

บทนำ

ปัจจุบันจำนวนประชากรในประเทศไทยมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น จึงทำให้ความต้องการอาหารเพื่อการบริโภคเพิ่มมากขึ้นมากกว่าในอดีต โดยเฉพาะปูม้า (*Portunus pelagicus*) ที่ถือว่าเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพราะเป็นสัตว์น้ำที่หาได้ง่ายพบอยู่ทั่วไปในทะเลอ่าวไทย และอันดามัน ทำรายได้ให้แก่ชาวประมงมาช้านาน แต่ในปัจจุบันมีการทำประมงเกินอัตรา (over fishing) ทำให้ปริมาณปูม้า และทรัพยากรประมงอื่น ๆ ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว อีกทั้งสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป อันเนื่องมาจากภัยธรรมชาติและมลพิษในทะเล

เนื่องจากปัญหาที่เกิดขึ้นดังกล่าวจึงได้มีการเลี้ยงปูม้าขึ้นเพื่อทดแทนการจับปูม้าจากธรรมชาติเพื่อนำมาบริโภค ซึ่งระบบการเลี้ยงปูม้าในปัจจุบันเริ่มมีการเลี้ยงแบบพัฒนา (intensive culture) โดยเป็นการนำลูกปูม้าจากโรงเพาะฟักมาเลี้ยงให้ได้ขนาดตามที่ตลาดต้องการ ประเทศแถบเอเชียก็มีการเลี้ยงปูม้าเช่นกัน เช่น ประเทศญี่ปุ่นซึ่งมีลักษณะการจัดการฟาร์มเลี้ยงปูม้า (*Portunus* sp.) แบบดั้งเดิม (extensive farming) และการเลี้ยงปูม้าร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (polyculture) ส่วนในประเทศไทยก็เริ่มมีการนำปูม้ามาเลี้ยงเช่นกัน แต่การเลี้ยงปูม้าในประเทศไทยยังขาดข้อมูลพื้นฐานต่างๆที่จะนำไปประยุกต์ใช้ เพื่อการเลี้ยงให้ได้ผลผลิตที่ดีและแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากการทำการศึกษาค้นคว้าค่อนข้างน้อย แม้ว่าเกษตรกรจะได้ใช้ประสบการณ์และความชำนาญเดิมจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เป็นพื้นฐานแล้วก็ตาม อัตราการรอดตายของปูม้ายังคงต่ำเนื่องจากปูม้ามีพฤติกรรมแตกต่างจากกุ้งทะเลดังกล่าวมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดอาหารที่ปูม้าต้องการ มีระยะเวลาลอกคราบที่ยาวนานกว่า อีกทั้งมีการสร้างเปลือกภายหลังลอกคราบที่นาน จึงส่งผลให้มีพฤติกรรมการกินกันเองที่รุนแรง แม้จะมีการจัดการที่ดี ลดความหนาแน่นและให้สิ่งหลบซ่อน ไม่สามารถแก้ปัญหานี้ได้ (บุญรัตน์ และสุริยน์, 2548) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปทางสรีระเคมีภายในร่างกายด้วยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแร่ธาตุที่สำคัญ จะช่วยทำให้เข้าใจและสามารถเข้าถึงวิธีการหาการจัดการที่เหมาะสมได้

อาหารที่เหมาะสมกับการเลี้ยงปูม้านับว่าเป็นประเด็นหนึ่งที่สำคัญเป็นลำดับแรก เนื่องจากเมื่อได้รับชนิดอาหารที่มีความเหมาะสมก็อาจทำให้พฤติกรรมการกินกันเองของปูม้ามลดลงและสามารถเพิ่มอัตราการรอดตายได้ การนำสารอาหารไปใช้เป็นพลังงานสำหรับการลอกคราบ และเจริญเติบโตอย่างมีประสิทธิภาพนั้นกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิดเป็นตัวแปรหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตและคุณภาพของอาหาร (Wormhoudt *et al.*, 1992) จึงนับว่าการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์มีความสำคัญเนื่องจากสามารถอธิบายความต้องการชนิดอาหารซึ่งสัมพันธ์กับวงจรการลอกคราบของปูม้าและสามารถคัดเลือกชนิดของวัตถุดิบอาหารเพื่อการผลิตอาหารสำเร็จรูปที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงปูม้า

ปูม้ามีการเจริญเติบโตด้วยการลอกคราบ ความเข้มข้นของเลือดและกิจกรรมของเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีผลต่อกลไกการควบคุมสรีระเคมีภายในร่างกายเพื่อการเจริญเติบโตและกลไกการลอกคราบมีผลกระทบต่อระยะเวลาการลอกคราบและความสำเร็จในการลอกคราบ จึงได้ทำการวิจัยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแร่ธาตุ 5 ชนิด ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม โพแทสเซียม และคลอไรด์ รวมถึงหลักพื้นฐานจากความรู้ด้านเอนไซม์ย่อยอาหารเกี่ยวกับรูปแบบการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก (Pavasovic *et al.*, 2004) ได้แก่ ทริปซิน (trypsin) และไคโมทริปซิน (chymotrypsin) ของปูม้าในวงจรการลอกคราบ จะได้ช่วยสร้างความมั่นใจได้ว่าวัตถุดิบอาหารที่ได้คัดเลือกมาเพื่อผลิตอาหารปูม้างั้นหากมีข้อมูลพื้นฐานเหล่านี้แล้วจะสามารถนำผลการวิจัยไปประยุกต์ใช้ในการกำหนดสิ่งแวดล้อมและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปูม้าได้ต่อไป

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ระยะลอกคราบของปูม้า (Molting stage of blue swimming crab)

การลอกคราบนอกจากจะเป็นการเพิ่มขนาดแล้ว ยังเป็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะด้วย ระยะเวลาในการลอกคราบครั้งหนึ่งๆ จะห่างกันเท่าใดนั้นขึ้นกับขนาด อายุ และความสมบูรณ์ของปูทะเล นอกจากนี้ยังขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมด้วย วงจรการลอกคราบของปูม้าขนาดโตเต็มวัยโดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 5 ระยะใหญ่คือ ระยะหลังการลอกคราบตอนต้น หรือ ระยะ A (Early postmolt) ระยะหลังลอกคราบ หรือ ระยะ B (postmolt) ระยะคราบแข็ง หรือ ระยะ C (Intermolt) ระยะก่อนลอกคราบ หรือ ระยะ D (Premolt) และระยะลอกคราบ หรือ ระยะ E (Ecdysis) ระยะการลอกคราบที่มีการจำแนกไว้นี้ยังสามารถแบ่งย่อยได้อีกเป็น 9 ระยะคือ ระยะ A, B, C₁, C₂, C₃, D₁, D₂, D₃ และ E เหมือนกันกับปูทะเล (Pratoomchat *et al.*, 2004)

2. การรักษาสมดุลออสโมติกและไอออนิก (Osmotic and Ionic Regulation)

ครัสเตเชียนสามารถแสดงระบบ osmoregulation ได้หลายรูปแบบ บางชนิดเป็น stenohaline คือทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มน้ำได้ในช่วงแคบๆ บางชนิดเป็น euryhaline คือทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มน้ำได้ในช่วงกว้าง โดยความสัมพันธ์ระหว่างค่าออสโมลาลิตี (osmolality) ภายในร่างกายกับน้ำภายนอก มักแสดงในรูปของ osmoconformity เรียกสัตว์กลุ่มนี้ว่า osmoconformer ซึ่งแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ภายในจะเปลี่ยนแปลงตามน้ำภายนอกตลอดช่วงของความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มน้ำ ความเข้มข้นของเลือด (hemolymph) และน้ำภายนอกจะมีแรงดันออสโมติกเท่ากันทั้งสองด้าน (isosmotic) ตัวอย่างสัตว์กลุ่มนี้ได้แก่ *Pollicipes polymerus* และ *Porcellana platycheles* ส่วนสัตว์กลุ่ม osmoregulator จะพยายามรักษาระดับความเข้มข้นออสโมติกภายในให้ค่อนข้างคงที่ อาจจะมากกว่าหรือน้อยกว่าน้ำภายนอกตลอดช่วงของความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มน้ำ ตัวอย่างสัตว์กลุ่มนี้ได้แก่ กุ้ง *Panulirus longipes* และ กุ้ง *Crangon crangon* เป็นต้น (Mantel และ Farmer, 1983)

