



วิทยานิพนธ์

การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวโมเลกุลที่สำคัญบางชนิดในปูทะเล
(*Scylla serrata* Forskål 1775) ที่มีอาการท้องแดง

QUANTITATIVE CHANGES OF SOME IMPORTANT
BIOCHEMICAL COMPOSITION IN THE TISSUES OF
MUD CRAB (*Scylla serrata* Forskål 1775) HAVING RED
STERNUM SYMPTOMS

นางสาวปรียาดา บุญเย็น

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีววิทยาของเซลล์และโมเลกุล)

ปริญญา

ชีววิทยาของเซลล์และโมเลกุล

วิทยาศาสตร์ทั่วไป

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวโมเลกุลที่สำคัญบางชนิดในปูทะเล
(*Scylla serrata* Forskål 1775) ที่มีอาการท้องแดง

Quantitative Changes of Some Important Biochemical Composition in the Tissues of
Mud Crab (*Scylla serrata* Forskål 1775) Having Red Sternum Symptoms

นามผู้วิจัย นางสาวปรีชาดา บุญเย็น

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์มิ่งขวัญ มิ่งเมือง, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์อมรา ทองปาน, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จินตนา สและน้อย, วท.ด.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พรสวาท วัฒนกุล, Dr. rer.nat.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อางคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวโมเลกุลที่สำคัญบางชนิดในปูทะเล
(*Scylla serrata* Forskål 1775) ที่มีอาการท้องแดง

Quantitative Changes of Some Important Biochemical Composition in the Tissues of
Mud Crab (*Scylla serrata* Forskål 1775) Having Red Sternum Symptoms

โดย

นางสาวปริยดา บุญเย็น

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยาของเซลล์และโมเลกุล)
พ.ศ. 2550

ปรีชาดา บุญเย็น 2550: การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวโมเลกุลที่สำคัญบางชนิดในปูทะเล (*Scylla serrata* Forskål 1775) ที่มีอาการท้องแดง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยาของเซลล์และโมเลกุล) สาขาชีววิทยาของเซลล์และโมเลกุล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป ประชานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์มิ่งขวัญ มิ่งเมือง, Ph.D. 74 หน้า

องค์ประกอบทางชีวโมเลกุลใน 3 ระบบ คือ กลุ่มที่เป็นแหล่งพลังงาน (glycogen, glucose, lactate, fatty acid) กลุ่มที่เป็นโครงสร้าง (glucosamine, *N*-acetylglucosamine, chitin) และกลุ่มที่เป็นรงควัตถุ (total carotenoid, astaxanthin, β -carotene) ถูกนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบในเนื้อเยื่อต่างๆ ของปูทะเล (*Scylla serrata*) ปกติและปูที่มีอาการท้องแดง โดยพบว่า glycogen ลดลงอย่างเห็นได้ชัดถึง 4 เท่าในเนื้อของปูที่มีอาการท้องแดง (จาก 0.8609 ± 0.0912 เป็น 0.2097 ± 0.0122 mg/g wet weight) แต่ glucose กลับเพิ่มมากขึ้นถึง 6 เท่าในตับของปูที่มีอาการท้องแดง (จาก 0.0058 ± 0.5715 เป็น 0.0365 ± 0.0024 mg/g wet weight) และ lactate ก็เพิ่มขึ้นมากในเหงือก คือ 4 เท่า (จาก 0.3510 ± 0.0695 เป็น 1.4612 ± 0.0689 mg/g wet weight) ซึ่งบ่งชี้ถึงการเกิดกระบวนการ anaerobic respiration ในปูที่มีอาการท้องแดงเหล่านี้ สำหรับ fatty acid นั้นพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ saturated fatty acid (palmitic acid; C16:0) และ monounsaturated fatty acid (palmitoleic acid; C16:1, oleic acid; C18:1) ในตับและเลือดอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเกิด lipid catabolism ในขณะที่ polyunsaturated fatty acid (docosahexaenoic acid DHA; C22:6) ที่เพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัดในตับและเลือดเช่นกันอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ ion permeability บน membrane ของปูที่มีอาการท้องแดง สำหรับองค์ประกอบทางชีวโมเลกุลที่เป็นโครงสร้าง พบว่า glucosamine ลดลงในทุกเนื้อเยื่อของปูที่มีอาการท้องแดงแต่ไม่เด่นชัดมาก ในขณะที่ *N*-acetylglucosamine เพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัดในเลือดของปูที่มีอาการท้องแดงถึง 5 เท่า (จาก 0.5712 ± 0.149 เป็น 3.0189 ± 1.5454 μ g/ml) ส่วน chitin ซึ่งวิเคราะห์ในกระดองเท่านั้นพบว่าปริมาณลดลงในปูที่มีอาการท้องแดง (จาก 9.08 ± 0.5204 เป็น 6.92 ± 0.2887 % dry weight) ซึ่งน่าจะเป็นผลจากกระบวนการ chitin degradation จึงทำให้ปริมาณ chitin ลดลงส่วน *N*-acetylglucosamine เพิ่มขึ้น สำหรับองค์ประกอบทางชีวโมเลกุลที่เป็นรงควัตถุ พบว่า total carotenoid และ β -carotene ลดลงเกือบทุกเนื้อเยื่อของปูที่มีอาการท้องแดง ถึงแม้ total carotenoid จะมีปริมาณลดลงไม่เด่นชัด แต่ β -carotene ในตับลดลงเกือบ 2 เท่า (จาก 6.9562 เป็น 3.6692 μ g/g wet weight) ส่วน astaxanthin พบว่าเนื้อเยื่อของปูที่มีอาการท้องแดงส่วนใหญ่มีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในเลือดเพิ่มขึ้นถึง 9 เท่า (จาก 0.3504 เป็น 3.2466 μ g/ml) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิด oxidation ของ β -carotene ส่งผลให้ β -carotene ลดลงและทำให้ astaxanthin เพิ่มขึ้น

Preyada Boonyen 2007: Quantitative Changes of Some Important Biochemical Composition in the Tissues of Mud Crab (*Scylla serrata* Forskål 1775) Having Red Sternum Symptoms. Master of Science (Cell and Molecular Biology), Major Field: Cell and Molecular Biology, Department of General Science. Thesis Advisor: Associate Professor Mingkwan Mingmuang, Ph.D. 74 pages.

Three major biochemical compositions; those involve energy sources (glycogen, glucose, lactate, fatty acid), structural components (glucosamine, *N*-acetylglucosamine, chitin) and pigmentation (total carotenoid, astaxanthin, β -carotene) in several tissues and organs of normal mud crab (*Scylla serrata*) were compared to those having red sternum symptoms. Glycogen was found to decrease 4 times in the muscle of red sternum crabs (from 0.8609 ± 0.0912 to 0.2097 ± 0.0122 mg/g wet weight) but glucose was increased 6 times in the hepatopancreas (from 0.0058 ± 0.5715 to 0.0365 ± 0.0024 mg/g wet weight), while lactate was also increased 4 times in the gills (from 0.3510 ± 0.0695 to 1.4612 ± 0.0689 mg/g wet weight) suggesting the switch to anaerobic respiration in these crabs. On the other hand, saturated fatty acid (palmitic acid; C16:0) and monounsaturated fatty acid (palmitoleic acid; C16:1 , oleic acid; C18:1) which are responsible for lipid catabolism and polyunsaturated fatty acid (docosahexaenoic acid DHA; C22:6) involving ion permeability of membrane were distinctively increased in the hepatopancreas and haemolymph of red sternum crabs. As for structural components, glucosamine was found to decrease in all tissues and organs of red sternum crabs at low levels but *N*-acetylglucosamine was drastically increased 5 times (from 0.5712 ± 0.14 to 3.0189 ± 1.5454 μ g/ml) in the haemolymph, while chitin in the carapace of red sternum crabs was decreased from 9.08 ± 0.5204 to 6.92 ± 0.2887 % dry weight which could be the results of chitin degradation and transformed into *N*-acetylglucosamine. It is interesting to find both total carotenoid and β -carotene decreased in most of the tissues of red sternum crabs. Although total carotenoid was only moderately changed, β -carotene in hepatopancreas was clearly decreased (from 6.9562 to 3.6692 μ g/g wet weight). On the contrary, astaxanthin was mostly increased especially at high levels (from 0.3504 to 3.2466 μ g/ml) in the haemolymph of red sternum crabs which is probably due to the oxidation of β -carotene itself.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์มิ่งขวัญ มิ่งเมือง ประธานกรรมการที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์อมรา ทองปาน กรรมการสาขาวิชาเอก ผู้ช่วยศาสตราจารย์จินตนา สและน้อย กรรมการสาขาวิชาการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนิษฐา ทรัพย์นันทน์ ใจดี ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์สุนันท์ ภัทรจินดา หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือสถานที่ เครื่องมืออุปกรณ์ สำหรับการทดลองและปฏิบัติการ และขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับเงินทุนในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกคนจากสาขาชีววิทยาของเซลล์และโมเลกุล สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ และสาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง ที่คอยช่วยเหลือให้คำแนะนำ เป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลงด้วยดี

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ผู้ซึ่งมีพระคุณสูงสุด ที่คอยช่วยเหลือและสนับสนุนเป็นกำลังใจเสมอมา จนสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ปรียาดา บุญเย็น

สิงหาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
ปูทะเล	4
สารชีวโมเลกุลและการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลเมื่อได้รับ stress	6
ลักษณะและอาการของปูที่มีอาการท้องแดง	13
อุปกรณ์และวิธีการ	14
ผลและวิจารณ์	20
Glycogen	20
Glucose	23
Lactate	26
Fatty Acid	29
Glucosamine (GlcN), <i>N</i> -acetylglucosamine (GlcNAc) และ chitin	33
Total carotenoid, Astaxanthin และ β -carotene	37
สรุป	43
ข้อเสนอแนะ	44
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	45
ภาคผนวก	56
ภาคผนวก ก ปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง	57
ภาคผนวก ข วิธีเตรียมสารเคมีและการวิเคราะห์	60
ภาคผนวก ค โครมาโตแกรม	69

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณ glycogen ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ เนื้อ และเลือด ของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง	20
2	ปริมาณ glucose ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ เนื้อ และเลือด ของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง	23
3	ปริมาณ lactate ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ เนื้อ และเลือด ของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง	26
4	ปริมาณ fatty acid ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ เนื้อ และเลือด ของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง	30
5	ปริมาณ glucosamine และ <i>N</i> -acetylglucosamine ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ เนื้อและเลือดของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง	34
6	ปริมาณ total carotenoid, astaxanthin และ β -carotene ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ เนื้อ เลือด และกระดูกของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง	38

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ปริมาณ glycogen ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ เนื้อ และเลือด ของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง	21
2 ปริมาณ glucose ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ เนื้อ และเลือด ของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง	24
3 ปริมาณ lactate ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ เนื้อ และเลือด ของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง	27
4 ปริมาณ glucosamine และ <i>N</i> -acetylglucosamine ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ เนื้อ เลือด และ chitin ในกระดูกของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง	35
5 ปริมาณ total carotenoid, astaxanthin และ β -carotene ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ เนื้อ เลือด และกระดูกของปูปกติและ ปูที่มีอาการท้องแดง	39
6 ปริมาณ glycogen, glucose, lactate, glucosamine, <i>N</i> -acetylglucosamine, chitin, total carotenoid, astaxanthin และ β -carotene ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของ ปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง	42
 ภาพผนวกที่	
ก 1 ลักษณะภายนอกปูทะเล (<i>Scylla serrata</i>) เพศเมียปกติ	58
ก 2 ลักษณะภายนอกปูทะเล (<i>Scylla serrata</i>) เพศเมียที่มีอาการท้องแดง	58
ก 3 อวัยวะภายในปูทะเล (<i>Scylla serrata</i>) เพศเมียปกติ	59
ก 4 อวัยวะภายในปูทะเล (<i>Scylla serrata</i>) เพศเมียที่มีอาการท้องแดง	59
ข 1 กราฟมาตรฐานของ glucosamine (GlcN)	64
ข 2 กราฟมาตรฐานของ <i>N</i> -acetylglucosamine (GlcNAc)	65
ข 3 ขั้นตอนวิเคราะห์ glucosamine และ <i>N</i> -acetylglucosamine	66
ข 4 กระบวนการ metabolism และการเปลี่ยนแปลง carotenoid ในครัสเตเชีย	68

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ค 1 องค์ประกอบของ fatty acid ในเหงือกปูทะเลปกติ	70
ค 2 องค์ประกอบของ fatty acid ในเหงือกปูทะเลที่มีอาการท้องแดง	70
ค 3 องค์ประกอบของ fatty acid ในเนื้อเยื่อได้กระดองปูทะเลปกติ	71
ค 4 องค์ประกอบของ fatty acid ในเนื้อเยื่อได้กระดองปูทะเลที่มีอาการท้องแดง	71
ค 5 องค์ประกอบของ fatty acid ในตับปูทะเลปกติ	72
ค 6 องค์ประกอบของ fatty acid ในตับปูทะเลที่มีอาการท้องแดง	72
ค 7 องค์ประกอบของ fatty acid ในเนื้อปูทะเลปกติ	73
ค 8 องค์ประกอบของ fatty acid ในเนื้อปูทะเลที่มีอาการท้องแดง	73
ค 9 องค์ประกอบของ fatty acid ในเลือดปูทะเลปกติ	74
ค 10 องค์ประกอบของ fatty acid ในเลือดปูทะเลที่มีอาการท้องแดง	74

การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวโมเลกุลที่สำคัญบางชนิดในปูทะเล

(*Scylla serrata* Forskål 1775) ที่มีอาการท้องแดง

Quantitative Changes of Some Important Biochemical Composition in the Tissues of Mud Crab (*Scylla serrata* Forskål 1775) Having Red Sternum Symptoms

คำนำ

ปูทะเล (*Scylla serrata*) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญและเป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ให้กับประเทศ เนื่องจากปูทะเลมีรสชาติดี มีคุณค่าทางโภชนาการสูงเมื่อเทียบกับสัตว์ทะเลอื่นๆหลายชนิด อีกทั้งมีราคาแพง ในปัจจุบันพบว่ามีการเลี้ยงปูในเชิงพาณิชย์รูปแบบต่างๆ เช่น การเลี้ยงปูขนาดเล็กให้เป็นปูขนาดใหญ่ การเลี้ยงปูโพรงให้เป็นปูเนื้อแน่น การเลี้ยงปูไข่ การเลี้ยงปูนิ่ม โดยพบว่าปัญหาหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อการเลี้ยงปูในเชิงพาณิชย์คือ การเกิดโรคในปู เช่น อาการปูท้องแดง จากการสังเกตปูที่เลี้ยงในฟาร์มปูนิ่ม พบว่ามีปูที่มีลักษณะอาการท้องแดงประมาณ 10% ปูดังกล่าวจะมีสีแดงเกิดขึ้นบริเวณท้องและรอยากโดยจะแดงเป็นแถบๆ หรือแดงทั้งหมด เป็นปูที่ไม่แข็งแรง กระดองไม่แข็งมากเหมือนปูปกติ ไม่ค่อยกินอาหาร การเคลื่อนไหวของขาทำได้ช้าและในที่สุดขาและก้ามจะไม่สามารถเคลื่อนไหวได้และตายในที่สุด ทำให้ไม่สามารถขายได้ ซึ่งเป็นปัญหาอย่างมากต่อผู้ทำการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้องค์ประกอบทางชีวโมเลกุลที่สำคัญในเนื้อเยื่อต่างๆ ได้แก่ สารชีวโมเลกุลที่เป็นแหล่งพลังงาน (glycogen, glucose, lactate และ fatty acid) สารชีวโมเลกุลที่เป็นโครงสร้าง (glucosamine, N-acetylglucosamine และ chitin) และสารชีวโมเลกุลที่เป็นรงควัตถุ (total carotenoid, astaxanthin และ β -carotene) น่าจะมีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างไปจากปูปกติ ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้ล้วนมีบทบาทที่สำคัญสำหรับเซลล์ เนื่องจาก glycogen และ glucose เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีบทบาทในการเป็นแหล่งพลังงานให้กับเซลล์ แต่เมื่อใดที่มีปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอ glucose จะเข้าสู่กระบวนการ anaerobic metabolism ซึ่งเป็นผลให้เกิด lactate สะสมขึ้นภายในเซลล์ นอกจากนี้ glucose สามารถเปลี่ยนเป็น glucosamine และ N-acetylglucosamine เพื่อ form เป็น polymer สำหรับสร้าง chitin ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของ crustacean exoskeleton นอกจากนี้โครงสร้างของ crustacean exoskeleton จะประกอบด้วย chitin แล้วยังมีรงควัตถุซึ่งได้แก่ astaxanthin และ β -carotene สำหรับไขมันนั้นเป็นสารชีวโมเลกุลที่ให้พลังงานมากกว่าคาร์โบไฮเดรต และโปรตีน เมื่อต้องการพลังงานไขมันจะสลายให้ fatty acid และเกิดกระบวนการ β -oxidation เข้าสู่

Kreb's cycle ต่อไปเพื่อผลิตเป็นพลังงานสำหรับใช้ในเซลล์ ดังนั้นเมื่อมีอาการท้องแดงคาดว่าองค์ประกอบทางชีวโมเลกุลเหล่านี้น่าจะมีการเปลี่ยนแปลงต่างจากปกติ ซึ่งบ่งชี้ถึงพยาธิสภาพนี้ โดยความรู้ที่ได้นี้อาจเป็นข้อมูลอันนำไปสู่แนวทางในการแก้ปัญหาปุทะเลที่มีอาการท้องแดงต่อไป

วัตถุประสงค์

วิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณองค์ประกอบทางชีวโมเลกุลที่สำคัญบางชนิดดังนี้

1. สารชีวโมเลกุลที่เป็นแหล่งพลังงาน ได้แก่ glycogen, glucose, lactate และ fatty acid
2. สารชีวโมเลกุลที่เป็นโครงสร้าง ได้แก่ glucosamine, *N*-acetylglucosamine และ chitin
3. สารชีวโมเลกุลที่เป็นรงควัตถุ ได้แก่ total carotenoid, astaxanthin และ β -carotene

โดยเปรียบเทียบระหว่างปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง

การตรวจเอกสาร

1. ปูทะเล

1.1 อนุกรมวิธานของปูทะเล

Barnes (1987) ได้จำแนกอนุกรมวิธานของปูทะเลชนิด *Scylla serrata* ดังนี้

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Superorder Eucarida

Order Decapoda

Suborder Reptantia

Section Brachyura

Subsection Brachygnatha

Superfamily Brachyrhyncha

Family Portunidae

Genus *Scylla*

Species *Scylla serrata* (Forskål 1775)

Scientific name: *Scylla serrata* (Forskål 1775)

Common name: Mud crab, Mangrove crab

1.2 ลักษณะทั่วไปของปูทะเล

ปูทะเลมีส่วนประกอบของร่างกาย 3 ส่วน คือ ส่วนหัว (head), อก (thorax) และท้อง (abdomen) ส่วนหัวและอกจะเชื่อมติดกัน เรียกว่า cephalothorax มีกระดอง (carapace) หุ้มอยู่ ตอนบนเป็นรูปไข่ กระดองจะมีหยักคล้ายหนามแหลมๆ อยู่ในส่วนหน้า 4 อัน ในขณะที่ด้านข้างของกระดองจะมีหนามอยู่ข้างละ 9 อันเท่าๆ กัน และมีหนามกระดอง (spines) 3 อัน ที่ด้านหน้าของขา และ 2 อันที่ด้านหลัง (Motoh, 1979) ปูทะเลมีตาอยู่ทางด้านหน้า 1 คู่ ซึ่งเป็นตาประกอบ (compound

eye) มีก้านตา (eye stalk) ที่สามารถชูและพับอยู่ในเปลือกได้ ปูทะเลมีขา 5 คู่ อยู่ 2 ข้างลำตัว โดยขาคู่แรกเป็นก้ามขนาดใหญ่ใช้ในการหยิบจับอาหารและต่อสู้ป้องกันตัว ขา 3 คู่ถัดไปมีขนาดเล็กปลายแหลมใช้เดิน (walking legs) ส่วนขาคู่สุดท้ายแบนคล้ายใบพายเป็นขาที่ช่วยในการว่ายน้ำ (swimming legs) ลักษณะส่วนท้องปูทะเลเพศผู้จะเป็นรูปสามเหลี่ยมแคบตรงยาวแบ่งเป็นปล้องทั้งหมด 7 ปล้อง โดยด้านล่างของส่วนท้องจะมียางค์ว่ายน้ำ (pleopod) โดยในเพศผู้จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างและทำหน้าที่เป็นอวัยวะที่ช่วยในการสืบพันธุ์มี 2 คู่ สำหรับเพศเมียจะมีมากกว่า 2 คู่ และมีลักษณะเรียวยาวมีขนาดเล็กๆ คล้ายขนนกเพื่อให้ไข่ติดในเวลาฟัก ส่วนท้องเพศเมียมีลักษณะแผ่ขยายออก (สุกัลลักษณ์, 2532)

1.3 วงชีวิตของปูทะเล

ปูทะเลมีการอพยพย้ายถิ่นเพื่อแพร่พันธุ์จากแหล่งหากินในบริเวณเขตนํ้ากร่อยออกไปวางไข่ในทะเล ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังจากที่ได้ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์แล้ว (Hill, 1975) โดยไข่ของปูทะเลจะพัฒนาไปเป็นลูกปูทะเลวัยอ่อน 3 ระยะ ได้แก่ ระยะที่ 1 คือระยะซุเอีย (zoea) ประกอบด้วยซุเอีย 1 ถึง ซุเอีย 5 ซึ่งจะมีการพัฒนาโดยการลอกคราบ 4 ครั้ง โดยในระยะนี้เป็นระยะที่ลูกปูมีอวัยวะต่างๆ ที่ยังไม่พัฒนาจนสามารถว่ายน้ำได้ดี จึงล่องลอยหากินตามกระแสนํ้า แต่เมื่อเข้าสู่ระยะที่ 2 คือ ระยะเมกาโลปา (megalopa) จะมีการพัฒนารยางค์ส่วนต่างๆ เพิ่มขึ้นพร้อมทั้งมีก้ามที่แข็งแรงมากขึ้น จึงมีการอพยพเข้าไปใกล้ชายฝั่งทะเลโดยอาศัยการว่ายน้ำและการพัดพาของกระแสนํ้า จากนั้นลูกปูระยะเมกาโลปาจะมีการพัฒนาเข้าสู่ระยะที่ 3 คือระยะลูกปู (crab stage) ซึ่งมีลักษณะคล้ายพ่อแม่ โดยลูกปูระยะนี้จะเริ่มจมตัวลงสู่พื้นดิน และพากันอพยพเข้าไปอาศัยหลบภัยและหากินอยู่ในบริเวณป่าชายเลนต่อไป (ชูชาติ, 2531)

2. สารชีวโมเลกุลและการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลเมื่อได้รับ stress

สารชีวโมเลกุลคือสารที่เป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิต เป็นสารประกอบคาร์บอน เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก สารชีวโมเลกุลเหล่านี้ล้วนเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ metabolism ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่เกิดขึ้น เช่น การได้รับ stress ทั้งที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต เช่น bacteria, parasite หรือสิ่งไม่มีชีวิต เช่น สารเคมี ความเค็ม หรือ สภาพที่มีออกซิเจนน้อย stress เหล่านี้ล้วนมีบทบาทต่อกระบวนการ metabolism และส่งผลให้สารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการ metabolism เปลี่ยนแปลงไปด้วย

2.1 สารชีวโมเลกุลที่เป็นแหล่งพลังงาน

สารชีวโมเลกุลที่เป็นแหล่งพลังงานได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน สำหรับ คาร์โบไฮเดรตที่พบในเนื้อเยื่อของ crustacean ส่วนใหญ่มักอยู่ในรูป glycogen และ glycoprotein ซึ่งเป็นน้ำตาลที่จับกับโปรตีน

Glycogen

โครงสร้างของ glycogen ประกอบด้วย D-glucose มาต่อกันเป็นสายโซ่ยาวด้วยพันธะ α (1 $\rightarrow$ 4) glycosidic โดยมีการแตกกิ่งก้านทุกๆ 8-12 หน่วย glucose ด้วยพันธะ α (1 $\rightarrow$ 6) glycosidic ซึ่ง glycogen 1 โมเลกุลประกอบด้วย glucose ประมาณ 10^5 หน่วยมาต่อกัน ในเนื้อเยื่อสัตว์จะพบ polysaccharide สะสมในรูปของ glycogen โดยเฉพาะในตับและกล้ามเนื้อ ซึ่งหน้าที่ glycogen ในเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิดจะต่างกัน glycogen ในกล้ามเนื้อ ทำหน้าที่เป็นพลังงานสำรองสำหรับการหดตัวของกล้ามเนื้อ (Morin and McLaughlin, 1973) ในขณะที่ glycogen ในตับทำหน้าที่ให้ glucose แก่เนื้อเยื่ออื่นๆ โดยทางกระแสเลือด (Verri *et al.*, 2001)

Glycogen ที่พบ ใน crustacean มีการสะสมในอวัยวะต่างๆ แตกต่างกันโดย Rosa and Nunes (2003) ศึกษาระดับ glycogen ของ deep-sea decapod crustacean 3 ชนิด ได้แก่ *Aristeus antennatus*, *Parapenaeus longirostris* และ *Nephrops norvegicus* ใน 3 อวัยวะ คือ เนื้อ (muscle), รังไข่ (ovary) และตับ (hepatopancreas) พบว่า glycogen มีอยู่ในตับเป็นส่วนใหญ่ ส่วนในเนื้อมีปริมาณน้อยกว่า นอกจากนี้ไม่เพียงแต่ ตับ เนื้อ และรังไข่ เท่านั้น ยังพบว่า เหงือกและเนื้อเยื่อได้กระดองมี glycogen ด้วย (Welcomme and Devos, 1991; Wang and Scheer, 1963)

