

อภิปรายผลการทดลอง

จากผลการวิจัย ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของแร่ธาตุทั้ง 5 ชนิด และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ของปูม้าที่ระยะลอกคราบ 8 ระยะ สามารถอภิปรายผลได้ดังนี้

1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแร่ธาตุ

จากการทดลองพบว่า ในระยะก่อนลอกคราบตั้งแต่ระยะ D1 ถึง D3 ความเข้มข้นแร่ธาตุทุกชนิดมีค่าสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเป็นระยะที่ปูม้าจะมีการสะสมสารอินทรีย์และอนินทรีย์ โดยส่วนหนึ่งมาจากการดั่งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ที่อยู่ในเปลือกเข้าสู่ระบบเลือด ทำให้ความเข้มข้นของเลือดมีค่าเพิ่มขึ้น (Telford, 1968; Vijayan และ Diwan, 1996) เป็นการเพิ่มความดันออสโมติก (osmotic pressure) (Passano, 1960; Robertson, 1960; Hagerman, 1973; Haegner และ Van Engel, 1975 อ้างโดย Mercaldo-Allen, 1991) โดยต่อมาที่ระยะก่อนลอกคราบ (D4 stage) ความเข้มข้นของแร่ธาตุทั้ง 5 ชนิด มีค่าลดลง ($p < 0.05$) อาจเนื่องมาจากการสร้าง hydrostatic pressure ซึ่งจะมีการนำน้ำเข้าสู่ร่างกาย และในระหว่างที่ลอกคราบเปลือกของปูจะนิ่มมาก โอกาสที่น้ำจะซึมผ่านเซลล์เมมเบรน (membrane) ของเปลือกจึงทำได้สะดวก ทำให้ปริมาตรของเลือด (hemolymph volume) เพิ่มขึ้น ส่งผลให้องค์ประกอบของเลือดเจือจางอย่างรวดเร็ว และลดลงอย่างต่อเนื่องที่ระยะหลังลอกคราบใหม่ๆ (A stage) (Mykles, 1980; Mantle และ Farmer, 1983; Charmantier *et al.*, 1984 อ้างโดย Mercaldo-Allen, 1991) สอดคล้องกับรายงานของ Drach (1960) อ้างโดย ประจวบ หล้าอุบล (2537) ว่า ปริมาณน้ำในร่างกายของพวกปู (Branchyuran) ในระยะ early postmolt มีค่าสูงถึง 86 % และ 76 % ในกุ้ง *P. indicus* และพบว่าความเข้มข้นของแคลเซียมในเลือดปู *C. sapidus*, *C. maenas*, *C. magister* (Robertson, 1960; Guderley, 1977 อ้างโดย Towle และ Mangum, 1985) และกุ้ง lobster *H. americanus*, *H. vulgaris* (Robertson, 1960; Lockwood, 1967; Glynn, 1968; Guderley, 1977; Greenaway, 1985 อ้างโดย Mercaldo-Allen, 1991) มีความเข้มข้นลดลงอย่างรวดเร็วในระยะหลังลอกคราบ และระดับอนินทรีย์ฟอสเฟตก็มีค่ามีค่าลดลงเช่นกัน (Travis, 1955b อ้างโดย Mercaldo-Allen, 1991) ซึ่งจากการศึกษาใน Lobster *H. vulgaris* พบว่าระดับอนินทรีย์ฟอสเฟตในเลือดในระยะหลังลอกคราบลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีการนำไปใช้ในการสร้างเปลือกให้แข็งขึ้น (Glynn, 1968) เช่นเดียวกับความเข้มข้นของโซเดียม และคลอไรด์ ในเลือดของ Lobster *H. americanus* ซึ่งพบว่ามีความเข้มข้นต่ำในระยะหลังลอกคราบ (Mercaldo-Allen, 1991) ซึ่งนอกจากสารอนินทรีย์ที่ได้กล่าวไปแล้ว ยังพบว่าโปรตีนและกลูโคสในกุ้ง *P. duorarum* (Bursey และ Lane, 1971) กุ้ง *P. argus* (Travis, 1955b อ้างโดย Bursey และ Lane, 1971) ปู *C. maenas* (Robertson, 1960 อ้างโดย Bursey และ Lane, 1971) crayfish *O. limosus* (Andrews, 1967 อ้างโดย Bursey และ Lane, 1971) *H. vulgaris* (Djangmah, 1970 อ้างโดย Bursey และ Lane, 1971) และ lobster *H. americanus* (Mercaldo-Allen, 1991) ในระยะหลังลอกคราบลดลง เนื่องจากช่วงดังกล่าวมีการใช้โปรตีนเพื่อการสร้างโครงสร้างเปลือกใหม่ ประกอบกับในระยะนี้สัตว์น้ำจะไม่กินอาหาร ก็เป็นผลให้ทั้งสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์มีค่าลดลงอีกด้วย

