



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทางทะเล)
ปริญญา

วิทยาศาสตร์ทางทะเล

วิทยาศาสตร์ทางทะเล

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง จำนวนเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และปริมาณคาโรทีนอยด์ในวงจรการลอกคราบของปูทะเล (*Scylla serrata* Forskål 1775)

Total Haemocyte Count, Immune Related Enzyme Activities and the Carotenoid
Contents in the Molting Cycle of Mud Crab (*Scylla serrata* Forskål 1775)

นามผู้วิจัย นางสาวพีพร ฤกษ์พุดิ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จินตนา สและน้อย, วท.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีชน, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุนันท์ ภัทรจินดา, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

จำนวนเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และปริมาณคาโรทีนอยด์
ในวงจรการลอกคราบของปูทะเล (*Scylla serrata* Forskål 1775)

Total Haemocyte Count, Immune Related Enzyme Activities and the Carotenoid Contents in the
Molting Cycle of Mud Crab (*Scylla serrata* Forskål 1775)

โดย

นางสาวรพีพร ฤกษ์พุดิ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรบัณฑิตทางทะเล)

พ.ศ. 2552

รพีพร ฤกษ์พุดิ 2552: จำนวนเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และ ปริมาณคาโรทีนอยด์ในวงจรการลอกคราบของปูทะเล (*Scylla serrata* Forskål 1775)
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทางทะเล) สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชา
วิทยาศาสตร์ทางทะเล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์จินตนา สและน้อย,
วท.ค. 80 หน้า

การศึกษาจำนวนเม็ดเลือดรวม กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase และ superoxide dismutase รวมทั้ง องค์ประกอบของชนิดและปริมาณ carotenoid ของปูทะเล (*Scylla serrata* Forskål 1775) จำนวน 12 ระยะตลอด วงจรการลอกคราบพบว่า จำนวนเม็ดเลือดรวมมีค่าอยู่ในช่วง 5.02 ± 1.90 ถึง $17.64 \pm 9.98 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$ โดย จำนวนเม็ดเลือดในระยะหลังลอกคราบมีค่ามากกว่าปูในระยะปกติและระยะก่อนลอกคราบอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ในตับ เหงือก เนื้อเยื่อได้กระดอง และเลือดพบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.65 ± 0.13 ถึง 3.93 ± 2.48 , 2.27 ± 0.33 ถึง 7.40 ± 0.85 , 0.52 ± 0.29 ถึง 4.89 ± 1.72 และ 0.93 ± 0.21 ถึง $3.65 \pm 1.80 \text{ units mg proteins}^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งพบว่า เอนไซม์แสดงกิจกรรมเด่นชัดในเหงือก แต่ตับและเนื้อเยื่อได้ กระดองมีค่ากิจกรรมค่อนข้างแปรปรวน สำหรับเลือดพบว่า กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase มีค่าสูงสุดใน ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง เนื่องจากเม็ดเลือดและ phenoloxidase มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ sclerotization, melanization และระบบภูมิคุ้มกันของปู ส่วนกิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase ในตับ เหงือก เนื้อเยื่อได้กระดอง และเลือด มีค่าอยู่ในช่วง 5.25 ± 1.46 ถึง 52.56 ± 17.05 , 8.67 ± 1.33 ถึง 29.52 ± 9.53 , 2.48 ± 0.49 ถึง 14.14 ± 7.25 และ 0.53 ± 0.16 ถึง $1.20 \pm 0.37 \text{ units mg proteins}^{-1}$ โดยค่ากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ พบในตับและเนื้อเยื่อได้กระดองของปูในระยะกระดองแข็งปกติ ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ที่พบในเลือดและ เหงือกมีค่าสูงสุดในระยะหลังลอกคราบ 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่ง superoxide dismutase มีหน้าที่ เกี่ยวข้องกับการกำจัด superoxide anion ที่ได้จากขบวนการ metabolism และกระบวนการ respiratory burst สำหรับปริมาณ carotenoid พบว่า มีค่าสูงสุดในเนื้อเยื่อได้กระดองของปูระยะปกติ (11.75 ± 2.64 ถึง $53.43 \pm 0.98 \mu\text{g g wet weight}^{-1}$) รองลงมา ได้แก่ ตับ เหงือก และเลือด โดยมีค่าเท่ากับ 1.42 ± 0.16 ถึง 5.30 ± 0.99 , 0.53 ± 0.22 ถึง 3.54 ± 1.58 และ 0.05 ± 0.02 ถึง $1.31 \pm 0.69 \mu\text{g g wet weight}^{-1}$ ตามลำดับ การวิเคราะห์ชนิด carotenoid ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า เนื้อเยื่อได้กระดอง เหงือก และเลือด มีการสะสม astaxanthin เป็นหลัก ในขณะที่ตับ พบ β -carotene มากที่สุด ผลงานวิจัยแสดงถึงความสัมพันธ์ของเม็ดเลือด กิจกรรมเอนไซม์ และรงควัตถุที่ส่งผล ต่อกระบวนการลอกคราบ การเกิดสี กิจกรรม metabolism และระบบภูมิคุ้มกันของปูทะเล

Rapeeporn Reaksputi 2009: Total Haemocyte Count, Immune Related Enzyme Activities and the Carotenoid Contents in the Molting Cycle of Mud Crab (*Scylla serrata* Forskål 1775). Master of Science (Marine Science), Major Field: Marine Science, Department of Marine Science. Thesis Advisor: Assistant Professor Jintana Salaenoi, Ph.D. 80 pages.

The total haemocyte count, phenoloxidase and superoxide dismutase activities, quantitative and qualitative of carotenoid were determined in different tissues of the mud crab (*Scylla serrata* Forskål 1775) throughout 12 stages in the molting cycle. The total haemocyte counts ranged from 5.02 ± 1.90 to $17.64 \pm 9.98 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$. The result showed that haemocyte numbers were higher in the postmolt than in the intermolt and premolt stages ($p < 0.05$). Levels of phenoloxidase activities ranged from 0.65 ± 0.13 to 3.93 ± 2.48 , 2.27 ± 0.33 to 7.40 ± 0.85 , 0.52 ± 0.29 to 4.89 ± 1.72 and 0.93 ± 0.21 to 3.65 ± 1.80 units mg proteins^{-1} , in the hepatopancreas, gill, integument and haemolymph, respectively. Phenoloxidase showed predominant activities in the gill, while variation in activities throughout the molting cycle was observed in hepatopancreas and integument. However, haemolymph was distinctly high at early postmolt. The haemocyte and phenoloxidase play an important role in sclerotization, melanization and immunity system of the crab. On the other hand, activities of superoxide dismutase in the hepatopancreas, gill, integument and haemolymph ranged from 5.25 ± 1.46 to 52.56 ± 17.05 , 8.67 ± 1.33 to 29.52 ± 9.53 , 2.48 ± 0.49 to 14.14 ± 7.25 and 0.53 ± 0.16 to 1.20 ± 0.37 units mg proteins^{-1} , respectively. The highest activities were observed in the hepatopancreas and integument at intermolt, while in the haemolymph and gill the activities were highest at 6 and 24-hour postmolt, respectively. Superoxide dismutase is responsible for eradication of superoxide anions being released from metabolic processes and respiratory burst. As for carotenoids, the highest content was evaluated in intermolt of the integument (11.75 ± 2.64 to $53.43 \pm 0.98 \mu\text{g g wet weight}^{-1}$), followed by the contents in hepatopancreas gill and haemolymph ranging from 1.42 ± 0.16 to 5.30 ± 0.99 , 0.53 ± 0.22 to 3.54 ± 1.58 and 0.05 ± 0.02 to $1.31 \pm 0.69 \mu\text{g g wet weight}^{-1}$. The tissues carotenoid analysed by HPLC technique revealed that the integument, gill and haemolymph mainly accumulated astaxanthin, while β -carotene was the major source in the hepatopancreas. This research has demonstrated that haemocyte, enzyme activities and carotenoid were important aspects in relevant to shedding, coloration, metabolism and immune system of the mud crab.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จินตนา สและน้อย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำปรึกษาทั้งด้านการศึกษา การวางแผนงานวิจัย ตลอดจนแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นนทวิทย์ อารีรักษ์ และอาจารย์ ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภูมิ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. ศรีณย์ เพ็ชรพิรุณ ประธานการสอบ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จันทนา กาญจน์กมล ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ให้ความกรุณาแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มิ่งขวัญ มิ่งเมือง ภาควิชาวิทยาศาสตร์ พื้นพิภพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ดร. สุพิศ ทองรอด และเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยอาหารสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี และคุณสุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. อมรา ทองปาน ที่กรุณาตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ รวมทั้งขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่มอบทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์เฉลิมวิไล ชื่นศรี อาจารย์ธนาคม บัณฑิตวงศ์รัตน์ และครอบครัวสและน้อย และขอขอบคุณ นางสาวจิรนนท์ อินทาคม นางสาวอัมมา ปานแก้ว นางสาวกวรรณ ปานข่อยงาม นางสาวนัยนา เปลี่ยนพันธ์ นางสาวภัทราวดี ศรีมีเทียน และนายวุฒินันท์ เรืองศรี รวมทั้งเพื่อน พี่ น้อง ชาวมินกร และเจ้าหน้าที่จากภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล และภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง และสาขาชีววิทยาของเซลล์และโมเลกุล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจจนทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว รวมทั้ง คุณพรพิมล สวนมะพลับ ที่สนับสนุนและเป็นแรงใจสำคัญที่ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

รพีพร ฤกษ์พุดิ

เมษายน 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	14
ผลและวิจารณ์	18
สรุป	50
ข้อเสนอแนะ	52
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	53
ภาคผนวก	65
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	80

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 จำนวนเม็ดเลือดรวมตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	19
2 กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ในอวัยวะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	25
3 กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase ในอวัยวะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	33
4 ปริมาณ carotenoid ในอวัยวะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	40
5 ชนิด carotenoid ในอวัยวะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	42

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ระบบการกระตุ้น prophenoloxidase ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย	8
2 โครงสร้างเปลือกของสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย	11
3 โครงสร้างของรงควัตถุชนิด carotenoid	12
4 จำนวนเม็ดเลือดรวมตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	20
5 กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ในตับ เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง และเลือด ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	26
6 กลไกการทำงานของเอนไซม์ phenoloxidase ในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ กลุ่มครัสเตเชีย	28
7 กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase ของตับ เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดองและ เลือดในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	34
8 การทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase ระหว่างการทำลายสิ่งแปลกปลอม โดยเม็ดเลือด	36
9 ปริมาณ carotenoid รวมในตับ เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง และเลือดในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	41
10 ปริมาณ astaxanthin, β -carotene และ zeaxanthin ในตับ เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง และเลือดในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	43

ภาพผนวกที่

1 การเลี้ยงปูนิ่งและลักษณะปูที่ลอกคราบเสร็จใหม่ ๆ	66
2 ลักษณะภายนอกของปูระยะปกติ และกระดองเก่าที่เกิดจากการลอกคราบของปู ทะเล	67
3 การเก็บเลือดที่โคนขาคู่ที่ 5 และอวัยวะภายในของปู	68
4 ลักษณะ end product ของเอนไซม์และโปรตีนมาตรฐาน BSA	69
5 สารสกัด carotenoid จากตับในปูทะเลระยะต่าง ๆ	70
6 สารสกัด carotenoid จากเหงือกในปูทะเลระยะต่าง ๆ	71

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
7 สารสกัด carotenoid จากเนื้อเยื่อได้กระดองในปูทะเลระยะต่าง ๆ	72
8 สารสกัด carotenoid จากเลือดในปูทะเลระยะต่าง ๆ	73
9 กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin	74
10 กราฟมาตรฐานของเอนไซม์ phenoloxidase	75
11 กราฟมาตรฐานของเอนไซม์ superoxide dismutase	75
12 กราฟมาตรฐานของ astaxanthin	77
13 กราฟมาตรฐานของ β -carotene	78
14 กราฟมาตรฐานของ zeaxanthin	79

จำนวนเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และปริมาณ คาโรทีนอยด์ในวงจรการลอกคราบของปูทะเล (*Scylla serrata* Forskål 1775)

Total Haemocyte Count, Immune Related Enzyme Activities and the Carotenoid Contents in the Molting Cycle of Mud Crab (*Scylla serrata* Forskål 1775)

คำนำ

ปูทะเล (*Scylla serrata*) เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญในการประมงและจัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยชนิดหนึ่ง เนื่องจากมีรสชาติดี มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และสามารถหาบริโภคได้ง่าย โดยปูทะเลนับเป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ดีและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศ ซึ่งปริมาณการส่งออกในปี พ.ศ. 2548 เท่ากับ 8,749.44 ตัน คิดเป็นมูลค่า 4,164.77 ล้านบาท ปีพ.ศ. 2549 เท่ากับ 7,824.99 ตัน คิดเป็นมูลค่า 3,351.43 ล้านบาท และปี พ.ศ. 2550 เท่ากับ 12,584.89 ตัน คิดเป็นมูลค่า 3,725.00 ล้านบาท (กรมประมง, 2551)

ปูทะเลเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีกระดองแข็งหุ้มตัว จึงไม่สามารถขยายหรือเพิ่มขนาดได้ ปูจะเจริญเติบโตหรือมีขนาดใหญ่ขึ้นก็ต่อเมื่อได้สลัดเปลือกเก่าทิ้งและสร้างเปลือกใหม่ที่ใหญ่กว่าเดิมที่เรียกว่า ปูลอกคราบ โดยความถี่ของการลอกคราบขึ้นอยู่กับอายุและขนาดของปู การลอกคราบของปูสามารถสังเกตได้จากการที่กระดองแยกออกจากเยื่อหุ้มตัวซึ่งระยะนี้เรียกว่า ปูสองกระดอง เป็นระยะที่ปูเคลื่อนไหวช้า มีกระบวนการสะสมสารอินทรีย์และการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์และไคตินในเปลือกเก่าไปใช้ในการสร้างเปลือกใหม่ ปูที่ลอกคราบใหม่ ๆ ผิวของกระดองจะนิ่มและเย็น หลังจากthatปูปรับระดับความเข้มข้นของเกลือแร่และปริมาณน้ำในตัวให้เข้าสู่ระดับปกติแล้วเปลือกใหม่จะค่อย ๆ แข็งและเพิ่มขนาดตามส่วนโดยในระยะนี้ปูจะไม่มีกระบวนการลอกคราบเป็นช่วงเวลาวิกฤติที่ปูมีความอ่อนแอที่สุด กระบวนการลอกคราบนี้จำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของระบบต่าง ๆ หลายระบบ เช่น ระบบฮอร์โมน ระบบขับถ่าย ระบบภูมิคุ้มกัน และระบบหมุนเวียนของเลือด เป็นต้น

เนื่องจากสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชีย เช่น ปู มีระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) เพียงอย่างเดียว จึงไม่มีระบบการจดจำ antigen และปฏิกิริยา antigen-antibody ที่ใช้ต่อต้าน

สิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ซึ่งแตกต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลัง ทำให้ปูจำเป็นต้องพัฒนากลไกการป้องกันตัวที่มีประสิทธิภาพ ระบบหมุนเวียนเลือดของปูเป็นแบบเปิดและในเลือดประกอบไปด้วยเซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายซึ่งนับเป็นกระบวนการป้องกันตัวที่สำคัญ มีรายงานพบว่า มีเอนไซม์หลายชนิดทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย เช่น phenoloxidase ซึ่งมีการแสดงออกของเอนไซม์มากกว่า 80% ในเม็ดเลือด (Perazzolo and Barracco, 1997; Söderhäll and Cerenius, 1992) superoxide dismutase ช่วยป้องกันเซลล์จากอนุมูลอิสระ (free radical) และกระตุ้นกระบวนการกลืนกินเซลล์และห้อมล้อมสิ่งแปลกปลอม นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า เอนไซม์ superoxide dismutase และรงควัตถุบางชนิดยังมีความสัมพันธ์กับการลดลงของการเกิดมะเร็ง การลดการอักเสบ และการเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Shingu *et al.*, 1994; Aggarwal *et al.*, 2006) ในสัตว์จำพวกหนูอีกด้วย

ปูที่อยู่ในช่วงเวลาดังการลอกคราบใหม่ ๆ จะอยู่ในสภาพอ่อนแอ ไม่เคลื่อนที่ และจำเป็นต้องดื่มน้ำเข้าตัวไปเป็นจำนวนมากเพื่อขยายขนาดโครงร่าง ซึ่งอาจทำให้ร่างกายปูได้รับจุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าไปพร้อมกับน้ำได้โดยง่าย มีความเป็นไปได้ว่าปูน่าจะมีระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพเพื่อช่วยในการป้องกันตัวเองและรักษาร่างกายให้แข็งแรงพร้อมที่จะเข้าสู่ระยะกระดองแข็งต่อไป จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวกับจำนวนเม็ดเลือด รวมถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณรงควัตถุตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล ทั้งนี้เพื่อใช้องค์ความรู้นี้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอธิบายหน้าที่ทางสรีรวิทยาในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาจำนวนเม็ดเลือดรวมในวงจรการลอกคราบของปูทะเล
2. เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ phenoloxidase และ superoxide dismutase ในวงจรการลอกคราบของปูทะเล
3. เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของ carotenoid ที่สะสมในวงจรการลอกคราบของปูทะเล

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางชีววิทยาของปูทะเล

1.1 อนุกรมวิธานของปูทะเล

ปูทะเลมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Scylla serrata* Forskål, 1775 และชื่อสามัญคือ mud crab หรือ mangrove crab ถูกจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานซึ่งรวบรวมโดย Barne (1987) ดังนี้

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Order Decapoda

Family Portunidae

Genus *Scylla*

Species *Scylla serrata* Forskål, 1775

ปูทะเลมีกระดองที่มีลักษณะแบนและเรียบเป็นรูปหกเหลี่ยม มีสีน้ำตาลปนเขียวหรือน้ำตาลปนเทา กว้างประมาณ 1.5 เท่าของความยาวกระดอง ขอบกระดองด้านหน้ามีหนามขนาดเท่ากัน 4 อัน เบ้าตาขนาดใหญ่ หนามในเบ้าตาข้างท้องมีลักษณะแหลมและยื่นออกมา ขอบกระดองด้านข้างมีหนาม 9 อัน ก้าม (cheliped) เรียบ บนรยางค์ขาเดินปล้องที่ 4 (merus) และ 5 (carpus) มีหนาม 3 อัน มือ (manus) มีลักษณะเรียบและพอง ผิวด้านหลังมีสัน 2 สัน ขาว่ายน้ำมีผิวเรียบ รยางค์ขาเดินปล้องที่ 4 มีความยาวประมาณ 1.5 เท่าของความกว้าง ขอบด้านท้ายของรยางค์ขาเดินปล้องที่ 6 (propodus) เรียบ ไม่มีหนาม อวัยวะเพศผู้ (pleopod) คู่แรกมีลักษณะทู่แบนและมีหนามจำนวนมากตรงบริเวณด้านนอก กระดองตัวเต็มวัยเพศผู้มีความยาวประมาณ 86.5 มิลลิเมตร กว้าง 127.2 มิลลิเมตร ตัวเต็มวัยเพศเมียมีความยาวประมาณ 90.2 มิลลิเมตร กว้าง 130.2 มิลลิเมตร ปูทะเลมักอาศัยบนพื้นท้องทะเลที่เป็นโคลนบริเวณแหล่งน้ำกร่อยไม่ห่างจากชายฝั่ง (Dai and Yang, 1991) สำหรับประเทศไทยพบชุกชุมในป่าเสม โกงกาง และป่าจากริมฝั่งทะเลทั้งอ่าวไทยและอันดามัน (บรรจง และ บุญรัตน์, 2545)

1.2 วงจรชีวิตและการลอกคราบของปูทะเล

วงจรชีวิตของปูทะเลเริ่มจากปูตัวเต็มวัยจับคู่ผสมพันธุ์กันบริเวณป่าชายเลน แล้วจึงวางไข่ โดยในอ่าวไทยจะวางไข่ที่ระดับความลึก 20-30 เมตร ห่างจากฝั่งประมาณ 30-50 กิโลเมตร ส่วนในทะเลอันดามันจะวางไข่ที่ระดับความลึก 90-200 เมตร ห่างจากฝั่งประมาณ 80 กิโลเมตร และไข่จะฟักเป็นตัวเข้าสู่ลูกปูวัยอ่อนระยะที่ 1 (zoea) ภายใน 10-15 วัน ลูกปูระยะนี้มีรูปร่างไม่เหมือนพ่อแม่ ดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอน โดยลอยไปตามกระแสน้ำ และจะมีการลอกคราบประมาณ 5 ครั้ง ใช้เวลาทั้งหมด 15-20 วัน จึงเข้าสู่ปูวัยอ่อนระยะที่ 2 (megalopa) ซึ่งมีลักษณะคล้ายปู แต่ส่วนท้ายของท้องยื่นยาว อาจว่ายน้ำได้และมีการอพยพเข้าใกล้ชายฝั่งมากขึ้นซึ่งใช้เวลา 5-7 วัน แล้วพัฒนาเข้าสู่ลูกปูขนาดเล็ก (instar) ซึ่งมีลักษณะเป็นลูกปูเหมือนพ่อแม่ มีกระดองกว้างประมาณ 3.5 เซนติเมตร โดยลูกปูจะเริ่มจมตัวลงสู่พื้นดิน และอพยพเข้าสู่ป่าชายเลนและพัฒนาเป็นปูตัวเต็มวัยต่อไป (ชลธิ, 2539)

การเจริญเติบโตของปูทะเลเพื่อเข้าสู่ระยะต่าง ๆ อาศัยการลอกคราบเพราะปูมีกระดองแข็งจึงไม่สามารถขยายหรือเพิ่มขนาดได้ จำเป็นต้องสลัดเปลือกเก่าออก (molting) ในวงจรการลอกคราบจะมีการสะสมอาหารและเกลือแร่ที่จำเป็น นอกจากนี้ยังดึงเอาสารอาหารบางอย่างจากเปลือกเก่ามาใช้ซ้ำ วงจรการลอกคราบแบ่งออกเป็น 5 ระยะ (บรรจง และ บุญรัตน์, 2545 อ้างถึง Drach, 1939) ดังนี้

1. ระยะก่อนการลอกคราบ (stage D: proecdysis หรือ premolt) ระยะนี้ปูเริ่มสร้างชั้นเคลือบผิว (epicuticle) และหนาม โดยที่ผิวหนังชั้นนอก (epidermis) จะเริ่มหลั่งสารเพื่อย่อยคราบเก่า มีการสะสมอาหารและแร่ธาตุเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับคราบใหม่ ระยะนี้ปูจะกินอาหารน้อย มีการเคลื่อนไหวช้า ช่วงท้ายของระยะจะเกิดรอยปริแตกออกบริเวณ epimeral line และหยุดกินอาหาร ระยะนี้ใช้เวลาประมาณร้อยละ 24 ของวงจรการลอกคราบ

2. ระยะลอกคราบ (stage E: ecdysis) เกิดการลอกคราบ โดยปูดื่มน้ำเข้าตัวอย่างรวดเร็วเพื่อถอดเปลือกเก่าออก ระยะนี้ปูจะไม่เคลื่อนไหว กินอาหารถือเป็นช่วงวิกฤตเนื่องจากปูอ่อนแออาจถูกสัตว์อื่นทำร้ายได้ ระยะนี้ใช้เวลาร้อยละ 0.5 ของวงจรการลอกคราบ

3. ระยะกระดองนุ่ม (stage A: soft shell) เป็นระยะหลังการลอกคราบใหม่ๆ กระดองจะมีความอ่อนนุ่ม ชั้นเคลือบผิว ชั้นเมดูลีและชั้นเยื่อจะติดกันเป็นชั้นเดียว ปูจะไม่กินอาหารและไม่ค่อยเคลื่อนไหว ระยะนี้ใช้เวลาประมาณร้อยละ 1.5 ของวงจรการลอกคราบ

4. ระยะกระดองเริ่มแข็ง (stage B: paper shell) เป็นระยะที่กระดองใหม่เริ่มแข็ง เคลือบผิวชั้นใน (endocuticle) เริ่มพัฒนา ชั้นเมดูลีเริ่มถอยกลับ แต่ปูจะยังไม่กินอาหาร ระยะนี้ใช้เวลาประมาณร้อยละ 8 ของวงจรการลอกคราบ

5. ระยะเปลือกแข็ง (stage C: intermolt) ระยะกระดองแข็งเต็มที่ ผิวชั้นนอก (epidermis) มีการจัดเรียงตัวอย่างสมบูรณ์ การพัฒนาของชั้นเมดูลีสมบูรณ์และถอยกลับเข้าไปอยู่ฐานปลายขนเก่า ระยะนี้ปูกินอาหารตามปกติ มีการเคลื่อนไหวอย่างว่องไว เริ่มมีการสะสมสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์เพื่อที่จะใช้ในการลอกคราบในรอบต่อไป ระยะนี้ใช้เวลาประมาณร้อยละ 66 ของวงจรการลอกคราบ

2. ลักษณะเม็ดเลือดของปูทะเล

ปูทะเลมีระบบหมุนเวียนเลือดแบบเปิด ในน้ำเลือดประกอบไปด้วยเซลล์เม็ดเลือดที่เรียกว่า ฮีโมไซต์ (haemocyte) ทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย อันมีความสำคัญในกระบวนการป้องกันตัวที่มีประสิทธิภาพ (Smith and Söderhäll, 1986 อ้างถึง Bauchau, 1981) ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีจำแนกเม็ดเลือดออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งมีหน้าที่สำคัญแตกต่างกัน ดังนี้

1. Hyaline cell เป็นเซลล์ขนาดเล็กซึ่งไม่มี granule อยู่ภายใน มีความสามารถในการกลืนกินเซลล์ (phagocytosis) โดยจะถูกกระตุ้นจากเอนไซม์ prophenoloxidase ในสัตว์จำพวก decapod จะพบเซลล์ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับ hyaline cell เป็นส่วนใหญ่

2. Semigranular cell เป็นเซลล์ที่พบ granule ขนาดเล็กอยู่ภายใน ซึ่งบรรจุเอนไซม์ prophenoloxidase เซลล์ชนิดนี้มีความสามารถในการทำลายเชื้อโรคได้อย่างรวดเร็ว โดยจะเข้าทำปฏิกิริยาเป็นลำดับแรกในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้วยวิธีการปลดปล่อยสารจาก granule (degranulation)