นอกจาก glycogen จะพบในหลายอวัยวะ และแต่ละอวัยวะมีปริมาณ glycogen ที่แตกต่างกันแล้ว ยังพบว่า crustacean ที่อยู่ในสภาวะ stress ต่างๆ เช่น สภาวะที่มีออกซิเจนน้อย (hypoxia) สภาวะอดอาหาร (starvation) สภาวะเป็นโรค (disease) หรืออยู่ในช่วงที่มีการลอกคราบ (molting) ล้วนส่งผลให้ glycogen ในอวัยวะต่างๆ มีปริมาณที่แตกต่างกันด้วย ซึ่ง Salaenoi *et al.* (2006b) รายงานว่า mud crab (*Scylla serrata*) ที่อยู่ในช่วงวงจรการลอกคราบมีปริมาณ glycogen ในเนื้อและตับเปลี่ยนแปลงเป็นอย่างมากตลอดช่วงวงจรการลอกคราบเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อได้กระดองซึ่งมีจำนวนค่อนข้างคงที่ ส่วน Stentiford *et al.* (2000) รายงานว่า Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) ที่ถูก infect ด้วย dinoflagellate parasite *Hematodinium* sp. มีผลทำให้ glycogen ที่สะสมในเนื้อลดจำนวนลงอย่างชัดเจน นอกจากนี้ Torreblanca *et al.* (1992) ยังรายงานว่า red crayfish (*Procambarus clarkii*) ที่ได้รับสาร mercury ทำให้ glycogen ในเนื้อลดจำนวนลงเช่นกัน รวมทั้งสภาวะอดอาหารก็ยังพบว่าส่งผลทำให้ปริมาณ glycogen เปลี่ยนแปลงขึ้นลงไม่คงที่อีกด้วย (Pascual *et al.*, 2006)

Glucose

Glucose เป็นคาร์โบไฮเดรตหลักที่ทำหน้าที่ให้พลังงานกับร่างกาย สำหรับ decapod พบว่า glucose เป็นน้ำตาลที่พบมากที่สุด โดยส่วนใหญ่จะอยู่ในรูป monosaccharide หรืออาจพบอยู่ในรูป disaccharide บ้าง เช่น maltose และ trehalose นอกจากนี้ glucose อาจ form เป็น polymer ได้เป็น glycogen ซึ่งเก็บสะสมในตับ (Johnston and Davies, 1972)

สำหรับ crustacean นั้น glucose ส่วนใหญ่จะเก็บสะสมอยู่ในรูปของ glycogen เช่นเดียวกับสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม แต่เมื่อใดที่ร่างกายจำเป็นต้องใช้พลังงาน glycogen จะสลายเป็น glucose และปลดปล่อยออกมาตามกระแสเลือด ทั้งนี้พบว่าระดับ glucose ของ crustacean ถูกควบคุมด้วยฮอร์โมน crustacean hyperglycemic hormone (CHH) ซึ่งเป็น neurohormone พบที่ก้านคอ โดย Santos and Keller (1993b) รายงานว่า CHH จะทำหน้าที่เคลื่อนย้าย glucose ที่เก็บในรูปของ glycogen ในเนื้อเยื่อต่างๆ ผ่านกระบวนการ glycogenolysis ส่งผลให้มีระดับ glucose ในเลือดสูงขึ้น ซึ่ง glucose ที่เกิดจากการสลาย glycogen นี้สามารถเข้าสู่กระบวนการ glycolysis และ Krebs's cycle เพื่อผลิตเป็นพลังงาน แต่เมื่อใดที่อยู่ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน glucose จะเปลี่ยนเป็น pyruvate และ lactate ตามลำดับ (Santos and Keller, 1993a)

Lactate

Lactate เป็นสารอินทรีย์ที่เกิดจากกระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic respiration) โดยทั่วไป lactate จะอยู่ในรูป L-lactate และ D-lactate ซึ่งทั้งสองต่างเป็น isomer กัน สำหรับ crustacean จะพบ lactate ที่อยู่ในรูป L-lactate เท่านั้น (Pritchard and Eddy, 1979) การใช้พลังงานของร่างกายมีแหล่งของพลังงาน 3 แหล่งคือ แหล่งแรกเป็นแหล่งพลังงานจากระบบ ATP-PC (adenosine triphosphate-phosphocreatine) แหล่งที่สองคือ แหล่งพลังงานจากระบบแอโรบิก (aerobic system) และแหล่งที่สามคือ แหล่งพลังงานจากระบบแอนแอโรบิก (anaerobic pathway) โดยระบบนี้พลังงานได้จากการสลายอาหารประเภท glucose ที่ถูกเก็บสะสมอยู่ในรูปของ glycogen ทำให้ได้ ATP และ lactate เป็น end product ของปฏิกิริยา ซึ่ง lactate ที่เกิดขึ้นเป็น waste product และถ้าเกิดขึ้นในกล้ามเนื้อ เซลล์จะมีสถานะความเป็นกรดมากขึ้น (ชูศักดิ์ และ กันยา, 2536)

สำหรับ crustacean พบว่าสถานะที่ได้รับออกซิเจนน้อย (hypoxia) และได้รับอากาศ (aerial exposure) เช่น การขึ้นมาอยู่บนบก ทั้งสองสถานะล้วนส่งผลให้ crustacean เกิดกระบวนการ anaerobic metabolism โดย Morris *et al.* (2005) รายงานว่า freshwater crayfish (*Cherax destructor*) ที่อยู่ในสถานะ hypoxia มีผลทำให้ปริมาณ lactate ในเลือดเพิ่มขึ้น ส่วน Ridgway *et al.* (2006) รายงานว่า Norway lobsters (*Nephrops norvegicus*) ที่อยู่ในสถานะได้รับอากาศ (aerial exposure) มีทั้งปริมาณ glucose และ lactate ในเลือดเพิ่มขึ้น

Fatty acid

ไขมันเป็นสารชีวโมเลกุลที่เป็นแหล่งพลังงานให้กับเซลล์ เช่นเดียวกับคาร์โบไฮเดรต ไขมันที่เก็บสะสมในร่างกายสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ triglyceride เมื่อใดที่ร่างกายต้องการพลังงาน triglyceride จะเกิดการ hydrolyze เป็น glycerol และ free fatty acid สำหรับ crustacean พบว่ากระบวนการ catabolism ของไขมันเพื่อให้ได้พลังงานนั้นมีรูปแบบที่คล้ายคลึงกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและมีการขนย้ายไขมันไปยังอวัยวะต่างๆ โดยอาศัยอนุภาคของ lipoprotein เช่นกัน (Brichon *et al.*, 1980)

โดยปกติ fatty acid ที่พบในเซลล์ส่วนใหญ่มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างของโครงสร้าง fatty acid จะขึ้นอยู่กับความยาวของโมเลกุล จำนวนพันธะคู่ และโครงสร้างของโมเลกุลที่เชื่อมต่อกันเป็นลักษณะต่างๆ เช่น โมเลกุลที่เป็นสายยาว (aliphatic chain) เป็นวง

(aromatic ring) และกิ่งก้านสาขา (branch chain) (Chow, 2000) ดังนั้นโดยทั่วไปจึงมักจำแนกชนิดของ fatty acid ตามชนิดของพันธะ ซึ่งจำแนกเป็น 2 ชนิดคือ saturated fatty acid และ unsaturated fatty acid สำหรับ saturated fatty acid เป็น fatty acid ที่มีพันธะเดี่ยวในโมเลกุลไม่มีพันธะคู่ ส่วน unsaturated fatty acid เป็น fatty acid ที่มีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุล และสามารถจำแนกตามจำนวนพันธะคู่ที่ปรากฏในโมเลกุลได้อีกเป็น fatty acid ที่มีพันธะคู่ในโมเลกุลเพียง 1 พันธะ เรียกว่า monounsaturated fatty acid (MUFA) และ fatty acid ที่มีพันธะคู่ในโมเลกุลมากกว่า 1 พันธะ เรียกว่า polyunsaturated fatty acid (PUFA)

Fatty acid ที่พบในเซลล์ส่วนใหญ่มีคาร์บอนตั้งแต่ 14 ถึง 24 อะตอม ใน crustacean พบ fatty acid หลายชนิดด้วยกัน สำหรับ fatty acid กลุ่ม unsaturated ส่วนใหญ่ที่พบคือ palmitic acid (C16:0) และ stearic acid (C18:0) กลุ่ม MUFA คือ oleic acid (C18:1) ส่วนกลุ่ม PUFA คือ eicosapentaenoic acid (C20:5 n3; EPA) และ docosahexaenoic acid (C22:6 n3; DHA) นอกจากจะพบ fatty acid หลายชนิดแล้วยังพบว่า fatty acid แต่ละชนิดมีปริมาณที่แตกต่างกันด้วย โดย Naczka *et al.* (2004) รายงานว่า green crab (*Carcinus maenas*) มีปริมาณ palmitic acid และ stearic acid อยู่ในช่วง 9.17 – 11.7% และ 6.05 – 6.32 % ตามลำดับ ส่วน oleic acid พบอยู่ในช่วง 10.3 – 13.1% สำหรับปริมาณ PUFA นั้นอยู่ในช่วง 47.1 – 50.5% นอกจากนี้ Celik *et al.* (2004) รายงานว่า fatty acid ใน blue crab (*Callinectes sapidus*) มีการสะสมในอวัยวะต่างๆ แตกต่างกันด้วย คือ total n-6 fatty acid มีการสะสมในตับมากที่สุดคือ 8.61% รองลงมาคือ เนื้อที่ก้าม และเนื้อที่อก ซึ่งมีปริมาณ 7.80% และ 5.34 % ตามลำดับ

เนื่องจาก fatty acid ที่พบใน crustacean มีหลายกลุ่มและแต่ละกลุ่มมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน ดังนั้น fatty acid แต่ละกลุ่มจึงมีบทบาทในกระบวนการ metabolism ที่แตกต่างกันด้วย คือ นอกจาก fatty acid มีบทบาทในเรื่องของการให้พลังงานแล้วยังพบว่า fatty acid มีบทบาทในเรื่องโครงสร้างของเซลล์ด้วย โดย fatty acid กลุ่ม saturated และ MUFA นั้นส่วนใหญ่จะมีบทบาทในการให้พลังงาน โดย Vosloo *et al.* (2002) รายงานว่า freshwater prawn ที่ได้รับ stress คือสาร copper มีผลทำให้ fatty acid ในกลุ่ม saturated และ MUFA ซึ่งได้แก่ C14:0, C15:0, C16:0, C16:1 และ C18:0 มีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจากเกิดกระบวนการ catabolism เพื่อให้ได้พลังงาน ส่วน Heras *et al.* (2000) รายงานว่า shrimp ชนิด *Macrobrachium borellii* ที่อยู่ในช่วง development stage พบ MUFA เป็น fatty acid หลักที่อยู่ในโครงสร้างของ triacylglycerol โดยมักจะมีการสลายเพื่อให้ได้พลังงาน ในขณะที่ PUFA นั้นส่วนใหญ่เป็นองค์ประกอบของ phospholipids ซึ่งเป็น structural lipid ที่ membrane นอกจากนี้ Bell and Sargent (2003) รายงานว่า EPA และ arachidonic acid

(ARA) มีบทบาททั้งเป็น structure membrane และเป็น precursor ในการสังเคราะห์สาร prostaglandin อีกด้วย

2.2 สารชีวโมเลกุลที่เป็นโครงร่าง

โครงร่าง crustacean มีลักษณะแข็ง (hard exoskeleton) โดยทั่วไปใน ส่วน integument ของ crustacean ประกอบด้วย 4 ชั้น คือ epicuticle, exocuticle, endocuticle และ membranous layer ชั้น epicuticle เป็นชั้นที่อยู่ด้านนอกสุด และบางที่สุด ประกอบด้วย lipoprotein ร่วมกับเกลือ แคลเซียมและสารอินทรีย์ เป็นชั้นที่ไม่มี chitin ส่วนชั้น exocuticle และ endocuticle มีองค์ประกอบที่คล้ายกันคือ เป็นชั้นของ chitin-protein microfibrils ส่วนชั้น membranous layer เป็นชั้นที่อยู่ ในสุด ประกอบด้วย chitinoprotein เช่นกัน แต่ไม่มีการสะสมของเกลือแคลเซียม (Warner, 1977)

เนื่องจาก chitin เป็นคาร์โบไฮเดรตที่พบอยู่ทั้งชั้น exocuticle และ endocuticle เกิดขึ้น จาก monomer ของ *N*-acetyl- β -D-glucosamine มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β - (1-4)-glycosidic จน เป็นสายของ polymer จึงมีบทบาททำให้โครงสร้างมีความแข็งแรง โดยทั่วไป chitin ที่พบจะมีผลึก ที่แตกต่างกันแบ่งได้เป็น 3 ประเภทตามลักษณะการเรียงตัวของสายโซ่ คือ β -chitin, α -chitin และ γ -chitin สำหรับ β -chitin จะมีการเรียงตัวของสายโซ่ทางเดียวกัน ส่วน α -chitin มีการเรียงตัวแบบ สวนทิศทางสลับกัน ในขณะที่ γ -chitin จะมี 2 สายที่เรียงขนานกัน ส่วนอีกสายเรียงตัวในทิศทาง ตรงกันข้าม ดังนั้นความแตกต่างในการเรียงตัวจึงทำให้ chitin แต่ละชนิดมีความแข็งแรงแตกต่างกัน ซึ่งพบว่า α -chitin เป็นโครงสร้างที่มีความแข็งแรงที่สุด โดยจะมีการเรียงตัวอย่างหนาแน่นเกิดเป็น chitin microfibril ซึ่งจะพบโครงสร้างแบบ α -chitin ในพวก crustacean ในขณะที่โครงสร้างแบบ β -chitin และ γ -chitin เป็นโครงสร้างที่ไม่แข็งแรงมากนักซึ่งพบในพวกแมลงและผนังเซลล์ของยีสต์ (Merzendorfer and Zimoch, 2003)

เนื่องด้วย crustacean cuticle มี chitin เป็นองค์ประกอบสำคัญ ดังนั้นในกระบวนการ ลอกคราบ จะมี 2 เหตุการณ์เกิดขึ้น คือ การสังเคราะห์ chitin ในกระดองใหม่ และการสลาย chitin ในกระดองเก่า ซึ่งจะทำให้การลอกคราบเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งเหตุการณ์ทั้งสองนี้ล้วน เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ทั้งสิ้น สำหรับการสังเคราะห์ chitin นั้นเริ่มต้นจาก precursor คือ glucose ซึ่ง Horst (1990) รายงานว่าเริ่มขึ้นจากการที่เอนไซม์ dolichol kinase นำหมู่ phosphate มาต่อกับ dolichol ได้เป็น dolichol-1-P หลังจากนั้น dolichol-1-P จะเข้าสู่กระบวนการ glycosylation โดย อาศัยการทำงานของเอนไซม์ *N*-acetylglucosamine-1-P transferase ซึ่งนำ *N*-acetylglucosamine

(GlcNAc) มาต่อเข้ากับ dolichol-1-P ต่อจากนั้นเอนไซม์ oligosaccharyl transferase จะนำ oligosaccharide มาต่อเข้ากับ protein ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างของ chitoprotein แล้วมีการเคลื่อนย้ายเข้าสู่ Golgi apparatus เพื่อสร้างเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ของ chitin โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ chitin synthetase ร่วมกับการทำงานของเอนไซม์อื่นๆ เช่น transglycosylase, transpeptidase จนสุดท้ายเกิดเป็น chitin protein complex อยู่ที่ชั้น cuticle ของ crustacean สำหรับกระบวนการสลาย chitin นั้นเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในกลุ่ม chitolytic enzyme ได้แก่ chitinase และ chitobiase โดย chitinase จะสลาย chitin เป็น oligomer และ trimer ของ *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) ต่อจากนั้น chitobiase จะย่อยต่อจนเป็น monomer ในที่สุด (Espie and Roff, 1995)

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์และสารที่เป็นองค์ประกอบของ chitin ในวงจรการลอกคราบนั้น Salaenoi *et al.* (2004) รายงานว่า mud crab (*Scylla serrata*) มีกิจกรรมของ chitinase สูงในเนื้อเยื่อได้กระดองในช่วงก่อนการลอกคราบ 2 วัน และต่ำลงในระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ chitobiase นั้นสูงที่สุดในช่วงก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (Salaenoi *et al.*, 2006b) และมีปริมาณ *N*-acetylglucosamine สูงในเนื้อเยื่อได้กระดองตลอดวงจรการลอกคราบ เมื่อเทียบกับเลือดและเหงือกซึ่งมีปริมาณ GlcNAc ที่ต่ำกว่า (Salaenoi *et al.*, 2006c)

นอกจากนี้ยังพบว่าการได้รับ stress เช่น สารเคมีบางชนิดอาจมีผลต่อกระบวนการสร้าง chitin โดยส่วนใหญ่จะไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์หรือสลาย chitin โดย Walker *et al.* (2005) รายงานว่าสาร metoprene ซึ่งเป็น pesticide ชนิดหนึ่งจะยับยั้ง pathway การสังเคราะห์ cuticle ของ lobster (*Homarus americanus*) ทำให้การสังเคราะห์ chitin เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่ม chitinolytic bacteria เช่น *Aeromonas*, *Pseudomonas* และ *Vibrio* มีผลต่อการสลายของ chitin ด้วย (Bayer *et al.*, 1989; Prince, 1997) โดย bacteria เหล่านี้จะเข้าทำลาย epicuticle ของ crustacean ทำให้เกิด lesion, ulcer และ erosion ของ exoskeleton (Malloy, 1978; Floreto *et al.*, 2000)

2.3 สารชีวโมเลกุลที่เป็นรงควัตถุ

รงควัตถุที่พบในสิ่งมีชีวิตทั่วไปสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีหน้าที่ทำให้เกิดสี เช่น carotenoid, melanin และกลุ่มที่มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการ metabolism เช่น cytochromes (Goodwin, 1960)

Carotenoid มีโครงสร้างพื้นฐานจาก isoprenoid 8 โมเลกุลมาเชื่อมต่อกันเป็น acyclic $C_{40}H_{56}$ โดย Greenberg (1968) ได้แบ่ง carotenoid ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีคือ carotene และ xanthophylls สำหรับ carotene นั้นเป็น โมเลกุลของ $C_{40}H_{56}$ carotene ซึ่งประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเดี่ยวสลับคู่ และที่ปลายข้างหนึ่งหรือทั้งสองปลายจะมีอะตอมคาร์บอนมาเกาะเป็นวงเรียกว่า ionone ring ตัวอย่างของ carotene ได้แก่ β -carotene, α -carotene และ γ -carotene ส่วน xanthophylls เป็น โมเลกุลที่เกิดจากการเพิ่มออกซิเจนเข้าไปในโมเลกุลของ carotene ตัวอย่างของ xanthophylls ได้แก่ echinenone, canthaxanthin, astaxanthin เป็นต้น

ใน crustacean โดยเฉพาะกุ้งและปู carotenoid จะรวมอยู่กับโปรตีน เรียกว่า carotenoprotein ทำให้ได้เป็นสีน้ำเงินหรือเทาอมเงิน แต่เมื่อใดที่โปรตีนถูกทำลายจะทำให้ carotenoid อยู่เป็นอิสระจึงปรากฏเป็นสีแดง (Garate *et al.*, 1984) crustacean ส่วนใหญ่มี carotenoid สะสมอยู่ในหลายอวัยวะ ได้แก่ กระดอง เลือด ตับ รังไข่ เนื้อเยื่อใต้กระดอง และตา ซึ่ง carotenoid ที่พบในอวัยวะเหล่านี้โดยเฉพาะ กุ้ง ปู ส่วนใหญ่คือ astaxanthin และ β -carotene โดย Katayama *et al.* (1971) รายงานว่า prawn *Pandalas borealis* และ *Penaeus japonicus* มี β -carotene มากในตับ ส่วน astaxanthin มีปริมาณมากใน epidermis และกระดองซึ่งในกระดองมี astaxanthin อยู่ถึง 90% ส่วน hermit crab (*Pagurus prideauxi*) มี astaxanthin อยู่ในรูป free astaxanthin 69% ในกระดองแต่ใน epidermis มีทั้ง free astaxanthin และ esterified astaxanthin ซึ่งมี 38.71% และ 21.44% ตามลำดับ ส่วนตับพบ β -carotene อยู่ 7.09% (Castillo *et al.*, 1980)

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุที่พบใน crustacean นั้นพบว่า ฮอร์โมน อาหาร การลอกคราบ หรือแม้แต่การเกิดโรค ล้วนมีผลทำให้ปริมาณ carotenoid เปลี่ยนแปลงไป โดย Howell and Matthews (1991) รายงานว่า tiger shrimp (*Penaeus monodon*) ที่ได้รับอาหารที่มีปริมาณ carotenoid ต่ำ มีผลทำให้เกิดโรค blue disease ส่วน Stentiford *et al.* (2002) รายงานว่า edible crab (*Cancer pagurus*) ที่ติดเชื้อ parasitic dinoflagellate *Hematodinium* จะมีสีแดงที่กระดอง และรอยากค์ เข้มมากคือเกิดภาวะ hyperpigmentation โดยเรียกโรคนี้ว่า Pink Crab Disease (PCD) นอกจากนี้ Gaillard *et al.* (2004) รายงานว่า freshwater amphipod ชนิด *Gammarus roeseli* ที่ถูก infect ด้วย acanthocephalan parasite (*Polymorphus minutus*) ส่งผลให้ carotenoid ชนิดต่างๆ ได้แก่ astaxanthin, β -carotene, lutein, zeaxanthin และ β -cryptoxanthin มีปริมาณลดลง

3. ลักษณะและอาการของปูที่มีอาการท้องแดง

ปูที่มีอาการท้องแดงที่พบโดยทั่วไปมีลักษณะดังนี้คือ บริเวณอกและท้องจะมีลักษณะเป็นสีแดง โดยอาจจะแดงเป็นแถบๆ หรือแดงบริเวณท้องทั้งหมด ซึ่งแตกต่างจากปูปกติที่มีอกและท้องเป็นสีขาวขุ่น (ภาพผนวก ก) ปูที่มีอาการท้องแดงเป็นปูที่ไม่แข็งแรง โพรก กระจกไม่แข็งแรง เหมือนปูปกติ ไม่ค่อยกินอาหาร การเคลื่อนไหวของขาทำได้ช้าและในที่สุดขาและก้ามจะไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ และตายในที่สุด เมื่อเปิดดูอวัยวะภายในของปูท้องแดงพบว่าอวัยวะภายในเสียหาย เช่น เลือดมีสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม ซึ่งปูปกติจะมีเลือดใสไม่มีสีแต่เมื่อรวมกับออกซิเจนเลือดจะมีสีฟ้าออกน้ำเงิน นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อปูใกล้ตายจะขึ้นจากน้ำมาอาศัยอยู่บนบก

จากลักษณะและอาการของปูที่มีอาการท้องแดงที่ได้กล่าวมาข้างต้น จึงสันนิษฐานว่า องค์ประกอบทางชีวโมเลกุลอาจมีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างจากปูปกติ ซึ่งลักษณะของสีแดงที่ปรากฏขึ้นอาจเกี่ยวข้องกับสารสีชนิด carotenoid และการที่ปูขึ้นมาอาศัยอยู่บนบกก่อนที่จะตายนี้แสดงให้เห็นว่าระบบการหายใจน่าจะมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมคือไม่สามารถหายใจในน้ำได้เหมือนปูปกติ ผนวกกับปูที่มีอาการท้องแดงที่นำมาศึกษาเป็นปู 2 กระจกและไม่สามารถลอกคราบได้ กระจกไม่แข็งแรงเหมือนกับปูปกติ อาจมีผลเกี่ยวเนื่องทำให้องค์ประกอบทางชีวโมเลกุลที่อยู่ที่กระจกมีการเปลี่ยนแปลงไป เช่น glucosamine, *N*-acetylglucosamine, chitin รวมไปถึง องค์ประกอบทางชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการให้พลังงานเช่น glycogen, glucose, lactate และ lipid อาจมีการเปลี่ยนแปลงด้วย เนื่องจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปูที่มีลักษณะอาการดังกล่าวมีการศึกษาน้อยมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้อาจเป็นประโยชน์ในการชี้แสดงลักษณะอาการดังกล่าวและอาจเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาเพื่อการเพาะเลี้ยงปูในเชิงพาณิชย์ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ

คัดเลือกปูทะเลสภาพปกติที่อยู่ในระยะกระดองแข็ง (intermolt) และปูทะเลที่มีอาการท้องแดงซึ่งมีเลือดเป็นสีน้ำตาลอม จาก อ. ชลุม จ. จันทบุรี ซึ่งมีขนาดความกว้างของกระดองประมาณ 12-15 เซนติเมตร จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างอวัยวะต่างๆ ได้แก่ เหงือก (gill) เนื้อเยื่อใต้กระดอง (integument) ตับ (hepatopancreas) เนื้อ (muscle) และ เลือด (haemolymph) โดยนำปูแช่ในน้ำที่เย็นจัดเป็นเวลาประมาณ 1 นาทีเพื่อให้ปูสลบ แล้วจับตัวปูให้แห้งด้วยผ้าที่สะอาด ทำความสะอาดบริเวณขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 ด้วย 70% ethanol จากนั้นจึงใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 21 ซึ่งทำให้ชุ่มด้วย 10% trisodium citrate (เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด) เจาะเลือดปูบริเวณขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 แล้วนำตัวอย่างเลือดเก็บในหลอดพลาสติก ทั้งตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อต่างๆ เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป (ส่วนกระดอง ตัดเฉพาะฝากระดองด้านบน ล้างทำความสะอาดแล้วเก็บที่อุณหภูมิเดียวกัน)

2. การวิเคราะห์ glycogen

วิเคราะห์ glycogen คัดแปลงจากวิธีการของ Carroll *et al.* (1955) โดยนำเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ตับ เนื้อ ตัวอย่างละ 1 กรัม และเลือดปริมาตร 1 ml บดผสมกับ 5% trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 5 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 4,500 g เป็นเวลา 15 นาที เท supernatant ผ่านกระดาษกรองแล้วนำมาเติม 95% ethanol ลงไป 5 เท่าของปริมาตร supernatant ที่ได้ ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 g นาน 15 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งไป เติมน้ำกลั่นลงไป 2 ml เพื่อละลาย glycogen ที่เกาะติดอยู่ข้างหลอด นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ glycogen โดยแบ่งหลอดทดลองออกเป็น 3 กลุ่มโดยเติมตัวอย่าง glycogen ที่ละลายด้วยน้ำกลั่น 2 ml ลงในหลอดทดลอง ส่วนหลอดควบคุมเติมสารละลายมาตรฐาน glucose (ภาคผนวก ข) ส่วนหลอดที่ใช้เป็น blank เติมน้ำกลั่น หลอดละ 2 ml ตามลำดับ (โดยแต่ละกลุ่มทำ 3 ซ้ำ) หลังจากนั้นเติมสารละลาย anthrone (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 8 ml ลงไปในทุกหลอด ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาทีและทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำแข็ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

