

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของสาหร่ายหนาม *Acanthophora spicifera* และสาหร่ายผักกาดทะเล *Ulva rigida* ต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ในพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาว

Effects of *Acanthophora spicifera* and *Ulva rigida* on gonadal development of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) broodstock

ดร. ธนพรรณ เสี่ยงแจ่ม

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

มหาวิทยาลัยบูรพา

เริ่มบริการ

11 ต.ค. 2564

18 มี.ค. 2565

3 93992

600993420

รหัสโครงการ 66778

สัญญาเลขที่ 30/2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของสาหร่ายหนาม *Acanthophora spicifera* และสาหร่ายผักกาดทะเล *Ulva rigida* ต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ในพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาว

Effects of *Acanthophora spicifera* and *Ulva rigida* on gonadal development of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) broodstock

ดร. ธนพรรณ เสี่ยงแจ่ม

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 30/2562

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 30/2562).

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
สารบัญคำย่อ	ซ
1. บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 สมมติฐานของการทดลอง	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 ขอบเขตของการวิจัย	3
2. วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง	4
2.1 วัสดุอุปกรณ์	4
2.2 สารเคมี	5
2.3 วิธีการทดลอง	6
2.3.1 การเตรียมสารสกัดจากสาหร่าย 4 ชนิด	6
2.3.2 การแยกและการหาปริมาณของไขมันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC)	6
2.3.3 การวิเคราะห์กรดไขมันโดยเครื่องโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS)	7
2.3.4 การคำนวณปริมาณสารอาหารที่จำเป็นในสูตรอาหาร	7
2.3.5 การทดลองเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวด้วยสาหร่ายทะเล	9
2.3.6 การสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่ออวัยวะ	10
2.3.7 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE	10
2.3.8 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค western blot	10
2.3.9 การตรวจหาโปรตีนด้วยเทคนิค Immunostaining	10
2.3.10 การเตรียมชิ้นเนื้อ	11
2.3.11 การตัด paraffin section	11
2.3.12 การย้อม Hematoxylin and Eosin	12
2.3.13 ขั้นตอนการย้อมสีพิเศษด้วยวิธี Immunohistochemistry	12
2.3.14 การทดสอบทางสถิติ	13
2.3.15 วิเคราะห์สัดส่วนสาหร่ายที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง	13

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4 ผลการทดลอง	13
2.4.1 การแยกและการหาปริมาณของไขมันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวนาง (Thin-layer Chromatography, TLC)	13
2.4.2 การคำนวณสูตรอาหารพ่อแม่พันธุ์	15
2.4.3 การศึกษาการสะสมวิตามินอี แคโรทีนอยด์ และทอรีนของอวัยวะสืบพันธุ์เฮปาทopancreas (hepatopancreas) และเนื้อกุ้ง	19
2.4.4 ศึกษาผลของอาหารกับระยะเวลาของการพัฒนารังไข่ และผลของอาหารต่อปริมาณไข่ อัตราการ ฟัก และความแข็งแรงของลูกกุ้ง	20
2.4.5 ศึกษาผลของอาหารที่มีส่วนประกอบของสาหร่ายกับการเจริญเติบโตของกุ้ง	22
2.4.6 ศึกษาผลของอาหารที่มีส่วนประกอบของสาหร่ายกับการเจริญของอวัยวะของกุ้ง	23
2.4.7 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE	26
2.4.8 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western Blot	26
2.4.9 การวิเคราะห์ตำแหน่งของโปรตีนโดยเทคนิค Immunohistochemistry	27
3. อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	29
4. เอกสารอ้างอิง	31
6. ภาคผนวก ก	35
7. รายงานสรุปการเงิน	

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงชนิดของสาหร่ายในแต่ละตัวทำละลาย	13
2 แสดงสูตรอาหารแม่กึ่งขาวเสริมสาหร่ายผักกาดทะเลและสาหร่ายหนาม	15
3 แสดงปริมาณไขมันในสูตรอาหารแม่กึ่งขาวเสริมสาหร่ายผักกาดทะเลและสาหร่ายหนาม	16
4 แสดงปริมาณกรดอะมิโนในสูตรอาหารแม่กึ่งขาวเสริมสาหร่ายผักกาดทะเลและสาหร่ายหนาม	17
5 แสดงปริมาณกรดอะมิโนในสูตรอาหารแม่กึ่งขาวเสริมสาหร่ายผักกาดทะเลและสาหร่ายหนาม เทียบกับสูตรอาหารเอกชน	18
6 วิตามินอี แคโรทีนอยด์ และทอรีนของอวัยวะสืบพันธุ์ เฮปพาทوپแนครอส และเนื้อกึ่ง	19
7 ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมของอวัยวะสืบพันธุ์ เฮปพาทوپแนครอส และเนื้อกึ่งเพศเมีย	20
8 ปริมาณวิตามินอี ของอวัยวะสืบพันธุ์ เฮปพาทوپแนครอส และเนื้อกึ่ง	20
9 ระยะเวลาของการพัฒนารังไข่ของแม่กึ่ง	21
10 ผลการเจริญเติบโต ปริมาณไข่ อัตราการฟัก และความแข็งแรงของลูกกึ่ง	21
11 ผลการเจริญเติบโตของกึ่ง ณ วันที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์ที่ 4) เทียบกับวันเริ่มต้นทำการวิจัย (D0)	22
12 ผลการเจริญเติบโตของอวัยวะของกึ่ง ณ วันที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์ที่ 4) เทียบกับวันเริ่มต้น ทำการวิจัย (D0)	24

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 แผนผังแสดงการสกัดสารจากสาหร่าย 4 ชนิด	6
2-2 การวิเคราะห์ปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดในอัตราส่วนของกุ้งแต่ละระยะด้วย GC-MS	8
2-3 TLC chromatogram ชนิดของไขมันจากสารสกัดสาหร่ายแห้ง	14
2-4 TLC chromatogram ชนิดของไขมันจากสารสกัดสาหร่ายสด	14
2-5 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักของกุ้ง (กรัม) ณ วันที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์ที่ 4) เทียบกับวันเริ่มต้นทำการวิจัย (D0)	23
2-6 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวของกุ้ง (เซนติเมตร) ณ วันที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์ที่ 4) เทียบกับวันเริ่มต้นทำการวิจัย (D0)	23
2-7 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนัก hepatopancreas ของกุ้งในรูปแบบ hepato-somatic index ณ วันที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์ที่ 4) เทียบกับวันเริ่มต้นทำการวิจัย (D0)	24
2-8 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักอัตราส่วนของกุ้งในรูปแบบ testicular-somatic index (TSI) ณ วันที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์ที่ 4) เทียบกับวันเริ่มต้นทำการวิจัย (D0)	25
2-9 แสดงค่าเฉลี่ยกล้ามเนื้อ Muscle-somatic index (MSI) ณ วันที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์ที่ 4) เทียบกับวันเริ่มต้นทำการวิจัย (D0)	25
2-10 แสดงการแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลโดยเทคนิค SDS-PAGE	26
2-11 แสดงแบบแผนโปรตีนที่ได้จากการตรวจสอบของ Anti-IAGH และ Anti-vitellin โดยเทคนิค Western Blot	26
2-12 การแสดงออกของโปรตีนจากเนื้อเยื่อส่วน CNS (A), Gut (B), HP (C) และ TT (D) ของกุ้งเพศผู้ ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry โดยใช้ 1°Ab : Anti-IAGH	27
2-13 การแสดงออกของโปรตีนจากเนื้อเยื่อส่วน CNS (A), Gut (B), HP (C) และ OV (D) ของกุ้งเพศเมีย ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry โดยใช้ 1°Ab : Anti-IAGH	27
2-14 การแสดงออกของโปรตีนจากเนื้อเยื่อส่วน CNS (A), Gut (B), HP (C) และ TT (D) ของกุ้งเพศผู้ ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry โดยใช้ 1°Ab : Anti-vitellin	28
2-15 การแสดงออกของโปรตีนจากเนื้อเยื่อส่วน CNS (A), Gut (B), HP (C) และ OV (D) ของกุ้งเพศเมีย ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry โดยใช้ 1°Ab : Anti-vitellin	28

สารบัญคำย่อ

ARA	Arachidonic acid
DHA	Docosahexaenoic acid
EPA	Eicosapentaenoic acid
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
GLA	Gamma-linolenic acid
LA	Linoleic acid
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
TLC	Thin Layer Chromatography

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

สาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ (macroalgae) เป็นทรัพยากรธรรมชาติที่ไม่มีระบบราก ใบ และระบบการลำเลียงน้ำ และสารอาหารที่แท้จริง อาศัยการดูดซึมโดยวิธีการแพร่ (osmosis) ซึ่งสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่สามารถจำแนกได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) สาหร่ายสีแดง (red algae) สาหร่ายสีเขียว (green algae) และสาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae) สาหร่ายแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันตามชนิดของรงควัตถุ สาหร่ายแต่ละกลุ่มมีการนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายรูปแบบ ทั้งการใช้เป็นอาหารโดยตรงสำหรับมนุษย์และสัตว์ เนื่องจากสาหร่ายอุดมไปด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิด ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน วิตามิน และใยอาหาร เป็นต้น นอกจากนี้ยังนำมาใช้ประโยชน์และในรูปแบบของสารสกัดซึ่งมีคุณสมบัติต่างๆ มากมาย สารประกอบจากสาหร่ายทะเล (bioactive compound) ได้รับการยอมรับว่ามีคุณสมบัติที่ดีในด้านต่างๆ เช่น ด้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) ด้านเชื้อไวรัส (antivirus) ด้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ด้านมะเร็ง (anticancer) ด้านการแข็งตัวของเลือด (anti-coagulant) ลดความดันโลหิต (Chew et al., 2008; Yangthong et al., 2009) และเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน (Chiu et al., 2008; Yangthong et al., 2012) เป็นต้น ซึ่งสารประกอบจากสาหร่ายทะเล ได้แก่ xanthin, astaxanthin, carotenoid, phenolic acids, flavonoid, phlorotannin, bromophenol, ulvan, และ polyphenol ซึ่งในสาหร่ายสีน้ำตาลมักถูกเรียกว่า phlorotannin (Nakai et al., 2006) ส่วนในสาหร่ายสีแดงจะถูกเรียกว่า bromophenol (Li et al., 2007) สารในกลุ่มฟีนอล คือ สารประกอบที่มีวงแหวน (aromatic ring) และกลุ่มไฮดรอกซิลและรวมไปถึงอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล ซึ่งมีการแทนที่ด้วยหมู่เคมีต่าง ๆ จำแนกตามโครงสร้าง (จำนวนของวงแหวนฟีนอลและองค์ประกอบอื่นของโครงสร้างที่เชื่อมวงแหวน) แบ่งออกเป็น 5 ประเภท ได้แก่ ไดเฟอรูลอยล์มีเทน (diferuloylmethane) สทิลบีน (stilbenes) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) กรดฟีนอลิก (phenolic acids) และแทนนิน (tannins) (Weerawatanakorn, 2013) โดยกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ (Atanassova et al., 2011) ซึ่งสาหร่ายทะเลถือเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีความสำคัญและมีคุณค่าและมีองค์ประกอบของสารสำคัญที่มีความสามารถเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดี นอกจากนี้กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นองค์ประกอบในสาหร่ายหลายชนิดยังมีความสำคัญ โดยเฉพาะกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน เช่น กรดไขมันโอเมก้า 3 ที่ประกอบด้วยกรดไขมันสำคัญคือ EPA (eicosapentaenoic acid) และ DHA (docosahexaenoic acid) เป็นต้น โดยทั่วไปสาหร่ายที่ให้ไขมันได้สูงพบทั้งในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียวและไดอะตอม เช่น *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Isochrysis* sp., *Tetraselmis* sp. เป็นต้น นอกจากนี้ไขมันของสาหร่ายยังมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นประโยชน์อยู่มากนอกเหนือจาก EPA และ DHA เช่น arachidonic acid (ARA), gamma-linolenic acid (GLA), linoleic acid (LA) เป็นต้น (Chisti, 2007) ซึ่งกรดไขมัน

เหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งของอุตสาหกรรมอาหาร และสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและอุตสาหกรรมยาได้อีกด้วย ในการศึกษาปริมาณไขมันและชนิดของกรดไขมันในสาหร่ายขนาดใหญ่ที่มีมากในธรรมชาติ มีการศึกษาในสาหร่ายหลายชนิด ได้แก่ สาหร่ายสีแดง (*Acanthophora* sp.) สาหร่ายสีเขียว (*Ulva rigida*, *U. intestinalis*, *Caulerpa racemosa*, *C. lentilifera*, *Cladophora* sp.) สาหร่ายสีน้ำตาล (*Sargassum* sp., *Padina* sp.) เป็นต้น ซึ่งสาหร่ายทะเลได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เพราะในสาหร่ายทะเลมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูง (Lohrmann, 2007) สำหรับสาหร่ายทะเลสีเขียวและสาหร่ายทะเลสีแดงซึ่งพบได้หลายชนิด พบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นที่ยอมรับและน่าจะมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างสูงทั้งในปัจจุบันและอนาคต เนื่องจากเป็นสารธรรมชาติ ซึ่งแตกต่างจากสารที่สังเคราะห์ขึ้นจากสารเคมีที่ทำให้ผู้บริโภคไม่มั่นใจในผลที่จะได้รับจากสารเคมีเหล่านั้น (Yang, 2000) จากคุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายทะเลดังกล่าวแล้วนั้น ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาชนิดของไขมันและกรดไขมันสำคัญในสาหร่ายทะเล 4 ชนิด ได้แก่ สาหร่ายพวงอุ้ง (*Caulerpa lentillifera*), สาหร่ายโพรง (*Solieria robusta*), สาหร่ายลันมังกร (*Halymenia durvillei*) และสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้ง และสัตว์เศรษฐกิจ

