



การเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อและตับ องค์ประกอบของธาตุจากเกล็ด และ
สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากภายหลังการตายของปลานิล

(Oreochromis niloticus)

**Postmortem Changes of Muscle and Liver, Scale Elemental Profile and
Cadaveric Volatile Organic Compounds of Nile Tilapia**

(Oreochromis niloticus)

ตุลาคุณ นนทพุท

Tulakhun Nonthaput

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Master of Science in Forensic Science

Prince of Songkla University

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อและตับ องค์กรประกอบของธาตุจากเกลือ และ สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากภายหลังการตายของปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

ผู้เขียน นายตุลาคุณ นนทพุทธร

สาขาวิชา นิติวิทยาศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. การุณ ทองประจุแก้ว)ประธานกรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร. สรรพสิทธิ์ กลุ่มมเกล้า)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมกรรมการ
..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นเรศ ช้วนยุค)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรากร ลีมบุตร)
..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นเรศ ช้วนยุค)กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. การุณ ทองประจุแก้ว)
..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมรักษ์ รอดเจริญ)กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นเรศ ช้วนยุค)
กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมรักษ์ รอดเจริญ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

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

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณ
บุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ

(ผศ. ดร. การุณ ทองประจุแก้ว
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ

(ผศ. ดร. นเรศ ช้วนยุก)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ

(ผศ. ดร. สมรักษ์ รอดเจริญ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ

(นายตุลาคุณ นนทพุทฺธ)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นายตุลาคุณ นนทพุทฺธ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อและตับ องค์กรประกอบของธาตุจากเกล็ด และสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากภายหลังการตายของปลานิล (<i>Oreochromis niloticus</i>)
ผู้เขียน	นายตุลาคุณ นนทพุทท
สาขาวิชา	นิติวิทยาศาสตร์
ปีการศึกษา	2558

บทคัดย่อ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยสุ่มตัวอย่างปลาที่มีความยาวและน้ำหนักใกล้เคียงกัน (น้ำหนัก 105.83 ± 1.66 กรัม และความยาว 18.55 ± 0.14 เซนติเมตร) มาลอยในภาชนะทรงสี่เหลี่ยมที่มีอุณหภูมิ 29.60 ± 0.15 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างปลา ($n = 4$) ที่เวลา 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ภายหลังการตาย เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อและตับ องค์กรประกอบของธาตุจากเกล็ด และสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก ผลการศึกษาพบว่าการดำเนินปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันตรงกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($r = 0.799-0.970$, $P < 0.01$, $n = 32$) การวิเคราะห์สมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อพบว่าการเปลี่ยนแปลงใน 24 ชั่วโมงแรก ($P < 0.05$) จนไม่สามารถตรวจวัดได้ในชั่วโมงที่ 48 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวมีการสลายตัว เนื่องจากการลดลงของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และการสลายตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ โดยกล้ามเนื้อแดงสลายตัวเร็วกว่ากล้ามเนื้อขาว ลักษณะทางจุลกายวิภาคของตับและตับอ่อนมีการสลายตัวเช่นเดียวกัน โดยเริ่มพบการตายของเซลล์ตับในชั่วโมงที่ 4 และเซลล์ตับสลายตัวเป็นอย่างมากในชั่วโมงที่ 12 เกล็ดมีการเปลี่ยนแปลงโดยมีการแห้งเนื่องจากภาวะขาดน้ำและการสลายตัวของคอลลาเจน และพบธาตุหลักทั้งหมด 8 ชนิด โดยแต่ละชนิดมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากมีการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบสารประกอบทั้งหมด 65 ชนิด ข้อมูลทั้งหมดสามารถนำมาใช้ร่วมกันในการประมาณระยะเวลาภายหลังการตายของสัตว์น้ำ ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับมลพิษทางน้ำ และการทารุณกรรมสัตว์น้ำได้

Thesis Title	Postmortem changes of muscle and liver, scale elemental profile and cadaveric volatile organic compounds of Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)
Author	Mr. Tulakhun Nonthaput
Major Program	Forensic Science
Academic Year	2015

ABSTRACT

Postmortem changes were studied in an aquatic animal model, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Dead fish (105.83 ± 1.66 g weight, 18.55 ± 0.14 cm length) were floated indoors at water temperature 29.60 ± 0.15 °C, and samples ($n = 4$) were collected at the time points 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h after death in order to evaluate postmortem changes of muscle and liver, scale elemental profile and cadaveric volatile organic compounds (VOCs). The antioxidant capacity in red and white muscle was dramatically decreased with time since death ($P < 0.05$) and correlated positively ($r = 0.799\text{--}0.970$, $P < 0.01$, $n = 32$). Thermal properties of myosin and actin in red and white muscle, fluctuations in results for both these proteins were observed within the first 24 h postmortem ($P < 0.05$) and became undetectable by the end of observations. The microanatomy was degraded with postmortem delay due to decrease of connective tissue and muscle fiber degradation; these changes were early observed in red muscle than in white muscle. The necrotic cells in hepatopancreas were early observed at 4 h after death and the prominence in degraded cells was progressively increased until 12 h. Drying of fish scales 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 ($P < 0.05$). The sixty-five VOCs were detected and the changes in concentration were significantly affected with postmortem delay. Overall the findings from the current study might be used as primary data to estimate the time of death of an aquatic animal and applied for environmental forensics in relation to water pollutants and in case of aquatic animal cruelty.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. การุณ ทองประจุแก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการศึกษาค้นคว้าและทำงานวิจัย ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. นเรศ ช้วนยุก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษา และให้คำแนะนำในการศึกษาด้านจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อและตับของปลานิล ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. สมรักษ์ รอดเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำด้านชีววิทยาของปลานิล และขอขอบพระคุณ รศ. ดร. สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า และ ผศ. ดร. วรากร ลิ้มบุตร ที่สละเวลามาเป็นประธานและกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รวมทั้งเสนอแนะแนวทางการเขียนเพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ผู้วิจัยขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ขอขอบคุณวิจัยประเภททั่วไปจากสำนักวิจัยและพัฒนา (เลขที่สัญญา SCI 570522S) และทุนนำเสนอผลงานวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรมิเตอร์ ขอขอบคุณคุณอัครวิทย์ อีสสระโร นักวิทยาศาสตร์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ สุภมาตย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ช่วยฝึกสอน ให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือในการทำวิจัยด้านจุลกายวิภาค

ขอบคุณสมาชิกในครอบครัวที่ให้กำลังใจ และขอบคุณนักศึกษาปริญญาโท สาขานิติวิทยาศาสตร์ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา

ตุลาคุณ นนทพุทท

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	(5)
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(11)
สัญลักษณ์และคำย่อ	(13)
บทที่ 1 บทนำ	1
1. บทนำต้นเรื่อง	1
2. การตรวจเอกสาร	3
3. วัตถุประสงค์	16
บทที่ 2 วิธีการวิจัย	17
1. การเตรียมตัวอย่างปลาไหล	17
2. การเก็บตัวอย่าง	17
3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาออกซิเดชัน	18
4. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อน	19
5. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาค	19
6. การศึกษาองค์ประกอบของธาตุจากเกลือ	20
7. การศึกษาสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก	20
8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	21

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 ผลการศึกษา	22
1. การเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อ	22
2. การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของกล้ามเนื้อ	25
3. การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อและตับ	29
4. องค์ประกอบของธาตุจากเกลือ	35
5. สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก	38
บทที่ 4 บทวิจารณ์	46
1. การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อภายหลังการตาย	46
2. การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของกล้ามเนื้อภายหลังการตาย	47
3. การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคภายหลังการตาย	48
4. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของธาตุจากเกลือภายหลังการตาย	49
5. การเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากภายหลังการตาย	51
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	54
บรรณานุกรม	57
ภาคผนวก	68
ก ผลงานวิจัยที่นำเสนอแบบบรรยายในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ	69
ข ผลงานวิจัยจากภาคผนวก ก ที่ได้รับพิจารณาให้ตีพิมพ์	78
ค ต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ	92
ประวัติผู้เขียน	117

รายการตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	การศึกษาเกี่ยวกับสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ภายหลังการตาย	13
ตารางที่ 2	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) ระหว่างการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวภายหลังการตายของปลานิล ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกันอย่างน้อยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$)	24
ตารางที่ 3	สมการถดถอยระหว่างเวลาภายหลังการตาย (ชั่วโมง) ของปลานิล (X) และการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาว (Y) ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับเวลาภายหลังการตายอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$)	24
ตารางที่ 4	คุณลักษณะเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและแอกทิน ในกล้ามเนื้อแดงของปลานิลแปลงเพศ ภายหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)	27
ตารางที่ 5	คุณลักษณะเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและแอกทิน ในกล้ามเนื้อขาวของปลานิลแปลงเพศ ภายหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)	28
ตารางที่ 6	องค์ประกอบของธาตุ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) จากเกล็ดปลานิล ภายหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (ค่าน้อยสุด – ค่ามากที่สุด)	37
ตารางที่ 7	สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) ภายหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ	41

รายการภาพประกอบ

		หน้า
ภาพที่ 1	สัณฐานวิทยาของปลาไนอายุ 4 เดือน	4
ภาพที่ 2	การเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อปลาไนภายหลังการตาย 48 ชั่วโมง โดยใช้วิธี DPPH กล้ามเนื้อแดง (a) และ กล้ามเนื้อขาว (b) และวิธี reducing power กล้ามเนื้อแดง (c) และ กล้ามเนื้อขาว (d) อักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)	23
ภาพที่ 3	สมบัติเชิงความร้อนของไมโอซิน และแอกทิน ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้น (T_0) อุณหภูมิพีค (T_p) และอุณหภูมิสุดท้าย (T_c) ในกล้ามเนื้อแดง (a) และ กล้ามเนื้อขาว (b) ของปลาไนในชุดควบคุม (0 ชั่วโมงภายหลังการตาย)	26
ภาพที่ 4	จุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อแดง (ตัดตามขวาง) ของปลาไนภายหลังการตายที่เวลา 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 μ m) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 400 เท่า	30
ภาพที่ 5	จุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อขาว (ตัดตามขวาง) ของปลาไนภายหลังการตายที่เวลา 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 μ m) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 400 เท่า	31
ภาพที่ 6	จุลกายวิภาคของตับ (ตัดตามยาว) ของปลาไนภายหลังการตายที่เวลา 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 μ m) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 400 เท่า	33
ภาพที่ 7	จุลกายวิภาคของตับอ่อน (ตัดตามยาว) ของปลาไนภายหลังการตายที่เวลา 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 μ m) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 400 เท่า	34

รายการภาพประกอบ

หน้า

ภาพที่ 8	ลักษณะของเกล็ดปลาชนิดต่าง ๆ หลังการตาย 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (h) ภาพถ่ายบันทึกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 500 เท่า	35
-----------------	---	----

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

ATP	=	Adenosine triphosphate
CRD	=	Completely randomized design
CW/PDMS	=	Carbowax/polydimethylsiloxane
DPPH	=	2,2-Diphenylpicrylhydrazyl
DSC	=	Differential scanning calorimetry
EDX	=	Energy dispersive x-ray spectrometer
GC	=	Gas chromatography
HS-SPME	=	Headspace solid phase microextraction
MS	=	Mass spectrometry
TPTZ	=	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine
T_c	=	Conclusion temperature
T_o	=	Onset temperature
T_p	=	Peak temperature
T_c-T_o	=	Melting temperature range
ΔH	=	Enthalpy
$^{\circ}C$	=	Degree celsius
cm	=	Centimeter
g	=	Gram
<i>g</i>	=	Gravity
h	=	Hour
J	=	Joule
<i>n</i>	=	Number of sample
<i>r</i>	=	Correlation coefficient
r^2	=	Pearson correlation

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

การเปลี่ยนแปลงภายหลังการตาย (postmortem change) ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดได้รับอิทธิพลจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมหลายประการ ทั้งอุณหภูมิ ความชื้น การเจริญของจุลินทรีย์ และกระบวนการที่ทำให้ตาย (Campobasso *et al.*, 2001) ซึ่งการศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายส่วนใหญ่จะทำในสัตว์บก โดยเฉพาะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น หนู (Kočárek, 2003) สุนัข (Lasseter *et al.*, 2003) สุนัข (Dekeirsschietter *et al.*, 2009) และวัว (Rhee and Kim, 2001) สำหรับในสัตว์น้ำ มีเฉพาะการศึกษาในตัวอย่างที่เก็บในอุณหภูมิต่ำเพื่อประยุกต์ใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษา หรือคงสภาพผลิตภัณฑ์เป็นหลัก (Aoki *et al.*, 2000; Roth *et al.*, 2006; Wilkinson *et al.*, 2008; Fidalgo *et al.*, 2014) ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายภายใต้สภาวะปกติ หรือในสภาวะใกล้เคียงธรรมชาติของสัตว์น้ำยังไม่มีรายงานมาก่อน จึงจำเป็นต้องศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานต่อไป

ภายหลังการตายของสัตว์ ไกลโคเจนที่ร่างกายสะสมไว้ที่ตับและกล้ามเนื้อจะถูกขับออกมา ผ่านกระบวนการสลายในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เกิดเป็นกรดแลคติกสะสมในกล้ามเนื้อ ทำให้ค่าพีเอชของกล้ามเนื้อลดต่ำลง (Bayliss, 1996) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่กล้ามเนื้อทั้ง 3 ระยะ คือ ระยะก่อนการเกร็งตัว (pre-rigor mortis) โดยทำให้กล้ามเนื้ออ่อนลง มีรอยเขียวช้ำ และมีความยืดหยุ่น (Shahidi and Botta, 1994) ระยะการเกร็งตัว (rigor mortis) โดยทำให้กล้ามเนื้อเกิดการเกร็งตัว แข็งทื่อ และไม่ยืดหยุ่น และระยะสิ้นสุดการเกร็งตัว (post-rigor mortis) ซึ่งจะทำให้เนื้อนิ่ม ไม่ยืดหยุ่น และเสื่อมคุณภาพ (Fraser and Sumar, 1998; Chytiri *et al.*, 2004) การเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายของกล้ามเนื้อเหล่านี้ขึ้นอยู่กับโปรตีนไมโอซิน (myosin) และแอกทิน (actin) ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของกล้ามเนื้อสัตว์ที่ทำหน้าที่โดยตรงเกี่ยวกับการหดและคลายตัว (McMahon, 1984; Tyska and Warshaw, 2002) นอกจากนี้ยังส่งผลต่อตับ โดยกระบวนการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) จะทำให้เซลล์ตับหดตัว และมีรูปร่างผิดปกติไปจากเดิม (Yamamoto *et al.*, 1997) ส่วนของเกล็ดสามารถเก็บสะสมโลหะบางชนิดไว้ได้ เช่น สังกะสี ตะกั่ว และแมงกานีส (Abdullah *et al.*, 1976; Sauer and Watanabe, 1989)

ซึ่งอาจมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบดังกล่าวหลังจากที่ตาย อีกทั้งซากสัตว์ยังสามารถปล่อยสารอินทรีย์ระเหยที่มีกลิ่นอันไม่พึงประสงค์เพื่อดึงดูดแมลงมากินซาก ซึ่งเกิดจากองค์ประกอบของสารอาหารหลักทั้งไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (Shahidi and Botta, 1994)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายทั้งในด้านชีววิทยาและชีวเคมีของกล้ามเนื้อ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาออกซิเดชัน การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อน และการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อ รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของตับ องค์ประกอบของธาตุจากเกล็ด และสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก โดยใช้ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นต้นแบบ เนื่องจากปลานิลชนิดนี้มีข้อมูลพื้นฐานทางด้านชีววิทยาค่อนข้างมาก (Morrison and Wright, 1999; Nielsen and Nielsen, 2001; Wang *et al.*, 2010) อีกทั้งเป็นปลาที่สามารถปรับตัวให้เข้ากับธรรมชาติได้ง่าย กินอาหารได้หลายชนิด เจริญเติบโตเร็ว สามารถทนต่อความเครียดได้ดี และเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลก (Getinet and Amrit, 2007) ผลการศึกษาในครั้งนี้คาดว่าจะสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจำแนกระยะเวลาภายหลังการตาย (postmortem interval) ของสัตว์น้ำได้ เป็นประโยชน์สำหรับการขนส่งสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ กรณีที่มีการทำประกันภัยความเสียหายระหว่างการขนส่ง รวมทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับมลพิษทางน้ำ และการสืบสวนสอบสวนคดีความที่เกี่ยวข้องกับสัตว์น้ำที่ถูกทารุณกรรมหรือสัตว์น้ำที่ตายในฟาร์มเลี้ยงอย่างผิดปกติ

2. การตรวจเอกสาร

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้ ประกอบด้วยชีววิทยาของปลานิล กล้ามเนื้อของปลา ตับของปลา เกล็ดของปลา สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก และปฏิกิริยาออกซิเดชันหลังการตาย ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.1 ชีววิทยาของปลานิล

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่แถบลุ่มน้ำในทวีปแอฟริกา เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยนับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2508 สามารถเลี้ยงได้ทั้งในกระชัง บ่อดิน และบ่อซีเมนต์ มีผู้นิยมบริโภคกันอย่างกว้างขวาง การจำแนกลำดับทางอนุกรมวิธานของปลานิลเป็นดังนี้

Kingdom Animalia

Phylum Chordata

Class Actinopterygii

Order Perciformes

Family Cichlidae

Genus *Oreochromis*

Species *Oreochromis niloticus*

ปลานิลมีลักษณะพิเศษ คือ มีริมฝีปากบนและฝีปากล่างเสมอกัน มีลายพาดขวาง 9–10 แถว ครีบท้อง ครีบก้นและครีบหางมีจุดขาว เส้นสีดำตัดขวาง โดยครีบท้องมีเพียง 1 ครีบ ประกอบด้วยก้านครีบแข็ง และก้านครีบอ่อนเป็นจำนวนมาก ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาลและมีเส้นสีดำตัดขวางอยู่ทั่วไป (ภาพที่ 1) ในปลานิลที่มีอายุเท่ากันปลาตัวผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าตัวเมีย มีสีเข้มตรงบริเวณใต้คางและตามลำตัว ที่บริเวณใกล้กับช่องทวารของตัวผู้จะมีอวัยวะเพศลักษณะเรียวยาวยื่นออกมา ส่วนปลานิลตัวเมียจะมีขนาดเล็กกว่าตัวผู้ สีซีด ใต้คางมีสีเหลือง ที่อวัยวะสืบพันธุ์มี 3 ช่อง ลักษณะค่อนข้างใหญ่และกลม การจำแนกเพศของปลานิลโดยใช้สัญญาณวิทยาจะมีความชัดเจนมากขึ้นเมื่อปลา มีขนาดยาวตั้งแต่ 10 เซนติเมตรขึ้นไป



ภาพที่ 1 สันฐานวิทยาของปลานิลอายุ 4 เดือน

ปลานิลมีพฤติกรรมอยู่รวมกันเป็นฝูง ยกเว้นในช่วงสืบพันธุ์ มีความอดทนสูง และสามารถปรับตัวให้เข้ากับธรรมชาติได้ง่าย อาศัยได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย ปลานิลทนต่อความเค็มได้ถึง 20 ส่วนในพันส่วน ทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 40 องศาเซลเซียส แต่ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส ปลานิลจะเจริญเติบโตช้า (Popma and Masser, 1999) ทั้งนี้เป็นเพราะถิ่นกำเนิดเดิมของปลานิลอยู่ในเขตร้อน และสามารถทนต่อค่าพีเอชได้ดีในช่วง 6.5–8.3 (อุดม, 2549) ปัจจุบันสามารถพบปลานิลได้ทุกภาคในประเทศไทย เนื่องจากในปี พ.ศ. 2509 กรมประมงได้เพาะขยายพันธุ์ปลานิล เพื่อแจกจ่ายให้กับเกษตรกรจึงมีการเพาะเลี้ยงและปล่อยในแหล่งน้ำทั่วประเทศ ทำให้ปลานิลนี้แพร่กระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณที่มีลักษณะเป็นคลอง แม่น้ำ และอ่างเก็บน้ำ ปลานิลเป็นผู้บริโภคขั้นทุติยภูมิ (secondary consumer) กินอาหารได้หลายชนิดทั้งพืชและสัตว์ เช่น ไรน้ำ ตะไคร่น้ำ ตัวอ่อนของแมลง และสัตว์เล็กๆ ตลอดจนสาหร่ายและเห็ด (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, 2551)

ปลานิลที่ยังไม่เจริญพันธุ์จะอยู่รวมกันเป็นฝูง แต่เมื่อมีขนาดใหญ่พอที่จะสืบพันธุ์ได้ ปลาตัวผู้จะแยกตัวออกไปสร้างรัง และพยายามไล่ปลาตัวอื่นๆ ให้ออกไปนอกรังของรัง โดยปลาตัวผู้จะแผ่ครีบท้องและอ้าปากกว้าง เมื่อปลาตัวเมียว่ายน้ำอยู่ใกล้ๆ รัง ก็แสดงพฤติกรรมจับคู่โดยว่ายน้ำเคล้าคู่กันไป และใช้หางตีพร้อมกักกันเบาๆ พฤติกรรมเกี่ยวพาราซีติงกล่าวใช้เวลาไม่นานนัก ปลาตัวผู้ก็จะใช้บริเวณหน้าผากดันที่ใต้ท้องของตัวเมียเพื่อเป็นการกระตุ้นให้วางไข่ โดยปลาตัวเมียจะเก็บไข่ที่ได้รับการผสมแล้วอมไว้ในปากและว่ายน้ำออกจากรัง ส่วนปลาตัวผู้จะคอยหาโอกาสเคล้าเคลียกับปลาตัวเมียอื่นต่อไป หลังจากนั้นแม่ปลาจะขยับปากให้น้ำไหลเข้าออกในช่องปากอยู่เสมอ เพื่อช่วยให้ไข่ที่อมไว้ได้รับน้ำที่สะอาด ปริมาณไข่ที่แม่ปลาวางแต่ละครั้งขึ้นอยู่กับขนาดของแม่ปลาและฤดูกาล โดยทั่วไปแล้วปลานิลจะวางไข่ได้ครั้งละ 50–600 ฟอง แม่ปลาที่เริ่มวางไข่ครั้งแรกจะให้ลูกปลาจำนวนน้อย ปริมาณไข่จะเพิ่มตามขนาดของ

แม่ปลาที่เจริญวัยขึ้น (สุภาพร, 2542) ไข่จะมีพัฒนาการเป็นลูกปลาวัยอ่อนภายใน 8 วัน ในช่วงระยะเวลาที่ลูกปลาฟักออกมาเป็นตัวใหม่ๆ ลูกปลาวัยอ่อนจะเกาะรวมตัวกันเป็นกลุ่ม โดยว่ายวนเวียนอยู่บริเวณหัวของแม่ปลา และเข้าไปหลบซ่อนอยู่ในช่องปากเมื่อมีภัย หลังจาก 3 สัปดาห์แล้ว ลูกปลาจะหากินได้โดยลำพัง ปกติปลาในลสามารถผสมพันธุ์ได้ตลอดปี โดยใช้เวลา 2-3 เดือนต่อครั้ง แต่ถ้าอาหารเพียงพอและเหมาะสม จะสามารถผสมพันธุ์ได้ 5-6 ครั้ง ในระยะเวลา 1 ปี (Popma and Masser, 1999) ขนาดอายุ และช่วงการสืบพันธุ์ของปลาแต่ละตัว จะแตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อมและสภาพทางสรีรวิทยาของปลาเอง

2.2 กล้ามเนื้อของปลา

กล้ามเนื้อเป็นเนื้อเยื่อที่พบได้ทุกส่วนของร่างกาย เมื่อกล้ามเนื้อหดตัวและคลายตัว จะทำให้เกิดการเคลื่อนไหวส่วนต่างๆ ส่วนมากกล้ามเนื้อในร่างกายจะมีเส้นประสาทมาควบคุมการทำงานเพียงเส้นเดียว แต่กล้ามเนื้อที่อยู่บริเวณลำตัวจะมีเส้นประสาทมาควบคุมหลายเส้น (McArdle *et al.*, 1996; Marieb *et al.*, 2013) กล้ามเนื้อส่วนใหญ่ประกอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อ (muscle fiber) ภายในมีเส้นใยกล้ามเนื้อย่อย (myofibril) ที่ประกอบด้วยเส้นใยฝอย (myofilament) และเยื่อเกี่ยวพันระหว่างมัด (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 ซึ่งเส้นใยชนิดหนาเป็นส่วนประกอบของโปรตีนไมโอซิน และเส้นใยชนิดบางเป็นส่วนประกอบของโปรตีนแอคติน (วิชัย, 2534)

