

ผลของโปรเจสเทอโรนที่เคลือบด้วยไคโตซานและมอลโทเดกซ์ทรีนต่อการพัฒนารังไข่
กึ่งขาวแวนนาไม *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931



นางสาวประภาภรณ์ เทอดสุทธิธัญญ์

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF PROGESTERONE IN CHITOSAN/MALTODEXTRIN MICROENCAPSULATION
ON OVARIAN DEVELOPMENT OF PACIFIC WHITE SHRIMP

Litopenaeus vannamei Boone, 1931



Miss Praphaphorn Therdsutthironnapoom

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Programe in Marine Science

Department of Marine Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของโปรเจสเทอโรนที่เคลือบด้วยไคโตซานและมอลโทเดกซ์ทรีนต่อ
การพัฒนาไร้งไข่กุ้งขาวแวนนาไม *Litopenaeus vannamei* Boone,
1931

โดย

นางสาวประภาภรณ์ เทอดสุทธิธรมณี

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์ทางทะเล

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิตวิรกุล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ดร.อรพร หมื่นพล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท

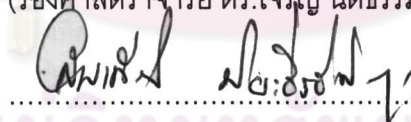


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ นารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



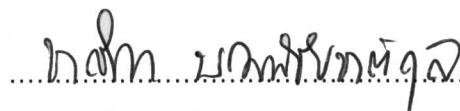
..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เจริญ นิตินรมยง)



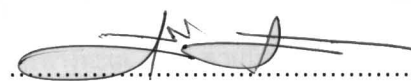
..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิตวิรกุล)



..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.อรพร หมื่นพล)



..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล)



..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณพ วิยกกาญจน์)

ประภากรณ์ เทอดสุทธิธรมภูมิ : ผลของโปรเจสเตอโรนที่เคลือบด้วยไคโตซานและมอลโทเดกซ์ทรินต่อการพัฒนารังไข่กุ้งขาวแวนนาไม *Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931. (EFFECTS OF PROGESTERONE IN CHITOSAN/MALTODEXTRIN MICROENCAPSULATION ON OVARIAN DEVELOPMENT OF PACIFIC WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) อ. ที่ปรึกษา :
 รศ.ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิตวิกรกุล, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร.อรพร หมั่นพล, 97 หน้า.

การเตรียมไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรินไมโครแคปซูลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เพื่อนำไปผสมลงในอาหารกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่ในแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ด้วยเทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอยพบว่า อัตราส่วนของไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรินที่เหมาะสมคือ 1:2 (v/v) เมื่อใช้อุณหภูมิเข้า 140 องศาเซลเซียส การเพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บกักฮอร์โมนโดยการเติม 0.1% Pentasodium tripolyphosphate (TPP) ส่งผลให้สามารถเก็บกักโปรเจสเตอโรน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพิ่มขึ้นเป็น $28.99 \pm 0.84\%$ อัตราการหลั่งของฮอร์โมนออกสู่ภายนอกสูงสุดที่ pH 5.5 ใน 1 ชั่วโมงแรก เท่ากับ $57.25 \pm 0.78\%$ และลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งคงที่ในชั่วโมงที่ 4

เมื่อนำไมโครแคปซูลที่ผลิตได้ไปผสมลงในอาหาร พบว่าแม่กุ้งขาวแวนนาไม ที่กินอาหารที่ประกอบด้วยฮอร์โมนเข้มข้น 2.2 mg P4/kg feed มีคุณภาพของการสืบพันธุ์ดีกว่าแม่กุ้งที่กินอาหารฮอร์โมนเข้มข้น 1.1 และ 3.3 mg P4/kg feed โดยนับจากความเร็วในการพัฒนาไข่และรังไข่ ความถี่ในการวางไข่ และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไข่ภายในเวลา 3 วันหลังตัดตา แม่กุ้งที่ได้รับอาหารฮอร์โมนเข้มข้น 2.2 mg P4/kg feed สามารถพัฒนาไข่และไข่ได้ 1 ครั้ง และมีแนวโน้มที่จะวางไข่ครั้งที่ 2 ในรอบการตัดตา 10 วัน จำนวนไข่ที่ได้ต่อน้ำหนักแม่กุ้ง เท่ากับ $1,357 \pm 450$ ฟอง/น้ำหนักตัว ขนาดของไข่ที่ได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มทดลองอื่น

เมื่อตรวจวัดปริมาณโปรเจสเตอโรนในเลือด พบว่าแปรผันตามปริมาณฮอร์โมนที่ผสมลงในอาหาร โดยปริมาณโปรเจสเตอโรนในเลือดสูงที่สุดในสัปดาห์แรกภายหลังจากได้รับอาหารทดลอง (0.77 ± 0.12 ng/ml) จากนั้นจะค่อย ๆ ลดต่ำลงจนกระทั่งคงที่ในสัปดาห์ที่ 4 (0.04 ± 0.02 ng/ml) เมื่อศึกษาปริมาณโปรเจสเตอโรนในแต่ละระยะการพัฒนาของรังไข่และไข่ ในแม่กุ้งควบคุม ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีระดับต่ำสุดที่รังไข่ระยะที่ 1 และจะค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นจนถึงระยะที่ 4 แต่ในแม่กุ้งทดลอง ฮอร์โมนขึ้นสูงในรังไข่ระยะแรก คาดว่าเนื่องมาจากการที่แม่กุ้งได้รับอาหารฮอร์โมนต่อเนื่องมาเป็นระยะเวลา 1 เดือน จากนั้นระดับฮอร์โมนในเลือด จะลดต่ำลงในรังไข่ระยะที่ 2 และ 3 และกลับสูงขึ้นอีกในรังไข่ระยะที่ 4

หลักสูตร.....วิทยาศาสตร์ทางทะเล.....ลายมือชื่อนิสิต.....*John Doms*
 สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์ทางทะเล.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*สมเกียรติ ปิยะธีรธิตวิกรกุล*
 ปีการศึกษา.....2550.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*อรพร หมั่นพล*

4872356123: MAJOR MARINE SCIENCE

KEY WORD: MICROENCAPSULATION/ SPRAY DRY/ PROGESTERONE/ SHRIMP/
OVARIAN DEVELOPMENT

PRAPHAPHORN THERDSUTTHIRONNAPOOM : EFFECTS OF PROGESTERONE IN
CHITOSAN/MALTODEXTRIN MICROENCAPSULATION ON OVARIAN DEVELOPMENT OF
PACIFIC WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. THESIS ADVISOR:
ASSOC. PROF. SOMKIAT PIYATIRATITIVORAKUL, Ph.D., THESIS
COADVISOR : ORAPORN MEUNPOL, Ph.D., 97 pp.

In this study, progesterone was encapsulated in chitosan and maltodextrin mixture by spray-drying technique. The optimal condition of chitosan/maltodextrin microencapsulating was as follows: chitosan:maltodextrin ratio at 1:2 (v/v) and inlet temperature at 140°C. At this condition the capsules could hold progesterone at a maximum concentration of 1mg/ml. To increase percentage of hormones bound to capsules, 0.1% Pentasodium tripolyphosphate (TPP) was used for cross-linking agent resulting in 28.99 ± 0.84% encapsulation efficiency. Encapsulated hormone was released rapidly in 1 hour after submersing in buffer solution at pH 5.5 (57.25 ± 0.78%). The rate of hormone release from chitosan:maltodextrin capsules was almost zero from 4th hours onward.

The hormone bound microcapsules was incorporated into semi-moist diet for *Litopenaeus vannamei* broodstock at 0.5, 1 and 2% inclusion rate. Based on ovarian maturation acceleration, spawning frequency and egg diameter, at 1%HBMD (2.2 mg P4/kg feed) was optimal to stimulate ovarian maturation of *L. vannamei*. Within 3 days of post ablation, 1%HBMD treatment group displayed signs of ovarian development which consecutively spawned twice in 10 days. Number and sizes of eggs produced were not different from other treatment significantly (1,357 ± 450 eggs/body weight).

Detected levels of haemolymphatic progesterone were related to progesterone concentrations in diets. Levels of progesterone reached its highest point on the first week (0.77 ± 0.12 ng/ml) after receiving hormone bound diets and rapidly declined until reached its basal level on the fourth week (0.04 ± 0.02 ng/ml). Progesterone concentration in shrimp haemolymph increased gradually toward ovarian maturation. However, in the treatment group, progesterone concentration in shrimp haemolymph was highest at stage 1 ovary and gradually declined at stage 2 and 3 ovary before increased to the maximal level again at stage 4 ovary. This might be a result from hormone accumulation in treated female shrimp before subjected to eyestalk ablation.

Department.....Marine Science..... Student's signature.....
Field of Study.....Marine Science..... Advisor's signature.....
Academic Year.....2007..... Co-Advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง การทำไมโครเอนแคปซูเลชันของ ฮอริโมนระบบสืบพันธุ์กึ่ง และการนำมาใช้เพื่อพัฒนาระบบสืบพันธุ์พ่อแม่พันธุ์กึ่งทะเล โดยดร.อรพร หมื่นพล ซึ่งได้รับทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2549 และได้ดำเนินการ จดสิทธิบัตร ตามคำขอเลขที่ 0701005839 เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรนิติวรกุล อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ และ ดร.อรพร หมื่นพล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและให้ ความช่วยเหลือข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เจริญ นิตินทรมยง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณพ วิทยาภรณ์ และอาจารย์ ดร.ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และ ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ มณีวรรณ กมลพัฒนะ คุณวรรณวิภา สุทธิไกร คุณราตรี จินตนา และเจ้าหน้าที่โครงการใช้นิวเคลียร์เพื่อส่งเสริมกิจการผสมเทียมโคนมและกระบือปลัก คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คุณอิสเรศ สิทธิมงคลชัย และเจ้าหน้าที่ เฟิร์สฟาร์ม ที่ให้คำแนะนำและเอื้อเฟื้อเครื่องมือ รวมทั้งสถานที่ในการทดลอง

ขอขอบคุณ คุณชนัดดา เกษมโชติช่วง คุณฝารีนา เก็นตาสา เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ที่ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยเหลือใน การทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา คุณพรเพ็ญ พรรณราย และสมาชิกในครอบครัวของข้าพเจ้า ทุกคน สำหรับคำปรึกษาที่ดี ตลอดจนกำลังใจและความห่วงใยให้กับข้าพเจ้า ทำให้วิทยานิพนธ์ครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
- ปัจจัยที่ส่งผลต่อการพัฒนาการสืบพันธุ์กึ่ง.....	4
- สิ่งแวดล้อม.....	4
- พันธุศาสตร์.....	5
- คุณค่าทางโภชนาการ.....	6
- ฮอโมน.....	8
- การพัฒนาระบบสืบพันธุ์.....	12
- ไมโครเอนแคปซูล.....	13
- ชนิดของไมโครแคปซูล.....	14
- เทคนิคการผลิตไมโครแคปซูล.....	15
- วัสดุที่ใช้ในการผลิตแคปซูล.....	16
3 วิธีดำเนินงานวิจัย	
- การเตรียม Hormone bound microcapsules (HBM).....	18
- การทดสอบวัสดุที่นำมาผลิตเป็นผนังเคลือบไมโครแคปซูลเพื่อเก็บกักฮอโมน โปรเจสเตอโรน.....	18
- ผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการเก็บกักฮอโมนโปรเจสเตอโรนของไมโครแคปซูล	20
- การวิเคราะห์ปริมาณโปรเจสเตอโรนสูงสุดที่ไมโครแคปซูลสามารถเก็บกักไว้ภายใน ไมโครแคปซูล.....	21

บทที่	หน้า
- ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Pentasodium tripolyphosphate (TPP) (cross-linking agent) ต่อความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของไมโครแคปซูล.....	23
- ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรินต่อความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน.....	25
- การทดสอบคุณสมบัติของ Hormone bound microencapsulation (HBM).....	27
- การศึกษาผลของ Hormone bound microcapsulated diet (HBMD) ต่อการเจริญของระบบสืบพันธุ์กึ่งชาวแวนนาไม.....	31
- การทดสอบผลของอาหารเสริมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนต่อการพัฒนารังไข่กึ่งชาวแวนนาไม.....	32
4 ผลการทดลอง	
- ไมโครแคปซูลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่เคลือบด้วยไคโตซานและมอลโทเดกซ์ทรินโดยเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย.....	38
- คุณสมบัติวัสดุที่นำมาผลิตเป็นผนังเคลือบไมโครแคปซูลเพื่อเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน.....	38
- ผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของไมโครแคปซูล	40
- ปริมาณโปรเจสเตอโรนสูงสุดที่ไมโครแคปซูลสามารถเก็บกักไว้ภายในไมโครแคปซูล.....	41
- ผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Pentasodium tripolyphosphate (TPP) (cross-linking agent) ต่อความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของไมโครแคปซูล.....	43
- อัตราส่วนที่เหมาะสมของไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรินต่อความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน.....	45
- คุณสมบัติของ Hormone bound microencapsulation (HBM).....	46
- ความสามารถในการปลดปล่อยของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่บรรจุอยู่ภายในไมโครแคปซูลออกสู่ภายนอก.....	46
- ลักษณะทางกายภาพของไมโครแคปซูล.....	48

บทที่	หน้า
- ผลของ Hormone bound microcapsulated diet (HBMD) ต่อการเจริญของระบบ สืบพันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม.....	50
- วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารผสมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน.....	50
- การเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดกึ่งภายหลังได้รับอาหารทดลอง.....	51
- ผลของอาหารเสริมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนต่อการพัฒนารังไข่กึ่งขาวแวนนาไม หลังจาก ให้อาหารทดลองนาน 1 เดือน แล้วตัดตา.....	53
- การพัฒนารังไข่แม่พันธุ์กึ่ง (Reproductive performance).....	53
- การพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม.....	53
- จำนวนครั้งในการวางไข่ของแม่พันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม.....	55
- ความดกไข่ที่พบในแม่พันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม.....	56
- ขนาดของไข่ที่ได้จากแม่พันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม.....	57
- ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดกับการพัฒนารังไข่.....	58
5 วิจัยกรณีผลการทดลอง.....	60
สรุปผลการวิจัย.....	66
ข้อเสนอแนะ.....	67
รายการอ้างอิง.....	68
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	86
ภาคผนวก ข.....	94
ภาคผนวก ค.....	95
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	97

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 องค์ประกอบของอาหารแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม.....	31
4.1 คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง.....	50



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
3.1	การผลิตไมโครแคปซูลเพื่อเก็บกักฮอริโมนโปรเจสเตอโรน..... 19
3.2	ขั้นตอนการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการเก็บกักฮอริโมนโปรเจสเตอโรน ของไมโครแคปซูล..... 21
3.3	ขั้นตอนการทดลองเพื่อศึกษาระดับโปรเจสเตอโรนสูงสุดที่ไมโครแคปซูลสามารถเก็บกักไว้ ภายในไมโครแคปซูล..... 22
3.4	ขั้นตอนการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Pentasodium tripolyphosphate (TPP) (cross-linking agent) ต่อความสามารถในการเก็บกักฮอริโมนโปรเจสเตอโรนของ ไมโครแคปซูล..... 24
3.5	ขั้นตอนการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของโคโคซาน:มอลโทเดกซ์ทรินต่อความสามารถ ในการเก็บกักฮอริโมนโปรเจสเตอโรน..... 26
3.6	ขั้นตอนการวัดประสิทธิภาพของการตรึงฮอริโมนในเม็ดแคปซูล..... 28
3.7	ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการปลดปล่อยของฮอริโมนโปรเจสเตอโรนที่บรรจุอยู่ ภายในไมโครแคปซูลออกสู่ภายนอก (Controlled release)..... 30
3.8	ลักษณะปอที่ใช้ในการทดลองเลี้ยง..... 33
3.9	การวัดผลของอาหารเสริมฮอริโมนโปรเจสเตอโรนต่อการพัฒนารังไข่แม่พันธุ์กึ่งขาว แวนนาไม..... 37
4.1	ผลของวัสดุที่นำมาผลิตเป็นผนังเคลือบไมโครแคปซูลต่อความสามารถในการเก็บกัก ฮอริโมนโปรเจสเตอโรนภายในไมโครแคปซูล..... 38
4.2	ผลของวัสดุที่นำมาผลิตเป็นผนังเคลือบไมโครแคปซูลต่อความชื้นของไมโครแคปซูล..... 39
4.3	ผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อความสามารถในการเก็บกักฮอริโมนโปรเจสเตอโรนภายใน ไมโครแคปซูล..... 40
4.4	ผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อความชื้นของไมโครแคปซูล..... 41
4.5	ผลของปริมาณฮอริโมนโปรเจสเตอโรนที่แตกต่างกันต่อความสามารถในการเก็บกัก ฮอริโมนโปรเจสเตอโรนภายในไมโครแคปซูล..... 42
4.6	ผลของปริมาณฮอริโมนโปรเจสเตอโรนที่แตกต่างกันต่อความชื้นของไมโครแคปซูล..... 43

รูปที่	หน้า
4.7 ผลของความเข้มข้น TPP ที่แตกต่างกันต่อความสามารถในการเก็บกักฮอริโมน โปรเจสเตอโรนภายในไมโครแคปซูล.....	44
4.8 ผลของความเข้มข้น TPP ที่แตกต่างกันต่อความชื้นของไมโครแคปซูล.....	44
4.9 อัตราส่วนที่ต่างกันของโคโคซาน:มอลโทเดกซ์ทรีนต่อความสามารถในการเก็บกัก ฮอริโมนโปรเจสเตอโรนภายในไมโครแคปซูล.....	45
4.10 ผลของอัตราส่วนที่ต่างกันของโคโคซาน:มอลโทเดกซ์ทรีนต่อความชื้นของ ไมโครแคปซูล.....	46
4.11 อัตราการปลดปล่อยฮอริโมนโปรเจสเตอโรนของไมโครแคปซูล ในสารละลาย PBS ซึ่ง มี pH ต่างกัน ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ.....	47
4.12 การปลดปล่อยฮอริโมนโปรเจสเตอโรนจากไมโครแคปซูลสู่สารละลาย PBS แบบสะสม ณ pH ที่แตกต่างกันเมื่อครบ 10 ชั่วโมง.....	47
4.13 ลักษณะผงโคโคซาน:มอลโทเดกซ์ทรีนไมโครแคปซูล เมื่อมองด้วยตาเปล่า.....	48
4.14 ลักษณะทางกายภาพของเม็ดแคปซูลที่ผลิตจากอัตราส่วนที่ต่างกันของโคโคซาน และมอลโทเดกซ์ทรีน (ก) 1C:1M (ข) 1C:2M (ค) 2C:1M ได้กลัองจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 250 เท่า.....	48
4.15 ขนาดของไมโครแคปซูลที่ห่อหุ้มฮอริโมนโปรเจสเตอโรน ผลิตด้วยเทคนิคการทำแห้ง แบบพ่นฝอย จากอัตราส่วนระหว่างโคโคซาน:มอลโทเดกซ์ทรีนที่ต่างกัน.....	49
4.16 ลักษณะทางกายภาพของอาหารเม็ดทดลองที่ผสมฮอริโมนโปรเจสเตอโรน.....	50
4.17 ความเข้มข้นของฮอริโมนโปรเจสเตอโรนในเลือดของแม่พันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม ในแต่ละ สัปดาห์ภายหลังจากได้รับอาหารทดลอง จนครบ 4 สัปดาห์.....	52
4.18 การพัฒนารังไข่ที่พบครั้งแรกของแม่พันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม ภายในระยะเวลา 10 วัน หลังการตัดก้านตา.....	54
4.19 จำนวนแม่กึ่งที่วางไข่ 1 ครั้ง หลังได้รับอาหารแตกต่างกัน.....	55
4.20 ความตกไข่ที่พบในแม่พันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารแตกต่างกันและออกไข่ 1 ครั้ง	56
4.21 ขนาดของไข่ที่พบในแม่พันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารแตกต่างกันและออกไข่ 1 ครั้ง	57
4.22 ความเข้มข้นของฮอริโมนโปรเจสเตอโรนในเลือดของแม่พันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม ในแต่ละ ระยะการพัฒนา ภายหลังจากได้รับอาหารทดลอง จนครบ 4 สัปดาห์ แล้วตัดตา.....	59

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

ฮอริโมนเป็นปัจจัยควบคุมกระบวนการสร้างและสะสมอาหาร ตลอดจนการพัฒนารังไข่และไข่ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียรวมทั้งกุ้ง (Subramoniam, 2000) โดยทั่วไปนิยมใช้ การตัดก้านตา เพื่อทำลายฮอริโมนที่ยับยั้งการสร้างรังไข่ ส่งผลให้แม่งุ้งวางไข่ได้เร็วขึ้น แต่คุณภาพของไข่และอัตราการรอดของแม่พันธุ์กุ้งกลับลดลง (ชูศักดิ์ แสงธรรม, 2541) การผสมฮอริโมนในอาหารเม็ดสำเร็จรูป เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อทดแทนการตัดตา แต่ปัญหาของอาหารที่ผสมฮอริโมน คือ ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายฮอริโมนไปยังร่างกายของสัตว์น้ำ ซึ่งอาจสูญเสียไปโดย พฤติกรรมการกินของสัตว์น้ำหรือการละลายน้ำของอาหาร (Yúfera et al., 2003)

ไมโครเอนแคปซูลชัน (microencapsulation) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเคลือบหรือห่อหุ้มของแข็งที่มีอนุภาคขนาดเล็ก หยดน้ำหรือแก๊สที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อป้องกันการปลดปล่อยของสารภายในออกสู่ภายนอก (Schrooyen et al., 2001) การทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer) เป็นเทคนิคในการทำไมโครเอนแคปซูลชันวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการเก็บกักกลิ่นและสารระเหยเร็ว (Deis, 1997) เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ปฏิบัติง่าย และราคาถูก รวมทั้งมีประสิทธิภาพสูงในการเก็บกักกลิ่นหรือสารขนาดเล็กไว้ภายในไมโครแคปซูล (Reineccius, 1989) ส่วนใหญ่สารที่นำมาเป็นผนังห่อหุมนั้น ได้แก่ พอลิเมอร์ที่สามารถเก็บกักสารให้คงอยู่ภายในได้ (Wong, 1998)

โคโตซานเป็นพอลิเมอร์ทางชีวภาพ เป็นองค์ประกอบของเปลือกสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย มีคุณสมบัติที่ดีคือ ไม่มีพิษ ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (Senal and McClure, 2004) การใช้โคโตซานเป็นแคปซูลนั้นประกอบด้วยกระบวนการ cross-linking เพื่อให้เม็ดแคปซูลคงรูปและเพิ่มประสิทธิภาพในการกักเก็บสารไว้ภายใน (He et al., 1999) แต่สารที่ใช้ในกระบวนการ cross-linking นั้นส่วนใหญ่เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง เช่น ฟอรัลดีไฮด์ กลูตารัลดีไฮด์ จึงมีการพิจารณาใช้สารที่ไม่เป็นพิษมาทดแทน ได้แก่ มอลโทเดกซ์ทริน

มอลโทเดกซ์ทริน เป็นแป้งดัดแปรชนิดหนึ่ง มีความหนืดสูง นิยมนำมาใช้ในการห่อหุ้มสารอาหารขนาดเล็กหรือกลิ่น (Agnihotri et al., 2004) แต่ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาถึงการนำ

โคโคซานผสมกัมมอลโทเดกซ์ทรินเพื่อทำเป็นแคปซูล โดยเฉพาะการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างพอลิเมอร์ทางชีวภาพทั้ง 2 ตัว ในการขึ้นรูปแคปซูลและการเก็บกักสารที่ต้องการไว้ภายใน ฮอริโมนโปรเจสเทอโรนเป็นสารที่เลือกใช้บรรจุภายในแคปซูล เนื่องจากฮอริโมนโปรเจสเทอโรนมีความสำคัญต่อการพัฒนาไข่กึ่งกลาดำ ทำให้เกิดขบวนการสร้างและสะสมไข่แดงจนกระทั่งการตกไข่ (เสาวลักษณ์ เขียมไผ่, 2548) การศึกษาในครั้งนี้จึงศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการกระตุ้นการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยอาหารสำเร็จรูปซึ่งผสมแคปซูลฮอริโมนโปรเจสเทอโรนสังเคราะห์กักเก็บในโคโคซาน/มอลโทเดกซ์ทริน ด้วยเทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอยเพื่อผลิตอาหารสำเร็จรูปซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการที่ดีและสามารถกระตุ้นการพัฒนารังไข่และไข่ในแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

วัตถุประสงค์

ศึกษาการพัฒนารังไข่ในแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมแคปซูลฮอริโมนโปรเจสเทอโรนที่ทำจากโคโคซานผสมมอลโทเดกซ์ทริน ด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ช่วยกระตุ้นการพัฒนารังไข่แม่พันธุ์กุ้งทะเล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลจำเป็นต้องมีพ่อ-แม่พันธุ์ที่มีคุณภาพ เพื่อให้ได้ผลผลิตที่ดีและเพียงพอต่อความต้องการ กระบวนการสืบพันธุ์ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับผลผลิตถูกควบคุมโดยปัจจัยทางด้านฮอร์โมน เช่น ขนาดของพ่อ-แม่พันธุ์ (Tsukimura and Kamemoto, 1991) และปัจจัยทางกายภาพ เช่น ความเข้มของแสง คุณภาพของแสง อุณหภูมิ และอาหารที่พ่อ-แม่พันธุ์ได้รับ (Emmerson, 1980)

อาหารสำหรับพ่อ-แม่พันธุ์ของสัตว์ เป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยในการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ ความดกไข่ การฟักและอัตราการรอดของตัวอ่อน ดำเนินไปอย่างสมบูรณ์ (Watanabe, 1988) อาหารสำหรับพ่อ-แม่พันธุ์อาจจำแนกเป็น อาหารธรรมชาติ หรืออาหารเม็ดสำเร็จรูปแบบแห้งและแบบกึ่งเปียก (Bray et al., 1990) เกษตรกรนิยมใช้ เพรียงทราย (*Perinereis* sp.) เนื่องจากมีองค์ประกอบที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ของกุ้ง (Gomez and Arellano, 1987) อุดมไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (โอเมก้า 3 และโอเมก้า 6) ช่วยให้เกิดการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์จนสมบูรณ์ได้ (Lytle et al., 1990) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยฮอร์โมนพอสตาแกรนดิน อีทู (PGE2) (เอกชัย ดวงใจ, 2548) และฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (P4 และ 17 α - OHP4) (เสาวลักษณ์ เขียมไม้, 2548) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการพัฒนารังไข่จนกระทั่งเกิดการตกไข่ แต่ข้อเสียของเพรียงทราย หรืออาหารธรรมชาติ คือ ราคาสูง ปริมาณและคุณค่าทางอาหารที่ไม่คงที่ ไม่สามารถปรับปรุงหรือพัฒนาคุณภาพได้ ทำให้น้ำในบ่อเลี้ยงสกปรก รวมทั้งอาจเป็นตัวนำพาเชื้อโรคและไวรัสมาสู่พ่อ-แม่พันธุ์ได้ (Harrison, 1997)

อาหารสำเร็จรูปเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อแก้ปัญหาของอาหารธรรมชาติ เนื่องจากมีราคา ปริมาณและคุณค่าทางอาหารที่คงที่ เก็บไว้ได้นาน สะดวกในการใช้งาน ไม่ต้องเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อโรคจากอาหารลงสู่บ่อเลี้ยง รวมทั้งง่ายในการเติมสารอาหารที่สำคัญ เช่น ฮอร์โมนหรือยาลงในอาหารสำเร็จรูปเพื่อเพิ่มคุณค่าของอาหาร (Wouters, 2002)

2.1 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการพัฒนาการสืบพันธุ์กุ้ง

2.1.1 สิ่งแวดล้อม

ปัจจัยแวดล้อมมีอิทธิพลต่อคุณภาพของผลผลิตซึ่งได้จากพ่อแม่พันธุ์กุ้งจากธรรมชาติ (Chow and Sandifer, 1991) ปัจจัยแวดล้อมที่ส่งผลต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์กุ้งประกอบไปด้วยหลายปัจจัย ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.1.1.1 อุณหภูมิ อุณหภูมิมีอิทธิพลสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ เช่น ความถี่ในการลอกคราบ การเปลี่ยนอาหารให้เป็นพลังงาน รวมทั้งการสืบพันธุ์ (O'Brien, 1994) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการพัฒนาสเปิร์มในกุ้งขาวแวนนาไม คือ 26 องศาเซลเซียส และถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 29 และ 32 องศาเซลเซียส จะพบสเปิร์มที่ผิดปกติ 99.7% และตาย ตามลำดับ (Perez-Velazquez, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของกุ้งที่แตกต่างกันอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสืบพันธุ์มักแตกต่างกันตามไปด้วย ในกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis*) อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่ออัตราการพัฒนาตัวอ่อนและคุณภาพของการฟัก และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 23 องศาเซลเซียส เป็น 27 องศาเซลเซียส สามารถปรับปรุงความสามารถในการฟักตัวอ่อนของกุ้งแชบ๊วยให้เพิ่มขึ้นได้ (Hoang et al., 2002)

2.1.1.2 ความเค็มน้ำ ความเค็มที่เหมาะสมต่อการอยู่อาศัยของกุ้งขาวแวนนาไม คือ 15-25 ppt (Ponce-Palafor et al., 1997) ได้มีการทดสอบผลของการถ่ายโอนน้ำเชื้อในกุ้งกุลาดำเพศผู้ (*P. monodon*) ไปยังกุ้งกุลาดำเพศเมีย ในสภาวะที่มีความเค็มสูง (52 ppt) Bray et al. (1998) กล่าวว่า ถึงแม้จะถ่ายโอนน้ำเชื้อได้แต่เพศเมียไม่สามารถเกิดการพัฒนารังไข่ได้ ยกเว้นในกรณีที่เพศเมียถูกตัดก้านตา จึงสามารถเกิดการพัฒนารังไข่ได้

2.1.1.3 แสง เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการกินอาหาร การสืบพันธุ์และการการเจริญเติบโตของกุ้งวัยอ่อน (Giri et al., 2002) ส่วนใหญ่แล้วกุ้งสามารถพัฒนาระบบสืบพันธุ์และฟักเป็นตัวอ่อนในที่มืดได้ดีกว่าในบริเวณที่มีแสง ทั้งกุ้ง *P. stylirostris* (Chamberlain and Lawrence, 1981) และกุ้งแชบ๊วย ที่พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มแสงมากขึ้นยังส่งผลให้แนวโน้มความดกไข่เพิ่มขึ้น (Hoang et al., 2002)

2.1.1.4 ความหนาแน่นในการเลี้ยง ความหนาแน่นในการเลี้ยงที่แตกต่างกัน

ส่งผลต่ออัตราการฟักตัวอ่อนที่แตกต่างกัน จากการศึกษาของ Coman et al. (2007) พบว่ากึ่งซึ่งเลี้ยงที่ความหนาแน่นต่ำ (1 ตัว/ตร.ม.) มีอัตราการฟักตัวอ่อนดีกว่าความหนาแน่นสูง (3 ตัว/ตร.ม.) แต่คุณภาพของตัวอ่อนที่ฟักออกมารวมทั้งน้ำหนักของ spermatophore ในกึ่งซึ่งเลี้ยงทั้ง 2 ความหนาแน่นไม่แตกต่างกัน

2.1.2 พันธุกรรม

เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมได้ถูกประยุกต์ใช้กับการเพาะเลี้ยงกึ่งทะเลในปัจจุบัน เพื่อควบคุมการสืบพันธุ์ พัฒนาสายพันธุ์รวมทั้งควบคุมโรค (Hedgecock and Malecha, 1991) ได้มีความพยายามค้นคว้าจนสามารถระบุได้ว่า พันธุกรรมเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อผลผลิตที่ได้ นอกเหนือจากปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ (Benzie et al., 1997, Arcos et al., 2004)

การพัฒนาและการประยุกต์ใช้โปรแกรมการคัดเลือกพันธุ์ทางพันธุวิศวกรรมที่เหมาะสม ส่งผลให้ประสิทธิภาพของผลผลิตดีขึ้นได้ (Gitterle et al., 2005) การคัดเลือกแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพและหลากหลายจัดเป็นโปรแกรมการคัดเลือกพันธุ์วิธีการหนึ่ง เพื่อป้องกันการผสมสายเลือดชิด (Inbreeding) ซึ่งเกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างพี่น้อง หรือสายเครือญาติ ซึ่งอาจส่งผลให้ผลผลิตที่ได้มีความดกไข่และอัตราการรอดต่ำ (Camara, Evans and Langdon, 2007) การคัดเลือกผลผลิตซึ่งได้โดยการคัดการณ้ไว้ล่วงหน้า จากลักษณะของพ่อ-แม่พันธุ์ที่กำหนดไว้ ถือได้ว่าเป็นเครื่องมือที่สามารถเพิ่มผลผลิตได้อีกวิธีการหนึ่ง จากการศึกษาของ Wyban and Sweeney (1991) ในกรณีที่เพิ่มความหลากหลายของเพศเมียจาก 10% เป็น 26% พบว่าผลผลิตที่ได้เพิ่มขึ้นจาก 50% เป็น 75% สอดคล้องกับการศึกษาของ Sbordoni et al. (1987) ที่พบว่าเมื่อลดความหลากหลายทางพันธุกรรมลง ส่งผลให้การผสมสายเลือดชิดเกิดได้มากขึ้น