3. การวิเคราะห์ glucose

วิเคราะห์ glucose คัดแปลงจากวิธีของ Folin and Wu (1920) โดยนำเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ตับ และเนื้อ ตัวอย่างละ 0.5 กรัม ส่วนเลือดใช้ปริมาตร 0.1 ml ตกตะกอนโปรตีนโดยบดตัวอย่างใน 5% TCA ปริมาตร 3 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 g นาน 5 นาที กรอง supernatant ส่วนตะกอนนำมาตกตะกอนโปรตีนซ้ำอีก 2 รอบ สำหรับการตกตะกอนโปรตีนในเลือดทำโดยใส่สารละลาย 0.05 M H_2SO_4 ปริมาตร 800 μ l , ตัวอย่างเลือด 100 μ l , 10% sodium tungstate 100 μ l และน้ำกลั่น 2 ml ลงในหลอดทดลองโดยเติมสารเรียงตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 4,500 g นาน 5 นาที นำส่วน supernatant มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณ glucose โดยใส่ supernatant ของตัวอย่างที่ตกตะกอนโปรตีนแล้ว หลอดละ 1.5 ml ส่วนหลอดควบคุมใส่สารละลายมาตรฐาน glucose (ภาคผนวก ข), หลอดที่เป็น blank เติมน้ำกลั่น หลอดละ 1 ml ตามลำดับ (โดยแต่ละกลุ่มทำ 3 ซ้ำ) จากนั้นเติม Alkaline copper II tartrate (ภาคผนวก ข) ลงในหลอดๆ ละ 1 ml นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำหลอดแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที จากนั้นเติมสารละลาย phosphomolybdic acid (ภาคผนวก ข) หลอดละ 1 ml ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำจนมีปริมาตรครบ 5 ml ในแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายมีสีเข้มสุดประมาณ 5 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร

4. การวิเคราะห์ lactate

วิเคราะห์ lactate คัดแปลงจากวิธีการของ Gutmann and Wahlefeld (1974) โดยนำเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ตับ เนื้อ ตัวอย่างละ 1 กรัม ส่วนเลือดใช้ปริมาตร 0.5 ml บดผสมกับ 1N perchloric acid ที่เย็นจัด 5 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 3,000 g นาน 10 นาที นำเฉพาะ supernatant มาปรับปริมาตรด้วย 1N perchloric acid ให้ได้ปริมาตรรวม 5 ml หลังจากนั้นเติม 0.05 % methyl orange ปริมาตร 20 μ l และ 5 M K_2CO_3 ลงไป 100 μ l โดยเติมสารเรียงตามลำดับ แล้วทำการ neutralize โดยเติม 5 M K_2CO_3 ที่ละหยดจนค่า pH อยู่ในช่วง 3.5 ในขณะที่ทำการ neutralize ต้องทำในที่เย็นและคนด้วย magnetic stirrer ตลอดเวลา หลังจากนั้นใช้ส่วนของ supernatant ที่ได้นี้ ปริมาตร 0.2 ml วิเคราะห์หาปริมาณ lactate โดยเติม hydrazine/glycine buffer (ภาคผนวก ข) 2.5 ml, 40 mM nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 0.2 ml และ supernatant ของตัวอย่างที่ตกตะกอนโปรตีนแล้ว 0.2 ml ตามลำดับ ส่วน blank จะไม่เติม supernatant ของตัวอย่างแต่เติม 1N perchloric acid ปริมาตร 0.2 ml ลงไปแทนแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร หลังจากนั้นเติม เอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) ปริมาตร 20 μ l แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งหนึ่งที่

340 นาโนเมตร

5. การวิเคราะห์ fatty acid

สกัดหาค่าประกอบของ fatty acid คัดแปลงจากวิธีของ Folch *et al.* (1957) โดยนำตัวอย่าง เนื้อเยื่อได้กระดอง ตับ เนื้อ และเลือด อบแห้งที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำมาบดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 0.25 กรัม แล้วเติมสาร internal standard คือ 2 % pentadecanoic acid (C15:0) 100 µl ลงไปเขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมตัวทำละลายอินทรีย์ chloroform-methanol (2:1) ปริมาตร 5 ml เขย่าให้เข้ากันนาน 2 นาทีแล้วจึงเติม 0.88% KCl ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 g เป็นเวลา 10 นาที จะสังเกตการแยกชั้นของตัวทำละลาย จากนั้นเก็บส่วนชั้นของ chloroform แยกใส่หลอดใหม่เพื่อทำ fatty acid ให้อยู่ในรูปของ methyl ester (derivatization) โดยใช้วิธีของ Holub and Skeaff (1987) นำไขมันที่อยู่ในชั้น chloroform ที่แยกได้ มาระเหยแห้งที่ 40 °C ด้วยเครื่อง rotary evaporator จนเหลือไขมันแห้งติดเครื่องแก้ว จากนั้นทำ transesterification โดยเติมส่วนผสมของ 6% H₂SO₄ ใน methanol ปริมาตร 2 ml เขย่าประมาณ 30 วินาที ย้ายใส่หลอดที่มีฝาปิดแล้วนำไปให้ความร้อนที่ 80 °C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำหลอดทดลองตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็นแล้วจึงเติม petroleum ether ปริมาตร 2 ml เขย่า 1 นาทีแล้วล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ml เขย่า 30 วินาที เก็บส่วนของกรดไขมันที่ละลายอยู่ในชั้น petroleum ether ใส่ลงในหลอด vial นำไประเหยตัวทำละลายออกโดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน (N₂) จนแห้ง แล้วเติม hexane 800 µl เพื่อละลาย fatty acid เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวิเคราะห์หาค่าประกอบของ fatty acid โดยใช้เครื่อง gas chromatography (GC-2010, Shimadzu, Japan) คอลัมน์ที่ใช้เป็นชนิด capillary (DB-Wax) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ที่เคลือบภายในด้วยแผ่นฟิล์มหนา 0.5 ไมโครเมตร ใช้ระบบตรวจแบบ flame ionization detector (FID) อุณหภูมิคอลัมน์ที่ใช้งานเริ่มที่ 170 °C – 240 °C โดยเพิ่มอุณหภูมิอัตรา 2 °C/นาที และอุณหภูมิของ injection ที่ใช้เท่ากับ 230 °C ฉีดตัวอย่างปริมาตร 1 µl และใช้อัตราการแบ่งตัวอย่าง (split rate) เท่ากับ 1:20 วิเคราะห์ชนิดของ fatty acid ในตัวอย่างโดยเปรียบเทียบเวลาคงตัว (retention time) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณทำได้โดยคำนวณเปรียบเทียบ peak area ของตัวอย่างกับ standard fatty acid ชนิดต่างๆ ได้แก่ myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), linolenic acid (C18:3), arachidonic acid (C20:4), eicosapentaenoic acid (C20:5) และ docosahexaenoic acid (C22:6) (Sigma, St. Louis, MO, USA)

6. การวิเคราะห์ glucosamine (GlcN) และ N-acetylglucosamine (GlcNAc)

นำตัวอย่างเหงือก เนื้อเยื่อได้กระดอง ดับ และ เนื้อ ออบแห้งที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำมาบดให้ละเอียด ใช้เนื้อเยื่อแต่ละชนิดอย่าง ละ 0.05 กรัม ส่วนเลือดนั้นใช้ ปริมาตร 0.5 ml นำมาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ปฏิกริยา คือ ปฏิกริยาแรกไฮโดรไลซ์ ด้วย 1 M HCl ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนปฏิกริยาที่สอง ไฮโดรไลซ์ด้วย 1 M H₂SO₄ ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 g นาน 15 นาที นำ supernatant ของตัวอย่างที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ความเข้มข้นของกรด ลดลงเหลือ 0.25 M เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange chromatography) ตามวิธีของ Regnault (1996)

ในการเตรียมคอลัมน์ที่ใช้แยก glucosamine และ N-acetylglucosamine นั้นใช้ syringe ขนาด 15 x 80 mm ที่ภายในบรรจุอนุภาคเรซินที่มีประจุบวก (Dowex 50W-X4, 100-200 mesh, H⁺ form) ซึ่งก่อนใช้ต้องทำการกระตุ้นเรซินก่อนโดยนำเรซินแช่น้ำกลั่นทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วล้างด้วย 2 M NaOH, 2M HCl และน้ำกลั่นตามลำดับ จะได้เรซินที่พร้อมสำหรับใช้งานหลังจากนั้นจึงแยก glucosamine โดยนำตัวอย่าง (supernatant) ที่เจือจางความเข้มข้นกรดจนเหลือ 0.25 M ใส่ลงใน คอลัมน์แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 5 ml เพื่อชะตัวอย่างที่ไม่มีประจุออกจากคอลัมน์ หลังจากนั้นจึงชะคอลัมน์ด้วย 2M HCl และเก็บสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากคอลัมน์ประมาณ 12 ml เพื่อนำไปหาปริมาณ glucosamine ต่อ โดยวิธีการของ Hancock (2001) โดยนำสารที่ได้จากคอลัมน์ (fraction) ปริมาตร 0.6 ml ใส่หลอดทดลองที่มีฝาปิด แล้ว neutralize ด้วย 2 M Na₂CO₃ ปริมาตร 0.4 ml เขย่าเบาๆ หลังจากนั้นทำให้เย็น โดยตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม absolute ethanol จำนวน 1 ml , Ehrlich reagent 0.5 ml (ภาคผนวก ข) เขย่าอย่างแรงเพื่อกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณโดยเทียบกับ กราฟมาตรฐาน glucosamine (ภาคผนวก ข) สำหรับปริมาณ N-acetylglucosamine คำนวณจากการลบออกจาก ปริมาณ total glucosamine (ภาคผนวก ข)

7. การวิเคราะห์ chitin

วิเคราะห์ chitin ดัดแปลงจากวิธีการของ Naczek *et al.* (1981) โดยนำกระดองปูที่ตัดออกล้าง น้ำให้สะอาด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วบดให้ละเอียด จากนั้นกำจัดเกลือแร่ (แคลเซียมคาร์บอเนต) โดยแช่กระดองปูบด 4 กรัม ในสารละลาย 1 M HCl อัตราส่วน 1: 10 คน

เป็นระยะในช่วงแรกเนื่องจากเกิดฟองแก๊ส ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน แล้วล้างสารละลายกรดออกด้วยน้ำกลั่นจนน้ำที่ล้างเป็นกลางต่อกระดาษวัดค่า pH และอบที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาผ่านขั้นตอนการกำจัดโปรตีนโดยนำกระดองปูแช่ในสารละลาย 4% NaOH ในอัตราส่วน 1: 20 คนให้เข้ากัน แช่ทิ้งไว้ 1 คืน หลังจากนั้นกรองเอาสารละลาย NaOH ออก แล้วทำซ้ำโดยเติม 4% NaOH ในอัตราส่วนเดิม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเทสารละลายล้างออกแล้วล้างกระดองปูด้วยน้ำกลั่นจนน้ำที่ล้างเป็นกลางและล้างต่อด้วย absolute ethanol อีก 2 ครั้ง ต่อจากนั้นทำการกำจัดรงควัตถุโดยล้างด้วย acetone อีก 3 ครั้ง นำไปอบให้แห้ง ชั่งน้ำหนักและคิดคำนวณเป็น % chitin (dry weight)

8. การวิเคราะห์รงควัตถุ

8.1 Total carotenoid

วิเคราะห์ปริมาณ carotenoid โดยดัดแปลงจากวิธีของ Saito and Regier (1971) นำเนื้อเยื่อแต่ละชนิด 1-8 กรัม บดรวมกับ acetone 3 ครั้งๆ ละ 20 ml แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman # 4) จากนั้นนำสารละลาย acetone ที่กรองได้ใส่ในกรวยแยก (separatory funnel) และเติม petroleum ether 20 ml หมุนกรวยแยกเพียงเบาๆ รงควัตถุจะแยกอยู่ในชั้นของ petroleum ether ซึ่งอยู่ชั้นบน ทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้สารละลายแยกชั้นอย่างชัดเจน แล้วปล่อยสารละลายชั้นล่างลงในกรวยแยกใบที่ 2 เติม petroleum ether อีก 20 ml ลงในกรวยแยกใบที่ 2 หมุนกรวยเบาๆ ทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้นแล้วปล่อยสารละลายชั้นล่างทิ้ง นำสารละลายชั้นบนในกรวยแยกใบที่ 2 รวมลงในกรวยแยกใบแรก เติมน้ำกลั่นลงไป 20 ml หมุนกรวยแล้วตั้งทิ้งไว้จะสังเกตเห็นการแยกชั้น แล้วจึงปล่อยสารละลายชั้นล่างทิ้ง ล้างต่อด้วยน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำสารละลายชั้นบนใส่ในบีกเกอร์ที่มี Na₂SO₄ (anhydrous) 10 กรัม แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง ปริมาตรด้วย petroleum ether จนได้ปริมาตร 25 ml นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 468 นาโนเมตร

8.2 Astaxanthin และ β -carotene

ขจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศ (rotary evaporator) จนสารสกัด carotenoid แห้ง (crude extract) จากนั้นจึงละลายสารสกัดด้วย hexane 1 ml และใช้เทคนิค TLC วิเคราะห์หาชนิดของ carotenoid โดยหยดตัวอย่างสารสกัดประมาณ 5-20 μ l ลงบน TLC plate ที่เคลือบซิลิกาเจล (Merck, ขนาด 20 x 20 cm หนา 0.25 mm) และหยดสารมาตรฐาน astaxanthin

และ β -carotene (ภาคผนวก ข) ไว้ตรงกลาง จากนั้นย้ายแผ่น TLC ที่หยดสารเรียบร้อยแล้วลงในถังแก้วที่มี developing solvent ประกอบด้วย hexane : acetone (75 : 25) เพื่อวิเคราะห์ชนิดของแคโรทีนอยด์โดยเปรียบเทียบค่า R_f ซึ่ง astaxanthin และ β -carotene จะมีค่า R_f เท่ากับ 0.36 และ 0.98 ตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ astaxanthin และ β -carotene ทำได้โดยนำแผ่น TLC ที่ผ่านการ develop แล้ว ใส่ในส่วนหนึ่งของเครื่อง fluorodensitometer (CAMAG, TLC Scanner) โดยตั้งสภาวะของเครื่องดังนี้คือ ใช้หลอดชนิด tungsten (W) lamp การตรวจวัด (measurement mode) ใช้ fluorescence / remission mode และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 468 นาโนเมตร เพื่อหา astaxanthin และ 450 นาโนเมตร เพื่อหา β -carotene ตามลำดับ โดยวิเคราะห์หาปริมาณเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน astaxanthin และ β -carotene (ภาคผนวก ข) โดยใช้โปรแกรม Win CATS software

9. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างปลูกดีและปลูกที่มีอาการท้องแดงแล้ววิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ผลและวิจารณ์

1. Glycogen

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ glycogen ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง พบว่า เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ และเนื้อ ของปูปกติมี glycogen อยู่ 0.4976 ± 0.0353 , 2.4519 ± 0.0452 , 0.7664 ± 0.0667 และ 0.8609 ± 0.0912 mg/g wet weight ตามลำดับ สำหรับเลือดมี 0.0240 ± 0.0186 mg/ml haemolymph ส่วน เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ และเนื้อ ของปูที่มีอาการท้องแดงมี glycogen 0.4602 ± 0.0100 , 2.1471 ± 0.0844 , 0.5525 ± 0.0593 , 0.2097 ± 0.0122 mg/g wet weight ตามลำดับ ส่วนเลือดมี 0.0070 ± 0.0053 mg/ml haemolymph (ตารางที่ 1, ภาพที่ 1)

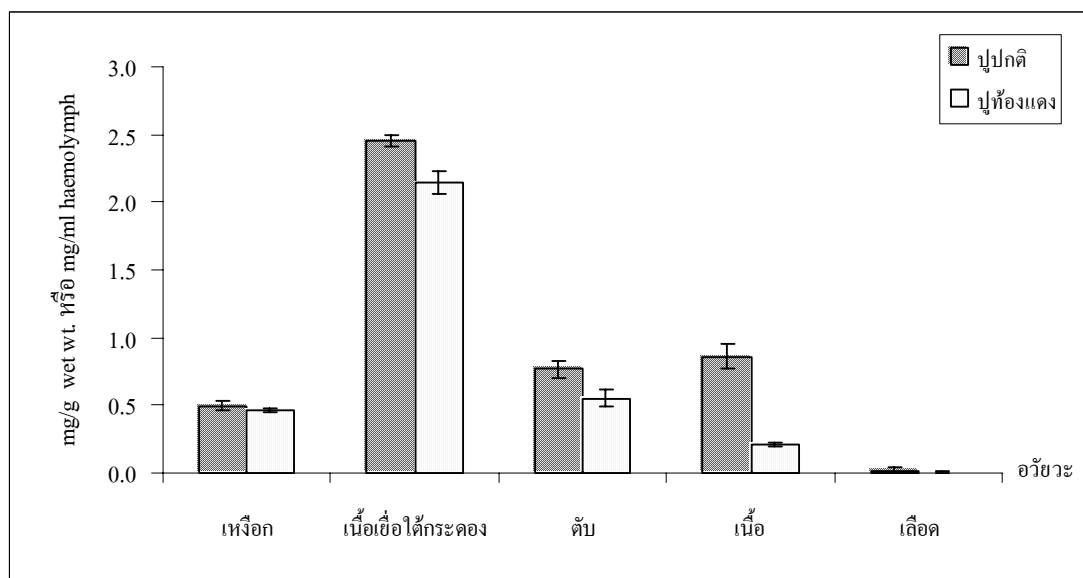
ตารางที่ 1 ปริมาณ glycogen ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ เนื้อ และเลือดของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง

เนื้อเยื่อ/อวัยวะ	ปริมาณ glycogen (mg/g wet weight หรือ mg/ml haemolymph)	
	ปูปกติ	ปูท้องแดง
เหงือก	0.4976 ± 0.0353^a	0.4602 ± 0.0100^a
เนื้อเยื่อใต้กระดูก	2.4519 ± 0.0452^b	2.1471 ± 0.0844^a
ดับ	0.7664 ± 0.0667^b	0.5525 ± 0.0593^a
เนื้อ	0.8609 ± 0.0912^b	0.2097 ± 0.0122^a
เลือด	0.0240 ± 0.0186^a	0.0070 ± 0.0053^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (superscript) ในแถวเดียวกัน แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

เป็นที่น่าสังเกตว่าเนื้อเยื่อที่มีการสะสม glycogen สูงสุดทั้งปูปกติและปูท้องแดงคือ เนื้อเยื่อใต้กระดูก ซึ่งโดยปกติแล้ว glycogen จะมีการสะสมมากในเนื้อและดับเป็นส่วนใหญ่ (Glowik *et al.*, 1997) ที่เป็นเช่นนี้อาจเกี่ยวข้องเนื่องกับการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ glycogen คือ เอนไซม์ uridine-diphosphate-glucose (UDPG) -glycogen transglucosylase ซึ่ง Wang and Scheer (1963) รายงานว่า glycogen ที่มีปริมาณมากใน hypodermis (ส่วนหนึ่งของ integument) แต่มีปริมาณน้อยในตับอาจเป็นไปได้ว่า เอนไซม์นี้ซึ่งอยู่ในตับและเนื้ออยู่ในรูป inactive จึงไม่มีการนำ

glycosyl unit มา form เป็น glycogen ส่งผลให้ glycogen ในตับและเนื้อมามีปริมาณน้อยกว่า hypodermis และจากผลการทดลองพบว่าปริมาณ glycogen ใน ตับและเนื้อมามีปริมาณน้อยกว่าใน เนื้อเยื่อใต้กระดูกเช่นกันซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์นี้ก็เป็นได้



ภาพที่ 1 ปริมาณ glycogen ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ตับ เนื้อ และเลือดของปูปกติและปูที่มีการท้องแดง

ในขณะที่ปริมาณ glycogen มีการสะสมมากในเนื้อเยื่อใต้กระดูกแต่เมื่อปูแสดงอาการท้องแดงกลับพบว่าปริมาณ glycogen ในเนื้อเยื่อใต้กระดูกของปูที่มีการท้องแดงลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นแต่เนื้อเยื่อที่มีการลดลงของ glycogen มากที่สุดคือเนื้อ โดยลดลงเป็น 4 เท่า เมื่อเทียบกับปูปกติ แสดงให้เห็นว่าเนื้อเป็นแหล่งพลังงานที่ถูกนำไปใช้เร็วที่สุดเมื่อปูเกิดอาการท้องแดง โดย Hoet and Kerridge (1926) รายงานว่า glycogen ที่สะสมในเนื้อจะใช้เป็นแหล่งพลังงานสำคัญในกระบวนการลอกคราบเนื่องจากเมื่อสิ้นสุดกระบวนการลอกคราบพบว่า glycogen มีปริมาณลดลง 3-11 เท่าเมื่อเทียบกับก่อนการลอกคราบ ส่วน Salaenoi *et al.* (2006b) รายงานว่าปริมาณ glycogen ในเนื้อและตับมีการเปลี่ยนแปลงเป็นอย่างมากตลอดช่วงวงจรการลอกคราบเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อใต้กระดูกซึ่งมีปริมาณค่อนข้างคงที่ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองคือ glycogen ในตับและเนื้อมีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างมากเนื่องจากปูที่มีการท้องแดงมีการค้างคาของกระดูก ซึ่งบ่งชี้ว่าปูที่มีการท้องแดงอยู่ในช่วงการลอกคราบ จึงส่งผลให้ glycogen ในตับและเนื้อลดลงเพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน นอกจากกระบวนการลอกคราบแล้ว stress ต่างๆ รวมทั้งการเกิดโรคและการได้รับสารเคมีล้วนส่งผลให้ glycogen ลดลงเช่นกัน โดย Shields *et al.* (2003) รายงานปริมาณ glycogen

ในตัวของ blue crab (*Callinectes sapidus*) ที่ติดเชื้อ dinoflagellate parasite (*Hematodinium perezii*) มีปริมาณลดลง 50-70% เมื่อเทียบกับปูปกติที่ไม่ได้ติดเชื้อ ส่วน Chang *et al.* (2006) รายงาน giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) ที่ได้รับสาร trichlorfon (pesticide) มีผลทำให้ glycogen ในตับและเนื้อลดลง นอกจากนั้น Ridgway *et al.* (2006) ได้ศึกษา Norway lobsters (*Nephrops norvegicus*) ที่อยู่ในสภาพ aerial exposure พบว่าเมื่อ lobsters ได้รับอากาศ (ขึ้นมาอยู่บนบก) ทำให้ปริมาณ glycogen ที่สะสมในเนื้อที่มีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด

สำหรับ glycogen ที่สะสมในเหงือกนั้นพบว่ามีการสะสมรองจากตับทั้งปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง (ตารางที่ 1, ภาพที่ 1) ซึ่ง glycogen ที่สะสมในเนื้อเยื่อนี้มีบทบาทสำคัญสำหรับเป็นแหล่งพลังงานในกระบวนการ osmoregulation (Chausson and Regnault, 1995) จึงทำให้ glycogen ในเนื้อเยื่อนี้ลดลงไปบ้าง เนื่องจากปูที่มีอาการท้องแดงขึ้นมาอยู่บนบก แต่ถึงอย่างไรก็ตามปูที่มีอาการท้องแดงอยู่ในช่วงการลอกคราบจึงทำให้ glycogen ที่สะสมในเหงือกลดลงน้อยกว่าเนื้อ เนื่องจากเนื้ออาจเป็นแหล่งพลังงานที่นำไปใช้ได้เร็วเมื่อสัตว์อยู่ในช่วงการลอกคราบ

สำหรับ glycogen ในเลือดนั้นพบว่าปริมาณน้อยมากทั้งปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดงเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่ออื่นๆ โดย Johnston *et al.* (1973) รายงานว่า glycogen มีการสะสมในเลือดด้วย สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณ glycogen ในเลือดนั้น Vijayavel and Balasubramanian (2006) รายงานว่า mud crab (*Scylla serrata*) ที่ได้รับสาร naphthalene มี glycogen ในเลือดลดลง และเมื่อเปรียบเทียบกับทดลองพบว่าปริมาณ glycogen ที่สะสมในเลือดมีปริมาณลดลงเช่นกันแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อปูมีอาการท้องแดงพลังงานที่ใช้ส่วนใหญ่นั้นอาจได้มาจากการสลาย glycogen ในเนื้อและตับ จึงทำให้ปริมาณ glycogen ที่สะสมในเนื้อและตับมีปริมาณการลดลงมากเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อได้กระดอง เหงือก และเลือด

2. Glucose

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ glucose ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง พบว่า เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ตัว และ เนื้อ ของปูปกติมี glucose อยู่ 0.0026 ± 0.0012 , 0.0161 ± 0.1172 , 0.0058 ± 0.5715 และ 0.0030 ± 0.0860 mg/g wet weight ตามลำดับ สำหรับเลือดมี 0.1256 ± 2.5329 mg/ml haemolymph ส่วนเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ตัว และ เนื้อ ของปูที่มีอาการท้องแดงมี glucose 0.0093 ± 0.0012 , 0.0210 ± 0.0073 , 0.0365 ± 0.0024 และ 0.0097 ± 0.0018 mg/g wet weight ตามลำดับ ส่วนเลือดมี 0.1860 ± 0.0105 mg/ml haemolymph (ตารางที่ 2, ภาพที่ 2)

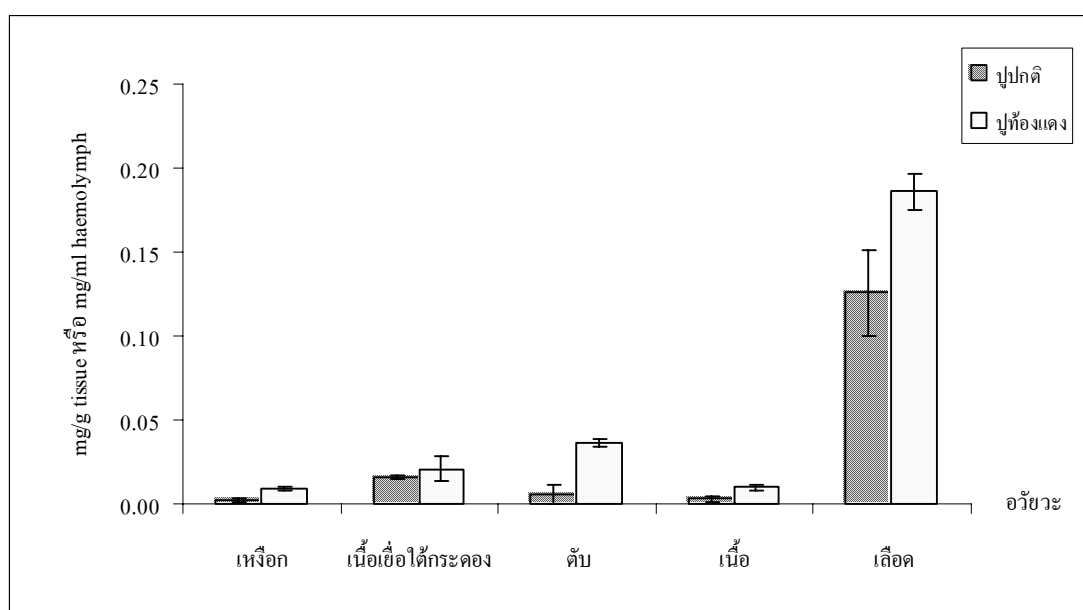
ตารางที่ 2 ปริมาณ glucose ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ตัว เนื้อ และเลือดของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง

เนื้อเยื่อ/อวัยวะ	ปริมาณ glucose (mg/g wet weight หรือ mg/ml haemolymph)	
	ปูปกติ	ปูท้องแดง
เหงือก	0.0026 ± 0.0012^a	0.0093 ± 0.0012^b
เนื้อเยื่อใต้กระดอง	0.0161 ± 0.1172^a	0.0210 ± 0.0073^a
ตัว	0.0058 ± 0.5715^a	0.0365 ± 0.0024^b
เนื้อ	0.0030 ± 0.0860^a	0.0097 ± 0.0018^b
เลือด	0.1256 ± 2.5329^a	0.1860 ± 0.0105^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (superscript) ในแถวเดียวกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

เป็นที่น่าสังเกตว่าเลือดเป็นแหล่งที่มีปริมาณ glucose มากที่สุดทั้งปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดงซึ่งสอดคล้องกับ Salaenoi *et al.* (2006c) ที่รายงานว่า mud crab (*Scylla serrata*) มีปริมาณ glucose สูงที่สุดในเลือดตลอดวงจรการลอกคราบเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่ออื่นๆ ซึ่ง Radford *et al.* (2005) รายงานว่าโดยปกติแล้วจะพบ glucose เป็น monosaccharide ชนิดหลักในเลือดของ lobster ชนิด *Jasus edwardsii*

สำหรับในปูปกติเนื้อเยื่อที่มีปริมาณ glucose สะสมรองจากเลือด คือ เนื้อเยื่อใต้กระดอง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าปูปกติที่นำมาทดลองอาจอยู่ในช่วงหลังการลอกคราบ 7 วัน เนื่องจากช่วงนี้ถือว่าเป็นระยะ intermolt เช่นกันเนื่องจากกระดองแข็งแล้ว ซึ่ง Salaenoi *et al.* (2006c) รายงานว่า mud crab ที่อยู่ในช่วงหลังลอกคราบ 7 วัน นั้นมีปริมาณ glucose สะสมในเนื้อเยื่อใต้กระดองรองจากเลือด ในขณะที่ปูปกติมีปริมาณ glucose ในเนื้อเยื่อใต้กระดองรองจากเลือด (ตารางที่ 2, ภาพที่ 2) แต่กลับพบว่าปูที่มีอาการท้องแดงมีปริมาณ glucose ในตับรองจากเลือด แสดงให้เห็นว่าตับน่าจะเป็นเนื้อเยื่อที่มีบทบาทสำคัญในการเป็นแหล่งพลังงาน



ภาพที่ 2 ปริมาณ glucose ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ตับ เนื้อ และเลือดของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง

นอกจากนี้จากผลการทดลองพบว่าปูที่มีอาการท้องแดงมีปริมาณ glucose สูงกว่าปูปกติในทุกเนื้อเยื่อ ซึ่งเลือดเป็นแหล่งที่มีปริมาณ glucose สะสมมากที่สุดแต่เมื่อปูแสดงอาการท้องแดงกลับพบว่าเลือดเป็นแหล่งที่มีปริมาณ glucose เพิ่มขึ้นเพียง 1 เท่า ในขณะที่ตับมีปริมาณ glucose สูงขึ้นถึง 6 เท่าเมื่อเทียบกับปูปกติ ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าตับน่าจะเป็นเนื้อเยื่อสำคัญที่มีบทบาทในการเป็นแหล่งพลังงานเมื่อปูแสดงอาการท้องแดง เนื่องจากเมื่อสัตว์เป็นโรค หรือได้รับ stress ต่างๆ พลังงานส่วนหนึ่งที่น่ามาใช้ได้จาก glycogen สลายเป็น glucose คือเกิดกระบวนการ glycogenolysis โดย glycogen ที่สะสมในตับและกล้ามเนื้อจะสลายเป็น glucose ปล่อย่อยออกสู่กระแสเลือด (Dall and Moriarty, 1983; Schwoch, 1972) โดย Stentiford *et al.* (2001) รายงานว่า lobster ชนิด *Nephrops*

norvegicus ที่ถูก infect ด้วย parasite พบว่า glucose ที่ส่งผ่านมายังเลือดนั้นเป็นผลมาจากกระบวนการ glycogenolysis ของตับและเนื้อ แต่ทั้งนี้จากการทดลองพบว่าปริมาณ glucose ในเลือดปูท้องแดงสูงกว่าปูปกติเพียงแค่ 1 เท่า เท่านั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า glycogen ที่สะสมในตับนั้นสลายเป็น glucose แต่ยังคงสะสมอยู่ในตับยังไม่มีการเคลื่อนย้ายออกสู่เลือด จึงทำให้ปริมาณ glucose ในตับของปูท้องแดงสูงขึ้นถึง 6 เท่า

ส่วนปริมาณ glucose ในเหงือกถึงแม้จะมีอยู่น้อยในปูปกติแต่เมื่อปูมีอาการท้องแดงพบว่าเพิ่มขึ้นถึง 4 เท่า อาจเนื่องจากเหงือกเป็นเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนก๊าซ ซึ่งจากการสังเกตปูที่มีอาการท้องแดงพบว่าจะขึ้นมาอยู่อาศัยบนบกด้วยเหตุนี้จึงอาจทำให้เหงือกต้องทำงานเพิ่มขึ้นจากเดิมเนื่องจากต้องใช้พลังงานส่วนหนึ่งเพื่อปรับระบบการหายใจที่เปลี่ยนแปลงไปจึงเป็นไปได้ว่าปูที่มีอาการท้องแดงที่มีปริมาณ glucose เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อนี้เนื่องจากต้องใช้พลังงานเพื่อเสริมระบบที่อาจผิดปกติไป นอกจากนี้ Salaenoi *et al.* (2006c) รายงานว่าปริมาณ glucose ในเหงือกของ mud crab ที่เพิ่มขึ้นสูงในช่วง 5 วันหลังการลอกคราบนั้นอาจเนื่องมาจากต้องใช้พลังงานในกระบวนการ respiration

ส่วน glucose ในเนื้อปูที่มีอาการท้องแดงพบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่า เมื่อเทียบกับปูปกติ ซึ่ง glucose ที่เพิ่มสูงในเนื้อเยื่อนี้อาจเป็นไปได้ว่าปูที่มีอาการท้องแดงต้องการใช้พลังงานในการเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อ เนื่องจากการสังเกตพฤติกรรมของปูที่มีอาการท้องแดงพบว่าไม่ค่อยมีการเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อ ซึ่งอาจต้องการพลังงานเพื่อใช้ในส่วนนี้ ซึ่ง Rosas *et al.* (1995) รายงานว่า glucose เป็นแหล่งพลังงานสำคัญในการเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อ

ส่วน glucose ในเนื้อเยื่อได้กระดองของปูที่มีอาการท้องแดงมีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับปูปกติ ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นไปได้ว่าปูที่มีอาการท้องแดงอยู่ในช่วงการลอกคราบแต่อาจไม่ได้ใช้ glucose เพื่อการลอกคราบ แต่ใช้ glucose เพื่อเป็นแหล่งพลังงานในส่วนอื่นจึงทำให้ glucose ในอวัยวะนี้มีปริมาณเพิ่มขึ้นไม่มากนัก ซึ่ง Salaenoi *et al.* (2006c) รายงานว่า mud crab มีปริมาณ glucose ในเนื้อเยื่อได้กระดองค่อนข้างคงที่ตลอดวงจรการลอกคราบ

3. Lactate

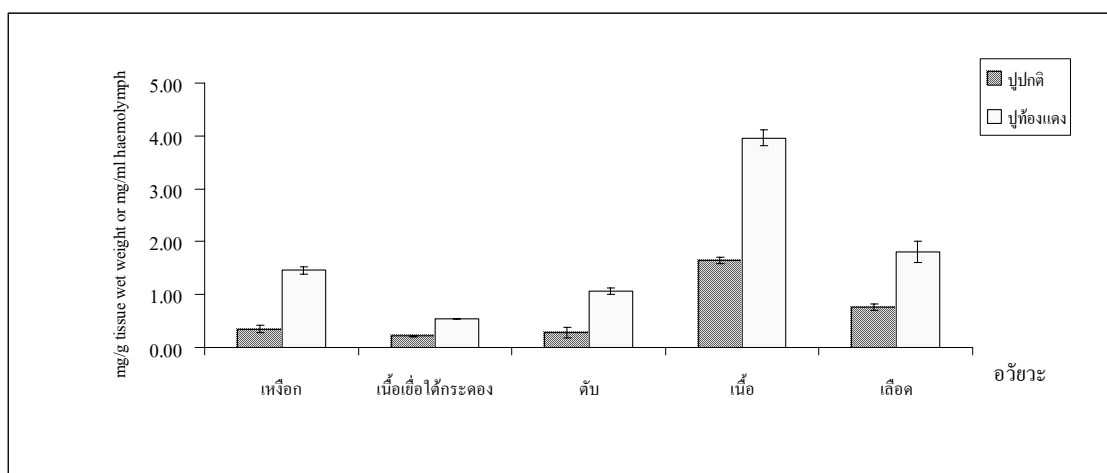
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ lactate ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดงพบว่า เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ดับ และ เนื้อ ของปูปกติมี lactate อยู่ 0.3510 ± 0.0695 , 0.2117 ± 0.0071 , 0.2784 ± 0.0997 และ 1.6471 ± 0.0559 mg/g wet weight ตามลำดับ สำหรับเลือดมี 0.7649 ± 0.0645 mg/ml haemolymph ส่วนเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ดับ และ เนื้อ ของปูที่มีอาการท้องแดงมีปริมาณ lactate 1.4612 ± 0.0689 , 0.5383 ± 0.0032 , 1.0697 ± 0.0623 และ 3.9629 ± 0.1494 mg/g wet weight ตามลำดับ ส่วนเลือดมี 1.8069 ± 0.1997 mg/ml haemolymph (ตารางที่ 3, ภาพที่ 3)

ตารางที่ 3 ปริมาณ lactate ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ดับ เนื้อ และเลือดของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง

เนื้อเยื่อ/อวัยวะ	ปริมาณ lactate (mg/g wet weight หรือ mg/ml haemolymph)	
	ปูปกติ	ปูท้องแดง
เหงือก	0.3510 ± 0.0695^a	1.4612 ± 0.0689^b
เนื้อเยื่อใต้กระดอง	0.2117 ± 0.0071^a	0.5383 ± 0.0032^b
ดับ	0.2784 ± 0.0997^a	1.0697 ± 0.0623^b
เนื้อ	1.6471 ± 0.0559^a	3.9629 ± 0.1494^b
เลือด	0.7649 ± 0.0645^a	1.8069 ± 0.1997^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (superscript) ในแถวเดียวกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากการทดลองพบว่าปริมาณ lactate มีการสะสมมากที่สุดในเนื้อ ทั้งปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง (ตารางที่ 3, ภาพที่ 3) ซึ่งโดยปกติ lactate จะมีอยู่ในเนื้อเยื่อนี้มากกว่าเนื้อเยื่ออื่น โดย Dendinger and Schatzlein (1973) รายงานว่า striped shore crab *Pachygrapsus crassipes* มีปริมาณ lactate มากที่สุดในเนื้อเช่นกัน ส่วนในเหงือกมีมากกว่าดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองคือทั้งปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดงมี lactate ในเหงือกมากกว่าดับเช่นกัน (ตารางที่ 3, ภาพที่ 3) นอกจากนี้ Savin *et al.* (2006) รายงานว่า Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) มี lactate ในเนื้อมากที่สุด ส่วนเหงือกจะมีปริมาณ lactate มากกว่าดับ



ภาพที่ 3 ปริมาณ lactate ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ตับ เนื้อ และเลือดของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง

ในขณะที่เนื้อมีการสะสม lactate มากที่สุด แต่เมื่อปูแสดงอาการท้องแดงกลับพบว่าเนื้อมียุณหภูมิ lactate เพิ่มขึ้นเพียงประมาณ 2 เท่า ซึ่งเมื่อเทียบกับเหงือกแล้วพบว่าเหงือกเป็นเนื้อเยื่อที่มีปริมาณ lactate เพิ่มขึ้นถึง 4 เท่าซึ่งมากกว่าเนื้อเยื่ออื่นๆ เมื่อเทียบกับปูปกติ แสดงให้เห็นว่าเหงือกอาจเป็นเนื้อเยื่อที่มีบทบาทสำคัญเมื่อปูแสดงอาการท้องแดง นอกจากนี้จากการสังเกตพฤติกรรมของปูที่มีอาการท้องแดงพบว่าปูจะขึ้นมาอาศัยอยู่บนบก ซึ่ง Greenaway *et al.* (1996) รายงานว่าเมื่อสัตว์น้ำขึ้นมาอาศัยอยู่บนบกมีผลทำให้เหงือกได้รับความเสียหายส่งผลให้พื้นที่ผิวในการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจน (O_2) ลดลง ซึ่งโดยปกติเหงือกมีหน้าที่เกี่ยวกับการแลกเปลี่ยนก๊าซ (gas exchange), การควบคุมการเป็นกรด-ด่าง (acid-base balance), ควบคุมการผ่านเข้าออกของไอออน (ion regulation) (Dickson *et al.*, 1991) สำหรับการทำหน้าที่แลกเปลี่ยนก๊าซของเหงือกนี้จะอาศัยการบีบของหัวใจทำให้ O_2 แพร่ผ่านไปยังเหงือกและเลือด (Henry *et al.*, 1990) นอกจากนี้การลำเลียง O_2 ต้องอาศัยโปรตีนชนิดหนึ่งคือ haemocyanin ซึ่งทำหน้าที่ลำเลียง O_2 ไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ (Ainslie, 1980) โดย Salaenoi *et al.* (2006a) ศึกษา haemocyanin ในปูทะเล mud crab (*Scylla serrata*) ที่มีอาการท้องแดงพบว่าโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 75 kDa หายไป และไม่พบค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm ซึ่งเป็นค่าดูดกลืนแสงสูงสุด (maximum absorbance) ของ oxyhaemocyanin แสดงว่าปูที่มีอาการท้องแดงไม่มี oxyhaemocyanin จึงอาจมีปริมาณ O_2 ในเซลล์ลดลง ด้วยเหตุนี้อาจส่งผลให้เกิดกระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ O_2 (anaerobic respiration) ซึ่งเป็นไปได้ว่าเหงือกเป็นเนื้อเยื่อที่ได้รับ ความเสียหายมากที่สุด เนื่องจากเป็นเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนก๊าซจึงส่งผลให้ lactate ซึ่งเป็น end product ของกระบวนการ anaerobic respiration สะสมมากที่สุดถึง 6 เท่า ในเนื้อเยื่อนี้เมื่อปูแสดงอาการท้องแดง

นอกจากนี้แล้วพบว่าตับมีปริมาณ lactate เพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้น 3.8 เท่า รองจากเหงือกเมื่อเทียบกับปอดก็อาจเป็นไปได้ว่า lactate ที่เพิ่มขึ้นนี้ส่งผลมาจากปริมาณ glucose ที่เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่าในตับของปูที่มีอาการท้องแดง (ตารางที่ 2, ภาพที่ 2) เนื่องจาก glucose เป็น precursor ของกระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ O_2 (anaerobic respiration) โดย glucose จะเปลี่ยนเป็น pyruvate และ pyruvate จะเปลี่ยนเป็น lactate ซึ่ง lactate ที่เพิ่มขึ้นในตับนี้อาจเป็นผลให้ pyruvate เข้าสู่ Kreb's cycle น้อยลง แต่เข้าสู่ anaerobic metabolism แทนเนื่องจากเซลล์ขาด O_2 ซึ่ง Reddy and Bhagyalakshmi (1994) รายงานว่า mud crab (*Scylla serrata*) ที่ได้รับสาร cadmium chloride ส่งผลให้เกิด oxidative metabolism ในตับ ทำให้ระดับ glucose และ lactate สูงขึ้นซึ่งเป็นผลจาก anaerobic respiration และทำให้ pyruvate เข้าสู่ Kreb's cycle ลดลง

สำหรับใน เนื้อ เลือด และเนื้อเยื่อใต้กระดองนั้นเป็นเนื้อเยื่อที่มีอัตราการเพิ่มของ lactate ใกล้เคียงกันคือประมาณ 2 เท่า เมื่อเทียบกับปอดก็ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า lactate มีการขนส่งไปมาใน 3 เนื้อเยื่อนี้ซึ่ง Jackson *et al.* (2001) รายงานว่า crayfish (*Austropotamobius pallipes*) ที่อยู่ในสภาพ O_2 น้อย (hypoxia) มีผลทำให้ปริมาณ lactate ในเนื้อ เลือด และกระดอง เพิ่มขึ้น ส่วน Carlsson and Gade (1986) รายงานว่า horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) ที่อยู่ในสภาพ hypoxia มีผลทำให้ เซลล์ผลิต lactate ในเนื้อเพิ่มขึ้น โดย lactate จะมีการเคลื่อนย้ายจากเนื้อไปยังเลือด นอกจากนี้ Taylor *et al.* (1996) รายงานว่า Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) ที่ถูก infect ด้วย parasite (*Hematodinium* sp.) มีผลทำให้ lactate ในกล้ามเนื้อเคลื่อนย้ายออกสู่เลือดเช่นกัน

4. Fatty acid

จากการวิเคราะห์ปริมาณ fatty acid ทั้ง 10 ชนิด โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ saturated fatty acid (กรดไขมันอิ่มตัว), monounsaturated fatty acid (กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 พันธะ; MUFA) และ polyunsaturated fatty acid (กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ; PUFA) ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ เนื้อ และเลือด ของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดงพบว่า saturated fatty acid ได้แก่ myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0) และ stearic acid (C18:0) มีปริมาณอยู่ในช่วง 0.06 - 5.16, 1.08 - 32.55 และ 0.62 - 7.61 mg/g dry weight ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

สำหรับ monounsaturated fatty acid ได้แก่ palmitoleic acid (C16:1) และ oleic acid (C18:1n-9) ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ เนื้อ และเลือด ของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง มีปริมาณอยู่ในช่วง 0.10 - 11.07 และ 0.89 - 22.87 mg/g dry weight ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ส่วน polyunsaturated fatty acid ได้แก่ linoleic acid (C18:2n-6), linolenic acid (C18:3n-6), arachidonic acid (C20:4n-6; ARA), eicosapentaenoic acid (C20:5n-3; EPA) และ docosahexaenoic acid (C22:6n-3; DHA) ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ เนื้อ และเลือด ของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง มีปริมาณอยู่ในช่วง 0.00 - 2.69, 0.00 - 1.21, 0.73 - 9.77, 0.23 - 10.65 และ 0.55 - 23.89 mg/g dry weight ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ปริมาณ fatty acid ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ตับ เนื้อ และเลือด ของปูปกติและปูที่มีการทองแดง

Fatty acid	Fatty acid content (mg/g dry weight)									
	เหงือก		เนื้อเยื่อใต้กระดูก		ตับ		เนื้อ		เลือด	
	ปูปกติ	ปูทองแดง	ปูปกติ	ปูทองแดง	ปูปกติ	ปูทองแดง	ปูปกติ	ปูทองแดง	ปูปกติ	ปูทองแดง
Saturated fatty acid										
Myristic acid (C14:0)	0.06	0.12	0.23	0.37	1.36	5.16	0.10	0.12	0.20	2.58
Palmitic acid (C16:0)	1.08	2.15	2.84	5.29	11.81	32.55	2.15	3.32	1.77	23.83
Stearic acid (C18:0)	0.79	0.91	2.20	2.45	3.78	7.26	1.43	1.95	0.62	7.61
Monounsaturated fatty acid										
Palmitoleic acid (C16:1)	0.00	0.39	0.50	1.32	2.16	11.07	0.33	0.82	0.12	6.87
Oleic acid (C18:1)	0.89	2.92	3.07	6.64	6.78	17.09	2.57	4.67	1.00	22.87
Polyunsaturated fatty acid										
Linoleic acid (C18:2)	0.00	0.17	0.22	0.29	1.18	1.11	0.13	0.32	0.16	2.69
Linolenic acid (C18:3)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.38	1.21	0.12	0.27	0.07	1.14
Arachidonic acid (C20:4)	0.73	1.83	8.06	7.14	5.05	9.77	2.23	5.21	0.87	7.77
EPA (C20:5)	0.23	1.18	2.74	4.14	4.26	10.65	2.40	6.00	0.52	6.31
DHA (C22:6)	0.57	2.10	2.57	6.08	4.91	23.89	2.85	7.27	0.55	17.48

จากการวิเคราะห์ fatty acid ทั้ง 10 ชนิด โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ saturated fatty acid, monounsaturated fatty acid และ polyunsaturated fatty acid สำหรับกลุ่มแรก saturated fatty acid ได้แก่ myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0) และ stearic acid (C18:0) พบว่า palmitic acid เป็นกรดไขมันอิ่มตัวที่มีปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับกรดไขมันอิ่มตัวชนิดอื่นๆ ในทุกเนื้อเยื่อทั้งปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง (ตารางที่ 4) โดย Chen *et al.* (2007) รายงานว่า palmitic acid เป็นกรดไขมันอิ่มตัวที่มีปริมาณมากที่สุด ใน Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) เมื่อเทียบกับกรดไขมันอิ่มตัวชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ Garofalaki *et al.* (2006) รายงานว่า spiny lobster (*Palinurus vulgaris*) มีกรดไขมันอิ่มตัวที่มีปริมาณมากที่สุดคือ palmitic acid เช่นเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้งกุ้งและปูส่วนใหญ่มี palmitic acid เป็นกรดไขมันอิ่มตัวชนิดหลักซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองคือ ในทุกเนื้อเยื่อของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดงพบ palmitic acid เป็นกรดไขมันอิ่มตัวชนิดหลักเช่นกัน

สำหรับ fatty acid กลุ่มที่ 2 คือ monounsaturated fatty acid (MUFA) ได้แก่ palmitoleic acid (C16:1) และ oleic acid (C18:1) พบว่า oleic acid เป็นกรดไขมันที่มีปริมาณมากที่สุดในทุกเนื้อเยื่อของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดงเมื่อเทียบกับ palmitoleic acid ซึ่ง Garofalaki *et al.* (2006) รายงานว่า spiny lobster มีปริมาณ oleic acid มากที่สุดเมื่อเทียบกับ MUFA ชนิดอื่นๆ ส่วน Nates and McKenney Jr (2000) รายงานว่า mud crab (*Rhithropanopeus harrisi*) มีปริมาณ MUFA ที่มากที่สุดคือ oleic acid ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเช่นกัน

สำหรับ fatty acid กลุ่มที่ 3 คือ polyunsaturated fatty acid (PUFA) ได้แก่ linoleic acid (C18:2), linolenic acid (C18:3), arachidonic acid (C20:4; ARA), eicosapentaenoic acid (C20:5; EPA) และ docosahexaenoic acid (C22:6; DHA) พบว่าในทุกเนื้อเยื่อของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดงมี linoleic และ linolenic ในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับ PUFA ชนิดอื่นๆ อาจเนื่องจาก fatty acid ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็น essential fatty acid ร่างกายไม่สามารถสร้างเองได้จำเป็นต้องได้รับจากอาหาร เท่านั้นจึงทำให้กรดไขมันชนิดนี้มีปริมาณน้อย ซึ่งใน crustacean อื่นๆ ก็มีปริมาณกรดไขมัน 2 ชนิดนี้ในปริมาณน้อยเช่นกัน (Guary *et al.*, 1974) ส่วน ARA, EPA และ DHA ส่วนใหญ่มีปริมาณมากใน crustacean ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเช่นกันคือ ARA, EPA และ DHA เป็น PUFA ที่มีปริมาณมากกว่า linoleic และ linolenic ในทุกเนื้อเยื่อทั้งปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดงโดย arachidonic acid มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการควบคุม ion (Ying *et al.*, 2006) ส่วน EPA และ DHA มีบทบาทเป็น structural membrane (Bell and Sargent, 2003)

เมื่อปูมีอาการท้องแดงพบว่าปริมาณ fatty acid เกือบทุกชนิดมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับปูปกติโดยเฉพาะอย่างยิ่งในตับและเลือดมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (ตั้งแต่ 2 ถึง 57 เท่า) (ตารางที่ 4) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเนื้อเยื่อทั้งสองนี้มีบทบาทสำคัญในเรื่องของ lipid metabolism เนื่องจากทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและ crustacean มีการขนส่ง lipid ที่คล้ายกันโดยมีการขนส่งผ่านทางเลือด (Brichon *et al.*, 1980) ดังนั้นปริมาณ fatty acid ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในตับและเลือดนั้นเป็นไปได้ว่าอาจมีการขนส่งไปมาระหว่างเนื้อเยื่อทั้งสองนี้ โดย Garcia *et al.* (2002) รายงานว่าการขนส่ง lipid ใน crustacean จะมีการขนส่งไปมาระหว่างตับและเลือด

