การศึกษากลุ่มโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมือง

บทคัดย่อ

โครงการ “การศึกษากลุ่มโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมือง” มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาคุณภาพเนื้อ ปริมาณและชนิดของ collagen ในเนื้อโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา 2) ศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนกลุ่ม myofibrillar ในเนื้อโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มาและที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน 3) พัฒนาการใช้ calpastatin antibody ในการตรวจสอบความนุ่มของเนื้อโค และ 4) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ collagen ชนิดของโปรตีนที่แสดงออกในเนื้อ และปริมาณโปรตีน calpastatin ที่มีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อโค ทำการศึกษาในโคไทยพันธุ์พื้นเมือง 4 กลุ่ม และโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรป 2 กลุ่ม โคไทยพันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ (1) กลุ่มโคพื้นเมืองจากภาคอีสานจากจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 10 ตัว น้ำหนักมีชีวิต 200-250 กิโลกรัม (2) กลุ่มโคพื้นเมืองภาคกลางจากจังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 8 ตัว น้ำหนักมีชีวิต 180-250 กิโลกรัม ซึ่งโคทั้งสองกลุ่มใช้การเลี้ยงแบบปล่อยแทะเล็มหญ้าตามธรรมชาติ (3) กลุ่มโคพื้นเมืองภาคเหนือตอนล่างจากจังหวัดตาก จำนวน 10 ตัว น้ำหนักมีชีวิต 200-300 กิโลกรัม และ (4) กลุ่มโคพื้นเมืองจากจังหวัดชัยนาท (โคขาวลำพูน) จำนวน 8 ตัว น้ำหนักมีชีวิต 300-350 กิโลกรัม ใช้การเลี้ยงแบบกักบริเวณให้อยู่ในพื้นที่ที่มีพื้นที่เดินเล่น และมีหญ้าสดแพงโกล่าตัดจากแปลงปลูกหญ้ามาให้กิน อายุเฉลี่ยโคพันธุ์พื้นเมืองไทยทั้ง 4 กลุ่ม ประมาณ 2 ปี ส่วนโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรป ได้แก่ (1) กลุ่มโคลูกผสมที่มีระดับเลือดยุโรปที่เป็นพันธุ์ซิมเมนทอล 62.5 เปอร์เซ็นต์ (62.5 %ซิมเมนทอล x 25 % ซาฮิวาลหรือบราห์มัน 12.5 % พื้นเมือง) จำนวน 6 ตัว น้ำหนักเข้าฆ่าเฉลี่ย 590 กิโลกรัม และ (2) กลุ่มโคลูกผสมที่มีระดับเลือดซิมเมนทอล 25 เปอร์เซ็นต์ (25 % ซิมเมนทอล x 50 % ซาฮิวาลหรือบราห์มัน 25 % พื้นเมือง) จำนวน 3 ตัว น้ำหนักเข้าฆ่าเฉลี่ย 550 กิโลกรัม โคทั้งสองกลุ่มเลี้ยงภายใต้ระบบการผลิตของสหกรณ์โคขุนโพนยางคำ โดยมีการให้อาหารข้นตลอดช่วงเวลา 10-14 เดือน ร่วมกับฟางข้าวและหญ้าสด มีการเสริมกากน้ำตาลให้กินร่วมด้วยเป็นเวลา 6 เดือนก่อนสิ้นสุดการขุน ทั้งนี้โคทั้ง 2 กลุ่ม มีคะแนนไขมันแทรกที่ระดับ 3 เท่ากัน

เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) จากซากซีกซ้ายจำนวน 100 กรัม (24 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย) เพื่อนำไปศึกษาชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ จากนั้นเมื่อครบระยะเวลา 48 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย ทำการตัดแต่งซากเอาเฉพาะกล้ามเนื้อสันนอกบริเวณซี่โครงคู่ที่ 6 จนถึงปลายกระดูกสันหลัง จากนั้นตัดแบ่งกล้ามเนื้อสันนอกออกเป็น 4 ชิ้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ตามระยะเวลาการบ่มที่ 2, 7, 14 และ 21 วันภายหลังสัตว์ตาย เมื่อครบตามแต่ละระยะเวลาการบ่มนำเนื้อไปศึกษาค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ค่าสีของเนื้อ (L*, a*, b*) ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ

(Warner Bratzler shear force; WBSF) ปริมาณ collagen ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของไมโอไฟบริลล่าโปรตีน (myofibrillar protein) วิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนในเนื้อโค ตรวจสอบปริมาณโปรตีน calpastatin และศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอนไซม์ μ-calpain นำข้อมูลของเนื้อในกลุ่มโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มาหรือกลุ่มโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรปและที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน มาวิเคราะห์ด้วย General Linear Model (GLM) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least Square Means ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปทางสถิติ

ผลจากการศึกษาในกลุ่มโคพื้นเมืองพบว่า กลุ่มเนื้อโคไทยมีอิทธิพลต่อค่า pH โดยเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีค่า pH สูงที่สุด ($p<0.05$) รองลงมาคือ เนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูนจากจังหวัดชัยนาท เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี โดยมีค่า pH เท่ากับ 5.50±0.05, 5.48±0.03, 5.46±0.03 และ 5.41±0.03 ตามลำดับ ทั้งนี้ระยะเวลาในการบ่มเนื้อนานขึ้นส่งผลให้ค่า pH ของเนื้อลดลง โดยค่า pH ของเนื้อที่บ่มนาน 21 วัน มีค่าต่ำที่สุด (5.43±0.03)

เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีมีค่าความสว่างของเนื้อ (L*) สูงที่สุด (42.63±0.51) เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อโคกลุ่มอื่นๆ ($p<0.05$) โดยเนื้อโคที่มีค่า L* รองลงมาคือ เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน มีค่าเท่ากับ 40.28±0.46 และ 38.77±0.51 ตามลำดับ ทั้งนี้ระยะเวลาในการบ่มเนื้อนานขึ้นส่งผลให้ค่า L* ของเนื้อเพิ่มขึ้น ($p<0.05$) โดยเนื้อที่บ่มผ่านไป 21 วัน พบว่าสีของเนื้อมีความสว่างสูงสุด (41.36±0.54)

เนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูนมีค่าสีแดงของเนื้อ (a*) สูงที่สุด ($p<0.05$) คือ 21.63±0.38 รองลงมาคือ เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี โดยมีค่า a* เท่ากับ 17.40±0.38 และ 15.80±0.34 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูนมีค่าสีเหลืองของเนื้อ (b*) สูงที่สุด ($p<0.05$) คือ 5.19±0.27 รองลงมาคือ เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี โดยมีค่า b* เท่ากับ 4.21±0.24 และ 3.06±0.27 ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้นพบว่าค่า a* และค่า b* ของเนื้อจะมีค่าเพิ่มขึ้น ($p<0.05$) โดยเนื้อที่บ่มผ่านไป 21 วัน มีค่า a* และค่า b* สูงที่สุดเท่ากับ 18.48±0.40 และ 5.67±0.28 ตามลำดับ

เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีค่าแรงตัดผ่านของเนื้อต่ำที่สุด (6.21±0.22 กิโลกรัม) เมื่อเทียบกับเนื้อโคกลุ่มอื่นๆ ($p<0.05$) โดยเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี เนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อรองลงมา คือมีค่าเท่ากับ 7.92±0.22, 8.11±0.24, และ 8.37±0.24 กิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อนานขึ้นพบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีค่าลดลง ($p<0.05$) ซึ่งเนื้อที่ระยะเวลาการบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 9.67±0.23, 8.14±0.23, 6.68±0.23 และ 6.12±0.23 กิโลกรัม ตามลำดับ

คอลลาเจนที่ละลายได้ในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีปริมาณมากที่สุด ($p<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 0.26±0.01 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อ ขณะที่เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน มีปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้เท่ากับ 0.16±0.01, 0.16±0.01 และ 0.16±0.01 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อ ตามลำดับ ปริมาณของคอลลาเจนที่ละลายได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม ($p<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 0.13±0.01, 0.16±0.01, 0.19±0.01 และ 0.27±0.01 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อ ตามระยะเวลาการบ่มที่ 2, 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ

สำหรับคอลลาเจนที่ไม่ละลายพบว่า กลุ่มเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีปริมาณมากที่สุด ($p<0.05$) ซึ่งไม่แตกต่างจากเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี โดยมีค่าเท่ากับ 3.19±0.11 และ 2.87±0.14 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อ รองลงมาคือเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 2.07±0.13 และ 1.44±0.13 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าคอลลาเจนที่ไม่ละลายมีปริมาณลดลงตามระยะเวลาการบ่มที่นานขึ้น ($p<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 3.31±0.13, 2.50±0.13, 2.04±0.13 และ 1.71±0.13 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อ ตามระยะเวลาการบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ

การศึกษาครั้งนี้ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มเนื้อโคไทยและระยะเวลาการบ่มที่มีผลต่อค่า pH ค่า L* ค่า a* ค่า b* ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ และปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย ($p>0.05$)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Troponin T (Tn-T) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าอิทธิพลของกลุ่มโคมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T โดยเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูนมีปริมาณโปรตีน Tn-T ขนาด 37-39 kDa น้อยกว่า ($p<0.05$) เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.07±0.34, 1.65±0.33, 3.43±0.31 และ 4.01±0.34 µg/µl ตามลำดับ กลุ่มของโปรตีน Troponin ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่มีขนาด 30 kDa พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีปริมาณมากที่สุด (1.60±0.08 µg/µl) ส่วนเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูนมีปริมาณโปรตีน Tn-T ขนาด 30 kDa น้อยที่สุด (0.26±0.12 µg/µl)

นอกจากนี้ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคและระยะเวลาการบ่มที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ขนาด 30 kDa โดยที่ระยะเวลาการบ่ม 2 วัน เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน ไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่มีค่าน้อยกว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก ($p<0.05$) และไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคและระยะเวลาการบ่มต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ขนาด 37-39 kDa ($p>0.05$)

แต่จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Tn-T ด้วยเทคนิค Western blot พบว่าการศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโคที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T รวม โดยแยกออกเป็นโปรตีน Tn-T

กลุ่มที่มีการสลายตัว (37–39 kDa) และกลุ่มผลผลิตจากการสลายตัวของ Tn-T (28-30 kDa) พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีค่าความเข้มโปรตีน Tn-T รวมขนาด 37-39 kDa มากที่สุด ($p<0.01$) (771.64±70.59 x10^3 pixel) รองลงมาคือเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 762.38± 70.59, 761.80±70.59 และ 573.53±70.59 x10^3 pixel ตามลำดับ ส่วนค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T รวม ขนาด 28-30 kDa พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีมีค่าความเข้มของโปรตีนมากที่สุด (661.92±48.95 x10^3 pixel) รองลงมาคือเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก (454.51±48.95, 440.43±48.95 และ 421.68±48.95 x10^3 pixel ตามลำดับ)

อิทธิพลของระยะเวลาบ่มที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ในเนื้อพบว่า เมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อเพิ่มขึ้นความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 39 kDa มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) ค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 30 และ 28 kDa พบว่ามีการเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่มอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) สำหรับอิทธิพลของระยะเวลาบ่มที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T รวม ในกลุ่ม 37-39 kDa พบว่าความเข้มของโปรตีนลดลงตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่ค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T รวม ในกลุ่ม 28-30 kDa เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) ทั้งนี้ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคกับระยะเวลาบ่มที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานีมีเปอร์เซ็นต์การสลายตัวสูงที่สุด (26.97 เปอร์เซ็นต์) เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการบ่มที่ 21 วัน รองมาคือ เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน

การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยเทคนิค 2D - gel พบความแตกต่างของโปรตีนรวมของเนื้อโคทั้ง 4 กลุ่ม ในระยะเวลาบ่มที่ 2 และ 14 วัน จำนวน 8 ตำแหน่ง สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอนไซม์ μ-calpain พบการปรากฏของแถบแบน ขนาดประมาณ 80 kDa ในเนื้อโคทุกชนิด โดยพบแถบแบนอย่างชัดเจนตั้งแต่วันที่ 2 ของการบ่ม และมีการสลายตัวตามระยะเวลาการบ่มจนสิ้นสุดการทดลอง

อิทธิพลของกลุ่มเนื้อโคไทยมีผลต่อปริมาณโปรตีน calpastatin โดยเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก มีปริมาณโปรตีน calpastatin ต่ำที่สุด (1.71±0.04 μg/μl) รองลงมาคือ เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี เนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี โดยมีปริมาณโปรตีน calpastatin เท่ากับ 1.82±0.04, 1.89±0.04 และ 1.99±0.04 μg/μl ตามลำดับ ($p<0.05$) และพบว่าอิทธิพลของระยะเวลาการบ่มมีผลต่อปริมาณโปรตีน calpastatin โดยที่ระยะเวลาการบ่ม 2 วัน มีปริมาณโปรตีน calpastatin สูงกว่าเนื้อโคที่ระยะเวลาการบ่ม 7, 14 และ 21 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งนี้ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มเนื้อโคไทยและระยะเวลาการบ่มต่อปริมาณโปรตีน calpastatin ($p>0.05$)

ค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณโปรตีน calpastatin ($r = 0.68$) ($p<0.01$) และปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย ($r = 0.18$) ($p<0.05$) แต่มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ ($r = -0.49$) ขณะที่ปริมาณโปรตีน calpastatin มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย ($r = 0.25$) ($p<0.01$) แต่มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ ($r = -0.46$) ($p<0.01$) และปริมาณโปรตีน Tn-T ขนาด 28-30 kDa ($r = -0.31$) ($p<0.05$)

สำหรับผลการศึกษาในกลุ่มโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรปพบว่า ค่า pH ในกล้ามเนื้อสันนอกของโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูง (5/8 Simmental) และโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำ (2/8 Simmental) มีค่า pH ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) และเมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้นจะส่งผลให้ค่า pH ลดลง ($p>0.05$)

ค่า L* ของเนื้อโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูงมีค่ามากกว่าเนื้อโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำ ($p<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 38.97 และ 35.46 ตามลำดับ เมื่อเวลาในการบ่มเนื้อนานขึ้นค่า L* ของเนื้อโคทั้ง 2 กลุ่มจะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในส่วนของค่า a* พบว่าโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูงมีค่ามากกว่าเนื้อโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำ โดยมีค่าเท่ากับ 25.39 และ 23.06 ตามลำดับ ($p<0.05$) และพบว่าค่า a* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ($p>0.05$) เมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้น สำหรับค่า b* ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างโคทั้ง 2 กลุ่ม และเมื่อบ่มเนื้อเป็นระยะเวลานานขึ้นค่า b* จะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

กลุ่มโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูงมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อน้อยกว่ากลุ่มโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำ ($p<0.05$) โดยมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 5.06 และ 6.46 กิโลกรัม ตามลำดับ ค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้น ($p<0.05$) โดยที่ระยะเวลาการบ่ม 2 วัน มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 6.94 ± 0.40 kg/cm^2 ($p<0.05$) ปริมาณโปรตีน calpastatin เนื้อโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูงและโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำมีปริมาณไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) และเมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้นปริมาณโปรตีน calpastatin ในเนื้อโคทั้ง 2 กลุ่ม จะลดลง ($p<0.05$)

นอกจากนี้ยังพบว่าคอลลาเจนที่ละลายได้และคอลลาเจนที่ไม่ละลายของกลุ่มโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูง ($p>0.05$) และปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม ($p< 0.05$) ขณะที่ปริมาณคอลลาเจนทั้งหมดและปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลายพบว่ามีการย่อยสลายสูงขึ้นโดยมีค่าลดลงตามระยะเวลาการบ่มเนื้อที่นานขึ้น ($p> 0.05$)