3. Granular cell ประกอบด้วย granule ขนาดใหญ่และมี secretory granule จำนวนมากใน cytoplasm มีหน้าที่ในการเก็บสะสมเอนไซม์ prophenoloxidase เซลล์ไม่มีกระบวนการกลืนกิน เซลล์ มีแรงจับ (attach) อ่อนมากและมีการกระจายในวงจำกัด

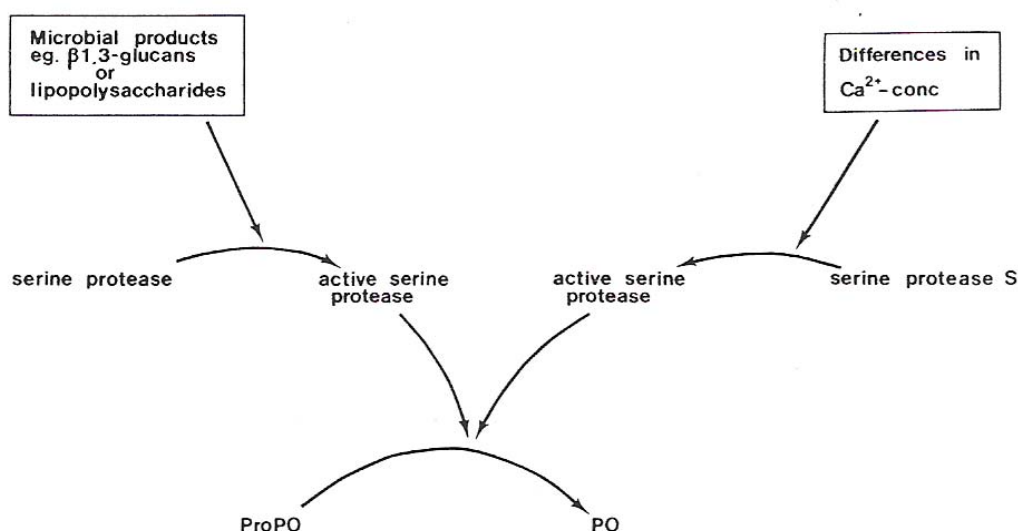
มีรายงานการศึกษาจำนวนและชนิดของเม็ดเลือดในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียหลายคณะ เช่น Vázquez *et al.* (1997) จำแนกเม็ดเลือดของกุ้งน้ำจืดชนิด *Macrobrachium rosenbergii* ตามลักษณะ สัณฐานออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดชนิด hyaline เป็นชนิดที่มีมากที่สุด ซึ่งมี cytoplasmic granule ขนาดใหญ่จำนวนน้อย อัตราส่วนของ nucleocytoplasmic มากและสามารถแบ่งตัวได้อย่าง อิสระในสภาวะที่ไม่มี anticoagulant ชนิดที่สองเป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มี granule หลายชนิด ซึ่งมี ขนาดและความหนาแน่นของ granule แตกต่างกันและมีการแสดงกิจกรรมการกลืนกินเซลล์ ส่วน เซลล์เม็ดเลือดชนิดสุดท้ายยังไม่สามารถจัดจำแนกกลุ่มได้ ซึ่งมีจำนวนน้อยที่สุด

Laxmilatha and Laxminarayana (2004) ได้จำแนกเม็ดเลือดของกุ้ง Indian white shrimp (*Fenneropenaeus indicus* H. Milne Edwards, 1837) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า ประกอบไปด้วยเม็ดเลือดจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เม็ดเลือดที่ไม่มี granule (agranulocyte) เม็ดเลือดที่มี จำนวน granular ปานกลาง (semi-dense granulocyte) และเม็ดเลือดที่มี granule จำนวนมาก (dense granulocyte) ส่วน Mix and Sparks (1980) ศึกษาระบบหมุนเวียนเลือดของปู Tanner crab (*Chionocetes bairdi*) พบว่า สามารถจำแนกเม็ดเลือดออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ hyalinocyte, intermediate granulocyte และ eosinophilic granulocyte และพบว่า ปูที่ติดเชื้อรากลุ่ม Ascomycete จะมีอัตราส่วนของ granulocyte มากกว่า hyalinocyte เมื่อเปรียบเทียบกับปูที่ไม่ได้ติดเชื้อ นอกจากนี้ Yildiz and Atar (2002) ศึกษาเม็ดเลือดในปูน้ำจืดชนิด *Potamon fluviatilis* พบว่า สามารถจำแนกชนิดเม็ดเลือดออกเป็น 3 กลุ่ม คือ hyalinocyte, semigranulocyte และ granulocyte สัดส่วนที่พบคือ 15%, 54.25% และ 30.75% ตามลำดับ ส่วน Jussila *et al.* (1997) ได้ศึกษาจำนวน เม็ดเลือดรวมและชนิดของเม็ดเลือดในกุ้งมังกร western rock lobster (*Panulirus cygnus*) ที่เกิด ความเครียดจากการถูกจับและการขนส่งพบว่า เม็ดเลือดถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ hyalinocyte, semi-granulocyte และ granulocyte ซึ่งมีอัตราส่วนอยู่ในช่วง 29.1-37.0%, 51.1-62.9% และ 5.1-13.1% ตามลำดับ สัดส่วนของเม็ดเลือด granulocyte จะลดลงหลังจากกุ้งมังกรถูกจับมาเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3. เอนไซม์ในระบบภูมิคุ้มกันของปูทะเล

3.1 phenoloxidase (PO)

ภายในเม็ดเลือดของปูทะเลจะมีการทำงานของ phenoloxidase อันเป็นโปรตีนที่สำคัญของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งเกิดจาก prophenoloxidase (proPO) ถูกเปลี่ยนสภาพให้พร้อมทำงานโดยถูกกระตุ้นจากเอนไซม์ serine proteinase ที่อยู่ในรูป active form (Söderhäll and Cerenius, 1992 อ้างถึง Söderhäll, 1983) (ภาพที่ 1) และ phenoloxidase จะ oxidize tyrosine ไปเป็น quinone และเกิดปฏิกิริยา polymerization จนได้ melanin ซึ่งทำหน้าที่ในกระบวนการ melanization ต่อไป



ภาพที่ 1 ระบบการกระตุ้น prophenoloxidase ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย (Smith and Söderhäll, 1986)

มีการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียโดย Söderhäll and Smith (1983) วิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมีในเม็ดเลือดของปูชนิด *Carcinus maenas* และครัสเตเชียกลุ่มอื่น ๆ พบว่า มี prophenoloxidase อยู่ในเม็ดเลือดชนิด granular cell และ semigranular cell แต่ไม่พบใน hyaline cell ส่วน Vargas-Albores *et al.* (2005) ศึกษาเม็ดเลือดในกุ้งกลุ่ม penaeid (*Farfantepenaeus californiensis*, *Litopenaeus vannamei* และ *L. stylirostris*) พบว่า กุ้งมีเม็ดเลือด 3 ชนิด โดยมีขนาดของ cytoplasm ใน granule แตกต่างกัน และเม็ดเลือดแต่ละชนิดจะมีลักษณะ

ทางชีวเคมีและหน้าที่เฉพาะตัว เอนไซม์ prophenoloxidase ส่วนใหญ่มีอยู่ในเม็ดเลือดที่มี granule ขนาดใหญ่ (75%) ในขณะที่เม็ดเลือดที่มี granule ขนาดเล็กมีเพียง 25%

Liu *et al.* (2006) ศึกษากิจกรรมของ phenoloxidase ในเลือดของปูหิน (*Charybdis japonica*) เมื่อใช้ L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) เป็น substrates พบว่า phenoloxidase มีสภาพเหมาะสม (optimum condition) ที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 40 °C และมีค่า K_m ของ L-DOPA เท่ากับ 3.41 นอกจากนี้ phenoloxidase ยังมีความไวต่อสารบางชนิด ได้แก่ sodium sulfite, 1-phenyl-2-thiourea, thiourea และ benzoic acid แต่จะถูกยับยั้งโดย Zn^{2+} , Mg^{2+} , ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ diethyldithiocarbamate (DECT)

Perazzolo and Barracco (1997) ศึกษาเอนไซม์ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง *Penaeus paulensis* พบว่ามีการแสดงออกของ phenoloxidase มากกว่า 80% ในเม็ดเลือด โดยเอนไซม์ phenoloxidase จะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเมื่อมี lipopolysaccharide, trypsin และ β -1, 3 glucan เป็นตัวกระตุ้น นอกจากนี้ยังพบว่าแคลเซียมและแมกนีเซียมที่ระดับความเข้มข้น 5 mM และ 10 mM ตามลำดับ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ phenoloxidase

Sritunyalucksana *et al.* (1999b) ศึกษา agglutination ในกิจกรรมของ phenoloxidase และการยับยั้งจุลชีพ (antibacterial) ในเลือดของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) พบว่าที่ระดับ peptidoglycan 0.4% และ lipopolysaccharide 0.002% สามารถยับยั้งจุลชีพกระตุ้น agglutination และทำให้กิจกรรมของ phenoloxidase เพิ่มขึ้นถึง 22 และ 11 เท่าตามลำดับ แต่ laminarin (β -1,3 glucan) ไม่สามารถกระตุ้นกิจกรรมของ phenoloxidase ได้ แต่ในเม็ดเลือดของกุ้งชนิด *Penaeus californiensis* พบว่า prophenoloxidase จะมีประสิทธิภาพในการทำงานสูง เมื่อมี laminarin เป็นตัวกระตุ้น (Hernández-López *et al.*, 1996)

3.2 superoxide dismutase (SOD)

superoxide dismutase เป็น antioxidative enzyme (Holmblad and Söderhäll, 1999) ที่มีอยู่ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจน เช่น green pea, *Streptococcus mutans*, wheat germ, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Neurospora crassa* (Worthington Biochemical Corporation, 2006) โดยบริเวณ active site ของเอนไซม์จะมีทองแดงและสังกะสี (CuSOD, ZnSOD) หรือแมงกานีส

(MnSOD) หรือเหล็ก (FeSOD) เพื่อช่วยป้องกันจากการถูกออกซิไดส์ (oxidize) โมเลกุลออกซิเจน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเอนไซม์ชนิดนี้ยังทำหน้าที่กระตุ้นกระบวนการกลืนกินเซลล์และการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) อีกด้วย

Yao *et al.* (2004) สกัด superoxide dismutase จากกุ้งชนิด *Macrobrachium nipponense* พบว่าเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21.7 kDa ดูดซับแสงที่ความยาวคลื่น 278 nm เอนไซม์จะคงสภาพอยู่ 90 นาที ที่อุณหภูมิ 25-45 °C และกิจกรรมของเอนไซม์ถูกกระตุ้นโดย $ZnCl_2$, SDS และ mercaptoethanol แต่จะถูกยับยั้งจาก $CaCl_2$, $CuSO_4$, $ZnCl_2$ และ $K_2Cr_2O_7$

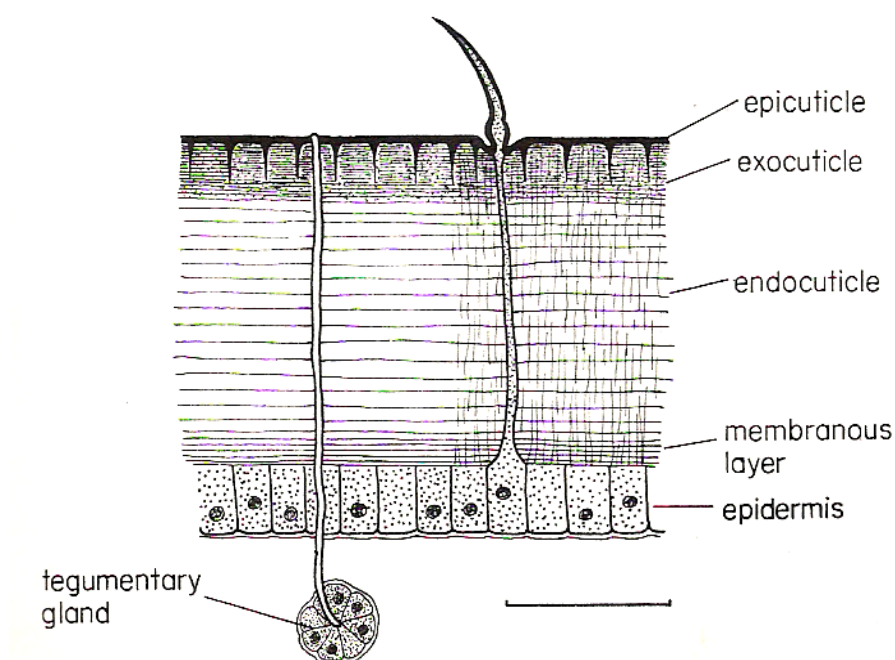
Campa-Córdova *et al.* (2002) ศึกษาระดับ superoxide dismutase ที่เหมาะสมในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ระยะ juvenile พบว่า β -glucan และ sulphated polysaccharide สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวได้ โดยทำให้ระดับกิจกรรม superoxide dismutase ในเม็ดเลือดและกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น 1.5 และ 1.4 เท่า ตามลำดับ

Campa-Córdova *et al.* (2005) ศึกษากิจกรรมของ MnSOD ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ระยะ juvenile พบว่ากิจกรรมของ MnSOD สามารถกระตุ้นให้เกิดการต้านอนุมูลอิสระ โดยพบการตอบสนองสูงสุดหลังจากกระตุ้นด้วย β -glucan, lipopolysaccharide (LPS), fucoidan และเชื้อไวรัส (Vibrio penaeicida) ที่ตายแล้ว ตามลำดับ

4. รังควัตถุในปูทะเล

โครงสร้างผิว (integument) ของปูแบ่งออกเป็น 4 ชั้น ดังนี้ (ภาพที่ 2) (Warner, 1977)

1. ชั้นเคลือบผิว (epicuticle) เป็นชั้นบางๆ ที่อยู่ด้านนอกสุด ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน และแคลเซียม แต่ไม่พบการสะสมของไคตินในชั้นนี้
2. เคลือบผิวชั้นนอก (exocuticle) ประกอบด้วยไคติน โปรตีน รังควัตถุ และแคลเซียม



ภาพที่ 2 โครงสร้างเปลือกของสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย (Warner, 1977)

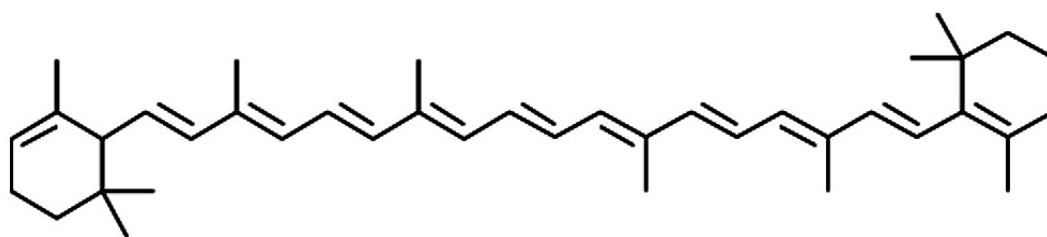
3. เคลือบผิวชั้นใน (endocuticle) ประกอบด้วยไคติน โปรตีน คล้ายกับชั้น exocuticle แต่ไม่มีการสะสมของรงควัตถุในชั้นนี้

4. ชั้นเยื่อ (membranous layer) เป็นชั้นในสุดของชั้นเคลือบผิว ประกอบด้วยโปรตีน และไคตินเป็นส่วนใหญ่

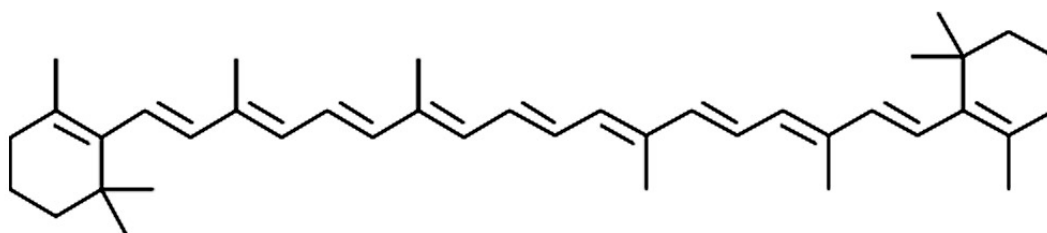
รงควัตถุในกลุ่มครัสเตเชียส่วนใหญ่จัดอยู่ใน carotenoid ซึ่งเป็นรงควัตถุที่มีโครงสร้างของ isoprene 8 หน่วยมาต่อกัน สัตว์กลุ่มครัสเตเชียมี carotenoid ในอวัยวะต่าง ๆ เช่น ตา น้ำเลือด ไข่ กระดอง ตับ (hepatopancreas) และรังไข่ Bauernfeind (1981) แบ่ง carotenoid เป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่ม ดังนี้

1. carotene เป็นรงควัตถุในกลุ่ม carotenoid ที่ไม่ถูกออกซิไดส์ (oxidized) และประกอบไปด้วยสารไฮโดรคาร์บอนเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 3) รงควัตถุในกลุ่มนี้ ได้แก่ α -carotene และ β -carotene คาโรทีนมีสีส้ม ส้มเหลือง และเหลือง สะสมอยู่ในตับ แครอท และผักผลไม้ แต่พบปริมาณน้อยในสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย (Wikipedia, 2006b)

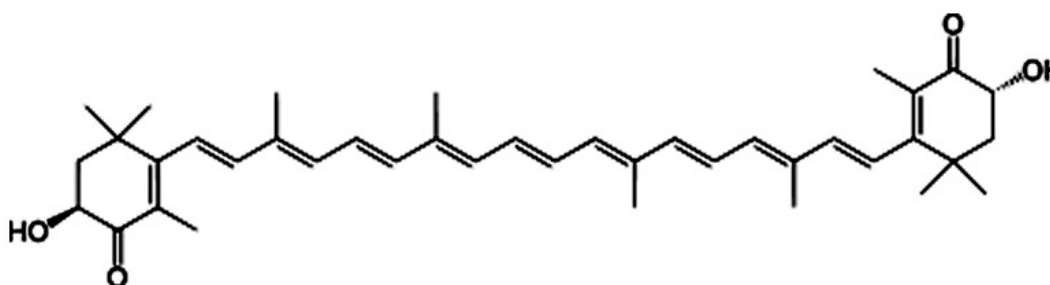
2. xanthophylls เป็นรงควัตถุประเภท oxycarotenoid (ภาพที่ 3) โดยชนิดที่พบมากที่สุด ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย คือ astaxanthin ซึ่งอาจพบอยู่ในรูปอิสระ (free form), esterified form หรือ carotenoprotein ส่วนมากจะพบในรูปของ free form ที่จับอยู่กับโปรตีน astaxanthin พบในสิ่งมีชีวิต หลายชนิด เช่น สาหร่ายขนาดเล็ก ยีสต์ ปลาแซลมอน ปลาเทราท์ ปีกนกบางชนิด และสัตว์ กลุ่มครัสเตเชีย (Wikipedia, 2006a)



α -carotene



β -carotene



astaxanthin

ภาพที่ 3 โครงสร้างของรงควัตถุในกลุ่ม carotenoid (Wikipedia, 2009a, 2009b; Ben Best, 2009)

Czeczuga (1971) ศึกษาชนิดของ carotenoid ในหนวด (antennae) ก้านตา กระจก
กล้ามเนื้อ และลำไส้ของ crayfish ชนิด *Astacus leptodactylus* (Esch.) พบว่า มีจำนวน 10 ชนิด
ได้แก่ β -carotene, echinenone, canthaxanthin, cryptoxanthin, lutein, zeaxanthin, violaxanthin,
neoxanthin, ketocarotenoid และ astaxanthin

Sachindra *et al.* (2005) ศึกษาปริมาณ carotenoid ในเนื้อและเปลือกของปูทะเลชนิด
Charybdis cruciata และปูน้ำจืดชนิด *Potamon potamon* พบว่า ปูทั้ง 2 ชนิดมี carotenoid ปริมาณ
น้อย โดย carotenoid ในเปลือกของปูทะเลมีปริมาณ 11 $\mu\text{g/g}$ และเมื่อแยกชนิดของ carotenoid พบ
astaxanthin ester ในเนื้อ 67.6 g/100 g ของปริมาณ carotenoid ทั้งหมด และเปลือก 65.5 g/100 g
ของปริมาณ carotenoid ทั้งหมด ส่วนปูน้ำจืดประกอบด้วย zeaxanthin เป็นหลัก โดยพบในเนื้อ
42 g/100 g ของปริมาณ carotenoid ทั้งหมด และเปลือก 74.8 g/100 g ของปริมาณ carotenoid
ทั้งหมด

Nègre-Sadargues *et al.* (2000) วิเคราะห์ carotenoid ในกุ้งทะเลลึกครอบครัว
Alvinocarididae 3 ชนิด ได้แก่ *Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei* และ *Alvinocaris markensis*
ที่อาศัยอยู่บริเวณปล่องภูเขาไฟใต้น้ำใน mid-Atlantic พบว่า กุ้งชนิด *Rimicaris exoculata* มีปริมาณ
carotenoid เพิ่มขึ้นในระยะ juvenile ในขณะที่กุ้งชนิด *Chorocaris chacei* และ *Alvinocaris*
markensis มี carotenoid ปริมาณน้อย

Wade *et al.* (2005) ศึกษาการวัดกลุ่ม carotenoid พวกร astaxanthin ในเปลือกของ
western rock lobster (*Panulirus cygnus*) ในระยะเกือบตัวเต็มวัย (sub-adult) ที่มีการลอกคราบจาก
ระยะ red phase สู่ระยะ white phase พบว่าปริมาณ carotenoid ในระยะ red phase สูงเป็น 2.4 เท่า
ของระยะ white phase

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างปูทะเล

เก็บตัวอย่างปูทะเล (*Scylla serrata*) จากฟาร์มปูน้ำม อ. ชลุม จ. จันทบุรี ที่มีขนาดความกว้างของกระดองประมาณ 6.5-9.5 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 50-130 กรัม ซึ่งอยู่ในระยะ (stage) ต่าง ๆ กัน นำปูที่ได้มาพักในตู้เลี้ยงที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง ม. เกษตรศาสตร์ ซึ่งเป็นระบบปิดมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำสัปดาห์ละ 2 ครั้ง อาหารที่เลี้ยงปู ได้แก่ เนื้อปลาสด และให้อาหารปริมาณที่มากเกินไปทุก ๆ 2 วัน จากนั้นรอนจนกระทั่งปูเข้าสู่ระยะที่ต้องการของวงจรลอกคราบ (molting cycle) จึงเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์จำนวนเม็ดเลือดรวม กิจกรรมเอนไซม์ ชนิดและปริมาณ carotenoid ที่สะสมในปูทะเล โดยเก็บตัวอย่างปูจำนวน 12 ระยะ ได้แก่

1. ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D_1)
2. ระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D_2)
3. ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_3)
4. ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A_1)
5. ระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง ($A_{2,1}$)
6. ระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง ($A_{2,2}$)
7. ระยะหลังลอกคราบ 2 วัน (B_1)
8. ระยะหลังลอกคราบ 3 วัน ($B_{2,1}$)
9. ระยะหลังลอกคราบ 5 วัน ($B_{2,2}$)
10. ระยะหลังลอกคราบ 7 วัน ($B_{2,3}$)
11. ระยะหลังลอกคราบ 10 วัน ($B_{2,4}$)
12. ปูระยะกระดองปกติ (C)

2. การนับจำนวนเม็ดเลือดรวมของปูทะเล (Total Haemocyte Count: THC)

เตรียมตัวอย่างเลือด (haemolymph) จากปู 15 ตัว โดยใช้ ethanol 70% ทำความสะอาดบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 จากนั้นใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 21 เจาะเลือดปูบริเวณโคนขาเดิน นำเลือดเก็บในหลอดพลาสติกที่มี 10% trisodium citrate บรรจุอยู่ (อัตราส่วนระหว่าง 10% trisodium

citrate และเลือดเท่ากับ 1:4) ย้อมเม็ดเลือดด้วย trypan blue แล้วจึงนับเม็ดเลือดที่มีลักษณะสมบูรณ์ โดยใช้ haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การศึกษากิจกรรมเอนไซม์

3.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

หลังจากทำความสะอาดปูแล้วจึงเตรียมตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อจากปูจำนวน 9 ตัว แบ่งเป็นซ้าละ 3 ตัว โดยเจาะเลือดบริเวณโคนขาเดิน นำเลือดเก็บในหลอดพลาสติกที่มี 10% trisodium citrate บรรจุอยู่ (อัตราส่วนระหว่าง 10% trisodium citrate และเลือดเท่ากับ 1:5) จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็นจัดเพื่อให้ปูสลบ แล้วตัดเปิดขอบกระดอง (carapace) โดยรอบ ใช้ปากคีบดึงเนื้อเยื่อใต้กระดอง (integument) และตับ (hepatopancreas) ออกโดยมิให้เนื้อเยื่อฉีกขาด จากนั้นทำความสะอาดบริเวณเหงือก (gill) ด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด ใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนเหงือก แล้วจึงนำเนื้อเยื่อที่ถูกตัดไปบดในโกร่งที่เติม liquid nitrogen และ 1 M Tris-HCl, pH 8 ที่เย็นจัดเพื่อช่วยรักษาสภาพเนื้อเยื่อ จากนั้นนำเลือดและเนื้อเยื่อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที แล้วจึงเก็บเฉพาะส่วนใส (crude enzyme) เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ดำเนินการจากวิธีการของ Christopher *et al.* (2006) และ Heinz *et al.* (2001) โดยนำ 2% SDS บ่มลงใน crude enzyme 100 µl ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม 97.5 mM Tris-HCl, pH 7 และ 2 mM L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA ใน 100 mM phosphate buffer, pH 6.5) โดยปริมาตรสุดท้ายของ reaction mixture เท่ากับ 2 ml และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 475 nm และคำนวณหากิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase (units mg protein⁻¹) โดยกำหนดให้ 1 unit คือ ความสามารถของเอนไซม์ที่ทำให้ค่า absorbance ของ dopamine ที่ 475 nm เพิ่มขึ้น 0.01 หน่วย ใน 1 นาที

3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase

วิธีการวิเคราะห์เอนไซม์ superoxide dismutase ดำเนินการตามวิธีการของ Marklund and Marklund (1974) ใน Pan and Zhang (2006) โดยนำส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) 2 ml ซึ่งประกอบด้วย 97.5 mM Tris-HCl pH 7, 0.4 mM pyrogallol และ 100 μ l ของ crude enzyme นำส่วนผสมของปฏิกิริยาบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 5 นาที และวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 325 nm คำนวณกิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase ($\text{units mg protein}^{-1}$) โดย 1 unit คือความสามารถของเอนไซม์ในการยับยั้งกระบวนการ oxidation ที่เพิ่มขึ้น 0.01 หน่วย ใน 1 นาที

