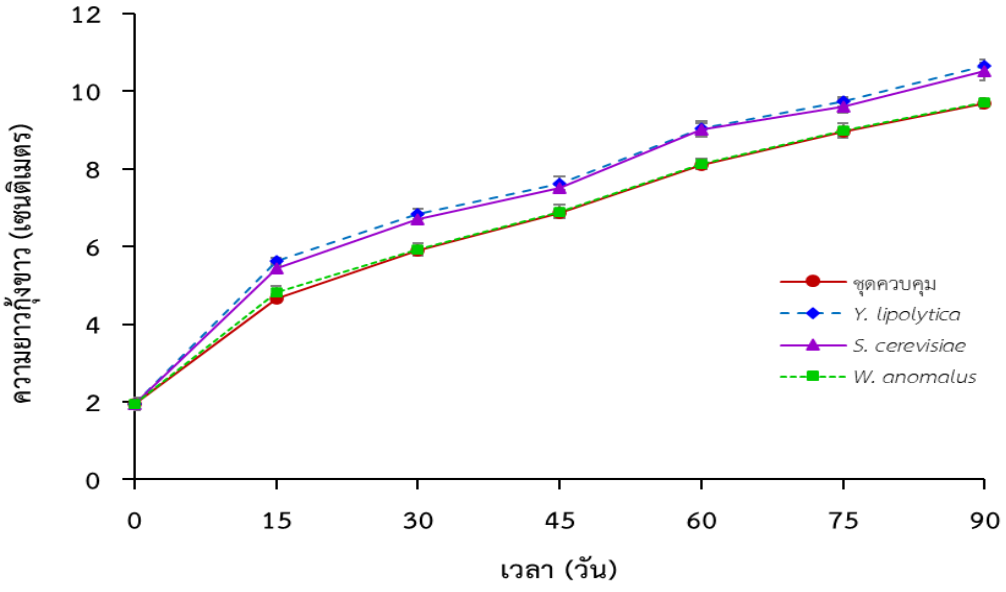
การตรวจวัดน้ำหนักของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica, S. cerevisiae*, *W. anomalus* และกุ้งขาวชุดควบคุม เมื่อเริ่มต้นการทดลองกุ้งขาวมีน้ำหนักเฉลี่ยทุกชุดการทดลอง เท่ากับ 0.16 ± 0.2 กรัม เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 90 วัน โดยทำการตรวจวัดน้ำหนักที่ 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica* มีน้ำหนักมากที่สุด คือ 2.03 ± 0.13, 2.74 ± 0.11, 3.63 ± 0.10, 6.06 ± 0.19, 7.36 ± 0.24 และ 9.39 ± 0.23 กรัม ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าไม่แตกตางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* คือ 1.96 ± 0.10, 2.65 ± 0.09, 3.58 ± 0.12, 5.97 ± 0.26, 7.22 ± 0.05 และ 9.18 ± 0.09 กรัม แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกุ้งขาวชุดควบคุมที่มีน้ำหนักน้อยที่สุด คือ 1.33 ± 0.18, 2.18 ± 0.21, 3.15 ± 0.11, 4.99 ± 0.19, 6.52 ± 0.24 และ 7.70 ± 0.23 กรัม และกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *W. anomalus* คือ 1.45 ± 0.18, 2.29 ± 0.14, 3.19 ± 0.11, 5.16 ± 0.07, 6.60 ± 0.19 และ 8.06 ± 0.12 กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 น้ำหนักของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica, S. cerevisiae*, *W. anomalus* และกุ้งขาวชุดควบคุม ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 0, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน

3. ความยาวของกุ้งขาว

การตรวจวัดความยาวของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica, S. cerevisiae*, *W. anomalus* และกุ้งขาวชุดควบคุม เมื่อเริ่มต้นการทดลองกุ้งขาวมีความยาวเฉลี่ยทุกชุดการทดลอง เท่ากับ 1.95 ± 0.14 กรัม เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 90 วัน โดยทำการตรวจวัดความยาวที่ 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica* มีความยาวมากที่สุด คือ 5.62 ± 0.10, 6.83 ± 0.14, 7.62 ± 0.17, 9.05 ± 0.18, 9.73 ± 0.12 และ 10.65 ± 0.17 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* คือ 5.45 ± 0.11, 6.71 ± 0.11, 7.51 ± 0.08, 9.00 ± 0.17, 9.61 ± 0.18 และ 10.51 ± 0.23 เซนติเมตร แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกุ้งขาวชุดควบคุมที่มีความยาวน้อยที่สุด คือ 4.66 ± 0.11, 5.89 ± 0.11, 6.86 ± 0.08, 8.09 ± 0.07, 8.95 ± 0.09 และ 9.68 ± 0.12 เซนติเมตร และกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *W. anomalus* คือ 4.81 ± 0.16, 5.93 ± 0.16, 6.90 ± 0.18, 8.13 ± 0.14, 8.98 ± 0.19 และ 9.72 ± 0.11 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ความยาวของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica, S. cerevisiae*, *W. anomalus* และกุ้งขาวชุดควบคุม ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 0, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน

4. การเจริญเติบโตของกุ้งขาว

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกุ้งขาวหลังจากสิ้นสุดการทดลอง 90 วัน พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica* มีค่าสูงสุด คือ 9.23 ± 0.12 กรัม ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* คือ 9.02 ± 0.06 กรัม แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *W. anomalus* คือ 7.90 ± 0.07 กรัม และกุ้งขาวชุดควบคุม คือ 7.54 ± 0.13 กรัม ซึ่งผลการทดลองเป็นไปทางเดียวกันกับความยาวที่เพิ่มขึ้นของกุ้งขาว พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica* มีค่าสูงสุด คือ 8.70 ± 0.17 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* คือ 8.56 ± 0.19 เซนติเมตร แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *W. anomalus* คือ 7.77 ± 0.13 เซนติเมตร และกุ้งขาวชุดควบคุม คือ 7.73 ± 0.13 เซนติเมตร (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae*, W. *anomalus* และกุ้งขาวชุดควบคุม ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 90 วัน

การเจริญเติบโต	ชุดควบคุม	ชุดอาหารเสริม *Y. lipolytica*	ชุดอาหารเสริม *S. cerevisiae*	ชุดอาหารเสริม *W. anomalus*
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	7.54 ± 0.13^{b}	9.23 ± 0.12^{a}	9.02 ± 0.06^{a}	7.90 ± 0.07^{b}
ความยาวที่เพิ่มขึ้น (เซนติเมตร)	7.73 ± 0.13^{b}	8.70 ± 0.17^{a}	8.56 ± 0.19^{a}	7.77 ± 0.13^{b}
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน	4.30 ± 0.07^{b}	4.52 ± 0.09^{a}	4.50 ± 0.05^{a}	4.35 ± 0.05^{b}
อัตราการรอดตาย	72.00 ± 2.65^{b}	87.00 ± 4.36^{a}	83.33 ± 2.89^{a}	74.33 ± 3.51^{b}
อัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	3.22 ± 0.13^{b}	2.56 ± 0.04^{a}	2.69 ± 0.05^{a}	3.10 ± 0.09^{b}

หมายเหตุ เปรียบเทียบทางสถิติ แสดงโดยการใช้อักษรที่แตกต่างกัน (a และ b) แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$) ค่าเฉลี่ยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่าง 3 ซ้ำ

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวันของกุ้งขาว หลังจากสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica, S. cerevisiae*, *W. anomalus* และชุดควบคุม คือ 4.52 ± 0.09, 4.50 ± 0.05, 4.35 ± 0.05 และ 4.30 ± 0.07 ตามลำดับ สำหรับอัตรารอดตายของกุ้งขาว หลังจากสิ้นสุดการทดลอง คือ 87.00 ± 4.36, 83.33 ± 2.89, 74.33 ± 3.51 และ 72.00 ± 2.65 ตามลำดับ และอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ คือ 2.56 ± 0.04, 2.69 ± 0.05, 3.10 ± 0.09 และ 3.22 ± 0.13 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้งขาว อัตราการรอดตาย และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica* ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *W. anomalus* และกุ้งขาวชุดควบคุม (ตารางที่ 1)

