

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหาร กล้ามเนื้อ และเกล็ดหลังการ  
ตายของปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

Postmortem changes of digestive system, muscle and scale  
of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. การุณ ทองประจุแก้ว  
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์  
ประจำปีงบประมาณ 2557 รหัสโครงการ SCI570522S

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนจากเงินรายได้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (เลขที่สัญญา SCI570522S) ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นเรศ ช้วนยุค และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมรักษ์ รอดเจริญ ที่ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือตลอดการทดลอง และขอขอบคุณ คุณอัครวิทย์ อีสสระโร นักวิทยาศาสตร์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ ศุภมาตย์ ภาควิชา วาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ช่วยให้คำแนะนำในการศึกษาด้าน จุลกายวิภาค

ผู้วิจัยขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโทที่ทำวิทยานิพนธ์ภายใต้โครงการวิจัยนี้ ได้แก่ นางสาว วราภรณ์ ห่าหอ (รหัสนักศึกษา 5610220077) และ นายตุลาคคุณ นนทพุทธ (รหัสนักศึกษา 5610220032) ที่มีส่วนสำคัญและช่วยเหลือจนทำให้โครงการวิจัยสำเร็จลุล่วงภายในระยะเวลาที่กำหนด

ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ตัวอย่าง หน่วย Publication Clinic สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการเตรียมต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ และขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

การุณ ทองประจุกแก้ว

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. การุณ ทองประจุกแก้ว)

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
รายการตาราง	(2)
รายการภาพประกอบ	(3)
บทคัดย่อ	(6)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
วิธีการทดลอง	22
ผลการทดลองและวิจารณ์	
ผลการทดลอง	30
วิจารณ์ผลการทดลอง	70
สรุปผลการทดลอง	82
เอกสารอ้างอิง	83
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป	101
ภาคผนวก	
ก สำเนาผลงานวิจัยที่นำเสนอแบบบรรยายในที่ประชุมวิชาการระดับชาติเรื่องที่ 1	103
ข สำเนาผลงานวิจัยที่นำเสนอแบบบรรยายในที่ประชุมวิชาการระดับชาติเรื่องที่ 2	110
ค สำเนาผลงานวิจัยในภาคผนวก ข ที่ถูกคัดเลือกให้ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ	119
ง สำเนาทบทวนที่ตีพิมพ์แล้วในวารสารระดับนานาชาติ	133
จ สำเนาทบทวนที่ตอบรับให้ตีพิมพ์แล้วในวารสารระดับนานาชาติ	143

## รายการตาราง

ตาราง	หน้า
1 การศึกษาเกี่ยวกับสารอินทรีย์ที่ระเหยได้หลังการตาย	20
2 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน ( $r$ ) ระหว่างตัวแปรแต่ละคู่ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารหลังการตายของปลานิล ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P < 0.01$ )	37
3 สมการถดถอยระหว่างเวลาหลังการตาย (ชั่วโมง) ของปลานิล (X) และตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหาร (Y) ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับเวลาหลังการตายอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P < 0.01$ )	38
4 สมการถดถอยระหว่างเวลาหลังการตาย (ชั่วโมง) ของปลานิล (X) และเอนไซม์คาเทปซินในกล้ามเนื้อขาว (Y) ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับเวลาหลังการตายอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P < 0.01$ )	41
5 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน ( $r$ ) ระหว่างการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวหลังการตายของปลานิล ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P < 0.01$ )	43
6 สมการถดถอยระหว่างเวลาหลังการตาย (ชั่วโมง) ของปลานิล (X) และการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาว (Y) ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับเวลาหลังการตายอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P < 0.01$ )	43
7 คุณลักษณะเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อแดงของปลานิลแปลงเพศหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)	46
8 คุณลักษณะเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อขาวของปลานิลแปลงเพศหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)	47
9 องค์ประกอบของธาตุ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) จากเกล็ดปลานิล หลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (ค่าน้อยสุด-ค่ามากที่สุด)	62
10 สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) หลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ	65

## รายการภาพประกอบ

ภาพ	หน้า
1 การเปลี่ยนแปลงดัชนีของกระเพาะอาหาร (a) และลำไส้ (b) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ด้วยที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ )	31
2 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโปรตีนในกระเพาะอาหาร (a) และลำไส้ (b) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ด้วยที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ )	32
3 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมจำเพาะ (mU mg protein <sup>-1</sup> ) ของเอนไซม์เปปซิน (a) ทริปซิน (b) และโคโมทริปซิน (c) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ด้วยที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ )	34
4 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลส (a, U mg protein <sup>-1</sup> ) และไลเปส (b, mU mg protein <sup>-1</sup> ) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ด้วยที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ )	35
5 การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระในกระเพาะอาหาร (a) และลำไส้ (b) (% inhibition) และความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในกระเพาะอาหาร (c) และลำไส้ (d) (% remaining) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ด้วยที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ )	36
6 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมจำเพาะ (mU mg protein <sup>-1</sup> ) ของเอนไซม์คาเทปซินบี (a) เอช (b) และแอล (c) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ด้วยที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ )	40
7 การเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อปลานิลหลังการตาย 48 ชั่วโมง โดยใช้วิธี DPPH กล้ามเนื้อแดง (a) และกล้ามเนื้อขาว (b) และวิธี reducing power กล้ามเนื้อแดง (c) และ กล้ามเนื้อขาว (d) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ด้วยที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญ	42

## รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ตาราง	หน้า
ระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ ) (ต่อ)	
8	45
สมบัติเชิงความร้อนของไมโอซิน และแอกทิน ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้น ( $T_o$ ) อุณหภูมิพีค ( $T_p$ ) และอุณหภูมิสุดท้าย ( $T_c$ ) ในกล้ามเนื้อแดง (a) และ กล้ามเนื้อขาว (b) ของปลานิลในชุดควบคุม (0 ชั่วโมงหลังการตาย)	
9	49
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	
10	50
จุลกายวิภาคของกระเพาะอาหาร (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, B = blood vessel) (H&E, scale bar = 50) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 200 เท่า	
11	52
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 $\mu$ m) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 40 เท่า	
12	53
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 $\mu$ m) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 200 เท่า	
13	55
จุลกายวิภาคของตับ (ตัดตามยาว) ของปลานิลหลังการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e) และ 12 ชั่วโมง (f) (HE = hepatocyte, SI = hepatic sinusoid, NC = necrotic cell) (H&E, scale bar = 10 $\mu$ m) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 400 เท่า	
14	56
จุลกายวิภาคของตับอ่อน (ตัดตามยาว) ของปลานิลหลังการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e) และ 12 ชั่วโมง (f) (HE = hepatocyte, AC = acinar cell, ZG = zymogen granule) (H&E, scale bar = 10 $\mu$ m) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 400 เท่า	
15	58
จุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อแดง (ตัดตามขวาง) ของปลานิลหลังการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (h) (MF = muscle fiber, RBC = red blood cell, Arrowhead = endomysium) (H&E, scale bar = 10	

µm) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 400 เท่า

### รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ตาราง	หน้า
16 จุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อขาว (ตัดตามขวาง) ของปลานิลหลังการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (h) (MF = muscle fiber, Arrowhead = endomysium) (H&E, scale bar = 10 µm) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 400 เท่า	59
17 ลักษณะของเกล็ดปลานิลหลังการตาย 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (h) ภาพถ่ายบันทึกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 500 เท่า	60

## บทคัดย่อ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงหลังการตายของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยสุ่มตัวอย่างปลา (น้ำหนัก  $105.83 \pm 1.66$  กรัม และความยาว  $18.55 \pm 0.14$  เซนติเมตร) มาลอยในภาชนะที่บรรจุน้ำ และเก็บตัวอย่าง ( $n = 4$ ) ที่เวลา 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการตาย เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารและกล้ามเนื้อ องค์ประกอบของธาตุจากเกล็ด และสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก ผลการศึกษาพบว่าดัชนีของกระเพาะอาหารและลำไส้ ความเข้มข้นของโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหาร (เปปซิน ทริปซิน ไคโมทริปซิน อะไมเลส และไลเปส) และกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระของอวัยวะในระบบย่อยอาหารมีค่าลดลงตามระยะเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ ) โดยเอนไซม์ย่อยไขมันมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงหลังการตายมากกว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต และการเปลี่ยนแปลงในลำไส้เกิดขึ้นเร็วกว่าในกระเพาะอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของวิลไลในลำไส้ ผนังเนื้อเยื่อ และเซลล์ภายใน lamina propria รวมทั้งจุลกายวิภาคของตับและตับอ่อน การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในกล้ามเนื้อพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์คาเทปซินบี เอช และแอล มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังการตาย ขณะที่การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมีค่าลดลง การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสอดคล้องกับสมบัติเชิงความร้อนของไมโอซินและแอคทิน และลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อที่มีการสลายตัว สำหรับในเกล็ดพบว่าการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากภาวะขาดน้ำและการสลายตัวของคอลลาเจน และพบธาตุหลักทั้งหมด 8 ชนิด ที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญหลังการตาย การศึกษาสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากพบสารประกอบทั้งหมด 65 ชนิด สารส่วนใหญ่มีรายงานตรวจพบในสัตว์น้ำและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ปล่อยออกมาเพื่อดึงดูดสิ่งมีชีวิตอื่นมายังซาก และมีสารหลายชนิดที่มีศักยภาพสำหรับใช้ประเมินระยะเวลาหลังการตายได้ ข้อมูลจากการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ในการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารและกล้ามเนื้อ องค์ประกอบของธาตุจากเกล็ด และสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก เพื่อประมาณระยะเวลาหลังการตายของสัตว์น้ำ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมลพิษทางน้ำและการกระทำทารุณกรรมสัตว์น้ำได้



## 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 in water, and the 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, scale elemental profile and cadaveric volatile organic compounds (VOCs). Stomasomatic and intestosomatic indices, protein concentration, specific activity of digestive enzymes (pepsin, trypsin, chymotrypsin, amylase and lipase) and scavenging activity were decreased with postmortem times. The digestive enzymes exhibited earlier lipid degradation than carbohydrate or protein. The intestine changed more rapidly than the stomach. The coherent changes in the stomach and the intestine, consistent with postmortem degradation in microanatomy of both organs (lumen, wall and cells within lamina propria) as well as in hepatopancreas. Specific activity of the muscle cathepsins B, H and L increased significantly with postmortem times while the scavenging activity was decreased. These observed changes are accordant with thermal properties of myosin and actin, and degradation in muscle microanatomy. For scale, drying was occurred due to the dehydration and degradation of collagen. The main eight elements were detected during investigation and all values were changed with time since death. The sixty-five VOCs were detected; these most compounds are previously reported in some aquatic animals and mammals in relation to attraction of insects to the carcasses. Various VOCs exhibited a key potential for discriminating the time since death. Overall, the findings suggest that the postmortem changes of digestive system and muscle, scale elemental profile and VOCs 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.

## บทนำ

สิ่งมีชีวิตที่ตายแล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) กลไกดังกล่าวขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารประกอบและผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเมแทบอลิซึม รวมทั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิต (endogenous enzyme) (จิรวัดน์ และสุรสิทธิ์, 2554) การย่อยตัวเองโดยเอนไซม์คาเทปซิน (cathepsin) ในกล้ามเนื้อจะทำให้มีการสลายตัวของโปรตีนไมโอไฟบริล (myofibril) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนไมโอซิน (myosin) และแอกทิน (actin) ที่ทำหน้าที่โดยตรงเกี่ยวกับการหดและคลายตัว (McMahon, 1984; Tyska and Warshaw, 2002) ส่งผลให้กล้ามเนื้ออ่อนตัวลง (Liu *et al.*, 2008) นอกจากนี้ เมื่อสัตว์ตายยังมีการปล่อยสารอินทรีย์ระเหยง่ายที่มีกลิ่นไม่พึงประสงค์เพื่อดึงดูดแมลงมากินซาก ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารอาหารหลักทั้งไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (Shahidi and Botta, 1994) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวข้างต้นจะส่งผลให้กล้ามเนื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น 3 ระยะ คือ ระยะก่อนการเกร็งตัว (pre-rigor mortis) โดยทำให้กล้ามเนื้ออ่อนตัว มีรอยเขียวช้ำ และมีความยืดหยุ่น (Shahidi and Botta, 1994) ระยะการเกร็งตัว (rigor mortis) ซึ่งกล้ามเนื้อจะเกร็งมากที่สุด แข็งทื่อ และไม่ยืดหยุ่น และระยะสิ้นสุดการเกร็งตัว (post-rigor mortis) ซึ่งจะทำให้เนื้อนิ่ม ไม่ยืดหยุ่น และเสื่อมคุณภาพ (Fraser and Sumar, 1998; Chytiri *et al.*, 2004)

ระบบย่อยอาหารมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วหลังการตายเนื่องจากเกิดการย่อยตัวเอง ของอวัยวะย่อยอาหารและเนื้อเยื่อโดยรอบจากการทำงานของเอนไซม์ (O'Donnell and Baker, 2010; Laczniak *et al.*, 2011; Usui *et al.*, 2013) การศึกษาของ Querido (1992) พบว่าความต้านทานไฟฟ้าของผนังกระเพาะอาหารลดลงตามระยะเวลาหลังการตาย ขณะที่ Erlandsson และ Munro (2007) รายงานว่าลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อลำไส้เกิดการเสื่อมสภาพลงเมื่อเวลาผ่านไป กระบวนการดังกล่าวยังส่งผลให้เซลล์ตับหดตัว มีรูปร่างผิดปกติไปจากเดิม และเกิดช่องว่างระหว่างเซลล์มากขึ้น ทำให้องค์ประกอบในเซลล์ตับถูกแทนที่ด้วยน้ำเลือดและไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ เมื่อแบคทีเรียในลำไส้แพร่กระจายเข้าสู่ตับก็จะทำให้เกิดการเน่าเปื่อย และส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงในทุกๆระบบในระยะเวลาต่อมา (Yamamoto *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2003) ผลการศึกษาเหล่านี้บ่งชี้ว่าอวัยวะในระบบย่อยอาหารมีบทบาทสำคัญและมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้เพื่อประมาณระยะเวลาหลังการตายได้

การศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงหลังการตาย (postmortem change) มีรายงานบางส่วนแล้วในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด (Rhee and Kim, 2001; Kočárek, 2003; Lasseter *et al.*, 2003; Dekeirsschietter *et al.*, 2009) สำหรับการศึกษาในสัตว์น้ำพบว่ามีรายงานน้อยมาก อีกทั้งการศึกษาส่วนใหญ่ยังกระทำภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่ำเพื่อประยุกต์ใช้ในงานทางด้านอาหาร สำหรับการตายที่เกิดขึ้นในแหล่งอาศัยของสัตว์น้ำยังไม่มีการศึกษามาก่อน ดังนั้น การศึกษาโดยใช้ปลาไนล (Oreochromis

*niloticus*) เป็นต้นแบบจะทำให้มีความเข้าใจเกี่ยวกับชีววิทยาหลังการตายของสัตว์น้ำมากยิ่งขึ้น อีกทั้งปลาชนิดนี้ยังมีข้อมูลพื้นฐานทางด้านชีววิทยาค่อนข้างมาก (Morrison and Wright Jr, 1999; Nielsen and Nielsen, 2001; Wang *et al.*, 2010) เป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย เลี้ยงและขยายพันธุ์ได้ง่าย เจริญเติบโตเร็ว ให้ผลผลิตสูง และเนื้อมีรสชาติดีเป็นที่นิยมบริโภคของคนทั่วไป (Pasnik *et al.*, 2006) นอกจากนี้ เกล็ดของปลาซึ่งมีการสร้างและสะสมแร่ธาตุไว้ (Onozato and Watabe, 1979; Zylberberg and Nicolas, 1982) ยังมีการเปลี่ยนแปลงที่ตอบสนองต่อปัจจัยทั้งทางด้านชีววิทยาของสัตว์ และปัจจัยทางด้านเคมีกายภาพของแหล่งน้ำ (Gillanders, 2001) อีกทั้งซากสัตว์ยังสามารถปล่อยสารอินทรีย์ระเหยที่มีกลิ่นอันไม่พึงประสงค์เพื่อดึงดูดแมลงมากินซาก ซึ่งเกิดจากองค์ประกอบของสารอาหารหลักทั้งไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (Shahidi and Botta, 1994) ดังนั้น ระยะเวลาหลังการตายของปลาจึงอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงแร่ธาตุและสารอินทรีย์ระเหยได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณได้

การศึกษาค้นคว้านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงหลังการตายของระบบย่อยอาหารกล้ามเนื้อ และเกล็ด ผลการศึกษาคาดว่าสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจำแนกระยะเวลาหลังการตาย (postmortem interval) ของสัตว์น้ำได้ ซึ่งอาจเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาด้านนิติวิทยาศาสตร์ทางน้ำ โดยอาจใช้สำหรับสืบสวนและสอบสวนคดีความที่เกี่ยวข้องกับการตายของสัตว์น้ำในฟาร์มเลี้ยงและการตายจากการถูกรุณกรรม (animal cruelty) หรือใช้ประมาณช่วงเวลาหลังการตายในการขนส่งสัตว์น้ำที่สำคัญทางเศรษฐกิจทั้งสัตว์น้ำที่เลี้ยงเพื่อบริโภคเป็นอาหารและเลี้ยงเป็นสัตว์น้ำสวยงามในกรณีที่มีการทำประกันภัยความเสียหายระหว่างการขนส่ง

## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหาร กล้ามเนื้อ และเกล็ดหลังการตายของปลานิล (*O. niloticus*) ทั้งในด้านชีววิทยาและชีวเคมี

## การตรวจเอกสาร

### 1. ชีววิทยาของปลานิล

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบ  
ลุ่มน้ำในทวีปแอฟริกา แพร่กระจายไปทั่วทุกภูมิภาคของโลก นิยมทำการเพาะเลี้ยงกันอย่างกว้างขวาง  
เนื่องจากสามารถขยายพันธุ์ได้ดี เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว และปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี (Pasnik  
*et al.*, 2006) ลำดับทางอนุกรมวิธานของปลานิลสามารถจำแนกได้ดังนี้

Kingdom Animalia

Phylum Chordata

Class Actinopterygii

Order Perciformes

Family Cichlidae

Genus *Oreochromis*

Species *Oreochromis niloticus*

ปลานิลมีรูปร่างลักษณะคล้ายปลาหมอ คือ มีริมฝีปากบนและฝีปากล่างเสมอกัน ลำตัวป้อม มีสี  
เขียวปนน้ำตาล ที่ลำตัวมีลายพาดขวาง 9-10 แถว ครีบหลังมีเพียง 1 ครีบ ประกอบด้วยก้านครีบแข็ง และ  
ก้านครีบอ่อนเป็นจำนวนมาก ครีบอื่นประกอบด้วยก้านครีบแข็ง และก้านครีบอ่อนเช่นเดียวกัน บริเวณส่วน  
ที่อ่อนของครีบหลัง ครีบอื่น และครีบหางมีจุดขาวและเส้นสีดำตัดขวาง (สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ,  
2536) รูปร่างภายนอกของปลานิลตัวผู้และตัวเมียมีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่เมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ ปลา  
นิลตัวผู้มักจะมีขนาดใหญ่กว่า การแยกเพศของปลานิลสามารถทำได้โดยดูอวัยวะเพศที่บริเวณใกล้กับช่อง  
ทวาร ซึ่งปลาต้องมีความยาวตั้งแต่ 10 เซนติเมตรขึ้นไป จึงจะสามารถจำแนกเพศได้ชัดเจน โดยบริเวณ  
อวัยวะเพศของตัวผู้ จะมีลักษณะเรียวยาวยื่นออกมา มีรูเปิด 2 รู คือ รูกัน และรูเปิดรวมของท่อน้ำเชื้อและ  
ท่อน้ำสภาวะ ส่วนตัวเมียบริเวณอวัยวะเพศจะมีสีซีดกว่าตัวผู้ มีรูเปิด 3 รู คือ รูกัน รูท่อน้ำไขเป็นรูปกลมใหญ่  
และรูท่อน้ำสภาวะ นอกจากนี้ยังสามารถสังเกตเพศของปลานิลได้จากสีของตัวปลา ซึ่งตัวผู้จะมีสีเข้ม  
โดยเฉพาะในฤดูผสมพันธุ์ แถบขวางลำตัวมองเห็นไม่ชัด ครีบต่างๆ จะยาวกว่าตัวเมีย บริเวณใต้คางจะมีสี  
แดง ในขณะที่ลำตัวของตัวเมียจะมีสีซีดกว่า ใต้คางมีสีเหลือง มองเห็นแถบขวางข้างตัวได้ชัดเจน และครีบ  
ต่างๆ จะสั้นกว่าเมื่อเทียบกับตัวผู้

ปลานิลเป็นปลาที่ชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง ยกเว้นในช่วงสืบพันธุ์ สามารถปรับตัวให้เข้ากับ  
สภาพแวดล้อมได้ดี เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ในเวลา 1 ปี จะมีน้ำหนักประมาณครึ่งกิโลกรัม และมีความ

ยาวประมาณ 1 ฟุต อาศัยได้ทั้งน้ำจืดและน้ำกร่อย ทนต่อความเค็มได้ถึง 20 ส่วนในพันส่วน แต่จะไม่สามารถสืบพันธุ์ได้หากมีความเค็มสูงกว่า 30 ส่วนในพันส่วน (Fineman-Kalio, 1988) ทนต่อค่าพีเอชได้ดีในช่วง 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 (อุดม, 2549)

ปลานิลมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เมื่อพร้อมที่จะสืบพันธุ์จะแยกตัวออกมาจากฝูง โดยปลาตัวผู้แยกออกไปสร้างรัง จะแผ่ครีบทางและอ้าปากกว้าง แสดงพฤติกรรมจับคู่โดยว่ายน้ำเคล้าคู่กันไปกับตัวเมีย ใช้บริเวณส่วนหัวคุดที่ใต้ท้องของตัวเมียเพื่อเป็นการกระตุ้นให้วางไข่ โดยปลาตัวเมียจะเก็บไข่ที่ได้รับการผสมแล้วอมไว้ในปากและว่ายออกจากรัง แม่ปลาจะขยับปากให้น้ำไหลเข้า-ออกในช่องปาก เพื่อช่วยให้ไข่ที่อมไว้ได้รับน้ำที่สะอาด ปริมาณไข่ที่แม่ปลาวางแต่ละครั้งจะขึ้นอยู่กับฤดูกาลและขนาดของแม่ปลา ในเขื่อน Emiliano Zapata ของเม็กซิโก ฤดูวางไข่ของปลานิลอยู่ในช่วงเดือนสิงหาคมและเดือนกุมภาพันธ์ ปลานิลตัวเมียที่เจริญพันธุ์เต็มที่ (mature) มีความยาวประมาณ 150 มิลลิเมตร ส่วนตัวผู้จะมีความยาวประมาณ 152 มิลลิเมตร โดยปลานิลตัวเมียจะวางไข่ได้ครั้งละประมาณ 243–847 ฟอง (Peña-Mendoza *et al.*, 2005) สำหรับในประเทศไทย ปลานิลมีความถี่ในการวางไข่สูงในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนตุลาคม เนื่องจากเป็นช่วงฤดูฝน อุณหภูมิและระดับน้ำเพิ่มขึ้น สัตส่วนของสารเคมีหรือของเสียลดลง โดยจะวางไข่ได้ครั้งละประมาณ 100–700 ฟอง (Bhujje, 2000) เมื่อตัวเมียวางไข่แล้ว ปลานิลตัวผู้จะปล่อยน้ำเชื้อลงไปในไข่จนกว่าการผสมพันธุ์เสร็จ ใช้เวลาประมาณ 1–2 ชั่วโมง ไข่จะพัฒนาเป็นลูกปลาวัยอ่อนภายใน 8 วัน ในช่วงที่ลูกปลาฟักออกมาเป็นตัวใหม่ๆ จะเกาะรวมตัวกันเป็นกลุ่ม ว่ายวนเวียนอยู่บริเวณหัวของแม่ปลา หลังจาก 3 สัปดาห์ ลูกปลาจะหากินเองได้ ปกติปลานิลสามารถผสมพันธุ์ได้ตลอดปี โดยใช้เวลา 2–3 เดือนต่อครั้ง แต่ถ้าอาหารเพียงพอและเหมาะสมจะผสมพันธุ์ได้ 5–6 ครั้ง ในระยะเวลา 1 ปี (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, 2551)

## 2. อาหารและระบบย่อยอาหารของปลานิล

ปลานิลดำรงชีวิตเป็นผู้บริโภคลำดับที่สอง ส่วนใหญ่กินพืชเป็นอาหารและสามารถผลิตโปรตีนที่มีคุณภาพสูงสำหรับการบริโภคของมนุษย์ (Bezerra *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2009) ปลานิลกินอาหารที่ได้จากธรรมชาติได้หลายชนิดทั้งพืชและสัตว์ เช่น ไรน้ำ ตะไคร่น้ำ ตัวอ่อนแมลง และสัตว์เล็กๆ รวมทั้งสาหร่ายและแพลง (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 และตัวเต็มวัยถึงแม่พันธุ์ มีความต้องการโปรตีน 35–40 เปอร์เซ็นต์, 28–35 เปอร์เซ็นต์ และ 20–30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (วีรพงศ์, 2536) สำหรับความต้องการคาร์โบไฮเดรต พบว่าปลานิลมีการใช้ประโยชน์จากคาร์โบไฮเดรตได้ดี เนื่องจากสามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยแป้งในทางเดินอาหารได้ (เวียง, 2542) แต่ควรมีวัตถุดิบอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต เช่น ปลายข้าวและมันสำปะหลังไม่เกิน 35 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารของปลาขนาดเล็ก 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 และ 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 มีชั้นทูนิกามัสคูลาริส (tunica muscularis) ที่ประกอบด้วยกล้ามเนื้อลาย (striated muscle) 2 ชั้น โดยชั้นนอกเรียงตัวเป็นวงกลม (outer circular) และชั้นในเรียงตัวตามแนวยาว (inner longitudinal)

#### 2. กระเพาะอาหาร (stomach)

กระเพาะอาหารของปลานิลแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ กระเพาะอาหารส่วนต้น (cardiac) ส่วนกลาง (fundus) และส่วนปลาย (pyloric) โดยทั่วไปกระเพาะอาหารประกอบด้วยต่อมสร้างน้ำย่อย

(gastric gland) ยกเว้นด้านหน้า (anterior surface) ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อลายที่มีต่อมทิวบูลาร์ (tubular gland) ที่ประกอบไปด้วยเซลล์สร้างเมือกขนาดใหญ่กับเบซัลนิวคลีไอ (basal nuclei) ต่อมทิวบูลาร์ของหลอดอาหารจะยื่นขยายตามแนวพื้นผิวด้านหน้าของกระเพาะอาหารไปยังท่อของกระเพาะอาหารส่วนปลาย (tubular pyloric portion) และลิ้นอิลิโอ-เรกตัล (ileo-rectal valve) สำหรับด้านล่าง (ventral) ของกระเพาะอาหาร ต่อมทิวบูลาร์จะค่อยๆ เปลี่ยนแปลงไปเป็นต่อมสร้างน้ำย่อย บริเวณต่อมนี้จะพบมิวคัสเนคเซลล์ (mucous neck cell) ซึ่งทำหน้าที่หลังเมือกออกมาเคลือบกระเพาะเพื่อป้องกันการถูกย่อยในชั้นมัสคูลาริส กระเพาะอาหารส่วนปลายจะประกอบไปด้วยกล้ามเนื้อลายยื่นขยายเป็นระยะสั้นๆ และมีกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) ที่ชั้นในเรียงตัวเป็นวงกลมและชั้นนอกเรียงตัวตามยาว บริเวณกล้ามเนื้อหูรูดของกระเพาะอาหารส่วนปลาย (pyloric sphincter) มีการเปลี่ยนแปลงจากต่อมทิวบูลาร์ไปเป็นเยื่อบุผิวลำไส้ (intestinal epithelium) ซึ่งประกอบด้วยเยื่อบุผิวคอลัมน์ (columnar epithelium) และเซลล์สร้างเมือกขนาดเล็ก

### 3. ลำไส้ (intestine)

ลำไส้ของปลานิลแบ่งออกเป็นลำไส้ส่วนหน้า (anterior portion) และส่วนปลาย (posterior portion) (Scocco *et al.*, 1997; Gargiulo *et al.*, 1998) ซึ่งชั้นมิวโคซา (mucosa) ประกอบไปด้วยเยื่อบุคอลัมน์และเซลล์สร้างเมือกขนาดเล็ก ส่วนในชั้นมัสคูลาริส (muscularis) มีเซลล์กล้ามเนื้อลายเป็นชั้นบางๆ อยู่อย่างต่อเนื่อง สำหรับบริเวณลิ้นอิลิโอ-เรกตัล ประกอบไปด้วยชั้นของกล้ามเนื้อเรียบที่เรียงตัวเป็นวงกลม (circular layer of smooth muscle)

ตับของปลานิลจะรวมอยู่กับตับอ่อน (hepatopancreas) ส่วนประกอบที่สำคัญ ได้แก่ เซลล์ตับ (hepatocyte) อยู่ถัดลงไปจากชั้นเยื่อบุผิว โดยเซลล์ตับของปลานิลมีลักษณะคล้ายกับปลากระดูกแข็งชนิดอื่นๆ (Kendall and Hawkins, 1975; Hinton and Pool, 1976; Beccaria *et al.*, 1992) พบท่อเลือด (sinusoid) แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ตับ และมีกลุ่มของตับอ่อน (exocrine pancreas) แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ตับด้วย โดยพบเป็นกลุ่มล้อมรอบท่อเลือดที่อยู่ในตับ ซึ่งประกอบด้วยเซลล์อะซินาร์ (acinar cell) อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม มีนิวเคลียสทรงกลมขนาดใหญ่อยู่ที่ฐานของเซลล์ และมีไซโทพลาซึม ภายในไซโทพลาซึมพบไซโมเจนแกรนูล (zymogen granule) นอกจากนี้ ตับยังมีส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน หลอดน้ำเหลือง เส้นประสาท และท่อน้ำดี เนื่องจากตับต้องใช้พลังงานจำนวนมากในการทำหน้าที่ จึงเป็นอวัยวะที่มีไมโทคอนเดรียอยู่มาก และมีอุณหภูมิสูงกว่าอวัยวะอื่น (Arias *et al.*, 1994) ลักษณะทางจุลกายวิภาคของตับในสภาวะปกติจะมีลักษณะเป็นไซโทพลาซึมทรงสี่เหลี่ยม เป็นเนื้อเดียวกัน และมีนิวเคลียสทรงกลมขนาดใหญ่อยู่ตรงกลาง หรืออยู่บริเวณใกล้จุดศูนย์กลางของไซโทพลาซึม ล้อมรอบไปด้วยนิวคลีโอลัส (nucleolus) อย่างหนาแน่น (Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2006) เซลล์ตับและนิวเคลียสจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างและขนาดอย่างเห็นได้ชัด เมื่อปลาได้รับสารพิษที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำ โดยจากการศึกษาลักษณะ

ทางจุลกายวิภาคของตับ พบว่าเซลล์ตับจะย่อยเม็ดสีชมพู ในขณะที่เซลล์อะซินาร์ของตับอ่อนจะย่อยเม็ดสีม่วง และไซโมเจนแกรนูลย่อยเม็ดสีแดง (Paris-Palacios *et al.*, 2000)

### 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)

#### 3.1 เปปซิน

เปปซินเป็นอะซิดิกโปรติเอส (acidic protease) พบได้ทั่วไปในน้ำย่อยของสัตว์มีกระดูกสันหลังและกระเพาะอาหารของปลา ทำหน้าที่ย่อยสารอาหารประเภทโปรตีนให้มีขนาดเล็กลง ก่อนส่งไปย่อยต่อที่ลำไส้เล็ก เอนไซม์เปปซินถูกสร้างขึ้นในรูปเปปซิโนเจนที่ไม่สามารถทำงานได้ โดยผนังชั้นในสุดของกระเพาะอาหารหลังกรดไฮโดรคลอริกออกมา ทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรด เพื่อเปลี่ยนเปปซิโนเจนเป็นเอนไซม์เปปซิน ตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลข้างเป็นอะโรมาติก ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโทเฟน เปปซินสามารถทำงานได้ดีในสภาพที่เป็นกรด (Simpson, 2000) ในกระเพาะอาหารของปลา pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*) เปปซิน A และ B มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 3.0–3.5 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Klomkiao *et al.*, 2007) ส่วนกระเพาะอาหารของปลา Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) 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) สำหรับการศึกษาใน bolti fish (*Tilapia nilotica*) พบว่าอะซิดิกโปรติเอสมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 2.5 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Beltagy *et al.*, 2004) ส่วนในปลานิล (*O. niloticus* และ *O. aureus*) ระยะวัยอ่อน อะซิดิกโปรติเอสในกระเพาะอาหารสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 1.6–3.3 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (Sheng *et al.*, 2006)



### 3.2 ทริปซิน

ทริปซินเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทหลักในการควบคุมการย่อยโปรตีน โดยทำหน้าที่กระตุ้นโปรเอนไซม์ (proenzyme) หรือไซโมเจน (zymogen) ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนได้หลายชนิด ได้แก่ ทริปซิโนเจน (trypsinogen) ไคโมทริปซิโนเจน (chymotrypsinogen) โปรคาร์บอกซีเปปติเดส (procarboxypeptidase) และโปรอีลาสเตส (proelastase) ให้อยู่ในรูปที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ (active enzyme) ได้แก่ ทริปซิน ไคโมทริปซิน คาร์บอกซีเปปติเดส (carboxypeptidase) และอีลาสเตส (elastase) ตามลำดับ ดังนั้น การศึกษากิจกรรมของทริปซินจึงมีบทบาทสำคัญต่อการประเมินประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2002; Supannapong *et al.*, 2008) ทริปซินเป็นอัลคาไลน์โปรตีเอสที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงพีเอช 7–10 (Chong *et al.*, 2002; Natalia *et al.*, 2004; Thongprajukaew *et al.*, 2010a) โดยสามารถตัดพันธะเอไมด์ (amidase activity) และเอสเทอร์ (esterase activity) หลังกรดอะมิโนที่โซ่ข้างมีขั้วและประจุบวก ได้แก่ ไลซีน และอาร์จินีน สารสังเคราะห์ซึ่งนิยมใช้เพื่อศึกษาการยับยั้งกิจกรรมของทริปซิน คือ tosyl lysine chloromethyl ketone (TLCK) และ leupeptin ส่วนสารยับยั้งจากธรรมชาติ ได้แก่ soybean trypsin inhibitor (SBTI) กิจกรรมของทริปซินมีการศึกษากันมากเนื่องจากทริปซินมีบทบาทสำคัญต่อพัฒนาการของสัตว์น้ำแต่ละช่วงวัย กิจกรรมของทริปซินมีความผันแปรกับอุณหภูมิ (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006) อายุและเพศ (Thongprajukaew *et al.*, 2010a; Thongprajukaew and Kovitvadhi, 2013) หรือสภาพแวดล้อมในระบบนิเวศที่ต่างกัน (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 1998) การแสดงออกของทริปซินในสัตว์น้ำมีอิทธิพลมาจากปัจจัยต่างๆ ได้แก่ คุณภาพของอาหาร (Sunde *et al.*, 2004) แสง (Sunde *et al.*, 2001) การแสดงออกของยีนและการได้รับฮอร์โมน (Rungruangsak-Torrissen and Sundby, 2000) และระบบภูมิคุ้มกัน (Andrés *et al.*, 2010) การศึกษาของ Sunde *et al.* (2001, 2004) พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของทริปซิน กรดอะมิโนจำเป็น กรดอะมิโนทั้งหมด และปริมาณอาร์เอ็นเอในกล้ามเนื้อ โดยกิจกรรมของทริปซินจะมีค่าสูงในช่วงที่สิ่งมีชีวิตมีการเติบโตเร็ว

### 3.3 ไคโมทริปซิน

ไคโมทริปซินเป็นเอนไซม์ที่เกิดจากการกระตุ้นของทริปซิน สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 7–10 (Chong *et al.*, 2002; Natalia *et al.*, 2004; Thongprajukaew *et al.*, 2010a) ไคโมทริปซินมีความจำเพาะต่อชนิดของสารตั้งต้น และสามารถตัดพันธะเอไมด์ และเอสเทอร์ได้เช่นเดียวกับทริปซิน โดยตัดพันธะเปปไทด์หลังกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นวงแหวน ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน ทริปโทเฟน ไทโรซีน และกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นไฮโดรโฟบิก เช่น เมทไธโอนีน สารยับยั้งการทำงานของไคโมทริปซิน คือ tosyl phenyl alanine chloromethyl ketone (TPCK) และ chymostatin การศึกษาในสัตว์น้ำพบว่า การแสดงออกไคโมทริปซินมีผลต่อการเติบโตในทิศทางตรงกันข้ามกับทริปซิน โดยกิจกรรมของไคโมทริปซินจะ

มีค่าสูงในช่วงที่สิ่งมีชีวิตเติบโตซ้ำหรือถูกจำกัดโดยปัจจัยต่างๆ (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2008) ขณะที่การศึกษาการแสดงออกของโคโมทริปซินในปูแมงมุม (*Maja brachydactyla*) พบว่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุ และมีค่าสูงสุดเมื่อปูเข้าสู่ระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงเมตามอร์โฟซิส (Andrés *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตาม การศึกษาในปลากัดด้วยเจริญพันธุ์พบว่า การได้รับสารพิษจากอาหารจะทำให้กิจกรรมของโคโมทริปซินมีค่าลดลง เช่นเดียวกับเอนไซม์ย่อยอาหารชนิดอื่นๆ (Thongprajukaew *et al.*, 2013a)

### 3.4 แอลฟา-อะไมเลส

แอลฟา-อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของการย่อยคาร์โบไฮเดรต (Thongprajukaew *et al.*, 2013b) เนื่องจากเป็นเอนโดอะไมเลส (endoamylase) ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลกลูโคสและมอลโทส โดยย่อยสายพอลิแซ็กคาไรด์ของคาร์โบไฮเดรตที่ตำแหน่ง  $\alpha$ -1,4 glycosidic bond (Areekijsee *et al.*, 2006; Supannapong *et al.*, 2008; การุณ และ อุทัยวรรณ, 2555) แหล่งของแอลฟา-อะไมเลสในปลากินพืช และปลากินพืชและเนื้อ ส่วนใหญ่จะได้อาหารจากการลั่งของผนังลำไส้ 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 (neutral amylase) (Areekijsee *et al.*, 2004) ในปลา Pacific bluefin tuna แอลฟา-อะไมเลสมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 6.9 (Parra *et al.*, 2007) ใน red porgy (*Pagrus pagrus*) และ Bogue (*Boops boops*) ทำงานได้ดีที่พีเอช 8 หรือ 9 ที่เป็นเบส (alkaline amylase) 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) และตับ (liver) ของปลานิล (*O. niloticus*) ที่มีน้ำหนักต่างกัน คือ 5.7, 35.8 และ 92.1 กรัม พบว่ามีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 6, 7 และ 2 ตามลำดับ โดยปลานิลน้ำหนัก 92.1 กรัมมีกิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลสสูงสุด (Klahan *et al.*, 2009)

### 3.5 ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ย่อยไขมันที่เกิดจากการลั่งของผนังลำไส้และตับอ่อน ไลเปสมีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันโมเลกุลยาวกับกลีเซอรอลให้เป็นโมโนกลี

เซอรอล ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมัน และกลีเซอรอล เอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางถึงเบส (การุณ และอุทัยวรรณ, 2555) โดยจะทำงานร่วมกับน้ำดี ทำหน้าที่ร่วมกันย่อยไขมันให้กลายเป็นไขมันโมเลกุลเล็ก กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในปลากินเนื้อมีค่าสูงกว่าปลากินพืชและสัตว์ และปลากินพืช ตามลำดับ (Thongprajukaew *et al.*, 2010b) ใน yellowtail kingfish ซึ่งเป็นปลากินเนื้อ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสค่อนข้างสูงตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นของตัวอ่อน (larva) (Chen *et al.*, 2006) และในปลา Pacific bluefin tuna ไลเปสสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 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 พบว่าไลเปสมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 8, 7 และ 8 ตามลำดับ โดยปลานิลน้ำหนัก 35.8 กรัม มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด (Klahan *et al.*, 2009)

#### 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 and Baker, 2010; Laczniak *et al.*, 2011; Usui *et al.*, 2013) กระบวนการนี้ส่งผลโดยตรงต่อดัชนีของอวัยวะย่อยอาหาร ซึ่งจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในเนื้อเยื่อที่มีเอนไซม์และมีปริมาณน้ำสูง (Vass, 2001) อย่างไรก็ตาม Li *et al.* (2003) รายงานว่าดัชนีของตับต่อน้ำหนักตัว (hepatosomatic index: HSI) ของหนูสปราก-ดอร์ลี (Sprague-Dawley) มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังการตาย (0 ถึง 25 นาที) ในขณะที่การประมาณช่วงเวลาหลังการตายในสุนัขปีเกิ้ลของ Erlandsson และ Munro (2007) พบว่าลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อลำไส้มีการเสื่อมสภาพลงเมื่อเวลาผ่านไป การเปลี่ยนแปลงหลังการตายนอกจากจะมีสาเหตุมาจากเอนไซม์หรือจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในแล้ว อาจเกิดจากการขาดออกซิเจน การเพิ่มขึ้นของคาร์บอนไดออกไซด์ และการสะสมของของเสีย (Benzie and Strain, 1996; Vass, 2001) ปัจจัยเหล่านี้อาจมีผลต่อโปรตีนในกระเพาะอาหารและลำไส้

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

ในสิ่งมีชีวิตมีสารต้านออกซิเดชัน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase) กลูตาไธโอน เพอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) คตะเลส (catalase) เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) ไซโตโครมซีเพอร์ออกซิเดส (cytochrome C peroxidase) ทองแดง (copper) และสังกะสี (zinc) และกลุ่มที่ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ 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 โดยในกระเพาะอาหารพบมากที่สุดบริเวณต่อมสร้างน้ำย่อยและผิวหนังด้านนอกของผนังชั้นในสุด (superficial gastric mucosa) ซึ่งบางครั้งพบในบริเวณ lamina propria ด้วย ส่วนในลำไส้เล็กพบอะพอพโทติกบอดีอยู่ตรงบริเวณปลายของวิลไล (villi) และบริเวณฐานของคริปต์ (crypt) ขณะที่การศึกษาการเปลี่ยนแปลงหลังการตายในสุนัขปีเกิดของ Erlandsson และ Munro (2007) พบว่าการเปลี่ยนแปลงภายในลำไส้จะสังเกตเห็นชัดมากขึ้นเมื่อเวลาหลังการตายนานขึ้น โดยที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการตาย ถู่น้ำดีมีสีผสมระหว่างสีเขียว น้ำตาล และเหลือง (green-brown-yellow mixture) จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแดง (yellow-red) ในเวลา 2-3 วัน และเปลี่ยนเป็นสีแดงน้ำตาล (red-brown) ในเวลา 7 วัน จนถึง 3 สัปดาห์ สำหรับการศึกษากลกายวิภาคเนื้อเยื่อ ได้แก่ ต่อม้ำเหลือง ไต ต่อมหมวกไต รังไข่ อัณฑะ ลำไส้ ต่อม้ำลาย และผิวหนังพบว่าลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อดังกล่าวมีรูปแบบที่ไม่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงหลังการตาย อย่างไรก็ตาม เนื้อเยื่อดังกล่าวมีการเสื่อมสภาพลง

เมื่อเวลาผ่านไปหลังการตาย สำหรับการประมาณช่วงเวลาหลังการตายของศพซึ่งถูกฝังในดิน โดยใช้ซากหมู (*Sus scrofa domestica*) เป็นต้นแบบ พบว่าระยะเวลา 7 วันหลังจากฝัง บริเวณส่วนท้องของซากหมูพองขึ้นเล็กน้อย ในระยะเวลา 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)

## 5. กล้ามเนื้อของปลา

กล้ามเนื้อเป็นเนื้อเยื่อที่พบได้ทุกส่วนของร่างกาย เมื่อกล้ามเนื้อหดตัวและคลายตัว จะทำให้เกิดการเคลื่อนไหวส่วนต่างๆ ส่วนมากกล้ามเนื้อในร่างกายจะมีเส้นประสาทมาควบคุมการทำงานเพียงเส้นเดียว แต่กล้ามเนื้อที่อยู่บริเวณลำตัวจะมีเส้นประสาทมาควบคุมหลายเส้น (McArdle *et al.*, 1996; Marieb *et al.*, 2013) กล้ามเนื้อส่วนใหญ่ประกอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อ (muscle fiber) ภายในมีเส้นใยกล้ามเนื้อย่อยที่ประกอบด้วยเส้นใยฝอย (myofilament) และเยื่อกั้นระหว่างมัด (myosepta) ซึ่งมีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหลัก (Chéret *et al.*, 2007)

กล้ามเนื้อแบ่งออกได้ 3 ชนิด คือ กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) พบตามผนังของอวัยวะภายในที่เป็นระบบท่อเป็นส่วนใหญ่ มีลักษณะเรียบ ไม่เป็นลาย และไม่อยู่ในอำนาจของจิตใจ กล้ามเนื้อหัวใจ (cardiac muscle) พบได้ที่ผนังของหัวใจเท่านั้น มีลายแต่ทำงานอยู่นอกอำนาจของจิตใจ และทำงานเป็นจังหวะสม่ำเสมอ และกล้ามเนื้อลาย (skeletal muscle) พบได้ทั่วไปตามลำตัว มีลายตามขวางตลอดความยาว เกาะติดกับกระดูก ทำงานอยู่ภายใต้อำนาจจิตใจ และมีความสัมพันธ์กับการทำงานของโครงกระดูก ประกอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อจำนวนมากอยู่รวมกันเป็นมัดกล้ามเนื้อ (muscle bundle) ภายในเส้นใยฝอยของเส้นใยกล้ามเนื้อจะมีซาร์โคเมอร์ (sarcomere) ซ้อนสลับกัน ซึ่งเส้นใยชนิดหนึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนไมโอซิน และเส้นใยชนิดบางเป็นส่วนประกอบของโปรตีนแอคติน (วิชัย, 2534)

กล้ามเนื้อลายแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ กล้ามเนื้อแดง (red muscle) และกล้ามเนื้อขาว (white muscle) โดยกล้ามเนื้อแดงอยู่บริเวณด้านข้างลำตัวใต้ผิวหนังระหว่างกล้ามเนื้อด้านบน (expaxial muscle) และกล้ามเนื้อด้านล่าง (hypaxial muscle) มีลักษณะเป็นแผ่นบาง มีเส้นเลือดแดงมาหล่อเลี้ยง และมีเส้นเลือดฝอยจำนวนมาก กล้ามเนื้อแดงมีซาร์โคเมอร์ที่เล็กกว่ากล้ามเนื้อขาวถึง 3 เท่า (เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 18–75 ไมโครเมตร) แต่ปริมาตรของเลือดที่มาหล่อเลี้ยงมากกว่า และไม่โทคอนเดรียของกล้ามเนื้อแดงจะใหญ่และหนาแน่นกว่า กล้ามเนื้อแดงใช้พลังงานจากการสลายสารชีวโมเลกุลแบบใช้

ออกซิเจน (aerobic catabolism) ทำหน้าที่รักษาความต่อเนื่องในการว่ายน้ำของปลา ส่วนกล้ามเนื้อขาพบบริเวณลำตัวด้านหลังและกะโหลกศีรษะ มีลักษณะเป็นมัดใหญ่และหนา (เส้นผ่านศูนย์กลางยาวถึง 300 ไมโครเมตร) เส้นใยกล้ามเนื้อไม่ค่อยมีเส้นเลือดมาเลี้ยง ไมโทคอนเดรียมีขนาดเล็กมาก ทำให้กล้ามเนื้อมีสีซีด กล้ามเนื้อขาทำงานแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic) โดยใช้พลังงานจากกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) มีแคลเซียมไอออนช่วยในการหดตัวของกล้ามเนื้อ ปลาใช้กล้ามเนื้อขาเป็นหลักในการว่ายน้ำในช่วงเวลาสั้นๆ เช่น การว่ายน้ำทวนกระแสน้ำ และการจู่โจมเหยื่อ (สุภาพร, 2542)

การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อลำตัวของปลาส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในกล้ามเนื้อลาย โดยกล้ามเนื้อมีการจัดเรียงตัวกันเป็นตอน ๆ เรียกว่า ไมโอเมียร์ (myomere) ซึ่งภายในมีเส้นใยกล้ามเนื้อที่ไม่แตกแขนง ถูกห่อหุ้มอยู่ในเยื่อหุ้มเส้นใยกล้ามเนื้อบางๆ (sarcolemma membrane) ของเหลวภายในเส้นใยกล้ามเนื้อประกอบด้วยเส้นใยฝอยกล้ามเนื้อ (longitudinal myofibril) 5 เส้นที่แตกแขนงไปทั่ว แต่ละเส้นใยฝอยกล้ามเนื้อประกอบด้วยโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการหดตัว ซึ่งกล้ามเนื้อในสภาพปกติจะสามารถมองเห็นเยื่อเกี่ยวพันระหว่างมัดระหว่างไมโอเมียร์ได้อย่างชัดเจน กล้ามเนื้อแดงจะมีปริมาณไขมันสูงกว่าในกล้ามเนื้อขาว (Ramesh and Nagarajan, 2013) แต่ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจน เนื่องจากมีลักษณะใกล้เคียงกัน แต่ถ้าใช้วิธีการทางมิวเคมิ (histochemistry) จะสามารถเห็นองค์ประกอบของไขมันและไกลโคเจนในกล้ามเนื้อแดงสูงกว่ากล้ามเนื้อขาว (Carani *et al.*, 2013)

โปรตีนไมโอซินและแอกทิน เป็นโครงสร้างหลักของกล้ามเนื้อสัตว์ที่ทำหน้าที่โดยตรงเกี่ยวกับการหดและคลายตัว เมื่อสัตว์ตาย เซลล์กล้ามเนื้อขาดพลังงานจากการหายใจ แอกทินกับไมโอซินจะจับกันแน่นรวมตัวกันเป็นแอกโทไมโอซิน (actomyosin) กล้ามเนื้อจึงหดตัว แต่ไม่คลายตัว เนื่องจากขาดอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate: ATP) ทำให้ซากสัตว์แข็งที่อู่ระยะหนึ่งภายหลังการตาย (Tyska and Warshaw, 2002) ในขณะที่ซาร์โคพลาสมิคโปรตีน (sarcolemmic protein) และองค์ประกอบอื่นๆ แขนงลอยอยู่ในส่วนของไซโทพลาซึม (Matos *et al.*, 2011) ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของร่างกายหลังจากการตายเช่นกัน

การเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อภายหลังการตายมี 3 ระยะ เริ่มจากระยะก่อนการเกร็งตัวโดยเกิดกระบวนการไกลโคไลซิสตั้งแต่เริ่มตายจนกระทั่งถึงระยะเริ่มแรกที่ ATP ในกล้ามเนื้อลดลง โดยมีการย่อยสลายโปรตีนซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ เอนไซม์คาเทปซิน เอนไซม์คาลเพน (calpain) และเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนลง มีรอยเขียวช้ำ และมีความยืดหยุ่น (Shahidi and Botta, 1994; Dent *et al.*, 2004) ต่อมาเป็นระยะการเกร็งตัว โดยที่แอกทินและไมโอซินรวมตัวกันอย่างถาวรเป็นแอกโทไมโอซิน เนื่องจากขาดพลังงานจาก ATP ในการคลายตัวของกล้ามเนื้อเมื่อตายและกล้ามเนื้อขาดออกซิเจน ไกลโคเจนจะเกิดการเปลี่ยนแปลงในสถานะที่ไม่มีอากาศ โดยที่กลูโคสจะเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกและพลังงานในรูป ATP เมื่อไกลโคเจนหมดไป กล้ามเนื้อจะเกิด

การเกร็งตัว แข็งทื่อ และไม่มีความยืดหยุ่น (Bayliss, 1996; Manzano-Mazorra *et al.*, 2000) และระยะสุดท้ายเป็นการสิ้นสุดของการเกร็งตัว เป็นระยะที่จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ขึ้นมาย่อยองค์ประกอบของกล้ามเนื้อ ทำให้มีกลิ่นเปลี่ยนไปจากเดิม (Fraser and Sumar, 1998; Chytiri *et al.*, 2004)

การเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายในสัตว์น้ำส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในตัวอย่างที่ถูกเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิต่ำ การศึกษาในปลาแซลมอน (*Salmo salar*) (Roth *et al.*, 2006) และปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) (Wilkinson *et al.*, 2008) พบว่าระยะเกร็งตัวอยู่ระหว่าง 2–24 และ 3–24 ชั่วโมงตามลำดับ และหลังจาก 24 ชั่วโมงไปแล้ว จะเข้าสู่ระยะสิ้นสุดการเกร็งตัว ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนนุ่ม และไม่ยืดหยุ่น เนื่องจากโปรตีนไมโอซินซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของกล้ามเนื้อมีการสูญเสียสภาพธรรมชาติ (Tyska and Warshaw, 2002) โดยการสลายตัวของโปรตีนสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (differential scanning calorimeter) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนที่แสดงถึงการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนได้ เนื่องจากอุณหภูมิที่กล้ามเนื้อสูญเสียสภาพธรรมชาติจะลดลงภายหลังการตาย (Kuo *et al.*, 2005) โดยช่วงอุณหภูมิที่กว้าง เป็นผลมาจากความแตกต่างของความยาวของสายพอลิเมอร์ (Thongprajukaew *et al.*, 2015a) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงต่อระยะเวลาภายหลังการตายตรวจพบเช่นกันในปลาแพะ (*Mullus barbatus*) ปลากะพงแดง (*Lutjanus campechanus*) และปลาดุก (*Ictalurus punctatus*) (Schubring, 1999) นอกจากนี้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Krompecher, 1994; Dalal *et al.*, 2006) พบการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายช้ากว่าในปลา เนื่องจากกล้ามเนื้อมีความซับซ้อน และมีหลอดเลือดมาเลี้ยงกล้ามเนื้อมากกว่า (Gillis and Biewener, 2001; Smith, 2011)

## 6. เอนไซม์ที่ส่งผลให้กล้ามเนื้ออ่อนตัว

เอนไซม์ที่พบในกล้ามเนื้อปลาประกอบด้วยเอนไซม์ในไมโอไฟบริล 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) และเอนไซม์ที่พบในส่วนของซาร์โคพลาสซึม 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) การศึกษาคคุณลักษณะของทริปซินในกล้ามเนื้อของปลาจวดขาว (*Argyrosomus argentatus*) พบว่ามีความจำเพาะต่อหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนอาร์จินีนและไลซีนเช่นเดียวกับทริปซินที่พบในระบบย่อยอาหาร (Cao *et al.*, 2005) ส่วนคาลเพนจัดเป็นนิวทรัลโปรตีเอส (neutral protease) ซึ่งมีกิจกรรมสูงที่พีเอชเป็นกลาง เอนไซม์คาลเพนถูกปล่อยออกจากเส้นใยกล้ามเนื้อโดยการย่อยส่วนของ Z disk การทำปรีสุทธ์คาลเพนชนิดที่ 1 (type-I) และชนิดที่ 2 (type-II) ในกล้ามเนื้อปลาแอนโชวี (*Engraulis japonica*)