3. การรักษาสมดุลไอออน (Ionic Regulation)

เป็นที่ทราบกันมานานแล้วว่าไอออนที่เป็นองค์ประกอบของเลือดจะมีความแตกต่างกับน้ำภายนอก (Robertson, 1944, 1953, 1960 อ้างโดย Mantel และ Farmer, 1983) โดยไม่คำนึงถึงความสัมพันธ์ของระบบออสโมติก การเปรียบเทียบกันโดยตรงของไอออนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำภายนอก, ในเลือด และในปัสสาวะ มักจะทำให้เกิดความผิดพลาดได้เนื่องจากผลกระทบของโปรตีนที่มีมากถึง 10% ในเลือด มีผลให้น้ำที่เป็นองค์ประกอบของของเหลวทั้ง 3 แหล่งไม่เท่ากัน

ความเข้มข้นของโซเดียมและคลอรีนในเลือดมักจะใกล้เคียงกับค่าที่จุดสมดุลเมื่อสัตว์อยู่ในน้ำทะเล และศักย์ไฟฟ้าที่เป็นลบจำนวนเล็กน้อยมักจะถูกนำมานับด้วย ซึ่งที่จุดสมดุลนี้มักจะทำให้ในเลือดมีค่าโซเดียมมากเกินไป และมีคลอรีนน้อยกว่าค่าจริงเมื่อเทียบกับน้ำภายนอก มักจะพบว่าโปแตสเซียมในเลือดมีความเข้มข้นมากกว่าในน้ำภายนอก แม้ว่าบางส่วนอาจจะมาจากการปนเปื้อนโดยเซลล์ถ้ามีการนำเลือดทั้งหมดมาใช้ในการวิเคราะห์

การรักษาสมดุลของไอออนที่มีประจุ 2 หน่วย (divalent ion) ยังมีความซับซ้อนมากกว่า บางส่วนของแคลเซียมและแมกนีเซียม จะเกิดพันธะกับโปรตีนหรือไอออนอื่นๆ และไม่แสดงความเป็นไอออน ตัวอย่างเช่น ปู *Gecarcinus lateralis* มีแคลเซียมทั้งหมดในเลือด 22 mmol ในขณะที่มีเพียง 8.6 mmol

ในเลือดที่ผ่านการกรองอย่างละเอียดเพื่อจัดโปรตีนออกไป นั่นคือมีแคลเซียมจับตัวกับโปรตีนอยู่ถึง 13.4 mmol (Skinner et al., 1965 อ้างโดย Mantel และ Farmer, 1983) แคลเซียมที่เกิดพันธะกับสารอื่นจะมีประมาณ 10% ของแคลเซียมทั้งหมดในเลือดของ *Emerita asiatica* (Sitaramaiah และ Krishnan, 1966 อ้างโดย Mantel และ Farmer, 1983) อีกทั้งใน crayfish *Austropotamobius pallipes* มีแคลเซียมที่อยู่ในรูปของไอออนน้อยกว่า 50% ในขณะที่ส่วนอื่นๆ ไปเกิดพันธะกับโปรตีน ไอออนของสารอินทรีย์ขนาดเล็กหรือกับสารอนินทรีย์ เช่น SO_4^{2-} , HCO_3^- , PO_4^{2-} , และ CO_3^{2-} (Greenaway, 1972 อ้างโดย Mantel และ Farmer, 1983) ส่วนใน *Orconectes limosus* พบว่ามีแคลเซียมที่อยู่ในรูปไอออนอยู่ 82% และแมกนีเซียมก็พบว่ามีลักษณะเช่นเดียวกัน (Andrews, 1976 อ้างโดย Mantel และ Farmer, 1983)

divalent ion ที่มีการรักษาสสมดุลไว้ได้เป็นอย่างดี คือ Mg^{2+} และ SO_4^{2-} เมื่อสัตว์อยู่ในน้ำทะเล ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนจะอยู่ระหว่าง 20-80% ของความเข้มข้นในน้ำทะเล โดย มีรายงานการศึกษาที่พบว่าปู *Hyas*, *Lithodes* และ *Dromia* มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมในร่างกายประมาณ 80% ของแมกนีเซียมในน้ำทะเล หรือในปู *Uca* sp. และปู *Ocypode quadrata* มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมในร่างกายมากกว่า 65% ของแมกนีเซียมในน้ำทะเล ส่วนปู grapsids พบว่ามีความเข้มข้นของแมกนีเซียมในร่างกายประมาณ 20-30% ของน้ำทะเล ซึ่งเหมือนกับในเตาปอด (decapod) ที่อาศัยบนบกและกึ่งบกชนิดอื่นๆ (Robertson, 1960 อ้างโดย Mantel และ Farmer, 1983)

4. กลไกของระบบ Osmoregulation

ในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำในกลุ่ม euryhaline เช่น ปู *C. maenas* เป็นปูชนิดที่สามารถทนต่อสภาพสิ่งแวดล้อมทางด้านความเค็มน้ำที่เปลี่ยนแปลงไปได้ซึ่งสภาพนี้เรียกว่า “hyperregulation” และ “hyporegulation” สัตว์เหล่านี้มีความสามารถที่จะรักษาระดับความเข้มข้นของเลือดให้คงที่ในระหว่างที่สัตว์มีการปรับตัวต่อความเค็มน้ำที่เปลี่ยนแปลงไป เซลล์จะมีการต้านต่อ osmotic stress ซึ่งจะทำให้ได้นั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการควบคุมความเข้มข้นในเลือด (Gilles และ Pequeux, 1981) ซึ่งการควบคุมระดับความเข้มข้นของเลือดภายในร่างกายกับน้ำภายนอกนั้นมีอยู่ 2 รูปแบบ ดังนี้

4.1 Hyperregulation

สิ่งมีชีวิตที่อาศัยในน้ำจืดหรือน้ำทะเลที่มีความเจือจางกว่าเลือดของมัน จะต้องเผชิญกับการแพร่เข้าของน้ำภายนอกในร่างกายและการสูญเสียไอออนออกไปสู่สิ่งแวดล้อม แต่ก็สามารถลดภาวะเหล่านี้ได้โดยการลดการนำน้ำและไอออนผ่านเข้าออกโดยการลดขนาดของเยื่อเลือกผ่านให้มีขนาดเล็กลง ซึ่งตามปกติแล้วพวก osmoconformer จะมีการยอมให้สารผ่านเข้าออกได้มากกว่าพวก osmoregulator และจะมีการเปลี่ยนแปลงการยอมให้สารผ่านเข้าออกน้อยเมื่อน้ำภายนอกมีความเค็มลดลง ใน congeneric amphipods ได้แก่ *Gammarus duebeni*, *G. pulex*, *G. lacustris*, *G. zaddachi* และ *G. tigrinis* จะลดการยอมให้โซเดียมผ่านเมื่ออยู่ในสภาวะที่ความเค็มน้ำลดลง (Shaw และ Sutcliffe, 1961, Sutcliffe, 1967a,b, 1968 อ้างโดย Mantel และ Farmer, 1983)

ใน moderate regulator เช่น *C. maenas* (Shaw, 1961 อ้างโดย Mantel และ Farmer, 1983) แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงการยอมให้สารผ่านเข้าออกน้อย ส่วนในพวก strong regulator เช่น *Palaemonetes* sp. พบว่าอัตราการสูญเสียเกลือแร่ผ่านทางพื้นผิวภายนอกจะลดลงเป็นเวลานานๆ เมื่อนำไปอยู่ในน้ำความเค็มต่ำ ส่วนพวก hyperregulator จะลดการยอมให้น้ำผ่านเข้าออกเมื่อต้องเผชิญกับน้ำความเค็มต่ำ