กล้ามเนื้อลายแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ กล้ามเนื้อแดง (red muscle) และกล้ามเนื้อขาว (white muscle) โดยกล้ามเนื้อแดงอยู่บริเวณด้านข้างลำตัวใต้ผิวหนังระหว่างกล้ามเนื้อด้านบน (expaxial muscle) และกล้ามเนื้อด้านล่าง (hypaxial muscle) มีลักษณะเป็นแผ่นบาง มีเส้น

เลือดแดงมาหล่อเลี้ยง และมีเส้นเลือดฝอยจำนวนมาก กล้ามเนื้อแดงมีซาร์โคไมเออร์ที่เล็กกว่า กล้ามเนื้อขาวถึง 3 เท่า (เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 18–75 ไมโครเมตร) แต่ปริมาตรของเลือดที่มาหล่อเลี้ยงมากกว่า และไมโทคอนเดรียของกล้ามเนื้อแดงจะใหญ่และหนาแน่นกว่า กล้ามเนื้อแดงใช้พลังงานจากการสลายสารชีวโมเลกุลแบบใช้ออกซิเจน (aerobic catabolism) ทำหน้าที่รักษาความต่อเนื่องในการว่ายน้ำของปลา ส่วนกล้ามเนื้อขาว พบบริเวณลำตัวด้านหลังและกะโหลกศีรษะ มีลักษณะเป็นมัดใหญ่และหนา (เส้นผ่านศูนย์กลางยาวถึง 300 ไมโครเมตร) เส้นใยกล้ามเนื้อไม่ค่อยมีเส้นเลือดมาเลี้ยง ไมโทคอนเดรียมีขนาดเล็กมาก ทำให้กล้ามเนื้อมีสีซีด กล้ามเนื้อขาวทำงานแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic) โดยใช้พลังงานจากกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) มีแคลเซียมไอออนช่วยในการหดตัวของกล้ามเนื้อ ปลาใช้กล้ามเนื้อขาวเป็นหลักในการว่ายน้ำในช่วงเวลาสั้น ๆ เช่น การว่ายน้ำทวนกระแสน้ำ และการจู่โจมเหยื่อ (สุภาพร, 2542)

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

โปรตีนไมโอซินและแอกทิน เป็นโครงสร้างหลักของกล้ามเนื้อสัตว์ที่ทำหน้าที่โดยตรงเกี่ยวกับการหดและคลายตัว เมื่อสัตว์ตาย เซลล์กล้ามเนื้อขาดพลังงานจากการหายใจ แอกทินกับไมโอซินจะจับกันแน่น รวมตัวกันเป็นแอกโทไมโอซิน (actomyosin) กล้ามเนื้อจึงหดตัว แต่ไม่คลายตัว เนื่องจากขาดอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate: ATP) ทำให้ซากสัตว์แข็งที่อยู่อายุระยะหนึ่งภายหลังการตาย (Tyska and Warshaw, 2002) ในขณะที่ซาร์โคพลาสมิคโปรตีน (sarcolemmal protein) และองค์ประกอบอื่นๆ แขนงลอยอยู่ในส่วนของไซโทพลาสซึม (cytoplasm) (Matos *et al.*, 2011) ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของร่างกายหลังจากการตายเช่นกัน

การเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อภายหลังการตายมี 3 ระยะ เริ่มจากระยะก่อนการเกร็งตัว โดยเกิดกระบวนการไกลโคไลซิซตั้งแต่วินาทีแรกเริ่มตายจนกระทั่งถึงระยะเริ่มแรกที่ ATP ในกล้ามเนื้อลดลง โดยมีการย่อยสลายโปรตีนซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ เอนไซม์คาเทปซิน (cathepsin) เอนไซม์คาลเพน (calpain) และเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนลง มีรอยเขียวช้ำ และมีความยืดหยุ่น (Shahidi and Botta, 1994; Dent *et al.*, 2004) ต่อมาเป็นระยะการเกร็งตัว โดยที่แอกทินและไมโอซินรวมตัวกันอย่างถาวรเป็นแอกโทไมโอซิน เนื่องจากขาดพลังงานจาก ATP ในการคลายตัวของกล้ามเนื้อเมื่อตายและกล้ามเนื้อขาดออกซิเจน ไกลโคเจนจะเกิดการเปลี่ยนแปลงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยที่กลูโคสจะเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกและพลังงานในรูป ATP เมื่อไกลโคเจนหมดไปกล้ามเนื้อจะเกิดการเกร็งตัว 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 ชั่วโมง ตามลำดับ 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, 2015b) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงต่อระยะเวลาภายหลังการตายตรวจพบเช่นกันในปลาแพะ (*Mullus barbatus*) ปลากะพงแดง (*Lutjanus campechanus*) และปลาดุก (*Ictalurus punctatus*) (Schubring, 1999) นอกจากนี้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Krompecher, 1994; Dalal *et al.*, 2006) พบการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายช้ากว่าในปลา เนื่องมาจากกล้ามเนื้อมีความซับซ้อน และมีหลอดเลือดมาเลี้ยงกล้ามเนื้อมากกว่า (Gillis and Biewener, 2001; Smith, 2011)

2.3 ตับของปลา

ตับเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ และเป็นต่อมที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในร่างกาย พื้นผิวของตับเกือบทั้งหมดจะถูกคลุมด้วยเยื่อช่องท้อง เพื่อลดการเสียดสีระหว่างอวัยวะ ตับมีลักษณะเป็นพูสีเหลืองปนน้ำตาล ชั้นเยื่อผิวที่ปกคลุมเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เป็นเส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) และเส้นใยร่างแห (reticular fiber) (Vicentini *et al.*, 2005) ตับมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึม รวมทั้งมีหน้าที่หลายประการในร่างกาย เช่น สังเคราะห์โปรตีนในพลาสมา เป็นที่อยู่ของเม็ดเลือดเพื่อดักจับเชื้อโรค (Stamatoglou and Hughes, 1994) ผลิตน้ำดีซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการย่อยไขมัน และสะสมไกลโคเจนอยู่ภายในแกรนูล (granule) ที่มีขนาด 10–40 นาโนเมตร โดยแกรนูลเหล่านั้นจะมีเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างและการสลายไกลโคเจน (Berg *et al.*, 2002; Roach, 2002) สำหรับตับอ่อนทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ย่อยอาหารหลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์อะไมเลส (amylase) ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) และไลเปส (lipase) (Thongprajukaew and Kovitvadi, 2013)

ตับของปลาจะรวมอยู่กับตับอ่อน (hepatopancreas) ส่วนประกอบที่สำคัญ ได้แก่ เซลล์ตับ (hepatocyte) อยู่ถัดลงไปจากชั้นเยื่อผิว โดยเซลล์ตับของปลามีลักษณะคล้ายกับปลากระดูกแข็งชนิดอื่นๆ (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 โดยจากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของตับ พบว่าเซลล์ตับจะย้อมติดสีชมพู ในขณะที่เซลล์อะซินาร์ของตับอ่อนจะย้อมติดสีม่วง และไซโมเจนแกรนูลย้อมติดสีแดง (Paris-Palacios *et al.*, 2000)

ภายหลังการตาย อวัยวะภายในทางเดินอาหารเป็นบริเวณที่เน่าเสียก่อนเป็นอันดับแรก รองลงมาคือตับ (เนตรนรินทร์, 2546) เนื่องจากแบคทีเรียในลำไส้แพร่กระจายเข้าสู่ตับและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว จนทำให้เกิดการเน่าเปื่อย โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น อุณหภูมิของสภาพแวดล้อม และความชื้นของอากาศ เป็นต้น (Flanagan *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010) นอกจากนี้ตับยังมีการสะสมไกลโคเจน และมีกระบวนการเมแทบอลิซึมแบบใช้ออกซิเจน อีกทั้งตับอ่อนยังผลิตเอนไซม์ย่อยอาหารหลายชนิด (Thongprajukaew and Kovitvadhi, 2013) ที่ช่วยส่งเสริมให้การย่อยสลายเร็วขึ้น โดยภายหลังการตายตับจะเกิดกระบวนการย่อยสลายด้วยตัวเอง และเกิดการหดตัวของเซลล์ทำให้ตับนุ่มเหลว และรูปร่างผิดปกติกไป (Yamamoto *et al.*, 1997) ระดับของ ATP ในตับจะลดลงอย่างรวดเร็ว และจะหมดไปภายใน 2 ชั่วโมง ทำให้สูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์โปรตีน นอกจากนี้ยังเกิดช่องว่างที่เซลล์ตับเพิ่มมากขึ้น ทำให้องค์ประกอบในเซลล์ตับถูกแทนที่ด้วยน้ำเลือด และไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ (Li *et al.*, 2003)

2.4 เกล็ดของปลา

เกล็ดปลามีลักษณะแข็ง แบน และเบา เป็นองค์ประกอบของกระดูกที่ปกคลุมและทำหน้าที่ปกป้องกันผิวของปลาไว้ การซ้อนทับกันของเกล็ดช่วยทำให้เกิดความยืดหยุ่นเพื่อให้ปลาสามารถขยับร่างกายในรูปแบบต่างๆ ได้คล่องแคล่ว (Yang *et al.*, 2013) โดยปลานิลมีเกล็ดแบบอีลาสมอยด์ (elasmoid scale) ชนิดกลมผิวเรียบ (cycloid) ประกอบด้วย 2 ชั้น คือ ชั้นนอกมีเส้นใยคอลลาเจนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20–30 นาโนเมตร จัดเรียงตัวแบบสุมและฝังตัวอยู่ในโปรตีโอไกลแคน (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) คอลลาเจนในเกล็ดของสัตว์น้ำส่วนใหญ่มีช่วงอุณหภูมิที่ทำให้เริ่มเสถียรภาพอยู่ที่ 26–29 องศาเซลเซียส แต่สำหรับในปลานิลมีช่วงอุณหภูมิที่ทำให้เสถียรภาพอยู่ที่ 36 องศาเซลเซียส อีกทั้งในภาวะขาดน้ำจะส่งผลต่อโครงสร้างของคอลลาเจนในเกล็ด เนื่องจากมีการสร้างพันธะเพปไทด์เพิ่ม และมีการกำจัดโมเลกุลน้ำ ทำให้เกล็ดไม่ยืดหยุ่น (Ikoma *et al.*, 2003b) นอกจากนี้เกล็ดยังประกอบด้วยสารอินทรีย์ เช่น โปรตีนเคราติน และสารอินทรีย์ เช่น คาร์บอนเนต และอะพาไทต์ (Perga and Gerdeaux, 2003; Sinnatamby *et al.*, 2007) ซึ่งส่วน

ใหญ่เป็นไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีแคลเซียมน้อย (calcium-deficient hydroxyapatite) โดยประกอบด้วยโซเดียม แมกนีเซียม และคาร์บอเนตไอออน 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 ปลายังสามารถดูดซับแร่ธาตุจากสิ่งแวดล้อมไว้ได้ โดยผ่านทางเหงือกและผิวหนังเมื่ออยู่ในน้ำจืด 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) โดยการสะสมของแร่ธาตุเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้คอลลาเจนในเกล็ดมีความแข็งแรง ทำให้เกล็ดแข็งและทำหน้าที่ป้องกันผิวหนังของปลาได้ดีขึ้น (Meunier, 1984)

การศึกษาในปลาสกุล *Pagrus* พบโซเดียม แมกนีเซียม และคาร์บอเนตไอออน ในกระบวนการสร้างไฮดรอกซีอะพาไทต์ของเกล็ด (Ikoma *et al.*, 2003a) ในเกล็ดปลาทอง (*Carassius auratus*) พบว่าเกล็ดชั้นใน ส่วนบนบริเวณที่ติดกับเกล็ดชั้นนอก มีการสะสมแร่ธาตุมากกว่าตรงกลางและส่วนฐานของเกล็ดชั้นใน (Zylberberg *et al.*, 1992) เช่นเดียวกับปลาช่อนยักษ์อะเมซอน (*Arapaima gigas*) ที่มีการสะสมแร่ธาตุบริเวณเกล็ดชั้นนอกมากกว่า ส่งผลให้เกล็ดมีความแข็งแรงกว่าเกล็ดชั้นใน (Yang *et al.*, 2013) แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของปลาด้วย โดยระดับการสะสมแร่ธาตุที่แตกต่างกันในแต่ละบริเวณของเกล็ด ขึ้นอยู่กับการปรับเปลี่ยนโครงสร้างระดับนาโนของเกล็ดปลา และปฏิกิริยาระหว่างคอลลาเจนกับน้ำ ซึ่งไม่มีรูปแบบที่แน่นอน (Torres *et al.*, 2012) ในเกล็ดปลานิล พบการกระจายของแร่ธาตุอยู่ในเส้นใยคอลลาเจนแต่ละเส้น และสะสมอยู่ในนิวเคลียสที่อยู่ในช่องว่าง (hole zone) (Okuda *et al.*, 2009) โดยคอลลาเจนจากเกล็ดปลาสามารถรวมตัวกันภายใต้อุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าคอลลาเจนในกระดูกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Williams *et al.*, 1978; Kadler *et al.*, 1996)

2.5 สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก

สารอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds: VOCs) คือ กลุ่มของสารประกอบที่มีความดันไอมากกว่า 1 มิลลิเมตรปรอท สามารถระเหยเป็นไอกระจายตัวไปในอากาศได้ง่ายที่อุณหภูมิและความดันปกติ โมเลกุลส่วนใหญ่ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจน นอกจากนี้อาจมีออกซิเจนหรือฮาโลเจน 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; Statheropoulos *et al.*, 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) โดยแอลกอฮอล์เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ภายหลังการตายของสิ่งมีชีวิตหรือการย่อยสลายไกลโคเจนเป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งเกิดขึ้นในตับ สำหรับน้ำตาลจะกระจายเข้าไปในหลอดเลือดที่อยู่ใกล้เคียงภายใต้สภาวะที่ใช้ออกซิเจน และมักจะถูกเผาผลาญอย่างสมบูรณ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ในขณะที่ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน จะได้ผลิตภัณฑ์ประเภทหมัก เช่น กรดแลคติก (lactic acid) กรดบิวทาโนอิก (butanoic acid) และกรดแอซีติก (acetic acid) (Gill-King, 1997; Dent *et al.*, 2004; Boumba *et al.*, 2008) ส่วนแอลกอฮอล์ที่มีโซ่กิ่ง (branched alcohols) มักจะเกิดจากการดอะมิโน (amino acid) ที่ถูกย่อยผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม และการสลายตัวของกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acids) ซึ่งปฏิกริยาระหว่างกรดคาร์บอกซิลิกกับแอลกอฮอล์ทำให้เกิดสารกลุ่มเอสเทอร์ (Paczkowski and Schütz, 2011) สารกลุ่มแอลกอฮอล์ที่สำคัญ คือ 1-hexanol ที่ผลการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าเกิดจากเผาผลาญอาหารของเชื้อรา (fungal metabolism) (Korpi *et al.*, 1998; Paczkowski and Schütz, 2011)

การย่อยสลายไขมันด้วยเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส (phospholipase) โดยทั่วไปพบในส่วนของกล้ามเนื้อ ทางเดินอาหาร และตับ มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายฟอสโฟลิพิด (phospholipid) และเอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) เกิดเป็นกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว (Cabirol *et al.*, 1998; Vass *et al.*, 2002) สำหรับการย่อยสลายกรดนิวคลีอิกจะได้เป็นไนโตรจีนัสเบส (nitrogenous base) ฟอสเฟต และน้ำตาล (Vass *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีกรดคาร์บอกซิลิกที่เกิดจากการย่อยสลายไขมันคาร์โบไฮเดรต และกรดอะมิโนด้วยจุลินทรีย์ (Paczkowski and Schütz, 2011) โดยกรดอะมิโน เช่น ไอโซลิวซีน (isoleucine) เป็นสารที่ดึงดูดแมลงวันวงศ์ Piophilidae และ Calliphoridae ตัวเต็มวัย อีกทั้งยังสามารถดึงดูดแมลงดูดเลือด (bloodsucking insects) ตัวมูลสัตว์ (dung beetles) และตักแตนกินซาก (necrophagous grasshoppers) (Wolff *et al.*, 2001; Barrozo and Lazzari, 2004; Dormont *et al.*, 2010; Whitman and Richardson, 2010) สำหรับกรดไขมันสายยาวที่สามารถดึงดูดตัวผู้ เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาซาพอนิฟิเคชัน (saponification) ประกอบด้วย กรดไขมัน และเอสเทอร์ (Levinson *et al.*, 1981) ซึ่งกรดไขมันจะเกิดกระบวนการสลายได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลกอฮอล์ 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)

โปรตีนจะย่อยสลายเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กลงกว่าเดิม 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 (polysulphides) ซึ่ง

รายงานที่สามารถดึงดูดแมลงให้มากินซากได้ 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; Statheropoulo *et al.*, 2005) รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของต่างที่ระเหยได้ เช่น ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ (trimethylamine oxide: TMAO) เป็นไตรเมทิลเอมีน (trimethylamine: TMA) และไดเมทิลเอมีนออกไซด์ (dimethylamine oxide: DMA) และการเปลี่ยนแปลงของฟอร์มัลดีไฮด์โดยเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ดีเมทิลเลส (trimethylamine oxide demethylase: TMAOase) (Shahidi and Botta, 1994) สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากที่ศึกษาในสัตว์บางชนิด แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การศึกษาเกี่ยวกับสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ภายหลังการตาย

Organism	Key VOCs	Postmortem delay (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)

ตารางที่ 1 การศึกษาเกี่ยวกับสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ภายหลังการตาย (ต่อ)

Organism	Key VOCs	Postmortem delay (h)	Organ	References
Pig (<i>S. domesticus</i>)	Benzaldehyde, phenol, dimethyltrisulfide, indole and undecan-2-one	240	Whole body	Brasseur <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-octanedi-one, 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)
Domestic pig (<i>S. scrofa domesticus</i>)	Dimethyl trisulfide, dimethyl disulfide, nonanal and hexan-1-ol	1,536 (autumn) 1,320 (summer)	Whole body	Paczkowski <i>et al.</i> (2014)
Domestic pig (<i>S. scrofa domesticus</i>)	1-Hexanol, 1-octen-3-ol, 1-pentanol, carbon disulfide, dimethyl sulfide and hexanal	0–72	Whole body	Armstrong <i>et al.</i> (2016)

2.6 ปฏิกริยาออกซิเดชันภายหลังการตาย

ภายหลังการตายมีการเปลี่ยนแปลงของปฏิกริยาออกซิเดชัน (oxidation) ซึ่งเป็นปฏิกริยาที่โมเลกุลหรืออะตอมมีการสูญเสียอิเล็กตรอน (reducing agent) จากวงโคจรให้กับโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (oxidizing agent) ปฏิกริยาออกซิเดชันทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ของสารต่างๆ โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมของสารที่อยู่ใกล้เคียงเพื่อทำให้เสถียร โมเลกุลที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งจะไปทำปฏิกริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกริยา

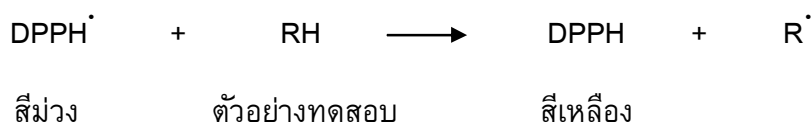
ลูกโซ่ (chain reaction) (Halliwell, 1991; Ames *et al.*, 1993) ซึ่งทำลายองค์ประกอบของเซลล์ (Lassoued *et al.*, 2015)

สารที่ร่างกายสร้างขึ้นในสภาวะปกติทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant) เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) กลูตาไธโอน เปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) คะตะเลส (catalase) เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) และไซโทโครมซี เปอร์ออกซิเดส (cytochrome C peroxidase) เป็นต้น และกลุ่มที่ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ เช่น วิตามินอี (vitamin E) เบตา-แคโรทีน (β -carotene) วิตามินซี (vitamin C) ยูบิควิโนน (ubiquinone) กรดยูริก (uric acid) กรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) ซึ่งมีอยู่ในโปรตีนของเนื้อสัตว์ เป็นต้น (รัตนา และประพนธ์, 2538; ไมตรี และวรพล, 2555) การศึกษาของ Lassoued *et al.* (2015) พบว่าเซลล์ที่ตายแล้วจะผลิตเปอร์ออกไซด์ (peroxide) และอนุมูลอิสระมาทำลายส่วนประกอบต่างๆ รวมทั้งเกิดสารจากการย่อยของเอนไซม์ เช่น เพปไทด์ขนาดต่างๆ ที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ แต่องค์ประกอบเหล่านี้ไม่เพียงพอที่จะกำจัดอนุมูลอิสระที่มากเกินไปภายหลังการตาย นอกจากนี้ในกระบวนการไฮโดรลิซิสที่ใช้เวลานานขึ้น เพปไทด์ที่เกิดจะมีสายสั้นลง และมีประสิทธิภาพน้อยลง

การตรวจวัดกิจกรรมการต้านออกซิเดชันที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่

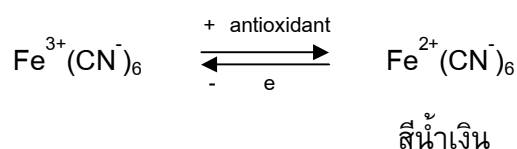
1. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธี 2,2-Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) (Hou *et al.*, 2001)

เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง (scavenging activity) โดยให้ไฮโดรเจนอะตอม และใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) วัดการลดลงของสีเมื่อเติมสารต้านออกซิเดชันลงไป ซึ่งอนุมูล DPPH[•] เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว อยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว มีสีม่วง เมื่อได้รับไฮโดรเจนจะเปลี่ยนไปเป็นสารละลายสีเหลืองตามสมการ



2. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธี reducing power (Oyaizu, 1986)

เป็นวิธีการศึกษาความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ แก่อนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นภายในระบบ โดยสารที่ต้องการทดสอบจะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่ อนุมูลอิสระ แล้วทำให้เปลี่ยนเป็นสารที่คงตัว อีกทั้งยังสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของ อนุมูลอิสระได้ โดยอาศัยจากการวัดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของ $\text{Fe}^{3+}(\text{CN}^-)_6$ ไปเป็น $\text{Fe}^{2+}(\text{CN}^-)_6$ ซึ่งจะทำให้สารทดสอบมีสีน้ำเงินเข้มขึ้น โดยค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นแสดงถึง ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนที่มากขึ้น



3. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อและตับ องค์ประกอบของธาตุจากเกล็ด และ สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก ภายหลังจากการตายของปลานิล (*O. niloticus*) ในช่วงระยะเวลาที่ แตกต่างกัน

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างปลาไหล

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

2. การเก็บตัวอย่าง

อดอาหารปลาไหลแปลงเพศก่อนเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นสุ่มปลาที่มีความยาวและน้ำหนักใกล้เคียงกัน (น้ำหนัก 105.83 ± 1.66 กรัม และความยาวเหยียด 18.55 ± 0.14 เซนติเมตร) มาสลบโดยใช้น้ำแข็ง และนำมาวางในภาชนะทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า ($32 \times 43 \times 11$ เซนติเมตร) ที่มีระดับน้ำสูง 7 เซนติเมตร และมีอุณหภูมิน้ำ 29.60 ± 0.15 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อแดง บริเวณด้านข้างลำตัวใต้ผิวหนังระหว่างกล้ามเนื้อด้านบนและกล้ามเนื้อด้านล่าง และเก็บกล้ามเนื้อขาวบริเวณกล้ามเนื้อด้านบนใต้ครีบล้าง (ก้านครีบหลังที่ 3 ถึง 10) เพื่อใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาออกซิเดชัน การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อน และการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาค ผ่าตัดเก็บตัวอย่างตับบริเวณช่องท้องเพื่อใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาค เก็บตัวอย่างเกล็ด (บริเวณใต้ก้านครีบหลังที่ 3 ถึง 7) เพื่อใช้ศึกษาองค์ประกอบของธาตุ และเก็บตัวอย่างปลาทั้งตัวเพื่อใช้ศึกษาสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก ภายหลังจากตายที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาออกซิเดชัน

เตรียมตัวอย่างโดยการสกัดกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Chéret *et al.* (2007) โดยบั่นกล้ามเนื้อให้เป็นเนื้อเดียวกันในทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl, pH 7.5) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีเบตา-เมอร์แคปโทเอทานอลความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และกรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติก ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (1:3 น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้เครื่องบั่นละเอียดเนื้อเยื่อ (THP-220; Omni International, Kennesaw GA, USA) และนำไปหมუნเหวี่ยงที่ความเร็ว $10,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที สารสกัดที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.1. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH

นำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Thongprajukaew *et al.* (2015) โดยละลาย DPPH น้ำหนัก 24 มิลลิกรัม ในเมทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยเมทานอลเพื่อให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 ± 0.5 หน่วย หลังจากนั้นนำสารสกัดปริมาตร 3 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (% inhibition) คำนวณจาก $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ เมื่อ A_0 เป็นค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างชุดควบคุมซึ่งเติมเมทานอลแทนสารสกัด และ A_1 เป็นค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ทดสอบ