2.1.3 คุณค่าทางโภชนาการ

2.1.3.1 ไขมัน

ไขมันเป็นสารตั้งต้นของสเตียรอยด์ฮอร์โมนซึ่งมีความสำคัญต่อการพัฒนารังไข่ (Gong et al., 2000) รวมทั้งสังเคราะห์เนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ (Teshima and Kanazawa, 1983) ภายหลังจากที่เกิดการสะสมของไขมันในร่างกายแล้วไขมันจะถูกเปลี่ยนโดยตับอ่อน แล้วส่งผ่านเลือดไปสะสมในรังไข่ (Teshima et al., 1988) รังไข่ที่เจริญเต็มที่แล้วมีองค์ประกอบของไขมันมากถึง 10%/น้ำหนักแห้งเพศเมีย (Bray et al., 1990) โดยทั่วไปแล้วความต้องการไขมันของกุ้งจะอยู่ระหว่าง 6-7.5% สูงสุดอยู่ที่ระดับ 10% (Akiyama, 1991) แต่ที่ระดับไขมันรวมมากกว่า 9% Wouters et al (2001) กลับพบว่าเป็นอุปสรรคต่อการฟักตัวอ่อนในกุ้งขาวแวนนาไม กุ้งทะเลไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงทั้งกรดไลโนลิค (LOA) และกรดไลโนลินิค (LNA) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ในร่างกายได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเสริมกรดไขมันลงในอาหารของกุ้ง (Kanazawa, 1979)

2.1.3.2 โปรตีน

อาหารสำเร็จรูปสำหรับสัตว์น้ำมักประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 50% (Harrison, 1990) โดยกุ้งมีความต้องการโปรตีนในระยะเจริญพันธุ์และสืบพันธุ์สูงกว่าระยะที่ไม่มีการสืบพันธุ์ จากการศึกษาของ Goimier et al. (2006) พบว่า ปริมาณโปรตีน 45% เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการสืบพันธุ์ในกุ้ง *L. setiferus* เพศผู้ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณโปรตีนในอาหารที่แตกต่างกันส่งผลต่อความสามารถในการฟักตัวอ่อนของสัตว์น้ำ จากการศึกษาของ El-Sayed et al. (2003) พบว่า หากระดับโปรตีนในอาหารเพิ่มสูงขึ้น ความถี่ในการฟักตัวอ่อนและจำนวนไข่ที่ได้จากปลาไนล (*Oreochromis niloticus*) จะเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย แต่ปริมาณโปรตีน 40% ส่งผลให้ความดกไข่ของปลาไนลสูงที่สุด

2.1.3.3 คาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรตนิยมใช้เป็นตัวแทนในอาหารเม็ด คาร์โบไฮเดรตประเภทน้ำตาลเชิงซ้อนและพอลิแซคคาไรด์มีประสิทธิภาพดีกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Deshimaru and Yone, 1978) แต่ไม่พบว่ามีส่วนสำคัญที่ช่วยในเรื่องการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ในกุ้ง (Wouters et al., 2001)

2.1.3.4 คาโรทีนอยด์

ขณะเกิด secondary vitellogenesis จะมีการลำเลียงคาโรทีนอยด์อิสระและ esterified carotenoids ซึ่งได้รับจากอาหาร ผ่านเลือดไปสะสมในตับอ่อน (Vincent et al., 1988) ส่งผลให้สีของรังไข่เข้มขึ้นตามระยะการพัฒนารังไข่ และสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ระยะการพัฒนารังไข่เบื้องต้นได้ (Jeckel et al., 1989) ปริมาณคาโรทีนอยด์ที่พบตลอดการพัฒนารังไข่อยู่ที่ 90 ส่วนในล้านส่วน หลังจากที่กึ่งดูดซึมคาโรทีนอยด์แล้วจะถูกเปลี่ยนเป็นแอสตาแซนทินซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ วิตามิน เอ ในร่างกาย (Dall et al., 1995)

2.1.3.5 วิตามิน

วิตามินที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของกึ่ง ประกอบไปด้วย วิตามินเอ (หรือ β -carotene), วิตามินดี และวิตามินอี (He et al., 1992) จากการศึกษาของ Yano (1993) พบว่า อาหารเม็ดที่ผสมวิตามิน ซี ร่วมกับน้ำมันปลา เหนียวทำให้กึ่งกุลาดำเพศเมียสามารถพัฒนาระบบสืบพันธุ์จนเจริญเต็มที่และฟักเป็นตัวอ่อนได้ในที่สุด และในกรณีที่เพิ่มปริมาณวิตามิน ซี ในอาหารให้สูงขึ้น ส่งผลให้อัตราการฟักของ *Fenneropenaeus indicus* สูงขึ้น แต่พบว่าปริมาณวิตามิน ซี ที่เหมาะสมสำหรับกึ่ง คือ 100 มิลลิกรัม/1 กิโลกรัม อาหาร (D'Abramo and Conklin, 1995) ส่วนปริมาณวิตามิน อี 500 มิลลิกรัม/1 กิโลกรัม อาหาร สามารถปรับปรุงสเปิร์มและการพัฒนารังไข่ใน *L. setiferus* ได้ดี (Chamberlain, 1988) แต่ในกรณีที่ระดับของวิตามิน อี หรือวิตามิน ซี สูงเกินไป กลับมีผลยับยั้งกรดไอโคซะเพนทาอีนอิก (eicosapentaenoic acid ;EPA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน ที่มีความสำคัญต่อการสืบพันธุ์ของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Herman, 1990)

2.1.3.6 แร่ธาตุ

แร่ธาตุบางส่วนกึ่งจะได้รับจากการแลกเปลี่ยนแร่ธาตุภายในน้ำผ่านทางเหงือกหรือจากการย่อยและดูดซึมจากกระเพาะอาหาร (Shiau, 1998) ดังนั้น ปริมาณแร่ธาตุที่แนะนำให้ผสมในอาหาร อยู่ระหว่าง 1.2% - 5.1%/ 592 มิลลิกรัม/1 กิโลกรัม อาหาร (National Research Council, 1983)

โดยปริมาณ 0.35% ฟอสฟอรัส เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของกึ่ง โดยปริมาณ 1% หรือ 2% แคลเซียม 1 – 2% ฟอสฟอรัส และ 0.0032% ทองแดง เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตสำหรับกึ่งขาว (Davis et al., 1993)

ส่วนปริมาณสังกะสี ≥ 35 มิลลิกรัม/1 กิโลกรัม อาหาร ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ ได้ดีกว่าที่ระดับ ≤ 17 มิลลิกรัม/1 กิโลกรัม อาหาร และปริมาณ สังกะสี 35-48 มิลลิกรัม/1 กิโลกรัม อาหาร เป็นปริมาณที่เพียงพอต่อการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ (Shiau and Jiang, 2006)

2.1.4 ฮอริโมน

การทำงานร่วมของฮอริโมนส่งผลต่อกระบวนการต่าง ๆ ภายในร่างกาย เช่น การลอกคราบ, เมทาบอลิซึม, ปริมาณสารสี รวมทั้งการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ในกุ้ง ก้านตาของครัสเตเชียนเป็นศูนย์กลางในการควบคุมระบบต่าง ๆ ของร่างกาย รวมทั้งระบบสืบพันธุ์ (Quackenbush, 1986) การตัดก้านตาเป็นการกำจัด gonad inhibiting hormone (GIH) ที่สร้างจาก X-organ sinus glang complex บริเวณก้านตา (Panouse, 1943) ทำหน้าที่ควบคุมการนำ vitellogenin จากเลือดมาใช้ใน ระยะ secondary vitellogenesis (Charniaux-Cotton and Payen, 1988) และยับยั้งทำงานของฮอริโมนบางชนิดที่มีส่วนในการกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่ ดังนั้น การตัดก้านตาส่งผลให้การทำงานของฮอริโมนที่กระตุ้นการพัฒนาของรังไข่ทำงานได้อย่างเต็มที่ แต่จากการศึกษาของ Benzie, 1998 พบว่าคุณภาพของไข่และอัตราการรอดของแม่พันธุ์ลดต่ำลง ฮอริโมนที่ควบคุมการทำงานในระบบสืบพันธุ์ของครัสเตเชียนสามารถจำแนกเป็นกลุ่ม ๆ ได้ ดังนี้

1) Peptide hormones

1.1 Vitellogenesis inhibiting Hormones (VIH) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Gonad Inhibiting Hormones (GIH) (Adiyodi, 1985) สร้างมาจาก x-organ-sinus gland complex (Wang et al., 2000; Okumura, 2004) ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ ซึ่งสามารถพบได้ทั้งเพศผู้และเพศเมีย (Wilder et al., 2002) รวมทั้งยับยั้งกระบวนการ vitellogenesis ในครัสเตเชียน (Tsutsui et al., 2005)

1.2 Vitellogenesis Stimulating Hormones (VSH) หรือ Vitellogenesis-activating neurohormone (VAH) การทำงานนั้นพบเป็นวัฏจักรประจำปี VSH จะเริ่มหลังเมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์และจะหยุดหลังเมื่อระดับของ VIH เพิ่มขึ้น (Eastman-Reks and Fingerman, 1984) ในปู *Potamon dehaani*, *Peratelpusa hydrodromous* ฮอริโมน VSH ถูกสร้างมาจาก thoracic ganglion สามารถพบได้ในเพศเมียซึ่งเจริญเติบโตเต็มที่ไปจนถึงระยะกำลังเจริญเติบโต และพบอยู่ในไข่แดงของ *Libia*

emarginata (Otsu, 1963) ส่วนในกึ่ง *Paratya compressa* นั้นพบว่า VSH สร้างมาจากสมองและ thoracic ganglion ทำหน้าที่กระตุ้นการพัฒนารังไข่ (Takayanagi et al., 1986)

1.3 Crustacean Hyperglycemic Hormones (CHH) เป็นฮอร์โมนประเภทเปปไทด์ที่พบมากในก้านตาของครัสเตเชีย สร้างมาจาก x-organ-sinus gland complex (Wang et al., 2000; Okumura, 2004) ส่วนใหญ่แล้วประกอบด้วยกรดอะมิโน 72-78 ตัว มีซิสเทอีน 6 ตัว รวมกับพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ เป็นองค์ประกอบ (Tsutsui et al., 2005) ทำหน้าที่ควบคุมระดับกลูโคสในเลือด การสังเคราะห์ ecdysteroid และการพัฒนารังไข่ (Udomkit, 2004)

1.4 Molt Inhibiting Hormones (MIH) สร้างและหลั่งมาจาก X-organ sinus gland complex (Soumoff, 1982) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 8,400 Da ละลายน้ำได้, คงตัวในความร้อนและสามารถแพร่จากก้านตาได้ (Lui et al., 1997) ทำหน้าที่ยับยั้งต่อมแมนดิเบล ไม่ให้สร้างและหลั่ง Methyl farnesoate (MF) (Udomkit, 2004)

1.5 Androgenic gland hormones (AGH) สร้างจากต่อมแอนโดรจีนิก ทำหน้าที่เป็นปัจจัยในการพิจารณาเพศ ควบคุมลักษณะความแตกต่างในเพศผู้ และการพัฒนาลักษณะของเพศเมีย (Minagawa et al., 1994)

2) Ecdysteroid จัดอยู่ในกลุ่มของ polyhydroxylated ketosteroids พบเป็นสารตั้งต้นของฮอร์โมนในการลอกคราบของอาร์โทพอดทุกชนิด (Bückmann, 1989) ในครัสเตเชีย ecdysteroids ถูกสังเคราะห์มาจาก ecdysial gland หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Y-organ (Subramoniam, 2000) โดย Y-organ จะหลั่ง ecdysone ไปยังเลือดแล้วถูกเปลี่ยนเป็น 20 hydroxyecdysone (20E; crustecdysone, ecdysterone) โดย peripheral tissues (Goodwin, 1978, Okumura, 2004) ecdysteroid จะแปรผันตามการลอกคราบ โดยจะพบคงที่ในระยะ intermolt และพบน้อยที่สุดในระยะ premolt (Huberman, 2000)

3) Steroid hormones

3.1 Progesterone สร้างมาจากเลือด รังไข่ ตับและตับอ่อน ในระยะสืบพันธุ์และระยะลอกคราบ ปริมาณของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) จะพบสูงสุดในช่วง intermolt และจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง pre/postmolt โดยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีบทบาทต่อการพัฒนาในระยะ post-vitellogenic meiotic ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Gunamalai et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีผลไปยัง serotonin ไม่ให้กระตุ้นการฟักตัวในหอยเชลล์, *Placopecten magellanicus* (Wang and Croll, 2006) สามารถเหนี่ยวนำให้กุ้งกุลาดำ มีไข่แก่ได้โดยไม่ต้องตัดก้านตา (เรณูและคณะ, 2535)

จากการศึกษาของ Yano (1985) พบว่าการฉีด progesterone และ 17- α -OH-progesterone สามารถที่จะทำให้เกิดการพัฒนาของรังไข่ได้ในกุ้ง *Metapenaeus ensis* และกระตุ้นการหลั่ง vitellogenin ใน *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Yano, 1987) รวมทั้งยังกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนโดยทั่วไปและสังเคราะห์โปรตีนภายในไข่แดงของกุ้งขาวแวนนาไมเพื่อเป็นอาหารให้แก่ลูกกุ้งในระยะวัยอ่อน และในกรณีที่ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงมากเกินไปไม่ส่งผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนทั้ง 2 ชนิด (Quackenbush, 1992)

3.2 Prostaglandin โพรสตาแกรนดิน (PG) โครงสร้างประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งมีคาร์บอน 20 อะตอม มีสารตั้งต้น คือ อะราคิโดนิก แอซิด (Arachidonic acid: AA) ไอโคซะเพนทาอีโนอิก แอซิด (Eicosapentaenoic acid: EPA) และ ไดโคซะเฮกซาอีโนอิก แอซิด (Docosahexaenoic acid: DHA) (Stanley-Samuelson and Pedibhotla, 1996) เป็นฮอร์โมนที่มีส่วนสำคัญในการผลิตและฝักไข่ในหอยน้ำจืดและหอยสองฝา (Osada and Nomura, 1990) มีความสัมพันธ์กับกระบวนการ vitellogenesis และการออกลูกในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน (Spaziani et al., 1995)

สามารถพบได้ในหลายรูปแบบซึ่งทำหน้าที่แตกต่างกันออกไป เช่น PGE₂ ทำให้เกิดพฤติกรรมในการวางไข่ของ cricket (*Acheta domesticus*) เพศเมีย (Destepano and Brady, 1977) นอกจากนี้โพรสตาแกรนดินยังสัมพันธ์กับปริมาณ Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ Scallops เพศเมียวางไข่ โดย PGE₂ ส่งผลให้ปริมาณเซโรโตนินเพิ่มขึ้น และ PGF_{2 α} ส่งผลให้เซโรโตนินลดลง (Morse et al., 1977)

4) Terpenoid hormone

4.1 Methyl farnesoate (MF) สร้างมาจาก mandibular organ (MO) มีโครงสร้างคล้ายกับ juvenile hormone (JH III) ในพวกแมลง (Huberman, 2000) ทำหน้าที่ เกี่ยวกับการเจริญเติบโต, การพัฒนาของระบบสืบพันธุ์, การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง, พฤติกรรมในการจับคู่และชบวนการ vitellogenesis ในครัสเตเชียน (Laufer et al., 1993)

Tsukimura et al., 2006 ได้ทดสอบการยับยั้งการพัฒนาของรังไข่โดยใช้ Methyl farnesoate (MF) ใน tadpole shrimp (*Triops longicaudatus*) พบว่า tadpole shrimp ที่ได้รับ MF ผ่านทาง *Artemia nauplii* ซึ่งผ่านการบ่มด้วย MF, MF-coated food pellets และ MF liposome food pellets มีการผลิต oocyte ลดลง ในกรณีที่ MF มีความเข้มข้นต่ำ (0.75µg/g – 3.8µg/g) จะส่งผลต่อความดกไข่แต่ที่ความเข้มข้นสูง (10µg/g) จะส่งผลต่อการเจริญเติบโต

4.2 Biogenic amine

4.2.1 Dopamine (DA) ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์และการหลั่ง neurohormones (VSH หรือ GSH) กระตุ้นการหลั่ง pigment และความเข้มข้นของฮอร์โมน (Fingerman et al., 1994) รวมทั้งยับยั้งการหลั่ง CHH จากก้านตาดีกด้วย (Sarojini et al., 1995) สามารถพบได้ในระบบประสาทส่วนกลางของครัสเตเชียน (Fingerman et al., 1994) การทำงานนั้นพบทั้งในรูปของ neurotransmitters และ neuromodulators (Alfaro et al., 2004) Chen et al. (2003) ได้ศึกษาผลของ DA ต่อการพัฒนารังไข่ในกึ่งก้ามกราม ที่ถูกตัดก้านตาพบว่า DA จะไปยับยั้งการสังเคราะห์ vitellogenin ขณะที่ serotonin ให้ผลที่ตรงกันข้าม ดังนั้นเพื่อให้ DA สามารถทำหน้าที่ยับยั้งการสังเคราะห์ vitellogenin ในกึ่งก้ามกราม ที่ถูกตัดก้านตาออก จึงจำเป็นที่จะต้องยับยั้งการทำงานของ DA ที่ thoracic ganglia ตลอดจนยับยั้งการหลั่ง VSH ในก้านตา รวมทั้งต้องกระตุ้นการหลั่ง VIH จาก x-organ-sinus gland complex

4.2.2 Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) ทำหน้าที่กระตุ้นการหลั่งของฮอร์โมนที่พบในกลุ่มครัสเตเชียนหลายชนิดรวมทั้ง hyperglycemic hormone (Keller et al., 1985) red pigment hormone (Rao and Fingerman, 1975), neurodepressing hormone (Arechiga et al., 1985), MIH (molt inhibiting hormone) (Mattson and Spaziani, 1985) รวมทั้งกระตุ้นการหลั่งของ Gonad-stimulating hormone (GSH) แต่ทำหน้าที่ยับยั้งการสังเคราะห์ methyl farnesoate (Fingerman, 1997)

จากการศึกษาของ Wang and Croll (2006) พบว่า เมื่อฉีด 5-HT แล้วทำให้เกิดการพักไข่ใน sea scallop, *Placopecten magellanicus* และสามารถทำให้เกิดพัฒนาอย่างสมบูรณ์ใน *L. stylirostris* และกุ้งขาวแวนนาไม (Alfaro et al., 2004) การทำงานพบทั้งในรูปของ neurotransmitters และ neuromodulators (Alfaro et al., 2004; Chen et al., 2003) พบได้ในระบบประสาทส่วนกลาง (Fingerman et al., 1994)

2.2 การพัฒนาระบบสืบพันธุ์ (Ovarian maturation)

การพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของกุ้งทะเลเพศเมียประกอบไปด้วย 2 กระบวนการ คือ vitellogenesis และการพัฒนารังไข่ขั้นสุดท้าย (final maturation of oocytes) (Yano, 1995)

1) กระบวนการ vitellogenesis เมื่อสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนได้รับอาหาร จากนั้นจะเกิดการสังเคราะห์โปรตีนและไขมัน กลายเป็น Vitellogenin (Vg) แล้วเปลี่ยนรูปจนกลายเป็น vitellin (Vt) (Souty-Grosset, 1997) ซึ่งเป็นสารประเภท lipoglycoprotein (Lee et al., 1997) จำนวนมากสะสมอยู่ใน oocyte (Jasmani et al., 2000) กระบวนการ vitellogenesis แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1.1) primary vitellogenesis ไข่มีการเปลี่ยนแปลงขนาดและเส้นผ่านศูนย์กลางเพียงเล็กน้อย เนื่องมาจากการสะสมอาหารภายในรังไข่ (Quackenbush, 1991) ระยะนี้จะสิ้นสุดลงเมื่อเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือครัสเตเชียนเพศเมียเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (Charniaux-Cotton and Payen, 1988)

1.2) secondary vitellogenesis ไข่เจริญเต็มที่โดยมีขนาดเพิ่มจาก 50 เป็น 300 ไมโครเมตร (Quackenbush, 2001) รอบ ๆ oocyte เริ่มมีผนังเป็น secondary follicle cell 1 ชั้น (Charniaux-Cotton and Payen, 1988) และมีการสะสม yolk protein ภายใน oocyte (Okumura and Aida, 2000) โปรตีนไข่แดงประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต น้ำตาลและไขมันซึ่งจะกลายเป็นอาหารให้กับตัวอ่อนขณะที่อยู่ในไข่ ในระยะ embryogenesis ครัสเตเชียนจะพบโปรตีนไข่แดงมากถึง 60-90% ของโปรตีนรวมในไข่ สัตว์กลุ่มแมลง สังเคราะห์โปรตีนไข่แดงมาจากไขมันในร่างกายและรังไข่ (Chen and Chen, 1994) ครัสเตเชียนบางชนิดสังเคราะห์โปรตีนไข่แดงที่รังไข่ แต่สำหรับกุ้งขาวตัวเป็นแหล่งสังเคราะห์หรือสร้างโปรตีน แล้วนำมาเก็บที่รังไข่โดยลำเลียงผ่านท่อของรังไข่ที่เชื่อมกับตัวโดยตรง (Quackenbush, 2001)

2) การพัฒนารังไข่ขั้นสุดท้าย (final maturation of oocytes) แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

2.1) การตกไข่ (ovulation) เกิดขึ้นเมื่อ secondary follicular epithelium บริเวณรังไข่หดตัวลง (Charniaux-Cotton and Payen, 1988) การตกไข่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำของหลายปัจจัย เช่น การให้อาหารกระตุ้นการพัฒนารังไข่ การใช้อุณหภูมิกระตุ้น เป็นต้น (Yano, 1995)

2.2) germinal vesicle breakdown (GVBD) เกิดขึ้นภายหลังจากที่เกิดการตกไข่แล้ว oocyte จะยังคงอยู่ในระยะ meiosis หรือเกิดกระบวนการยับยั้ง meiotic metaphase และยังคงอยู่ใน cytoplasmic membrane ของ oocyte ในรังไข่ เพื่อรอการผสมพันธุ์ครั้งต่อไป (Yano, 1995)

2.3 ไมโครเอนแคปซูลเลชัน (Microencapsulation)

ไมโครเอนแคปซูลเลชัน หรือ microbonding (MB) เป็นวิธีการที่ใช้เพื่อจัดเก็บวัสดุทั้งที่เป็นของแข็ง ของเหลว หรือแก๊สขนาดเล็ก ลงในแคปซูลซึ่งสามารถควบคุมอัตราการปลดปล่อยของสารจากภายในออกสู่ภายนอกได้ (Cho, Shin and Park, 2000) ขนาดของไมโครแคปซูลอยู่ระหว่างไมโครเมตร – มิลลิเมตร มีรูปร่างที่แตกต่างกันขึ้นกับวัตถุประสงค์และวิธีการที่ใช้ในการเตรียม ข้อดีของไมโครเอนแคปซูลเลชัน นอกจากป้องกันการเสื่อมสลายของสารที่อยู่ภายในไม่ให้เกิดปฏิกิริยากับภายนอก ยังลดอัตราการระเหย กำหนดอัตราการปลดปล่อยของสารที่เก็บกักและสามารถปรับเปลี่ยนลักษณะทางกายภาพเพื่อสะดวกต่อการใช้งาน (Gibbs et al., 1999) รูปแบบของไมโครแคปซูลอาจเปลี่ยนแปลงได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบที่เหมาะสม ตำแหน่งที่ตั้ง กลไกในการปลดปล่อย ขนาดของอนุภาค ลักษณะสุดท้ายทางกายภาพ รวมทั้งราคา (Desai and Park, 2005)

การประยุกต์ใช้ไมโครแคปซูลพบได้ในหลายอุตสาหกรรม โดยเฉพาะทางด้านอุตสาหกรรมยา Grenha, Seijo and López (2005) ทดลองผลิตโคโคซานไมโครแคปซูลเพื่อห่อหุ้มยาไปยังปอด พบว่าแคปซูลสามารถเก็บกักยาได้ 65-80% และมีอัตราการปลดปล่อยยา 75-80% ภายในระยะเวลา 15 วัน นับว่าเป็นการผลิตยาที่มีประสิทธิภาพสูงเพราะยาสามารถเข้าไปออกฤทธิ์ได้ถึงปอดชั้นในได้

แต่ทางด้านอุตสาหกรรมผลิตอาหารสำหรับสัตว์น้ำนั้น ยังไม่เป็นที่แพร่หลายนัก ส่วนใหญ่แล้วเป็นการผลิตอาหารให้กับสัตว์น้ำวัยอ่อน ดังเช่น การศึกษาของ Yúfera et al. (2003) ได้ทดลองผลิตไมโครแคปซูลที่สร้างจากโปรตีน ภายในบรรจุด้วย วิตามิน ฮอร์โมนและกรดไขมัน พบว่า ไมโครแคปซูลมีความคงทนเมื่อละลายน้ำหรือระหว่างอยู่ภายในทางเดินอาหารของตัวอ่อนปลา gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) และ Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup)

2.3.1 ชนิดของไมโครแคปซูล

การจำแนกไมโครแคปซูลตามชนิดของผนังที่ห่อหุ้มอยู่ภายนอก ตามวิธีการของ Langdon (2003) แบ่งออกเป็น 6 ชนิด ดังนี้ คือ

1. Microbound particles

ชนิดของอนุภาคชนิดนี้ขึ้นอยู่กับผนังที่ห่อหุ้ม ตัวผลสารของแคปซูลส่วนใหญ่เป็นส่วนประกอบสำคัญของอาหารสำเร็จรูป ประเภทโปรตีนหรือแป้ง เช่น zein, alginate, agar และ gelatin ข้อดีของไมโครแคปซูลชนิดนี้ คือ ผลิตได้ง่าย และวัตถุดิบที่ใช้ไม่เป็นพิษ (Langdon, 2003)

2. Cross-linked protein-walled capsules

เป็นแคปซูลที่ใช้ในการขนส่งสารอาหารให้แก่สัตว์เคี้ยวเอื้อง ผนังผลิตจากวัตถุดิบที่ไม่ปนเปื้อนด้วยสารพิษ (Hayworth, 1983) คงตัวในน้ำได้นาน (Yúfera et al., 1999, López-Alvarado et al., 1994) แคปซูลชนิดนี้ถูกสร้างขึ้นเพื่อปรับสมดุลความสามารถในการย่อยและความคงตัวของตัวภายใต้การเลี้ยงแบบไม่ปลอดเชื้อ ผนังถูกทำลายได้ด้วยการทำงานของแบคทีเรีย (Alabi et al., 1999) ข้อเสียของแคปซูลชนิดนี้ คือ ต้นทุนในการผลิตมีราคาแพงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น ๆ (Lazo et al., 2000)

3. Lipid-walled microcapsules

Lipid-walled microcapsules ผลิตเพื่อห่อหุ้มสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ สารอาหารที่ละลายน้ำ (Langdon, 2003) ผนังของไมโครแคปซูลชนิดนี้มักอ่อนนุ่ม ส่งผลให้การรั่วไหลของสารออกสู่ภายนอกเกิดขึ้นได้

4. Lipid spray beads

เป็นไมโครแคปซูลที่ใช้ในการขนส่งไขมันและสารอาหารที่ละลายน้ำไปยัง marine suspension-feeders (Bunchal and Langdon, 1998) ภายในเม็ดประกอบไปด้วยอนุภาคจับยึดกันไว้ที่แกนกลางประกบกันจนเป็นเม็ด ไม่มีผนังที่ล้อมรอบ ส่งผลให้ไมโครแคปซูลชนิดนี้จะละลายน้ำอย่างรวดเร็ว ข้อดีของแคปซูลชนิดนี้ คือ เตรียมได้ง่ายและสามารถขนส่งสารที่อยู่ภายในได้เช่นกัน

5. Liposomes

ใช้กันมากในด้านเภสัชกรรม (Ostro, 1987) มีผนังซึ่งสร้างจากไขมันปิดล้อมสารละลายที่อยู่ตรงกลางไว้มากกว่า 2 ชั้น แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ตามขนาดและความสามารถในการเก็บกักสารที่อยู่ภายใน คือ (1) ขนาดเล็ก (10-100 nm) หรือ uni-lamellar vesicles (SUVs) (2) ขนาดใหญ่ (100-1000 nm) หรือ uni-lamellar vesicles (LUVs) ใช้ในการเก็บกักสารอาหารที่สามารถละลายน้ำได้ ซึ่ง SUVs ไม่สามารถเก็บกักได้ดีหากปริมาณของสารอาหารเพิ่มมากขึ้น (3) multi-lamellar vesicles (MLVs) (100 nm – 20 μ m) มีความเปราะบางน้อยกว่า LUVs เหมาะสำหรับการเก็บกักสารอาหารที่ละลายน้ำได้ยาก (Langdon, 2003)

6. Complex particles

ประกอบไปด้วยอนุภาคที่แตกต่างกันอย่างน้อย 2 ชนิด รวมกันเป็นอนุภาคเดียว (Langdon, 2000) อนุภาคนี้มักใช้ในการขนส่งอนุภาค 2 ชนิดพร้อม ๆ กัน เช่น ไขมันกับสารอาหารที่มีมวลโมเลกุลสูงหรือต่ำและสารอาหารที่ละลายน้ำ ส่งผลให้สัตว์น้ำไม่เลือกกินอาหารเพียงอย่างเดียวอย่างใดอย่างหนึ่งซึ่งทำให้ได้รับสารอาหารอย่างครบถ้วน (Langdon, 2003)

2.3.2 เทคนิคการผลิตไมโครแคปซูล

เทคนิคที่ใช้ในการผลิตไมโครแคปซูลนั้นมีหลายวิธีด้วยกัน สิ่งที่ต้องคำนึงเมื่อต้องเลือกใช้เทคนิคในการผลิตไมโครแคปซูล คือ ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของสิ่งที่ถูกเคลือบ และวัตถุดิบที่นำมาเป็นผนังเคลือบควบคู่กันไปซึ่งรวมทั้งต้นทุนในการผลิต (Desai and Park, 2005) เทคนิคที่ใช้ในการผลิตไมโครแคปซูลมีหลายวิธี เช่น เทคนิค emulsification/solvent evaporation ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการเตรียมยาหรือสารที่ไม่ทนความร้อน (Genta et al., 1997) เทคนิค emulsification/internal gelation ใช้ในการเตรียมสารที่ไม่ละลายน้ำและมีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ (Robinson and Lee, 1987) เป็นต้น การศึกษาเปรียบเทียบถึงเทคนิคในการผลิตไมโครแคปซูลที่แตกต่างกัน ต่อประสิทธิภาพของการห่อหุ้มวิตามิน ซี พบว่า spray drying เป็นเทคนิคที่ห่อหุ้ม วิตามิน ซี ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ thermal phase separation, melt dispersion และ solvent evaporation โดยผนังที่เคลือบกรดแอสคอร์บิกนั้นสร้างจากแป้งและ β -cyclodextrin และเก็บที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ความชื้น 84%

การทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray-drying)

การทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นเทคนิคที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและยา (Agnihotri et al., 2004) วิธีการนี้เริ่มต้นจากการผสมวัตถุดิบที่เตรียมในรูปแบบของสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นจึงลำเลียงสารละลายที่ผสมจนเข้ากันดีแล้วเข้าสู่เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยไปยังหัวอัดฉีด (Taylor, 1983) สารละลายถูกอัดฉีดเข้าไปในห้อง เมื่อสัมผัสกับลมร้อนที่พัดมาทางด้านล่างของเครื่องอบแห้งแล้ว จะเกิดการระเหยน้ำออกจากสารละลายอย่างรวดเร็ว กลายเป็นอนุภาคแห้งหรือไมโครแคปซูลตกลงสู่เบื่องล่างแล้วถูกลำเลียงไปยังเครื่องแยกไซโคลนเพื่อรอการบรรจุลงหีบห่อหรืออาจถูกส่งต่อไปเพื่อผ่านกระบวนการอื่น ๆ (ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, 2539) ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ ขั้นตอนในการผลิตไม่ยุ่งยาก ไมโครแคปซูลที่ผลิตได้มีคุณภาพดี สามารถขยายกำลังการผลิตได้มาก ราคาถูกเหมาะสำหรับการผลิตในเชิงพาณิชย์ (Desai and Park, 2005)

2.3.3 วัสดุที่ใช้ในการผลิตแคปซูล

วัสดุแต่ละชนิดที่นำมาใช้เป็นผนังของไมโครแคปซูลมีความสามารถในการเก็บกักสารและการปลดปล่อยแตกต่างกัน ปัจจัยสำคัญในการพิจารณาเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการผลิตไมโครแคปซูลคือ ลักษณะทางเคมีของวัสดุ เช่น มวลโมเลกุล ความสามารถในการละลาย รวมทั้งราคา วัสดุที่นำมาเป็นผนังเคลือบแคปซูลสำหรับผลิตอาหารสัตว์น้ำนั้น ต้องสามารถเก็บกักสารอาหารที่อยู่ภายในได้ดี แข็งแรงทนทาน สัตว์น้ำสามารถย่อยได้ และสามารถควบคุมอัตราการปลดปล่อยของสารออกสู่ภายนอกได้ (Wong, 1998) วัสดุที่นิยมใช้ในการผลิตแคปซูล เช่น Gum arabic, แป้งดัดแปร (Shahidi and Han, 1993) sodium caseinate (Hogan et al., 2001), ไคโตซาน (He et al., 1999), PLGA (Castellanos and Griebenow, 2003) เป็นต้น

2.3.3.1 ไคโตซาน (Chitosan)

