Research Article

Received: April 2, 2018; Accepted: May 25, 2018

องค์ประกอบของสารสีในเนื้อหอยและปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตในเปลือกหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

Pigment Profiles in Meat and Calcium Carbonate Content Deposited in Green Mussel (*Perna viridis*)

รติกร สมิตไมตรี และจินตนา สและน้อย*

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

กังสดาลย์ บุญปราบ

ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

Ratikorn Smithmaitrie and Jintana Salaenoi[A]*

Department of Marine Science, Faculty of Fisheries, Kasetsart University,

Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 10900

Kangsadan Boonprab

Department of Fishery Products, Faculty of Fisheries, Kasetsart University,

Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 10900

บทคัดย่อ

หอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) เป็นสัตว์ทะเลที่มีเพศแยก สีของเนื้อหอยแมลงภู่ในแต่ละเพศจะมีความแตกต่างกันตามระยะของการพัฒนาการการเจริญเติบโต ซึ่งขนาดและความแข็งของเปลือกก็มีความแตกต่างกันในแต่ละระยะการเจริญเติบโต จึงเป็นที่มาของการศึกษาองค์ประกอบของสารสีในเนื้อหอย และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่สะสมอยู่ในเปลือกหอยจำนวน 4 ขนาด (2.00-3.00, 3.01-4.00, 4.01-5.00 และ 5.01-8.00 ซม.) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย โดยใช้เทคนิค thin-layer chromatography (TLC) และเทคนิค EDTA titrimetric method ตามลำดับ ผลการศึกษาพบสารแคโรทีนอยด์ที่มีสีเหลืองถึงส้มในสารสกัดจากเนื้อหอยแมลงภู่ทั้งเพศเมียและเพศผู้จากทุกขนาดของเปลือกหอยที่นำมาศึกษา ซึ่งจำแนกได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม xanthophyll และกลุ่ม carotene กลุ่ม xanthophyll (ค่า $R_f = 0.41$) ประกอบด้วยสารสีชนิด fucoxanthin (ค่า $R_f = 0.27$) ที่มีสีเหลืองถึงส้ม และสารสีชนิดอื่น ๆ ที่มีสี

[A]Center for Advanced Studies in Tropical Natural Resources, NRU-KU, Kasetsart University, Latyao, Chatuchak, Bangkok 10900

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** ffisjid@ku.ac.th

doi: 10.14456/tstj.2019.56

เหลืองถึงส้มคล้ายกันทั้งในสารสกัดจากหอยแมลงภู่เพศเมียและเพศผู้ในทุกขนาด ซึ่งมีค่า R_f ใกล้เคียงกัน กลุ่ม carotene ประกอบด้วยสารสีชนิดเบต้าแคโรทีน (ค่า $R_f = 0.96$) ส่วนปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่สะสมในเปลือกหอยแมลงภู่พบว่าเปลือกหอยแมลงภู่เพศผู้ขนาด 5.01-8.00 ซม. มีปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตมากที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ย 714.52±50.59 mg $CaCO_3$/g shell แตกต่างจากขนาดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าความยาวของเปลือกหอยแมลงภู่แต่ละขนาดมีความสัมพันธ์กับการสะสมแคลเซียมคาร์บอเนตในเปลือกของหอยแมลงภู่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ขนาดของเปลือกหอยไม่มีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของสารสีที่สะสมในตัวหอยแมลงภู่

คำสำคัญ : สารสี; หอยแมลงภู่; แคลเซียมคาร์บอเนต; แคโรทีนอยด์

Abstract

Green mussel (*Perna viridis*) is a dioecious marine animal. Each gender of green mussel has a different color depends on growth stages including the size and hardness of the shell has a different too. The aim of this study is to investigate the pigment composition in meat and the amount of calcium carbonate deposited in the mussel shell at 4 sizes (2.00-3.00, 3.01-4.00, 4.01-5.00, and 5.01-8.00 cm) both male and female. Thin-layer chromatography (TLC) and EDTA titrimetric technique methods were used for analysis, respectively. The results showed that carotenoids were expressed yellow to orange in both male and female meat extract from all shell sizes. They were classified into 2 groups; xanthophyll and carotene. Xanthophyll ($R_f = 0.41$) consisted of fucoxanthin ($R_f = 0.27$) and other xanthophylls in all size of male and female which were yellow to orange and presented the same R_f value. Carotene was composed of ß-carotene ($R_f = 0.96$). The calcium carbonate content (mean±SD) in green mussel shell of male at size 5.01-8.00 cm was 714.52±50.59 mg $CaCO_3$/g shell which was significantly higher than other sizes ($p < 0.05$). The study was concluded that the size of the shell related to the accumulation of calcium carbonate in green mussel shell ($p < 0.05$), but were not affected to the component of pigments in sex of green mussel.

