

ผลของการเสริมยีสต์ออโตไลเซทในอาหารต่อการเติบโตและ
ระบบภูมิคุ้มกันภายใต้สภาวะความเครียดภายหลังการเหนี่ยวนำด้วยโรคไวรัส
ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Effects of Dietary Yeast Autolysate Supplementation on
Growth Performance and Immunity After Stress Condition by Vibriosis Infection
in Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

พัชรพร จันทร์รอด^{1*} อรพินท์ จินตสถาพร¹ ศรีน้อย ชุ่มคำ² และ ศุภวิทย์ ไตรวุฒานนท์³
Phatcharaphorn Janrot^{1*}, Orapint Jintasataporn¹, Srinoy Chumkam² and Supawit Triwutanon³

¹ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

²คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จ. ปทุมธานี 13180

²Faculty of Agricultural Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University, Pathum Thani 13180, Thailand

³คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

³Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

*Corresponding author: Email: ffsora@ku.ac.th

(Received: 23 May 2023; Accepted: 27 July 2023)

Abstract: The study on the effects of dietary yeast autolysate supplementation on growth performance, and immunity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was assigned to a completely randomized design (CRD) with 3 treatments and 5 replications. Commercial shrimp diets were supplemented yeast autolysate at 0, 0.1 and 0.2% on top by pullulan coated. Shrimp with an initial weight of 0.66 ± 0.55 g/shrimp were stocked at 100 ind./m³ into fifteen 500-L fiberglass tanks and cultured for 65 days. After that stress was induced for 8 hr by subcutaneous injecting of 2.6×10^4 CFU/ml *Vibrio parahaemolyticus*. The results showed that the growth performance of shrimp was in the same range ($P > 0.05$), which was 10.67- 11.41 g/shrimp. The immunity under normal conditions demonstrated that total hemocyte count of shrimp fed with yeast autolysate was significantly higher than control ($P < 0.05$). There was $10.40 \pm 0.44 \times 10^6$ cell/ml in shrimp fed with 0.2% yeast autolysate. After applied stress condition by subcutaneous injection of *V. parahaemolyticus*, shrimp fed with yeast autolysate 0.1 -0.2% exhibited the significantly higher levels of superoxide dismutase ($P < 0.05$). This indicates the efficacy of yeast autolysate on improving innate-immunity of Pacific white shrimp under normal and stress condition after *V. parahaemolyticus* infection.

Keywords: Yeast autolysate , Pacific white shrimp, growth performance, innate immunity, *Vibrio parahaemolyticus*

บทคัดย่อ: การศึกษาผลการเสริมยีสต์ออโตไลเซทในอาหารต่อการเติบโตและภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม วางแผนทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) จำนวน 3 ชุดทดลอง ชุดทดลองละ 5 ซ้ำ โดยเสริมยีสต์ออโตไลเซทที่ระดับ 0, 0.1 และ 0.2 % ในอาหารสำเร็จรูปที่ถูกเคลือบด้วยพอลิแลน เลียงในถังไฟเบอร์กลาสที่มีความหนาแน่น 100 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร จำนวน 15 ถัง มีปริมาตรน้ำ 500 ลิตรต่อถัง เป็นเวลา 65 วัน จากนั้นเหนี่ยวนำความเครียดโดยฉีดเชื้อไวรัสโอซิส โดยใช้เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ความเข้มข้น 2.6×10^4 CFU/ml เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ผลพบว่า การเสริมยีสต์ออโตไลเซทที่ระดับ 0-0.2 % มีผลให้กุ้งขาวแวนนาไมมีน้ำหนักใกล้เคียงกัน ($P > 0.05$) มีค่าเฉลี่ย 10.67-11.41 กรัมต่อตัว ในสภาวะปกติกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออโตไลเซทมีปริมาณเม็ดเลือด สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ 0.2 % มีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงที่สุด $10.40 \pm 0.44 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายหลังได้รับความเครียดจากเชื้อไวรัสโอซิส กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออโตไลเซทมีกิจกรรมซูเปอร์ออกไซด์ดีสโมเทสสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังนั้น การเสริมยีสต์ออโตไลเซทในอาหารที่ปริมาณ 0.1-0.2 % สามารถส่งเสริมประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสภาวะปกติและภายหลังได้รับเชื้อไวรัสโอพาราอีโมไลติคัส

คำสำคัญ: ยีสต์ออโตไลเซท กุ้งขาวแวนนาไม การเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน ไวรัสโอพาราอีโมไลติคัส

คำนำ

ผลผลิตกุ้งขาวแวนนาไมและกุ้งกุลาดำในปี พ.ศ. 2565 จากการเพาะเลี้ยงแบบพัฒนา มีผลผลิตรวม 256,822.41 ตัน โดยคิดเป็นผลผลิตกุ้งขาวแวนนาไม 241,516.07 ตัน และผลผลิตกุ้งกุลาดำ 15,306.34 ตัน ซึ่งผลผลิตกุ้งทั้งหมดเพิ่มขึ้น 0.78 % เมื่อเทียบกับปี พ.ศ. 2564 โดยมีผลผลิตเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (Langkapon, 2023) เนื่องจากเกษตรกรมีการจัดการฟาร์มที่ดีขึ้น อย่างไรก็ตามเกษตรกรประสบปัญหาต่าง ๆ อันได้แก่ สภาพอากาศที่แปรปรวน ต้นทุนการผลิตที่เพิ่มขึ้น เช่น ราคาอาหารกุ้งขาวแวนนาไม ค่าไฟฟ้า ค่าแรงงาน (Rattanapun, 2019) รวมถึงปัญหาโรคกุ้งขาวแวนนาไมที่มักพบเมื่อเลี้ยงไปได้ระยะหนึ่ง ในปัจจุบันเกษตรกรที่ประสบกับปัญหาเรื่องโรคที่เกิดขึ้นระหว่างการเลี้ยงเลือกใช้สารเสริมชีวิต (probiotics) เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์มีชีวิตหรือผลิตภัณฑ์ที่มีจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิต (El-Saadony et al., 2021) ซึ่งในสัตว์น้ำจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ถูกนำมาใช้เพื่อควบคุมโรคผ่านการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น ยีสต์คัลเจอร์ (yeast culture) ยีสต์ออโตไลเซท (yeast autolysate) เป็นการสลายเซลล์ของยีสต์ ด้วยกรดหรือเอนไซม์หรือสารละลายเกลือ

