



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การศึกษากลุ่มโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อที่เกี่ยวข้องกับ
ลักษณะความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมือง”

โดย

รศ.ดร. จุฑารัตน์ เศรษฐกุล

มีนาคม 2555

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การศึกษากลุ่มโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อที่เกี่ยวข้อง
กับลักษณะความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมือง”

โดย

รศ.ดร. จุฑารัตน์ เศรษฐกุล

รศ.ดร. นवलพรรณ งามยี่สุน

ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์

ดร. ปิยะดา ทวีศรี

ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้เป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณภายใต้ความร่วมมือทางวิชาการระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และขอขอบคุณนายฉันทวัฒน์ อาชะวาคม ผู้ช่วยนักวิจัย นางสาวยุรินทร์ รักทองและนางสาวพัชรา เอื้อพัฒนพงศ์ นักศึกษาปริญญาโทผู้ช่วยวิจัยของโครงการ รวมทั้งผู้ช่วยวิจัยภายใต้โครงการหน่วยประสานงานการขยายโอกาสธุรกิจเนื้อโค ได้แก่ นายเฉลิมชัย ทิพย์ค นายศิริโชค หาญกลาง และนายณัฐพล ขวงสะอาด และนักศึกษาปริญญาโท สาขาสัตวศาสตร์ ซึ่งได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บรวบรวมข้อมูลและเตรียมตัวอย่างในการวิจัย ทั้งนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิที่ช่วยตรวจทานและให้คำแนะนำตลอดจนชี้แนะในโครงการวิจัยครั้งนี้จนสามารถบรรลุผลตามวัตถุประสงค์ได้

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ต่อไปในอนาคตและนำผลจากการวิจัยครั้งนี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

คณะผู้วิจัย

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summery)

ปัญหาและความสำคัญ

ผลจากการศึกษาวิจัยภายใต้ชุดโครงการ “การขยายโอกาสธุรกิจเนื้อโคไทย” พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองไม่เหมาะที่จะนำไปทำอาหารประเภทสเต็กเพราะเนื้อมีความเหนียวมาก การบ่มเนื้อถึง 14 วัน ช่วยทำให้เนื้อนุ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและแม้ว่าจะเพิ่มระยะเวลาการบ่มให้นานขึ้นเป็น 21 หรือ 30 วัน ก็ไม่ได้ช่วยให้เนื้อนุ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าความนุ่มเหนียวของเนื้อโคพื้นเมืองในแต่ละภูมิภาคของประเทศยังมีความแตกต่างกันอย่างมาก ทั้งนี้ข้อมูลในด้านองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพโคพื้นเมืองไทยในเชิงลึกยังไม่มีการศึกษากันอย่างจริงจัง มีเพียงรายงานจากการศึกษาวิจัยเบื้องต้นพบว่าเนื้อโคพื้นเมืองทั่วไปจะมีสีเข้ม เนื้อแน่นเป็นมันวาว เส้นใยกล้ามเนื้อละเอียด และเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าคุณภาพเนื้อโคที่ผู้บริโภคในปัจจุบันให้ความสำคัญเป็นอันดับต้นคือ คุณค่าทางการบริโภค ซึ่งได้แก่คุณภาพที่เกี่ยวข้องกับรสชาติ สี กลิ่น ความนุ่ม ความคงตัวของเนื้อ และคุณค่าทางโภชนาการและสุขภาพ เนื่องจากเนื้อโคเป็นแหล่งอาหารโปรตีน ให้พลังงาน กรดอะมิโนจำเป็น กรดไขมันจำเป็น และแร่ธาตุวิตามินที่จำเป็น เช่น ธาตุเหล็กและสังกะสีสูง รวมทั้งวิตามิน E และวิตามิน B

ดังนั้นการให้ความสำคัญของการศึกษาวิจัยถึงคุณภาพของเนื้อโคพื้นเมืองไทยให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถอธิบายถึงคุณลักษณะเฉพาะตัวของเนื้อโคพื้นเมืองไทยที่ โดยเฉพาะความเหนียวของเนื้อ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลุ่มโปรตีนในเส้นใยกล้ามเนื้อและชนิดของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในเนื้อที่มีต่อคุณภาพของเนื้อโคพื้นเมืองไทยภายหลังการฆ่าและในแต่ละช่วงระยะเวลาการบ่มเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำเนื้อไปใช้ประโยชน์ได้อย่างถูกต้องเหมาะสม โดยเฉพาะในแง่การเพิ่มมูลค่าของเนื้อโค

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาคุณภาพเนื้อ ปริมาณและชนิดของ collagen ในเนื้อโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา และที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน
2. เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนกลุ่ม myofibrillar ในเนื้อโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา และที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน
3. พัฒนาการใช้ calpastatin antibody ในการตรวจสอบปริมาณโปรตีน calpastatin ที่มีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อโค
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ collagen ชนิดของโปรตีนที่แสดงออกในเนื้อ และปริมาณโปรตีน calpastatin ที่มีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อโค

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพเนื้อโคพื้นเมือง
2. ทราบปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมือง
3. ทราบถึงตัวชี้วัดที่เหมาะสมที่ใช้ตรวจสอบความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมือง
4. ต่อยอดองค์ความรู้เพื่อการพัฒนาเป็น monoclonal antibodies สำหรับผลิตชุดตรวจสอบระดับความนุ่มของเนื้อโค
5. ผลิตผลงานเพื่อตีพิมพ์ในระดับประเทศและ/หรือต่างประเทศ
6. ผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโทและนักวิจัยรุ่นใหม่

ขอบเขตการวิจัย

เนื้อโคพื้นเมืองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มาจากโคพื้นเมืองไทยที่เลี้ยงต่างพื้นที่ ได้แก่ โคภาคกลางเป็นกลุ่มโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี โคภาคเหนือตอนล่างมาจากกลุ่มโคพื้นเมืองจังหวัดตาก โคภาคอีสานเป็นกลุ่มโคพื้นเมืองจังหวัดอุบลราชธานี และโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูนจากภาคเหนือ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางด้านสายพันธุ์ ระดับเลือดโคพื้นเมือง ระบบการเลี้ยง อย่างไรก็ตามกลุ่มโคพื้นเมืองทั้งหมดที่เป็นตัวแทนในการศึกษาครั้งนี้ถูกเลี้ยงด้วยอาหารหยาดสดแต่เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังได้ศึกษาในกลุ่มเนื้อโคขุนลูกผสมเลือดยุโรปจากสหกรณ์การเลี้ยงปศุสัตว์กรป. กลาง โพนยางคำ

ข้อมูลที่ทำการศึกษาคือ กลุ่มโปรตีน myofibrillar ในเนื้อ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับความนุ่มเหนียวของเนื้อ (ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ) คือ Troponin-T โปรตีน calpastatin และเอนไซม์ในเนื้อคือ calpain โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนดังกล่าวภายหลังการบ่มเนื้อ (ageing) ที่ระยะเวลาการบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน

การดำเนินการวิจัย

1. กลุ่มโคทดลอง

กลุ่มโคพื้นเมืองภาคเหนือตอนล่าง เป็นโคลูกผสมพื้นเมืองและบราห์มันเพศผู้ มีเลือดโคพื้นเมืองไม่ต่ำกว่า 62.5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงอยู่ทั่วไปในจังหวัดตาก เป็นกลุ่มโคที่ถูกคัดเลือกโดยกลุ่มเกษตรกรก้าวหน้าโดยเลี้ยงแบบขังคอกรวมฝูงมีบริเวณให้เดินเล่น เลี้ยงด้วยอาหารหยาดสดโดยตัดมาจากแปลงปลูกหญ้ารวม ซึ่งมีหญ้าแพงโกล่า หญ้าลูซี่ และถั่วฮามาตา เป็นระยะเวลาประมาณ 1 ปี จนได้น้ำหนักตัวประมาณ 250-300 กิโลกรัม อายุเฉลี่ย 2-2.5 ปี ถูกส่งเข้าโรงฆ่าสุนัขวิจัยและปรับปรุงพันธุ์สัตว์ จังหวัดตาก

กลุ่มโคพื้นเมืองภาคกลางเป็นกลุ่มโคพื้นเมืองที่เลี้ยงอยู่ทั่วไปตามที่ราบเชิงเขาในจังหวัดกาญจนบุรี เป็นโคพื้นเมืองเพศผู้จำนวน 8 ตัว เลี้ยงแบบปล่อยหากินหญ้าตามธรรมชาติ จนได้

น้ำหนักตัวประมาณ 150-180 กิโลกรัม อายุเฉลี่ย 2-2.5 ปี ถูกคัดเลือกส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

กลุ่มโคพื้นเมืองภาคอีสานเป็นกลุ่มโคพื้นเมืองที่เลี้ยงแบบปล่อยหากินหญ้าตามธรรมชาติ ตามที่ราบเชิงเขา บนภูเขาและนาหญ้าในจังหวัดอุบลราชธานี เป็นโคเพศผู้จำนวน 10 ตัว จนได้น้ำหนักตัวประมาณ 180-200 กิโลกรัม อายุเฉลี่ย 2-2.5 ปี ถูกคัดเลือกส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์เทศบาล อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

กลุ่มโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน เป็นเพศผู้ จำนวน 8 ตัว เลี้ยงแบบขังคอกมีบริเวณให้เดินเล่น ตัดหญ้าจากแปลงปลูกหญ้าแพงโกลามาให้กินเป็นระยะเวลาประมาณ 13 เดือน จนได้น้ำหนักตัวประมาณ 300 กิโลกรัม อายุเฉลี่ย 2-2.5 ปี ถูกคัดเลือกส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