Keywords: pigment; green mussel; calcium; carotenoid

1. บทนำ

ทะเลเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายของชนิดพันธุ์ ระบบนิเวศ รวมถึงความหลากหลายทางชีวภาพระหว่างสายพันธุ์ ทำให้สิ่งมีชีวิตในทะเลมักจะมีสีสันสดใสแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ระดับความลึก แสง และแหล่งอาหาร หอยแมลงภู่เป็นสัตว์ทะเลชนิดหนึ่งที่มีเปลือกสีเขียวอมน้ำตาล [1] อาศัยอยู่บริเวณเขตน้ำขึ้นน้ำลง [2] เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งที่เป็นที่นิยมของผู้บริโภค สีของเนื้อหอยแมลงภู่เกิดจากการได้รับสารอาหารผ่านทางการกิน

Louda และคณะ รายงานว่าพบคลอโรฟิลล์เอและแคโรทีนอยด์ในสารสกัดจากเนื้อของหอยแมลงภู่ ซึ่งเป็นสารชนิดเดียวกันกับที่พบในตัวอย่างของแพลงก์ตอนพืชที่ได้จากการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณแปลงเลี้ยงหอยแมลงภู่ [3] และ Takashi ยังรายงานว่ากลุ่มหอยสองฝาจำพวกหอยนางรม หอยแครง และหอยแมลงภู่ สะสมสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ผ่านทางการกรองกินสาหร่ายขนาดเล็กแล้วเปลี่ยนสารอาหารเหล่านั้นด้วยกระบวนการเมแทบอลิซึม ตัวอย่างชนิดสารแคโรทีนอยด์ที่พบในหอยสองฝา เช่น fucoxanthin diatoxanthin และ alloxanthin [4]

การจำแนกเพศของหอยแมลงภู่อาศัยจากตัวบ่งชี้ต่าง ๆ เช่น การสังเกตจากลักษณะสีของบริเวณต่อมเพศ (gonad) ที่แตกต่างกัน โดยในเพศผู้เนื้อของหอยแมลงภู่จะมีสีเหลืองแกมขาว และในเพศเมียต่อมเพศจะมีสีส้ม [5] แต่ขณะเดียวกัน Laura และคณะ ได้รายงานว่าการใช้สีของต่อมเพศเป็นตัวบ่งชี้เพศของหอยแมลงภู่ยังมีความไม่แน่นอน มีการศึกษาในหอยแมลงภู่แคลิฟอร์เนียชนิด *Mytilus californianus* พบว่าสีของต่อมเพศในหอยแมลงภู่เพศเมียและเพศผู้มีสีส้มคล้ายกัน [6] และในหอยแมลงภู่เพศเมียที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในช่วงระยะกำลังพัฒนา (immature stage) สีของรังไข่ (ovary) จะมีสีขาวครีมคล้ายกับสีของต่อมเพศของหอยแมลงภู่เพศผู้ที่อยู่ในระยะสมบูรณ์เพศหรือระยะเต็มวัย แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบของสารสีในหอยแมลงภู่ทั้งเพศเมียและเพศผู้อาจมีความคล้ายคลึงกัน ส่วนลักษณะของสีบริเวณต่อมเพศที่ปรากฏให้เห็นจากภายนอกมีความแตกต่างกัน อาจขึ้นอยู่กับขนาดหรือพัฒนาการของการเจริญเติบโต ทั้งนี้การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยแมลงภู่จะเริ่มพัฒนาเมื่อหอยเข้าสู่ระยะวัยเจริญพันธุ์ ซึ่งมีความยาวของเปลือกหอยตั้งแต่ 20 มิลลิเมตร ขึ้นไป [7] มีรายงานว่าหอยแมลงภู่ระยะโตเต็มวัยหรือพ่อแม่พันธุ์จะมีขนาดของเปลือกยาว 50-70 มิลลิเมตร [8] ซึ่ง Bigatti และคณะ ยังได้รายงานอีกว่าไม่พบการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในหอยแมลงภู่ที่มีขนาดความยาวเปลือกน้อยกว่า 18 มิลลิเมตร [9]

เปลือกของหอยแมลงภู่มีแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นองค์ประกอบหลักอยู่ถึง 95-99 % และเป็นสารอินทรีย์อีก 5 % [10] เปลือกหอยแมลงภู่มีรูปร่างลักษณะกลมรี แบ่งเป็น 3 ชั้น โดยเรียงจากชั้นนอกสุด คือ periostracum เป็นชั้นที่มีลักษณะบาง ประกอบด้วยรงควัตถุสี สารโปรตีนประเภท conchiolin [11] และไคติน ถัดมา คือ ชั้น prismatic ประกอบด้วยผลึกของแคลเซียมคาร์บอเนตแบบแคลไซต์ (calcite) และชั้นในสุด คือ nacreous ประกอบด้วยผลึกแคลเซียมคาร์บอเนตแบบอะราโกไนต์ (aragonite) เป็นชั้นผิวเรียบ มีความแวววาว [12] Takashi และคณะ รายงานว่าเปลือกของหอยสร้างขึ้นจากการหลั่งสารจำพวกสารอินทรีย์บริเวณเซลล์ชั้นนอกของแมนเทิล โดยในขั้นแรกแมนเทิลจะหลั่งสารอินทรีย์ออกมาเป็นเยื่อหุ้ม (ชั้น periostracum) แล้วเกิดการตกผลึกของแคลเซียมระหว่างชั้น periostracum และแมนเทิล จนเกิดเป็นเปลือกชั้น prismatic และ nacreous ตามลำดับ โดยไอออนของแคลเซียมและคาร์บอเนตในน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการสร้างเปลือกของหอย [13] พัฒนาการของเปลือกหอยแมลงภู่มีความสัมพันธ์กับขนาดของเปลือกหอยและการเจริญเติบโตของหอย Bernd และ Donna ได้ศึกษาพัฒนาการในการสร้างเปลือกของหอยทะเลสองฝา พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นระยะ ๆ บริเวณขอบของเปลือก [14] และการเจริญเติบโตของเปลือกหอยแมลงภู่ยังมีความสัมพันธ์กับความยาวของเปลือกหอย รวมถึงระยะห่างระหว่างรอยของกล้ามเนื้อมัดต่าง ๆ ภายในเปลือก [15] แสดงให้เห็นว่าแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่ใช้ในการ