4. การศึกษาชนิดและปริมาณ carotenoid ในปุ๋ยมะเขือเทศลดวงจรการลอกคราบ

4.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ carotenoid

การศึกษา carotenoid ในปุ๋ยมะเขือเทศ โดยนำตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อของปูจำนวน 9 ตัว แบ่งออกเป็น 3 ซ้ำ ซึ่งเก็บเลือดจากโคนขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 ที่ได้รับการทำความสะอาดแล้ว สำหรับเนื้อเยื่อได้กระดองได้จากการใช้กรรไกรตัดขอบกระดองโดยรอบ จากนั้นใช้ปากคีบดึงเนื้อเยื่อได้ส่วนของกระดองที่ถูกตัดออกมา ส่วนตับและเหงือกเก็บในสภาพที่สดไม่ให้ถูกอากาศ จากนั้นนำเนื้อเยื่อทั้งหมดไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณ carotenoid

วิธีวิเคราะห์ปริมาณ carotenoid ดำเนินการตามวิธีของ Saito and Regier (1970) โดยนำ acetone ที่แช่เย็นจัด 20 ml ใส่ลงในตัวอย่างเนื้อเยื่อ 8 g แล้วบดให้ละเอียดในโกร่ง จากนั้นกรองเอาเฉพาะสารสกัดไปใส่กรวยแยกและเติม petroleum ether 20 ml ลงไป รอจนสารละลายแยกชั้นซึ่งรงควัตถุจะอยู่ในชั้นของ petroleum ether (ชั้นบน) ทำการสกัดซ้ำจนไม่มีรงควัตถุเหลืออยู่ จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาเติมน้ำ 20 ml เพื่อล้าง acetone แล้วกรองผ่าน Na_2SO_4 (anhydrous) และนำไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 nm

การคำนวณปริมาณ carotenoid

$$\text{ปริมาณ carotenoid } (\mu\text{g/g}) = \frac{A \times \text{ปริมาตรของสารสกัด (ml)} \times 10^4}{A_{1\text{ cm}}^{1\%} \times \text{น้ำหนักสดของตัวอย่าง (g)}}$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสง

$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ = ค่า extinction coefficient ของ β -carotene ใน petroleum ether;

$$A_{1\text{ cm}}^{1\%} = 2592$$

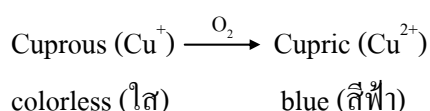
4.3 การวิเคราะห์ชนิดของ carotenoid

นำ crude extract ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Column Inertsil® ODS-3 ขนาด 5 μm ยาว 4.6x250 mm (2B186104)

วัฏภาคไหลที่ใช้ในการชะสาร คือ สารละลายผสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ อัตราส่วน 9:1 (v/v) 1,000 ml และ ethylacetate 1,000 ml โดยมีอัตราการไหล 20 $\mu\text{l}/50$ นาที ที่อุณหภูมิ 25 °C ความยาวคลื่น 450 nm

ผลและวิจารณ์

การศึกษาจำนวนเม็ดเลือดรวม กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase และ superoxide dismutase รวมถึงชนิดและปริมาณรวมของ carotenoid ในตับ เหยือก เนื้อเชื้อได้กระดอง และเลือดของปูทะเล จำนวน 12 ระยะตลอดวงจรลอกคราบ โดยเก็บตัวอย่างจากฟาร์มปูนิ่ม อ.ขลุง จ.จันทบุรี ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2550 ถึง ตุลาคม 2551 พบว่า ปูที่อยู่ในระยะปกติ ระยะก่อนลอกคราบ และระยะหลังลอกคราบจะมีลักษณะภายนอกที่มีความแตกต่างกัน สังเกตได้จาก ปูที่อยู่ในระยะกระดองแข็งปกติ กระดองจะมีความแข็งแรงมาก มีสีน้ำตาลเข้ม ปูสามารถเคลื่อนไหวได้อย่างรวดเร็ว และมีพฤติกรรมที่ก้าวร้าว ไม่สามารถเลี้ยงให้อยู่รวมกันได้ ปูในระยะนี้กินอาหารได้ตามปกติ เลือดของปูระยะนี้จะใส ไม่มีสี แต่เมื่อปล่อยทิ้งไว้ เลือดปูจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศทำให้เปลี่ยนเป็นสีฟ้า ตามปฏิกิริยาดังต่อไปนี้



ส่วนปูที่เข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบจะพบว่า มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของกระดอง กล่าวคือ กระดองจะมีความกรอบมากขึ้นเมื่อเข้าใกล้ระยะลอกคราบ ปูที่ใกล้ลอกคราบจะไม่กินอาหาร เคลื่อนไหวช้า หรือเกือบไม่เคลื่อนที่ เมื่อสังเกตที่ขาคู่สุดท้าย บริเวณ propodus และ dactylus จะปรากฏเป็นแถบสีส้มถึงแดง (ecdysial line) บริเวณรอยต่อระหว่างกระดองกับจับปีง พบว่า มีการยืดออกและยกตัวขึ้น เลือดของปูในระยะที่ใกล้ลอกคราบจะมีสีชมพูจาง เนื่องจากมีการดึงกลับของรงควัตถุสำหรับไปสะสมคราบใหม่ที่อยู๋ภายในตัว ขณะที่ปูกำลังลอกคราบ ปูจะค่อย ๆ ถอยออกทางส่วนท้ายของลำตัว ขณะเดียวกันก็จะมีการดึงน้ำเข้าสู่ร่างกายในปริมาณมาก ทำให้ปูตัวใหม่มีขนาดใหญ่กว่าเดิมประมาณ 1/3 ถึง 2/3 เท่าของขนาดเดิม ปูที่ลอกคราบใหม่ ๆ จะมีร่างกายที่อ่อนนุ่ม ไม่เคลื่อนไหวหรือเคลื่อนไหวได้ช้า และไม่กินอาหาร โดยเลือดของปูในระยะนี้ จะค่อนข้างแข็งตัวช้ากว่าเลือดปูในระยะกระดองแข็งปกติ ปูจะเริ่มเคลื่อนไหวและกินอาหารตามปกติ หลังจากลอกคราบแล้วประมาณ 2 วัน

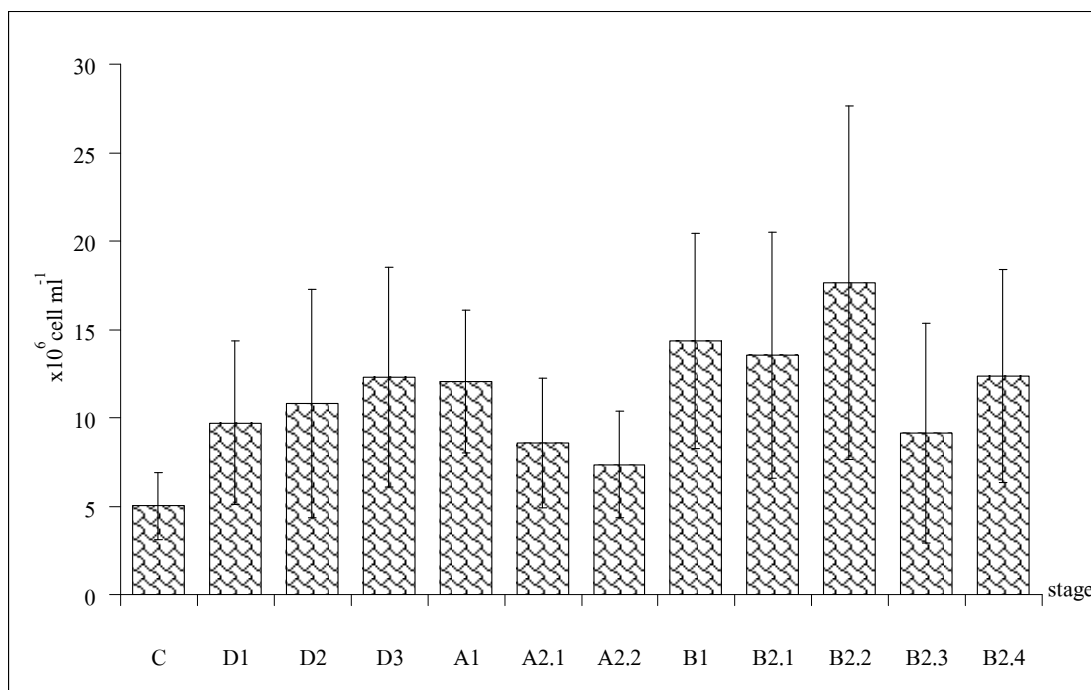
1. จำนวนเม็ดเลือดรวมตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

ผลการนับจำนวนเม็ดเลือดรวมของปูทะเลภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20x พบว่าจำนวนเม็ดเลือดรวมตลอดวงจรการลอกคราบมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง $5.02 \pm 1.90 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$ ถึง $17.64 \pm 9.98 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$ (ตารางที่ 1, ภาพที่ 4) ปูที่อยู่ในระยะกระดองแข็งปกติ (C) มีจำนวนเม็ดเลือดรวมเท่ากับ $5.02 \pm 1.90 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$ ซึ่งเป็นระยะที่มีจำนวนเม็ดเลือดรวมต่ำสุด ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับทุกระยะ หลังจากนั้นจะพบว่า จำนวนเม็ดเลือดเริ่มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D_1) ($9.72 \pm 4.65 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$) ผ่านระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D_2) ($10.81 \pm 6.46 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$) ถึงระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_3) และระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A_1) ที่มีจำนวนเม็ดเลือดรวมเท่ากับ $12.30 \pm 6.20 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$ และ $12.03 \pm 4.03 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$ ตามลำดับ หลังจากนั้นจำนวนเม็ดเลือดรวมจะค่อย ๆ ลดลงจากระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง จนถึงระยะหลังลอกคราบ

ตารางที่ 1 จำนวนเม็ดเลือดรวมตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

ระยะ	จำนวนเม็ดเลือดรวมเฉลี่ย ($\times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$)
กระดองแข็งปกติ (C)	5.02 ± 1.90^c
ก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D_1)	9.72 ± 4.65
ก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D_2)	10.81 ± 6.46^b
ก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_3)	12.30 ± 6.20
หลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A_1)	12.03 ± 4.03
หลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง ($A_{2,1}$)	8.58 ± 3.67
หลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง ($A_{2,2}$)	7.36 ± 3.02
หลังลอกคราบ 2 วัน (B_1)	14.35 ± 6.08
หลังลอกคราบ 3 วัน ($B_{2,1}$)	13.54 ± 6.97
หลังลอกคราบ 5 วัน ($B_{2,2}$)	17.64 ± 9.98^a
หลังลอกคราบ 7 วัน ($B_{2,3}$)	9.11 ± 6.21
หลังลอกคราบ 10 วัน ($B_{2,4}$)	12.33 ± 6.03

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (superscript) ในคอลัมน์เดียวกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4 จำนวนเม็ดเลือดรวมตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

24 ชั่วโมง ($A_{2.2}$) ($7.36 \pm 3.02 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$) และมาเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วอีกครั้งในระยะหลังลอกคราบ 2 วัน (B_1) ($14.35 \pm 6.08 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$) ถึงระยะหลังลอกคราบ 5 วัน ($B_{2.2}$) ($17.64 \pm 9.98 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$) ซึ่งเป็นระยะที่มีจำนวนเม็ดเลือดรวมสูงสุด ($p < 0.05$)

เมื่อนำผลการศึกษานับจำนวนเม็ดเลือดรวมของปูทะเลระยะปกติ (C) ($5.02 \pm 1.90 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$) มาเปรียบเทียบกับจำนวนเม็ดเลือดรวมของกุ้งในระยะเดียวกันที่ได้จากการศึกษาของ van de Braak *et al.* (1996), Cheng and Chen, (2001) และ Cheng *et al.* (2005) พบว่า ปูมีจำนวนเม็ดเลือดรวมน้อยกว่ากุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) และกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ซึ่งมีจำนวนเม็ดเลือดรวมเท่ากับ $50.9 \pm 17.7 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$, $14.2 \pm 8.2 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$ และ $9.8 \pm 11 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$ ตามลำดับ

เมื่อปูเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ (D_1 - D_3) เป็นที่น่าสังเกตว่า จำนวนเม็ดเลือดรวมจะมีปริมาณมากกว่าระยะกระดองแข็งปกติ (C) อย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Le Moullac *et al.* (1997) ที่พบว่า เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งชนิด *P. stylirostris* ในระยะกระดองแข็งปกติมีจำนวนน้อยกว่าเม็ดเลือดในระยะก่อนลอกคราบอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากในช่วง

ก่อนลอกคราบ กระดองที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ซึ่งอยู่ภายใต้กระดองเก่าของปูมีโอกาสติดเชื้อโรคได้ง่าย เม็ดเลือดจึงถูกสร้างเพิ่มขึ้นเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอมเหล่านี้ (Le Moullac *et al.*, 1997) โดยการทำงานของเม็ดเลือดในลักษณะนี้เป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบ cellular immunity ซึ่งเม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดจะแบ่งหน้าที่ในการทำงานโดย hyaline cell ทำหน้าที่ phagocytosis และยังมีส่วนในการส่งเสริมการทำงานแบบ humoral immunity คือ ช่วยกระตุ้นการแข็งตัวของเลือด ในขณะที่ semigranular cell ทำหน้าที่ในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) การห่อหุ้มเชื้อโรค (encapsulation) เก็บและปลดปล่อยเอนไซม์ prophenoloxidase ส่วน granular cell ทำหน้าที่เก็บและปลดปล่อยเอนไซม์ prophenoloxidase (Söderhäll and Cerenius, 1992)

นอกจากนี้ในระยะก่อนลอกคราบ เม็ดเลือดชนิดที่ภายในมีเม็ด granule ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์และเก็บเอนไซม์ prophenoloxidase จะทำการปลดปล่อยเอนไซม์สู่ชั้น epidermis (Terwilliger and Ryan, 2006) ซึ่ง prophenoloxidase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยา sclerotization หรือ quinone tanning ซึ่งเป็นกระบวนการที่ก่อให้เกิดการจับกัน (cross-linked) ระหว่าง protein กับ quinone เพื่อช่วยคงสภาพ (stabilize) protein matrix และก่อให้เกิดความแข็งแรงของชั้น cuticle รวมทั้งช่วยยับยั้ง hydrolytic enzymes ที่ผลิตจากเชื้อโรค (Klowden, 2007) โดย Krishnan (1951) พบว่า กระบวนการ sclerotization ในชั้น cuticle ของปูชนิด *Carcinus maenas* เกิดขึ้นหลังการลอกคราบเสร็จใหม่ ๆ ซึ่ง Vacca and Fingerman (1983) อธิบายว่า เม็ดเลือดชนิด hyaline cell มีหน้าที่ผลิต diphenol ส่วนเม็ดเลือดชนิด granular cell จะทำหน้าที่ผลิต protein ที่ก่อให้เกิดกระบวนการ sclerotization ใน cuticle ของปู โดยในช่วงที่ปูกำลังลอกคราบจนกระทั่งทำการลอกคราบเสร็จใหม่ ๆ พบว่า บริเวณใกล้กับ epidermis เต็มไปด้วย hyaline cell ที่รวมตัวกันเป็นกลุ่มใหญ่ หรือบางครั้งอาจพบกลุ่มเม็ดเลือด hyaline cell รวมตัวล้อมรอบเม็ดเลือด granulocyte ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่า จำนวนเม็ดเลือดของปูในระยะหลังการลอกคราบใหม่ ๆ (A_1) ยังคงมีจำนวนมากกว่าระยะกระดองแข็งปกติ (C) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดย Hose *et al.* (1992) สังเกตพบว่า จำนวนเม็ดเลือดชนิด hyaline cell และ granular cell ที่เพิ่มขึ้นของกุ้ง penaeid shrimp (*Sicyonia ingentis*) ในระหว่างการลอกคราบนั้นเกิดขึ้นเพื่อช่วยในการซ่อมแซม (repair) exoskeleton และต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอมหลังจากกึ่งลอกคราบเสร็จ เนื่องจากกระดองมีลักษณะอ่อนนุ่มและสามารถติดเชื้อได้ง่าย

มีความเป็นไปได้ว่า การที่ปูที่ลอกคราบใหม่ ๆ มีโครงร่างที่อ่อนนุ่มและมีการดึงน้ำเข้าสู่ร่างกายในปริมาณมากเพื่อเพิ่มขนาดร่างกายนั้น อาจส่งผลทำให้ปูเสี่ยงต่อการติดเชื้อได้ง่าย

เม็ดเลือดซึ่งทำหน้าที่ในการปกป้องและต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกจะมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบ non-self immunity โดย Hose *et al.* (1992) พบว่า จำนวนเม็ดเลือดที่เพิ่มขึ้นนั้น เพื่อช่วยในการซ่อมแซมกระดูกและต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอมระหว่างเกิดกระบวนการลอกคราบ เนื่องจากกระดูกใหม่มีลักษณะนุ่มและง่ายต่อการติดเชื้อ โดยเม็ดเลือดชนิด hyaline cell มีความสามารถในการ phagocytosis แบบที่เรีย (Walton and Smith, 1999) ในขณะที่เม็ดเลือดชนิด semi-granular cell และ granular cell ซึ่งภายในเซลล์มี granule ที่นอกจากจะสร้างและเก็บสาร prophenoloxidase แล้ว ภายใน granule ยังสามารถสังเคราะห์และเก็บสาร peroxinectin (Liu *et al.*, 2005) และ antimicrobial peptide เช่น penaeidins (Destoumieux *et al.*, 2000), crustin-like antibacterial peptide หรือ single whey-acidic-domain antibacterial peptide (Hauton *et al.*, 2006) เป็นต้น

เมื่อพิจารณาปูที่ลอกคราบแล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ($A_{2,1}$) และ 24 ชั่วโมง ($A_{2,2}$) พบว่า จำนวนเม็ดเลือดค่อย ๆ ลดลง แต่อย่างไรก็ตามจำนวนเม็ดเลือดรวมก็ยังคงมีจำนวนสูงกว่าปูในระยะกระดูกแข็งปกติ (C) ($p<0.05$) ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ที่มีจำนวนเม็ดเลือดรวมใน 2 ระยะนี้น้อยกว่ากุ้งปกติ (C) ($p<0.05$) (Cheng and Chen, 2001) โดยจากผลของจำนวนเม็ดเลือดที่ลดลงนี้อาจเป็นไปได้ว่าในช่วงเวลาก่อนการลอกคราบจนถึงระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง ($A_{2,1}$) และ 24 ชั่วโมง ($A_{2,2}$) ปูจะไม่ค่อยกินอาหารหรือกินอาหารน้อยลงซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Verghese *et al.* (2008) ที่พบว่า สภาพการขาดอาหารของกุ้งมังกร Indian spiny lobster (*Panulirus homarus*) ส่งผลให้จำนวนเม็ดเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

เมื่อปูพัฒนาเข้าสู่วันที่ 2 หลังจากการลอกคราบ (B_1) ปูเริ่มมีพฤติกรรมการกินอาหารและพบว่า เม็ดเลือดมีจำนวนเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีจำนวนเม็ดเลือดรวมสูงสุดในวันที่ 5 ($B_{2,2}$) ซึ่งแตกต่างจากระยะอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และให้ผลที่สอดคล้องกับ Cheng and Chen (2001) ที่พบว่า กุ้ง *P. stylirostris* มีจำนวนเม็ดเลือดสูงสุดในระยะหลังลอกคราบ (B) ($p<0.05$) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในช่วงหลังลอกคราบนี้ ปูเกิดกระบวนการ melanization เพื่อเพิ่มรงควัตถุชนิด melanin ที่ก่อให้เกิดสีดำในชั้น cuticle (Krishnan, 1951) นอกจากนี้ร่างกายของปูอาจจะเกิดการสังเคราะห์ chitin ใน cuticle โดยจากรายงานวิจัยของ Chung (2008) พบว่า เม็ดเลือดมีการสะสมน้ำตาล trehalose ในระดับที่สูงกว่าน้ำตาล glucose ถึง 50 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ trehalose 6-phosphate synthase ภายในเซลล์เม็ดเลือดมีค่าสูงสุดในระยะหลังลอกคราบ โดยเอนไซม์ trehalose

6-phosphate synthase และ trehalase เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และ metabolism น้ำตาล trehalose โดยน้ำตาล trehalose จะถูกเอนไซม์ trehalase สลาย (break down) ไปเป็น glucose เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ chitin ในชั้น cuticle ของปู เพื่อเหนียวนาให้เกิดกระบวนการ calcification ที่เสริมสร้างให้โครงร่างมีความแข็งแรงขึ้น

นอกจากนี้ Cheng and Chen (2001) เสนอแนะว่า สารอาหารบางชนิดน่าจะมีส่วนช่วยกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดให้เพิ่มขึ้นได้ โดย Huang *et al.* (2006) รายงานว่า กุ้ง *Fenneropenaeus chinensis* ที่ได้รับสาร polysaccharide ที่สกัดจากสาหร่ายทะเลชนิด *Sargassum fusiforme* ส่งผลให้จำนวนเม็ดเลือดรวมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) เช่นเดียวกับกุ้งกุลาดำที่ได้รับวิตามินอี ปริมาณ 75 และ 100 mg kg diet⁻¹ เสริมในอาหารช่วยให้จำนวนเม็ดเลือดรวมเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) มากกว่ากุ้งที่ได้รับวิตามินอีในปริมาณที่น้อยกว่า 50 mg kg diet⁻¹ (Lee and Shiau, 2004) แต่จากการศึกษาของ Liu *et al.* (2006) พบว่า sodium alginate ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ

ในขณะที่ปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิและความเค็ม ก็มีอิทธิพลต่อจำนวนเม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่ม crustacean โดย Wang and Chen (2006b) พบว่า กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเลอุณหภูมิ 22 และ 34 °C ทำให้จำนวนเม็ดเลือดและกิจกรรม phagocytosis ลดลง ($p < 0.05$) คล้ายกับกุ้งกุลาดำที่ถูกนำไปเลี้ยงในความเค็มต่ำ (5-15 ppt) ก็ทำให้จำนวนเม็ดเลือดลดลง ($p < 0.05$) (Wang and Chen, 2006a) ส่วนการศึกษาของ Ravindranath (1977) พบว่าเม็ดเลือดของปู mole-crab (*Emerita asiatica*) ช่วงเช้ามีจำนวนน้อยกว่าช่วงบ่าย

สำหรับผลกระทบต่อเม็ดเลือดที่เกิดจากการติดเชื้อโรคพบว่า ปู blue crab (*Callinectes sapidus*) ที่เป็นโรค shell disease syndrome จะมีเม็ดเลือดล้อมรอบบริเวณที่เกิดบาดแผลเป็นจำนวนมากเพื่อเหนียวนาให้เกิดกระบวนการ melanization (Noga *et al.*, 2000) แต่ Vogan and Rowley, (2002) พบว่า โรค shell disease syndrome ไม่ส่งผลกระทบต่อจำนวนเม็ดเลือดรวมของปู edible crab (*Cancer pagurus*) ในขณะที่กุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่เป็นโรค white spot syndrome ก็พบเม็ดเลือดบริเวณที่ติดเชื้อเช่นกัน (van de Braak *et al.*, 2002) ส่วน Liu *et al.* (2005) อธิบายว่า กุ้งชนิด *Litopenaeus vannamei* ที่ติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* นั้น เม็ดเลือดจะมีบทบาทในการสร้างสาร antibacterial peptide เพื่อกำจัดเชื้อโรค

2. กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase และ superoxide dismutase

2.1 Phenoloxidase (PO)

2.1.1 phenoloxidase ในตับ

จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ในตับพบว่า มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.65 ± 0.13 ถึง 3.93 ± 2.48 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 2, ภาพที่ 5A) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) พบว่า มีกิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 3.93 ± 2.48 units mg protein⁻¹ เมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) กิจกรรมเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 2.61 ± 1.23 units mg protein⁻¹ ซึ่งลดลงจากเดิมจนผ่านเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) (1.35 ± 0.44 units mg protein⁻¹) แต่กิจกรรมของ phenoloxidase จะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D₃) เท่ากับ 2.63 ± 1.34 units mg protein⁻¹ หลังจากปูลอกคราบแล้วพบว่า กิจกรรมเอนไซม์ลดลงและมีค่าค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) ถึงระยะหลังลอกคราบ 7 วัน (B_{2,3}) (0.65 ± 0.13 ถึง 1.46 ± 0.71 units mg protein⁻¹) เมื่อปูลอกคราบได้ 10 วัน (B_{2,4}) พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase กลับเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 3.84 ± 1.91 units mg protein⁻¹

2.1.2 phenoloxidase ในเหงือก

จากการวิเคราะห์พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ในเหงือกมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 2.27 ± 0.33 ถึง 7.40 ± 0.85 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 2, ภาพที่ 5B) ซึ่งในระยะกระดองแข็งปกติ (C) มีกิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 2.27 ± 0.33 units mg protein⁻¹ จากนั้น phenoloxidase จะมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) (2.89 ± 0.88 units mg protein⁻¹) ผ่านระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) (3.77 ± 0.54 units mg protein⁻¹) และระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D₃) (6.02 ± 2.91 units mg protein⁻¹) โดยจะมีค่าคงที่จนกระทั่งปูเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (6 ± 2.81 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase จะลดลงอย่างรวดเร็วในระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A_{2,1}) (2.66 ± 0.11 units mg protein⁻¹) และมีค่าค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A_{2,2}) จนถึงระยะหลังลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (5.02 ± 0.22 ถึง 7.40 ± 0.85 units mg protein⁻¹)

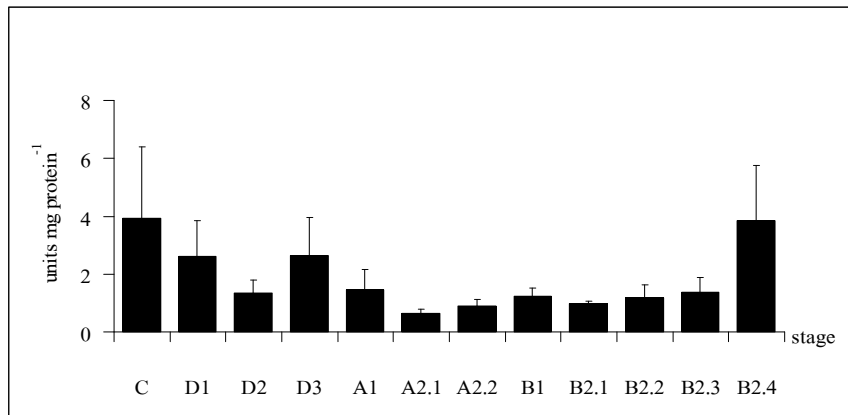
ตารางที่ 2 กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ในอวัยวะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