กลุ่มโคขุนลูกผสมเลือดยุโรปเป็นโคทดลองที่มาจากโคลูกผสมระหว่างเลือดยุโรป Taurus และเลือดอินเดีย Indicus แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นโคลูกผสมที่มีระดับเลือดซิมเมนทอล 62.5 เปอร์เซนต์ คณะเพศจำนวน 6 ตัว (5/8 Simmental) กลุ่มที่ 2 มีระดับเลือดซิมเมนทอล 25 เปอร์เซนต์ คณะเพศจำนวน 3 ตัว (2/8 Simmental) โดยเลือด Indicus เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ Sahiwal หรือ Brahman กับโคพื้นเมือง ซึ่งเลี้ยงภายใต้ระบบการผลิตของสหกรณ์โคขุนโพธิ์ยางคำ โดยมีการให้อาหารข้นตลอดช่วงเวลา 10-14 เดือน ร่วมกับฟางข้าวและหญ้าสด ทั้งนี้มีการเสริมกากน้ำตาลให้กินร่วมด้วยเป็นเวลา 6 เดือน ก่อนส่งเข้าโรงฆ่าโดยโคมีน้ำหนักเข้าฆ่าเฉลี่ย 560 กิโลกรัม เข้าฆ่าที่โรงฆ่าสหกรณ์โพธิ์ยางคำ จังหวัดสกลนคร และมีคะแนนไขมันแทรกเท่ากัน คืออยู่ที่ระดับ 3

2. การเก็บตัวอย่างเนื้อ

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) จากซากซีกซ้ายจำนวน 100 กรัม (24 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย) เพื่อนำไปศึกษาชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ จากนั้นเมื่อครบระยะเวลา 48 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย ทำการเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) บริเวณซี่โครงคู่ที่ 6 จนถึงปลายกระดูกสันหลัง มาทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอุณหภูมิที่ 48 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย (2 วัน) จากนั้นทำการตัดแบ่งกล้ามเนื้อสันนอกออกเป็น 4 ชิ้น ให้ได้รูปแบบชิ้นเนื้อสเต็กหนา 2.5 เซนติเมตร ตามระยะเวลาการบ่มที่ 2, 7, 14 และ 21 วันภายหลังสัตว์ตาย โดยนำชิ้นเนื้อที่ระยะเวลาการบ่มที่ 7, 14 และ 21 วัน ไปบรรจุถุงสุญญากาศเพื่อทำการบ่มให้ครบตามระยะเวลาการบ่มที่กำหนด ในขณะที่ชิ้นเนื้อที่ระยะเวลาการบ่มที่ 2 วัน จะถูกนำมาทดสอบในทันที ทำการแบ่งตัวอย่างเนื้อออกเป็น 2 ส่วน เพื่อนำไปศึกษาคุณภาพเนื้อต่อไป

3. วิธีการ

3.1 ศึกษาคุณภาพของเนื้อโคทางกายภาพ โดยการตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าของสี ($L^* a^* b^*$) (Goñi *et al.* 2007)

3.2 ศึกษาความนุ่มของเนื้อ โดยการตรวจวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (WBSF) (Boccard *et al.* 1981) ปริมาณและชนิดของ collagen (Hill. 1966)

3.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรตีน myofibrillar โดยวิธี SDS-PAGE และเทคนิค two-dimensional electrophoresis (2D-gel)

3.4 ศึกษาปริมาณโปรตีน calpastatin ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา proteolysis ในเนื้อภายหลังสัตว์ตายและสัมพันธ์โดยตรงกับความนุ่มเหนียวของเนื้อ ด้วยวิธี indirect Enzyme linked immunosorbent assay (iELISA) โดยใช้ทั้ง polyclonal anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเอง (pET-28a. 1AD; Tavitchasri. 2007) และ monoclonal anti-calpastatin ทางการค้า (clone 1F7E3DD10; Sigma, U.S.A.) เป็น primary antibody

3.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ μ -calpain ด้วยวิธี western blot โดยใช้ monoclonal antibody ต่อ μ -calpain

3.6 ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ collagen ชนิดของโปรตีนที่แสดงออกในเนื้อ และปริมาณโปรตีน calpastatin ที่มีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อโค

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อ (pH) ค่าสีของเนื้อ ($L^* a^*$ และ b^*) ค่าแรงตัดผ่านชิ้นเนื้อ (WBSF) ปริมาณ collagen การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน troponin-T และปริมาณโปรตีน calpastatin ในเนื้อโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มาและที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน มาวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี General Linear Model (GLM) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least Square Means ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปทางสถิติ

5. ผลการศึกษา

กลุ่มโคพื้นเมือง

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนกลุ่ม myofibrillar protein ที่เกี่ยวข้องกับความนุ่มและคุณภาพเนื้อทางด้านกายภาพในโคพื้นเมือง 4 กลุ่ม ได้แก่ โคภาคกลางเป็นกลุ่มโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี โคภาคเหนือตอนล่างมาจากกลุ่มโคพื้นเมืองจังหวัดตาก โคภาคอีสานเป็นกลุ่มโคพื้นเมืองจังหวัดอุบลราชธานี กลุ่มโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน ที่ระยะเวลาการบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน โดยตัวชี้วัดที่ได้ทำการศึกษาซึ่งเกี่ยวข้องกับความนุ่มของเนื้อ คือ ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณและ

ชนิดของ collagen การเปลี่ยนแปลงของ calpain system การตรวจสอบปริมาณโปรตีน calpastatin และการเปลี่ยนแปลงโปรตีนกลุ่ม myofibrillar สรุปผลได้ดังนี้

1) ผลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ

เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีความนุ่มมากที่สุด โดยมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อน้อยที่สุด ($p < 0.05$) ทั้งนี้ค่าแรงตัดผ่านเนื้อของโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี โคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

ค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลงอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้น แต่จะลดลงอย่างช้าๆ หลังการบ่ม 14 วัน ทั้งนี้ในกลุ่มของเนื้อโคที่ศึกษาทั้ง 4 กลุ่ม พบว่าระยะเวลาการบ่มในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีผลต่อความนุ่มอย่างชัดเจนและลดลงอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาการบ่ม รองลงมาคือ โคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี โคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

2) ผลต่อชนิดของคอลลาเจน

ในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีปริมาณ soluble collagen มากที่สุด ทั้งนี้ในกลุ่มโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี โคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลของค่าแรงตัดผ่านเนื้อ โดยค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงจะมีปริมาณ soluble collagen น้อย

3) ผลของการเปลี่ยนแปลงโปรตีน Troponin-T (Tn-T)

จากการศึกษาด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏแถบของโปรตีนหลายขนาด แต่ที่แถบโปรตีนขนาด 37 และ 39 kDa ที่คาดว่าเป็นโปรตีน Tn-T มีการเปลี่ยนแปลงโดยเริ่มจางหายอย่างชัดเจนตามระยะเวลาการบ่ม ทั้งนี้ปรากฏแถบโปรตีนขนาด 28 และ 30 kDa เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่มและพบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจังหวัดตากมีความเข้มของกลุ่มโปรตีนขนาด 28 และ 30 kDa มากที่สุดรองลงมาคือ โคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี โคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน

แต่จากการนำเอา monoclonal antibody ของ Tn-T มาศึกษาโดยใช้เทคนิค Western blot เป็นการยืนยันแถบโปรตีน Tn-T ให้เห็นชัดเจนและสามารถแสดงความเข้มของปริมาณ Tn-T ได้ ผลการศึกษาพบว่า เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีมีปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสลายตัวของโปรตีนขนาด 37 และ 39 kDa (Tn-T₂₈₋₃₀)มากที่สุด และในทำนองเดียวกัน Tn-T₂₈₋₃₀ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม

4) ผลของการใช้ calpastatin antibody

ในการวิเคราะห์หาปริมาณ calpastatin ด้วยวิธี iELISA โดยใช้ anti-calpastatin ที่ผลิตโดยปิยะดา (2550) ในตัวอย่างเนื้อโคได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ antibody ที่ผลิตได้เองเปรียบเทียบกับ monoclonal anti-calpastatin (clone 1F7E3D10; Sigma USA) พบว่าค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง O.D

ของ anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเองและที่ผลิตเพื่อการค้ามีค่าสหสัมพันธ์ $r = 0.964$ จึงสรุปได้ว่า สามารถพัฒนาการใช้ calpastatin antibody ที่ผลิตขึ้นได้เองในการตรวจสอบความนุ่มของเนื้อได้

จากการตรวจสอบปริมาณโปรตีน calpastatin ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ calpains พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีปริมาณน้อยที่สุด รองลงมาคือ เนื้อโคพื้นเมืองจาก จังหวัดอุบลราชธานี โคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูนและโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี สอดคล้องกับ ปริมาณ soluble collagen ที่พบมากที่สุดมากในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก

จากผลการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ μ -calpain ด้วยเทคนิค western blot ในกลุ่มโค พื้นเมืองพบแถบโปรตีน μ -calpain (80 kDa) อย่างชัดเจนในวันที่ 2 ของการบ่ม และมีการสลายตัว ตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการบ่มเนื้อที่นานขึ้นจะมีผลต่อการ ลดลงของปริมาณโปรตีนอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการบ่ม