โดยระยะหลังลอกคราบ (B stage) มีระดับความเข้มข้นของแร่ธาตุส่วนใหญ่ของปูม้ามีค่ามากกว่าระยะหลังลอกคราบใหม่ๆเล็กน้อย แต่มีค่าต่ำกว่าในระยะลอกคราบ C1, C2, D1, D2 และ D3 เนื่องจาก

ช่วงเวลาดังกล่าวปูม้าจะทำการขับน้ำออกเพื่อรักษาระดับ osmotic pressure ขณะเดียวกันจะมีการสะสมไขมันบางตัวในเลือด (Greenaway, 1985) และมีการดึงแคลเซียมในน้ำทะเล กล้ามเนื้อ (muscle) มิดกัท แกลนด์ (midgut gland) โครงสร้างเปลือก (exoskeleton) และตับ (hepatopancreas) มาใช้เพื่อสร้างเปลือกใหม่ (Vijayan และ Diwan, 1996; Pratoomchat *et al.*, 2002a, b) อีกทั้งปูเริ่มกินอาหารแล้ว ส่งผลให้ความเข้มข้นสูงขึ้นในระยะคราบแข็ง (intermolt stage, C1 และ C2) จากการนำเอาแร่ธาตุต่างๆไปใช้ในการสร้างเปลือกทั้งจากการกินอาหารและการดูดซึมจากน้ำที่เลี้ยง (Mantel และ Farmer, 1983) โดยปูม้าจะมีกลไกที่เริ่มการละลาย (dissolution) แร่ธาตุจากเปลือกเก่าโดยมีอัตราเพิ่มขึ้นจากระยะก่อนลอกคราบตอนต้น (Premolt, D1 stage) จนถึงระยะ D3 เพื่อสร้างความดันออสโมติก (Passano, 1960; Robertson, 1960; Hagerman, 1973; Haegner และ Van Engel, 1975 อ้างโดย Mercaldo-Allen, 1991) ก่อนลดลงที่ระยะ D4 จากการนำน้ำเข้าร่างกาย ซึ่งคล้ายคลึงกับพฤติกรรมที่พบในสัตว์ทะเลหลายชนิด ได้แก่ lobster *H. americanus* (Mercaldo-Allen, 1991) กุ้งทะเล *P. indicus* (Vijayan และ Diwan, 1996) กุ้ง *P. duorarum* (Bursey และ Lane, 1971) และปูทะเล *S. serrata* (Chen และ Chia, 1997, Pratoomchat *et al.*, 2002a,b)

2. กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์

กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับระยะลอกคราบของปูม้า แต่มีเพียงกิจกรรมจำเพาะของทริปซินและ T/C ratio ที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตในรอบวงจรการลอกคราบชี้ให้เห็นว่ากิจกรรมจำเพาะของทริปซินและ T/C ratio เป็นปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาด้านการเจริญเติบโตด้านน้ำหนักได้ ขณะที่กิจกรรมจำเพาะของโคโมทริปซิน ทริปซิน และโปรติเอสใช้เป็นดัชนีชี้วัดการกินอาหารได้ (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2009; Rungruangsak-Torrissen, 2012) และ/หรืออัตราการบริโภคโปรตีน (protein consumption rate) (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2009; Rungruangsak-Torrissen, 2012) ค่า T/C ratio มีค่าสูงช่วงระยะ D4 สามารถอธิบายได้ว่าปูมีการขยายตัวของกระดองสูงภายหลังลอกคราบ การลดลงของน้ำหนักปูช่วงก่อนลอกคราบอาจจะมีผลมาจากปูกินอาหารลดลง รวมถึงการสูญเสียพลังงานไปกับการรักษาสมดุลเกลือแร่ และต่อเนื่องไปถึงน้ำหนักหายไปภายหลังลอกคราบ การลดลงต่ำสุดของกิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสและโปรติเอสช่วงก่อนลอกคราบตอนปลาย (D4 stage) ซึ่งคล้ายคลึงกับที่พบในปู *Carcinus maenas* (Bauchau และ Mengeot, 1965) ขณะที่พบค่าสูงสุดที่ระยะ D1 และ D2 ซึ่งคล้ายคลึงกับที่พบในกุ้ง *Litopenaeus vannamei* (Le Moullac, 1995) กิจกรรมจำเพาะของทริปซินและโคโมทริปซินในปูม้ามีค่าสูงที่ระยะ C2 และ D1 เมื่อปูมีอัตราการกินสูงสุด