พบว่าคาเลเพนทั้ง 2 ชนิดสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6.8 และ 7.0–7.5 ตามลำดับ (Ishida *et al.*, 1995)

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)

## 6.1 คาเทปซินบี

เอนไซม์คาเทปซินบีทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างโปรตีนหลักของกล้ามเนื้อ ได้แก่ คอนเนคติน (connectin) เนบูลิน (nebulin) และไมโอซิน (Yamashita and Konagaya, 1991) น้ำหนักโมเลกุลของคาเทปซินบี ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา สำหรับในกล้ามเนื้อลายของปลานิลพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 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) การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเอนไซม์คาเทปซินบี ในกล้ามเนื้อของปลามีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 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) พบว่าไลโซโซมของปลามีคาเทปซินบี เอช และแอลเป็นหลักและมีกิจกรรมสูง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Aoki *et al.* (2000b) ที่พบว่าในกล้ามเนื้อขาวของปลากลุ่ม red fresh คาเทปซินบี และแอลมีกิจกรรมสูง ส่วนการศึกษาในปลากะพงขาว พบว่าคาเทปซินบีในกล้ามเนื้อขาวมีค่าสูงเป็น 29.7 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับในเนื้ออ้วน นอกจากนี้คาเทปซินบีจะเป็นเอนโดเปปติเดส (endopeptidase) แล้ว ยังมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการทางพยาธิวิทยา เช่น การเกิดมะเร็ง การตายของเซลล์ การอักเสบการติดเชื้อ และโรคอื่นๆ ด้วย (Gocheva *et al.*, 2006)



## 6.2 คาเทปซินเอช

เอนไซม์คาเทปซินเอชพบครั้งแรกในตับของหนูซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 28 กิโลดาลตัน (Kirschke *et al.*, 1977) สารตั้งต้นของเอนไซม์ชนิดนี้ คือ L-Arg-4-methylcoumaryl-7-amide (Arg-MCA) เอนไซม์คาเทปซินเอชทำหน้าที่สลายพันธะเอไมด์ของสารตั้งต้นที่มีกลุ่มอะมิโนอิสระ เช่น อาร์จีนิน เนปทิลเอไมด์ (naphthylamide) นอกจากนี้ยังสามารถสลายสารที่คล้ายกับสารตั้งต้นที่มีกลุ่มอะมิโน (blocked  $\alpha$ -amino group) เช่น benzoyl-Arg-naphthylamide (BANA) (Takahashi *et al.*, 1988) เอนไซม์คาเทปซินเอชในปลา มีกิจกรรมที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอชประมาณ 6.0–6.8 (Kirschke *et al.*, 1977; Aranishi *et al.*, 1997) การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของคาเทปซินเอชในปลา 4 ชนิด ได้แก่ Pacific whiting (*Merluccius productus*), arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*), Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) และ Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) พบว่าคาเทปซินเอช ในปลา Alaska pollock มีกิจกรรมสูงสุด รองลงมา ได้แก่ ปลา arrowtooth flounder ปลา Pacific cod และ ปลา Pacific whiting ตามลำดับ (Porter *et al.*, 1995) สำหรับการศึกษาในกล้ามเนื้อขาของปลากะพงขาว และกล้ามเนื้อต้นขาด้านหลัง (biceps femoris muscle) ของวัวนม พบว่ากิจกรรมของคาเทปซินเอช ในกล้ามเนื้อของสัตว์ทั้ง 2 ชนิด มีกิจกรรมที่ต่ำกว่าคาเทปซินบีและแอล (Chéret *et al.*, 2007) คล้ายกับการศึกษาในกล้ามเนื้อวัวที่ตอนแล้วที่กิจกรรมของเอนไซม์คาเทปซินเอชมีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับคาเทปซินบี (Wu *et al.*, 1985) อย่างไรก็ตาม คาเทปซินเอชมีความสามารถย่อยสลายไมโอซินได้เร็วกว่าคาเทปซินบี (Aranishi *et al.*, 1997) นอกจากนี้คาเทปซินเอชจะมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนแล้วยังเกี่ยวข้องกับการรักษาโรคและการพัฒนาของปอด (Che *et al.*, 2014)

## 6.3 คาเทปซินแอล

เอนไซม์คาเทปซินแอลทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างโปรตีนหลักของกล้ามเนื้อ ได้แก่ โปรตีนคอนเนคติน เนบูลิน ไมโอซิน คอลลาเจน แอลฟา-แอคตินิน ( $\alpha$ -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) เอนไซม์คาเทปซินแอลในปลามีคุณสมบัติคล้ายกับที่แยกได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและไก่ และสามารถใช้ Z-Phe-Arg-MCA เป็นสารตั้งต้น การศึกษาในปลาแซลมอนพบว่าคาเทปซินแอลเป็นโปรติเอสที่ย่อยสลายโปรตีนของกล้ามเนื้อได้มากที่สุด (Hu *et al.*, 2008) เช่นเดียวกับการศึกษาในกล้ามเนื้อของปลาลิ้น (*Hypophthalmichthys molitrix*) ที่พบว่าคาเทปซินแอลมีกิจกรรมที่สูงกว่าคาเทปซินบี (Liu *et al.*, 2008) และพบว่าในกล้ามเนื้อขาของปลากะพงขาวมีกิจกรรมของคาเทปซินแอลสูงเป็น 3.9 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับคาเทปซินแอลในกล้ามเนื้อวัวนม (Chéret *et al.*, 2007) โดยสามารถย่อยโปรตีนเส้นใยย่อยจากกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein) ได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 21 ชั่วโมง (Ladrat *et al.*, 2003) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเอนไซม์

คาเทปซินแอลในกล้ามเนื้อปลาที่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 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)

## 7. เกล็ดของปลา

เกล็ดปลามีลักษณะแข็ง แบน และเบา เป็นองค์ประกอบของกระดูกที่ปกคลุมและทำหน้าที่ปกป้องผิวของปลาไว้ การซ้อนทับกันของเกล็ดช่วยทำให้เกิดความยืดหยุ่นเพื่อให้ปลาสามารถขยับร่างกายในรูปแบบต่างๆ ได้คล่องแคล่ว (Yang *et al.*, 2013) โดยปลานิลมีเกล็ดแบบอีลาสมอยด์ (elasmoid scale) ชนิดกลมผิวเรียบ (cycloid) ประกอบด้วย 2 ชั้น คือ ชั้นนอก มีเส้นใยคอลลาเจนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20–30 นาโนเมตร จัดเรียงตัวแบบสุ่มและฝังตัวอยู่ในโปรตีโอไกลแคน (proteoglycan) และชั้นใน (ส่วนฐาน) เส้นใยคอลลาเจนมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 70–100 นาโนเมตร อยู่ชิดติดกันและเรียงตัวซ้อนเหลื่อมกัน (Khemiri *et al.*, 2001; Ikoma *et al.*, 2003a) ซึ่งเส้นใยคอลลาเจนที่พบในเกล็ด คือ คอลลาเจนชนิดที่ 1 (type 1) เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีหน้าที่สำคัญในการค้ำจุนโครงสร้าง และทำให้เกล็ดแข็งแรง (Okuda *et al.*, 2009) คอลลาเจนในเกล็ดของสัตว์น้ำส่วนใหญ่มีช่วงอุณหภูมิที่ทำให้เริ่มเสียสภาพอยู่ที่ 26–29 องศาเซลเซียส แต่สำหรับในปลานิลมีช่วงอุณหภูมิที่ทำให้เสียสภาพอยู่ที่ 36 องศาเซลเซียส อีกทั้งในภาวะขาดน้ำจะส่งผลต่อโครงสร้างของคอลลาเจนในเกล็ด เนื่องจากมีการสร้างพันธะเพปไทด์เพิ่ม และมีการกำจัดโมเลกุลน้ำ ทำให้เกล็ดไม่ยืดหยุ่น (Ikoma *et al.*, 2003b) นอกจากนี้ เกล็ดยังประกอบด้วยสารอินทรีย์ เช่น โปรตีนเคราติน และสารอินทรีย์ เช่น คาร์บอนเนต และอะพาไทต์ (Perga and Gerdeaux, 2003; Sinnatamby *et al.*, 2007) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีแคลเซียมน้อย (calcium-deficient hydroxyapatite) โดยประกอบด้วยไฮเดียม แมกนีเซียม และคาร์บอนเนตไอออน เกล็ดปลาบางชนิดหลุดง่าย บางชนิดยึดติดแน่น ขึ้นอยู่กับวิวัฒนาการของเกล็ด (Torres *et al.*, 2012)

แร่ธาตุในเกล็ดปลามีการสร้างอย่างต่อเนื่องตลอดชีวิต โดยเกล็ดชั้นนอกมีเซลล์เริ่มต้นในการสร้างหินปูนและแร่ธาตุ (Schönborner *et al.*, 1979) ส่วนเกล็ดชั้นในเป็นบริเวณที่สร้างและสะสมแร่ธาตุ (Onozato and Watabe, 1979; Zylberberg and Nicolas, 1982) อย่างไรก็ตาม การสร้างแร่ธาตุสามารถหยุดได้หากปลาไม่ได้รับอาหารและอยู่ในภาวะเครียดรุนแรง (Campana and Neilson, 1985) นอกจากนี้ ปลายังสามารถดูดซับแร่ธาตุจากสิ่งแวดล้อมไว้ได้โดยผ่านทางเหงือกและผิวหนังเมื่ออยู่ในน้ำจืด และจากการกินอาหารเมื่ออยู่ในน้ำเค็ม ซึ่งแร่ธาตุมีความสำคัญต่อสุขภาพของกระดูก ฟัน และเกล็ด แร่ธาตุที่จำเป็นในปลา ได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โซเดียม เหล็ก ซีลีเนียม ทองแดง และไอโอดีน นอกจากนี้ยังมีธาตุที่จำเป็นต่อการเกิดปฏิกิริยาภายในเกล็ดปลา ได้แก่ ออกซิเจน และไนโตรเจน และอาจพบโลหะบางชนิดสะสมในเกล็ดปลา เช่น สังกะสี ตะกั่ว กำมะถัน และแมงกานีส เป็นต้น (Abdullah *et al.*, 1976; Sauer and Watanabe, 1989; Ikoma *et al.*, 2003a) โดยการสะสมของแร่ธาตุเป็นส่วนหนึ่ง

ที่ช่วยทำให้คอลลาเจนในเกล็ดมีความแข็งแรง ทำให้เกล็ดแข็งและทำหน้าที่ป้องกันผิวหนังของปลาได้ดีขึ้น (Meunier, 1984)

การศึกษาในปลาสกุล *Pagrus* พบโซเดียม แมกนีเซียม และคาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการสร้างไฮดรอกซีอะพาไทต์ของเกล็ด (Ikoma *et al.*, 2003a) ในเกล็ดปลาทอง (*Carassius auratus*) พบว่าเกล็ดชั้นในส่วนบนบริเวณที่ติดกับเกล็ดชั้นนอก มีการสะสมแร่ธาตุมากกว่าตรงกลางและส่วนฐานของเกล็ดชั้นใน (Zylberberg *et al.*, 1992) เช่นเดียวกับปลาช่อนยักษ์อะเมซอน (*Arapaima gigas*) ที่มีการสะสมแร่ธาตุบริเวณเกล็ดชั้นนอกมากกว่า ส่งผลให้เกล็ดมีความแข็งแรงกว่าเกล็ดชั้นใน (Yang *et al.*, 2013) แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของปลาด้วย โดยระดับการสะสมแร่ธาตุที่แตกต่างกันในแต่ละบริเวณของเกล็ดขึ้นอยู่กับกระบวนการปรับเปลี่ยนโครงสร้างระดับนาโนของเกล็ดปลา และปฏิกิริยาระหว่างคอลลาเจนกับน้ำ ซึ่งไม่มีรูปแบบที่แน่นอน (Torres *et al.*, 2012) ในเกล็ดปลานิลพบการกระจายของแร่ธาตุอยู่ในเส้นใยคอลลาเจนแต่ละเส้น และสะสมอยู่ในนิวเคลียสที่อยู่ในช่องว่าง (hole zone) (Okuda *et al.*, 2009) โดยคอลลาเจนจากเกล็ดปลาสามารถรวมตัวกันภายใต้อุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าคอลลาเจนในกระดูกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Williams *et al.*, 1978; Kadler *et al.*, 1996)

## 8. สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก

สารอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds: VOCs) คือ กลุ่มของสารประกอบที่มีความดันไอมากกว่า 1 มิลลิเมตรปรอท สามารถระเหยเป็นไอกระจายตัวไปในอากาศได้ง่ายที่อุณหภูมิและความดันปกติ โมเลกุลส่วนใหญ่ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจน นอกจากนี้ยังมีออกซิเจนหรือฮาโลเจน เช่น คลอรีน และโบรมีน รวมอยู่ด้วย (Paczkowski and Schütz, 2011)

ในสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้ว การสลายตัวขององค์ประกอบอินทรีย์โดยทั่วไปจะเกิดขึ้นพร้อมกับการปล่อยสารอินทรีย์ระเหยที่มีกลิ่นอันไม่พึงประสงค์เพื่อดึงดูดแมลงมากินซาก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นกลางของการย่อยสลาย และเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน (Vass *et al.*, 2002) สารอินทรีย์ระเหยง่ายเกิดจากย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ และการแคแทบอลิซึมของสารชีวโมเลกุลหลักในสิ่งมีชีวิต ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน กรดนิวคลีอิก และโปรตีน (Vass *et al.*, 2002; Statheropoulos *et al.*, 2005, 2007) โดยคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่จะย่อยสลายเป็นสารประกอบที่มีออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล (oxygenated compounds) ได้แก่ กรดอินทรีย์บางชนิด แอลกอฮอล์ (alcohol) คีโตน (ketone) แอลดีไฮด์ (aldehyde) และเอสเทอร์ (ester) (Gill-King, 1997; Dent *et al.*, 2004; Statheropoulos *et al.*, 2005) โดยแอลกอฮอล์เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์หลังการตายของสิ่งมีชีวิต หรือการย่อยสลายไกลโคเจนเป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งเกิดขึ้นในตับ สำหรับน้ำตาลจะกระจายเข้าไปในหลอดเลือดที่อยู่ใกล้เคียงภายใต้สภาวะที่ใช้ ออกซิเจน และมักจะถูกเผาผลาญอย่างสมบูรณ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ในขณะที่ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน และมักจะถูกเผาผลาญอย่างสมบูรณ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ในขณะที่ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

ออกซิเจน จะได้ผลิตภัณฑ์ประเภทหมัก เช่น กรดแลคติก (lactic acid) กรดบิวทานอิก (butanoic acid) และกรดแอซีติก (acetic acid) (Gill-King, 1997; Dent *et al.*, 2004; Boumba *et al.*, 2008) ส่วน แอลกอฮอล์ที่มีโซ่กิ่ง (branched alcohols) มักจะเกิดจากกรดอะมิโนที่ถูกย่อยผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม และการสลายตัวของกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acids) ซึ่งปฏิกิริยาระหว่างกรดคาร์บอกซิลิกกับ แอลกอฮอล์ทำให้เกิดสารกลุ่มเอสเทอร์ (Paczkowski and Schütz, 2011) สารกลุ่มแอลกอฮอล์ที่สำคัญ คือ 1-hexanol ที่ผลการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าเกิดจากเผาผลาญอาหารของเชื้อรา (fungal metabolism) (Korpi *et al.*, 1998; Paczkowski and Schütz, 2011)

การย่อยสลายไขมันด้วยเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส (phospholipase) โดยทั่วไปพบในส่วนของ กล้ามเนื้อ ทางเดินอาหาร และตับ มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายฟอสโฟลิพิด (phospholipid) และ เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) เกิดเป็นกรดไขมันอิ่มตัวและ ไม่อิ่มตัว (Cabirol *et al.*, 1998; Vass *et al.*, 2002) สำหรับการย่อยสลายกรดนิวคลีอิกจะได้เป็นไนโตรจีนัสเบส (nitrogenous base) ฟอสเฟต และน้ำตาล (Vass *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีกรดคาร์บอกซิลิกที่เกิดจากการย่อยสลายไขมัน คาร์โบไฮเดรต และกรดอะมิโนด้วยจุลินทรีย์ (Paczkowski and Schütz, 2011) โดยกรดอะมิโน เช่น ไอโซลิวซีน (isoleucine) เป็นสารที่ดึงดูดแมลงวันวงศ์ Piophilidae และ Calliphoridae ตัวเตี้ยม้วย อีกทั้งยังสามารถดึงดูดแมลงดูดเลือด (bloodsucking insects) ตัวมดดำ (dung beetles) และตั๊กแตนกินซาก (necrophagous grasshoppers) (Wolff *et al.*, 2001; Barrozo and Lazzari, 2004; Dormont *et al.*, 2010; Whitman and Richardson, 2010) สำหรับกรดไขมันสายยาวที่สามารถดึงดูดตัวผู้ เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาซาพอนนิฟิเคชัน (saponification) ประกอบด้วย กรดไขมัน และเอสเทอร์ (Levinson *et al.*, 1981) ซึ่งกรดไขมันจะเกิดกระบวนการสลายได้ ผลิตภัณฑ์เป็นแอลกอฮอล์ คีโตน แอลดีไฮด์ และเอสเทอร์ เช่นเดียวกับการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต (Cabirol *et al.*, 1998; Vass *et al.*, 2002) สำหรับแอลดีไฮด์และคีโตน อาจเป็นผลมาจากจุลินทรีย์หรือปฏิกิริยาการสลายตัวของไขมันที่เกี่ยวข้องกับออกซิเจนในชั้นบรรยากาศ (Whitfield and Mottram, 1992; Dent *et al.*, 2004) ส่วนสารประกอบอะโรมาติกเป็นสารระเหยทั่วไปที่ได้มาจากการย่อยสลายกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก ได้แก่ ไทโรซีน (tyrosine) ฟีนิลแอลานีน (phenylalanine) และทริปโตเฟน (tryptophan) (Vass *et al.*, 1992; Dent *et al.*, 2004; Paczkowski and Schütz, 2011)

ตารางที่ 1 การศึกษาเกี่ยวกับสารอินทรีย์ที่ระเหยได้หลังการตาย

Organism	Key VOCs	Postmortem interval (h)	Organ	References
Whiting ( <i>Merlangius merlangus</i> )	Acetaldehyde, ethanol, acetone, ethyl acetate, acetic acid and 1-hexanol	336	Muscle	Duflos <i>et al.</i> (2005)
Tench ( <i>Tinca tinca</i> )	Hexanal, ethylbenzene, benzaldehyde, octanal and nonanol	0	Muscle	Turchini <i>et al.</i> (2005)
Atlantic horse mackerel ( <i>Trachurus trachurus</i> )	1-Penten-3-ol, 2,3-pentanedione, 2,3-octanedione, 3,5-octadien-2-one and pentanal	0	Muscle	Iglesias and Medina (2008)
Gilthead seabream ( <i>Sparus aurata</i> )	2-Pentylfuran, 2,3-pentandione, 3,5-octadien-3-ol and hexadecane	0	Muscle	Iglesias <i>et al.</i> (2009)
Domestic pig ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Formic acid, butyl acetate, acetone, aldehydes, ethanol, butanal, benzaldehyde and acetamide	4	Whole body	Dekeirsschieter <i>et al.</i> (2009)
Pig ( <i>Sus domesticus</i> )	1-Octen-3-ol, 2-phenylethanol, hexanoic acid, butyric acid and isoamyl butyrate	600	Whole body	von Hoermann <i>et al.</i> (2011)
Mice ( <i>Mus musculus</i> )	Acetic acid, butanoic acid, butanol, octanol, phenol and 1-hexanol	24, 240 and 720	Whole body	Kasper <i>et al.</i> (2012)
Pig ( <i>S. domesticus</i> )	Benzaldehyde, phenol, dimethyltrisulfide, indole and undecan-2-one	240	Whole body	Brasseura <i>et al.</i> (2012)
Pig ( <i>S. domesticus</i> )	Butanoic acid, 1-hexanol, 1-pentanol, 3-methyl-2-hexanol and octanol	39	Bone, muscle and skin	Cablk <i>et al.</i> (2012)
Cow ( <i>Bos primigenius</i> )	1-Pentanol and hexanal, heptanal, octanal, nonanal and toluene	39	Bone, muscle and skin	Cablk <i>et al.</i> (2012)
Human ( <i>Homo sapiens</i> )	1-Pentanol, hexanal, benzaldehyde, octanal, nonanol and toluene	39	Bone, muscle and skin	Cablk <i>et al.</i> (2012)
Greenshell™ mussels ( <i>Perna canaliculus</i> )	Dimethyl sulfide, 2,3-octanedione, 3-undecen-2-one and (5Z)-octa-1,5-dien-3-ol	0	Muscle	Tuckey <i>et al.</i> (2013)
Malpura ewes ( <i>Ovis aries</i> )	Acetic acid, propionic acid and butyric acid	24	Whole body	Bhatt <i>et al.</i> (2013)

## ตารางที่ 1 การศึกษาเกี่ยวกับสารอินทรีย์ที่ระเหยได้หลังการตาย (ต่อ)

Organism	Key VOCs	Postmortem interval (h)	Organ	References
Domestic pig ( <i>S. scrofa domestica</i> )	Dimethyl trisulfide, dimethyl disulfide, nonanal and hexan-1-ol	1,536 (autumn)	Whole body	Paczkowski <i>et al.</i> (2014)
Domestic pig ( <i>S. scrofa domestica</i> )	1-Hexanol, 1-octen-3-ol, 1-pentanol, carbon disulfide, dimethyl sulfide and hexanal	1,320 (summer) 0-72	Whole body	Armstrong <i>et al.</i> (2016)

โปรตีนจะย่อยสลายเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กกว่าเดิม เช่น กรดอะมิโน และโพลีเพปไทด์ (polypeptide) โดยเอนไซม์ที่มาจากตัวปลาและจากจุลินทรีย์ ทำให้เกิดการอ่อนตัวของกล้ามเนื้อ โดยเอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์คาเทปซิน เอนไซม์คาลเพน และเอนไซม์คอลลาจีเนส (Shahidi and Botta, 1994; Dent *et al.*, 2004) กระบวนการย่อยสลายโปรตีนจะสร้างสารระเหยขึ้นมา เช่น สารประกอบกำมะถัน (sulphur compound) เอมีน (amine) และอินโดล (indole) หรืออาจเกิดจากการสลายของฟิวโซแบคทีเรีย (fusobacterium) ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยสารประกอบกำมะถันเกิดจากการย่อยสลายกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบโดยแบคทีเรีย สารประกอบกำมะถันที่สำคัญ คือ โพลีซัลไฟด์ (polysulfides) ซึ่งรายงานว่าจะสามารถดึงดูดแมลงให้มากินซากได้ รวมทั้งแมลงวันหัวเขียว (blow flies) และด้วงสัปหระอ (burying beetles) (Stensmyr *et al.*, 2002; Kalinova *et al.*, 2009) สำหรับเอมีนเกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ของกรดอะมิโนในกล้ามเนื้อ โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ อินโดลเกิดจากการย่อยสลายของทริปโตเฟน โดยเอนไซม์ทริปโตเฟเนส (tryptophanase) ที่สร้างโดยแบคทีเรีย (Vass *et al.*, 1992, 2002; Statheropoulou *et al.*, 2005) รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของต่างที่ระเหยได้ เช่น ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ (trimethylamine oxide) เป็นไตรเมทิลเอมีน (trimethylamine) และไดเมทิลเอมีนออกไซด์ (dimethylamine oxide) และการเปลี่ยนแปลงของฟอร์มัลดีไฮด์โดยเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ดีเมทิลเลส (trimethylamine oxide demethylase) (Shahidi and Botta, 1994) สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากที่ศึกษาในสัตว์บางชนิดแสดงดังตารางที่ 1

## วิธีการทดลอง

### 1. การเตรียมตัวอย่างปลานิล

ปรับสภาพปลานิลแปลงเพศ (*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. การเก็บตัวอย่างปลานิล

อดอาหารปลานิลแปลงเพศเป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนการเก็บตัวอย่าง เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมเนื่องจากอาหารที่กิน สุ่มปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกัน (น้ำหนัก  $105.83 \pm 1.66$  กรัม และความยาวตลอดลำตัว  $18.55 \pm 0.14$  เซนติเมตร) สลับปลาโดยใช้น้ำแข็ง และนำมาลอยในภาชนะทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า ( $32 \times 43 \times 11$  เซนติเมตร) ระดับน้ำสูง 7 เซนติเมตร ที่ความหนาแน่น 14 ตัวต่อภาชนะ โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นสุ่มปลาที่เวลา 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ฆ่าตัดเก็บตัวอย่างกระเพาะอาหารและลำไส้ เพื่อใช้ศึกษาระบบย่อยอาหาร ได้แก่ ดัชนีน้ำหนัก ความเข้มข้นของโปรตีน กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน และการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาค ( $n = 4$ ) เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อขาวบริเวณกล้ามเนื้อด้านบนใต้ครีบหลัง (ก้านครีบหลังที่ 3 ถึง 10) และกล้ามเนื้อแดงบริเวณด้านข้างลำตัวใต้ผิวหนังระหว่างกล้ามเนื้อด้านบนและกล้ามเนื้อด้านล่าง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาออกซิเดชัน การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อน และการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาค ( $n = 4$ ) สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ในกล้ามเนื้อศึกษาเฉพาะในกล้ามเนื้อขาวเท่านั้น ฆ่าตัดเก็บตัวอย่างตับบริเวณช่องท้องเพื่อใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาค เก็บตัวอย่างเกล็ด (บริเวณใต้ก้านครีบหลังที่ 3 ถึง 7) เพื่อใช้ศึกษาองค์ประกอบของธาตุ และเก็บตัวอย่างปลาทั้งตัวเพื่อใช้ศึกษาสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก ( $n = 4$ )

### 3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหาร

#### 3.1 ดัชนีน้ำหนักของอวัยวะย่อยอาหาร

หลังจากเก็บตัวอย่างอวัยวะย่อยอาหารทั้ง 8 ช่วงเวลาหลังการตาย นำอวัยวะดังกล่าวมาศึกษาดัชนีน้ำหนัก โดยชั่งน้ำหนักตัวปลา น้ำหนักของกระเพาะอาหาร และลำไส้ (กรัม) และคำนวณดัชนีของกระเพาะอาหารต่อน้ำหนักตัว (stomasomatic index: SSI) และดัชนีของลำไส้ต่อน้ำหนักตัว

(intestosomal index: ISI) จาก (น้ำหนักกระเพาะอาหาร/น้ำหนักตัว)  $\times$  100 และ (น้ำหนักลำไส้/น้ำหนักตัว)  $\times$  100 ตามลำดับ

### 3.2 การสกัดสารสกัดจากกระเพาะอาหารและลำไส้

ผ่าตัดและเก็บตัวอย่างกระเพาะอาหารและลำไส้ของปลาบ่นน้ำแข็ง จากนั้นสกัดสารตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Rungruangsak และ Utne (1981) โดยบดกระเพาะอาหารและลำไส้ในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 10 และ 1 มิลลิโมลาร์ (1 : 3 น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ โดยใช้เครื่องปั่นละเอียดเนื้อเยื่อ (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

### 3.3 การศึกษาความเข้มข้นของโปรตีนในสารสกัดจากกระเพาะอาหารและลำไส้

วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนในสารสกัดตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA)

### 3.4 การศึกษากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหาร

#### 3.4.1 กิจกรรมของเอนไซม์เปปซิน

ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เปปซินจากกระเพาะอาหารตามวิธีการของ Rungruangsak และ Utne (1981) โดยเติมเคซีนความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง หลังจากนั้นก็เปิดตู้บัฟเฟอร์ 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 ดูดส่วนใสของตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติม Folin Ciocalteu reagent (เจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 720 นาโนเมตร และหาค่าผลผลิตที่ได้อาศัยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ L-tyrosine ยูนิต (unit) ของเปปซินคำนวณจากปริมาณของ L-tyrosine ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้พีเอช 2 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส



### 3.4.2 กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซิน

ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินในลำไส้ตามวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2006) กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินทดสอบโดยผสมบัฟเฟอร์พีเอช 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 หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมกรดอะซิติกความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน กิจกรรมของเอนไซม์โคโมทริปซินใช้วิธีการทดสอบเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้นที่กล่าวมา แต่เปลี่ยนเป็นใช้บัฟเฟอร์พีเอช 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 และหาค่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ p-nitroanilide ยูนิตของทริปซินและโคโมทริปซิน คำนวณจากปริมาณของ p-nitroanilide ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้พีเอช 9 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 9 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

### 3.4.3 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสตามวิธีการของ Areekijserree *et al.* (2004) โดยผสมน้ำแป้ง ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตรกับบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 62.5 ไมโครลิตร และโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร แล้วเติมเอนไซม์สกัดปริมาตร 125 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดไธโนไตรซาลิไซคลิกความเข้มข้น 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

### 3.4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Winkler และ 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 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเติม

โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่  $13,000 \times g$  ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใส เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบค่าผลิตภัณฑ์ที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ *p*-nitrophenol ยูนิตของไลเปสคำนวณจากปริมาณ ของ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้พีเอช 8 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

### 3.5 การศึกษาการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของระบบย่อยอาหาร

#### 3.5.1 การกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

นำสารสกัดจากกระเพาะอาหารและลำไส้จากข้อ 3.2 มาศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของ DPPH ตามวิธีการของ Thongprajukaew *et al.* (2015) โดยเตรียม stock solution จากการละลาย DPPH 24 มิลลิกรัมในเมทานอลปริมาตร 100 มิลลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียม working solution โดยเจือจาง stock solution ด้วยเมทานอล แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง  $1.0 \pm 0.5$  หน่วย ที่ 517 นาโนเมตร จากนั้นทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยผสม working solution ปริมาตร 3 มิลลิตรกับสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตร วางไว้ในที่มีदनาน 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และคำนวณกิจกรรมการกำจัดอนุมูลของ DPPH (เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง) ได้จาก  $[(A_0 - A_t)/A_0] \times 100$  เมื่อ  $A_0$  และ  $A_t$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของบัพเฟอร์และสารสกัดจากตัวอย่าง ตามลำดับ

#### 3.5.2 ความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนโดยวิธี reducing power

นำสารสกัดจากกระเพาะอาหารและลำไส้จากข้อ 3.2 มาศึกษาความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Benzie และ Strain (1996) และ Wong *et al.* (2006) โดยการผสม 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 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 วางไว้ในที่มีदनาน 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร เปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยวิธี reducing power (% remaining) คำนวณได้จาก  $[(A_i - A_0)/A_i] \times 100$  เมื่อ  $A_0$  และ  $A_i$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของบัพเฟอร์ และสารสกัดจากตัวอย่าง ตามลำดับ

## 4. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อ

### 4.1 การสกัดสารสกัดจากกล้ามเนื้อ

สกัดเอนไซม์คาเทปซินตามวิธีการของ Chéret *et al.* (2007) โดยบดกล้ามเนื้อขาเข้ากับบัฟเฟอร์ 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 (THP-220; Omni International, Kennesaw GA, USA) หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่  $10,000 \times g$  ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และดูดส่วนสารละลายส่วนใสเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์คาเทปซินต่อไป

### 4.2 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์คาเทปซิน

#### 4.2.1 กิจกรรมของเอนไซม์คาเทปซินบี

ศึกษากิจกรรมของคาเทปซินบีตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก 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) กับเอนไซม์สกัดปริมาตร 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

#### 4.2.2 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*-Arg-4-methylcoumaryl-7-amide ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร) กับเอนไซม์สกัดปริมาตร 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

#### 4.2.3 กิจกรรมของเอนไซม์คาเทปซินแอล

ศึกษากิจกรรมของคาเทปซินแอลตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก 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) กับเอนไซม์สกัดปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมโมโนคลอโรอะซิเตตพีเอช 4.3 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยวัดค่าการเรืองแสงของผลิตภัณฑ์ที่ความยาวคลื่นเดียวกับเอนไซม์คาเทปซินบีและเอช และเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ AMC ยูนิตของคาเทปซินแอลคำนวณจากปริมาณของ aminomethylcoumarin ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้พีเอช 6.5 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

#### 4.3 การศึกษาการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกล้ามเนื้อ

นำสารสกัดจากกล้ามเนื้อมาศึกษาการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay และวิธี reducing power เช่นเดียวกับการศึกษาในข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ตามลำดับ

#### 4.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อน

เตรียมตัวอย่างกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวโดยตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดประมาณ 20 มิลลิกรัม จากนั้นนำมาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนโดยใช้ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (DSC7; PerkinElmer, Waltham, USA) ในช่วงอุณหภูมิ 25 ถึง 120 องศาเซลเซียส กำหนดอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที และใช้น้ำแข็งเป็นตัวทำความเย็น การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนไมโอซินและแอกทิน พิจารณาตามอุณหภูมิที่โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติที่ 47–50 องศาเซลเซียส และ 73–75

องศาเซลเซียส ตามลำดับ ตามรายงานวิจัยของ Matos *et al.* (2011) คุณสมบัติเชิงความร้อนของพีคที่ตรวจสอบ ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้น (onset temperature:  $T_o$ ) อุณหภูมิพีค (peak temperature:  $T_p$ ) อุณหภูมิสุดท้าย (conclusion temperature:  $T_c$ ) ช่วงอุณหภูมิ (melting temperature range:  $T_c-T_o$ ) และเอนทาลปี (enthalpy:  $\Delta H$ ) ของการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน

## 5. การศึกษาลักษณะจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหาร ลำไส้ ตับ และกล้ามเนื้อ

ตรึงตัวอย่างเนื้อเยื่อโดยใช้ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 วัน จากนั้นล้างออกโดยให้น้ำไหลผ่าน ดึงน้ำออกจากเซลล์โดยแช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากนั้นตัดแต่งเนื้อเยื่อให้ได้ขนาด พร้อมทั้งใช้แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ฉีดไล่อาหารออกจากกระเพาะและลำไส้ นำกล้องที่บรรจุเนื้อเยื่อดังกล่าว ใส่ลงในเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติระบบเปิด (TP1020; Leica, Wetzlar, Germany) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปฝังลงในพาราฟินเหลวโดยใช้เครื่องหล่อพาราฟิน (EG 1150 H; Leica, Nussloch, Germany) แล้วทำให้พาราฟินแข็งตัว โดยใช้เครื่องทำความเย็น (EG 1150 C; Leica, Nussloch, Germany) ตัดแต่งบล็อกเนื้อเยื่อให้ได้ขนาดตามต้องการ หลังจากนั้นใช้เครื่องตัดเนื้อเยื่อ (R; Jung AG., Heidelberg, Germany) ตัดบล็อกเนื้อเยื่อให้บาง 3–5 ไมโครเมตร นำไปลอยในน้ำอุ่นที่เติมเจลาตินลงไปเพื่อให้เนื้อเยื่อเกาะกับสไลด์ แล้วซ้อนเก็บบนแผ่นสไลด์ อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปย้อมสีนิวเคลียสโดยใช้ฮีมาทอกซาลิน และย้อมไซโทพลาซึมและสารที่อยู่ระหว่างเซลล์ด้วยสีอีโอซิน จากนั้นทำสไลด์ถาวรโดยหยด permount บนสไลด์เนื้อเยื่อและปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงภายใต้กล้องจุลทรรศน์

## 6. การศึกษาองค์ประกอบของธาตุจากเกล็ด

เตรียมตัวอย่างเกล็ดปลานิล โดยนำเกล็ดไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยใช้เครื่องทำแห้งตัวอย่าง (Delta 2-24 LSC; Christ, Osterode am Harz, Germany) จากนั้นนำตัวอย่างเกล็ดมาวางบนสตัปคาร์บอน ก่อนนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบและแผนภาพกระจายของธาตุ โดยใช้เทคนิควิเคราะห์ธาตุกึ่งเชิงปริมาณประกอบไปด้วยอุปกรณ์วิเคราะห์ธาตุเชิงคุณภาพ (energy dispersive x-ray spectrometer: EDX) (X-MAX; Oxford Instruments, Oxford, England) ติดตั้งบนกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Quanta 400; FEI, Oregon, USA) และใช้กำลังขยาย 500 เท่า

## 7. การศึกษาสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก

ศึกษาสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากของปลานิล เตรียมตัวอย่างโดยใช้เทคนิคเฮดสเปซ โซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน (headspace solid phase microextraction: HS-SPME) โดยการปั่นชิ้นส่วนของปลาทั้งตัวให้เข้ากัน และนำตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 5 กรัม ใส่ในขวดเฮดสเปซ (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้ตัวดูดซับ SPME ชนิดคาร์โบแว็กซ์พอลิไดเมทิลซิลิโคโนน (carbowax/polydimethylsiloxane: CW/PDMS) ความหนาของฟิล์ม 75 ไมโครเมตร ดูดซับสารระเหยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตัวดูดซับมาวิเคราะห์โดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟี (Trace GC Ultra; Thermo Scientific Inc., Waltham, USA) ร่วมกับเครื่องตรวจวัดแมสสเปกโตรมิเตอร์ (ISQ MS; Thermo Scientific Inc., Waltham, USA) โดยใช้คอลัมน์แบบแคปิลารี TR-WaxMS ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร และขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร โดยมีสภาวะภายในเครื่องวิเคราะห์ ดังนี้ อุณหภูมิของส่วนฉีดสารตัวอย่าง 260 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม เท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิภายในส่วนที่ใช้บรรจุคอลัมน์เริ่มต้นที่ 35 องศาเซลเซียส และเพิ่มสูงสุดถึง 260 องศาเซลเซียส ในส่วนของเครื่องตรวจวัดแมสสเปกโตรมิเตอร์ ใช้แหล่งพลังงานจากอิเล็กตรอนไอออไนเซชัน โดยใช้อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส

## 8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

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

## ผลการทดลอง

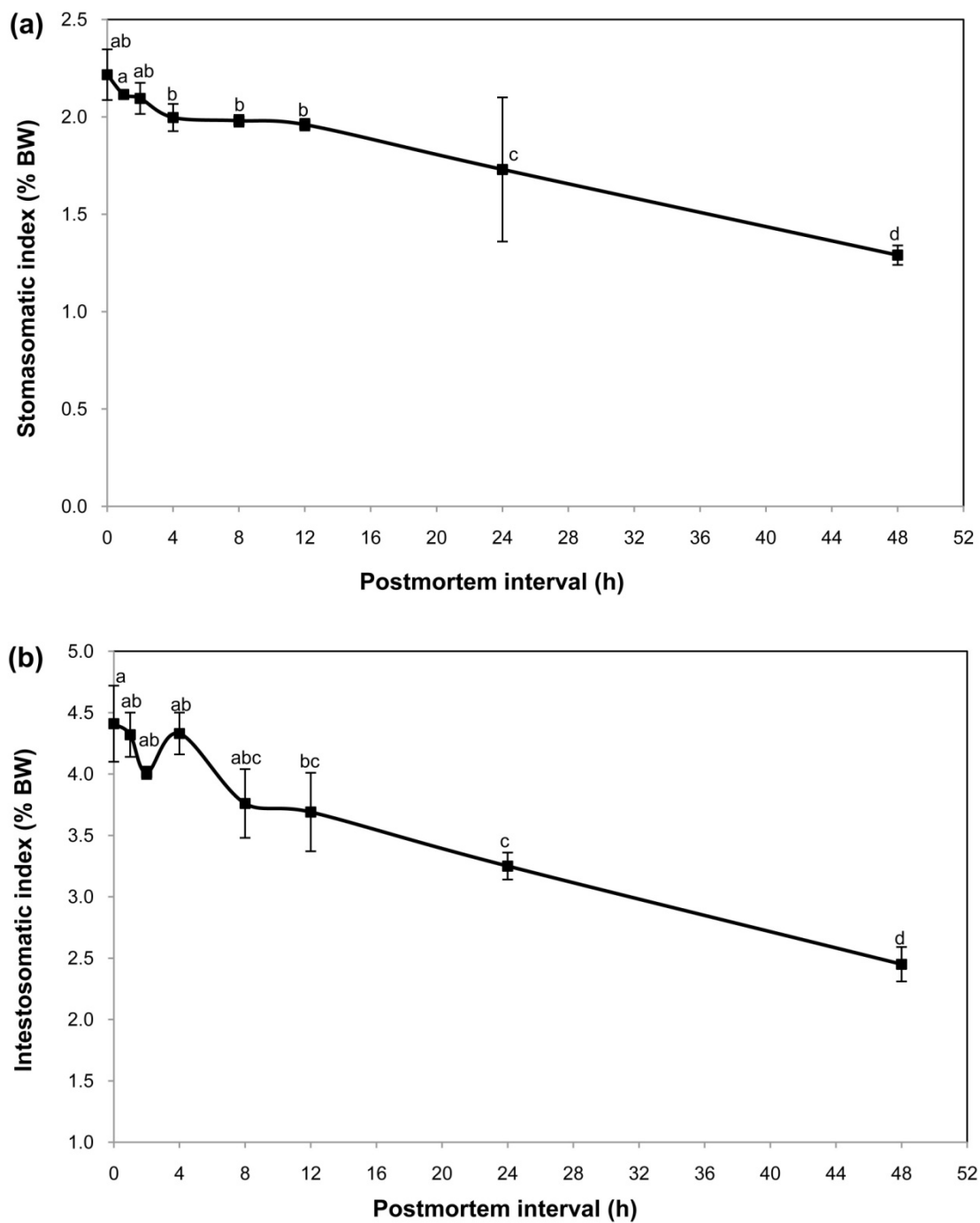
### 1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารหลังการตาย

#### 1.1 การเปลี่ยนแปลงของดัชนีทางเดินอาหาร

ลำไส้ของปลานิล ( $4.41 \pm 0.31$  เปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวที่ 0 ชั่วโมง) มีน้ำหนักมากกว่ากระเพาะอาหาร ( $2.22 \pm 0.13$  เปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวที่ 0 ชั่วโมง) (ภาพที่ 1) ผลการศึกษาพบว่าดัชนีของกระเพาะอาหาร (ภาพที่ 1a) และดัชนีของลำไส้ (ภาพที่ 1b) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญตามระยะเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ ,  $n = 32$ ) โดยดัชนีของกระเพาะอาหารยังไม่เปลี่ยนแปลงใน 2 ชั่วโมงแรก ในขณะที่ดัชนีของลำไส้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายใน 8 ชั่วโมง สำหรับช่วงเวลาสุดท้ายของการเก็บตัวอย่างพบว่าดัชนีของกระเพาะอาหารและลำไส้ลดลงเหลือประมาณ 42 และ 44 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับดัชนีเริ่มต้นเมื่อเริ่มเก็บตัวอย่าง ตามลำดับ

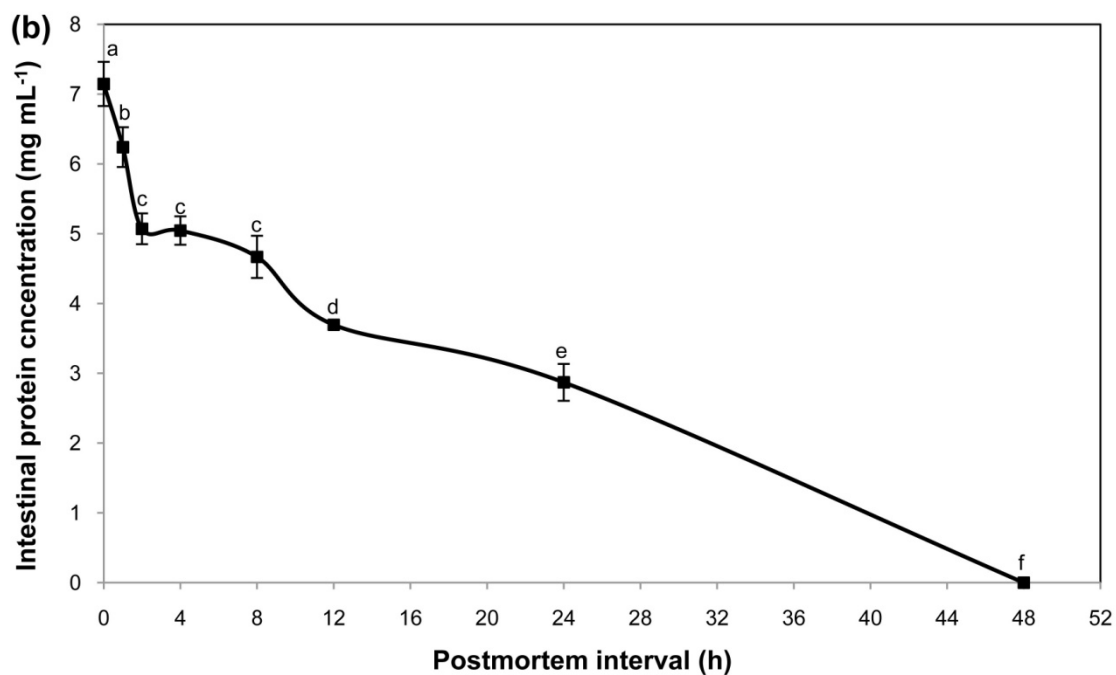
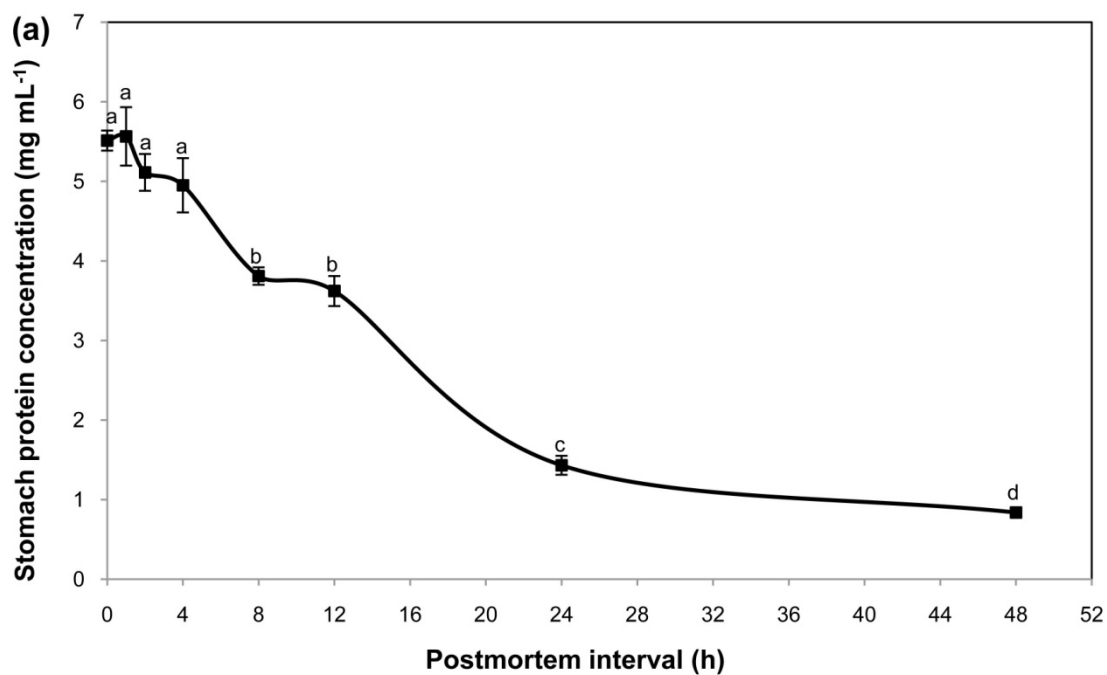
#### 1.2 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโปรตีนในทางเดินอาหาร

ความเข้มข้นของโปรตีนในทางเดินอาหารมีลักษณะและแนวโน้มเช่นเดียวกับดัชนีของกระเพาะอาหารและลำไส้ (ภาพที่ 2) โดยความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในกระเพาะอาหาร (ภาพที่ 2a) และในลำไส้ (ภาพที่ 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



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





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

### 1.3 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหาร

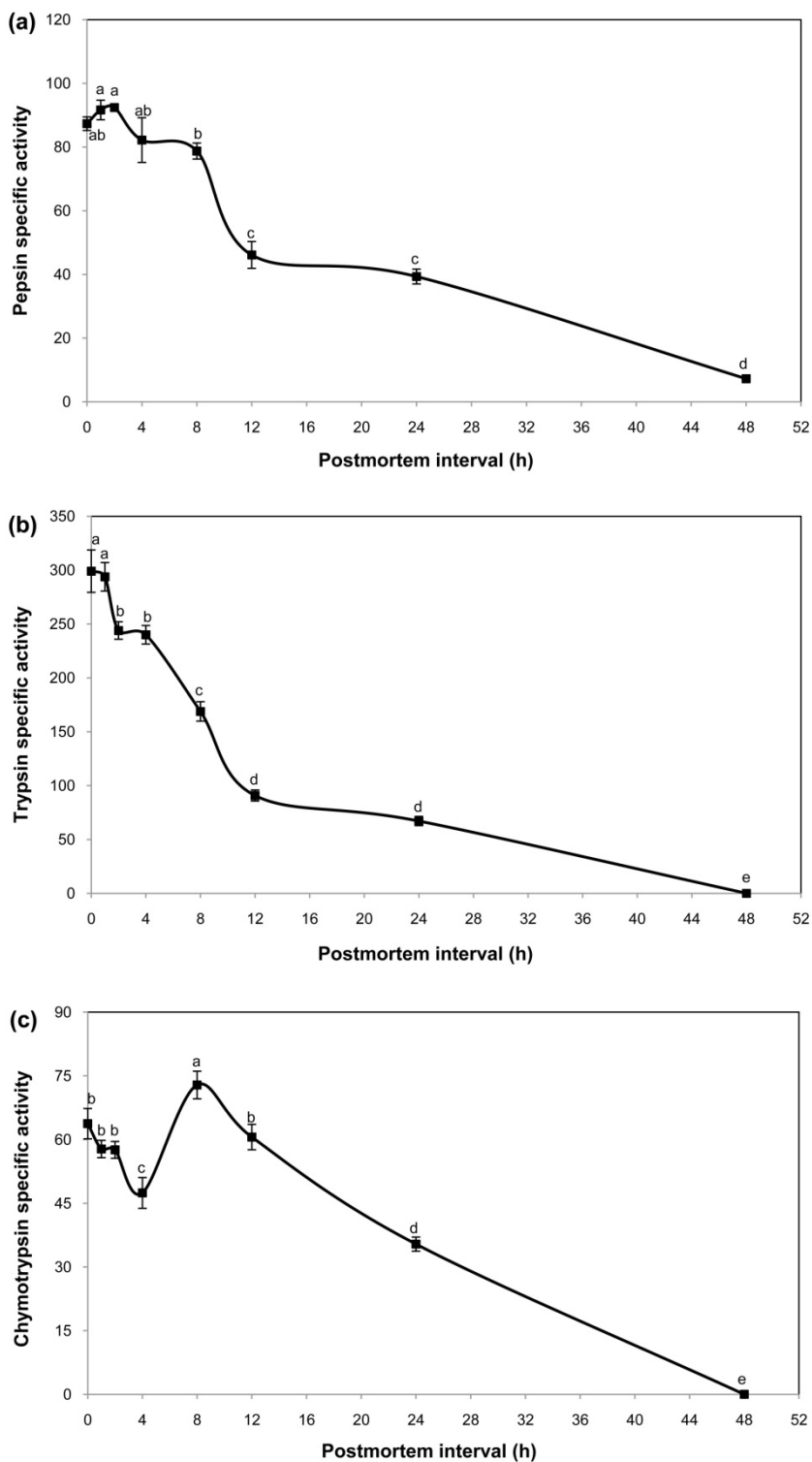
การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโปรตีนในทางเดินอาหาร สามารถศึกษาได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน 3 ชนิด (ภาพที่ 3) กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เปปซินไม่เปลี่ยนแปลงใน 4 ชั่วโมงแรกหลังการตาย (ภาพที่ 3a) จากนั้นจะลดลงเรื่อยๆ และมีกิจกรรมจำเพาะต่ำสุด ( $7.24 \pm 1.18 \text{ mU mg protein}^{-1}$ ) ที่ช่วงเวลาสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินมีความไวต่อเวลาหลังการตายมากกว่าเอนไซม์เปปซิน (ภาพที่ 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 (ภาพที่ 3c) อย่างไรก็ตามกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ชนิดนี้มีค่าต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัดในระยะเวลา 48 ชั่วโมงหลังการตายเช่นเดียวกับเอนไซม์ทริปซิน

กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลส (ภาพที่ 4a) และไลเปส (ภาพที่ 4b) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญตามระยะเวลาหลังการตายเช่นเดียวกับทริปซิน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสมีความไวต่อเวลาหลังการตายมากกว่าในทุุกเอนไซม์ที่ศึกษา โดยลดลง 98.63 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมงแรก และมีค่าต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัดได้ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการตาย

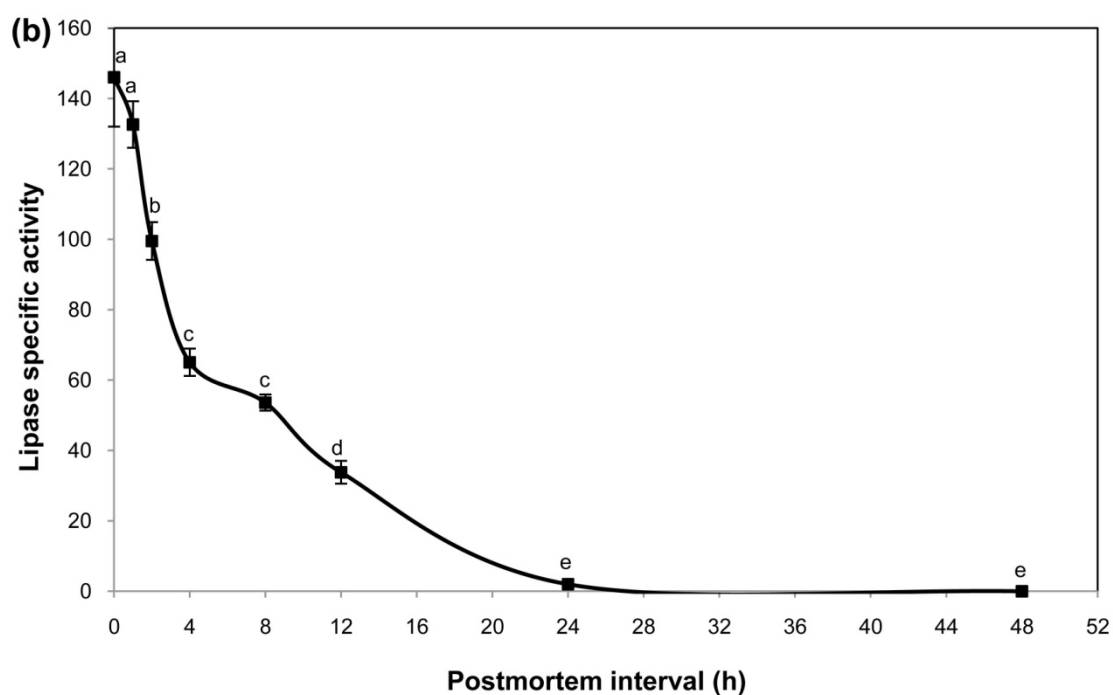
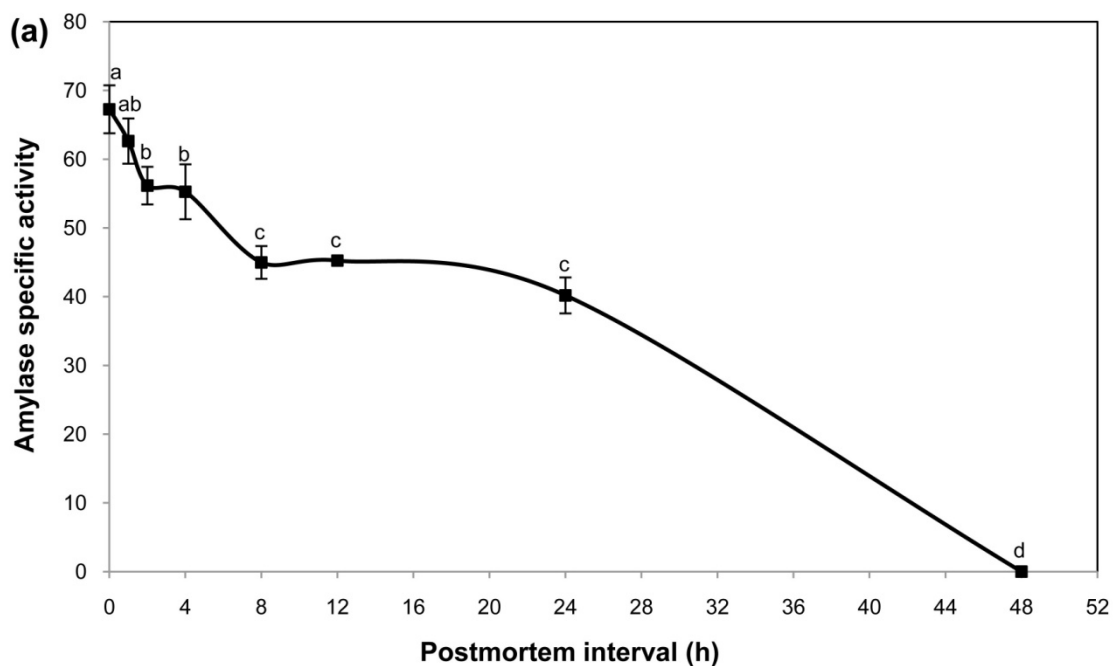
### 1.4 การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาออกซิเดชันในระบบย่อยอาหาร

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

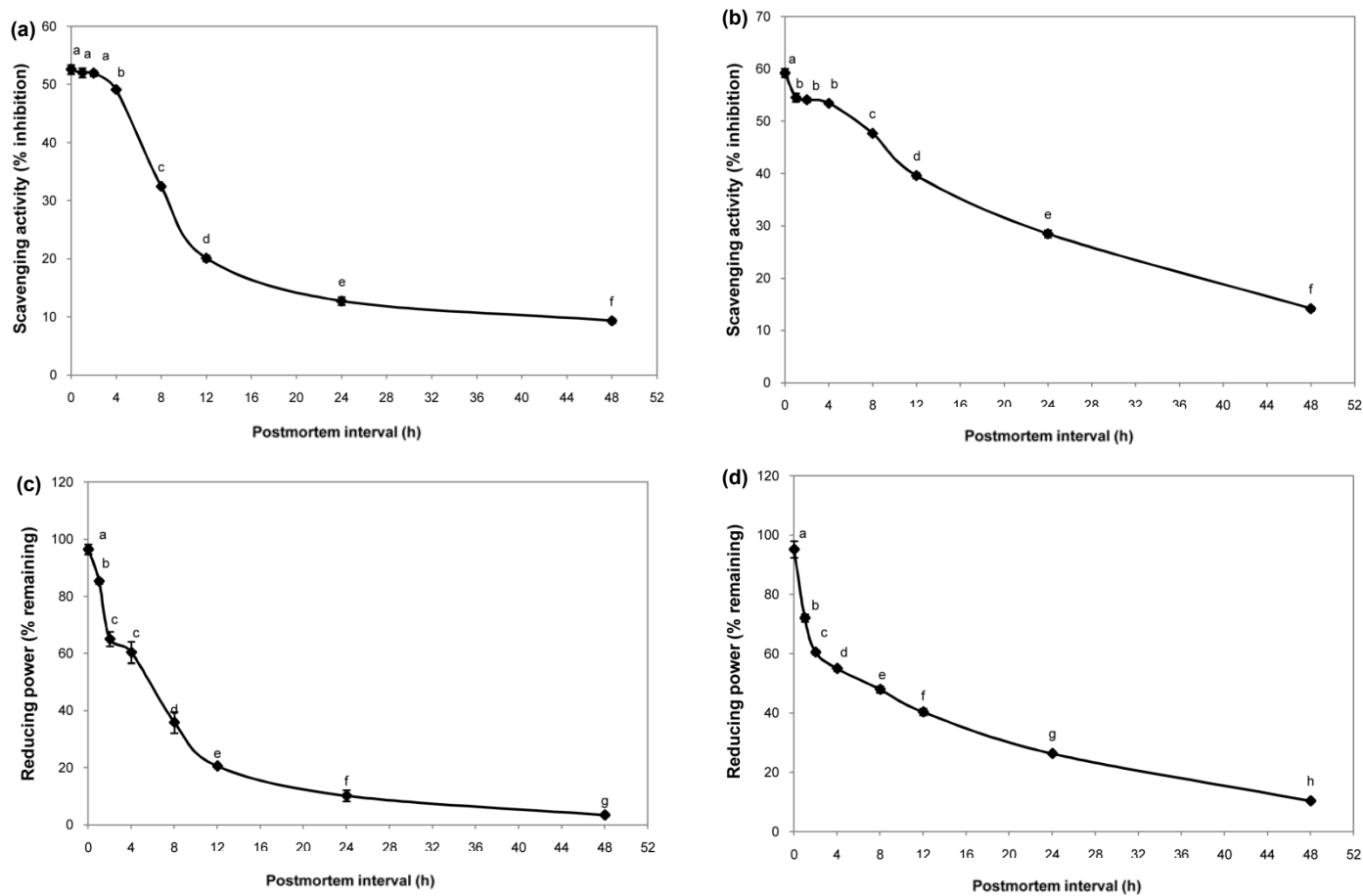
ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สันระหว่างเวลาและตัวแปรแต่ละคู่ ได้แก่ ดัชนีอวัยวะย่อยอาหารต่อน้ำหนักตัว ความเข้มข้นของโปรตีน เอนไซม์ย่อยอาหาร และกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระในกระเพาะอาหารและลำไส้ พบว่าตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกันโดยมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P < 0.01$ , ตารางที่ 2)



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมจำเพาะ (mU mg protein<sup>-1</sup>) ของเอนไซม์เปปซิน (a) ทริปซิน (b) และ ไคโมทริปซิน (c) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ตัวยกที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ )



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลส (a, U mg protein<sup>-1</sup>) และไลเปส (b, mU mg protein<sup>-1</sup>) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ )



ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระในกระเพาะอาหาร (a) และลำไส้ (b) (% inhibition) และความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในกระเพาะอาหาร (c) และลำไส้ (d) (% remaining) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ตัวยกที่ต่างกันอย่างเห็นได้ชัดถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ )

**ตารางที่ 2** ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน ( $r$ ) ระหว่างตัวแปรแต่ละคู่ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารหลังการตายของปลานิล 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 3** 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.