ระยะ	กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase (units mg protein ⁻¹)			
	ตับ	เหงือก	เนื้อเยื่อใต้กระดอง	เลือด
ปกติ (C)	3.93±2.48 ^a	2.27±0.33 ^c	1.41±0.70	1.42±0.31
ก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D ₁)	2.61±1.23	2.89±0.88	1.54±0.68 ^c	1.09±0.19
ก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D ₂)	1.35±0.44 ^b	3.77±0.54 ^b	0.52±0.29 ^d	1.31±0.14
ก่อนลอกคราบ 2 วัน (D ₃)	2.63±1.34	6.02±2.91 ^a	2.37±0.93 ^b	1.31±0.41
หลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A ₁)	1.46±0.71	6.00±2.18	2.47±0.77	3.65±1.80 ^a
หลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A _{2,1})	0.65±0.13	2.66±0.11	1.47±0.12	2.14±0.48 ^b
หลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A _{2,2})	0.89±0.23	5.97±1.56	0.94±0.47	1.04±0.26 ^c
หลังลอกคราบ 2 วัน (B ₁)	1.23±0.30	6.57±2.62	1.87±0.58	2.00±0.41
หลังลอกคราบ 3 วัน (B _{2,1})	0.98±0.09	6.11±2.43	3.03±0.71	2.21±0.82
หลังลอกคราบ 5 วัน (B _{2,2})	1.18±0.45	5.59±2.12	2.30±0.42	2.82±0.45
หลังลอกคราบ 7 วัน (B _{2,3})	1.38±0.51	7.40±0.85	3.11±1.14	1.67±0.54
หลังลอกคราบ 10 วัน (B _{2,4})	3.84±1.91	5.02±0.22	4.89±1.72 ^a	0.93±0.21

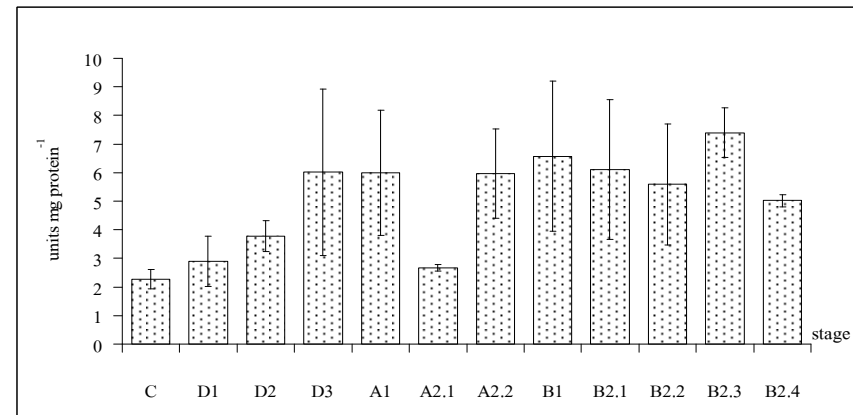
หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (superscript) ในคอลัมน์เดียวกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2.1.3 phenoloxidase ในเนื้อเยื่อใต้กระดอง

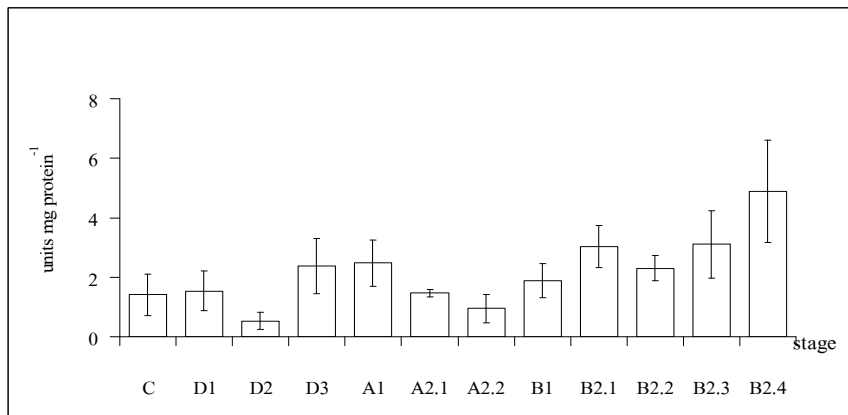
จากการวิเคราะห์พบว่า เอนไซม์ phenoloxidase ในเนื้อเยื่อใต้กระดองมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.52±0.29 ถึง 4.89±1.72 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 2, ภาพที่ 5C) โดยกิจกรรมเอนไซม์ของปูกระดองแข็งปกติ (C) มีค่าเท่ากับ 1.41±0.70 units mg protein⁻¹ และมีค่าคงที่จนเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) (1.54±0.68 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นกิจกรรมมีค่าลดลงอย่างมากเมื่อเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) (0.52±0.29 units mg protein⁻¹) เมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 2 วัน (D₃) (2.37±0.93 units mg protein⁻¹) พบว่า กิจกรรมของ phenoloxidase



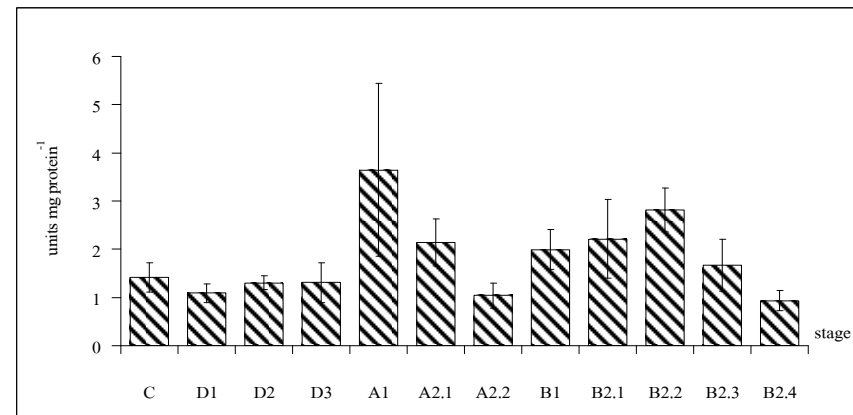
(A)



(B)



(C)



(D)

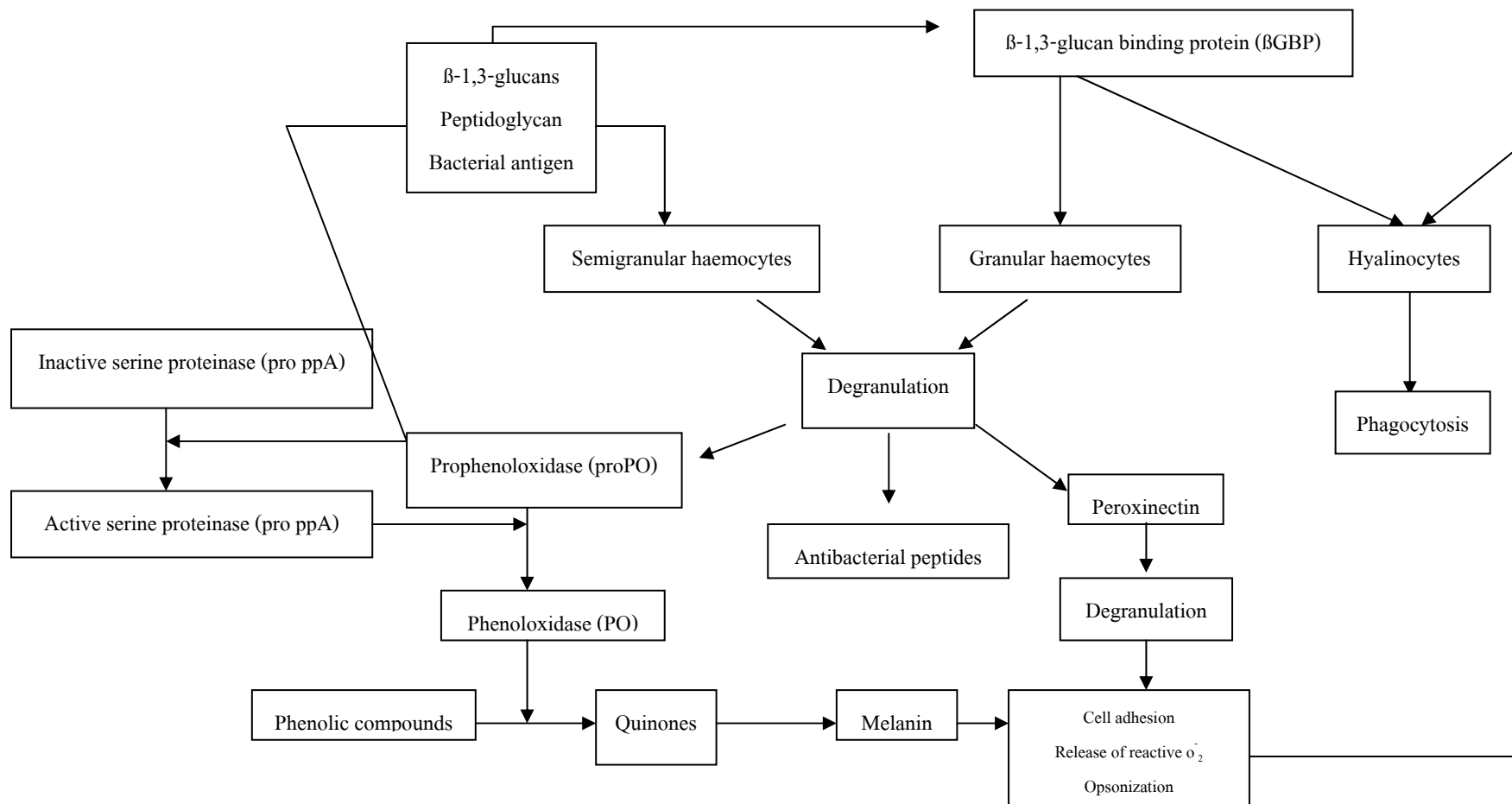
ภาพที่ 5 กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ในตับ (A) เหนือก (B) เนื้อเยื่อใต้กระดอง (C) และเลือด (D) ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

กลับเพิ่มสูงขึ้นและมีค่าคงที่จนปล่อยลอกคราบเสร็จ (A_1) (2.47 ± 0.77 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจากระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง ($A_{2,2}$) (0.94 ± 0.47 units mg protein⁻¹) ถึงระยะหลังลอกคราบ 10 วัน ($B_{2,4}$) ซึ่งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 4.89 ± 1.72 units mg protein⁻¹

2.1.4 phenoloxidase ในเลือด

จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ในเลือด พบว่า มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 0.93 ± 0.21 ถึง 3.65 ± 1.80 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 2, ภาพที่ 5D) ในระยะกระดองแข็งปกติ (C) มีกิจกรรมของ phenoloxidase เท่ากับ 1.42 ± 0.31 units mg protein⁻¹ โดยกิจกรรมเอนไซม์จะมีค่าคงที่ตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D_1) (1.09 ± 0.19 units mg protein⁻¹) ถึงระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D_2) และระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_3) เท่ากับ 1.31 ± 0.14 และ 1.31 ± 0.41 units mg protein⁻¹ ตามลำดับ เมื่อเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A_1) พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase เพิ่มสูงสุดเท่ากับ 3.65 ± 1.80 units mg protein⁻¹ หลังจากนั้นกิจกรรมของ phenoloxidase ลดลงและค่อนข้างคงที่จนถึงระยะหลังลอกคราบ 10 วัน ($B_{2,4}$)

จากผลการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ในเลือดตลอดวงจรลอกคราบ (ภาพที่ 5D) พบว่า เอนไซม์ phenoloxidase ของปูในระยะหลังลอกคราบใหม่ ๆ (A_1) มีค่ากิจกรรมมากกว่าปูในระยะกระดองแข็งปกติ (C) และระยะก่อนลอกคราบ (D_1 - D_3) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แตกต่างจากผลการศึกษาของ Verghese *et al.* (2008) และ Le Moullac *et al.* (1997) ที่พบว่า ระยะปกติของกุ้ง *Penaeus stylirostris* และ Indian spiny lobster (*Panulirus homarus*) มีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าระยะก่อนและหลังลอกคราบอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งน่าจะเกิดจากเม็ดเลือดหลังเอนไซม์ phenoloxidase สู้เลือด โดยเอนไซม์ phenoloxidase (ภาพที่ 6) จะทำหน้าที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมในระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ซึ่งเอนไซม์ phenoloxidase (activate) เป็นเอนไซม์ที่ถูกเปลี่ยนรูปมาจากเอนไซม์ prophenoloxidase (inactivate) ที่ถูกสังเคราะห์และเก็บอยู่ภายในเม็ด granule ของเซลล์เม็ดเลือดชนิด semigranular cell และ granular cell



ภาพที่ 6 กลไกการทำงานของเอนไซม์ phenoloxidase ในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย (Smith *et al.*, 2003)

ในขณะที่ปูอยู่ในช่วงสลัดคราบเก่าออกนั้น ปูจะมีการดื่มน้ำปริมาณมากเข้าสู่ร่างกายเพื่อขยายขนาดลำตัวไปพร้อม ๆ กัน และเมื่อการลอกคราบเสร็จสิ้น ร่างกายของปูจะมีลักษณะอ่อนนุ่ม ด้วยสาเหตุเหล่านี้ อาจส่งผลให้ปูมีความไวต่อการติดเชื้อโรคได้มากขึ้น (Le Moullac *et al.*, 1997) จึงอาจส่งผลให้กิจกรรมของ phenoloxidase ของเลือดเพิ่มขึ้นในระยะหลังลอกคราบเสร็จใหม่ ๆ โดยเมื่อเม็ดเลือดได้รับการกระตุ้นจากสารที่เป็นโครงสร้างของจุลชีพ เช่น lipopolysaccharides ในแบคทีเรียแกรมลบ (Cárdenas *et al.*, 2004), β -1,3-glucans ของยีสต์ หรือรา (Vargas-Albores *et al.*, 1996) และ peptidoglycan จากแบคทีเรียแกรมบวกที่รวมกับ pattern-recognition protein ทำให้เกิดการปลดปล่อยเอนไซม์ prophenoloxidase จากเม็ด granule (degranulation) ตัวเลือด หลังจากนั้น prophenoloxidase จะถูกกระตุ้นการทำงานจาก prophenoloxidase-activation factor (Buda and Shafer, 2005) หรือ serine proteinase ในเม็ดเลือดของปูทะเล (Vaseeharan *et al.*, 2006) เพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ phenoloxidase ที่สามารถทำงานได้

เอนไซม์ phenoloxidase ในเลือดจะทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา (catalyze) โครงสร้างของ monophenol และ diphenol ให้เป็น quinone อันเป็นสารสำคัญที่มีความสามารถในการจับ (cross-linked) กับโปรตีน เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโครงร่างแข็งในกระบวนการ sclerotization บริเวณ cuticle ของปู ซึ่งอาจส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ในเนื้อเยื่อได้กระดองของปูที่อยู่ในระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_2) และระยะที่เป็นปูใหม่ (A_1) มีกิจกรรมสูงกว่าปูที่มีกระดองแข็ง (C) อย่างชัดเจน ($p < 0.05$) (ภาพที่ 5C) โดย Terwilliger and Ryan (2006) อธิบายว่า ในช่วงก่อนลอกคราบ granule ที่อยู่ภายในเม็ดเลือดจะปลดปล่อย prophenoloxidase ตัวเลือด หลังจากนั้น เอนไซม์จะถูกส่งผ่านชั้น epidermis ไปยังชั้น cuticle ที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ โดยเอนไซม์ prophenoloxidase จะถูกกระตุ้นให้เป็น phenoloxidase ที่อยู่ในสภาพพร้อมทำงานในระยะหลังลอกคราบใหม่ ๆ (A_1) โดยสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Buda and Shafer (2005) ที่พบ mRNA ของ prophenoloxidase-activating factor (PPAF) ที่มีหน้าที่กระตุ้นการทำงานของ prophenoloxidase ในระยะก่อนลอกคราบและหลังลอกคราบเสร็จใหม่ ๆ และการศึกษาของ Krishnan (1951) ให้ข้อมูลที่ช่วยสนับสนุนว่า พบการเกิด phenolic tanning ในชั้น cuticle ของปูที่ลอกคราบเสร็จใหม่ ๆ

นอกจาก quinone จะเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์สำคัญที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของ phenol โดยเอนไซม์ phenoloxidase แล้ว quinone ยังสามารถเปลี่ยนโครงสร้าง (polymerize) เป็น melanin ที่มีลักษณะเป็นเม็ดสีดำ (melanization) สะสมอยู่ในชั้น cuticle และมีความสามารถในการ

จับกับ protein matrix fiber อีกทั้งยังพบ melanin ในบริเวณของ cuticle ที่เกิดบาดแผลด้วย (Ghidalia, 1985) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ตั้งแต่ระยะหลังลอกคราบ 2 วัน (B_1) จนมีค่าสูงสุดในระยะหลังลอกคราบ 10 วัน ($B_{2.4}$) ($p < 0.05$) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในช่วงนี้เนื้อเยื่อใต้กระดองของปูเกิดกระบวนการ melanization เพื่อเพิ่มรงควัตถุชนิด melanin ที่ก่อให้เกิดสีดำในชั้น cuticle โดย Krishnan (1951) ได้อธิบายว่าเลือดจะทำหน้าที่ลำเลียง tyrosine ไปยังชั้น cuticle ในช่วงท้าย ๆ ของระยะหลังลอกคราบ โดย tyrosine จะถูก oxidize ไปเป็น diphenol โดยมีเอนไซม์ phenoloxidase ในเลือดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

นอกจากกระบวนการ melanization จะมีบทบาทในกระบวนการ sclerotization และช่วยในการสร้างเม็ดสีดำในเนื้อเยื่อใต้กระดองแล้ว Cerenius *et al.* (2008) สันนิษฐานว่า กระบวนการ melanization ยังมีความสัมพันธ์กับการกระตุ้นกระบวนการ phagocytosis และ encapsulation รวมทั้งยังเป็นกระบวนการสุดท้ายที่เกิดขึ้นในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยการสร้าง nodule (nodule formation) (Söderhäll and Cerenius, 1992) ซึ่งกระบวนการทั้งหมดนี้นับเป็นกลไกที่สำคัญในระบบการป้องกันตัวแบบ cellular defense ของปู

สำหรับผลการศึกษาในเนื้อเยื่อของตับ (ภาพที่ 5A) และเหงือก (ภาพที่ 5B) ของปูทะเล อาจกล่าวได้ว่า กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ที่พบในเนื้อเยื่อนั้น น่าจะเป็นกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดจากเลือดที่ไหลไปหล่อเลี้ยงอวัยวะทั้งสอง เนื่องจาก proenzyme ของ phenoloxidase คือ เอนไซม์ prophenoloxidase ถูกสังเคราะห์และเก็บอยู่ภายในเม็ดเลือด (Sritunyalucksana *et al.*, 1999a) และระบบการไหลเวียนเลือดของปูเป็นแบบระบบเปิด (open circulatory system) โดยเลือดจะถูกส่งไปยังตับด้วยเส้นเลือด hepatic artery ที่ไหลออกจากหัวใจ ในขณะที่เลือดที่อยู่ในโพรงเลือด (haemoceal) จะไหลไปที่แอ่งเลือด infrabranchial sinus เพื่อส่งเลือดไปยังเหงือก โดยเลือดจะไหลผ่าน lamellae ของเหงือกแต่ละอัน (Ceccaldi, 1989) จึงอาจเป็นไปได้ว่า phenoloxidase ที่พบในตับและเหงือกเป็นกิจกรรมเอนไซม์ที่เกิดจากเลือด

จากผลการวิเคราะห์เอนไซม์ phenoloxidase ในตับของปูทะเลที่เข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2-1 สัปดาห์ (D_1 - D_2) มีแนวโน้มลดลง ($p < 0.05$) จากปูที่อยู่ในระยะกระดองแข็ง (C) โดยจากการศึกษาของ Adachi *et al.* (2004) พบว่า ตับเป็นอวัยวะที่สังเคราะห์ hemocyanin ซึ่งเป็นสารสีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจ และอาจมีส่วนร่วมในกระบวนการ sclerotization โดย hemocyanin จะถูกปล่อยเข้าสู่เลือด เพื่อส่งไปยังชั้น cuticle ซึ่ง Adachi *et al.* (2003) อธิบายว่า hemocyanin

สามารถถูกเปลี่ยนเป็นเอนไซม์ phenoloxidase-like enzyme จากการกระตุ้นของเม็ดเลือด โดย Terwilliger and Ryan (2006) พบว่า quaternary structure ของ hemocyanin มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปของ diphenol ได้คล้ายกับเอนไซม์ phenoloxidase

เมื่อปูเข้าสู่ช่วงใกล้ลอกคราบ (D_3) พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ของตับเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปูกระดองแข็งปกติ ($p>0.05$) อาจเป็นเพราะใกล้ลอกคราบ ปูจะเสี่ยงต่อการติดเชื้อได้ง่าย เพราะกระดองอันใหม่ที่สร้างอยู่ภายใต้กระดองอันเก่า มีลักษณะอ่อนนุ่มและอาจมีความสามารถในการป้องกันอวัยวะภายในร่างกายจากการรุกรานของเชื้อโรคน้อยกว่าปกติ จึงอาจส่งผลให้ปูมีการสร้างภูมิคุ้มกันมากขึ้น ซึ่งเมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 10 วัน ($B_{2.4}$) กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ของตับเพิ่มขึ้นอีกครั้ง ($p<0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับปูปกติ โดยจากรายงานของ Burgents *et al.* (2005) พบว่า ตับเป็นอวัยวะที่พบแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก และ Vogan *et al.* (2001) พบว่า ภายใน haemal spaces ของตับจะมีการสร้าง nodules ซึ่งเกิดจากเซลล์เม็ดเลือดที่รวมตัวกันจำนวนมาก เพื่อล้อมรอบเชื้อโรค (encapsulation) ที่มีขนาดใหญ่เกินกว่าที่เม็ดเลือดจะทำลายด้วยวิธี phagocytosis โดยผลของการเกิด nodules formation จะเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ melanization เพื่อกำจัดเชื้อโรคต่อไป (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006)

สำหรับผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ในเหงือก (ภาพที่ 5B) จะเห็นได้ว่า กิจกรรมเอนไซม์เริ่มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ตั้งแต่ปูในระยะกระดองแข็งปกติ (C) จนกระทั่งปูลอกคราบและเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบใหม่ ๆ (A_1) เนื่องจากเหงือกเป็นอวัยวะหนึ่งซึ่งช่วยในการป้องกันจุลชีพจากภายนอก โดยกิจกรรมของ phenoloxidase ที่สูงขึ้นในช่วงนี้ อาจเพราะในระหว่างการลอกคราบจะต้องดึงน้ำเข้าสู่ร่างกายผ่านเหงือกในปริมาณมาก และเหงือกอันเก่าจะถูกลอกออกไปพร้อมคราบเก่า จึงอาจส่งผลให้เหงือกได้รับเชื้อจุลชีพได้ง่ายกว่าปกติ ซึ่งเหงือกจะมีกลไกในการต่อสู้กับจุลชีพด้วยการสร้าง nodule เช่นเดียวกับตับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Martin *et al.* (1998) ที่พบว่า แบคทีเรียที่อยู่ในเลือด (hemolymph) จะถูกส่งไปยังเหงือก ซึ่งหลังจากนั้นเม็ดเลือดจะรวมตัวกันเพื่อสร้างกลไกการป้องกันตัวแบบ nodule ภายใน vessels ของเหงือก โดย Vogan *et al.* (2001) พบว่า โรค shell disease syndrome ที่เกิดบนกระดองส่งผลให้เกิด nodule formation ใน haemal sinus ของเหงือก หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ในเหงือกเริ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญอีกครั้ง ($p<0.05$) และมีค่าคงที่จนปูเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 10 วัน ($B_{2.4}$)

2.2 superoxide dismutase (SOD)

2.2.1 superoxide dismutase ในตับ

จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase ในตับพบว่า กิจกรรมมีค่าระหว่าง 5.25 ± 1.46 ถึง 52.56 ± 17.05 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 3, ภาพที่ 7A) โดยในปุระยะกระดองแข็งปกติ (C) มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 52.56 ± 17.05 units mg protein⁻¹ ซึ่งเมื่อปูเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) (16.84 ± 8.92 units mg protein⁻¹) พบว่า superoxide dismutase มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วผ่านระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) (10.79 ± 2.35 units mg protein⁻¹) และระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D₃) (11.08 ± 3.33 units mg protein⁻¹) แต่เมื่อเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าสูงขึ้นเท่ากับ 16.56 ± 8.14 units mg protein⁻¹ หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ลดลงและมีค่าคงที่ตั้งแต่ระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A_{2,1}) ถึงระยะหลังลอกคราบ 10 วัน (B_{2,2}) (5.25 ± 1.46 ถึง 15.38 ± 3.06 units mg protein⁻¹)

2.2.2 superoxide dismutase ในเหงือก

จากการวิเคราะห์ superoxide dismutase ในเหงือกพบว่า กิจกรรมเอนไซม์มีค่าอยู่ระหว่าง 8.67 ± 1.33 ถึง 29.52 ± 9.53 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 3, ภาพที่ 7B) โดย superoxide dismutase ของปูกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 10.92 ± 2.72 units mg protein⁻¹ และมีค่าคงที่จนถึงระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) (10.16 ± 1.99 units mg protein⁻¹) แต่กิจกรรมเอนไซม์เริ่มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D₃) (14.53 ± 5.36 units mg protein⁻¹) ผ่านระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A_{2,2}) ซึ่งมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 29.52 ± 9.53 units mg protein⁻¹ หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase จะลดลงและมีค่าค่อนข้างคงที่เมื่อพ้นระยะหลังลอกคราบ 2 วัน (D₃)

