

อิทธิพลของความเค็มต่อองค์ประกอบกรดไขมันและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ
สังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคฟีพอด *Apocyclops royi*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF SALINITY ON FATTY ACID COMPOSITION AND EXPRESSION OF GENES
INVOLVED IN POLYUNSATURATED FATTY ACID BIOSYNTHESIS IN COPEPOD *Apocyclops*

royi



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Food Technology

Department of Food Technology

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2022

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	อิทธิพลของความเค็มต่อองค์ประกอบกรดไขมันและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคฟีพอด <i>Apocyclops royi</i>
โดย	น.ส.สุภิดา เกื้อกอบ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ปิติ อ่ำพ่ายัพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.ปิติ อ่ำพ่ายัพ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิดา โชติช่วง)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ราตรี วงศ์ปัญญา)

สุกิตา เกื้อกอบ : อิทธิพลของความเค็มต่อองค์ประกอบกรดไขมันและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพีพอด *Apocyclops royi*. (EFFECTS OF SALINITY ON FATTY ACID COMPOSITION AND EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN POLYUNSATURATED FATTY ACID BIOSYNTHESIS IN COPEPOD *Apocyclops royi*) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.ปิติ อ้าพ่ายพ

โคพีพอด *Apocyclops royi* เป็นแพลงก์ตอนสัตว์ขนาดเล็กกลุ่มครัสเตเชียน ที่นิยมนำมาเป็นอาหารมีชีวิตในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำ โคพีพอดมีความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Long chain polyunsaturated fatty acid; LC-PUFA) ผ่านการทำงานของเอนไซม์ดีเซซทูเรส (Desaturase) และอีลองเกส (Elongase) งานวิจัยนี้ได้ศึกษาลักษณะสมบัติและบทบาทของยีน desaturase-like (*ArCb5D6D*) ในโคพีพอด *Apocyclops royi* สายพันธุ์ไทย (*A. royi*-TH) จากการศึกษพบว่ายีน *ArCb5D6D* ประกอบด้วยบริเวณ open reading frame 1323 คู่เบส ซึ่งสามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนขนาด 440 กรดอะมิโน โดยโปรตีน *ArCb5D6D* ประกอบด้วยบริเวณ Cytochrome b5-like heme/steroid binding domain และบริเวณ Fatty acid desaturase domain ซึ่งมีความเหมือนกับโปรตีน desaturase-like ในกุ้งและปู 61-65% และจากการศึกษาการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* ในโคพีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ (NP: ระยะอนุพลีซิส, CD: ระยะโคพีพอดิต, AD: ระยะโตเต็มวัย) พบว่ายีน *ArCb5D6D* มีการแสดงออกสูงในโคพีพอดระยะ CD และโคพีพอดระยะ AD ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดไขมัน PUFA ในโคพีพอด โดยพบปริมาณกรดไขมัน PUFA สูงสุดในโคพีพอดระยะ AD รองลงมาคือ ระยะ CD และระยะ NP ตามลำดับ จากผลการศึกษานี้สามารถบ่งชี้ได้ว่ายีน *ArCb5D6D* เป็นยีนในกลุ่ม desaturase-like ซึ่งมีบทบาทในชีวสังเคราะห์กรดไขมันในสิ่งมีชีวิตครัสเตเชียน นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาอิทธิพลของความเค็มต่อคุณค่าทางโภชนาการของโคพีพอด *A. royi*-TH โดยเลี้ยงโคพีพอดที่สภาวะความเค็ม 15 พีพีที (ความเค็มต่ำ) และ 25 พีพีที (กลุ่มควบคุม) จากนั้นเปรียบเทียบองค์ประกอบกรดไขมัน และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์กรดไขมันจำนวน 3 ยีน ได้แก่ ยีน *ArD5D*, ยีน *ArD6D* และยีน *ArCb5D6D* จากผลการศึกษพบว่าโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงที่ความเค็ม 15 พีพีที (ความเค็มต่ำ) มีปริมาณกรดไขมัน ARA (C20:4 n-6) และปริมาณกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 (n-6 PUFA) สูงกว่าโคพีพอดกลุ่มควบคุม (25 พีพีที) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์กรดไขมัน พบว่าโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มต่ำ (15 พีพีที) มีค่าการแสดงออกของยีน *ArD5D*, ยีน *ArD6D* และยีน *ArCb5D6D* สูงกว่าโคพีพอดกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าสภาวะความเครียดจากความเค็มต่ำสามารถเพิ่มการสังเคราะห์กรดไขมัน ARA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของฮอร์โมนหลายชนิด ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมสมดุลออสโมซิส (osmoregulation) ของสัตว์น้ำ และอาจสันนิษฐานได้ว่ายีน *ArCb5D6D* เป็นยีนในกลุ่ม desaturase-like ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน ARA ของสิ่งมีชีวิตครัสเตเชียน โดยข้อมูลเชิงลึกที่ได้จะทำให้เข้าใจถึงชีววิทยาพื้นฐานของชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนของโคพีพอด และจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนของโคพีพอด *A. royi*-TH

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6470070523 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORD: copepod, *Apocyclops royi*., Salinity, desaturase, polyunsaturated fatty acid (PUFA)

Supida Kueakob : EFFECTS OF SALINITY ON FATTY ACID COMPOSITION AND EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN POLYUNSATURATED FATTY ACID BIOSYNTHESIS IN COPEPOD *Apocyclops royi*. Advisor: Assoc. Prof. CHANPRAPA IMJONGJIRAK, Ph.D. Co-advisor: Piti Amparyup, Ph.D.

Copepod *Apocyclops royi* is a small zooplankton crustacean and one of the dominant species in the larval fish live feed. Copepods possess the capacity to synthesize LC-PUFA through the activity of desaturase and elongase enzymes. In this study, a desaturase-like gene (*ArCb5D6D*) was identified in the copepod *Apocyclops royi*, Thai copepod species (*A. royi*-TH). Bioinformatics analysis showed that the *ArCb5D6D* gene consists of an open reading frame of 1323 bp that encoded a protein of 440 amino acids. *ArCb5D6D* protein possessed the typical features of the desaturase protein family including conserved cytochrome b5-like heme/steroid binding domain, followed by fatty acid desaturase domain, sharing 61-65% amino acid sequence similarity with shrimp and crab desaturase-like proteins. Moreover, the mRNA expression of the *ArCb5D6D* gene was investigated in *A. royi*-TH copepods at each developmental stage (NP: nauplius, CD: copepodid, AD: adult stage). The results show that the *ArCb5D6D* gene was highly expressed in CD and AD, consistent with PUFA content in copepods. The highest PUFA content was observed in the AD stage, followed by the CD stage and NP stage, respectively. It supports that the *ArCb5D6D* protein of *A. royi*-TH is a desaturase-like protein families which plays a role in fatty acid biosynthesis in the crustacean group. Additionally, the effect of salinity on the nutritional value of copepod *A. royi*-TH was also studied. Copepod *A. royi*-TH were cultured at different salinities (15 ppt: hyposalinity, 25 ppt: control group). We investigate the fatty acid composition and the mRNA expression of three genes involved in fatty acid biosynthesis (*ArD5D*, *ArD6D*, *ArCb5D6D*). The results showed that the content of ARA (C20:4 n-6) and n-6 PUFA in *A. royi*-TH cultured at 15 ppt salinity (hyposalinity) was significant ($p < 0.05$) higher than the control group (25 ppt) consistent with the results of gene expression analysis. The expression level of *ArD5D*, *ArD6D* and *ArCb5D6D* was up-regulated in hyposalinity group. These results suggest that low salinity stress can increase the synthesis of ARA which is the precursor of hormone involved in the osmoregulation of aquatic animals and the *ArCb5D6D* gene may play a role in ARA synthesis in copepod *A. royi*-TH. The results provide further insight into the mechanisms of LC-PUFA biosynthesis and also provide a foundation to optimize the LC-PUFA biosynthetic pathway in *A. royi*-TH.

Field of Study: Food Technology

Student's Signature

Academic Year: 2022

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาและความอนุเคราะห์อย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และดร.ปิติ อ่ำพ่าย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้โอกาสข้าพเจ้า และคอยช่วยเหลือข้าพเจ้าเสมอมา อีกทั้งให้ คำปรึกษา ข้อชี้แนะอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการวิจัย ตลอดจนช่วยปรับปรุงข้อบกพร่องต่างๆ งานวิจัยสามารถสำเร็จลุล่วง ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจและทุ่มเทของอาจารย์ และขอกราบ ขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา ประธานสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิดา โชติช่วง และรองศาสตราจารย์ ดร.ราตรี วงศ์ปัญญา ที่ได้กรุณามาเป็น กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และได้ให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ทำให้รายงานวิจัยฉบับนี้มีความ สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณนางสาวศุภกานต์ สังข์แก้ว ที่คอยให้คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือและให้ กำลังใจผู้วิจัยมาตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณทีมวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ แห่งชาติ (ไบโอเทค) และศูนย์เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ และ เครื่องมือในการทำวิจัยจนสามารถดำเนินการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย “ทุนวิทยบัณฑิต” ที่ได้สนับสนุน ทุนอุดหนุนการศึกษาตลอดระยะเวลา 2 ปีการศึกษา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ รุ่นพี่ รุ่นน้อง ทุกคนที่คอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณพ่อ แม่ พี่ชาย และทุกคนในครอบครัวของข้าพเจ้า ที่คอยสนับสนุน ข้าพเจ้าเสมอมา ทำให้ข้าพเจ้ามีกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วง

สุภิดา เกื้อกอบ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	6
2.1 โคฟีพอด.....	6
2.1.1 ลักษณะทั่วไปของโคฟีพอด.....	6
2.1.1.1 ลักษณะโคฟีพอดกลุ่มคาลานอยด์ (Calanoida).....	8
2.1.1.2 ลักษณะโคฟีพอดกลุ่มไซโคลพอยด์ (Cyclopoida).....	8
2.1.1.3 ลักษณะโคฟีพอดกลุ่มฮาร์แพคติกอยด์ (Harpacticoida).....	9
2.1.2 คุณค่าทางโภชนาการของโคฟีพอด.....	10
2.1.2.1 กรดไขมัน.....	10
2.1.2.2 โปรตีนและกรดอะมิโน.....	11
2.1.2.3 แอสต้าแซนทีน (Astaxanthin).....	11
2.1.2.4 วิตามินและแร่ธาตุต่างๆ.....	12
2.2 โคฟีพอด <i>Apocyclops royi</i>	13
2.3 ความเค็ม (Salinity).....	15
2.3.1 อิทธิพลของสภาวะความเค็มต่อโคฟีพอด.....	16

2.3.1.1	อิทธิพลของความเค็มต่อการเจริญเติบโตในโคฟีพอด.....	18
2.3.1.2	อิทธิพลของความเค็มต่อความสำเร็จในการสืบพันธุ์ในโคฟีพอด.....	19
2.3.1.3	อิทธิพลของความเค็มต่อคุณค่าทางโภชนาการในโคฟีพอด.....	19
2.4	กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Long chain polyunsaturated fatty acid).....	20
2.4.1	กรดไขมันโอเมก้า 3.....	21
2.4.2	กรดไขมันโอเมก้า 6.....	22
2.4.3	ประโยชน์ของกรดไขมัน LC-PUFA ในอาหารสัตว์น้ำ.....	23
2.4.3.1	อิทธิพลของกรดไขมัน LC-PUFA ต่อการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของสัตว์น้ำ.....	23
2.4.3.2	อิทธิพลของกรดไขมัน LC-PUFA ต่อสุขภาพของสัตว์น้ำ.....	23
2.4.3.3	อิทธิพลของกรดไขมัน LC-PUFA ต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ.....	24
2.5	ชีวสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA biosynthesis).....	24
2.6	ยีนที่เกี่ยวข้องชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน.....	26
2.6.1	$\Delta 6$ desaturase gene ($\Delta 6$ FAD).....	26
2.6.2	$\Delta 5$ desaturase gene ($\Delta 5$ FAD).....	27
บทที่ 3	วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	31
3.1	สัตว์ทดลอง.....	31
3.2	อุปกรณ์.....	31
3.2.1	อุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายและโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH.....	31
3.2.2	อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน.....	31
3.2.3	อุปกรณ์สำหรับการสกัด total RNA.....	32
3.2.4	อุปกรณ์สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน.....	32
3.3	สารเคมี.....	33
3.3.1	สารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายและโคฟีพอด.....	33

3.3.2	สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน	33
3.3.3	สารเคมีสำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน.....	34
3.3.3.1	สารเคมีสำหรับสกัด RNA	34
3.3.3.2	สารเคมีสำหรับสังเคราะห์ first strand cDNA.....	34
3.3.3.3	สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา PCR	34
3.3.3.4	สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ PCR product ด้วยเทคนิค 1.8% agarose electrophoresis.....	35
3.4	วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	35
3.4.1	การเพาะเลี้ยงสาหร่ายและโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH	35
3.4.1.1	การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Tetraselmis sp.</i>	35
3.4.1.2	การเพาะเลี้ยงโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH และเก็บตัวอย่างโคฟีพอดแยกแต่ละระยะพัฒนาการ	37
3.4.1.3	การเพาะเลี้ยงโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH ในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที).....	37
3.4.2	การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH ด้วยเทคนิค Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).....	38
3.4.2.1	การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH แต่ละระยะพัฒนาการ	38
3.4.2.2	การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน.....	39
3.4.3	การศึกษาลักษณะสมบัติยีน desaturase-like gene (<i>ArCb5D6D</i>) ในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH.....	39
3.4.4	การศึกษาการแสดงออกของยีนในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH แต่ละระยะพัฒนาการ.....	40
3.4.4.1	การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) ในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH แต่ละระยะพัฒนาการ	40

3.4.4.2 การสังเคราะห์ first-strand cDNA โคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH แต่ละระยะ พัฒนาการ	43
3.4.4.3 การทำปฏิกิริยา PCR ในตัวอย่างโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH แต่ละระยะพัฒนาการ	45
3.4.4.4 การวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค 1.8% agarose electrophoresis ..	47
3.4.4.5 การวัดค่าการแสดงออกของยีน	47
3.4.5 การศึกษาการแสดงออกของยีนในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ แตกต่างกัน	48
3.4.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	50
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	51
4.1 การศึกษาลักษณะสมบัติและบทบาทของยีน desaturase-like gene (<i>ArCb5D6D</i>) ในโคฟี พอด <i>A. royi</i> -TH	51
4.2 การศึกษาแสดงออกของยีน desaturase-like gene (<i>ArCb5D6D</i>) ในโคฟีพอด <i>A. royi</i> แต่ละ ระยะพัฒนาการ.....	55
4.3 การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH แต่ละระยะพัฒนาการ.....	56
4.4 การศึกษาอิทธิพลของความเค็มต่อชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC- PUFA Biosynthesis) ในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH	58
4.4.1 อิทธิพลของความเค็มต่อองค์ประกอบกรดไขมันในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH.....	58
4.4.2 อิทธิพลของความเค็มต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์กรดไขมันสาย ยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA Biosynthesis) ในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH.....	60
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	67
5.1 สรุปผลการทดลอง	67
5.2 ข้อเสนอแนะ	68
บรรณานุกรม.....	69
ภาคผนวก ก.....	93
ภาคผนวก ข.....	94

ภาคผนวก ค..... 95

ประวัติผู้เขียน..... 105



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางชีวเคมีโดยเฉลี่ยของโคฟีพอดระยะนอเพเลียส, โคฟีพอด, โรติเฟอร์ และอาร์ทีเมีย.....	12
ตารางที่ 2 ประเภทของน้ำแบ่งตามระดับความเค็ม	16
ตารางที่ 3 รายชื่อกรดไขมันโอเมก้า 3.....	21
ตารางที่ 4 รายชื่อกรดไขมันโอเมก้า 6.....	22
ตารางที่ 5 ลักษณะสมบัติของกลุ่มยีน Desaturase ในชีวสังเคราะห์กรดไขมันในโคฟีพอด <i>A. royi-TH</i>	29
ตารางที่ 6 ลักษณะสมบัติของกลุ่มยีน Elongase ในชีวสังเคราะห์กรดไขมันในโคฟีพอด <i>A. royi-TH</i>	30
ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2.....	36
ตารางที่ 8 การเตรียมตัวอย่าง total RNA ปริมาณ 1000 ng สำหรับการสังเคราะห์ first strand cDNA ในตัวอย่างโคฟีพอด <i>A. royi-TH</i> แต่ละระยะพัฒนาการ	43
ตารางที่ 9 สารเคมีสำหรับการทำปฏิกิริยา Reverse transcription เพื่อสังเคราะห์ first strand cDNA.....	44
ตารางที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (primer) สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR	45
ตารางที่ 11 ส่วนผสมของสารเคมีสำหรับการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain reaction (PCR) ...	46
ตารางที่ 12 การตั้งค่าโปรแกรมปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในตัวอย่างโคฟีพอด <i>A. royi-TH</i> แต่ละระยะพัฒนาการ.....	46
ตารางที่ 13 การเตรียมตัวอย่าง total RNA ปริมาณ 500 ng สำหรับการสังเคราะห์ first strand cDNA ในตัวอย่างโคฟีพอด <i>A. royi-TH</i> ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน	48
ตารางที่ 14 การตั้งค่าโปรแกรมปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในตัวอย่างโคฟีพอด <i>A. royi-TH</i> ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน	49

ตารางที่ 15 องค์ประกอบของกรดไขมันในโคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ (ระยะนอเพเลียส, ระยะโคฟีพอดติด และระยะโตเต็มวัย) 57

ตารางที่ 16 องค์ประกอบของกรดไขมันในโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที) 59

ตารางที่ 17 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ total RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที) 60



สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างร่างกายโคฟีพอด.....	7
รูปที่ 2 โคฟีพอดกลุ่มคาลานอยด์ (Calanoida).....	8
รูปที่ 3 โคฟีพอดกลุ่มไซโคลพอยด์ (Cyclopoida).....	9
รูปที่ 4 โคฟีพอดกลุ่มฮาร์แพคติกอยด์ (Harpacticoida).....	9
รูปที่ 5 โคฟีพอด <i>Apocyclops royi</i>	13
รูปที่ 6 โคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH แต่ละระยะพัฒนาการ.....	15
รูปที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA)	20
รูปที่ 8 วิธีชีวสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA biosynthesis) ในสัตว์	24
รูปที่ 9 แสดงชีวสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคฟีพอด <i>Apocyclops royi</i> -TH..	28
รูปที่ 10 วิธีการสกัด total RNA จากตัวอย่างโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH.....	41
รูปที่ 11 วิธีการกำจัด genomic DNA จากตัวอย่าง total RNA โคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH.....	42
รูปที่ 12 ลักษณะโปรตีน desaturase-like ในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH (ArCb5D6D) เปรียบเทียบกับ โปรตีน desaturase-like ในสิ่งมีชีวิตครึ่งเตี๊ยน และโปรตีน delta-6-desaturase ในโคฟีพอด <i>A.</i> <i>royi</i> -TH.....	53
รูปที่ 13 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน desaturase-like ในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH (ArCb5D6D) เพื่อ เปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน desaturase-like ในสิ่งมีชีวิตครึ่งเตี๊ยน อื่นๆที่เคยมีรายงานจาก GenBank	54
รูปที่ 14 การแสดงออกของยีน ArCb5D6D ในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH แต่ละระยะพัฒนาการ.....	55
รูปที่ 15 การแสดงออกของยีน ArD5D ในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที).....	62
รูปที่ 16 การแสดงออกของยีน ArD6D ในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที).....	63
รูปที่ 17 การสังเคราะห์กรดไขมัน ARA ในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH.....	64

รูปที่ 18 การแสดงออกของยีน <i>ArCb5D6D</i> ในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที).....	65
รูปที่ 19 ผลการแสดงออกของยีน <i>ArCb5D6D</i> และยีน <i>Ar18srRNA</i> ในโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH แต่ละ ระยะพัฒนาการ (ระยะนอเพเลียส, ระยะโคฟีพอดติด, ระยะโตเต็มวัย).....	94
รูปที่ 20 ผลการแสดงออกของยีน <i>ArD6D</i> , <i>ArD5D</i> , <i>ArCb5D6D</i> และ <i>Ar18srRNA</i> ในโคฟีพอด <i>A.</i> <i>royi</i> -TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที)	94



บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยังคงประสบปัญหาลูกสัตว์น้ำแรกเกิดมีอัตราการตายสูง อันเนื่องมาจากอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนที่ใช้สำหรับการอนุบาลลูกสัตว์น้ำมีคุณค่าทางโภชนาการไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ ทำให้ลูกสัตว์น้ำสุขภาพอ่อนแอ ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และตายในที่สุด ซึ่งนำไปสู่ปัญหาการขาดแคลนลูกพันธุ์สัตว์น้ำ และเกิดการลดลงของผลผลิต ทำให้ผลผลิตสัตว์น้ำบางชนิดไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด

คุณภาพของอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนจึงถือเป็นหนึ่งในองค์ประกอบที่ส่งผลต่อการประสพผลสำเร็จในการทำธุรกิจอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ หากลูกสัตว์น้ำได้รับอาหารที่มีคุณภาพเหมาะสมกับชนิด ระยะเวลาการและมีคุณค่าทางโภชนาการที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต จะสามารถช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกัน และส่งเสริมให้ลูกสัตว์น้ำมีสุขภาพดี ทำให้สามารถลดอัตราการตาย เพิ่มอัตราการรอดของลูกสัตว์น้ำ และนำไปสู่ผลผลิตสัตว์น้ำที่เพิ่มขึ้น ในปัจจุบันการอนุบาลลูกสัตว์น้ำนิยมใช้อาหารธรรมชาติที่มีชีวิต (live feeds) ได้แก่ โรติเฟอร์ และอาร์ทีเมีย แต่โภชนาการของโรติเฟอร์และอาร์ทีเมียยังไม่สามารถตอบสนองความต้องการของลูกสัตว์น้ำบางชนิด เช่น ปลาทูน่าครีบน้ำเงิน (Solgaard et al., 2007; de Lima et al., 2013) อีกทั้งโรติเฟอร์และอาร์ทีเมียมีขนาดที่ค่อนข้างใหญ่กว่าปากลูกสัตว์น้ำแรกฟักบางชนิด (McKinnon et al., 2003) ทำให้ลูกสัตว์น้ำไม่สามารถกินแหล่งก่อก่อนเหล่านั้นได้ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้โคฟีพอดได้กลายเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนทางเลือกใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจมากยิ่งขึ้น

ปัจจุบันในโรงเพาะฟักสัตว์น้ำมีการใช้ไซอาร์ทีเมียแห้งสำเร็จรูป (Dry artemia cyst) ในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำอย่างแพร่หลาย (Wickins and Lee, 2002) แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันไซอาร์ทีเมียมีราคาสูงถึง 3,500 บาท/กิโลกรัม (ข้อมูลจากเว็บไซต์บริษัท, 2566) เนื่องจากไซอาร์ทีเมียเป็นสินค้านำเข้ามาจากทะเล Great Salt Lake ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็นแหล่งผลิตไซอาร์ทีเมียหลักที่ส่งออกสินค้าไซอาร์ทีเมียแห้งสำเร็จรูปออกไปทั่วโลก นอกจากนี้ปริมาณความต้องการซื้อสินค้าไซอาร์ทีเมียมีเพิ่มขึ้น ในขณะที่ไซอาร์ทีเมียในทะเลธรรมชาติมีปริมาณน้อยลงส่งผลให้ไซอาร์ทีเมียมีราคาสูง (Lavens and Sorgeloos, 2000) และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในอนาคต ซึ่งจะส่งผลให้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีต้นทุนเพิ่มขึ้นตามมา ดังนั้นการเพาะเลี้ยงโคฟี

พอดเพื่อใช้ในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำทดแทนการใช้อาร์ทีเมีย จึงเป็นหนึ่งในแนวทางที่จะสามารถช่วยลดต้นทุนแก่ผู้ประกอบการธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้

โคฟีพอดเป็นหนึ่งในอาหารที่มีชีวิตของสัตว์น้ำวัยอ่อนตามธรรมชาติ เป็นแพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง จากรายงานการวิจัยพบว่าการใช้โคฟีพอดในการอนุบาลสัตว์น้ำมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้โรติเฟอร์และอาร์ทีเมีย (Bell et al. 2003; Rajkumar, 2006; van der Meeren et al. 2008) โดยโคฟีพอด *Apocyclops royi* เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับความนิยม เนื่องจากเลี้ยงง่าย สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว สามารถทนอุณหภูมิและความเค็มได้ในช่วงกว้าง นอกจากนี้โคฟีพอด *A. royi* ระยะเวลาเพื่อยังมีขนาดเล็กกว่า 100 ไมครอน ซึ่งเหมาะสมกับขนาดปากของตัวอ่อนลูกสัตว์น้ำ (McKinnon et al., 2003) และที่สำคัญโคฟีพอดมีความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Long Chain Polyunsaturated fatty acid; LC-PUFA) เช่น ดีเอชเอ, อีพีเอ และ เออาร์เอ ผ่านการทำงานของเอนไซม์ดีแซตทูเรส (desaturase) และ อีลองเกส (elongase) ซึ่งปริมาณของกรดไขมันเหล่านี้ถือเป็นตัวแปรสำคัญที่บ่งชี้คุณภาพของอาหารสัตว์น้ำ และมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และสุขภาพของสัตว์น้ำ จึงนับว่าการศึกษาชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในอาหารมีชีวิตอย่างโคฟีพอดมีความสำคัญ โดยในปัจจุบัน การศึกษาและพัฒนาความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนของโคฟีพอดมักมุ่งเน้นไปที่การปรับเปลี่ยนชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงโคฟีพอด แต่อย่างไรก็ตามการปรับเปลี่ยนปัจจัยทางกายภาพในการเพาะเลี้ยงโคฟีพอด เช่น สภาวะความเค็ม ก็เป็นส่วนสำคัญที่มีอิทธิพลต่อความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคฟีพอดเช่นกัน

สภาวะความเค็มเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีบทบาทต่อกระบวนการทางชีวภาพในสัตว์น้ำ ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น การเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ และจำนวนประชากร รวมถึงความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคฟีพอด จากรายงานการศึกษาในโคฟีพอด *Paracyclops nana* พบว่าโคฟีพอด *P. nana* ที่ทำการเลี้ยงในสภาวะความเค็มสูง (25 พีพีที และ 30 พีพีที) มีปริมาณกรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (15 พีพีที)

นอกจากนี้จากหลักฐานการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าสภาวะความเค็มต่ำมีอิทธิพลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของสัตว์ทะเลหลายชนิด ซึ่งทำให้องค์ประกอบทางโภชนาการของสัตว์น้ำเหล่านั้นเปลี่ยนแปลงไป (Pinoni et al., 2018; Romano et al., 2014) และมีการค้นพบว่าปลาทะเลจะมีความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนเพิ่มขึ้นเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะความเค็มต่ำ (Li et al., 2008) โดยจากการศึกษาในปลาสลิดทะเลพบว่าระดับการแสดงออกของยีน $\Delta 4$ และยีน $\Delta 6 / \Delta 5 fad$ ในปลาสลิดทะเลจะสูงขึ้นเมื่อทำการเลี้ยงที่สภาวะความเค็มต่ำ (Hyposalinity) เช่นเดียวกับการศึกษาในปลาแซลมอนแอตแลนติก (Zheng et al., 2005) และ ปลาจันแดง (Sarker et al., 2011) แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลอิทธิพลของสภาวะความเค็มในการเพาะเลี้ยงต่อกระบวนการชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพีพอด *A. royi*

กระบวนการชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนประกอบด้วยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มยีน methyl-end desaturases (ωx desaturase), กลุ่มยีน fatty acyl desaturases (front-end desaturase; Fads), และกลุ่มยีน elongation of very long-chain fatty acid (Elovl) ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ระบุและจำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพีพอด *Apocyclops royi* สายพันธุ์ไทย (*A. royi*-TH) รวมทั้งสิ้น 13 ยีน ประกอบด้วยกลุ่มยีนดีแซตทูเรส (desaturase) จำนวน 5 ยีน ได้แก่ *ArD6D*, *ArD5D*, *ArD4D*, *ArO3D-1* และ *ArO3D-2* และกลุ่มยีนอีลองเกส (elongase) จำนวน 8 ยีน ได้แก่ *ArElovl1*, *ArElovl2*, *ArElovl3*, *ArElovl4*, *ArElovl5*, *ArElovl6*, *ArElovl7*, และ *ArElovl8* (Amparyup et al., 2022a) และจากการศึกษาข้อมูลทรานสคริปโตมของโคพีพอด *A. royi*-TH (Amparyup et al., 2022) ได้ค้นพบยีน desaturase-like gene (*ArCb5D6D*) ซึ่งเป็นยีนกลุ่ม desaturase ชนิดใหม่ซึ่งยังไม่มีรายงานในโคพีพอด *A. royi*-TH แต่อย่างไรก็ตามยีน desaturase-like gene เคยได้รับการศึกษาในสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียน เช่น ปูทะเล *Scylla paramamosain* (Lin et al., 2017), ปูชน *Eriocheir sinensis* (Yang et al., 2013), กุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (Chen et al., 2017) และ กุ้งน้ำจืด *Macrobrachium nipponense* (Luo et al., 2018)

โดยจากการศึกษาพบว่ายีน *desaturase-like gene* อาจจะมีหน้าที่ในการสร้างกรดไขมันใน สัตว์กลุ่มครึ่งเตเชียน

ดังนั้น ในโครงการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *ArCb5D6D* ในโคฟี พอด *A. royi* สายพันธุ์ไทย (*A. royi*-TH) จากนั้นศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* ในโคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ (ระยะนอเพเลียส ระยะโคฟีพอดติด และ ระยะโตเต็มวัย) เพื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับชีว สังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เคยมีรายงานไว้ และ ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในโคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ โดยผลรูปแบบ การแสดงออกของยีนและผลปริมาณของกรดไขมันในโคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะ พัฒนาการจะช่วยทราบถึงบทบาทของยีน *ArCb5D6D* ที่เป็นไปได้ในชีวสังเคราะห์กรดไขมันสาย ยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนของโคฟีพอด *A. royi*-TH

นอกจากนี้การศึกษานี้ได้ศึกษาอิทธิพลของสภาวะความเค็มต่อชีวสังเคราะห์กรดไขมัน สายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA biosynthesis) ในโคฟีพอด *A. royi*-TH โดยทำการศึกษา โคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงที่ความเค็ม 15 พีพีที (ความเค็มต่ำ) เปรียบเทียบกับโคฟีพอดที่เลี้ยง ที่ความเค็ม 25 พีพีที (กลุ่มควบคุม) จากนั้นศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมัน และการแสดงออก ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน ได้แก่ ยีน *ArD5D*, ยีน *ArD6D* และ ยีน *ArCb5D6D* ในโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่ทำการเลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที) โดยผลจากการศึกษานี้จะช่วยทำให้เข้าใจถึงกลไกชีวสังเคราะห์กรดไขมันสาย ยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน และสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาว ไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคฟีพอด *A. royi*-TH และได้โคฟีพอดที่มีคุณภาพ มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และมีประสิทธิภาพสำหรับการนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน สามารถแก้ไขปัญหาอัตราการ ตายสูงในสัตว์น้ำแรกเกิดได้ โดยองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์สำหรับ อุตสาหกรรมอาหารสัตว์น้ำ และอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาลักษณะสมบัติและบทบาทของยีน *ArCb5D6D* ในโคพีพอด *Apocyclops royi* สายพันธุ์ไทย (*A. royi*-TH)
2. เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเค็มต่อคุณค่าทางโภชนาการของโคพีพอด *A. royi*-TH โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันด้วยเทคนิค Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)
3. เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเค็มต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันของโคพีพอด *A. royi*-TH ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR



บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 โคพีพอด

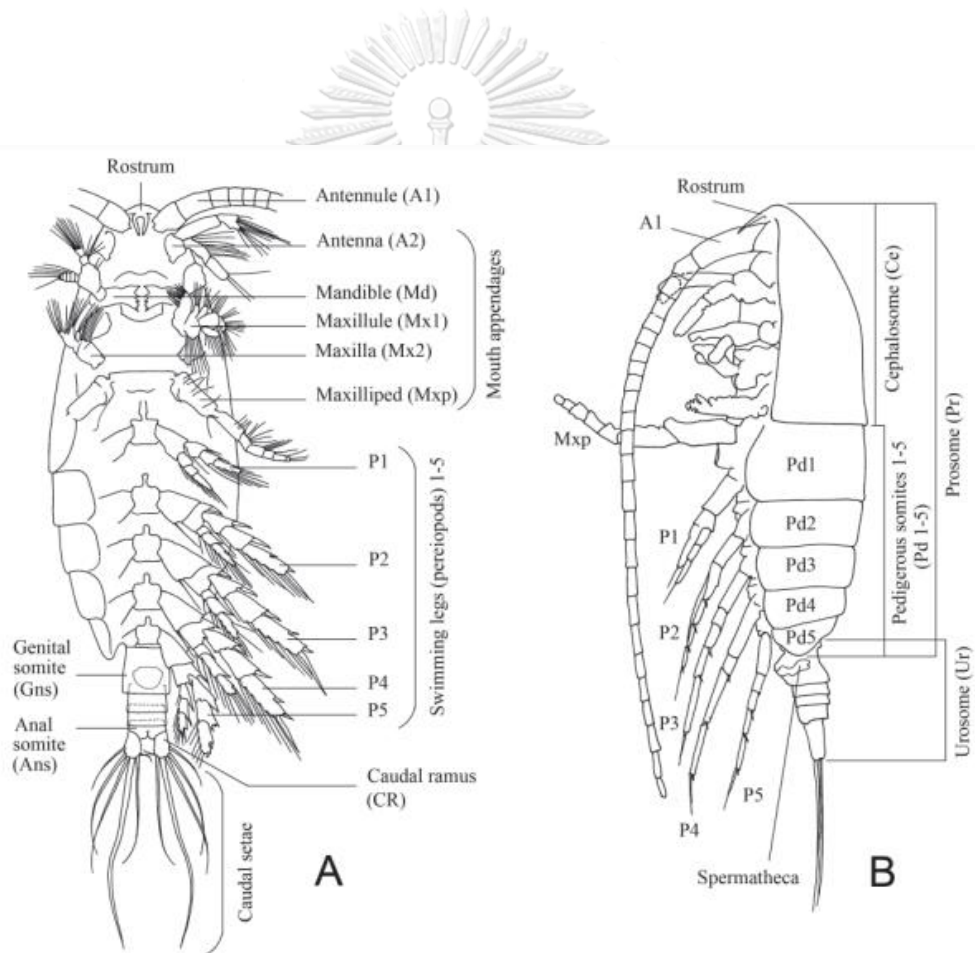
โคพีพอด (Copepod) เป็นแพลงก์ตอนสัตว์ รูปร่างทรงกระบอกขนาดเล็ก จัดอยู่กลุ่มครัสเตเชียน เป็นแหล่งอาหารตามธรรมชาติของสัตว์น้ำ สามารถพบโคพีพอดได้ทั้งในแหล่งน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำทะเล ในระบบนิเวศทางทะเลโคพีพอดมีบทบาทเป็นผู้บริโภคขั้นต้น (consumer) โดยโคพีพอดจะกินแพลงก์ตอนพืช ต่อมาโคพีพอดจะถูกสัตว์น้ำกินเป็นอาหาร (Das et al., 2012) กล่าวคือโคพีพอดมีบทบาทในการเป็นตัวกลางในการเชื่อมต่อระหว่างแพลงก์ตอนพืชและสัตว์น้ำวัยอ่อน

ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงโคพีพอดเชิงพาณิชย์เพื่อนำมาใช้เป็นอาหารมีชีวิตสำหรับการอนุบาลลูกสัตว์น้ำตามโรงเพาะฟัก (Su et al., 2005; Ajiboye et al., 2011) เนื่องจากโคพีพอดมีสารอาหารที่ครบถ้วนซึ่งประกอบไปด้วยธาตุอาหารหลัก เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และธาตุอาหารรอง เช่น วิตามิน แร่ธาตุ (van der Meeren et al., 2008) นอกจากนี้ขนาดตัวที่เล็กและการเคลื่อนไหวของโคพีพอดสามารถกระตุ้นพฤติกรรมกินอาหารของลูกสัตว์น้ำได้ (Bengtson, 2003) ด้วยเหตุนี้โคพีพอดจึงเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่เปรียบเสมือน “living capsules of nutrition” (Das et al., 2012)

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของโคพีพอด

โคพีพอดเป็นสมาชิกของไฟลัมอาร์โทพอด (Arthropoda) ไฟลัมย่อยครัสเตเชีย (Crustacea) คลาสแมกซิลโลโปดา (Maxillopoda) คาสาย่อยโคพีโปดา (Copepoda) ซึ่งแบ่งออกเป็น 10 อันดับ (order) ได้แก่ Calanoida, Cyclopoida Gelyelloida, Harpacticoida, Misophrioida, Monstrilloida, Mormonilloida, Platycopioida, Polyarthra และ Siphonostomatoida โคพีพอดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายสูง จากการศึกษาพบว่า มีจำนวนสปีชีส์มากกว่า 20,000 สปีชีส์ โดยโคพีพอดกลุ่มที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงและศึกษาประกอบด้วย 3 กลุ่ม ได้แก่ Calanoida, Cyclopoida และ Harpacticoida (Davis et al., 1995; Blaxter et al., 1998; Johnson et al., 2012)

โคพีพอดเป็นครัสเตเชียนที่มีเปลือกแข็งหุ้ม มีรูปร่างที่หลายหลายขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ โดยทั่วไปโคพีพอดโตเต็มวัยขนาดเฉลี่ยประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ถึง 2.0 จะมีรูปร่างสั้นเป็นทรงกระบอก มีตาเดี่ยว ลำตัวโคพีพอดจะมีลักษณะเป็นปล้อง โดยโคพีพอดจะมีจำนวนปล้องโดยประมาณ 16-17 ปล้อง และมีรยางค์จำนวน 11 คู่ โครงสร้างร่างกายโคพีพอดแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนหัว (cephalosome) ส่วนอก (metasome) และส่วนหาง (urosome) ส่วนหัวและอกจะประกอบอวัยวะ 6 ส่วน ได้แก่ (1) หนวด 2 คู่สำหรับรับความรู้สึกและจับอาหาร, (2) mandibles 1 คู่ (3) maxillae 2 คู่ และ (4) maxilliped 1 คู่ (Wingerter, 2023) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างร่างกายโคพีพอด
ที่มา : Prusova และคณะฯ (2012)

2.1.1.1 ลักษณะโคพีพอดกลุ่มคาลานอยด์ (Calanoida)

โคพีพอดกลุ่มคาลานอยด์ประกอบด้วยวงศ์ (family) ประมาณ 46 วงศ์ มีจำนวนสายพันธุ์มากกว่า 1,800 สายพันธุ์ พบได้ทั้งแหล่งน้ำเค็มและน้ำจืด ระยะโตเต็มวัยมีขนาดใหญ่กว่ากลุ่ม Cyclopoida และ Harpacticoida โดยขนาดตัวจะมีความยาวในช่วง 0.5–2.0 มิลลิเมตร (0.02–0.08 นิ้ว) (Blaxter, 1998) โคพีพอดกลุ่มคาลานอยด์มักมีรูปร่างเป็นทรงกระบอก หนวดคู่แรกมีความยาวเป็นครึ่งหนึ่งของความยาวลำตัว มีข้อต่อระหว่างส่วนต่างๆ (Barnes, 1982) ส่วนใหญ่มักกินแพลงก์ตอนพืชเป็นอาหาร มีลักษณะการว่ายน้ำแบบกระตุก (jerky movement) ซึ่งดึงดูดให้เกิดตอบสนองต่อพฤติกรรมการกินอาหารของสัตว์น้ำ (Wingerter, 2023)



รูปที่ 2 โคพีพอดกลุ่มคาลานอยด์ (Calanoida)

(Wingerter, 2023)

2.1.1.2 ลักษณะโคพีพอดกลุ่มไซโคลพอยด์ (Cyclopoida)

โคพีพอดกลุ่มไซโคลพอยด์ (Cyclopoida) ประกอบด้วยวงศ์ (family) ประมาณ 30 วงศ์ พบได้ทั้งในแหล่งน้ำเค็มและแหล่งน้ำจืด โคพีพอดกลุ่มไซโคลพอยด์ (Cyclopoida) มีลักษณะรูปร่างคล้ายลูกแพร์ ปลายหางมีลักษณะเป็นแฉก หนวดคู่แรกมีขนาดใหญ่และหนวดคู่ที่สองมีขนาดสั้นกว่าขนาดส่วนหัวและส่วนอก เพศเมียจะมีถุงไข่ติดกับบริเวณส่วนท้องช่วงแรก มีลักษณะเคลื่อนไหวที่เร็ว (Barnes, 1982) โคพีพอดกลุ่มไซโคลพอยด์ (Cyclopoida) สามารถกินอาหารได้หลากหลาย เช่น สารอินทรีย์ แพลงก์ตอนพืช รวมถึงแบคทีเรีย (Wingerter, 2023)

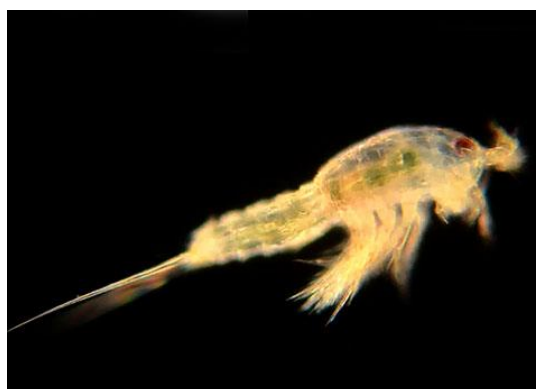


รูปที่ 3 โคพีพอดกลุ่มไซโคลพอยด์ (Cyclopoida)

ที่มา: Wingerter, 2023

2.1.1.3 ลักษณะโคพีพอดกลุ่มฮาร์แพคติกอยด์ (Harpacticoida)

โคพีพอดกลุ่มฮาร์แพคติกอยด์ (Harpacticoida) เป็นโคพีพอดหน้าดิน ซึ่งพบได้ทั้งในแหล่งน้ำเค็ม แหล่งน้ำจืด และทะเลน้ำแข็ง จากการศึกษาโคพีพอดกลุ่มฮาร์แพคติกอยด์ (Harpacticoida) มีจำนวนสายพันธุ์มากกว่า 3000 สายพันธุ์ โดยสกุลที่พบได้บ่อย ได้แก่ Ameiridae, Parastenocarididae และ Canthocamptidae ลักษณะของโคพีพอดกลุ่มฮาร์แพคติกอยด์ (Harpacticoida) จะมีความยาวลำตัวยาวกว่าโคพีพอดกลุ่มไซโคลพอยด์ (Cyclopoida) และโคพีพอดกลุ่มคาลานอยด์ (Calanoida) มีรูปร่างคล้ายหนอน มีหนวดคู่แรกค่อนข้างสั้น (Barnes, 1982; Wingerter, 2023)



รูปที่ 4 โคพีพอดกลุ่มฮาร์แพคติกอยด์ (Harpacticoida)

ที่มา: Bryant, 2014

2.1.2 คุณค่าทางโภชนาการของโคพีพอด

โคพีพอดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญในห่วงโซ่อาหาร จัดเป็นแหล่งอาหารที่ของสัตว์น้ำในระบบนิเวศทางทะเล เนื่องจากคุณค่าทางโภชนาการที่โดดเด่นของโคพีพอด จึงได้มีการนำโคพีพอดมาใช้เป็นอาหารมีชีวิตตามโรงเพาะฟักสัตว์น้ำ จากการศึกษาของ van der Meeren et al. (2008) ได้เปรียบเทียบองค์ประกอบทางชีวเคมี เช่น ไขมัน กรดอะมิโน แอสต้าแซนทีน และวิตามิน ในโคพีพอด 3 สายพันธุ์ (*Acartia grani*, *Centropages hamatus*, และ *Eurytemora affinis*) เปรียบเทียบกับองค์ประกอบทางชีวเคมีไรติเฟอร์และอาร์ทีเมีย โดยผลองค์ประกอบทางชีวเคมีเฉลี่ยของโคพีพอดระยะนอเพลียส, โคพีพอด, ไรติเฟอร์ และอาร์ทีเมีย แสดงดังในตารางที่ 1 โดยรวมแล้วจากผลการศึกษาพบว่าโคพีพอดมีคุณค่าทางโภชนาการที่สูงกว่าไรติเฟอร์และอาร์ทีเมีย

2.1.2.1 กรดไขมัน

ปริมาณกรดไขมัน PUFA ในโคพีพอดเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้โคพีพอดมีคุณค่าทางโภชนาการที่เหนือกว่าไรติเฟอร์และอาร์ทีเมีย (Kanazawa 1993; Reitan et al., 1994; Bell et al. 2003) จากการศึกษาโคพีพอดมีปริมาณไขมันอยู่ที่ 6.9–22.5% DW มีปริมาณกรดไขมัน EPA 8.3–24.6% ของไขมันทั้งหมด, มีปริมาณกรดไขมัน DHA 13.9–42.3% ของไขมันทั้งหมด และ มีปริมาณกรดไขมัน ARA 0–2.6% (van der Meeren et al., 2008) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันเหล่านี้ในโคพีพอดกับอาร์ทีเมียและไรติเฟอร์ พบว่าโคพีพอดระยะนอเพลียสมีปริมาณกรดไขมัน DHA สูงกว่าไรติเฟอร์ 0.8 เท่า และโคพีพอดมีปริมาณกรดไขมัน DHA สูงกว่าอาร์ทีเมีย 0.3 เท่า ในขณะที่โคพีพอดมีปริมาณกรดไขมัน ARA น้อยกว่าไรติเฟอร์และอาร์ทีเมีย 0.5 เท่า โดยสัดส่วน EPA/ARA ในโคพีพอดมีค่ามากกว่า 20 และอัตราส่วน DHA/EPA มากกว่า 2 ซึ่งอัตราส่วนเหล่านี้มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและคุณภาพของสัตว์น้ำวัยอ่อน (Sargent et al., 1999; Bell et al. 2003)

นอกจากนี้โคพีพอดยังมีปริมาณไขมันที่มีขั้ว (polar lipid) สูงถึง 37.9–70.2% ของปริมาณไขมันทั้งหมด และกรดไขมัน PUFA ในโคพีพอดมักอยู่ในส่วนของฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ในขณะที่ไขมันในไรติเฟอร์และอาร์ทีเมียจะอยู่ในรูปไขมันที่เป็นกลาง (neutral lipid) เช่น ไตรกลีเซอรอล (triacylglycerols) (Coutteau and Mourente, 1997)

นั่นคือกรดไขมัน PUFA ในโคฟีพอดจะมีชีวประสิทธิผล (bioavailability) ที่ดีกว่าในโรติเฟอร์ และอาร์ทีเมีย เนื่องจากไขมันที่มีขั้ว (polar lipid) จะถูกย่อย ดูดซึม และนำไปใช้ประโยชน์ในร่างกายได้ง่ายกว่าไขมันที่เป็นกลาง (neutral lipid) (Izquierdo et al., 2000; Gisbert et al. 2005) นอกจากนี้จากรายงานการศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าตัวอ่อนของปลาทะเลมีความต้องการฟอสโฟลิพิด (phospholipid) จากอาหาร (Geurden, 1997; Bell et al. 2003; Cahu et al., 2003)

2.1.2.2 โพรตีนและกรดอะมิโน

โพรตีนเป็นสารอาหารที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตในสิ่งมีชีวิต ปริมาณโพรตีนที่เหมาะสมในอาหารสัตว์น้ำมีความสำคัญต่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ โดยจากการศึกษาปริมาณโพรตีนและกรดอะมิโนในโคฟีพอด พบว่าโคฟีพอดมีปริมาณโพรตีนและปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูงกว่าเมื่อเทียบกับอาร์ทีเมียและโรติเฟอร์ แสดงดังตารางที่ 2 (Fyhn et al., 2020; Conceição et al., 1997; Helland et al., 2003; van der Meeren et al., 2008) โดยจากการรายงานของ van der Meeren และคณะ (2008) พบว่า

- โคฟีพอดมีปริมาณมีโพรตีนสูงกว่าอาร์ทีเมีย 0.5 เท่า
- โคฟีพอดมีปริมาณมีกรดอะมิโนอิสระสูงกว่าอาร์ทีเมีย 0.8 เท่า
- โคฟีพอดระยะอนุเพลียสมิปริมาณโพรตีนสูงกว่าโรติเฟอร์ 0.2 เท่า
- โคฟีพอดระยะอนุเพลียสมิปริมาณกรดอะมิโนสูงกว่าโรติเฟอร์ 4.2 เท่า

ปริมาณโพรตีนและกรดอะมิโนที่โดดเด่นโคฟีพอดช่วยให้ตัวอ่อนของปลามีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น (Conceição et al., 2003; Rønnestad et al., 2003)

2.1.2.3 แอสต้าแซนทีน (Astaxanthin)

แอสต้าแซนทีน (Astaxanthin) เป็นเม็ดสีที่มีบทบาทสำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและแหล่งของวิตามินเอของลูกปลา (van der Meeren et al. 2008) ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแอสต้าแซนทีนมักถูกเติมลงในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มสีส้มให้กับสัตว์น้ำ หากสัตว์น้ำไม่ได้รับแอสต้าแซนทีนในปริมาณที่ไม่เพียงพอจะส่งผลให้สีเนื้อซีด และ

คุณภาพผลผลิตสัตว์น้ำลดลง นอกจากนี้แอสต้าแซนทีนยังสามารถปรับปรุงการทำงานของภูมิคุ้มกันและสุขภาพโดยรวมของปลา ซึ่งช่วยลดการเกิดโรคและอัตราการตายได้

จากการศึกษา van der Meeren และคณะ (2008) พบปริมาณแอสต้าแซนทีนในโคฟีพอด 413–1422 $\mu\text{g/g}$ ของน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ไม่พบปริมาณแอสต้าแซนทีน (Astaxanthin) ในอาร์ทีเมีย

2.1.2.4 วิตามินและแร่ธาตุต่างๆ

จากการศึกษา van der Meeren และคณะ (2008) พบว่าโคฟีพอดปริมาณมีวิตามิน C, E, B1 และ B2 สูงเทียบเท่า โรติเฟอร์และอาร์ทีเมีย และในโคฟีพอดมีปริมาณไอโอดีนสูงกว่าอาร์ทีเมียถึง 109 เท่า (Moren et al., 2006)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางชีวเคมีโดยเฉลี่ยของโคฟีพอดระยะนอเพเลียส, โคฟีพอด, โรติเฟอร์ และอาร์ทีเมีย

องค์ประกอบทางชีวเคมี	หน่วย	แหล่งที่มา	โคฟีพอดระยะนอเพเลียส	โรติเฟอร์	โคฟีพอด	อาร์ทีเมีย
Dry weight	$\mu\text{g/individual}$	1	0.6	0.6	8.8	2.1
Protein	%DW	1	30.3	25	43	29
Free amino acid	%DW	1	8.6	1.7	6.0	3.3
Total lipids	%DW	1	8.6	15	11	25
Polar Lipids	%DW	1	5.4	6.1	6.2	4.5
DHA	%DW		3.5	1.9	3.5	2.7
EPA	%DW		1.4	1.1	1.8	1.9
DHA/EPA		1	2.8	1.7	2.2	1.4
EPA/ARA		1	27.7	3.7	24.0	4.0
Vitamin E	$\mu\text{g/gDW}$	1	-	513	113	456
Vitamin C	$\mu\text{g/gDW}$	1	-	220	515	446
Vitamin B1	$\mu\text{g/gDW}$	1	-	49	23	16
Iodine	$\mu\text{g/gDW}$	2,3	-	4.7	121	1.1
Se	$\mu\text{g/gDW}$	3	-	0.08	4.00	-

หมายเหตุ: DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; ARA, arachidonic acid;

แหล่งที่มา: (1) van der Meeren et al. (2008), (2) Moren et al. (2006), และ (3) Hamre et al. (2008)

ดัดแปลงจาก: Conceição และคณะฯ (2010)

2.2 โคพีพอด *Apocyclops royi*

Apocyclops royi เป็นโคพีพอดขนาดเล็ก รูปร่างทรงกระบอก ลำตัวค่อนข้างใส (รูปที่ 5) โคพีพอด *A. royi* ถูกจัดอยู่ในอันดับ Cyclopoid วงศ์ Cyclopidae โดยอนุกรมวิธานของโคพีพอด *A. royi* (Walter, 2008) แสดงได้ดังนี้

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Crustscea

Superclass: Multicrustacea

Class: Copepoda

Infraclass Neocopepoda

Superorder: Podoplea

Order: Cyclopoida

Suborder: Cyclopida

Family: Cyclopidae

Genus: *Apocyclops*

Species: *Apocyclops royi*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

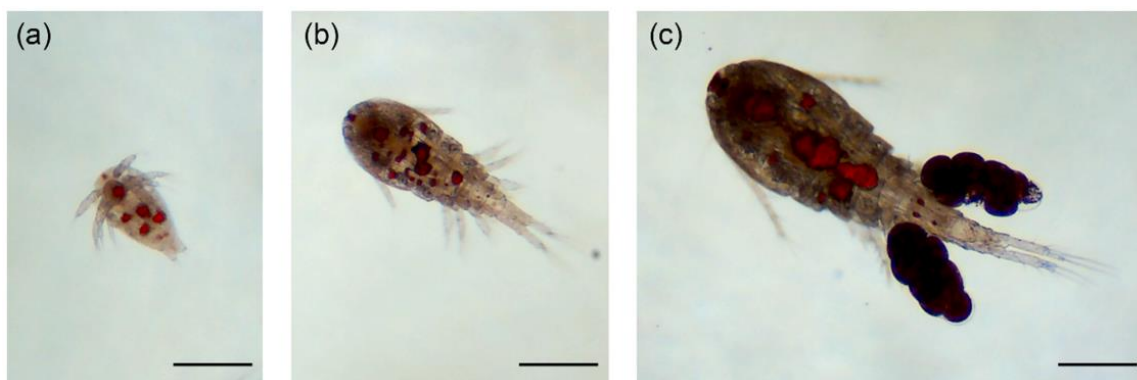


รูปที่ 5 โคพีพอด *Apocyclops royi*

ที่มา: Gréve, 2019

โคพีพอด *Apocyclops royi* เป็นโคพีพอดเขตร้อน สามารถพบได้ทั้งแหล่งน้ำจืด บ่อ เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกร่อย และบริเวณปากอ่าวแม่น้ำ (Chang and Lei, 1993; Su et al., 2005; Blanda et al., 2015, 2017; Amparyup et al., 2022) โคพีพอด *A. royi* เป็นสายพันธุ์ที่มีการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์มีชีวิตในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของไต้หวัน (Su et al., 2005; Ajiboye et al., 2011) เนื่องจากโคพีพอด *A. royi* เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสำหรับการนำมาอนุบาลลูกปลา (Liao et al., 2001) มีความทนทานต่อความเค็มและอุณหภูมิได้ในช่วงกว้าง เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงในปริมาณมากเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ (Lee et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมก้า 3 (n-3 LC-PUFA) จากกรดไขมัน PUFA สายสั้น (Nielsen et al., 2019, Nielsen et al., 2020, Nielsen et al., 2021, Pan et al., 2018) ดังนั้นโคพีพอด *A. royi* สามารถมีชีวิตและอยู่รอดได้แม้จะเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีกรดไขมัน LC-PUFA ต่ำ (Blanda et al., 2015; Nielsen et al., 2020) ส่งผลให้โคพีพอด *A. royi* มีต้นทุนการเพาะเลี้ยงต่ำ (Yoshino et al., 2022)

โคพีพอด *A. royi* สายพันธุ์ไทย (*A. royi*-TH) มีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีกรดไขมันจำเป็นทั้ง DHA EPA และ ARA โดยพบปริมาณกรดไขมัน PUFA และกรดไขมัน LC-PUFA ในโคพีพอด *A. royi*-TH ระยะโตเต็มวัยสูงถึง 40.15% และ 11.22 % ตามลำดับ (Amparyup et al., 2022a) และโคพีพอด *A. royi*-TH มีปริมาณกรดไขมัน PUFA และกรดไขมัน LC-PUFA สูงกว่าอาร์ทีเมีย *A. salina* และไรแดงน้ำจืด *Moina sp.* (ศุภกานต์, 2565) นอกจากนี้จากการศึกษาก่อนหน้าพบการแสดงออกของยีนต้านจุลชีพ Theromacin-like (ArTM-like) ในโคพีพอด *A. royi*-TH (Amparyup et al., 2022b)



รูปที่ 6 โคพีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ
(a): ระยะนอเพลียส, (b): ระยะโคพีพอดิต, (c) ระยะโตเต็มวัย
ที่มา: Amparyup และคณะฯ (2022a)

2.3 ความเค็ม (Salinity)

ความเค็ม (salinity) คือปริมาณของเกลือและแร่ธาตุทั้งหมดที่ละลายอยู่ในน้ำทะเล เช่น ไบคาร์บอเนต แคลเซียม โพแทสเซียม โซเดียม โบรไมด์ ซัลเฟต แมกนีเซียม คลอไรด์ เป็นต้น โดยปกติแล้วความเค็มอาจมีหน่วยวัดเป็นหน่วย ppt (ส่วนในพันส่วน), หน่วย % (เปอร์เซ็นต์) และ หน่วย PSU โดยค่าของความเค็มถูกใช้ในการจำแนกประเภทของแหล่งน้ำได้ 3 ประเภท ได้แก่ น้ำจืด (fresh water), น้ำเค็ม (sea water) และน้ำกร่อย (brackish water) (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2564)

- น้ำจืด (fresh water) คือน้ำที่มีปริมาณเกลือและแร่ธาตุละลายอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งโดยปกติมีค่าความเค็มน้อยกว่า 0.5 ppt (Groundwater Glossary, 2006) พบในแม่น้ำ ทะเลสาบ ลำธาร สระน้ำ และน้ำบาดาล (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2564)
- น้ำทะเล (sea water) คือน้ำที่มีค่าความเค็มอยู่ในช่วงระหว่าง 30 – 40 ppt โดยน้ำทะเลแต่ละพื้นที่จะค่าความเค็มแตกต่างกันขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่ตั้งของแหล่งน้ำ และระดับความลึกของน้ำทะเล ซึ่งส่วนใหญ่ค่าความเค็มเฉลี่ยของน้ำทะเลจะมีค่าเท่ากับ 35 ppt โดยน้ำทะเลถือเป็นน้ำที่ปกคลุมพื้นผิวโลกเกือบทั้งหมด ทั้งมหาสมุทร ทะเล และแหล่งน้ำเค็มอื่นๆ (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2564)
- น้ำกร่อย (brackish water) คือ น้ำที่มีค่าความเค็มมากกว่าน้ำจืด แต่มีความเค็มน้อยกว่าน้ำทะเล ซึ่งน้ำกร่อยจะมีความเค็มอยู่ที่ 0.5 – 30 ppt แหล่งน้ำกร่อยสามารถพบได้

ตามบริเวณที่น้ำทะเลและน้ำจืดไหลมาบรรจบกัน เช่น ปากแม่น้ำ ปากอ่าวและช่องแคบ แหล่งน้ำกร่อยเป็นแหล่งน้ำที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง มักพบสิ่งมีชีวิตหลากหลาย เช่น กุ้ง หอย ปู เป็นต้น ตัวอย่างแหล่งน้ำกร่อยในประเทศไทย เช่น ปากแม่น้ำเจ้าพระยา จ.สมุทรปราการ และปากแม่น้ำบางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2564)

ตารางที่ 2 ประเภทของน้ำแบ่งตามระดับความเค็ม

ชนิดของน้ำ	ระดับความเค็ม
น้ำจืด	น้อยกว่า 0.5 ppt
น้ำกร่อย	0.5 – 30 ppt
น้ำเค็ม/น้ำทะเล	30 – 50 ppt

ดัดแปลงจาก: (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2564)

2.3.1 อิทธิพลของสภาวะความเค็มต่อโคฟีพอด

โคฟีพอดเป็นสิ่งมีชีวิตยูริเฮไลน์ (euryhaline) สามารถทนต่อความเค็มในช่วงกว้างได้ (Dexter, 1993) ช่วงความเค็มที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของโคฟีพอดอาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของโคฟีพอด (species-specific) (Charmantier et al., 2008) โดยทั่วไปโคฟีพอดที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศทางทะเลตามธรรมชาติมักจะอาศัยอยู่ในช่วงความเค็มที่ 30 - 40 ppt แต่อย่างไรก็ตามโคฟีพอดบางสายพันธุ์สามารถทนต่อระดับความเค็มที่ต่ำกว่าหรือสูงกว่าได้ ตัวอย่างเช่น โคฟีพอด *Arctodiaptomus dorsalis*, โคฟีพอด *Leptodiaptomus novamexicanus*, โคฟีพอด *Mastigodiaptomus albuquerquensis*, โคฟีพอด *Mastigodiaptomus texensis*, โคฟีพอด *Mastigodiaptomus nesus*, โคฟีพอด *Mastigodiaptomus reidae* และโคฟีพอด *Mastigodiaptomus maya* เป็นโคฟีพอดที่ถูกค้นพบในแหล่งน้ำจืด ซึ่งสามารถมีชีวิตและอยู่รอดได้ในระดับความเค็มที่ต่ำถึง 0.1 ppt (Suárez-Morales, 2003; Marsh, 1907; Herrick, 1895; Wilson, 1953; Bowman, 1986; Suárez-Morales and Elías-Gutiérrez, 2000) ในขณะที่โคฟีพอดบางสายพันธุ์ถูกค้นพบในบ่อ

เกลือและสามารถทนต่อระดับความเค็มที่สูงได้ เช่น โคพีพอด *Pseudodiaptomus pankajus* และ โคพีพอด *Acartia saroju* (Madhupratap, 1992; Madhupratap, 1994)

โคพีพอดที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศทางทะเลตามธรรมชาติต้องรับมือกับความผันผวนของระดับความเค็มตลอดเวลาเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศและฤดูกาล โคพีพอดจึงได้มีการพัฒนาและการปรับตัวเพื่อควบคุมสมดุลภายในร่างกายผ่านกระบวนการควบคุมสมดุลออสโมซิส (osmoregulation) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ช่วยให้สัตว์น้ำสามารถรับมือกับการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไอออนภายในร่างกายกับสภาพแวดล้อมที่สัตว์น้ำอาศัยอยู่ได้ (Charmantier et al., 2008) เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับความเค็ม โคพีพอดจะเกิดการตอบสนองทางสรีรวิทยาต่างๆ (physiological responses) เพื่อรักษาสมดุลออสโมซิส (osmotic balance) ภายในร่างกาย หนึ่งในกลไกการตอบสนองของโคพีพอดเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงความเค็มของสภาพแวดล้อม คือ การควบคุมการขนส่งไอออนและน้ำผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membranes) โดยโคพีพอดจะมีเซลล์พิเศษที่เรียกว่า ionocytes หรือเซลล์คลอไรด์ (chloride cell) บริเวณเหงือกและเนื้อเยื่อร่างกาย (Johnson et al., 2014) ซึ่งเซลล์ชนิดนี้มีความสามารถในการขนส่งไอออนต่างๆ เช่น โซเดียม คลอไรด์ และโพแทสเซียม เพื่อควบคุมแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ภายในเซลล์กับสภาพแวดล้อมโดยรอบ และอีกกลไกในการตอบสนองของโคพีพอดเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงความเค็มของสภาพแวดล้อม คือ การปรับความเข้มข้นของสารออสโมไลต์ (osmolytes) ภายในร่างกายโคพีพอด เช่น กรดอะมิโน และน้ำตาล โดยจากการศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าโคพีพอดมีการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดจากความเค็ม (salinity stress) โดยการสะสมสารออสโมไลต์ (osmolytes) ที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ เช่น โพรลีน, อะลานีน, และ ไกลซีน ไว้ภายในเซลล์ (Lauritano et al., 2012; Willett and Burton, 2002)