จากผลการศึกษาศักยภาพของยีสต์โปรไบโอติกในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม แสดงให้เห็นว่าการใช้ยีสต์โปรไบโอติก *Y. lipolytica* และ *S. cerevisiae* เสริมอาหารเม็ดสำเร็จรูปมีผลทำให้น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ความยาวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน และอัตราการรอดตายของกุ้งขาวสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด รวมทั้งอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกุ้งขาวดีกว่าเมื่อเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปไม่เสริมยีสต์ เนื่องจากยีสต์สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น โปรตีน กรดอะมิโน วิตามิน โพลีแซคคาไรด์ กรดไขมัน ฟอสโฟลิพิด โพลีเอมีน แอสตาแซนทิน แคโรทีนอยด์ ทรีฮาโลส กลูตาไธโอน และเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น ไลเปส โปรตีเอส อินเวอร์เทส ไฟเทส ไคติเนส และ ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว (Zhenming *et al*., 2006; Nayak, 2011) สอดคล้องกับงานวิจัยของ เกรียงศักดิ์ และคณะ (2561) พบว่า จากการใช้สารสกัดจากยีสต์ในอัตราส่วน 5% และ 10% สามารถทำให้ลูกกุ้งขาวแวนนาไมมีอัตราการเจริญเติบโตด้านน้ำหนักต่อวัน (ADG) เพิ่มสูงขึ้นประมาณ 11.11 - 12.56% อัตราการรอดตายเพิ่มสูงขึ้น 6.67 - 7.08% และผลผลิตเพิ่มสูงขึ้น 10.97 - 11.29% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้ผสมสารสกัดจากยีสต์ลงในอาหารกุ้ง และจากงานวิจัยของ Zhenming และคณะ (2006) พบว่า ยีสต์สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น polyamine ทำให้กุ้งมีอัตรารอดสูงขึ้นและสามารถผลิตเม็ดเลือดได้มากขึ้น รวมทั้งการนำแอสตาแซนทินและแคโรทีนอยด์ใส่ในอาหารสัตว์สามารถเป็นสารตั้งต้นในการผลิตวิตามินเอได้ ยีสต์ถือว่าเป็นหนึ่งในโปรไบโอติกที่ช่วยในเรื่องการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์ได้ของอาหาร จึงถูกนำไปใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำกันอย่างแพร่หลาย เช่น ในปลา Catla carp, ปลา Mrigal carp, ปลาลูกผสม Striped bass, ปลา Japanese flounder, ปลา Grouper (*Epinephelus coioides*) ตลอดจนปลานิลและปลา Galilee tilapia (*Sarotherodon galilaeus*) (นันทพร และคณะ, 2561) เนื่องจากผนังเซลล์ของยีสต์มีสารพวก β-glucans สาร mannan และสาร nucleic acid ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของโฮสต์ (Kühlwein *et al*., 2014)

5. ปริมาณเม็ดเลือดรวม

ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica* ที่ 30, 60 และ 90 วัน มีค่าสูงสุด คือ $8.20 \pm 0.05 \times 10^6$, $8.66 \pm 0.02 \times 10^6$ และ $8.90 \pm 0.01 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* คือ $8.00 \pm 0.03 \times 0^6$, $8.15 \pm 0.01 \times 0^6$ และ $8.26 \pm 0.03 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *W. anomalus* คือ $6.31 \pm 0.01 \times 10^6$, $6.68 \pm 0.05 \times 10^6$, $7.02 \pm 0.02 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และชุดควบคุม คือ $5.19 \pm 0.03 \times 10^6$, $5.12 \pm 0.03 \times 10^6$ และ $5.21 \pm 0.05 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์*Y. lipolytica, S. cerevisiae*, *W. anomalus* และกุ้งขาวชุดควบคุม ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 30, 60 และ 90 วัน