2.2.3 superoxide dismutase ในเนื้อเยื่อใต้กระดอง

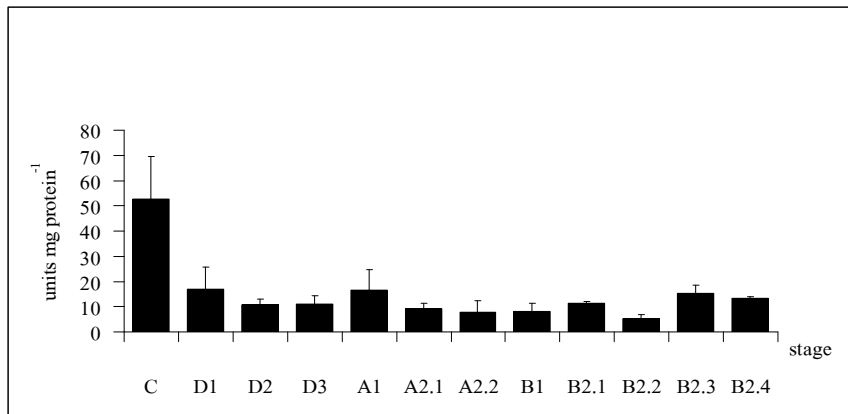
จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase ในเนื้อเยื่อใต้กระดองพบว่า มีค่าระหว่าง 2.48 ± 0.49 ถึง 14.14 ± 7.25 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 3, ภาพที่ 7C) ซึ่งในระยะ

ตารางที่ 3 กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase ในอวัยวะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

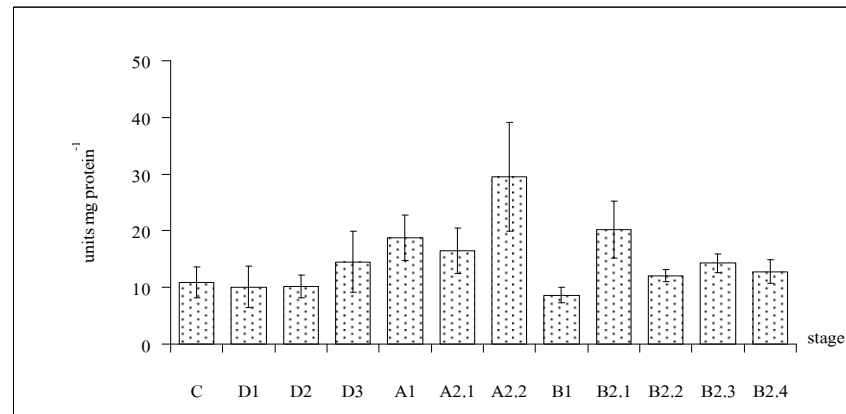
ระยะ	กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase (units mg protein ⁻¹)			
	ตับ	เหงือก	เนื้อเยื่อใต้กระดอง	เลือด
ปกติ (C)	52.56±17.05 ^a	10.92±2.72	14.14±7.25 ^a	0.53±0.16 ^b
ก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D ₁)	16.84±8.92	10.08±3.70	4.85±1.94	0.55±0.09
ก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D ₂)	10.79±2.35	10.16±1.99	3.47±1.88	0.66±0.07
ก่อนลอกคราบ 2 วัน (D ₃)	11.08±3.33	14.53±5.36	7.48±1.19	0.53±0.13
หลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A ₁)	16.56±8.14	18.80±3.98	6.95±1.94	1.07±0.07 ^a
หลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A _{2,1})	9.08±2.33	16.46±4.05	6.85±1.96	0.74±0.21
หลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A _{2,2})	7.75±4.55	29.52±9.53 ^a	9.60±1.86	0.63±0.04
หลังลอกคราบ 2 วัน (B ₁)	8.11±3.38	8.67±1.33 ^c	2.48±0.49 ^c	0.57±0.10
หลังลอกคราบ 3 วัน (B _{2,1})	11.51±0.43	20.19±5.03 ^b	9.25±2.97	0.65±0.12
หลังลอกคราบ 5 วัน (B _{2,2})	5.25±1.46 ^b	12.08±1.06	4.73±0.95	1.17±0.16
หลังลอกคราบ 7 วัน (B _{2,3})	15.38±3.06	14.27±1.67	8.85±1.56 ^b	1.20±0.37
หลังลอกคราบ 10 วัน (B _{2,4})	13.25±0.64	12.80±2.05	7.96±2.71	0.58±0.05

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (superscript) ในคอลัมน์เดียวกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

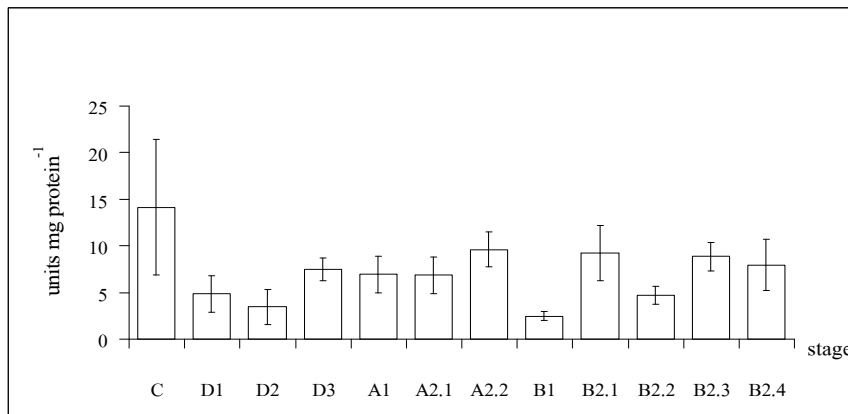
กระดองแข็งปกติ (C) มีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 14.14±7.25 units mg protein⁻¹ เมื่อเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) ถึงระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) พบว่า superoxide dismutase มีค่าเท่ากับ 4.85±1.94 และ 3.47±1.88 units mg protein⁻¹ ตามลำดับ แต่กิจกรรมเอนไซม์เริ่มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D₃) (7.48±1.19 units mg protein⁻¹) จนผ่านเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (6.95±1.94 units mg protein⁻¹) และระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A_{2,1}) (6.85±1.96 units mg protein⁻¹) ถึงระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A_{2,2}) (9.60±1.86 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ค่อนข้างแปรปรวนในระยะหลังลอกคราบ 2 วัน (B₁) ถึงระยะหลังลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) ซึ่งมีค่าระหว่าง 2.48±0.49 ถึง 9.25±2.97 units mg protein⁻¹



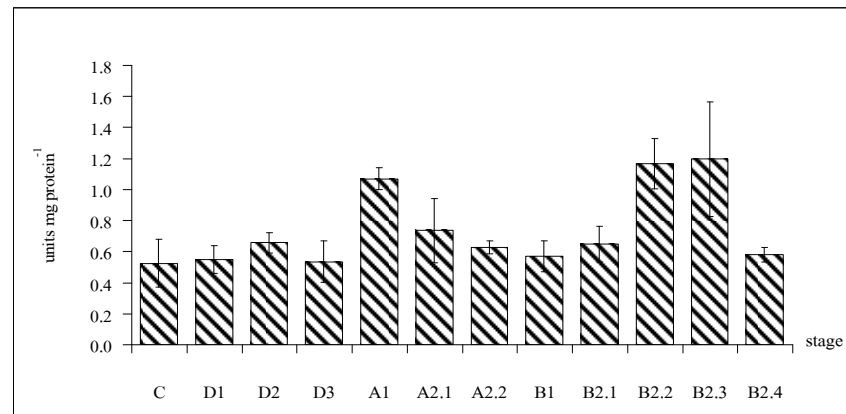
(A)



(B)



(C)



(D)

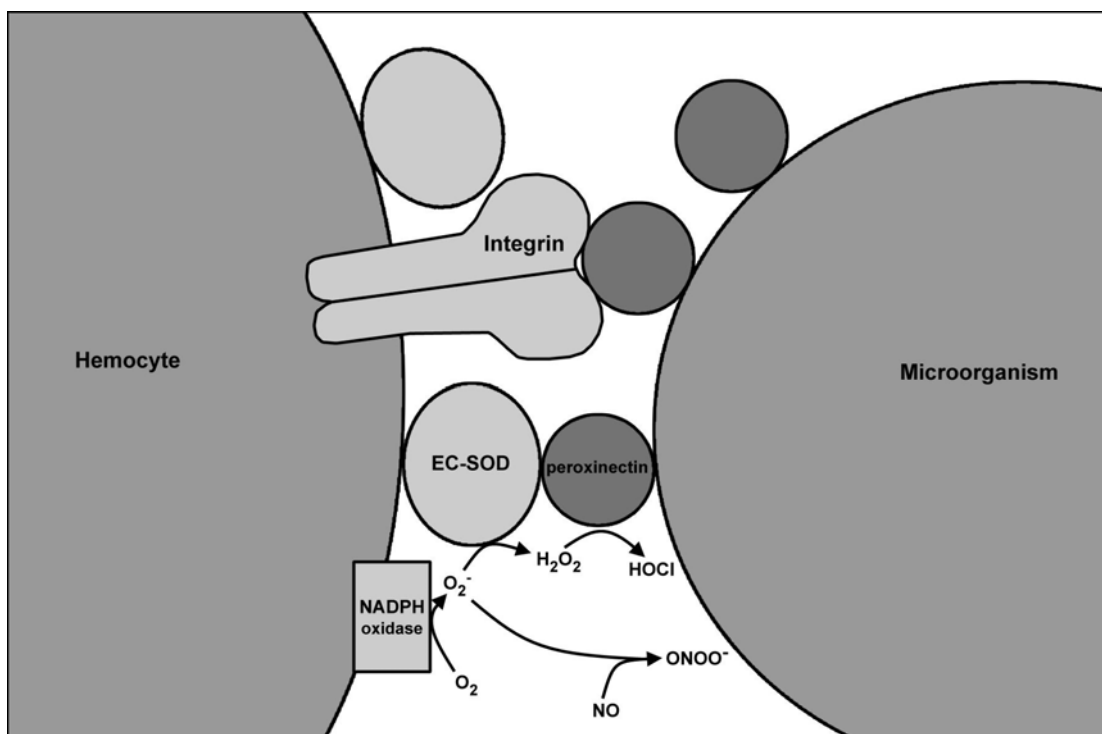
ภาพที่ 7 กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase ของตับ (A) เหนือก (B) เนื้อเยื่อใต้กระดูก (C) และเลือด (D) ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

2.2.4 superoxide dismutase ในเลือด

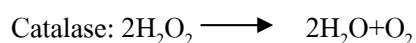
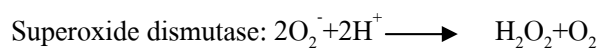
จากการวิเคราะห์กิจกรรมของกิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase ในเลือดมีค่าระหว่าง 0.53 ± 0.16 ถึง 1.20 ± 0.37 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 3, ภาพที่ 7D) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.53 ± 0.16 units mg protein⁻¹ โดยกิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase มีค่าคงที่ตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) (0.55 ± 0.09 units mg protein⁻¹) ผ่านระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) (0.66 ± 0.07 units mg protein⁻¹) ถึงระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D₃) (0.53 ± 0.13 units mg protein⁻¹) แต่เมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase เพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.07 ± 0.07 units mg protein⁻¹ หลังจากนั้น กิจกรรมเอนไซม์ลดลงและมีค่าคงที่ตั้งแต่ระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A_{2,1}) ถึงระยะหลังลอกคราบ 3 วัน (B_{2,1}) ซึ่งมีค่าระหว่าง 0.57 ± 0.10 ถึง 0.74 ± 0.21 units mg protein⁻¹ และกิจกรรมจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 5 วัน (B_{2,2}) และระยะหลังลอกคราบ 7 วัน (B_{2,3}) เท่ากับ 1.17 ± 0.16 และ 1.20 ± 0.37 units mg protein⁻¹ ตามลำดับ

เอนไซม์ superoxide dismutase จัดเป็น antioxidative enzyme ที่ทำหน้าที่ในการกำจัดหรือต้านอนุมูลอิสระ (free radical) อันได้แก่ superoxide anion (O₂⁻) ซึ่งเป็นอนุมูลเริ่มแรกที่เกิดขึ้นจากขบวนการ metabolism ของเซลล์ที่มีการใช้ออกซิเจน และจากกระบวนการ respiratory burst ที่เกิดระหว่างการกำจัดสิ่งแปลกปลอมแบบ phagocytosis หรือ encapsulation ของเซลล์เม็ดเลือด (ภาพที่ 8) (Holmblad and Söderhäll, 1999) โดย peroxinectin จะทำหน้าที่ส่งเสริมการกำจัดสิ่งแปลกปลอม ซึ่งเอนไซม์ NADPH oxidase จะเปลี่ยนโมเลกุลของ oxygen (O₂) เป็น superoxide anion จากนั้นเอนไซม์ superoxide dismutase จะเร่งปฏิกิริยาของ superoxide anion เพื่อให้เปลี่ยนไปเป็น hydrogen peroxide (H₂O₂) โดย peroxinectin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยส่งเสริมกระบวนการ phagocytosis จะเปลี่ยน hydrogen peroxide ให้อยู่ในรูปของ hypochlorous acid (HOCl) เพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม

กลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระนั้น การทำงานของเอนไซม์จะมีความสัมพันธ์กันเป็นห่วงโซ่ โดย superoxide dismutase จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาระหว่าง superoxide anion กับน้ำ ให้เปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide (H₂O₂) และ oxygen (O₂) จากนั้น hydrogen peroxide จะถูกกำจัดต่อโดยเอนไซม์ catalase และเอนไซม์ peroxidase ดังสมการ



ภาพที่ 8 การทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase ระหว่างการทำลายสิ่งแปลกปลอม
โดยเม็ดเลือด (Holmblad and Söderhäll, 1999)



เอนไซม์ superoxide dismutase จะถูกแบ่งกลุ่มตามชนิดโลหะที่อยู่บริเวณแอคทีฟ (active site) เป็น 3 กลุ่ม คือ mitochondria manganese superoxide dismutase (MnSOD) พบใน mitochondria, iron superoxide dismutase (FeSOD) พบในแบคทีเรีย และ copper/zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) พบใน eukaryote โดย CuZnSOD ถูกแบ่งเป็น extracellular และ cytosolic SOD (Holmblad and Söderhäll, 1999)

เลือดเป็นแหล่งของเอนไซม์ superoxide dismutase ชนิด extracellular CuZnSOD (ecCuZnSOD) เพียงชนิดเดียว (Brouwer *et al.*, 2003) เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase ในเลือด (ภาพที่ 7D) พบว่า เอนไซม์มีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดวงจรการลอก

คราบ แต่กิจกรรมเอนไซม์มีค่าต่ำกว่าวัยอื่น ๆ โดยเมื่อเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A_1) เอนไซม์ superoxide dismutase ในเลือดมีค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งอาจเป็นเพราะร่างกายเกิดกระบวนการ phagocytosis เพื่อป้องกันตัวจากจุลชีพในขณะที่ปูลอกคราบ โดย phagocytosis ที่เกิดจากเซลล์เม็ดเลือดชนิด hyaline cell จะก่อให้เกิดอนุมูลจากขั้นตอนการ respiratory burst โดยสิ่งแปลกปลอมจะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา reduction ใน oxygen consumption โดยมี NADPH-oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่บน membrane ของเม็ดเลือด เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิด superoxide anion, hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen (1O_2), hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$) เพิ่มขึ้น (Bachère *et al.*, 1995) โดย ecSOD ที่ถูกผลิตจากเม็ดเลือดและอยู่บริเวณผิวเซลล์ (Brouwer *et al.*, 2003) จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน superoxide anion ให้เป็น hydrogen peroxide โดย ecSOD จับอยู่กับ peroxinectin ที่เป็นโปรตีนที่ส่งเสริมการ phagocytosis ซึ่ง peroxinectin จะเปลี่ยน hydrogen peroxide ให้เป็นสารประกอบที่เป็นพิษ เช่น hypochlorous acid เพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอมต่อไป

ตามรายงานของ Brouwer *et al.*, (2003) พบเอนไซม์ superoxide dismutase 3 ชนิดในตับของปู blue crab (*Callinectes sapidus*) คือ mtMnSOD, cytMnSOD และ ecCuZnSOD โดย mtMnSOD พบทุกระยะของวงจรการลอกคราบ ส่วนเอนไซม์ชนิด cytMnSOD พบว่ามีค่ากิจกรรมสูงในระยะกระดองแข็งปกติ ในขณะที่ ecCuZnSOD พบในระยะก่อนและหลังลอกคราบ และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase ที่พบในตับของปูที่อยู่ระยะกระดองแข็งปกติ (C) จะมีค่ามากกว่าปูที่เข้าสู่ระยะปูกระดาก (papershell crab) สอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่า รูปแบบกิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase ของตับปูทะเลในระยะปกติ มีเอนไซม์สูงสุด ($p < 0.05$) (ภาพที่ 7A) แต่ในระยะอื่น ๆ มีค่ากิจกรรมค่อนข้างคงที่ทั้งวงจรการลอกคราบ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าตับน่าจะทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase บางชนิด ซึ่งคล้ายกับในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ที่ตับเป็นอวัยวะที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ชนิด CuZnSOD (Cheng *et al.*, 2006) ทั้งนี้กิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase ที่เพิ่มขึ้นในตับ น่าจะเป็นผลมาจากการที่ superoxide dismutase ช่วยลดความเป็นพิษของออกซิเจน (Tainer *et al.*, 1991) ที่เกิดจาก metabolism ในร่างกายสัตว์ เนื่องจากตับเป็นอวัยวะที่สะสมอินทรีย์สารและแร่ธาตุหลายชนิด เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรอง (Chang, 1995)

สำหรับเอนไซม์ superoxide dismutase ที่พบในเหงือก (ภาพที่ 7B) มีกิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างคงที่ตลอดวงจร ยกเว้นในระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A_{22}) ซึ่งมีค่าสูงกว่าระยะอื่น ๆ ($p < 0.05$) อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ superoxide dismutase ในเหงือกแสดงบทบาทในการ

ทำลาย O_2^- ในระหว่างกระบวนการหายใจ (respiration) ทั้งนี้เหงือกเป็นอวัยวะที่ใช้ในการขนส่งออกซิเจน โดยทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยวิธีการแพร่ (ประจวบ, 2538) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mangum *et al.* (1985) ที่พบว่า ความดันออกซิเจนภายนอก (blood PO_2) ในเหงือกเพิ่มขึ้นในระยะก่อนลอกคราบ และมีค่าต่ำสุดเมื่อปูกำลังลอกคราบ แต่จะมีค่า blood PO_2 สูงสุดในระยะหลังลอกคราบ นอกจากนี้ในเนื้อเยื่อของเหงือกที่มีแบคทีเรียอยู่ ส่งผลให้เกิดการ phagocytosis ของ hyalinocyte เพิ่มขึ้น (Hauton *et al.*, 1997)

กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase ที่พบในเนื้อเยื่อไค้กระดอง มีกิจกรรมในระยะก่อน (D_1 - D_3) และหลังลอกคราบ (A_1 - $B_{2,4}$) ต่ำกว่าในระยะปกติ (C) แต่อย่างไรก็ตาม แนวโน้มของกิจกรรมเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D_1) ถึงระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง ($A_{2,2}$) อย่างเห็นได้ชัดเจน ($p<0.05$) ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาของ Mangum *et al.* (1985) และ Skinner (1962) ที่อธิบายว่า ปริมาณ oxygen ของเนื้อเยื่อไค้กระดองในชั้น epidermis ของปู จะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ (D_3) จนถึงระยะหลังลอกคราบใหม่ ๆ (A_1) ซึ่งมีปริมาณ oxygen uptake สูงกว่าปูปกติ โดยปริมาณ oxygen ที่เพิ่มขึ้น เกิดจากกิจกรรมเมตาบอลิซึม (metabolic activity) ในช่วงสร้างกระดองใหม่ (Mangum *et al.*, 1985) ซึ่งพบว่า มีการสร้าง glycogen ในเนื้อเยื่อไค้กระดองเพิ่มขึ้นในช่วงก่อนการลอกคราบ เนื่องจากปูเกิดการย่อยและดึงกลับสารอินทรีย์จากกระดองเก่า เพื่อสร้างกระดองใหม่ขึ้นมาแทน โดยมีเลือดเป็นแหล่งของกลูโคส (Skinner, 1962)

3. ชนิดและปริมาณ carotenoid ในอวัยวะต่าง ๆ ของปูทะเล

3.1 ชนิดและปริมาณ carotenoid ในตับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณ carotenoid ในตับของปู พบว่า มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.42 ± 0.16 ถึง 5.30 ± 0.99 $\mu\text{g/g}$ wet weight (ตารางที่ 4, ภาพที่ 9A) ระยะกระดองแข็งปกติ (C) พบว่า มีปริมาณ carotenoid เท่ากับ 2.97 ± 0.86 $\mu\text{g/g}$ wet weight ซึ่งปริมาณ carotenoid จะเริ่มลดลงตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D_1) (2.62 ± 0.88 $\mu\text{g/g}$ wet weight) จนถึงระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D_2) (1.53 ± 0.11 $\mu\text{g/g}$ wet weight) แต่เมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_3) พบว่า ปริมาณ carotenoid ในตับกลับเพิ่มสูงขึ้นเป็น 5.12 ± 0.21 $\mu\text{g/g}$ wet weight และสูงสุดที่ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A_1) (5.30 ± 0.99 $\mu\text{g/g}$ wet weight) หลังจากนั้นปริมาณ carotenoid ค่อย ๆ ลดลงจนมีปริมาณเท่ากับ 1.95 ± 1.63 $\mu\text{g/g}$ wet weight ในระยะหลังลอกคราบ 10 วัน ($B_{2,4}$)

เมื่อแยกชนิดของ carotenoid ในตับของปูทะเลตลอดวงจรการลอกคราบ (ตารางที่ 5, ภาพที่ 10A) ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า ตับประกอบด้วย carotenoid 2 ชนิด คือ astaxanthin และ β -carotene โดย astaxanthin มีปริมาณอยู่ระหว่าง 0.05-0.42 $\mu\text{g/g}$ wet weight และ β -carotene มีปริมาณอยู่ระหว่าง 0.32-4.98 $\mu\text{g/g}$ wet weight

ปริมาณ astaxanthin ของตับในระยะกระดองแข็งปกติมีปริมาณเท่ากับ 0.15 $\mu\text{g/g}$ wet weight เมื่อเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D_1) มีปริมาณเท่ากับ 0.06 $\mu\text{g/g}$ wet weight ซึ่งปริมาณ astaxanthin ลดลงจากระยะกระดองแข็งปกติถึง 2 เท่า และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อปูเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D_2) (0.15 $\mu\text{g/g}$ wet weight) astaxanthin มีปริมาณสูงสุดในระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_3) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.42 $\mu\text{g/g}$ wet weight หลังจากเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ สามารถตรวจสอบ astaxanthin ได้เพียง 3 ระยะ คือ ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A_1) (0.11 $\mu\text{g/g}$ wet weight) ระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง ($A_{2,2}$) (0.13 $\mu\text{g/g}$ wet weight) และระยะหลังลอกคราบ 10 วัน ($B_{2,4}$) (0.05 %) ส่วนระยะอื่น ๆ ที่เหลือมีปริมาณที่ต่ำมาก

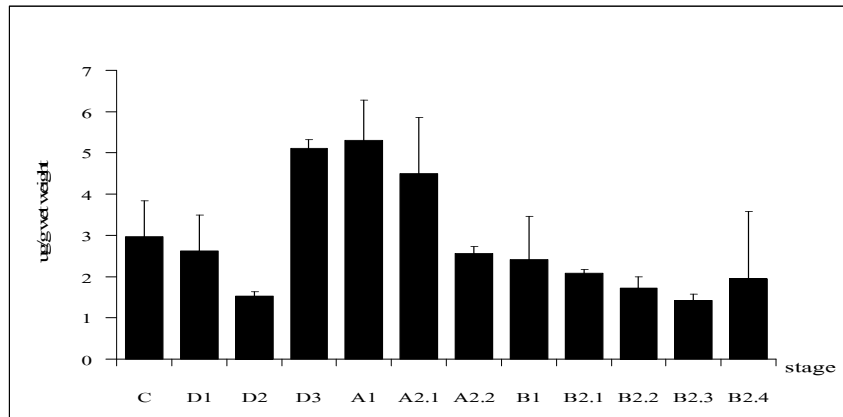
ในขณะที่ปริมาณ β -carotene ในตับปูค่อนข้างแปรปรวนตลอดวงจรการลอกคราบ กล่าวคือ ในระยะปูกระดองแข็งปกติมีปริมาณเท่ากับ 2.68 $\mu\text{g/g}$ wet weight เมื่อเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D_2) พบว่า β -carotene ลดลง เท่ากับ 1.89 $\mu\text{g/g}$ wet weight และเมื่อผ่านเข้าระยะ

ตารางที่ 4 ปริมาณ carotenoid ในอวัยวะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

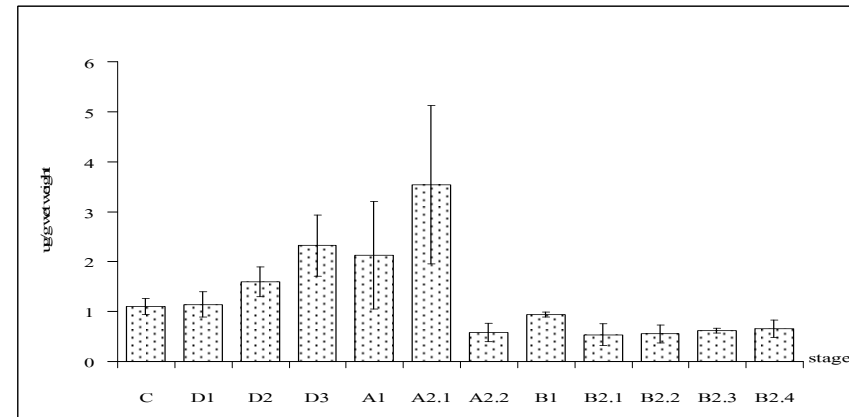
ระยะ	ปริมาณ carotenoid			
	(µg/g wet weight หรือ µg/ml haemolymph)			
	ตับ	เหงือก	เนื้อเยื่อใต้กระดอง	เลือด
ปกติ (C)	2.97±0.86	1.10±0.16	53.43±0.98 ^a	0.44±0.21
ก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D ₁)	2.62±0.88	1.14±0.25	42.82±7.07 ^b	0.26±0.13
ก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D ₂)	1.53±0.11 ^b	1.60±0.30	26.75±7.42 ^c	0.42±0.13
ก่อนลอกคราบ 2 วัน (D ₃)	5.12±0.21	2.32±0.62 ^b	34.80±5.40	1.03±0.33
หลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A ₁)	5.30±0.99 ^a	2.13±1.08	17.52±4.34	1.31±0.69 ^a
หลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A _{2,1})	4.49±1.36	3.54±1.58 ^a	12.48±2.07	0.25±0.06
หลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A _{2,2})	2.56±0.18	0.58±0.19	16.29±6.64	0.13±0.05
หลังลอกคราบ 2 วัน (B ₁)	2.42±1.04	0.94±0.04	12.01±5.85	0.08±0.02
หลังลอกคราบ 3 วัน (B _{2,1})	2.08±0.09	0.53±0.22 ^c	19.06±4.83	0.08±0.03
หลังลอกคราบ 5 วัน (B _{2,2})	1.72±0.27	0.55±0.18	22.45±2.65	0.05±0.02 ^b
หลังลอกคราบ 7 วัน (B _{2,3})	1.42±0.16	0.62±0.05	20.47±1.02	0.09±0.03
หลังลอกคราบ 10 วัน (B _{2,4})	1.95±1.63	0.65±0.17	11.75±2.64 ^d	0.29±0.12