การเปลี่ยนแปลงของความเค็มในสภาพแวดล้อมส่งผลต่อกระบวนการทางชีวภาพในสิ่งมีชีวิต (Cervetto et al., 1999) เมื่อสัตว์น้ำอยู่ในสภาวะความเค็มที่ไม่เหมาะสม จะทำให้สัตว์น้ำตกอยู่ในสภาวะความเครียด (Chinnery and Williams, 2004) ซึ่งสภาวะความเครียดจากความเค็มนี้ทำให้สัตว์น้ำมีความต้องการพลังงานเพิ่มขึ้นเพื่อใช้สำหรับกระบวนการควบคุมสมดุลออสโมซิส (osmoregulation) (Devreker et al., 2009) โดยจากการศึกษาของ

Goolish และ Burton (1989) พบว่าโคฟีพอด *Tigriopus californicus* ใช้พลังงาน 11.6% ของพลังงานทั้งหมดที่ใช้ประโยชน์ได้ เพื่อรับมือกับความเครียดด้านออสโมซิส (osmotic stress) ซึ่งการรับมือกับความเครียดด้านออสโมซิส (osmotic stress) ของโคฟีพอดนี้อาจทำให้โคฟีพอดต้องลดการจัดสรรพลังงานสำหรับกระบวนการทางชีวภาพอื่นๆ (Michalec et al., 2010) ซึ่งจะส่งผลต่อการเจริญเติบโต, ความสำเร็จในการสืบพันธุ์ รวมถึงคุณค่าทางโภชนาการในสัตว์น้ำ (Burton, 1991; Calliari et al., 2006; Devreker et al., 2004; Pan et al., 2016; Petkeviciute et al., 2015; Roddie et al., 1984)

2.3.1.1 อิทธิพลของความเค็มต่อการเจริญเติบโตในโคฟีพอด

Chen และคณะ (2006) ได้ศึกษาอัตราการรอดของโคฟีพอด *Pseudodiaptomus annandalei* ในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน ได้แก่ 5, 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 ppt จากการศึกษาพบว่าที่ระดับความเค็ม 15 ppt โคฟีพอด *P. annandalei* มีอัตราการรอดสูงสุดถึง 98.33% นอกจากนี้ยังพบว่าโคฟีพอด *P. annandalei* เพศเมีย สามารถทนความเครียดจากความเค็มได้ดีกว่าโคฟีพอด *P. annandalei* เพศผู้ โดยโคฟีพอด *P. annandalei* เพศเมียสามารถทนความเค็มได้ในช่วง 4.5–40.5 ppt และโคฟีพอด *P. annandalei* เพศผู้สามารถทนความเค็มได้ในช่วง 12.9–38.7 ppt

Pan และคณะ (2016) เลี้ยงโคฟีพอด *A. royi* ที่ระดับความเค็มต่างๆ (0, 10, 20, 30 ppt) เป็นเวลา 14 วัน จากการศึกษาพบว่า อัตราการเติบโตของประชากรโคฟีพอด *A. royi* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเค็ม 0, 5, 30 และ 35 ppt

Lee และคณะ (2017) ได้ศึกษาโคฟีพอด *Paracyclops nana* ในสภาวะความเค็มสูง (25, 30 ppt) และสภาวะความเค็มต่ำ (5 ppt) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (15 ppt) พบว่าโคฟีพอด *P.nana* ที่เลี้ยงที่สภาวะความเค็มสูง (30 ppt) มีระยะเวลาพัฒนาการล่าช้ากว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่โคฟีพอด *P.nana* ที่ทำการเลี้ยงในสภาวะความเค็มต่ำ (5 ppt) มีระยะเวลาพัฒนาการไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (15 ppt)

2.3.1.2 อิทธิพลของความเค็มต่อความสำเร็จในการสืบพันธุ์ในโคฟีพอด

Chen และคณะ (2006) ได้ศึกษาการสืบพันธุ์ (reproduction) ในโคฟีพอด *P. annandalei* เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน พบว่าการสืบพันธุ์ของโคฟีพอด *P. annandalei* มีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อเลี้ยงที่ความเค็ม 15 ppt โดยโคฟีพอด *P. annandalei* เพศเมียมีความสามารถในการผลิตนอเพลียส 334 ± 171.6 นอเพลียส/โคฟีพอดเพศเมีย และในหนึ่งวันสามารถผลิตนอเพลียสได้ 22 ± 6.4 นอเพลียส/โคฟีพอดเพศเมีย

Pan และคณะ (2016) ซึ่งทำการเลี้ยงโคฟีพอด *A. royi* ที่ระดับความเค็มต่างๆ (0, 10, 20, 30 ppt) เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทำการตรวจสอบการผลิตนอเพลียส พบว่าโคฟีพอด *A. royi* มีการผลิตนอเพลียสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ที่ระดับความเค็ม 0 และ 30 ppt เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงที่ระดับความเค็ม 10 และ 20 ppt

Lee และคณะ (2017) ได้ศึกษาความดกไข่ (fecundity) ในโคฟีพอด *P. nana* ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน พบว่าความดกไข่ของ *P. nana* สูงสุดเมื่อเลี้ยงในความเค็ม 15 ppt และโคฟีพอด *P. nana* ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มสูง 25 ppt และ 30 ppt มีความดกไข่ลดลง 30% และ 60% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (15 ppt) และโคฟีพอด *P. nana* ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มต่ำ 5 ppt มีความดกของไข่ลดลง 30% อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการศึกษาชี้ให้เห็นว่าช่วงความเค็มที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของโคฟีพอด *P. nana* คือ 5 ถึง 25 ppt

2.3.1.3 อิทธิพลของความเค็มต่อคุณค่าทางโภชนาการในโคฟีพอด

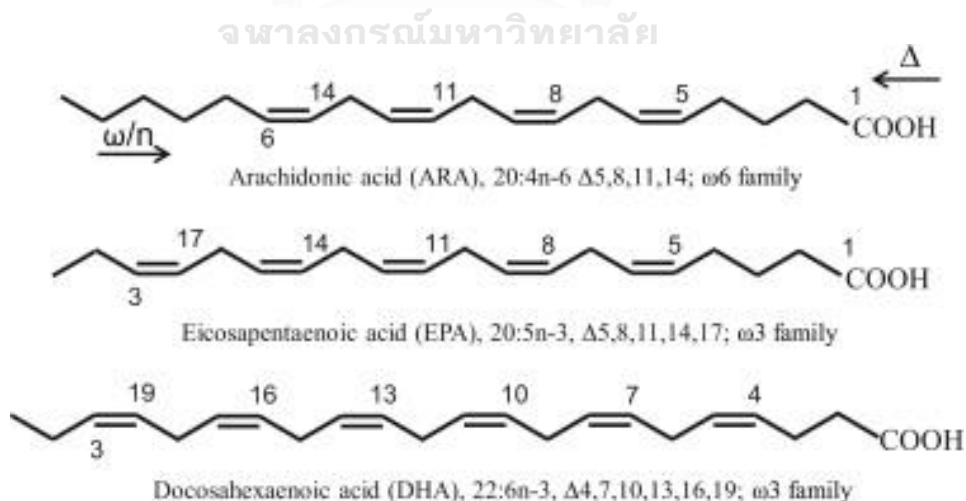
Lee และคณะ (2017) พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงโคฟีพอด *P. nana* ในสภาวะความเค็มสูง (25 และ 30 ppt) และสภาวะความเค็มต่ำ (5 ppt) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (15 ppt) จากนั้นทำการตรวจสอบการสะสมไขมัน พบว่าพื้นที่สัมผัสของหยดไขมันลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในโคฟีพอด *P. nana* ที่ทำการเลี้ยงในสภาวะความเค็มสูง 25 ppt และ 30 ppt โดยมีการลดลงของหยดไขมันเป็น 60% และ 80% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (15 ppt) และโคฟีพอด *P. nana* ที่ทำการเลี้ยงในสภาวะความเค็มต่ำ (5 ppt) มีการสะสมของหยดไขมันไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (15 ppt) นอกจากนี้กรดไขมันอิ่มตัวและกรด

ไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFAs) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญใน *P.nana* ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มสูง 25 และ 30 ppt เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

Sumiarsa และ Phelps (2007) พบว่าโคพีพอด *A. panamensis* มีปริมาณไขมันโดยรวมเฉลี่ยลดลง 44.2% ภายหลังจากปรับสภาพความเค็มเป็น 32 ppt ในเวลา 6 ชม.

2.4 กรดไขมันไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Long chain polyunsaturated fatty acid)

กรดไขมันไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA; Long chain polyunsaturated fatty acids) คือกรดไขมันที่มีโครงสร้างประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนมากกว่า 18 อะตอม และมีพันธะคู่มากกว่าหนึ่งพันธะ (แสดงดังรูปที่ 7) ซึ่งถือเป็นกรดไขมันจำเป็นสำหรับมนุษย์ เนื่องจากมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันเหล่านี้ได้เอง หรืออาจสามารถสังเคราะห์ได้แต่เกิดขึ้นในอัตราที่ช้ามาก จึงมีความจำเป็นที่ต้องได้รับกรด LC-PUFA เหล่านี้จากอาหารเป็นหลัก โดยกรดไขมัน LC-PUFA เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษาโครงสร้างและหน้าที่ และยังมีบทบาทในกระบวนการทางสรีรวิทยาหลายอย่าง เช่น การพัฒนาของสมอง การมองเห็น การทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และการควบคุมการอักเสบ ตัวอย่างของ LC-PUFA ได้แก่ กรดไขมันโอเมก้า 3 เช่น กรดไขมันอีพีเอ (EPA; eicosapentaenoic acid) และกรดไขมันดีเอชเอ (DHA; docosahexaenoic acid) และกรดไขมันโอเมก้า 6 เช่น กรดไขมันเออาร์เอ (ARA; arachidonic acid)



รูปที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA)

ที่มา: Chen และคณะฯ (2014)

2.4.1 กรดไขมันโอเมก้า 3

กรดไขมันโอเมก้า 3 คือกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ที่มีพันธะคู่ อยู่ในตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 3 นับจากปลายหมู่เมทิล (CH₃-) ของสายกรดไขมัน รายชื่อกรดไขมันโอเมก้า 3 แสดงดังตารางที่ 3 โดยกรดไขมันโอเมก้า 3 ชนิดที่มีความสำคัญสำคัญได้แก่ กรดไขมันอีพีเอ (EPA; eicosapentaenoic acid) และ กรดไขมันดีเอชเอ (DHA; docosahexaenoic acid) มักพบในปลาที่มีไขมัน เช่น ปลาแซลมอน ปลาแมคเคอเรล และปลาทูน่า

ตารางที่ 3 รายชื่อกรดไขมันโอเมก้า 3

ชื่อสามัญ	ชื่อย่อ	ชื่อลพิต	ชื่อเคมี
Hexadecatrienoic acid	HTA	C16: 3n-3	<i>all-cis</i> -7,10,13-hexadecatrienoic acid
α -Linolenic acid	ALA	C18: 3n-3	<i>all-cis</i> -9,12,15-octadecatrienoic acid
Stearidonic acid	SDA	C18: 4n-3	<i>all-cis</i> -6,9,12,15-octadecatetraenoic acid
Eicosatrienoic acid	ETE	C20: 3n-3	<i>all-cis</i> -11,14,17-eicosatrienoic acid
Eicosatetraenoic acid	ETA	C20: 4n-3	<i>all-cis</i> -8,11,14,17-eicosatetraenoic acid
Eicosapentaenoic acid	EPA	C20: 5n-3	<i>all-cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid
Heneicosapentaenoic acid	HPA	C21: 5n-3	<i>all-cis</i> -6,9,12,15,18-heneicosapentaenoic acid
Docosapentaenoic acid Clupanodonic acid	DPA	C22: 5n-3	<i>all-cis</i> -7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid
Docosahexaenoic acid	DHA	C22: 6n-3	<i>all-cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid
Tetracosapentaenoic acid	-	C24: 5n-3	<i>all-cis</i> -9,12,15,18,21-tetracosapentaenoic acid
Tetracosahexaenoic acid (Nisinic acid)	-	C24: 6n-3	<i>all-cis</i> -6,9,12,15,18,21-tetracosahexaenoic acid

ดัดแปลงจาก: (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2566)

2.4.2 กรดไขมันโอเมก้า 6

กรดไขมันโอเมก้า 6 คือกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ที่มีพันธะคู่อยู่ในตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 6 นับจากปลายหมู่เมทิล (CH₃-) ของสายกรดไขมัน รายชื่อกรดไขมันโอเมก้า 6 แสดงดังตารางที่ 4 ตัวอย่างกรดไขมันโอเมก้า 6 เช่น กรดไขมันเออาร์เอ (ARA; arachidonic acid) มักพบในเนื้อสัตว์และน้ำมันพืช

ตารางที่ 4 รายชื่อกรดไขมันโอเมก้า 6

ชื่อสามัญ	ชื่อย่อ	ชื่อลพิต	ชื่อเคมี
Linoleic acid	LA	C18: 2n-6	<i>all-cis</i> -9,12-octadecadienoic acid
γ -Linolenic acid	GLA	C18: 3n-6	<i>all-cis</i> -6,9,12-octadecatrienoic acid
Calendic acid	-	C18: 3n-6	8E,10E,12Z-octadecatrienoic acid
Eicosadienoic acid	EDA	C20: 2n-6	<i>all-cis</i> -11,14-eicosadienoic acid
Dihomo-gamma-linolenic acid	DGLA	C20: 3n-6	<i>all-cis</i> -8,11,14-eicosatrienoic acid
Arachidonic acid	AA, ARA	C20: 4n-6	<i>all-cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoic acid
Docosadienoic acid	-	C22: 2n-6	<i>all-cis</i> -13,16-docosadienoic acid
Adrenic acid	-	C22: 4n-6	<i>all-cis</i> -7,10,13,16-docosatetraenoic acid
Osbond acid	-	C22: 5n-6	<i>all-cis</i> -4,7,10,13,16-docosapentaenoic acid
Tetracosatetraenoic acid	-	C24: 4n-6	<i>all-cis</i> -9,12,15,18-tetracosatetraenoic acid
Tetracosapentaenoic acid	-	C24: 5n-6	<i>all-cis</i> -6,9,12,15,18-tetracosapentaenoic acid

ดัดแปลงจาก: (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2566)

2.4.3 ประโยชน์ของกรดไขมัน LC-PUFA ในอาหารสัตว์น้ำ

กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA) เป็นสารอาหารที่สำคัญสำหรับสัตว์น้ำในการผลิตอาหารสัตว์น้ำจึงมักมีการเสริมกรดไขมัน LC-PUFA เข้าไปในอาหารของสัตว์น้ำ เนื่องจากเป็นแหล่งของพลังงาน และเป็นกรดไขมันจำเป็น (essential fatty acid) สำหรับสัตว์น้ำหลายชนิด ซึ่งจะส่งผลต่อการเจริญเติบโต สุขภาพ รวมถึงรสชาติและเนื้อสัมผัสของสัตว์น้ำ

2.4.3.1 อิทธิพลของกรดไขมัน LC-PUFA ต่อการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของสัตว์น้ำ

กรดไขมัน LC-PUFA มีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ในสิ่งมีชีวิต และมีบทบาทในการเป็นสารตั้งต้น (precursor) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮอร์โมนที่สำคัญหลายชนิด มีรายงานว่ากรดไขมัน DHA และกรดไขมัน EPA มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของระบบการมองเห็นและระบบประสาท (Ishizaki et al., 2000; Noffs, et al., 2009) และการพัฒนากระดูกในปลาทะเล (Gapasin and Duray 2001; Roo et al., 2009) ด้วยเหตุนี้กรดไขมัน LC-PUFA จึงมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ (Bransden et al., 2005; Glencross and Rutherford 2011; Matsunari et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาบางส่วนค้นพบว่าหากสัตว์น้ำได้ปริมาณกรดไขมัน LC-PUFA ที่มากเกินไปอาจส่งผลเสียต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำได้ (Morais et al., 2004 , Villalta et al., 2005)

2.4.3.2 อิทธิพลของกรดไขมัน LC-PUFA ต่อสุขภาพของสัตว์น้ำ

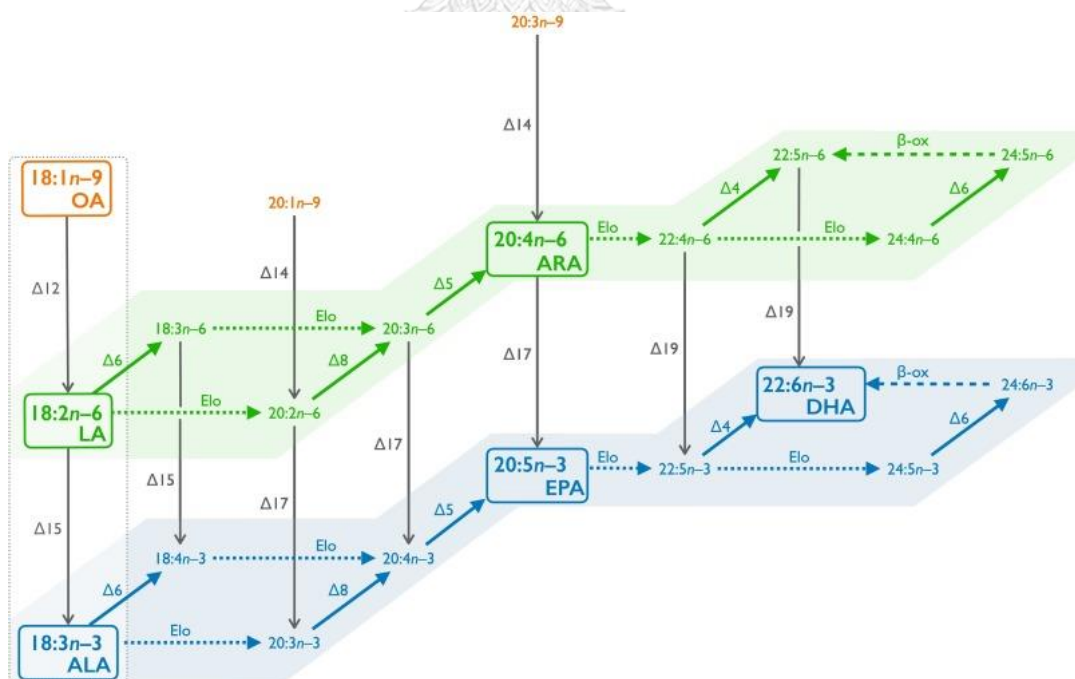
มีรายงานการศึกษาจำนวนหนึ่งค้นพบว่ากรดไขมัน LC-PUFA มีส่วนช่วยในการเพิ่มภูมิคุ้มกันและเพิ่มความสามารถในการทนต่อความเครียดได้ในสัตว์น้ำ เช่น จากการศึกษาของ Liu และคณะ (2002) พบว่าตัวอ่อนของปลา *Sparus aurata* มีความสามารถในการความต้านความเครียดเนื่องจากอุณหภูมิได้มากขึ้น เมื่อได้รับอาหารที่มีกรดไขมัน EPA และจากรายงานในปลากะพงขาว *Lateolabrax japonicus* (Cuvier) พบว่าเมื่อปลาได้รับอาหารที่มีอัตราส่วน DHA/EPA เท่ากับ 1.53–2.08 จะมีการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ lysozyme และ superoxide dismutase อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสิ่งนี้บ่งบอกได้ว่าอัตราส่วน DHA/EPA ในอาหารส่งผลให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และเพิ่มความสามารถในการทนทานต่อความเครียดในปลาได้ (Xu et al., 2016)

2.4.3.3 อิทธิพลของกรดไขมัน LC-PUFA ต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

กรดไขมัน LC-PUFA ในอาหารสัตว์น้ำมีความสำคัญต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ โดยมีการศึกษาที่พบว่ากรดไขมัน LC-PUFA มีผลต่อกระบวนการการสร้างเม็ดสีในสัตว์น้ำ (Villalta et al., 2008; Vizcaino et al., 2010)

2.5 ชีวสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA biosynthesis)

ชีวสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA biosynthesis) คือกระบวนการเปลี่ยนกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนน้อยกว่า 18 อะตอม เช่น กรดไขมัน ALA (alpha-linolenic acid; C18:3n-3) และกรดไขมัน LA (linoleic acid; C18:2n-6) ไปเป็นกรดไขมัน LC-PUFA ซึ่งมีจำนวนคาร์บอน 18 ถึง 22 อะตอม เช่น กรดไขมัน DHA และกรดไขมัน EPA ผ่านปฏิกิริยา desaturation และปฏิกิริยา elongation (รูปที่ 8) ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน LC-PUFA นี้เกิดขึ้นในอัตราที่ช้ามากในมนุษย์ จากการศึกษาพบว่าในมนุษย์มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนกรดไขมัน ALA ไปเป็นกรดไขมัน EPA และการเปลี่ยนกรดไขมัน LA ไปเป็นกรดไขมัน DHA อยู่ในช่วง 0.5% – 5% (Burdge et al., 2002; Goyens et al., 2006)



รูปที่ 8 วิถีชีวสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA biosynthesis) ในสัตว์น้ำ

ที่มา: Monroig และคณะ (2022)

วิถีชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA biosynthesis) ถูกค้นพบครั้งแรกในปลาน้ำจืด (Seiliez et al. 2003) แต่ภายหลังมีการค้นพบว่าสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายกลุ่มมีความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมัน LC-PUFA (Kabeya et al., 2017; Monroig et al., 2018) เช่น mollusks, crustaceans, และ echinoderms แต่อย่างไรก็ตามวิถีชีวสังเคราะห์กรดไขมัน LC-PUFA ในสิ่งมีชีวิตเหล่านี้อาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (Monroig et al., 2013) ตัวอย่างเช่น จากการศึกษาพบว่าโคพีพอด *Eucyclops serrulatus* ซึ่งเป็นโคพีพอดน้ำจืดมีความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมัน DHA เมื่อเลี้ยงด้วยสาหร่ายที่ปราศจากกรดไขมัน DHA (Desvillettes et al., 1997) ในขณะที่โคพีพอดบางชนิด เช่น โคพีพอด *Dropanopus forcipatus* และโคพีพอด *Euphausia superba* ไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมัน LC-PUFA ได้ (Bell et al., 2009; Parrish et al., 2012; Bell et al., 2007)

สิ่งมีชีวิตครัสเตเชียนหลายชนิดโดยเฉพาะแพลงก์ตอนสัตว์และสัตว์เดคาพอด (decopod) ได้รับการศึกษาและถูกค้นพบยีน front-end desaturases จำนวนหนึ่ง (Morris et al., 1973; Kanazawa et al., 1979; Kayama et al., 1984; Mourente, 1996; De Troch et al., 2012; Moreno et al., 1979; Bell et al., 2007; Farkas et al., 1981) นอกจากนี้ยังมีการค้นพบยีน desaturase-like ในสิ่งมีชีวิตครัสเตเชียนจำนวนหนึ่ง เช่น *Eriocheir sinensis* Yang et al., 2013, ปู *Scylla paramamosain* (Lin et al., 2017), กุ้ง *Litopenaeus vannamei* (Chen et al., 2017) และ กุ้ง *Cherax quadricarinatus* (Wu et al., 2018) โดยโปรตีน desaturase-like นี้มีคุณลักษณะของโปรตีน front-end desaturases ซึ่งประกอบด้วยบริเวณ cytochrome b5-like domain ที่บรรจุกล่องฮิสทีดีน (histidine boxes) 3 ตำแหน่ง แต่อย่างไรก็ตามกรดอะมิโนภายในกล่องฮิสทีดีน (HXXHH) มีความแตกต่างจากโปรตีน front-end desaturases ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆ (Monroig et al., 2012; Kabeya et al., 2017)

2.6 ยีนที่เกี่ยวข้องชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน

2.6.1 $\Delta 6$ desaturase gene ($\Delta 6$ FAD)

ยีน $\Delta 6$ FAD เป็นยีนที่มีการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ $\Delta 6$ desaturase ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกาะติดอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในการเติมพันธะคู่ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 6 นับจากปลาย carboxyl ของสายกรดไขมัน (Yadav et al., 1993) เอนไซม์ $\Delta 6$ desaturase เป็นเอนไซม์ที่กำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยา (rate-limiting enzyme) ในชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA biosynthesis) เนื่องจากมีบทบาทในปฏิกิริยา desaturation ขั้นตอนแรก โดยเอนไซม์ $\Delta 6$ -desaturase จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา desaturation ในการเปลี่ยนกรดไขมัน LA (C18:3 n-3) และ LNA (C18:2 n-6) เป็นกรดไขมัน GLA (C18:4 n-3) และกรดไขมัน STA (C18:3 n-6) ตามลำดับ นอกจากนี้เอนไซม์ $\Delta 6$ -desaturase ยังมีบทบาทในขั้นตอนการสังเคราะห์กรดไขมัน DHA (C22:6 n-3) จากกรดไขมัน EPA (C20:5 n-3) โดยเอนไซม์ elongase จะเปลี่ยนกรดไขมัน EPA (C20:5 n-3) ไปเป็นกรดไขมัน DPA (C22:5 n-3) และ กรดไขมัน TPA (C24:5 n-3) ตามลำดับ จากนั้นกรดไขมัน TPA จะถูกเติมพันธะคู่กลายเป็นกรดไขมัน THA (C24:6 n-3) ด้วยเอนไซม์ $\Delta 6$ -desaturase จึงเกิดปฏิกิริยา oxidation กลายเป็นกรดไขมัน DHA (C22:6 n-3) (Sprecher, 2000; Wallis et al., 2002; Zheng et al., 2009a) แสดงดังรูปที่ 8

ยีน $\Delta 6$ FAD ถูกโคลนครั้งแรกจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Synechocystis sp.* (Reddy et al., 1993) ต่อจากนั้นมีการศึกษา $\Delta 6$ -desaturases อย่างกว้างขวางในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์น้ำประเภทปลา (Hastings et al., 2001; Zheng et al., 2004; Zheng et al., 2005; Zheng et al., 2009b) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด เช่น หนอนไหมสายพันธุ์จีน *Antheraea pernyi* (Wang et al., 2010) และ หนอน *Caenorabditis elegans* (Napier et al., 1998) และได้มีการค้นพบยีน $\Delta 6$ desaturase-like สิ่งมีชีวิตจำพวกครัสเตเชียน เช่น ปู *Eriocheir sinensis* (Yang et al., 2013), ปู *Scylla paramamosain* (Lin et al., 2017), ปู *Portunus trituberculatus* (Wang et al., 2014), ลีอบสเตอร์ *Sagmariasus verreauxi* (Shu-Chien et al., 2017), และ กุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (Chen et al., 2017) โดยการแสดงออกของยีน $\Delta 6$

FAD มักถูกใช้ในการบ่งชี้ความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันของสิ่งมีชีวิต (Tocher et al., 2006)

2.6.2 $\Delta 5$ desaturase gene ($\Delta 5$ FAD)

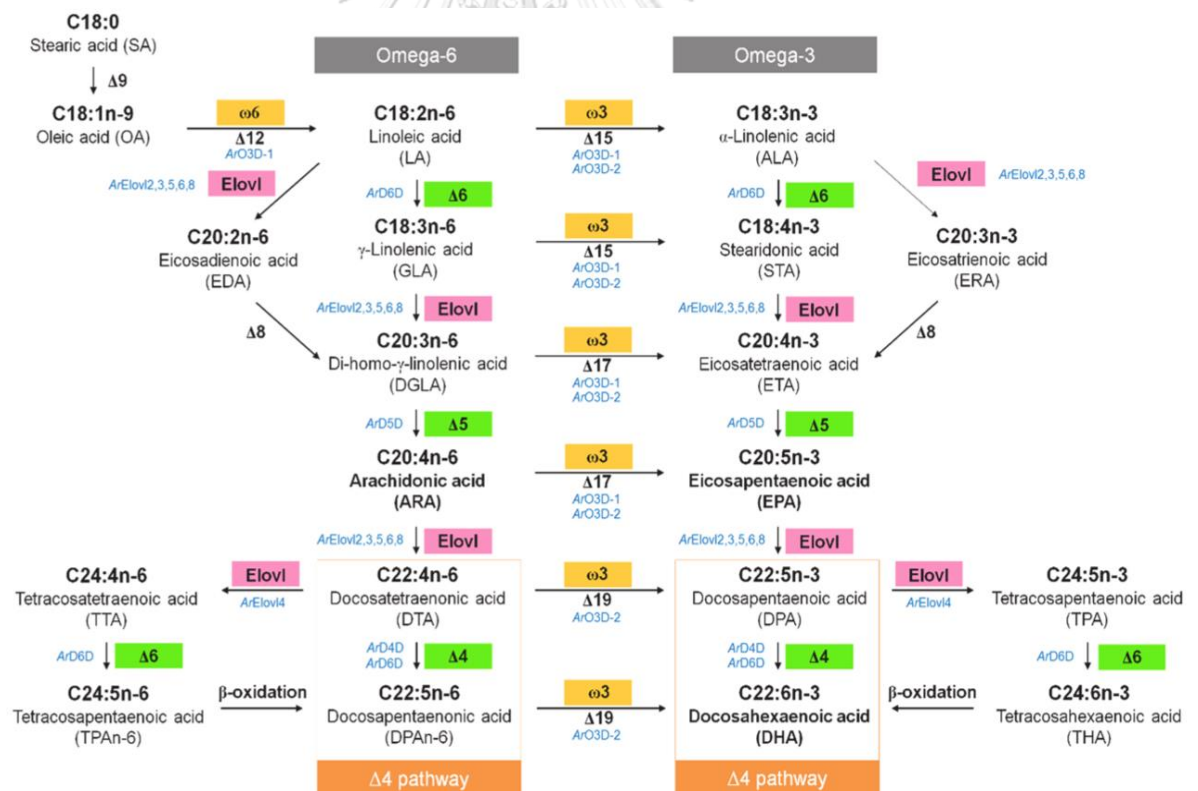
ยีน $\Delta 5$ FAD เป็นยีนที่มีการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ $\Delta 5$ desaturase ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกาะติดอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในการเติมพันธะคู่ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 5 นับจากปลายคาร์บอกซิล (carboxyl) ของสายกรดไขมัน (Nakamura and Nara, 2004; Yadav et al., 1993) โดยเอนไซม์ $\Delta 5$ desaturase ประกอบด้วยโดเมนสำคัญ 2 โดเมน ได้แก่ โดเมน cytochrome b5 domain ที่ปลาย N ของสายเปปไทด์ ซึ่งมีบริเวณ heme-binding motifs อยู่ในโดเมนนี้ และโดเมน desaturase domain ที่ปลาย C ของสายเปปไทด์ ซึ่งโดเมนนี้จะมีบริเวณ histidine boxes โดย histidine อาจถูกแทนที่ด้วย glutamine ได้ (Lee et al., 2016; Nakamura and Nara, 2004)

