

ผลของการใช้กากยีสต์ต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา
และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)
Effect of dietary yeast by-product on growth, hematology and immune response in
Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

เดชวัฒน์ พูนนวล¹ นรัทธ ประชุม^{1*} และปวีณา ทวีกิจการ¹
Dachawat Poonnual¹, Noratat Prachom^{1*} and Paveena Taveekijakarn¹

บทคัดย่อ

การศึกษามผลของการใช้กากยีสต์ในสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่ระดับ 0 (กลุ่มควบคุม) 2.5 5 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ของสูตรอาหาร ระดับละ 3 ซ้ำ โดยเลี้ยงกุ้งขาวน้ำหนักเริ่มต้น 1.02 ± 0.01 กรัมต่อตัว ในตู้กระจกระบบน้ำหมุนเวียน (ปริมาตรน้ำ 60 ลิตรต่อตู้) ตู้ละ 20 ตัว เลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยมีการให้อาหารแบบเต็มอิ่ม วันละ 4 มื้อ เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีค่าการเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ได้ของโปรตีนจากอาหาร ดัชนีตับ องค์ประกอบทางเคมีในกุ้ง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และมีอัตราการรอดมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ในทุกชุดการทดลอง ในส่วนของค่าโลหิตวิทยาและค่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันพบว่า มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระดับการใช้กากยีสต์ โดยมีปริมาณเม็ดเลือดรวม (THC) เม็ดเลือดชนิดไฮยาไลน์เซลล์ (HC) ลาร์จแกรนูโลเซลล์ (LGC) กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) และประสิทธิภาพการกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากระบบไหลเวียนเลือด (Clearance efficiency) ในกุ้งที่ได้รับอาหารที่มีระดับการใช้กากยีสต์ 10 เปอร์เซ็นต์มีค่าที่สูงที่สุด ($1.63 \pm 0.27 \times 10^6$, $1.47 \pm 0.28 \times 10^6$, $1.43 \pm 0.17 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร, 2.521 ± 0.214 และ $2.36 \pm 0.23 \times 10^3$ CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการใช้กากยีสต์จากกระบวนการหมักเอทานอล ในสูตรอาหารได้ถึงระดับ 10 เปอร์เซ็นต์โดยไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต และการใช้ประโยชน์ได้จากอาหารของกุ้งขาว

คำสำคัญ: ยีสต์ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ชิงเกลเซลล์โปรตีน กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Abstract

A 12-week feeding trial was conducted in a semi-recirculating system (60 L tank⁻¹) with Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (mean weight, 1.02 ± 0.01 g) to examine the growth, hematology and immune response to diets with increasing levels of yeast by-product meal (0, 2.5, 5, 7.5 and 10 %). Shrimps were fed four times a day to the visual satiation. This study showed all treatments had no significant difference on growth, feed utilization and chemical composition in carcass ($P > 0.05$). Moreover, increasing in hematology and immune response (*i.e.* THC, HC, LGC, superoxide anion and clearance efficiency) were observed in the group of shrimps fed with 10% yeast by-product ($P < 0.05$). Based on this study, yeast by-product could be included in the diet up to 10% without negative effects on growth performance and utilization of *L. vannamei*.

Keyword: yeast, non-specific immune response, single cell protein, pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

¹ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

*Corresponding author, Email: noratat.pr@kmitl.ac.th

คำนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งมีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากได้รับความนิยมจากผู้บริโภคอย่างกว้างขวาง และสามารถทำเงินรายได้เข้าสู่ประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น หลังจากผ่านภาวะวิกฤติจากการระบาดของโรค Early Mortality Syndrome (EMS) ทำให้มีความต้องการอาหารเพิ่มขึ้น และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์น้ำนิยมใช้ปลาป่น (Fishmeal) เป็นแหล่งโปรตีนหลัก ซึ่งปลาป่นที่ผลิตได้มีแนวโน้มลดลงและไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ที่เพิ่มขึ้นในอนาคต (Prachom *et al.*, 2013 และ Tacon and Metain, 2008) หลาย ๆ ประเทศจึงให้ความสนใจในการหาแหล่งวัตถุดิบเพื่อเสริมภูมิคุ้มกันและสามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนใหม่ในสูตรอาหารสัตว์น้ำ หนึ่งในแหล่งวัตถุดิบที่น่าสนใจ คือ ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ เช่น กากยีสต์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการกระบวนการหมักในโรงงานอุตสาหกรรมโดยมีผลิตภัณฑ์ตั้งต้น เช่น กากน้ำตาล มันสำปะหลัง เป็นต้น ซึ่งยีสต์ที่ได้จากการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังในรูปมันเส้นและกากน้ำตาลมีมากถึง 12 ตันต่อวัน (กรมพลังงานทดแทนและกรมอนุรักษ์พลังงาน, 2559) โดยกากยีสต์เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสารเบต้ากลูแคน (β -glucan) แมนแนนโพลิกลีแซคคาไรด์ (Mannan-oligosaccharide) และกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) ซึ่งใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์น้ำมีความต้านโรคเพิ่มขึ้น (Gopalakannan and Arul, 2010 และ Refstie *et al.*, 2010) นอกจากนี้ กากยีสต์ยังมีโปรตีนสูง (45-55 เปอร์เซ็นต์) (Adedayo *et al.*, 2011) หลายงานวิจัยได้ทำการศึกษาโดยใช้สายพันธุ์ยีสต์และรูปแบบที่ต่างกันเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและเป็นแหล่งโปรตีนในสูตรอาหารสัตว์น้ำ เช่น ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ในสูตรอาหารปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และ ปลาเยือกเทศ (*Labeo rohita*) (Manoppo *et al.*, 2015; He *et al.*, 2009 และ Andrews *et al.*, 2011) พบว่าสามารถเพิ่มการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยมีจำนวนเม็ดเลือดและกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) ในขณะที่ Olive-Teles and Gonçalves (2001) ใช้ยีสต์ (*S. cerevisiae*) ในสูตรอาหารปลากะพง Gamboa-Delgado *et al.* (2016) ใช้ทอรูลาียีสต์ (*Candidia utilis*) ในสูตรอาหารกุ้งขาว และ Øverland *et al.* (2013) *C. utilis*, *Kluyveromyces fragilis* และ *S. cerevisiae* ในสูตรอาหารปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) พบว่าไม่ส่งผลในด้านลบต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ได้จากอาหาร เป็นต้น การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของการใช้กากยีสต์ (*S. cerevisiae*) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการกระบวนการหมักเอทานอลเป็นแหล่งโปรตีนในสูตรอาหาร ต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม *L. vannamei*) เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมอาหารสัตว์น้ำและในระดับฟาร์มเพาะเลี้ยงต่อไป