	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
ชุดการทดลอง	30 วัน	60 วัน	90 วัน
ชุดควบคุม	5.19 ± 0.03^c	5.12 ± 0.03^c	5.21 ± 0.05^c
ชุดอาหารเสริม *Y. lipolytica*	8.20 ± 0.05^a	8.66 ± 0.02^a	8.90 ± 0.01^a
ชุดอาหารเสริม *S. cerevisiae*	8.00 ± 0.03^a	8.15 ± 0.01^a	8.26 ± 0.03^a
ชุดอาหารเสริม *W. anomalus*	6.31 ± 0.01^b	6.68 ± 0.05^b	7.02 ± 0.02^b

หมายเหตุ: เปรียบเทียบทางสถิติ แสดงโดยการใช้อักษรที่แตกต่างกัน (a, b และ c) แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$) ค่าเฉลี่ยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่าง 3 ซ้ำ

6. กิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

กิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งขาวได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica* ที่ 30, 60 และ 90 วัน มีค่าสูงสุด คือ 0.78 ± 0.03, 0.88 ± 0.01 และ 0.91 ± 0.03 ยูนิตต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* คือ 0.75 ± 0.02, 0.82 ± 0.04 และ 0.87 ± 0.02 ยูนิตต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *W. anomalus* คือ 0.60 ± 0.03, 0.62 ± 0.01, 0.65 ± 0.04 ยูนิตต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน และชุดควบคุม คือ 0.51 ± 0.04, 0.50 ± 0.01 และ 0.52 ± 0.03 ยูนิตต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 กิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica, S. cerevisiae*, *W. anomalus* และกุ้งขาวชุดควบคุม ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 30, 60 และ 90 วัน

	กิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (ยูนิตต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน)		
ชุดการทดลอง	30 วัน	60 วัน	90 วัน
ชุดควบคุม	0.51 ± 0.04^{c}	0.50 ± 0.01^{c}	0.52 ± 0.03^{c}
ชุดอาหารเสริม *Y. lipolytica*	0.78 ± 0.03^{a}	0.88 ± 0.01^{a}	0.91 ± 0.03^{a}
ชุดอาหารเสริม *S. cerevisiae*	0.75 ± 0.02^{a}	0.82 ± 0.04^{a}	0.87 ± 0.02^{a}
ชุดอาหารเสริม *W. anomalus*	0.60 ± 0.03^{b}	0.62 ± 0.01^{b}	0.65 ± 0.04^{b}

หมายเหตุ: เปรียบเทียบทางสถิติ แสดงโดยการใช้อักษรที่แตกต่างกัน (a, b และ c) แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$) ค่าเฉลี่ยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่าง 3 ซ้ำ