3.2. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธี reducing power

นำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ความสามารถของการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันของสารทดสอบ ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Benzie and Strain (1996) และ Wong *et al.* (2006) โดยเตรียมสารละลายจากการผสม 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ กับอะซีเตทบัฟเฟอร์ (pH 5.2) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และเฟอริคคลอไรด์

(FeCl₃) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลายที่เตรียม ปริมาตร 2,850 ไมโครลิตรกับตัวอย่างปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วเก็บในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน (% remaining) คำนวณจาก $[(A_0 - A_t)/A_0] \times 100$ เมื่อ A_0 เป็นค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างชุดควบคุมซึ่งใช้โทรลอคซ์ (trolox) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน และ A_t เป็นค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ทดสอบ

4. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อน

เตรียมตัวอย่างกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาว โดยตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดประมาณ 20 มิลลิกรัม จากนั้นนำมาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนโดยใช้ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (DSC7, PerkinElmer, Waltham, USA) ในช่วงอุณหภูมิ 25 ถึง 120 องศาเซลเซียส กำหนดอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที และใช้น้ำแข็งเป็นตัวทำความเย็น

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนไมโอซินและแอกทิน ศึกษาตามอุณหภูมิที่โปรตีนเสียดสภาพธรรมชาติที่ 47–50 องศาเซลเซียส และ 73–75 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ตามรายงานวิจัยของ Matos *et al.* (2011) คุณสมบัติเชิงความร้อนของฟีกที่ตรวจสอบ ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้น (onset temperature: T_o) อุณหภูมิฟีก (peak temperature: T_p) อุณหภูมิสุดท้าย (conclusion temperature: T_c) ช่วงอุณหภูมิ (melting temperature range: $T_c - T_o$) และเอนทาลปี (enthalpy: ΔH) ของการเสียดสภาพธรรมชาติของโปรตีน

5. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาค

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อแดง กล้ามเนื้อขาว และตับ โดยเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีการของ Smith *et al.* (2000) ได้แก่ การคงสภาพเนื้อเยื่อในฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอล 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากนั้นล้างตัวอย่างพร้อมกับทำให้แห้งและใส โดยใช้เครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติระบบเปิด (TP1020, Leica, Wetzlar, Germany) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำการซึมและหล่อในพาราฟินโดยใช้เครื่องหล่อพาราฟิน (EG1150 H, Leica, Nussloch, Germany) แล้วทำให้พาราฟินแข็งตัวโดยใช้เครื่องทำความเย็น (EG1150 C, Leica, Nussloch, Germany) และตัด

เนื้อเยื่อโดยใช้เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Jung A.G., Heidelberg, Germany) ให้บางประมาณ 3–5 ไมโครเมตร นำไปปล่อยในน้ำอุ่นที่ผสมเจลาตินเพื่อให้เนื้อเยื่อเกาะกับสไลด์ แล้วช้อนเก็บเนื้อเยื่อบนแผ่นสไลด์ ออบในตู้อบลมร้อน (oven) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาย้อมสีนิวเคลียสด้วยสีฮีมาทอกซีลิน (hematoxylin) และย้อมสารที่อยู่ระหว่างเซลล์และไซโทพลาซึมด้วยสีอีโอซิน (eosin) และนำแผ่นสไลด์ที่ได้มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า

6. การศึกษาองค์ประกอบของธาตุจากเกล็ด

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

7. การศึกษาสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก

ศึกษาสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากของปลานิล เตรียมตัวอย่างโดยใช้เทคนิคเฮดสเปซโซลิดเฟสไมโครเอ็กซ์แทรกชัน (headspace solid phase microextraction: HS-SPME) โดยการบั่นชิ้นส่วนของปลาทั้งตัวให้เข้ากัน และนำตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 5 กรัม ใส่ในขวดเฮดสเปซ (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้ตัวดูดซับ SPME ชนิดคาร์โบวอกซ์พอลิไดเมทิลซิลอกเซน (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 อุณหภูมิภายในส่วนที่ใช้

บรรจุคอลัมน์เริ่มต้นที่ 35 องศาเซลเซียส และเพิ่มสูงสุดถึง 260 องศาเซลเซียส ในส่วนของเครื่องตรวจวัดแมสสเปกโตรมิเตอร์ ใช้แหล่งพลังงานจากอิเล็กทรอนิกส์ไอออนไนเซชัน โดยใช้อุณหภูมิตั้งที่ 200 องศาเซลเซียส

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 17 (SPSS Inc., Chicago, USA) รายงานผลข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบทางเดียว และเปรียบเทียบข้อมูลโดยใช้ Duncan Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พร้อมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาภายหลังการตายกับการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยใช้สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation: r^2) และรายงานผลเป็นสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) และแสดงสมการถดถอยระหว่างเวลากับการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยสมการเส้นตรง ($Y = mx + c$) เมื่อ Y คือ การเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชัน X คือ ระยะเวลาภายหลังการตาย (ชั่วโมง) m คือ ความชัน และ c คือ จุดตัดแกน y

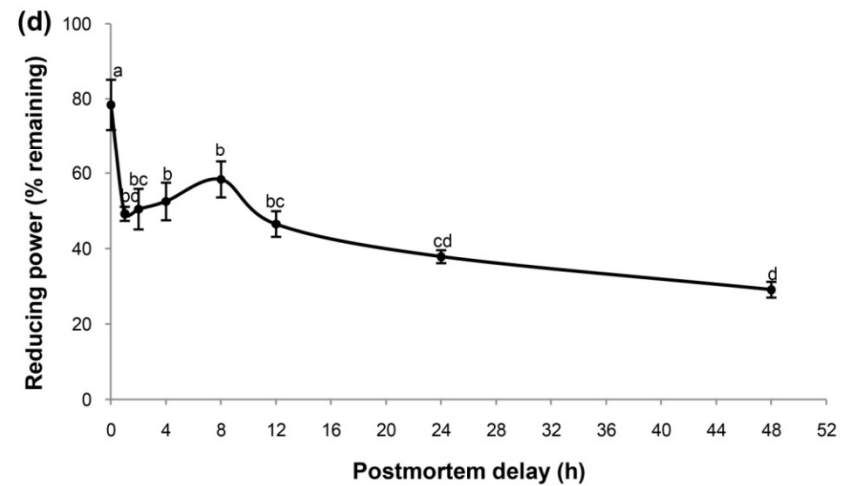
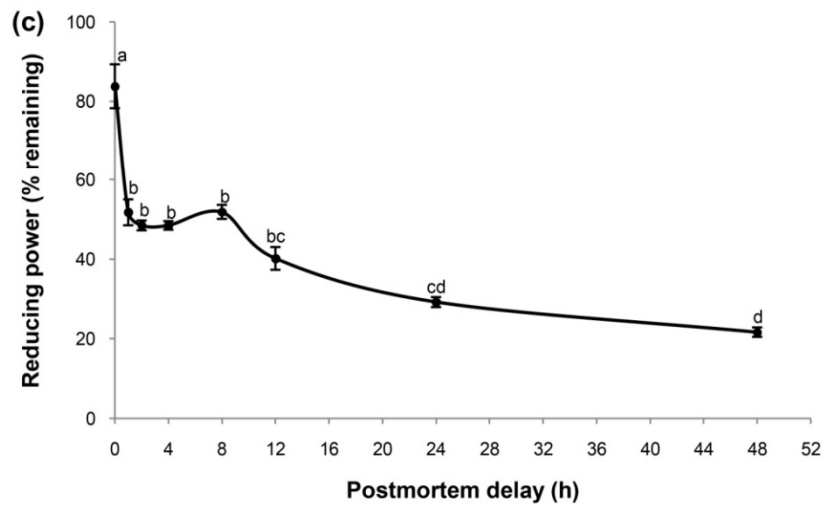
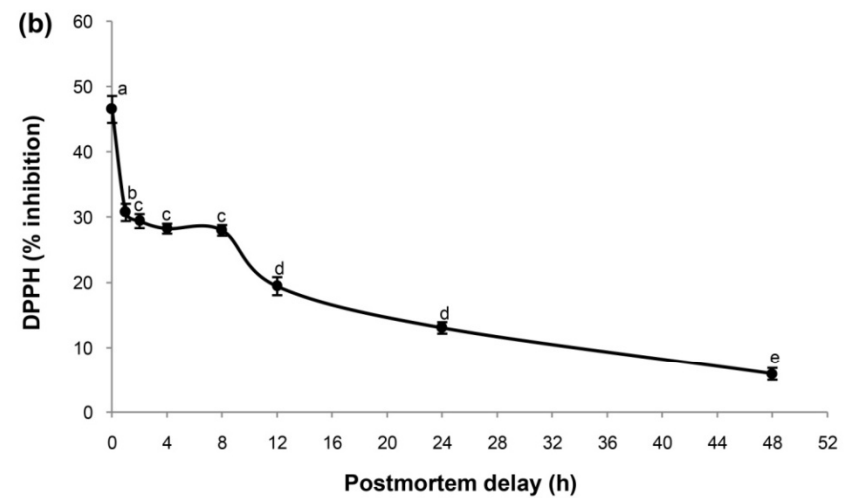
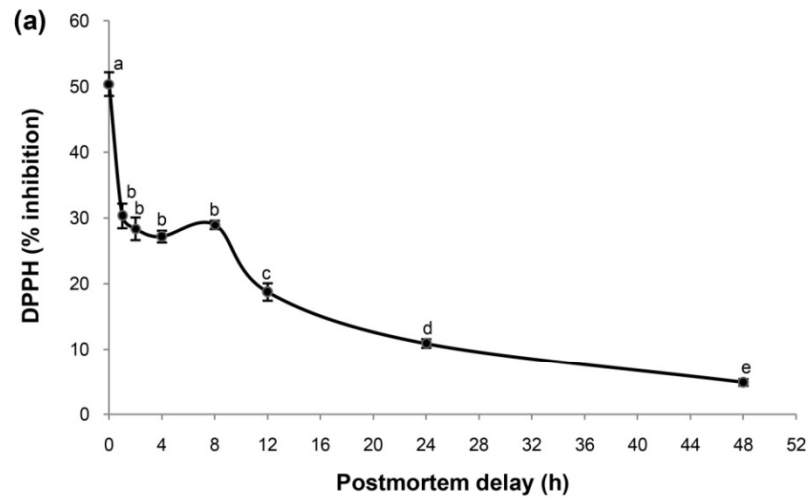
บทที่ 3

ผลการศึกษา

1. การเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อ

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

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



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกลัมน้ำเหลืองและเขียว 48 ชั่วโมง โดยใช้วิธี DPPH กลัมน้ำเหลือง (a) และ กลัมน้ำเขียว (b) และวิธี reducing power กลัมน้ำเหลือง (c) และ กลัมน้ำเขียว (d) อักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สันระหว่างการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาว โดยใช้วิธี DPPH และ reducing power มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกันโดยมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($r = 0.799-0.970$, $P < 0.01$, $n = 32$, ตารางที่ 2) และเวลาภายหลังการตาย (X) มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาว (Y) ทั้งโดยใช้วิธี DPPH และ reducing power [$r = (-0.684)-(-0.855)$, $P < 0.01$, $n = 32$, ตารางที่ 3] โดยการตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ($r^2 = 0.671-0.731$) จะมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาภายหลังการตายมากกว่าวิธี reducing power ($r^2 = 0.468-0.534$) และการตรวจสอบในกล้ามเนื้อขาว ($r^2 = 0.534-0.731$) จะมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาภายหลังการตายมากกว่าในกล้ามเนื้อแดง ($r^2 = 0.468-0.671$)

ตารางที่ 2 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) ระหว่างการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวภายหลังการตายของปลาไนล์ ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$)

Parameter	DPPH _R	DPPH _W	RP _R
DPPH _W	0.970		
RP _R	0.938	0.928	
RP _W	0.828	0.840	0.799

DPPH_R, % DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl) scavenging activity in red muscle;
 DPPH_W, % DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl) scavenging activity in white muscle;
 RP_R, reducing power in red muscle; RP_W, reducing power in white muscle

ตารางที่ 3 สมการถดถอยระหว่างเวลาภายหลังการตาย (ชั่วโมง) ของปลาไนล์ (X) และการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาว (Y) ตัวแปรทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับเวลาภายหลังการตายอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$)

Y variable	Regression equation	r
DPPH _R	$Y = -0.703X + 33.674$	-0.819
DPPH _W	$Y = -0.655X + 33.331$	-0.855
RP _R	$Y = -0.884X + 57.872$	-0.684
RP _W	$Y = -0.683X + 58.721$	-0.731

DPPH_R, % DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl) scavenging activity in red muscle;
 DPPH_W, % DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl) scavenging activity in white muscle;
 RP_R, reducing power in red muscle; RP_W, reducing power in white muscle

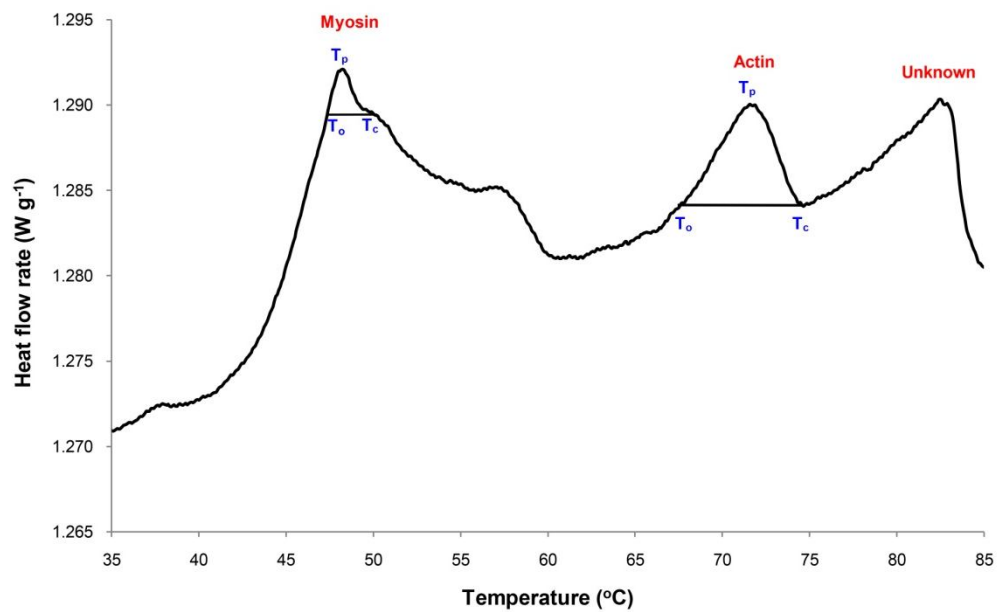
2. การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของกล้ามเนื้อ

เทอร์โมแกรมของกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวในตัวอย่างชุดควบคุม (0 ชั่วโมง) แสดงการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อน โดยพบการเสียดสภาพของโปรตีนไมโอซินในกล้ามเนื้อแดง (อุณหภูมิเริ่มต้น 41.92 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิพีค 46.25 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิสุดท้าย 48.72 องศาเซลเซียส) (ภาพที่ 3a) และกล้ามเนื้อขาว (อุณหภูมิเริ่มต้น 44.45 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิพีค 46.88 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสุดท้าย 48.62 องศาเซลเซียส) (ภาพที่ 3b) และแอกทินในกล้ามเนื้อแดง (อุณหภูมิเริ่มต้น 66.33 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิพีค 70.84 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสุดท้าย 73.47 องศาเซลเซียส) (ภาพที่ 3a) และกล้ามเนื้อขาว (อุณหภูมิเริ่มต้น 68.31 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิพีค 71.04 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสุดท้าย 73.42 องศาเซลเซียส) (ภาพที่ 3b) นอกจากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนไมโอซินและแอกทินแล้ว ยังตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนบางชนิดในกล้ามเนื้อแดง ที่มีอุณหภูมิเริ่มต้น 77.18 องศาเซลเซียส อุณหภูมิพีค 82.04 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสุดท้าย 84.06 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3a)

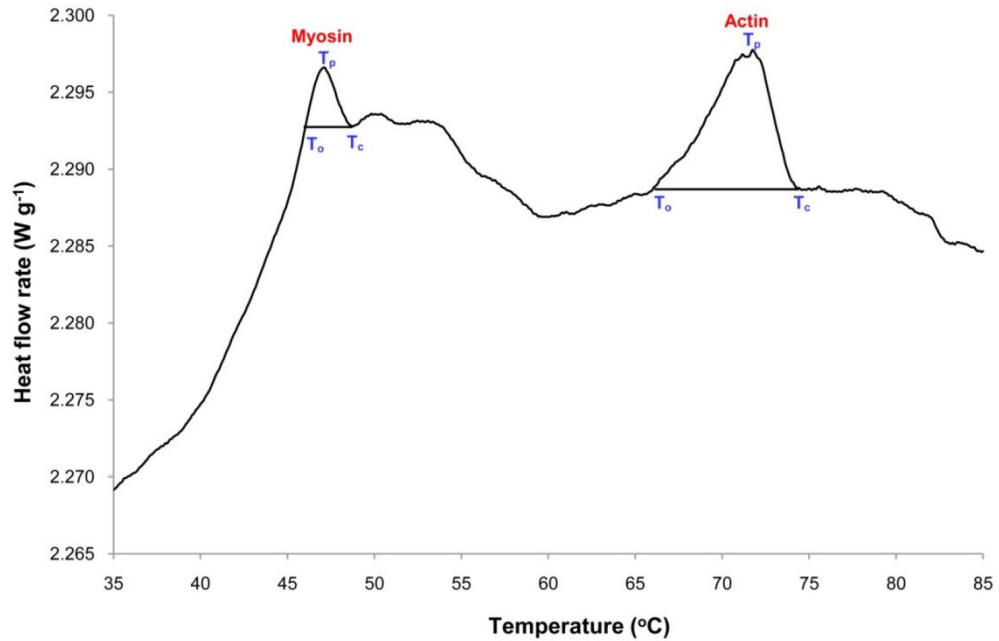
ระยะเวลาภายหลังการตายมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อทั้ง 2 ชนิด คุณลักษณะพีค ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้น อุณหภูมิพีค อุณหภูมิสุดท้าย ช่วงอุณหภูมิ และเอนทาลปีของการเสียดสภาพของโปรตีน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในช่วงเวลา 0–12 ชั่วโมง แต่มีแนวโน้มลดลงในชั่วโมงที่ 24 ($P < 0.05$) จนไม่สามารถตรวจวัดได้ในช่วงเวลาสุดท้าย (ตารางที่ 4 และ 5) ไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อแดง มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4) ในขณะที่กล้ามเนื้อขาว แอกทินมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงมากกว่าไมโอซิน โดยอุณหภูมิเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 12 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเวลา 0 ชั่วโมง (ตารางที่ 5)

ช่วงอุณหภูมิของไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อแดงไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 4) แต่ในกล้ามเนื้อขาว ช่วงอุณหภูมิมิมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาภายหลังการตายจนถึงชั่วโมงที่ 24 ($P < 0.05$, ตารางที่ 5) สำหรับเอนทาลปีของไมโอซินในกล้ามเนื้อแดง พบว่ามีค่าน้อยที่สุดในชั่วโมงที่ 24 (ตารางที่ 4) แต่เอนทาลปีของแอกทินในกล้ามเนื้อแดง (ตารางที่ 4) กับไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อขาว (ตารางที่ 5) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ผลรวมเอนทาลปีของไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อแดงมีค่าน้อยที่สุดในชั่วโมงที่ 24 (ตารางที่ 4) แต่ในกล้ามเนื้อขาว ผลรวมเอนทาลปีมีค่าใกล้เคียงกัน

(a)



(b)



ภาพที่ 3 สมบัติเชิงความร้อนของไมโอซิน และแอกทิน ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้น (T_0) อุณหภูมิพีค (T_p) และอุณหภูมิสุดท้าย (T_c) ในกล้ามเนื้อแดง (a) และ กล้ามเนื้อขาว (b) ของปลานิลในชุดควบคุม (0 ชั่วโมงภายหลังการตาย)

ตารางที่ 4 คุณสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและแอกทิน ในกล้ามเนื้อแดงของปลานิลแปลงเพศ ภายหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)

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

ตารางที่ 5 คุณสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินและแอกทิน ในกล้ามเนื้อขาวของปลานิลแปลงเพศ ภายหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)

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

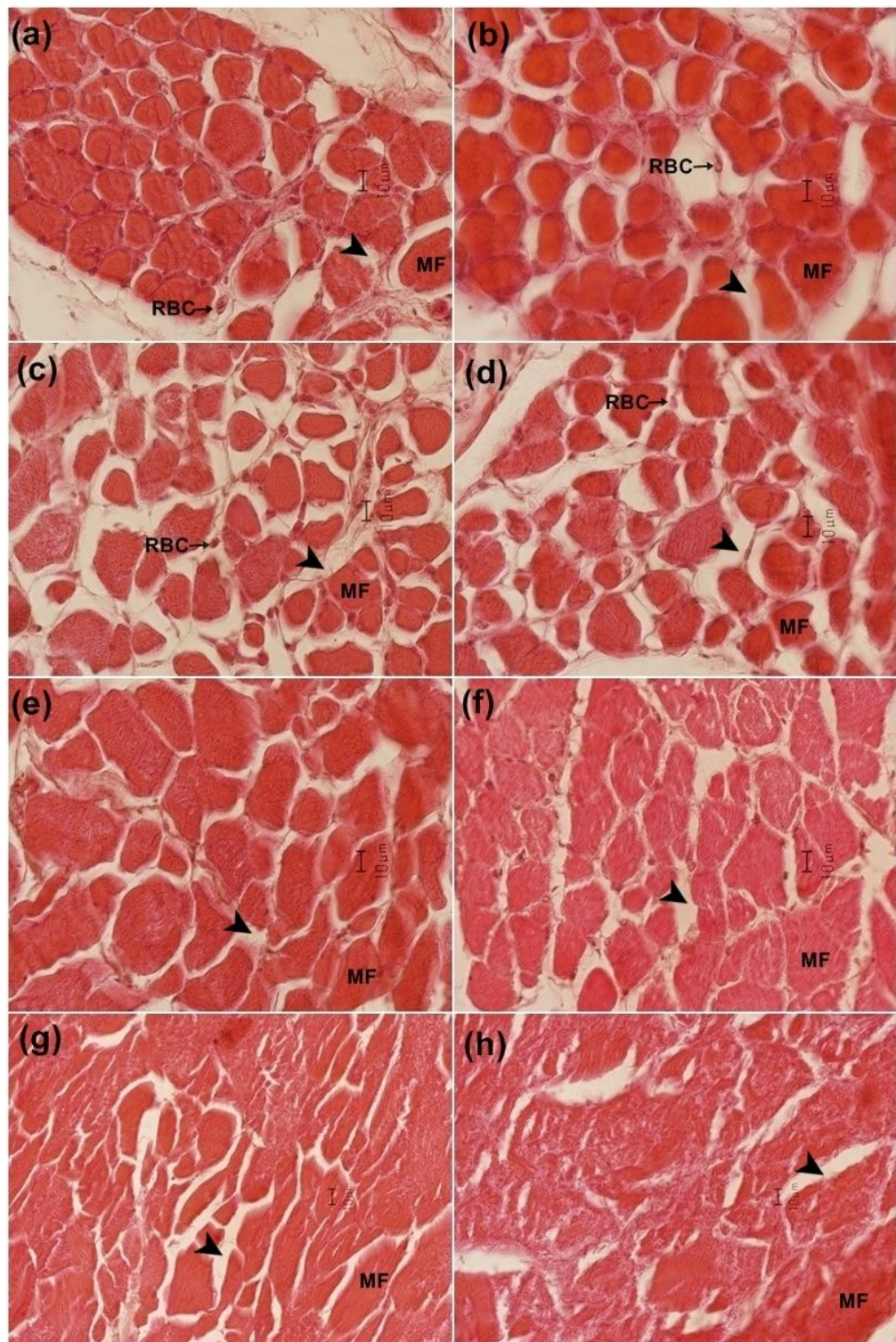
อักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3. การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อและตับ