วิธีการศึกษา

การวางแผนการทดลอง

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design; CRD) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ได้แก่ สูตรอาหารควบคุม (Control diet) สูตรอาหารที่มีการใช้กากยีสต์ (*S. cerevisiae*) เป็นแหล่งโปรตีนที่ระดับ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (YP-0, YP-2.5, YP-5.0, YP-7.5 และ YP-10 ตามลำดับ)

วัตถุดิบและอาหารทดลอง

วัตถุดิบหลักที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีน ได้แก่ ปลาป่น (Fish meal) ไก่ป่น (Poultry meal) การถั่วเหลืองสกัดน้ำมันชนิดกะเทาะเปลือก (Dehulled soybean meal) ถั่วเหลืองหมัก (Ferment soybean meal) และกากยีสต์ (*S. cerevisiae*) (Dried yeast by-product) ที่ได้จากการกระบวนการหมักเอทานอล นำวัตถุดิบมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ซึ่งแสดงใน Table 1

สูตรอาหารทดลองในแต่ละชุดการทดลองมีการคำนวณให้มีระดับโปรตีนแบบ Isonitrogenous และไขมัน

เป็นแบบ isolipidic ให้อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน และมีการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร ได้แก่ ความชื้น (Moisture) โดยอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เถ้า (Ash) โดยอบแห้งที่อุณหภูมิ 550 - 600 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง โปรตีน (Protein) ตามวิธีการ Kjeldahl method ไขมัน (Lipid) ตามวิธีการ Soxhlet extraction method เยื่อใย (Fiber) และ คาร์โบไฮเดรต (Nitrogen free extract) ตามวิธีของ AOAC (1995) (Table 2)

การเตรียมอาหารทดลองโดยนำวัตถุดิบต่าง ๆ ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำร้อยละ 30-40 จนกระทั่งวัตถุดิบผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำเข้าเครื่องบดเนื้อที่มีรูเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2 เซนติเมตร ตัดอาหารผ่านตะแกรงร่อนให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อลดความชื้นให้มีไม่เกินร้อยละ 10 จากนั้นบรรจุในถุงและนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

Table 1 Chemical composition of protein sources (% , as dry basis).

Chemical composition	FM60 ¹	FM55 ²	PBM ³	SBM ⁴	FSBM ⁵	YP ⁶
Moisture	6.0	8.0	11.0	11.0	8.4	5.7
Protein	63.9	55.8	62.1	49.0	53.5	35.3
Lipid	8.8	8.0	19.8	0.5	1.7	2.1
Fiber	0.3	1.0	-	3.8	4.2	3.7
Ash	21.6	26.0	7.5	6.3	7.0	13.6
NFE [*]	-	-	-	29.4	25.3	39.7

^{*} NFE; Nitrogen free extract = 100- (Moisture + Protein + Lipid + Fiber + Ash), ¹ FM60; Fish meal grade 60, ² FM55; Fish meal grade 55, ³ PBM; Poultry by-product meal (NRC, 2011), ⁴ SBM; Dehulled soybean meal, ⁵ FSBM; Ferment soybean meal and ⁶ YP; Dried yeast (*S. cerevisiae*) by-product