Rhithropanopeus harrisi ซึ่งเป็น hyperosmotic regulator ที่น้ำความเค็มต่ำและเป็น isosmotic ที่น้ำความเค็มปกติ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของน้ำที่ผ่านเข้าออกร่างกายเพิ่มขึ้น 145% ต่อชั่วโมง เมื่ออยู่ในน้ำความเค็ม 45% น้ำทะเล การแลกเปลี่ยนโดยการแพร่จะลดลงเหลือ 70% ต่อชั่วโมง และเมื่ออยู่ในน้ำความเค็ม 1% น้ำทะเล การแลกเปลี่ยนการแพร่จะลดลงเหลือ 10% ต่อชั่วโมง (Smith, 1967 อ้างโดย Mantel และ Farmer, 1983) และยังพบรูปแบบเช่นนี้ในปู *U. pugilator* และ *C. sapidus* (Hannan และ Euans, 1973, Robertson, 1982 อ้างโดย Mantel และ Farmer, 1983)

ใน moderate hyperregulator เช่น *C. maenas* ที่มีการยอมให้น้ำแพร่ผ่านเข้าออกได้มากแสดงให้เห็นว่ามีการยอมให้น้ำผ่านลดลงเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเค็มน้ำจาก 263‰ ต่อชั่วโมงในน้ำทะเลปกติ เป็น 176‰ ต่อชั่วโมงในน้ำความเค็ม 40‰ น้ำทะเล รวมทั้ง isopod *S. serratum* ที่อาศัยในเขตน้ำขึ้นน้ำลง มีการลดการยอมให้น้ำผ่านเข้าออกจาก 820% ต่อชั่วโมง เมื่ออยู่ในน้ำทะเลเป็น 200% ต่อชั่วโมงในความเค็ม 50‰ น้ำทะเล ซึ่งเกิดขึ้นภายใน 30 นาทีเท่านั้น และยังพบว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการลดความเข้มข้นของโซเดียมและคลอรีนในน้ำภายนอกด้วย (Smith, 1970, Thuet, 1978 อ้างโดย Mantel และ Farmer, 1983)

4.2 Hyporegulation

เมื่อสัตว์อยู่ในน้ำที่มีความเค็มสูง สัตว์จะมีการปรับตัวโดยทำให้ของเหลวในร่างกายมีความเข้มข้นต่ำกว่าภายนอกเพราะที่ระดับความเค็มน้ำสูงจะมีเกลือแร่เข้าสู่ร่างกายโดยมาพร้อมกับน้ำปริมาณที่มาก ดังนั้นสัตว์จะมีปรับให้มีความเข้มข้นที่น้อยลงโดยการขับเกลือแร่ออกและรักษาน้ำไว้ให้ได้มากที่สุด ซึ่งเป็นการยากที่จะวัดการยอมให้ผ่านของไอออนได้อย่างแม่นยำ เพราะมักจะมีการแลกเปลี่ยนองค์ประกอบของไอออนที่ไหลออกจากร่างกายอยู่ตลอดเวลา

ในสัตว์ที่มีความสามารถอย่างมากในการปรับระดับสมดุลเกลือแร่ในร่างกายจะแสดงภาวะ hyperosmotic เป็นการกระตุ้นการรับน้ำเข้าภายในตัว ซึ่งจะแพร่ผ่านเข้าสู่ลำไส้และจะพยายามรักษาเกลือแร่ไว้ในตัวให้มากที่สุดเพื่อปรับสมดุลเกลือแร่ในร่างกายเมื่อสภาวะสิ่งแวดล้อมมีความเข้มข้นเกลือแร่ต่ำกว่าภายในตัว (Passano, 1960) และในสัตว์ที่สามารถปรับสมดุลเกลือแร่ได้ไม่ดัดนักจะมีค่าออสโมลาลิตีต่ำทำให้ระบบการแพร่ผ่านเข้าออกของแร่ธาตุต่างๆ ไม่ค่อยสมบูรณ์ ทำให้ต้องใช้พลังงานอย่างมากในการปรับสมดุล (Smith, 1976, Mykles, 1980 อ้างโดย Passano, 1960) การปรับสมดุลนี้จะเป็นตัวรักษาค่าความดันออสโมติกภายในร่างกายให้มีความสัมพันธ์กันอย่างคงที่กับสภาพแวดล้อมภายนอก ซึ่งก็คือการปรับระดับค่าความเข้มข้นภายในร่างกายให้มีค่าสูงหรือต่ำกว่าสิ่งแวดล้อมภายนอกที่อาศัยอยู่ การปรับสมดุลดังกล่าวเพื่อให้สิ่งมีชีวิตสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เมื่อสิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลง จะพบได้ในสิ่งมีชีวิตพวกครัสเตเชียน ซึ่งมีรูปแบบการปรับสมดุลแตกต่างกันออกไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด

ครัสเตเชียนที่อาศัยในน้ำกร่อยส่วนมากจะปรับสภาพสมดุลเกลือแร่ในร่างกายให้สูงกว่าน้ำภายนอก (hyperosmotic) ระดับความเข้มข้นของเกลือแร่ในเลือดจะสูงกว่าน้ำที่อาศัยอยู่ สัตว์ที่อาศัยในน้ำจืด น้ำทะเล เช่น กุ้งน้ำจืด กุ้งทะเล (Caridea และ Penaeids) ปู (Grapsid และ Xanthid) รวมทั้งสัตว์ชนิดอื่นๆ ที่อาศัยอยู่ในน้ำกร่อย พบว่าเลือดจะอยู่ในสภาวะ hyposmotic กับน้ำทะเลปกติและจะปรับสภาพเป็นสภาวะ hyperosmotic เมื่ออยู่ในความเค็มน้ำที่ต่ำลง การรักษาระดับ hyposmotic ในสภาพปกติของปู (Grapsid) และกุ้งบางชนิดทำได้ 2 ทางคือ ทางแรกการดูดน้ำจะเป็นแบบค่อยเป็นค่อยไป ทางที่ 2 การดื่มน้ำเข้าไปโดยตรงเหมือนเช่นปลากระดูกแข็งและในเวลาเดียวกันจะขับเกลือที่มากเกินไปออกทางเหงือก (ประจวบ, 2537)

ส่วนใหญ่แล้วสัตว์พวกครัสเตเชียนที่อาศัยอยู่ในน้ำเค็มนั้น ในเลือดของสัตว์จะมีชนิดและปริมาณของไอออนใกล้เคียงกับของน้ำทะเล ซึ่งส่วนใหญ่แล้วประกอบด้วยโซเดียมและคลอรีน และแรงดันออสโมติกของเลือดก็มาจากไอออนสองตัวนี้เช่นกัน นอกจากนั้นก็มีพวกไอออนอื่นๆ บ้าง เช่น แมกนีเซียม ซัลเฟต และแคลเซียมไอออน เป็นต้น แต่จะมีอยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างน้อย โดยเฉพาะแมกนีเซียมในเลือดของครัสเตเชียนจะมีอยู่น้อยกว่าในน้ำทะเลมาก ถึงแม้องค์ประกอบของไอออนรวมในเลือดกับในน้ำทะเลจะต่างกันบ้าง แต่มันก็สามารถควบคุมให้อยู่ในภาวะสมดุลได้ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไอออนรวมในเลือดกึ่ง อันเนื่องมาจากการปรับตัวทางด้าน สรีรวิทยาต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำภายนอก ไอออนตัวที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นคือ โซเดียม และคลอรีนไอออน ส่วนไอออนตัวอื่นๆ นั้นจะมีปริมาณค่อนข้างคงที่หรือเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (Parry, 1954 อ้างโดย คาริน, 2531)