ไคโตซาน (α (1 \rightarrow 4) 2-amino 2-deoxy β -D glucan) เป็นพอลิเมอร์ทางชีวภาพ เกิดจากการกำจัดหมู่อะซิทิล (deacetylated) ของไคตินออก (Chen et al., 1996) ส่วนใหญ่เป็นองค์ประกอบหลักของเปลือกในสัตว์ประเภทครัสเตเชียน เช่น ปู กุ้งและแมลง รวมทั้งเป็นผนังเซลล์ของแบคทีเรียและราบางชนิด (van der Lubben et al., 2001; Senal and McClure, 2004) ไคโตซานมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ เช่น ไม่มีพิษ ไม่ส่งผลร้ายเมื่อรับประทานเข้าสู่ร่างกาย ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (Peppas, 1992; Senal and McClure, 2004) รวมทั้งราคาถูก (van der Lubben, 2001) จึงมีการใช้

ประโยชน์จากโคโตซานทั้งทางตรงและทางอ้อมอย่างแพร่หลาย เช่น ใช้บำบัดน้ำ การขนส่งยา ผลิตเป็นเครื่องสำอาง รวมทั้งใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร (Senal and McClure, 2004)

การผลิตไมโครแคปซูลจากโคโตซานทางเภสัชกรรมมักใช้ในการขนส่งยาไปยังอวัยวะเป้าหมาย การศึกษาของ Ko et al. (2002) ถึงการห่อหุ้มยา felodipine ด้วยโคโตซานไมโครพาทีเคิลพบว่า ไมโครพาทีเคิลที่ได้มีรูปร่างค่อนข้างกลม สามารถเก็บกักยาได้ถึง 90% แต่เมื่อลดมวลโมเลกุลของโคโตซานที่ใช้ในการผลิตไมโครพาทีเคิลลง พบว่าอัตราการรั่วไหลของยาออกสู่ภายนอกเพิ่มมากขึ้น และเมื่อเพิ่มขึ้นตอนในการเคลือบด้วยโคโตซานจาก 1 ชั้น เป็น 2 ชั้น พบว่าไมโครแคปซูลที่ผลิตด้วยเทคนิค emulsification/internal gelation technique สามารถเก็บกักยาประเภทโปรตีนได้ถึง 89% รวมทั้งควบคุมอัตราการรั่วไหลของยาออกสู่ภายนอกให้ช้าลง (Ribeiro et al., 2005)

2.3.3.2 มอลโทเดกซ์ทรีน (Maltodextrin)

มอลโทเดกซ์ทรีน เป็นแป้งดัดแปรชนิดหนึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการย่อยแป้งด้วยกรดหรือเอนไซม์ α -amylase (Dokic et al., 1997) มีคุณสมบัติอยู่ระหว่างแป้งและน้ำเชื่อม มอลโทเดกซ์ทรีนต่างจากแป้งตรงที่ละลายได้ในน้ำเย็นและต่างจากน้ำเชื่อมที่มอลโทเดกซ์ทรีนนั้นไม่มี ความหวาน (Dokic et al., 1997) การจำแนกชนิดของ มอลโทเดกซ์ทรีนสามารถแบ่งตามค่า DE (Dextrose Equivalent) (Dokic-Baucal et al., 2004) จากการศึกษาของ Bangs and Reineccius (1981) พบว่ามอลโทเดกซ์ทรีน ที่ DE 10 มีความคงทนในการเก็บกักกลิ่นได้ดีที่สุด แต่ถ้า DE เพิ่มขึ้นความสามารถในการเก็บกักกลิ่นจะลดลง ส่วนใหญ่นิยมใช้มอลโทเดกซ์ทรีนเป็นสารเพิ่มปริมาณในผลิตภัณฑ์ที่พบในการทำแห้งแบบพ่นฝอย นอกจากนี้ยังใช้เคลือบลูกกวาดเพื่อป้องกันและลดการดูดความชื้น (Van Beynum and Roels, 1985) ข้อดีของมอลโทเดกซ์ทรีน คือมีราคาถูก สามารถเก็บกักสารที่อยู่ภายในได้ดี (Anandaraman and Reineccius, 1986) Belghith et al. (2001) ทดลองผลิตไมโครแคปซูลจากมอลโทเดกซ์ทรีน ด้วยเทคนิค spray drying แล้วทดสอบความคงตัวของ *Penicillium occitanis* ในไมโครแคปซูล ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แคปซูลสามารถเก็บกัก CMCase ได้ดีที่สุด แต่ความสามารถในการเก็บกัก β -glucosidase ได้เพียง 50% เท่านั้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวางแผนการทดลองอาหารเสริมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสังเคราะห์ เพื่อกระตุ้นการเจริญพันธุ์ของกึ่งขาวแวนนาไม แบ่งการทดลองเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นการเตรียมไมโครแคปซูล ทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ส่วนที่ 2 เป็นการศึกษารูปร่าง ณ ศูนย์เครื่องมือส่วนกลาง ฝ่ายบริการวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศึกษาลักษณะภายนอก รวมทั้งสมบัติของไมโครแคปซูล ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และส่วนสุดท้ายคือการนำไมโครแคปซูลมาผสมกับอาหารและให้อาหารนั้นแก่แม่พันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม ณ เฟิร์สฟาร์ม จ.ภูเก็ต เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของระบบสืบพันธุ์ระหว่างกึ่งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารปกติกับกึ่งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมฮอร์โมน

3.1 การเตรียม Hormone bound microcapsules (HBM)

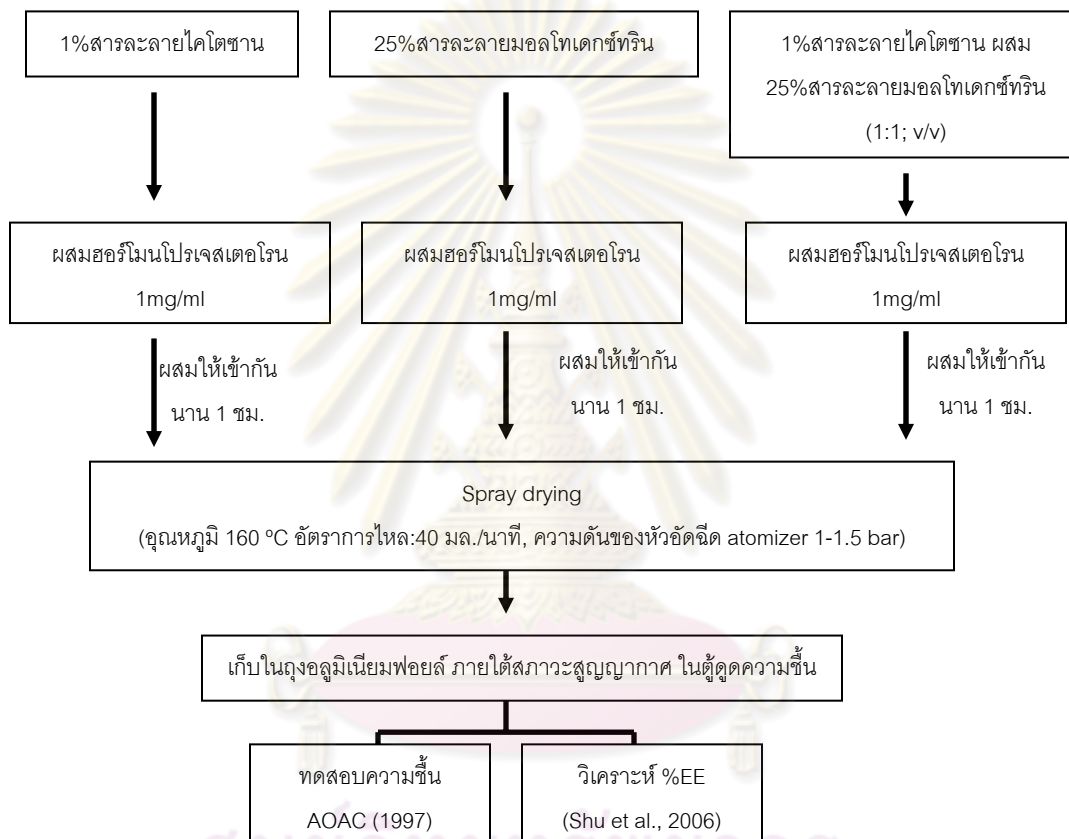
การเตรียมสารละลายเพื่อผลิตไมโครแคปซูลดัดแปลงตามวิธีการของ He et al. (1999) โดยนำโคโตซาน (%DD 91.4%, สีนอุดมเกษตรภัณฑ์, สุราษฎร์ธานี) ละลายในกรดอะซิติก (Labscan Asia, Thailand) 1% จนได้สารละลายโคโตซานความเข้มข้น 1% จากนั้นเตรียมสารละลายมอลโทเดกซ์ทริน (DE10, รวมเคมี, Thailand) ในน้ำกลั่น จนได้ความเข้มข้น 25%

3.1.1 การทดสอบวัสดุที่นำมาผลิตเป็นผนังเคลือบไมโครแคปซูลเพื่อเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

วัสดุหรือสารละลายที่นำมาใช้ในการทดสอบ แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ สารละลายโคโตซาน ความเข้มข้น 1% สารละลายมอลโทเดกซ์ทริน ความเข้มข้น 25% และสารละลายผสมระหว่างสารละลายโคโตซาน ความเข้มข้น 1% และสารละลายมอลโทเดกซ์ทริน ความเข้มข้น 25% ในอัตราส่วน 1:1 (v/v)

แต่ละชุดการทดลองใส่สารละลายที่ผสมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมจากทำละลายฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสังเคราะห์ (Sigma-Aldrich, USA) น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ในคลอโรฟอร์ม (Labscan Asia, Thailand) 100 มิลลิลิตร ผสมวัสดุที่เป็นผนังเคลือบ

และสารละลายฮอริโมนให้เข้ากันบนเครื่อง magnetic stirrer นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง spray dryer (GEA Niro A/S, Gladsaxevej 305, DK2860, Denmark) กำหนดให้อุณหภูมิลมเข้าเป็น 160 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของสารละลายเข้าสู่เครื่อง spray dryer เท่ากับ 40 มล./นาที่ ความดันของ atomizer ที่ 1-1.5 bar เก็บไมโครแคปซูลที่ได้ในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ในตู้ดูดความชื้น (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 การผลิตไมโครแคปซูลเพื่อเก็บกักฮอริโมนโปรเจสเตอโรน

นำแคปซูลที่ผลิตได้ไปทดสอบความชื้นของไมโครแคปซูล ด้วยวิธี oven-drying (AOAC, 1997) และวิเคราะห์ความสามารถในการเก็บกักฮอริโมน (%Encapsulation Efficiency-%EE) โดยใช้วิธีการของ Shu et al. (2006) ดังรายละเอียดใน 3.2 และสามารถหา %EE ได้ตามสมการที่ 1 คือ

$$\text{ความสามารถในการเก็บกักฮอริโมน (\%EE)} = \frac{\text{น้ำหนักของฮอริโมนที่ได้จากผลิตภัณฑ์สุดท้าย}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้นของฮอริโมน}} \times 100 \text{ ---- 1}$$

พิจารณาเลือกวัสดุที่เหมาะสมจากความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนที่ดีที่สุดและความชื้นของไมโครแคปซูลต่ำที่สุด เพื่อนำไปศึกษาผลของอิทธิพลของอุณหภูมิและอัตราส่วนระหว่างโคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรินที่เหมาะสมต่อความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

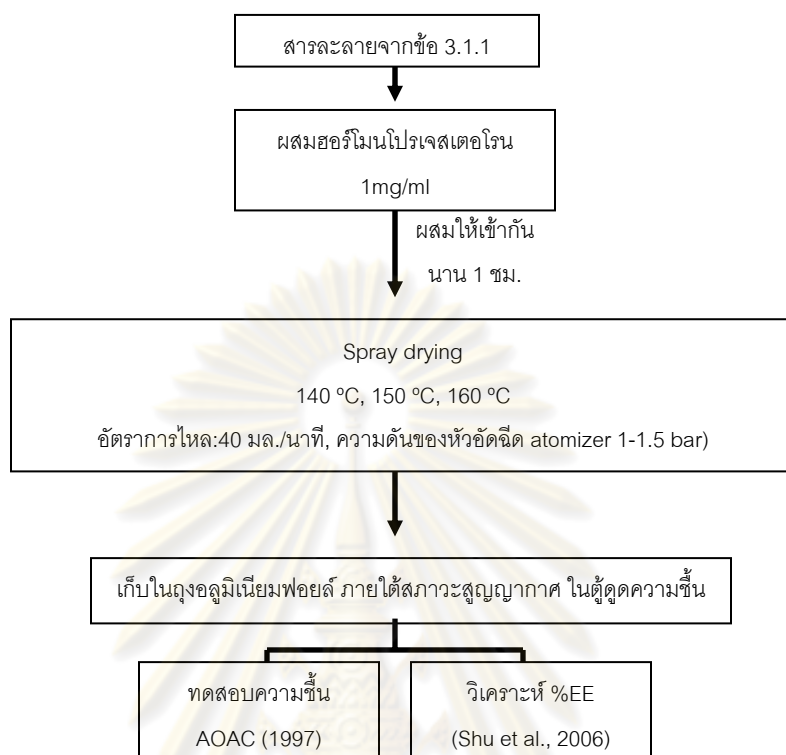
3.1.2 ผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของไมโครแคปซูล

ทดลองอุณหภูมิลมเข้าที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 140 150 และ 160 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของไมโครแคปซูลในการเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำแห้งแบบพ่นฝอย

นำสารละลายที่เลือกได้จากข้อ 3.1.1 ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง spray dryer โดยใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 140, 150 และ 160 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของสารละลายเข้าสู่เครื่อง spray dryer เท่ากับ 40 มิลลิลิตร/นาที ความดันของ atomizer ที่ 1-1.5 bar เก็บไมโครแคปซูลที่ได้ในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ในตู้ดูดความชื้น ทดสอบความชื้นของไมโครแคปซูลด้วยวิธี oven-drying (AOAC, 1997) และคำนวณความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนตามสมการที่ 1

พิจารณาเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไมโครแคปซูลจากความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนที่ดีที่สุดและความชื้นของไมโครแคปซูลต่ำที่สุด เพื่อนำไปศึกษาปริมาณโปรเจสเตอโรนสูงสุดที่ไมโครแคปซูลสามารถเก็บกักได้ (รูปที่ 3.2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนของไมโครแคปซูล

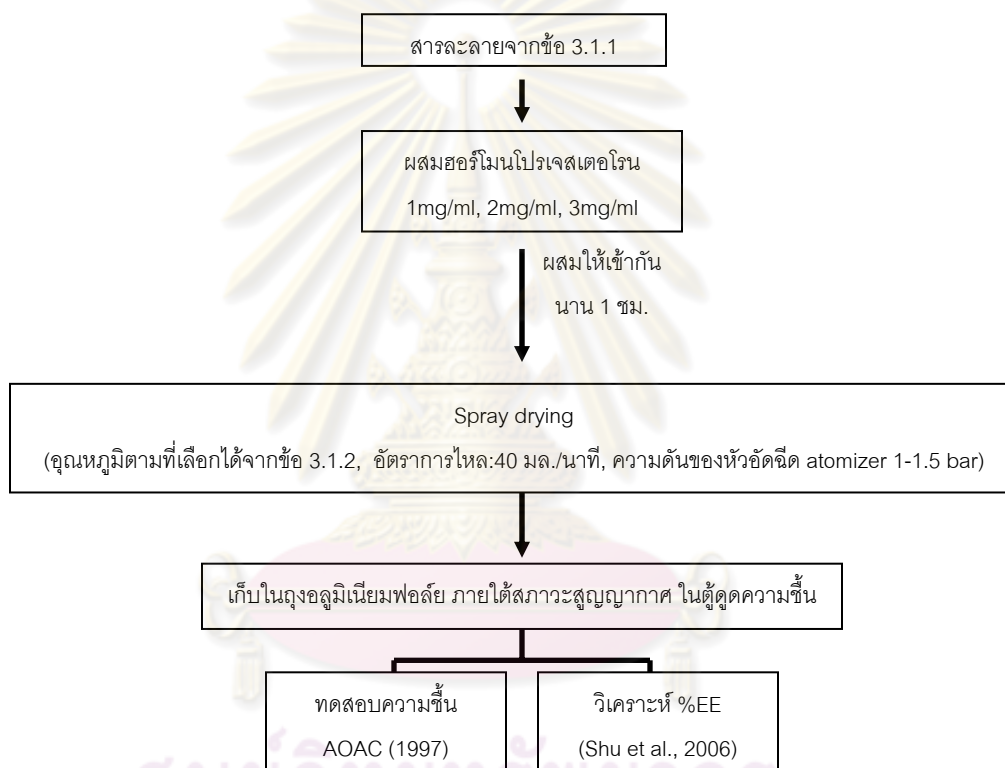
3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรเจสเทอโรนสูงสุดที่ไมโครแคปซูลสามารถเก็บกักไว้ภายในไมโครแคปซูล

วิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนสูงสุดที่ไมโครแคปซูลสามารถเก็บกักโดยใช้ความเข้มข้นของฮอร์โมน แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 1 2 และ 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

นำสารละลายที่เลือกได้จากข้อ 3.1.1 ผสมด้วยสารละลายโปรเจสเทอโรนที่มีความเข้มข้นต่างกัน คือ 1, 2 และ 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมตามวิธีในขั้นตอนการทดลอง 3.1.1 ผสมให้เข้ากันบนเครื่อง magnetic stirrer นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง spray dryer โดยใช้อุณหภูมิลมเข้าที่เลือกจากขั้นตอนการทดลองที่ 3.1.2 โดยอัตราการไหลของสารละลายเข้าสู่เครื่อง spray dryer เท่ากับ 40 มล./นาที ความดันของ atomizer ที่ 1-1.5 bar เก็บ

ไมโครแคปซูลที่ได้ในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ในตู้ดูดความชื้น ทดสอบความชื้นของไมโครแคปซูล ด้วยวิธี oven-drying (AOAC, 1997) และวิเคราะห์ความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนตามสมการที่ 1

พิจารณาเลือกปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่เหมาะสมในการเก็บกักไว้ภายในไมโครแคปซูลจากความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนที่ดีที่สุดและความชื้นของไมโครแคปซูลต่ำที่สุด แล้วนำไปทดสอบหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Pentasodium tripolyphosphate (TPP) (cross-linking agent) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (รูปที่ 3.3)



รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการทดลองเพื่อศึกษาระดับโปรเจสเตอโรนสูงสุดที่ไมโครแคปซูลสามารถเก็บกักไว้ภายในไมโครแคปซูล

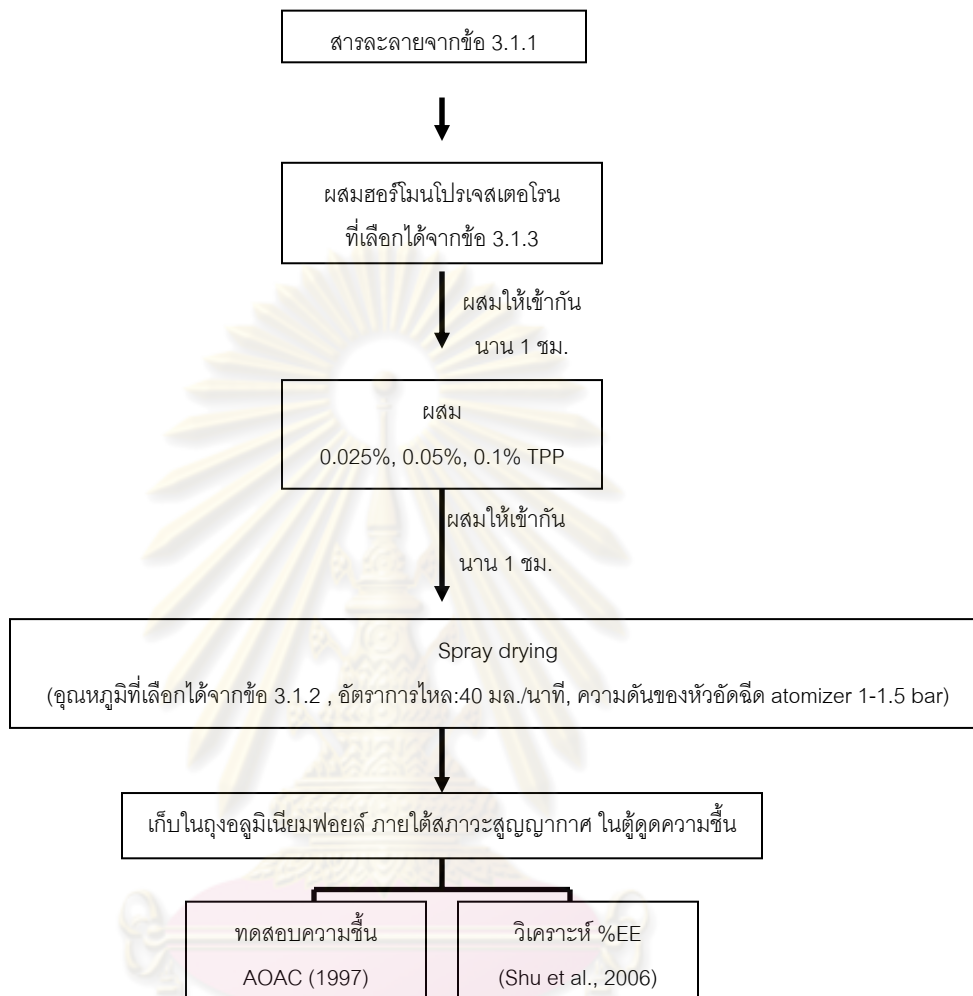
3.1.4 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Pentasodium tripolyphosphate (TPP) (cross-linking agent) ต่อความสามารถในการเก็บกักฮอริโมนโปรเจสเตอโรนของไมโครแคปซูล

แปรความเข้มข้นของ TPP ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) (85%, Sigma-Aldrich) 3 ระดับ คือ 0.025%, 0.05% และ 0.1% เพื่อทดสอบความสามารถในการเก็บกักฮอริโมนโปรเจสเตอโรนของไมโครแคปซูล

นำสารละลายที่เลือกได้จากข้อ 3.1.1 ผสมกับสารละลายโปรเจสเตอโรน ที่ความเข้มข้นซึ่งเลือกได้จากข้อ 3.1.3 ผสมให้เข้ากันบนเครื่อง magnetic stirrer นาน 1 ชั่วโมง แต่ละชุดการทดลองเติม TPP ที่ความเข้มข้น 0.025%, 0.05% และ 0.1% ซึ่งเตรียมจากน้ำ TPP หนัก 0.025 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนได้ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมลงในสารละลายที่เตรียมไว้เบื้องต้น ผสมให้เข้ากันบนเครื่อง magnetic stirrer นาน 1 ชั่วโมง

นำสารละลายที่เตรียมไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง spray dryer โดยใช้อุณหภูมิลมเข้าที่เลือกได้จากการทดลอง 3.1.2 อัตราการไหลของสารละลายเข้าสู่เครื่อง spray dryer เท่ากับ 40 มล./นาที ความดันของ atomizer ที่ 1-1.5 bar เก็บไมโครแคปซูลที่ได้ในถุงออลูมิเนียมฟอยล์ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ในตู้ดูดความชื้น ทดสอบความชื้นของไมโครแคปซูล ด้วยวิธี oven-drying (AOAC, 1997) และวิเคราะห์ความสามารถในการเก็บกักฮอริโมนตามสมการที่ 1

พิจารณาเลือกความเข้มข้นของ TPP ที่เหมาะสมในการเก็บกักไว้ในไมโครแคปซูลจากความสามารถในการเก็บกักฮอริโมนที่ดีที่สุดและความชื้นของไมโครแคปซูลต่ำที่สุด แล้วนำไปทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของโคโคซาน:มอลโทเดกซ์ทริน (รูปที่ 3.4)



รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Pentasodium tripolyphosphate (TPP) (cross-linking agent) ต่อความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของไมโครแคปซูล

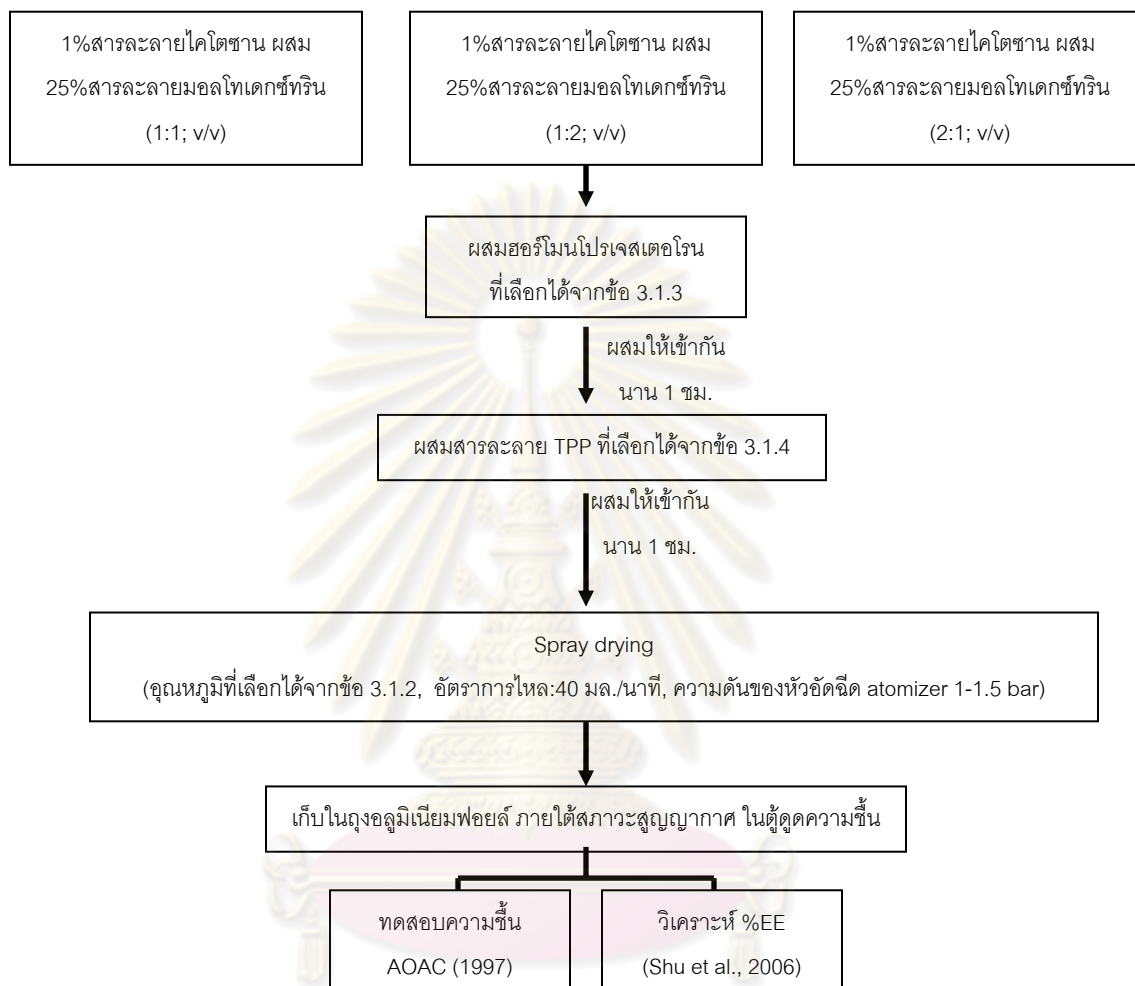
3.1.5 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของโคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีนต่อความสามารถในการเก็บกักฮอริโมนโปรเจสเตอโรน

แปรอัตราส่วนระหว่างโคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีน 3 ระดับ คือ 1:1, 1:2 และ 2:1 (v/v) เพื่อทดสอบความสามารถในการเก็บกักฮอริโมนโปรเจสเตอโรน

นำสารละลายที่เลือกได้จากข้อ 3.1.1 ผสมกับสารละลายโปรเจสเตอโรน ที่ความเข้มข้นซึ่งเลือกได้จากข้อ 3.1.3 ผสมให้เข้ากันบนเครื่อง magnetic stirrer นาน 1 ชั่วโมง แต่ละชุดการทดลองเติม TPP ที่ความเข้มข้นซึ่งเลือกได้จากข้อ 3.1.4 ผสมให้เข้ากันบนเครื่อง magnetic stirrer นาน 1 ชั่วโมง

นำสารละลายที่เตรียมไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง spray dryer โดยใช้อุณหภูมิลมเข้าที่เลือกได้จากการทดลอง 3.1.2 อัตราการไหลของสารละลายเข้าสู่เครื่อง spray dryer เท่ากับ 40 มล./นาที ความดันของ atomizer ที่ 1-1.5 bar เก็บไมโครแคปซูลที่ได้ในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ในตู้ดูดความชื้น ทดสอบความชื้นของไมโครแคปซูล ด้วยวิธี oven-drying (AOAC, 1997) และวิเคราะห์ความสามารถในการเก็บกักฮอริโมนตามสมการที่ 1

พิจารณาเลือกอัตราส่วนระหว่างโคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีนที่เหมาะสมในการเก็บกักไว้ในไมโครแคปซูลจากความสามารถในการเก็บกักฮอริโมนที่ดีที่สุดและความชื้นของไมโครแคปซูลต่ำที่สุด (รูปที่ 3.5)



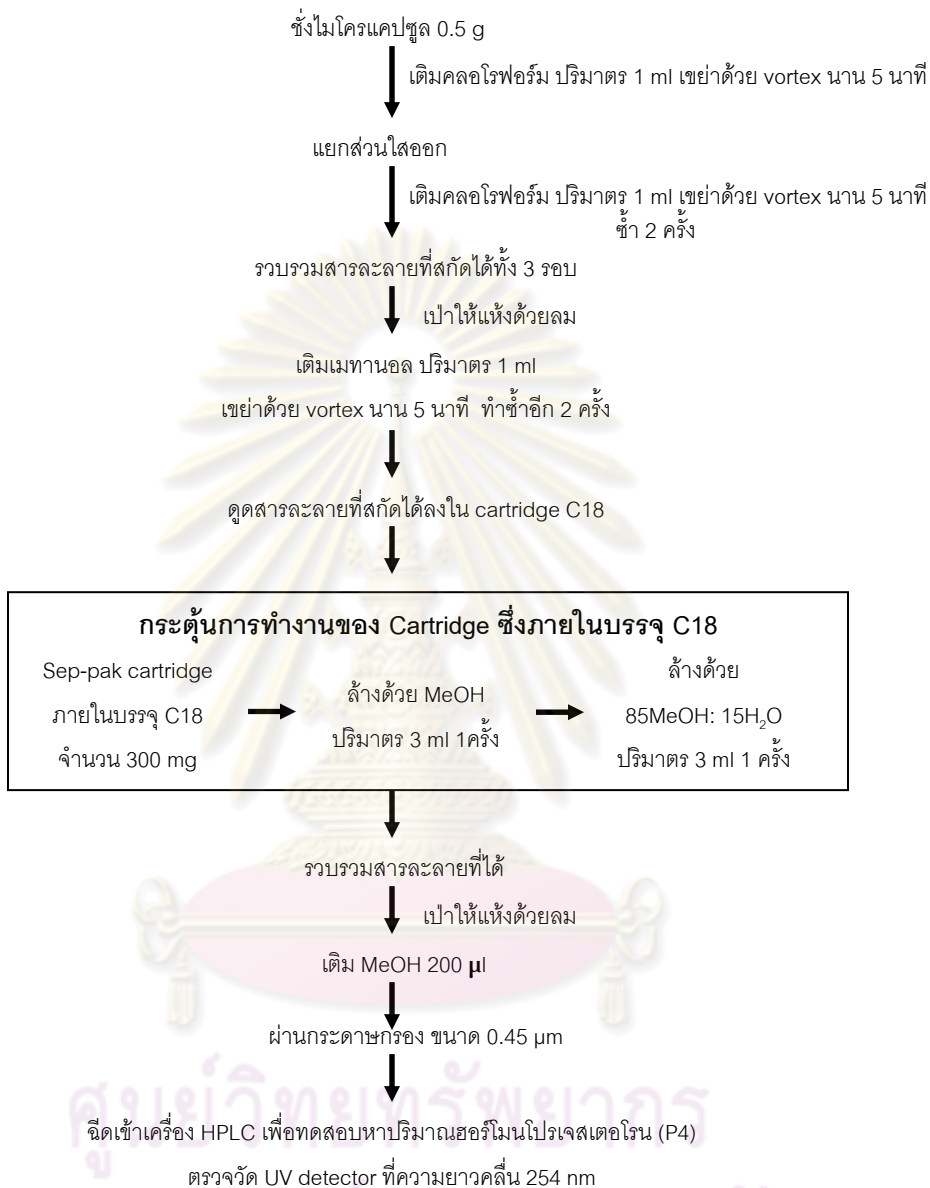
รูปที่ 3.5 ขั้นตอนการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของโคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรินต่อ
ความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

3.2 การทดสอบคุณสมบัติของ Hormone bound microencapsulation (HBM)

3.2.1 การวัดประสิทธิภาพของการตรึงฮอร์โมนในเม็ดแคปซูล

ซึ่งตัวอย่างไมโครแคปซูลหนัก 0.5 กรัม นำมาสกัดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมบนเครื่อง vortex (Genie 2, Scientific Industries, U.S.A.) แล้วแยกส่วนใส่ออกมา ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง รวบรวมฮอร์โมนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม นำมาเป่าให้แห้งด้วยลม จากนั้นทำการสกัดฮอร์โมนโดยการเติมด้วยเมทานอล (Labscan Asia, Thailand) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมบน vortex แล้วนำส่วนผสมเมทานอล-ฮอร์โมน ไปสกัดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ด้วยเทคนิค Solid Phase Extraction (SPE) ที่บรรจุ C18 (17%, Vertical Chromatography, Thailand) ทำซ้ำ 3 ครั้ง รวบรวมสารละลายที่ผสมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (eluant) เป่าให้แห้งด้วยลม แล้วเติมเมทานอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผ่านกระดาษกรองขนาด 45 ไมโครเมตร (Supor^R-450 Membrane, Water, USA) เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Jameela et al., 1998) นำสารละลายเมทานอล:ฮอร์โมน ผ่านคอลัมน์ชนิด Reverse phase ในเครื่อง high performance liquid chromatography (Prevail C18 column ขนาด 0.45x15 เซนติเมตร, Alltech, USA) มีสารตัวพา (mobile phase) คือ เมทานอลผสมน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 85:15 (v/v) ปรับอัตราการไหลของสารตัวพา (flow rate) เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย UV detector (Water 2487, U.S.A.) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (Warrier et al., 2001) (รูปที่ 3.6)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.6 ขั้นตอนการวัดประสิทธิภาพของการตรึงฮอร์โมนในเม็ดแคลปซูล