5) ความสัมพันธ์ระหว่างตัวชี้วัดความนุ่มของเนื้อโค

ค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีความสัมพันธ์ในทางบวก ($p < 0.05$) กับปริมาณ โปรตีน calpastatin และ มีความสัมพันธ์ในทางลบกับปริมาณ soluble collagen และปริมาณโปรตีนผลผลิต Tn-T ขนาด 30 kDa ในกลุ่มโคทั้งหมดที่ใช้ศึกษา แต่พบว่าในกลุ่มโคพื้นเมืองด้วยกัน พบเฉพาะปริมาณ โปรตีน calpastatin และ soluble collagen ที่มีความสัมพันธ์กับค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ($p < 0.01$) ไม่พบ ความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนผลผลิต Tn-T ขนาด 30 kDa

6) ผลต่อคุณภาพเนื้อทางกายภาพ

โคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูนมีค่าสีแดงของเนื้อ (a^*) สูงที่สุด แสดงว่าเนื้อมีสีแดงเข้มมาก ที่สุด ขณะที่โคพื้นเมืองกาญจนบุรีมีค่าความสว่างของเนื้อ (L^*) สูงที่สุด แสดงว่าเนื้อสีซีดมากที่สุด

กลุ่มโคลูกผสมเลือดยุโรป(โคขุนโพนยางคำ)

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนกลุ่ม myofibrillar protein ที่เกี่ยวข้องกับ ความนุ่มและคุณภาพเนื้อทางด้านกายภาพในโค กลุ่มที่ 1 เป็นโคลูกผสมที่มีระดับเลือดซิมเมนทอล 62.5 เปอร์เซนต์ คณะเพศจำนวน 6 ตัว (5/8 Simmental) กลุ่มที่ 2 มีระดับเลือดซิมเมนทอล 25 เปอร์เซนต์ คณะเพศจำนวน 3 ตัว (2/8 Simmental) โดยเลือด Indicus เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ Sahiwal หรือ Brahman กับโคพื้นเมือง ที่ระยะเวลาการบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน สรุปผลได้ดังนี้

1) ผลต่อความนุ่มของเนื้อ

เนื้อโคขุนโพนยางคำที่มาจากกลุ่มโคระดับเลือดซิมเมนทอลสูงมีความนุ่มมากกว่าเนื่องจาก มีปริมาณคอลลาเจนรวม และชนิดของคอลลาเจนที่ไม่ละลายต่ำกว่าแต่ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่าง ทางสถิติของปริมาณ โปรตีน calpastatin นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อโคขุนโพนยางคำที่มาจากกลุ่มโค ระดับเลือดซิมเมนทอลสูงมีเนื้อที่มีสีแดงและสดใสมากกว่า

ระยะเวลาการบ่มมีผลต่อการลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณคอลลาเจนรวม ชนิดของคอลลาเจนที่ไม่ละลาย และปริมาณโปรตีน calpastatin อย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการบ่มแต่ไม่พบความแตกต่างภายหลังระยะการบ่ม 7 วัน

2) ความสัมพันธ์ระหว่างตัวชี้วัดความนุ่มของเนื้อโคลูกผสมเลือดยุโรป

ค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน $Tn-T_{28-30}$ โดยมีค่าสหสัมพันธ์ในทางลบ และมีค่าสหสัมพันธ์ในทางบวกกับปริมาณโปรตีนปริมาณและปริมาณคอลลาเจนละลายได้ ($p<0.05$) ทั้งนี้ไม่พบว่าปริมาณโปรตีน $Tn-T_{28-30}$ มีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน calpastatin

ผลผลิต (out put) จากงานวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในระดับประเทศ จำนวน 5 เรื่อง
2. ผลงานตีพิมพ์ในระดับต่างประเทศ จำนวน 1 เรื่อง
3. ผลงานตีพิมพ์ใน proceeding ของการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 7 เรื่อง
4. บัณฑิตระดับปริญญาโทและนักวิจัยรุ่นใหม่ จำนวน 4 คน
5. ได้ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ที่มีความพร้อมในการศึกษาคุณภาพของเนื้อ ชนิดและองค์ประกอบของโปรตีนในเนื้อสัตว์ถึงระดับอนุโมเลกุล

ข้อสังเกตและประเด็นที่ได้จากการวิจัย

1. จากข้อมูลที่ได้นำมาใช้ในการศึกษาเพื่อตรวจวัดความนุ่มของเนื้อในกลุ่มโคพื้นเมืองต่างระยะเวลาในการบ่มชี้ให้เห็นว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีจุดเด่น คือ เนื้อมีความนุ่มมากกว่าโคพื้นเมืองกลุ่มอื่นๆ และพบว่าการบ่มเนื้อสามารถที่จะช่วยทำให้เนื้อมีความนุ่มมากขึ้นและจากการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อของโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากภายหลังการบ่ม 21 วัน มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อจาก 7.77 กิโลกรัมของวันที่ 2 ของการบ่ม ลดลงเหลือ 4.44 กิโลกรัม ซึ่งใกล้เคียงกับค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่มีรายงานว่าผู้บริโภคนในสหรัฐอเมริกายอมรับที่ระดับไม่เกิน 4.1 กิโลกรัม (Huffman *et al.* 1996) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาโคพื้นเมืองให้เป็นเนื้อโคธรรมชาติที่มีความนุ่มเช่นเดียวกับโคขุนได้

ข้อมูลจากการศึกษานี้ยังชี้ให้เห็นว่าเนื้อโคพื้นเมืองไทย ยกเว้นเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก อาจไม่มีความจำเป็นต้องบ่มเพื่อให้เนื้อนุ่มมากขึ้น เนื่องจากผลการวิจัยพบว่าการบ่มเนื้อช่วยทำให้เนื้อโคมีความนุ่มเพิ่มขึ้นไม่มากพอที่จะสร้างความพอใจให้กับผู้บริโภคที่นิยมเนื้อนุ่ม อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มต้นทุนโดยไม่คุ้มกับมูลค่าเพิ่มที่จะได้รับจากความนุ่มของเนื้อที่เพิ่มขึ้น

เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานีมีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายของโปรตีนใกล้เคียงกับเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก และมีความนุ่มในเกณฑ์รองลงมาจากกลุ่มโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก

2. ผลจากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าตัวชี้วัดที่ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวัดความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมืองคือปริมาณการย่อยสลายของโปรตีนหรือการวัดปริมาณ Tn-T ขนาด 30 kDa แต่การวัดปริมาณ soluble collagen และการวัดปริมาณโปรตีน calpastatin จะเป็นวิธีการเหมาะสมที่สุดแต่ในเนื้อโคขุน โพนยางคำทุกตัวชี้วัดที่ทำการศึกษานี้สามารถใช้เป็นตัววัดความนุ่มของเนื้อได้

3. anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นโดยนักวิจัยของศูนย์เครือข่ายสามารถใช้เพื่อตรวจสอบความนุ่มของเนื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ ควรได้รับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยเพื่อพัฒนาให้เป็น monoclonal antibody สำหรับชุดตรวจสอบความนุ่มของเนื้อโคต่อไปในอนาคต

4. เทคนิค Two-dimension electrophoresis technique (2-D gel) เป็นวิธีหนึ่งในปัจจุบันมีการนำมาใช้ในการศึกษาโปรตีนในระดับ proteomic level ซึ่งสามารถบ่งบอกรายละเอียดได้ถึงลำดับของ nucleotide ที่เป็นชนิดของโปรตีน โดยการใช้ร่วมกับเครื่อง Mass spectrometer หรือใช้ยืนยันชนิดของโปรตีนในแต่ละจุดที่ปรากฏโดยวิธี western blotting ผู้วิจัยได้นำเอาเทคนิคของ 2-D gel มาใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรตีนในกล้ามเนื้อสันนอกในระยะการบ่มที่ 2 และ 14 วัน ของโคทุกกลุ่ม โดยบ่งชี้ได้ถึงผลความแตกต่างของจุดโปรตีนที่ปรากฏบนแผ่น gel ดังแสดงในผลการทดลอง แต่ยังไม่สามารถระบุถึงชนิดโปรตีนที่แตกต่างแม้จะนำวิธี western blotting มาตรวจสอบความเป็นไปได้ว่าจุดที่เห็นคือ troponin ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความไม่เหมาะสมในอัตราส่วนของ จุดโปรตีนกับ monoclonal antibody ต่อ troponin จึงมีความเห็นที่น่าจะได้มีการศึกษาที่ต่อเนื่อง หรือเสาะหาความร่วมมือและงบประมาณจากหน่วยงานทั้งภายในและภายนอกประเทศที่มีเครื่อง Mass spectrometer หรือเครื่องมืออื่นๆ ที่พัฒนาก้าวหน้าขึ้นเพื่อให้งานวิจัยลงลึกในรายละเอียดเชิงวิทยาศาสตร์มากขึ้น ส่งผลให้เกิดความแข็งแกร่งทางวิชาการทั้งบุคคลากรในศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ และเพิ่มโอกาสให้นักศึกษาในระดับปริญญาโทและเอกที่สนใจงานวิจัยทาง meat sciences

ปัญหาและอุปสรรค

โคพื้นเมืองที่ใช้เป็นตัวแทนของโคที่เลี้ยงต่างภูมิภาคกัน ไม่มีข้อมูลที่ชี้ชัดถึงความแตกต่างด้านสายพันธุ์ อีกทั้งยังมีความแตกต่างด้านระบบการเลี้ยงทั้งนี้เนื่องจากโครงการวิจัยแม่บทเป็นการวิจัยภาคสนามจึงทำให้ไม่สามารถตัดปัจจัยร่วมที่อาจมีผลต่อข้อมูลด้านคุณภาพเนื้อที่ทำการศึกษาได้ อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าพบข้อมูลพื้นฐานในการศึกษากลุ่มโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมือง ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนและจะเป็นจุดเริ่มต้นของการวิจัยเชิงลึกต่อไปในอนาคต

