



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

.....
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (สัตววิทยา)

ปริญญา

.....
สัตววิทยา

.....
สัตววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การใช้เทคนิคทางชีวเคมีในการประเมินคุณภาพอาหารต่อการเจริญเติบโต คุณภาพเนื้อ และการพัฒนาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกานน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* (Lea, 1856)

Biochemical Evaluation of Dietary Quality in Relation to Growth Rate, Muscle Quality and Sexual Maturation of Freshwater Mussel *Chamberlainia hainesiana* (Lea, 1856)

นามผู้วิจัย นางวิไลลักษณ์ เครือเนตร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(..... รองศาสตราจารย์อุทัยวรรณ โกวิทวดี, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(..... ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรุณี อิงคากุล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(..... รองศาสตราจารย์มณจันทร์ เมฆชน, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(..... รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้เทคนิคทางชีวเคมีในการประเมินคุณภาพอาหารต่อการเจริญเติบโต คุณภาพเนื้อ
และการพัฒนาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกาบน้ำจืด

Chamberlainia hainesiana (Lea, 1856)

Biochemical Evaluation of Dietary Quality in Relation to Growth Rate, Muscle Quality
and Sexual Maturation of Freshwater Mussel *Chamberlainia hainesiana* (Lea, 1856)

โดย

นางวิไลลักษณ์ เกรือเนตร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (สัตววิทยา)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิไลลักษณ์ เครือเนตร 2557: การใช้เทคนิคทางชีวเคมีในการประเมินคุณภาพอาหาร ต่อการเจริญเติบโต คุณภาพเนื้อ และการพัฒนาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* (Lea, 1856) ปรินญาปรัชญาคุณวุฒิบัณฑิต (สัตววิทยา) สาขาสัตววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์อุทัยวรรณ โกวิทวที, Ph.D. 99 หน้า

การแสดงออกของกิจกรรมของเอนไซม์จากต่อมย่อยอาหารร่วมกับกระเพาะอาหารของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* พบว่าอะไมเลส โปรติเอส และไลเปส แสดงกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ไม่พบแอลคาไลน์โปรติเอสในการศึกษาครั้งนี้ สภาวะดังกล่าวเหมาะสมต่อการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง โดยการประเมินประสิทธิภาพการถูกย่อยในหลอดทดลองของอาหารสำเร็จรูปทางการค้า 5 สูตร และวัตถุดิบอาหาร 21 ชนิด จากสาหร่าย พีช และ สัตว์ พบว่าวัตถุดิบอาหารที่มีโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ที่มีประสิทธิภาพของการถูกย่อยสูงสุดได้แก่ กากถั่วเหลือง และปลายข้าว ตามลำดับ พบการแสดงออกของกิจกรรมของ trypsin-like enzyme ที่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเพศเมียมีค่ากิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ผลของการเลี้ยง *C. hainesiana* ด้วยสูตรอาหารที่พัฒนาจากการคัดเลือกวัตถุดิบจากการประเมินประสิทธิภาพการถูกย่อยในหลอดทดลอง (สูตรอาหาร โปรตีนร้อยละ 35, 40 และ 45) และสาหร่ายสด พบว่าไม่แตกต่างกัน โดยระยะเวลาที่ใช้เลี้ยงมีผลต่อระดับกิจกรรมจำเพาะของอะไมเลส และไลเปส ($P < 0.01$) ขณะที่ระดับกิจกรรมจำเพาะของโปรติเอสมีอิทธิพลมาจากปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างสูตรอาหารและระยะเวลาที่ใช้เลี้ยง ($P < 0.01$) โดยที่ไม่มีความแตกต่างกันของคุณภาพกล้ามเนื้อ พบการเจริญเติบโตลดลงเนื่องจากหอยอยู่ในระยะเจริญพันธุ์

พบเซลล์สืบพันธุ์ 3 ระยะจากอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* เพศเมียที่เลี้ยงในบ่อดิน คือ immature oocyte I, immature oocyte II และ maturing oocyte I หลังจากนั้นจะเคลื่อนไป outer demibranch พัฒนาเข้าสู่ระยะ mature oocyte ระดับกิจกรรมจำเพาะของ trypsin-like enzyme มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ระยะ maturing oocyte I ($r = 0.812, P < 0.01$) ปริมาณ RNA มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ระยะ maturing oocyte I ($r = -0.326, P < 0.05$) และ immature oocyte I ($r = -0.519, P < 0.01$) ปริมาณ โปรตีนมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ระยะ immature oocyte I ($r = -0.533, P < 0.01$) และ immature oocyte II ($r = -0.517, P < 0.01$) ส่วนปริมาณ RNA/protein ratio มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับระดับกิจกรรมจำเพาะของ trypsin-like enzyme ($r = -0.339, P < 0.01$) แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับกิจกรรมจำเพาะของ trypsin-like enzyme และปริมาณ โปรตีนในไข่

อุณหภูมินี้มีความสัมพันธ์ต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ระยะ immature oocyte I และ maturing oocyte I พีเอช ($r = -0.766, P < 0.01$) มีความสัมพันธ์กับ immature oocyte I ความเป็นด่าง ($r = 0.683, P < 0.05$) ในเตรท ($r = -0.676, P < 0.01$) และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์อิสระ ($r = -0.736, P < 0.01$) มีความสัมพันธ์กับ immature oocyte II ขณะที่ค่าการนำไฟฟ้า ($r = -0.799, P < 0.01$) และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ($r = -0.867, P < 0.01$) มีความสัมพันธ์กับ maturing oocyte I

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Wilailuk Khruanet 2014: Biochemical Evaluation of Dietary Quality in Relation to Growth Rate, Muscle Quality and Sexual Maturation of Freshwater Mussel *Chamberlainia hainesiana* (Lea, 1856). Doctor of Philosophy (Zoology), Major Field: Zoology, Department of Zoology.
Thesis Advisor: Associate Professor Uthaiwan Kovitvadhi, Ph.D. 99 pages.

The activities of enzymes from digestive gland including stomach from freshwater mussel *Chamberlainia hainesiana* revealed the suitable optimal conditions at pH 6 40°C for amylase activity, pH 5 50°C for protease activity, and pH 8 50°C for lipase activity. No alkaline protease activities were detected. These conditions are suitable for future study on *in vitro* digestibility of feeds and feedstuffs. *In vitro* digestibility of 5 commercial diets and 21 feedstuffs from algae, plants and animals revealed that broken rice and soybean meal had the highest carbohydrate and protein digestibilities, respectively. The activity of trypsin-like enzyme has been found in oocytes of females, with optimal condition at pH 6 40°C.

Artificial diets were formulated based on *in vitro* digestibility screening of feedstuffs, prepared at 35%, 40% and 45% protein levels, and algae. There were no differences in the *in vitro* digestibility values between them. Changes in specific activities of amylase and lipase were dependent on time of treatment ($P < 0.01$), while that of protease specific activity was dependent on the interaction between time of treatment and feed quality ($P < 0.01$). The muscle qualities of freshwater mussels were similar between treatments at the end of experiment with 3 months period ($P > 0.05$). Growth was found to decrease due to maturation.

There were three stages of eggs observed; immature oocyte I, immature oocyte II and maturing oocyte I from the female gonad of mussels fed freely with natural plankton in the pond. After that, maturing oocyte I was moved to outer demibranch for the mature oocyte development. Trypsin-like specific activity was correlated with the number of maturing oocyte I ($r = 0.812, P < 0.01$). RNA levels were inversely correlated with the number of maturing oocyte I ($r = -0.326, P < 0.05$) and immature oocyte I ($r = -0.519, P < 0.01$). Protein levels were inversely correlated with the number of immature oocyte I ($r = -0.533, P < 0.01$) and immature oocyte II ($r = -0.517, P < 0.01$). RNA/protein ratio was inversely correlated with specific activity of trypsin-like enzyme ($r = -0.339, P < 0.01$) indicating a positive relationship between trypsin-like specific activity and protein level.

Water temperature had relationships with productions of immature oocyte I and maturing oocyte I. The pH ($r = -0.766, P < 0.01$) was generally inversely correlated with the production of immature oocyte I. Alkalinity ($r = 0.683, P < 0.05$), nitrate ($r = -0.676, P < 0.01$) and free CO₂ ($r = -0.736, P < 0.01$) were correlated with the production of immature oocyte II. Conductivity ($r = -0.799, P < 0.01$), and dissolved oxygen ($r = -0.867, P < 0.01$) were inversely correlated with the production of maturing oocyte I.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อุทัยวรรณ โกวิทวาทิ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง ที่ได้อบรมสั่งสอนให้ความรู้ เสนอแนะแนวทางในการศึกษา ให้คำปรึกษาในด้านการวางแผนการทดลอง การเก็บตัวอย่าง เรียบเรียงและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณี อิงคากุล กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาอบรมสั่งสอน ให้ความรู้ให้คำปรึกษาด้านการทดลอง และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ Dr. Krisna Rungruangsak-Torrissen ผู้เชี่ยวชาญจากต่างประเทศที่ให้คำแนะนำแนวทางในการศึกษาวิเคราะห์ และช่วยแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. การุณ ทองประจุแก้ว ที่ให้คำปรึกษาในระหว่างการวิเคราะห์เอนไซม์ และประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง ขอกราบขอบพระคุณประธานกรรมการสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกียรติทิวิ ชวงส์โกมล และรองศาสตราจารย์ ดร. มยุภา อารีกิจเสรี ผู้ทรงคุณวุฒิที่กรุณาให้คำแนะนำในการเขียน และแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณพิศมัย สมสืบ หัวหน้ากลุ่มงานวิจัยและพัฒนาการผลิตอาหารสัตว์น้ำจืด คุณนันทนา ทองคด นักวิชาการ และ คุณบุญธิดา กิจไพศาล พนักงานราชการจากกรมประมงที่ให้ความอนุเคราะห์ผลิตอาหารเพื่อใช้ในการทดลอง ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. ชมภูณัฐ วรากุลวิทย์ จากศูนย์นาโนเทคโนโลยี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องโซนิเคเตอร์สำหรับการศึกษาปริมาณ RNA และ protein ในกล้ามเนื้อ

ขอขอบคุณภาควิชาสัตววิทยา และ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย ขอขอบคุณคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่อนุเคราะห์สถานที่เลี้ยงหอย ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และทุนวิจัยจากโครงการพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาที่ให้ความสนับสนุนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

วิไลลักษณ์ เครือเนตร

ธันวาคม 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	31
ผล	31
วิจารณ์	61
สรุปและข้อเสนอแนะ	71
สรุป	71
ข้อเสนอแนะ	73
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	74
ภาคผนวก	87
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และกราฟมาตรฐานน้ำตาลมอดโทส	88
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมี	92
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี	95
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	98

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเพาะเลี้ยงหอยกาบน้ำจืดระยะ โกลคิเดียในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งโปรตีนแตกต่างกัน	11
2	อัตราส่วนของวัตถุดิบอาหาร (ร็อยละ) ของอาหารสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยงหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i>	26
3	องค์ประกอบทางเคมีของอาหารสำเร็จรูปเลี้ยงสัตว์น้ำและวัตถุดิบอาหารที่ใช้สำหรับประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง	38
4	องค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยงหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> ที่มีโปรตีนแตกต่างกัน 3 ระดับ	42
5	ผลของระยะเวลาเลี้ยง (1, 2 และ 3 เดือน) และอาหารที่ใช้เลี้ยงหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> (สำหรับยสด และสูตรอาหารสำเร็จรูปที่มีโปรตีนแตกต่างกัน 3 ระดับ) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ อะไมเลส ไลเปส และโปรติเอสจากต่อมย่อยอาหารรวมกับกระเพาะอาหาร	46
6	องค์ประกอบของกรดไขมันในกล้ามเนื้อแอดดักเตอร์ส่วนท้ายของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> ที่เลี้ยงด้วยสำหรับยสด และสูตรอาหารสำเร็จรูปที่มีโปรตีนแตกต่างกัน 3 ระดับ	49
7	คุณภาพน้ำในตู้เลี้ยงของการเพาะเลี้ยงหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 4 สูตร	50
8	การเจริญเติบโตในรอบปีของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> เพศเมียอายุ 3 ปี 5 เดือนที่เลี้ยงในบ่อดิน	52
9	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่าง trypsin-like enzyme กับขนาดของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i>	54
10	ร็อยละจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่างๆ ในรอบปีของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> เพศเมียอายุ 3 ปี 5 เดือน ที่เลี้ยงในบ่อดิน ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2552 ถึง ตุลาคม 2553	56

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
11	ขนาดของเซลล์สืบพันธุ์เฉลี่ยระยะต่างๆในรอบปี ของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> เพศเมียที่เลี้ยงในบ่อดิน ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2552 ถึง ตุลาคม 2553	57
12	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพน้ำกับร้อยละจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i>	60

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กิจกรรมจำเพาะของอะไมเลส ($\mu\text{mol maltose h}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) ในสภาวะเปลี่ยนแปลงพีเอช ที่อุณหภูมิห้อง และที่พีเอช 5, 6 และ 8 ในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i>	32
2	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส (increase in absorbance at 440 nm $\text{h}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) ในสภาวะเปลี่ยนแปลงพีเอช ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 3, 5 และ 8 ในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i>	34
3	กิจกรรมจำเพาะของไลเปส (increase in absorbance at 440 nm $\text{h}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) ในสภาวะเปลี่ยนแปลงพีเอช ที่อุณหภูมิห้อง และที่พีเอช 6, 8 และ 10 ในสภาวะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i>	35
4	กิจกรรมจำเพาะของ trypsin-like enzyme ($\mu\text{mol p-nitroaniline produced h}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) ในเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> ภายใต้สภาวะการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่ 6, 7 และ 8 ที่อุณหภูมิ 30 – 80 องศาเซลเซียส	36
5	ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในหลอดทดลอง ($\mu\text{mol DL-alanine g dried feed}^{-1} \text{ protease activity}^{-1}$) ของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> ตัวเต็มวัย	40
6	ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตในหลอดทดลอง ($\mu\text{mol maltose g dried feed}^{-1} \text{ amylase activity}^{-1}$) ของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> ตัวเต็มวัย	40
7	ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ($\mu\text{mol DL-alanine g dried feed}^{-1} \text{ protease activity}^{-1}$) และคาร์โบไฮเดรต ($\mu\text{mol maltose g dried feed}^{-1} \text{ amylase activity}^{-1}$) ของสูตรอาหารสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยงหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i>	41
8	ร้อยละที่เพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว (กรัม) และความยาวเปลือก (เซนติเมตร) ของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i>	43

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
9 ร้อยละที่เพิ่มขึ้นของความสูง (มิลลิเมตร) และความหนาของเปลือก (มิลลิเมตร) ของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i>	44
10 กิจกรรมจำเพาะของอะไมเลส ($\mu\text{mol maltose h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) ของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 4 สูตร เป็นระยะเวลา 3 เดือน	45
11 กิจกรรมจำเพาะของไลเปส (increase in absorbance at $440 \text{ nm h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) ของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 4 สูตร เป็นระยะเวลา 3 เดือน	45
12 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส (increase in absorbance at $440 \text{ nm h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) ของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 4 สูตร เป็นระยะเวลา 3 เดือน	46
13 ปริมาณ Protein (mg g^{-1}), RNA ($\mu\text{g g}^{-1}$) และ RNA/protein ($\mu\text{g mg}^{-1}$) ในกล้ามเนื้อแอดคักเตอร์ส่วนท้ายของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 4 สูตร เป็นระยะเวลา 3 เดือน	48
14 ความสัมพันธ์ของปริมาณ RNA ($\mu\text{g g}^{-1}$) และปริมาณ protein (mg g^{-1}) ของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> ที่เลี้ยงในบ่อดิน ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2552 ถึงเดือนตุลาคม 2553	53
15 ความสัมพันธ์ของปริมาณ RNA ($\mu\text{g g}^{-1}$) และ trypsin-like enzyme ($\mu\text{mol p-nitroaniline produced h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) ของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> ที่เลี้ยงในบ่อดิน ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2552 ถึงเดือนตุลาคม 2553	53
16 ความสัมพันธ์ของปริมาณ RNA/protein ($\mu\text{g mg}^{-1}$) และ trypsin-like enzyme ($\mu\text{mol p-nitroaniline produced h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) ของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> ที่เลี้ยงในบ่อดิน ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2552 ถึงเดือนตุลาคม 2553	54
17 เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ immature oocyte I , immature oocyte II และ maturing oocyte I	55

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
18	56
<p>ร้อยละจำนวนเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ maturing oocyte I ของหอย กาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> เลี้ยงในบ่อดิน ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2552 ถึงเดือนตุลาคม 2553</p>	
19	58
<p>ร้อยละจำนวนเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ maturing oocyte I กับการเปลี่ยนแปลง ของ trypsin-like enzyme ($\mu\text{mol } p\text{-nitroaniline produced h}^{-1} \text{ mg}$ protein^{-1}) และ RNA/protein ratio ($\mu\text{g mg}^{-1}$) ของหอยกาบน้ำจืด <i>Chamberlainia hainesiana</i> เลี้ยงในบ่อดิน ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2552 ถึง เดือนตุลาคม 2553</p>	
ภาพผนวกที่	
ก1	90
<p>กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น BSA (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร</p>	
ก2	91
<p>กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นมอลโทส (ไมโคร โมลต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร</p>	

การใช้เทคนิคทางชีวเคมีในการประเมินคุณภาพอาหารต่อการเจริญเติบโต
คุณภาพเนื้อและการพัฒนาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกาน้ำจืด

Chamberlainia hainesiana (Lea, 1856)

**Biochemical Evaluation of Dietary Quality in Relation to Growth Rate, Muscle
Quality and Sexual Maturation of Freshwater Mussel *Chamberlainia hainesiana*
(Lea, 1856)**

คำนำ

Chamberlainia hainesiana (Lea, 1856) เป็นหอยกาน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในประเทศไทย จัดอยู่ในวงศ์ Unionidae ไฟลัม Mollusca ชั้น Bivalvia พบอาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำจืดหลายแหล่ง ได้แก่ ลุ่มแม่น้ำแม่กลอง และลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา (สาริต และคณะ, 2548) เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญหลายด้าน เปลือกมีความแวววาวสวยงาม สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น ทำเครื่องเรือนประดับมุก เครื่องประดับ ของที่ระลึก นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ทำเป็นนิวเคลียสเพื่อทำแกนสำหรับผลิตไข่มุกแบบมีแกนในหอยมุกทะเล (Pennak, 1978) จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงไข่มุกน้ำจืดในหอยกาน้ำจืดวงศ์ Unionidae 7 ชนิด ได้แก่ *C. hainesiana*, *Hyriopsis myersiana*, *H. desowitzi*, *H. bialatus*, *Pseudodon inoscularis cumingi*, *P. vondembuschianus ellipticus* และ *Pseudon* sp. พบว่า *C. hainesiana* มีอัตราการเกิดไข่มุก น้ำหนักเฉลี่ยของไข่มุกสูง สุด และผลิตไข่มุกที่มีความแวววาวและมีความเรียบของผิวไข่มุกมากกว่าหอยกาน้ำจืดชนิดอื่นๆ (อรภา และคณะ, 2548) นอกจากนี้คนในท้องถิ่นนิยมใช้ทำเป็นอาหาร เพราะมีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 40 (Post, 1982) ยิ่งไปกว่านั้นยังมีความสำคัญในการจัดการด้านสิ่งแวดล้อม เนื่องจากหอยชนิดนี้มีการกินอาหารแบบกรองกิน (filter feeding) จึงทำให้น้ำบริเวณดังกล่าวใส มีส่วนช่วยลดมลภาวะแหล่งน้ำให้น้อยลง (Hameed *et al.*, 1993)

ปัจจุบัน *C. hainesiana* ได้ลดจำนวนลงอย่างมาก ผลจากการทำกิจกรรมโดยการใช้ยาฆ่าแมลงและยากำจัดวัชพืช รวมทั้งของเสียจากชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรมที่ปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ ทำให้คุณภาพน้ำไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ โดยเฉพาะปลาที่เป็นโฮสต์ให้กับโกลคิเดีย ซึ่งส่งผลทำให้หอยลดลง ปัจจุบันได้มีความพยายามในการเพิ่มจำนวนประชากรของหอยโดยการทดลองเลี้ยงโกลคิเดียในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งพบว่าเป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดเวลา และลดค่า

ใช้ง่าย อีกทั้งทำให้อัตราการรอดตาย และอัตราการเปลี่ยนแปลงจากโกลดิเดียไปเป็นจิวีในล้อยู่ในระดับสูง (Uthaiwan *et al.*, 2002) การศึกษาของ Kovitvadhi *et al.* (2006) พบว่าการเลี้ยง *H. myersiana* อายุ 0-60 วันในห้องปฏิบัติการ โดยให้แพลงก์ตอนพืชผสมของ *Chlorella* sp., *Kirchneriella incurvata*, *Navicula* sp. และ *Coccomyxa* sp. อัตราส่วน 1:1:1:1 เป็นอาหาร พบว่าความยาวและความสูงเฉลี่ยของลูกหอยเพิ่มขึ้น มีอัตราการรอดตายร้อยละ 8.00 ± 0.2 ในขณะที่การเลี้ยงลูกหอยอายุ 60-120 วัน โดยให้อาหารแพลงก์ตอนพืชแต่ละชนิด เปรียบเทียบการใช้แพลงก์ตอนพืชผสมทั้ง 4 ชนิด พบว่าลูกหอยที่เลี้ยงด้วย *K. incurvata* เจริญเติบโตดีที่สุด มีอัตราการรอดตายร้อยละ 65.00 ± 8.32 นอกจากนั้นเมื่อย้ายลูกหอยไปเลี้ยงในบ่อดิน ในช่วงอายุ 120-360 วัน โดยได้รับอาหารจากธรรมชาติ พบว่าเมื่อลูกหอยมีอายุ 160 วัน จะมีการพัฒนาอวัยวะต่างๆ สมบูรณ์ และเมื่ออายุครบ 360 วัน ลูกหอยมีน้ำหนักเฉลี่ย ความยาว ความสูง และความกว้างเพิ่มขึ้น สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ และมีอัตราการรอดตายถึงร้อยละ 100 ถึงแม้ว่าจะประสบความสำเร็จในการเลี้ยงหอยอย่างครบวงจร แต่ยังคงขาดข้อมูลการศึกษาเพื่อพัฒนาคุณภาพหอยตัวเต็มวัยให้มีความพร้อมสำหรับการเป็นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่ดี จึงควรมีการศึกษาคูณภาพอาหารและปัจจัยของคุณภาพน้ำที่เหมาะสม

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาแนวทางสร้างสูตรอาหารทดแทนอาหารธรรมชาติของ *C. hainesiana* โดยใช้เทคโนโลยีด้านเอนไซม์ย่อยอาหาร โดยเริ่มศึกษาคูณลักษณะของเอนไซม์ย่อยอาหาร และนำข้อมูลดังกล่าวมาประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง (*in vitro* digestibility) โดยใช้เอนไซม์ย่อยอาหารจากสัตว์โดยตรง ซึ่งสามารถใช้เป็นวิธีการเบื้องต้นสำหรับการประเมินคุณภาพของวัตถุดิบอาหาร (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2002; Areekijsee *et al.*, 2006; Rungruangsak-Torrissen, 2007) ข้อมูลที่ได้ทำให้สามารถเลือกใช้วัตถุดิบที่สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างแท้จริง และนำไปสร้างสูตรอาหารเพื่อทำการทดลองเลี้ยงจริง นอกจากนี้ยังศึกษาข้อมูลพื้นฐานทางชีวเคมี ได้แก่ การศึกษาสมบัติและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารการศึกษาคูณภาพของเนื้อสัตว์ทางชีวเคมี โดยศึกษาการสร้างโปรตีน (ปริมาณของ RNA และ RNA/protein ratio) ในกล้ามเนื้อ (Sunde *et al.*, 2001, 2004; Rungruangsak-Torrissen, 2007; Rungruangsak-Torrissen and Fosseidengen, 2007) รวมทั้งการศึกษาคูณภาพทางชีวเคมีของเซลล์สืบพันธุ์ โดยศึกษา trypsin-like specific activity (Rungruangsak-Torrissen, 2007; Rungruangsak-Torrissen and Fosseidengen, 2007) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวนับว่าเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งต่อการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอย่างมีคุณภาพของหอยกาน้ำจืด นอกจากนี้ยังศึกษาคูณภาพน้ำ และคูณภาพทางชีวเคมีของเซลล์สืบพันธุ์ในรอบปีของหอยระยะตัวเต็มวัยที่เลี้ยงในบ่อดิน

ดังนั้นการศึกษาการเจริญเติบโตอย่างมีคุณภาพของ *C. hainesiana* นับว่าจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญ เพื่อพัฒนาอาหารและทราบปัจจัยของคุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงตัวเต็มวัย ซึ่งจะนำไปสู่การเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์โดยเป็นการอนุรักษ์ *C. hainesiana* ให้คงอยู่และส่งเสริมการเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ เพื่อเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกร ทั้งยังเป็นการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า และเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาเทคนิคทางชีวเคมีเพื่อใช้บ่งชี้คุณภาพสัตว์ชนิดอื่นได้



การตรวจเอกสาร

1. อนุกรมวิธาน

อนุกรมวิธานของ *C. hainesiana* โดยวิธีเปรียบเทียบสัณฐานวิทยาของเปลือกและตัวเต็มวัย (Graft and Cummings, 2007) เป็นดังนี้

Kingdom	Animalia
Phylum	Mollusca
Class	Bivalvia
Order	Unionoida
Family	Unionidae
Subfamily	Gonideinae
Genus	<i>Chamberlainia</i>
Species	<i>Chamberlainia hainesiana</i>

2. ชีววิทยาของ *C. hainesiana*

2.1 สัณฐานวิทยา

ลักษณะเปลือกด้านนอกมีขนาดใหญ่ รูปร่างเป็นกึ่งรูปไข่ (semi oval) เปลือกหนา ฝาทั้งสองข้างมีขนาดเท่ากัน เปลือกทางด้านหน้า (anterior) และด้านหลัง (posterior) มีขนาดไม่เท่ากัน โดยเปลือกด้านหน้าจะโค้งแคบกว่า เปลือกทางด้านหลังจะมีลักษณะเป็นเปลือกหรือแฉ่ (posterior wing) เห็นชัดเจน ทางด้านบน (dorsal) สุดของเปลือกก่อนมาทางด้านหน้าเรียก อัมโบหรือบีก (umbo หรือ beak) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอายุมากที่สุด เปลือกทางด้านล่าง (ventral) ตั้งแต่บริเวณด้านหน้าจนเลยกลางเปลือกมาเพียงเล็กน้อยจะมีความหนาแน่นมากกว่าเปลือกทางด้านหลัง เปลือกบริเวณตรงกลางและเปลือกทางด้านบนซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนเมื่อดูด้านในของเปลือก บริเวณทางด้านหลังจะมีสัน (ridge) อยู่ 2 สัน ลักษณะเป็นสันยาวจากบริเวณอัมโบไปสิ้นสุดทางด้านหลังของเปลือก ซึ่งในหอยชนิดนี้จะไม่ชัดเจน เปลือกชั้นนอกเรียกว่าเพอริโอสทราทัม (periostratum) พบว่ามีสีน้ำตาลเข้มเกือบดำตลอดทั้งเปลือก เปลือกชั้นนอกจะเห็นเส้นการเจริญเติบโต (growth line) ชัดเจน มีลักษณะเป็นเส้นโค้งจากทางด้านหน้าเปลือกไปสุดทางด้านหลังของเปลือก โดยแต่ละเส้นการ

เจริญเติบโตจะมีการจัดเรียงตัวเป็นชั้นๆ โดยมีการเรียงตัวจากบริเวณอัมโบจนถึงทางด้านล่างของเปลือก