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (superscript) ในคอลัมน์เดียวกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

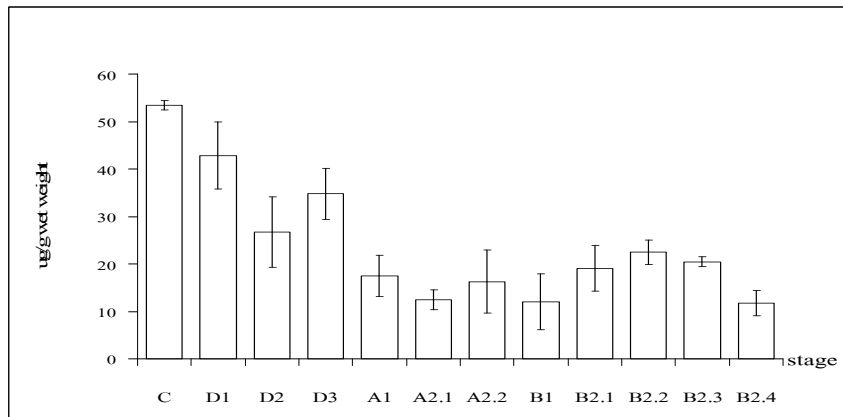
ก่อนลอกคราบ 2 วัน (D₃) β-carotene กลับเพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.94 µg/g wet weight แต่หลังจากปูลอกคราบเสร็จแล้ว β-carotene ลดลงเกือบ 3 เท่า (0.54 µg/g wet weight) ในระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) ซึ่งหลังจากนั้นปริมาณ β-carotene ไม่คงที่ โดยพบว่าในระยะหลังลอกคราบ 5 วัน (B_{2,2}) มี β-carotene สูงสุดเท่ากับ 4.98 µg/g wet weight



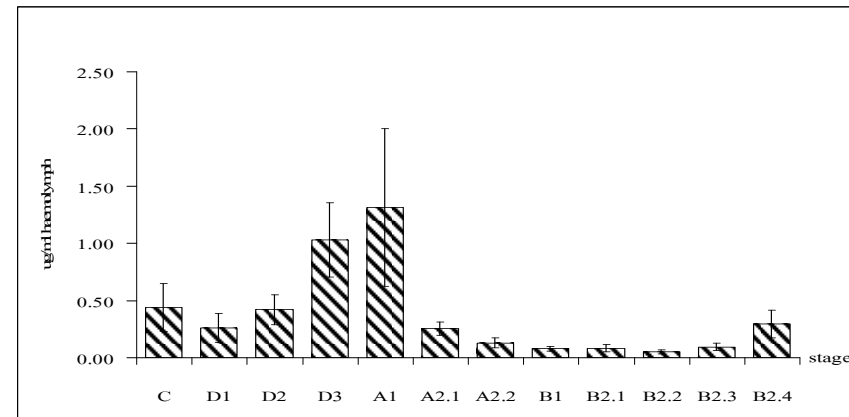
(A)



(B)



(C)



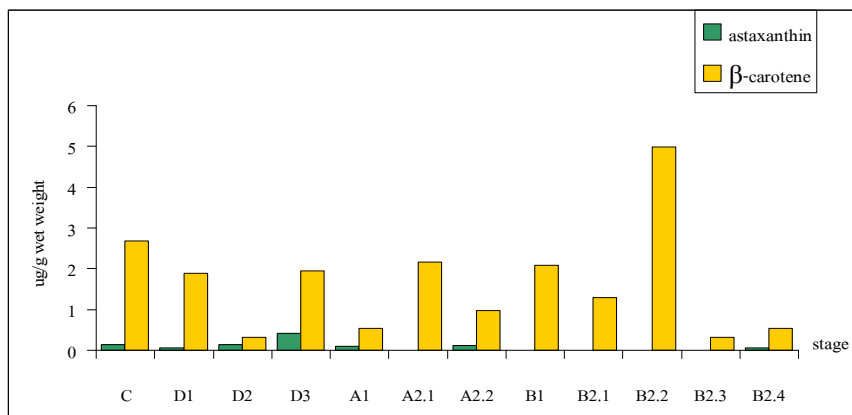
(D)

ภาพที่ 9 ปริมาณ carotenoid ในตัว (A) เหยือก (B) เนื้อเยื่อใต้กระดอง (C) และเลือด (D) ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

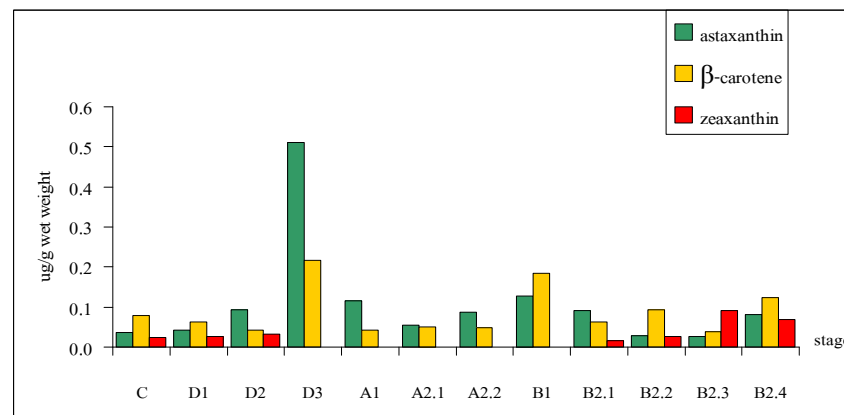
ตารางที่ 5 ชนิดของ carotenoid ที่พบในอวัยวะต่าง ๆ ตลอดจนผลการลอกคราบของปูทะเล

ระยะ	ปริมาณ carotenoid (μg/g wet weight หรือ μg/ml haemolymph)								
	ตับ		เหงือก		เนื้อเยื่อใต้กระดอง			เลือด	
	astaxanthin	β-carotene	astaxanthin	β-carotene	zeaxanthin	astaxanthin	unknown	astaxanthin	β-carotene
ปกติ (C)	0.15	2.68	0.04	0.08	0.02	0.83	2.37	0.31	0.08
ก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D ₁)	0.06	1.89	0.04	0.06	0.03	0.34	6.25	0.06	0.03
ก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D ₂)	0.15	0.32	0.09	0.04	0.03	0.55	0.53	0.07	nd
ก่อนลอกคราบ 2 วัน (D ₃)	0.42	1.94	0.51	0.22	nd	1.28	2.72	0.11	0.02
หลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A ₁)	0.11	0.54	0.12	0.04	nd	0.48	0.80	0.12	0.01
หลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A _{2,1})	nd	2.16	0.06	0.05	nd	0.47	1.15	0.03	nd
หลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A _{2,2})	0.13	0.98	0.09	0.05	nd	0.23	0.27	0.05	0.01
หลังลอกคราบ 2 วัน (B ₁)	nd	2.08	0.13	0.18	nd	0.38	1.15	0.06	nd
หลังลอกคราบ 3 วัน (B _{2,1})	nd	1.29	0.09	0.06	0.02	0.74	1.53	0.05	nd
หลังลอกคราบ 5 วัน (B _{2,2})	nd	4.98	0.03	0.09	0.03	0.02	0.44	0.04	0.01
หลังลอกคราบ 7 วัน (B _{2,3})	nd	0.32	0.03	0.04	0.09	0.11	1.31	0.06	0.01
หลังลอกคราบ 10 วัน (B _{2,4})	0.05	0.54	0.08	0.12	0.07	0.21	0.59	0.28	0.05

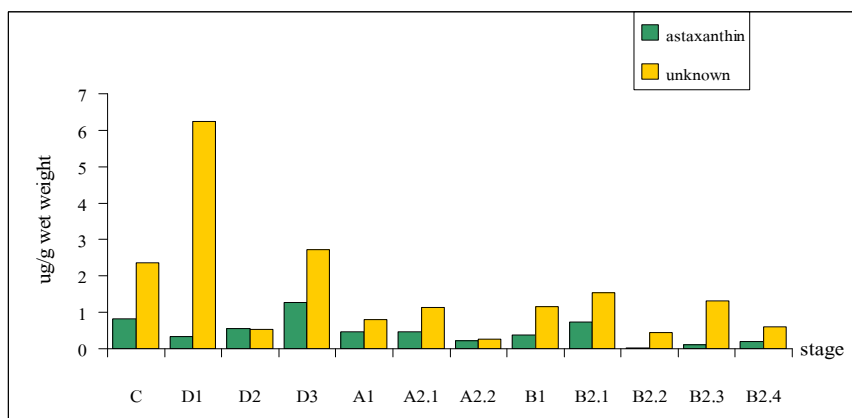
หมายเหตุ: nd = not detected



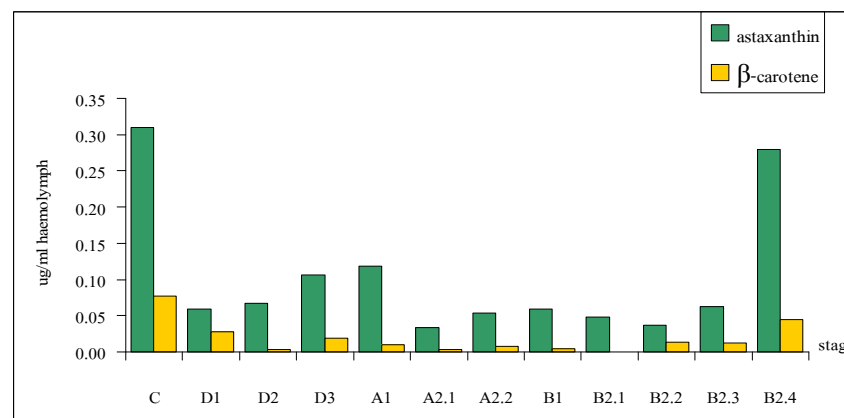
(A)



(B)



(C)



(D)

ภาพที่ 10 ปริมาณ astaxanthin, β -carotene และ zeaxanthin ในตับ (A) เหนือก (B) เนื้อเยื่อใต้กระดอง (C) และเลือด (D) ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

3.2 ชนิดและปริมาณ carotenoid ในเหงือก

จากการวิเคราะห์ปริมาณ carotenoid ในเหงือกพบว่า มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 0.53 ± 0.22 ถึง 3.54 ± 1.58 $\mu\text{g/g wet weight}$ (ตารางที่ 4, ภาพที่ 9B) ซึ่งปลูกระดองแข็งปกติ (C) มีปริมาณ carotenoid เท่ากับ 1.10 ± 0.16 $\mu\text{g/g wet weight}$ โดยปริมาณ carotenoid เริ่มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D_1) (1.14 ± 0.25 $\mu\text{g/g wet weight}$) ผ่านระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_3) (2.32 ± 0.62 $\mu\text{g/g wet weight}$) จนเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง ($A_{2,1}$) ซึ่งมีปริมาณ carotenoid สูงสุดเท่ากับ 3.54 ± 1.58 $\mu\text{g/g wet weight}$ แต่ปริมาณ carotenoid กลับลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง ($A_{2,2}$) (0.58 ± 0.19 $\mu\text{g/g wet weight}$) หลังจากนั้น carotenoid มีปริมาณค่อนข้างคงที่จนถึงระยะหลังลอกคราบ 10 วัน ($B_{2,4}$)

สำหรับผลการวิเคราะห์ชนิด carotenoid ในเหงือก (ตารางที่ 5, ภาพที่ 10B) พบว่ามี 3 ชนิด ได้แก่ astaxanthin (0.03 - 0.51 $\mu\text{g/g wet weight}$), β -carotene (0.04 - 0.22 $\mu\text{g/g wet weight}$) และ zeaxanthin (0.02 - 0.09 $\mu\text{g/g wet weight}$) โดยในระยะปลูกระดองแข็งปกติ (C) ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 0.04, 0.08 และ 0.02 ตามลำดับ โดยปริมาณ astaxanthin เริ่มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D_2) (0.09 $\mu\text{g/g wet weight}$) จนกระทั่งเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_3) ที่มีการสะสมของ astaxanthin สูงสุดเท่ากับ 0.51 $\mu\text{g/g wet weight}$ โดยหลังจากปูลอกคราบเสร็จแล้ว (A_1) กลับพบว่า astaxanthin ของเหงือกลดลงเกือบ 5 เท่า (0.12 $\mu\text{g/g wet weight}$)

ส่วนการสะสม β -carotene ในเหงือกพบว่า เมื่อปูเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D_1) (0.06 $\mu\text{g/g wet weight}$) ถึง 1 สัปดาห์ (D_2) (0.04 $\mu\text{g/g wet weight}$) ปริมาณ β -carotene มีค่าค่อนข้างคงที่ โดยปริมาณ β -carotene ในระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_3) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.22 $\mu\text{g/g wet weight}$ เมื่อเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A_1) พบว่า ปริมาณ β -carotene ลดลงเหลือ 0.04 $\mu\text{g/g wet weight}$ และมีค่าคงที่จนถึงระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง ($A_{2,2}$) (0.05 $\mu\text{g/g wet weight}$) หลังจากนั้นปริมาณ β -carotene ในเหงือกค่อนข้างแปรปรวน

สำหรับ zeaxanthin ในเหงือกพบว่า มีปริมาณคงที่ระหว่างระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D_1) ถึง 1 สัปดาห์ (D_2) เท่ากับ 0.03 $\mu\text{g/g wet weight}$ แต่ไม่พบ zeaxanthin เมื่อเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_3) ถึงระยะหลังลอกคราบ 2 วัน (B_1) หลังจากนั้น zeaxanthin เริ่มปรากฏอีก

ครั้งในช่วงระยะหลังลอกคราบ 3 วัน ($B_{2,1}$) ถึงระยะหลังลอกคราบ 10 วัน ($B_{2,4}$) โดยมีปริมาณสูงสุดเท่ากับ $0.09 \mu\text{g/g wet weight}$ ในระยะหลังลอกคราบ 7 วัน ($B_{2,3}$)

3.3 ชนิดและปริมาณ carotenoid ในเนื้อเยื่อใต้กระดอง

จากการวิเคราะห์ carotenoid ในเนื้อเยื่อใต้กระดองพบว่า มีปริมาณเฉลี่ยระหว่าง 11.75 ± 2.64 ถึง $53.43 \pm 0.98 \mu\text{g/g wet weight}$ (ตารางที่ 4, ภาพที่ 9C) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) พบว่า เนื้อเยื่อใต้กระดองมีปริมาณ carotenoid สูงสุดเท่ากับ $53.43 \pm 0.98 \mu\text{g/g wet weight}$ ปริมาณ carotenoid ในเนื้อเยื่อใต้กระดองเริ่มลดลงตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D_1) ($42.82 \pm 7.07 \mu\text{g/g wet weight}$) จนถึงระยะก่อนการลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D_2) ($26.75 \pm 7.42 \mu\text{g/g wet weight}$) ก่อนจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย เมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_3) ($34.80 \pm 5.40 \mu\text{g/g wet weight}$) โดยหลังจากปูลอกคราบแล้ว (A_1 - $B_{2,4}$) พบว่า carotenoid ยังคงมีแนวโน้มลดลง โดยมีปริมาณ carotenoid เฉลี่ยระหว่าง 11.75 ± 2.64 ถึง $22.45 \pm 2.65 \mu\text{g/g wet weight}$

เมื่อวิเคราะห์เนื้อเยื่อใต้กระดองของปูพบ carotenoid 2 ชนิด (ตารางที่ 5, ภาพที่ 10C) ได้แก่ astaxanthin และ unknown โดยมีปริมาณอยู่ระหว่าง 0.02 - $1.28 \mu\text{g/g wet weight}$ และ 0.27 - $6.25 \mu\text{g/g wet weight}$ ตามลำดับ โดยพบว่า astaxanthin ในระยะกระดองแข็งปกติ (C) มีค่าเท่ากับ $0.83 \mu\text{g/g wet weight}$ แต่ปริมาณ astaxanthin มีค่าลดลงกว่า 2 เท่า เมื่อปูเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D_1) ($0.55 \mu\text{g/g wet weight}$) หลังจากนั้นปริมาณ astaxanthin ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่อผ่านระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D_2) ($0.55 \mu\text{g/g wet weight}$) จนกระทั่งมีปริมาณ astaxanthin สูงสุดเท่ากับ $1.28 \mu\text{g/g wet weight}$ ในระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_3) ภายหลังจากปูลอกคราบแล้ว พบว่า ปริมาณ astaxanthin ลดลงเกือบ 3 เท่า ($0.48 \mu\text{g/g wet weight}$) ในระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A_1) ซึ่งหลังจากนั้น astaxanthin มีปริมาณค่อนข้างที่จนถึงระยะหลังลอกคราบ 10 วัน ($B_{2,4}$)

สำหรับรูปแบบของ unknown พบว่า มีความแปรปรวนตลอดวงจรการลอกคราบ กล่าวคือ เมื่อเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D_1) พบว่า ปริมาณ unknown เพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ $6.25 \mu\text{g/g wet weight}$ แต่ปริมาณ unknown ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D_2) และ 2 วัน (D_3) เท่ากับ 0.53 และ $2.72 \mu\text{g/g wet weight}$ ตามลำดับ ซึ่งหลังจากปูลอกคราบแล้วพบว่า unknown มีปริมาณอยู่ระหว่าง 0.27 - $1.53 \mu\text{g/g wet weight}$

3.4 ชนิดและปริมาณ carotenoid ในเลือด

จากการวิเคราะห์ปริมาณ carotenoid ในเลือดตลอดวงจรการลอกคราบ มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.05 ± 0.02 ถึง 1.31 ± 0.69 $\mu\text{g/ml}$ haemolymph (ตารางที่ 4, ภาพที่ 9D) ซึ่งในปูกระดองแข็งปกติ (C) พบปริมาณ carotenoid เท่ากับ 0.44 ± 0.21 $\mu\text{g/ml}$ haemolymph โดยปริมาณ carotenoid จะเพิ่มขึ้นอย่างคงที่ตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D_1) (0.26 ± 0.13 $\mu\text{g/ml}$ haemolymph) ผ่านระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_3) (1.03 ± 0.33 $\mu\text{g/ml}$ haemolymph) จนถึงระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A_1) (1.31 ± 0.69 $\mu\text{g/ml}$ haemolymph) ซึ่งเป็นปริมาณ carotenoid สูงสุด จากนั้นปริมาณ carotenoid ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง ($A_{2,1}$)

ผลการวิเคราะห์ชนิด carotenoid ในเลือด (ตารางที่ 5, ภาพที่ 10D) พบ 2 ชนิด คือ astaxanthin และ β -carotene ที่มีปริมาณอยู่ระหว่าง 0.03 - 0.31 $\mu\text{g/g}$ wet weight และ 0.01 - 0.08 $\mu\text{g/g}$ wet weight ตามลำดับ โดยรูปแบบการสะสม astaxanthin พบว่า ในปูกระดองแข็งปกติ (C) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.31 $\mu\text{g/g}$ wet weight ซึ่งเมื่อเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D_1) พบว่าปริมาณ astaxanthin ลดลงกว่า 5 เท่า (0.06 $\mu\text{g/g}$ wet weight) หลังจากนั้น astaxanthin มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนผ่านระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_3) (0.11 $\mu\text{g/g}$ wet weight) และเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A_1) (0.12 $\mu\text{g/g}$ wet weight) แต่ในระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง ($A_{2,1}$) พบว่า ปริมาณ astaxanthin ลดลงถึง 4 เท่า (0.03 $\mu\text{g/g}$ wet weight) โดยหลังจากนั้น astaxanthin มีค่าคงที่จนถึงระยะหลังลอกคราบ 7 วัน ($B_{2,3}$) แต่ปริมาณ astaxanthin จะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 10 วัน ($B_{2,4}$) (0.28 $\mu\text{g/g}$ wet weight) ตรงข้ามกับ β -carotene ในเลือดมีปริมาณค่อนข้างต่ำตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D_1) (0.03 $\mu\text{g/g}$ wet weight) ผ่านระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_3) (0.02 $\mu\text{g/g}$ wet weight) โดยในระหว่างระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A_1) ถึงระยะหลังลอกคราบ 7 วัน ($B_{2,3}$) ซึ่งแทบไม่พบ β -carotene เลย แต่ปรากฏ β -carotene อีกครั้งในระยะหลังลอกคราบ 10 วัน ($B_{2,4}$) (0.05 $\mu\text{g/g}$ wet weight)

carotenoid เป็นรงควัตถุกลุ่มหลักที่สะสมในเซลล์ผิวหนังชั้นนอก (epidermis) หรือในโครมาโตฟอร์ (chromatophores) โดย carotenoid พบในเนื้อเยื่อ peripheral tissues ที่อยู่ในอวัยวะต่าง ๆ ของสัตว์ (Ghidalia, 1985) เช่น ตา ปลีอก ตับ เลือด และรังไข่ (Bauernfeind, 1981) ซึ่งรงควัตถุกลุ่มนี้มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลักและมีโครงสร้างจัดอยู่ในกลุ่ม

เตตราเทอฟินอยด์ โดยพืชและจุลชีพ (microorganisms) สามารถสังเคราะห์ carotenoid ได้ แต่สัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง (Rock, 1997)

สำหรับรูปแบบการสะสม carotenoid ในเลือดจากภาพที่ 9D แสดงให้เห็นว่า ปริมาณ carotenoid มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ปูอยู่ในระยะก่อนลอกคราบ (D_1 - D_3) ถึงระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A_1) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แตกต่างกับผลการศึกษาในปูเสฉวน (hermit crab, *Clibanarius erythropus*) ที่พบว่า ปูระยะกระดองแข็งปกติมีปริมาณ carotenoid สูงสุด ส่วนรูปแบบ carotenoid ที่พบในเหงือก (ภาพที่ 4B) มีลักษณะเหมือนกับรูปแบบของเลือด กล่าวคือ ปริมาณ carotenoid เพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะกระดองแข็งปกติและมีค่าสูงสุดในระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง ($A_{2,1}$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบว่า astaxanthin เป็น carotenoid หลักที่สะสมอยู่ในเลือดและเหงือกของปูทุกระยะ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Greenberg (1968) ที่พบว่า เลือดและเหงือกเป็นอวัยวะที่มีการสะสม carotenoid ชนิด astaxanthin เป็นส่วนใหญ่ โดยจากภาพที่ 10B และ 10D แสดงให้เห็นว่า ปริมาณของ astaxanthin ในเลือดและเหงือกเริ่มเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ปูพัฒนาเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ (D_1 - D_3) จนกระทั่งปูทำการลอกคราบเก่าออกเป็นปูใหม่ (A_1) และปูกระดาก ($A_{2,1}$) ซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบของปริมาณ carotenoid ที่พบในเลือดและเหงือก

การที่ปริมาณ carotenoid และปริมาณของ astaxanthin ของเลือดสูงขึ้นในระยะก่อนลอกคราบ (D_1 - D_3) และระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A_1) น่าจะเป็นเพราะว่า เลือดเป็นแหล่งหมุนเวียนและทำหน้าที่ในการขนส่ง carotenoid และสารอินทรีย์ที่สำคัญจากอวัยวะหนึ่งไปยังอีกอวัยวะหนึ่งในระยะก่อนการลอกคราบ ซึ่งเป็นระยะที่ปูเริ่มสร้างกระดองใหม่ และกระดองเก่าเริ่มแยกตัวออก ดังนั้นเพื่อมิให้สารอินทรีย์ที่จำเป็นต้องลอกทิ้งไปพร้อมกับกระดองเก่า จึงทำให้ปูต้องลำเลียงสารอินทรีย์จากกระดองเก่าไปสู่กระดองใหม่ผ่านทางเลือด (Ghidalia, 1985) ด้วยเหตุผลเหล่านี้ จึงอาจส่งผลให้ปริมาณ carotenoid และปริมาณของ astaxanthin ที่พบในเหงือกเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ (D_1 - D_3) จนผ่านเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง ($A_{2,1}$) นอกจากนี้ยังพบว่า เหงือกเป็นเนื้อเยื่อเพียงชนิดเดียวที่พบการสะสม zeaxanthin ในเกือบทุกระยะ ยกเว้นระยะก่อนลอกคราบ (D_3) ถึงระยะหลังลอกคราบ 2 วัน (B_1) โดย Tanaka *et al.* (1976) อธิบายว่า zeaxanthin ที่พบสะสมในกุ้ง prawn, *Penaeus japonicus* ถูกเปลี่ยนมาจาก β -carotene โดย zeaxanthin สามารถเปลี่ยนรูปเป็น astaxanthin ได้

จากภาพที่ 9A แสดงถึงรูปแบบการสะสม carotenoid ในตับที่มีปริมาณค่อนข้างคงที่ตลอดวงจรการลอกคราบ ยกเว้นปูที่อยู่ในระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_2) ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A_1) และระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง ($A_{2,1}$) ที่มีการสะสม carotenoid เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แตกต่างกับ carotenoid ที่พบในตับของปูเสฉวน hermit crab (*C. erythropus*) ที่มีปริมาณ carotenoid น้อยในระยะก่อนลอกคราบ (D) และระยะหลังลอกคราบใหม่ (A_1) เนื่องจากตับเป็นอวัยวะที่ช่วยในการสะสมสารอินทรีย์และแร่ธาตุ โดย carotenoid ที่ลดลงในช่วงก่อนการลอกคราบ อาจเกิดจากตับทำหน้าที่ส่ง carotenoid และสารอาหารที่มีความจำเป็น โดยใช้เลือดเป็นตัวนำไปส่งยังเนื้อเยื่อได้กระดอง เพื่อทำการสร้างกระดองอันใหม่