การศึกษากลุ่มโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อที่เกี่ยวข้องกับ ลักษณะความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมือง

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 เปอร์เซนต์ (62.5 % ซิมเมนทอล x 25 % ซาฮิวาลหรือบราห์มัน 12.5 % พื้นเมือง) จำนวน 6 ตัว น้ำหนักเข้าฆ่าเฉลี่ย 590 กิโลกรัม และ (2) กลุ่มโคลูกผสมที่มีระดับเลือดซิมเมนทอล 25 เปอร์เซนต์ (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 เมื่อครบตามแต่ละระยะเวลาดการบ่มนำเนื้อไปศึกษาค่าความเป็นกรดค่า (pH) ค่าสีของเนื้อ (L^* , a^* , b^*) ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ

(Warner Bratzler shear force; WBSF) ปริมาณ collagen ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของไมโอไฟบริลลาโปรตีน (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 ทั้งนี้ระยะเวลาในการบ่มเนื้อมานานขึ้นส่งผลให้ค่า 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 ทั้งนี้ระยะเวลาในการบ่มเนื้อมานานขึ้นส่งผลให้ค่า 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 เมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อมานานขึ้นพบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่มีค่าลดลง ($p < 0.05$) 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 และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน 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 และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน 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 ($p > 0.05$)

การศึกษการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Troponin T (Tn-T) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า อิทธิพลของกลุ่มโคมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T โดยเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูนมีปริมาณโปรตีน 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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ตามลำดับ กลุ่มของโปรตีน Troponin ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่มีขนาด 30 kDa พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีปริมาณมากที่สุด (1.60 ± 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ส่วนเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูนมีปริมาณโปรตีน Tn-T ขนาด 30 kDa น้อยที่สุด (0.26 ± 0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

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

แต่จากการศึกษการเปลี่ยนแปลงของ 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 ($p<0.01$) ($771.64\pm70.59 \times 10^3$ pixel) รองลงมาคือเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 762.38 ± 70.59 , 761.80 ± 70.59 และ $573.53\pm70.59 \times 10^3$ pixel ตามลำดับ ส่วนค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T รวม ขนาด 28-30 kDa พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีมีค่าความเข้มของโปรตีนมากที่สุด ($661.92\pm48.95 \times 10^3$ pixel) รองลงมาคือเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก (454.51 ± 48.95 , 440.43 ± 48.95 และ $421.68\pm48.95 \times 10^3$ 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 ($1.71\pm0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) รองลงมาคือ เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี เนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี โดยมีปริมาณโปรตีน calpastatin เท่ากับ 1.82 ± 0.04 , 1.89 ± 0.04 และ $1.99\pm0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ตามลำดับ ($p<0.05$) และพบว่าอิทธิพลของระยะเวลาการบ่มมีผลต่อปริมาณโปรตีน calpastatin โดยที่ระยะเวลาการบ่ม 2 วัน มีปริมาณโปรตีน calpastatin สูงกว่าเนื้อโคที่ระยะเวลาการบ่ม 7, 14 และ 21 วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) 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 ในกล้ามเนื้อสันนอกของโคขุนชิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูง (5/8 Simmental) และโคขุนชิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำ (2/8 Simmental) มีค่า pH ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และเมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้นจะส่งผลให้ค่า pH ลดลง ($p > 0.05$)

ค่า L^* ของเนื้อโคขุนชิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูงมีค่ามากกว่าเนื้อโคขุนชิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 38.97 และ 35.46 ตามลำดับ เมื่อเวลาในการบ่มเนื้อนานขึ้นค่า L^* ของเนื้อโคทั้ง 2 กลุ่มจะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในส่วนของค่า a^* พบว่าโคขุนชิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูงมีค่ามากกว่าเนื้อโคขุนชิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำ 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 ($p < 0.05$)

กลุ่มโคขุนชิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูงมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อน้อยกว่ากลุ่มโคขุนชิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำ ($p < 0.05$) โดยมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 5.06 และ 6.46 กิโลกรัม ตามลำดับ ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ มีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้น ($p < 0.05$) โดยที่ระยะเวลาการบ่ม 2 วัน มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ $6.94 \pm 0.40 \text{ kg/cm}^2$ ($p < 0.05$) ปริมาณโปรตีน calpastatin เนื้อโคขุนชิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูงและโคขุนชิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำมีปริมาณไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และเมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้นปริมาณโปรตีน calpastatin ในเนื้อโคทั้ง 2 กลุ่ม จะลดลง ($p < 0.05$)

นอกจากนี้ยังพบว่าคอลลาเจนที่ละลายได้และคอลลาเจนที่ไม่ละลายของกลุ่มโคขุนชิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มโคขุนชิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูง ($p > 0.05$) และปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม ($p < 0.05$) ขณะที่ปริมาณคอลลาเจนทั้งหมดและปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลายพบว่าการย่อยสลายสูงขึ้นโดยมีค่าลดลงตามระยะเวลาการบ่มเนื้อที่นานขึ้น ($p > 0.05$)

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

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ (Tn-T) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าอิทธิพลของกลุ่มโคมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T โดยเนื้อโคขุนกลุ่มชิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูง มีปริมาณของโปรตีน Tn-T ขนาด 37-39 kDa และขนาด 30 kDa มากกว่าเนื้อกลุ่มโคขุนชิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำ ($p>0.05$) เมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อมานานขึ้นโปรตีน 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 ในเนื้อกลุ่มโคขุนชิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูงและกลุ่มโคขุนชิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำ

การวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีนด้วยเทคนิค 2D - gel ไม่พบความแตกต่างของโปรตีนรวมในเนื้อจากทั้งโคขุนชิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูงและระดับเลือดต่ำ 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 Ponyangkhram 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 6th 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 $573.53 \pm 70.59 \times 10^3$ 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 $421.68 \pm 48.95 \times 10^3$ 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 and 14 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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. 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 ($r = -0.46$) and Tn-T at 28-30 kDa ($r = -0.31$).

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 ($r= -0.67$). Moreover, values of ISC and Tn-T products had strongly positive correlation to SC ($r=0.52$ and $r= 0.88$; $p<0.01$).

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร	II
บทคัดย่อ	XV
สารบัญ	XX
สารบัญตาราง	XXVI
สารบัญภาพ	XXVIII
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ปัญหาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
1.4 สถานที่ดำเนินงาน	3
1.5 แผนการดำเนินงานราย 6 เดือน และผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.6 ผลผลิต	4
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อ	5
พันธุ์หรือระดับเลือด	5
อายุ	6
เพศ	7
เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน	7
ชนิดของกล้ามเนื้อ	9
ขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อ	10
ระดับความเป็นกรด-ด่างในเนื้อ	10
ระดับไขมันแทรก	13
ระยะเวลาในการบ่ม	14
อาหารและระบบการเลี้ยง	15
สารเร่งการเจริญเติบโต	15
ฮอร์โมน	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2 กระบวนการย่อยสลายโปรตีนภายหลังสัตว์ตาย	18
2.3 ความสำคัญของโปรตีน troponin-T ต่อความนุ่มของเนื้อ	19
ชนิดของโปรตีน troponin-T	21
2.4 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายโปรตีนภายหลังสัตว์ตาย	22
2.5 ความสัมพันธ์ของ calpastatin และเอนไซม์ calpains ที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อสัตว์	24
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย	
3.1 วิธีการดำเนินการวิจัย	27
3.1.1 กลุ่มโคทดลอง	27
3.1.2 การเก็บตัวอย่างเนื้อ	30
3.2 การศึกษาคุณภาพเนื้อและปริมาณ collagen ในเนื้อโคที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน	32
3.2.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และสีของเนื้อโค	32
3.2.2 การศึกษาความนุ่มของเนื้อโดยวิธีวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Warner-Bratzler shear force; WBSF)	33
3.2.3 การศึกษาปริมาณ collagen ในเนื้อโคที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน	33
3.2.3.1 การสกัดตัวอย่างเนื้อโค	33
3.2.3.2 ขั้นตอนการย่อย	33
3.2.3.3 ขั้นตอนการหาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน	34
3.2.3.4 การทำกราฟมาตรฐานของไฮดรอกซีโพรลีน (standard hydroxyproline)	34
3.3 การศึกษาชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อในโคที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน	34
3.3.1 การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ	34
3.3.2 การตัดชิ้นเนื้อ	35
3.3.3 การย้อมสีสไลด์ด้วยวิธี ATPase ร่วมกับ Diaphorase	35
3.4 การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนกลุ่มไมโอไฟบริลล่าโปรตีน ในเนื้อโคที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน	35
3.4.1 การสกัดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein)	35
3.4.2 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ	36
3.4.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Myofibrillar protein ด้วยวิธี SDS-PAGE	36
3.4.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ troponin ด้วยวิธี SDS-PAGE	38