สำหรับการเพิ่มขึ้นของ fatty acid เกือบทุกชนิดในปูที่มีอาการท้องแดงมีปริมาณเพิ่มขึ้นซึ่งอาจเป็นผลจากกระบวนการ lipid catabolism คือ triglyceride เกิดปฏิกิริยา hydrolysis เป็น glycerol และ free fatty acid จึงอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อปูมีอาการท้องแดงจำเป็นต้องได้รับพลังงานซึ่งพลังงานนี้ได้มาจากไขมันที่เก็บสะสมในตับที่อยู่ในรูปของ triglyceride เกิดปฏิกิริยา hydrolysis ได้เป็น fatty acid จึงส่งผลให้มีปริมาณ fatty acid สูงขึ้นในปูที่มีอาการท้องแดง ซึ่ง Vosloo *et al.* (2002) รายงานว่าเมื่อ fresh water prawn (*Potamonautes warreni*) ได้รับ stress คือ ได้รับสาร copper มีผลทำให้ปริมาณ fatty acid ชนิดต่างๆ ได้แก่ C14:0, C15:0, C16:0, C16:1 และ C18:0 ใน midgut gland มีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ fatty acid เหล่านี้อาจเป็นผลจากกระบวนการ lipid catabolism นอกจากนี้จากการทดลองพบว่ามี fatty acid เพียง 3 ชนิดที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดทั้งในเลือดและตับของปูที่มีอาการท้องแดงคือ palmitic acid, oleic acid และ DHA โดย palmitic acid ซึ่งเป็น saturated fatty acid นั้นพบว่ามีปริมาณเพิ่มจาก 11.81 เป็น 32.55 mg/g dry weight ส่วนเลือดเพิ่มขึ้นจาก 1.77 เป็น 23.83 mg/g dry weight (ตารางที่ 4) ส่วน oleic acid ซึ่งเป็น monounsaturated fatty acid โดยในตับเพิ่มจาก 6.78 เป็น 17.09 mg/g dry weight ส่วนเลือดเพิ่มขึ้นจาก 1.00 เป็น 22.87 mg/g dry weight (ตารางที่ 4) ซึ่ง Heras *et al.* (2000) รายงานว่าทั้ง saturated และ monounsaturated fatty acid มีบทบาทในเรื่องของการให้พลังงาน ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของ palmitic acid และ oleic acid อาจเป็นไปได้ว่าปูที่มีอาการท้องแดงต้องการพลังงาน สำหรับ DHA นั้นพบว่ามีปริมาณเพิ่มจาก 4.91 เป็น 23.89 mg/g dry weight และเลือดเพิ่มขึ้นจาก 0.55 เป็น 17.48 mg/g dry weight (ตารางที่ 4) ซึ่ง Bell and Sargent (2003) รายงานว่า DHA มีบทบาทในเรื่องของ membrane structure

นอกจากปริมาณ fatty acid ที่เพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจากกระบวนการ catabolism เพื่อให้ได้พลังงานแล้ว อีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณ fatty acid เพิ่มขึ้นในปูที่มีอาการท้องแดงอาจเนื่องจากปูที่มีอาการท้องแดงมี permeability ของ membrane ที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งเกี่ยวข้องกับ membrane

structure ที่กล่าวไว้ข้างต้น จากการสังเกตพฤติกรรมของปูที่มีอาการท้องแดงพบว่าปูจะขึ้นมากอาศัยอยู่บนบกซึ่งการขึ้นมากอาศัยอยู่บนบกนี้อาจส่งผลให้ water permeability และ ion permeability เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดย Whitney (1974) รายงานว่าเมื่อย้าย blue crab (*Callinectes sapidus*) มาใช้น้ำที่มีความเค็มต่ำลงคือย้ายจากน้ำที่มีความเค็ม 32 ppt มาอยู่ในน้ำที่มีความเค็ม 16 ppt มีผลทำให้ปริมาณ fatty acid ทั้ง saturated, monounsaturated และ polyunsaturated fatty acid ในตับ เหนือก และเนื้อ มีปริมาณเพิ่มขึ้น ส่วน Williams *et al.* (2004) รายงานว่า blue crab (*C. sapidus*) จะมีปริมาณ fatty acid กลุ่ม n-3 เพิ่มขึ้นในช่วงหลังการลอกคราบ 72 ชั่วโมง เนื่องจากช่วงนี้น้ำจะซึมผ่านเข้าตัวลดลง คือ water permeability ลดลง แต่การดูดซึมเกลือแร่จะเพิ่มขึ้น คือ ion permeability เพิ่มขึ้น ซึ่ง n-3 นี้อาจมีบทบาทเพิ่ม ion permeability ของ membrane ดังนั้นปูที่มีอาการท้องแดงที่ขึ้นมากอาศัยอยู่บนบกจำเป็นต้องปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งในการปรับตัวเพื่อไม่ให้สูญเสีย ion อาจมีการเพิ่ม fatty acid กลุ่ม n-3 คือ EPA และ DHA เพื่อช่วยในการทำงานของ ion permeability ของ membrane ไม่ให้สูญเสียไปเนื่องจากการขึ้นมากอยู่บนบก ดังนั้นจึงอาจทำให้ปูที่มีอาการท้องแดงมีปริมาณ EPA และ DHA เพิ่มขึ้น

5. Glucosamine (GlcN), N-acetylglucosamine (GlcNAc) และ chitin

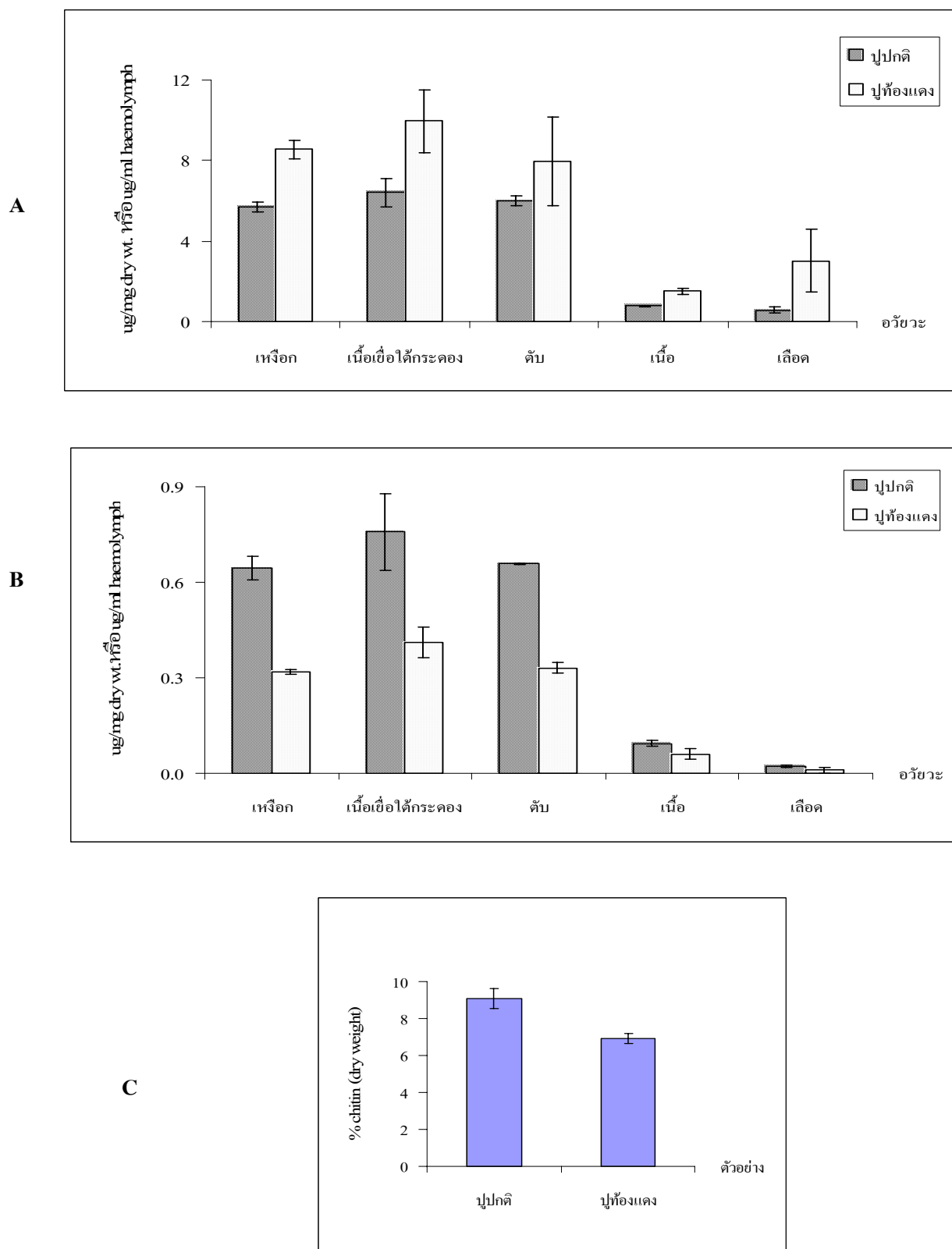
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ glucosamine ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดงพบว่าเหนือก เนื้อเยื่อได้กระดอง ดับ และ เนื้อ ของปูปกติมี glucosamine อยู่ 0.6458 ± 0.0372 , 0.7578 ± 0.1216 , 0.6575 ± 0.0018 และ 0.0941 ± 0.0092 $\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight ตามลำดับ สำหรับเลือดมี 0.0218 ± 0.0026 $\mu\text{g}/\text{ml}$ haemolymph ส่วนเหนือก เนื้อเยื่อได้กระดอง ดับ และ เนื้อ ของปูที่มีอาการท้องแดงมี glucosamine 0.3187 ± 0.0083 , 0.4120 ± 0.0472 , 0.3307 ± 0.0174 และ 0.0605 ± 0.0162 $\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight ตามลำดับ ส่วนเลือดมี 0.0101 ± 0.0089 $\mu\text{g}/\text{ml}$ haemolymph (ตารางที่ 5, ภาพที่ 4)

สำหรับ N-acetylglucosamine ในเหนือก เนื้อเยื่อได้กระดอง ดับ และ เนื้อ ของปูปกติมี N-acetylglucosamine อยู่ 5.6972 ± 0.2194 , 6.4180 ± 0.7067 , 5.9820 ± 0.2383 และ 0.7750 ± 0.0131 $\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight ตามลำดับ สำหรับเลือดมี 0.5712 ± 0.149 $\mu\text{g}/\text{ml}$ haemolymph ส่วนเหนือก เนื้อเยื่อได้กระดอง ดับ และ เนื้อ ของปูที่มีอาการท้องแดงมี N-acetylglucosamine 8.5566 ± 0.4496 , 9.9499 ± 1.5801 , 7.9552 ± 2.1965 และ 1.5063 ± 0.1438 $\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight ตามลำดับ ส่วนเลือดมี 3.0189 ± 1.5454 $\mu\text{g}/\text{ml}$ haemolymph (ตารางที่ 5, ภาพที่ 4) ส่วนปริมาณ chitin ในกระดองปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดงมี 9.08 ± 0.5204 และ 6.92 ± 0.2887 % chitin (dry weight) ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ปริมาณ glucosamine และ N-acetylglucosamine ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดูก ดับ เนื้อ และเลือด ของหนูที่มีการทอนแดง

เนื้อเยื่อ/อวัยวะ	glucosamine (µg/mg dry weight หรือ µg/ml haemolymph)		N-acetylglucosamine (µg/mg dry weight หรือ µg/ml haemolymph)	
	ปลูกดี	ปลูกแดง	ปลูกดี	ปลูกแดง
เหงือก	0.6458 ± 0.0372 ^b	0.3187 ± 0.0083 ^a	5.6972 ± 0.2194 ^a	8.5566 ± 0.4496 ^b
เนื้อเยื่อใต้กระดูก	0.7578 ± 0.1216 ^b	0.4120 ± 0.0472 ^a	6.4180 ± 0.7067 ^a	9.9499 ± 1.5801 ^b
ตับ	0.6575 ± 0.0018 ^b	0.3307 ± 0.0174 ^a	5.9820 ± 0.2383 ^a	7.9552 ± 2.1965 ^a
เนื้อ	0.0941 ± 0.0092 ^b	0.0605 ± 0.0162 ^a	0.7750 ± 0.0131 ^a	1.5063 ± 0.1438 ^b
เลือด	0.0218 ± 0.0026 ^b	0.0101 ± 0.0089 ^a	0.5712 ± 0.149 ^a	3.0189 ± 1.5454 ^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (superscript) ในแถวเดียวกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(P<0.05)



ภาพที่ 4 ปริมาณ glucosamine (A), *N*-acetylglucosamine (B) ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ตับ เนื้อ เลือด และ chitin (C) ในกระดองของปูปกติและปูที่มีการท้องแดง

จากการทดลองพบว่าปริมาณ glucosamine ทั้งปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดงมีปริมาณมากที่สุด ในเนื้อเยื่อได้กระดอง รองลงมาคือ ตับ เหงือก เนื้อ และเลือด ตามลำดับ (ตารางที่ 5, ภาพที่ 4) ซึ่งทั้ง 5 เนื้อเยื่อนี้ พบว่ามี 3 เนื้อเยื่อที่มีปริมาณ glucosamine อยู่ในระดับใกล้เคียงกัน คือ เนื้อเยื่อได้กระดอง ตับ และเหงือก นอกจากนี้พบว่าไม่เพียงแต่ปริมาณ glucosamine เท่านั้นแต่พบว่าปริมาณ *N*-acetylglucosamine มีปริมาณมากที่สุดในเนื้อเยื่อได้กระดองเช่นเดียวกัน และมีปริมาณ *N*-acetylglucosamine ในเนื้อเยื่อได้กระดอง ตับ และเหงือกที่ใกล้เคียงกันทั้งปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดงเช่นเดียวกับ glucosamine แสดงให้เห็นว่าทั้ง 3 เนื้อเยื่อนี้อาจมีความสัมพันธ์กัน ซึ่ง Salaenoi *et al.* (2006c) รายงานว่า mud crab (*Scylla serrata*) มีรูปแบบการสะสม glucosamine ในเหงือกและเนื้อเยื่อได้กระดองคล้ายคลึงกันในช่วงก่อนการลอกคราบ ส่วนปริมาณ *N*-acetylglucosamine ใน 2 เนื้อเยื่อนี้มีรูปแบบการสะสมเหมือนกันตลอดวงจรการลอกคราบ

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ glucosamine ของปูที่มีอาการท้องแดงกับปูปกติพบว่าปริมาณลดลง โดยทั้ง 5 เนื้อเยื่อ คือ เหงือก เนื้อเยื่อได้กระดอง ตับ เนื้อ และเลือด มีอัตราการลดลงอยู่ในช่วงใกล้เคียงกันคือ 1.5 - 2 เท่า ในขณะที่ glucosamine มีปริมาณลดลงแต่กลับพบว่า *N*-acetylglucosamine มีปริมาณเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 5, ภาพที่ 4) โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นในเหงือก เนื้อเยื่อได้กระดอง ตับ และเนื้อในอัตรา 1.5-2 เท่าเช่นกัน ส่วนเลือดมีความแตกต่างจากเนื้อเยื่ออื่นๆ มากที่สุด ถึงแม้ว่าเลือดจะเป็นเนื้อเยื่อที่มีปริมาณ *N*-acetylglucosamine น้อยที่สุด แต่เมื่อปูแสดงอาการท้องแดงกลับพบว่าเลือดมีอัตราการเพิ่มขึ้นถึง 5 เท่าที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากปูที่มีอาการท้องแดงอยู่ในระยะปู 2 กระดองคืออยู่ในช่วงก่อนการลอกคราบ จึงเป็นไปได้ว่า chitin มีการสลายเป็น *N*-acetylglucosamine แล้วมีการปล่อยออกสู่กระแสเลือดทำให้ปริมาณ *N*-acetylglucosamine เพิ่มขึ้นนอกจากนี้ Regnault (1996) รายงานว่า crab (*Cancer pagurus*) ที่ได้รับอากาศ (air exposure) มีผลทำให้ปริมาณ *N*-acetylglucosamine ในเลือดสูงขึ้นเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่ออื่นๆ

สำหรับ chitin พบว่ามีปริมาณลดลงเมื่อปูแสดงอาการท้องแดง ดังนั้นจากผลของ chitin ที่ลดลง และ *N*-acetylglucosamine ที่เพิ่มขึ้น จึงเป็นไปได้ว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการทำงานของ chitinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สลาย chitin ได้เป็น trimer และ dimer ของ *N*-acetylglucosamine หลังจากนั้น chitinase จะสลายต่อไปเป็น monomer (Espie and Roff, 1995) ซึ่ง Salaenoi *et al.* (2004, 2006b) รายงานว่าเอนไซม์ chitinase ในเนื้อเยื่อได้กระดองของ mud crab มีกิจกรรมสูงที่สุดในช่วงก่อนการลอกคราบ 2 วัน ส่วน chitinase มีกิจกรรมสูงที่สุดในช่วงก่อนการลอกคราบ 1 อาทิตย์ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองนี้อาจไปมีผลทำให้ปริมาณ chitin ลดลง ส่วนปริมาณ *N*-acetylglucosamine เพิ่มขึ้นเนื่องจากปูที่มีอาการท้องแดงอยู่

ในช่วงใกล้ที่จะมีการลอกคราบ สำหรับปริมาณ glucosamine ที่ลดลงในปูที่มีอาการท้องแดงนั้น อาจเป็นไปได้ว่า crustacean อาจจะมีการสะสม glycoprotein ในรูปแบบใดรูปแบบหนึ่ง ซึ่ง Salaenoi *et al.* (2006c) รายงานว่า mud crab ที่มีการสะสม glucosamine, *N*-acetylglucosamine ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง และเลือดในทิศทางตรงกันข้ามนั้นอาจเป็นไปได้ว่า ถ้ามีปริมาณ glucosamine เพิ่มขึ้น จะมีปริมาณ *N*-acetylglucosamine ลดลง และถ้ามีปริมาณ glucosamine ลดลง จะมีปริมาณ *N*-acetylglucosamine เพิ่มขึ้น ซึ่งจากการทดลองพบว่าปูที่มีอาการท้องแดงมีการสะสม glucosamine และ *N*-acetylglucosamine ในทิศทางตรงกันข้ามเช่นกันคือ glucosamine มีปริมาณลดลงส่วน *N*-acetylglucosamine มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับปูปกติ

6. Total carotenoid, Astaxanthin และ β -carotene

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ total carotenoid ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดงพบว่า เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ตับ เนื้อ เลือด และกระดองของปูปกติมี total carotenoid 2.0947 ± 0.2369 , 25.4771 ± 1.4585 , 13.927 ± 3.40 , 1.7301 ± 0.9899 , 0.6309 ± 0.2195 และ 5.8527 ± 0.6942 $\mu\text{g/g wet weight}$ หรือ $\mu\text{g/ml haemolymph}$ ตามลำดับ ส่วนเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ตับ เนื้อ เลือด และกระดองของปูที่มีอาการท้องแดง มี total carotenoid 1.9251 ± 0.0967 , 19.2545 ± 0.1806 , 9.1419 ± 0.9016 , 1.7064 ± 0.1221 , 2.4968 ± 0.8647 และ 3.1326 ± 0.8061 $\mu\text{g/g wet weight}$ หรือ $\mu\text{g/ml haemolymph}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 5)

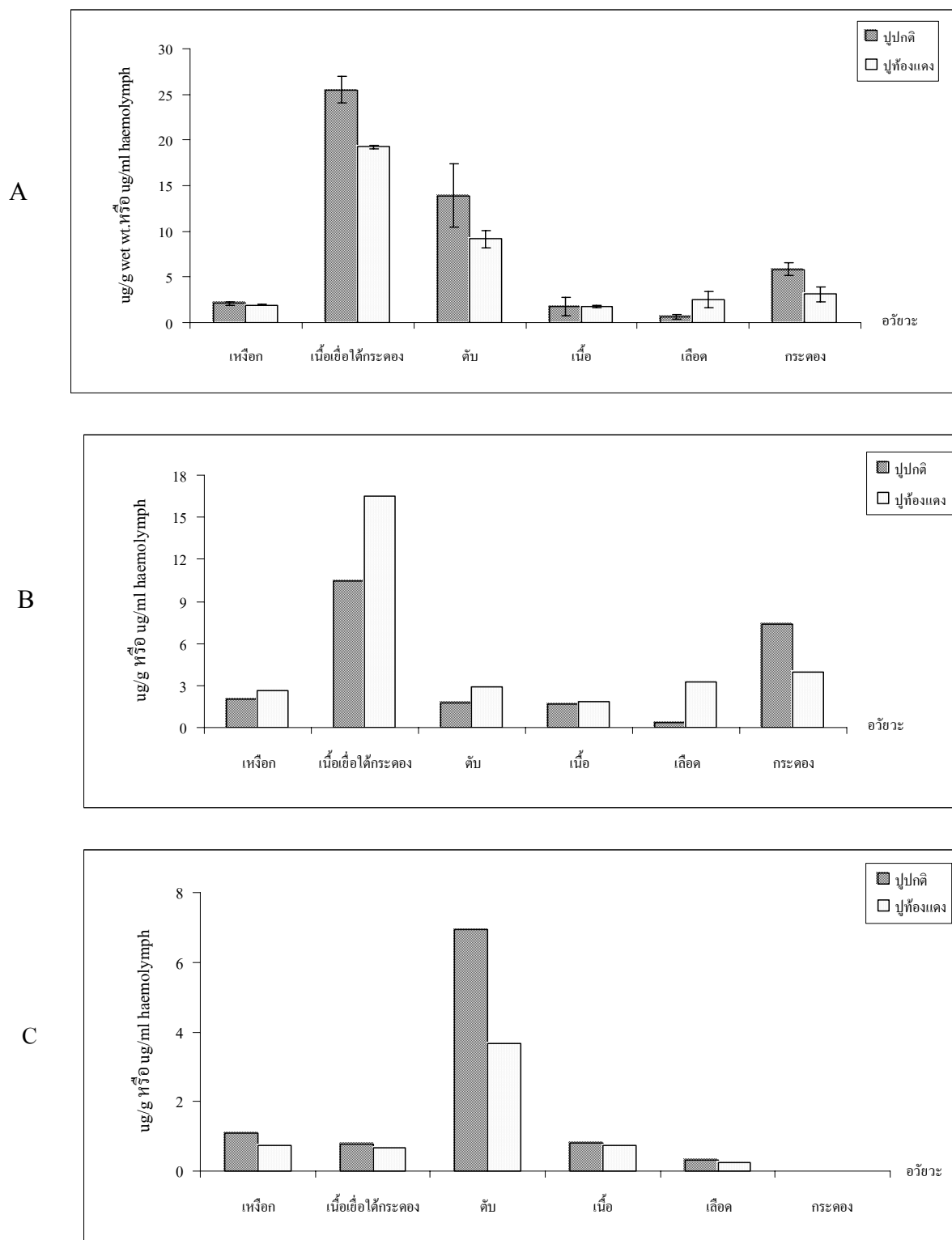
สำหรับ astaxanthin ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ตับ เนื้อ เลือด และกระดองของปูปกติมีค่า 2.0606, 10.4240, 1.7575, 1.6418, 0.3504 และ 7.3520 $\mu\text{g/g wet weight}$ หรือ $\mu\text{g/ml haemolymph}$ ตามลำดับ ส่วนเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ตับ เนื้อ เลือด และกระดองของปูที่มีอาการท้องแดง มีค่า 2.6190, 16.4875, 2.9255, 1.8538, 3.2466 และ 3.9790 $\mu\text{g/g wet weight}$ หรือ $\mu\text{g/ml haemolymph}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 5)

สำหรับ β -carotene ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ตับ เนื้อ เลือด และกระดองของปูปกติมีค่า 1.0887, 0.7591, 6.9562, 0.8135, 0.3134 และ 0.0000 $\mu\text{g/g wet weight}$ หรือ $\mu\text{g/ml haemolymph}$ ตามลำดับ ส่วนเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ตับ เนื้อ เลือด และกระดองของปูที่มีอาการท้องแดง มีค่า 0.7327, 0.6869, 3.6692, 0.7312, 0.2428 และ 0.0000 $\mu\text{g/g wet weight}$ หรือ $\mu\text{g/ml haemolymph}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 5)

ตารางที่ 6 ปริมาณ Total carotenoid, Astaxanthin และ β -carotene ในเหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ตับ เนื้อเลือด และกระดูกของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง

เนื้อเยื่อ/อวัยวะ	Total carotenoid ($\mu\text{g/g}$ wet weight หรือ $\mu\text{g/ml}$ haemolymph)		Astaxanthin ($\mu\text{g/g}$ wet weight หรือ $\mu\text{g/ml}$ haemolymph)		β -carotene ($\mu\text{g/g}$ wet weight หรือ $\mu\text{g/ml}$ haemolymph)	
	ปูปกติ	ปูท้องแดง	ปูปกติ	ปูท้องแดง	ปูปกติ	ปูท้องแดง
เหงือก	2.0947 ± 0.2369^a	1.9251 ± 0.0967^a	2.0606	2.6190	1.0887	0.7327
เนื้อเยื่อใต้กระดอง	25.4771 ± 1.4585^b	19.2545 ± 0.1806^a	10.4240	16.4875	0.7591	0.6869
ตับ	13.927 ± 3.40^b	9.1419 ± 0.9016^a	1.7575	2.9255	6.9562	3.6692
เนื้อ	1.7301 ± 0.9899^a	1.7064 ± 0.1221^a	1.6418	1.8538	0.8135	0.7312
เลือด	0.6309 ± 0.2195^a	2.4968 ± 0.8647^b	0.3504	3.2466	0.3134	0.2428
กระดูก	5.8527 ± 0.6942^b	3.1326 ± 0.8061^a	7.3520	3.9790	0.0000	0.0000

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (superscript) ในแถวเดียวกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 5 ปริมาณ total carotenoid (A), astaxanthin (B) และ β -carotene (C) ในเหยือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ตับ เนื้อ เลือด และกระดอง ของปุบกดีและปุที่มีอาการท้องแดง