เวลาหลังการตาย (X) มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหาร (Y) ได้แก่ ดัชนีอวัยวะย่อยอาหารต่อน้ำหนักตัว ความเข้มข้นของโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหาร และกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระในกระเพาะอาหารและลำไส้ ( $P < 0.01$ , ตารางที่ 3)

## 2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อหลังการตาย

### 2.1 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของคาเทปซินบี เอช และแอล

กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนตัว ได้แก่ คาเทปซินบี (ภาพที่ 6a) เอช (ภาพที่ 6b) และแอล (ภาพที่ 6c) ในปลานิลมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่เริ่มตาย โดยกิจกรรมมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วง 4 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นก็มีค่าเพิ่มสูงมากขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกัน ( $r = 0.987-0.997$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 32$ ) โดยกิจกรรมจำเพาะของคาเทปซินบี และแอลมีแนวโน้มที่คล้ายกันตลอดระยะเวลา 48 ชั่วโมง และมีกิจกรรมจำเพาะสูงที่สุดในช่วงเวลาสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง 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) ในขณะที่กิจกรรมจำเพาะของคาเทปซินเอชมีแนวโน้มที่แตกต่างกับคาเทปซินบีและแอล รวมทั้งมีค่าที่ต่ำกว่ามาก โดยหลังการตาย 8 ชั่วโมง คาเทปซินเอชมีกิจกรรมต่ำสุด ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกับช่วงเวลา 0 ถึง 2 ชั่วโมง กิจกรรมจำเพาะสูงสุดของเอนไซม์ชนิดนี้ที่เวลา 48 ชั่วโมงมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 6.03 และ 7.83 เท่า โดยเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบกับเวลา 0 และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ

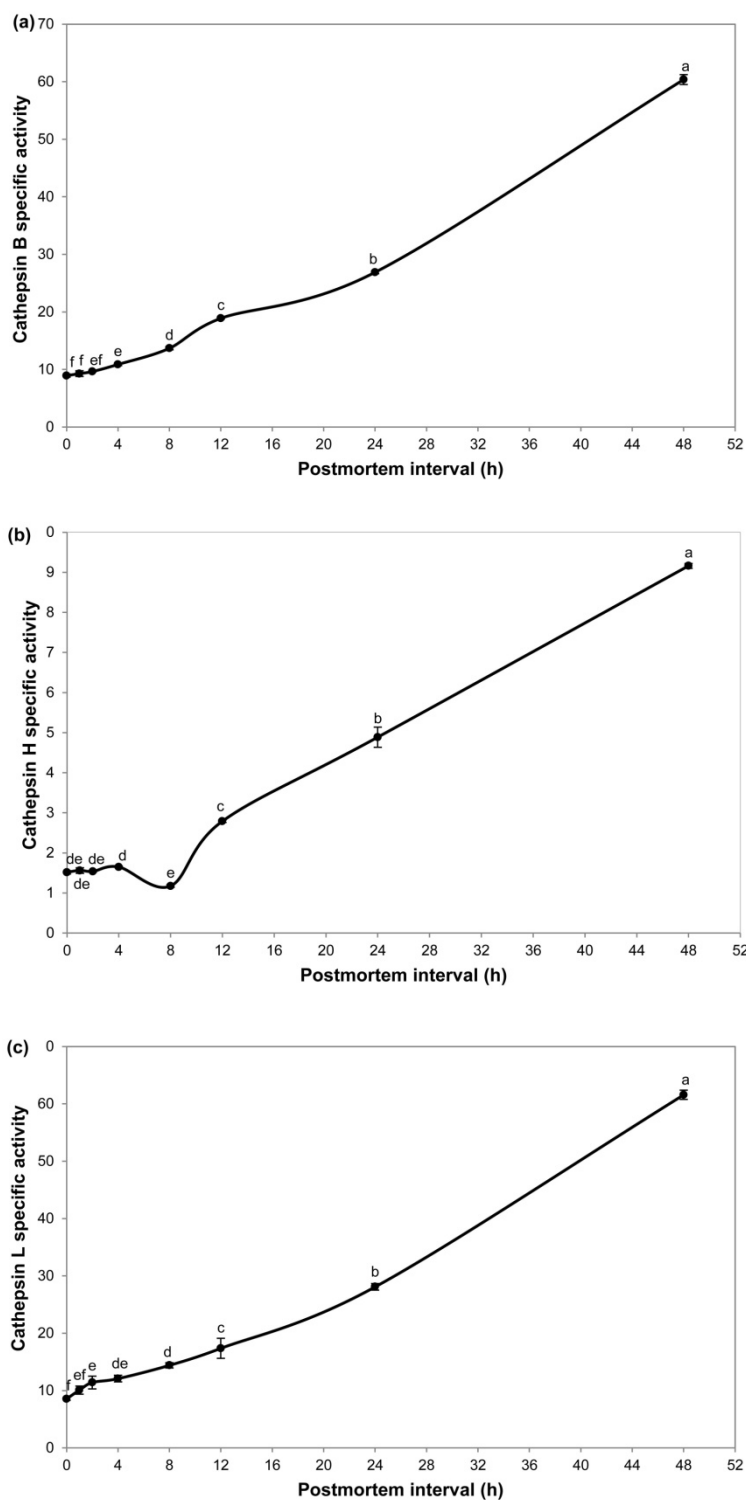
เวลาหลังการตาย (X) มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์คาเทปซินในกล้ามเนื้อขาว (Y) ได้แก่ คาเทปซินบี คาเทปซินเอช และคาเทปซินแอล ( $P < 0.01$ , ตารางที่ 4)

### 2.2 การเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อ

การเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาว ซึ่งตรวจสอบโดยวิธี DPPH แสดงดังภาพที่ 7a และ 7b ตามลำดับ การต้านออกซิเดชันมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องนับตั้งแต่เริ่มตาย โดยเฉพาะภายใน 1 ชั่วโมงแรก แต่ไม่พบความแตกต่างในช่วง 1-8 ชั่วโมง ในกล้ามเนื้อแดง และ 12-24 ชั่วโมง ในกล้ามเนื้อขาว ซึ่งมีค่าลดลง ตามลำดับ โดยช่วงเวลาที่มีการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำที่สุดของกล้ามเนื้อทั้ง 2 ชนิด คือ ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการตาย ซึ่งลดลงเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ ในกล้ามเนื้อแดง และ 6 เปอร์เซ็นต์ ในกล้ามเนื้อขาว เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้นเมื่อเริ่มเก็บตัวอย่าง

การเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาว ซึ่งตรวจสอบโดยวิธี reducing power แสดงดังภาพที่ 7c และ 7d ตามลำดับ ค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันลดลงอย่างต่อเนื่องนับตั้งแต่เริ่มตาย โดยเฉพาะภายใน 1 ชั่วโมงแรก เช่นเดียวกับการตรวจสอบโดยวิธี DPPH แต่ไม่พบความแตกต่างในช่วง 1-12 ชั่วโมง ทั้งในกล้ามเนื้อแดง และกล้ามเนื้อขาว และมีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัดอีกครั้งในชั่วโมงที่ 24 โดยช่วงเวลาที่มีการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำที่สุดของกล้ามเนื้อทั้ง 2 ชนิด คือ ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการตาย ซึ่งลดลงเหลือ 22 เปอร์เซ็นต์ ในกล้ามเนื้อแดง และ 29 เปอร์เซ็นต์ ในกล้ามเนื้อขาว เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้นเมื่อเริ่มเก็บตัวอย่าง

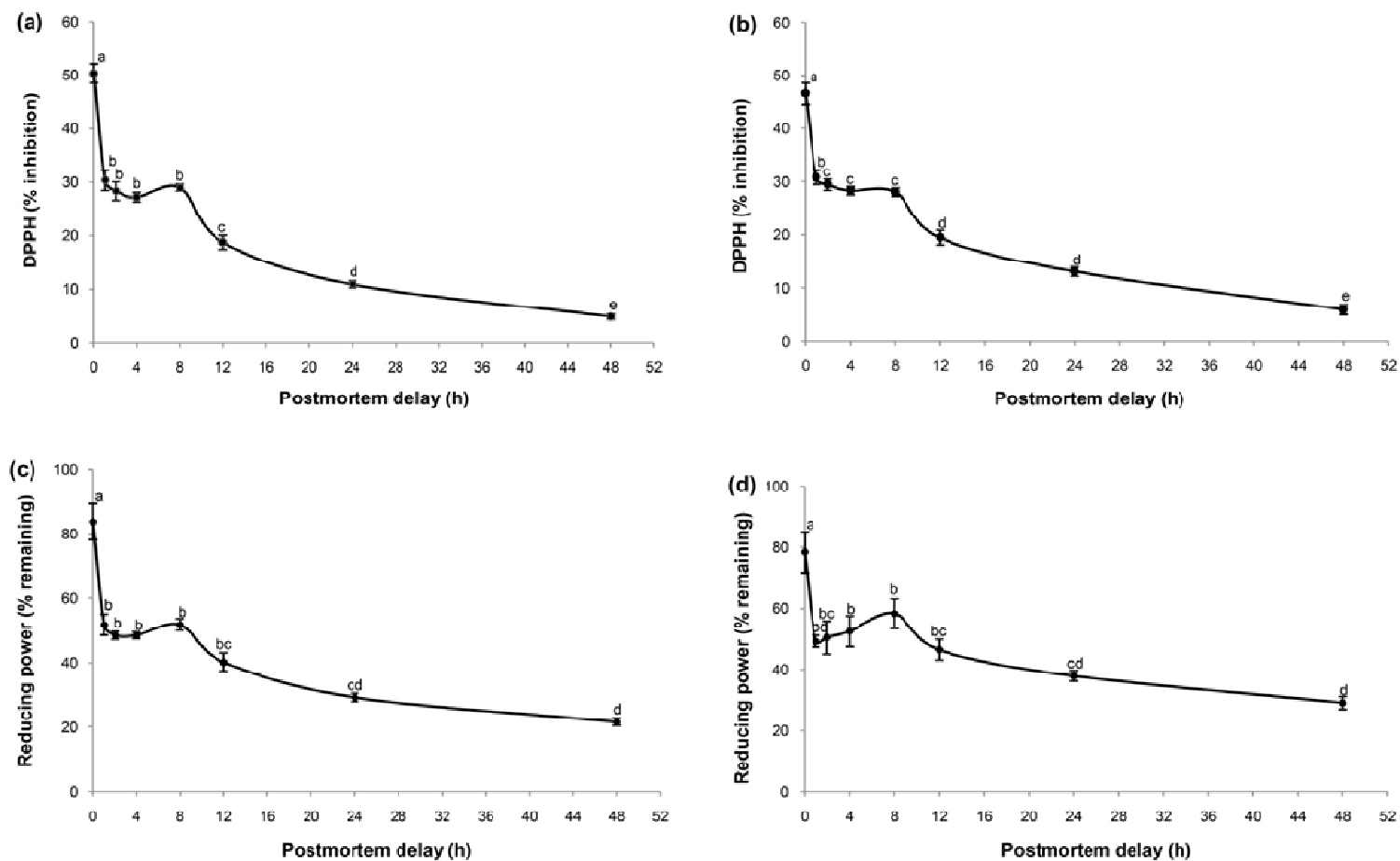




ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมจำเพาะ (mU mg protein<sup>-1</sup>) ของเอนไซม์คาเทปซินบี (a) เอช (b) และแอล (c) ของปลานิลภายใน 48 ชั่วโมงหลังการตาย ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ )

**ตารางที่ 4** สมการถดถอยระหว่างเวลาหลังการตาย (ชั่วโมง) ของปลานิล (X) และเอนไซม์คาเทปซินในกล้ามเนื้อขาว (Y) ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับเวลาหลังการตายอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P < 0.01$ )

Y variable	Regression equation	<i>r</i>
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



ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อปลาน้ำจืดหลังการตาย 48 ชั่วโมง โดยใช้วิธี DPPH กล้ามเนื้อแดง (a) และ กล้ามเนื้อขาว (b) และวิธี reducing power กล้ามเนื้อแดง (c) และ กล้ามเนื้อขาว (d) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $n = 4$ ) ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย ( $P < 0.05$ )

**ตารางที่ 5** ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน ( $r$ ) ระหว่างการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวหลังการตายของปลาไนล์ ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.01$ )

Parameter	DPPH <sub>R</sub>	DPPH <sub>W</sub>	RP <sub>R</sub>
DPPH <sub>W</sub>	0.970		
RP <sub>R</sub>	0.938	0.928	
RP <sub>W</sub>	0.828	0.840	0.799

DPPH<sub>R</sub>, % DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl) scavenging activity in red muscle; DPPH<sub>W</sub>, % DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl) scavenging activity in white muscle; RP<sub>R</sub>, reducing power in red muscle; RP<sub>W</sub>, reducing power in white muscle

**ตารางที่ 6** สมการถดถอยระหว่างเวลาหลังการตาย (ชั่วโมง) ของปลาไนล์ (X) และการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาว (Y) ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับเวลาหลังการตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.01$ )

Y variable	Regression equation	$r$
DPPH <sub>R</sub>	$Y = -0.703X + 33.674$	-0.819
DPPH <sub>W</sub>	$Y = -0.655X + 33.331$	-0.855
RP <sub>R</sub>	$Y = -0.884X + 57.872$	-0.684
RP <sub>W</sub>	$Y = -0.683X + 58.721$	-0.731

DPPH<sub>R</sub>, % DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl) scavenging activity in red muscle; DPPH<sub>W</sub>, % DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl) scavenging activity in white muscle; RP<sub>R</sub>, reducing power in red muscle; RP<sub>W</sub>, reducing power in white muscle

ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สันระหว่างการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาว โดยใช้วิธี DPPH และ reducing power มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกันโดยมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $r = 0.799-0.970$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 32$ , ตารางที่ 5) และเวลาหลังการตาย (X) มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาว (Y) ทั้งโดยใช้วิธี DPPH และ reducing power [ $r = (-0.684)-(-0.855)$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 32$ , ตารางที่ 6] โดยการตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ( $r^2 = 0.671-0.731$ ) จะมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาหลังการตายมากกว่า

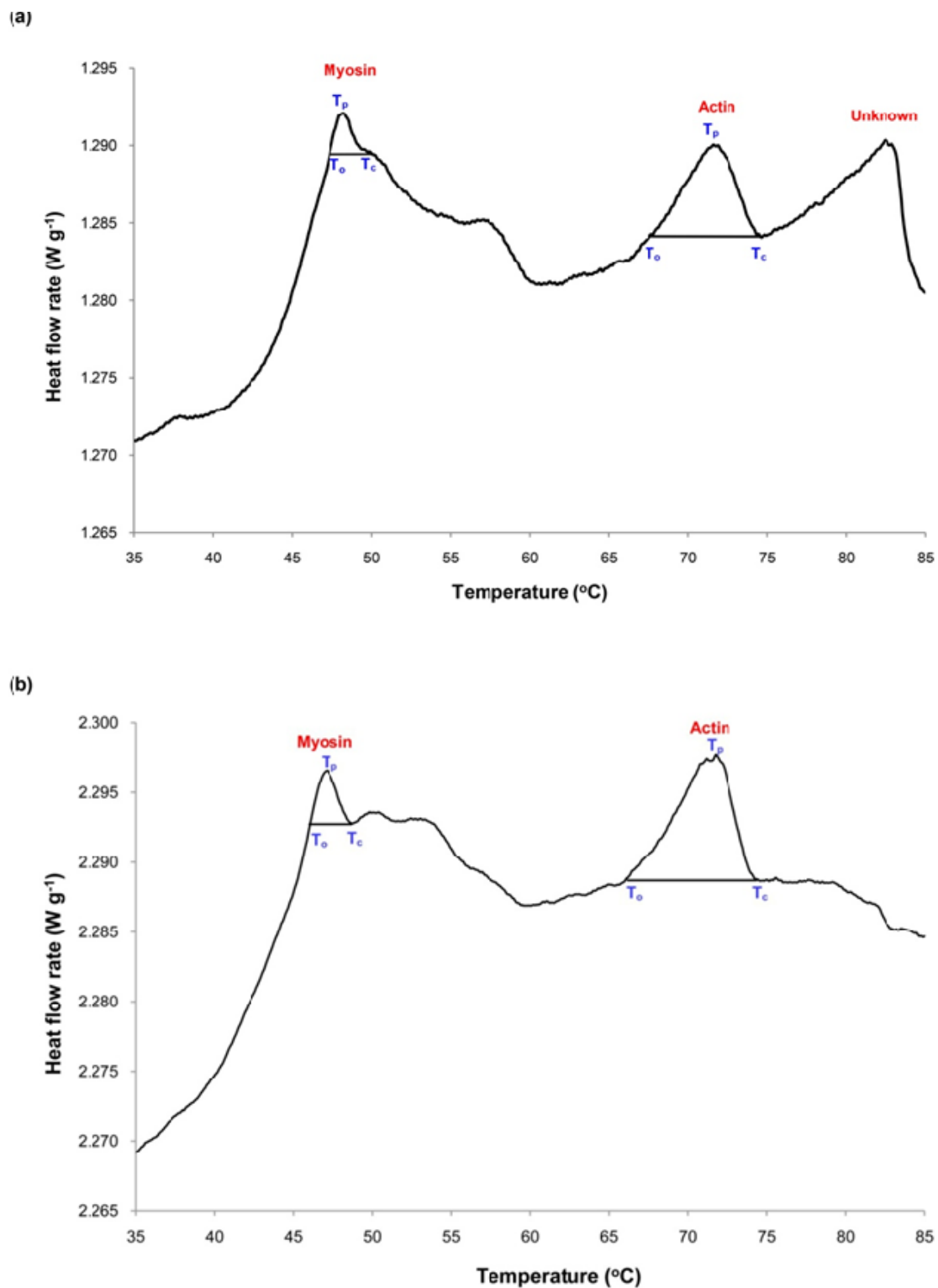
วิธี reducing power ( $r^2 = 0.468-0.534$ ) และการตรวจสอบในกล้ามเนื้อขาว ( $r^2 = 0.534-0.731$ ) จะมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาหลังการตายมากกว่าในกล้ามเนื้อแดง ( $r^2 = 0.468-0.671$ )

### 2.3 การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของกล้ามเนื้อ

เทอร์โมแกรมของกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวในตัวอย่างชุดควบคุม (0 ชั่วโมง) แสดงการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อน โดยพบการเสียดสภาพของโปรตีนไมโอซินในกล้ามเนื้อแดง (อุณหภูมิเริ่มต้น 41.92 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิพีค 46.25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสุดท้าย 48.72 องศาเซลเซียส) (ภาพที่ 8a) และกล้ามเนื้อขาว (อุณหภูมิเริ่มต้น 44.45 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิพีค 46.88 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสุดท้าย 48.62 องศาเซลเซียส) (ภาพที่ 8b) และแอกทินในกล้ามเนื้อแดง (อุณหภูมิเริ่มต้น 66.33 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิพีค 70.84 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสุดท้าย 73.47 องศาเซลเซียส) (ภาพที่ 8a) และกล้ามเนื้อขาว (อุณหภูมิเริ่มต้น 68.31 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิพีค 71.04 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสุดท้าย 73.42 องศาเซลเซียส) (ภาพที่ 8b) นอกจากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนไมโอซินและแอกทินแล้วยังตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนบางชนิดในกล้ามเนื้อแดง ที่มีอุณหภูมิเริ่มต้น 77.18 องศาเซลเซียส อุณหภูมิพีค 82.04 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสุดท้าย 84.06 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 8a)

ระยะเวลาหลังการตายมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อทั้ง 2 ชนิด คุณลักษณะพีค ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้น อุณหภูมิพีค อุณหภูมิสุดท้าย ช่วงอุณหภูมิและเอนทาลปีของการเสียดสภาพของโปรตีน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในช่วงเวลา 0-12 ชั่วโมง แต่มีแนวโน้มลดลงในชั่วโมงที่ 24 ( $P < 0.05$ ) จนไม่สามารถตรวจวัดได้ในช่วงเวลาสุดท้าย (ตารางที่ 7 และ 8) ไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อแดงมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงหลังการตายไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 7) ในขณะที่กล้ามเนื้อขาว แอกทินมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงมากกว่าไมโอซิน โดยอุณหภูมิเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 12 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเวลา 0 ชั่วโมง (ตารางที่ 8)

ช่วงอุณหภูมิของไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อแดงไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 7) แต่ในกล้ามเนื้อขาว ช่วงอุณหภูมิมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังการตายจนถึงชั่วโมงที่ 24 ( $P < 0.05$ , ตารางที่ 8) สำหรับเอนทาลปีของไมโอซินในกล้ามเนื้อแดง พบว่ามีค่าน้อยที่สุดในชั่วโมงที่ 24 (ตารางที่ 7) แต่เอนทาลปีของแอกทินในกล้ามเนื้อแดง (ตารางที่ 7) กับไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อขาว (ตารางที่ 8) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ผลรวมเอนทาลปีของไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อแดงมีค่าน้อยที่สุดในชั่วโมงที่ 24 (ตารางที่ 7) แต่ในกล้ามเนื้อขาว ผลรวมเอนทาลปีมีค่าใกล้เคียงกัน



ภาพที่ 8 สมบัติเชิงความร้อนของไมโอซิน และแอคติน ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้น ( $T_o$ ) อุณหภูมิพีค ( $T_p$ ) และ อุณหภูมิสุดท้าย ( $T_e$ ) ในกล้ามเนื้อแดง (a) และกล้ามเนื้อขาว (b) ของปลานิลในชุดควบคุม (0 ชั่วโมงหลังการตาย)

ตารางที่ 7 คุณลักษณะเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อแดงของปลานิลแปลงเพศหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)

Postmortem interval (h)	Myosin					Actin					$\Sigma\Delta H$ ( $J g^{-1}$ )
	$T_o$ ( $^{\circ}C$ )	$T_p$ ( $^{\circ}C$ )	$T_c$ ( $^{\circ}C$ )	$T_c-T_o$ ( $^{\circ}C$ )	$\Delta H$ ( $J g^{-1}$ )	$T_o$ ( $^{\circ}C$ )	$T_p$ ( $^{\circ}C$ )	$T_c$ ( $^{\circ}C$ )	$T_c-T_o$ ( $^{\circ}C$ )	$\Delta H$ ( $J g^{-1}$ )	
0	41.92 <sup>ab</sup> (0.33)	46.25 <sup>a</sup> (0.35)	48.72 <sup>a</sup> (0.42)	6.80 <sup>ab</sup> (0.10)	0.37 <sup>a</sup> (0.01)	66.33 <sup>a</sup> (0.24)	70.84 <sup>a</sup> (0.06)	73.47 <sup>a</sup> (0.05)	7.14 <sup>a</sup> (0.29)	0.35 <sup>a</sup> (0.03)	0.73 <sup>a</sup> (0.04)
1	43.50 <sup>ab</sup> (0.26)	47.33 <sup>a</sup> (0.01)	49.92 <sup>a</sup> (0.27)	6.42 <sup>b</sup> (0.01)	0.47 <sup>a</sup> (0.02)	68.01 <sup>a</sup> (0.01)	71.92 <sup>a</sup> (0.24)	74.57 <sup>a</sup> (0.42)	6.56 <sup>a</sup> (0.40)	0.35 <sup>a</sup> (0.01)	0.82 <sup>a</sup> (0.03)
2	43.17 <sup>ab</sup> (0.36)	47.59 <sup>a</sup> (0.12)	52.12 <sup>a</sup> (0.75)	8.95 <sup>a</sup> (1.10)	0.53 <sup>a</sup> (0.01)	68.50 <sup>a</sup> (0.88)	71.59 <sup>a</sup> (0.12)	73.71 <sup>a</sup> (0.29)	5.22 <sup>a</sup> (1.17)	0.32 <sup>a</sup> (0.02)	0.85 <sup>a</sup> (0.01)
4	44.91 <sup>a</sup> (0.75)	47.84 <sup>a</sup> (0.47)	49.93 <sup>a</sup> (0.79)	5.03 <sup>b</sup> (0.04)	0.52 <sup>a</sup> (0.19)	67.48 <sup>a</sup> (0.07)	70.92 <sup>a</sup> (0.01)	73.43 <sup>a</sup> (0.02)	5.95 <sup>a</sup> (0.06)	0.34 <sup>a</sup> (0.01)	0.86 <sup>a</sup> (0.18)
8	43.18 <sup>ab</sup> (0.90)	46.34 <sup>a</sup> (1.18)	48.80 <sup>a</sup> (0.95)	5.62 <sup>b</sup> (0.05)	0.58 <sup>a</sup> (0.16)	67.68 <sup>a</sup> (0.55)	70.92 <sup>a</sup> (0.01)	73.50 <sup>a</sup> (0.19)	5.82 <sup>a</sup> (0.36)	0.37 <sup>a</sup> (0.03)	0.90 <sup>a</sup> (0.19)
12	44.65 <sup>a</sup> (0.83)	48.34 <sup>a</sup> (0.47)	50.54 <sup>a</sup> (0.50)	5.89 <sup>b</sup> (0.34)	0.51 <sup>a</sup> (0.02)	68.13 <sup>a</sup> (0.35)	71.58 <sup>a</sup> (0.01)	74.16 <sup>a</sup> (0.01)	6.04 <sup>a</sup> (0.34)	0.29 <sup>a</sup> (0.04)	0.80 <sup>a</sup> (0.05)
24	39.60 <sup>b</sup> (1.54)	42.25 <sup>b</sup> (1.29)	44.35 <sup>b</sup> (1.10)	4.75 <sup>b</sup> (0.44)	0.24 <sup>b</sup> (0.06)	62.89 <sup>b</sup> (1.20)	67.00 <sup>b</sup> (1.18)	69.95 <sup>b</sup> (1.02)	7.06 <sup>a</sup> (0.18)	0.25 <sup>a</sup> (0.03)	0.48 <sup>b</sup> (0.09)
48	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd, ตรวจไม่พบ;  $T_o$ , อุณหภูมิเริ่มต้น;  $T_p$ , อุณหภูมิพีค;  $T_c$ , อุณหภูมิสุดท้าย;  $T_c-T_o$ , ช่วงอุณหภูมิ;  $\Delta H$ , เอนทาลปี;  $\Sigma\Delta H$ , ผลรวมเอนทาลปีของไมโอซินและแอกทิน

อักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

ตารางที่ 8 คุณลักษณะเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อขาวของปลานิลแปลงเพศหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)

Postmortem interval (h)	Myosin					Actin					$\Sigma\Delta H$ ( $J g^{-1}$ )
	$T_o$ ( $^{\circ}C$ )	$T_p$ ( $^{\circ}C$ )	$T_c$ ( $^{\circ}C$ )	$T_c-T_o$ ( $^{\circ}C$ )	$\Delta H$ ( $J g^{-1}$ )	$T_o$ ( $^{\circ}C$ )	$T_p$ ( $^{\circ}C$ )	$T_c$ ( $^{\circ}C$ )	$T_c-T_o$ ( $^{\circ}C$ )	$\Delta H$ ( $J g^{-1}$ )	
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

nd, ตรวจไม่พบ;  $T_o$ , อุณหภูมิเริ่มต้น;  $T_p$ , อุณหภูมิพีค;  $T_c$ , อุณหภูมิสุดท้าย;  $T_c-T_o$ , ช่วงอุณหภูมิ;  $\Delta H$ , เอนทาลปี;  $\Sigma\Delta H$ , ผลรวมเอนทาลปีของไมโอซินและแอกทิน

อักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

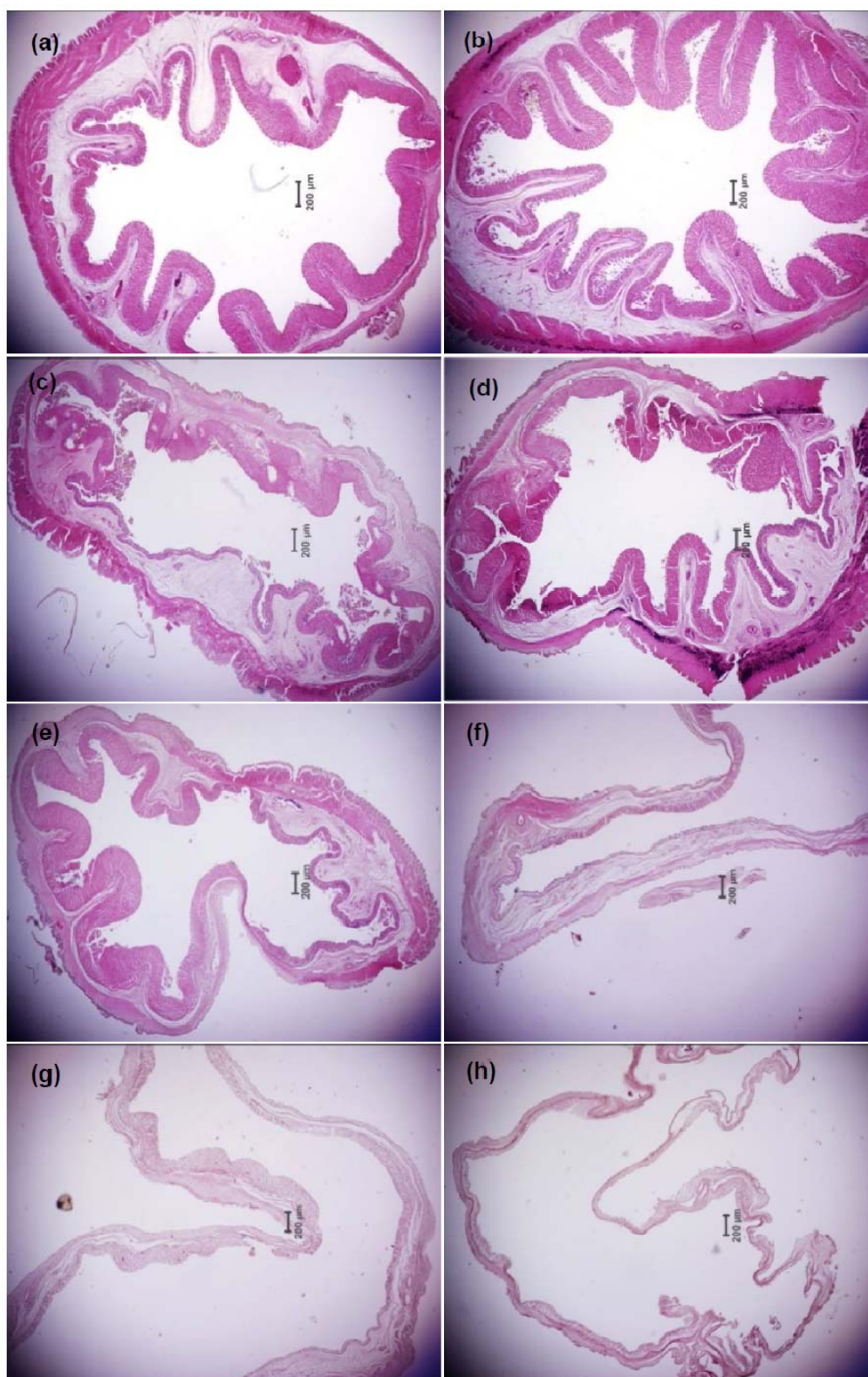


### 3. การศึกษาลักษณะจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหาร ลำไส้ ตับ และกล้ามเนื้อ

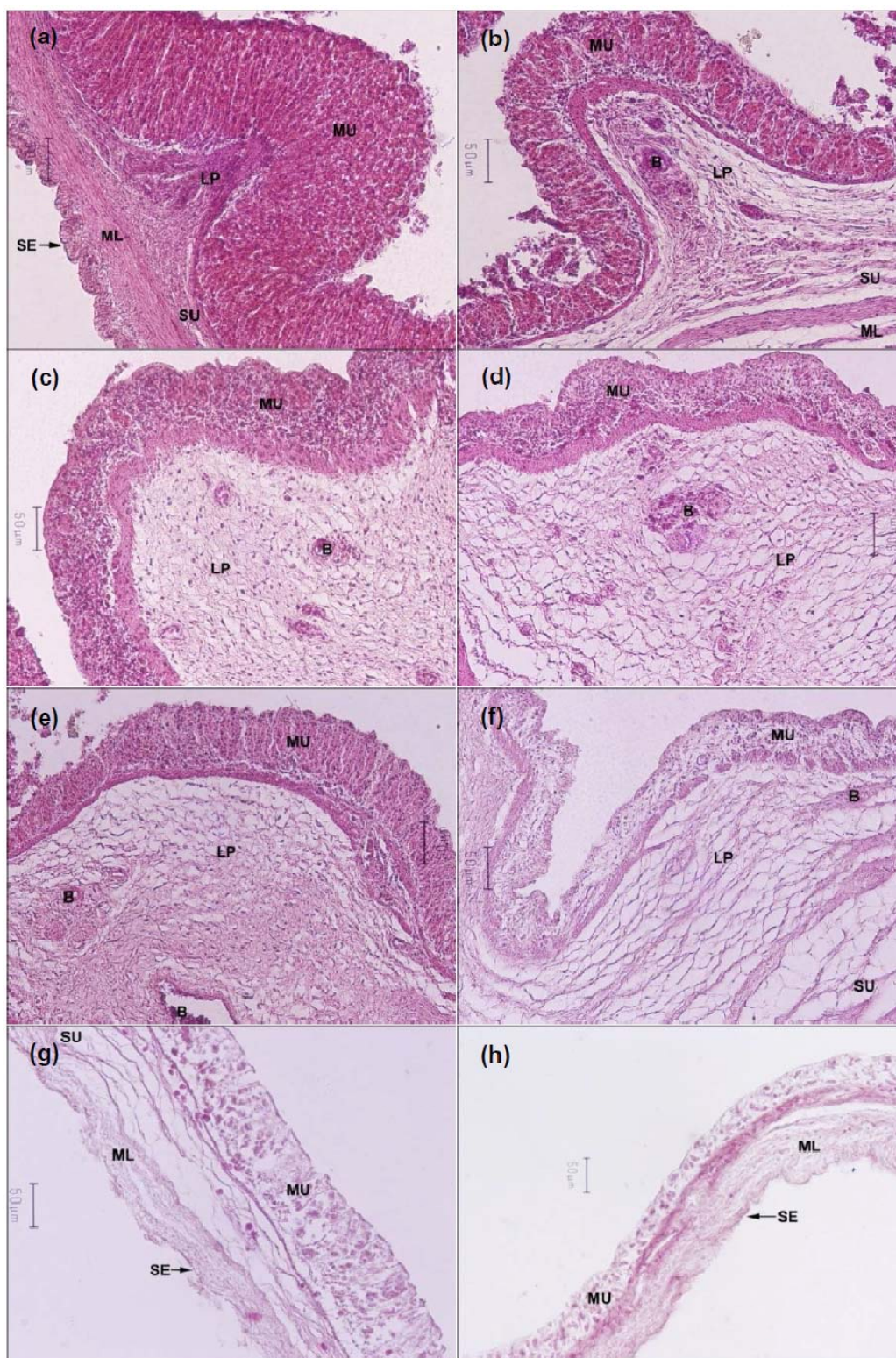
#### 3.1 กระเพาะอาหาร

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหารปลานิลภายในเวลา 48 ชั่วโมงหลังการตายที่กำลังขยาย 40 เท่า พบว่าก่อนปลาตาย (0 ชั่วโมง) และหลังตายนาน 1 ชั่วโมง ลูเมน (lumen) ของกระเพาะอาหารมีรูปร่างค่อนข้างกลม (ภาพที่ 9a และ 9b) แต่เมื่อเวลาผ่านไปในช่วง 2 ถึง 8 ชั่วโมง พบว่าลูเมนของกระเพาะอาหารมีรูปร่างค่อนข้างรี ความหนาของผนังลดลง และลูเมนมีขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 9c-9e) และเมื่อเวลาผ่านไปในช่วง 12 ถึง 48 ชั่วโมง พบว่าลูเมนขยายขนาดใหญ่มากขึ้น กระเพาะอาหารมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ไม่แน่นอน แต่มีรูปร่างยาวขึ้นตามระยะเวลาหลังการตาย (ภาพที่ 9f-9h)

สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหารที่กำลังขยาย 200 เท่า พบว่าก่อนการตาย (0 ชั่วโมง) กระเพาะอาหารประกอบด้วยผนังชั้น mucosa, submucosa, muscularis และ serosa และส่วนของ lamina propria ที่อยู่ถัดลงมาจากผนังชั้น mucosa (ภาพที่ 10a) เมื่อปลาตายนาน 1 ชั่วโมง พบว่าเนื้อเยื่อกระเพาะประกอบด้วยผนังทั้ง 4 ชั้น และ lamina propria ไม่แตกต่างกับกระเพาะอาหารของปลาในชุดควบคุม (ภาพที่ 10b) แต่เมื่อเวลาผ่านไปในช่วง 2 ถึง 8 ชั่วโมง พบว่าผนังเนื้อเยื่อชั้น mucosa เริ่มสลายตัวและเกิดการตายของเซลล์บริเวณ lamina propria (ภาพที่ 10c-10e) และเมื่อเวลาผ่านไปในช่วง 12 ถึง 48 ชั่วโมง พบว่าผนังกระเพาะอาหารบางลงตามระยะเวลาหลังการตายที่นานขึ้น เนื่องจากเกิดการสลายตัวของเนื้อเยื่อแต่ละชั้นอย่างเห็นได้ชัด โดยพบการสลายตัวของเนื้อเยื่อและการตายของเซลล์บริเวณ lamina propria มากขึ้น จนไม่สามารถแยกชั้นของผนังกระเพาะอาหารได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 10f-10h)



ภาพที่ 9 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 μm) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 40 เท่า

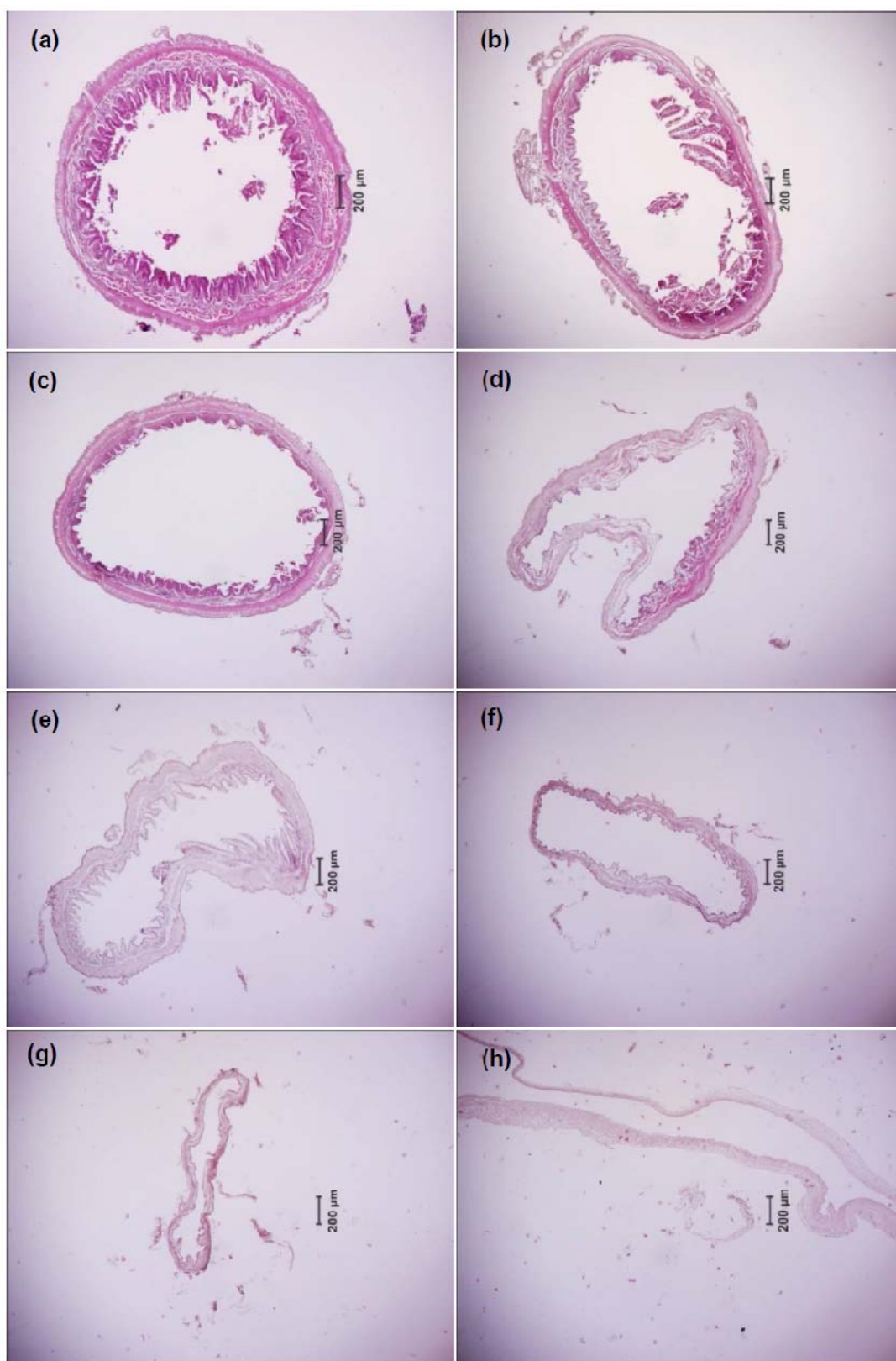


ภาพที่ 10 จุลกายวิภาคของกระเพาะอาหาร (ตัดตามขวาง) ของปลานิลหลังการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (h) (MU = mucosa, LP = lamina propria, SU = submucosa, ML = muscularis, SE = serosa, B = blood vessel) (H&E, scale bar = 50) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 200 เท่า

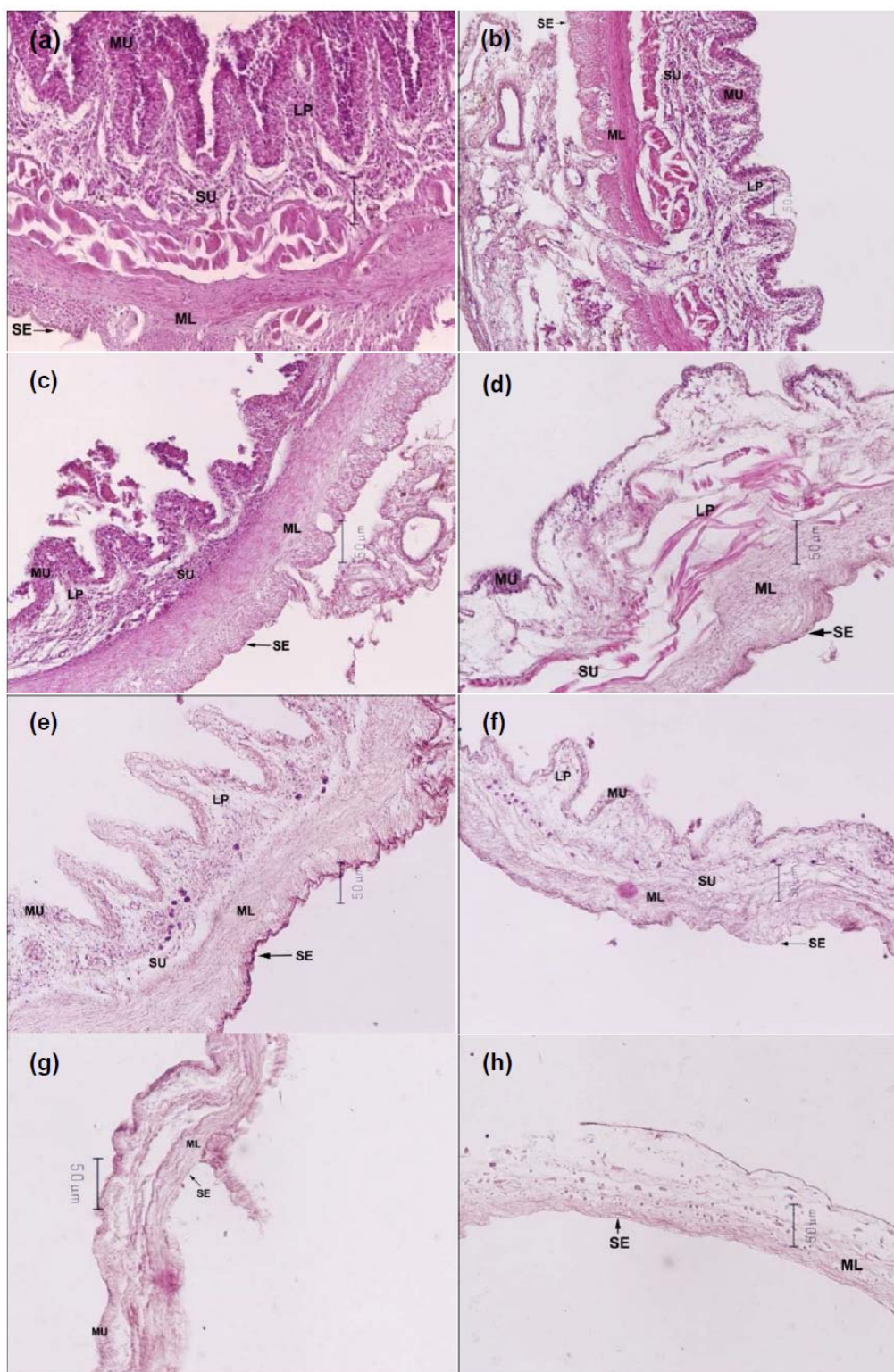
### 3.2 ลำไส้

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลกายวิภาคของลำไส้ปลานิลภายในเวลา 48 ชั่วโมงหลังการตาย ที่กำลังขยาย 40 เท่า พบว่าก่อนตาย (0 ชั่วโมง) ลูเมนของลำไส้มีรูปร่างค่อนข้างกลม (ภาพที่ 11a) เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง รูปร่างของลูเมนลำไส้ค่อนข้างยาวรี (ภาพที่ 11b) และเมื่อปลาทายนาน 2 ชั่วโมง พื้นที่ผิวของผนังลำไส้ลดลงอย่างเห็นได้ชัด และช่องว่างภายในเนื้อเยื่อขยายขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 11c) และเมื่อเวลาผ่านไปในช่วงเวลา 4 ถึง 48 ชั่วโมง พบว่าเนื้อเยื่อลำไส้มีวิลไลน้อยลง และมีรูปร่างยืดยาวขึ้น ตามระยะเวลาหลังการตาย (ภาพที่ 11d-11h)

สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลกายวิภาคของลำไส้ที่กำลังขยาย 200 เท่า พบว่าก่อนปลาทาย (0 ชั่วโมง) ลำไส้ประกอบด้วยผนังเนื้อเยื่อชั้น mucosa, submucosa, muscularis และ serosa รวมทั้งส่วนของ lamina propria เช่นเดียวกับกระเพาะอาหาร (ภาพที่ 12a) เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง พบว่าเริ่มมีการสลายตัวของเนื้อเยื่อในแต่ละชั้น และพบการตายของเซลล์บริเวณ lamina propria (ภาพที่ 12b) เมื่อปลาทายนาน 2 ชั่วโมง พบว่าเนื้อเยื่อแต่ละชั้นสลายตัวมากขึ้น (ภาพที่ 12c) และเมื่อเวลาผ่านไปในช่วง 4 ถึง 48 ชั่วโมง พบว่าผนังลำไส้ทั้ง 4 ชั้นบางลงตามระยะเวลาหลังการตาย โดยผนังเนื้อเยื่อทุกชั้นที่เวลาสุดท้ายของการเก็บตัวอย่างมีความหนาน้อยที่สุด เนื่องจากการตายของเซลล์บริเวณ lamina propria และการสลายตัวของเนื้อเยื่อที่มากขึ้น จนไม่สามารถแยกชั้นของผนังลำไส้ได้ (ภาพที่ 12d-12h)