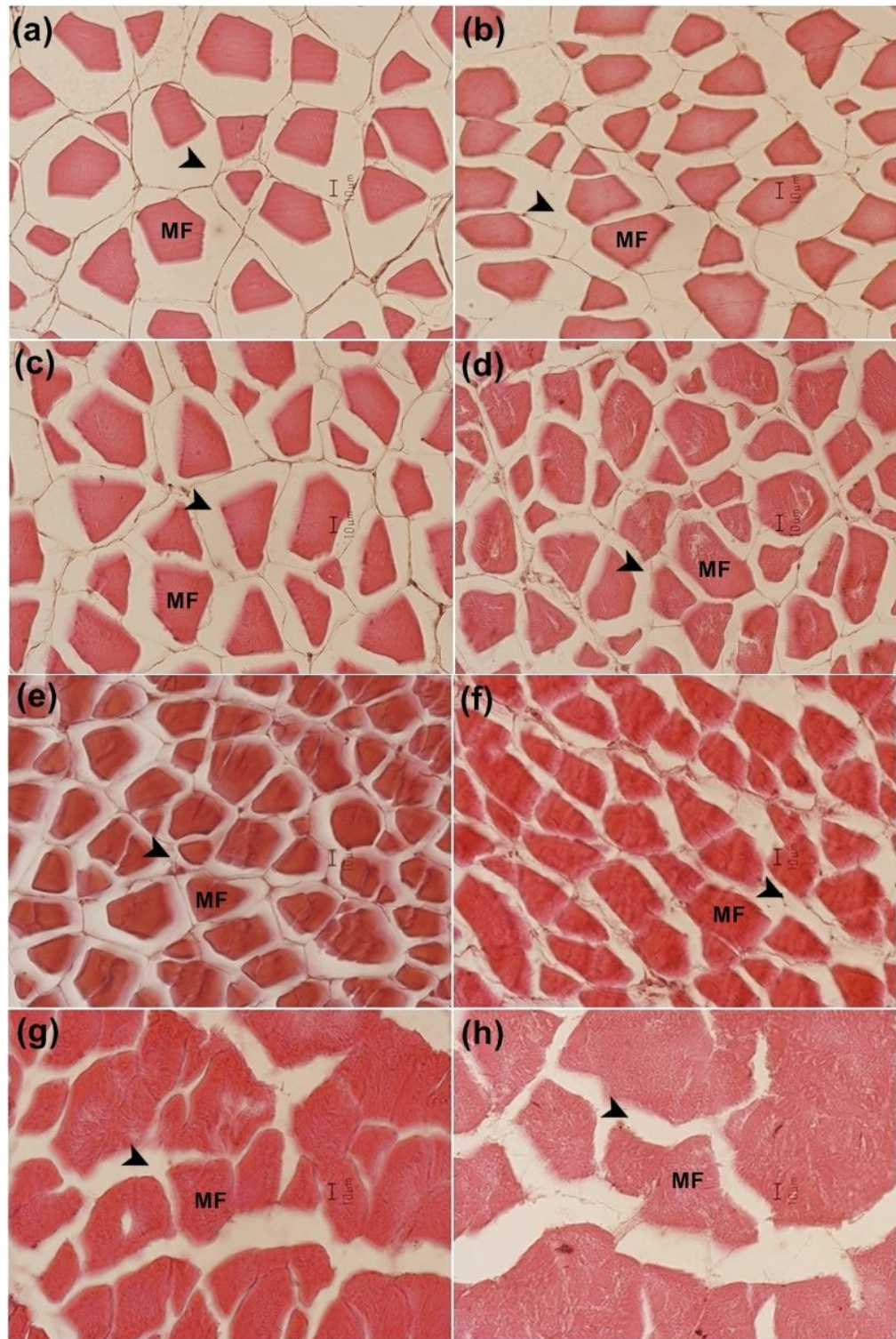
3.1 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อปลาไนลภายหลังการตาย 48 ชั่วโมง พบว่ากล้ามเนื้อแดงที่เวลาภายหลังการตาย 0–1 ชั่วโมง ประกอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อจำนวนมาก ล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชั้นเอนโดไมเซียม (endomysium) และมีเซลล์เม็ดเลือดแดง (red blood cell) และเส้นเลือดแทรกอยู่ระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 4a–4b) ภายหลังการตาย 2–4 ชั่วโมง พบเซลล์ภายในเส้นใยกล้ามเนื้อเริ่มเสื่อมสลาย ทำให้มีรูปร่างเปลี่ยนไป และยังคงพบเซลล์เม็ดเลือดแดงแทรกอยู่เล็กน้อย (ภาพที่ 4c–4d) ภายหลังการตาย 8–12 ชั่วโมง พบเอนโดไมเซียมลดลงจนส่งผลให้เส้นใยกล้ามเนื้อมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป และมีการสลายตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงและเส้นเลือด (ภาพที่ 4e–4f) ภายหลังการตาย 24 ชั่วโมง พบเอนโดไมเซียมลดลงอย่างมาก ทำให้เซลล์ภายในเส้นใยกล้ามเนื้อสลายตัว (ภาพที่ 4g) ในชั่วโมงที่ 48 พบการสลายตัวของกล้ามเนื้ออย่างเห็นได้ชัด โดยเอนโดไมเซียมลดลงจนไม่สามารถทำให้เส้นใยกล้ามเนื้อคงรูปร่างเดิมได้อีก (ภาพที่ 4h)

กล้ามเนื้อขาวของปลาไนลมีลักษณะของเส้นใยกล้ามเนื้อซึ่งล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชั้นเอนโดไมเซียมเช่นเดียวกัน แต่การย้อมติดสีจางกว่ากล้ามเนื้อแดงเล็กน้อย โดยพบลักษณะของเส้นใยกล้ามเนื้อชัดเจนที่เวลาภายหลังการตาย 0–2 ชั่วโมง (ภาพที่ 5a–5c) แต่เริ่มเห็นการลดลงของเอนโดไมเซียมเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 2 (ภาพที่ 5c) ในชั่วโมงที่ 4–12 เส้นใยกล้ามเนื้อเริ่มสลายตัว และเอนโดไมเซียมลดลงอย่างเห็นได้ชัด ทำให้เส้นใยกล้ามเนื้อมีรูปร่างเปลี่ยนไป (ภาพที่ 5d–5f) ที่เวลาภายหลังการตาย 24 ชั่วโมง เอนโดไมเซียมลดลงจนทำให้เส้นใยกล้ามเนื้อมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เนื่องจากเซลล์ภายในกล้ามเนื้อเสื่อมสลาย แต่ยังไม่มีการแตกออกมาภายนอกเซลล์จนเห็นได้ชัดเหมือนกล้ามเนื้อแดง (ภาพที่ 5g) ในชั่วโมงที่ 48 ภายหลังการตาย พบการสลายตัวของกล้ามเนื้ออย่างเห็นได้ชัด โดยเอนโดไมเซียมลดลงอย่างมาก ทำให้ไม่มีประสิทธิภาพในการยึดเส้นใยกล้ามเนื้อ ส่งผลให้เส้นใยกล้ามเนื้อไม่สามารถคงรูปร่างเดิมได้อีก (ภาพที่ 5h)



ภาพที่ 4 จุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อแดง (ตัดตามขวาง) ของปลาไนหลังจากการตายที่เวลา 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

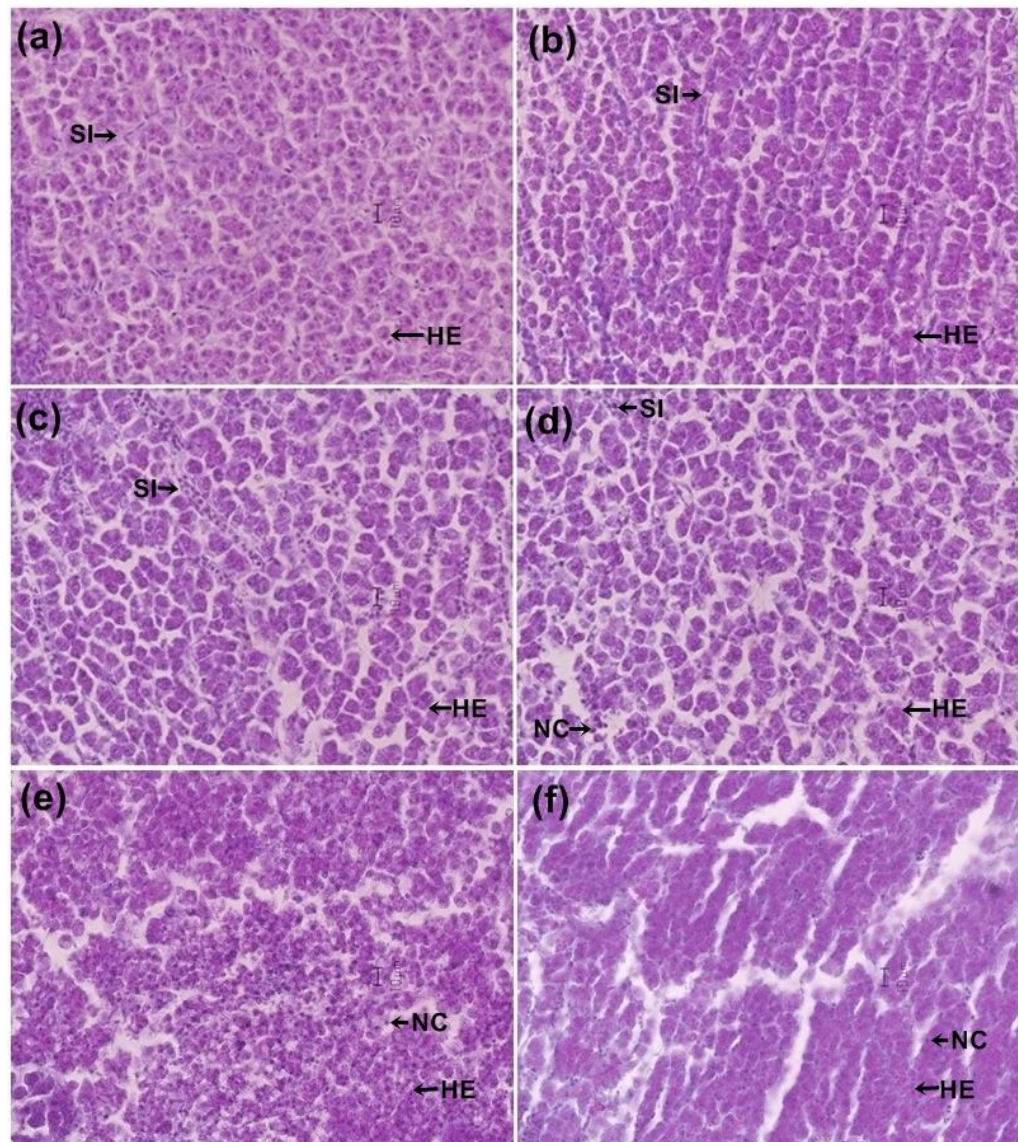


ภาพที่ 5 จุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อขาว (ตัดตามขวาง) ของปลาไนหลังจากการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e), 12 (f), 24 (g) และ 48 ชั่วโมง (h) (MF = muscle fiber, Arrowhead = endomysium) (H&E, scale bar = 10 μ m) ภาพถ่ายบันทึกที่ กำลังขยาย 400 เท่า

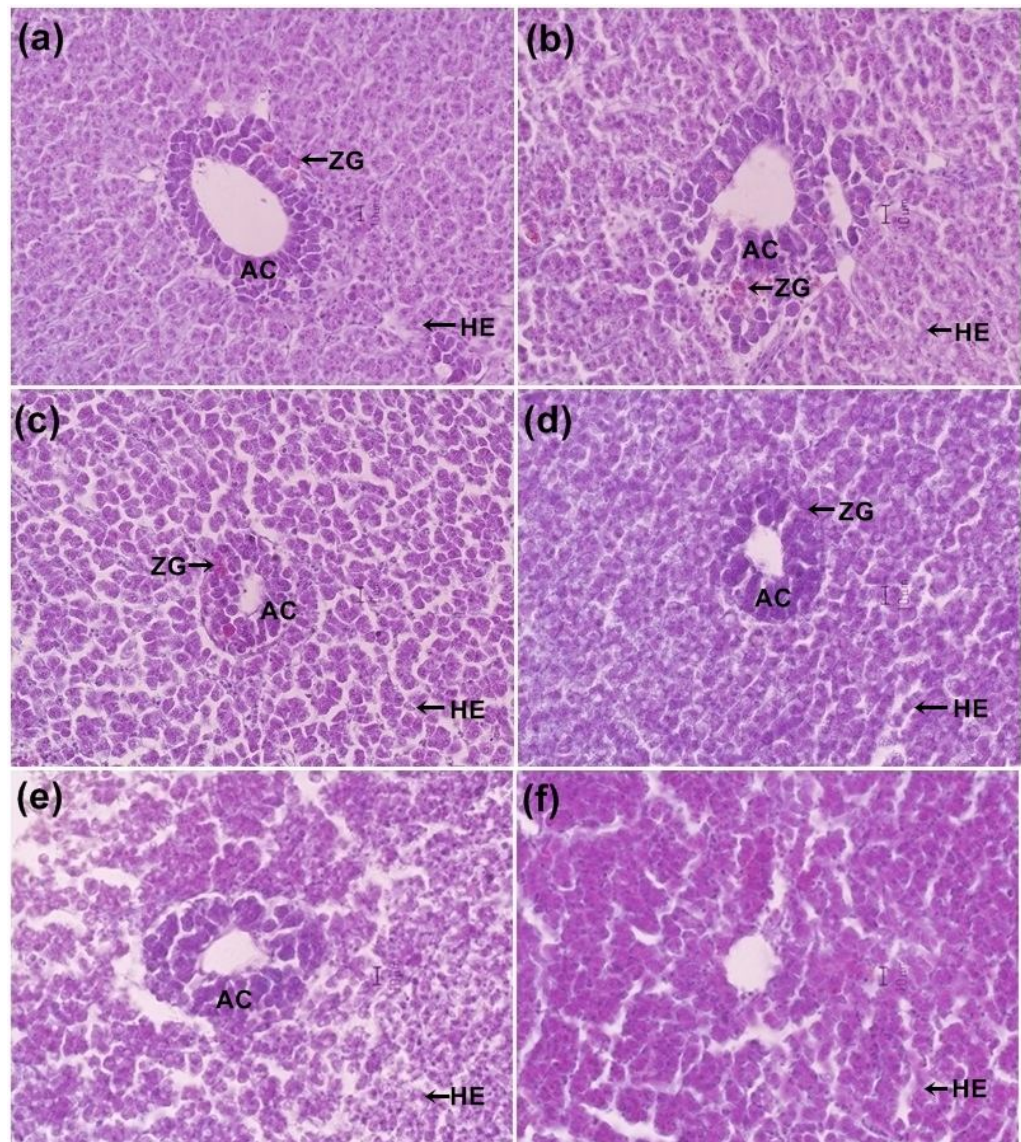
3.2 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของตับและตับอ่อน

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

นอกจากนี้ยังพบตับอ่อนแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ตับ โดยภายหลังการตาย 0-1 ชั่วโมง พบเซลล์อะซินาร์รูปร่างยาวรีอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม แต่ละเซลล์แยกกันชัดเจน มีนิวเคลียสรูปกลมขนาดใหญ่อยู่ที่ฐานของเซลล์ และพบไซโมเจนแกรนูลอยู่ภายในไซโทพลาซึม (ภาพที่ 7a-7b) ในชั่วโมงที่ 2 เกิดการบวมของเซลล์อะซินาร์ ทำให้เซลล์เปลี่ยนรูปร่างและชิดกันมากขึ้น แต่ยังคงพบไซโมเจนแกรนูลอยู่ภายในไซโทพลาซึม (ภาพที่ 7c) ในชั่วโมงที่ 4 พบการหดตัวของเซลล์อะซินาร์แล้วแตกตัว และพบไซโมเจนแกรนูลเหลืออยู่เพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 7d) ในชั่วโมงที่ 8 เซลล์อะซินาร์เริ่มมีการสลายตัว และไม่พบไซโมเจนแกรนูล (ภาพที่ 7e) และในชั่วโมงที่ 12 ไม่พบลักษณะของเซลล์อะซินาร์ เนื่องจากสลายตัวจนหมด (ภาพที่ 7f)



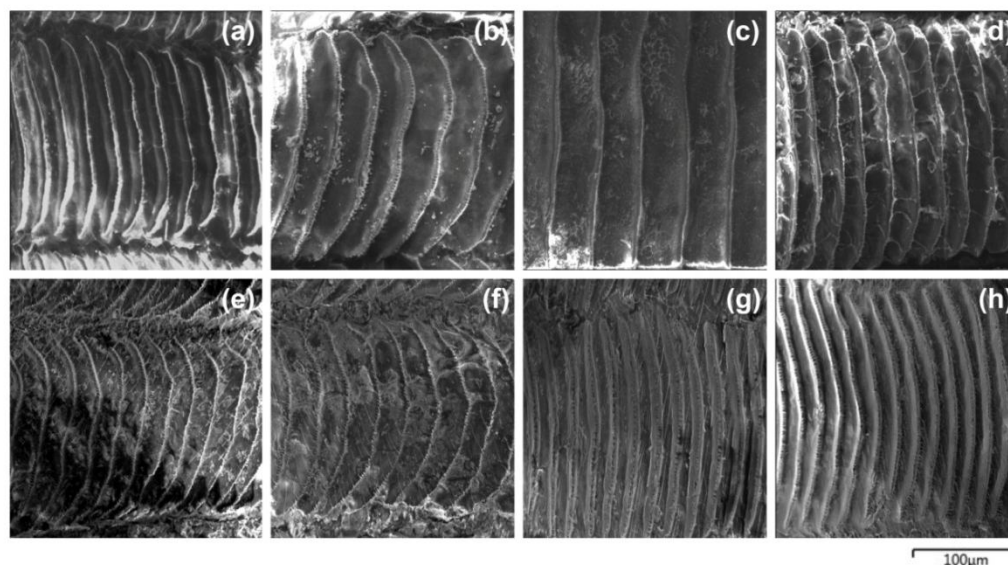
ภาพที่ 6 จุลกายวิภาคของตับ (ตัดตามยาว) ของปลาไนล์ภายหลังการตายที่เวลา 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 8 (e) และ 12 ชั่วโมง (f) (HE = hepatocyte, SI = hepatic sinusoid, NC = necrotic cell) (H&E, scale bar = 10 μ m) ภาพถ่ายบนที่กึ่งที่กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 7 จุลกายวิภาคของตับอ่อน (ตัดตามยาว) ของปลาไนลภายหลังการตายที่เวลา 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 μm) ภาพถ่ายบันทึกที่กำลังขยาย 400 เท่า

4. องค์ประกอบของธาตุจากเกล็ด

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



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

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

การวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุจากเกลือปลาแห้ง 10 บริเวณ พบธาตุทั้งหมด 8 ชนิด (ตารางที่ 6) โดยธาตุที่พบในทุกช่วงเวลามี 7 ชนิด ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน โซเดียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส และแคลเซียม สำหรับกำมะถัน พบในช่วง 1 และ 4-12 ชั่วโมงภายหลังการตายเท่านั้น โดยธาตุแต่ละชนิดมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการตาย ($P < 0.05$)

ออกซิเจนเป็นธาตุที่พบมากที่สุด และมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 0 และ 24 ภายหลังการตาย ($P > 0.05$) และมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วงเวลาอื่นๆ ($P < 0.05$) โดยช่วงเวลาที่พบปริมาณออกซิเจนน้อยที่สุด คือ ชั่วโมงที่ 1 และ 4 ตามลำดับ ธาตุที่พบในปริมาณมากที่สุดคือ คาร์บอน พบมากที่สุดในชั่วโมงที่ 1 และมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วงเวลาอื่นๆ ช่วงเวลาที่พบปริมาณคาร์บอนน้อยที่สุด คือ ชั่วโมงที่ 0 และ 8 สำหรับไนโตรเจน มีปริมาณมากที่สุดในชั่วโมงที่ 1 และมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วงเวลาอื่นๆ ช่วงเวลาที่พบปริมาณไนโตรเจนน้อยที่สุด คือ ชั่วโมงที่ 0 ธาตุฟอสฟอรัสและแคลเซียม มีปริมาณใกล้เคียงกัน โดยพบมากที่สุดในชั่วโมงที่ 4 และมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในชั่วโมงอื่นๆ ช่วงเวลาที่พบปริมาณฟอสฟอรัส และแคลเซียมน้อยที่สุด คือ ชั่วโมงที่ 1 และ 48 เช่นเดียวกัน

โซเดียม แมกนีเซียม และกำมะถัน พบในปริมาณที่น้อยมาก โดยมีปริมาณไม่ถึง 1 เปอร์เซ็นต์ ของแร่ธาตุทั้งหมด ธาตุโซเดียมและแมกนีเซียมมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 0 ภายหลังการตายเช่นเดียวกัน ($P > 0.05$) แต่ช่วงเวลาที่พบปริมาณโซเดียมน้อยที่สุด คือ ชั่วโมงที่ 48 และช่วงเวลาที่พบปริมาณแมกนีเซียมน้อยที่สุด คือ 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 6 องค์ประกอบของธาตุ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) จากเกล็ดปลาไหล ภายหลังจากตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (ค่าน้อยสุด – ค่ามากที่สุด)

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

nd, ต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัด

อักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

5. สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก

การวิเคราะห์สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากปลาในภายหลังการตาย 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 7) ผลการวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารแต่ละกลุ่มในแต่ละช่วงเวลาพบว่าไม่มีค่าไม่ต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

สารประกอบในกลุ่มแอลกอฮอล์ที่สำคัญ คือ 1-octanol, 1-octen-3-ol และ 1-pentanol ซึ่งตรวจพบในทุกช่วงเวลา โดยมีปริมาณสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 1-8, 1-12 และ 1-2 ภายหลังการตายตามลำดับ และลดลงในเวลาต่อมา จนมีปริมาณน้อยที่สุดในชั่วโมงสุดท้าย ($P < 0.05$) สาร (5Z)-octa-1,5-dien-3-ol ตรวจพบใน 24 ชั่วโมงแรก มีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 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 มีปริมาณลดลงตามระยะเวลาภายหลังการตาย 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 และมีค่า

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

สารประกอบในกลุ่มอัลเคนที่สำคัญ คือ pentadecane ซึ่งตรวจพบในทุกช่วงเวลา ภายหลังจากการตาย 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 ที่ตรวจพบในทุกช่วงเวลา ภายหลังจากการตาย 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-methylbutyl)-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

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 ชั่วโมงภายหลังการตาย โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามช่วงเวลา ส่วนสารประกอบในกลุ่มเทอร์พีน ตรวจพบสาร α -humulene ในชั่วโมงที่ 2-4 ($P > 0.05$) และ *trans*-caryophyllene พบในบางช่วงเวลา (ชั่วโมงที่ 1, 2, 8 และ 12 ภายหลังการตาย) โดยมีปริมาณไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 7 สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) ภายหลังจากตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

Class	Volatile compound	Postmortem delay (h)								SEM	P-value
		0	1	2	4	8	12	24	48		
Alcohol	1-Butanol	—	—	—	—	—	11.33 ^{bc}	21.34 ^{ab}	32.97 ^a	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 ^c	11.03 ^a	7.96 ^{abc}	10.08 ^{ab}	8.59 ^{abc}	7.00 ^{bc}	6.72 ^c	2.34 ^d	0.68	< 0.001
	1-Octen-3-ol	91.95 ^{bc}	119.73 ^a	122.13 ^a	122.68 ^a	105.49 ^{ab}	129.48 ^a	70.16 ^c	11.21 ^d	7.04	< 0.010
	1-Pentanol	29.33 ^b	34.82 ^{ab}	43.66 ^a	28.99 ^b	25.72 ^b	27.73 ^b	23.65 ^b	5.97 ^c	3.48	0.001
	1-Penten-3-ol	13.65 ^a	8.06 ^b	10.16 ^{ab}	7.93 ^b	6.69 ^b	8.97 ^b	—	—	1.15	< 0.001
	2-Octen-1-ol	14.60 ^b	13.29 ^b	27.02 ^a	18.55 ^{ab}	17.07 ^{ab}	26.24 ^a	—	—	5.70	< 0.001
	2-Penten-1-ol	4.74 ^{ab}	7.29 ^a	—	—	—	7.26 ^a	—	—	0.89	0.006
	2-(3-Cyclohexen-1-yl)ethanol	5.12 ^{ab}	8.00 ^a	7.34 ^a	7.62 ^a	—	8.80 ^a	—	—	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 ^{bc}	31.93 ^{ab}	27.47 ^{bc}	15.69 ^c	25.46 ^{bc}	44.55 ^a	22.32 ^{bc}	—	2.35	< 0.001
	Benzeneethanol	—	—	—	—	—	—	4.21	—	0.27	—
	Isoamyl alcohol	—	—	—	—	—	—	10.01 ^a	6.94 ^{ab}	0.38	0.008

—, ต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัด

อักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 7 สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) ภายหลังจากตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (ต่อ)

Class	Volatile compound	Postmortem delay (h)								SEM	P-value
		0	1	2	4	8	12	24	48		
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
	2-Isopropyl-5-methyl-2-hexenal	–	–	–	–	–	–	13.45	17.16	1.35	0.180
	2-Nonenal	–	–	–	7.12	–	–	–	–	1.19	–
	2-Octenal	10.38 ^{ab}	9.74 ^{abc}	9.54 ^{abc}	12.20 ^a	13.37 ^a	5.64 ^c	7.23 ^{bc}	–	0.99	< 0.001
	2,4-Decadienal	–	–	–	5.18	–	–	–	–	0.10	–
	3-Methyl-butanal	–	–	–	–	–	162.32 ^{ab}	213.30 ^a	75.95 ^{bc}	24.52	0.009
	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	–	–	–	–	–	2.39	–	–	0.35	–
	Hexadecanal	–	3.68 ^a	3.75 ^a	2.04 ^b	2.01 ^b	2.50 ^b	–	–	0.28	0.007
	Hexanal	434.95 ^a	277.45 ^b	323.90 ^b	343.12 ^b	322.40 ^b	150.38 ^c	135.16 ^c	–	13.89	< 0.001
	Heptanal	33.18 ^a	32.18 ^a	28.53 ^a	32.37 ^a	34.91 ^a	19.89 ^b	14.04 ^b	–	1.43	< 0.001

–, ต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัด

อักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 7 สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) ภายหลังจากตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (ต่อ)

Class	Volatile compound	Postmortem delay (h)								SEM	P-value
		0	1	2	4	8	12	24	48		
Aldehyde	Nonanal	54.67 ^{ab}	63.36 ^{ab}	48.06 ^b	71.07 ^a	62.17 ^{ab}	14.68 ^c	12.23 ^c	–	3.95	< 0.001
(continued)	Nonenal	–	–	6.45	–	8.56	–	–	–	0.77	0.120
	Octanal	19.23 ^{abc}	18.70 ^{bc}	17.14 ^c	23.30 ^{ab}	24.46 ^a	11.27 ^d	15.90 ^{cd}	–	1.33	0.002
	Pentanal	54.23 ^a	24.32 ^b	27.47 ^b	21.52 ^b	–	–	–	–	3.64	0.016
Alkane	Heptadecane	–	–	–	–	–	–	–	5.23	0.77	–
	Pentadecane	2.95 ^b	3.77 ^b	4.65 ^{ab}	5.80 ^{ab}	5.22 ^{ab}	5.27 ^{ab}	7.85 ^a	5.81 ^{ab}	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 ^a	14.82 ^b	1.96	0.009
Aromatic	1,2,3,4-Tetrahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-naphthalene	2.93 ^b	6.30 ^a	5.81 ^a	6.19 ^a	5.23 ^a	5.65 ^a	5.17 ^a	–	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 ^b	134.63 ^a	9.62	0.001

–, ต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัด

อักษรที่ต่างกันแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 7 สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) ภายหลังจากตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (ต่อ)

Class	Volatile compound	Postmortem delay (h)								SEM	P-value
		0	1	2	4	8	12	24	48		
Aromatic	Benzaldehyde	7.78 ^f	14.58 ^{ef}	23.32 ^{de}	36.50 ^{cd}	70.20 ^a	58.75 ^{ab}	48.28 ^{bc}	33.98 ^{cd}	52.13	< 0.001
(continued)	Benzeneacetaldehyde	–	–	–	–	1.96 ^b	3.47 ^{ab}	5.51 ^a	–	0.51	0.034
	Decahydro-1,6-dimethyl-naphthalene	–	3.80	–	–	–	–	–	–	0.27	–
	Indolizine	–	–	–	–	–	–	17.51	–	0.98	–
	Phenol	–	–	–	–	–	–	9.24 ^b	29.31 ^a	1.71	< 0.001
Ester	Hexadecanoic acid ethyl ester	3.40 ^{bc}	6.03 ^a	6.59 ^a	4.06 ^b	2.39 ^c	6.19 ^a	–	–	0.40	< 0.001
	Hexadecanoic acid methyl ester	3.40 ^b	11.00 ^a	6.56 ^{ab}	5.63 ^{ab}	5.55 ^{ab}	4.90 ^{ab}	1.98 ^b	–	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	–
Ketone	1-Phenyl-ethanone	–	–	–	–	–	–	–	8.33	0.66	–
	2-Pentadecanone	–	–	–	–	–	–	–	4.64	0.09	–

–, ต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัด

อักษรที่ต่างกันแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 7 สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) ภายหลังจากตายในช่วง 48 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (ต่อ)

Class	Volatile compound	Postmortem delay (h)								SEM	P-value
		0	1	2	4	8	12	24	48		
Ketone (continued)	2,3-Pentanedione	20.22 ^a	13.63 ^b	13.07 ^b	12.37 ^b	–	–	–	–	1.10	0.018
	2-Pentyl-furan	3.86 ^{bc}	7.93 ^{bc}	14.73 ^{ab}	22.00 ^a	16.42 ^{ab}	8.74 ^{abc}	6.10 ^{bc}	–	2.10	0.039
	2,3-Octanedione	76.28 ^{ab}	73.84 ^{ab}	91.88 ^a	93.48 ^a	69.94 ^{ab}	51.79 ^b	22.56 ^c	–	5.00	< 0.001
	3-Methyl-3-decen-2-one	–	–	–	–	–	–	–	9.35	0.01	–
	3-Undecen-2-one	–	–	–	1.02 ^{ab}	2.31 ^a	–	2.25 ^a	2.48 ^a	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 ^b	143.30 ^a	13.02	< 0.001
	Dimethyl trisulfide	–	–	–	–	–	–	10.51 ^b	45.97 ^a	2.30	< 0.001
Terpene	à-Humulene	–	–	1.10	1.05	–	–	–	–	0.06	0.956
	<i>Trans</i> -caryophyllene	–	2.53 ^{ab}	2.75 ^a	–	2.90 ^a	2.17 ^{ab}	–	–	0.72	0.027

–, ต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัด

อักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

บทที่ 4

บทวิจารณ์

1. การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อภายหลังการตาย

การเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายในช่องว่างระหว่างเซลล์ หรือของเหลวภายในและภายนอกเซลล์ ทำให้การนำไฟฟ้าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Querido, 1992) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ ที่พบว่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวโดยใช้วิธี DPPH และ reducing power ลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการตาย เนื่องจากเซลล์ที่ตายแล้วจะผลิตเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลอิสระมาทำลายส่วนประกอบต่างๆ แม้ว่ากระบวนการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนสามารถปลดปล่อยเพปไทด์ขนาดต่างๆ ที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในระบบ DPPH (Lassoued *et al.*, 2015) แต่องค์ประกอบเหล่านี้ไม่เพียงพอที่จะกำจัดอนุมูลอิสระที่มากเกินไปภายหลังการตาย นอกจากนี้ในกระบวนการไฮโดรลิซิสที่ใช้เวลานานขึ้น เพปไทด์ที่เกิดขึ้นจะมีสายสั้นลง และมีประสิทธิภาพน้อยลงในการต้านสาร DPPH (Lassoued *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตาม ข้อสังเกตในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของการต้านออกซิเดชัน เป็นตัวชี้วัดที่มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตาย

การศึกษาการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวทั้งสองวิธี มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกันโดยมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าสามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์ระยะเวลาภายหลังการตายได้ แต่การวิเคราะห์โดยวิธี DPPH มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันมากกว่าวิธี reducing power โดยพิจารณาจากสมการถดถอยระหว่างเวลาภายหลังการตายกับการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยสมการเส้นตรง ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เข้าใกล้ -1 มากกว่า แสดงให้เห็นว่าตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์กันอย่างมากในทิศทางตรงข้ามกัน และเมื่อพิจารณาถึงความแตกต่างระหว่างกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาว พบว่ากล้ามเนื้อขาวมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เข้าใกล้ -1 มากกว่ากล้ามเนื้อแดง อีกทั้งกล้ามเนื้อขาวเป็นกล้ามเนื้อส่วนใหญ่ของปลา (Martini *et al.*, 2014) ดังนั้นกล้ามเนื้อชนิดนี้จึงมีศักยภาพในการพยากรณ์ระยะเวลาภายหลังการตายได้ดี

2. การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของกล้ามเนื้อภายหลังการตาย

การเสถียรภาพธรรมชาติของโปรตีนไมโอซินและแอกทินอาจเกิดจากการลดลงของพีเอช (Tyska and Warshaw, 2002) และการย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน การศึกษาของ Kuo *et al.* (2005) พบว่าอุณหภูมิที่กล้ามเนื้อเสถียรภาพธรรมชาติจะลดลงภายหลังการตาย และในการศึกษานี้พบว่าอุณหภูมิเริ่มต้น อุณหภูมิพีค และอุณหภูมิสุดท้ายลดลง ส่วนช่วงอุณหภูมิเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาภายหลังการตาย การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้บ่งชี้ถึงการเสถียรภาพหรือการสลายตัวของโปรตีน Thongprajukaew *et al.* (2015a, 2015b) รายงานว่าช่วงอุณหภูมิที่กว้างเป็นผลมาจากความแตกต่างของความยาวของสายพอลิเมอร์ ค่าที่เพิ่มขึ้นในการศึกษาระยะนี้อาจเกิดจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์แล้วได้สายโพลีเพปไทด์ที่หลากหลาย การเปลี่ยนแปลงต่อระยะเวลาภายหลังการตายตรวจพบเช่นกันในปลาแพะ ปลากระพงแดง และปลาดุก (Schubring, 1999) โดยการศึกษาครั้งนี้พบว่าแอกทินมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายมากกว่าไมโอซิน สอดคล้องกับรายงานของ Schubring (1999) ที่พบว่าธรรมชาติของไมโอซินมีลักษณะคงตัวในปลาเขตร้อน นอกจากนี้ การไม่พบพีคของโปรตีนภายหลังการตาย 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าไม่มีโปรตีนที่อยู่ในสภาพเดิม (native protein) แล้ว ซึ่งสอดคล้องกันทั้งในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาว และสอดคล้องกับระยะเวลาการเกิดตัวของปลาแซลมอนแซแข็ง ซึ่งอยู่ระหว่าง 2–24 ชั่วโมง (Roth *et al.*, 2006) และปลากระพงขาวแซแข็ง อยู่ระหว่าง 3–24 ชั่วโมง (Wilkinson *et al.*, 2008) โดยกล้ามเนื้อของปลาจะเกร็ง แข็งที่อ แต่โปรตีนยังไม่เสถียรภาพ แต่หลังจาก 24 ชั่วโมงไปแล้ว จะเข้าสู่ระยะสิ้นสุดการเกร็งตัว ทำให้กล้ามเนื้อนิ่ม เหลว และไม่ยืดหยุ่น เนื่องจากโปรตีนไมโอซินและแอกทินซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของกล้ามเนื้อได้เสถียรภาพธรรมชาติไปแล้ว (Tyska and Warshaw, 2002)

ผลการศึกษาในครั้งนี้ต่างจากการทดลองในหนู ซึ่งมีระยะเวลาการเกิดตัวของ 5–24 ชั่วโมง (Krompecher, 1994) ขณะที่ในมนุษย์ พบการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายช้ากว่าในปลาเช่นเดียวกัน โดยการตายในฤดูร้อน (ช่วงอุณหภูมิ 12.0 ถึง 46.5 องศาเซลเซียส) ระยะเวลาการเกิดตัวจะอยู่ที่ 8–30 ชั่วโมง แต่ถ้าตายในฤดูฝน (ช่วงอุณหภูมิ -2.6 ถึง 35.4 องศาเซลเซียส) ระยะเวลาการเกิดตัวจะอยู่ที่ 7–36 ชั่วโมง (Dalal *et al.*, 2006) ความแตกต่างของระยะเวลาระหว่างสัตว์น้ำและสัตว์บก อาจเนื่องมาจากกล้ามเนื้อของหนูและมนุษย์มีความซับซ้อน และมีหลอดเลือดมาเลี้ยงกล้ามเนื้อจำนวนมาก (Gillis and Biewener, 2001) อีกทั้งการศึกษาระยะเวลาภายหลังการตายของปลาในครั้งนี้กระทำในตัวกลางที่เป็นน้ำ ซึ่งอาจทำให้อัตราการสลายตัวของโปรตีนเกิดขึ้นได้เร็วกว่า และองค์ประกอบหลักส่วนใหญ่ในเซลล์สามารถละลายได้ดีในน้ำ

ค่าเอนทาลปีและผลรวมของเอนทาลปีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในช่วง 0–24 ชั่วโมงภายหลังการตาย คุณลักษณะดังกล่าวบ่งชี้ถึงปริมาณของโปรตีนที่อยู่ในสภาพเดิม ซึ่งจากการศึกษาของ Beyrer and Klaas (2007) รายงานว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเอนทาลปีในปลาหิมะ (*Anoplopoma fimbria*) แซ่แข็ง ในทำนองเดียวกัน ขณะที่การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในเทอร์โมแกรมสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดความสดใหม่ของเนื้อ แต่เอนทาลปีไม่สามารถใช้ได้ (Kuo *et al.*, 2005) ดังนั้น อุณหภูมิเริ่มต้น อุณหภูมิพีค อุณหภูมิสุดท้าย และช่วงอุณหภูมิของการเสียสภาพของโปรตีน มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายมากกว่าเอนทาลปี และผลรวมของเอนทาลปี

3. การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคภายหลังการตาย

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อและตับภายหลังการตาย เกิดจากการย่อยสลายตัวเองของเนื้อเยื่อโดยเอนไซม์ และจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ภายในอวัยวะดังกล่าวเป็นหลัก (Shahidi and Botta, 1994; Yamamoto *et al.*, 1997; Chytiri *et al.*, 2004) โดยลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวที่เวลา 0 ชั่วโมงภายหลังการตาย สอดคล้องกับการศึกษาในตัวอย่างปลาแซลมอนของ Kaale and Eikevik (2013) และปลาช่อนยักษ์อเมซอนของ Carani *et al.* (2013) ที่พบว่ากล้ามเนื้อแดงมีเส้นใยกล้ามเนื้อขนาดเล็ก มีรูปร่างไม่ชัดเจน เรียงตัวกันหนาแน่น และมีเส้นเลือดและเม็ดเลือดแดงมากกว่ากล้ามเนื้อขาว ลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวภายหลังการตายในช่วง 1–48 ชั่วโมง มีการสลายตามระยะเวลา เนื่องจากการลดลงของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และมีการสลายตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อมากขึ้น ทั้งนี้กล้ามเนื้อของปลาจะมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันน้อย แต่มีน้ำมาก ทำให้ง่ายต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Manzano-Mazorra *et al.*, 2000) และการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (Smith, 2011) สอดคล้องกับการศึกษาในปลาแพะ ปลากระพงแดง และปลาดุก (Schubring, 1999) และยังสอดคล้องกับการดำเนินปฏิกิริยาออกซิเดชัน และการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้ในกล้ามเนื้อแดงมีเส้นใยกล้ามเนื้อที่บางกว่า และมีกระบวนการเมแทบอลิซึมสูงกว่าในกล้ามเนื้อขาว ทำให้กล้ามเนื้อแดงมีการสลายตัวเร็วกว่า (Martini *et al.*, 2014)

ตับเป็นอวัยวะที่มีการเน่าเสียเร็วมาก (เนตรนรินทร์, 2546) สอดคล้องกับการศึกษานี้ที่พบว่า การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคในตับเกิดขึ้นได้เร็วกว่าในกล้ามเนื้อและต่อทางเดินอาหาร (วรารภรณ์ และคณะ, 2558) โดยไม่พบลักษณะของตับในขั้นตอนการเก็บ

ตัวอย่างภายหลังการตาย 24–48 ชั่วโมง เนื่องจากตับเป็นอวัยวะที่สะสมไกลโคเจน และมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึม (Stamatoglou and Hughes, 1994) นอกจากนี้ตับอ่อนยังผลิตเอนไซม์ย่อยสลายหลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์อะไมเลส ทริปซิน ไคโมทริปซิน และไลเปส (Thongprajukaew and Kovitvadh, 2013) ที่ช่วยส่งเสริมให้การย่อยสลายเร็วขึ้น โดยลักษณะทางจุลกายวิภาคของตับและตับอ่อนที่เวลา 0 ชั่วโมงภายหลังการตาย สอดคล้องกับการศึกษาในปลาไนของ Vicentini *et al.* (2005) Figueiredo-Fernandes *et al.* (2007) และ Matos *et al.* (2007) ที่พบว่าเซลล์ตับปกติมีไซโทพลาซึมทรงสี่เหลี่ยมเนื้อเดียวกัน มีนิวเคลียสทรงกลมขนาดใหญ่อยู่ตรงกลาง เห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน และมีหลอดเลือดและตับอ่อนที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มแทรกอยู่ ลักษณะทางจุลกายวิภาคของตับและตับอ่อนภายหลังการตายในช่วง 1–12 ชั่วโมง พบการสลายตัวตามระยะเวลาตามลำดับ โดยไซโทพลาซึมของเซลล์ตับจับกันแน่นขึ้น และสูญเสียการเชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์ ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์ และส่งผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Fischer and Dietrich, 2000) องค์กรประกอบในเซลล์ตับถูกแทนที่ด้วยน้ำเลือด และไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดสลายตัว (Li *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียในลำไส้แพร่กระจายเข้าสู่ตับ ซึ่งมีทั้งแบคทีเรียที่ต้องการและไม่ต้องการออกซิเจน ทำให้ตับเกิดการเน่าเปื่อย และเซลล์ตับสลายตัว (Flanagan *et al.*, 2005)

4. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของธาตุจากเกล็ดภายหลังการตาย

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

การวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุจากเกล็ดปลาไนพบทั้งหมด 8 ชนิด โดยธาตุแต่ละชนิดมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการตาย แต่ไม่มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่แน่นอนในแต่ละช่วงเวลา ซึ่งสามารถนำข้อมูลมาจำแนกความแตกต่างระหว่างระยะเวลา

ภายหลังการตายได้โดยใช้ธาตุหลายชนิดร่วมกัน เกิดเป็นส่วนประกอบที่ทำหน้าที่ปกคลุมบริเวณภายนอกของตัวปลา มีกลไกการสร้างคอลลาเจนภายในเกล็ดเองร่วมกับปัจจัยภายนอก และสะสมแร่ธาตุจากสิ่งแวดล้อม (Ikoma *et al.*, 2003a; Okuda *et al.*, 2009) จึงมีความเป็นไปได้ว่าแร่ธาตุในเกล็ดปลามีการสร้างและสะสมอย่างต่อเนื่องแม้ปลาตาย (Schönbörner *et al.*, 1979)

การพบออกซิเจนและคาร์บอนในเกล็ดสูงกว่าธาตุอื่น เนื่องจากเป็นธาตุที่พบได้มากที่สุด ในสิ่งแวดล้อม (Sauer and Watanabe, 1989; Ikoma *et al.*, 2003a) รองลงมาเป็นไนโตรเจน ซึ่งพบในชั้นบรรยากาศ 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) โดยภายหลังการตายของพืชและสัตว์บางชนิด ออกซิเจนมีการสะสมอย่างคงที่ เนื่องจากเป็นธาตุที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างพลังงานแก่สิ่งมีชีวิต คาร์บอนจะอยู่ในสภาพคาร์บอเนต และละลายออกมาในน้ำ ไนโตรเจนสะสมอยู่ในสภาพสารอินทรีย์ ฟอสฟอรัสจะถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียเพื่อให้เป็นฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้ แคลเซียม โซเดียม และแมกนีเซียมสะสมอยู่ในรูปของเกลือฟอสเฟตและคาร์บอเนต และกำมะถันมีการระเหย ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เติบโตในสภาวะไร้ออกซิเจน (Everstine *et al.*, 2013; Marini, 2013)

การเพิ่มขึ้นและลดลงของแร่ธาตุ เกิดขึ้นจากหลายสาเหตุ เนื่องจากร่างกายต้องควบคุมสมดุลของแร่ธาตุต่างๆ อยู่ตลอดเวลา เช่น การขาดแมกนีเซียมทำให้กล้ามเนื้อเกร็งเนื่องจากขาด ATP ร่างกายจึงต้องรักษาสมดุลโดยการเพิ่มแมกนีเซียม การขาดแคลเซียมทำให้เกิดบางลงและหลุดออกง่าย เมื่อมีการลดลงของแคลเซียม ร่างกายจะเพิ่มการสร้างและดูดซับแคลเซียมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเกล็ด โซเดียมเป็นตัวกระตุ้นการย่อยสลายโปรตีน จึงต้องเพิ่มโซเดียมเพื่อรักษาสภาวะความเป็นกรดต่างของร่างกาย เป็นต้น (Sauer and Watanabe, 1989; Ikoma *et al.*, 2003a, 2003b) สำหรับปลาที่ตายแล้ว เกล็ดและผิวหนังสามารถดูดซึมธาตุจากสิ่งแวดล้อมได้เช่นเดิม (Schönbörner *et al.*, 1979) สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นและลดลงของแร่ธาตุตลอดระยะเวลาภายหลังการตายในการศึกษาครั้งนี้ โดยการย่อยสลายของจุลินทรีย์ทำให้ร่างกายปล่อยสารอินทรีย์ระเหยง่ายหลายชนิด ส่งผลต่อสมบัติทางเคมีกายภาพของน้ำ (Meunier, 1984) นอกจากนี้สารอินทรีย์ระเหยง่ายบางชนิดมีแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบ (Iglesias and Medina, 2008; Paczkowski *et al.*, 2014) ทำให้เกิดแร่ธาตุในน้ำซึ่งปลาสามารถดูดซึมผ่านเกล็ดได้

5. การเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากภายหลังการตาย

ระยะเวลาภายหลังการตายมีผลต่อองค์ประกอบที่ระเหยได้ในซาก โดยส่วนใหญ่เกิดจากการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีปัจจัยหลายอย่างเกี่ยวข้อง ทั้งชนิดของจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และปฏิกิริยาเคมีที่เปลี่ยนแปลงภายในร่างกาย ทำให้เกิดกระบวนการสร้างและปล่อยสารอินทรีย์ระเหยได้ตลอดเวลาภายหลังการตาย เพื่อดึงดูดสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เข้ามายังซาก (Paczkowski and Schütz, 2011) สารอินทรีย์ที่ระเหยจากซากแบ่งออกเป็นสารประกอบหลายชนิด ซึ่งการสลายตัวที่แตกต่างกัน ทำให้มีการปลดปล่อยออกมาในช่วงเวลาที่ต่างกัน (Dent *et al.*, 2004; Paczkowski *et al.*, 2014) ปริมาณสารอินทรีย์ระเหยที่ปล่อยออกมา ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ทั้งอุณหภูมิ ความชื้น ครอบคลุมถึงปฏิกิริยาเคมีในร่างกาย และการสลายตัวด้วยจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีบทบาทแตกต่างกัน โดยในช่วงแรกของการสลายตัวเกิดจากแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต (aerobic bacteria) ทำให้ออกซิเจนในร่างกายหมดไป และภายหลังมีการย่อยสลายให้เน่าเปื่อยอีกครั้งโดยแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic bacteria) (Kasper *et al.*, 2012)

สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากในการศึกษาครั้งนี้ 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) ซึ่งเป็นการศึกษาภายหลังการตายที่เก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ หรือการศึกษาในสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม เช่น หนู (Kasper *et al.*, 2012) และ (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 จึงสามารถนำสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากในการศึกษาครั้งนี้ มาใช้ในการจำแนกระยะเวลาภายหลังการตายของสัตว์น้ำในสภาวะปกติได้ ยกเว้นสารกลุ่มเทอร์พีน ได้แก่ α -humulene ที่ตรวจพบในช่วงเวลา 2–4 ชั่วโมง และ *trans*-caryophyllene ที่พบในบางช่วงเวลา ไม่อยู่ในกลุ่มสารอินทรีย์ระเหยในซาก แต่มีการตรวจพบเล็กน้อยในการศึกษาก่อนหน้านี้ (Statheropoulos *et al.*, 2005) ซึ่งเป็นสารที่เกิดขึ้นในวิถีกรดเมวาโลนิก (mevalonic acid pathway) ในพืชและสัตว์ (Adam *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 ในกลุ่มสารประกอบกำมะถัน เป็นสารอินทรีย์ระเหยที่สำคัญในการดึงดูดแมลงกินซากเข้ามายังซาก รวมทั้งแมลงวันหัวเขียว และด้วงสปีหรือ การศึกษาของ von Hoermann *et al.* (2011) ในสุกร พบว่า benzyl butyrate ในกลุ่มเอสเทอร์ เป็นสารที่ดึงดูดด้วงเขาสัตว์ตัวผู้โดยเฉพาะ ซึ่งสารทั้งสองชนิดไม่พบในการศึกษาในครั้งนี้ นอกจากนี้ยังมีกรดไขมันสายสั้นบางชนิดที่รายงานว่าสามารถดึงดูดแมลงวันในวงศ์ Piophilidae และ Calliphoridae ตัวเต็มวัย แมลงดูดเลือด ด้วงมูลสัตว์ และตั๊กแตนกินซากได้ (Wolff *et al.*, 2001; Barrozo and Lazzari, 2004; Dormont *et al.*, 2010; Whitman and Richardson, 2010)

สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากที่สามารถนำมาใช้ระบุเวลาภายหลังการตายได้ในการศึกษาครั้งนี้ ประกอบด้วยสารที่พบในช่วงเวลาภายหลังการตาย 4 ชั่วโมง ได้แก่ สารประกอบในกลุ่มแอลดีไฮด์ คือ pentanal และสารประกอบคีโตน คือ 2,3-pentanedione ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Iglesias and Medina (2008) ที่รายงานว่า การพบ 2,3-pentanedione เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในเนื้อปลาแซ่แข็ง สารที่พบในช่วงเวลาภายหลังการตาย 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 and Schütz (2011) ที่รายงานว่า เป็นสารที่เกิดจากเผาผลาญอาหารของเชื้อรา และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Iglesias and Medina (2008) ที่รายงานว่า 1-penten-3-ol เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในเนื้อปลาฮอร์สแมคเคอเรล สารที่พบในช่วงเวลาภายหลังการตาย 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)- ซึ่ง

สารประกอบอะโรมาติกได้มาจากการย่อยสลายของจุลินทรีย์ของกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก ได้แก่ ไทโรซีน ฟีนิลแอลานีน และทริปโตเฟน (Vass *et al.*, 1992; Dent *et al.*, 2004; Paczkowski and Schütz, 2011) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Iglesias and Medina (2008) ที่รายงานว่า การพบ 2,3-octanedione เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในเนื้อปลาแช่แข็ง และสารที่พบในช่วงเวลาภายหลังการตาย 48 ชั่วโมง ได้แก่ สารประกอบในกลุ่มแอลกอฮอล์ คือ 1-octanol, 1-octen-3-ol และ 1-pentanol สารประกอบในกลุ่มอัลเคน คือ pentadecane และสารประกอบอะโรมาติก คือ benzaldehyde

สารที่พบในบางช่วงเวลา ซึ่งสามารถใช้ระบุเวลาภายหลังการตายได้เช่นกัน ประกอบด้วยสารที่พบในช่วงเวลา 1–12 ชั่วโมงภายหลังการตาย ได้แก่ สารประกอบในกลุ่มแอลดีไฮด์ คือ hexadecanal สารที่พบในช่วงเวลา 8–24 ชั่วโมงภายหลังการตาย ได้แก่ สารประกอบอะโรมาติก คือ benzeneacetaldehyde สารที่พบในช่วงเวลา 12–24 ชั่วโมงภายหลังการตาย ได้แก่ สารประกอบในกลุ่มแอลกอฮอล์ คือ 2,6-dimethyl-4-heptanol สารที่พบในช่วงเวลา 12–48 ชั่วโมงภายหลังการตาย 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 ในเนื้อวัวภายหลังการตาย 24 ชั่วโมง สารที่พบในช่วงเวลา 24–48 ชั่วโมงภายหลังการตาย ได้แก่ สารประกอบในกลุ่มแอลกอฮอล์ คือ isoamyl alcohol สารประกอบในกลุ่มแอลดีไฮด์ คือ 2-isopropyl-5-methyl-2-hexenal สารประกอบในกลุ่มเอมีน คือ 3-methylbutyl-(3-methylbutylidene) amine และ 3-methylbutyl-2-phenylethylidene 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 ในระยะถัดไปจนถึงระยะเน่าสลายแบบสมบูรณ์ของซากหมู ซึ่งช่วงเวลา 24–48 ชั่วโมงภายหลังการตายของปลานิล เป็นระยะสิ้นสุดการเกร็งตัว และซากปลาเริ่มเน่าเสียเช่นกัน

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

บทสรุป

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปลา NIL ภายใต้การตาย 48 ชั่วโมง พบการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาดังต่อไปนี้

1. การดำเนินปฏิกิริยาออกซิเดชันในกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวโดยใช้วิธี DPPH และ reducing power ลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการตาย และมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกันโดยมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แต่การวิเคราะห์โดยวิธี DPPH มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาออกซิเดชันมากกว่าวิธี reducing power และกล้ามเนื้อขาวมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้พยากรณ์ระยะเวลาภายหลังการตายมากกว่ากล้ามเนื้อแดง

2. สมบัติเชิงความร้อนของกล้ามเนื้อแดงและกล้ามเนื้อขาวมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาภายหลังการตายอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีแนวโน้มลดลงในชั่วโมงที่ 24 จนไม่สามารถตรวจวัดได้ในชั่วโมงที่ 48 และพบว่าอุณหภูมิเริ่มต้น อุณหภูมิพีค และอุณหภูมิสุดท้ายลดลงในขณะที่ช่วงอุณหภูมิเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาภายหลังการตาย ซึ่งบ่งชี้ถึงการเสียดสภาพหรือการสลายตัวของโปรตีน โดยเอกทินมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายมากกว่าไมโอซิน

3. ลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาภายหลังการตาย เนื่องจากการลดลงของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และการสลายตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ โดยพบการเปลี่ยนแปลงในกล้ามเนื้อแดงเกิดขึ้นเร็วกว่ากล้ามเนื้อขาว เนื่องจากกล้ามเนื้อแดงมีเส้นใยกล้ามเนื้อที่บาง และมีกระบวนการเมแทบอลิซึมสูงกว่า ส่วนการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของตับและตับอ่อน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาภายหลังการตายเช่นเดียวกัน โดยอัตราการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นได้เร็วกว่าในกล้ามเนื้อ และไม่พบลักษณะของตับในการเก็บตัวอย่างภายหลังการตาย 24 และ 48 ชั่วโมง

4. ลักษณะของเกล็ดมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาภายหลังการตาย พิจารณาได้จากความแห้งของเกล็ดเมื่อเวลาผ่านไปเนื่องจากภาวะขาดน้ำ สำหรับองค์ประกอบของธาตุจากเกล็ดภายหลังการตาย พบธาตุทั้งหมด 8 ชนิด โดยธาตุแต่ละชนิดมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการตาย แต่ไม่มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่แน่นอนในแต่ละช่วงเวลา

5. สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาภายหลังการตายอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบสารประกอบทั้งหมด 65 ชนิด สารระเหยในซากส่วนใหญ่เป็นสารที่มีการรายงานในสัตว์น้ำและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ปล่อยออกมาเพื่อดึงดูดสิ่งมีชีวิตอื่นมายังซาก

6. สามารถนำข้อมูลการดำเนินปฏิกิริยาออกซิเดชัน สมบัติเชิงความร้อน ลักษณะทางจุลกายวิภาค องค์ประกอบของธาตุจากเกล็ด และสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซาก มาใช้ร่วมกันในการประมาณระยะเวลาภายหลังการตายของสัตว์น้ำได้ อาจเป็นประโยชน์ในการขนส่งสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ กรณีที่มีการทำประกันภัยความเสียหายระหว่างการขนส่ง รวมทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับมลพิษทางน้ำ และการสืบสวนสอบสวนคดีความที่เกี่ยวข้องกับสัตว์น้ำที่ถูกทารุณกรรม หรือสัตว์น้ำที่ตายในฟาร์มเลี้ยงอย่างผิดปกติ

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาครั้งนี้เป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ยังไม่สามารถนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้โดยตรง ควรทำการศึกษาตัวแปรจำเพาะที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมลพิษทางน้ำ เพื่อประยุกต์ใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ เช่น อุณหภูมิของน้ำ ค่าพีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ และชนิดของมลสาร เป็นต้น หรือทำการทดสอบโดยอ้างอิงจากเหตุการณ์ที่อาจเกิดขึ้นจริงเกี่ยวกับการทารุณกรรมสัตว์น้ำ เช่น การจงใจให้ขาดออกซิเจน และการปล่อยมลสารในฟาร์มเลี้ยง เป็นต้น นอกจากนี้ควรทำการศึกษาในปลาชนิดอื่น ซึ่งอาจมีการเปลี่ยนแปลงหลังการตาย และกลไกการทำงานของร่างกายที่แตกต่างกัน โดยสถานการณ์ดังกล่าวอาจสามารถนำมาใช้ในการพิจารณาของศาลได้

2. ควรศึกษารูปแบบของโปรตีนในกล้ามเนื้อโดยใช้วิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในแต่ละช่วงเวลาหลังการตาย

3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของกล้ามเนื้อและตับ ควรเพิ่มจำนวนซ้ำ และตรวจวัดข้อมูลทางมอร์โฟเมตริก (morphometric) ของเซลล์ เพื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้างสมการถดถอยสำหรับใช้ประมาณระยะเวลาภายหลังการตาย

4. ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับแร่ธาตุปริมาณน้อย (trace elements) จากเกล็ดภายหลังการตาย เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลในการประมาณระยะเวลาภายหลังการตายได้แม่นยำยิ่งขึ้น

5. ควรศึกษาสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ในซากในระยะเวลาภายหลังการตายที่นานขึ้น เนื่องจากมีสารอินทรีย์ระเหยง่ายบางชนิดที่พบตลอดช่วงระยะเวลาภายหลังการตาย 48 ชั่วโมง หรือพบในช่วงท้ายของการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งมีแนวโน้มที่สามารถพบได้อีกในระยะเวลาถัดไป อีกทั้งยังมีสารบางชนิดที่พบในชั่วโมงที่ 48 หลังการตายเท่านั้น ซึ่งอาจมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นอีกในระยะเวลาภายหลังการตายที่นานขึ้น

บรรณานุกรม

- เนตรนรินทร์ ชุนสูงเนิน. 2546. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้การปรับเปลี่ยนบรรยากาศ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ไผตรี สุทธิจิตต์ และวรพล เองวานิช. 2555. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ. สมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย (สวอ.), นนทบุรี.
- รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย และประพนธ์ วิไลรัตน์. 2538. Apoptosis: กลไกกับการประยุกต์ทางคลินิก. วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร 3: 11–15.
- วราภรณ์ ห่าหอ, การุณ ทองประจุแก้ว, สมรักษ์ รอดเจริญ และ ตูลาคุณ นนทพุท. 2558. การเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารภายหลังการตายของปลานิล *Oreochromis niloticus*. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 53 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. วันที่ 3–6 กุมภาพันธ์ 2558. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 18–24.
- วิชัย วนดุรงค์วรรณ. 2534. กีฬาเวชศาสตร์พื้นฐาน. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- สุภาพร สุกสีเหลือง. 2542. มีนวิทยา. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, กรุงเทพฯ.
- สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด. 2551. การจัดทำองค์ความรู้ (knowledge management) เรื่องการเพาะและอนุบาลปลานิล. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- อุดม เรืองนพคุณ. 2549. การเพาะพันธุ์และเลี้ยงปลานิล. เกษตรสยามบุ๊คส์, กรุงเทพฯ.
- 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.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7915–7922.
- Aoki, T., Yamashita, T., Ueno, R. 2000. Distribution of cathepsin in red and white muscle among fish species. *Fish. Sci.* 66: 776–782.

- 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.
- 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.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. 2002. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company.
- 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.
- 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.
- Boumba, V.A., Zivrou, 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.

- Cablk, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics.* 11: 1–42.

- Everstine, K., Spink, J., Kennedy, S. 2013. Economically motivated adulteration (EMA) of food: common characteristics of EMA incidents. *J. Food Prot.* 76: 723–735.
- Fidalgo, L.G., Saraiva, J.A., Aubourg, S.P., Vázquez, M., Torres, J.A. 2014. High pressure effects on the activities of cathepsins B and D of mackerel and horse mackerel muscle. *Czech J. Food Sci.* 32: 188–193.
- 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.
- 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.
- Getinet, G.T., Amrit, N.B. 2007. Effects of feeding, stocking density and water-flow rate on fecundity, spawning frequency and egg quality of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 272: 380–388.
- 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.
- 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.

- Halliwell, B. 1991. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Medicine* 91: 14–22.
- Hinton, D.E., Pool, C.R. 1976. Ultrastructure of the liver in channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Biol.* 8: 209–219.
- Hou, W.C., Lee, M.H., Chen, H.J., Liang, W.L., Han, C.H., Liu, Y.W., & Lin, Y.H. 2001. Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4956–4960.
- 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 frozenthawed 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 Dornspeckkafers *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.

- 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.
- 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*. 7th 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*. 10th 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*. 4th 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 vascular plate of elasmoid scales in Osteichthyan. *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.
- 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.
- 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
- Oyaizu, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan J. Nutr.* 44: 307–315.
- 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.
- Perga, M.E., Gerdeaux, D. 2003. Using the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of whitefish scales for retro-spective ecological studies: changes in isotope signatures during the restoration of Lake Geneva, 1980–2001. *J. Fish Biol.* 63: 1197–1207.
- Popma, T., Masser, M. 1999. Tilapia: Life history and biology. Mississippi: SRAC. No. 283. pp 4.
- 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.
- Roach, P.J. 2002. Glycogen and its metabolism. *Curr. Mol. Med.* 2: 101–120.
- 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.
- 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.
- Shahidi, F., Botta, J.R. 1994. *Seafoods chemistry, processing technology and quality*. London: Chapman & Hall.
- Sinnatamby, R.N., Bowman, J.E., Dempson, J.B., Power, M. 2007. An assessment of de-calcification 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.
- Smith, B.J., Smith, S.A., Tengjaroenkul, B., Lawrence, T.A. 2000. Gross morphology and topography of the adult intestinal tract of the tilapian fish, *Oreochromis niloticus* L. *Cells Tiss. Org.* 166: 294–303.
- 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.
- Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U. 2013. Effects of sex on characteristics and expression levels of digestive enzymes in the adult guppy *Poecilia reticulata*. *Zoo. Stud.* 52: 1–8
- 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., Rodjaroen, S., Yoonram, K., Sornthong, P., Hutcha, N., Tantikitti, C., Kovitvadi, U. 2015b. Effects of dietary modified palm kernel meal on growth, feed utilization, radical scavenging activity, carcass composition and muscle quality in sex reversed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 439: 45–52.
- 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.
- Vass, A.A., Barshick, S.A., Sega, G., Caton, J., Skeen, J.T., Love, J.C., Synsteliën, 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.
- 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.
- 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, 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 invitro conditions and preliminary kinetic results. *J. Biol. Chem.* 253: 6578–6585.
- 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.
- 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.
- 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.

ภาคผนวก

ก ผลงานวิจัยที่นำเสนอแบบบรรยายในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ

การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อภายหลังการตาย
ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

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

ตุลาคุณ นนทพุท¹ การุณ ทองประจุแก้ว^{2*} สมรักษ์ รอดเจริญ³ และวารากรณ์ ห่าหอ¹
Tulakhun Nonthaput¹, Karun Thongprajukaew^{2*}, Somrak Rodjaroen³ and Waraporn Hahor¹

บทคัดย่อ

ศึกษาการสลายตัวของโปรตีนไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อของปลานิลแดงเพศ (*Oreochromis niloticus*) ภายหลังการตายที่ระยะเวลา 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 คือ ระยะเวลาก่อนเกร็งตัว (ภายใน 1 ชั่วโมง) ระยะเวลาเกร็งตัว (1 ถึง 24 ชั่วโมง) และระยะเวลาหลังเกร็งตัว (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

¹ นักศึกษาปริญญาโท สาขานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

² ผศ.ดร., ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

³ อ.ดร., สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ตรีัง 92150

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

บทนำ

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

การศึกษาการสลายตัวของโปรตีนในกล้ามเนื้อภายหลังการตายส่วนใหญ่จะเน้นในสัตว์บก เช่น ไก่ สุกร และวัว รวมทั้งในมนุษย์ [7], [8], [9], [10] สำหรับในสัตว์น้ำมีเฉพาะการศึกษาในตัวอย่างที่เก็บในอุณหภูมิต่ำเพื่อประยุกต์ใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษา หรือคงสภาพผลิตภัณฑ์เป็นหลัก [11] การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสลายตัวของโปรตีนไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อภายหลังการตายในสภาพใกล้เคียงธรรมชาติ โดยใช้ปลาชนิด ปลานิลแดง (*Oreochromis niloticus*) เป็นต้นแบบ ข้อมูลที่ได้จะใช้เป็นพื้นฐานในการจำแนกระยะเวลาหลังการตาย (Postmortem interval) ของสัตว์น้ำ รวมทั้งอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ สิ่งแวดล้อมเพื่อระบุช่วงเวลาของการปล่อยมลสารลงในแหล่งน้ำจนทำให้สัตว์น้ำตาย

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างปลานิล

นำตัวอย่างปลานิลแดงเพศอายุ 4 เดือน มาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพในบ่อเป็นเวลา 15 วัน โดยให้อาหารที่มีโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้งต่อวัน และให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน คุณภาพน้ำทางเคมีของบ่อปรับสภาพคือ อุณหภูมิ 29.60 ± 0.15 องศาเซลเซียส พีเอช 6.95 ± 0.02 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ 5.05 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณแอมโมเนีย 0.94 ± 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การเก็บตัวอย่างปลานิล

อดอาหารปลานิลแดงก่อนเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นสุ่มปลาที่มีความยาวและน้ำหนักใกล้เคียงกัน (น้ำหนัก 105.83 ± 1.66 กรัม และความยาวเหยียด 18.55 ± 0.14 เซนติเมตร) มาสลบโดยใช้น้ำแข็งและนำมาวางในภาชนะทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า ($32 \times 43 \times 11$ เซนติเมตร) ที่มีระดับน้ำสูง 7 เซนติเมตร จากนั้นเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อแดง (Red muscle) บริเวณใต้ครีบท่อนหลังก้านครีบท่อนที่ 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 องศา

เซลล์พืชก่อนที่ การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนไมโอซินและแอกทิน พิจารณาตามอุณหภูมิที่โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติที่ 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

ระยะเวลาหลังการตายมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินในกล้ามเนื้อคุณลักษณะพีคของไมโอซินได้ ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้น (Onset temperature: T_o) อุณหภูมิพีค (Peak temperature: T_p) อุณหภูมิสุดท้าย (Conclusion temperature: T_c) และเอนทัลปี (Enthalpy: ΔH) ของการเสียสภาพของโปรตีนพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ในช่วงเวลา 0–12 ชั่วโมง แต่มีแนวโน้มลดลงในชั่วโมงที่ 24 ($P < 0.05$) จนไม่สามารถตรวจวัดได้ในช่วงเวลาสุดท้าย (ตารางที่ 1) ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างบางส่วนของไมโอซินมีการเปลี่ยนแปลง (Transformation) ซึ่งอาจเกิดจากการลดลงของค่าพีเอชในกล้ามเนื้อ [1] ทำให้โปรตีนไมโอซินสูญเสียสภาพธรรมชาติ [6] หรือเกิดจากการทำงานของเอนไซม์คาเทปซินแอล (Cathepsin L) ซึ่งเป็นซิสเตอีนโปรติเอสที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไมโอซินในกล้ามเนื้อ [13] และสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิห้อง [14] ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิน้ำที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (24–30 องศาเซลเซียส) หรืออาจเกิดจากกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรติเอสบางชนิด

หลังการตาย 48 ชั่วโมง ไม่พบโปรตีนไมโอซินที่อยู่ในสภาพเดิม (Native protein) ในกล้ามเนื้อแดงของปลานิล (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนชนิดนี้สลายตัวหมด [5] หรืออยู่ในรูปที่เสียสภาพธรรมชาติ (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 และไม่ยึดหยุ่น 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] อีกทั้งการศึกษาระยะเวลาหลังการตายของปลาในครั้งนี้กระทำในตัวกลางที่เป็นน้ำ ซึ่งอาจทำให้อัตราการสลายตัวของโปรตีนเกิดขึ้นได้เร็วกว่า เนื่องจากองค์ประกอบหลักส่วนใหญ่ในเซลล์สามารถละลายได้ดีในน้ำ [20]

2. การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนแอกทิน

สมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนแอกทินมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับระยะเวลาภายหลังการตาย เช่นเดียวกับไมโอซิน (ตารางที่ 2) โปรตีนชนิดนี้จะทำหน้าที่ร่วมกับไมโอซินช่วยให้กล้ามเนื้อเกิดการหดและคลายตัว ทำให้อวัยวะสามารถเคลื่อนตัว และช่วยให้ร่างกายสามารถเคลื่อนที่ได้ ดังนั้น เมื่อไมโอซินสลายตัวจะส่งผลให้แอกทินสูญเสียสภาพและสลายตัวตามไปด้วย [6] นอกจากนี้ การสลายตัวของโปรตีนแอกทินยังเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์คาเทปซินบี (Cathepsin B) และคาเทปซินดี (Cathepsin D) ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายกล้ามเนื้อหลังการตายส่งผลให้กล้ามเนื้ออ่อนตัวลง และเสื่อมประสิทธิภาพ [21]

ตารางที่ 1 คุณลักษณะเชิงความร้อนของไมโอซินในกล้ามเนื้อแดงของปลานิลแปลงเพศภายหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง

ระยะเวลาหลังการตาย (ชั่วโมง)	$T_0(^{\circ}\text{C})$	$T_p(^{\circ}\text{C})$	$T_c(^{\circ}\text{C})$	$\Delta H(\text{J g}^{-1})$
0	41.92 ± 0.33^{ab}	46.25 ± 0.35^a	48.72 ± 0.42^a	0.37 ± 0.01^a
1	43.50 ± 0.26^{ab}	47.33 ± 0.01^a	49.92 ± 0.27^a	0.47 ± 0.02^a
2	43.17 ± 0.36^{ab}	47.59 ± 0.12^a	52.12 ± 0.75^a	0.53 ± 0.01^a
4	44.91 ± 0.75^a	47.84 ± 0.47^a	49.93 ± 0.79^a	0.52 ± 0.19^a
8	43.18 ± 0.90^{ab}	46.34 ± 1.18^a	48.80 ± 0.95^a	0.58 ± 0.16^a
12	44.65 ± 0.83^a	48.34 ± 0.47^a	50.54 ± 0.50^a	0.51 ± 0.02^a
24	39.60 ± 1.54^b	42.25 ± 1.29^b	44.35 ± 1.10^b	0.24 ± 0.06^b
48	nd	nd	nd	nd

nd, ตรวจไม่พบ; T_0 , อุณหภูมิเริ่มต้น; T_p , อุณหภูมิพีค; T_c , อุณหภูมิสุดท้าย; ΔH , เอนทัลปี

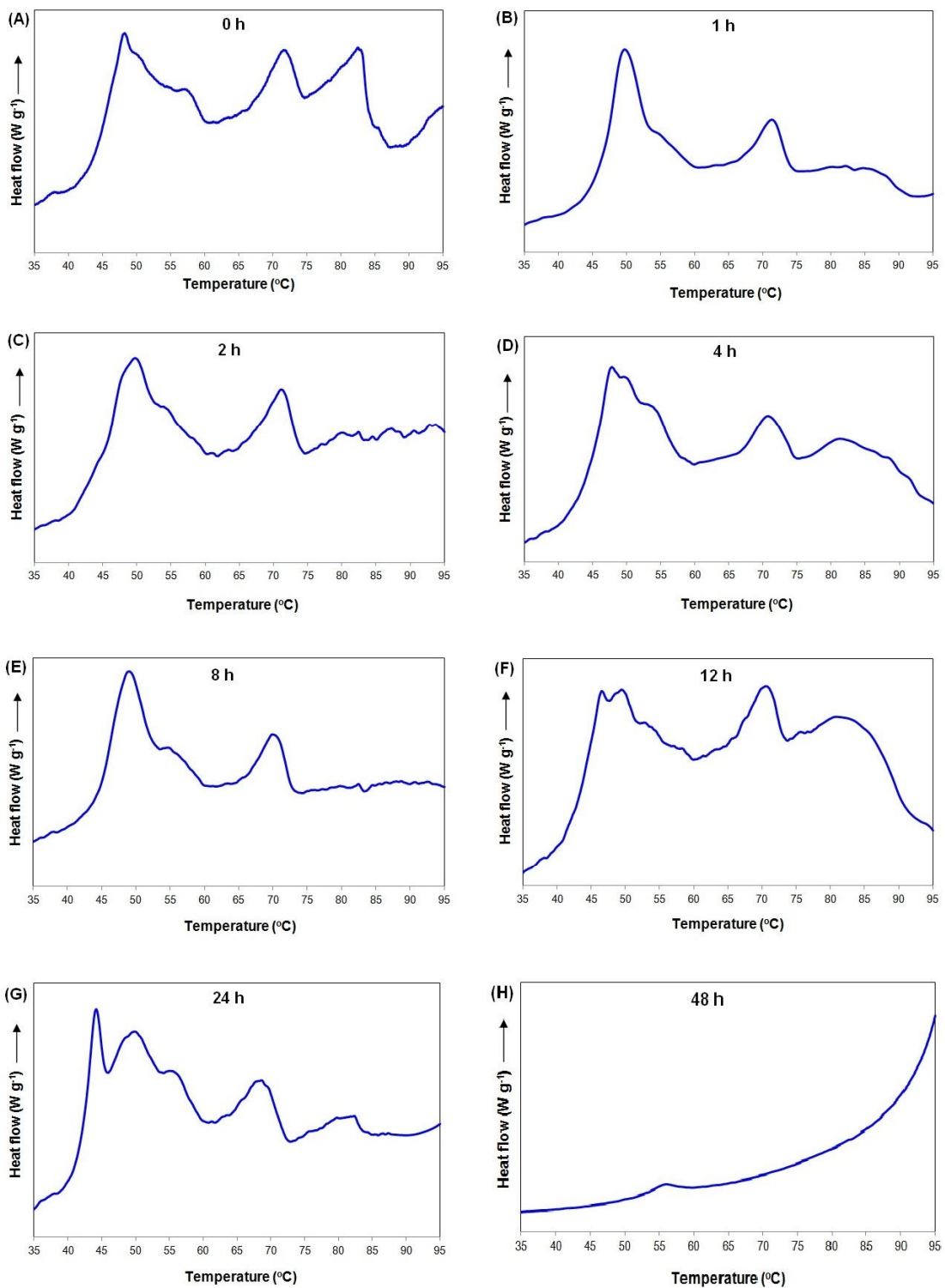
อักษร a และ b ที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 2 คุณลักษณะเชิงความร้อนของแอกทินในกล้ามเนื้อแดงของปลานิลแปลงเพศภายหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง

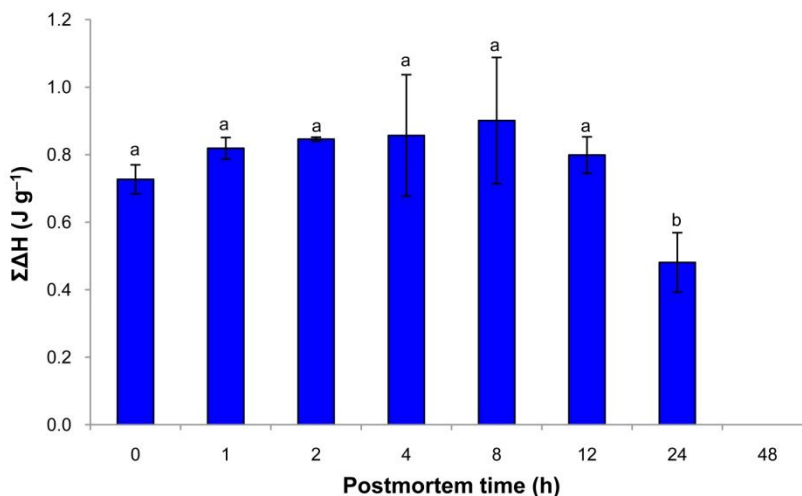
ระยะเวลาหลังการตาย (ชั่วโมง)	$T_0(^{\circ}\text{C})$	$T_p(^{\circ}\text{C})$	$T_c(^{\circ}\text{C})$	$\Delta H(\text{J g}^{-1})$
0	66.33 ± 0.24^a	70.84 ± 0.06^a	73.47 ± 0.05^a	0.35 ± 0.03^a
1	68.01 ± 0.01^a	71.92 ± 0.24^a	74.57 ± 0.42^a	0.35 ± 0.01^a
2	68.50 ± 0.88^a	71.59 ± 0.12^a	73.71 ± 0.29^a	0.32 ± 0.02^a
4	67.48 ± 0.07^a	70.92 ± 0.01^a	73.43 ± 0.02^a	0.34 ± 0.01^a
8	67.68 ± 0.55^a	70.92 ± 0.01^a	73.50 ± 0.19^a	0.37 ± 0.03^a
12	68.13 ± 0.35^a	71.58 ± 0.01^a	74.16 ± 0.01^a	0.29 ± 0.04^a
24	62.89 ± 1.20^b	67.00 ± 1.18^b	69.95 ± 1.02^b	0.25 ± 0.03^a
48	nd	nd	nd	nd

nd, ตรวจไม่พบ; T_0 , อุณหภูมิเริ่มต้น; T_p , อุณหภูมิพีค; T_c , อุณหภูมิสุดท้าย; ΔH , เอนทัลปี

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



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 การเปลี่ยนแปลงเอนทาลปีรวมในกล้ามเนื้อแดงของปลาไนหลังจากการตายในช่วง 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) แสดงให้เห็นว่าในช่วงเวลาดังกล่าวโปรตีนมีอัตราของการสลายตัวหรือเสียสภาพธรรมชาติในอัตราที่สูงกว่าช่วงเวลาอื่นๆ

สรุปผลการวิจัย

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

คำขอขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททั่วไป (เลขที่สัญญา SCI570522S) และ ทุนวิจัยจากภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ 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] Gazsó, I., Kráncz, 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.

ข ผลงานวิจัยจากภาคผนวก ก ที่ได้รับพิจารณาให้ตีพิมพ์

การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อน
ในกล้ามเนื้อภายหลังการตายของปลาไน
(*Oreochromis niloticus*)

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

ตุลาคุณ นนทพุท¹ การุณ ทองประจุแก้ว^{2*}

สมรักษ์ รอดเจริญ³ และวารภรณ์ ท่าหอ¹

Tulakhun Nonthaput¹, Karun Thongprajukaew^{2*},
Somrak Rodjaroen³ and Waraporn Hahor¹

¹ นักศึกษาปริญญาโท สาขานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112
² ผศ.ดร., ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112
³ อ.ดร., สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ตรีัง 92150

บทคัดย่อ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนในกล้ามเนื้อแดงของปลานิลแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus*) ภายหลังจากตายที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ ผลการศึกษาพบโปรตีนไมโอซินและแอกทินในช่วง 24 ชั่วโมงแรกหลังการตาย แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดในเวลา 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 มีรอยเขียวช้ำและยืดหยุ่น [2] ระยะเกร็งตัว (Rigor mortis) กล้ามเนื้อจะเกิดการเกร็ง แข็งทื่อ และขาดความยืดหยุ่น และระยะหลังเกร็งตัว (Post-rigor mortis) ซึ่งเนื้อจะนิ่ม ไม่ยืดหยุ่น 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] การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสลายตัวของโปรตีนไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อภายหลังการตายในสภาพใกล้เคียงธรรมชาติโดยใช้ปลานิลแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus*) เป็นต้นแบบ เนื่องจากปลานิลชนิดนี้มีข้อมูลพื้นฐานทางด้านชีววิทยาค่อนข้างมาก [18-20] อีกทั้งเป็นปลาที่สามารถปรับตัวให้เข้ากับธรรมชาติได้ง่าย กินอาหารได้หลายชนิด เจริญเติบโตเร็ว และเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจระดับโลก [21-22] ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการจำแนกระยะเวลาหลังการตาย (Postmortem interval) ของสัตว์น้ำ รวมทั้งอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (Environmental forensics) เพื่อระบุช่วงเวลาของการปล่อยสารที่ทำให้เกิดพิษ (มลสาร) ลงในแหล่งน้ำ หรืออาจใช้สำหรับสืบสวนและสอบสวนคดีความที่เกี่ยวข้องกับการตายของสัตว์น้ำในฟาร์มเลี้ยง (Fisheries forensics)

ระเบียบวิธีการศึกษา

1. การเตรียมตัวอย่างปลานิล

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

2. การเก็บตัวอย่างปลานิล

อดอาหารปลานิลแปลงเพศก่อนเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นสุ่มปลาที่มีความยาวและน้ำหนักใกล้เคียงกัน (น้ำหนัก 105.83 ± 1.66 กรัม และความยาวเหยียด 18.55 ± 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

วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของกล้ามเนื้อแดงโดยใช้ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (DSC7, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) ในช่วง 25 ถึง 120 องศาเซลเซียส และกำหนดอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ต่อนาที การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนไมโอซินและแอกทิน พิจารณาตามอุณหภูมิที่โปรตีนเสถียรภาพธรรมชาติที่ 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

ระยะเวลาหลังการตายมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนไมโอซินในกล้ามเนื้อ คุณลักษณะพีคของไมโอซินได้ ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้น (Onset temperature: T_o) อุณหภูมิพีค (Peak temperature: T_p) อุณหภูมิสุดท้าย (Conclusion temperature: T_c) และเอนทัลปี (Enthalpy: ΔH) ของการเสียสภาพของโปรตีน 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) ซึ่งเป็นซีสโตอินโปรติเอสที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไมโอซินในกล้ามเนื้อ [7] และสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิห้อง [23] ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิน้ำที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (24–30 องศาเซลเซียส) หรืออาจเกิดจากกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรติเอสบางชนิด

หลังการตาย 48 ชั่วโมง ไม่พบโปรตีนไมโอซินที่อยู่ในสภาพเดิม (Native protein) ในกล้ามเนื้อแดงของปลานิล (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนชนิดนี้สลายตัวหมด [5] หรืออยู่ในรูปที่เสียสภาพธรรมชาติ (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] เนื่องจากกล้ามเนื้อและมนุษย์มีความซับซ้อน และมีหลอดเลือดมาเลี้ยงกล้ามเนื้อ [28] อีกทั้งการศึกษาระยะเวลาหลังการตายของปลาในครั้งนี้กระทำในตัวกลางที่เป็นน้ำ ซึ่งอาจทำให้อัตราการสลายตัวของโปรตีนเกิดขึ้นได้เร็วกว่า เนื่องจากองค์ประกอบหลักส่วนใหญ่ในเซลล์สามารถละลายได้ดีในน้ำ [29]

2. การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนแอกทิน

สมบัติเชิงความร้อนของโปรตีนแอกทินมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับระยะเวลาภายหลังการตายเช่นเดียวกับไมโอซิน (ตารางที่ 2) โปรตีนชนิดนี้จะทำหน้าที่ร่วมกับไมโอซินช่วยให้กล้ามเนื้อเกิดการหดและคลายตัว ทำให้อวัยวะสามารถเคลื่อนไหว 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 ระยะเวลาก่อนเกร็งตัว (ภายใน 1 ชั่วโมง) ระยะเวลาเกร็งตัว (1 ถึง 24 ชั่วโมง) และระยะเวลาหลังเกร็งตัว (หลัง 24 ชั่วโมง) ข้อมูลจากการศึกษาเบื้องต้นนี้สามารถนำมาใช้ในการจำแนกระยะเวลาหลังการตายของสัตว์น้ำ รวมทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับมลพิษทางน้ำ หรือในกรณีที่สัตว์น้ำตายในฟาร์มหรือแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดำเนินงานนิติวิทยาศาสตร์การประมง

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] 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.
- [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). การเพาะพันธุ์และเลี้ยงปลานิล. 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

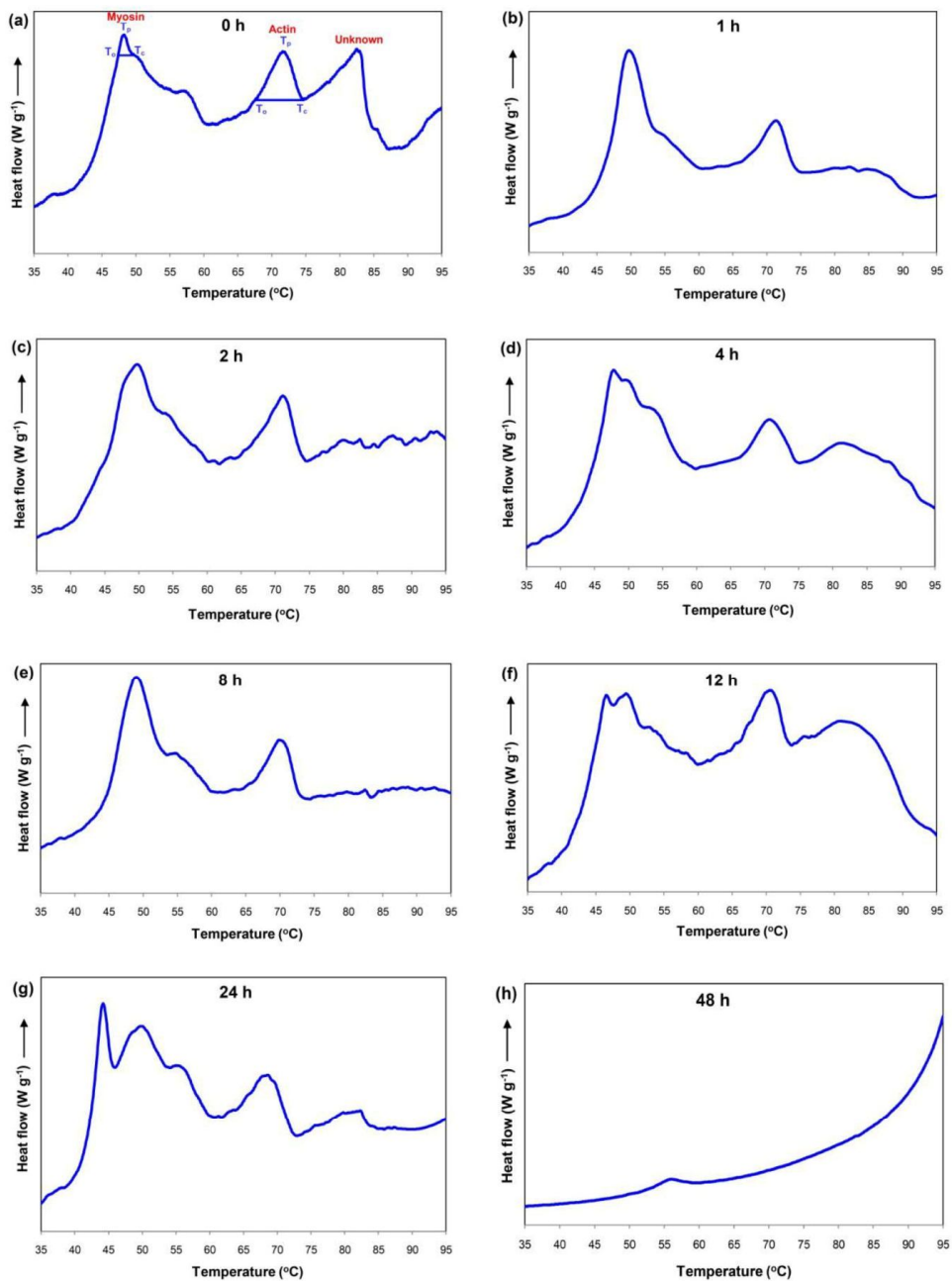
ระยะเวลาหลังการตาย (ชั่วโมง)	T _o (°C)	T _p (°C)	T _d (°C)	ΔH (J g ⁻¹)
0	41.92 ± 0.33 ^{ab}	46.25 ± 0.35 ^a	48.72 ± 0.42 ^a	0.37 ± 0.01 ^a
1	43.50 ± 0.26 ^{ab}	47.33 ± 0.01 ^a	49.92 ± 0.27 ^a	0.47 ± 0.02 ^a
2	43.17 ± 0.36 ^{ab}	47.59 ± 0.12 ^a	52.12 ± 0.75 ^a	0.53 ± 0.01 ^a
4	44.91 ± 0.75 ^a	47.84 ±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

nd, ตรวจไม่พบ; T_o, อุณหภูมิเริ่มต้น; T_p, อุณหภูมิพีค; T_d, อุณหภูมิสุดท้าย; ΔH, เอนทาลปี
อักษร a และ b ที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

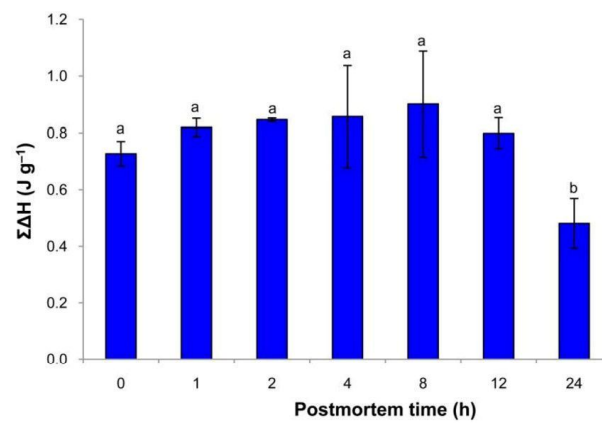
ตารางที่ 2 คุณลักษณะเชิงความร้อนของแอกทินในกล้ามเนื้อแดงของปลานิลแปลงเพศ
ภายหลังการตายในช่วง 48 ชั่วโมง

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

nd, ตรวจไม่พบ; T_o, อุณหภูมิเริ่มต้น; T_p, อุณหภูมิพีค; T_d, อุณหภูมิสุดท้าย; ΔH, เอนทาลปี
อักษร a และ b ที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (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 ($P < 0.05$)

ค ตันฉบับสำหรับตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

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

3

4

5

6 **Tulakhun Nonthaput^a, Waraporn Hahor^a, Karun Thongprajukaew^{a,*},**
7 **Krueawan Yoonram^a and Somrak Rodjaroen^b**

8

9

10

11 *^a Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University,*
12 *Songkhla 90112, Thailand*

13 *^b Department of Bioscience, Faculty of Sciences and Fisheries Technology,*
14 *Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang 92150, Thailand*

15

16

17

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

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

20

21 **Abstract**

22 Most studies of postmortem changes in fish muscles have been conducted
23 under cold conditions, so that no information is available relevant to the ambient
24 aquatic environment in tropical regions, for applications in environmental forensic
25 studies. We investigated the muscle degradation in Nile tilapia (*Oreochromis*
26 *niloticus*) in terms of specific activities of cathepsins (B, H and L), scavenging
27 activities and thermal transition properties of myosin and actin, to assess postmortem
28 changes with time (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h after death). The study results are
29 relevant to the ambient temperatures in Thailand, meaning about 30 Centigrade.
30 Specific activities of the three cathepsin enzymes increased significantly with
31 postmortem time ($P < 0.05$) and exhibited highly positive relationship ($r = 0.987$ –
32 0.997 , $P < 0.01$, $n = 32$). Cathepsin H had the lowest specific activity. A novel
33 observation, not reported previously, concerns the role of cathepsin H at 8 h after
34 death. The radical scavenging activity dramatically decreased with time since death,
35 especially within the first 1 h, while no changes occurred from 2 h to 8 h, or from 12 h
36 to 24 h. Thermal properties of myosin and actin were observed up to 24 h delay. The
37 degradation of each protein fluctuated with delay time, and actin was more sensitive
38 to postmortem delay than myosin. Overall the findings from the current study might
39 be used as primary data to estimate the time of death of an aquatic animal.

40

41 **Keywords:** Actin; aquatic animal; cathepsin; muscle; myosin; postmortem

42

43

44

45 **1. Introduction**

46 Postmortem changes of animals are influenced by various environmental
47 factors including temperature, humidity, cooling rate and growth of microorganisms
48 (Campobasso et al., 2001). Most studies of postmortem changes have investigated
49 terrestrial animal models, especially mammals such as rat (Kočárek, 2003), dog
50 (Lasseter et al., 2003), pig (Dekeirsschieter et al., 2009) and cattle (Rhee and Kim,
51 2001). For aquatic animals, preservation of the products is the main purpose for cold
52 temperatures used in transport or storage by the food industries. No prior information
53 is available of postmortem changes under the ambient aquatic conditions in a tropical
54 environment, and this study performed in Thailand addresses that knowledge gap.

55 After death, a crude assessment of muscles and joint stiffness allows assigning
56 the postmortem interval to one of three categories, namely pre-rigor mortis, rigor
57 mortis, and post-rigor mortis. The main processes relate to muscle degradation by
58 enzymes, cathepsins, causing rapid softening of muscle texture due to the degradation
59 of myofibrillar proteins (Jiang, 2000). Cathepsins B and L exhibit superior activity
60 relative to cathepsin H in the white muscle of sea bass (Chéret et al., 2007). Also,
61 Aoki et al. (2000) report high activities of cathepsins B and L in white muscles of
62 some red-flesh fish. These findings suggest important roles of the cathepsins B, H and
63 L in the postmortem degradation of white fish muscle.

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

69 al., 2005; Beyrer and Klaas, 2007; Matos et al., 2011; Thongprajukaew et al., 2015b).
70 The aim of this present study was to evaluate postmortem changes in muscles of an
71 aquatic animal. The economic freshwater fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)
72 was chosen as a model, as it is widely cultured around the world. The well-known
73 fundamental biology of this species also supported its selection for a laboratory study.
74 The main muscle degradation enzymes (cathepsins B, H and L) were studied
75 concurrently with the thermal properties of actin and myosin. The degradation
76 products were also monitored by a sensitive method, namely by
77 diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity. The findings from this
78 study might be used as primary data to identify (estimate) the postmortem delay from
79 an aquatic animal carcass in ambient tropical waters.

80

81 **2. Materials and methods**

82 **2.1. Fish preparation and observation of postmortem changes**

83 Four-month-old sex reversed Nile tilapia was collected from a private farm in
84 Trang province, Thailand. The fish were acclimatized indoor for 15 days and were fed
85 to satiation with a commercial diet containing 30% protein, twice daily (07.00 and
86 16.00 h) under 12-h light/12-h dark cycle. The water quality parameters during
87 acclimatization were temperature $29.60 \pm 0.15^{\circ}\text{C}$, pH 6.95 ± 0.02 , dissolved oxygen
88 $5.05 \pm 0.01 \text{ mg L}^{-1}$ and ammonia $0.94 \pm 0.15 \text{ mg L}^{-1}$. Prior to sampling the fish were
89 starved for 48 h under the conditions described above. Subsequently, all the fish were
90 killed by chilling in ice. Fish with similar body weights ($105.83 \pm 1.66 \text{ g}$) and total
91 lengths ($18.55 \pm 0.14 \text{ cm}$) were randomly distributed into rectangular containers (32
92 cm width \times 43 cm length \times 11 cm height with 7 cm water level) at a density of 14 fish

93 per container. The fish were floated in their rectangular containers under ambient
94 temperature and 12-h light/12-h dark cycle. Four fish ($n = 4$) at each postmortem time
95 (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h) were dissected on ice and the white muscles were
96 collected. These samples were packed in polyethylene bags and kept at -20°C until
97 determinations.

98

99 **2.2. Extraction of muscle crude extract**

100 Crude extract of white muscle was prepared according to Chéret et al. (2007),
101 with slight modifications. Briefly, the muscle was homogenized in 90 mL buffer (1:3
102 *w/v*) containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM β -mercaptoethanol and 1 mM
103 ethylenediaminetetraacetic acid using a micro-homogenizer (THP-220; Omni
104 International, Kennesaw GA, USA). The homogenate was centrifuged at $10,000\times g$, at
105 4°C for 40 min. The supernatant was collected after removing the lipid layer and kept
106 in small portions at -20°C .

107

108 **2.3. Determination of muscle degradation enzyme activity**

109 **2.3.1. Protein concentration in crude extract**

110 Determination of protein was carried out based on the method of Lowry et al.
111 (1951). Bovine serum albumin (BSA) was used as the protein standard. The protein
112 concentrations in the crude extracts were used for quantifying muscle degradation
113 enzyme specific activities (U mg protein^{-1}).

114

115

116

117 **2.3.2. Cathepsin B, H and L assays**

118 Activities of the cathepsins B (EC 3.4.22.1), H (EC 3.4.22.16) and L (EC
119 3.4.22.15) were determined based on Aranishi et al. (1997), with slight modifications.
120 Cathepsin B was assayed by mixing 200 μ L of 0.4 M phosphate buffer (pH 6.0,
121 containing 5 mM EDTA, 490 μ L of 0.1% Brij35, 100 μ L of 10 mM cysteine and 200
122 μ L of 25 μ M Z-Arg-Arg-MCA) and 10 μ L of crude enzyme extracts. The enzymatic
123 reaction mixture was incubated at 40°C for 30 min, and the reaction was stopped by
124 adding 1.5 mL of 0.1 M sodium acetate buffer containing 0.1 M sodium
125 monochloroacetate (pH 4.3). The cathepsins H and L were assayed as described
126 above, except with the 0.4 M phosphate buffer (pH 6.0) replaced by 0.4 M phosphate
127 buffer (pH 6.8, containing 5 mM EDTA, 0.1% Brij35, 10 mM cysteine and 25 μ M
128 Arg-MCA) or by 0.4 M sodium acetate buffer (pH 6.5, containing 5 mM EDTA, 0.1%
129 Brij35, 10 mM cysteine, 25 μ M Z-Phe-Arg-MCA), respectively. Reaction activating
130 incubation for these enzymes was performed at 45°C or at 50°C, in the same order.
131 The fluorescence of liberated aminomethylcoumarin (AMC) was measured by a
132 spectrofluorimeter (Jasco FP-8200, Jasco, Tokyo, Japan) at an excitation wavelength
133 of 380 nm and an emission wavelength of 450 nm.

134

135 **2.4. Scavenging activity by 2,2-Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical** 136 **assay**

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

141 control sample (extraction buffer in equal volume to the actual sample) and the
142 extract, respectively.

143

144 **2.5. Thermal transition properties**

145 The thermal transition properties of muscle were analyzed with a differential
146 scanning calorimeter (DSC7, PerkinElmer, USA). A 20 mg muscle sample was placed
147 in an aluminum sample pan, sealed, allowed to equilibrate at room temperature, and
148 then heated with comparison against an empty reference pan. Thermal changes were
149 recorded from 25 to 120°C at a rate of 5°C min⁻¹. Myosin and actin were indentified
150 by denaturation temperatures, as described by Skipnes et al. (2008) and Matos et al.
151 (2011). Thermal parameters including onset (T_o), peak (T_p) and conclusion (T_c)
152 temperatures of protein denaturation, melting temperature range (T_c-T_o), and the
153 transition enthalpy (ΔH) were recorded automatically.

154

155 **2.6. Statistical analysis**

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

161

162

163

164

165 **3. Results**

166 **3.1. Specific activities of cathepsins B, H and L**

167 The specific activities of cathepsins B (Fig. 1a), H (Fig. 1b) and L (Fig. 1c)
168 increased with the time delay after death. Generally, a slight increase in specific
169 activity was observed within the first 4 h, followed by a dramatic increase. The
170 cathepsins B and L exhibited similar characteristics within the 48 h observation. Both
171 these enzymes had their highest specific activities at the end of the sampling, and the
172 values increased approximately 6.26 fold (60.98 ± 0.59 mU mg protein⁻¹ on average)
173 compared to the initial activity at 0 h delay (9.74 ± 0.24 mU mg protein⁻¹ on average).
174 Cathepsin H exhibited a different type of time profile and had lower specific activities
175 than the cathepsins B and L. Its lowest specific activity was observed at 8 h after
176 death, and this did not significantly differ from its activities at 0 to 2 h delay times.
177 The highest specific activity of this enzyme was 6.03 (7.83) fold increased relative to
178 to the 0 h (8 h) sampling time.

179

180 **3.2. Scavenging activity of white muscle**

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

186

187

188

189 3.3. Thermal changes of myosin and actin

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

202

203 4. Discussion

204 Muscle protein degradation increased significantly with postmortem delay in
205 fish muscle, both when ice-stored and when super-chilled (Gaarder et al., 2012).
206 Available information is scarce regarding protein degradation in a fish carcass that
207 floats in ambient aquatic conditions of the tropics. The cathepsins B, D, H and L are
208 cysteine proteases, mainly presents in the lysosomes. Cathepsin D was not observed
209 in the current study because its role in fish protein hydrolysis should not be
210 significant; it hydrolyses myofibrils at an optimal pH range from 3 to 5 (Makinodan et
211 al., 1982; Jiang, 2000). These enzymes are released into both cytoplasm and
212 intracellular spaces as a consequence of lysosomal disruption, and induce the

213 postmortem pH to fall and the intramuscular ionic strength to increase (Yates et al.,
214 1983). Aoki et al. (2000) and Chéret et al. (2007) reported that the main postmortem
215 degradation of white muscle is attributed to cathepsins B and L. These enzymes
216 hydrolyze the major muscle structural proteins: B hydrolyzes connectin, nebulin and
217 myosin; and L hydrolyzes connectin, nebulin, myosin, collagen, α -actinin and
218 troponins T and I (Yamashita and Konagaya, 1991). The observed pH in muscle
219 tissue after death is near optimal for both these enzymes (Sainclivier, 1983). The rapid
220 activity increases observed in the current study indicate that the rate of protein
221 breakdown by cathepsins B and L was faster than that by cathepsin H. This finding is
222 in agreement with data for sea bass, as well as for beef (Wang and Xiong, 1999),
223 suggesting that cathepsin H plays a secondary role in the postmortem proteolysis of
224 fish (Chéret et al., 2007). A novel not previously reported observation was the role of
225 cathepsin H at 8 h after death. This may be due to the postmortem pH drop from 7.0
226 to 6.5 during the rigor mortis period of fish, while it later rises to values close to 7
227 (Sainclivier, 1983). This pH point negatively affects the dissociation of amino acid
228 side chains at the active site of the enzyme, affecting activity.

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

237 degradation of muscle was lesser than that of the gastrointestinal tract (Hahor et al.,
238 2015). Longer observation times than those of the current study might help better
239 understand the roles of these enzymes.

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

253 Denaturation of myosin and actin can be caused by a pH drop (Tyska and
254 Warshaw, 2002), and is followed with degradation by the proteolytic enzymes. Kuo et
255 al. (2005) reported that denaturation temperature of muscle protein was lowered
256 postmortem, and in the current study we observed decreased T_o , T_p and T_c , and
257 increased T_c-T_o with postmortem delay. These changes indicate the transformation or
258 partial degradation of proteins by proteolytic cleavage. Thongprajukaew et al. (2015a)
259 reported that a broad T_c-T_o range was due to the heterogeneity of polymer chain
260 lengths. Increased values in the current study might be caused by the production of

261 diverse polypeptide chains by enzymatic hydrolysis. This effect of the time delay after
262 death has also been observed in the red muscles of the same species (Nonthaput et al.,
263 2015), as well as in red snapper, red mullet, and catfish (Schubring, 1999). According
264 to our data, actin was more sensitive to postmortem changes than myosin. This is in
265 agreement with the stable nature of tropical fish myosin, reported by Schubring
266 (1999). However, the transition peaks of the proteins were no longer detected at 48 h
267 after death, suggesting complete absence of native protein forms. This finding is in
268 agreement with our earlier investigation of the red muscles of Nile tilapia (Nonthaput
269 et al., 2015), and with studies of the rigor mortis phase of frozen Atlantic salmon
270 (within 2–24 h after death) (Roth et al., 2006) and of frozen barramundi within 3–24 h
271 after death (Wilkinson et al., 2008). Therefore, the muscles become flexible again as
272 the proteins are completely degraded (Tyska and Warshaw, 2002). In higher animals,
273 rigor mortis in rat develops within 5–24 h after death (Krompecher, 1994), while in
274 human during summer (12.0–46.5°C) or winter (–2.6–35.4°C) this can take 8–30 h or
275 7–36 h, respectively (Dalal et al., 2006). These differences in the time delay between
276 aquatic and terrestrial animals are consequences of muscle structure and configuration
277 of blood circulation (Gillis and Biewener, 2001). Furthermore, our current study was
278 conducted in ambient water environment which may cause faster degradation rates
279 due to both availability of water and the comparatively high temperatures in the
280 tropics. In ΔH or $\Sigma\Delta H$, no significant differences within 24 h from death were
281 observed. Both these thermal parameters indicate the amounts of proteins in native
282 form. Beyrer and Klaas (2007) also reported no changes in total ΔH for single or
283 double frozen cod fillets. Similarly, while the temperature shift in the DSC
284 thermogram can be used as an indicator of meat freshness, ΔH cannot be used (Kuo et

285 al., 2005). Therefore, prior studies support the conclusion that T_o , T_p , T_c and T_c-T_o are
286 more sensitive to the qualitative postmortem changes in proteins than are ΔH or $\Sigma\Delta H$.

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

296

297 **Acknowledgements**

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

304

305 **Reference**

306 Aoki, T., Yokono, Yamashita, T., Ueno, R., 2000. Distribution of cathepsin in red and
307 white muscle among fish species. *Fish. Sci.* 66, 776–782.

- 308 Aranishi, F., Hara, K., Osatomi, K., Ishihara, T., 1997. Cathepsins B, H and L in
309 peritoneal macrophages and hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. *Comp.*
310 *Biochem. Physiol.* 117B, 605–611.
- 311 Beyrer, M., Klaas, M.R., 2007. Influence of freezing and of frozen storage on the
312 specific heat capacity of trout and herring fillet. *Eur. Food Res. Technol.* 224,
313 349–353.
- 314 Campobasso, C.A., Vella, G.A., Introna, F., 2001. Factors affecting decomposition
315 and Diptera colonization. *Forensic Sci. Int.* 120, 18–27.
- 316 Chéret, R., Delbarre-Ladrat, C., Lamballerie-Anton, M., Verrez-Bagnis, V., 2007.
317 Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food*
318 *Chem.* 115, 1228–1233.
- 319 Dalal, J.S., Tejpal, H.R., Chanana, A., Kaur, N., 2006. Medicolegal study of rigor
320 mortis to estimate postmortem interval. *J. Indian Acad. Forensic Med.* 28,
321 971–973.
- 322 Dekeirsschieter, J., Verheggen, F.J., Gohy, M., Hubrecht, F., Bourguignon, L.,
323 Lognay, G., Haubruge, E., 2009. Cadaveric volatile organic compounds
324 released by decaying pig carcasses (*Sus domesticus* L.) in different biotopes.
325 *Forensic Sci. Int.* 189, 46–53.
- 326 Gaarder, M.Ø., Bahuaud, D., Veiseth-Kent, E., Mørkøre, T., Thomassen, M.S., 2012.
327 Relevance of calpain and calpastatin activity for texture in super-chilled and
328 ice-stored Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fillets. *Food Chem.* 132, 9–17.
- 329 Gillis, G.B., Biewener, A.A., 2001. Hindlimb muscle function in relation to speed and
330 gait: *in vivo* patterns of strain and activation in a hip and knee extensor of the
331 rat (*Rattus norvegicus*). *J. Exp. Biol.* 204, 2717–2731.

- 332 Hahor, W., Thongprajukaew, K., Rodjaroen, S., Nonthaput, T., 2015. Postmortem
333 changes of digestive system in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. In
334 proceeding of the 53rd Kasetsart University Annual Conference. Kasetsart
335 University, Bangkok. Thailand.
- 336 Ho, M.L., Chen, G.H., Jiang, S.T., 2000. Effect of mackerel cathepsins L and L like,
337 and calpain on the degradation of mackerel surimi. *Fish. Sci.* 66, 558–568.
- 338 Jiang, S.T., 2000. Effect of proteinases on the meat texture and seafood quality. *J.*
339 *Agric. Food Chem.* 2, 55–74.
- 340 Kočárek, P., 2003. Decomposition and Coleoptera succession on exposed carrion of
341 small mammal in Opava, the Czech Republic. *Eur. J. Soil Biol.* 39, 31–45.
- 342 Krompecher, T., 1994. Experimental evaluation of rigor mortis VIII. Estimation of
343 time since death by repeated measurements of the intensity of rigor mortis on
344 rats. *Forensic Sci. Int.* 68, 149–159.
- 345 Kuo, H.L., Chen, M.T., Liu, D.C., Lin, L.C., 2005. Relationship between thermal
346 properties of muscle proteins and pork quality. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18,
347 427–432.
- 348 Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J., Fleurence, J., 2003. *In vitro* proteolysis of
349 myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass
350 (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of cathepsins B, D and L. *Food Chem.* 81,
351 517–525.
- 352 Lasseter, A.E., Jacobi, K.P., Farley, R., Hensel, L., 2003. Cadaver dog and handler
353 team capabilities in the recovery of buried human remains in the southeastern
354 United States. *J. Forensic Sci.* 48, 617–621.

- 355 Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Aydi, M., Toldrá, F., Aristoy, M.C., Barkia, A.,
356 Nasri, M., 2015. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties
357 of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. J.
358 Proteomics. doi: 10.1016/j.jprot.2015.05.007.
- 359 Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein
360 measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.
- 361 Makinodan, Y., Akasaka, T., Toyohara, H., Ikeda, S., 1982. Purification and
362 properties of carp muscle cathepsin D. J. Food Sci. 47, 647–652.
- 363 Matos, E., Silva, T.S., Tiago, T., Aureliano, M., Dinis, M.T., Dias, J., 2011. Effect of
364 harvesting stress and storage conditions on protein degradation in fillets of
365 farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*): A differential scanning calorimetry
366 study. Food Chem. 126, 270–276.
- 367 Nonthaput, T., Thongprajukaew, K., Rodjaroen, S., Hahor, W., 2015. Postmortem
368 changes of muscle myosin and actin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In
369 proceeding of the 25th Thaksin University National Conference. Thaksin
370 University, Songkhla, Thailand.
- 371 Querido, D., 1992. Postmortem changes in electrical resistance of the gastric wall
372 during the early postmortem period in rats. Forensic Sci. Int. 53, 81–92.
- 373 Rhee, M.S., Kim, B.C., 2001. Effect of low voltage electrical stimulation and
374 temperature conditioning on postmortem changes in glycolysis and calpains
375 activities of Korean native cattle (Hanwoo). Meat Sci. 58, 231–237.
- 376 Roth, B., Slinde, E., Arildsen, J., 2006. Pre or post mortem muscle activity in Atlantic
377 salmon (*Salmo salar*). The effect on rigor mortis and the physical properties of
378 flesh. Aquaculture 257, 504–510.

- 379 Sainclivier, M., 1983. L'industrie halieutique –Chapitre 1: Le poisson matie`re
380 premie`re. Sciences agronomiques-Rennes-Bulletin Scientifique et technique
381 de l'ENSA et du CRR.
- 382 Schubring, R., 1999. DSC studies on deep frozen fishery products. *Thermochimica*
383 *Acta* 337, 89–95.
- 384 Skipnes, D., der Plancken, I.V., Loey, A.V., Hendrickx, M.E., 2008. Kinetics of heat
385 denaturation of proteins from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. Food*
386 *Eng.* 85, 51–58.
- 387 Thongprajukaew, K., Rodjaroen, S., Tantikitti, C., Kovitvadhi, U., 2015a.
388 Physicochemical modifications of dietary palm kernel meal affect growth and
389 feed utilization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Anim. Feed Sci.*
390 *Technol.* 202, 90–99.
- 391 Thongprajukaew, K., Rodjaroen, S., Yoonram, K., Sornthong, P., Hutcha, N.,
392 Tantikitti, C., Kovitvadhi, U., 2015b. Effects of dietary modified palm kernel
393 meal on growth, feed utilization, radical scavenging activity, carcass
394 composition and muscle quality in sex reversed Nile tilapia (*Oreochromis*
395 *niloticus*). *Aquaculture* 439, 45–52.
- 396 Tyska, M.J., Warshaw, D.M., 2002. The myosin power stroke. *Cell Motil.*
397 *Cytoskeleton* 51, 1–15.
- 398 Wang, B., Xiong, Y.L., 1999. Characterization of the proteases involved in gel
399 weakening of beef heart surimi. *J. Agric. Food Chem.* 47, 887–892.
- 400 Wilkinson, R.J., Paton, N., Porter, M.J.R., 2008. The effects of pre-harvest stress and
401 harvest method on the stress response, rigor onset, muscle pH and drip loss in
402 barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 282, 26–32.

403 Yamashita, M., Konagaya, S., 1991. Hydrolytic action of salmon cathepsins B and L
404 to muscle structural proteins in respect of muscle softening. Nippon Suisan
405 Gakk. 57, 1917–1922.

406 Yates, L.D., Dutson, T.R., Caldwell, J., Carpenter, Z.L., 1983. Effect of temperature
407 and pH on the post-mortem degradation of myofibrillar proteins. Meat Sci. 9,
408 157–179.

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427 **Figure captions**

428

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

433

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

438

439 **Fig. 3.** Thermal transition properties of muscle from control Nile tilapia (0 h after
440 death). T_o = onset temperature, T_p = peak temperature, T_c = conclusion
441 temperature.

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451 Acknowledgements

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

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

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

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

* Includes all observed proteins within the studied temperature range, as depicted in Fig. 3.

T_o, onset temperature; T_p, peak temperature; T_c, conclusion temperature; T_c-T_o, melting temperature range; ΔH , enthalpy; nd, not detected.

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

Figure 1.

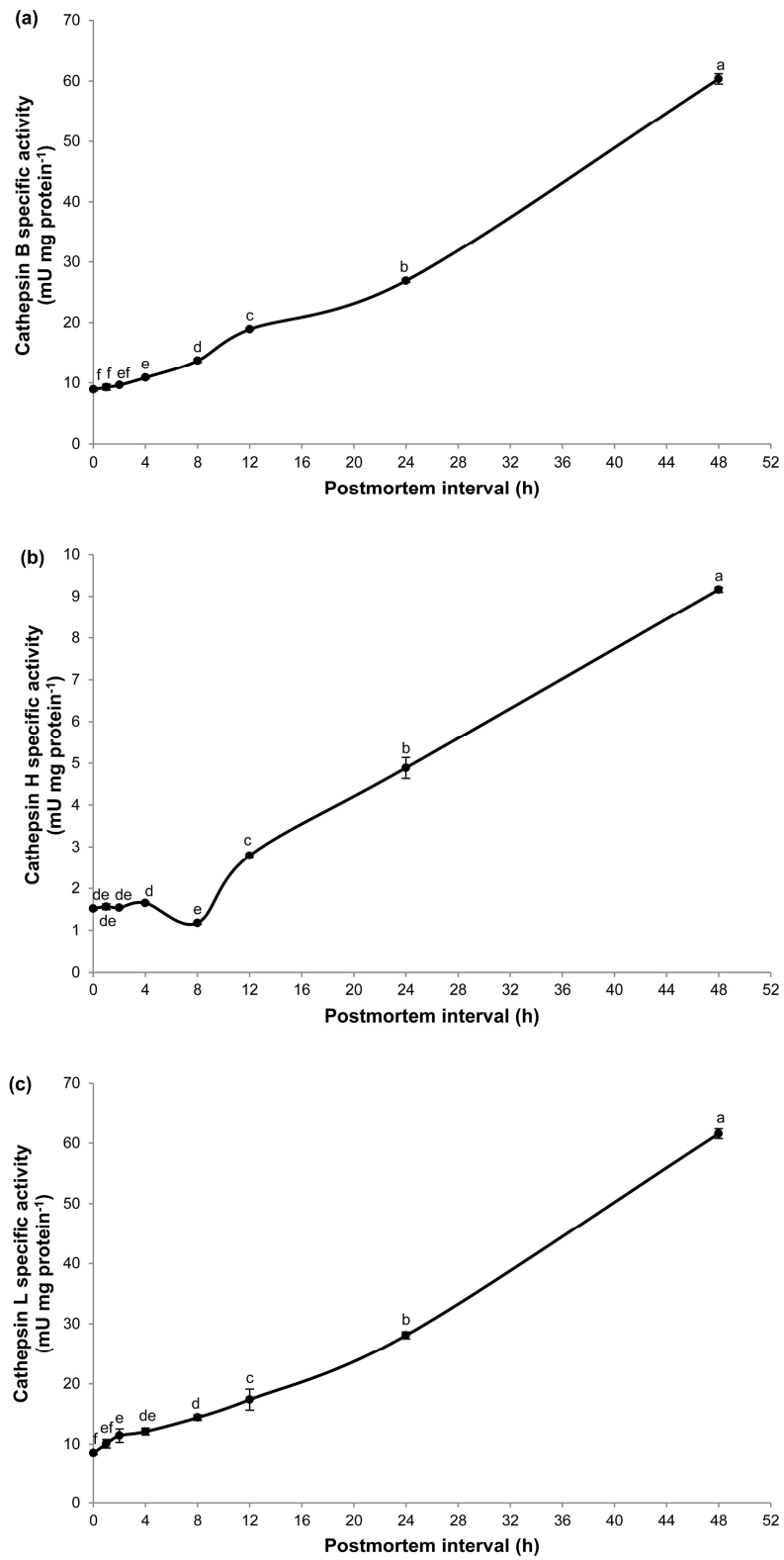


Figure 2.

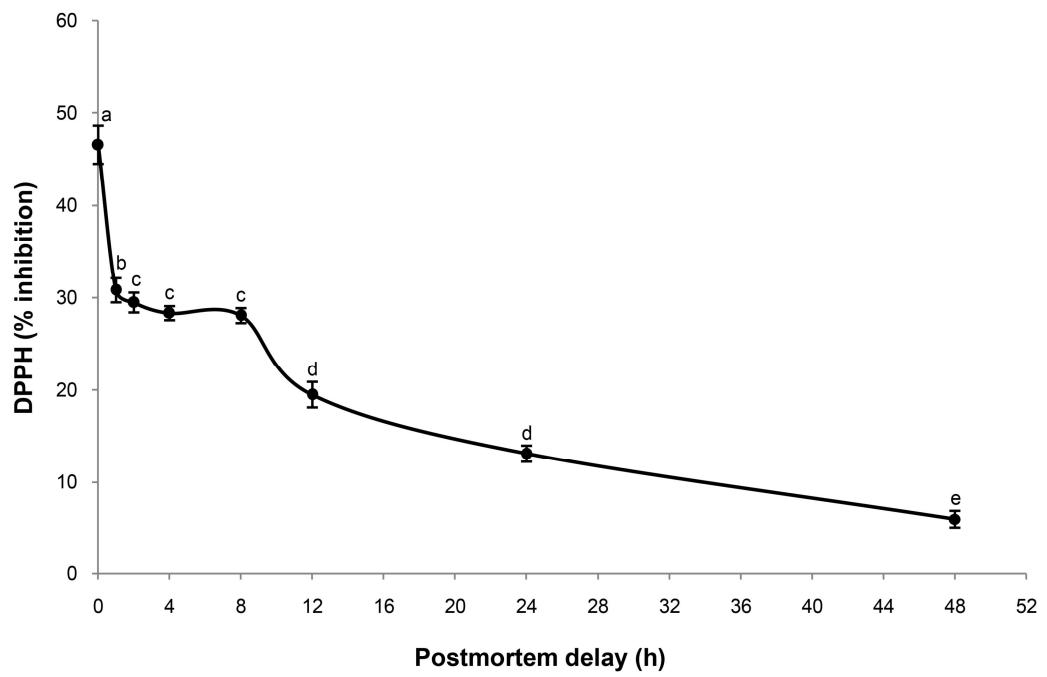
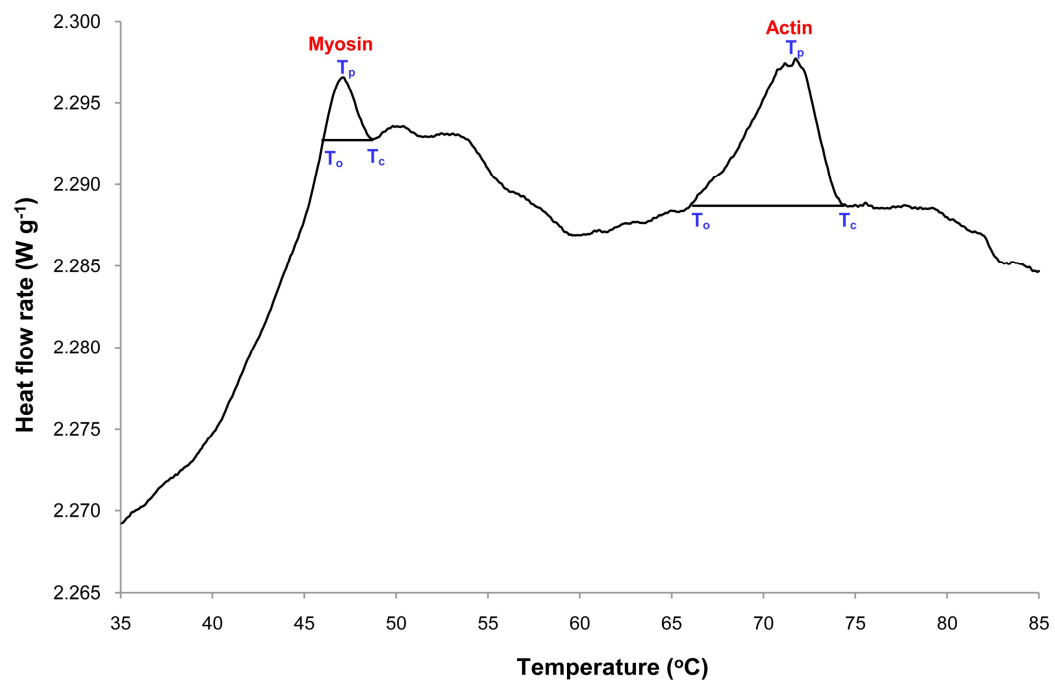


Figure 3.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายตุลาคุณ นนทพุท
 รหัสประจำตัวนักศึกษา 5610220032
 วุฒิการศึกษา

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

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

1. ทุนวิจัยประเภททั่วไปจากสำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (เลขที่สัญญา SCI 570522S)
2. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ประจำปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. ทุนสนับสนุนการนำเสนอผลงานวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

1. ตุลาคุณ นนทพุท, การุณ ทองประจุแก้ว, สมรักษ์ รอดเจริญ และวารภรณ์ ห่าหอ. 2558. การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนไมโอซินและแอกทินในกล้ามเนื้อภายหลังการตายของปลานิล (*Oreochromis niloticus*). การประชุมทางวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 25. วันที่ 10–12 มิถุนายน 2558. มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา. หน้า 87–94.
2. ตุลาคุณ นนทพุท, การุณ ทองประจุแก้ว, สมรักษ์ รอดเจริญ และวารภรณ์ ห่าหอ. 2558. การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงความร้อนในกล้ามเนื้อภายหลังการตายของปลานิล (*Oreochromis niloticus*). วารสารปาริชาติ. 28(3): 10–23.
3. Nonthaput, T., Hahor, W., Thongprajukaew, K., Yoonram, K., Rodjaroen, S. 2015. Muscle degradation in aquatic animal carcass allows estimating time of death in ambient water environment (submitted).