ผลของปริมาตรน้ำและสีของภาชนะต่อการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910)

Effects of Water Volume and Aquarium Background Color on Growth and Feed Utilization of Siamese Fighting Fish (*Betta splendens* Regan, 1910)

ศุกร์เทียนชัย แซ่โค้ว

Suktianchai Saekhow

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

Prince of Songkla University

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผลของปริมาตรน้ำและสีของภาชนะต่อการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910)

Effects of Water Volume and Aquarium Background Color on Growth and Feed Utilization of Siamese Fighting Fish (*Betta splendens* Regan, 1910)

ศุกร์เทียนชัย แซ่โค้ว

Suktianchai Saekhow

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Aquatic Science
Prince of Songkla University
2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิทยานิพนธ์ ผลของปริมาตรน้ำและสีของภาชนะต่อการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910)

ผู้เขียน นายศุกร์เทียนชัย แซ่โค้ว

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. การุณ ทองประจุแก้ว)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นเรศ ช่วนยุก)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภฎา คีรีรัฐนิคม)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. การุณ ทองประจุแก้ว)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

.....

(ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. การุณ ทองประจุแก้ว)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ.....
(นายศุกร์เทียนชัย แซ่โค้ว)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นายศุกร์เทียนชัย แซ่โค้ว)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของปริมาตรน้ำและสีของภาชนะต่อการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910)
ผู้เขียน นายศุกร์เทียนชัย แซ่โค้ว
สาขาวิชา วาริชศาสตร์
ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบปริมาตรน้ำและสีภาชนะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910) โดยประเมินจากอัตราการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร สีผิว คุณภาพของกล้ามเนื้อ และองค์ประกอบทางเคมีของซาก การศึกษาปริมาตรน้ำที่เหมาะสมโดยนำปลากัดตัวผู้สีแดงทั้งตัว (น้ำหนักตัวเริ่มต้น 0.97 ± 0.01 กรัม) มาเลี้ยงแบบเดี่ยวในตู้แก้วที่มีปริมาตรแตกต่างกัน 5 ระดับ (100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิลิตร) จำนวน 15 ตัว/ทรีทเมนต์ (n = 15) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 150 มิลลิลิตร มีการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และสีผิวดีที่สุด ($P < 0.05$) กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารมีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากปริมาตรน้ำที่ใช้เลี้ยง ยกเว้นกิจกรรมของอะไมเลส นอกจากนี้ ปริมาตรน้ำ 150 มิลลิลิตร ยังช่วยรักษาคุณภาพกล้ามเนื้อที่ดี แต่ไม่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของซาก ยกเว้นปริมาณไขมันที่มีค่าผกผันกับปริมาตรน้ำ ปริมาตรน้ำดังกล่าวจึงใช้ทดสอบผลของสีภาชนะที่เหมาะสม โดยนำปลากัดตัวผู้สีแดงทั้งตัว (น้ำหนักตัวเริ่มต้น 1.13 ± 0.01 กรัม) มาเลี้ยงแบบเดี่ยวในตู้แก้วที่มีสีภาชนะแตกต่างกัน 5 สี (สีใส สีขาว สีแดง สีน้ำเงิน และสีดำ) จำนวน 15 ตัว/ทรีทเมนต์ (n = 15) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่าปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีน้ำเงินมีการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์จากอาหารดีที่สุด และมีอัตราส่วนของอะไมเลส/ทริปซินสูงที่สุด ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร สีผิว คุณภาพกล้ามเนื้อ และองค์ประกอบทางเคมีของซากไม่มีความแตกต่างกับปลาในชุดควบคุม (สีใส) ผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงปลากัด คือ ปริมาตรน้ำ 150 มิลลิลิตร และภาชนะเลี้ยงที่มีสีน้ำเงิน

Thesis Title	Effects of Water Volume and Aquarium Background Color on Growth and Feed Utilization of Siamese Fighting Fish (*Betta splendens* Regan, 1910)
Author	Mr. Suktianchai Saekhow
Major Program	Aquatic Science
Academic Year	2017

Abstract

This study aimed to determine the effects of water volume and aquarium background color on growth, feed utilization, digestive enzyme activities, color coordinates, muscle quality and carcass composition of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). The solid-red male Siamese fighting fish (0.97 ± 0.01 g initial body weight) were distributed individually into aquaria with five alternative water volumes (100, 150, 200, 250 and 300 mL), comprising fifteen fish/treatment (n = 15), over eight weeks duration. The fish reared in 150 mL water were superior in growth performance, feed utilization and skin color ($P < 0.05$). Specific activities of the digestive enzymes were variance due to water volume, except for amylase. In addition, 150 mL water preferred treatment maintained muscle quality, but no affected proximate composition of the carcasses, except for the crude lipids that fluctuated with water volume. This preferred water volume was subjected to study the optimal aquarium background color. The solid-red male fish (1.13 ± 0.01 g initial body weight) were distributed individually into aquaria with five alternative background colors (transparent, white, red, blue, and black), comprising fifteen fish/treatment (n = 15), over eight weeks duration. The fish reared in blue background were superior in growth performance and feed utilization, and showed highest amylase/trypsin ratio. This preferred treatment maintained the activities of the digestive enzymes as same as in the suite control background, as well as skin color, muscle quality and proximate composition of carcass. The overall results from the current study indicate that the 150 mL water in blue-based aquarium background were suitable for rearing solid-red male Siamese fighting fish.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. การุณ ทองประจุแก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือในการดำเนินการวิจัย รวมทั้งอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมีในการทำการวิจัย และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นเรศ ซ่วนยุก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภฎา คีรีรัฐนิคม ที่สละเวลามาเป็นประธานและกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รวมทั้งเสนอแนะแนวทางการเขียนเพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย และค่าใช้จ่ายตลอดการศึกษา (เลขที่สัญญา SCI 590420S)

ผู้วิจัยขอบคุณภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ และภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมืออุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้สำหรับการวิจัย ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อนุเคราะห์การใช้เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิงแคลอริมิเตอร์ และขอขอบคุณหน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อนุเคราะห์การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสมาชิกในครอบครัวที่ให้การสนับสนุน ขอบคุณบุคลากรภาควิชาวาริชศาสตร์และภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ที่ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินการวิจัย และขอขอบคุณนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาภาควิชาวาริชศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา

ศุกร์เทียนชัย แซ่โค้ว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) **(5)**

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) **(6)**

กิตติกรรมประกาศ **(7)**

สารบัญ **(8)**

รายการตาราง **(11)**

สัญลักษณ์และคำย่อ **(12)**

บทที่ 1 บทนำ **1**

1. บทนำต้นเรื่อง 1

2. การตรวจเอกสาร 3

3. วัตถุประสงค์ 18

บทที่ 2 วิธีการศึกษา **19**

การทดลองที่ 1 ปริมาตรน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด **19**

1. การเตรียมและเลี้ยงปลากัด 19

2. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร 20

3. การศึกษาคุณภาพของกล้ามเนื้อ 23

4. การศึกษาความเข้มสีของปลากัด 25

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของซาก 25

6. การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 26

การทดลองที่ 2 สีของภาชนะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด 27

บทที่ 3 ผลการศึกษา 28

การทดลองที่ 1 ปริมาตรน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด 28

1. อัตราการรอด การเจริญเติบโต และการใช้ประโยชน์จากอาหาร 28

2. กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหาร 29

3. คุณภาพของกล้ามเนื้อ 30

4. ความเข้มของสีผิว 31

5. องค์ประกอบทางเคมีของซาก 32

การทดลองที่ 2 สีของภาชนะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด 33

1. อัตราการรอด การเจริญเติบโต และการใช้ประโยชน์จากอาหาร 33

2. กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหาร 34

3. ความเข้มของสีผิว 35

4. คุณภาพกล้ามเนื้อ 36

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5. องค์ประกอบทางเคมีของซาก	36
บทที่ 4 บทวิจารณ์	**38**
การทดลองที่ 1 ปริมาตรน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด	**38**
การทดลองที่ 2 สีของภาชนะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด	**41**
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	**45**
บรรณานุกรม	**46**
ภาคผนวก	**64**
ก ต้นฉบับสำหรับการนำเสนอแบบบรรยายในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ	65
ข ผลงานที่ได้รับการตอบรับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ	75
ค ต้นฉบับสำหรับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ	87
ประวัติผู้เขียน	**117**

รายการตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 อัตราการรอด การเจริญเติบโต และการใช้ประโยชน์จากอาหารของปลากัดที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำแตกต่างกัน 29

ตารางที่ 2 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลากัดที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำแตกต่างกัน 30

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพการสังเคราะห์โปรตีน และสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและแอกตินในกล้ามเนื้อของปลากัดที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำแตกต่างกัน 31

ตารางที่ 4 สีผิวของปลากัดที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำแตกต่างกัน 32

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางเคมีในซากของปลากัดที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำแตกต่างกัน 32

ตารางที่ 6 อัตราการรอด การเจริญเติบโต และการใช้ประโยชน์จากอาหารของปลากัดที่เลี้ยงในภาชนะสีแตกต่างกัน 33

ตารางที่ 7 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลากัดที่เลี้ยงในภาชนะสีแตกต่างกัน 34

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพการสังเคราะห์โปรตีน และสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและแอกตินในกล้ามเนื้อของปลากัดที่เลี้ยงในภาชนะสีแตกต่างกัน 35

ตารางที่ 9 สีผิวของปลากัดที่เลี้ยงในภาชนะสีแตกต่างกัน 36

ตารางที่ 10 องค์ประกอบทางเคมีในซากของปลากัดที่เลี้ยงในภาชนะสีแตกต่างกัน 37

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

AOAC	=	Association of Official Analytical Chemists
BAPNA	=	Bensoyl-*L*-Arg-*p*-nitroanilide
BSA	=	Bovine serum albumin
BW	=	Body weight
CF	=	Condition factor
CRD	=	Completely randomized design
DMRT	=	Duncan's multiple range test
DNS	=	Dinitrosalicylic acid
FCR	=	Feed conversion ratio
FR	=	Feeding rate
FW	=	Fresh weight
J	=	Joule
PER	=	Protein efficiency ratio
RNA	=	Ribonucleic acid
SAPNA	=	*N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide
SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
SGR	=	Specific growth rate
U	=	Unit
VSI	=	Viscerosomatic index
E_{260}	=	Absorbance at 260 nm
E_{280}	=	Absorbance at 280 nm
L^*	=	Lightness
T_o	=	Onset temperature
T_p	=	Peak temperature

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

T_c	=	Conclusion temperature
ΔH	=	Enthalpy
mL	=	Milliliter
mU	=	Milli unit
a^*	=	Redness/greenness
b^*	=	Yellowness/blueness
cm	=	Centimeter
g	=	Gram
g	=	Gravity
n	=	Number of sample
mg	=	Milligram
w	=	Weight
µg	=	Microgram
%	=	Percent

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

ปลากัด (*Betta splendens*) เป็นปลาสวยงามพื้นเมือง มีสีและครีบที่เป็นจุดเด่น นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย และเป็น 1 ใน 3 ของปลาสวยงามที่นิยมเลี้ยง จึงมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย ปลากัดที่ผลิตได้ในประเทศ ส่วนใหญ่ถูกส่งออกต่างประเทศ โดยในปี พ.ศ. 2553 มีปริมาณการส่งออกประมาณ 15 ล้านตัว คิดเป็นมูลค่า 329 ล้านบาท แม้มีมูลค่าการส่งออกที่สูง แต่ผลกำไรที่ได้รับของผู้ประกอบการยังน้อย (0.38 บาท/ตัว) กว่าปลาทอง (*Carassius auratus*) (15.23 บาท/ตัว) และปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) (0.86 บาท/ตัว) ซึ่งเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทยเช่นกัน (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) ผลกำไรที่น้อยเกิดจากต้นทุนการผลิตที่สูง เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิม รวมทั้งราคาในตลาดที่ต่ำ เนื่องจากผู้ประกอบการยังไม่มีอำนาจในการต่อรองราคา รวมทั้งปลากัดที่ส่งออกยังมีคุณภาพไม่ดีนัก จากปัญหาข้างต้น การพัฒนาระบบเลี้ยงปลากัดแบบหนาแน่นด้วยความรู้ทางวิทยาศาสตร์จึงอาจเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มคุณภาพของปลากัดได้

การเพาะเลี้ยงปลากัดให้มีคุณภาพเกี่ยวข้องกับตัวแปรหลายประการ ความหนาแน่นเป็นตัวแปรหนึ่งที่มีความสำคัญ โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเชิงพาณิชย์นิยมเลี้ยงด้วยความหนาแน่นสูงซึ่งมีผลต่อพฤติกรรมของสัตว์น้ำ สำหรับปลากัดในธรรมชาติพบว่าสามารถครองพื้นที่ได้ไม่เกิน 5 ตัว/ตารางเมตร ที่ความลึก 2.0–9.4 เซนติเมตร (Jaroensutasinee and Jaroensutasinee, 2001) ขณะที่ การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการเลี้ยงปลากัดมีการใช้น้ำในปริมาตรที่แตกต่างกัน เช่น ปริมาตรน้ำ 1 ลิตร ในภาชนะ 1.5 ลิตร (Takeuchi *et al*., 2010) หรือ 2 ลิตร (Karino and Someya, 2007) หรือ 250 มิลลิลิตร ในภาชนะ 500 มิลลิลิตร (Verbeek *et al*., 2008) เป็นต้น สำหรับการจำหน่ายปลากัดตัวผู้ที่โตเต็มวัยจะบรรจุในถุงพลาสติกขนาดเล็กที่มีปริมาตรน้ำประมาณ 60 มิลลิลิตร (ปลากัดครีบสั้น) หรือ 120–150 มิลลิลิตร (ปลากัดครีบยาว) (Cole *et al*., 1999) โดยมีอัตราส่วนของน้ำต่ออากาศเท่ากับ 1 ต่อ 3 หรือ 3 ต่อ 5 (Monvises *et al*., 2009) ข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าปลาชนิดนี้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลานานแม้จะมีปริมาตรน้ำเล็กน้อย ดังนั้น

การศึกษาปริมาตรของน้ำที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อการผลิตปลากัดแบบหนาแน่นในเชิงพาณิชย์

ปลากัดมีการตอบสนองต่อสีได้ดี เนื่องจากปลากัดตัวเมียจะจับคู่กับปลาตัวผู้ที่มีสีเข้มมากกว่าตัวที่มีสีอ่อน (Blakeslee *et al*., 2009) หรือปลาที่มีฟีโนไทป์สีแดงมากกว่าสีน้ำเงิน (Gautier *et al*., 2008) นอกจากนี้การศึกษาในปลาทองที่เลี้ยงในภาชนะที่มีสีแตกต่างกัน (สีดำ สีขาว สีน้ำเงิน และสีแดง) พบว่าปลาที่เลี้ยงในตู้สีแดงมีการเจริญเติบโตและปริมาณคอร์ติซอลสูงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีขาว พบว่าความเข้มของสีผิวลดลง (Eslamloo *et al*., 2015) สำหรับปลา scaled carp (*Cyprinus carpio*) พบว่าปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมามีค่าสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในภาชนะสีดำ (Papoutsoglou *et al*., 2000) การเปลี่ยนแปลงสีภาชนะอาจช่วยปรับระดับความเครียด และส่งเสริมการเจริญเติบโต รวมทั้งการตอบสนองของสีผิวของปลากัดเช่นเดียวกัน

เอนไซม์ย่อยอาหารมีบทบาทสำคัญในการย่อยเชิงเคมีเพื่อเปลี่ยนแปลงขนาดโมเลกุลของอาหารให้มีขนาดเล็กจนร่างกายสามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์และนำไปใช้ประโยชน์ได้ ซึ่งการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารมีความน่าเชื่อถือและสามารถบ่งชี้ถึงกระบวนการใช้ประโยชน์จากอาหาร (Ueberschar, 1988) สำหรับการย่อยส่วนใหญ่เกิดขึ้นในลำไส้ โดยเอนไซม์ที่ผลิตจากตับอ่อน ได้แก่ ทริปซิน ไคโมทริปซิน ไลเปส และอะไมเลส (Bolasina *et al*., 2006; Ktari *et al*., 2012; Wang *et al*., 2015) และการย่อยในกระเพาะอาหาร โดยมีเอนไซม์ที่สำคัญ คือ เปปซิน (Cuvier-Peres *et al*., 2001) ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ได้รับผลกระทบจากความหนาแน่น เช่น การศึกษาในปลาจะละเม็ดขาว (*Pampus argenteus*) วัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 15 ตัว/ลูกบาศก์เมตร มีกิจกรรมของทริปซินและไลเปสสูงที่สุด ส่วนกิจกรรมของอะไมเลสสูงที่สุดในปลาที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 10 หรือ 15 ตัว/ลูกบาศก์เมตร ขณะที่กิจกรรมของเปปซินไม่ได้รับผลจากความหนาแน่นที่แตกต่างกัน (Peng *et al*., 2013) แต่ในปลา Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) ระยะลาร์วา กิจกรรมของทริปซินและไลเปสได้รับผลจากความหนาแน่นที่เลี้ยง (Bolasina *et al*., 2006) สำหรับสีภาชนะอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม เช่น ความเข้มแสง ระยะเวลาการได้รับแสง เป็นต้น ซึ่งมีการรายงานพบว่าความเข้มแสงที่แตกต่างกันส่งผลให้เกิดความแตกต่างของกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร (เปปซิน ทริปซิน และไคโมทริปซิน) ในปลากะพง (*Dicentrachus labrax*) ระยะโพสต์ลาร์วา (Cuvier-Peres *et al*., 2001) เช่นเดียวกับระยะเวลาการได้รับแสงที่แตกต่างกันส่งผลให้เกิดความแตกต่างของกิจกรรม

ของอะไมเลสและไลเปสในปลาเรนโบว์เทร้าต์ (*Oncorhynchus mykiss*) (Ramzanzadeh *et al*., 2016) และปลา miiuy croaker (*Miichthys miiuy*) (Shan *et al*., 2008) ตามลำดับ

ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสีของภาชนะเลี้ยงอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการเพิ่มศักยภาพในการเลี้ยงปลากัดให้มีคุณภาพ ดังนั้นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในครั้งนี้ ได้แก่ ปริมาตรน้ำ และสีของภาชนะ จึงสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้ และพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงปลากัดเชิงพาณิชย์

2. การตรวจเอกสาร

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์ประกอบด้วยชีววิทยาของปลากัด ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงของปลากัด เอนไซม์ย่อยอาหาร คุณภาพกล้ามเนื้อของปลา การสร้างสี และคุณภาพของน้ำ

2.1 ชีววิทยาของปลากัด

ปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910) เป็นปลาน้ำจืดในสกุล *Betta* ที่มีพฤติกรรมการก่อหวอด (bubble nest) เพื่อใช้สำหรับฟักไข่และเลี้ยงลูกปลาวัยอ่อน ปลากัดชนิดนี้มีการเลี้ยงเพื่อจำหน่ายและส่งออก การจัดลำดับทางอนุกรมวิธานของปลากัดตามการจำแนกของ Nelson (2006) เป็นดังนี้

Phylum Chordata

Class Actinopterygii

Order Perciformes

Family Osphronemidae

Genus *Betta*

Species *Betta splendens*

ปลากัดเป็นปลากระดูกแข็งขนาดเล็กที่มีสีสันสวยงาม อาศัยอยู่รวมกันเป็นกลุ่มตามลำดับชั้นหรืออาศัยแบบเดี่ยวก็ได้ (Snekser *et al*., 2006) เมื่อปลาอายุครบ 1.5–2 เดือน จะมีนิสัยก้าวร้าวและมีพฤติกรรมการกัดกัน (วันเพ็ญ และคณะ, 2531) โดยแสดงออกด้วยการเพิ่มความเข้มของสี

แผ่ครีบ เปิดแผ่นปิดช่องเหงือก (operculum) และกัดหางตัวอื่น ปลากัดมีถิ่นกำเนิดในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และพบกระจายในทุกภูมิภาคของประเทศไทย (Monvises *et al*., 2009) โดยพบการแพร่กระจายมากในพื้นที่ภาคกลาง และมีการเพาะเลี้ยงมากที่สุดในจังหวัดนครปฐม (Meejui *et al*., 2005) แหล่งน้ำธรรมชาติที่ปลากัดอาศัยมักอยู่บริเวณน้ำตื้นในระบบนิเวศน้ำนิ่งหรือน้ำไหลช้า มีพีเอช 5.3–5.8 อุณหภูมิ 27.0–31.5 องศาเซลเซียส ความลึกอยู่ในช่วง 2.0–9.4 เซนติเมตรจากผิวน้ำ และมีพืชขึ้นอยู่ เช่น บึง หนอง นาข้าว (Winemiller and Leslie, 1992; Jaroensutasinee and Jaroensutasinee, 2001; Monvises *et al*., 2009) คุณภาพน้ำที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงปลากัด คือ น้ำที่มีค่าพีเอช 6.5–7.5 อุณหภูมิ 26–28 องศาเซลเซียส ความกระด้าง 75–100 มิลลิกรัม/ลิตร และความเป็นด่าง 150–200 มิลลิกรัม/ลิตร (วันเพ็ญ และคณะ, 2531)

ปลากัดตัวเต็มวัยมีลักษณะทั่วไป คือ มีลำตัวแบน ความยาวจากปลายปากถึงโคนหางเป็น 2.9–3.3 เท่าของความลึกลำตัว ปากมีขนาดเล็กและเชิดขึ้นด้านบนเล็กน้อย มีฟันอยู่ที่ขากรรไกรบนและล่าง มีเกล็ดปกคลุมส่วนหัวและลำตัว กระดูกที่ขอบตาเรียบ มีครีบอก (pectoral fin) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าครีบอื่นๆ และครีบสะโพก (pelvic fin) อยู่ในตำแหน่งอกเช่นกัน มีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน ก้านครีบอ่อน 5 ก้าน ครีบก้น (anal fin) มีฐานครีบต่อจากครีบท้องยาวไปสุดที่ครีบหาง มีก้านครีบเดี่ยว 2–4 ก้าน และก้านครีบแขนง 21–24 ก้าน ส่วนครีบหาง (caudal fin) ต่อจากครีบก้นอยู่ค่อนไปทางด้านหาง และมีครีบหลัง (dosal fin) 1–2 ครีบซึ่งมีก้านครีบแขนง 7–9 ก้าน นอกจากนี้ปลากัดที่มีอายุครบ 10 วันจะมีอวัยวะช่วยหายใจอยู่หลังเหงือก (labyrinth organ) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเป็นหยักและมีเส้นเลือดฝอยอยู่จำนวนมาก (วันเพ็ญ และคณะ, 2531) ด้วยอวัยวะพิเศษนี้ทำให้ปลากัดสามารถอาศัยในบริเวณที่ออกซิเจนต่ำได้ ลักษณะเหล่านี้พบได้ในปลากัดทั้งสองเพศ แต่ในปลากัดตัวเมียจะมีขอบเหงือกสีแดงเข้มและมีลายชะโดเกิดขึ้นตามแนวขวางข้างลำตัวเมื่อพร้อมผสมพันธุ์ (ชัย และบุญชัย, 2548) ซึ่งเป็นข้อสังเกตสำหรับการแยกเพศปลากัด นอกจากนี้การแยกเพศสามารถสังเกตจากขนาด สีสัน และครีบ โดยปลากัดตัวผู้จะมีขนาดใหญ่ สีสันสวยงาม และครีบที่ยาวกว่าตัวเมีย (Jaroensutasinee and Jaroensutasinee, 2001)

ประสิทธิภาพการกินอาหารอาจเกี่ยวข้องกับการมองเห็นของปลา โดยเซลล์เรตินาในตาของปลากัดมีทั้งหมด 7 ชั้น ตั้งแต่อายุ 4 วัน และการมองเห็นและตอบสนองต่ออาหารตามอายุ (Nascimento *et al*., 2015) ปลากัดเป็นปลากินเนื้อ อาหารที่ใช้เลี้ยงส่วนใหญ่เป็นอาหารมีชีวิต เช่น อินฟิวโซเรีย (infusoria) โรติเฟอร์ (rotifer) ไรแดง (water fleas) หนอนแดง (blood worm) และลูกน้ำ (mosquito larva) เป็นต้น เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลากัดส่วนใหญ่เลี้ยงโดยใช้อาหารมีชีวิต โดย

ต้นทุนค่าอาหารคิดเป็น 65 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนแปรผันทั้งหมด (อมรรัตน์ และสุดารัตน์, 2544) โดยอาหารสำเร็จรูปที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัดอายุ 2–4 สัปดาห์ อายุ 1–3 เดือน และปลากัดพ่อ–แม่พันธุ์ควรมีโปรตีน 40, 37 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (สถาบันวิจัยอาหารสัตว์น้ำจืด, 2549) การเปรียบเทียบปลาในช่วงอายุ 1–6 เดือน พบว่าอาหารที่มีโปรตีน 35 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมให้มีอัตราการรอดและการเจริญเติบโตสูงสุด (James and Sampath, 2003) การเลี้ยงปลากัดวัยอ่อนด้วยอาหารธรรมชาติ (*Chorella* sp. และ *Brachionus rotundiformis*) ทำให้มีอัตราการรอดสูงกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารธรรมชาติร่วมกับอาหารสำเร็จรูป และการเลี้ยงด้วยอาหารธรรมชาติร่วมกับอาหารสำเร็จรูปตั้งแต่วันที่ 2 หลังจากการฟัก (วันแรกหลังจากการฟักตัวเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปทั้งหมด) (Puello-Cruz *et al*., 2010) และจากการศึกษาของธวัช (2530) พบว่าการให้ไข่แดงในตอนเช้าและให้อินฟิวโซเรียในตอนเย็นทำให้อัตราการรอด (83 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าการเลี้ยงด้วยไรแดงร่วมกับไข่แดง (68 เปอร์เซ็นต์) และการเลี้ยงด้วยไรแดงร่วมกับอินฟิวโซเรีย ไรแดง หรือไข่แดง (66 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ยังพบว่าการแทนที่อาหารมีชีวิต (*Tubifex tubifex*) ด้วยอาหารสำเร็จรูป 25 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงปลากัด (Mandal *et al*., 2010) และพบว่าการแทนที่ด้วยอาหารสำเร็จรูป 50 เปอร์เซ็นต์ไม่กระทบต่อระบบสืบพันธุ์และอัตราการรอด แต่การเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปเพียงอย่างเดียวทำให้การฟักตัว และอัตราการรอดของลูกปลาต่ำลง (Mandal *et al*., 2012) สำหรับการใช้อาหารสำเร็จรูปเลี้ยงปลากัด พบว่าการให้อาหาร 2 ครั้ง/วัน ทำให้การเจริญเติบโตและความสามารถในการสืบพันธุ์ดีที่สุด (James and Sampath, 2003) ขณะที่พฤติกรรมการเข้าหาอาหารไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเลี้ยงปลากัดวัยอ่อนด้วยภาชนะสี (สีใส สีแดง และสีน้ำเงิน) (Nascimento *et al*., 2015)

2.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเลี้ยงปลากัด

การเลี้ยงปลามีปัจจัยที่ส่งผลต่อการดำรงชีวิตหลายประการ ประกอบด้วยปัจจัยภายใน เช่น อายุ เพศ และพันธุกรรม เป็นต้น และปัจจัยภายนอกหรือปัจจัยที่ได้รับจากสิ่งแวดล้อม เช่น คุณภาพของน้ำ ภาชนะที่ใช้เลี้ยง แสง และอุณหภูมิ เป็นต้น การศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษาเฉพาะปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยง รวมทั้งเป็นปัจจัยเบื้องต้นที่นำไปสู่การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงปลากัดแบบหนาแน่นในเชิงพาณิชย์ ได้แก่ ปริมาตรของน้ำ และสีของภาชนะที่ใช้เลี้ยง

2.2.1 ปริมาตรของน้ำ

ปลากัดในธรรมชาติอาศัยอยู่ในน้ำจืดที่เป็นน้ำนิ่งและมีระดับน้ำตื้นประมาณ 2.0–9.4 เซนติเมตร ซึ่งมีปริมาณออกซิเจนน้อย และสามารถครองพื้นที่ได้อย่างเหมาะสมไม่เกิน 5 ตัว/ตารางเมตร (Jaroensutasinee and Jaroensutassinee, 2001) สำหรับการเพาะเลี้ยงโดยทั่วไปในประเทศไทยนิยมใช้ขวดแบนซึ่งมีปริมาตร 350 มิลลิลิตร และเติมน้ำประมาณ 3/4 ของความสูงของขวด (ปิยะมาศ, 2544) และปลากัดที่โตเต็มวัยถูกบรรจุในถุงขนาดเล็กเพื่อจำหน่ายซึ่งมีน้ำปริมาตร 60 มิลลิลิตร (ปลากัดครีบสั้น) หรือ 120–150 มิลลิลิตร (ปลากัดครีบยาว) (Cole *et al*., 1999) หรือมีอัตราส่วนของน้ำต่ออากาศภายในถุงพลาสติกเท่ากับ 1 ต่อ 3 หรือ 3 ต่อ 5 ของน้ำต่ออากาศภายในถุงพลาสติก (Monvises *et al*., 2009) การศึกษาก่อนหน้านี้มีการใช้ปริมาตรน้ำในการทดลองที่แตกต่างกัน เช่น การศึกษาของ Karino and Someya (2007) และ Takeuchi และคณะ (2010) ใช้น้ำปริมาตร 1 ลิตร ในภาชนะขนาด 2 และ 1.5 ลิตร ตามลำดับ หรือ Verbeek และคณะ (2008) ใช้น้ำเพียง 250 มิลลิลิตร ในภาชนะขนาด 500 มิลลิลิตร และน้ำ 3/4 ของความสูงของภาชนะหกเหลี่ยมขนาด 150 ลิตร (Matessi *et al*., 2010) การเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นในการเลี้ยงสามารถปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการดำรงชีวิต เช่น การกิน ความสัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อม และความเครียด (Cristea *et al*., 2012) ขณะที่การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าความหนาแน่นหรือปริมาตรน้ำส่งผลต่ออัตราการรอด (Jha and Barat, 2005) การเจริญเติบโต (Sanchez *et al*., 2010) และประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากอาหาร (Niazie *et al*., 2013) ของปลา ซึ่งการตอบสนองของปลาแต่ละชนิดเกิดขึ้นแตกต่างกัน บางชนิดตอบสนองเชิงลบต่อการลดลงของปริมาตรน้ำ เช่น ปลา Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) (Ahmadivand *et al*., 2013) หรือ koi carp (*Cyprinus carpio* vr. *koi*) (Jha and Barat, 2005) อย่างไรก็ตาม ปลาบางชนิดแสดงการตอบสนองในทางกลับกัน เช่น ปลาทอง (Niazie *et al*., 2013) หรือปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (Osofero *et al*., 2009)

2.2.2 สีภาชนะเลี้ยง

โดยทั่วไปการเลี้ยงปลากัดจะเลี้ยงในตู้กระจกหรือขวดแก้ว อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงสีภาชนะเลี้ยงอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความเข้มแสง ระยะเวลาที่ได้รับแสง และสีของแสง (Hochachka and Somero, 2002) การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการเลี้ยงปลาในภาชนะที่มีสี

แตกต่างกันส่งผลต่ออัตราการรอด การเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และองค์ประกอบทางเคมีของซาก (Papoutsoglou *et al*., 2000; McLean *et al*., 2008; Raghavan *et al*., 2013) ซึ่งการตอบสนองดังกล่าวอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของความเครียด (Hochachka and Somero, 2002) โดยการศึกษาในปลา scaled carp ที่เลี้ยงในภาชนะที่มีสีแตกต่างกัน (สีขาว สีดำ และสีเขียว) พบว่าปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีขาวมีปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมาน้อยกว่าภาชนะสีดำ และมีการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์จากอาหารที่ดีที่สุด (Papoutsoglou *et al*., 2000) นอกจากนี้ สีภาชนะยังส่งผลต่อการเจริญเติบโตของปลาค็อดแอตแลนติก (*Gadus morhua*) โดยปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีน้ำเงินจะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ (Sierra-Flores *et al*., 2015) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลาเรนโบว์เทร้าต์วัยอ่อนที่เลี้ยงในภาชนะสีดำ (Papoutsoglou *et al*., 2005) นอกจากนั้น สีภาชนะยังส่งผลต่อการปรับสมดุลการหลั่งของฮอร์โมนเมลาโทนิน และแอลฟา-เมลาโนไซต์ สติมูเลติงฮอร์โมน (α-malanocyte stimulating hormone) (Balm *et al*., 1995; Rotllant *et al*., 2003) การทดลองในปลา striped trumpeter (*Latris lineata*) วัยอ่อน พบว่าสีของภาชนะเลี้ยงยังส่งผลในระดับยีน โดยปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีขาว ทำให้มีอาการผิดปกติของขากรรไกรสูงกว่าการเลี้ยงในภาชนะสีดำ (Cobcroft *et al*., 2012) สำหรับในตัวอ่อนปลาค็อดแอตแลนติกไม่พบความแตกต่างกันของการเจริญเติบโต การรอดชีวิต และพฤติกรรมการจับเหยื่อเมื่อเลี้ยงในภาชนะที่มีสีดำสนิทกับสีดำสนิทยกเว้นก้นภาชนะที่เป็นสีใส (Monk *et al*., 2008) แสงที่ส่องสว่างก็มีผลต่อการตอบสนองของปลาเช่นกัน ในปลาค็อดแอตแลนติกและปลา turbot (*Scophthalmus maximus*) พบว่าแสงสีน้ำเงินและสีเขียวช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตได้ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับแสงสีแดง (Sierra-Flores *et al*., 2015) หรือตัวอ่อนปลา Eurasian perura (*Perca fluviatilis*) มีการกินอาหารเพิ่มสูงขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณแสงที่ได้รับ (Strand *et al*., 2007) ในทางกลับกันในสัตว์น้ำบางชนิดก็ไม่ได้รับผลกระทบจากสีของภาชนะ เช่น การศึกษาในม้าน้ำ (*Hippocampus abdominalis*) วัยอ่อนซึ่งไม่พบความแตกต่างของอัตราการรอดและการเจริญเติบโตระหว่างสีที่ทำการทดลอง (Martinez-Cardenas and Purser, 2007)

2.3 การตอบสนองของเอนไซม์ย่อยอาหารของสัตว์น้ำต่อสภาวะเลี้ยง

เอนไซม์ย่อยอาหารมีบทบาทสำคัญในการย่อยเชิงเคมีเพื่อเปลี่ยนแปลงขนาดโมเลกุลของอาหารให้มีขนาดเล็กลงจนร่างกายสามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์และนำไปใช้ประโยชน์ได้ เอนไซม์ย่อย

อาหารถูกสร้างจากอวัยวะย่อยอาหารและอวัยวะช่วยย่อย ได้แก่ กระเพาะอาหาร (เปปซิน) และตับอ่อน (ทริปซิน ไคโมทริปซิน อะไมเลส และไลเปส)

2.3.1 เปปซิน (pepsin)

เปปซิน (EC 3.4.23.1) เป็นอะซิดิกโปรติเอส (acidic protease) ซึ่งทำงานได้ดีในสภาพที่เป็นกรด ทำหน้าที่ย่อยสารอาหารประเภทโปรตีนให้มีขนาดเล็กลงก่อนส่งไปย่อยต่อที่ลำไส้เล็ก เปปซินพบได้ทั่วไปในน้ำย่อยของปลาจากการหลั่งของต่อมในกระเพาะอาหาร (gastric gland) ชนิดชีฟเซลล์ (chief cell) ในรูปของไซโมเจน (zymogen) ที่ไม่สามารถทำงานได้ เรียกว่า เปปซิโนเจน (pepsinogen) เมื่อมีการหลั่งกรดไฮโดรคลอริกของพาริทัลเซลล์ (parietal cell) ในผนังชั้นในสุดของกระเพาะอาหาร ทำให้เกิดสภาพเป็นกรด ซึ่งกระตุ้นให้เปปซิโนเจนเปลี่ยนเป็นเปปซินซึ่งสามารถทำงานได้ การศึกษาในปลาบางชนิดพบว่าอาจมีการสร้างเปปซิโนเจนมากกว่า 1 ชนิด ทำให้มีเอนไซม์เปปซินมากกว่าหนึ่งชนิดด้วย โดยแต่ละรูปแบบ (isoform) อาจทำงานได้ดีในสภาวะเดียวกันหรือแตกต่างกัน การศึกษาของ Wu และคณะ (2009) พบว่าเปปซิโนเจนจากกระเพาะอาหารของปลา European eel (*Anguilla anguilla*) มีทั้งหมด 3 ชนิด ทำให้มีเอนไซม์เปปซิน 3 ชนิดด้วย โดยเปปซิน-1 ทำงานได้ดีที่พีเอช 3.5 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ส่วนเปปซิน-2 และ เปปซิน-3 ทำงานได้ดีที่พีเอช 2.5 และอุณหภูมิ 40 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ หรือในปลา pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*) ที่เปปซิน A และ B ทำงานได้ดีที่พีเอช 3.0 และ 3.5 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Klomklao *et al*., 2007)