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ troponin ด้วยวิธี Western blot	38
3.4.6 การวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีนด้วยเทคนิค 2D- gel	39
3.4.6.1 การสกัดโปรตีน	39
3.4.6.2 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีน	39
3.4.6.3 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-gel	39
3.4.7 การศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ μ -calpain ที่ระยะเวลาการบ่มต่างๆ	40
3.4.7.1 การสกัดโปรตีน	40
3.4.7.2 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีน	41
3.4.7.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ μ -calpain ด้วยวิธี western blot	41
3.5 การพัฒนาการใช้ calpastatin antibody ในการตรวจสอบความนุ่มของเนื้อโค	42
3.5.1 การทดสอบเปรียบเทียบ polyclonal anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเอง (pET-28a. 1AD; Tavitchasri. 2007) กับ monoclonal anti-calpastatin ทางการค้า (clone 1F7E3DD10; Sigma, U.S.A.)	42
3.5.2 การสกัดโปรตีน	43
3.5.3 การตรวจหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ polyclonal anti-calpastatin (Tavitchasri. 2007) ต่อโปรตีนที่สกัดจากเนื้อโคด้วยวิธี Checker-Board Titration	43
3.5.4 การตรวจหาปริมาณโปรตีน calpastatin ในเนื้อโคที่เก็บรักษาในระยะเวลาที่ต่างกันด้วยวิธี iELISA	44
3.5.4.1 การทำกราฟมาตรฐาน (standard curve)	45
3.5.4.2 การหาปริมาณโปรตีน calpastatin	45
3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ	47
 บทที่ 4 ผลการทดลอง	
ตอนที่ 1 ศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา	49
4.1 อิทธิพลของกลุ่มโคและระยะเวลาการบ่มต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	49

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 อิทธิพลของกลุ่มโคและระยะเวลาการบ่มต่อค่าสีของเนื้อ (colour)	49
4.2.1 ค่าความสว่าง (lightness; L*)	49
4.2.2 ค่าสีแดง (redness; a*)	49
4.2.3 ค่าสีเหลือง (yellowness; b*)	50
4.3 อิทธิพลของกลุ่มโคและระยะเวลาการบ่มต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (WBSF)	50
4.4 อิทธิพลของกลุ่มโคและระยะเวลาการบ่มต่อปริมาณ collagen	50
4.5 การศึกษาชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ	50
4.6 การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนกลุ่มไมโอไฟบริลล่าโปรตีน ในเนื้อโค พื้นเมืองต่างแหล่งที่มา และที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน	55
4.6.1 ผลของการเปลี่ยนแปลงโปรตีน myofibrillar ด้วยเทคนิค SDS-PAGE	55
4.6.2 ผลการเปลี่ยนแปลงของ Troponin-T (Tn-T) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE	56
4.6.3 ผลการเปลี่ยนแปลงของ Tn-T ด้วยวิธี Western blot	58
4.6.4 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีน ด้วยเทคนิค 2D - gel	66
4.6.5 ผลการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอนไซม์ μ -calpain ด้วยวิธี Western blot	69
4.7 การพัฒนาการใช้ calpastatin antibody ในการตรวจสอบความนุ่มของเนื้อโค	71
4.7.1 ผลการทดสอบเปรียบเทียบ polyclonal anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเอง (pET-28a. 1AD; Tavitchasri, 2007) กับ monoclonal anti-calpastatin ทางการค้า (clone 1F7E3DD10; Sigma, U.S.A.)	71
4.7.2 ผลการตรวจหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Antibodies ต่อโปรตีนที่สกัด จากเนื้อโค	72
4.7.3 ผลการตรวจหาปริมาณโปรตีน calpastatin ในเนื้อโคพื้นเมืองไทยและระยะเวลา การบ่มด้วยวิธี iELISA	73
4.8 ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ collagen ชนิดของโปรตีนที่แสดงออกในเนื้อ และ ปริมาณโปรตีน calpastatin ที่มีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อโค	74

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ตอนที่ 2 ศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรป	76
4.9 อิทธิพลของกลุ่มโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรป	76
4.10 อิทธิพลของระยะเวลาการบ่ม	76
4.11 ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ collagen ชนิดของโปรตีนที่แสดงออกในเนื้อและปริมาณโปรตีน calpastatin กับความนุ่มของเนื้อโคลูกผสมเลือดยุโรป	78
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง	
5.1 ความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมืองต่างกลุ่มพื้นที่การเลี้ยง	79
5.2 ความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมืองต่างระยะเวลาการบ่ม	80
5.3 คุณภาพเนื้อด้านกายภาพในเนื้อโคพื้นเมืองต่างพื้นที่การเลี้ยงและที่ระยะเวลาการบ่ม	81
5.3.1 อิทธิพลของกลุ่มโคและระยะเวลาการบ่มต่อค่า pH	81
5.3.2 ค่าสีของเนื้อ (L^* , a^* , b^*)	81
5.3.3 การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนกลุ่ม myofibrillar protein ในเนื้อโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มาและระยะเวลาการบ่มต่างกัน	82
5.3.4 การวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีนด้วยเทคนิค 2D- gel	84
5.3.5 การศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ μ -calpain ที่ระยะเวลาการบ่มต่างๆ	84
5.3.6 การพัฒนาการใช้ calpastatin antibody ในการตรวจสอบความนุ่มของเนื้อโค	84
5.4 ความสัมพันธ์ระหว่างตัวชี้วัดความนุ่มในเนื้อโคพื้นเมือง	85
5.5 ความนุ่มของโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรป	86
5.6 ความนุ่มของเนื้อโคลูกผสมเลือดยุโรปต่างระยะเวลาการบ่มเนื้อ	87
5.7 ความสัมพันธ์ระหว่างตัวชี้วัดความนุ่มในเนื้อโคลูกผสมเลือดยุโรป (โคโพนยางคำ)	88
บทที่ 6 สรุปและข้อเสนอแนะ	89
บทที่ 7 ปัญหาและอุปสรรค	92
บรรณานุกรม	94

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	104
ภาคผนวก ก	105
ภาคผนวก ข	118
ภาคผนวก ค	122

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ชนิดของโปรตีน troponin-T โดยแบ่งตามชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ	21
2.2 กลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อเยื่อภายหลังสัตว์ตาย	22
3.1 คุณลักษณะและระบบการเลี้ยงของสัตว์ทดลอง	28
3.2 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม Gel	37
3.3 แสดงระยะเวลาและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกโปรตีนทิศทางที่ 1 ด้วยเทคนิค Isoelectric focusing	40
4.1 แสดงค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (LSM±SE) ของอิทธิพลของกลุ่มโคที่มีผลต่อลักษณะคุณภาพเนื้อด้านกายภาพ ปริมาณโปรตีน calpastatin (CAST) และปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ (SC) และคอลลาเจนที่ไม่ละลาย (ISC) ที่ระยะเวลาการบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน	52
4.2 แสดงค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (LSM±SE) ของกลุ่มโคที่มีผลต่อความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 37-39 และ 30 kDa ($\mu\text{g BSA-equivalent}$)	57
4.3 แสดงค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (LSM±SE) ของอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคกับระยะเวลาบ่มที่มีต่อความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 37-39 และ 30 kDa ($\mu\text{g BSA-equivalent}$)	58
4.4 แสดงค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (LSM±SE) ของอิทธิพลของกลุ่มโคที่มีผลต่อความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 39, 37, 30 และ 28 kDa	62
4.5 แสดงค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (LSM±SE) ของอิทธิพลของกลุ่มโคที่มีผลต่อความเข้มของโปรตีน Tn-T รวม ขนาด 37-39 และ 28-30 kDa	63
4.6 แสดงค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (LSM±SE) ของอิทธิพลของระยะเวลาบ่มเนื้อโคที่มีผลต่อความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 39, 37, 30 และ 28 kDa	64
4.7 แสดงค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (LSM±SE) ของอิทธิพลของระยะเวลาบ่มเนื้อโคที่มีผลต่อความเข้มของโปรตีน Tn-T รวม ขนาด 37-39 และ 28-30 kDa	65
4.8 แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มเนื้อโคกับระยะเวลาบ่มที่มีผลต่อความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 37-39 และ 28-30 kDa ($\times 10^3 \text{ pixel}$)	65

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.9 แสดงเปอร์เซ็นต์การสลายตัวของโปรตีน Tn-T ในกลุ่ม 37-39 kDa ในแต่ละระยะเวลาการบ่มเทียบกับระยะเวลาการบ่มเริ่มต้น	66
4.10 แสดงการปรากฏและการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนรวมของเนื้อโคในแต่ละระยะเวลาบ่ม	67
4.11 แสดงเปอร์เซ็นต์การสลายตัวของเอนไซม์ μ -calpain ขนาดประมาณ 80 kDa ในแต่ละระยะเวลาการบ่มเทียบกับระยะเวลาการบ่มเริ่มต้น	69
4.12 แสดงค่าเฉลี่ย สูงสุด ต่ำสุด ของข้อมูลที่ทำการศึกษา	75
4.13 ค่าสหสัมพันธ์ของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความนุ่มของเนื้อเฉพาะกลุ่มโคพื้นเมือง 4 กลุ่ม โดยรวมทุกระยะเวลการบ่ม	75
4.14 แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (LSM $\pm$ SE) ของอิทธิพลของกลุ่มโคเนื้อ ลูกผสมเลือดยุโรปและระยะเวลาบ่มที่มีผลต่อลักษณะคุณภาพเนื้อ ปริมาณโปรตีน calpastatin (CAST) ปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด (TC) และที่ไม่ละลาย (ISC)	77
4.15 แสดงค่าเฉลี่ย สูงสุด ต่ำสุด ของข้อมูลที่ทำการศึกษา	78
4.16 แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (WBSF) ปริมาณโปรตีน calpastatin (CAST) ปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ (SC) คอลลาเจนที่ไม่ละลาย (ISC) และความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 28-30 kDa	78