ไอออนรวมที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเมื่อความเค็มเปลี่ยนแปลง เป็นไอออนรวมที่อยู่ในของเหลวภายนอกเซลล์ (extracellular fluid) ซึ่งได้แก่เลือดนั่นเอง เลือดนี้จะหมุนเวียนไปทั่วร่างกายโดยการสูบฉีดของหัวใจ ปริมาตรของของเหลวนี้จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับว่ากุ้งและปูอยู่ในระยะใดของกระบวนการลอกคราบ องค์ประกอบของของเหลวภายในตัวจะค่อนข้างคงที่ ส่วนอวัยวะที่ใช้ในการปรับสมดุลของของเหลวในร่างกายสัตว์เหล่านี้มี 3 แห่งคือ green gland หรือ maxillary gland เป็นอวัยวะที่คอยควบคุมปริมาณเกลือ เหยือกควบคุมไอออนพวก monovalents เช่น โซเดียม คลอรีน และโปแตสเซียมไอออน ส่วนลำไส้เล็กจะเป็นตัวควบคุมปริมาณไอออนพวก divalence เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม และซัลเฟตไอออน เป็นต้น (Potts และ Parry, 1964)

5. การเปลี่ยนแปลงไอออนในรอบวงจรการลอกคราบ (Ionic change over the molt cycle)

แร่ธาตุมีบทบาทหลายประการสำหรับสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบในเมทริกซ์เนื้อเยื่อที่มีความแข็งแรง เช่น เปลือกหรือโครงร่างแข็ง เนื้อเยื่อที่อ่อนนุ่ม (เช่น ซัลเฟอร์ไนโพรตีน) เมทิลโล-ไพรตีน (เช่น สังกะสีไนคาร์บอกซีเปปติเดต) โคแฟกเตอร์ และ/หรือ ตัวกระตุ้นในเอนไซม์หลายชนิด (เช่น สังกะสี และ แมงกานีส) และฮีโมซัยนิน (เช่น คอปเปอร์) ส่วนแร่ธาตุที่ละลายง่ายกว่า เช่น แคลเซียม โซเดียม โปแตสเซียม แมกนีเซียม คลอไรด์ และฟอสฟอรัส จะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบสมดุลเกลือแร่และรักษาระดับความเป็นกรดต่างภายในร่างกาย และความต่างศักย์ของเมมเบรน

ปูมามีการเจริญเติบโตด้วยการลอกคราบ องค์ประกอบทางเคมีของเลือดมีการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีผลต่อกลไกการควบคุมสรีระเคมีภายในร่างกายเพื่อการเจริญเติบโตและกลไกการลอกคราบมีผลกระทบต่อระยะเวลาการลอกคราบและความสำเร็จในการลอกคราบ การรักษาสสมดุลเกลือแร่ในวงจรการลอกคราบของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนนั้น จะมีการเพิ่มความเข้มข้นของเลือดโดยการเพิ่มปริมาณของแคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และคลอไรด์ โดยดึงมาจากคราบเก่าและจากน้ำภายนอก โดยที่การสะสมจะเริ่มตั้งแต่ระยะหลังลอกคราบ (stage A) จนกระทั่งถึงระยะก่อนลอกคราบ (stage D₁) (Mantel และ Farmer, 1985) ดังจะเห็นได้จากการศึกษาในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน เช่น lobster (*Hormarus americanus*) กุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) และปู *Callinectes sapidus*, *Carcinus* และ *Scylla* ที่พบว่าปริมาณแคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม คลอไรด์ ฟอสฟอรัส ไพรตีน กลูโคส และออสโมลาลิตี (osmolality) จะมีการเปลี่ยนแปลงสัมพันธ์กับวงจรการลอกคราบในเลือด ระยะหลังลอกคราบมักจะต่ำกว่าระยะก่อนลอกคราบ (Vigh and Dendinger 1982; Roer and Dillaman 1984; Cameron 1985; Mercaldo-Allen, 1991; Pratoomchat *et al.*, 2002a, b) แคลเซียมไอออนนับว่าเป็นไอออนที่มีความสำคัญมากในการควบคุมกลไกในการสร้างเปลือกโดยมีทั้งการเคลื่อนย้ายจากเลือดไปสู่เปลือกและในทางกลับกัน (Roer และ Dillaman, 1984; Mangum, 1992;

Ziegler, 1997; Pratoomchat *et al.*, 2000) สารประกอบอินทรีย์ก็มีบทบาทสำคัญเช่นเดียวกัน (Hagerman, 1983)แต่ยังไม่เคยพบการศึกษาดังกล่าวในปูม้า ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่พบจากการวิจัยนี้จะสามารถทราบระดับที่เหมาะสมและวิกฤติสำหรับการควบคุมสมดุลแร่ธาตุ เพื่อที่จะนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อกำหนดและควบคุมปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมเพื่อการเลี้ยงปูม้าให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นต่อไป

6. การศึกษาเอนไซม์ย่อยอาหารของคริสต์เตียน

เอนไซม์ย่อยอาหารของคริสต์เตียนในเชิงปริมาณ และคุณภาพจะมีความสัมพันธ์กับระยะพัฒนาการของคริสต์เตียนวัยอ่อน (Van Wormhoudt *et al.*, 1989) เช่นในกุ้งกลุ่มพีเนียด (Penaeid) พบว่าเอนไซม์อะไมเลสในระยะวัยอ่อนตอนต้นจะมีความเข้มข้นสูงมาก จากนั้นความเข้มข้นจะต่ำลงเนื่องจากถูกแทนที่ด้วยเอนไซม์โปรตีนเอสที่ระยะวัยอ่อนตอนกลาง และตอนปลาย เนื่องมาจากการปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของอาหารที่ได้รับ เช่น กุ้งขาวแวนนาไม ที่มีสัดส่วนเอนไซม์อะไมเลสต่อทริปซินอยู่ในระดับต่ำที่ระยะซูเอีย 1 จากนั้นจะเริ่มมีสัดส่วนสูงขึ้นจนมีค่าสูงสุดที่ระยะซูเอีย 3 คงที่ไปจนถึงระยะไมซิส 3 (Mysis) และลดลงในระยะโพสลาวา (Post larva) นอกจากนี้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส และโปรตีนเอสของปู *Carcinus maenas* ในช่วงก่อนลอกคราบตอนปลาย (Late Pre-molt) จะมีกิจกรรมต่ำ (Ceccadi, 1997) ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ Nucleotide pyrophosphatase ของปู *Callinectes sapidus* จะมีค่าสูงสุดในระยะก่อนการลอกคราบตอนต้น (Early Premolt stage) (Puyear, 1969) ในขณะที่ Vega-Villasante *et al.* (1995) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสค่อนข้างคงที่ในระยะคราบแข็ง (Intermolt stage) ในขณะที่เอนไซม์อะไมเลส และไลเปสมีค่าสูงขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ นอกจากความสัมพันธ์ของกิจกรรมที่เปลี่ยนแปลงตามระยะการลอกคราบแล้วยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับการกินอาหารของคริสต์เตียน

คริสต์เตียนที่กินเนื้อส่วนใหญ่ จะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสสูงดังเช่นการศึกษาใน Midgut gland ของกุ้งทะเลหลายชนิด (Le Moullac *et al.*, 1996; Fernandez-Gimenez *et al.*, 2001; Johnston, 2003) ในขณะที่คริสต์เตียนที่เป็นพวกกินซากหรือผู้ย่อยสลาย จะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสต่ำเช่นในกุ้งเครย์ฟิช (*Cherax quadricarinatus*) เป็นต้น (Figueierdo *et al.*, 2001) นอกจากนี้กิจกรรมของเอนไซม์ยังขึ้นอยู่กับปริมาณของอาหารที่ได้รับอีกด้วย (Anger, 2001) เช่นเอนไซม์โปรตีนเอส และแอลฟาอะไมเลสของคริสต์เตียนจะมีกิจกรรมสูงขึ้นเมื่อมีการเพิ่มระดับของกลูโคส หรือโปรตีนในสูตรอาหาร (Van Wormhoudt *et al.*, 1992) โดยระดับที่เหมาะสมของกลูโคสและโปรตีนคือ 5-10% และ 40-50% ตามลำดับ (Le Moullac *et al.*, 1994)