ลักษณะของเปลือกด้านใน เปลือกชั้นในสุดเรียกว่า เนเคลียส (nacreous) มีความแวววาวมากกว่าเปลือกด้านนอก และทางด้านหน้าของเปลือกจะมีความแวววาวน้อยกว่าทางด้านหลัง เปลือกด้านบนตรงบริเวณด้านบนของฟันแลเทอร์ล (lateral teeth) และฟันชูโดคาร์ดินัล (pseudo cardinal teeth) จะมีอีลาสติคลิกาเมนต์ (elastic ligament) ซึ่งมีสีน้ำตาลดำ และมีความแวววาวทำหน้าที่ช่วยให้เปลือกยึดติดกัน นอกจากนี้ยังมีฮินจ์ (hinge) ช่วยยึดเปลือกอีกด้วย ฮินจ์ประกอบด้วย 3 ส่วน ส่วนแรกเป็นฟันแลเทอร์ล ซึ่งอยู่บริเวณด้านบนของเปลือกใต้อีลาสติคลิกาเมนต์ ส่วนที่สองคือ ฟันชูโดคาร์ดินัลมีลักษณะเป็นแผ่นสั้นกว่าฟันแลเทอร์ล อยู่บริเวณด้านบนของเปลือกใกล้กับรอยกล้ามเนื้อของเปลือกด้านหน้า โดยเปลือกด้านขวามีลักษณะเป็นแผ่นยื่นออกมาและบางช่วงจะบุ่มเข้าไป ผิวของฟันชูโดคาร์ดินัลจะมีลักษณะเป็นร่องเล็กๆ เรียงตามยาว ส่วนเปลือกด้านซ้ายฟันชูโดคาร์ดินัลจะมีลักษณะเหมือนกับเปลือกด้านขวา ส่วนสุดท้ายคือ อินเทอร์เดนทัม (interdentum) เป็นบริเวณที่อยู่ระหว่างฟันแลเทอร์ลและฟันชูโดคาร์ดินัล ซึ่งเห็นชัดเจน ใต้อินเทอร์เดนทัมจะมีช่องปาก (beak cavity) ซึ่งติดต่อกับอัมโบ ร่องรอยของกล้ามเนื้อเห็นชัดเจน เปลือกของด้านหน้าจะมีร่องรอยของกล้ามเนื้อ 3 รอย ซึ่งมีลักษณะแ่งลึกลงไป ในเปลือก รอยกล้ามเนื้อแอดดักเตอร์ส่วนหน้า (anterior adductor muscle scar) มีขนาดใหญ่ที่สุดอยู่ทางด้านหน้าของเปลือกและทางด้านหน้าของฟันชูโดคาร์ดินัล รอยกล้ามเนื้อพิคัลรีแทรกเตอร์ส่วนหน้า (anterior pedal retractor muscle scar) อยู่ติดกับฟันชูโดคาร์ดินัล ถัดจากรอยกล้ามเนื้อแอดดักเตอร์ส่วนหน้าและรอยกล้ามเนื้อพิคัลรีแทรกเตอร์ส่วนหน้ามาทางด้านล่างของรอยกล้ามเนื้อทั้งสอง จะเป็นรอยกล้ามเนื้อพิคัลโพรแทรกเตอร์ (pedal protractor muscle scar) เปลือกด้านหลังจะมีร่องรอยของกล้ามเนื้อ 2 รอย ซึ่งมีลักษณะเป็นแ่ง แต่ลึกน้อยกว่าร่องรอยของกล้ามเนื้อของเปลือกด้านหน้าคือ รอยกล้ามเนื้อแอดดักเตอร์ส่วนท้าย (posterior adductor muscle scar) มีขนาดใหญ่ที่สุด อยู่ใต้ฟันแลเทอร์ล และส่วนที่ถัดออกไปทางด้านหลังของเปลือกเป็นรอยกล้ามเนื้อพิคัลรีแทรกเตอร์ส่วนหลัง (posterior pedal retractor muscle scar) และบริเวณด้านล่างของเปลือกจะมีรอยที่เรียกว่าเส้นแพลเลียล (pallial line) ซึ่งเป็นรอยที่อยู่บริเวณใต้รอยกล้ามเนื้อแอดดักเตอร์ส่วนหน้าแล้วโค้งไปสุดที่ฟันแลเทอร์ล ซึ่งรอยดังกล่าวเกิดจากส่วนของแมนเทิล (mantle) ยึดติดกับเปลือก เปลือกทางด้านล่างตั้งแต่ของเปลือกจนถึงเส้นแพลเลียล พบว่าบริเวณด้านหน้าจนเลยกลางเปลือกมาเล็กน้อยจะมีความหนามากกว่าเปลือกทางด้านหลัง นอกจากนี้ยังหนากว่าบริเวณตรงกลางและทางด้านบนของเปลือก (สาธิต และคณะ, 2548)

2.2 อาหารและการย่อยอาหาร

หอยกาน้ำจืดกินอาหาร โดยการกรอง อาหารของหอยกาน้ำจืดได้แก่ แพลงก์ตอนพืช โดยอาหารจะผ่านเข้าทางท่อน้ำเข้าไปยังเหงือกที่ทำหน้าที่ในการกรองอาหาร ลักษณะอาหารเป็น สายถูกส่งไปที่ตาเบียดพาลพ์ (labial palp) ตาเบียดพาลพ์จะช่วยรวบรวมอาหารเข้าสู่ปาก หลังจากนั้นอาหารจะลำเลียงไปยังหลอดอาหารและกระเพาะอาหาร ที่กระเพาะอาหารจะมีการย่อย 2 แบบ คือ แบบที่ 1 การย่อยภายนอกเซลล์ อาหารจะถูกบดด้วยแกสตริก ชีลด์ (gastric shield) และ คริสตัล ลิน สไตล์ (crystalline style) ที่อยู่ภายในสไตล์ แซค (style sac) ซึ่งมีการสร้างเอนไซม์ และสารหล่อ ลื่นปริมาณมากช่วยในการย่อยอาหารที่ผ่านการบดมีทั้งอาหารขนาดเล็กและอาหารขนาดใหญ่ อาหารขนาดเล็กจะถูกย่อยแบบที่ 2 คือการย่อยภายในเซลล์ โดยจะถูกลำเลียงไปย่อยที่ต่อมย่อย อาหาร (digestive gland) ซึ่งจะมีการหลั่งเอนไซม์ เช่น อะไมเลส ไลเปส และ โปรติเอสออกมาช่วย ย่อย ส่วนอาหารที่มีอนุภาคขนาดใหญ่จะถูกส่งไปย่อยที่ลำไส้เล็ก ส่วนท้ายของลำไส้เล็กมีไทโฟ ซอล (typhlosol) ยกสูง ช่วยเพิ่มพื้นที่ในการย่อยและดูดซึมสารอาหาร สำหรับอาหารที่ย่อยไม่ได้ จะกลายเป็นของเสียลำเลียงผ่านไส้ตรงและกำจัดออกทางทวาร (Ruppert and Barnes, 1994)

2.3 กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกาน้ำจืด

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกาน้ำจืดและหอยกาน้ำเค็มเพศเมียเกิดขึ้นภายใน โครงสร้างคล้ายถุงที่กระจายอยู่ในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยเรียกโครงสร้างดังกล่าวว่าฟอลลิ คิวล (follicle) (Jones *et al.*, 1986) การสร้างเซลล์ไข่เริ่มต้นจากไพรมอร์เดียล เจม เซลล์ (primordial germ cell) (de Jong-Brink *et al.*, 1983) พัฒนากลายเป็นโอโอโกเนียขั้นต้น (primary oogonia) แล้ว ผ่านกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) กลายเป็นโอโอโกเนียขั้นที่ 2 (secondary oogonia) หลังจากนั้นจะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ได้เซลล์โอโอ ไซต์ขั้นต้น (primary oocyte) และโอโอไซต์ขั้นที่ 2 (secondary oocyte) ตามลำดับ ซึ่งจะพัฒนาต่อ ไปกลายเป็นโอโอไซต์ที่เจริญเต็มที่ (mature oocyte) หลังจากนั้นโอโอไซต์เจริญเต็มที่จะถูกปล่อย ออกมาที่ลูเมน (lumen) ของฟอลลิคิวล และจะถูกดันออกจากลูเมนในเวลาต่อมา (de Jong-Brink *et al.*, 1983) ตลอดระยะเวลาของการพัฒนาเซลล์สตอลค์ (stalk) ซึ่งเป็นก้านเชื่อมติดกับผนังของฟอล ลิวล โดยเชื่อมต่อกับเซลล์พี่เลี้ยง (auxiliary cell) มีหน้าที่ในการเตรียมสารอาหารให้กับโอโอไซต์ (Rebhun, 1962) ซึ่งเซลล์ไข่จะหลุดออกจากสตอลค์ เมื่อเซลล์ถูกล้อมรอบด้วย วิเทลลิน เลเยอร์ (vitelline layer) หลังจากการวางไข่สิ้นสุดลง เซลล์ไข่ที่เหลืออยู่ในฟอลลิคิวล จะถูกดูดซึมกลับหรือ กระจายออกจากอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เช่น ไข่ของหอย *Cucumerunio novaehollandiae* ระยะ

โอโอไซต์ขั้นต้น และ โอโอไซต์ขั้นที่ 2 จะมีแกนเชื่อมต่อกับผนังของฟอลลิเคิล เมื่อ โอโอไซต์เจริญเต็มที่แล้วจะถูกปล่อยออกสู่ภายนอก โดยโอโอไซต์บางส่วนที่เหลืออยู่ในรังไข่ (ovary) จะถูกดูดซึมกลับ (Jones *et al.*, 1986)

การจำแนกระยะของการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์แบบ 5 ระยะ โดย Ropes (1968) ประกอบด้วย

ระยะที่ 1 โอโอไซต์จะฝังตัวอยู่ในผนังของอวัยวะสืบพันธุ์ นิวเคลียสมีลักษณะกลมหรือรูปไข่ ไซโทพลาสซึมมีรูปร่างไม่แน่นอน ทั้งนิวคลีโอลัส (nucleolus) และนิวคลีโอพลาสซึม (nucleoplasm) ย้อมติดสีเบโซฟิลิก (basophilic) รูปร่างของเซลล์มีหลายแบบ อาจเป็นสามเหลี่ยมสี่เหลี่ยม ครึ่งวงกลม หรือทรงกระบอก มีก้านเชื่อมติดกับเบสเมมเบรน (basement membrane) ของฟอลลิเคิล เส้นผ่านศูนย์กลางของนิวเคลียสประมาณ 5-20 ไมโครเมตร มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 11.10 ไมโครเมตร

ระยะที่ 2 โอโอไซต์จะมีขนาดเพิ่มขึ้นและมีลักษณะกลม ส่งผลให้ความหนาของเบสเมมเบรนลดลง นิวคลีโอลัสย้อมติดสีเบโซฟิลิก ส่วนของไซโทพลาสซึมมีขนาดใหญ่ขึ้น มีบาง ส่วนเชื่อมติดอยู่กับเบสเมมเบรน ด้วยก้านบางๆ (thin stalk) นิวเคลียสมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 14-32 ไมโครเมตร และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 24.10 ไมโครเมตร ต่างจากการศึกษาของ Morton (1985) ซึ่งพบว่าเซลล์ไข่จะนูนสูงขึ้นจากผนังของฟอลลิเคิลและมีก้านเชื่อมต่อระหว่างไข่กับผนังของฟอลลิเคิล เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ไข่ 10 ไมโครเมตร

ระยะที่ 3 โอโอไซต์จะอยู่อย่างอิสระในลูเมนของฟอลลิเคิล เซลล์จะถูกหุ้มด้วยวิเทลลีน เลเยอร์ มีการปรากฏของแอมฟินิวคลีโอล (amphinucleoli) อย่างชัดเจน (Allen, 1951) แต่ละอันจะประกอบด้วยแกรนูล นิวเคลียส (granule nucleus) ที่ค่อนข้างใส มีส่วนของนิวคลีโอลินัส (nucleolinus) ที่ติดสีเบโซฟิลิกทึบ เส้นผ่านศูนย์กลางของนิวเคลียสประมาณ 22-33 ไมโครเมตร มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 28.50 ไมโครเมตร

ระยะที่ 4 พบโอโอไซต์ที่เจริญเต็มที่ในบางฟอลลิเคิล โดยบริเวณผนังของฟอลลิเคิลจะมีโอโอโกเนีย และ โอโอไซต์ระยะแรก (early oocyte) เซลล์ไข่ที่เจริญเต็มที่ที่เหลืออยู่ในฟอลลิเคิลในหอยบางตัวจะเกิดการสลายของเซลล์ (cytolysis) ต่างจากการศึกษาของ Morton (1985) ที่

พบว่าโอโอไซต์มีขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลาง 60 ไมโครเมตร เวสสิคูลา นิวเคลียส (vesicular nucleus) มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 ไมโครเมตร เห็นนิวเคลียสเด่นชัด

ระยะที่ 5 ลูเมนของฟอลลิเคิลไม่พบเซลล์ไข่ที่เจริญเต็มที่ที่อยู่ในเซลล์ แต่จะปรากฏโอโอโกเนีย และ โอโอไซต์ระยะแรก มีเซลล์มีเซนไคม์ระหว่างฟอลลิเคิล

การจำแนกระยะของการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์แบบ 6 ระยะ โดย Nagachinta and Meejui (1998) ประกอบด้วย

ระยะที่ 1 ไม่ปรากฏเซลล์สืบพันธุ์ในอวัยวะสืบพันธุ์

ระยะที่ 2 มีเซลล์อีโอซิโนฟิลิก แกรนูล (eosinophilic granule cell) และโอโอโกเนีย กับ โอโอไซต์ระยะแรก

ระยะที่ 3 ปริมาณของเซลล์อีโอซิโนฟิลิก แกรนูล ลดลงในฟอลลิเคิลประกอบด้วย โอโอโกเนียและโอโอไซต์ระยะแรก

ระยะที่ 4 ภายในฟอลลิเคิลมีโอโอไซต์ที่เจริญเต็มที่มากกว่าโอโอไซต์ระยะแรก โดยโอโอไซต์ที่เจริญเต็มที่ที่มีรูปร่างกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 117.50 ไมโครเมตร และเคลื่อนตัวมาอยู่ตรงกลางของฟอลลิเคิล

ระยะที่ 5 ผนังของฟอลลิเคิลบางมาก โอโอไซต์ที่เจริญเต็มที่บางส่วนถูกปล่อยออกจากฟอลลิเคิลจึงปรากฏเป็นช่องว่างในฟอลลิเคิล

ระยะที่ 6 โอโอไซต์ที่เจริญเต็มที่ ปล่อยออกจากฟอลลิเคิลเป็นจำนวนมาก ฟอลลิเคิลมีลักษณะเหี่ยวแฟบ และมีขนาดเล็กลง

ไข่ที่ยังไม่ได้รับการปฏิสนธิของหอยมุกน้ำจืดจะมีวิเทลลิน เมมเบรนหุ้ม เกิดจากเซลล์ไข่หลังสารวิเทลลินออกมาหุ้มขณะอยู่ในรังไข่ (สุชาติ และคณะ, 2538) เมื่อโอโอไซต์เจริญเต็มที่ วิเทลลิน เมมเบรนจะแยกตัวออกจากผิวของโอโอไซต์เกิดเป็นช่องว่างพรีวิเทลลิน (previtellic space) (Dorange and Le Penec, 1989)

ธวัชชัย และคณะ (2546) และ Chatchavalvanich *et al.* (2006) ศึกษาเซลล์สืบพันธุ์ของ *H. bialatus* เพศเมียมีการเจริญแบ่งเป็น 5 ระยะ ได้แก่โอโอไซต์ระยะที่ 1, โอโอไซต์ระยะที่ 2, โอโอไซต์ระยะที่ 3, โอโอไซต์ระยะที่ 4 และ โอโอไซต์ระยะที่ 5 แต่จากการศึกษาของลลิตภัทร (2553) โดยวิธี whole mount ใน *H. desowitzi* พบเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย 2 ระยะคือโอโอไซต์ที่ยังไม่เจริญ (immature oocyte) และโอโอไซต์ที่เจริญเต็มที่ (mature oocyte)

2.4 ฤดูกาลสืบพันธุ์ของหอยกาบน้ำจืด

การสืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* อยู่ระหว่างเดือนกันยายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ (อุทัยวรรณ และคณะ, 2540) และพบมากในช่วงเดียวกับ *H. myersiana* ในเดือนธันวาคมซึ่งมีอุณหภูมิน้ำประมาณ 24-25 องศาเซลเซียส (อรภา, 2543) แตกต่างจากหอย *H. desowitzi* และ *H. bialatus* ที่พบการเจริญและพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมียตลอดทั้งปี เป็นการสืบพันธุ์แบบต่อเนื่องโดยไม่มีฤดูกาล แม้อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญของมาร์ซูเปีย (marsupia) ใน *H. desowitzi* (ธวัชชัย และคณะ, 2546; ลลิตภัทร, 2553)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

การเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกาบขึ้นกับปัจจัยหลายประการด้วยกัน โดยมีอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดต่อการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์และการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ หอยกาบส่วนมากในเขตหนาวจะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ปีละครั้ง ในเขตอบอุ่นปีละสองครั้ง และในเขตร้อนอาจมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ตลอดปี นอกจากนี้อัตราการสืบพันธุ์ของหอยกาบก็ขึ้นอยู่กับอิทธิพลจากดวงจันทร์ ความลึกของน้ำ ความหนาแน่นของประชากร ความสมบูรณ์ของอาหาร ตลอดจนปรสิตร่างกายในและปัจจัยอื่นๆ (สุชาติ และคณะ, 2538) เช่น การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกาบ *Lithophaga lithophaga* ทั้งเพศผู้และเพศเมีย เกิดเมื่ออุณหภูมิน้ำลดลงต่ำกว่า 27 องศาเซลเซียส ความเค็มของน้ำ (salinity) เพิ่มขึ้นสูงกว่าร้อยละ 37 และการละลายของออกซิเจนลดลงเหลือ 6.5 ส่วนในล้านส่วน (Galinou-Mitsoudi and Sinis, 1994) ผลการศึกษา *Dreissena polymorpha* 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่อยู่ในช่วงสืบพันธุ์ และกลุ่มช่วงหลังการสืบพันธุ์ โดยเลี้ยงทั้งสองกลุ่มเป็นระยะเวลา 3 เดือน ที่อุณหภูมิน้ำ 5, 12 และ 19 องศาเซลเซียส แต่ละกลุ่มให้อาหาร (*Clamydomonas reinhardtii*) ในปริมาณสูงและต่ำ พบว่าหอยกาบน้ำจืดที่เลี้ยงในระดับอุณหภูมิน้ำ 12 และ 19 องศาเซลเซียส มีขนาดของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใหญ่ขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อหอยได้รับอาหารในปริมาณสูง โดยที่อุณหภูมิน้ำ 12 องศาเซลเซียสมีขนาดของอวัยวะสร้างเซลล์

สืบพันธุ์สูงสุด ส่วนหอยที่ได้รับอาหารในปริมาณต่ำพอวัยจะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีขนาดลดลง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Borcherding, 1995) เป็นต้น

2.6 วงจรชีวิตของหอยกาน้ำจืด *C. hainesiana*

หอยกาน้ำจืดมีเพศแยกเป็นเพศผู้และเพศเมีย รังไข่และอวัยวะอยู่ด้านบนของเท้า (foot) และเชื่อมต่อกับซูปราบราเซียล แคมเบอร์ (suprabranchial chamber) ด้วยท่อสั้นๆ เซลล์สืบพันธุ์ของหอยเพศเมียจะเจริญพัฒนาอยู่ภายในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) เซลล์สืบพันธุ์จะพัฒนาเป็นเซลล์ไข่ที่สมบูรณ์ที่ outer demibranch สเปิร์มจากหอยเพศผู้ถูกปล่อยออกสู่น้ำทางช่องน้ำออก (exhalent siphon) จากนั้นสเปิร์มที่ปนมากับน้ำจะเข้าสู่ช่องน้ำเข้า (incurrent siphon) ของหอยเพศเมียผ่านออสติยา (ostia) ของแผ่นเหงือกและปฏิสนธิภายในตัวหอย หลังจากนั้นเหงือกของหอยเพศเมียจะพองออกเป็นถุงเรียกมาซูเปีย (marsupia) ไซโกต (zygote) เจริญและพัฒนาอยู่ในมาซูเปียกลายเป็นตัวอ่อนระยะแรกเรียกว่า โกลคิเดีย (glochidia) โกลคิเดียออกจากซูปราบราเซียล แคมเบอร์ ผ่านช่องน้ำออกสู่น้ำและตกลงพื้น จากนั้นจะไปเกาะที่เหงือก ครีบ และเกล็ดของปลาที่เป็นโฮสต์ (host) ต่อจากนั้นจะพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่เรียกว่า จูวีไนล์ (juvenile) จึงหลุดออกจากโฮสต์ตกลงสู่พื้นท้องน้ำหากินเป็นอิสระ เจริญพัฒนาเป็นลูกหอยและตัวเต็มวัยต่อไป (อรภา, 2543)

3. การเพาะเลี้ยงหอยกาน้ำจืด

การเพาะเลี้ยงหอยกาน้ำจืดแบ่งเป็น 3 ระยะตามวัฏจักรชีวิต คือ โกลคิเดีย จูวีไนล์ และตัวเต็มวัย การเพาะเลี้ยง โกลคิเดียมีการศึกษาดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเพาะเลี้ยงหอยกาบน้ำจืดระยะ โกลคิเดียในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งโปรตีนแตกต่างกัน

โกลคิเดีย	แหล่งโปรตีน	อัตราการรอด (ร้อยละ)	การเปลี่ยนจากโกลคิเดียเป็นจูวีไนล์ (ร้อยละ)	แหล่งอ้างอิง
<i>Anodonta imbecilis</i>	horse serum	-	65.40	Keller and Zam (1990)
	horse serum	-	65.80	
<i>H. desowitzi</i>	horse serum	96.60	89.64	อุทัยวรรณ และคณะ (2542)
<i>H. desowitzi</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	85.32	84.28	อุทัยวรรณ และสาธิต (2543)
<i>H. myersiana</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	93.77	93.77	Kovitvadhı et al. (2002)
<i>C. hainesiana</i>	<i>C. carpio</i>	96.24	96.24	Polwong et al. (2003)
<i>P. exilis compressa</i>	<i>C. carpio</i>	86.37	86.37	Kovitvadhı et al. (2003)
<i>Ensidens ingallsianus</i>				
<i>ingallsianus</i>		92.03	92.03	
<i>Scabies scobinata</i>		92.22	92.22	
<i>S. crispate</i>		83.36	83.36	
<i>S. phaseus</i>		96.25	96.25	
<i>Pilsbryoconcha exilis exilis</i>		82.79	82.79	
<i>H. myersiana</i>	<i>C. carpio</i>	95.00 ± 2.5	95.00 ± 2.5	Uthaiwan et al. (2002)

Hudson and Isom (1984) เลี้ยงลูกหอยระยะจูวีไนล์ *Anodonta imbecilis* ด้วยน้ำทะเลสาบที่มีแพลงก์ตอนปนอยู่หลายชนิด ได้แก่ *Gonium* sp., *Anabaena* sp., *Navicula* sp., *Phacus* sp., *Oscillatoria* sp. เป็นต้น พบว่าจูวีไนล์มีอัตราการเจริญเติบโต และมีอัตราการรอดมากขึ้น มีขนาดความยาวเพิ่มขึ้นมากกว่า 5.1 มิลลิเมตร หลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 74 วัน ในขณะที่เลี้ยงลูกหอยของ *H. myersiana* ด้วยน้ำประปาปราศจากคลอรีน โดยให้ *Chamydomonas* sp., *Monoraphidium* sp. และ *Chlorella* sp. เป็นอาหาร พบว่าลูกหอยมีอายุได้ 60 วัน และมีขนาดความยาวสูงสุด 2.4 มิลลิเมตร เลี้ยงจูวีไนล์ของ *H. myersiana* จนถึงตัวเต็มวัย โดยแบ่งการเลี้ยงออกเป็น 3 ขั้นตอนคือ เมื่อลูกหอยอายุ 0-60 วัน ให้แพลงก์ตอนพืชผสม 4 ชนิด (*Chlorella* sp., *K. incurvata*, *Navicula* sp. และ *Coccomyxa* sp.) เป็นอาหาร ทำให้ความยาวและความสูงเฉลี่ยของลูกหอยเพิ่มขึ้นจาก 0.13 ± 0.01 และ 0.16 ± 0.01 มิลลิเมตร เป็น 1.41 ± 0.16 และ 0.98 ± 0.05 มิลลิเมตร ตามลำดับ มีอัตราการรอดตายร้อยละ 8.00 ± 0.2 ต่อมาในช่วงที่ลูกหอยอายุ 60-120 วัน ให้อาหารแพลงก์ตอนพืชแต่ละชนิด เมื่อเปรียบเทียบการใช้แพลงก์ตอนพืชทั้ง 4 ชนิด พบว่าลูกหอยที่เลี้ยงด้วย *K. incurvata* เจริญเติบโตดีที่สุดโดยมีความยาวและความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 3.46 ± 0.04 และ 1.94 ± 0.04 มิลลิเมตร ตามลำดับ มีอัตราการรอดตายร้อยละ 65.00 ± 8.32 หลังจากนั้นจึงย้ายลูกหอยไปเลี้ยงในบ่อดินในช่วงอายุ 120-360 วัน โดยได้รับอาหารจากธรรมชาติ เมื่อลูกหอยมีอายุ 160 วัน พบว่ามีการพัฒนาอวัยวะต่างๆ สมบูรณ์ เมื่อครบ 360 วันพบว่าลูกหอยมีน้ำหนักเฉลี่ย ความยาว ความสูง และความกว้าง เพิ่มขึ้นมาก สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ และมีอัตราการรอดตายถึงร้อยละ 100 (Kovitvadhı et al., 2006)

4. เอนไซม์ย่อยอาหารของสัตว์น้ำ

การย่อยอาหารเป็นกระบวนการที่อาหารในท่อทางเดินอาหารถูกย่อยให้มีขนาดเล็กลงเพื่อดูดซึมผ่านเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารเข้าไปในกระแสเลือด โดยโปรตีนจะถูกย่อยเป็นกรดอะมิโน ส่วนไขมันจะถูกย่อยเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล และคาร์โบไฮเดรตถูกย่อยเป็นน้ำตาล กระบวนการเหล่านี้จำเป็นต้องมีเอนไซม์ย่อยอาหารหรือน้ำย่อยมาทำหน้าที่ย่อยอาหารก่อน เพื่อนำไปเผาผลาญให้ได้พลังงานต่อไป

จากการศึกษาเอนไซม์ย่อยอาหารในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังของ Barrington, 1979 สามารถแบ่งชนิดของเอนไซม์ได้เป็น 3 กลุ่ม

4.1 คาร์โบไฮเดรส (carbohydrase)

ทำหน้าที่ในการสลายพันธะไกลโคซิดิกที่เชื่อมโมโนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ ไตรแซคคาไรด์ และพอลิแซคคาไรด์ โดยทั่วไปสามารถแบ่งคาร์โบไฮเดรสเป็น 2 ประเภท คือ พอลิแซคคาริเดส (polysaccharidase) และ โอลิโกแซคคาริเดส (oligosaccharidase) พอลิแซคคาริเดสทำหน้าที่ในการในการย่อยพอลิแซคคาไรด์ เช่น แป้ง ไกลโคเจน และเซลลูโลส โดยเอนไซม์ย่อยแป้งคืออะไมเลส ซึ่งพบทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง โอลิโกแซคคาริเดส มีหน้าที่สลายไดแซคคาไรด์และไตรแซคคาไรด์ (Kay, 1998) จากการศึกษาในคริสตัลลิน สไตล์ ของ *Placopecten magellanicus* Gmelin พบว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสทำงานได้ดีที่พีเอช 6.5 สอดคล้องกับการศึกษาของ Khruanet *et al.* (2009) ที่พบว่าอะไมเลสที่สกัดจากต่อมย่อยอาหารร่วมกับกระเพาะอาหารของ *C. hainesiana* ตัวเต็มวัยเกิดปฏิกิริยาได้ดีในสถานะพีเอช 6 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในขณะที่ Areekijserree *et al.* (2002, 2004, 2006) วิเคราะห์กิจกรรม และสถานะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่สกัดจากกระเพาะอาหาร และลำไส้ของหอยกาบน้ำจืด *H. bialatus* ตัวเต็มวัย พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส และอะไมเลสมีค่าสูง

จากการศึกษาเอนไซม์คาร์โบไฮเดรสในทางเดินอาหารของหอยทาก *Helix lucorum* พบเอนไซม์ คาร์โบไฮเดรสที่หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้ และต่อมย่อยอาหาร (Flair and Charrier, 1992) ส่วนการย่อยคาร์โบไฮเดรสในหอยเชลล์ *Pecten maximus* เกิดขึ้นที่ไคเจสทิฟไคเวอร์ทิกิวลา (Stark and Walker, 1983) นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ที่สกัดจากต่อมย่อยอาหาร และคริสตัลลินไสตัลของหอยแมลงภู่ *Perna iridis* ตัวเต็มวัย มีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตในทุกฤดูกาล โดยการเจริญเติบโต และกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในต่อมย่อยอาหารต่ำที่สุดในเดือนกุมภาพันธ์ และสูงสุดในเดือนตุลาคม ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณอาหารที่มีในแต่ละช่วงฤดูกาล (Wong and Cheung, 2001)

4.2 โปรติเอส (protease)

เอนไซม์โปรติเอสทำหน้าที่ในการสลายพันธะเปปไทด์ที่เชื่อมกรดอะมิโนเข้าด้วยกัน สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ เอนโดเปปติเดส (endopeptidase) และเอกโซเปปติเดส (exopeptidase) (Kay, 1998) Reid and Rauchert (1972) พบว่าโปรติเอสสามารถทำงานได้ดีในสภาพที่มีค่าพีเอชเป็นกรด โดยศึกษาน้ำย่อยและไคเจสทิฟไคเวอร์ทิกิวลาในหอยสองฝาสกุล *Macoma* 7 ชนิด พบว่าการย่อยโปรตีนภายในเชลล์จะเกิดปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 3 นอกจากนี้ยังพบที่

พีเอช 5 และพบว่าเกิดปฏิกิริยาน้อยที่ค่าพีเอช 7.5 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Khruanet (2009) ที่พบว่า โปรติเอสที่สกัดจากต่อมย่อยอาหารรวมกับกระเพาะอาหารของ *C. hainesiana* ตัวเต็มวัยจะเกิดปฏิกิริยาได้ดีในสภาวะพีเอช 5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

การศึกษาเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอสสามารถใช้ประเมินการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำได้ เช่น Sunde *et al.* (2004) ศึกษาการตอบสนองของกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ ทริปซิน (trypsin) และไคโมทริปซิน (chymotrypsin) ต่อคุณภาพของอาหารที่แตกต่างกัน และระยะเวลาการให้อาหารในปลาแซลมอน (*Salmo salar*) พบว่าเมื่อให้อาหารที่มีคุณภาพดี ทริปซิน และไคโมทริปซินจะมีค่าสูงขึ้นในช่วงเดือนแรกของการทดลอง และมีผลต่อประสิทธิภาพของการแลกเปลี่ยน การเจริญเติบโตจะเพิ่มสูงขึ้นในเดือนแรกที่ทดลอง และเริ่มคงที่เมื่อเข้าสู่ช่วง 2 เดือนสุดท้ายของการทดลอง โดยปลาที่ได้อาหารคุณภาพดีและเคยมีอัตราการเจริญเติบโตดีจะแสดงค่าทริปซินต่อไคโมทริปซิน (T/C ratio) ต่ำลงขณะที่หยุดการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับที่ค้นพบโดย Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2006) และ Rungruangsak-Torrissen and Fosseidengen (2007)