ในขณะที่ ผลการศึกษา carotenoid ในเนื้อเยื่อได้กระดอง (ภาพที่ 9C) พบว่า มีปริมาณสูงกว่าในเลือดและเนื้อเยื่ออื่น ๆ ซึ่งแสดงว่าเนื้อเยื่อได้กระดองเป็นแหล่งสะสม carotenoid หลักในปูทะเล ซึ่งสอดคล้องกับ Gilchrist and Lee (1967) ที่รายงานว่า บริเวณเนื้อเยื่อได้กระดองเป็นแหล่งที่พบ carotenoid มากที่สุด โดยรูปแบบของการสะสม carotenoid ในเนื้อเยื่อได้กระดองของปูในระยะก่อนลอกคราบ (D_1 - D_3) มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับปูระยะกระดองแข็งปกติ (C) อาจเป็นเพราะเนื้อเยื่อได้กระดองของปูที่อยู่ในระยะก่อนลอกคราบ จะเกิดกระบวนการสะสม การดึงกลับและการสลายตัวของสารอินทรีย์หลายชนิด เพื่อสร้าง cuticle ให้แก่กระดองอันใหม่ โดยหลังจากปูลอกคราบเสร็จแล้วพบว่า แนวโน้มของ carotenoid ในเนื้อเยื่อได้กระดองมีปริมาณลดลงมาก ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับปูระยะกระดองแข็งปกติ (C) ในขณะที่ปริมาณ carotenoid ของตับช่วงใกล้ลอกคราบ (D_3) จนกระทั่งถึงระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง ($A_{2,1}$) กลับมีปริมาณ carotenoid เพิ่มขึ้นสูงมาก ($p<0.05$) อาจเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของ carotenoid ที่เกิดขึ้นในอวัยวะทั้งสองนี้มีความสัมพันธ์กัน

สำหรับผลการศึกษาชนิด carotenoid พบว่า β -carotene มีการสะสมมากในตับ (ภาพที่ 10A) สอดคล้องกับรายงานของ Katayama *et al.* (1971) ที่พบว่า ตับเป็นเนื้อเยื่อที่มีปริมาณ carotenoid ชนิด β -carotene มากที่สุด โดยรูปแบบการสะสมของ β -carotene ค่อนข้างมีความแปรปรวนตลอดวงจรการลอกคราบ แตกต่างจากผลการศึกษา carotenoid ในเนื้อเยื่อได้กระดองที่พบว่าเป็นชนิด astaxanthin ซึ่งผลที่ได้เหมือนกับรายงานของ Gilchrist and Lee (1967) และ Greenberg (1968) ที่พบว่า บริเวณเนื้อเยื่อได้กระดองเป็นส่วนที่มีการสะสม astaxanthin เป็นหลัก (60-90%) โดยจะพบในรูปของ esterified form (Sagi *et al.*, 1995) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า unknown ที่พบในเนื้อเยื่อได้กระดองนี้ อาจเป็น carotenoid ชนิด esterified astaxanthin นอกจากนี้

เป็นที่น่าสังเกตว่า ปริมาณ β -carotene ที่ลดลงในตับอาจเกิดจากการเปลี่ยนรูปไปเป็น astaxanthin เพื่อส่งไปสะสมยังเนื้อเยื่อได้กระดองในระหว่างเกิดกระบวนการลอกคราบ

สรุป

1. จำนวนเม็ดเลือดรวม

จากการศึกษาจำนวนเม็ดเลือดรวมในปูทะเลตลอดวงจรการลอกคราบพบว่า ระยะหลังลอกคราบมีจำนวนเม็ดเลือดรวมโดยเฉลี่ยสูงกว่าระยะก่อนลอกคราบ โดยจำนวนเม็ดเลือดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น 2 ช่วง คือ ช่วงระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ ถึงระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง และช่วงระยะหลังลอกคราบ 2 วัน ถึงระยะหลังลอกคราบ 5 วัน โดยเม็ดเลือดทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ prophenoloxidase สังเคราะห์น้ำตาล และมีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกัน

2. กิจกรรมเอนไซม์

2.1 กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase

รูปแบบกิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ในตับพบว่า มีค่าค่อนข้างต่ำตลอดวงจรการลอกคราบ เมื่อเปรียบเทียบกับในเหงือก เนื้อเยื่อได้กระดอง และเลือด โดยกิจกรรมในตับของปูระยะกระดองแข็งปกติมีค่าสูงสุด สำหรับกิจกรรมเอนไซม์ในเหงือกพบว่า กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase มีค่าค่อนข้างสูงตลอดวงจรการลอกคราบ ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ในเนื้อเยื่อได้กระดองมีค่าแปรปรวนตลอดวงจรการลอกคราบ ส่วนเลือดพบว่า กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ในระยะก่อนลอกคราบมีกิจกรรมค่อนข้างคงที่และมีค่าน้อยกว่าระยะหลังลอกคราบ ซึ่งเอนไซม์ phenoloxidase ช่วยเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ sclerotization, melanization, calcification ในกระดอง และช่วยทำลายสิ่งแปลกปลอมในระบบภูมิคุ้มกันของปูทะเล

2.2 กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase

สำหรับกิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase พบว่า ตับมีค่ากิจกรรมค่อนข้างคงที่ตลอดวงจรการลอกคราบ ยกเว้นในระยะปูกระดองแข็งปกติที่มีค่าสูงมาก ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ในเหงือกมีค่ากิจกรรมค่อนข้างสูงตลอดวงจรการลอกคราบ แต่กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase ในเนื้อเยื่อได้กระดองพบว่า มีค่ากิจกรรมค่อนข้างแปรปรวนตลอดวงจรการลอกคราบ ในขณะที่รูปแบบกิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase ของเลือดในระยะก่อนลอก

ทราบพบว่า กิจกรรมเอนไซม์มีรูปแบบค่อนข้างคงที่และมีค่าน้อยกว่าระยะหลังลอกคราบ โดยเอนไซม์ superoxide dismutase จะช่วยกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดจากขบวนการ metabolism และกระบวนการ respiratory burst ในระหว่างการทำลายจุลชีพแบบ phagocytosis ของเซลล์เม็ดเลือด

3. ปริมาณ carotenoid

ตัวบ่งชี้การสะสม carotenoid ในรูป β -carotene เป็นหลัก โดยปริมาณ carotenoid ที่สะสมมีค่าค่อนข้างแปรปรวน เนื่องจากตัวบ่งชี้เป็นอวัยวะที่สะสมสารอินทรีย์ ซึ่งจะถูกดึงมาใช้ในระหว่างที่มีการลอกคราบ ส่วนเหงือกสะสม carotenoid 3 ชนิด คือ astaxanthin, β -carotene และ zeaxanthin ในขณะที่ carotenoid หลักที่พบในเลือด คือ astaxanthin โดยเหงือกและเลือดมีรูปแบบของปริมาณ carotenoid ที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ปริมาณ carotenoid มีค่าสูงในระยะหลังลอกคราบใหม่ ๆ โดยเลือดมีบทบาทในการขนส่ง carotenoid จากอวัยวะหนึ่งไปยังอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย สำหรับ carotenoid ที่พบในเนื้อเยื่อได้กระดองเป็นชนิด astaxanthin ซึ่งเนื้อเยื่อได้กระดองมีการสะสม carotenoid สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับอวัยวะอื่น ๆ โดยปริมาณ carotenoid สูงสุดพบในปฏะกระดองแข็งปกติ ทั้งนี้ carotenoid จะถูกเก็บสะสมไว้ภายในโครมาโตเฟอร์

ข้อเสนอแนะ

1. ผลการศึกษาจำนวนเม็ดเลือดรวมและกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และ superoxide dismutase สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและระบบภูมิคุ้มกันของปูทะเลตลอดวงจรการลอกคราบได้
2. เนื่องจากปริมาณ carotenoid โดยเฉพาะชนิด astaxanthin ในเนื้อเยื่อได้กระดองมีค่าค่อนข้างสูง จึงน่าจะมีการนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์น้ำ
3. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณ carotenoid ในระบบภูมิคุ้มกันของปูทะเลตลอดวงจรการลอกคราบต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมประมง. 2551. Available Source: <http://www.fisheries.go.th/foreign/doc/excel/totalexportm.xls>. กุมภาพันธ์ 2552.
- ชลธิ์ ชีวะเศรษฐกรรม. 2539. การเพาะเลี้ยงปูทะเล. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.
- บรรจง เทียนส่งรัมย์ และ บุญรัตน์ ประทุมชาติ. 2545. ปูทะเล: ชีววิทยา การอนุรักษทรัพยากร และการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์แบบยั่งยืน. สำนักงานกองทุนสนับสนุนวิจัย, กรุงเทพฯ.
- ประจวบ หล้าอุบล. 2538. สรีรวิทยาของกุ้ง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Adachi, K., H. Endo, T. Watanabe, T. Nishioka and T. Hirata. 2004. Hemocyanin in the exoskeleton of crustaceans: enzymatic properties and immunolocalization. **Pigm. Cell Res.** 18: 136-143.
- Adachi, K., T. Hirata, T. Nishioka and M. Sakaguchi. 2003. Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. **Comp. Biochem. Physiol.** 134B: 135-141.
- Aggarwal, S., M. Subberwal, S. Kumar and M. Sharma. 2006. Brain tumor and role of β -carotene, α -tocopherol, superoxide dismutase and glutathione peroxidase. **J. Can. Res. Ther.** 2(1): 24-27.
- Bachère, E., E. Mialhe and J. Rodriguez. 1995. Identification of defence effectors in the haemolymph of Crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and applications. **Fish Shellfish Immunol.** 5: 597-612.
- Barne, R.D. 1987. **Invertebrate Zoology**. CBS College Publishing, New York.

Bauernfeind, J.C. 1981. **Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors: Technological and Nutritional Applications**. Academic Press, New York.

Ben Best. 2009. Astaxanthin. Available Source: <http://www.benbest.com/nutrceut/phytochemicals.html>

Brouwer, M., T.H. Brouwer, W. Grater and N.B. Peterson. 2003. Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport. **Biochem. J.** 374: 219-228.

Buda, E.S. and T.H. Shafer. 2005. Expression of a serine proteinase homolog prophenoloxidase-activating factor from the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 140B: 521-531.

Burgents, J.E., L.E. Burnett, E.V. Stabb and K.G. Burnett. 2005. Localization and bacteriostasis of *Vibrio* introduced into the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Dev. Comp. Immunol.** 29: 681-691.

Campa-Córdova, A.I., N.Y. Hernández-Saavedra and F. Ascencio. 2002. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Comp. Biochem. Physiol.** 133C: 557-565.

———, ———, G. Aguirre-Guzmán and F. Ascencio. 2005. Immunomodulatory response of superoxide dismutase in juvenile American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to immunostimulants. **Cienc. Mar.** 31 (4): 661-669.

Cárdenas, W., J.R. Dankert and J.A. Jenkins. 2004. Flow cytometric analysis of crayfish haemocytes activated by lipopolysaccharides. **Fish Shellfish Immunol.** 17: 223-233.

- Ceccaldi, H.J. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of crustaceans decapods reared in aquaculture. **Adv. Trop. Aqua.** 9 : 243-259.
- Cerenius, L., B.L. Lee and K. Söderhäll. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends Immunol.** 29(6): 263-271.
- Chang, E.S. 1995. Physiological and biochemical changes during the molt cycle in decapod crustaceans: an overview. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 193: 1-14.
- Cheng, W. and J.C. Chen. 2001. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the haemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish Shellfish Immunol.** 11: 53- 63.
- , L.U. Wang and J.C. Chen. 2005. Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. **Aquaculture** 250: 592-601.
- , Y.S. Tung, C.H. Liu and J.C. Chen. 2006. Molecular cloning and characterization of copper/zinc superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish Shellfish Immunol.** : 1-11.
- Christopher, A.T., E.B. Louis and G.B. Karen. 2006. The effects of hypoxia and pH on phenoloxidase activity in Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 144A: 218-223.
- Chung, J.S. 2008. A trehalose 6-phosphate synthase gene of the hemocytes of the blue crab, *Callinectes sapidus*: cloning, the expression, its enzyme activity and relationship to hemolymph trehalose levels. **Saline Systems** 4(18): 1-8.

- Czeczuga, B. 1971. Composition and tissue distribution of carotenoids and vitamin A in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Esch.) (Crustacea, Decapoda). **Comp. Biochem. Physiol.** 39B: 945-953.
- Dai, A. and S. Yang. 1991. **Crabs of the China Seas**. China Ocean Press Beijing and Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York & Tokyo.
- Destoumieux, D., M. Muñoz, C. Cosseau, J. Rodriguez, P. Bulet, M. Comps and E. Bachère. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. **J. Cell Sci.** 113: 461-469.
- Ghidalia, W. 1985. Structural and biological aspects of pigments, pp. 301-394. In D.E. Bliss and L.H. Mantel, eds. **The Biology of Crustacea** vol. 9. Academic Press, Inc., London.
- Gilchrist, B.M. and W.L. Lee. 1967. Carotenoids and carotenoid metabolism in *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda). **J. Zool. Lond.** 151: 171-180.
- Greenberg, D.M. 1968. **Metabolic Pathways**. Academic Press, New York.
- Hauton, C., J.A. Williams and L.E. Hawkins. 1997. The effects of a live *in vivo* pathogenic infection on aspects of the immunocompetence of the common shore crab, *Carcinus maenas* (L.). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 211: 115-128.
- , V. Brockton and V.J. Smith. 2006. Cloning of a crustin-like, single whey-acidic-domain, antibacterial peptide from the haemocytes of the European lobster, *Homarus gammarus*, and its response to infection with bacteria. **Mol. Immunol.** 43: 1490-1496.

- Heinz, D., R. Margaret, J. Elmar and T. Nora. 2001. SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. **J. Biol. Chem.** 276: 17796-17799.
- Hernández-López, J., F. Vargas-Albores and T. Gollas-Galván. 1996. Activation of prophenoloxidase system of brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). **Comp. Biochem. Physiol.** 113C (1): 61-66.
- Holmblad, T and K. Söderhäll. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. **Aquaculture** 172: 111-123.
- Hose, J.E., G.G. Martin, S. Tiu and N. Mckrell. 1992. Patterns of hemocyte production and release throughout the molt cycle in the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. **Biol. Bull.** 183: 185-199.
- Huang, X., H. Zhou and H. Zhang. 2006. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish Shellfish Immunol.** 20: 750-757.
- Jiravanichpaisal, P., B.L. Lee and K. Söderhäll. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis: coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology** 211: 213-236.
- Jussila, J., J. Jago, E. Tsvetnenko, B. Dunstan and L.H. Evans. 1997. Total and differential haemocyte counts in western rock lobsters (*Panulirus cygnus* George) under post-harvest stress. **Mar. Freshwater Res.** 48 (8): 863-868.
- Katayama, T., K. Hirata and C.O. Chichester. 1971. The biosynthesis of astaxanthin-IV. The carotenoid in the prawn, *Penaeus japonicus* Bate (Part I). **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 37 (7): 614-620.

- Klowden, M.J. 2007. **Physiology Systems in Insects**. Academic Press, Amsterdam.
- Krishnan, G. 1951. Phenolic tanning and pigmentation of the cuticle in *Carcinus maenas*. **Q. J. Microsc. Sci.** 92: 333-342.
- Laxmilatha, P. and A. Laxminarayana. 2004. Fine structure of the haemocytes of the Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus* (H. Milne Edwards, 1837). **Crustaceana** 77 (14): 835-848.
- Le Moullac, G., M. Le 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 Shellfish Immunol.** 7: 227-234.
- Lee, M.H. and S.Y. Shiau. 2004. Vitamin E requirements of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses. **Fish Shellfish Immunol.** 16: 475-485.
- Liu, C.H., S.P. Yeh, C.M. Kuo, W. Cheng and C.H. Chou. 2006. The effect of sodium alginate on the immune response of tiger shrimp via dietary administration: activity and gene transcription. **Fish Shellfish Immunol.** 21: 442-452.
- _____, W. Cheng and J.C. Chen. 2005. The peroxinectin of white shrimp *Litopenaeus vannamei* is synthesized in the semi-granular and granular cells, and its transcription is up-regulated with *Vibrio alginolyticus* infection. **Fish Shellfish Immunol.** 18: 431- 444.
- Liu, G., L. Yang, T. Fan, R. Cong, Z. Tang, W. Sun, X. Meng and L. Zhu. 2006. Purification and characterization of phenoloxidase from crab *Charybdis japonica*. **Fish Shellfish Immunol.** 20: 47-57.

- Mangum, C.P., P.L. deFur, J.H.A. Fields, R.P. Henry, G.A. Kormanik, B.R. McMahon, J. Ricci, D.W. Towle and M.G. Wheatly. 1985. Physiology of the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun during a molt, pp. 1-12. In H.M. Perry and R.F. Malone, eds. **Proceedings of the national symposium on the soft-shelled blue crab fishery**. Mississippi-Alabama Sea Grant Consortium and Louisiana Sea Grant College Program.
- Martin, G.G., J. Kay, D. Poole and C. Poole. 1998. *In vitro* nodule formation in the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis*, and the American lobster, *Homarus americanus*. **Invertebr. Biol.** 117(2): 155-168.
- Mix, M.C. and A.K. Sparks. 1980. Tanner crab *Chionocetes bairdi* Rathbun haemocyte classification and an evaluation of using differential counts to measure infection with a fungal disease. **J. Fish Diseases** 3: 285-293.
- Nègre-Sadargues, G., R. Castillo and M. Segonzac. 2000. Carotenoid pigments and tropic behaviour of deep-sea shrimps (Crustacea, Decapod, Alvinocarididae) from a hydrothermal area of the Mid-Atlantic Ridge. **Comp. Biochem. Physiol.** 127A: 293-300.
- Noga, E.J., R. Smolowitz and L.H. Khoo. 2000. Pathology of shell disease in the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, (Decapod: Portunidae). **J. Fish Diseases** 23: 389-399.
- Pan, L. and H. Zhang. 2006. Metallothionein, antioxidant enzyme and DNA strand breaks as biomarkers of Cd exposure in a marine crab, *Charybdis japonica*. **Comp. Biochem. Physiol.** 144C: 67-75.
- Perazzolo, L.M. and M.A. Barracco. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. **Dev. Comp. Immunol.** 21 (5): 385-395.

- Ravindranath, M.H. 1977. The circulating hemocyte population of the mole-crab *Emerita* (= *Hippa*) *asiatica* Milne Edwards. **Biol. Bull.** 152: 415-423.
- Rock, C.L. 1997. Carotenoids: biology and treatment. **Pharmacol. Ther.** 75(3): 185-197.
- Sachindra, N.M., N. Bhaskar and N.S. Mahendrakar. 2005. Carotenoids in crabs from marine and freshwaters of India. **LWT** 38: 221-225.
- Sagi, A., M. Rise, K. Isam and S. Arad. 1995. Carotenoids and their derivatives in organs of the maturing female crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 112B: 309-313.
- Saito, A. and W. Regier. 1970. Pigmentation of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by feeding dried crustacean waste. **J. Fish. Res. Board Can.** 28: 509-512.
- Shingu, M., S. Takahashi, M. Ito, N. Hamamatu, Y. Suenaga, Y. Ichibangase and M. Nobunaga. 1994. Anti-inflammatory effects of recombinant human manganese superoxide dismutase on adjuvant arthritis in rats. **Rheumatol. Int.** 14(2): 77-81.
- Skinner, D.M. 1962. The structure and metabolism of a crustacean integumentary tissue during a molt cycle. **Biol. Bull.** 123: 635-647.
- Smith, V.J. and K. Söderhäll. 1986. Cellular immune mechanisms in the crustacea. **Symp. Zool. Soc. London** (56): 59-79.
- _____, J.H. Brown and C. Hauton. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. **Fish Shellfish Immunol.** 15: 71-90.

- Söderhäll, K. and V.J. Smith. 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. **Dev. Comp. Immunol.** 7(2): 229-239.
- _____ and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. **Annu. Rev. Fish Dis.** : 3-23.
- Sritunyalucksana, K., L. Cerenius and K. Söderhäll. 1999a. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Dev. Comp. Immunol.** 23: 179-186.
- _____, P. Sithisarn, B. Withayachumnarnkul and T.W. Flegel. 1999b. Activation of phenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. **Fish Shellfish Immunol.** 9: 21-30.
- Tainer, J.A., V.A. Roberts, C.A. Fisher, R.A. Hallewell and E.D. Getzoff. 1991. Mechanism and structure of superoxide dismutase, pp. 499-538. In S.A. Kuby, ed. **A Study of Enzymes II: Mechanism of Enzyme Action**. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Tanaka, Y., H. Matsuguchi, T. Katayama, K.L. Simpson and C.O. Chichester. 1976. The biosynthesis of astaxanthin-XVIII. The metabolism of carotenoids in the prawn, *Penaeus japonicus* Bate. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 42 (2): 197-202.
- Terwilliger, N.B. and M.C. Ryan. 2006. Functional and phylogenetic analyses of phenoloxidase from brachyuran (*Cancer magister*) and branchiopod (*Artemia franciscana*, *Triops longicaudatus*) crustaceans. **Biol. Bull.** 210: 38-50.
- Vacca, L.L. and M. Fingerman. 1983. The roles of hemocytes in tanning during the molting cycle: a histochemical study of the fiddler crab, *Uca pugilator*. **Biol. Bull.** 165: 758-777.

- van de Braak, C.B.T., M.H.A. Botterblom, E.A. Huisman, J.H.W.M. Rombout and W.P.W. van der Knaap. 2002. Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.** 51: 149-155.
- , C.B.T., R. Faber and J.H. Boon. 1996. Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1789) haemolymph. **Comp. Haematol Int.** 6: 194-203.
- Vargas-Albores, F., F. Jiménez and K. Söderhäll. 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. **Dev. Comp. Immunol.** 20(5): 299-306.
- , F., T. Gollas-Galván and J. Hernández-López. 2005. Functional characterization of *Farfantepenaeus californiensis*, *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* haemocyte separated using density gradient centrifugation. **Aquac. Res.** 36: 352-360.
- Vaseeharan, B., Y.C. Lin, C.F. Ko and J.C. Chen. 2006. Cloning and characterization of a serine proteinase from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*. **Fish Shellfish Immunol.** :1-12.
- Vázquez, L., A. Pérez, D. Millán, C. Agundis, G. Martin, E.L. Cooper, R. Lascurain and E. Zenteno. 1997. Morphology of hemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Morphol.** 234: 147-153.
- Verghese, B., E.V. Radhakrishnan and A. Padhi. 2008. Effect of moulting, eyestalk ablation, starvation and transportation on the immune response of the Indian spiny lobster, *Panulirus homarus*. **Aquac. Res.** 39: 1009-1013.
- Vogan, C.L. and A.F. Rowley. 2002. Effects of shell disease syndrome on the haemocytes and humoral defences of the edible crab, *Cancer pagurus*. **Aquaculture** 205: 237-252.

- _____, C.L., C. Costa-Ramos and A.F. Rowley. 2001. A histological study of shell disease syndrome in the edible crab *Cancer pagurus*. **Dis. Aquat. Org.** 47: 209-217.
- Wade, N., K.C. Goulter, K.J. Wilson, M.R. Hall and B.M. Degnan. 2005. Esterified astaxanthin levels in lobster epithelia correlate with shell colour intensity: Potential role in crustacean shell colour formation. **Comp. Biochem. Physiol.** 141B: 307-313.
- Walton, A. and V.J. Smith. 1999. Primary culture of the hyaline haemocytes from marine decapods. **Fish Shellfish Immunol.** 9: 181-194.
- Wang, F.I. and J.C. Chen, 2006a. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. **Fish Shellfish Immunol.** 20: 671-681.
- _____ and _____. 2006b. The immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* under temperature stress. **Aquaculture** 258: 34-41.
- Warner, G.F. 1977. **The Biology of Crabs**. Paul Elek Ltd., London.
- Wikipedia. 2006a. Astaxanthin. Available Source: <http://en.wikipedia.org/wiki/Astaxanthin>, June 16, 2006.
- _____. 2006b. Carotene. Available Source: <http://en.wikipedia.org/wiki/Carotene>, June 7, 2006.
- Wikipedia. 2009a. Alpha-carotene. Available Source: <http://en.wikipedia.org/wiki/Alpha-carotene>, April 22, 2009.

_____. 2009b. Beta-carotene. Available Source: <http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-carotene>, April 22, 2009.

Worthington Biochemical Corporation. 2006. Superoxide dismutase. Available Source: <http://www.worthington-biochem.com/SODBE/cat.html>, June 19, 2006.

Yao, C.L., A.L. Wang, W.N. Wang and R.Y. Sun. 2004. Purification and partial characterization of Mn superoxide dismutase from muscle tissue of the shrimp *Macrobrachium nipponense*. **Aquaculture** 241: 621-631.

Yildiz, Y.H. and H.H. Atar. 2002. Haemocyte classification and differential counts in the freshwater crab, *Potamon fluviatilis*. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** 26: 403-406.