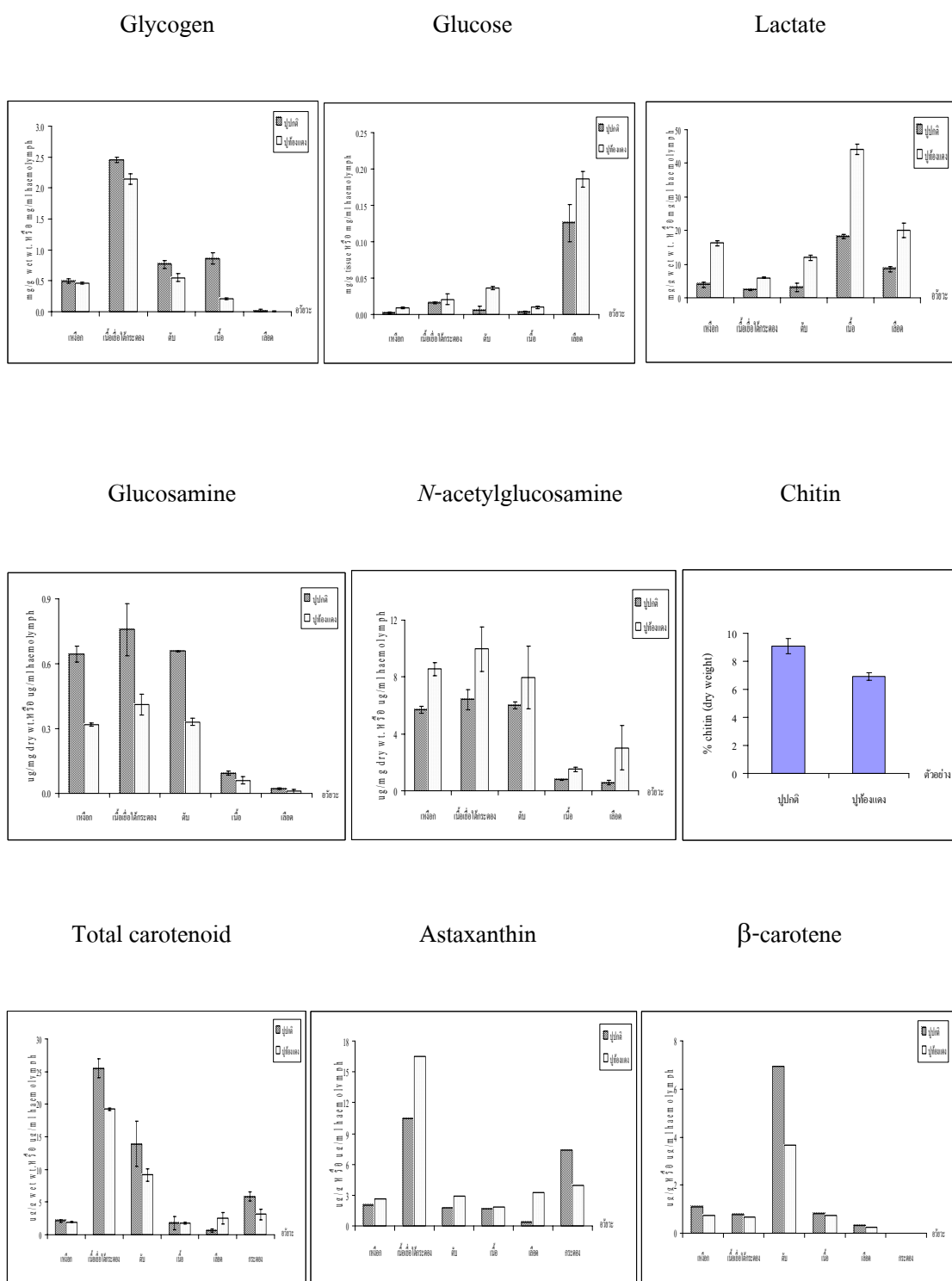
เป็นที่น่าสังเกตว่าเนื้อเยื่อใต้กระดองเป็นเนื้อเยื่อที่มีปริมาณ total carotenoid มากที่สุด และเป็น carotenoid ชนิด astaxanthin เป็นส่วนใหญ่ มี β -carotene เป็นส่วนน้อย ทั้งปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง ในขณะที่ตับเป็นเนื้อเยื่อที่มีปริมาณ total carotenoid รองจากเนื้อเยื่อใต้กระดอง แต่ชนิดของ carotenoid ที่พบเป็นจำนวนมากคือ β -carotene ส่วน astaxanthin มีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ตารางที่ 6, ภาพที่ 5) ซึ่งสอดคล้องกับ Gilchrist and Lee (1967) รายงานว่า astaxanthin เป็น carotenoid ชนิดหลักที่พบในเนื้อเยื่อใต้กระดองซึ่งมีปริมาณถึง 60-90% เมื่อเทียบกับปริมาณ total carotenoid ทั้งหมดที่พบในเนื้อเยื่อนี้ ส่วนตับ เป็นเนื้อเยื่อที่มีปริมาณ β -carotene มากที่สุด (Katayama *et al.*, 1971) นอกจากนี้ Castillo *et al.* (1989) รายงานว่า astaxanthin เป็น carotenoid ที่พบในเลือด และกระดอง เป็นส่วนใหญ่แต่พบ β -carotene เป็นส่วนน้อยในเลือดและไม่พบ β -carotene เลยในกระดองซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองคือ ไม่พบ β -carotene ในกระดองทั้งปูปกติและปูท้องแดง ส่วนในเลือดพบการสะสมของ astaxanthin มากกว่า β -carotene (ตารางที่ 6, ภาพที่ 5) จากการทดลองเห็นได้ชัดเจนว่า เนื้อเยื่อใต้กระดอง กระดอง เหงือก เนื้อ และเลือด เป็นเนื้อเยื่อที่มีการสะสม astaxanthin เป็นส่วนใหญ่ โดย astaxanthin นี้มีบทบาทสำคัญในการเกิดสีของ crustacean (Greenberg, 1968)

เมื่อปูแสดงอาการท้องแดงพบว่าปริมาณ total carotenoid ในทุกเนื้อเยื่อของปูที่มีอาการท้องแดงมีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับปูปกติ ยกเว้นในเลือดซึ่งพบว่าปริมาณ total carotenoid เพิ่มขึ้น อาจเป็นไปได้ว่าเลือดเป็นแหล่งที่ทำหน้าที่ขนส่ง carotenoid แต่เมื่อปูมีอาการท้องแดงอาจทำให้ไม่มีการขนส่ง carotenoid ไปยังเนื้อเยื่ออื่นๆ เป็นไปได้ว่า carotenoid หมุนเวียนอยู่เฉพาะในเลือดจึงส่งผลให้ปริมาณ total carotenoid ในเลือดสูงขึ้นแต่ในเนื้อเยื่ออื่นๆ คือ เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ตับ เนื้อ และกระดองมีปริมาณ total carotenoid ลดลง (ตารางที่ 6, ภาพที่ 5)

สำหรับปริมาณ astaxanthin พบว่าเมื่อปูมีอาการท้องแดง astaxanthin มีปริมาณเพิ่มขึ้นในทุกเนื้อเยื่อ ยกเว้นกระดองในขณะที่ปริมาณ astaxanthin เพิ่มขึ้น กลับพบว่า β -carotene มีปริมาณลดลงในทุกเนื้อเยื่อ อาจเป็นไปได้ว่า β -carotene มีการเปลี่ยนรูปไปเป็น astaxanthin (ภาพผนวกที่ 8) เนื่องจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ astaxanthin และ β -carotene มีการศึกษาน้อยมาก แต่มีรายงานการศึกษาการตัดก้านตาที่มีผลต่อ carotenoid 2 ชนิดนี้คือ Castillo and Negre-Sadargues (1991) ได้ศึกษาการตัดก้านตาใน hermit crab (*Clibanarius erythropus*) พบว่าการตัดก้านตามีผลทำให้ปริมาณ β -carotene ในตับลดลงมากซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนรูปเป็น free astaxanthin คือการตัดก้านตามีผลเร่งกระบวนการ oxidation ทำให้มีปริมาณ β -carotene ลดลงซึ่งนำไปสู่การ form เป็น astaxanthin ทำให้มีการปลดปล่อย free astaxanthin มายัง epidermis และเลือด ซึ่งสอดคล้องกับผล

การทดลอง คือ เนื้อเยื่อใต้กระดองและเลือดเป็นเนื้อเยื่อที่มีปริมาณ astaxanthin เพิ่มมากกว่าเนื้อเยื่ออื่นๆ โดยเฉพาะเลือดเป็นแหล่งที่มีปริมาณ astaxanthin เพิ่มขึ้นถึง 9 เท่า ในขณะที่ตับเป็นเนื้อเยื่อที่มีการลดลงของ β -carotene มากที่สุดเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่ออื่นเนื่องจากตับเป็นเนื้อเยื่อที่เป็นแหล่งสะสมของ β -carotene เมื่อปูมีอาการท้องแดงจึงทำให้ปริมาณ β -carotene ในตับเปลี่ยนแปลงไป

ในขณะที่ astaxanthin ใน เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง ตับ เนื้อ และเลือด ของปูที่มีอาการท้องแดงมีปริมาณเพิ่มขึ้นแต่ในกระดองกลับพบว่าปริมาณ astaxanthin ลดลง และจากการทดลองเมื่อนำกระดองปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดงไปให้ความร้อนที่ 80°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมงพบว่ากระดองปูปกติมีสีแดงเข้มแต่กระดองปูที่มีอาการท้องแดงกลับมีสีแดงซีด แสดงให้เห็นว่าสีแดงที่ซีดลงของกระดอง ส่งผลให้ปริมาณ astaxanthin ลดลงด้วย ซึ่งสอดคล้องกับ Wade *et al.*, (2005) รายงานว่า astaxanthin เป็น carotenoid ที่ทำให้เกิดสีของเปลือก (shell) ของ western rock lobster (*Panulirus cygnus*) โดย lobster ที่มีเปลือกสีแดงเข้มจะมีปริมาณ carotenoid มากกว่า lobster ที่มีเปลือกสีแดงอ่อน นอกจากนี้เมื่อสังเกตลักษณะภายนอกของปูที่มีอาการท้องแดงพบว่าบริเวณรยางค์ และท้องจะมีสีแดงเกิดขึ้น เมื่อเทียบกับปูปกติซึ่งมีอกและท้องเป็นสีขาว (ภาพผนวกที่ 1,2) ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะ protein ถูกทำลาย ซึ่งโดยปกติแล้ว exoskeleton ของสัตว์ crustacean นั้นประกอบด้วย protein และ carotenoid รวมกันเป็น carotenoprotein complex (Garate *et al.*, 1984) ดังนั้นเมื่อ protein ถูกทำลายจึงทำให้ carotenoid อยู่ในรูปอิสระจึงปรากฏสีแดงขึ้นซึ่ง Lenel (1961) รายงานว่าเมื่อตัดก้านตาของ shore crab (*Carcinus maenas*) มีผลทำให้เกิดสีแดงบริเวณ exoskeleton ซึ่งเป็นผลมาจากการ denature ของ protein นั่นเอง



ภาพที่ 6 ปริมาณ glycogen, glucose, lactate, glucosamine, N-acetylglucosamine, chitin, total carotenoid, astaxanthin และ β-carotene ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง

สรุป

1. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวโมเลกุลของปูที่มีอาการท้องแดงพบว่ามี ความแตกต่างไปจากปูปกติ โดย glycogen มีปริมาณลดลงในขณะที่ glucose เพิ่มขึ้นซึ่งอาจเป็นผลจาก กระบวนการ glycogenolysis ทำให้มีการสลาย glycogen ไปเป็น glucose เพื่อให้ได้พลังงานใช้ สำหรับเซลล์ และเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ออกซิเจนไม่เพียงพอ พลังงานที่ได้จะมาจากกระบวนการ anaerobic pathway คือเกิด anaerobic respiration ส่งผลให้มีการผลิต lactate เพิ่มขึ้นซึ่งเห็นได้ ชัดเจนในเนื้อเยื่อของปูที่มีอาการท้องแดง
2. สำหรับปริมาณ fatty acid ที่เพิ่มขึ้นในปูที่มีอาการท้องแดงอาจสืบเนื่องมาจากความ ต้องการพลังงานเช่นกัน จึงทำให้เกิดกระบวนการ lipid catabolism นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของ fatty acid ในกลุ่ม saturated และ monounsaturated fatty acid ส่วนอีกสาเหตุหนึ่งอาจเป็นเพราะการปรับ โครงสร้างของ membrane เนื่องจากปูที่มีอาการท้องแดงมีการเคลื่อนย้ายจากน้ำมาสู่บนบก จึงอาจ ทำให้ ion permeability ลดลง ดังนั้น membrane ของปูที่มีอาการท้องแดงจึงอาจมีการปรับโครงสร้าง โดยเพิ่ม fatty acid ในกลุ่ม polyunsaturated fatty acid โดยเฉพาะกลุ่ม n-3 คือ EPA และ DHA ขึ้น
3. สารชีวโมเลกุลที่เป็นโครงร่างของ exoskeleton ได้แก่ glucosamine, *N*-acetylglucosamine และ chitin อาจมีความสัมพันธ์กันคือในปูที่มีอาการท้องแดงมีกระดองที่ไม่ แข็งมากเหมือนปูปกติซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการ chitin degradation จึงทำให้ปริมาณ chitin ลดลง ส่วน *N*-acetylglucosamine เพิ่มขึ้น สำหรับปริมาณ glucosamine ที่ลดลงนั้นอาจเป็นเพราะ glucosamine และ *N*-acetylglucosamine จะอยู่ในรูปใดรูปหนึ่งเท่านั้นคือถ้า *N*-acetylglucosamine เพิ่มขึ้นอาจส่งผลให้ glucosamine ลดลง
4. สำหรับสารชีวโมเลกุลที่เป็นรงควัตถุ ปริมาณ total carotenoid ในปูที่มีอาการท้องแดง ส่วนใหญ่มีปริมาณลดลง ส่วน astaxanthin และ β -carotene จะมีปริมาณที่ตรงกันข้ามกันคือในปูที่มี อาการท้องแดง ส่วนใหญ่มี astaxanthin เพิ่มขึ้นและ β -carotene ลดลง ทั้งนี้อาจเป็นผลจาก กระบวนการ oxidation ของ β -carotene นำไปสู่การเปลี่ยนรูปเป็น astaxanthin

ข้อเสนอแนะ

1. ปัจจัยหนึ่งที่อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลในปฏที่มีอาการท้องแดงอาจเกี่ยวข้องกับอาหาร คือ ปฏที่มีอาการท้องแดงมีการกินอาหารลดลง จึงเป็นไปได้ว่าอาหารอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล
2. คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงปฏอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อสุขภาพของสัตว์น้ำ กล่าวคือ เมื่อคุณภาพน้ำไม่ดีอาจส่งผลให้ปฏอ่อนแอลง ระบบ metabolism เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้สารชีวโมเลกุลเปลี่ยนแปลงด้วย ดังนั้นการจัดการฟาร์มที่ดีมีผลทำให้ปฏมีความแข็งแรง ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคและอาการท้องแดงได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ชูชาติ ชัยรัตน์. 2531. การศึกษาเกี่ยวกับปูทะเล. เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2531. กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- ชูศักดิ์ เวชแพศย์ และ กันยา ปาละวิวัฒน์. 2536. สรีรของการออกกำลังกาย. ครั้งที่ 4. ธรรมมลการพิมพ์, กรุงเทพมหานคร.
- ศุภลักษณ์ วิรัชพินทุ. 2532. อนุกรมวิธานของปูปอร์ทูนิดในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Ainslie, R.C. 1980. The quantitative role of hemocyanin in the respiration of abalone (genus *Haliotis*). **J. Exp. Zool.** 211: 87-99.
- Barnes, R.D. 1987. **Invertebrate Zoology**. CBS College Publishing, New York.
- Bayer, R.C., D.L. Prince, C.D. Waltz, A.R. Corey and R.G. Getchell. 1989. Scanning electron microscopy and X-ray analysis of shell disease lesions in the American lobster. **J. Shellfish Res.** 8: 481-482.
- Bell, J.G. and J.R. Sargent. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. **Aquaculture** 218: 491-499.
- Brichon, R., S. Chapelle and G. Zwingelstein. 1980. Phospholipid composition and metabolism in the hemolymph of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda)-Effect of temperature. **Comp. Biochem. Physiol.** 67: 647-652.
- Carlsson, K.H. and G. Gade. 1986. Metabolic adaptation of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*, during exercise and environmental hypoxia and subsequent recovery. **Biol. Bull.** 171: 217-235.

- Carroll, N.V., R.W. Longley and J.H. Roe. 1955. The determination of glycogen in liver and muscle by the use of anthrone reagent. **J. Biol. Chem.** 220 (2): 583-593.
- Castillo, R. and G. Negre-Sadargues. 1991. Effect of eyestalk ablation on the metabolism of carotenoid pigments of the hermit crab *Clibanarius erythropus* Latreille (1818) (Crustacean Decapoda Anomoura). **Comp. Biochem. Physiol.** 99 (B):187-192.
- _____, G. Negre-Sadargues and R. Lenel. 1989. The carotenoids of the hermit crab *Clibanarius erythropus* during the moulting cycle -II Qualitative aspects. **Comp. Biochem. Physiol.** 92 (A): 111-115
- Castillo, R., R. Lenel and G. Negre-Sadargues. 1980. Determination tissue distribution and metabolism of carotenoid pigments in the hermit crab *Pagurus prideauxi* Leach (1815) Decapoda: Anomura. **Comp. Biochem. Physiol.** 66 (B): 483-489.
- Celik, M., C. Tureli, M. Celik, Y. Yanar, U. Erdem and A. Kucukgulmez. 2004. Fatty acid composition of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) in the north eastern Mediterranean. **Food Chem.** 88: 271-273.
- Chang, C.C., P.P. Lee, J.P. Hsu, S.P. Yeh and W. Cheng. 2006. Survival and biochemical, physiological and histopathological responses of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to short-term trichlofon exposure. **Aquaculture** 253: 653-666.
- Chausson, F. and M. Regnault. 1995. Glycogen concentrations of the gills of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda): Comparison of anterior and posterior gills. **Cah. Biol. Mar.** 36 (4): 291-297.
- Chen, D.W., M. Zhang and S. Shrestha. 2007. Compositional characteristics and nutritional quality of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). **Food Chem.** 103: 1343-1349.

- Chow, C.K. 2000. **Fatty Acids in Foods and Their Health Implications**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Dall, W. and D.J.W. Moriarty. 1983. Nutrition and digestion, pp. 215-261. *In* L.H. Mantel, ed. **The Biology of Crustacea, vol.5**. Academic Press, New York.
- Dendinger, J.E. and F.C. Schatzlein. 1973. Carbohydrate metabolism in the striped shore crab (*Pachygrapsus crassipes*) II Glycolytic rates of muscle, gill and hepatopancreas. **Comp. Biochem. Physiol.** 46 (B): 699-708.
- Dickson, J.S., R.M. Dillaman, R.D. Roer and D.B. Roye. 1991. Distributions and characterization of ion transporting and respiratory filaments in the gills of *Procambarus clarkii*. **Biol. Bull.** 180: 154-166.
- Espie, P.J. and J.C. Roff. 1995. Characterization of chitobiase from *Daphnia magna* and its relation to chitin flux. **Physiol. Zool.** 68: 727-748.
- Folch, J., M. Lees and G.H. Sloane-Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.** 266: 497-509.
- Floreto, E.A.T., D.L. Prince, P.B. Brown and R.C. Bayer. 2000. The biochemical profiles of shell-diseased American lobsters, *Homarus americanus* Milne Edwards. **Aquaculture** 188: 247-262.
- Folin, O. and H. Wu. 1920. A simplified and improved method for determination of sugar. **J. Biol. Chem.** 41: 367-374.
- Gaillard, M., C. Juillet, F. Cezilly. 2004. Carotenoids of two freshwater amphipod species (*Gammarus pulex* and *G. roeseli*) and their common acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 139 (B): 129-136.

- Garate, A.M., E. Urrechaga, J.G. Milicua, R. Gomez and G. Britton. 1984. A blue carotenoprotein from the carapace of the crab *Carcinus maenas*. **Comp. Biochem. Physiol.** 77 (B): 605-608.
- Garcia, F., M. Gonzalez-Baro and R. Pollero. 2002. Transfer of lipids between hemolymph and hepatopancreas in the shrimp *Macrobrachium borellii*. **Lipids** 37 (6): 581-585.
- Garofalaki, T.F., S.M. Meimaroglou and V.J. Sinanoglou. 2006. Main phospholipid and their fatty acid composition in muscle and cephalothorax of the edible Mediterranean *Palinurus vulgaris* (spiny lobster). **Chem. Phys. Lipids** 140: 55-65.
- Gilchrist, B.M. and W.L. Lee. 1967. Carotenoids and carotenoid metabolism in *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda). **J. Zool. Lond.** 151: 171-180.
- Glowik, R.M., J. Golowasch, R. Keller and E. Marder. 1997. D-glucose-sensitive neurosecretory cells of the crab (*Cancer borealis*) and negative feedback regulation of blood glucose level. **J. Exp. Biol** 200: 1421-1431.
- Goodwin, T.W. 1960. Biochemistry of Pigments, pp. 101-140. In T.H. Waterman, ed. **The Physiology of Crustacea, Vol1.** Academic Press, New York.
- Greenaway, P., S. Morris, B.R. McMahon, C.A. Farrelly and K.L. Gallagher. 1996. Air breathing by the purple shore crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana) I Morphology, behaviour and respiratory gas exchange. **Physiol. Zool.** 69: 785-805.
- Greenberg, D.M. 1968. **Metabolic Pathways.** Academic Press, New York.
- Guary, J.C., M. Kayama and Y. Murakami. 1974. Lipid class distribution and fatty acid composition of prawn, *Penaeus japonicus*. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 40: 1027-1032.

- Gutmann, I. and A.W. Wahlefeld. 1974. L-(+)-lactate: determination with lactate dehydrogenase and NAD^+ , pp. 1464-1468. In H.D. Bergmeyer, ed. **Methods of Enzymatic Analysis**. Academic Press, New York.
- Hancock, R.E.W. 2001. **Lab Method: Glucosamine Rapid Assay**. Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, Canada. Available Source: <http://www.cmdr.ubc.ca/bobh/showmethod.php?methodid=26>, March 12, 2006.
- Henry, R.P., H.L. Handley, A. Krarup and H.M. Perry. 1990. Respiratory and cardiovascular responses of two species of deep-sea crabs, *Chaceon fenneri* and *C. quinquedens* in normoxia and hypoxia. **J. Crust. Biol.** 10: 413-422.
- Heras, H., M.R. Gonzalez-Baro and R.J. Pollero. 2000. Lipid and fatty acid composition and energy partitioning during embryo development in the shrimp *Macrobrachium borellii*. **Lipids** 35: 645-651.
- Hill, B.J. 1975. Abundance, breeding and growth of the crab *Scylla serrata* (Forskål) in two South African estuaries. **Mar. Biol.** 72: 119-126.
- Hoet, J.P. and P.M.T. Kerridge. 1926. Observations on the muscles of normal and moulting crustacea. **Proc. Roy. Soc.** 100 (B): 116-119.
- Holub, B.J. and C.M. Skeaff. 1987. Nutritional regulation of cellular phosphatidylinositol. **Methods Enzymol.** 141: 234-244.
- Horst, M.N. 1990. Concurrent protein synthesis is required for *in vivo* chitin synthesis in postmolt blue crab. **J. Exp. Zool.** 256: 242-254.
- Howell, B.K. and A.D. Matthews. 1991. The carotenoids of wild and blue disease affected farmed tiger shrimp (*Penaeus monodon*, Fabricus). **Comp. Biochem. Physiol.** 98 (B): 375-379.

- Jackson, D.C., T. Wang, P. Koldkjaer and E.W. Taylor. 2001. Lactate sequestration in the carapace of the crayfish *Austropotamobius pallipes* during exposure in air. **J. Exp. Biol.** 204: 941-946.
- Johnston, M.A., H.Y. Elder and P.S. Davies. 1973. Cytology of *Carcinus* haemocytes and their function in carbohydrate metabolism. **Comp. Biochem. Physiol.** 46 (A): 569-574.
- _____, and P.S. Davies. 1972. Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus* sp. **Comp. Biochem. Physiol.** 41 (B): 433-443.
- Katayama, T., K. Hirata and C.O. Chichester. 1971. The biosynthesis of astaxanthin-IV. the carotenoid in the prawn, *Penaeus japonicus* Bate (Part I). **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 37 (7): 614-620.
- Latscha, T. 1990. **Carotenoid Their Nature and Significance in Animal Feed**. F. Hoffmann-La Roche Ltd., Animal nutrition and health. Basel, Switzerland.
- Lenel, R. 1961. Metabolism of pigments carotenoid crab *Carcinus maenas*. **Bull. Soc. Lorr. Sci.** 1: 1-134.
- Merzendorfer, H. and L. Zimoch. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **J. Exp. Biol.** 206: 4393-4412.
- Malloy, S.C. 1978. Bacteria induced shell disease of lobster (*Homarus americanus*). **J. Wildl. Dis.** 14: 2-10.
- Motoh, H. 1979. Edible crustaceans in the Philippines. **Asian Aqua.** 2 (10): 5.

- Morin, W.A. and E. McLaughlin. 1973. Glycogen in crustacean fast and slow muscles. **Integr. Comp. Biol.** 13: 435-445.
- Morris, S., W.J. van Aardt, M.D. Ahern. 2005. The effect of lead on the metabolic and energetic status of the Yabby *Cherax destructor* during environmental hypoxia. **Aquat. Toxicol.** 75: 16-31.
- Naczki, M., J. Synowiecki and Z.E. Sikorski. 1981. The gross chemical composition of Antarctic krill shell waste. **Food Chem.** 7: 175-179.
- _____, J. Williams, K. Brennan, C. Liyanapathirana and F. Shahidi. 2004. Compositional characteristics of green crab (*Carcinus maenas*). **Food Chem.** 88: 429-434.
- Nates, S.F. and C.L. McKenney Jr. 2000. Growth, lipid class and fatty acid composition in juvenile mud crabs (*Rhithropanopeus harrisi*) following larval exposure to fenoxycarb, insect juvenile hormone analog. **Comp. Biochem. Physiol.** 127 (C): 317-325.
- Pascual, C., A. Sanchez, E. Zenteno, G. Cuzon, G. Gabriela, R. Brito, R. Gelabert, E. Hidalgo and C. Rosas. 2006. Biochemical, physiological and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture** 251: 416-429.
- Prince, D.L. 1997. **Studies on the etiology and pathogenesis of shell disease in the American lobster (*Homarus americanus*)**. Ph.D thesis, University of Maine, USA.
- Pritchard, A. and S. Eddy. 1979. Lactate formation in *Callinassa californiensis* and *Upogebia pugettensis*. **Mar. Biol.** 50: 249-253.
- Radford, C.A., I.D. Marsden, W. Davison and H.H. Taylor. 2005. Haemolymph glucose concentrations of juvenile rock lobsters, *Jasus edwardsii*, feeding on different carbohydrate diets. **Comp. Biochem. Physiol.** 140 (A): 241-249.

- Reddy, P.S. and A. Bhagyalakshmi. 1994. Changes in oxidative metabolism in selected tissue of the crab (*Scylla serrata*) in response to cadmium toxicity. **Ecotoxicol. Environ. Safety** 29 (3): 255-264.
- Regnault, M. 1996. Air exposure-induced increase in acetylglucosamine content of some soft tissues and haemolymph of a crab (*Cancer pagurus*). **J. Exp. Zool.** 275: 421-430.
- Ridgway, I.D., A.C. Taylor, R.J.A. Atkinson, G.D. Stentiford, E.S. Chang, S.A. Chang and D.M. Neil. 2006. Morbidity and mortality in Norway lobsters, *Nephrops norvegicus*: physiological, immunological and pathological effects of aerial exposure. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 328: 251-264.
- Rosa, R. and M.L. Nunes. 2003. Biochemical composition of deep-sea decapod crustaceans with two different benthic life strategies of the Portuguese south coast. **Deep-sea Res. I.** 50: 119-130.
- Rosas, C., A. Bolongaro-Crevenna, A. Sanchez, G. Gaxiola, L. Sato and E. Escobar. 1995. Role of digestive gland in the energetic metabolism of *Penaeus setiferus*. **Biol. Bull.** 189: 168-174.
- Saito, A. and L.W. Regier. 1971. Pigmentation of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by feeding dried crustacean waste. **J. Fish. Res. Board Can.** 28: 509-512.
- Salaenoi, J., A. Sangcharoen, A. Thongpan and M. Mingmuang. 2006a. Morphology and haemolymph composition changes in red sternum mud crab (*Scylla serrata*). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 40: 158-166.
- _____, J. Bootpugdeethum, M. Mingmuang and A. Thongpan. 2006b. Chitobiase, proteinase, glycogen and some trace elements during molting cycle of mud crab (*Scylla serrata* Forskål 1775). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 40: 1-12.