4.3 เอสเทอร์เลสและไลเปส (esterase and lipase)

เอสเทอร์เลสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยพันธะเอสเทอร์ในไขมันที่มีขนาดเล็กที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนเอนไซม์นี้แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ (specific and nonspecific) ส่วนเอนไซม์ไลเปสจัดเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolases) มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานประมาณ 7.0-8.8 สอดคล้องกับการศึกษาของ Khruanet *et al.* (2009) ที่พบว่าไลเปสที่สกัดจากต่อมย่อยอาหารรวมกับกระเพาะอาหารของ *C. hainesiana* ตัวเต็มวัยจะเกิดปฏิกิริยาได้ดีในสภาวะพีเอช 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งพีเอชที่เหมาะสมจะเพิ่มขึ้นตามความยาวของกรดไขมันในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ หน้าที่ของไลเปส คือ เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมัน โมเลกุลยาวกับกลีเซอรอลในโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ จากการวิเคราะห์กิจกรรมและสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่สกัดจากกระเพาะอาหาร และลำไส้ของหอยกาบน้ำจืด *H. bialatus* ตัวเต็มวัย พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และไลเปสมีค่าต่ำ (Areekijserree *et al.*, 2002, 2004, 2006)

5. การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารของสัตว์น้ำในหลอดทดลอง

ประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง (*in vitro* digestibility) มีประโยชน์ต่อการคัดเลือกวัตถุดิบที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยอาหารต่อการย่อยวัตถุดิบแต่ละชนิด เป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย

5.1 ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน (protein digestibility)

ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนสามารถใช้ทำนายคุณภาพอาหารสำหรับศึกษาการเจริญเติบโตของสัตว์ เนื่องจากมีความสัมพันธ์กับคุณภาพโปรตีนในอาหาร ได้แก่ reactive sulphhydryl group, disulphide bond และ *D*-aspartic acid (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2002) สัตว์น้ำ เช่น ปลา โดยทั่วไปมีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนได้ดี โดยปลากินเนื้อจะมีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนสูงกว่าปลากินพืชและสัตว์ และปลากินพืช ตามลำดับ เนื่องจากปลากินเนื้อมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนในปริมาณที่สูงกว่า (วีรพงษ์, 2536)

5.2 ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate digestibility)

ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตขึ้นกับ ชนิด ปริมาณ และความสุกของแป้ง ปลา กินพืชมีประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตได้ดีกว่าปลากินพืชและเนื้อ และปลากินเนื้อ เนื่องจากปลากินพืชมีเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตในปริมาณที่มากกว่าคาร์โบไฮเดรตที่ปลาเป็นอาหาร (วีรพงษ์, 2536) หอยกาบน้ำจืดเป็นสัตว์กินพืช มีประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตมากกว่า ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน (Areekijsee *et al.*, 2006) การประเมินประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตอาศัยการย่อยของอะไมเลสเป็นหลัก จึงสามารถใช้ค่ากิจกรรมของอะไมเลสในการเทียบเป็นค่ามาตรฐาน เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันหรือต่างกันได้ (Areekijsee *et al.*, 2006)

6. คุณภาพของสัตว์น้ำ

6.1 คุณภาพของกล้ามเนื้อ

การศึกษาของ Sunde *et al.* (2001) พบว่าประสิทธิภาพการแลกเนื้อ และอัตราการเจริญเติบโตของปลาแซลมอน มีความสัมพันธ์กับระดับกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีนอิสระในกล้ามเนื้อ และอัตราส่วนระหว่างกรดอะมิโนจำเป็นต่อกรดอะมิโนไม่จำเป็นในกล้ามเนื้อยังสัมพันธ์กับการแสดงออกของทร립ซิน (Torrissen *et al.*, 1994) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงคุณภาพกล้ามเนื้อจึงใช้ตรวจสอบการเจริญเติบโตของสัตว์ได้

Sunde *et al.* (2004) พบว่าหลังจากให้ปลาอดอาหารเป็นเวลา 3 วัน อัตราส่วนระหว่างกรดอะมิโนจำเป็นต่อกรดอะมิโนไม่จำเป็นในพลาสมา มีค่าต่ำลงในกลุ่มปลาที่เคยได้รับอาหารคุณภาพดี เนื่องจากกรดอะมิโนจำเป็นถูกดูดซึมไปใช้ในการสร้าง protein และพบว่า RNA ในกล้ามเนื้อจะมีค่าสูง และการสลายโปรตีนจากการวัดค่าปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนอิสระ (free hydroxy proline) มีค่าต่ำ เพราะในกลุ่มปลาที่ได้รับอาหารคุณภาพดีจะมีการสร้างโปรตีนในกล้ามเนื้อสูงกว่าการสลายโปรตีน เมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารคุณภาพด้อยกว่า ซึ่งการวัดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทร립ซิน และโคโมทร립ซิน รวมทั้ง T/C ratio เป็นอีกหนทางหนึ่งที่จะทำนายการเจริญเติบโตของปลาที่เลี้ยงในสภาพแวดล้อมแตกต่างกัน นอกจากนี้การวัดปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) รวมทั้งระดับของ RNA และ protein ในกล้ามเนื้อจะช่วยให้ทราบถึงคุณภาพของกล้ามเนื้อได้เป็นอย่างดี

6.2 คุณภาพของโอโอไฮด์

Rungruangsak-Torrissen (2007) และ Rungruangsak-Torrissen and Fosseidengen (2007) ศึกษาการพัฒนาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลา พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีคุณภาพแตกต่างกันจะมีพัฒนาการของไข่ที่แตกต่างกัน โดยโอโอไฮด์ที่มีพัฒนาการสูงจะมีระดับของ trypsin-like specific activity ที่ต่ำกว่า และปริมาณ RNA และ RNA/protein ratio ในโอโอไฮด์พบสูงกว่าในกล้ามเนื้อ ทั้งนี้เนื่องจากความต้องการอาหารของปลาวัยอ่อนมีความสัมพันธ์กับการย่อยโปรตีนจากโอโอไฮด์ โดยโปรตีนดังกล่าวจะใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเคลื่อนไหวในช่วงที่ตัวอ่อนมีถุงแดง การศึกษาของ Sveinsdottir *et al.* (2006) พบว่าทร립ซินและโคโมทร립ซินในโอโอไฮด์มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างเอมบริโอของ Atlantic cod (*Gadus morhua*) โดยพบทร립ซินใน

ระดับสูง ในช่วงที่โอโอไฮด์ยังไม่ได้รับการปฏิสนธิ แต่เมื่อหลังการปฏิสนธิช่วงที่ไข่มีการฟักตัว และช่วงตัวอ่อนเริ่มกินอาหาร จะพบทริปซินมีระดับลดต่ำลง

6.3 กรดไขมัน

กรดไขมันจัดเป็นกรดคาร์บอกซิลิก (Carboxylic acid) ที่มีหมู่ $-COOH$ เพียงหมู่เดียว กับไฮโดรคาร์บอนสายยาวเส้นตรง กรดไขมันสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทดังนี้ (วิระพงษ์, 2536)

6.3.1 กรดไขมันที่อิ่มตัว (saturated fatty acid) หมายถึงกรดไขมันที่มีพันธะเดี่ยว ทำให้คาร์บอนในโมเลกุลจับกับไฮโดรเจนเต็มที่แล้วไม่สามารถจับกับไฮโดรเจนเพิ่มได้อีก กรดไขมันที่อิ่มตัวเมื่อมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเพิ่มขึ้นจะมีจุดหลอมเหลวสูงขึ้น ทำให้เป็นสาเหตุหนึ่งที่สัตว์น้ำย่อยกรดไขมันที่อิ่มตัวได้ไม่ดี

6.3.2 กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) หมายถึงกรดไขมันที่มีพันธะคู่ ทำให้คาร์บอนในโมเลกุลสามารถจับกับไฮโดรเจนเพิ่มได้อีก กรดไขมันที่มีจำนวนพันธะคู่เพิ่มขึ้นจะมีจุดหลอมเหลวต่ำลง ทำให้สัตว์น้ำย่อยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวได้ดี

องค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อเยื่อสัตว์น้ำ เช่นปลา และ brown mussel *P. perna* จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสาเหตุดังต่อไปนี้ ได้แก่อุณหภูมิน้ำที่มีผลโดยตรงต่อปลาที่อยู่ในเขตหนาว ซึ่งมีกรดไขมันกลุ่ม โอเมกา-3 เป็นองค์ประกอบในเนื้อเยื่อมากกว่าปลาที่อยู่ในเขตร้อน เพราะกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-3 ทำให้เนื้อเยื่อปลายืดหยุ่นได้ดีโดยเฉพาะในสภาพอุณหภูมิต่ำ ความเค็ม พบว่าปลาน้ำเค็มส่วนมากมีกรดไขมันกลุ่ม โอเมกา-3 เป็นองค์ประกอบมากกว่าปลาน้ำจืด เพราะปลาน้ำเค็มอยู่ในทะเลที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า ต้องการการเคลื่อนไหวที่คล่องแคล่วมากกว่า (Helper, 1988) และชนิดอาหารซึ่งมีผลโดยตรงเพราะปลาจะนำกรดไขมันในอาหารไปใช้ หรือสะสมในเนื้อเยื่อปลา (Norkko, 2006)

7. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ

การเจริญเติบโตของหอยกาบขึ้นกับปัจจัยหลายประการด้วยกัน โดยมีอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด เช่น อุณหภูมิน้ำมีผลต่อการเจริญของตัวอ่อนระยะ โกลิเลีย *H. desowitzi* โดยอุณหภูมิ

ต่ำกว่า 28 องศาเซลเซียส จะพบตัวอ่อนระยะ โกลดิเดีย ทั้งเหงือกชั้นนอกและชั้นใน ขณะที่อุณหภูมิสูงกว่า 28 องศาเซลเซียส จะพบเฉพาะเหงือกชั้นนอก (ลลิต์ภักทร, 2553) การเจริญเติบโตของหอยสองฝาน้ำจืด *Corbicula fluminea* ที่เลี้ยงในกระชังเป็นระยะเวลา 40 สัปดาห์ พบว่าเมื่ออุณหภูมิน้ำต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส ความยาวและน้ำหนักของ *C. fluminea* ไม่เพิ่มขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิน้ำเพิ่มเป็น 14 องศาเซลเซียส พบว่ามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น และมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่ออุณหภูมิน้ำมีค่าอยู่ระหว่าง 24-30 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สอดคล้องกับหอยกาบน้ำจืดที่อาศัยในแหล่งธรรมชาติ (Buddensiek , 1995)



อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาคุณลักษณะและกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารจาก *C. hainesiana* อายุ 14 เดือน

1.1 การเตรียมตัวอย่าง *C. hainesiana*

1.1.1 นำตัวอย่าง *C. hainesiana* อายุ 14 เดือน ที่เลี้ยงจากระยะ โกลกิเดียถึงระยะตัวเต็มวัย จากโครงการวิจัยการพัฒนากล้ามเนื้อหอยมุกน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* ระดับกิ่งอุตสาหกรรม (อุทัยวรรณ และคณะ, 2551) ซึ่งเลี้ยงที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด จังหวัดกาญจนบุรีมาพักที่บ่อพักน้ำภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์โดยได้รับอาหารธรรมชาติในแหล่งน้ำ หลังจากนั้นสุ่มเลือกตัวอย่างหอยที่มีขนาดเท่าๆ กัน เพื่อสกัดเอนไซม์ชำระ 4 ตัว จำนวน 2 ซ้ำ พร้อมทั้งบันทึกข้อมูล ประกอบด้วย ความยาวและน้ำหนักของหอย

1.1.2 นำ *C. hainesiana* มาทำความสะอาดเปลือก แล้วทำให้สลับด้วยการแช่ในน้ำแข็งนานประมาณ 5-10 นาที ผ่าตัดแยกต่อมย่อยอาหารร่วมกับกระเพาะอาหาร นำไปบดละเอียดด้วย homogenizer ขณะที่แช่ในอ่างน้ำแข็ง ในอัตราส่วน 1:0.5 (มวลต่อปริมาตร) ใน 200 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $10,000 \times g$ นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนที่เป็นชั้นไขมันลอยอยู่ด้านบนออก นำส่วนใสไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ $13,000 \times g$ นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วดูดส่วนใส เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ใช้เป็น crude enzyme extract

1.2 การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยอาหาร

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหาร โดยใช้บัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่างๆ ได้แก่ พีเอช 2 (ไกลซีน-กรดไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์) พีเอช 4-5 (กรดซิตริก-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) พีเอช 6-8 (ฟอสเฟต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์) พีเอช 9-10 (โซเดียมคาร์บอเนต-โซเดียมไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์) พีเอช 11 (ฟอสเฟต-โซเดียมไฮดรอกไซด์ บัฟเฟอร์)

1.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส ตามวิธีการของ Areekijserree *et al.* (2004) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Bernfeld (1951) ดังนี้

1.2.1.1 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในสภาวะเปลี่ยนแปลงพีเอช โดยใช้สับสเตรทคือน้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่างๆ (ตามข้อ 1.2) ที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 62.5 ไมโครลิตร และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร (สุดท้ายจะได้น้ำแป้งร้อยละ 1 ในบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์ ที่มี 6 มิลลิโมลาร์ ของโซเดียมคลอไรด์) ผสมสับสเตรทดังกล่าว (ปริมาตรเท่ากับ 125 ไมโครลิตร) กับ crude enzyme extract ปริมาตร 5 ไมโครลิตรในหลอดทดลองให้เข้ากัน หลังจากนั้นบ่ม ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายกรดไคนโตรซาลิไซลิก ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโทส

1.2.1.2 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ตั้งแต่ 20-80 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะพีเอชที่เหมาะสม โดยอุ่นสับสเตรทปริมาตร 125 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม crude enzyme extract ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายกรดไคนโตรซาลิไซลิก ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโทส

1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของโปรติเอส ตามวิธีการของ Areekijserree *et al.* (2004) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Garcia-Carreno (1992)

1.2.2.1 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะเปลี่ยนแปลงพีเอช โดยเตรียมสารละลายสับสเตรท คือ azocasein ความเข้มข้นร้อยละ 5 (เตรียมโดยละลาย azocasein ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์

พีเอช ต่างๆ (ตามข้อ 1.2) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร (สุดท้ายจะได้อ้อยละ 1 ของ azocasein ในบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์) จากนั้นจึงเติม crude enzyme extract ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ นาน 15 นาที หลังจากนั้นดูดส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

1.2.2.2 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ตั้งแต่ 20-80 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะพีเอชที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1.2.2.1 โดยอุ่นสารละลายสับสเตรทปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 5 นาที เติม crude enzyme extract ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ นาน 15 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

1.2.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของไลเปส ตามวิธีการของ Winkler and Stuckmann (1979) ดังนี้

1.2.3.1 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในสภาวะเปลี่ยนแปลงพีเอช โดยเตรียมสารละลายสับสเตรท *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ (เตรียมโดยละลาย *p*-NPP ในสารละลายโพพานอลความเข้มข้นร้อยละ 78.6) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ (ตามข้อ 1.2) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และ sodium taurocholate ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเติม crude enzyme extract ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ นาน 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ *p*-nitrophenol

1.2.3.2 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตั้งแต่ 20-80 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะพีเอชที่เหมาะสม โดยอุ่นสารละลายสับสเตรทปริมาตร 200 ไมโครลิตรที่ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ 800 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 5 นาที เติม crude enzyme extract ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ นาน 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ *p*-nitrophenol

1.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร

ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารของ *C. hainesiana* ได้แก่ อะไมเลส (พีเอช 6 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส) โปรติเอส (พีเอช 5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) และไลเปส (พีเอช 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) ในสภาวะที่เหมาะสมตามรายงานของ Khruanet *et al.* (2009) ตามวิธีการในข้อ 1.2 และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme extract โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐานตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951)

2. การศึกษาคุณลักษณะและการแสดงของ trypsin-like enzyme ในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จาก *C. hainesiana* อายุ 3 ปี

นำเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* อายุ 3 ปี จาก ข้อ 1.1.1 มาสกัดเอนไซม์ตามข้อ 1.1.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ trypsin-like enzyme และศึกษาคุณลักษณะและกิจกรรมของ trypsin-like enzyme ในเซลล์สืบพันธุ์

2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ trypsin-like enzyme ตามวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2006) ดังนี้

2.1.1 วิเคราะห์กิจกรรมของ trypsin-like enzyme ในสภาวะเปลี่ยนแปลงพีเอช โดยเตรียมสารละลายสับสเตรท คือ N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ละลายในบัฟเฟอร์ พีเอช 6-11 (ตามข้อ 1.2) ที่มี dimethylformamide (DMF) ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 5 ผสม crude enzyme extract ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับสับสเตรทปริมาตร 700 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาคด้วยการเติม

กรดอะซิติลความเข้มข้นร้อยละ 30 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ *p*-nitroaniline

2.1.2 วิเคราะห์กิจกรรม trypsin-like enzyme ในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิภายใต้ สภาวะพีเอชที่เหมาะสม โดยผสม crude enzyme extract ปริมาตร 100 ไมโครลิตรกับสับสเตรท ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ (20-80 องศาเซลเซียส) นาน 10 นาทีหยุด ปฏิกริยาด้วยการเติมกรดอะซิติลความเข้มข้นร้อยละ 30 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืน แสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ *p*-nitroaniline

3. การวิเคราะห์หองค์ประกอบทางชีวเคมีของอาหารสำเร็จรูปทางการค้า และวัตถุดิบอาหาร

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างอาหารสำเร็จรูปทางการค้าจำนวน 5 สูตร ได้แก่ อาหารสูตร 1-5 (ADP No.1, TNT No.2, อาหารปลาดุกขนาดเล็ก อาหารปลาดุกขนาดกลาง และ อาหารปลาดุกขนาดใหญ่ ตามลำดับ) และวัตถุดิบอาหาร จำนวน 21 ชนิด ได้แก่ กลุ่มวัตถุดิบจากสัตว์ (เลือดป่น ปลาป่น เนื้อและกระดูกป่น) กลุ่มวัตถุดิบจากพืช (โปรตีนข้าวสาลี โปรตีนข้าวโพด กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง กากมะพร้าว รำข้าวสาลี รำละเอียด แป้งสาลี เมล็ดข้าวโพด ปลายข้าวหนึ่ง ปลายข้าว กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม และมันสำปะหลังเส้น) และกลุ่มวัตถุดิบจากสาหร่าย (*Spirulina* sp., *Chlorella* sp. และ *Kirchneriella incurvata*) โดยการอบที่ อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมี และเตรียม ตัวอย่างโดยการทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งตัวอย่าง หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ในเดกซิเคเตอร์

3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมี

วิเคราะห์ความชื้นและองค์ประกอบทางโภชนาการอื่นๆ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เถ้า และ เยื่อใยโดยใช้วิธีการของ AOAC (2005) (ภาคผนวก ข) สำหรับค่าของคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้จะคำนวณจากผลต่างขององค์ประกอบทางโภชนาการ

4. การเตรียมตัวอย่างและการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองของ *C. hainesiana* อายุ 3 ปี

4.1 การเตรียมตัวอย่าง *C. hainesiana*

นำตัวอย่าง *C. hainesiana* จากข้อ 1.1.1 อายุ 3 ปี สุ่มเลือกตัวอย่างหอยที่มีขนาดเท่าๆ กัน เพื่อสกัดเอนไซม์ตามข้อ 1.1.2 ซ้ำละ 1 ตัว จำนวน 3 ซ้ำ พร้อมทั้งบันทึกข้อมูล ประกอบด้วย ความยาว และน้ำหนักของตัวอย่าง นำตัวอย่างเอนไซม์ที่สกัดได้มาไดอะไลส์ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8 ที่มี 200 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์นาน 24 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างเพื่อใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์สำหรับศึกษาประสิทธิภาพการถูกย่อยในหลอดทดลอง

4.2 การเตรียมตัวอย่างอาหารและวัตถุดิบอาหาร

เตรียมตัวอย่างอาหารสำเร็จรูปทางการค้าและวัตถุดิบอาหาร (ตามข้อ 3.1) โดยบดให้ละเอียด และทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งตัวอย่าง และนำไปเก็บในเดกซิเดเตอร์ เพื่อใช้เป็นสับสเตรทในการทดสอบประสิทธิภาพการถูกย่อยในหลอดทดลอง

4.3 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารและวัตถุดิบอาหารในหลอดทดลอง

ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตของอาหารและวัตถุดิบอาหารในหลอดทดลอง โดยการชั่งอาหารสำเร็จรูปทางการค้าหรือวัตถุดิบอาหารตัวอย่างละ 5 มิลลิกรัม เติม 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอล ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม dialyzed crude enzyme extracts ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อีก 24 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาโดยการนำสารละลายไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วดูดส่วนใสไปวิเคราะห์เพปไทด์สายสั้น (ข้อ 3.3.1) และน้ำตาลมอลโทส (ข้อ 3.3.2)

4.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณเพปไทด์สายสั้นตามวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2002) โดยนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการย่อยในข้อ 2.3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลาย trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ในที่มืด หลังจากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของ *DL*-alanine

4.3.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลมอลโทสตามวิธีการของ Areekijserree *et al.* (2006) โดยนำสารละลายส่วนใสที่ผ่านการย่อยในข้อ 2.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย dinitrosalicylic acid (DNS) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโทส

4.4 การวางแผนการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รายงานผลในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean \pm SEM) เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยของโปรตีน และประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต ด้วยการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One-Way Analysis of Variance)

5. การพัฒนาอาหารสำเร็จรูป และศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารของอาหารสำเร็จรูปในหลอดทดลอง

5.1 การพัฒนาอาหารสำเร็จรูป

นำวัตถุดิบอาหารกลุ่มหลักที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธีประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง (ข้อ 4.3) ได้แก่ ปลาช่อน กากถั่วเหลือง *Spirulina* sp. และ โปรตีนสกัดจากแป้งสาธิตตามรายงานของ Khruanet *et al.* (2011) ผสมให้เข้ากันและเตรียมส่วนผสมให้เป็นผงสำหรับเลี้ยง *C. hainesiana* ที่มีโปรตีนร้อยละ 35, 40 และ 45 ตามลำดับ หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปทำให้แห้งเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารในหลอดทดลองตามรายละเอียดข้อ 4.3 โดยใช้ crude enzyme extract ที่เตรียมจากข้อ 4.1 สำหรับการผลิตอาหารสำเร็จรูป นำส่วนผสมดังกล่าวไปผสมกับยีสต์ขนมปัง วิตามินรวม ธาตุรวม วิตามินซี น้ำมันปลาทะเล น้ำมันถั่วเหลือง เลซิธิน และเซลลูโลส ดังตารางที่ 2 จากนั้นอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง และเก็บอาหารสำเร็จรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสตลอดการทดลอง

ตารางที่ 2 อัตราส่วนของวัตถุดิบอาหาร (ร้อยละ) ของอาหารสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยงหอยกาบน้ำจืด
Chamberlainia hainesiana

วัตถุดิบ	ปริมาณ โปรตีน (ร้อยละ) ของอาหารที่เลี้ยง		
	35	40	45
กากถั่วเหลือง	5	15	26
โปรตีนสกัดจากแป้งสาลี	45	45	45
ปลายข้าว	26	26	20
<i>Spirulina</i> sp.	0.5	0.5	0.5
ยีสต์ขนมปัง	0.5	0.5	0.5
วิตามินรวม	0.25	0.25	0.25
แร่ธาตุรวม	0.05	0.05	0.05
วิตามินซี	0.1	0.1	0.1
น้ำมันปลาทะเล	2	2	2
น้ำมันถั่วเหลือง	2	2	2
เลซิทิน	2	2	2
เซลลูโลส	16.6	6.6	1.6
รวม	100	100	100

6. การทดสอบอาหารสำเร็จรูปที่ผ่านการคัดเลือกจากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองมาทดลองเลี้ยง *C. hainesiana* อายุ 3 ปี 8 เดือนในห้องปฏิบัติการ

6.1 การเตรียมตัวอย่าง *C. hainesiana*

สุ่มตัวอย่าง *C. hainesiana* อายุ 3 ปี 8 เดือน จากข้อ 1.1.1 มาทำความสะอาดเปลือกปรับสภาพหอยกาบน้ำจืดในตู้พัก (ความยาว × ความกว้าง × ความสูง × ระดับน้ำ = 45 × 29 × 30 × 23 เซนติเมตร) ที่มีน้ำปราศจากคลอรีนเป็นเวลา 3 วัน

6.2 การเลี้ยง *C. hainesiana*

การทดสอบอาหารเลี้ยง *C. hainesiana* ซึ่งประกอบด้วยอาหาร 4 สูตร ได้แก่ สาหร่ายสด และอาหารสำเร็จรูป 3 สูตร ที่ได้รับการพัฒนาจากข้อ 5.1 คือ อาหารสำเร็จรูป โพรตีนร้อยละ 35, 40 และ 45 แต่ละสูตรอาหารทำการทดลอง 3 ซ้ำ เป็นเวลา 3 เดือน ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง 06.00 น. และ 18.00 น. บันทึกข้อมูลทุกเดือน ได้แก่ ขนาด ความยาว ความสูง น้ำหนักเปลือก และน้ำหนักตัว หลังจากนั้นจึงเก็บตัวอย่างต่อมย่อยอาหารร่วมกับกระเพาะอาหาร เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร (ข้อ 1.3) และกล้ามเนื้อแอดคักเตอร์ส่วนท้าย เพื่อศึกษาคุณภาพกล้ามเนื้อ (ข้อ 7.2)

6.3 การจัดการคุณภาพน้ำและการวิเคราะห์

เลี้ยง *C. hainesiana* ในตู้เลี้ยงที่มีการเปลี่ยนน้ำใหม่ 20 เปอร์เซ็นต์ วันเว้นวัน ทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำจากตู้เลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ ประกอบด้วย อุณหภูมิ น้ำและอากาศ พีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และการนำไฟฟ้า โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (556 MPS, YSI Incorporated, USA) วิเคราะห์ความเป็นด่าง ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์อิสระ ความกระด้าง ในไตรท์ ไนเตรท และแอมโมเนียไนโตรเจน ตามวิธีการของ APHA, AWWA, WPCF (1998) ดังแสดงในภาคผนวก ค

6.4 การวางแผนการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รายงานผลข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ($\text{mean} \pm \text{SEM}$) เปรียบเทียบการเจริญเติบโต กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร และคุณภาพของกล้ามเนื้อแอดคักเตอร์ส่วนท้าย โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ศึกษาผลของระยะเวลาที่เลี้ยง (1, 2 และ 3 เดือน) และสูตรอาหาร (สาหร่ายสด โพรตีนร้อยละ 35, 40 และ 45) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ไลเปส และโปรติเอส โดยใช้ Two-Way Analysis of Variance (Two-Way ANOVA)

7. การศึกษาคุณภาพของกล้ามเนื้อและเซลล์สืบพันธุ์

7.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่าง *C. hainesiana* ที่ผ่านการเลี้ยงจากข้อ 5.2 มาผ่าตัดแยกกล้ามเนื้อแอดดักเตอร์ส่วนท้ายเพื่อใช้ศึกษาคุณภาพของกล้ามเนื้อ ได้แก่ RNA, protein, RNA/protein ratio และกรดไขมัน

7.2 การศึกษาความเข้มข้นของ RNA และ protein

สกัด RNA และ protein จากกล้ามเนื้อและโอโอไซต์ตามวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen (2007) ซึ่งดัดแปลงจาก Sunde *et al.* (2001) โดยชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 50 มิลลิกรัม ผสมกับ TRIzol reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบดให้ละเอียดโดยใช้โซนิเคเตอร์บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $5,000 \times g$ นาน 10 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายชั้นบน (aqueous phase) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อใช้ศึกษาความเข้มข้นของ RNA และดูดสารละลายชั้นล่าง (organic phase) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อใช้ศึกษาความเข้มข้นของ protein

7.2.1 ศึกษาความเข้มข้นของ RNA ด้วยการผสมกับไอโซโพรพานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $9,000 \times g$ นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 90 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ $9,000 \times g$ นาน 10-20 นาที หลังจากนั้นระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำ RNA ที่แห้งมาละลายด้วยโซเดียมอะซีเตตพีเอช 5 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของ RNA ตามสมการ $E_{260} = 40 \mu\text{g RNA ml}^{-1}$

7.2.2 ศึกษาความเข้มข้นของ protein ด้วยการผสมกับไอโซโพรพานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $9,000 \times g$ นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 90 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ $9,000 \times g$ นาน 10-20 นาที หลังจากนั้น ระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำ protein ที่แห้งมาละลายด้วย sodium dodecyl sulfate ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรและคำนวณความเข้มข้นของ protein ตามสมการ $E_{280} = 2.1 \text{ mg protein ml}^{-1}$

7.3 การวิเคราะห์กรดไขมัน

เตรียม fatty acid methyl ester (FAME) โดยใช้โซเดียมเมทริกซ์ ตามวิธีการของ Gandhi and Weete (1991) และศึกษาปริมาณของกรดไขมันในตัวอย่างโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี (GC-14A, Shimadzu, Kyoto, Japan) โดยใช้ stainless steel packed SS column และตัวตรวจสอบชนิด flame ionization detector โดยใช้อุณหภูมิในการฉีด 205–250 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิ เท่ากับ 2 องศาเซลเซียสต่อนาที อุณหภูมิในการตรวจสอบ 275 องศาเซลเซียส โดยใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นตัวพา (2 kg/cm^3) และแยกชนิดของกรดไขมัน โดยการเปรียบเทียบกับ standard menhaden oil methyl ester (NMFS, Seattle, USA)

8. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ RNA, protein และ trypsin- like enzyme ในเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* อายุ 3 ปี 5 เดือนที่เลี้ยงในบ่อดิน

8.1 การเลี้ยง *C. hainesiana*

นำ *C. hainesiana* จากข้อ 1.1.1 อายุ 3 ปี 5 เดือน ใส่ในตะกร้าเลี้ยงหอยวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร ภาชนะละ 20 ตัว โดยใส่หอยเพศผู้ 10 ตัว และเพศเมีย 10 ตัว แล้วนำไปแขวนเลี้ยงที่กระชังเลี้ยงหอยที่ระดับความลึก 1 เมตร ภายในบ่อดินพื้นที่ 5 ไร่ ของคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.2 การเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาคุณภาพเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana*

เก็บตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* ที่เลี้ยงในบ่อดินทุกเดือนตลอดทั้งปีตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2552 ถึง ตุลาคม 2553 โดยนำหอยกาน้ำจืดที่เลี้ยงไว้ขึ้นมาจากแหล่งเพาะเลี้ยง จากนั้นทำความสะอาดเปลือกด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ใช้ opening forceps เปิดเปลือกหอย แล้วใช้ลิ้นสอดเข้าไปบริเวณระหว่างเปลือกของฝาทั้งสองข้าง เพื่อป้องกันการปิดของเปลือก หลังจากนั้นใช้ syringe ดูดของเหลวภายใน visceral mass ตรงตำแหน่งที่เป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

8.2.1 เก็บตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตรไว้ในไมโครทิวบ์ (microtube) เพื่อนำไปศึกษาความเข้มข้นของ RNA และ protein ในเซลล์สืบพันธุ์ (ข้อ 7.2)

8.2.2 เก็บตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตรไว้ในไมโครทิวบ์นำไปสกัดเอนไซม์ตามข้อ 1.2 เพื่อศึกษาคุณลักษณะของ trypsin-like enzyme ในเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลอง ข้อ 2

8.3 การเก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana*

เก็บตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* ที่เลี้ยงในบ่อคิน เดือนเว้นเดือนตลอดทั้งปี ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2552 ถึง ตุลาคม 2553 โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตรไว้ในไมโครทิวบ์ เก็บรักษาสภาพตัวอย่างด้วยการเติมฟอร์มาลินร้อยละ 4 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เพื่อใช้นับจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่างๆ โดยการเขย่าไมโครทิวบ์ให้เซลล์กระจายตัวดี หลังจากนั้นจึงใช้ไมโครปิเปต (micropipet) ดูดตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดใส่สไลด์นับจำนวน (counting slide) จากนั้นเติมน้ำกลั่น 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ที่กำลังขยาย 100 เท่า

8.4 คุณภาพน้ำและการวิเคราะห์

วิเคราะห์คุณภาพน้ำจากบ่อคินทุกเดือน ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2552 ถึง ตุลาคม 2553 ประกอบด้วย อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณออกซิเจนละลาย และการนำไฟฟ้า โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (556 MPS, YSI Incorporated, USA) วิเคราะห์ความเป็นด่าง ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์อิสระ ความกระด้าง ไนโตรที่ ไนเตรท แอมโมเนียไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ตามวิธีการของ APHA, AWWA, WPCF (1998) ภาคผนวก ก

ผลและวิจารณ์

ผล

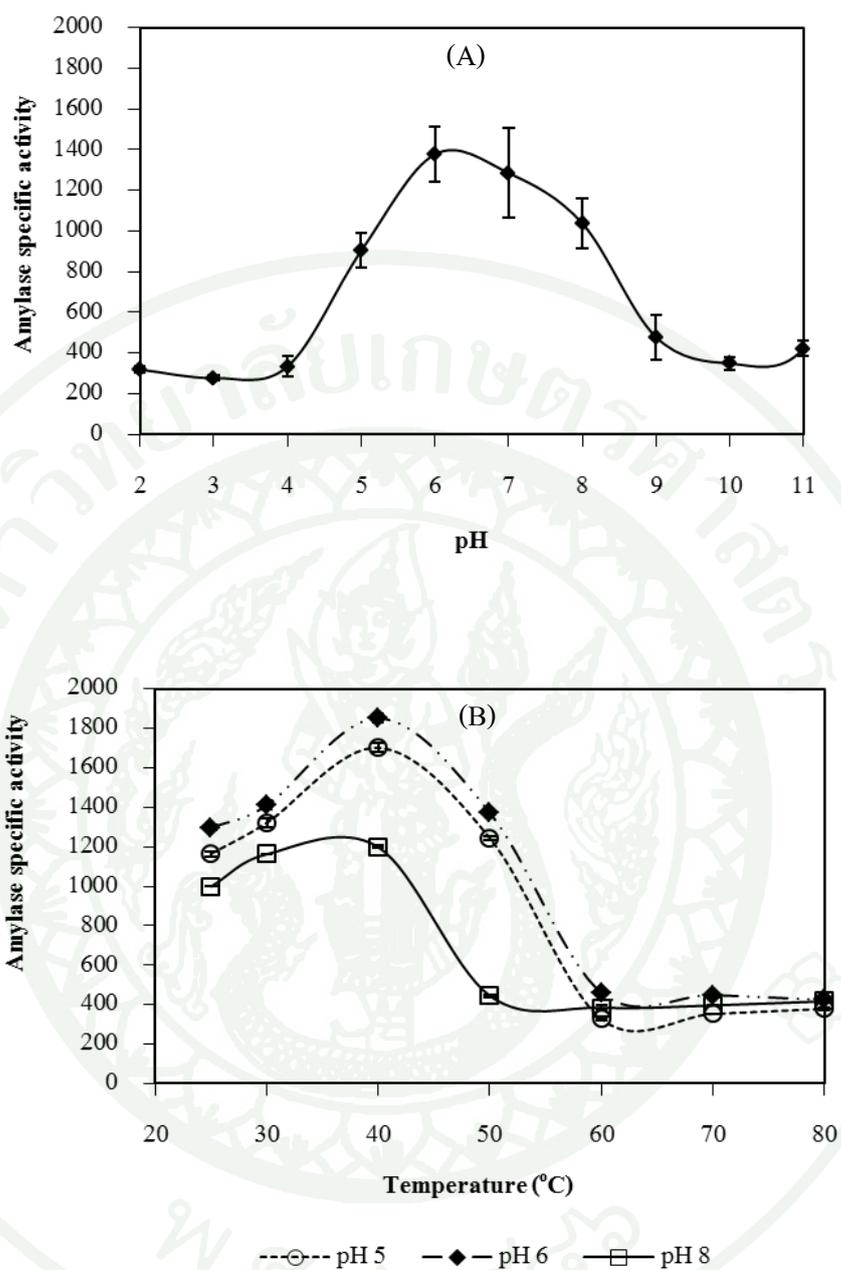
ผลจากการศึกษาการใช้เทคนิคทางชีวเคมีในการประเมินคุณภาพอาหาร ต่อการเจริญเติบโต คุณภาพเนื้อ และการพัฒนาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* ประกอบด้วย การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยอาหารเพื่อใช้ในการประเมินประสิทธิภาพการย่อยอาหารในหลอดทดลอง การทดสอบสูตรอาหารที่ผ่านการคัดเลือกจากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองมาทดลองเลี้ยง สำหรับการประเมินคุณภาพการเจริญเติบโต ประกอบด้วย การศึกษาคุณภาพกล้ามเนื้อ และการแสดงออกของเอนไซม์ย่อยอาหาร นอกจากนี้ยังศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ RNA, protein และ trypsin-like enzyme ในเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* ที่เลี้ยงในบ่อดิน ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. คุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยอาหารจาก *C. hainesiana* อายุ 14 เดือน

1.1 คุณลักษณะของเอนไซม์อะไมเลส

จากการศึกษากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสที่สกัดจาก *C. hainesiana* ในสภาวะเปลี่ยนแปลงพีเอชที่อุณหภูมิห้อง ตั้งแต่ 2-11 พบว่าเอนไซม์อะไมเลสแสดงกิจกรรมในช่วงพีเอชกว้างจาก 6-8 โดยเอนไซม์อะไมเลสที่พีเอช 6 มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุด (ภาพที่ 1A)

การศึกษาเกี่ยวกับผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของอะไมเลสที่พีเอช 6 ในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ตั้งแต่ 20-80 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 1B) พบว่าเอนไซม์อะไมเลสแสดงกิจกรรมจำเพาะที่อุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส โดยแสดงค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 1 กิจกรรมจำเพาะของอะไมเลส ($\mu\text{mol maltose h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) ในสภาวะการเปลี่ยนแปลงพีเอช ที่อุณหภูมิห้อง (A) และที่พีเอช 5, 6 และ 8 ในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (B) ของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana*

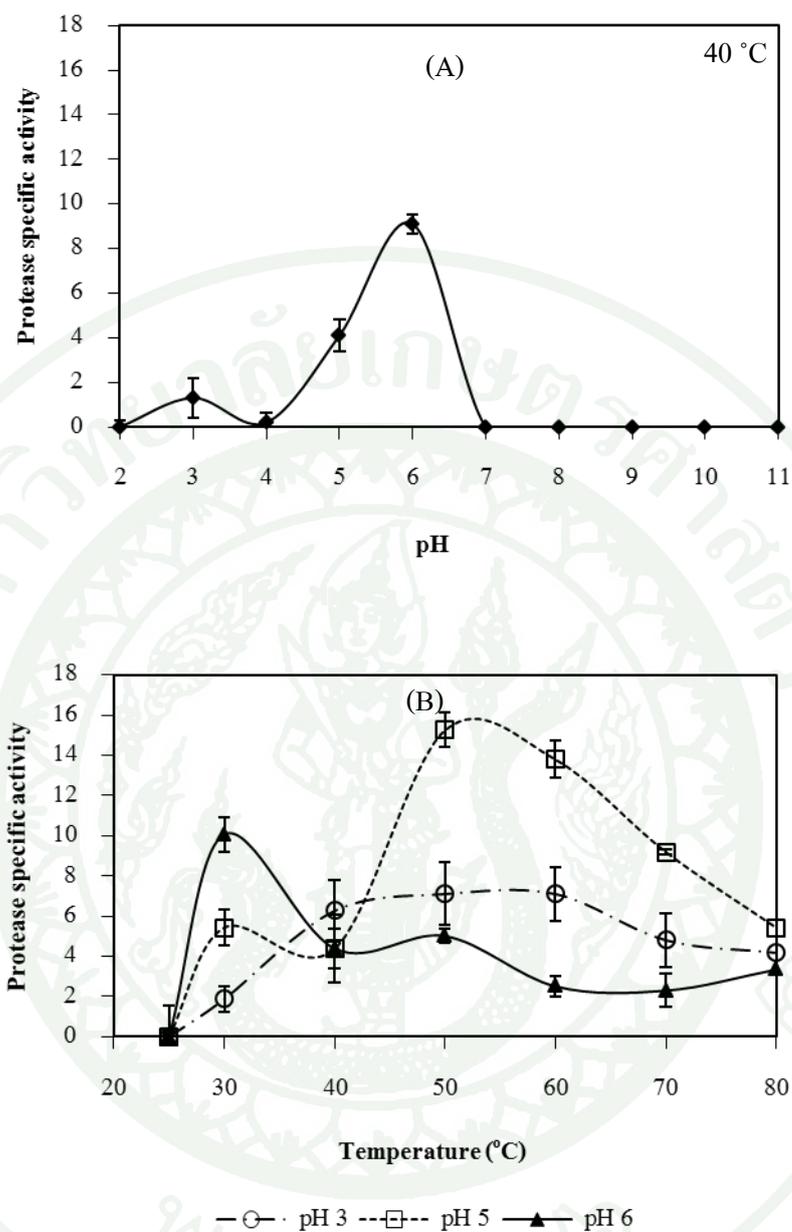
1.2 คุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอส

โปรติเอสของ *C. hainesiana* ในสภาวะเปลี่ยนแปลงพีเอช ตั้งแต่ 2-11 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 2A) แสดงกิจกรรมจำเพาะเฉพาะเอสดีโปรติเอสที่พีเอช 3, 5 และ 6 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อนำค่าพีเอชที่เหมาะสมดังกล่าวมาศึกษาภายใต้สภาวะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (ภาพที่ 2B) พบว่ากิจกรรมจำเพาะของพีเอช 3 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สูงกว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ประมาณ 4 เท่า ที่พีเอช 6 แสดงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 5 แสดงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

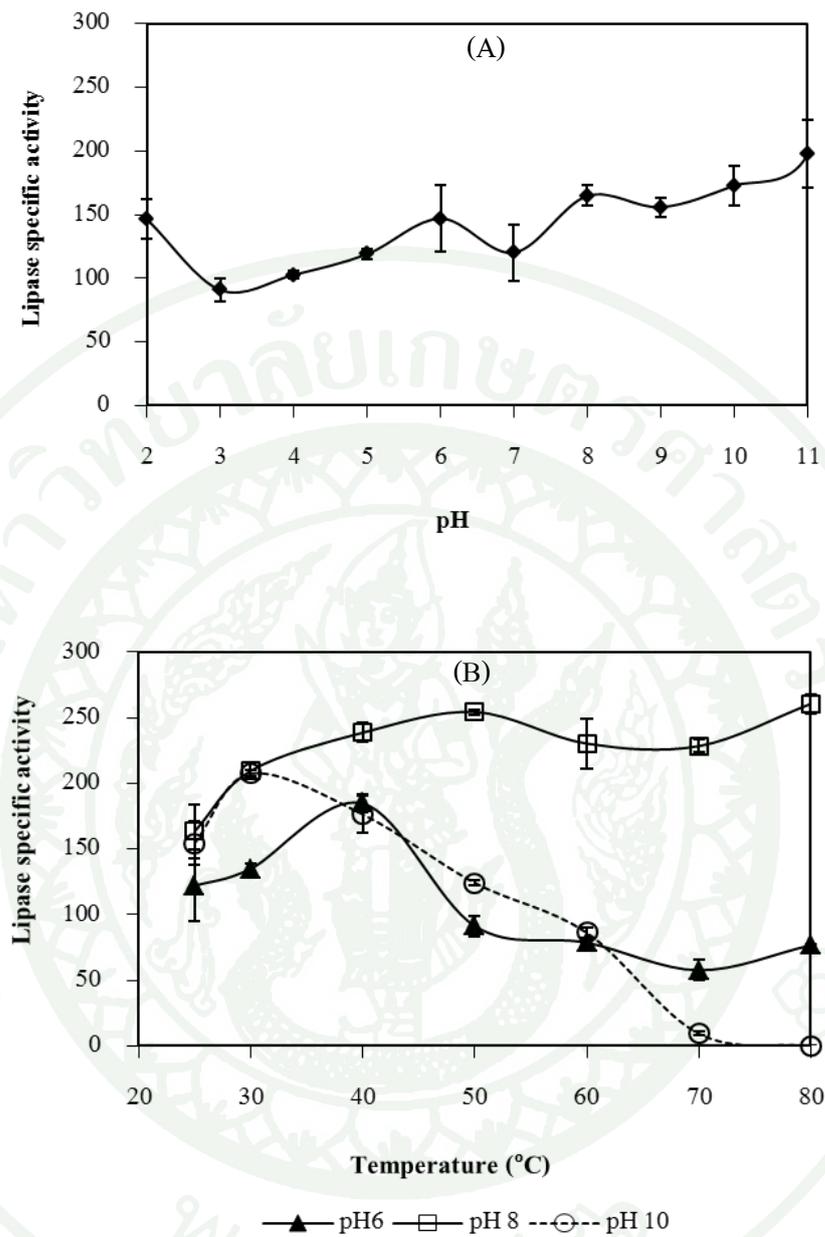
1.3 คุณลักษณะของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสมีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งเอสดี และแอลคาไลน์ไลเปส โดยเอสดีไลเปสแสดงกิจกรรมจำเพาะที่พีเอช 2 และ 6 ส่วนแอลคาไลน์ไลเปสแสดงกิจกรรมจำเพาะที่พีเอช 8 ถึง 11 ตามลำดับ (ภาพที่ 3A)

เอสดีไลเปสของพีเอช 6 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 40 องศาเซลเซียส ขณะที่แอลคาไลน์ไลเปสพีเอช 8 มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ส่วนแอลคาไลน์ไลเปสพีเอช 10 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3B)



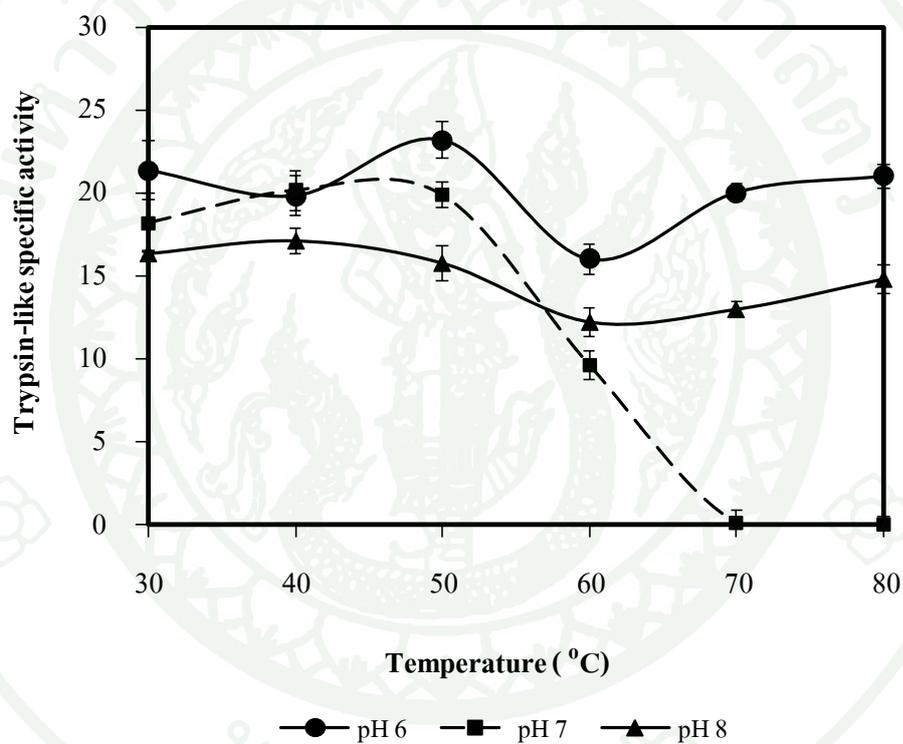
ภาพที่ 2 กิจกรรมจำเพาะของโปรติเอส (increase in absorbance at 440 nm h⁻¹ mg protein⁻¹) ในสภาวะเปลี่ยนแปลงพีเอช ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (A) และที่พีเอช 3, 5 และ 6 ในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (B) ของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana*



ภาพที่ 3 กิจกรรมจำเพาะของไลเปส (increase in absorbance at 440 nm h^{-1} mg protein $^{-1}$) ในสภาวะเปลี่ยนแปลงพีเอช ที่อุณหภูมิห้อง (A) และที่พีเอช 6, 8 และ 10 ภายใต้สภาวะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (B) ของหอยกานน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana*

2. คุณลักษณะของ trypsin-like enzyme ในเซลล์สืบพันธุ์จาก *C. hainesiana* อายุ 3 ปี

trypsin-like enzyme ใน *C. hainesiana* มีรูปแบบที่เหมาะสมต่อการทำงานทั้งในสภาวะที่เป็นกรดอ่อน (พีเอช 6) กลาง (พีเอช 7) และเบส (พีเอช 8) โดยกิจกรรมจะมีค่าสูงสุดที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4) จึงใช้สภาวะที่เหมาะสมนี้ในการตรวจสอบการศึกษากิจกรรมของ trypsin-like enzyme ในเซลล์สืบพันธุ์ของตัวอย่าง *C. hainesiana* ที่เลี้ยงในบ่อดิน ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2552 ถึงเดือนตุลาคม 2553



ภาพที่ 4 กิจกรรมจำเพาะของ trypsin-like enzyme ($\mu\text{mol } p\text{-nitroaniline produced h}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) ในเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* ภายใต้สภาวะการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่ 6, 7 และ 8 ที่อุณหภูมิ 30 – 80 องศาเซลเซียส

3. องค์ประกอบทางเคมีของอาหารสำเร็จรูปทางการค้า และวัตถุดิบอาหาร ที่ใช้สำหรับประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง

องค์ประกอบทางเคมีของอาหารสำเร็จรูปทางการค้า 5 สูตร พบว่าอาหารสูตร 1 (ADP No.1) มีร้อยละของโปรตีนสูงที่สุดคือ 51.70 รองลงมาคืออาหารสูตร 2 (TNT No.2) ร้อยละ 39.09 สูตรอาหารที่ 3 (อาหารปลาคุณภาพเล็ก) มีร้อยละของคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุดร้อยละ 64.66 อันดับรองลงมาคืออาหารสูตรที่ 4 (อาหารปลาคุณภาพกลาง) ร้อยละ 50.96

กลุ่มอาหารวัตถุดิบจากสัตว์ เลือดปนมีร้อยละของโปรตีนสูงที่สุดคือ 90.39 รองลงมาคือเนื้อและกระดูกปนร้อยละ 40.06 โดยปลาปนมีร้อยละของคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุดคือ 24.37

กลุ่มวัตถุดิบจากพืชและสาหร่าย โปรตีนข้าวสาลีมีร้อยละของโปรตีนสูงที่สุดคือ 83.66 รองลงมาคือโปรตีนข้าวโพด *Spirulina* sp. และกากถั่วเหลือง (ร้อยละ 52.07, 46.14 และ 39.52 ตามลำดับ) ปลาขี้มีร้อยละของคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุดคือ 90.34 (ร้อยละ 87.42 และ 84.19 ตามลำดับ) องค์ประกอบทางเคมีของอาหารและวัตถุดิบอาหารแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารสำเร็จรูปเลี้ยงสัตว์น้ำและวัตถุดิบอาหารที่ใช้สำหรับ
ประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง

Feeds and feedstuffs	Moisture		% on dry weight basis			
	%	Protein	Carbohydrate	Lipid	Fiber	Ash
Commercial feeds						
Formulation 1	6.61	51.70	33.99	6.15	0.96	7.20
Formulation 2	8.13	39.09	47.72	5.04	0.65	7.50
Formulation 3	7.31	19.63	64.66	0.40	1.09	14.22
Formulation 4	6.40	28.51	50.96	1.02	0.91	18.60
Formulation 5	7.57	15.53	72.96	0.49	2.20	8.82
Animal sources						
Blood meal	5.98	90.39	7.14	0.43	0.36	1.68
Fish meal	7.01	45.74	24.37	3.87	0.75	25.27
Meat and bone meal	4.60	40.06	16.36	8.53	0.21	34.84
Plant sources						
Broken rice	10.31	6.53	90.14	1.23	0.54	1.20
Corn	10.91	7.42	84.19	4.53	2.59	1.27
Coconut meal	6.82	38.53	42.42	5.18	6.79	7.08
Corn gluten meal	7.51	52.07	42.23	3.08	0.52	2.10
Palm seed meal	9.06	14.01	70.58	5.97	4.73	4.71
Peanut meal	6.82	38.53	42.42	5.18	6.79	7.08
Rice bran	9.83	11.59	59.67	15.07	5.73	7.94
Soybean meal	9.96	39.52	45.59	3.47	4.15	7.27
Steam broken rice	10.44	6.81	90.34	1.32	0.17	1.36
Tapioca chip	9.24	2.75	90.47	0.50	1.58	4.70
Wheat gluten	8.27	83.66	15.00	0.65	nd	0.69
Wheat bran	10.05	14.02	70.95	3.30	7.12	4.61
Wheat flour	12.06	11.14	87.42	0.38	0.34	0.72
Algae sources						
<i>Chlorella</i> sp.*	-	35.60	37.32	34.67	-	-
<i>Kirchneriella incurvata</i> *	-	23.57	21.64	34.00	-	-
<i>Spirulina</i> sp. meal	8.74	46.14	39.05	0.23	0.42	14.16

หมายเหตุ * ข้อมูลจาก Supannapong *et al.* (2008)

4. ประสิทธิภาพการย่อยของอาหารสำเร็จรูปทางการค้า และวัตถุดิบอาหารสำหรับเลี้ยง

C. hainesiana อายุ 3 ปีในหลอดทดลอง

4.1 ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน

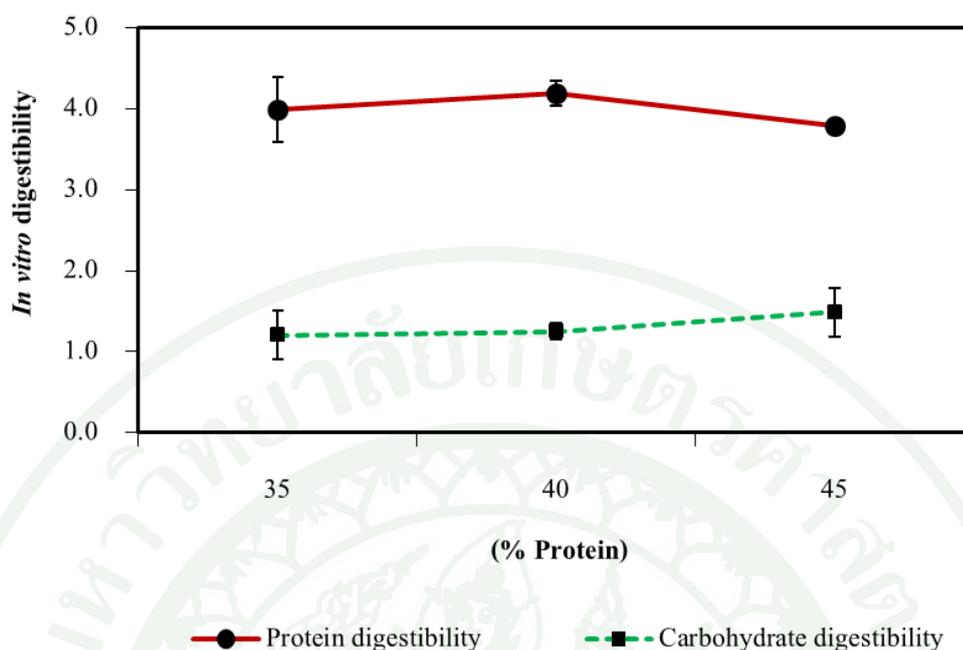
ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของ *C. hainesiana* อยู่ในระดับต่ำ จากการศึกษพบว่า ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของ *C. hainesiana* ต่อวัตถุดิบอาหาร 26 ชนิด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{25,51} = 8.367, P = 0.000$) โดยกากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบที่ให้ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนสูงสุด ลำดับรองลงมาคืออาหารสูตร 3 *Spirulina* sp. อาหารสูตร 1 กากถั่วลิสง และโปรตีนสกัดจากข้าวสาลี ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ภาพที่ 5)

4.2 ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต

ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตของ *C. hainesiana* ต่อวัตถุดิบอาหาร 26 ชนิด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{25,51} = 10.650, P = 0.000$) ปลายข้าวเป็นวัตถุดิบอาหารที่ให้ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตสูงสุด รองลงมาได้แก่ ปลายข้าวหนึ่ง เลือดปน เมล็ดข้าวโพด และอาหารสูตร 5 ตามลำดับ (ภาพที่ 6) ซึ่งปลายข้าวมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากปลายข้าวหนึ่ง เลือดปน เมล็ดข้าวโพด และอาหารสำเร็จรูปทางการค้าสูตรที่ 5 (อาหารปลาคุณภาพใหญ่)

4.3 ประสิทธิภาพการย่อยอาหารสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยง *C. hainesiana* ระยะตัวเต็มวัย 3 สูตร

นำวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธีประเมินประสิทธิภาพการย่อยอาหาร ได้แก่ ปลายข้าว กากถั่วเหลือง *Spirulina* sp. และโปรตีนสกัดจากแป้งสาลี มาพัฒนาเป็นสูตรอาหารสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยง *C. hainesiana* ที่มีโปรตีนร้อยละ 35, 40 และ 45 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองของโปรตีนในสูตรอาหารสำเร็จรูป พบว่ามีประสิทธิภาพการย่อยสูงสุดในสูตรอาหารที่มีโปรตีนร้อยละ 40 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับสูตรอาหารที่มีโปรตีนร้อยละ 35 และ 45 ($P > 0.05$) ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตในสูตรอาหารสำเร็จรูป มีค่าต่ำกว่า ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตในวัตถุดิบอาหาร (ข้อ 3.2) เกือบ 8 เท่า โดยมีประสิทธิภาพการย่อยสูงสุดในสูตรอาหารที่มีโปรตีนร้อยละ 45 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับสูตรอาหารที่มี



ภาพที่ 7 ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ($\mu\text{mol DL-alanine g dried feed}^{-1}$ protease activity⁻¹) และคาร์โบไฮเดรต ($\mu\text{mol maltose g dried feed}^{-1}$ amylase activity⁻¹) ของอาหารสำเร็จรูป สำหรับเลี้ยงหอยกานน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* ที่มีเปอร์เซ็นต์โปรตีนแตกต่างกัน 3 ระดับ

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารสำเร็จรูป (%) สำหรับเลี้ยงหอยกานน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* ที่มีโปรตีนแตกต่างกัน 3 ระดับ