เจริญเติบโตและการสร้างเปลือกของหอยแมลงภู่ Silvia และ Marina ยังรายงานอีกว่ากระบวนการตกผลึกของแคลเซียมคาร์บอเนตในการสร้างเปลือกของหอยนี้เป็นกิจกรรมที่เพิ่มขึ้นตลอดวงจรชีวิตของหอย โดยขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ทั้งภายในตัวของสิ่งมีชีวิตและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม [16]

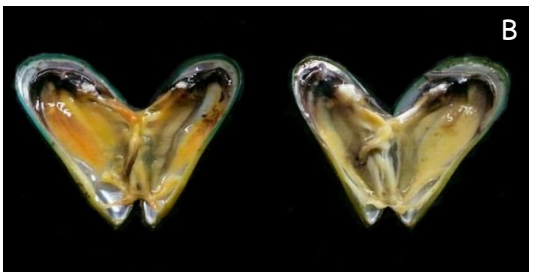
การที่สีของหอยแมลงภู่และความแข็งของเปลือกหอยซึ่งมาจากการสะสมแคลเซียมคาร์บอเนตในเพศเมียและเพศผู้มีความแตกต่างกัน อาจเกี่ยวข้องกับขนาดของหอยและระยะการเจริญเติบโต ผู้วิจัยจึงเกิดแนวคิดในการศึกษาความแตกต่างดังกล่าว รวมถึงหาความสัมพันธ์ของการสะสมแคลเซียมคาร์บอเนตกับการพัฒนาการเจริญเติบโต ซึ่งความรู้ที่ได้จะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่จะบอกถึงองค์ประกอบของสารสีในแต่ละเพศของหอย อันจะนำไปสู่การอธิบายถึงคุณค่าทางโภชนาการและการนำแคลเซียมคาร์บอเนตไปใช้ประโยชน์ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) จากกระชังเลี้ยงหอยแมลงภู่ ณ สถานีวิจัยประมงศรีราชา ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี วัดขนาดความยาวและความหนาของเปลือกหอยแมลงภู่ โดยจำแนกหอยแมลงภู่ออกเป็น 4 ขนาดตามความยาวของเปลือก คือ 2.00-3.00, 3.01-4.00, 4.01-5.00 และ 5.01-8.00 เซนติเมตร (รูปที่ 1A) (การแบ่งขนาดของเปลือกหอยคำนึงถึงระยะที่หอยแมลงภู่เริ่มเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ ตั้งแต่ขนาดความยาวเปลือก 2 เซนติเมตรขึ้นไป ส่วนขนาดอื่น ๆ แบ่งตามที่มีการซื้อขายในท้องตลาด) จากนั้นนำหอยมาชั่งน้ำหนักรวมแล้วแยกเนื้อหอยแมลงภู่ออกจากเปลือก ชั่งน้ำหนักเนื้อหอยแมลงภู่ที่แยกได้จากเปลือกและแยกเพศหอยโดยสังเกตจากสีของเนื้อหอยแมลงภู่ (รูปที่ 1B) [5] ชั่งน้ำหนักเปลือกหอยแมลงภู่ที่เหลือแล้วนำเปลือกหอยมาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้งแล้วบดให้ละเอียดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร

5.01-8.00 ซม. 4.01-5.00 ซม. 3.01-4.00 ซม. 2.00-3.00 ซม.



เพศเมีย เพศผู้

รูปที่ 1 เปลือกหอยแมลงภู่ขนาดต่าง ๆ (A) และหอยแมลงภู่เพศเมียและเพศผู้ (B)

2.2 การวิเคราะห์สารสีในหอยแมลงภู่

ชั่งเนื้อหอยแมลงภู่ 8 กรัม (น้ำหนักเปียก) ใส่ลงในโกร่ง เติม acetone ที่แช่เย็นจัดลงไป 20 มิลลิลิตร แล้วบดให้ละเอียด กรองเอาเฉพาะส่วนของสารสกัดใส่ลงในกรวยแยกแล้วเติม petroleum ether 20 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่ากรวยแยกเพื่อให้สารละลายเข้ากัน ทิ้งไว้รอจนสารละลายแยกชั้น รงควัตถุจะละลายอยู่ในชั้น petroleum ether ในสารละลายชั้นบน นำส่วนของสารละลายที่อยู่ชั้นล่างมาสกัดซ้ำจนไม่มีรงควัตถุเหลืออยู่ จากนั้นกรองสารสกัดที่ได้ผ่าน Na_2SO_4 (anhydrous) แล้วเติมสารละลาย butylated

hydroxytoluene (BHT) ความเข้มข้น 500 ppm จากนั้นนำสารสกัดไประเหยแห้ง (evaporation) ภายใต้ความดันสุญญากาศด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นชะสารสกัดหยาบ (crude extract) ออกจากขวดระเหย (evaporating flask) โดยใช้ hexane เก็บรักษาสารสกัดที่ได้ไว้ในขวด vial ที่หุ้มด้วยกระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์เพื่อไม่ให้โดนแสง แล้วนำไปเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน (nitrogen flushing) เพื่อให้สารสกัดเข้มข้นขึ้นและไล่แก๊สออกซิเจนออก เก็บรักษา crude extract ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดจากหอยแมลงภู่เพศผู้และเพศเมียแต่ละขนาดด้วยเทคนิค thin-layer chromatography (TLC) โดยนำสารสกัดหยาบมาละลายในสารละลายผสมระหว่าง acetone และ methanol อัตราส่วน 2:3 แล้วจุดสารลงบนแผ่น TLC แบบอะลูมิเนียม ที่เคลือบด้วย silica gel 60 F_{254} ขนาด 9×11 เซนติเมตร (stationary phase) ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ทิ้งไว้ให้สารละลายระเหยแห้งจนหมด จากนั้นนำแผ่น TLC ไปใส่ใน tank ซึ่งบรรจุตัวทำละลายผสม (mobile phase) ระหว่าง acetone และ hexane อัตราส่วน 3:7 mobile phase จะเคลื่อนที่ผ่าน stationary phase ทำให้เกิดการแยกขององค์ประกอบสารสกัด บันทึกตำแหน่งและสีของสารที่แยกออกมา แล้วนำไปคำนวณหาค่า R_f เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานจากตัวอย่างพืช ได้แก่ ฟักทอง แครอท และใบปวยเล้ง [17]

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมในเปลือกหอยแมลงภู่

วิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมในเปลือกหอยแมลงภู่ด้วยเทคนิค EDTA titrimetric method [18] โดยชั่งเปลือกหอยแมลงภู่บด 1 กรัม (ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ) เติม 1N HCl 35 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วแช่เปลือกหอยซ้ำจนไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น เก็บรวบรวมสารละลาย 1N HCl ที่แช่เปลือกหอยบดไว้ทั้งหมด ปิเปตสารละลาย 1N HCl ที่ใช้แช่เปลือกหอยแมลงภู่ 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่น (deionized distilled water) แล้วเทใส่ในขวดรูปชมพู่ ปรับ pH (10.00± 0.05) ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (NH_4Cl 67.6 กรัม ละลายใน NH_4OH 572 มิลลิลิตร ผสมกับ Na_2EDTA 4.716 กรัม และ $MgSO_4$ 3.12 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) จากนั้นเติมสารละลายอินดิเคเตอร์ eriochrome 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู นำไปไตเตรทด้วยสารละลาย Na_2EDTA จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน จดบันทึกปริมาตรของ Na_2EDTA ที่ใช้ในการไตเตรท แล้วนำไปคำนวณหาค่าโมลาริตีของแคลเซียมที่อยู่ในสารละลาย 1N HCl ที่ใช้ในการแช่เปลือกหอยทั้งหมดต่อไป แสดงผลเป็นความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนต (mg $CaCO_3$/g shell) [19]

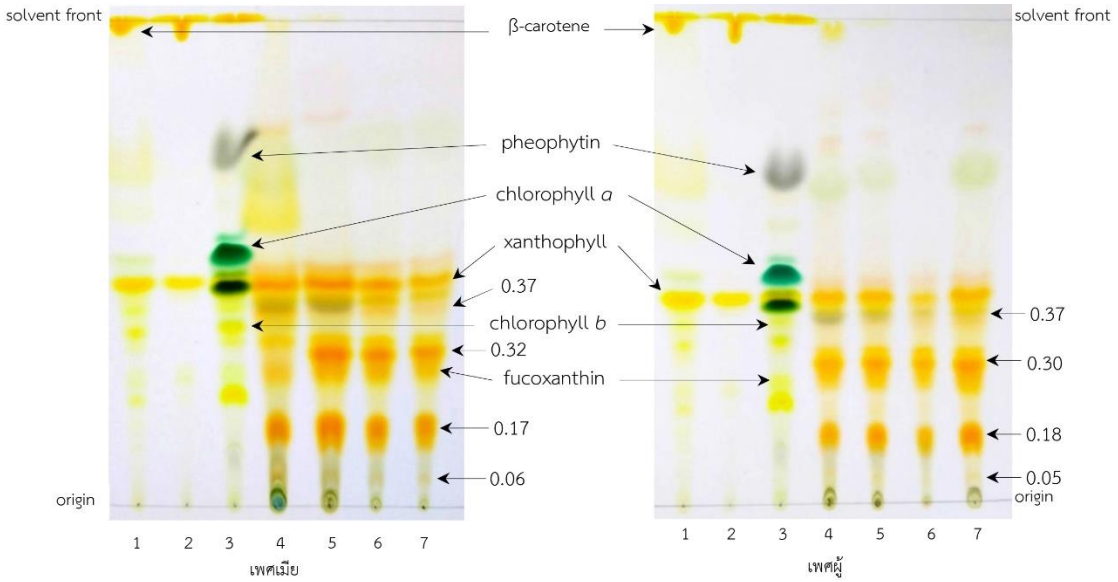
2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการศึกษาของการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมในเปลือกหอยแมลงภู่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยข้อมูลที่ได้ด้วย one-way ANOVA และ t-test ($p < 0.05$) [19]

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากหอยแมลงภู่เพศเมียและเพศผู้โดยใช้เทคนิค TLC จากการศึกษาพบสารแคโรทีนอยด์หลายชนิด (รูปที่ 2) ในสารสกัดของหอยแมลงภู่จากทุก ๆ ขนาดของเปลือกหอยและสารสกัดจากตัวอย่างพืช พบสารสีเหลืองส้มของกลุ่ม xanthophyll มีค่า R_f เท่ากับ 0.41 ในตัวอย่างทุกชนิด พบ fucoxanthin มีค่า R_f เท่ากับ

0.27 และยังพบกลุ่มของ xanthophyll ชนิดอื่น ๆ ที่มีสีเหลืองถึงส้มคล้ายกันทั้งในสารสกัดจากหอยแมลงภู่เพศเมียและเพศผู้แต่ละขนาดและมีค่า R_f ใกล้เคียงกัน ดังนี้ สารสกัดจากหอยแมลงภู่เพศเมียมีค่า R_f เท่ากับ 0.06, 0.17 และ 0.32 สารสกัดจากหอยแมลงภู่เพศผู้มีค่า R_f เท่ากับ 0.05, 0.18 และ 0.30 จากสารสกัดใบปวยเล้งพบสารในกลุ่ม chlorophyll ได้แก่ chlorophyll a มีค่า R_f เท่ากับ 0.45 chlorophyll b มีค่า R_f เท่ากับ 0.32 และพบสารสีเทาอมเขียวของ pheophytin มีค่า R_f เท่ากับ 0.55 ซึ่งเห็นได้เด่นชัดกว่าสารสกัดจากหอยแมลงภู่ทั้ง 2 เพศ เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดจากหอยแมลงภู่ทั้งสองเพศที่ได้จาก แต่ละขนาดของเปลือก พบว่าที่ขนาดเปลือก 2.00-3.00 และ 3.01-4.00 ซม. พบสารสีกลุ่ม carotene ชนิด β-carotene มีค่า R_f = 0.96 เห็นได้เด่นชัดมาก กว่าในหอยแมลงภู่ที่ขนาดเปลือกหอย 4.01-5.00 และ 5.01-8.00 ซม. ขณะที่สารสกัดจากหอยแมลงภู่เพศผู้ที่ขนาดเปลือก 2.00-3.00 ซม. มีสารสีส้มในกลุ่มของ xanthophyll (R_f = 0.32) เห็นได้เด่นชัดมากกว่าในเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่เพศเมียที่ขนาดเปลือกเท่ากัน และ mobile phase (acetone 3 : hexane 7 v/v) ที่ใช้ในการพาสารสกัดเคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC โดยส่วนใหญ่สามารถแยกองค์ประกอบของสารสกัดจากหอยแมลงภู่ได้ดี



รูปที่ 2 องค์ประกอบของสารสกัดจากหอยแมลงภู่เพศเมียและเพศผู้ที่ได้จากเปลือกหอยแต่ละขนาด เปรียบเทียบกับองค์ประกอบของสารสกัดจากพืชแต่ละชนิด (1 = ฟักทอง, 2 = แครอท, 3 = ใบปวยเล้ง, 4 = เปลือกหอยแมลงภู่ขนาด 2.00-3.00 ซม., 5 = เปลือกหอยแมลงภู่ขนาด 3.01-4.00 ซม., 6 = เปลือกหอยแมลงภู่ขนาด 4.01-5.00 ซม. และ 7 = เปลือกหอยแมลงภู่ขนาด 5.01-8.00 ซม.)

รงควัตถุหรือสีที่ปรากฏในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ใบ ผล ดอก เกิดจากการสังเคราะห์ขึ้นในพืชและสะสมอยู่ในส่วนประกอบของพืชที่เรียกว่าพลาสติด (plastid) ซึ่งพบเฉพาะในพืชและสาหร่าย จำแนกตามลักษณะของสีได้ 3 ชนิด คือ คลอโรพลาสต์ (chloroplast) เป็นพลาสติดที่มีสีเขียวประกอบไปด้วย

สารคลอโรฟิลล์ต่าง ๆ โครโมพาสต์ (chromoplast) เป็นพลาสติดที่ไม่มีองค์ประกอบของสารคลอโรฟิลล์ จึงทำให้เกิดสีสันต่าง ๆ ยกเว้นสีเขียวในพืช และลิวโคพลาสต์ (leucoplast) เป็นพลาสติดที่ไม่มีสีทำหน้าที่สะสมแป้งที่ได้จากการสังเคราะห์แสงของพืช [20] Yoshikazu และคณะ รายงานว่าพบสารเบต้าแคโรทีนปริมาณสูงสะสมอยู่ในโครโมพาสต์บริเวณรากของแครอท และสารแคโรทีนอยด์ชนิดต่าง ๆ มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับส่วนประกอบและชนิดของพืช [21] สิ่งมีชีวิตในทะเลมักมีลำตัวหรือเนื้อเยื่อที่มีสีสันที่สวยงาม ใช้ในการดึงดูดความสนใจ รวมไปถึงใช้สำหรับการป้องกันตัวจากศัตรู แต่สัตว์ทะเลเป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถสังเคราะห์อาหารเองต่างจากพวกพืช สีสันของสิ่งมีชีวิตในทะเลส่วนใหญ่จึงเกิดจากการได้รับสารผ่านการกินอาหาร [4] และมีส่วนประกอบของเซลล์ที่เรียกว่าโครมาโตฟอร์ (chromatophore) อยู่บริเวณผิวลำตัว ทำหน้าที่ในการสร้างและสะสมเม็ดสีต่าง ๆ ให้กับสิ่งมีชีวิต [22] แหล่งของสารแคโรทีนอยด์ในทะเลส่วนใหญ่มาจากแพลงก์ตอนพืชในทะเล

มีรายงานพบคลอโรฟิลล์เอและแคโรทีนอยด์ในหอยแมลงภู่สกุล *Perna* ซึ่งเป็นสารชนิดเดียวกันกับที่พบในแพลงก์ตอนพืชบริเวณแปลงเลี้ยงหอยแมลงภู่ [3] และหอยทะเลสองฝาจะสะสมสารแคโรทีนอยด์ต่าง ๆ ที่ได้รับไว้ในเนื้อเยื่อตามลำตัว [23] ความแตกต่างของแหล่งแคโรทีนอยด์ที่สังเคราะห์ขึ้นเองได้ในพืชและจากการได้รับผ่านทางการกินอาหารในหอยแมลงภู่ จึงมีแนวโน้มทำให้กลุ่มของสารแคโรทีนอยด์ที่พบในพืชและหอยแมลงภู่มีองค์ประกอบของสารสีที่แตกต่างกัน อาจใช้สารสกัดจากสิ่งมีชีวิตทะเลซึ่งมีสีที่คล้ายกันกับหอยแมลงภู่ในการนำมาเปรียบเทียบเพื่อศึกษาองค์ประกอบของสารสีในหอยแมลงภู่ ได้แก่ หอยแครง เปลือกของกุ้ง และปู

หอยแมลงภู่สามารถเปลี่ยนสารแคโรทีนอยด์ที่สะสมจากการกรองกินแพลงก์ตอนหรือสาหร่ายขนาดเล็กไปเป็นสาร fucoxanthin, diatoxanthin, diadinoxanthin และ alloxanthin ผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมได้ นอกจากนี้ Takashi ยังพบว่าสีส้มหรือแดงในหอยเกิดจากสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ชนิด fucoxanthin เป็นหลัก [4] ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาองค์ประกอบของสารสีในหอยแมลงภู่ที่พบสารแคโรทีนอยด์ชนิด fucoxanthin ในระยะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยแมลงภู่ Louda และคณะ รายงานว่าต่อมเพศของหอยแมลงภู่เพศเมียซึ่งมีสีส้มจะพบองค์ประกอบของสารแคโรทีนอยด์มากกว่าในเพศผู้ และในทางกลับกันต่อมเพศของเพศผู้จะพบคลอโรฟิลล์ที่มีปริมาณมากกว่าในเพศเมีย [3] ซึ่งใกล้เคียงกับผลการศึกษาในภาพรวมที่พบองค์ประกอบของสารแคโรทีนอยด์ในสารสกัดจากหอยแมลงภู่เพศเมียที่มีสีส้มถึงแดงเห็นได้เด่นชัดมากกว่าเพศผู้ จึงมีแนวโน้มเป็นไปได้ว่าองค์ประกอบของสารแคโรทีนอยด์ในหอยแมลงภู่เพศเมียที่เห็นได้เด่นชัดกว่าในเพศผู้ในแต่ละขนาดเปลือกของหอยจะอยู่ในช่วงระยะการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศเมีย นอกจากนี้มีรายงานว่าหอยแมลงภู่สามารถสืบพันธุ์ครั้งแรกเมื่อมีขนาดประมาณ 10-20 มิลลิเมตร หรืออายุประมาณ 2 เดือน [7-9] จึงคาดว่าขนาดของเปลือกหอยอาจไม่มีอิทธิพลต่อความแตกต่างระหว่างองค์ประกอบของสารสีที่พบในหอยแมลงภู่ทั้งเพศเมียและเพศผู้ แต่ขึ้นอยู่กับช่วงระยะที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยแมลงภู่ สอดคล้องกับผลการศึกษาองค์ประกอบของสารสีจากหอยแมลงภู่ที่มีความคล้ายกันในเปลือกหอยแต่ละขนาด

การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมในเปลือกหอยแมลงภู่ด้วยเทคนิค EDTA titrimetric method ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตในเปลือกหอยแมลงภู่แสดงดังตาราง

ตารางที่ 1 ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) โดยเฉลี่ย (mean±sd) ในเปลือกหอยแมลงภู่เพศเมียและเพศผู้แต่ละขนาด

ขนาดเปลือกหอยแมลงภู่ (ซม.)	เปลือกหอยเพศเมีย (mg $CaCO_3$/g shell)	เปลือกหอยเพศผู้ (mg $CaCO_3$/g shell)
2.00-3.00	660.81 ± 66.54^{Aa}	614.14 ± 17.59^{Aa}
3.01-4.00	611.81 ± 29.11^{Aa}	625.79 ± 39.75^{Aa}
4.01-5.00	600.16 ± 4.04^{Aa}	616.47 ± 13.98^{Aa}
5.01-8.00	670.19 ± 40.47^{Aa}	714.52 ± 50.59^{Ab}

A คือ ค่าเฉลี่ยที่ต่างกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) และ a-b คือค่าเฉลี่ยที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากตารางแสดงปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตโดยเฉลี่ยในเปลือกหอยแมลงภู่แต่ละขนาด พบว่าในเปลือกหอยเพศผู้ขนาด 5.01-8.00 ซม. มีปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตโดยเฉลี่ย (714.52±50.59 mg $CaCO_3$/g shell) มากกว่าปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตโดยเฉลี่ยในเปลือกหอยเพศผู้ขนาด 2.00-3.00 ซม. (614.14±17.59 mg $CaCO_3$/g shell) 3.01-4.00 ซม. (625.79±39.75 mg $CaCO_3$/g shell) และ 4.01-5.00 ซม. (616.47±13.98 mg $CaCO_3$/g shell) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F = 5.985$, $df = 3$, $p < 0.05$) การเจริญเติบโตของเปลือกหอยแมลงภู่มีความสัมพันธ์กับความยาวมากกว่าความกว้างและความหนาของเปลือกหอย [15] โดยการขยายขนาดของเปลือกหอยเกิดจากการสะสมตัวของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ [14] จึงมีแนวโน้มว่าเปลือกหอยแมลงภู่ขนาดใหญ่ที่สุดจะมีปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่สะสมอยู่ในเปลือกมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาปริมาณแคลเซียมในเปลือกหอยแมลงภู่ที่ความยาวเปลือกมากที่สุด พบว่ามีปริมาณแคลเซียมโดยเฉลี่ยสูงที่สุด Cen และ Rongqing ได้ศึกษาผลึกของแคลเซียมคาร์บอเนตที่อยู่ภายในเปลือกของหอยแมลงภู่ พบว่าในแต่ละชั้นของเปลือกหอยเกิดขึ้นจากแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีผลึกโครงสร้างแบบอะราโกไนต์หรือแคลไซต์ขึ้นอยู่กับลักษณะการจัดเรียงตัวของผลึก ความแตกต่างของโครงสร้างผลึกในแต่ละชั้นของเปลือกหอยถูกควบคุมโดยโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์เยื่อบุผิวส่วนต่าง ๆ ของแมนเทิล (mantle) โดยทั่วไปผลึกแคลไซต์ในชั้น prismatic สัมพันธ์กับโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเยื่อบุผิวบริเวณขอบของแมนเทิล และผลึกอะราโกไนต์ในชั้น nacreous หรือชั้นในสุดของเปลือกหอยสัมพันธ์กับโปรตีนที่หลั่งออกมาจากบริเวณ pallial ของแมนเทิล [10]

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตเฉลี่ยระหว่างเปลือกหอยแมลงภู่เพศเมียและเพศผู้ พบว่าเพศของหอยไม่มีผลต่อปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตโดยเฉลี่ยที่สะสมอยู่ในเปลือกแต่ละขนาด ($p > 0.05$) แหล่งของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ใช้ในการสร้างเปลือกหอยมาจากแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) และคาร์บอเนตไอออน (CO_3^{2-}) ในน้ำทะเล [24] ซึ่งเกิดจากการละลายของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศสู่น้ำทะเล แล้วทำปฏิกิริยากับน้ำจนแตกตัวเป็นไอออน ดังกล่าวตามวัฏจักรคาร์บอน Frederic และคณะ

รายงานว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มสูงขึ้นในทะเลเป็นสาเหตุทำให้ pH ของน้ำทะเลและความเข้มข้นของคาร์บอเนตไอออนลดลงส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางสรีระวิทยา การพัฒนาการของตัวอ่อน รวมถึงการสร้างเปลือกของหอย [25] นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อการสะสมแคลเซียมคาร์บอเนตในเปลือกหอยแมลงภู่ เช่น อาหาร [13] ความหนาแน่นของบริเวณที่อยู่อาศัย [26] จึงแสดงให้เห็นว่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอาจมีบทบาทในการสะสมแคลเซียมคาร์บอเนตเพื่อสร้างเปลือกของหอยมากกว่าปัจจัยที่มาจากตัวของสิ่งมีชีวิต

4. สรุป

การศึกษาองค์ประกอบของสารสีในหอยแมลงภู่เพศเมียและเพศผู้ พบสารกลุ่มแคโรทีนอยด์จำนวน 6 แถบสี ประกอบไปด้วยสารที่อยู่ในกลุ่ม xanthophyll และ carotene ทั้งนี้แต่ละชนิดของสารสีในกลุ่ม xanthophyll อาจมีความแตกต่างกัน จึงทำให้สีที่แสดงออกในเนื้อหอยมีความแตกต่างกัน การศึกษาขั้นต่อไปอาจใช้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น high performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อจะได้วิเคราะห์องค์ประกอบให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น องค์ประกอบของสารสีในเนื้อหอยที่ได้จากเปลือกแต่ละขนาดไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีข้อสังเกตว่าหอยที่มีขนาดเปลือกใหญ่ขึ้น จะมีองค์ประกอบของสีที่ชัดเจนขึ้น แสดงให้เห็นว่าเมื่อหอยมีขนาดใหญ่ขึ้นอาจมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของชนิดของแคโรทีนอยด์ ซึ่งพบทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ขณะที่ความยาวของเปลือกหอยแมลงภู่มีความสัมพันธ์กับการสะสมแคลเซียมคาร์บอเนตในเปลือก โดยเปลือกหอยแมลงภู่ขนาดใหญ่จะมีปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตสะสมอยู่ในเปลือกมากกว่าขนาดเล็ก ผลจากการศึกษาองค์ประกอบของสารสีในหอยแมลงภู่ด้วยเทคนิค TLC พบว่าไม่มีความแตกต่างขององค์ประกอบของสารสีระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ดังนั้นการรับประทานหอยแมลงภู่เพศผู้หรือเพศเมียจึงไม่น่าจะมีความแตกต่างกันในด้านคุณค่าทางอาหาร สำหรับการนำแคลเซียมคาร์บอเนตจากเปลือกหอยแมลงภู่ไปใช้ประโยชน์ พบว่าการนำเปลือกหอยขนาดใหญ่ไปใช้ประโยชน์จะให้ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตมากกว่าเปลือกหอยขนาดเล็ก