เอนไซม์ $\Delta 5$ desaturase มีหน้าที่หลักคือ เร่งปฏิกิริยา desaturation ในการเปลี่ยนกรดไขมัน ETA ให้เป็นกรดไขมัน EPA ในวิถีชีวสังเคราะห์กรดไขมันโอเมก้า 3 (n-3 PUFA biosynthesis) และเร่งปฏิกิริยา desaturation ในการเปลี่ยนกรดไขมัน DGLA ให้เป็นกรดไขมัน ARA ในวิถีชีวสังเคราะห์กรดไขมันโอเมก้า 6 (n-6 PUFA biosynthesis) (Nakamura and Nara, 2004)

2.6 ชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโคพิพอด *A. royi*-TH

โคพิพอด *A. royi*-TH มีวิถีชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Amparyup et al., 2022a; Nielsen et al., 2019, Nielsen et al., 2020, Nielsen et al., 2021, Pan et al., 2018) โดยจากรายงานการศึกษาของ Amparyup และคณะ (2022) ได้ทำการตรวจสอบองค์ประกอบของกรดไขมันในโคพิพอด *A. royi*-TH ทั้ง 3 ระยะ ได้แก่ ระยะออเพเลียส ระยะโคพิพอดติด และระยะโตเต็มวัย ที่ทำการเลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis suecica* (มีปริมาณ LC-PUFA ต่ำ) พบว่าโคพิพอด *A. royi*-TH ทั้ง 3 ระยะมีปริมาณกรดไขมัน LC-PUFA สูงกว่าปริมาณกรดไขมัน LC-PUFA ในสาหร่าย *T. suecica* นอกจากนี้การศึกษานี้ได้ระบุและจำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน

รวมทั้งสิ้น 13 ยีน ประกอบด้วยกลุ่มยีน desaturases จำนวน 5 ยีน ได้แก่ ArD6D, ArD5D, ArD4D, ArO3D-1 และ ArO3D-2 และกลุ่มยีน elongases จำนวน 8 ยีน ได้แก่ ArElov1, ArElov2, ArElov3, ArElov4, ArElov5, ArElov6, ArElov7, และ ArElov8 (ตารางที่ 5 และตารางที่ 6) พบว่ายีน ArD6D, ArD5D, ArD4D, ArO3D-1 และ ArO3D-2 และ ArElov3, ArElov4, ArElov5, ArElov6 และ ArElov7 ในโคฟีพอด *A.royi*-TH ระยะโตเต็มวัยมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ LC-PUFA ที่สูงในโคฟีพอด *A.royi*-TH ระยะโตเต็ม ซึ่งผลจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าโคฟีพอด *A.royi*-TH ระยะนอเพลียส, ระยะโคฟีพอดติด และระยะโตเต็มวัย มีความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมัน LC-PUFA จากกรดไขมัน PUFA สายสั้นผ่านวิถีชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคฟีพอด *A.royi*-TH (แสดงดังรูปที่ 10)



รูปที่ 9 แสดงชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคฟีพอด *Apocyclops royi*-TH

ที่มา: Amparyup และคณะฯ (2022a)

ตารางที่ 5 ลักษณะสมบัติของกลุ่มยีน Desaturase ในชีวสังเคราะห์กรดไขมันในโคฟีพอด *A. royi*-TH

Gene name	CDS /ORF	Closest gene (% amino acid similarity) (ACNO)	Conserved domains	Putative Biological Functions/ Reference sources
Fatty acid desaturase				
ArD6D	1302 bp / 433 aa	<i>T. californicus</i> front-end desaturase-2 (76%) (QWC69495)	- Cytochrome b5- like Heme/Steroid binding domain - Five transmembrane domains - FA_desaturase domain	Front-end desaturase: Δ 6 fatty acid desaturase activity (Nielsen et al., 2019) Δ 4 desaturase activity (Kabeya et al., 2021)
ArD5D	1317 bp / 438 aa	<i>P. nana</i> delta5 desaturase (76%) (APH81338)	- Cytochrome b5- like Heme/Steroid binding domain - Five transmembrane domains - FA_desaturase domain	Front-end desaturase: Δ 5 fatty acid desaturase activity (Lee et al., 2017b) Δ 6 fatty acid desaturase activity (Nielsen et al., 2019)
ArD4D	1026 bp / 341 aa	<i>Tigriopus japonicus</i> delta4- desaturase (86%) (AIW65589)	- Sphingolipid desaturase domain - Four transmembrane domains - FA_desaturase domain	Front-end desaturase: Δ 4 desaturase activity (Lee et al., 2020b)
ArO3D-1	1149 bp / 382 aa	<i>T. californicus</i> methyl-end desaturase-1 (72%) (QWC69499)	- Five transmembrane domains - FA_desaturase domain	Methyl-end desaturase: Δ 12, Δ 15, and Δ 17 desaturase activities (Kabeya et al., 2021)
ArO3D-2	1233 bp / 410 aa	<i>T. californicus</i> methyl-end desaturase-2 (73%) (QWC69500)	- Six transmembrane domains - FA_desaturase domain	Methyl-end desaturase: Δ 15, Δ 17, and Δ 19 desaturase activities (Kabeya et al., 2021)

ที่มา: Amparyup et al., 2022a

ตารางที่ 6 ลักษณะสมบัติของกลุ่มยีน Elongase ในชีวสังเคราะห์กรดไขมันในโคพีพอด *A. royi*-TH

Gene name	CDS /ORF	Closest gene (% amino acid similarity) (ACNO)	Conserved domains	Putative Biological Functions/ Reference sources
Elongation of very long fatty acids protein (Elovl)				
ArElovl1	873 bp / 290 aa	<i>P. nana</i> elongase-1 (86%) (APH81340)	- Five transmembrane domains - ELO domain	Elongase activity (Lee et al., 2017b)
ArElovl2	831 bp / 276 aa	<i>T. californicus</i> fatty acid elongase-2 (79%) (QWC69490)	- Seven transmembrane domains - ELO domain	Elongase activity towards C18 and C20, but not C22 (Kabeya et al., 2021)
ArElovl3	858 bp / 285 aa	<i>T. californicus</i> fatty acid elongase-1 (73%) (QWC69489)	- Seven transmembrane domains - ELO domain	Elongase activity towards C18 and C20, but not C22 (Kabeya et al., 2021)
ArElovl4	903 bp / 300 aa	<i>T. californicus</i> fatty acid elongase-6 (67%) (QWC69501)	- Seven transmembrane domains - ELO domain	Elovl4 (Nielsen et al., 2019) Elongase activity towards C18, C20, and C22:5n-3, but not C22:4n-6 (Kabeya et al., 2021)
ArElovl5	723 bp / 240 aa	<i>T. californicus</i> fatty acid elongase-4 (76%) (QWC69492)	- Six transmembrane domains - ELO domain	Elovl5 (Nielsen et al., 2019) Elongase activity towards C18 and C20, but not C22 (Kabeya et al., 2021)
ArElovl6	879 bp / 292 aa	<i>T. japonicus</i> elongase-2 (78%) (AIW65585)	- Seven transmembrane domains - ELO domain	Elongase activity (Lee et al., 2020b)
ArElovl7	879 bp / 292 aa	<i>P. nana</i> elongase-1 (82%) (APH81340)	- Five transmembrane domains - ELO domain	Elongase activity (Lee et al., 2017b)
ArElovl8	771 bp/ 256 aa	<i>T. californicus</i> fatty acid elongase-5 (79%) (QWC69493)	- Five transmembrane domains - ELO domain	Elongase activity towards C18 and C20, but not C22 (Kabeya et al., 2021)

ที่มา: Amparyup et al., 2022a

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

โคฟีพอด *Apocyclops royi* สายพันธุ์ไทย (*A. royi*-TH) ที่ใช้สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากทีมวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) โดยก่อนการทำการทดลองโคฟีพอด *A.royi*-TH จะถูกเลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis sp.* ที่ระดับความเค็ม 25 พีพีที ในขวดปริมาตร 5 ลิตร ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้อากาศตลอดเวลา และให้แสงความเข้ม 1500-2000 ลักซ์ ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ตลอดเวลา ซึ่งขวดและน้ำทะเลสำหรับการเพาะเลี้ยงโคฟีพอด *A.royi*-TH ได้ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 พีเอสไอ เป็นเวลา 20 นาที

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายและโคฟีพอด *A.royi*-TH

- ขวดแก้วขนาด 5 ลิตร ยี่ห้อ Duran, Germany
- เครื่องวัดความเค็มแบบส่องกล้อง (Salinity Refractometers)
- ปีเปตขนาด 5 มิลลิลิตร
- ผ้ากรองขนาด 33, 180, 300 ไมครอน
- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ยี่ห้อ TOMY, Japan
- หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์
- สายยาง PVC ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร
- หัวทรายสำหรับกระจายอากาศ

3.2.2 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบของกรดไขมัน

- กระดาษกรอง (No. 1, Whatman, Clifton, NJ)

- เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี (Gas chromatography-Mass spectrometry)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (High Speed Refrigerated Micro Centrifuge)
- เครื่องให้ความร้อนหลอดทดลอง (Heat block)

3.2.3 อุปกรณ์สำหรับการสกัด total RNA

- เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer) ยี่ห้อ biosan, Latvia
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (High Speed Refrigerated Micro Centrifuge)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Nanodrop Spectrophotometer) ยี่ห้อ Thermo Scientific, USA รุ่น Nanodrop 2000c
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Deep Freezer) ยี่ห้อ Sanyo, Japan
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Refrigerator) ยี่ห้อ Mitsubishi electric, Japan
- ตู้ดูดควัน
- แท่งแก้วบดตัวอย่าง

- ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 1000, 200, 20, 10 ไมโครลิตร
- ไมโครปิเปตทิวป์ (Micropipette Tip) ขนาด 200, 10 ไมโครลิตร
- หลอดไมโครทิวป์ (Microtube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.2.4 อุปกรณ์สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน

- กระจกบอทวงขนาด 100 มิลลิลิตร
- ขวดลูกชมพู่ ยี่ห้อ Duran, Germany

- เครื่องชุดถ่ายภาพเจล ยี่ห้อ Syngene (U.K.) รุ่น G.Box EF
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Minicentrifuge)
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) ยี่ห้อ Bio-Rad, Germany
- เครื่องแยกสารด้วยไฟฟ้า (electrophoresis) ยี่ห้อ Toyobo, Japan รุ่น GelMate

2000

- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Refrigerator) ยี่ห้อ Mitsubishi electric, Japan

- เต้าไมโครเวฟ ยี่ห้อ HITASHI
- ภาชนะสำหรับขึ้นรูปเจล (Gel Casting Stand)
- หลอดพีซีอาร์ชนิดฝาเรียบ (PCR tube)
- หลอดไมโครทิวบ์ (Microtube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 1000, 200, 20, 10 ไมโครลิตร
- ไมโครปิเปตทิป (Micropipette Tip) ขนาด 200, 10 ไมโครลิตร

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายและโคฟีพอด

- น้ำเค็ม
- อาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 สำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่าย (ตารางที่ 7)

3.3.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน

- 0.1% Potassium chloride (KCl)
- 6% Potassium carbonate (K_2CO_3)
- 10% BHA

- 98% Ethanol
- Acetyl Chloride
- Dichloromethane
- Hexane
- Methanol

3.3.3 สารเคมีสำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน

3.3.3.1 สารเคมีสำหรับสกัด RNA

- 75% Ethanol
- Chloroform
- Isopropanol
- Nuclease free water
- RNase-free DNase I (Promega)
- TRI[®] Reagent (MRC, USA)

3.3.3.2 สารเคมีสำหรับสังเคราะห์ first strand cDNA

- Nuclease free water
- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ประกอบด้วย 5x Reaction buffer, OligodT, Ribolock และ RevertAid

3.3.3.3 สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา PCR

- 1 mM dNTP (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 10X Taq Buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 25 mM MgCl_2 (Thermo Fisher Scientific, USA)

- Nuclease free water
- Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.3.3.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ PCR product ด้วยเทคนิค 1.8% agarose electrophoresis

- 6x Loading Dye
- Agarose (Molecular Biology Grade) (Vivantis, USA)
- Boric acid (Merck, Germany)
- Ethidium bromide (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Ethylenediaminetetra-acetic acid disodium salt (EDTA di-sodium salt) (KemAus, Australia)
- GeneRuler 100 bp plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Tris, Molecular Biology Grade (Vivantis, USA)

3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายและโคพีพอด *A. royi*-TH

3.4.1.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Tetraselmis sp.*

หัวเชื้อสาหร่าย *Tetraselmis sp.* ใช้สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากทีมวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค)

เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Tetraselmis sp.* ด้วยอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 (ตารางที่ 7) ที่ระดับความเค็ม 25 พีพีที ในขวดปริมาตร 5 ลิตร ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้อากาศตลอดเวลา และให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสงประมาณ 1500-2000 ลักซ์

ตลอดเวลา โดยขวดและน้ำทะเลสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยหม้อ
นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 พีเอสไอ เป็นเวลา 20 นาที เมื่อ
สาหร่าย *Tetraselmis sp.* เจริญเติบโตเข้าสู่ระยะทวีคูณ (log phase) จึงทำการเก็บเกี่ยว
สาหร่ายเพื่อนำไปใช้เป็นอาหารที่มีชีวิตของโคพีพอด *A. royi*-TH

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)
สารละลาย A Nitrate and phosphate stock solution	
NaNO ₃	84.15
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6.00
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2.90
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	10.00
สารละลาย B Silicate stock solution	
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	33.00
สารละลาย C Trace metal stock solution	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.96
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4.40
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1.26
MnCl ₂ ·4H ₂ O	36.00
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2.00
สารละลาย D Vitamins stock solution	
Vitamin B1	0.40
Vitamin B12	0.002 mg

ที่มา: ศุภกานต์, 2565

3.4.1.2 การเพาะเลี้ยงโคฟีพอด *A. royi*-TH และเก็บตัวอย่างโคฟีพอดแยกแต่ ละระยะพัฒนาการ

1) เพาะเลี้ยงโคฟีพอด *A. royi*-TH ด้วยสาหร่าย *Tetraselmis sp.* ที่ระดับความเค็ม 25 พีพีที ในขวดปริมาตร 5 ลิตร ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้อากาศด้วยเครื่องปั๊มอากาศตลอดเวลา และให้แสงความเข้ม 1500-2000 ลักซ์ ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ตลอดเวลา ซึ่งขวดและน้ำทะเลสำหรับการเพาะเลี้ยงโคฟีพอด *A. royi*-TH ได้ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 พีเอสไอ เป็นเวลา 20 นาที

2) ให้อาหารโคฟีพอดด้วยสาหร่าย *Tetraselmis sp.* ทุกๆ 3 วัน โดยจะกรองสาหร่ายเดิมออก ด้วยผ้ากรองขนาด 33 ไมครอน แล้วจึงเติมสาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะทวีคูณ (log phase) ลงไปเพื่อเป็นอาหารสำหรับโคฟีพอด

3) เก็บตัวอย่างโคฟีพอดแยกแต่ละระยะพัฒนาการในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ได้แก่ ระยะนอพลีส ระยะโคฟีพอดติด และระยะโตเต็มวัย โดยใช้ผ้ากรองขนาด 33 ไมครอน, 180 ไมครอน และ 300 ไมครอน ตามลำดับ ซึ่งตัวอย่างโคฟีพอดสำหรับการศึกษาคู่ประกอบกรดไขมัน จะถูกเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ทันทีภายหลังการเก็บตัวอย่าง เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในตัวอย่าง และตัวอย่างโคฟีพอดสำหรับการสกัด total RNA จะถูกเก็บในสารละลาย TRI[®] Reagent (Trizol) และเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.4.1.3 การเพาะเลี้ยงโคฟีพอด *A. royi*-TH ในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที)

1) แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 2 ชุดทดลอง คือชุดการทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่ระดับความเค็ม 15 พีพีที (กลุ่มทดลอง) และชุดการทดลองที่ 2 เพาะเลี้ยงโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่ระดับความเค็ม 25 พีพีที (กลุ่มควบคุม) ซึ่งโคฟีพอด *A. royi*-TH ทั้ง 2 ชุดการทดลองถูกเพาะเลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis sp.* ในขวดปริมาตร 5 ลิตร ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้อากาศด้วยเครื่องปั๊มอากาศและให้แสงความเข้ม

1500-2000 ลักซ์ ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ตลอดเวลา โดยขวดและน้ำทะเลสำหรับการเพาะเลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH ได้ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave)

2) ให้อาหารโคพีพอดด้วยสาหร่าย *Tetraselmis sp.* ทุกๆ 3 วัน โดยจะกรองสาหร่ายออก ด้วยผ้ากรองขนาด 33 ไมครอน แล้วจึงเติมสาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะทวีคูณ (log phase) ลงไปเพื่อเป็นอาหารสำหรับโคพีพอด *A. royi*-TH จากนั้นปรับระดับความเค็มชุดการทดลองที่ 1 และชุดการทดลองที่ 2 เป็น 15 พีพีที และ 25 พีพีที ตามลำดับ

3) เก็บตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที) ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง โดยใช้ผ้ากรองขนาด 33 ไมครอน เพื่อเก็บตัวอย่างโคพีพอดรวมทั้ง 3 ระยะพัฒนาการ ซึ่งตัวอย่างโคพีพอดสำหรับการศึกษาองค์ประกอบกรดไขมัน จะถูกเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ทันทีภายหลังการเก็บตัวอย่างเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในตัวอย่าง และตัวอย่างโคพีพอดสำหรับการสกัด total RNA จะถูกเก็บในสารละลาย TRIzol™ Reagent และเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในโคพีพอด *A. royi*-TH ด้วยเทคนิค Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

3.4.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในโคพีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ

นำตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ (ระยะนอเพเลียส ระยะโคพีพอดติด, ระยะโตเต็มวัย) จากข้อ 3.4.1.2 มาวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันด้วยเทคนิค Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดไขมันจากตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH

บดตัวอย่างโคพีพอดละเอียด และสกัดไขมันด้วยสารละลายผสม Dichloromethane: Methanol ในอัตราส่วน 2:1 (ดัดแปลงจาก Lepage and Roy., 1986) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นเก็บส่วนใสโดยกรองส่วนผสมด้วยกระดาษกรอง

No. 1 (Whatman, Clifton, NJ) และเติมสารละลาย 0.1 M KCl ลงในสารละลาย ก่อนนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที และเก็บสารละลายอินทรีย์ส่วนล่าง เพื่อนำไปเตรียม Fatty acid methyl ester (FAME) ในขั้นตอนถัดไป (ดัดแปลงจาก Lepage and Roy., 1986)

ขั้นตอนที่ 2 การเตรียม Fatty acid methyl ester (FAME)

เปลี่ยนกรดไขมันเป็น Fatty acid methyl ester (FAME) ด้วยปฏิกิริยาทรานเอสเตอริฟิเคชัน (transesterification) ตามวิธีของ Lepage และ Roy (1986) โดยเติมสารละลาย Acetyl chloride ลงในสารละลายไขมันที่สกัดได้จากขั้นตอนที่ 1 จากนั้นนำสารละลายไปให้ความร้อนด้วย Heat block ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง รอให้สารละลายอุณหภูมิลดลงจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วเติมสารละลาย 6% K_2CO_3 เขย่าให้เข้ากัน (vortex) แล้วเติม Hexane เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 1000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจัดเก็บสารละลายส่วนบน เพื่อนำไประบุชนิดและปริมาณของกรดไขมันด้วยเครื่อง GC-MS ในขั้นตอนถัดไป

ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

การระบุชนิดและปริมาณของกรดไขมันด้วยเครื่อง GC-MS ได้รับการวิเคราะห์โดยศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย

3.4.2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในโคพิพอด *A. royi*-TH ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน

นำตัวอย่างโคพิพอด *A. royi*-TH ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที) จากข้อ 3.4.1.3 มาวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันด้วยเทคนิค GC-MS ตามวิธีในข้อ 3.4.2.1

3.4.3 การศึกษาลักษณะสมบัติยีน desaturase-like gene (*ArCb5D6D*) ในโคพิพอด *A. royi*-TH

ศึกษาลักษณะสมบัติยีน desaturase-like gene (*ArCb5D6*) ในโคพิพอด *A. royi*-TH โดยค้นหาบริเวณ open reading frame ด้วยโปรแกรม Open Reading Frame Finder

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีน ด้วยโปรแกรม ExPASy translated tool (<http://web.expasy.org/translate/>) เปรียบเทียบ ความเหมือน (% similarity) ของโปรตีน ArCb5D6D กับโปรตีนอื่นๆที่เคยมีรายงานใน ฐานข้อมูล ด้วยโปรแกรม BLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ค้นหา ตำแหน่งอนุรักษ์ของแต่ละยีนด้วยโปรแกรม SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) จากนั้นเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน desaturase ในสิ่งมีชีวิต กลุ่ม ครัสเตเชีย น ด้วย โปรแกรม Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

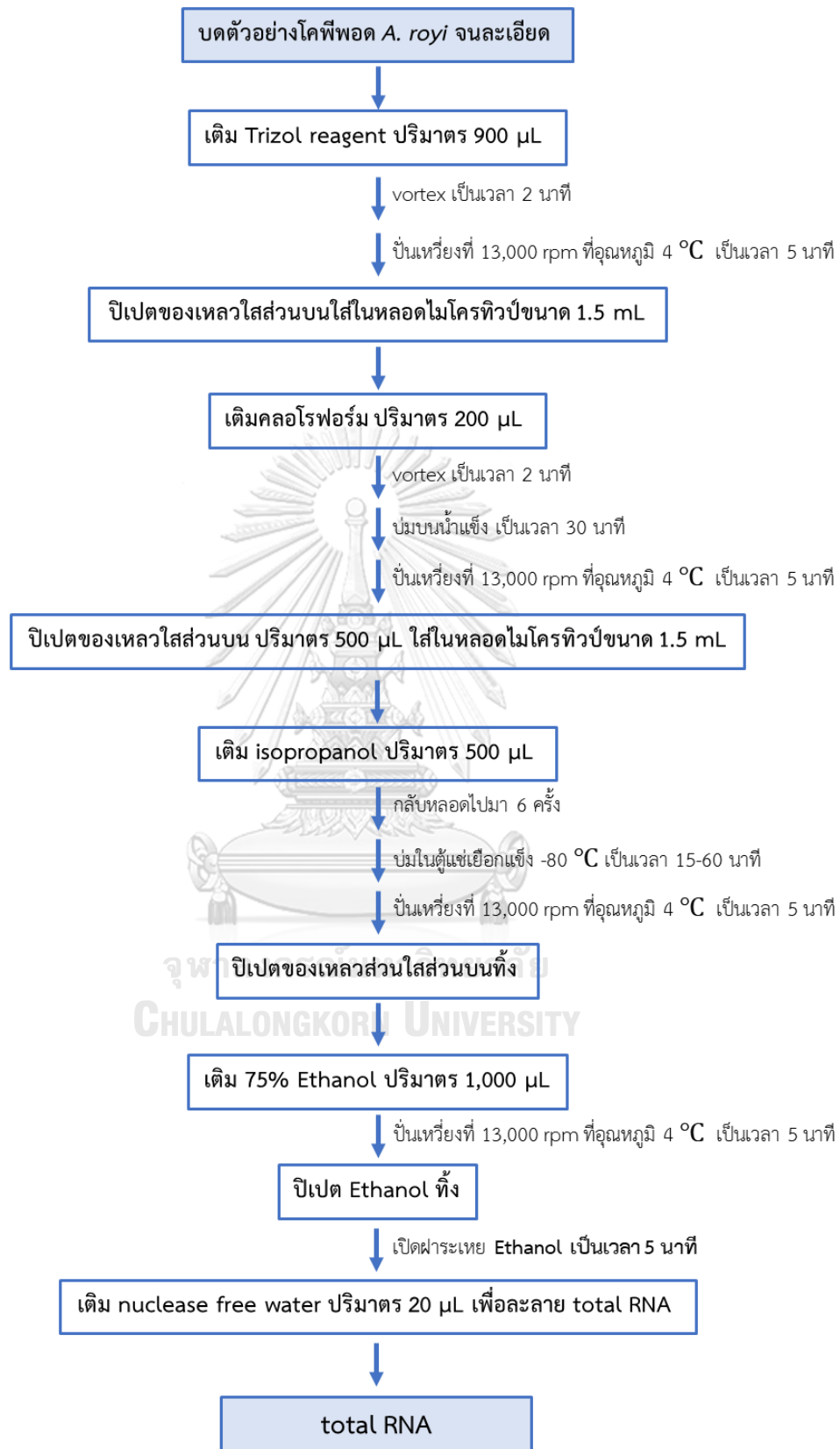
3.4.4 การศึกษาการแสดงออกของยีนในโคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ

3.4.4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) ในโคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ

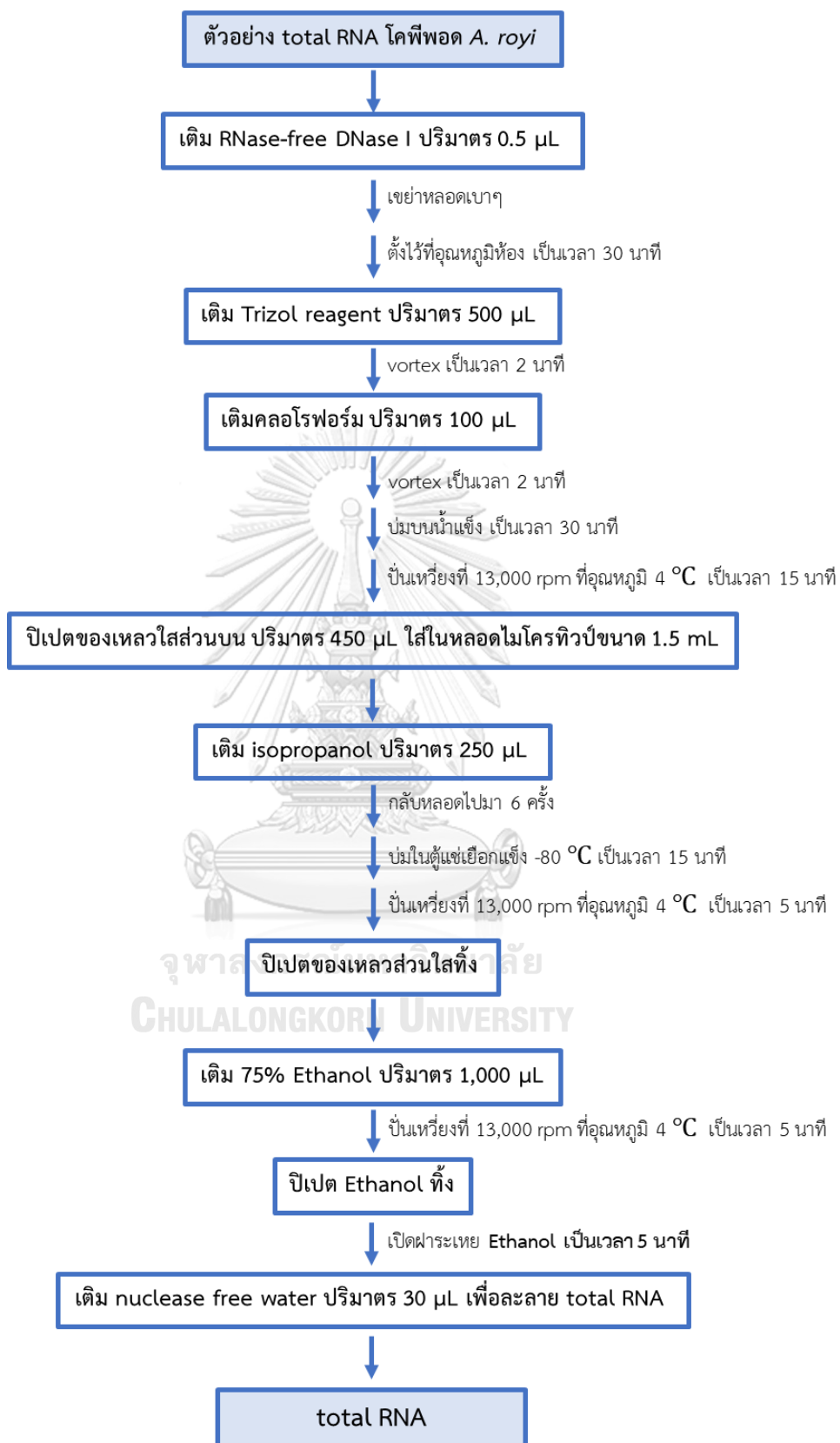
สกัด total RNA ในตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ ได้แก่ ระยะนอเพเลียส ระยะโคฟีพอดติด และระยะโตเต็มวัย ด้วยสารละลาย TRI[®] Reagent (Trizol) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต (Thermo Fisher Scientific corporation) โดยรายละเอียดวิธีการสกัด total RNA แสดงดังในรูปที่ 10

นำ total RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH ทั้ง 3 ระยะพัฒนาการ มากำจัด genomic DNA โดยการบ่ม total RNA ด้วย RNase-free DNase I (Promega) ซึ่งรายละเอียดวิธีการกำจัด genomic DNA แสดงดังในรูป 11

นำ total RNA ที่ผ่านการกำจัด genomic DNA แล้วมาวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ total RNA ด้วยเครื่อง NanoDrop[™] Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และจัดเก็บ total RNA ไว้ที่ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส



รูปที่ 10 วิธีการสกัด total RNA จากตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH



รูปที่ 11 วิธีการกำจัด genomic DNA จากตัวอย่าง total RNA โคฟีพอด *A. royii*-TH

3.4.4.2 การสังเคราะห์ first-strand cDNA โคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ

1) เตรียม total RNA ของตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ ปริมาณ 1000 นาโนกรัม ในสารละลายปริมาตร 12 ไมโครลิตร โดยปีเปิด total RNA, Nuclease free water และ oligodT ลงในหลอดพีซีอาร์ (PCR tube) จำนวน 9 หลอด ซึ่งปริมาตรสารเคมีสำหรับเตรียมสารละลาย total RNA ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในโคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การเตรียมตัวอย่าง total RNA ปริมาณ 1000 ng สำหรับการสังเคราะห์ first strand cDNA ในตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ

หลอดที่	ตัวอย่าง total RNA ¹	ความเข้มข้นของ total RNA ² (ng/μL)	ปริมาตร total RNA ที่ใช้ ³ (μL)	ปริมาตร oligodT ⁴ (μL)	ปริมาตรน้ำ ⁵ (μL)	ปริมาตรรวมทั้งหมด ⁶ (μL)
1	ArTet_NP1	623.9	1.60	1.0	9.40	12
2	ArTet_NP2	480.2	2.08	1.0	8.92	12
3	ArTet_NP3	1059.7	0.94	1.0	10.06	12
4	ArTet_CD1	441.3	2.27	1.0	8.73	12
5	ArTet_CD2	407.4	2.45	1.0	8.55	12
6	ArTet_CD3	694.3	1.44	1.0	9.56	12
7	ArTet_AD1	1188.8	0.84	1.0	10.19	12
8	ArTet_AD2	564.4	1.77	1.0	9.23	12
9	ArTet_AD3	345.4	2.90	1.0	8.10	12

หมายเหตุ:

¹ ตัวอย่าง total RNA ในตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ ได้แก่ ระยะนอเพเลียส ระยะโคฟีพอด ระยะโตเต็มวัย โดย ArTet_NP: โคฟีพอด *A. royi*-TH ระยะนอเพเลียส; ArTet_CD: โคฟีพอด *A. royi*-TH ระยะโคฟีพอด; ArTet_AD: โคฟีพอด *A. royi*-TH ระยะโตเต็มวัย

² ความเข้มข้นของ total RNA จากการวัดด้วยเครื่อง NanoDropTM Spectrophotometer

³ ปริมาตร total RNA ที่ใช้ (μL) = $\frac{1000 \text{ ng total RNA}}{\text{ความเข้มข้นของ total RNA (ng/μL)}}$