- Salaenoi, J., J. Bootpugdeethum, M. Mingmuang and A. Thongpan. 2006c. Variation of calcium, *N*-acetylglucosamine, glucosamine and glucose content during molting cycle of mud crab (*Scylla serrata* Forskål 1775). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 40: 668-679.
- _____, M. Mingmuang, A. Engkagul, P. Tabthipwan and A. Thongpan. 2004. Chitinase and carbonic anhydrase activities during molting cycle of mud crab (*Scylla serrata* Forskål 1775). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 38: 74-82.
- Santos, E.A. and R. Keller. 1993a. Effect of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentration in two crustacean species: A role of crustacean hyperglycaemic hormone (CHH). **Comp. Biochem. Physiol.** 106: 343-347.
- _____, 1993b. Regulation of circulating levels of crustacean hyperglycaemic hormone (CHH): Evidence for a dual feedback control system. **J. Comp. Physiol.** 163: 374-379.
- Savin, T.Z., R. Saldierna and M.A. Sandoval. 2006. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. **Comp. Biochem. Physiol.** 142: 301-308.
- Schwoch, G. 1972. Some studies on the biosynthesis and function of trehalose in the crayfish *Orconectes limosus* Rafinesque. **Comp. Biochem. Physiol.** 43 (B): 905-917.
- Shields, J.D., C. Scanlon and A. Volety. 2003. Aspects of the pathophysiology of blue crabs, *Callinectes sapidus*, infected with the parasitic dinoflagellate *Hematodinium perezii*. **Bull. Mar. Sci.** 72: 519-535.
- Stentiford, G.D., D.M. Neil and G.H. Coombs. 2000. Alterations in the biochemistry and ultrastructure of the deep abdominal flexor muscle of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* during infection by a parasitic dinoflagellate of the genus *Hematodinium*. **Diseases Aquat. Organ** 42: 133-141.

- Stentiford, G.D., E.S. Chang, S.A. Chang and D.M. Neil. 2001. Carbohydrate dynamics and the crustacean hyperglycemic hormone (CHH): Effects of parasitic infection in Norway lobsters (*Nephrops norvegicus*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 121: 13-22.
- _____, M. Green, K. Bateman, H.J. Small, D.M. Neil and S.W. Feist. 2002. Infection by a Hematodinium-like parasitic dinoflagellate causes Pink Crab Disease (PCD) in the edible crab *Cancer pagurus*. **J. Invertebr. Pathol.** 79: 179-191.
- Taylor, A.C., R.H. Field and P.J. Parslow-Williams. 1996. The effects of *Hematodinium* sp. infection on aspects of the respiratory physiology of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 207: 217-228.
- Torreblanca, A., J.D. Ramo and J. Diaz-Mayans. 1992. Changes in biochemical composition of gills, hepatopancreas and muscle of the red crayfish *Procambarus clarkii* (girard) after sublethal exposure to mercury. **Comp. Biochem. Physiol** 102 (C): 247-252.
- Verri, T., A. Mandal, L. Zilli, D. Bossa, P.K. Mandal, L. Ingrosso, V. Zonno, S. Vilella, G.A. Ahearn and C. Storelli. 2001. D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. **Comp. Biochem. Physiol.** 130 (A): 585-606.
- Vijayavel, K. and M.P. Balasubramanian. 2006. Fluctuation of biochemical constituents and marker enzymes as a consequence of naphthalene toxicity in the edible estuarine crab *Scylla serrata*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 63: 141-147.
- Vosloo, A., W.J. van Aardt and L.J. Mienie. 2002. Sublethal effects of copper on the freshwater crab *Potamonautes warreni*. **Comp. Biol. Physiol.** 133: 695-702.
- Wade, N., K.C. Goulter, K.J. Wilson, M.R. Hall and B.M. Degnan. 2005. Esterified astaxanthin levels in lobster epithelia correlate with shell colour intensity: Potential role in crustacean shell colour formation. **Comp. Biochem. Physiol.** 141 (B): 307-313.

- Walker, A.N., P. Bush, J. Puritz, T. Wilson, E.S. Chang, T. Miller, K. Holloway and M.N. Horst. 2005. Bioaccumulation and metabolic effects of the endocrine disruptor methoprene in the lobster, *Homarus americanus*. **Integr. Comp. Biol.** 45: 118-126.
- Wang, D.H. and B.T. Scheer. 1963. UDPG-glycogen transglucosylase and a natural inhibitor in crustacean tissue. **Comp. Biochem. Physiol.** 9: 263-274.
- Warner, G.F. 1977. **The Biology of Crabs**. Paul Elek (Scientific Books) LTD., London.
- Welcomme, L. and P. Devos. 1991. Energy consumption in the perfused gills of the euryhaline crab *Eriocheir sinensis* adapted to freshwater. **J. Exp. Zool.** 257: 150-159.
- Whitney, J.O. 1974. The effect of external salinity upon lipid synthesis in the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun and in the spider crab *Libinia emarginata* Leech. **Comp. Biochem. Physiol.** 49 (A): 433-440.
- Williams, E.E., M.J. Anderson, T.J. Miller and S.D. Smith. 2004. The lipid composition of hypodermal membranes from the blue crab (*Callinectes sapidus*) changes during the molt cycle and alters hypodermal calcium permeability. **Comp. Biochem. Physiol.** 137 (B): 235-245.
- Ying, X.P., W.X. Yang and Y.P. Zhang. 2006. Comparative studies on fatty acid composition of the ovaries and hepatopancreas at different physiological stages of the Chinese mitten crab. **Aquaculture** 256: 617-623.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

บุปผชาติและบุที่มีอาการท้องแดง



ภาพผนวกที่ ก 1 ลักษณะภายนอกปูทะเล (*Scylla serrata*) เพศเมียปกติ



ภาพผนวกที่ ก 2 ลักษณะภายนอกปูทะเล (*Scylla serrata*) เพศเมียที่มีอาการท้องแดง



ภาพผนวกที่ ก 3 อวัยวะภายในปูทะเล (*Scylla serrata*) เพศเมียปกติ



ภาพผนวกที่ ก 4 อวัยวะภายในปูทะเล (*Scylla serrata*) เพศเมียที่มีอาการท้องแดง

ภาคผนวก ข

วิธีเตรียมสารเคมีและการวิเคราะห์

การเตรียมสารเคมีและการวิเคราะห์

1. สารเคมีในการวิเคราะห์ glycogen

1.1 สารละลาย Anthrone (Anthrone reagent)

นำ anthrone 0.5 g thiourea 10.0 g ละลายด้วย 72% H_2SO_4 720 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วย shaker จะได้สารละลาย anthrone ที่มีสีเหลืองใส

1.2 สารละลายมาตรฐาน glucose

ชั่ง glucose 100 mg ละลายด้วยสารละลาย benzoic acid อิมตัว 100 ml (ใช้เป็น stock standard solution) จากนั้นใส่ stock standard solution ปริมาตร 5 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลาย benzoic acid อิมตัว จนครบ 100ml (ใช้เป็น working standard solution) เติม working standard solution ปริมาตร 2 ml นำไปวิเคราะห์จะได้สารละลายมาตรฐาน glucose ที่มีความเข้มข้น 0.1 mg/ml

2. สารเคมีในการวิเคราะห์กลูโคส

2.1 สารละลาย Alkaline copper (II) tartrate

นำ sodium carbonate 20 g ละลายในน้ำกลั่น 400 ml แล้วเติม tartaric acid 3.8 g คนให้ละลายแล้วเติม copper sulfate 2.25 g คนให้ละลายเติมน้ำกลั่นจนครบ 500 ml

2.2 สารละลาย phosphomolybdic acid

นำ sodium molybdate 28.4 g และ sodium tartrate 5.0 g ละลายในน้ำ 300 ml คั้นให้เดือดจนละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม 85% H_3PO_4 เข้มข้น จำนวน 125 ml ลงไปที่ตะกอนจนหมด แล้วจึงเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 500 ml

2.3 สารละลายมาตรฐาน glucose

นำ glucose 5 mg ละลายในน้ำกลั่นเติมน้ำจนครบ 100 ml จะได้สารละลายมาตรฐาน glucose ที่มีความเข้มข้น 0.05 mg/ml

3. สารเคมีในการวิเคราะห์ lactate

3.1 สารละลาย Hydrazine/glycine buffer

นำ glycine 11.4 g ละลายในน้ำกลั่น 200 ml ที่มี hydrazine hydrate อยู่ 25 ml ปรับ pH 9 ด้วย 2 M NaOH แล้วเติมน้ำจนมีปริมาตรครบ 300 ml

3.2 สารละลาย Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)

นำ NAD 150 mg ละลายในน้ำ 5 ml จะได้สารละลาย NAD เข้มข้น 40 mM

4. สารเคมีในการวิเคราะห์ glucosamine และ *N*-acetylglucosamine

4.1 สารละลาย Ehrlich's reagent

นำ *p*-dimethylaminobenzaldehyde 1 g ละลายด้วย absolute ethanol 15 ml และ HCl เข้มข้น 15 ml

4.2 สารละลาย Schales' reagent

นำ sodium carbonate 5.23 g และ potassium ferricyanide 0.05 g ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 100 ml

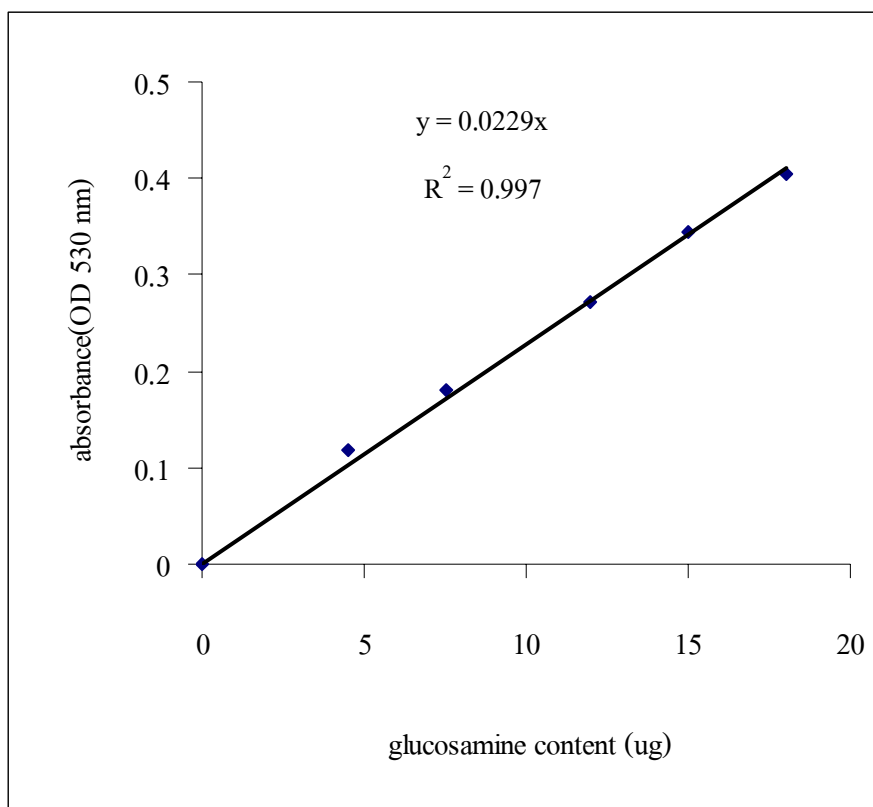
กราฟมาตรฐานของ Glucosamine (GlcN)

สารเคมี

- สารละลาย glucosamine 1.5 mg/ml (stock standard solution)
- สารละลาย 4 N HCl
- absolute ethanol
- สารละลาย 2M Na_2CO_3
- สารละลาย 2% ใน acetylacetone ใน 1.5 M Na_2CO_3
- สารละลาย Ehrlichs reagent

วิธีวิเคราะห์

เตรียมสารละลายเจือจางจาก stock GlcN solution ให้มีปริมาณ GlcN 0-20 μg โดยใส่ stock GlcN solution ปริมาตร 0, 3, 5, 8, 10, 12 μl แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 300 μl หลังจากนั้นเติม 4 N HCl ลงในแต่ละสารละลายเจือจาง GlcN แล้วปรับสารละลายเจือจาง GlcN แต่ละความเข้มข้นให้เป็นกลางโดยเติม 2M Na_2CO_3 0.4 ml แล้วเขย่าเบาๆ หลังจากนั้นเติมสารละลาย 2% ใน acetylacetone ใน 1.5 M Na_2CO_3 ปริมาตร 0.5 ml นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จึงเติม สารละลาย Ehrlichs reagent 0.5 ml และเขย่าแรงๆ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร นำค่าที่ได้แต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ GlcN กับค่าการดูดกลืนแสง



ภาพผนวกที่ ข 1 กราฟมาตรฐานของ glucosamine (GlcN)

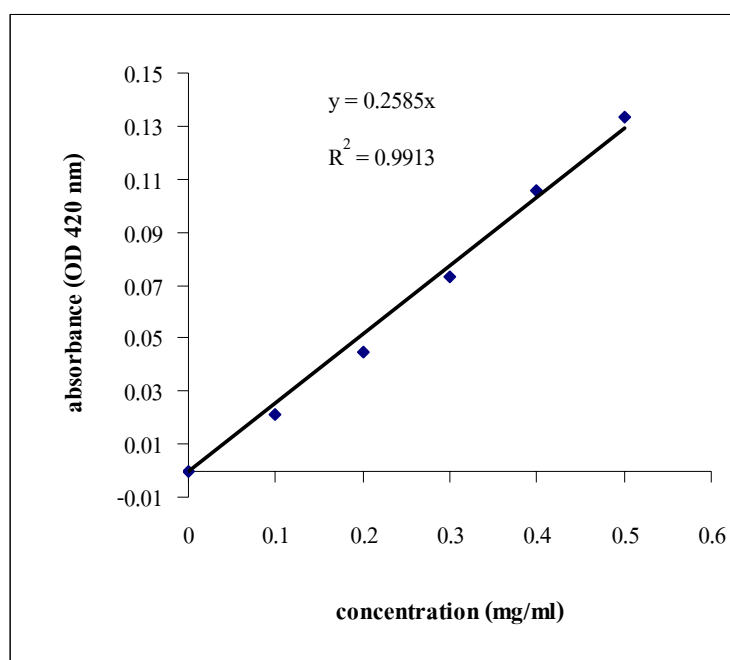
กราฟมาตรฐานของ *N*-acetylglucosamine (GlcNAc)

สารเคมี

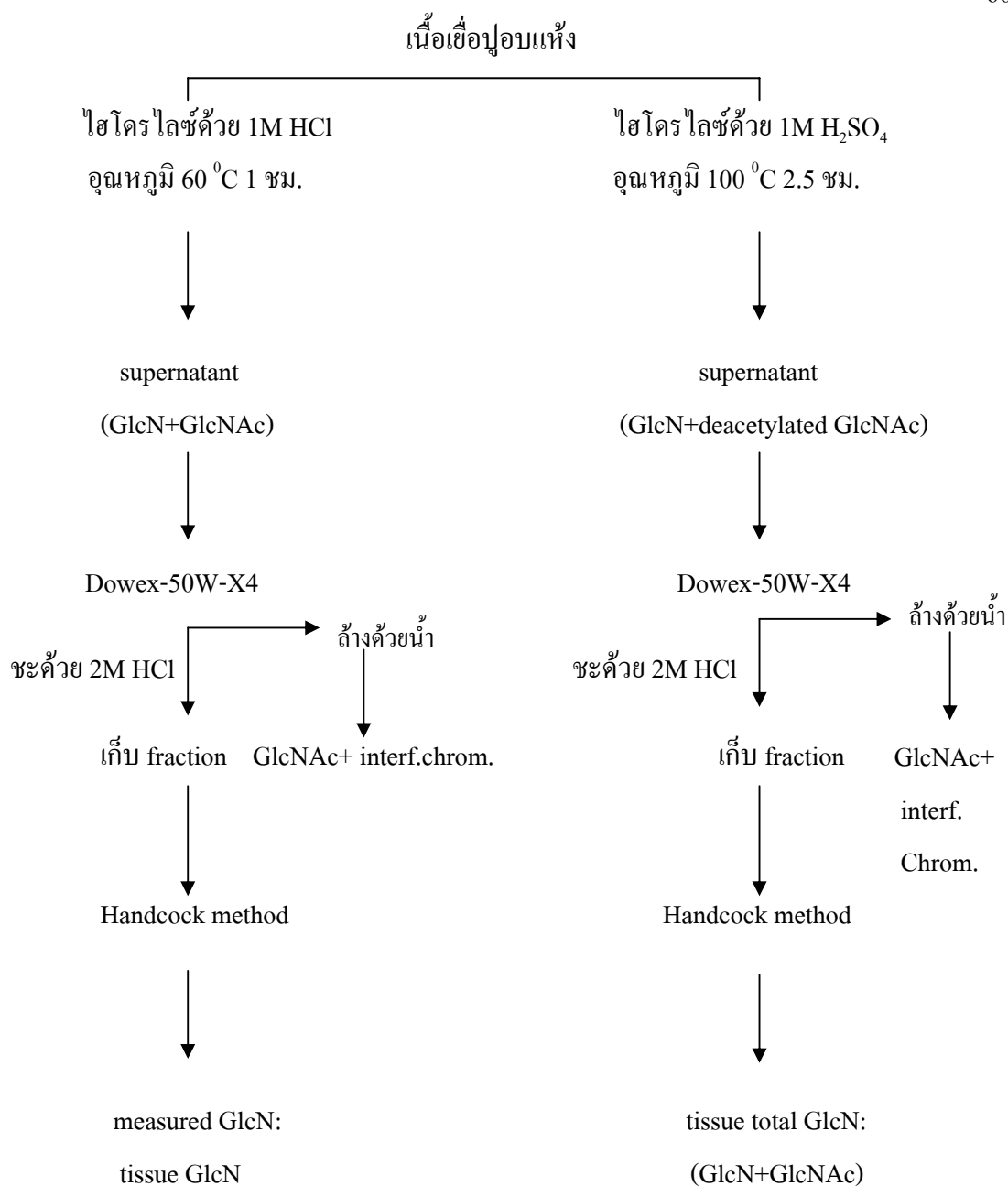
- สารละลาย *N*-acetylglucosamine 1.0 mg/ml (stock GlcNAc solution)
- สารละลาย Schales' reagent

วิธีวิเคราะห์

เตรียมสารละลายเจือจางจาก stock GlcNAc solution ให้ได้ความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml ตามลำดับ หลังจากนั้นเติมสารละลาย Schales' reagent 2 ml ลงในสารละลายเจือจาง GlcNAc แต่ละความเข้มข้น แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าที่ได้แต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ GlcNAc (mg/ml) กับค่าการดูดกลืนแสง



ภาพผนวกที่ ข 2 กราฟมาตรฐานของ *N*-acetylglucosamine (GlcNAc)



หมายเหตุ: ปริมาณ GlcNAc คัดจาก ปริมาณ tissue total GlcN ลบด้วยปริมาณ GlcN

ภาพผนวกที่ ข 3 ขั้นตอนวิเคราะห์ glucosamine และ N-acetylglucosamine

5. สารเคมีในการวิเคราะห์สารสี

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน β -carotene และ Astaxanthin

5.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานตั้งต้น (Stock standard solution)

นำสารมาตรฐาน β -carotene (Sigma, USA) 3 mg ละลายด้วย hexane 2 ml เตรียมเป็นสารละลายมาตรฐานตั้งต้น หาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานด้วย UV/Vis spectrum โดยเจือจางสารมาตรฐาน 200 เท่า ด้วย hexane แล้วนำไปวัดค่าความเข้มข้นที่แน่นอนโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ซึ่งคำนวณความเข้มข้นจาก Absorbance ที่ $\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$ จากสมการ

$$\beta\text{-carotene } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{A \times \text{MW} \times \text{CF}}{\epsilon}$$

โดยที่ A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm

MW = น้ำหนักโมเลกุลของ β -carotene (536.85)

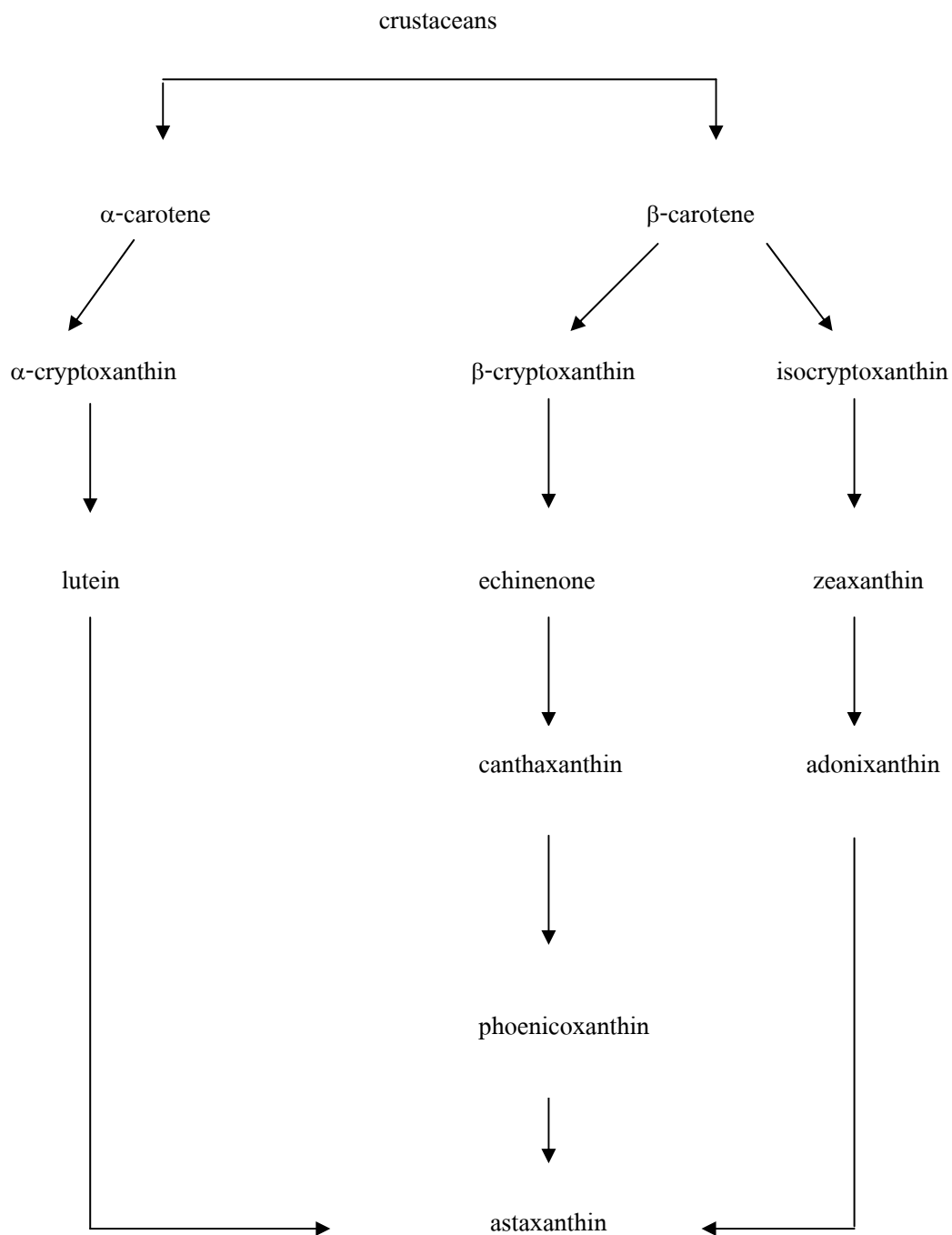
CF = correction factor

ϵ = molar absorptivity (ใช้ hexane เป็น reference มีค่า 2592)

5.2 การเตรียมสารมาตรฐานสำหรับใช้เป็น working standard solution

เตรียมสารละลายมาตรฐาน β -carotene ที่มีความเข้มข้น 0.15 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ปริมาตร 2 ml โดยคำนวณจาก สมการ $N_1V_1 = N_2V_2$ แล้วนำสารละลายมาตรฐาน β -carotene ที่คำนวณไว้จากข้อ 5.1 ระเหยจนแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วละลายด้วย hexane 2 ml เก็บในขวด vial สีชา ที่อุณหภูมิ -20°C

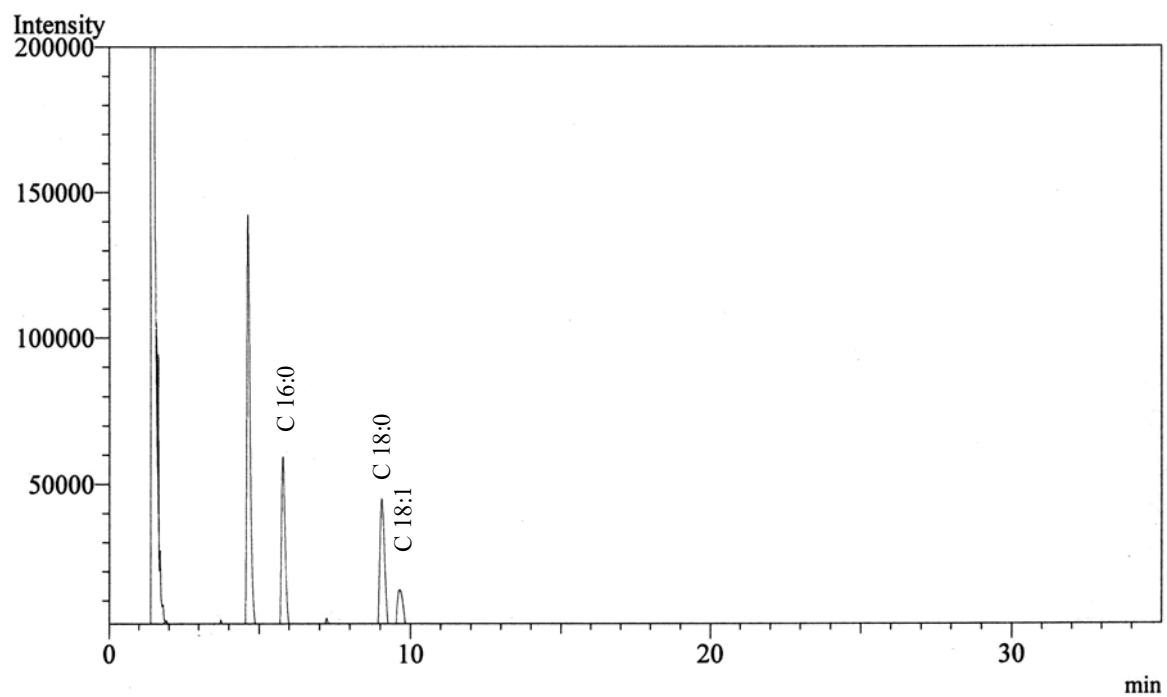
หมายเหตุ: ส่วนการเตรียมสารละลายมาตรฐานของ astaxanthin สามารถใช้หลักการเตรียมเหมือนกับการเตรียมสารละลายมาตรฐาน β -carotene โดยนำสารมาตรฐาน astaxanthin 4 mg ละลายด้วย dichloromethane 2 ml หาความเข้มข้นด้วย UV/Vis spectrum โดยเจือจางสารมาตรฐาน 200 เท่า ด้วย hexane แล้วนำไปวัดค่าความเข้มข้นที่แน่นอนโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ซึ่งคำนวณความเข้มข้นจาก absorbance ที่ $\lambda_{\max} = 468 \text{ nm}$ สำหรับ working standard solution ของ astaxanthin วิธีการเตรียมเหมือน ข้อ 5.2 โดยเตรียม working standard solution ของ astaxanthin ให้มีความเข้มข้น 0.55 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$



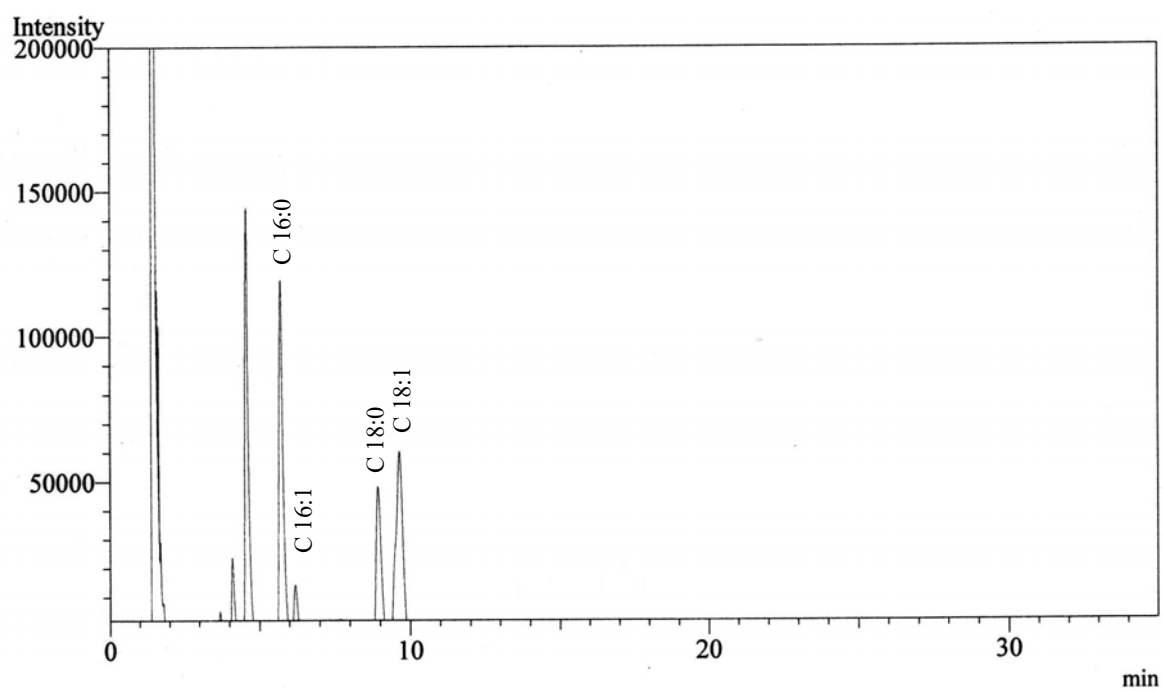
ภาพผนวกที่ ข 4 กระบวนการ metabolism และการเปลี่ยนแปลง carotenoid ในครัสเตเชีย
(Latscha, 1990)

ภาคผนวก ค

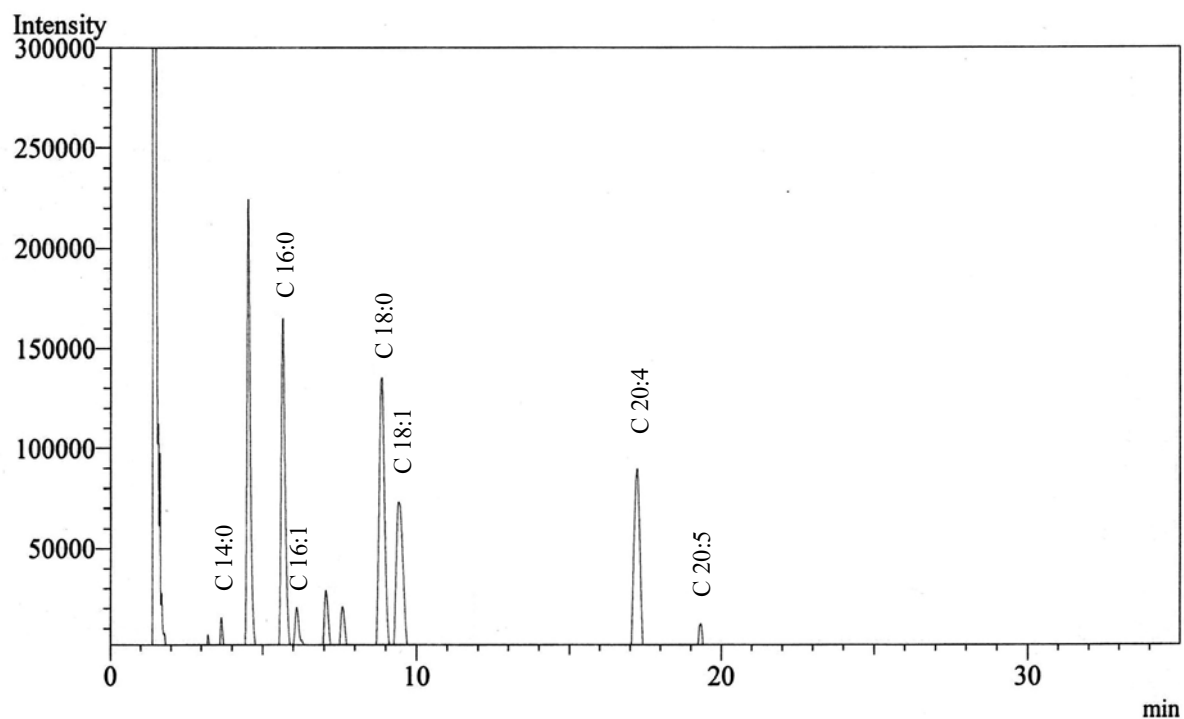
โครมาโตแกรม



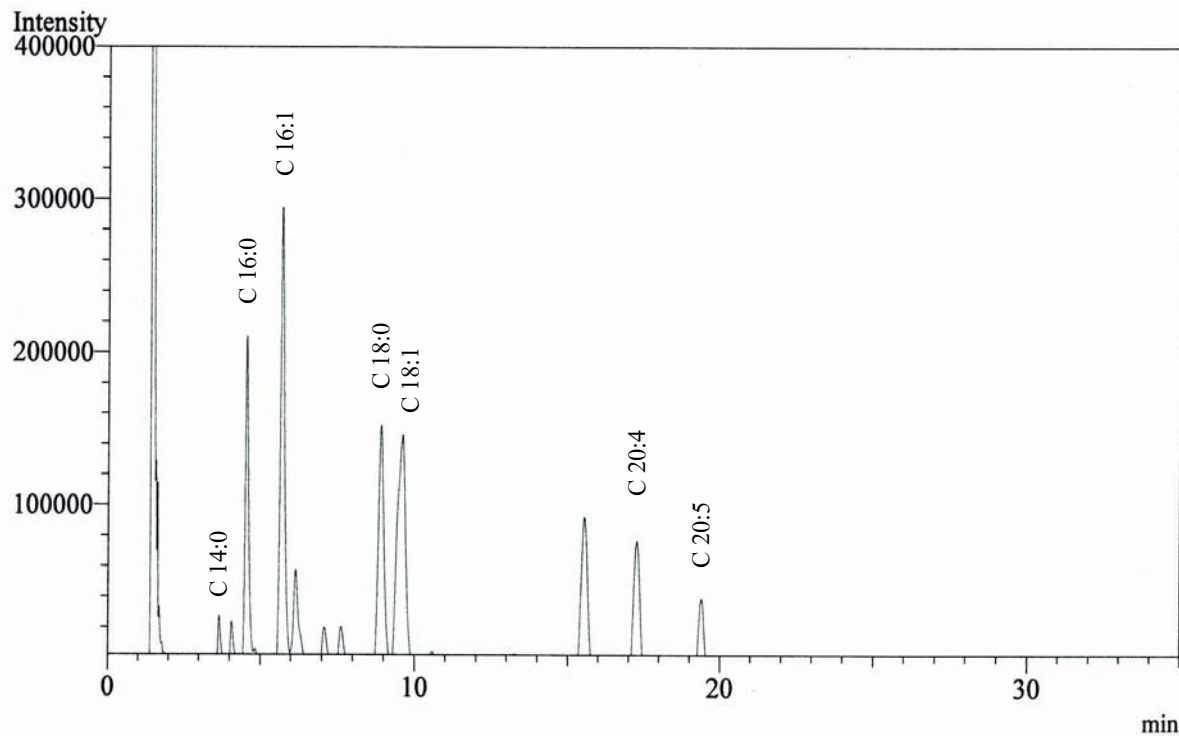
ภาพผนวกที่ ค 1 องค์ประกอบของ fatty acid ในเหงือกปูทะเลปกติ



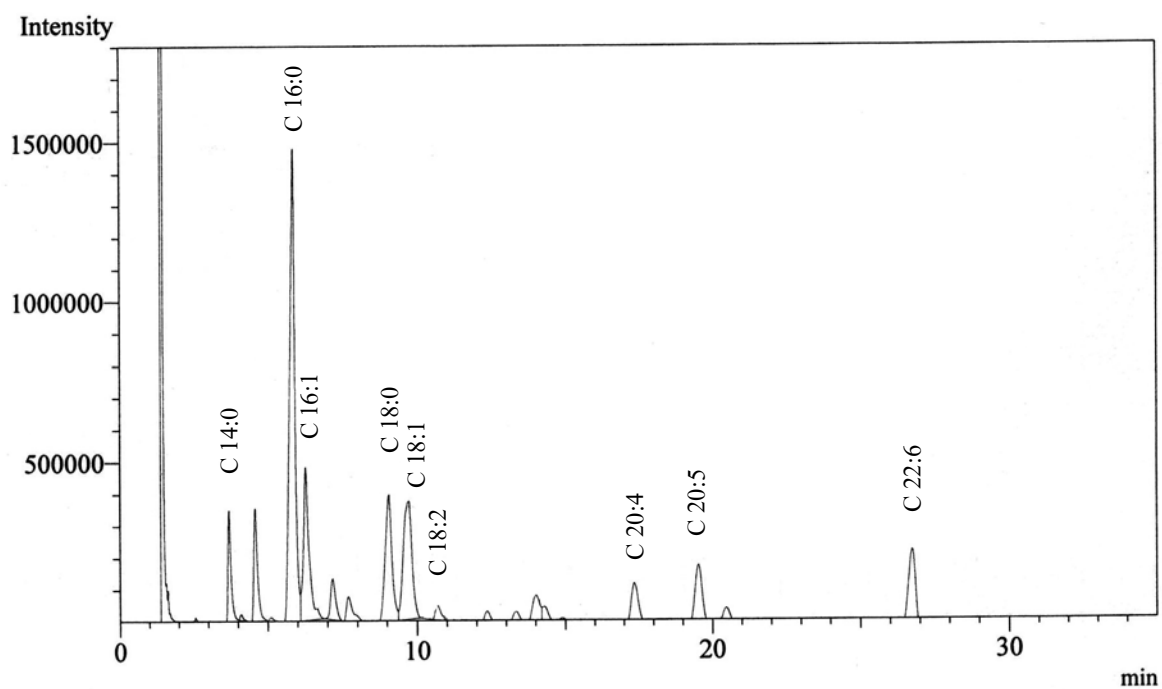
ภาพผนวกที่ ค 2 องค์ประกอบของ fatty acid ในเหงือกปูทะเลที่มีอาการท้องแดง



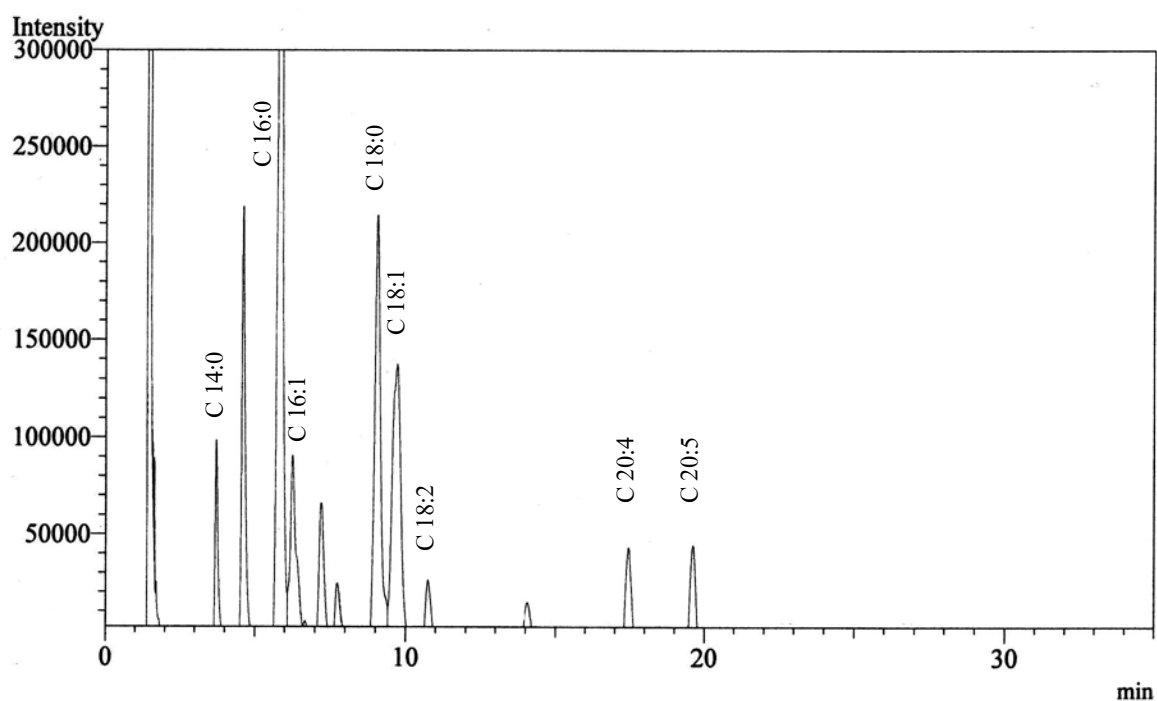
ภาพผนวกที่ ค 3 องค์ประกอบของ fatty acid ในเนื้อเยื่อใต้กระดูกปลูทะเลปกติ



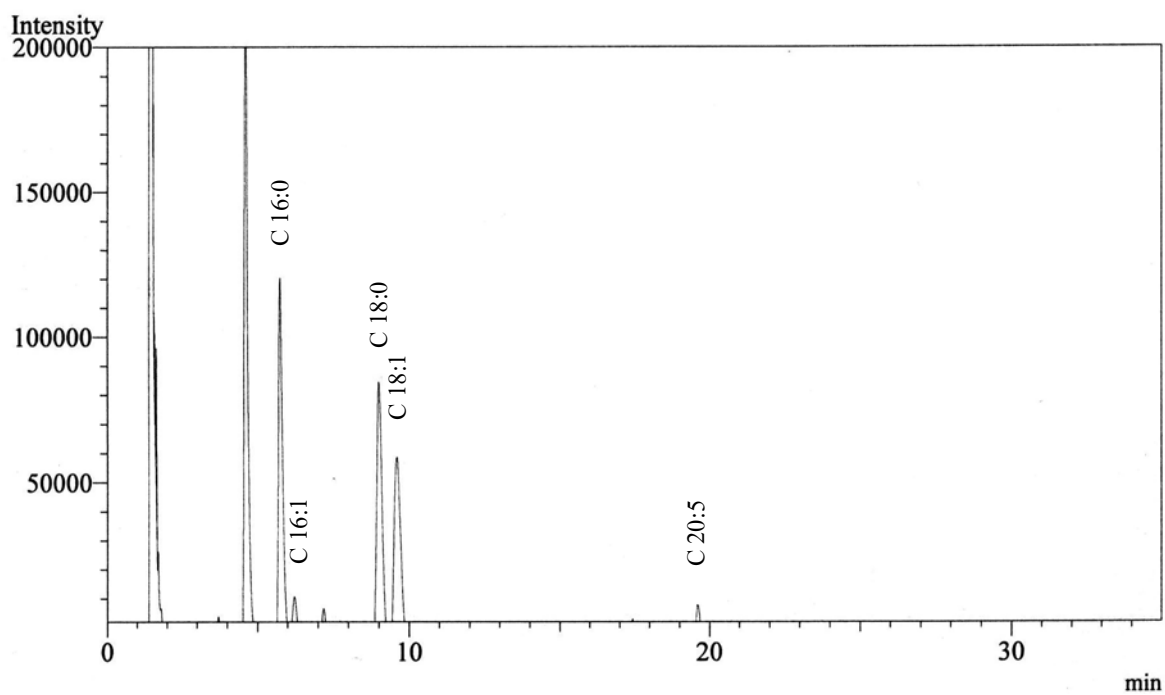
ภาพผนวกที่ ค 4 องค์ประกอบของ fatty acid ในเนื้อเยื่อใต้กระดูกปลูทะเลที่มีอาการท้องแดง



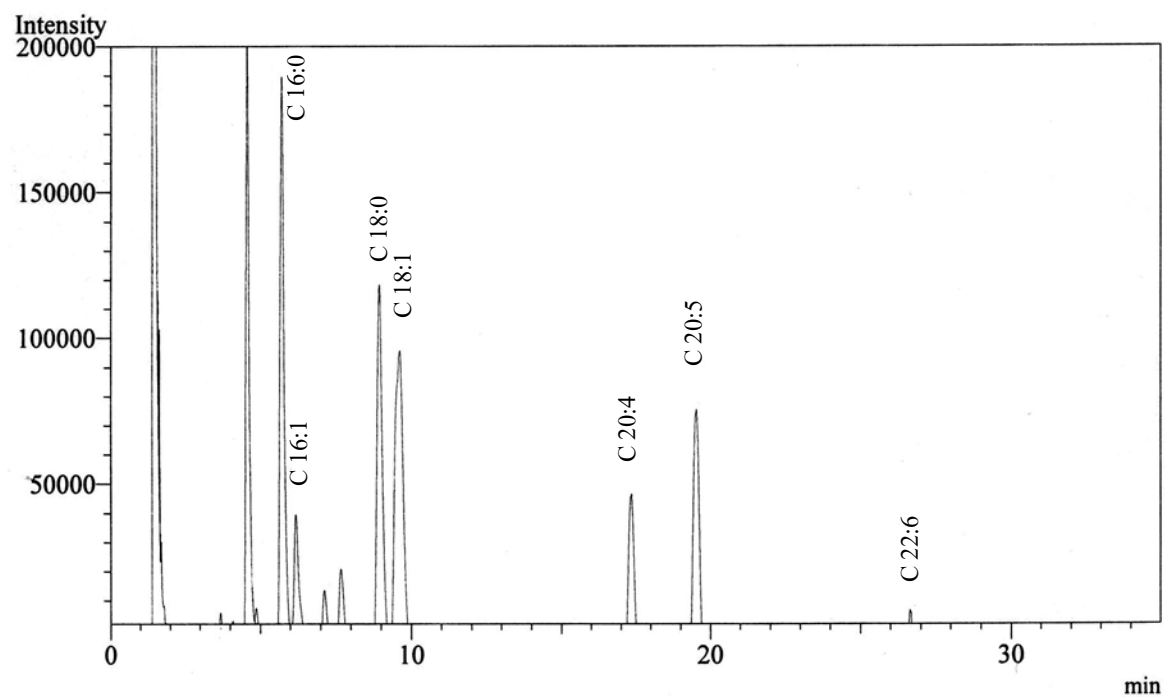
ภาพผนวกที่ ๕ องค์ประกอบของ fatty acid ในตับปูทะเลปกติ



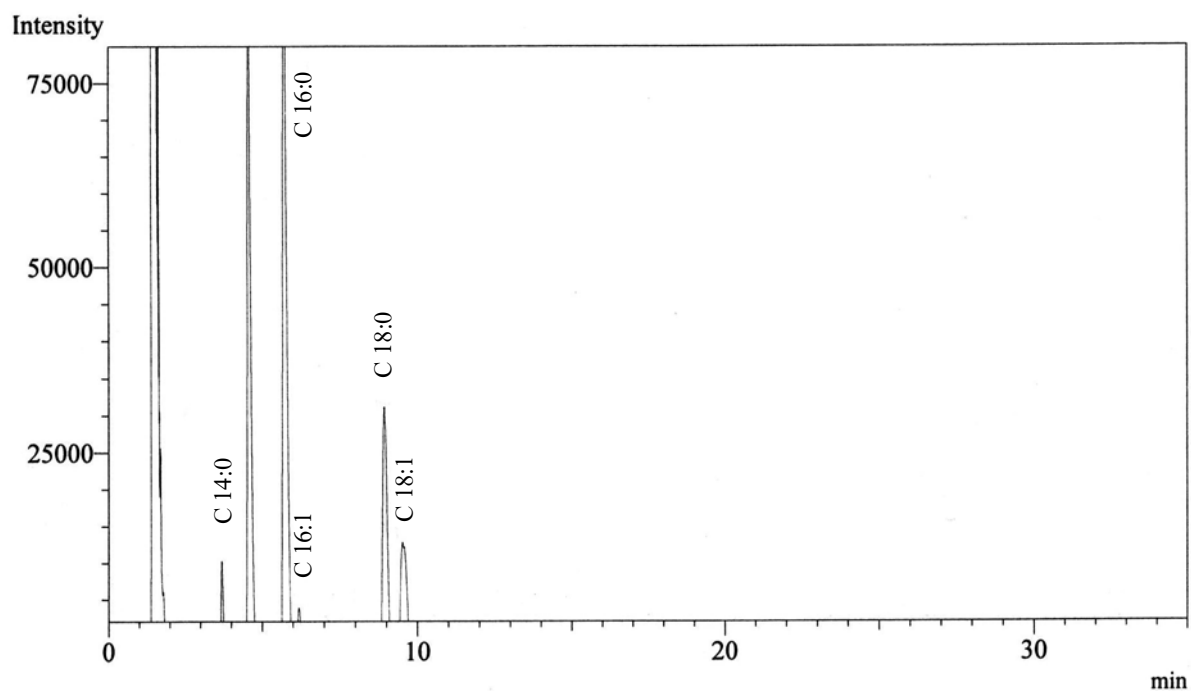
ภาพผนวกที่ ๖ องค์ประกอบของ fatty acid ในตับปูทะเลที่มีอาการท้องแดง



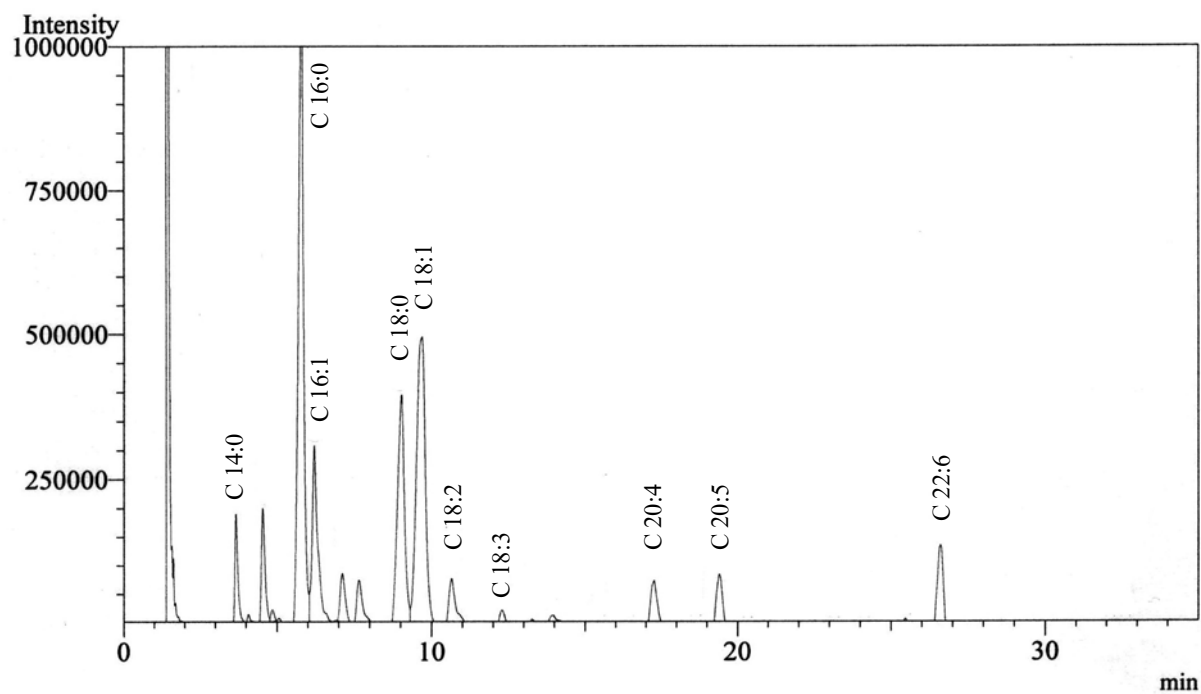
ภาพผนวกที่ ค 7 องค์ประกอบของ fatty acid ในเนื้ปูทะเลปกติ



ภาพผนวกที่ ค 8 องค์ประกอบของ fatty acid ในเนื้ปูทะเลที่มีอาการท้องแดง



ภาพผนวกที่ ค 9 องค์ประกอบของ fatty acid ในเลือดปูทะเลปกติ



ภาพผนวกที่ ค 10 องค์ประกอบของ fatty acid ในเลือดปูทะเลที่มีอาการท้องแดง