การศึกษาครั้งนี้ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรปและระยะเวลาการบ่มที่มีผลต่อค่า pH ค่า L* ค่า a* ค่า b* ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณ calpastatin ปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ และปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย ($p>0.05$)

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ (Tn-T) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าอิทธิพลของกลุ่มโคมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T โดยเนื้อโคขุนกลุ่มซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูงมีปริมาณของโปรตีน Tn-T ขนาด 37-39 kDa และขนาด 30 kDa มากกว่าเนื้อกลุ่มโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำ ($p>0.05$) เมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อนานขึ้นโปรตีน Tn-T ขนาด 37-39 kDa ของโคทั้ง 2 กลุ่ม มีแนวโน้มลดลง ($p>0.05$) ขณะที่ปริมาณโปรตีน Tn-T ขนาด 30 kDa ของโคทั้ง 2 กลุ่ม มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม ($p>0.05$) การศึกษาครั้งนี้ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคและระยะเวลาการบ่มต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ขนาด 37-39 kDa และขนาด 30 kDa ($p>0.05$)

เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ Tn-T ด้วยวิธี Western blot พบการสลายตัวของโปรตีนขนาด 37-39 kDa และการเพิ่มขึ้นของโปรตีนขนาด 28-30 kDa ตามระยะเวลาการบ่มที่ 2, 7, 14 และ 21 วัน ในเนื้อกลุ่มโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูงและกลุ่มโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำ

การวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีนด้วยเทคนิค 2D - gel ไม่พบความแตกต่างของโปรตีนรวมในเนื้อจากทั้งโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูงและระดับเลือดต่ำ ทั้งนี้ในระยะเวลาบ่มที่ 2 วัน พบโปรตีนในตำแหน่งที่ 5, 6 และ 7 ในเนื้อโคทั้ง 2 กลุ่ม ส่วนวันที่ 14 ของการบ่ม พบตำแหน่งของโปรตีนในเนื้อโคทั้ง 2 กลุ่ม ในตำแหน่งที่ 6, 7 และ 8

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ μ-calpain ด้วยเทคนิค Western blot พบการปรากฏของแถบแบนขนาดประมาณ 80 kDa ในเนื้อโคทั้งสองกลุ่ม โดยพบแถบแบนอย่างไม่ชัดเจนในวันที่ 2, 7 และ 14 ของระยะเวลาบ่มและหายไปในวันที่ 21 ของการบ่ม

ค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณโปรตีน calpastatin ($r = 0.52$) ($p<0.01$) และปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ ($r = 0.48$) ($p<0.01$) แต่มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับปริมาณโปรตีน Tn-T ขนาด 28-30 kDa ($r = -0.67$) ขณะที่ปริมาณโปรตีน calpastatin มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ ($r = 0.46$) ($p<0.01$) ส่วนปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณคอลลาเจนไม่ละลาย ($r = 0.64$) ($p<0.01$) และปริมาณโปรตีน Tn-T ขนาด 30 และ 28 kDa ($r = 0.88$) ($p<0.01$)

Study of Myofibrillar Protein in Relationship to Tenderness of Thai Native Beef

Abstract

The objectives of this project were to 1) study of meat quality, type and content of collagen in Thai native cattle, 2) study of myofibrillar protein at ageing periods, 3) using calpastatin antibody to detect level of calpastatin protein in Thai native cattle and its relationship to meat tenderness, 4) relationship study of collagen content, protein degradation and calpastatin quantification on meat tenderness in Thai native cattle.

Groups of Thai native cattle average age at 2 years were from 1) north-eastern region : Ubonratchatani province (n=10, 200-250 kg), 2) central region : Kanchanaburi province (n=8, 180-250 kg) both groups were naturally raised under free range grazing, 3) northern region : Tak province (n=10, 200-300kg), 4) "Kao Lumphun" from Chainat province (n=8, 300-350 kg) were raised with cultivated grass supplemented with pangola grass in the stall. Whereas, European crossbred groups were 1) Simmental crossbred (62.5% Simmental x 25% Sahiwal/Brahman x 17.5% Thai native (n=6,550kg), 2) Simmental crossbred (25% Simmental x 50% Sahiwal/Brahman x 25% Thai native) (n=3,550 kg). Both groups were raised under production system of Ponyangkham Beef Co-operation. The cattle were fed with TMR and supplemented with grass and rice straw for 10-14 months and molasses were added in the ratio 6 months before slaughtering.

All samples were *Longissimus dorsi* (LD) cut from the left side of each carcass at the 6^{th} rib downward. Samples for muscle fiber type evaluation were collected after 24 hr. postmortem at 100 g of weight. Others were collected at 48 hr. postmortem and divided into 4 pieces put in vacuum package stored at 0°-4 °C for 2, 7, 14 and 21 day postmortem. At each ageing, pH value, meat color (L*,a*,b*), Warner Bratzler shear force (WBSF), soluble collagen (SC), insoluble collagen (ISC), myofibrillar protein, Troponin-T degradation, calpastatin protein and μ-calpain were determined. Meat traits data were performed using PROC GLM of the Statistical Analysis System. When significance was determined ($p<0.05$), least square group means were compared using the PDIFF test of SAS (2000).

The results in Thai native cattle were indicated that meat from Tak had the highest pH values among meat of "Kao Lumphun", Ubonratchatani and Kanchanaburi at 5.50±0.05,

5.48±0.03, 5.46±0.03 and 5.41±0.03 respectively ($p< 0.05$). The pH values decreased along ageing period, at 21 day postmortem pH value among Thai native cattle was lowest at 5.43±0.03. Meanwhile, Kanchanaburi meat had the highest lightness (L*) to Ubonratchatani and "Kao Lumphun" meat at 42.63±0.51, 40.28±0.46 and 38.77±0.51 respectively ($p<0.05$). Ageing periods resulted in an increase of (L*) values, at 27 day postmortem (L*) values within Thai Native cattle was highest at 41.36±0.54. Meat of "Kao Lumphun" had the highest redness values (a*) to meat from Kanchanaburi and Ubonratchatani at 21.63±0.38, 17.40±0.38 and 15.80±0.34 respectively ($p<0.05$). While "Kao Lumphun" had the highest yellowness values (b*) to meat from Ubonratchatani and Kanchanaburi at 5.19±0.27, 4.21±0.24 and 3.06±0.27 respectively ($p<0.05$). In addition to, a* and b* values also increased along ageing period, at 21 day postmortem these values were 18.48±0.40 and 5.67±0.28 27 respectively ($p<0.05$).

In term of WBSF, Tak meat had the lowest shear force values to Ubonratchatani, "Kao Lumphun" and Kanchanaburi meat at 6.21±0.22, 7.92±0.22, 8.11±0.24 and 8.37±0.24 kg respectively ($p<0.05$). Postmortem WBSF values gradually declined at 2,7,14 and 21 day ageing periods as follow : 9.67±0.23, 8.14±0.23, 6.68±0.23, 6.12±0.23 kg ($p<0.05$).

Meat from Tak had the highest SC and ISC to meat from Ubonratchatani, Kanchanaburi and "Kao Lumphun", for SC at 0.26±0.01, 0.16±0.01, 0.16±0.01 and 0.16±0.01 mg/g and 3.19±0.01, 2.87±0.14, 2.07±0.13 and 1.44±0.13 mg/g respectively for ISC ($p<0.05$). While postmortem ageing time longer, SC values increased (0.13±0.01, 0.16±0.01, 0.19±0.01 and 0.27±0.01 mg/g) in conversion to ISC (3.31±0.13, 2.50±0.13, 2.04±0.13 and 1.71±0.13 mg/g). There was no significant interaction between Thai native groups and ageing period effect on pH values, meat color, WBSF, SC and ISC ($p>0.05$).

SDS-PAGE analysis of Troponin T (Tn-T) indicated that "Kao Lumphun" meat had the lowest band intensity of Tn-T precursors (37-39 kDa) to Ubonratchatani, Tak and Kanchanaburi meat at 1.07±0.34, 1.65±0.33, 3.43±0.31 and 4.01±0.34 µg/µl respectively ($p<0.05$). Band intensity of Tn-T products (30kDa) of Tak meat had the highest at 1.60 ±0.08 µg/µl. The interaction was found between Thai native cattle groups and ageing period on Tn-T 30 kDa. Meat from Tak had the highest band intensity ($p<0.05$) at 2 day ageing period. Moreover, there was no interaction between cattle groups and ageing period on Tn-T precursors ($p>0.05$).

Western blot analysis of Tn-T showed that Tak meat had the highest band intensity of Tn-T precursors to Ubonratchatani, Kanchanaburi and "Kao Lumphun" meat at 771.64 ±70.59, 762.38±70.59, 761.80±70.59 and 573.53±70.59 x 10^3 pixel, respectively ($p<0.01$), whereas meat from Kanchanaburi had the most band intensity of Tn-T products to meat of "Kao Lumphun", Ubonratchatani and Tak at 661.92±48.95, 454.51± 48.95, 440.43±48.95 and 421.68±48.95 x 10^3 pixel respectively ($p<0.01$). Prolong ageing period caused the decrease of Tn-T precursors whereas, Tn-T products increased ($p<0.01$). There was non-significant between cattle groups and ageing period on Tn-T protein ($p>0.05$). Furthermore, the study found that Ubonratchatani meat had the highest percentage of protein degradation (26.97 %) along ageing period.

Analysis of 2 D gel found 8 different positions of protein spots from Thai native cattle at 2 and14 day postmortem.

The result of μ-calpain determination indicated that at 2 day postmortem in all cattle groups, there was band at 80 kDa which gradually degraded during ageing.

Calpastatin quantification in Tak meat was the lowest to Ubonratchatani, "Kao Lumphun", and Kanchanaburi meat at 1.71±0.04, 1.82± 0.04, 1.89±0.04 and 1.99±0.04 μg/μl. respectively ($p<0.05$). Calpastatin declined from 2 day to 21 day ageing ($p<0.05$), whereas there were no significant interaction between Thai native cattle groups and ageing period on calpastatin protein degradation ($p>0.05$). In this study, WBSF had positive correlation to calpastatin ($r=0.68$; $p<0.01$) and ISC ($r=0.18$; $p<0.05$) but negative to SC ($r = ¬0.49$). Whereas, the correlation of calpastatin was positive to ISC($r=0.25$) but negative to SC ($r= ¬0.46$) andTn-T at 28-30kDa ($r= ¬0.31$).

In European crossbred groups, the results revealed that there was no effect of higher level (62.5%) or lower level (25%) of Simmental contributions on pH values ($p>0.05$). Moreover, postmortem ageing decreased the pH values ($p<0.05$). Meat from higher Simmental level had higher L* and a* values than another at 38.97 and 35.46 for L* ($p<0.05$) and 25.39, 23.06 for a* ($p<0.05$), whereas there was no significant difference for calpastatin between two groups. Although, the study showed that L*, a*, b* values, SC and Tn-T products increased during ageing, WBSF, calpastatin, ISC, total collagen (TC) and Tn-T precursors decreased.

SDS-PAGE analysis of Tn-T revealed that higher level of Simmental meat had higher band intensity of both precursor band and Tn-T 30 kDa. Moreover, there was no

significant of the interaction between crossbred cattle groups and ageing period on pH values, meat color, WBSF, calpastatin, SC, ISC, Tn-T precursors and Tn-T 30 kDa ($p>0.05$). There was no significant difference between European crossbred groups on 2 D gel as protein spots were found homologous at 5,6 and 7 position at 2 day postmortem and at 6,7,8 position at 14 day postmortem.

While, western blot analysis of μ - calpain showed band at 80 kDa at 2, 7 and 14 day postmortem, and this band disappeared at 21 day postmortem in both Simmental groups. There was positive correlation on WBSF, calpastatin ($r=0.52$; $p<0.01$) and SC ($r= 0.48$; $p<0.01$), but negative to Tn-T products ($r= \neg 0.67$). Moreover, values of ISC and Tn-T products had strongly positive correlation to SC ($r=0.52$ and $r= 0.88$; $p<0.01$).