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
3.1 แสดงลักษณะของโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา	29
3.2 แสดงตำแหน่งของการสุมตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกจากซากซีกซ้าย ตามระยะเวลาการบ่มเนื้อ 2, 7, 14 และ 21 วันภายหลังกระบวนการฆ่า	31
3.3 แสดงการเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกเพื่อศึกษาคุณภาพของเนื้อ	32
3.4 แสดงลักษณะและขนาด band (kDa) ตัวมาตรฐาน Seeblue plus2 Pre-Stained standard	38
3.5 การทดสอบเปรียบเทียบ monoclonal anti-calpastatin ทางการค้ากับ polyclonal anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเอง	43
3.6 รูปแบบการเจือจางโปรตีนสกัดจากเนื้อโค (antigen) เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อ antibodies ด้วยวิธี checker-board titration และตรวจปริมาณ calpastatin protein ในเนื้อโคที่เก็บรักษาในระยะเวลาที่ต่างกันด้วยวิธี iELISA	46
4.1 กราฟแสดงอิทธิพลของกลุ่มโคที่มีผลต่อลักษณะคุณภาพเนื้อ ปริมาณโปรตีน calpastatin (CAST) และปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ (SC) และคอลลาเจนที่ไม่ละลาย (ISC) ที่ระยะเวลาการบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน	53
4.2 การย้อมเส้นใยกล้ามเนื้อของโคพื้นเมืองจากจังหวัดพัทลุงโดยใช้เทคนิคการย้อมด้วย ATPase ร่วมกับ NADH	54
4.3 การย้อมเส้นใยกล้ามเนื้อของโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากโดยใช้เทคนิคการย้อมด้วย ATPase ร่วมกับ NADH	54
4.4 การย้อมเส้นใยกล้ามเนื้อของโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากโดยใช้เทคนิคการย้อมด้วย ATPase	55
4.5 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงของ myofibrillar protein	56
4.6 แสดงลักษณะของการเปลี่ยนแปลงของแถบโปรตีนที่ 37-39 kDa (Tn-T) และ 30 kDa (Tn-T product) ที่ระยะเวลายบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน	57
4.7 แสดงลักษณะของการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ที่ระยะเวลายบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน ของเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก	59
4.8 แสดงลักษณะของการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ที่ระยะเวลายบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน ของเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.9 แสดงลักษณะของการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ที่ระยะเวลาบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วันของเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี	60
4.10 แสดงลักษณะของการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ที่ระยะเวลาบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน ของเนื้อโคพื้นเมืองชาวลำพูน	60
4.11 แสดงความแตกต่างของโปรตีนรวมที่ระยะเวลาบ่ม 2 และ 14 วัน ในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก	68
4.12 แสดงความแตกต่างของโปรตีนรวมที่ระยะเวลาบ่ม 2 และ 14 วัน ในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี	68
4.13 แสดงความแตกต่างของโปรตีนรวมที่ระยะเวลาบ่ม 2 และ 14 วัน ในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี	68
4.14 แสดงความแตกต่างของโปรตีนรวมที่ระยะเวลาบ่ม 2 และ 14 วัน ในเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน	69
4.15 การแสดงออกของโปรตีน μ -calpain ในกลุ่มโคต่างชนิดตามระยะเวลาการบ่มที่ 2, 7, 14, และ 21 วัน	70
4.16 การแสดงออกของโปรตีน μ -calpain ในกลุ่มโคต่างชนิดตามระยะเวลาการบ่มที่ 1, 2, 7, 14, 21 และ 30 วัน	71
4.17 ค่า O.D. ที่ 650 nm ของ polyclonal anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเอง และ monoclonal anti-calpastatin ที่ผลิตเพื่อการค้า	72
4.18 สหสัมพันธ์ระหว่าง ค่า O.D. ที่ 650 nm ของ polyclonal anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเอง และ monoclonal anti-calpastatin ที่ผลิตเพื่อการค้า	72
4.19 การตรวจสอบ Checker-Board titration ระหว่างโปรตีนสกัดจากกล้ามเนื้อสันนอกของโคที่เจือจาง 1:100 ถึง 1:6,400 กับซีรัมของกระด่ายที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันด้วย pET-28a.1AD recombinant protein ที่เจือจาง 1:200 ถึง 1:3,200	73

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ปัญหาและความสำคัญของปัญหา

โคพื้นเมืองไทย หมายถึง โคที่มีถิ่นกำเนิดในเมืองไทยและเป็นโคที่อยู่ในเมืองไทยมานาน อาจเป็นโคที่อยู่ในท้องถิ่นแต่เดิมหรือโคที่นำมาจากที่อื่นมานานมาแล้ว หรือโคที่เกิดจากการผสมข้ามอย่างใดอย่างหนึ่งซึ่งไม่อาจแยกแยะหรือแจกแจงเข้ากับพันธุ์โคพันธุ์หนึ่งซึ่งมีอยู่ในท้องถิ่น (จรัญ จันทลักษณ์, 2515) โคพื้นเมืองเป็นโคที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงดูในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย มาเป็นเวลานานมีขนาดเล็กทนทานต่อสภาพอากาศร้อนชื้น ทนต่อโรคพยาธิและแมลงรบกวนได้ดี หากินเก่ง ให้ลูกดกสามารถใช้ประโยชน์จากอาหารหยาบได้ดี โคชนิดนี้มีความเหมาะสมกับสภาพปัจจุบันที่กำลังประสบปัญหาการขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ตามธรรมชาติ และพื้นที่เลี้ยงสัตว์ตามธรรมชาติ ซึ่งมีแนวโน้มลดลง การเลี้ยงโคพื้นเมืองจึงถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่เกษตรกรรายย่อยสามารถนำมาเป็นอาชีพเสริมให้กับครอบครัว โคพื้นเมืองเป็นโคที่เลี้ยงง่ายโดยปล่อยให้หากินตามทุ่งหญ้าสาธารณะ ตามป่าละเมาะ ไล่ต้อนตามป่าเขา สามารถใช้เศษเหลือจากผลผลิตทางการเกษตรเป็นหลัก นอกจากนี้ยังใช้ต้นทุนในการเลี้ยงดูต่ำกว่าโคพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ปัจจุบันโคพื้นเมืองมีบทบาทที่สำคัญมากขึ้น เพราะการแข่งขันในการใช้พื้นที่การเกษตรเพื่อผลิตอาหาร และเครื่องอุปโภคโดยเฉพาะการผลิตอาหารโปรตีนเพื่อให้พอเพียงกับการบริโภคในท้องถิ่น จากข้อมูลเศรษฐกิจการปศุสัตว์ประจำปี พ.ศ. 2553 รายงานว่า ประเทศไทยมีจำนวนโคเนื้อรวมทั้งสิ้น 6,426,853 ตัว ในจำนวนนี้เกือบครึ่งหนึ่งของจำนวนประชากรโคทั้งหมดพบว่าประกอบด้วยประชากรโคพื้นเมือง ที่เลี้ยงกระจายอยู่ตามภาคต่างๆ ของประเทศโดยมีจำนวนถึง 4,610,395 ตัว

นอกจากนี้ผลจากการศึกษาวิจัยภายใต้ชุดโครงการการขยายโอกาสธุรกิจเนื้อโคไทย พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองไทยแต่ละประเภทที่ผลิตได้มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์แตกต่างกัน โดยเนื้อโคพื้นเมืองไม่เหมาะที่จะนำไปทำอาหารประเภทสเต็กเพราะเนื้อมีความเหนียวมาก การบ่มเนื้อถึง 14 วัน ช่วยทำให้เนื้อนุ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการบ่มให้นานขึ้นเป็น 21 หรือ 30 วัน ก็ไม่ช่วยให้เนื้อนุ่มมากขึ้น ในส่วนขององค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพของเนื้อโคพื้นเมืองไทยในเชิงลึกนั้นยังไม่มีการศึกษา นอกจากการศึกษาวิจัยเบื้องต้น ที่พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองทั่วไปจะมีสีเข้ม เนื้อแน่นเป็นมันวาว เส้นใยกล้ามเนื้อละเอียด

ดังนั้นการให้ความสำคัญของการศึกษาวิจัยถึงคุณภาพของเนื้อโคพื้นเมืองไทยให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถอธิบายถึงคุณลักษณะเฉพาะตัวของเนื้อโคพื้นเมืองไทยที่ โดยเฉพาะความเหนียวของเนื้อ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลุ่มโปรตีนในเส้นใยกล้ามเนื้อและชนิดของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในเนื้อที่มีต่อคุณภาพของเนื้อโคพื้นเมืองไทยภายหลังการฆ่าและในแต่ละช่วงระยะเวลาการบ่มเพื่อเป็น

ข้อมูลพื้นฐาน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างถูกต้องเหมาะสม โดยเฉพาะในแง่การเพิ่มมูลค่าของเนื้อโค

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อในโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา
2. เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีน myofibrillar ในเนื้อโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา และที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน
3. พัฒนาการใช้ calpastatin antibody ในการตรวจสอบความนุ่มของเนื้อโค
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ ชนิดของโปรตีนที่แสดงออกในเนื้อ และปริมาณโปรตีน calpastatin ที่มีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อโค

หมายเหตุ ได้มีการเปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์ในการศึกษา

โดยได้มีการเปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์การวิจัย ในข้อที่ 1 และ 4 ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ดังนี้