Experimental diets (% Protein)	Moisture	% on dry weight basis				
	%	Protein	Carbohydrate	Lipid	Fiber	Ash
35	6.63	36.12	54.70	6.94	1.07	1.17
40	7.10	39.54	51.12	6.62	0.95	1.77
45	6.85	45.66	43.42	6.59	1.87	2.46

5. การทดสอบสูตรอาหารที่ผ่านการคัดเลือกจากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองมาทดลองเลี้ยง *C. hainesiana* อายุ 3 ปี 8 เดือนในห้องปฏิบัติการ

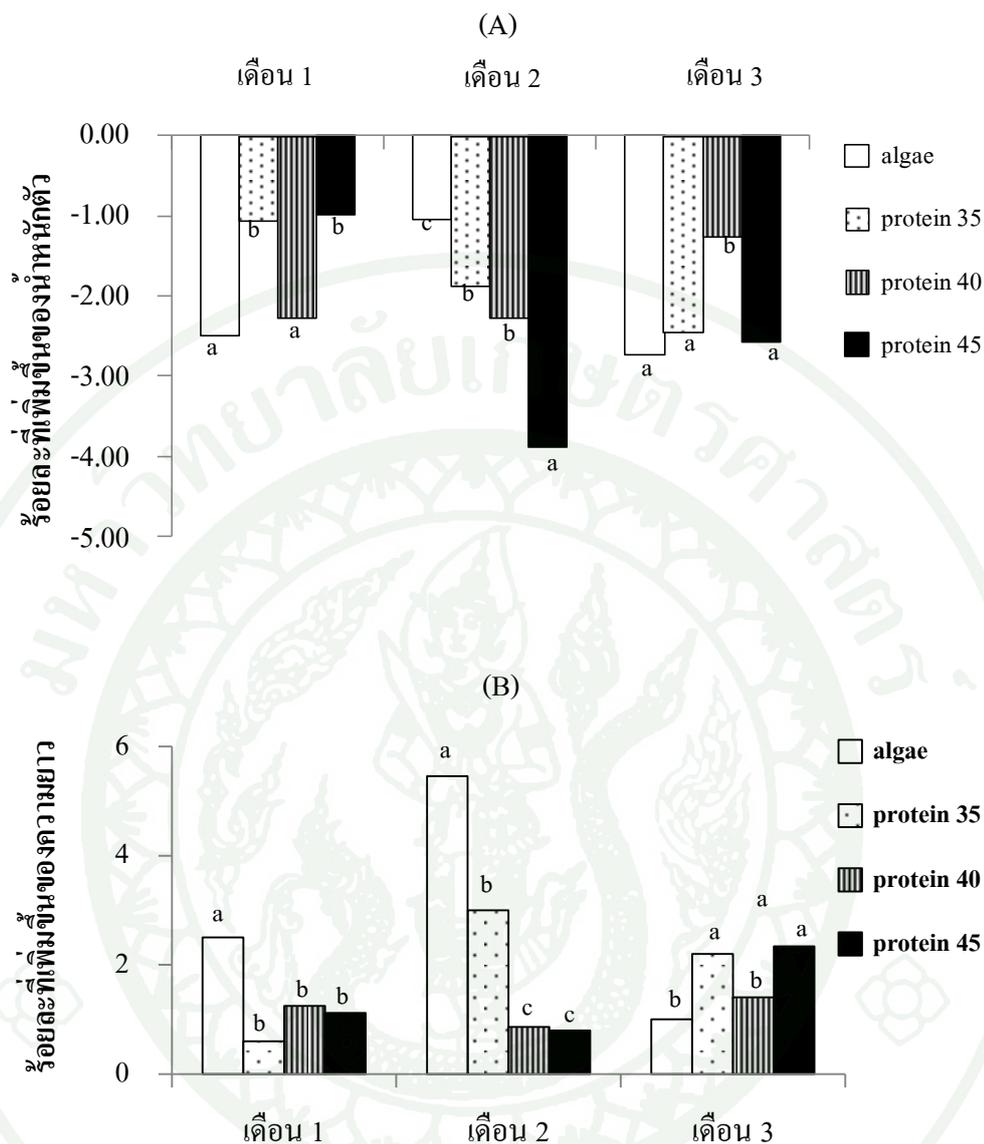
5.1 การเจริญเติบโตของ *C. hainesiana*

C. hainesiana ที่เลี้ยงในทุกสูตรอาหาร ไม่พบการตาย ร้อยละที่เพิ่มขึ้นของความยาวเปลือก ความสูง และความหนาของ *C. hainesiana* ในทุกชุดการทดลองไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) โดยร้อยละของน้ำหนักมีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวเริ่มต้นก่อนทำการทดลองในทุกชุดการทดลอง (ภาพที่ 8A) ร้อยละของความยาวเปลือกที่เพิ่มขึ้นมีค่าสูงสุดในชุดที่เลี้ยงด้วยสหาร่ายสดในเดือนที่ 2 ของการทดลอง และมีค่าสูงในสูตรอาหารสำเร็จรูปโปรตีนร้อยละ 35 และ 45 ในเดือนที่ 3 ของการทดลอง (ภาพที่ 8B) ร้อยละของความสูงมีค่าสูงสุดในชุดที่เลี้ยงด้วยสหาร่ายสด และที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารสำเร็จรูปโปรตีนร้อยละ 40 ในเดือนที่ 3 ของการทดลอง และความหนาของเปลือกมีค่าสูงสุดที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารสำเร็จรูปโปรตีนร้อยละ 35 ในเดือนที่ 3 ของการทดลอง (ภาพที่ 9B)

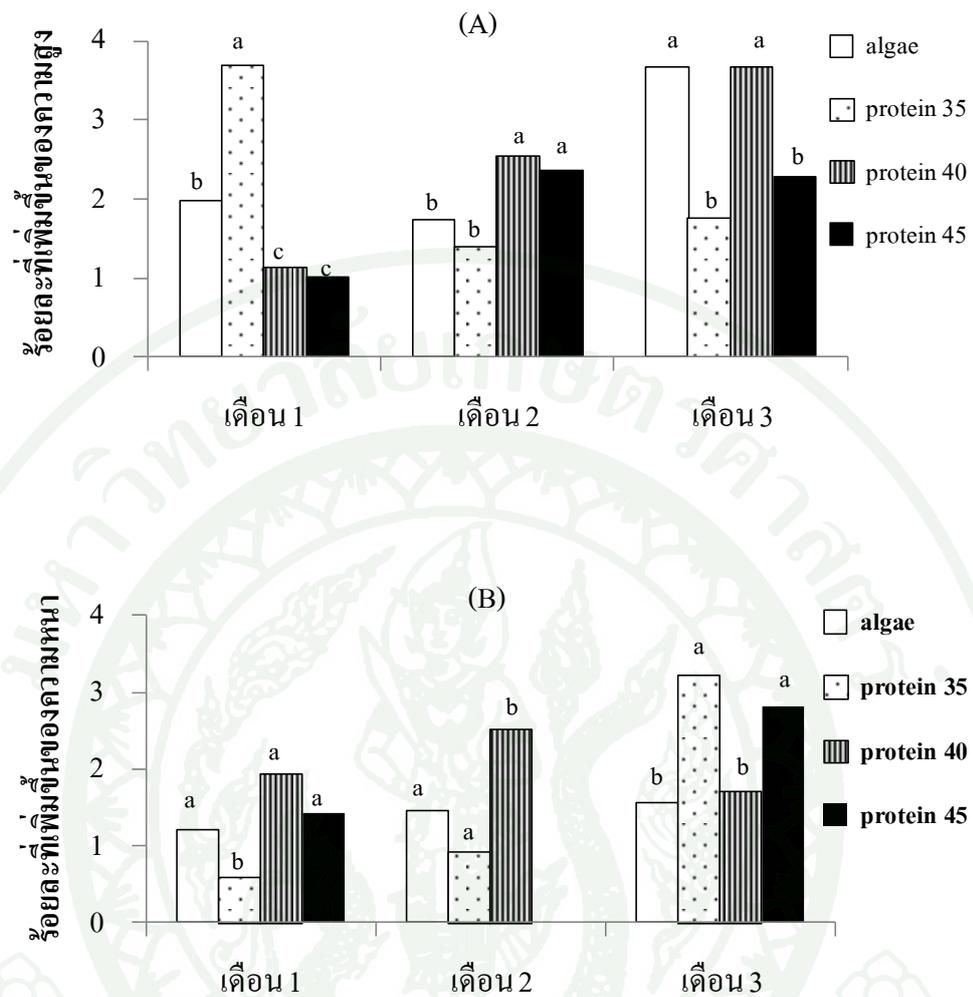
5.2 การแสดงออกของเอนไซม์ย่อยอาหาร

กิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสจาก *C. hainesiana* มีค่าสูงสุดในเดือนที่ 1 โดยเฉพาะหอยที่เลี้ยงด้วยสหาร่ายสด ($P < 0.05$) และกิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสมีค่าต่ำลงในทุกชุดการทดลองเมื่อเข้าสู่เดือนที่ 2 และเดือนที่ 3 ของการเลี้ยง (ภาพที่ 10) กิจกรรมจำเพาะของไลเปสมีค่าต่ำในทุกชุดการทดลองในเดือนที่ 1 ($P < 0.05$) และเริ่มมีค่าสูงขึ้นในเดือนที่ 2 และเดือนที่ 3 โดยที่เดือนที่ 2 และเดือนที่ 3 กิจกรรมจำเพาะของไลเปสในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) (ภาพที่ 11) กิจกรรมจำเพาะของโปรติเอสมีค่าสูงที่สุดในหอยที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารสำเร็จรูปโปรตีนร้อยละ 35 ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 12) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของเอนไซม์ทั้งสามชนิดต่อการเจริญเติบโตของหอย ($P > 0.05$)

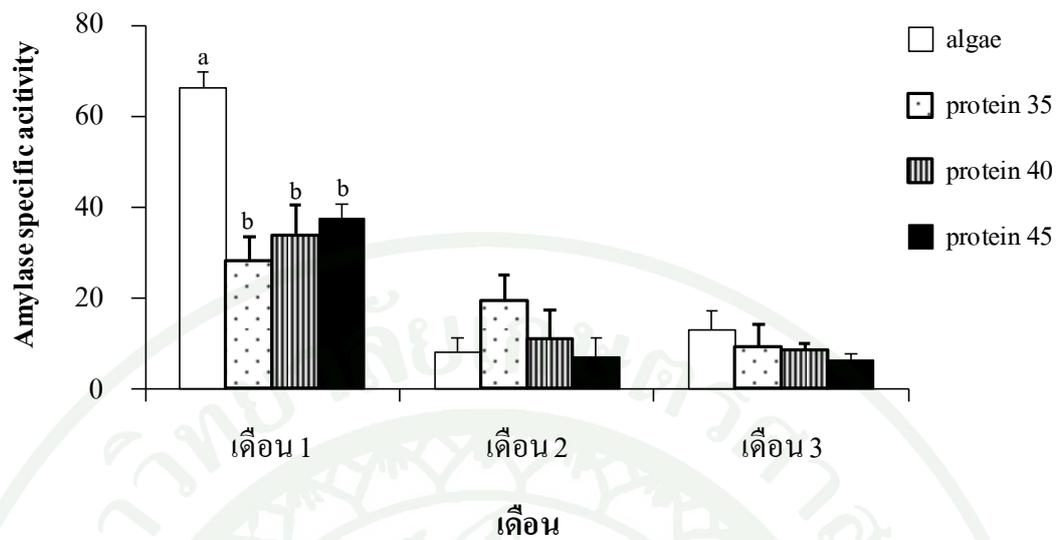
การวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงมีอิทธิพลต่อกิจกรรมจำเพาะของอะไมเลส และไลเปส ($P < 0.01$) ขณะที่กิจกรรมจำเพาะของโปรติเอสมีอิทธิพลมาจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาและสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง ($P < 0.01$) (ตารางที่ 5)



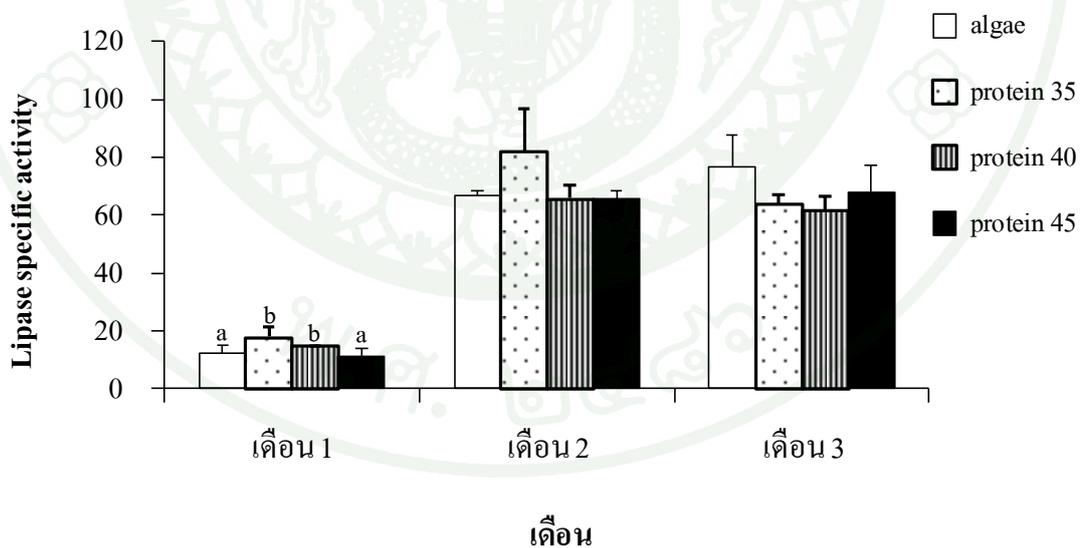
ภาพที่ 8 ร้อยละที่เพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว (กรัม) (A) และความยาวเปลือก (เซนติเมตร) (B) ของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แสดงด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน



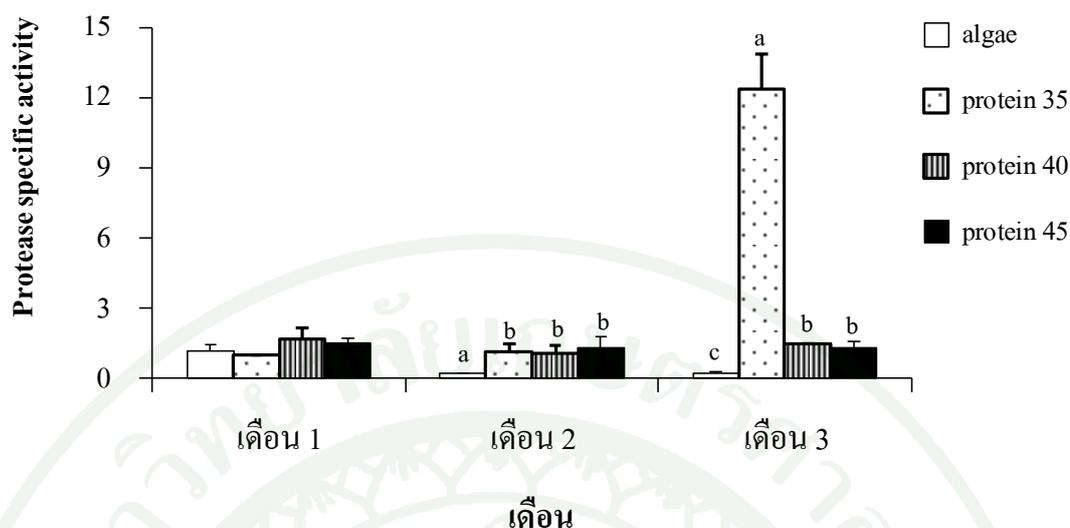
ภาพที่ 9 ร้อยละที่เพิ่มขึ้นของความสูง (มิลลิเมตร) (A) และความหนาของเปลือก (มิลลิเมตร) (B) ของหอยกาน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แสดงด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน



ภาพที่ 10 กิจกรรมจำเพาะของอะไมเลส ($\mu\text{mol maltose h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) ของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 4 สูตร (สาหร่ายสด โปรตีนร้อยละ 35, 40 และ 45) เป็นระยะเวลา 3 เดือน ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แสดงด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน



ภาพที่ 11 กิจกรรมจำเพาะของไลเปส (increase in absorbance at 440 nm $\text{h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) ของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 4 สูตร (สาหร่ายสด โปรตีนร้อยละ 35, 40 และ 45) เป็นระยะเวลา 3 เดือน ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แสดงด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน



ภาพที่ 12 กิจกรรมจำเพาะของโปรติเอส (increase in absorbance at 440 nm h^{-1} mg protein $^{-1}$) ของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 4 สูตร (สาหร่ายสด โปรตีนร้อยละ 35, 40 และ 45) เป็นระยะเวลา 3 เดือน ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แสดงด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน

ตารางที่ 5 ผลของระยะเวลาเลี้ยง (1, 2 และ 3 เดือน) และอาหารที่ใช้เลี้ยงหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* (สาหร่ายสด และสูตรอาหารสำเร็จรูปที่มีโปรตีนแตกต่างกัน 3 ระดับ) ต่อกิจกรรมของอะไมเลส ไลเปส และโปรติเอส จากต่อมย่อยอาหารรวมกับกระเพาะอาหารของ

Enzyme specific activity	สูตรอาหาร		ระยะเวลาที่เลี้ยง		สูตรอาหาร x ระยะเวลาที่เลี้ยง	
	F	P	F	P	F	P
amylase	0.497	0.698	15.490	0.004	0.146	0.232
lipase	1.070	0.430	177.074	0.000	2.503	0.050
protease	2.762	0.134	0.601	0.578	8.514	0.000

ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ($P < 0.05$) แสดงด้วยอักษรตัวหนา

5.3 คุณภาพกล้ามเนื้อแอดคักเตอร์ส่วนท้าย

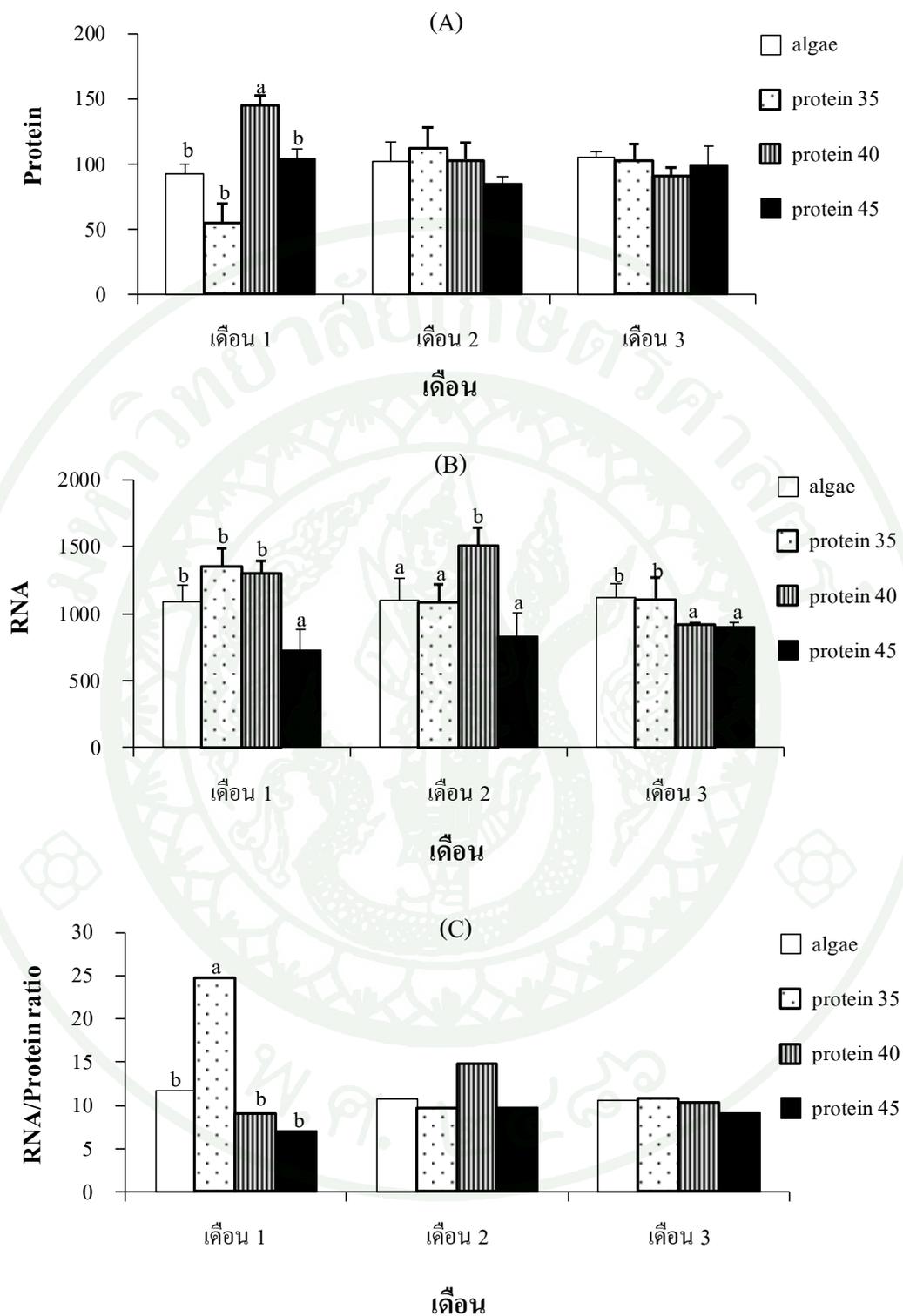
คุณภาพกล้ามเนื้อแอดคักเตอร์ของ *C. hainesiana* (RNA, protein และ RNA/protein ratio) มีค่าแตกต่างกันในแต่ละเดือนของการทดลอง ($P < 0.05$) ปริมาณโปรตีนใน *C. hainesiana* ที่ได้รับอาหารสูตรโปรตีนร้อยละ 40 มีค่าสูงที่สุดในเดือนที่ 1 ($P < 0.05$) ปริมาณ RNA มีค่าสูงในสูตรอาหารโปรตีนร้อยละ 35 และ 40 ในเดือนที่ 1 มีค่าสูงที่สุดในสูตรอาหารโปรตีนร้อยละ 40 ในเดือนที่ 2 และมีค่าสูงในสูตรอาหารที่สาหร่ายสด และโปรตีนร้อยละ 35 ในเดือนที่ 3 ($P < 0.05$) ปริมาณ RNA/protein ratio สูงที่สุดในหอยที่ได้รับอาหารสูตรโปรตีนร้อยละ 35 ในเดือนที่ 1 ($P < 0.05$) (ภาพที่ 13)

5.4 ปริมาณกรดไขมันของ *C. hainesiana*

พบปริมาณกรดไขมันในกล้ามเนื้อแอดคักเตอร์ส่วนท้ายของ *C. hainesiana* ที่ทดลองเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 เดือนส่วนใหญ่มีค่าใกล้เคียงกันในอาหารทั้ง 4 สูตร มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวบางชนิดที่มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่น เช่น กรดไขมันไม่อิ่มตัว 18:1n9 และ 18:2n6 ในกล้ามเนื้อแอดคักเตอร์ส่วนท้ายของหอยที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารโปรตีนร้อยละ 40 มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เหลือส่วนใหญ่มีค่าสูงในสูตรอาหารโปรตีนร้อยละ 45 ยกเว้น 20:5n3 และ 22:4n6 ที่มีค่าสูงสุดในอาหารชุดสาหร่ายสด (ตารางที่ 6) เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$)

5.5 คุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยง

คุณภาพน้ำที่ตรวจวัดในการเพาะเลี้ยง *C. hainesiana* ในตู้เลี้ยงของทุกชุดการทดลอง ได้แก่ อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส) อุณหภูมิอากาศ (องศาเซลเซียส) พีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ความเป็นด่าง (ppm CaCO_3) คาร์บอนไดออกไซด์อิสระ (ppm CO_2) ไนเตรท (ppm $\text{NO}_3\text{-N}$) ไนไตรท์ (ppm $\text{NO}_2\text{-N}$) แอมโมเนีย ไนโตรเจน (ppm $\text{NH}_4\text{-N}$) การนำไฟฟ้า (มิลลิซีเมนต์ต่อเซนติเมตร) และความกระด้างของน้ำ (ppm CaCO_3) ไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) (ตารางที่ 7)



ภาพที่ 13 ปริมาณ Protein (mg g⁻¹) (A), RNA (μg g⁻¹) (B) และ RNA/protein ratio (μg mg⁻¹) (C) ในกล้ามเนื้อแอดดักเตอร์ส่วนท้ายของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แสดงด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของกรดไขมันในกล้ามเนื้อแอดดักเตอร์ส่วนท้ายของหอยกาน้ำจืด
Chamberlainia hainesiana ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายสด และสูตรอาหารสำเร็จรูปที่มีโปรตีน
แตกต่างกัน 3 ระดับ

Fatty acid	(% Protein)			
	Algae	Protein 35	Protein 40	Protein 45
14:0	1.95	1.76	1.94	1.73
15:0	0.55	0.56	0.61	0.60
16:0	29.60	28.93	29.33	27.60
16:1	4.00	4.45	4.09	4.20
17:0	2.95	2.99	2.87	3.00
18:0	6.45	6.75	7.03	6.73
18:1n9	8.10	8.30	9.29	7.87
18:2n6	5.80	5.80	5.90	5.63
18:3n3	9.80	9.56	9.24	8.90
18:4n3	2.25	2.25	2.20	2.23
20:1n9	6.80	6.70	6.73	8.73
20:2n6	1.30	1.30	1.11	1.43
20:4n6	3.00	3.05	2.89	3.23
20:5n3	4.70	4.55	4.34	4.57
21:5n3	1.50	1.43	1.59	1.70
22:4n3	0.55	0.59	0.43	0.60
22:4n6	2.65	2.50	2.41	2.53
22:5n3	1.75	1.70	1.60	1.80
22:6n3	2.75	2.88	2.64	2.93
Fatty acid (%)	96.45	96.04	96.24	96.03
Total Saturated fatty acid (%)	41.50	40.99	41.79	39.67
Total monounsaturated fatty acid (%)	18.90	19.45	20.10	19.87

ตารางที่ 7 คุณภาพน้ำในตู้เลี้ยงของการเพาะเลี้ยงหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 4 สูตร

Parameter	(% Protein)			
	Algae	Protein 35	Protein 40	Protein 45
อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส)	19.96±0.27	20.00±0.10	20.57±0.43	20.76±0.32
อุณหภูมิอากาศ (องศาเซลเซียส)	26.00±0.00	26.00±0.00	26.00±0.00	26.00±0.00
การนำไฟฟ้า (ms/cm)	0.31±0.01	0.30±0.01	0.32±0.01	0.28±0.07
ปริมาณออกซิเจน ที่ละลายในน้ำ (mg/L)	8.68±0.15	8.43±0.21	8.37±0.13	8.33±0.09
พีเอช	7.65±0.03	7.58±0.03	7.53±0.04	7.56±0.02
ความเป็นด่าง (ppm CaCO ₃)	57.66±14.12	57.75±7.07	63.74±11.07	55.34±6.18
ความกระด้าง (ppm CaCO ₃)	97.69±3.98	97.02±6.71	101.11±2.44	95.69±5.76
ปริมาณคาร์บอนได ออกไซด์อิสระ (ppm CO ₂)	2.39±1.06	2.39±1.06	1.94±0.29	2.28±1.07
ไนเตรท (ppm NO ₃ -N)	0.69±0.03	0.64±0.02	0.68±0.03	0.69±0.01
ไนไตรท์ (ppm NO ₂ -N)	0.89±0.01	0.83±0.01	0.86±0.01	0.79±0.01
แอมโมเนียไนโตรเจน (ppm NH ₄ -N)	0.021±0.001	0.023±0.001	0.022±0.001	0.021±0.001

6. การเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงของ RNA, protein และ trypsin- like enzyme ในเซลล์ สปีพันธุ์ของ *C. hainesiana* อายุ 3 ปี 5 เดือนที่เลี้ยงในบ่อดิน

6.1 การเจริญเติบโตของ *C. hainesiana* ที่แขวนในบ่อดิน

การเจริญเติบโตด้านความยาว (เซนติเมตร) ความสูง (มิลลิเมตร) และน้ำหนักตัว (กรัม) ของ *C. hainesiana* ที่เลี้ยงในบ่อดินในรอบปีไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) ยกเว้นความหนา (มิลลิเมตร) ที่มีความแตกต่างกัน ($P < 0.01$) (ตารางที่ 8)

6.2 การเปลี่ยนแปลงของ RNA, protein และ trypsin- like enzyme ในเซลล์สปีพันธุ์ของ *C. hainesiana* ที่เลี้ยงในบ่อดิน

ความเข้มข้นของ RNA และ protein ในเซลล์สปีพันธุ์ของ *C. hainesiana* ในรอบปีมีความแตกต่างกัน ($P < 0.05$) ปริมาณ RNA มีค่าสูงสุดในเดือนธันวาคม 2552 และเริ่มต่ำลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเข้าสู่เดือนมกราคมจนถึงเดือนเมษายน 2553 และเริ่มมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อเข้าสู่เดือนมิถุนายน 2553 (ภาพที่ 14) สำหรับปริมาณ protein มีปริมาณสูงในเดือนพฤศจิกายน 2552 มิถุนายน 2553 และ ตุลาคม 2553 ความเข้มข้นของ RNA พบว่ามีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับความเข้มข้นของ protein ($r = 0.629, P < 0.01$) (ภาพที่ 14) และมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับระดับของ trypsin-like enzyme ($r = -0.414, P < 0.01$) (ภาพที่ 15)