ภาพที่ 11 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) ภาพถ่ายบันทึกที่ กำลังขยาย 40 เท่า

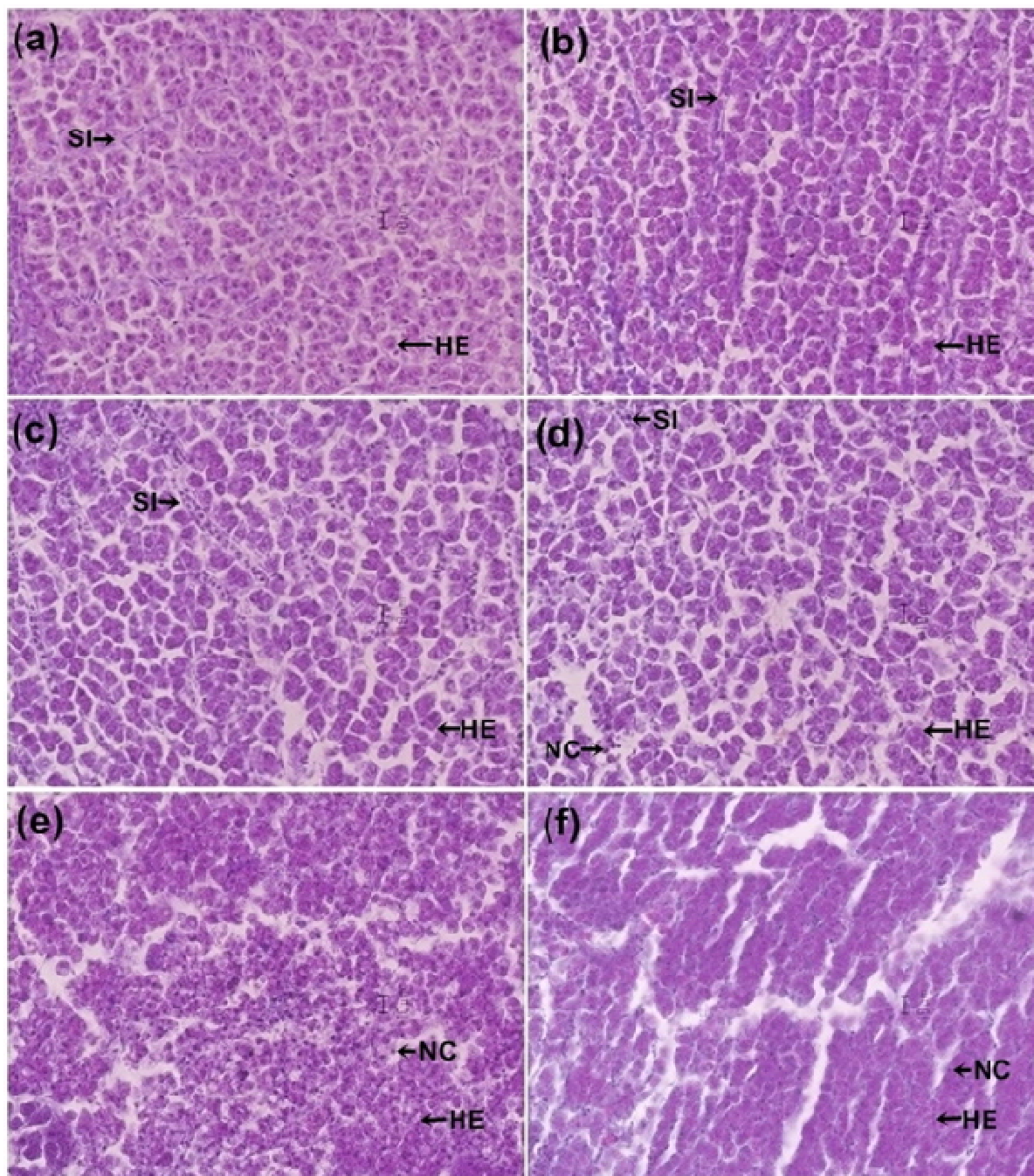


ภาพที่ 12 จุลกายวิภาคของลำไส้ (ตัดตามขวาง) ของปลานิลหลังการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (h) (MU = mucosa, LP = lamina propria, SU = submucosa, ML = muscularis, SE = serosa (H&E, scale bar = 50  $\mu$ m) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 200 เท่า

### 3.3 ตับและตับอ่อน

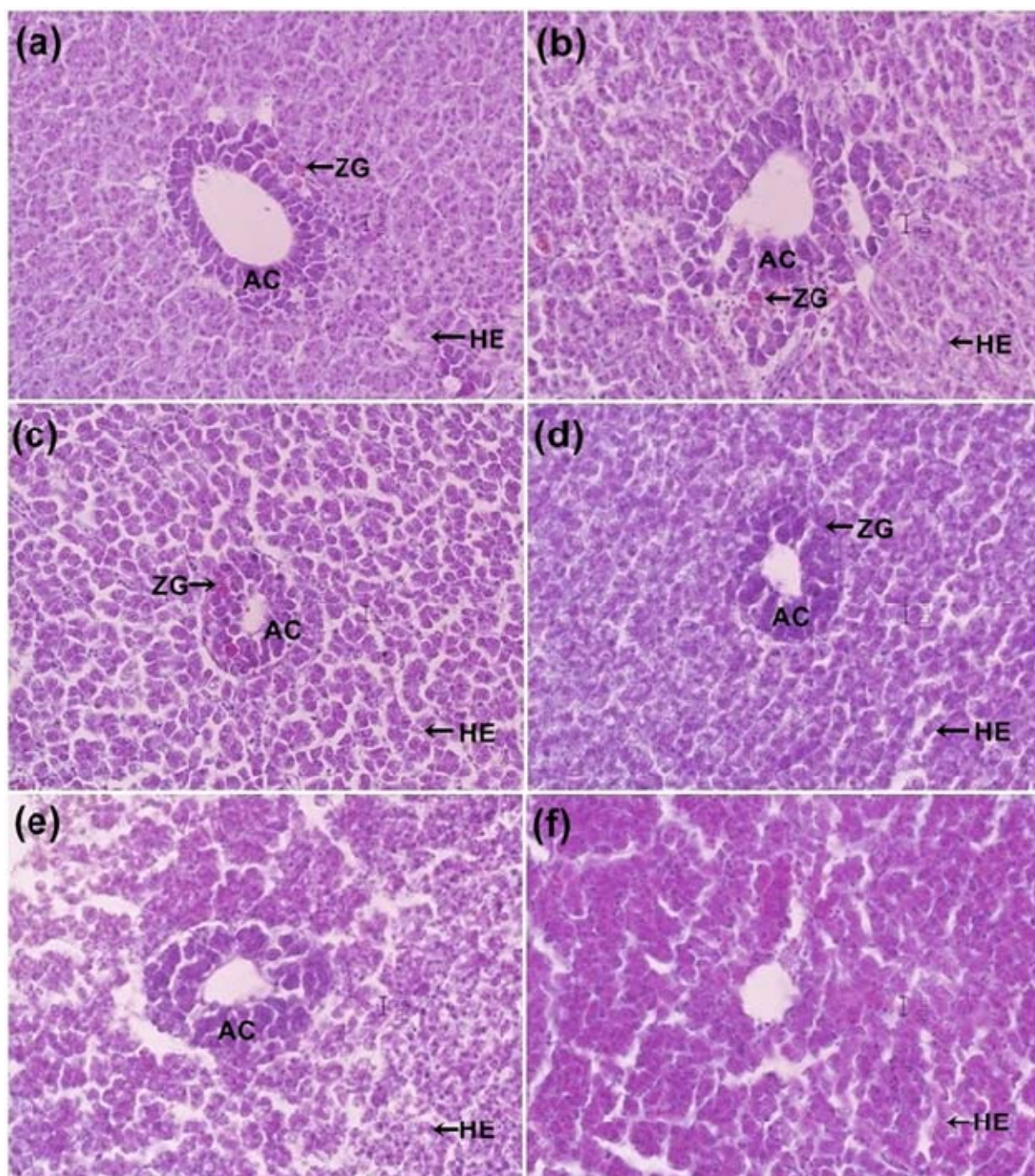
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลกายวิภาคของตับของปลานิลหลังการตาย 48 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 0 ชั่วโมง ลักษณะของเซลล์ตับปกติ โดยมีหลอดเลือด (hepatic sinusoid) แทรกอยู่ และเซลล์เม็ดเลือดมีลักษณะยาวรี (ภาพที่ 13a) ในชั่วโมงที่ 1 พบลักษณะการแยกตัวและเกิดเป็นช่องว่างในเซลล์ตับ ทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกัน และเซลล์เม็ดเลือดแดงเริ่มเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (ภาพที่ 13b) ในชั่วโมงที่ 2 พบช่องว่างในเซลล์ตับ และเริ่มมีการตายของเซลล์เม็ดเลือด โดยเซลล์เม็ดเลือดมีขนาดเล็กกลวง และผนังหลอดเลือดมีลักษณะบางลง (ภาพที่ 13c) ในชั่วโมงที่ 4 เริ่มพบการตายของเซลล์ตับ และเซลล์เม็ดเลือดสลายตัวจนเกือบหมด (ภาพที่ 13d) ในชั่วโมงที่ 8 พบการตายของเซลล์ตับ และเซลล์เม็ดเลือดสลายตัวหมด (ภาพที่ 6e) ในชั่วโมงที่ 12 มีการสลายตัวของเซลล์ตับเป็นจำนวนมากอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 13f) และในชั่วโมงที่ 24 และ 48 ไม่พบลักษณะของตับในการเก็บตัวอย่าง เนื่องจากสลายตัวหมด

นอกจากนี้ยังพบตับอ่อนแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ตับ โดยหลังการตาย 0-1 ชั่วโมง พบเซลล์อะซินาร์รูปร่างยาวหรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม แต่ละเซลล์แยกกันชัดเจน มีนิวเคลียสรูปกลมขนาดใหญ่อยู่ที่ฐานของเซลล์ และพบไซโมเจนแกรนูลอยู่ภายในไซโทพลาซึม (ภาพที่ 14a-14b) ในชั่วโมงที่ 2 เกิดการบวมของเซลล์อะซินาร์ ทำให้เซลล์เปลี่ยนรูปร่างและชิดกันมากขึ้น แต่ยังคงพบไซโมเจนแกรนูลอยู่ภายในไซโทพลาซึม (ภาพที่ 14c) ในชั่วโมงที่ 4 พบการหดตัวของเซลล์อะซินาร์แล้วแตกตัว และพบไซโมเจนแกรนูลเหลืออยู่เพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 14d) ในชั่วโมงที่ 8 เซลล์อะซินาร์เริ่มมีการสลายตัว และไม่พบไซโมเจนแกรนูล (ภาพที่ 14e) และในชั่วโมงที่ 12 ไม่พบลักษณะของเซลล์อะซินาร์ เนื่องจากสลายตัวจนหมด (ภาพที่ 14f)



ภาพที่ 13 จุลกายวิภาคของตับ (ตัดตามยาว) ของปลานิลหลังการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e) และ 12 ชั่วโมง (f) (HE = hepatocyte, SI = hepatic sinusoid, NC = necrotic cell) (H&E, scale bar = 10  $\mu$ m) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 400 เท่า



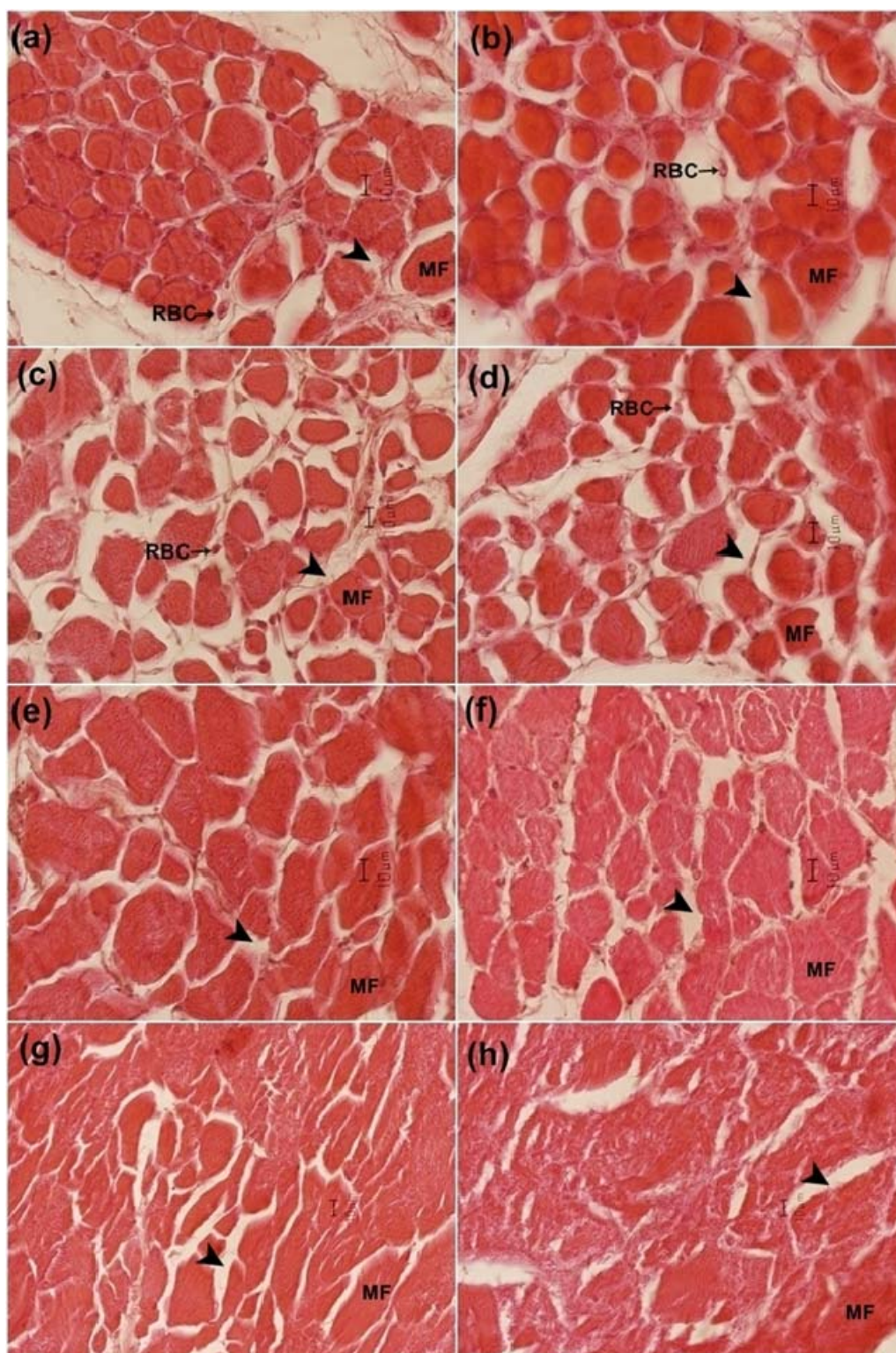


ภาพที่ 14 จุลกายวิภาคของตับอ่อน (ตัดตามยาว) ของปลานิลหลังการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e) และ 12 ชั่วโมง (f) (HE = hepatocyte, AC = acinar cell, ZG = zymogen granule) (H&E, scale bar = 10  $\mu$ m) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 400 เท่า

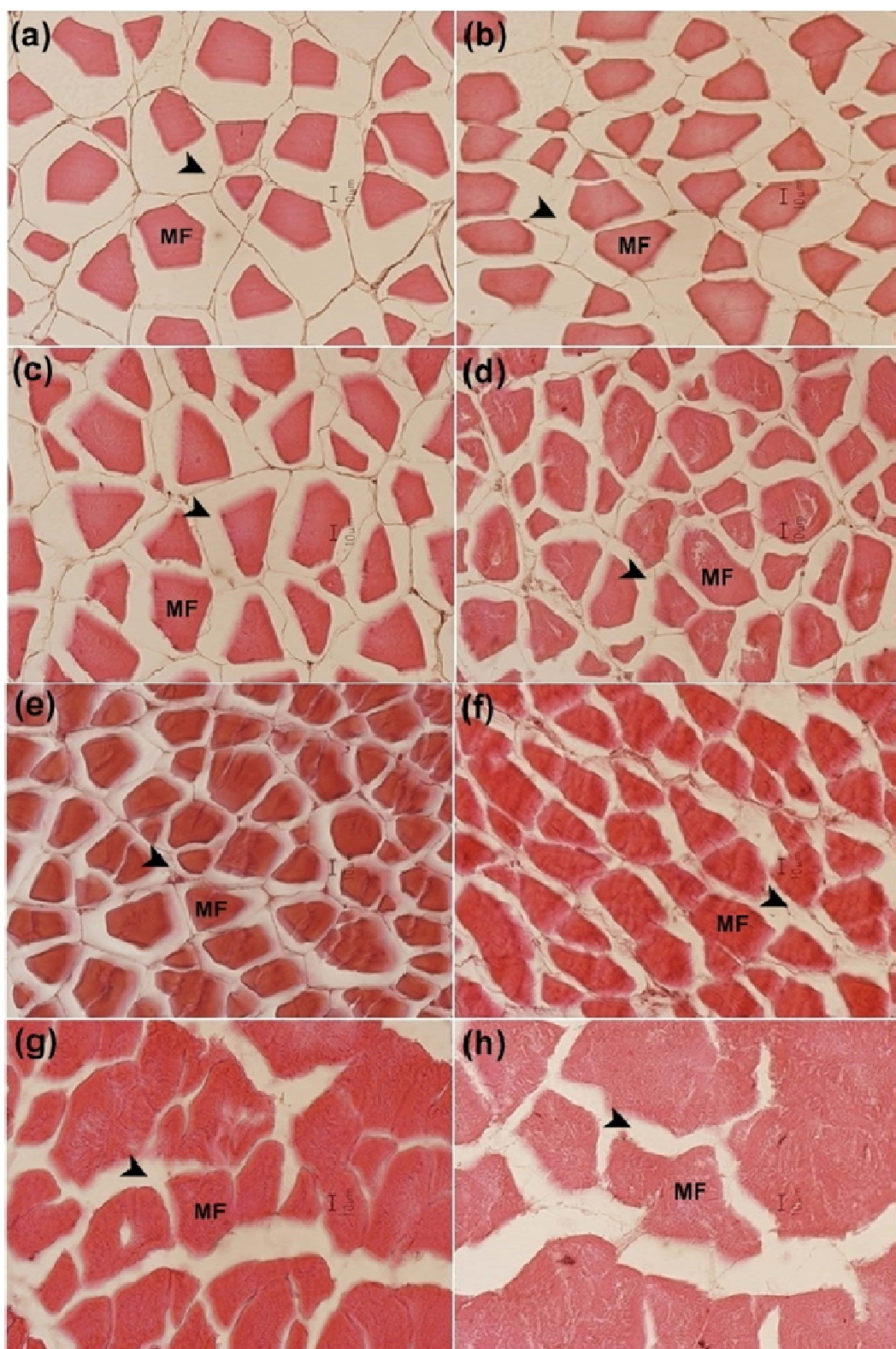
### 3.4 กล้ามเนื้อ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อปลานิลหลังการตาย 48 ชั่วโมง พบว่ากล้ามเนื้อแดงที่เวลาหลังการตาย 0–1 ชั่วโมง ประกอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อจำนวนมาก ล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชั้นเอนโดไมเซียม และมีเซลล์เม็ดเลือดแดงและเส้นเลือดแทรกอยู่ระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 15a–15b) หลังการตาย 2–4 ชั่วโมง พบเซลล์ภายในเส้นใยกล้ามเนื้อเริ่มเสื่อมสลาย ทำให้มีรูปร่างเปลี่ยนไป และยังคงพบเซลล์เม็ดเลือดแดงแทรกอยู่เล็กน้อย (ภาพที่ 15c–15d) หลังการตาย 8–12 ชั่วโมง พบเอนโดไมเซียมลดลงจนส่งผลให้เส้นใยกล้ามเนื้อมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป และมีการสลายตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงและเส้นเลือด (ภาพที่ 15e–15f) หลังการตาย 24 ชั่วโมง พบเอนโดไมเซียมลดลงอย่างมาก ทำให้เซลล์ภายในเส้นใยกล้ามเนื้อสลายตัว (ภาพที่ 15g) ในชั่วโมงที่ 48 พบการสลายตัวของกล้ามเนื้ออย่างเห็นได้ชัด โดยเอนโดไมเซียมลดลงจนไม่สามารถทำให้เส้นใยกล้ามเนื้อคงรูปร่างเดิมได้อีก (ภาพที่ 15h)

กล้ามเนื้อขาวของปลานิลมีลักษณะของเส้นใยกล้ามเนื้อซึ่งล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชั้นเอนโดไมเซียมเช่นเดียวกัน แต่การย้อมติดสีจางกว่ากล้ามเนื้อแดงเล็กน้อย โดยพบลักษณะของเส้นใยกล้ามเนื้อชัดเจนที่เวลาหลังการตาย 0–2 ชั่วโมง (ภาพที่ 16a–16c) แต่เริ่มเห็นการลดลงของเอนโดไมเซียมเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 2 (ภาพที่ 16c) ในชั่วโมงที่ 4–12 เส้นใยกล้ามเนื้อเริ่มสลายตัว และเอนโดไมเซียมลดลงอย่างเห็นได้ชัด ทำให้เส้นใยกล้ามเนื้อมีรูปร่างเปลี่ยนไป (ภาพที่ 16d–16f) ที่เวลาหลังการตาย 24 ชั่วโมง เอนโดไมเซียมลดลงจนทำให้เส้นใยกล้ามเนื้อมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เนื่องจากเซลล์ภายในกล้ามเนื้อเสื่อมสลาย แต่ยังไม่มีการแตกออกมาภายนอกเซลล์จนเห็นได้ชัดเหมือนกล้ามเนื้อแดง (ภาพที่ 16g) ในชั่วโมงที่ 48 หลังการตาย พบการสลายตัวของกล้ามเนื้ออย่างเห็นได้ชัด โดยเอนโดไมเซียมลดลงอย่างมาก ทำให้ไม่มีประสิทธิภาพในการยึดเส้นใยกล้ามเนื้อ ส่งผลให้เส้นใยกล้ามเนื้อไม่สามารถคงรูปร่างเดิมได้อีก (ภาพที่ 16h)



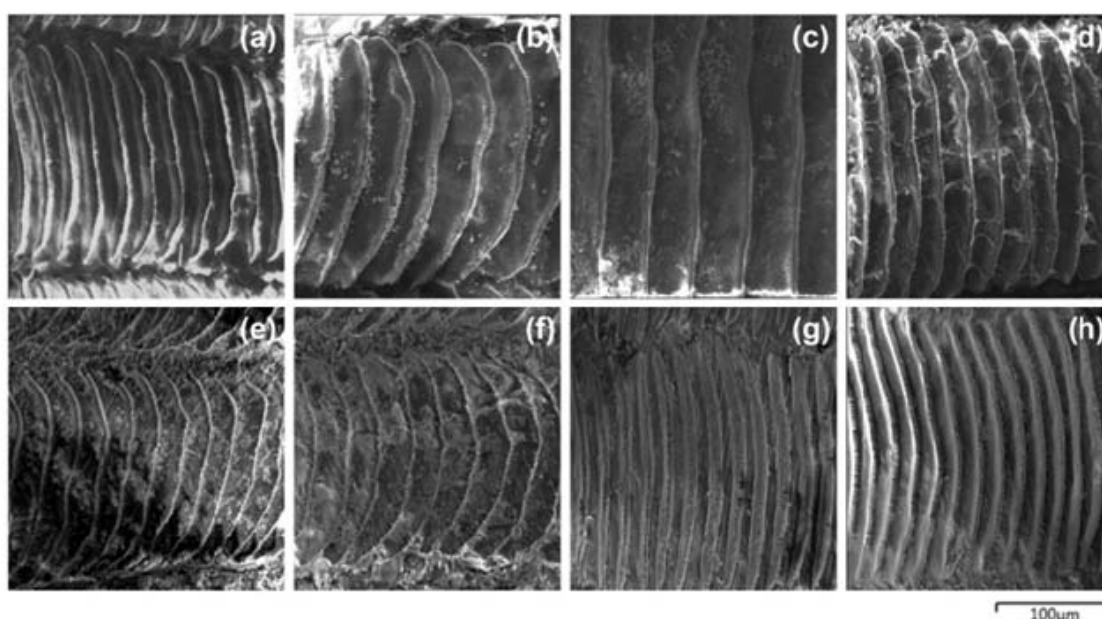
ภาพที่ 15 จุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อแดง (ตัดตามขวาง) ของปลานิลหลังการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (h) (MF = muscle fiber, RBC = red blood cell, Arrowhead = endomysium) (H&E, scale bar = 10 μm) ภาพถ่ายบันทึกที่ กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 16 จุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อขาว (ตัดตามขวาง) ของปลาฉลามหลังการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (h) (MF = muscle fiber, Arrowhead = endomysium) (H&E, scale bar = 10  $\mu$ m) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 400 เท่า

#### 4. การศึกษาองค์ประกอบของธาตุจากเกล็ด

การเปลี่ยนแปลงของเกล็ดปลานิลหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 17 ใน 2 ชั่วโมงแรกหลังการตาย เกล็ดมีลักษณะเรียบ เรียงตัวกันเป็นระเบียบ และโครงสร้างยังมีความสมบูรณ์ (ภาพที่ 17a-17c) แต่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงในชั่วโมงที่ 4 (ภาพที่ 17d) โดยเกล็ดมีลักษณะไม่เรียบ แต่ยังคงเรียงตัวกันเป็นระเบียบ ในชั่วโมงที่ 8 (ภาพที่ 17e) และ 12 (ภาพที่ 17f) คอลลาเจนเสื่อมสภาพลงมากขึ้น จนสังเกตเห็นความขรุขระบนเกล็ดได้มากขึ้น ในชั่วโมงที่ 24 (ภาพที่ 17g) และ 48 (ภาพที่ 17h) เกล็ดมีลักษณะแห้ง และโครงสร้างที่ซ้อนทับกันของเกล็ดมีการสลายตัวเกือบสมบูรณ์



ภาพที่ 17 ลักษณะของเกล็ดปลานิลหลังการตาย 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (h) ภาพถ่ายบันทึกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 500 เท่า

สำหรับการทำแผนภาพกระจายของธาตุในเกล็ดปลานิลหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง พบแร่ธาตุทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน โซเดียม แมกนีเซียม อะลูมิเนียม ซิลิคอน ฟอสฟอรัส กำมะถัน คลอรีน และแคลเซียม โดยลักษณะของแผนภาพที่ได้มีลักษณะไม่แตกต่างกัน และไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างระยะเวลาหลังการตายได้

การวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุจากเกล็ดปลานิล 10 บริเวณ พบธาตุทั้งหมด 8 ชนิด (ตารางที่ 9) โดยธาตุที่พบในทุกช่วงเวลามี 7 ชนิด ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน โซเดียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส และแคลเซียม สำหรับกำมะถัน พบในช่วง 1 และ 4-12 ชั่วโมงหลังการตายเท่านั้น โดยธาตุแต่ละชนิดมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญหลังการตาย ( $P < 0.05$ )

ออกซิเจนเป็นธาตุที่พบมากที่สุด และมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 0 และ 24 หลังการตาย ( $P > 0.05$ ) และมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วงเวลาอื่นๆ ( $P < 0.05$ ) โดยช่วงเวลาที่พบปริมาณออกซิเจนน้อยที่สุดคือ ชั่วโมงที่ 1 และ 4 ตามลำดับ ธาตุที่พบในปริมาณมากที่สุดคือ คาร์บอน พบมากที่สุดในชั่วโมงที่ 1 และมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วงเวลาอื่นๆ ช่วงเวลาที่พบปริมาณคาร์บอนน้อยที่สุดคือ ชั่วโมงที่ 0 และ 8 สำหรับไนโตรเจน มีปริมาณมากที่สุดในชั่วโมงที่ 1 และมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วงเวลาอื่นๆ ช่วงเวลาที่พบปริมาณไนโตรเจนน้อยที่สุดคือ ชั่วโมงที่ 0 ธาตุฟอสฟอรัสและแคลเซียม มีปริมาณใกล้เคียงกัน โดยพบมากที่สุดในชั่วโมงที่ 4 และมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในชั่วโมงอื่นๆ ช่วงเวลาที่พบปริมาณฟอสฟอรัส และแคลเซียมน้อยที่สุดคือ ชั่วโมงที่ 1 และ 48 เช่นเดียวกัน

โซเดียม แมกนีเซียม และกำมะถัน พบในปริมาณที่น้อยมาก โดยมีปริมาณไม่ถึง 1 เปอร์เซ็นต์ของแร่ธาตุทั้งหมด ธาตุโซเดียมและแมกนีเซียมมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 0 หลังการตายเช่นเดียวกัน ( $P > 0.05$ ) แต่ช่วงเวลาที่พบปริมาณโซเดียมน้อยที่สุดคือ ชั่วโมงที่ 48 และช่วงเวลาที่พบปริมาณแมกนีเซียมน้อยที่สุดคือ ชั่วโมงที่ 1 ในขณะที่กำมะถัน พบเพียง 4 ช่วงเวลาเท่านั้น โดยมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 1 และ 4 ( $P > 0.05$ ) และลดลงอย่างมีนัยสำคัญในชั่วโมงที่ 8 และ 12 ( $P < 0.05$ ) และไม่ตรวจพบอีกในชั่วโมงที่ 24 และ 48

ตารางที่ 9 องค์ประกอบของธาตุ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) จากเกลือดีปลาชนิด หลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (ค่าน้อยสุด-ค่ามากที่สุด)

Elemental profile	Postmortem interval (h)								SEM	P-value
	0	1	2	4	8	12	24	48		
C	34.74 <sup>c</sup> (31.78–37.69)	48.96 <sup>a</sup> (46.53–50.59)	37.53 <sup>bc</sup> (34.99–40.44)	37.12 <sup>bc</sup> (34.27–40.43)	34.50 <sup>c</sup> (31.18–36.44)	39.28 <sup>abc</sup> (36.10–41.83)	37.33 <sup>bc</sup> (34.02–42.29)	40.97 <sup>ab</sup> (38.44–43.56)	0.96	0.007
N	4.86 <sup>e</sup> (2.63–7.06)	16.40 <sup>a</sup> (12.48–19.76)	6.80 <sup>cd</sup> (6.06–7.50)	7.12 <sup>cd</sup> (5.89–8.79)	5.92 <sup>de</sup> (4.14–7.28)	7.80 <sup>c</sup> (6.22–9.17)	6.02 <sup>de</sup> (4.11–7.38)	10.27 <sup>b</sup> (7.17–13.51)	0.64	< 0.001
O	48.26 <sup>a</sup> (45.60–52.45)	31.62 <sup>d</sup> (30.08–33.41)	46.08 <sup>b</sup> (42.96–50.26)	38.45 <sup>c</sup> (34.68–41.72)	44.71 <sup>b</sup> (42.50–49.53)	45.32 <sup>b</sup> (42.14–49.45)	48.59 <sup>a</sup> (45.37–51.44)	43.85 <sup>b</sup> (40.53–48.97)	1.14	< 0.001
Na	0.38 <sup>a</sup> (0.28–0.51)	0.16 <sup>ef</sup> (0.11–0.25)	0.37 <sup>a</sup> (0.32–0.40)	0.33 <sup>b</sup> (0.19–0.40)	0.26 <sup>c</sup> (0.19–0.33)	0.21 <sup>cd</sup> (0.14–0.34)	0.20 <sup>de</sup> (0.17–0.27)	0.15 <sup>f</sup> (0.11–0.23)	0.02	< 0.001
Mg	0.42 <sup>a</sup> (0.30–0.49)	0.10 <sup>d</sup> (0.04–0.18)	0.38 <sup>ab</sup> (0.29–0.47)	0.34 <sup>b</sup> (0.29–0.40)	0.40 <sup>ab</sup> (0.33–0.46)	0.29 <sup>c</sup> (0.25–0.39)	0.36 <sup>b</sup> (0.30–0.41)	0.29 <sup>c</sup> (0.17–0.38)	0.03	< 0.001
P	5.25 <sup>b</sup> (4.58–6.20)	1.25 <sup>f</sup> (0.38–2.28)	4.42 <sup>c</sup> (3.18–5.69)	6.45 <sup>a</sup> (5.33–7.38)	5.98 <sup>a</sup> (5.06–8.08)	3.54 <sup>d</sup> (2.80–4.39)	3.99 <sup>cd</sup> (2.93–5.57)	2.46 <sup>e</sup> (1.56–4.31)	0.36	< 0.001
S	nd	0.15 <sup>a</sup> (0.07–0.20)	nd	0.14 <sup>a</sup> (0.13–0.18)	0.11 <sup>b</sup> (0.07–0.18)	0.10 <sup>b</sup> (0.06–0.13)	nd	nd	0.02	< 0.001
Ca	6.08 <sup>c</sup> (4.70–7.38)	1.36 <sup>e</sup> (0.33–2.94)	4.43 <sup>d</sup> (0.33–2.94)	10.05 <sup>a</sup> (7.69–12.08)	8.12 <sup>b</sup> (5.43–11.99)	3.46 <sup>d</sup> (1.82–4.89)	3.39 <sup>d</sup> (2.02–5.63)	2.02 <sup>e</sup> (1.03–4.02)	0.61	< 0.001

nd, ต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัด

อักษรที่ต่างกันแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

## 5. สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก

การวิเคราะห์สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากปลานิลหลังการตาย 48 ชั่วโมง พบสารประกอบทั้งหมด 65 ชนิด โดยเป็นสารในกลุ่มแอลกอฮอล์ 14 ชนิด แอลดีไฮด์ 17 ชนิด อัลเคน 2 ชนิด เอมีน 2 ชนิด สารประกอบอะโรมาติก 9 ชนิด เอสเทอร์ 4 ชนิด อินโดล 2 ชนิด คีโตน 11 ชนิด สารประกอบกำมะถัน 2 ชนิด และเทอร์พีน 2 ชนิด (ตารางที่ 10) ผลการวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารแต่ละกลุ่มในแต่ละช่วงเวลา พบว่ามีค่าไม่ต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ )

สารประกอบในกลุ่มแอลกอฮอล์ที่สำคัญ คือ 1-octanol, 1-octen-3-ol และ 1-pentanol ซึ่งตรวจพบในทุกช่วงเวลา โดยมีปริมาณสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 1-8, 1-12 และ 1-2 หลังการตาย ตามลำดับ และลดลงในเวลาต่อมา จนมีปริมาณน้อยที่สุดในชั่วโมงสุดท้าย ( $P < 0.05$ ) สาร (5Z)-octa-1,5-dien-3-ol ตรวจพบใน 24 ชั่วโมงแรก มีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 1 และ 12 และลดลงในช่วงเวลาอื่นๆ สาร 1-hexanol, 1-penten-3-ol และ 2-octen-1-ol ตรวจพบใน 12 ชั่วโมงแรก โดยสาร 1-hexanol มีปริมาณไม่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลา ส่วน 1-penten-3-ol มีปริมาณมากที่สุดที่เวลา 0 ชั่วโมง และลดลงในช่วงเวลาต่อมา สำหรับ 2-octen-1-ol มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลา สาร 1-butanol, 2,6-dimethyl-4-heptanol และ isoamyl alcohol ตรวจไม่พบในช่วงแรก แต่พบในช่วงหลัง โดย 1-butanol ตรวจพบในชั่วโมงที่ 12-48 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลา ในขณะที่ 2,6-dimethyl-4-heptanol ตรวจพบในชั่วโมงที่ 12-24 และ isoamyl alcohol ตรวจพบในชั่วโมงที่ 24-48 โดยมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ยังมีสารที่พบได้ในบางช่วงเวลา ได้แก่ 3-vinylcyclohexanol (8 ชั่วโมง) และ benzeneethanol (24 ชั่วโมง) ส่วนสาร 2-penten-1-ol มีรูปแบบที่ไม่แน่นอน คือ ตรวจพบในบางช่วงเวลา และมีค่าไม่แตกต่างกัน

สารประกอบในกลุ่มแอลดีไฮด์ที่สำคัญ คือ 2-octenal, hexanal, heptanal, nonanal และ octanal ซึ่งตรวจพบใน 24 ชั่วโมงแรก โดย hexanal, heptanal และ nonanal มีปริมาณลดลงตามระยะเวลาหลังการตาย ส่วน 2-octenal พบว่ามีปริมาณสูงสุดในช่วง 8 ชั่วโมงแรก และ octanal มีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 4-8 สำหรับสาร pentanal ตรวจพบในช่วง 4 ชั่วโมงแรกเท่านั้น ซึ่งมีปริมาณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างปลาในชุดควบคุม (0 ชั่วโมง) และชุดทดลอง สาร hexadecanal ตรวจพบในชั่วโมงที่ 1-12 เท่านั้น และมีปริมาณลดลงตามช่วงเวลา สำหรับสาร 2-isopropyl-5-methyl-2-hexenal และ 3-methyl-butanal ตรวจพบในช่วงท้ายของการทดลอง โดย 2-isopropyl-5-methyl-2-hexenal พบในชั่วโมงที่ 24-48 และมีค่าไม่ต่างกันทางสถิติ ส่วน 3-methyl-butanal พบในชั่วโมงที่ 12-48 โดยมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 และลดลงอย่างมีนัยสำคัญในชั่วโมงที่ 48 นอกจากนี้ยังมีแอลดีไฮด์ที่พบได้ในบางช่วงเวลา ได้แก่ 1-methyl-3-cyclohexene-1-carboxaldehyde (8 ชั่วโมง), 2-decenal (4 ชั่วโมง), 2-nonenal (4 ชั่วโมง), 2,4-decadienal (4 ชั่วโมง) และ 5-methyl-2-phenyl-2-hexenal (12 ชั่วโมง)



ชั่วโมง) สำหรับสาร 2-hexenal, 2-heptenal และ nonenal พบว่ามีรูปแบบที่ไม่แน่นอน เนื่องจากตรวจพบได้ในบางช่วงเวลาเท่านั้น

สารประกอบในกลุ่มอัลเคนที่สำคัญ คือ pentadecane ซึ่งตรวจพบในทุกช่วงเวลาหลังการตาย และมีปริมาณใกล้เคียงกัน ส่วนสาร heptadecane ตรวจพบเฉพาะที่เวลา 48 ชั่วโมงเท่านั้น สำหรับสารประกอบในกลุ่มเอมีน ตรวจพบในชั่วโมงที่ 24-48 เท่านั้น โดยสาร 3-methylbutyl-2-phenylethylidene amine มีปริมาณไม่แตกต่างกัน แต่สาร 3-methylbutyl-(3-methylbutylidene) amine มีแนวโน้มลดลงในชั่วโมงที่ 48

สารประกอบอะโรมาติก มีเพียงสาร benzaldehyde ที่ตรวจพบในทุกช่วงเวลาหลังการตาย โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลา มีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 8 และลดลงในช่วงเวลาต่อมา สำหรับสาร 1,2,3,4-tetrahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-naphthalene ตรวจพบใน 24 ชั่วโมงแรก โดยมีปริมาณน้อยที่สุดที่เวลา 0 ชั่วโมง และมีค่าไม่แตกต่างกันในช่วงเวลาหลังจากนั้น สารที่ตรวจไม่พบในช่วงแรก แต่ตรวจพบในช่วงหลัง ได้แก่ 4-methyl-phenol (24-48 ชั่วโมง) และ phenol (24-48 ชั่วโมง) โดย 4-methyl-phenol และ phenol มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลา ส่วน benzeneacetaldehyde ตรวจพบในชั่วโมงที่ 8-24 เท่านั้น และมีค่าเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลา นอกจากนี้ยังมีสารที่พบได้ในบางช่วงเวลา ได้แก่ 2,5-dimethyl-3-(3-methyl butyl)-pyrazine (24 ชั่วโมง), 3,5-dimethyl-piperidine (24 ชั่วโมง), decahydro-1,6-dimethyl-naphthalene (1 ชั่วโมง) และ indolizine (24 ชั่วโมง)

สารประกอบในกลุ่มเอสเทอร์ที่สำคัญ คือ hexadecanoic acid methyl ester ซึ่งตรวจพบใน 24 ชั่วโมงแรก ปริมาณสารมีความแตกต่างกันเฉพาะชั่วโมงที่ 1 กับชั่วโมงที่ 0 และ 24 สาร hexadecanoic acid ethyl ester ตรวจพบใน 12 ชั่วโมงแรก มีรูปแบบที่ไม่แน่นอน โดยมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 1, 2 และ 12 นอกจากนี้ยังมีสารที่พบได้ในบางช่วงเวลา ได้แก่ octadecanoic acid methyl ester และ (Z)-9-octadecenoic acid ethyl ester ซึ่งพบเฉพาะชั่วโมงที่ 1 เท่านั้น สำหรับสารประกอบในกลุ่มอินโดล ตรวจพบ 1H-indole และ 5-methyl-1H-indole ในชั่วโมงที่ 48 เท่านั้น โดยปริมาณของ 1H-indole มีมากกว่า 5-methyl-1H-indole ประมาณ 8 เท่า

ตารางที่ 10 สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) หลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

Class	Volatile compound	Postmortem interval (h)								SEM	P-value
		0	1	2	4	8	12	24	48		
Alcohol	1-Butanol	–	–	–	–	–	11.33 <sup>bc</sup>	21.34 <sup>ab</sup>	32.97 <sup>a</sup>	2.57	0.007
	1-Hexanol	8.27	10.11	10.43	8.29	8.17	10.60	–	–	1.11	0.654
	1-Octanol	6.72 <sup>c</sup>	11.03 <sup>a</sup>	7.96 <sup>abc</sup>	10.08 <sup>ab</sup>	8.59 <sup>abc</sup>	7.00 <sup>bc</sup>	6.72 <sup>c</sup>	2.34 <sup>d</sup>	0.68	< 0.001
	1-Octen-3-ol	91.95 <sup>bc</sup>	119.73 <sup>a</sup>	122.13 <sup>a</sup>	122.68 <sup>a</sup>	105.49 <sup>ab</sup>	129.48 <sup>a</sup>	70.16 <sup>c</sup>	11.21 <sup>d</sup>	7.04	< 0.010
	1-Pentanol	29.33 <sup>b</sup>	34.82 <sup>ab</sup>	43.66 <sup>a</sup>	28.99 <sup>b</sup>	25.72 <sup>b</sup>	27.73 <sup>b</sup>	23.65 <sup>b</sup>	5.97 <sup>c</sup>	3.48	0.001
	1-Penten-3-ol	13.65 <sup>a</sup>	8.06 <sup>b</sup>	10.16 <sup>ab</sup>	7.93 <sup>b</sup>	6.69 <sup>b</sup>	8.97 <sup>b</sup>	–	–	1.15	< 0.001
	2-Octen-1-ol	14.60 <sup>b</sup>	13.29 <sup>b</sup>	27.02 <sup>a</sup>	18.55 <sup>ab</sup>	17.07 <sup>ab</sup>	26.24 <sup>a</sup>	–	–	5.70	< 0.001
	2-Penten-1-ol	4.74 <sup>ab</sup>	7.29 <sup>a</sup>	–	–	–	7.26 <sup>a</sup>	–	–	0.89	0.006
	2-(3-Cyclohexen-1-yl)ethanol	5.12 <sup>ab</sup>	8.00 <sup>a</sup>	7.34 <sup>a</sup>	7.62 <sup>a</sup>	–	8.80 <sup>a</sup>	–	–	1.27	0.007
	2,6-Dimethyl-4-heptanol	–	–	–	–	–	4.41	5.32	–	0.44	0.751
	3-Vinylcyclohexanol	–	–	–	–	6.40	–	–	–	2.12	–
	(5Z)-Octa-1,5-dien-3-ol	21.19 <sup>bc</sup>	31.93 <sup>ab</sup>	27.47 <sup>bc</sup>	15.69 <sup>c</sup>	25.46 <sup>bc</sup>	44.55 <sup>a</sup>	22.32 <sup>bc</sup>	–	2.35	< 0.001
	Benzeneethanol	–	–	–	–	–	–	4.21	–	0.27	–
	Isoamyl alcohol	–	–	–	–	–	–	10.01 <sup>a</sup>	6.94 <sup>ab</sup>	0.38	0.008
Aldehyde	1-Methyl-3-cyclohexene-1-carboxaldehyde	–	–	–	–	19.04	–	–	–	1.67	–
	2-Decenal	–	–	–	6.72	–	–	–	–	0.20	–
	2-Hexenal	4.22	–	–	4.61	4.06	–	–	–	0.64	0.974
	2-Heptenal	7.88	–	6.11	12.58	10.93	–	–	–	1.16	0.282

–, ต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัด

อักษรที่ต่างกันแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

ตารางที่ 10 สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) หลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (ต่อ)

Class	Volatile compound	Postmortem interval (h)								SEM	P-value
		0	1	2	4	8	12	24	48		
Aldehyde	2-Isopropyl-5-methyl-2-hexenal	-	-	-	-	-	-	13.45	17.16	1.35	0.180
	2-Nonenal	-	-	-	7.12	-	-	-	-	1.19	-
	2-Octenal	10.38 <sup>ab</sup>	9.74 <sup>abc</sup>	9.54 <sup>abc</sup>	12.20 <sup>a</sup>	13.37 <sup>a</sup>	5.64 <sup>c</sup>	7.23 <sup>bc</sup>	-	0.99	< 0.001
	2,4-Decadienal	-	-	-	5.18	-	-	-	-	0.10	-
	3-Methyl-butanal	-	-	-	-	-	162.32 <sup>ab</sup>	213.30 <sup>a</sup>	75.95 <sup>bc</sup>	24.52	0.009
	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	-	-	-	-	-	2.39	-	-	0.35	-
	Hexadecanal	-	3.68 <sup>a</sup>	3.75 <sup>a</sup>	2.04 <sup>b</sup>	2.01 <sup>b</sup>	2.50 <sup>b</sup>	-	-	0.28	0.007
	Hexanal	434.95 <sup>a</sup>	277.45 <sup>b</sup>	323.90 <sup>b</sup>	343.12 <sup>b</sup>	322.40 <sup>b</sup>	150.38 <sup>c</sup>	135.16 <sup>c</sup>	-	13.89	< 0.001
	Heptanal	33.18 <sup>a</sup>	32.18 <sup>a</sup>	28.53 <sup>a</sup>	32.37 <sup>a</sup>	34.91 <sup>a</sup>	19.89 <sup>b</sup>	14.04 <sup>b</sup>	-	1.43	< 0.001
	Nonanal	54.67 <sup>ab</sup>	63.36 <sup>ab</sup>	48.06 <sup>b</sup>	71.07 <sup>a</sup>	62.17 <sup>ab</sup>	14.68 <sup>c</sup>	12.23 <sup>c</sup>	-	3.95	< 0.001
	Nonenal	-	-	6.45	-	8.56	-	-	-	0.77	0.120
Alkane	Octanal	19.23 <sup>abc</sup>	18.70 <sup>bc</sup>	17.14 <sup>c</sup>	23.30 <sup>ab</sup>	24.46 <sup>a</sup>	11.27 <sup>d</sup>	15.90 <sup>cd</sup>	-	1.33	0.002
	Pentanal	54.23 <sup>a</sup>	24.32 <sup>b</sup>	27.47 <sup>b</sup>	21.52 <sup>b</sup>	-	-	-	-	3.64	0.016
Amine	Heptadecane	-	-	-	-	-	-	-	5.23	0.77	-
	Pentadecane	2.95 <sup>b</sup>	3.77 <sup>b</sup>	4.65 <sup>ab</sup>	5.80 <sup>ab</sup>	5.22 <sup>ab</sup>	5.27 <sup>ab</sup>	7.85 <sup>a</sup>	5.81 <sup>ab</sup>	0.46	0.125
Amine	3-Methylbutyl-2-phenylethylidene amine	-	-	-	-	-	-	4.43	7.36	0.87	0.147
	3-Methylbutyl-(3-methylbutylidene) amine	-	-	-	-	-	-	32.09 <sup>a</sup>	14.82 <sup>b</sup>	1.96	0.009

-, ต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัด

อักษรที่ต่างกันแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

ตารางที่ 10 สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) หลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (ต่อ)

Class	Volatile compound	Postmortem interval (h)								SEM	P-value
		0	1	2	4	8	12	24	48		
Aromatic	1,2,3,4-Tetrahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-naphthalene	2.93 <sup>b</sup>	6.30 <sup>a</sup>	5.81 <sup>a</sup>	6.19 <sup>a</sup>	5.23 <sup>a</sup>	5.65 <sup>a</sup>	5.17 <sup>a</sup>	–	0.59	< 0.001
	2,5-Dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine	–	–	–	–	–	–	5.76	–	1.09	–
	3,5-Dimethyl-piperidine	–	–	–	–	–	–	14.19	–	0.43	–
	4-Methyl-phenol	–	–	–	–	–	–	19.64 <sup>b</sup>	134.63 <sup>a</sup>	9.62	0.001
	Benzaldehyde	7.78 <sup>f</sup>	14.58 <sup>ef</sup>	23.32 <sup>de</sup>	36.50 <sup>cd</sup>	70.20 <sup>a</sup>	58.75 <sup>ab</sup>	48.28 <sup>bc</sup>	33.98 <sup>cd</sup>	52.13	< 0.001
	Benzeneacetaldehyde	–	–	–	–	1.96 <sup>b</sup>	3.47 <sup>ab</sup>	5.51 <sup>a</sup>	–	0.51	0.034
	Decahydro-1,6-dimethyl-naphthalene	–	3.80	–	–	–	–	–	–	0.27	–
	Indolizine	–	–	–	–	–	–	17.51	–	0.98	–
	Phenol	–	–	–	–	–	–	9.24 <sup>b</sup>	29.31 <sup>a</sup>	1.71	< 0.001
Ester	Hexadecanoic acid ethyl ester	3.40 <sup>bc</sup>	6.03 <sup>a</sup>	6.59 <sup>a</sup>	4.06 <sup>b</sup>	2.39 <sup>c</sup>	6.19 <sup>a</sup>	–	–	0.40	< 0.001
	Hexadecanoic acid methyl ester	3.40 <sup>b</sup>	11.00 <sup>a</sup>	6.56 <sup>ab</sup>	5.63 <sup>ab</sup>	5.55 <sup>ab</sup>	4.90 <sup>ab</sup>	1.98 <sup>b</sup>	–	1.30	0.036
	Octadecanoic acid methyl ester	–	5.34	–	–	–	–	–	–	0.53	–
	(Z)-9-Octadecenoic acid ethyl ester	–	7.13	–	–	–	–	–	–	1.36	–
Indole	1H-Indole	–	–	–	–	–	–	–	277.68	3.47	–
	5-Methyl-1H-indole	–	–	–	–	–	–	–	34.62	3.94	–

–, ต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัด

อักษรที่ต่างกันแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

ตารางที่ 10 สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) หลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (ต่อ)

Class	Volatile compound	Postmortem interval (h)								SEM	P-value
		0	1	2	4	8	12	24	48		
Ketone	1-Phenyl-ethanone	-	-	-	-	-	-	-	8.33	0.66	-
	2-Pentadecanone	-	-	-	-	-	-	-	4.64	0.09	-
	2,3-Pentanedione	20.22 <sup>a</sup>	13.63 <sup>b</sup>	13.07 <sup>b</sup>	12.37 <sup>b</sup>	-	-	-	-	1.10	0.018
	2-Pentyl-furan	3.86 <sup>bc</sup>	7.93 <sup>bc</sup>	14.73 <sup>ab</sup>	22.00 <sup>a</sup>	16.42 <sup>ab</sup>	8.74 <sup>abc</sup>	6.10 <sup>bc</sup>	-	2.10	0.039
	2,3-Octanedione	76.28 <sup>ab</sup>	73.84 <sup>ab</sup>	91.88 <sup>a</sup>	93.48 <sup>a</sup>	69.94 <sup>ab</sup>	51.79 <sup>b</sup>	22.56 <sup>c</sup>	-	5.00	< 0.001
	3-Methyl-3-decen-2-one	-	-	-	-	-	-	-	9.35	0.01	-
	3-Undecen-2-one	-	-	-	1.02 <sup>ab</sup>	2.31 <sup>a</sup>	-	2.25 <sup>a</sup>	2.48 <sup>a</sup>	0.27	0.030
	3,5-Octadien-2-one	4.52	4.00	3.57	3.84	5.48	3.25	5.55	-	0.58	0.646
	4-Ketoisophorone	-	-	1.62	-	-	-	-	-	0.16	-
	6-Methyl-5-hepten-2-one	-	-	3.93	-	-	-	-	-	0.02	-
	Cycloundecanone	-	-	-	-	-	-	11.15	-	2.06	-
Sulphur	Dimethyl disulfide	-	-	-	-	-	-	47.82 <sup>b</sup>	143.30 <sup>a</sup>	13.02	< 0.001
	Dimethyl trisulfide	-	-	-	-	-	-	10.51 <sup>b</sup>	45.97 <sup>a</sup>	2.30	< 0.001
Terpene	à-Humulene	-	-	1.10	1.05	-	-	-	-	0.06	0.956
	Trans-caryophyllene	-	2.53 <sup>ab</sup>	2.75 <sup>a</sup>	-	2.90 <sup>a</sup>	2.17 <sup>ab</sup>	-	-	0.72	0.027

-, ต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัด

อักษรที่ต่างกันแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

สารประกอบในกลุ่มคีโตนที่สำคัญ คือ 2-pentyl-furan, 2,3-octanedione และ 3,5-octadien-2-one ซึ่งตรวจพบในช่วง 24 ชั่วโมงแรก โดย 2-pentyl-furan มีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 4 และ 2,3-octanedione มีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 2-4 และลดลงในเวลาต่อมา ส่วน 3,5-octadien-2-one มีปริมาณไม่แตกต่างกัน ( $P > 0.05$ ) พบสาร 2,3-pentanedione ในช่วง 4 ชั่วโมงแรก โดยมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 1 และลดลงในเวลาต่อมา นอกจากนี้ยังมีสารที่พบได้ในบางช่วงเวลา ได้แก่ 4-ketoisophorone (2 ชั่วโมง), 6-methyl-5-hepten-2-one (2 ชั่วโมง), cycloundecanone (24 ชั่วโมง), 1-phenyl-ethanone (48 ชั่วโมง), 2-pentadecanone (48 ชั่วโมง) และ 3-methyl-3-decen-2-one (48 ชั่วโมง) ส่วน 3-undecen-2-one มีรูปแบบที่ไม่แน่นอน เนื่องจากตรวจพบได้ในบางช่วงเวลา (ชั่วโมงที่ 4, 8, 24 และ 48) ในปริมาณใกล้เคียงกัน

สารประกอบกำมะถันที่พบ ได้แก่ dimethyl disulfide และ dimethyl trisulfide พบในช่วงเวลา 24-48 ชั่วโมงหลังการตาย โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามช่วงเวลา ส่วนสารประกอบในกลุ่มเทอร์พีน ตรวจพบสาร  $\alpha$ -humulene ในชั่วโมงที่ 2-4 ( $P > 0.05$ ) และ *trans*-caryophyllene พบในบางช่วงเวลา (ชั่วโมงที่ 1, 2, 8 และ 12 หลังการตาย) โดยมีปริมาณไม่แตกต่างกัน

## วิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. การเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารหลังการตาย

#### 1.1 การเปลี่ยนแปลงของดัชนีทางเดินอาหารและความเข้มข้นของโปรตีนในทางเดินอาหาร

หลังการตายจะเกิดแก๊สโทรมาลาเซียในกระเพาะอาหารจากการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ภายใน 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) พบว่าดัชนีของตับต่อน้ำหนักตัวมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังการตาย (0 ถึง 25 นาที) สำหรับการศึกษาในตัวอย่างปลาไนครั้งนี้พบว่าดัชนีของกระเพาะอาหารและลำไส้มีแนวโน้มตรงกันข้ามกับการศึกษาดัชนีของตับในหนู ซึ่งอาจเป็นเพราะใช้เวลานานกว่า (48 ชั่วโมง) นอกจากนี้ของเหลวซึ่งเกิดจากการย่อยของเอนไซม์ถูกปล่อยออกมาจากซากปลาในตู้กลางที่เป็นน้ำ กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในเนื้อเยื่อที่มีเอนไซม์และมีปริมาณน้ำที่สูง (Vass, 2001)

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

#### 1.2 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร

เอนไซม์เปปซินมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนในกระเพาะอาหาร โดยทำหน้าที่ตัดพันธะเพปไทด์ ตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นอะโรมาติก เช่น ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโทเฟน (Dunn, 2001) กิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้บ่งบอกถึงการย่อย

สารอาหารประเภทโปรตีนภายในกระเพาะอาหาร (Thongprajukaew and Kovitvadhi, 2013) จากการศึกษาครั้งนี้ กิจกรรมของเอนไซม์เปปซินที่ลดลงเกิดขึ้นเนื่องจากการเกิดออกโตไลซิสจากการทำงานของจุลินทรีย์หลังการตาย มีผลทำให้ต่อมสร้างน้ำย่อยถูกทำลาย (Lacznia *et al.*, 2011) เอนไซม์นี้มีความทนทานมากกว่าเอนไซม์อื่นๆ ที่ตรวจวัด เนื่องจากยังคงมีกิจกรรมจนถึงเวลาสุดท้ายที่เก็บตัวอย่าง (48 ชั่วโมง) ในขณะที่เอนไซม์อื่นมีกิจกรรมสูงประมาณ 4 ชั่วโมงแรกที่ทำการศึกษาเท่านั้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์เปปซินมีโครงสร้างที่แข็งแรง (rigid) จึงเสียสภาพธรรมชาติช้ากว่า

กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินลดลงอย่างรวดเร็ว แสดงถึงอัตราเร็วในการสลายตัวของโปรตีนในลำไส้ซึ่งเกิดขึ้นเร็วกว่าในกระเพาะอาหาร เนื่องจากทริปซินเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่สำคัญในลำไส้เล็ก ทำหน้าที่ควบคุมการย่อยโปรตีน โดยกระตุ้นทริปซินเองและไซโมเจนที่ย่อยโปรตีนชนิดอื่น สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์โคโมทริปซินพบว่ามีค่าสูงสุดที่ 8 ชั่วโมงหลังการตาย เอนไซม์ชนิดนี้ย่อยโปรตีนตรงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีหมู่โซ่ข้างเป็นอะโรมาติก (ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโทเฟน) รวมทั้งไฮโดรโฟบิก กิจกรรมของเอนไซม์โคโมทริปซินที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากความเครียดของปลาก่อนตาย ซึ่งจะหลั่งสารกลุ่มอะโรมาติก เช่น เบนซีน (benzene) และไดออกซิน (dioxin) ออกมา ซึ่งอาจชักนำให้กิจกรรมของโคโมทริปซินเพิ่มขึ้น (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006) นอกจากนี้เอนไซม์โคโมทริปซินยังทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการตัด internucleosomal DNA ของเซลล์ที่ตายแล้ว (Murn *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตาม บทบาทหลังการตายของเอนไซม์ชนิดนี้ยังมีรายงานน้อยมาก ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

แคทาบอลิซึมของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตมีความเกี่ยวข้องกัน เนื่องจากกิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาหลังการตาย โดยเอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่สลายสายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ตำแหน่ง  $\alpha$ -1,4 glycosidic bond เพื่อเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็นน้ำตาลมอลโทส การลดลงของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ชนิดนี้จึงอาจมีนัยสำคัญเกี่ยวข้องกับแคทาบอลิซึมของไกลโคเจนหลังการตาย ในขณะที่กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสลดลงมากกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ชนิดอื่น เนื่องจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปลาสามารถถูกออกซิไดซ์ให้อนุมูลอิสระได้ง่าย ส่งผลทำให้เกิดการย่อยสลายโมเลกุลอื่น ๆ การลดลงของเอนไซม์ไลเปสสอดคล้องกับการลดลงของไขมันในช่องท้องที่สังเกตจากการผ่าตัดตัวอย่าง ตลอดจนजनชั้นของไขมันหลังจากปั่นเหวี่ยงตัวอย่างในขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์

### 1.3 การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาออกซิเดชันในระบบย่อยอาหาร

การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกระเพาะอาหารและลำไส้ทั้งวิธี DPPH assay และ reducing power ลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังการตายเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของดัชนีของอวัยวะต่อหน้าหน้ากตัว และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหาร เนื่องจากในเซลล์ที่ตายแล้ว จะมีการผลิตเปอร์ออกไซด์และอนุมูลอิสระมาทำลายส่วนประกอบต่างๆ ของอวัยวะ 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 ซึ่งเป็นสารที่มีสีม่วง การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างการตรวจวัดทั้ง 2 วิธี พบว่าวิธี DPPH assay มีศักยภาพในการใช้ประเมินระยะเวลาหลังการตายมากกว่าวิธี reducing power นอกจากนี้ สารสกัดจากลำไส้ยังให้ผลการวิเคราะห์ที่มีนัยสำคัญมากกว่าในกระเพาะอาหาร

## 2. การเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อหลังการตาย

### 2.1 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของคาเทปซินบี เอช และแอล

เอนไซม์คาเทปซินบี ดี เอช และแอล เป็นเอนไซม์ที่พบในไลโซโซมเป็นส่วนใหญ่ การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าคาเทปซินบี มีบทบาทน้อยในการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อ เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวสามารถย่อยสลายไมโอไฟบริลได้ดีในช่วงพีเอช 3 และ 5 (Makinodan *et al.*, 1982; Jiang, 2000) หลังการตายค่าพีเอชของกล้ามเนื้อจะลดลงทำให้ค่าความแรงไอออนเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เอนไซม์คาเทปซินจากไลโซโซมถูกปล่อยไปยังไซโทพลาสซึมและช่องว่างระหว่างเซลล์ (Yates *et al.*, 1983) การศึกษาของ Aoki *et al.* (2000a) และ Chéret *et al.* (2007) พบว่าเอนไซม์คาเทปซินบี และแอล มีความสำคัญในการย่อยสลายกล้ามเนื้อขาวหลังการตาย เนื่องจากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างโปรตีนหลักของกล้ามเนื้อ ได้แก่ คอนเนคติน เนบูลิน และไมโอซิน และย่อยคอนเนคติน เนบูลิน ไมโอซิน คอลลาเจน แอลฟา-แอกทีนิน และโทรโปนิน T และ I ตามลำดับ (Yamashita and Konagaya, 1991) เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานใกล้เคียงกับค่าพีเอชกล้ามเนื้อหลังการตาย (Sainclivier, 1983) ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์คาเทปซินบี และแอล เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสามารถย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อได้เร็วกว่าคาเทปซินเอช เช่นเดียวกับการศึกษาในปลากะพงขาวและเนื้อวัว (Chéret *et al.*, 2007) การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าคาเทปซินเอช มีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อหลังการตายของปลาค่อนข้างน้อย (Wang and Xiong, 1999)

และยังไม่มีงานวิจัยที่อธิบายบทบาทของคาเทปซินเอชที่ลดลงในช่วงเวลา 8 ชั่วโมงหลังการตาย การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเกิดจากค่าพีเอชลดลงจาก 7.0 เป็น 6.5 ในช่วงเวลาการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ และในเวลาต่อมาค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจนใกล้เคียง 7 (Sainclivier, 1983) ระดับพีเอชดังกล่าวอาจส่งผลต่อการแตกตัวของโซ่ข้างกรดอะมิโนในบริเวณเร่งของเอนไซม์ทำให้กิจกรรมมีการเปลี่ยนแปลง

กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์คาเทปซินบี เอช และแอลเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังการตาย เช่นเดียวกับการศึกษาในระบบย่อยอาหาร เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกันแสดงให้เห็นว่าคาเทปซินทั้ง 3 ชนิดที่ศึกษาทำหน้าที่ร่วมกันในการย่อยสลายโปรตีนของกล้ามเนื้อ จากการเปรียบเทียบกับสัตว์บกพบว่าคาเทปซินย่อยสลายกล้ามเนื้อปลาได้เร็วกว่ากล้ามเนื้อวัว (Chéret *et al.*, 2007) ซึ่งอาจเป็นเพราะกล้ามเนื้อปลามีความชื้นน้อยกว่าเมื่อเทียบกับกล้ามเนื้อวัว รวมทั้งการศึกษาในครั้งนี้ได้นำทำการทดลองโดยลอยซากปลาในน้ำ ทำให้โปรตีนถูกย่อยสลายได้เร็วขึ้น การศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตอาจจะช่วยให้เข้าใจบทบาทของเอนไซม์เหล่านี้มากขึ้น

## 2.2 การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อ

การเปลี่ยนแปลงหลังการตายในช่องว่างระหว่างเซลล์ หรือของเหลวภายในและภายนอกเซลล์ ทำให้การนำไฟฟ้าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Querido, 1992) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ ที่พบว่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวโดยใช้วิธี DPPH และ reducing power ลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังการตาย เนื่องจากเซลล์ที่ตายแล้วจะผลิตเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลอิสระมาทำลายส่วนประกอบต่างๆ แม้ว่ากระบวนการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนสามารถปลดปล่อยเพปไทด์ขนาดต่างๆ ที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในระบบ DPPH (Lassoued *et al.*, 2015) แต่องค์ประกอบเหล่านี้ไม่เพียงพอที่จะกำจัดอนุมูลอิสระที่มากเกินไปหลังการตาย นอกจากนี้ในกระบวนการไฮโดรลิซิสที่ใช้เวลานานขึ้น เพปไทด์ที่เกิดขึ้นจะมีสายสั้นลง และมีประสิทธิภาพน้อยลงในการต้านสาร DPPH (Lassoued *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตาม ข้อสังเกตในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของการต้านออกซิเดชัน เป็นตัวชี้วัดที่มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงหลังการตาย

การศึกษากการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวทั้ง 2 วิธี มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกันโดยมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าสามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์ระยะเวลาหลังการตายได้ แต่การวิเคราะห์โดยวิธี DPPH มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันมากกว่าวิธี reducing power โดยพิจารณาจากสมการถดถอยระหว่างเวลาหลังการตายกับการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยสมการเส้นตรง ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เข้าใกล้ -1 มากกว่า แสดงให้เห็นว่าตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์กันอย่างมากในทิศทางตรงข้ามกัน และเมื่อพิจารณาถึงความแตกต่างระหว่างกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาว พบว่ากล้ามเนื้อขาวมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เข้าใกล้ -1 มากกว่า

กล้ามเนื้อแดง อีกทั้งกล้ามเนื้อขาวเป็นกล้ามเนื้อส่วนใหญ่ของปลา (Martini *et al.*, 2014) ดังนั้นกล้ามเนื้อชนิดนี้จึงมีศักยภาพในการพยากรณ์ระยะเวลาหลังการตายได้ดี

### 2.3 การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของกล้ามเนื้อ

การเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนไมโอซินและแอกทินอาจเกิดจากการลดลงของพีเอช (Tyska and Warshaw, 2002) และการย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน การศึกษาของ Kuo *et al.* (2005) พบว่าอุณหภูมิที่กล้ามเนื้อเสียสภาพธรรมชาติจะลดลงหลังการตาย และในการศึกษานี้พบว่าอุณหภูมิเริ่มต้น อุณหภูมิพีค และอุณหภูมิสุดท้ายลดลง ส่วนช่วงอุณหภูมิเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังการตาย การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้บ่งชี้ถึงการเสียสภาพหรือการสลายตัวของโปรตีน Thongprajukaew *et al.* (2015a) รายงานว่าช่วงอุณหภูมิที่กว้างเป็นผลมาจากความแตกต่างของความยาวของสายพอลิเมอร์ ค่าที่เพิ่มขึ้นในการศึกษาครั้งนี้อาจเกิดจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์แล้วได้สายโพลีเพปไทด์ที่หลากหลาย การเปลี่ยนแปลงต่อระยะเวลาหลังการตายตรวจพบเช่นกันในปลาแพะ ปลากระพงแดง และปลาดุก (Schubring, 1999) โดยการศึกษาครั้งนี้พบว่าแอกทินมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงหลังการตายมากกว่าไมโอซิน สอดคล้องกับรายงานของ Schubring (1999) ที่พบว่าธรรมชาติของไมโอซินมีลักษณะคงตัวในปลาเขตร้อน นอกจากนี้ การไม่พบพีคของโปรตีนหลังการตาย 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าไม่มีโปรตีนที่อยู่ในสภาพเดิม (native protein) แล้ว ซึ่งสอดคล้องกันทั้งในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาว และสอดคล้องกับระยะครึ่งตัวของปลาแซลมอนแซ่แข็ง ซึ่งอยู่ระหว่าง 2–24 ชั่วโมง (Roth *et al.*, 2006) และปลากระพงขาวแซ่แข็ง อยู่ระหว่าง 3–24 ชั่วโมง (Wilkinson *et al.*, 2008) โดยกล้ามเนื้อของปลาจะเกร็ง แข็งทื่อ แต่โปรตีนยังไม่เสียสภาพ แต่หลังจาก 24 ชั่วโมงไปแล้ว จะเข้าสู่ระยะสิ้นสุดการเกร็งตัว ทำให้กล้ามเนื้อนุ่มเหลว และไม่ยืดหยุ่น เนื่องจากโปรตีนไมโอซินและแอกทินซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของกล้ามเนื้อได้เสียสภาพธรรมชาติไปแล้ว (Tyska and Warshaw, 2002)

ผลการศึกษาในครั้งนี้ต่างจากการทดลองในหนู ซึ่งมีระยะเกร็งตัวอยู่ที่ 5–24 ชั่วโมง (Krompecher, 1994) ขณะที่ในมนุษย์ พบการเปลี่ยนแปลงหลังการตายช้ากว่าในปลาเช่นเดียวกัน โดยการตายในฤดูร้อน (ช่วงอุณหภูมิ 12.0 ถึง 46.5 องศาเซลเซียส) ระยะเกร็งตัวจะอยู่ที่ 8–30 ชั่วโมง แต่ถ้าตายในฤดูฝน (ช่วงอุณหภูมิ -2.6 ถึง 35.4 องศาเซลเซียส) ระยะเกร็งตัวจะอยู่ที่ 7–36 ชั่วโมง (Dalal *et al.*, 2006) ความแตกต่างของระยะเวลาระหว่างสัตว์น้ำและสัตว์บก อาจเนื่องมาจากกล้ามเนื้อของหนูและมนุษย์มีความซับซ้อน และมีหลอดเลือดมาเลี้ยงกล้ามเนื้อในจำนวนมาก (Gillis and Biewener, 2001) อีกทั้งการศึกษาระยะเวลาหลังการตายของปลาในครั้งนี้กระทำในตัวอย่างที่เป็นน้ำ ซึ่งอาจทำให้อัตราการสลายตัวของโปรตีนเกิดขึ้นได้เร็วกว่า และองค์ประกอบหลักส่วนใหญ่ในเซลล์สามารถละลายได้ดีในน้ำ

ค่าเอนทาลปีและผลรวมของเอนทาลปีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในช่วง 0–24 ชั่วโมงหลังการตาย คุณลักษณะดังกล่าวบ่งชี้ถึงปริมาณของโปรตีนที่อยู่ในสภาพเดิม ซึ่งจากการศึกษาของ Beyrer และ Klaas (2007) รายงานว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเอนทาลปีในปลาหิมะ (*Anoplopoma fimbria*) แข็งแรง ในทำนองเดียวกัน ขณะที่การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในเทอร์โมแกรมสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดความสดใหม่ของเนื้อ แต่เอนทาลปีไม่สามารถใช้ได้ (Kuo *et al.*, 2005) ดังนั้น อุณหภูมิเริ่มต้น อุณหภูมิที่อุณหภูมิสุดท้าย และช่วงอุณหภูมิของการเสียสภาพของโปรตีน มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงหลังการตายมากกว่าเอนทาลปี และผลรวมของเอนทาลปี

### 3. ลักษณะทางจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหาร ลำไส้ ตับ และกล้ามเนื้อ

#### 3.1 กระเพาะอาหารและลำไส้

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหารและลำไส้หลังการตาย เกิดจากการย่อยตัวเองโดยเอนไซม์และจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในอวัยวะดังกล่าวเป็นหลัก (O'Donnell and Baker, 2010; Lacznik *et al.*, 2011; Usui *et al.*, 2013) จากผลการศึกษาพบว่าส่วนของวิลไลในลำไส้ ผนังเนื้อเยื่อและเซลล์ภายใน lamina propria ของกระเพาะอาหารและลำไส้เสื่อมสภาพลงตามระยะเวลาหลังการตาย คล้ายกับการศึกษาการเกิดอะพอโทซิสในกระเพาะอาหารและลำไส้ของหนูและมนุษย์โดย Hall *et al.* (1994) ที่แสดงให้เห็นว่าอะพอโทซิสพบมากในเยื่อบุผิวและใน immediate sub-epithelial connective tissue ซึ่งในกระเพาะอาหารพบมากที่สุดบริเวณต่อมสร้างน้ำย่อย ผิวด้านนอกของผนังชั้นในสุด และเซลล์บริเวณ lamina propria ในส่วนลำไส้เล็กพบอะพอโทซิสมากตรงบริเวณปลายของวิลไล ผลการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหารและลำไส้หลังการตายสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารและการต้านปฏิบัติการออกซิเดชันทั้งในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก ในขณะที่การศึกษาที่ผ่านมาของ Querido (1992) พบว่าความต้านทานไฟฟ้าของผนังกระเพาะอาหารลดลงตามระยะเวลาหลังการตาย ขณะที่ Erlandsson และ Munro (2007) รายงานว่าลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อลำไส้เกิดการเสื่อมสภาพลงเมื่อเวลาผ่านไปหลังการตายเช่นกัน

ลำไส้เป็นอวัยวะที่มีการเน่าเสียเร็วที่สุด รองลงมาคือส่วนของทางเดินอาหารและเหงือก (เนตรนรินทร์, 2546) ข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ซึ่งพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคหลังการตายในลำไส้เกิดขึ้นเร็วกว่าในกระเพาะอาหาร เนื่องจากผนังชั้นในสุดของกระเพาะอาหารมีความหนากว่าในลำไส้ ซึ่งโดยทั่วไปเซลล์เมือกในต่อมทิวบูลาร์ และเซลล์หลังเมือกของต่อมสร้างน้ำย่อย จะทำหน้าที่ป้องกันผนังชั้นในสุดจากความเป็นกรดแก่ของกระเพาะอาหาร (Morrison and Wright Jr., 1999) และในลำไส้มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารหลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์ทริปซิน โคโมทริปซิน โลเปส และอะไมเลส (Thongprajukaew and Kovitvadh, 2013) ที่ช่วยส่งเสริมการย่อยสลายให้เร็วขึ้น ในขณะที่

ที่กระเพาะอาหารมีเพียงเอนไซม์เปปซินเป็นหลักเท่านั้น รวมทั้งในกระเพาะอาหารและลำไส้มีจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus*, *Clostridium*) ในปริมาณที่แตกต่างกัน (Gibson, 1998) นอกจากนี้ในลำไส้มีสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกลาง จึงทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตและเพิ่มขึ้นในปริมาณมาก (Macfarlane *et al.*, 1997) โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในกระเพาะอาหารส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนในการเติบโตมีประมาณ 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)

### 3.2 ตับและตับอ่อน

ตับเป็นอวัยวะที่มีการเน่าเสียเร็วมาก (เนตรนรินทร์, 2546) สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่า การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคในตับเกิดขึ้นได้เร็วกว่าในกล้ามเนื้อและท่อทางเดินอาหาร โดยไม่พบลักษณะของตับในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างหลังการตาย 24–48 ชั่วโมง เนื่องจากตับเป็นอวัยวะที่สะสมไกลโคเจน และมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึม (Stamatoglou and Hughes, 1994) นอกจากนี้ตับอ่อนยังผลิตเอนไซม์ย่อยสลายหลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์อะไมเลส ทริปซิน ไคโมทริปซิน และไลเปส (Thongprajukaew and Kovitvadh, 2013) ที่ช่วยส่งเสริมให้การย่อยสลายเร็วขึ้น โดยลักษณะทางจุลกายวิภาคของตับและตับอ่อนที่เวลา 0 ชั่วโมงหลังการตาย สอดคล้องกับการศึกษาในปลาของ Vicentini *et al.* (2005), Figueiredo-Fernandes *et al.* (2007) และ Matos *et al.* (2007) ที่พบว่า เซลล์ตับปกติมีไซโทพลาซึมทรงสี่เหลี่ยมเนื้อเดียวกัน มีนิวเคลียสทรงกลมขนาดใหญ่อยู่ตรงกลาง เห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน และมีหลอดเลือดและตับอ่อนที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มแทรกอยู่ ลักษณะทางจุลกายวิภาคของตับและตับอ่อนหลังการตายในช่วง 1–12 ชั่วโมง พบการสลายตัวตามระยะเวลาตามลำดับ โดยไซโทพลาซึมของเซลล์ตับจับกันแน่นขึ้น และสูญเสียการเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์ และส่งผลกระทบต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Fischer and Dietrich, 2000) องค์กรประกอบในเซลล์ตับถูกแทนที่ด้วยน้ำเลือด และไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดสลายตัว (Li *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียในลำไส้แพร่กระจายเข้าสู่ตับ ซึ่งมีทั้งแบคทีเรียที่ต้องการและไม่ต้องการออกซิเจน ทำให้ตับเกิดการเน่าเปื่อย และเซลล์ตับสลายตัว (Flanagan *et al.*, 2005)

### 3.3 กล้ามเนื้อ

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อและตับหลังการตายเกิดจากการย่อยสลายตัวเองของเนื้อเยื่อโดยเอนไซม์ และจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ภายในอวัยวะดังกล่าวเป็นหลัก (Shahidi and

Botta, 1994; Yamamoto *et al.*, 1997; Chytiri *et al.*, 2004) โดยลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวที่เวลา 0 ชั่วโมงหลังการตายสอดคล้องกับการศึกษาในตัวอย่างปลาแซลมอนของ Kaale และ Eikevik (2013) และปลาช่อนยักษ์เมซอนของ Carani *et al.* (2013) ที่พบว่ากล้ามเนื้อแดงมีเส้นใยกล้ามเนื้อขนาดเล็ก มีรูปร่างไม่ชัดเจน เรียงตัวกันหนาแน่น และมีเส้นเลือดและเม็ดเลือดแดงมากกว่ากล้ามเนื้อขาว ลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวหลังการตายในช่วง 1–48 ชั่วโมง มีการสลายตามระยะเวลา เนื่องจากการลดลงของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และมีการสลายตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อมากขึ้น ทั้งนี้กล้ามเนื้อของปลาจะมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันน้อย แต่มีน้ำมาก ทำให้ง่ายต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Manzano-Mazorra *et al.*, 2000) และการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (Smith, 2011) สอดคล้องกับการศึกษาในปลาแพะ ปลากระพงแดง และปลาดุก (Schubring, 1999) และยังสอดคล้องกับการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน และการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวในการศึกษารั้งนี้ นอกจากนี้ในกล้ามเนื้อแดงมีเส้นใยกล้ามเนื้อที่บางกว่า และมีกระบวนการเมแทบอลิซึมสูงกว่าในกล้ามเนื้อขาว ทำให้กล้ามเนื้อแดงมีการสลายตัวเร็วกว่า (Martini *et al.*, 2014)

#### 4. การศึกษาองค์ประกอบของธาตุจากเกล็ด

การศึกษารั้งนี้พบว่าเกล็ดมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาหลังการตาย สังเกตได้จากความแห้งของเกล็ดเมื่อเวลาผ่านไปเนื่องจากภาวะขาดน้ำ การศึกษาของ Ikoma *et al.* (2003a) พบว่าอุณหภูมิที่ทำให้เส้นใยคอลลาเจนของสัตว์น้ำเริ่มเสถียรอยู่ระหว่าง 26–29 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิน้ำที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ (24–30 องศาเซลเซียส) ทำให้เกล็ดแห้งและไม่ยืดหยุ่น แต่ยังคงมีเส้นใยคอลลาเจนเพื่อค้ำจุนโครงสร้างและสะสมแร่ธาตุอยู่ (Ikoma *et al.*, 2003a; Torres *et al.*, 2012) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Okuda *et al.* (2009) ที่พบการกระจายของแร่ธาตุในเกล็ดปลานิลอยู่ในเส้นใยคอลลาเจนแต่ละเส้น และสะสมอยู่ในนิวเคลียสที่อยู่ในช่องว่าง

การวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุจากเกล็ดปลานิลพบทั้งหมด 8 ชนิด โดยธาตุแต่ละชนิดมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญหลังการตาย แต่ไม่มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่แน่นอนในแต่ละช่วงเวลา ซึ่งสามารถนำข้อมูลมาจำแนกความแตกต่างระหว่างระยะเวลาหลังการตายได้โดยใช้ธาตุหลายชนิดร่วมกัน เกล็ดเป็นส่วนประกอบที่ทำหน้าที่ปกคลุมบริเวณภายนอกของตัวปลา มีกลไกการสร้างคอลลาเจนภายในเกล็ดเองร่วมกับปัจจัยภายนอก และสะสมแร่ธาตุจากสิ่งแวดล้อม (Ikoma *et al.*, 2003a; Okuda *et al.*, 2009) จึงมีความเป็นไปได้ว่าแร่ธาตุในเกล็ดปลานิลมีการสร้างและสะสมอย่างต่อเนื่องแม้ปลาตาย (Schönbömer *et al.*, 1979)

การพบออกซิเจนและคาร์บอนในเกล็ดสูงกว่าธาตุอื่น เนื่องจากเป็นธาตุที่พบได้มากที่สุดในเรื่องสิ่งแวดล้อม (Sauer and Watanabe, 1989; Ikoma *et al.*, 2003a) รองลงมาเป็นไนโตรเจนซึ่งพบในชั้นบรรยากาศ ดิน และเป็นส่วนประกอบสำคัญของโปรตีนที่ใช้ในการสร้างคอลลาเจน (Dent *et al.*, 2004; Okuda *et al.*, 2009) เช่นเดียวกับฟอสฟอรัส แคลเซียม โซเดียม แมกนีเซียม และกำมะถัน ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่จำเป็นในปลา พบได้ในแหล่งน้ำ (Abdullah *et al.*, 1976; Sauer and Watanabe, 1989; Ikoma *et al.*, 2003a) โดยหลังการตายของพืชและสัตว์บางชนิด ออกซิเจนมีการสะสมอย่างคงที่ เนื่องจากเป็นธาตุที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างพลังงานแก่สิ่งมีชีวิต คาร์บอนจะอยู่ในสภาพคาร์บอเนต และละลายออกมาในน้ำ ไนโตรเจนสะสมอยู่ในสภาพสารอินทรีย์ ฟอสฟอรัสจะถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียเพื่อให้เป็นฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้ แคลเซียม โซเดียม และแมกนีเซียมสะสมอยู่ในรูปของเกลือฟอสเฟตและคาร์บอเนต และกำมะถันมีการระเหย ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เติบโตในสภาวะไร้ออกซิเจน (Everstine *et al.*, 2013; Marini, 2013)

การเพิ่มขึ้นและลดลงของแร่ธาตุเกิดขึ้นจากหลายสาเหตุ เนื่องจากร่างกายต้องควบคุมสมดุลของแร่ธาตุต่างๆ อยู่ตลอดเวลา เช่น การขาดแมกนีเซียมทำให้กล้ามเนื้อเกร็งเนื่องจากขาด ATP ร่างกายจึงต้องรักษาสมดุลโดยการเพิ่มแมกนีเซียม การขาดแคลเซียมทำให้เกิดบางลงและหลุดออกง่าย เมื่อมีการลดลงของแคลเซียม ร่างกายจะเพิ่มการสร้างและดูดซับแคลเซียมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเกล็ด โซเดียมเป็นตัวกระตุ้นการย่อยสลายโปรตีน จึงต้องเพิ่มโซเดียมเพื่อรักษาภาวะความเป็นกรดต่างของร่างกาย เป็นต้น (Sauer and Watanabe, 1989; Ikoma *et al.*, 2003a, 2003b) สำหรับปลาที่ตายแล้ว เกล็ดและผิวหนังสามารถดูดซึมธาตุจากสิ่งแวดล้อมได้เช่นเดิม (Schönbömer *et al.*, 1979) สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นและลดลงของแร่ธาตุตลอดระยะเวลาหลังการตายในการศึกษาครั้งนี้ โดยการย่อยสลายของจุลินทรีย์ทำให้ร่างกายปล่อยสารอินทรีย์ระเหยง่ายหลายชนิดส่งผลกระทบต่อสมบัติทางเคมีกายภาพของน้ำ (Meunier, 1984) นอกจากนี้สารอินทรีย์ระเหยง่ายบางชนิดมีแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบ (Iglesias and Medina, 2008; Paczkowski *et al.*, 2014) ทำให้เกิดแร่ธาตุในน้ำซึ่งปลาสามารถดูดซึมผ่านเกล็ดได้

## 5. สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก

ระยะเวลาหลังการตายมีผลต่อองค์ประกอบที่ระเหยได้ในซาก โดยส่วนใหญ่เกิดจากการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีปัจจัยหลายอย่างเกี่ยวข้อง ทั้งชนิดของจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และปฏิกิริยาเคมีที่เปลี่ยนแปลงภายในร่างกาย ทำให้เกิดกระบวนการสร้างและปล่อยสารอินทรีย์ระเหยได้ตลอดเวลาหลังการตาย เพื่อดึงดูดสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เข้ามายังซาก (Paczkowski and Schütz, 2011) สารอินทรีย์ที่ระเหยจากซากแบ่งออกเป็นสารประกอบหลายชนิด ซึ่งการสลายตัวที่แตกต่างกัน ทำให้มีการปลดปล่อยออกมาในช่วงเวลาที่ต่างกัน (Dent *et al.*, 2004; Paczkowski *et al.*, 2014) ปริมาณสารอินทรีย์ระเหยที่ปล่อยออกมาขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ทั้งอุณหภูมิ ความชื้น ครอบคลุม

ถึงปฏิกิริยาเคมีในร่างกาย และการสลายตัวด้วยจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีบทบาทแตกต่างกัน โดยในช่วงแรกของการสลายตัวเกิดจากแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต (aerobic bacteria) ทำให้ออกซิเจนในร่างกายหมดไป และภายหลังมีการย่อยสลายให้เน่าเปื่อยอีกครั้งโดยแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic bacteria) (Kasper *et al.*, 2012)

สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากในการศึกษาค้างนี้ ส่วนใหญ่มีการรายงานแล้วในสัตว์น้ำ เช่น ปลาฮอร์สแมคเคอเรล (*Trachurus trachurus*) (Iglesias and Medina, 2008) ปลา gilthead seabream (*Sparus aurata*) (Iglesias *et al.*, 2009) ปลา whiting (*Merlangius merlangus*) (Duflos *et al.*, 2005) และหอยแมลงภู่เปลือกเขียว (*Perna canaliculus*) (Tuckey *et al.*, 2013) ซึ่งเป็นการศึกษาหลังการตายที่เก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ หรือการศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น หนู (Kasper *et al.*, 2012) แกะ (Bhatt *et al.*, 2013) สุนัข (Dekeirsschietter *et al.*, 2009; von Hoermann *et al.*, 2011; Brasseur *et al.*, 2012; Cablk *et al.*, 2012; Paczkowski *et al.*, 2014; Armstrong *et al.*, 2016) วัว และมนุษย์ (Cablk *et al.*, 2012) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการศึกษาภายใต้สภาพภูมิอากาศหรือฤดูที่แตกต่างกัน จึงสามารถนำสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากในการศึกษาค้างนี้ มาใช้ในการจำแนกระยะเวลาหลังการตายของสัตว์น้ำในสภาวะปกติได้ ยกเว้นสารกลุ่มเทอร์พีน ได้แก่  $\alpha$ -humulene ที่ตรวจพบในช่วงเวลา 2–4 ชั่วโมง และ *trans*-caryophyllene ที่พบในบางช่วงเวลา ไม่อยู่ในกลุ่มสารอินทรีย์ระเหยในซาก แต่มีการตรวจพบเล็กน้อยในการศึกษาก่อนหน้านี้ (Statheropoulos *et al.*, 2005) ซึ่งเป็นสารที่เกิดขึ้นในวิถีกรดเมวาโลนิก (mevalonic acid pathway) ในพืชและสัตว์ (Adams *et al.*, 1996)

การเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก สามารถดึงดูดให้แมลงชนิดต่างๆ เข้ามาแพร่พันธุ์และอาศัยอาหารจากซาก ซึ่งแบ่งได้ 3 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มที่เข้ามาอาศัยและกินอาหารจากซาก (necrophagous species) เช่น แมลงวัน และด้วงเขาสัตว์ กลุ่มที่เข้ามาอาศัยและกินแมลงในกลุ่มแรก (predator species) เช่น แมลงปีกแข็ง มด และผึ้ง และกลุ่มเข้ามาอาศัยกินซากและกินแมลงในกลุ่มแรก (scavenger and omnivorous species) ส่วนมากเป็นแมลงในกลุ่มด้วง และมด (Kulshrestha and Satpathy, 2001; Klotzbach *et al.*, 2004) โดยการเข้ามาใช้ประโยชน์ในซากสัตว์น้ำของแมลงยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน จากการศึกษาของ Stensmyr *et al.* (2002) ในน้ำ พบว่า polysulphides ในกลุ่มสารประกอบกำมะถันเป็นสารอินทรีย์ระเหยที่สำคัญในการดึงดูดแมลงกินซากเข้ามายังซาก รวมทั้งแมลงวันหัวเขียว และด้วงสับห่อย การศึกษาของ von Hoermann *et al.* (2011) ในสุกรพบว่า benzyl butyrate ในกลุ่มเอสเทอร์เป็นสารที่ดึงดูดด้วงเขาสัตว์ตัวผู้โดยเฉพาะ ซึ่งสารทั้งสองชนิดไม่พบในการศึกษาในครั้งนี้นอกจากนี้ยังมีกรดไขมันสายสั้นบางชนิดที่รายงานว่าสามารถดึงดูดแมลงวันในวงศ์ Piophilidae และ Calliphoridae ตัวเต็มวัย แมลงดูดเลือด ด้วงมูลสัตว์ และต๊กแตนกินซากได้ (Wolff *et al.*, 2001; Barrozo and Lazzari, 2004; Dormont *et al.*, 2010; Whitman and Richardson, 2010)



สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากที่สามารถนำมาใช้ระบุเวลาหลังการตายได้ในการศึกษาครั้งนี้ ประกอบด้วยสารที่พบในช่วงเวลาหลังการตาย 4 ชั่วโมง ได้แก่ สารประกอบในกลุ่มแอลดีไฮด์ คือ pentanal และสารประกอบคีโตน คือ 2,3-pentanedione ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Iglesias และ Medina (2008) ที่รายงานว่าพบ 2,3-pentanedione เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในเนื้อปลาแซ่แซ็ง สารที่พบในช่วงเวลาหลังการตาย 12 ชั่วโมง ได้แก่ สารประกอบในกลุ่มแอลกอฮอล์ คือ 1-hexanol, 1-penten-3-ol และ 2-octen-1-ol และสารประกอบเอสเทอร์ คือ hexadecanoic acid ethyl ester โดยการพบ 1-hexanol สอดคล้องกับงานวิจัยของ Paczkowski และ Schütz (2011) ที่รายงานว่าพบสารที่เกิดจากเผาผลาญอาหารของเชื้อรา และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Iglesias และ Medina (2008) ที่รายงานว่า 1-penten-3-ol เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในเนื้อปลาฮอร์สมัคเคอเรล สารที่พบในช่วงเวลาหลังการตาย 24 ชั่วโมง ได้แก่ สารประกอบในกลุ่มแอลกอฮอล์ คือ (5Z)-octa-1,5-dien-3-ol สารประกอบในกลุ่มแอลดีไฮด์ คือ 2-octenal, hexanal, heptanal, nonanal และ octanal สารประกอบเอสเทอร์ คือ hexadecanoic acid methyl ester สารประกอบคีโตน คือ 2-pentyl-furan, 2,3-octanedione และ 3,5-octadien-2-one และสารประกอบอะโรมาติก คือ 1,2,3,4-tetrahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)- ซึ่งสารประกอบอะโรมาติกได้มาจากการย่อยสลายของจุลินทรีย์ของกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก ได้แก่ ไทโรซีน ฟินิลอะลานีน และทริปโตเฟน (Vass *et al.*, 1992; Dent *et al.*, 2004; Paczkowski and Schütz, 2011) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Iglesias และ Medina (2008) ที่รายงานว่าพบ 2,3-octanedione เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในเนื้อปลาแซ่แซ็ง และสารที่พบในช่วงเวลาหลังการตาย 48 ชั่วโมง ได้แก่ สารประกอบในกลุ่มแอลกอฮอล์ คือ 1-octanol, 1-octen-3-ol และ 1-pentanol สารประกอบในกลุ่มอัลเคน คือ pentadecane และสารประกอบอะโรมาติก คือ benzaldehyde

สารที่พบในบางช่วงเวลา ซึ่งสามารถใช้ระบุเวลาหลังการตายได้เช่นกัน ประกอบด้วยสารที่พบในช่วงเวลา 1-12 ชั่วโมงหลังการตาย ได้แก่ สารประกอบในกลุ่มแอลดีไฮด์ คือ hexadecanal สารที่พบในช่วงเวลา 8-24 ชั่วโมงหลังการตาย ได้แก่ สารประกอบอะโรมาติก คือ benzeneacetaldehyde สารที่พบในช่วงเวลา 12-24 ชั่วโมงหลังการตาย ได้แก่ สารประกอบในกลุ่มแอลกอฮอล์ คือ 2,6-dimethyl-4-heptanol สารที่พบในช่วงเวลา 12-48 ชั่วโมงหลังการตาย ได้แก่ สารประกอบในกลุ่มแอลกอฮอล์ คือ 1-butanol ซึ่ง 1-butanol มีการรายงานว่าเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทหมักที่ได้จากกระบวนการสลายน้ำตาลภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน (Dent *et al.*, 2004; Boumba *et al.*, 2008) และสารประกอบในกลุ่มแอลดีไฮด์ คือ 3-methyl-butanal ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ma *et al.* (2012) ที่พบ 3-methyl-butanal ในเนื้อวัวหลังการตาย 24 ชั่วโมง สารที่พบในช่วงเวลา 24-48 ชั่วโมงหลังการตาย ได้แก่ สารประกอบในกลุ่มแอลกอฮอล์ คือ isoamyl alcohol สารประกอบในกลุ่มแอลดีไฮด์ คือ 2-isopropyl-5-methyl-2-hexenal สารประกอบในกลุ่มเอมีน คือ 3-methylbutyl-2-phenylethylidene amine และ 3-methylbutyl-(3-methylbutylidene) amine สารประกอบอะโรมาติก คือ 4-methyl-phenol และ

phenol และสารประกอบกำมะถัน คือ dimethyl disulfide และ dimethyl trisulfide สอดคล้องกับงานวิจัยของ Paczkowski *et al.* (2014) ที่พบสาร 4-methyl-phenol, dimethyl disulfide และ dimethyl trisulfide ในระยะอืดไปจนถึงระยะเน่าสลายแบบสมบูรณ์ของซากหมู ซึ่งช่วงเวลา 24–48 ชั่วโมง หลังการตายของปลานิลเป็นระยะสิ้นสุดการเกร็งตัว และซากปลาเริ่มเน่าเสียเช่นกัน

## สรุปผลการทดลอง

ระยะเวลาหลังการตายส่งผลต่อการทำงานของระบบย่อยอาหาร โดยการตรวจสอบดัชนีของทางเดินอาหาร ความเข้มข้นของโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหาร และการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน พบว่าตัวแปรดังกล่าวทั้งหมดมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญตามระยะเวลาหลังการตาย สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหาร ลำไส้ และตับที่เสื่อมสภาพลง การวิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีน ลักษณะทางจุลกายวิภาค และการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารพบว่าการเปลี่ยนแปลงในลำไส้เกิดขึ้นเร็วกว่าในกระเพาะอาหาร รวมทั้งเอนไซม์ย่อยไขมันมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงหลังการตายมากกว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์คาเทปซิน การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน สมบัติเชิงความร้อน และลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญและมีศักยภาพในการประเมินระยะเวลาหลังการตายได้ โดยการวิเคราะห์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงมากกว่าวิธี reducing power และกล้ามเนื้อขาวยามีประสิทธิภาพในการนำมาใช้พยากรณ์ระยะเวลาหลังการตายมากกว่ากล้ามเนื้อแดง ส่วนการวิเคราะห์สมบัติเชิงความร้อนบ่งชี้ว่าเอกทินมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงหลังการตายมากกว่าไมโอซิน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบของธาตุจากเกล็ดมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาหลังการตาย โดยพบธาตุหลักทั้งหมด 8 ชนิด ซึ่งมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่ไม่แน่นอนในแต่ละช่วงเวลา ส่วนสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากพบทั้งหมด 65 ชนิด ประกอบด้วยสารในกลุ่มแอลกอฮอล์ 14 ชนิด แอลดีไฮด์ 17 ชนิด อัลเคน 2 ชนิด เอมีน 2 ชนิด สารประกอบอะโรมาติก 9 ชนิด เอสเทอร์ 4 ชนิด อินโดล 2 ชนิด คีโตน 11 ชนิด สารประกอบกำมะถัน 2 ชนิด และเทอร์พีน 2 ชนิด โดยสารเกือบทุกกลุ่มมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญหลังการตายเช่นกัน

การศึกษารังนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้การเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหาร กล้ามเนื้อ เกล็ด และสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากปลาที่ลอยอยู่ในน้ำสำหรับประมาณช่วงเวลาหลังการตายของสัตว์น้ำ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวอาจเป็นประโยชน์ในการใช้สืบสวนและสอบสวนคดีความที่เกี่ยวข้องกับการตายของสัตว์น้ำในฟาร์มเลี้ยง การตายจากการถูกทารุณกรรม หรือใช้ประมาณช่วงเวลาหลังการตายในการขนส่งสัตว์น้ำที่สำคัญทางเศรษฐกิจทั้งสัตว์น้ำที่ใช้บริโภคเป็นอาหารและสัตว์น้ำสวยงาม ในกรณีที่มีการทำประกันภัยความเสียหายระหว่างการขนส่ง เป็นต้น

## เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มวิจัยอาหารสัตว์น้ำ. 2534. อาหารสัตว์น้ำ. กองส่งเสริมการประมง กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- การุณ ทองประจุแก้ว และอุทัยวรรณ โกวิทวที. 2555. เอนไซม์ย่อยอาหารกับการพัฒนาอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ 22: 709–720.
- จันทกานต์ นุชสุข. 2550. การพัฒนาสูตรอาหารโดยใช้เทคโนโลยีทางเอนไซม์ย่อยอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงปลาสายพันธุ์ *Helicophagus leptorhynchus* Ng & Kottelat, 2000. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 146 หน้า.
- จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล และสุรสิทธิ์ รอดทอง. 2554. การใช้เอนไซม์จากปลาและกล้าเชื้อแบคทีเรียในกระบวนการหมักน้ำปลา. รายงานการวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- เนตรนรินทร์ ชุนสูงเนิน. 2546. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้การปรับเปลี่ยนบรรยากาศ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 116 หน้า.
- พัชรา นิธิโรจน์ภักดี. 2549. ชนิดอาหารในทางเดินอาหารของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และปลาทองถิ่นบางชนิดที่พบในอ่างเก็บน้ำบางพระจังหวัดชลบุรี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. 68 หน้า.
- ไมตรี สุทธิจิตต์, รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย, วีรพล คู่คงวิริยพันธ์, ศิริธร ศิริอมรพรรณ, ชัยวัฒน์ ไชยสุด, สุพัตรา ปรสุพัฒนา, อุไรวรรณ พานิช, ชลธิดา เทพหินลับ และศุภชัย เจริญสิน. 2555. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: นวัตกรรมสุขภาพ. เชียงใหม่
- วิชัย วนดุรงค์วรรณ. 2534. กีฬาเวชศาสตร์พื้นฐาน. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. อาหารปลา. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2542. โภชนศาสตร์สัตว์น้ำและการให้อาหารสัตว์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดปราจีนบุรี. 2554. อาหารสัตว์น้ำ. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, ปราจีนบุรี.
- สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. 2536. การพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลานิล. กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- สุภาพร สุกสีเหลือง. 2542. มินวิทยา. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, กรุงเทพฯ.
- สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด. 2551. การจัดทำองค์ความรู้ (Knowledge Management) เรื่องการเพาะเลี้ยงและอนุบาลปลานิล. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- อุดม เรื่องนพคุณ. 2549. การเพาะพันธุ์และเลี้ยงปลานิล. กรุงเทพฯ: เกษตรสยามบุ๊คส์.
- Abdullah, M.I., Banks, J.W., Miles, D.L., Grady, K.O. 1976. Environmental dependence of manganese and zinc in scales of Atlantic salmon, *Salmo salar* (L) and brown trout, *Salmo trutta* (L). *Freshwater Biol.* 6: 161–166.

- Adams, T.B., Hallagan, J.B., Putnam, J.M., Gierke, T.L., Doull, J., Munro, I.C., Newberne, P., Portoghese, P.S., Smith, R.L., Wagner, B.M., Weil, C.S., Woods, L.A., Ford, R.A. 1996. The FEMA GRAS assessment of alicyclic substances used as flavour ingredients. *Food Chem. Toxicol.* 34: 763–828.
- 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.
- Andrés, M., Gisbert, E., Díaz, M., Moyano, F.J., Estévez, A., Rotllant, G. 2010. Ontogenetic changes in digestive enzymatic capacities of the spider crab, *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 389: 75–84.
- Aoki, T., Yokono, M., Ueno, R. 2002a. A cathepsin B-like enzyme from mackerel white muscle is a precursor of cathepsin B. *Comp. Biochem. Physiol. B* 133: 307–316.
- Aoki, T., Yokono, M., Yamashita, T., Ueno, R. 2000b. Distribution of cathepsin in red and white muscle among fish species. *Fish. Sci.* 66: 776–782.
- Aoki, T., 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. B* 117: 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.
- Arias, I.M., Boyer, J.L., Fausto, N., Jakoby, W.B., Schachter, D., Shafritz D.A. 1994. *The liver: biology and pathobiology*. New York: Raven Press.
- Armstrong, P., Nizio, K.D., Perrault, K.A., Forbes, S.L. 2016. Establishing the volatile profile of pig carcasses as analogues for human decomposition during the early postmortem period. *Heliyon* 2: 1–24.

- Barrozo, R.B., Lazzari, C.R. 2004. The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. *Chem. Senses* 29: 319–329.
- Bayliss, P. 1996. Chemistry in the kitchen: fish and fish products. *Nutr. Food Sci.* 96: 41–43.
- Beccaria, C., Diaz, J.P., Connes, R. 1992. Effects of dietary conditions on the exocrine pancreas of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. (Teleostei). *Aquaculture* 101: 163–176.
- 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.
- Beyrer, M., Klaas, M.R. 2007. Influence of freezing and of frozen storage on the specific heat capacity of trout and herring fillet. *Eur. Food Res. Technol.* 224: 349–353.
- 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.
- Bhatt, R.S., Sahoo, A., Shinde, A.K., Karim, S.A. 2013. Change in body condition and carcass characteristics of cull ewes fed diets supplemented with rumen bypass fat. *Livest. Sci.* 157: 132–140.
- Bhuje, R.C. 2000. A review of strategies for the management of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish in seed production systems, especially hapa-based systems. *Aquaculture* 181: 37–59.
- Boumba, V.A., Ziavrou, K.S., Vougiouklakis, T. 2008. Biochemical pathways generating post-mortem volatile compounds co-detected during forensic ethanol analyses. *Forensic Sci. Int.* 174: 133–151.
- Brasseura, C., Dekeirsschieterb, J., Schotsmansc, E.M.J., de Koningd, S., Wilsonc, A.S, Haubrugeb, E., Focanta, J.F. 2012. Comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry for the forensic study of cadaveric volatile organic compounds released in soil by buried decaying pig carcasses. *J. Chromatogr. A* 1255: 163–170.
- Cabirol, N., Pommier, M.T., Gueux, M., Payen, G. 1998. Comparison of lipid in two types of human putrefactive liquid. *Forensic Sci. Int.* 94: 47–54.

- Cablak, M.E., Szlagowski, E.E., Sagebiel, J.C. 2012. Characterization of the volatile organic compounds present in the headspace of decomposing animal remains, and compared with human remains. *Forensic Sci. Int.* 220: 118–125.
- Campana, S.E., Neilson, J.D. 1985. Microstructure of fish otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 1014–1032.
- 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.
- Carani, F.R., Da Silva Duran, B.O., De Paula, T.G., Piedade, W.P., Dal-Pai-Silva, M. 2013. Morphology and expression of genes related to skeletal muscle growth in juveniles of pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimatidae, Teleostei). *Acta Sci. Anim. Sci.* 35: 219–226.
- 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.
- Chan, C.R., Lee, D.L., Cheng, Y.H., Hsieh, D.J.Y., Weng, C.F. 2008. Feed deprivation and re-feeding on alterations of proteases in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Zool. Stud.* 47: 207–214.
- 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.
- Chytiri, S., Chouliara, I., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. 2004. Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. *Food Microbiol.* 21: 157–165.
- Dalal, J.S., Tejpal, H.R., Chanana, A., Kaur, N. 2006. Medicolegal study of rigor mortis to estimate postmortem interval. *J. Indian Acad. Forensic Med.* 28: 971–973.
- Dekeirsschieter, J., Verheggen, F.J., Gohy, M., Hubrecht, F., Bourguignon, L., Lognay, G., Haubruge, E. 2009. Cadaveric volatile organic compounds released by decaying pig carcasses (*Sus domesticus* L.) in different biotopes. *Forensic Sci. Int.* 189: 46–53.
- 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.
- Dent, B.B., Forbes, S.L., Stuart, B.H. 2004. Review of human decomposition processes in soil. *Environ. Geol.* 45: 576–585.
- Dormont, L., Jay-Robert, P., Bessiere, J.M., Rapior, S., Lumaret, J.P. 2010. Innate olfactory preferences in dung beetles. *J. Exp. Biol.* 213: 3177–3186.
- Duflos, G., Moine, F., Coin, V.M., Malle, P. 2005. Determination of volatile compounds in whiting (*Merlangius merlangus*) using headspace–solid-phase microextraction–gas chromatography–massspectrometry. *J. Chromatogr. Sci.* 43: 304–312.
- 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.
- Everstine, K., Spink, J., Kennedy, S. 2013. Economically motivated adulteration (EMA) of food: common characteristics of EMA incidents. *J. Food Prot.* 76: 723–735.



- 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.
- Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J.V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Matos, P., Fontainhas-Fernandes, A. 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesq. Vet. Bras.* 27: 103–109.
- Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas-Fernandes, A., Monteiro, R., Reis-Henriques, M.A., Rocha, E. 2006. Temperature and gender influences on the hepatic stroma (and associated pancreatic acini) of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae): A stereological analysis by light microscopy. *J. Morphol.* 267: 221–230.
- 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.
- Fischer, W., Dietrich, D. 2000. Toxicity of the cyanobacterial cyclic heptapeptide toxins microcystin LR and RR in early life-stages of the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Aquat. Toxicol.* 49: 189–198.
- Flanagan, R.J., Connally, G., Evans, J.M. 2005. Analytical toxicology: guidelines for sample collection postmortem. *Toxicol. Rev.* 24: 63–71.
- Fraser, O.P., Sumar, S. 1998. Composition changes and spoilage fish (part II) microbiological induced deterioration. *Nutr. Food Sci.* 6: 325–329.
- 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.
- Gibson, G.R. 1998. Dietary modulation of the human gut microflora using probiotics. *Br. J. Nutr.* 80: S209.
- Gill-King, H. 1997. Chemical and ultrastructural aspects of decomposition, in: W.D. Haglund, M.H. Sorg (Eds.), *Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains*. CRC Press, Boca Raton. pp. 93–108.
- Gillanders, B.M. 2001. Trace metals in four structures of fish and their use for estimates of stock structure. Sydney: Fishery Bulletin Publisher.
- Gillis, G.B., Biewener, A.A. 2001. Hindlimb muscle function in relation to speed and gait: *in vivo* patterns of strain and activation in a hip and knee extensor of the rat (*Rattus norvegicus*). *J. Exp. Biol.* 204: 2717–2731.

- 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.
- Hinton, D.E., Pool, C.R. 1976. Ultrastructure of the liver in channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Biol.* 8: 209–219.
- 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 mullet (*Priacanthus macracanthus*) surimi gel paste. *J. Sci. Food Agric.* 90: 370–375.
- Iglesias, J., Medina, I. 2008. Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. *J. Chromatogr. A* 1192: 9–16.
- Iglesias, J., Medina, I., Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., Musci, M. 2009. Study of the volatile compounds useful for the characterisation of fresh and frozen thawed cultured gilthead sea bream fish by solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chem.* 115: 1473–1478.
- Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., Mann, S. 2003a. Microstructure, mechanical and biomimetic properties of fish scales from *Pagrus major*. *J. Struct. Biol.* 142: 327–333.
- Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., Mann, S. 2003b. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. *Int. J. Biol. Macromol.* 32: 199–204.

- 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.
- Kaale, L.D., Eikevik, T.M. 2013. A histological study of the microstructure sizes of the red and white muscles of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets during superchilling process and storage. J. Food Eng. 114: 242–248.
- Kadler, K.E., Holmes, D.F., Trotter, J.A., Chapman, J.A. 1996. Collagen fibril formation. Biochem. J. 316: 1–11.
- Kalinova, B., Podskalska, H., Růžička, J., Hoskoec, M. 2009. Irresistible bouquet of death how are burying beetles (Coleoptera: Silphidae: Nicrophorus) attracted by carcasses. Natur. Wissen Schafft. 96: 889–899.
- Kasper, J., Mumm, R., Ruther, J. 2012. The composition of carcass volatile profiles in relation to storage time and climate. Forensic Sci. Int. 223: 64–71.
- 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.
- Kendall, M.W., Hawkins, W.E. 1975. Hepatic morphology and acid phosphatase localization in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). J. Fish. Res. Bd. Can. 32: 1459–1464.
- Khemiri, S., Meunier, F.J., Laurin, M., Zylberberg, L. 2001. Morphology and structure of the scales in the Gadiformes (Actinopterygii: Teleostei: Paracanthopterygii) and a comparison to the elasmoid scales of other Teleostei. Cah. Biol. Mar. 42: 345–362.
- 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. B 147: 682–689.