จากผลการศึกษาศักยภาพของยีสต์โปรไบโอติกในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม แสดงให้เห็นว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมยีสต์ *Y. lipolytica* และ *S. cerevisiae* มีปริมาณเม็ดเลือดรวม และกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปไม่เสริมยีสต์ เนื่องจากยีสต์มีองค์ประกอบหลายชนิดที่มีผลโดยตรงต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น เบต้ากลูแคน กรดนิวคลีอิก ไคติน โพลีเอมีน แมนโนโปรตีน แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ รวมทั้ง secondary metabolite เช่น แอสตาแซนทิน (Navarrete และ Tovar-Ramírez, 2014) สอดคล้องกับการศึกษาของ เดชวัฒน์ และคณะ (2562) พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารที่มีระดับการใช้กากยีสต์ 10% ส่งผลดีที่สุดต่อปริมาณเม็ดเลือดรวม, เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์, ลาร์จแกรนูลาเซลล์, กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และประสิทธิภาพการกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากระบบไหลเวียนเลือด คือ $1.63 \pm 0.27 \times 10^6$, $1.47 \pm 0.28 \times 10^6$, $1.43 \pm 0.17 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร, 2.521 ± 0.21 และ $2.36 \pm 0.23 \times 10^3$ CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) อีกทั้งสอดคล้องกับการศึกษาของ (Bai *et al*., 2014) ใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* ผสมอาหารกุ้งขาว พบว่า กุ้งขาวมีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสและมีความสามารถในการต้านทานเชื้อ *V. harveyi* และไวรัสตัวแดงดวงขาวเพิ่มขึ้น นอกจากนี้กุ้งกุลาดำที่ได้รับเซลล์ยีสต์ *Candida aquaetextoris* S527 ผสมอาหาร พบว่า มีการแสดงออกของสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคเพิ่มขึ้น (Babu *et al*., 2013) และมีรายงานการศึกษาการใช้สายพันธุ์ยีสต์และรูปแบบที่ต่างกันเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและเป็นแหล่งโปรตีนในสูตรอาหารสัตว์น้ำ เช่น ใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* ในสูตรอาหารปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) พบว่า สามารถเพิ่มการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยมีจำนวนเม็ดเลือดและกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมมากขึ้น (Manoppo *et al*., 2015) ในขณะที่ Gamboa-Delgado *et al*. (2016) ใช้ยีสต์ *Candida utilis* ในสูตรอาหารกุ้งขาว Ølive-Teles and Gonçalves (2001) ใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* ในสูตรอาหารปลากะพง และ Øverland *et al*. (2013) ใช้ยีสต์ *C. utilis*, *S. cerevisiae* และ *Kluyveromyces maxianus* ในสูตรอาหารปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) พบว่า ไม่ส่งผลในด้านลบต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ได้จากอาหาร

เบต้ากลูแคนในเซลล์ยีสต์มีความสามารถกระตุ้นให้ Pattern Recognition Protein (PRPs) ในน้ำเลือดเปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อน β-1,3 glucan-binding protein ไปกระตุ้น membrane receptor ที่จำเพาะของเม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาเซลล์ ส่งผลให้เกิดการหลั่งสารต่าง ๆ ออกมาในระบบภูมิคุ้มกัน (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) อย่างเช่นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่สามารถทำลายเชื้อโรคได้ จะมีความสัมพันธ์กับปริมาณเม็ดเลือด โดยการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่เกิดขึ้นในตัวกุ้ง พบว่า 90 เปอร์เซ็นต์จะพบในเม็ดเลือด และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบในน้ำเลือด (กิจการ และคณะ, 2543) ซึ่งปริมาณเม็ดเลือดมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยกุ้งที่มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงเป็นกุ้งที่มีปริมาณเม็ดเลือดสูงด้วยเช่นกัน (Purivirojkul *et al*., 2006; เดชวัฒน์ และคณะ, 2562)

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิจัยศักยภาพของยีสต์โปรไบโอติกเสริมอาหารเม็ดสำเร็จรูปเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า ยีสต์ *Y. lipolytica* และ *S. cerevisiae* มีผลทำให้น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight Gain, WG) ความยาวที่เพิ่มขึ้น (Length Gain, LG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน (Specific Growth Rate, SGR, % ต่อวัน) อัตราการรอดตาย (Survival Rate, %) ของกุ้งขาวแวนนาไมมีค่าสูงกว่ากุ้งขาวแวนนาไมชุดควบคุมที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปไม่เสริมยีสต์ และมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed Conversion Rate, FCR) ดีกว่ากุ้งขาวแวนนาไมชุดควบคุมที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปไม่เสริมยีสต์ รวมทั้งปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocyte count, THC) และกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity, PO) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จเสริมยีสต์ *Y. lipolytica* และ *S. cerevisiae* มีค่าสูงกว่ากุ้งขาวแวนนาไมชุดควบคุมที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปไม่เสริมยีสต์

จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงเป็นไปได้ที่จะใช้ยีสต์โปรไบโอติก 2 สายพันธุ์ คือ *Y. lipolytica* และ *S. cerevisiae* กระตุ้นการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม เป็นการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมแบบเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ผลิตอาหารปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคและเพิ่มมูลค่าผลผลิตสัตว์น้ำ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

บรรณานุกรม

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

เกรียงศักดิ พูนสุข, สุทธิพงศ์ อุริยะพงศ์สรรค์, ไพรัตน์ ศรแผลง และ พลสัณห์ มหาขันธ์. 2550. แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากมูลไก่พื้นเมือง. วารสารสัตวแพทยศาสตร์. ปีที่ 17.