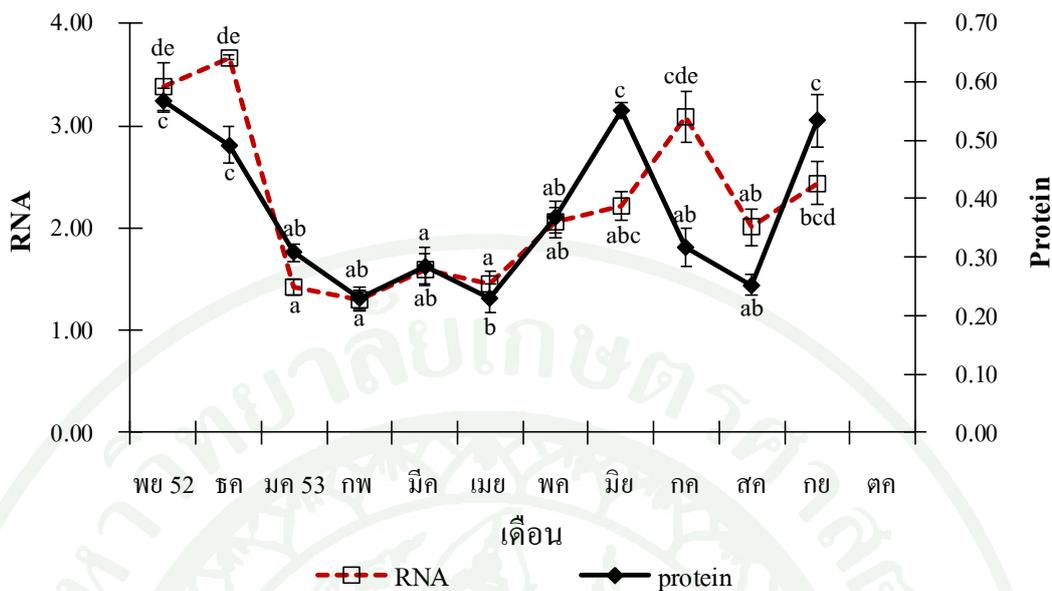
ความเข้มข้นของ RNA/protein ratio มีค่าแตกต่างกันในรอบปี ($P < 0.05$) โดยมีแนวโน้มสูงขึ้นในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2552 ถึงเดือนธันวาคม 2552 และมีค่าต่ำลงในช่วงมกราคม 2553 จนถึงมิถุนายน 2553 เมื่อเข้าสู่เดือนกรกฎาคม 2553 มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก และลดต่ำลงเมื่อเข้าสู่เดือนสิงหาคม 2553 ความเข้มข้นของ RNA/protein ratio มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับการแสดงออกของ trypsin-like enzyme ($r = -0.339, P < 0.01$) (ภาพที่ 16)

trypsin-like enzyme ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับน้ำหนัก (กรัม) ความสูง (มิลลิเมตร) ($P > 0.05$) แต่มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับความหนา (มิลลิเมตร) ($r = -0.277, P < 0.01$) และความยาว (เซนติเมตร) ของ *C. hainesiana* ($r = -0.275, P < 0.01$) (ตารางที่ 9)

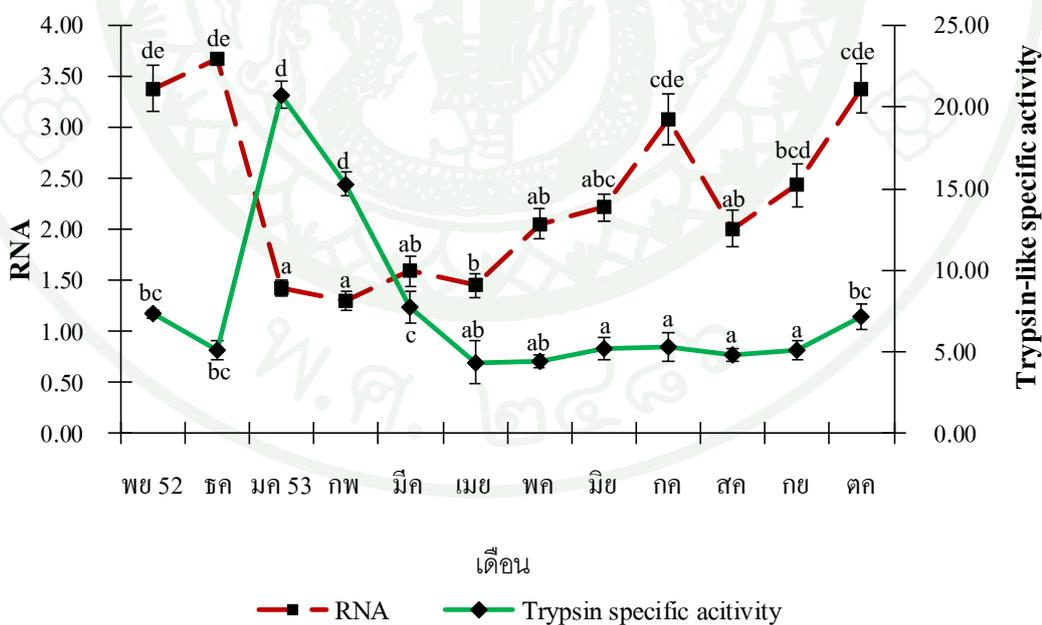
ตารางที่ 8 การเจริญเติบโตในรอบปีของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* เพศเมียอายุ 3 ปี 5 เดือนที่เลี้ยงในบ่อดิน

	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	ความหนา (มิลลิเมตร)	ความสูง (มิลลิเมตร)
พ.ย. 52	555.33±53.17	15.24±0.77	50.58±1.65 ^a	91.44±3.58
ธ.ค. 52	560.41±43.19	15.31±0.36	50.78±1.45 ^a	91.44±3.58
ม.ค. 53	569.56±50.17	15.37±0.98	51.13±1.03 ^{ab}	91.44±3.58
ก.พ. 53	570.33±61.88	15.40±0.73	51.43±1.78 ^{ab}	92.63±4.37
มี.ค. 53	580.89±60.95	15.63±0.70	51.59±1.78 ^{ab}	92.77±4.35
เม.ย. 53	592.00±63.95	15.71±0.67	52.51±1.67 ^{ab}	93.43±4.28
พ.ค. 53	599.33±66.24	15.87±0.70	53.70±1.84 ^b	93.62±4.26
มิ.ย. 53	604.00±66.45	15.95±0.69	53.91±1.88 ^b	93.81±4.25
ก.ค. 53	608.33±66.50	16.13±0.69	54.08±1.89 ^b	93.96±4.26
ส.ค. 53	613.33±66.64	16.23±0.68	54.26±1.92 ^{bd}	94.10±4.22
ก.ย. 53	620.00±69.15	16.28±0.69	54.43±1.94 ^d	94.27±4.17
ต.ค. 53	659.33±100.94	16.37±0.69	54.59±1.98 ^d	94.38±4.16

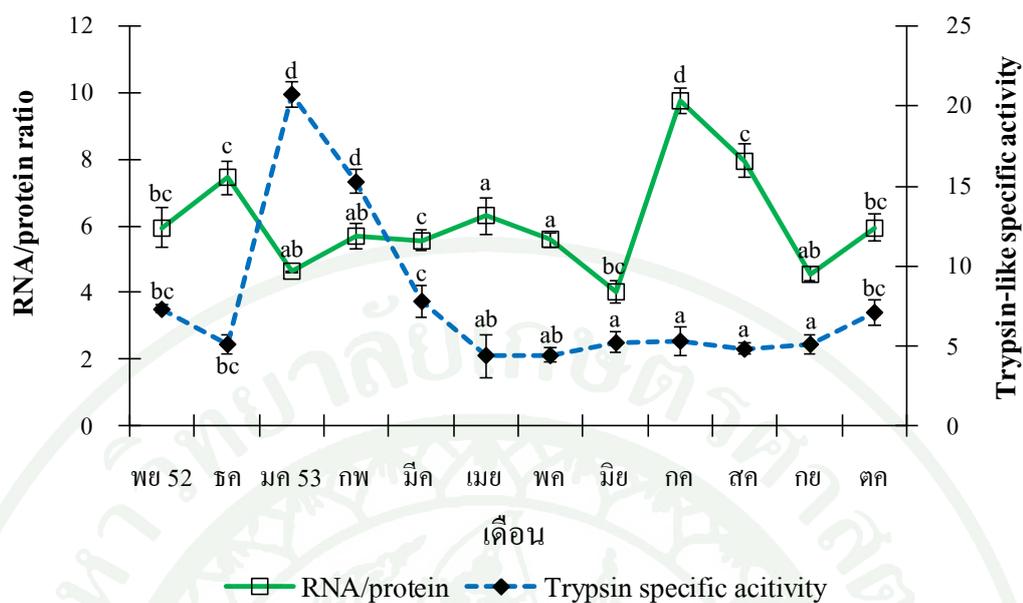
ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในคอลัมน์เดียวกัน ($P < 0.05$) แสดงด้วยอักษรต่างกัน



ภาพที่ 14 ความสัมพันธ์ของปริมาณ RNA ($\mu\text{g g}^{-1}$) และปริมาณ protein (mg g^{-1}) ของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* ที่เลี้ยงในบ่อดิน ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2552 ถึงเดือนตุลาคม 2553 ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แสดงด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน



ภาพที่ 15 ความสัมพันธ์ของปริมาณ RNA ($\mu\text{g g}^{-1}$) และ trypsin-like enzyme ($\mu\text{mol p-nitroaniline produced h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) ของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* ที่เลี้ยงในบ่อดิน ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2552 ถึงเดือนตุลาคม 2553 ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แสดงด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน



ภาพที่ 16 ความสัมพันธ์ของปริมาณ RNA/protein ratio ($\mu\text{g mg}^{-1}$) และ trypsin-like enzyme ($\mu\text{mol p-nitroaniline produced h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) ของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* ที่เลี้ยงในบ่อดิน ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2552 ถึงเดือนตุลาคม 2553 ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แสดงด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน

ตารางที่ 9 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่าง trypsin-like enzyme กับขนาดของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana*

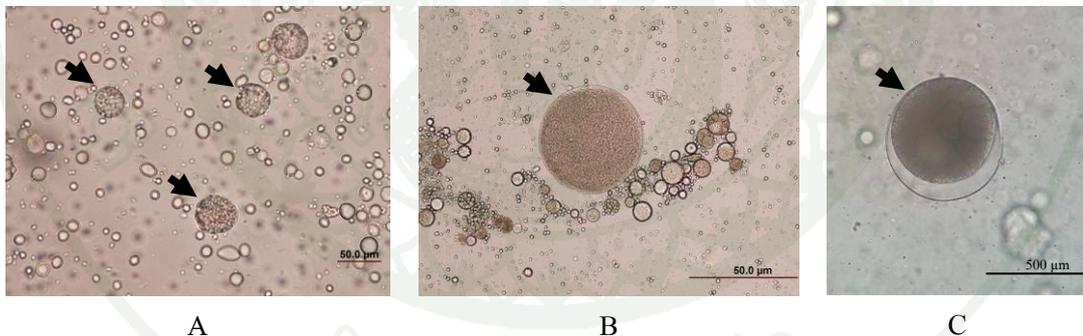
	น้ำหนัก (กรัม)	ความสูง (มิลลิเมตร)	ความหนา (มิลลิเมตร)	ความยาว (เซนติเมตร)
Trypsin-like enzyme	-0.150	-0.144	-0.277**	-0.275**

** $P < 0.01$

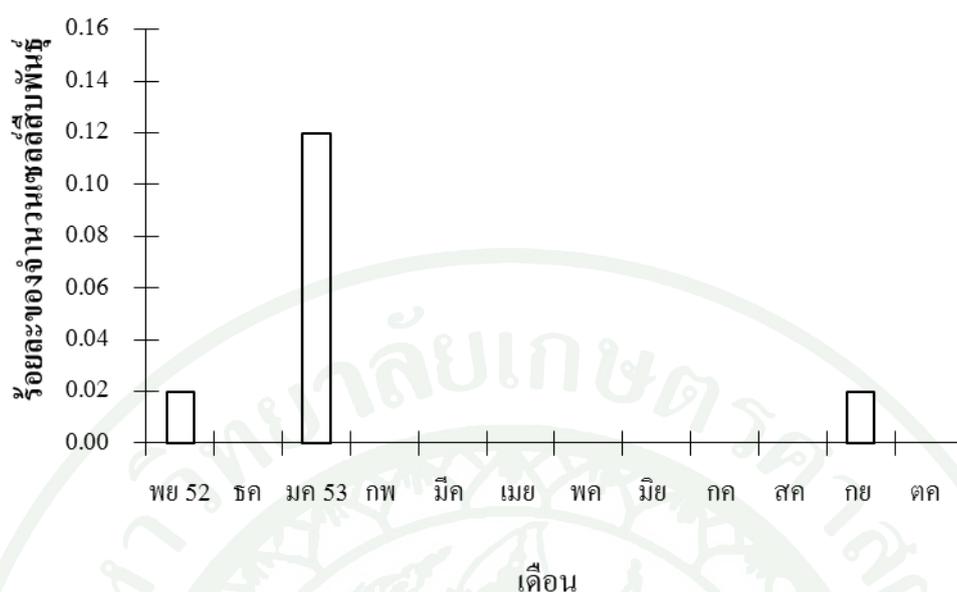
7. การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* เพศเมียอายุ 3 ปี 5 เดือนที่เลี้ยงในบ่อดินในรอบปี และความสัมพันธ์ของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์กับปัจจัยด้านต่างๆ

7.1 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* เพศเมียที่เลี้ยงในบ่อดินในรอบปี

เมื่อนำของเหลวจากอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถแบ่งเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียของ *C. hainesiana* ได้เป็น 3 ระยะ คือ immature oocyte ซึ่ง immature oocyte สามารถแบ่งเป็น 2 ระยะย่อย (immature oocyte I และ II) และ maturing oocyte I ซึ่งเป็นระยะที่ไข่เจริญเกือบเต็มที่ (ภาพที่ 17) โดย immature oocyte I พบมากกว่าร้อยละ 99.85 ของทุกเดือนตลอดทั้งปี (ตารางที่ 10) มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 40.6 ± 5.1 ไมโครเมตร รองลงมาคือระยะ immature oocyte II มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 103.34 ± 17.0 ไมโครเมตร พบตลอดทั้งปียกเว้นเดือนกรกฎาคม และระยะ maturing oocyte I พบเฉพาะเดือนพฤศจิกายน มกราคม และกันยายน โดยเดือนมกราคมพบไข่ขนาดใหญ่ที่สุดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 305.5 ± 191.4 ไมโครเมตร (ตารางที่ 11) (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 17 เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ immature oocyte I (A), immature oocyte II (B) และ maturing oocyte I (C)



ภาพที่ 18 ร้อยละจำนวนเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ maturing oocyte I ของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* เลี้ยงในบ่อดิน ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2552 ถึงเดือนตุลาคม 2553

ตารางที่ 10 ร้อยละจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่างๆในรอบปีของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* เพศเมียอายุ 3 ปี 5 เดือน ที่เลี้ยงในบ่อดิน ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2552 ถึง ตุลาคม 2553

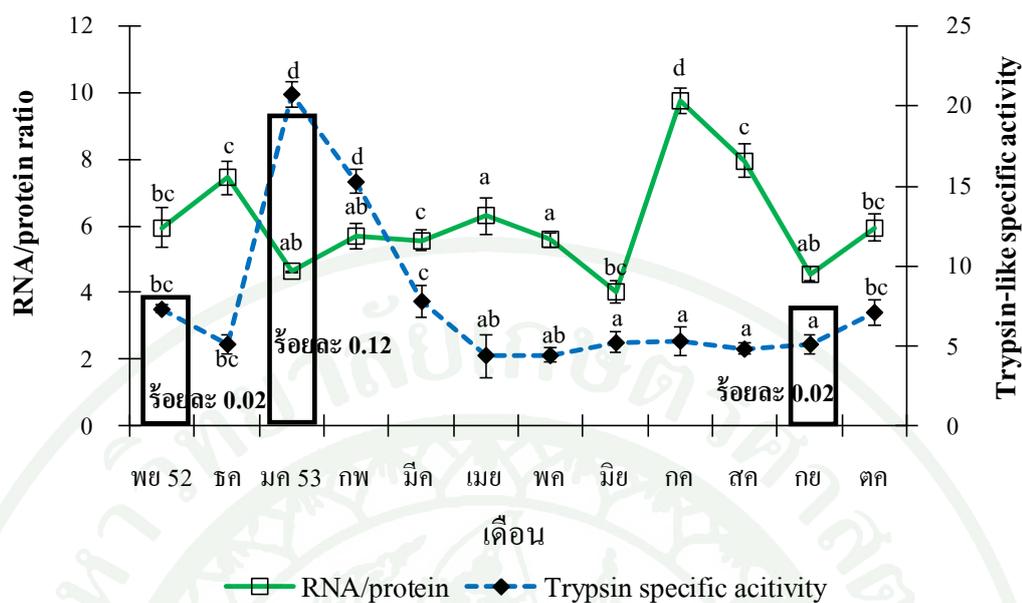
เดือน	ร้อยละจำนวนเซลล์สืบพันธุ์		
	immature oocyte I	immature oocyte II	maturing egg
พฤศจิกายน	99.89	0.09	0.02
มกราคม	99.85	0.02	0.12
มีนาคม	99.94	0.06	0.00
พฤษภาคม	99.93	0.07	0.00
กรกฎาคม	100.00	0.00	0.00
กันยายน	99.88	0.10	0.02

ตารางที่ 11 ขนาดของเซลล์สืบพันธุ์เฉลี่ยระยะต่างๆในรอบปี ของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* เพศเมียที่เลี้ยงในบ่อดิน ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2552 ถึง ตุลาคม 2553

เดือน	ขนาดของเซลล์สืบพันธุ์เฉลี่ยในระยะต่างๆ (μm)		
	immature oocyte I	immature oocyte II	maturing egg
พฤศจิกายน	39.8 \pm 4.3	104.4 \pm 8.0	190 \pm 0.00
มกราคม	39.8 \pm 2.7	120 \pm 0.00	305.5 \pm 191.4
มีนาคม	38.4 \pm 6.5	76.9 \pm 0.00	-
พฤษภาคม	44.8 \pm 7.1	96.3 \pm 0.00	-
กรกฎาคม	35.9 \pm 0.8	-	-
กันยายน	44.9 \pm 1.8	119.1 \pm 12.7	220 \pm 42.4

7.2 ความสัมพันธ์ของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* เพศเมียกับการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรม trypsin-like enzyme ปริมาณ RNA และปริมาณ protein

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะต่างๆ พบว่ามีความสัมพันธ์กับ กิจกรรมของ trypsin-like enzyme ปริมาณ RNA และปริมาณ protein ที่พบในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศเมีย *C. hainesiana* ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2552 ถึง ตุลาคม 2553 จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ระยะ maturing oocyte I ที่พบในเดือนพฤศจิกายน มกราคม และกันยายน มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับกิจกรรมของ trypsin-like enzyme ($r = 0.812, P < 0.01$) และกิจกรรมของ trypsin-like enzyme มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผัน RNA/protein ratio ($r = -0.339, P < 0.01$) (ภาพที่ 18) สำหรับปริมาณ protein มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับการสร้างไข่ระยะ immature oocyte I ($r = -0.533, P < 0.01$) และ immature oocyte II ($r = -0.517, P < 0.01$)



ภาพที่ 19 ร้อยละจำนวนเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ maturing oocyte I กับการเปลี่ยนแปลงของ trypsin-like enzyme ($\mu\text{mol } p\text{-nitroaniline produced h}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) และ RNA/protein ratio ($\mu\text{g mg}^{-1}$) ของหอยคาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* เลี้ยงในบ่อดิน ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2552 ถึงเดือนตุลาคม 2553

7.3 ความสัมพันธ์ของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* เพศเมียกับคุณภาพน้ำ

คุณภาพน้ำที่ตรวจวัดได้จากบ่อดินที่เลี้ยงหอยตลอดทั้งปีได้แก่ อุณหภูมิ น้ำ อุณหภูมิอากาศ พีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ การนำไฟฟ้า ความเป็นด่าง ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์อิสระ ไนเตรท ไนไตรท์ และปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน มีความแตกต่างกัน ($P < 0.05$) ส่วนความกระด้างของน้ำไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$)

จำนวนร้อยละของเซลล์สืบพันธุ์ระยะ immature oocyte I มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับอุณหภูมิ น้ำ ($r = 0.661, P < 0.05$) อุณหภูมิอากาศ ($r = 0.690, P < 0.05$) และมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับพีเอช ($r = -0.766, P < 0.01$)

จำนวนร้อยละเซลล์สืบพันธุ์ระยะ immature oocyte II มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับความเป็นด่าง ($r = 0.683, P < 0.05$) ไนเตรท ($r = -0.676, P < 0.01$) และมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์อิสระ ($r = -0.736, P < 0.01$)

จำนวนร้อยละของเซลล์สืบพันธุ์ระยะ maturing oocyte I มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับอุณหภูมิน้ำ ($r = -0.777, P < 0.01$) อุณหภูมิอากาศ ($r = -0.657, P < 0.05$) การนำไฟฟ้า ($r = -0.799, P < 0.01$) และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ($r = -0.867, P < 0.01$) (ตารางที่ 12)



ตารางที่ 12 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพน้ำกับ ร้อยละจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกาบน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana*

Parameter	Oocyte stage		
	immature oocyte I	immature oocyte II	maturing oocyte I
อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส)	0.611*	0.309	-0.777**
อุณหภูมิอากาศ (องศาเซลเซียส)	0.690*	0.306	-0.657*
การนำไฟฟ้า (ms/cm)	0.565	0.453	-0.799**
ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย ในน้ำ (mg/L)	-0.216	0.469	-0.867**
พีเอช	-0.716**	0.329	0.239
ความเป็นด่าง (ppm CaCO ₃)	-0.007	0.683*	-0.410
ความกระด้าง (ppm CaCO ₃)	-0.330	0.414	-0.184
ปริมาณาร์บอนไดออกไซด์ อิสระ (ppm CO ₂)	-0.076	-0.726**	0.193
ไนเตรท (ppm NO ₃ -N)	-0.087	0.676*	-0.380
ไนไตรท์ (ppm NO ₂ -N)	0.432	0.213	-0.061
แอมโมเนียไนโตรเจน (ppm NH ₄ -N)	0.176	0.059	0.422

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

วิจารณ์

1. คุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยอาหารจาก *C. hainesiana* อายุ 14 เดือน

1.1 คุณลักษณะของเอนไซม์อะไมเลส

รูปแบบของอะไมเลสมีทั้งเอนไซม์อะไมเลส พบแสดงกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 6 นิวทรัล อะไมเลสแสดงกิจกรรมที่พีเอช 7 และแอลคาไลน์อะไมเลสแสดงกิจกรรมที่พีเอช 8 เมื่อศึกษา กิจกรรมของอะไมเลสในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 20-80 องศาเซลเซียส พบว่าอะไมเลสแสดง กิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศา

กิจกรรมของอะไมเลสมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น นิสัยการกินอาหาร (วีระพงศ์, 2536) ระยะการเจริญเติบโต (Thongprajukaew *et al.*, 2010) และความแตกต่างระหว่าง เพศ (Areekijseeree *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตามสภาวะที่เหมาะสมสำหรับศึกษากิจกรรมของอะไม เลส ระยะตัวเต็มวัยของ *C. hainesiana* คือพีเอช 6 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับสัตว์น้ำ ชนิดอื่นพบว่ามิลักษณะเช่นเดียวกับอะไมเลสที่พบในนิวทรัลอะไมเลสในหอยแมลงภู่ (*Mytilus chilensis*) ซึ่งแสดงกิจกรรมจำเพาะสูงสุดในช่วงพีเอช 6-7 และอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส (Fernandez *et al.*, 2001) เช่นเดียวกับนิวทรัลอะไมเลสที่พบในปู *Scylla serrata* (Pavasovic *et al.*, 2004) ดังนั้นอะไมเลสที่ทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 6-7 ใน *C. hainesiana* น่าจะมีบทบาทสำคัญและ เป็นเอนไซม์หลักในการย่อยสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต สำหรับสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ ศึกษาอะไมเลสในสัตว์น้ำชนิดอื่น เช่น แอสิดอะไมเลสทำงานได้ดีที่พีเอช 4.5-5 ใน Redfish (*Sebastes entella*) (Munilla-Moran and Saborido-Rey, 1996) นิวทรัลอะไมเลสในหอยกาบน้ำจืด (*H. bialatus*) ทำงานได้ดีที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Supannapong *et al.*, 2008) และแอล คาไลน์อะไมเลสในปลากัด (*Betta splendens*) ทำงานได้ดีที่พีเอช 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Thongprajukaew *et al.*, 2010)

1.2 คุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอส

พบกิจกรรมจำเพาะสูงสุดของแอสิดโปรติเอสใน *C. hainesiana* เท่านั้น เช่นเดียวกับ หอยกาบน้ำจืด *H. bialatus* ที่พบแอสิดโปรติเอสในกระเพาะอาหารรวมต่อมย่อยอาหาร โดยแสดง กิจกรรมจำเพาะสูงสุดที่พีเอช 5 (ปรารักษ์ทิพย์, 2548) โปรติเอสจะมีประสิทธิภาพการย่อยได้ดี เมื่อ

ทำงานที่พีเอชเหมาะสม จึงจะแสดงกิจกรรมจำเพาะได้สูงขึ้น และสภาพเป็นกรดของกระเพาะอาหาร ร่วมกับต่อมย่อยอาหารของหอยกาบน้ำจืดอาจจะเหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมจำเพาะของเปปซิน มากกว่า ดังนั้นในกระเพาะอาหารร่วมกับต่อมย่อยอาหารจึงมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสมากกว่าแอลคาไลน์โปรติเอส ซึ่งแอลคาไลน์โปรติเอสอาจมีค่าน้อยมากจนไม่สามารถแสดงผลออกมาได้ หรืออาจเป็นเพราะการใช้ azocasein เป็นสับสเตรทซึ่ง azocasein ไม่ใช่สับสเตรทจำเพาะสำหรับโปรติเอสชนิดใดชนิดหนึ่ง จึงถือเป็นการศึกษากิจกรรมของโปรติเอสโดยรวม (Garcia-Carreno and Harnd, 1993) ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้กิจกรรมของโปรติเอสที่วัดได้ค่อนข้างต่ำ ซึ่งถ้าใช้สับสเตรทที่มีความจำเพาะต่อโปรติเอสแต่ละชนิด อาจจะทำให้สามารถตรวจวัดกิจกรรมจำเพาะของโปรติเอสได้ชัดเจนขึ้น

การทดลองนี้มีความแตกต่างจากการศึกษาในสัตว์น้ำชนิดอื่น เช่น ในปลาสวายหนู (*Helicophagus leptorhynchus*) ที่พบว่าโปรติเอสจะแสดงกิจกรรมจำเพาะสูงสุดที่พีเอช 9 ทุกระยะการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงถือได้ว่าแอลคาไลน์โปรติเอสเป็นเอนไซม์หลักสำหรับการย่อยสารอาหารประเภทโปรตีนในทุกระดับการเจริญของปลาชนิดนี้ (จันทกานต์, 2550) ขณะที่ Simpson (2000) รายงานว่าแอลคาไลน์โปรติเอสของปลาโดยทั่วไปแสดงกิจกรรมจำเพาะสูงในช่วงพีเอช 8-10 ขณะที่เอนไซม์โปรติเอสจากกระเพาะอาหารแสดงกิจกรรมจำเพาะสูงในช่วงพีเอช 2-4 ส่วน Castillo-Yanez *et al.* (2004) รายงานว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่สกัดจากลำไส้ของปลาซาร์ดีน *Sardinops sagax caerulea* แสดงกิจกรรมจำเพาะได้สูงที่พีเอช 10 และแสดงกิจกรรมจำเพาะได้ต่ำที่พีเอช 3 แอลคาไลน์โปรติเอสที่สกัดจากลำไส้เล็กของปลานิล *O. niloticus* ซึ่งเป็นปลากินพืชที่เป็นแหล่งโปรตีนสูงสำหรับมนุษย์ มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมจำเพาะที่พีเอช 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Bezerra *et al.*, 2005) ขณะที่แอลคาไลน์โปรติเอสจากลำไส้และตับอ่อนของปลาอะโรวาน่าสามารถแสดงกิจกรรมจำเพาะได้ทั้งสภาวะกรดพีเอช 2-3 และสภาวะเบสพีเอช 12 ส่วนเอนไซม์โปรติเอสจากกระเพาะอาหารมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมจำเพาะประมาณ 1-2 (Natalia *et al.*, 2004) เช่นเดียวกับการศึกษาในปลากินเนื้อ 3 ชนิด คือ *Sebastes mentella*, *Sparus aurata* และ *Scophthalmus maximus* พบโปรติเอสในกระเพาะอาหารแสดงกิจกรรมจำเพาะที่พีเอช 2 และแสดงกิจกรรมจำเพาะได้สูงที่พีเอช 9.5-10 (Munilla-Moran and Saborido-Rey, 1996) พีเอชที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมจำเพาะของโปรติเอสในกุ้ง *Pleoticus muelleri* มีค่าประมาณ 7.5-8 (Gimenez *et al.*, 2001)