เพื่อให้เซลล์แตกซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มแรงดันออสโมติก ประกอบไปด้วยส่วนของผนังเซลล์และของเหลวภายในเซลล์ยีสต์ (Shurson, 2018) โดยมีรายงานว่า การเสริมยีสต์ออโตไลเซทในอาหารปลากะพง มีความสามารถในการส่งเสริมการเติบโตและค่าการย่อยได้ของอาหารได้ดีขึ้นกว่าชุดควบคุม (Takii et al., 2004) นอกจากนี้ ยังมียีสต์ไฮโดรไลเซท (yeast hydrolysate) เป็นยีสต์ที่มีการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ (biotransformation processes) ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยการใช้เอนไซม์และกระบวนการการแยกส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ของเปปไทด์ไฮโดรไลเซท โดยผ่านการกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดต่าง ๆ เพื่อแยกขนาดและลักษณะจำเพาะที่ระดับความดันต่าง ๆ (Amorim et al., 2016) และมีรายงานว่ายีสต์ไฮโดรไลเซทมีปริมาณของกรดอะมิโน เปปไทด์ ที่มากกว่ายีสต์อื่น ๆ (Shi et al., 2018) ในส่วนของยีสต์สกัด (yeast extracts) ประกอบด้วยองค์ประกอบของของเหลวภายในเซลล์ยีสต์ (intracellular components) เท่านั้น ซึ่งอุดมไปด้วยกรดอะมิโน วิตามินและแร่ธาตุ นอกจากนี้ สารสกัดยีสต์ยังถูกนำมาใช้ในแง่ของการกระตุ้นจุลินทรีย์ (microbial stimulants) ในกระบวนการหมักและในอุตสาหกรรมยา (Hassan, 2011) ในกลุ่มของยีสต์แห้ง (dried yeast) ซึ่งเป็นกลุ่มของ nutritional yeast

product ประกอบไปด้วยมวลชีวภาพของยีสต์ที่ตายแล้ว ถูกใช้เป็นทางเลือกในการเพิ่มโภชนาในอาหารสัตว์ เช่น ยีสต์โฮลเซลล์ (yeast whole cell) ที่ประกอบไปด้วยองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ ภายหลังกระบวนการผลิตยีสต์หรือเป็นเซลล์ยีสต์ที่เหลือทิ้งจากการหมักแอลกอฮอล์ ในขณะที่ยีสต์นิวคลีโอไทด์ (yeast nucleotide) เป็นยีสต์ที่มีความเฉพาะมีปริมาณของนิวคลีโอไทด์มากกว่ายีสต์ชนิดอื่น (Biswas *et al.*, 2012) จะเห็นได้ว่ายีสต์ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ งานวิจัยของ Jin *et al.* (2018) พบว่า การใช้สารเสริมจากยีสต์นิวคลีโอไทด์สามารถกระตุ้นการเติบโต และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และความทนทานต่อสภาวะที่มีแอมโมเนียในกุ้งขาวแวนนาไมได้เช่นเดียวกับ Rairat *et al.* (2022) รายงานว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์นิวคลีโอไทด์มีความสามารถในการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันและการต้านทานโรคได้

ดังนั้น การวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาประสิทธิภาพของยีสต์ออกโตไลเซทที่เสริมในอาหารที่ระดับ 0.1-0.2% ต่อการเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไมในสภาวะการเลี้ยงทั่วไปและระบบภูมิคุ้มกันภายหลังได้รับเชื้อไวรัสอิพาราฮิโมไลติคัส

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

คัดเลือกกุ้งขาวแวนนาไม จำนวน 750 ตัว จากฟาร์มเอกชน อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร นำมาพักในถังไฟเบอร์กลาสความจุ 500 ลิตร ที่ความเค็ม 3 พีพีที ให้อาหารโปรตีน 34 % วันละ 2 ครั้ง เป็นระยะเวลา 3 วัน เพื่อให้กุ้งปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมก่อนทำการทดลอง จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์การปลดเชื้อโรคตายด่วน (Early Mortality Syndrome) ก่อนนำมาศึกษาทดลอง

อาหารทดลอง

อาหารทดลองเป็นอาหารกุ้งขาวแวนนาไมเชิงการค้าชนิดเกล็ดขนาด 1.6 มิลลิเมตร (อาหารเบอร์ 3)

ที่มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 39% และไขมันไม่น้อยกว่า 7% คลุกยีสต์ออกโตไลเซท จากบริษัท มิตรผล ไปโอฟูเอล จำกัด ที่ปริมาณ 0, 0.1 และ 0.2 % แล้วเคลือบด้วยพอลูลูเลน® ป้องกันการละลายน้ำ จากนั้นผึ่งให้แห้ง 15 นาทีก่อนนำไปใช้ เก็บรักษาในตู้เย็นในห้องปฏิบัติการ (Laboratory Refrigerator) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีการเตรียมอาหารใหม่ทุกสัปดาห์

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มทดลอง (Completely randomized design, CRD) โดยแบ่งการทดลอง ออกเป็น 3 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ

ชุดการทดลองที่ 1 คือ อาหารที่ไม่เสริมยีสต์ออกโตไลเซท (T1C)

ชุดการทดลองที่ 2 คือ อาหารที่เสริมยีสต์ออกโตไลเซท 0.1 % (T2Y)

ชุดการทดลองที่ 3 คือ อาหารที่เสริมยีสต์ออกโตไลเซท 0.2 % (T3Y)

สภาวะการทดลอง

กุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนักเริ่มต้น 0.66 ± 0.05 กรัมต่อตัว เลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาส 15 ถัง ปลอยลงในถังที่มีความจุน้ำ 500 ลิตร พร้อมระบบให้อากาศ ที่ความหนาแน่น 50 ตัวต่อถัง (100 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร) ด้วยน้ำความเค็ม 3 พีพีที ให้อาหาร 3 -10% ของน้ำหนักตัว โดยแบ่งเป็น 3 มื้อต่อวัน (8.00, 12.00, และ 16.00 น.) มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 10 - 20% ในทุกวัน และใช้ระยะเวลาเลี้ยง 65 วัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำโดยใช้น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน คุณภาพน้ำในระหว่างการเลี้ยงควบคุมค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 7.5 - 8.0 ออกซิเจนละลายน้ำมากกว่า 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความเป็นด่างไม่ต่ำกว่า 80 มิลลิกรัมต่อลิตร แอมโมเนียรวมน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม ภายหลังได้รับเชื้อแบคทีเรียไวรัสอิพาราฮิโมไลติคัส (*Vibrio parahaemolyticus*)

การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การเติบโต

เก็บรวบรวมข้อมูลและทำการวิเคราะห์ข้อมูลการเติบโต ได้แก่ น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการรอดตาย

2. การศึกษาภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

ทำการวิเคราะห์ค่าทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม จำนวน 3 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ โดยเก็บตัวอย่างเลือดของกุ้งขาวแวนนาไม 5 ตัวต่อซ้ำ คิดเป็นชุดทดลองละ 25 ตัว โดยมีวิธีเก็บตัวอย่าง ดังนี้

2.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (total hemocyte count) โดยวิธีการของ Supamattaya *et al.* (2000)

หยดเลือดกุ้งขาวแวนนาไม 100 ไมโครลิตร ลงใน trypan blue solution 400 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหยดลงบนแผ่นสไลด์นับเม็ดเลือด 20 ไมโครลิตร ส่องกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X เพื่อนับเม็ดเลือด

2.2 ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (total protein in hemolymph) ตามวิธีการของ Supamattaya *et al.* (2000)

หยดน้ำกลั่นลงใน solution I (2 % sodium carbonate, 1 % copper sulfate, 2 % sodium potassium tartrate) 2 มิลลิลิตร แล้วหยดเลือดกุ้ง 50 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที และเติม Folin (1:10) 3 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร และนำไปเปรียบเทียบกับ standard curve ของ bovine serum albumin

2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) โดยวิธีการดัดแปลงจาก Smith and Söderhäll (1991)

เติมสารละลาย L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA; Sigma) 300 ไมโครลิตร ใส่ใน HEPES 570 ไมโครลิตร แล้วเติมเลือดกุ้ง 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร

1 หน่วยของฟีนอลออกซิเดส = $\Delta OD_{490}/\text{นาที}/\text{มิลลิกรัม โปรตีน}$

2.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme activity) โดยใช้วิธีการของ Ellis (1990)

หยดเลือดกุ้ง 10 ไมโครลิตร ลงในไมโครเวลเพลท จากนั้นใช้ไมโครปิเปตขนาด 1000 ไมโครลิตร สำหรับหยดเชื้อ *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่ 1 นาที และที่ 6 นาที จากนั้นคำนวณค่าหนึ่งหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ มีค่าเท่ากับกิจกรรมในการทำลายเซลล์ *Micrococcus* เมื่อวัดจากการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดซับแสงที่ 450 นาโนเมตรในเวลา 0.001 นาที ที่พีเอช 6.24 และ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ΔA_{450} of 0.001 per minute at pH 6.24 and 25 °C)

2.5 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) ตามวิธีการของ Ukeda *et al.* (1999) โดยใช้ SOD Assay Kit#19160-1KTF (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)

หยดเลือดกุ้ง 20 ไมโครลิตร จากนั้นกำหนดหลอด blank (a. Blank 1 ใส่ น้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร, b. Blank 2 ใส่ตัวอย่างเลือดกุ้ง 20 ไมโครลิตร และ c. Blank 3 ใส่ น้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร) จากนั้นเติมด้วย WST ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในแต่ละหลอดและผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม dilution buffer 20 ไมโครลิตร ใน blank 2 และ blank 3 ตามด้วยเอนไซม์ 20 ไมโครลิตร ลงในทุกหลอดและผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ -37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร และคำนวณค่า SOD

2.6 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไธโอน โดยทำการหยดเลือดกุ้งขาวแวนนาไม 10 ไมโครลิตร จากนั้นกำหนดหลอด blank 1 หลอด โดยเติมน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร และหยดด้วย 5 % SSA แล้วเติม working mixture 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมด้วย NADPH solution 50 ไมโครลิตร และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 นาที และคำนวณค่าเพื่อเปรียบเทียบกับ standard curve (glutathione assay kit; CS0260; Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)

3. ผลของความเครียดจากการเหนี่ยวนำโดยเชื้อไวรัสโอซิส (vibriosis challenge test) ต่อภูมิคุ้มกันโรค

ทำการเหนี่ยวนำให้กุ้งขาวแวนนาไมเกิดความเครียดจากโรคไวรัสโอซิสโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ภายหลังกุ้งขาวแวนนาไมได้รับอาหารทดลอง ครบ 65 วัน สุ่มกุ้งทั้ง 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ จำนวน 10 ตัวต่อซ้ำ มาทดสอบด้วยสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ในปริมาณความเข้มข้นที่ 2.6×10^4 CFU/ml ซึ่งเตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกเชื้อจากกุ้งที่ป่วยเป็นโรคไวรัสโอซิส ของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ทดสอบความแข็งแรงของเชื้อแล้ว นำเลี้ยงใน tryptic soy broth (TSB) ที่มีเกลือ 1.5% เป็นเวลา 15-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 29-37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที แล้วดูดแบคทีเรีย ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายแบคทีเรีย mid-log phase ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว นำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 3,500 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 10 นาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำเชื้อแบคทีเรียไวรัสโอ ไปวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้มีค่า optical density (OD) เท่ากับ 0.1 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อ $10^6 - 10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายแบคทีเรียที่ OD 0.1 ทำการเจือจาง โดยใช้จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับกับสารละลายน้ำเกลือ 0.85% 9 มิลลิลิตร และทำการเจือจางอีกครั้งโดยใช้ จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับกับสารละลายน้ำเกลือ 0.85% 9 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นของเชื้อโดยประมาณ $10^4 - 10^5$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร มานับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธีการ spread plate บนอาหาร thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) ที่มีเกลือ 1.5% ที่ป่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น เพื่อยืนยันความเข้มข้นที่ใช้ในการฉีด และนำสารละลายชุดเดียวกันมาฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อบริเวณปล้องที่ 2 ของลำตัว ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 26 G นำกุ้งขาวแวนนาไมที่ฉีดเชื้อแล้วใส่ตู้ทดสอบ ขนาด 100 ลิตร