การเลี้ยงกุ้งทดลองและการให้อาหาร

นำลูกพันธุ์กุ้งขาว (*L. vannamei*) ระยะ พีแอล 15 จำนวน 5,000 ตัว จากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา มาเลี้ยงในบ่อคอนกรีต ขนาด 2.7 × 1.7 × 0.7 เมตร ระหว่างการเลี้ยงให้อาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาว (โปรตีนไม่น้อยกว่า 40% ไขมันไม่น้อยกว่า 8%) ให้อาหารแบบเต็มอิ่มทุกวัน วันละ 8 ครั้ง (07.00, 10.00, 13.00, 16.00, 19.00, 22.00, 01.00 และ 4.00 น.) เป็นระยะเวลา 1 เดือน จนกุ้งได้ขนาดประมาณ 1 กรัมต่อตัว จากนั้นกุ้งขาวทั้งหมดถูกอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการสุ่มเพื่อใช้ในการทดลอง

กุ้งขาวที่ใช้ในการทดลองมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 1.02±0.01 กรัมต่อตัว ใส่ในตู้ทดลองขนาด 30 × 60 × 35 เซนติเมตร ความหนาแน่น 20 ตัวต่อตู้ จำนวน 15 ตู้ โดยใช้ระบบน้ำแบบกึ่งปิด (semi-circuiting system) มีการให้อากาศด้วยหัวทรายตลอดเวลา โดยมีการให้อาหารทดลองแบบเต็มอิ่มทุกวัน ๆ ละ 4 ครั้ง (08.00 น. 12.00 น. 16.00 น. และ 20.00 น.) ระยะเวลาการเลี้ยง 12 สัปดาห์ ระหว่างการเลี้ยงมีการวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen) พีเอช (pH) อุณหภูมิ (Temperature) และความเค็ม (Salinity) ทุกวัน ในช่วงเช้า (08.00น.) และช่วงเย็น (16.00น.) ก่อนให้อาหาร และเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อตรวจวัดค่า แอมโมเนีย (Ammonia) ไนไตรท์ (Nitrite) ตามวิธีการของ Strickland and Parsons (1972) อัลคาไลน์ (Alkalinity) ตามวิธีการของ APHA, AWWA and WEF (1998) สัปดาห์ละ 1 ครั้งก่อนเปลี่ยนถ่ายน้ำ (50 เปอร์เซ็นต์) และมีการดูดตะกอนอาหารที่เหลือทุกวัน ๆ ละ 2 ครั้ง (ก่อนให้อาหารเช้าและเย็น)

การเก็บตัวอย่างกุ้งเพื่อประเมินการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์ได้จากอาหาร

ในระหว่างการศึกษา ทำการชั่งน้ำหนักกุ้งทุก ๆ 2 สัปดาห์ เพื่อประเมินการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์ได้จากอาหาร ดังนี้ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight gain; WG) อาหารที่กินต่อวัน (Feed intake; FI) อัตราการแลกเนื้อ (Feed conversion ratio; FCR) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate; SGR) อัตราส่วนประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (Protein efficiency ratio; PER) อัตราการรอด (Survival) (Prachom *et al.*, 2013) เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 12 สัปดาห์ ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกุ้ง โดยสุ่มตัวอย่างกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง ซ้ำละ 5 ตัว วิเคราะห์คุณภาพซาก ได้แก่ ความชื้น (Moisture) เถ้า (Ash) โปรตีน (Protein) ไขมัน (Lipid) (AOAC, 1995) และทำการเก็บตัวอย่างตับกุ้งเพื่อวิเคราะห์ค่าดัชนีตับ (Hepato-somatic index)

Table 2 Ingredients and chemical composition of experimental diets (% , as is basis).

Ingredients/treatments	YP-0 (control)	YP-2.5	YP-5.0	YP-7.5	YP-10.0
Fish meal (60% CP)	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Fish meal (55% CP)	9.0	8.0	7.0	6.0	5.0
Dried yeast by-product ¹	0.0	2.5	5.0	7.5	10.0
Dehulled Soybean meal	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5
Fermented Soybean meal	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
Wheat flour	22.0	20.5	19.0	17.5	16.0
Poultry meal	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Fish solubles	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Squid liver powder	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Fish oil	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
Vitamin-mineral mix ²	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Binder	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Antimicrobial ³	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Antioxidant ⁴	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Proximate compositions (Analysis)					
Moisture	6.03	6.16	6.11	6.17	6.11
Ash	10.57	10.58	10.70	10.60	10.62
Crude protein	40.01	40.63	40.53	40.48	40.64
Crude Lipid	10.64	10.77	10.63	10.70	10.67
Fiber	1.78	1.84	1.84	1.88	1.88
NFE ⁵	30.97	30.02	30.19	30.17	30.07
Gross energy ⁶ (KJ/g)	1897.22	1900.44	1895.59	1897.07	1898.24

¹Dried yeast by-product : yeast by-product meal form ethanol fermented, ²Vitamin-mineral premix (vitamin(unit/kg), mineral (mg/kg)): vitamin A 12,000,000 IU; vitamin D3 2,200,000 IU; vitamin E 100,000 mg; vitamin K3 12,000 mg; vitamin B1 25,000 mg; vitamin B2 25,000 mg; vitamin B6 23,000 mg; vitamin B12 43 mg; Pantothenic 75,000 mg; Niacin 125,000 mg; Folic 4,000 mg; Biotin 800 mg, vitamin 150,000 mg; Potassium 8,000; Magnesium 600; Cobalt 0.05; Copper 5; Iron 50; Iodine 5; Manganese 5; Selenium 0.3; Zinc 37. ³ Antimicrobial agent (%): formic acid 63; propionic acid 32; benzoic acid 5;

⁴Antioxidant: ethoxyquin and butylated hydroxytoluene; ⁵ NFE; Nitrogen free extract,

⁶Gross energy; protein × 23.6 + Fat × 39.5 + NFE × 17.2 (NRC, 2011)

การเก็บตัวอย่างกุ้งเพื่อทดสอบค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 12 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้กระบอกฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร ซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (10 เปอร์เซ็นต์ Tri-sodium citrate ละลายใน RMPI) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จากแ่งเลือด (Sinus venous) หรือโคเนาเดนคู่ที่ 5 เพื่อตรวจวัดค่าต่าง ๆ ดังนี้

การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocytes count; THC) และจำนวนเม็ดเลือดแต่ละชนิด (Differential hemocyte count) ตามวิธีการของ Moullac *et al.* (1997) โดยหยดตัวอย่างเลือดกุ้ง 20 ไมโครลิตร ลงบน hemocytometer ทำการส่องนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า

การหา Superoxide anion production (O_2^-) โดยวัดการลดลงของ NBT (Nitroblue tetrazolium) จากความสามารถของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์เอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยน NBT ไปเป็น Formazan ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ตามวิธีการของ Munoz *et al.* (2000)

การทดสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity; PO) โดยวัดความสามารถของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่สามารถเปลี่ยน L-dihydroxyphenylalanine (L- DOPA) ไปเป็นโดปามีน (Dopamine) ด้วยการดูดกลืนแสงของสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ตามวิธีการของ Söderhäll and Hall (1984) และ Hernández-López *et al.* (1996)

กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง (Phagocytic activity) ตามวิธีการของ Itami *et al.* (1994) โดยดูดเลือดกุ้ง 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดฉีดยาที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัวของเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบ 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นนำเม็ดเลือดที่ตกตะกอนมานับจำนวนเซลล์และปรับให้ได้ 2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย RPMI medium หลังจากนั้นดูดเม็ดเลือด 0.2 มิลลิลิตร หยดลงบน cover slip โดยเกลี่ยให้ทั่ว ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วล้างออกด้วย shrimp saline จากนั้นหยดลาเทกซ์บีด (Latex beads) ที่มีจำนวน 2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ล้างออกด้วย shrimp saline แล้วย้อมด้วยสี Wright และ Giemsa stain 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น และทิ้งไว้ให้แห้งจึงทำการปิดสไลด์ด้วย Permount นำไปวิเคราะห์ข้อมูลโดยการสุ่มนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือด 200 เซลล์ และนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่กินเม็ดบีดเข้าไปคำนวณค่าจากสูตร

$$\% \text{Phagocytosis} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่กินเม็ดบีดเข้าไป} \times 100}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}}$$

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

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา ค่าทางภูมิคุ้มกันวิทยาของกุ้ง และองค์ประกอบทางเคมีในกุ้ง มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 16.0

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การศึกษาการใช้กากยีสต์ในสูตรอาหารกุ้งขาวแวนนาไม น้ำหนักเริ่มต้น 1.02 ± 0.01 กรัมต่อตัว ($P > 0.05$) ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 12 สัปดาห์ ผลของคุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง พบว่า คุณภาพน้ำอยู่ในระดับที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้ง โดยมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำอยู่ในช่วง 4.35-8.24 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 6.91-8.25 อุณหภูมิ 22-29 องศาเซลเซียส ความเค็ม 12-17 พีพีที แอมโมเนีย 0.03-0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนไตรท์ 0.05-0.43 มิลลิกรัมต่อลิตร และอัลคาไลน์ 112.7-140.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ค่าน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการแลกเนื้อ ประมาณอาหารที่กิน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ได้ของโปรตีนในอาหารของกุ้ง และดัชนีดัชนีของกุ้งที่ได้รับอาหารชุดควบคุมและอาหารที่มีกากยีสต์ (YP) ทุกระดับ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) อัตราการรอด มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ในทุกชุดการทดลอง ($P > 0.05$) (Table 3) และองค์ประกอบทางเคมีในกุ้งของทุกชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) (Table 4)

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้กากยีสต์ สามารถใช้ในสูตรอาหารกุ้งขาวได้ โดยไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์ของอาหาร ซึ่งมีงานวิจัยที่มีการใช้ยีสต์ในรูปแบบต่างๆ ในสูตรอาหารกุ้งขาว (*L.vannamei*) พบว่า ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต (Zhao *et al.*, 2017 และ Gamboa-Delgado *et al.*, 2016) แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ากุ้งขาวกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีกากยีสต์มีแนวโน้มของปริมาณอาหารที่กินเพิ่มขึ้นอาจเนื่องจากกลิ่นของยีสต์ส่งผลต่อการกินอาหารเพิ่มขึ้น (Overland *et al.*, 2013 และ Zhao *et al.*, 2017) ในขณะที่ องค์ประกอบทางเคมีในกุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีการใช้กากยีสต์ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ($P > 0.05$) สอดคล้องกับการรายงานของ Zhao *et al.* (2017) พบว่า การใช้กากยีสต์ในสูตรอาหารไม่ส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบทางเคมีในกุ้ง (โปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น) เช่นกัน

จากการศึกษาผลของการใช้กากยีสต์ในสูตรอาหารต่อค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า ที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนเม็ดเลือดรวม เม็ดเลือดชนิดไลโซคลินเซลล์ เม็ดเลือดชนิดลาร์จแกรนูลาเซลล์ มีค่าสูงสุด ($1.63 \pm 0.27 \times 10^6$, $1.47 \pm 0.28 \times 10^6$ และ $1.43 \pm 0.17 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) (Fig. 1 A, B and C) นอกจากนี้ยังมีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ออกไซด์แอนไอออน เอนไซม์ฟีนอกซออกซิเดส และกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Fig. 2 A and B, Fig 3 A) มีค่ามากที่สุด (2.521 ± 0.214 , 0.812 ± 0.080 และ 32.17 ± 4.36 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) เช่นเดียวกันกับกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง พบว่า มีจำนวนแบคทีเรียลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) (Fig. 3B) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากผนังเซลล์ยีสต์มีองค์ประกอบของ เบต้า 1,3 กลูแคน (β -1,3 glucan) 57 เปอร์เซ็นต์ เบต้า 1,6 กลูแคน (β -1,6 glucan) 10 เปอร์เซ็นต์ แมนแนน (mannan) 40 เปอร์เซ็นต์ และไคติน (chitin) 1-3 เปอร์เซ็นต์ (Zhao *et al.*, 2017 และ Lipke and Ovalle, 1998) โดยยีสต์ชนิด *S. cerevisiae* มีองค์ประกอบหลักคือ เบต้ากลูแคนซึ่งเป็นสารที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งได้ (Gatesoupe, 2007; Gopalakannan and Arul, 2010 และ Li and Gatlin, 2006) และเบต้ากลูแคนเป็นสารโพลีแซคคาไรด์สายยาวของน้ำตาลกลูโคส สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดได้ (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000 และ Sritunyalucksana and Söderhäll, 2000) และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวเป็นแบบไม่จำเพาะ (non-specific immune response) อาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเลือดที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงสุขภาพกุ้งได้ดี (Moullac *et al.*, 1997) ปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งมีรายงานอยู่ในช่วง $2.0 \times 10^6 - 4.0 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยมีปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อปริมาณเม็ดเลือดของกุ้ง ได้แก่ ระยะเวลาลอกคราบ ระยะการเจริญพันธุ์ สภาวะติดเชื้อ และสารอาหารที่กุ้งได้รับ (Chang *et al.*, 1999) และจากการ

รายงานของ Moullac *et al.* (1997) กล่าวว่าเม็ดเลือดกุ้งมี 3 ชนิด ได้แก่ ไฮยาไลน์เซลล์ ลาร์จแกรนูลาร์เซลล์ และเซมิแกรนูลาร์เซลล์ โดยในกุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดชนิดไฮยาไลน์เซลล์มากที่สุดในระบบไหลเวียนเลือด รองลงมาคือ ลาร์จแกรนูลาร์เซลล์ และ เซมิแกรนูลาร์เซลล์ ตามลำดับ โดยการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดที่สำคัญในกุ้ง ได้แก่ กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ซึ่งสารเบต้ากลูแคนจะกระตุ้นให้ Pattern Recognition Protein (PRPs) ในน้ำเลือดเปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อน β -1,3 glucan-binding protein ไปกระตุ้น membrane receptor ที่จำเพาะของเม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์เซลล์ส่งผลให้เกิดการหลั่งสารต่างๆ ออกมาในระบบภูมิคุ้มกัน (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) เช่น กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ออกไซด์ (superoxide anion production) และกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่สามารถทำลายเชื้อโรคได้ เอนไซม์เหล่านี้มีความสัมพันธ์กับปริมาณเม็ดเลือด โดยการทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ออกไซด์และเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่เกิดขึ้นในตัวกุ้ง พบว่า 90 เปอร์เซ็นต์จะพบในเม็ดเลือดและ 10 เปอร์เซ็นต์พบในน้ำเลือด (กิจการ และคณะ, 2543) จึงเป็นเหตุผลให้ปริมาณเม็ดเลือดมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ออกไซด์และเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยกุ้งที่มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ออกไซด์และเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงเป็นกุ้งที่มีปริมาณเม็ดเลือดสูงเช่นกัน (Srituyalucksana and Söderhäll, 2000; Supphantharika *et al.* 2003 และ Purivirojkul *et al.* 2006) ในขณะที่ ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์จากระบบไหลเวียนเลือดของกุ้งเป็นค่าหนึ่งที่เป็นบ่งบอกถึงประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Rodríguez and Moullac, 2000) เนื่องจากในน้ำเลือดของกุ้งประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือดที่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ อีกทั้งยังมีโปรตีนและเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมได้ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าอาหารที่มีการใช้กากยีสต์ในระดับที่เพิ่มขึ้นช่วยเพิ่มความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ออกจากระบบเลือดได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Thanardkit *et al.* (2002)

Table 3 Growth performance and feed utilization of *L. vannamei* fed experimental diets for 12 weeks (mean $\pm$ SD, n = 3) .

Treatment	YP-0(control)	YP-2.5	YP-5.0	YP-7.5	YP-10.0	P- value
FW(g/shrimp)	7.54 $\pm$ 0.85	7.71 $\pm$ 0.26	7.66 $\pm$ 0.43	7.75 $\pm$ 0.51	7.97 $\pm$ 0.10	0.804
FI (g/shrimp)	9.33 $\pm$ 0.27	9.54 $\pm$ 0.14	10.05 $\pm$ 0.34	9.96 $\pm$ 0.42	10.19 $\pm$ 0.63	0.109
WG (g/shrimp)	6.52 $\pm$ 0.84	6.68 $\pm$ 0.26	6.64 $\pm$ 0.52	6.74 $\pm$ 0.52	6.95 $\pm$ 0.10	0.813
FCR	1.44 $\pm$ 0.17	1.43 $\pm$ 0.04	1.52 $\pm$ 0.11	1.49 $\pm$ 0.17	1.47 $\pm$ 0.07	0.788
SGR (%/day)	2.37 $\pm$ 0.12	2.39 $\pm$ 0.05	2.40 $\pm$ 0.07	2.42 $\pm$ 0.09	2.44 $\pm$ 0.02	0.827
PER	1.75 $\pm$ 0.20	1.72 $\pm$ 0.04	1.62 $\pm$ 0.12	1.68 $\pm$ 0.19	1.68 $\pm$ 0.06	0.770
PRE (%)	0.34 $\pm$ 0.05	0.49 $\pm$ 0.36	0.41 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.18	0.40 $\pm$ 0.29	0.881
Survival (%)	70.0 $\pm$ 0.0	70.0 $\pm$ 0.0	71.67 $\pm$ 2.89	70.0 $\pm$ 0.0	70.0 $\pm$ 5.0	0.903
HSI (%)	5.76 $\pm$ 0.27	5.32 $\pm$ 0.54	5.78 $\pm$ 0.42	5.83 $\pm$ 0.65	6.14 $\pm$ 0.36	0.700

P<0.05 mean significant

FW; Final weight, FI; Feed intake, WG; Weight gain' FCR; Feed conversion ratio, SGR; Specific growth rate, PER; Protein efficiency ratio, PRE; Protein retention ratio and HSI; Hepato-somatic index

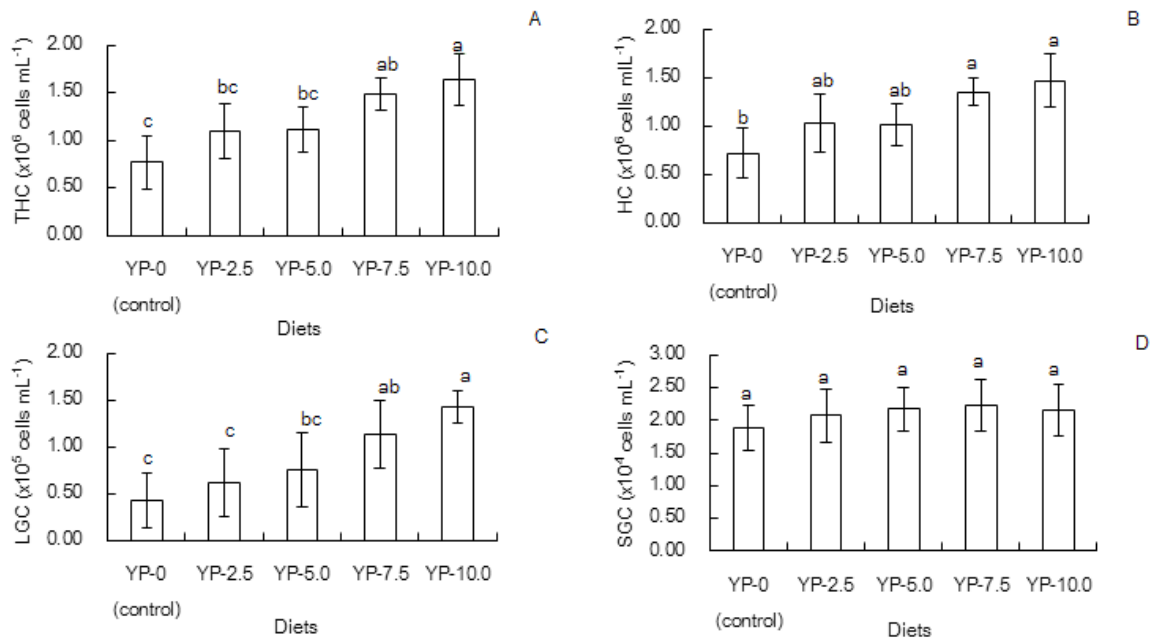


Figure 1 A; Total hemocytes count (THC), B; Hyaline cell (HC), C; Large granular cell (LGC) and D; Semi-granular cell (SGC) of *L. vannamei* fed with experimental diets for 12 weeks (mean $\pm$ SD, n = 3).

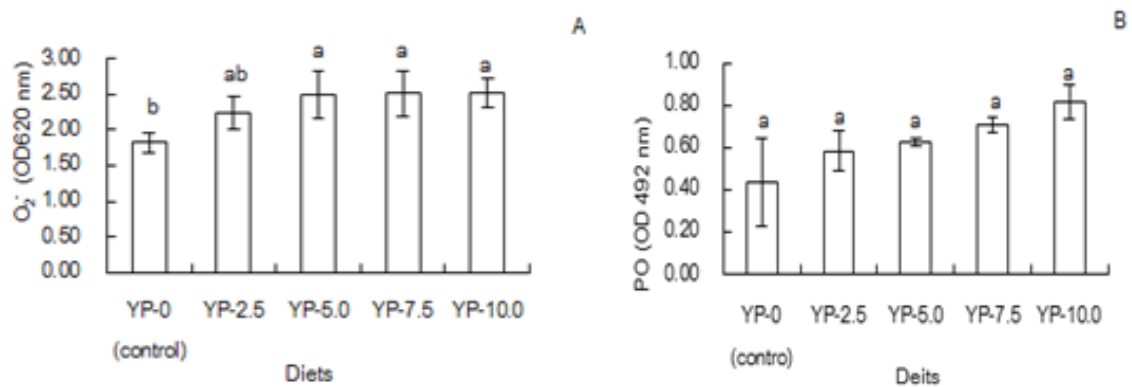


Figure 2 A; Superoxide anion activity (O_2^-) and B; Phenoloxidase activity (PO) in hemocytes of *L. vannamei* fed with experimental diets for 12 weeks (mean $\pm$ SD, n = 3).

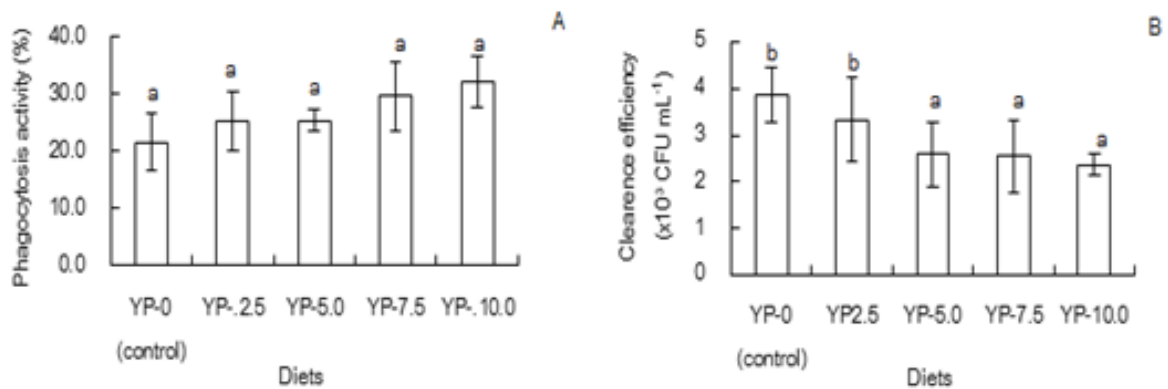


Figure 3 A; Phagocytosis activity and B; clearance efficiency in hemolymph of *L.vannamei* fed with experimental diets for 12 weeks (mean± SD, n = 3).

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาลักษณะของการใช้กากยีสต์ในอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว โดยทำการเลี้ยงกุ้งขาวน้ำหนักเริ่มต้น 1.02 ± 0.01 กรัมต่อตัว ระยะเวลาการเลี้ยง 12 สัปดาห์ พบว่า สามารถใช้กากยีสต์จากกระบวนการหมักเอทานอลได้ถึงระดับ 10 เปอร์เซ็นต์โดยไม่ส่งผลกระทบต่ออาการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์ได้ในอาหารของกุ้งขาว และสามารถเพิ่มค่าโลหิตวิทยา และประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการใช้กากยีสต์จากกระบวนการหมักเอทานอลเป็นแหล่งโปรตีนในสูตรอาหารเลี้ยงกุ้งขาวได้