⁴ ปริมาตร oligodT (μL) = 1.0 μL

⁵ ปริมาตรน้ำ (μL) = ปริมาตรทั้งหมด - ปริมาตร oligodT - ปริมาตร total RNA ที่ใช้

⁶ ปริมาตรรวมทั้งหมด (μL) = 12 μL

2) บ่มสารละลาย total RNA ที่เตรียมจากข้อ 1) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR)

3) บ่มสารละลาย total RNA บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

4) เตรียมสารละลายสำหรับการทำปฏิกิริยา Reverse transcription เพื่อสังเคราะห์ first strand cDNA ลงในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยใช้สัดส่วนของสารเคมีดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สารเคมีสำหรับการทำปฏิกิริยา Reverse transcription เพื่อสังเคราะห์ first strand cDNA

สารเคมี	สัดส่วน
5x Reaction buffer	4
10mM dNTP	2
Ribolock	1
RevertAid	1
total	8

5) ปิเปตสารละลายสำหรับการทำปฏิกิริยา Reverse transcription ที่เตรียมไว้ในข้อที่ 4) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย total RNA แต่ละหลอดในข้อที่ 1)

6) นำสารละลายแต่ละหลอดจากข้อที่ 5) เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) เพื่อทำปฏิกิริยา Reverse transcription ในการสังเคราะห์ first strand cDNA จาก total RNA โดยจะตั้งโปรแกรมเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) ดังนี้ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที, 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที, 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

7) จัดเก็บ first strand cDNA ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.4.3 การทำปฏิกิริยา PCR ในตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะ

พัฒนาการ

1) ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* และ *Ar18srRNA* ในตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ โดยออกแบบไพรเมอร์ของยีน ด้วยโปรแกรม Primer3Plus ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แต่ละยีน แสดงดังตาราง 10

ตารางที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (primer) สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

ยีน	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')
<i>ArD6D</i>	<i>ArD6D_F</i>	5' TCGCCCTTCCCATTATCTACACGC 3'
	<i>ArD6D_R</i>	5' TGTTTCGATCTGGTAATTGAGACCTCC 3'
<i>ArD5D</i>	<i>ArD5D_F</i>	5' CCGTTGTCTACATCATCAGGTGGGT 3'
	<i>ArD5D_R</i>	5' GTGTGCGTTGACTGGTCTTCTCGTG 3'
<i>ArCb5D6D</i>	<i>ArCb5D6D_F</i>	5' GGAATAGTTCTCGGAATGGCGGCA 3'
	<i>ArCb5D6D_R</i>	5' TCACGGCGAGGTTTTTCTTGGGGTCA 3'
<i>Ar18srRNA</i>	<i>Ar18srRNA_F</i>	5' CATATTGCGGACACTGGTTCT 3'
	<i>Ar18srRNA_R</i>	5' AAGAGTCTGGGCAAGGAAGAG 3'

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2) เจือจาง first strand cDNA ของตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH ด้วย Nuclease free water ในอัตราส่วน 1:10

3) เตรียมสารละลายสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้สารเคมีตามอัตราส่วนในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ส่วนผสมของสารเคมีสำหรับการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain reaction (PCR)

สารเคมี	ปริมาตร (μL)
H ₂ O	10.3
10XTaq.buffer + (NH ₄) ₂ SO ₄	2.5
25 mM MgCl ₂	1.5
1 mM dNTP	2.5
Forward primer	2.5
Reverse primer	2.5
Taq (Thermo)	0.2

4) ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้สารละลายสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ที่เตรียมดัง
ในตารางที่ 11 ปริมาตร 22 ไมโครลิตร และสารละลาย cDNA (1:10) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร
จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) โดยตั้งโปรแกรมดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 การตั้งค่าโปรแกรมปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในตัวอย่างโคฟี
พอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา	จำนวนรอบ(รอบ)	
			<i>ArCb5D6D</i>	<i>Ar18srRNA</i>
Initial denaturation	94	1 นาที	1 รอบ	1 รอบ
Denaturation	94	30 วินาที	27 รอบ	25 รอบ
Annealing	60	30 วินาที		
Extension	72	30 วินาที		
Post amplification	72	5 นาที	1 รอบ	1 รอบ

5) เก็บผลผลิต PCR (PCR product) ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อน
นำไปวิเคราะห์แถบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค 1.8% agarose electrophoresis

3.4.4.4 การวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค 1.8% agarose electrophoresis

1) เตรียม Agarose gel ความเข้มข้น 1.8% (w/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใช้บัฟเฟอร์ 1xTris-Borate-EDTA (1xTBE) เป็นตัวทำละลาย

2) ย้อม PCR product ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ด้วยสีย้อม 6x Loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

3) ปิเปตสารละลาย PCR product ที่ย้อมด้วยสีย้อม และ GeneRuler 100 bp plus DNA ladder ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ลงใน well ของแผ่น Agarose gel อย่างช้าๆ จากนั้นเท 1xTBE ลงใน chamber ให้ท่วมแผ่นเจล

4) ใช้เครื่อง electrophoresis ผ่านกระแสไฟฟ้าไปยังแผ่น Agarose gel โดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

5) นำแผ่น Agarose gel ย้อมด้วย Ethidium Bromine เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นแช่น้ำเป็นเวลา 15 นาที

6) นำแผ่น Agarose gel ไปวิเคราะห์แถบการแสดงออกของยีนด้วยเครื่องชุดถ่ายภาพเจล ยี่ห้อ Syngene (U.K.) รุ่น G.Box EF

3.4.4.5 การวัดค่าการแสดงออกของยีน

1) นำภาพถ่ายเจลไปวิเคราะห์ค่าการแสดงออกของยีนด้วยโปรแกรม Gel Pro 3.1 simple analysis

2) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การแสดงออกของยีน (Relative mRNA expression) จากสูตร

$$\text{ค่าสัมประสิทธิ์การแสดงออกของยีน } ArCb5D6D = \frac{\text{ค่าการแสดงออกของยีน } ArCb5D6D}{\text{ค่าการแสดงออกของยีน } Ar18srRNA}$$

3.4.5 การศึกษาการแสดงออกของยีนในโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน

สกัด total RNA ในตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 15 พีพีที และ โคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 25 พีพีที ด้วยสารละลาย TRI[®] reagent (Trizol) เช่นเดียวกับข้อ 3.4.4.1

สังเคราะห์ first strand cDNA ในตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน ได้แก่ โคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 15 พีพีที และ 25 พีพีที โดยใช้ total RNA ปริมาณ 500 นาโนกรัม เป็นต้นแบบ โดยเตรียมสารละลาย total RNA ในตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกันตามตารางที่ 13 จากนั้นสังเคราะห์ first strand cDNA เช่นเดียวกับหัวข้อที่ 3.4.4.2 (ข้อที่ 2) - ข้อที่ 7))

ตารางที่ 13 การเตรียมตัวอย่าง total RNA ปริมาณ 500 ng สำหรับการสังเคราะห์ first strand cDNA ในตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน

หลอดที่	ตัวอย่าง total RNA ¹	ความเข้มข้นของ total RNA ² (ng/μL)	ปริมาตร total RNA ที่ใช้ ³ (μL)	ปริมาตร oligodT ⁴ (μL)	ปริมาตรน้ำ ⁵ (μL)	ปริมาตรรวมทั้งหมด ⁶ (μL)
1	ArTet_15/1	115.4	4.33	0.5	7.17	12
2	ArTet_15/2	272.6	1.83	0.5	9.67	12
3	ArTet_15/3	604.7	0.83	0.5	10.67	12
4	ArTet_25/1	227.4	2.20	0.5	9.30	12
5	ArTet_25/2	274.9	1.82	0.5	9.68	12
6	ArTet_25/3	283.8	1.76	0.5	9.74	12

หมายเหตุ:

¹ ตัวอย่าง total RNA ในตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที) โดย ArTet_15: โคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 15 พีพีที; ArTet_25: โคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 25 พีพีที

² ความเข้มข้นของ total RNA จากการวัดด้วยเครื่อง NanoDropTM Spectrophotometer

³ ปริมาตร total RNA ที่ใช้ (μL) = $\frac{500 \text{ ng total RNA}}{\text{ความเข้มข้นของ total RNA (ng/}\mu\text{L)}}$

⁴ ปริมาตร oligodT (μL) = 0.5 μL

⁵ ปริมาตรน้ำ (μL) = ปริมาตรทั้งหมด - ปริมาตร oligodT - ปริมาตร total RNA ที่ใช้

⁶ ปริมาตรรวมทั้งหมด (μL) = 12 μL

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ArD5D*, *ArD6D*, *ArCb5D6D* และ *Ar18srRNA* ในตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 15 พีพีที และ 25 พีพีที ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ แสดงดังตารางที่ 10 ทำปฏิกิริยา PCR ตามวิธีในข้อ 3.4.4.3 โดยตั้งค่าโปรแกรม PCR ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 การตั้งค่าโปรแกรมปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ(รอบ)			
			<i>ArD6D</i>	<i>ArD5D</i>	<i>ArCb5D6D</i>	<i>Ar18srRNA</i>
Initial denaturation	94	1 นาที	1 รอบ	1 รอบ	1 รอบ	1 รอบ
Denaturation	94	30 วินาที	28 รอบ	25 รอบ	30 รอบ	28 รอบ
Annealing	60	30 วินาที				
Extension	72	30 วินาที				
Post amplification	72	5 นาที	1 รอบ	1 รอบ	1 รอบ	1 รอบ

นำ PCR product ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR มาวิเคราะห์แถบการแสดงออกของแต่ละยีนด้วยเทคนิค 1.8% agarose electrophoresis ตามวิธีข้อ 3.4.4.4 จากนั้นวัดค่าการแสดงออกของแต่ละยีน ด้วยโปรแกรม Gel Pro 3.1 simple analysis และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การแสดงออกของยีน (Relative mRNA expression) ของยีน *ArD5D*, *ArD6D*, *ArCb5D6D* ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{ค่าสัมประสิทธิ์การแสดงออกของยีน } ArD5D &= \frac{\text{ค่าการแสดงออกของยีน } ArD5D}{\text{ค่าการแสดงออกของยีน } Ar18srRNA} \\ \text{ค่าสัมประสิทธิ์การแสดงออกของยีน } ArD6D &= \frac{\text{ค่าการแสดงออกของยีน } ArD6D}{\text{ค่าการแสดงออกของยีน } Ar18srRNA} \\ \text{ค่าสัมประสิทธิ์การแสดงออกของยีน } ArCb5D6D &= \frac{\text{ค่าการแสดงออกของยีน } ArCb5D6D}{\text{ค่าการแสดงออกของยีน } Ar18srRNA} \end{aligned}$$

3.4.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดลองมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำซ้ำ 3 ครั้ง ในทุกๆขั้นตอน คำนวณค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของปริมาณองค์ประกอบของกรดไขมันและค่าการสัมประสิทธิ์การแสดงออกของยีน จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองของตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ (ระยะนอเพเลียส, ระยะโคฟีพอดติด, ระยะโตเต็มวัย) ด้วยการวิเคราะห์ผลทางสถิติแบบ Analysis of variance (ANOVA) โดยใช้การคำนวณแบบ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS statistical package version 28.0 และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองของตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที) ด้วยการวิเคราะห์ผลทางสถิติแบบ t-test (2-tail) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS statistical package version 28.0

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาลักษณะสมบัติและบทบาทของยีน desaturase-like gene (*ArCb5D6D*) ในโคฟีพอด *A. royi*-TH

จากการศึกษาลักษณะสมบัติของยีน desaturase-like gene (*ArCb5D6D*) ในโคฟีพอด *A. royi*-TH พบว่ายีน *ArCb5D6D* ประกอบด้วยบริเวณ Open reading frame (ORF) 1323 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ArCb5D6D* โดยใช้โปรแกรม ExPASy translated tool (<http://web.expasy.org/translate/>) พบว่าโปรตีน *ArCb5D6D* มีความยาวของสายโพลีเปปไทด์เท่ากับ 440 กรดอะมิโน ซึ่งถือว่ามีขนาดยาวสอดคล้องกับโปรตีน desaturase-like ในสิ่งมีชีวิตครัสเตเชียนอื่นๆ (433-453 กรดอะมิโน)

จากการวิเคราะห์โดเมนที่สำคัญของโปรตีน *ArCb5D6D* ด้วยโปรแกรม SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) พบว่าโปรตีน *ArCb5D6D* ประกอบด้วยบริเวณ Cytochrome b5-like heme/steroid binding domain (amino acid interval: 24-95) ที่ปลายด้าน N ของสายโพลีเปปไทด์ ซึ่งประกอบด้วย H-P-G-G heme binding motif แสดงดังแถบสีเขียว ในรูปที่ 13 และพบบริเวณ Fatty acid desaturase domain (amino acid interval: 155-403) ที่ปลายด้าน C ของสายโพลีเปปไทด์ แสดงดังแถบสีฟ้า ในรูปที่ 13

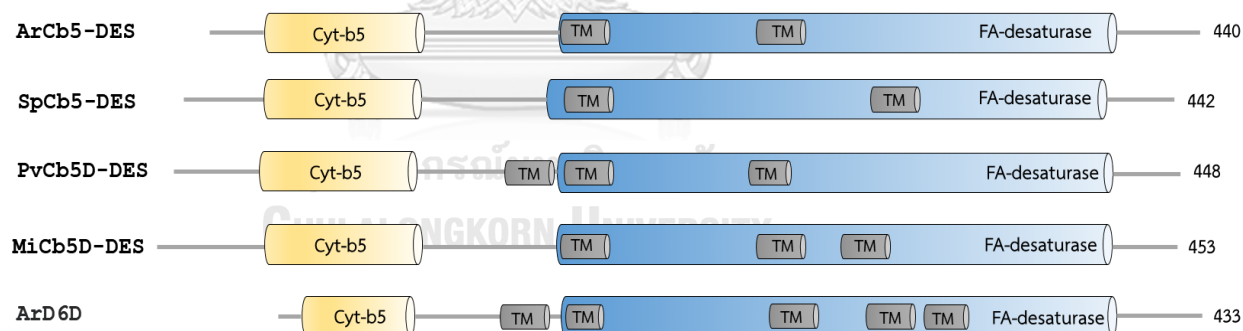
นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน desaturase-like (*ArCb5 D6 D*) ใน โค พี พ อ ด *A. royi*-TH ด้วย โปรแกรม BLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่าโปรตีน desaturase-like (*ArCb5D6D*) ในโคฟีพอด *A. royi*-TH มีความคล้ายกับโปรตีน desaturase-like ในสิ่งมีชีวิตครัสเตเชียนอื่นๆ ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล โดยโปรตีน desaturase-like (*ArCb5D6D*) ในโคฟีพอด *A. royi*-TH มีความเหมือนกับโปรตีน desaturase-like ในกุ้งน้ำจืด *Macrobrachium nipponense* (AMQ48726.1) มากที่สุด (65%) รองลงมาคือ ปูทะเล *Scylla paramamosain* (ANA07380.1) (62%) และกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (ALS03812.1) (61%) อย่างไรก็ตามพบว่าโปรตีน *ArCb5D6D* มีความเหมือนกับโปรตีน *ArD6D* ในโคฟีพอด *A. royi*-TH (Amparyup et al., 2022) ที่เคยมีรายงานไว้เพียง 34%

ยีนกลุ่ม desaturase มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA biosynthesis) ในสิ่งมีชีวิต และมักถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมัน PUFA ในสัตว์มีกระดูกสันหลังจำพวกปลา (Tocher et al. 2006; Li et al. 2008) ถัดมาได้มีการศึกษายีน desaturase-like ในสิ่งมีชีวิตจำพวกครัสเตเชียจำนวนหนึ่ง เช่น จากรายงานการศึกษาของ Lin และคณะ (2017) พบว่า ยีน $\Delta 6$ fatty acyl desaturase-like gene ในปูทะเล *S. paramamosain* (ANA07380.1) มีการแสดงออกสูงสุดในเนื้อเยื่อตับและเนื้อเยื่อตับอ่อน ซึ่งเป็นอวัยวะสำคัญที่มีความเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของไขมัน นอกจากนี้ยีน $\Delta 6$ fatty acyl desaturase-like gene ในปูทะเล *S. paramamosain* (ANA07380.1) มีการแสดงออกสูงในกลุ่มปูทะเล *S. paramamosain* ที่ได้รับอาหารสูตรที่มีการแทนที่ของน้ำมันปลา (ปริมาณ C18-PUFA ต่ำ) ด้วยน้ำมันถั่วเหลือง (ปริมาณ C18-PUFA สูง) โดยระดับการแสดงออกของยีน $\Delta 6$ fatty acyl desaturase-like gene สูงสุดในกลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรที่มีการแทนที่ของน้ำมันปลาด้วยน้ำมันถั่วเหลือง 100% และ 80% รองลงมาคือ 60%, 40%, 20% และ 0% เช่นเดียวกับการศึกษาของ Luo และคณะ (2018) พบว่ามีแสดงออกของยีน $\Delta 6$ FAD กุ้งน้ำจืด *Macrobrachium nipponense* (AMQ48726.1) เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณกรดไขมัน LNA (C18: 3n-3) ในอาหารที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Chen และคณะ (2017) ได้รายงานว่า การแสดงออกของยีน $\Delta 6$ Fatty Acyl Desaturase-Like Gene ในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (ALS03812.1) จะเพิ่มขึ้นตามความเค็มที่ลดลง และการแสดงออกของยีนนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของกรดไขมันที่มีคาร์บอน 18 อะตอม เช่น กรดไขมัน LNA และกรดไขมัน LA ในอาหารของกุ้ง จากการศึกษาเหล่านี้สามารถสันนิษฐานได้ว่า ยีนกลุ่ม desaturase-like มีบทบาทในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน LC-PUFA ในสิ่งมีชีวิตจำพวกครัสเตเชีย โดยมีส่วนตั้งต้นคือกรดไขมันที่มีคาร์บอน 18 อะตอม

โปรตีน ArCb5D6D ในการศึกษาที่มีคุณลักษณะสมบัติของโปรตีน desaturase-like นั้นคือ โปรตีน ArCb5D6D มีส่วนประกอบของโดเมน Cytochrome b5-like heme/steroid binding domain และโดเมน Fatty acid desaturase domain (รูปที่ 12) ซึ่งถูกพบในโปรตีน desaturase-like ในสิ่งมีชีวิตครัสเตเชียเช่นเดียวกัน (Chen et al., 2017; Lin et al., 2017; Luo et al., 2018) โดยโดเมน Cytochrome b5-like heme/steroid binding domain เป็น

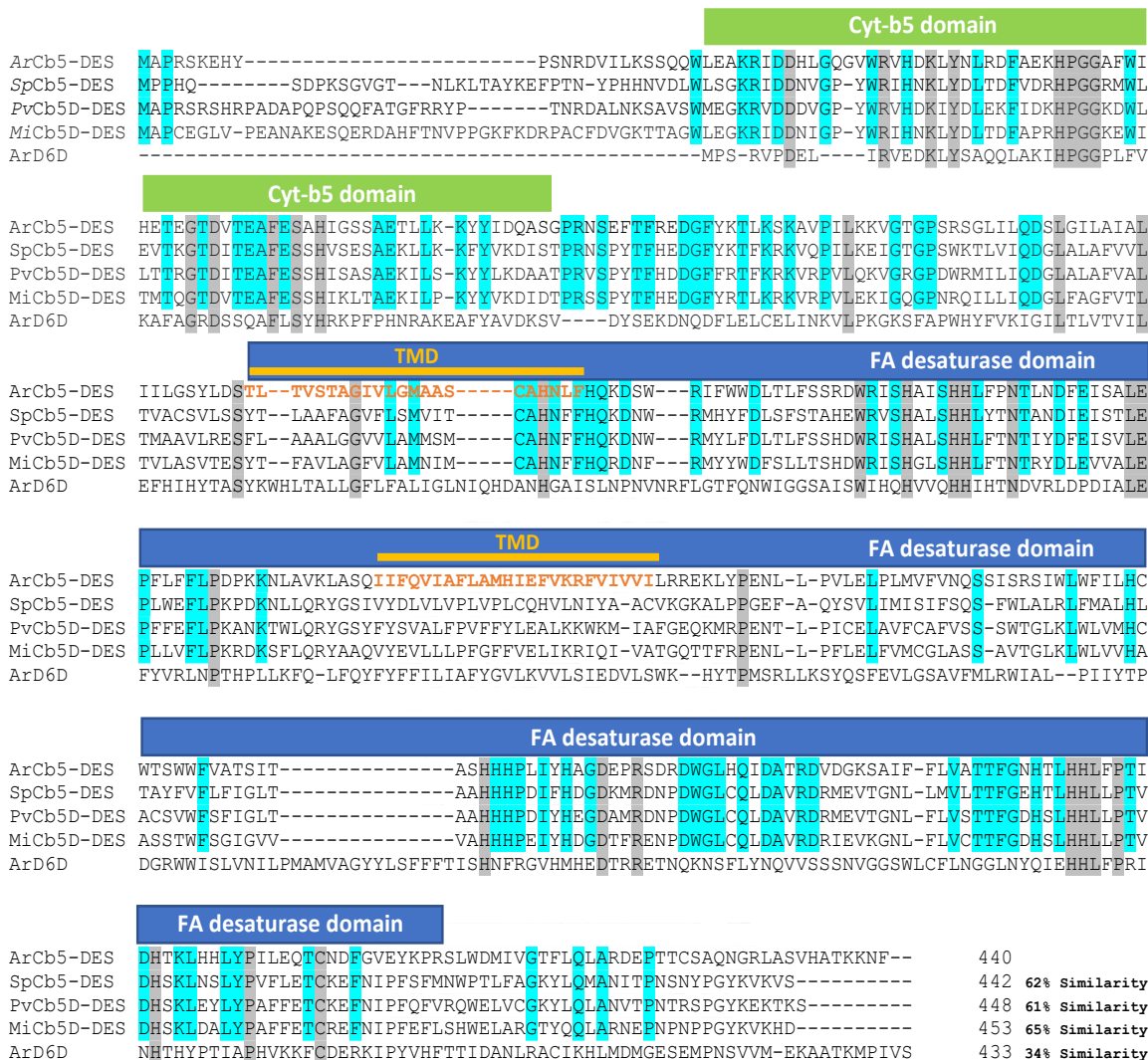
ส่วนโปรตีนขนาดเล็กที่มีบทบาทในการทำหน้าทีเป็นผู้ให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาการถ่ายโอนอิเล็กตรอนทางชีวเคมี เช่น ปฏิกิริยา fatty acid desaturation และปฏิกิริยา hydroxylation (Smith et al., 1998) และส่วนของโดเมน Fatty acid desaturase domain เป็นส่วนของโปรตีนที่มีการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ desaturase (Tocher et al., 2006; Santigosa et al., 2011) นอกจากนี้โปรตีน ArCb5D6D ในโคพีพอด *A. royi*-TH มีความเหมือนกับโปรตีน desaturase-like ในสิ่งมีชีวิตครึ่งเซียนอื่นๆสูง 61% ถึง 65% ในขณะที่มีความเหมือนกับโปรตีน ArD6D ในโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เคยมีรายงานไว้เพียง 34% ผลการวิเคราะห์นี้บ่งชี้ว่าลักษณะโปรตีน ArCb5D6D ในการศึกษาที่มีความแตกต่างจากโปรตีน ArD6D ในโคพีพอด *A. royi*-TH (Amparyup et al., 2022) ที่เคยมีรายงานไว้

จากผลการวิเคราะห์โดเมนที่สำคัญของโปรตีนและการวิเคราะห์ความเหมือนของโปรตีน ArCb5D6D ในโคพีพอด *A. royi*-TH สามารถสรุปได้ว่าโปรตีน ArCb5D6D ในโคพีพอด *A. royi*-TH เป็นโปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน desaturase-like ในสัตว์กลุ่มครึ่งเซียน โดยอาจมีบทบาทในกระบวนการชีวสังเคราะห์กรดไขมันในโคพีพอด *A. royi*-TH



รูปที่ 12 ลักษณะโปรตีน desaturase-like ในโคพีพอด *A. royi*-TH (ArCb5D6D) เปรียบเทียบกับโปรตีน desaturase-like ในสิ่งมีชีวิตครึ่งเซียน และโปรตีน delta-6-desaturase ในโคพีพอด *A. royi*-TH

โดย ArCb5-DES: โปรตีน desaturase-like ในโคพีพอด *A. royi*-TH, SpCb5-DES: โปรตีน desaturase-like ในปูทะเล *S. paramamosain*, PvCb5D-DES: โปรตีน desaturase-like ในกุ้งขาว *L. vannamei*, MiCb5D-DES: โปรตีน desaturase-like ในกุ้งน้ำจืด *M. nipponense*, ArD6D: โปรตีน delta-6-desaturase ในโคพีพอด *A. royi*-TH, สีเหลืองแสดง บริเวณ Cytochrome b5-like heme/steroid binding domain, สีฟ้าแสดง บริเวณ Fatty acid desaturase domain, สีเทาแสดง บริเวณ Transmembrane domain, ตัวเลขด้านขวา แสดง ความยาวกรดอะมิโนของสายโปรตีน



รูปที่ 13 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน desaturase-like ในโคพีพอด *A. royi*-TH (ArCb5D6D) เพื่อเปรียบเทียบกับความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน desaturase-like ในสิ่งมีชีวิตครัสเตเชียนอื่นๆที่เคยมีรายงานจาก GenBank

ได้แก่ ปูทะเล *S. paramamosain* (ANA07380.1), กุ้งขาว *L. vannamei* (ALS03812.1), กุ้งน้ำจืด *M.*

nipponense (AMQ48726.1), โคพีพอด *A. royi*-TH (Amparyup et al., 2022) โดย ArCb5-DES: โปรตีน

desaturase-like ในโคพีพอด *A. royi*-TH, SpCb5-DES: โปรตีน desaturase-like ในปูทะเล *S.*

paramamosain, PvCb5D-DES: โปรตีน desaturase-like ในกุ้งขาว *L. vannamei*, MiCb5D-DES: โปรตีน

desaturase-like ในกุ้งน้ำจืด *M. nipponense*, ArD6D: โปรตีน delta-6-desaturase ในโคพีพอด *A. royi*-TH

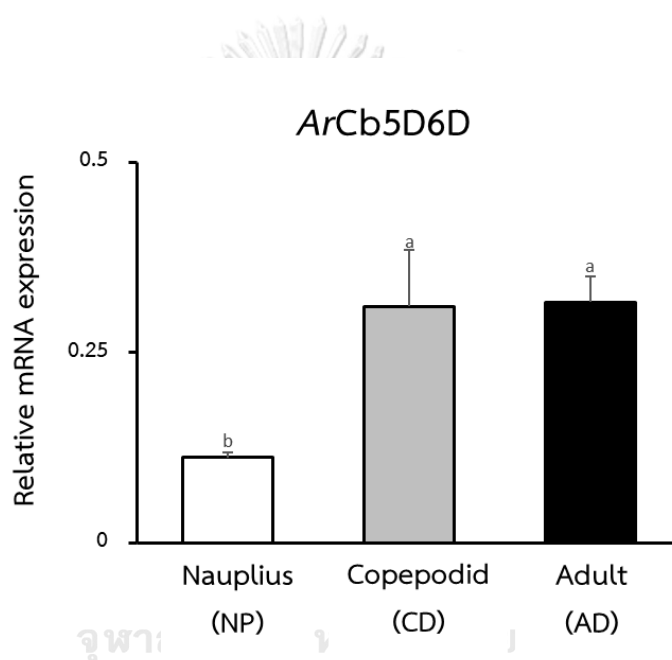
(Amparyup et al., 2022), TMD: Tranmembrane domain การแรงเงาสีเทา แสดงถึง ตำแหน่งกรดอะมิโนที่เหมือนในทุกโปรตีน และการแรงเงาสีฟ้า แสดงถึงตำแหน่งกรดอะมิโนที่เหมือนใน *S. paramamosain*

(ANA07380.1), *L. vannamei* (ALS03812.1), *M. nipponense* (AMQ48726.1) แต่แตกต่างจาก ArD6D ใน *A.*

royi-TH (Amparyup et al., 2022) ที่เคยมีรายงาน

4.2 การศึกษาแสดงออกของยีน desaturase-like gene (*ArCb5D6D*) ในโคพีพอด *A. royi* แต่ละระยะพัฒนาการ

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* ในตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ (ระยะนอเพลียส, ระยะโคพีพอดติด, ระยะโตเต็มวัย) ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis sp.* ที่ความเค็ม 25 พีพีที (แสดงดังรูปที่ 14) จากการศึกษาพบว่าการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* ในตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH ระยะโคพีพอดติด (CD) และโคพีพอดระยะโตเต็มวัย (AD) สูงกว่าโคพีพอดระยะนอเพลียส (NP) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



รูปที่ 14 การแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* ในโคพีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ โดย NP: โคพีพอด *A. royi*-TH ระยะนอเพลียส; CD: โคพีพอด *A. royi*-TH ระยะโคพีพอดติด; AD: โคพีพอด *A. royi*-TH ระยะโตเต็มวัย)

รูปแบบการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* ในตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ (ระยะนอเพลียส ระยะโคพีพอดติด และ ระยะโตเต็มวัย) สอดคล้องกับผลการแสดงออกของยีน *ArD6D* (Delta-6-desaturase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมอัตราเร็วของปฏิกิริยา (rate limiting enzyme) สำหรับชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพีพอด *A. royi* ที่มีการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ โดย Amparyup และคณะ (2022) พบว่าโคพีพอด

A. royi-TH ระยะนอพลีซิสมีการแสดงออกของยีน *ArD6D* น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับโคฟีพอดระยะโคฟีพอดติด และโคฟีพอดระยะโตเต็มวัย

4.3 การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในโคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในโคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ (ระยะนอพลีซิส, ระยะโคฟีพอดติด และระยะโตเต็มวัย) ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis sp.* ที่ระดับความเค็ม 25 พีพีที ด้วยเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) แสดงดังในตารางที่ 15 โดยพบปริมาณกรดไขมัน PUFA โคฟีพอด *A. royi*-TH ระยะนอพลีซิส (NP), ระยะโคฟีพอดติด (CD) และระยะโตเต็มวัย (AD) เท่ากับ 22.50%, 38.5% และ 41.85% ตามลำดับ พบปริมาณกรดไขมัน LC-PUFA เท่ากับ 5.27%, 7.98% และ 10.36% ตามลำดับ พบปริมาณกรดไขมัน DHA เท่ากับ 2.78%, 3.54% และ 4.85% ตามลำดับ พบปริมาณกรดไขมัน EPA เท่ากับ 2.50%, 3.05% และ 2.55% ตามลำดับ และไม่พบปริมาณกรดไขมัน ARA ในโคฟีพอดระยะนอพลีซิส (NP) ในขณะที่พบปริมาณกรดไขมัน ARA ในโคฟีพอดระยะโคฟีพอดติด (CD) และโคฟีพอดระยะโตเต็มวัย (AD) เท่ากับ 0.95% และ 1.31%

ตารางที่ 15 องค์ประกอบของกรดไขมันในโคพีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ (ระยะนอเพเลียส, ระยะโคพีพอดติด และระยะโตเต็มวัย)