3.2.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการปลดปล่อยของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่บรรจุอยู่ในไมโครแคปซูลออกสู่ภายนอก (Controlled release)

3.2.2.1 การเตรียมสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ที่ pH ต่าง ๆ

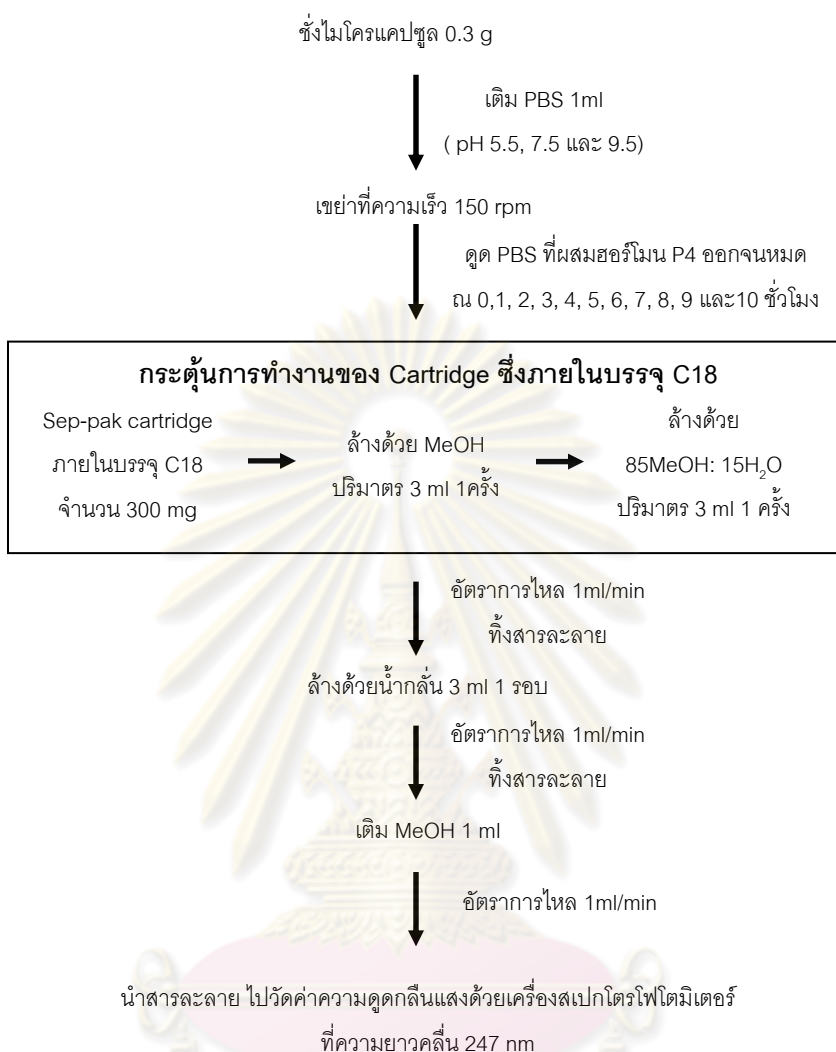
เตรียมสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) (0.1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (Gomori,1995) ปรับ pH ด้วย 10% กรดไฮโดรคลอริก (Labscan Asia, Thailand) และ 10% โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Labscan Asia, Thailand) จนได้ PBS ที่มี pH 5.5, 7.5 และ 9.5 เพื่อทดสอบความสามารถในการปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากไมโครแคปซูล

3.2.2.2 การทดสอบความสามารถในการปลดปล่อยฮอร์โมน

ทดสอบความสามารถในการปลดปล่อยฮอร์โมนจากไมโครแคปซูลโดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ pH 5.5, 7.5 และ 9.5 ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ

วิธีการดำเนินการทดลองดัดแปลงตามวิธีการของ Jameela et al. (1998) นำไมโครแคปซูล 0.3 กรัม เติมสารละลาย PBS ที่มี pH 5.5, 7.5 และ 9.5 ชุดการทดลองละ 1 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมบนเครื่อง orbital shaker ที่ความเร็ว 150 rpm ณ อุณหภูมิห้อง ทดลองที่ระดับ pH ละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างสารละลายที่ เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ชั่วโมง นำสารละลายที่เก็บได้มาสกัดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยเทคนิค Solid Phase Extraction (SPE) ที่บรรจุ C18 ซึ่งผ่านการกระตุ้นด้วยเมทานอล 3 มิลลิลิตร 1 ครั้ง ตามด้วยสารละลาย 85เมทานอล:15น้ำ 3 มิลลิลิตร 1 ครั้ง แล้วจึงนำ PBS ที่เก็บได้ในแต่ละชุดการทดลอง ที่ เวลาต่าง ๆ ใส่ลงใน cartridge ดัน (elute) สารละลายไหลลงจาก cartridge ด้วยความเร็ว 1 มิลลิลิตร/นาที จากนั้นล้าง cartridge ด้วยน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร 1 รอบ ให้สารละลายไหลลงจาก cartridge ความเร็ว 1 มิลลิลิตร/นาที จากนั้นเติมเมทานอล 1 มิลลิลิตร ดันให้สารละลายไหลลงจาก cartridge ความเร็ว 1 มิลลิลิตร/นาที เก็บสารละลายที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Model Genesys 10 series, Thermo Spectronic, USA) ที่ความยาวคลื่น 247 nm (รูปที่ 3.7) คำนวณปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากไมโครแคปซูล ตามช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยใช้วิธีการของ Wu (2004) ดังนี้ คือ

$$\text{ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ปลดปล่อยออกมาจากไมโครแคปซูล (\%)} = \frac{\text{ปริมาณโปรเจสเตอโรนที่หลังออกมาอยู่ใน PBS}}{\text{ปริมาณโปรเจสเตอโรนทั้งหมดที่เก็บกักได้}} \times 100$$



รูปที่ 3.7 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการปลดปล่อยของฮอริโมนโปรเจสเตอโรนที่บรรจุอยู่ในไมโครแคปซูลออกสู่ภายนอก (Controlled release)

3.3.3 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของไมโครแคปซูล

ศึกษาตามวิธีการของ Shu et al. (2006) โดยนำไมโครแคปซูลมาวางลงบนแท่นโลหะแล้วเคลือบด้วยทองในภาวะสุญญากาศ จากนั้นศึกษาตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM; SEM-JSM 5800 CV, JEOL, Tokyo, Japan) ที่ศูนย์เครื่องมือส่วนกลาง ฝ่ายบริการวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อดูขนาดและรูปร่างของไมโครแคปซูลที่ผลิตได้

3.3 การศึกษาผลของ Hormone bound microcapsulated diet (HBMD) ต่อการเจริญของระบบสืบพันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม

3.3.1 การผสมไมโครแคปซูลลงในอาหารกึ่ง (Hormone bound microencapsulation diet; HBMD)

3.3.1.1 การเตรียมอาหารเสริมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

การเตรียมอาหารเม็ดสำเร็จรูปดัดแปลงตามวิธีการของ Meunpol et al. (2005) โดยอาหารเม็ดทดลองประกอบไปด้วยส่วนผสมดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของอาหารแม่พันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม

วัสดุอาหาร	กรัมต่อ 102 กรัมอาหาร			
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่ 1 (0.5%HBMD)	กลุ่มที่ 2 (1%HBMD)	กลุ่มที่ 3 (2%HBMD)
ปลาป่น (ปริมาณโปรตีน 63.91%)	50	50	50	50
หมึกป่น (ปริมาณโปรตีน 70.87%)	17	17	17	17
กากถั่วเหลืองป่น (ปริมาณโปรตีน 47.39%)	8	8	8	8
หัวกุ้งป่น (ปริมาณโปรตีน 39.91%)	4	4	4	4
แป้งสาลี	8	8	8	8
วีท กลูเทิน (ปริมาณโปรตีน 75.12%)	4	4	4	4
น้ำมันปลา	3	3	3	3
วิตามินรวม*	2	2	2	2
แร่ธาตุรวม**	2	2	2	2
คอเลสเตรอล	0.5	0.5	0.5	0.5
เลซีทีน	0.5	0.5	0.5	0.5
วิตามิน ซี (35%)	0.5	0.5	0.5	0.5
แอสตาแซนทีน	0.5	0.5	0.5	0.5
ผงไคโตซาน	2	1.5	1	0
ไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรินไมโครแคปซูล	0	0.5	1	2

* องค์ประกอบวิตามินรวม คือ วิตามิน A, B, AB, E, K, B, B₁, B₂, B₆, B₁₂, ไนอะซิน, โฟลิค, กรดเพนโทเทนิค, ไบโอดีน, โคลีน

** องค์ประกอบแร่ธาตุรวม คือ เหล็ก, แมกนีเซียม, แมงกานีส, ไอโอดีน, โพแทสเซียม, ซีลีเนียม, สังกะสี

นำส่วนประกอบทั้งหมดผสมน้ำในอัตราส่วน 50 มิลลิลิตร ต่อ 100 กรัมอาหาร ผสมในเครื่องผสมอาหารจนเป็นเนื้อเดียวกัน และอัดผ่านเครื่องบดเนื้อ จากนั้นนำอาหารที่ได้ไปอบในตู้อบแห้ง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้ได้อาหารกึ่งเปียก เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนถึงเวลาใช้เลี้ยง

3.3.1.2 องค์ประกอบของอาหารเม็ดสำเร็จรูป

วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหาร ซึ่งประกอบไปด้วย ปริมาณโปรตีน, ไขมัน, ความชื้น, เถ้าและ ปริมาณใยอาหาร ตามวิธีการของ AOAC (1997) โดยวิเคราะห์องค์ประกอบดังนี้

- ปริมาณความชื้นและปริมาณวัสดุแห้ง ด้วยวิธี oven-drying
- ปริมาณเถ้า ด้วยวิธี muffle furnace combustion
- ปริมาณไขมัน ด้วยวิธี ether extraction
- ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Kjeldahl method
- ปริมาณใยอาหาร ด้วยวิธี acid digestion

3.4 การทดสอบผลของอาหารเสริมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนต่อการพัฒนารังไข่กึ่งชาวแวนนาไม

3.4.1 สถานที่/ระยะเวลาดำเนินการทดลอง

ดำเนินการทดลองที่ เฟิร์สฟาร์ม ตำบลไม้ขาว อำเภอถลาง จังหวัดภูเก็ต เริ่มทดลองในช่วงเดือนกันยายน-พฤศจิกายน พ.ศ. 2550 ใช้ระยะเวลาในการปรับสภาพสัตว์ทดลองและการเลี้ยง เป็นเวลา 60 วัน

3.4.2 สัตว์ทดลอง

กึ่งชาวแวนนาไม เพศเมีย อายุ 7 เดือน ซึ่งเกษตรกรเลี้ยงในบ่อดินและได้รับแต่อาหารสดเท่านั้น จำนวน 400 ตัว ทำเครื่องหมายที่บริเวณก้านตากุ้ง เมื่อเริ่มต้นน้ำหนักเฉลี่ย 32.79 ± 3.43 กรัม ความยาวเฉลี่ย 15.52 ± 0.64 เซนติเมตร

3.4.3 ชุดการทดลอง

ทดลองในบ่อกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 273 เซนติเมตร สูง 90 เซนติเมตร แบ่งบ่อออกเป็น 2 ส่วน ด้วยมุ้งเขียว ทั้งหมด 4 บ่อ บ่อละ 2 ซ้ำ นำแม่พันธุ์กุ้งขาวที่ซังน้ำหนัก, วัดความยาวและทำเครื่องหมายที่บริเวณก้านตาแล้ว จัดลงในแต่ละชุดการทดลองอย่างสุ่ม ชุดการทดลองละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 50 ตัว จัดเป็น 4 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดที่ 1 กลุ่มควบคุม (อาหารมีชีวิต เท่านั้น)

ชุดที่ 2 อาหารผสมฮอร์โมน 0.5% + อาหารมีชีวิต

ชุดที่ 3 อาหารผสมฮอร์โมน 1% + อาหารมีชีวิต

ชุดที่ 4 อาหารผสมฮอร์โมน 2% + อาหารมีชีวิต



รูปที่ 3.8 ลักษณะบ่อที่ใช้ในการทดลองเลี้ยง

3.4.4 การให้อาหาร

ก่อนเริ่มทำการทดลองปรับพฤติกรรมในการยอมรับอาหารนาน 1 สัปดาห์ ตลอดการทดลองให้อาหารวันละ 4 มื้อ/วัน (เวลา 10.00น., 13.00น., 17.00น. และ 21.00น.) กลุ่มควบคุมจะได้รับแต่อาหารสด คือ หอยแมลงภู่ (*Perna sp.*) และหมึกกล้วย (*Loligo sp.*) ส่วนกลุ่มที่ 2-4 จะได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ผสมฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน 2 มื้อ/วัน (เวลา 10.00น. และ 17.00น.) และได้รับอาหารสด 2 มื้อ/วัน (เวลา 13.00น. และ 21.00น.) โดยการให้อาหารจะให้ในปริมาณที่กินจนอิ่ม

3.4.5 การจัดการคุณภาพบ่อเลี้ยง

ทำความสะอาดพร้อมทั้งเปลี่ยนถ่ายน้ำ 90% ภายในบ่อเป็นประจำทุกวัน คุณภาพน้ำที่ตรวจวัด คือ อุณหภูมิ ความเค็ม pH โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (test kit) ตรวจวัด ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท

3.4.6 การวัดผลของอาหารเสริมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนต่อการพัฒนารังไข่แม่พันธุ์ กึ่งขาว

3.4.6.1 การพัฒนารังไข่แม่พันธุ์กึ่งขาว (Reproductive performance)

นำแม่พันธุ์กึ่งขาวเวนนาไม ซึ่งได้รับอาหารทดลองมาแล้วนาน 1 เดือน ในแต่ละชุดการทดลอง จำนวน 2 ซ้ำ ซ้ำละ 25 ตัว มาตัดก้านตา

พิจารณาระยะการพัฒนารังไข่ในแม่พันธุ์กึ่งขาวเวนนาไม จากลักษณะภายนอก สังเกตขนาดและสีของรังไข่ตามวิธีการของ Yano et al. (1988) ดังนี้

ระยะที่ 1 รังไข่มีลักษณะเป็นท่อนบาง ๆ โปรงใส จนแทบมองไม่เห็น

ระยะที่ 2 เริ่มมองเห็นรังไข่เป็นเส้นทึบที่บริเวณกลางหลัง

ระยะที่ 3 รังไข่เป็นเส้นสีเหลืองที่ทึบและหนามากขึ้น

ระยะที่ 4 รังไข่กว้างและหนาขึ้น มีสีส้มเข้ม

ศึกษาการพัฒนารังไข่และรังไข่ โดยพิจารณาจากความเร็วในการพัฒนารังไข่, ความถี่ในการวางไข่, ความตกไข่, ขนาดของไข่ (รูปที่ 3.9)

3.4.6.1.1 การพัฒนารังไข่และจำนวนครั้งในการวางไข่

สังเกตและจดบันทึกการพัฒนารังไข่ที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละวัน และจำนวนครั้งที่แม่พันธุ์วางไข่ ภายหลังจากได้รับอาหารทดลอง แล้วตัดก้านตา (รูปที่ 3.9)

3.4.6.1.2 ความตกไข่ (fecundity)

นำแม่พันธุ์ที่มีการพัฒนารังไข่ในระยะที่ 4 แยกนำไปวางในบ่อพักแม่พันธุ์ขนาด 200 ลิตร/ตัว ภายหลังจากที่แม่พันธุ์วางไข่แล้วนำแม่พันธุ์มาชั่งน้ำหนัก พร้อมทั้งสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำในบ่อวางแม่พันธุ์ปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วนับจำนวนไข่ในน้ำ 100 มิลลิลิตร 3 ครั้ง (รูปที่ 3.9) การคำนวณความตกไข่ ดังนี้

$$\text{ความตกไข่} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่ได้/ครั้ง}}{\text{น้ำหนักแม่พันธุ์ (กรัม)}}$$

3.4.6.1.3 ขนาดของไข่

ขนาดของฟองไข่สามารถวัดได้โดยเก็บตัวอย่างฟองไข่จากบ่อวางแม่พันธุ์ภายหลังจากที่เก็บน้ำเพื่อหาความตกไข่แล้ว วัดขนาดของฟองไข่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Model YS100, Nikon, USA) (Ayub and Ahmed, 2002) จำนวน 100 ฟอง ก่อนคำนวณค่าเฉลี่ยและ SD. (รูปที่ 3.9)

3.4.6.2 ศึกษาปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือด

3.4.6.2.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเมื่อได้รับ

อาหารทดลอง

การศึกษาระดับฮอร์โมนในแม่กึ่งระหว่างให้อาหารทดลองนาน 4 สัปดาห์ ใน 4 ชุดการทดลอง โดยจัดเป็นชุดการทดลองละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 25 ตัว เมื่อให้อาหารทดลองร่วมกับอาหารมีชีวิตครบ 1 สัปดาห์ สุ่มดูดเลือดแม่กึ่ง ชุดการทดลองละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ตัว วิธีการเก็บเลือดใช้เข็มขนาด 24G บริเวณแอ่งเลือด (บริเวณขาเดินคู่ที่ 5 และขาว่ายน้ำคู่ที่ 1) เก็บเลือดปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 1%Na-EDTA (สารป้องกันเลือดแข็งตัว) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยแม่กึ่งที่ดูดเลือดแล้วจะแยกไปไว้ในบ่อพักแม่พันธุ์ และไม่นำกลับมาทดลองอีก สุ่มแม่กึ่งที่เหลือในบ่อมาดูดเลือดเช่นเดิมทุกสัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์ แล้วนำเลือด (ผสม 1% Na-EDTA) ไปวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยเทคนิคเรดิโอ อิมมูโน เอสเส (Radioimmunoassay; RIA)

3.4.6.2.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนกับ

การพัฒนารังไข่

นำแม่พันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารทดลองที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชุดการทดลองมานาน 1 เดือน แล้วตัดก้านตา 1 ข้าง จัดเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 25 ตัว สุ่มเก็บเลือดแม่พันธุ์กึ่งในแต่ละระยะการพัฒนาของไข่ ระยะการพัฒนาละ 10 ตัว นำเลือดผสมกับ 1% Na-EDTA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยเทคนิคเรดิโอ อิมมูโน เอสเส (Radioimmunoassay; RIA)

3.4.6.3 การวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดโดยเทคนิคเรดิโอ

อิมมูโน เอสเส (Radioimmunoassay; RIA) (Kamonpatana et al., 1979)

ทำการวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่กึ่ง ที่โครงการใช้นิวเคลียร์เพื่อส่งเสริมกิจการผสมเทียมโคนมและกระบือปลัก คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.6.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างเลือดซึ่งผสมกับ 0.1%Na-EDTA ปริมาตร 150 ไมโครลิตร สกัดตัวอย่างด้วยไดเอทิล อีเทอร์ (Labscan Asia, Thailand) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมทั้งสองที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 วินาที แล้วปล่อยให้ตัวอย่างแยกชั้นจึงเก็บส่วนใสชั้นบน ทำให้แห้งด้วย vacuum dryer และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Kamonpatana et al., 1979)

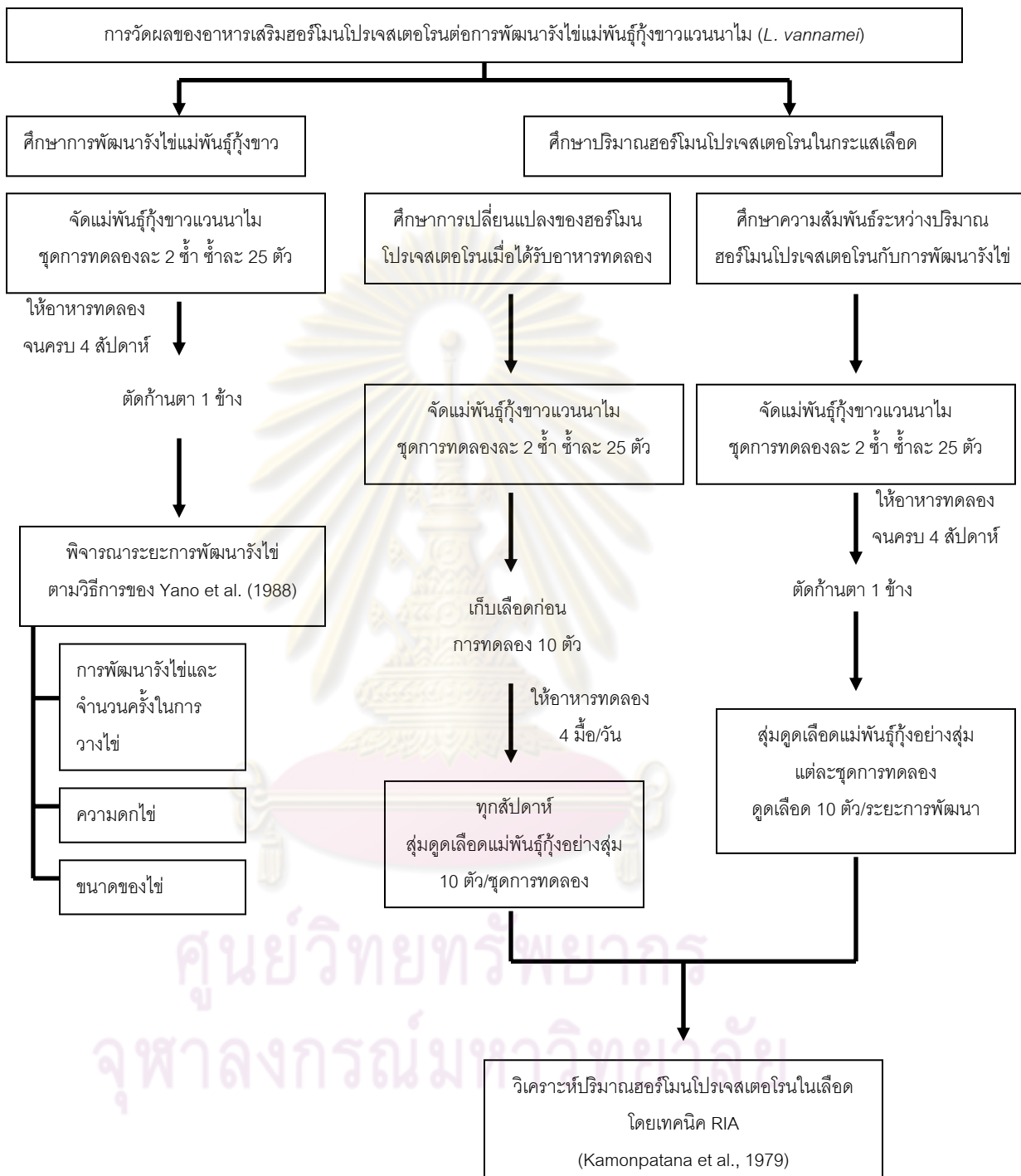
3.4.6.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด

นำตัวอย่างซึ่งผ่านการเตรียมและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาละลายด้วย Phosphate buffer solution (PBS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง นำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการบ่มแล้วมาผสมกับ Anti-Progesterone (Antibody; As-P) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที จากนั้นเติมสารกัมมันตภาพรังสีทริเทียม [(1,2,6,7-³H)P4] ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 12 ชั่วโมง ต่อมาเติม ice-cold dextran-coated charcoal ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และแยกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกตัวอย่าง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส จำนวน 3,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที เก็บส่วนใส ด้านบนและเติม Scintillation [0.01% 1,4-bis-214 Methyl-5-Phenylloxzolyyl-Benzole (POPOP), 0.3%P-Terphynyl (pTP) ละลายใน Toluene ปริมาตร 2.5 ลิตร] ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยเครื่อง Liquid Scintillation Counter (Beckman, USA) คำนวณระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเทียบกับกราฟมาตรฐานสารตัวอย่าง (Kamonpatana et al., 1979)

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทดสอบผลของอาหารเสริมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ระดับต่าง ๆ ต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ในแม่พันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน และทดสอบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลอง โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.9 การวัดผลของอาหารเสริมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนต่อการพัฒนารังไข่แม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม (*L. vannamei*)

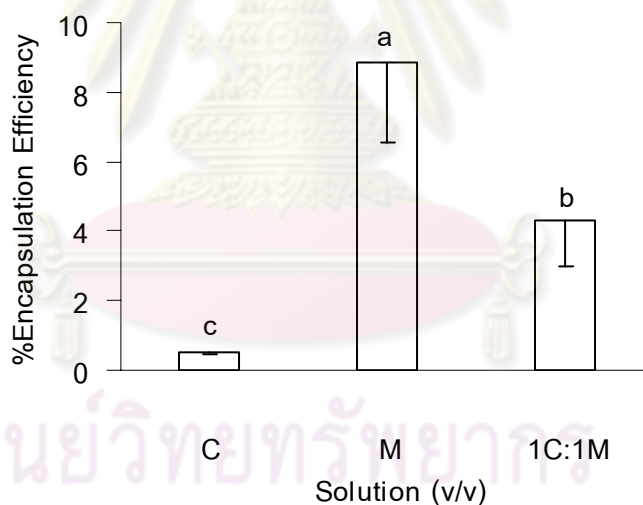
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ไมโครแคปซูลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่เคลือบด้วยโคโตซานและมอลโทเดกซ์ทรีน โดยเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย

4.1.1 คุณสมบัติวัสดุที่นำมาผลิตเป็นผนังเคลือบไมโครแคปซูลเพื่อเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

วัสดุที่นำมาผลิตเป็นผนังเคลือบไมโครแคปซูลที่ต่างกันส่งผลให้ความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ไมโครแคปซูลที่ผนังสร้างจากมอลโทเดกซ์ทรีนมีประสิทธิภาพในการเก็บกักฮอร์โมนสูงที่สุด คือ $8.83 \pm 2.25\%$ รองลงมา คือ โคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีน (1:1;v/v) ($4.3 \pm 1.32\%$) และสารละลายโคโตซาน ($0.53 \pm 0.05\%$) ตามลำดับ (รูปที่ 4.1)

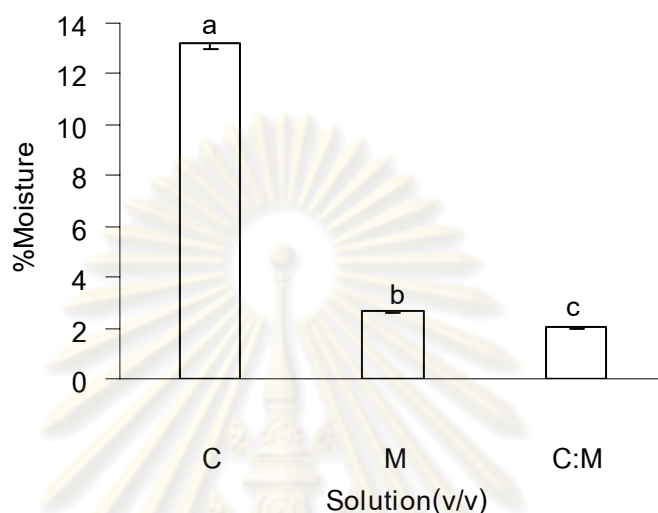


C): สารละลายโคโตซาน - M): สารละลายมอลโทเดกซ์ทรีน
C:M): สารละลายโคโตซาน : สารละลายมอลโทเดกซ์ทรีน (1:1; v/v)

รูปที่ 4.1 ผลของวัสดุที่นำมาผลิตเป็นผนังเคลือบไมโครแคปซูลต่อความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนภายในไมโครแคปซูล

- ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย \pm SD.
- อักษรที่แสดงเหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
- ทำการทดลองชุดละ 3 ครั้ง

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของไมโครแคปซูลที่เคลือบด้วยผนังจากวัสดุที่แตกต่างกันพบว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ไมโครแคปซูลที่ผนังสร้างจากไคโตซานมีความชื้นสูงสุด ($13.19 \pm 0.21\%$) รองลงมาคือ มอลโทเดกซ์ทริน ($2.71 \pm 0.13\%$) และไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทริน (1:1;v/v) ($2.08 \pm 0.10\%$) ตามลำดับ (รูปที่ 4.2)



C) : สารละลายไคโตซาน - M) : สารละลายมอลโทเดกซ์ทริน

C:M) : สารละลายไคโตซาน : สารละลายมอลโทเดกซ์ทริน (1:1; v/v)

รูปที่ 4.2 ผลของวัสดุที่นำมาผลิตเป็นผนังเคลือบไมโครแคปซูลต่อความชื้นของไมโครแคปซูล

- ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย \pm SD.
- อักษรที่แสดงเหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
- ทำการทดลองชุดละ 3 ครั้ง

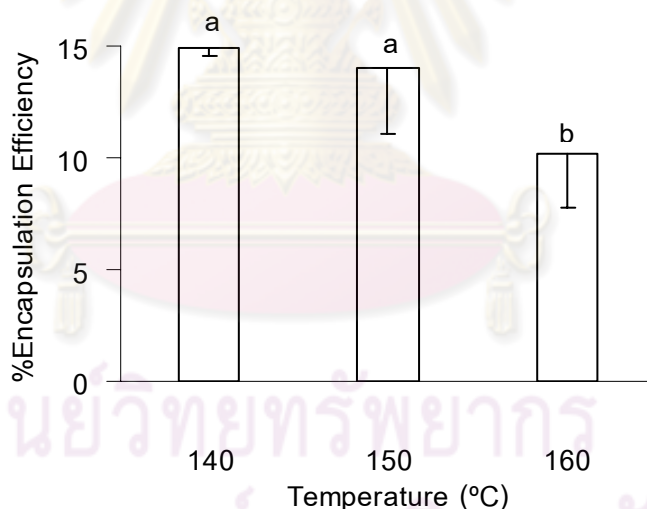
ภายหลังจากผลิตไมโครแคปซูลเพื่อห่อหุ้มโปรเจสเทอโรนแล้ว ขั้นตอนต่อไปจะนำไมโครแคปซูลที่ผลิตได้ไปผสมและผลิตเป็นอาหารสำเร็จรูป แล้วศึกษาถึงผลของอาหารสำเร็จรูปเสริมฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนต่อการพัฒนารังไข่ในแม่พันธุ์กึ่งขาว ซึ่งเป็นสัตว์น้ำ ดังนั้นการศึกษาถึงความคงทนในน้ำของไมโครแคปซูลจึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อให้แน่ใจว่าฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนจะเดินทางเข้าสู่ร่างกายของกึ่งขาว โดยไม่สูญเสียไปจากการละลายน้ำ

การทดสอบการละลายน้ำของไมโครแคปซูลเบื้องต้น ของไมโครแคปซูลซึ่งผลิตจากวัสดุเคลือบที่แตกต่างกันในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ไมโครแคปซูลที่ผลิตจากมอลโทเดกซ์ทรินละลายน้ำและแตกตัวทันทีในน้ำทะเล (pH 8.3) ขณะที่ไมโครแคปซูลซึ่งผลิตจากไคโตซานและวัสดุผสมระหว่างไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทริน (1:1; v/v) เกิดอาการบวมน้ำ แต่ยังสามารถคงตัวอยู่ในน้ำได้มากกว่า 30 นาที ดังนั้นไมโครแคปซูลที่ผลิตได้จากวัสดุผสมระหว่างไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทริน

(1:1; v/v) จึงเหมาะสำหรับเป็นผนังเคลือบไมโครแคปซูลสำหรับเคลือบโปรเจสเตรอโรน เพื่อเป็นอาหารกระตุ้นการพัฒนารังไข่ในกึ่งขาว เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีกว่าโคโตซานไมโครแคปซูล คือ มีความสามารถในการเก็บกักโปรเจสเตรอโรนได้ดีกว่ารวมทั้งมีความชื้นต่ำกว่า และมีคุณสมบัติที่ดีกว่ามอลโทเดกซ์ทรินไมโครแคปซูล คือ ไม่แตกตัวทันทีที่สัมผัสกับน้ำ จึงเลือกใช้ผนังซึ่งเป็นวัสดุผสมระหว่างโคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทริน (1:1; v/v) เป็นผนังสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4.1.2 ผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตรอโรนของไมโครแคปซูล

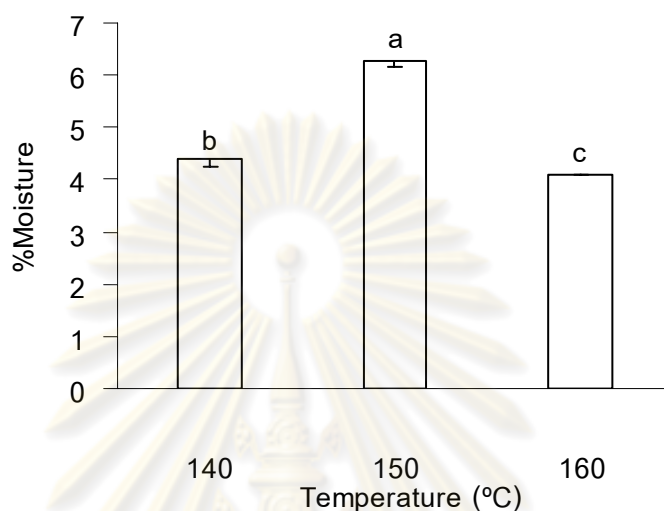
อุณหภูมิต่ำส่งผลให้ความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตรอโรนสูงขึ้น ไมโครแคปซูลที่ผนังสร้างจากโคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทริน (1:1; v/v) ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส มีความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตรอโรนดีที่สุด คือ $14.9 \pm 0.34\%$ ไม่แตกต่างจาก ไมโครแคปซูลที่ผลิตจากอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ($13.97 \pm 2.94\%$) แต่ต่างจากไมโครแคปซูลที่ผลิตจากอุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส ($10.17 \pm 2.38\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 ผลของอุณหภูมิที่ต่างกันต่อความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตรอโรนภายในไมโครแคปซูล

- ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm SD.
- อักษรที่แสดงเหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
- ทำการทดลองชุดละ 3 ครั้ง

อุณหภูมิในการผลิตต่างกันส่งผลให้ความชื้นของไมโครแคปซูลที่ผนังเคลือบด้วยไคโตซาน :มอลโทเดกซ์ทริน (1:1; v/v) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ไมโครแคปซูลที่ผลิตจากอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส มีความชื้นสูงที่สุด ($6.27 \pm 0.12\%$) รองลงมาคือ อุณหภูมิ 140 และ 160 องศาเซลเซียส ($4.40 \pm 0.17\%$ และ $4.10 \pm 0.00\%$) ตามลำดับ (รูปที่ 4.4)



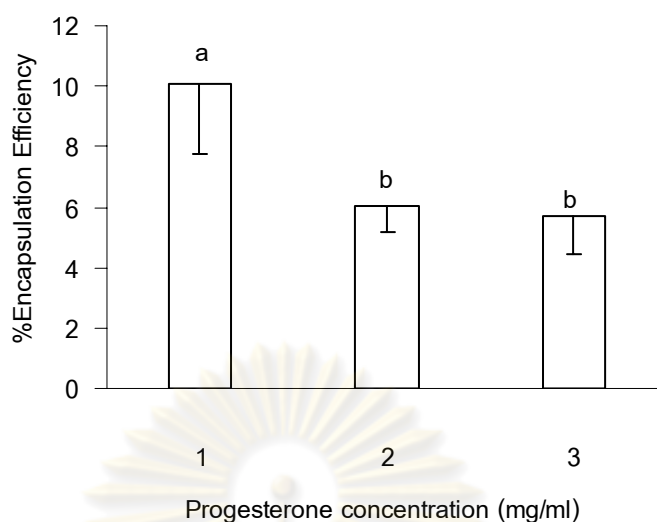
รูปที่ 4.4 ผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อความชื้นของไมโครแคปซูล

- ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm SD.
- อักษรที่แสดงเหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
- ทำการทดลองชุดละ 3 ครั้ง

4.1.3 ปริมาณโปรเจสเตรอโรนสูงสุดที่ไมโครแคปซูลสามารถเก็บกักไว้ภายในไมโครแคปซูล

การเพิ่มปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตรอโรนภายในไมโครแคปซูลที่เคลือบด้วยผนังจากสารละลายไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทริน (1:1; v/v) มีผลให้ความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ไมโครแคปซูลสามารถเก็บกักปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตรอโรนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ได้ดีที่สุด ($10.10 \pm 2.36\%$) รองลงมา คือ 2 และ 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ($6.05 \pm 0.88\%$ และ $5.70 \pm 1.23\%$) (รูปที่ 4.5)



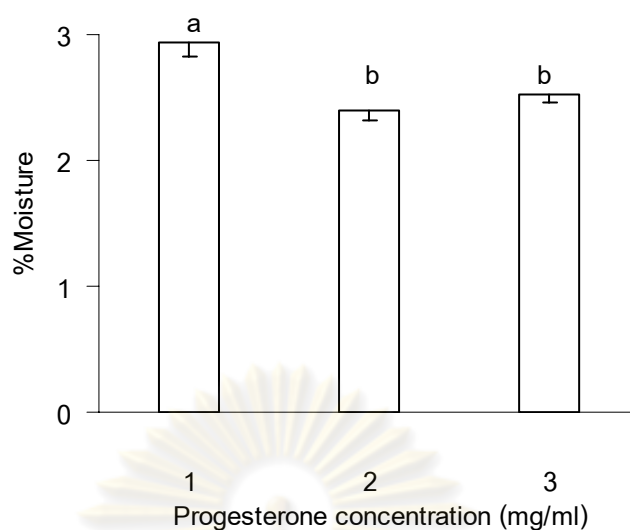
รูปที่ 4.5 ผลของปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่แตกต่างกันต่อความสามารถในการเก็บกัก

ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนภายในไมโครแคปซูล

- ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm SD.
- อักษรที่แสดงเหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
- ทำการทดลองชุดละ 3 ครั้ง

ความชื้นของไมโครแคปซูลซึ่งผสมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีปริมาณความชื้นสูงที่สุด ($2.93 \pm 0.11\%$) แตกต่างจากระดับ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ($2.52 \pm 0.07\%$) และ 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ($2.40 \pm 0.09\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.6)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



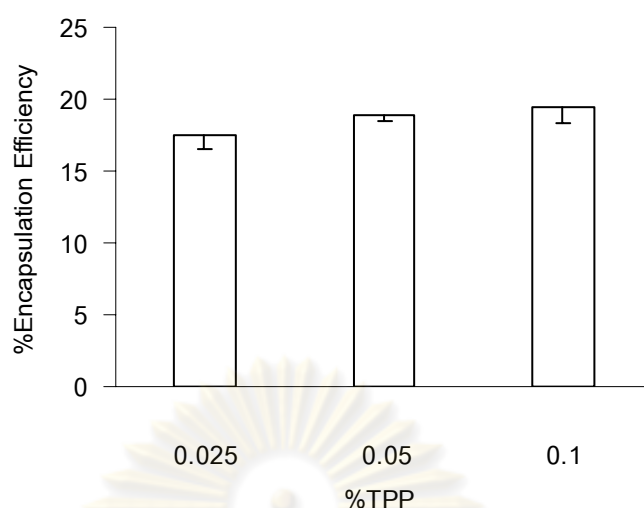
รูปที่ 4.6 ผลของปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่แตกต่างกันต่อความชื้นของไมโครแคปซูล

- ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm SD.
- อักษรที่แสดงเหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
- ทำการทดลองชุดละ 3 ครั้ง

4.1.4 ผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Pentasodium tripolyphosphate (TPP) (cross-linking agent) ต่อความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของไมโครแคปซูล

ความเข้มข้นของ TPP สูงขึ้นส่งผลให้ความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ไมโครแคปซูลที่ผสม 0.1% TPP มีความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนดีที่สุด คือ $19.51 \pm 1.15\%$ รองลงมาคือ 0.05% TPP ($18.94 \pm 0.41\%$) และ 0.025% TPP ($17.48 \pm 0.92\%$) ตามลำดับ (รูปที่ 4.7)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

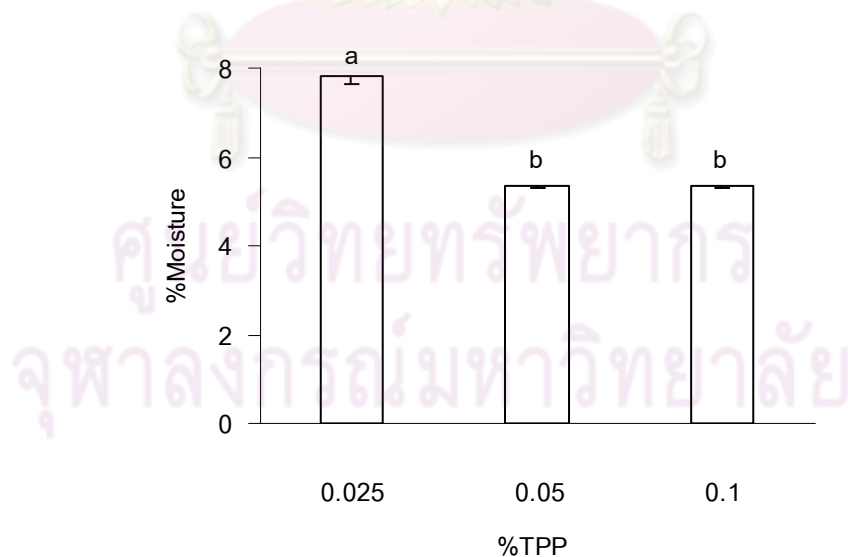


รูปที่ 4.7 ผลของความเข้มข้น TPP ที่แตกต่างกันต่อความสามารถในการเก็บกักฮอริโมน

โปรเจสเตรอโรนภายในไมโครแคปซูล

- ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm SD.
- ทำการทดลองชุดละ 3 ครั้ง

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TPP ส่งผลให้ความชื้นของไมโครแคปซูลลดต่ำลง 0.025%TPP มีปริมาณความชื้นสูงที่สุด ($7.82 \pm 0.17\%$) แตกต่างจากปริมาณความชื้นที่พบใน 0.05%TPP ($5.35 \pm 0.04\%$) และ 0.1%TPP ($5.33 \pm 0.01\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.8)

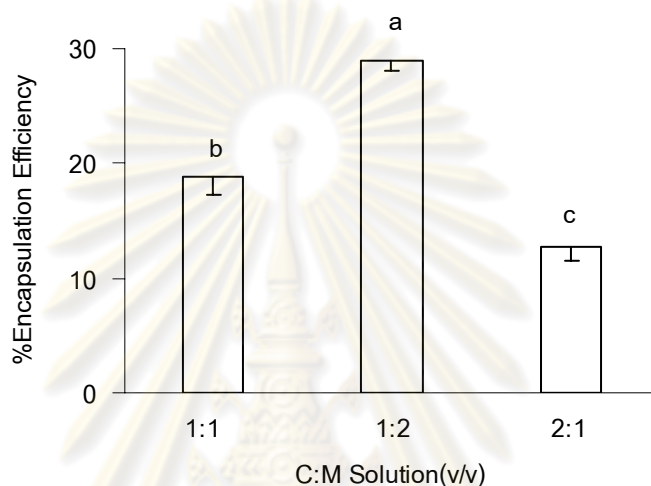


รูปที่ 4.8 ผลของความเข้มข้น TPP ที่แตกต่างกันต่อความชื้นของไมโครแคปซูล

- ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm SD.
- อักษรที่แสดงเหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
- ทำการทดลองชุดละ 3 ครั้ง

4.1.5 อัตราส่วนที่เหมาะสมของไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีนต่อความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีน ส่งผลให้ความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเพิ่มขึ้น และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อัตราส่วน 1C:2M มีความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนสูงที่สุด คือ $28.99 \pm 0.84\%$ รองลงมาคือ 1C:1M ($18.85 \pm 1.59\%$) และ 2C:1M ($12.76 \pm 1.16\%$) ตามลำดับ (รูปที่ 4.9)



1C:1M : สารละลายไคโตซาน : สารละลายมอลโทเดกซ์ทรีน (1:1; v/v)

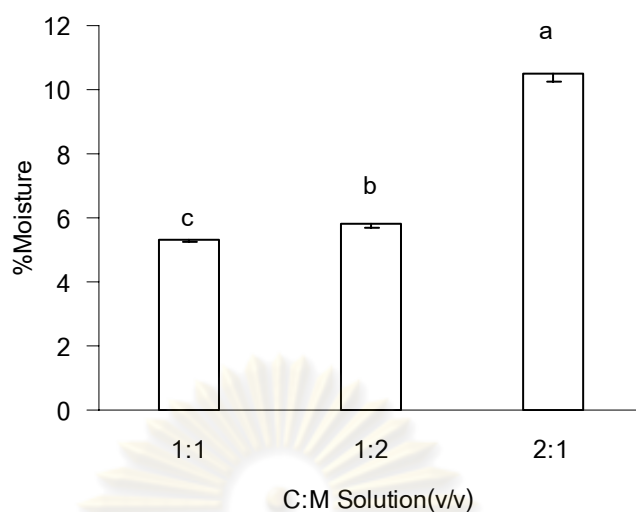
1C:2M : สารละลายไคโตซาน : สารละลายมอลโทเดกซ์ทรีน (1:2; v/v)

2C:1M : สารละลายไคโตซาน : สารละลายมอลโทเดกซ์ทรีน (2:1; v/v)

รูปที่ 4.9 อัตราส่วนที่ต่างกันของไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีนต่อความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนภายในไมโครแคปซูล

- ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm SD.
- อักษรที่แสดงเหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
- ทำการทดลองชุดละ 3 ครั้ง

ความขึ้นของไมโครแคปซูลที่ผลิตจากอัตราส่วนระหว่างไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีน ที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) ระดับ 2C:1M มีความขึ้นสูงที่สุด ($10.52 \pm 0.25\%$) รองลงมา คือ 1C:2M ($5.84 \pm 0.14\%$) และ 1C:1M ($5.31 \pm 0.04\%$) ตามลำดับ (รูปที่ 4.10)



1C:1M : สารละลายไคโตซาน : สารละลายมอลโทเดกซ์ทรีน (1:1; v/v)

1C:2M : สารละลายไคโตซาน : สารละลายมอลโทเดกซ์ทรีน (1:2; v/v)

2C:1M : สารละลายไคโตซาน : สารละลายมอลโทเดกซ์ทรีน (2:1; v/v)

รูปที่ 4.10 ผลของอัตราส่วนที่แตกต่างกันของไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีนต่อความชื้น

ของไมโครแคปซูล

- ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm SD.

- อักษรที่แสดงเหนือกราฟแห่งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

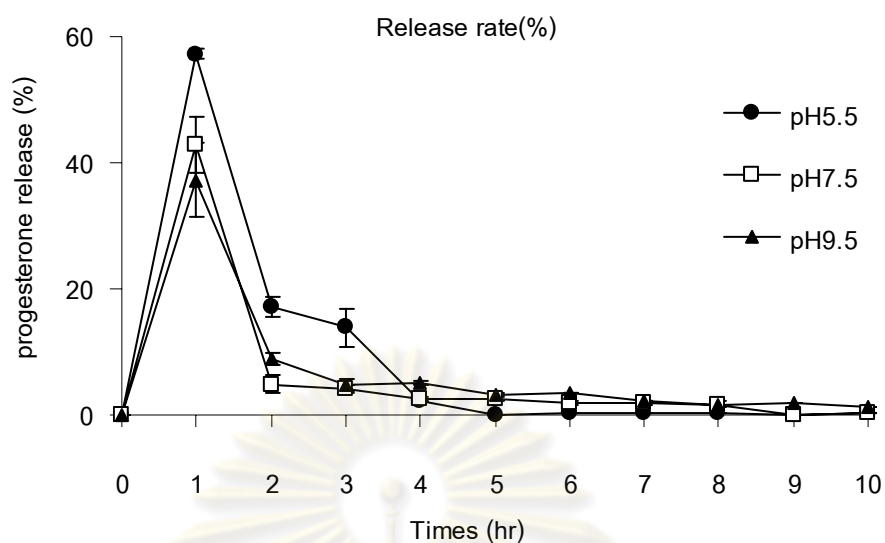
- ทำการทดลองชุดละ 3 ครั้ง

4.2 คุณสมบัติของ Hormone bound microencapsulation (HBM)

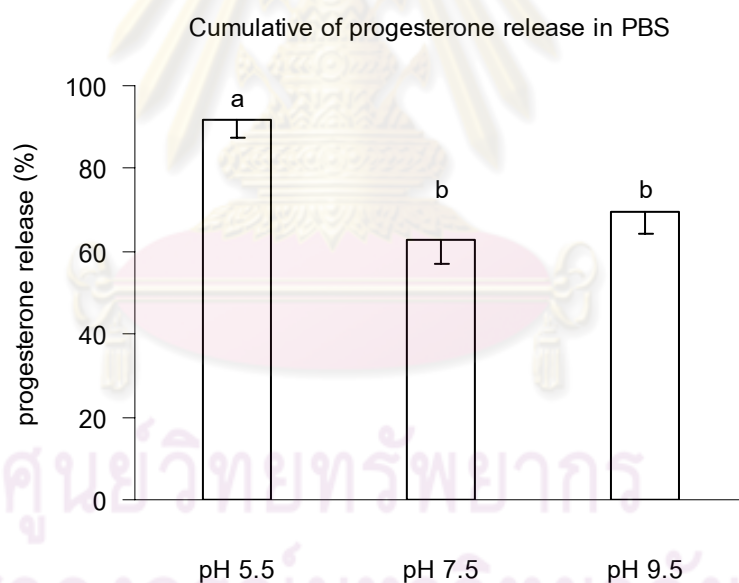
4.2.1 ความสามารถในการปลดปล่อยของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่บรรจุอยู่ในไมโครแคปซูลออกสู่ภายนอก (Controlled release)

การปลดปล่อยของไมโครแคปซูลที่ pH ต่างกัน ณ ชั่วโมงที่ 1 ทั้ง 3 pH มีอัตราการปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงที่สุด โดยที่ pH 5.5 มีอัตราการปลดปล่อยมากที่สุด เท่ากับ $57.25 \pm 0.78\%$ รองลงมาคือ pH 7.5 ($42.87 \pm 4.34\%$) และ pH 9.5 ($37.28 \pm 5.85\%$) ตามลำดับ อัตราการปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนทั้ง 3 pH เริ่มคงที่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 4 (รูปที่ 4.11)

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ณ ชั่วโมงที่ 10 การปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนรวมออกสู่สารละลาย PBS โดยที่ pH 5.5 ไมโครแคปซูลสามารถปลดปล่อยได้ $91.82 \pm 4.52\%$ ต่างจาก pH 9.5 ($69.77 \pm 5.68\%$) และ pH 7.5 (69.77 ± 5.68) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.12)



รูปที่ 4.11 อัตราการปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของไมโครแคปซูล ในสารละลาย PBS ที่มี pH ต่างกัน ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ



รูปที่ 4.12 การปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนออกจากไมโครแคปซูลสู่สารละลาย PBS แบบ สละสม ณ pH ที่แตกต่างกันเมื่อครบ 10 ชั่วโมง

- ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm SD.
- อักษรที่แสดงเหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
- ทำการทดลองชุดละ 3 ครั้ง

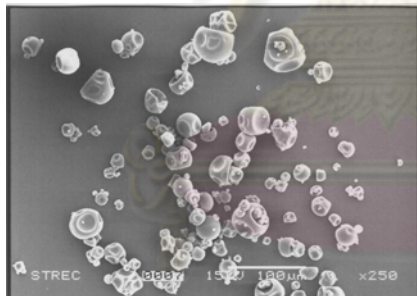
4.2.2 ลักษณะทางกายภาพของไมโครแคปซูล

ลักษณะทางกายภาพของไมโครแคปซูลเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า มีลักษณะเป็นผงสีขาว นวล ค้ำยผงแป้ง (รูปที่ 4.13)

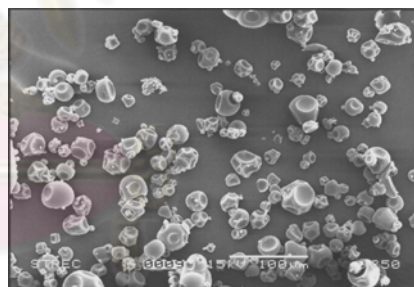


รูปที่ 4.13 ลักษณะผงโคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรินไมโครแคปซูล เมื่อมองด้วยตาเปล่า

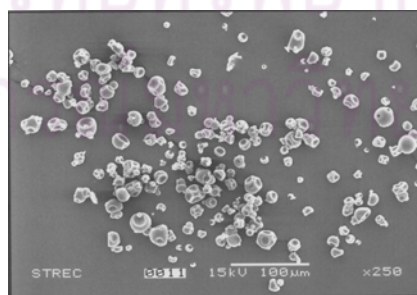
ลักษณะทางกายภาพของไมโครแคปซูลจากอัตราส่วนระหว่างโคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทริน ที่แตกต่างกันเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่ามีรูปร่างคล้ายคลึงกัน คือ ค่อนข้างกลม บิดเบี้ยว ผิวหนังขรุขระ แต่มีขนาดที่แตกต่างกัน โดยเม็ดแคปซูลที่มีอัตราส่วนของโคโตซานสูง (ค) 2C:1M จะมีขนาดเล็กกว่าเม็ดแคปซูลที่มีอัตราส่วนของโคโตซานต่ำ (ก) 1C:1M (ข) 1C:2M (รูปที่ 4.14)



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.14 ลักษณะทางกายภาพของเม็ดแคปซูลที่ผลิตจากอัตราส่วนที่ต่างกันของโคโตซาน และมอลโทเดกซ์ทริน (ก) 1C:1M (ข) 1C:2M (ค) 2C:1M ได้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 250 เท่า

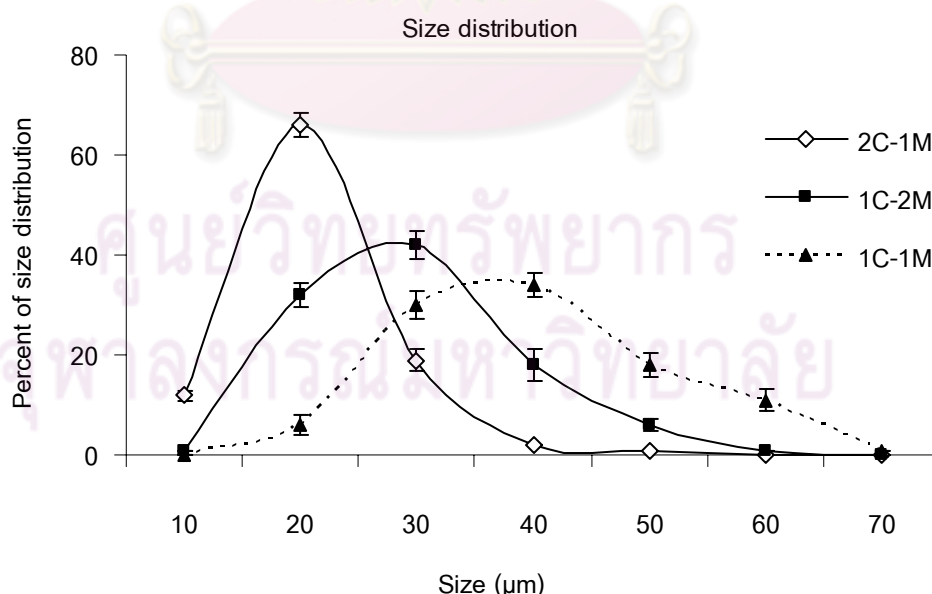
อัตราส่วนที่แตกต่างกันระหว่างไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีนส่งผลต่อขนาดไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีนไมโครแคปซูลที่ห่อหุ้มฮอริโมนโปรเจสเตอโรนแตกต่างกัน ไมโครแคปซูลมีขนาดอยู่ระหว่าง 7-70 μm จากทั้ง 3 อัตราส่วน

ไมโครแคปซูลที่ผลิตจากอัตราส่วนไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีน 1:1 (1C:1M; v/v) มีขนาด $31 \geq 40 \mu\text{m}$ ($34.00 \pm 2.59\%$) มากที่สุด รองลงมา คือขนาด $21 \geq 30 \mu\text{m}$ ($30.00 \pm 2.62\%$) $41 \geq 50 \mu\text{m}$ ($18.00 \pm 2.30\%$) $51 \geq 60 \mu\text{m}$ ($11.00 \pm 2.30\%$) $11 \geq 20 \mu\text{m}$ ($6.00 \pm 2.13\%$) และ $61 \geq 70 \mu\text{m}$ ($1.00 \pm 0.00\%$) (รูปที่ 4.15)

ไมโครแคปซูลที่ผลิตจากอัตราส่วนไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีน 1:2 (1C:2M; v/v) มีขนาด $21 \geq 30 \mu\text{m}$ ($42.00 \pm 2.68\%$) มากที่สุด รองลงมา คือขนาด $11 \geq 20 \mu\text{m}$ ($30.00 \pm 2.22\%$) $31 \geq 40 \mu\text{m}$ ($18.00 \pm 3.22\%$) $41 \geq 50 \mu\text{m}$ ($6.00 \pm 1.27\%$) $0 \geq 10 \mu\text{m}$ และ $51 \geq 60 \mu\text{m}$ ($1.00 \pm 0.00\%$) (รูปที่ 4.15)

ไมโครแคปซูลที่ผลิตจากอัตราส่วนไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีน 2:1 (2C:1M; v/v) มีขนาด $11 \geq 20 \mu\text{m}$ ($66.00 \pm 2.55\%$) มากที่สุด รองลงมา คือขนาด $21 \geq 30 \mu\text{m}$ ($19.00 \pm 2.22\%$) $0 \geq 10 \mu\text{m}$ ($12.00 \pm 1.00\%$) และ $41 \geq 50 \mu\text{m}$ ($1.00 \pm 0.00\%$) (รูปที่ 4.15)

เปรียบเทียบไมโครแคปซูลซึ่งผลิตจากอัตราส่วนที่แตกต่างกันของไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีน พบว่า 1C:1M มีขนาดไมโครแคปซูลใหญ่ที่สุด รองลงมา คือ 1C:2M และ 2C:1M ตามลำดับ (รูปที่ 4.15)



รูปที่ 4.15 ขนาดของไมโครแคปซูลที่ห่อหุ้มฮอริโมนโปรเจสเตอโรน ผลิตด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย จากอัตราส่วนระหว่างไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีนที่แตกต่างกัน

4.3 ผลของ Hormone bound microcapsulated diet (HBMD) ต่อการเจริญของระบบ สืบพันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม

4.3.1 วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารผสมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

ภายหลังจากเตรียมอาหารผสมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในปริมาณที่แตกต่างกัน 3 ระดับ แล้ว เมื่อนำอาหารเม็ดสำเร็จรูปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ พบคุณค่าทางโภชนาการตามตารางที่ 4.1 และมีลักษณะเม็ดอาหารทางกายภาพ ดังรูป 4.16

ตารางที่ 4.1 คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง (ค่าเฉลี่ย \pm SD.)

ชุดการทดลอง	เปอร์เซ็นต์ไขมัน	เปอร์เซ็นต์โปรตีน	เปอร์เซ็นต์ความชื้น	เปอร์เซ็นต์ใยอาหาร	เปอร์เซ็นต์ถั่ว
0.5%HBMD	11.80 \pm 0.69	52.63 \pm 0.27	30.38 \pm 0.16	3.26 \pm 0.06	17.70 \pm 0.27
1%HBMD	11.70 \pm 0.23	53.00 \pm 0.51	29.50 \pm 0.01	3.13 \pm 0.00	16.77 \pm 0.10
2%HBMD	11.34 \pm 0.04	52.30 \pm 0.45	31.47 \pm 0.04	2.37 \pm 0.65	16.52 \pm 0.04



รูปที่ 4.16 ลักษณะทางกายภาพของอาหารเม็ดทดลองที่ผสมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

4.3.2 การเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดกึ่งภายหลังได้รับอาหารทดลอง โดยไม่มีการตัดก้านตา

อาหารทดลองที่แตกต่างกันส่งผลให้ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแตกต่างกันเมื่อไม่มีการตัดก้านตา อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ในกลุ่มควบคุมกรณีที่ไม่ตัดก้านตาไม่พบความแตกต่างของปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด (รูปที่ 4.17)

ภายหลังจากให้อาหารทดลองครบ 1 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแปรผันตามความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนซึ่งผสมลงในอาหาร กลุ่มทดลอง 1%HBMD (P2) ส่งผลให้แม่กึ่งมีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงที่สุด คือ 0.7670 ± 0.12 ng/ml แต่เมื่อลดความเข้มข้นของฮอร์โมนผสมลงในอาหารเป็น 1.1 mg-kg⁻¹ อาหาร (กลุ่มทดลอง 0.5% HBMD (P1)) ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดกลับเพิ่มน้อยลงสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณฮอร์โมนที่ผสมลงในอาหาร (0.4865 ± 0.10 ng/ml) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ผสมลงในอาหารให้สูงขึ้นเป็น 3.3 mg-kg⁻¹ อาหาร (กลุ่มทดลอง 2%HBMD (P3)) มีผลให้ความเข้มข้นของฮอร์โมนลดลง เนื่องจากพบปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับแม่กึ่งซึ่งได้รับอาหารทดลอง พบปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเพียง 0.1817 ± 0.08 ng/ml (รูปที่ 4.17)

ภายหลังจากให้อาหารจนครบ 1 สัปดาห์ แม้จะให้อาหารต่อจนครบ 4 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนลดลงและคงที่เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 4 (รูปที่ 4.17)

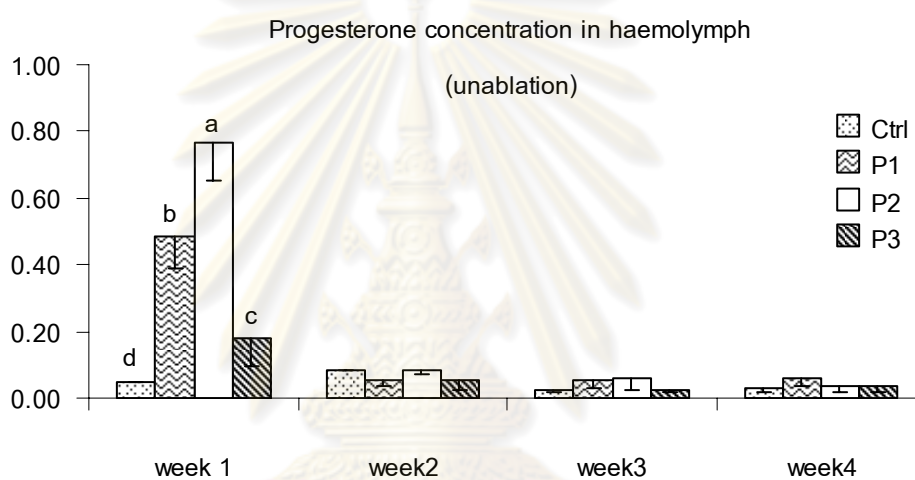
ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดเมื่อได้รับอาหารทดลองที่แตกต่างกันจนครบ สัปดาห์ที่ 2 ลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างชุดการทดลอง ($p > 0.05$) แม่กึ่งในกลุ่มทดลอง 1%HBMD (P2) พบปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดสูงที่สุด (0.0839 ± 0.01 ng/ml) เช่นเดียวกับสัปดาห์ที่ 1 เมื่อเทียบกับแม่กึ่งซึ่งได้รับอาหารผสมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเช่นเดียวกัน รองลงมา คือ กลุ่มทดลอง 2%HBMD (P3) (0.0521 ± 0.03 ng/ml) และกลุ่มทดลอง 0.5%HBMD (P1) (0.0512 ± 0.01 ng/ml) ตามลำดับ (รูปที่ 4.17)

ในสัปดาห์ที่ 3 ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด ลดต่ำลงมากกว่าสัปดาห์ที่ 2 ในทุกกลุ่มการทดลองและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างชุดการทดลอง ($p > 0.05$) ในทุกกลุ่มทดลอง กลุ่มทดลอง 1%HBMD (P2) มีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงที่สุด คือ 0.0580 ± 0.03 ng/ml เช่นเดียวกับสัปดาห์ที่ 1 และ 2 รองลงมา คือ 0.5%HBMD (P1) (0.0529 ± 0.02 ng/ml) และกลุ่มทดลอง 2%HBMD (P3) (0.0232 ± 0.00 ng/ml) ตามลำดับ (รูปที่ 4.17)

สัปดาห์ที่ 4 ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเกือบคงที่ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากสัปดาห์ที่ 3 โดยกลุ่มทดลอง 0.5%HBMD ส่งผลให้แม่กึ่งมีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมากที่สุด เท่ากับ 0.0605 ± 0.02 ng/ml รองลงมา คือ กลุ่มทดลอง 1%HBMD (0.0379 ± 0.02 ng/ml) และ

2%HBMD (0.0375 ± 0.02 ng/ml) ตามลำดับ แต่พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($p > 0.05$) (รูปที่ 4.17)

ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่กึ่งที่ไม่ได้ตัดก้านตาของกลุ่มควบคุม มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณต่ำมากเมื่อเทียบกับแม่กึ่งในกลุ่มที่ได้รับอาหารทดลอง ตลอดระยะเวลา 4 สัปดาห์ ภายหลังจากได้รับอาหารสครบ 1 สัปดาห์ พบปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเพียง 0.0491 ± 0.00 ng/ml และสูงขึ้นเมื่อได้รับอาหารครบสัปดาห์ที่ 2 (0.0863 ± 0.00 ng/ml) จากนั้นลดต่ำลงเมื่อครบสัปดาห์ที่ 3 (0.0229 ± 0.00 ng/ml) และคงที่เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 4 ปริมาณ (0.0281 ± 0.01 ng/ml)



รูปที่ 4.17 ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดของแม่พันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม ในแต่ละสัปดาห์ภายหลังจากได้รับอาหารทดลอง จนครบ 4 สัปดาห์

- ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm SD.
- อักษรที่แสดงเหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแต่ละสัปดาห์แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($p < 0.05$)
- ทำการทดลองชุดการทดลองละ 2 ครั้ง ครั้งละ 25 ตัว

4.3.2 ผลของอาหารเสริมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนต่อการพัฒนารังไข่กึ่งขาว แวนนาไม หลังจากให้อาหารทดลองนาน 1 เดือน แล้วตัดตา