1.3 คุณลักษณะของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสของ *C. hainesiana* แสดงกิจกรรมจำเพาะที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส และแสดงกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสที่พีเอช 8 ดังนั้นจึงถือได้ว่าแอลคาไลน์ไลเปสเป็นเอนไซม์หลักสำหรับการย่อยสารอาหารประเภทไขมันของ *C. hainesiana* เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์น้ำชนิดอื่น สอดคล้องกับไลเปสในหอยกาบน้ำจืด *H. bialatus* ที่พบว่าในลำไส้และกระเพาะอาหารมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมของไลเปสประมาณ 8 และอุณหภูมิอยู่ในช่วง 35-55 องศาเซลเซียส แต่กิจกรรมของไลเปสในลำไส้มีค่าต่ำกว่ากิจกรรมของไลเปสในกระเพาะอาหาร (Areekijserree *et al.*, 2002) ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาไลเปสในปลาชเวตหู (*H. leptorhynchus*) ที่พบไลเปสแสดงกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสทุกระยะการเจริญเติบโต (จันทกานต์, 2550) ซึ่งใกล้เคียงกับแอลคาไลน์ไลเปส (พีเอช 8) ในปลากัด (*B. splendens*) พบว่าทำงานได้ดีที่ 20 ถึง 40 และ 60 องศาเซลเซียส ทั้งเพศผู้และเพศเมีย แตกต่างจากการศึกษาใน red drum ของ Lazo *et al.* (2007) ที่พบนิวทรัลไลเปส (พีเอช 7) มีสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 20 และ 40 องศาเซลเซียส

2. คุณลักษณะของ trypsin-like enzyme ในโอโอไข่ต์จาก *C. hainesiana* อายุ 3 ปี

trypsin-like enzyme ใน โอโอไข่ต์มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แตกต่างจาก trypsin-like enzyme ในโอโอไข่ต์ของปลากัดที่มีสภาวะเหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 10 อุณหภูมิ 20–30 องศาเซลเซียส และมีกิจกรรมต่ำที่ 40 และ 50 องศาเซลเซียส ขณะที่ทริปซินและโคโมทริปซินในระบบย่อยอาหารปลากัดที่พีเอชดังกล่าวพบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 30–35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (การุณ, 2554) ซึ่งไม่พบกิจกรรมของทริปซินและโคโมทริปซินในระบบย่อยอาหารของ *C. hainesiana* ความแตกต่างเกี่ยวกับรูปแบบอุณหภูมิของเอนไซม์โปรติเอสในโอโอไข่ต์กับในระบบย่อยอาหารแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางด้านไอโซฟอร์มในแต่ละเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต

3. ประสิทธิภาพการย่อยอาหารหรือวัตถุดิบอาหารในหลอดทดลองจาก *C. hainesiana* อายุ 3 ปี

3.1 ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในวัตถุดิบอาหาร

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองพบว่าแหล่งโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับ *C. hainesiana* คือ กากถั่วเหลือง (โปรตีนร้อยละ 39.52) ซึ่งโดยทั่วไปกากถั่วเหลืองนิยมใช้กันแพร่หลายเพื่อทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น ปลา เนื่องจากราคาไม่แพงและมีความสมดุลของกรดอะมิโน การศึกษาของ Chou *et al.* (2004) พบว่าการแทนที่ปลาป่นด้วยกากถั่วเหลืองร้อยละ 40 ทำให้การเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์จากโปรตีนของ cobia (*Rachycentron canadum*) อยู่ในสภาวะปกติ สำหรับ *Spirulina* sp. ซึ่งมีประสิทธิภาพการย่อยในระดับรองลงมา มีโปรตีนสูง (ร้อยละ 46.14) มีกรดอะมิโนจำเป็น วิตามินในระดับที่พอเหมาะ (Peirettie and Meineri, 2008) น่าจะใช้เป็นแหล่งของโปรตีนได้ดี เนื่องจากไม่มีผนังเซลล์ จึงทำให้อย่อยและดูดซึมได้ง่าย (Nandeessa *et al.*, 1998) ขณะที่เลือดปนพบว่าไม่ควรใช้เป็นวัตถุดิบอาหารหลักในอาหารสัตว์ นอกจากจะไม่พบว่าไม่มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในหลอดทดลองแล้วยังมีปริมาณกรดอะมิโน ไอโซลิวซีน และไกลซีนในระดับต่ำ (Khawaja *et al.*, 2007)

3.2 ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตในวัตถุดิบอาหาร

แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมสำหรับ *C. hainesiana* คือ ปลาขี้ขาว การศึกษาของ Areekijsee *et al.* (2006) และ Supannapong *et al.* (2008) พบว่าการย่อยโปรตีนเป็นปัจจัยหลักที่ใช้ประเมินคุณภาพของอาหาร โดยมีปัจจัยรองคือประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต อย่างไรก็ตาม การดัดแปลงโครงสร้างของวัตถุดิบอาหารให้มีการเจลาติไนซ์ที่เหมาะสม อาจช่วยปรับปรุงการใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบอาหารให้ดีขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาที่พบว่าสมบัติในการเจลาติไนซ์ (Kumar *et al.*, 2006) และการละลายน้ำ (Lee *et al.*, 2006) ของแป้งมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยหรือการใช้ประโยชน์จากคาร์โบไฮเดรต สอดคล้องกับการศึกษาของ การุณ (2554) ที่พบว่าการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตของอาหารที่ผ่านการไมโครเวฟในปลากัดวัยอ่อน ($P < 0.05$, pooled data) เกิดขึ้นเนื่องจากการมีสมบัติทางกายภาพและชีวภาพที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ซึ่งควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

3.3 ประสิทธิภาพการย่อยวัตถุดิบอาหารของสูตรอาหาร 3 สูตร

ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตในวัตถุดิบอาหารของสูตรอาหาร 3 สูตร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในสูตรอาหาร 3 สูตร เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยของแต่ละวัตถุดิบอาหารมีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตจาก 3 สูตรอาหารมีค่าต่ำกว่าเกือบ 8 เท่า อาจเป็นเพราะสัดส่วนของปลายข้าวที่ใช้เป็นสับเสตรทในสูตรอาหารมีปริมาณน้อย ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตในหลอดทดลองมีค่าต่ำ

4. การทดสอบสูตรอาหารที่ผ่านการคัดเลือกจากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองมาทดลองเลี้ยง *C. hainesiana* อายุ 3 ปี 8 เดือนในห้องปฏิบัติการ

4.1 การเจริญเติบโตของ *C. hainesiana*

การเจริญเติบโตของ *C. hainesiana* กลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ มีความแตกต่างกันในแต่ละเดือนที่ทำการทดลอง ($P > 0.05$) ร้อยละของน้ำหนักที่ลดลงในทุกสูตรอาหารของทุกเดือน เป็นเพราะในช่วงที่หอยมีการเจริญพันธุ์จะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2012) ร้อยละความยาวเปลือกที่เพิ่มขึ้นของ *C. hainesiana* มีค่าสูงสุดในชุดที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายสดในเดือนที่ 2 ของการเลี้ยง เมื่อเข้าสู่เดือนที่ 3 มีค่าสูงในสูตรอาหารที่มีโปรตีนร้อยละ 35 และ 45 ร้อยละของความหนา มีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุดในสูตรอาหารที่มีโปรตีนร้อยละ 35 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรอาหารอื่น สอดคล้องกับผลของประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองที่พบว่าสูตรอาหารที่มีโปรตีนร้อยละ 35 ให้ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรอาหารที่มีโปรตีนร้อยละ 40 และ 45

4.2 การแสดงออกของเอนไซม์ย่อยอาหาร

การแสดงออกของกิจกรรมจำเพาะของอะไมเลส และไลเปสไม่แตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง ($P > 0.05$) แต่กิจกรรมของอะไมเลสในทุกชุดการทดลองมีค่าสูงในเดือนที่ 1 และมีค่าลดลงเมื่อเข้าสู่เดือนที่ 2 และ 3 ($P < 0.05$) เนื่องจากเมื่อมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ให้กับสัตว์ สัตว์จะหลั่งอะไมเลสออกมาเป็นจำนวนมาก เพื่อต้องการประมาณการใช้อะไมเลสในการย่อยแป้ง เมื่อร่างกายสามารถประเมินการใช้อะไมเลสในการย่อยแป้งได้แล้ว อะไมเลสจึงมีค่าลดลงและคงที่เมื่อ

เข้าสู่การเลี้ยงในเดือนที่ 2 และเดือนที่ 3 ซึ่งตรงข้ามกับการแสดงออกของไลเปสที่มีค่าต่ำในเดือนที่ 1 และมีค่าสูงขึ้นเมื่อเข้าสู่เดือนที่ 2 และ 3 ($P < 0.05$) เป็นเพราะ *C. hainesiana* ต้องการพลังงานจากไขมันสูงในขณะเจริญพันธุ์ (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2012) ขณะที่กิจกรรมของโปรตีนเอสในแต่ละเดือนไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาอิทธิพลของระยะเวลากับสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงพบว่า มีผลต่อการแสดงออกของกิจกรรมจำเพาะของโปรตีนเอส ($P < 0.01$) โดยเฉพาะในเดือนที่ 3 ที่พบว่า *C. hainesiana* ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปรตีนร้อยละ 35 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สอดคล้องกับผลของประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองที่พบว่าสูตรอาหารที่มีโปรตีนร้อยละ 35 ให้ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรอาหารอื่น ($P > 0.05$) แต่เป็นปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของหอย และชี้ให้เห็นว่าการย่อยโปรตีนเป็นปัจจัยหลักที่ใช้ประเมินคุณภาพของอาหาร (Areekijsee *et al.*, 2006; Supannapong *et al.*, 2008)

4.3 คุณภาพกล้ามเนื้อ

การวัดอัตราการเจริญเติบโตของหอยมักเก็บข้อมูลจากการเปลี่ยนแปลงด้านน้ำหนักหรือ ความยาวเปลือก อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษา nucleic acid ratio (RNA:DNA, RNA:protein และปริมาณ RNA ทั้งหมด) เพื่อให้การประมาณการอัตราการเจริญเติบโตเป็นไปอย่างรวดเร็ว โดยมีสมมุติฐานที่ว่าปริมาณของ RNA ในเนื้อเยื่อจะสอดคล้องกับปริมาณของ protein ที่จะถูกสังเคราะห์ ดังนั้น RNA ในเนื้อเยื่อ จึงสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดความสามารถในการสังเคราะห์ protein และการเจริญเติบโตได้ พบว่าการเลี้ยงหอยทะเล 2 ชนิด ที่กินอาหารแบบกรองกิน *Austrovenus stutchburyi* และ *Paphies australis* ในบริเวณดินตะกอนที่ต่างกัน 2 แบบเป็นระยะเวลา 1 เดือน ความเข้มข้นของตะกอนในดิน และตะกอนที่แขวนลอยในน้ำส่งผลเชิงลบต่อปริมาณ RNA และพบว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณ RNA คือปริมาณอาหารที่เพิ่มขึ้นในแหล่งน้ำ (Norkko *et al.*, 2006) ในการทดลองครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในคุณภาพกล้ามเนื้อ แอตคคเตอร์ส่วนท้าย ของ *C. hainesiana* ในทุกสูตรอาหาร อาจเป็นเพราะหอยที่ใช้ศึกษามีอายุ 3 ปี 8 เดือน ซึ่งเป็นระยะตัวเต็มวัยมีการเจริญเติบโตค่อนข้างต่ำ จึงไม่พบความเปลี่ยนแปลงในคุณภาพกล้ามเนื้อ สอดคล้องกับการศึกษาในสัตว์กลุ่มหมึก *Loligo forbesi* และ *Eledone cirrhosa* ที่พบปริมาณ RNA และ RNA/protein ratio มีค่าสูงในระยะวัยอ่อนมากกว่าระยะตัวเต็มวัย ยังพบว่าความเข้มข้นของโปรตีนมีผลต่อการประเมินการเจริญเติบโตที่ดีกว่า RNA/protein ratio ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และการสะสมของโปรตีนในสภาวะที่มีการเจริญเติบโตต่างกัน (Pierce *et al.*, 1999)

4.4 ปริมาณกรดไขมัน

Narvaez *et al.* (2008) ได้ใช้ปริมาณ และชนิดของกรดไขมันในสัตว์ทำนายถึงความอุดมสมบูรณ์ของอาหารในช่วงระยะเวลาต่างๆ ได้ เพราะการสังเคราะห์กรดไขมัน การปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของกรดไขมันในสัตว์น้ำเช่น brown mussel (*Perna perna*) ขึ้นกับอาหารที่สัตว์กินในช่วงเวลานั้น ในหอยสองฝาซึ่งมีการกรองกินแพลงก์ตอนพืชเป็นอาหาร ในแพลงก์ตอนพืชมีกรดไขมันที่ให้พลังงานหลักได้แก่ ไลโนเลอิก (18:2n6) และ ไลโนเลนิก (18:3n3) และ polyunsaturated fatty เป็นชนิดเด่น ซึ่งในด้านอาหารสัตว์น้ำถือว่ากรดไขมันสองชนิดนี้ เป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย (essential fatty acid) เพราะสัตว์น้ำไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมัน 2 ตัวนี้ได้เอง (วีระพงษ์, 2536) ในการทดลองนี้พบกรดไขมันอิ่มตัวหลายชนิด และกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นสารตั้งต้นสำคัญในการสังเคราะห์กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวทั้ง 3 กลุ่ม คือกลุ่มกรดไขมันโอเลอิก ไลโนเลอิก และกลุ่มกรดไขมันไลโนเลนิก เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบกรดไขมันเฉลี่ยจากกล้ามเนื้อแอดดักเตอร์ส่วนท้ายของ *C. hainesiana* พบว่ามีกรดไขมันอิ่มตัว และกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายชนิดที่มีปริมาณมากกว่าที่พบในเนื้อเยื่อของปลาน้ำจืด และปลาน้ำเค็ม (16:0, 18:0, 18:2n6, 18:3n3, 18:4n3, 20:4n6 และ 22:5n3) (วีระพงษ์, 2536) สำหรับการศึกษาครั้งนี้มีปริมาณกรดไขมันในกล้ามเนื้อแอดดักเตอร์ส่วนท้ายของหอยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 4 สูตร ไม่มีความแตกต่างกันมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) อาจเป็นเพราะระยะเวลาหอยที่ใช้ในการทดลองเป็นระยะตัวเต็มวัย มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ ปริมาณกรดไขมันที่ตรวจพบจึงอาจเป็นกรดไขมันที่มีอยู่แล้วในตัวสัตว์จึงไม่แสดงความแตกต่างกัน

4.5 คุณภาพน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

คุณภาพน้ำทางกายภาพมีบทบาทสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ รวมทั้งหอยกาน้ำจืดเพราะมีความเกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิต การกินอาหาร การสืบพันธุ์ และการแพร่กระจายเป็นต้น (อุทัยวรรณ, 2555) การตรวจวัดพารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการพบว่ามีความใกล้เคียงและอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (วิรัช, 2544) ยกเว้นอุณหภูมิที่มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์

5. การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในรอบปีของ *C. hainesiana* อายุ 3 ปี 5 เดือน เพศเมียที่เลี้ยงในบ่อดิน และความสัมพันธ์ของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์กับปัจจัยด้านต่างๆ

5.1 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* เพศเมียที่เลี้ยงในบ่อดินในรอบปี

จากการศึกษาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* โดยการดูของเหลวจากอวัยวะสืบพันธุ์ ซึ่งมีการแบ่งกลุ่มตามขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางและการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ที่ตรวจพบได้เป็น 3 ระยะ คือ immature oocyte I, immature oocyte II และ maturing oocyte I แตกต่างจากการศึกษาด้วยวิธีการเดียวกันในหอยกาบน้ำจืด *H. desowitzi* ที่พบเฉพาะระยะ immature oocyte กับ mature oocyte (ลลิตภัทร และอุทัยวรรณ, 2552) และแตกต่างจากการศึกษาของธวัชชัย (2546) Chatchavalvanich *et al.* (2006) และ Ropes (1968) ที่พบเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย 5 ระยะ เนื่องจากศึกษาด้วยวิธีการตัดเนื้อเยื่อ จึงทำให้พบทุกระยะของเซลล์สืบพันธุ์ ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นที่เซลล์สืบพันธุ์เชื่อมติดกับเบสเม้นท์ เมมเบรน จนกระทั่งระยะที่ไข่เจริญเต็มที่ใน acinus ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะสามารถเปรียบเทียบระยะ immature oocyte I, immature oocyte II และ maturing oocyte I กับผลจากการศึกษาของ Ropes (1968) ในหอยสองฝา น้ำจืดและน้ำเค็มของ และใน *H. bialatus* oocyte ระยะที่ 3, 4 และ 5 ตามลำดับ (ธวัชชัย, 2546; Chatchavalvanich *et al.*, 2006)

5.2 ความสัมพันธ์ของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* เพศเมียกับการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรม trypsin-like enzyme ปริมาณ RNA และปริมาณ protein

trypsin-like enzyme มีบทบาทสำคัญต่อการสร้างไข่แดง (yolk formation) สลายไข่แดง (yolk degradation) การสร้างเอ็มบริโอ (Embryogenesis) และการฟักตัวของลูกปลา (Hiramatsu *et al.*, 2002) การศึกษาครั้งนี้พบกิจกรรมของ trypsin-like enzyme ในเซลล์สืบพันธุ์มีค่าสูงสุดในช่วงที่พบไข่ระยะ maturing oocyte I ซึ่งมีขนาดเฉลี่ยของไข่ใหญ่ที่สุดและมีจำนวนมากที่สุด พร้อมกับมีปริมาณ RNA/protein ratio ลดลง ($r = -0.339$, $P < 0.01$) แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับกิจกรรมจำเพาะของ trypsin-like enzyme และปริมาณโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์ โดยระดับกิจกรรมของ trypsin-like enzyme เพิ่มขึ้นเพื่อย่อยโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์สำหรับเป็นอาหารของตัวอ่อนต่อไป (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2012) ระดับของโปรตีนในไข่จะลดลงต่ำสุดระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเมษายน พร้อมกับลดลงของระดับกิจกรรมจำเพาะของ trypsin-like enzyme จนเป็น mature egg พร้อมทั้งจะสืบพันธุ์ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงมีนาคม สอดคล้องกับการศึกษาของ

อุทัยวรรณ และคณะ (2540) ที่พบว่าการศึกษาการสืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* อยู่ระหว่างเดือนกันยายนถึงเดือนกุมภาพันธ์

เซลล์สืบพันธุ์ระยะ maturing oocyte I ที่พัฒนาอยู่ภายในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียจะเคลื่อนตัวไปที่บริเวณซูปราบราเซียล แคมเบอร์และเจริญเข้าสู่ระยะ mature oocyte ใน outer demibranch ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการศึกษาที่บริเวณ outer demibranch จึงคาดว่า mature egg จะเจริญสมบูรณ์เต็มที่อยู่ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมีนาคม และคาดว่าจะมีกิจกรรมจำเพาะของ trypsin-like enzyme ค่าที่สูงสุดในรอบปีที่ศึกษา

5.3 ความสัมพันธ์ของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* เพศเมียกับคุณภาพน้ำ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า *C. hainesiana* สร้างเซลล์สืบพันธุ์ระยะ immature oocyte I ตลอดทั้งปี โดยจำนวนร้อยละไข่ระยะ immature oocyte I มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับอุณหภูมิน้ำ ($r = 0.661, P < 0.05$) และอุณหภูมิอากาศ ($r = 0.690, P < 0.05$) ขณะที่ระยะ immature oocyte II ไม่พบในเดือนกรกฎาคม น่าสังเกตที่จำนวนร้อยละของไข่ระยะ immature oocyte II ในเดือนมกราคมจะลดลงจากเดือนพฤศจิกายน ซึ่งเป็นเดือนที่มีจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ระยะ maturing oocyte I เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าระยะ immature oocyte II มีการพัฒนาไปเป็นระยะ maturing oocyte I สำหรับการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ระยะ maturing oocyte I พบเฉพาะเดือนพฤศจิกายน มกราคม และกันยายน ซึ่งแสดงความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับอุณหภูมิน้ำ ($r = -0.777, P < 0.01$) และอุณหภูมิอากาศ ($r = -0.657, P < 0.05$) โดยมีจำนวนไข่ที่มากที่สุดในเดือนมกราคม ซึ่งเป็นช่วงที่มีอุณหภูมิน้ำต่ำที่สุดในรอบปี (27.15 องศาเซลเซียส) ซึ่งต่างจากการศึกษาของลลิตภัทร และอุทัยวรรณ (2552) ที่พบว่าอุณหภูมิไม่มีผลต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ไปเป็น maturing egg ของ *H. desowitzi* สำหรับการศึกษาครั้งนี้พบว่าช่วงที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ระยะ maturing oocyte I สอดคล้องกับการศึกษาของ อุทัยวรรณ และคณะ (2540) ที่พบว่าการศึกษาการสืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* อยู่ระหว่างเดือนกันยายนถึงเดือนกุมภาพันธ์

จำนวนร้อยละของไข่ระยะ immature oocyte I ซึ่งพบตลอดทั้งปีมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับพีเอช ($r = -0.766, P < 0.01$) ซึ่งในช่วงตลอดปีหอยตัวเต็มวัยมีการเจริญเติบโตมากขึ้นจากความแตกต่างกันของความหนา ($P < 0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าพีเอชของน้ำที่เลี้ยงหอยกาน้ำจืด *M. margaritifera* ในแม่น้ำ 4 สาย (Buddenseik, 1995) การเลี้ยงตัวเต็มวัย

D. polymorpha (Hincks and Mackie, 1997) มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโต และอัตราการรอดของหอย (Kovidvadi and Kovidvadi, 2013)



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การศึกษาคูณลักษณะของเอนไซม์ย่อยอาหารของ *C. hainesiana* อายุ 14 เดือน

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารใน *C. hainesiana* ได้แก่ อะไมเลส พีเอช 6 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โปรติเอส พีเอช 5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ไลเปส พีเอช 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2. คุณลักษณะของ trypsin-like enzyme ในเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* อายุ 3 ปี

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับศึกษากิจกรรมของ trypsin-like enzyme คือที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3. ประสิทธิภาพการย่อยอาหารหรือวัตถุดิบอาหารในหลอดทดลองของ *C. hainesiana* อายุ 3 ปี

การประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองของตัวอย่างอาหารสำเร็จรูปทางการค้า จำนวน 5 สูตร และวัตถุดิบอาหาร จำนวน 21 ชนิด พบว่า กากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบที่ให้ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนสูงสุด ขณะที่ปลายข้าวเป็นวัตถุดิบอาหารที่ให้ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตสูงสุด รองลงมาได้แก่ ปลายข้าวหนึ่ง เลือดปน เมล็ดข้าวโพด ตามลำดับ

เมื่อคัดเลือกว่าวัตถุดิบอาหารที่มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตสูงมาพัฒนาเป็นอาหารสำเร็จรูปที่มีร้อยละของโปรตีน 35, 40 และ 45 และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทุกชุดการทดลอง

4. การเลี้ยง *C. hainesiana* อายุ 3 ปี 8 เดือนในห้องปฏิบัติการ

นำสูตรอาหารที่พัฒนามาจากการประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองมาทำการทดลองเลี้ยงจริงพบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต แต่มีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ ปริมาณ

กรดไขมัน และคุณภาพกล้ามเนื้อ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

5. การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของ *C. hainesiana* อายุ 3 ปี 5 เดือนเพศเมียที่เลี้ยงในบ่อดินในรอบปี และความสัมพันธ์ของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์กับปัจจัยด้านต่างๆ

เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียของ *C. hainesiana* แบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ immature oocyte ซึ่ง immature oocyte สามารถแบ่งเป็น 2 ระยะย่อย (immature oocyte I และ II) และ maturing oocyte I ระยะ maturing oocyte I พบเฉพาะเดือนพฤศจิกายน มกราคม และกันยายน ซึ่งเป็นช่วงพร้อมต่อการผสมพันธุ์ กิจกรรมจำเพาะของ trypsin-like enzyme มีค่าสูงเมื่อหอยคาบน้ำจืดเพศเมียสร้างเซลล์สืบพันธุ์ระยะ maturing oocyte I มีการสังเคราะห์ protein สูงขึ้นในช่วงที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ระยะ immature oocyte I และ immature oocyte II

จำนวนร้อยละของเซลล์สืบพันธุ์ระยะ immature oocyte I เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิ น้ำ และ อุณหภูมิอากาศสูงขึ้น ขณะที่จำนวนร้อยละของเซลล์สืบพันธุ์ระยะ maturing oocyte I เพิ่มขึ้นเมื่อ อุณหภูมิน้ำ และอุณหภูมิอากาศต่ำลง

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษากิจกรรมของไลเปสมีปัญหาก็เกี่ยวกับการแขวนลอยของตะกอนโซเดียมคาร์บอเนต ซึ่งมีลักษณะเบา ทำให้การวัดค่าการดูดกลืนแสงมีค่าสูง ปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขโดยการนำสารผสมดังกล่าวบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ก่อนการปั่นเหวี่ยงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตกตะกอน
2. การศึกษาการประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง และการทดลองเลี้ยงจริง ควรใช้ *C. hainesiana* เพศเมียวัยเดียวกันที่อยู่ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตดี เพราะความแตกต่างของอายุมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อย และการแสดงออกของเอนไซม์ย่อยอาหาร
3. กรดไขมันในกล้ามเนื้อหอยควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อเป็นข้อมูลสำคัญในการใช้ประโยชน์เนื้อหอยเพื่อการบริโภค หรือเป็นอาหารสัตว์
4. trypsin-like enzyme และ chymotrypsin-like enzyme ควรได้รับการศึกษาทั้งในบริเวณอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย และบริเวณ outer demibranch เพื่อเป็นข้อมูลของระดับกิจกรรมของเอนไซม์ในเซลล์สืบพันธุ์ที่กำลังพัฒนา และพัฒนาเต็มที่แล้ว

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- การณ ทองประจุกแก้ว. 2554. การพัฒนาสูตรอาหารโดยใช้เทคโนโลยีของเอนไซม์ย่อยอาหาร เพื่อการเจริญเติบโตอย่างมีคุณภาพของปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910). วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จันทกานต์ นุชสุข. 2550. คุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยอาหารและประสิทธิภาพการย่อยอาหารเพื่อพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงปลาสายพันธุ์ Indochinese Molluscivorous Catfishes, *Helicophagus leptorhynchus* Ng & Kottelat, 2000. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธวัชชัย จินดามงคล, อุทัยวรรณ โกวิทวที, สาธิต โกวิทวที, อมรา ทองปาน และ กรรณิกา ชัชวาลวานิช. 2546. ระยะเวลาและความถี่ในการพัฒนาตัวอ่อนระยะ โกลคิเดียของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson, 1900, น. 171-178. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 (สาขาประมง). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ปรางทิพย์ สุพรรณพงศ์. 2548. คุณลักษณะและประสิทธิภาพการย่อยสาหร่ายของเอนไซม์อะไมเลส และโปรตีนเอสในหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Hyriopsis) Bialatus* Simpson, 1900. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ลลิตภัทร ดวงสว่าง. 2553. วงสืบพันธุ์และการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนระยะ โกลคิเดียของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* (Brandt, 1974) ในอาหารสังเคราะห์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- _____ และ อุทัยวรรณ โกวิทวที. 2552. วงสืบพันธุ์และการพัฒนาการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนระยะ โกลคิเดียของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* (Brandt, 1974). ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35 (วทท 35) (Section G: Agricultural Science). 15-17 ตุลาคม, ชลบุรี.

สาธิต โกวิทวที , อุทัยวรรณ โกวิทวที และ สนธิพันธ์ ผาสุชาติ. 2548. โครงการวิจัยย่อยที่ 1 เรื่อง การคัดเลือกลูกหอยกาน้ำจืดวงศ์ Amblemidae ในประเทศไทยเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงไข่มุกน้ำจืด. ใน รายงานการวิจัยการพัฒนาการเพาะเลี้ยงไข่มุกน้ำจืดในประเทศไทย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

สุชาติ อุปถัมภ์, มาลียา เครือตราชู, เขวลักษณ์ จิตรามวงศ์ และ ศิริวรรณ จันทเดมิย์. 2538. **สังขวิทยา.** ศักดโสภากการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

วิรัช จิวแหยม. 2544. **ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับคุณภาพน้ำ และการวิเคราะห์คุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.** พิมพ์ครั้งที่ 1 โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. **อาหารปลา.** พิมพ์ครั้งที่ 1 โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

อรภา นาคจินดา. 2543. การศึกษาเกี่ยวกับหอยมุกน้ำจืดและการเพาะเลี้ยงไข่มุกน้ำจืดในประเทศไทย, น. 63-86. ใน เอกสารเสวนาวิชาการเรื่อง การศึกษาวิชาการหอยปี 2000. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, อ้อมเดือน มีชัย, สาธิต โกวิทวที, อุทัยวรรณโกวิทวที และ กรรณิกา ชัชวาลวานิช. 2548. โครงการวิจัยย่อยที่ 2 เรื่องการศึกษาศักยภาพการผลิตไข่มุกจากหอยกาน้ำจืดวงศ์ Amblemidae ในประเทศไทย. ใน รายงานการวิจัยการพัฒนาการเพาะเลี้ยงไข่มุกน้ำจืดในประเทศไทย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

อุทัยวรรณ โกวิทวที. 2555. **ชีววิทยาของหอยกาน้ำจืด.** พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, นฤมล เดชประเสริฐ และ อรภา นาคจินดา. 2542. การเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* ระยะโกลคิเดียในอาหารสังเคราะห์. รายงานการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36, กรุงเทพฯ.

อุทัยวรรณ โกวิทวที, นฤมล รุจินันท์ถการ และ อรภา นาคจินดา. 2540. การเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด. *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* ระยะ โกลคิเดียในอาหารสังเคราะห์. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36, กรุงเทพฯ. (CD-ROM)

_____ และ สาธิต โกวิทวที. 2543. การรวบรวมและการจัดจำแนกชนิดของหอยกาบน้ำจืดวงศ์ **Amblemidae** ในลุ่มน้ำมูลเพื่อการเพาะเลี้ยงโกลคิเดียในอาหารสังเคราะห์. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, สาธิต โกวิทวที และ อ้อมเดือน มีจ้อย. 2551. การพัฒนาการเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* ระดับกึ่งอุตสาหกรรม. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์, โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัยสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีงบประมาณ 2549.