ทั้งนี้ ในโครงการก่อนหน้า (วช 61) ทีมผู้วิจัยได้ทำการศึกษาค่าประกอบของสารสกัดจากสาหร่ายเพื่อวิเคราะห์หาสารที่มีคุณประโยชน์ เช่น ไขมัน และกรดไขมันจำพวก PUFA ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการ มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต การพัฒนาเพศทั้งในมนุษย์ และสัตว์เศรษฐกิจ หรือสารพวกซิลิเฟตพอลิแซคคาไรด์ ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งให้ต้นทุนที่ค่อนข้างต่ำ แต่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง หากนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง การกระตุ้นการเจริญเติบโต และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในสัตว์เศรษฐกิจ อาทิ กุ้งขาว ซึ่งเป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย และมีสัดส่วนทางการตลาดที่ค่อนข้างสูง ก็จะสามารถทำให้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งมีทางเลือกในการลดต้นทุนการผลิตกุ้งมากขึ้น ด้วยเหตุนี้ งานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสาหร่ายหนาม หรือสาหร่ายมงกุฎหนาม (*Acanthophora spicifera*) และสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) ในแง่การผลิตอาหารเสริมเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวในรายล้อมเยา และเป็นการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจให้แก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ หรืออีกนัยหนึ่งการให้กุ้งกินอาหารที่มาจากธรรมชาติก็เป็นทางเลือกหนึ่งที่จะตอบโจทย์ในแง่ของการใส่ใจสุขภาพ ด้วยการเน้นอาหารที่มาจากธรรมชาติ หรือการบริโภคอาหารออร์แกนิก ซึ่งสังคมปัจจุบันนั้นให้ความสำคัญก็จะสามารถสร้างจุดขายตรงนี้ให้แก่เกษตรกรได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพ่อพันธุ์กุ้งขาว
2. ศึกษาปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของแม่พันธุ์กุ้งขาว
3. ศึกษาปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมในการกระตุ้นระบบสืบพันธุ์ของพ่อพันธุ์กุ้งขาว
4. ศึกษาปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมในการกระตุ้นระบบสืบพันธุ์ของแม่พันธุ์กุ้งขาว
5. ศึกษาอัตราส่วนของปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวในรูปแบบสูตรอาหาร

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

สารสกัดจากสาหร่ายมีผลต่อการกระตุ้นระบบสืบพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์กุ้ง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สัดส่วนและปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพ่อพันธุ์กุ้งขาว
2. ได้สัดส่วนและปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของแม่พันธุ์กุ้งขาว
3. ได้สัดส่วนและปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมในการกระตุ้นระบบสืบพันธุ์ของพ่อพันธุ์กุ้งขาว
4. ได้สัดส่วนและปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมในการกระตุ้นระบบสืบพันธุ์ของแม่พันธุ์กุ้งขาว
5. ได้อัตราส่วนของปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวในรูปแบบสูตรอาหาร

1.5 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพ่อพันธุ์กุ้งขาว โดยการให้สาหร่ายสดในปริมาณต่างๆเทียบกับน้ำหนักตัว พร้อมทั้งวัดความยาวจากก้านตาจนถึงหาง เส้นรอบวง และชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบ

2. ศึกษาปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของแม่พันธุ์กุ้งขาว โดยการให้สาหร่ายสดในปริมาณต่างๆเทียบกับน้ำหนักตัว พร้อมทั้งวัดความยาวจากก้านตาจนถึงหาง เส้นรอบวง และชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบ

3. ศึกษาปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมในการกระตุ้นระบบสืบพันธุ์ของพ่อพันธุ์กุ้งขาว โดยการให้สาหร่ายสดในปริมาณต่างๆเทียบกับน้ำหนักตัว พร้อมทั้งเทียบน้ำหนักอัมชะ และปริมาณการสร้างอสุจิ

4. ศึกษาปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมในการกระตุ้นระบบสืบพันธุ์ของแม่พันธุ์กุ้งขาว โดยการให้สาหร่ายสดในปริมาณต่างๆเทียบกับน้ำหนักตัว พร้อมทั้งเทียบน้ำหนักรังไข่ และปริมาณการสร้างไข่

5. ศึกษาอัตราส่วนของปริมาณสาหร่ายที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวในรูปแบบสูตรอาหาร โดยการคำนวณสูตรอาหารที่เหมาะสม เพื่อถ่ายทอดการเผยแพร่ความรู้ไปยังเกษตรกร

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 วัสดุอุปกรณ์

1. สำลี
2. ตู้อบ
3. Rack
4. ถังก๊าซไนโตรเจน
5. กระดาษฟอยด์ (foil)
6. พาราฟิล์ม (parafilm)
7. ช้อนตักสาร (spatula)
8. ขวด vial ปริมาตร 2 ml
9. กระบอกตวง (cylinder)
10. กรวยกรอง (glass funnel)
11. เครื่อง Rotary evaporator
12. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
13. เข็มฉีดยาแก้ว ปริมาตร 25 μ l
14. หลอดทดลอง ปริมาตร 12 ml
15. ตู้ดูดควันสารเคมี (Fume hood)
16. บีกเกอร์ ปริมาตร 50, 100, 1000 ml
17. เครื่อง BLook LED transilluminator
18. เครื่องปั่นเหวี่ยงสุญญากาศ (Speed vac)
19. ขวดแก้ว Duran ปริมาตร 100, 500, 1000 ml
20. เครื่อง Gas chromatography-mass spectrometry
21. High performance thin layer chromatography plate (HPTLC silica gel plate)

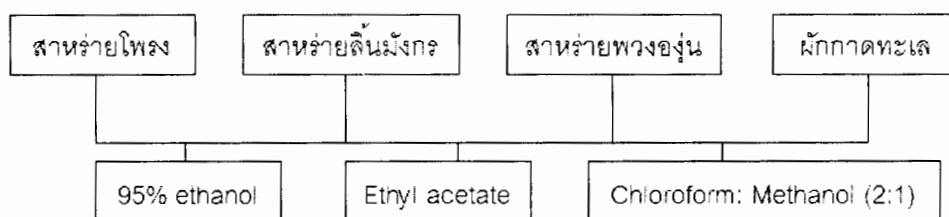
2.2 สารเคมี

1. PC standard
2. Hexane (C_6H_{14})
3. Methanol (CH_3OH)
4. Primuline reagents
5. Chloroform ($CHCl_3$)
6. 1-Propanol (C_3H_8O)
7. 80% Acetone (C_3H_6O)
8. Ethyl acetate ($C_4H_8O_2$)
9. น้ำกลั่น (Distilled water)
10. Diethyl ether ($(C_2H_5)_2O$)
11. Methyl acetate ($C_3H_6O_2$)
12. 1% Sulfuric acid (H_2SO_4)
13. Toluene (C_7H_8 ($C_6H_5CH_3$))
14. 95% Ethanol (CH_3CH_2OH)
15. Absolute ethanol (C_2H_5OH)
16. 0.25% Potassium chloride (KCl)
17. 2% Potassium bicarbonate ($KHCO_3$)
18. 0.1% Butylated hydroxytoluene (BHT)

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การสกัดสารจากสาหร่ายโดยตัวทำละลาย 95% ethanol, Ethyl acetate และ Chloroform: Methanol (2:1)

นำตัวอย่างสดของสาหร่าย มาล้างทำความสะอาด ชั่งน้ำหนักสด และตากให้แห้ง จากนั้นนำสาหร่ายมาตัดให้ละเอียด และชั่งน้ำหนักแห้ง แล้วมาแช่ในตัวทำละลาย ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 7 วัน เพื่อให้สารละลายในสาหร่ายแต่ละชนิดออกมา โดยใช้ตัวอย่างแต่ละชนิด (ตัวอย่างแห้ง:ตัวทำละลาย) ในตัวทำละลาย 95% ethanol จะมีอัตราส่วนที่ใช้ดังนี้ 1:10 ส่วนในตัวทำละลาย Ethyl acetate และ Chloroform: Methanol (2:1) อ้างอิงจากทุน วช 61 (ภาพ 3-1) เมื่อครบเวลา ได้ทำการกรองสารละลายของแต่ละตัวอย่างโดยใช้กรวยแก้วและสำลี จากนั้นนำสารสกัดไประเหยแห้งเพื่อนำตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator (BUCHI, Switzerland) จะได้สารสกัดของตัวอย่างแต่ละชนิดและนำสารสกัดที่ได้ไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของสาร



ภาพ 2-1 แผนผังแสดงการสกัดสารจากสาหร่ายโพรง, สาหร่ายลื่นมังกร, สาหร่ายพวงองุ่น และผักกาดทะเลโดยตัวทำละลาย 95% ethanol, Ethyl acetate และ Chloroform: Methanol (2:1)

2.3.2 การแยกและการหาปริมาณของไขมันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (Thin-layer Chromatography, TLC)

สารสกัดจะถูกแยกและหาปริมาณของไขมันด้วย TLC โดยนำสารละลายที่มีไขมันที่สกัดได้ (ตัวอย่างละ 5 μl) และ PC standard (*Sigma-Aldrich, USA*) มาหยดให้เป็นเส้นตรง ขนาด 5x1 mm. ลงบน High performance thin layer chromatography plate (HPTLC silica gel plate) และรอให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำแผ่น HPTLC แต่ละแผ่นแช่ในบีกเกอร์ที่มี separation buffer (methyl acetate, 1-propanol, chloroform และ 0.25% KCl ในอัตราส่วน 25:25:10:9 โดยปริมาตร) เมื่อสารแยกเสร็จแล้วนำแผ่น HPTLC มาเป่าให้แห้ง และฉีดพ่นด้วย primuline reagents (*Sigma-Aldrich, USA*) ที่ประกอบด้วย primuline 5 mg ใน 80% acetone (ในน้ำกลั่น) ปริมาณ 100 ml จากนั้นรอนจนแห้ง แบน PC ปรากฏและสามารถถ่ายภาพได้ภายใต้ Blue light โดยใช้เครื่อง BLook LED transilluminator (GeneDirex, Taiwan) และนำมาวิเคราะห์ความเข้มของแบนโดยใช้โปรแกรม ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)

2.3.3 การวิเคราะห์กรดไขมันโดยเครื่องโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-แมสสเปกโตรเมตรี (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)

อ้างอิงจาก วช. 61 โดย นำสารสกัดสาหร่ายแต่ละชนิดมาทำการสกัดไขมันโดยการทำให้แห้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสุญญากาศ (Thermo scientific SC210A, USA) เมื่อสารสกัดแห้งได้นำมาทำการเติมหมู่เมทิล (Methylation) โดยการเติม toluene 1 ml, 1% sulfuric acid 2 ml และ arachidic acid (20:0) 2.5 μ l นำไปต้มในตู้อบ 80°C, 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมาเติมด้วย 2%K₂HCO₃ 2 ml, hexane: diethyl ether 5 ml และ 0.1% BHT เมื่อสารตัวอย่างแยกชั้นเลือกเฉพาะสารชั้นบน (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) พอทำครบจำนวนนำมาทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน เมื่อสารตัวอย่างแห้งได้เติม Chloroform: Methanol (2:1) 0.5 ml ลงในแต่ละตัวอย่าง และนำตัวอย่างลงในขวด vial สำหรับทำ GC-MS จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ โดยใช้การฉีดปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง ด้วยเครื่อง GC-MS (Agilent Technology GC 6890N, USA) ใช้กับคอลัมน์ HP-5MS (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 mm, Agilent Technology, USA) กรดไขมันบริสุทธิ์จะได้รับการวิเคราะห์ภายใต้อุณหภูมิคอลัมน์ 210 °C และความดันคอลัมน์ระหว่าง 110 kPa-380 kPa ที่ 7 kPa/min หลังจากการวิเคราะห์ กรดไขมันจะถูกประมวลผลด้วย Agilent Chem Station data system