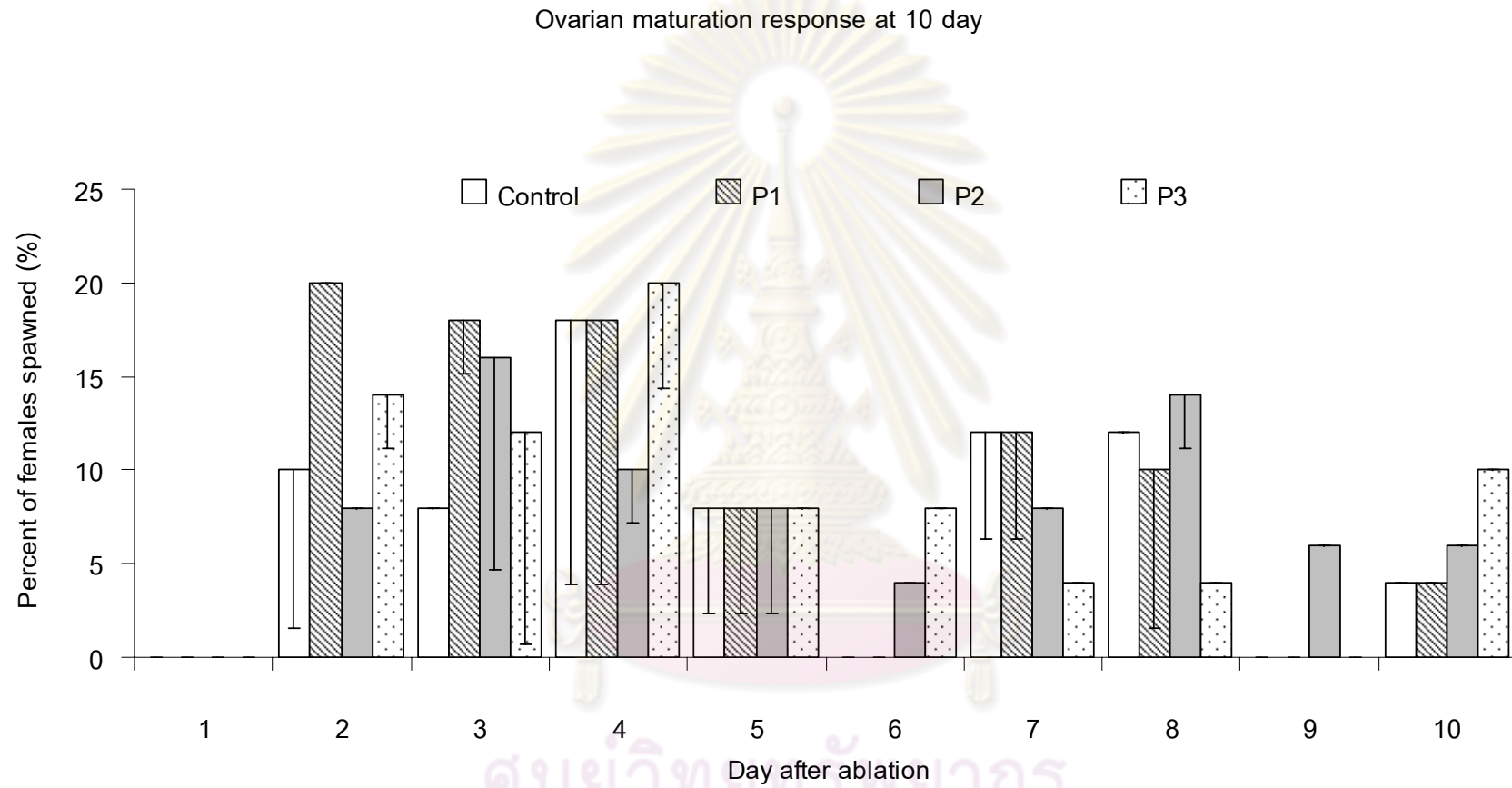
4.3.2.1 การพัฒนารังไข่แม่พันธุ์กึ่ง (Reproductive performance)

4.3.2.1.1 การพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม

แม่กึ่งในทุกกลุ่มการทดลองมีการพัฒนารังไข่ครั้งแรกภายหลังการตัดก้านตา 2 วัน โดยแม่กึ่งในกลุ่ม 0.5%HBMD(P1) พบจำนวนแม่กึ่งที่เริ่มพัฒนารังไข่มากที่สุดเท่ากับ $20 \pm 0.00\%$ รองลงมา คือ กลุ่ม 2%HBMD(P3) ($14 \pm 2.83\%$) กลุ่มควบคุม ($10 \pm 8.49\%$) และ 1%HBMD(P2) ($8 \pm 0.00\%$) ตามลำดับ แต่ทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) (รูปที่ 4.18)

แต่ละกลุ่มมีวันที่พบจำนวนแม่กึ่งพัฒนารังไข่สูงที่สุดต่างกันออกไป แม่กึ่งในกลุ่มทดลอง 0.5%HBMD(P1) จะมีจำนวนแม่กึ่งพัฒนารังไข่สูงที่สุดในวันที่ 2 ภายหลังการตัดก้านตา ($20 \pm 0.00\%$) ต่อมาในวันที่ 3 ภายหลังการตัดก้านตา แม่กึ่งในกลุ่มทดลอง 1%HBMD(P2) จะมีการพัฒนาสูงที่สุดเท่ากับ $16 \pm 11.31\%$ ส่วนแม่กึ่งกลุ่ม 2%HBMD(P3) และกลุ่มควบคุมนั้นมีจำนวนแม่กึ่งที่เกิดการพัฒนาสูงที่สุดในวันเดียวกัน คือวันที่ 4 เท่ากับ $20 \pm 5.66\%$ และ $18 \pm 14.14\%$ ตามลำดับ (รูปที่ 4.18)

แม่กึ่งทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวนแม่กึ่งที่เกิดการพัฒนาสูงที่สุด 2 ช่วง ภายหลังจากพัฒนาช่วงแรกแล้ว จำนวนแม่กึ่งที่พัฒนารังไข่จะค่อย ๆ ลดต่ำลง และสูงขึ้นอีกครั้ง ประมาณวันที่ 7-8 ใน 3 กลุ่มทดลอง คือ กลุ่มควบคุม ($12 \pm 5.66\%$) กลุ่ม 0.5%HBMD(P1) ($12 \pm 5.66\%$) และกลุ่ม 1%HBMD(P2) ($14 \pm 2.83\%$) กลุ่มที่ขึ้นซ้ำที่สุดในช่วงที่ 2 คือ กลุ่ม 2%HBMD(P2) ในวันที่ 10 ภายหลังการตัดก้านตา พบจำนวนแม่กึ่งที่เกิดการพัฒนาสูง เท่ากับ $10 \pm 0.0\%$ และจำนวนแม่กึ่งที่เกิดการพัฒนาสูงในรอบที่ 2 พบจำนวนน้อยกว่าจำนวนแม่กึ่งที่เกิดการพัฒนาในรอบที่ 1 ในทุกกลุ่มการทดลอง (รูปที่ 4.18)



รูปที่ 4.18 การพัฒนาไข่ที่พบครั้งแรกของแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม ภายในระยะเวลา 10 วัน หลังการตัดก้านตา

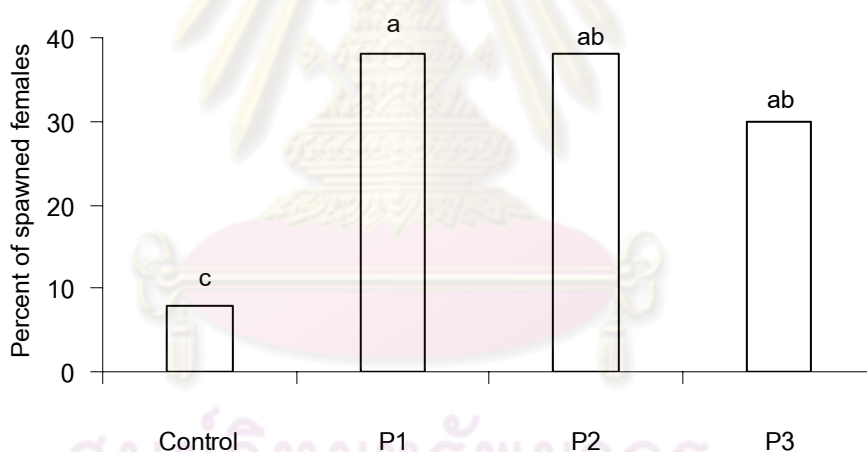
- ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm SD.

- ทำการทดลองชุดการทดลองละ 2 ครั้ง ครั้งละ 25 ตัว

4.3.2.1.2 จำนวนครั้งในการวางไข่ของแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม

แม่กุ้งที่ได้รับอาหารต่างสูตรกัน มีผลต่อจำนวนแม่กุ้งที่วางไข่ 1 ครั้ง แตกต่างกันภายในระยะเวลา 10 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยแม่พันธุ์ที่ได้รับอาหารทดลอง 0.5% HBMD (P1) และ 1% HBMD (P2) มีจำนวนแม่กุ้งที่วางไข่ 1 ครั้งสูงสุด คือ $38 \pm 0.71\%$ และ $38 \pm 3.54\%$ ตามลำดับ แตกต่างจากแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมซึ่งได้รับ อาหารทดลอง 2% HBMD (P3) ($30 \pm 0.71\%$) และกลุ่มควบคุม (8.00%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.19)

แม่กุ้งทั้ง 4 ชุดการทดลองสามารถวางไข่ได้อย่างน้อย 2 ครั้ง แต่ไม่พบในทุกซ้ำของแต่ละชุดการทดลอง จึงไม่สามารถทดสอบทางสถิติได้ โดยแม่กุ้งที่ได้รับอาหารชุดควบคุม, อาหารทดลอง 1% และ 2% HBMD พบแม่กุ้งที่วางไข่ 2 ครั้ง ชุดการทดลองละ 1 ตัว และแม่กุ้งที่ได้รับอาหารทดลอง 0.5% HBMD พบแม่กุ้งที่วางไข่ 2 ครั้ง ชุดละ 2 ตัว รวมทั้งสิ้น 4 ตัว หรือ $8 \pm 0\%$ ขณะที่แม่กุ้งซึ่งได้รับอาหารทดลอง 0.5% HBMD เท่านั้น ที่พบแม่กุ้งวางไข่ได้ถึง 3 ครั้ง จำนวน 1 ตัว จึงไม่สามารถทดสอบความแตกต่างทางสถิติได้



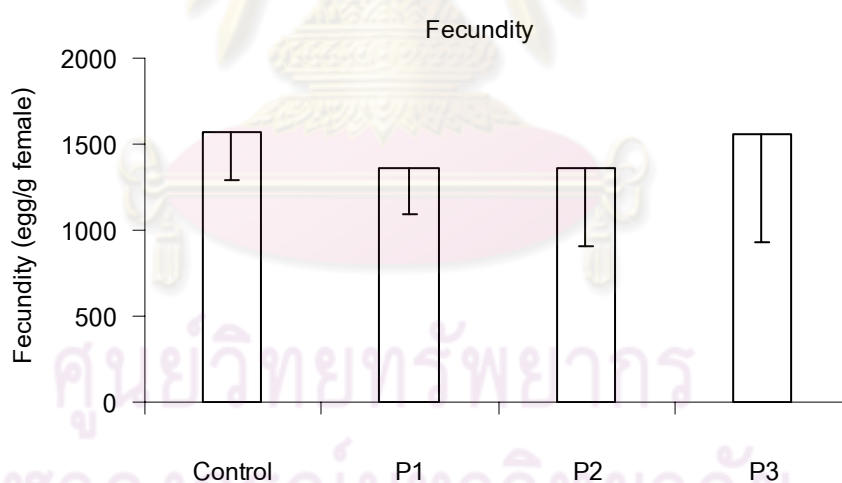
รูปที่ 4.19 จำนวนแม่กุ้งที่วางไข่ 1 ครั้ง หลังได้รับอาหารแตกต่างกัน

- ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm SD.
- อักษรที่แสดงเห็นอกรภาพแท่งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
- ทำการทดลองชุดการทดลองละ 2 ครั้ง ครั้งละ 25 ตัว

4.3.2.1.3 ความตกไข่ที่พบในแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม

ความตกไข่ของแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม ในการวางไข่ครั้งแรก แม่กุ้งที่ได้รับอาหารเสริมฮอร์โมนมีแนวโน้มความตกไข่ต่ำกว่าแม่กุ้งในกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) โดยแม่พันธุ์กลุ่มควบคุม มีความตกไข่สูงที่สุด คือ $1,567.99 \pm 280.98$ ฟอง/น้ำหนักตัว-แม่กุ้ง รองลงมาคือ กลุ่มทดลอง 2%HBMD $1,556.65 \pm 626.27$ ฟอง/น้ำหนักตัว-แม่กุ้ง, กลุ่มทดลอง 0.5%HBMD(P1) $1,364.60 \pm 277.32$ ฟอง/น้ำหนักตัว-แม่กุ้ง และกลุ่มทดลอง 1% HBMD (P2) $1,357.34 \pm 449.61$ ฟอง/น้ำหนักตัว-แม่กุ้ง ตามลำดับ (รูปที่ 4.20)

ความตกไข่ของแม่กุ้งที่วางไข่ครั้งที่ 2 มีแนวโน้มสูงกว่าแม่กุ้งที่วางไข่ครั้งที่ 1 แต่ไม่พบความตกไข่ในทุกซ้ำ ของแต่ละชุดการทดลอง เป็นเหตุให้ไม่สามารถทดสอบความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดการทดลองได้ โดยแม่กุ้งซึ่งวางไข่ครั้งที่ 2 ในกลุ่มควบคุม มีความตกไข่ 2,153 ฟอง/น้ำหนักตัว-แม่กุ้ง กลุ่มทดลอง 0.5% HBMD มีความตกไข่ 2,480 ฟอง/น้ำหนักตัว-แม่กุ้ง กลุ่มทดลอง 1%HBMD มีความตกไข่ $1,777.06 \pm 993.88$ ฟอง/น้ำหนักตัว-แม่กุ้ง และกลุ่มทดลอง 2% มีความตกไข่ 2,222 ฟอง/น้ำหนักตัว-แม่กุ้ง โดยแม่กุ้งที่วางไข่ 3 ครั้ง พบในกลุ่มทดลอง 0.5% HBMD จำนวน 1 ตัว พบความตกไข่ เท่ากับ 1,109 ฟอง/น้ำหนักตัว-แม่กุ้ง จึงไม่สามารถทดสอบความแตกต่างทางสถิติได้



รูปที่ 4.19 ความตกไข่ที่พบในแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารแตกต่างกันและวางไข่ 1 ครั้ง

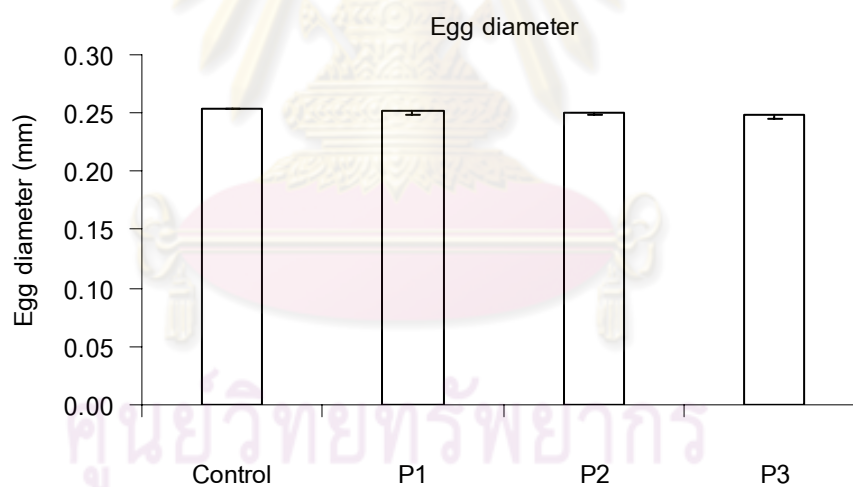
- ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm SD.

- ทำการทดลองชุดการทดลองละ 2 ครั้ง ครั้งละ 25 ตัว

4.3.2.1.4 ขนาดของไข่ที่ได้จากแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม

เส้นผ่านศูนย์กลางของไข่ในการวางไข่ 1 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($p>0.05$) แม่พันธุ์ที่ได้รับแต่อาหารมีชีวิตมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2540 ± 0.00001 มิลลิเมตร รองลงมาคือ แม่พันธุ์ที่ได้รับอาหารทดลอง 0.5%HBMD (0.2524 ± 0.0041 มิลลิเมตร), 1%HBMD (0.2501 ± 0.0009 มิลลิเมตร) และ 2%HBMD (0.2479 ± 0.0022 มิลลิเมตร) ตามลำดับ (รูปที่ 4.21)

ขนาดไข่ที่ได้จากแม่พันธุ์ที่มีการวางไข่ 2 ครั้ง มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจากการวางไข่ 1 ครั้ง โดยกลุ่มควบคุมยังคงมีขนาดไข่ใหญ่กว่าแม่พันธุ์ที่ได้รับอาหารทดลอง เส้นผ่านศูนย์กลางไข่ที่ได้จากแม่พันธุ์กลุ่มควบคุม กลุ่มทดลอง 0.5%, 1% และ 2% HBMD ซึ่งวางไข่ครั้งที่ 2 คือ 0.2568 , 0.2527 ± 0.0042 , 0.2512 และ 0.2520 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่พบในทุกซ้ำ ของแต่ละชุดการทดลอง จึงไม่สามารถทดสอบความแตกต่างทางสถิติขนาดไข่จากแม่พันธุ์ที่ได้รับอาหารทดลองที่แตกต่างกันได้ ส่วนขนาดของไข่ที่พบในแม่พันธุ์ที่ออกไข่ 3 ครั้ง ในกลุ่มทดลอง 0.5%HBMD จำนวน 1 ตัว คือ 0.2547 มิลลิเมตร แต่ไม่สามารถทดสอบความแตกต่างทางสถิติ



รูปที่ 4.21 ขนาดของไข่ที่พบในแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารแตกต่างกัน และวางไข่ 1 ครั้ง

- ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm SD.

- ทำการทดลองชุดการทดลองละ 2 ครั้ง ครั้งละ 25 ตัว

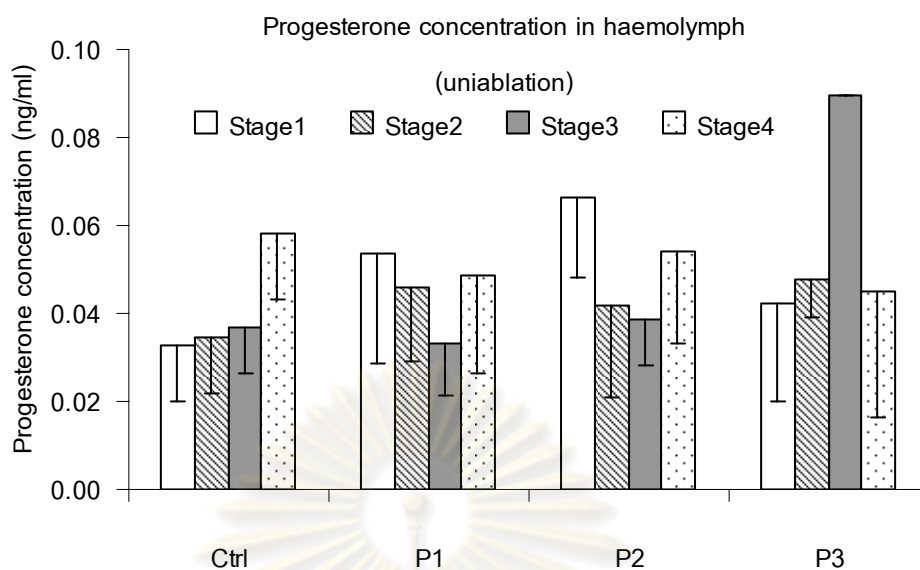
4.3.2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดกับการพัฒนารังไข่

แม่กึ่งในกลุ่มควบคุมมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดต่ำถึงแม้ตัดก้านตายังพบว่าปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในระยะเวลาการพัฒนาที่ 1-4 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดจากระยะการพัฒนาที่ 1-4 เท่ากับ 0.0326 ± 0.01 ng/ml 0.0345 ± 0.01 ng/ml 0.0369 ± 0.01 ng/ml 0.0583 ± 0.02 ng/ml ตามลำดับ (รูปที่ 4.22)

แม่กึ่งในกลุ่มทดลอง 0.5%HBMD (P1) พบปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงที่สุดเมื่อเริ่มต้น ในระยะที่ยังไม่มีการพัฒนารังไข่ (0.0535 ± 0.03 ng/ml) จากนั้นปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดลดลงอย่างต่อเนื่องจากระยะการพัฒนาที่ 1 ถึงระยะเวลาการพัฒนาที่ 3 คือ 0.0535 ± 0.02 ng/ml, 0.0461 ± 0.02 ng/ml และ 0.0333 ± 0.01 ng/ml ตามลำดับ และกลับเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะไข่แก่ (0.0485 ± 0.02 ng/ml) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในแต่ละระยะการพัฒนารังไข่ ($p > 0.05$)

กลุ่มทดลอง 1 %HBMD (P2) แม่กึ่งมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดเช่นเดียวกับกลุ่มทดลอง 1%HBMD คือ ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงที่สุดในระยะเวลาการพัฒนาที่ 1 พบปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด 0.0662 ± 0.02 ng/ml รองลงมาคือ ระยะการพัฒนาที่ 2 (0.0420 ± 0.02 ng/ml) และ 3 (0.0388 ± 0.01 ng/ml) ตามลำดับ จากนั้นปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดกลับเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะการพัฒนาที่ 4 (0.054 ± 0.02 ng/ml) แต่ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดจากระยะการพัฒนาที่แตกต่างกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$)

ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่กึ่งของกลุ่มทดลอง 2%HBMD (P3) พบปริมาณสูงที่สุดในระยะเวลาการพัฒนาที่ 1 0.0424 ± 0.02 ng/ml โดยปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะการพัฒนาที่ 2 (0.0477 ± 0.01 ng/ml) และสูงที่สุดเมื่อเข้าสู่ระยะการพัฒนาที่ 3 (0.0894 ± 0.00 ng/ml) จากนั้นปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนลดต่ำลงอีกครั้งเมื่อเข้าสู่ระยะการพัฒนาที่ 4 (0.0450 ± 0.03 ng/ml) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$)



รูปที่ 4.22 ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดของแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม ในแต่ละ

ระยะการพัฒนา ภายหลังจากได้รับอาหารทดลอง จนครบ 4 สัปดาห์ แล้วตัดตา

- ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm SD.

- ทำการทดลองชุดการทดลองละ 2 ครั้ง ครั้งละ 25 ตัว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การกระตุ้นการพัฒนาไข่และรังไข่แม่กึ่งทะเลที่ปฏิบัติกันทั่วไปในฟาร์มเพาะเลี้ยงกึ่งคือการตัดตา เพื่อยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน Gonad Inhibiting Hormone (GIH) (Primavera, 1985) ได้มีความพยายามค้นคว้าหาวิธีอื่นที่เหมาะสมมากกว่า เช่นการฉีดฮอร์โมนต่างๆ ทั้งสเตียรอยด์ (วิชัย วัฒนกุล, 2534) และฮอร์โมนในกลุ่มไปโอเอมีน เช่น เซอโรโทนิน (Wang and Croll, 2006) เข้าสู่ร่างกายของกึ่งโดยตรง แต่การใช้ฮอร์โมนผสมในอาหารเพื่อกระตุ้นการเจริญพันธุ์ของแม่กึ่งทะเลนั้นยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน จึงได้มีแนวคิดในการผสมฮอร์โมนที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการพัฒนาไข่ลงในอาหาร เช่นการศึกษาของ Zapata et al. (2003) ถึงผลของ 17α -hydroxyprogesterone และ juvenile hormone III (JHIII) ต่อการพัฒนาไข่ในปู *Chasmagnathus granulata* พบว่าการผสมฮอร์โมนลงในอาหาร ให้ผลการกระตุ้นเช่นเดียวกับการฉีดฮอร์โมนเข้าสู่ร่างกาย แต่อัตรารอดของปูที่ได้รับฮอร์โมนผสมลงในอาหารมีมากกว่าแม่กึ่งที่ถูกกระตุ้นโดยการฉีดฮอร์โมน ข้อได้เปรียบของอาหารผสมฮอร์โมนต่อการฉีดฮอร์โมนเข้าสู่ร่างกายสัตว์ คือ สามารถกระตุ้นฮอร์โมนเข้าสู่ตัวสัตว์จำนวนมากพร้อมกันได้เหมาะแก่การใช้งานในเชิงพาณิชย์ รวมทั้งไม่เสี่ยงต่อการบาดเจ็บของแม่กึ่งหรือตายอันเนื่องมาจากการฉีด

อย่างไรก็ตาม การผสมฮอร์โมนหรือสารที่ต้องการขนส่งลงในอาหารมักเกิดการสูญเสียไปจากขบวนการต่างๆ ทั้งกระบวนการผลิตที่มีความร้อน (Teixeira et al., 2004) และ/หรือพฤติกรรมในการกินของสัตว์น้ำหรือจากการละลายน้ำ (Yúfera et al., 2003) จึงต้องใช้เทคนิคในการกักเก็บฮอร์โมนให้คงอยู่ภายใน ซึ่งเทคนิคนี้เรียกว่า ไมโครเอนแคปซูลเลชัน (Gibbs et al., 1999) การทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นเทคนิคทางไมโครเอนแคปซูลเลชันวิธีหนึ่งที่เลือกใช้ เนื่องจากขั้นตอนการผลิตไม่ยุ่งยาก มีประสิทธิภาพที่ดีในการเก็บกักสารไว้ภายใน สามารถขยายกำลังการผลิตได้มาก ทำให้ได้ผลผลิตที่มีราคาถูกลง เหมาะสำหรับการผลิตในเชิงพาณิชย์ (Desai and Park, 2005)

วัสดุที่ใช้เป็นผนังเคลือบไมโครแคปซูล มีการออกแบบเพื่อป้องกันการสูญเสียสิ่งที่บรรจุอยู่ภายในจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น การระเหยจากความร้อนในกระบวนการผลิต ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารที่ต้องการขนส่งกับวัตถุดิบอื่น รวมทั้งต้องสามารถควบคุมอัตราการหลั่งของสารออกสู่ภายนอกได้ (Shahidi and Han, 1993) วัสดุที่นำมาใช้เป็นผนังเคลือบนิยมใช้ทั้งพอลิเมอร์ทางชีวภาพและพอลิเมอร์สังเคราะห์ (Gharsallaoui et al., 2007) งานวิจัยนี้เลือกใช้พอลิเมอร์ทางชีวภาพ 2 ชนิด

คือ ไคโตซานและมอลโทเดกซ์ทรินเป็นผนังเคลือบ ไมโครแคปซูลที่ได้มีลักษณะค่อนข้างกลม ผิวขรุขระ มีขนาดอยู่ระหว่าง 15-42 ไมโครเมตร แต่การใช้ไคโตซาน 100% สามารถเก็บกักโปรเจสเทอโรนได้ดีต่ำ หลังจากเติมมอลโทเดกซ์ทรินเข้าไปพบว่าเพิ่มความสามารถในการเก็บกักโปรเจสเทอโรนได้สูงขึ้น รวมทั้งมีความชื้นลดต่ำลง แต่การใช้มอลโทเดกซ์ทรินมากกว่า 2 เท่าส่งผลให้ไมโครแคปซูลมีการละลายในน้ำสูง โดยทั่วไปแล้วนิยมใช้มอลโทเดกซ์ทรินเพื่อเพิ่มปริมาตรในการผลิตไมโครแคปซูล (Van Beynum and Roels, 1985) แต่การใช้มอลโทเดกซ์ทรินเพื่อลดความชื้นนั้น ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน

พันธะ glycosidic bonds ระหว่างโมเลกุลของไคโตซานสามารถปรับปรุงให้มีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น ด้วยการให้ cross-linking agent ซึ่งปกติแล้วนิยมใช้ คือ สารประเภทไดอัลดีไฮด์ เช่น ฟอรั่มอลดีไฮด์ กลูตารัลดีไฮด์ เนื่องจากเป็นสารเคมีที่มีความเป็นพิษสูงจึงไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหาร การใช้ TPP ทำหน้าที่เป็น cross-linking agent ได้มีการศึกษามาก่อนหน้า โดย Ko et al. (2002) ได้ทำการทดลองใช้ TPP เป็น cross-linking agent ทดแทนสาร ไดอัลดีไฮด์ ในการผลิตไคโตซานไมโครแคปซูลเพื่อเก็บกักยา felodipine พบว่ามีประสิทธิภาพในการเก็บกักสารที่ไม่แตกต่างกัน โดยปฏิกิริยาระหว่างประจุบวกทางด้านกลุ่มอะมิโนของไคโตซานกับประจุลบของโมเลกุล TPP ทำให้เกิดการยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลไคโตซานมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ปริมาณ TPP ที่ใส่ต้องมีปริมาณที่พอเหมาะ เพราะถ้าใช้มากเกินไปจะทำให้แคปซูลมีขนาดเล็กลง (Gupta and Jabrail, 2006) และมีความสามารถในการปลดปล่อยสารออกสู่ภายนอกได้ช้า (Akbuğa and Durmaz, 1994) แต่อย่างไรก็ตาม TPP อาจยังเป็น cross-linking agent ที่มีประสิทธิภาพต่ำกว่าสารประเภทไดอัลดีไฮด์ เนื่องจากการทำปฏิกิริยา cross-linking ของไดอัลดีไฮด์เข้าไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไคโตซาน ขณะที่ TPP ใช้หลักการสร้างพันธะระหว่างประจุเท่านั้น จึงทำให้พันธะไม่แข็งแรงเพียงพอต่อการเก็บกักฮอร์โมน

การผลิตไมโครแคปซูลของฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย ใช้ อุณหภูมิเข้าสูงถึง 140 องศาเซลเซียส แต่ไม่เป็นปัญหาสำหรับการผลิตไมโครแคปซูลเพราะน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลายหลักและคลอโรฟอร์ม จะเริ่มระเหยตั้งแต่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผนังแคปซูลเกิดการแข็งตัวหุ้มโปรเจสเทอโรนไว้ภายใน ทำให้โปรเจสเทอโรนไม่สัมผัสกับความชื้น ประกอบกับ อุณหภูมิเข้าเมื่อเข้าไปยังห้องลมร้อนและสัมผัสกับน้ำซึ่งได้จากการระเหยอย่างรวดเร็วออกจาก สารละลาย ในขั้นตอนการระเหยน้ำเพื่อให้เกิดเป็นเม็ดแคปซูล จึงพบว่าอุณหภูมิภายในห้องต่ำกว่า อุณหภูมิที่นำเข้า และเป็นที่น่าสังเกตว่าอุณหภูมิที่ส่งผลต่อไมโครแคปซูล คือ อุณหภูมิขาออก โดยวัดได้จากบริเวณใต้ห้องลมร้อนซึ่งเป็นบริเวณที่ไมโครแคปซูลจะตกลงเมื่อระเหยน้ำสมบูรณ์แล้ว ก่อนที่จะ

ถูกทำลายไปยังบริเวณที่เก็บผลผลิต จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า อุณหภูมิขากออกเป็นครึ่งหนึ่งของ อุณหภูมิที่นำเข้าไป ทำให้ไม่เกิดการสูญเสียฮอริโมนโปรเจสเตอโรนจากความร้อนแต่อย่างใด

ปริมาณฮอริโมนโปรเจสเตอโรนที่สามารถบรรจุลงในไมโครแคปซูลนั้นถูกจำกัดโดยขนาดของ ไมโครแคปซูล (Cevher et al., 2006) เมื่อศึกษาถึงปริมาณโปรเจสเตอโรนที่พอเหมาะต่อการบรรจุไว้ ภายในโคโดซาน:มอลโทเดกซ์ทรีนไมโครแคปซูล พบว่าปริมาณ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นปริมาณที่ พอเหมาะต่อการบรรจุอยู่ในไมโครแคปซูล เพราะหากเพิ่มสารที่อยู่ในไมโครแคปซูลมากเกินไปส่งผลให้ขนาดของไมโครแคปซูลเพิ่มมากขึ้นแต่ความสามารถในการเก็บกักสารลดต่ำลง (Anal et al., 2006) เนื่องจากช่องว่างหรือพื้นที่ในการเก็บสารที่อยู่ในไมโครแคปซูล เพียงพอ ดังนั้นกรณีที่เพิ่มสารที่ บรรจุไว้ในมากเกินไปอาจส่งผลให้ไมโครแคปซูลแตกไม่สามารถเก็บสารภายในได้

เมื่อฮอริโมนบรรจุลงในแคปซูลแล้วจำเป็นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการปลดปล่อย ฮอริโมนออกสู่ภายนอก ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการปลดปล่อยฮอริโมนประกอบไปด้วย ค่าความเป็น กรด-ด่างของสารละลายที่เม็ดแคปซูลทำงาน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคปซูล ความเข้มข้นของ สารละลายที่นำมาผลิตเป็นผนังเคลือบแคปซูล และปริมาณ cross-linking agent โคโดซาน: มอลโทเดกซ์ทรีนไมโครแคปซูลมีอัตราการปลดปล่อยโปรเจสเตอโรนจากสูงสุดที่ pH5.5 ซึ่งเป็นค่า pH ที่ใกล้เคียงกับน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของกึ่ง (Ceccaldi, 1989) ทำให้ไมโครแคปซูลที่ผลิตได้มี ความเหมาะสมต่อการทำงานในระบบทางเดินอาหารของกึ่ง อัตราการปลดปล่อยฮอริโมนจาก โคโดซาน:มอลโทเดกซ์ทรีนไมโครแคปซูลเป็นแบบทันทีทันใดภายใน 1 ชั่วโมงแรก สูงถึง 60% หลังจากนั้นแทบไม่เกิดการปลดปล่อยอีกเลย อาจเนื่องจากโคโดซาน:มอลโทเดกซ์ทรีนที่ cross link ด้วย TPP มีพันธะแข็งแรงเท่ากับ cross linking agent ประเภทไดอัลดีไฮด์ที่ทำให้โคโดซานมีการยึดเกาะกันสูง สามารถปลดปล่อยฮอริโมนครั้งละน้อย ต่อเนื่องเป็นเวลายาวนาน (Gupta and Jabrail, 2006)