เปปซินเป็นเอนไซม์ชนิดเอนโดเปปทิเดส (endopeptidase) ซึ่งจะไฮโดรไลซ์พันธะเพปไทด์ที่อยู่ด้านในของสาย ตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่มีหมู่โซ่ข้างเป็นอะโรมาติก เช่น ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโตเฟน หรือกรดอะมิโนชนิดที่เป็นกรด เช่น กรดกลูตามิก กรดแอสพาร์ติก เป็นต้น เนื่องจากเปปซินทำหน้าที่ย่อยโปรตีนจึงพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เปปซินในปลากินเนื้อมีค่าสูงกว่าปลากินพืช (วีรพงศ์, 2536; Hofer and Schiemer, 1981) นอกจากนิสัยการกินของสัตว์น้ำ ปัจจัยภายนอก เช่น ความหนาแน่น หรือแสงก็ส่งผลต่อกิจกรรมของเปปซิน โดยการศึกษาในเต่าตนุ (*Chelonia mydas*) พบว่ากิจกรรมของเปปซินมีการตอบสนองต่อความหนาแน่นที่ใช้เลี้ยง ซึ่งเต่าที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 20 ตัว/ลูกบาศก์เมตร มีกิจกรรมของเปปซินสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นอื่น (40, 60 และ 80 ตัว/ลูกบาศก์

เมตร) (Kanghae *et al*., 2016) แต่การศึกษาในปลาจะละเม็ดขาวพบว่ากิจกรรมของเปปซินไม่ได้รับผลจากความหนาแน่น (Peng *et al*., 2013) ขณะที่ กิจกรรมของเปปซินในปลากะพงระยะโพสต์ลาร์วา พบว่ามีค่าสูงขึ้นเมื่อได้รับแสงในช่วงความเข้มแสง 50–100 ลักซ์ (Cuvier-Peres *et al*., 2001)

2.3.2 ทริปซิน (trypsin)

ทริปซิน (EC 3.4.21.4) ผลิตจากตับอ่อนในรูปของทริปซิโนเจนที่ยังไม่สามารถทำงานได้ เมื่อตับอ่อนถูกกระตุ้นจากโคเลซีสโตไคนิน (cholecystokinin) จะหลั่งทริปซิโนเจนเข้าสู่ลำไส้ส่วนต้น (duodenum) และลำไส้เล็กจะหลั่งเอนไซม์เอนเทอโรไคเนส (enterokinase) ออกมากระตุ้นทริปซิโนเจนให้เปลี่ยนเป็นทริปซินซึ่งเป็นรูปแบบที่พร้อมทำงาน ทริปซินเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการควบคุมการย่อยโปรตีน โดยทำหน้าที่กระตุ้นโปรเอนไซม์ (proenzyme) หรือไซโมเจนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนได้หลายชนิด ได้แก่ ทริปซิโนเจน (trypsinogen) ไคโมทริปซิโนเจน (chymotrypsinogen) โปรคาร์บอกซีเปปติเดส (procarboxypeptidase) และอีลาสเตส (elastase) ดังนั้นการศึกษากิจกรรมของทริปซินจึงมีบทบาทสำคัญต่อการประเมินประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน (Rungruangsak-Torrissen *et al*., 2002; Supannapong *et al*., 2008) กิจกรรมของทริปซินเป็นตัวบ่งชี้ถึงการพัฒนาของเซลล์ดูดซึมของระบบทางเดินอาหาร (Ribeiro *et al*., 1999) และเป็นตัวชี้วัดที่สำคัญในช่วงพัฒนาการของสัตว์น้ำวัยอ่อน (Bolasina *et al*., 2006)

ทริปซินเป็นอัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) สามารถตัดพันธะเอไมน์ (amidase activity) และเอสเทอร์ (esterase activity) หลังกรดอะมิโนที่โซ่ข้างมีขั้วและประจุบวก ได้แก่ ไลซีนและอาร์จีนีน (Stryer, 1988) ด้วยความจำเพาะที่สูงในกระบวนย่อยสลายโปรตีน (proteolysis) ทำให้มีการนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์และอุตสาหกรรม (Macouzet *et al*., 2005) ทริปซินเร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงพีเอช 7–10 (Chong *et al*., 2002; Natalia *et al*., 2004; Lazo *et al*., 2007; Thongprajukaew *et al*., 2010a) เช่น ทริปซินของปลา golden grey mullet (*Liza aurata*) ทำงานได้ดีที่พีเอช 10 (Bkhairia *et al*., 2016) กิจกรรมของทริปซินมีการศึกษาอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีบทบาทสำคัญต่อพัฒนาการของสัตว์น้ำ และเป็นตัวบ่งชี้ถึงพฤติกรรมการกินอาหารและการพัฒนาของระบบทางเดินอาหารได้ (Falcon-Hidalgo *et al*., 2011) ซึ่งกิจกรรมของทริปซินมีความผันแปรกับอุณหภูมิ (Rungruangsak-Torrissen *et al*., 2006) เช่น การศึกษาในปลา magellanic rockcod (*Paranotothenia magellanica*) ซึ่งอาศัยอยู่ที่อุณหภูมิต่ำ พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำถึง

ปานกลาง และจะหยุดการทำงานอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส (Genicot *et al*., 1996) แต่ในปลา golden grey mullet ทริปซินทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Bkhairia *et al*., 2016) ขณะที่กิจกรรมของทริปซินมีการแปรผันตามการกินอาหาร อายุ ขนาดของลำไส้ สปีชีส์ และที่อยู่อาศัยในปลา Cuban gambusia (*Gambusia punctate*) และ Cuban limia (*Limia vittata*) (Falcon-Hidalgo *et al*., 2011) สอดคล้องกับการศึกษาในปลากัด ซึ่งพบว่ากิจกรรมของทริปซินผันแปรตามอายุ (Thongprajukaew *et al*., 2010a) และเพศ (Thongprajukaew *et al*., 2013b)

การศึกษาก่อนหน้านี้พบการรายงานผลกระทบของความหนาแน่นต่อกิจกรรมของทริปซินในปลาหลายชนิด การศึกษาในปลา Japanese flounder พบว่าปลาที่อยู่ในระยะวัยอ่อนมีกิจกรรมของทริปซินสูงเมื่อเลี้ยงด้วยความหนาแน่นสูง (20,000 ตัว/ลูกบาศก์เมตร) และลดลงเมื่อเลี้ยงในความหนาแน่นต่ำ (2,000 ตัว/ลูกบาศก์เมตร) แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในปลาระยะลาร์วา (Bolasina *et al*., 2006) นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของทริปซินในปลาจะละเม็ดขาว โดยพบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 15 ตัว/ลูกบาศก์เมตร มีกิจกรรมของทริปซินสูงที่สุดเมื่อเมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นอื่น (5, 10 และ 25 ตัว/ลูกบาศก์เมตร) (Peng *et al*., 2013) รวมทั้งเต่าตนุที่มีกิจกรรมของทริปซินสูงที่สุดในการเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 20 ตัว/ลูกบาศก์เมตร เมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นอื่น (40, 60 และ 80 ตัว/ลูกบาศก์เมตร) (Kanghae *et al*., 2016) เช่นเดียวกับแสงซึ่งเป็นปัจจัยที่มีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากสีภาชนะ ซึ่งพบว่ากิจกรรมของทริปซินในปลากะพงที่มีอายุไม่เกิน 5 วันหลังจากการฟัก มีกิจกรรมของทริปซินต่ำลงเมื่อได้รับความเข้มแสง 5 ลักซ์ (Cuvier-Peres *et al*., 2001) หรือปลาเรนโบว์เทร้าต์ที่มีกิจกรรมของทริปซินสูงขึ้นเมื่อได้รับแสงทั้งวัน (Ramzanzadeh *et al*., 2016) ขณะที่ปลา miiuy croaker ไม่มีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของทริปซินเนื่องจากระยะเวลาการให้แสง (Shan *et al*., 2008) นอกจากนี้การแสดงออกของทริปซินในสัตว์น้ำยังมีอิทธิพลมาจากหลายปัจจัย ได้แก่ คุณภาพของอาหาร (Sunde *et al*., 2004) การแสดงออกของยีนและการได้รับฮอร์โมน (Rungruangsak-Torrissen and Sundby, 2000) และระบบภูมิคุ้มกัน (Andres *et al*., 2010)

2.3.3 ไคโมทริปซิน (chymotrypsin)

ไคโมทริปซิน (EC 3.4.21.1) ถูกสังเคราะห์ที่ตับอ่อนในสัตว์มีกระดูกสันหลัง และต่อมในระบบทางเดินอาหารในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในรูปที่ไม่ทำงาน เรียกว่า ไคโมทริปซิโนเจน และ

หลั่งออกบริเวณลำไส้ส่วนต้น (Navarrete-del-Toro *et al*., 2015; Ozyigit *et al*., 2016) โดยสามารถทำงานได้จากการกระตุ้นของทริปซิน และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 7–10 (Chong *et al*., 2002; Natalia *et al*., 2004; Rungruangsak-Torrissen, 2007; Thongprajukaew *et al*., 2010a) และอุณหภูมิช่วง 45–60 องศาเซลเซียส (Heu *et al*., 1995; Castillo-Yanez *et al*., 2004; Balti *et al*., 2012; Navarrete-del-Toro *et al*., 2015) ไคโมทริปซินมีความจำเพาะต่อชนิดของสารตั้งต้น และสามารถตัดพันธะเอไมน์และเอสเทอร์ได้เช่นเดียวกับทริปซิน โดยตัดพันธะเปปไทด์หลังกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นวงแหวน ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน ทริปโทเฟน ไทโรซีน และกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นไฮโดรโฟบิก เช่น เมทไธโอนีน (Stryer, 1988)

อัตราการหลั่งเอนไซม์ไคโมทริปซินสัมพันธ์กับปริมาณการกินและสภาพภายในระบบทางเดินอาหาร (Einarsson *et al*., 1996) การศึกษาในสัตว์น้ำพบว่าการแสดงออกของไคโมทริปซินมีผลต่อการเจริญเติบโตในทิศทางตรงกันข้ามกับทริปซิน โดยกิจกรรมของไคโมทริปซินจะมีค่าสูงในช่วงที่สิ่งมีชีวิตที่เติบโตช้าหรือถูกจำกัดโดยปัจจัยต่างๆ (Rungruangsak-Torrissen *et al*., 2006; Chan *et al*., 2008) ขณะที่การศึกษาการแสดงออกของไคโมทริปซินในปูแมงมุม (*Maja brachydactyla*) พบว่ากิจกรรมจำเพาะของไคโมทริปซินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุ และมีค่าสูงสุดเมื่อปูเข้าสู่ระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงเมทามอร์โฟซิส (Andres *et al*., 2010) อย่างไรก็ตาม การศึกษาในปลากัดวัยเจริญพันธุ์พบว่าการได้รับสารพิษจากอาหารจะทำให้กิจกรรมของไคโมทริปซินมีค่าลดลง (Thongprajukaew *et al*., 2013a) เช่นเดียวกับปลากะพงที่มีอายุไม่เกิน 5 วันหลังจากการฟัก มีกิจกรรมของไคโมทริปซินต่ำลงเมื่อได้รับความเข้มแสง 5 ลักซ์ (Cuvier-Peres *et al*., 2001) ขณะที่การให้แสงทั้งวันสามารถเหนี่ยวนำกิจกรรมของไคโมทริปซินสูงขึ้นในปลาเรนโบว์เทร้าต์ (Ramzanzadeh *et al*., 2016) ขณะที่การศึกษาความหนาแน่นในเต่าตนุพบว่าไม่ส่งผลต่อกิจกรรมของไคโมทริปซิน อย่างไรก็ตาม ผลของความหนาแน่นต่อกิจกรรมของไคโมทริปซินยังมีอยู่จำกัด จึงอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

3.3.4 แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase)

แอลฟา-อะไมเลส (EC 3.2.1.1) เป็นเอนโดอะไมเลส (endoamylase) พบได้ในพืช สัตว์ แบคทีเรีย และเชื้อรา (Dhont and Van Stappen, 2003) โดยมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาของตัวอ่อนปลากินเนื้อ (Moyano *et al*., 1996; Peres *et al*., 1996; Martinez *et al*., 1999; Ribeiro *et al*.,

1999; Darias *et al*., 2006) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลกลูโคสและมอลโทส โดยการตัดพันธะของสายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ตำแหน่ง α-1,4-glycosidic bond ดังนั้น แอลฟา-อะไมเลสจึงเป็นเอนไซม์ที่ใช้ประเมินประสิทธิภาพของการย่อยคาร์โบไฮเดรต (Thongprakaew *et al*., 2013b) โดยทั่วไปการสังเคราะห์แอลฟา-อะไมเลสเกิดขึ้นที่ตับอ่อน (Darias *et al*., 2006) และเกือบทุกส่วนของระบบทางเดินอาหาร (ผนังลำไส้ กระเพาะอาหาร ตับ ตับอ่อน และไส้ติ่ง) ในปลากินพืชและปลากินพืชและเนื้อ (วีรพงศ์, 2536; จันทกานต์, 2550) สำหรับปลานิลพบเอนไซม์นี้ในลำไส้ (Tengjaroenkul *et al*., 2000) เนื่องจากปลานิลกินอาหารส่วนใหญ่ที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง ทำให้กิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลสในปลานิลมีค่าสูงอย่างมีนัยสำคัญ (Hlophe *et al*., 2014) เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน เช่น หอยมุกน้ำจืด (*Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus*) ทำงานได้ดีที่พีเอช 7 อุณหภูมิช่วง 30–40 องศาเซลเซียส (Areekijseree *et al*., 2004) หรือหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis discus discus*) ทำงานได้ดีที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Nikapitiya *et al*., 2009) สำหรับการศึกษาในหอยกะพงเมดิเตอร์เรเนียน (*Mytilus galloprovincialis*) พบว่าแอลฟา-อะไมเลสบริสุทธิ์และแอลฟา-อะไมเลสสกัดหยาบทำงานได้ดีที่พีเอช 6.5 และอุณหภูมิช่วง 35–40 องศาเซลเซียส (Lombrana *et al*., 2005) ในปูทะเล (*Scylla serrata*) ทำงานได้ดีที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และปลานิลวัยอ่อน (*O. niloticus* และ *O. aureus*) ทำงานได้ดีที่พีเอช 6–7 อุณหภูมิ 25–35 องศาเซลเซียส (Sheng *et al*., 2006) นอกจากนี้พบว่ากิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลสยังขึ้นกับอุณหภูมิ โดยอุณหภูมิที่ต่ำลงทำให้มีกิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลสต่ำลงด้วย แต่แนวโน้มดังกล่าวก็ยังขึ้นอยู่กับสปีชีส์และอวัยวะของปลา (Hidalgo *et al*., 1999) เมื่อศึกษากิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลสในอวัยวะย่อยอาหารส่วนต่างๆ ได้แก่ กระเพาะอาหารเทียม (pseudostomach) ลำไส้ส่วนต้น (upper intestine) ลำไส้ส่วนปลาย (lower intestine) และตับ (liver) ของปลานิล (*O. niloticus*) ที่มีน้ำหนักต่างกัน (5.7, 35.8 และ 92.1 กรัม) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ พีเอช 6, 7 และ 2 ตามลำดับ โดยปลานิลที่มีน้ำหนัก 92.1 กรัม มีกิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลสสูงที่สุด (Klahan *et al*., 2009) หรือในหอยกะพงเมดิเตอร์เรเนียนมีแนวโน้มของกิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลสเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Lombrana *et al*., 2005)

สภาวะการเลี้ยงเป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลต่อกิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลส การศึกษาของ Peng และคณะ (2013) พบว่าปลาจะละเม็ดขาวที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 15 และ 25 ตัว/ลูกบาศก์เมตร มีกิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลสสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นอื่น (5 และ 10 ตัว/ลูกบาศก์เมตร) แต่กิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลสในเต่าตนุไม่ได้รับผลจากความหนาแน่นใน

การเพาะเลี้ยง (Kanghae *et al*., 2016) ขณะที่การศึกษาผลจากสีภาชนะเลี้ยงต่อแอลฟา-อะไมเลสยังไม่พบการรายงาน อย่างไรก็ตาม สีภาชนะส่งผลต่อแสงที่สัตว์น้ำได้รับ จากการรายงานของ Suzer และคณะ (2006) พบว่าความเข้มแสง 30 ลักซ์ ทำให้กิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลสของตัวอ่อนของปลา common pandora (*Pagellus erythrinus*) มีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มแสงอื่น (10 และ 100 ลักซ์) เช่นเดียวกับปลิงทะเล (*Apostichopus japonicas*) ที่ได้รับความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ทำให้กิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลสสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มแสงอื่น (0, 1,000 และ 3,000 ลักซ์) (Wei and Zhao, 2014) นอกจากนี้กิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลสจากกระเพาะ ลำไส้ และตับของปลากะรังดอกแดง (*Epinephelus coioides*) ยังมีค่าสูงขึ้นเมื่อได้รับแสงที่ความเข้มช่วง 350–1,150 ลักซ์ (Wang *et al*., 2015) แต่ความเข้มแสง (5, 50, 100 และ 400 ลักซ์) ไม่ส่งผลต่อกิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลสของปลากะพงระยะโพสต์ลาร์วา (Cuvier-Peres *et al*., 2001) ขณะที่ปลาเรนโบว์เทร้าต์ที่ได้รับแสงตลอดทั้งวันพบว่ากิจกรรมของอะไมเลสสูงกว่าปลาที่ได้รับแสง 4, 10 และ 14 ชั่วโมง/วัน (Ramzanzadeh *et al*., 2016)

3.3.5 ไลเปส (lipase)

ไลเปส (EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ย่อยไขมันที่เกิดจากการหลั่งของผนังลำไส้และตับอ่อน มีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันโมเลกุลยาวกับกลีเซอรอลให้เป็นโมโนกลีเซอรอล ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมัน และกลีเซอรอล เอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางถึงเบส (การุณ และอุทัยวรรณ, 2555) เช่น ปลา Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) เอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 7.4 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Parra *et al*., 2007) หรือปลา miiuy croaker ทำงานได้ดีที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Shan *et al*., 2008) อย่างไรก็ตาม ในสัตว์น้ำบางชนิดเอนไซม์ไลเปสอาจทำงานได้ในสภาวะที่เป็นกลางถึงกรดอ่อน เช่น ปลานิล (*O. niloticus* และ *O. aureus*) ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจากลำไส้สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 6–7 ในช่วงอุณหภูมิ 25–35 องศาเซลเซียส (Sheng *et al*., 2006) ขณะที่การศึกษากิจกรรมของไลเปสในอวัยวะย่อยอาหารส่วนต่างๆ ได้แก่ กระเพาะอาหารเทียม ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลาย และตับของปลานิล (*O. niloticus*) ที่มีน้ำหนักต่างกัน คือ 5.7, 35.8 และ 92.1 กรัม พบว่าไลเปสมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 8, 7 และ 8 ตามลำดับ โดยปลานิลน้ำหนัก 35.8 กรัม มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด (Klahan *et al*.,

2009) อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ไลเปสจะทำงานร่วมกับน้ำดีในการย่อยไขมันให้กลายเป็นไขมันโมเลกุลเล็ก

กิจกรรมของไลเปสในปลากินเนื้อมีค่าสูงกว่าปลากินพืชและสัตว์และปลากินพืชตามลำดับ การศึกษาในปลา yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) วัยอ่อนซึ่งเป็นปลากินเนื้อพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสค่อนข้างสูงตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นพัฒนาการของตัวอ่อน (Chen *et al*., 2006) สอดคล้องกับตัวอ่อนของปลา common pandora ซึ่งมีกิจกรรมของไลเปสเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 10 วันหลังจากการฟัก (Suzer *et al*., 2006) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของไลเปสได้รับผลจากความหนาแน่นและแสงที่ใช้ทดสอบ (Shan *et al*., 2008; Peng *et al*., 2013; Wang *et al*., 2015) การรายงานของ Peng และคณะ (2013) พบว่าปลาจะละเม็ดขาวที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 15 ตัว/ลูกบาศก์เมตร มีกิจกรรมของไลเปสสูงกว่าความหนาแน่นอื่น (5, 10 และ 25 ตัว/ลูกบาศก์เมตร) แต่กิจกรรมของไลเปสในเต่าตนุไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Kanghae *et al*., 2016) สอดคล้องกับการศึกษาในปลา Japanese flounder ระยะลาร์วา (Bolasina *et al*., 2006) ขณะที่การศึกษาของ Shan และคณะ (2008) พบว่ากิจกรรมของไลเปสในปลา miiuy croaker ที่ได้รับแสงสว่าง 16 และ 24 ชั่วโมง/วัน มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับแสงสว่าง 12 ชั่วโมง/วัน อย่างไรก็ตาม ในปลาเรนโบว์เทร้าพบว่าไม่ได้ผลจากระยะเวลาการให้แสงที่แตกต่างกัน (Ramzanzadeh *et al*., 2016) นอกจากนี้การศึกษาของ Wei และ Zhao (2014) พบว่าความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ทำให้กิจกรรมของไลเปสในปลิงทะเลมีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มแสงอื่น (0, 1,000 และ 3,000 ลักซ์) และการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากกระเพาะ ลำไส้ และตับของปลากะรังดอกแดงพบว่ามีค่าสูงขึ้นเมื่อได้รับแสงที่ความเข้มช่วง 350–1,150 ลักซ์ (Wang *et al*., 2015)

4. การตอบสนองของกล้ามเนื้อต่อสภาวะเลี้ยง

คุณภาพของกล้ามเนื้อเป็นปัจจัยที่สำคัญในการบ่งชี้ถึงสุขภาพและการเคลื่อนไหวที่ดีของสัตว์น้ำ คุณภาพกล้ามเนื้อที่ดีอาจบ่งบอกได้จากคุณสมบัติของโปรตีน เนื่องจากโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักของกล้ามเนื้อ โดยในกล้ามเนื้อมีโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการยืดหยุ่นของกล้ามเนื้อและการว่ายน้ำของปลา ได้แก่ โปรตีนแอกตินและไมโอซิน ซึ่งจะส่งผลต่อความสามารถในการเคลื่อนไหวของสัตว์น้ำ ดังนั้น กล้ามเนื้อที่ดีควรมีการเจริญเติบโตจากโปรตีนและสามารถรักษาปริมาณโปรตีนแอกตินและไมโอซินในกล้ามเนื้อ

4.1 ความสามารถในการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis capacity)

ความสามารถในการสังเคราะห์โปรตีน (ความเข้มข้นของโปรตีน และความเข้มข้นของ RNA) และอัตราการหมุนเวียนโปรตีน (RNA/protein ratio) เป็นปัจจัยบ่งชี้คุณภาพของกล้ามเนื้อ (Sunde *et al*., 2001, 2004) สำหรับปลานิยมศึกษาในกล้ามเนื้อขาว (white muscle) บริเวณใต้ครีบหลัง เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและมีการตอบสนองต่อการเจริญเติบโตได้ดี (Peragon *et al*., 2001) การศึกษาของ Rungruangsak-Torrissen และ Male (2000) และ Sunde และคณะ (2001) พบว่าอัตราการแลกเนื้อและอัตราการเจริญเติบโตมีความสัมพันธ์กับระดับกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีนอิสระในกล้ามเนื้อ และการสลายคอลลาเจนซึ่งเกิดจากการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งระดับของกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีนอิสระเป็นตัวบ่งชี้ถึงการสร้างโปรตีนในการพัฒนาของเนื้อเยื่อ (Sunde *et al*., 2004; Rungruangsak-Torrissen *et al*., 2009) การสะสมโปรตีนในกล้ามเนื้อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (Rungruangsak-Torrissen *et al*., 2009) สอดคล้องกับการรายงานของ Fauconneau และคณะ (1990) พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของปลามีความสัมพันธ์กับอัตราการสังเคราะห์โปรตีนและอัตราส่วนของ RNA/protein ในกล้ามเนื้อ นอกจากนี้อัตราส่วนของกรดอะมิโนจำเป็นต่อกรดอะมิโนไม่จำเป็นในกล้ามเนื้อยังสัมพันธ์กับการแสดงออกของทริปซิน (Torrissen *et al*., 1994)

ความเข้มข้นของ RNA และ RNA/protein ratio มีความสัมพันธ์ที่แปรผันตรงกับอัตราการเจริญเติบโตของปลาแม้ว่าปลาจะถูกจำกัดอาหาร (Rungruangsak-Torrissen *et al*., 1999; Rungruangsak-Torrissen, 2007; Rungruangsak-Torrissen and Fosseidengen, 2007) แต่จะมีความสัมพันธ์ที่แปรผกผันเมื่ออัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นไม่ได้เกิดจากการสะสมของโปรตีน (Sunde *et al*., 2001) การศึกษาของ Pierce *et al*. (1999) พบว่าปริมาณของ RNA และ RNA/protein ratio ของหมึก (*Loligo forbesi* และ *Eledone cirrhosa*) มีค่าในวัยก่อนเจริญพันธุ์ > วัยเจริญพันธุ์, เพศผู้ > เพศเมีย และขนาดเล็ก > ขนาดใหญ่ เมื่อสิ่งมีชีวิตมีการเจริญเติบโตขึ้นความเข้มข้นของ RNA จะลดลง และการศึกษาของ Sunde และคณะ (2001) พบว่าความเข้มข้นของ RNA และ RNA/protein ratio มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับระยะเวลาการให้แสง แต่ในการศึกษาของ Rungruangsak-Torrissen และคณะ (2009) ในปลาแซลมอนแอตแลนติก (*Salmo salar*) พบว่าการได้รับแสงอย่างต่อเนื่องในช่วงฤดูหนาวและฤดูใบไม้ผลิทำให้ความเข้มข้นของ RNA ในกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น ขณะที่การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของโปรตีนส่งผลให้มี RNA/protein ratio ลดต่ำลง

(Mathers *et al*., 1993; Peragon *et al*., 2001) สอดคล้องกับการศึกของ Blier และคณะ (2002) ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของโปรตีนในปลาที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงมีมากกว่าปลาที่มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ

4.2 สมบัติเชิงความร้อนของแอกตินและไมโอซิน

คุณภาพของกล้ามเนื้อสามารถตรวจสอบด้วยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของกล้ามเนื้อขาว เนื่องจากส่วนของกล้ามเนื้อขาวมีไขมันแทรกอยู่ปริมาณน้อย (Ramesh and Nagarajan, 2013) การศึกษาจะอาศัยการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein) ได้แก่ โปรตีนแอกติน (actin) และไมโอซิน (myosin) ซึ่งมีความสำคัญในการบ่งชี้คุณภาพของกล้ามเนื้อ เนื่องจากโปรตีนแอกตินและไมโอซินมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อสัตว์ (Tyska and Warshaw, 2002; Paredi *et al*., 2003) การศึกษาจะใช้ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิงแคลอริมิเตอร์ (different scanning colorimeter: DSC) (Matos *et al*., 2011; Thongprajukaew *et al*., 2015) เนื่องจากเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์ในการศึกษาสมบัติทางความร้อนของโปรตีน โดยเฉพาะการสูญเสียสภาพธรรมชาติ (Konieczny *et al*., 2016) โดยดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิงแคลอริมิเตอร์จะอาศัยการดูดซับความร้อนจากตัวอย่างหรือโปรตีนที่เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติที่ระบายออกมา (Schubring, 1999) ซึ่งการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเกิดจากพันธะไฮโดรเจนในโครงสร้างถูกทำลาย (Wang *et al*., 2008) โครงสร้างที่แตกต่างกันทำให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติในอุณหภูมิช่วงกว้าง (Bao and Cork, 2002) การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนไมโอซินเกิดที่อุณหภูมิต่ำกว่าโปรตีนแอกติน เช่น การศึกษาในกล้ามเนื้อขาวของปลานิล (ไมโอซิน 43.0–49.9 องศาเซลเซียส และแอกติน 66.6–74.6 องศาเซลเซียส) (Thongprajukaew *et al*., 2015) และการศึกษาของ Paredi และคณะ (2003) ในหอยเชลล์ 2 สปีชีส์ (*Chlamys tehuelchus* และ *Zygochlamys patagonica*) พบว่าค่าการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนในกล้ามเนื้อลายและกล้ามเนื้อเรียบไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีการเปลี่ยนแปลงตามค่าพีเอช ดังนั้นค่าการเปลี่ยนแปลงเชิงความร้อนจึงสามารถใช้เปรียบเทียบเสถียรภาพทางความร้อนของโปรตีนที่สภาวะควบคุม (Schubring, 1999) นอกจากนี้การศึกษาด้วยดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิงแคลอริมิเตอร์สามารถบ่งบอกถึงคุณภาพโปรตีนด้วยค่าเอนทัลปี (ΔH) จากการรายงานของ Arntfield และ Murray (1981) พบว่าค่าดังกล่าวสามารถบ่งชี้ความเป็นระเบียบ

ของโครงสร้างของโปรตีน ซึ่งเป็นผลจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน โดยค่าเอนทัลปีเป็นผลมาจากโปรตีนแอกตินและไมโอซินเป็นหลัก (Matos *et al*., 2011) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนจึงสามารถบ่งบอกคุณภาพของกล้ามเนื้อ (Kuo *et al*., 2005) ซึ่งเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมในงานด้านการตรวจสอบคุณภาพของเนื้อปลาอย่างหลากหลาย (Schubring, 1999)

5. การตอบสนองของสีต่อสภาวะเลี้ยง

สีของปลากัดควบคุมโดยยีนที่กำหนดการสร้างสารเมลานิน ยีนควบคุมการสร้างรงควัตถุสีเหลือบ (iridescence pigment) และยีนกำหนดความหนาแน่นของสี (Wallbrunn, 1957) สำหรับสีบริเวณลำตัวตัว ครีบ และเกล็ดเกิดจากสารสี โดยสีของเกล็ดเกิดสารสีควินีนและเพียวรีน (Monvises *et al*., 2009) ขณะเดียวกัน Clotfelter และคณะ (2007) พบว่าแคโรทีนอยด์เป็นสารสีที่สร้างสีแดงในผิวหนังของปลากัด โดยมีโดรโซเทอริน (drosopterin) เป็นตัวควบคุมความสว่างของสีผิวหนัง โดยกล้ามเนื้อมีการสะสมของแคโรทีนอยด์สูงที่สุด (44–51 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งความเข้มข้นและการสะสมแคโรทีนอยด์นั้นมีความสัมพันธ์กับอายุ ฟีโนไทป์ และระหว่างปฏิสัมพันธ์ของอายุกับฟีโนไทป์ เนื่องจากการสะสมและความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์จะมีค่าใกล้เคียงกันในช่วงวัยก่อนเจริญพันธุ์ แต่ปลาที่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์จะมีการสะสมและความเข้มข้นที่แตกต่างกันชัดเจน (Thongprajukaew *et al*., 2014) นอกจากนี้การสะสมแคโรทีนอยด์ยังมีอิทธิพลต่อการจับคู่ของปลากัด เนื่องจากปลากัดตัวเมียจะเลือกจับคู่กับปลาที่มีความเข้มของสีมากกว่า โดยปลาที่มีฟีโนไทป์สีแดงจะมีปริมาณแคโรทีนอยด์ในครีบสูงกว่าปลาที่มีฟีโนไทป์สีน้ำเงิน (Blakeslee *et al*., 2009) สอดคล้องกับการศึกษาของ Gautier และคณะ (2008) ที่พบว่าปลากัดตัวเมียเลือกจับคู่กับปลาตัวผู้ที่มีฟีโนไทป์สีแดงมากกว่าที่มีฟีโนไทป์สีน้ำเงิน และสีของปลาตัวผู้จะเข้มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นจากปลาตัวอื่น (Monvises *et al*., 2009) เนื่องจากรงคพาหะ (chromatophore) บริเวณใต้ชั้นของหนังแท้ได้รับสัญญาณจากระบบประสาท ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นและการกระจายตัวของสารสี (Fujii, 2000)

ปลากัดหนึ่งตัวอาจแสดงสีที่หลากหลาย ซึ่งเกิดจากรงควัตถุที่แตกต่างกัน การรายงานของ Wallbrunn (1957) และ Khoo และคณะ (2012) พบว่าสีแดงและสีทองของปลากัดเกิดจากเซลล์อีริโทรฟอร์ (erythrophore) ซึ่งภายในมีเทอริโนโซม (pterinosome) เป็นเม็ดสารสีแดง และเซลล์

แซนโธฟอร์ (xanthophore) ซึ่งมีถุงขนาดใหญ่บรรจุสารสีเหลือง (แคโรทีนอยด์) และมีเทอริโนโซมขนาดเล็กปนอยู่ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์อิริโดฟอร์ (iridophore) มีการสะสมสารสีน้ำเงิน ม่วง เขียว ชมพู เหลือง และเฉดสี ด้วยเหตุนี้เซลล์อิริโดฟอร์อาจมีความสัมพันธ์กับเซลล์แซนโธฟอร์ และลิวโคฟอร์ (leucophore) เช่นเดียวกับเซลล์เมลาโนฟอร์ (melanophore) ซึ่งประกอบด้วยเมลาโนโซม (melanosome) ที่สะสมสารสีดำหรือน้ำตาล (Wallbrunn, 1957; Khoo *et al*., 2012)

การแสดงออกของเม็ดสีในปลากัดเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย การรายงานของ Wallbrunn (1957) พบว่าปลาที่มีอาการป่วยหรืออยู่ในอาการหวาดกลัวจะมีสีอ่อน เนื่องจากเม็ดสีกระจายตัวได้ไม่ดี นอกจากนี้การชักนำด้วยโพแทสเซียมและนอร์เอพิเนฟริน (norepinephrine) ทำให้สีของครีบปลากัดเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีฟ้าอมเหลือง แต่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมเมื่อสารดังกล่าวหมดไป การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเกิดจากเซลล์อิริโดฟอร์ และเซลล์เมลาโนฟอร์มีการกระจายตัวและจัดเรียงตัวใหม่ (Amiri and Shaheen, 2012) ขณะที่ความหนาแน่นและสีของภาชนะเลี้ยงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ได้รับการรายงานถึงความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีผิว (Van der Salm *et al*., 2004; Doolan *et al*., 2008; Zeng *et al*., 2010) การศึกษาในปลา darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*) พบว่าพารามิเตอร์ของสีผิว (ค่าความสว่าง ค่าความแดง และค่าความเหลือง) มีค่าลดลงเมื่อความหนาแน่นเพิ่มขึ้น (Zeng *et al*., 2010) ขณะที่ความหนาแน่น 50 กิโลกรัม/ลูกบาศก์เมตร ทำให้ปลา Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) มีการสะสมแคโรทีนอยด์สูงที่สุด (Metusalach *et al*., 1997) เช่นเดียวกับสีภาชนะที่ส่งผลต่อการสะสมแคโรทีนอยด์และความเข้มของสีผิวปลาทองจะสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงในภาชนะสีทึบ (สีดำ และสีน้ำเงินเข้ม) เมื่อเปรียบเทียบกับภาชนะสีอ่อน (สีขาว และสีน้ำตาล) (Eslamloo *et al*., 2015) รวมทั้งการศึกษาในปลากะพงออสเตรเลีย (*Pagrus auratus*) ที่พบว่าปลาที่เลี้ยงในตาข่ายสีขาวและความหนาแน่นต่ำมีความสว่างของสีผิวสูงและขาวกว่าปลาที่เลี้ยงในตาข่ายสีดำ (Doolan *et al*., 2008)

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาผลของปริมาตรน้ำและสีของภาชนะต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากอาหารของปลากัด

บทที่ 2

วิธีการศึกษา

การทดลองที่ 1 ปริมาตรของน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด

1. การเตรียมและเลี้ยงปลากัด

นำปลากัดตัวผู้สีแดงทั้งตัวอายุ 1 เดือน จากแหล่งเพาะเลี้ยงมาปรับสภาพในแก้วพลาสติกทรงกระบอกปริมาตร 350 มิลลิลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5 เซนติเมตร × สูง 12.5 เซนติเมตร) ที่มีน้ำปริมาตร 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยให้อาหารสำเร็จรูป (โปรตีน 35 เปอร์เซ็นต์) ในอัตรา 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว จำนวน 2 ครั้ง/วัน (08.00 และ 17.00 น.) และเก็บเศษอาหารที่เหลือหลังการให้อาหาร 30 นาที ให้แสงธรรมชาติเป็นเวลา 12 ชั่วโมง/วัน และเปลี่ยนน้ำที่ใช้เลี้ยง 80 เปอร์เซ็นต์ ทุก 3 วัน ก่อนการให้อาหารมื้อเย็น หลังจากนั้นนำปลาที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน (น้ำหนักเริ่มต้น 0.97 ± 0.01 กรัม) มาเลี้ยงเดี่ยวในตู้กระจกใส (ความกว้าง 3.5 เซนติเมตร × ความยาว 8 เซนติเมตร × ความสูง 20 เซนติเมตร) ที่มีปริมาตรน้ำแตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิลิตร ทำการทดลองทั้งหมด 15 ตัว/ปริมาตรน้ำ เลี้ยงนาน 2 เดือน ตลอดการเลี้ยงอุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วง 26.00–29.90 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.40–6.93 นอกจากนี้ การให้อาหาร แสง และการเปลี่ยนถ่ายน้ำทำเช่นเดียวกับการเลี้ยงปรับสภาพ

ตลอดการทดลองทำการบันทึกอัตราการตายของปลาทุกวัน และเก็บข้อมูลปริมาณอาหารที่กินในแต่ละวัน (daily feed intake) เพื่อใช้คำนวณอัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio) เมื่อสิ้นสุดการทดลองให้ปลาอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บข้อมูลน้ำหนักและความยาว (n = 15) เพื่อใช้คำนวณคอนดิชันแฟกเตอร์ (condition factor) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) อัตราการกิน (feeding rate) และประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio) รวมทั้งการตรวจวัดสีผิวของปลา (n = 15) นอกจากนี้ทำการเก็บตัวอย่างระบบย่อยอาหารเพื่อใช้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (n = 5) ตัวอย่างกล้ามเนื้อเพื่อใช้วิเคราะห์คุณภาพของกล้ามเนื้อ (n = 5) และตัวอย่างปลาทั้งตัวเพื่อใช้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของซาก (n = 5) ตัวอย่างทั้งหมดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

2. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร

2.1 การสกัดเอนไซม์ย่อยอาหาร

สกัดเอนไซม์ย่อยอาหารตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Rungruangsak และ Utne (1981) โดยนำอวัยวะภายในมาเติม 0.2 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Na_2HPO_4-NaH_2PO_4) พีเอช 8 ในอัตราส่วน 1:3 (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นละเอียดเนื้อเยื่อ (THP-220; Omni International, Kennesaw GA, USA) หลังจากนั้นนำสารละลายไปหมุนเหวี่ยงที่ 15,000 × *g* เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และดูดสารละลายส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของสารสกัดเอนไซม์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อการทดสอบต่อไป

2.2 การศึกษาปริมาณโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์

ปริมาณของโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์ศึกษาตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) โดยเติมสารสกัดเอนไซม์ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย C ปริมาตร 750 ไมโครลิตร (โดยเตรียมสารละลาย C จากสารละลาย A ที่ผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม กับ โซเดียมซิเตรท 1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร กับสารละลาย B จากการผสมระหว่างโซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัม กับ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร โดยผสมสารละลาย A ต่อ B ในอัตราส่วน 1 ต่อ 50) จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent (เจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:2) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA)

2.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร

กิจกรรมของเปปซินตรวจสอบภายใต้สภาวะที่มีพีเอช 2 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ Rungruangsak และ Utne (1981) โดยเติม 2 เปอร์เซ็นต์ เคซีนที่ละลายใน 0.1 นอร์มัลโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม 0.2 โมลาร์โพแทสเซียมคลอไรด์-กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ (KCl-HCl) พีเอช 2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมเอนไซม์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศา

เซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นเติม 5 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรคลอโรอะซิติก เพื่อหยุดปฏิกิริยา ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 × *g* ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.5 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ Folin-Ciocalteu reagent (เจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 720 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ *L*-tyrosine และคำนวณกิจกรรมจำเพาะของเปปซินได้จากสูตร

กิจกรรมจำเพาะของเปปซิน (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)

$$= \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงที่ 720 นาโนเมตร} \times 1{,}000\ (\text{ไมโครลิตร}) \times 1\ (\text{นาที}) \times \text{การเจือจาง (เท่า)}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ (ไมโครลิตร)} \times 5\ (\text{นาที}) \times \text{ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}$$

กิจกรรมของทริปซินตรวจสอบภายใต้สภาวะที่มีพีเอช 8 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ Rungruangsak-Torrissen และคณะ (2006) โดยเติม 1.25 มิลลิโมลาร์ bensoyl-*L*-Arg-*p*-nitroanilide (BAPNA) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมเอนไซม์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 30 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติกปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ นาน 5 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน *p*-nitroanilide และคำนวณกิจกรรมจำเพาะของทริปซินได้จากสูตร

กิจกรรมจำเพาะของทริปซิน (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)

$$= \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร} \times 1000\ (\text{ไมโครลิตร}) \times 1\ (\text{นาที}) \times \text{การเจือจาง (เท่า)}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ (ไมโครลิตร)} \times 5\ (\text{นาที}) \times \text{ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}$$

กิจกรรมของไคโมทริปซินตรวจสอบภายใต้สภาวะที่มีพีเอช 8 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ Rungruangsak-Torrissen และคณะ (2006) โดยเติม 0.10 มิลลิโมลาร์ *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (SAPNA) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมเอนไซม์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 30 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติกปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร และนำ

ค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน *p*-nitroanilide และคำนวณกิจกรรมจำเพาะของไคโมทริปซิน เช่นเดียวกับสูตรการคำนวณหากิจกรรมจำเพาะของทริปซิน

กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรวจสอบภายใต้สภาวะที่มีพีเอช 8 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Winkler และ Struckmann (1979) โดยเติม 0.01 โมลาร์ *p*-nitrophenyl palmitate ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง และเติม 0.2 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 8 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมเอนไซม์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำสารไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 × *g* ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที โดยเก็บสารละลายส่วนใสเพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ *p*-nitrophenol และคำนวณกิจกรรมจำเพาะของไลเปส ได้จากสูตร

กิจกรรมจำเพาะของไลเปส (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)

$$= \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร} \times 1{,}000 \text{ (ไมโครลิตร)} \times 1 \text{ (นาที)} \times \text{การเจือจาง (เท่า)}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ (ไมโครลิตร)} \times 5 \text{ (นาที)} \times \text{ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}$$

กิจกรรมของอะไมเลสตรวจสอบภายใต้สภาวะที่มีพีเอช 8 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Areekijseree และคณะ (2004) โดยเติม 5 เปอร์เซ็นต์ สารละลายน้ำแป้ง ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติม 0.2 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 8 ปริมาตร 62.5 ไมโครลิตร และ 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมเอนไซม์ปริมาตร 125 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1 เปอร์เซ็นต์ กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic: DNS) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานมอลโทส และคำนวณกิจกรรมจำเพาะของอะไมเลส ได้จากสูตร

กิจกรรมจำเพาะของอะไมเลส (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)

$$= \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร} \times 1{,}000 \text{ (ไมโครลิตร)} \times 1 \text{ (นาที)} \times \text{การเจือจาง (เท่า)}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ (ไมโครลิตร)} \times 5 \text{ (นาที)} \times \text{ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}$$

3. การศึกษาคุณภาพของกล้ามเนื้อ

3.1 ประสิทธิภาพการสังเคราะห์โปรตีน

ประสิทธิภาพการสังเคราะห์โปรตีนพิจารณาจากปริมาณของ RNA, protein และ RNA/protein ratio โดยศึกษาปริมาณ RNA และโปรตีน ตามวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen (2007) โดยชั่งตัวอย่างประมาณ 50 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ แล้วเติม TRIzol reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องอัลตราโซนิกส์ (VCX; Sonic and Materials Inc., Newtown CT, USA) จนเนื้อเยื่อละเอียดเป็นเนื้อเดียวกับสารละลาย แล้วนำมาเติมคลอโรฟอร์มเข้มข้น 0.1 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 × *g* นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเสร็จสิ้น สารจะเกิดการแยกชั้นออกเป็น 3 ชั้น

ตรวจสอบปริมาณ RNA โดยดูดสารละลายชั้นบนปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ใหม่แล้วเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10–20 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 × *g* นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บส่วนตะกอนไว้ โดยการเทสารละลายทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนด้วยการเติม 90 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10–20 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 × *g* นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทสารละลายทิ้ง แล้วนำตัวอย่างไประเหยเอทานอลที่เหลือด้วยการบ่มในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนเอทานอลระเหยหมด (แต่ไม่ควรแห้งเกินไป ซึ่งทำให้ตะกอนละลายช้า) ในขั้นต่อไปละลายตะกอน RNA ที่ผ่านการระเหยเอทานอลเรียบร้อย โดยเติม 0.1 โมลาร์ เอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนตะกอนละลายหมด โดยระหว่างการบ่มจะนำตัวอย่างออกมาเขย่าทุก 30 นาที เมื่อตะกอนละลายหมด นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (E_{260}) และคำนวณปริมาณ RNA ได้จากสูตร E_{260} = 40 ไมโครกรัม RNA/มิลลิลิตร

ตรวจสอบปริมาณโปรตีนโดยดูดสารละลายชั้นล่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ใหม่แล้วเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่

อุณหภูมิห้องนาน 10–20 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 × *g* นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บส่วนตะกอนไว้ โดยการเทสารละลายทิ้ง จากนั้นทำการล้างตะกอนด้วยการเติม 90 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10–20 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 × *g* นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทสารละลายทิ้ง ทำการล้างตะกอนซ้ำอีกครั้ง เมื่อล้างตะกอนครบ 2 ครั้ง นำตัวอย่างไประเหยเอทานอลที่เหลือด้วยการบ่มในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนเอทานอลระเหยหมด สำหรับขั้นตอนการละลายตะกอนโปรตีนนั้น ทำโดยการเติม 1 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulphate: SDS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนกว่าตะกอนของโปรตีนละลายหมด โดยระหว่างการบ่มจะนำตัวอย่างออกมาเขย่าทุก 30 นาที เมื่อตะกอนละลายหมด นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (E_{280}) และคำนวณปริมาณโปรตีน ได้จากสูตร E_{280} = 2.1 มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร

3.2 การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อน

เตรียมตัวอย่างกล้ามเนื้อที่ปราศจากหนัง โดยตัดกล้ามเนื้อให้มีขนาดเล็กหนักประมาณ 10 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) แล้วศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนในกล้ามเนื้อ (แอกติน และไมโอซิน) โดยใช้เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิงแคลอริมิเตอร์ (DSC7, PerkinElmer, Waltham, USA) โดยให้ความร้อนในช่วง 20 ถึง 100 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที ซึ่งใช้น้ำแข็งเป็นแหล่งทำความเย็น การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนที่ตรวจสอบ ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้น (onset temperature: T_o) อุณหภูมิพีค (peak temperature: T_p) อุณหภูมิสุดท้าย (conclusion temperature: T_c) และเอนทัลปี (enthalpy: ΔH) ในการเสียสภาพของโปรตีน รวมทั้งอัตราส่วนของเอนทัลปีของแอกตินต่อไมโอซิน

4. การศึกษาความเข้มสีของปลากัด

นำปลากัดที่สลบด้วยน้ำมันกานพลูมาตรวจสอบความเข้มของสีผิวทันที โดยใช้เครื่องมือวัดสี (Miniscan EZ, Hunter Associates Laboratory, Reston VA, USA) แนบกับตัวปลาบริเวณส่วนกลางของลำตัวซีกซ้าย สำหรับค่าที่ตรวจสอบ ได้แก่ ค่าความสว่าง (L^*) ค่าความแดง (a^*) และค่าความเหลือง (b^*)

5. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของซาก

5.1 ความชื้น

ปริมาณความชื้นวิเคราะห์ตามวิธีการของ AOAC (2005) โดยการเตรียมถ้วยกระเบื้องด้วยการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วเก็บในโถดูดความชื้นจนอุณหภูมิลดลงจึงชั่งและบันทึกน้ำหนักถ้วยกระเบื้อง (w_2) จากนั้นชั่งตัวอย่างใส่ลงในถ้วยกระเบื้องประมาณ 1 กรัม และบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (w_1) แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำตัวอย่างที่อบแล้วเก็บในโถดูดความชื้นและทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลง จึงนำตัวอย่างไปชั่งและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (w_3) และคำนวณหาค่าปริมาณความชื้น ได้จากสูตร ความชื้น (เปอร์เซ็นต์) = $100 - [((w_3-w_2)/w_1)*100]$

5.2 โปรตีน

ปริมาณโปรตีนวิเคราะห์โดยวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen (2007) ซึ่งมีขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในกล้ามเนื้อ (ข้อ 3.2)

5.3 ไขมัน

ปริมาณไขมันวิเคราะห์โดยดัดแปลงวิธีการของ Supannapong และคณะ (2008) โดยการนำตัวอย่างซากไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างที่อบแห้งไปบดให้ละเอียด และชั่งน้ำหนักประมาณ 1 กรัม บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (w_1) ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวก์ จากนั้นเติมเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (GFL 3018, Gesellschaft Fur Labortechnik mbH, Burgwedel, Germany) ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ดูดสารละลายทั้งหมดในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ใหม่ที่ผ่านการอบไล่ความชื้นและทราบน้ำหนักที่แน่นอน (w_2) แล้วนำไประเหยตัวทำละลายด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ในโถดูดความชื้นและตั้งไว้ให้

อุณหภูมิลดลง จึงนำมาชั่งและบันทึกน้ำหนัก (w_3) และคำนวณปริมาณไขมันได้จากสูตร ไขมัน (เปอร์เซ็นต์) = $[(w_3–w_2)/w_1]*100$

5.4 เถ้า

ปริมาณเถ้าวิเคราะห์โดยวิธีการของ AOAC (2005) โดยการเตรียมถ้วยกระเบื้องด้วยการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วเก็บในโถดูดความชื้นจนอุณหภูมิลดลงจึงชั่งและบันทึกน้ำหนักถ้วยกระเบื้อง (w_2) จากนั้นทำการชั่งตัวอย่างใส่ลงในถ้วยกระเบื้องประมาณ 1 กรัม และบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (w_1) แล้วนำไปเผาด้วยเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเก็บในโถดูดความชื้นและทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลง จึงนำตัวอย่างไปชั่งและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (w_3) และสามารถคำนวณหาค่าปริมาณเถ้าได้จากสูตร เถ้า (เปอร์เซ็นต์) = $((w_3–w_2)/w_1)*100$

6. การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) ทำการทดลอง 15 ซ้ำ โดยปลากัดแต่ละตัว คือ หน่วยทดลอง วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 14 (SPSS Inc., Chicago, USA) แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และวิเคราะห์การถดถอยเพื่อหาสมการเชิงเส้นโดยใช้ Regression analysis ในส่วนของพารามิเตอร์การเจริญเติบและการใช้ประโยชน์จากอาหารคำนวณตามสูตร ดังต่อไปนี้

คอนดิชันแฟกเตอร์ (CF, g/cm^3) = 100 × (น้ำหนักตัว/ความยาวเหยียด^3)

ดัชนีอวัยวะภายใน (VSI, %) = 100 × (น้ำหนักเปียกอวัยวะภายใน/น้ำหนักตัว)

การเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR, % BW/day) = 100 (e^g – 1)

โดย g มีค่าเท่ากับ g = $(\ln W_t - \ln W_0)/(t – t_0)$; W_t = ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักในเดือน t, W_0 = ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักในเดือนเริ่มต้น

อัตราการกิน (FR, % BW/day) = อาหารที่กินในแต่ละวัน/[(น้ำหนักตัวเริ่มต้น + น้ำหนักตัวสุดท้าย)/2]ระยะเวลาให้อาหาร] × 100

อัตราการแลกเนื้อ (FCR, g feed/g gain) = น้ำหนักแห้งอาหารที่ปลากิน/น้ำปลาที่เพิ่มขึ้น

ประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากโปรตีน (PER, g gain/g protein) = น้ำหนักตัว/โปรตีนที่กิน

การทดลองที่ 2 สีของภาชนะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด

ปรับสภาพปลากัดในแก้วพลาสติกทรงกระบอกที่มีปริมาตรน้ำ 150 มิลลิลิตร (ปริมาตรน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัดตามการทดลองที่ 1) ควบคุมปัจจัยและสภาวะแวดล้อมเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 หลังจากนั้นนำปลาที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน (น้ำหนักเริ่มต้น 1.13 ± 0.01 กรัม) มาเลี้ยงเดี่ยวในตู้กระจกที่มีสีแตกต่างกัน 5 สี ได้แก่ สีใส สีขาว สีแดง สีน้ำเงิน และสีดำ ทำการทดลองทั้งหมด 15 ตัว/สี เลี้ยงนาน 2 เดือน ตลอดการเลี้ยงอุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วง 26.70–31.00 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.09–6.98 นอกจากนี้ การให้อาหาร แสง ปริมาตรน้ำที่ใช้เลี้ยง และการเปลี่ยนถ่ายน้ำทำเช่นเดียวกับการเลี้ยงปรับสภาพ เมื่อสิ้นสุดการทดลองให้ปลาอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเก็บข้อมูลและตัวอย่างเพื่อคำนวณการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากอาหาร วิเคราะห์สีผิวของปลา (n = 15) กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร (n = 5) คุณภาพของกล้ามเนื้อ (n = 5) และองค์ประกอบทางเคมีของซาก (n = 5) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

บทที่ 3

ผลการศึกษา

การทดลองที่ 1 ปริมาตรน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด

1. อัตราการรอด การเจริญเติบโต และการใช้ประโยชน์จากอาหาร

ปลาในทุกชุดการทดลองมีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำหนักเริ่มต้นที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) ขณะที่ปลาที่เลี้ยงในน้ำปริมาตร 150 มิลลิลิตร มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 300 มิลลิลิตร แต่ไม่แตกต่างจากปลาในกลุ่มอื่น ส่วนความยาวมาตรฐานมีค่าต่ำในปลาที่เลี้ยงด้วยปริมาตรน้ำ 100 มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 300 มิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม ดัชนีอวัยวะภายในมีค่าลดลงในปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 150 มิลลิลิตร ($P < 0.05$) สำหรับค่าคอนดิชันแฟกเตอร์มีค่าสูงที่สุดในปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 150 มิลลิลิตร แต่ไม่แตกต่างจากปริมาตรน้ำ 100 มิลลิลิตร สำหรับพารามิเตอร์การเจริญเติบโตอื่นๆ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

การใช้ประโยชน์จากอาหาร (อัตราการแลกเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้โปรตีน) ที่ดีพบในปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 150, 200 และ 250 มิลลิลิตร ขณะที่อัตราการกินอาหารไม่พบความแตกต่างกันระหว่างปลาที่เลี้ยงด้วยปริมาตรน้ำที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 1 อัตราการรอด การเจริญเติบโต และการใช้ประโยชน์จากอาหารของปลากัดที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำแตกต่างกัน

Parameter	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
Survival (%)	100	100	100	100	100
Initial weight (g)	0.97 ± 0.03	0.96 ± 0.03	0.97 ± 0.03	0.96 ± 0.03	0.97 ± 0.03
Final body weight (g)	1.06 ± 0.04	1.16 ± 0.03	1.09 ± 0.03	1.08 ± 0.04	1.10 ± 0.03
Weight gain (g)	0.24 ± 0.03^{ab}	0.31 ± 0.04^{a}	0.25 ± 0.02^{ab}	0.22 ± 0.04^{ab}	0.20 ± 0.04^{b}
Standard length (cm)	3.39 ± 0.04^{b}	3.48 ± 0.04^{ab}	3.52 ± 0.04^{ab}	3.49 ± 0.06^{ab}	3.54 ± 0.04^{a}
VSI (%)	6.36 ± 0.28^{a}	5.26 ± 0.24^{b}	6.37 ± 0.33^{a}	6.62 ± 0.28^{a}	7.12 ± 0.62^{a}
CF (g/cm^{3})	2.73 ± 0.04^{a}	2.80 ± 0.04^{a}	2.46 ± 0.04^{b}	2.47 ± 0.04^{b}	2.49 ± 0.04^{b}
SGR (% BW/day)	0.38 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.36 ± 0.04	0.37 ± 0.03	0.34 ± 0.03
FR (% BW/day)	1.17 ± 0.02	1.09 ± 0.02	1.10 ± 0.04	1.17 ± 0.05	1.15 ± 0.03
FCR (mg feed/mg gain)	2.65 ± 0.25^{ab}	2.28 ± 0.25^{b}	3.12 ± 0.28^{ab}	2.53 ± 0.16^{ab}	3.14 ± 0.48^{a}
PER (mg feed/mg protein)	1.22 ± 0.25^{b}	1.65 ± 0.25^{ab}	1.45 ± 0.28^{ab}	1.85 ± 0.16^{a}	1.48 ± 0.48^{ab}

VSI, ดัชนีอวัยวะภายใน; CF, คอนดิชันแฟกเตอร์; SGR, อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ; BW, น้ำหนักตัว; FR, อัตราการกิน; FCR, อัตราการแลกเนื้อ; PER, ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (n = 15)

ตัวยกที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2. กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหาร

กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารของปลากัดได้รับผลจากปริมาตรน้ำที่ใช้เลี้ยง ยกเว้น กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลส (ตารางที่ 2) โดยปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 100 มิลลิลิตร มีการลดลงของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน (เปปซิน ทริปซิน และไคโมทริปซิน) โดยที่กิจกรรมจำเพาะของเปปซินและไคโมทริปซินมีค่าไม่แตกต่างจากปลาที่เลี้ยงในปริมาตร 150, 200 และ 250 มิลลิลิตร ส่วนกิจกรรมจำเพาะของทริปซินของปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 100 มิลลิลิตร มีค่าไม่แตกต่างกับปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 200 และ 300 มิลลิลิตร ขณะที่อัตราส่วนของกิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสต่อทริปซิน (A/T) มีค่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาตรน้ำอื่นๆ สำหรับกิจกรรมจำเพาะของไลเปสพบว่ามีค่าต่ำที่สุดในปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 250 มิลลิลิตร แต่มีค่าไม่แตกต่างจากปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 100, 150 และ 200 มิลลิลิตร

ตารางที่ 2 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลากัดที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำแตกต่างกัน

Enzyme specific activity	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
Pepsin (U/mg protein)	24.77 ± 3.92^{b}	31.94 ± 1.60^{ab}	25.43 ± 1.90^{ab}	26.92 ± 1.67^{ab}	32.82 ± 1.76^{a}
Trypsin (U/mg protein)	51.52 ± 2.17^{b}	88.40 ± 6.45^{a}	54.39 ± 6.02^{b}	87.99 ± 8.18^{a}	74.91 ± 8.35^{b}
Chymotrypsin (U/mg protein)	18.07 ± 1.91^{b}	23.83 ± 2.39^{ab}	21.70 ± 1.88^{ab}	21.04 ± 1.38^{ab}	25.87 ± 1.12^{a}
Lipase (U/mg protein)	18.69 ± 2.47^{ab}	19.67 ± 1.94^{ab}	15.98 ± 1.30^{ab}	14.40 ± 2.16^{b}	22.91 ± 2.78^{a}
Amylase (mU/mg protein)	111.45 ± 6.34	107.96 ± 2.58	108.55 ± 6.35	107.24 ± 6.50	101.71 ± 1.41
A/T ratio ($\times 10^{-3}$)	2.27 ± 0.21^{a}	1.37 ± 0.13^{b}	1.70 ± 0.17^{b}	1.25 ± 0.17^{b}	1.25 ± 0.14^{b}

A/T ratio, อัตราส่วนของอะไมเลสต่อทริปซิน

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ($n = 15$)

ตัวยกที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3. คุณภาพกล้ามเนื้อ

3.1 ประสิทธิภาพการสังเคราะห์โปรตีน

ความเข้มข้นของ RNA ในกล้ามเนื้อมีค่าสูงที่สุดในปลากัดที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 200 มิลลิลิตร รองลงมาคือ ปริมาตรน้ำ 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3) ขณะที่ค่าต่ำที่สุดพบในปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 100 และ 300 มิลลิลิตร ส่วนปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 150 มิลลิลิตร มีความเข้มข้น RNA อยู่กึ่งกลางระหว่างปลาทั้ง 2 กลุ่ม สำหรับความเข้มข้นของโปรตีนในกล้ามเนื้อ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในปลาที่เลี้ยงในปริมาตร 100, 150 และ 200 มิลลิลิตร แต่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 250 และ 300 มิลลิลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม อัตราส่วน RNA/protein แสดงค่าผกผันกับความเข้มข้นของโปรตีน

3.2 สมบัติเชิงความร้อนของไมโอซินและแอกติน

ค่าเอนทัลปีของไมโอซินมีค่าสูงในปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 150, 200 และ 250 มิลลิลิตร (ตารางที่ 3) แต่ค่าเอนทัลปีของแอกตินและอัตราส่วนของแอกติน/ไมโอซินพบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างปลาที่เลี้ยงด้วยปริมาตรน้ำต่างๆ

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพการสังเคราะห์โปรตีน และสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและแอกตินในกล้ามเนื้อของปลากัดที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำแตกต่างกัน

Muscle parameter	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
RNA (μg/g)	1,177 ± 62^{c}	1,218 ± 86^{bc}	1,462 ± 46^{a}	1,418 ± 81^{ab}	1,106 ± 54^{c}
Protein (μg/g)	169.80 ± 4.35^{a}	178.55 ± 7.96^{a}	182.58 ± 8.41^{a}	137.81 ± 4.45^{b}	99.71 ± 5.52^{c}
RNA/protein ratio (μg/g)	7.01 ± 0.52^{c}	7.59 ± 0.69^{bc}	7.91 ± 0.25^{bc}	9.18 ± 0.70^{b}	12.13 ± 0.72^{a}
Δ Myosin (J/g)	0.69 ± 0.01^{bc}	0.85 ± 0.19^{ab}	1.56 ± 0.02^{a}	1.27 ± 0.41^{ab}	0.73 ± 0.01^{c}
Δ Actin (J/g)	0.33 ± 0.01	0.34 ± 0.06	0.35 ± 0.05	0.32 ± 0.00	0.24 ± 0.02
Δ Actin/Myosin	0.48 ± 0.02	0.37 ± 0.14	0.25 ± 0.01	0.28 ± 0.09	0.44 ± 0.00

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (n = 15)

ตัวยกที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4. ความเข้มของสีผิว

ความสว่างของสีผิวปลาไม่มีความแตกต่างกันระหว่างปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำแตกต่างกัน (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตาม พารามิเตอร์บ่งชี้ความแดงของผิว (a^* and a^*/b^*) พบว่าปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 150 มิลลิลิตร มีค่าดังกล่าวสูงที่สุด แต่ค่าความแดงพบว่าไม่แตกต่างจากปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 100 มิลลิลิตร สำหรับค่าความเหลืองแสดงค่าต่ำที่สุดในปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 300 มิลลิลิตร ขณะที่ปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำอื่นๆ ไม่พบความแตกต่างกันของค่าความเหลือง

ตารางที่ 4 สีผิวของปลากัดที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำแตกต่างกัน

Color parameter	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
L^*	18.61 ± 0.60	20.67 ± 0.67	18.61 ± 0.91	20.41 ± 0.46	20.56 ± 0.13
a^*	13.06 ± 0.47^{a}	12.17 ± 0.48^{a}	11.13 ± 0.49^{b}	11.04 ± 0.21^{b}	10.99 ± 0.40^{b}
b^*	7.87 ± 0.46^{a}	7.82 ± 0.61^{a}	8.36 ± 0.40^{a}	6.92 ± 0.24^{ab}	6.31 ± 0.34^{b}
a^*/b^*	1.28 ± 0.11^{b}	1.48 ± 0.05^{a}	1.10 ± 0.03^{c}	1.45 ± 0.03^{ab}	1.46 ± 0.03^{ab}

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (n = 15)

ตัวยกที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

5. องค์ประกอบทางเคมีของซาก

ปริมาตรน้ำที่แตกต่างกันไม่ส่งผลต่อปริมาณความชื้น โปรตีน และเถ้าในซาก (ตารางที่ 5) สำหรับปริมาณไขมันในซากมีค่าสูงที่สุดในปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 100 มิลลิลิตร รองลงมาคือปริมาตรน้ำ 150 มิลลิลิตร และมีค่าต่ำที่สุดในปลาที่เลี้ยงด้วยปริมาตรน้ำที่สูงขึ้น (200, 250 และ 300 มิลลิลิตร)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางเคมีในซากของปลากัดที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำแตกต่างกัน

Carcass composition	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
Moisture (% FW)	74.32 ± 0.57	73.36 ± 0.74	75.31 ± 0.82	73.93 ± 0.52	75.01 ± 0.54
Crude protein (% FW)	15.62 ± 0.35	14.99 ± 0.45	15.02 ± 0.50	15.86 ± 0.32	15.21 ± 0.33
Crude lipid (% FW)	3.27 ± 0.18^{a}	2.40 ± 0.13^{b}	1.26 ± 0.14^{c}	1.48 ± 0.16^{c}	1.60 ± 0.27^{c}
Crude ash (% FW)	3.33 ± 0.46	4.23 ± 0.34	4.13 ± 0.48	4.48 ± 0.30	3.33 ± 0.31

FW, น้ำหนักเปียก

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (n = 15)

ตัวยกที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การทดลองที่ 2 สีภาชนะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด

1. อัตราการรอด การเจริญเติบโต และการใช้ประโยชน์จากอาหาร

ปลาในทุกชุดการทดลองมีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำหนักเริ่มต้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6) ขณะที่ปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีดำมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์จากอาหารต่ำกว่าภาชนะสีอื่น ส่วนปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีน้ำเงินมีการเจริญเติบโตการใช้ประโยชน์จากอาหารที่ดี รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีแดง โดยปลาทั้งสองชุดทดลองมีอัตราการกินและอัตราการแลกเนื้อต่ำ ขณะที่มีค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสูง สำหรับดัชนีอวัยวะภายในและคอนดิชันแฟกเตอร์พบว่ามีค่าสูงสุดในปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีขาวและสีน้ำเงินหรือสีดำ ตามลำดับ

ตารางที่ 6 อัตราการรอด การเจริญเติบโต และการใช้ประโยชน์จากอาหารของปลากัดที่เลี้ยงในภาชนะสีแตกต่างกัน

Parameter	Background color				
	Transparent	White	Red	Blue	Black
Survival (%)	100	100	100	100	100
Initial weight (g)	1.13 ± 0.04	1.14 ± 0.04	1.14 ± 0.04	1.14 ± 0.04	1.10 ± 0.05
Final body weight (g)	1.89 ± 0.06^{ab}	1.92 ± 0.05^{ab}	1.96 ± 0.05^{a}	2.06 ± 0.06^{a}	1.77 ± 0.06^{b}
Weight gain (g)	0.72 ± 0.06^{b}	0.71 ± 0.05^{b}	0.80 ± 0.05^{ab}	0.90 ± 0.05^{a}	0.67 ± 0.05^{b}
Standard length (cm)	4.03 ± 0.07^{a}	4.03 ± 0.04^{a}	4.00 ± 0.04^{a}	4.02 ± 0.04^{a}	3.54 ± 0.08^{b}
VSI (%)	6.37 ± 0.28^{b}	9.82 ± 0.24^{a}	6.87 ± 0.33^{b}	7.30 ± 0.28^{b}	7.76 ± 0.62^{b}
CF (g/cm^3)	0.50 ± 0.03^{b}	0.54 ± 0.02^{b}	0.58 ± 0.03^{b}	0.71 ± 0.03^{a}	0.69 ± 0.03^{a}
SGR (% BW/day)	0.88 ± 0.05^{a}	0.88 ± 0.05^{a}	0.86 ± 0.05^{a}	0.97 ± 0.04^{a}	0.69 ± 0.03^{b}
FR (% BW/day)	1.58 ± 0.02^{b}	1.85 ± 0.08^{a}	1.49 ± 0.02^{bc}	1.42 ± 0.02^{c}	1.46 ± 0.03^{c}
FCR (mg feed/mg gain)	1.87 ± 0.11^{b}	1.83 ± 0.04^{b}	1.50 ± 0.06^{c}	1.60 ± 0.06^{bc}	2.67 ± 0.16^{a}
PER (mg feed/mg protein)	1.37 ± 0.11^{b}	1.39 ± 0.10^{b}	1.71 ± 0.12^{a}	1.83 ± 0.07^{a}	1.11 ± 0.07^{b}

VSI, ดัชนีอวัยวะภายใน; CF, คอนดิชันแฟกเตอร์; SGR, อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ; BW, น้ำหนักตัว; FR, อัตราการกิน; FCR, อัตราการแลกเนื้อ; PER, ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (n = 15)

ตัวยกที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2. กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหาร

สีภาชนะส่งผลต่อกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารของปลากัด ยกเว้นกิจกรรมจำเพาะของไคโมทริปซิน (ตารางที่ 7) โดยกิจกรรมจำเพาะของเปปซินของปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีดำมีค่าสูงกว่าสีแดง ส่วนสีที่เหลือมีค่าอยู่ระหว่างสีดังกล่าว สำหรับปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีขาว พบว่ากิจกรรมจำเพาะของทริปซิน ไลเปส และอะไมเลสสูงที่สุด โดยที่กิจกรรมจำเพาะของทริปซินไม่แตกต่างจากปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีใส ขณะที่ปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีอื่นๆ มีกิจกรรมของเอนไซม์ (ทริปซิน และไลเปส) ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นกิจกรรมของอะไมเลสในปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีใสมีค่าต่ำกว่าปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีดำ ขณะที่ปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีแดงและสีน้ำเงินมีค่าอยู่ระหว่างสองชุดทดลองดังกล่าว สำหรับอัตราส่วนของอะไมเลสต่อทริปซิน (A/T) พบว่าปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีน้ำเงินมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับภาชนะสีใสและสีแดง

ตารางที่ 7 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลากัดที่เลี้ยงในภาชนะสีแตกต่างกัน

Enzyme specific activity	Background color				
	Transparent	White	Red	Blue	Black
Pepsin (U/mg protein)	13.85 ± 0.45^{ab}	11.31 ± 1.17^{ab}	8.69 ± 2.58^{b}	14.28 ± 1.14^{ab}	16.19 ± 2.43^{a}
Trypsin (U/mg protein)	15.57 ± 1.78^{ab}	17.00 ± 0.70^{a}	12.67 ± 0.94^{b}	12.68 ± 1.36^{b}	12.86 ± 1.18^{b}
Chymotrypsin (U/mg protein)	30.20 ± 0.40	31.20 ± 2.60	32.65 ± 1.24	28.52 ± 2.54	32.54 ± 2.85
Lipase (U/mg protein)	1.45 ± 0.07^{b}	2.27 ± 0.12^{a}	1.67 ± 0.06^{b}	1.77 ± 0.12^{b}	1.51 ± 0.08^{b}
Amylase (mU/mg protein)	1.78 ± 0.08^{c}	3.03 ± 0.11^{a}	2.12 ± 0.57^{bc}	2.06 ± 0.04^{bc}	2.39 ± 0.15^{b}
A/T ratio ($\times 10^{-4}$)	0.13 ± 0.01^{b}	0.16 ± 0.01^{ab}	0.14 ± 0.01^{b}	0.19 ± 0.04^{a}	0.16 ± 0.01^{ab}

A/T, อัตราส่วนของอะไมเลสต่อทริปซิน

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ($n = 15$)

ตัวยกที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3. คุณภาพกล้ามเนื้อ

3.1 ประสิทธิภาพการสังเคราะห์โปรตีน

ความเข้มข้นของ RNA และอัตราส่วนของ RNA/protein มีค่าต่ำสุดในปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีดำ แต่อัตราส่วนของ RNA/protein มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับภาชนะสีน้ำเงิน (ตารางที่ 8) ขณะที่ความเข้มข้นของโปรตีนแสดงค่าผกผันกับความเข้มข้นของ RNA และอัตราส่วนของ RNA/protein ในทุกชุดการทดลอง โดยปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีใส สีขาว สีแดง และสีน้ำเงินมีค่าที่ไม่แตกต่างกันทุกพารามิเตอร์