2.3.4 การคำนวณปริมาณสารอาหารที่จำเป็นในสูตรอาหาร

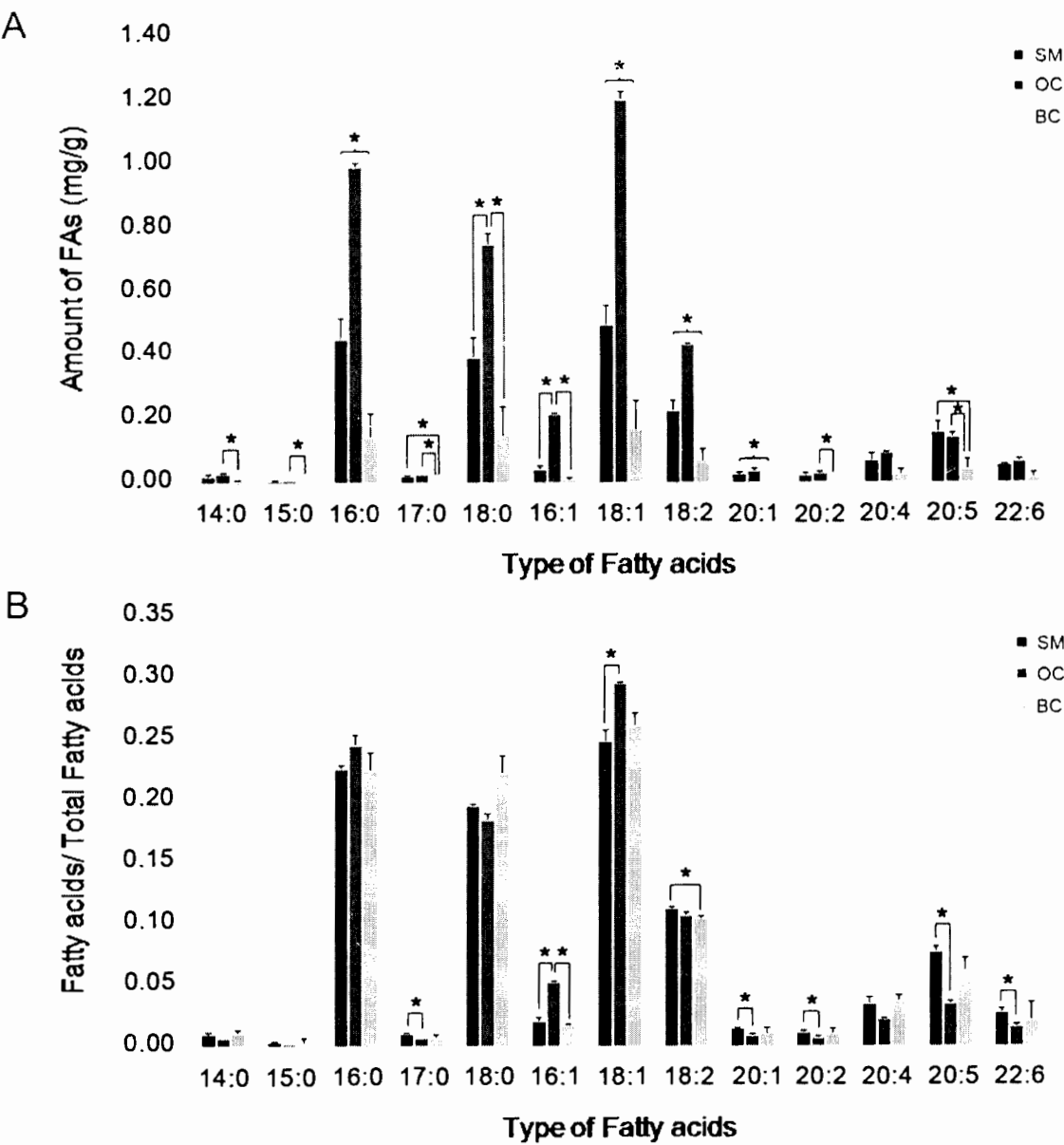
อ้างอิงจาก วช. 61 โดยนำผล GC-MS/MS ในแง่ของปริมาณกรดไขมันที่จำเป็นมาคำนวณ ควบคู่กับงานวิจัยขอที่วิจัยก่อนหน้านี้ เกี่ยวกับปริมาณสารอาหารในอินทผลุง ดังแสดงในหัวข้อผลการวิจัย

1 นำข้อมูลการวิเคราะห์ปริมาณไขมัน และกรดไขมันในสาหร่ายทั้งสองชนิด โดยเฉพาะ HUFA และ PUFA ที่ได้จากโครงการก่อนหน้านี้ (วช 61) มาคำนวณ และกำหนดอัตราส่วนในการให้อาหาร

2 นำข้อมูลจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ของหัวหน้าโครงการเกี่ยวกับการวิเคราะห์ปริมาณและสัดส่วนของไขมัน โดยเฉพาะ fatty acids (FA) ในอินทผลุงของกึ่งกำมกรามเพศผู้ในระยะ SM, OC และ BC เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมในกึ่งขาว (Siangcham et al., 2015) ซึ่งได้ผลตามที่แสดงในภาพที่ 3 โดยตั้งสมมติฐานว่า ปริมาณและสัดส่วนของ FA ในอาหารที่เหมาะสมที่สุดน่าจะปรับให้ใกล้เคียงหรือไม่น้อยกว่าที่ปรากฏตามธรรมชาติในอินทผลุง โดยเฉพาะในอินทผลุงระยะ OC การวิเคราะห์ FA ในอินทผลุงของกึ่งทั้งสามระยะ โดยวิธี GC-MS พบว่าสามารถแบ่ง FA ตามปริมาณ สัดส่วนและอัตราการเพิ่มออกได้เป็น 4 กลุ่ม (ภาพที่ 3) คือ

1. กลุ่มที่มีปริมาณและสัดส่วนสูงสุด คือ hexadecanoic acid (16:0) octadecanoic acid (18:0) และ octadecanoic acid (18:1)
2. กลุ่มที่มีปริมาณและสัดส่วนปานกลาง คือ octadecadienoic acid acid (18:2)
3. กลุ่มที่มีปริมาณและสัดส่วนต่ำ คือ hexadecanoic acid (16:1), eicosatetraenoic acid (ARA, 20:4), eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5) และ docosahexaenoic acid (DHA, 22:6)

4. กลุ่มที่มีปริมาณและสัดส่วนต่ำสุด คือ tetradecanoic acid (14:0), pentadecanoic acid (15:0), eicosenoic acid (20:1) และ eicosadienoic acid (20:2)



ภาพท 2-2 การวิเคราะห์ปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดในอ้นทะเลของกุ้งแต่ละระยะด้วย GC-MS โดย (A) แสดงปริมาณของกรดไขมันต่อน้ำหนักต่อมอ้นทะเล และ (B) แสดงอัตราส่วนของกรดไขมันแต่ละชนิดเทียบกับปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (20:4 = ARA, Arachidonic acid; 20:5 = EPA, Eicosapentaenoic acid; 22:6 = DHA, Docosahexaenoic acid; SM = small male; OC = orange claw male; BC = blue claw male; * = แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$) (Siangcham et al., 2015)

จากนั้นจะทำการประเมินปริมาณสาหร่ายให้เพียงพอต่อความต้องการของกุ้ง ภายใต้การควบคุมดูแลของคุณมนทกานติ ท้ามตัน (ผู้อำนวยการ) และคุณชัชวาลี ชัยศรี (นักวิชาการประมงปฏิบัติการ) สถาบันวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งเพชรบุรี

2.3.5 การทดลองเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวด้วยสาหร่ายทะเล

เลือกกุ้งขาวที่จะใช้เป็นพ่อและแม่พันธุ์อายุประมาณ 6-8 เดือน น้ำหนักประมาณ 40 กรัมที่ปราศจากโรค โดยเฉพาะโรคดวงขาว (White Spot Syndrome Virus; WSSV) โรคทอรา (Taura syndrome virus ; TSV) และโรคหัวเหลือง (Yellow-head virus; YHV) ในบ่อคอนกรีตขนาดใหญ่บรรจุน้ำสะอาดที่ได้รับการเปลี่ยนทุกๆ 3 วัน และมีการให้อากาศตลอดเวลา ทั้งนี้สถานที่ตั้งของบ่อเลี้ยงมีหลังคาปกคลุมมิดชิด ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งเพชรบุรี

ทำการคัดเลือกกุ้งคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น จำนวน 60 ตัว ต่อ 1 การทดลอง โดยจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วแบ่งกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว ซึ่งจะถูกนำมาพักในบ่อเลี้ยงเพื่อให้ปรับตัวเข้ากับการกินอาหารเม็ดประมาณ 10 วัน จากนั้นเริ่มให้อาหารดังนี้

กลุ่มที่ 1 ให้สาหร่ายที่คำนวณได้กรดไขมัน 10 mg/kg

กลุ่มที่ 2 ให้สาหร่ายที่คำนวณได้กรดไขมัน 40 mg/kg

กลุ่มที่ 3 (กลุ่มควบคุม) ให้อาหารเม็ด

โดยให้ติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยตรวจดูการเจริญเติบโตและพัฒนาของต่อมอัณฑะในเพศผู้หรือรังไข่ในเพศเมีย จากการตรวจภายนอกบริเวณแผ่น carapace ทุกๆ 7 วัน จากนั้นเมื่อครบ 4 สัปดาห์ในระหว่างการทดลอง นำพ่อและแม่พันธุ์ มาทำการตรวจสอบการเจริญเติบโต (น้ำหนักตัว, ความยาวของลำตัว) GSI (gonad-somatic index) ปริมาณท่อสุจิ (seminiferous tubule) ตามรายงานของ Poljaroen et al. (2011) เตรียมสไลด์เนื้อเยื่อต่อมอัณฑะที่เก็บในก้อนพาราฟินแล้วทำการประเมินการแบ่งตัวของ spermatogonia ในกึ่งเพศผู้ และทำการเก็บรังไข่ และไข่ ในกึ่งเพศเมีย จากนั้นย้อมด้วย Insulin-like androgenic gland hormone เพื่อดูการสร้างฮอร์โมนเพศในกึ่งเพศผู้ และ vitellognin เพื่อดูความสมบูรณ์ของไข่ในกึ่งเพศเมีย ซึ่งจะช่วยให้ทราบผลกระทบของอาหารสูตรต่างๆ ที่มีต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์สืบพันธุ์ในกึ่ง

การบันทึกผลการทดลอง	ดรชนีชี้วัด
1. ทุก 7 วัน ตลอดระยะเวลาการทดลอง	- ชั่งน้ำหนัก (Body weight) - วัดความยาวลำตัว (Body length) - ตรวจสอบการพัฒนาของต่อมเพศ จากการสังเกตผ่านแผ่น carapace - จำนวนกุ้งที่ลอกคราบ (คำนวณเป็น %)
2. ณ สัปดาห์ที่ 4	- บันทึกดรชนีชี้วัด 4 ค่า ตามที่ได้กล่าวในข้อ 1 แล้ว เก็บตัวอย่างกุ้ง 10 ตัว/กลุ่ม

เพื่อทำการบันทึกครชนีชีวัดเพิ่ม

- Hepato-somatic index (HSI)
 - Testicular-somatic index (GSI)
 - Muscle-somatic index (MSI)
 - เตรียม sections ของ hepatopancreas ต่อมอินทะ และรังไข่แล้วย้อมด้วย Insulin-like androgenic gland hormone และ vitellogenin เพื่อดูการสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ (Siangcham et al., 2013)
-

2.3.6 การสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อวัยของกุ้ง

นำตัวอย่างของกุ้งมาทำการสกัดโปรตีนด้วย lysis buffer พร้อมกับ PMSF ที่ความเข้มข้น 10 mM และทำการบดเนื้อเยื่อด้วยแท่งพลาสติกโพรพิลีนจนเนื้อเยื่อละเอียดโดยทุกครั้งที่บดเนื้อเยื่อต้องทำบนน้ำแข็งเสมอ จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่บดแล้วไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บส่วนของเหลวใสที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำไปวัดปริมาณโปรตีน

2.3.7 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

หยอดสารมาตรฐาน ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และโปรตีนตัวอย่างที่ความเข้มข้น 20 µg ลงในร่องเจลที่เตรียมไว้ ต่อด้วยไฟฟ้าเข้ากับ Power supply โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 100 volt เวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จน Dye front หลุดที่ขอบกระจกด้านล่าง จากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมด้วย coomassie blue เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วย Destaining รอบแรก 20 นาที ล้างด้วย Destaining ครั้งที่ 2 รอจนแผ่นเจลใสแล้วนำไปถ่ายรูปเพื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยเครื่อง Gel documentation

2.3.8 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western Blot

นำโปรตีนตัวอย่างที่ผ่านการแยกด้วยวิธี Gel electrophoresis ย้ายโปรตีนลงกระดาษ Nitrocellulose โดยนำ Filter Papers จำนวน 2 แผ่น จากนั้นวางทับด้วย Nitrocellulose membrane ตามด้วยแผ่นเจล และประกบด้วย Filter Papers จำนวน 2 แผ่น ทับอีกครั้ง โดยตำแหน่งของแผ่นเจลและ Nitrocellulose membrane ต้องดูทิศทางการเคลื่อนที่ของกระแสไฟฟ้า จากนั้นไปใส่ใน Chamber แล้วเติม Transfer buffer pH 9.2 ให้ท่วม นำไปต่อเข้ากับ Power supply โดยใช้กระแสไฟฟ้า 10 volt เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ Nitrocellulose membrane มาย้อมด้วย 1% Ponceau S 1-2 นาที แล้วล้างด้วย PBST รอจนแห้ง เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2.3.9 การตรวจหาโปรตีนด้วยเทคนิค Immunostaining

นำแผ่น Nitrocellulose membrane มาล้างสี Ponceau S ออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมา block nonspecific binding โดยใช้ 5% Skimmed milk ที่ละลายใน PBST เป็นเวลา 1 ชั่วโมงพร้อมเขย่าเบา ๆ จากนั้นแช่แผ่น Nitrocellulose membrane ใน Primary antibody ที่ละลายใน PBST เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องพร้อมเขย่าเบา ๆ แช่แผ่น Nitrocellulose membrane ใน Secondary antibody โดยใช้ horseradish peroxidase – conjugated secondary antibody ที่ละลายใน PBST

เป็นเวลา 1 ชั่วโมงพร้อมเขย่าเบา ๆ เมื่อครบเวลานำไปล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน substrate solution ในที่มีดเป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปถ่ายรูปเพื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยเครื่อง Gel documentation

2.3.10 การเตรียมชิ้นเนื้อ

กระบวนการการเตรียมชิ้นเนื้อหลักๆ คือ

- Fixation เป็นการรักษาสภาพเนื้อเยื่อโดยใช้ formalin เป็น fixative
- Dehydration เป็นการดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อโดยใช้แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้น

สูง

- Clearing โดยใช้ xylene เป็น clearing agent
- Infiltration โดยใช้ paraffin เพื่อรักษาโครงสร้างของเซลล์