- Klotzbach, H., Krettek, R., Bratzke, H., Puschel, K., Zehner, R., Amendt, J. 2004. The history of forensic entomology in German-speaking countries. *Forensic Sci. Int.* 144: 259–263.
- Kočárek, P. 2003. Decomposition and Coleoptera succession on exposed carrion of small mammal in Opava, the Czech Republic. *Eur. J. Soil Biol.* 39: 31–45.
- Korpi, A., Pasanen, A.L., Pasanen, P. 1998. Volatile compounds originating from mixed microbial cultures on building materials under various humidity conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 2914–2919.
- Krompecher, T. 1994. Experimental evaluation of rigor mortis VIII. Estimation of time since death by repeated measurements of the intensity of rigor mortis on rats. *Forensic Sci. Int.* 68: 149–159.
- Kulshrestha, P., Satpathy, D.K. 2001. Use of beetles in forensic entomology. *Forensic Sci. Int.* 120: 15–17.
- Kuo, H.L., Chen, M.T., Liu, D.C., Lin, L.C. 2005. Relationship between thermal properties of muscle proteins and pork quality. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18: 427–432.
- 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.
- Lasseter, A.E., Jacobi, K.P., Farley, R., Hensel, L. 2003. Cadaver dog and handler team capabilities in the recovery of buried human remains in the southeastern United States. *J. Forensic Sci.* 48: 617–621.
- 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.
- Levinson, A.R., Levinson, H.Z., Francke, W. 1981. Intraspezifische Lockstoffe des Dornspeckkäfers *Dermestes maculatus* (De Geer). *Mitt. Deutsch. Ges. Allg. Angew. Entomol.* 2: 235–237.
- 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.
- Ma, Q.L., Hamid, N., Bekhit, A.E.D., Robertson, J., Law, T.F. 2012. Evaluation of pre-rigor injection of beef with proteases on cooked meat volatile profile after 1 day and 21 days post-mortem storage. *Meat Sci.* 92: 430–439.
- 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.
- Manzano-Mazorra, M.A., Aguilar, R.P., Rojas, E.I., Sanchez, M.E. 2000. Postmortem changes in black skipjack muscle during storage in ice. *J. Food Sci.* 65: 774–779.
- Marieb, E.N., Wilhelm, P.B., Mallatt, J.B. 2013. *Human anatomy*. 7<sup>th</sup> ed. London: Pearson.
- Marini, F. 2013. *Chemometric in food chemistry*. Amsterdam: Elsevier.
- Martini, F.H., Nath, J.L., Bartholomew, E.F. 2014. *Fundamentals of anatomy and physiology*. 10<sup>th</sup> ed. London: Pearson.
- Matos, E., Silva, T.S., Tiago, T., Aureliano, M., Dinis, M.T., Dias, J. 2011. Effect of harvesting stress and storage conditions on protein degradation in fillets of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*): A differential scanning calorimetry study. *Food Chem.* 126: 270–276.
- Matos, P., Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Carrola, J., Roch, E. 2007. Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl. *Pest Biochem. Physiol.* 89: 73–80.
- McArdle, W.D., Katch, F.I., Katch, V.L. 1996. *Physiology: Energy, nutrition and human performance*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Williams and Wilkins.

- McMahon, T.A. 1984. Muscles, reflexes and locomotion. New Jersey: Princeton University Press.
- Meunier, F.J. 1984. Spatial organization and mineralization of the vasal plate of elasmoid scales in Osteichthyans. *Am. Zool. Sci.* 24: 953–964.
- 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.
- 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.
- Nielsen, L.B., Nielsen, H.H. 2001. Purification and characterization of cathepsin D from herring muscle (*Clupea harengus*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 128: 351–363.
- 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.
- Okuda, M., Takeguchi, M., Tagaya, M., Tonegawa, T., Hashimoto, A., Hanagata, N., Ikoma, T. 2009. Elemental distribution analysis of type I collagen fibrils in tilapia fish scale with energy-filtered transmission electron microscope. *Micron* 40: 665–668.
- Onozato, H., Watabe, N. 1979. Studies on fish scale formation and resorption. *Cell Tissue Res.* 201: 409–422.
- Paczkowski, S., Nicke, S., Ziegenhagen, H., Schutz, S. 2014. Volatile emission of decomposing pig carcasses (*Sus scrofa domesticus* L.) as an indicator for the postmortem interval. *J. Forensic Sci.* 60: 130–137.
- Paczkowski, S., Schütz, S. 2011. Post-mortem volatiles of vertebrate tissue. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91: 917–935.

- Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G. 2000. Biochemical and (ultra) structural hepatic perturbation of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulphate. *Aquat. Toxicol.* 50: 109–124.
- 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.
- 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.
- Perga, M.E., Gerdeaux, D. 2003. Using the  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  of whitefish scales for retrospective ecological studies: changes in isotope signatures during the restoration of Lake Geneva, 1980–2001. *J. Fish Biol.* 63: 1197–1207.
- 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.
- Ramesh, F., Nagarajan, K. 2013. Histopathological changes in the muscle tissue of the fish *Clarias batrachus* exposed to untreated and treated sago effluent. *J. Biosci. Bioeng.* 1: 74–80.
- Rhee, M.S., Kim, B.C. 2001. Effect of low voltage electrical stimulation and temperature conditioning on postmortem changes in glycolysis and calpains activities of Korean native cattle (Hanwoo). *Meat Sci.* 58: 231–237.
- Roth, B., Slinde, E., Arildsen, J. 2006. Pre or post mortem muscle activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). The effect on rigor mortis and the physical properties of flesh. *Aquaculture* 257: 504–510.
- 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., Pringle, G.M., Moss, R., Houlihan, D.F. 1998. Effects of varying rearing temperatures on expression of different trypsin isozymes, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 19: 247–255.
- 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.
- Rungruangsak-Torrissen, K., Sundby, A. 2000. Protease activities, plasma free amino acids and insulin at different ages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with genetically different trypsin isozymes. *Fish Physiol. Biochem.* 22: 337–347.
- 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.
- Sauer, G.R., Watanabe, N. 1989. Temporal and metal specific patterns in the accumulation of heavy metals by the scales of *Fundulus heteroclitus*. *Aquat. Toxicol.* 14: 233–248.
- Schönbörner, A.A., Boivin, G., Baud, C.A. 1979. The mineralization processes in teleost fish scales. *Cell Tiss. Res.* 202: 203–212.
- Schubring, R. 1999. DSC studies on deep frozen fishery products. *Thermochim. Acta* 337: 89–95.
- Scocco, P., Menghi, G., Ceccarelli, P. 1997. Histochemical differentiation of glycoconjugates occurring in the tilapine intestine. *Fish Biol.* 51: 848–857.
- Shahidi, F., Botta, J.R. 1994. Seafoods chemistry, processing technology and quality. London: Chapman & Hall.
- 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.
- Sinnatamby, R.N., Bowman, J.E., Dempson, J.B., Power, M. 2007. An assessment of decalcification procedures for  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  analysis of yellow perch, walleye and Atlantic salmon scales. J. Fish Biol. 70: 1630–1635.
- 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.
- Smith, P.G. 2011. Introduction to food process engineering. Berlin: Springer.
- Stamatoglou, S.C., Hughes, R.C. 1994. Cell adhesion molecules in liver function and pattern formation. J. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 8: 420–427.
- Statheropoulos, M., Agapiou, A., Spiliopouliou, C., Pallis, G.C., Sianos, E. 2007. Environmental aspects of VOCs evolved in the early stages of human decomposition. Sci. Total Environ. 385: 221–227.
- Statheropoulos, M., Spiliopoulou, C., Agapiou, A. 2005. A study of volatile organic compounds evolved from decaying human body. Forensic Sci. Int. 153: 147–155.
- Stensmyr, M.C., Urru, I., Collu, I., Celander, M., Hansson, B.S., Angioy, A.M. 2002. Pollination: rotting smell of dead-horse arum florets. Nature 420: 625–626.
- Sunde, J., Eiane, S.A., Rustad, A., Jensen, H.B., Opstevedt, J., Nygard, E., Venturini, G., Rungruangsak-Torrissen, K. 2004. Effect of fish feed processing conditions of digestive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquac. Nutr. 10: 261–277.
- Sunde, J., Taranger, G.L., Rungruangsak-Torrissen, K. 2001. Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Physiol. Biochem. 25: 335–345.
- Supannapong, P., Pimsalee, T., A-komol, T., 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, S., Kovitvadhi, U., Somsueb, P. 2013a. Effects of red monaschal rice supplementation on growth, digestive function and oocyte maturation in Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). *Afr. J. Biotechnol.* 12: 6400–6410.
- 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., Tantikitti, C., Kovitvadhi, U. 2015a. Physicochemical modifications of dietary palm kernel meal affect growth and feed utilization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Anim. Feed Sci. Technol.* 202: 90–99.
- Thongprajukaew, K., Yawang, P., Duda, L., Bilanglod, H., Dumrongrittamatt, T., Tantikitti, C., Kovitvadhi, U. 2013b. Physical modification of palm kernel meal improved available carbohydrate, physicochemical properties and *in vitro* digestibility in economic freshwater fish. *J. Sci. Food. Agric.* 93: 3832–3840.
- Torres, F.G., Troncoso, O.P., Amaya, E. 2012. The effect of water on the thermal transitions of fish scales from *Arapaima gigas*. *Mater. Sci. Eng. C* 32: 2212–2214.
- Tuckey, N.P.L., Day, J.R., Miller, M.R. 2013. Determination of volatile compounds in New Zealand Greenshell™ mussels (*Perna canaliculus*) during chilled storage using solid phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chem.* 136: 218–223.

- Turchini, G.M., Moretti V.M., Mentasti, T., Orban, E., Valfre, F. 2005. Effects of dietary lipid source on fillet chemical composition, flavour volatile compounds and sensory characteristics in the freshwater fish tench (*Tinca tinca* L.). *Food Chem.* 102: 1144–1155.
- Tyska, M.J., Warshaw, D.M. 2002. The myosin power stroke. *Cell Mot. Cyto.* 51: 1–15.
- 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.
- Vass, A.A., Barshick, S.A., Segal, G., Caton, J., Skeen, J.T., Love, J.C., Synstelien, J.A. 2002. Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the postmortem interval. *J. Forensic Sci.* 47: 542–553.
- Vass, A.A., Bass, W.B., Wolt, J.D., Foss, J.E., Ammons, J.T. 1992. Time since death determinations of human cadavers using soil solution. *J. Forensic Sci.* 37: 1236–1253.
- Verrez-Bagnis, V., Ladrat, C., Noël, 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.
- Vicentini, C.A., Franceschini-Vicentini, I.B., Bombonato, M.T.S., Bertolucci, B., Lima, S.G., Santos, A.S. 2005. Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. *Int. J. Morphol.* 23: 211–216.
- Visseanguan, W., Benjakul, S., An, H. 2003. Purification and characterization of cathepsin L in arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 134: 477–487.
- von Hoermann, C., Ruther, J., Reibe, S., Madea, B., Ayasse, M. 2011. The importance of carcass volatiles as attractants for the hide beetle *Dermestes maculatus* (De Geer). *Forensic Sci. Int.* 212: 173–179.
- 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, 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.

- Whitfield, F.B., Mottram, D.S. 1992. Volatiles from interactions of Maillard reactions and lipids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 31: 1–58.
- Whitman, D.W., Richardson, M.L. 2010. Necrophagy in grasshoppers: *Taeniopoda eques* feeds on mammal. *J. Orthop. Res.* 19: 377–380.
- Wilkinson, R.J., Paton, N., Porter, M.J.R. 2008. The effects of pre-harvest stress and harvest method on the stress response, rigor onset, muscle pH and drip loss in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 282: 26–32.
- Williams, B.R., Gelman, R.A., Poppke, D.C., Piez, K.A. 1978. Collagen fibril formation—optimal *in vitro* conditions and preliminary kinetic results. *J. Biol. Chem.* 253: 6578–6585.
- 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.
- Wolff, M., Uribe, A., Ortiz, A., Duque, P. 2001. A preliminary study of forensic entomology in Medellin, Colombia. *Forensic Sci. Int.* 120: 53–59.
- 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.
- Yamamoto, K., Yamamoto, Y., Matsumoto, H., Hayase, T., Ojima, K., Matsubayashi, K., Abiru, H., Kazuko, K. 1997. Unusual post-mortem autolytic change in the liver: wavy transformation of hepatocytes. *Med. Sci. Law.* 37: 256–259.
- Yang, W., Gludovatz, B., Zimmermann, E.A., Bale, H.A., Ritchie, R.O., Meyers, M.A. 2013. Structure and fracture resistance of alligator gar (*Atractosteus spatula*) armored fish scales. *Acta Biomater.* 9: 5876–5889.
- 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.

- Zylberberg, L., Bonaventure, J., Cohen-Solal, L., Hartmann, D.J., Bereiter-Hahn, J. 1992. Organization and characterization of fibrillar collagens in fish scales *in situ* and *in vitro*. J. Cell Sci. 103: 273–285.
- Zylberberg, L., Nicolas, G. 1982. Ultrastructure of scales in a teleost (*Carassius auratus* L.) after use of rapid freeze-fixation and freeze-substitution. Cell Tissue Res. 223: 349–367.

## ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

1. การศึกษาครั้งนี้เป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการเบื้องต้น ยังไม่สามารถนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้โดยตรง ควรทำการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวแปรที่จำเพาะต่อการเกิดมลพิษทางน้ำเพิ่มเติม เพื่อประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ เช่น อุณหภูมิของน้ำ ชนิดของมลสาร และค่าพีเอช เป็นต้น หรือทดสอบเกี่ยวกับสถานการณ์ที่เป็นการทำธุรกรรมสัตว์น้ำ เช่น การอดอาหาร การปล่อยสารที่เป็นพิษลงในฟาร์มเลี้ยง หรือตัดกระแสไฟฟ้าทำให้สัตว์น้ำขาดออกซิเจน เป็นต้น นอกจากนี้ปลาต่างชนิดกันอาจมีกลไกการทำงานของร่างกายที่แตกต่างกัน จึงควรดำเนินการทดสอบในปลาชนิดอื่นๆ ด้วย ซึ่งสถานการณ์ดังกล่าวอาจสามารถนำมาใช้ในการพิจารณาของศาลได้
2. ควรศึกษาบทบาทของเอนไซม์โคโมทรินซินและเอนไซม์คาเทปซินเอชเพิ่มเติม เพื่อให้เข้าใจถึงบทบาทการทำงานหลังการตายมากยิ่งขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมที่มีนัยสำคัญ และแตกต่างจากกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ที่ศึกษา
3. ควรศึกษารูปแบบของโปรตีนในกล้ามเนื้อโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในทางชีวเคมีในแต่ละช่วงเวลาหลังการตาย
4. การศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหาร ลำไส้ ตับ และกล้ามเนื้อ ควรทำซ้ำเพิ่มเติม และตรวจวัดข้อมูลทางมอร์โฟเมตริก (morphometric) เพื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้างสมการถดถอยสำหรับพยากรณ์ระยะเวลาหลังการตาย
5. ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับแร่ธาตุปริมาณน้อย (trace elements) จากเกล็ดหลังการตาย เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลในการประมาณระยะเวลาหลังการตายได้แม่นยำยิ่งขึ้น
6. ควรศึกษาสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากในระยะเวลาหลังการตายที่นานขึ้น เนื่องจากมีสารอินทรีย์ระเหยง่ายบางชนิดที่พบตลอดช่วงระยะเวลาหลังการตาย 48 ชั่วโมง หรือพบในช่วงท้ายของการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งมีแนวโน้มที่สามารถพบได้อีกในระยะเวลาถัดไป อีกทั้งยังมีสารบางชนิดที่พบในช่วงที่ 48 หลังการตายเท่านั้น ซึ่งอาจมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นอีกในระยะเวลาหลังการตายที่นานขึ้น

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สำเนาผลงานวิจัยที่นำเสนอแบบบรรยาย  
ในที่ประชุมวิชาการระดับชาติเรื่องที่ 1



## 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* ภายหลังการตาย ในช่วงเวลา 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าดัชนีของกระเพาะอาหารต่อน้ำหนักตัวมีค่าลดลงตามระยะเวลา ( $P < 0.05$ ) และมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเปปซิน ( $r = 0.927, P < 0.01, n = 32$ ) สำหรับการศึกษาในลำไส้พบว่าดัชนีมีค่าลดลงตามระยะเวลาเช่นเดียวกัน ( $P < 0.05$ ) และมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของทริปซิน ( $r = 0.790, P < 0.01, n = 32$ ) โดยการเปลี่ยนแปลงในลำไส้จะเกิดขึ้นเร็วกว่าในกระเพาะอาหาร และไม่สามารถตรวจสอบกิจกรรมได้ ภายหลังการตาย 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) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้โปรตีนและโภชนะอื่น ๆ เกิดการสลายตัว และละลายในตัวกลางที่เป็นน้ำ ทำให้น้ำหนักของกระเพาะอาหารเมื่อเทียบกับน้ำหนักตัวมีแนวโน้มลดลง นอกจากนี้ ภายหลังจากการตายยังมีการเปลี่ยนแปลงของความต้านทานไฟฟ้าของผนังกระเพาะอาหาร 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)

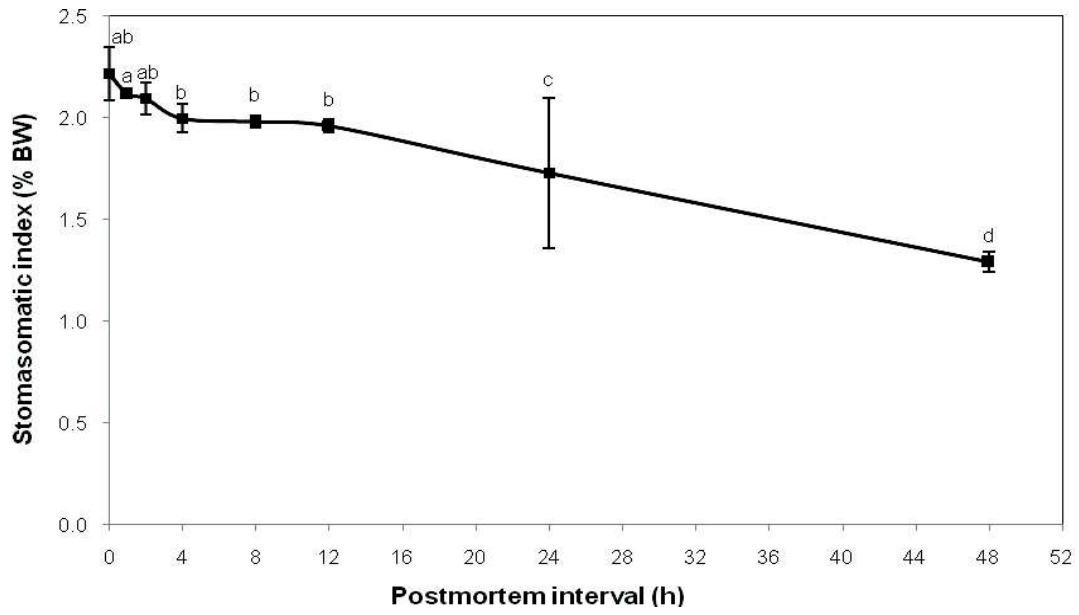


Figure 1 Postmortem changes (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h) of stomasomatic index in Nile tilapia. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Different superscripts indicate significant differences between postmortem intervals ( $P < 0.05$ ).

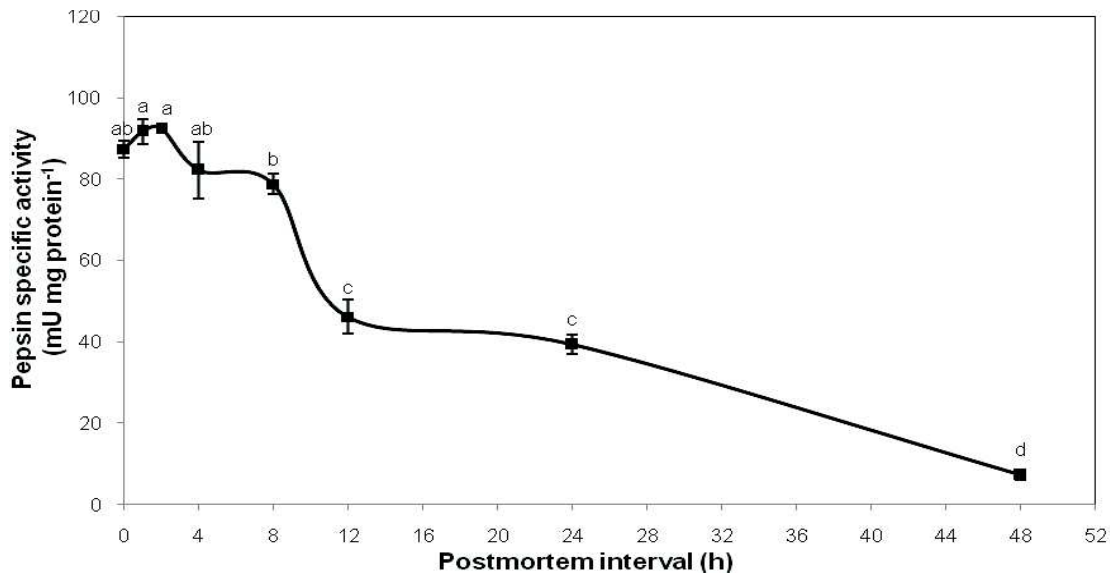


Figure 2 Postmortem changes (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h) of pepsin specific activity (mU mg protein<sup>-1</sup>) in Nile tilapia. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Different superscripts indicate significant differences between postmortem intervals ( $P < 0.05$ ).

## 2. การเปลี่ยนแปลงของลำไส้

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

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

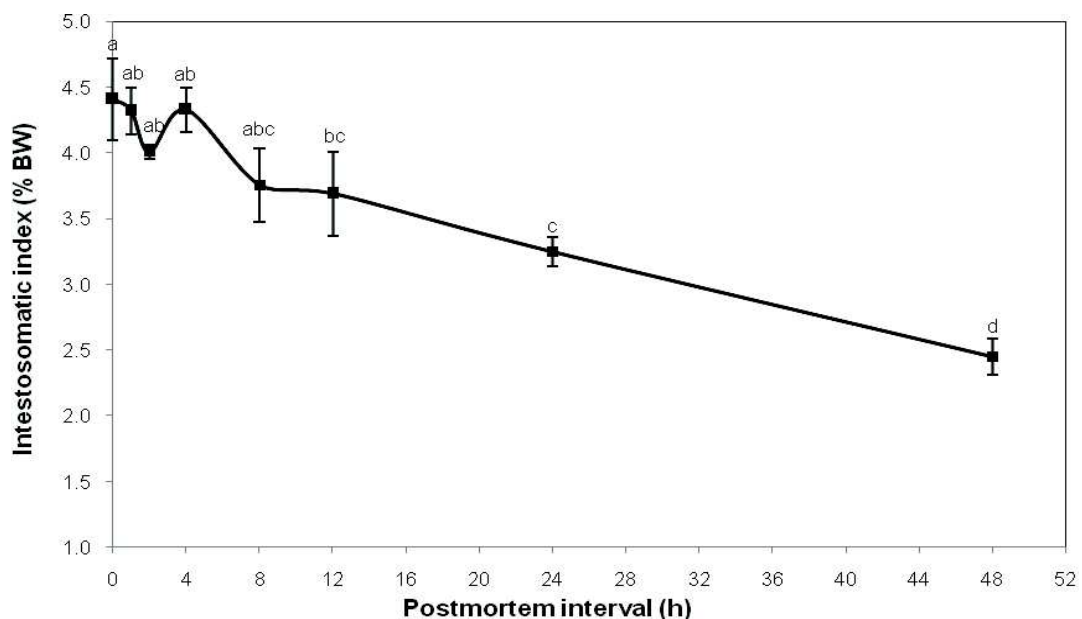


Figure 3 Postmortem changes (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h) of intestosomal index in Nile tilapia.

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

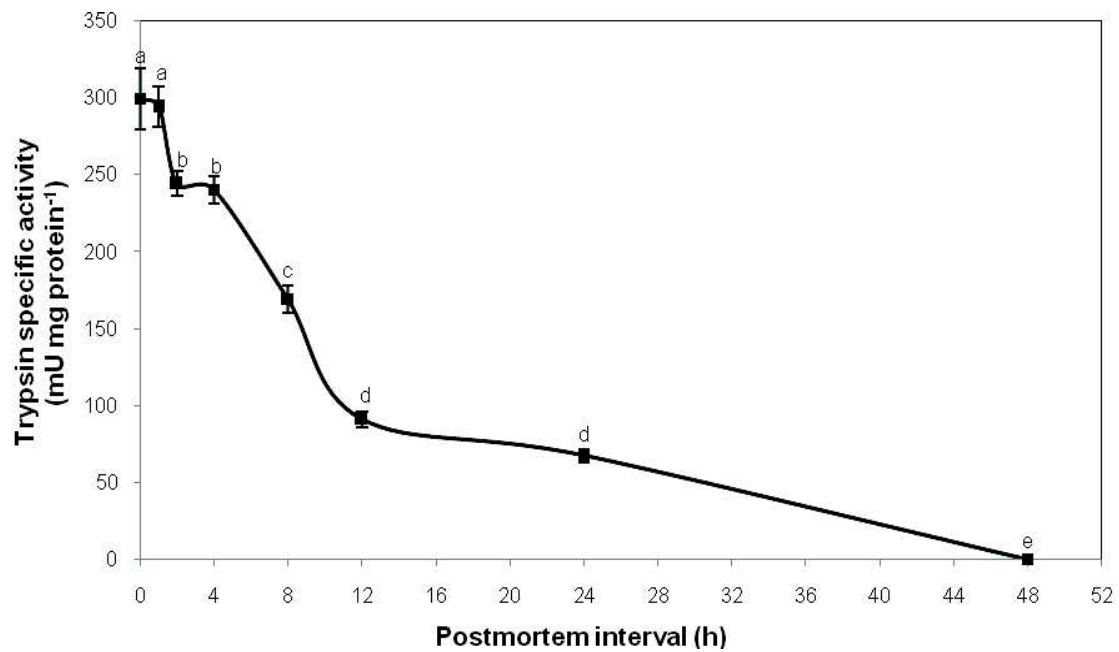


Figure 4 Postmortem changes (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h) of trypsin specific activity (mU mg protein<sup>-1</sup>) in Nile tilapia. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Different superscripts indicate significant differences between postmortem intervals ( $P < 0.05$ ).

### สรุป

ดัชนีของกระเพาะอาหารและลำไส้ต่อน้ำหนักตัวมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาภายหลังการตาย การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์เปปซินและทริปซิน ตามลำดับ โดยการเปลี่ยนแปลงในลำไส้จะเกิดขึ้นเร็วกว่าในกระเพาะอาหาร ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจำแนกระยะเวลาภายหลังการตายของสัตว์น้ำได้

### กิตติกรรมประกาศ

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

### เอกสารอ้างอิง

- จิรวัดณ์ ยงสวัสดิ์ดิกุล และสุริลักษณ์ รอดทอง. 2554. การใช้เอนไซม์จากปลาและกล้ามเนื้อแคทเทปซินที่เรียกในกระบวนการหมักน้ำปลา. รายงานการวิจัย, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- เนตรนรินทร์ ขุนสูงเนิน. 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.

ภาคผนวก ข

สำเนาผลงานวิจัยที่นำเสนอแบบบรรยาย  
ในที่ประชุมวิชาการระดับชาติเรื่องที่ 2



การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อภายหลังการตาย  
ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

Postmortem Changes of Muscle Myosin and Actin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ตุลาคุณ นนทพุท<sup>1</sup> การุณ ทองประจุแก้ว<sup>2\*</sup> สมรักษ์ รอดเจริญ<sup>3</sup> และวารภรณ์ ห่าหอ<sup>1</sup>  
Tulakhun Nonthaput<sup>1</sup>, Karun Thongprajukaew<sup>2\*</sup>, Somrak Rodjaroen<sup>3</sup> and Waraporn Hahor<sup>1</sup>

บทคัดย่อ

ศึกษาการสลายตัวของโปรตีนไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อของปลานิลแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus*) ภายหลังการตายที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ ผลการศึกษาพบโปรตีนไมโอซินและแอกทินในช่วง 24 ชั่วโมงแรกหลังการตาย แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนทั้ง 2 ชนิด ในเวลา 48 ชั่วโมง คุณสมบัติเชิงความร้อนของไมโอซินและแอกทิน ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้น อุณหภูมิพีค อุณหภูมิสุดท้าย และเอนทัลปี รวมทั้งการแสดงออกของโปรตีน สามารถจำแนกระยะเวลาหลังการตายได้ 3 ช่วง คือ ระยะก่อนเกร็งตัว (ภายใน 1 ชั่วโมง) ระยะเกร็งตัว (1 ถึง 24 ชั่วโมง) และระยะหลังเกร็งตัว (หลัง 24 ชั่วโมง) ข้อมูลดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการจำแนกระยะเวลาหลังการตายของสัตว์น้ำได้

คำสำคัญ: กล้ามเนื้อ ไมโอซิน แอกทิน การเปลี่ยนแปลงหลังการตาย

Abstract

Postmortem degradation (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h) of muscle myosin and actin was investigated in sex reversed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a differential scanning calorimeter. Myosin and actin were observed in the first 24 h postmortem time but not at 48 h. Thermal transition properties of myosin and actin (onset, peak and conclusion temperatures, and enthalpy) as well as expression of other protein can divide these postmortem changes into 3 intervals including pre-rigor mortis (within 1 h), rigor mortis (1 to 24 h) and post-rigor mortis (after 24 h). These data could be used for identifying postmortem interval in aquatic animals.

**Keywords:** Muscle, Myosin, Actin, Postmortem Change

<sup>1</sup> นักศึกษาปริญญาโท สาขานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

<sup>2</sup> ผศ.ดร., ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

<sup>3</sup> อ.ดร., สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ตรัง 92150

\* Corresponding author: e-mail: karun.t@psu.ac.th Tel. 0-7428-8562

## บทนำ

ภายหลังการตายของสิ่งมีชีวิต โกลโคเจนที่ร่างกายสะสมไว้ที่ตับและกล้ามเนื้อจะถูกขับออกมา ผ่านกระบวนการสลายในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เกิดเป็นกรดแลคติกสะสมในกล้ามเนื้อ ทำให้ค่าพีเอชของกล้ามเนื้อลดต่ำลง [1] ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อ 3 ระยะ คือ ระยะก่อนเกร็งตัว (Pre-rigor mortis) โดยกล้ามเนื้อจะอ่อนตัว มีรอยเขียวช้ำ และยึดหยุ่น [2] ระยะเกร็งตัว (Rigor mortis) กล้ามเนื้อจะเกิดการเกร็ง แข็งทื่อ และขาดความยืดหยุ่น และระยะหลังเกร็งตัว (Post-rigor mortis) ซึ่งเนื้อจะนิ่ม ไม่ยึดหยุ่น และเสื่อมคุณภาพ [3-4] การเปลี่ยนแปลงหลังการตายเหล่านี้ขึ้นอยู่กับโปรตีนไมโอซิน (Myosin) และแอกทิน (Actin) ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของกล้ามเนื้อสัตว์ที่ทำหน้าที่โดยตรงเกี่ยวกับการหดและคลายตัว [5-6]

การศึกษาการสลายตัวของโปรตีนในกล้ามเนื้อภายหลังการตายส่วนใหญ่จะเน้นในสัตว์บก เช่น ไก่ สุกร และวัว รวมทั้งในมนุษย์ [7-10] สำหรับในสัตว์น้ำมีเฉพาะการศึกษาในตัวอย่างที่เก็บในอุณหภูมิต่ำเพื่อประยุกต์ใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษา หรือคงสภาพผลิตภัณฑ์เป็นหลัก [11] การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสลายตัวของโปรตีนไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อภายหลังการตายในสภาพใกล้เคียงธรรมชาติ โดยใช้ปลาไนล์แปลงเพศ (*Oreochromis niloticus*) เป็นต้นแบบ ข้อมูลที่ได้จะใช้เป็นพื้นฐานในการจำแนกระยะเวลาหลังการตาย (Postmortem interval) ของสัตว์น้ำ รวมทั้งอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมเพื่อระบุช่วงเวลาของการปล่อยมลสารลงในแหล่งน้ำจนทำให้สัตว์น้ำตาย

## วิธีการวิจัย

### 1. การเตรียมตัวอย่างปลาไนล์

นำตัวอย่างปลาไนล์แปลงเพศอายุ 4 เดือน มาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพในบ่อเป็นเวลา 15 วัน โดยให้อาหารที่มีโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้งต่อวัน และให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน คุณภาพน้ำทางเคมีของบ่อปรับสภาพ คือ อุณหภูมิ  $29.60 \pm 0.15$  องศาเซลเซียส พีเอช  $6.95 \pm 0.02$  ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ  $5.05 \pm 0.01$  มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณแอมโมเนีย  $0.94 \pm 0.15$  มิลลิกรัมต่อลิตร

### 2. การเก็บตัวอย่างปลาไนล์

อดอาหารปลาไนล์แปลงเพศก่อนเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นสุ่มปลาที่มีความยาวและน้ำหนักใกล้เคียงกัน (น้ำหนัก  $105.83 \pm 1.66$  กรัม และความยาวเหยียด  $18.55 \pm 0.14$  เซนติเมตร) มาสลบโดยใช้น้ำแข็งและนำมาวางในภาชนะทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า ( $32 \times 43 \times 11$  เซนติเมตร) ที่มีระดับน้ำสูง 7 เซนติเมตร จากนั้นเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อแดง (Red muscle) บริเวณใต้กรีบหลังก้านครีบที่ 3 ถึง 10 ภายหลังการตายที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อน

### 3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของกล้ามเนื้อแดง

วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของกล้ามเนื้อแดงโดยใช้ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (DSC7, PerkinElmer, USA) ในช่วง 25 ถึง 120 องศาเซลเซียส และกำหนดอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนไมโอซินและแอกทิน พิจารณาคามอุณหภูมิที่โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติที่ 47–50 องศาเซลเซียส และ 73–75 องศาเซลเซียสตามลำดับ ตามรายงานวิจัยของ Matos *et al.* [12]

#### 4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ (8 ช่วงเวลา  $\times$  2 ซ้ำ) รายงานผลข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard error of mean: SEM) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบทางเดียวและเปรียบเทียบข้อมูลโดยใช้ Duncan Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

### ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

#### 1. การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซิน

ระยะเวลาหลังการตายมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินในกล้ามเนื้อ คุณลักษณะพิกของไมโอซินได้ ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้น (Onset temperature:  $T_o$ ) อุณหภูมิพิก (Peak temperature:  $T_p$ ) อุณหภูมิสุดท้าย (Conclusion temperature:  $T_c$ ) และเอนทัลปี (Enthalpy:  $\Delta H$ ) ของการเสียดสภาพของโปรตีน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ในช่วงเวลา 0–12 ชั่วโมง แต่มีแนวโน้มลดลงในชั่วโมงที่ 24 ( $P < 0.05$ ) จนไม่สามารถตรวจวัดได้ในช่วงเวลาสุดท้าย (ตารางที่ 1) ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างบางส่วนของไมโอซินมีการเปลี่ยนแปลง (Transformation) ซึ่งอาจเกิดจากการลดลงของค่าพีเอชในกล้ามเนื้อ [1] ทำให้โปรตีนไมโอซินสูญเสียสภาพธรรมชาติ [6] หรือเกิดจากการทำงานของเอนไซม์คาเทปซินแอล (Cathepsin L) ซึ่งเป็นซีสเทอีนโปรติเอสที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไมโอซินในกล้ามเนื้อ [13] และสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิห้อง [14] ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิน้ำที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (24–30 องศาเซลเซียส) หรืออาจเกิดจากกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรติเอสบางชนิด

หลังการตาย 48 ชั่วโมง ไม่พบโปรตีนไมโอซินที่อยู่ในสภาพเดิม (Native protein) ในกล้ามเนื้อแดงของปลานิล (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนชนิดนี้สลายตัวหมด [5] หรืออยู่ในรูปที่เสียดสภาพธรรมชาติ (Denatured protein) ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับระยะเกร็งตัวของปลาแซลมอน (*Salmo salar*) ซึ่งอยู่ระหว่าง 2–24 ชั่วโมง [15] และปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) อยู่ระหว่าง 3–24 ชั่วโมง [16] โดยกล้ามเนื้อของปลาจะเกร็ง แข็งทื่อ แต่ยังไม่สูญเสียโปรตีน แต่หลังจาก 24 ชั่วโมงไปแล้ว จะเข้าสู่ระยะสิ้นสุดการเกร็งตัว ทำให้กล้ามเนื้อนิ่ม เหลว และไม่ยืดหยุ่น เนื่องจากโปรตีนไมโอซินซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของกล้ามเนื้อได้สลายตัวหมดไปแล้ว [5] ผลการศึกษาที่ได้ต่างจากการทดลองในหนู ซึ่งพบว่ามีระยะเกร็งตัวที่ 5–24 ชั่วโมง [17] สำหรับในมนุษย์พบการเปลี่ยนแปลงหลังการตายช้ากว่าในปลาเช่นเดียวกัน โดยการตายในฤดูร้อน (ช่วงอุณหภูมิ 12.0–46.5 องศาเซลเซียส) ระยะเกร็งตัวจะอยู่ที่ 8–30 ชั่วโมง แต่ถ้าตายในฤดูฝน (ช่วงอุณหภูมิ -2.6–35.4 องศาเซลเซียส) ระยะเกร็งตัวจะอยู่ที่ 7–36 ชั่วโมง [18] เนื่องจากกล้ามเนื้อหนูและมนุษย์มีความซับซ้อน และมีหลอดเลือดมาเลี้ยงกล้ามเนื้อ [19] อีกทั้งการศึกษาระยะเวลาหลังการตายของปลาในครั้งนี้กระทำในตู้กลางที่เป็นน้ำ ซึ่งอาจทำให้อัตราการสลายตัวของโปรตีนเกิดขึ้นได้เร็วกว่า เนื่องจากองค์ประกอบหลักส่วนใหญ่ในเซลล์สามารถละลายได้ดีในน้ำ [20]

#### 2. การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนแอกทิน

สมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนแอกทินมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กักระยะเวลาภายหลังการตายเช่นเดียวกับไมโอซิน (ตารางที่ 2) โปรตีนชนิดนี้จะทำหน้าที่ร่วมกับไมโอซินช่วยให้กล้ามเนื้อเกิดการหดและคลายตัว ทำให้อวัยวะสามารถเคลื่อนไหว และช่วยให้ร่างกายสามารถเคลื่อนที่ได้ ดังนั้น เมื่อไมโอซินสลายตัวจะส่งผลให้แอกทินสูญเสียสภาพและสลายตัวตามไปด้วย [6] นอกจากนี้ การสลายตัวของโปรตีนแอกทินยังเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์คาเทปซินบี

(Cathepsin B) และคาเทปซินดี (Cathepsin D) ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายกล้ามเนื้อหลังการตายส่งผลให้กล้ามเนื้ออ่อนตัวลง และเสื่อมประสิทธิภาพ [21]

**ตารางที่ 1** คุณลักษณะเชิงความร้อนของไมโอซินในกล้ามเนื้อแดงของปลานิลแปลงเพศภายหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง

ระยะเวลาหลังการตาย (ชั่วโมง)	T <sub>o</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH (J g <sup>-1</sup> )
0	41.92 ± 0.33 <sup>ab</sup>	46.25 ± 0.35 <sup>a</sup>	48.72 ± 0.42 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.01 <sup>a</sup>
1	43.50 ± 0.26 <sup>ab</sup>	47.33 ± 0.01 <sup>a</sup>	49.92 ± 0.27 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.02 <sup>a</sup>
2	43.17 ± 0.36 <sup>ab</sup>	47.59 ± 0.12 <sup>a</sup>	52.12 ± 0.75 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.01 <sup>a</sup>
4	44.91 ± 0.75 <sup>a</sup>	47.84 ± 0.47 <sup>a</sup>	49.93 ± 0.79 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.19 <sup>a</sup>
8	43.18 ± 0.90 <sup>ab</sup>	46.34 ± 1.18 <sup>a</sup>	48.80 ± 0.95 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.16 <sup>a</sup>
12	44.65 ± 0.83 <sup>a</sup>	48.34 ± 0.47 <sup>a</sup>	50.54 ± 0.50 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>a</sup>
24	39.60 ± 1.54 <sup>b</sup>	42.25 ± 1.29 <sup>b</sup>	44.35 ± 1.10 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.06 <sup>b</sup>
48	nd	nd	nd	nd

nd, ตรวจไม่พบ; T<sub>o</sub>, อุณหภูมิเริ่มต้น; T<sub>p</sub>, อุณหภูมิพีค; T<sub>c</sub>, อุณหภูมิสุดท้าย; ΔH, เอนทาลปี

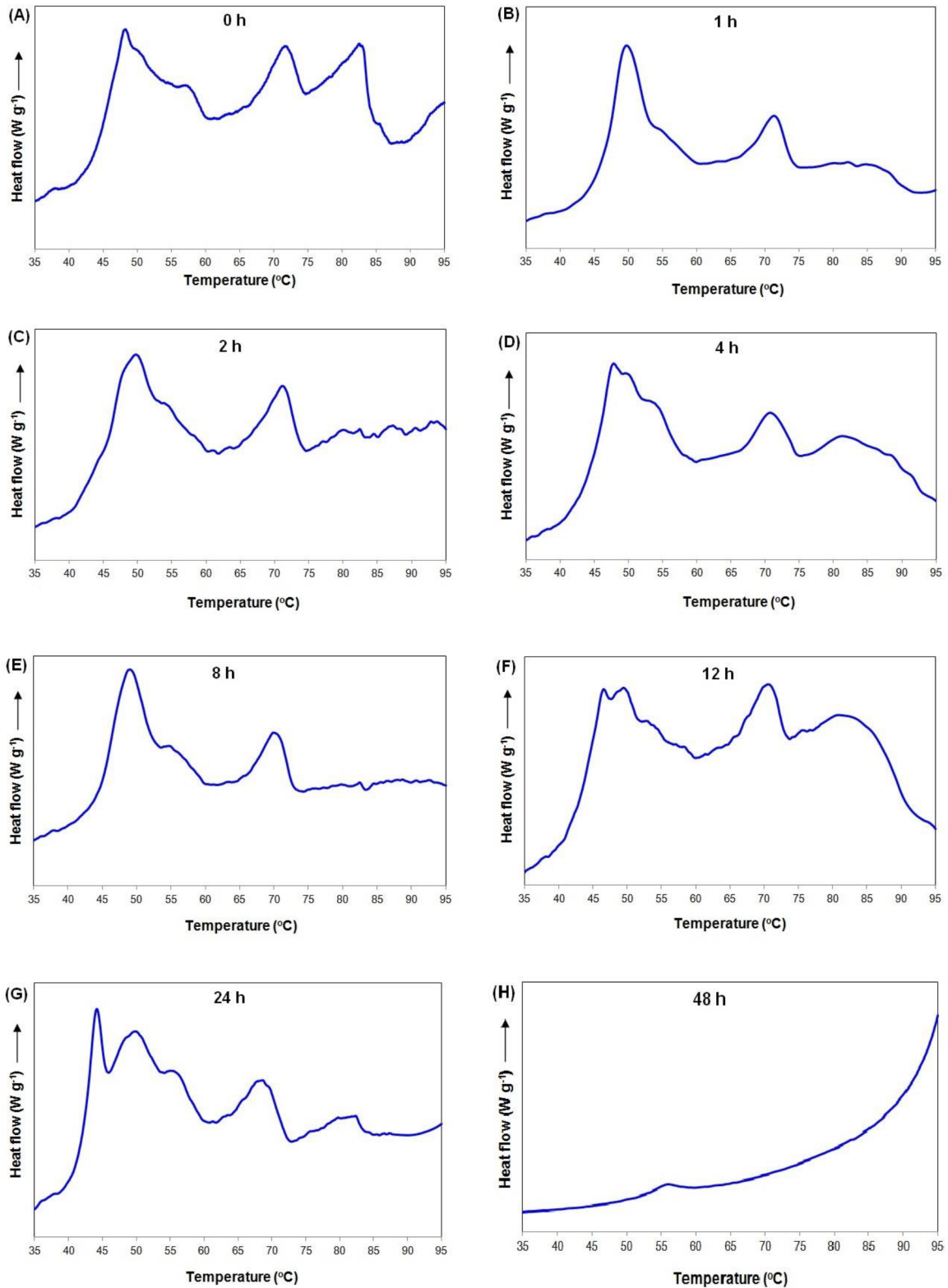
อักษร a และ b ที่ต่างกันในกลุ่มนี้เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

**ตารางที่ 2** คุณลักษณะเชิงความร้อนของแอกทินในกล้ามเนื้อแดงของปลานิลแปลงเพศภายหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง

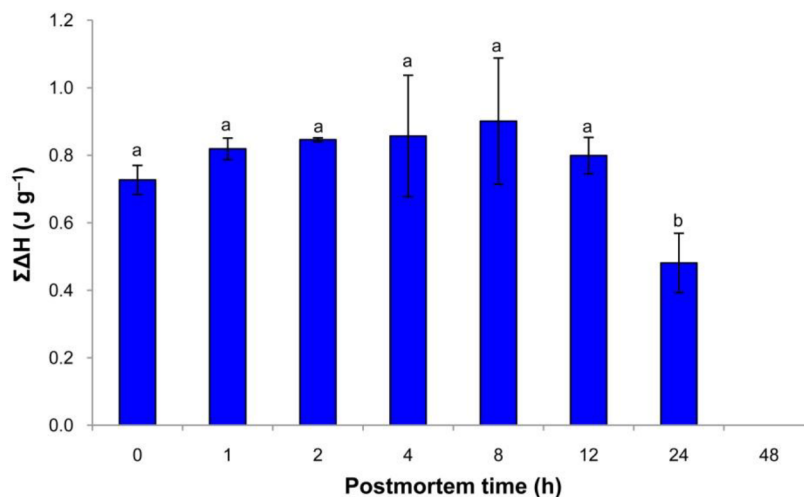
ระยะเวลาหลังการตาย (ชั่วโมง)	T <sub>o</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH (J g <sup>-1</sup> )
0	66.33 ± 0.24 <sup>a</sup>	70.84 ± 0.06 <sup>a</sup>	73.47 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.03 <sup>a</sup>
1	68.01 ± 0.01 <sup>a</sup>	71.92 ± 0.24 <sup>a</sup>	74.57 ± 0.42 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.01 <sup>a</sup>
2	68.50 ± 0.88 <sup>a</sup>	71.59 ± 0.12 <sup>a</sup>	73.71 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.02 <sup>a</sup>
4	67.48 ± 0.07 <sup>a</sup>	70.92 ± 0.01 <sup>a</sup>	73.43 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.01 <sup>a</sup>
8	67.68 ± 0.55 <sup>a</sup>	70.92 ± 0.01 <sup>a</sup>	73.50 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.03 <sup>a</sup>
12	68.13 ± 0.35 <sup>a</sup>	71.58 ± 0.01 <sup>a</sup>	74.16 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.29 ± 0.04 <sup>a</sup>
24	62.89 ± 1.20 <sup>b</sup>	67.00 ± 1.18 <sup>b</sup>	69.95 ± 1.02 <sup>b</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>a</sup>
48	nd	nd	nd	nd

nd, ตรวจไม่พบ; T<sub>o</sub>, อุณหภูมิเริ่มต้น; T<sub>p</sub>, อุณหภูมิพีค; T<sub>c</sub>, อุณหภูมิสุดท้าย; ΔH, เอนทาลปี

อักษร a และ b ที่ต่างกันในกลุ่มนี้เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )



ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนในกล้ามเนื้อแดงของปลานิลภายหลังการตาย (A = 0 ชั่วโมง, B = 1 ชั่วโมง, C = 2 ชั่วโมง, D = 4 ชั่วโมง, E = 8 ชั่วโมง, F = 12 ชั่วโมง, G = 24 ชั่วโมง และ H = 48 ชั่วโมง)



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงเอนทาลปีรวมในกล้ามเนื้อแดงของปลานิลภายหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง อักษร a และ b ที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

นอกจากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนไมโอซินและแอกทินแล้ว ยังตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนบางชนิด (ภาพที่ 1A และ 1H) ซึ่งคาดว่าเป็นซาร์โคพลาสมิคโปรตีน (Sarcoplasmic protein) ที่แขวนลอยอยู่ในส่วนของซาร์โคพลาสซึม [12] หรืออาจเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของโปรตีนไมโอซินหรือแอกทิน โปรตีนดังกล่าวมีการตอบสนองต่อระยะเวลาภายหลังการตายเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาผลรวมของเอนทาลปีซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณของโปรตีนที่อยู่ในสภาพเดิม พบว่าค่าดังกล่าวมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วหลังจาก 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่าในช่วงเวลาดังกล่าวโปรตีนมีอัตราของการสลายตัวหรือเสถียรภาพธรรมชาติในอัตราที่สูงกว่าช่วงเวลาอื่นๆ

### สรุปผลการวิจัย

ระยะเวลาหลังการตายมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและแอกทิน เมื่อพิจารณาผลรวมของเอนทาลปี รูปแบบของเทอร์โมแกรม และการแสดงออกของโปรตีนสามารถจำแนกระยะเวลาหลังการตายได้ 3 ช่วงคือ ระยะก่อนเกร็งตัว (ภายใน 1 ชั่วโมง) ระยะเกร็งตัว (1 ถึง 24 ชั่วโมง) และระยะหลังเกร็งตัว (หลัง 24 ชั่วโมง) อย่างไรก็ตาม การแบ่งระยะดังกล่าวจำเป็นต้องยืนยันผลและศึกษาเพิ่มเติมในพารามิเตอร์อื่นที่เกี่ยวข้อง ข้อมูลจากการศึกษาเบื้องต้นนี้สามารถนำมาใช้ในการจำแนกระยะเวลาหลังการตายของสัตว์น้ำ รวมทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับมลพิษทางน้ำได้

### คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัยทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททั่วไป (เลขที่สัญญา SC1570522S) และทุนวิจัยจากภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

## เอกสารอ้างอิง

- [1] Bayliss, P. (1996). Chemistry in the kitchen: fish and fish products. **Nutrition and Food Science**. 96(1), 41–43.
- [2] Shahidi, F. and Botta, J.R. (1994). **Seafoods chemistry, processing technology and quality**. London. Chapman and Hall.
- [3] Fraser, O.P. and Sumar, S. (1998). Composition changes and spoilage fish (part II) microbiological induced deterioration. **Nutrition and Food Science**. 98(6), 325–329.
- [4] Chytiri, S., Chouliara, I., Savvaidis, I.N. and Kontominas, M.G. (2004). Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. **Food Microbiology**. 21(2), 157–165.
- [5] McMahon, T.A. (1984). **Muscles, reflexes and locomotion**. New Jersey. Princeton University Press.
- [6] Tyska, M.J. and Warshaw, D.M. (2002). The myosin power stroke. **Cell Motility and the Cytoskeleton**. 51(1), 1–15.
- [7] Bircan, C. and Barringerd, S.A. (2002). Determination of protein denaturation of muscle foods using the dielectric properties. **Journal of Food Science**. 67(1), 202–205.
- [8] Deng, Y., Rosenvold, K., Karlsson, A.H., Horn, P., Hedegaard, J., Steffensen, C.L. and Andersen, H.J. (2002). Relationship between thermal denaturation of porcine muscle proteins and water-holding capacity. **Journal of Food Science**. 67(5), 1642–1647.
- [9] Gzásó, I., Kránicz, J., Bellyei, A. and Lőrinczy, D. (2003). DSC analysis of the abnormalities of human leg skeletal muscles: A preliminary study. **Thermochimica Acta**. 402(1–2), 117–122.
- [10] McDonnell, C.K., Allen, P., Morin, C. and Lyng, J.G. (2014). The effect of ultrasonic salting on protein and water–protein interactions in meat. **Food Chemistry**. 147(1), 245–251.
- [11] Herrera, J.J., Pastoriza, L. and Sampedro, G. (2001). A DSC study on the effects of various maltodextrins and sucrose on protein changes in frozen-stored minced blue whiting muscle. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 81(4), 377–384.
- [12] Matos, E., Silva, T.S., Tiago, T., Aureliano, M., Dinis, M.T. and Dias, J. (2011). Effect of harvesting stress and storage conditions on protein degradation in fillets of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*): A differential scanning calorimetry study. **Food Chemistry**. 126(1), 270–276.
- [13] Ho, M.L., Chen, G.H. and Jiang, S.T. (2000). Effect of mackerel cathepsins L and L like, and calpain on the degradation of mackerel surimi. **Fisheries Science**. 66(3), 558–568.
- [14] Astier, C., Labbe, J.P., Roustan, C. and Benyamin, Y. (1991). Sarcomeric disorganization in post-mortem fish muscles. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 100(3), 459–465.
- [15] Roth, B., Slinde, E. and Arildsen, J. (2006). Pre or post mortem muscle activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). The effect on rigor mortis and the physical properties of flesh. **Aquaculture**. 257(1–4), 504–510.

- [16] Wilkinson, R.J., Paton, N. and Porter, M.J.R. (2008). The effects of pre-harvest stress and harvest method on the stress response, rigor onset, muscle pH and drip loss in barramundi (*Lates calcarifer*). **Aquaculture**. 282(1–4), 26–32.
- [17] Krompecher, T. (1994). Experimental evaluation of rigor mortis. VIII. Estimation of time since death by repeated measurements of the intensity of rigor mortis on rats. **Forensic Science International**. 68(3), 149–159.
- [18] Dalal, J.S., Tejpal, H.R., Chanana, A. and Kaur, N. (2006). Medicolegal study of rigor mortis to estimate postmortem interval. **Journal of Indian Academy of Forensic Medicine**. 28(2), 971–973.
- [19] Gillis, G.B. and Biewener, A.A. (2001). Hindlimb muscle function in relation to speed and gait: *in vivo* patterns of strain and activation in a hip and knee extensor of the rat (*Rattus norvegicus*). **Journal of Experimental Biology**. 204(Pt 15), 2717–2731.
- [20] Baroni, L., Cenci, L., Tettamanti, M. and Berati, M. (2007). Evaluating the environmental impact of various dietary patterns combined with different food production systems. **European Journal of Clinical Nutrition**. 61(2), 279–286.
- [21] Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J. and 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 Chemistry**. 81(4), 517–525.