เอนไซม์ทริปซินเป็นเอนไซม์สำคัญที่มีหน้าที่ย่อยโปรตีนในคริสต์เตียน ซึ่งประกอบด้วยไอโซไซม์ 6 ชนิดมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 kDa (Galgani *et al.*, 1985) ไคโมทริปซินที่สกัดจากเฮปพาโตแพนเคเรียสของกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งจัดเป็น Serine protease homologous ชนิดเดียวกับสัตว์มีกระดูกสันหลัง นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนระดับของโปรตีนในอาหารจะมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงขึ้น คือเพิ่มระดับของเคซีนจาก 25% เป็น 48%และยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินที่ทดสอบกับเนื้อหมึกจะมีค่าสูงมากกว่าการทดสอบกับเจลาติน (Gelatin) (Van wormhoudt *et al.*, 1992)

Cordova-Murueta *et al.* (2003) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินในกุ้งขาวแวนนาไมคืออุณหภูมิ 37°C และ pH 7.5 ในขณะที่ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารจากเฮปพาโตแพนเคเรียสของปูทะเล (*S. serrata*) พบว่าที่อุณหภูมิ 50°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอสอะไมเลส เซลลูเลสและไลลาเนสในขณะที่ pH 7 จะเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอส และอะไมเลส (Pavasovic *et al.*, 2004) สอดคล้องกับ Garcia-Carreno

al.(1997) พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอสของกุ้ง *P. japonicus* อยู่ที่ 5.5-9 ส่วนที่ pH 5.5 จะเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไคลาเนส

Zwilling และ Neurath (1981) พบว่าเอนไซม์ทริปซินในครีستเซียนจะมีกิจกรรมเหมาะสมในช่วง pH 7-9 โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 kDa และมีการตอบสนองต่อ Soybean trypsin inhibitor, Diisopropyl fluorophosphates และ Tosyl-lysyl-chloromethyl ketone กล่าวคือเอนไซม์ในครีستเซียนส่วนใหญ่จะมีกิจกรรมที่สภาวะเหมาะสมกับเป็นกลางจนถึงเบส เนื่องจากครีستเซียนจะมี Acidic isoelectric point ในขณะที่ Brockerhoff *et al.* (1970) ซึ่งศึกษาเอนไซม์โปรตีนเอส 7 ชนิดในลอบสเตอร์ (*H. americanus*) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 12.5-50.0 kDa โดยมีเอนไซม์บางชนิดจะมีสภาวะ pH ที่เหมาะสมที่ pH 4 และ 8 ซึ่งพบว่าเอนไซม์โปรตีนเอสในกุ้ง *Astacus* sp. มีน้ำหนักโมเลกุลเพียง 11 kDa

ปริมาณอาหารที่ครีستเซียนได้รับมีผลโดยตรงกับความถี่ของการกินอาหาร อัตราการเจริญเติบโต และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร กล่าวได้ว่าในช่วงที่ครีستเซียนได้รับอาหารที่เหมาะสมเพียงพอกับความ ต้องการจะมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่ม และส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นด้วยทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับ ความถี่ของการกินที่มากขึ้นนั่นเอง จนกระทั่งครีستเซียนมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดถึงจุดจุดหนึ่ง กิจกรรมของเอนไซม์ก็จะมีความสูงที่สุดเช่นกัน จากนั้นอัตราการเจริญเติบโตจะคงที่ต่อไปเรื่อย ๆ แม้ว่าจะมีอัตราการกิน ที่มากขึ้นเพราะปริมาณอาหารที่เพิ่มขึ้นก็ตาม แต่กลับพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเรื่อย ๆ และคงที่เมื่อ อัตราการกินคงที่เนื่องจากปริมาณอาหารสูงสุดแล้ว (Anger, 2001)

อัตราการรอดตายของปูม้ายังคงต่ำเนื่องจากปูม้ามักมีพฤติกรรมการกินกันเอง เนื่องจากปูม้ามีวงจร ลอกคราบที่ยาวนาน อีกทั้งใช้เวลาของการสร้างเปลือกภายหลังลอกคราบ จึงส่งผลให้มีพฤติกรรมการกิน กันเองที่รุนแรงขึ้นอาหารที่เหมาะสมกับการเลี้ยงปูม้าควรจะเป็นประเด็นหนึ่งที่จะต้องให้ความสำคัญเป็นลำดับ แรก เนื่องจากเมื่อได้รับชนิดอาหารที่มีความเหมาะสมก็อาจทำให้พฤติกรรมการกินกันเองของปูม้าลดลงและ สามารถเพิ่มอัตราการรอดตายได้การนำสารอาหารไปใช้เป็นพลังงานสำหรับการลอกคราบ และเจริญเติบโต อย่างมีประสิทธิภาพนั้น กิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิดเป็นตัวแปรหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับอัตราการ เจริญเติบโตและคุณภาพของอาหารเช่น เอนไซม์อะไมเลสและโปรตีนเอส (Wormhoudt *et al.*, 1992) เอนไซม์ทริปซินนับว่าเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญอีกชนิดหนึ่งที่เหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์สำคัญหลาย ชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ไคโมทริปซินโดยเอนไซม์ 2 ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยโปรตีน ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณกรดอะมิโน และเพปไทด์ (Peptide) ในพลาสมา (Plasma) ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อการ เจริญเติบโต (Torrisen *et al.*, 1994) นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินมีความสัมพันธ์ กับการเจริญเติบโตของกุ้งขาว (*L. vannamei*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับของเค ซีน (Casein) และแหล่งโปรตีน (Le Moullac *et al.*, 1996) จึงนับว่าการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์มี ความสำคัญเนื่องจากสามารถอธิบายความต้องการชนิดอาหารซึ่งสัมพันธ์กับวงจรการลอกคราบของปูม้าและ สามารถคัดเลือกชนิดของวัตถุดิบอาหาร เพื่อการผลิตอาหารสำเร็จรูปที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงปูม้า

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์

- 1.1.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 1.1.2 เครื่องเหวี่ยงตกตะกอนควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge)
- 1.1.3 ตู้แช่แข็ง -80°C (Deep freeze refrigerator)
- 1.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรด ด่าง (pH Meter)
- 1.1.5 ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette)
- 1.1.6 โกร่งแก้ว (Glass Homogenizer)
- 1.1.7 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)
- 1.1.8 หลอดแอปเพนดอร์ฟ (Appendorf Tube)
- 1.1.9 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
- 1.1.10 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)
- 1.1.11 ตู้อบ (Hot air oven)
- 1.1.12 ตู้เผา (Muffle Furnace)
- 1.1.13 เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน (Kjeltec system)
- 1.1.14 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 1.1.15 เครื่องวิเคราะห์ไขมัน
- 1.1.16 โถดูดความชื้น (Desiccators)
- 1.1.17 ถ้วยกระเบื้อง (Crucible)
- 1.1.18 Dialysis tube (MW cut off 10,000 Da)
- 1.1.19 Autopipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร
- 1.1.20 Microcentrifuge
- 1.1.21 X – ray fluorescent Spectrophotometer ED²⁰⁰⁰
- 1.1.22 เครื่องมือวัดการดูดกลืนแสง
- 1.1.23 เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortex Mixer)

1.2 อุปกรณ์ และสารเคมีทางการเพาะเลี้ยง

- 1.2.1 ปูม้า
- 1.2.2 เครื่องวัดความเค็ม (Hand refractometer)
- 1.2.3 คลอรีนผง $\text{Ca}(\text{OCl})_2$
- 1.2.4 โพรโตนไโอไดต์
- 1.2.5 ถังไฟเบอร์กลาสปริมาตร 500 L
- 1.2.6 บ่อซีเมนต์ขนาด 1 m^3 และ 5 m^3
- 1.2.7 หัวทรายและสายอากาศ