สรุปผลการทดลอง

ความเข้มข้นของแร่ธาตุทั้ง 5 ชนิดและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารมีการเปลี่ยนแปลงไปตามวงจรการลอกคราบของปูม้า แร่ธาตุส่วนใหญ่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจากระยะหลังลอกคราบ (B stage) โดยเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงระยะก่อนลอกคราบ (D2 หรือ D3 stages) ก่อนลดลงที่ระยะก่อนลอกคราบ (D4 stage) จนถึงระยะลอกคราบใหม่ ๆ (A stage) กิจกรรมจำเพาะของทริปซินและ T/C ratio มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตในรอบวงจรการลอกคราบของปูม้า การลดลงต่ำสุดของกิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสและโปรติเอสในระยะ D4 ขณะที่พบค่าสูงสุดที่ระยะ D1 และ D2 กิจกรรมจำเพาะของทริปซินและโคโมทริปซินในปูม้ามีค่าสูงที่ระยะ C2 และ D1 เมื่อปูมีอัตราการกินสูงสุด

เอกสารอ้างอิง

- บุญรัตน์ ประทุมชาติ และสุริยัน ธีญกิจจานุกิจ. 2548. ผลของความเค็มน้ำ ชนิดอาหาร และ สิ่งลบลบซ่อนต่อการพัฒนาการ การเจริญเติบโต และการรอดตายของการอนุบาลลูกปูม้า (*Portunus pelagicus*). ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี กรุงเทพมหานคร.
- ประจวบ หล้าอุบล.2537. สรีรวิทยาของกุ้งทะเล . ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 293 หน้า.
- ดาริน ขาญวิชัย.2531. การปรับตัวของกุ้งกุลาดำวัยร่อนต่อการเปลี่ยนแปลงระดับความเค็ม. ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 31หน้า
- Anger, K. 2001. The biology of decapod crustacean larvae. In *Crustacean issues 14* . Vonk, R. (Ed.) (p. 41-325). The Netherlands, Krips, Meppel.
- Bauchau, A.G., Mengeot, J.C. 1965. Prote'ases et amylases de l'h'epatopancr'eas des crabs au cours du cycle de mue et d'intermue. *Annals Soc. R. de Zool. Belg.* 95, 29-37.
- Bernfeld, P. 1951. Enzymes of starch degradation and synthesis. *Advances in Enzym. and Related Subjects of Biochem.*, 12, 379-384.
- Bursey C.R., Lane, C.E., 1971. Ionic and protein concentration changes during the molt cycle of *Penaeus duorarum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 40A, 155-162.
- Brockhoff, H., Hoyle, R. J., Hwang, P. C. 1970. Digestive enzymes of the American lobster. (*Homarus americanus*). *J Shellfish Res Board of Canada*, 27, 1357-1370.
- Cameron, J. N., 1985. Post-moult calcification in the blue crab (*Callinectes sapidus*): Relationships between apparent net H^+ excretion, calcium and bicarbonate. *J Exp. Biol.* 119, 275-285.
- Ceccadi, H. J. 1997. Anatomy and physiology of the digestive system. In *Crustacean nutrition advances in world aquaculture*. Vol. 6. D' Abramo, L. R., Conklin, D. E., & Akiyama, D. M. (Eds.) (p. 261-291). The world aquaculture society, the United States of America.
- Chamchuen, P., Engkagul, A., Kovitvadhi, U., Rungruangsak – Torrissen, K., Pratoomchat, B. 2008. Temperature and pH characteristics of digestive enzyme in blue swimming crab larvae, (*Portunus pelagicus*). In *The 9th National Grad Research Conference*, Burapa University. Bangsaen Chonburi, Thailand.
- Cordova-Murueta, J. H., Garcia-Carreno, F. L., Navarrete-del-Toro, M. A. 2003. Digestive enzyme present in crustacean feces as a tool for biochemical, physiological, and ecological studied. *J Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 297, 43-56.