ภาคผนวก ค

สำเนาผลงานวิจัยในภาคผนวก ข  
ที่ถูกคัดเลือกให้ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อน  
ในกล้ามเนื้อภายหลังการตายของปลาไน  
(*Oreochromis niloticus*)

Postmortem Changes in Thermal Property of  
Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Muscle

ตุลาคุณ นนทพุท<sup>1</sup> การุณ ทองประจุแก้ว<sup>2\*</sup>  
สมรักษ์ รอดเจริญ<sup>3</sup> และวารภรณ์ ห่าหอ<sup>1</sup>

Tulakhun Nonthaput<sup>1</sup>, Karun Thongprajukaew<sup>2\*</sup>,  
Somrak Rodjaroen<sup>3</sup> and Waraporn Hahor<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112  
<sup>2</sup>ผศ.ดร., ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112  
<sup>3</sup>อ.ดร., สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ตรีัง 92150

## บทคัดย่อ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนในกล้ามเนื้อแดงของปลาไนล์แปลงเพศ (*Oreochromis niloticus*) ภายหลังจากการตายที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ ผลการศึกษาพบโปรตีนไมโอซินและแอกทินในช่วง 24 ชั่วโมงแรกหลังการตาย แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนทั้ง 2 ชนิด ในเวลา 48 ชั่วโมง คุณลักษณะเชิงความร้อนของไมโอซินและแอกทิน ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้น อุณหภูมิพีค อุณหภูมิสุดท้าย และเอนทัลปี รวมทั้งการแสดงออกของโปรตีน สามารถจำแนกระยะเวลาหลังการตายได้ 3 ช่วง คือระยะก่อนเกร็งตัว (ภายใน 1 ชั่วโมง) ระยะเกร็งตัว (1 ถึง 24 ชั่วโมง) และระยะหลังเกร็งตัว (หลัง 24 ชั่วโมง) ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของกล้ามเนื้อสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการประมาณระยะเวลาหลังการตายของสัตว์น้ำได้

**คำสำคัญ :** ไมโอซิน แอกทิน การเปลี่ยนแปลงหลังการตาย

## Abstract

Postmortem changes (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h) in muscle thermal transition property were investigated in sex reversed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a differential scanning calorimeter. Myosin and actin were observed in the first 24 h postmortem times but not at 48 h. Thermal transition property of myosin and actin (onset, peak and conclusion temperatures, and enthalpy) as well as expression of other proteins can divide these postmortem changes into 3 intervals, including pre-rigor mortis (within 1 h after death), rigor mortis (1 to 24 h after death) and post-rigor mortis (exceeding 24 h after death). The findings suggest that the thermal changes of muscle can serve as primary data for the estimation of time of death of an aquatic animal.

**Keywords :** Myosin, Actin, Postmortem Change

## บทนำ

ภายหลังการตายของสิ่งมีชีวิต โกลโคเจนที่ร่างกายสะสมไว้ที่ตับและกล้ามเนื้อจะถูกขับออกมา ผ่านกระบวนการสลายในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เกิดเป็นกรดแลคติกสะสมในกล้ามเนื้อ ทำให้ค่าพีเอชของกล้ามเนื้อลดต่ำลง [1] ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อ 3 ระยะ คือ ระยะก่อนเกร็งตัว (Pre-rigor mortis) โดยกล้ามเนื้อจะอ่อนตัว มีรอยเขียวช้ำและยึดหยุ่น [2] ระยะเกร็งตัว (Rigor mortis) กล้ามเนื้อจะเกิดการเกร็ง แข็งทื่อ และขาดความยืดหยุ่น และระยะหลังเกร็งตัว (Post-rigor mortis) ซึ่งเนื้อจะนิ่ม ไม่ยึดหยุ่น และเสื่อมคุณภาพ [3-4] การเปลี่ยนแปลงหลังการตายเหล่านี้ขึ้นอยู่กับโปรตีนไมโอซิน (Myosin) และแอกทิน (Actin) ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของกล้ามเนื้อสัตว์ที่ทำหน้าที่โดยตรงเกี่ยวกับการหดและคลายตัว [5-6] เมื่อสัตว์ตาย เซลล์กล้ามเนื้อขาดพลังงานจากการหายใจ แอกทินกับไมโอซินจะจับกันแน่น รวมตัวกันเป็นแอกโทไมโอซิน กล้ามเนื้อจึงหดตัว แต่ไม่คลายตัวเนื่องจากขาด ATP ทำให้ซากสัตว์แข็งทื่ออยู่ระยะหนึ่งหลังจากตาย [6] ซึ่งโปรตีนทั้งสองจะสลายตัวหลังการตายโดยเอนไซม์ คาเทปซิน (Cathepsin) [7-8] และสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (Differential scanning calorimeter) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนที่แสดงถึงการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนได้ [9-12]

การศึกษาการสลายตัวของโปรตีนในกล้ามเนื้อภายหลังการตายส่วนใหญ่เน้นในสัตว์บก เช่น ไก่ สุกร และวัว รวมทั้งในมนุษย์ [13-16] สำหรับในสัตว์น้ำมีเฉพาะการศึกษาในตัวอย่างที่เก็บในอุณหภูมิต่ำเพื่อประยุกต์ใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษา หรือคงสภาพผลิตภัณฑ์เป็นหลัก [17] การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสลายตัวของโปรตีนไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อภายหลังการตายในสภาพใกล้เคียงธรรมชาติโดยใช้ปลาชนิดแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus*) เป็นต้นแบบ เนื่องจากปลาชนิดนี้มีข้อมูลพื้นฐานทางด้านชีววิทยาค่อนข้างมาก [18-20] อีกทั้งเป็นปลาที่สามารถปรับตัวให้เข้ากับธรรมชาติได้ง่าย กินอาหารได้หลายชนิด เจริญเติบโตเร็ว และเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจระดับโลก [21-22] ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการจำแนกระยะเวลาหลังการตาย (Postmortem interval) ของสัตว์น้ำ รวมทั้งอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (Environmental forensics) เพื่อระบุช่วงเวลาของการปล่อยสารที่ทำให้เกิดพิษ (มลสาร) ลงในแหล่งน้ำ หรืออาจใช้สำหรับสืบสวนและสอบสวนคดีความที่เกี่ยวข้องกับการตายของสัตว์น้ำในฟาร์มเลี้ยง (Fisheries forensics)

## ระเบียบวิธีการศึกษา

### 1. การเตรียมตัวอย่างปลาชนิด

นำตัวอย่างปลาชนิดปลานิลแปลงเพศอายุ 4 เดือน มาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพในบ่อเป็นเวลา 15 วัน โดยให้อาหารที่มีโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้งต่อวัน และให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน คุณภาพน้ำทางเคมีของบ่อปรับสภาพ คือ อุณหภูมิ  $29.60 \pm 0.15$  องศาเซลเซียส พีเอช  $6.95 \pm 0.02$  ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ  $5.05 \pm 0.01$  มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณแอมโมเนีย  $0.94 \pm 0.15$  มิลลิกรัมต่อลิตร

### 2. การเก็บตัวอย่างปลาชนิด

อดอาหารปลานิลแปลงเพศก่อนเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นสุ่มปลาที่มีความยาวและน้ำหนักใกล้เคียงกัน (น้ำหนัก  $105.83 \pm 1.66$  กรัม และความยาวเหยียด  $18.55 \pm 0.14$  เซนติเมตร) มาสลบโดยใช้น้ำแข็งและนำมาวางในภาชนะทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า ( $32 \times 43 \times 11$  เซนติเมตร) ที่มีระดับน้ำสูง 7 เซนติเมตร จากนั้นเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อแดง (Red muscle) บริเวณใต้ครีบหลังก้านครีบที่ 3 ถึง 10 ภายหลังจากตายที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อน

### 3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของกล้ามเนื้อแดง

วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของกล้ามเนื้อแดงโดยใช้ดีพีเฟอร์นเซียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (DSC7, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) ในช่วง 25 ถึง 120 องศาเซลเซียส และกำหนดอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ต่อนาที การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนไมโอซินและแอกทิน พิจารณาตามอุณหภูมิที่โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติที่ 47–50 องศาเซลเซียส และ 73–75 องศาเซลเซียสตามลำดับตามรายงานวิจัยของ Matos et al. [12]

### 4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ (8 ช่วงเวลา  $\times$  2 ซ้ำ) รายงานผลข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard error of mean: SEM) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบทางเดียวและเปรียบเทียบข้อมูลโดยใช้ Duncan Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

## ผลการศึกษาและการอภิปรายผล

### 1. การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซิน

ระยะเวลาหลังการตายมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซิน ในกล้ามเนื้อ คุณลักษณะพีคของไมโอซินได้ ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้น (Onset temperature:  $T_o$ ) อุณหภูมิพีค (Peak temperature:  $T_p$ ) อุณหภูมิสุดท้าย (Conclusion temperature:  $T_c$ ) และเอนทัลปี (Enthalpy:  $\Delta H$ ) ของการเสียดสภาพของโปรตีน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ในช่วงเวลา 0–12 ชั่วโมง แต่มีแนวโน้มลดลงในช่วงเวลาที่ 24 ( $P < 0.05$ ) จนไม่สามารถตรวจวัดได้ในช่วงเวลาล่าสุดท้าย (ตารางที่ 1) ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างบางส่วนของไมโอซินมีการเปลี่ยนแปลง (Transformation) ซึ่งอาจเกิดจากการลดลงของค่าพีเอชในกล้ามเนื้อ [1] ทำให้โปรตีนไมโอซินสูญเสียสภาพธรรมชาติ [6] หรือเกิดจากการทำงานของเอนไซม์คาเทปซินแอล (Cathepsin L) ซึ่งเป็นซีสโตอินโปรติเอสที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไมโอซินในกล้ามเนื้อ [7] และสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิห้อง [23] ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิน้ำที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (24–30 องศาเซลเซียส) หรืออาจเกิดจากกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรติเอสบางชนิด

หลังการตาย 48 ชั่วโมง ไม่พบโปรตีนไมโอซินที่อยู่ในสภาพเดิม (Native protein) ในกล้ามเนื้อแดงของปลานิล (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนชนิดนี้สลายตัวหมด [5] หรืออยู่ในรูปที่เสียดสภาพธรรมชาติ (Denatured protein) ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับระยะเกร็งตัวของปลาแซลมอน (*Salmo salar*) ซึ่งอยู่ระหว่าง 2–24 ชั่วโมง [24] และปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) อยู่ระหว่าง 3–24 ชั่วโมง [25] โดยกล้ามเนื้อของปลาจะเกร็ง แข็งทื่อ แต่ยังไม่สูญเสียโปรตีน แต่หลังจาก 24 ชั่วโมงไปแล้ว จะเข้าสู่ระยะสิ้นสุดการเกร็งตัว ทำให้กล้ามเนื้อนิ่ม เหลว และไม่ยืดหยุ่น เนื่องจากโปรตีนไมโอซินซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของกล้ามเนื้อได้สลายตัวหมดไปแล้ว [5] ผลการศึกษาก็ได้ต่างจากการทดลองในหนู ซึ่งพบว่ามีระยะเกร็งตัวที่ 5–24 ชั่วโมง [26] สำหรับในมนุษย์พบการเปลี่ยนแปลงหลังการตายช้ากว่าในปลาเช่นเดียวกัน โดยการตายในฤดูร้อน (ช่วงอุณหภูมิ 12.0–46.5 องศาเซลเซียส) ระยะเกร็งตัวจะอยู่ที่ 8–30 ชั่วโมง แต่ถ้าตายในฤดูฝน (ช่วงอุณหภูมิ –2.6–35.4 องศาเซลเซียส) ระยะเกร็งตัวจะอยู่ที่ 7–36 ชั่วโมง [27] เนื่องจากกล้ามเนื้อหนูและมนุษย์มีความซับซ้อน และมีหลอดเลือดมาเลี้ยงกล้ามเนื้อ [28] อีกทั้งการศึกษาระยะเวลาหลังการตายของปลาในครั้งนี้กระทำในตัวกลางที่เป็นน้ำ ซึ่งอาจทำให้อัตราการสลายตัวของโปรตีนเกิดขึ้นได้เร็วกว่า เนื่องจากองค์ประกอบหลักส่วนใหญ่ในเซลล์สามารถละลายได้ดีในน้ำ [29]

## 2. การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนแอกทิน

สมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนแอกทินมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กักระยะเวลาภายหลังการตายเช่นเดียวกับไมโอซิน (ตารางที่ 2) โปรตีนชนิดนี้จะทำหน้าที่ร่วมกับไมโอซินช่วยให้กล้ามเนื้อเกิดการหดและคลายตัว ทำให้อวัยวะสามารถเคลื่อนตัว และช่วยให้ร่างกายสามารถเคลื่อนที่ได้ ดังนั้น เมื่อไมโอซินสลายตัวจะส่งผลให้แอกทินสูญเสียสภาพและสลายตัวตามไปด้วย [6] นอกจากนี้ การสลายตัวของโปรตีนแอกทินยังเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์คาเทปซินบี (Cathepsin B) และคาเทปซินดี (Cathepsin D) ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายกล้ามเนื้อหลังการตายส่งผลให้กล้ามเนื้ออ่อนตัวลง และเสื่อมประสิทธิภาพ [8]

นอกจากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนไมโอซินและแอกทินแล้ว ยังตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนบางชนิด (ภาพที่ 1a และ 1h) ซึ่งคาดว่าเป็นซาร์โคพลาสมิคโปรตีน (Sarcoplasmic protein) ที่แขวนลอยอยู่ในส่วนของซาร์โคพลาสซึม [12] หรืออาจเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของโปรตีนไมโอซินหรือแอกทิน โปรตีนดังกล่าวมีการตอบสนองต่อระยะเวลาภายหลังการตายเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาผลรวมของเอนทัลปีซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณของโปรตีนที่อยู่ในสภาพเดิม พบว่าค่าดังกล่าวมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วหลังจาก 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่าในช่วงเวลาดังกล่าวโปรตีนมีอัตราของการสลายตัวหรือเสถียรภาพธรรมชาติในอัตราที่สูงกว่าช่วงเวลาอื่น ๆ

## สรุปผลการศึกษา

ระยะเวลาหลังการตายมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและแอกทิน เมื่อพิจารณาผลรวมของเอนทัลปี รูปแบบของเทอร์โมแกรม และการแสดงออกของโปรตีนสามารถจำแนกระยะเวลาหลังการตายได้ 3 ช่วงคือ ระยะก่อนเกร็งตัว (ภายใน 1 ชั่วโมง) ระยะเกร็งตัว (1 ถึง 24 ชั่วโมง) และระยะหลังเกร็งตัว (หลัง 24 ชั่วโมง) ข้อมูลจากการศึกษาเบื้องต้นนี้สามารถนำมาใช้ในการจำแนกระยะเวลาหลังการตายของสัตว์น้ำ รวมทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับมลพิษทางน้ำ หรือในกรณีที่สัตว์น้ำตายในฟาร์มหรือแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งเกี่ยวข้องกับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์การประมง

## คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททั่วไป (เลขที่สัญญาSCI570522S) และทุนวิจัยจากภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

## เอกสารอ้างอิง

- [1] Bayliss, P. (1996). "Chemistry in the kitchen: fish and fish products", **Nutrition and Food Science**. 96(1), 41–43.
- [2] Shahidi, F. and Botta, J.R. (1994). **Seafoods chemistry, processing technology and quality**. London: Chapman and Hall.
- [3] Fraser, O.P. and Sumar, S. (1998). "Composition changes and spoilage fish (part II) microbiological induced deterioration", **Nutrition and Food Science**. 98(6), 325–329.
- [4] Chytiri, S., Chouliara, I., Savvaidis, I.N. and Kontominas, M.G. (2004). "Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout", **Food Microbiology**. 21(2), 157–165.
- [5] McMahon, T.A. (1984). **Muscles, reflexes and locomotion**. New Jersey : Princeton University Press.
- [6] Tyska, M.J. and Warshaw, D.M. (2002). "The myosin power stroke". **Cell Motility and the Cytoskeleton**. 51(1), 1–15.
- [7] Ho, M.L., Chen, G.H. and Jiang, S.T. (2000). "Effect of mackerel cathepsins L and L like, and calpain on the degradation of mackerel surimi", **Fisheries Science**. 66(3), 558–568.
- [8] Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J. and 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 Chemistry**. 81(4), 517–525.



- [9] Schubring, R. (1999). “DSC studies on deep frozen fishery products”, **Thermochimica Acta**. 337(1–2), 89–95.
- [10] Kuo, H.L., Chen, M.T., Liu, D.C. and Lin, L.C. (2005). “Relationship between thermal properties of muscle proteins and pork quality”, **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. 18(3), 427–432.
- [11] Beyrer, M. and Klaas, M.R. (2007). “Influence of freezing and of frozen storage on the specific heat capacity of trout and herring fillet”, **European Food Research and Technology**. 224(3), 349–353.
- [12] Matos, E., Silva, T.S., Tiago, T., Aureliano, M., Dinis, M.T. and Dias, J. (2011). “Effect of harvesting stress and storage conditions on protein degradation in fillets of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*): A differential scanning calorimetry study”, **Food Chemistry**. 126(1), 270–276.
- [13] Bircan, C. and Barringerd, S.A. (2002). “Determination of protein denaturation of muscle foods using the dielectric properties”, **Journal of Food Science**. 67(1), 202–205.
- [14] Deng, Y., Rosenvold, K., Karlsson, A.H., Horn, P., Hedegaard, J., Steffensen, C.L. and Andersen, H.J. (2002). Relationship between thermal denaturation of porcine muscle proteins and water-holding capacity. **Journal of Food Science**. 67(5), 1642–1647.
- [15] Gászó, I., Kránicz, J., Bellyei, A. and Lőrinczy, D. (2003). “DSC analysis of the abnormalities of human leg skeletal muscles: A preliminary study”, **Thermochimica Acta**. 402(1–2), 117–122.
- [16] McDonnell, C.K., Allen, P., Morin, C. and Lyng, J.G. (2014). “The effect of ultrasonic salting on protein and water–protein interactions in meat”, **Food Chemistry**. 147(1), 245–251.

- [17] Herrera, J.J., Pastoriza, L. and Sampedro, G. (2001). "A DSC study on the effects of various maltodextrins and sucrose on protein changes in frozen-stored minced blue whiting muscle", **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 81(4), 377–384.
- [18] Morrison, C.M. and Wright Jr, J.R. (1999). "A study of the histology of the digestive tract of the Nile tilapia", **Journal of Fish Biology**. 54, 597–606.
- [19] Nielsen, L.B. and Nielsen, H.H. (2001). "Purification and characterization of cathepsin D from herring muscle (*Clupea harengus*)", **Comparative Biochemistry and Physiology**. 128, 351–363.
- [20] Wang, Q., Gao, Z., Zhang, N., Shi, Y., Xie, X. and Chen, Q. (2010). "Purification and characterization of trypsin from the intestine of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)", **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58, 655–659.
- [21] อุดม เรืองนพคุณ. (2549). **การเพาะพันธุ์และเลี้ยงปลาไนล์**. กรุงเทพฯ : เกษตรสยามบุ๊คส์
- [22] De Silva, S.S., Subasinghe, R.P., Bartley, D.M. and Lowther, A. (2004). **Tilapias as alien aquatics in Asia and the Pacific: a review**. Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- [23] Astier, C., Labbe, J.P., Roustan, C. and Benyamin, Y. (1991). "Sarcomeric disorganization in post-mortem fish muscles", **Comparative Biochemistry and Physiology**. 100(3), 459–465.
- [24] Roth, B., Slinde, E. and Arildsen, J. (2006). "Pre or post mortem muscle activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). The effect on rigor mortis and the physical properties of flesh", **Aquaculture**. 257(1–4), 504–510.
- [25] Wilkinson, R.J., Paton, N. and Porter, M.J.R. (2008). "The effects of pre-harvest stress and harvest method on the stress response, rigor onset, muscle pH and drip loss in barramundi (*Lates calcarifer*)", **Aquaculture**. 282(1–4), 26–32.

- [26] Krompecher, T. (1994). "Experimental evaluation of rigor mortis. VIII. Estimation of time since death by repeated measurements of the intensity of rigor mortis on rats", **Forensic Science International**. 68(3), 149–159.
- [27] Dalal, J.S., Tejpal, H.R., Chanana, A. and Kaur, N. (2006). "Medicolegal study of rigor mortis to estimate postmortem interval", **Journal of Indian Academy of Forensic Medicine**. 28(2), 971–973.
- [28] Gillis, G.B. and Biewener, A.A. (2001). "Hindlimb muscle function in relation to speed and gait: in vivo patterns of strain and activation in a hip and knee extensor of the rat (*Rattus norvegicus*)", **Journal of Experimental Biology**. 204(Pt 15), 2717–2731.
- [29] Baroni, L., Cenci, L., Tettamanti, M. and Berati, M. (2007). "Evaluating the environmental impact of various dietary patterns combined with different food production systems", **European Journal of Clinical Nutrition**. 61(2), 279–286.

### ตารางที่ 1 คุณลักษณะเชิงความร้อนของไมโอซินในกล้ามเนื้อแดงของปลานิลแปลงเพศ ภายหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง

ระยะเวลาหลังการตาย (ชั่วโมง)	T <sub>o</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH (J g <sup>-1</sup> )
0	41.92 ± 0.33 <sup>ab</sup>	46.25 ± 0.35 <sup>a</sup>	48.72 ± 0.42 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.01 <sup>a</sup>
1	43.50 ± 0.26 <sup>ab</sup>	47.33 ± 0.01 <sup>a</sup>	49.92 ± 0.27 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.02 <sup>a</sup>
2	43.17 ± 0.36 <sup>ab</sup>	47.59 ± 0.12 <sup>a</sup>	52.12 ± 0.75 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.01 <sup>a</sup>
4	44.91 ± 0.75 <sup>a</sup>	47.84 ± 0.47 <sup>a</sup>	49.93 ± 0.79 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.19 <sup>a</sup>
8	43.18 ± 0.90 <sup>ab</sup>	46.34 ± 1.18 <sup>a</sup>	48.80 ± 0.95 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.16 <sup>a</sup>
12	44.65 ± 0.83 <sup>a</sup>	48.34 ± 0.47 <sup>a</sup>	50.54 ± 0.50 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>a</sup>
24	39.60 ± 1.54 <sup>b</sup>	42.25 ± 1.29 <sup>b</sup>	44.35 ± 1.10 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.06 <sup>b</sup>
48	nd	nd	nd	nd

nd, ตรวจไม่พบ; T<sub>o</sub>, อุณหภูมิเริ่มต้น; T<sub>p</sub>, อุณหภูมิที่ค; T<sub>c</sub>, อุณหภูมิสุดท้าย; ΔH, เอนทาลปี

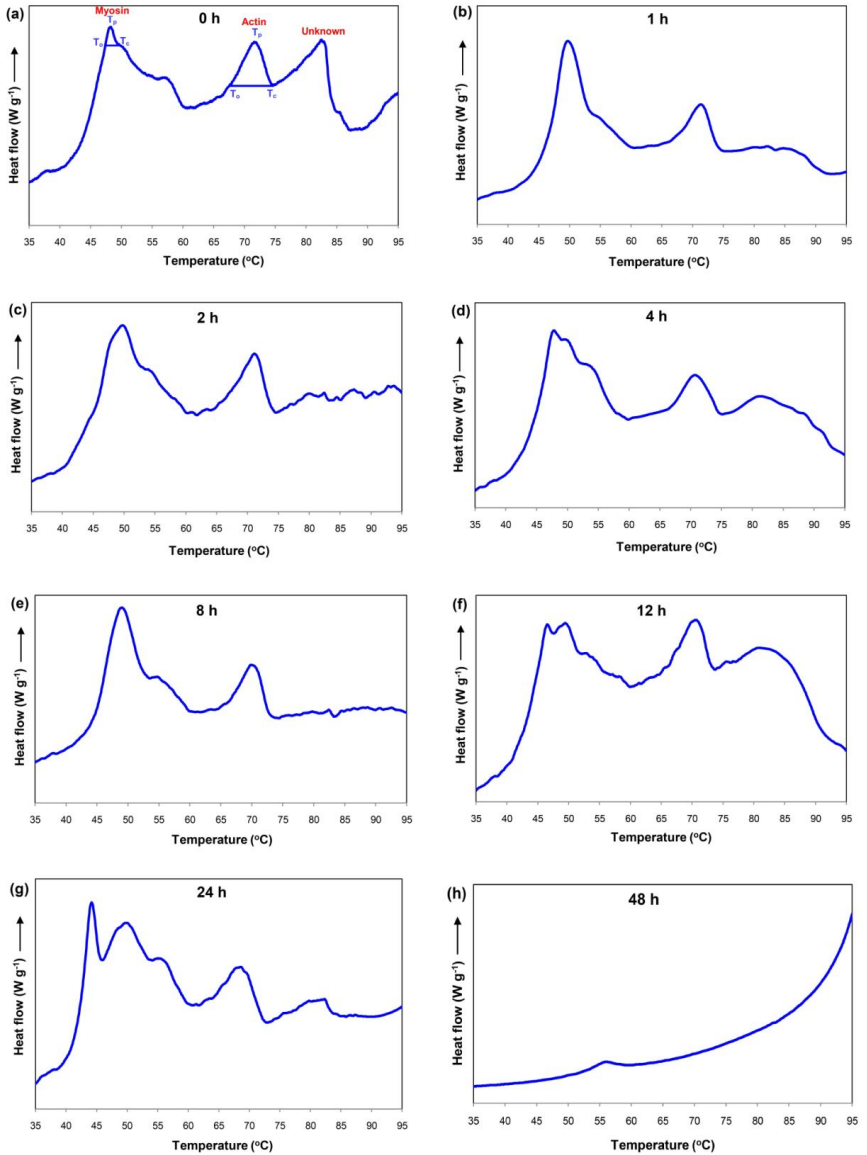
อักษร a และ b ที่ต่างกันในกลุ่มนี้แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

### ตารางที่ 2 คุณลักษณะเชิงความร้อนของแอกทินในกล้ามเนื้อแดงของปลานิลแปลงเพศ ภายหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง

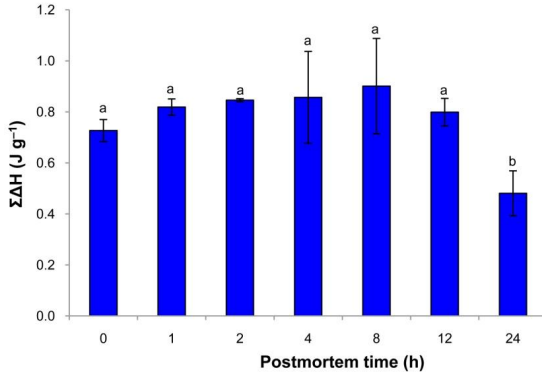
ระยะเวลาหลังการตาย (ชั่วโมง)	T <sub>o</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH (J g <sup>-1</sup> )
0	66.33 ± 0.24 <sup>a</sup>	70.84 ± 0.06 <sup>a</sup>	73.47 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.03 <sup>a</sup>
1	68.01 ± 0.01 <sup>a</sup>	71.92 ± 0.24 <sup>a</sup>	74.57 ± 0.42 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.01 <sup>a</sup>
2	68.50 ± 0.88 <sup>a</sup>	71.59 ± 0.12 <sup>a</sup>	73.71 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.02 <sup>a</sup>
4	67.48 ± 0.07 <sup>a</sup>	70.92 ± 0.01 <sup>a</sup>	73.43 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.01 <sup>a</sup>
8	67.68 ± 0.55 <sup>a</sup>	70.92 ± 0.01 <sup>a</sup>	73.50 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.03 <sup>a</sup>
12	68.13 ± 0.35 <sup>a</sup>	71.58 ± 0.01 <sup>a</sup>	74.16 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.29 ± 0.04 <sup>a</sup>
24	62.89 ± 1.20 <sup>b</sup>	67.00 ± 1.18 <sup>b</sup>	69.95 ± 1.02 <sup>b</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>a</sup>
48	nd	nd	nd	nd

nd, ตรวจไม่พบ; T<sub>o</sub>, อุณหภูมิเริ่มต้น; T<sub>p</sub>, อุณหภูมิที่ค; T<sub>c</sub>, อุณหภูมิสุดท้าย; ΔH, เอนทาลปี

อักษร a และ b ที่ต่างกันในกลุ่มนี้แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)



**ภาพที่ 1** การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนในกล้ามเนื้อแดงของปลานิล ภายหลังการตาย (A = 0 ชั่วโมง, B = 1 ชั่วโมง, C = 2 ชั่วโมง, D = 4 ชั่วโมง, E = 8 ชั่วโมง, F = 12 ชั่วโมง, G = 24 ชั่วโมง และ H = 48 ชั่วโมง)



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงเอนทาลปีรวมในกล้ามเนื้อแดงของปลานิล  
ภายหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง อักษร a และ b ที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกัน  
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )



ภาคผนวก ง

สำเนาบทความที่ตีพิมพ์แล้วในวารสารระดับนานาชาติ



**TECHNICAL NOTE****PATHOLOGY/BIOLOGY**

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

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

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

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

Postmortem changes have been studied in many terrestrial animal models, such as rat (1,2), dog (3), cattle cow (4), and pig (5). The changes are driven by endogenous enzymes and microorganisms within the body (6,7) as well as by insect activity (8). Various environmental factors, namely temperature, humidity, cooling rate, slaughter procedure, growth of microorganisms, and aging time, are generally known to affect the rate of postmortem changes (9,10). Observations on postmortem changes have also been reported for aquatic animals. However, most such investigations have focused on low temperature conditions used to preserve catch (11–14). The understanding of postmortem changes in aquatic animals in their ambient aquatic environment is currently lacking and needs to be improved.

Gastromalacia after death is caused by endogenous enzymes and can significantly thin and soften the gastric fundus wall (15–17). More active endogenous digestive enzymes, namely trypsin, chymotrypsin, lipase, and amylase, are found in the intestinal section (18) than in the stomach, which mainly has pepsin activity. These enzymes contribute to the autolysis of digestive organs and also of the surrounding tissue. Querido (1) reported that the electrical resistance of gastric wall decreased

with the time since death, and Erlandsson and Munro (3) reported on the degenerative changes of intestinal anatomy as time after death progresses. These prior observations provide some key characteristics of postmortem changes in the gastrointestinal tract, helpful in estimating the time of death.

The aim of this study was to evaluate postmortem changes in the gastrointestinal functionality in an aquatic animal model. The gastrointestinal index and the specific activities of the main digestive enzymes were assessed for postmortem effects. Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 (Family Cichlidae), which is among the most economically important fish in the world (19) was used as the aquatic model. Global production of this species exceeded 3,440,000 tonnes in 2013 (20) and tends to increase annually, being about equal to those of salmon and trout (19). Commercial tilapia production generally requires the use of male monosex populations as these have several desirable characteristics for aquaculture, such as fast growth and high fillet quality (20,21). This species has a well-known histology of its digestive tract (22), can grow and reproduce in a wide range of environmental conditions, and tolerates stress induced by handling (23). The application of two sensitive biochemical techniques, namely scavenging activity and reducing power assay, was also examined for assessing digestive enzyme activity. The findings from this study might facilitate identifying the postmortem interval in aquatic animals, that is, estimating the time of death from a floating carcass. The potential application is for environmental forensics in relation to fish kill events associated with pollution crimes, as well as in animal cruelty investigations, for example, involving a fish farm abandoned by the owners, resulting in mass death of the fish.

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

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

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

Received 3 Sept. 2015; and in revised form 6 Jan. 2016; accepted 13 Mar. 2016.

## Materials and Methods

### Preparation of Fish Samples

Newly hatched Nile tilapias were treated with 17- $\alpha$ -methyltestosterone (60 mg/kg diet) for 4 weeks to induce a monosex male (24), and these sex-reversed fish were reared until four months old at a private farm in Trang Province, Thailand. The fish were acclimatized indoors for 15 days and were fed *ad libitum*, twice daily (at 7.00 and 16.00 h) under 12-h light/12-h dark cycle, with a commercial diet for herbivorous fish (Hi-grade 9931; Charoen Pokphand PCL, Bangkok, Thailand). The average water quality parameters during the acclimatization were as follows: 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 ammonia  $0.94 \pm 0.15$  mg/L.

### Postmortem Change Studies

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

### Fish Dissection and Extraction of Digestive Enzymes

The fish organs were dissected on ice, and then, the gastrointestinal tracts were collected. Crude extracts were prepared according to the method described in Rungruangsak and Utne (25), with slight modifications. The stomach and intestine were homogenized in 10 and 1 mmol/L HCl (1:3 *w/v*), respectively, using microhomogenizer (THP-220; Omni International, Kennesaw, GA). The homogenates were centrifuged at  $15,000 \times g$  for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatants were collected after removing the lipid layer and then kept in small portions at  $-20^\circ\text{C}$  before analysis.

### Determination of Protein in Crude Extract

Protein concentrations in the crude enzyme extracts were determined based on Lowry et al. (26). Bovine serum albumin was used as the standard for quantifying the protein concentration (mg/mL). Normalization by the protein was then also used on calculating the specific activities of digestive enzymes (U/mg protein).

### Digestive Enzyme Study

**Pepsin-Specific Activity Assay**—Pepsin (EC 3.4.23.1) activity determination was based on Rungruangsak-Torrissen and Utne (25), with some modifications. First, 100  $\mu\text{L}$  of 2% casein was

mixed with 100  $\mu\text{L}$  of 0.2 mol/L KCl-HCl buffer pH 2 and 200  $\mu\text{L}$  of crude enzyme extract. The reaction mixture was then incubated at  $55^\circ\text{C}$  for 10 min, and the reaction was stopped by adding 1 mL of 5% trichloroacetic acid. Then, the mixture was centrifuged at  $5000 \times g$  at room temperature for 20 min. A 0.5 mL sample of supernatant was taken and mixed with 1 mL of 0.5 mol/L NaOH and 0.3 mL of Folin-Ciocalteu reagent (threefold diluted). The obtained solution was measured spectrophotometrically at 720 nm against *L*-tyrosine standard.

**Trypsin and Chymotrypsin-Specific Activity Assays**—Trypsin (EC 3.4.21.4) and chymotrypsin (EC 3.4.21.1) activities were determined based on Rungruangsak-Torrissen et al. (27). The trypsin assay was performed by mixing 700  $\mu\text{L}$  of 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  buffer at pH 9 containing 1.25 mmol/L benzoyl-*L*-Arg-*p*-nitroanilide with 100  $\mu\text{L}$  of a crude enzyme extract. The mixture was incubated at  $50^\circ\text{C}$  for 10 min, and then, the enzymatic reaction was stopped by adding 800  $\mu\text{L}$  of 30% acetic acid. Chymotrypsin was assayed as above, except with a 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  buffer at pH 9 containing 0.1 mmol/L *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide, and the incubation was at  $60^\circ\text{C}$ . Absorbance at 410 nm was measured to quantify products of each enzyme, and the final results were based on a *p*-nitroanilide standard curve.

**Amylase-Specific Activity Assay**—Amylase (EC 3.2.1.1) activity was determined based on Areekijserree et al. (28). The assay was performed by mixing 25  $\mu\text{L}$  of 5% soluble starch, 62.5  $\mu\text{L}$  of 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer pH 7, 37.5  $\mu\text{L}$  of 20 mmol/L NaCl, and 125  $\mu\text{L}$  of crude enzyme extract. The mixture was incubated at  $50^\circ\text{C}$  for 15 min, and the reaction was stopped by adding 250  $\mu\text{L}$  of 1% dinitrosalicylic acid. Staining was performed by boiling at  $100^\circ\text{C}$  for 5 min, cooling to room temperature, and mixing with 2.5 mL of distilled water. The stained reducing sugar was measured spectrophotometrically at 540 nm against a maltose standard.

**Lipase-Specific Activity Assay**—Lipase (EC 3.1.1.3) activity was determined based on Winkler and Stuckmann (29), with slight modifications. The assay was performed by mixing 200  $\mu\text{L}$  of 0.01 mol/L *p*-nitrophenyl palmitate, 800  $\mu\text{L}$  of 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer at pH 8, and 20  $\mu\text{L}$  of crude enzyme extract. The mixture was incubated at  $60^\circ\text{C}$  for 30 min, and then, the enzymatic reaction was stopped 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 temperature for 15 min. The supernatant was collected, and its absorbance was measured at 410 nm against a *p*-nitrophenol standard.

### Gastrointestinal Scavenging Activity

**2,2-Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) Radical Assay**—Stomach and intestinal extracts were obtained as described above. Their 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities were determined according to the method of Thongprajukaew et al. (30). The radical scavenging activity (% inhibition) was calculated as  $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ , where  $A_0$  and  $A_1$  are the absorbances of the control sample (extraction buffer in equal volume replacing the actual sample) and the extract, respectively.

**Reducing Power**—Stomach and intestinal extracts were obtained as described above. The reducing power was assayed based on the method of Benzie and Strain (31) and Wong et al. (32), with some modifications. Briefly, a premixture was prepared by mixing 10 mmol/L of 2,4,6-tris(2-pyridyl)-*s*-triazine in 40 mmol/L HCl, 20 mmol/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , and acetate buffer at

pH 5.2 in the ratio of 1:1:10. The assay was performed by mixing 2850  $\mu\text{L}$  of the premixture with 150  $\mu\text{L}$  of sample, keeping this in the dark for 30 min, and measuring the absorbance at 593 nm. The volume of sample was replaced by extraction buffer in the control, and the absorbances were converted to final results with a Trolox standard curve. Percentage of remaining reducing power at each postmortem time was calculated as  $[(A_i - A_o)/A_i] \times 100$ , where  $A_o$  and  $A_i$  are the absorbances of the control sample (extraction buffer in equal volume replacing the actual sample) and the actual sample, respectively.

#### Statistical Analysis

Data analyses were performed using SPSS version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL). All data are expressed as mean  $\pm$  SEM from quadruplicate observations ( $n = 4$ ), chosen based on preliminary analysis of appropriate fish sample size. The percentages were

checked for normality after arcsine transformation. Significant differences between means were ranked using Duncan's multiple range test (DMRT), with significance equated to  $p < 0.05$ . A bias correction factor was used to improve accuracy. Pearson correlation coefficients ( $r$ ) are reported between each pair of variables across the observation points of gastrointestinal changes.

#### Results

##### Postmortem Changes in Gastrointestinal Index

The intestine of Nile tilapia ( $4.41 \pm 0.31\%$  of body weight at 0 h) was heavier than its stomach ( $2.22 \pm 0.13\%$  of body weight at 0 h) (Fig. 1). The SSI (Fig. 1A) and the ISI (Fig. 1B) decreased with postmortem interval significantly ( $p < 0.05$  by DMRT,  $n = 4$ ). The SSI remained unchanged for up to 2 h after

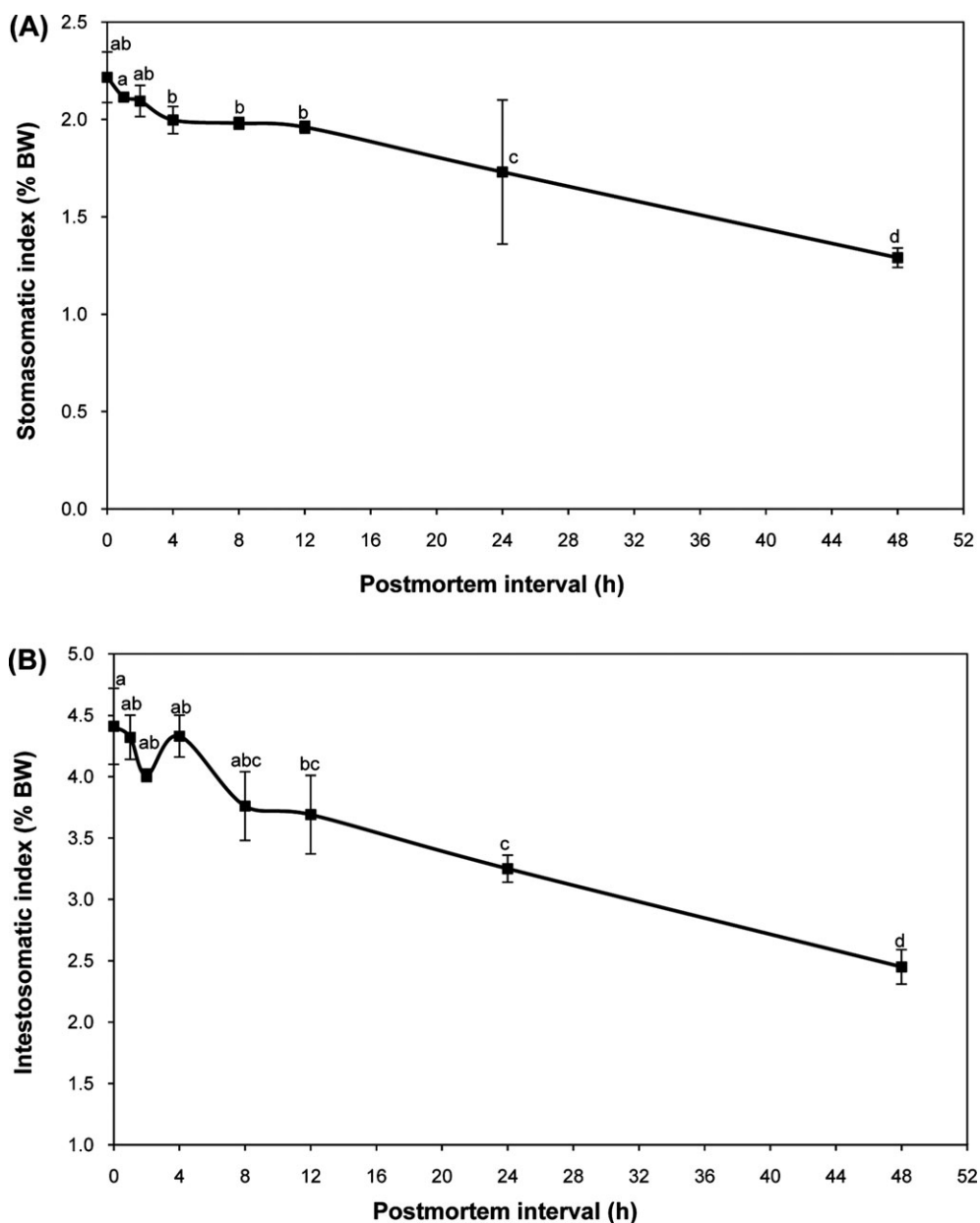


FIG. 1—Postmortem changes in the stomasomatic index (% body weight, A) and the intestosomatic index (% body weight, B), in Nile tilapia within 48 h after death. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$  per time point).

death, while the ISI was unchanged up to 8 h. At the final 48-h sampling time, the carcasses had about 42% and 44% of their initial SSI and ISI, respectively.

#### Postmortem Changes in Gastrointestinal Protein

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

dramatically, showing a change at 1 h after death and having undetectable level at the final observation time.

#### Postmortem Changes in the Main Digestive Enzymes

Protein dynamics in the gastrointestinal section were observed through three digestive enzymes. The specific activity of pepsin was unchanged for the first 4 h after death (Fig. 3A) and then decreased progressively. The lowest  $7.24 \pm 1.18$  mU/mg protein specific activity of pepsin was found at the final sampling time. Trypsin-specific activity (mU/mg protein) was very sensitive to postmortem delay, more so than pepsin (Fig. 3B). Unchanged activity was observed for 1 h after death and was below detection limit at 48 h. Chymotrypsin-specific activity (mU/mg protein) showed a different

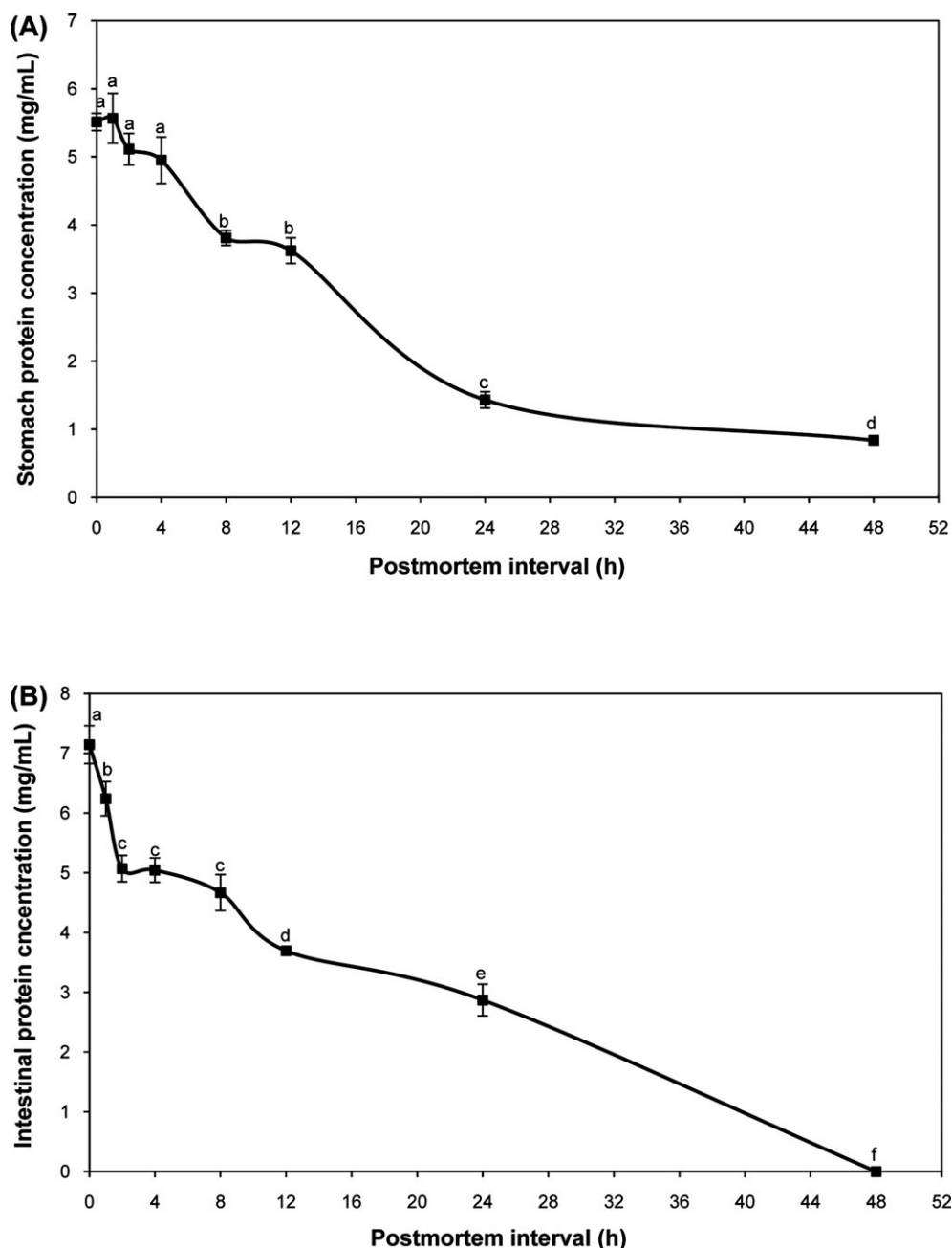


FIG. 2—Postmortem changes in stomach (mg/mL, A) and intestinal (mg/mL, B) protein concentrations, in Nile tilapia within 48 h after death. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$  per time point).

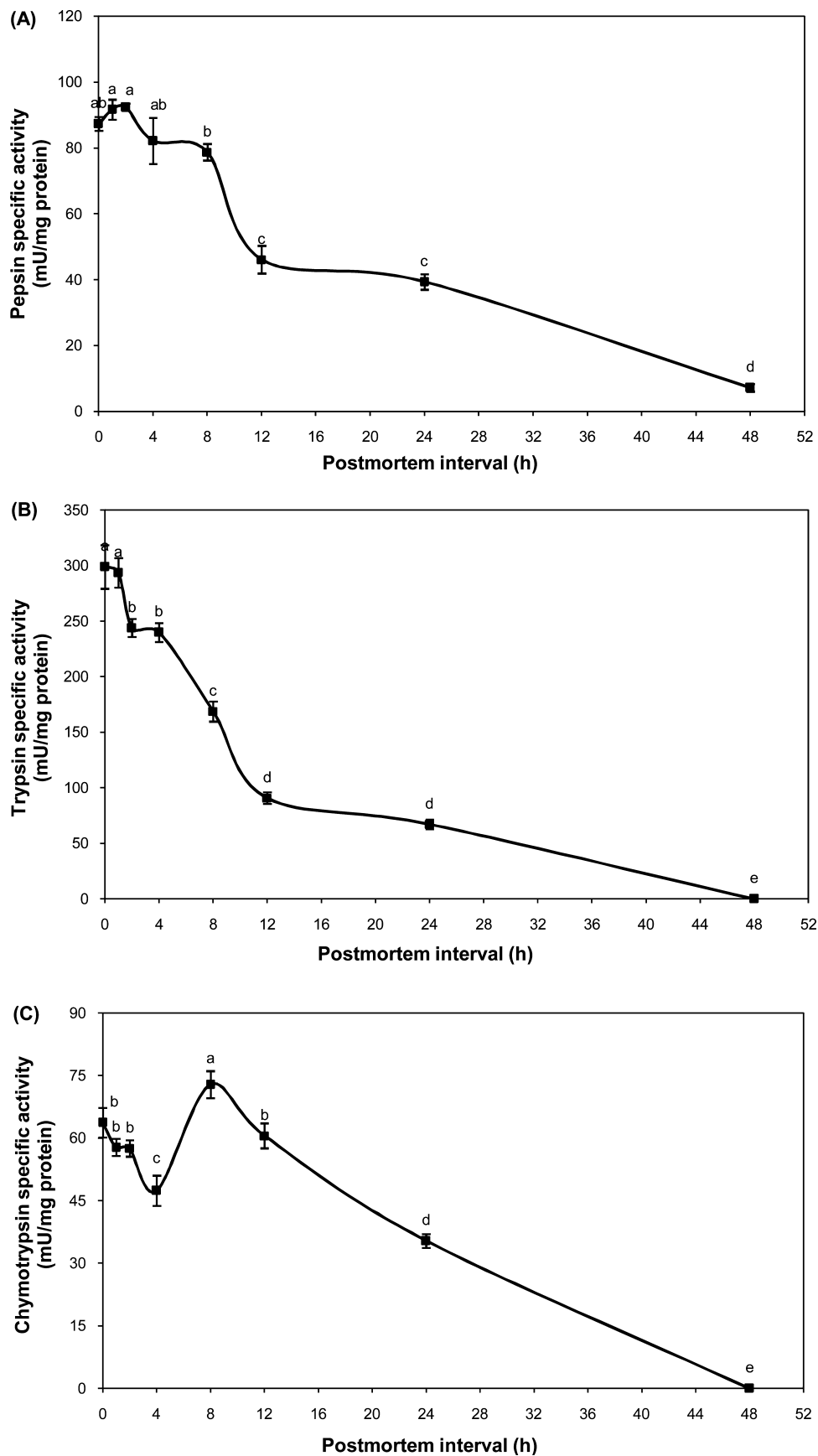


FIG. 3—Postmortem changes in specific activity of pepsin (mU/mg protein, A), trypsin (mU/mg protein, B), and chymotrypsin (mU/mg protein, C), in Nile tilapia within 48 h after death. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 4 per time point).

trend than the two protein-digestive enzymes above. Its highest specific activity was observed at 8 h after death, while the activities at 0–2 and 12 h were mutually similar (Fig. 3C). However, also this enzyme had undetectable activity at 48 h after death.

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

#### Postmortem Changes in Gastrointestinal Scavenging Activity

Figure 5 illustrates the significant decreases in the scavenging activity (% inhibition) of stomach (Fig. 5A) and intestine (Fig. 5B), and in the reducing power (% remaining) of stomach (Fig. 5C) and intestine (Fig. 5D). Both these responses

decreased statistically significantly with postmortem delay ( $p < 0.05$  by DMRT,  $n = 4$ ), but the reducing power was more effective in distinguishing postmortem changes than the DPPH.

#### Relationships among the Observed Variables

The Pearson correlation coefficients ( $r$ ) for each pair of variables, including gastrointestinal index (SSI and ISI), protein concentration (in stomach and intestine), specific activity of digestive enzymes (pepsin, trypsin, chymotrypsin, amylase, and lipase), and scavenging activity (in stomach and intestine), were positive and highly significant ( $r = 0.519–0.972$ ,  $p < 0.01$ , Table 1).

#### Discussion

Endogenous enzymes contribute to the rapid loss of gastrointestinal weight, which directly affects the digestive indices (SSI and ISI). In a terrestrial animal, namely in the Sprague–Dawley

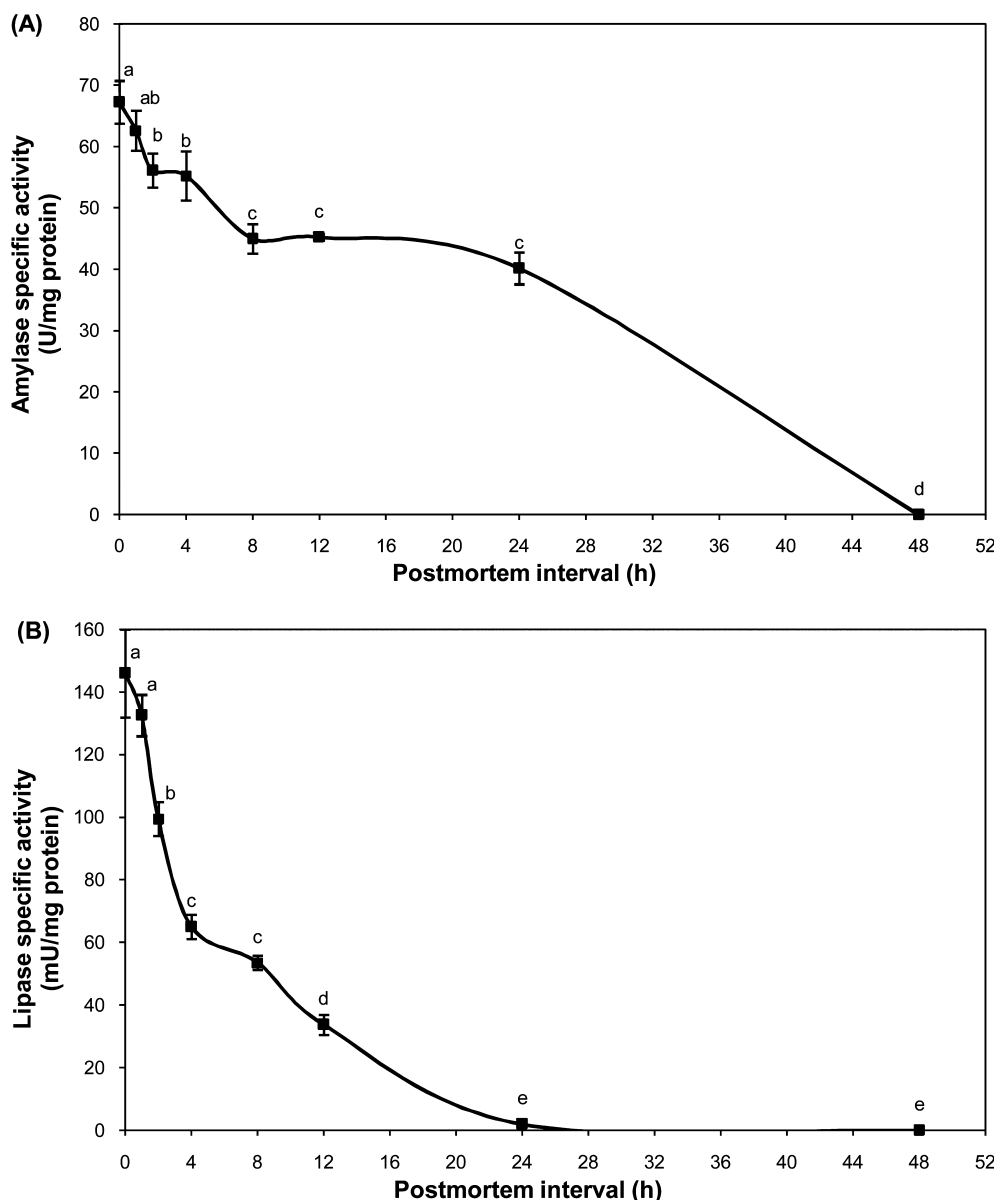


FIG. 4—Postmortem changes in specific activity of amylase (U/mg protein, A) and lipase (mU/mg protein, B), in Nile tilapia within 48 h after death. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$  per time point).