นำ specimen เข้าสู่กระบวนการ tissue processing ด้วยเครื่อง (ATP700 Tissue Processor) Automatic tissue processor และเครื่อง (Tissue-Tek®TEC™) Embedding center ชิ้นเนื้อจะผ่านกระบวนการการเตรียมชิ้นเนื้อหลักๆ คือ Fixation จากนั้น Dehydration โดยใช้แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูง เริ่มตั้งแต่ 70% ethanol, 80% ethanol, 90% ethanol, 95% ethanol, absolute ethanol ตามลำดับ จากนั้น Clearing โดยใช้ xylene เป็น clearing agent เพื่อเตรียมพร้อมในกระบวนการ Infiltration เพื่อรักษาโครงสร้างของเซลล์ หลังจากกระบวนการเสร็จสมบูรณ์ให้นำชิ้นเนื้อออกจากเครื่อง Automatic tissue processor วางลงบน Embedding mold ในช่องร้อนของเครื่อง Embedding center เพื่ออุ่น Embedding mold ให้พร้อมใช้งาน ต่อมาใช้ forceps คีบชิ้นเนื้อออกจาก cassette นำมาวางบนแท่นร้อน ตรวจสอบแนวการวางชิ้นเนื้อ โดยวางด้านของชิ้นเนื้อที่ต้องการลงที่ก้นของ Embedding mold จากนั้นย้าย Embedding mold มาที่แท่นเย็นของเครื่อง Embedding พยายามให้ด้านของชิ้นเนื้อที่ต้องการแนบกับก้นของ Embedding mold ให้มากที่สุด วาง Embedding ring ทับ Embedding mold แล้วเติม paraffin ที่เหลวลงไป จากนั้นนำไปวางบนแท่นทำความเย็นรอให้ paraffin แข็งตัว เมื่อบล็อกชิ้นเนื้อแข็งแล้วให้แกะบล็อกชิ้นเนื้อออกจากตัว Embedding mold นำไปแช่ในตู้ทำความเย็นที่ 4 °C

2.3.11 การตัด paraffin section ด้วยเครื่อง Semi-Automatic Rotary Microtome

นำ paraffin block ที่แช่ไว้ในตู้ทำความเย็นมา trim ให้เป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมคางหมู จากนั้นนำมาตัดด้วยเครื่อง Semi-Automatic Rotary Microtome (ERM 3000) เริ่มตัดแบบหยาบๆ จนเห็นเนื้อเยื่อเต็มแผ่น paraffin section จากนั้นทำการตัดที่ความหนา 3 ไมครอน ให้เป็นแถบยาวเรียงต่อกัน (ribbon) นำ ribbon ที่ได้ไปลอยน้ำกลั่นเพื่อตรวจสอบสภาพของ paraffin section หากมีรอยย่นหรือรอยมิด ควรเช็คอุปกรณ์ที่ใช้ตัดให้มีความคมและสะอาด หลังจากนั้นนำไปลอยใน water bath ที่อุณหภูมิ 40-43 °C สังเกต paraffin section ว่าแผ่ขยายเต็มที่แล้วจึงนำสไลด์แก้วที่ coat ด้วย silane ช้อน paraffin section

ขึ้นมาจากบน hot plate ที่อุณหภูมิ 40-45 °C เป็นเวลาข้ามคืน เมื่อครบเวลาให้เก็บสไลด์ในกล่องเพื่อการย้อมในขั้นตอนต่อไป

2.3.12 การย้อม Hematoxylin and Eosin

นำชิ้นเนื้อที่ได้รับมาทำการย้อม H&E โดยขั้นแรกนำมาผ่านกระบวนการ Deparaffinize ด้วย Xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำมา Rehydrate ด้วย Ethanol ความเข้มข้นจากมากไปน้อย (100%, 95% และ 70%) อย่างละ 5 นาที เสร็จแล้วลงน้ำกลั่น 5 นาที ต่อมาลงสี Mayer's hematoxylin เป็นเวลา 1 นาที นำไปผ่านน้ำประปา 10 นาที แล้วนำมาลงสี Eosin Y 10 dips และ 95% Ethanol 20 dips ส่องใต้กล้องและนำไป Dehydrate ด้วย Ethanol ความเข้มข้นจากน้อยไปมาก (70%, 95%, 100%) อย่างละ 5 นาที จากนั้นลง xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เสร็จแล้ว mount ด้วย permount หลังจากนั้นก็ตากสไลด์ไว้ใน Hood เป็นเวลา 1 คืน ให้แห้งแล้วนำไปถ่ายรูปด้วยกล้องถ่ายรูป (Olympus รุ่น BX51)

2.3.13 ขั้นตอนการย้อมสีพิเศษด้วยวิธี Immunohistochemistry

นำสไลด์พาราฟินเข้าสู่กระบวนการละลายพาราฟิน (Deparaffinization) โดยการจุ่มลงใน xylene เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง และนำน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อด้วยวิธี Rehydration โดยนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่างกันตั้งแต่ absolute alcohol, 95% ethyl alcohol, 90% ethyl alcohol, 80% ethyl alcohol, 70% ethyl alcohol อย่างละ 5 นาที ตามลำดับ หลังจากนั้นนำมาพักในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที ต่อมาทำการกำจัด Endogenous peroxidase enzyme ด้วย 3% Hydrogen peroxide ใน methanol เป็นเวลา 45 นาที (ในที่มืด) จากนั้นล้างด้วย 0.1X phosphate buffered saline with 0.4% Tween 20 (PBST) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ต่อมาทำการ block unreacted aldehydes โดยนำไปแช่ 1% glycine ใน 0.1 M PBS เป็นเวลา 15 นาที เพื่อลด background staining และล้างด้วย 1X PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นหยด 4% BSA ใน 1X PBST เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อ block non-specific sites ทำให้ background staining ลดลง จากนั้นหยด Primary antibody คือ Rabbit polyclonal to MrlAG (1:400) Rabbit polyclonal to vitellogenin (1:400) และ Rabbit polyclonal to Ki67 (1:200) (Abcam plc.) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นล้างด้วย PBST 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที และล้างด้วย 1X PBS 5 นาที หยด Secondary antibody คือ Goat anti-rabbit conjugated Horse-radish peroxidase (HRP) ที่ความเข้มข้น 1:2000 ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ต่อมาล้างด้วย 1X PBST 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และล้างด้วย 1X PBS 5 นาที จากนั้นทำการ incubate เอนไซม์ด้วย substrate โดยหยด Diaminobenzidine (DAB) (Drago plc.) เป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที สังเกตดูการเกิดปฏิกิริยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อได้ผลตามต้องการ ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นและน้ำประปา เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำไปถ่ายภาพด้วยกล้อง Olympus รุ่น BX51 (Olympus Corporation) ต่อมานำมา counter stain ด้วย Mayer's hematoxylin เป็นเวลา 1 นาที 20 วินาที ผ่าน

น้ำประปาไหลผ่าน 15 นาที จากนั้นนำไปเข้าสู่กระบวนการ Dehydration ด้วย 70% ethanol, 80% ethanol, 90% ethanol, 95% ethanol, absolute ethanol และ xylene อย่างละ 5 นาที ตามลำดับ ทำการ mount และนำไปถ่ายภาพด้วยกล้อง Olympus รุ่น BX51 (Olympus Corporation) ที่กำลังขยาย 400 เท่า นำไปนับเซลล์ที่ positive ด้วยโปรแกรม Image J (NIH Image)

2.3.14 การทดสอบทางสถิติ

ปริมาณสารจะถูกแสดงในรูป เป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ S.D.) โดยใช้การทดสอบทางสถิติแบบ One-Way ANOVA ที่ความต่างอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ($P<0.05$)

2.3.15 วิเคราะห์สัดส่วนสารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

โดยการนำปริมาณสารที่เหมาะสมมาคำนวณให้ได้สูตรอาหารที่ช่วยกระตุ้นทั้งการเจริญเติบโตและระบบสืบพันธุ์ในกุ้งพ่อแม่พันธุ์ ภายใต้การควบคุมดูแลของคุณมนทกานติ ท้ามตัน (ผู้อำนวยการ) และคุณชัชวาลี ชัยศรี (นักวิชาการประมงปฏิบัติการ) สถาบันวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งเพชรบุรี

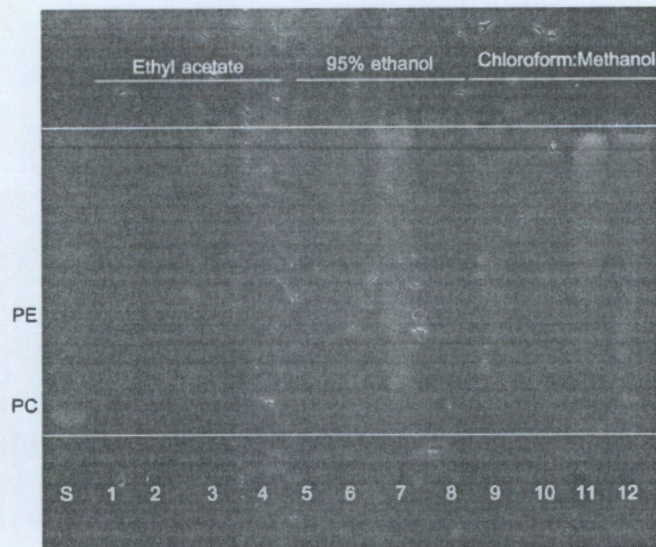
2.4 ผลการทดลอง

2.4.1 การแยกและการหาปริมาณของไขมันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (Thin-layer Chromatography, TLC)

จากผลการทดลองการหาชนิดของไขมันจากสารสกัดสาหร่ายแห้ง 4 ชนิด ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (ภาพ 2-2) ผลที่ได้ คือ พบ Phosphatidylcholine (PC) และ Phosphatidylethanolamine (PE) ได้มากในสาหร่ายพวงองุ่นที่สกัดด้วย 95% ethanol สาหร่ายล้นมังกรและสาหร่ายผักกาดที่สกัดด้วย Chloroform:Methanol เมื่อเทียบกับสาหร่ายชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของสาหร่ายในแต่ละตัวทำละลาย

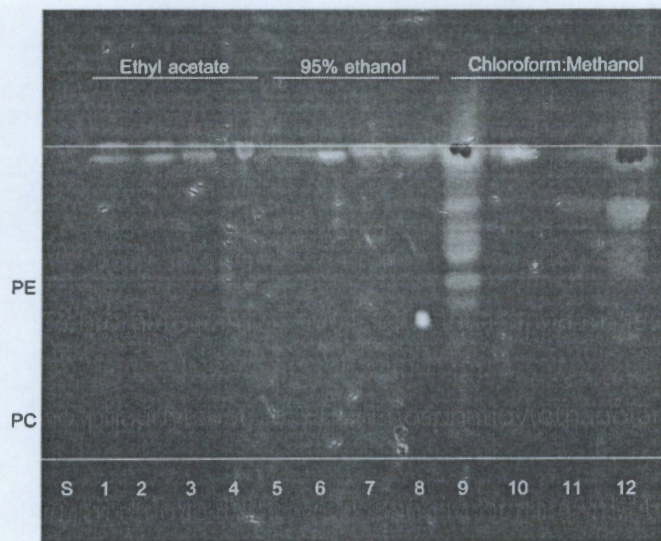
ที่	Ethyl acetate	ที่	95% ethanol	ที่	Chloroform:Methanol
1	สาหร่ายผักกาดทะเล	5	สาหร่ายล้นมังกร	9	สาหร่ายผักกาดทะเล
2	สาหร่ายโพรง	6	สาหร่ายโพรง	10	สาหร่ายโพรง
3	สาหร่ายพวงองุ่น	7	สาหร่ายพวงองุ่น	11	สาหร่ายล้นมังกร
4	สาหร่ายล้นมังกร	8	สาหร่ายผักกาดทะเล	12	สาหร่ายพวงองุ่น



ภาพ 2-3 TLC chromatogram ชนิดของไขมันจากสารสกัดสาหร่ายแห้ง 4 ชนิด
ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

(PC = Phosphatidylcholine, PE = Phosphatidylethanolamine)

จากผลการทดลองการหาชนิดของไขมันจากสารสกัดสาหร่ายสด 4 ชนิด ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (ภาพ 2-3) ผลที่ได้ คือ พบ Phosphatidylcholine (PC) และ Phosphatidylethanolamine (PE) ได้มากในสาหร่ายพวงองุ่นและสาหร่ายผักกาดที่สกัดด้วย Chloroform:Methanol เมื่อเทียบกับสาหร่ายชนิดต่าง ๆ



ภาพ 2-4 TLC chromatogram ชนิดของไขมันจากสารสกัดสาหร่ายสด 4 ชนิด
ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

(PC = Phosphatidylcholine, PE = Phosphatidylethanolamine)

2.4.2 การคำนวณสูตรอาหารพ่อแม่พันธุ์

ทีมผู้วิจัยจึงได้ทำการคำนวณสูตรอาหารแม่พันธุ์กุ้งขาว ดังนี้ โดยเลือกใช้เพียงสองสูตร คือสูตรที่ 1 และสูตรที่ 4

ตารางที่ 2 แสดงสูตรอาหารแม่กุ้งขาวเสริมสาหร่ายผักกาดทะเลและสาหร่ายหนาม

	1	2	3	4	5
Thai Fish Meal A	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00
Squid powder meal กะตอย	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Casein	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
SPC	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Modified starch	8.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Wheat gluten	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Soybean Oil	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Vitamin Premix	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Trace Mineral Premix	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Monophosphat VC	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
แอลฟา tocopheryl acetate50%	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
BHT	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Lecithin	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Cholesterol	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Betain	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
CMC	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
รำ	6.82	3.82	0.82	3.82	0.82
Chitosan	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Krill oil	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Krill meal	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
taurine	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Choline Chloride	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Ulva	0.00	6.00	9.00	0.00	0.00
Acanthophora	0.00	0.00	0.00	6.00	9.00
	100.0	100.0	100.0	100.00	100

Calculated Proximate Content (%As fed basis)

Moisture	7.71	7.59	7.48	7.23	6.94
Protein	46.58	47.11	47.33	46.97	47.12
Fat	9.01	8.70	8.39	8.76	8.46
Ash	9.51	10.42	10.71	12.61	13.98
Fibre	2.41	2.46	2.36	2.55	2.50
NFE	24.79	23.71	23.72	21.89	20.98
GE	449.47	445.15	443.48	437.37	431.80

Calculated Proximate Content (%DM)

Moisture	7.71	7.6	7.5	7.2	6.94
Protein	50.47	51.0	51.2	50.6	50.64
Fat	9.76	9.4	9.1	9.4	9.10
Ash	10.30	11.3	11.6	13.6	15.03
Fibre	2.61	2.7	2.6	2.8	2.69
NFE	26.86	25.7	25.6	23.6	22.55
GE	487.02	481.7	479.35	471.5	464.02

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณไขมันในสูตรอาหารแม่กุ้งขาวเสริมสาหร่ายผักกาดทะเลและสาหร่ายหนาม

Fatty acid from calculated table	Fatty acid profile in diet (% crude lipid)				
	สูตรอาหาร				
	1	2	3	4	5
14:0	3.50	3.58	3.62	3.57	3.60
16:0	10.35	10.56	10.71	10.52	10.64
16:1	2.37	2.43	2.45	2.42	2.44
17:0	0.11	0.11	0.12	0.11	0.12
18:1n-9	8.29	8.35	8.36	8.32	8.31
18:2n-6	3.35	3.33	3.33	3.32	3.30
18:3n-3	0.46	0.47	0.47	0.47	0.47

18:4n-3	1.05	1.07	1.09	1.07	1.09
20:1n-9	0.46	0.47	0.48	0.47	0.48
20:4n-6	0.51	0.53	0.55	0.53	0.54
22:5n-6	0.39	0.41	0.42	0.41	0.42
20:5n-3	6.15	6.31	6.43	6.29	6.39
22:5n-3	0.26	0.27	0.27	0.27	0.27
22:6n-3	4.57	4.70	4.82	4.68	4.78
Total n-3	12.49	12.82	13.09	12.77	13.01
n-3 HUFA	4.83	4.97	5.09	4.94	5.05
Total n-6	4.25	4.27	4.30	4.25	4.26
DHA/EPA	17.58	17.57	17.57	17.57	17.57
DHA/ARA	8.87	8.84	8.77	8.85	8.78
EPA/ARA	11.95	11.87	11.71	11.89	11.74
N3/N6	2.93	3.00	3.04	3.00	3.05
DHA/EPA/ARA	1.44	1.40	1.36	1.41	1.37

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณกรดอะมิโนในสูตรอาหารแม่กุ้งขาวเสริมสาหร่ายผักกาดทะเลและสาหร่ายหนาม

Amino acid from calculated table	สูตรอาหาร				
	1	2	3	4	5
ARG	2.39	2.35	2.33	2.35	2.33
HIS	1.07	1.06	1.05	1.06	1.05
ISO	1.93	1.91	1.90	1.91	1.90
LEU	3.45	3.41	3.40	3.41	3.40
LYS	2.93	2.92	2.91	2.92	2.91
MET	1.08	1.08	1.08	1.08	1.08
PHE	2.00	1.97	1.96	1.97	1.96
THE	1.71	1.70	1.69	1.70	1.69
TYR	1.96	1.94	1.93	1.94	1.93
VAL	2.13	2.12	2.12	2.12	2.12
SER	2.15	2.14	2.14	2.14	2.14
GLU	7.87	7.83	7.83	7.83	7.83
GLY	2.02	2.01	2.01	2.01	2.01

ALA	2.16	2.14	2.14	2.14	2.14
CYS	0.36	0.35	0.35	0.35	0.35
PRO	3.01	3.00	3.00	3.00	3.00

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณกรดอะมิโนในสูตรอาหารแม่กุ้งขาวเสริมสาหร่ายผักกาดทะเลและสาหร่ายหนาม
 เทียบกับสูตรอาหารเอกชน

Amino acid in diet เทียบกับ requirement in goand stage 4 (%protein) over/under						Amino acid profile in diet (%diet) เทียบกับ อาหารเอกชน					
สูตรอาหาร						สูตรอาหาร					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
ARG	3.05	2.89	2.81	2.91	2.84	ARG	0.52	0.45	0.42	0.46	0.43
HIS	1.30	1.24	1.21	1.25	1.22	HIS	-6.37	-6.47	-6.51	-6.45	-6.48
ISO	2.45	2.34	2.29	2.36	2.32	ISO	-7.50	-7.63	-7.68	-7.60	-7.64
LEU	4.62	4.42	4.33	4.45	4.38	LEU	0.58	0.50	0.47	0.51	0.48
LYS	3.78	3.66	3.61	3.68	3.65	LYS	0.84	0.80	0.79	0.81	0.80
MET	1.54	1.49	1.48	1.50	1.49	MET	0.01	-0.01	-0.01	0.00	-0.01
PHE	2.49	2.36	2.31	2.38	2.34	PHE	0.44	0.39	0.37	0.40	0.38
THE	1.16	1.05	1.00	1.07	1.03	THE	0.59	0.56	0.54	0.56	0.55
TYR	2.79	2.69	2.64	2.70	2.67	TYR	0.89	0.86	0.85	0.86	0.85
VAL	2.48	2.38	2.34	2.40	2.37	VAL	1.05	1.02	1.01	1.02	1.02
						SER	0.85	0.82	0.82	0.83	0.82
						GLU	2.10	1.99	1.97	2.01	1.99
						GLY	0.12	0.09	0.08	0.10	0.09
						ALA	0.40	0.36	0.35	0.37	0.36
						CYS	-0.14	-0.16	-0.16	-0.15	-0.16
						PRO	0.40	0.36	0.35	0.37	0.36

2.4.3 การศึกษาการสะสมวิตามินอี แคโรทีนอยด์ และทอรีนของอวัยวะสืบพันธุ์เฮปาทอปแนครอส (hepatopancreas) และเนื้อกึ่ง

จากผลวิเคราะห์การสะสมวิตามินอี แคโรทีนอยด์ และทอรีน ของ อวัยวะสืบพันธุ์ hepatopancreas และเนื้อกึ่ง จากการเสริมสารอาหารเทียบกับชุดควบคุม พบว่าชุดการทดลองที่เสริมวิตามินอี แคโรทีนอยด์ และทอรีน พบวิตามินอี แคโรทีนอยด์ และทอรีน สะสมในอวัยวะสืบพันธุ์ hepatopancreas และเนื้อกึ่งมากกว่าชุดควบคุม ส่วนชุดการทดลองที่เสริมวิตามินอีพบวิตามินอีสะสม ใน hepatopancreas ในกึ่งเพศเมียมากกว่ากึ่งเพศผู้ ส่วนในเนื้อไม่แตกต่างกัน และในอวัยวะสืบพันธุ์พบ น้อยที่สุด ส่วนชุดการทดลองที่เสริมแคโรทีนอยด์พบแคโรทีนอยด์สะสมใน hepatopancreas ในกึ่งเพศ เมียมากกว่ากึ่งเพศผู้ และพบในอวัยวะสืบพันธุ์พบรองลงมา ส่วนในเนื้อและ hepatopancreas ในกึ่งเพศผู้ ไม่แตกต่างกัน และชุดการทดลองที่เสริมทอรีน พบทอรีนสะสมในอวัยวะสืบพันธุ์มากที่สุด รองลงมาพบใน เฮปาทอปแนครอสในกึ่งเพศเมียและกึ่งเพศผู้ไม่แตกต่างกันในเนื้อพบน้อยที่สุดและมีค่าไม่แตกต่างกัน ตามตารางที่ 6

ตารางที่ 6 วิตามินอี แคโรทีนอยด์ และทอรีนของอวัยวะสืบพันธุ์ เฮปาทอปแนครอส และเนื้อกึ่ง

Organ	Vitamin E (mg/kg)		Total carotenoid		Taurine (%)	
	Diet 1	Diet 2	Diet 1	Diet 3	Diet 1	Diet 4
Gonad	5.19±0.04	7.49±0.02 ^a	12.15±0.85	16.75±0.65	2.37±0.02	2.96±0.01
Hepatopancreas	36.76±0.16	45.90±0.15	9.59±4.14	27.36±9.34 ^c	0.54±0.32	1.74±0.01 ^b
Muscle Female	14.10±0.06	26.85±0.57	1.22±0.26	2.29±0.56 ^a	0.25±0.18	0.69±0.02 ^a
Hepatopancreas male	30.44±0.09	35.62±1.32	2.40±0.42	4.18±0.46 ^a	1.35±0.18	1.50±0.01 ^b
Muscle male	19.49±0.02	29.87±0.01	3.22±0.37	4.98±0.07 ^a	0.32±0.15	0.86±0.02 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายความว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ของอวัยวะสืบพันธุ์ hepatopancreas และเนื้อ กึ่ง พบว่าอวัยวะสืบพันธุ์พบมากที่สุดในช่วงการพัฒนารังไข่ระยะที่ 2 และพบปริมาณน้อยที่สุดใน ระยะที่ 4 เช่นเดียวกับในเนื้อ แต่ในเฮปาทอปแนครอส พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะที่ 2 และ 4 ตามลำดับ ตาม ตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมของอวัยวะสืบพันธุ์ hepatopancreas และเนื้อกุ้ง

	Total carotenoid (mg/g)		
	Stage 1	Stage 2	Stage 4
	B	c	a
Gonad	12.10±0.07	16.75±0.65	7.02±0.06
	Ab	b	a
Muscle Female	1.18±0.08	2.29±0.56	0.62±0.07
	A	b	c
Hepatopancreas Female	9.71±0.21	27.36±19.34	48.93±27.01

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวดังหมายความว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีของอวัยวะสืบพันธุ์ hepatopancreas และเนื้อกุ้ง พบว่าอวัยวะสืบพันธุ์พบมากที่สุดในช่วงการพัฒนารังไข่ระยะที่ 2 และพบปริมาณน้อยที่สุดใน ระยะที่ 4 แต่ใน hepatopancreas และในเนื้อกุ้ง พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะที่ 2 และ 4 ตามลำดับ ตามตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณวิตามินอี ของอวัยวะสืบพันธุ์ เฮปาทอปแนครอส และเนื้อกุ้ง

	Vitamin E (mg/g)		
	Stage 1	Stage 2	Stage 4
Gonad	5.12±0.13 ^{ab}	7.56±0.08 ^b	2.07±0.54 ^a
Muscle Female	14.00±.012 ^a	26.85±0.41 ^b	36.75±0.41 ^c
Hepatopancreas Female	36.00±0.11 ^a	45.85±0.83 ^b	74.22±0.13 ^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวดังหมายความว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

2.4.4 ศึกษาผลของอาหารกับระยะเวลาของการพัฒนารังไข่ และผลของอาหารต่อปริมาณไข่ อัตราการฟัก และความแข็งแรงของลูกกุ้ง

ผลของอาหารกับระยะเวลาของการพัฒนารังไข่ในกุ้ง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทุกระยะเวลาของการพัฒนารังไข่ ตามตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ระยะเวลาของการพัฒนารังไข่ของแม่อุ้ง (วัน)

Stage of ovary	time of development (day)			
	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4
stage 1-2	4.25±0.50 ^a	4.00±0.82 ^a	-	3.33±1.15 ^a
stage 2-3	4.00±1.41 ^a	3.00±0.00 ^a	-	2.50±0.71 ^a
stage 3-4	1.33±0.58 ^a	2.00±1.73 ^a	-	1.00±0.00 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายความว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลของอาหารต่อการเจริญเติบโต ปริมาณไข่ อัตราการฟัก และความแข็งแรงของลูกกุ้ง พบว่าอาหารที่เสริมวิตามินอี แคโรทีนอยด์ และทอรีน ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต ต่อปริมาณไข่ และอัตรา การฟัก ส่วนความแข็งแรงของลูกกุ้งในระยะโซเอียพบว่าอาหารที่เสริมวิตามินอีมีปริมาณมากที่สุด และพบว่าอาหารที่เสริมทอรีนมีเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดของกุ้งวัยอ่อนมากกว่าชุดควบคุมและอาหารที่ เสริมวิตามินอี ส่วนอาหารที่เสริมแคโรทีนอยด์ไม่มีผลจากการทดลอง เนื่องจากกุ้งไม่มีการพัฒนารังไข่ ตามตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการเจริญเติบโต ปริมาณไข่ อัตราการฟัก และความแข็งแรงของลูกกุ้ง

Development of shrimp	Diet			
	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4
Initial weight (g)	35.21±0.33 ^a	35.22±2.18 ^a	-	36.50±4.48 ^a
Final weight (g)	33.90±0.43 ^a	34.26±2.28 ^a	-	35.54±4.56 ^a
Final length (cm)	12.73±0.11 ^a	13.32±0.62 ^a	-	13.50±0.71 ^a
Weight of eggs (g)	1.32±0.10 ^a	0.95±0.59 ^a	-	0.95±0.59 ^a
Number of eggs	85,333±577 ^a	78,000±288 ^a	-	78,500±134 ^a
Number of nauplius	53,833±930 ^a	58,125±239 ^a	-	48,750±178 ^a
Number of zoea	45,833±144 ^{ab}	50,000±288 ^b	-	42,500±255 ^a
Number of postlarva 15	22,000±0.00 ^a	22,000±11.54 ^a	-	23,000±0.00 ^a
Hatching rate (%)	63.05±10.55 ^a	47.60±4.70 ^a	-	63.22±13.06 ^a
Survival rate (%)	40.00±0.00 ^b	38.25±0.86 ^a	-	48.42±0.00 ^c
Matured shrimp no.	4	6	none	5

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายความว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

2.4.5 ศึกษาผลของอาหารที่มีส่วนประกอบของสาหร่ายกับการเจริญเติบโตของกุ้ง

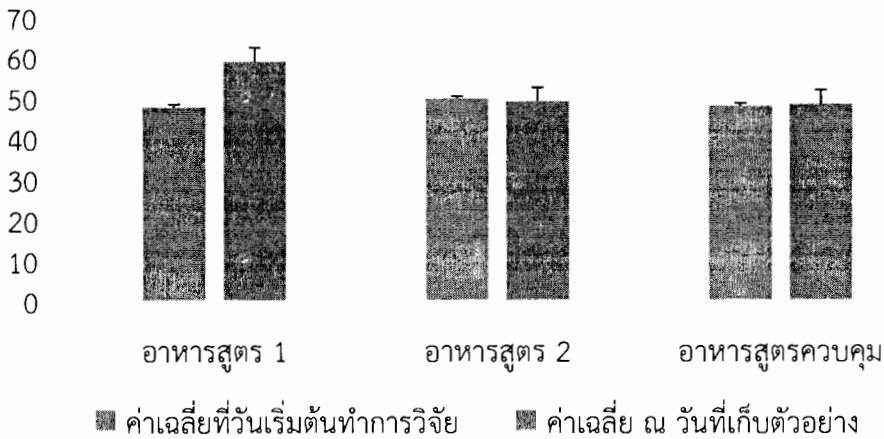
เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักของกุ้ง พบว่า ค่าเฉลี่ยน้ำหนักกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 มีค่า 58.86 กรัม มากกว่าน้ำหนักในวันเริ่มทำการทดลองถึง 11.5 กรัม และมากกว่าอาหารสูตรที่ 2 และอาหารสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 นอกจากนี้เมื่อวัดความยาวกุ้งจากก้านตาถึงปลายหางพบว่ามีค่าเฉลี่ยความยาว 12.38 เซนติเมตร มากกว่าอาหารสูตรที่ 2 และอาหารสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังแสดงในตารางที่ 11 ภาพที่ 1 และ 2

ตารางที่ 11 ผลการเจริญเติบโตของกุ้ง ณ วันที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์ที่ 4) เทียบกับวันเริ่มต้นทำการวิจัย (D0)

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยที่วันเริ่มต้นทำการวิจัย		ค่าเฉลี่ย ณ วันที่เก็บตัวอย่าง	
	ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก (กรัม)	ค่าเฉลี่ยความยาว (เซนติเมตร)	ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก (กรัม)	ค่าเฉลี่ยความยาว (เซนติเมตร)
อาหารสูตร 1	47.71	12.28	58.86*	12.38*
อาหารสูตร 2	49.61	12.02	48.98	11.97
อาหารสูตรควบคุม	47.79	11.95	48.31	11.8

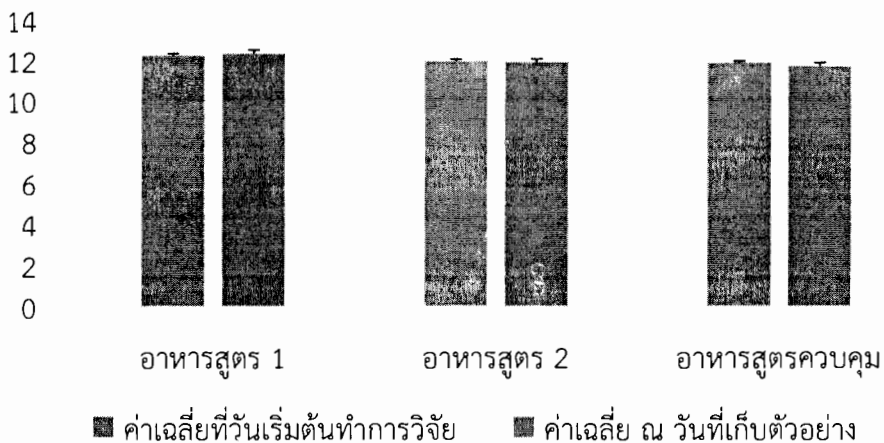
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วย * หมายความว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก (กรัม)



ภาพ 2-5 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักของกุ้ง (กรัม) ณ วันที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์ที่ 4) เทียบกับวันเริ่มต้นทำการวิจัย (D0)

ค่าเฉลี่ยความยาว (เซนติเมตร)



ภาพ 2-6 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวของกุ้ง (เซนติเมตร) ณ วันที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์ที่ 4) เทียบกับวันเริ่มต้นทำการวิจัย (D0)

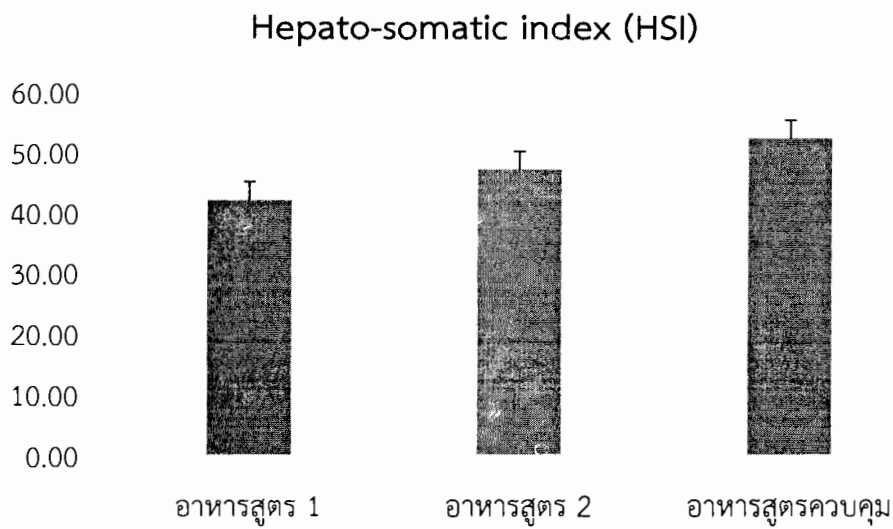
2.4.6 ศึกษาผลของอาหารที่มีส่วนประกอบของสาหร่ายกับการเจริญของอวัยวะของกุ้ง

เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนัก hepatopancreas ของกุ้งในรูปแบบ hepatosomatic index พบว่า ค่าเฉลี่ย HIS กุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 มีค่า 42.26 น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 และอาหารสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อทำการเปรียบเทียบน้ำหนักของอวัยวะในรูปแบบ testicular-somatic index (TSI) พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 มีแนวโน้ม

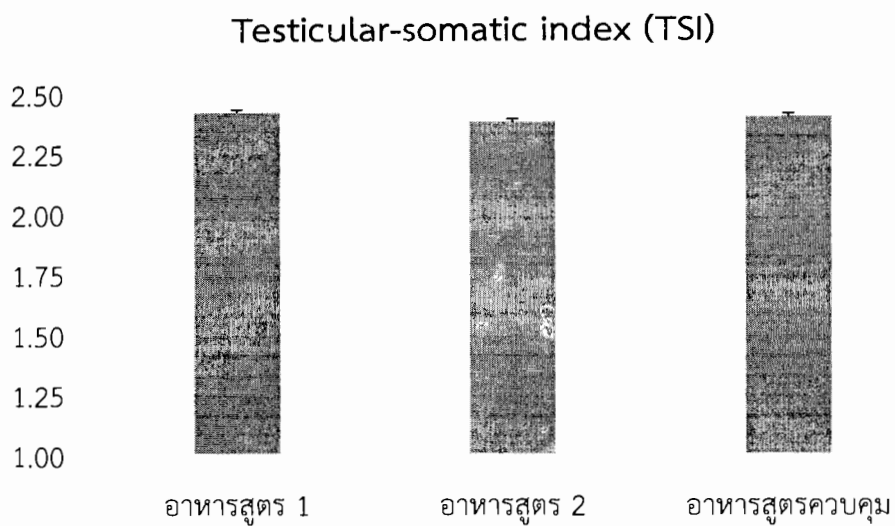
ค่าเฉลี่ยที่มากกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 และอาหารสูตรควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่า ค่าเฉลี่ยกล้ามเนื้อ Muscle-somatic index (MSI) ของกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 มีค่า 248.17 มากกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 และอาหารสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังแสดงในตารางที่ 12 ภาพที่ 3, 4 และ 5

ตารางที่ 12 ผลการเจริญเติบโตของอวัยวะของกุ้ง ณ วันที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์ที่ 4) เทียบกับวันเริ่มต้นทำการวิจัย (D0)

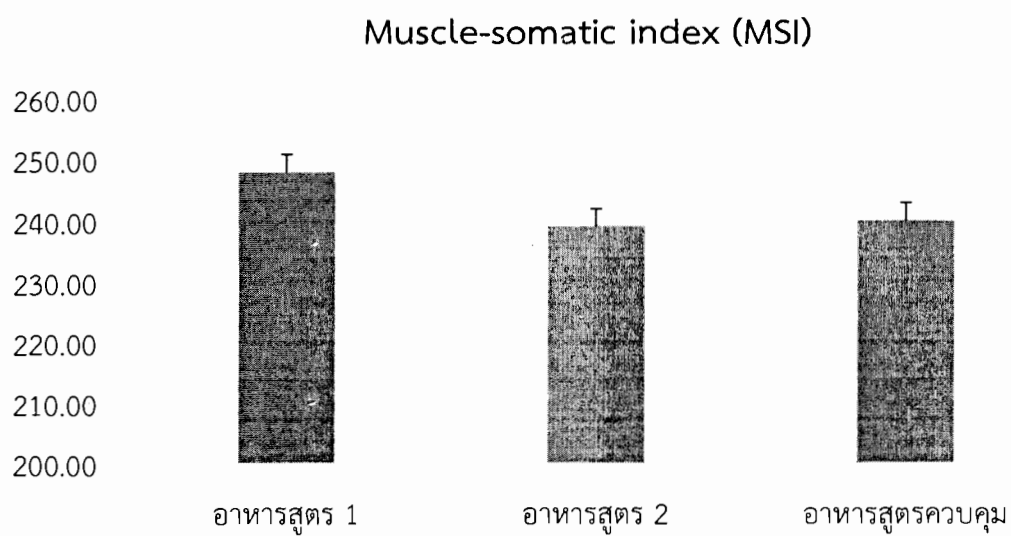
กลุ่ม	Hepato-somatic index (HSI)	Testicular-somatic index (TSI)	Muscle-somatic index (MSI)
อาหารสูตร 1	42.26*	2.42	248.17*
อาหารสูตร 2	47.30*	2.38	239.30
อาหารสูตรควบคุม	52.57	2.40	240.22



ภาพ 2-7 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนัก hepatopancreas ของกุ้งในรูปแบบ hepato-somatic index ณ วันที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์ที่ 4) เทียบกับวันเริ่มต้นทำการวิจัย (D0)



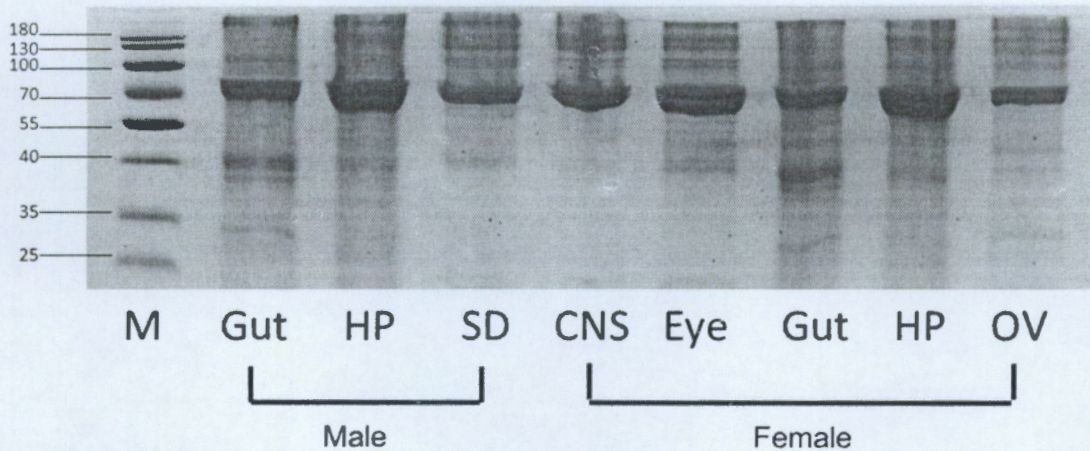
ภาพ 2-8 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักอวัยวะของกุ้งในรูปแบบ testicular-somatic index (TSI) ณ วันที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์ที่ 4) เทียบกับวันเริ่มต้นทำการวิจัย (D0)



ภาพ 2-9 แสดงค่าเฉลี่ยกล้ามเนื้อ Muscle-somatic index (MSI) ณ วันที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์ที่ 4) เทียบกับวันเริ่มต้นทำการวิจัย (D0)

2.4.7 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

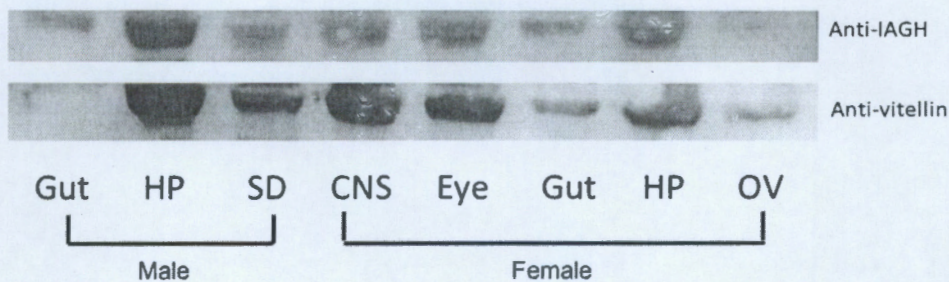
การแยกโปรตีนที่ได้จาก Gut, Hepatopancreas (HP) และ Spermatic duct (SD) ของกุ้งเพศผู้ และ Central nervous system (CNS), Eye, Gut, Hepatopancreas และ Overy (OV) ของกุ้งเพศเมีย ที่ทำการสกัดด้วย lysis buffer โดยเทคนิค SDS-PAGE แล้วทำการย้อมแผ่น Polyacrylamide gel ด้วย Coomassie Blue พบว่า แถบโปรตีนตัวอย่าง ได้แก่ Central nervous system, Eye, Hepatopancreas, Overy และ Spermatic duct มีขนาดอยู่ที่ประมาณ 70 kDa ส่วน Gut พบแถบโปรตีน 2 ตำแหน่ง มีขนาดประมาณ 70 kDa และ 40 kDa



ภาพ 2-10 แสดงการแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลโดยเทคนิค SDS-PAGE

2.4.8 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western Blot

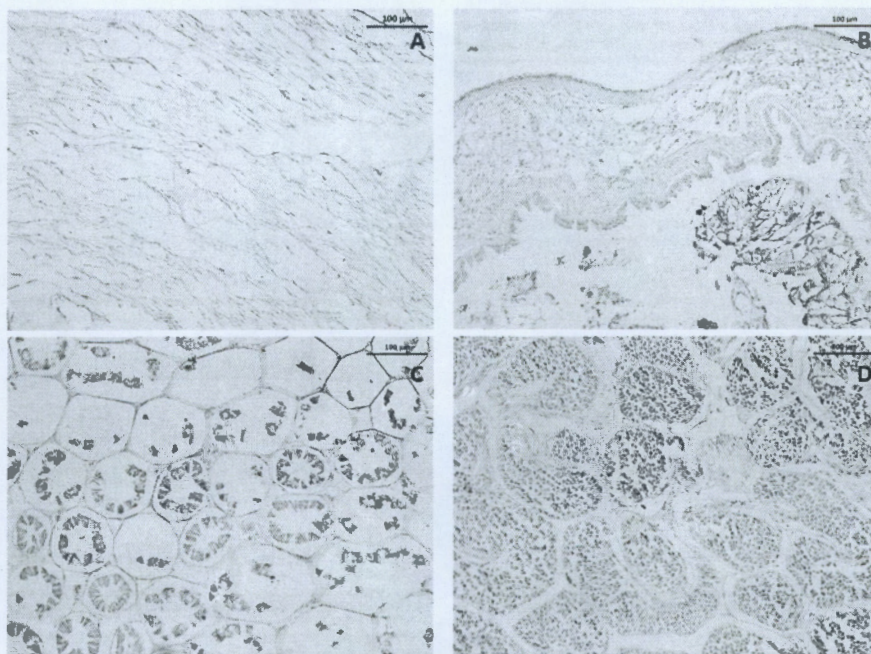
จากผลการทดลองพบว่าแถบโปรตีนที่มีสัญญาณของ Anti-IAGH และ Anti-vitellin ของตัวอย่าง ได้แก่ Gut, Hepatopancreas และ Spermatic duct ของกุ้งเพศผู้ และ Central nervous system, Eye, Gut, Hepatopancreas และ Overy ของกุ้งเพศเมีย มีทั้งสิ้น 1 แถบ ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลพบว่ามีความขนาดประมาณ 70 kDa เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน



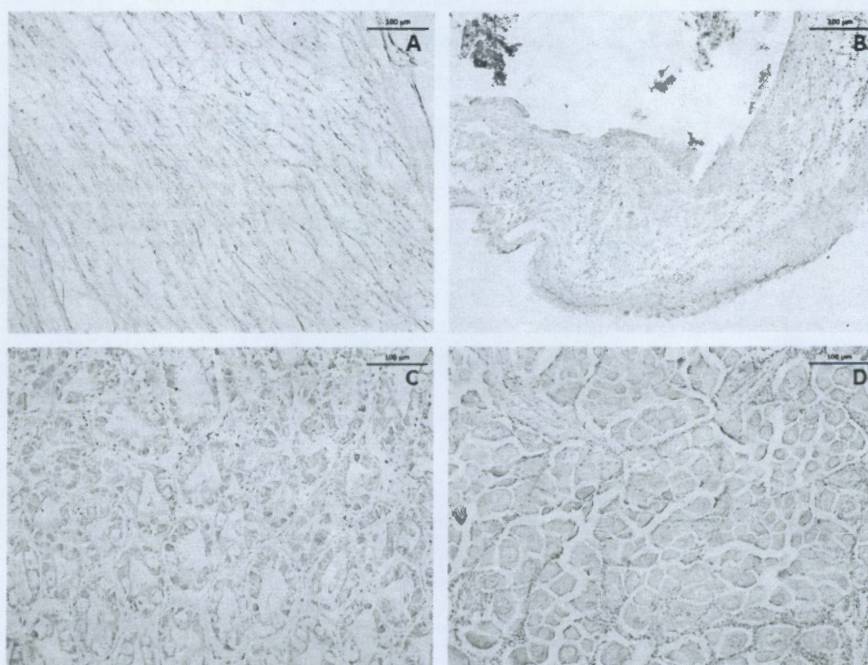
ภาพ 2-11 แสดงแบบแผนโปรตีนที่ได้จากการตรวจสอบของ Anti-IAGH และ Anti-vitellin จาก Gut, Hepatopancreas และ Spermatic duct ของกุ้งเพศผู้ และ Central nervous system, Eye, Gut, Hepatopancreas และ Overy ของกุ้งเพศเมีย โดยเทคนิค Western Blot

2.4.9 การวิเคราะห์ตำแหน่งของโปรตีนโดยเทคนิค Immunohistochemistry

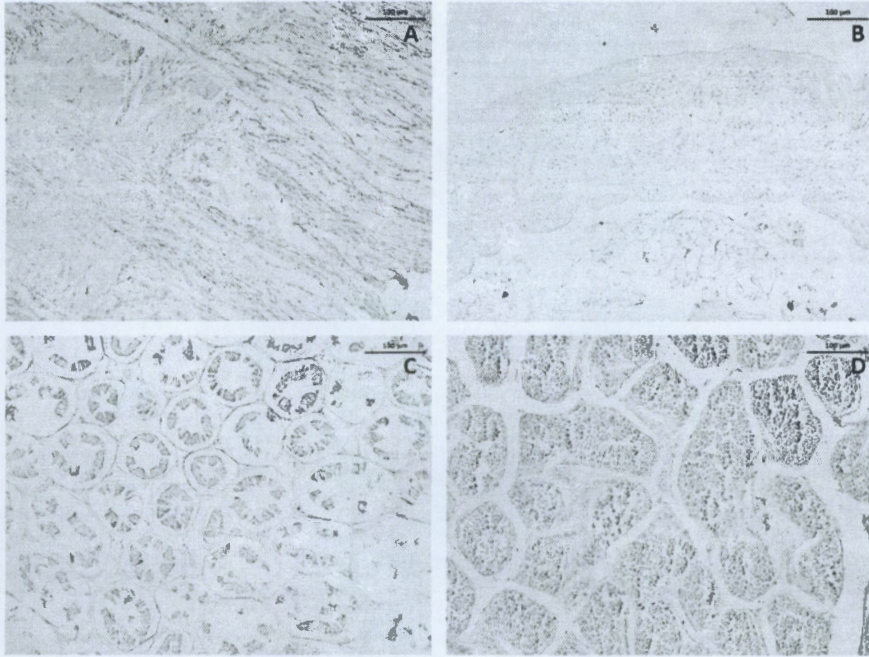
จากการวิเคราะห์หาตำแหน่งของโปรตีนจากเนื้อเยื่อของกิ้งโดยการ Paraffin section ของ CNS, Gut, HP และ TT ของเพศผู้ และ CNS, Gut, HP และ OV ของเพศเมีย ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry โดยใช้ Anti-IAGH และ Anti-vitellin



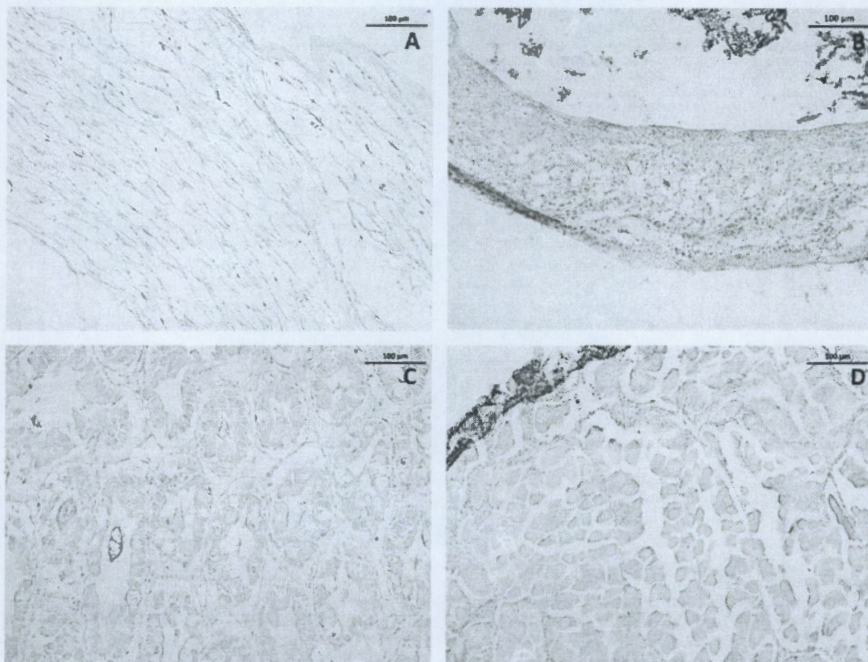
ภาพ 2-12 การแสดงออกของโปรตีนจากเนื้อเยื่อส่วน CNS (A), Gut (B), HP (C) และ TT (D) ของกิ้งเพศผู้ ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry โดยใช้ 1°Ab : Anti-IAGH (scale bar = 100 μm)



ภาพ 2-13 การแสดงออกของโปรตีนจากเนื้อเยื่อส่วน CNS (A), Gut (B), HP (C) และ OV (D) ของกิ้งเพศเมีย ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry โดยใช้ 1°Ab : Anti-IAGH (scale bar = 100 μm)



ภาพ 2-14 การแสดงออกของโปรตีนจากเนื้อเยื่อส่วน CNS (A), Gut (B), HP (C) และ TT (D) ของกิ้งก่า
ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry โดยใช้ 1°Ab : Anti-vitellin (scale bar = 100 μm)



ภาพ 2-15 การแสดงออกของโปรตีนจากเนื้อเยื่อส่วน CNS (A), Gut (B), HP (C) และ OV (D) ของกิ้งก่า
เมีย ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry โดยใช้ 1°Ab : Anti-vitellin (scale bar = 100 μm)

บทที่ 3

อภิปราย สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาเปรียบเทียบ ชนิดและปริมาณของไขมันจากตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายสีเขียว (สาหร่ายผักกาดทะเล และสาหร่ายพวงองุ่น) และสาหร่ายสีแดง (สาหร่ายโพรง และสาหร่ายลันมังกร) ที่มีทั้งแบบสดและแห้ง ในตัวทำละลาย Ethyl acetate, 95% ethanol และ Chloroform:Methanol พบว่า ในสารสกัดสาหร่ายแห้ง พบไขมันชนิด Phosphatidylcholine (PC) และ Phosphatidylethanolamine (PE) อยู่มากในสาหร่ายพวงองุ่นที่สกัดใน 95% ethanol สาหร่ายลันมังกรและสาหร่ายผักกาดที่สกัดด้วย Chloroform:Methanol และในสารสกัดสาหร่ายสด พบมากในสาหร่ายพวงองุ่นและสาหร่ายผักกาดทะเลที่สกัดใน Chloroform:Methanol เนื่องจากพบไขมันในตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายแห้งมากกว่าสาหร่ายสด นั้น อาจจะมาจกสาหร่ายแห้งมีองค์ประกอบของสารที่แตกต่างจากสาหร่ายสดและไม่มีน้ำเป็นองค์ประกอบรวมเหมือนสาหร่ายสด เพราะน้ำอาจจะไปเจือจางสารในขั้นตอนการสกัด

นอกจากนี้การศึกษาเปรียบเทียบชนิดของกรดไขมัน และอนุพันธ์อื่น ๆ จากตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายสีเขียวและสาหร่ายสีแดง พบว่า สาหร่ายสีเขียวที่สกัดด้วย Chloroform:Methanol พบ C14:0, C16:0, C18:0, C18:1n9, C20:0, C22:0, C22:1n9 และ C24:0 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ratana-arporn ที่ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่ายพวงองุ่น โดยในงานวิจัยนี้จะพบกรดไขมันชนิด C16:0 มากที่สุด และงานวิจัยของ Frikha ที่ศึกษาในสาหร่ายผักกาดทะเล (Ratana-arporn and Chirapart, 2006; Frikha et al., 2011) ส่วนที่สกัดด้วย 95% ethanol พบ C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C18:2n6, C20:0, C22:0, C22:1n9 และ C24:0 และส่วนที่สกัดด้วย Ethyl acetate พบ C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C18:1n9, C18:2n6, C20:0, C22:0, C22:1n9 และ C24:0 ซึ่งสาหร่ายสีเขียวที่สกัดด้วย 95% ethanol และ Ethyl acetate ยังไม่พบการศึกษาในงานวิจัยอื่น ๆ และจากตัวอย่างสาหร่ายสีแดงที่สกัดด้วย Chloroform:Methanol พบ C8:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C18:1n9, C18:2n6, C21:0 และ C22:1n9 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ McCauley ที่ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่ายโพรง (McCauley et al., 2015) ส่วนที่สกัดด้วย 95% ethanol พบ C7:0, C8:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C18:1n9 และ C22:0 และส่วนที่สกัดด้วย Ethyl acetate พบ C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C18:1n9, C18:2n6, C20:0 และ C24:0 ซึ่งสาหร่ายสีแดงที่สกัดด้วย 95% ethanol และ Ethyl acetate ยังไม่พบการศึกษาในงานวิจัยอื่น ๆ จะเห็นได้ว่าตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวและสาหร่ายสีแดงในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ซึ่งกรดไขมันส่วนใหญ่ที่พบนั้นจะเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (MUFA) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFA) โดยจะพบกรดไขมันที่เหมือนกันทั้งในสาหร่ายสีเขียวและสาหร่ายสีแดง เช่น C14:0, C16:0, C18:0, C18:1n9 และ C22:1n9 เป็นต้น ซึ่งเป็นกรดไขมันส่วนใหญ่ที่พบในสาหร่ายทะเล (Dawczynski et al., 2007) และกรดไขมันเหล่านี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้มาก และสาหร่ายทะเลยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ เช่น ด้านเชื้อแบคทีเรีย ด้านการอักเสบ ด้านเชื้อไวรัส ด้านเชื้อรา ด้านมะเร็ง โรคเบาหวาน