ฉัทชนัน ศิริไพศาล, นนทวิทย์ อารีย์ชน และ เรืองวิชญ์ ยุ้นพันธ์. 2549. การใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 279-290.

เดชวัฒน์ พูนนวล, นรธัช ประชุม และปวีณา ทวีกิจการ. 2562. ผลของการใช้กากยีสต์ต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม *(Litopenaeus vannamei)*. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 37: 154-164

ทัศนีย์ นลวชัย. 2555. ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม. จุลสารคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง. ฉบับที่ 1 ปีที่ 1 มกราคม-เมษายน.

นันทพร สุทธิ, สุปราณี วิกรัยบูรณ์ และ พันธภรณ์ สุภัคกาญจน์กุล. 2561. ผลของอาหารเสริมยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและค่าชีวเคมีของเลือดในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่มีระดับการเลี้ยงหนาแน่นต่างกัน. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 23: 649-668.

ประจวบ หลำอุบล. 2537. สรีรวิทยากุ้ง. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

ภิญโญ เกียรติภิญโญ. 2545. วิธีปฏิบัติสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว แอล. แวนนาไม (Practical Technology for *Litopenaeus vannamei* Culture). สำนักพิมพเมืองเกษตรแม็กกาซีน สมุทรปราการ. 120 น.

มลฤดี สนธิ. 2559. การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งทะเล. แก่นเกษตร. 44: 373-382.

วัฒนา วัฒนกุล, อุไรวรรณ วัฒนกุล และเจษฎา อิสเหาะ. 2554. รายงานการวิจัยระดับที่เหมาะสมของน้ำนึ่งปลาและกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย.

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

Bai, N., Gu, M., Zhang, W., Xu, W. and Mai, K. 2014. Effects of β-glucan derivatives on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against white spot syndrome virus infection. Aquaculture. 426-427: 66-73.

Balcazar, J.L., Vendrell, D., deBlas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Girones, O., and Muzquiz, J.L. 2006. Immune modulation by probiotic strains: quantification of phagocytosis of *Aeromonas salmonicida* by leukocytes isolated from gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using a radiolabelling assay. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 29: 335-343.

Boone, L. 1931. A collection of anomuran and macruran Crustacea from the Bay of Panama and the fresh waters of the Canal Zone. Bulletin of the American Museum of Natural History. 63: 137-189.

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

Chi, Z.M., Liu, G., Zhao, S., Li, J. and Peng, Y. 2010. Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. Applied Microbiology and Biotechnology. 86:1227-1241.

Farzanfar, A. 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 48: 149-158.

Fredlund, E., Druvefors, U., Boysen, M.E., Lingsten, K. and Schnurer, J. 2002. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala*. FEMS Yeast Research. 2: 395-402.

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

Gismondo, M.R., Drago, L. and Lombardi, A. 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. International Journal of Antimicrobial Agents. 12: 287-292.

Hatoum, R., Labrie, S. and Fliss, I. 2012. Review Article: Antimicrobial and probiotic properties of yeast: from fundamental to novel applications. Frontiers in Microbiology. 3: 1-12.

Ji, P.F., Yao, C.L. and Wang, Z.Y. 2009. Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. Fish and Shellfish Immunology. 27:563-570.

Jorge, H.L., Teresa, G.G. and Francisco, V.A. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the BrownShrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comparative Biochemistry and Physiology. 113: 61-66.

Kühlwein, H., Merrifield, D.L., Rawling, M.D., Foey, A.D. and Davies, S.J. 2014. Effects of dietary β-(1,3)(1,6)- D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 98: 279-289.