1.3 สารเคมีสำหรับการเตรียมบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ

- 1.3.1 Glycine ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)
- 1.3.2 Hydrochloric acid (HCl)

- 1.3.3 Citric acid monohydrate ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)
- 1.3.4 Disodium hydrogen phosphate ($Na_2 HPO_4 \cdot 2H_2O$)
- 1.3.5 Sodium dihydrogen phosphate ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)
- 1.3.6 Sodium carbonate (Na_2CO_3)
- 1.3.7 Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)
- 1.3.8 Sodium hydroxide ($NaOH$)
- 1.3.9 Potassium chloride (KCl)

1.4 สารเคมีสำหรับการศึกษากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์

- 1.4.1 N, α -Benzoyl-L-arginine -p-nitroanilide Hydrochloride ($C_{12}H_{22}N_6O_4 \cdot HCl$)
- 1.4.2 p-Nitroaniline ($C_6H_6N_2O_2$)
- 1.4.3 N-Succinyl- Ala-Ala-Pro-Phe p- Nitroanilide ($C_{30}H_{36}N_6O_9$)
- 1.4.4 N, N-Dimethylformamide (C_3H_7NO)
- 1.4.5 Tris-hydrochloride ($C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$)
- 1.4.6 EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)
- 1.4.7 3, 5-Dinitrosalicylic acid (DNS)
- 1.4.8 Starch solution
- 1.4.9 Azocasein solution
- 1.4.10 Trichloroacetic acid (TCA)

1.5 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแร่ธาตุ

- 1.5.1 Bovine serum albumin ($C_8H_{21}NOSi_2$)
- 1.5.2 Sodium carbonate (Na_2CO_3)
- 1.5.3 Sodium hydroxide ($NaOH$)
- 1.5.4 Copper sulphate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)
- 1.5.5 Potassium sodium tartrate
- 1.5.6 Folin-Ciocalteu
- 1.5.7 30 % - Tri Sodium Citrate

2. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

ปฏิกิริยาจากธรรมชาติขนาดความกว้างกระตอง 8-9 เซนติเมตร น้ำหนัก 50-60 กรัม

3. สถานที่ทำการเพาะเลี้ยง

โรงเพาะเลี้ยงภาควิชาชีววิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาจังหวัดชลบุรี

4. ระยะเวลาทำการทดลอง

ทำการทดลองตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2557 ถึงวันที่ 30 เมษายน พ.ศ. 2558

5. การเลี้ยงและการให้อาหารปูม้า

เลี้ยงปูม้าในถังไฟเบอร์กลาส โดยใช้ปริมาณน้ำทะเลความเค็ม 30 psu ในการเลี้ยงประมาณ 100 ลิตร ซึ่งน้ำจะท่วมตัวปูประมาณ 10 เซนติเมตร วางสายอากาศบ่อละ 2 จุด โดยเปิดอากาศเต็มที่ ที่พื้นถังไฟเบอร์กลาสจะเรียงด้วยฟองเปลือกหอยแมลงภู่ ให้กระจายครอบคลุมพื้นที่เพื่อเป็นที่กำบัง และลดการกระทบกระแทกกันของปูม้า ทำการเลี้ยงทั้งหมด 10 บ่อ การให้อาหารจะใช้ปลาข้างเหลืองหั่นเป็นชิ้นๆ ให้ประมาณ 10-15% ของน้ำหนักตัวปู ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เวลา 09.00 น และ 16.00 น

ระหว่างการเลี้ยงปูม้า จะมีการสุ่มตัวอย่างน้ำเพื่อตรวจสอบคุณภาพด้วยชุดวิเคราะห์คุณภาพน้ำวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (D.O. meter) pH (pH meter) และเทอร์โมมิเตอร์สำหรับวัดอุณหภูมิ มีการควบคุม และรักษาระดับของคุณภาพน้ำตลอดการเพาะเลี้ยง ดังนั้นความเค็มน้ำมีค่า 25-28 ppt pH มีค่า 7.5-8.3 แอมโมเนีย < 0.5 ppm ไนโตร < 0.2 ppm ออกซิเจนที่ละลายในน้ำสูงกว่า 5.7 ppm และอัลคาไลน์มีค่า 90-120 ppm

6. การวางแผนการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 8 การทดลองจากระยะลอกคราบทั้งสิ้น 8 ระยะ ได้แก่ ระยะหลังลอกคราบใหม่ ๆ (Early post-molt, A stage) ระยะหลังลอกคราบ (Post-molt, B stage) ระยะคราบแข็ง (Intermolt, C1, C2 stages) และระยะก่อนลอกคราบ (Premolt, D1, D2, D3 และ D4 stages) (Pratoomchat และ Jindadam, 2007) ทำการตรวจสอบระยะลอกคราบทุก 5-7 วัน เมื่อพบว่าปูม้าเข้าสู่ระยะที่ต้องการจึงทำการเก็บตัวอย่างมาเพื่อเก็บเลือดและเก็บตับทำการทดลอง 5 ซ้ำ

7. การเก็บตัวอย่างเลือดปูม้า

ทำการดูดเลือดปูม้าโดยใช้เข็มฉีดยา (Tuberculin ขนาด 1.0 ml ด้วยเข็มเบอร์ 26) แทงลงผ่าน Arthodial membrane บริเวณโคนของรยางค์ (รยางค์คู่ที่ 1 หรือที่เรียกว่าโคนก้ามหนีบ) นำเลือดเก็บไว้ใน appendroff โดยผสม 10% tri-sodium citrate ซึ่งเป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant) ลงไปด้วย ในอัตราส่วน 1:1 (ใช้เลือด 1 ml : 10% tri-sodium citrate 1 ml) เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บในตู้แช่เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. การเตรียมพลาสมาปูม้า

นำเลือดปูม้าที่ผสม 10% tri-sodium citrate ดังข้อ 7 ไปปั่นเพื่อให้ตกตะกอน (ควรทิ้งให้เลือดใน appendroff เป็นของเหลวก่อน) ด้วยเครื่อง microcentrifuge เพื่อให้เม็ดเลือดตกตะกอนรวมตัวกันที่ก้นหลอดด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานประมาณ 15 -20 นาที แล้วดูดของเหลวส่วนบน (Supernatant) ซึ่งก็คือพลาสมาเก็บไว้ใน appendroff ใหม่

9. การวัดปริมาณแร่ธาตุ

ใช้ autopipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ดูดพลาสมาปูม้ามาใส่ cup โดยด้านล่างหุ้มด้วย prolene film แล้วนำไปวัดปริมาณของธาตุโซเดียม คลอรีน โพแทสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม ด้วยเครื่อง X-ray fluorescent spectrophotometer ED²⁰⁰⁰ ตามวิธีการของ Pratoomchat *et al.* (2003) จะได้ปริมาณของแร่ธาตุต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นมีหน่วยเป็น mg/l แล้วนำมาคำนวณเปลี่ยนให้เป็นหน่วย mmol/l

10. การเก็บตัวอย่างตับ (hepatopancreas) และการสกัดเอนไซม์ย่อยอาหาร

10.1 สลบลู แล้วทำการผ่าตัดตับและนำตับออกมา แต่ในกรณีที่ยังไม่ทำการสกัดโดยทันทีให้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ย่อยอาหาร

10.2 นำตับมาบดใน 50 mM Tris buffer, pH 7.0 ที่มี 200 mM NaCl ในอัตราส่วน 1: 3 (W/V) ที่อุณหภูมิ 4°C นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ 15,000 g เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

10.3 ดูดเอาส่วนที่เป็นของเหลวออกมาโดยระวังไม่ให้ดูดเอาส่วนที่เป็นไขมันด้านบนออกมาด้วย และนำของเหลวที่ได้ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะทดลองต่อไป

10.4 ความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์วิเคราะห์ตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951).