Allen, R. D. 1951. The use of *Spisula solidissima* egg in cell research. **J. Cell. Comp. Physiol.** 37: 504-505.

AOAC. 2005. **Official Methods of Analysis**. 18th ed Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

APHA, AWWA and WPCF. 1998. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20th ed Water Pollution Control Federation, Washington, DC.

Areekijsee, M., A. Engkagul, S. Kovitvadhi, U. Kovitvadhi, A. Thongpan and K. Rungruangsak-Torrissen. 2006. Development of digestive enzymes and *in vitro* digestibility of different species of phytoplankton for culture of early juveniles of the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson, 1900. **Invert. Reprod. Develop.** 49: 255-262.

- Areekijserree, M., A. Engkagul, U. Kovitvadhi, A. Thongpan, M. Mingmuang, P. Pakkong and K. Rungruangsak-Torrissen. 2004. Temperature and pH characteristics of amylase and proteinase of adult freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson 1900. **Aquaculture** 234: 575-587.
- _____, A. Engkagul, U. Kovitvadhi, A. Thongpan, M. Mingmuang and S. Kovitvadhi. 2002. Activity profiles at different pH and temperature of cellulases and lipases in freshwater pearl mussel: *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus*, Simpson 1900. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. 36: 399-407.
- Barrington, E. J. W. 1979. **Invertebrate structure and function**. 2nd Wiley, New york.
- Bernfeld, P. 1951. Enzymes of starch degradation and synthesis. **Adv. Enzym.** 12: 379.
- Bezerra, R., E. Lins, R. Alencar, P. Paiva, M. Chaves, L. Coelho and L. Carvalho Jr. 2005. Alakaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process. Biochem.** 40: 1829-1834.
- Borcherding, J. 1995. Laboratory experiments of the influence of food availability, temperature and photoperiod on gonad development in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. **Malacologia** 36: 15-27.
- Buddensiek, V. 1995. The culture of juvenile freshwater mussel *Margaritifera margaritifera* in cages: a contribution to conservation programmes and the knowledge of habitat requirements. **Biological Conservation** 74: 33-40.
- Castillo-Yanez, F.L., R. Pacheco, F.L. Garcia-Carreno and M.A. Navarrete-Del Toro. 2004. Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. **Food Chem.** 85: 343-350.

- Chatchavalvanich, K., P. Jindamongkon, U. Kovitvadhi, A. Thongpan and S. Kovitvadhi. 2006. Histological structure of gonads in the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson, 1900. **Invertebrate Reproduction and Development** 49(4): 245-253.
- Chou, R.L., B.Y. Her, M.S. Su, G. Hwang, Y.H. Wu and H.Y. Chen. 2004. Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. **Aquaculture** 229: 325-333.
- de Jong-Brink, M., H.H. Boer, and J. Joosse. 1983. **Mollusca In oogenesis oviposition and oosorption**. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Dorange, G. and M. Le Pennec. 1989. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieuc. **Mar. Biol.** 103: 339-348.
- Fernandez, I., F.J. Moyano, M. Diaz and T. Martinez. 2001. Characterisation of α -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fish (Sparidae, Teleostei). **J. Exp. Mar. Biol.** 262: 1-12.
- Flari, V. and M. Charrier. 1992. Contribution to the study of carbohydrases in the digestive tract of the edible snail *Helix lucorum* L. (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora) in relation to its age and its physiological state. **Comparative Biochemistry and Physiology** 102(2): 363-372.
- Gandhi, S.R. and J.D. Weete. 1991. Production of the polyunsaturated fatty acids, arachidonic acid and eicosapentaenoic acid. **J. Gen. Microbiol.** 137: 1825-1830.

- Garcia-Carreno, F.L. 1992. The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes palanipes*, Decapoda): their partial characterization and the effect of food on their composition. **Comp. Biochem. Physiol.** 103B: 575-578.
- _____, and N.F. Haard. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes palanipes*) extracts. **J. Food Biochem.** 17: 97-113.
- Garlinou-Mitsoudi, S. and A.I. Sinis. 1994. Reproductive cycle and fecundity of the date mussel *Lithophaga lithophaga* (Bivalvia: Mytilidae). **J. Moll. Stud.** 60: 371-385.
- Gimenez, A.V.F., F.L. Garcia-Carreno, M.A. Navarrete del Toro and J.L. Fenucci. 2001. Digestive proteinases of red shrimp *Ploticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): partial characterization and relationship with molting. **Comp. Biochem. Physiol. B.** 130: 331-338.
- Graft, D and K. Cummings. 2007. Review of the systematics and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia:Unionoidea). **Journal of Molluscan Studies** 73: 291-314.
- Hameed, P.S., R. Asokan, M.A.R. Lyengar and V. Kannan. 1993. The freshwater mussel *Parreysia favidens* (Benson) as a biological indicator of polonium-210 in riverine system. **J. Chem. Ecol.** 8(1): 11-18.
- Helper, B. 1988. **Nutrition of pond fishes.** Cambridge University Press, New York.
- Hincks, S.S. and G.L. Mackie. 1997. Effects of pH, calcium, alkalinity, hardness and chlorophyll on the survival growth and reproductive success of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in Ontario lakes. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 54: 2049-2057.

- Hiramatsu, N., N. Ichikawa, H. Fukada, T. Fujita, C.V. Sullivan and A. Hara. 2002. Identification and characterization of proteases involved in specific proteolysis of vitellogenin and yolk proteins in salmonids. **J. Exp. Zool.** 292: 11-25.
- Hudson, R.G. and B.G. Isom. 1984. Rearing juveniles of the freshwater mussels (Unionidae) in a laboratory setting. **The Nautilus** 98: 129-135.
- Jones, H.A., R.D. Simpson and C.L. Humphrey. 1986. The reproductive cycles and glochidia of freshwater mussel (Bivalvia: Hyriidae) of the Macleay River, Northern New South Wales, Australia. **Malacologia** 27(1): 185-202.
- Kay, I. 1998. **Introduction to animal physiology**. Guilford bios scientific.
- Keller, E.A. and G.S. Zam. 1990. Simplification of *in vitro* culture techniques for freshwater mussels. **Environ. Toxicol. Chem.** 9: 1291-1296.
- Khawaja, T., S.H. Khan and N.N. Ansari. 2007. Effect of different levels of blood meal on broiler performance during two phase of growth. **Int. J. Poult. Sci.** 6: 860-865.
- Khrueanet, W., U. Kovitvadhi, A. Engkakul, S. Kovitvadhi and K. Rungruangsak-Torrissen. 2009. Characterization of digestive enzymes from adult freshwater pearl mussel *Chamberlainia hainesiana* (Lea, 1856). **KKU Science Journal** 37(supplement): 11-21.
- _____, W., U. Kovitvadhi, A. Engkakul, S. Kovitvadhi and K. Rungruangsak-Torrissen. 2011. *In vitro* digestibility of different feedstuffs for culturing of the freshwater pearl mussel *Chamberlainia hainesiana* (Lea, 1856). **The 4th International conference on science and technology for sustainable development of the greater Mekong Sub-region. Khon Kaen, Thailand.**

- Kovitvadhi, S. and U. Kovitvadhi. 2013. Effects of rearing density and sub-sand filters on growth performance of juvenile freshwater mussels (*Chamberlainia hainesiana*) reared under recirculating system conditions. **ScienceAsia** 39: 139-149.
- _____, P. Pakkong, N. Noparatnaraporn., L. Vilarinho and J. Machado. 2002. *In vitro* culture of glochidia *Hyriopsis myersiana* with suitable fish plasma. **Aquaculture** 195: 61-69.
- _____, U. Kovitvadhi, P. Sawanwong, A. Thongpan and J. Machado. 2006. Optimization of diet and culture environment for larvae and juvenile freshwater pearl mussels, *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* Lea, 1856. **Invert. Reprod. Dev.** 49: 61-70.
- _____, U. Kovitvadhi, P. Polwong and N. Kuchwattana. 2003. Development of rearing method for glochidia and juveniles of the freshwater mussel, *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856), pp. 195-202. **Proceeding of the 41st Kasetsart University Annual Conference (Subject: Fisheries), Bangkok.**
- Kumar, S., N.P. Sahu, A.K. Pal, D. Choudhury and S.C. Mukherjee. 2006. Studies on digestibility and digestive enzyme activities in *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles: effect of microbial α -amylase supplementation in non-gelatinized or gelatinized corn-based diet at two protein levels. **Fish Physiol. Biochem.** 32: 209-220.
- Lazo, J.P., R. Mendoza, G.J. Holt, C. Aguilera and C.R. Arnold. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenop ocellatus*). **Aquaculture** 265: 194-205.
- Lee, Y.J., S.Y. Kim, S.T. Lim, S.M. Han, H.M. Kim and I.J. Kang. 2006. Physicochemical properties of gamma-irradiated corn starch. **J. Food Sci. Nutr.** 11: 146-154.
- Lowry, H.O., N.J. Rosenbrough., A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.

- Morton, B. 1985. The reproductive strategy of the mangrove bivalve *Polymesoda (Gelotna) erosa* (Bivalvia: Corbiculoidea) in Hong Kong. **Malac. Rev.** 18: 83-89.
- Munilla-Moran, R. and F. Saborido-Rey. 1996. Digestive enzymes in marine species. II. Amylase activities in gut from seabream (*Sparus aurata*), Turbot (*Scophthalmus maximus*) and Redfish (*Sebastes mentella*). **Comp. Biochem. Physiol.** 113(4): 827-834.
- Nagachinta, A. and O. Meejui. 1998. Reproductive biology of Thai freshwater pearl mussel *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856). **Phuket Marine Biological Center Special Publication** 18(1): 103-106.
- Nandeesh, M.C., B. Gangadhara, T.J. Varghese, P. Keshavanath. 1998. Effect of feeding *Spirulina platensis* on the growth, proximate composition and organoleptic quality of common carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquacult. Res.** 29: 305-312.
- Narvaez, M., L. Freitas, M. Guevara, J. Mendoza, H. Guderley, C.J. Lodeiros, G. Salazar. 2008. Food availability and reproduction affects lipid and fatty acid composition of the brown mussel, *Perna perna*, raised in suspension culture. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part B 149: 293-302.
- Natalia, Y., R. Hashim, A. Ali and A. Chong. 2004. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formamus* (Osteoglossidae). **Aquaculture** 233: 305-320.
- Norkko, J.S.F. Thrush and R.M.G. Well. 2006. Indicators of short term growth in bivalves detecting environmental change across ecological scales. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 337: 38-48.
- Pavasovic, M., N.A. Richardson, A.J. Anderson, D. Mann and P.B. Mather. 2004. Effect of pH, temperature and diet on digestive enzyme profiles in the mud crab, *Scylla serrata*. **Aquaculture** 242: 641-654.

- Peirettie, P.G. and G. Meineri. 2008. Effects of diets with increasing levels of *Spirulina platensis* on the performance and apparent digestibility in growing rabbits. **Livest. Sci.** 118: 173-177.
- Pennak, R.W. 1978. **Freshwater Invertebrates of the United States.** John Wiley and Son, Inc., London.
- Pierce, G. J., L.N. Key, P.R. Boyle, K.J. Siegert, J.M. Gonçalves, F.M. Porteiro and H.R. Martins. 1999. RNA concentration and the RNA to protein ratio in cephalopod tissues: sources of variation and relationship with growth rate. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 237: 185-201.
- Polwong, P., U. Kovitvadhii and A. Nagachinta. 2003. Suitable food additives and densities of freshwater pearl mussel (*Chamberlainia hainesiana*) glochidia culture in artificial media, pp. 179-186. **Proceeding of the 41st Kasetsart University Annual Conference (Subject: Fisheries), Bangkok.**
- Post, A.R. 1982. **Evaluation of freshwater mussels (*Megalonias gigantea*) as a new protein source.** University of Tennessee, Knoxville.
- Rathore. R.M., S. Kumar and R. Chakrabatri. 2005. Digestive enzyme patterns and evaluation of protease classes in *Catla catla* (Family: Cyprinidae) during early development stages. **Comp. Biochem. Physiol. B.** 142: 98-106.
- Rebhun, L.I. 1962. Electron microscope studies on the vitelline membrane of the surf clam *Spisula solidissima*. **J. Ultrastruc. Res.** 6: 107-122.
- Reid, R.G.B., K. Rauchert. 1972. Protein digestion in members of the genus *Macoma* (Mollusca:Bivalvia). **Comparative Biochemistry and Physiology** 41: 887-895.

Ropes, J.W. 1968. Reproductive cycle of the surf clam, *Spisula solidissima*, in offshore New Jersey. **Biol. Bull.** 135: 349-365.

Rungruangsak-Torrissen, K. 2007. Digestive efficiency, growth and qualities of muscle and oocyte in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed on diets with krill meal as an alternative protein source. **J. Food Biochem.** 31: 509-540.

_____, A. Rustad, J. Sunde, S.A. Eiane, H.B. Jensen, J. Opstvedt, E. Nygard, T.A. Samuelsen, H. Mundheim, U. Luzzana and G. Venturini. 2002. *In vitro* digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. **J. Sci. Food Agricult.** 82: 644-654.

_____ and J.E. Fosseidengen. 2007. Effect of artificial feeding on digestive efficiency, growth and qualities of muscle and oocyte in maturing Atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.). **J. Food Biochem.** 31: 726-747.

_____ and R. Male. 2000. Trypsin isozymes: development, digestion and structure, pp. 215-269. In: N.F. Haard and B.K. Simpson, eds. **Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality**. Marcel Dekker, Inc., New York.

_____, R. Moss, L.H. Andresen, A. Berg and R. Waagbo. 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish Physiol. Biochem.** 32: 7-23.

_____, T. Thongprajukaew, K. Sangsuwan, P. Thapthimdaeng, U. Kovitvadh, S. Seetaha, K. Choowongkomon, I.M Beck and O.O. Arnøy. 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 Science Journal** 5: 44-56.

- Rønnestad, I., W. Koven, A. Tandler, M. Harel and H.J. Fyhn. 1998. Utilisation of yolk fuels in developing eggs and larvae of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture** 162: 157-170.
- Ruppert, E. E. and D. R. Barnes. 1994. **Invertebrate zoology**. 6th ed Saunders college publishing, United state of America.
- Simpson, B.K. 2000. Digestive proteases from marine animals, pp. 191-213. In Haard, N.F. and B.K. Simpson, eds. **Seafood enzymes**. NY:Marcel Dekker, Inc., New York.
- Stark, J. R. and R. S. Walker. 1983. Carbohydrate digestion in *Pecten maximus*. **Comparative Biochemistry and Physiology** 76(1): 173-177.
- Sunde, J., S. A. Eiane, A. Rustad, H.B. Jensen, J. Opstevedt, E. Nygard, G. Venturini and K. Rungruangsak Torrissen. 2004. Effect of fish feed processing conditions of digestive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquacult. Nutr.** 10: 261-277.
- _____, G. L. Taranger and K. Rungruangsak Torrissen. 2001. Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish Physiol. Biochem** 25: 335-345.
- Supannapong, P., T. Pimsalee, T. A-komol, A. Engkakul, U. Kovitvadhi, S. Kovitvadhi and K. Rungruangsak-Torrissen. 2008. Digestive enzymes and in vitro digestibility of different species of phytoplankton for culture of the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus*. **Aquacult. Int.** 16: 437-453.
- Sveinsdottir, H., H. Thorarensen and A. Gudmundsdottir. 2006. Involvement of trypsin and chymotrypsin activities in Atlantic cod (*Gadus morhua*) embryogenesis. **Aquaculture** 260: 307-314.

- Thongprajukaew, K., U. Kovitvadi, A. Engkagul and K. Rungruangsak-Torrissen. 2010. Characterization and expression levels of protease enzymes at different developmental stages of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. 44: 411-423.
- _____, S. Kovitvadi, P. Somsueb and K. Rungruangsak-Torrissen. 2011. Effects of different modified diets on growth, digestive enzyme expressions and muscle quality in juvenile Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). **Aquaculture** 322-323: 1-9.
- Torrissen, K.R., E. Lied and M. Espe. 1994. Differences in digestion and absorption of dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with genetically different trypsin isozymes. **J. Fish Biol.** 45: 1087-1104.
- Uthaiwan, K., P. Pakkong, N. Noparatnaraporn, L. Vilarinho and J. Machado. 2002. Study of a suitable fish plasma for in vitro culture of glochidia *Hyriopsis myersiana* (Lea, 1856). **Aquaculture** 209: 197-208.
- Winkler, U.K. and M. Stuckmann. 1979. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.** 138: 663-670.
- Wong, W.H. and S.G. Cheung. 2001. Feeding rates and scope for growth of green mussels, *Perna viridis* L. and their relationship with food availability in Kat O, Hong Kong. **Aquaculture** 193: 127-137.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และกราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme extract โดยวิธีการของ Lowry *et al.* (1951)

สารเคมี : 1. โปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 1 mg/ml

2. สารละลาย A ประกอบด้วย
 - โซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัม
 - น้ำกลั่น 960 มิลลิลิตร
 - สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 3 นอร์มอล ปริมาตร 35 มิลลิลิตร
3. สารละลาย B ประกอบด้วย
 - คอปเปอร์(II)ซัลเฟต 1 กรัม
 - น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
4. สารละลาย C ประกอบด้วย
 - โพแทสเซียม-โซเดียม ทาร์เตรต 2 กรัม
 - น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

เตรียม reagent โดยผสมสารละลาย A:B:C = 100:1:1 (โดยผสมสารละลาย B กับ C ให้เข้ากันก่อน จึงผสมสารละลาย A ลงไป)

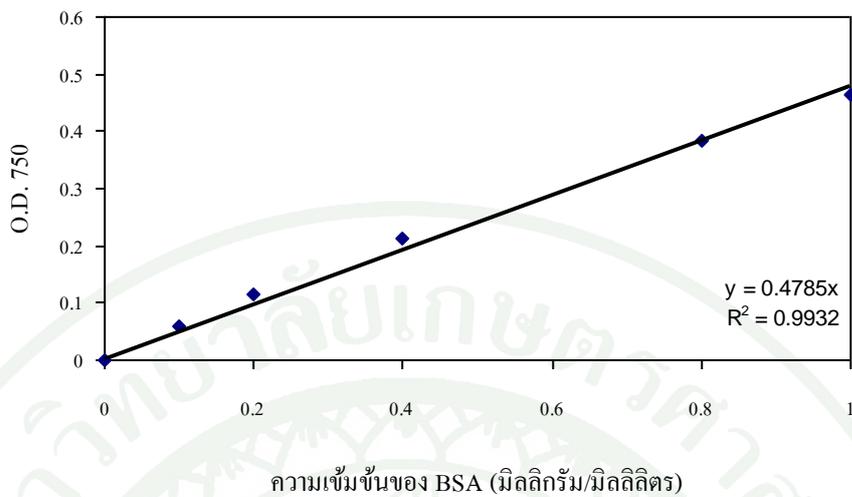
5. Folin-Ciocalteu (ผสมกับน้ำอัตราส่วน 1:1 ก่อนใช้)

วิธีการ : 1. การเตรียมสารละลาย BSA มาตรฐาน

เตรียม BSA เข้มข้น 1 mg/ml เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.1-1.0 mg/ml ปิเปตมาความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร เติม reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น BSA (mg/ml) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme extract

- 2.1 ปิเปต crude enzyme extract ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (เจือจาง 100 เท่า) ผสมกับ reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
- 2.2 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที
- 2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร
- 2.4 เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)



ภาพผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส

สารเคมี : 1. มอลโทสมาตรฐาน เข้มข้น 10 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร

2. สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

วิธีการ : 1. เจือจางมอลโทสมาตรฐานให้ได้ความเข้มข้น 0.2-3.0 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร

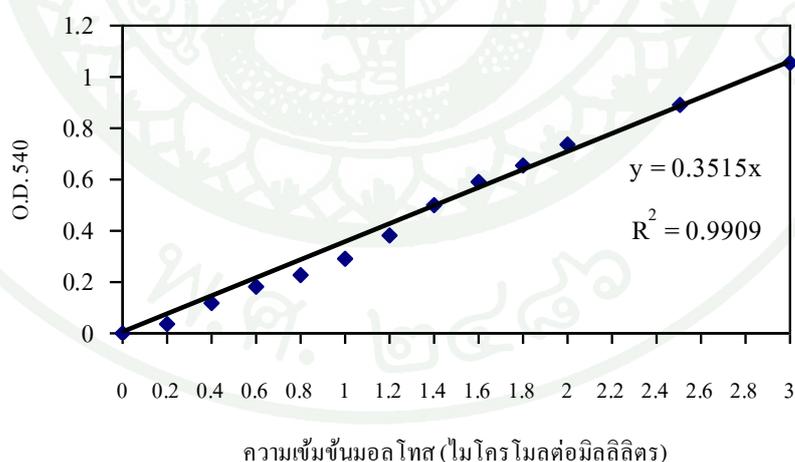
2. บีบสารละลายมอลโทสแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 125 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DNS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3. ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

4. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโทส (ไมโครโมล/มิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร



ภาพผนวกที่ ก2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นมอลโทส (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร



ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมี

การวิเคราะห์หึ่งค้ประกอบทางชีวเคมี (AOAC, 2005)

1. การหาปริมาณความชื้น

หาความชื้นในตัวอย่างโดยใช้เครื่องหาความชื้นอัตโนมัติระบบอินฟราเรด (MA 30, Sartorius, Germany) โดยกำหนดอุณหภูมิที่ 105 องศาเซลเซียส และกำหนดเวลาโดยให้เครื่องหยุดทำงานอัตโนมัติ เมื่อความชื้นคงที่จึงบันทึกปริมาณความชื้นที่คำนวณได้จากเครื่อง

2. การหาปริมาณเถ้า

เผาครุชชีเบิลในเตาเผา (Carbolite ELF 11/14, England) ที่ 600 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ นาน 30 นาที นำครุชชีเบิลชั่งน้ำหนัก (W1) และน้ำหนักของตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ (W2) โดยใส่ตัวอย่างลงในครุชชีเบิลประมาณ 2 กรัม หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปเผาที่ 600 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์นาน 30 นาที ชั่งน้ำหนักครุชชีเบิลพร้อมเถ้า (W3) และคำนวณปริมาณเถ้า (ร้อยละ) จาก $100 \times [(W3 - W1)/W2]$

3. การหาปริมาณโปรตีน

3.1 ขั้นตอนการย่อย

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 0.5-1.0 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อย จากนั้นใส่ตัวเร่งปฏิกิริยาประมาณ 7 กรัม และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 12 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปย่อย (K-435, Buchi, Switzerland) ที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส ประมาณ 30-45 นาที จนได้สารละลายสีเขียวใส

3.2 ขั้นตอนการกลั่น

นำสารละลายที่ผ่านการย่อยในข้อ 3.1 มาก่่น โดยใช้ชุดกลั่นและไตเตรท (B-339, Buchi, Switzerland) กำหนดปริมาตรน้ำ (60 มิลลิลิตร) โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 32 (100 มิลลิลิตร) กรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 2 (50 มิลลิลิตร) และกำหนดความเข้มข้น

ของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไตเตรท (0.1 นอร์มัล) ทำการไตเตรท เมื่อครบเวลาบันทึกปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้จากเครื่อง

4. การหาปริมาณไขมัน

อบ extraction cup ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ประมาณ 30 นาที ชั่งน้ำหนัก extraction cup (W1) และน้ำหนักตัวอย่าง (ประมาณ 2 กรัม) (W2) หลังจากนั้นนำตัวอย่างใส่ลงในทิมเบิล และนำทิมเบิลใส่ลงใน extraction cup และเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 140 มิลลิลิตร นำ extraction cup ใส่ในเครื่องสกัดไขมัน (Soxtherm S306AK, Gerhardt, Germany) และทำการสกัดโดยตั้งโปรแกรมการทำงาน ประกอบด้วย boiling time (30 นาที), solvent reduction A (5 × 15 มิลลิลิตร) และ extraction time (80 นาที) เมื่อครบเวลาถอด extraction cup ออก แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์นาน 30 นาที ชั่งน้ำหนัก extraction cup พร้อมไขมัน (W3) และคำนวณปริมาณไขมัน (ร้อยละ) จาก $100 \times [(W3-W1)/W2]$

5. การหาปริมาณเยื่อใย

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมัน ประมาณ 0.5 กรัม (W1) จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 1.25 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปต้มเป็นเวลา 30 นาที นำสารแขวนลอยมากรองโดยผ่านเครื่องกรองสุญญากาศ เก็บตะกอนที่ได้ จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.25 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วผ่านกระบวนการเช่นเดียวกับการต้มด้วยกรดซัลฟิวริก แล้วเก็บตะกอนที่ได้ใส่ในภาชนะเดิม อบตะกอนพร้อมครุชีเบิลที่อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส นาน 1.5 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ นาน 30 นาที หลังจากนั้น ชั่งน้ำหนักตะกอนพร้อมครุชีเบิล (W2) และเผาตะกอนพร้อมครุชีเบิลที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ประมาณ 30 นาที ชั่งน้ำหนักครุชีเบิลพร้อมถ้ำ (W3) และคำนวณปริมาณเยื่อใย (ร้อยละ) จาก $100 \times [(W2-W3)/W1]$



ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี (APHA, AWWA, WPCF, 1998)

1. คาร์บอนไดออกไซด์อิสระ (titrimetric method)

หยดฟีนอล์ฟทาลีน 10 หยด ลงในน้ำตัวอย่าง 200 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ถ้าเป็นสีชมพู แสดงว่าไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์) ถ้าสารละลายไม่มีสีให้ไตเตรทด้วยโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.0454 นอร์มัล จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู และคำนวณปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์อิสระ (ppm CO₂) จาก $5 \times$ (ปริมาตรของโซเดียมคาร์บอเนตที่ใช้)

2. ความเป็นด่าง (titration method)

หยดฟีนอล์ฟทาลีน 5 หยด ลงในน้ำตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ถ้าเป็นสีชมพู ให้ไตเตรทด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.02 นอร์มัล จนสีชมพูหายไป) หลังจากนั้นหยด methyl orange 5 หยด เขย่าให้เข้ากัน และไตเตรทด้วยกรดซัลฟิวริก จนสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้ม และคำนวณความเป็นด่าง (ppm CaCO₃) จาก $8.35 \times$ (ปริมาตรของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ทั้งหมด)

3. ความกระด้าง (EDTA titrimetric method)

นำน้ำตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ (แอมโมเนียมคลอไรด์-แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ บัฟเฟอร์) 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมอินดิเคเตอร์ 6 หยด (ประกอบด้วย NH₄OH.HCl, eriochrome black T และเอทานอลร้อยละ 70) เขย่าให้เข้ากัน ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน EDTA (ประกอบด้วย EDTA และ MgCl₂.H₂O) จนสารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงแดงเป็นสีน้ำเงิน และคำนวณความกระด้าง (ppm CaCO₃) จาก $20 \times$ (ปริมาตรของ EDTA ที่ใช้)

4. ไนไตรท์ (colorimetric method)

ผสมสารละลาย sulfanilamide 1 มิลลิลิตร กับน้ำตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-4 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย NED 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 543 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณไนไตรท์ (ppm NO₂⁻) จาก (ค่าการดูดกลืนแสง-0.001556)/3.48

5. ไนเตรท (cadmium reduction method)

เติมแคดเมียม 10 มิลลิกรัม ลงในน้ำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย sulfanilamide 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย NED ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 543 นาโนเมตรและคำนวณปริมาณไนเตรท ($\text{ppm NO}_3\text{-N}$) จาก (ค่าการดูดกลืนแสง-0.056)

6. แอมโมเนียไนโตรเจน (phenate method)

ผสมสารละลายฟีนอล และ sodium nitroprusside อย่างละ 1 มิลลิลิตร และ oxidizing solution ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร กับน้ำตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน ($\text{ppm NH}_4\text{Cl}$) จาก (ค่าการดูดกลืนแสง-0.0018)/0.5708

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางวิไลลักษณ์ เครือเนตร
เกิดวันที่	25 มกราคม พ.ศ. 2519
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดหนองคาย
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา), วท.ม. (ชีววิทยา)
ตำแหน่งปัจจุบัน	ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ทุนการศึกษาที่เคยได้รับ	ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์เพื่อตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการ จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทุนโครงการพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา
ผลงานวิชาการจากวิทยานิพนธ์	
ประชุมวิชาการ (โปสเตอร์)	<p>1) Khrueanet W., U. Kovitvadhi, A. Engkagul, S. Kovitvadhi and K. Rungruangsak-Torrissen. 2009. Characterization of digestive enzymes from adult freshwater pearl mussel <i>Chamberlainia hainesiana</i> (Lea, 1856). The 2rd International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region. Hanoi, Vietnam. (Abstract).</p> <p>2) Khrueanet W., U. Kovitvadhi, K. Thongprajukaew, A. Engkagul, S. Kovitvadhi and K. Rungruangsak-Torrissen. 2011. <i>In Vitro</i> digestibility of different feedstuffs for culturing of the freshwater pearl mussel <i>Chamberlainia hainesiana</i> (Lea, 1856). The 4th International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region. Khon Kaen, Thailand. (Abstract).</p>

บทความวิชาการ

- 1) Khrueanet W., U.Kovitvadhi, A. Engkagul, S. Kovitvadhi and K. Rungruangsak-Torrissen. 2009. Characterization of digestive enzymes of freshwater pearl mussel *Chamberlainia hainesiana* (Lea, 1856). **KKU Science Journal** 37 (supplement): 11-21.