กรดไขมัน	โคพีพอด <i>Apocyclops royi</i> -TH		
	ระยะนอเพเลียส (NP)	ระยะโคพีพอดติด (CD)	ระยะโตเต็มวัย (AD)
n-3 PUFA			
C20:5 n-3 (EPA)	2.50±0.19 ^{n.s.}	3.05±0.84 ^{n.s.}	2.55±0.08 ^{n.s.}
C22:6 n-3 (DHA)	2.78±0.01 ^b	3.54±0.48 ^a	4.85±0.88 ^a
n-6 PUFA			
C20:4 n-6 (ARA)	-	0.95±0.20 ^{n.s.}	1.31±0.19 ^{n.s.}
ΣSFA	44.58±4.06 ^{n.s.}	21.58±1.16 ^{n.s.}	27.10±10.42 ^{n.s.}
ΣMUFA	14.20±1.12 ^a	9.00±2.16 ^b	8.86±1.68 ^b
ΣSC-PUFA	17.23±6.76 ^b	30.56±5.43 ^a	31.49±3.62 ^a
ΣLC-PUFA	5.27±0.20 ^c	7.98±0.50 ^b	10.36±1.22 ^a
Σn-3 PUFA	15.58±5.48 ^b	25.81±1.10 ^a	26.64±2.31 ^a
Σn-6 PUFA	6.92±0.72 ^b	12.72±3.81 ^a	15.21±0.10 ^a
ΣPUFA	22.50±6.56 ^b	38.53±4.92 ^a	41.85±2.40 ^a

หมายเหตุ: ปริมาณของกรดไขมันเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด (% of total fatty acid) แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± standard deviation) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแต่ละแถวแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดย SFA: กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid); MUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid); SC-PUFA: กรดไขมันสายสั้นไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (short-chain polyunsaturated fatty acid); LC-PUFA: กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (long-chain polyunsaturated fatty acid); n-3 PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมก้า-3 (omega-3 : polyunsaturated fatty acid); ; n-6 PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมก้า-6 (omega-6 : polyunsaturated fatty acid); PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid) และ - คือไม่พบ

4.4 การศึกษาอิทธิพลของความความเค็มต่อชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA Biosynthesis) ในโคฟีพอด *A. royi*-TH

4.4.1 อิทธิพลของความเค็มต่อองค์ประกอบกรดไขมันในโคฟีพอด *A. royi*-TH

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที) ด้วยเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) แสดงดังในตารางที่ 16 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณกรดไขมัน PUFA และ LC-PUFA ในตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงที่ 15 พีพีที และ 25 พีพีที ไม่มีความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงที่ 15 พีพีที มีปริมาณกรดไขมัน ARA (C20:4 n-6) และปริมาณกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 (n-6 PUFA) สูงกว่าโคฟีพอดที่เลี้ยงที่ความเค็ม 25 พีพีที อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยปริมาณกรดไขมัน ARA (C20:4 n-6) ในตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงที่ 15 พีพีที และ 25 พีพีที มีค่าเท่ากับ 1.64% และ 1.07% ตามลำดับ และปริมาณกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 (n-6 PUFA) ในตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงที่ 15 พีพีที และ 25 พีพีที มีค่าเท่ากับ 17.53% และ 14.74% ตามลำดับ เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาของ Xie และคณะ (2015) ซึ่งได้ทำการศึกษาในปลาชนิดทะเล *Siganus canaliculatus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะความเค็ม 10 พีพีที และ 32 พีพีที เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าปลา *S. canaliculatus* ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะความเค็มต่ำ (10 พีพีที) มีปริมาณกรดไขมัน ARA สูงกว่า ปลาที่ถูกเลี้ยงความเค็ม 32 พีพีที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยปลา *S. canaliculatus* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำมันพืช (VO) ในสภาวะความเค็ม 10 พีพีที ปริมาณกรดไขมัน ARA เท่ากับ 10.90 mg/g lipid ในขณะที่ปลา *S. canaliculatus* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่ส่วนผสมของน้ำมันพืช (VO) ในสภาวะความเค็ม 32 พีพีที ปริมาณกรดไขมัน ARA เท่ากับ 5.01 mg/g lipid

ตารางที่ 16 องค์ประกอบของกรดไขมันในโคพิพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที)

กรดไขมัน	โคพิพอด <i>Apocyclops royi</i> -TH	
	15 ppt (สภาวะความเค็มต่ำ)	25 ppt (กลุ่มควบคุม)
n-3 PUFA		
C18:3 n-3 (ALA)	19.94±0.07 ^{n.s.}	19.07±2.06 ^{n.s.}
C20:5 n-3 (EPA)	2.87±0.05 ^{n.s.}	2.61±0.17 ^{n.s.}
C22:6 n-3 (DHA)	3.70±0.06 ^{n.s.}	3.61±0.55 ^{n.s.}
n-6 PUFA		
C18:2 n-6 cis (LA)	15.16±0.11 ^{n.s.}	12.69±1.16 ^{n.s.}
C20:4 n-6 (ARA)	1.64±0.03 ^a	1.07±0.12 ^b
ΣMUFA	8.28±0.06 ^{n.s.}	8.35±1.72 ^{n.s.}
ΣSC-PUFA	35.83±0.13 ^{n.s.}	32.39±3.18 ^{n.s.}
ΣLC-PUFA	9.59±0.16 ^{n.s.}	8.97±0.82 ^{n.s.}
Σn-3 PUFA	27.89±0.08 ^{n.s.}	26.26±2.19 ^{n.s.}
Σn-6 PUFA	17.53±0.20 ^a	14.74±1.06 ^b
ΣPUFA	45.42±0.28 ^{n.s.}	41.35±2.87 ^{n.s.}

หมายเหตุ: ปริมาณของกรดไขมันเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด (% of total fatty acid) แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± standard deviation) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแต่ละแถวแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดย SFA: กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid); MUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid); SC-PUFA: กรดไขมันสายสั้นไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (short-chain polyunsaturated fatty acid); LC-PUFA: กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (long-chain polyunsaturated fatty acid); n-3 PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมกา-3 (omega-3 : polyunsaturated fatty acid);); n-6 PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมกา-6 (omega-6 : polyunsaturated fatty acid); PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid)

4.4.2 อิทธิพลของความเค็มต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์กรด

ไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA Biosynthesis) ในโคพีพอด *A. royi*-TH

ผลการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ total RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที) ด้วยเครื่อง NanoDrop™ Spectrophotometer แสดงดังในตารางที่ 17 จากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิกจากตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 15 พีพีที มีค่าเท่ากับ 115.4 ng/μL, 272.6 ng/μL และ 604.7 ng/μL ความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิกจากตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 25 พีพีที มีค่าเท่ากับ 227.4 ng/μL, 274.9 ng/μL และ 283.8 ng/μL จากนั้นตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ total RNA โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A260) และค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) แล้วนำมาคำนวณอัตราส่วน A260/A280 เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของโปรตีน จากการคำนวณพบว่าอัตราส่วน A260/A280 ของตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 15 พีพีที และ 25 พีพีที มีค่าอยู่ในช่วง 1.91 ถึง 1.99 ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่า total RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างโคพีพอดที่เพาะเลี้ยงในทั้ง 2 สภาวะ มีความบริสุทธิ์ (purity) เพียงพอที่จะนำมาสังเคราะห์ first strand cDNA และตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ต่อไป

ตารางที่ 17 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ total RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที)

ตัวอย่างอาร์เอ็นเอ ¹	ความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิก ² (ng/μL)		
	A260	A280	A260/A280
ArTet15/1	115.4	1.447	1.99
ArTet15/2	272.6	3.500	1.95
ArTet15/3	604.7	7.654	1.98
ArTet25/1	227.4	2.962	1.92
ArTet25/2	274.9	3.588	1.92
ArTet25/3	283.8	3.721	1.91

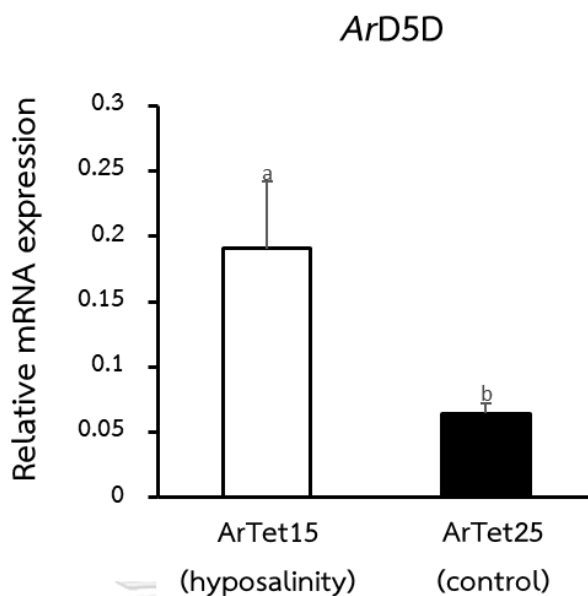
หมายเหตุ:

¹ ArTet15: ตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 15 พีพีที และ ArTet25: ตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 25 พีพีที

² ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ total RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที) ด้วยเครื่อง NanoDrop™ Spectrophotometer

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR จำนวน 3 ยีน ได้แก่ *ArD6D*, *ArD5D* และ *ArCb5D6D* ในโคฟีพอด *A. royi*-TH เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 15 พีพีที (สภาวะความเค็มต่ำ) และ 25 พีพีที (กลุ่มควบคุม) พบว่าโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 15 พีพีที (สภาวะความเค็มต่ำ) มีค่าการแสดงออกของยีน *ArD6D*, *ArD5D* และ *ArCb5D6D* สูงกว่าโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 25 พีพีที (กลุ่มควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

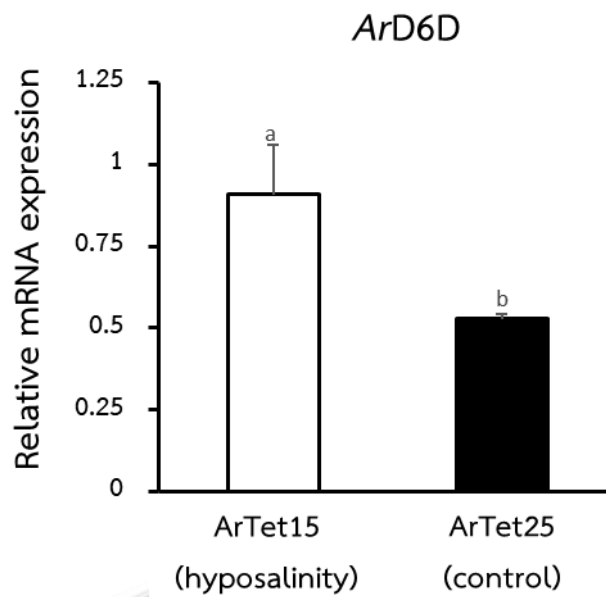
ผลการแสดงออกของยีน *ArD5D* ในโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 15 พีพีที (กลุ่มทดลอง) และ 25 พีพีที (กลุ่มควบคุม) แสดงดังในรูปที่ 15 พบว่าโคฟีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 15 พีพีที มีค่าการแสดงออกของยีน *ArD5D* สูงกว่าโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 25 พีพีที อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การเพิ่มขึ้นของแสดงออกของยีน *ArD5D* ในโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 15 พีพีที สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดไขมัน ARA ในโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 15 พีพีที (ตารางที่ 16) ซึ่งสันนิษฐานได้ว่าโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มต่ำ (15 พีพีที) มีการสังเคราะห์กรดไขมัน ARA เพิ่มขึ้น โดยมีการแสดงออกของยีน *ArD5D* ที่เพิ่มขึ้น เพื่อเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ Δ^5 -desaturase ในการเติมพันธะคู่กรดไขมัน DGLA เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดไขมัน ARA (รูปที่ 17) วิทยาลัย



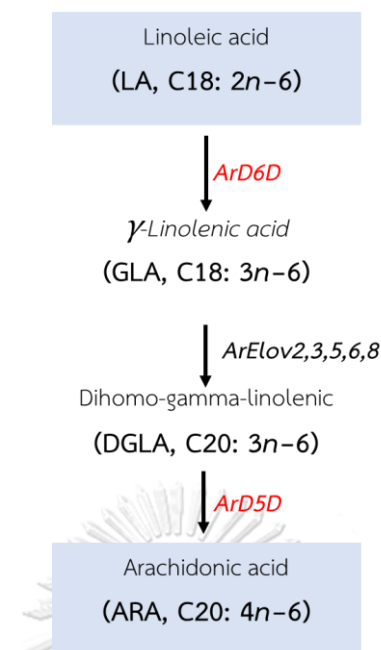
รูปที่ 15 การแสดงออกของยีน *ArD5D* ในโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที)

โดย ArTet15: โคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 15 พีพีที; ArTet25: โคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 25 พีพีที

ผลการแสดงออกของยีน *ArD6D* ในโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 15 พีพีที (กลุ่มทดลอง) และ 25 พีพีที (กลุ่มควบคุม) แสดงดังในรูปที่ 17 ซึ่งพบว่าโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 15 พีพีที มีค่าการแสดงออกของยีน *ArD6D* สูงกว่าโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 25 พีพีที อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยยีน *ArD6D* อาจแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Δ^6 -desaturase ในขั้นตอนการเปลี่ยนกรดไขมัน LA ไปเป็นกรดไขมัน GLA จากนั้นเกิดปฏิกิริยาการเติมคาร์บอน (Elongation) ไปเป็นกรดไขมัน DGLA และเกิดปฏิกิริยา desaturation ด้วยเอนไซม์ Δ^5 -desaturase เป็นกรดไขมัน ARA แสดงดังรูปที่ 17



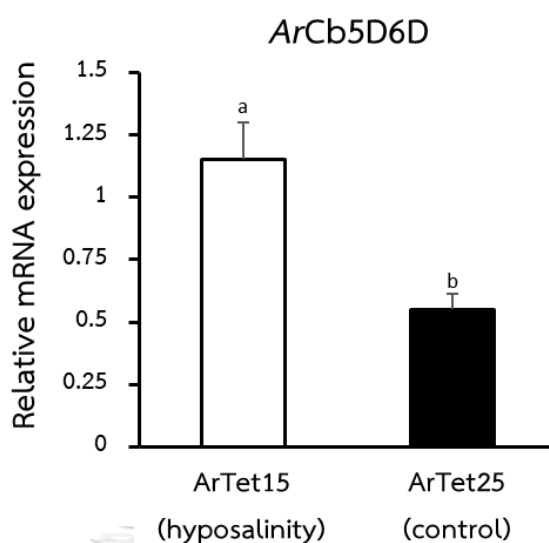
รูปที่ 16 การแสดงออกของยีน *ArD6D* ในโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที)
โดย ArTet15: โคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 15 พีพีที; ArTet25: โคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 25 พีพีที



รูปที่ 17 การสังเคราะห์กรดไขมัน ARA ในโคพีพอด *A. royi*-TH
ดัดแปลงจาก: Amparyup และคณะฯ (2022a)

ผลการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* ในโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 15 พีพีที (กลุ่มทดลอง) และ 25 พีพีที (กลุ่มควบคุม) แสดงดังในรูปที่ 18 ซึ่งพบว่าโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 15 พีพีที มีค่าการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* สูงกว่าโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 25 พีพีที อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาของ Chen และคณะ (2017) ซึ่งพบว่ากุ้ง *L. vannamei* ที่ถูกเลี้ยงที่ความเค็มต่ำ (3 พีพีที) มีการแสดงออกของยีน $\Delta 6$ Fatty Acyl Desaturase-Like Gene ในเหงือก ก้านตา และตับอ่อน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่เลี้ยงที่ความเค็ม 30 พีพีที (กลุ่มควบคุม)

การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* ทั้งในตัวอย่างโคพีพอดแต่ละระยะพัฒนาการ (รูปที่ 14) และตัวอย่างโคพีพอดที่เลี้ยงในความเค็มที่แตกต่างกัน (รูปที่ 18) มีผลลัพธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับการแสดงออกของยีน *ArD5D* และ *ArD6D* และจากผลปริมาณของกรดไขมัน ARA ที่เพิ่มขึ้น อาจสันนิษฐานได้ว่ายีน *ArCb5D6D* เป็นยีนในกลุ่ม desaturase ที่ถูกพบในสิ่งมีชีวิตครึ่งเตหียน และมีบทบาทในการเติมพันธะคู่ให้กับกรดไขมันในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน ARA ในโคพีพอด *A. royi*-TH



รูปที่ 18 การแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* ในโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที)

โดย ArTet15: โคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 15 พีพีที; ArTet25: โคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 25 พีพีที

สภาวะความเค็มต่ำ (Hyposalinity) ส่งผลให้เกิดความเครียดภายในร่างกายสัตว์น้ำเนื่องจากความไม่สมดุลของไอออน และอาจนำไปสู่ภาวะเซลล์บวมได้ แต่อย่างไรก็ตามโคฟีพอดมีกลไกการควบคุมสมดุลภายในร่างกายเพื่อรับมือกับสภาวะความเค็มที่เปลี่ยนแปลงผ่านกระบวนการควบคุมสมดุลออสโมซิส หรือกระบวนการออสโมเรกูเลชัน (osmoregulation) จากผลการศึกษานี้สภาวะความเค็มต่ำส่งผลให้โคฟีพอด *A. royi*-TH มีการสังเคราะห์กรดไขมัน ARA จากกรดไขมัน LA เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน *ArD5D* และยีน *ArD6D* ซึ่งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับบทบาทในการสังเคราะห์กรดไขมัน ARA ในชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (LC-PUFA biosynthesis) ในโคฟีพอด *A. royi* แสดงดังในรูปที่ 17

Chen และคณะ (2015) ได้ศึกษาทรานสคริปโตมในกุ้ง *L. vannamei* ที่ทำการเลี้ยงที่ความเค็มต่ำ 3 พีพีที เปรียบเทียบกับกุ้งที่ทำการเลี้ยงที่ความเค็ม 30 พีพีที (กลุ่มควบคุม) จาก

การวิเคราะห์วิถีเมตาบอลิซึมด้วย Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway (KEGG pathway analysis) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับไขมัน ซึ่งรวมถึงเมตาบอลิซึมของกรดไขมัน ARA (Arachidonic acid metabolism) ในกุ้งที่ทำการเลี้ยงที่ความเค็ม 3 พีพีที (สภาวะความเค็มต่ำ)

กรดไขมัน ARA เป็นสารตั้งต้น (precursor) ในการสังเคราะห์สารจำพวก eicosanoid หลายชนิดที่มีคุณสมบัติเหมือนฮอร์โมน (hormone-like agents) เช่น thromboxane, prostaglandin และ prostacyclin จากการศึกษาของ Lund และคณะ (2019) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับพรอสตาแกลนดินในลูกปลา *Sander lucioperca* ที่เลี้ยงที่ความเค็ม 0 พีพีที เมื่อเปรียบเทียบกับลูกปลาที่เลี้ยงที่ความเค็ม 5 พีพีที และ 10 พีพีที โดยพรอสตาแกลนดิน (Prostaglandin) เป็นสารที่ทำหน้าที่เหมือนฮอร์โมนซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องในการกระตุ้นการทำงานของช่องโปรตีนขนส่งโพแทสเซียมไอออน (K^+ channel) เพื่อส่งเสริมการควบคุมการลดปริมาตรของเซลล์ (regulatory volume decrease; RVD) ในเซลล์เยื่อ (epithelial cell) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Civan et al., 1994) นอกจากนี้สาร Eicosanoids ยังมีบทบาทในการทำงานทางสรีรวิทยาของสัตว์น้ำ เช่น การปรับภูมิคุ้มกันและการทำงานของระบบประสาท และการรักษาสมดุลของออสโมเรกูเลชัน (osmoregulation) และควบคุมการตอบสนองต่อความเครียด (Koven et al., 2001, Koven et al., 2003; Tocher, 2003) ดังนั้นจากผลการศึกษาในรายงานวิจัยนี้ การเพิ่มขึ้นของการสังเคราะห์กรดไขมัน ARA ในโคพีพอด *A. royi*-TH ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะความเค็มต่ำ (15 พีพีที) อาจมาจากความต้องการในการสังเคราะห์ prostaglandin ที่เพิ่มขึ้นเมื่อสัตว์น้ำตกอยู่ในสภาวะความเครียดจากความเค็มเพื่อช่วยควบคุมสมดุลออสโมซิส (osmoregulation)

น้ำทะเลถือเป็นวัตถุดิบหลักสำหรับการเพาะเลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH แต่อย่างไรก็ตามต้นทุนสำหรับน้ำทะเลที่ใช้ในระบบเพาะเลี้ยงโคพีพอดค่อนข้างสูง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงโคพีพอดในสภาวะความเค็มต่ำจึงเป็นประโยชน์ในแง่ของการลดต้นทุนการเพาะเลี้ยง อีกทั้งยังเพิ่มความสามารถในสังเคราะห์กรดไขมัน ARA ในโคพีพอด ซึ่งเป็นกรดไขมันจำเป็นสำหรับสัตว์น้ำ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะสมบัติและบทบาทของยีน desaturase-like (*ArCb5D6D*) ในโคฟีพอด *Apocyclops royi* สายพันธุ์ไทย (*A. royi*-TH) และศึกษาอิทธิพลของความเค็มต่อคุณค่าทางโภชนาการของโคฟีพอด *A. royi*-TH ผ่านการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมัน และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันในโคฟีพอด *A. royi*-TH จากผลการทดลองพบว่ายีน desaturase-like (*ArCb5D6D*) ในโคฟีพอด *A. royi*-TH มีโดเมนที่สำคัญ Cytochrome b5-like heme/steroid binding domain และ Fatty acid desaturase domain ซึ่งสอดคล้องกับยีน desaturase-like ที่มีรายงานในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน และจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* ในโคฟีพอดแต่ละระยะ พัฒนาการพบว่าการแสดงออกของยีนสูงสุดในโคฟีพอดระยะโตเต็มตัววัยและระยะโคฟีพอดติด สอดคล้องกับปริมาณกรดไขมัน PUFA และจากการศึกษาอิทธิพลของความเค็มในโคฟีพอด *A. royi*-TH พบว่าโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงที่ 15 พีพีที มีปริมาณกรดไขมัน ARA (C20:4 n-6) และปริมาณกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 (n-6 PUFA) สูงกว่าโคฟีพอดที่เลี้ยงที่ความเค็ม 25 พีพีที อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน พบว่าโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 15 พีพีที (สภาวะความเค็มต่ำ) มีค่าการแสดงออกของยีน *ArD5D*, ยีน *ArD6D*, และยีน *ArCb5D6D* สูงกว่าโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 25 พีพีที (กลุ่มควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่ายีน *ArCb5D6D* อาจมีบทบาทในการวิถีสังเคราะห์กรดไขมัน ARA และโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะความเค็มต่ำจะมีความสามารถในการเปลี่ยนกรดไขมัน LA ไปเป็นกรดไขมัน ARA ได้มากกว่าโคฟีพอดที่เพาะเลี้ยงที่ความเค็ม 25 พีพีที ซึ่งข้อมูลเชิงลึกที่ได้จะทำให้เข้าใจถึงชีววิทยาพื้นฐานของชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนของโคฟีพอด และจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนของโคฟีพอด *A. royi*-TH

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากข้อมูลการศึกษาลักษณะสมบัติและบทบาทของยีน Desaturase-like (ArCb5D6D) ในโคฟีพอด *A. royi*-TH จะเป็นพื้นฐานสำคัญต่อการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์กรดไขมันชนิดอื่นๆในอนาคตได้ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงโคฟีพอดในสภาวะความเค็มต่ำสามารถช่วยลดต้นทุนการเพาะเลี้ยงโคฟีพอดได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงโคฟีพอดเชิงพาณิชย์ แต่อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงประสิทธิภาพของโคฟีพอดที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะความเค็มต่ำเมื่อนำไปอนุบาลลูกสัตว์น้ำ



บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาษาไทย

ศุภกานต์ สังข์แก้ว, องค์ประกอบของกรดไขมันและการแสดงออกของยีน delta-6 desaturase (ArD6D) ที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 ในโคพีพอด *Apocyclops royi*. (2565). วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2564. น้ำเกลือ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%99%E0%B9%89%E0%B8%B3%E0%B9%80%E0%B8%81%E0%B8%A5%E0%B8%B7%E0%B8%AD> [31 พฤษภาคม 2566]

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2566. น้ำกร่อย. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%99%E0%B9%89%E0%B8%B3%E0%B8%81%E0%B8%A3%E0%B9%88%E0%B8%AD%E0%B8%A2>. [31 พฤษภาคม 2566]

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2566. รายการกรดไขมันโอเมกา-3. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%81%E0%B8%A3%E0%B8%94%E0%B9%84%E0%B8%82%E0%B8%A1%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B9%82%E0%B8%AD%E0%B9%80%E0%B8%A1%E0%B8%81%E0%B8%B2-3> [31 พฤษภาคม 2566]

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2566. รายการกรดไขมันโอเมกา-6. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%81%E0%B8%A3%E0%B8%94%E0%B9%84%E0%B8%82%E0%B8%A1%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B9%82%E0%B8%AD%E0%B9%80%E0%B8%A1%E0%B8%81%E0%B8%B2-6> [31 พฤษภาคม 2566]

ภาษาอังกฤษ

- Ajiboye, O.O., Yakubu, A.F., Adams, T.E., Olaji, E.D. and Nwogu, N.A., 2011. A review of the use of copepods in marine fish larviculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21: 225-246.
- Amparyup, P., Sungkaew, S., Charoensapsri, W., Chumtong, P., Yocawibun, P., Tapaneeyaworawong, P., Wongpanya, R. and Imjongjirak, C., 2022b. RNA-seq transcriptome analysis and identification of the theromacin antimicrobial peptide of the copepod *Apocyclops royi*. *Developmental & Comparative Immunology*, 135: 104464.
- Amparyup, P., Sungkaew, S., Charoensapsri, W., Tapaneeyaworawong, P., Chumtong, P., Yocawibun, P., Pantong, P., Wongpanya, R., Imjongjirak, C. and Powtongsook, S., 2022a. Molecular characterization of biosynthesis of polyunsaturated fatty acids during different developmental stages in the copepod *Apocyclops royi*. *Aquaculture Reports*, 23: 101064.
- Barnes, R.D. 1982. *Invertebrate Zoology*. Philadelphia, PA: Holt-Saunders International. pp. 692
- Bell, J.G., McEvoy, L.A., Estevez, A., Shields, R.J. and Sargent, J.R., 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture*, 227(1-4): 211-220.
- Bell, M.V. and Tocher, D.R., 2009. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions. *Lipids in aquatic ecosystems*, pp.211-236.
- Bell, M.V., Dick, J.R., Anderson, T.R. and Pond, D.W., 2007. Application of liposome and stable isotope tracer techniques to study polyunsaturated fatty acid biosynthesis in marine zooplankton. *Journal of Plankton Research*, 29(5): 417-422.

- Bengtson, D.A., 2003. Status of marine aquaculture in relation to live prey: past, present and future. *Live feeds in marine aquaculture*, pp.1-16.
- Blanda, E., Drillet, G., Huang, C.C., Hwang, J.S., Højgaard, J.K., Jakobsen, H.H., Rayner, T.A., Su, H.M. and Hansen, B.W., 2017. An analysis of how to improve production of copepods as live feed from tropical Taiwanese outdoor aquaculture ponds. *Aquaculture*, 479: 432-441.
- Blanda, E., Drillet, G., Huang, C.C., Hwang, J.S., Jakobsen, H.H., Rayner, T.A., Su, H.M., Wu, C.H. and Hansen, B.W., 2015. Trophic interactions and productivity of copepods as live feed from tropical Taiwanese outdoor aquaculture ponds. *Aquaculture*, 445: 11-21.
- Blaxter, J.H., Douglas, B., Tyler, P.A. and Mauchline, J., 1998. *The biology of calanoid copepods*. Academic Press.
- Bowman, T.E., 1986. Freshwater calanoid copepods of the West Indies. *Sylogus*, 58: 237-246.
- Brandsen, M.P., Battaglione, S.C., Morehead, D.T., Dunstan, G.A. and Nichols, P.D., 2005. Effect of dietary 22: 6n-3 on growth, survival and tissue fatty acid profile of striped trumpeter (*Latris lineata*) larvae fed enriched *Artemia*. *Aquaculture*, 243(1-4): 331-344.
- Bryant, P.J. 2014 Harpacticoid Copepod. [Online]. Available from: <https://nathistoc.bio.uci.edu/crustacea/Copepoda/Harpacticoid/index.html> [2023, 29 May]
- Burdge, G.C., Jones, A.E. and Wootton, S.A., 2002. Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of α -linolenic acid metabolism in young men. *British Journal of Nutrition*, 88(4): 355-363.
- Burton, R.S., 1991. Regulation of proline synthesis in osmotic response: effects of protein synthesis inhibitors. *Journal of Experimental Zoology*, 259(2): 272-277.

- Cahu, C.L., Infante, J.L.Z. and Barbosa, V., 2003. Effect of dietary phospholipid level and phospholipid: neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *British Journal of Nutrition*, 90(1): 21-28.
- Calliari, D., Andersen, C.M., Thor, P., Gorokhova, E. and Tiselius, P., 2006. Salinity modulates the energy balance and reproductive success of co-occurring copepods *Acartia tonsa* and *A. clausi* in different ways. *Marine Ecology Progress Series*, 312: 177-188.
- Cervetto, G., Gaudy, R. and Pagano, M., 1999. Influence of salinity on the distribution of *Acartia tonsa* (Copepoda, Calanoida). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 239(1): 33-45.
- Chang, W.B. and Lei, C.H., 1993. Development and energy content of a brackish-water copepod, *Apocyclops royi* (Lindberg) reared in a laboratory. *Bull. Inst. Zool. Acad. Sin*, 32: 62-81.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M. and Towle, D., 2008. Osmotic and ionic regulation in aquatic arthropods. In *Osmotic and ionic regulation* (pp. 165-230). CRC press.
- Chen, K., Li, E., Li, T., Xu, C., Xu, Z., Qin, J.G. and Chen, L., 2017. The expression of the $\Delta 6$ fatty acyl desaturase-like gene from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under different salinities and dietary lipid compositions. *Journal of Shellfish Research*, 36(2): 501-509.
- Chen, K., Li, E., Li, T., Xu, C., Wang, X., Lin, H., Qin, J.G. and Chen, L., 2015. Transcriptome and molecular pathway analysis of the hepatopancreas in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* under chronic low-salinity stress. *PLoS One*, 10(7): e0131503.

- Chen, Q., Sheng, J., Lin, Q., Gao, Y. and Lv, J., 2006. Effect of salinity on reproduction and survival of the copepod *Pseudodiaptomus annandalei* Sewell, 1919. *Aquaculture*, 258(1-4): 575-582.
- Chen, Y., Meesapyodsuk, D. and Qiu, X., 2014. Transgenic production of omega-3 very long chain polyunsaturated fatty acids in plants: accomplishment and challenge. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(1): 38-43.
- Chinnery, F.E. and Williams, J.A., 2004. The influence of temperature and salinity on *Acartia* (Copepoda: Calanoida) nauplii survival. *Marine Biology*, 145: 733-738.
- Civan, M.M., Coca-Prados, M. and Peterson-Yantorno, K., 1994. Pathways signaling the regulatory volume decrease of cultured nonpigmented ciliary epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 35(6): 2876-2886.
- Conceição, L.E., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S. and Dinis, M.T., 2010. Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture research*, 41(5): 613-640.
- Conceição, L.E.C., Grasdalen, H. and Rønnestad, I., 2003. Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings. *Aquaculture*, 227(1-4): 221-232.
- Conceição, L.E.C., Van der Meeren, T., Verreth, J.A.J., Evjen, M.S., Houlihan, D.F. and Fyhn, H.J., 1997. Amino acid metabolism and protein turnover in larval turbot (*Scophthalmus maximus*) fed natural zooplankton or *Artemia*. *Marine Biology*, 129: 255-265.
- Coutteau, P. and Mourente, G., 1997. Lipid classes and their content of n-3 highly unsaturated fatty acids (HUFA) in *Artemia franciscana* after hatching, HUFA-enrichment and subsequent starvation. *Marine Biology*, 130: 81-91.
- Davis, C.C., 1955. The marine and fresh-water plankton. Michigan State University Press.