1. เพื่อศึกษาคุณภาพเนื้อและปริมาณ collagen ในเนื้อโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา
2. เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีน myofibrillar ในเนื้อโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา และที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน
3. พัฒนาการใช้ calpastatin antibody ในการตรวจสอบความนุ่มของเนื้อโค
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ collagen ชนิดของโปรตีนที่แสดงออกในเนื้อ และปริมาณโปรตีน calpastatin ที่มีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อโค

1.3 ขอบเขตการวิจัย

เนื้อโคพื้นเมืองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มาจากโคพื้นเมืองไทยที่เลี้ยงต่างพื้นที่ ได้แก่ โคภาคกลางเป็นกลุ่มโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี โคภาคเหนือตอนล่างมาจากกลุ่มโคพื้นเมืองจังหวัดตาก โคภาคอีสานเป็นกลุ่มโคพื้นเมืองจังหวัดอุบลราชธานี และโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูนจากภาคเหนือ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางด้านสายพันธุ์ ระดับเลือดโคพื้นเมือง ระบบการเลี้ยง อย่างไรก็ตามกลุ่มโคพื้นเมืองทั้งหมดที่เป็นตัวแทนในการศึกษาครั้งนี้ถูกเลี้ยงด้วยอาหารหยาดสดแต่เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังได้ศึกษาในกลุ่มเนื้อโคขุนลูกผสมเลือดยุโรปจากสหกรณ์การเลี้ยงปศุสัตว์กรป. กลาง โพนยางคำ

ข้อมูลที่ทำการศึกษาคือ กลุ่มโปรตีน myofibrillar ในเนื้อ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับความนุ่มเหนียวของเนื้อ (ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ) คือ Troponin-T โปรตีน calpastatin และเอนไซม์ในเนื้อ คือ

calpain โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนดังกล่าวภายหลังการบ่มเนื้อ (ageing) ที่ระยะเวลาการบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน

1.4 สถานที่ดำเนินงาน

1.4.1 ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ และห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

1.4.2 ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

1.4.3 ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

1.4.4 ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

1.4.5 โรงฆ่าสัตว์ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

1.4.6 โรงฆ่าสัตว์เทศบาล อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

1.4.7 โรงฆ่าปศุสัตว์ตาก จังหวัดตาก

1.4.8 โรงฆ่าจากสหกรณ์การเลี้ยงปศุสัตว์ กรป.กลาง โพนยางคำ จังหวัดสกลนคร

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับราย 6 เดือน

ระยะเวลา	ผลที่คาดว่าจะได้รับ
6 เดือนที่ 1	ศึกษาเนื้อโคจากภาคใต้ และเนื้อโคขุนโพนยางคำ 1. ทราบคุณสมบัติของเนื้อโค ได้แก่ ชนิดและปริมาณ collagen ค่า pH และสีของเนื้อ 2. ทราบระดับความนุ่มของเนื้อในระยะเวลาการบ่มที่ต่างกัน 3. ทราบแผนและชนิดของโปรตีนจากตัวอย่างเนื้อหลังการคั่วและหลังการบ่มที่ 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน ด้วย SDS-PAGE
6 เดือนที่ 2	ศึกษาเนื้อโคจากภาคใต้ และเนื้อโคขุนโพนยางคำ 1. ทราบคุณสมบัติของเนื้อโค ได้แก่ ชนิดและปริมาณ collagen ค่า pH และสีของเนื้อ 2. ทราบระดับความนุ่มของเนื้อในระยะเวลาการบ่มที่ต่างกัน 3. ทราบแผนและชนิดของโปรตีนจากตัวอย่างเนื้อหลังการคั่วและหลังการบ่มที่ 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน ด้วย SDS-PAGE

ระยะเวลา	ผลที่คาดว่าจะได้รับ
6 เดือนที่ 3	ศึกษาจากเนื้อโคภาคกลาง ภาคเหนือตอนล่าง และภาคอีสาน 1. ทราบคุณสมบัติของเนื้อโค ได้แก่ ชนิดและปริมาณ collagen ค่า pH และสีของเนื้อ 2. ทราบระดับความนุ่มของเนื้อในระยะเวลาการบ่มที่ต่างกัน 3. ทราบแผนและชนิดของโปรตีนจากตัวอย่างเนื้อหลังการคั่วและหลังการบ่มที่ 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน ด้วย SDS-PAGE
6 เดือนที่ 4	ศึกษาจากโคภาคกลาง โคภาคเหนือตอนล่าง และภาคอีสาน 1. ทราบคุณสมบัติของเนื้อโค ได้แก่ ชนิดและปริมาณ collagen ขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อ ค่า pH และสีของเนื้อ 2. ทราบระดับความนุ่มของเนื้อในระยะเวลาการบ่มที่ต่างกัน 3. ทราบแผนและชนิดของโปรตีนจากตัวอย่างเนื้อหลังการคั่วและหลังการบ่มที่ 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน ด้วย SDS-PAGE
6 เดือนที่ 5	- ได้องค์ความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทางกายภาพ ชีวเคมี ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายของกลุ่มโปรตีนในเส้นใยกล้ามเนื้อซึ่งสามารถใช้เป็นข้ออ้างทางวิทยาศาสตร์ในเรื่องความเหมาะสมของเนื้อโคในการนำไปใช้ประโยชน์อย่างเหมาะสม
6 เดือนที่ 6	- ได้องค์ความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทางกายภาพ ชีวเคมี ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายของกลุ่มโปรตีนในเส้นใยกล้ามเนื้อซึ่งสามารถใช้เป็นข้ออ้างทางวิทยาศาสตร์ในเรื่องความเหมาะสมของเนื้อโคในการนำไปใช้ประโยชน์อย่างเหมาะสม

1.6 ผลผลิต

1. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับประเทศและ/หรือระดับต่างประเทศ 11 เรื่อง
2. นักศึกษาปริญญาโท 3 คน
3. ข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มโปรตีนในเส้นใยกล้ามเนื้อและชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อที่มีต่อความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมือง หลังการฆ่าและในช่วงเวลาหลังเก็บบ่ม และเอกลักษณ์ของเนื้อโคพื้นเมืองเพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้ในวงการอุตสาหกรรมเนื้อในประเทศและวงการอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อ

พันธุ์หรือระดับเลือด

จากการศึกษาของ Wheeler *et al.* (1990) ได้รายงานว่าโคสายเลือดอินเดีย (*Bos indicus*) เนื้อจะมีความเหนียวมากกว่าโคที่มีสายเลือดยุโรป (*Bos taurus*) ถึงแม้จะมีระดับไขมันแทรกที่เท่ากัน นอกจากนี้โคที่มีระดับเลือด *Bos indicus* ที่มีสัดส่วนเพิ่มขึ้นจะมีความสัมพันธ์กับความนุ่มที่ลดลงในโคลูกผสมระดับสายเลือดอินเดียสูง เนื้อที่ได้จะมีความเหนียวมากเมื่อเทียบกับเนื้อโคลูกผสมที่มีสายเลือดอินเดียที่ต่ำกว่า ซึ่ง Marshall (1994) ได้มีการรายงานไว้ว่า เมื่อระดับเลือดโคพันธุ์ Brahman เพิ่มขึ้นเป็น 25% 50% และ 75% ระดับไขมันแทรก และความนุ่มของเนื้อจะมีค่าลดลง โดยมีระดับไขมันแทรกที่ 3.93, 3.51 และ 3.06 ตามลำดับ และค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 5.16, 5.80 และ 6.68 กิโลกรัม ตามลำดับ

Koohmaraie (1996) ได้ทำการศึกษาความนุ่มของเนื้อโคด้วยวิธีการวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ จากโค 6 สายพันธุ์ ได้แก่โคสายพันธุ์ Angus Tuli Hereford Belgian blue Boran และ Brahman พบว่าโคในกลุ่ม *Bos taurus* ซึ่งได้แก่ โคพันธุ์ Angus Tuli Hereford และ Belgian blue จะมีความนุ่มมากกว่าโคในกลุ่ม *Bos indicus* ซึ่งได้แก่ โคพันธุ์ Boran และ Brahman ทั้งนี้สอดคล้องกับการวิจัยของ Wulf *et al.* (1997) ที่ได้ทำการศึกษาในเรื่องความแตกต่างของพันธุกรรมโคที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อ โดยทำการทดลองในโค *Bos taurus* และ โค *Bos indicus* จากการศึกษาพบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อในโค *Bos taurus* จะมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ต่ำกว่าโค *Bos indicus*

O'Conner *et al.* (1997) ศึกษาอิทธิพลจากพันธุกรรมที่มีผลต่อความนุ่มในโคเนื้อลูกผสมเลือดอินเดีย และโคเนื้อเลือดยุโรป โดยการศึกษานี้ได้จำแนกโคออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกคือ โคเนื้อลูกผสมเลือดอินเดีย จำนวน 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย โคพันธุ์ Brahford (62.5% Hereford x 37.5% Brahman) โคพันธุ์ Red-Brangus (62.5% Red-Angus x 37.5% Brahman) และโคพันธุ์ Simbrah (62.5% Simmental x 37.5% Brahman) กลุ่มที่สองคือ โคเนื้อเลือดยุโรปแท้ จำนวน 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย โคพันธุ์ Hereford, Red-Angus และ Simmental ทำการบ่มเนื้อสันนอก ที่ 1, 4, 7, 14, 21 และ 35 วันหลังสัตว์ตาย เมื่อนำมาทำการตรวจวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปรากฏว่าไม่พบความแตกต่างทางสถิติจากโคทั้งสองกลุ่มในวันที่ 1 ของการบ่ม แต่เริ่มพบความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ตั้งแต่วันที่ 4 ของการบ่มไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยพบว่ากลุ่มโคเนื้อเลือดยุโรปแท้จะมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำกว่าโคลูกผสมเลือดอินเดีย นอกจากนี้พันธุ์มีอิทธิพลต่อความเครียดในสัตว์ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดลักษณะเนื้อ DFD ได้เช่นกัน Lorenzen *et al.* (1992) รายงานว่าโคที่มี