หลังการฉีดเชื้อ 8 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไม ศึกษากระบวนการภูมิคุ้มกัน ตามวิธีการศึกษาในกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในสภาวะปกติ และนับจำนวนกุ้งขาวแวนนาไมที่ตายทุกวัน ประเมินผล การทดลองโดยเปรียบเทียบอัตราการตายของกุ้งแวนนาไมกลุ่มควบคุม กับกลุ่มทดลอง ภายในระยะเวลา 7 วัน ทำการแยกเชื้อจากตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม และลำไส้ เพื่อยืนยันว่ากุ้งขาวแวนนาไมมีการตายจากเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* (Noble et al., 2021)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเสริมยีสต์ออกโตไลเซทต่อการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมระยะเติบโต ที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 100 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร ที่ระดับการเสริมยีสต์ออกโตไลเซท 0, 0.1 และ 0.2 % เคลือบที่บนอาหารนั้น กุ้งขาวแวนนาไมทดลองมีขนาดน้ำหนักเริ่มต้น 0.65 ± 0.05 , 0.66 ± 0.03 และ 0.70 ± 0.06 กรัมต่อตัว ตามลำดับ ผลการเจริญเติบโตในการทดลองให้อาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซทเป็นเวลา 65 วัน พบว่า มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติของการเติบโต ($P > 0.05$) ซึ่งได้แก่ ค่าน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย (final weight) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (average daily gain) อัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio) และอัตราการรอดตาย (survival rate)

ค่าน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซทในชุดการทดลอง T1C, T2Y และ T3Y นั้น มีค่า 11.25 ± 0.06 , 11.41 ± 0.94 และ 10.67 ± 0.26 กรัมต่อตัว ตามลำดับ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซทในชุดการทดลอง T1C, T2Y, และ T3Y มีค่า 10.58 ± 0.08 , 10.76 ± 0.92 และ 10.08 ± 0.27 กรัมต่อตัว ตามลำดับ น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อวันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซทในชุดการทดลอง T1C, T2Y, และ T3Y มีค่า 0.16 ± 0.00 , 0.17 ± 0.01 และ 0.15 ± 0.00 กรัมต่อวัน ตามลำดับ อัตรา-

การเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซทในชุดการทดลอง T1C, T2Y, และ T3Y มีค่า 4.33 ± 0.05 , 4.40 ± 0.11 และ 4.19 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ตามลำดับ อัตราแลกเนื้อของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซทในชุดการทดลอง T1C, T2Y, และ T3Y มีค่า 1.44 ± 0.06 , 1.43 ± 0.04 และ 1.45 ± 0.05 ตามลำดับ อัตรารอดของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซทในชุดการทดลอง T1C, T2Y, และ T3Y มีค่า 83.67 ± 5.19 , 84.67 ± 10.87 และ 89.00 ± 4.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 1)

ผลของการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในการทดลองนี้ มีแนวโน้มเช่นเดียวกับงานทดลองของ Rungrassamee *et al.* (2014) ที่รายงานว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ในแง่ของการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม ต่อการได้รับอาหารกุ้งที่เสริมด้วยสารแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 2, 3 และ 4 กรัมต่อกิโลกรัม เช่นเดียวกับงานทดลองสารเสริมยีสต์สกัด ในปูก้ามขน (*Eriocheir sinensis*) ที่ปริมาณ 2.5, 5 และ 10 กรัมในอาหาร 1 กิโลกรัม ผลการวิจัยพบว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ของน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการแลกเนื้อ และจำนวนของการลอกคราบเฉลี่ย ของปูประกอบในร่างกายสัตว์ (body composition) ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (non-specific immunity) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant status) (Zhang *et al.*, 2019) ในขณะที่งานทดลองของ Zheng *et al.* (2021) รายงานว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารเสริมยีสต์สกัด (yeast extract) 2% มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และ Zhang *et al.* (2012) รายงานว่าปริมาณการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับความเข้มข้นอย่างน้อย 2 กรัมต่อกิโลกรัมสามารถพัฒนาการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ผลของการทดลองที่มีความแตกต่าง อาจเนื่องมาจากการทดลองต่าง ๆ มีสูตรอาหาร แหล่งที่มาของสารเสริมยีสต์ พันธุกรรม

ของสัตว์ทดลอง สภาพแวดล้อม ที่แตกต่างกัน (Lara-Flores *et al.*, 2003)

การศึกษาภูมิคุ้มกันในสภาวะปกติ (normal condition) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซท ผลการศึกษาภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 3 ชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 65 วัน ในสภาวะปกติ พบว่าปริมาณเม็ดเลือด (total hemocyte count) โปรตีนในเลือด (hemolymph protein) และกิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่ค่ากิจกรรมไลโซไซม์ (lysozyme activity) ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (superoxide dismutase) ในกลุ่มที่ได้รับยีสต์ออกโตไลเซทมีแนวโน้มสูงขึ้น ($P = 0.08$) และกลูตาไทโอน (glutathione) ($P = 0.82$) มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ภูมิคุ้มกันในชุดการทดลอง T1C, T2Y และ T3Y นั้น มีปริมาณเม็ดเลือดรวม มีค่าเท่ากับ 9.65 ± 0.64 , 8.35 ± 0.56 และ 10.40 ± 0.44 ($\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ โปรตีนในเลือด มีค่าเท่ากับ 6.52 ± 0.66 , 4.96 ± 0.33 และ 6.17 ± 0.36 กรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ กิจกรรมฟีนอลออกซิเดส มีค่า 26.99 ± 4.24 , 31.61 ± 3.36 และ 21.17 ± 2.93 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ไลโซไซม์มีค่า 180.00 ± 26.46 , 253.33 ± 55.08 และ 260.00 ± 26.46 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กิจกรรมซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส มีค่า 4.51 ± 1.88 , 6.22 ± 0.62 และ 7.33 ± 0.74 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และกลูตาไทโอนรวม มีค่า 17.41 ± 1.13 , 17.65 ± 1.25 และ 17.97 ± 0.64 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 2)