- Fernandez-Gimenez, A. V., Garcia-Carreno, F. L., Navarrete del Torro, M. A., Fenucci, J. L. 2001. Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): partial characterisation and relationship with moulting. *Comp. Biochem. Physiol.*, 130B, 331-338.
- Galgani, M. L., AQUACOP, 1988. Replacement of live unicellular algae by microparticulate diet during larval rearing of zoeal stages of some penaeid prawns. *Aquaculture* 69, 115-127.
- Garcia-Carreno, F. L., del Toro, N., Ezquerro, J. M. 1997. Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility *in vitro*: I. Effect of protease inhibitors in protein ingredients. *J. Mar. Biotech.*, 5, 36-40.
- Gilles, R., Pequeux, A. 1981. Cell regulation in Crustacean : Relation between mechanism for controlling the osmolality of extracellular and intracellular fluids. *J. Exp. Zool.* 215 : 351-362.
- Glynn, J.P., 1968. Studies on the ionic, protein and phosphate changes associated with the moult cycle of *Homarus vulgaris*. *Comp. Biochem. Physiol.* 26, 937-946.
- Greenaway, P. 1985. Calcium balance and moulting in the Crustacea. *Biol Rev* 60: 425-454.
- Hagerman, L., 1983. Haemocyanin concentration of juvenile lobsters (*Homarus gammarus*) in relation to moulting cycle and feeding conditions. *Mar. Biol.* 77, 11-17.
- Johnston, D. J. 2003. Ontogenetic changes in digestive enzyme activity of the spiny lobster, *Jasus edwardsii* (Decapoda: Palinuridae). *J. Mar. Biotech.*, 143 (6), 1071-1082.
- Le Moullac, G. 1995. Adaptation des enzymes digestives à l'alimentation chez la crevette *Penaeus vannamei* (Crustacean, Decapoda). *Thèse Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes (Océanologie)*, 122p.
- Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., Van Wormhoudt, A. V. 1996. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (crustacea, decapoda). *J Exp. Mar. Biol. and Ecol.*, 208, 107-125.
- Le Moullac, G., Van Wormhoudt, A., AQUACOP. 1994. Adaptation of digestive enzyme to dietary protein, carbohydrate and fiber levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapod). *Aqua. Living Res.*, 7, 203-210.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Mantel, L.H., Farmer, L.L. 1983. Osmotic and ionic regulation. In: *The Biology of crustacea.* (vol.5): Internal anatomy and physiological regulation, Bliss, D.E. and Mantel, L.H. (eds), Academic Press, New York, pp.54-143