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัย แผนพัฒนาศักยภาพบัณฑิตวิจัยรุ่นใหม่ จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2561 และขอขอบคุณ ศูนย์วิทยาการขั้นสูงด้านทรัพยากรธรรมชาติเขตร้อนภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มูลนิธิพระบรมราชานุสรณ์พระบาทสมเด็จพระปกเกล้าเจ้าอยู่หัวและสมเด็จพระนางเจ้ารำไพพรรณี ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัย สถานีวิจัยประมงศรีราชา จังหวัดชลบุรี และภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทำวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

6. รายการอ้างอิง

[1] ลือชัย ดรุณชู, 2550, คู่มือการเลี้ยงหอยแมลงภู่, กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

[2] วันทนา อยู่สุข, 2541, หอยทะเล, ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

[3] Louda, J.W., Neto, R.R., Magalhaes, A.R.M. and Schneider, V.F., 2008, Pigment

alterations in the brown mussel *Perna perna*, Comp. Biochem. Physiol. B 150: 385-349.

[4] Maoka, T., 2011, Carotenoids in marine animals, Mar. Drugs. 9: 278-293.

[5] Tewari, A., Joshi, H.V., Raghunathan, C., Kumar, S.V.G. and Khambhaty, Y., 2001, Effect of heavy metal pollution on growth, carotenoid content and bacterial flora in the gut of *Perna viridis* (L.) in *in situ* condition, Curr. Sci. 81: 819-828.

[6] Petes L.E., Menge B.A., Chan F. and Webb M.A.H., 2008, Gonadal tissue color is not a reliable indicator of sex in rocky intertidal mussels, Aquat. Biol. 3: 63-70.

[7] นิรนาม, หอยแมลงภู่และการเลี้ยงหอยแมลงภู่, แหล่งที่มา : http://pasusat.com, 2 กุมภาพันธ์ 2561.

[8] เสรี นิยมเดชา, 2558, การเปรียบเทียบวงจรการสืบพันธุ์และขนาดแรกสืบพันธุ์ของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ระหว่างชายฝั่งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหา วิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา, 128 น.

[9] Bigatti, G., Miloslavich, P. and Penchaszadeh P.E., 2005, Sexual differentiation and size at first maturity of the invasive mussel *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Mytilidae) at La Restinga Lagoon (Margarita Island, Venezuela), Amer. Malac. Bull. 20: 65-69.

[10] Zhang, C. and Zhang, R., 2006, Matrix proteins in the outer shells of molluscs, Mar. Biotechnol. 8: 572-586.

[11] บพิธ จารุพันธ์ และนันทพร จารุพันธ์, 2552, สัตววิทยา, พิมพ์ครั้งที่ 5, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

[12] Matsushiro, A. and Miyashita, T., 2004, Evolution of hard-tissue mineralization: comparison of the inner skeletal system and the outer shell system, J. Bone. Miner. Metab. 22: 163-169.

[13] Furuhashia, T., Schwarzinger, C., Miksik, I., Smrz, M. and Beran, A., 2009, Molluscan shell evolution with review of shell calcification hypothesis, Comp. Biochem. Physiol. B 154: 351-371.

[14] Schöne, B.R. and Surge, D., 2014, Bivalve shells: Ultra high-resolution paleoclimate archives, Pages Magazine 22: 20-21.

[15] Chentanez, T., Kuanpitak, S. and Chentanez, V., 1982, Relative growth of shell and muscle and positional changes of muscle scars during shell growth of green mussel, *Perna viridis* L., J. Sci. Soc. TH 8: 33-51.

[16] Paula, S.Md. and Silveira, M., 2009, Studies on molluscan shells: Contributions from microscopic and analytical methods, Micron 40: 669-690.

[17] Quach, H.T., Steeper R.L. and Griffin W.G., 2004, An improved method for the extraction and thin-layer chromatography of chlorophyll a and b from spinach, J. Chem. Educ. 81: 385-387.

[18] Nielsen, S.S., 2010, Complexometric determination of calcium, pp. 61-66, In Nielsen, S.S. (Ed.), Food Analysis Laboratory

Manual, Springer, New York.

[19] Soídol, C., VasconcellosII, M.C., DinizI A.G. and PinheiroI J., 2009, An improvement of calcium determination technique in the shell of molluscs, Braz. Arch. Biol. Technol. 52: 93-98.

[20] วิลาส รัตนานุกูล, สีของพืช ผัก และผลไม้สำคัญอย่างไร, แหล่งที่มา : ttp://biology.ipst.ac.th, 2 กุมภาพันธ์ 2561.

[21] Tanaka, Y., Sasaki, N. and Ohmiya A., 2008, Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids, Plant J. 54: 733-749.

[22] New World Encyclopedia writers, Chromatophore, Available Source: http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Chromatophore, March 19, 2018.

[23] Kantha, S.S., 1989, Carotenoids of edible molluscs; A review, J. Food Biochem. 13: 429-442.

[24] Madin, K., 2010, Ocean acidification: A risky shell game, Oceanus 48: 6-7.

[25] Gazeau, F., Parker L.M., Comeau, S., Gattuso, J.P., O'Connor, W.A., Martin, S., Pörtner, H.O. and Ross, P.M., 2013, Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs, Mar Biol. 160: 2207-2245.

[26] Seed, R., 1968, Factors influencing shell shape in the mussel *Mytilus edulis,* J. mar. biol. Ass. UK 48: 561-584.