องค์ประกอบที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันภายในของสัตว์รวมทั้งกุ้งขาวแวนนาไม คือ เม็ดเลือดที่ไหลเวียนอยู่ในระบบหมุนเวียนของเลือด มีการจัดแบ่งเม็ดเลือดในกุ้งตามลักษณะสัณฐานวิทยาออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ ไฮยาลิโนไซต์ (hyalinocytes) เซมิแกรนูโลไซต์ (semigranulocytes) และ แกรนูโลไลต์ (granulocyte) โดยเม็ดเลือดทำหน้าที่ทั้งในระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดและระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเม็ดเลือดเป็นตัวหลักในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม

**ผลของการเสริมยีสต์ออกโตไลเซทในอาหารต่อการเติบโตและระบบภูมิคุ้มกัน
ภายใต้สภาวะความเครียดภายหลังการเหนี่ยวนำด้วยโรคไวรัสในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)**

Table 1. Growth performance of Pacific white shrimp fed with yeast autolysate for 65 days

Growth performance	T1C	T2Y	T3Y	P-value
Initial weight (g/ind.)	0.65 ± 0.05	0.65 ± 0.03	0.70 ± 0.06	0.31
Final weight (g/ind.)	11.25 ± 0.06	11.41 ± 0.94	10.67 ± 0.26	0.44
Weight gain (g/ind.)	10.58 ± 0.08	10.76 ± 0.92	10.08 ± 0.27	0.39
Average daily gain (g/ind./day)	0.16 ± 0.00	0.17 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.40
Specific growth rate (%/day)	4.33 ± 0.05	4.40 ± 0.11	4.19 ± 0.03	0.09
Feed conversion ratio	1.44 ± 0.06	1.43 ± 0.04	1.45 ± 0.05	0.94
Survival rate (%)	83.67 ± 5.19	84.67 ± 10.87	89.00 ± 4.32	0.76

Note: Data with superscript letters a,b in the same row indicates a significant difference ($P < 0.05$)

Table 2. Immune parameters of Pacific white shrimp fed with yeast autolysate for 65 days under normal condition

Parameter	(T1C)	T2Y0.1%	T3Y0.2%	P-value
Total hemocyte count ($\times 10^6$ cell/ml)	9.65 ± 0.64 ^a	8.35 ± 0.56 ^b	10.40 ± 0.44 ^a	< 0.01
Hemolymph protein (g/dL)	6.52 ± 0.66 ^a	4.96 ± 0.33 ^b	6.17 ± 0.36 ^a	< 0.01
Phenoloxidase activity (unit/min/mg Protein)	26.99 ± 4.24 ^a	31.61 ± 3.36 ^a	21.17 ± 2.93 ^b	0.01
Lysozyme (unit/ml)	180.00 ± 26.46	253.33 ± 55.08	260.00 ± 26.46	0.08
Superoxide dismutase (unit/ml)	4.51 ± 1.88	6.22 ± 0.62	7.33 ± 0.74	0.08
Glutathione (nmole/ml)	17.41 ± 1.13	17.65 ± 1.25	17.97 ± 0.64	0.82

Note: Data with superscript letters a,b in the same row indicates a significant difference ($P < 0.05$)

โดยกระบวนการต่างๆ เช่น การกลืนกินเซลล์ (phagocytosis) การเข้าแคปซูล (encapsulation) และการเกิดตุ่มปม (nodule formation) เป็นต้น จะเห็นได้ว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซท 0.2% มีปริมาณเม็ดเลือดรวมที่มากที่สุด ทั้งนี้ เนื่องจาก ปีต้ากลูแคน จัดเป็นกลุ่มของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) ซึ่งพบว่าเป็นองค์ประกอบของยีสต์ โดยโมเลกุลของปี้ต้ากลูแคน เมื่อกุ้งขาวแวนนาไมได้รับเข้าไปในกระแสเลือดแล้วนั้น จะเรียกว่าเป็น pathogen associated molecular pattern (PAMPs) ไปเจอกับโปรตีนที่ทำหน้าที่ช่วยในการเข้าจับกับโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคในกระแสเลือดที่เรียกว่า pattern recognition protein (PRPs) จะส่งผลให้เกิดเป็นโมเลกุลเชิงซ้อน (protein

complex) เรียกว่า beta-1,3-glucan-binding protein complex โดยโมเลกุลเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะไปกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดเคลื่อนที่เข้ามา (migration) และเกิดกระบวนการแตกของเม็ดเลือด (degranulation) หลั่งโปรตีนและเอนไซม์กับระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อพร้อมทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามา (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) ตัวอย่างเช่น ในกระบวนการ phagocytosis เป็นการตอบสนองแบบ non-specific immune response และเป็น cytoskeleton-dependent process ซึ่งเกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึม โดยเริ่มจากการที่ฟาโกไซต์มีการยึดติดกับสิ่งแปลกปลอมโดยเกิดผ่าน non-specific receptor อย่างเช่น toll-like receptor (TLR) จับโครงสร้างของปี้ต้ากลูแคน และ

ส่งผลให้เกิดกระบวนการกลืนกินและทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้นต่อไป ซึ่งถือเป็นการทำงานแบบ cellular immunity โดยเม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด แบ่งหน้าที่ในการทำงานโดยเม็ดเลือดชนิด hyaline cell ที่มีลักษณะเป็นเซลล์ขนาดเล็กสุด ทำหน้าที่ phagocytosis และมีการหลั่งเอนไซม์ไลโซไซม์เพื่อกำจัดเชื้อโรค อีกทั้งยังมีส่วนในการส่งเสริมการทำงานแบบ humoral immunity คือช่วยกระตุ้นการแข็งตัวของเลือด (blood clotting) ในขณะที่ semigranulocyte ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มเชื้อโรค (encapsulation) การกลืนกินเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) การเก็บและการปลดปล่อยเอนไซม์ prophenoloxidase ส่วน granular cell ทำหน้าที่ในการเก็บและปลดปล่อยเอนไซม์ prophenoloxidase ใช้เซลล์ฆ่าเซลล์ (cytotoxicity) ในขณะที่มีกระบวนการกำจัดเชื้อโรคเกิด สารอนุมูลอิสระชนิดต่างๆมากมาย ที่ไปทำลายเซลล์เม็ดเลือดและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ร่างกายสัตว์จึงมีการปกป้องตนเองโดยการหลั่งเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส-แคตตาลเลสและกลูตาไทโอน เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นโดยการเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และน้ำ ซึ่งปลอดภัยต่อตัวสัตว์ (Song *et al.*, 1994) โดยพบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวม โปรตีนในเลือด กิจกรรมไลโซไซม์ และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส ($P \leq 0.08$) ในกุ่มกลุ่มที่ได้รับยีสต์ออกโตไลเซท 0.2 % โดยรวมมีค่าสูงขึ้น โดยเป็นผลมาจากการทำงานของกุ่มคัมกันเซลล์เม็ดเลือดและในน้ำเลือดดังที่กล่าวไปข้างต้น

ผลของการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดโดยเชื้อไวรัสโอซิสต่อกุ่มคัมกันโรค โดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้นต่ำ พบว่า กุ่มขาวแวนนาไม่ที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซท 0.1-0.2% มีกุ่มคัมกันสูงขึ้น ($P < 0.05$) ในส่วนกิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (superoxide dismutase) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่ากุ่มคัมกันในชุดการทดลอง T1C, T2Y, และ T3Y มีค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส 52.50 ± 10.32 , 38.49 ± 2.62 , และ 29.00 ± 0.17 หน่วยต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีนของเลือด ตามลำดับ กิจกรรมซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตสมีค่า 7.55 ± 1.05 , 11.53 ± 1.72 และ 11.90 ± 1.90 หน่วยต่อ

มิลลิลิตรของเลือด ตามลำดับ ขณะที่ค่าปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte count) โปรตีนในเลือด (hemolymph protein) กิจกรรมไลโซไซม์ (lysozyme activity) และกลูตาไทโอน (glutathione) มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกลุ่มควบคุม กุ่มขาวแวนนาไม่ในชุดการทดลอง T1C, T2Y และ T3Y นั้น มีปริมาณเม็ดเลือดรวม มีค่าเท่ากับ 5.58 ± 0.31 , 6.42 ± 1.01 และ 5.92 ± 0.92 ($\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ โปรตีนในเลือดมีค่าเท่ากับ 5.01 ± 1.16 , 6.98 ± 0.58 และ 6.28 ± 0.05 กรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ ไลโซไซม์มีค่า 213.33 ± 32.15 , 220.00 ± 26.46 , และ 243.33 ± 35.12 หน่วยต่อมิลลิลิตรของเลือด ตามลำดับ และกลูตาไทโอนมีค่า 17.23 ± 1.07 , 17.69 ± 0.60 , และ 17.96 ± 0.78 นาโนโมลต่อมิลลิลิตรของเลือด ตามลำดับ (Table 3)

ผลการศึกษาภายหลังการเหนี่ยวนำโดยเชื้อไวรัสโอซิสต่อกุ่มคัมกันโรค พบว่า กิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (superoxide dismutase) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยกุ่มที่ได้รับอาหารชุดควบคุม (T1C) มีปริมาณกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสที่สูงกว่าชุดทดลองอื่นๆ ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากปริมาณของยีสต์ที่เสริมลงไปให้อาหารซึ่งมีความสำคัญต่อการส่งเสริมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในกุ่มขาวแวนนาไม่รวมถึงความต้านทานของกุ่มต่อเชื้อโรค (Andrews *et al.*, 2011) งานวิจัยของ Ma *et al.* (2020) รายงานว่ากุ่มขาวแวนนาไม่ที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซท (yeast autolysate) 1% มีปริมาณของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่สูงขึ้นกว่าชุดควบคุม ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte count) ความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (total antioxidative capacity) กิจกรรมการหายใจระดับเซลล์ (respiratory burst) และกิจกรรมของไลโซไซม์ (lysozyme activity) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยรายงานว่า การเสริมยีสต์คัลเจอร์ (yeast culture) ในอาหาร 1.1% มีความสามารถในการเพิ่มปริมาณของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ่มขาวแวนนาไม่ ได้แก่ ยีน penaeidin (PEN), lysozyme (LYZ) และ prophenoloxidase (proPO) (Licón-Jain *et al.*, 2020)

Table 3. Immune responses of Pacific white shrimp fed with yeast autolysate under stress condition by injection *Vibrio parahaemolyticus*

Parameter	T1C	T2Y	T3Y	P-value
Total hemocyte count ($\times 10^6$ cell/ml)	5.58 $\pm$ 0.31	6.42 $\pm$ 1.01	5.92 $\pm$ 0.92	0.61
Hemolymph protein (g/dL)	5.01 $\pm$ 1.16	6.98 $\pm$ 0.58	6.28 $\pm$ 0.05	0.10
Phenoloxidase activity (unit/min/mg protein)	52.50 $\pm$ 10.32 ^a	38.49 $\pm$ 2.62 ^{ab}	29.00 $\pm$ 0.17 ^b	0.02
Lysozyme (unit/ml)	213.33 $\pm$ 32.15	220.00 $\pm$ 26.46	243.33 $\pm$ 35.12	0.51
Superoxide dismutase (unit/ml)	7.55 $\pm$ 1.05 ^b	11.53 $\pm$ 1.72 ^a	11.90 $\pm$ 1.90 ^a	0.03
Glutathione (nmole/ml)	17.23 $\pm$ 1.07	17.69 $\pm$ 0.60	17.96 $\pm$ 0.78	0.59

Note: Data with superscript letters a,b in the same row indicates a significant difference ($P < 0.05$)

กุ้งขาวแวนนาไมมีการปกป้องตัวเองจากเชื้อก่อโรค ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งซึ่งประกอบด้วย ระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune system) ที่ไม่มีการจดจำแอนติเจนและไม่สามารถทำวัคซีนได้เหมือนในสัตว์ชั้นสูง จะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรค โดยอาศัยเซลล์และสารน้ำ (cellular and humoral mechanisms) ไปยับยั้งและกระตุ้นการเก็บกินสิ่งแปลกปลอมและเชื้อโรค โดยการทำงานของ เซลล์เม็ดเลือดกุ้ง ที่เรียกว่า ฮีโมไซต์ (hemocytes) ซึ่งทำหน้าที่ในการขนส่งออกซิเจน และยังมีหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันด้วย เมื่อฮีโมไซต์เจอกับสิ่งแปลกปลอมจะถูกกระตุ้นผ่านตัวรับกลุ่ม pattern recognition proteins และนำไปสู่การทำงานของเซลล์และการสร้างสารน้ำต่าง ๆ ที่ช่วยควบคุมทำลายเชื้อโรค เช่น กระบวนการฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) การสร้างก้อน (nodule formation) การหลั่งสารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides) (AMPs) และไลโซไซม์ (lysozyme) เป็นต้น (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006) นอกจากการฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) แล้ว การป้องกันตนเองของกุ้งยังมีการโอบล้อมสำหรับปรสิตที่มีขนาดใหญ่และการสร้างตุ่มหรือปมสำหรับจุลชีพขนาดเล็ก (encapsulation and nodule formation) (Aguirre-Guzman *et al.*, 2009) ในส่วนของภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immune defense) ที่เกิดจากการหลั่งโปรตีนหลาย ๆ ชนิดที่ใช้ในการทำลายเชื้อโรค