- Mercaldo-Allen, R. 1991. Change in the blood chemistry of the American lobster *Homarus americanus*, H. Milne Edwards, 1837, over the molt cycle. *J Shellfish Res* 10 (10): 147-156.
- Passano, L.M. 1960. Molting and its control. In : *The Physiology of Crustacea*. Vol. 1, Waterman T.H. (ed), Academic Press, New York, pp. 437 – 536.
- Potts, W.T.W., Parry, G. 1964. *Osmotic and ionic regulation in animals*: In: International series of monographs on pure and applied biology, Kerkut, G.A. (Ed.), Pergamon press, Oxford, pp.423.
- Pavasovic, M., Richardson, N. A., Anderson, A. J., Mann, D., Mathera, P. B. 2004. Effect of pH, temperature and diet on digestive enzyme profile in the mud crab, *Scylla serrata*. *Aquaculture* 242, 641–654.
- Pratoomchat, B., Sawangwong, P., Pakkong, P. Machado, J. 2002a. Organic and inorganic variations in haemolymph, epidermal tissue and cuticle over the molt cycle in *Scylla serrata* (Decapoda). *Comp Biochem and Physiol Part A*, 131: 243-255.
- Pratoomchat, B., Sawangwong, P., Guedes, R., M.D.L., Machado, J. 2002b. Cuticle ultrastructure changes in the crab *Scylla serrata* over the molt cycle. *J Exp Zool*, 293 (4): 414-426.
- Pratoomchat, B., Jindadam, W. 2007. Discrimination of molting stages in the blue swimming crab, *Portunus pelagicus* based on observable changes in external morphology. In: *Sustainability on Marine Science Proceeding of CU/NRCT/JSPP* Queen Sirikit Convention Center, Thailand, May 2007, p1-11.
- Pratoomchat, B., Sawangwong, P., Machado, J. 2004. The identification of molt stage in *Scylla serrata* on cuticle morphology. *Proceedings of Biomineralization (BIOM2001): formation, diversity, evolution and application*, Kobayashi & Ozawa (Eds) Tokai Univ Press, 2004, p. 98-102. ISBN4-486-01370-9
- Puyear, R.L. 1969. Molt cycle regulation of nucleotide pyrophosphatase in the hepatopancreas of the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *J Comp. Biochem. Physiol.*, 28, 159-168.
- Robertson, J.D. 1960. Osmotic and ionic regulation. In: *The physiology of crustacea vol.1*. Waterman, T.H. (Ed.), Academic Press, New York, pp. 317-339.
- Roer, R., Dillaman, R., 1984. The structure and calcification of the crustacean cuticle *Amer. Zool.* 24: 893-909.
- Rungruangsak-Torrissen, K., Stien, L. H., Daae, B. S., Vågseth, T., Thorsheim, G. B., Tobin, D. Ritola, O. 2009. Different dietary levels of protein to lipid ratio affected digestive efficiency, skeletal growth, and muscle protein in rainbow trout families. *Scholarly Research Exchange*, vol. 2009, Article ID 709529, doi:10.3814/2009/709529.

- Rungruangsak-Torrissen, K., Thongprajukaew, K., Sansuwan, K., Thapthimdaeng, P., Kovitvadhi, U., Seetaha, S., Choowongkamon, K., Beck, I.M., Arnøy, O.O. 2012. Ecological effects on food utilization, trypsin isozymes, and performance qualities of growth and maturation in Northeast Arctic cod (*Gadus morhua* L.). *The Open Fish Sci. J.* 5, 44–56.
- Telford, M., 1968. Changes in blood sugar composition during the molt cycle of the lobster *Homarus americanus*. *Comp Biochem Physiol* 135, 574-584.
- Torrissen, K. R., Lied, E., Espe, M. 1994. Differences in digestion and absorption of dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with genetically different trypsin isozymes. *J Fish Biol.*, 45, 1087-1104.
- Towle, D.W., Mangum, C.P., 1985, Ionic regulation and transport ATPase activities during the molt cycle in the blue crab *Callinectes sapidus*. *J Crust. Biol.* 5(2), 216-222.
- Van Wormhoudt, A., Favrel, P., Guillaume, J. 1989. Gastrin/cholecystokinin-like postprandial variations: quantitative and qualitative changes in the hemolymph of penaeids (Crustacea, Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 159 B, 269-273.
- Van Wormhoudt, A., Le Chavallier, P., Sellos, D. 1992. Purification, biochemical characterization and N-terminal sequence of a serine- protease with chymotrypsin and collagenolytic activities in a tropical shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacean,Decapoda). *Comp. Biochem Physiol.*, 103B, 675-680.
- Vega-Villasante, F., Nolasco, H., Civera, R. 1995. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californensis* properties of protease activity in the whole digestive tract. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B, 123-129.
- Vigh, D.A., Dendinger, J.E., 1982. Temporal relationships of postmolt deposition of calcium, magnesium, chitin and protein in the cuticle of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Comp Biochem Physiol* 72A (2), 365-369.
- Vijayan K.K., Diwan, A.D. 1996. Fluctuation in Ca, Mg and P Levels in The hemolymph, muscle, midgut gland and exoskeleton during the molt cycle of the Indian White Prawns, *Penaeus indicus* (Decapod; Penaeidae) *Comp. Biochem. Physiol.* 114A (1):91-97
- Zwilling, R. H., Neurath, H. 1981. Invertebrate proteases. In *Methods in Enzymology*, 80. Wood, W.A.,Kellog, S.T.(Eds.) (p. 633-664). Academic Press, San Diego, CA.