11 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ

11.1 ทริปซินและไคโมทริปซิน (Trypsin and chymotrypsin)

เอนไซม์ 10 μL กิจกรรมจำเพาะของทริปซินและไคโมทริปซิน วัดจากการเพิ่มขึ้นของ *p*-nitroaniline ด้วยการใส่ benzoyl-*L*-arginine-*p*-nitroanilide และ *N*-succinyl-ala-ala-pro-phe-*p*-nitroanilide ตามวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen (2007) ใช้ 100 mM phosphate buffer pH 9 ที่อุณหภูมิ 60°C และ 40°C , ตามลำดับ สำหรับ trypsin และ chymotrypsin (Chamchuen *et al.*, 2008) เจือจางเอนไซม์ที่สกัด 1:2 (v/v) ด้วยบัฟเฟอร์ก่อนใช้ วัดเป็นหน่วย $\mu\text{mol p-nitroaniline produced min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$

11.2 แอลฟาอะไมเลส (α Amylase)

นำเอนไซม์ 5 μL กับสารละลายน้ำแป้ง 2% ปริมาตร 125 μL ในหลอดทดลองบ่มที่ pH 7 อุณหภูมิ 50°C นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย Dinitrosalicylic acid (DNS) 250 μL แล้วต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เมื่อเย็นแล้วจึงเติมน้ำกลั่น 2 mL จึงทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm โดยเทียบความเข้มข้นกับกราฟมาตรฐานมอลโทส การรายงานเป็น $\mu\text{mol maltose min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ วิธีดังกล่าวดัดแปลงจาก Bernfeld (1951) และ Chamchuen *et al.* (2008)

11.3 โปรติเอส (Protease)

เอนไซม์ 5 μL ผสมกับสารละลาย Azocasein 125 μL ในหลอดทดลองบ่มไว้นาน 15 นาที ที่ pH 7 อุณหภูมิ 60°C นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% Trichloro acetic acid 1.2 mL เทใส่ Appendoff เข้าเครื่องเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลานาน 15 นาที ดูด Supernatant ผสมกับ 1M NaOH 1.4 mL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm รายงานค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเนสเป็น $\text{mmol Azocasein min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ วิธีดังกล่าวดัดแปลงจาก Vega-villasante *et al.* (1995) และ Chamchuen *et al.* (2008)

12. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

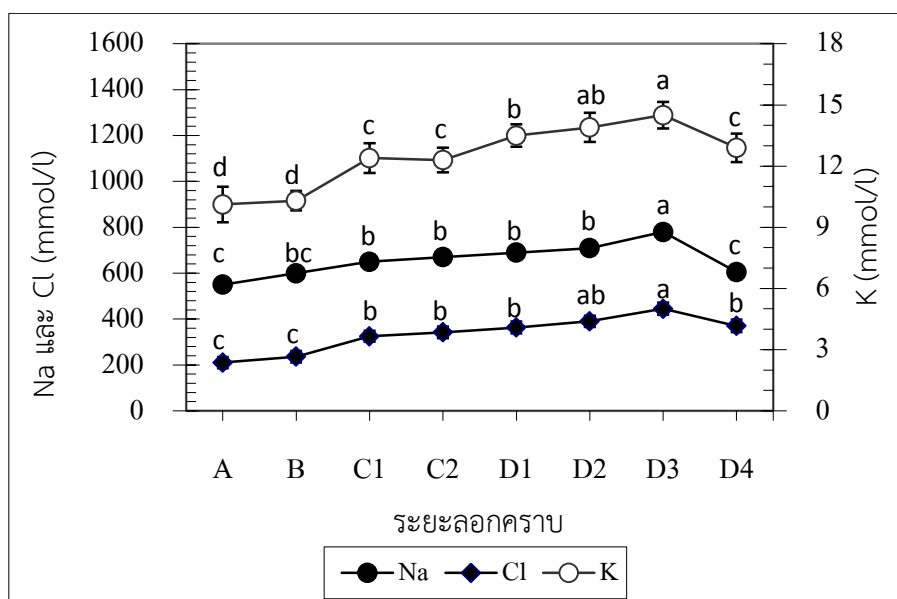
ข้อมูลโซเดียม โปแตสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม และคลอรีน ในเลือดของปูม้า และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ของทริปซิน ไคโมทริปซิน โปรติเอส และอะไมเลสของปูม้าทั้ง 8 ระยะลอกคราบมาทำวิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of variance) และนำมาหาค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้วิธี Duncan New' Multiple Rang Test

ผลการวิจัย

จากผลการวิจัย ข้อมูลแร่ธาตุทั้ง 5 ชนิด และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ของปูม้าทั้ง 8 ระยะลอกคราบให้ผลดังต่อไปนี้

1. โซเดียม คลอรีน และโพแทสเซียม

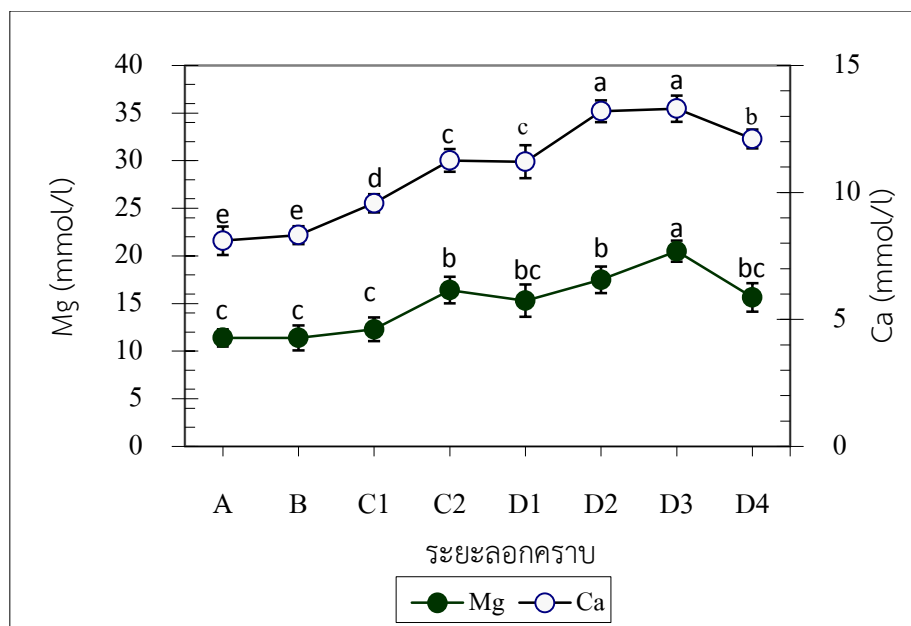
จากการทดลองพบว่าปริมาณของธาตุโซเดียมมีความเข้มข้นสูงขึ้น ($p < 0.05$) จากระยะลอกคราบ A-B ไป C1 และเพิ่มขึ้น ($p > 0.05$) ต่อเนื่องจนถึงระยะ D2 โดยมีค่าสูงขึ้น ($p < 0.05$) ในระยะ D3 ก่อนจะลดลง ($p < 0.05$) ที่ระยะ D4 ตามลำดับ (รูปที่ 1) ส่วนโพแทสเซียมมีความเข้มข้นสูงขึ้น ($p < 0.05$) จากระยะลอกคราบ A-B ไปที่ C1 คงที่ในระยะ C1-C2 ก่อนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ($p < 0.05$) ที่ระยะ D1 ถึง D3 ก่อนค่าจะลดลง ($p < 0.05$) ที่ระยะ D4 (รูปที่ 1) โดยคลอรีน ก็มีลักษณะคล้าย ๆ กัน โดยมีค่าต่ำในระยะ A-B และมีค่าสูงขึ้นตามลำดับ ($p > 0.05$) ที่ระยะ C1-D2 จนมีค่าสูงขึ้น ($p < 0.05$) ที่ระยะ D3 ก่อนจะลดลง ($p < 0.05$) อีกครั้งที่ระยะ D4 เช่นเดียวกัน (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ โซเดียม คลอรีน และโพแทสเซียมในพลาสมาของปูม้า (*P. pelagicus*) ตลอดวงจรลอกคราบ

2. แมกนีเซียม และแคลเซียม

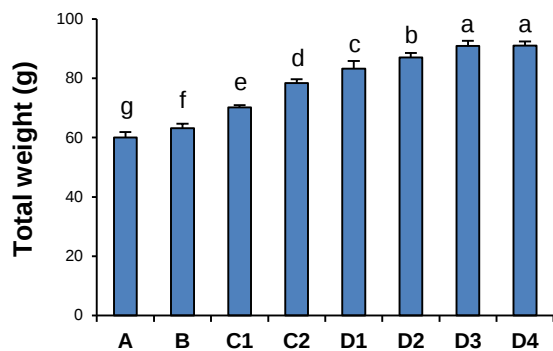
จากการทดลองพบว่าแมกนีเซียมมีค่าคงที่ช่วงระยะลอกคราบ A, B และ C1 และค่าจะเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ที่ระยะ C2 และไม่เปลี่ยนแปลงช่วง C2 ถึง D1 จนสูงขึ้น ($p < 0.05$) ช่วง D2-D3 ก่อนจะลดลง ($p < 0.05$) ที่ระยะ D4 (รูปที่ 2) ขณะที่แคลเซียมมีค่าคงที่ช่วงระยะ A, B และค่าจะเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ที่ระยะ C1 ถึง C2-D1 และยังคงสูงขึ้น ($p < 0.05$) ต่อเนื่องช่วง D2-D3 ก่อนจะลดลง ($p < 0.05$) ที่ระยะ D4 (รูปที่ 2)



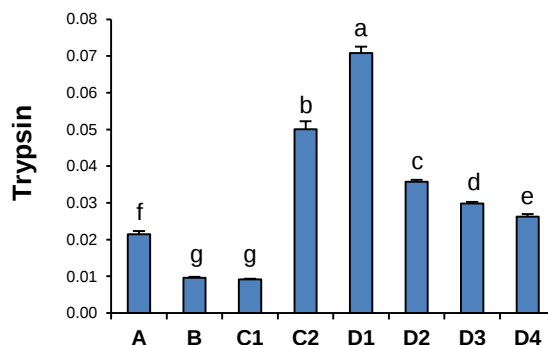
รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแมกนีเซียม และแคลเซียมในพลาสมาของปูม้า (*P. pelagicus*) ตลอดวงจรลอกคราบ

3. กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์

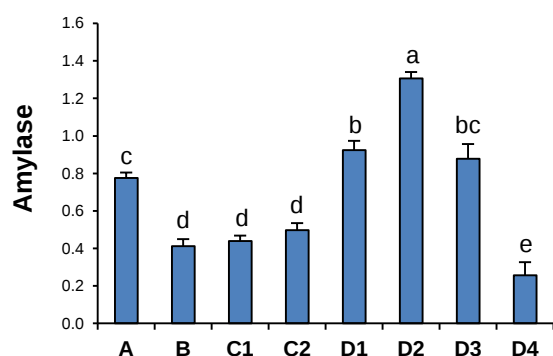
จากการทดลองพบว่าน้ำหนักรปูม้ามักเพิ่มขึ้นช่วง 35 วันของการเลี้ยง ซึ่งพบว่าปูม้ามมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นจากระยะลอกคราบ A ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นสูงสุด ($p < 0.05$) ที่ระยะ D3 (รูปที่ 3ก) กิจกรรมจำเพาะของ Amylase มีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับจากระยะ B จนสูงสุดที่ระยะ D2 ($p < 0.05$) และลดลงต่ำสุด ($p < 0.05$) ที่ระยะ D4 (รูปที่ 3ข) กิจกรรมจำเพาะของ Protease และ Trypsin มีค่าเพิ่มขึ้นจากระยะ B-C1 จนสูงสุดที่ระยะ D1 ($p < 0.05$) และลดลงหลังจากนั้นจนต่ำสุด ($p < 0.05$) ที่ระยะ D4 (รูปที่ 3ค และ 3ง) กิจกรรมจำเพาะของ Chymotrypsin มีค่าเพิ่มขึ้นจากระยะ A-C1 จนสูงสุดที่ระยะ C2 ($p < 0.05$) และลดลงตามลำดับหลังจากนั้นจนต่ำสุด ($p < 0.05$) ที่ระยะ D4 (รูปที่ 3จ) รวมถึง อัตราส่วนของกิจกรรมจำเพาะ Trypsin ต่อ Chymotrypsin (T/C ratio) มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากระยะ B จนมีค่าสูงสุด ($p < 0.05$) ที่ระยะ D4 (รูปที่ 3ฉ)



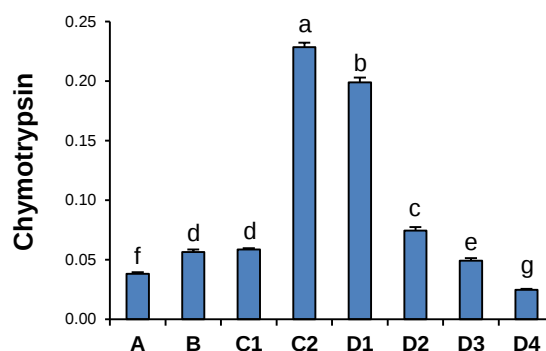
(ก)



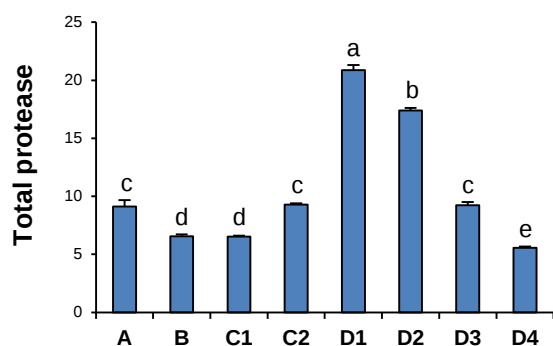
(ง)



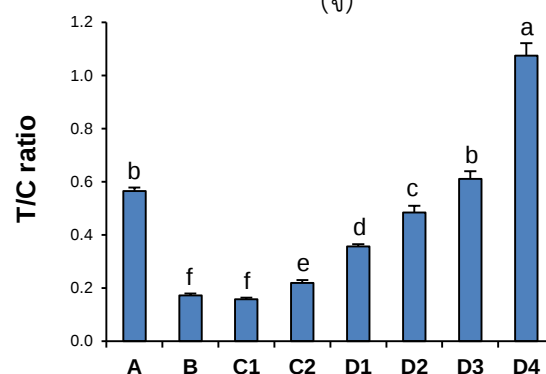
(ข)



(จ)



(ค)



(ฉ)

ระยะลอกคราบ

ระยะลอกคราบ

รูปที่ 3 น้ำหนัก (ก) กิจกรรมจำเพาะ (specific activities) ของ amylase ($\mu\text{mol maltose min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) (ข), total protease (U mg protein^{-1}) (ค), trypsin (ง) and chymotrypsin ($\mu\text{mol } p\text{-nitroaniline min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) (จ), และอัตราส่วนของ trypsin และ chymotrypsin (T/C ratio) (ฉ) ของปูม้า (*P. pelagicus*) ที่ระยะลอกคราบ 8 ระยะ; early postmolt (A), postmolt (B), intermolt (C1), late intermolt (C2), early premolt (D1), mid premolt (D2), late premolt (D3), and very late premolt (D4).

กราฟแท่งแสดง $\pm$ S.E. ($n = 3-5$) และอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนแท่งกราฟหมายถึงมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).