3.2 สมบัติเชิงความร้อนของไมโอซินและแอกติน

ค่าเอนทัลปีของไมโอซินและแอกตินของกล้ามเนื้อไม่มีความแตกต่างกันระหว่างปลาที่เลี้ยงในภาชนะทั้ง 5 สี (ตารางที่ 8) สำหรับอัตราส่วนของแอกติน/ไมโอซินมีค่าสูงที่สุดในปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีน้ำเงิน รองลงมาคือภาชนะสีขาว สำหรับปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีใสและสีดำพบว่ามีค่าอัตราส่วนดังกล่าวอยู่ในช่วงระหว่างภาชนะสีขาวและสีแดง

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพการสังเคราะห์โปรตีน และสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและแอกตินในกล้ามเนื้อของปลากัดที่เลี้ยงในภาชนะสีแตกต่างกัน

Muscle parameter	Background color				
	Transparent	White	Red	Blue	Black
RNA (μg/g)	1,387 ± 119^{a}	1,504 ± 99^{a}	1,302 ± 161^{a}	1,432 ± 83^{a}	861 ± 75^{b}
Protein (μg/g)	260.12 ± 22.67^{b}	281.31 ± 12.57^{b}	298.57 ± 24.78^{b}	280.91 ± 19.14^{b}	385.60 ± 32.01^{a}
RNA/protein ratio (μg/g)	4.89 ± 0.49^{a}	5.31 ± 0.40^{a}	4.99 ± 0.24^{a}	4.12 ± 0.60^{ab}	2.31 ± 0.27^{b}
Δ Myosin (J/g)	0.44 ± 0.01	0.39 ± 0.04	0.53 ± 0.02	0.37 ± 0.05	0.40 ± 0.11
Δ Actin (J/g)	0.35 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.38 ± 0.03
Δ Actin/ Myosin	0.81 ± 0.06^{bc}	0.89 ± 0.01^{b}	0.67 ± 0.06^{c}	1.13 ± 0.01^{a}	0.74 ± 0.07^{bc}

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (n = 15)

ตัวยกที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4. ความเข้มของสีผิว

ค่าความสว่างและค่าความเหลืองของปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีดำแสดงค่าต่ำกว่าปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีแดงและสีขาว ตามลำดับ แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น (ตารางที่ 9) สำหรับพารามิเตอร์ค่าความแดง (a^* และ a^*/b^*) ของผิวพบว่าปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีน้ำเงินมีอัตราส่วนของ a^*/b^* สูงกว่าภาชนะสีแดง ขณะที่การเลี้ยงในภาชนะสีอื่นๆ พบว่าค่าความแดงที่ได้ไม่แตกต่างจากปลา 2 กลุ่มข้างต้น

ตารางที่ 9 สีผิวของปลากัดที่เลี้ยงในภาชนะสีแตกต่างกัน

Color parameter	Background color				
	Transparent	White	Red	Blue	Black
L^*	23.17 ± 0.60^{ab}	23.66 ± 0.64^{ab}	22.88 ± 0.67^{a}	24.38 ± 0.39^{ab}	24.83 ± 0.43^{b}
a^*	11.79 ± 0.51	11.69 ± 0.33	11.98 ± 0.33	12.25 ± 0.36	11.91 ± 0.44
b^*	5.68 ± 0.52^{b}	7.06 ± 0.52^{a}	6.02 ± 0.31^{ab}	6.03 ± 0.23^{ab}	5.83 ± 0.19^{b}
a^*/b^*	1.88 ± 0.06^{ab}	1.88 ± 0.10^{ab}	1.74 ± 0.07^{b}	2.11 ± 0.07^{a}	1.97 ± 0.06^{ab}

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ($n = 15$)

ตัวยกที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

5. องค์ประกอบทางเคมีของซาก

สีภาชนะที่แตกต่างกันไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณเถ้าในซาก (ตารางที่ 10) ปริมาณความชื้นมีค่าลดลงในปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีน้ำเงินเมื่อเปรียบเทียบกับภาชนะสีใส ปริมาณโปรตีนที่พบในปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีขาวและสีแดงมีค่าสูงกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีดำ แต่ปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะทุกสีมีปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างจากภาชนะสีใส สำหรับปริมาณไขมันพบว่ามีค่าสูงที่สุดในปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีน้ำเงิน รองลงมาคือภาชนะสีแดง ขณะที่การเลี้ยงในภาชนะสีใส สีขาว และสีดำพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 10 องค์ประกอบทางเคมีในซากของปลากัดที่เลี้ยงในภาชนะสีแตกต่างกัน

Carcass composition	Background color				
	Transparent	White	Red	Blue	Black
Moisture (% FW)	73.05 ± 0.57[a]	71.98 ± 0.95[ab]	72.05 ± 0.63[ab]	70.43 ± 0.82[b]	72.85 ± 0.47[a]
Crude protein (% FW)	16.26 ± 0.33[ab]	17.08 ± 0.34[a]	16.88 ± 0.15[a]	16.71 ± 0.46[ab]	15.72 ± 0.27[b]
Crude lipid (% FW)	2.99 ± 0.33[c]	3.47 ± 0.32[bc]	4.45 ± 0.29[b]	5.77 ± 0.24[a]	3.92 ± 0.48[bc]
Crude ash (% FW)	5.07 ± 0.27	5.22 ± 0.14	5.13 ± 0.12	4.92 ± 0.42	5.26 ± 0.15

FW, น้ำหนักเปียก

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (n = 15)

ตัวยกที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

บทที่ 4

บทวิจารณ์

การทดลองที่ 1 ปริมาตรน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด

ความหนาแน่นเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของปลา (Jha and Barat 2005; Sanchez *et al*., 2010; Niazie *et al*., 2013) เนื่องจากความหนาแน่นจะส่งผลให้เกิดการแย่งชิงอาหาร ซึ่งจะไปลดการเจริญเติบโตของปลา โดยน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นมีค่าต่ำเมื่อเลี้ยงที่ความหนาแน่นสูง (Stickney, 1994) การศึกษาครั้งนี้พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลากัดไม่ได้รับผลกระทบจากปริมาตรน้ำที่แตกต่างกัน ซึ่งคล้ายคลึงกับการรายงานของ James and Sampath (2006) สำหรับการลดลงของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำสูงอาจเกี่ยวข้องกับการว่ายน้ำที่เพิ่มขึ้น (Karakatsouli *et al*., 2010) รวมทั้งการที่ปลากัดตัวผู้มีการสร้างหวอด ทำให้พลังงานสำหรับการเจริญเติบโตลดลง นอกจากนี้ ปริมาตรน้ำที่แตกต่างกันในการศึกษาครั้งนี้ยังส่งผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงของความลึกซึ่งเกี่ยวข้องกับความดันของน้ำและค่าแรงโน้มถ่วงที่มีผลต่อการใช้พลังงานเช่นกัน สำหรับปริมาตรน้ำ 100 มิลลิลิตร พบว่าปลามีค่าความยาวมาตรฐานที่ต่ำ แสดงว่าปลามีการเจริญเติบโตของกระดูก (skeletal growth) ในด้านความยาวลดลง และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางสัณฐานวิทยาพบว่ามีเพียงค่าคอนดิชันแฟกเตอร์ที่ได้รับอิทธิพลจากปริมาตรน้ำ โดยค่าคอนดิชันแฟกเตอร์มีค่าค่อนข้างสูงในการศึกษานี้ เนื่องจากคำนวณค่าจากน้ำหนักตัวต่อความยาวมาตรฐาน ซึ่งจะช่วยลดความแปรปรวนจากความยาวของครีบ โดย Lambert and Dutil (2001) รายงานว่าความหนาแน่นที่สูงขึ้นส่งผลกระทบเชิงลบต่อค่าคอนดิชันแฟกเตอร์ในปลาค็อดแอตแลนติกซึ่งขัดแย้งกับผลการศึกษาในครั้งนี้ โดยการเลี้ยงปลากัดแบบเดี่ยวอาจทำให้ปฏิสัมพันธ์ระหว่างปลาด้วยกันลดลง อย่างไรก็ตาม ค่าคอนดิชันแฟกเตอร์ที่ใกล้เคียงกันพบว่ามีการรายงานในปลาหลายชนิดที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่นแตกต่างกัน (Saoud *et al*., 2007; Tolussi *et al*., 2010) นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงของค่าคอนดิชันแฟกเตอร์และดัชนีอวัยวะภายในเกี่ยวข้องกับการสะสมพลังงานของร่างกาย (Goede and Barton, 1990) การเพิ่มขึ้นของค่าคอนดิชันแฟกเตอร์และดัชนีอวัยวะภายในของปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำน้อยที่สุดอาจเป็นผลมาจากการ

สะสมพลังงานและการเจริญเติบโตของอวัยวะภายใน ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตต่ำลง (Lui *et al*., 2016)

ผลการเจริญเติบโตแสดงให้เห็นว่าปริมาตรน้ำที่น้อยที่สุดสำหรับการเลี้ยงปลากัดตัวผู้สีแดง คือ 150 มิลลิลิตร ที่มีระดับน้ำลึก 5.36 เซนติเมตร สอดคล้องกับช่วงความลึกที่ปลากัดอาศัยในแหล่งธรรมชาติซึ่งอยู่ในช่วง 2–9 เซนติเมตร (Jaroensutasinee and Jaroensutassinee, 2001) นอกจากนี้ ปริมาตรน้ำดังกล่าวยังต่ำกว่าปริมาตรน้ำที่ใช้ภายในฟาร์ม (250 มิลลิลิตร) และต่ำกว่าปริมาตรน้ำที่รายงานในการศึกษาก่อนหน้านี้ เช่น 250 มิลลิลิตร (Verbeek *et al*., 2008) 1,000 มิลลิลิตร (Takeuchi *et al*., 2010) และ 2,000 มิลลิลิตร (Karino and Someya, 2007) เป็นต้น การลดลงของปริมาตรที่ใช้เลี้ยงปลานอกจากช่วยเพิ่มคุณภาพของปลากัดแล้วอาจจะช่วยลดต้นทุนจากการจัดการและการใช้น้ำ (ต้นทุนผันแปรในการเลี้ยงปลากัด)

การใช้อาหาร (อัตราการกิน อัตราการแลกเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้โปรตีน) ที่ดีที่สุดพบในปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 150 มิลลิลิตร ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน (เปปซิน ทริปซิน และไคโมทริปซิน) และเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากปลากัดเป็นปลากินเนื้อ การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนเป็นการบ่งบอกถึงเปลี่ยนแปลงการย่อยและการใช้โปรตีนจากอาหาร (Chakrabarti *et al*., 1995) เช่นเดียวกับกิจกรรมของไลเปสที่บ่งชี้ถึงความสามารถในการย่อยลิพิด ขณะที่น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญสำหรับเนื้อเยื่อต่างๆ (Romijn *et al*., 1990) การรักษาระดับของอะไมเลสเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเผาผลาญพลังงาน ข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับการรายงานในปลา turbot ที่เลี้ยงในความหนาแน่นที่แตกต่างกัน 4 ระดับ (Li *et al*., 2013) อย่างไรก็ตาม พฤติกรรมการกินอาหารจะบ่งบอกด้วยอัตราส่วนของอะไมเลส/ทริปซิน (Hofer and Schiemer, 1981) ในการศึกษานี้พบว่าอัตราส่วนดังกล่าวได้รับอิทธิพลจากปริมาตรน้ำ โดยปลาที่เลี้ยงด้วยน้ำ 100 มิลลิลิตร มีความต้องการใช้พลังงานเพิ่มสูงขึ้น ทำให้มีการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าโปรตีน

การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นโปรตีนในกล้ามเนื้อในช่วงเจริญเติบโตพบในปลาเรนโบว์เทร้าต์ (Rungruangsak-Torrissen *et al*., 2009) ขณะที่ปลาแซลมอนแอตแลนติกมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสัมพันธ์ในเชิงลบกับความเข้มข้นของ RNA และอัตราส่วนของ RNA/protein ในกล้ามเนื้อ (Sunde *et al*., 2001) เช่นเดียวกับการศึกษาในปลากัด ซึ่งปลากัดตัวผู้จะมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าปลากัดตัวเมีย ทำให้ปลากัดตัวผู้มีความเข้มข้นของ RNA (การสังเคราะห์โปรตีน) และอัตราส่วนของ RNA/protein (การหมุนเวียนของโปรตีน) ต่ำกว่าปลากัดตัวเมีย

(Thongprajukaew *et al*., 2013b) ดังนั้น การลดความสามารถในการสังเคราะห์โปรตีนและอัตราการหมุนเวียนของโปรตีน ในขณะที่ความเข้มข้นของโปรตีนไม่มีการเปลี่ยนแปลงแสดงให้เห็นว่าปลายังมีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องภายใต้สภาวะควบคุม เช่น ปลากัดที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 150 มิลลิลิตร

ค่าเอนทัลปีสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนที่อยู่ในสภาพเดิมและอาจเกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานทางสรีรวิทยาของปลา (Thongprajukaew *et al*., 2015) ไมโอไฟบริลลาโปรตีน (myofibrillar protein) เป็นส่วนประกอบหลักของกล้ามเนื้อปลา (39–56 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาเป็นซาร์โคพลาสมิกโปรตีน (sarcoplasmic protein) (21–25 เปอร์เซ็นต์) และที่เหลือเป็นส่วนของสโตรมาโปรตีน (stroma protein) หรือโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (6–21 เปอร์เซ็นต์) (Chaijan *et al*., 2010) โดยไมโอซินเป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากถึง 50–60 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดในกล้ามเนื้อ (Shahidi, 1994) ค่าเอนทัลปีของไมโอซินที่เพิ่มขึ้นในปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 150, 200 และ 250 มิลลิลิตร อาจเป็นการบ่งบอกถึงปริมาณไมโอซินในกล้ามเนื้อที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Coughlin *et al*. (2016) ว่าสภาวะในการเลี้ยงส่งผลโดยตรงต่อการแสดงออกของไมโอซิน ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมรรถภาพในการว่ายน้ำและคุณสมบัติการหดตัวของกล้ามเนื้อ อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างระหว่างค่าเอนทัลปีของแอกตินระหว่างปลาทั้ง 5 กลุ่มในการศึกษาครั้งนี้

สีผิวเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อมูลค่าทางเศรษฐกิจของปลากัด สำหรับสีแดงของปลากัดถูกควบคุมโดยแคโรทีนอยด์ และปลากัดสีแดงจะถูกเลือกเพื่อจับคู่มากกว่าปลากัดสีน้ำเงิน ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบทางเพศจากอิทธิพลของสี (Clotfelter *et al*., 2007) นอกจากนี้ ปลากัดตัวเมียจะเลือกจับคู่กับปลาตัวผู้ที่มีสีเข้มมากกว่าสีซีดในกลุ่มปลาที่มีฟีโนไทป์เหมือนกัน (Blakeslee *et al*., 2009) การศึกษาในครั้งนี้พบว่าค่าความแดงของสีผิว (a^* และ a^*/b^*) มีค่าสูงที่สุดในปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 150 มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าปริมาตรน้ำดังกล่าวช่วยรักษาความแดงของปลากัดซึ่งเป็นลักษณะที่ดีของปลาสวยงาม รวมทั้งข้อได้เปรียบทางเพศ การศึกษาในปลา Arctic charr พบว่าความหนาแน่นในการเลี้ยงส่งผลต่อการสะสมแคโรทีนอยด์ โดยปลาที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 50 กิโลกรัม/ลูกบาศก์เมตร มีการสะสมแคโรทีนอยด์สูงกว่าปลาที่เลี้ยงในความหนาแน่น 40 และ 75 กิโลกรัม/ลูกบาศก์เมตร (Metusalach *et al*., 1997) เช่นเดียวกับการศึกษาในปลา darkbarbel catfish (Zeng *et al*., 2010) และปลาเรนโบว์เทร้าต์ (Cagiltay *et al*., 2015) การตอบสนองเหล่านี้คล้ายคลึงกับข้อสังเกตจากการศึกษานี้ โดยที่สารสีในอาหารและอัตราการให้อาหารในการศึกษาครั้งนี้ถูก

ควบคุมให้เป็นแบบเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ความเครียดเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อสีผิวมากกว่าแคโรทีนอยด์ในอาหาร แม้ว่าแคโรทีนอยด์จะเป็นสารสีที่มีความสำคัญต่อการเกิดสีแดงของผิวของปลากัด (Metusalach *et al*., 1997; Clotfelter *et al*., 2007) ความแปรผันของความแดงอาจเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อม เช่น ปริมาตรน้ำ ซึ่งส่งผลต่อการทำงานของโครมาโทฟอร์ (Kelsh, 2004)

การศึกษาก่อนหน้านี้ได้รายงานถึงผลของความหนาแน่นในการเลี้ยงต่อองค์ประกอบทางเคมีของซากที่แตกต่างกัน (Toko *et al*., 2007; Osofero *et al*., 2009; Karakatsouli *et al*., 2010) การศึกษาครั้งนี้พบว่าไม่มีความแตกต่างของปริมาณความชื้น โปรตีน และเถ้าระหว่างปลาทั้ง 5 กลุ่มที่ทำการศึกษา แสดงให้เห็นว่าปลากัดสามารถรักษาองค์ประกอบทางเคมีให้คงเดิมแม้มีการปรับปริมาตรน้ำให้ต่างกัน ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับปลาเรนโบว์เทร้าต์ที่องค์ประกอบทางเคมี (ความชื้น โปรตีน เถ้า และไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรก) ของซากไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Cretu *et al*., 2014) การสะสมของไขมันสูงขึ้นในปลาที่เลี้ยงด้วยปริมาตรที่ต่ำกว่า 200 มิลลิลิตร โดยปริมาณไขมันสูงที่สุดในปลาที่เลี้ยงในปริมาตร 100 มิลลิลิตร อาจเกิดจากการว่ายน้ำที่ลดลง ทำให้มีการใช้พลังงานจากการเผาผลาญไขมันลดลง (Karakatsouli *et al*., 2010) สอดคล้องกับปริมาณของไขมันในปลา African catfish (*Clarias gariepinus*) และปลา vundu catfish (*Heterobranchus longifilis*) เมื่อความหนาแน่นในการเลี้ยงสูงขึ้น (Toko *et al*., 2007)

การทดลองที่ 2 สีภาชนะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด

ปลาแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อสีภาชนะที่แตกต่างกัน และพบว่าสีภาชนะส่งผลต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์จากอาหารของปลาหลายชนิด (Papoutsoglou *et al*., 2000; Karakatsouli *et al*., 2007; McLean *et al*., 2008) ในการศึกษาครั้งนี้การเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์จากอาหารของปลากัดที่ดีที่สุดพบในปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีน้ำเงิน ขณะที่ภาชนะสีดำส่งผลกระทบเชิงลบเมื่อเปรียบเทียบกับสีของภาชนะในชุดควบคุม (สีใส) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการรายงานในปลา white sea beam (*Diplodus sargus*) เมื่อเลี้ยงด้วยภาชนะสีน้ำเงิน (Karakatsouli *et al*., 2007) หรือปลา scaled carp (Papoutsoglou *et al*., 2000) และ Eurasian perura (Tamazouzt *et al*., 2000) เมื่อเลี้ยงด้วยภาชนะสีดำ การศึกษาครั้งนี้พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลากัดจากทั้ง 5 กลุ่มอยู่ในช่วงที่รายงานโดย James and Sampath (2006) สำหรับค่าคอนดิชันแฟกเตอร์และดัชนีอวัยวะภายในจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการสะสมพลังงานของร่างกาย

และการเจริญเติบโตของอวัยวะภายใน (Goede and Barton, 1990) การเพิ่มขึ้นของทั้งสองพารามิเตอร์นี้ในปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีดำและสีขาว ตามลำดับ อาจเกิดจากการสะสมพลังงานของอวัยวะภายใน (Lui *et al*., 2016) ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงมวลของอวัยวะภายในและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของร่างกาย

การใช้ประโยชน์จากอาหารได้รับผลกระทบจากสีภาชนะที่ใช้เลี้ยง โดยปลากัดที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีขาวมีอัตราการกินสูงที่สุดซึ่งอาจเกิดจากสีของอาหารที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (สีแดง สีเขียว และสีดำ) ที่มีสีแตกต่างจากสีภาชนะ ทำให้มีการมองเห็นและการกินอาหารที่ดีขึ้น ความแตกต่างของสีอาหารกับสีภาชนะช่วยให้ปลากินอาหารได้ดีขึ้น ซึ่งมีการรายงานในการศึกษาก่อนหน้านี้จำนวนมาก (Dowing and Litvak, 1999; Papoutsoglou *et al*., 2000; El-Sayed and El-Ghobashy, 2011) ขณะที่ปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีแดง สีน้ำเงิน หรือสีดำ มีอัตราการกินอาหารต่ำเนื่องจากสีภาชนะเหล่านี้มีสีเหมือนหรือคล้ายกับ 1 ใน 3 ของสีอาหาร อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงปลาวัยอ่อนบางชนิดด้วยภาชนะสีดำและให้อาหารมีชีวิต (โรติเฟอร์ และอาร์ทีเมีย) พบว่าสามารถเพิ่มการเข้าถึงอาหารได้มากขึ้น (Hinshaw, 1986; Martin-Robichaud and Peterson, 1998) การแสดงผลข้างต้นที่แตกต่างกันอาจเกิดจากสีของน้ำ สีภาชนะ หรือสีของอาหาร การศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีน้ำเงินมีอัตราการกินต่ำ รวมทั้งการเลี้ยงด้วยภาชนะสีแดง แต่ผลการศึกษาดังกล่าวไม่ได้แสดงผลเชิงลบ เนื่องจากปลาทั้งสองกลุ่มมีการใช้ประโยชน์จากอาหาร (อัตราการแลกเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้โปรตีน) ที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอีก 3 กลุ่มที่ทำการศึกษา ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงปลากัดตัวผู้สีแดงด้วยภาชนะสีน้ำเงินช่วยให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นและลดการกินอาหาร ซึ่งเกิดจากสภาวะทางโภชนาการที่เหมาะสมที่สามารถลดปริมาณอาหารที่กินและเพิ่มน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นได้ (Wattanakul *et al*., 2017) การตอบสนองดังกล่าวของปลากัดเป็นสิ่งที่ดีสำหรับการเลี้ยงเชิงพาณิชย์

ความรู้ในส่วนของผลกระทบจากสีภาชนะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารยังมีอยู่จำกัด การเพิ่มกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีขาว แสดงให้เห็นว่าปลากลุ่มดังกล่าวผลิตเอนไซม์ย่อยอาหารปริมาณมากเพื่อย่อยอาหารที่กินเข้าไป ภาชนะสีขาวช่วยให้ปลากินอาหารได้ดีขึ้นเนื่องจากมีการสะท้อนและความสว่างของแสงมาก ทำให้ปลามองเห็นอาหารและเคลื่อนที่เข้าหาอาหารได้ดี (Hayd *et al*., 2010) ขณะที่อัตราการแลกเนื้อและประสิทธิภาพการใช้โปรตีนมีค่าสูงและต่ำกว่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับภาชนะสีน้ำเงิน ดังนั้น อัตราการกินที่มีค่าสูงอาจไม่สามารถบ่งชี้ถึงสภาวะการเลี้ยงที่ดีในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานใน

Amazon river prawn (*Macrobrachium amazonicum*) (Maciel and Valenti, 2014) สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ต่ำในปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีแดงและสีน้ำเงินอาจเป็นเพราะมีการเก็บสะสมพลังงานเนื่องจากความต้องการด้านโภชนาการนั้นเพียงพอต่อความต้องการ ขณะที่อัตราส่วนของอะไมเลสต่อทริปซินเป็นตัวบ่งชี้ลักษณะการกินอาหารของปลา (Hofer and Schiemer, 1981; Thongprajukaew *et al*., 2011) การแสดงค่าดังกล่าวที่สูงกว่าปลาจากกลุ่มอื่นของปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีน้ำเงิน รวมทั้งกิจกรรมของอะไมเลสที่สูงกว่าเอนไซม์ย่อยอาหารอื่นๆ ที่ทำการศึกษาแสดงให้เห็นว่าปลากัดมีความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตสูงกว่าโปรตีน ดังนั้น การเพิ่มสัดส่วนของคาร์โบไฮเดรตในอาหารสำเร็จรูปสำหรับปลากัดอาจทำได้ด้วยการเลี้ยงในภาชนะสีน้ำเงิน

ความเข้มข้นของ RNA สะท้อนถึงอัตราการเจริญเติบโตของปลา herring (*Clupea harengus*) วัยอ่อน (Mathers *et al*., 1994) การสังเคราะห์โปรตีน (ความเข้มข้นของ RNA) และอัตราการหมุนเวียนของโปรตีน (อัตราส่วนของ RNA/protein) ในปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีขาว สีแดง และสีน้ำเงินในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าปลาอยู่ช่วงกำลังเจริญเติบโต ความเข้มข้นของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีดำแสดงว่าสีภาชนะดังกล่าวไม่เหมาะสม เนื่องจากมีการเจริญเติบโตและความสามารถในการสังเคราะห์โปรตีนต่ำ สำหรับปริมาณโปรตีนสามารถตรวจสอบด้วยค่าเอนทัลปี (Matos *et al*., 2011) โดยโปรตีนไมโอซินและแอกตินทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนไหวของปลา (Thongprajukaew *et al*., 2015) Coughlin *et al*. (2016) รายงานว่าสภาวะการเลี้ยงส่งผลโดยตรงต่อการแสดงออกของไมโอซิน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมรรถภาพในการว่ายน้ำและคุณสมบัติการหดตัวของกล้ามเนื้อ แต่การศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าเอนทัลปีของไมโอซินและแอกตินไม่ได้รับผลกระทบจากสีภาชนะ นอกจากนี้ การเคลื่อนไหวทำให้โปรตีนไมโอซินในกล้ามเนื้อเสียสภาพได้ (Matos *et al*., 2011) ดังนั้น อัตราส่วนของแอกติน/ไมโอซินที่สูงขึ้นของปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีน้ำเงินแสดงให้เห็นว่าภาชนะดังกล่าวทำให้การเสียสภาพของโปรตีนไมโอซินลดลง ผลกระทบจากการเคลื่อนไหวและความเครียดเนื่องจากสีของภาชนะควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มสวัสดิภาพในการเลี้ยงปลาชนิดนี้

สีภาชนะอาจทำให้ปลามีสีผิวคล้ำขึ้นหรืออ่อนลง ซึ่งเป็นผลมาจากการกระจายตัวและความเข้มข้นของเม็ดสีในเมลาโนฟอร์บนผิว (Szisch *et al*., 2002; Rotllant *et al*., 2003) สีผิวมีความสำคัญต่อการเกี้ยวพาราสีและการเลือกคู่ของปลากัด เนื่องจากปลากัดตัวเมียมักจะเลือกจับคู่กับปลาตัวผู้ที่มีสีแดงเข้มมากกว่าสีแดงอ่อน (Blakeslee *et al*., 2009) นอกจากนี้สีผิวยังส่งผลต่อ

ความพึงพอใจและมูลค่าทางเศรษฐกิจของตัวปลา โดยเฉพาะปลากัดตัวผู้ซึ่งได้รับความนิยม สำหรับการศึกษาครั้งนี้พบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีขาวและสีน้ำเงินมีความเหมาะสมสำหรับการปรับปรุงสีผิว เนื่องจากค่าความสว่างและค่าความแดงของผิว (*a** และ *a**/*b**) ของปลาทั้งสองกลุ่มคล้ายกับปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีใส ขณะที่ ภาชนะสีแดงและสีดำส่งผลเสียต่อสีผิวของปลากัด ผลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสีของภาชนะในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ส่งเสริมให้สีผิวของปลากัดดีขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีใส (ชุดควบคุม) มีพฤติกรรมรุกราน ซึ่งช่วยเพิ่มการตอบสนองทางสรีรวิทยาของโครมาโทฟอร์ จึงทำให้สีผิวค่อนข้างเข้ม สำหรับการลดลงของความสว่างเมื่อเลี้ยงปลาด้วยภาชนะสีดำ อาจเกิดจากการกระจายตัวของเม็ดสีในเมลาโนฟอร์ในชั้นผิวซึ่งเกิดจากการหลั่งของฮอร์โมนแอลฟา-เมลาโนไซท์-สติมูเลติง (Baker *et al*., 1984; Szisch *et al*., 2002 Rotllant *et. al*., 2003) ขณะที่การลดลงของอัตราส่วน *a**/*b** ในปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีแดงอาจเกิดจากการปรับตัวของปลากับสิ่งแวดล้อมรอบตัว ซึ่งการตอบสนองต่อสีภาชนะของปลามีความจำเพาะในแต่ละสายพันธุ์

การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของซากเนื่องจากสีของภาชนะมีรายงานในปลาหลายชนิด เช่น การศึกษาในปลา scaled carp ซึ่งไม่พบความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีของซากจากสีภาชนะที่แตกต่างกัน (สีดำ สีขาว และสีเขียว) (Papoutsoglou *et al*., 2000) หรือปลาเบลูก้า (*Huso huso*) ที่เลี้ยงในภาชนะสีดำ สีขาว สีเขียว สีแดง และสีน้ำเงิน (Banan *et al*., 2011) ขณะที่การศึกษาใน thinlip mullet (*Liza ramada*) แสดงผลในทางกลับกันเมื่อเลี้ยงด้วยภาชนะสีดำ สีขาว สีเขียว สีแดง สีเหลือง และสีน้ำเงิน (El-Sayed and El-Ghobashy, 2011) การศึกษาในครั้งนี้พบว่าการสะสมของไขมันมีค่าสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงด้วยภาชนะสีน้ำเงิน ขณะที่ปริมาณความชื้นแสดงค่าที่ตรงข้ามกับไขมันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานใน Caspian Kutum (*Rtilus frisii*) เมื่อเลี้ยงด้วยภาชนะสีเหลืองเมื่อเปรียบเทียบกับภาชนะสีดำ สีขาว สีแดง สีเหลือง และสีน้ำเงิน (Imanpoor and Abdollahi, 2011) ปริมาณไขมันในปลาที่เลี้ยงด้วยภาชนะสีน้ำเงินอาจเกิดจากการว่ายน้ำที่ลดลง ทำให้ลดการใช้พลังงานจากการเผาผลาญไขมัน (Karakatsouli *et al*., 2010) ความแตกต่างของการใช้พลังงานซึ่งเกิดจากการเลี้ยงปลาในภาชนะที่มีสีแตกต่างกันเป็นประเด็นการศึกษาที่น่าสนใจ และอาจมีการตอบสนองที่แตกต่างกันในปลาแต่ละสปีชีส์

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

บทสรุป

ปริมาตรน้ำน้อยที่สุดสำหรับการเลี้ยงปลากัดตัวผู้สีแดงแบบเดี่ยว คือ 150 มิลลิลิตร ซึ่งปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำดังกล่าวมีการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร คุณภาพกล้ามเนื้อ และสีของผิวดีที่สุด นอกจากนี้ ปริมาตรน้ำนี้ยังไม่ส่งผลเชิงลบต่อองค์ประกอบทางเคมีของซาก ขณะที่สีภาชนะที่ทำให้ปลากัดตัวผู้สีแดงมีการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และคุณภาพของกล้ามเนื้อที่ดีขึ้น โดยไม่ส่งผลเชิงลบต่อสีของผิวและองค์ประกอบทางเคมีของซาก คือ ภาชนะสีน้ำเงิน นอกจากนี้ ปลาที่เลี้ยงในภาชนะสีดังกล่าวยังมีการสำรองพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตซึ่งสังเกตได้จากอัตราส่วนของอะไมเลส/ทริปซิน ข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้สามารถประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงปลากัดตัวผู้สีแดงที่มีอายุ 1.5 เดือน ถึงอายุ 4 เดือน ซึ่งเป็นอายุสำหรับขุนเพื่อจำหน่าย รวมทั้งเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงปลากัดแบบหนาแน่น

ข้อเสนอแนะ

1. ปริมาตรน้ำและสีภาชนะเป็นเพียงข้อมูลบางส่วนที่จำเป็นต่อการเลี้ยงปลากัด ดังนั้น การศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมของปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเพาะเลี้ยง เช่น ระยะเวลาการให้แสง ความเข้มของแสง รูปทรงของภาชนะเลี้ยง หรืออัตราการเปลี่ยนถ่ายน้ำ เป็นต้น ซึ่งงมีความจำเป็นในการพัฒนาระบบการเลี้ยงให้เหมาะสมที่สุด
2. การจัดการขนาดและความสูงของภาชนะเลี้ยงให้เหมาะสมกับปริมาตรน้ำ อาจลดความเครียดจากปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความสว่าง เป็นต้น
3. ปลากัดมีสีที่หลากหลายซึ่งอาจมีการตอบสนองต่อปัจจัยที่ศึกษาในครั้งนี้ที่แตกต่างกัน ดังนั้น ควรมีการศึกษาการตอบสนองของปลากัดสีอื่น

บรรณานุกรม

การุณ ทองประจุแก้ว และอุทัยวรรณ โกวิทวที. 2555. เอนไซม์ย่อยอาหารกับการพัฒนาอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ 22: 709–720.

จันทกานต์ นุชสุข. 2550. การพัฒนาสูตรอาหารโดยใช้เทคโนโลยีทางเอนไซม์ย่อยอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงปลาวายหนู *Helicophagus leptorhynchus* Ng & Kottelat, 2000. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชัย เกียรติ์นีรนาท และบุญชัย อัศวกิจวานิช. 2548. การพัฒนาปลากัดไทยก้าวไกลสู่ตลาดโลก. วารสารการประมง 58: 505–517.

ธวัช ดอนสกุล. 2530. การศึกษากระบวนการผสมพันธุ์และการเพาะเลี้ยงปลากัดไทย. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

ปิยะมาศ ประทุมมา. 2544. คู่มือสัตว์เลี้ยงสวยงามร่วมสมัย ชุดที่ 2 ปลากัด. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์สัตว์เศรษฐกิจแมกซีน.

วันเพ็ญ มีนกาญจน์, นงนุช เลาะหะวิสุทธิ์ และสุภาพ พรหมยศ. 2531. การเพาะพันธุ์ปลากัด. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 14. กรุงเทพฯ: สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. อาหารปลา. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์

สถาบันวิจัยอาหารสัตว์น้ำจืด. 2549. อาหารและการผลิตอาหารสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: กรมประมง.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2554. การศึกษาเศรษฐกิจการผลิตการตลาดปลาสวยงาม. เอกสารวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร เลขที่ กันยายน 2554. กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร.

อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล และสุดารัตน์ บวรศุภกิจกุล. 2544. ศักยภาพการผลิตปลากัดเพื่อการส่งออกในจังหวัดนครปฐม. วารสารการประมง 54: 423–432.

Ahmadivand, S., Eagderi, S. and Imanpour, M. R. 2013. Effects of stocking density on hematological parameters, growth and survival rate of Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) larvae. Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences 3: 1320–1326.

Amiri, M. H. and Shaheen, H. M. 2012. Chromatophores and color revelation in the blue variant of the Siamese fighting fish (*Betta splendens*). Micron 43: 159–169.

Andres, M., Gisbert, E., Diaz, M., Moyano, F. J., Estevez, A. and Rotllant, G. 2010. Ontogenetic changes in digestive enzymatic capacities of the spider crab, *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 389: 75–84.

AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 18th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

Areekijseree, M., Engkagul, A., Kovitvadhi, S., Kovitvadhi, U., Thongpan, A. and Rungruangsak-Torrissen, K. 2006. Development of digestive enzymes and *in vitro* digestibility of different species of phytoplankton for culture of early juveniles of the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus* Simpson, 1990. Invertebrate Reproduction and Development 49: 255–262.

Areekijseree, M., Engkagul, A., Kovitvadhi, U., Thongpan, A., Mingmuang, M., Pakkong, P. and Rungruangsak-Torrissen, K. 2004. Temperature and pH characteristics of amylase and proteinase of adult freshwater pearl mussel, *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus* Simpson, 1990. Aquaculture 234: 575–587.