เอกสารอ้างอิง

- กรมพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน . 2559. การนำของเสียจากการผลิตเอทานอลมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่า. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กิจการ สุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุตินา ตันติกิตติ และ Rudlf Hoffmann. 2543. ภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ: II เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 581-588.
- Adams, A. 1991. Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species. Fish and Shellfish Immunology 1: 59-70.
- Adedayo, M.R., E.A. Ajiboye, J.K. Akintunde and A. Odaibo. 2011. Single cell proteins: as nutritional enhancer. Advances in Applied Science Research 2 (5): 396-409.
- Anderws, S.R., N.P. Sahu, A.K. Pal, S.C. Mukherjee and S. Kumar. 2011. Yeast extract, brewer's yeast and *Spirulina* in diet for *Labeo rohita* fingerlings affect haemato-immunological responses and survival following *Aeromonas hydrophilla* challenge. Research in Veterinary Science 91: 103-109.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis, 16th edn. AOAC International, Arlington, VA, USA.
- APHA, AWWA and WEF. 1998. Standard methods for the examination of water and waste – water. 20th edn. United Book Press, Maryland.
- Chang, C.F., Su, M.S. and Chen, H.U. 1999. A rapid method to quantify total haemocytes count of *Penaeus monodon* using ATP analysis. Fish Pathology 34: 211-212.
- Gamboa-Delgado, J., B. Fernández-Díaz, M. Nieto-López, and L.E. Cruz-Suárez. 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.

- Gatesoupe J. 2007. Live yeasts in the gut: natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture* 267: 20–30.
- Gopalakannan, A. and V. Arul. 2010. Enhancement of the innate immune system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of β -glucan and whole cell yeast. *Aquaculture research* 41(6): 884-892.
- Hernández-López, J., T. Gollas-Galván and F. Vargas-Albores. 1996. Activation of the proPhenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comparative Chemistry and Physiology* 113: 61-66.
- He, S., Z. Zhou, Y. Liu, P. Shi, B. Yao, E. RingØ and I. Yoon. 2009. Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on growth performance, intestinal autochthonous bacterial community and non-specific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) cultured in cages. *Aquaculture* 294: 99-107.
- Itami, T., Y. Takahashi., E. Tsuchihira and H. Igusa. 1994. Enhancement of disease resistance of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β -1,3-glucan (*Schizophyllan*). 375-378 pp. In Chou, L.M., A.D. Munro, T.J. Lam, T.W. Chen, L.K.K Cheong, J.K. Ding, K.K. Hooi, H.W. Khoo, V.P.E. Phang, K.F. Shim, C.H. Tan (eds.) The Third Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Li, P. and D. Gatlin. 2006. Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications. *Aquaculture* 251: 141–152.
- Lipke, P.N. and R. Ovalle. 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology* 180(15): 3735-40.
- Manoppo, H., U.N. Manurung and R.A. Tumbol. 2015. Efficacy of baker's yeast as immunostimulant in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of chemTech Resesrch* 8(3): 1396-1402.
- Moullac, G.L., M.L. Groumellec, D. Ansquer, S. Froissard, P. Levy and Aquacop. 1997. Haematological 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.
- Munoz, M., R. Cedenob, J. Rodríguez, W.P.W Van der Knaap, E. Mialhe and E. Bachere. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191: 89-107.
- NRC. 2011. NRC (National Research Council) Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academy Press, Washington, D.C. 376 pp.
- Ølive-Teles, A. and P. GonÇalves. 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., A. Karlsson, L.T. Mydland, O.H. Romarheim and A. Skrede. 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.
- Prachom, N., Y. Haga and S. Satoh. 2013. Impact of dietary high protein distillers dried grains on amino acid utilization, growth response, nutritional health status and waste output in juvenile rainbow trout. *Aquaculture Nutrition* 19: 62-71.
- Purivirojkul, W., N. Areechon and P. Srisapoome. 2006. The effect of peptidoglycan on immune response in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Kasetsart Journal (Nat. sci.)* 40: 181-187.
- Refstie, S., G. Baevefjord, R.R. Seim and O. ElvebØ. 2010. Effects of dietary yeast cell wall β -glucan and MOS on performance, gut health, and salmon lice resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed sunflower and soybean meal. *Aquaculture* 305: 109-116.
- Rodríguez, J. and G.L. Moullac. 2000. State of the immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191: 101-119.
- Söderhäll, K. and L. Häll. 1984. Lipopolysaccharide induced activation prophenoloxidase activating system in crayfish hemocyte lysate. *Biochimica Biophysica Acta* 797: 99-104.
- Sritunyalucksana, K. and K. Söderhäll. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191: 53-69.
- Supphantharika, M., P. Khunrae, P. Thanardkit and C. Verduyn. 2003. Preparation of spent brewer's yeast – glucan with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Bioresource Technology* 88(1): 55-60.

- Strickland, J.D.H. and T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada Bulletin 167, Ottawa.
- Tacon, A.G.J. and M. Metian. 2008. Global overview on the use of fishmeal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture* 285 (1-4): 146-158.
- Thanardkit, P., P. Khunrae, M. Suphantharika and C. Verduyn. 2002. Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 527-39.
- Vargas-Albores, F. and G. Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191:13-21.
- Zhao, L., W. Wang, X. Huang, T. Guo, W. Wen, L. Feng and L. Wei. 2017. The effect of replacement of fish meal by yeast extracts on the digestibility, growth and muscle composition of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research* 48: 311-320.

วันรับบทความ (Received date) 20 พ.ค. 2561

วันแก้ไขบทความ (Revised date) 14 มิ.ย. 2561

วันตอบรับบทความ (Accepted date) 16 ก.ค. 2561