เช่นสารกลุ่ม เลคติน (non-enzymatic proteins) ไกลโคโปรตีน (glycoproteins) เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysosome enzymes) ใช้ในการกำจัดเชื้อโรค และสารต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides, AMPs) ที่ไปเกาะบนผิวของเชื้อโรค และทำลายเซลล์นั้น สารเหล่านี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมและจดจำโมเลกุลของผนังเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับระบบ prophenoloxidase (ProPO) cascade ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์เป็น quinone ที่ช่วยยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และนำไปสู่การเกิดเม็ดสีดำ (melanization) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากุ้งขาวแวนนาไมมีการติดเชื้อ โดยเซลล์ฮีโมไซต์หลั่งโปรตีน (antimicrobial protein) ที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (blood clotting) เมื่อมีการติดเชื้อ ดังนั้นกิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์และกิจกรรมฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immune defense) จะเพิ่มขึ้น และทำงานรวดเร็วขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อโรคแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, และ *V. cholerae* เป็นต้น (Chong *et al.*, 2022) การที่เซลล์เม็ดเลือดยื่นไซโทพลาสซึมล้อมรอบและจับกินสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีการ phagocytosis นั้น เป็นกลไกที่สำคัญของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง (cellular defense) เมื่อมีกระบวนการฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) อนุภาคของสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพจะถูกกลืนเข้าไปอยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือดและกลายเป็น digestive vacuole ที่เรียกว่า phagosome

การผลิตของ reactive oxygen intermediates (ROIs) นั้น เป็นผลมาจากกระบวนการหายใจระดับเซลล์ (respiratory burst) ซึ่ง reactive intermediates 3 ตัวหลัก ได้แก่ superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hypochlorous acid (HOCl) เกิดจาก เอนไซม์ NADPH oxidase ไปรีดิวซ์ออกซิเจน (O_2) และได้ superoxide anion ซึ่งเป็นอันตรายต่อเม็ดเลือด และเซลล์เนื้อเยื่อต่าง ๆ เมื่อเกิดสารอนุมูลอิสระ (ROS) จากการต่อสู้ป้องกันเชื้อโรค กุ้งมีเอนไซม์กลุ่มที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น เม็ดเลือดจึงมีบทบาทในการสร้างเอนไซม์ในการต่อต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidative stress enzymes) ซึ่งได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเทส (superoxide dismutase) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และออกซิเจน และมีการสร้างเอนไซม์กลุ่มคาตาเลส (catalase) และ กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) ซึ่งเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำและออกซิเจน ซึ่งปลอดภัยกับตัวสัตว์ (Di Giulio *et al.*, 2020) ดังนั้น ในเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อโรคระบบภูมิคุ้มกันทั้งสองระบบ ดังกล่าวจะทำงานร่วมกันในการทำลายสิ่งแปลกปลอม และเชื้อโรคต่าง ๆ

สรุป

การเสริมยีสต์ออกโตไลเซทในอาหารต่อการเติบโต และภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม ในสภาวะการเลี้ยงทั่วไปและภายใต้สภาวะความเครียดภายหลังการเหนี่ยวนำด้วยโรคไวรัสอินัน การเสริมยีสต์ออกโตไลเซท 0, 0.1 และ 0.2% เคลือบหีบบนอาหารนั้น มีผลให้การเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 100 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร เป็นเวลา 65 วัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในส่วนของ ค่าน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นต่อวัน อัตราการเติบโตจำเพาะ อัตราแลกเนื้อ และอัตราการรอด โดยกุ้งขาวแวนนาไมมีน้ำหนักเฉลี่ย $10.67-11.41 \pm 0.94$ กรัมต่อตัว เมื่อพิจารณาถึงภูมิคุ้มกันในสภาวะปกติพบว่า ในกุ้งกลุ่มที่ได้รับยีสต์ออก

โตไลเซท 0.2% (T2Y) มีปริมาณเม็ดเลือดรวม โปรตีนในเลือด กิจกรรมไลโซซิม และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเทส ($P \leq 0.08$) ที่สูงกว่าชุดทดลองอื่น และภายหลังการได้รับความเครียดจากการได้รับเชื้อไวรัสโอชีส โดยการฉีดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้นต่ำ 2.6×10^4 CFU/ml กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซทที่ระดับ 0.2% (T2Y) มีปริมาณซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเทสที่ใช้ในการกำจัดเชื้อโรคสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังนั้น การเสริมยีสต์ออกโตไลเซท 0.2% ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทั้งในสภาวะปกติและในสภาวะความเครียดภายหลังการได้รับเชื้อ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีสัตว์น้ำ คาร์กิลล์ บ้านแพ้ว สมุทรสาคร ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาวิจัยเพิ่มพูนความรู้ และให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์อาหารสัตว์น้ำ ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์ สารเคมีในการวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนิสิตปริญญาตรี นิสิตปริญญาโท และนิสิตปริญญาเอก ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์อาหารสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่อนุเคราะห์การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ต่าง ๆ การศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ภายใต้โครงการพัฒนาวิชาการ 0527/64 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

- Aguirre-Guzman, G., J.G. Sanchez-Martinez, A.I. Campa-Cordova, A. Luna-Gonzalez and F. Ascencio. 2009. Penaeid shrimp immune system. The Thai Journal of Veterinary Medicine 39(3): 205-215.