Arntfield, S. D. and Murray, E. D. 1981. The influence of processing parameters on food protein functionality. I. Differential scanning calorimetry as an indicator of protein denaturation. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal 14: 289–294.

Baker, B. I., Wilson, J. F. and Bowley, T. J. 1984. Changes in pituitary and plasma levels of MSH in teleosts during physiological colour change. General and Comparative Endocrinology 55: 142–149.

Balm, P. H. M., Hovens, M. L. M. and Bonga, S. E. W. 1995. Endorphin and MSH in concert form the corticotropic principle released by tilapia (*Oreochromis mossambicus*; teleostei) melanotropes. Peptides 16: 463–469.

Balti, R., Bougherra, F., Bougatef, A., Klaled, B., Hayet, B. K., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P., Guillochon, D. and Nasri, M. 2012. Chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*) with high activity in the hydrolysis of long chain peptide substrates: Purification and biochemical characterization. Food Chemistry 130: 475–484.

Banan, A., Kalbassi, M. R., Bahmani, M. and Sadati, M. A. Y. 2011. Effects of colored light and tank color on growth indices and some physiological parameters of juvenile beluga (*Huso huso*). Journal of Applied Ichthyology 27: 565–570.

Bao, J. and Corke, H. 2002. Pasting properties of γ-irradiated rice starches as affected by pH. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 336–341.

Bkhairia, I., Khaled, H. B., Ktari, N., Miled, N., Nasri, M. and Ghorbel, S. 2016. Biochemical and molecular characterization of a new alkaline trypsin from *Liza aurata*: Structural features explaining thermal stability. Food Chemistry 196: 1346–1354.

Blakeslee, C., McRobert, S. P., Brown, A. C. and Clotfelter, E. D. 2009. The effect of body coloration and group size on social partner preferences in female Siamese fighting fish (*Betta splendens*). Behavioural Processes 80: 157–161.

Blier, P. U., Lemieux, H. and Devlin, R. H. 2002. Is the growth rate of the fish set by digestive enzymes or metabolic capacity of the tissue? Insight from transgenic coho salmon. Aquaculture 209: 379–384.

Bolasina, S., Tagawa, M. and Yamashita, Y. 2006. Effect of stocking density on growth, digestive enzyme activity and cortisol level in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture 259: 432–443.

Cagiltay, F., Erkan, N., Ulusoy, S., Selcuk, A. and Ozden, O. 2015. Effects of stock density on texture-colour quality and chemical composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Journal of Fisheries Sciences 14: 687–698.

Castillo-Yanez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., Garcia-Carreno, F. L. and Toro, M. A. N. 2004. Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. Food Chemistry 85: 343–384.

Chaijan, M., Jongjareonrak, A., Phatcharat, S., Benjakul, S. and Rawdkuen, S. 2010. Chemical compositions and characteristics of farm raised giant catfish (*Pangasianodon gigas*) muscle. LWT-Food Science and Technology 43: 452–457.

Chakrabarti, I., Gani, M. D. A., Chaki, K. K., Sur, R. and Misra, K. K. 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 112: 167–177.

Chan, C. R., Lee, D. L., Cheng, Y. H., Hsieh, D. J. Y. and Weng, C. F. 2008. Feed deprivation and re-feeding on alteration of proteases in tilapia *Oreochromis mossambicus*. Zoological Studies 47: 207–214.

Chen, B. N., Qin, J. G., Kumar, M. S. Hutchinson, W. G. and Clarke, S. M. 2006. Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. Aquaculture 260: 264–271.

Chong, A. S. C., Hashim, R., Chow-Yang, L. and Ali, A. B. 2002. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). Aquaculture 203: 321–333.

Clotfelter, E. D., Ardia, D. R. and Mcgraw, K. J. 2007. Red fish, blue fish: trade–offs between pigmentation and immunity in *Betta splendens*. Behavioural Ecology 18: 1139–1145.

Cobcroft, J. M., Shu-Chien, A. C., Kuah, M. K., Jaya-Ram, A. and Battaglene, S. C. 2012. The effects of tank colour, live food enrichment and greenwater on the early onset of jaw malformation in striped trumpeter larvae. Aquaculture 356-357: 61–72.

Cole, B., Tamura, C. S., Bailey, R., Brown, C. and Ako, H. 1999. Shipping practices in the ornamental fish industry. Hawaii: Center for Tropical and Subtropical Aquaculture.

Coughlin, D. J., Shiels, L. P., Nuthakki, S. and Shuman, J. L. 2016. Thermal acclimation to cold alters myosin content and contractile properties of rainbow smelt, *Osmerus mordax*, red muscle. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 196: 46–53.

Cretu, M., Cristea, V., Dediu, L. and Petrea, S. M. 2014. The influence of different stocking densities on biochemical composition of rainbow trout meat reared in a recirculating aquaculture system. Animal Science and Biotechnologies 47: 200–204.

Cristea, V., Mocanu, M. C., Antache, A., Docan, A., Dediu, L., Ion, S. and Coada, M. T. 2012. Effect of stocking density on leuckocyte reaction of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Animal Science and Biotechnologies 45: 31–36.

Cuvier-Peres, A., Jourdan, S., Fontaine, P. and Kestemont, P. 2001. Effects of light intensity on animal husbandry and digestive enzyme activities in sea bass *Dicentrachus labrex* post–larvae. Aquaculture 202: 317–328.

Darias, M. J., Murray, H. M., Gallant, J. W., Astola, A., Douglas, S. E., Yefera, M. and Matinez-Rodriguez, G. 2006. Characterization of a partial α-amylase clone from red porgy (*Pagrus pagrus*): Expression during larval development. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 143: 209–218.

Dhont, J. and Van Stappen, G. 2003. Biology, tankproducktion and nutritional value of Artemia. In: Live feeds in marine aquaculture. (eds. Stottrup, J.G. and McEvoy, L. A), pp. 65–121. Oxford, UK: Bleckwell Publishing.

Doolan, B. J., Allan, G. L., Booth, M. A. and Jones, P. L. 2008. Effect of carotenoids and background colour on the skin pigmentation of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch and Schneider, 1801). Aquaculture Research 39: 1423–1433.

Downing, G. and Litvak, M. K. 1 9 9 9 . The influence of light intensity on growth of larval haddock. North American Journal of Aquaculture 61: 135–140.

Einarsson, S., Davies, P. S. and Talbot, C. 1996. The effect of feeding on the secretion of pepsin, trypsin and chymotrypsin in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Fish Physiology and Biochemistry 15: 439–446.

El-Sayed, A. F. M. and El-Ghobashy, A. E. 2 0 1 1 . Effects of tank colour and feed colour on growth and feed utilization of thinlip mullet (*Liza ramada*) larvae. Aquaculture Research 42: 1163–1169.

Eslamloo, K., Akhavan, S. R., Eslamifar, A. and Henry, M. 2015. Effects of background colour on growth performance, skin pigmentation, physiological condition and innate immune responses of goldfish, *Carassius auratus*. Aquaculture Research 46: 202–215.

Falcon-Hidalgo, B., Forrellat-Barrios, A., Farnes, O. C. and Hernandez, K. U. 2011. Digestive enzymes of two freshwater fishes (*Limia vittata* and *Gambusia punctata*) with different dietary preferences at three developmental stages. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 158: 136–141.

Fauconneau, B., Aguirre, P. and Blanc, J. M. 1990. Protein synthesis in different tissues of mature rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Influence of triploidy. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 97: 345–352.

Fujii, R. 2000. The regulation of motile activity in fish chromatophores. Pigment Cell and Melanoma Research 13: 300–319.

Gautier, P., Barroca, M., Bertrand, S., Eraud, C., Gaillard, M., Hamman, M., Motreuil, S., Sorci, G. and Faivre, B. 2008. The presence of females stimulate the expression of a carotenoid-based sexual signal. Behavioural Ecology and Sociobiology 62: 1159–1166.

Genicot, S., Rentier-Delrue, F., Edwards, D. and VanBeeumen, J. 1996. Trypsin and trypsinogen from an Antarctic fish: molecular basis of cold adaptation. Biochemica et Biophysica Acta 298: 45–57.

Goede, R. W. and Barton, B. A. 1990. Organismic indices andan autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. American Fisheries Society Symposium 8 : 93–108.

Hayd, L. A., Lemos, D. and Valenti, W. C. 2010. Ontogenetic variation in ammonia excretion during the early life stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*. Journal of the World Aquaculture Society 41: 107–115.

Heu, M. S., Kim, H. R. and Pyeun, J. H. 1995. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 112: 557–567.

Hidalgo, M. C., Urea, E. and Sanz, A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. Aquaculture 170: 267–283.

Hinshaw, M. 1986. Factors affecting survival and growth of larval and early juvenile perch *Perca flalescens* Mitchill. Doctor of Philosophy Thesis, North Carolina State University.

Hlophe, S. N., Moyo, N. A. G. and Ncube, I. 2014. Postprandial changes in pH and enzyme activity from the stomach and intestines of *Tilapia rendalli* (Boulenger, 1897), *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) and *Clarias gatiepinus* (Burchell, 1822). Journal of Applied Ichthyology 30: 35–41.

Hochachka, P. W. and Somero, G. N. 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. New York: Oxford University Press.

Hofer, R. and Schiemer, F. 1981. Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. Oecologia 48: 342–345.

Imanpoor, M. R. and Abdollahi, M. 2011. Effects of tank color on growth, stress response and skin color of juvenile Caspian Kutum *Rtilus frisii* Kutum. Global Veterinaria 6: 118–125.

James, R. and Sampath, K. 2003. Effect of animal and plant protein diets on growth and fecundity in ornamental fish, *Betta splendens* (Regan). The Israeli Journal of Aquaculture–Bamidgeh 55: 39–52.

James, R. and Sampath, K. 2006. Effect of dietary administration of methyltestosterone on the growth and sex reversal of two ornamental fish species. Indian Journal of Fisheries 53 : 283–290.

Jaroensutasinee, M. and Jaroensutasinee, K. 2001. Bobble nest habitat characteristics of wild Siamese fighting fish. Journal of Fish Biology 58: 1311–1319.

Jha, P. and Barat, S. 2005. The effect of stocking density on growth, survival rate, and number of marketable fish produced of koi carps, *Cyprinus carpio* vr. *koi* in concrete tanks. Journal of Applied Aquaculture 17: 89–102.

Kanghae, H., Thongprajukaew, K., Jatupornpitukchat, S. and Kittiwattanawong, K. 2016. Optimal-rearing density for head-starting green turtles (*Chelonia mydas* Linnaeus, 1758). Zoo Biology 35: 454–461.

Karakatsouli, N., Papoutsoglou, S. E. and Manolessos, G. 2007. Combined effects of rearing density and tank colour on the growth and welfare of juvenile white sea bream *Diplodus sargus* L. in a recirculating water system. Aquaculture Research 38: 1152–1160.

Karakatsouli, N., Papoutsoglou, S. E., Sotiropoulos, N., Mourtikas, D., Stigen-Martinsen, T. and Papoutsoglou, S. E. 2010. Effects of light spectrum, rearing density and light intensity on growth performance of scaled and mirror common carp *Cyprinus carpio* reared under recirculating system conditions. Aquaculturel Engineering 42: 121–127.

Karino, K. and Someya, C. 2007. The influence of sex, line, and fight experience on aggressiveness of the Siamese fighting fish in intrasexual competition. Behavioural Processes 75: 283–289.

Kelsh, R. N. 2004. Genetics and evolution of pigment patterns in fish. Pigment Cell Research 17: 326–336.

Khoo, G., Lim, T. M. and Phang, V. P. 2012. Ultrastructure of erythrophores and xanthophores of the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. The Israeli Journal of Aquaculture–Bamidgeh DOI: http://hdl.handle.net/10524/31821.

Klahan, R., Areechon, N., Yoonpundh, R. and Engkagul, A. 2009. Characterization and activity of digestive enzymes in different size of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Agriculture and Natural Resources 43: 143–153.

Klomklao, S., Kishimura, H., Yabe, M. and Benjakul, S. 2007. Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B 147: 682–689.

Konieczny, P., Tomaszewska-Gras, J., Andrzejewski, W., Mikolajczak, B., Urbanska, M., Mazurkiewicz, J. and Stangierski, J. 2016. DSC and electrophoretic studies on protein denaturation of *Anodonta woodiana* (Lea, 1834). Journal of Thermal Analysis and Calorimetry DOI:10.1007/s10973–016–5707–0.

Ktari, N., Khaled, H. B., Nasri, R., Jellouli, K., Ghorbel, S. and Nasri, M. 2012. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera. Purification, characterization and potential application as a detergent additive. Food Chemistry 130: 467–474.

Kuo, H. L., Chen, M. T., Liu, D. C. and Lin, L. C. 2005. Relationship between thermal properties of muscle proteins and pork quality. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 18: 427–432.

Lambert, Y. and Dutil, J. 2001. Food intake and growth of adult Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) reared under different conditions of stocking density, feeding frequency and size-grading. Aquaculture 192: 233– 247

Lazo, J. P., Mendoza, R., Holt, G. J., Aguilera, C. and Arnold, C. R. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenop ocellatus*). Aquaculture 265: 194–205.

Li, X., Liu, Y. and Blancheton, J. P. 2013. Effect of stocking density on performances of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) in recirculating aquaculture systems. Chinese Journal of Oceanology and Limnology 31: 514–522.

Lombrana, M., Suarez, P. and Juan, F. S., 2005. Two froms of α–amylase in mantle tissue of *Mytilus galloprovincialis*: Purification and molecular properties of from II. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 142: 56–66.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemisry 193: 265–275.

Liu, Q., Hou, Z., Wen, H., Li, J., He, F., Wang, J., Guan, B. and Wang, Q. 2016. Effect of stocking density on water quality and (growth, body composition and plasma cortisol content) performance of pen-reared a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Ocean University of China 15: 667–675.

Maciel, C. R. and Valenti, W. C. 2014. Effect of tank colour on larval performance of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. Aquaculture Research 45: 1041–1050.

Macouzet, M., Simpson, B. K. and Lee, B. H. 2005. Expression of a cold-adapted fish trypsin in *Pichia pastoris*. FEMS Yeast Research 5: 851–857.

Mandal, S. C., Kohli, M. P. S., Das, P., Singh, S. K., Munikumar, S., Sarma, K. and Baruah, K. 2012. Effect of substituting live feed with formulated feed on the reproductive performance

and fry survival of Siamese fighting fish, *Betta splendens* (Regan, 1910). Fish Physiology and Biochemistry 38: 573–584.

Mandal, S. C., Sahu, N. P., Kohli, M. P. S., Das, P., Gupta, S. K. and Munikumar, S. 2010. Replacement of live feed by formulated feed: effect on the growth and spawning performance of Siamese fighting fish (*Betta splendens*, Regan, 1910). Aquaculture Research 41: 1707–1716.

Martin-Robichaud, D. J. and Peterson, R. H. 1998. Effects of light intensity, tank colour and photoperiod on swimbladder inflation success in larval striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). Aquaculture Research 29: 539–547.

Martínez, I., Moyano, F. J., Fernandez–Díaz, C. and Yúfera, M. 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Soleaseneg alensis*). Fish Physiology and Biochemistry 21: 317–323.

Martinez-Cardennas, L. and Purser, G. J. 2007. Effect of tank colour on Artemia ingestion, growth and survival in cultured early juvenile pot-bellied seahorses (*Hippocampus abdominalis*). Aquaculture 264: 92–100.

Matessi, G., Matos R. J., Peake, T. M., McGregor, P. K. and Dabelsteen, T. 2010. Effects of social environment and personality on communication in male Siamese fighting fish in an artificial network. Animal Behaviour 70: 43–49.

Mathers, E. M., Houlihan, D. F. and Burren, L. J. 1994. DNA and protein concentrations in fed and starved herring Clupea harengus larvae. Marine Ecology Progress Series 107: 223–231.

Mathers, E. M., Houlihan, D. F., McCarthy, I. D. and Buren, L. J. 1993. Rates of growth and protein synthesis correlated with nucleic acid content in fry of rainbow trout, *Oncorhychus mykiss*: effects of age and temperature. Journal of Fish Biology 43: 245–263.

Matos, E., Silva, T. S., Tiago, T., Aureliano, M., Dinis, M. T. and Dias, J. 2011. Effect of harvesting stress and storage conditions on protein degradation in fillets of farm gilthead seabream (*Sparus aurata*): A differential scanning calorimetry study. Food Chemistry 126: 270–276.

McLean, E., Cotter, P., Thain, C. and King, N. 2008. Tank color impacts performance of cultured fish. Croatian Journal of Fisheries 66: 43–54.

Meejui, O., Sukmanomon, S. and Na-Nakorn, U. 2005. Allozyme revealed substantial genetic diversity between hatchery stocks of Siamese fighting fish, *Betta splendens*, in the province of Nakornpathom, Thailand. Aquaculture 250: 110–119.

Metusalach, J., Brown, A. and Shahidi, F. 1997. Effects of stocking density on colour characteristics and deposition of carotenoids in cultured Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Food Chemistry 59: 107–l14.

Monk, J., Puvanendran, V. and Brown, J. 2008. Does different tank bottom colour affect the growth, survival and foraging behaviour of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae ?. Aquaculture 277: 197–202.

Movises, A., Nuangsaeng, B., Sriwattanarothai, N. and Panijpan, B. 2009. Siamese fighting fish: Well–known generally but little–known scientifically. ScienceAsia 35: 8–16.

Moyano, F. J., Díaz, M., Alarcón, F. J. and Sarasquete, M. C. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish Physiology and Biochemistry 15: 121–130.

Natalia, Y. Hashim, R., Ali, A. and Chong, A. 2004. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). Aquaculture 233: 305–320.

Navarrete-del-Toro, M. A., Garcia–Carreno, F. L., Hernandez–Cortes, P., Molnar, T. and Graf, L. 2015. Biochemical characterization of chymotrypsin from the midgut gland of yellowleg shrimp, *Penaeus californiensis*. Food Chemistry 173: 147–155.

Nascimento, N., Velentin, F. N., Pereira-Santos, M., Chavarro, S. Y. C., Manzini, B., Paes, M. C. F., Faustino, F., Silva, R. C. and Nakaghi, L. S. O. 2015. Initial Feeding Behaviour, Eye Structure and Effect of Colours on Prey Capture Rates of *Betta splendens* Larvae. Journal of Fisheries and Aquatic Science 10: 357–366.

Nelson, J. S. 2006. Fish of the world. 4th ed. New York: John Wily and Son Inc.

Niazie, E. H. N., Imanpoor, M., Taghizade, V. and Zadmajid, G. 2013. Effects of density stress on growth indices and survival rate of goldfish (*Carassius auratus*). Global Veterinaria 10: 365–371.

Nikapitiya, C., Oh, C., Whang, I., Kim, C. G., Lee, Y. H., Kim, S. J. and Lee, J. 2009. Molecular characterization, gene expression analysis and biochemical properties of α-amylase from the disk abalone, *Haliotis discus discus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 152: 271–281.

Osofero, S. A., Otubusin, S. O. and Daramola, J. A. 2009. Effect of stocking density on tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1757) growth and survival in bamboo-net cages trial. African Journal of Biotechnology 8:1322–1325

Ozyigit, I. E., Karakus, E. and Pekcan, O. 2016. The modifier effects of chymotrypsin and trypsin enzymes on fluorescence lifetime distribution of "N-(1-pyrenyl) maleimide-bovine serum albumin" complex. Spectrochimica Acta Part A 154: 8–12.

Papoutsoglou, S. E., Karakatsouli, N. and Chiras, G. 2005. Dietary l–tryptophan and tank colour effects on growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles reared in a recirculating water system. Aquacultural Engineering 32: 277–284.

Papoutsoglou, S. E., Mylonakis, G., Miliou, H., Karakatsouli, N. P. and Chadio, S. 2000. Effects of background color on growth performances and physiological responses of scaled carp (*Cyprinus carpio* L.) reared in a closed circulated system. Aquacultural Engineering 22: 309–318.

Paredi, M. E., Tomas, M. C. and Crupkin, M. 2003. Thermal behavior of myofibrillar protein from the adductor muscles of scallops. A differential scanning calorimetric study (DSC). Brazillian Journal of Chemical Engineering 20: 153–159.

Parra, A. M., Rosas, A., Lazo, J. P. and Viana, M. T. 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture condition. Fish Physiology and Biochemistry 33: 223–231.

Peng, S., Lin, S., Gao, Q., Wang, J., Sun, P. and Yin, F. 2013. Effects rearing density on growth rate and digestive enzyme activity of juvenile *Pampus argenteus*. Marine Fisheries 1: 1–9.

Peragon, J., Barroso, J. B., Garcia–Salguero, L. Higuere, M. and Lupianez, J. A. 2001. Growth, protein-turnover rates and nucleic-acid concentration in the white muscle of rainbow trout during development. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 33: 1227–1238.

Peres, A., Cahu, C., Zambonino-Infante, J. L., Le Gall, M. M. and Quazuguel, P. 1996. Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Fish Physiology and Biochemistry 15: 237–242.

Pierce, G. J., Key, L. N., Boyle, P. R., Siegert, K. J., Goncalves, J. M., Porteiro, F. M. and Martins, H. R. 1999. RNA concentration and the RNA to protein ratio in cephalopod tissues: sources of variation and relationship with growth rate. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 237: 185–201.

Puello-Cruz, A. C., Velasco-Blanco, G. and Martinez-Rodriguez, I. E. 2010. Growth and survival of Siamese fighting fish, *Betta splendens*, larvae at low salinity and with different diets. Journal of the World Aquaculture Society 45: 823–828.

Raghavan, P. R., Xiao-ming, Z., Wu, L., Dong, H., Yun-xia, Y. and Shou-qi, X. 2013. Rearing tank color influences survival and growth of the early larvae of the yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*, Richardson. Acta Hydrobiologica Sinica 37: 177–184.

Ramesh, F. and Nagarajan, K. 2013. Histopathological changes in the muscle tissue of the fish *Clarias batrachus* exposed to untreated and treated sago effluent. Advances in Bioscience and Bioengineering 1: 74–80.

Ramzanzadeh, F., Yeganeh, S., JaniKhalili, K. and Babaei, S. S. 2016. Effects of different photoperiods on digestive enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) alevin and fry. Canadian Journal of Zoology 94: 435–442.

Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C. and Dinis, M. T. 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. Aquaculture 179: 465–473.

Romijn, J. A., Godfried, M. H., Hommes, M. J. T., Endert, E. and Sauerwein, H. P. 1990. Decreased glucose oxidation during short-term starvation. Metabolism 39: 525–530.

Rotllant, J., Tort, L., Montero, D., Pavlidis, M., Martinez, M., Wendelaar Bonga, S. E. and Balme, P. H. M. 2003. Background colour influence on the stress response in cultured red porgy *Pagrus pagrus*. Aquaculture 223: 129–139.

Rungruangsak, K. and Utne, F. 1981. Effect of different acidified wet feeds on protease activities in the digestive tract and on growth rate of rainbow trout (*Salmo gairdnen* Richardson). Aquaculture 22: 67–79.

Rungruangsak-Torrissen, K. 2007. Digestive efficiency, growth and qualities of muscle and oocyte in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed on diets with krill meal as an alternative protein source. Food Biochemistry 31: 509–540.

Rungruangsak-Torrissen, K., Carter, C. G., Sunby, A., Berg, A. and Houlihan, D. F. 1999. Maintenance ratio, protein synthesis capacity, plasma insulin and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with genetically different trypsin isozymes. Fish Physiology and Biochemistry 21: 223–233.

Rungruangsak-Torrissen, K. and Fosseidengen, J. E. 2007. Effect of artificial feeding on digestive efficiency, growth and qualities of muscle and oocyte in maturing Atlantic mackerel (*Scomber scombus* L.). Journal of Food Biochemistry 31: 726–747.

Rungruangsak-Torrissen, K. and Male, R. 2000. Trypsin isozymes: development, digestion and structure. In: Seafood enzyme: utilization and influence on postharvest seafood quality. (eds. Haard, N. F. and Simpson, B. K.), pp. 215–269. New York: Marcel Dekker, Inc.

Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, L. H., Berg, A. and Waagbø, R. 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Physiology and Biochemistry 32: 7–23.

Rungruangsak-Torrissen, K., Pringle, G. M., Moss, R. and Houlihan, D. F. 1998. Effects of varying rearing temperatures on expression of different trypsin isozymes, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Physiology and Biochemistry 19: 247–255.

Rungruangsak-Torrissen, K., Rustad, A., Sunde, J., Eiane, S. A., Jensen, H. B., Opstvedt, J., Nygard, E., Samuelsen, T. A., Mundheeim, H., Luzzana, U. and Venturini, G. 2002. *In vitro* digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. Journal of the Science of Food and Agriculture 82: 644–654.

Rungruangsak-Torrissen, K. and Sundby, A. 2000. Protease activities, plasma free amino acids and insulin at different ages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with genetically different trypsin isozymes. Fish Physiology and Biochemistry 22: 337–347.

Rungruangsak-Torrissen, K, Stien, L. H., Daae B. S., Vagseth, T., Thorsheim, G. B., Tobin, D. and Ritola, O. 2009. Different dietary levels of protein to lipid ratio affected digestive efficiency, skeletal growth, and muscle protein in rainbow trout families. Scholarly Research Exchange. DOI:10.3814/2009/709529.

Rungruangsak-Torrissen, K., Sunde, J., Berg, A. E., Nordgarden, U., Fjelldal, P. G. and Oppedal, F. 2009. Digestive efficiency, free amino acid pools and quality of growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) affected by light regimes and vaccine types. Fish Physiology and Biochemistry 35: 255–272.

Sanchez, P., Ambrosio, P. P. and Flos, R. 2010. Stocking density and sex influence individual growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Aquaculture 300: 93–101.

Saoud, I. P., Ghanawi, J. and Lebbos, N. 2007. Effects of stocking density on the survival, growth, size variation and condition index of juvenile rabbitfish *Siganus rivulatus*. Aquaculture International 16: 109–116.

Schubring, R. 1999. DSC studies on deep frozen fishery products. Thermochimica Acta 337: 89–95.

Shahidi, F. 1994. Seafood proteins and preparation of protein concentrates. In: Seafood: chemistry, processing technology and quality. (eds. Shahidi, F. and Botta, J. R.) pp. 3–9. London: Blackie Academic and Professional.

Shan, X., Xiao, Z., Huang, W. and Dou, S. 2008. Effects of photoperiod on growth, mortality and digestive enzymes in miiuy croaker larvae and juveniles. Aquaculture 281: 70–76.

Sheng, L., Lin, L. and Ting, W. 2006. Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*). Fish Physiology and Biochemistry 32: 295–303.

Sierra-Flores, R., Davie, A., Grant, B., Carboni, S., Atack, T. and Migaud, H. 2015. Effects of light spectrum and tank background colour on Atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae performances. Aquaculture 450: 6–13.

Snekser, J.L., McRobert, S.P. and Clotfelter, E.D. 2006. Social partner preference of male and female fighting fish (*Betta splendens*). Behavioural Processes 72: 38–41.

Stickney, R. R. 1994. Principles of aquaculture. New York: John Wiley and Sons.

Strand, A., Alanara, A., Staffan, F. and Magnhagen, C. 2007. Effects of tank colour and light intensity on feed intake, growth rate and energy expenditure of juvenile Eurasian perch, ` *Perca fluviatilis* L. Aquaculture 272: 312–318.

Stryer, L. 1988. Biochemistry. 3rd ed. New York: W.H. Freeman.

Sunde, J., Eiane, S. A, Rustad, A., Jensen, H. B., Opstvedt, J., Nygard, E., Venturini, G. and Rungruangsak-Torrissen, K. 2004. Effect of fish feed processing conditions of digestive ` protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture Nutrition 10: 261–277.

Sunde, J., Taranger, G. L. and Rungruangsak-Torrissen, K. 2001. Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Physiology and Biochemistry 25: 335–345.

Supannapong, P., Pimsalee, T., A-komon, T., Engkakul, A., Kovitvadhi, U. and Rungruangsak-Torrissen, K. 2008. Digestive enzymes and *in vitro* digestibility of different species of phytoplankton for culture of the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus.* Aquaculture International 16: 437–453.

Suzer, C., Saka, S. and Firat, K. 2006. Effects of illumination on early life development and digestive enzyme activities in common pandora *Pagellus erythrinus* L. larvae. Aquaculture 260: 86–93.

Szisch, V., Van der Salm, A. L., Wendelaar Bonga, S. E. and Pavlidis, M. 2002. Physiological colour changes in the red porgy, *Pagrus pagrus*, following adaptation to blue lighting spectrum. Fish Physiology and Biochemistry 27: 1–8.

Takeuchi, L., Hori, M., Myint, O. and Kohda, M. 2010. Lateral bias of agonistic responses to mirror images and morphological asymmetry in the Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan). Behavioural Brain Research 208: 106–111.

Tamazouzt, L., Chatain, B. and Fontaine, P. 2000. Tank wall colour and light level affect growth and survival of Eurasian perch larvae (*Perca fluviatilis* L.). Aquaculture 182: 85–90.

Tengjaroenkul, B., Smith, B. J., Caceci, T. and Smith, S. A. 2000. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture 182: 317–327.

Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, S., Kovitvadhi, U. and Rungruangsak–Torrissen, K. 2014. Pigment deposition and *in vitro* screening of natural pigment sources for enhancing pigmentation in adult male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). Aquaculture Research 45: 709–719.

Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, S., Kovitvadhi, U. and Somsueb, P. 2013a. Effects of red monascal rice supplementation on growth, digestive function and oocyte maturation in Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). African Journal of Biotechnology 12: 6400–6410.

Thongprajukaew, K. and Kovitvadhi, U. 2013. Effect of sex characteristics and expression levels of digestive enzymes in adult guppy *Poecilia reticulata*. Zoological Studies 52: 1–8.

Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Engkagul, A., and Rungruangsak-Torrissen, K. 2010a. Characterization and expression levels of protease enzymes at different developmental stages of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). Agriculture and Natural Resources 44: 411–423.

Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Engkagul, A., and Rungruangsak-Torrissen, K. 2010b. Temperature and pH characteristic of amylase and lipase at different developmental stages of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). Agriculture and Natural `Resources 44: 210–219.

Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Engkagul, A. and Rungruangsak-Torrissen, K. 2013b. Evaluation of growth performance and nutritional quality of diets using digestive enzyme markers and *in vitro* digestibility in Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). African Journal of Biotechnology 12: 1689–1702.

Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Somsueb, P. and Rungruangsak–Torrissen, K. 2011. Effects of different modified diets on growth, digestive enzyme activities and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). Aquaculture 322–323: 1–9.

Thongprajukaew, K., Rodjaroen, S., Yoonram, K., Sornthong, P., Hutcha, N., Tantikitti, C. and Kovitvadhi, U. 2015. Effects of dietary modified palm kernel meal on growth, feed utilization, radical scavenging activity, carcass composition and muscle quality in sex reversed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 439: 45–52.

Thongprajukaew, K., Yawang, P., Dudae, L., Bilanglod, H., Dumrongrittamatt, T., Tantikitti, C and Kovitvadhi, U. 2013c. Physical modification of palm kernel meal improved available carbohydrate, physicochemical properties and *in vitro* digestibility in economic freshwater fish. Journal of the Science of Food and Agriculture 93: 3832–3840.

Toko, I., Fiogbe, E. D., Koukpode, B. and Kestemont, P. 2007. Rearing of African catfish (*Clarias gariepinus*) and vundu catfish (*Heterobranchus longifilis*) in traditional fish ponds (whedos): Effect of stocking density on growth, production and body composition. Aquaculture 262: 65–72.

Tolussi, C. E., Hilsdorf, A. W. S., Caneppele, D. and Moreira, R. G. 2010. The effects of stocking density in physiological parameters and growth of the endangered teleost species piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1877). Aquaculture 310: 221–228.

Torrissen, K., Lied, E. and Espe, M. 1994. Differences in digestion and absorption of dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with genetically different trypsin isozymes. Journal of Fish Biology 45: 1087–1104.

Tyska, M. J. and Warshaw, D. M. 2002. The myosin power stroke. Cell Motility and the Cytoskeleton 51: 1–15.

Ueberschar, B. 1988. Determination of the nutritional condition of individual marine fish larvae by analyzing their proteolytic enzyme activities with a highly sensitive fluorescence technique. Meeresforsch 32: 144–154.

Van der Salm, A. L., Martınezc, M., Flika, G. and Bonga, S. E. W. 2004. Effects of husbandry conditions on the skin colour and stress response of red porgy, *Pagrus pagrus*. Aquaculture 241: 371–386.

Verbeek, P., Iwamoto, T. and Murakami, N. 2008. Variable stress-responsiveness in wild type and domesticated fighting fish. Physiology and Behavior 93: 83–88.

Wallbrunn, H.M. 1957. Genetics of the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. Genetics 43: 281–289.

Wang, T., Cheng, Y. Z., Liu, Z. P. and Long, X. H. 2015. Effects of light intensity on husbandry parameters, digestive enzymes and whole-body composition of juvenile *Epinephelus coioides* reared in artificial sea water. Aquaculture Research 46: 884–892.

Wang, X. S., Tang, C. H., Yang, X. O. and Gao, W. R. 2008. Characterization, amino acid composition and *in vitro* digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins. Food Chemistry 107: 11–18.

Wattanakul, W., Thongprajukaew, K., Songnui, A., Satjarak, J. and Kanghae, H. 2017. Pre-soaking feed pellet significantly improved feed utilization in Asian seabass (*Lates calcarifer*). Aquaculture 471: 106–112.

Wei, Z. Z. and Zhao, W. 2014. Effect of light intensity on the growth and digestive enzyme activity of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicas* under two kinds of culture methods. Chinese Journal of Applied Ecology 25: 237–242.

Winemiller, K. O. and Leslie, M. A. 1992. Fish assemblages across a complex tropical freshwater/marine ecotone. Environmental Biology of Fishes 34: 29–50.

Winkler, U. K. and Stuckmann, M. 1979. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens.* Journal of Bacteriology 138: 663–670.

Wu, T., Sun, L. C., Du, C. H., Cai, Q. F, Zhang, Q. B., Su, W. J. and Cao, M. J. 2009. Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*). Food Chemistry 115: 137–142.

Zeng, W., Li, Z., Ye, S., Xie, S., Liu, J., Zhang, T. and Duan, M. 2010. Effects of stocking density on growth and skin color of juvenile darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli* (Richardson). Journal of Applied Ichthyology 26: 925–929.

ภาคผนวก

ก ต้นฉบับสำหรับการนำเสนอแบบบรรยายในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ

ปริมาตรน้ำที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และคุณภาพสีของปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910) เพศผู้

Optimal Water Volume on Growth, Feed Utilization and Coloration of Male Siamese Fighting Fish (*Betta splendens* Regan, 1910)

ศุกร์เทียนชัย แซ่โค้ว[1*] การุณ ทองประจุแก้ว[2] และวุฒิพร พรหมขุนทอง[1]

Suktianchai Saekhow[1*] Karun Thongprajukaew[2] and Wuttiporn Promkunthong[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาปริมาตรน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910) โดยนำปลากัดหางเดี่ยวครีบยาวเพศผู้สีแดงล้วนอายุ 6 สัปดาห์ (น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 0.97 ± 0.01 กรัม) มาเลี้ยงเดี่ยวในตู้สี่เหลี่ยมผืนผ้า (ความกว้าง 3.5 เซนติเมตร × ความยาว 8 เซนติเมตร × ความสูง 20 เซนติเมตร) ที่มีปริมาตรน้ำแตกต่างกัน 5 ระดับ (100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิลิตร) จำนวน 15 ตัวต่อทรีทเมนต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และเก็บข้อมูลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ผลการศึกษาพบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยปริมาตรน้ำ150 มิลลิลิตร มีความเหมาะสมที่สุดเมื่อพิจารณาจากอัตราการรอด การเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และสีของผิว ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงปลากัดเพื่อจำหน่าย รวมทั้งสามารถต่อยอดเพื่อพัฒนาระบบเลี้ยงที่ใช้น้ำน้อย

ABSTRACT

The optimal water volume for rearing single-tailed long-finned Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910) was studied. Six-week-old solid-red male fish (0.97 ± 0.01 g mean initial body weight, *n* = 75) were individually divided into rectangular aquaria (3.5 cm width × 8 cm length × 20 cm height) which containing different water volumes (100, 150, 200, 250 and 300 mL). At the end of eight weeks experiment, the suitable treatment in terms of survival, growth performance, feed utilization and skin coloration was 150 mL water. Finding from the current study could be applied for commercial production of Siamese fighting fish, as well as developing an intensive system (with low water volume) for this species.

Keyword: Coloration, Feed utilization, Growth, Siamese fighting fish

* Corresponding author; e-mail address: suktianchaisaekhow@gmail.com

[1] ภาควิชาวารีชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

[2] ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

[1] Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

[2] Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

คำนำ

ปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910) เป็นปลาสวยงามที่มีสีสันหลากหลาย และมีครีบที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะสายพันธุ์ และได้รับความนิยมเลี้ยงไว้เพื่อการต่อสู้และสวยงามทั้งในและต่างประเทศ จึงเป็นปลาสวยงามที่มีการส่งออกและสร้างรายได้เข้าประเทศเป็นอันหนึ่ง โดยในปี พ.ศ. 2553 มีการส่งออกปลากัดคิดเป็นมูลค่า 329 ล้านบาท (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) อย่างไรก็ตาม ผลตอบแทนที่ได้รับของผู้เพาะเลี้ยงยังน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับปลาเศรษฐกิจอื่น เช่น ปลาทอง และปลาหางนกยูง เป็นต้น ซึ่งต่างก็เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทยเช่นกัน (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) ต้นทุนการผลิตที่สูงเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อกำไร ซึ่งปัจจุบันการเพาะเลี้ยงปลากัดยังคงเป็นแบบดั้งเดิม และขาดการนำความรู้และแนวคิดทางด้านวิทยาศาสตร์เข้ามาพัฒนาทำให้ต้นทุนในการผลิตสูง ดังนั้น การนำความรู้ทางวิทยาศาสตร์มาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาระบบเลี้ยงปลากัดจะเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มคุณภาพของปลากัดได้

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหนาแน่นสูงเป็นทางเลือกหนึ่งของการเพิ่มผลผลิตในการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าปลากัดในธรรมชาติมักอาศัยอยู่ที่ความลึก 2.0–9.4 เซนติเมตร และครอบครองพื้นที่ได้ไม่เกิน 5 ตัวต่อตารางเมตร (Jaroensutasinee and Jaroensutasinee, 2001) การมีพฤติกรรมก้าวร้าวทำให้ต้องมีการเลี้ยงปลากัดเป็นแบบเดี่ยว การศึกษาในปลากัดพบว่ามีการเลี้ยงด้วยปริมาตรน้ำที่แตกต่างกันตั้งแต่ปริมาตรน้ำมาก เช่น 1 ลิตร (Takeuchi *et al*., 2010) หรือ 2 ลิตร (Karino and Someya, 2007) หรือปริมาตรน้ำน้อย เช่น 250 มิลลิลิตร (Verbeek *et al*., 2008) เป็นต้น ความหลากหลายของปริมาตรน้ำที่ใช้ดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าปลากัดสามารถดำรงชีวิตได้ในปริมาตรน้ำที่หลากหลายภายในภาชนะรูปทรงแตกต่างกัน

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าความหนาแน่นในการเลี้ยงส่งผลต่อการเจริญเติบโต (Jha and Barat, 2005) รวมทั้งสีผิวของปลาหลายชนิด (Zeng *et al*., 2010) ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาตรน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากัด (*B. splendens*) โดยนำปลากัดหางเดี่ยวครีบยาวเพศผู้สีแดงล้วนมาเลี้ยงเดี่ยวในตู้สี่เหลี่ยมผืนผ้าเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และประเมินอัตราการรอด การเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และสีผิวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงปลากัดเพื่อจำหน่ายรวมทั้งการต่อยอดและพัฒนาระบบสำหรับการเลี้ยงปลากัดที่ใช้น้ำน้อย

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมและเลี้ยงปลากัด

นำปลากัดหางเดี่ยวครีบยาวเพศผู้สีแดงล้วนอายุ 4 สัปดาห์ จากฟาร์มเพาะเลี้ยงใน จ. นครปฐม มาปรับสภาพนาน 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำปลาน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 0.97 ± 0.01 กรัม มาเลี้ยงเดี่ยวในตู้สี่เหลี่ยมผืนผ้า (ความกว้าง 3.5 เซนติเมตร × ความยาว 8 เซนติเมตร × ความสูง 20 เซนติเมตร) ที่มีปริมาตรน้ำแตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิลิตร (15 ตัวต่อทรีทเมนต์) ทำการทดลองนาน 8 สัปดาห์ ตลอดการเลี้ยงอุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วง 26.00–29.80 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.40–6.93 อาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นอาหารสำเร็จรูปสำหรับปลากัดที่มีโปรตีน $\geq$46 เปอร์เซ็นต์ (เอ็มซีที อะควาเรียม จำกัด, นครปฐม) โดยให้ในอัตรา 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว จำนวน 2 ครั้งต่อวัน (08.00 และ 17.00 น.) ให้แสงธรรมชาติเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน และเปลี่ยนน้ำที่ใช้เลี้ยง 80 เปอร์เซ็นต์ ทุก 3 วัน สถานที่และการควบคุมสภาวะในการเลี้ยงทำเช่นเดียวกันทั้งการเลี้ยงเพื่อปรับสภาพและการเลี้ยงเพื่อทดลอง และปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของสภาวิจัยแห่งชาติ (เลขที่ใบอนุญาต U1-06514-2560) เมื่อสิ้นสุดการทดลองให้ปลาอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงสลบปลาด้วยน้ำมันกานพลู แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก วัดความยาว และตรวจวัดสี (n = 15) สำหรับอัตราการรอดและปริมาณอาหารที่ให้ปลากินจะบันทึกข้อมูลทุกวัน สูตรสำหรับคำนวณอัตราการรอด การเจริญเติบโต และการใช้ประโยชน์จากอาหารมีดังนี้

$$\text{อัตราการรอด (เปอร์เซ็นต์)} = (\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}/\text{จำนวนปลาเริ่มต้น}) \times 100$$

$$\text{คอนดิชันแฟกเตอร์} = [\text{น้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)}/\text{ความยาว(เซนติเมตร)}^3] \times 100$$

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวต่อวัน)} = [\ln \text{น้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลอง(กรัม)} - \ln \text{น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)}/\text{ระยะเวลาในการทดลอง (วัน)}] \times 100$$

$$\text{อัตราการกิน (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวต่อวัน)} = \text{อาหารที่กินในแต่ละวัน}/[\text{ระยะเวลาให้อาหาร} \times (\text{น้ำหนักตัวเริ่มต้น} + \text{น้ำหนักตัวสุดท้าย})/2] \times 100$$

$$\text{อัตราการแลกเนื้อ (กรัมอาหารต่อกรัมน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น)} = \text{น้ำหนักแห้งของอาหารที่กิน (กรัม)}/\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}$$

การตรวจวัดสีผิว

นำปลาที่สลบแล้วไปตรวจวัดสีผิวทันทีโดยใช้เครื่องมือวัดสี (Miniscan EZ, Hunter Associates Laboratory, Reston VA, USA) ในบริเวณส่วนกลางของลำตัว โดยค่าที่ตรวจวัด ได้แก่ ค่าความสว่าง (L^*) ค่าความแดง (a^* และ a^*/b^*) ค่าความเหลือง (b^*) ค่าโครมา (C^*) และค่าฮิว (h^*)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน(n = 15) วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 14 (SPSS Inc., Chicago, USA) และใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการทดลอง

อัตราการรอด การเจริญเติบโต และการใช้ประโยชน์จากอาหาร

ปลาทุกทรีทเมนต์มีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำหนักสุดท้ายและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1, $P > 0.05$) ความยาวมาตรฐานและคอนดิชันแฟกเตอร์มีค่าสูงในปลาที่เลี้ยงด้วยน้ำปริมาตร 150 มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับทรีทเมนต์อื่นๆ สำหรับการใช้ประโยชน์จากอาหาร พบว่าอัตราการกินอาหารไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการแลกเนื้อมีค่าต่ำที่สุดในปลาที่เลี้ยงด้วยน้ำปริมาตร 150 มิลลิลิตร และมีค่าสูงสุดในปลาที่เลี้ยงด้วยน้ำปริมาตร 300 มิลลิลิตร ขณะที่ทรีทเมนต์อื่นๆ มีค่าที่ไม่แตกต่างจากปลาทั้ง 2 กลุ่ม

Table 1 Survival rate, growth performance and feed utilization of single-tailed long-finned solid-red male Siamese fighting fish at various water volumes.

Parameter	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
Survival rate (%)	100	100	100	100	100
FBW (g)	1.06 ± 0.04	1.16 ± 0.03	1.09 ± 0.03	1.08 ± 0.04	1.10 ± 0.03
SL (cm)	3.39 ± 0.04^{b}	3.48 ± 0.04^{ab}	3.52± 0.04^{ab}	3.49± 0.06^{ab}	3.54 ± 0.04^{a}
CF	2.73 ± 0.04^{a}	2.80 ± 0.04^{a}	2.46 ± 0.04^{b}	2.47 ± 0.04^{b}	2.49 ± 0.04^{b}
SGR (% BW day^{-1})	0.38 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.36 ± 0.04	0.37 ± 0.03	0.34 ± 0.03
FR (% BW day^{-1})	1.17 ± 0.02	1.09 ± 0.02	1.10 ± 0.04	1.17 ± 0.05	1.15 ± 0.03
FCR (mg feed mg gain^{-1})	2.65 ± 0.25^{ab}	2.28 ± 0.25^{b}	3.12 ± 0.28^{ab}	2.53 ± 0.16^{ab}	3.41 ± 0.48^{a}

FBW, final body weight; SL, standard length; CF, condition factor; SGR, specific growth rate; FR, feeding rate; FCR, feed conversion ratio

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$)

ความเข้มของสีผิว

ปริมาตรน้ำที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อความสว่างของสีผิวปลา (ตารางที่ 2) เมื่อพิจารณาทุกพารามิเตอร์ร่วมกันพบว่าค่าความสว่าง ความแดง ความเหลือง โครมา และฮิว มีค่าสูงสุดในปลาที่เลี้ยงด้วยปริมาตรน้ำ 150 มิลลิลิตร

Table 2 Color parameters measured from skin of single-tailed long-finned solid-red male Siamese fighting fish at various water volumes.

Parameter	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
*L**	18.61 ± 0.60	20.67 ± 0.67	18.61 ± 0.91	20.41 ± 0.46	20.56 ± 0.13
*a**	13.06 ± 0.47^{a}	12.17 ± 0.48^{a}	11.13 ± 0.49^{b}	11.04 ± 0.21^{b}	10.99 ± 0.40^{b}
*b**	7.87 ± 0.46^{a}	7.82 ± 0.61^{a}	8.36 ± 0.40^{a}	6.92 ± 0.24^{ab}	6.31 ± 0.34^{b}
*C**	15.36 ± 0.19^{a}	14.54 ± 0.66^{ab}	13.52 ± 0.18^{bc}	13.54 ± 0.30^{bc}	12.60 ± 0.43^{c}
*h**	32.46 ± 1.36^{a}	32.97 ± 0.45^{a}	42.45 ± 0.62^{b}	34.66 ± 1.25^{a}	32.50 ± 1.36^{a}
*a**/*b**	1.28 ± 0.11^{b}	1.48 ± 0.05^{a}	1.10 ± 0.03^{c}	1.45 ± 0.03^{ab}	1.46 ± 0.03^{ab}

*L**, lightness; *a** and *a**/*b**, redness; *b**, yellowness; *C**, Chroma; *h**, hue

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$)

วิจารณ์ผลการทดลอง

ความหนาแน่นเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของปลาหลายชนิด (Jha and Barat, 2005; Niazie *et al*., 2013) โดยความหนาแน่นสูงทำให้มีการแย่งอาหาร คุณภาพน้ำต่ำลง สัตว์ที่เลี้ยงเกิดความเครียด และใช้พลังงานเพื่อการดำรงชีวิตเพิ่มมากขึ้น (Roo *et al*., 2010; Manley *et al*., 2014) ขณะที่ความหนาแน่นต่ำอาจทำให้ปลาเจริญเติบโตช้าและใช้อาหารได้ต่ำอีกเช่นเดียวกัน เนื่องจากปลาบางชนิดอาจอยู่รวมกันเป็นฝูงและมีพฤติกรรมทางสังคม (Pirozzi *et al*., 2009; Millán-Cubillo *et al*., 2016) การเลี้ยงปลากัดแบบเดี่ยวในตู้กระจกและวางตู้ชิดกันเพื่อเลียนแบบการเลี้ยงในฟาร์มในการศึกษาครั้งนี้ทำให้ปลาสามารถมองเห็นกันชัดเจน และด้วยพฤติกรรมก้าวร้าวของปลากัด ทำให้เกิดความเครียดเช่นเดียวกับการเลี้ยงปลาหลายตัวในตู้เดียวกัน (Karino and Someya, 2007) อย่างไรก็ตาม ความหนาแน่นที่เหมาะสมเท่านั้นจึงจะทำให้สัตว์มีความสมดุลทั้งอัตราการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และสวัสดิภาพในการเลี้ยง เช่น ความหนาแน่นที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเต่าตนุ (*Chelonia mydas*) คือ 40 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร เมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับ 20, 60 และ 80 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร (Kanghae *et al*., 2016) ดังนั้น การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของปริมาตรน้ำต่อความเครียดของปลากัด (เช่น

ระดับของคอร์ติซอล) จึงมีความจำเป็นต่อการเพิ่มสวัสดิภาพในการเลี้ยง การเลี้ยงปลาในปริมาตรน้ำน้อยที่สุด (100 มิลลิลิตร) ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการลดลงของความยาวมาตรฐาน ปลากัดในกลุ่มนี้จึงมีค่าคอนดิชันแฟกเตอร์สูง ซึ่งอาจเกิดจากการสะสมพลังงานของอวัยวะภายใน (Lui *et al*., 2016) หรือการสะสมพลังงานของร่างกาย (Goede and Barton, 1990) เนื่องจากถูกจำกัดพื้นที่ สำหรับค่าคอนดิชันแฟกเตอร์ในการศึกษาครั้งนี้คำนวณจากน้ำหนักตัวต่อความยาวมาตรฐานซึ่งจะช่วยลดความแปรปรวนจากความยาวครีบหางซึ่งเป็นผลมาจากความแปรผันทางพันธุกรรมได้ ค่าคอนดิชันแฟกเตอร์ที่ต่ำในปลาที่เลี้ยงในน้ำที่มีปริมาตรตั้งแต่ 200 มิลลิลิตรขึ้นไป เกี่ยวข้องกับความยาวของลำตัวที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามปริมาตรของน้ำ ขณะที่น้ำหนักมีอัตราการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างคงที่

อัตราการกินอาหารไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการแลกเนื้อมีค่าต่ำสุดในปลาที่เลี้ยงด้วยน้ำปริมาตร 150 มิลลิลิตร ผลที่ได้อาจเกิดจากปริมาตรน้ำ (ความหนาแน่น) กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารทำให้ใช้ประโยชน์จากอาหารได้ดีขึ้น (Kanghae *et al.,* 2016) นอกจากนี้ ปริมาตรน้ำที่แตกต่างกันยังส่งผลโดยตรงต่อความลึกซึ่งเกี่ยวข้องกับความดันของน้ำ และค่าแรงโน้มถ่วงที่มีผลต่อการใช้พลังงาน ดังนั้น ความลึกของน้ำจึงอาจมีผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารของสัตว์ (Songnui *et al*., 2017) ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้อาจแสดงให้เห็นว่าปริมาตรน้ำและ/หรือความลึกเป็นตัวกระตุ้นที่ส่งผลต่อการย่อยและการดูดซึมอาหารของปลา ทำให้ปลาในแต่ละกลุ่มมีการดูดซึมสารอาหารมาใช้ประโยชน์ได้ต่างกัน

ความเข้มของสีเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อมูลค่าทางการค้าของปลา สำหรับสีแดงในปลากัดถูกควบคุมโดยปัจจัยหลายประการ แต่ปัจจัยที่สำคัญคือปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่ปลากินเข้าไป โดยปลากัดเพศเมียชอบจับคู่กับปลากัดเพศผู้ที่มีสีแดงมากกว่าสีน้ำเงิน (Clotfelter *et al*., 2007) และชอบจับคู่กับปลากัดที่มีสีแดงสดมากกว่าสีแดงอ่อน (Blakeslee *et al*., 2009) การศึกษาในครั้งนี้พบว่าพารามิเตอร์บ่งชี้ความแดงของสีผิว (a^* และ a^*/b^*) มีค่าสูงที่สุดในปลาที่เลี้ยงในปริมาตรน้ำ 150 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับค่าโครมาที่ช่วยบ่งบอกถึงความอิ่มตัวของสี และค่าฮิวซึ่งแสดงสีที่มองเห็น (Zeng *et al*., 2010) ดังนั้น การเลี้ยงปลากัดที่ปริมาตรน้ำดังกล่าวอาจสร้างความพึงพอใจต่อสีของผู้ซื้อได้เป็นอย่างดี รวมทั้งช่วยรักษาลักษณะที่ดีต่อการเกี้ยวพาราสีของปลาเพศผู้ ในปลา Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) พบว่าปลาที่เลี้ยงที่ความหนาแน่น 50 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร มีการสะสมของแคโรทีนอยด์สูงกว่าที่ความหนาแน่น 40 และ 75 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร (Metusalach *et al*., 1997) เช่นเดียวกับการศึกษาใน darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*) (Zeng *et al*., 2010) การเปลี่ยนแปลงสีของปลาดังกล่าวอาจเกิดขึ้นจากปัจจัยอื่นๆ นอกเหนือจากปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้รับจากอาหาร สำหรับการศึกษาในปลากัดครั้งนี้ อาหารที่ใช้เลี้ยงปลาทุกทรีทเมนต์เป็นชนิดเดียวกันและปลามีอัตราการกินอาหารที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงปริมาตรน้ำและ/หรือความลึกของน้ำอาจเป็นตัวกระตุ้นที่มีผลต่อคุณภาพสีของปลากัด ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของโครมาโทฟอร์ (Kelsh, 2004)

สรุป

ปริมาตรน้ำที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงปลากัดหางเดี่ยวครีบยาวเพศผู้สีแดงล้วนแบบเดี่ยว คือ 150 มิลลิลิตร ในภาชนะสี่เหลี่ยมผืนผ้า (ความกว้าง 3.5 เซนติเมตร × ความยาว 8 เซนติเมตร × ความสูง 20 เซนติเมตร) โดยพิจารณาจากอัตราการรอด การเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และสีผิว ปริมาตรน้ำดังกล่าวเหมาะสำหรับการเลี้ยงปลากัดที่มีอายุ 1.5 ถึง 4 เดือน ซึ่งเป็นอายุตั้งแต่เริ่มเลี้ยงแยกจนถึงจำหน่าย อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงรูปทรงของภาชนะ และ/หรือระดับความลึกของน้ำอาจให้ผลที่แตกต่างกัน รวมทั้งควรมีการศึกษาปลากัดสีอื่น และปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ เช่น ความเข้มของแสง หรืออัตราการเปลี่ยนน้ำ เป็นต้น จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเลี้ยงและเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการออกแบบระบบการเลี้ยงปลากัดแบบใช้น้ำน้อย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย (เลขที่สัญญา SCI590420S)

เอกสารอ้างอิง

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2554. **การศึกษาเศรษฐกิจการผลิตการตลาดปลาสวยงาม**. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

Blakeslee, C., S.P. McRobert, A.C. Brown and E.D. Clotfelter. 2009. The effect of body coloration and group size on social partner preferences in female fighting fish (*Betta splendens*). **Behav. Proc.** 80: 157–161.

Clotfelter, E.D., D.R. Ardia and K.J. Mcgraw. 2007. Red fish, blue fish: trade–offs between pigmentation and immunity in *Betta splendens*. **Behav. Ecol.** 18: 1139–1145.

Goede, R.W. and B.A. Barton. 1990. Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. **Amer. Fish. Soc. Symp.** 8: 93–108.

Jaroensutasinee, M. and J. Jaroensutasinee. 2001. Bubble nest habitat characteristics of wild Siamese fighting fish. **J. Fish Biol.** 58: 1311–1319.

Jha, P. and S. Barat. 2005. The effect of stocking density on growth, survival rate, and number of marketable fish produced of koi carps, *Cyprinus carpio* vr. *koi* in concrete tanks. **J. Appl. Aquac.** 17: 89–102.

Kanghae, H., K. Thongprajukaew, S. Jatupornpitukchat and K. Kittiwattanawong. 2016. Optimal rearing density for head-starting green turtles (*Chelonia mydas* Linnaeus, 1758). **Zoo Biol.** 35: 454–461.

Karino, K. and C. Someya. 2007. The influence of sex, line, and fight experience on aggressiveness of the Siamese fighting fish in intrasexual competition. **Behav. Proc.** 75: 283–289.

Kelsh, R.N. 2004. Genetics and evolution of pigment patterns in fish. **Pigment Cell Res.** 17, 326–336.

Lui, Q., Z. Hou, H. Wen, J. Li, F. He, J. Wang, B. Guan and Q. Wang. 2016. Effect of stocking density on water quality and (growth, body composition and plasma cortisol content) performance of pen-reared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Ocean Univ. China** 15: 667–675.

Manley, C.B., C.F. Rakocinski, P.G. Lee and R.B. Blaylock. 2014. Stocking density effects on aggressive and cannibalistic behaviors in larval hatchery-reared spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*. **Aquaculture** 420–421: 89–94.

Metusalach, J., A. Brown and F. Shahidi. 1997. Effects of stocking density on colour characteristics and deposition of carotenoids in cultured Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Food Chem.** 59: 107–114.

Millán-Cubillo, A.F., J.A. Martos-Sitcha, I. Ruiz-Jarabo, S. Cárdenas and J.M. Mancera. 2016. Low stocking density negatively affects growth, metabolismand stress pathways in juvenile specimens of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801). **Aquaculture** 451:87–92.

Niazie, E.H.N., M. Imanpoor, V. Taghizade and G. Zadmajid. 2013. Effects of density stress on growth indices and survival rate of goldfish (*Carassius auratus*). **Global Veterinaria** 10: 365–371.

Pirozzi, I. M.A. Booth and P.M. Pankhurst. 2009. The effect of stocking densityand repeated handling on the growth of juvenile mulloway, *Argyrosomus japonicus* (Temminck & Schlegel 1843). **Aquac. Int.** 17:199–205.

Roo, J. C.M. Hernández-Cruz, C.Borrero, D. Schuchardt and H. Fernández-Palacios. 2010. Effect of larval density and feeding sequence on meager (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) larval rearing. **Aquaculture** 302:82–88.

Songnui, A., K. Thongprajukaew, H. Kanghae, J. Satjarak and K. Kittwattanawong. 2017. Water delp and feed pellet type effects on growth and feed utilization in the rearing of green turtle (*Chelonia mydas* Linnaeus, 1758). **Aquat. Living. Resour.** DOI: 10.1051/alr/2017017.

Takeuchi, Y., M. Hori, M. Myint and M. Kohda. 2010. Lateral bias of agonistic responses to mirror images and morphological asymmetry in the Siamese fighting fish (*Betta splendens*). **Behav. Brain Res.** 208: 106–111.

Thongprajukaew, K., S. Kovitvadhi, U. Kovitvadhi and K. Rungruangsak-Torrissen. 2014. Pigment deposition and *in vitro* screening of natural pigment sources for enhancing pigmentation in male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). **Aquac. Res.**45: 709–719.

Verbeek, P., T. Iwamoto and N. Murakami. 2008. Variable stress-responsiveness in wild type and domesticated fighting fish. **Physiol. Behav.** 93: 83–88.

Zeng, W., Z. Li, S. Ye, S. Xie, J. Liu, T. Zhang and M. Duan. 2010. Effects of stocking density on growth and skin color of juvenile darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli* (Richardson). **J. Appl. Ichthyol.** 26: 925–929.

ข ผลงานที่ได้รับการตอบรับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

AUTHOR'S PROOF

Fish Physiol Biochem
https://doi.org/10.1007/s10695-018-0495-z

Minimal water volume for intensively producing male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910)

Suktianchai Saekhow · Karun Thongprajukaew · Wutiporn Phromkunthong · Harit Sae-khoo

Received: 18 November 2017 / Accepted: 21 March 2018
© Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2018

Abstract Water volume is a key parameter affecting the individual rearing of male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). In this study, minimization of water volume was pursued by assessing growth, feed utilization, digestive enzyme activities, color coordinates, muscle quality, and carcass composition. One-month-old solid-red male fish (0.97 ± 0.01 g initial body weight) were distributed individually into glass aquaria with five alternative water volumes (100, 150, 200, 250, and 300 mL), comprising 15 fish per treatment ($n = 15$), over 8 weeks duration. No mortality of the reared fish was found during the study. Growth performance and feed utilization of the fish reared in 150 mL water were superior to the other treatments. The water volume significantly affected specific activities of the digestive enzymes ($P < 0.05$), except for amylase, and no differences in enzyme activities were observed between fish reared in 150 and in 300 mL water. The preferred treatment maintained skin lightness (L^*) and had the highest redness (a^* and a^*/b^*) among the treatments. Protein synthesis (RNA concentration) and its turnover rate (RNA/protein ratio) and myosin and actin in muscle also benefited from this treatment. Carcass composition, in terms of moisture, crude protein, and crude ash, was maintained, but the amount of crude lipid fluctuated with water volume. Based on our experiments, the preferred minimal water volume for individual rearing of male Siamese fighting fish should be about 150 mL.

Keywords Carcass composition · Color · Growth · Feed utilization · Muscle quality

S. Saekhow · W. Phromkunthong
Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand

S. Saekhow
e-mail: suktianchaisaekhow@gmail.com

W. Phromkunthong
e-mail: wutiporn.p@psu.ac.th

K. Thongprajukaew (✉) · H. Sae-khoo
Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand
e-mail: karun.t@psu.ac.th

H. Sae-khoo
e-mail: sern_handsome@hotmail.com

Introduction

Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910) is a commercially produced and exported species of ornamental fish in Thailand (Monvises et al. 2009). It inhabits shallow waters among dense emergent vegetation near the margins of hill streams, swamps, or paddy fields (Jaroensutasinee and Jaroensutasinee 2001) and is native to the Mekong basin of Laos, Cambodia, Vietnam, and Thailand (Froese and Pauly 2016). Only the male fish are popular for their brilliant colors, and solid red is preferred by the fish culturists with solid blue coming in the second place (Thongprajukaew et al. 2014).

UNCORRECTED PROOF

AUTHOR'S PROOF
UmID 10695_ArtID 495_Proof# 1 - 26/03/2018

In the nature, *B. splendens* has a mean population density of 1.7 fish m^{-2} in shallow (about 2–9 cm) waters (Jaroensutasinee and Jaroensutassinee 2001). Under captivity in aquaria, this fish can be reared in small containers with poor quality water (Jaroensutasinee and Jaroensutasinee 2001). Individual rearing of this species can depress its otherwise aggressive behavior under captivity in aquaria (Halperin et al. 1992). Various water volumes have been used for rearing *B. splendens* in laboratory studies (Karino and Someya 2007; Verbeek et al. 2008; Takeuchi et al. 2010), as well as during export logistics. However, the minimal water volume for rearing this species has not been examined, but needs to be assessed.

The stocking density has been demonstrated as a variable crucial to growth performance (Sanchez et al. 2010), survival (Jha and Barat 2005), and feed utilization (Niazie et al. 2013) of cultured fishes. The effects of density on these parameters vary by fish species. Negative effects from decreased water volume have been generally reported (Jha and Barat 2005; Ahmadivand et al. 2013); however, also positive effects have been found in some cases (Osofero et al. 2009; Sammouth et al. 2009; Niazie et al. 2013). Varying the stocking density can require adaptations in the fish lifestyle by changes in feed consumption, social interactions, water quality, and stress (Cristea et al. 2012). In addition, the density also affects digestive enzymes that relate to the mechanisms of digestion and the feed utilization (Bolasina et al. 2006; Kanghae et al. 2016).

Stocking denstity has been reported to affect skin pigmentation in various fish (Ali et al. 2006; Zeng et al. 2010). Therefore, the physiological induction under restricted water volume might alter the skin coloration of captive fighting fish. In addition, studies of the myofibrillar proteins, actin and myosin (Tyska and Warshaw 2002), and protein synthesis capacity (Sunde et al. 2001), appear necessary to observe as indicators of the physiological changes in muscles under captivity. Proximate composition of carcass may also be affected by the stocking density (Osofero et al. 2009; Cretu et al. 2014; Lui et al. 2016), due to accumulation or depletion of energy reserves (Cretu et al. 2014). Therefore, the objective of this study was to minimize the water volume for the individual rearing of male Siamese fighting fish, based on assessment of growth, feed utilization, digestive enzyme activities, skin color, muscle quality, and carcass composition. Only solid-red male fish were chosen as the models, because they have the relatively high market prices in comparison to other solid colorations (Thongprajukaew et al. 2014). Findings from the current study might be useful for farm management, as well as on developing systems for the intensive rearing of this species.

Materials and methods

Fish preparation and experimental setup

One-month-old solid-red male Siamese fighting fish were purchased from a local farm in Nakonpathom province of Thailand. The fish were individually acclimatized in cylindrical plastic beakers (7.5 cm diameter × 12.5 cm height) containing 250 mL water, for 2 weeks. The fish with similar size (0.97 ± 0.01 g initial body weight) were distributed individually into glass aquaria (3.5 cm width × 8 cm length × 20 cm height) containing five alternative water volumes (100, 150, 200, 250, and 300 mL), comprising 15 fish per treatment ($n = 15$) as the experimental units. The fish were fed a commercial floating diet (MCT Aquarium, Nakonpathom, Thailand) for small ornamental fish (containing ≥ 10% moisture, ≥ 46% crude protein, ≥ 6% crude lipid, ≥ 5% crude fiber, and ≥ 12% crude ash) twice daily (08.00 and 17.00 h) at 2% of body weight (BW). The experiment was conducted for 8 weeks with the natural 12 h:12 h light/dark cycle. Survival was recorded daily before beginning the first feeding. Uneaten excess diet was siphoned off 30 min after feeding, dried at 60 °C until constant weight, and the determined weight was used to calculate the feeding rate (FR), feed conversion ratio (FCR), and protein efficiency ratio (PER). At the end of the experiment, all the fish were starved for 24 h and then were anesthetized by clove oil. Measurement of BW and standard length of all the fish was performed at the end of experiment. All these fish were used for subsequent analysis of digestive enzymes, muscle quality, color coordinates, and carcass composition.

Water monitoring

The water was 80% replaced by dechlorinated stock within 3 consecutive days. Water was sampled at the same time (07.30 h) for quality analysis. Water temperature (Hg thermometer) and pH (pH meter) were determined according to standard methods of APHA, AWWA, and WPCF (1998). Ammonia, nitrite, and

UNCORRECTED PROOF

AUTHOR'S PROOF

alkalinity were determined using a commercial test kit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Dissolved oxygen was determined by a water analyzer (Multiparameter Display System; YSI 650MDS, YSI Incorporated, Ohio, USA).

Determination of digestive enzyme activity

Extraction of digestive enzymes

The frozen whole visceral organs ($n = 5$) were extracted in 0.2 M Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 buffer (pH 8) at a ratio of 1:15 (*w*/*v*), using a micro-homogenizer (THP-220; Omni International, Kennesaw GA, USA). The homogenates were centrifuged at 15,000×*g* for 30 min at 4 °C, and supernatants were collected, and aliquots were kept at – 20 °C until use. The protein concentration of a crude enzyme extract was compared to a standard curve of bovine serum albumin, according to the standard method of Lowry et al. (1951).

Digestive enzyme assay

The optimal conditions of assaying pepsin (EC 3.4.23.2), trypsin (EC 3.4.21.4), chymotrypsin (EC 3.4.21.1), amylase (3.2.1.1), and lipase (EC 3.1.1.3) in Siamese fighting fish were chosen from Thongprajukaew et al. (2010a, b). Pepsin activity was assayed according to the method of Rungruangsak and Utne (1981), using 2% casein as substrate. The activity was spectrophotometrically measured at 720 nm against the linear range of *L*-tyrosine standard. Trypsin and chymotrypsin activities were determined as described by Rungruangsak-Torissen et al. (2006), using 1.25 mM *N*-α-benzoyl-Arg-*p*-nitroanilide (BAPNA) and 0.10 mM *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (SAPNA) as substrates, respectively. The liberated product of each enzyme was spectrophotometrically measured at 410 nm against the linear range of *p*-nitroanilide standard. Lipase activity was assayed according to the method of Winkler and Stuckmann (1979), using 0.01 M *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) as substrate. The absorbance at 410 nm was measured against *p*-nitrophenol standard. Amylase activity was assayed as described by Areekijseree et al. (2004), using 5% starch soluble as the substrate. The product was measured at 540 nm against maltose standard.

Color measurement

Quantitative values of skin color in terms of lightness (*L**), redness/greenness (*a**), and yellowness/blueness (*b**) were measured using a MiniScan EZ (Hunter Associates Laboratory, Reston VA, USA) with small area view (6 mm port and 5 mm view diameters). The instrument was calibrated to white and black standards before measurement. Each unconscious fish ($n = 15$) was carefully cleaned by soft blotting paper and then the color was measured from the middle part of body. The redness index (*a**/*b**) was also calculated.

Muscle quality

Protein synthesis capacity

The expoxial white muscle excluding scale and skin (below dorsal fin) was carefully removed ($n = 5$). Then 50 mg frozen samples were sonicated (VCX; Sonic and Materials Inc., Newtown CT, USA) in TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) and the concentrations of RNA and protein were determined as described in Rungruangsak-Torrissen (2007). The extinction coefficients for calculating RNA and protein were $E_{260} =$ 40 μg RNA per milliliter and $E_{280} = 2.1$ mg protein per milliliter, respectively. The concentration ratio (RNA/protein ratio) from each sample was calculated from the amounts of RNA and protein.

Actin and myosin

Thermal parameters, including onset (T_o), denaturation peak (T_d), and conclusion (T_c) temperatures, and enthalpy (ΔH), were determined using a differential scanning calorimeter (DSC7, Perkin Elmer,Waltham, Massachusetts, USA). Approximately 10 mg of thawed fish muscle ($n = 5$) was placed in an aluminum pan, sealed, allowed to equilibrate at room temperature, and then heated from 20 to 100 °C at a rate of 5 °C min^{-1} against an empty pan. Identification of myosin and actin peaks was performed as described in Thongprajukaew et al. (2015).

Proximate chemical composition of carcass

The whole body ($n = 5$) was minced and then moisture and crude ash were determined according to standard methods of AOAC (2005). Crude protein was

UNCORRECTED PROOF

AUTHOR'S PROOF JrnlID 10695_ArtID 495_Proof# 1 - 26/03/2018

determined as described in Rungruangsak-Torrissen (2007). Crude lipid was determined by ethyl acetate extraction according to Supannapong et al. (2008).

Statistical analysis and calculations

The experiment followed a completely randomized design (CRD), comprising five treatments and 15 replications each. The data were recorded in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) and then subjected to analysis in Statistical Package for Social Science (SPSS) Version 14 (SPSS Inc., Chicago, USA) for all the statistical evaluations. The data are here expressed as mean ± standard error of mean (SEM). Comparisons of means in the statistical analyses were carried out using Duncan's multiple range test with significance threshold $P < 0.05$. Survival, growth performance, and feed utilization parameters were calculated as described below:

$$\text{Survival}\ (\%) = [\text{Final fish number}/\text{initial fish number}] \times 100$$

$$\text{Condition factor}\ \left(\text{CF}, \text{g cm}^{-3}\right) = \left[\text{Live body weight (g)}/\text{body length (cm)}^3\right] \times 100$$

$$\text{Specific growth rate}\ \left(\text{SGR}, \%\text{BW day}^{-1}\right) = [(\ln W_t - \ln W_0)/(t - t_0)] \times 100$$

where W_t = mean weight (g) at day t, W_0 = mean weight (g) at day t_0.

$$\text{Viscerosomatic index (VSI, \%)} = [\text{Wet weight of visceral organ (g)}/\text{wet body weight (g)}] \times 100$$

$$\text{FR}\ \left(\%\text{BW day}^{-1}\right) = \text{C}/[(W_0 + W_t)/2]/t \times 100$$

where C = daily feed consumption (g), W_0 = initial body weight (g), W_t = final body weight(g), t = feeding duration (day)

$$\text{FCR}\ \left(\text{g feed g gain}^{-1}\right) = \text{dry feed consumed (g)}/\text{wet weight gain (g)}$$

$$\text{PER}\ \left(\text{g gain g protein}^{-1}\right) = \text{wet weight gain (g)}/\text{protein intake (g)}$$

Results

Water quality during experiment

There were no significant differences in water temperature, dissolved oxygen, nitrite, or alkalinity between the five treatments ($P > 0.05$, Table 1). The pH values were elevated in the treatments with 250 and 300 mL water ($P < 0.05$), followed by 150 and 200 mL ($P > 0.05$), on comparing to the lowest volume. Ammonia concentration was highest in the 100 mL volume, although without significant difference to the 150 mL treatment.

Table 1 Water quality during male Siamese fighting fish individual rearing. The analysis was performed every 3 days with water change

Water quality	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
pH	6.44 ± 0.04^{b}	6.55 ± 0.06^{ab}	6.66 ± 0.02^{ab}	6.79 ± 0.14^{a}	6.79 ± 0.12^{a}
Temperature (°C)	27.83 ± 0.16	27.99 ± 0.20	28.00 ± 0.25	27.98 ± 0.25	27.81 ± 0.27
Dissolved oxygen (mg L^{-1})	3.36 ± 0.17	3.33 ± 0.15	3.26 ± 0.11	3.01 ± 0.14	2.97 ± 0.09
Ammonia (mg L^{-1})	3.73 ± 0.28^{a}	2.90 ± 0.45^{ab}	2.52 ± 0.48^{b}	1.85 ± 0.29^{b}	2.29 ± 0.06^{b}
Nitrite (mg L^{-1})	1.21 ± 0.24	1.28 ± 0.52	0.87 ± 0.11	1.04 ± 0.55	0.89 ± 0.17
Alkalinity (mg L^{-1})	63.25 ± 5.50	57.29 ± 5.54	52.11 ± 6.52	54.56 ± 6.77	63.66 ± 6.44

Data are expressed as mean ± SEM

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$)

UNCORRECTED PROOF

AUTHOR'S PROOF

Survival, growth performance, and feed utilization

No mortality of reared fish was observed within the studied period (Table 2). Final body weight, body thickness, body depth, and SGR did not differ significantly between the five tratments. The highest and lowest weight gains were observed in the fish reared in 150 and 300 mL, respectively; the three remaining water volumes were intermediate between those two groups. Standard length was superior in the fish reared in 300 mL water relative to the lowest volume, while no significant differences were observed in the other groups. VSI was significantly decreased in the fish reared in 150 mL relative to the other four treatments. The highest CF values were observed in the fish reared in the two least water volumes. FCR and PER had superior values in the fish reared with 150, 200, or 250 mL water, while the FR showed no significant differences between the treatments.

Specific activities of digestive enzymes

The water volumes had significant effects on the specific activities of digestive enzymes, except for amylase (Table 3). The fish reared in the least water volume exhibited decreased enzyme activities, except for lipase and A/T ratio, relative to the other treatments. The fish reared in 200 or 250 mL had significant reductions in trypsin- and lipase-specific activities, respectively. There were no differences in any enzyme activity between rearing in 150 and 300 mL.

Color parameters

L^* values of fish skin did not differ among the five treatments (Table 4). Color parameters indicating skin redness (a^* and a^*/b^*) had their highest values in the fish reared in 150 mL water. This treatment also maintained the b^* value, as did the treatments with 100, 200, and 250 mL, but the 300 mL treatment did not.

Muscle quality

Protein synthesis capacity

The highest RNA concentration was achieved by the fish reared in 200 and 250 mL ($P < 0.05$) and followed by 150 mL ($P > 0.05$) relative to 100 and 300 mL

Table 2 Survival, growth performance, and feed utilization of male Siamese fighting fish individually reared in various water volumes. The observed parameters were recorded at the end of 8 weeks duration

Parameter	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
Survival (%)	100	100	100	100	100
Final body weight (g)	1.06 ± 0.04	1.16 ± 0.03	1.09 ± 0.03	1.08 ± 0.04	1.10 ± 0.03
Weight gain (g)	0.24 ± 0.03^{ab}	0.31 ± 0.04^{a}	0.25 ± 0.02^{ab}	0.22 ± 0.04^{ab}	0.20 ± 0.04^{b}
Standard length (cm)	3.39 ± 0.04^{b}	3.48 ± 0.04^{ab}	3.52 ± 0.04^{ab}	3.49 ± 0.06^{ab}	3.54 ± 0.04^{a}
Body thickness (cm)	0.34 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01
Body depth (cm)	0.87 ± 0.01	0.91 ± 0.01	0.94 ± 0.01	0.92 ± 0.02	0.92 ± 0.01
VSI (%)	6.36 ± 0.28^{a}	5.26 ± 0.24^{b}	6.37 ± 0.33^{a}	6.62 ± 0.28^{a}	7.12 ± 0.62^{a}
CF (g cm^{-3})	2.73 ± 0.04^{a}	2.80 ± 0.04^{a}	2.46 ± 0.04^{b}	2.47 ± 0.04^{b}	2.49 ± 0.04^{b}
SGR (% BW day^{-1})	0.38 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.36 ± 0.04	0.37 ± 0.03	0.34 ± 0.03
FR (% BW day^{-1})	1.17 ± 0.02	1.09 ± 0.02	1.10 ± 0.04	1.17 ± 0.05	1.15 ± 0.03
FCR (mg feed mg gain^{-1})	2.65 ± 0.25^{ab}	2.28 ± 0.25^{b}	3.12 ± 0.28^{ab}	2.53 ± 0.16^{ab}	3.41 ± 0.48^{a}
PER (mg gain mg protein^{-1})	1.22 ± 0.25^{b}	1.65 ± 0.25^{ab}	1.45 ± 0.28^{ab}	1.85 ± 0.16^{a}	1.48 ± 0.48^{ab}

VSI, viscerosomatic index; *CF*, condition factor; *SGR*, specific growth rate; *BW*, body weight; *FR*, feeding rate; *FCR*, feed conversion ratio; *PER*, protein efficiency ratio

Data are expressed as mean ± SEM ($n = 15$)

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$)

UNCORRECTED PROOF

AUTHOR'S PROOF
UmID 10695_ArtID 495_Proof# 1 - 26/03/2018

t3.1 **Table 3** Specific activity of digestive enzymes in male Siamese fighting fish individually reared in various water volumes. The observed parameters were recorded at the end of the 2-month experiment

Digestive enzyme	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
Pepsin (U mg protein^{-1})	24.77 ± 3.92^{b}	31.94 ± 1.60^{ab}	25.43 ± 1.90^{ab}	26.92 ± 1.67^{ab}	32.82 ± 1.76^{a}
Trypsin (U mg protein^{-1})	51.52 ± 2.17^{b}	88.40 ± 6.45^{a}	54.39 ± 6.02^{b}	87.99 ± 8.18^{a}	74.91 ± 8.35^{a}
Chymotrypsin (U mg protein^{-1})	18.07 ± 1.91^{b}	23.83 ± 2.39^{ab}	21.70 ± 1.88^{ab}	21.04 ± 1.38^{ab}	25.87 ± 1.12^{a}
Lipase (U mg protein^{-1})	18.69 ± 2.47^{ab}	19.67 ± 1.94^{ab}	15.98 ± 1.30^{ab}	14.40 ± 2.61^{b}	22.91 ± 2.78^{a}
Amylase (mU mg protein^{-1})	117.45 ± 6.34	107.96 ± 2.58	108.55 ± 6.35	107.24 ± 6.50	101.71 ± 1.41
A/T ratio (× 10^{3})	2.27 ± 0.21^{b}	1.37 ± 0.13^{a}	1.70 ± 0.17^{a}	1.25 ± 0.17^{a}	1.25 ± 0.14^{a}

A/T ratio, amylase/trypsin ratio

Data are expressed as mean ± SEM ($n = 5$)

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$)

treatmentss (Table 5). There were no differences in protein concentration among the three least volume treatments, followed by statistically significant reduction with the 250 and 300 mL treatments. This trend was opposite to that observed for the RNA/protein ratio.

Thermal properties of actin and myosin

The amount of native myosin was relatively high in the fish reared in 150, 200, and 250 mL water volumes (Table 5). The amount of actin showed no significant differences between the five treatments.

Carcass composition

Varying the water volumes did not affect carcass moisture, crude protein, or crude ash (Table 6). Crude lipid was the highest in fish reared in 100 mL water, followed by 150 mL and the other three treatments.

Discussion

The water quality was significantly affected by the water volume, in the current study. The decrease of pH and increase of total ammonia with higher stocking density (lower water volume per fish) were similar to prior observations in koi carp, *Cyprinus carpio* (Jha and Barat 2005) and seabass, *Dicentrarchus labrax* (Sammouth et al. 2009). The pH in all treatments was higher than in the natural habitat of the wild fighting fish, which is pH 5.28–5.80 (Jaroensutasinee and Jaroensutasinee 2001). However, under laboratory conditions, the pH in all these treatments was within the

t4.1 **Table 4** Color parameters of male Siamese fighting fish individually reared in various water volumes. The observed parameters were recorded at the end of the 2-month experiment

Color parameter	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
L^*	18.61 ± 0.60	20.67 ± 0.67	18.61 ± 0.91	20.41 ± 0.46	20.56 ± 0.13
a^*	13.06 ± 0.47^{a}	12.17 ± 0.48^{a}	11.13 ± 0.49^{b}	11.04 ± 0.21^{b}	10.99 ± 0.40^{b}
b^*	7.87 ± 0.46^{a}	7.82 ± 0.61^{a}	8.36 ± 0.40^{a}	6.92 ± 0.24^{ab}	6.31 ± 0.34^{b}
a^*/b^*	1.28 ± 0.11^{b}	1.48 ± 0.05^{a}	1.10 ± 0.03^{c}	1.45 ± 0.03^{ab}	1.46 ± 0.03^{ab}

Data are expressed as mean ± SEM ($n = 15$)

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$)

UNCORRECTED PROOF

AUTHOR'S PROOF

t5.1 **Table 5** Protein synthesis capacity and myosin and actin in white muscle of male Siamese fighting fish individually reared in various water volumes. The observed parameters were recorded at the end of the 2-month experiment

Parameter	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
RNA (μg g^{-1})	1177 ± 62^{c}	1218 ± 86^{bc}	1462 ± 46^{a}	1418 ± 81^{ab}	1106 ± 54^{c}
Protein (mg g^{-1})	169.80 ± 4.35^{a}	178.55 ± 7.96^{a}	182.58 ± 8.41^{a}	137.81 ± 4.45^{b}	99.71 ± 5.52^{c}
RNA/protein ratio (μg mg^{-1})	7.01 ± 0.52^{c}	7.59 ± 0.69^{bc}	7.91 ± 0.25^{bc}	9.18 ± 0.70^{b}	12.13 ± 0.72^{a}
Δ Myosin (J g^{-1})	0.69 ± 0.01^{bc}	0.85 ± 0.19^{ab}	1.56 ± 0.02^{a}	1.27 ± 0.41^{ab}	0.73 ± 0.01^{c}
Δ Actin (J g^{-1})	0.33 ± 0.01	0.34 ± 0.06	0.35 ± 0.05	0.32 ± 0.00	0.24 ± 0.02

Data are expressed as mean ± SEM ($n = 5$)

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$)

range for rearing fighting fish, namely pH 6.5–7.5 (Verbeek et al. 2007), except for the slightly low pH with 100 mL water volume (pH 6.44 ± 0.04). Total ammonia was significantly elevated with 100 mL water relative to the other treatments; high-rearing density can cause dramatic changes in water quality from the excreted ammonia wastes. This observed trend in ammonia has been previously reported on rearing some fish (Jha and Barat 2005; Sammouth et al. 2009; Lui et al. 2016). Based on two above parameters, rearing the fighting fish individually in 100 mL water volume appears to be inappropriate, since it provides relatively poor water quality when compared to larger water volumes. However, the water exchange rate naturaly affects water quality, and in intensive aquaculture systems, the water is typically changed more often or a recirculating system is used. Regarding the other water quality parameters, no significant differences between the treatments were observed, and these parameters were within good levels, close to the ranges reported for *B. splendens* aquaculture (Jaroensutasinee and Jaroensutasinee 2001; Mandal et al. 2010).

Stocking density is among the most important rearing parameters affecting fish growth (Jha and Barat 2005; Sanchez et al. 2010; Niazie et al. 2013). Generally, food competition limits fish growth and leads to poor weight gain with high-density rearing (Stickney 1994). On the other hand, the decreased weight increment in the largest water volume of the current study might be associated with increasing swimming activity (Karakatsouli et al. 2010) as well as bubble nest building by this male fish, reducing the energy for growth. A minimal water volume can significantly decrease skeletal growth. Regarding morphometry, only CF was affected by the water volume while body thickness and depth were not. The relatively high CF value observed in the

UNCORRECTED PROOF

t6.1 **Table 6** Carcass proximate chemical composition of male Siamese fighting fish individually reared in various water volumes. The observed parameters were recorded at the end of the 2-month experiment

Chemical component	Water volume (mL)				
	100	150	200	250	300
Moisture (% FW)	74.32 ± 0.57	75.36 ± 0.74	75.31 ± 0.82	73.93 ± 0.52	75.01 ± 0.54
Crude protein (% FW)	15.62 ± 0.35	14.99 ± 0.45	15.02 ± 0.50	15.86 ± 0.32	15.21 ± 0.33
Crude lipid (% FW)	3.27 ± 0.18^{a}	2.40 ± 0.13^{b}	1.26 ± 0.14^{c}	1.48 ± 0.16^{c}	1.60 ± 0.27^{c}
Crude ash (% FW)	3.33 ± 0.46	4.23 ± 0.34	4.13 ± 0.48	4.48 ± 0.30	3.33 ± 0.31

FW fresh weight

Data are expressed as mean ± SEM ($n = 5$)

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$)

AUTHOR'S PROOF

current study is due to the calculation of body weight per standard length, which reduces the variations from fin shape phenotypes. Lambert and Dutil (2001) have reported negative effects of increasing stocking density on the CF of Atlantic cod (*Gadus morhua*). This conflicts with the results found in this current study, where the male fighting fish were individually reared, reducing the social interactions between the fish. However, similar CF has been reported across different stocking densities when rearing fish (Saoud et al. 2007; Tolussi et al. 2010). The CF and VSI can relate to body energy storage, as observed by Goede and Barton (1990). Increased CF and VSI in the fish reared in the least water volume might be due to viscerosomatic energy storage and to viscerosomatic mass growth processes that reduce growth performance (Lui et al. 2016).

The SGR of fighting fish in this investigation was similar to that in data reported by James and Sampath (2006). Based on our investigation of growth parameters, the minimal water volume for rearing male fighting fish should be about 150 mL. This level had 5.36 cm water depth, which matches well the depth in the preferred natural habitat, 2–9 cm (Jaroensutasinee and Jaroensutassinee 2001). In addition, this volume is below the 250 mL used by the supplying farm and below the volumes reported by various researchers: 250 mL (Verbeek et al. 2008), 1000 mL (Takeuchi et al. 2010), and 2000 mL (Karino and Someya 2007).

Superior feed utilization (FR, FCR, and PER) was also observed in the fish reared in 150 mL water. This finding matches well the increased protease (pepsin, trypsin, chymotrypsin) and lipase activities. Since *B. splendens* are carnivorous fish, up-regulation of the protease activities can improve digestion and utilization of dietary proteins (Chakrabarti et al. 1995) and ditto to lipids and lipase activity. Since glucose is an essential energy source for a number of tissues (Romijn et al. 1990), maintaining the amylase activity is necessary for metabolic homeostasis. This finding is in agreement with the response of turbot, *Scophthalmus maximus*, when subjected to four rearing density levels (Xian et al. 2013). However, feeding habits, as indicated by the A/T ratio (Hofer and Schiemer 1981), were influenced by the water volume. Rearing the fish in 100 mL water can increase the energy requirements, increasing carbohydrate catabolism per amount of protein.

Skin color is another important factor influencing the commercial value of fish. In *B. splendens*, skin redness is controlled by carotenoids and the female fish prefer to associate with red males over blue males, suggesting a sexually selected advantage to being red (Clotfelter et al. 2007). In addition, within the red phenotype groups, the female fish prefer to associate with the vermilion males over those that are pale red (Blakeslee et al. 2009). In the current study, the skin redness parameters (a^* and a^*/b^*) were the highest in fish reared individually in 150 mL water, suggesting that this treatment contributes to a valuable ornamental trait as well as to courting competency of the male fish. Metusalach et al. (1997) reported stocking density has an effect on carotenoid uptake in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*); the highest pigment deposition was observed in the fish stocked at 50 kg m^{-3}, when the other alternatives were lower (40 kg m^{-3}) or higher (75 kg m^{-3}) levels. Similar findings were also reported in darkbarbel catfish, *Pelteobagrus vachelli* (Zeng et al. 2010), and in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Çagiltay et al. 2015). These responses are similar to our observations, but the amout of pigments in *B. splendens* feed and its feeding rate were fixed during this study. Stress is a more important factor affecting skin color than the dietary carotenoid administration, even though carotenoids are important pigments contributing to the red skin of *B. splendens* (Metusalach et al. 1997; Clotfelter et al. 2007). Fluctuations in skin redness might be associated with environmental cues, water volume, and with generating striped patterns of chromatophores (Kelsh 2004).

Increased muscle protein concentration during growth has been observed in rainbow trout (Rungruangsak-Torrissen et al. 2009). In Atlantic salmon (*Salmo salar*), SGR was negatively correlated with muscle RNA and RNA/protein ratio (Sunde et al. 2001). Similarly, significantly lower RNA concentration (protein sythesis) and RNA/protein ratio (protein turnover rate) were also observed in the faster growing males than in the slower growing females of Siamese fighting fish (Thongprajukaew et al. 2013). Based on these previous reports, reduced protein sythesis capacity and protein turnover rate while the protein concentration was maintained suggest continuous growth of the fish individually reared under the preferred conditions, i.e., in 150 mL water. The measured ΔH is linked to the amount of proteins left in their native state and may relate to the physiological exercise by the fish (Thongprajukaew et al. 2015) in a restricted water volume. Myofibrillar protein is the major component of fish muscle (39–56%), followed by sarcoplasmic protein

UNCORRECTED PROOF

AUTHOR'S PROOF

(21–25%) and stroma or connective tissue proteins (6–21%) (Chaijan et al. 2010); myosin contributes 50–60% of the total (Shahidi 1994). The comparatively elevated ΔH of myosin in fish reared in 150, 200, or 250 mL of water may indicate its increased amount in muscle. This is similar to the findings of Coughlin et al. (2016) that the rearing conditions can directly affect myosin heavy chain expression, causing changes in swimming performance and muscle contractile properties. However, no differences were observed in the ΔH of actin between the five treatment groups of fish, in the current study.

Previous studies have reported effects of fish rearing density on carcass composition, with varying trends (Toko et al. 2007; Osofero et al. 2009; Karakatsouli et al. 2010). In the current study, no significant differences in carcass moisture, protein, and ash content were found between the preferred treatment and the other treatments. This indicates that the fighting fish can maintain their proximate composition in the face of restricted water volume. Similarly, no effects of stocking density on meat composition (moisture, CP, lipid, ash, and nitrogen free extract) were observed in rainbow trout (Cretu et al. 2014). Some improvements in lipid deposition were observed with the preferred treatment when compared to the baseline volume used by the farmer, 250 mL, or to other higher volumes. Higher amount of lipid in fish reared in 100 mL might be caused by decreased swimming activity, reducing energy usage from lipid catabolism (Karakatsouli et al. 2010). This finding is in agreement with the lipid contents observed in African catfish (*Clarias gariepinus*) and in vundu catfish (*Heterobranchus longifilis*), when subjected to increased stocking density (Toko et al. 2007).

Conclusions

Based on our investigation, the preferred minimal water volume for individual rearing of male Siamese fighting fish was 150 mL. This water level gave superior growth performance, feed utilization, skin redness, and muscle quality and had no negative effects on carcass composition. This volume should be applied since the male fish begins aggressive behavior at 1.5 months of age, and it continues until the fish is sold at approximately 4 months of age. Optimization of the other known factors in the physical circumstances, i.e., photoperiod, light intensity, aquarium shape, and water exchange rate, is necessary before designing an intensive aquaculture system for this species. Subsequent experiments on the effects of aquarium color background on the male fish are currently underway.

Acknowledgements We acknowledge Assoc. Prof. Dr. Seppo Karrila and the Publication Clinic, Research and Development Office, PSU, for advice in manuscript preparation.

Funding information Funding was provided by the budget revenue (Contract No. SCI590420S) of the Prince of Songkla University (PSU). The fish samples were kindly provided by Boonrueang Plakat Farm in Nakonpathom province of Thailand. Research facilities were supported by Kidchakan Supamattaya Aquatic Animal Health Research Center, Faculty of Natural Resources, PSU.

References

Ahmadivand S, Eagderi S, Imanpour MR (2013) Effects of stocking density on hematological parameters, growth and survival rate of Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) larvae. J Chem Biol Phys Sci 3:1320–1326

Ali MS, Stead SM, Houlihan DF (2006) Effects of socking density on ammonia excretion and the growth of Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus* L.). Bangladesh J Fish Res 10:13–24

AOAC (2005) Official methods of analysis of AOAC international, 18th edn. Association of Official Analytical Chemists, Maryland

APHA, AWWA, WPCF (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edn. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington, DC

Areekijseree M, Engkagul A, Kovitvadhi U, Thongpan A, Mingmuang M, Pakkong P, Rungruangsak-Torrissen K (2004) Temperature and pH characteristics of amylase and proteinase of adult freshwater pearl mussel, *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus* Simpson 1900. Aquaculture 234:575–587

Blakeslee C, McRobert SP, Brown AC, Clotfelter ED (2009) The effect of body coloration and group size on social partner preferences in female fighting fish (*Betta splendens*). Behav Proc 80:157–161

Bolasina S, Tagawa M, Yamashita Y, Tanaka M (2006) Effect of stocking density on growth, digestive enzyme activity and cortisol level in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture 259:432–443

Chaijan M, Jongjareonrak A, Phatcharat S, Benjakul S, Rawdkuen S (2010) Chemical compositions and characteristics of farm raised giant catfish (*Pangasianodon gigas*) muscle. LWT-Food Sci Technol 43:452–457

Chakrabarti I, Gani MDA, Chaki KK, Sur R, Misra KK (1995) Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. Comp Biochem Physiol 112A:167–177

Clotfelter ED, Ardia DR, Mcgraw KJ (2007) Red fish, blue fish: trade–offs between pigmentation and immunity in *Betta splendens*. Behav Ecol 18:1139–1145

UNCORRECTED PROOF

AUTHOR'S PROOF JrnlID 10695_ArtID 495_Proof# 1 - 26/03/2018

Coughlin DJ, Shiels LP, Nuthakki S, Shuman JL (2016) Thermal acclimation to cold alters myosin content and contractile properties of rainbow smelt, *Osmerus mordax*, red muscle. Comp Biochem Physiol 196A:46–53

Cretu M, Cristea V, Dediu L, Petrea SM (2014) The influence of different stocking densities on biochemical composition of rainbow trout meat reared in a recirculating aquaculture system. Anim Sci Biotechnol 47: 200–204

Cristea V, Mocanu MC, Antache A, Docan A, Dediu L, Ion S, Coada MT (2012) Effect of stocking density on leuckocyte reaction of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Anim Sci Biotechnol 45:31–36

Çagiltay F, Erkan N, Ulusoy Ş, Selcuk A, Özden Ö (2015) Effects of stock density on texture-colour quality and chemical composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian J Fish Sci 14:687–698

Froese R, Pauly D (2016) Betta splendens Regan 1910 Siamese fighting fish. http://www.fishbase.org/summary/4768. Accessed 10 March 2017

Goede RW, Barton BA (1990) Organismic indices andan autopsy-based assessment as indicators of health and conditionof fish. Am Fish Soc Symp 8:93–108

Halperin JRP, Dunham DW, Ye S (1992) Social isolation increases social display after priming in *Betta splendens* but decreases aggressive readiness. Behav Proc 28:13–32

Hofer R, Schiemer F (1981) Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. Oecologia 48:342–345

James R, Sampath K (2006) Effect of dietary administration of methyltestosterone on the growth and sex reversal of two ornamental fish species. Indian J Fish 53:283–290

Jaroensutasinee M, Jaroensutasinee J (2001) Bubble nest habitat characteristics of wild Siamese fighting fish. J Fish Biol 58: 1311–1319

Jha P, Barat S (2005) The effect of stocking density on growth, survival rate, and number of marketable fish produced of koi carps, *Cyprinus carpio* vr. *koi* in concrete tanks. J Appl Aquac 17:89–102

Kanghae H, Thongprajukaew K, Jatupornpitukchat S, Kittiwattanawong K (2016) Optimal-rearing density for head-starting green turtles (*Chelonia mydas* Linnaeus, 1758). Zoo Biol 35:454–461

Karakatsouli N, Papoutsoglou ES, Sotiropoulos N, Mourtikas D, Stigen-Martinsen T, Papoutsoglou SE (2010) Effects of light spectrum, rearing density and light intensity on growth performance of scaled and mirror common carp *Cyprinus carpio* reared under recirculating system conditions. Aquac Eng 42: 121–127

Karino K, Someya C (2007) The influence of sex, line, and fight experience on aggressiveness of the Siamese fighting fish in intrasexual competition. Behav Proc 75:283–289

Kelsh RN (2004) Genetics and evolution of pigment patterns in fish. Pigment Cell Res 17:326–336

Lambert Y, Dutil J (2001) Food intake and growth of adult Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) reared under different conditions of stocking density, feeding frequency and size-grading. Aquaculture 192:233–247

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265–275

Lui Q, Hou Z, Wen H, Li J, He F, Wang J, Guan B, Wang Q (2016) Effect of stocking density on water quality and (growth, body composition and plasma cortisol content) performance of pen-reared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Ocean Univ China 15:667–675

Mandal SC, Sahu NP, Kohli MPS, Das P, Gupta SK, Munilkumar S (2010) Replacement of live feed by formulated feed: effect on the growth and spawning performance of Siamese fighting fish (*Betta splendens*, Regan, 1910). Aquac Res 41: 1707–1716

Metusalach J, Brown A, Shahidi F (1997) Effects of stocking density on colour characteristics and deposition of carotenoids in cultured Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Food Chem 59:107–114

Monvises A, Nuangsaeng B, Sriwattanarothai N, Panijipan B (2009) The Siamese fighting fish: well-known generally but little-known scientifically. ScienceAsia 35:8–16

Niazie EHN, Imanpoor M, Taghizade V, Zadmajid G (2013) Effects of density stress on growth indices and survival rate of goldfish (*Carassius auratus*). Global Veterinaria 10:365–371

Osofero SA, Otubusin SO, Daramola JA (2009) Effect of stocking density on tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1757) growth and survival in bamboo-net cages trial. Afr J Biotechnol 8:1322–1325

Romijn JA, Godfried MH, Hommes MJT, Endert E, Sauerwein HP (1990) Decreased glucose oxidation during short-term starvation. Metabolism 39:525–530

Rungruangsak K, Utne F (1981) Effect of different acidified wet feeds on protease activities in the digestive tract and on growth rate of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Aquaculture 22:67–79

Rungruangsak-Torrissen K (2007) Digestive efficiency, growth and qualities of muscle and oocyte in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed on diets with krill meal as an alternative protein source. J Food Biochem 31:509–540

Rungruangsak-Torrissen K, Moss R, Andresen LH, Berg A, Waagbo R (2006) Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Fish Physiol Biochem 32:7–23

Rungruangsak-Torrissen K, Stien LH, Daae BS, Vågseth T, Thorsheim GB, Tobin D, Ritola O (2009) Different dietary levels of protein to lipid ratio affected digestive efficiency, skeletal growth, and muscle protein in rainbow trout families. Scholarly Research Exchange 2009:1–13. https://doi.org/10.3814/2009/709529 Article ID 709529

Sammouth S, D'Orbcastel ER, Gasset E, Breuil G, Marino G, Coeurdacier JL, Fiveistad S, Blancheton JP (2009) The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. Aquac Eng 40:72–78

Sanchez P, Ambrosio PP, Flos R (2010) Stocking density and sex influence individual growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Aquaculture 300:93–101

Saoud IP, Ghanawi J, Lebbos N (2007) Effects of stocking density on the survival, growth, size variation and condition index of juvenile rabbitfish *Siganus rivulatus*. Aquac Int 16:109–116

Shahidi F (1994) Seafood proteins and preparation of protein concentrates. In: Shahidi F, Botta JR (eds) Seafood: chemistry, processing technology and quality. Blackie Academic & Professional, London, pp 3–9

UNCORRECTED PROOF

AUTHOR'S PROOF

Stickney RR (1994) Principles of aquaculture. John Wiley & Sons, New York

Sunde J, Taranger GL, Rungruangsak-Torrissen K (2001) Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Fish Physiol Biochem 25:335–345

Supannapong P, Pimsalee T, A-komol T, Engkagul A, Kovitvadhi U, Kovitvadhi S, Rungruangsak-Torrissen K (2008) Digestive enzymes and *in vitro* digestibility of different species of phytoplankton for culture of the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus*. Aquac Int 16:437–453

Takeuchi Y, Hori M, Myint M, Kohda M (2010) Lateral bias of agonistic responses to mirror images and morphological asymmetry in the Siamese fighting fish (*Betta splendens*). Behav Brain Res 208:106–111

Thongprajukaew K, Kovitvadhi S, Kovitvadhi U, Rungruangsak-Torrissen K (2014) Pigment deposition and *in vitro* screening of natural pigment sources for enhancing pigmentation in male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). Aquac Res 45:709–719

Thongprajukaew K, Kovitvadhi U, Engkagul A, Rungruangsak-Torrissen K (2010a) Characterization and expression levels of protease enzymes at different developmental stages of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). Agric Nat Res 44:411–423

Thongprajukaew K, Kovitvadhi U, Engkagul A, Rungruangsak-Torrissen K (2010b) Temperature and pH characteristics of amylase and lipase at different developmental stages of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). Agric Nat Res 44:210–219

Thongprajukaew K, Kovitvadhi U, Kovitvadhi S, Engkagul A, Rungruangsak-Torrissen K (2013) Evaluation of growth performance and nutritional quality of diets using digestive enzyme markers and *in vitro* digestibility in Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). African J Biotechnol 12:1689–1702

Thongprajukaew K, Rodjaroen S, Yoonram K, Sornthong P, Hutcha N, Tantikitti C, Kovitvadhi U (2015) Effects of dietary modified palm kernel meal on growth, feed utilization, radical scavenging activity, carcass composition and muscle quality in sex reversed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 439:45–52

Toko I, Fiogbe ED, Koukpode B, Kestemont P (2007) Rearing of African catfish (*Clarias gariepinus*) and vundu catfish (*Heterobranchus longifilis*) in traditional fish ponds (whedos): effect of stocking density on growth, production and body composition. Aquaculture 262:65–72

Tolussi CE, Hilsdorf AWS, Caneppele D, Moreira RG (2010) The effects of stocking density in physiological parameters and growth of the endangered teleost species piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1877). Aquaculture 310:221–228

Tyska MJ, Warshaw DM (2002) The myosin power stroke. Cell Motil Cyt 51:1–15

Verbeek P, Iwamoto T, Murakami N (2007) Differences in aggression between wild-type and domesticated fighting fish are context dependent. Anim Behav 73:75–83

Verbeek P, Iwamoto T, Murakami N (2008) Variable stress-esponsiveness in wild type and domesticated fighting fish. Physiol Behav 93:83–88

Winkler UK, Stuckmann M (1979) Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. J Bacteriol 138:663–670

Xian L, Ying L, Blancheton JP (2013) Effect of stocking density on performances of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) in recirculating aquaculture systems. Chin J Oceanol Limnol 31:514–522

Zeng W, Li Z, Ye S, Xie S, Liu J, Zhang T, Duan M (2010) Effects of stocking density on growth and skin color of juvenile darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli* (Richardson). J Appl Ichthyol 26:925–929

UNCORRECTED PROOF

ค ต้นฉบับสำหรับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

Blue aquarium background improved the production quality of male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910)

Running title: Aquarium color for fighting fish

Suktianchai Saekhow[a], Karun Thongprajukaew[b,*], Wutiporn Phromkunthong[a]

[a] *Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand*

[b] *Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand*

* Corresponding author. Tel.: +66 74879957; fax: +66 74446681.

E-mail address: karun.t@psu.ac.th (K. Thongprajukaew).

Abstract

Background color can improve the production quality of various fish species. In this study, the effects of five aquarium backgrounds (transparent, white, red, blue and black) on survival, growth, feed utilization, digestive enzyme activities, color coordinates, muscle quality, and carcass composition were investigated in solid red male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). The fish (1.13 ± 0.01 g initial body weight) were distributed individually into glass aquaria varying in color backgrounds (n = 15) and were reared over eight weeks duration. There was no mortality of the fish during the study period. The growth performance and feed utilization of the fish reared with blue background were superior relative to the other treatments, followed by red background as next best. The fish in this treatment maintained activity of the observed enzymes but had significantly increased ratio of amylase to trypsin, indicating protein sparing effect, relative to the control with transparent background ($P < 0.05$). The preferred treatment also maintained skin lightness, yellowness and redness. Protein synthesis (RNA and protein concentrations) and protein turnover rate (RNA/protein ratio), and enthalpy of the main muscle proteins, myosin and actin, also benefited from this treatment. Carcass lipid was improved with the preferred treatment but crude protein and ash were still maintained comparable to the control treatment. Findings from the current study indicate that the blue-based aquarium background is appropriate for rearing male Siamese fighting fish.

Keywords: Background color; Digestive enzyme; Growth; Feed utilization; Muscle quality

1. Introduction

The male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910) is a highly commercial ornamental fish around the world (Froese and Pauly, 2016), while the females are usually sold en masse at very low prices. The fin shape and various desired coloring are the main criteria for consumer satisfaction with the male fish. However, the phenotype with solid red color that is long finned is preferred by the fish culturist, followed in rank by the solid blue (Thongprajukaew et al., 2014). Since this fish becomes aggressive at 1.5 months after hatching, individual rearing is always used until selling the fish (Thongprajukaew et al., 2013).

Background color is one factor affecting the fish production, affecting suitability of the rearing conditions. This parameter has significant effects on survival, growth performance, feed utilization and carcass proximate composition of various fish species (Papoutsoglou et al., 2000; McLean et al., 2008; Raghavan et al., 2013). Previous studies indicate that the best color background depends on species and should be separately determined for any species that will be produced (McLean et al., 2008; Maciel and Valenti, 2014). Since the background color may interact with light intensity, photoperiod and light color, these environmental changes can cause stress in fish, using up available energy from food digestion (Hochachka and Somero, 2002). Digestive enzymes play an important role in transforming macronutrients into forms easily digested. Previous studies on the above light parameters have reported changes

in digestive enzyme activities, including protein-, carbohydrate- and lipid-digesting enzymes (Shan et al., 2008; Wei and Zhao, 2014; Ramzanzadeh et al., 2016). Assessing the feed utilization through digestive enzyme activities is reasonable.

In addition, background color can influence the skin color of aquatic animals (Papoutsoglou et al., 2000; Doolan et al., 2009; Qin et al., 2012). In Siamese fighting fish, redness of the skin is controlled by carotenoids, and the female fish prefer red males over blue males, suggesting a sexual-selection advantage from being red (Clotfelter et al., 2007). Therefore, physiological induction by various backgrounds may alter the skin coloration in captive fighting fish, impacting their commercial value.

Therefore, the aim of this study was to determine the effects of various aquarium color backgrounds in individually reared male Siamese fighting fish. The production quality of reared fish was assessed basedเห็นเติม ed ซ้อนกันเลย ไม่แน่ใจ on growth performance, feed utilization, digestive enzyme activities, skin color, muscle quality, and carcass composition. The optimal color from the current study might be used by fish culturists, as well as on developing systems for the intensive rearing of this species.

2. Materials and methods

2.1. Fish acclimatization and preparation

One-month-old solid-red male Siamese fighting fish were collected from a local farm in Nakonpathom province of Thailand. They were individually acclimatized in transparent cylindrical plastic beakers (7.5 cm diameter × 12.5 cm

92 height) containing 150 mL water, for two weeks. They were fed a commercial
93 floating diet (10% moisture, 35% crude protein, 4% crude fat, 5% crude fiber and
94 12% ash) for small ornamental fish twice daily (08.00 and 17.00 h) at 2% of body
95 weight (BW). The acclimatization was conducted for two weeks with the natural 12
96 h:12 h light/dark cycle.
97
98 **2.2. Fish rearing**
99 Each fifteen screened fish with similar size (1.13 ± 0.01 g initial body weight)
100 were distributed individually into glass aquaria (3.5 cm width × 8 cm length × 20 cm
101 height) varying in สองคำนี้เพื่อสลับกัน color backgrounds (transparent, white, red, blue
102 and black). These individual fish were designated as the experimental units. The
103 feeding regimen and rearing conditions were as described above. The water content
104 was 80% replaced by dechlorinated stock within three consecutive days, maintaining
105 the standard ranges of pH (6.54 ± 0.07) and temperature (28.90 ± 0.13^{o}C). Survival of
106 the reared fish was recorded daily before beginning the first feeding. Uneaten excess
107 diet was siphoned off 30 min after feeding, dried at 60°C until constant weight, and
108 the determined weight was used to calculate the feeding rate (FR), feed conversion
109 ratio (FCR), and protein efficiency ratio (PER). At the end of the experiment, all the
110 fish were starved for 24 h and then were anaesthetized by clove oil. Measurement of
111 BW and length of all the fish was performed. All these fish were used for subsequent
112 analysis of digestive enzymes, muscle quality, color coordinatesจริงน่าจะวัดอยู่ในช่วง
113 เดียวกับน้ำหนักความยาวไมครับ, and carcass composition. Survival, growth performance
114 and feed utilization parameters were calculated as described below:

Survival (%) = [Final fish number/initial fish number] × 100

Condition factor (CF, g cm^{-3}) = [Live body weight (g)/body length $(cm)^3$] × 100

Specific growth rate (SGR, % BW day^{-1}) = $[(\ln W_t - \ln W_0)/(t - t_0)] \times 100$

where W_t = mean weight (g) at day t, W_0 = mean weight (g) at day t_0.

Viscerosomatic index (VSI, %) = [Wet weight of visceral organ (g)/wet body weight (g)] × 100

FR (% BW day^{-1}) = $C/[(W_0 + W_t)/2]/t \times 100$

where C = daily feed consumption (g), W_0 = initial body weight (g), W_t = final body weight (g), t = feeding duration (day)

FCR (g feed g $gain^{-1}$) = Dry feed consumed (g)/wet weight gain (g)

PER (g gain g $protein^{-1}$) = Wet weight gain (g)/protein intake (g)

2.3. Determination of digestive enzyme activity

2.3.1. Digestive enzyme extraction and protein quantification

The whole visceral organs of individual fish (*n* = 5 per treatment) were extracted in 0.2 M Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 buffer (pH 8) at a ratio of 1: 15 (*w*/*v*), using a micro-homogenizer (THP-220; Omni International, Kennesaw GA, USA). The homogenates were centrifuged at 15,000×*g* for 30 min at 4°C and supernatants were collected, and kept at –20°C until use. The protein concentration of a crude enzyme extract was determined according to the standard method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as protein standard.

2.3.2. Digestive enzyme assay

The protocols for assaying activities of pepsin, trypsin, chymotrypsin, amylase and lipase are summarized in Table 1. The optimal conditions for Siamese fighting fish were chosen from Thongprajukaew et al. (2010a, b). Each measured product was compared against the linear range of its standard curve. One unit (U) of enzyme is defined as the amount that catalyzed the conversion of 1 μmol of substrate per minute. Specific activities of enzymes are expressed as U (or mU) mg protein^{-1}. Ratio of amylase to trypsin (A/T ratio) was quantified by dividing the specific activities from the same sample.

2.4. Color measurement

The unconscious fish (n = 15) were carefully cleaned by soft blotting paper and then the color was measured from the middle parts of bodies. A MiniScan EZ (Hunter Associates Laboratory, Reston VA, USA) was calibrated to white and black standards before measuring the color parameters. The skin lightness (L^*), redness/greenness (a^*), yellowness/blueness (b^*) and redness index (a^*/b^*) were measured and automatically recorded.

2.5. Muscle quality

2.5.1. Protein synthesis capacity and its turnover rate

Concentrations of RNA and protein from the frozen expoxial white muscle (n = 5) were determined as described in Rungruangsak-Torrissen (2007). The extinction coefficients for calculating RNA and protein were E_{260} = 40 μg RNA mL^{-1} and E_{280} =

163 2.1 mg protein mL^{-1}, respectively. The concentration ratio (RNA/protein ratio) for
164 each sample was calculated from the amounts of RNA and protein.
165
166 *2.5.2. Enthalpy of myosin and actin*
167 Onset (T_o), denaturation peak (T_d), and conclusion (T_c) temperatures, and
168 enthalpy (ΔH) of myosin and actin, were determined using a differential scanning
169 calorimeter (DSC7, Perkin Elmer,Waltham, Massachusetts, USA). Ten milligrams of
170 epaxial white muscle (n = 5) was placed in an aluminum pan, sealed, allowed to
171 equilibrate at room temperature, and then heated from 20 to 100°C at a rate of 105°C
172 min^{-1} against an empty pan. Peaks of myosin and actin were identified from the
173 reported thermal properties of fish muscle protein (Matos et al., 2011;
174 Thongprajukaew et al., 2015).
175
176 **2.6. Proximate chemical composition of carcass**
177 The moisture and crude ash of the whole body (n = 5) were determined
178 according to standard methods of AOAC (2005). Crude protein was determined as
179 described in Rungruangsak-Torrissen (2007). Crude lipid was determined by ethyl
180 acetate extraction according to Supannapong et al. (2008).
181
182
183
184 **2.7. Statistical analysis**
185 The five treatments, each with fifteen replicate fish, followed a completely
186 randomized design. The data were subjected to analysis in Statistical Package for

187 Social Science Version 14 (SPSS Inc., Chicago, USA) for all the statistical
188 evaluations. The arc sine transformation was applied to percentage values prior to
189 analysis. The data are here expressed as means, with the standard error of mean
190 (SEM) expressing the variability. Comparisons of means in the statistical analyses
191 were carried out using Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$ significance level ($P <$
192 0.05).
193
194 **3. Results**
195 **3.1. Survival, growth performance and feed utilization**
196 No mortality of reared fish occurred within the 2 months study period (Table
197 2). Fish reared with black background had inferior growth performance and feed
198 utilization relative to the other treatments. Superior characteristics, namely higher
199 growth, lower feed consumption (FR and FCR) and higher PER, were observed in the
200 fish reared with the blue background, followed by the red background as second best.
201 Transparent background was the third in order with FR values significantly lower than
202 with white background ($P < 0.05$). The highest values of VSI and CF were found in
203 fish reared with white background, and with blue or black background, respectively.
204
205 **3.2. Specific activities of digestive enzymes**
206 The aquarium background had significant effects on the specific activities of
207 digestive enzymes, except for chymotrypsin (Table 3). Pepsin specific activity was
208 higher in fish reared with black background than with red background; the other three
209 treatments were intermediate. The fish reared with white background exhibited
210 superior trypsin specific activity. Lipase specific activity was highest in the fish

reared with white background. The fish reared with white or black background were higher in amylase specific activity than with the control treatment (transparent), but not so with red or blue background. Regarding the A/T ratio, it was significantly increased only in the fish reared with blue background, relative to the control.

3.3. Color parameters

*a**-values of the fish skin did not differ between the five treatments (Table 4). Fish reared with blue or white background were superior in three of the color parameters (*L**, *b** and *a**/*b**). Significantly decreased *b** and *a**/*b** were observed in the fish reared with transparent or red background, respectively. Inferior traits (decreased *L** and *b**) were exhibited by the fish reared with black background.

3.4. Muscle quality

3.4.1. Protein synthesis capacity and its turnover rate

The lowest RNA concentrations were achieved with black background (Table 5). This trend was opposite to that observed for the protein concentration. RNA/protein ratio was similar in the fish reared with transparent, white, red or blue background, but lower with the black background.

3.4.2. Enthalpy of myosin and actin

The amounts of native myosin and actin were similar across the five treatments (Table 5). The myosin/actin ratio was highest with the blue treatment, followed by white, transparent, black and red treatments in this order.

3.5. Carcass composition

Varying the color background did not affect crude ash (Table 6). Decreased moisture content was observed in the fish reared with blue and black backgrounds relative to control (transparent) treatment; the other treatments were intermediate. There were significant differences in crude protein between most actual treatments and the control. Crude lipid was the highest in fish reared with blue background, followed by red, while the other treatments did not significantly differ from the control.

4. Discussion

The response to background color may be species specific, and the effects of background color on growth performance and feed utilization of fish are varied (Papoutsoglou et al., 2000; Karakatsouli et al., 2007; McLean et al., 2008). In the present study, growth performance and feed utilization of solid red fighting fish were superior when reared with the blue backgrounds while the black background had negative impact relative to control (transparent). Similar findings were reported for the white sea bream (*Diplodus sargus*) when reared with blue tank color (Karakatsouli et al., 2007) as well as for scaled carp, *Cyprinus carpio* (Papoutsoglou et al., 2000) or Eurasian perch, *Perca fluviatilis* (Tamazouzt et al., 2000) when reared with black color. The SGR of fighting fish in this investigation (0.69–0.97% BW day^{-1}) was within the range reported by James and Sampath (2006). The CF and VSI can relate to body energy storage and to viscerosomatic mass growth (Goede and Barton, 1990). Increases in these parameters in the fish reared with black and white backgrounds,

respectively, might be due to viscerosomatic energy storage (Lui et al., 2016), changing the visceral mass and body morphometrics.

In the current study, the highest FR in fish reared with the white aquarium might be the strong color contrast with floating feed (mixed red, green and black pellets), improving food detection and consumption. Improved feed consumption due to sharp constrast between feed and background has been reported by a number of authors (Dowing and Litvak, 1999; Papoutsoglou et al., 2000; El-Sayed and El-Ghobashy, 2011). In contrast, fish reared in the red, green or black tanks and fed by the same feeds were inferior in FR; a third of the feed was the same color as the tank. In some larval fish, rearing in a black walled tank and feeding by live diet (rotifers and *Artemia* nauplii) can improve the food perception (Hinshaw, 1986; Martin-Robichaud and Peterson, 1998). Differences in the above results might be due to the colors of water column, tank wall or feed. However, lower FR with the preferred treatment (blue background), as well as with red, was not negative, as there was also superior feed utilization in terms of FCR and PER. The results indicate that rearing fighting fish with blue backgrounds improved productivity and lowered feed consumption, improving economic viability. Sufficient nutrition can reduce the feed intake per weight gain as reported by Wattanakul et al. (2017).

The effects of color backgrounds on digestive enzyme activities are poorly known. Increased FR with high specific activity of digestive enzymes in the fish reared with the white background, suggest high capacity of the fish to digest excess food. This might be due to the white wall reflecting more light and attracting phototaxis, which may have increased competition for food and space, and consequently energy expenditure (Hayd et al., 2010). Therefore, high FR may not

282 indicate good rearing conditions in the current study, similar to the observations on
283 Amazon river prawn (*Macrobrachium amazonicum*) reported by Maciel and Valenti
284 (2014). Low activity of enzymes might be due to energy saving, since nutritional
285 requirements are satified. Regarding the A/T ratio, this marker is linked to fish
286 feeding habits (Hofer and Schiemer, 1981; Thongprajukaew et al., 2011). Different
287 trends in the fish reared with blue background, relative to the other enzymes, indicates
288 high capacity to utilize carbohydrates per amount of protein. Increased proportion of
289 carbohydrates in the artificial feed of this carnivorous fish is possible when reared
290 with blue blackground.

291 The color backgrounds could lead to darkening or paling of fish skin by either
292 dispersion or concentration of pigments in the dermal melanophores (Szisch al., 2002;
293 Rotllant et al., 2003). Fighting fish females prefer to associate with the vermilion
294 males over those that are pale red (Blakeslee et al., 2009), suggesting selection
295 advantage from body color. In addition, skin color influences the acceptability and
296 commercial value of this fish by consumers, especially in males. Based on the four
297 measured color parameters, white and blue backgrounds are suitable since they
298 maintained lightness and redness of the skin (a^* and a^*/b^*) similar to the control fish,
299 while the red and black backgrounds had negative effects. No improvement of skin
300 coloration was achieved in the current study, probably because the fish reared with
301 transparent background are constitutively aggressive, enhancing physiological
302 response of the chromatophores; thus causing high level of skin coloration in the
303 baseline treatment. Diminishing lightness when reared in black background might be
304 due to the dispersion of pigments in the dermal melanophores of the skin, caused by
305 secretion of α-melanocyte-stimulating hormone (Baker et al., 1984; Szisch et al.,

306 2002; Rotllant et al., 2003). Decreasing *a*/b** value of skin in solid red male fish
307 when reared with red background might have improve the distinction of fish from its
308 surrounding environment. The responses of various fish species to color backgrounds
309 are species specific.

310 The concentration of RNA per cell reflects the rate of growth in herring
311 (*Clupea harengus*) larvae (Mathers et al., 1994). Maintained protein sythesis (RNA
312 concentration) and its turnover rate (RNA/protein ratio) in fish reared with white, red
313 and blue backgrounds in the current study indicate the growth phase of Siamese
314 fighting fish. Significantly increased protein in the fish reared with black background
315 indicated unsuitable alternative, and all the growth performances measures and
316 protein synthesis capacity were inferior. The amount of proteins left in their native
317 state is reflected in ΔH (Matos et al., 2011). The enthalpic response of myosin and
318 actin in the current study indicated no significant effects by the color backgrounds on
319 amounts of myosin and actin, which relate to the physiological exercise by the fish
320 (Thongprajukaew et al., 2015). Coughlin et al. (2016) reported the effects of rearing
321 conditions on myosin heavy chain expression, causing changes in swimming
322 performance and muscle contractile properties. In addition, intense exercise can
323 promote partial denaturation of muscle myosin, leading to lower ΔH actin/myosin
324 ratio (Matos et al., 2011). Therefore, the elevated ΔH actin/myosin ratio with the blue
325 background treatment suggests the color backgrounds decreased partial denaturation
326 of myosin. The effects on exercise and stress response should be further investigated
327 for improving the welfare of this reared fish.

328 Varying trends in carcass composition caused by the tank color background
329 have been previously reported in various fish species. No significant differences in

composition were observed in scaled carp (*Cyprinus carpio*) reared in black, white or green tanks (Papoutsoglou et al., 2000); or in beluga (*Huso huso*) reared in black, white, green, red or blue tanks (Banan et al., 2011); nor in thinlip mullet (*Liza ramada*) reared in black, white, green, red, yellow or blue tanks (El-Sayed and El-Ghobashy, 2011). In the current study, some improvements in lipid deposition were observed with the preferred treatment, while the amount of moisture was inversely affected, when compared to the other treatments. This finding is in agreement with the observations in Caspian Kutum (*Rtilus frisii*) when reared in yellow tank, compared to black, white, red, yellow or blue tanks (Imanpoor and Abdollahi, 2011). Higher amount of lipid in fish reared with blue background might be caused by decreased swimming activity, reducing energy usage from lipid catabolism (Karakatsouli et al., 2010). Differences in energy allocation caused by the color background should be of interest, although with species specific details.

5. Conclusions

Based on our investigations of five alternative color backgrounds (transparent, white, red, blue and black), the solid red male Siamese fighting fish had generally superior growth performance, feed utilization, and muscle quality, without negative effects on carcass composition and skin coloration, when reared with blue background. This preferred treatment exhibited protein sparing effect, as indicated by the activity ratio of amylase to trypsin. This background color should be applied since the solid red male fish begins aggressive behavior at 1.5 months of age, and continues it until the fish are sold at approximately 4 months of age. Optimization of the other lighting factors, i.e., photoperiod, light spectral characteristics, light position and light

intensity (or their combined effects), is necessary for the optimal design of an intensive aquaculture system for this species. In addition, since Siamese fighting fish have varied body colors and these fish are significantly responsive to color backgrounds, specific backgrounds should be further investigated for the other color phenotypes, or to determine colors overall suited across the fighting fish.

Acknowledgements

Funding was provided by the budget revenue (Contract No. SCI590420S) of the Prince of Songkla University (PSU). We acknowledge Assoc. Prof. Dr. Seppo Karrila and the Publication Clinic, Research and Development Office, PSU, for advice in manuscript preparation.

References

AOAC, 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Maryland.

Areekijseree, M., Engkagul, A., Kovitvadhi, U., Thongpan, A., Mingmuang, M., Pakkong, P., Rungruangsak-Torrissen, K., 2004. Temperature and pH characteristics of amylase and proteinase of adult freshwater pearl mussel, *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus* Simpson 1900. Aquaculture 234, 575–587.

Baker, B.I., Wilson, J.F., Bowley, T.J., 1984. Changes in pituitary and plasma levels of MSH in teleosts during physiological colour change. Gen. Comp. Endocrinol. 55, 142–149.

376 Banan, A., Kalbassi, M.R., Bahmani, M., Sadati, M.A.Y., 2011. Effects of colored
377 light and tank color on growth indices and some physiological parameters of
378 juvenile beluga (*Huso huso*). J. Appl. Ichthyol. 27, 565–570.
379 Blakeslee, C., McRobert, S.P., Brown, A.C., Clotfelter, E.D., 2009. The effect of
380 body coloration and group size on social partner preferences in female fighting
381 fish (*Betta splendens*). Behav. Proc. 80, 157–161.
382 Clotfelter, E.D., Ardia, D.R., Mcgraw, K.J., 2007. Red fish, Blue fish: trade-offs
383 between pigmentation and immunity in *Betta splendens*. Behav. Ecol. 18, 1139–
384 1145.
385 Coughlin, D.J., Shiels, L.P., Nuthakki, S., Shuman, J.L., 2016. Thermal acclimation to
386 cold alters myosin content and contractile properties of rainbow smelt, *Osmerus*
387 *mordax*, red muscle. Comp. Biochem. Physiol. 196A, 46–53.
388 Doolan, B.J., Booth, M.A., Allan, G.L., Jones, P.L., 2009. Changes in skin colour and
389 cortisol response of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider,
390 1801) to different background colours. Aquac. Res. 40, 542–550.
391 Downing, G., Litvak, M.K., 1999. The influence of light intensity on growth of larval
392 haddock. North Amer. J. Aquac. 61, 135–140.
393 El-Sayed, A-F.M., El-Ghobashy, A.E., 2011. Effects of tank colour and feed colour
394 on growth and feed utilization of thinlip mullet (*Liza ramada*) larvae. Aquac.
395 Res. 42, 1163–1169.
396 Froese, R., Pauly, D., 2016. FishBase. www.fishBase.org (accessed 10.03.17).
397 Goede, R.W., Barton, B.A., 1990. Organismic indices andan autopsy-based
398 assessment as indicators of health and condition of fish. Amer. Fish. Soc.
399 Symp. 8, 93–108.

Hayd, L.A., Lemos, D., Valenti, W.C., 2010. Ontogenetic variation in ammonia excretion during the early life stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*. J. World Aquac. Soc. 41, 107–115.

Hinshaw, M., 1986. Factors affecting survival and growth of larval and early juvenile perch *Perca flalescens* Mitchill.. Ph.D. Thesis, North Carolina State University, USA, 80 pp.

Hochachka, P.W., Somero, G.N., 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, New York.

Hofer, R., Schiemer, F., 1981. Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. Oecologia 48, 342–345.

Imanpoor, M.R., Abdollahi, M., 2011. Effects of tank color on growth, stress response and skin color of juvenile Caspian Kutum *Rtilus frisii* Kutum. Global Veterinaria 6, 118–125.

James, R., Sampath, K., 2006. Effect of dietary administration of methyltestosterone on the growth and sex reversal of two ornamental fish species. Indian J. Fish. 53, 283–290.

Karakatsouli, N., Papoutsoglou, S.E., Manolessos, G., 2007. Combined effects of rearing

density and tank colour on the growth and welfare of juvenile white sea bream *Diplodus sargus* L. in a recirculating water system. Aquac. Res. 38, 1152–1160.

Karakatsouli, N., Papoutsoglou, S.E., Sotiropoulos, N., Stigen-Martinsen, T.D.N., Sofronios E., Papoutsoglou, E.S., 2010. Effects of light spectrum, rearing density and light intensity on growth performance of scaled and mirror common

carp *Cyprinus carpio* reared under recirculating system conditions. Aquac. Eng. 42, 121–127.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.

Lui, Q., Hou, Z., Wen, H., Li, J., He, F., Wang, J., Guan, B., Wang, Q., 2016. Effect of stocking density on water quality and (growth, body composition and plasma cortisol content) performance of pen-reared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Ocean Univ. China 15, 667–675.

Maciel, C.R., Valenti, W.C., 2014. Effect of tank colour on larval performance of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. Aquac. Res. 45, 1041–1050.

Martin-Robichaud, D.J., Peterson, R.H., 1998. Effects of light intensity, tank colour and photoperiod on swimbladder inflation success in larval striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). Aquac. Res. 29, 539–547.

Mathers, E.M., Houlihan, D.F., Burren, L.J., 1994. DNA and protein concentrations in fed and starved herring *Clupea harengus* larvae. Mar. Ecol. Prog. Ser. 107, 223–231.

Matos, E., Silva, T.S., Tiago, T., Aureliano, M., Dinis M.T., Dias, J., 2011. Effect of harvesting stress and storage conditions on protein degradation in fillets of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*): A differential scanning calorimetry study. Food Chem. 126, 270–276.

McLean, E., Cotter, P. Thain, C., King, N., 2008. Tank color impacts performance of cultured fish. Croatian J. Fish. 66, 43–54.

Papoutsoglou, S.E., Mylonakis, G., Miliou, H., Karakatsouli, N.P., Chadio, S., 2000. Effects of background color on growth performances and physiological

448 responses of
449 scaled carp (*Cyprinus carpio* L.) reared in a closed circulated system. Aquac.
450 Eng. 22, 309–318.
451 Qin, G., Lin, Q., Gu, N., Lin, J., Huang, L., 2012. Effect of broodstock origin,
452 background and substrate color on skin coloration of three-spotted seahorses
453 *Hippocampus trimaculatus* Leach, 1814. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 416–417,
454 129–134.
455 Raghavan, P.R., Xiao-ming, Z., Wu, L., Dong, H., Yun-xia, Y., Shou-qi, X., 2013.
456 Rearing tank color influences survival and growth of the early larvae of the
457 yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*, Richardson. Acta Hydrobiologica
458 Sinica 37, 177–184.
459 Ramzanzadeh, F., Yeganeh, S., JaniKhalili, K., Babaei, S.S., 2016. Effects of
460 different photoperiods on digestive enzyme activities in rainbow trout
461 (*Oncorhynchus mykiss*) alevin and fry. Canadian J. Zool. 94, 435–442.
462 Rotllant, J., Tort, L., Montero, D., Pavlidis, M., Martinez, M., Wendelaar Bonga, S.E.,
463 Balme, P.H.M., 2003. Background colour influence on the stress response in
464 cultured red porgy *Pagrus pagrus*. Aquaculture 223, 129–139.
465 Rungruangsak, K., Utne, F., 1981. Effect of different acidified wet feeds on protease
466 activities in the digestive tract and on growth rate of rainbow trout (*Salmo*
467 *gairdneri* Richardson). Aquaculture 22, 67–79.
468 Rungruangsak-Torrissen, K., 2007. Digestive efficiency, growth and qualities of
469 muscle and oocyte in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed on diets with krill
470 meal as an alternative protein source. J. Food Biochem. 31, 509–540.

471 Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, L.H., Berg, A., Waagbo, R., 2006.
472 Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in
473 Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Physiol. Biochem. 32, 7–23.
474 Shan, X.J., Xiao, Z.Z., Huang, W., Dou, S.Z., 2008. Effects of photoperiod on
475 growth, mortality and digestive enzymes in miiuy croaker larvae and juveniles.
476 Aquaculture 281, 70–76.
477 Supannapong, P., Pimsalee, T., A-komol, T., Engkagul, A., Kovitvadhi, U.,
478 Kovitvadhi, S., Rungruangsak-Torrissen, K., 2008. Digestive enzymes and *in*
479 *vitro* digestibility of different species of phytoplankton for culture of the
480 freshwater pearl mussel, *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus*. Aquac. Int. 16, 437–
481 453.
482 Szisch, V., Van der Salm, A.L., Wendelaar Bonga, S.E., Pavlidis, M., 2002.
483 Physiological colour changes in the red porgy, *Pagrus pagrus*, following
484 adaptation to blue lighting spectrum. Fish Physiol. Biochem. 27, 1–8.
485 Tamazouzt, L., Chatain, B., Fontaine, P., 2000. Tank wall colour and light level affect
486 growth and survival of Eurasian perch larvae (*Perca fluviatilis* L.).
487 Aquaculture 182, 85–90.
488 Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, S., Kovitvadhi, U., Rungruangsak-Torrissen, K.,
489 2014. Pigment deposition and *in vitro* screening of natural pigment sources for
490 enhancing pigmentation in male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan,
491 1910). Aquac. Res. 45, 709–719.
492 Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Engkagul, A., Rungruangsak-Torrissen, K.,
493 2010a. Characterization and expression levels of protease enzymes at different

494 developmental stages of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910).
495 Agric. Nat. Res. 44, 411–423.
496 Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Engkagul, A., Rungruangsak-Torrissen, K.,
497 2010b. Temperature and pH characteristics of amylase and lipase at different
498 developmental stages of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910).
499 Agric. Nat. Res. 44, 210–219.
500 Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Engkagul, A., Rungruangsak-
501 Torrissen, K., 2013. Evaluation of growth performance and nutritional quality
502 of diets using digestive enzyme markers and *in vitro* digestibility in Siamese
503 fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). African J. Biotechnol. 12, 1689–
504 1702.
505 Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Somsueb, P., Rungruangsak-
506 Torrissen, K., 2011. Effects of different modified diets on growth, digestive
507 enzyme activities and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish
508 (*Betta splendens* Regan, 1910). Aquaculture 322–323, 1–9.
509 Thongprajukaew, K., Rodjaroen, S., Yoonram, K., Sornthong, P., Hutcha, N.,
510 Tantikitti, C., Kovitvadhi, U., 2015. Effects of dietary modified palm kernel
511 meal on growth, feed utilization, radical scavenging activity, carcass
512 composition and muscle quality in sex reversed Nile tilapia (*Oreochromis*
513 *niloticus*). Aquaculture 439, 45–52.
514 Wattanakul, W., Thongprajukaew, K., Songnui, A., Satjarak, J., Kanghae, H., 2017.
515 Pre-soaking feed pellet significantly improved feed utilization in Asian
516 seabass (*Lates calcarifer*). Aquaculture 471, 106–112.

517 Wei, Z.Z., Zhao, W., 2014. Effect of light intensity on the growth and digestive
518 enzyme activity of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicas* under two
519 kinds of culture methods. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao. 25, 237–242 (in
520 Chinese with English abstract).
521 Winkler, U.K., Stuckmann, M., 1979. Glycogen, hyaluronate and some other
522 polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia*
523 *marcescens*. J. Bacteriol. 138, 663–670.
524

Table 1 Protocols used for determination of digestive enzyme specific activity.

Digestive enzyme	Optimal conditions*	Substrate	Observed product	References
Pepsin	pH 2 at 40ºC	Casein	*L*-Tyrosine (A_{720})	Rungruangsak and Utne (1981)
Trypsin	pH 8 at 50ºC	BAPNA	*p*-Nitroanilide (A_{410})	Rungruangsak-Torrissen et al. (2006)
Chymotrypsin	pH 8 at 50ºC	SAPNA	*p*-Nitroanilide (A_{410})	Rungruangsak-Torrissen et al. (2006)
Lipase	pH 8 at 40ºC	*p*-Nitrophenyl palmitate	*p*-Nitrophenol (A_{410})	Winkler and Stuckmann (1979)
Amylase	pH 8 at 50ºC	Starch soluble	Maltose (A_{540})	Areekijseree et al. (2004)

* The optimal conditions were chosen from previous reports on characteristics of the main digestive enzymes in Siamese fighting fish, as observed by Thongprajukaew et al. (2010a, b).
BAPNA, benzoyl-*L*-Arg-*p*-nitroanilide; SAPNA, *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide.

Table 2 Survival, growth performance and feed utilization of male Siamese fighting fish individually reared with various color backgrounds. The observed parameters were recorded at the end of the two-month experiment.

Parameter	Background color				
	Transparent	White	Red	Blue	Black
Survival (%)	100	100	100	100	100
Final body weight (g)	1.89 ± 0.06^{ab}	1.92 ± 0.05^{ab}	1.96 ± 0.05^{a}	2.06 ± 0.06^{a}	1.77 ± 0.06^{b}
Standard length (cm)	4.03 ± 0.07^{a}	4.03 ± 0.04^{a}	4.00 ± 0.04^{a}	4.02 ± 0.04^{a}	3.54 ± 0.08^{b}
Total length (cm)	6.64 ± 0.13	6.68 ± 0.11	6.53 ± 0.15	6.44 ± 0.15	6.30 ± 0.11
VSI (%)	6.37 ± 0.28^{b}	9.82 ± 0.24^{a}	6.87 ± 0.33^{b}	7.30 ± 0.28^{b}	7.76 ± 0.62^{b}
CF (g cm^{-3})	0.50 ± 0.03^{b}	0.54 ± 0.02^{b}	0.58 ± 0.03^{b}	0.71 ± 0.03^{a}	0.69 ± 0.03^{a}
SGR (% BW day^{-1})	0.88 ± 0.05^{a}	0.88 ± 0.05^{a}	0.86 ± 0.05^{a}	0.97 ± 0.04^{a}	0.69 ± 0.03^{b}
FR (% BW day^{-1})	1.58 ± 0.02^{b}	1.85 ± 0.08^{a}	1.49 ± 0.02^{bc}	1.42 ± 0.02^{c}	1.46 ± 0.03^{c}
FCR (mg feed mg $gain^{-1}$)	1.87 ± 0.11^{b}	1.83 ± 0.04^{b}	1.50 ± 0.06^{c}	1.60 ± 0.06^{bc}	2.67 ± 0.16^{a}
PER (mg gain mg $protein^{-1}$)	1.37 ± 0.11^{b}	1.39 ± 0.10^{b}	1.71 ± 0.12^{a}	1.83 ± 0.07^{a}	1.11 ± 0.07^{b}

VSI, viscerosomatic index; CF, condition factor; SGR, specific growth rate; BW, body weight; FR, feeding rate; FCR, feed conversion ratio, PER, protein efficiency ratio.

Data are expressed as mean ± SEM (n = 15).

Differences between means were tested with Duncan's multiple range test.

Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Table 3 Specific activity of digestive enzymes in male Siamese fighting fish individually reared with various color backgrounds. The observed parameters were recorded at the end of the two-month experiment.

Digestive enzyme	Background color				
	Transparent	White	Red	Blue	Black
Pepsin (U mg protein^{-1})	13.85 ± 0.45^{ab}	11.31 ± 1.17^{ab}	8.69 ± 2.58^{b}	14.28 ± 1.14^{ab}	16.19 ± 2.43^{a}
Trypsin (U mg protein^{-1})	15.57 ± 1.78^{ab}	17.00 ± 0.70^{a}	12.67 ± 0.94^{b}	12.68 ± 1.36^{b}	12.86 ± 1.18^{b}
Chymotrypsin (U mg protein^{-1})	30.20 ± 0.40	31.20 ± 2.60	32.65 ± 1.24	28.52 ± 2.54	32.54 ± 2.85
Lipase (U mg protein^{-1})	1.45 ± 0.07^{b}	2.27 ± 0.12^{a}	1.67 ± 0.06^{b}	1.77 ± 0.12^{b}	1.51 ± 0.08^{b}
Amylase (mU mg protein^{-1})	1.78 ± 0.08^{c}	3.03 ± 0.11^{a}	2.12 ± 0.57^{bc}	2.06 ± 0.04^{bc}	2.39 ± 0.15^{b}
A/T ratio (× 10^{-4})	0.13 ± 0.01^{b}	0.16 ± 0.01^{ab}	0.14 ± 0.01^{b}	0.19 ± 0.04^{a}	0.16 ± 0.01^{ab}

A/T ratio, amylase/trypsin ratio.
Data are expressed as mean ± SEM (n = 5).
Differences between means were tested with Duncan's multiple range test.
Different superscripts in the same row indicate a significant difference (P < 0.05).

Table 4 Color parameters of skin of male Siamese fighting fish individually reared with various color backgrounds. The observed parameters were recorded at the end of the two-month experiment.

Color parameter	Background color				
	Transparent	White	Red	Blue	Black
*L**	23.17 ± 0.60^{ab}	23.66 ± 0.64^{ab}	22.88 ± 0.67^{a}	24.38 ± 0.39^{ab}	24.83 ± 0.43^{b}
*a**	11.79 ± 0.51	11.69 ± 0.33	11.98 ± 0.33	12.25 ± 0.36	11.91 ± 0.44
*b**	5.68 ± 0.52^{b}	7.06 ± 0.52^{a}	6.02 ± 0.31^{ab}	6.03 ± 0.23^{ab}	5.83 ± 0.19^{b}
*a**/*b**	1.88 ± 0.06^{ab}	1.88 ± 0.10^{ab}	1.74 ± 0.07^{b}	2.11 ± 0.07^{a}	1.97 ± 0.06^{ab}

Data are expressed as mean ± SEM (n = 15).
Differences between means were tested with Duncan's multiple range test.
Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Table 5 Protein synthesis capacity and myosin and actin in white muscles of male Siamese fighting fish individually reared with various color backgrounds. The observed parameters were recorded at the end of the two-month experiment.

Parameter	Background color				
	Transparent	White	Red	Blue	Black
RNA (μg g^{-1})	1,387 ± 119^{a}	1,504 ± 99^{a}	1,302 ± 161^{a}	1,432 ± 83^{a}	861 ± 75^{b}
Protein (mg g^{-1})	260.12 ± 22.67^{b}	281.31 ± 12.57^{b}	298.57 ± 24.78^{b}	280.91 ± 19.14^{b}	385.60 ± 32.01^{a}
RNA/protein ratio (μg mg^{-1})	4.89 ± 0.49^{a}	5.31 ± 0.40^{a}	4.99 ± 0.24^{a}	4.12 ± 0.60^{ab}	2.31 ± 0.27^{b}
Δ Myosin (J g^{-1})	0.44 ± 0.01	0.39 ± 0.04	0.53 ± 0.02	0.37 ± 0.05	0.40 ± 0.11
Δ Actin (J g^{-1})	0.35 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.38 ± 0.03
Δ Actin/Myosin	0.81 ± 0.06^{bc}	0.89 ± 0.01^{b}	0.67 ± 0.06^{c}	1.13 ± 0.01^{a}	0.74 ± 0.07^{bc}

Data are expressed as mean ± SEM (n = 5).
Differences between means were tested with Duncan's multiple range test.
Different superscripts in the same row indicate a significant difference (P < 0.05).

Table 6 The chemical composition of carcass of male Siamese fighting fish individually reared with various color backgrounds. The observed parameters were recorded at the end of the two-month experiment.

Chemical component	Background color				
	Transparent	White	Red	Blue	Black
Moisture (% FW)	73.05 ± 0.57^{a}	71.98 ± 0.95^{ab}	72.05 ± 0.63^{ab}	70.43 ± 0.82^{b}	72.85 ± 0.47^{b}
Crude protein (% FW)	16.26 ± 0.33^{ab}	17.08 ± 0.34^{a}	16.88 ± 0.15^{a}	16.71 ± 0.46^{ab}	15.72 ± 0.27^{b}
Crude lipid (% FW)	2.99 ± 0.33^{c}	3.47 ± 0.32^{bc}	4.45 ± 0.29^{b}	5.77 ± 0.24^{a}	3.92 ± 0.48^{bc}
Crude ash (% FW)	5.07 ± 0.27	5.22 ± 0.14	5.13 ± 0.12	4.92 ± 0.42	5.26 ± 0.15

FW, fresh weight.
Data are expressed as mean ± SEM ($n = 5$).
Differences between means were tested with Duncan's multiple range test.
Different superscripts in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$).

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายศุกร์เทียนชัย แซ่โค้ว

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5810620024

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมี-ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2557

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

1. ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภททั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2559 จากสำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (เลขที่สัญญา SCI 590420S)

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

1. **ศุกร์เทียนชัย แซ่โค้ว**, การุณ ทองประจุแก้ว และวุฒิพร พรหมขุนทอง. 2017. ปริมาตรน้ำที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และคุณภาพสีของปลากัด (*Betta splendens* Regen, 1910) เพศผู้. การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 56 มหาวิทยาเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ, 30 มกราคม–2 กุมภาพันธ์ 2561. หน้า 633–640.
2. **Saekhow, S.**, Thongprajukaew, K. and Phromkunthong, W. 2017. Blue aquarium background improved the production quality of male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910) (submitted).
3. **Saekhow, S.**, Thongprajukaew, K., Phromkunthong, W. and Sae-Khoo, H. 2018. Minimal water volume for intensively producing male Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). Fish Physiology and Biochemistry. https://doi.org/10.1007/s10695-018-0495-z.