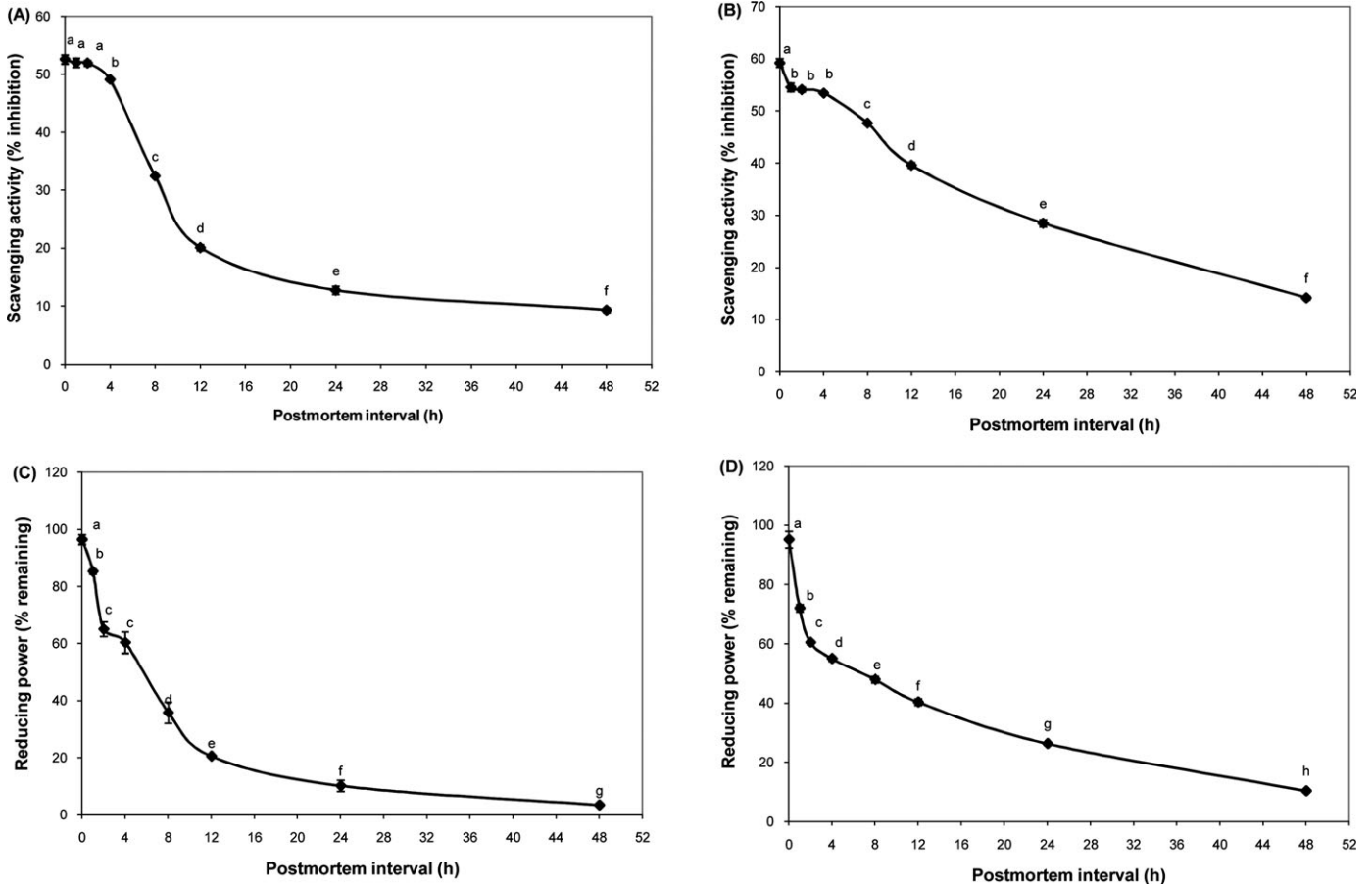


FIG. 5—Postmortem changes in stomach (% inhibition, A) and intestinal (% inhibition, B) scavenging activities, and stomach (% remaining, C) and intestinal (% remaining, D) reducing powers, in Nile tilapia within 48 h after death. Data are expressed as mean ± SEM (n = 4 per time point).

TABLE 1—Pearson correlation coefficients (r) of variables that are indicative of gastrointestinal changes in postmortem Nile tilapia (n = 32) 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.

rat, Li et al. (2) reported increasing hepatosomatic index with postmortem time (0–25 min). Our observations of both the SSI and the ISI in fish specimens show the opposite trend, partly because of a much longer observation time extending to 48 h. In addition, the nutrient-rich fluid released from a fish carcass caused by the endogenous enzymes is easily dissolved and flushed away in an aquatic environment. This process is most rapid in those tissues that have high enzyme and water contents (6). The electrical resistance of the gastric wall

corroborates our understanding of this degradation and is linked to the physical intracellular size of the changing electrical conductivity of the intracellular and extracellular fluid (1). Penny (33) reported a rapid fall after death in the muscle pH of a pig carcass. This indicates the accumulation of carboxyl groups liberated by hydrolytic reactions. Moreover, such post-mortem changes can also be induced by the absence of oxygen, increase in carbon dioxide, and accumulation of wastes (6,34). These conditions lead to the denaturation of proteins,

which governs the progressive decrease in protein concentration in stomach and intestine. Khunsoongnern (7) suggested that rapid postmortem putrefaction is observed in the intestine, followed by the whole alimentary tract and gill. Similarly, our observations showed more rapid postmortem changes in the intestine than in the stomach. This might be due to the mucosa layer of stomach wall being thicker than in the intestine. Generally, mucus cells in the tubular glands and neck cells of gastric glands protect the stomach with mucosa from its strongly acidic contents (22).

Pepsin is the most efficient digestive enzyme in the stomach, cleaving peptide bonds of hydrophobic compounds to preferably aromatic amino acids, such as phenylalanine, tryptophan, and tyrosine (35). The activity of this enzyme indicates extracellular digestion in the stomach (18). The decrease in pepsin activity was due to the autolysis of gastric gland after death (16). This enzyme appears more robust than the other detected enzymes, as it maintained its activity until the end of sampling (48 h), while others did so for only about four hours. The rigid structure and low molecular weight may partially protect this enzyme against denaturation. Practically, specimen collection in the field for estimating the initial pepsin activity at death would be feasible for about four hours after death, in ambient temperature.

Trypsin is a key protein-digesting enzyme in the small intestine. It acts as an activator controlling both itself and other proteolytic zymogens. Its rapid activity decrease indicates fast protein breakdown, faster in the intestine than in the stomach. Interestingly, chymotrypsin had maximal activity at 8 h after death, among the observation points. This enzyme cleaves proteins at the carboxyl side of aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine, and tryptophan) and cleaves large hydrophobic residues. An increased activity of this enzyme has been attributed to induction by toxic organic pollutants, such as benzene and dioxins, as well as to the stress before death of the fish (27). Moreover, strong evidence supports the mediation of internucleosomal DNA cleavage in apoptotic cells by a chymotrypsin-like protease (36). The role of this enzyme in relation to postmortem changes is still little known and would warrant further research.

The association of protein and carbohydrate catabolisms caused the decreasing trend in amylase activity with postmortem delay. This enzyme breaks down  $\alpha$ -1,4 glycosidic bonds of large-chain polysaccharides, to convert carbohydrates to glucose. Significantly reduced enzyme activity might be associated with the catabolism of glycogen after death. Regarding lipid catabolism, the specific activity of lipase decreased earlier than those of the other observed enzymes. This is due to unsaturated fatty acids in a fish that are very easy to oxidize, providing lots of free radicals that degrade other molecules. The dramatic decrease in lipase activity is also in agreement with direct observations of peritoneal fats during fish dissection, as well as of the lipid layer after homogenate centrifugation (enzyme preparation). This finding is corroborated by the significant decrease in scavenging activity and in remaining reducing power with postmortem delay. Lassoued et al. (37) proposed that the hydrolysis by proteolytic enzymes can release a mixture of various peptides that act as electron donors in DPPH system. However, these constituents are not sufficient to compensate for the overproduction of free radicals after death by various catabolism processes. Moreover, at longer hydrolysis times, the formed peptides have shorter chains and are less effective in scavenging DPPH radicals (37).

## Summary

The gastrointestinal functionality was significantly affected by the postmortem delay. Based on the digestive enzyme analyses, significant changes occurred earlier in the intestine than in the stomach, and lipid break down appeared to be more sensitive than degradation of protein or carbohydrate to the time delay. A novel not previously reported observation was the role of chymotrypsin after death, and this would warrant further investigation. In continuation of this reported research, a histopathological examination of the gastrointestinal tract (stomach and intestine) and its accessory gland (liver) for their postmortem changes is currently underway, in this same fish species. The findings from the current study suggest that the time of death of an aquatic animal can be estimated by sampling the gut of the carcass left in ambient water. However, these results are preliminary and are not yet ready for forensic use. This report might encourage further research with larger sample sizes, studies of varying water pollutants, or assessments of situations that qualify as aquatic animal cruelty. In addition, fish kills have a large variety of differing circumstances, that is, water temperature, chemicals, environmental factors, pH, that can interfere with the processes examined in the current study. Also, each species might require work specific to it under a variety of circumstances before the approach of the current study could be used in a court of law. It might be directly useful on recreating a crime scene and testing fish after the fact.

## Acknowledgments

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

## References

1. Querido D. Postmortem changes in electrical resistance of the gastric wall during the early postmortem period in rats. *Forensic Sci Int* 1992;53:81–92.
2. Li X, Elwell MR, Ryan AM, Ochoa R. Morphogenesis of postmortem hepatocyte vacuolation and liver weight increases in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol* 2003;31:682–8.
3. Erlandsson M, Munro R. Estimation of the post-mortem interval in beagle dogs. *Sci Justice* 2007;47:150–4.
4. Costa RS, Henry FC, Ferreira KS, do Valle FRAF, Quirino CR. Characterization of rigor mortis of *longissimus dorsi* and *triceps brachii* muscles of male cattle carcasses. *J Biotechnol* 2012;11:8127–32.
5. Myburgh J, L'Abbé EN, Steyn M, Becker PJ. Estimating the postmortem interval (PMI) using accumulated degree-days (ADD) in a temperate region of South Africa. *J Forensic Sci* 2013;229(165):e1–6.
6. Vass AA. Beyond the grave—understanding human decomposition. *Microbiol Today* 2001;28:190–3.
7. Khunsoongnern N. Quality change of tilapia fillets store under modified atmosphere [thesis]. Nakhon Ratchasima, Thailand: Suranaree University of Technology, 2003.
8. Ma T, Huang J, Wang JF. Study on the pupal morphogenesis of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae) for postmortem interval estimation. *Forensic Sci Int* 2015;253:88–93.
9. Campobasso CA, Vella GA, Introna F. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Sci Int* 2001;120:18–27.
10. Pearce KL, Rosenvold K, Andersen HJ, Hopkins DL. 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* 2011;89:111–24.
11. Aoki T, Yokono M, Ueno R. A cathepsin B-like enzyme from mackerel white muscle is a precursor of cathepsin B. *Com Biochem Physiol* 2002;133B:307–16.



12. Wang PA, Stenvik J, Larsen R, Maehre H, Olsen RL. Cathepsin D from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) liver. Isolation and comparative studies. *Com Biochem Physiol* 2007;147B:504–11.
13. Bahuaud D, Mørkøre T, Langsrud Ø, Sinnes K, Veiseth E, Ofstad R, et al. Effects of  $-1.5^{\circ}\text{C}$  super-chilling on quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) *pre-rigor* fillets: cathepsin activity, muscle histology, texture and liquid leakage. *Food Chem* 2008;111:329–39.
14. Fidalgo LG, Saraiva JA, Aubourg SP, Vázquez M, Torres JA. High pressure effects on the activities of cathepsins B and D of mackerel and horse mackerel muscle. *Czech J Food Sci* 2014;32:188–93.
15. O'Donnell CJ, Baker MA. Postmortem CT findings of “gastromalacia”: a trap for the radiologist with forensic interest. *Forensic Sci Med Pathol* 2010;6:293–7.
16. Laczniak AN, Sato T, Nashelsky M. Postmortem gastric perforation (gastromalacia) mimicking abusive injury in sudden unexplained infant death. *Pediatr Radiol* 2011;41:1595–7.
17. Usui A, Kawasumi Y, Hosokai Y, Hayashizaki Y, Saito H, Funayama M. Postmortem radiography of gastromalacia: case reports. *Japanese J Radiol* 2013;31:637–41.
18. Thongprajukaew K, Kovitvadhi U. Effects of sex on characteristics and expression levels of digestive enzymes in the adult guppy *Poecilia reticulata*. *Zool Stud* 2013;52:1–8.
19. De Silva SS, Subasinghe RP, Bartley DM, Lowther A. Tilapias as alien aquatics in Asia and the Pacific: a review. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004.
20. FAO. Cultured aquatic species information programme. *Oreochromis niloticus*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015.
21. Little DC, Edwards P. Impact of nutrition and season on pond culture performance of mono-sex and mixed-sex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 2004;232:279–92.
22. Morrison CM, Wright JR Jr. A study of the histology of the digestive tract of the Nile tilapia. *J Fish Biol* 1999;54:597–606.
23. Getinet GT, Amrit NB. Effects of feeding, stocking density and water-flow rate on fecundity, spawning frequency and egg quality of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 2007;272:380–8.
24. Shelton WL, Guerrero RD, Lopez-Marcias J. Factors effecting androgen sex-reversal of *Tilapia aurea*. *Aquaculture* 1981;25:59–65.
25. Rungruangsak K, Utne F. Effect of different acidified wet feeds on protease activities in the digestive tract and on growth rate of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture* 1981;22:67–79.
26. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
27. Rungruangsak-Torrisen K, Moss R, Andresen LH, Berg A, Waagbø R. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol Biochem* 2006;32:7–23.
28. Areekijseree M, Engkagul A, Kovitvadhi U, Thongpan A, Mingmuang M, Pakkong P, et al. Temperature and pH characteristics of amylase and proteinase of adult freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson 1900. *Aquaculture* 2004;234:575–87.
29. Winkler UK, Stuckmann M. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 1979;138:663–70.
30. Thongprajukaew K, Rodjareon S, Yoonram K, Sornthong P, Hutchana N, Tantikitti C, et al. 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* 2015;439:45–52.
31. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239:70–6.
32. Wong SP, Leong LP, Koh JHW. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem* 2006;99:775–83.
33. Penny IF. Protein denaturation and water-holding capacity in pork muscle. *Food Sci Technol Int* 1969;4:269–73.
34. Goff ML. Early post-mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers. *Exp Appl Acarol* 2009;49:21–36.
35. Dunn BM. Overview of pepsin-like aspartic peptidases. *Curr Protoc Protein Sci* 2001;Chpt21:Unit21.3.
36. Murn J, Urleb U, Mlinaric-Rascan I. Internucleosomal DNA cleavage in apoptotic WEHI 231 cells is mediated by a chymotrypsin-like protease. *Genes Cells* 2004;9:1103–11.
37. Lassoued I, Mora L, Nasri R, Aydi M, Toldrá F, Aristoy MC, et al. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. *J Proteomics* 2015;128:458–68.

Additional information and reprint requests:

Karun Thongprajukaew, Ph.D.  
 Department of Applied Science  
 Faculty of Science  
 Prince of Songkla University  
 Songkhla 90112  
 Thailand  
 E-mail: karun.t@psu.ac.th

ภาคผนวก จ

สำเนาบทความที่ตอบรับให้ตีพิมพ์แล้วในวารสารระดับนานาชาติ

1 **Cathepsin activities and thermal properties of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) meat**  
2 **during ambient storage**

3

4 **Tulakhun Nonthaput<sup>a</sup>, Waraporn Hahor<sup>a</sup>, Karun Thongprajukaew<sup>a\*</sup>, Krueawan**  
5 **Yoonram<sup>a</sup>, Somrak Rodjaroen<sup>b</sup>**

6

7 <sup>a</sup>Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University,  
8 Songkhla 90112, Thailand.

9 <sup>b</sup>Department of Bioscience, Faculty of Sciences and Fisheries Technology, Rajamangala  
10 University of Technology Srivijaya, Trang 92150, Thailand.

11

12 Received 6 July 2016

13 Accepted 2 February 2017

14

15 *Keywords:*

16 Actin,

17 Aquatic animal,

18 Cathepsin,

19 Myosin,

20 Postmortem

21

22 \* Corresponding author.

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

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

## 35 **Abstract**

36           Understanding the postmortem changes at the ambient aquatic temperature, can be  
37 useful for estimating time of death in environmental forensic studies and less information is  
38 available. We investigated the muscle degradation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in  
39 terms of specific activities of cathepsins (B, H and L), scavenging activities and thermal  
40 transition properties of myosin and actin, to assess postmortem changes with time (0, 1, 2, 4,  
41 8, 12, 24 and 48 hr after death). The study results are relevant to the ambient temperatures in  
42 Thailand, meaning about 30°C. Specific activities of the three cathepsin enzymes increased  
43 significantly with postmortem time ( $p < 0.05$ ) and exhibited highly positive relationship ( $r =$   
44  $0.987\text{--}0.997$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 32$ ). Cathepsin H had the lowest specific activity and exhibited a  
45 different type of time profile. Its lowest specific activity was observed at 8 hr, concerns the  
46 significant role at this time point after death. The radical scavenging activities dramatically  
47 decreased with time since death, especially within the first 1 hr, while no changes occurred  
48 from 2 hr to 8 hr, or from 12 hr to 24 hr. Thermal properties of myosin and actin were  
49 observed up to 24 hr delay. The degradation of each protein fluctuated with delay time, and  
50 actin was more sensitive to postmortem delay than myosin. Overall the findings from the  
51 current study might be used as primary data to estimate the time of death of an aquatic  
52 animal. The potential application is for environmental forensics in relation to fish kill events  
53 associated with pollution crimes or mass death of exported fish under transportation  
54 insurance, as well as in animal cruelty investigations.

55

## 56 **Introduction**

57

58           Postmortem changes of animals are influenced by various environmental factors  
59 including temperature, humidity, cooling rate and growth of microorganisms (Campobasso et  
60 al., 2001). Most studies of postmortem changes have investigated terrestrial animal models,  
61 especially mammals such as rat (Kočárek, 2003), dog (Lasseter et al., 2003), pig  
62 (Dekeirsschieter et al., 2009) and cattle (Rhee and Kim, 2001). For aquatic animals,  
63 preservation of the products is the main purpose for cold temperatures used in transport or  
64 storage by the food industries. However, understanding the postmortem changes at the  
65 ambient temperature, can be useful for estimating time of death and less information is  
66 available.

67           After death, a crude assessment of muscles and joint stiffness allows assigning the  
68 postmortem interval to one of three categories, namely pre-rigor mortis, rigor mortis, and

69 post-rigor mortis. These three processes relate to muscle degradation by enzymes, cathepsins,  
70 causing rapid softening of muscle texture due to the degradation of myofibrillar proteins  
71 (Jiang, 2000). Cathepsins B and L exhibit superior activity relative to cathepsin H in the  
72 white muscle of sea bass (Chéret et al., 2007). Also, Aoki et al. (2000) report high activities  
73 of cathepsins B and L in white muscles of some red-fresh fish. These findings suggest  
74 important roles of the cathepsins B, H and L in the postmortem degradation of white fish  
75 muscle.

76 Actin and myosin are the main actors that make muscles contract or relax (Tyska and  
77 Warshaw, 2002), while sarcoplasmic proteins are another component in muscles, suspended  
78 in the cytoplasm (Matos et al., 2011). These proteins can be degraded after death by the  
79 cathepsin enzymes (Ho et al., 2000; Ladrat et al., 2003) and can be monitored by differential  
80 scanning calorimetry (Schubring, 1999; Kuo et al., 2005; Beyrer and Klaas, 2007; Matos et  
81 al., 2011; Thongprajukaew et al., 2015b). The aim of this present study was to evaluate  
82 postmortem changes in muscles of an aquatic animal. The economic freshwater fish Nile  
83 tilapia (*Oreochromis niloticus*) was chosen as a model, as it is widely cultured around the  
84 world. The well-known fundamental biology of this species also supported its selection for a  
85 laboratory study. The main muscle degradation enzymes (cathepsins B, H and L) were  
86 studied concurrently with the thermal properties of actin and myosin. The degradation  
87 products were also monitored by a sensitive method, namely by diphenylpicrylhydrazyl  
88 (DPPH) radical scavenging activity. The findings from this study might be used as primary  
89 data to identify (estimate) the postmortem delay from an aquatic animal carcass in ambient  
90 tropical waters.

91

## 92 **Materials and Methods**

93

### 94 *Fish preparation and observation of postmortem changes*

95 Four-month-old sex reversed Nile tilapia was collected from a private farm in Trang  
96 province, Thailand. The fish were acclimatized indoor for 15 d and were fed to satiation with  
97 a commercial diet containing 30% protein, twice daily (0700 hr and 1600 hr) under 12-hr  
98 light/12-hr dark cycle. The water quality parameters during acclimatization were  $29.60 \pm$   
99  $0.15^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 6.95 \pm 0.02$ , dissolved oxygen  $5.05 \pm 0.01 \text{ mg/L}$  and ammonia  $0.94 \pm 0.15 \text{ mg/L}$ .  
100 Prior to sampling the fish were starved for 48 hr under the conditions described above.  
101 Subsequently, all the fish were killed by chilling in ice. Fish with similar body weights  
102 ( $105.83 \pm 1.66 \text{ g}$ ) and total lengths ( $18.55 \pm 0.14 \text{ cm}$ ) were randomly distributed into

103 rectangular containers (32 cm width × 43 cm length × 11 cm height with 7 cm water level) at  
104 a density of 14 fish per container. The fish were floated in their rectangular containers under  
105 ambient temperature ( $29.60 \pm 0.15^\circ\text{C}$ ) and 12-hr light/12-hr dark cycle. Four fish ( $n = 4$ ) at  
106 each postmortem time (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 hr) were dissected on ice and the white  
107 muscles were collected. These samples were packed in polyethylene bags and kept at  $-20^\circ\text{C}$   
108 until determinations. All analyses of white muscle were performed within one month after  
109 dissection.

110

#### 111 *Extraction of muscle crude extract*

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

118

#### 119 *Determination of muscle degradation enzyme activity*

120

##### 121 *Protein concentration in crude extract*

122 Determination of protein was carried out based on the method of Lowry et al. (1951).  
123 Bovine serum albumin (BSA) was used as the protein standard. The protein concentrations in  
124 the crude extracts were used for quantifying muscle degradation enzyme specific activities (U  
125 /mg protein).

126

##### 127 *Cathepsin B, H and L assays*

128 Activities of the cathepsins B (EC 3.4.22.1), H (EC 3.4.22.16) and L (EC 3.4.22.15)  
129 were determined based on Aranishi et al. (1997), with slight modifications. Cathepsin B was  
130 assayed by mixing 200  $\mu\text{L}$  of 0.4 M phosphate buffer (pH 6.0, containing 5 mM EDTA, 490  
131  $\mu\text{L}$  of 0.1% Brij35, 100  $\mu\text{L}$  of 10 mM cysteine and 200  $\mu\text{L}$  of 25  $\mu\text{M}$  Z-Arg-Arg-7-amido-4-  
132 methylcoumarin) and 10  $\mu\text{L}$  of crude enzyme extracts. The enzymatic reaction mixture was  
133 incubated at  $40^\circ\text{C}$  for 30 min, and the reaction was stopped by adding 1.5 mL of 0.1 M  
134 sodium acetate buffer containing 0.1 M sodium monochloroacetate (pH 4.3). The cathepsins  
135 H and L were assayed as described above, except with the 0.4 M phosphate buffer (pH 6.0)  
136 replaced by 0.4 M phosphate buffer (pH 6.8, containing 5 mM EDTA, 0.1% Brij35, 10 mM

137 cysteine and 25  $\mu$ M Z-Arg-7-amido-4-methylcoumarin) or by 0.4 M sodium acetate buffer  
138 (pH 6.5, containing 5 mM EDTA, 0.1% Brij35, 10 mM cysteine, 25  $\mu$ M Z-Phe-Arg-7-amido-  
139 4-methylcoumarin), respectively. Reaction activating incubation for these enzymes was  
140 performed at 45°C or at 50°C, in the same order. The fluorescence of liberated 7-amido-4-  
141 methylcoumarin was measured by a spectrofluorimeter (Jasco FP-8200; Jasco, Tokyo, Japan)  
142 at an excitation wavelength of 380 nm and an emission wavelength of 450 nm.

143

#### 144 *Scavenging activity by 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical assay*

145 The crude muscle extracts were obtained as described above. The DPPH radical  
146 scavenging activity was determined according to the method of Thongprajukaew et al.  
147 (2015b). Radical scavenging activity (% inhibition) was calculated from  $[(A_o - A_i)/A_o] \times 100$ ,  
148 where  $A_o$  and  $A_i$  are the absorbances of the control sample (extraction buffer in equal volume  
149 to the actual sample) and the extract, respectively.

150

#### 151 *Thermal transition properties*

152 The thermal transition properties of muscle were analyzed with a differential scanning  
153 calorimeter (DSC7; PerkinElmer, Waltham, MA, USA). A 20 mg muscle sample was placed  
154 in an aluminum sample pan, sealed, allowed to equilibrate at room temperature, and then  
155 heated with comparison against an empty reference pan. Thermal changes were recorded  
156 from 25°C to 120°C at a rate of 5°C/min. Myosin and actin were identified by denaturation  
157 temperatures, as described by Skipnes et al. (2008) and Matos et al. (2011). Thermal  
158 parameters including onset ( $T_o$ ), peak ( $T_p$ ) and conclusion ( $T_c$ ) temperatures of protein  
159 denaturation, temperature range ( $T_c - T_o$ ), and the transition enthalpy ( $\Delta H$ ) were recorded  
160 automatically.

161

#### 162 *Statistical analysis*

163 Data were analyzed using SPSS version 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and all  
164 data are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM,  $n = 4$ ). Significance of  
165 differences between means was determined by using the Duncan Multiple Range Test, with  
166 significance equated to  $p < 0.05$ . Pearson correlation coefficients ( $r$ ) for each pair of  
167 measured parameters are reported.

168

169

170

## 171 **Results**

172

### 173 *Specific activities of cathepsins B, H and L*

174 The specific activities of cathepsins B (Fig. 1A), H (Fig. 1B) and L (Fig. 1C)  
175 increased with the time delay after death. Generally, a slight increase in specific activity was  
176 observed within the first 4 hr, followed by a dramatic increase. The cathepsins B and L  
177 exhibited similar characteristics within the 48 hr observation. Both these enzymes had their  
178 highest specific activities at the end of the sampling, and the values increased approximately  
179 6.26 fold ( $60.98 \pm 0.59$  mU/mg protein on average) compared to the initial activity at 0 hr  
180 delay ( $9.74 \pm 0.24$  mU/mg protein on average). Cathepsin H exhibited a different type of time  
181 profile and had lower specific activities than cathepsins B and L. Its lowest specific activity  
182 was observed at 8 hr after death, and this did not significantly differ from its activities at 0 hr  
183 to 2 hr delay times. The highest specific activity of this enzyme was 6.03 (7.83) fold  
184 increased relative to the 0 hr (8 hr) sampling time.

185

### 186 *Scavenging activity of white muscle*

187 The radical scavenging activity of white muscle is illustrated in Fig. 2. The values  
188 dramatically decreased with the time elapsed since death, especially within the first 1 hr. No  
189 differences in the values were observed in the time delay interval 2–8 hr, or between 12 hr  
190 and 24 hr. The lowest scavenging activity was observed at 48 hr after death, with about 40  
191 fold decrease from the initial at 0 hr.

192

### 193 *Thermal changes of myosin and actin*

194 The thermograms of white muscle showed two endothermic characteristics (Fig. 3). In  
195 the control sample, denaturation of myosin occurred at comparatively low temperatures as the  
196 first peak ( $T_o = 44.45 \pm 0.22^\circ\text{C}$ ,  $T_p = 46.88 \pm 0.03^\circ\text{C}$ ,  $T_c = 48.62 \pm 0.23^\circ\text{C}$ ), while the  
197 following peak corresponded to the denaturation of actin ( $T_o = 68.31 \pm 0.50^\circ\text{C}$ ,  $T_p = 71.04 \pm$   
198  $0.50^\circ\text{C}$ ,  $T_c = 73.42 \pm 0.37^\circ\text{C}$ ). Fluctuations in results for both proteins were observed within  
199 the first 24 hr postmortem (Table 1), while the protein peaks became undetectable by the end  
200 of observations. Actin was more sensitive to the postmortem changes than myosin, as  
201 indicated by the significantly decreased  $T_o$  at 12 hr after death. The main changes in  $T_o$ ,  $T_p$   
202 and  $T_c$  for both proteins were observed at 24 hr, and decreased with postmortem delay. The  
203 values  $T_c - T_o$ , fluctuated and increased with postmortem delay. No significant changes  
204 occurred in  $\Delta H$  or  $\Sigma\Delta H$  for either protein within the first 24 hr after death.



## 205 Discussion

206

207 Muscle protein degradation increased significantly with postmortem delay in fish  
208 muscle, both when ice-stored and when super-chilled (Gaarder et al., 2012). Available  
209 information is scarce regarding protein degradation in a fish carcass that floats in ambient  
210 aquatic conditions of the tropics. The cathepsins B, D, H and L are cysteine proteases, mainly  
211 presents in the lysosomes. Cathepsin D was not observed in the current study because its role  
212 in fish protein hydrolysis should not be significant since it hydrolyses myofibrils at an  
213 optimal pH range from 3 to 5 (Makinodan et al., 1982; Jiang, 2000). These enzymes are  
214 released into both cytoplasm and intracellular spaces as a consequence of lysosomal  
215 disruption, and induce the postmortem pH to fall and the intramuscular ionic strength to  
216 increase (Yates et al., 1983). Aoki et al. (2000) and Chéret et al. (2007) reported that the main  
217 postmortem degradation of white muscle is attributed to cathepsins B and L. These enzymes  
218 hydrolyze the major muscle structural proteins: B hydrolyzes connectin, nebulin and myosin;  
219 and L hydrolyzes connectin, nebulin, myosin, collagen,  $\alpha$ -actinin and troponins T and I  
220 (Yamashita and Konagaya, 1991). The observed pH in muscle tissue after death is near  
221 optimal for both these enzymes (Sainclivier, 1983). The rapid activity increases observed in  
222 the current study indicate that the rate of protein breakdown by cathepsins B and L was faster  
223 than that by cathepsin H. This finding is in agreement with data for sea bass, as well as for  
224 beef (Wang and Xiong, 1999), suggesting that cathepsin H plays a secondary role in the  
225 postmortem proteolysis of fish (Chéret et al., 2007). A novel not previously reported  
226 observation was the significant decrease of cathepsin H activity at 8 hr after death. This may  
227 be due to the postmortem pH drop from 7.0 to 6.5 during the rigor mortis period of fish,  
228 while it later rises to values close to 7 (Sainclivier, 1983). This pH point (pH 6.5) may  
229 negatively affect the amphotericism of amino acid side chains at the active site of the enzyme,  
230 affecting activity.

231 Based on Pearson correlation analysis, the three observed cathepsins degraded muscle  
232 protein concurrently, as indicated by the highly positive pairwise correlation coefficients  
233 between enzyme specific activity and postmortem delay ( $r = 0.987-0.997$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 32$ ),  
234 suggesting that the three cathepsins function synergistically on muscle proteins. In a  
235 comparison to a terrestrial animal, cathepsins degraded fish muscle faster than bovine muscle  
236 (Chéret et al., 2007). This may be due to the fish having less complex structure of muscle,  
237 relative to bovine. In this study, floating the fish carcass in water also supported the  
238 hydrolysis capacity of the enzymes. Based on a prior investigation in the same species,

239 however, the degradation of muscle was lesser than that of the gastrointestinal tract (Hahor et  
240 al., 2016). Longer observation times than those of the current study might help better  
241 understand the roles of these enzymes.

242 Postmortem changes of the physical dimensions of the intercellular space and/or  
243 intercellular/extracellular fluids significantly decrease the electrical conductivity (Querido,  
244 1992). This prior finding is in agreement with the significant decrease in scavenging activity  
245 with postmortem delay, observed in the current study. The postmortem degradation of cells  
246 can have toxic effects through produced peroxides and free radicals that damage all  
247 components. Although the hydrolysis by proteolytic enzymes can release a mixture of various  
248 peptides that act as electron donors in DPPH system (Lassoued et al., 2015), these  
249 constituents are not sufficient to compensate for the overproduction of free radicals after  
250 death. Moreover, at longer hydrolysis times the formed peptides have shorter chains and are  
251 less effective in scavenging DPPH• radicals (Lassoued et al., 2015). However, based on our  
252 observations, the biochemical determination of this scavenging activity appears to be a  
253 sensitive indicator of the time delay since death.

254 DSC is used for assessing the protein conformation and the energy changes can lead  
255 to explain the structural changes such as protein denaturation. Denaturation of myosin and  
256 actin can be caused by a pH drop (Tyska and Warshaw, 2002), and is followed with  
257 degradation by the proteolytic enzymes. Kuo et al. (2005) reported that denaturation  
258 temperature of muscle protein was lowered in postmortem specimen, and in the current study  
259 we observed decreased  $T_o$ ,  $T_p$  and  $T_c$ , and increased  $T_c-T_o$  with postmortem delay. These  
260 changes indicate the transformation or partial degradation of proteins by proteolytic cleavage.  
261 Thongprajukaew et al. (2015a) reported that a broad  $T_c-T_o$  range was due to the  
262 heterogeneity of polymer chain lengths. Increased values in the current study might be caused  
263 by the production of diverse polypeptide chains by enzymatic hydrolysis. This effect of the  
264 time delay after death has also been observed in the red muscles of the same species  
265 (Nonthaput et al., 2015), as well as in red snapper, red mullet, and catfish (Schubring, 1999).  
266 According to our data, actin was more sensitive to postmortem changes than myosin since  
267 significantly decreased  $T_o$  was observed at 12 hr after death. This is in agreement with the  
268 stable nature of tropical fish myosin, reported by Schubring (1999). However, the transition  
269 peaks of the proteins were no longer detected at 48 hr after death, suggesting complete  
270 absence of native protein forms. This finding is in agreement with our earlier investigation of  
271 the red muscles of Nile tilapia (Nonthaput et al., 2015), and with studies of the rigor mortis  
272 phase of frozen Atlantic salmon (within 2–24 hr after death) (Roth et al., 2006) and of frozen

273 barramundi within 3–24 hr after death (Wilkinson et al., 2008). Therefore, the muscles  
274 become flexible again as the proteins are completely degraded (Tyska and Warshaw, 2002).  
275 In higher animals, rigor mortis in rat develops within 5–24 hr after death (Krompecher,  
276 1994), while in human during summer (12.0–46.5°C) or winter (–2.6–35.4°C) this can take 8–  
277 30 hr or 7–36 hr, respectively (Dalal et al., 2006). These differences in the time delay  
278 between aquatic and terrestrial animals are consequences of muscle structure and  
279 configuration of blood circulation (Gillis and Biewener, 2001). Furthermore, our current  
280 study was conducted in ambient water environment which may cause faster degradation rates  
281 due to both availability of water and the comparatively high temperatures in the tropics. In  
282  $\Delta H$  or  $\Sigma\Delta H$ , no significant differences within 24 hr from death were observed. Both these  
283 thermal parameters indicate the amounts of proteins in native form. Beyrer and Klaas (2007)  
284 also reported no changes in total  $\Delta H$  for single or double frozen cod fillets. Similarly, while  
285 the temperature shift in the DSC thermogram can be used as an indicator of meat freshness,  
286  $\Delta H$  cannot be used (Kuo et al., 2005). Therefore, prior studies support the conclusion that  $T_o$ ,  
287  $T_p$ ,  $T_c$  and  $T_c - T_o$  are more sensitive to the qualitative postmortem changes in proteins than are  
288  $\Delta H$  or  $\Sigma\Delta H$ .

289

## 290 **Conclusions**

291

292 The specific activities of cathepsins, the radical scavenging activity, and the  
293 degradation of myosin and actin were significantly affected by postmortem delay time. Based  
294 on our observations, the degradation rate of fish muscle in ambient aquatic environment, in  
295 the tropics, was faster than what is reported for terrestrial animals. In continuation of this  
296 reported research, a histopathological examination of the muscles for their postmortem  
297 changes is currently underway, in this same fish species. The findings from the current study  
298 suggest that the time of death of an aquatic animal, left to decay in ambient tropical waters,  
299 can be estimated from muscle samples of the carcass. The potential application is for  
300 environmental forensics in relation to fish kill events associated with pollution crimes, as well  
301 as in animal cruelty investigations. However, fish kills have a large variety of differing  
302 circumstances (*i.e.* chemicals, pH, water temperature, environmental factors, etc.) that can  
303 interfere with the processes examined in the current study. Therefore, each species might  
304 require work specific to it under a variety of circumstances before the approach of the current  
305 study could be used in a court of law.

306

307 **Acknowledgements**

308

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

315

316 **References**

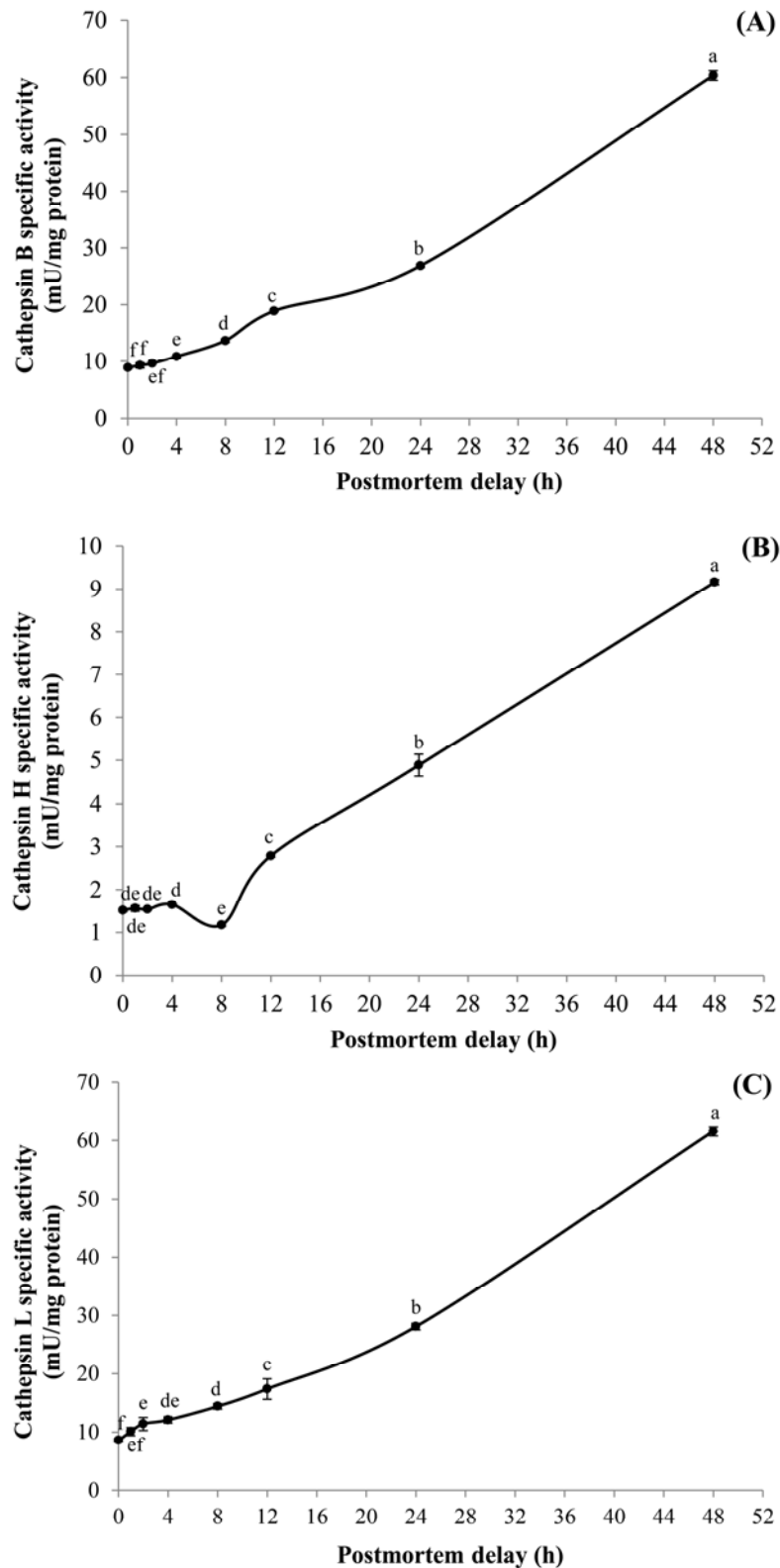
317

- 318 Aoki, T., Yokono, Yamashita, T., Ueno, R. 2000. Distribution of cathepsin in red and white  
319 muscle among fish species. *Fish. Sci.* 66, 776–782.
- 320 Aranishi, F., Hara, K., Osatomi, K., Ishihara, T. 1997. Cathepsins B, H and L in peritoneal  
321 macrophages and hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Physiol.*  
322 117B, 605–611.
- 323 Beyrer, M., Klaas, M.R. 2007. Influence of freezing and of frozen storage on the specific  
324 heat capacity of trout and herring fillet. *Eur. Food Res. Technol.* 224, 349–353.
- 325 Campobasso, C.A., Vella, G.A., Introna, F. 2001. Factors affecting decomposition and  
326 Diptera colonization. *Forensic Sci. Int.* 120, 18–27.
- 327 Chéret, R., Delbarre-Ladrat, C., Lamballerie-Anton, M., Verrez-Bagnis, V. 2007. Calpain and  
328 cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chem.* 101, 1474–  
329 1479.
- 330 Dalal, J.S., Tejpal, H.R., Chanana, A., Kaur, N. 2006. Medicolegal study of rigor mortis to  
331 estimate postmortem interval. *J. Indian Acad. Forensic Med.* 28, 971–973.
- 332 Dekeirsschieter, J., Verheggen, F.J., Gohy, M., Hubrecht, F., Bourguignon, L., Lognay, G.,  
333 Haubruge, E. 2009. Cadaveric volatile organic compounds released by decaying pig  
334 carcasses (*Sus domesticus* L.) in different biotopes. *Forensic Sci. Int.* 189, 46–53.
- 335 Gaarder, M.Ø., Bahuaud, D., Veiseth-Kent, E., Mørkøre, T., Thomassen, M.S. 2012.  
336 Relevance of calpain and calpastatin activity for texture in super-chilled and ice-  
337 stored Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fillets. *Food Chem.* 132, 9–17.

- 338 Gillis, G.B., Biewener, A.A. 2001. Hindlimb muscle function in relation to speed and gait: *in*  
339 *vivo* patterns of strain and activation in a hip and knee extensor of the rat (*Rattus*  
340 *norvegicus*). J. Exp. Biol. 204, 2717–2731.
- 341 Hahor, W., Thongprajukaew, K., Yoonram, K., Rodjaroen, S. 2016. Gastrointestinal  
342 functionality of aquatic animal (*Oreochromis niloticus*) carcass in water allows  
343 estimating time of death. J. Forensic Sci. 61, 1647–1655.
- 344 Ho, M.L., Chen, G.H., Jiang, S.T. 2000. Effect of mackerel cathepsins L and L like, and  
345 calpain on the degradation of mackerel surimi. Fish. Sci. 66, 558–568.
- 346 Jiang, S.T. 2000. Effect of proteinases on the meat texture and seafood quality. J. Agric. Food  
347 Chem. 2, 55–74.
- 348 Kočárek, P. 2003. Decomposition and Coleoptera succession on exposed carrion of small  
349 mammal in Opava, the Czech Republic. Eur. J. Soil Biol. 39, 31–45.
- 350 Krompecher, T. 1994. Experimental evaluation of rigor mortis VIII. Estimation of time since  
351 death by repeated measurements of the intensity of rigor mortis on rats. Forensic Sci.  
352 Int. 68, 149–159.
- 353 Kuo, H.L., Chen, M.T., Liu, D.C., Lin, L.C. 2005. Relationship between thermal properties  
354 of muscle proteins and pork quality. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 18, 427–432.
- 355 Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J., Fleurence, J. 2003. *In vitro* proteolysis of  
356 myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus*  
357 *labrax* L.): Effects of cathepsins B, D and L. Food Chem. 81, 517–525.
- 358 Lasseter, A.E., Jacobi, K.P., Farley, R., Hensel, L. 2003. Cadaver dog and handler team  
359 capabilities in the recovery of buried human remains in the southeastern United  
360 States. J. Forensic Sci. 48, 617–621.
- 361 Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Aydi, M., Toldrá, F., Aristoy, M.C., Barkia, A., Nasri, M.  
362 2015. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates  
363 obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. J. Proteomics 128, 458–468.
- 364 Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with  
365 the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.
- 366 Makinodan, Y., Akasaka, T., Toyohara, H., Ikeda, S. 1982. Purification and properties of  
367 carp muscle cathepsin D. J. Food Sci. 47, 647–652.
- 368 Matos, E., Silva, T.S., Tiago, T., Aureliano, M., Dinis, M.T., Dias, J. 2011. Effect of  
369 harvesting stress and storage conditions on protein degradation in fillets of farmed  
370 gilthead seabream (*Sparus aurata*): A differential scanning calorimetry study.  
371 Food Chem. 126, 270–276.

- 372 Nonthaput, T., Thongprajukaew, K., Rodjaroen, S., Hahor, W. 2015. Postmortem changes in  
373 thermal property of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle. Parichart J. 28, 10–  
374 23. [in Thai]
- 375 Querido, D. 1992. Postmortem changes in electrical resistance of the gastric wall during the  
376 early postmortem period in rats. Forensic Sci. Int. 53, 81–92.
- 377 Rhee, M.S., Kim, B.C. 2001. Effect of low voltage electrical stimulation and temperature  
378 conditioning on postmortem changes in glycolysis and calpains activities of Korean  
379 native cattle (Hanwoo). Meat Sci. 58, 231–237.
- 380 Roth, B., Slinde, E., Arildsen, J. 2006. Pre or post mortem muscle activity in Atlantic salmon  
381 (*Salmo salar*). The effect on rigor mortis and the physical properties of flesh.  
382 Aquaculture 257, 504–510.
- 383 Sainclivier, M. 1983. L'industrie halieutique—Chapitre 1: Le poisson matie`re premie`re.  
384 Sciences agronomiques-Rennes-Bulletin Scientifique et technique de l'ENSA et du  
385 CRR, Rennes, France.
- 386 Schubring, R. 1999. DSC studies on deep frozen fishery products. Thermochemica Acta 337,  
387 89–95.
- 388 Skipnes, D., der Plancken, I.V., Loey, A.V., Hendrickx, M.E. 2008. Kinetics of heat  
389 denaturation of proteins from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). J. Food Eng. 85,  
390 51–58.
- 391 Thongprajukaew, K., Rodjaroen, S., Tantikitti, C., Kovitvadhi, U. 2015a. Physicochemical  
392 modifications of dietary palm kernel meal affect growth and feed utilization of Nile  
393 tilapia (*Oreochromis niloticus*). Anim. Feed Sci. Technol. 202, 90–99.
- 394 Thongprajukaew, K., Rodjaroen, S., Yoonram, K., Sornthong, P., Hutcha, N., Tantikitti,  
395 C., Kovitvadhi, U. 2015b. Effects of dietary modified palm kernel meal on growth,  
396 feed utilization, radical scavenging activity, carcass composition and muscle quality  
397 in sex reversed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 439, 45–52.
- 398 Tyska, M.J., Warshaw, D.M. 2002. The myosin power stroke. Cell Motil. Cytoskel. 51, 1–15.
- 399 Wang, B., Xiong, Y.L. 1999. Characterization of the proteases involved in gel weakening of  
400 beef heart surimi. J. Agric. Food Chem. 47, 887–892.
- 401 Wilkinson, R.J., Paton, N., Porter, M.J.R. 2008. The effects of pre-harvest stress and harvest  
402 method on the stress response, rigor onset, muscle pH and drip loss in barramundi  
403 (*Lates calcarifer*). Aquaculture 282, 26–32.

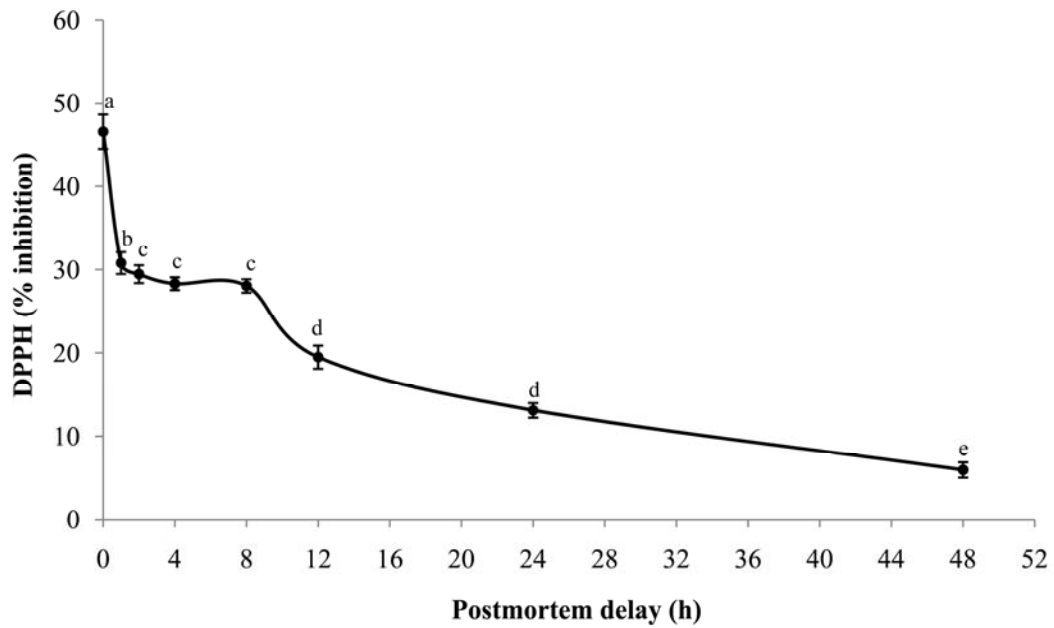
- 404 Yamashita, M., Konagaya, S. 1991. Hydrolytic action of salmon cathepsins B and L to  
405 muscle structural proteins in respect of muscle softening. *Nippon Suisan Gakk.* 57,  
406 1917–1922.
- 407 Yates, L.D., Dutson, T.R., Caldwell, J., Carpenter, Z.L. 1983. Effect of temperature and pH  
408 on the post-mortem degradation of myofibrillar proteins. *Meat Sci.* 9, 157–179.



409

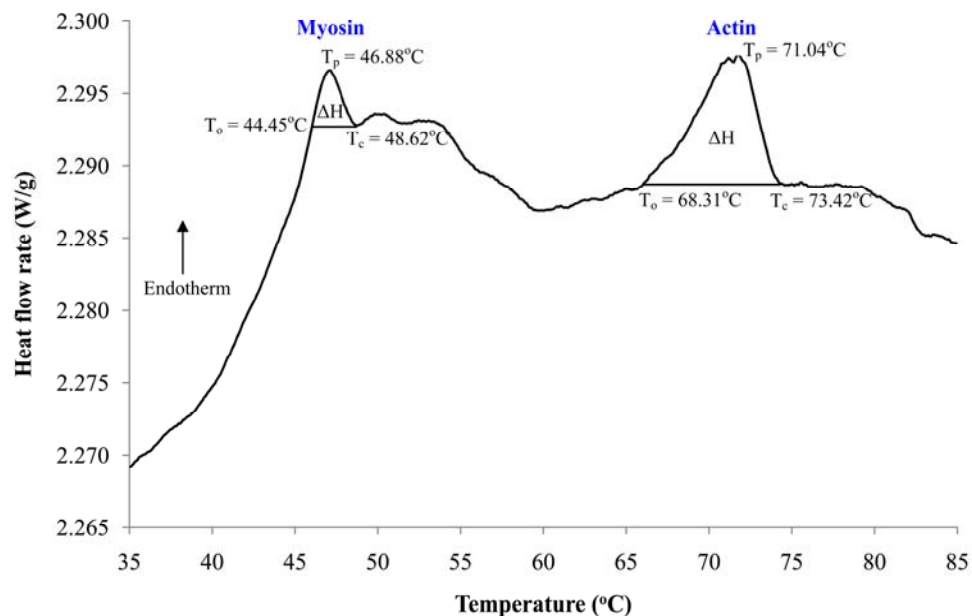
410 **Fig. 1** Postmortem changes in specific activity of the cathepsin B (A), H (B), and L (C), in  
 411 white muscles of Nile tilapia carcass within 48 hr after death. The data are expressed  
 412 as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Different superscripts indicate significant differences  
 413 between observation time points ( $p < 0.05$ )





414  
415  
416  
417  
418  
419

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



420  
421  
422  
423

**Fig. 3** Thermal transition properties of muscle from control Nile tilapia (0 hr after death).  $T_o$  = onset temperature,  $T_p$  = peak temperature,  $T_c$  = conclusion temperature,  $\Delta H$  = enthalpy

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

Postmortem delay (hr)	Myosin					Actin					$\Sigma\Delta H$ (J/g)
	$T_o$ ( $^{\circ}C$ )	$T_p$ ( $^{\circ}C$ )	$T_c$ ( $^{\circ}C$ )	$T_c-T_o$ ( $^{\circ}C$ )	$\Delta H$ (J/g)	$T_o$ ( $^{\circ}C$ )	$T_p$ ( $^{\circ}C$ )	$T_c$ ( $^{\circ}C$ )	$T_c-T_o$ ( $^{\circ}C$ )	$\Delta H$ (J/g)	
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

426

427  $T_o$  = onset temperature;  $T_p$  = peak temperature;  $T_c$  = conclusion temperature;  $T_c-T_o$  = temperature range;  $\Delta H$  = enthalpy; nd = not detected.

428 Different superscripts in the same column indicate significant differences between observations with different postmortem delays ( $p < 0.05$ ).