- Andrews, S.R., N.P. Sahu, A.K. Pal, S. C. Mukherjee and S. Kumar. 2011. Yeast extract, brewer's yeast and spirulina in diets for *Labeo rohita* fingerlings affect haemato-immunological responses and survival following *Aeromonas hydrophila* challenge. Research in veterinary science 91(1): 103-109.
- Amorim, M., J.O. Pereira, D. Gomes, C.D. Pereira, H. Pinheiro and M. Pintado. 2016. Nutritional ingredients from spent brewer's yeast obtained by hydrolysis and selective membrane filtration integrated in a pilot process. Journal of Food Engineering 185: 42-47.
- Biswas, G., H. Korenaga, R. Nagamine, T. Kono, H. Shimokawa, T. Itami and M. Sakai. 2012. Immune stimulant effects of a nucleotide-rich baker's yeast extract in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. Aquaculture 366-367: 40-45.
- Chong, R.S.-M., B. Vaseeharan and A. Iswarya. 2022. Crustacean immunology. pp 13-26. In: F.S.B. Kibenge, B. Baldisserotto and R. S.-M. Chong (eds.). Aquaculture Pathophysiology Volume II. Crustacean and Mollusks Diseases. Academic Press, London.
- Di Giulio, R.T., W.H. Benson, B.M. Sanders and P.A. Van Veld. 2020. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. pp. 523-561. In: G.M. Rand (ed.). Fundamentals of Aquatic Toxicology. CRC Press, Boca Raton.
- Ellis, A.E. 1990. Lysozyme assays. pp. 101-103. In: J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson and W.B. Van Muiswinkel (eds.). Techniques in Fish Immunology. SOS Publications, Fair Haven.
- El-Saadony, M.T., M. Alagawany, A.K. Patra, I. Kar, R. Tiwari, M. A. Dawood, K. Dhama and H.M. Abdel-Latif. 2021. The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. Fish & shellfish immunology 117: 36-52.
- Hassan, H.M.M. 2011. Antioxidant and immunostimulating activities of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) autolysates. World Applied Sciences Journal 15(8): 1110-1119.
- Jin, M., J. Xiong, Q.-C. Zhou, Y. Yuan, X.-X. Wang and P. Sun. 2018. Dietary yeast hydrolysate and brewer's yeast supplementation could enhance growth performance, innate immunity capacity and ammonia nitrogen stress resistance ability of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Fish and Shellfish Immunology 82: 121-129.
- Jiravanichpaisal, P., B.L. Lee and K. Söderhäll. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology 211(4): 213-236.
- Langkapon, P. 2023. Marine shrimp products in 2022. (Online). Available: <https://www.fisheries.go.th/strategy/fisheconomic/pages/fish%20shrimp.html> (May 20, 2023). (in Thai)
- Lara-Flores, M., M.A. Olvera-Novoa, B.E. Guzmán-Méndez and W. López-Madrid. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 216(1-4): 193-201.

- Licon-Jain, A., Á. Campa-Córdova, A. Luna-González, I.S. Racotta, M. Tello and C. Angulo. 2020. Dietary supplementation of marine yeast *Yarrowia lipolytica* modulates immune response in *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology 105: 469-476.
- Ma, S., X. Wang, W. Gao, W. Xu, W. Zhang and K. Mai. 2020. Effects of yeast autolysate in the practical diet on the growth performance, immune response, and disease resistance of Pacific white shrimp. Journal of Aquatic Animal Health 32(3): 109-115.
- Noble, T.H., M. Rao, M. Briggs, A.P. Shinn, C. Simon and J.W. Wynne. 2021. Novacq™ improves survival of *Penaeus vannamei* when challenged with pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease. Aquaculture 545:737235, doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737235.
- Rairat, T., N. Chuchird, A. Keetanon, P. Carcano, M. Comi and W. Koppe. 2022. Effects of dietary yeast-derived nucleotide and RNA on growth performance, survival, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture Reports 27:101352, doi: 10.1016/j.aqrep.2022.101352.
- Rattanapun, E. 2019. Costs and returns of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* BOONE, 1931) culture in Surat Thani province after the effects of EMS disease. Technical Paper. Surat Thani Provincial Office, Department of Fisheries, 67 p. (in Thai)
- Rungrassamee, W., Y. Kingcha, Y. Srimarut, S. Maibunkaew, N. Karoonuthaisiri and W. Visessanguan. 2014. Mannooligosaccharides from copra meal improves survival of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after exposure to *Vibrio harveyi*. Aquaculture 434: 403-410.
- Shi, L., Y. Ren, C. Zhang, W. Yue and F. Lei. 2018. Effects of organic selenium (Se-enriched yeast) supplementation in gestation diet on antioxidant status, hormone profile and haemato-biochemical parameters in Taihang Black Goats. Animal Feed Science and Technology 238: 57-65.
- Shurson, G.C. 2018. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. Animal Feed Science and Technology 235: 60-76.
- Smith, V.J. and K. Söderhäll. 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. Developmental & Comparative Immunology 15(4): 251-261.
- Song, Y.L. and Y.T. Hsieh. (1994). Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. Developmental & Comparative Immunology 18(3): 201-209.
- Supamattaya, K., J. Raungsri, S. Kiratnikom and N. Suanyuk. 2000. Immune system in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius: VI. Effect of diseases on immuno-physiological function and blood components in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). Songkhlanakarin Journal of Science and Technology 22(Suppl.): 615-621. (in Thai)

- Takij, K., S.I. Akiyama, T. Maoka, K. Hidaka, K. Otaka, M. Seoka and H. Kumai. 2004. Evaluation of dietary yeast autolysates for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture Science* 52(4): 387-394.
- Ukeda, H., D. Kawana, S. Maeda and M. Sawamura. 1999. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63(3): 485-488.
- Vargas-Albores, F. and G. Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191(1-3): 13-21.
- Zhang, J., Y. Liu, L. Tian, H. Yang, G. Liang and D. Xu. 2012. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* 33(4): 1027-1032.
- Zhang, R., Y. Jiang, L. Zhou, Y. Chen, C. Wen, W. Liu and Y. Zhou. 2019. Effects of dietary yeast extract supplementation on growth, body composition, non-specific immunity, and antioxidant status of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Fish and Shellfish Immunology* 86: 1019-1025.
- Zheng, L., S. Xie, Z. Zhuang, Y. Liu, L. Tian and J. Niu. 2021. Effects of yeast and yeast extract on growth performance, antioxidant ability and intestinal microbiota of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 530:735841, doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735941.
-