ปัจจัยที่มีผลต่อการปลดปล่อยสารออกสู่ภายนอกไมโครแคปซูลอีกปัจจัยหนึ่ง คือ ขนาดของ ไมโครแคปซูล ขนาดเล็กจะมีอัตราการปลดปล่อยสารที่อยู่ในออกสู่ภายนอกเร็วกว่าไมโครสเฟียร์ ขนาดใหญ่ เนื่องจากการทำลายพันธะของสารที่อยู่ในไมโครแคปซูลขนาดใหญ่เกิดขึ้นได้ยาก รวมทั้งพื้นที่ผิวของไมโครแคปซูลขนาดเล็กมีโอกาสเกิดปฏิกิริยากับสารละลายภายนอกได้เร็วและ ทั่วถึงมากกว่าไมโครแคปซูลขนาดใหญ่ (Narayani and Panduranga Rao, 1995, Jameela et al. 1998) ขนาดของไมโครแคปซูลที่ผลิตได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีขนาดค่อนข้างใหญ่ (14-41 ไมโครเมตร) เพราะโดยทั่วไปแล้วขนาดของไมโครแคปซูลที่ผลิตได้จากเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย จะมีขนาดเล็กกว่า 10 ไมโครเมตร (Tefft and Friend, 1993) การปลดปล่อยสารที่อยู่ในจึง ยาวนานถึง 10 ชั่วโมง ขณะที่โคโดซานไมโครแคปซูลที่ห่อหุ้ม Climeidine และ Nizatidine จาก

การศึกษาของ He et al. (1999) ซึ่งมีขนาด 2-10 ไมโครเมตร มีอัตราการปลดปล่อยสารที่อยู่ภายใน ออกสู่ภายนอกได้เพียง 3 ชั่วโมงเท่านั้น

เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาอัตราการปลดปล่อยฮอร์โมนจากส่วนผสมของ แคปซูลที่อัตราส่วนเดียวจึงไม่สามารถวิเคราะห์ได้ว่าความเข้มข้นของสารละลายที่เป็นผนังเคลือบมี อิทธิพลต่อการปลดปล่อยของสารออกสู่ภายนอกหรือไม่ แต่จากการศึกษาของ Shi and Tan (2002) พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายมีอิทธิพลต่ออัตราการหลั่งของสารออกสู่ภายนอก โดยที่ความเข้มข้นของสารละลายสูงไมโครแคปซูลจะประกอบไปด้วยอนุภาคจำนวนมากประกอบกันแน่น รูพรุน ของแคปซูลเหลือน้อยลงหรือมีขนาดเล็กส่งผลให้อัตราการหลั่งของสารที่อยู่ภายในออกสู่ภายนอกเกิด ได้ช้ากว่าความเข้มข้นของสารละลายต่ำ

ภายหลังจากได้ไมโครแคปซูล จะนำไมโครแคปซูลไปผสมในวัตถุดิบอาหารเพื่อผลิตเป็น อาหารเม็ดแบบกึ่งหยาบ เพราะอาหารชนิดนี้จะมีผิวสัมผัสนุ่ม หยุน มีความชวนกิน ทำให้กึ่งตอบรับ อาหารเป็นอย่างดี (ปนัดดา มีจริง, 2546) และมีการพัฒนารังไข่ได้ดีกว่าแม่กึ่งที่ได้รับอาหารมีชีวิต ซึ่ง ในการทดลองครั้งนี้ใช้หอยแมลงภู่ (*Perna* sp.) และหมึกกล้วย (*Loligo* sp)

คุณภาพของผลผลิตส่วนใหญ่มักศึกษาจากความดกไข่ จำนวนครั้งในการวางไข่ ขนาดของไข่ ตลอดจนอัตราการฟักและจำนวนออพเพิลส์ที่ฟักออกมา (Vaca and Alfaro, 2000) Quackenbush (1992) รายงานว่าจากการฉีดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ความเข้มข้น 10^{-6} M เข้าสู่กึ่งขาวแวนนาไม่ สามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนในไข่แดงทำให้ขนาดของไข่เพิ่มขึ้นได้

กระบวนการไวเทลโลเจเนซิส เป็นกระบวนการในการสะสมอาหารประเภทโปรตีนและไขมัน ที่ได้รับจากอาหารกลายเป็นไวเทลลิน ซึ่งเป็นสารประเภทไลโปไกลโคโปรตีน (lipoglycoprotein) ไว้ใน ภายไข่ (Souty-Grosset, 1997) ความเร็วในการพัฒนารังไข่สามารถบ่งบอกได้ถึงช่วงเวลาในการ สร้างและสะสมไข่แดง อาหารจะเป็นสารตั้งต้นที่นำพาสารอาหารมาโดยตรง แต่ต้องอาศัยฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน กระตุ้นให้เกิดการสร้างและสะสมไข่แดงร่วมด้วย เนื่องจากฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างและสะสมไข่แดงได้ (Yano, 1987) เนื่องด้วยแม่กึ่งที่ใช้ในการทดลอง ครั้งนี้ได้รับอาหารทดลองซึ่งมีองค์ประกอบของวัตถุดิบอาหารเท่าเทียมกัน ดังนั้น ฮอร์โมนจึงเป็นปัจจัย ที่ส่งผลต่อกระบวนการสร้างและสะสมไข่แดงในแม่กึ่ง จากการศึกษานี้ พบว่าแม่กึ่งในกลุ่ม ทดลอง 0.5%HBMD มีการพัฒนารังไข่สูงที่สุดและเร็วที่สุด แสดงว่าเป็นปริมาณที่กระตุ้นให้เกิดการ พัฒนารังไข่เป็นไข่อ่อนจนกระทั่งเกิดการวางไข่ได้ เนื่องจากจำนวนแม่กึ่งที่สามารถวางไข่เท่ากับแม่กึ่ง ซึ่งได้รับอาหารทดลอง 1%HBMD มากกว่ากลุ่มทดลองอื่น และเป็นที่น่าสังเกตว่าแม่กึ่งในทุกกลุ่มการ ทดลองมีการพัฒนารังไข่เป็น 2 ช่วง

เมื่อพิจารณาถึงจำนวนครั้งที่วางไข่ พบว่าจำนวนครั้งที่วางไข่แปรผกผันกับความตกไข่ โดยความตกไข่จะลดลงเมื่อจำนวนความถี่ในการออกไข่เพิ่มมากขึ้น ในการทดลองนี้ แม่กุ้งที่ได้รับอาหารควบคุม มีการวางไข่น้อยกว่าแม่กุ้งกลุ่มทดลอง แต่แม่กุ้งที่วางไข่จากกลุ่มควบคุมนั้น จะมีความตกไข่สูงกว่า สอดคล้องกับข้อสรุปของ Arcos et al. (2003) ที่ว่าแม่กุ้งที่ออกไข่ครั้งแรกจะมีความตกไข่สูงที่สุดและลดต่ำลงในการออกไข่ครั้งต่อไป จากนั้นจะกลับเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อการสะสมอาหารในไข่เพียงพอ

จากการศึกษาถึงความตกไข่และวัดขนาดของไข่สามารถชี้ให้เห็นได้ว่า อาหารทดลองเป็นอาหารที่มีประสิทธิภาพหรือไม่ แม่กุ้งที่ได้รับอาหารทดลองมีคุณภาพไข่เทียบเท่ากับแม่กุ้งที่ได้รับอาหารมีชีวิต ไข่ที่มีขนาดใหญ่เป็นตัวบ่งบอกถึงคุณภาพของตัวอ่อนซึ่งจะสูงกว่าตัวอ่อนที่มาจากไข่ขนาดเล็ก เนื่องจากภายในไข่ประกอบไปด้วยไข่แดงซึ่งใช้เป็นอาหารให้กับตัวอ่อนที่ยังไม่ฟัก การที่มีการสะสมไข่แดงมากส่งผลให้ฟองไข่มีขนาดใหญ่และมีอาหารเพียงพอต่อการพัฒนาตัวอ่อน ขณะที่ไข่ขนาดเล็กมีการสะสมไข่แดงภายในน้อยกว่าและอาจไม่เพียงพอต่อการพัฒนาตัวอ่อน (Clarke, 1993) จากการศึกษาของ Reddy et al. (2005) กล่าวว่าฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ความเข้มข้น 10^{-7} mol/crab ของ 17α -hydroxyprogesterone ส่งผลให้ไข่ของปู *Oziotelphusa senex senex* มีขนาดไข่ใหญ่ขึ้น อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาถึงคุณภาพของตัวอ่อน เนื่องจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่ากุ้งขาวแวนนาไมเพศผู้ยังไม่สามารถผสมพันธุ์ได้ เนื่องจากช่วงเวลาที่ทำกรทดลอง ตัวผู้มน้ำเชื้อที่ไม่สมบูรณ์เต็มที่ ไม่ประสบความสำเร็จในการผสมพันธุ์กับแม่กุ้งจึงไม่ได้ผลผลิตออกมา

การทดลองในช่วง 1 เดือนแรกก่อนการตัดตา พบว่าแม่กุ้งที่ได้รับอาหารทดลอง มีการพัฒนารังไข่ขึ้นมาได้ ขณะที่แม่กุ้งซึ่งได้รับอาหารมีชีวิตไม่เกิดการพัฒนารังไข่แต่อย่างใด หากขยายระยะเวลาในการเลี้ยงแม่กุ้งด้วยอาหารผสมฮอร์โมนออกไปอีก อาจทำให้แม่กุ้งสามารถพัฒนารังไข่ได้โดยไม่ต้องตัดก้านตา

การตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนในเลือดสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาการพัฒนารังไข่ได้ตามปกติปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดจะเพิ่มสูงตามการพัฒนารังไข่ ซึ่งเห็นว่าฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเป็นฮอร์โมนที่มีหน้าที่ต่อการสร้างและสะสมไข่แดง (Yano, 1987) ตลอดจนการพัฒนารังไข่ขั้นสุดท้าย เช่นเดียวกับการศึกษาของเรณูและคณะ (2534) ที่พบว่าภายหลังการฉีดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนแก่กุ้งกุลาดำส่งผลให้แม่กุ้งมีไข่แก่ได้โดยไม่ต้องตัดก้านตา เมื่อวิเคราะห์ระดับของโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างแม่กุ้ง พบว่า โปรเจสเตอโรนในเลือดแปรผันตามความเข้มข้นของโปรเจสเตอโรนที่ผสมลงในอาหาร กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนในอาหารสูง จะมีปริมาณฮอร์โมน

โปรเจสเตอรินในเลือดสัตว์ป่าครั้งแรกสูงตามไปด้วย ขณะที่แม่กึ่งในกลุ่มควบคุมไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอรินในเลือด

ภายหลังตัดก้านตาแม่กึ่งทุกกลุ่มทดลองมีการพัฒนารังไข่จนกระทั่งเป็นไข่แก่ได้ โดยที่แม่กึ่งในกลุ่มทดลองมีการพัฒนารังไข่สูงกว่าแม่กึ่งในกลุ่มควบคุม ซึ่งสัมพันธ์กับกับปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอรินในเลือดแม่กึ่งที่ได้รับอาหารทดลองพบว่ามีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอรินในเลือดสูงกว่าแม่กึ่งในกลุ่มควบคุมเช่นกัน

ปริมาณโปรเจสเตอรินในเลือดแม่กึ่งจะต่ำในช่วงระยะไข่อ่อนและสูงที่สุดในระยะไข่แก่ แต่จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า แม่กึ่งในกลุ่มทดลองมีฮอร์โมนโปรเจสเตอรินสูงที่สุดในระยะไข่ที่ 1 เนื่องจากแม่กึ่งในกลุ่มทดลองได้รับการกระตุ้นโดยอาหารผสมโปรเจสเตอรินมาแล้วนาน 1 เดือน แต่ยังคงมี GIH ในก้านตาคอยควบคุมการกระตุ้นของโปรเจสเตอรินอยู่ ดังนั้นภายหลังการตัดก้านตาจึงพบว่าฮอร์โมนโปรเจสเตอรินพุ่งขึ้นสูงทันที และค่อย ๆ ปรับลดระดับลงตามกระบวนการในร่างกายที่สามารถดึงเอาโปรเจสเตอรินไปใช้ได้อย่างจำกัด หากมากเกินไปร่างกายจะกำจัดออก และเมื่อเข้าสู่ระยะการพัฒนาที่ 4 ซึ่งเป็นระยะที่ต้องการฮอร์โมนโปรเจสเตอรินกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ จึงพบว่าฮอร์โมนโปรเจสเตอรินจึงกลับมาสูงอีกครั้ง จากการศึกษานี้ พบว่า แม่กึ่งซึ่งได้รับอาหารจากกลุ่มทดลอง 1%HBMD (P2) พบปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอรินในระยะการพัฒนาที่ 4 สูงที่สุด 54 ± 0.02 นาโนกรัม แสดงว่ามีการสะสมโปรเจสเตอรินในรังไข่มาก ส่วนในกลุ่มทดลอง 0.5% HBMD (P1) ซึ่งลดปริมาณไม่โครแคปซูลที่ผสมลงในอาหารครึ่งหนึ่ง พบว่า ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอรินในเลือดของระยะไข่แก่ลดต่ำลง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอรินลงในอาหารเป็น 2%HBMD (P3) ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอรินในเลือดกลับพบต่ำกว่าแม่กึ่งในกลุ่มทดลอง 0.5% HBMD (P1) เนื่องจากปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอรินสูงเกินไปนอกจากไม่ส่งเสริมให้เกิดการพัฒนารังไข่แล้วกลับส่งผลในทางลบต่อการพัฒนารังไข่ ขณะที่แม่กึ่งในกลุ่มควบคุมถึงแม้จะตัดก้านตาแต่แทบไม่พบความแตกต่างของปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอรินในเลือดตั้งแต่ระยะที่ยังไม่เกิดการพัฒนารังไข่จนถึงระยะไข่แก่

สรุปผลการศึกษานี้ได้ว่าสามารถขนส่งฮอร์โมนโปรเจสเตอรินผ่านทางอาหารเข้าสู่ร่างกายของแม่กึ่งได้ โดยต้องอาศัยเทคนิคการห่อหุ้มฮอร์โมนโปรเจสเตอรินด้วยผนังที่สร้างจากไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทริน เพื่อลดการสูญเสียฮอร์โมนออกสู่ภายนอก เป็นการกระตุ้นการพัฒนารังไข่โดยใช้ฮอร์โมนวิธีการใหม่ที่ช่วยลดระยะเวลาในการทำงาน ลดความเสี่ยงต่อการนำพาเชื้อโรคมาสู่ร่างกายของกึ่งอันเนื่องมาจากอาหารมีชีวิต รวมทั้งสามารถควบคุมราคาและคุณภาพของอาหารได้

จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าอาหารสามารถกระตุ้นให้แม่กึ่งวางไข่ได้มากขึ้น โดยที่คุณภาพของไข่ไม่ได้ลดต่ำลง ในอนาคตอาจให้ฮอร์โมนผ่านทางอาหารเพื่อกระตุ้นการพัฒนารังไข่ได้ เป็นงานที่เร่งให้แม่กึ่งมีไข่แก่ได้โดยที่ไม่ตัดตา

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษา สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

- 1) ไมโครแคปซูลซึ่งผลิตจากวัสดุผสมระหว่างไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีน มีประสิทธิภาพในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนได้ดีกว่าไคโตซานไมโครแคปซูลหรือมอลโทเดกซ์ทรีนไมโครแคปซูล
- 2) อุณหภูมิเข้าที่ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีน (1:1; v/v) เพื่อห่อหุ้มฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนคือ 140 องศาเซลเซียส
- 3) ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่บรรจุภายในไมโครแคปซูลของไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีน (1:1;v/v) สามารถเก็บกักได้ดีที่สุด คือ ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
- 4) เมื่อเพิ่มปริมาณ Pentasodium tripolyphosphate (TPP) ซึ่งเป็นสาร cross-linking agent ส่งผลให้ความสามารถในการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของไมโครแคปซูลเพิ่มสูงขึ้น โดยปริมาณ TPP ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีน (1:1; v/v) คือ 0.1% TPP
- 5) อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีน เพื่อผลิตเป็นไมโครแคปซูลอยู่ที่ไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีน 1:2 (v/v) หรือ 1C:2M
- 6) ขนาดของไมโครแคปซูลที่สามารถพบได้จากอัตราส่วนที่แตกต่างกันระหว่างไคโตซาน:มอลโทเดกซ์ทรีน (1C:1M, 1C:2M และ 2C:1M) คือ 15-42 ไมโครเมตร
- 7) อัตราการปลดปล่อยไมโครแคปซูลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงสุดประมาณ 60% ใน 1 ชั่วโมงแรก จากนั้นอัตราการปลดปล่อยจะลดลงและคงที่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 4
- 8) ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ผสมลงในอาหารสามารถเข้าสู่ร่างกายของแม่กึ่งได้ เพราะตรวจพบปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่กึ่งกลุ่มทดลอง และระดับฮอร์โมนในเลือดนั้นผันแปรตามความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ผสมลงในอาหาร
- 9) ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่กึ่งกลุ่มอาหารทดลอง จะสูงที่สุดในสัปดาห์แรกที่ได้รับอาหาร ขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในแม่กึ่งกลุ่ม

- ควบคุม หลังจากนั้นฮอร์โมนในแม่กึ่งกลุ่มอาหารทดลอง จะลดต่ำลงในสัปดาห์ต่อมา จนกระทั่งมีปริมาณใกล้เคียงกันกับแม่กึ่งกลุ่มควบคุมเมื่อเข้าสัปดาห์ที่ 4
- 10) แม่กึ่งที่ได้รับอาหารกลุ่มทดลอง 0.5%HBMD(P1) เกิดการพัฒนารังไข่เร็วที่สุด คือ ในวันที่ 2 ภายหลังการตัดก้านตา มีจำนวนแม่กึ่งที่เกิดการพัฒนารังไข่ เท่ากับ $20 \pm 0.00\%$ โดยแม่กึ่งในทุกกลุ่มการทดลองมีการพัฒนารังไข่สูงที่สุด 2 ช่วง
 - 11) แม่กึ่งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนทั้ง 3 ความเข้มข้นสามารถออกไข่ได้อย่างน้อย 2 ครั้ง ภายหลังการตัดก้านตา 10 วัน แต่ที่กลุ่มทดลอง 0.5%HBMD มีความถี่ในการออกไข่ได้มากที่สุดถึง 3 ครั้ง ภายหลังการตัดก้านตา 10 วัน
 - 12) แม่กึ่งที่ได้รับอาหารมีชีวิตมีแนวโน้มความดกไข่สูงกว่าแม่กึ่งที่ได้รับอาหารทดลอง และแม่กึ่งที่ออกไข่ครั้งที่ 2 มีแนวโน้มความดกไข่สูงขึ้น เช่นเดียวกับขนาดของไข่ที่พบว่าขนาดไข่ของแม่กึ่งที่ออกไข่ครั้งที่ 2 และ 3 มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นแต่ขนาดของไข่ของแม่กึ่งทุกกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกัน
 - 13) ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่พันธุ์กึ่งขาวแวนนาไม (*L. vannamei*) สูงที่สุดเมื่อรังไข่อยู่ในระยะการพัฒนาที่ 1 และลดต่ำลงในระยะการพัฒนาที่ 2 และ 3 เมื่อรังไข่พัฒนาจนเป็นไข่แก่ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดจะสูงขึ้นอีกครั้ง

ข้อเสนอแนะ

- 1) ปริมาณไม่โครแคปซูลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่สูงเกินไปไม่ส่งผลกระทบต่อพัฒนาการรังไข่ การใช้ปริมาณไม่โครแคปซูลอย่างพอเหมาะนอกจากจะส่งผลกระทบต่อพัฒนาการรังไข่ได้ดีแล้วยังเป็นการลดต้นทุนการผลิต
- 2) การศึกษาคุณภาพของตัวอ่อน สามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้คุณภาพของอาหารได้ดียิ่งขึ้น
- 3) หากเพิ่มระยะเวลาในการทดลองให้เพิ่มขึ้น อาจส่งผลให้แม่กึ่งมีการพัฒนารังไข่และตกไข่ได้ โดยที่ไม่ต้องตัดก้านตา

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ชูศักดิ์ แสงธรรม. 2541. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม.
- ปนัดดา มีจริง. 2546. การพัฒนาอาหารเม็ดที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงเพื่อคุณสมบัติพันธุ์ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* เพศผู้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. 2539. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เรณู ยาชิโร และ ยุพาพร ไชยสีหา. 2534. ผลการฉีดสเตอรอยด์ฮอร์โมนต่อการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* I: ระดับฮอร์โมนเพศในพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. เอกสารวิชาการฉบับที่ 9/2534. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา. 16 น.
- เรณู ยาชิโร, วิชัย วัฒนกุล และ นิเวศน์ เรืองพานิช. 2535. ผลของสเตอรอยด์ฮอร์โมนต่อการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* II: ผลของฮอร์โมนบางชนิดและปมประสาทส่วนนอกต่อการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 15/2535 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา. 10 น.
- วิชัย วัฒนกุล. 2534. ผลการฉีดฮอร์โมน 17 α -hydroxy-progesterone ต่อคุณภาพสเปิร์มในกุ้งแชบ๊วย *Penaeus merguensis* (de Man). เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 7/2534 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรุงเทพฯ. 18 น.
- เสาวลักษณ์ เขียมไม้. 2548. ผลของการสกัดโปรเจสเตอโรนและ 17 แอลฟา-ไฮดรอกซีโปรเจสเตอโรนจากแม่เพรียง *Perinereis* sp. ต่อการเจริญของเซลล์ไข่กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เอกชัย ดวงใจ. 2548. การสกัดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดินจากแม่เพรียงทรายและผลของการสกัดฮอร์โมนต่อการพัฒนาของไข่แม่กุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

- Adiyodi, R.G. 1985. Reproduction and its control. The Biology of Crustacea 9: 147-215. In: Bliss, D.E. and Mantel, L.H. (Eds.). 9. New York: Academic Press: 147-215.
- Agnihotri, S.A., Mallikajuna, N.N. and Aminabhavi, T.M. 2004. Review Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. Journal of Controlled Release 100: 5-28.
- Akbuğça, J. and Durmaz, G. 1994. Preparation and evaluation of cross-linked chitosan microspheres containing furosemide. International Journal of Pharmaceutics 111: 217-222.
- Akiyama, D.M., Dominy, W.G. and Lawrence, A.L. 1991. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry: In: Akiyama, D.M. and Tan, R.K.H. (Eds.). 1991. Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. American Soybean Association, Singapore, Thailand and Indonesia: 80–98.
- Alabi, A.O., Cob, Z.C., Jones, D.A. and Latchford, J.W. 1999. Influence of algal exudates and bacteria on growth and survival of white shrimp larvae fed entirely on microencapsulated diets. Aquaculture Institutes 7: 137-158.
- Alfaro, J., Zúñiga, G. and Komen, J. 2004. Induction of ovarian maturation and spawning by combined treatment of serotonin and dopamine antagonist, spiperone in *Litopenaeus stylirostris* and *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 236: 511-522.
- Anal, A.K., Stevens, W.F. and López, C.R. 2006. Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicilin. International Journal of Pharmaceutics 312: 166-173.
- Anandaraman, S. and Reineccius, G.A. 1980. Microencapsulation of flavour. Food FIPP 2(5)(14): 17-18.
- AOAC. 1990. Official methods of Analysis. Washington,D.C.: Association of Agriculture Chemist.

- Arcos, F.G., Ibarra, A.M., Palacios, E., Vazquez-Boucard, C. and Racotta, I.S. 2003. Feasible predictive criteria for reproductive performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: egg quality and female physiological condition. Aquaculture 228: 335–349.
- Arechiga, H., Flores, J., and Carcia, U. 1985. Biosynthesis and release of the crustacean neurodepressing hormone. In: Lofts, B. and Holmes, W.N. (Eds.). Current Trends in Comparative Endocrinology.
- Ayub, Z. and Ahmed, M. 2002. A description of the ovarian development stages of penaeid shrimps from the coast of Pakistan. Aquaculture Research 33: 767-776.
- Bangs, W.E. and Reineccius, G.A. 1981. Influence of dryer infeed matrices on retention of volatile flavor compounds during spray-drying. Journal of food Science 47: 254-259.
- Belghith, H., Chaabouni, S.E. and Gargouri, A. 2001. Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of Maltodextrin. Enzyme and Microbial Technology 28: 253–258.
- Benzie, J.A.H. 1997. A review of the effect of genetics and environment on the maturation and larval quality of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. Aquaculture 155: 69-85.
- Bray, W.A., Lawrence, A. and Lester, L.J. 1990. Reproduction of eyestalk ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels of total dietary lipid. Journal World Aquaculture Societies 21: 41-52.
- Bunchal, M. and Langdon, C. 1998. Evaluation of lipid spray beads for the delivery of water-soluble materials to a marine suspension-feeder, the Manila clam *Tapes philippinarum* (Deshayes, 1853). Aquaculture Nutrition 4: 265-284.
- Bückmann, D. 1989. The significance of ecdysone in comparative physiology. In: Koolman, J. (Eds.), Ecdysone - From Chemistry to Mode of Action. Thieme, Stuttgart.

- Camara, M.D., Evans, S. and Langdon, C. 2007. Inbreeding effects on growth and survival in a naturalized population of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) revealed using molecular marker-based estimates of parental relatedness. Aquaculture 7: 38.
- Castellanos, I.J. and Griebenow, K. 2003. Improved α -chymotrypsin stability upon encapsulation in PLGA microspheres by solvent replacement. Pharmaceutical Research 20(11).
- Ceccaldi, H.J. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. Advances in Tropical Aquaculture 9: 243-259.
- Cevher, E., Orhan, Z., Mülazımöğlü, L., Sensoy, D., Alper, M., Yıldız, A. and Özsoy, Y. 2006. Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres. International Journal of Pharmaceutics 317: 127-135.
- Chamberlain, G.W. 1988. Stepwise investigation of environmental and nutritional requirements for reproduction of penaeid shrimp. PhD dissertation. Department of Wildlife and Fisheries Science Texas A and M University.
- Charniaux-Cotton, H. and Payen, G. 1988. Crustacean reproduction. In: Laufer, H. and Downer, R.C.G. (Eds.). Endocrinology of Selected Invertebrate Types. New York.
- Chen, C.C. and Chen, S.N. 1994. Vitellogenesis in the giant tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius, 1789. Composition of Biochemistry Physiology 107B(3): 453-460.
- Chen, R.H., Tsaih, M.L. and Lin, W.C. 1996. Effects of chain flexibility of chitosan molecules on the preparation, physical and release characteristics of the prepared capsule. Carbohydrate Polymers 31: 141-148.
- Chen, Y.N., Fan, H.F., Hsieh, S.L. and Kuo, C.M. 2003. Physiological involvement of DA in ovarian development of the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 228: 383-395.

- Cho, Y.H., Shin, D.S. and Park, J. 2000. Optimization of emulsification and spray drying processes for the microencapsulation of flavor compounds. Korean Journal of Food Science and Technology 32: 323-329.
- Chow, S. and Sandifer, P.A. 1991. Differences in growth, morphometric traits and male sexual maturity among Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, from different commercial hatcheries. Aquaculture 92: 165-178.
- Clarke, A. 1993. Egg size and egg composition in polar shrimp (Caridea; Decapoda). Journal of Experimental Marine Biology Ecology 168: 189–203.
- Coman, G.J., Arnold, S.J., Jones, M.J. and Preston, N.P. 2007. Effect of rearing density on growth, survival and reproductive performance of domesticated *Penaeus monodon*. Aquaculture 264: 175–183.
- D'Abramo, L.R. and Conklin, D.E. 1995. New developments in the understanding of the nutrition of penaeid and caridean species of shrimp. In: Browdy, C.L. and Hopkins, J.S. (Eds.). Swimming through Troubled Water: Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA: 95-107.
- Dall, W., Smith, D.M. and Moore, L.E. 1995. Carotenoids in the tiger prawn *Penaeus esculentus* during ovarian maturation. Marine Biology 123 (3): 435–441.
- Davis, D.A., Lawrence, A.L. and Gatlin, D.M. III, 1993. Response of *Penaeus vannamei* to dietary calcium, phosphorus and calcium: phosphorus ratio. Journal World Aquaculture Societies 24: 504–515.
- Deis, R.C. 1997. Spray-drying-innovative use of an old process. Food Product Design 7: 97-113.
- Desai, K.G.H. and Park, H.J. 2005. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. Drying Technology 23: 1361-1394.
- Deshimaru, O. and Yone, Y. 1978. Effect of dietary carbohydrate sources on the growth and feed efficiency of prawn. Japan Society Science Fishery 44: 1161–1163.

- Destephano, D.B. and Brady, U.E. 1977. Prostaglandin and prostaglandin synthetase in the cricket, *Acheta domesticus*. Prostaglandins 11: 261-273.
- Dokic, P., Jakovljevic, J. and Dokic-Baucal, Lj. 1997. Molecular characteristics of maltodextrins and rheological behavior of diluted and concentrated solutions. Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 141: 435-440.
- Dokic-Baucal, L., Dokic, P. and Jakovljevic, J. 2004. Influence of different maltodextrins on properties of O/W emulsions. Food Hydrocolloids 18: 233-239.
- Eastman-Reks, S. and Fingerman, M. 1984. Effects of neuroendocrine tissue and cyclic-AMP on ovarian growth *in vivo* and *in vitro* in the fiddler crab, *Uca pugilator*. Comparative Biochemistry and Physiology 79A(4): 679-684.
- El-Sayed, A.F.M., Mansour, C.R. and Ezzat, A.A. 2003. Effects of dietary protein level on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. Aquaculture 220: 619-632.
- Emmerson, W.D. 1980. Induced maturation of prawn *Penaeus indicus*. Marine Ecology Progress Ser 2: 121-131.
- Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Sarojini, R. and Reddy, P.S. 1994. Biogenic amine in crustaceans: identification, location and roles. Journal of Crustacean Biology 14(3): 413-437.
- Fingerman, M. 1997. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in decapod crustaceans. Invertebrate Reproductive Dev 31: 47-54.
- Genta, I., Perugini, P., Conti, B. and Pavanetto, F. 1997. A multiple emulsion method to entrap a lipophilic compound into chitosan microspheres. International Journal of Pharmaceutics 152: 237-246.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. and Saurel, R. 2007. Review Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. Food Research International 40: 1107-1121.

- Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I. and Mulligan, C.N. Encapsulation in food industry: A review. 1999. International Journal of Food Science and Food Nutrition 50: 213-234.
- Giri, S.S., Sahoo, S.K. and Sahu, B.B. 2002. Larval survival and growth in Wallago attu (Bloch and Schneider): effects of light, photoperiod and feeding regime. Aquaculture 213: 151–161.
- Gitterle, T., Rye, M., Salte, R., Cock, J., Johansen, H., Lozano, C., Suárez, J.A. and Gjerde, B. 2005. Genetic (co)variation in harvest body weight and survival in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* under standard commercial conditions. Aquaculture 243: 83–92.
- Goimier, Y., Pascual, C., Sánchez, A., Gaxiola, G., Sánchez, A. and Rosas, C. 2006. Relation between reproductive, physiological and immunological condition of *Litopenaeus setiferus* pre-adult males fed different dietary protein levels (Crustacea; Penaeidae). Animal Reproduction Science 92: 193–208.
- Gomez, L. and Arellano, E. 1987. Maturation in captivity of *Penaeus vannamei* in the Escuela Superior Politecnica del Litoral (ESPOL): abstract only. Journal World Aquaculture Societies 18(1)(14A).
- Gong, H., Lawrence, A.L., Jiang, D.H., Castille, F.L. and Gatlin III, D.M. 2000. Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* I: Dietary cholesterol and de-oiled soy lecithin requirements and their interaction. Aquaculture 190: 305–324.
- Goodwin, T.W. 1978. Ecdysteroids: A new generic term. Nature 272: 122.
- Grenha, A., Seijo, B. and López, C.R. 2005. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. European Journal of Pharmaceutical Sciences 25: 427–437.
- Gunamalai, V., Kirubakaran R. and Subramoniam, T. 2005. Vertebrate steroids and the control of female reproduction in two decapod crustaceans, *Emerita asiatica* and *Macrobrachium rosenbergii*. RESEARCH COMMUNICATION.

- Gupta, K.C. and Jabrail, F.H. 2006. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. Carbohydrate Polymers.
- Harrison, K.E. 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. Journal Shellfish Research 9(9): 1–28.
- Harrison, K.E. 1997. Broodstock nutrition and maturation diets. In: D’Abramo, L.R., Conklin, D.E. and Akiyama, D.M. (Eds.). Crustacean Nutrition (6). The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA: 390-408.
- Hayworth, L.W. 1983. Microencapsulation process. U.K. patent 2103568. 4pp.
- He, H., Lawrence, A.L. and Liu, R. 1992. Evaluation of dietary essentiality of fat-soluble vitamins A, D, E and K for penaeid shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture 103: 177–185.
- He, P., Davis, S.S. and Illum, L. 1999. Chitosan microspheres prepared by spray drying. International Journal of Pharmaceutics 187: 53-65.
- Hedgecock, D. and Malecha, S.R. 1991. Prospects for the application of biotechnology to the development and improvement of shrimp and prawns. In: Sandifer, P.A. (Eds.). Shrimp culture in North America and the Caribbean. Advances in World Aquaculture (4). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA: 161–200.
- Herman, C.A. 1990. Prostaglandins in lower vertebrates. In: Eppler, A.C.G. and Scanes, M.H. Progress in comparative endocrinology, New York: Stetson, Wiley-liss: 608-613.
- Hoang, T., Lee, S.Y., Keenan, C.P. and Marsden, G.E. 2002. Effect of temperature on spawning of *Penaeus merguensis*. Journal of Thermal Biology 27: 433–437.
- Hogan, S.A., McNamee, B.F., Riordan, E.D. and Sullivan, M. 2001. Microencapsulating properties of sodium caseinate. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(4): 1934–1938.