ความดันโลหิตสูง และด้านอนุมูลอิสระ (Silva et al., 2013) นอกจากนั้นสาหร่ายทะเลยังอุดมไปด้วยสารอาหารหลายชนิดที่เป็นประโยชน์ ดังนั้นสาหร่ายทะเล น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปต่อยอดในด้านต่าง ๆ ได้

สำหรับในงานวิจัยส่วนการเพาะเลี้ยง เมื่อทำการศึกษาค่าเฉลี่ยน้ำหนักของกุ้ง พบว่าค่าเฉลี่ยน้ำหนักกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 มีค่า มากกว่าน้ำหนักในวันเริ่มทำการทดลอง และมากกว่าอาหารสูตรที่ 2 และอาหารสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 นอกจากนี้เมื่อวัดความยาวกุ้งจากก้านตาถึงปลายหางพบว่ามีค่าเฉลี่ยความยาวมากกว่าอาหารสูตรที่ 2 และอาหารสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบน้ำหนักของอวัยวะในรูปแบบ testicular-somatic index (TSI) พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 มีแนวโน้มค่าเฉลี่ยที่มากกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 และอาหารสูตรควบคุม และค่าเฉลี่ยกล้ามเนื้อ Muscle-somatic index (MSI) ของกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 และอาหารสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จึงสามารถเป็นแนวทางได้ว่า HUFAs PUFAs และสารประกอบอื่นๆ ที่พบในสาหร่ายสามารถใช้เป็นอาหารทางเลือกให้แก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งได้ ในราคาที่ถูกลงกว่าท้องตลาด ทั้งนี้ทางทีมผู้วิจัยจะนำแนวทางนี้ไปต่อยอดเพื่อพัฒนาสูตรอาหารให้เหมาะสมยิ่งขึ้นในการเพาะพันธุ์กุ้ง เพื่อการพัฒนาความร่วมมือระหว่างภาคเกษตรและภาคการวิจัยอย่างยั่งยืน

เอกสารอ้างอิง

1. Atanassova, M., Georgieva, S. and Ivancheva, K. (2011). Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 46, 81-88.
2. Chew, Y.L., Lim, Y.Y., Omar, M. and Khoo, S.K. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *Food Science and Technology*, 41(6), 1067-1072.
3. Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv* 25:294-306.
4. Chiu, S.T., Tsai, R.T., Hsu, J.P., Liu, C.H. and Cheng, W. (2008). Dietary sodium alginate administration to enhance the non-specific immune responses, and disease resistance of the juvenile grouper *Epinephelus fuscoguttatus*. *Aquaculture*, 277, 66-72.
5. Dawczynski, C., Schubert, R., and Jahreis, G. (2007). Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry*, 103, 891-899.
6. Frikha, F., Kammoun, M., Hammami, N., Mchirgui, R.A., Belbahri, L., Gargouri, Y., Miled, N., and Ben-Rebah, F. (2011). Chemical composition and some biological activities of marine algae collected in Tunisia. *Ciencias Marinas*, 37(2), 113-124.
7. Li, K., Li, X. M., Ji, N. Y. and Wang, B. G. (2007). Natural bromophenols from the marine red algae polysiphonia urceolate (Rhodomelaceae) structural elucidation and DPPH radicalscavenging activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(15), 6627-6631.
8. Lohrmann, N.L., Logan, B.A., and Johnson, A.S. (2004). Seasonal Acclimatization of Antioxidants and Photosynthesis in *Chondrus crispus* and *Mastocarpus stellatus*, Two Co-Occurring Red Algae With Differing Stress Tolerances. *Biol. Bull*, 207(3), 225-232.
9. McCauley, J. I., Meyer, B. J., Winberg, P. C., Ranson, M. & Skropeta, D. (2015). Selecting Australian marine macroalgae based on the fatty acid composition and anti-inflammatory activity. *Journal of Applied Phycology*, 27 (5), 2111-2121.
10. Nakai, M., Kageyama, N., Nakahara, K. and MiKi, W. (2006). Phlorotannins as radical scavengers from the extract of *Sargassum ringgoldiaum*. *Marine Biotechnology*, 8, 409-414.

11. Ratana-arporn, P., and Chirapart A. (2006). Nutritional Evaluation of Tropical Green Seaweeds *Caulerpa lentillifera* and *Ulva reticulate*. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 40, 75-83.
12. Silva, M., Vieira, L., Almeida, A.P., and Kijjoo, A. (2013). The Marine Macroalgae of the Genus *Ulva*: Chemistry, Biological Activities and Potential Applications. *Oceanography*, 1(1), 1-6.
13. Weerawatanakorn, M. (2013). Chemical reactions between proteins and polyphenols and human biological consequences of reaction. *Burapha Science Journal*. (1), 210-218.
14. Yang, J.H., Mau, J.L., Ko, P.T., and Huang, L.C. (2000). Antioxidant properties of fermented soybean broth. *Food Chem.*, 71(2), 294-254.
15. Yangthong, M., Hutadilok-Towatana, N. and Phromkunthong, W. (2009). Antioxidant activities of four edible seaweeds from the southern coast of Thailand. *Plant Foods Human Nutrient*, 64(3), 218-223.
16. Yangthong, M., Thawonsuwan, J., Hutadilok-Towatana, N. and Phromkunthog, W. (2012). Effects of the hot-water extract from *Sargassum* sp. on antibacterial activity, non-specific immunity and TBARs production in Asian Sea Bass (*Lates calcarifer*, Bloch). *Kasetsart University Fisheries Research Bulletin*, 36(3), 30-42.
17. Ahluwalia, B., Holman, R. 1966. Fatty acid distribution in the bovine pre- and postpartum testis. *Lipids* 1: 197-201.
18. Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotech. Adv.* 25: 294-306.
19. Choochote, W., Sucunthowong, K., Zeao, T., Kwansiriwanich, S. 2014. Screening of microalgae with high lipid production. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง* 8: 84-92.
20. Coman, G.J., Arnold, S.J., Callaghan, T.R., Preston, N.P. 2007. Effect of two maturation diet combinations on reproductive performance of domesticated *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 263: 75-83.
21. Coman, G.J., Arnold, S.J., Jones, M.J., Preston, N.P. 2007. Effect of rearing density on growth, survival and reproductive performance of domesticated *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 264: 175-183.
22. Cross, N.L. 1994. Phosphatidylcholine enhances the acrosomal responsiveness of human sperm. *J. Androl.* 15: 484-8.
23. Evans, R.W., Setchell, B.P. 1979. Lipid changes in boar spermatozoa during epididymal maturation with some observations on the flow and composition of boar rete testis fluid. *J. Reprod. Fert.* 57: 189-196.
24. Evans, R.W., Setchell, B.P. 1979. Lipid changes during epididymal maturation in ram spermatozoa collected at different times of the year. *J. Reprod. Fert.* 57: 197-203.

25. Ewing, L.L., Means, A.R., Beames, C.G., Montgomery, J.R., Montgomery, R.D. 1966. Biochemical changes in rat testis during postnatal maturation. *J. Reprod. Fert.* 12: 295-307.
26. Harlioğlu, M.M., Köprücü, K., Harlioğlu, A.S., Yonar, S.M., Duran, T.C. 2013. Effect of dietary n-3 series fatty acids on sperm production in the freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz) (Astacidae). *Aquacult. Int.* 21: 273-282.
27. Hoa, N.D., Wouters, R., Wille, M., Thanh, V., Dong, T.K., Hao, N.V., Sorgeloos, P. 2009. A fresh-food maturation diet with an adequate HUFA composition for broodstock nutrition studies in black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798). *Aquaculture*. 297: 116-121.
28. Imjongjairak, S., Tachaapaikoon, C., Pason, P., Waeonukul, R., Laohakunchit, N., Ratanakhanokchai, K. 2014. Antioxidant activity of sulfate polysaccharide extracts of red seaweed (*Gracilaria fisheri*). *Agricultural Sci. J.* 45: 325-328.
29. Infante, J.P., Huszagh, V.A. 1985. Synthesis of highly unsaturated phosphatidylcholines in the development of sperm motility: a role for epididymal glycerol-3-phosphorylcholine. *Mol. Cell. Biol.* 69: 3-6.
30. Ivanova, V., Stancheva, M., Petrova, D. 2013. Fatty acid composition of black sea *Ulva rigida* and *Cystoseira crinita*. *Bulgarian J. Agri. Sci.* 19: 42-47.
31. Kendel, M., Wielgosz-Collin, G., Bertrand, S., Roussakis, C., Bourgougnon, N., Bedoux, G. 2015. Lipid composition, fatty acids and sterols in the seaweeds *Ulva armoricana*, and *Solieria chordalis* from Brittany (France): An analysis from nutritional, chemotaxonomic, and antiproliferative activity perspectives. *Mar. Drugs*. 13:5606-5628.
32. Lin, D.S., Neuringer, M., Conner, W.E. 2004. Selective changes of docosahexaenoic acid-containing phospholipid molecular species in monkey testis during puberty. *J. Lipid Res.* 45: 529-535.
33. Long, J.A., Conn, T.L. 2012. Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4°C for 24 hours. *Poult. Sci.* 91: 1990-1996.
34. Meunpol, O., Meejing, P., Piyatiratitivorakul, S. 2005. Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquac. Res.* 36(12): 1216-1225.
35. Paibulkichakul, C., Piyatiratitivorakul, S., Sorgeloos, P., Menasveta, P. 2008. Improved maturation of pond-reared, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using fish oil and astaxanthin feed supplements. *Aquaculture*. 282: 83-89.
36. Poljaroen, J., Tinikul, Y., Phoungpetchara, I., Kankoun, W., Suwansa-ard, S., Siangcham, T., Meeratana, P., Cummins, S.F., Sretarugsa, P., Hanna, P.J., Sobhon, P. 2011. The effects of biogenic amines, gonadotropin-releasing hormones and

- corazonin on spermatogenesis in sexually mature small giant freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Aquaculture* 321: 21-29.
37. Roqueta-Rivera, M., Stroud, C.K., Haschek, W.M., Akare, S.J., Segre, M. 2010. Docosahexaenoic acid supplementation fully restores fertility and spermatogenesis in male delta-6 desaturase-null mice. *J. Lipid Res.* 51: 360-367.
 38. Siangcham, T., Tinikul, Y., Poljaroen, J., Sroyraya, M., Changklungmoa, N., Phoungpetchara, I., Kankoun, W., Sumpownon, C., Wanichanon, C., Hanna, P.J., Sobhon, P. 2013. The effects of serotonin, dopamine, gonadotropin-releasing hormones, and corazonin, on the androgenic gland of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 193: 10-18.
 39. Siangcham, T., Chansela, P., Hayasaka, T., Masaki, N., Sroyraya, M., Poljaroen, J., Suwansa-ard, S., Engsusophon, A., Hanna, P.J., Sobhon, P., Setou, M. 2015. Changes of phosphatidylcholine and fatty acids in germ cells during testicular maturation in three developmental male morphotypes of *Macrobrachium rosenbergii* revealed by imaging mass spectrometry. *PLoS ONE*, 10: DOI: 10.1371/journal.pone.0120412.
 40. Songarj, M., Ruangpanit, Y., Attamangkune, S. 2013. Effect of feeding *Schizochytrium sp.* on laying hen performance and egg yolk omega 3 content. *Agricultural Sci. J.* 44: 87-90.
 41. Stacey, N.E., Goetz, F.W. 1982. Role of prostaglandins in fish reproduction. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 39: 92-98.
 42. Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J., Sorgeloos, P. 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture*. 202: 1-21.
 43. Wouters, R., Molina, C., Lavens, P., Calderón, J. 2001. Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei* in different stages of sexual maturation. *Aquaculture*. 198: 307-323. สุพิศ ทองรอด, ชูชาติ ชัยรัตน์, มณฑกานติ ท้ามตัน และอนันต์ ต้นสุตะพานิช. 2545. ผลของสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) และสาหร่ายหนาม (*Acanthophora spicifera*) ต่อการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮื้อ. *วารสารการประมง* 55: 423-429

ภาคผนวก ก

การเตรียมสาร

1. Buffer

1.1 Buffer สำหรับ TLC

Methyl acetate	25	ml
1-propapnol	25	ml
Chloroform	10	ml
0.25% KCl	9	ml

2. Stock solution

2.1 0.25% KCl 100 ml

KCl	0.25	g
Distilled water	100	ml

2.2 primuline 100 ml

Primuline	5	mg
Acetone	80	ml
Distilled water	20	