ภาคผนวก



A



B

ภาพผนวกที่ 1 การเลี้ยงปูน้ำจืด (A) และลักษณะปูที่ลอกคราบเสร็จใหม่ๆ (B)



A

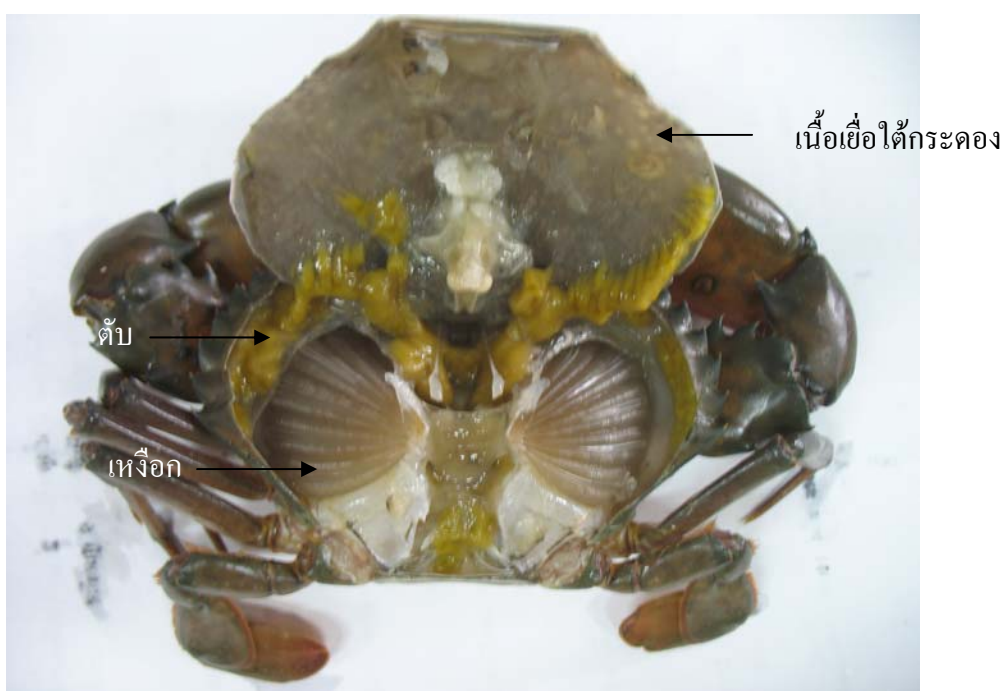


B

ภาพผนวกที่ 2 ลักษณะภายนอกของปูระยะปกติ (A) และกระดองเก่าที่เกิดจากการลอกคราบ
ของปูทะเล (B)



A



B

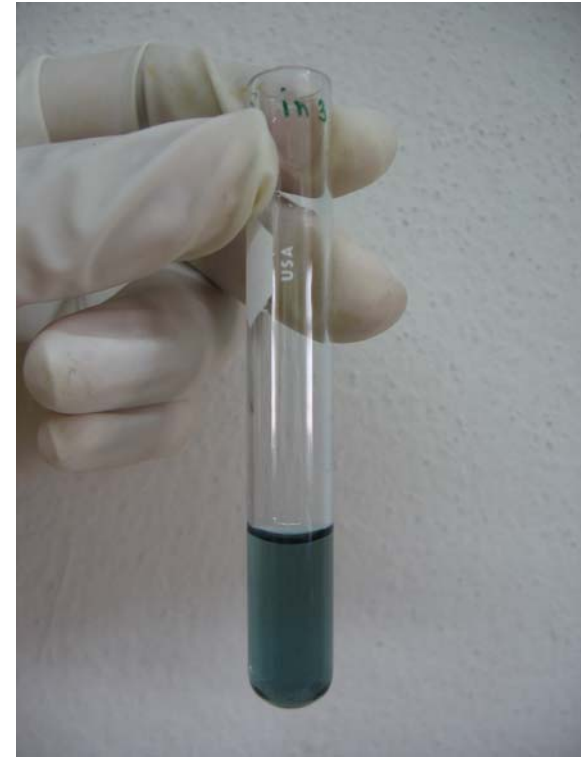
ภาพผนวกที่ 3 การเก็บเลือดที่โคนขาคู่ที่ 5 (A) และอวัยวะภายในของปู (B)



phenoloxidase



superoxide dismutase



BSA

ภาพผนวกที่ 4 ลักษณะ end product ของเอนไซม์และโปรตีนมาตรฐาน BSA



ระยะปกติ



ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์



ระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์



ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน



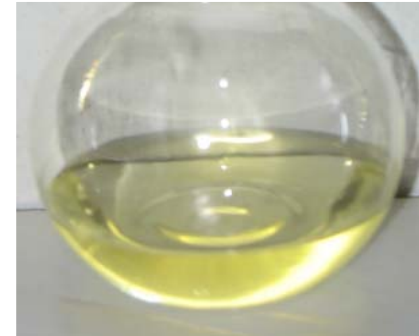
ระยะหลังลอกคราบ 3 วัน



ระยะหลังลอกคราบ 5 วัน



ระยะหลังลอกคราบ 7 วัน



ระยะหลังลอกคราบ 10 วัน

ภาพผนวกที่ 5 สารสกัด carotenoid จากตับในปูทะเลระยะต่าง ๆ



ระยะปกติ



ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์



ระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์



ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน



ระยะหลังลอกคราบ 3 วัน



ระยะหลังลอกคราบ 7 วัน



ระยะหลังลอกคราบ 10 วัน

ภาพผนวกที่ 6 สารสกัด carotenoid จากเหงือกในปูทะเลระยะต่าง ๆ



ระยะปกติ



ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์



ระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์



ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน



ระยะหลังลอกคราบ 3 วัน



ระยะหลังลอกคราบ 5 วัน

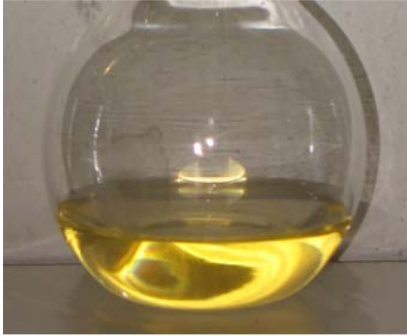


ระยะหลังลอกคราบ 7 วัน

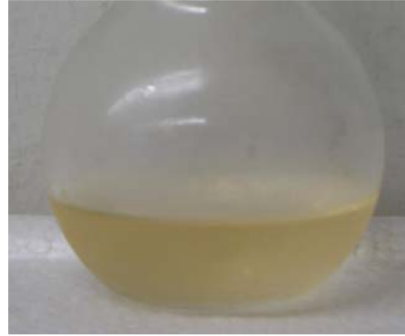


ระยะหลังลอกคราบ 10 วัน

ภาพผนวกที่ 7 สารสกัด carotenoid จากเนื้อไข่ได้กระดองในปูทะเลระยะต่าง ๆ



ระยะปกติ



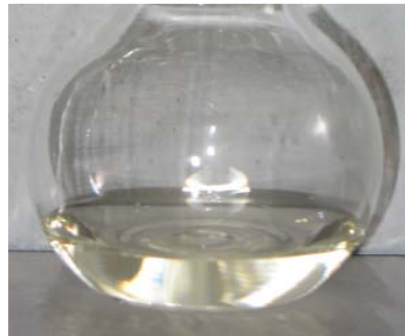
ระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์



ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน



ระยะหลังลอกคราบ 3 วัน



ระยะหลังลอกคราบ 7 วัน



ระยะหลังลอกคราบ 10 วัน

ภาพผนวกที่ 8 สารสกัด carotenoid จากเลือดในปูทะเลระยะต่าง ๆ

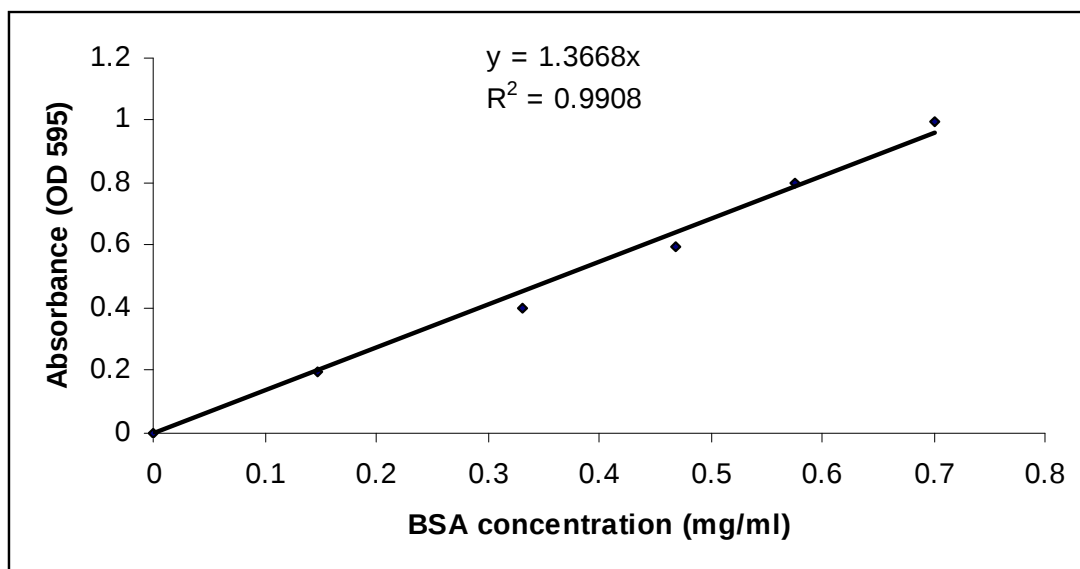
กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA)

สารเคมี

- 1.0 mg/ml BSA (stock solution)
- Bradford reagent

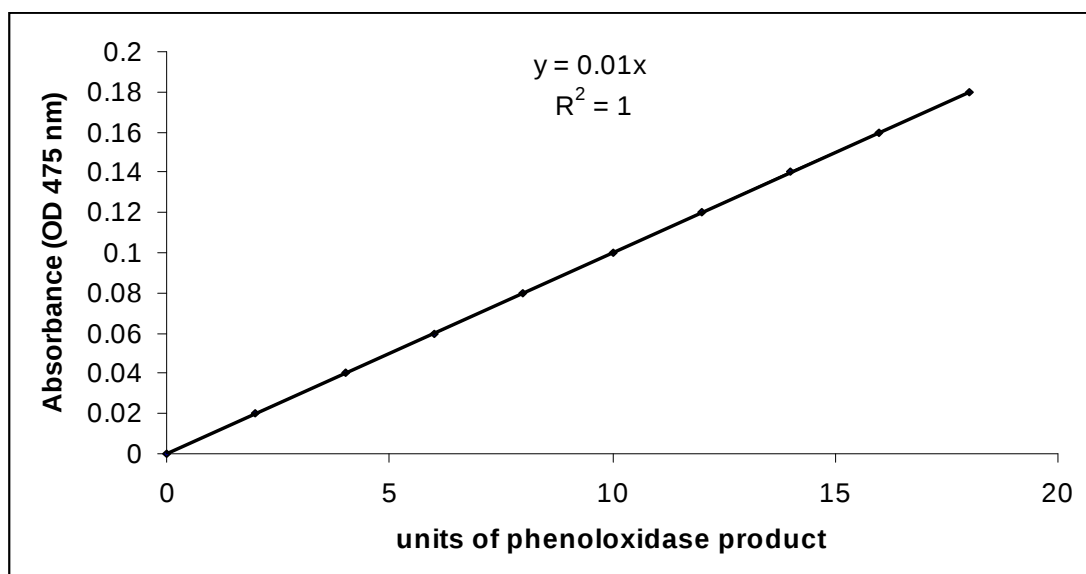
วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลาย BSA เจือจางที่ระดับความเข้มข้น 0.00, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 mg/ml ตามลำดับ จากสารละลาย BSA เข้มข้น (stock solution) (โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank)
2. เติม Bradford reagent ปริมาตร 1 ml ลงใน 100 μ l ของสารละลายเจือจางระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที
3. จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาว 595 nm
4. นำผลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 595 nm กับความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ของ BSA

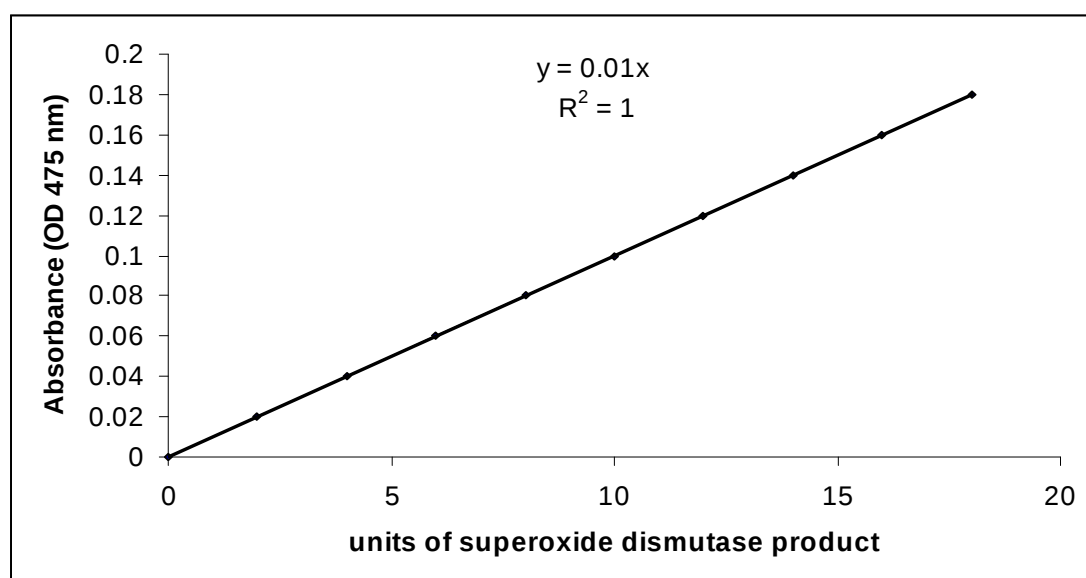


ภาพผนวกที่ 9 กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin

กราฟมาตรฐานของเอนไซม์ phenoloxidase และ superoxide dismutase



ภาพผนวกที่ 10 กราฟมาตรฐานของเอนไซม์ phenoloxidase

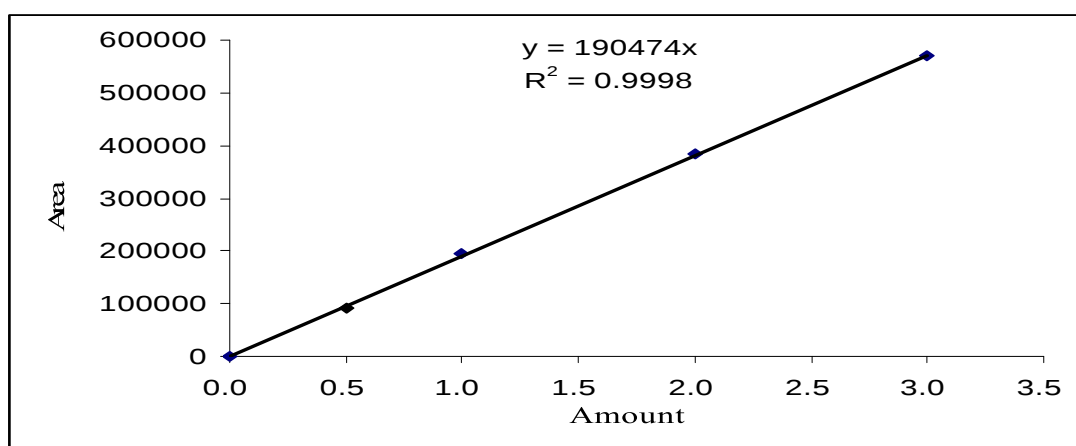
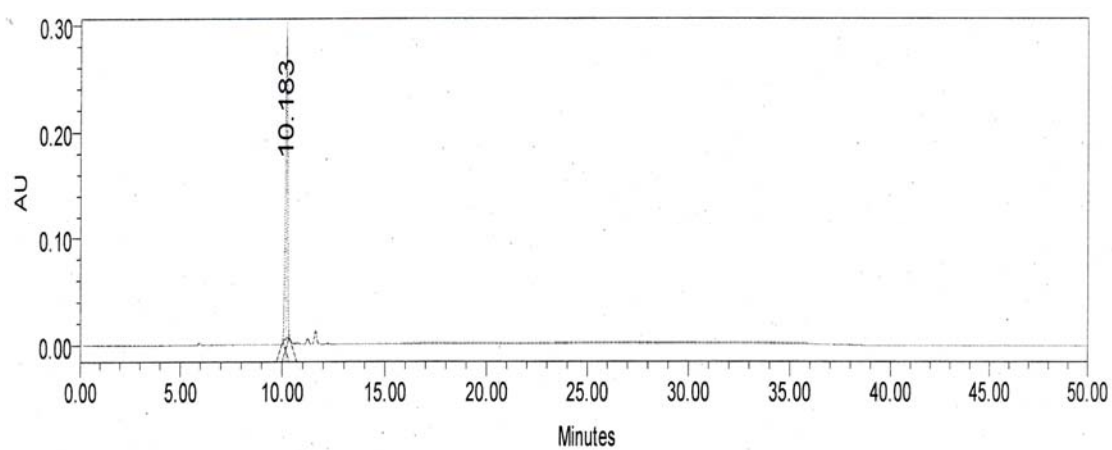
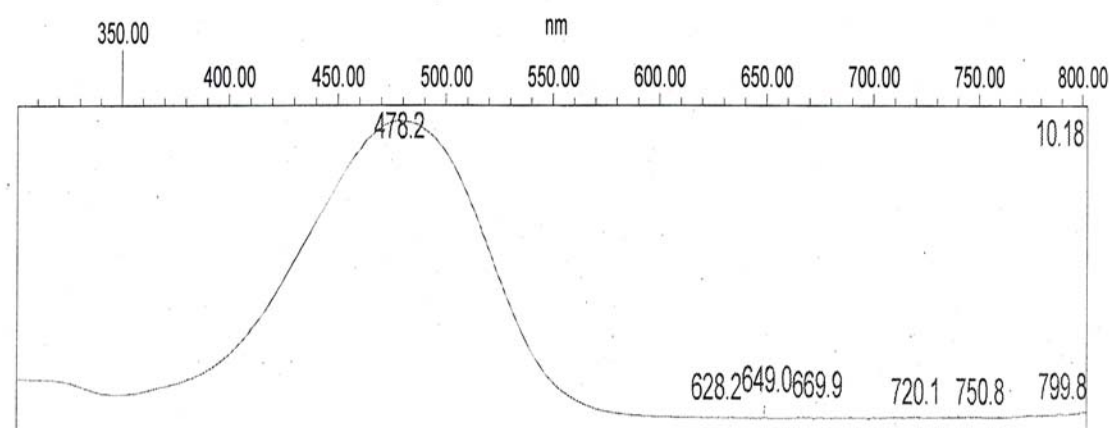


ภาพผนวกที่ 11 กราฟมาตรฐานของเอนไซม์ superoxide dismutase

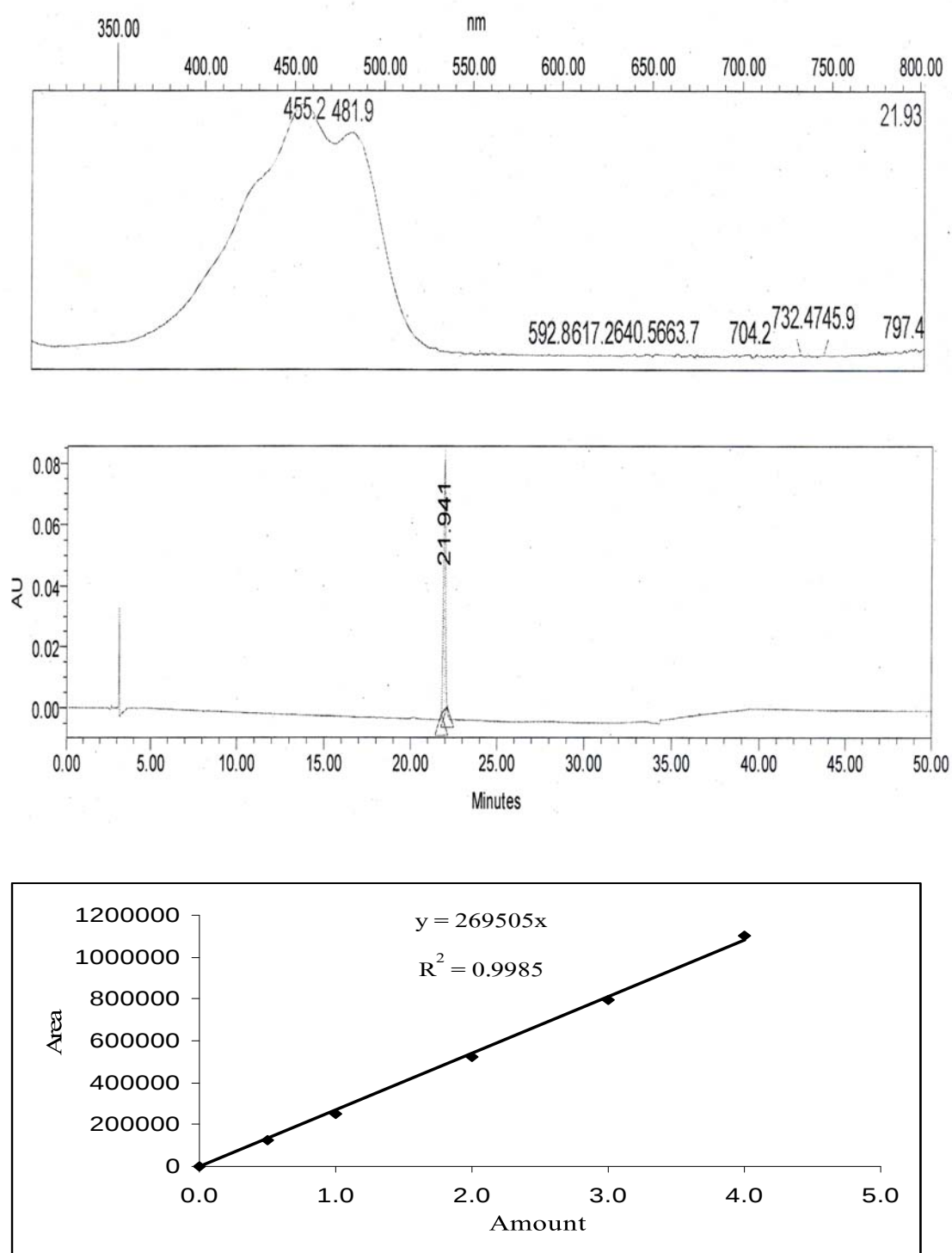
กราฟมาตรฐานของ astaxanthin, β -carotene และ zeaxanthin

วิธีการวิเคราะห์

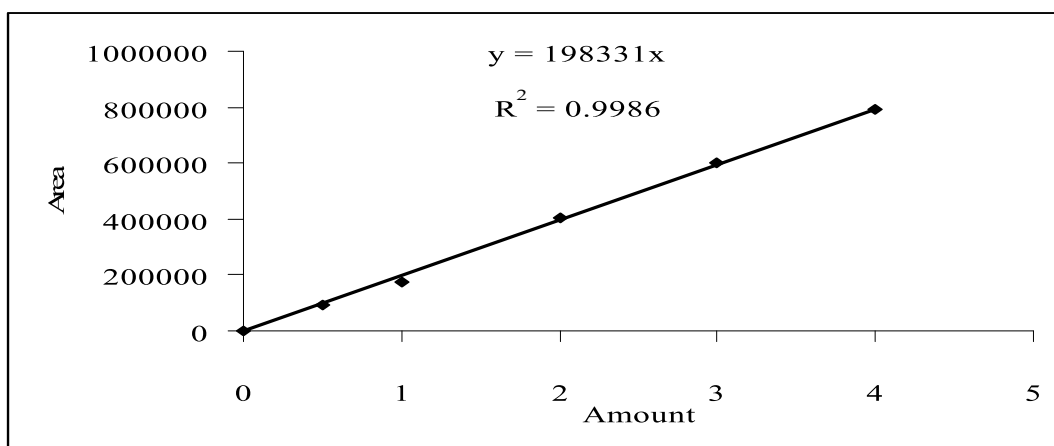
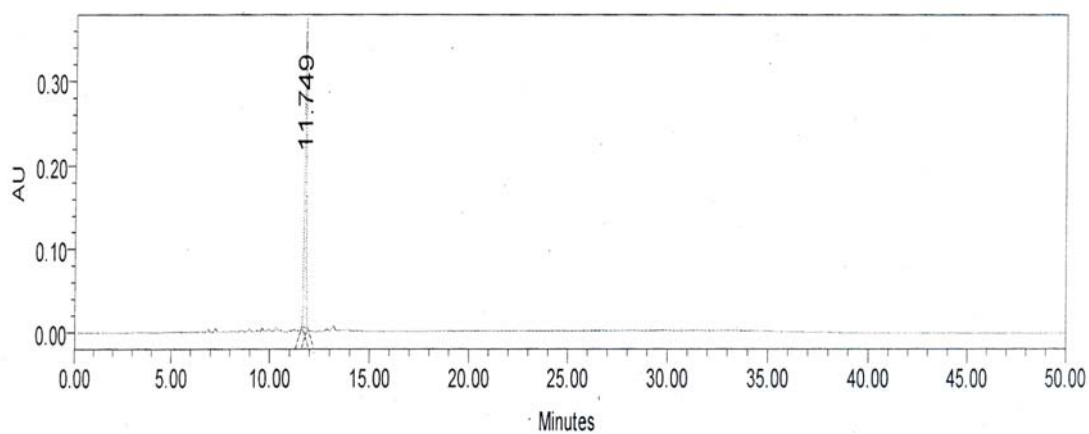
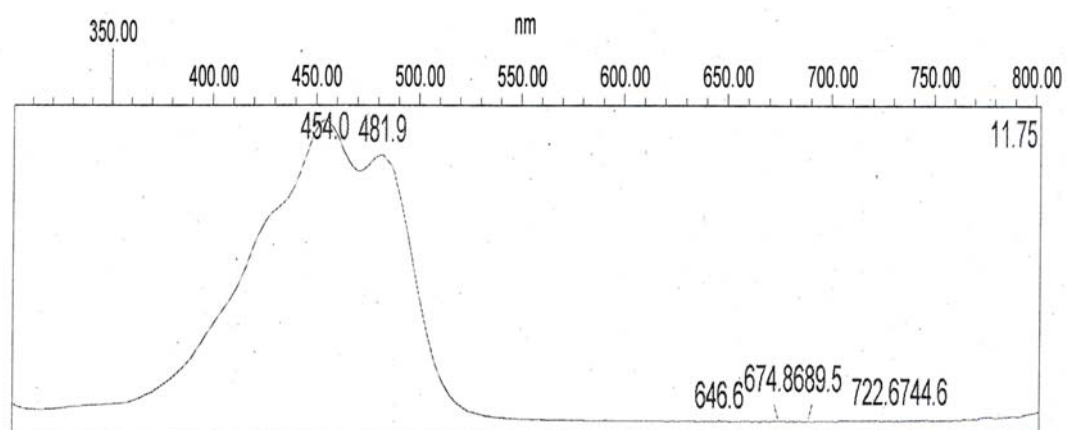
1. เตรียมสารละลาย standard carotenoid ในระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 ppm
2. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ carotenoid ชนิดนั้น ๆ แล้วคำนวณความเข้มข้นจริงของสารละลายมาตรฐานด้วยค่า absorption coefficient
3. นำสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาวัดค่า peak area ด้วย HPLC ที่การดูดกลืนแสงสูงสุด



ภาพผนวกที่ 12 กราฟมาตรฐานของ astaxanthin



ภาพผนวกที่ 13 กราฟมาตรฐานของ β -carotene



ภาพผนวกที่ 14 กราฟมาตรฐานของ zeaxanthin

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวรพีพร ฤกษ์พูลิ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 3 ธันวาคม 2523
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนผู้ช่วยสอน ภาคปลาย ปีการศึกษา 2548 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2549 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์