Kumar, V., Roy, S., Meena, D.K. and Sarkar, U.K. 2016. Application of probiotics in shrimp aquaculture: importance, mechanisms of action, and methods of administration. Reviews in Fisheries Science. 24: 342-368.

Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. 2000. In: The yeast handbook, biodiversity and ecophysiology of yeasts, P. Gábor. and C.L. de la Rosa, eds., Berlin Springer. 11-30.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randell, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275.

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

Moriarty, D.J.W. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture, Fish Nutrition, and Feeding Proceedings of the Sixth International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish. 151: 333-349.

Navarrete, P. and Tovar-Ramírez, D. 2014. Use of yeasts as probiotics in fish aquaculture. In: Sustainable aquaculture techniques. M. HernandezVergara. and C. Pérez-Rostro., eds., INTECH Open Science. 135-172.

Nayak, S. K. 2011. Biology of eukaryotic probiotics. Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York.

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

Øverland, M., Karlsson, A., Mydland, L.T., Romarheim, O.H. and Skrede, A. 2013. Evaluation of *Candida utilis*, *Kluyveromyces maxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast as protein sources in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture. 402-403: 1-7.

Pérez Farfante, I. and Kensley, B. 1997 Penaeoid and Sergestoid shrimps and prawns of the world: keys and diagnoses for the families and genera. Memories du museum national D'Historie naturelle, Paris France. 233p.

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

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

Srithaworn, M., Thuyhun, A., Chunhachart, O. & Preecharram, S. 2015. Antioxidant and Antibacterial Activity of Crude Extracts from Ya-Keaw Formula Against Shrimp Pathogens. SDU Research Journal Sciences and Technology, 8: 117-132.

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

Vargas-Albores, F., Gu´zman, M.A. and Ochoa, J.L. 1993. An anticoagulant solution for haemolymp collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Comparative Biochemistry and Physiology. 106A: 299-303.

Wang, Y.F., Chi, Z.M., Chi, Z., Li, J. and Wang, X.H. 2009. Siderophore production by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* and its antimicrobial activity. Bioresource Technology. 100: 2639-2641.

Yeh, S.P., Chang, C.A., Chang, C.Y., Liu, C.H. and Cheng, W. 2008. Dietary sodium alginate administration affects fingerling growth and resistance to *Streptococcus* sp. And iridovirus, and juvenile non-specific immune responses of the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Fish and Shellfish Immunology. 25:19-27.

Zhenming, C., Zhiqiang, L., Lingmei, G., Fang, G., Chunling, M., Xianghong, W. and Haifeng, L. 2006. Marine yeasts and their applications in mariculture. The Journal of Ocean University of China. 5: 251-256.

Zokaeifar, H., Balcazar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A. and Nejat, N. 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology. 33: 683-689.

ภาคผนวก ก

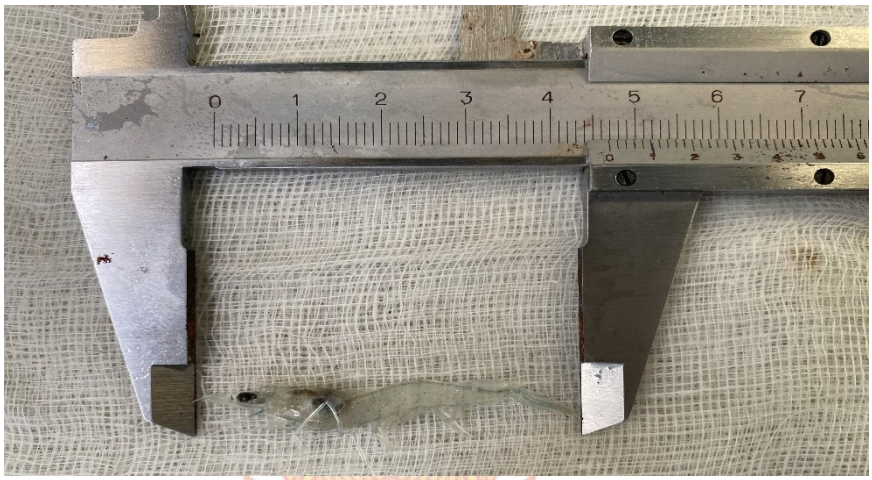
วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด มีชุดการทดลองทั้งหมด 4 ชุดการทดลอง