- Huberman, A., 2000. Shrimp endocrinology. A review. Aquaculture 191: 191-208.
- Jameela, S.R., Kumary, T.V., Lal, A.V. and Jayakrishnan, A. 1998. Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long biodegradable controlled delivery system. Journal of Controlled Release 52: 17-24.
- Jasmani, S., Kawazoe, I., Shih, T.W., Suzuki, Y. and Aida, K. 2000. Haemolymph vitellogenin levels during ovarian development in the kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). Fisheries science 66: 535-539.
- Jeckel, W.H., Aizpun de Moreno, J.E. and Moreno, V.J. 1989. Biochemical composition, lipid classes and fatty acids in the ovary of the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate. Composition Biochemistry Physiology 92B: 271-276.
- Kamonpatana, M., Van De Wiel, D.F.M., Koops, W., Dumtong, L., Ngramsuriyaroj, C. and Usanakornkul, S. 1979. Oestrus control and early pregnancy diagnosis in swamp buffalo: comparison of enzymeimmunoassay and radioimmunoassay for plasma progesterone. Theriogenology 11: 399-409.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Ono, K. and Chalayodeja, K. 1979. Biosynthesis of fatty acids from acetate in the prawn, *Penaeus monodon* and *Penaeus merguensis*. Memoirs Fac Fisheries 28: 21-26.
- Keller, R., Jaros, P. and Kegel, G. 1985. Crustacean hyperglycemic neuropeptides. American Zoology 25: 207-221.
- Ko, J.A., Park, H.J., Hwang, S.J., Park, J.B. and Lee, J.S. 2002. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. International Journal of Phamaceutics 249: 165-174.
- Langdon C.J. 2000. Microparticulate feeds, complex particles. Aquaculture: 528-529.
- Langdon, C. 2003. Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. Aquaculture 227: 259-275.
- Laufer, H., Ahl, J.S.B. and Sagi, A. 1993. The role of juvenile hormones in crustacean reproduction. American Zoology 33: 365-374.

- Lazo, J.P., Dinis, M.T., Holt, G.J., Faulk, C. and Arnold, C.R. 2000. Co-feeding Microparticulate diets with algae: towards eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture 188: 339-351.
- Lee, F.Y., Shin, T.W. and Chang, C.F. 1997. Isolation and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: comparison with ovarian vitellin. General Composition Endocrinology 108: 406-415.
- Lide, D.R. 1994. Handbook of chemistry and physics 1913-1995. (75th). London: CRD Press.
- López-Alvarado, J., Langdon, C.J., Teshima, S. and Kanazawa, A. 1994. Effects of coating and encapsulation of crystalline amino acids on leaching in larval feeds. Aquaculture 122: 335-346.
- Lytle, J.S., Lytle, T.F. and Ogle, J.T. 1990. Polyunsaturated fatty acid profiles as a comparative tool in assessing maturation diets of *Penaeus setiferus*. Aquaculture 89: 287-299.
- Lui, L., Laufer, H., Gogarte, P.J. and Wang, M.H. 1997. cDNA cloning of a mandibular organ inhibiting hormone from the spider crab *Libinia emarginata*. Invertebrate Neuroscience 3: 199-204.
- Mattson, M.P. and Spaziani, E. 1985. 5-hydroxytryptamine mediates release of molt inhibiting hormone activity from isolated crab eyestalk ganglia. Hong-Kong: Kong University Press: 787-791.
- Meunpol, O., Meejing, P. and Piyatiratitivorakul, S. 2005. Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. Aquaculture Research 36: 1216-1225.
- Minagawa, M., Chiu, J.R., Kudo, M. and Takashima, F. 1994. Male reproductive Biology of the red frog crab, *Ranina ranina*, off Hachijojima, Izu Islands, Japan. Marine Biology 118: 393-401.

- Morse, D.E., Duncan, H., Hooker, N. and Morse, A. 1977. Hydrogenperoxide induces spawning in mollusks with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. Science 196: 298-300.
- Narayani, R. and Panduranga-Rao, K. 1995. pH Responsive gelatin microspheres for the oral delivery of anticancer drug methotrexate. Journal Application Polymer Science 58(10): 1761-1769.
- National Research Council. 1983. Nutrient requirements of warmwater fishes and Shellfishes. Washington D.C.: National Academy Press: 102 pp.
- O'Brien, C.J. 1994. The effects of temperature and salinity on growth and survival of juvenile prawns *Penaeus esculentus* (Haswell). Journal Experimental Marine Biology Ecology 183: 133–145.
- Okumura, T. and Aida, K. 2000. Haemolymph vitellogenin levels and ovarian development During the reproductive and non-reproductive molt cycles in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Fisheries science 66: 678-685.
- Okumura, T., Yoshida, K. and Nikaido, H. 2004. Ovarian development and hemolymph vitellogenin levels in laboratory-maintained protandric shrimp, *Pandalus hypsinotus*: measurement by a newly developed time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA). Zoology Science 21: 1037–1047.
- Osada, M. and Nomura, T. 1990. The levels of prostaglandins associated with the reproductive cycle of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. Prostaglandins 40: 229–239.
- Ostro, M.J. 1987. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of parenteral histamine (H₂)-receptor antagonists. The American Journal of Medicine 83(6): 15-22.
- Otsu, T. 1963. Bihormonal control of sexual cycle in the freshwater crab, *Potamon dehaani*. Embryologica 8: 1-20.
- Panouse, J.B. 1943. Influence de l' ablation du pe'doncle oculaire surla croissance de l' ovaire chez la Crevette Leander serratus. C. R. Academic Science Paris 218: 293–294.

- Peppas, N. 1992. Diffusional release from polymeric carriers. Second workshop on the Controlled delivery in consumer products. Secaucus, NJ: Controlled Release Society.
- Perez-Velazquez, M., Bray, W.A., Lawrence, A.L., Gatlin III, D.M. and Gonzalez-Felix, M.L. 2001. Effect of temperature on sperm quality of captive *Litopenaeus vannamei* broodstock. Aquaculture 198: 209–218.
- Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C.A. and Ross, L.G. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, 1931. Aquaculture 157: 107-115.
- Primavera J. H. 1985. A review of the maturation and reproduction in closed thelycum penaeids. Proceeding First International Conference Culture of Penaeid Prawn. Iloilo City, Philippines.
- Quackenbush, L.S. 1986. Crustacean endocrinology; a review. Aquaculture Science 43: 2271–2282.
- Quackenbush, L.S. 1991. Regulation of vitellogenesis in penaeid shrimp. In: Deloach, P., Dougherty, W.J. and Davidson, M.J. (Eds.). Frontiers in shrimp research: 125-140.
- Quackenbush, L.S. 1992. Yolk synthesis in the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. Composition Biochemistry Physiology 103A(4): 711-714.
- Quackenbush, L.S. 2001. Yolk Synthesis in the Marine Shrimp, *Penaeus vannamei*. American Zoology 41: 458-464.
- Rao, K.R. and Fingerman, M. 1975. Color changes induced by certain indole Alkaloids in the fiddler crab, *Uca*. Composition Biochemistry Physiology C 51 (1): 59–62.
- Reddy, P.R., Kiranmayi, P., Thanuja Kumari, K. and Reddy, P.S. 2006. 17 α -Hydroxyprogesterone induced ovarian growth and vitellogenesis in the freshwater rice field crab *Oziotelphusa senex senex*. Aquaculture 254: 768–775.

- Reineccius, G.A. 1989. Flavor encapsulation. Food Reviews International 5: 147-176.
- Rosenberg, M. and Sheu, T.Y. 1996. Microencapsulation of volatiles by spray-drying in whey protein-based wall system. International Dairy Journal 6: 273-284.
- Ribeiro, A.J., Silva, C., Ferreira, D. and Veiga, F. 2005. Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique. European Journal of Pharmaceutical Sciences 25: 31-40.
- Robinson, V.H.K. and Lee, J.R. 1987. Controlled Drug Delivery, Fundamentals and Applications. New York: Marcel Dekker: 3-61.
- Sarojini, R., Nagabhushanam, R. and Fingerman, M. 1994. 5-hydroxytryptaminergic control of testes development through the androgenic gland in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkia*. Invertebrate Reproductive Development 26: 127-132.
- Sbordoni, V., La Rosa, G., Mattoccia, M., Cobolli-Sbordoni, M. and De Mattheis, E. 1987. Genetic changes in seven generations of hatchery stocks of the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). In: Tiews, K. (Eds.). Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture. Heenemann Verlag, Berlin: 143-155.
- Schrooyen, P.M.M., van der Meer, R. and De Kruif, C.G. 2001. Microencapsulation: its application in nutrition. Proceedings of the Nutrition Society 60: 475-479.
- Şenal, S. and McClure, S.J. 2004. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. Advanced Drug Delivery Reviews 56: 1467-1480.
- Shahidi, F. and Han, X. Q. 1993. Encapsulation of food ingredients. Critical Review of Food Science and Nutrition 33(6): 501-547.
- Shi, X.Y. and Tan, T.W. 2002. Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of Vitamin D2. Biomaterials 23: 4469-4473.
- Shiau, S.Y. 1998. Nutrient requirements of penaeid shrimps. Aquaculture 164: 77-93.

- Shiau, S.Y. and Jiang, L.C. 2006. Dietary zinc requirements of grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on immune responses. Aquaculture 254: 476–482.
- Shu, B., Yu, W., Zhao, Y. and Liu, X. 2006. Research note study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. Journal of Food Engineering 76: 664–669.
- Soumoff, C. and O'Connor, J.D. 1982. Repression of Y-organ secretory activity by molt inhibiting hormone in the crab *Pachygrapsus crassipes*. General Composition Endocrinology 48: 432-439.
- Souty-Grosset, C. 1997. Vitellogenin synthesis in marine invertebrates. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. and Thompson, M. (Eds.). Recent Advances in Marine Biotechnology, Endocrinology and Reproduction. New Hampshire, Science Publishers: 203–247.
- Spaziani, E.P., Hinsch, G.W. and Edwards, S.C. 1995. The effects of prostaglandin E2 and prostaglandin F2 a on ovarian tissue in the Florida crayfish *Procambarus aenninsulanus*. Prostaglandins 50: 189–200.
- Stanley-Samuelson, D.W. and Pedibhotla, V.K. 1996. Mini-review what can we learn from prostaglandins and related eicosanoids in insects?. Insect Biochemistry Molecular Biology 26(3): 223-234.
- Subramoniam, T. 2000. Review crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 125: 135–156.
- Takayanagi, H., Yamamoto, Y. and Takeda, N. 1986. An ovarian stimulating factor in the shrimp *Paratya compressa*. Journal Experimental Zoology 240: 203-209.
- Taylor, A.H. 1983. Encapsulation systems and their applications in the flavor industry. Food Flavor Ingredients Packaging and Processing 5(9): 48-51.
- Tefft, J. and Friend, D.R. 1993. Controlled release herbicide formulations based on Polymeric microspheres. Journal of Controlled release 27: 27-35.

- Teixeira, M.I., Andradeb, L.R., Farinab, M. and Rocha-Leão, M.H.M. 2004. Characterization of short chain fatty acid microcapsules produced by spray drying. Materials Science and Engineering C24: 653–658.
- Teshima, S. and Kanazawa, A. 1983. Variation in lipid compositions during the ovarian maturation of the prawn. Nippon Suisan Gakkaishi 49: 957-962.
- Teshima, S., Kanazawa, A., Horinouchi, K. and Koshio, S. 1988. Lipid metabolism in destalked prawn *Penaeus japonicus*: induced maturation and transfer of lipid reserves to the ovaries. Nippon Suisan Gakkaishi 54(7): 1123–1129.
- Tsukimura, B. and Kamemoto, F.I. 1991. In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular secretions in the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture 92: 59-66.
- Tsukimura, B., Nelson, W.K. and Linder, C.J. 2006. Inhibition of ovarian development by methyl farnesoate in the tadpole shrimp, *Triops longicaudatus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A(144): 135–144.
- Tsutsui, N., Katayama, H., Ohira, T., Nagasawa, H., Wilder, M.N. and Aida, K. 2005. The effects of crustacean hyperglycemic hormone-family peptides on vitellogenin gene expression in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. General and Comparative Endocrinology 144: 232–239.
- Udomkit, A., Treerattrakool, T. and Panyim, S. 2004. Crustacean hyperglycemic hormones of *Penaeus monodon*: cloning, production of active recombinant hormones and their expression in various shrimp tissues. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 298: 79-91.
- Vaca, A.A. and Alfaro, J. 2000. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus Íannamei*, by serotonin injection. Aquaculture 182: 373–385.
- Van Beynum, G.M.A. and Roels, J.A. 1985. Starch Conversion Technology. New York: Marcel Dekker.
- van der Lubben, I.M., Verhoef, J.C., Borchard, G. and Junginger, H.E. 2001. Review chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. European Journal of Pharmaceutical Sciences 14: 201-207.

- Vincent, M., Ramos, L. and Oliva, L., 1988. Variations qualitatives et quantitatives des pigments caroténoïdes dans l'ovaire et l'hepatopancreas de *Penaeus schmitti* au cours de la maturation ovarienne. Archives International Physiology Biochemistry 96: 155–164.
- Wang, C. and Croll, R.P. 2006. Effects of sex steroids on spawning in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. Aquaculture 256: 423–432.
- Wang, Y.J., Hayes, W.T., Holman, G.M., Chavez, A.R. and Keeley, L.L. 2000. Primary structure of CHH/MIH/GIH-like peptides in sinus gland extracts from *Penaeus vannamei*. Peptides 21: 477-484.
- Warrier, S.R., Tirumalai, R. and Subramoniam, T. 2001. Occurrence of vertebrate steroids, estradiols 17β and progesterone in the reproducing females of the mud crab *Scylla serrata*. Competition Biochemical Physiology 130A: 283-294.
- Watanabe, T. 1988. Fish Nutrition and Mariculture. The general aquaculture course. Kanagawa International Fisheries Training Centre. JICA: 233.
- Wilder, M.N., Subramoniam, T. and Aida, K. 2002. Yolk proteins of crustacean. In reproductive biology of invertebrates: 131-174.
- Wong, V.K. 1998. Microencapsulation of amino acids for prawn feed additives. Department of Chemical Engineering. The University of Queensland: England.
- Wouters, R., Molina, C., Lavens, P. and Calderón, J. 2001. Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei* in different stages of sexual maturation. Aquaculture 198: 307–323.
- Wouters, R., Zambrano, B., Espin, M., Calderon, J., Lavens, P. and Sorgeloos, P. 2002. Experimental broodstock diets as partial fresh food substitutes in white shrimp *Litopenaeus vannamei* B. Aquaculture Nutrition 8: 249-256.
- Wu, J.P. and Chen, H.C. 2004. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Chemosphere 57: 1591–1598
- Wyban, J., Sweeney, J.N. 1991. Intensive shrimp production technology: The Oceanic Institute Shrimp Manual. The Oceanic Institute, Honolulu.

- Yano, I. 1985. Induced ovarian maturation and spawning in greasyback shrimp, *Metapenaeus ensis*, by progesterone. Aquaculture 47: 223-229.
- Yano, I. 1987. Effect of 17- α -OH-progesterone on vitellogenin secretion in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture 61: 46-57.
- Yano, I. 1988. Oocyte development in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Marine Biology 99: 547-553.
- Yano, I. 1993. Ultraintensive culture and maturation in captivity of penaeid shrimp. In: McVey, J.P. Mariculture. Boca Raton: CRC Press: 289-313.
- Yano, I. 1995. Final oocyte maturation, spawning and mating in penaeid shrimp. Journal of Experimental Biology and Ecology 193: 113-118.
- Yúfera, M., Pascual, E. and Fernández-Díaz, C. 1999. A highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. Aquaculture 177: 249-256.
- Yúfera, M., Kolkovskib, S., Fernández-Díaza, C. and Rincharde, J. 2003. Delivering bioactive compounds to fish larvae using microencapsulated diets. Aquaculture 227: 277-291.
- Zapata, V., López Greco, L.S., Medesani, D. and Rodríguez, E.M. 2003. Ovarian growth in the crab *Chasmagnathus granulata* induced by hormones and neuroregulators throughout the year In vivo and in vitro studies. Aquaculture 224: 339-352.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ปริมาณสารอาหาร ด้วยวิธี AOAC, 1997

การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน

หลักการ

อีเทอร์ในบีกเกอร์ที่มีอาหารบรรจุอยู่จะถูกระเหยกลายเป็นไอโดยความร้อนหลังจากไอของอีเทอร์กระทบความเย็นจากเครื่องควบแน่นกลั่นตัวเป็นของเหลว ไหลผ่านตัวอย่างอาหาร พร้อมทั้งสกัดสารที่สามารถละลายได้ในอีเทอร์ออกมาด้วยจนกระทั่งขบวนการสกัดสิ้นสุด อีเทอร์จะถูกระเหยไปกักเก็บจนหมด จะเหลือแต่สิ่งที่ยีเทอร์สกัดออกมาในบีกเกอร์ คือ ไขมัน (Crude Fat) หรือที่เรียกว่า Ether extract

อุปกรณ์

1. Petroleum ether 40-60 องศา (AR grade)
2. เครื่องสกัดไขมัน
3. บีกเกอร์ปริมาตร 100 cc
4. Extraction thimble
5. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
6. โหลดูดความชื้น
7. ตู้อบ

วิธีวิเคราะห์

1. นำบีกเกอร์ปริมาตร 100 cc ที่สะอาดไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโหลดูดความชื้น แล้วนำออกมาชั่งให้น้ำหนักคงที่ ชั่งอาหารตัวอย่างในโหลดูดความชื้น แล้วนำออกมาชั่งให้น้ำหนักคงที่ ชั่งตัวอย่างอาหารให้น้ำหนักคงที่ประมาณ 2-3 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (ระวังอย่าใช้มือจับ เพราะไขมันจากมือจะลงไปในตัวอย่ง) ใส่ลงใน Extraction thimble
2. เปิดเครื่องสกัดไขมัน ตั้งอุณหภูมิ และเวลาตามที่ต้องการสกัด เติม Petroleum ether ลงในบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนักคงที่แล้วประมาณ 90 มิลลิลิตร (ให้เพียงพอสำหรับการกลั่น) นำอาหารไปใส่เครื่อง

สกัด 3-4 ชั่วโมง (เปิดเครื่องทำความเย็นด้วย)

- นำปิกเกอร์ที่บรรจุอาหารไปติดตั้งกับเครื่องสกัด วางบนที่ heating plate ผลักป้อนไปด้านหน้าที่ตำแหน่ง immersion จุ่มแช่ thimble ลงในสารละลายเป็นเวลา ประมาณ 30 นาที ยกตัวอย่างขึ้นจากสารทำละลายในขั้นตอน reflux washing เป็นเวลา 45 นาที กดผลักป้อน ด้านหน้าไปที่ตำแหน่ง washing
- เมื่อครบเวลา reflux washing ปิด valve ที่ condenser ไปที่ตำแหน่ง closed เพื่อที่เป็นการดูสารทำละลายกลับที่ส่วนล่างของ condenser glass
- นำ thimber ออก แล้วนำปิกเกอร์ไปอบที่ตู้อบความร้อน อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปใส่ตู้ดูดความชื้น แล้งชั่งน้ำหนักจนน้ำหนักคงที่

การคำนวณปริมาณไขมัน

$$\text{ร้อยละไขมัน} = \frac{b - a}{w} \times 100$$

a คือ น้ำหนักปิกเกอร์

b คือ น้ำหนักปิกเกอร์และไขมันหลังอบ

w คือ น้ำหนักอาหารตัวอย่าง

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

หลักการ

วิธีหาปริมาณไนโตรเจนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนซึ่งโดยทั่วไปโปรตีนประกอบด้วยไนโตรเจนประมาณร้อยละ 16 ดังนั้นเมื่อทราบปริมาณไนโตรเจนแล้วนำมาคูณกับแฟคเตอร์ 6.25 จะได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ต้องการในอาหาร (crude protein) ซึ่งวิธีที่ใช้วิเคราะห์ เรียกว่าวิธี Kjeldahl โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ 3 ขั้นตอน คือ

- การย่อย (digestion) ด้วยกรดกำมะถันเข้มข้น การเร่งปฏิกิริยา ไนโตรเจนในอาหารจะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต
- การกลั่น (distillation) เป็นการไล่แอมโมเนียจากแอมโมเนียมซัลเฟตโดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แอมโมเนียจะถูกกลั่นออกมาเพื่อนำไปทำปฏิกิริยากับกรดมาตรฐาน

3. การไตเตรด (titration) ด้วยสารละลายกรดมาตรฐานเป็นการหาปริมาณแอมโมเนียที่เกิดจากการกลั่น เพื่อนำไปคำนวณหาค่าไนโตรเจนทั้งหมด

อุปกรณ์

1. Kjeldahl flask
2. ชุดกลั่น erhardt vapodast 1
3. เครื่องย่อย erhardt kjeldatherm digestion unit
4. ชุดไตเตรท

สารเคมี

1. สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น
2. สารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 เข้มข้น 0.5 N
3. K_2SO_4 100 กรัม และ $CuSO_4$ 7 กรัม
4. สารละลาย NaOH เข้มข้นร้อยละ 50
5. สารละลายBoric acid เข้มข้นร้อยละ 4
6. อินดิเคเตอร์ tashio

การเตรียมสารเคมี

1. สารเร่งปฏิกิริยาโปรตีน (Protein catalyst) K_2SO_4 100 กรัม ผสม $CuSO_4$ 7 กรัม
2. สารละลายBoric acid เข้มข้นร้อยละ 4 เตรียมจาก Boric acid 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร
3. อินดิเคเตอร์ tashio เตรียมจาก methyl red : methylene blue สัดส่วน 3 ต่อ 2 โคนละลาย methyl red 1 กรัม ใน NaOH เข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 37 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 1 ลิตร ผสมกับสารละลาย methylene blue 1 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร
4. สารละลาย NaOH เข้มข้น 0.1 N เตรียมจากสูตร

$$V = (100 \times M \times N) / a \times p \times d$$

V คือ ปริมาตรของสารที่ใช้เตรียมสารละลาย 1 ลิตร

M คือ น้ำหนักโมเลกุลของสาร (40)

N คือ ความเข้มข้นหน่วยเป็น N

a คือ จำนวนอิเล็กตรอนของเบสที่ทำปฏิกิริยาได้ (1)

p คือ เปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์

d คือ ความหนาแน่นของสาร (0.9991)

5. สารละลาย NaOH เข้มข้นร้อยละ 50 เตรียมจาก NaOH หนัก 500 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร
6. สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.5 N เตรียมจากสูตร

$$V = (100 \times M \times N) / a \times p \times d$$

V คือ ปริมาตรของสารที่ใช้เตรียมสารละลาย 1 ลิตร

M คือ น้ำหนักโมเลกุลของสาร (98.0716)

N คือ ความเข้มข้นหน่วยเป็น N

a คือ จำนวนโปรตอนของกรดที่ทำปฏิกิริยาได้ (1)

p คือ เปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์

d คือ ความหนาแน่นของสาร (1.841)

7. การเตรียม Na_2CO_3 เข้มข้น 0.5 N ชั่ง Na_2CO_3 26.5 กรัม อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้น ละลายในน้ำกลั่นอุ่นที่ต้มไล่ CO_2 ออกแล้ว 1 ลิตร

การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของกรด H_2SO_4 (Skoog and West, 1986)

1. เตรียมสารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.5 N และ Na_2CO_3 เข้มข้น 0.5 N
2. ปิเปต Na_2CO_3 เข้มข้น 0.5 N 25 มิลลิลิตร ใส่ใน flask หยด methyl orange 2-3 หยดไทเตรตกับ สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.5 N จนถึงจุดยุติ จะได้สีชมพูเหลือง
3. คำนวณหาความเข้มข้นของ H_2SO_4 จาก

$$N_{acid} = (N_{base} \times V_{base}) / V_{acid}$$

N_{acid} คือ ความเข้มข้นของสารละลาย H_2SO_4 หน่วยเป็น N

N_{base} คือ ความเข้มข้นของสารละลาย Na_2CO_3 หน่วยเป็น N

V_{base} คือ ปริมาตรของสารละลาย Na_2CO_3 หน่วย เป็นมิลลิลิตร

V_{acid} คือ ปริมาตรของสารละลาย H_2SO_4 หน่วยเป็นมิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน

1. การย่อยสลาย (digestion)

1. ชั่งตัวอย่างอาหารที่บดละเอียดประมาณ 2 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา และเติม conc. H_2SO_4 25 มิลลิลิตร
3. นำ Kjeldahl flask ตั้งบนเตาย่อยเริ่มจากไฟอ่อนไปจนถึง 380 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้ สารละลายสีขาวใส

2. การกลั่น (distillation)

ต่อ Kjeldahl flask เข้ากับเครื่องกลั่น ให้ปลายด้านหนึ่งของ condenser จุ่มลงในขวดรูปชมพู่ ที่มี 4% boric acid 100 มิลลิลิตร ที่มีการหยดอินดิเคเตอร์ tashio 2-3 หยด กลั่นให้ได้ปริมาณสาร 300 มิลลิลิตร สารละลายในขวดรูปชมพู่จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเขียว (ในการกลั่นจะมีการเติมน้ำ 75-100 มิลลิลิตร และเวตติม NaOH 90 มิลลิลิตร โดยเครื่อง)

3. การไทเตรต (titration)

นำสารละลายที่กลั่นมาไทเตรต ด้วยสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 เข้มข้น 0.5 N และบันทึกค่า นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

การคำนวณหาปริมาณโปรตีน

$$\text{ร้อยละโปรตีน} = \frac{1400 \times V_s \times N_s \times N_p}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)} \times 1000}$$

V_s คือ ปริมาตรของ H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรต หน่วยเป็นมิลลิลิตร

N_s คือ ความเข้มข้นของสารละลาย H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรต หน่วยเป็น N

N_p คือ แฟคเตอร์ของโปรตีน (6.25)

การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น

หลักการ

นำวัตถุที่ทราบน้ำหนักไปอบในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปหาค่าน้ำหนักที่หายไปมาคำนวณค่าความชื้น

อุปกรณ์

1. crucible
2. ตู้อบความร้อน
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการวิเคราะห์

1. บดอาหารที่จะทำการวิเคราะห์ให้ละเอียด
2. อบ crucible ในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำไปใส่ในโถดูดความชื้นประมาณ 30-60 นาที ให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก และบันทึกค่า crucible
3. ชั่งน้ำหนักอาหารที่บดแล้ว 2-3 กรัม ใส่ใน crucible
4. นำ crucible ที่ใส่อาหารไปอบที่ตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำไปใส่ในโถดูดความชื้นประมาณ 30-60 นาที ให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก และบันทึกค่า

การคำนวณหาค่าความชื้น

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{a - b}{w} \times 100$$

a คือ น้ำหนักตัวอย่างอาหารพร้อมถ้วยก่อนอบ

b คือ น้ำหนักตัวอย่างอาหารหลังอบ

w คือ น้ำหนักอาหารตัวอย่าง

การวิเคราะห์หาปริมาณใยอาหาร

หลักการ

นำอาหารที่สกัดไขมันออกแล้ว ไปย่อยด้วยสารละลายกรดเจือจาง หลังจากนั้นอาหารจะถูกย่อยไปด้วยสารละลายด่างเจือจาง สารที่เหลืออยู่จะถูกกรองเก็บใน crucible แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส น้ำหนักที่สูญหายไปในการเผา คือ ใยอาหารทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร เรียกว่า Crude fibre

สารเคมี

1. 1.25% H₂SO₄
2. 1.25% KOH
3. n-Octanol

อุปกรณ์

1. บีกเกอร์ทรงสูง
2. กระดาษกรองขนาดใหญ่
3. กรวยกรอง
4. โหลดูดความชื้น
5. ตู้อบความร้อน
6. เตาเผาความร้อนสูง

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างอาหารที่สกัดไขมันออกแล้ว (ทราบน้ำหนักอย่างละเอียด) มาใส่ลงในบีกเกอร์ทรงสูง
2. เติม 1.25% H_2SO_4 150 มิลลิลิตร และเติม n-Octanol 3-5 หยด ต้มบนhot plate ของเครื่องสกัด รอให้เดือดก่อนแล้วค่อยนับเวลาไปอีก 30 นาที
3. เติม 1.25% KOH 150 มิลลิลิตร และเติม n-Octanol 3-5 หยด ต้มบนhot plate ของเครื่องสกัด รอให้เดือดก่อนแล้วค่อยนับเวลาไปอีก 30 นาที
4. กรองสารละลายที่ย่อยแล้ว จากนั้นเอาตะกอนที่กรองได้ไปอบที่ตู้อบความร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (จนกว่าน้ำหนักคงที่)
5. นำตะกอนที่ได้ไปใส่ crucible ที่ทราบน้ำหนัก แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่โถดูดความชื้นจนเย็น แล้วชั่งน้ำหนักที่ได้เป็นน้ำหนักของเถ้า เมื่อนำน้ำหนักที่ได้ไปหักออกจากรับน้ำหนักที่ได้ในข้อ 4 จะได้น้ำหนักของใยอาหารที่ปราศจากเถ้า

การคำนวณปริมาณใยอาหาร

$$\text{ร้อยละใยอาหาร} = \frac{b - a}{W} \times 100$$

a คือ น้ำหนักเถ้าหลังเผา

b คือ น้ำหนักใยอาหารรวมเถ้าก่อนเผา

w คือ น้ำหนักอาหารตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution)

สารละลายเริ่มต้น (Stock solution)

A: 0.1 M monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

ชั่ง $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (A.R. grade, Scharlau, Thailand) หนัก 13.9 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร

B: 0.1 M dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

ชั่ง $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (A.R. grade, Ajax Finechem, Thailand) หนัก 35.85 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร

มาตรฐานการผสมระหว่างสารละลาย A ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) และ สารละลาย B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) เป็นดังนี้ คือ

pH 5.5: เตรียมจาก สาร A 93.5 มิลลิลิตร ผสมกับ สาร B 6.5 มิลลิลิตร

pH 7.5: เตรียมจาก สาร A 16.0 มิลลิลิตร ผสมกับ สาร B 84.0 มิลลิลิตร

pH 9.5: เตรียมจาก สาร A 5.3 มิลลิลิตร ผสมกับ สาร B 94.7 มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วย 10% กรดไฮโดรคลอริก (A.R. grade, Labscan asia Co., Ltd., Thailand) และ 10% โซเดียมไฮดรอกไซด์ (A.R. grade, Labscan asia Co., Ltd., Thailand)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์ Radioimmunoassay (RIA) (Kamonpatana *et al.*, 1979)

วิธีการสกัดตัวอย่าง

1. นำเลือดแม่กึ่ง 150 μ l สกัดด้วย Diethyl ether 1500 μ l ปั่นด้วยความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 90 วินาที
2. แยกส่วนใสใส่ขวด vial ขนาด 10 ml และทำแห้งด้วย Vacuum dryer
3. เติม Phosphate buffer saline (PBS) p H 7.0 ปริมาณ 100 μ l ทิ้งไว้ 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยเทคนิค RIA

ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยเทคนิค RIA

1. เตรียมสารมาตรฐานฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 pg/50 ml

สารละลายฮอร์โมนตั้งต้นมีความเข้มข้น เท่ากับ 1 μ g/ml Ethanol

สารละลาย A = 100 μ l สารตั้งต้น + 5 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย B = 2.5 ml สารละลาย A + 2.5 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย C = 2.5 ml สารละลาย B + 2.5 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย D = 2 ml สารละลาย C + 3 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย E = 2.5 ml สารละลาย D + 2.5 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย F = 2.5 ml สารละลาย E + 2.5 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย G = 2ml สารละลาย F + 3 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย H = 2.5 ml สารละลาย G + 2.5 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย I = 2.5 ml สารละลาย B + 2.5 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย J = - +5 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย O= เติม สารละลาย PBS อย่างเดียว

2. ปิเปตสารมาตรฐาน 50 μ l เติมสารละลาย PBS 50 μ l ผสมให้เข้ากัน

3. เติม Anti-Progesterone (AS-P) 100 μ l ในสารละลายตัวอย่าง และสารมาตรฐาน ป่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที
4. เติมสารกัมมันตภาพรังสี [(1, 2, 6, 7 3 H) P4] 100 μ l ป่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง
5. เติม ice-dextran-coated charcoal 200 μ l และปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกสาร ความเร็ว 3,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที
6. เทส่วนใสด้านบนลงในขวด vial 10 ml และเติม Scintillation fluid 4 ml ป่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
7. วิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยเครื่อง Liquid Scintillation Counter (Beckman, USA)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวประภาภรณ์ เทอดสุทธิธรรณภูมิ สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนสระบุรีวิทยาคม จากนั้นได้เข้าศึกษาที่คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา สำเร็จการศึกษาได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตเมื่อปี พ.ศ.2547 และเข้าศึกษาต่อในระดับ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2548



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย