



การเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารและเอนไซม์ในกล้ามเนื้อหลังการตาย  
ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*)  
**Postmortem Changes of Digestive System and Muscle Degradation  
Enzymes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**

วราภรณ์ ห่าหอ  
**Waraporn Hahor**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

**2559**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารและเอนไซม์ในกล้ามเนื้อหลังการตาย  
ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

**Postmortem Changes of Digestive System and Muscle Degradation  
Enzymes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**

วราภรณ์ ห่าหอ

**Waraporn Hahor**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the**

**Degree of Master of Science in Forensic Science**

**Prince of Songkla University**

**2559**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์      การเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารและเอนไซม์ในกล้ามเนื้อหลังการ  
ตายของปลานิล (*Oreochromis niloticus*)  
ผู้เขียน                นางสาววราภรณ์ ห่าหอ  
สาขาวิชา              นิติวิทยาศาสตร์

---

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. การุณ ทองประจักษ์แก้ว)      (รองศาสตราจารย์ ดร. สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. การุณ ทองประจักษ์แก้ว)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นเรศ ช้วนยุก)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมรักษ์ รอดเจริญ)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรากร ลิ้มบุตร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร. วีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ .....

(ผศ. ดร. การุณ ทองประจุแก้ว)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ .....

(ผศ. ดร. นเรศ ช้วนยุก)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ .....

(ผศ. ดร. สมรักษ์ รอดเจริญ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ .....

(นางสาววราภรณ์ ห่าหอ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน  
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาววราภรณ์ ห่าหอ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารและเอนไซม์ในกล้ามเนื้อ หลังการตายของปลานิล ( <i>Oreochromis niloticus</i> )
ผู้เขียน	นางสาววารภรณ์ ห่าหอ
สาขาวิชา	นิติวิทยาศาสตร์
ปีการศึกษา	2558

### บทคัดย่อ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงหลังการตายของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยสุ่มตัวอย่างปลาที่มีความยาวและน้ำหนักใกล้เคียงกัน (น้ำหนัก  $105.83 \pm 1.66$  กรัม และความยาวตลอดลำตัว  $18.55 \pm 0.14$  เซนติเมตร) มาลอยในภาชนะทรงสี่เหลี่ยม ที่มีอุณหภูมิ  $29.60 \pm 0.15$  องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างปลา ( $n = 4$ ) ที่เวลา 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังการตาย เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารและเอนไซม์ในกล้ามเนื้อ ผลการศึกษาพบว่าดัชนีของกระเพาะอาหารลดลงตามระยะเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ ) และมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับความเข้มข้นของโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เปปซิน และกิจกรรมการกำจัดอนุภาคอิสระในกระเพาะอาหาร ( $r = 0.750-0.927$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 32$ ) สำหรับในลำไส้พบว่าดัชนีมีค่าลดลงตามระยะเวลาหลังการตายเช่นเดียวกัน ( $P < 0.05$ ) และมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหาร ได้แก่ ทริปซิน ไคโมทริปซิน อะไมเลส และไลเปส และกิจกรรมการกำจัดอนุภาคอิสระ ( $r = 0.665-0.842$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 32$ ) เอนไซม์ย่อยไขมันมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงหลังการตายมากกว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต และการเปลี่ยนแปลงในลำไส้เกิดขึ้นเร็วกว่าในกระเพาะอาหาร ความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงระหว่างตัวแปรทั้งหมดบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงของกระเพาะอาหารและลำไส้เกิดควบคู่กัน สอดคล้องกับลักษณะทางจุลกายวิภาคที่พบว่าส่วนของวิลไลในลำไส้ ผนังเนื้อเยื่อ และเซลล์ภายใน lamina propria ของกระเพาะอาหารและลำไส้เสื่อมสภาพลงตามระยะเวลาหลังการตาย การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ในกล้ามเนื้อ ได้แก่ คาเทปซินบี เอช และแอล พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังการตายเช่นเดียวกัน ( $P < 0.05$ ) กิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกัน ( $r = 0.987-0.997$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 32$ ) อย่างไรก็ตาม คาเทปซินเอช มีค่าต่ำกว่าคาเทปซินบี และแอล และมีกิจกรรมลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 8 หลังการตาย ซึ่งแปรผกผันกับกิจกรรมของไคโมทริปซิน จากการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้ในการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารและเอนไซม์ในกล้ามเนื้อประมาณระยะเวลาหลังการตายของสัตว์น้ำได้ ข้อมูลดังกล่าวอาจประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมลพิษทางน้ำ และการกระทำทารุณกรรมสัตว์น้ำ

<b>Thesis Title</b>	Postmortem changes of digestive system and muscle degradation enzymes of Nile tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )
<b>Author</b>	Miss Waraporn Hahor
<b>Major Program</b>	Forensic Science
<b>Academic Year</b>	2015

## ABSTRACT

Postmortem changes were studied in an aquatic animal model, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Dead fish ( $105.83 \pm 1.66$  g weight,  $18.55 \pm 0.14$  cm length) were floated indoors at water temperature  $29.60 \pm 0.15$  °C, and samples ( $n = 4$ ) were collected at the time points 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h after death in order to evaluate postmortem changes of digestive system and muscle degradation enzymes. Stomasomatic index decreased with postmortem time ( $P < 0.05$ ) and correlated positively with protein concentration, pepsin specific activity and stomach scavenging activity ( $r = 0.750\text{--}0.927$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 32$ ). Also intestosomatic index decreased significantly and correlated positively with protein concentration, specific activity of digestive enzymes including trypsin, chymotrypsin, amylase, lipase and intestinal scavenging activity ( $r = 0.665\text{--}0.842$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 32$ ). In their postmortem changes the digestive enzymes exhibited earlier lipid degradation than carbohydrate or protein. The intestinal changed more rapidly than the stomach. The positive correlations between all observed variables show coherent changes in the stomach and the intestine, consistent with postmortem degradation in microanatomy of both organs (lumen, wall and cells within lamina propria). Specific activity of the three cathepsin enzymes increased significantly with postmortem time ( $P < 0.05$ ) and exhibited highly positive relationship ( $r = 0.987\text{--}0.997$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 32$ ). However, cathepsin H had the lowest specific activity than the cathepsins B and L. Cathepsin H had the lowest specific activity at 8 h and correlated negatively with chymotrypsin. The findings suggest that the postmortem changes of digestive system and muscle degradation enzymes can serve as primary data for the estimation of time of death of an aquatic animal. These data can be applied for environmental forensics in relation to water pollutants, and in case of aquatic animal cruelty.

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. การุณ ทองประจักษ์ แก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่คอยให้คำแนะนำ คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือในการศึกษาและทำวิจัย ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. นเรศ ช้วนยุค อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาและสอนการทำวิจัย ด้านจุลกายวิภาคของปลาไนล์ ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. สมรักษ์ รอดเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือการทำวิจัยในด้านชีววิทยาของปลาไนล์ และขอขอบพระคุณ รศ. ดร. สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า และ ผศ. ดร. วรากร ลีมบุตร ที่เสียสละเวลาเป็นประธานและกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รวมทั้งเสนอแนะแนวทางการเขียน เพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ผู้วิจัยขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่สนับสนุนทุนอุดหนุน การวิจัย ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ (เลขที่สัญญา 1-2556-02-007) ทุนวิจัย ประเภททั่วไปจากสำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (เลขที่สัญญา SCI 570522S) และทุนนำเสนอผลงานวิชาการ

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับการฝึกอบรมและให้ความ อนุเคราะห์ในการใช้เครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ ขอขอบคุณคุณอัศวินวิทย์ อิศสระโร นักวิทยาศาสตร์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ สุขุมมาตย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะ ทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ช่วยฝึกสอน ให้คำแนะนำ ตลอดจน การทำวิจัยด้านจุลกายวิภาค ขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโท สาขานิติวิทยาศาสตร์ทุกคนที่ให้ กำลังใจและให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา และขอขอบคุณสมาชิกใน ครอบครัวทุกคนที่คอยให้กำลังใจตลอดการศึกษา

วราภรณ์ ห่าหอ



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(5)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(11)
สัญลักษณ์และคำย่อ	(13)
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	<b>1</b>
1. บทนำต้นเรื่อง	1
2. การตรวจเอกสาร	3
3. วัตถุประสงค์	17
<b>บทที่ 2 วิธีการวิจัย</b>	<b>18</b>
1. การเตรียมตัวอย่างปลาไหล	18
2. การเก็บตัวอย่างปลาไหล	18
3. การศึกษาดัชนีน้ำหนักของอวัยวะย่อยอาหาร	18
4. การสกัดสารสกัดจากกระเพาะอาหารและลำไส้	19
5. การศึกษาความเข้มข้นของโปรตีนในสารสกัดจากกระเพาะอาหารและลำไส้	19
6. การศึกษากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหาร	20
7. การศึกษาการต้านปฏิบัติการออกซิเดชันของระบบย่อยอาหาร	22
8. การศึกษาลักษณะจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหารและลำไส้หลังการตาย	23
9. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์คาเทปซินบี เอช และแอล	23
10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	25
<b>บทที่ 3 ผล</b>	<b>26</b>
1. การเปลี่ยนแปลงของดัชนีทางเดินอาหารหลังการตาย	26
2. การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโปรตีนในทางเดินอาหารหลังการตาย	26

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3. การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลังการตาย	29
4. การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาออกซิเดชันในระบบย่อยอาหารหลังการตาย	32
5. ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหาร	32
6. การเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลกายวิภาคกระเพาะอาหารและลำไส้หลังการตาย	36
7. การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของคาเทปซิน บี เอช และแอล หลังการตาย	42
<b>บทที่ 4 บทวิจารณ์</b>	<b>45</b>
1. การเปลี่ยนแปลงดัชนีและความเข้มข้นของโปรตีนในทางเดินอาหารหลังการตาย	45
2. การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารหลังการตาย	46
3. การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาออกซิเดชันในกระเพาะอาหารและลำไส้หลังการตาย	47
4. การเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหารและลำไส้หลังการตาย	47
5. การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของคาเทปซิน บี เอช และแอล ในกล้ามเนื้อขาหลังการตาย	49
<b>บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ</b>	<b>50</b>
<b>บรรณานุกรม</b>	<b>52</b>
<b>ภาคผนวก</b>	<b>64</b>
ก ผลงานวิจัยที่นำเสนอแบบบรรยายในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ	65
ข ต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ในวารสารเรื่องที่ 1	73
ค ต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ในวารสารเรื่องที่ 2	97

## รายการตาราง

	หน้า
<p><b>ตารางที่ 1</b> ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (<math>r</math>) ระหว่างตัวแปรแต่ละคู่ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารหลังการตายของปลานิล ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (<math>P &lt; 0.01</math>)</p>	34
<p><b>ตารางที่ 2</b> สมการถดถอยระหว่างเวลาหลังการตาย (ชั่วโมง) ของปลานิล (<math>X</math>) และตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหาร (<math>Y</math>) ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับเวลาหลังการตายอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (<math>P &lt; 0.01</math>)</p>	35
<p><b>ตารางที่ 3</b> สมการถดถอยระหว่างเวลาหลังการตาย (ชั่วโมง) ของปลานิล (<math>X</math>) และเอนไซม์คาเทปซินในกล้ามเนื้อขาว (<math>Y</math>) ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับเวลาหลังการตายอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (<math>P &lt; 0.01</math>)</p>	44

## รายการภาพประกอบ

	หน้า
<p><b>รูปที่ 1</b> การเปลี่ยนแปลงดัชนีของกระเพาะอาหาร (a) และลำไส้ (b) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย <math>\pm</math> ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (<math>n = 4</math>) ด้วยกที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย (<math>P &lt; 0.05</math>)</p>	27
<p><b>รูปที่ 2</b> การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโปรตีนในกระเพาะอาหาร (a) และลำไส้ (b) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย <math>\pm</math> ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (<math>n = 4</math>) ด้วยกที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย (<math>P &lt; 0.05</math>)</p>	28
<p><b>รูปที่ 3</b> การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมจำเพาะ (<math>\text{mU mg protein}^{-1}</math>) ของเอนไซม์เปปซิน (a) ทริปซิน (b) และโคโมทริปซิน (c) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย <math>\pm</math> ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (<math>n = 4</math>) ด้วยกที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย (<math>P &lt; 0.05</math>)</p>	30
<p><b>รูปที่ 4</b> การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลส (a, <math>\text{U mg protein}^{-1}</math>) และไลเปส (b, <math>\text{mU mg protein}^{-1}</math>) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย <math>\pm</math> ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (<math>n = 4</math>) ด้วยกที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย (<math>P &lt; 0.05</math>)</p>	31
<p><b>รูปที่ 5</b> การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการกำจัดอนุมลอิสระในกระเพาะอาหาร (a) และลำไส้ (b) (% inhibition) และความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในกระเพาะอาหาร (c) และลำไส้ (d) (% remained) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมง</p>	33
<p><b>รูปที่ 6</b> จุลกายวิภาคของกระเพาะอาหาร (ตัดตามขวาง) ของปลานิลหลังการตาย ที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (h) (H&amp;E, scale bar = 200 <math>\mu\text{m}</math>) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 40 เท่า</p>	37

## รายการภาพประกอบ (ต่อ)

	หน้า
<p><b>รูปที่ 7</b> จุลกายวิภาคของกระเพาะอาหาร (ตัดตามขวาง) ของปลานิลหลังการตาย ที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (h) (MU = mucosa, LP = lamina propria, SU = submucosa, ML = muscularis, SE = serosa, B = blood vessel) (H&amp;E, scale bar = 50 <math>\mu</math>m) ภาพถ่ายบันทึกที่ กำลังขยาย 200 เท่า</p>	38
<p><b>รูปที่ 8</b> จุลกายวิภาคของลำไส้ (ตัดตามขวาง) ของปลานิลหลังการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (h) (H&amp;E, scale bar = 200 <math>\mu</math>m) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 200 เท่า</p>	40
<p><b>รูปที่ 9</b> จุลกายวิภาคของลำไส้ (ตัดตามขวาง) ของปลานิลหลังการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (MU = mucosa, LP = lamina propria, SU = submucosa, ML = muscular, SE = serosa, B = blood vessel) (H&amp;E, scale bar = 50 <math>\mu</math>m) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลัง ขยาย 200 เท่า</p>	41
<p><b>รูปที่ 10</b> การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมจำเพาะ (<math>\text{mU mg protein}^{-1}</math>) ของเอนไซม์คาเทปซินบี (a) 43 เอช (b) และแอล (c) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย <math>\pm</math> ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (<math>n = 4</math>) ตัวอย่างที่แตกต่างกันแสดงถึง ความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย (<math>P &lt; 0.05</math>)</p>	43

### สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

ATP	=	Adenosine triphosphate
AMC	=	Aminomethylcoumarin
Arg-MCA	=	<i>L</i> -Arginine-4-methylcoumaryl-7-amide
BANA	=	Benzoyl-arginine naphthylamide
BAPNA	=	Benzoyl- <i>L</i> -Arg- <i>p</i> -nitroanilide
BSA	=	Bovine serum albumin
CRD	=	Completely randomized design
DPPH	=	2,2-Diphenylpicrylhydrazyl
EDTA	=	Ethylene diamine tetra-acetic acid
HSI	=	Hepatosomatic index
<i>O. aureus</i>	=	<i>Oreochromis aureus</i>
<i>O. niloticus</i>	=	<i>Oreochromis niloticus</i>
ISI	=	Intestosomal index
SAPNA	=	<i>N</i> -Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -nitroanilide
SSI	=	Stomasomatic index
TPTZ	=	2,4,6-Tris(2-pyridyl)- <i>s</i> -triazine
Z-Arg-Arg-MCA	=	Z-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin
Z-Phe-Arg-MCA	=	Z-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin
cm	=	Centimeter
g	=	Gram
<i>g</i>	=	Gravity
h	=	Hour
<i>n</i>	=	Number of sample
<i>r</i>	=	Correlation coefficient
$r^2$	=	Correlation

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1. บทนำต้นเรื่อง

การเปลี่ยนแปลงหลังการตาย (postmortem change) ส่วนใหญ่จะเน้นศึกษาในสัตว์บก เช่น หนู (Querido, 1992; Li *et al.*, 2003) สุนัข (Erlandsson และ Munro, 2007) วัว (Costa *et al.*, 2012) และสุกร (Myburgh *et al.*, 2013) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ รวมทั้งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ภายในร่างกาย (เนตรนรินทร์ และคณะ, 2546; Vass, 2001) และปัจจัยสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ความเย็น และกระบวนการฆ่า (Campobasso *et al.*, 2001; Pearce *et al.*, 2011) สำหรับในสัตว์น้ำพบว่า ส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นศึกษาภายใต้อุณหภูมิต่ำเพื่อประโยชน์ในการยืดอายุการเก็บรักษา และคงสภาพผลิตภัณฑ์ในด้านอุตสาหกรรมอาหารเป็นหลัก (Aoki *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007; Bahaud *et al.*, 2008; Fidalgo *et al.*, 2014) งานวิจัยที่อธิบายการเปลี่ยนแปลงหลังการตายของสัตว์น้ำยังไม่มีรายงาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานต่อไป

ระบบย่อยอาหารมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วหลังการตายเนื่องจากเกิดการย่อยตัวเอง (autolysis) ของอวัยวะย่อยอาหารและเนื้อเยื่อโดยรอบจากการทำงานของเอนไซม์ (O'Donnell *et al.*, 2010; Laczniak *et al.*, 2011; Usui *et al.*, 2013) การศึกษาของ Querido (1992) พบว่าความต้านทานไฟฟ้าของผนังกระเพาะอาหารลดลงตามระยะเวลาหลังการตาย ขณะที่ Erlandsson and Munro (2007) รายงานว่าลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อลำไส้เกิดการเสื่อมสภาพลงเมื่อเวลาผ่านไป ผลการศึกษาดังกล่าวบ่งชี้ว่าระบบทางเดินอาหารมีบทบาทสำคัญและมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้เพื่อประมาณระยะเวลาหลังการตายได้

ช่วงเวลาหลังการตายสามารถแบ่งได้เป็น 3 ช่วงตามการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อ ได้แก่ ระยะก่อนการเกร็งตัว (pre-rigor mortis stage) ระยะเกร็งตัว (rigor mortis stage) และระยะหลังการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ (post-rigor mortis stage) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดจากเอนไซม์คาเทปซินย่อยสลายโปรตีนไมโอไฟบริล (myofibril) ในกล้ามเนื้อ ส่งผลทำให้กล้ามเนื้ออ่อนตัวลงอย่างรวดเร็ว (Jiang, 2000) การศึกษาของ Chéret *et al.* (2007) พบว่าคาเทปซินบี

เอช และแอล ในกล้ามเนื้อขาวของปลากะพงขาว (*Dicentrarchus labrax*) มีกิจกรรมสูงกว่าคาเทปซินดี นอกจากนี้การศึกษาในกล้ามเนื้อขาวของปลากลุ่มเรดเฟรช (red-fresh) บางชนิดพบว่าคาเทปซินบี และแอลมีกิจกรรมที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับคาเทปซินดี (Aoki *et al.*, 2000) ข้อมูลดังกล่าวบ่งบอกถึงอัตราเร็วในการสลายโปรตีนของคาเทปซินบี เอช และแอล จากการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าคาเทปซินบี เอช และแอลเป็นเอนไซม์หลักในการย่อยสลายกล้ามเนื้อขาวหลังการตายของปลา

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงหลังการตายของระบบย่อยอาหารและเอนไซม์ในกล้ามเนื้อขาว โดยศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงของดัชนีทางเดินอาหาร กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารในกระเพาะอาหารและลำไส้ และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์คาเทปซินในกล้ามเนื้อขาว รวมทั้งประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารทดสอบ (scavenging activity) และความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันของสารทดสอบ (reducing power assay) เพื่อประเมินการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหาร การศึกษานี้ใช้ปลาไนล์ (*Oreochromis niloticus*) เป็นต้นแบบ เนื่องจากเป็นปลาเศรษฐกิจที่สำคัญของโลก มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย ทราบข้อมูลลักษณะทางจุลกายวิภาคของระบบย่อยอาหาร (Morrison and Wright Jr, 1999) เป็นปลาที่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในช่วงกว้างได้ดี เจริญเติบโตเร็ว และสามารถทนต่อความเครียดได้ (Getinet and Amrit, 2007) ผลการศึกษาในครั้งนี้คาดว่าจะสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจำแนกระยะเวลาหลังการตาย (postmortem interval) ของสัตว์น้ำได้ ซึ่งอาจเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ทางน้ำ โดยอาจใช้สำหรับสืบสวนและสอบสวนคดีความที่เกี่ยวข้องกับการตายของสัตว์น้ำในฟาร์มเลี้ยง และการตายจากการถูกทารุณกรรม (animal cruelty) หรือใช้ประมาณช่วงเวลาหลังการตายในการขนส่งสัตว์น้ำที่สำคัญทางเศรษฐกิจทั้งสัตว์น้ำที่เลี้ยงเพื่อบริโภคเป็นอาหารและเลี้ยงเป็นสัตว์น้ำสวยงามในกรณีที่มีการทำประกันภัยความเสียหายระหว่างการขนส่ง



## 2. การตรวจเอกสาร

### 2.1 ชีววิทยาของปลานิล

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบลุ่มน้ำในทวีปแอฟริกา แพร่กระจายไปทั่วทุกภูมิภาคของโลก นิยมเพาะเลี้ยงกันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถขยายพันธุ์ได้ดี เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว และปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี (Pasnik *et al.*, 2006) ลำดับทางอนุกรมวิธานของปลานิลสามารถจำแนกได้ดังนี้

Kingdom Animalia

Phylum Chordata

Class Actinopterygii

Order Perciformes

Family Cichlidae

Genus *Oreochromis*

Species *niloticus*

ปลานิลมีรูปร่างลักษณะคล้ายปลาหมอ คือ มีริมฝีปากบนและฝีปากล่างเสมอกัน ลำตัวป้อม มีสีเขียวปนน้ำตาล ที่ลำตัวมีลายพาดขวาง 9–10 แถว ครีบหลังมีเพียง 1 ครีบ ประกอบด้วยก้านครีบแข็ง และก้านครีบอ่อนเป็นจำนวนมาก ครีบกันประกอบด้วยก้านครีบแข็ง และก้านครีบอ่อนเช่นเดียวกัน โดยบริเวณส่วนที่อ่อนของครีบหลัง ครีบกันและครีบหางมีจุดขาว และเส้นสีดำตัดขวาง (สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, 2536) รูปร่างภายนอกของปลานิลตัวผู้ และตัวเมียมีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่เมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ปลานิลตัวผู้มักจะมีขนาดใหญ่กว่า เมื่อมีอายุเท่ากัน การแยกเพศสามารถกระทำได้โดยดูอวัยวะเพศที่บริเวณใกล้กับช่องทวาร ซึ่งปลานิลต้องมีความยาวตั้งแต่ 10 เซนติเมตรขึ้นไป โดยบริเวณอวัยวะเพศของตัวผู้จะมีลักษณะเรียวยาวยื่นออกมา มีรูเปิด 2 รูคือ รูกันและรูเปิดรวมของท่อน้ำเชื้อและท่อน้ำสภาวะ ส่วนตัวเมียบริเวณอวัยวะเพศจะมีสีซีดกว่าตัวผู้ มีรูเปิด 3 รู คือ รูกัน รูท่อน้ำไขเป็นรูปกลมขนาดใหญ่ และรูท่อน้ำสภาวะ นอกจากนี้ยังสามารถสังเกตเพศของปลานิลได้จากสีของตัวปลา ซึ่งลำตัวของตัวผู้จะมีสีเข้มโดยเฉพาะในฤดูผสมพันธุ์ แถบขวางลำตัวมองเห็นไม่ชัด ครีบต่างๆจะยาวกว่าตัวเมีย บริเวณใต้คางจะมีสีแดง ในขณะที่ลำตัวของตัวเมียจะมีสีซีดกว่า ใต้คางมีสีเหลือง มองเห็นแถบขวางข้างตัวได้ชัดเจน และครีบต่างๆ จะสั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวผู้

ปลานิลเป็นปลาที่ชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง ยกเว้นในช่วงสืบพันธุ์ สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในเวลา 1 ปี จะมีน้ำหนักประมาณครึ่งกิโลกรัม และมีความยาวประมาณ 1 ฟุต อาศัยได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย ทนต่อความเค็มได้ถึง 20 ส่วนในพันส่วน แต่จะไม่สามารถสืบพันธุ์ได้หากน้ำมีความเค็มสูงกว่า 30 ส่วนในพันส่วน (Fineman-Kalio, 1988) ทนต่อพีเอชได้ดีในช่วง 6.5–8.3 ซึ่งหากระดับพีเอชสูงกว่า 11 หรือต่ำกว่า 4 จะทำให้ปลานิลตาย (Chervinski, 1982) ปลานิลมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ที่ 24–32 องศาเซลเซียส (Zhu *et al.*, 2009) สามารถทนต่ออุณหภูมิได้ในช่วง 10–40 องศาเซลเซียส แต่ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส ปลานิลจะเจริญเติบโตได้ไม่ดี และจะกินอาหารน้อยลง (Chervinski, 1982) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะถิ่นกำเนิดเดิมของปลานิลอยู่ในแถบลุ่มน้ำของทวีปแอฟริกาซึ่งเป็นเขตร้อน (อุตม, 2549)

ปลานิลมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เมื่อพร้อมที่จะสืบพันธุ์จะแยกตัวออกมาจากฝูง โดยปลาตัวผู้แยกออกไปสร้างรัง จะแผ่ครีบทองและอ้าปากกว้าง แสดงพฤติกรรมจับคู่ โดยว่ายน้ำเคล้าคู่กันไปกับตัวเมีย และใช้บริเวณส่วนหัวคุดนที่ใต้ท้องของตัวเมียเพื่อเป็นการกระตุ้นให้วางไข่ ปลาตัวเมียจะเก็บไข่ที่ได้รับการผสมแล้วอมไว้ในปากและว่ายน้ำออกจากรัง แม่ปลาจะขยับปากให้น้ำไหลเข้าออกในช่องปากเพื่อช่วยให้ไข่ที่อมไว้ได้รับน้ำที่สะอาด ปริมาณไข่ที่แม่ปลาวางแต่ละครั้งจะขึ้นอยู่กับฤดูกาลและขนาดของแม่ปลา ในเขื่อน Emiliano Zapata ของเม็กซิโก ฤดูวางไข่ของปลานิลอยู่ในช่วงเดือนสิงหาคมและเดือนกุมภาพันธ์ ปลานิลที่เจริญพันธุ์เต็มที่ (mature) มีความยาวประมาณ 150 เซนติเมตร โดยปลานิลตัวเมียจะวางไข่ได้ครั้งละประมาณ 243–847 ฟอง (Peña-Mendoza *et al.*, 2005) สำหรับในประเทศไทย ปลานิลมีความถี่ในการวางไข่สูงในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนตุลาคม เนื่องจากเป็นช่วงฤดูฝน อุณหภูมิและระดับน้ำเพิ่มขึ้น และความเข้มข้นของสารเคมีหรือของเสียลดลง โดยจะวางไข่ได้ครั้งละประมาณ 100–700 ฟอง (Bhujje, 2000) เมื่อตัวเมียวางไข่แล้ว ปลานิลตัวผู้จะปล่อยน้ำเชื้อลงไปใไข่จนกว่าผสมพันธุ์เสร็จซึ่งใช้เวลาประมาณ 1–2 ชั่วโมง ไข่จะพัฒนาเป็นลูกปลาวัยอ่อนภายใน 8 วัน ในช่วงที่ลูกปลาฟักออกมาเป็นตัวใหม่ๆ จะเกาะรวมตัวกันเป็นกลุ่มว่ายวนเวียนอยู่บริเวณหัวของแม่ปลา หลังจาก 3 สัปดาห์ ลูกปลาจะหากินเองได้ ปกติปลานิลสามารถผสมพันธุ์ได้ตลอดปี โดยใช้เวลา 2–3 เดือนต่อรอบ แต่ถ้าอาหารเพียงพอและเหมาะสมในระยะเวลา 1 ปี จะผสมพันธุ์ได้ 5–6 รอบ (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, 2551)

## 2.2 อาหารและระบบย่อยอาหารของปลานิล

ปลานิลดำรงชีวิตเป็นผู้บริโภคลำดับที่สอง ส่วนใหญ่กินพืชเป็นอาหารและสามารถผลิตโปรตีนที่มีคุณภาพสูงสำหรับการบริโภคของมนุษย์ (Bezerra *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2009) ปลานิลกินอาหารที่ได้จากธรรมชาติได้หลายชนิดทั้งพืชและสัตว์ เช่น ไรน้ำ ตะไคร่น้ำ ตัวอ่อนแมลงและสัตว์เล็ก ๆ รวมทั้งสาหร่ายและเห็ด (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, 2551) การประเมินการกินอาหารในธรรมชาติของปลานิลในด้านชนิดและสัดส่วนของกลุ่มอาหารพบว่าอาหารกลุ่มเด่นของปลานิล คือ สัตว์หน้าดิน แพลงก์ตอนสัตว์ และแพลงก์ตอนพืช โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 38 33.5 และ 33.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (พัชรา, 2549) ความต้องการอาหารประเภทโปรตีนของปลานิลขึ้นอยู่กับขนาด อายุของปลา คุณภาพของโปรตีน และระดับพลังงานในอาหาร (อุดม, 2549) โดยปลานิลในช่วงวัยอ่อนถึงวัยรุ่น วัยรุ่นถึงวัยเจริญพันธุ์ และ ตัวเต็มวัยถึงแม่พันธุ์ มีความต้องการโปรตีน 35–40 เปอร์เซ็นต์ 28–35 เปอร์เซ็นต์ และ 20–30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (วีรพงศ์, 2536) สำหรับความต้องการคาร์โบไฮเดรต พบว่าปลานิลมีการใช้ประโยชน์จากคาร์โบไฮเดรตได้ดี เนื่องจากสามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยแป้งในทางเดินอาหารได้ (เวียง, 2542) แต่ควรมีวัตถุดิบอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต เช่น ปลายข้าวและมันสำปะหลังไม่เกิน 35 เปอร์เซ็นต์ในอาหารของปลาขนาดเล็ก และการทำให้อาหารสุกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยให้สูงขึ้นได้อีกประมาณ 25–30 เปอร์เซ็นต์ (กลุ่มวิจัยอาหารสัตว์น้ำ, 2534) สำหรับความต้องการไขมัน ปลานิลต้องการกรดไขมันที่จำเป็นในกลุ่มโอเมกา-6 มากกว่าในกลุ่มโอเมกา-3 เพื่อพัฒนาระบบสืบพันธุ์ โดยแม่ปลาที่ได้รับไขมันจากน้ำมันถั่วเหลืองซึ่งเป็นแหล่งโอเมกา-6 จะให้ผลผลิตลูกปลาสูง แต่การเจริญเติบโตจะช้ากว่าแม่ปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันตับปลาซึ่งเป็นแหล่งของโอเมกา-3 (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดปราจีนบุรี, 2554)

ระบบย่อยอาหารของปลาโดยทั่วไปจะประกอบด้วยส่วนสำคัญได้แก่ ท่อทางเดินอาหาร (digestive tract) และอวัยวะช่วยย่อยอาหาร (accessory gland) ได้แก่ ตับ (liver) และตับอ่อน (pancreas) และถุงน้ำดี (gall bladder) การศึกษาระบบย่อยอาหารของปลาทำให้ทราบถึงพฤติกรรมการกินอาหาร ระยะเวลาที่อาหารหมดจากกระเพาะอาหาร และประสิทธิภาพการย่อย (วีรพงศ์, 2536) การศึกษาจุลกายวิภาคของบางอวัยวะในระบบย่อยอาหารของปลานิล (*O. niloticus*) โดย Morrison and Wright Jr (1999) มีรายละเอียดดังนี้

### 1. หลอดอาหาร (esophagus)

หลอดอาหารมีเนื้อเยื่อบุผิวที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นเหลี่ยม (squamous epithelium) และเซลล์สร้างเมือก (mucous goblet cell) จำนวนมาก โดยเซลล์สร้างเมือกขนาดเล็ก (small mucous goblet cell) มีรูปร่างเหมือนลูกแพร์ (pear-shaped) อยู่ใกล้กับพื้นผิวของเยื่อบุผิวชั้นนอก ส่วนเซลล์สร้างเมือกขนาดใหญ่ (large mucous goblet cell) จะยื่นไปยังฐานของเยื่อบุผิวชั้นนอก มีชั้นทูนิกา มัสคิวลาริส (tunica muscularis) ที่ประกอบด้วยกล้ามเนื้อลาย (striated muscle) 2 ชั้น โดยชั้นนอกเรียงตัวเป็นวงกลม (outer circular) และชั้นในเรียงตัวตามแนวยาว (inner longitudinal)

### 2. กระเพาะอาหาร (stomach)

กระเพาะอาหารของปลาชนิด แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ กระเพาะอาหารส่วนต้น (cardiac) ส่วนกลาง (fundus) และส่วนปลาย (pyloric) โดยทั่วไปกระเพาะอาหารประกอบด้วยต่อมสร้างน้ำย่อย (gastric gland) ยกเว้นด้านหน้า (anterior surface) ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อลายที่มีต่อมทิวบูลาร์ (tubular gland) ที่ประกอบไปด้วยเซลล์สร้างเมือกขนาดใหญ่กับเบซัลนิวเคลียส (basal nuclei) ต่อมทิวบูลาร์ของหลอดอาหารจะยื่นขยายตามแนวพื้นผิวด้านหน้าของกระเพาะไปยังท่อของกระเพาะอาหารส่วนปลาย (tubular pyloric portion) และลิ้นอิลิโอ-เรกตัล (ileo-rectal valve) สำหรับด้านล่าง (ventral) ของกระเพาะอาหาร ต่อมทิวบูลาร์จะค่อยๆ เปลี่ยนแปลงไปเป็นต่อมสร้างน้ำย่อย บริเวณต่อมนี้จะพบมีวคัซเนคเซลล์ (mucous neck cell) ซึ่งทำหน้าที่หลั่งเมือกออกมาเคลือบกระเพาะเพื่อป้องกันการถูกย่อยในชั้นมัสคิวลาริส กระเพาะอาหารส่วนปลายจะประกอบไปด้วยกล้ามเนื้อลายยื่นขยายเป็นระยะสั้นๆ และมีกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) ที่ชั้นในเรียงตัวเป็นวงกลมและชั้นนอกเรียงตัวตามยาว บริเวณกล้ามเนื้อหูรูดของกระเพาะอาหารส่วนปลาย (pyloric sphincter) มีการเปลี่ยนแปลงจากต่อมทิวบูลาร์ไปเป็นเยื่อบุผิวลำไส้ (intestinal epithelium) ซึ่งประกอบด้วยเยื่อบุผิวคอลัมน์นาร์ (columnar epithelium) และเซลล์สร้างเมือกขนาดเล็ก

### 3. ลำไส้ (intestine)

ลำไส้ของปลาชนิดแบ่งออกเป็นลำไส้ส่วนหน้า (anterior portion) และส่วนปลาย (posterior portion) (Scocco *et al.*, 1997; Gargiulo *et al.*, 1998) ซึ่งชั้นมิวโคซา (mucosa) ประกอบไปด้วยเยื่อบุคอลัมน์นาร์และเซลล์สร้างเมือกขนาดเล็ก ส่วนในชั้นมัสคิวลาริส (muscularis) มีเซลล์กล้ามเนื้อลายเป็นชั้นบางๆ อยู่อย่างต่อเนื่อง สำหรับบริเวณลิ้นอิลิโอ-

เรกตัล ประกอบไปด้วยชั้นของกล้ามเนื้อเรียบที่เรียงตัวเป็นวงกลม (circular layer of smooth muscle)

## 2.3 เอนไซม์ย่อยอาหาร

การเปลี่ยนแปลงหลังการตายของปลาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารประกอบและผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเมแทบอลิซึม และปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลา ซึ่งยังอาจมีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารที่ศึกษา ได้แก่ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ( $\alpha$ -amylase, E.C. 3.2.1.1) เปปซิน (pepsin, E.C. 3.4.23.1) ทริปซิน (trypsin, E.C. 3.4.21.4) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin, E.C. 3.4.21.1) และไลเปส (lipase, E.C. 3.1.1.3)

### 1. แอลฟา-อะไมเลส

แอลฟา-อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของการย่อยคาร์โบไฮเดรตเนื่องจากเป็นเอนโดอะไมเลส (endoamylase) ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลกลูโคสและมอลโทส โดยย่อยสายพอลิแซ็กคาไรด์ของคาร์โบไฮเดรตที่ตำแหน่ง  $\alpha$ -1,4 glycosidic bond (การุณ และอุทัยวรรณ, 2555; Areekijsee et al., 2006; Supannapong et al., 2008) แหล่งของแอลฟา-อะไมเลสในปลากินพืช และปลากินพืชและเนื้อส่วนใหญ่จะได้อาหารหลักของผนังลำไส้ กระเพาะอาหาร ตับ ตับอ่อน และไส้ติ่ง (วีรพงศ์, 2536; จันทกานต์, 2550) สำหรับในปลานิลพบเอนไซม์นี้ในลำไส้ (Tengjaroenkul et al., 2000) เนื่องจากปลานิลกินอาหารส่วนใหญ่ที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในปลานิลสูงอย่างมีนัยสำคัญ (Hlophe et al., 2014) เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่แตกต่างกัน เช่น ในหอยมุกน้ำจืด (*Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus*) ทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 7 (Areekijsee et al., 2004) ในปลา Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) แอลฟา-อะไมเลสมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 6.9 (Parra et al., 2007) ใน red porgy (*Pagrus pagrus*) และ Bogue (*Boops boops*) ทำงานได้ดีที่พีเอช 8 และ 9 ตามลำดับ (Fernández et al., 2001) สำหรับปลานิล (*O. niloticus* และ *O. aureus*) ในระยะวัยอ่อนพบว่าทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 6–7 (Sheng et al., 2006) เมื่อศึกษากิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลสในอวัยวะย่อยอาหารส่วนต่างๆ ได้แก่ กระเพาะอาหารเทียม (pseudostomach) ลำไส้ส่วนต้น (upper intestine) ลำไส้ส่วนปลาย (lower intestine) และตับของปลานิล (*O. niloticus*) ที่มีน้ำหนักต่างกัน คือ 5.7 35.8 และ 92.1 กรัม ตามลำดับ พบว่ามีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 6 7 และ 2 ตามลำดับ โดยปลานิลน้ำหนัก 92.1 กรัมมีกิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลสสูงสุด (Klahan et al., 2009)

## 2. เปปซิน

เปปซินเป็นอะซิดิกโปรติเอส (acidic protease) พบได้ทั่วไปในน้ำย่อยของสัตว์มีกระดูกสันหลังและกระเพาะอาหารของปลา ทำหน้าที่ย่อยสารอาหารประเภทโปรตีนให้มีขนาดเล็กลงก่อนส่งไปย่อยต่อที่ลำไส้เล็ก เอนไซม์เปปซินถูกสร้างขึ้นในรูปเปปซิโนเจนที่ไม่สามารถทำงานได้โดยผนังชั้นในสุดของกระเพาะอาหารหลังกรดไฮโดรคลอริกออกมา ทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรด เพื่อเปลี่ยนเปปซิโนเจนเป็นเอนไซม์เปปซิน ตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลข้างเป็นอะโรมาติก ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโทเฟน เอนไซม์เปปซินสามารถทำงานได้ดีในสภาพที่เป็นกรด (Simpson, 2000) ซึ่งปลาต่างชนิดกันอาจมีค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเปปซินที่ต่างกัน เช่น ในกระเพาะอาหารของปลา pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*) เปปซิน A และ B มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 3.0–3.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Klomklao *et al.*, 2007) กระเพาะอาหารของปลา Pacific bluefin tuna พบว่าเปปซินมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 2 (Parra *et al.*, 2007) เช่นเดียวกับอะซิดิกโปรติเอสในปลา discus (*Symphysodon aequifasciata*) (Chong *et al.*, 2002) ปลา Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) (Castillo-Yanez *et al.*, 2004) และปลา Asian bony tongue (*Scleropages formosus*) (Natalia *et al.*, 2004) ส่วนการศึกษาใน bolti fish (*Tilapia nilotica*) พบว่าอะซิดิกโปรติเอสมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 2.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Beltagy *et al.*, 2004) สำหรับการศึกษาในปลานิล (*O. niloticus* และ *O. aureus*) ระยะเวลาที่อ่อนอะซิดิกโปรติเอสในกระเพาะอาหารสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 1.6–3.3 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (Sheng *et al.*, 2006)

## 3. ทริปซิน

ทริปซินเป็นอัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการย่อยโปรตีน ทริปซินจากตับอ่อนจะถูกหลังไปยังลำไส้เล็กในรูปของทริปซิโนเจน ซึ่งเป็นรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ เอนไซม์เอนเทอโรโคเนสและเอนไซม์ทริปซินจะเปลี่ยนทริปซิโนเจนให้อยู่ในรูปของทริปซินที่สามารถทำงานได้ นอกจากนี้ยังกระตุ้นโปรเอนไซม์ (proenzyme) หรือไซโมเจน (zymogen) อื่นๆ ได้แก่ ไคโมทริปซิโนเจน (chymotrypsinogen) โปรคาร์บอกซีเปปติเดส (procarboxypeptidase) โปรอีลาสเตส (proelastase) ให้อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ คือ ไคโมทริปซิน คาร์บอกซีเปปติเดส (carboxypeptidase) และอีลาสเตส (elastase) ตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาของทริปซินมีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนอาร์จินีนและไลซีน (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2002; Supannapong *et al.*, 2008) กิจกรรมของทริปซินมีความแปรผันกับ

อุณหภูมิต่ำ (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006) อายุและเพศ (Thongprajukaew *et al.*, 2010a) เอนไซม์ทริปซินมีความสำคัญกับพัฒนาการของสัตว์น้ำในแต่ละวัย ในลำไส้ของปลาชนิดระยะวัยอ่อน (*O. niloticus* และ *O. aureus*) ทริปซินสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 9.5–10.5 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (Sheng *et al.*, 2006) ส่วนในปลาชนิดระยะตัวเต็มวัย (*O. niloticus* และ *O. aureus*) ทริปซินมีสถานะที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วงพีเอช 9 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Wang *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามในปลาชนิด (*O. niloticus*) พบว่าทริปซินสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 8–11 ที่อุณหภูมิ 55–60 องศาเซลเซียส (Unajak *et al.*, 2012)

#### 4. ไคโมทริปซิน

ไคโมทริปซินเป็นอัลคาไลน์โปรติเอสที่เกิดจากเอนไซม์ทริปซินกระตุ้นไคโมทริปซินเอนไซม์ให้อยู่ในรูปที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ ไคโมทริปซินทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 7–10 (การุณ และ อุทัยวรรณ, 2555; Chong *et al.*, 2002; Areekijsee *et al.*, 2004; Natalia *et al.*, 2004; Supannapong *et al.*, 2008; Thongprajukaew *et al.*, 2010a) บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคโมทริปซินมีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนไทโรซีน ทริปโทเฟน และฟีนิลอะลานีน โดยสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซิน คือ โทซิล-ฟีนิลอะลานีนคลอโรเมทิล คีโตน (tosyl-phenylalaninechloromethyl ketone) กิจกรรมของไคโมทริปซินมีผลต่อการเติบโตของสัตว์น้ำ โดยจะมีค่าสูงขึ้นเมื่อสัตว์น้ำเติบโตช้า ซึ่งเป็นการแสดงออกที่ตรงกันข้ามกับเอนไซม์ทริปซิน (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006) ในปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) กิจกรรมของไคโมทริปซินมีค่าสูงขึ้นเมื่อการเจริญเติบโตถูกจำกัดโดยการให้ปลาอดอาหาร (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006) ไคโมทริปซินในปลาชนิดต่างๆ สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 8–12.5 และอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส (Chong *et al.*, 2002; Castillo-Yanez *et al.*, 2006; Parra *et al.*, 2007; Espósito *et al.*, 2009) โดยพบว่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินในปลาชนิด (*O. niloticus*) คือ 9–10 และ 60 องศาเซลเซียส (Bezerra *et al.*, 2005)

#### 5. ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ย่อยไขมันที่เกิดจากการหลั่งของผนังลำไส้และตับอ่อน ไลเปสมีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับกลีเซอรอลให้เป็นโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมัน และกลีเซอรอล เอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางถึงเบส (การุณ และ อุทัยวรรณ, 2555) โดยจะทำงานร่วมกับน้ำดี ทำหน้าที่ร่วมกันย่อยไขมันให้เป็นโมเลกุลเล็ก กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในปลา

กินเนื้อที่มีค่าสูงกว่าปลากินพืชและสัตว์ และปลากินพืช ตามลำดับ (Thongprajukaew *et al.*, 2010b) ใน yellowtail kingfish ซึ่งเป็นปลากินเนื้อ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสก่อนข้างสูงตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นของตัวอ่อน (larva) (Chen *et al.*, 2006) การศึกษาในปลา Pacific bluefin tuna พบว่าไลเปสสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 7.4 (Parra *et al.*, 2007) สำหรับปลานิล (*O. niloticus* และ *O. aureus*) เอนไซม์ไลเปสในลำไส้สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 6–9 ในช่วงอุณหภูมิ 25–35 องศาเซลเซียส (Sheng *et al.*, 2006) เมื่อศึกษากิจกรรมของไลเปสในอวัยวะย่อยอาหารส่วนต่างๆ ได้แก่ กระเพาะอาหารเทียม ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลาย และตับของปลานิล (*O. niloticus*) ที่มีน้ำหนักต่างกัน คือ 5.7 35.8 และ 92.1 กรัม พบว่าไลเปสมีสภาพที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 8.7 และ 8 ตามลำดับ โดยปลานิลน้ำหนัก 35.8 กรัม มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด (Klahan *et al.*, 2009)

## 2.4 การเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารหลังการตาย

หลังการตายของสัตว์ เซลล์และเนื้อเยื่อจะเกิดกระบวนการย่อยสลายตัวเองจากการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในเซลล์ และจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ กระบวนการย่อยสลายตัวเองในระบบย่อยอาหารทำให้ผนังกระเพาะอาหารยุบ บาง หรือทะลุเป็นรู และผนังลำไส้มีการลอกหลุดของเยื่อเมือก ทำให้น้ำย่อยจากตับอ่อนออกมาย่อยไขมันบริเวณด้านนอกและในช่องท้อง เมื่อกระเพาะอาหารและลำไส้เน่าจะเกิดการสะสมของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในปริมาณมาก ส่งผลให้เกิดแรงกดที่อวัยวะภายในช่องท้อง ทำให้กระเพาะอาหารแตก (Laczniak *et al.*, 2011)

การเกิดแกสโตรมาลาเซีย (gastromalacia) เป็นการเปลี่ยนแปลงหลังการตายที่สำคัญในกระเพาะอาหาร ทำให้ผนังกระเพาะอ่อนตัวและบางลงอย่างมีนัยสำคัญ จากการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ภายใน (O'Donnell *et al.*, 2010; Laczniak *et al.*, 2011; Usui *et al.*, 2013) กระบวนการนี้ส่งผลโดยตรงต่อดัชนีของอวัยวะย่อยอาหาร ซึ่งจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในเนื้อเยื่อที่มีเอนไซม์และมีปริมาณน้ำสูง (Vass, 2001) อย่างไรก็ตาม Li *et al.* (2003) รายงานว่าดัชนีของตับต่อน้ำหนักตัว (hepatosomatic index: HSI) ของหนูสปราก-ดอร์ลี่ (Sprague-Dawley) มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาภายหลังการตาย (0 ถึง 25 นาที) ในขณะที่การประมาณช่วงเวลาหลังการตายในสุนัขปีเกิลของ Erlandsson and Munro (2007) พบว่าลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อลำไส้มีการเสื่อมสภาพลงเมื่อเวลาผ่านไป การเปลี่ยนแปลงหลังการตายนอกจากจะมีสาเหตุมาจากเอนไซม์หรือจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในแล้ว อาจเกิดจากการขาดออกซิเจน การเพิ่มขึ้นของคาร์บอนไดออกไซด์ และการสะสมของของเสีย (Benzie and Strain, 1996; Vass, 2001) ปัจจุบันเหล่านี้จะมีผลต่อโปรตีนในกระเพาะอาหารและลำไส้



สำหรับการศึกษาเอนไซม์ย่อยอาหารหลังการตาย Murn *et al.* (2004) รายงานว่าเอนไซม์ ไคโมทริปซินทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการตัด internucleosomal DNA ของเซลล์ WEHI 231 ที่ตายแล้ว (apoptotic cell)

หลังการตายอาจเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่โมเลกุลหรืออะตอมสูญเสียอิเล็กตรอนจากวงโคจรให้กับโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน รวมทั้งการเสียไฮโดรเจนอะตอมออกจากโมเลกุล โดยสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (reducing agent) และสารที่ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอน (oxidizing agent) ปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารอื่นๆ เป็นลูกโซ่ต่อไป โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิด (lipid oxidation) ระหว่างออกซิเจนกับไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ที่มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ทำให้เกิดสารที่ให้กลิ่นที่ผิดปกติไปจากเดิม (ไมตรี และคณะ, 2555)

ในสิ่งมีชีวิตมีสารต้านออกซิเดชัน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase) กลูตาไธโอน เปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) คอะเลส (catalase) เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ไซโตโครมซี เปอร์ออกซิเดส (cytochrome C peroxidase) ทองแดง (copper) และสังกะสี (zinc) และกลุ่มที่ทำลายปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ ได้แก่ วิตามินอี (vitamin E) เบตา-แคโรทีน ( $\beta$ -carotene) วิตามินซี (vitamin C) กรดยูริก (uric acid) โปรตีนอัลบูมิน (albumin) สำหรับในเซลล์ที่ตายแล้วจะมีการผลิตเปอร์ออกไซด์และอนุมูลอิสระมาทำลายส่วนประกอบต่างๆ รวมทั้งจะมีสารที่เกิดจากการย่อยของเอนไซม์ปล่อยออกมา เช่น เพปไทด์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ (Lassoued *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตาม เพปไทด์ที่ถูกปล่อยอาจไม่เพียงพอเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตอนุมูลอิสระที่มากเกินไป นอกจากนี้การย่อยสลายที่นานขึ้นทำให้ได้เพปไทด์สายสั้นที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระลดน้อยลง (Lassoued *et al.*, 2015)

หลังการตายของเซลล์ (cell death) จะเกิดอะพอพโทติกบอดี (apoptotic body) เพื่อให้เซลล์แมคโคเฟจ (macrophage) สามารถกำจัดเซลล์ดังกล่าวออกไปอย่างรวดเร็ว (Katz, 2008) การศึกษาอะพอพโทติกบอดีในกระเพาะอาหารและลำไส้ของหนูและมนุษย์ โดย Hall *et al.* (1994) แสดงให้เห็นว่าอะพอพโทติกบอดีไม่ได้มีการกระจายแบบสุ่ม แต่พบมากในเยื่อบุผิวและใน immediate sub-epithelial connective tissue โดยในกระเพาะอาหารพบมากที่สุดบริเวณต่อมสร้างน้ำย่อยและผิวหนังนอกของผนังชั้นในสุด (superficial gastric mucosa) ซึ่งบางครั้งพบในบริเวณ lamina propria ด้วย ส่วนในลำไส้เล็กพบอะพอพโทติกบอดีอยู่ตรงบริเวณปลายของวิลไล (villi) และบริเวณฐานของคริปต์ (crypt) ขณะที่การศึกษาการเปลี่ยนแปลง

หลังการตายในสุนัขปีเกิ้ลของ Erlandsson and Munro (2007) พบว่าการเปลี่ยนแปลงภายในลำไส้จะสังเกตเห็นชัดมากขึ้นเมื่อเวลาหลังการตายนานขึ้น โดยที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการตาย อุ้งน้ำดีมีสีผสมระหว่างสีเขียว น้ำตาล และเหลือง (green-brown-yellow mixture) จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแดง (yellow-red) ในเวลา 2-3 วัน และเปลี่ยนเป็นสีแดงน้ำตาล (red-brown) ในเวลา 7 วัน จนถึง 3 สัปดาห์ สำหรับการศึกษากายวิภาคเนื้อเยื่อ ได้แก่ ต่อม น้ำเหลือง ไต ต่อมหมวกไต รังไข่ อัณฑะ ลำไส้ ต่อมไทรอยด์ และผิวหนังพบว่าลักษณะทางกายวิภาคของเนื้อเยื่อดังกล่าวมีรูปแบบที่ไม่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงหลังการตาย อย่างไรก็ตาม เนื้อเยื่อดังกล่าวมีการเสื่อมสภาพลงเมื่อเวลาผ่านไปหลังการตาย สำหรับการประมาณช่วงเวลาหลังการตายของศพซึ่งถูกฝังในดิน โดยใช้ซากหมู (*Sus scrofa domestica*) เป็นต้นแบบ พบว่าระยะเวลา 7 วันหลังจากฝัง บริเวณส่วนท้องของซากหมูพองขึ้นเล็กน้อย ในช่วงเวลา 13 วันหลังจากฝัง บริเวณส่วนท้องยังคงพองขึ้นเล็กน้อย แต่พบลำไส้ทะลักออกมา หลังจากฝังเป็นเวลา 20 วัน พบว่าบริเวณส่วนท้องฉีกขาดมากขึ้น สอดคล้องกับผิวหนังที่บางลง ในวันที่ 27 หลังจากฝังพบคราบเหมือนน้ำมันเคลือบสีขาว (greasy whitish coating) ตรงบริเวณส่วนท้อง ซึ่งอาจเป็นตัวบ่งชี้ให้เห็นว่าเริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ทำให้เนื้อเยื่อสลายตัวแต่มีลักษณะเหมือนขี้ผึ้งและไขมัน (adipocere) หลังจากฝังเป็นเวลา 34 วัน เกิด adipocere บริเวณส่วนท้อง และ 40 วันหลังจากฝัง ซากหมูถูกปกคลุมด้วย adipocere รวมทั้งน้ำหนักตัวลดลงไป 38.6 เปอร์เซ็นต์ (Niederegger *et al.*, 2015)

## 2.5 กล้ามเนื้อปลา

กล้ามเนื้อปลาส่วนใหญ่ประกอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อ (muscle fiber) โดยภายในมีเส้นใยย่อย (myofibril) ที่ประกอบไปด้วยเส้นใยฝอย (myofilament) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (myocommata) ซึ่งมีคอลลาเจน (collagen) เป็นส่วนประกอบหลัก (Chéret *et al.*, 2007) กล้ามเนื้อของปลามี 3 ชนิด คือ กล้ามเนื้อเรียบ กล้ามเนื้อลาย และกล้ามเนื้อหัวใจ (cardiac muscle) หลังการตายของปลา กล้ามเนื้อจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์คาเทปซินที่อยู่ในกล้ามเนื้อลายจะย่อยสลายโปรตีนทำให้กล้ามเนื้ออ่อนตัวลง

กล้ามเนื้อลายเป็นกล้ามเนื้อข้งลำตัวของปลา ช่วยในการเคลื่อนไหว อยู่ภายในอำนาจจิตใจ (voluntary muscle) ภายในเส้นใยฝอยของเส้นใยกล้ามเนื้อแต่ละเส้นจะมีซาร์โคเมียร์ (sarcomere) ที่ประกอบไปด้วยไมโอซิน (myosin) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเส้นใยชนิดหนา (thick filament) และแอกติน (actin) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเส้นใยชนิดบาง (thin filament) ซ้อนสลับกันไปมา จึงทำให้เกิดเป็นแถบที่สลับกับแถบโปร่งไปตลอดความยาวของเส้นใยย่อย

ดังนั้นเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จึงมองเห็นกล้ามเนื้อที่มีลักษณะเป็นลาย โดยกล้ามเนื้อลายของปลาสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ กล้ามเนื้อแดง (red muscle) และกล้ามเนื้อขาว (white muscle)

### 1. กล้ามเนื้อแดง

กล้ามเนื้อแดงทำหน้าที่รักษาความต่อเนื่องในการว่ายน้ำของปลา อยู่ระหว่างกล้ามเนื้อด้านบน (epaxial muscle mass) และกล้ามเนื้อด้านล่าง (hypaxial muscle mass) ของกล้ามเนื้อข้างลำตัว เป็นกล้ามเนื้อที่มีหลอดเลือดฝอย (capillary) จำนวนมาก ภายในเซลล์ประกอบด้วยไมโทคอนเดรีย และไมโอโกลบิน (myoglobin) จึงทำให้กล้ามเนื้อมีสีแดง กล้ามเนื้อแดงมีกระบวนการเมแทบอลิซึมแบบใช้ออกซิเจน (aerobic metabolism) ซึ่งสามารถขนส่งออกซิเจนได้มากและพบว่าซาร์โคเมียร์ของกล้ามเนื้อแดงมีขนาดเล็กและบางกว่ากล้ามเนื้อขาวถึง 3 เท่า

### 2. กล้ามเนื้อขาว

กล้ามเนื้อขาวทำงานแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic) โดยใช้พลังงานจากกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) มีไมโทคอนเดรียและไมโอโกลบินน้อยกว่ากล้ามเนื้อแดง ทำให้กล้ามเนื้อมีสีค่อนข้างซีดจาง ซาร์โคเมียร์มีขนาดใหญ่และหนากว่ากล้ามเนื้อแดง มีแคลเซียมไอออนช่วยในการหดตัวของกล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อขาวในปลามีหน้าที่ใช้ในการจู่โจมเหยื่อและว่ายน้ำทวนกระแสน้ำ กล้ามเนื้อขาวของปลาทุกชนิดมีพื้นที่มากกว่ากล้ามเนื้อแดงเมื่อเทียบกับพื้นที่ทั้งหมดของตัวปลา การศึกษาในปลากระแห (*Puntius schwanefeldi*) ปลาสร้อย (*Labiobarbus spiropleura*) ปลากระมัง (*Puntius proctozysron*) ปลาหมอช้างเหยียบ (*Pristolepis fasciatus*) ปลาตะเพียน (*Puntus gonionotus*) ปลากระดี่ (*Trichogaster trichopterus*) และปลาช่อน (*Channa striata*) พบว่ามีพื้นที่ของกล้ามเนื้อขาวเป็น 7 เท่า ของพื้นที่กล้ามเนื้อแดง ทั้งนี้เนื่องจากปลาเหล่านี้ มีพฤติกรรมการเคลื่อนที่ค่อนข้างเร็ว และจะกระโดดเมื่อตกใจ (สงศรี และ รุ่งกานต์, 2546)

เมื่อปลาทายจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อ 3 ระยะ ได้แก่ ระยะก่อนการเกร็งตัว ซึ่งเริ่มตั้งแต่ปลาทาย โดยการขนส่งออกซิเจนจะหยุดชะงัก เนื้อเยื่อจะขาดออกซิเจน ทำให้มีการสร้าง ATP จากกลูโคสแบบไม่ใช้ออกซิเจน เป็นผลให้พีเอชของเนื้อเยื่อลดต่ำลง เนื่องจากมีการผลิตกรดเกิดขึ้น ระยะการเกร็งตัว เป็นระยะที่มีการเกร็งของกล้ามเนื้อเนื่องจากโปรตีนไมโอซินและแอกตินที่อยู่ใเส้นใยย่อย เกิดการรวมตัวกันได้เป็นแอกโตไมโอซิน (actomyosin) ซึ่งต้องอาศัยพลังงานจาก ATP ถึงแม้ว่าพลังงานดังกล่าวในเนื้อเยื่อของปลาจะเริ่มลดต่ำลง ทำให้เกิด

การรวมตัวของอวตารของอโตไมโอซิส (automyosis) ส่งผลให้กล้ามเนื้อเริ่มเกิดการเกร็งแข็ง และระยะหลังการเกร็งตัว กล้ามเนื้อจะค่อยๆ อ่อนตัวลง เนื่องจากเกิดการย่อยสลายของ เอนไซม์ภายในกล้ามเนื้อ นอกจากนั้นอาจเกิดจากการย่อยสลายของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน ในเนื้อเยื่อ ในกล้ามเนื้อของปลา sea bream (*Sparus aurata*) ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลา 14 วัน พบว่าในวันที่ 10 ยังสามารถตรวจพบโปรตีนในเส้นใยย่อย ของกล้ามเนื้อ ได้แก่ แอกตินและเดซมิน (desmin) ในขณะที่โปรตีนดิซโทรฟิน (dystrophin) สามารถตรวจพบได้ในช่วง 4 วันแรกหลังการตายเท่านั้น (Caballero *et al.*, 2009) สำหรับ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในกล้ามเนื้อของปลาเทราท์สีน้ำตาล (*Salmo trutta*) ปลา turbot (*Psetta maxima*) และปลาซาร์ดีน (*Sardina pilchardus*) ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0–4 องศาเซลเซียส พบว่ากล้ามเนื้อปลาเทราท์ยังไม่มีอาการย่อยสลายโปรตีนเดซมินในช่วง 4 วันแรก หลังการตาย ในขณะที่พบอัตราการย่อยสลายของเดซมิน 10–20 เปอร์เซ็นต์ในปลา turbot ส่วน ในกล้ามเนื้อของปลาซาร์ดีนพบว่าการย่อยสลายจะเกิดขึ้นภายใน 24 ชั่วโมงหลังการตาย (Verrez-Bagnis *et al.*, 1999) ส่วนการศึกษาคุณสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและ แอกตินในกล้ามเนื้อแดงของปลานิล (*O. niloticus*) โดยตุลาคุณ และคณะ (2558) ผลการศึกษา ไม่พบโปรตีนทั้ง 2 ชนิดที่อยู่ในสภาพเดิม (native protein) ในเวลา 48 ชั่วโมงหลังการตาย แสดงให้เห็นว่าโปรตีนไมโอซินและแอกตินสลายตัวหมดแล้วหรือโปรตีนดังกล่าวอาจจะอยู่ในรูป ที่เสียดสภาพธรรมชาติ

เอนไซม์ในกล้ามเนื้อปลาประกอบด้วยเอนไซม์ในไมโอไฟบริล เช่น เอนไซม์คาเทปซินบี (cathepsin B, E.C. 3.4.22.1) ดี (cathepsin D, E.C. 3.4.22.5) เอช (cathepsin H, E.C. 3.4.22.16) และแอล (cathepsin L, E.C. 3.4.22.15) และเอนไซม์ที่พบในส่วนของซาร์โคพลาสติก เช่น เอนไซม์คาลเพน (calpain, E.C. 3.4.22.17) ทริปซิน และโคโมทริปซิน (Shahidi and Kamil, 2001) โดยทริปซินและโคโมทริปซินในปลา มีค่าพีเอชเหมาะสมต่อการทำงานในช่วงที่เป็นด่าง (Cao *et al.*, 2005; Sheng *et al.*, 2006) การศึกษาคูณลักษณะของทริปซินในกล้ามเนื้อของ ปลาจวดขาว (*Argyrosomus argentatus*) พบว่ามีความจำเพาะต่อหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโน อาร์จินีนและไลซีนเช่นเดียวกับทริปซินที่พบในระบบย่อยอาหาร (Cao *et al.*, 2005) ส่วน คาลเพนจัดเป็นนิวทรัลโปรตีเอส (neutral protease) ซึ่งมีกิจกรรมสูงที่พีเอชเป็นกลาง เอนไซม์ คาลเพนถูกปล่อยออกจากเส้นใยกล้ามเนื้อโดยการย่อยส่วนของ Z disk การทำบริสุทธิ์คาลเพน ชนิดที่ 1 (type-I) และชนิดที่ 2 (type-II) ในกล้ามเนื้อปลาแอนโชวี (*Engraulis japonica*) พบว่า คาลเพนทั้ง 2 ชนิดสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียสที่พีเอช 6.8 และ 7.0–7.5 ตามลำดับ (Ishida *et al.*, 1995)

กล้ามเนื้อขาวของปลาจะทำงานแบบไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งได้พลังงานจากการสลายไกลโคเจนให้กลายเป็นกรดแลคติก แต่ออกซิเจนจากการหายใจจะสลายกรดแลคติกทำให้ค่าพีเอชของกล้ามเนื้อไม่เป็นกรด สำหรับสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้วร่างกายจะขาดออกซิเจนส่งผลให้กล้ามเนื้อมีกรดแลคติกเพิ่มขึ้น ซึ่งสมภาวะดังกล่าวเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คาเทปซินในกล้ามเนื้อ โดยคาเทปซินทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อเป็นผลให้กล้ามเนื้ออ่อนตัวลง หลังการตาย (Jiang, 2000) การศึกษาของ Chéret *et al.* (2007) พบว่าเอนไซม์คาเทปซินแอลในปลากะพงขาวและเนื้อวัวมีกิจกรรมสูงกว่าคาลเพน 9 เท่า และ 2 เท่า ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์คาเทปซินมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานในสภาวะที่เป็นกรด

หลังการตายของสิ่งมีชีวิต ไลโซโซมจะปล่อยเอนไซม์คาเทปซินซึ่งเป็นซิสเตอีนโปรติเอส (cysteine proteases) ไปยังไซโทพลาสซึมและช่องว่างระหว่างเซลล์ มีผลทำให้ค่าพีเอชของกล้ามเนื้อลดลง และทำให้ค่าความแรงไอออน (ionic strength) ในกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น (Yates *et al.*, 1983; Verrez-Bagnis *et al.*, 2002) เอนไซม์คาเทปซินทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายกล้ามเนื้อหลังการตายของสัตว์ โดยทำให้กล้ามเนื้ออ่อนตัวลง เอนไซม์ชนิดหลักที่พบในกล้ามเนื้อ ได้แก่ คาเทปซินบี คาเทปซินดี คาเทปซินเอช และคาเทปซินแอล อย่างไรก็ตาม การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าคาเทปซินดี มีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อน้อยกว่าคาเทปซินอีก 3 ชนิด เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวสามารถย่อยสลายไมโอไฟบริลได้ดีในช่วงพีเอชประมาณ 5 (Makinodan *et al.*, 1982; Jiang, 2000)

## 1. คาเทปซินบี

เอนไซม์คาเทปซินบีทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างโปรตีนหลักของกล้ามเนื้อ ได้แก่ คอนเนคติน (connectin) เนบูลิน (nebulin) และไมโอซิน (Yamashita and Konagaya, 1991) น้ำหนักโมเลกุลของคาเทปซินบี ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา สำหรับในกล้ามเนื้อลายของปลานิล พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 23.5 กิโลดาลตัน (Sherekar *et al.*, 1988) โดยเอนไซม์คาเทปซินทั้งหมดถูกสังเคราะห์ขึ้นในรูปของ pre-proenzyme ซึ่งยังไม่สามารถทำงานได้ (inactive enzyme) หลังจากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการตัดแปลงจนเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ (active enzyme) (Egberts *et al.*, 2004) เอนไซม์คาเทปซินบีสามารถจับกับสารตั้งต้นได้หลายชนิดและจะย่อยสลาย Z-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Z-Arg-Arg-MCA) และ Z-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Z-Phe-Arg-MCA) การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเอนไซม์คาเทปซินบีในกล้ามเนื้อของปลามีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 5.5–6.5 และอุณหภูมิ 35–55 องศาเซลเซียส โดยสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดของปลา (Aranishi *et al.*, 1997; Jiang, 2000; Aoki *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Chéret *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008;

Ahmed *et al.*, 2015) การศึกษาของ Delbarre-Ladrat *et al.* (2006) พบว่าไลโซไซม์ของปลา มีคาเทปซินบี เอช และแอลเป็นหลักและมีกิจกรรมสูง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Aoki *et al.* (2000) ที่พบว่าในกล้ามเนื้อขาวของปลากลุ่ม red fresh คาเทปซินบี และแอลมีกิจกรรมสูง ส่วนการศึกษาในปลากะพงขาว พบว่าคาเทปซินบีในกล้ามเนื้อขาวมีค่าสูงเป็น 29.7 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับในเนื้ออ้ว นอกจากนี้คาเทปซินบีจะเป็นเอนโดเปปติเดส (endopeptidase) แล้ว ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางพยาธิวิทยา เช่น การเกิดมะเร็ง การตายของเซลล์ การอักเสบการติดเชื้อ และโรคอื่นๆ ด้วย (Gocheva *et al.*, 2006)

## 2. คาเทปซินเอช

เอนไซม์คาเทปซินเอชพบครั้งแรกในตับของหนูซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 28 กิโลดาลตัน (Kirschke *et al.*, 1977) สารตั้งต้นของเอนไซม์ชนิดนี้ คือ L-Arginine-4-methylcoumaryl-7-amide (Arg-MCA) เอนไซม์คาเทปซินเอชทำหน้าที่สลายพันธะเอไมด์ของสารตั้งต้นที่มีกลุ่มอะมิโนอิสระ เช่น อาร์จินีน เนปทิลเอไมด์ (naphthylamide) นอกจากนี้ยังสามารถสลายสารที่คล้ายกับสารตั้งต้นที่มีกลุ่มอะมิโน (blocked  $\alpha$ -amino group) เช่น benzoyl-arginine naphthylamide (BANA) (Takahashi *et al.*, 1988) เอนไซม์คาเทปซินเอช ในปลา มีกิจกรรมที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอชประมาณ 6.0–6.8 (Kirschke *et al.*, 1977; Aranishi *et al.*, 1997) การศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมของคาเทปซินเอช ในปลา 4 ชนิด ได้แก่ Pacific whiting (*Merluccius productus*), arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*), Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) และ Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) พบว่าคาเทปซินเอช ในปลา Alaska pollock มีกิจกรรมสูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ ปลา arrowtooth flounder ปลา Pacific cod และปลา Pacific whiting ตามลำดับ (Porter *et al.*, 1995) สำหรับการศึกษาในกล้ามเนื้อขาวของปลากะพงขาว และกล้ามเนื้อต้นขาด้านหลัง (biceps femoris muscle) ของวันม พบว่ากิจกรรมของคาเทปซินเอช ในกล้ามเนื้อของสัตว์ทั้ง 2 ชนิด มีกิจกรรมที่ต่ำกว่าคาเทปซินบี และแอล (Chéret *et al.*, 2007) คล้ายกับการศึกษาในกล้ามเนื้ออ้วที่ตอนแล้ว ที่กิจกรรมของเอนไซม์คาเทปซินเอช มีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับคาเทปซินบี (Wu *et al.*, 1985) อย่างไรก็ตาม คาเทปซินเอช มีความสามารถย่อยสลายไมโอซินได้เร็วกว่าคาเทปซินบี (Aranishi *et al.*, 1997) นอกจากนี้คาเทปซินเอช จะมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนแล้วยังเกี่ยวข้องกับการรักษาโรคและการพัฒนาของปอด (Che *et al.*, 2014)

### 3. คาเทปซินแอล

เอนไซม์คาเทปซินแอลทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างโปรตีนหลักของกล้ามเนื้อ ได้แก่ โปรตีนคอนเนคทีน เนบูลิน ไมโอซิน คอลลาเจน แอลฟา-แอคทีนิน ( $\alpha$ -actinin) และโทรโปนิน T (troponin T) และโทรโปนิน I (troponin I) (Yamashita and Konagaya, 1991; Ho *et al.*, 2000) โดยคาเทปซินแอลของปลามีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 23–30 กิโลดาลตัน (Visessanguan *et al.*, 2003) เอนไซม์คาเทปซินแอลในปลามีคุณสมบัติคล้ายกับที่แยกได้จาก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและไก่ และสามารถใช้ Z-Phe-Arg-MCA เป็นสารตั้งต้น การศึกษาใน ปลาแซลมอนพบว่าคาเทปซินแอลเป็นโปรติเอสที่ย่อยสลายโปรตีนของกล้ามเนื้อได้มากที่สุด (Hu *et al.*, 2008) เช่นเดียวกับการศึกษาในกล้ามเนื้อของปลาลิ้น (*Hypophthalmichthys molitrix*) ที่พบว่าคาเทปซินแอลมีกิจกรรมที่สูงกว่าคาเทปซินบี (Liu *et al.*, 2008) และพบว่าใน กล้ามเนื้อขาวของปลากะพงขาวมีกิจกรรมของคาเทปซินแอลสูงเป็น 3.9 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับคาเทปซินแอลในกล้ามเนื้อวัณม (Chéret *et al.*, 2007) โดยสามารถย่อยโปรตีนเส้นใยย่อย จากกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein) ได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 21 ชั่วโมง (Ladrat *et al.*, 2003) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเอนไซม์คาเทปซินแอลในกล้ามเนื้อปลามีพีเอชที่เหมาะสมต่อ การทำงานอยู่ในช่วง 5–7 และอุณหภูมิ 45–60 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา (Kim *et al.*, 2003; Visessanguan *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2004; Siringan *et al.*, 2006; Chéret *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2010)

### 3. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารและเอนไซม์ในกล้ามเนื้อหลังการตาย ของปลานิล (*O. niloticus*) ในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกัน

## บทที่ 2

### วิธีการทดลอง

#### 1. การเตรียมตัวอย่างปลาไหล

ปรับสภาพปลาไหลแปลงเพศ (*O. niloticus*) อายุ 4 เดือน เป็นเวลา 15 วัน โดยให้อาหารที่มีโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้งต่อวัน และให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน น้ำในบ่อเลี้ยงมีอุณหภูมิ  $29.60 \pm 0.15$  องศาเซลเซียส พีเอช  $6.95 \pm 0.02$  ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ  $5.05 \pm 0.01$  มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณแอมโมเนีย  $0.94 \pm 0.15$  มิลลิกรัมต่อลิตร

#### 2. การเก็บตัวอย่างปลาไหล

อดอาหารปลาไหลแปลงเพศเป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนการเก็บตัวอย่าง เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมเนื่องจากอาหารที่กิน สุ่มปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกัน (น้ำหนัก  $105.83 \pm 1.66$  กรัม และความยาวตลอดลำตัว  $18.55 \pm 0.14$  เซนติเมตร) สลับปลาโดยใช้ น้ำแข็ง และนำมาลอยในภาชนะทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า ( $32 \times 43 \times 11$  เซนติเมตร) ระดับน้ำสูง 7 เซนติเมตร ที่ความหนาแน่น 14 ตัวต่อภาชนะ โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นสุ่มปลา ( $n = 4$ ) ที่เวลา 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ฆ่าตัดเก็บตัวอย่างกระเพาะอาหาร และลำไส้ เพื่อใช้ศึกษาระบบย่อยอาหาร ได้แก่ ดัชนีน้ำหนัก ความเข้มข้นของโปรตีน กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร การต้านปฏิบัติการออกซิเดชัน และการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาค และเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อขาวเพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ในกล้ามเนื้อ ได้แก่ เอนไซม์คาเทปซินบี เอช และแอล

#### 3. การศึกษาดัชนีน้ำหนักของอวัยวะย่อยอาหาร

หลังจากเก็บตัวอย่างอวัยวะย่อยอาหารทั้ง 8 ช่วงเวลาหลังการตาย นำอวัยวะดังกล่าว มาศึกษาดัชนีน้ำหนัก โดยชั่งน้ำหนักตัวปลา น้ำหนักของกระเพาะอาหาร และลำไส้ (กรัม) และคำนวณดัชนีของกระเพาะอาหารต่อน้ำหนักตัว (stomasomatic index: SSI) และดัชนีของลำไส้ต่อน้ำหนักตัว (intestinosomatic index: ISI) จาก (น้ำหนักกระเพาะอาหาร/น้ำหนักตัว)  $\times 100$  และ (น้ำหนักลำไส้/น้ำหนักตัว)  $\times 100$  ตามลำดับ (Thongprajukaew *et al.*, 2015)



#### 4. การสกัดสารสกัดจากกระเพาะอาหารและลำไส้

ผ่าตัดและเก็บตัวอย่างกระเพาะอาหารและลำไส้ของปลาบ่น้ำแข็ง จากนั้นสกัดสารตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Rungruangsak and Utne (1981) โดยบดกระเพาะอาหารและลำไส้ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 10 และ 1 มิลลิโมลาร์ (1 : 3 น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ โดยใช้เครื่องปั่นละเอียดเนื้อเยื่อ (รุ่น THP-220; Omni International, Kennesaw GA, USA) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่  $15,000 \times g$  ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนที่เป็นไขมันออก และดูดสารละลายส่วนใสเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส เพื่อใช้วิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีน การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารต่อไป

#### 5. การศึกษาความเข้มข้นของโปรตีนในสารสกัดจากกระเพาะอาหารและลำไส้

เตรียมสารละลาย A โดยผสมคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัมกับไตรโซเดียมซิเตรท 1 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ส่วนสารละลาย B เตรียมโดยผสมโซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัมกับ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร และสารละลาย C เตรียมโดยผสมสารละลาย A กับ B ในอัตราส่วน 1 ต่อ 50 สำหรับสารละลาย D เตรียมโดยผสม Folin Ciocalteu reagent กับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 2

วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนในสารสกัดตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) โดยเติมสารสกัดปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย C ปริมาตร 750 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลาย D ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ในที่มีदनาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA)

## 6. การศึกษากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหาร

ศึกษากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหาร ได้แก่ เอนไซม์เปปซิน ทริปซิน ไคโมทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ดังนี้

### 6.1 กิจกรรมของเอนไซม์เปปซิน

ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เปปซินจากกระเพาะอาหารตามวิธีการของ Rungruangsak and Utne (1981) โดยเติมเคซีนความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง หลังจากนั้นบีเบตต์บัฟเฟอร์ พีเอช 2 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเอนไซม์สกัดปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่  $5,000 \times g$  ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที ตูดส่วนใสของตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติม Folin Ciocalteu reagent (เจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 720 นาโนเมตร และหาค่าผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ *L*-tyrosine ยูนิท (unit) ของเปปซินคำนวณจากปริมาณของ *L*-tyrosine ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้พีเอช 2 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

### 6.2 กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน

ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินในลำไส้ตามวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2006) กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินทดสอบโดยผสมบัฟเฟอร์ พีเอช 9 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 700 ไมโครลิตรที่มี benzoyl-*L*-Arg-*p*-nitroanilide (BAPNA) ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ และเอนไซม์สกัด 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมกรดอะซิติก ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินใช้วิธีการทดสอบเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้นที่กล่าวมา แต่เปลี่ยนเป็นใช้บัฟเฟอร์ พีเอช 9 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ที่มี *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (SAPNA) ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ รวมทั้งอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเป็น 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร และหาค่าผลิตภัณฑ์ที่

เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ *p*-nitroanilide ยูนิตของทริปซินและโคโม-ทริปซิน คำนวณจากปริมาณของ *p*-nitroanilide ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้พีเอช 9 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 9 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

### 6.3 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสตามวิธีการของ Areekijsee et al. (2004) โดยผสมน้ำแข็งความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตรกับบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 62.5 ไมโครลิตร และโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 20 มิลลิ-โมลาร์ ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร แล้วเติมเอนไซม์สกัดปริมาตร 125 ไมโครลิตร จากนั้นปมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดไตโนไตรซาลิไซคลิก ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และหาค่าผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโทส ยูนิตของอะไมเลสคำนวณจากปริมาณของน้ำตาลมอลโทสที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้พีเอช 7 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

### 6.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Winkler and Stuckmann (1979) โดยผสม *p*-nitrophenyl palmitate ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กับบัฟเฟอร์พีเอช 8 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และเอนไซม์สกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นปมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเติมโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่  $13,000 \times g$  ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใส เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบกับค่าผลิตภัณฑ์ที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ *p*-nitrophenol ยูนิตของไลเปสคำนวณจากปริมาณของ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้พีเอช 8 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

## 7. การศึกษาการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของระบบย่อยอาหาร

ศึกษาการต้านออกซิเดชันของระบบย่อยอาหาร ได้แก่ การกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) assay และความสามารถของการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนโดยวิธี reducing power ดังนี้

### 7.1 การกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

นำสารสกัดจากกระเพาะอาหารและลำไส้จากข้อ 4 มาศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของ DPPH ตามวิธีการของ Thongprajukaew *et al.* (2015) โดยเตรียม stock solution จากการละลาย DPPH 24 มิลลิกรัมในเมทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในอุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียม working solution โดยเจือจาง stock solution ด้วยเมทานอล แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง  $1.0 \pm 0.5$  หน่วย ที่ 517 นาโนเมตร จากนั้นทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยผสม working solution ปริมาตร 3 มิลลิลิตร กับสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตร วางไว้ในที่มืด นาน 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และคำนวณกิจกรรมการกำจัดอนุมูลของ DPPH (เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง) ได้จาก  $[(A_0 - A_t)/A_0] \times 100$  เมื่อ  $A_0$  และ  $A_t$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของบัพเฟอร์ และสารสกัดจากตัวอย่าง ตามลำดับ

### 7.2 ความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนโดยวิธี reducing power

นำสารสกัดจากกระเพาะอาหารและลำไส้จากข้อ 4 มาศึกษาความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Benzie and Strain (1996) และ Wong *et al.* (2006) โดยการผสม 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ กับ  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และอะซิเตตบัพเฟอร์พีเอช 5.2 ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในอัตราส่วน 1: 1: 10 หลังจากนั้นนำสารผสมดังกล่าวปริมาตร 2,850 ไมโครลิตร ผสมกับสารสกัดปริมาตร 150 ไมโครลิตร วางไว้ในที่มืดนาน 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ reducing power (% remained) คำนวณได้จาก  $[(A_i - A_0)/A_i] \times 100$  เมื่อ  $A_0$  และ  $A_i$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของบัพเฟอร์ และสารสกัดจากตัวอย่าง ตามลำดับ

## 8. การศึกษาลักษณะจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหารและลำไส้หลังการตาย

ตรึงตัวอย่างกระเพาะอาหารและลำไส้ โดยใช้ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 วัน จากนั้นล้างออกโดยให้น้ำไหลผ่าน ดึงน้ำออกจากเซลล์โดยแช่ในแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากนั้นตัดแต่งเนื้อเยื่อให้ได้ขนาด พร้อมทั้งใช้แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ฉีดไล่อาหารออกจากกระเพาะและลำไส้ นำกล้องที่บรรจุเนื้อเยื่อดังกล่าว ใส่ลงในเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติระบบเปิด (รุ่น TP1020, Leica, Wetzlar, Germany) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปฝังลงในพาราฟินเหลวโดยใช้เครื่องหล่อ พาราฟิน (รุ่น EG 1150 H, Leica, Nussloch, Germany) แล้วทำให้พาราฟินแข็งตัว โดยใช้เครื่องทำความเย็น (รุ่น EG 1150 C, Leica, Nussloch, Germany) ตัดแต่งบล็อกเนื้อเยื่อให้ได้ขนาดตามต้องการ หลังจากนั้นใช้เครื่องตัดเนื้อเยื่อ (รุ่น R, Jung AG., Heidelberg, Germany) ตัดบล็อกเนื้อเยื่อให้บาง 3–5 ไมโครเมตร นำไปลอยในน้ำอุ่นที่เติมเจลาตินลงไปเพื่อให้เนื้อเยื่อเกาะกับสไลด์ แล้วซ้อนเก็บบนแผ่นสไลด์ อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปย้อมสีนิวเคลียสโดยใช้สีฮีมาทอกไซลีน และย้อมไซโทพลาซึม และสารที่อยู่ระหว่างเซลล์ด้วยสีโอชิน จากนั้นทำสไลด์ถาวรโดยหยด permount บนสไลด์ เนื้อเยื่อและปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงภายใต้กล้องจุลทรรศน์

## 9. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์คาเทปซินบี เอช และแอล

ศึกษาเอนไซม์คาเทปซิน ได้แก่ การสกัดเอนไซม์คาเทปซิน และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์คาเทปซินบี เอช และแอล ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

### 9.1 การสกัดเอนไซม์คาเทปซิน

สกัดเอนไซม์คาเทปซินตามวิธีการของ Chéret *et al.* (2007) โดยบดกล้ามเนื้อขาอกกับ บัฟเฟอร์ A ปริมาตร 90 มิลลิลิตร (ที่มี Tris-HCl พีเอช 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์  $\beta$ -mercaptoethanol ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์) ในอัตราส่วน 1 : 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้เครื่องปั่นละเอียดเนื้อเยื่อ (รุ่น THP-220; Omni International, Kennesaw GA, USA) หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่  $10,000 \times g$  ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และดูส่วนสารละลายส่วนใสเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์คาเทปซินต่อไป

## 9.2 กิจกรรมของเอนไซม์คาเทปซินบี

ศึกษากิจกรรมของคาเทปซินบี ตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Aranishi *et al.* (1997) โดยผสมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6 ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (ที่มี EDTA 5 มิลลิโมลาร์ Brij35 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 490 ไมโครลิตร ซิสเตอีน ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ Z-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร) กับเอนไซม์สกัด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมโมโนคลอโรอะซิเตต พีเอช 4.3 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยวัดค่าการเรืองแสงของผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (รุ่น Jasco FP-8200, Jasco, Tokyo, Japan) ที่ 380 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืน และ 450 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่รังสีเปล่งออกมา หลังจากนั้นเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ aminomethylcoumarin (AMC) ยูนิตของคาเทปซินบีคำนวณจากปริมาณของ aminomethylcoumarin ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้พีเอช 6 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

## 9.3 กิจกรรมของเอนไซม์คาเทปซินเอช

ศึกษากิจกรรมของคาเทปซินเอชตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Aranishi *et al.* (1997) โดยผสมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (ที่มี EDTA 5 มิลลิโมลาร์ Brij35 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 490 ไมโครลิตร ซิสเตอีน ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ L-Arginine-4-methylcoumaryl-7-amide ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร) กับเอนไซม์สกัด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมโมโนคลอโรอะซิเตต พีเอช 4.3 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยวัดค่าการเรืองแสงของผลิตภัณฑ์ที่ความยาวคลื่นเดียวกับเอนไซม์คาเทปซินบี และเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ AMC ยูนิตของคาเทปซินเอชคำนวณจากปริมาณของ aminomethylcoumarin ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้พีเอช 6.8 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

#### 9.4 กิจกรรมของเอนไซม์คาเทปซินแอล

ศึกษากิจกรรมของคาเทปซินเอสตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Aranishi *et al.* (1997) โดยผสมโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.5 ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (ที่มี EDTA 5 มิลลิโมลาร์ Brij35 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 490 ไมโครลิตร ซิสเตอีน ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ Z-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร) กับเอนไซม์สกัด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมโมโนคลอโรอะซิเตต พีเอช 4.3 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยวัดค่าการเรืองแสงของผลิตภัณฑ์ที่ความยาวคลื่นเดียวกับเอนไซม์คาเทปซินบีและเอช และเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ AMC ยูนิทของคาเทปซินแอลคำนวณจากปริมาณของ aminomethylcoumarin ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้พีเอช 6.5 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

#### 10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ( $n = 4$ ) รายงานผลข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS รุ่นที่ 17 (SPSS Inc., Chicago, USA) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบทางเดียว (One Way ANOVA) เปรียบเทียบข้อมูลโดยใช้ Duncan multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรแต่ละคู่และความสัมพันธ์ระหว่างเวลาหลังการตายกับตัวแปรทั้งหมดโดยใช้สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation:  $r^2$ ) รายงานผลเป็นสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient:  $r$ ) และแสดงสมการถดถอยระหว่างระหว่างเวลาและตัวแปรที่ศึกษาด้วยสมการเส้นตรง ( $Y = mX + c$ ) เมื่อ  $Y$  คือ ตัวแปรที่ศึกษา,  $X$  คือ เวลาหลังการตาย (ชั่วโมง),  $m$  คือ ความชัน และ  $c$  คือ จุดตัดแกน  $Y$

### บทที่ 3

#### ผลการศึกษา

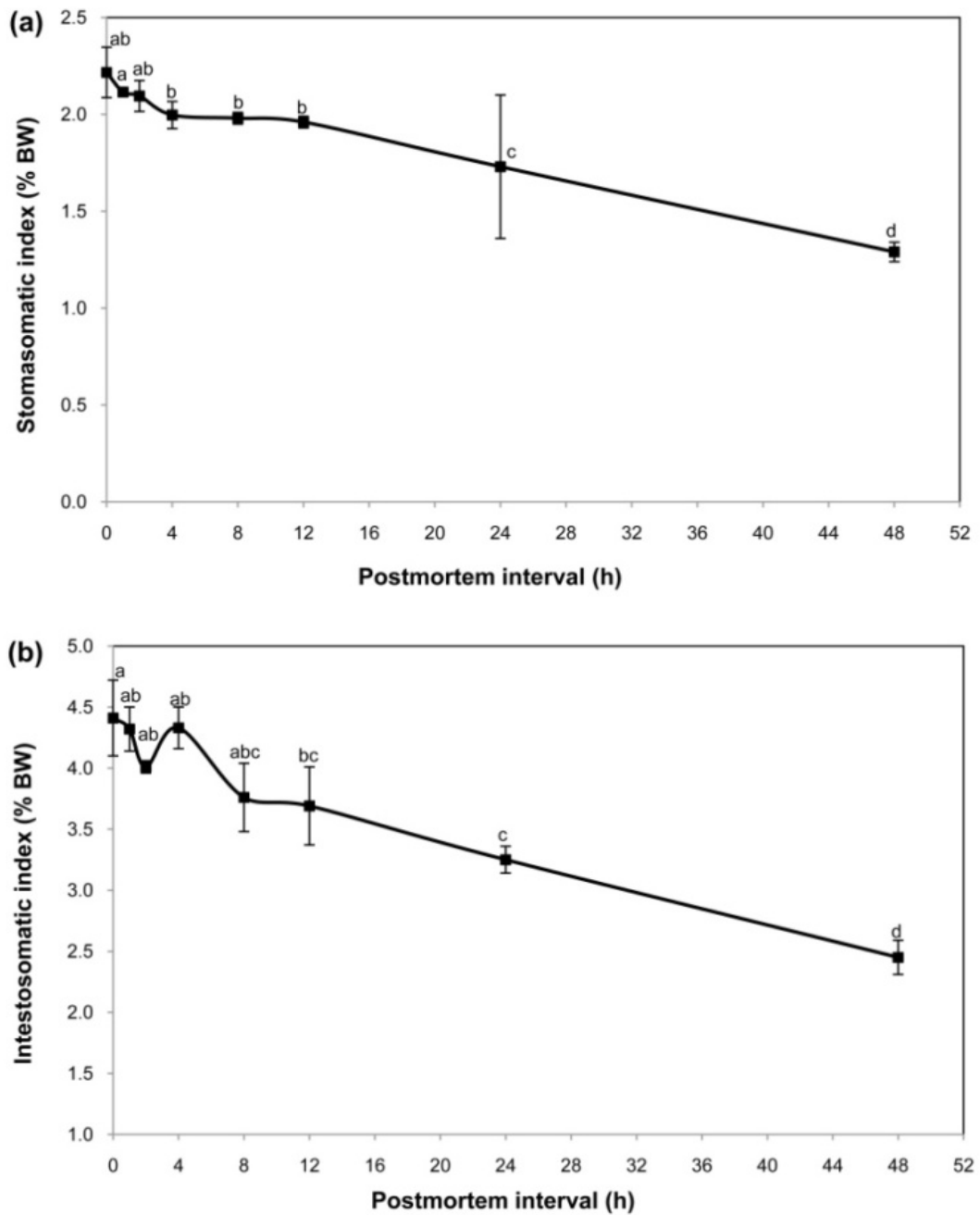
##### 1. การเปลี่ยนแปลงของดัชนีทางเดินอาหารหลังการตาย

ลำไส้ของปลานิล ( $4.41 \pm 0.31$  เปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวที่ 0 ชั่วโมง) มีน้ำหนักมากกว่า กระเพาะอาหาร ( $2.22 \pm 0.13$  เปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวที่ 0 ชั่วโมง) (รูปที่ 1) ผลการศึกษา พบว่าดัชนีของกระเพาะอาหาร (stomasomatic index: SSI) (รูปที่ 1a) และดัชนีของลำไส้ (intestosomal index: ISI) (รูปที่ 1b) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญตามระยะเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ ,  $n = 32$ ) โดยดัชนีของกระเพาะอาหารยังไม่เปลี่ยนแปลงใน 2 ชั่วโมงแรก ในขณะที่ ดัชนีของลำไส้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายใน 8 ชั่วโมง สำหรับช่วงเวลาสุดท้ายของการเก็บ ตัวอย่างพบว่า ดัชนีของกระเพาะอาหารและลำไส้ลดลงเหลือประมาณ 42 และ 44 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับดัชนีเริ่มต้นเมื่อเริ่มเก็บตัวอย่าง ตามลำดับ

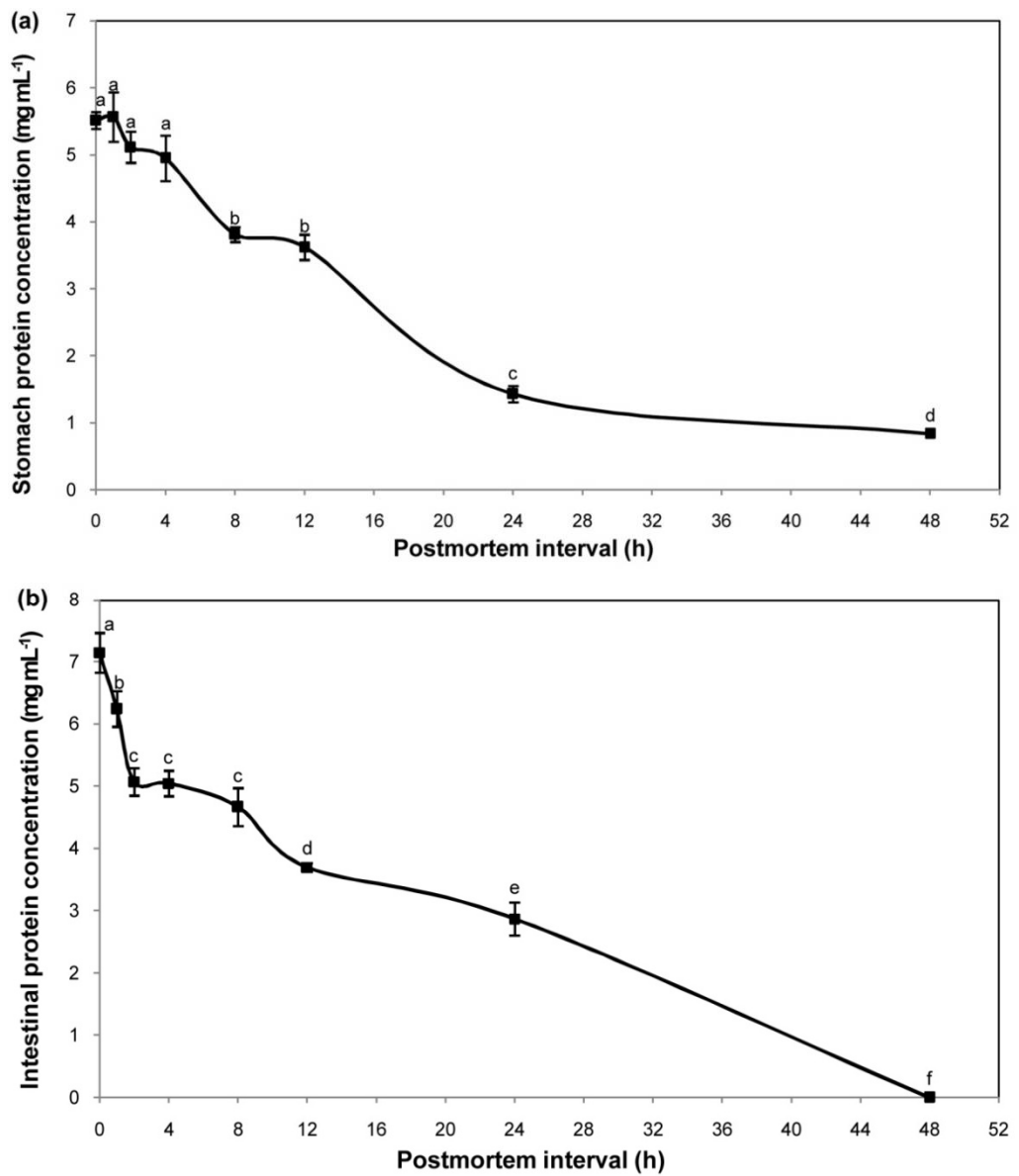
##### 2. การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโปรตีนในทางเดินอาหารหลังการตาย

ความเข้มข้นของโปรตีนในทางเดินอาหารมีลักษณะและแนวโน้มเช่นเดียวกับดัชนีของกระเพาะอาหารและลำไส้ (รูปที่ 2) โดยความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ใน กระเพาะอาหาร (รูปที่ 2a) และในลำไส้ (รูป 2b) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังการตาย ( $P < 0.05$ ,  $n = 32$ ) โดยโปรตีนในกระเพาะอาหารลดลงอย่างช้าๆ ในช่วงเวลา 4 ชั่วโมงแรก ( $P > 0.05$ ) หลังจากนั้นลดลงและคงที่ระหว่าง 8 ถึง 12 ชั่วโมง และลดลงอย่างมากที่เวลา 48 ชั่วโมง สำหรับความเข้มข้นของโปรตีนในลำไส้พบว่าเกิดการสลายและลดลงอย่างรวดเร็ว โดยมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญภายใน 2 ชั่วโมง และไม่สามารถตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนในลำไส้ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการตายได้





รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงดัชนีของกระเพาะอาหาร (a) และลำไส้ (b) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ )

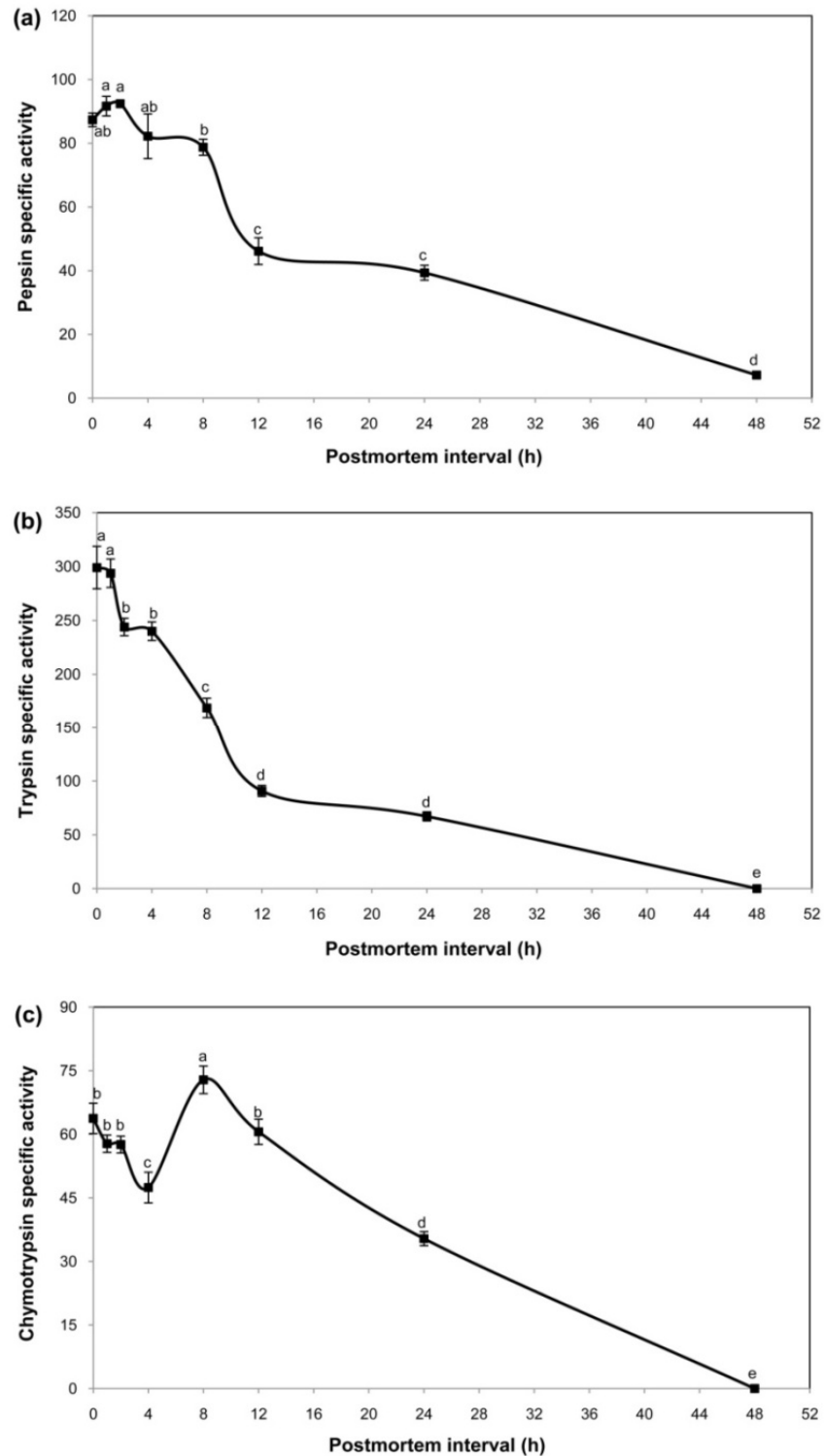


รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโปรตีนในกระเพาะอาหาร (a) และลำไส้ (b) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ตัวยกที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ )

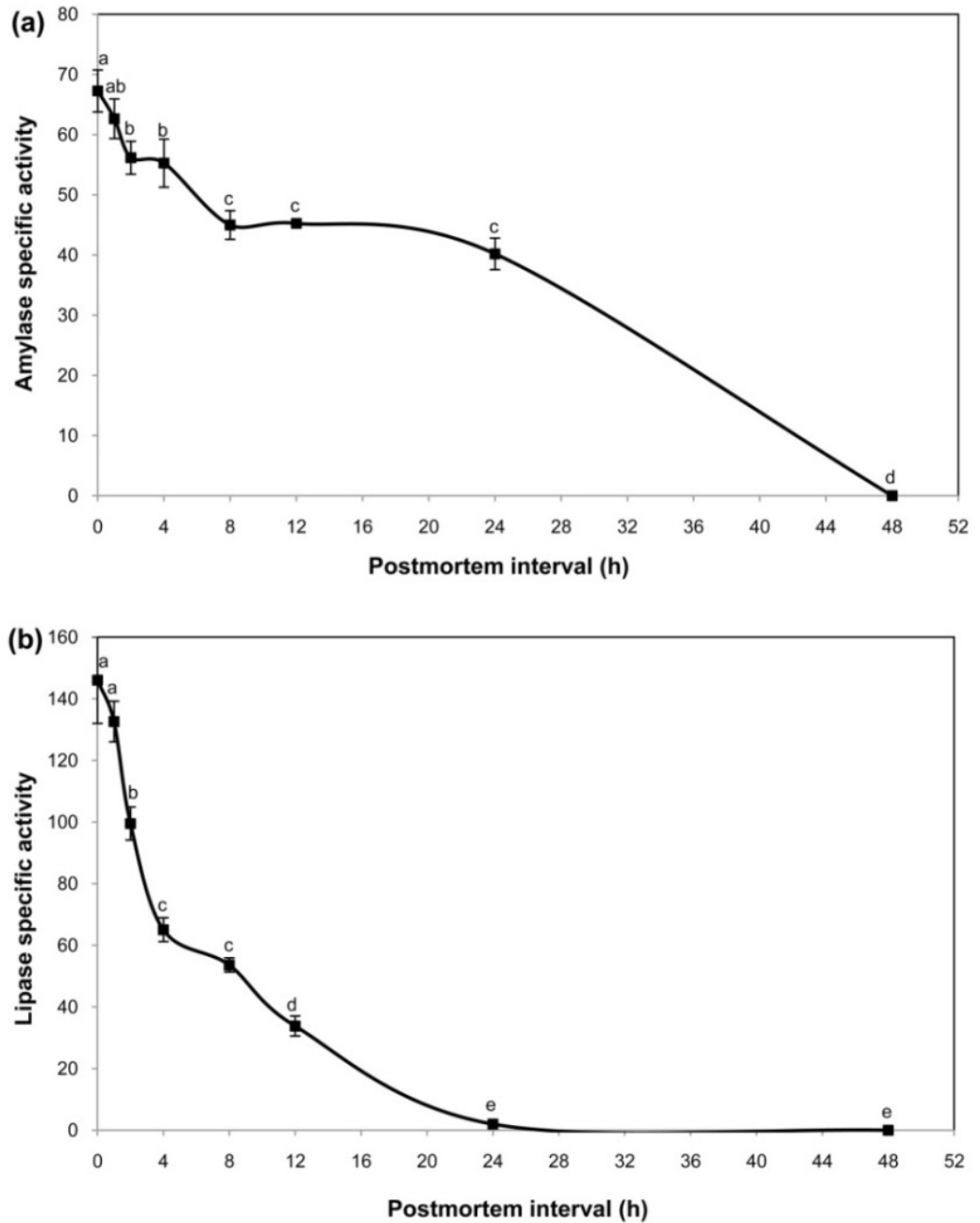
### 3. การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลังการตาย

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโปรตีนในทางเดินอาหาร สามารถศึกษาได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน 3 ชนิด (รูปที่ 3) กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เปปซินไม่เปลี่ยนแปลงใน 4 ชั่วโมงแรกหลังการตาย (รูปที่ 3a) จากนั้นจะลดลงเรื่อยๆ และมีกิจกรรมจำเพาะต่ำสุด ( $7.24 \pm 1.18 \text{ mU mg protein}^{-1}$ ) ที่ช่วงเวลาสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินมีความไวต่อเวลาหลังการตายมากกว่าเอนไซม์เปปซิน (รูปที่ 3b) โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง 1 ชั่วโมงหลังการตาย ( $P > 0.05$ ) และมีค่าต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัดที่เวลา 48 ชั่วโมง สำหรับกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โคโมทริปซิน พบว่ามีแนวโน้มที่แตกต่างกับเอนไซม์ย่อยโปรตีนทั้ง 2 ชนิดข้างต้น โดยกิจกรรมมีค่าสูงสุดที่ 8 ชั่วโมงหลังการตาย ในขณะที่เวลา 0 ถึง 2 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง กิจกรรมจำเพาะมีแนวโน้มที่คล้ายกัน (รูปที่ 3c) อย่างไรก็ตามกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ชนิดนี้มีค่าต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัดในระยะเวลา 48 ชั่วโมงหลังการตาย เช่นเดียวกับเอนไซม์ทริปซิน

กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลส (รูปที่ 4a) และไลเปส (รูปที่ 4b) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญตามระยะเวลาหลังการตายเช่นเดียวกับทริปซิน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสมีความไวต่อเวลาหลังการตายมากกว่าในทุกเอนไซม์ที่ศึกษา โดยลดลง 98.63 เปอร์เซ็นต์ภายใน 24 ชั่วโมงแรก และมีค่าต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัดได้ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการตาย



**รูปที่ 3** การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมจำเพาะ (mU mg protein<sup>-1</sup>) ของเอนไซม์เปปซิน (a) ทริปซิน (b) และไคโมทริปซิน (c) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ด้วยยกที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ )



**รูปที่ 4** การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลส (a, U mg protein<sup>-1</sup>) และไลเปส (b, mU mg protein<sup>-1</sup>) ของปลาใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ด้วยที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ )

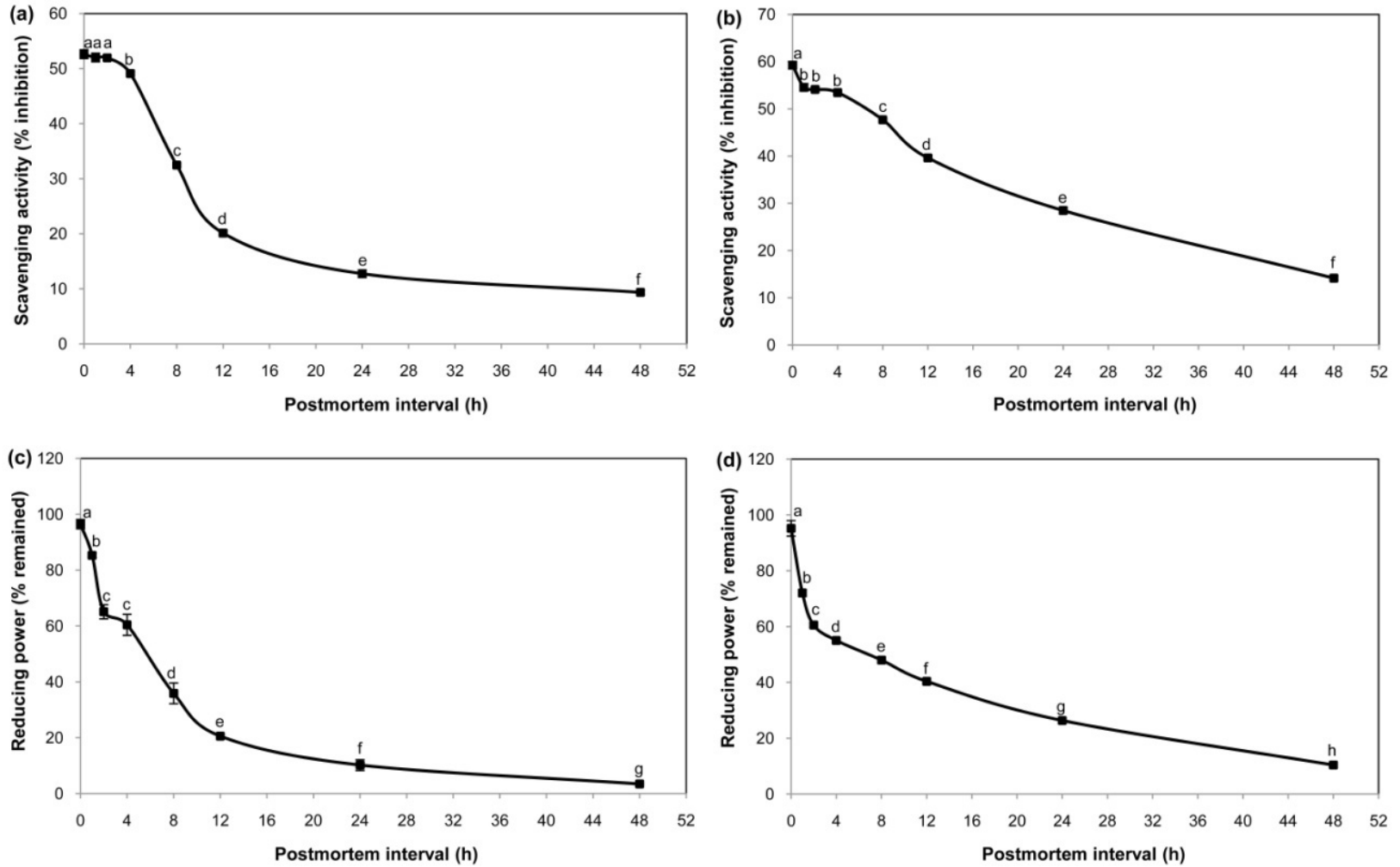
#### 4. การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาออกซิเดชันในระบบย่อยอาหารหลังการตาย

การต้านออกซิเดชันในระบบย่อยอาหารมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญตามระยะเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ ) โดยความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของกระเพาะอาหาร (รูปที่ 5a) และลำไส้ (รูป 5b) ในช่วงเวลาสุดท้ายลดลงเหลือ 18 และ 24 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้นเมื่อเริ่มเก็บตัวอย่าง ตามลำดับ เช่นเดียวกับความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนของกระเพาะอาหาร (รูปที่ 5c) และลำไส้ (รูปที่ 5d) ในช่วงเวลาสุดท้าย ซึ่งลดลงเหลือ 4 และ 11 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้นเมื่อเริ่มเก็บตัวอย่าง ตามลำดับ

#### 5. ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหาร

ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สันระหว่างเวลาและตัวแปรแต่ละคู่ ได้แก่ ดัชนีอวัยวะย่อยอาหารต่อน้ำหนักตัว ความเข้มข้นของโปรตีน เอนไซม์ย่อยอาหาร และกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระในกระเพาะอาหารและลำไส้ พบว่าตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกันโดยมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P < 0.01$ , ตารางที่ 1)

เวลาหลังการตาย (X) มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหาร (Y) ได้แก่ ดัชนีอวัยวะย่อยอาหารต่อน้ำหนักตัว ความเข้มข้นของโปรตีน เอนไซม์ย่อยอาหาร และกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระในกระเพาะอาหารและลำไส้ ( $P < 0.01$ , ตารางที่ 2)



**รูปที่ 5** การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระในกระเพาะอาหาร (a) และลำไส้ (b) (% inhibition) และความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในกระเพาะอาหาร (c) และลำไส้ (d) (% remained) ของปลาในภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตายข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ตัวยกที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ )

ตารางที่ 1 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน ( $r$ ) ระหว่างตัวแปรแต่ละคู่ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารหลังการตายของปลาชนิด ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P < 0.01$ )

Parameter	SSI	ISI	PC <sub>s</sub>	PC <sub>i</sub>	Pepsin	Trypsin	Chymotrypsin	Amylase	Lipase	RP <sub>s</sub>	RP <sub>i</sub>	DPPH <sub>s</sub>
ISI	0.835											
PC <sub>s</sub>	0.886	0.791										
PC <sub>i</sub>	0.948	0.841	0.889									
Pepsin	0.927	0.737	0.825	0.853								
Trypsin	0.834	0.790	0.914	0.892	0.887							
Chymotrypsin	0.867	0.665	0.700	0.778	0.809	0.677						
Amylase	0.921	0.783	0.833	0.871	0.858	0.883	0.828					
Lipase	0.773	0.688	0.866	0.848	0.745	0.918	0.595	0.770				
RP <sub>s</sub>	0.814	0.749	0.881	0.888	0.729	0.958	0.519	0.748	0.963			
RP <sub>i</sub>	0.877	0.782	0.888	0.945	0.746	0.920	0.705	0.829	0.951	0.949		
DPPH <sub>s</sub>	0.750	0.785	0.916	0.881	0.785	0.972	0.575	0.762	0.885	0.942	0.879	
DPPH <sub>i</sub>	0.901	0.842	0.942	0.956	0.870	0.934	0.810	0.879	0.853	0.886	0.919	0.942

SSI, stomasomatic index; ISI, intestosomatic index; PC<sub>s</sub>, Stomach protein; PC<sub>i</sub>, Intestinal protein; RP<sub>s</sub>, reducing power in stomach; RP<sub>i</sub>, reducing power in intestine; DPPH<sub>s</sub>, % DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenging activity in stomach; DPPH<sub>i</sub>, % DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenging activity in intestine.



ตารางที่ 2 สมการถดถอยระหว่างเวลาหลังการตาย (ชั่วโมง) ของปลานิล (X) และตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหาร (Y) ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับเวลาหลังการตายอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P < 0.01$ )

Y variable	Regression equation	r
SSI	$Y = -0.0168X + 2.1068$	-0.927
ISI	$Y = -0.0394X + 4.2644$	-0.833
PC <sub>s</sub>	$Y = -0.1094X + 5.1970$	-0.914
PC <sub>i</sub>	$Y = -0.1288X + 5.9358$	-0.941
Pepsin	$Y = -1.9741X + 94.182$	-0.867
Trypsin	$Y = -6.1441X + 251.45$	-0.887
Chymotrypsin	$Y = -1.2607X + 65.062$	-0.883
Amylase	$Y = -1.2451X + 61.982$	-0.947
Lipase	$Y = -2.6486X + 97.580$	-0.788
RP <sub>s</sub>	$Y = -1.7790X + 68.460$	-0.799
RP <sub>i</sub>	$Y = -1.3990X + 68.300$	-0.865
DPPH <sub>s</sub>	$Y = -1.0750X + 48.030$	-0.874
DPPH <sub>i</sub>	$Y = -0.9290X + 55.240$	-0.975

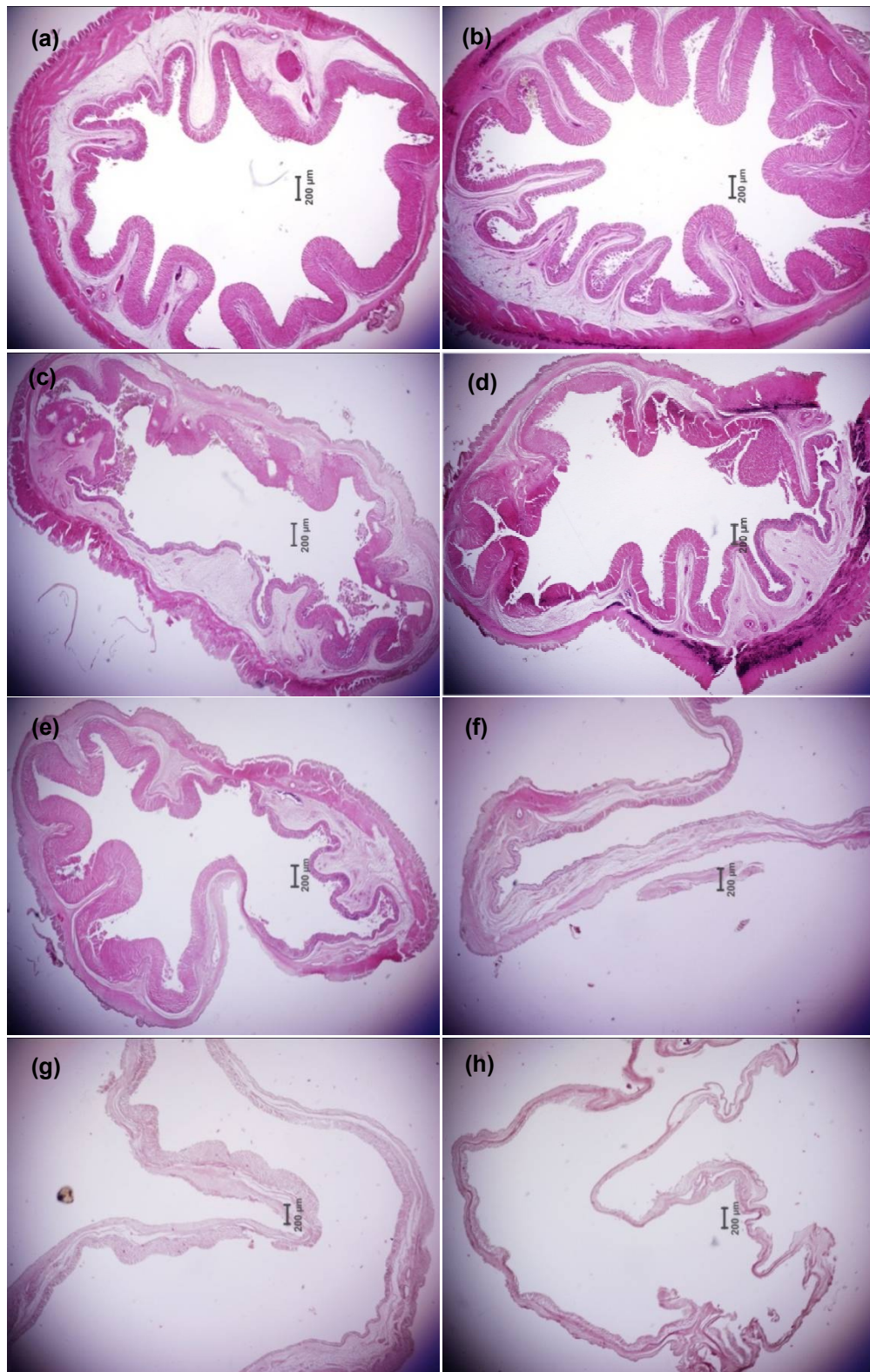
SSI, stomasomatic index; ISI, intestosomatic index; PC<sub>s</sub>, Stomach protein; PC<sub>i</sub>, Intestinal protein; RP<sub>s</sub>, reducing power in stomach; RP<sub>i</sub>, reducing power in intestine; DPPH<sub>s</sub>, % DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenging activity in stomach; DPPH<sub>i</sub>, % DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenging activity in intestine.

## 6. การเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลกายวิภาคกระเพาะอาหารและลำไส้หลังการตาย

### 6.1 การเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหาร

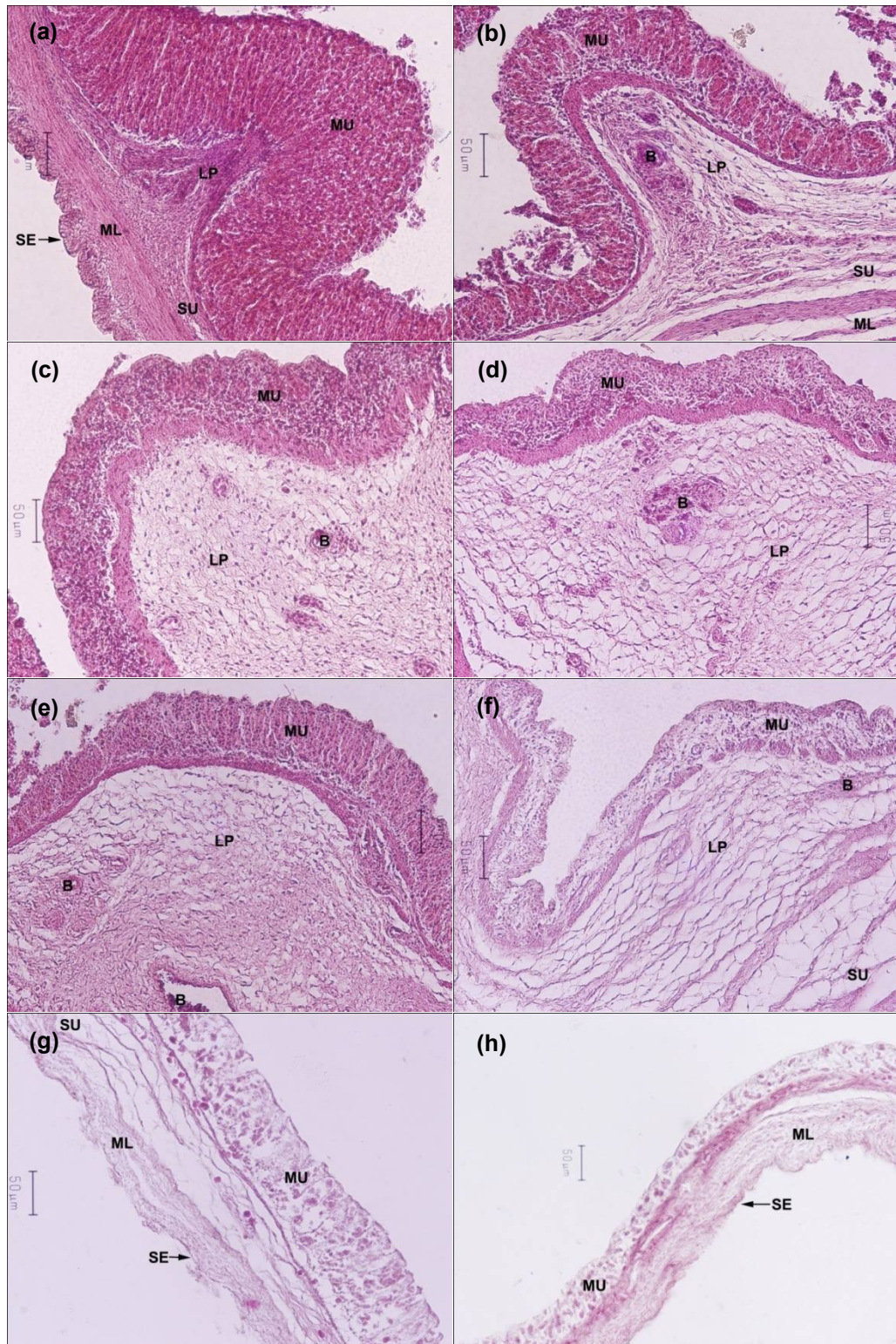
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหารปลาในระยะเวลา 48 ชั่วโมงหลังการตาย ที่กำลังขยาย 40 เท่า พบว่าก่อนปลาตาย (0 ชั่วโมง) และหลังตายนาน 1 ชั่วโมง ลูเมน (lumen) ของกระเพาะอาหารมีรูปร่างค่อนข้างกลม (รูปที่ 6a และ 6b) แต่เมื่อเวลาผ่านไปในช่วง 2 ถึง 8 ชั่วโมง พบว่าลูเมนของกระเพาะอาหารมีรูปร่างค่อนข้างรี ความหนาของผนังลดลง และลูเมนมีขนาดใหญ่ขึ้น (รูปที่ 6c-6e) และเมื่อเวลาผ่านไปในช่วง 12 ถึง 48 ชั่วโมง พบว่าลูเมนขยายขนาดใหญ่มากขึ้น กระเพาะอาหารมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ไม่แน่นอน แต่มีรูปร่างยาวขึ้นตามระยะเวลาหลังการตาย (รูปที่ 6f-6h)

สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหารที่กำลังขยาย 200 เท่า พบว่าก่อนการตาย (0 ชั่วโมง) กระเพาะอาหารประกอบด้วยผนังชั้น mucosa, submucosa, muscularis และ serosa และส่วนของ lamina propria ที่อยู่ถัดลงมาจากผนังชั้น mucosa (รูปที่ 7a) เมื่อปลาทายนาน 1 ชั่วโมง พบว่าเนื้อเยื่อกระเพาะประกอบด้วยผนังทั้ง 4 ชั้น และ lamina propria ไม่แตกต่างกับกระเพาะอาหารของปลาในชุดควบคุม (รูปที่ 7b) แต่เมื่อเวลาผ่านไปในช่วง 2 ถึง 8 ชั่วโมง พบว่าผนังเนื้อเยื่อชั้น mucosa เริ่มสลายตัวและเกิดการตายของเซลล์บริเวณ lamina propria (รูปที่ 7c-7e) และเมื่อเวลาผ่านไปในช่วง 12 ถึง 48 ชั่วโมง พบว่าผนังกระเพาะอาหารบางลงตามระยะเวลาหลังการตายที่นานขึ้น เนื่องจากเกิดการสลายตัวของเนื้อเยื่อแต่ละชั้นอย่างเห็นได้ชัด โดยพบการสลายตัวของเนื้อเยื่อ และการตายของเซลล์บริเวณ lamina propria มากขึ้น จนไม่สามารถแยกชั้นของผนังกระเพาะอาหารได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 7f-7h)



รูปที่ 6 จุลกายวิภาคของกระเพาะอาหาร (ตัดตามขวาง) ของปลานิลหลังการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (h) (H&E, scale bar = 200  $\mu$ m) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 40 เท่า



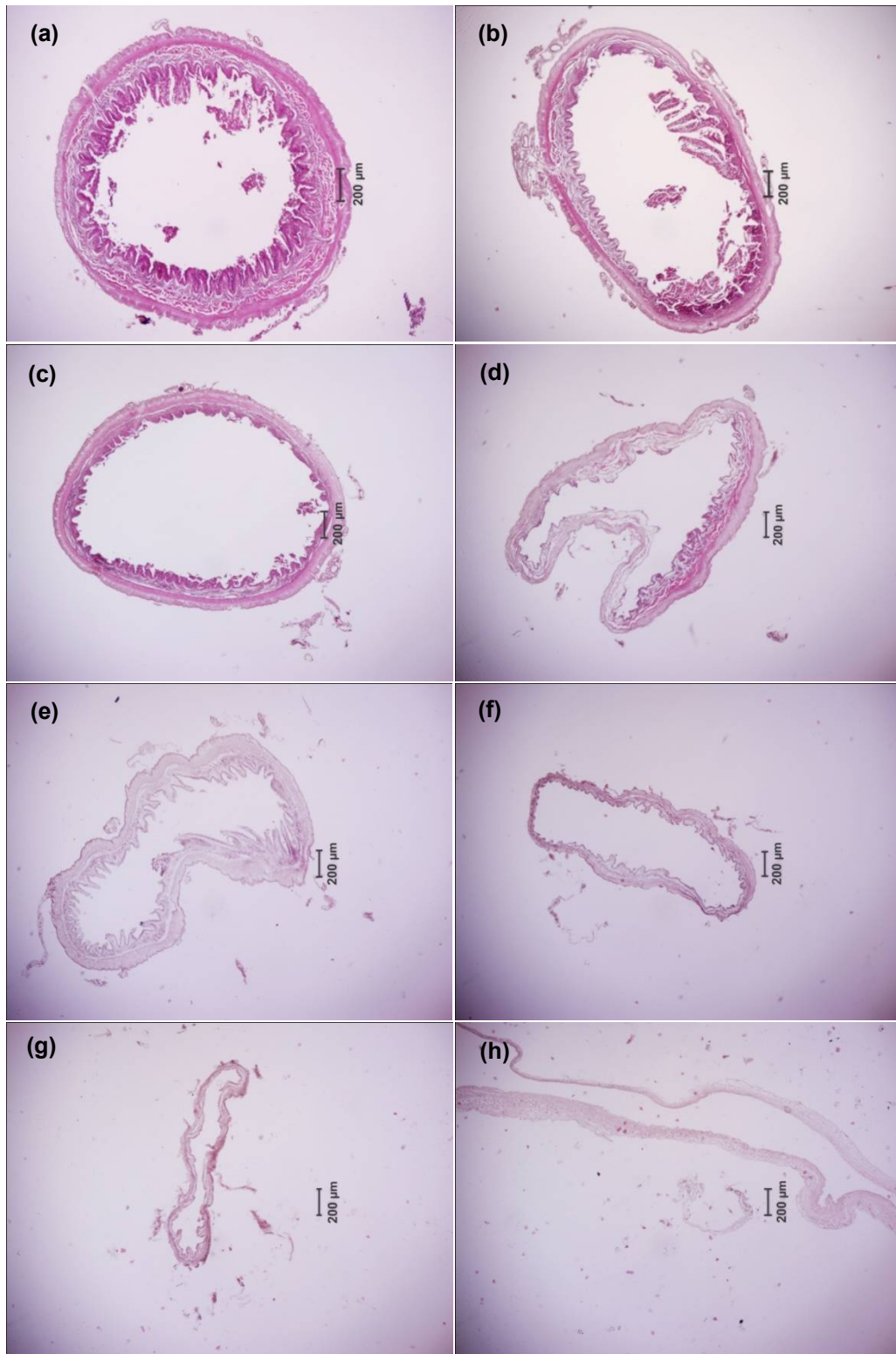


รูปที่ 7 จุลกายวิภาคของกระเพาะอาหาร (ตัดตามขวาง) ของปลาฉลามหลังการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (h) (MU = mucosa, LP = lamina propria, SU = submucosa, ML = muscularis, SE = serosa, B = blood vessel) (H&E, scale bar = 50) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 200 เท่า

## 6.2 การเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลกายวิภาคของลำไส้

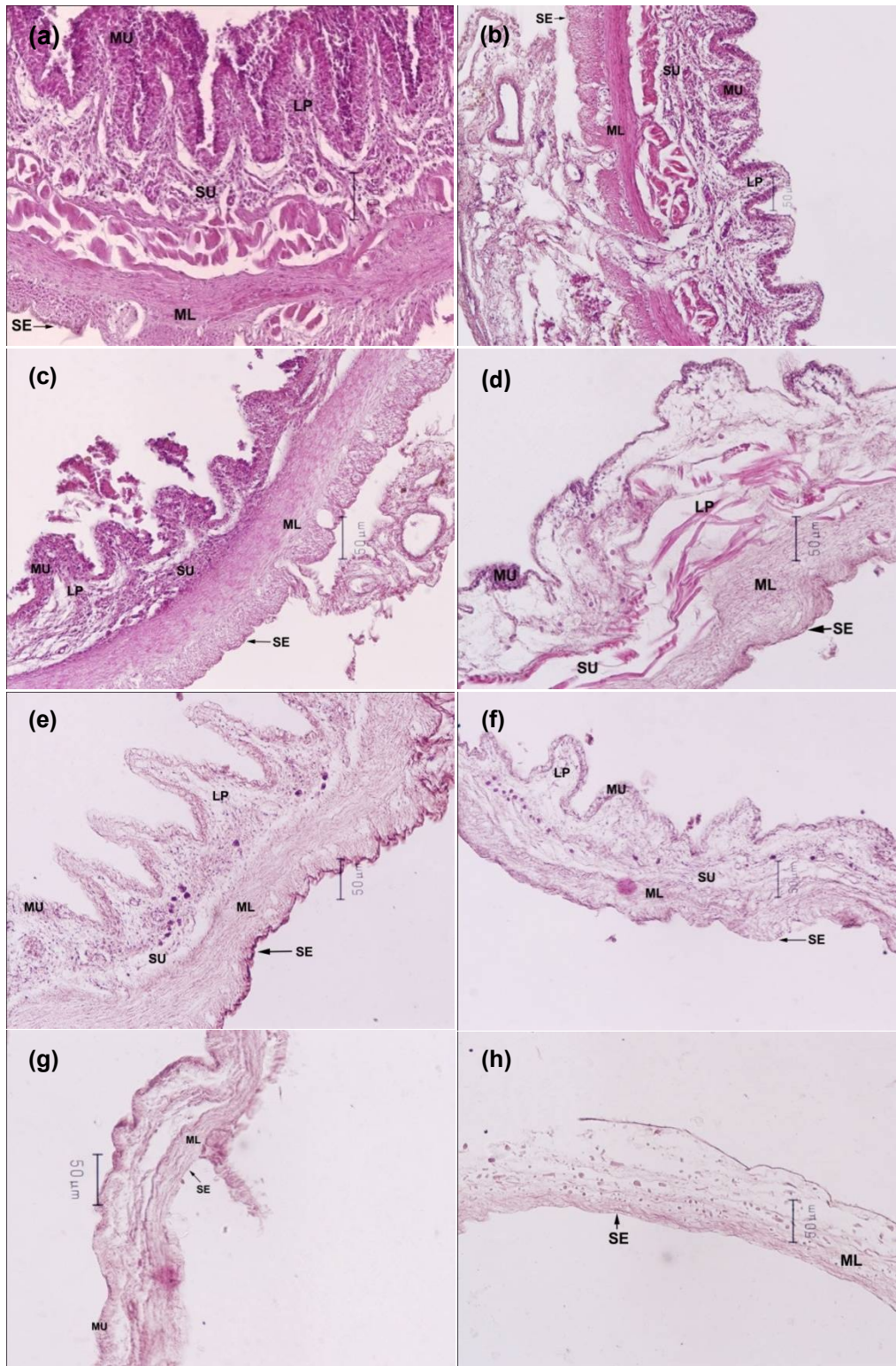
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลกายวิภาคของลำไส้ปลาในระยะเวลา 48 ชั่วโมงหลังการตาย ที่กำลังขยาย 40 เท่า พบว่าก่อนตาย (0 ชั่วโมง) ลูเมนของลำไส้มีรูปร่างค่อนข้างกลม (รูปที่ 8a) เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง รูปร่างของลูเมนลำไส้ค่อนข้างยาวรี (รูปที่ 8b) และเมื่อปลาทายนาน 2 ชั่วโมง พื้นที่ผิวของผนังลำไส้ลดลงอย่างเห็นได้ชัด และช่องว่างภายในเนื้อเยื่อขยายขนาดใหญ่ขึ้น (รูปที่ 8c) และเมื่อเวลาผ่านไปในช่วงเวลา 4 ถึง 48 ชั่วโมง พบว่าเนื้อเยื่อลำไส้มีวิลไลน้อยลง และมีรูปร่างยืดยาวขึ้นตามระยะเวลาหลังการตาย (รูปที่ 8d-8h)

สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลกายวิภาคของลำไส้ ที่กำลังขยาย 200 เท่า พบว่าก่อนปลาทาย (0 ชั่วโมง) ลำไส้ประกอบด้วยผนังเนื้อเยื่อชั้น mucosa, submucosa, muscularis และ serosa รวมทั้งส่วนของ lamina propria เช่นเดียวกับกระเพาะอาหาร (รูปที่ 9a) เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง พบว่าเริ่มมีการสลายตัวของเนื้อเยื่อในแต่ละชั้น และพบการตายของเซลล์บริเวณ lamina propria (รูปที่ 9b) เมื่อปลาทายนาน 2 ชั่วโมง พบว่าเนื้อเยื่อแต่ละชั้นสลายตัวมากขึ้น (รูปที่ 9c) และเมื่อเวลาผ่านไปในช่วง 4 ถึง 48 ชั่วโมง พบว่าผนังลำไส้ทั้ง 4 ชั้นบางลงตามระยะเวลาหลังการตาย โดยผนังเนื้อเยื่อทุกชั้นที่เวลาสุดท้ายของการเก็บตัวอย่างมีความหนาน้อยที่สุด เนื่องจากการตายของเซลล์บริเวณ lamina propria และการสลายตัวของเนื้อเยื่อที่มากขึ้น จนไม่สามารถแยกชั้นของผนังลำไส้ได้ (รูปที่ 9d-9h)



**รูปที่ 8** จุลกายวิภาคของลำไส้ (ตัดตามขวาง) ของปลานิลหลังการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (h) (H&E, scale bar = 200 μm) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 40 เท่า





รูปที่ 9 จุลกายวิภาคของลำไส้ (ตัดตามขวาง) ของปลานิลหลังการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (h) (MU = mucosa, LP = lamina propria, SU = submucosa, ML = muscularis, SE = serosa (H&E, scale bar = 50 µm) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 200 เท่า

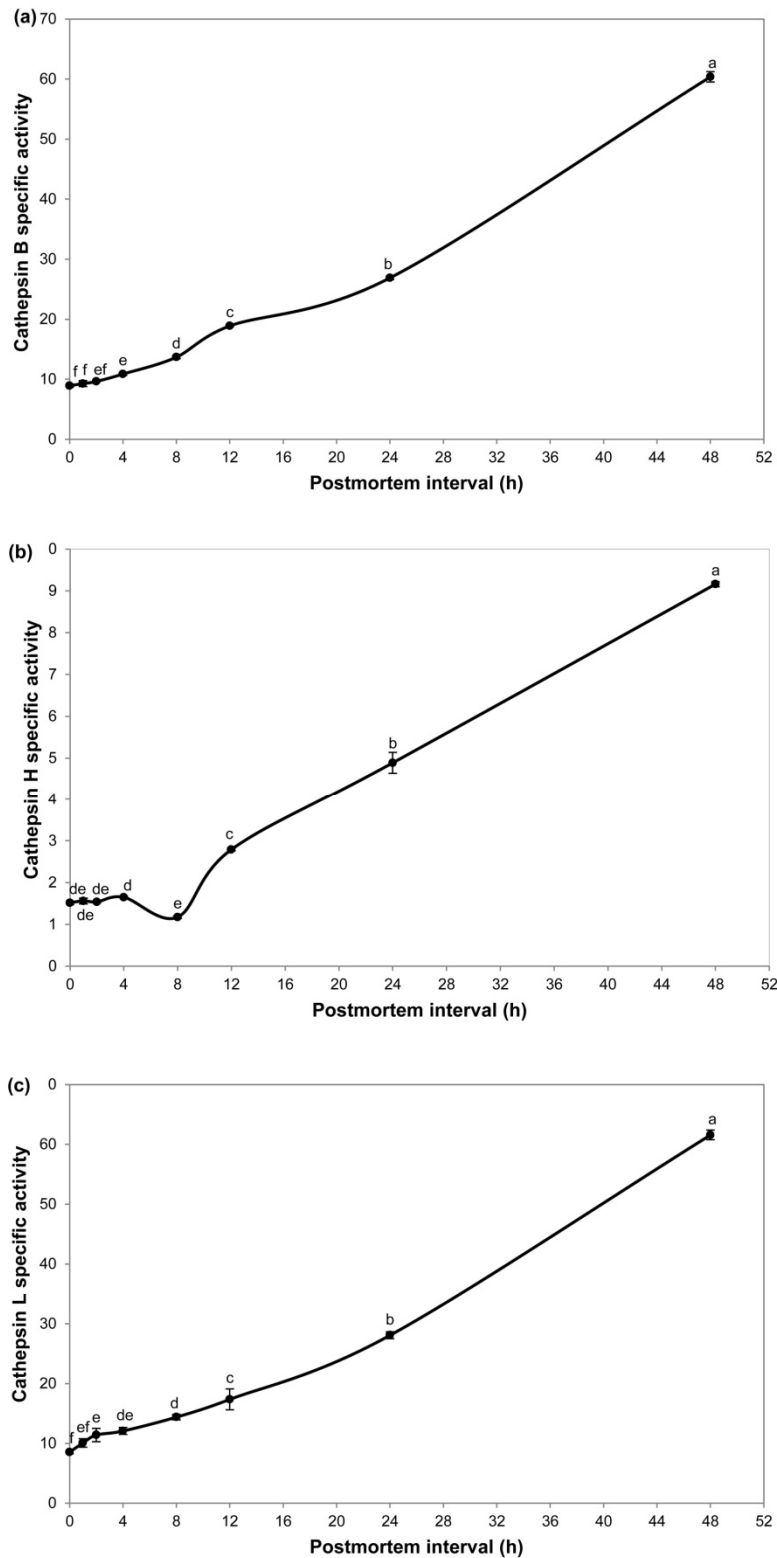
## 7. การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของคาเทปซินบี เอช และแอล หลังการตาย

กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนตัว ได้แก่ คาเทปซินบี (รูปที่ 10a) เอช (รูปที่ 10b) และแอล (รูปที่ 10c) ในปลานิลมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่เริ่มตาย โดยกิจกรรมมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วง 4 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นก็มีค่าเพิ่มสูงมากขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกัน ( $r = 0.987-0.997$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 32$ ) โดยกิจกรรมจำเพาะของคาเทปซินบี และแอลมีแนวโน้มที่คล้ายกันตลอดระยะเวลา 48 ชั่วโมง เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดในช่วงเวลาสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง โดยมีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 6.26 เท่า ( $60.98 \pm 0.59 \text{ mg protein}^{-1}$  โดยเฉลี่ย) เมื่อเปรียบเทียบกับ 0 ชั่วโมง ( $9.74 \pm 0.24 \text{ mg protein}^{-1}$  โดยเฉลี่ย) ในขณะที่กิจกรรมจำเพาะของคาเทปซินเอชมีแนวโน้มที่แตกต่างกับคาเทปซินบี และแอล รวมทั้งมีค่าที่ต่ำกว่ามาก โดยภายหลังการตาย 8 ชั่วโมง คาเทปซินเอชมีกิจกรรมต่ำสุด ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกับช่วงเวลา 0 ถึง 2 ชั่วโมง กิจกรรมจำเพาะสูงสุดของเอนไซม์ชนิดนี้ที่เวลา 48 ชั่วโมงมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 6.03 และ 7.83 เท่า โดยเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบกับเวลา 0 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ

## 8. ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาหลังการตายและการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์คาเทปซินในกล้ามเนื้อขาว

เวลาหลังการตาย (X) มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์คาเทปซินในกล้ามเนื้อขาว (Y) ได้แก่ คาเทปซินบี คาเทปซินเอช และคาเทปซินแอล ( $P < 0.01$ , ตารางที่ 3)





รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมจำเพาะ ( $\text{mU mg protein}^{-1}$ ) ของเอนไซม์คาเทปซินบี (a) เอนไซม์ (b) และแอล (c) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ด้วยยกที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ )

**ตารางที่ 3** สมการถดถอยระหว่างเวลาหลังการตาย (ชั่วโมง) ของปลานิล (X) และเอนไซม์คาเทปซินในกล้ามเนื้อขาว (Y) ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับเวลาหลังการตายอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P < 0.01$ )

<b>Y variable</b>	<b>Regression equation</b>	<b>R</b>
Cathepsin B	$Y = 1.069X + 6.710$	0.990
Cathepsin H	$Y = 0.166X + 0.983$	0.983
Cathepsin L	$Y = 1.079X + 7.259$	0.987

## บทที่ 4

### บทวิจารณ์

#### 1. การเปลี่ยนแปลงดัชนีและความเข้มข้นของโปรตีนในทางเดินอาหารหลังการตาย

หลังการตายจะเกิดแกสโตรมาลาเซียในกระเพาะอาหารจากการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ภายใน มีผลทำให้ผนังกระเพาะอาหารอ่อนตัวและบางลงอย่างมีนัยสำคัญ (O'Donnell and Baker, 2010; Lacznik *et al.*, 2011; Usui *et al.*, 2013) กระบวนการนี้ทำให้ทางเดินอาหารสูญเสียน้ำหนัก ส่งผลโดยตรงต่อดัชนีของอวัยวะย่อยอาหาร (ดัชนีของกระเพาะอาหารและลำไส้) การศึกษาในสัตว์บก เช่น ในหนูสปราก-ดอร์ลี โดย Li *et al.* (2003) พบว่าดัชนีของตับต่อน้ำหนักตัว มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังการตาย (0 ถึง 25 นาที) สำหรับการศึกษาในตัวอย่างปลาไนครั้งนี้พบว่า โดยดัชนีของกระเพาะอาหารและลำไส้มีแนวโน้มตรงกันข้ามกับการศึกษาดัชนีของตับในหนู ซึ่งอาจเป็นเพราะใช้เวลานานกว่า (48 ชั่วโมง) นอกจากนี้ของเหลวซึ่งเกิดจากการย่อยของเอนไซม์ถูกปล่อยออกมาจากซากปลาลงในตัวยกกลางที่เป็นน้ำ กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในเนื้อเยื่อที่มีเอนไซม์และมีปริมาณน้ำที่สูง (Vass, 2001)

การเปลี่ยนแปลงความต้านทานไฟฟ้าของผนังกระเพาะอาหารก็เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายผนังกระเพาะหลังการตาย ความต้านทานไฟฟ้าที่ลดลงอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงช่องว่างระหว่างเซลล์และการนำไฟฟ้าของของเหลวภายในและภายนอกเซลล์ (Querido, 1992) Penny (1969) รายงานว่าค่าพีเอชในกล้ามเนื้อของสุกรลดลงอย่างรวดเร็วหลังการตาย เนื่องจากการสะสมของหมู่คาร์บอกซิลอิสระจากการไฮโดรไลส์สารชีวโมเลกุล นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงหลังการตายดังกล่าวยังอาจเกิดจากการย่อยสลายของจุลินทรีย์ การขาดออกซิเจน การเพิ่มขึ้นของคาร์บอนไดออกไซด์ และการสะสมของของเสีย (Benzie and Strain, 1996; Vass, 2001) เงื่อนไขเหล่านี้อาจทำให้โปรตีนเสียสภาพ ส่งผลให้ความเข้มข้นของโปรตีนในกระเพาะอาหารและลำไส้ลดลง และไม่สามารถตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนในลำไส้ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการตายได้ เนื่องจากมีความเข้มข้นต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัดด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ ซึ่งหากมีการศึกษาต่อไปในอนาคตควรตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีน รวมทั้งเอนไซม์ย่อยอาหารหลังการตายด้วยเครื่องมือที่มีความไวต่อการตรวจวัดสูง

## 2. การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารหลังการตาย

เอนไซม์เปปซินมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนในกระเพาะอาหาร โดยทำหน้าที่ตัดพันธะเพปไทด์ ตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่มีหมู่ไฮดรอกซิล เป็นอะโรมาติก เช่น ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโทเฟน (Dunn, 2001) กิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้บ่งบอกถึงการย่อยสลายอาหารประเภทโปรตีนภายในกระเพาะอาหาร (Thongprajukaew and Kovitvadh, 2013) จากการศึกษาครั้งนี้ กิจกรรมของเอนไซม์เปปซินที่ลดลงเกิดขึ้นเนื่องจากการเกิดออกโตไลซิสจากการทำงานของจุลินทรีย์หลังการตาย มีผลทำให้ต่อมสร้างน้ำย่อยถูกทำลาย (Laczniak *et al.*, 2011) เอนไซม์นี้มีความทนทานมากกว่าเอนไซม์อื่นๆ ที่ตรวจวัด เนื่องจากยังคงมีกิจกรรมจนถึงเวลาสุดท้ายที่เก็บตัวอย่าง (48 ชั่วโมง) ในขณะที่เอนไซม์อื่นมีกิจกรรมสูงประมาณ 4 ชั่วโมงแรกที่ทำการศึกษาเท่านั้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์เปปซินมีโครงสร้างที่แข็งแรง (rigid) จึงเสถียรสภาพธรรมชาติมากกว่า

กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินลดลงอย่างรวดเร็ว แสดงถึงอัตราเร็วในการสลายตัวของโปรตีนในลำไส้ซึ่งเกิดขึ้นเร็วกว่าในกระเพาะอาหาร เนื่องจากทริปซินเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่สำคัญในลำไส้เล็ก ทำหน้าที่ควบคุมการย่อยโปรตีน โดยกระตุ้นทริปซินเองและไซโมเจนที่ย่อยโปรตีนชนิดอื่น สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์โคโมทริปซินพบว่ามีค่าสูงสุดที่ 8 ชั่วโมงหลังการตาย เอนไซม์ชนิดนี้ย่อยโปรตีนตรงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นอะโรมาติก (ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และ ทริปโทเฟน) รวมทั้งไฮโดรโฟบิก กิจกรรมของเอนไซม์โคโมทริปซินที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากความเครียดของปลาก่อนตาย ซึ่งจะหลั่งสารกลุ่มอะโรมาติก เช่น เบนซีน (benzene) และไดออกซิน (dioxin) ออกมา ชักนำให้มีกิจกรรมของโคโมทริปซินเพิ่มขึ้น (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006) นอกจากนี้เอนไซม์โคโมทริปซินยังทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการตัด internucleosomal DNA ของเซลล์ที่ตายแล้ว (Murn *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตามบทบาทหลังการตายของเอนไซม์ชนิดนี้ยังมีรายงานน้อยมาก ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

แคทาบอลิซึมของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตมีความเกี่ยวข้องกัน เนื่องจากกิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาหลังการตาย โดยเอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่สลายสายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ตำแหน่ง  $\alpha$ -1,4 glycosidic bond เพื่อเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็นน้ำตาลมอลโทส การลดลงของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ชนิดนี้จึงอาจมีนัยสำคัญเกี่ยวข้องกับแคทาบอลิซึมของไกลโคเจนหลังการตาย ในขณะที่กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสลดลงมากกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ชนิดอื่น เนื่องจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปลาสามารถถูกออกซิไดซ์ให้อนุมูลอิสระได้ง่าย ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายโมเลกุลอื่น ๆ การลดลงของเอนไซม์ไลเปส

สอดคล้องกับการลดลงของไขมันในช่องท้องที่สังเกตจากการผ่าตัดตัวอย่าง ตลอดจนชั้นของไขมันหลังจากปั่นเหวี่ยงตัวอย่างในขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์

### 3. การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาออกซิเดชันในกระเพาะอาหารและลำไส้หลังการตาย

การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกระเพาะอาหารและลำไส้ทั้งวิธี DPPH assay และ reducing power ลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังการตายเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของดัชนีของอวัยวะต่อน้ำหนักตัวและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหาร เนื่องจากในเซลล์ที่ตายแล้วจะมีการผลิตเปอร์ออกไซด์และอนุมูลอิสระมาทำลายส่วนประกอบต่างๆของอวัยวะ รวมทั้งการย่อยของเอนไซม์จะปล่อยผลิตภัณฑ์ต่างๆ ออกมา เช่น เพปไทด์ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ (Lassoued *et al.*, 2015) ทำให้สามารถกำจัดเปอร์ออกไซด์และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นหลังการตาย อย่างไรก็ตาม เพปไทด์ที่ถูกปล่อยออกมาอาจไม่เพียงพอเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตอนุมูลอิสระที่มากเกินไป นอกจากนี้หลังการตายจะเกิดการย่อยสลายที่นานขึ้นทำให้ได้เพปไทด์สายสั้นที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระลดน้อยลง (Lassoued *et al.*, 2015)

การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกระเพาะอาหารและลำไส้โดยวิธี DPPH assay เป็นการศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัวในตัวทำละลายเมทานอล โดยสารสกัดตัวอย่างทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนอะตอมแก่อนุมูล DPPH ส่งผลให้มีการเปลี่ยนจากสีม่วงของอนุมูล DPPH เป็นสารที่ไม่มีสี สำหรับวิธี reducing power เป็นการศึกษาความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารสกัดตัวอย่างแก่สารประกอบเชิงซ้อน  $Fe^{3+}$ -TPTZ ซึ่งเป็นอนุมูลที่สังเคราะห์ขึ้นให้เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ  $Fe^{2+}$ -TPTZ ซึ่งเป็นสารที่มีสีม่วงการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างการตรวจวัดทั้ง 2 วิธี พบว่าวิธี DPPH assay มีศักยภาพในการใช้ประเมินระยะเวลาหลังการตายมากกว่าวิธี reducing power นอกจากนี้ สารสกัดจากลำไส้ยังให้ผลการวิเคราะห์ที่มีนัยสำคัญมากกว่าในกระเพาะอาหาร

### 4. การเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหารและลำไส้หลังการตาย

การเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหารและลำไส้หลังการตาย เกิดจากการย่อยตัวเองโดยเอนไซม์และจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในอวัยวะดังกล่าวเป็นหลัก (O'Donnell and Baker, 2010; Lacznia *et al.*, 2011; Usui *et al.*, 2013) จากผลการศึกษาพบว่าส่วนของวิลไลในลำไส้ ผนังเนื้อเยื่อ และเซลล์ภายใน lamina propria ของกระเพาะอาหารและลำไส้เสื่อมสภาพลงตามระยะเวลาหลังการตาย คล้ายกับการศึกษาการเกิดอะพอพโทซิสในกระเพาะ

อาหารและลำไส้ของหนูและมนุษย์โดย Hall *et al.* (1994) ที่แสดงให้เห็นว่าอะพอพโทซิสพบมากในเยื่อบุผิวและใน immediate sub-epithelial connective tissue ซึ่งในกระเพาะอาหารพบมากที่สุดบริเวณต่อมสร้างน้ำย่อย ผิวด้านนอกของผนังชั้นในสุด และบริเวณ lamina propria ส่วนในลำไส้เล็กพบอะพอพโทซิสมากที่สุดบริเวณปลายของวิลไล ผลการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหารและลำไส้หลังการตายสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารและการต้านปฏิบัติการออกซิเดชันทั้งในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก ในขณะที่การศึกษาที่ผ่านมาของ Querido (1992) พบว่าความต้านทานไฟฟ้าของผนังกระเพาะอาหารลดลงตามระยะเวลาหลังการตาย ขณะที่ Erlandsson and Munro (2007) รายงานว่าลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อลำไส้เกิดการเสื่อมสภาพลงเมื่อเวลาผ่านไปหลังการตายเช่นกัน

ลำไส้เป็นอวัยวะที่มีการเน่าเสียเร็วที่สุด รองลงมาคือส่วนของทางเดินอาหารและเหงือก (เนตรนรินทร์, 2546) ข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคหลังการตายในลำไส้เกิดขึ้นเร็วกว่าในกระเพาะอาหาร เนื่องจากผนังชั้นในสุดของกระเพาะอาหารมีความหนากว่าในลำไส้ ซึ่งโดยทั่วไปเซลล์เมือกในต่อมทิวบูลาร์และเซลล์หลังเมือกของต่อมสร้างน้ำย่อย จะทำหน้าที่ป้องกันผนังชั้นในสุดจากความเป็นกรดแก่ของกระเพาะอาหาร (Morrison and Wright Jr., 1999) และในลำไส้มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารหลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน ไลเปส และอะไมเลส (Thongprajukaew and Kovitvadh, 2013) ที่ช่วยส่งเสริมการย่อยสลายให้เร็วขึ้น ในขณะที่กระเพาะอาหารมีเพียงเอนไซม์เปปซินเป็นหลักเท่านั้น รวมทั้งในกระเพาะอาหารและลำไส้มีจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus*, *Clostridium*) ในปริมาณที่แตกต่างกัน (Gibson, 1998) นอกจากนี้ในลำไส้มีสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกลาง จึงทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตและเพิ่มขึ้นในปริมาณมาก (Macfarlane *et al.*, 1997) โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในกระเพาะอาหารส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนในการเติบโต มีประมาณ 10–100 โคโลนีต่อกรัม (Naidu *et al.*, 1999) ในขณะที่แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้เล็กมีทั้งที่ต้องการและไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต มีประมาณ 100–1,000 โคโลนีต่อกรัม โดยแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนได้พลังงานมาจากการหมัก (Macfarlane and McBain, 1999) สารอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และกรดอะมิโนที่เหลือจากการย่อย (Madigan and Martinko, 2005)

## 5. การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของคาเทปซิน บี เอช และแอล ในกล้ามเนื้อขาหลังการตาย

เอนไซม์คาเทปซินบี ดี เอช และแอล เป็นเอนไซม์ที่พบในไลโซโซมเป็นส่วนใหญ่ การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าคาเทปซินดี มีบทบาทน้อยในการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อ เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวสามารถย่อยสลายไมโอไฟบริลได้ดีในช่วงพีเอช 3 และ 5 (Makinodan *et al.*, 1982; Jiang, 2000) หลังการตายค่าพีเอชของกล้ามเนื้อจะลดลง ทำให้ค่าความแรงไอออนเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เอนไซม์คาเทปซินจากไลโซโซมถูกปล่อยไปยังไซโทพลาสซึม และช่องว่างระหว่างเซลล์ (Yates *et al.*, 1983) การศึกษาของ Aoki *et al.* (2000) และ Chéret *et al.* (2007) พบว่าเอนไซม์คาเทปซินบี และแอล มีความสำคัญในการย่อยสลายกล้ามเนื้อขาหลังการตาย เนื่องจากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างโปรตีนหลักของกล้ามเนื้อ ได้แก่ คอนเนคทีน เนบูลิน และไมโอซิน และย่อยคอนเนคทีน เนบูลิน ไมโอซิน คอลลาเจน แอลฟา-แอคทีนิน และโทรโปนิน T และ I ตามลำดับ (Yamashita and Konagaya, 1991) เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานใกล้เคียงกับค่าพีเอชกล้ามเนื้อภายหลังการตาย (Sainclivier, 1983) ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์คาเทปซินบี และแอล เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสามารถย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อได้เร็วกว่าคาเทปซินเอช เช่นเดียวกับการศึกษาในปลากะพงขาวและเนื้อวัว (Chéret *et al.*, 2007) การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าคาเทปซินเอช มีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อหลังการตายของปลาค่อนข้างน้อย (Wang and Xiong, 1999) และยังไม่มียงานวิจัยที่อธิบายบทบาทของคาเทปซินเอชที่ลดลงในช่วงเวลา 8 ชั่วโมงหลังการตาย การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเกิดจากค่าพีเอชลดลงจาก 7.0 เป็น 6.5 ในช่วงเวลาการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ และในเวลาต่อมาค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจนใกล้เคียง 7 (Sainclivier, 1983) ระดับพีเอชดังกล่าวอาจส่งผลต่อการแตกตัวของโซ่ข้างกรดอะมิโนในบริเวณเร่งของเอนไซม์ทำให้กิจกรรมมีการเปลี่ยนแปลง

กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์คาเทปซินบี เอช และแอลเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังการตายเช่นเดียวกับการศึกษาในระบบย่อยอาหาร เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกันแสดงให้เห็นว่าคาเทปซินทั้ง 3 ชนิดที่ศึกษาทำหน้าที่ร่วมกันในการย่อยสลายโปรตีนของกล้ามเนื้อ จากการเปรียบเทียบกับสัตว์บกพบว่าคาเทปซินย่อยสลายกล้ามเนื้อปลาได้เร็วกว่ากล้ามเนื้อวัว (Chéret *et al.*, 2007) ซึ่งอาจเป็นเพราะกล้ามเนื้อปลามีความซับซ้อนน้อยกว่าเมื่อเทียบกับกล้ามเนื้อวัว รวมทั้งการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการทดลองโดยลอยซากปลาในน้ำ ทำให้โปรตีนถูกย่อยสลายได้เร็วขึ้น การศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตอาจจะช่วยให้เข้าใจบทบาทของเอนไซม์เหล่านี้มากขึ้น

## บทที่ 5

### บทสรุปและข้อเสนอแนะ

#### บทสรุป

ระยะเวลาภายหลังการตายส่งผลต่อการทำงานของระบบย่อยอาหารและเอนไซม์ในกล้ามเนื้อขาของปลาไน การตรวจสอบดัชนีของทางเดินอาหาร ความเข้มข้นของโปรตีนกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหาร และการต้านออกซิเดชันในกระเพาะอาหารและลำไส้ รวมทั้งกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์คาเทปซินในกล้ามเนื้อขา พบว่าตัวแปรดังกล่าวทั้งหมดมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญตามระยะเวลาหลังการตายสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหารและลำไส้ที่เสื่อมสภาพลง ซึ่งจากการวิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีน ลักษณะทางจุลกายวิภาคและการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารพบว่าการเปลี่ยนแปลงในลำไส้เกิดขึ้นเร็วกว่าในกระเพาะอาหาร รวมทั้งเอนไซม์ย่อยไขมันมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงหลังการตายมากกว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต สำหรับการศึกษานี้พบว่าการตายของปลาไนพบที่เอนไซม์คาเทปซินบี และแอลมีกิจกรรมจำเพาะสูงกว่าคาเทปซินเอช และยังไม่มีการวิจัยที่อธิบายบทบาทของคาเทปซินเอช รวมทั้งโคโมทรูปซินในช่วงเวลา 8 ชั่วโมง หลังการตาย การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้การเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารของซากปลาที่ลอยอยู่ในน้ำประกอบกับข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ในกล้ามเนื้อประมาณช่วงเวลาหลังการตายของสัตว์น้ำได้ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวอาจเป็นประโยชน์ในการใช้สืบสวนและสอบสวนคดีความที่เกี่ยวข้องกับการตายของสัตว์น้ำในฟาร์มเลี้ยง การตายจากการถูกทารุณกรรม หรือใช้ประมาณช่วงเวลาหลังการตายในการขนส่งสัตว์น้ำที่สำคัญทางเศรษฐกิจทั้งสัตว์น้ำที่ใช้บริโภคเป็นอาหารและสัตว์น้ำสวยงาม ในกรณีที่มีการทำประกันภัยความเสียหายระหว่างการขนส่ง เป็นต้น

#### ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษานี้เป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการเบื้องต้น ยังไม่สามารถนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้โดยตรง ควรทำการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวแปรที่จำเพาะต่อการเกิดมลพิษทางน้ำเพิ่มเติม เพื่อประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ เช่น อุณหภูมิของน้ำ ชนิดของมลสาร และค่าพีเอช เป็นต้น หรือทดสอบเกี่ยวกับสถานการณ์ที่เป็นการทารุณกรรมสัตว์น้ำ เช่น การอดอาหาร การปล่อยสารที่เป็นพิษลงในฟาร์มเลี้ยง หรือตัดกระแสไฟฟ้า



ทำให้สัตว์น้ำขาดออกซิเจน เป็นต้น นอกจากนี้ปลาต่างชนิดกันอาจมีกลไกการทำงานของร่างกายที่แตกต่างกัน จึงควรดำเนินการทดสอบในปลาชนิดอื่นๆ ด้วย ซึ่งสถานการณ์ดังกล่าวอาจสามารถนำมาใช้ในการพิจารณาของศาลได้

2. ควรศึกษาบทบาทของเอนไซม์โคโมทรูปซินและเอนไซม์คาเทปซินเอสเพิ่มเติม เพื่อให้เข้าใจถึงบทบาทการทำงานหลังการตายมากยิ่งขึ้น

3. ควรศึกษารูปแบบของโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในทางชีวเคมีในแต่ละช่วงเวลาหลังการตาย

4. การศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหารและลำไส้ ควรทำซ้ำเพิ่มเติม และตรวจวัดข้อมูลทางมอร์โฟเมตริก (morphometric) เพื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้างสมการถดถอยสำหรับพยากรณ์ระยะเวลาหลังการตาย

## บรรณานุกรม

- กลุ่มวิจัยอาหารสัตว์น้ำ. 2534. อาหารสัตว์น้ำ. กองส่งเสริมการประมง กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- การุณ ทองประจุแก้ว และอุทัยวรรณ โกวิทวาท. 2555. เอนไซม์ย่อยอาหารกับการพัฒนาอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ 22: 709–720.
- จันทกานต์ นุชสุข. 2550. การพัฒนาสูตรอาหารโดยใช้เทคโนโลยีทางเอนไซม์ย่อยอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงปลาสร้อย *Helicophagus leptorhynchus* Ng & Kottelat, 2000. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 146 หน้า.
- ตุลาคุณ นนทพุทท การุณ ทองประจุแก้ว สมรภัทร์ รอดเจริญ และวราภรณ์ ห่าหอ. 2558. การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อภายหลังการตายของปลานิล (*Oreochromis niloticus*). ประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 25. มหาวิทยาลัยทักษิณ, สงขลา.
- เนตรนรินทร์ ขุนสูงเนิน. 2546. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้การปรับเปลี่ยนบรรยากาศ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 116 หน้า.
- พัชรา นิธิโรจน์ภักดี. 2549. ชนิดอาหารในทางเดินอาหารของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และปลาท้องถิ่นบางชนิดที่พบในอ่างเก็บน้ำบางพระจังหวัดชลบุรี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. 68 หน้า.
- ไมตรี สุทธจิตต์ รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย วีรพล คู่คงวิริยพันธ์ ศิริธร ศิริอมรพรรณ ชัยวัฒน์ ไชยสุต สุกพัตรา ประสุพัฒนา อุไรวรรณ พานิช ชลธิดา เทพหินลับ และศุภชัย เจริญสิน. 2555. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: นวัตกรรมสุขภาพ. เชียงใหม่
- วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. อาหารปลา. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2542. โภชนศาสตร์สัตว์น้ำและการให้อาหารสัตว์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดปราจีนบุรี. 2554. อาหารสัตว์น้ำ. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, ปราจีนบุรี.

- สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. 2536. การพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลานิล. กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- สงศรี มหาสวัสดิ์ และรุ่งกานต์ กล้าหาญ. 2546. สรีรวิทยาของปลาในลุ่มน้ำเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 447 หน้า.
- สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด. 2551. การจัดทำองค์ความรู้ (Knowledge Management) เรื่องการเพาะเลี้ยงและอนุบาลปลานิล. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- อุดม เรืองนพคุณ. 2549. การเพาะพันธุ์และเลี้ยงปลานิล. กรุงเทพฯ: เกษตรสยามบุ๊คส์.
- Ahmed, Z., Donkor, O., Street, W. A., Vasiljevic, T. 2015. Calpains and cathepsins-induced myofibrillar changes in post-mortem fish: Impact on structural softening and release of bioactive peptides. *Food Sci. Technol.* 45: 130–146.
- Aoki, T., Yokono, M., Ueno, R. 2002. A cathepsin B-like enzyme from mackerel white muscle is a precursor of cathepsin B. *Comp. Biochem. Physiol.* 133(B): 307–316.
- Aoki, T., Yokono, M., Yamashita, T., Ueno, R. 2000. Distribution of cathepsin in red and white muscle among fish species. *Fish. Sci.* 66: 776–782.
- Aranishi, F., Hara, K., Osatomi, K., Ishihara, T. 1997. Cathepsins B, H and L in peritoneal macrophages and hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Physiol.* 117(B): 605–611.
- Areekijseeree, M., Engkagul, A., Kovitvadhi, S., Kovitvadhi, U., Thongpan, A., 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, 1900. *Invert. Reprod. Develop.* 49: 255–262.
- Areekijseeree, 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.

- Bahuaud, D., Mørkøre, T., Langsrud, Ø., Sinnes, K., Veiseth, E., Ofstad, R., Thomassen, M. S. 2008. Effects of -1.5 °C Super-chilling on quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) *pre-rigor* fillets: cathepsin activity, muscle histology, texture and liquid leakage. *Food Chem.* 111: 329–339.
- Beltagy, A. E., Adawy, T. A., Rahma, E. H., Bedawey, A. A. 2004. Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). *Food Chem.* 86: 33–39.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70–76.
- Bezerra, R. S., Lins, E. J. E., Alencar, R. B., Paiva, P. M. G., Chaves, M. E. C., Coelho, C. B. B., Carvalho, Jr, L. B. 2005. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Proc. Biochem.* 40: 1829–1834.
- Bhuje, R. C. 2000. A review of strategies for the management of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish in seed production systems, especially hapabased systems. *Aquaculture* 181: 37–59.
- Caballero, M. J., Betancor, M., Escrig, J. C., Montero, D., Espinosa de los Monteros, A., Castro, P., Ginés, R., Izquierdo, M. 2009. Post mortem changes produced in the muscle of sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture* 291: 210–216.
- Campobasso, C. A., Vella, G. A., Introna, F. 2001. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Sci. Int.* 120: 18–27.
- Cao, M. J., Hara, K., Weng, L., Zhang, N., Su, W. J. 2005. Further characterization of a sarcoplasmic serine proteinase from skeletal muscle of white croaker (*Argyrosomus argentatus*). *Biochem.* 70: 1163–1166.
- Castillo-Yanez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., Garcia-Carreno, F. L., Toro, M. A. N. 2004. Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chem.* 85: 343–350.

- Castillo-Yanez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., Garcia-Carreno, F. L., Toro, M. A. N. 2006. Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*). Food Chem. 99: 252–259.
- Che, R., Wang, R., Xu., T. 2014. Comparative genomic of the teleost cathepsin B and H and involvement in bacterial induced immunity of miiuy croaker. Fish Shellfish Immunol. 41: 163–171.
- Chen, B. N., Qin, J. G., Kumar, M. S., Hutchinson, W. G., Clarke, S. M. 2006. Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) larvae. Aquaculture 260: 264–271.
- Chéret, R., Delbarre-Ladrat, C., Lamballerie-Anton, M., Verrez-Bagnis, V. 2007. Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. Food Chem. 115: 1228–1233.
- Chervinski, J. 1982. Environmental physiology of tilapias. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila. 128 pp.
- Choi, Y. J., Heu, M. S., Kim, H. R., Pyeun, J. H. 2004. Properties of proteases Responsible for degradation of muscle proteins during anchovy sauce fermentation. Dev. Food Sci. 42: 425–439.
- Chong, A. S. C., Hashim, R., Chow-Yang, L., Ali, A. B. 2002. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). Aquaculture 203: 321–333.
- Costa, R. S., Henry, F. C., Ferreira, K. S., do Valle, F. R. A. F., Quirino, C. R. 2012. Characterization of *rigor mortis* of *longissimus dorsi* and *triceps brachii* muscles of male cattle carcasses. J. Biotechnol. 11: 8127–8132.
- Delbarre-Ladrat, C., Chéret, R., Taylor, R., Verrez-Bagnis, V. 2006. Trends in postmortem aging in fish: Understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. Food Sci. Nutr. 46: 409–421.
- Dunn, B. M. 2001. Overview of pepsin-like aspartic peptidases, Curr. Protoc. Protein Sci. doi:10.1002/0471140864.ps2103s25.2001

- Egberts, F., Heinrich, M., Jensen, J. M., Morbach, S. W., Pfeiffer, S., Wickel, M., Schunck, M., Steude, J., Saftig, P., Proksch, E., Schütz, S. 2004. Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation. *Cell Sci.* 117: 2295–2307.
- Erlandsson, M., Munro, R. 2007. Estimation of the post-mortem interval in beagle dogs. *Sci. Justice* 47: 150–154.
- Espósito, T. S., Amaral, I. P. G., Buarque, D. S., Oliveira, G. B., Carvalho, L. B., Bezerra, R. S. 2009. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chem.* 112: 125–130.
- Fernández, I., Moyano, F. J., Diaz, M., Martinez, T. 2001. Characterization of  $\alpha$ -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 262: 1–12.
- Fidalgo, L. G., Saraiva, J. A., Aubourg, S. P., Vázquez, M., Torres, J. A. 2014. High pressure effects on the activities of cathepsins B and D of mackerel and horse mackerel muscle. *Czech J. Food Sci.* 32: 188–193.
- Fineman-Kalio, A. S. 1988. Preliminary observations on the effect of salinity on the reproduction and growth of freshwater Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) cultured in brackish water ponds. *Aquac. Fish Manag.* 19: 313–320.
- Gargiulo, A. M., Ceccarelli, P., Pedini, V. 1998. Histology and ultrastructure of the gut of the tilapia (*Tilapia* spp.), a hybrid teleost. *Anat. Histol.* 27: 89–94.
- Getinet, G. T., Amrit, N. B. 2007. Effects of feeding, 344 stocking density and water-flow rate on fecundity, spawning frequency and egg quality of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), *Aquaculture* 272: 380–388.
- Gibson, G. R. 1998. Dietary modulation of the human gut microflora using probiotics. *Br. J. Nutr.* 80, S209.
- Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., Hanahan, D., Joyce, J. A. 2006. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev.* 20: 543–556.

- Hall, P. A., Coates, P. J., Ansari, B., Hopwood, D. 1994. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *Cell Sci.* 107: 3569-3577.
- Hlophe, S. N., Moyo, N. A. G., 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 gariepinus* (Burchell, 1822). *J. Appl. Ichthyol.* 30: 35–41.
- Ho, M.L., Chen, G. H., Jiang, S. T. 2000. Effect of mackerel cathepsinsL and L like, and calpain on the degradation of mackerel surimi. *Fish. Sci.* 66: 558–568.
- Hu, Y., Morioka, K., Itoh, Y. 2008. Actomyosin nonbinding cathepsin L in walleye pollock surimi. *Food Biochem.* 32: 143–152.
- Hu, Y., Morioka, K., Itoh, Y. 2010. Participation of cysteine protease cathepsinL in the gel disintegration of red bulleye (*Priacanthus macracanthus*) surimi gel paste. *J. Sci. Food Agric.* 90: 370–375.
- Ishida, M., Sugiyama, N., Sato, M., Nagayama, F. 1995. Two kinds of neutral serine proteinases in salted muscle of anchovy, *Engraulis japonica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 1107–1112.
- Jiang, S. T. 2000. Effect of proteinases on the meat texture and seafood quality. *J. Agric. Food Chem.* 2: 55–74.
- Katz, L. 2008. Involvement of chymotrypsin-like serine proteases in cell death processes. Doctor of Philosophy. Faculty of Health Science. Ben-Gurion University. 104 pp.
- Kirschke, H., Langer, J., Wiederanders, B., Ansorge, S., Bohley, P., Hanson, H. 1977. Cathepsin H: an endoaminopeptidase from rat liver lysosomes. *Acta Biologica et Medica Germanica* 36: 185–199.
- Kim, Y. S., Park, J. W., Choi, Y. J. 2003. New approaches for the effective recovery of fish proteins and their physicochemical characteristics. *Fish. Sci.* 69: 1231–1239.

- Klahan, R., Areechon, N., Yoonpundh, R., Engkagul, A. 2009. Characterization and activity of digestive enzymes in different sizes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Kasetsart J. (Nat. Sci.). 43: 143–153.
- Klomklao, S., Kishimura, H., Yabe, M., Benjakul, S. 2007. Purification and Characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). Comp. Biochem. Physiol. 147(B): 682–689.
- Laczniak, A. N., Sato, T., Nashelsky, M. 2011. Postmortem gastric perforation (gastromalacia) mimicking abusive injury in sudden unexplained infant death. Pediatr. Radiol. 41: 1595–1597.
- Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J., Fleurence, J. 2003. *In vitro* proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of cathepsins B, D and L. Food Chem. 81: 517–525.
- Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Aydi, M., Toldrá, F., Aristoy, M.C., Barkia, A., Nasri, M. 2015. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. J. Proteomics. 128: 458–468.
- Li, X., Elwell, M. R., Ryan, A. M., Ochoa, R. 2003. Morphogenesis of postmortem hepatocyte vacuolation and liver weight increases in Sprague-Dawley rats, Toxicol. Pathol. 31: 682–688.
- Liu, H., Yin, L., Zhang, N., Li, S., Ma, C. 2008. Isolation of cathepsin B from the muscle of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and comparison of cathepsins B and L actions on surimi gel softening. Food Chem. 110: 310–318.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Biol. Chem. 193: 265–275.
- Macfarlane, G. T., McBain, A. J. 1999. The human colonic microbiota. In Colonic microbiota nutrition and health. Gibson, GR., Roberfroid, M. Eds, Kluwer academic publishers, London, 1–26 pp.



- Macfarlane, S., McBain, A. J., Macfarlane, G. T. 1997. Consequences of biofilm and sessile growth in the large intestine. *Adv. Dent. Res.* 11: 59–68.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. 2005. Microbial interactions with humans. In Brock biology of microorganisms. Pearson Prentice Hall. New Jersey, USA. 700–725 pp.
- Makinodan, Y., Akasaka, T., Toyohara, H., Ikeda, S. 1982. Purification and properties of carp muscle cathepsin D. *J. Food Sci.* 47: 647–652.
- Morrison, C. M., Wright Jr, J. R. 1999. A study of the histology of the digestive tract of the Nile tilapia. *J. Fish Biol.* 54: 597–606.
- Murn, J., Urleb, U., Mlinaric-Rascan, I. 2004. Internucleosomal DNA cleavage in apoptotic WEHI 231 cells is mediated by a chymotrypsin-like protease, *Genes to Cells* 9: 1103–1111.
- Myburgh, J., L'Abbé, E. N., Steyn, M., Becker, P. J. 2013. Estimating the postmortem interval (PMI) using accumulated degree-days (ADD) in a temperate region of South Africa. *J. Forensic Sci.* 229: 165.e1–165.e6
- Naidu, A. S., Bidlack, W. R., Clemens, R. A. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38: 13–126.
- Natalia, Y., Hashim, R., Ali, A., Chong, A. 2004. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture* 233: 305–320.
- Niederegger, S., Schermer, J., Höfig, J., Mall, G. 2015. Case report: Time of death estimation of a buried body by modeling a decomposition matrix for a pig carcass. *J. Leg. Med.* 17: 34–38
- O'Donnell, C. J., Baker, M. A. 2010. Postmortem CT findings of “gastromalacia”: a trap for the radiologist with forensic interest. *Forensic Sci. Med. Pathol.* 6: 293–297.
- Parra, A. M., Rosas, A., Lazo, J. P., Viana, M. T. 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiol. Biochem.* 33: 223–231.

- Pasnik, D., Evans, J., Klesius, P. 2006. Passive immunization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) provides significant protection against *Streptococcus agalactiae*. Fish Shell. Immunol. 21: 365–371.
- Pearce, K. L., Rosenvold, K., Andersen, H. J., Hopkins, D. L. 2011. Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes—A review. Meat Sci. 89: 111–124.
- Peña-Mendoza, B., Gómez-Márquez, J. L., Salgado-Ugarte, I. H., Ramírez-Noguera, D. 2005. Reproductive biology of *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae) at Emiliano Zapata dam, Morelos, Mexico. Rev. Biol. Trop. 53: 3–4.
- Penny, I. F. 1969. Protein denaturation and water-holding capacity in pork muscle. Food Sci. Tech. Int. 4: 269–273.
- Porter, R., Koury, B., Stone, F. 1995. Comparison of cathepsin B, D, H and L activity in four species of Pacific fish. Food Biochem. 19: 429–442.
- Querido, D. 1992. Postmortem changes in electrical resistance of the gastric wall during the early postmortem period in rats. Forensic Sci. Int. 53: 81–92.
- 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., Moss, R., Andresen, L. H., Berg, A., Waagbø, 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., Rustad, A., Sunde, J., Eiane, S. A., Jensen, H. B., Opstvedt, J., Nygard, E., Samuelsen, T. A., Mundheim, H., Luzzana, U., Venturini, G. 2002. *In vitro* digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. J. Sci. Food Agric. 82: 644–654.
- Sainclivier, M. 1983. L'industrie halieutique—Chapitre 1: Le poisson matie`re premie`re. Sciences agronomiques-Rennes-Bulletin Scientifique et technique de l'ENSA et du CRR.

- Shahidi, F., Kamil, Y. V. A. J. 2001. Enzyme from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry—a review. *Food Sci. Technol.* 12: 435–464.
- Sheng, L., Lin, L., Ting, W. 2006. Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*). *Fish Physiol. Biochem.* 32: 295–303.
- Sherekar, S. V., Gore, M. S., Ninjoor, V. 1988. Purification and characterization of cathepsin B from the skeletal muscle of fresh water fish, *Tilapia mossambica*. *Food Sci.* 53: 1018–1023
- Simpson, B. K. 2000. Digestive proteases from marine animals. In Haard, N. F., Simpson, B. K. Eds, Marcel Dekker, New York. 191–213 pp.
- Siringan, P., Raksakulthai, N., Yongsawatdigul, J. 2006. Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *Food Chem.* 98: 678–684.
- Scocco, P., Menghi, G., Ceccarelli, P. 1997. Histochemical differentiation of glycoconjugates occurring in the tilapine intestine. *Fish Biol.* 51: 848–857.
- Supannapong, P., Pimsalee, T., A-komol, T., Engkakul, A., Kovitvadhi, S., Kovitvadhi, U., 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.
- Takahashi, T., Dehdarani, H., Tang, J. 1988. Porcine spleen cathepsin H hydrolyzes oligopeptides solely by aminopeptidase activity. *Biol. Chem.* 263: 10952-10957.
- Tengjaroenkul, B., Smith, B. J., Caceci, T., 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, U. 2013. Effects of sex on characteristics and expression levels of digestive enzymes in the adult guppy *Poecilia reticulata*, *Zool. Stud.* 52: 1–8.

- 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). Kasetsart J. (Nat. Sci.). 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). Kasetsart J. (Nat. Sci.). 44: 210–219.
- 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.
- Unajak, S., Meesawat, P., Paemanee, A., Areechon, N., Engkagul, A., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Rungruangsak-Torrissen, K., Choowongkamon, K. 2012. Characterisation of thermostable trypsin and determination of trypsin isozymes from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Food Chem. 134: 1533–1541.
- Usui, A. Kawasumi, Y., Hosokai, Y., Hayashizaki, Y., Saito, H., Funayama, M. 2013. Postmortem radiography of gastromalacia: case reports. Japanese J. Radiol. 31: 637–641.
- Vass, A. A. 2001. Beyond the grave—understanding human decomposition. Microbiol. Today 28: 190–193.
- Verrez-Bagnis, V., Ladrat, C., Noel, J., Fleurence, J. 2002. *In vitro* proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of European sea bass (*Dicentrarchus Labrax* L) by an endogenous m-calpain. J. Sci. Food Agric. 82: 1256–1262.
- Verrez-Bagnis, V., Noel, J., Sautereau, C., Fleurence, J. 1999. Desmin degradation in postmortem fish muscle. Food Sci. 64: 240–242.

- Vissesanguan, W., Benjakul, S., An, H. 2003. Purification and characterization of cathepsin L in arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Comp. Biochem. Physiol.* 134(B): 477–487.
- Wang, B., Xiong, Y. L. 1999. Characterization of the proteases involved in gel weakening of beef heart surimi. *J. Agric. Food Chem.* 47: 887–892.
- Wang, P. A., Stenvik, J., Larsen, R., Maehre, H., Olsen, R. L. 2007. Cathepsin D from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) liver. Isolation and comparative studies. *Comp. Biochem. Physiol.* 147(B): 504–511.
- Wang, Q., Gao, Z., Zhang, N., Shi, Y., Xie, X., Chen, Q. 2010. Purification and characterization of trypsin from the intestine of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *J. Agric. Food Chem.* 58: 655–659.
- Winkler, U. K., Stuckmann, M. 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 138: 663–670.
- Wong, S. P., Leong, L. P., Koh, J. H. W. 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem.* 99: 775–783.
- Wu, F. Y., Dutson, T. F., Valin, C., Cross, H. R., Smith, S. B. 1985. Aging index, lysosomal enzyme activities and meat tenderness in muscles from electrically stimulated bull and steer carcasses. *Food Sci.* 50: 1025–1028.
- Yamashita, M., Konagaya, S. 1991. Hydrolytic action of salmon cathepsins B and L to muscle structural proteins in respect of muscle softening. *Nippon Suisan Gakk.* 57: 1917–1922.
- Yates, L. D., Dutson, T. R., Caldwell, J., Carpenter, Z. L. 1983. Effect of temperature and pH on the post-mortem degradation of myofibrillar proteins. *Meat Sci.* 9: 157–179.
- Zhu, H. P., Huang, Z. H., Lu, M. X., Gao, F. Y., Yang, L. P. 2009. Large size tilapia aquaculture technique. *Agric. Sci.* 16: 107–109.

ภาคผนวก

ก ผลงานวิจัยที่นำเสนอแบบบรรยายในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ

การเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารภายหลังการตายของปลานิล *Oreochromis niloticus*  
Postmortem Changes of Digestive System in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*

วารภรณ์ ห่าหอ<sup>1\*</sup> การุณ ทองประจุแก้ว<sup>1</sup> สมรักษ์ รอดเจริญ<sup>2</sup> และตุลาคุณ นนทพุท<sup>1</sup>

Waraporn Hahor<sup>1\*</sup> Karun Thongprajukaew<sup>1</sup> Somrak Rodjaroen<sup>2</sup> and Tulakhun Nonthaput<sup>1</sup>

บทคัดย่อ

ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารของปลานิล *Oreochromis niloticus* ภายหลังการตายในช่วงเวลา 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าดัชนีของกระเพาะอาหารต่อน้ำหนักตัวมีค่าลดลงตามระยะเวลา ( $P < 0.05$ ) และมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเปปซิน ( $r = 0.927, P < 0.01, n = 32$ ) สำหรับการศึกษาน้ำลำไส้พบว่ามีค่าลดลงตามระยะเวลาเช่นเดียวกัน ( $P < 0.05$ ) และมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของทริปซิน ( $r = 0.790, P < 0.01, n = 32$ ) โดยการเปลี่ยนแปลงในลำไส้จะเกิดขึ้นเร็วกว่าในกระเพาะอาหาร และไม่สามารถตรวจสอบกิจกรรมได้ภายหลังการตาย 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารอาจสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจำแนกระยะเวลาภายหลังการตายของสัตว์น้ำได้

ABSTRACT

Postmortem intervals (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h) of digestive system were investigated in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Stomasomatic index decreased with postmortem interval ( $P < 0.05$ ) and had positive relationship with change of pepsin activity ( $r = 0.927, P < 0.01, n = 32$ ). Intestinosomatic index was also decreased ( $P < 0.05$ ) and had positive relationship with trypsin activity ( $r = 0.790, P < 0.01, n = 32$ ). More rapid postmortem changes were observed in the intestine than in the stomach, as indicated by the absence of trypsin activity after 48 h postmortem time. These findings suggest that postmortem changes of digestive system can be used as a primary data for identification of postmortem interval in aquatic animals.

Key Words: intestine, Nile tilapia, pepsin, postmortem, stomach, trypsin

\* Corresponding Author; e-mail address: tarn.something@gmail.com

<sup>1</sup> ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ.สงขลา 90112

<sup>2</sup> สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย จ.ตรัง 92150

<sup>1</sup> Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya 92150



## คำนำ

ภายหลังการตายของสัตว์จะเกิดการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของเซลล์และเนื้อเยื่อ เนื่องจากกระบวนการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในเซลล์ รวมทั้งการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่มีอยู่ การเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายจะทำให้ผนังกระเพาะอาหารมีลักษณะยุ่ยและบาง หรือทะลุเป็นรู และผนังลำไส้มีการลอกหลุดของเยื่อเมือก ทำให้น้ำย่อยจากตับอ่อนออกมาย่อยไขมันบริเวณด้านนอกและในช่องท้อง นอกจากนี้ การเน่าในกระเพาะอาหารและลำไส้จะทำให้มีก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์สะสมในปริมาณมาก เกิดแรงกดดันที่อวัยวะภายในช่องท้อง และอาจทำให้กระเพาะอาหารแตกได้ การเปลี่ยนแปลงของกระเพาะอาหารที่สำคัญคือแกสโตรมาลาเซีย (gastromalacia) ซึ่งพบในกระเพาะอาหารส่วนบน (gastric fundus) ทำให้ผนังกระเพาะอาหารเหนียวลื่น บาง และเกิดรูพรุนเนื่องจากการย่อยของเอนไซม์ที่มีอยู่ (endogenous enzyme) (Laczniak *et al.*, 2011; Usui *et al.*, 2013) การประมาณช่วงเวลาภายหลังการตายในสุนัขปีเกิดพบว่าลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อลำไส้ มีการเสื่อมสภาพลงเมื่อเวลาผ่านไปหลังการตาย (Erlandsson and Munro, 2007) ขณะที่การศึกษาในหนูพบว่าความต้านทานไฟฟ้าของผนังกระเพาะอาหารมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการตาย (Querido, 1992)

การเปลี่ยนแปลงของกระเพาะอาหารและลำไส้ภายหลังการตายจะเน้นศึกษาในสัตว์บก เช่น หนู และสุนัข (Querido, 1992; Erlandsson and Munro, 2007) สำหรับในสัตว์น้ำส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นศึกษาภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่ำ เพื่อประโยชน์ในการยืดอายุการเก็บรักษา และคงสภาพผลิตภัณฑ์ในด้านอุตสาหกรรมอาหารเป็นหลัก (Aoki *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงหลังการตาย (postmortem change) ในสภาวะใกล้เคียงธรรมชาติของปลานิล *Oreochromis niloticus* จึงอาจใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจำแนกระยะเวลาภายหลังการตาย (postmortem interval) ของสัตว์น้ำได้ การศึกษาดังนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงดัชนีของกระเพาะอาหาร และลำไส้ และกิจกรรมของเอนไซม์ในอวัยวะดังกล่าวโดยใช้ปลานิลแปลงเพศเป็นต้นแบบในการศึกษา

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การเตรียมตัวอย่างปลานิล

ปรับสภาพปลานิลแปลงเพศ *O. niloticus* อายุ 4 เดือน เป็นเวลา 15 วัน โดยให้อาหารที่มีโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้งต่อวัน และให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน ปรับสภาพน้ำในบ่อให้มีอุณหภูมิ  $29.60 \pm 0.15$  องศาเซลเซียส พีเอช  $6.95 \pm 0.02$  ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ  $5.05 \pm 0.01$  มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณแอมโมเนีย  $0.94 \pm 0.15$  มิลลิกรัมต่อลิตร

### การเก็บตัวอย่างปลา

อดอาหารปลานิลแปลงเพศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนการเก็บตัวอย่าง หลังจากนั้นสุ่มปลาจำนวน 32 ตัว (8 ช่วงเวลา  $\times$  4 ซ้ำ) ที่มีความยาวและน้ำหนักใกล้เคียงกัน (น้ำหนัก  $105.83 \pm 1.66$  กรัม และความยาวตลอดลำตัว  $18.55 \pm 0.14$  เซนติเมตร) สลบบปลาโดยใช้น้ำแข็ง และนำมาลอยในภาชนะทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า ( $32 \times 43 \times 11$  เซนติเมตร) ที่มีระดับน้ำสูง 7 เซนติเมตร หลังจากนั้นผ่าตัดเก็บตัวอย่างกระเพาะอาหารและลำไส้ในเวลา 0,

1, 2, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการศึกษาดัชนีของน้ำหนักของอวัยวะ และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน

### การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เปปซินและทริปซิน

สกัดเอนไซม์จากกระเพาะอาหารและลำไส้ของปลานิลตามวิธีการของ Rungruangsak and Utne (1981) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เปปซิน (EC 3.4.23.1) จากกระเพาะอาหาร ตามวิธีการของ Rungruangsak and Utne (1981) โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน (EC 3.4.21.4) จากลำไส้เล็ก ตามวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2006) โดยใช้ Benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide เป็นสับสเตรท สำหรับปริมาณโปรตีนจากเอนไซม์สกัดศึกษาตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ( $n = 4$ ) รายงานผลข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error of mean: SEM) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบทางเดียว เปรียบเทียบข้อมูลโดยใช้ Duncan Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดย และหาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์กับดัชนีของกระเพาะอาหารหรือลำไส้ต่อน้ำหนักตัวโดยใช้ Pearson correlation และรายงานผลเป็นสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient:  $r$ )

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. การเปลี่ยนแปลงของกระเพาะอาหาร

ดัชนีของกระเพาะอาหารต่อน้ำหนักตัวมีค่าลดลงตามระยะเวลา (Figure 1,  $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสอดคล้องกับการเกิดแกสโตรมาลาเซีย ทำให้กระเพาะอาหารมีลักษณะเหี่ยวลี้น ผนังบาง และเกิดรูพรุนจากการย่อยของเอนไซม์ที่มีอยู่ในกระเพาะ (Laczniak *et al.*, 2011; Usui *et al.*, 2013) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้โปรตีนและโภชนาอื่น ๆ เกิดการสลายตัว และละลายในตัวกลางที่เป็นน้ำ ทำให้น้ำหนักของกระเพาะอาหารเมื่อเทียบกับน้ำหนักตัวมีแนวโน้มลดลง นอกจากนี้ ภายหลังจากตายยังมีการเปลี่ยนแปลงของความต้านทานไฟฟ้าของผนังกระเพาะอาหาร ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากช่องว่างระหว่างเซลล์ หรือการนำไฟฟ้าของของเหลวที่อยู่ภายในหรือภายนอกเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (Querido, 1992)

กิจกรรมของเอนไซม์เปปซิน (Figure 2) มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการเปลี่ยนแปลงของกระเพาะอาหาร ( $r = 0.927$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 32$ ) เนื่องจากการเกิดแกสโตรมาลาเซียทำให้เกิดออกโตไลซิส ซึ่งส่งผลให้ต่อมสร้างน้ำย่อยถูกทำลาย (Laczniak *et al.*, 2011) ประกอบกับระยะเวลาภายหลังการตายมีผลต่อการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้การย่อยโปรตีนมีแนวโน้มลดลง และสามารถจำแนกระยะเวลาหลังการตายตามการทำงาน (functionality) ของกระเพาะอาหารได้ 3 ช่วงเวลา คือ ช่วง 0–8 ชั่วโมง (กิจกรรมของเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ) ช่วง 8–24 ชั่วโมง (กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วและค่อนข้างคงที่) และ ช่วง 24–48 ชั่วโมง (กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วและมีค่าต่ำสุด)

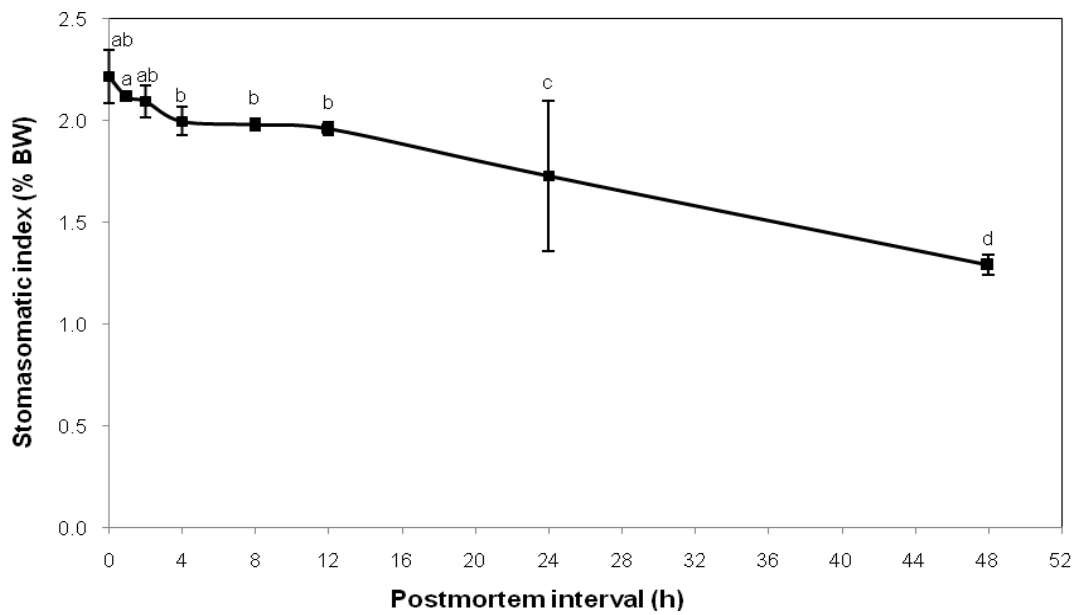


Figure 1 Postmortem changes (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h) of stomasomatic index in Nile tilapia. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Different superscripts indicate significant differences between postmortem intervals ( $P < 0.05$ ).

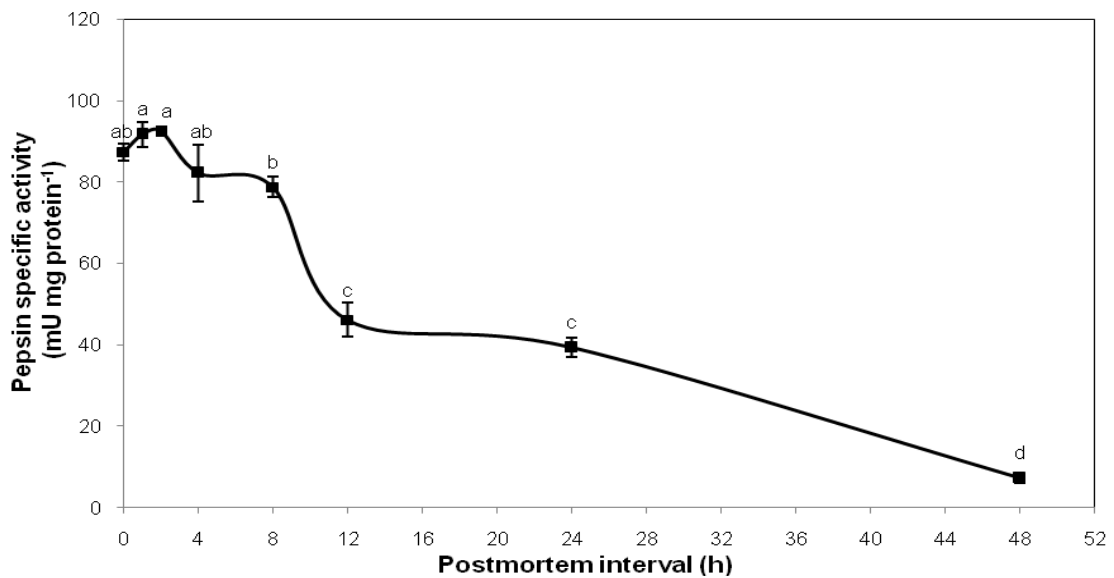


Figure 2 Postmortem changes (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h) of pepsin specific activity (mU mg protein<sup>-1</sup>) in Nile tilapia. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Different superscripts indicate significant differences between postmortem intervals ( $P < 0.05$ ).

## 2. การเปลี่ยนแปลงของลำไส้

ดัชนีของลำไส้ต่อน้ำหนักตัวมีค่าลดลงตามระยะเวลา (Figure 3,  $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ) การเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นเมื่อมีการสลายตัวของอาหารในลำไส้ รวมทั้งเอนไซม์ที่อยู่ในลำไส้จะย่อยสลายผนังให้ลอกหลุดออกจากเยื่อเมือก (เนตรนรินทร์, 2546) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นเช่นเดียวกับในกระเพาะอาหาร การศึกษาในสุนัขพบการเสื่อมสภาพของลำไส้ และอาจใช้การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเพื่อจำแนกระยะเวลาภายหลังการตายได้ (Erlandsson and Munro, 2007)

กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน (Figure 4) มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการเปลี่ยนแปลงของลำไส้ ( $r = 0.790$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 32$ ) เนื่องจากการเกิดออกโตไลซิสเช่นเดียวกัน (จิรวัดณ์ และสุวีลักษณ์, 2554) ระยะเวลาภายหลังการตายมีผลต่อการเสียดสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้การย่อยโปรตีนมีแนวโน้มลดลง โดยการเปลี่ยนแปลงในลำไส้มีแนวโน้มเกิดขึ้นเร็วกว่าในกระเพาะอาหาร เนื่องจากชั้นมิวคอสซา (mucosa) ของกระเพาะมีความหนากว่าผนังของลำไส้ รวมทั้งในลำไส้จะมีเอนไซม์ย่อยอาหารหลายชนิด (Thongprajukaew and Kovitvadh, 2013) ซึ่งสามารถส่งเสริมให้เกิดการย่อยสลายได้เร็วขึ้น (Morrison and Wright Jr, 1999) สอดคล้องกับการศึกษาของเนตรนรินทร์ (2546) ซึ่งพบว่าลำไส้เป็นอวัยวะส่วนที่เน่าเสียได้เร็วเช่นเดียวกับเหงือก ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงของดัชนีของลำไส้ต่อน้ำหนัก และกิจกรรมของทริปซินจึงอาจใช้เพื่อจำแนกระยะเวลาภายหลังการตายได้ เช่นเดียวกับการใช้ลักษณะทางจุลกายวิภาค (Erlandsson and Munro, 2007)

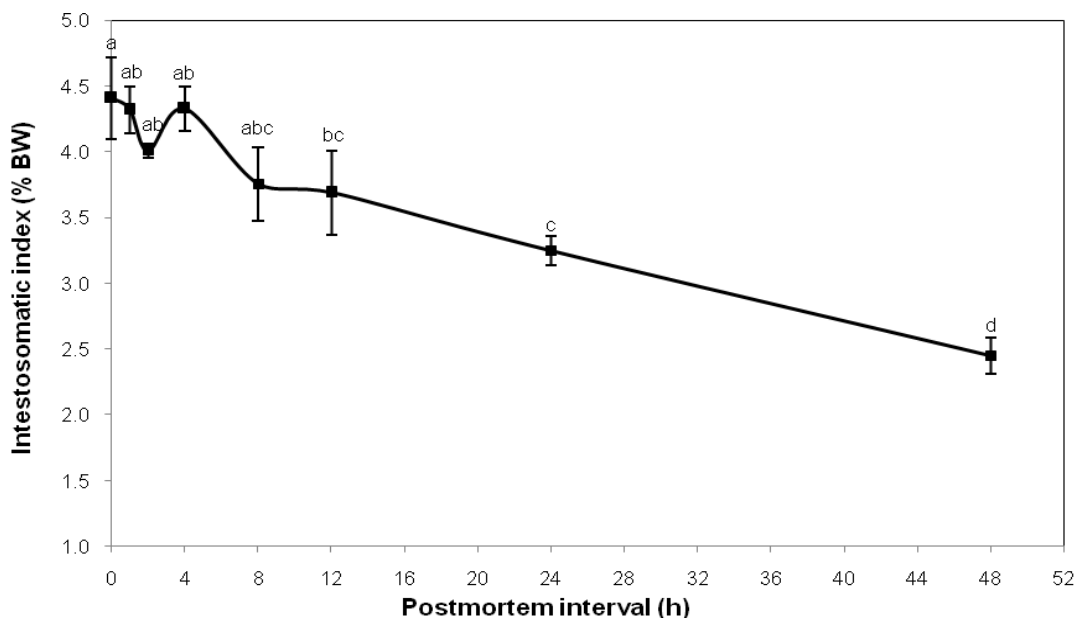


Figure 3 Postmortem changes (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h) of intestosomal index in Nile tilapia.

Data were expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Different superscripts indicate significant differences between postmortem intervals ( $P < 0.05$ ).

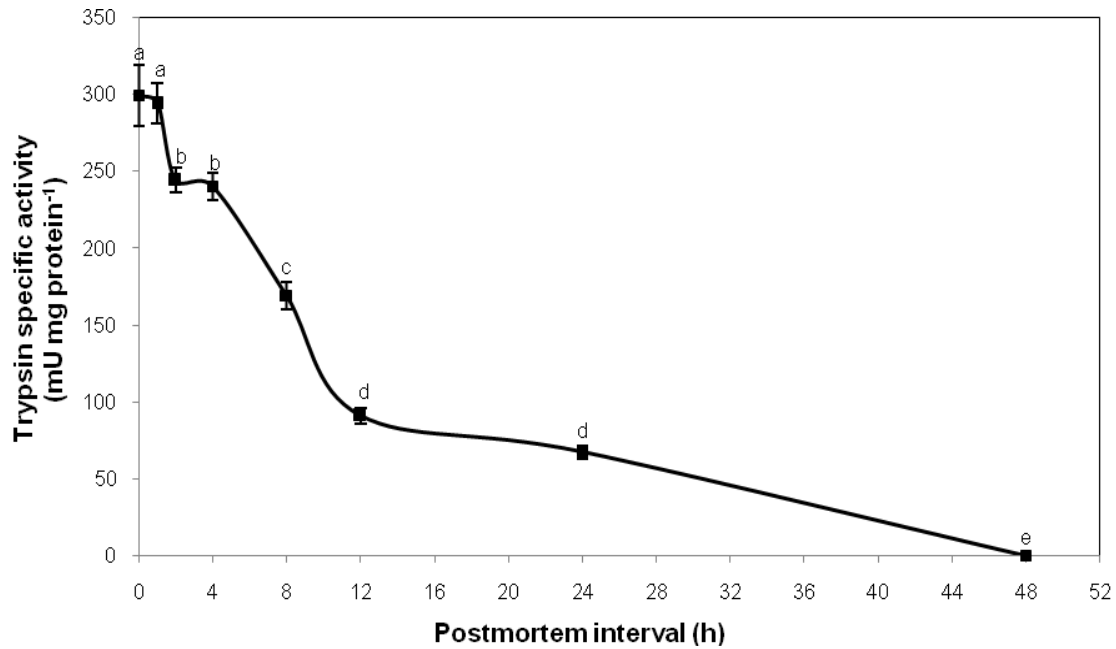


Figure 4 Postmortem changes (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h) of trypsin specific activity (mU mg protein<sup>-1</sup>) in Nile tilapia. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Different superscripts indicate significant differences between postmortem intervals ( $P < 0.05$ ).

### สรุป

ดัชนีของกระเพาะอาหารและลำไส้ต่อน้ำหนักตัวมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาภายหลังการตาย การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์เปปซินและทริปซิน ตามลำดับ โดยการเปลี่ยนแปลงในลำไส้จะเกิดขึ้นเร็วกว่าในกระเพาะอาหาร ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจำแนกระยะเวลาภายหลังการตายของสัตว์น้ำได้

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ (เลขที่สัญญา 1-2556-02-007) และทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (เลขที่สัญญา SCI 570522S) และขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

### เอกสารอ้างอิง

- จิรวัดณ์ ยงสวัสดิ์ดิกุล และสุวีร์ลักษณ์ รอดทอง. 2554. การใช้เอนไซม์จากปลาและกล้ามเนื้อแบคทีเรียในกระบวนการหมักน้ำปลา. รายงานการวิจัย, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- เนตรนรินทร์ ชุนสูงเนิน. 2546. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้การปรับเปลี่ยนบรรยากาศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- Aoki, T., M. Yokono and R. Ueno. 2002. A cathepsin B-like enzyme from mackerel white muscle is a precursor of cathepsin B. *Comparative Biochemistry and Physiology* 133(B): 307–316.
- Erlandsson, M. and R. Munro. 2007. Estimation of the post-mortem interval in beagle dogs. *Science and Justice* 47: 150–154.
- Lacznia, A. N., T. Sato and M. Nashelsky. 2011. Postmortem gastric perforation (gastromalacia) mimicking abusive injury in sudden unexplained infant death. *Pediatric Radiology* 41: 1595–1597.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biological Chemistry* 193: 265–275.
- Morrison, C. M. and J. R. Wright Jr. 1999. A study of the histology of the digestive tract of the Nile tilapia. *Journal of Fish Biology* 54: 597–606.
- Querido, D. 1992. Postmortem changes in electrical resistance of the gastric wall during the early postmortem period in rats. *Forensic Science International* 53: 81–92.
- Rungruangsak, K. and F. Utne. 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., R. Moss, L. H. Andresen, A. Berg and R. Waagbø. 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 32: 7–23.
- Thongprajukaew, K. and U. Kovitvadh. 2013. Effects of sex on characteristics and expression levels of digestive enzymes in the adult guppy *Poecilia reticulata*. *Zoological Studies* 52: 1–8.
- Usui, A., Y. Kawasumi, Y. Hosokai, Y. Hayashizaki, H. Saito and M. Funayama. 2013. Postmortem radiography of gastromalacia: case reports. *Japanese Journal of Radiology* 31: 637–641.
- Wang, P. A., J. Stenvik, R. Larsen, H. Maehre and R. L. Olsen. 2007. Cathepsin D from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) liver. Isolation and comparative studies. *Comparative Biochemistry and Physiology* 147(B): 504–511.

ข ต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ในวารสารเรื่องที่ 1

1 **Gastrointestinal Functionality Aquatic Animal (*Oreochromis***  
2 ***niloticus*) Carcass in Water Allows Estimating Time of Death\***

3

4

5

6 ***Waraporn Hahor*<sup>1</sup>, *M.S.*; *Karun Thongprajukaew*<sup>1</sup>, *Ph.D.*; *Krueawan***  
7 ***Yoonram*<sup>1</sup>, *Ph.D.*; and *Somrak Rodjaroen*<sup>2</sup>, *Ph.D.***

8

9

10

11 <sup>1</sup> Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University,  
12 Songkhla 90112, Thailand.

13 <sup>2</sup> Department of Bioscience, Faculty of Sciences and Fisheries Technology, Rajamangala  
14 University of Technology Srivijaya, Trang 92150, Thailand.

15

16

17

18

19 \* Funding provided by the budget revenue (Contract No. SCI570522S), Research Assistant  
20 Scholarship (Contract No. 1255602007) and Graduate School Research Support Funding for  
21 Thesis, at the Prince of Songkla University.



22 **ABSTRACT:** Postmortem changes have been previously studied in some terrestrial animal  
23 models but no prior information is available on aquatic species. Gastrointestinal functionality  
24 was investigated in terms of indices, protein concentration, digestive enzyme activity and  
25 scavenging activity, in an aquatic animal model, Nile tilapia, to assess the postmortem  
26 changes. Dead fish were floated indoors and samples were collected within 48 h after death.  
27 Stomasomatic index decreased with postmortem time and correlated positively with protein,  
28 pepsin specific activity and stomach scavenging activity. Also intestosomatic index decreased  
29 significantly and correlated positively with protein, specific activity of trypsin, chymotrypsin,  
30 amylase, lipase and intestinal scavenging activity. In their postmortem changes the digestive  
31 enzymes exhibited earlier lipid degradation than carbohydrate or protein. The intestine  
32 changed more rapidly than the stomach. The findings suggest that the postmortem changes of  
33 gastrointestinal functionality can serve as primary data for the estimation of time of death of  
34 an aquatic animal.

35 **KEYWORDS:** forensic science, forensic biology, postmortem change, digestive enzyme,  
36 aquatic animal, intestine, stomach

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46 Postmortem changes have been studied in many terrestrial animal models, such as rat  
47 (1, 2), dog (3), cattle cow (4) and pig (5). The changes are driven by endogenous enzymes and  
48 microorganisms within the body (6, 7). Various environmental factors, namely temperature,  
49 humidity, cooling rate, slaughter procedure, growth of microorganisms and ageing time, are  
50 generally known to affect the rate of postmortem changes (8, 9). Observations on postmortem  
51 changes have also been reported for aquatic animals. However, most such investigations have  
52 focused on low temperature conditions used to preserve catch (10–13). The understanding of  
53 postmortem changes in aquatic animals in their ambient aquatic environment is currently  
54 lacking, and needs to be improved.

55 Postmortem changes develop rapidly in the gastrointestinal tract due to the presence of  
56 endogenous enzymes (14–16). These enzymes contribute to the autolysis of digestive organs  
57 and also of the surrounding tissue. Querido (1) reported that the electrical resistance of gastric  
58 wall decreased with the time since death, and Erlandsson and Munro (3) reported on the  
59 degenerative changes of intestinal anatomy as time after death progresses. These prior  
60 observations provide some key characteristics of postmortem changes in the gastrointestinal  
61 tract, helpful in estimating the time of death.

62 The aim of this study was to evaluate postmortem changes in the gastrointestinal  
63 functionality in an aquatic animal model. The gastrointestinal index and the specific activities  
64 of the main digestive enzymes were assessed for postmortem effects. Nile tilapia  
65 (*Oreochromis niloticus*), which is among the most economically important fish in the world  
66 (17) was used as the aquatic model. This species has a well-known histology of its digestive  
67 tract (18), can grow and reproduce in a wide range of environmental conditions, and tolerates  
68 stress induced by handling (19). The application of two sensitive biochemical techniques,  
69 namely scavenging activity and reducing power assay, was also examined for assessing  
70 digestive enzyme activity. The findings from current study might facilitate identifying the

71 postmortem interval in aquatic animals, i.e. estimating the time of death from a floating  
72 carcass.

73

## 74 **Materials and Methods**

### 75 **Preparation of Fish Samples**

76 Four-month-old sex reversed Nile tilapia was obtained from a private farm in Trang  
77 province, Thailand. The fish were acclimatized indoors for 15 days and were fed *ad libitum*,  
78 twice daily (at 7.00 and 16.00 h) under 12-h light/12-h dark cycle, with a commercial diet  
79 containing 30% protein. The average water quality parameters during the acclimatization  
80 were: temperature  $29.60 \pm 0.15^\circ\text{C}$ , dissolved oxygen  $5.05 \pm 0.01$  mg/L, pH  $6.95 \pm 0.02$  and  
81 ammonia  $0.94 \pm 0.15$  mg/L.

82

### 83 **Postmortem Change Studies**

84 The fish were starved for 48 h prior to their necropsy, to avoid metabolic flexibility  
85 induced by food. Subsequently, all the fish were killed by chilling in ice, according to  
86 “Ethical Principles and Guidelines for the Use of Animals for Scientific Purposes”, National  
87 Research Council, Thailand. Fish with similar size ( $105.83 \pm 1.66$  g weight and  $18.55 \pm 0.14$   
88 cm length) were randomly distributed into plastic rectangular containers (32 cm width  $\times$  43  
89 cm length  $\times$  11 cm height, with 7 cm water level) at a density of 14 fish per container. The  
90 fish carcasses were kept at ambient temperature, and samples ( $n = 4$ ) were collected at various  
91 postmortem times (1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h), including also a control group of fish without  
92 postmortem delay (0 h). The weights of body, stomach and intestine were determined and  
93 used to calculate the stomasomatic index (SSI) and the intestosomatic index (ISI) that equal  
94 the weight ratios of stomach and intestine to body, respectively.

95

## 96 **Fish Dissection and Extraction of Digestive Enzymes**

97           The fish organs were dissected on ice and then the gastrointestinal tracts were  
98 collected. Crude extracts were prepared according to the method described in Rungruangsak  
99 and Utne (20), with slight modifications. The stomach and intestine were homogenized in 10  
100 mmol/L and 1 mmol/L HCl (1:3 w/v), respectively, by using micro-homogenizer (THP-220;  
101 Omni International, Kennesaw GA, USA). The homogenates were centrifuged at 15,000×g  
102 for 30 min at 4°C. The supernatants were collected after removing the lipid layer and then  
103 kept in small portions at –20°C before analysis.

104

## 105 **Determination of Protein in Crude Extract**

106           Protein concentrations in the crude enzyme extracts were determined based on Lowry  
107 et al. (21). Bovine serum albumin (BSA) was used as the standard for quantifying the protein  
108 concentration (mg/mL). Normalization by the protein was then also used on calculating the  
109 specific activities of digestive enzymes (U/mg protein).

110

## 111 **Digestive Enzyme Study**

### 112 *Pepsin Specific Activity Assay*

113           Pepsin (EC 3.4.23.1) activity determination was based on Rungruangsak-Torrissen  
114 and Utne (20), with some modifications. First, 100 µL of 2% casein was mixed with 100 µL  
115 of 0.2 mol/L buffer pH 2 and 200 µL of crude enzyme extract. The reaction mixture was then  
116 incubated at 55°C for 10 min, and the reaction was stopped by adding 1 mL of 5%  
117 trichloroacetic acid. Then the mixture was centrifuged at 5,000×g at room temperature for 20  
118 min. An 0.5 mL sample of supernatant was taken and mixed with 1 mL of 0.5 mol/L NaOH  
119 and 0.3 mL of Folin Ciocalteu reagent (three-fold diluted). The obtained solution was  
120 measured spectrophotometrically at 720 nm against L-tyrosine standard.

### 121 *Trypsin and Chymotrypsin Specific Activity Assays*

122 Trypsin (EC 3.4.21.4) and chymotrypsin (EC 3.4.21.1) activities were determined  
123 based on Rungruangsak-Torrissen et al. (22). The trypsin assay was performed by mixing 700  
124  $\mu\text{L}$  of 0.2 mol/L buffer at pH 9 containing 1.25 mmol/L Benzoyl-*L*-Arginine-*p*-Nitroanilide  
125 (BAPNA) with 100  $\mu\text{L}$  of a crude enzyme extract. The mixture was incubated at 50°C for 10  
126 min, and then the enzymatic reaction was stopped by adding 800  $\mu\text{L}$  of 30% acetic acid.  
127 Chymotrypsin was assayed as above, except with a 0.2 mol/L buffer at pH 9 containing 0.1 m  
128 mol/L *N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-Nitroanilide (SAPNA), and the incubation was at 60°C.  
129 Absorbance at 410 nm was measured to quantify products of each enzyme, and the final  
130 results were based on a *p*-nitroanilide standard curve.

131

### 132 *Amylase Specific Activity Assay*

133 Amylase (EC 3.2.1.1) activity was determined based on Areekijseree et al. (23). The  
134 assay was performed by mixing 25  $\mu\text{L}$  of 5% soluble starch, 62.5  $\mu\text{L}$  of 0.2 mol/L buffer pH  
135 7, 37.5  $\mu\text{L}$  of 20 mmol/L NaCl and 125  $\mu\text{L}$  of crude enzyme extract. The mixture was  
136 incubated at 50°C for 15 min and the reaction was stopped by adding 250  $\mu\text{L}$  of 1%  
137 dinitrosalicylic acid (DNS). Staining was performed by boiling at 100°C for 5 min, cooling to  
138 room temperature, and mixing with 2.5 mL of distilled water. The stained reducing sugar was  
139 measured spectrophotometrically at 540 nm against a maltose standard.

140

### 141 *Lipase Specific Activity Assay*

142 Lipase (EC 3.1.1.3) activity was determined based on Winkler and Stuckmann (24),  
143 with slight modifications. The assay was performed by mixing 200  $\mu\text{L}$  of 0.01 mol/L *p*-  
144 nitrophenyl palmitate, 800  $\mu\text{L}$  of 0.2 mol/L buffer at pH 8 and 20  $\mu\text{L}$  of crude enzyme extract.  
145 The mixture was incubated at 60°C for 30 min and then the enzymatic reaction was stopped

146 by adding 250  $\mu\text{L}$  of 1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . The mixture was centrifuged at  $13,000\times g$  at room  
147 temperature for 15 min. The supernatant was collected and its absorbance was measured at  
148 410 nm against a *p*-nitrophenol standard.

149

## 150 **Gastrointestinal Scavenging Activity**

### 151 *2,2-Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) Radical Assay*

152 Stomach and intestinal extracts were obtained as described in Section 2.3 above. Their  
153 DPPH radical scavenging activities were determined according to the method of  
154 Thongprajukaew et al. (25). The radical scavenging activity (% inhibition) was calculated as  
155  $((A_0 - A_i)/A_0) \times 100$ , where  $A_0$  and  $A_i$  are the absorbances of the control sample (extraction  
156 buffer in equal volume replacing the actual sample) and the extract, respectively.

157

### 158 *Reducing Power*

159 Stomach and intestinal extracts were obtained as described in Section 2.3. The  
160 reducing power was assayed based on the method of Benzie and Strain (26) and Wong et al.  
161 (27), with some modifications. Briefly, a pre-mixture was prepared by mixing 10 mmol/L of  
162 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-*s*-triazine (TPTZ) in 40 mmol/L HCl, 20 mmol/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and  
163 acetate buffer at pH 5.2 in the ratio of 1:1:10. The assay was performed by mixing 2,850  $\mu\text{L}$   
164 of the pre-mixture with 150  $\mu\text{L}$  of sample, keeping this in the dark for 30 min, and measuring  
165 the absorbance at 593 nm. The volume of sample was replaced by extraction buffer in the  
166 control, and the absorbances were converted to final results with a Trolox standard curve.  
167 Percentage of remaining reducing power at each post mortem time was calculated as  $((A_i -$   
168  $A_0)/A_i) \times 100$ , where  $A_0$  and  $A_i$  are the absorbances of the control sample (extraction buffer in  
169 equal volume replacing the actual sample) and the actual sample, respectively.

170

## 171 **Statistical Analysis**

172 Data analyses were performed using SPSS Version 20 (SPSS Inc., Chicago, USA). All  
173 data are expressed as mean  $\pm$  SEM from quadruplicate observations. Significant differences  
174 between means were ranked using Duncan Multiple Range Test, with significance equated to  
175  $P < 0.05$ . Pearson correlation coefficients ( $r$ ) are reported between each pair of variables  
176 across the observation points of gastrointestinal changes.

177

## 178 **Results**

### 179 **Postmortem Changes in Gastrointestinal Index**

180 The intestine of Nile tilapia ( $4.41 \pm 0.31\%$  of body weight at 0 h) was heavier than its  
181 stomach ( $2.22 \pm 0.13\%$  of body weight at 0 h) (Fig. 1). The stomasomatic index (SSI, Fig. 1A)  
182 and the intestosomatic index (ISI, Fig. 1B) decreased with postmortem interval significantly  
183 ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ). The SSI remained unchanged for up to 2 h after death, while the ISI was  
184 unchanged up to 8 h. At the final 48 h sampling time the carcasses had about 42% and 44% of  
185 their initial SSI and ISI, respectively.

186

### 187 **Postmortem Changes in Gastrointestinal Protein**

188 Gastrointestinal protein had the similar trend and characteristics as the SSI and ISI  
189 indices (Fig. 2). Soluble protein concentration in the stomach (Fig. 2A) and in the intestine  
190 (Fig. 2B) decreased significantly with postmortem time ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ). Stomach protein  
191 decreased slowly for 4 h after death (insignificant change,  $P > 0.05$ ), remained about constant  
192 during 8–12 h, and then decreased dramatically until the end of observation at 48 h. The  
193 intestinal protein was easy to lose and decreased dramatically, showing a change at 1 h after  
194 death and having undetectable level at the final observation time.

195

## 196 **Postmortem Changes in the Main Digestive Enzymes**

197 Protein dynamics in the gastrointestinal section were observed through three digestive  
198 enzymes. The specific activity of pepsin was unchanged for the first 4 h after death (Fig. 3A)  
199 and then decreased progressively. The lowest  $7.24 \pm 1.18$  U mg protein<sup>-1</sup> specific activity of  
200 pepsin was found at the final sampling time. Trypsin specific activity was very sensitive to  
201 postmortem delay, more so than pepsin (Fig. 3B). Unchanged activity was observed for 1 h  
202 after death, and was below detection limit at 48 h. Chymotrypsin specific activity showed a  
203 different trend than the two protein-digestive enzymes above. Its highest specific activity was  
204 observed at 8 h after death, while the activities at 0–2 and 12 h were mutually similar (Fig.  
205 3C). However, also this enzyme had undetectable activity at 48 h after death.

206 Amylase (Fig. 4A) and lipase (Fig. 4B) specific activities decreased significantly with  
207 postmortem time. The time-response of amylase matched well the trends in trypsin specific  
208 activity. The lipase specific activity was the most sensitive to postmortem delay among all the  
209 observed enzymes: it had 98.63% reduction in specific activity at 24 h after death from the  
210 initial level, with activity below detectable at 48 h.

211

## 212 **Postmortem Changes in Gastrointestinal Scavenging Activity**

213 Fig. 5 illustrates the significant decreases in the scavenging activity (% inhibition) of  
214 stomach (Fig. 5A) and intestine (Fig. 5B), and in the reducing power (% remaining) of  
215 stomach (Fig. 5C) and intestine (Fig. 5D). Both these responses decreased statistically  
216 significantly with postmortem delay, but the reducing power was more effective in  
217 distinguishing postmortem changes than the DPPH.

218

219

220



## 221 **Relationships among the Observed Variables**

222           The Pearson correlation coefficients ( $r$  in Table 1) for each pair of variables (across  
223 the observation time points of gastrointestinal changes) were positive and highly significant  
224 ( $P < 0.01$ ).

225

## 226 **Discussion**

227           Gastromalacia after death is caused by endogenous enzymes and can significantly thin  
228 and soften the gastric fundus wall (14–16). This process contributes to the rapid loss of  
229 gastrointestinal weight, which directly affects the digestive indices (SSI and ISI). In a  
230 terrestrial animal, namely in the Sprague-Dawley rat, Li et al. (2) reported increasing  
231 hepatosomatic index (HSI) with postmortem time (0–25 min). Our observations of both the  
232 SSI and the ISI in fish specimens show the opposite trend, partly because of a much longer  
233 observation time extending to 48 h. In addition, the nutrient-rich fluid released from a fish  
234 carcass caused by the endogenous enzymes is easily dissolved and flushed away in an aquatic  
235 environment. This process is most rapid in those tissues that have high enzyme and water  
236 contents (6). The electrical resistance of the gastric wall corroborates our understanding of  
237 this degradation, and is linked to the physical intracellular size of the changing electrical  
238 conductivity of the intracellular and extracellular fluid (1). Penny (28) reported a rapid fall  
239 after death in the muscle pH of a pig carcass. This indicates the accumulation of carboxyl  
240 groups liberated by hydrolytic reactions. Moreover, such postmortem changes can also be  
241 induced by the absence of oxygen, increase of carbon dioxide, and accumulation of wastes (6,  
242 29). These conditions lead to the denaturation of proteins, which governs the progressive  
243 decrease of protein concentration in stomach and intestine. Khunsoongnern (7) suggested that  
244 rapid postmortem putrefaction is observed in the intestine, followed by the whole alimentary  
245 tract and gill. Similarly, our observations showed more rapid postmortem changes in the

246 intestine than in the stomach. This might be due to the mucosa layer of stomach wall being  
247 thicker than in the intestine. Generally, mucus cells in the tubular glands and neck cells of  
248 gastric glands protect the stomach with mucosa from its strongly acidic contents (18). In  
249 addition, more active endogenous digestive enzymes, namely trypsin, chymotrypsin, lipase  
250 and amylase, are found in the intestinal section (30) than in the stomach, which mainly has  
251 pepsin activity.

252 Pepsin is the most efficient digestive enzyme in the stomach, cleaving peptide bonds  
253 of hydrophobic compounds to preferably aromatic amino acids, such as phenylalanine,  
254 tryptophan and tyrosine (31). The activity of this enzyme indicates extracellular digestion in  
255 the stomach (30). The decrease in pepsin activity was due to the autolysis of gastric gland  
256 after death (15). This enzyme appears more robust than the other detected enzymes, as it  
257 maintained its activity until the end of sampling (48 h), while others did so for only about four  
258 hours. The rigid structure and low molecular weight may partially protect this enzyme against  
259 denaturation. Practically, specimen collection in the field for estimating the initial pepsin  
260 activity at death would be feasible for about four hours after death, in ambient temperature.

261 Trypsin is a key protein-digesting enzyme in the small intestine. It acts as an activator  
262 controlling both itself and other proteolytic zymogens. Its rapid activity decrease indicates  
263 fast protein breakdown, faster in the intestine than in the stomach. Interestingly, chymotrypsin  
264 had maximal activity at 8 h after death, among the observation points. This enzyme cleaves  
265 proteins at the carboxyl side of aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine and  
266 tryptophan), and cleaves large hydrophobic residues. An increased activity of this enzyme has  
267 been attributed to induction by toxic organic pollutants, such as benzene and dioxins, as well  
268 as to the stress before death of the fish (22). Moreover, strong evidence supports the  
269 mediation of internucleosomal DNA cleavage in apoptotic cells by a chymotrypsin-like

270 protease (32). The role of this enzyme in relation to postmortem changes is still little known  
271 and would warrant further research.

272 The association of protein and carbohydrate catabolisms caused the decreasing trend  
273 in amylase activity with postmortem delay. This enzyme breaks down  $\alpha$ -1,4 glycosidic bonds  
274 of large-chain polysaccharides, to convert carbohydrates to glucose. Significantly reduced  
275 enzyme activity might be associated with the catabolism of glycogen after death. Regarding  
276 lipid catabolism, the specific activity of lipase decreased earlier than those of the other  
277 observed enzymes. This is due to unsaturated fatty acids in a fish that are very easy to oxidize,  
278 providing lots of free radicals that degrade other molecules. The dramatic decrease in lipase  
279 activity is also in agreement with direct observations of peritoneal fats during fish dissection,  
280 as well as of the lipid layer after homogenate centrifugation (enzyme preparation). This  
281 finding is corroborated by the significant decrease in scavenging activity and in remaining  
282 reducing power with postmortem delay.

283

#### 284 *Summary*

285 The gastrointestinal functionality was significantly affected by the postmortem delay.  
286 Based on the digestive enzyme analyses, significant changes occurred earlier in the intestine  
287 than in the stomach, and lipid break down appeared to be more sensitive than degradation of  
288 protein or carbohydrate to the time delay. A novel not previously reported observation was  
289 the role of chymotrypsin after death, and this would warrant further investigation. In  
290 continuation of this reported research, a histopathological examination of the gastrointestinal  
291 tract (stomach and intestine) and its accessory gland (liver) for their postmortem changes is  
292 currently underway, in this same fish species. The findings from the current study suggest that  
293 the time of death of an aquatic animal can be estimated by sampling the gut of the carcass left  
294 in ambient water.

295 *Acknowledgments*

296 We acknowledge Assoc. Prof. Dr. Seppo Karrila for English proofreading; and the  
297 Publication Clinic of the Prince of Songkla University for help in manuscript preparation.

298

299 **References**

- 300 1. Querido D. Postmortem changes in electrical resistance of the gastric wall during the early  
301 postmortem period in rats. *Forensic Sci Int* 1992;53:81–92.
- 302 2. Li X, Elwell MR, Ryan AM, Ochoa R. Morphogenesis of postmortem hepatocyte  
303 vacuolation and liver weight increases in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol*  
304 2003;31:682–8.
- 305 3. Erlandsson M, Munro R. Estimation of the post-mortem interval in beagle dogs. *Sci Justice*  
306 2007;47:150–4.
- 307 4. Costa RS, Henry FC, Ferreira KS, do Valle FRAF, Quirino CR. Characterization of rigor  
308 mortis of *longissimus dorsi* and *triceps brachii* muscles of male cattle carcasses. *J*  
309 *Biotechnol* 2012;11:8127–32.
- 310 5. Myburgh J, L'Abbé EN, Steyn M, Becker PJ. Estimating the postmortem interval (PMI)  
311 using accumulated degree-days (ADD) in a temperate region of South Africa. *J Forensic*  
312 *Sci* 2013;229:165.e1–e6.
- 313 6. Vass AA. Beyond the grave—understanding human decomposition. *Microbiol Today*  
314 2001;28:190–3.
- 315 7. Khunsoongnern N. Quality change of tilapia fillets store under modified atmosphere  
316 [Thesis]. Nakhon Ratchasima: Suranaree Univ. of Technology, 2003.
- 317 8. Campobasso CA, Vella GA, Introna F. Factors affecting decomposition and Diptera  
318 colonization. *Forensic Sci Int* 2001;120:18–27.

- 319 9. Pearce KL, Rosenvold K, Andersen HJ, Hopkins DL. Water distribution and mobility in  
320 meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat  
321 quality attributes—A review. *Meat Sci* 2011;89:111–24.
- 322 10. Aoki T, Yokono M, Ueno R. A cathepsin B-like enzyme from mackerel white muscle is a  
323 precursor of cathepsin B. *Com Biochem Physiol* 2002;133B:307–16.
- 324 11. Wang PA, Stenvik J, Larsen R, Maehre H, Olsen RL. Cathepsin D from Atlantic cod  
325 (*Gadus morhua* L.) liver. Isolation and comparative studies. *Com Biochem Physiol*  
326 2007;147B:504–11.
- 327 12. Bahuaud D, Mørkøre T, Langsrud Ø, Sinnes K, Veiseth E, Ofstad R et al. Effects of –  
328 1.5°C super-chilling on quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) *pre-rigor* fillets:  
329 cathepsin activity, muscle histology, texture and liquid leakage. *Food Chem*  
330 2008;111:329–39.
- 331 13. Fidalgo LG, Saraiva JA, Aubourg SP, Vázquez M, Torres JA. High pressure effects on the  
332 activities of cathepsins B and D of mackerel and horse mackerel muscle. *Czech J Food*  
333 *Sci* 2014;32:188–93.
- 334 14. O'Donnell CJ, Baker MA. Postmortem CT findings of “gastromalacia”: a trap for the  
335 radiologist with forensic interest. *Forensic Sci Med Pathol* 2010;6:293–7.
- 336 15. Laczniak AN, Sato T, Nashelsky M. Postmortem gastric perforation (gastromalacia)  
337 mimicking abusive injury in sudden unexplained infant death. *Pediatr Radiol* 2011;41:  
338 1595–7.
- 339 16. Usui A, Kawasumi Y, Hosokai Y, Hayashizaki Y, Saito H, Funayama M. Postmortem  
340 radiography of gastromalacia: case reports. *Japanese J Radiol* 2013;31:637–41.
- 341 17. De Silva SS, Subasinghe RP, Bartley DM, Lowther A. Tilapias as alien aquatics in Asia and  
342 the Pacific: A review. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations,  
343 2004.

- 344 18. Morrison CM, Wright Jr JR. A study of the histology of the digestive tract of the Nile  
345 tilapia. *J Fish Biol* 1999;54:597–606.
- 346 19. Getinet GT, Amrit NB. Effects of feeding, stocking density and water-flow rate on  
347 fecundity, spawning frequency and egg quality of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*  
348 (L.). *Aquaculture* 2007;272:380–8.
- 349 20. Rungruangsak K, Utne F. Effect of different acidified wet feeds on protease activities in  
350 the digestive tract and on growth rate of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson).  
351 *Aquaculture* 1981;22:67–79.
- 352 21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin  
353 phenol reagent. *Biol Chem* 1951;193:265–75.
- 354 22. Rungruangsak-Torrissen K, Moss R, Andresen LH, Berg A, Waagbø R. Different  
355 expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo*  
356 *salar* L.). *Fish Physiol Biochem* 2006;32:7–23.
- 357 23. Areekijserree M, Engkagul A, Kovitvadhi U, Thongpan A, Mingmuang M, Pakkong P et  
358 al. Temperature and pH characteristics of amylase and proteinase of adult freshwater  
359 pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson 1900. *Aquaculture* 2004;234:575–  
360 87.
- 361 24. Winkler UK, Stuckmann M. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides  
362 greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol*  
363 1979;138:663–70.
- 364 25. Thongprajukaew K, Rodjaroen S, Yoonram K, Sornthong P, Hutcha N, Tantikitti C et al.  
365 Effects of dietary modified palm kernel meal on growth, feed utilization, radical  
366 scavenging activity, carcass composition and muscle quality in sex reversed Nile tilapia  
367 (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 2015;439:45–52.

- 368 26. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of  
369 “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239:70–6.
- 370 27. Wong SP, Leong LP, Koh JHW. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected  
371 plants. *Food Chem* 2006;99:775–83.
- 372 28. Penny IF. Protein denaturation and water-holding capacity in pork muscle. *Food Sci*  
373 *Technol Int* 1969;4:269–73.
- 374 29. Goff ML. Early post-mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers.  
375 *Exp Appl Acarol* 2009;49:21–36.
- 376 30. Thongprajukaew K, Kovitvadh U. Effects of sex on characteristics and expression levels  
377 of digestive enzymes in the adult guppy *Poecilia reticulata*. *Zool Stud* 2013;52:1–8.
- 378 31. Dunn BM. Overview of pepsin-like aspartic peptidases. *Curr Protoc Protein Sci*  
379 2001;doi:10.1002/0471140864.ps2103s25.
- 380 32. Murn J, Urleb U, Mlinaric-Rascan I. Internucleosomal DNA cleavage in apoptotic WEHI  
381 231 cells is mediated by a chymotrypsin-like protease. *Genes to Cells* 2004;9:1103–11.

382

383 Additional information and reprint requests:

384 Asst. Prof. Karun Thongprajukaew, Ph.D.

385 Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University,

386 Songkhla 90112, Thailand.

387 E-mails: karun.t@psu.ac.th

388

389

## Figure Legends

**FIG. 1**—Postmortem changes in the SSI (A), and the ISI (B), in Nile tilapia within 48 h after death. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Different superscripts indicate significant differences between observation time points ( $P < 0.05$ ).

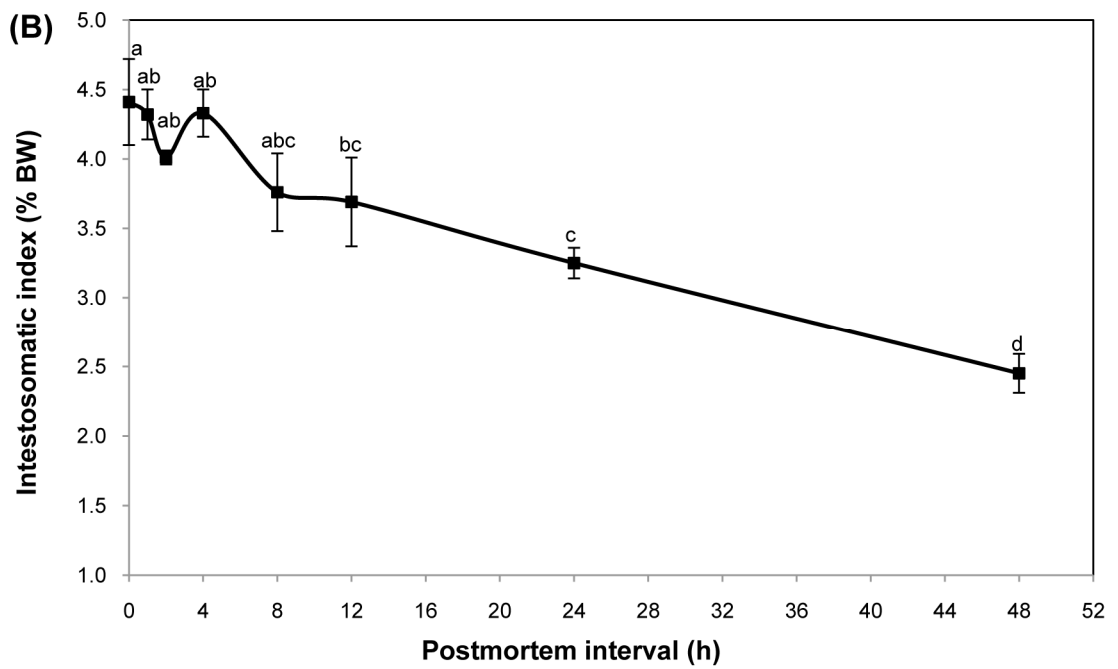
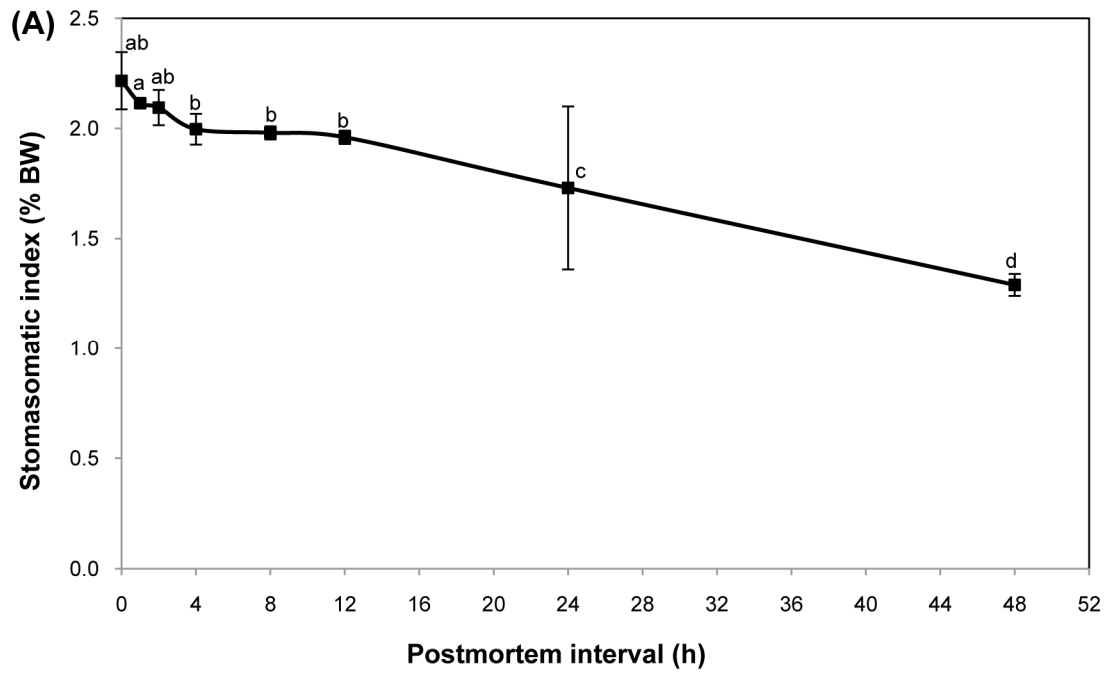
**FIG. 2**—Postmortem changes in stomach (A) and intestinal (B) protein concentrations, in Nile tilapia within 48 h after death. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Different superscripts indicate significant differences between observation time points ( $P < 0.05$ ).

**FIG. 3**—Postmortem changes in specific activity of pepsin (A), trypsin (B), and chymotrypsin (C), in Nile tilapia within 48 h after death. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Different superscripts indicate significant differences between observation time points ( $P < 0.05$ ).

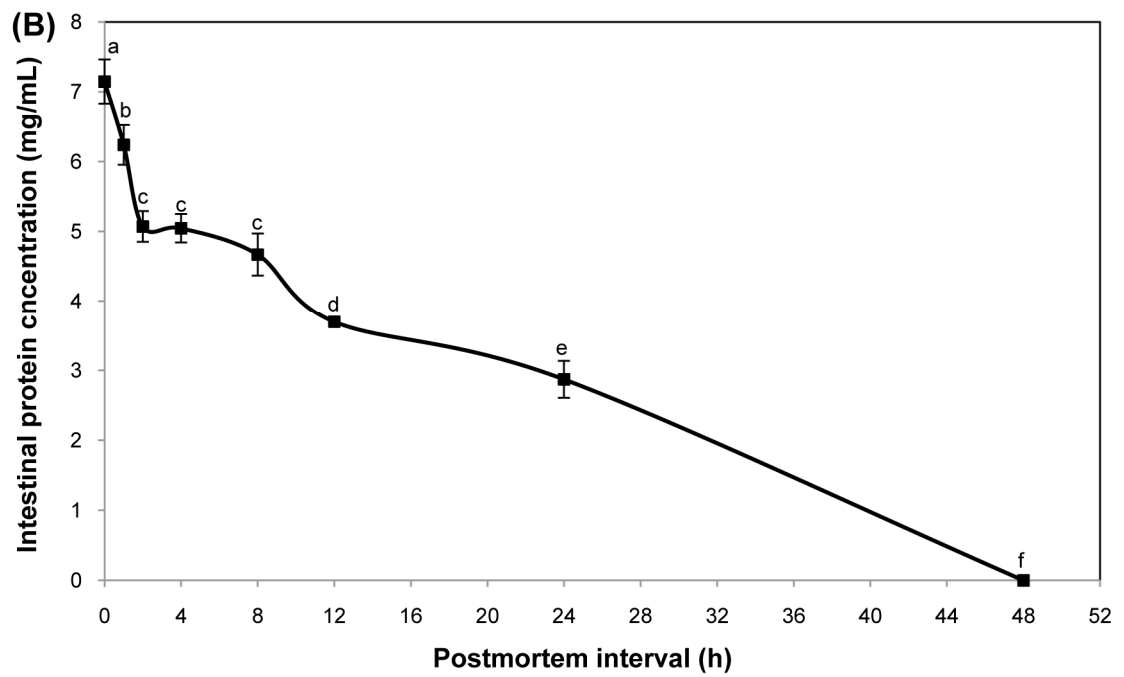
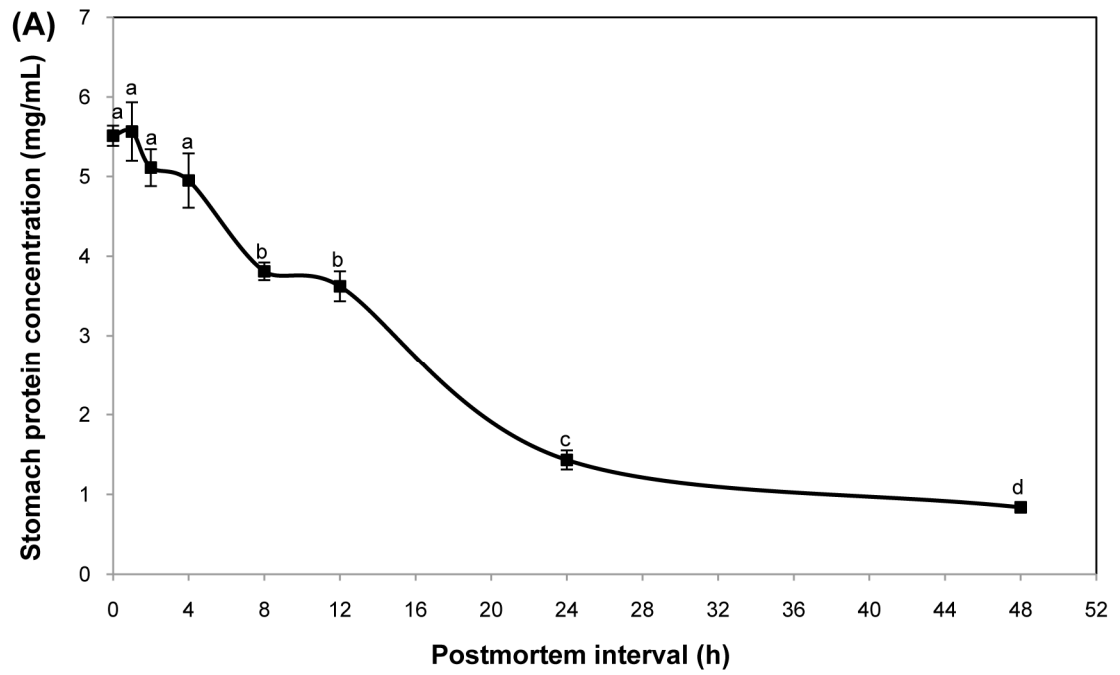
**FIG. 4**—Postmortem changes in specific activity of amylase (A), and lipase (B), in Nile tilapia within 48 h after death. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Different superscripts indicate significant differences between observation time points ( $P < 0.05$ ).

**FIG. 5**—Postmortem changes in stomach (A) and intestinal (B) scavenging activities, and stomach (C) and intestinal (D) remaining reducing powers, in Nile tilapia within 48 h after death. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Different superscripts indicate significant differences between observation time points ( $P < 0.05$ ).

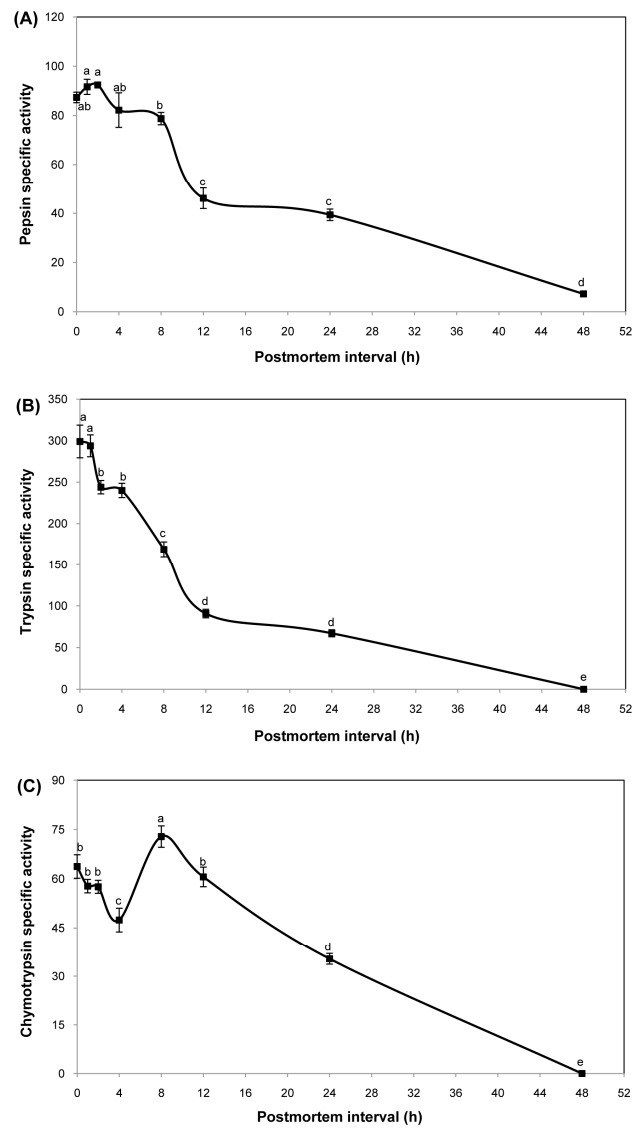




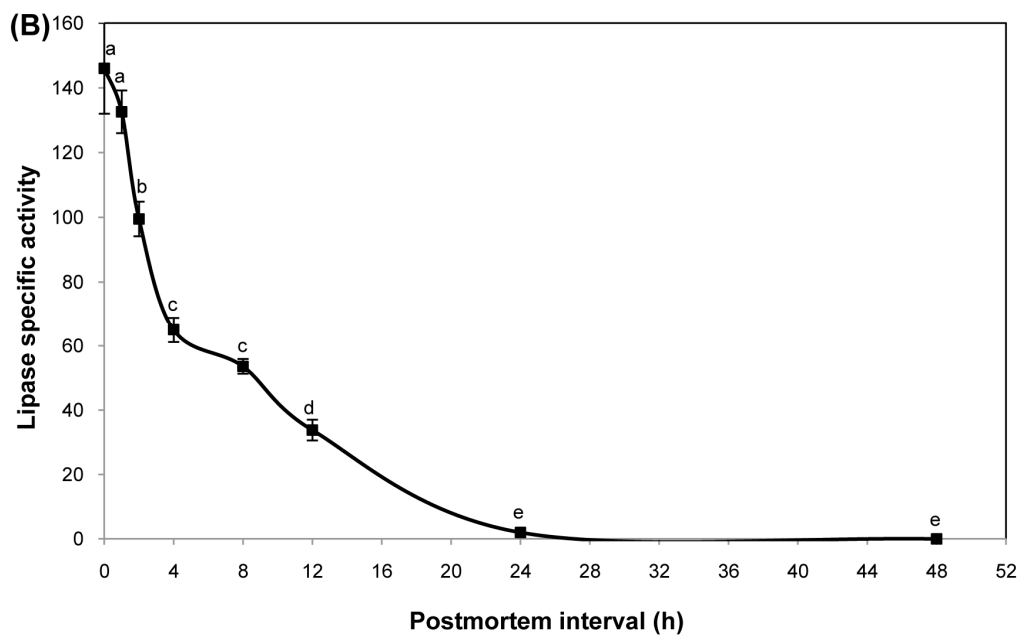
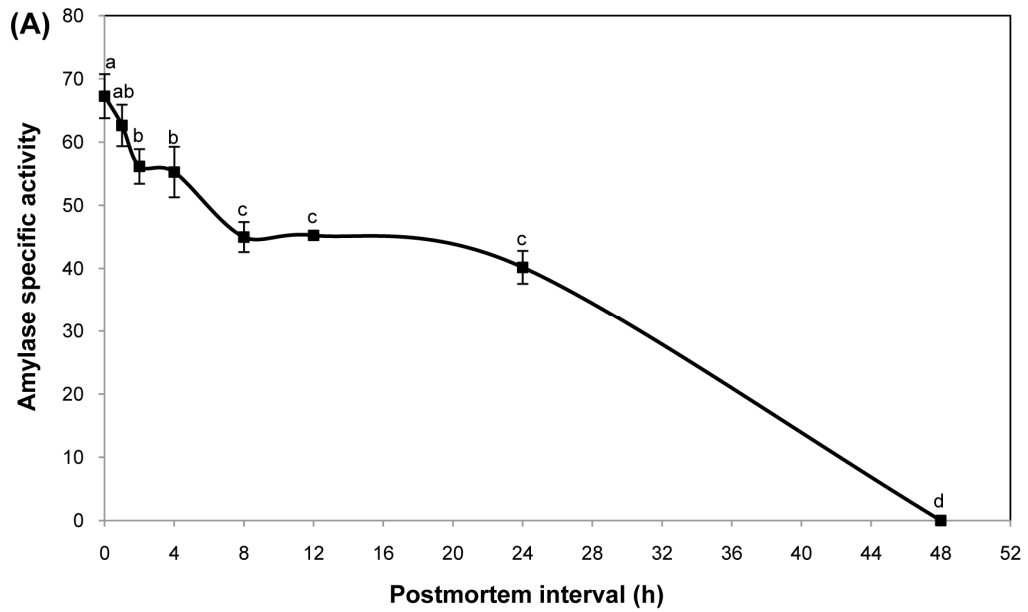
153×184 mm (300 × 300 DPI)



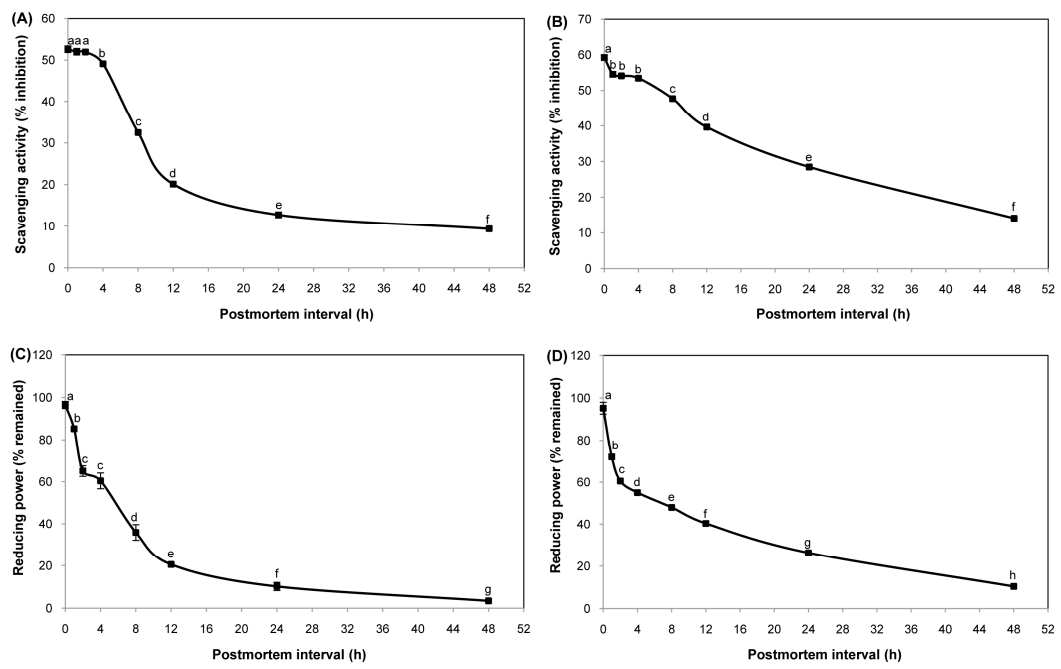
152×193 mm (300 × 300 DPI)



153×273mm (300 × 300 DPI)



149×187 mm (300 × 300 DPI)



246×153 mm (300 × 300 DPI)

**TABLE 1**—Pearson correlation coefficients (*r*) of variables that are indicative of gastrointestinal changes in post-mortem Nile tilapia across a set of observation times. All correlations were positive and statistically significant at  $P < 0.01$ .

Parameter	SSI	ISI	Stomach protein	Intestinal protein	Pepsin	Trypsin	Chymotrypsin	Amylase	Lipase	RP <sub>S</sub>	RP <sub>I</sub>	DPPH <sub>S</sub>
ISI	0.835											
Stomach protein	0.886	0.791										
Intestinal protein	0.948	0.841	0.889									
Pepsin	0.927	0.737	0.825	0.853								
Trypsin	0.834	0.790	0.914	0.892	0.887							
Chymotrypsin	0.867	0.665	0.700	0.778	0.809	0.677						
Amylase	0.921	0.783	0.833	0.871	0.858	0.883	0.828					
Lipase	0.773	0.688	0.866	0.848	0.745	0.918	0.595	0.770				
RP <sub>S</sub>	0.814	0.749	0.881	0.888	0.729	0.958	0.519	0.748	0.963			
RP <sub>I</sub>	0.877	0.782	0.888	0.945	0.746	0.920	0.705	0.829	0.951	0.949		
DPPH <sub>S</sub>	0.750	0.785	0.916	0.881	0.785	0.972	0.575	0.762	0.885	0.942	0.879	
DPPH <sub>I</sub>	0.901	0.842	0.942	0.956	0.870	0.934	0.810	0.879	0.853	0.886	0.919	0.942

SSI, stomasomatic index; ISI, intestosomatic index; RP<sub>S</sub>, % remaining reducing power in stomach; RP<sub>I</sub>, % remaining reducing power in intestine; DPPH<sub>S</sub>, % DPPH scavenging activity in stomach; DPPH<sub>I</sub>, % DPPH scavenging activity in intestine.

ค ต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ในวารสารเรื่องที่ 2

1 **Muscle degradation in aquatic animal carcass allows**  
2 **estimating time of death in ambient water environment**

3

4

5

6 **Tulakhun Nonthaput<sup>1</sup>, Waraporn Hahor<sup>1</sup>, Karun Thongprajukaew<sup>1,\*</sup>,**  
7 **Krueawan Yoonram<sup>1</sup>, and Somrak Rodjaroen<sup>2</sup>**

8

9

10

11 *<sup>1</sup> Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University,*  
12 *Songkhla, 90112, Thailand.*

13 *<sup>2</sup> Department of Bioscience, Faculty of Sciences and Fisheries Technology,*  
14 *Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang, 92150, Thailand.*

15

16

17

18

19 \* Corresponding author. Tel: +66 74879957; Fax: +66 74446681.

20 Email address: karun.t@psu.ac.th



## 1 **Abstract**

2           We investigated the muscle degradation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)  
3 in terms of specific activities of cathepsins (B, H and L), scavenging activities and  
4 thermal transition properties of myosin and actin, to assess postmortem changes with  
5 time. Specific activities of three cathepsin enzymes increased significantly with  
6 postmortem time and exhibited highly positive relationship ( $r = 0.987\text{--}0.997$ ,  $P < 0.01$ ).  
7 A novel observation, not reported previously, concerns the role of cathepsin H at 8 h  
8 after death. The radical scavenging activity dramatically decreased with time since  
9 death, especially within the first 1 h, while no changes occurred from 2 to 8 h, or from  
10 12 to 24 h. The degradation of muscle proteins fluctuated with delay time, and actin was  
11 more sensitive to postmortem delay than myosin. Overall the findings from the current  
12 study might be used as primary data to estimate the time of death of an aquatic animal.

13

14 **Keywords:** actin, aquatic animal, cathepsin, muscle, myosin, postmortem

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

## 25 **1. Introduction**

26 Postmortem changes of animals are influenced by various environmental factors  
27 including temperature, humidity, cooling rate and growth of microorganisms  
28 (Campobasso *et al.*, 2001). Most studies of postmortem changes have investigated  
29 terrestrial animal models, especially mammals such as rat (Kočárek, 2003), dog  
30 (Lassetter *et al.*, 2003), pig (Dekeirsschieter *et al.*, 2009) and cattle (Rhee and Kim,  
31 2001). For aquatic animals, preservation of the products is the main purpose for cold  
32 temperatures used in transport or storage by the food industries. No prior information is  
33 available of postmortem changes under the ambient aquatic conditions in a tropical  
34 environment, and this study performed in Thailand addresses that knowledge gap.

35 After death, a crude assessment of muscles and joint stiffness allows assigning  
36 the postmortem interval to one of three categories, namely pre-rigor mortis, rigor  
37 mortis, and post-rigor mortis. The main processes relate to muscle degradation by  
38 enzymes, cathepsins, causing rapid softening of muscle texture due to the degradation  
39 of myofibrillar proteins (Jiang, 2000). Cathepsins B and L exhibit superior activity  
40 relative to cathepsin H in the white muscle of sea bass (Chéret *et al.*, 2007). Also, Aoki  
41 *et al.* (2000) report high activities of cathepsins B and L in white muscles of some red-  
42 fresh fish. These findings suggest important roles of the cathepsins B, H and L in the  
43 postmortem degradation of white fish muscle.

44 Actin and myosin are the main actors that make muscles contract or relax (Tyska  
45 and Warshaw, 2002), while sarcoplasmic proteins are another component in muscles,  
46 suspended in the cytoplasm (Matos *et al.*, 2011). These proteins can be degraded after  
47 death by the cathepsin enzymes (Ho *et al.*, 2000; Ladrat *et al.*, 2003) and can be  
48 monitored by differential scanning calorimetry (Schubring, 1999; Kuo *et al.*, 2005;

49 Beyrer and Klaas, 2007; Matos *et al.*, 2011; Thongprajukaew *et al.*, 2015b). The aim of  
50 this present study was to evaluate postmortem changes in muscles of an aquatic animal.  
51 The economic freshwater fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) was chosen as a  
52 model, as it is widely cultured around the world. The well-known fundamental biology  
53 of this species also supported its selection for a laboratory study. The main muscle  
54 degradation enzymes (cathepsins B, H and L) were studied concurrently with the  
55 thermal properties of actin and myosin. The degradation products were also monitored  
56 by a sensitive method, namely by diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging  
57 activity. The findings from this study might be used as primary data to identify  
58 (estimate) the postmortem delay from an aquatic animal carcass in ambient tropical  
59 waters.

60

## 61 **2. Materials and Methods**

### 62 **2.1 Fish preparation and observation of postmortem changes**

63 Four-month-old sex reversed Nile tilapia was collected from a private farm in  
64 Trang province, Thailand. The fish were acclimatized indoor for 15 days and were fed  
65 to satiation with a commercial diet containing 30% protein, twice daily (07.00 and  
66 16.00 h) under 12-h light/12-h dark cycle. The water quality parameters during  
67 acclimatization were temperature  $29.60 \pm 0.15^{\circ}\text{C}$ , pH  $6.95 \pm 0.02$ , dissolved oxygen  
68  $5.05 \pm 0.01 \text{ mg L}^{-1}$  and ammonia  $0.94 \pm 0.15 \text{ mg L}^{-1}$ . Prior to sampling the fish were  
69 starved for 48 h under the conditions described above. Subsequently, all the fish were  
70 killed by chilling in ice. Fish with similar body weights ( $105.83 \pm 1.66 \text{ g}$ ) and total  
71 lengths ( $18.55 \pm 0.14 \text{ cm}$ ) were randomly distributed into rectangular containers (32 cm  
72 width  $\times$  43 cm length  $\times$  11 cm height with 7 cm water level) at a density of 14 fish per

73 container. The fish were floated in their rectangular containers under ambient  
74 temperature and 12-h light/12-h dark cycle. Four fish ( $n = 4$ ) at each postmortem time  
75 (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h) were dissected on ice and the white muscles were  
76 collected. These samples were packed in polyethylene bags and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until  
77 determinations.

78

## 79 **2.2 Extraction of muscle crude extract**

80 Crude extract of white muscle was prepared according to Chéret *et al.* (2007),  
81 with slight modifications. Briefly, the muscle was homogenized in 90 mL buffer (1:3  
82 *w/v*) containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 1 mM  
83 ethylenediaminetetraacetic acid using a micro-homogenizer (THP-220; Omni  
84 International, Kennesaw GA, USA). The homogenate was centrifuged at  $10,000\times g$ , at  
85  $4^{\circ}\text{C}$  for 40 min. The supernatant was collected after removing the lipid layer and kept in  
86 small portions at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

87

## 88 **2.3 Determination of muscle degradation enzyme activity**

### 89 **2.3.1 Protein concentration in crude extract**

90 Determination of protein was carried out based on the method of Lowry *et al.*  
91 (1951). Bovine serum albumin (BSA) was used as the protein standard. The protein  
92 concentrations in the crude extracts were used for quantifying muscle degradation  
93 enzyme specific activities ( $\text{U mg protein}^{-1}$ ).

94

95

96

### 97 **2.3.2 Cathepsin B, H and L assays**

98           Activities of the cathepsins B (EC 3.4.22.1), H (EC 3.4.22.16) and L (EC  
99 3.4.22.15) were determined based on Aranishi *et al.* (1997), with slight modifications.  
100 Cathepsin B was assayed by mixing 200  $\mu$ L of 0.4 M phosphate buffer (pH 6.0,  
101 containing 5 mM EDTA, 490  $\mu$ L of 0.1% Brij35, 100  $\mu$ L of 10 mM cysteine and 200  
102  $\mu$ L of 25  $\mu$ M Z-Arg-Arg-MCA) and 10  $\mu$ L of crude enzyme extracts. The enzymatic  
103 reaction mixture was incubated at 40°C for 30 min, and the reaction was stopped by  
104 adding 1.5 mL of 0.1 M sodium acetate buffer containing 0.1 M sodium  
105 monochloroacetate (pH 4.3). The cathepsins H and L were assayed as described above,  
106 except with the 0.4 M phosphate buffer (pH 6.0) replaced by 0.4 M phosphate buffer  
107 (pH 6.8, containing 5 mM EDTA, 0.1% Brij35, 10 mM cysteine and 25  $\mu$ M Arg-MCA)  
108 or by 0.4 M sodium acetate buffer (pH 6.5, containing 5 mM EDTA, 0.1% Brij35, 10  
109 mM cysteine, 25  $\mu$ M Z-Phe-Arg-MCA), respectively. Reaction incubation for these  
110 enzymes was performed at 45°C or at 50°C, in the same order. The fluorescence of  
111 liberated aminomethylcoumarin (AMC) was measured by a spectrofluorimeter (Jasco  
112 FP-8200, Jasco, Tokyo, Japan) at an excitation wavelength of 380 nm and an emission  
113 wavelength of 450 nm.

114

### 115 **2.4 Scavenging activity by 2,2-Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical assay**

116           The crude muscle extracts were obtained as described in Section 2.2. above. The  
117 DPPH radical scavenging activity was determined according to the method of  
118 Thongprajukaew *et al.* (2015b). Radical scavenging activity (% inhibition) was  
119 calculated from  $[(A_0 - A_i)/A_0] \times 100$ , where  $A_0$  and  $A_i$  are the absorbances of the control

120 sample (extraction buffer in equal volume to the actual sample) and the extract,  
121 respectively.

122

## 123 **2.5 Thermal transition properties**

124 The thermal transition properties of muscle were analyzed with a differential  
125 scanning calorimeter (DSC7, PerkinElmer, USA). A 20 mg muscle sample was placed  
126 in an aluminum sample pan, sealed, allowed to equilibrate at room temperature, and  
127 then heated with comparison against an empty reference pan. Thermal changes were  
128 recorded from 25 to 120°C at a rate of 5°C min<sup>-1</sup>. Myosin and actin were indentified by  
129 denaturation temperatures, as described by Skipnes *et al.* (2008) and Matos *et al.*  
130 (2011). Thermal parameters including onset ( $T_o$ ), peak ( $T_p$ ) and conclusion ( $T_c$ )  
131 temperatures of protein denaturation, melting temperature range ( $T_c-T_o$ ), and the  
132 transition enthalpy ( $\Delta H$ ) were recorded automatically.

133

## 134 **2.6 Statistical analysis**

135 Data were analyzed using SPSS version 17 (SPSS Inc., Chicago, USA), and all  
136 data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Significance of differences between means was  
137 determined by using the Duncan Multiple Range Test, with significance equated to  $P <$   
138 0.05. Pearson correlation coefficients ( $r$ ) for each pair of measured parameters are  
139 reported.

140

141

142

143

### 144 **3. Results**

#### 145 **3.1 Specific activities of cathepsins B, H and L**

146           The specific activities of cathepsins B (Figure 1a), H (Figure 1b) and L (Figure  
147 1c) increased with the time delay after death. Generally, a slight increase in specific  
148 activity was observed within the first 4 h, followed by a dramatic increase. The  
149 cathepsins B and L exhibited similar characteristics within the 48 h observation. Both  
150 these enzymes had their highest specific activities at the end of the sampling, and the  
151 values increased approximately 6.26 fold ( $60.98 \pm 0.59$  mU mg protein<sup>-1</sup> on average)  
152 compared to the initial activity at 0 h delay ( $9.74 \pm 0.24$  mU mg protein<sup>-1</sup> on average).  
153 Cathepsin H exhibited a different type of time profile and had lower specific activities  
154 than the cathepsins B and L. Its lowest specific activity was observed at 8 h after death,  
155 and this did not significantly differ from its activities at 0 to 2 h delay times. The  
156 highest specific activity of this enzyme was 6.03 (7.83) fold increased relative to the 0 h  
157 (8 h) sampling time.

158

#### 159 **3.2 Scavenging activity of white muscle**

160           The radical scavenging activity of white muscle is illustrated in Figure 2. The  
161 values dramatically decreased with the time elapsed since death, especially within the  
162 first 1 h. No differences in the values were observed in the time delay interval 2–8 h, or  
163 between 12 and 24 h. The lowest scavenging activity was observed at 48 h after death,  
164 with about 40 fold decrease from the initial at 0 h.

165

166

167

### 168 3.3 Thermal changes of myosin and actin

169 The thermograms of white muscle showed two endothermic characteristics  
170 (Figure 3). In the control sample, denaturation of myosin occurred at comparatively low  
171 temperatures as the first peak ( $T_o = 44.45^\circ\text{C}$ ,  $T_p = 46.88^\circ\text{C}$ ,  $T_c = 48.62^\circ\text{C}$ ), while the  
172 following peak corresponded to the denaturation of actin ( $T_o = 68.31^\circ\text{C}$ ,  $T_p = 71.04^\circ\text{C}$ ,  
173  $T_c = 73.42^\circ\text{C}$ ). Fluctuations in results for both these proteins were observed within the  
174 first 24 h postmortem (Table 1), while the protein peaks became undetectable by the end  
175 of observations. Actin was more sensitive to the postmortem changes than myosin, as  
176 indicated by the significantly decreased  $T_o$  at 12 h after death. The main changes in  $T_o$ ,  
177  $T_p$  and  $T_c$  for both proteins were observed at 24 h, and these decreased with postmortem  
178 delay. The values  $T_c - T_o$  fluctuated and increased with postmortem delay. No significant  
179 changes occurred in  $\Delta H$  or  $\Sigma\Delta H$  for either protein within the first 24 h after death.

180

### 181 4. Discussion

182 Muscle protein degradation increased significantly with postmortem delay in  
183 fish muscle, both when ice-stored and when super-chilled (Gaarder *et al.*, 2012).  
184 Available information is scarce regarding protein degradation in a fish carcass that  
185 floats in ambient aquatic conditions of the tropics. The cathepsins B, D, H and L are  
186 cysteine proteases, mainly presents in the lysosomes. Cathepsin D was not observed in  
187 the current study because its role in fish protein hydrolysis should not be significant; it  
188 hydrolyses myofibrils at an optimal pH range from 3 to 5 (Makinodan *et al.*, 1982;  
189 Jiang, 2000). These enzymes are released into both cytoplasm and intracellular spaces  
190 as a consequence of lysosomal disruption, and induce the postmortem pH to fall and the  
191 intramuscular ionic strength to increase (Yates *et al.*, 1983). Aoki *et al.* (2000) and



192 Chéret *et al.* (2007) reported that the main postmortem degradation of white muscle is  
193 attributed to cathepsins B and L. These enzymes hydrolyze the major muscle structural  
194 proteins: B hydrolyzes connectin, nebulin and myosin; and L hydrolyzes connectin,  
195 nebulin, myosin, collagen,  $\alpha$ -actinin and troponins T and I (Yamashita and Konagaya,  
196 1991). The observed pH in muscle tissue after death is near optimal for both these  
197 enzymes (Chéret *et al.*, 2007). The rapid activity increases observed in the current study  
198 indicate that the rate of protein breakdown by cathepsins B and L was faster than that by  
199 cathepsin H. This finding is in agreement with data for sea bass, as well as for beef  
200 (Wang and Xiong, 1999), suggesting that cathepsin H plays a secondary role in the  
201 postmortem proteolysis of fish (Chéret *et al.*, 2007). A novel not previously reported  
202 observation was the role of cathepsin H at 8 h after death. This may be due to the  
203 postmortem pH drop from 7.0 to 6.5 during the rigor mortis period of fish, while it later  
204 rises to values close to 7 (Chéret *et al.*, 2007). This pH point negatively affects the  
205 dissociation of amino acid side chains at the active site of the enzyme, affecting activity.

206         Based on Pearson correlation analysis, the three observed cathepsins degraded  
207 muscle protein concurrently, as indicated by the highly positive pairwise correlation  
208 coefficients ( $r = 0.987\text{--}0.997$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 32$ ), suggesting that the three cathepsins  
209 function synergistically on muscle proteins. In a comparison to a terrestrial animal,  
210 cathepsins degraded fish muscle faster than bovine muscle (Chéret *et al.*, 2007). This  
211 may be due to the fish having less complex structure of muscle, relative to bovine. In  
212 this study, floating the fish carcass in water also supported the hydrolysis capacity of the  
213 enzymes. Based on a prior investigation in the same species, however, the degradation  
214 of muscle was lesser than that of the gastrointestinal tract (Hahor *et al.*, 2015). Longer

215 observation times than those of the current study might help better understand the roles  
216 of these enzymes.

217 Postmortem changes of the physical dimensions of the intercellular space and/or  
218 intercellular/extracellular fluids significantly decrease the electrical conductivity  
219 (Querido, 1992). This prior finding is in agreement with the significant decrease in  
220 scavenging activity with postmortem delay, observed in the current study. The  
221 postmortem degradation of cells can have toxic effects through produced peroxides and  
222 free radicals that damage all components. Although the hydrolysis by proteolytic  
223 enzymes can release a mixture of various peptides that act as electron donors in DPPH  
224 system (Lassoued *et al.*, 2015), these constituents are not sufficient to compensate for  
225 the overproduction of free radicals after death. Moreover, at longer hydrolysis times the  
226 formed peptides have shorter chains and are less effective in scavenging DPPH• radicals  
227 (Lassoued *et al.*, 2015). However, based on our observations, the biochemical  
228 determination of this scavenging activity appears to be a sensitive indicator of the time  
229 delay since death.

230 Denaturation of myosin and actin can be caused by a pH drop (Tyska and  
231 Warsaw, 2002), and is followed with degradation by the proteolytic enzymes. Kuo *et*  
232 *al.* (2005) reported that denaturation temperature of muscle protein was lowered  
233 postmortem, and in the current study we observed decreased  $T_o$ ,  $T_p$  and  $T_c$ , and  
234 increased  $T_c-T_o$  with postmortem delay. These changes indicate the transformation or  
235 partial degradation of proteins by proteolytic cleavage. Thongprajukaew *et al.* (2015a)  
236 reported that a broad  $T_c-T_o$  range was due to the heterogeneity of polymer chain  
237 lengths. Increased values in the current study might be caused by the production of  
238 diverse polypeptide chains by enzymatic hydrolysis. This effect of the time delay after

239 death has also been observed in the red muscles of the same species (Nonthaput *et al.*,  
240 2015), as well as in red snapper, red mullet, and catfish (Schubring, 1999). According to  
241 our data, actin was more sensitive to postmortem changes than myosin. This is in  
242 agreement with the stable nature of tropical fish myosin, reported by Schubring (1999).  
243 However, the transition peaks of the proteins were no longer detected at 48 h after  
244 death, suggesting complete absence of native protein forms. This finding is in  
245 agreement with our earlier investigation of the red muscles of Nile tilapia (Nonthaput *et*  
246 *al.*, 2015), and with studies of the rigor mortis phase of frozen Atlantic salmon (within  
247 2–24 h after death) (Roth *et al.*, 2006) and of frozen barramundi within 3–24 h after  
248 death (Wilkinson *et al.*, 2008). Therefore, the muscles become flexible again as the  
249 proteins are completely degraded (Tyska and Warshaw, 2002). In higher animals, rigor  
250 mortis in rat develops within 5–24 h after death (Krompecher, 1994), while in human  
251 during summer (12.0–46.5°C) or winter (–2.6–35.4°C) this can take 8–30 h or 7–36 h,  
252 respectively (Dalal *et al.*, 2006). These differences in the time delay between aquatic  
253 and terrestrial animals are consequences of muscle structure and configuration of blood  
254 circulation (Gillis and Biewener, 2001). Furthermore, our current study was conducted  
255 in ambient water environment which may cause faster degradation rates due to both  
256 availability of water and the comparatively high temperatures in the tropics. In  $\Delta H$  or  
257  $\Sigma\Delta H$ , no significant differences within 24 h from death were observed. Both these  
258 thermal parameters indicate the amounts of proteins in native form. Beyrer and Klaas  
259 (2007) also reported no changes in total  $\Delta H$  for single or double frozen cod fillets.  
260 Similarly, while the temperature shift in the DSC thermogram can be used as an  
261 indicator of meat freshness,  $\Delta H$  cannot be used (Kuo *et al.*, 2005). Therefore, prior

262 studies support the conclusion that  $T_o$ ,  $T_p$ ,  $T_c$  and  $T_c-T_o$  are more sensitive to the  
263 qualitative postmortem changes in proteins than are  $\Delta H$  or  $\Sigma\Delta H$ .

264 In conclusion, the specific activities of cathepsins, the radical scavenging  
265 activity, and the degradation of myosin and actin were significantly affected by  
266 postmortem delay time. Based on our observations, the degradation rate of fish muscle  
267 in ambient aquatic environment, in the tropics, was faster than what is reported for  
268 terrestrial animals. In continuation of this reported research, a histopathological  
269 examination of the muscles for their postmortem changes is currently underway, in this  
270 same fish species. The findings from the current study suggest that the time of death of  
271 an aquatic animal, left to decay in ambient tropical waters, can be estimated from  
272 muscle samples of the carcass.

273

## 274 **References**

- 275 Aoki, T., Yokono, Yamashita, T. and Ueno, R. 2000. Distribution of cathepsin in red  
276 and white muscle among fish species. *Fisheries Science*. 66, 776–782.
- 277 Aranishi, F., Hara, K., Osatomi, K. and Ishihara, T. 1997. Cathepsins B, H and L in  
278 peritoneal macrophages and hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*.  
279 *Comparative Biochemistry and Physiology*. 117B, 605–611.
- 280 Beyrer, M. and Klaas, M.R. 2007. Influence of freezing and of frozen storage on the  
281 specific heat capacity of trout and herring fillet. *European Food*  
282 *Research and Technology*. 224, 349–353.
- 283 Campobasso, C.A., Vella, G.A. and Introna, F. 2001. Factors affecting decomposition  
284 and Diptera colonization. *Forensic Science International*. 120, 18–27.

- 285 Chéret, R., Delbarre-Ladrat, C., Lamballerie-Anton, M. and Verrez-Bagnis, V. 2007.  
286 Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. Food  
287 Chemistry. 115, 1228–1233.
- 288 Dalal, J.S., Tejpal, H.R., Chanana, A. and Kaur, N. 2006. Medicolegal study of rigor  
289 mortis to estimate postmortem interval. Journal of Indian Academy of Forensic  
290 Medicine. 28, 971–973.
- 291 Dekeirsschieter, J., Verheggen, F.J., Gohy, M., Hubrecht, F., Bourguignon, L., Lognay,  
292 G. and Haubruge, E. 2009. Cadaveric volatile organic compounds released by  
293 decaying pig carcasses (*Sus domesticus* L.) in different biotopes. Forensic  
294 Science International. 189, 46–53.
- 295 Gaarder, M.Ø., Bahuaud, D., Veiseth-Kent, E., Mørkøre, T. and Thomassen, M.S.,  
296 2012. Relevance of calpain and calpastatin activity for texture in super-chilled  
297 and ice-stored Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fillets. Food Chemistry. 132, 9–  
298 17.
- 299 Gillis, G.B. and Biewener, A.A. 2001. Hindlimb muscle function in relation to speed  
300 and gait: *in vivo* patterns of strain and activation in a hip and knee extensor of  
301 the rat (*Rattus norvegicus*). Journal of Experimental Biology. 204, 2717–2731.
- 302 Hahor, W., Thongprajukaew, K., Rodjaroen, S. and Nonthaput, T. 2015. Postmortem  
303 changes of digestive system in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Proceedings  
304 of the 53rd Kasetsart University Annual Conference, Bangkok, Thailand,  
305 February 3–6, 2015, 18–24.
- 306 Ho, M.L., Chen, G.H. and Jiang, S.T. 2000. Effect of mackerel cathepsins L and L like,  
307 and calpain on the degradation of mackerel surimi. Fisheries Science. 66, 558–  
308 568.

- 309 Jiang, S.T. 2000. Effect of proteinases on the meat texture and seafood quality. Journal  
310 of Agricultural and Food Chemistry. 2, 55–74.
- 311 Kočárek, P. 2003. Decomposition and Coleoptera succession on exposed carrion of  
312 small mammal in Opava, the Czech Republic. European Journal of Soil Biology.  
313 39, 31–45.
- 314 Krompecher, T. 1994. Experimental evaluation of rigor mortis VIII. Estimation of time  
315 since death by repeated measurements of the intensity of rigor mortis on rats.  
316 Forensic Science International. 68, 149–159.
- 317 Kuo, H.L., Chen, M.T., Liu, D.C. and Lin, L.C. 2005. Relationship between thermal  
318 properties of muscle proteins and pork quality. Asian-Australasian Journal  
319 of Animal Sciences. 18, 427–432.
- 320 Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J. and Fleurence, J. 2003. *In vitro* proteolysis of  
321 myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass  
322 (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of cathepsins B, D and L. Food Chemistry.  
323 81, 517–525.
- 324 Lasseter, A.E., Jacobi, K.P., Farley, R. and Hensel, L. 2003. Cadaver dog and handler  
325 team capabilities in the recovery of buried human remains in the southeastern  
326 United States. Journal of Forensic Sciences. 48, 617–621.
- 327 Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Aydi, M., Toldrá, F., Aristoy, M.C., Barkia, A. and  
328 Nasri, M. 2015. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of  
329 hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. Journal of  
330 Proteomics. 128, 458–468.

- 331 Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein  
332 measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*.  
333 193, 265–275.
- 334 Makinodan, Y., Akasaka, T., Toyohara, H. and Ikeda, S. 1982. Purification and  
335 properties of carp muscle cathepsin D. *Journal of Food Science*. 47, 647–652.
- 336 Matos, E., Silva, T.S., Tiago, T., Aureliano, M., Dinis, M.T. and Dias, J. 2011. Effect of  
337 harvesting stress and storage conditions on protein degradation in fillets of  
338 farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*): A differential scanning calorimetry  
339 study. *Food Chemistry*. 126, 270–276.
- 340 Nonthaput, T., Thongprajukaew, K., Rodjaroen, S., Hahor, W., 2015. Postmortem  
341 changes of muscle myosin and actin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).  
342 Proceedings of the 25th Thaksin University National Conference, Songkhla,  
343 Thailand, June 10–13, 2015, 87–94.
- 344 Querido, D. 1992. Postmortem changes in electrical resistance of the gastric wall during  
345 the early postmortem period in rats. *Forensic Science International*. 53, 81–92.
- 346 Rhee, M.S. and Kim, B.C. 2001. Effect of low voltage electrical stimulation and  
347 temperature conditioning on postmortem changes in glycolysis and calpains  
348 activities of Korean native cattle (Hanwoo). *Meat Science*. 58, 231–237.
- 349 Roth, B., Slinde, E. and Arildsen, J. 2006. Pre or post mortem muscle activity in  
350 Atlantic salmon (*Salmo salar*). The effect on rigor mortis and the physical  
351 properties of flesh. *Aquaculture* 257, 504–510.
- 352 Schubring, R. 1999. DSC studies on deep frozen fishery products. *Thermochimica Acta*.  
353 337, 89–95.

- 354 Skipnes, D., der Plancken, I.V., Loey, A.V. and Hendrickx, M.E. 2008. Kinetics of heat  
355 denaturation of proteins from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). Journal of  
356 Food Engineering. 85, 51–58.
- 357 Thongprajukaew, K., Rodjaroen, S., Tantikitti, C. and Kovitvadhi, U. 2015a.  
358 Physicochemical modifications of dietary palm kernel meal affect growth and  
359 feed utilization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Animal Feed Science and  
360 Technology. 202, 90–99.
- 361 Thongprajukaew, K., Rodjaroen, S., Yoonram, K., Sornthong, P., Hutcha, N.,  
362 Tantikitti, C. and Kovitvadhi, U. 2015b. Effects of dietary modified palm kernel  
363 meal on growth, feed utilization, radical scavenging activity, carcass  
364 composition and muscle quality in sex reversed Nile tilapia (*Oreochromis*  
365 *niloticus*). Aquaculture. 439, 45–52.
- 366 Tyska, M.J. and Warshaw, D.M. 2002. The myosin power stroke. Cell Motility and the  
367 Cytoskeleton. 51, 1–15.
- 368 Wang, B. and Xiong, Y.L. 1999. Characterization of the proteases involved in gel  
369 weakening of beef heart surimi. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47,  
370 887–892.
- 371 Wilkinson, R.J., Paton, N. and Porter, M.J.R. 2008. The effects of pre-harvest stress and  
372 harvest method on the stress response, rigor onset, muscle pH and drip loss in  
373 barramundi (*Lates calcarifer*). Aquaculture. 282, 26–32.
- 374 Yamashita, M. and Konagaya, S. 1991. Hydrolytic action of salmon cathepsins B and L  
375 to muscle structural proteins in respect of muscle softening. Nippon Suisan  
376 Gakkaishi. 57, 1917–1922.



377 Yates, L.D., Dutson, T.R., Caldwell, J. and Carpenter, Z.L. 1983. Effect of temperature  
378 and pH on the post-mortem degradation of myofibrillar proteins. Meat Science.  
379 9, 157–179.

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401 **Figure captions**

402

403 **Figure 1.** Postmortem changes in specific activity of the cathepsin B (a), H (b), and L  
404 (c), in white muscles of Nile tilapia carcass within 48 h after death. The data  
405 are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Different superscripts indicate  
406 significant differences between observation time points ( $P < 0.05$ ).

407

408 **Figure 2.** Postmortem changes in the DPPH scavenging activity of the white muscles of  
409 Nile tilapia carcass within 48 h after death. The data are expressed as mean  $\pm$   
410 SEM ( $n = 4$ ). Different superscripts indicate significant differences between  
411 observation time points ( $P < 0.05$ ).

412

413 **Figure 3.** Thermal transition properties of muscle from control Nile tilapia (0 h after  
414 death).  $T_o$  = onset temperature,  $T_p$  = peak temperature,  $T_c$  = conclusion  
415 temperature.

## 1 **Acknowledgements**

2           This work was supported by the budget revenue (Contract No. SCI570522S) and  
3 by the Graduate School Research Support Funding for Thesis, at the Prince of Songkla  
4 University (PSU). We further acknowledge the Department of Applied Science, Faculty  
5 of Science, PSU, for its support in providing access to chemicals and instruments used;  
6 Assoc. Prof. Dr. Seppo Karrila for English proofreading; and the Publication Clinic of  
7 the PSU for help in manuscript preparation.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

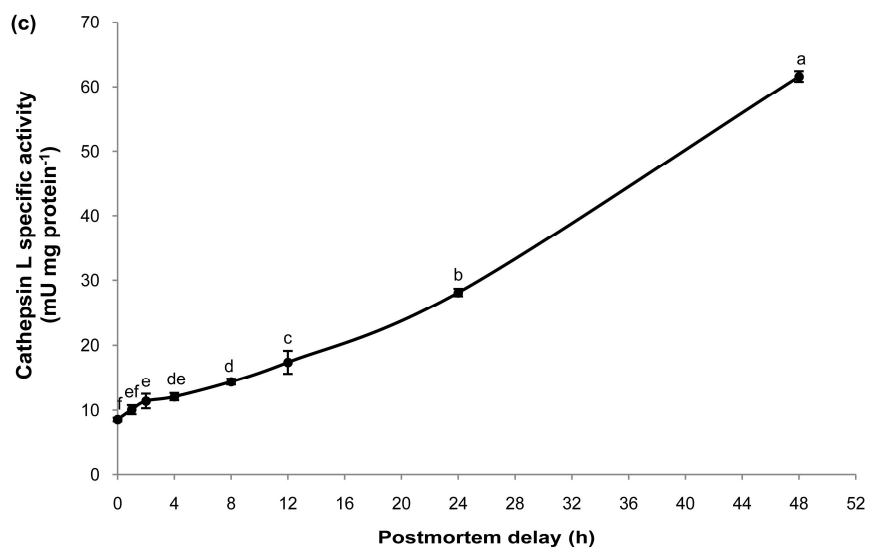
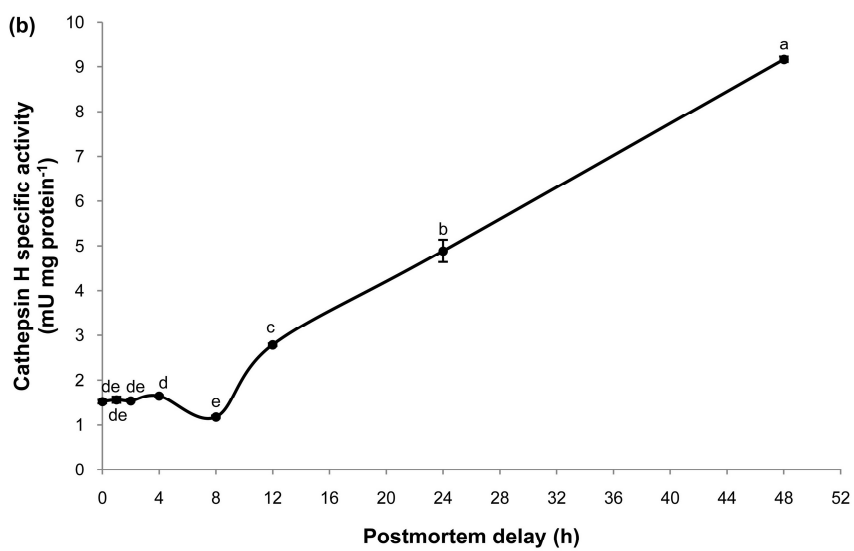
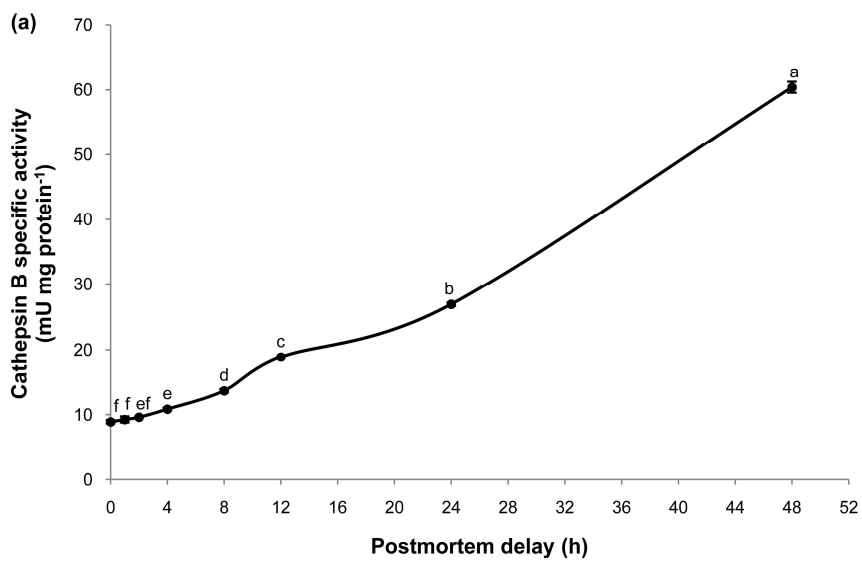
21

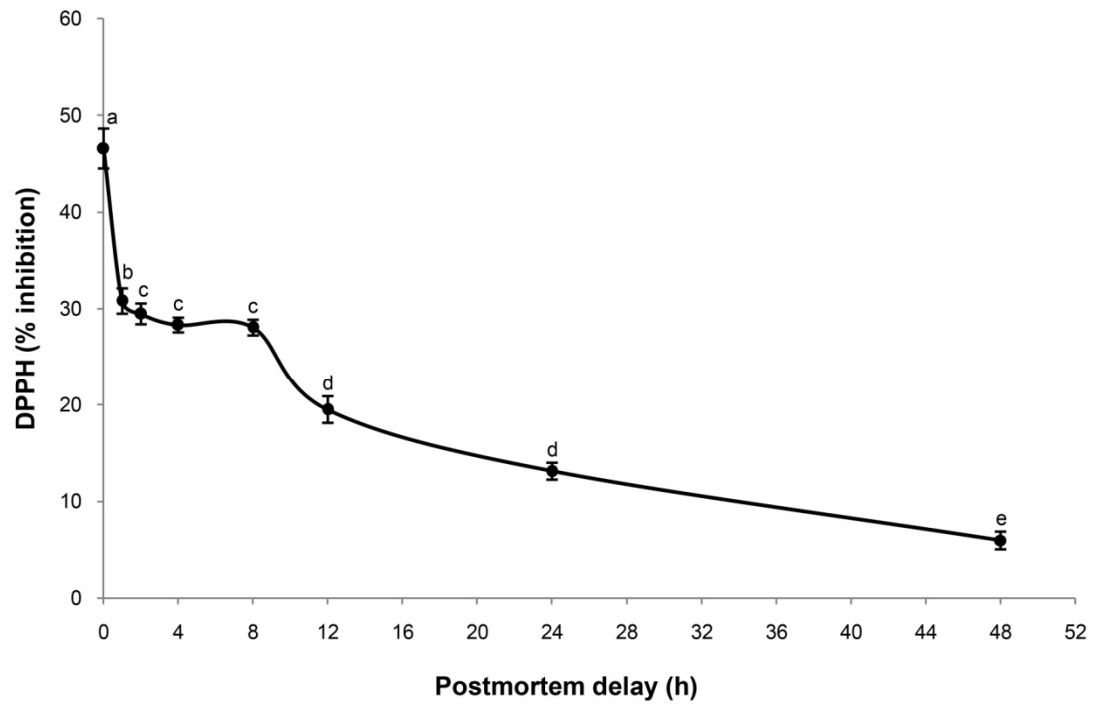
**Table 1.** Thermal transition characteristics of muscle proteins in sex reversed Nile tilapia in relation to postmortem time delay. The data were calculated from duplicate determinations and are expressed as mean (SEM)

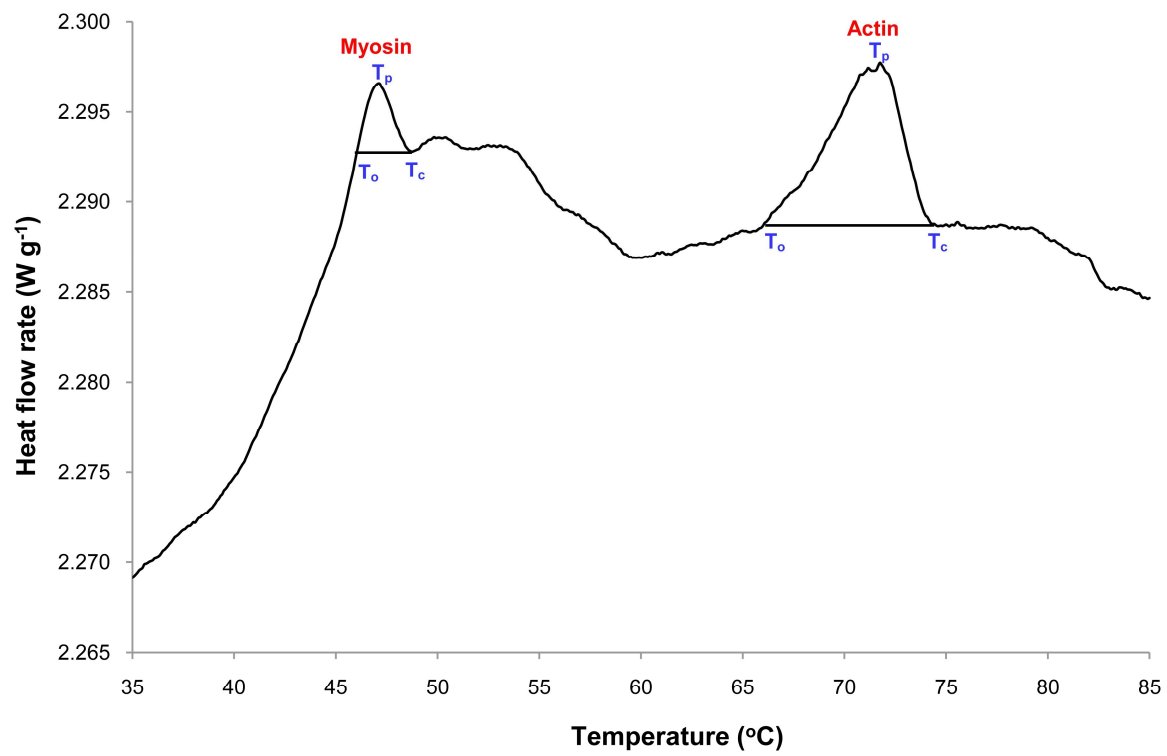
Postmortem delay (h)	Myosin					Actin					$\Sigma\Delta H$ (J g <sup>-1</sup> )
	T <sub>o</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	T <sub>c</sub> -T <sub>o</sub> (°C)	$\Delta H$ (J g <sup>-1</sup> )	T <sub>o</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	T <sub>c</sub> -T <sub>o</sub> (°C)	$\Delta H$ (J g <sup>-1</sup> )	
0	44.45 <sup>a</sup> (0.22)	46.88 <sup>a</sup> (0.03)	48.62 <sup>a</sup> (0.23)	4.18 <sup>b</sup> (0.44)	0.39 <sup>a</sup> (0.01)	68.31 <sup>a</sup> (0.50)	71.04 <sup>a</sup> (0.50)	73.42 <sup>a</sup> (0.37)	5.12 <sup>c</sup> (0.87)	0.34 <sup>a</sup> (0.09)	0.73 <sup>a</sup> (0.10)
1	43.35 <sup>ab</sup> (0.38)	46.67 <sup>a</sup> (0.06)	48.68 <sup>a</sup> (0.22)	5.33 <sup>ab</sup> (0.16)	0.42 <sup>a</sup> (0.10)	66.28 <sup>b</sup> (0.40)	70.67 <sup>a</sup> (0.35)	73.22 <sup>a</sup> (0.20)	5.94 <sup>abc</sup> (0.20)	0.31 <sup>a</sup> (0.05)	0.76 <sup>a</sup> (0.13)
2	43.42 <sup>ab</sup> (1.17)	46.55 <sup>a</sup> (0.44)	48.43 <sup>a</sup> (0.39)	5.01 <sup>ab</sup> (0.78)	0.37 <sup>a</sup> (0.05)	67.06 <sup>ab</sup> (0.50)	70.42 <sup>a</sup> (0.12)	72.72 <sup>a</sup> (0.04)	5.66 <sup>bc</sup> (0.54)	0.33 <sup>a</sup> (0.07)	0.70 <sup>a</sup> (0.02)
4	43.65 <sup>ab</sup> (0.11)	46.21 <sup>a</sup> (0.09)	48.28 <sup>a</sup> (0.12)	4.63 <sup>ab</sup> (0.23)	0.43 <sup>a</sup> (0.01)	66.26 <sup>b</sup> (0.08)	70.29 <sup>a</sup> (0.03)	72.59 <sup>a</sup> (0.01)	6.33 <sup>abc</sup> (0.06)	0.42 <sup>a</sup> (0.03)	0.85 <sup>a</sup> (0.04)
8	42.87 <sup>ab</sup> (0.09)	46.21 <sup>a</sup> (0.09)	48.71 <sup>a</sup> (0.33)	5.84 <sup>ab</sup> (0.24)	0.54 <sup>a</sup> (0.05)	67.09 <sup>ab</sup> (0.02)	70.42 <sup>a</sup> (0.06)	72.79 <sup>a</sup> (0.04)	5.70 <sup>bc</sup> (0.06)	0.39 <sup>a</sup> (0.03)	0.92 <sup>a</sup> (0.02)
12	42.16 <sup>ab</sup> (1.69)	47.00 <sup>a</sup> (0.29)	47.9 <sup>a</sup> (0.34)	4.56 <sup>ab</sup> (0.06)	0.43 <sup>a</sup> (0.09)	65.99 <sup>b</sup> (0.06)	69.92 <sup>a</sup> (0.47)	73.26 <sup>a</sup> (0.05)	7.27 <sup>ab</sup> (0.11)	0.39 <sup>a</sup> (0.03)	0.81 <sup>a</sup> (0.12)
24	39.72 <sup>b</sup> (0.03)	43.46 <sup>b</sup> (0.33)	45.96 <sup>b</sup> (0.27)	6.24 <sup>a</sup> (0.29)	0.32 <sup>a</sup> (0.04)	62.20 <sup>c</sup> (0.60)	66.79 <sup>b</sup> (0.15)	70.12 <sup>b</sup> (0.27)	7.92 <sup>a</sup> (0.34)	0.33 <sup>a</sup> (0.04)	0.68 <sup>a</sup> (0.04)
48	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

T<sub>o</sub>, onset temperature; T<sub>p</sub>, peak temperature; T<sub>c</sub>, conclusion temperature; T<sub>c</sub>-T<sub>o</sub>, melting temperature range;  $\Delta H$ , enthalpy; nd, not detected.

Different superscripts in the same column indicate significant differences between postmortem delays ( $P < 0.05$ ).







## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาววราภรณ์ ห่าหอ  
 รหัสประจำตัวนักศึกษา 5610220077  
 วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2555

## ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

1. ทุนผู้ช่วยวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (เลขที่สัญญา 1-2556-02-007)
2. ทุนวิจัยประเภททั่วไปจากสำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (เลขที่สัญญา SCI 570522S)
3. ทุนสนับสนุนการนำเสนอผลงานวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์
4. ทุนอุดหนุนวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน (ถ้ามี)

1. วราภรณ์ ห่าหอ, การุณ ทองประจุแก้ว, สมรภัช รอดเจริญ และตุลาคุณ นนทพุทท. 2558. การเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารภายหลังการตายของปลานิล *Oreochromis niloticus*. การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 53, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
2. Hahor, W., Thongprajukaew, K., Yoonram, K., Rodjaroen, S. 2015. Gastrointestinal functionality aquatic animal (*Oreochromis niloticus*) carcass in water allows estimating time of death. J. Forensic Sci. (revised).
3. Nonthaput, T., Hahor, W., Thongprajukaew, K., Yoonram, K., Rodjaroen, S. 2015. Muscle degradation in aquatic animal carcass allows estimating time of death in ambient water environment. Songklanakarin J. Sci. Technol. (under review)