- Das, P., Mandal, S.C., Bhagabati, S.K., Akhtar, M.S. and Singh, S.K., 2012. Important live food organisms and their role in aquaculture. *Frontiers in aquaculture*, 5(4): 69-86.
- de Lima, L.C., Navarro, D.M. and Souza-Santos, L.P., 2013. Effect of diet on the fatty acid composition of the copepod *Tisbe biminiensis*. *Journal of crustacean biology*, 33(3): 372-381.
- De Troch, M., Boeckx, P., Cnudde, C., Van Gansbeke, D., Vanreusel, A., Vincx, M. and Caramujo, M.J., 2012. Bioconversion of fatty acids at the basis of marine food webs: insights from a compound-specific stable isotope analysis. *Marine Ecology Progress Series*, 465: 53-67.
- Desvillettes, C., Bourdier, G. and Breton, J.C., 1997. On the occurrence of a possible bioconversion of linolenic acid into docosahexaenoic acid by the copepod *Eucyclops serrulatus* fed on microalgae. *Journal of Plankton Research*, 19(2): 273-278.
- Devreker, D., Souissi, S. and Seuront, L., 2004. Development and mortality of the first naupliar stages of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) under different conditions of salinity and temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 303(1): 31-46.
- Devreker, D., Souissi, S., Winkler, G., Forget-Leray, J. and Leboulenger, F., 2009. Effects of salinity, temperature and individual variability on the reproduction of *Eurytemora affinis* (Copepoda; Calanoida) from the Seine estuary: a laboratory study. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 368(2): 113-123.
- Dexter, D.M., 1993. Salinity tolerance of the copepod *Apocyclops dengizicus* (Lepeschkin, 1900), a key food chain organism in the Salton Sea, California. In *Saline Lakes V: Proceedings of the Vth International Symposium on Inland*

Saline Lakes, held in Bolivia, 22–29 March 1991 (pp. 203-209). Springer Netherlands.

Dhont, J., Dierckens, K., Støttrup, J., Van Stappen, G., Wille, M. and Sorgeloos, P., 2013. Rotifers, Artemia and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. In *Advances in aquaculture hatchery technology* (pp. 157-202). Woodhead Publishing.

Farkas, T., Kariko, K. and Csengeri, I., 1981. Incorporation of [1-¹⁴C] acetate into fatty acids of the crustaceans *Daphnia magna* and *Cyclops strenus* in relation to temperature. *Lipids*, 16(6): 418-422.

Fyhn, H.J., Finn, R.N., Helland, S., Rønnestad, I. and Lømsland, E.R., 2020. Nutritional value of phyto-and zooplankton as live food for marine fish larvae. In *Fish farming technology* (pp. 121-126). CRC Press.

Gapasin, R.S.J. and Duray, M.N., 2001. Effects of DHA-enriched live food on growth, survival and incidence of opercular deformities in milkfish (*Chanos chanos*). *Aquaculture*, 193(1-2): 49-63.

Geurden, I., 1997. The role of phospholipids in diets of larval and postlarval fish (Doctoral dissertation, Ghent University).

Gisbert, E., Villeneuve, L., Zambonino-Infante, J.L., Quazuguel, P. and Cahu, C.L., 2005. Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for long-chain polyunsaturated fatty acid supply in European sea bass *Dicentrarchus labrax* larval development. *Lipids*, 40(6): 609.

Glencross, B. and Rutherford, N., 2011. A determination of the quantitative requirements for docosahexaenoic acid for juvenile barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture Nutrition*, 17(2): e536-e548.

- Goolish, E.M. and Burton, R.S., 1989. Energetics of osmoregulation in an intertidal copepod: effects of anoxia and lipid reserves on the pattern of free amino accumulation. *Functional Ecology*, pp.81-89.
- Goyens, P.L., Spilker, M.E., Zock, P.L., Katan, M.B. and Mensink, R.P., 2006. Conversion of α -linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of α -linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio. *The American journal of clinical nutrition*, 84(1): 44-53.
- Gréve, H.V.S. 2019. Is This Tiny Copepod the Key to Sustainably Producing Omega-3s? [Online]. Available from: <https://hakaimagazine.com/news/is-this-tiny-copepod-the-key-to-sustainably-producing-omega-3s/> [2023, 29 May]
- Groundwater Glossary. 2006. Calanoida. [Online]. Available from: <https://web.archive.org/web/20060428102341/http://www.groundwater.org/gi/gwglossary.html#F> [2023, 29 May]
- Hamre, K., Srivastava, A., Rønnestad, I., Mangor-Jensen, A. and Stoss, J., 2008. Several micronutrients in the rotifer *Brachionus plicatilis* may be limiting for growth, survival and normal development of cod larvae. *Aquaculture Nutrition*, 14: 51-60.
- Hastings, N., Agaba, M., Tocher, D.R., Leaver, M.J., Dick, J.R., Sargent, J.R. and Teale, A.J., 2001. A vertebrate fatty acid desaturase with $\Delta 5$ and $\Delta 6$ activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(25): 14304-14309.
- Helland, S., Terjesen, B.F. and Berg, L., 2003. Free amino acid and protein content in the planktonic copepod *Temora longicornis* compared to *Artemia franciscana*. *Aquaculture*, 215(1-4): 213-228.
- Herrick, C.L., 1895. *Diaptomus albuquerquensis*. *Synopsis of the Entomostraca of Minnesota: With Descriptions of Related Species Comprising All Known Forms*

from the United States Included in the Orders Copepoda, Cladocera, Ostracoda. Pioneer Press Company, pp.67-68.

Ishizaki, Y., Uematsu, K. and Takeuchi, T., 2000. Preliminary study of the effect of dietary docosahexaenoic acid on the volumetric growth of the brain in larval yellowtail. *Fisheries science*, 66(3): 611-613.

Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L. and Hernández-Cruz, C.M., 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 22(2): 97.

Johnson, K.E., Perreau, L., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M. and Lee, C.E., 2014. Without gills: localization of osmoregulatory function in the copepod *Eurytemora affinis*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 87(2): 310-324.

Johnson, W.S. and Allen, D.M., 2012. *Zooplankton of the Atlantic and Gulf coasts: a guide to their identification and ecology*. JHU Press.

Kabeya, N., Sanz-Jorquera, A., Carboni, S., Davie, A., Oboh, A. and Monroig, O., 2017. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in sea urchins: Molecular and functional characterisation of three fatty acyl desaturases from *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816). *PLoS One*, 12(1): e0169374.

Kanazawa, A., 1993. Importance of dietary docosahexaenoic acid on growth and survival of fish larvae. In *TML Conference Proceedings* (Vol. 3, pp. 87-95).

Kanazawa, A., Teshima, S.L. and Ono, K., 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comparative Biochemistry and physiology. B, Comparative Biochemistry*, 63(3): 295-298.

KAYAMA, M. and HIRATA, M., 1984. Fatty acid metabolism in blue crab, *Portunus trituberculatus*, with special reference to de novo synthesis and conversion. *Journal of Japan Oil Chemists' Society*, 33(7): 426-434.

- Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Weiss, R., Harel, M., Behrens, P. and Tandler, A., 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20: 4n- 6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 193(1-2): 107-122.
- Koven, W., Van Anholt, R., Lutzky, S., Atia, I.B., Nixon, O., Ron, B. and Tandler, A., 2003. The effect of dietary arachidonic acid on growth, survival, and cortisol levels in different-age gilthead seabream larvae (*Sparus auratus*) exposed to handling or daily salinity change. *Aquaculture*, 228(1-4): 307-320.
- Lauritano, C., Procaccini, G. and Ianora, A., 2012. Gene expression patterns and stress response in marine copepods. *Marine Environmental Research*, 76: 22-31.
- Lavens, P. and Sorgeloos, P., 2000. The history, present status and prospects of the availability of Artemia cysts for aquaculture. *Aquaculture*, 181(3-4): 397-403.
- Lee, J.M., Lee, H., Kang, S. and Park, W.J., 2016. Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients*, 8(1): 23.
- Lee, S.H., Lee, M.C., Puthumana, J., Park, J.C., Kang, S., Hwang, D.S., Shin, K.H., Park, H.G., Souissi, S., Om, A.S. and Lee, J.S., 2017. Effects of salinity on growth, fatty acid synthesis, and expression of stress response genes in the cyclopoid copepod *Paracyclops nana*. *Aquaculture*, 470: 182-189.
- Lee, K.W., Kwon, O.N. and Park, H.G., 2005. Effects of temperature, salinity and diet on the productivity of the cyclopoid copepod, *Apocyclops royi*. *Journal of Aquaculture*, 18(1): 52-59.
- Lepage, G. and Roy, C.C., 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of lipid research*, 27(1): 114-120.
- Li, Y.Y., Hu, C.B., Zheng, Y.J., Xia, X.A., Xu, W.J., Wang, S.Q., Chen, W.Z., Sun, Z.W. and Huang, J.H., 2008. The effects of dietary fatty acids on liver fatty acid

composition and $\Delta 6$ -desaturase expression differ with ambient salinities in *Siganus canaliculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 151(2): 183-190.

Liao, I.C., Su, H.M. and Chang, E.Y., 2001. Techniques in finfish larviculture in Taiwan. *Aquaculture*, 200(1-2): 1-31.

Lin, Z., Hao, M., Zhu, D., Li, S. and Wen, X., 2017. Molecular cloning, mRNA expression and nutritional regulation of a $\Delta 6$ fatty acyl desaturase-like gene of mud crab, *Scylla paramamosain*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 208: 29-37.

Liu, J., Caballero, M.J., Izquierdo, M., Ali, T.E.S., Hernández-Cruz, C.M., Valencia, A. and Fernández-Palacios, H., 2002. Necessity of dietary lecithin and eicosapentaenoic acid for growth, survival, stress resistance and lipoprotein formation in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Fisheries science*, 68(6): 1165-1172.

Lund, I., Rodríguez, C., Izquierdo, M.S., El Kertaoui, N., Kestemont, P., Reis, D.B., Dominguez, D. and Pérez, J.A., 2019. Influence of salinity and linoleic or α -linolenic acid based diets on ontogenetic development and metabolism of unsaturated fatty acids in pike perch larvae (*Sander lucioperca*). *Aquaculture*, 500: 550-561.

Luo, N., Ding, Z.L., Kong, Y.Q., Zhang, R.F., Zhang, Y.X., Wu, C.L., Jiang, Z.Q. and Ye, J.Y., 2018. An evaluation of increasing linolenic acid level in the diet of *Macrobrachium nipponense*: Lipid deposition, fatty acid composition and expression of lipid metabolism-related genes. *Aquaculture Nutrition*, 24(2): 758-767.

- Madhupratap, M. and Haridas, P., 1992. New species of *Pseudodiaptomus* (Copepoda: Calanoida) from the salt pans of the Gulf of Kutch, India and a comment on its speciation. *Journal of plankton research*, 14(4): 555-562.
- Madhupratap, M. and Haridas, P., 1994. Descriptions of *Acartia* (Euacartia) *southwelli* Sewell 1914 and *Acartia* (Euacartia) *sarojus* n. sp. from India and status of the subgenus *Euacartia* Steuer 1923. In *Ecology and Morphology of Copepods: Proceedings of the 5th International Conference on Copepoda, Baltimore, USA, June 6–13, 1993* (pp. 67-74). Springer Netherlands.
- Marsh, C.D., 1907. *A revision of the North American species of Diaptomus* (Vol. 15).
- Matsunari, H., Hashimoto, H., Oda, K., Masuda, Y., Imaizumi, H., Teruya, K., Furuita, H., Yamamoto, T., Hamada, K. and Mushiake, K., 2013. Effects of docosahexaenoic acid on growth, survival and swim bladder inflation of larval amberjack (*Seriola dumerili*, Risso). *Aquaculture Research*, 44(11): 1696-1705.
- Mauchline, J., 1998. *Adv. Mar. Biol. 33: The biology of calanoid copepods*.
- McKinnon, A.D., Duggan, S., Nichols, P.D., Rimmer, M.A., Semmens, G. and Robino, B., 2003. The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture*, 223(1-4): 89-106.
- Michalec, F.G., Souissi, S., Dur, G., Mahjoub, M.S., Schmitt, F.G. and Hwang, J.S., 2010. Differences in behavioral responses of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) reproductive stages to salinity variations. *Journal of Plankton Research*, 32(6): 805-813.
- Monroig, Ó., Navarro, J.C., Dick, J.R., Alemany, F. and Tocher, D.R., 2012. Identification of a Δ^5 -like fatty acyl desaturase from the cephalopod *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) involved in the biosynthesis of essential fatty acids. *Marine Biotechnology*, 14: 411-422.

- Monroig, Ó., Shu-Chien, A.C., Kabeya, N., Tocher, D.R. and Castro, L.F.C., 2022. Desaturases and elongases involved in long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic animals: From genes to functions. *Progress in lipid research*, p.101157.
- Monroig, O., Tocher, D.R. and Castro, L.F.C., 2018. Polyunsaturated fatty acid biosynthesis and metabolism in fish. In *Polyunsaturated fatty acid metabolism* (pp. 31-60). AOCS Press.
- Monroig, Ó., Tocher, D.R. and Navarro, J.C., 2013. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in marine invertebrates: recent advances in molecular mechanisms. *Marine drugs*, 11(10): 3998-4018.
- Morais, S., Lacuisse, M., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T. and Rønnestad, I., 2004. Ontogeny of the digestive capacity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*), with respect to digestion, absorption and metabolism of amino acids from *Artemia*. *Marine Biology*, 145: 243-250.
- Moren, M., Opstad, I., Van der Meeren, T. and Hamre, K., 2006. Iodine enrichment of *Artemia* and enhanced levels of iodine in Atlantic halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) fed the enriched *Artemia*. *Aquaculture Nutrition*, 12(2): 97-102.
- Moreno, V.J., De Moreno, J.E. and Brenner, R.R., 1979. Fatty acid metabolism in the calanoid copepod *Paracalanus parvus*: 1. Polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 14(4): 313-317.
- Morris, R.J. and Sargent, J.R., 1973. Studies on the lipid metabolism of some oceanic crustaceans. *Marine Biology*, 22(1): 77-83.
- Mourente, G., 1996. In vitro metabolism of ¹⁴C-polyunsaturated fatty acids in midgut gland and ovary cells from *Penaeus kerathurus* Forskål at the beginning of

sexual maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 115(2): 255-266.

Nakamura, M.T. and Nara, T.Y., 2004. Structure, function, and dietary regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$, and $\Delta 9$ desaturases. *Annu. Rev. Nutr.*, 24: 345-376.

Nanton, D.A. and Castell, J.D., 1998. The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe sp.*, for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture*, 163(3-4): 251-261.

NAPIER, A.J., HEY, J.S., LACEY, J.D. and SHEWRY, R.P., 1998. Identification of a *Caenorhabditis elegans* $\Delta 6$ -fatty-acid-desaturase by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 330(2): 611-614.

Nielsen, B.L.H., Gøtterup, L., Jørgensen, T.S., Hansen, B.W., Hansen, L.H., Mortensen, J. and Jepsen, P.M., 2019. n-3 PUFA biosynthesis by the copepod *Apocyclops royi* documented using fatty acid profile analysis and gene expression analysis. *Biology Open*, 8(2): bio038331.

Nielsen, B.L.H., Gréve, H.V.S. and Hansen, B.W., 2021. Cultivation success and fatty acid composition of the tropical copepods *Apocyclops royi* and *Pseudodiaptomus annandalei* fed on monospecific diets with varying PUFA profiles. *Aquaculture Research*, 52(3): 1127-1138.

Nielsen, B.L.H., Greve, H.V.S., Rayner, T.A. and Hansen, B.W., 2020. Biochemical adaptation by the tropical copepods *Apocyclops royi* and *Pseudodiaptomus annandalei* to a PUFA-poor brackish water habitat. *Marine Ecology Progress Series*, 655: 77-89.

Noffs, M.D., Martino, R.C., Trugo, L.C., Urbinati, E.C., Fernandes, J.B.K. and Takahashi, L.S., 2009. Dietary fish oil replacement with lard and soybean oil affects triacylglycerol and phospholipid muscle and liver docosahexaenoic acid

content but not in the brain and eyes of surubim juveniles *Pseudoplatystoma* sp. *Fish physiology and biochemistry*, 35: 399-412.

Norsker, N.H. and Støttrup, J.G., 1994. The importance of dietary HUFAs for fecundity and HUFA content in the harpacticoid, *Tisbe holothuriae* Humes. *Aquaculture*, 125(1-2): 155-166.

Pan, Y.J., Sadovskaya, I., Hwang, J.S. and Souissi, S., 2018. Assessment of the fecundity, population growth and fatty acid composition of *Apocyclops royi* (Cyclopoida, Copepoda) fed on different microalgal diets. *Aquaculture Nutrition*, 24(3): 970-978.

Pan, Y.J., Souissi, A., Souissi, S. and Hwang, J.S., 2016. Effects of salinity on the reproductive performance of *Apocyclops royi* (Copepoda, Cyclopoida). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 475: 108-113.

Parrish, C.C., French, V.M. and Whiticar, M.J., 2012. Lipid class and fatty acid composition of copepods (*Calanus finmarchicus*, *C. glacialis*, *Pseudocalanus* sp., *Tisbe furcata* and *Nitokra lacustris*) fed various combinations of autotrophic and heterotrophic protists. *Journal of Plankton Research*, 34(5): 356-375.

Petkeviciute, E., Kania, P.W. and Skovgaard, A., 2015. Genetic responses of the marine copepod *Acartia tonsa* (Dana) to heat shock and epibiont infestation. *Aquaculture Reports*, 2: 10-16.

Pinoni, S.A., Jerez-Cepa, I., Mañanes, A.A.L. and Romero, J.M.M., 2018. The euryhaline crab *Uca tangeri* showed metabolic differences to sex and environmental salinity. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 98(6): 1465-1475.

- Prusova, I., Smith, S.L. and Popova, E., 2011. *Calanoid copepods of the Arabian Sea region* (p. 240). Muscat (Oman): Sultan Qaboos University, Academic Publication Board.
- Rajkumar, M., 2006. Suitability of the copepod, *Acartia clausi* as a live feed for Seabass larvae (*Lates calcarifer* Bloch): Compared to traditional live-food organisms with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*, 261(2): 649-658.
- Reddy, A.S., Nuccio, M.L., Gross, L.M. and Thomas, T.L., 1993. Isolation of a Δ 6-desaturase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by gain-of-function expression in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Plant molecular biology*, 22: 293-300.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R. and Olsen, Y., 1994. Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. *Aquaculture international*, 2: 33-48.
- Roddie, B.D., Leakey, R.J.G. and Berry, A.J., 1984. Salinity-temperature tolerance and osmoregulation in *Eurytemora affinis* (Poppe)(Copepoda: Calanoida) in relation to its distribution in the zooplankton of the upper reaches of the Forth estuary. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 79(2): 191-211.
- Romano, N., Wu, X., Zeng, C., Genodepa, J. and Elliman, J., 2014. Growth, osmoregulatory responses and changes to the lipid and fatty acid composition of organs from the mud crab, *Scylla serrata*, over a broad salinity range. *Marine Biology Research*, 10(5): 460-471.
- Rønnestad, I., Tonheim, S.K., Fyhn, H.J., Rojas-Garcia, C.R., Kamisaka, Y., Koven, W., Finn, R.N., Terjesen, B.F., Barr, Y. and Conceição, L.E.C., 2003. The supply of

amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: a review of recent findings. *Aquaculture*, 227(1-4): 147-164.

Roo, F.J., Hernández-Cruz, C.M., Socorro, J.A., Fernández-Palacios, H., Montero, D. and Izquierdo, M.S., 2009. Effect of DHA content in rotifers on the occurrence of skeletal deformities in red porgy *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 287(1-2): 84-93.

Santigosa, E., Geay, F., Tonon, T., Le Delliou, H., Kuhl, H., Reinhardt, R., Corcos, L., Cahu, C., Zambonino-Infante, J.L. and Mazurais, D., 2011. Cloning, tissue expression analysis, and functional characterization of two Δ^6 -desaturase variants of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Marine Biotechnology*, 13: 22-31.

Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D. and Estevez, A., 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177(1-4): 191-199.

Sargent, J.R., Tocher, D.R. and Bell, J.G., 2003. The lipids. *Fish nutrition*, pp.181-257.

Sarker, M.A.A., Yamamoto, Y., Haga, Y., Sarker, M.S.A., Miwa, M., Yoshizaki, G. and Satoh, S., 2011. Influences of low salinity and dietary fatty acids on fatty acid composition and fatty acid desaturase and elongase expression in red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science*, 77: 385-396.

Seiliez, I., Panserat, S., Corraze, G., Kaushik, S. and Bergot, P., 2003. Cloning and nutritional regulation of a Δ^6 -desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 135(3): 449-460.

Shu-Chien, A.C., Han, W.Y., Carter, C.G., Fitzgibbon, Q.P., Simon, C.J., Kuah, M.K., Battaglione, S.C., Codabaccus, B.M. and Ventura, T., 2017. Effect of dietary lipid

source on expression of lipid metabolism genes and tissue lipid profile in juvenile spiny lobster *Sagmariasus verreauxi*. *Aquaculture*, 479: 342-351.

Smith, M.A., Stobart, A.K., Shewry, P.R. and Napier, J.A., 1998. Cytochrome b5 and polyunsaturated fatty acid biosynthesis. In *Engineering crop plants for industrial end uses* (pp. 181-188). Portland Press.

Solgaard, G., Standal, I.B. and Draget, K.I., 2007. Proteolytic activity and protease classes in the zooplankton species *Calanus finmarchicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 147(3): 475-481.

Sprecher, H., 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1486(2-3): 219-231.

Støttrup, J.G., 2000. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquaculture research*, 31(8-9): 703-711.

Su, H.M., Cheng, S.H., Chen, T.I. and Su, M.S., 2005. Culture of copepods and applications to marine finfish larval rearing in Taiwan. *Copepods in aquaculture*: 183-194.

Suárez-Morales, E. and Elías-Gutiérrez, M., 2000. Two new Mastigodiaptomus (Copepoda, Diaptomidae) from southeastern Mexico, with a key for the identification of the known species of the genus. *Journal of Natural History*, 34(5): 693-708.

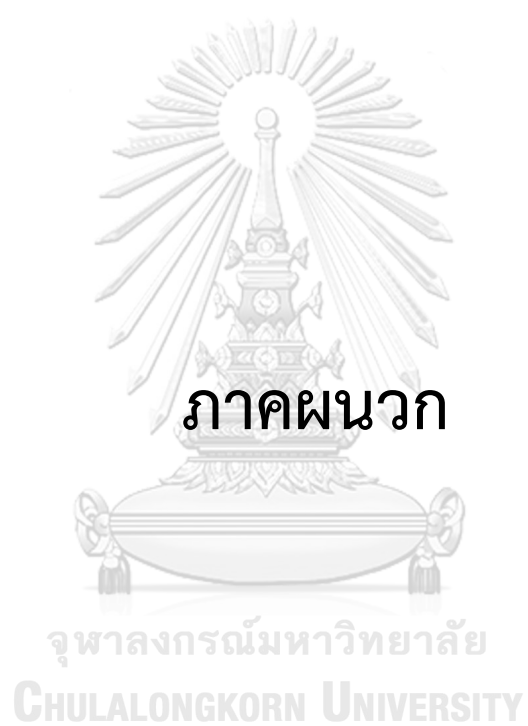
Suárez-Morales, E., 2003. Historical biogeography and distribution of the freshwater calanoid copepods (Crustacea: Copepoda) of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Biogeography*, 30(12): 1851-1859.

- Sumiarsa, G.S. and Phelps, R.P., 2007. Fatty acid profiles of cyclopoid copepod nauplii *Apocyclops panamensis* and the effects of salinity change. *Indonesian Aquaculture Journal*, 2(2): 75-88.
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in fisheries science*, 11(2): 107-184.
- Tocher, D.R., Zheng, X., Schlechtriem, C., Hastings, N., Dick, J.R. and Teale, A.J., 2006. Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl Δ^6 desaturase of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Lipids*, 41(11): 1003-1016.
- van der Meeren, T., Olsen, R.E., Hamre, K. and Fyhn, H.J., 2008. Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture*, 274(2-4): 375-397.
- Villalta, M., Estévez, A. and Bransden, M.P., 2005. Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture*, 245(1-4): 193-209.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P. and Bell, J.G., 2005. The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. *Aquaculture*, 249(1-4): 353-365.
- Villalta, M., Estevez, A., Bransden, M.P. and Bell, J.G., 2008. Effects of dietary eicosapentaenoic acid on growth, survival, pigmentation and fatty acid composition in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. *Aquaculture Nutrition*, 14(3): 232-241.
- Vizcaíno-Ochoa, V., Lazo, J.P., Barón-Sevilla, B. and Drawbridge, M.A., 2010. The effect of dietary docosahexaenoic acid (DHA) on growth, survival and pigmentation

- of California halibut *Paralichthys californicus* larvae (Ayres, 1810). *Aquaculture*, 302(3-4): 228-234.
- Wallis, J.G. and Watts, J.L., 2002. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next?. *Trends in biochemical sciences*, 27(9): 467-473.
- Walter, T.C., 2008. World of Copepods Database. *Apocyclops royi* (Lindberg, 1940). [Online]. Available from: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=357094> [2023, 29 May]
- Wang, H.L., Liénard, M.A., Zhao, C.H., Wang, C.Z. and Löfstedt, C., 2010. Neofunctionalization in an ancestral insect desaturase lineage led to rare Δ^6 pheromone signals in the Chinese tussah silkworm. *Insect biochemistry and molecular biology*, 40(10): 742-751.
- Wang, W., Wu, X., Liu, Z., Zheng, H. and Cheng, Y., 2014. Insights into hepatopancreatic functions for nutrition metabolism and ovarian development in the crab *Portunus trituberculatus*: gene discovery in the comparative transcriptome of different hepatopancreas stages. *PloS one*, 9(1): e84921.
- Wickins, J.F. and Lee, D.O., C. (2002) *Crustacean Farming Ranching and Culture*.
- Wikipedia. 2023. Calanoida. [Online]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Copepodkils.jpg> [2023, 29 May]
- Willett, C.S. and Burton, R.S., 2002. Proline biosynthesis genes and their regulation under salinity stress in the euryhaline copepod *Tigriopus californicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 132(4): 739-750.
- Wilson, M.S., 1953. New and inadequately known North American species of the copepod genus *Diaptomus*. *Smithsonian Miscellaneous Collections*.

- Wingerter, K. 2023. A Primer on the Different Characteristics and Uses of the Major Copepod Groups. [Online]. Available from: <https://www.algaebarn.com/blog/copepods/a-primer-on-the-different-characteristics-and-uses-of-the-major-copepod-groups/> [2023, 29 May]
- Wu, D.L., Huang, Y.H., Liu, Z.Q., Yu, P., Gu, P.H., Fan, B. and Zhao, Y.L., 2018. Molecular cloning, tissue expression and regulation of nutrition and temperature on $\Delta 6$ fatty acyl desaturase-like gene in the red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 225: 58-66.
- Xie, D., Wang, S., You, C., Chen, F., Tocher, D.R. and Li, Y., 2015. Characteristics of LC-PUFA biosynthesis in marine herbivorous teleost *Siganus canaliculatus* under different ambient salinities. *Aquaculture Nutrition*, 21(5): 541-551.
- Xu, H., Wang, J., Mai, K., Xu, W., Zhang, W., Zhang, Y. and Ai, Q., 2016. Dietary docosahexaenoic acid to eicosapentaenoic acid (DHA/EPA) ratio influenced growth performance, immune response, stress resistance and tissue fatty acid composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvier). *Aquaculture Research*, 47(3): 741-757.
- Yadav, N.S., Wierzbicki, A., Aegerter, M., Caster, C.S., Pérez-Grau, L., Kinney, A.J., Hitz, W.D., Booth Jr, J.R., Schweiger, B., Stecca, K.L. and Allen, S.M., 1993. Cloning of higher plant [omega]-3 fatty acid desaturases. *Plant physiology*, 103(2): 467-476.
- Yang, Z., Guo, Z., Ji, L., Zeng, Q., Wang, Y., Yang, X. and Cheng, Y., 2013. Cloning and tissue distribution of a fatty acyl $\Delta 6$ -desaturase-like gene and effects of dietary lipid levels on its expression in the hepatopancreas of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 165(2): 99-105.