ภาคผนวก ข

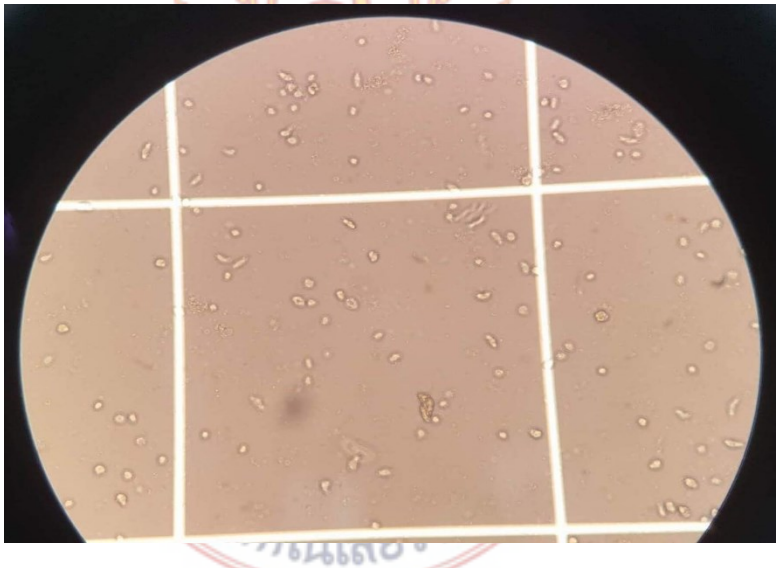
การตรวจวัดการเจริญเติบโต (น้ำหนัก) ของกุ้งขาวแวนนาไม

ภาคผนวก ค

การตรวจวัดการเจริญเติบโต (ความยาว) ของกุ้งขาวแวนนาไม



ภาคผนวก ง
การตรวจวัดภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม



ภาคผนวก จ
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Sabouraud dextrose broth (Difco, USA)

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อใน กรัมต่อลิตร

Dextrose	20	กรัม
Peptone	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 30 กรัม ผสมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนใสหรือวุ้นละลาย นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่เวลา 15 นาที (pH 5.6 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส)

2. Sabouraud dextrose agar (Difco, USA)

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อใน กรัมต่อลิตร

Dextrose	40	กรัม
Peptone	10	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 65 กรัม ผสมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนใสหรือวุ้นละลาย นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่เวลา 15 นาที (pH 5.6 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส)

3._Anticoagulant

[30 mM trisodium citrate, 340 mM NaCl, 10 mM EDTA, 120 mM glucose]

Trisodium citrate	0.71	กรัม
Sodium chloride	1.59	กรัม
EDTA	0.23	กรัม
Glucose	1.73	กรัม

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมด ผสมในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่เวลา 20 นาที (pH 7.55)

4. Formaldehyde 10%

ผสมฟอร์มาลีน 5 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร

5. Cacodylate (CAC) buffer

[10 mM sodium cacodylate, 450 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 260 mM $MgCl_2$]

Sodium cacodylate	0.43	g
Sodium chloride	5.26	g
Calcium chloride	0.22	g
Magnesium chloride	4.95	g

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมด ผสมในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่เวลา 15 นาที (pH 7.0)

6. L-3,4-dihydroxyphenylalanine 3% (3% L-PODA)

ละลาย L-3,4-dihydroxyphenylalanine 0.003 กรัม ใน cacodylate (CAC) buffer 1 มิลลิลิตร ละลายสมบูรณ์แล้วนำไปใช้ทันที

7. Trypsin 0.1%

ละลาย trypsin 0.001 กรัม ใน cacodylate (CAC) buffer 1 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้