- Yoshino, M., Pan, Y.J., Souissi, S. and Dur, G., 2022. An Individual-Based Model to quantify the effect of salinity on the production of *Apocyclops royi* (Cyclopoida, Copepoda). *Frontiers in Marine Science*, pp. 913.
- Zheng, X., Ding, Z., Xu, Y., Monroig, O., Morais, S. and Tocher, D.R., 2009a. Physiological roles of fatty acyl desaturases and elongases in marine fish: characterisation of cDNAs of fatty acyl Δ^6 desaturase and elovl5 elongase of coibia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 290(1-2): 122-131.
- Zheng, X., Leaver, M.J. and Tocher, D.R., 2009b. Long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis in fish: Comparative analysis of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) Δ^6 fatty acyl desaturase gene promoters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 154(3): 255-263.
- Zheng, X., Seiliez, I., Hastings, N., Tocher, D.R., Panserat, S., Dickson, C.A., Bergot, P. and Teale, A.J., 2004. Characterization and comparison of fatty acyl Δ^6 desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139(2): 269-279.
- Zheng, X., Torstensen, B.E., Tocher, D.R., Dick, J.R., Henderson, R.J. and Bell, J.G., 2005. Environmental and dietary influences on highly unsaturated fatty acid biosynthesis and expression of fatty acyl desaturase and elongase genes in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1734(1): 13-24.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

ก.1 การเตรียม 10xTris-Borate-EDTA (10xTBE)

1.1 ชั่ง Tris (Molecular Biology Grade) 108 กรัม, Boric acid 55 กรัม และ Ethylenediaminetetra-acetic acid disodium salt (EDTA di-sodium salt) 9.3 กรัม

1.2 ละลายสารเคมีด้วยน้ำที่ผ่านกระบวนการกรองด้วยระบบ Reverse osmosis (RO) ปริมาตร 950 มิลลิลิตร คนสารละลายให้เข้ากัน

1.3 ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำ

ก.2 การเตรียม 1.8% Agarose gel

2.1 ชั่ง Agarose 0.9 กรัม ใส่ในขวดลูกอมพู่ขนาด 200 มิลลิลิตร

2.2 ละลายด้วย 1xTris-Borate-EDTA (1xTBE) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

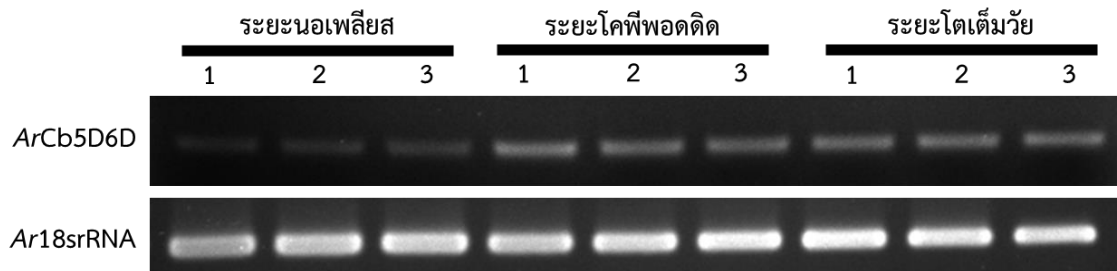
2.3 อุ่นสารละลายในไมโครเวฟ เป็นเวลาประมาณ 3 นาที หรือจนกว่าสารละลายจะเป็นเนื้อเดียวกัน

2.4 เทสารละลาย Agarose ลงถาดสำหรับขึ้นรูปเจล (Gel Casting Stand)

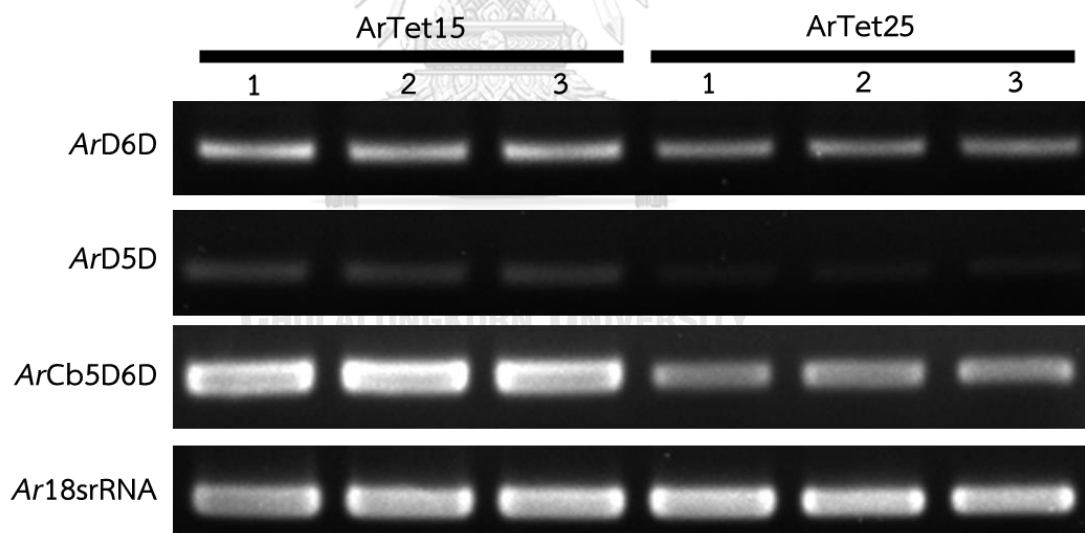
2.5 รอให้เจลเซตตัวเป็นเวลา 45 นาที ก่อนนำไป วิเคราะห์ PCR product ด้วยเทคนิค 1.8% agarose electrophoresis

ภาคผนวก ข
ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

ข.3 ผลการรันเจลด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis



รูปที่ 19 ผลการแสดงผลของยีน *ArCb5D6D* และยีน *Ar18srRNA* ในโคพีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ (ระยะนอเพเลียส, ระยะโคพีพอดติด, ระยะโตเต็มวัย)



รูปที่ 20 ผลการแสดงผลของยีน *ArD6D*, *ArD5D*, *ArCb5D6D* และ *Ar18srRNA* ในโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (15 พีพีที และ 25 พีพีที) โดย ArTet15: โคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 15 พีพีที; ArTet25: โคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 25 พีพีที

ภาคผนวก ค

ผลงานตีพิมพ์



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การระบุลักษณะยีน desaturase-like gene (*ArCb5D6D*) และอิทธิพลของความเค็มต่อการสังเคราะห์กรดไขมันในโคพีพอด *Apocyclops royi*

Identification of desaturase-like gene (*ArCb5D6D*) and effects of salinity on biosynthesis in copepod *Apocyclops royi*

สุภิดา เกื้อกอบ^a, ปิติ อำพARY^{b,c}, จันทรประภา อิมจงจิร์ก^{a,*}

Supida Kueakob^a, Piti Amparyup^{b,c}, Chanprapa Imjongjirak^{a,*}

^aภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

^bทีมวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปทุมธานี 12120

^cศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

^aDepartment of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

^bMarine Biotechnology Research Team, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Pathumthani 12120, Thailand

^cCenter of Excellence for Marine Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

*Corresponding author. E-mail address: chanprapa.i@chula.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ระบุลักษณะยีน desaturase-like gene (*ArCb5D6D*) ในโคพีพอด *Apocyclops royi* พบว่ายีน *ArCb5D6D* ประกอบด้วยบริเวณ open reading frame 1323 คู่เบส ซึ่งสามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนขนาด 440 กรดอะมิโน จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *ArCb5D6D* พบบริเวณ Cytochrome b5-like heme/steroid binding domain และ Fatty acid desaturase domain โดยมีความเหมือนกับโปรตีน desaturase ในกุ้งและปู 61–65% และพบว่ายีน *ArCb5D6D* มีการแสดงออกสูงในโคพีพอดระยะโคพีพอดติดและโตเต็มวัย ซึ่งสอดคล้องกับผลของปริมาณกรดไขมัน PUFA ในโคพีพอด นอกจากนี้ยังพบว่าโคพีพอดที่ทำการเลี้ยงในสภาวะความเค็มต่ำ (15ppt) มีปริมาณกรดไขมัน arachidonic acid (ARA) และระดับการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* สูงกว่าโคพีพอดกลุ่มควบคุม (25ppt) อย่างมีนัยสำคัญ โดยจากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่ายีน *ArCb5D6D* อาจมีบทบาทในการสังเคราะห์กรดไขมันในโคพีพอด *A. royi*

คำสำคัญ: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน, โคพีพอด, ความเค็ม, ดีแซตทูเรส

Abstract

In this study, desaturase-like gene (*ArCb5D6D*) was identified in copepod *Apocyclops royi*. The *ArCb5D6D* gene consists of an open reading frame of 1323 bp that encoded a protein of 440 amino acids. Sequence analysis revealed that *ArCb5D6D* protein contained conserved cytochrome b5-like heme/steroid binding domain, followed by fatty acid desaturase domain, sharing 61–65% amino acid sequence similarity with shrimp and crab desaturase-like proteins. *ArCb5D6D* gene was abundantly expressed in copepodid and adult stages which consistent with PUFA content in *A. royi*. Additionally, we found that the arachidonic acid (ARA) content in the copepods raised in hyposalinity (15ppt) was significantly higher than those in the control group (25ppt) and the expression level of *ArCb5D6D* mRNA was up regulated in hyposalinity group. These results suggested that *ArCb5D6D* gene may play a role in fatty acid synthesis in copepod *A. royi*

Keyword: Copepod, Salinity, Polyunsaturated fatty acid (PUFA), Desaturase

บทนำ

โคพีพอด *Apocyclops royi* เป็นหนึ่งในแพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนที่นิยมนำมาเป็นอาหารที่มีชีวิตสำหรับอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีความสามารถในการเปลี่ยนกรดไขมัน linolenic acids (LNA) และกรดไขมัน linoleic acids (LA) เป็นกรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid; LC-PUFA) ได้ โดยเฉพาะ docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA) และ arachidonic acid (ARA) ผ่านการทำงานของเอนไซม์ desaturase และ elongase (Amparyup et al., 2022) ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้ถือเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพทางโภชนาการของอาหารสัตว์น้ำ

เอนไซม์ desaturase ถือเป็นเอนไซม์หลักที่มีความสำคัญในชีวสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFA biosynthesis) จากการศึกษาในโคพีพอด *A. royi* ก่อนหน้านี้ ได้มีการระบุและจำแนกกลุ่มยีน desaturase จำนวน 5 ยีน ได้แก่ *ArD6D*, *ArD5D*, *ArD4D*, *ArO3D-1* และ *ArO3D-2* (Nielsen et al., 2019; Amparyup et al., 2022) โดยจากการศึกษาการแสดงออกของยีน พบว่าโคพีพอด *A. royi* ในระยะโตเต็มวัยมีการแสดงออกของยีน *ArD6D*, *ArD5D*, *ArD4D*, *ArO3D-1*, *ArO3D-2* สูงกว่าโคพีพอดระยะอนุเพล็ลิส และระยะโคพีพอดคืดอย่างมีนัยสำคัญ (Amparyup et al., 2022) จากการศึกษาข้อมูล transcriptome ของโคพีพอด *A. royi* (Amparyup et al., 2022) ได้ค้นพบยีน desaturase-like gene (*ArCb5D6D*) ชนิดใหม่ซึ่งยังไม่มียารงานในโคพีพอด อย่างไรก็ตามพบว่ายีนมีความเหมือนกับยีน desaturase-like ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียน เช่น ปูทะเล *Scylla paramamosain* (Lin et al., 2017), ปูขน *Eriocheir sinensis* (Yang et al., 2013), กุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (Chen et al., 2017) และ กุ้งน้ำจืด *Macrobrachium nipponense* (Luo et al., 2018) โดยพบว่ายีน desaturase-like อาจจะมีหน้าที่ในการสร้างกรดไขมันในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน

สมภาวะความเค็มเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันในสัตว์น้ำ มีการค้นพบว่าปลาทะเลจะมีความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนเพิ่มขึ้นเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะความเค็มต่ำ (Li et al., 2008) และจากการศึกษาในโคพีพอด *P. nana* พบปริมาณ LC-PUFA ในโคพีพอดที่เลี้ยงที่ความเค็ม 15 ppt สูงกว่า โคพีพอดที่เลี้ยงที่ความเค็ม 25 ppt อย่างมีนัยสำคัญ (Lee et al., 2017) อย่างไรก็ตามยังไม่มียารงานการศึกษาอิทธิพลของความเค็มต่อกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันในโคพีพอด *A. royi*

ในการศึกษานี้ได้ศึกษาลักษณะยีน *ArCb5D6D* ในโคพีพอด *A. royi* ซึ่งเป็นยีนกลุ่ม desaturase ที่ยังไม่เคยมีรายงานในโคพีพอด *A. royi* โดยศึกษาลักษณะสมบัติและการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* เปรียบเทียบกับยีน *delta-6 desaturase (ArD6D)* ของโคพีพอด *A. royi* และปริมาณกรดไขมันในโคพีพอดแต่ละระยะพัฒนาการ นอกจากนี้ยังศึกษาอิทธิพลของความเค็มต่อการสังเคราะห์กรดไขมันในโคพีพอดผ่านการศึกษาการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* และปริมาณกรดไขมันในโคพีพอด ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้จะช่วยให้เข้าใจถึงชีวสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพีพอด *A. royi*

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงโคพีพอด *Apocyclops royi*

เก็บระยะพัฒนาการของโคพีพอด โดยทำการเลี้ยงโคพีพอด *A. royi* ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ (28 °C) ด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ในขวดขนาด 5 ลิตรและน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยแยกระยะโคพีพอดระยะอนุเพล็ลิส โคพีพอดคืด และโตเต็มวัย ด้วยผ้ากรองขนาด 33 µm, 180 µm และ 300 µm ตามลำดับ

ศึกษาอิทธิพลของความเค็มต่อโคพีพอด โดยทำการเลี้ยงโคพีพอด *A. royi* ภายใต้สภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (28 °C) ด้วยสาหร่าย *Tetraselmis sp.* ในน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชุดทดลอง คือชุดที่ 1 เลี้ยงโคพีพอดที่ความเค็ม 15 ppt และชุดที่ 2 เลี้ยงโคพีพอดด้วยความเค็ม 25 ppt (กลุ่มควบคุม) ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ เก็บโคพีพอดด้วยผ้ากรองขนาด 33 µm

ตัวอย่างโคพีพอดสำหรับการศึกษากลไกการประกอบกรดไขมัน จะถูกเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80 °C และตัวอย่างโคพีพอดสำหรับการสกัด total RNA จะถูกเก็บในสารละลาย TRIzol™ Reagent และเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80 °C

ศึกษากลไกการประกอบกรดไขมันในโคพีพอด *A. royi* ด้วยวิธี GC/MS

สกัดไขมันจากตัวอย่างโคพีพอดในแต่ละระยะพัฒนาการ และโคพีพอดที่เลี้ยงภายใต้สภาวะความเค็ม 15 ppt และ 25 ppt ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lepage และ Roy (1986) จากนั้นทำการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันด้วยเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)

การศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *ArCb5D6* ในโคพีพอด *A. royi*

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ArCb5D6* โดยใช้โปรแกรม ExPASy translated tool (<http://web.expasy.org/translate/>) เปรียบเทียบความเหมือนกับโปรตีนอื่น ๆ ที่เคยมีรายงานในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และค้นหาตำแหน่งอนุรักษ์ของแต่ละยีนด้วยโปรแกรม SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) จากนั้นเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของ desaturase ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียน ด้วยโปรแกรม Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

การสกัด total RNA และสังเคราะห์ first strand cDNA จากตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*

นำตัวอย่างโคพีพอดแต่ละชุดการทดลองมาสกัด total RNA ด้วยสารละลาย TRIzol™ Reagent โดยสกัด total RNA ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต (*Thermo Fisher Scientific*) และนำ total RNA ที่สกัดได้มากำจัด genomic DNA ด้วย RNase-free DNase I (Promega) จากนั้นวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ total RNA ด้วยเครื่อง NanoDrop™ Spectrophotometer และทำการสังเคราะห์ first strand cDNA ด้วย RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (*Thermo Fisher Scientific*) เพื่อนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* (Forward primer: 5' GGAATAGTTCTCGGAATGGCGGCA 3'; Reverse primer: 5' TCACGGCGAGGTTTTCTGGGGTCA 3') และ *ArD6D* (Forward primer: 5' TCGCCCTCCCATTATCTACACGC 3'; Reverse primer: 5' TGTTGATCTGGTAATTGAGACCTCC 3') ในตัวอย่างโคพีพอดที่เลี้ยงที่ความเค็มที่แตกต่างกัน (15 ppt และ 25 ppt) และตัวอย่างโคพีพอดจากแต่ละระยะพัฒนาการ (นอเพเลียส โคพีพอดติด และ โตเต็มวัย) โดยทำปฏิกิริยา PCR จากนั้นตรวจสอบผลการแสดงออกของยีนด้วย 1.8% Agarose gel electrophoresis ภายใต้อินทรีย์ด้วยเครื่องชุดถ่ายภาพเจล ยี่ห้อ Syngene (U.K) รุ่น G.Box EF นำรูปที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าการแสดงออกของยีน (mRNA expression) ด้วยโปรแกรม Gel Pro 3.1 simple analysis และคำนวณค่าการแสดงออกของยีน (Relative mRNA expression) โดยใช้ยีน *Ar18srRNA* (Forward primer: 5' CATATTGCGGACACTGGTTCT 3'; Reverse primer: 5' AAGAGTCTGGGCAAGGAAGAG 3') เป็นยีนควบคุม

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *ArCb5D6D* ในโคพีพอด *A. royi*

จากการศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *ArCb5D6* ในโคพีพอด *A. royi* พบว่าประกอบด้วยบริเวณ Open reading frame (ORF) 1323 คู่เบส เมื่อแปลรหัสเป็นโปรตีนจะมีความยาวของสายโพลีเปปไทด์ 440 กรดอะมิโน นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ความเหมือนของโปรตีน *ArCb5D6D* ในโคพีพอด *A. royi* กับโปรตีน desaturase ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล พบว่าโปรตีน *ArCb5D6D* มีความเหมือนกับโปรตีน desaturase-like ในกุ้งน้ำจืด *Macrobrachium nipponense* (AMQ48726.1) มากที่สุด (65%) รองลงมาคือ ปูทะเล *Scylla paramamosain* (ANA07380.1) (62%) และกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (ALS03812.1) (61%) อย่างไรก็ตามพบว่าโปรตีน *ArCb5D6D* มีความเหมือนกับโปรตีน *ArD6D* ในโคพีพอด *A. royi* (Amparyup et al., 2022) ที่เคยมีรายงานไว้เพียง 34%

จากการวิเคราะห์โดเมนที่สำคัญของโปรตีน *ArCb5D6D* พบบริเวณ Cytochrome b5-like heme/steroid binding domain ที่ปลายด้าน N ของโปรตีน ซึ่งประกอบด้วย H-P-G-G heme binding motif และพบบริเวณ Fatty acid desaturase domain ที่ปลายด้าน C ของโปรตีน แสดงดัง Fig. 1 โดยโดเมนที่สำคัญทั้งสองโดเมนที่พบในโปรตีน *ArCb5D6D* สอดคล้องกับลักษณะสมบัติของโปรตีน desaturase-like ที่มีรายงานไว้ใน กุ้ง และปู (Luo et al., 2018) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าโปรตีน *ArCb5D6D* ในโคพีพอด *A. royi* เป็นโปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน desaturase-like ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน

ปริมาณกรดไขมันในโคพีพอด *A. royi*

จากการศึกษาปริมาณกรดไขมันในโคพีพอด *A. royi* ทั้ง 3 ระยะ ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis sp.* ที่ความเค็ม 25 ppt พบปริมาณ PUFA ในระยะนอพลีซิส (NP) ระยะโคพีพอดติด (CD) และระยะโตเต็มวัย (AD) เท่ากับ 22.5%, 38.53% และ 41.85% ตามลำดับ และพบปริมาณ LC-PUFA ในแต่ละระยะเท่ากับ 5.27%, 7.98% และ 10.36% ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณของกรดไขมันในโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงที่ความเค็ม 15 ppt และ 25 ppt แสดงดัง Table 1 พบว่าโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงที่ 15 ppt มีปริมาณกรดไขมัน Arachidonic acid (ARA, 20:4n-6) และปริมาณกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 (n-6 PUFA) สูงกว่าโคพีพอดที่เลี้ยงที่ความเค็ม 25 ppt อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาทรานสคริปโตมในกุ้ง *L. vannamei* ที่ทำการเลี้ยงที่ความเค็มต่ำ พบว่ากุ้งมีการสังเคราะห์ ARA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Chen et al., 2015) จากรายงานพบว่าเมื่อสัตว์น้ำอยู่ในสภาวะความเค็มต่ำ จะมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์โดยมีการสังเคราะห์กรดไขมันเพิ่มขึ้น เช่น LC-PUFA ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อรักษาสมดุลของเซลล์ ซึ่งจะช่วยให้อัตราการรอดของสิ่งมีชีวิตเมื่อตกในอยู่ในสภาวะที่มีความเครียดจากความเค็มได้ (Palacios et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบว่ากรดไขมัน ARA สามารถเพิ่มสมดุลของเซลล์ได้ (Van Anholt et al., 2004; Beckman et al., 1992)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* และ *ArD6D* ในตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ทั้ง 3 ระยะ พัฒนาการ และตัวอย่างโคพีพอดที่เลี้ยงในความเค็มที่แตกต่างกัน แสดงดัง Fig. 2 และ Fig. 3 ผลการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* ในโคพีพอดแต่ละระยะพัฒนาการ พบว่าโคพีพอดระยะนอพลีซิส (NP) มีการแสดงออกของยีนน้อยที่สุด สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน ซึ่งพบปริมาณ PUFA ในระยะนอพลีซิสน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับโคพีพอด

ระยะโคพีโทดและโตเต็มวัย และจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* ในโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงที่ความเค็มแตกต่างกัน พบว่าโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงที่ความเค็ม 15 ppt มีการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* สูงกว่าโคพีพอดที่เลี้ยงที่ความเค็ม 25 ppt อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ผลการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* ทั้งในตัวอย่างโคพีพอดแต่ละระยะพัฒนาการ และตัวอย่างโคพีพอดในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน มีผลไปในทิศทางเดียวกับการแสดงออกของยีน *ArD6D* ซึ่งเป็นยีนกลุ่ม desaturase ที่ทำหน้าที่ในการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่เคยมียางานไว้โคพีพอด *A. royi* (Amparup et al., 2022) จากผลการศึกษาลักษณะของยีนและการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* นี้แสดงให้เห็นว่ายีน *ArCb5D6D* เป็นยีนในกลุ่ม desaturase ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพีพอด *A. royi*

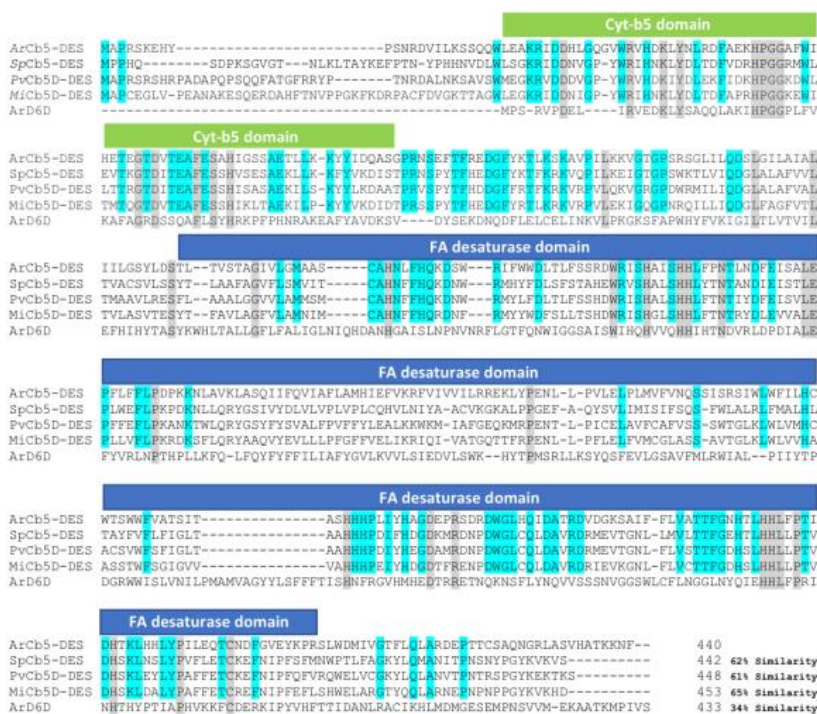


Fig. 1 Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of *ArCb5D6D* from *A. royi* with the other desaturase proteins. The amino acid sequence of desaturase from the *A. royi* (*ArCb5D6D*), *S. paramamosain* (ANA07380.1), *L. vannamei* (ALS03812.1), *M. nipponense* (AMQ48726.1), *A. royi* (Amparyup et al., 2022) were collectively compared

Table 1 The fatty acid composition in copepod *Apocyclops royi* exposed to different salinities

	Copepod <i>Apocyclops royi</i>	
	15 ppt (hyposalinity)	25 ppt (control)
C20:5 n-3 (EPA)	2.87±0.05 ^a	2.61±0.17 ^a
C22:6 n-3 (DHA)	3.70±0.06 ^a	3.61±0.55 ^a
C20:4 n-6 (ARA)	1.64±0.03 ^a	1.07±0.12 ^b
∑ PUFA	45.42±0.28 ^a	41.00±3.17 ^a
∑ n-3 PUFA	27.89±0.08 ^a	26.26±2.19 ^a
∑ n-6 PUFA	17.52±0.20 ^a	14.74±1.06 ^b

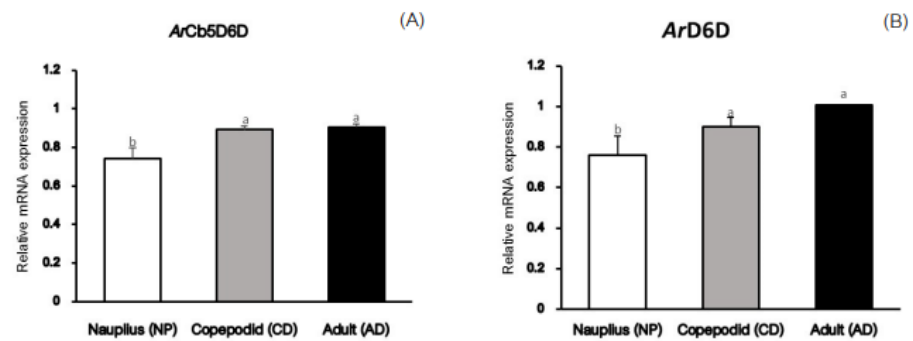


Fig. 2 The mRNA expression of ArCb5D6D and ArD6D from the nauplius (NP), copepodid (CD), and adult (AD) of the copepod *A. royi*. The Ar18srRNA served as an internal reference gene. Data represents the mean±standard deviation (error bars) of triplicate samples. Means with different lowercase letter (above each bar) are significantly different ($p < 0.05$; one-way ANOVA with Duncan's multiple range tests)

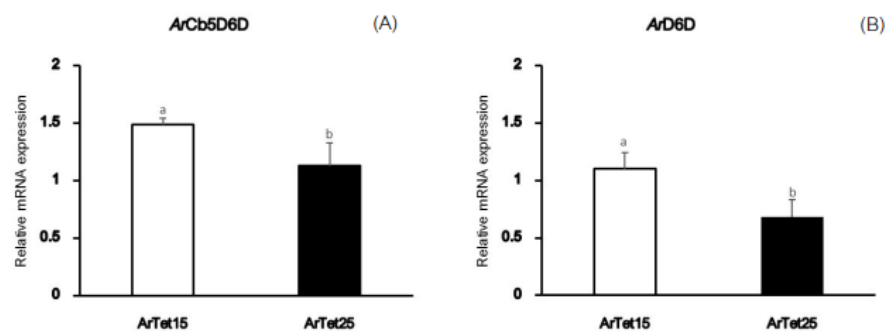


Fig. 3 The mRNA expression of ArCb5D6D and ArD6D from the copepod *A. royi* at different salinity (15 ppt: ArTet15 and 25 ppt: ArTet25). The Ar18srRNA served as an internal reference gene. Data represents the mean ± standard deviation (error bars) of triplicate samples. Means with different lowercase letter (above each bar) are significantly different

สรุป

รายงานวิจัยนี้ได้ประสบความสำเร็จในการค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนและองค์ประกอบไขมันและโนโคพิพอด *A. royi* พบว่ายีน *ArCb5D6D* มีโดเมนที่สำคัญ Cytochrome b5-like heme/steroid binding domain และ Fatty acid desaturase domain ซึ่งสอดคล้องกับยีน desaturase ที่มีรายงานในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน ผลจากการวิเคราะห์กรดไขมัน พบว่าโคพิพอดทั้งสามระยะมีปริมาณ PUFA เท่ากับ 22.5% (ระยะนอพลีเยส), 38.53% (ระยะโคพิพอดติด) และ 41.85% (ระยะโตเต็มวัย) และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* พบว่ามีการแสดงออกสูงสุดในโคพิพอดระยะโตเต็มวัยและระยะโคพิพอดติด และจากการตรวจสอบอิทธิพลของความเค็มที่มีต่อองค์ประกอบกรดไขมันพบว่า โคพิพอดที่ทำการเลี้ยงที่สภาวะความเค็มต่ำ (15 ppt) มีปริมาณ ARA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน พบว่าโคพิพอดที่ทำการเลี้ยงที่ความเค็มต่ำ (15 ppt) มีการแสดงออกของยีน *ArCb5D6D* มากกว่าโคพิพอดที่ทำการเลี้ยงที่ความเค็ม 25 ppt เช่นเดียวกับผลการแสดงออกของยีน *ArD6D* จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสภาวะความเค็มต่ำมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพิพอด *A. royi* และยีน *ArCb5D6D* อาจมีหน้าที่ในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพิพอด โดยอาจทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ARA โดยองค์ความรู้ที่ได้จากรายงานการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาโคพิพอดให้เป็นอาหารสัตว์น้ำที่มีประสิทธิภาพในอนาคตได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (P2050332), สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (สอวช.เลขที่ วช.ชว.(อ)/ภส)/49/2564) และกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (สัญญาเลขที่ RCU_F_64_004_23)

เอกสารอ้างอิง

- Amparyup, P., Sungkaew, S., Charoensapsri, W., Tapaneeyaworawong, P., Chumtong, P., Yocawibun, P., Pantong, P., Wongpanya, R., Imjongjirak, C., Powtongsook, S. 2022. Molecular characterization of biosynthesis of polyunsaturated fatty acids during different developmental stages in the copepod *Apocyclops royi*. *Aquaculture Reports* 23: 101064. doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101064
- Beckman, B. and Mustafa, T., 1992. Arachidonic acid metabolism in gill homogenate and isolated gill cells from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: the effect of osmolality, electrolytes and prolactin. *Fish Physiology and Biochemistry* 10(3): 213–222. doi.org/10.1007/BF00004515
- Chen, K., Li, E., Li, T., Xu, C., Wang, X., Lin, H., Qin, J.G., Chen, L., 2015. Transcriptome and molecular pathway analysis of the hepatopancreas in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* under chronic low-salinity stress. *PLoS One* 10(7): e0131503. doi.org/10.1371/journal.pone.0131503
- Chen, K., Li, E., Li, T., Xu, C., Xu, Z., Qin, J.G., Chen, L. 2017. The expression of the $\Delta 6$ fatty acyl desaturase-like gene from Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under different salinities and dietary lipid compositions. *J. Shellfish Res.* 36: 501–509. doi.org/10.2983/035.036.0221
- Lee, S. H., Lee, M. C., Puthumana, J., Park, J. C., Kang, S., Hwang, D.S., Shin, K.H., Park, H.G., Souissi, S., Om, A.S., Lee, J.S. 2017. Effects of salinity on growth, fatty acid synthesis, and expression of stress

- response genes in the cyclopoid copepod *Paracyclops nana*. *Aquaculture* 470: 182–189. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.037
- Lepage, G., Roy, C.C. 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of lipid research* 27(1): 114–120. doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38861-1
- Li, Y.Y., Hu, C.B., Zheng, Y.J., Xia, X.A., Xu, W.J., Wang, S.Q., Huang, J.H. 2008. The effects of dietary fatty acids on liver fatty acid composition and D6-desaturase expression differ with ambient salinities in *Siganus canaliculatus*. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 151(2): 183–190. doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.06.013
- Lin, Z., Hao, M., Zhu, D., Li, S., Wen, X., 2017. Molecular cloning, mRNA expression and nutritional regulation of a $\Delta 6$ fatty acyl desaturase-like gene of mud crab, *Scylla paramamosain*. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 208–209: 29–37. doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.03.004
- Luo, N., Ding, Z.L., Kong, Y.Q., Zhang, R.F., Zhang, Y.X., Wu, C.L., Jiang, Z.Q., Ye, J.Y., 2018. An evaluation of increasing linolenic acid level in the diet of *Macrobrachium nipponense*: Lipid deposition, fatty acid composition and expression of lipid metabolism-related genes. *Aquaculture Nutrition* 24(2): 758–767. doi.org/10.1111/anu.12604
- Nielsen, B.L.H., Götterup, L., Jørgensen, T.S., Hansen, B.W., Hansen, L.H., Mortensen, J., Jepsen, P.M. 2019. n-3 PUFA biosynthesis by the copepod *Apocyclops royi* documented using fatty acid profile analysis and gene expression analysis. *Biol. Open*. 8: bio038331. doi.org/10.1242/bio.038331
- Palacios, E., Bonilla, A., Luna, D., Racotta, I.S. 2004. Survival, Na⁺/K⁺-ATPase and lipid responses to salinity challenge in fed and starved white pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Aquaculture*, 234(1-4): 497–511. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.001
- Van Anholt, R.D., Spanings, F.A.T., Koven, W.M., Nixon, O., Bonga, S.W., 2004. Arachidonic acid reduces the stress response of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Journal of Experimental Biology* 207(19): 3419–3430. doi.org/10.1242/jeb.01166
- Yang, Z., Guo, Z., Ji, L., Zeng, Q., Wang, Y., Yang, X. and Cheng, Y., 2013. Cloning and tissue distribution of a fatty acyl $\Delta 6$ -desaturase-like gene and effects of dietary lipid levels on its expression in the hepatopancreas of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 165(2): 99–105. doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.03.010



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	สุภิดา เกื้อกอบ
วัน เดือน ปี เกิด	12 มีนาคม 2542
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลพัทลุง
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต
ที่อยู่ปัจจุบัน	21 ม.9 ต.ท่ามิหรำ อ.เมืองพัทลุง จ.พัทลุง 93000
ผลงานตีพิมพ์	Kueakob, S., Amparyup, P., and Imjongjirak, C. 2023. Identification of desaturase-like gene (ArCb5D6D) and effects of salinity on biosynthesis in copepod <i>Apocyclops royi</i> . In The Proceedings No.2 of The 61th Kasetsart University Annual Conference, pp. 912-919. Bangkok : Kasetsart University Research and Development Institute.