เลือด *Bos taurus* มีโอกาสเกิดลักษณะ DFD ได้มากกว่าโคที่มีเลือด *Bos indicus* นอกจากนี้ยังพบโคนมมีโอกาสเกิดเนื้อ DFD ได้ถึง 9.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ King *et al.* (2005) พบว่าโคที่มีระดับเลือด *Bos indicus* เพิ่มขึ้น จะทำให้ระดับไขมันแทรก ขนาดพื้นที่หน้าตัดเนื้อสันนอก และเกรดคุณภาพซากลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นันทนา ช่วยชูวงศ์ (2540) ทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพโคเนื้อ 5 พันธุ์ ที่มีอยู่ในประเทศไทย พบว่าพันธุ์มีผลต่อความนุ่มของเนื้อโค โดยโคพันธุ์กำแพงแสนและโคพันธุ์คร่ำท่ามาสเตอร์ นุ่มกว่าโคพันธุ์บราห์มัน และโคพันธุ์ลูกผสมอินดูบราซิล x บราห์มัน ($p < 0.01$) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากโคพันธุ์เบงกัล ลลิตรา ศรีสุวรรณ (2551) ศึกษาพันธุ์และระดับเลือดของโคในแต่ละระบบการผลิตมีผลต่อความนุ่มของเนื้อ โดยเนื้อโคขุนโพนยางคำที่มีระดับเลือดของพันธุ์ชาร์โรเลส์ 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปมีความนุ่มมากที่สุด รองมาคือเนื้อโคขุนกำแพงแสนที่มีระดับเลือดของพันธุ์ชาร์โรเลส์ 50 เปอร์เซ็นต์ และเนื้อโคขุนลูกผสมบราห์มันเลือดสูงเลี้ยงด้วยเปลือกสับปะรด ส่วนเนื้อโคลูกผสมบราห์มันเลือดสูงเลี้ยงด้วยหญ้า และเนื้อโคพื้นเมืองมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Uriyapongson *et al.* (2005) ศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อ คุณค่าด้านการบริโภค และลักษณะปรากฏของเนื้อสันนอกจากโคพื้นเมืองไทย 4 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นโคเลือดอินเดีย โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างจาก 4 ภาคของประเทศไทยได้แก่ ภาคเหนือ ภาคอีสาน ภาคใต้ และภาคกลางพบว่าคุณค่าทางด้านการบริโภค (ความนุ่ม ความฉ่ำน้ำ กลิ่น และการยอมรับรสชาติโดยรวม) แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ค่าแรงตัดผ่านเนื้อของโคจากภาคใต้จะมีค่าน้อยที่สุด รองลงมาคือโคภาคอีสาน โคภาคเหนือ และโคภาคกลาง

อายุ

สัตว์ที่อายุมากจะมี connective tissue ที่เป็นพวก inter และ intra-molecular cross linking ระหว่าง polypeptide ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสูง ซึ่งมีผลทำให้ความร้อนและเอนไซม์เข้าทำลายได้ยากขึ้น (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2539) ทั้งนี้ขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อจะใหญ่หรือเล็กขึ้นอยู่กับอายุของสัตว์ด้วย สัตว์ที่อายุมากเนื้อก็จะยิ่งเหนียวมากขึ้น โดยโคที่อายุมากมีความหนาของกล้ามเนื้อลดลง และมีการสะสมไขมันใต้ผิวหนังเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาอายุกับไขมันแทรกแล้วพบว่าเมื่อโคอายุมากขึ้นระดับไขมันแทรกจะสูงตามไปด้วย (ชัยณรงค์ คันธพนิต, 2529) ระดับของเมดสีไมโอโกลบินในกล้ามเนื้อสัตว์อายุมากจะมีเมดสีไมโอโกลบินมากกว่าสัตว์อายุน้อย ทำให้เห็นสีของเนื้อเป็นสีแดงเข้มกว่าสัตว์อายุน้อย (Warriss, 2000) ขนาดและรูปร่างของกระดูกซี่โครงและการแปรสภาพจากกระดูกอ่อนเป็นกระดูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งขอดข้าว (bottoms) ของกระดูกสันหลังซากโคที่อายุน้อยจะมีกระดูกสันหลังที่อ่อนและมีรูพรุนมาก โดยส่วนขอดจะเป็นกระดูกอ่อนสีขาวมีขนาดใหญ่กระดูกซี่โครงจะแคบและออกสีแดง กระดูกสันหลังช่วงสะโพกแต่ละข้อจะมีรอยแยกออกจากกันเห็นได้ชัดและมีกระดูกอ่อนที่กระดูกเชิงกรานผ่ำซีก ส่วนลักษณะเนื้อแดงจะเป็นเส้นเนื้อที่ละเอียด

ผิวหนังตัดค่อนข้างเรียบและมีสีแดงอ่อน ถ้าหากโคที่มีอายุมาก จะมีกระดูกซึ่งโครงมีขนาดกว้าง และแบนกล้ามเนื้อสันนอกออกสีแดงเข้มจัดและมีลักษณะหยาบ รูปร่างหากไม่ได้สัดส่วนและยังโคที่มีอายุมากจะมีความหนาของกล้ามเนื้อลดลง และมีการสะสมไขมันใต้ผิวหนังที่ไม่ได้สัดส่วนมาก (ชัยณรงค์ คันธพนิต, 2529)

มาลัย จงเจริญ (2546) ได้ทำการศึกษาคุณภาพซากและผลตอบแทนในการผลิตเนื้อโคคุณภาพสูงจากโคลูกผสมเลือดชาร์โรเลส์ พบว่า น้ำหนักมีชีวิตสุดท้ายและระดับไขมันแทรกเพิ่มสูงขึ้นตามอายุเมื่อส่งฆ่า และพบว่าอายุเมื่อส่งฆ่าที่ 2 และ 3 ปี มีระดับคะแนนไขมันแทรกเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการขุนที่เพิ่มขึ้น

เพศ

Morgan *et al.* (1993) พบว่าปริมาณ calpastatin ซึ่งมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยโปรตีนในกล้ามเนื้อ ในโคเพศผู้ไม่ตอนมีปริมาณสูงกว่าโคเพศผู้ตอน ซึ่งการที่ปริมาณของ calpastatin สูงจะมีผลทำให้ค่า myofibrillar fragmentation ในเนื้อของเพศผู้ไม่ตอนมีค่าน้อยกว่าเพศผู้ตอน ทำให้เนื้อมีความเหนียวกว่า เมื่อนำเนื้อไปหาค่าแรงตัดผ่านเนื้อ พบว่าโคเพศผู้ไม่ตอนมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงกว่าโคเพศผู้ตอนในทุกระยะการบ่ม (1, 7 และ 14 วัน) ชัยณรงค์ คันธพนิต (2529) รายงานว่าขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อของเพศผู้จะใหญ่กว่าในสัตว์เพศเมียหรือเพศผู้ตอน และเพศผู้ตอนจะใหญ่กว่าเพศเมีย นอกจากนี้เพศยังมีผลต่อระดับความอ้วนของโค ผู้เลี้ยงนิยมเลี้ยงโคเพศผู้ไม่ตอนมากกว่าโคเพศผู้ตอนเพราะเจริญเติบโตได้เร็ว ใช้อาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพและจำหน่ายได้ราคาดีเนื่องจากมีกล้ามเนื้อสูง แต่มีข้อเสียด้านคุณภาพเนื้อคือ เนื้อโคเพศผู้มีเนื้อม้วนเป็นเนื้อที่เหนียว สีเข้ม เน่าเสียง่าย และเก็บรักษาได้ไม่นาน สาเหตุของความเหนียวในเนื้อโคเพศผู้เกิดจากปริมาณคอลลาเจนที่ละลายน้ำได้ (insoluble collagen) มีต่ำและมีปริมาณไขมันแทรกน้อยกว่าโคเพศผู้ตอน

เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

เนื้อเยื่อเกี่ยวพันประกอบส่วนที่เป็นเซลล์ซึ่งมีน้อย (2-3 เซลล์) และส่วนที่เป็นสารต่างๆ ที่มีอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ซึ่งเป็นส่วนที่มีมากที่สุด เรียกว่า intercellular substance หรือ matrix ทั้งนี้ในส่วนนี้ยังประกอบด้วยอีก 2 หน่วยย่อย นั่นคือ ส่วนที่ไม่เป็นเส้นใย (ground substance) และส่วนที่เป็นเส้นใย (fiber) ซึ่งฝังอยู่ในส่วนที่เป็นเส้นใย (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2539)

ส่วนที่เป็นเส้นใยเป็นสารพวกโปรตีนมี 3 ชนิดด้วยกัน คือ collagen fiber, elastic fiber และ reticular fiber เส้นใยเหล่านี้จะฝังอยู่ใน ground substance ซึ่งเป็นสารพวก proteoglycan การที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีคุณสมบัติเฉพาะบางอย่างไม่เหมือนกัน เป็นเพราะสัดส่วนระหว่างสารที่เป็น fiber และ ground substance

กล้ามเนื้อหรือก้อนเนื้อ (muscle) ถูกหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เรียกว่าอีพิมิเซียม (epimysium) (ส่วนใหญ่เป็นคอลลาเจนและอีลาสติน) ในก้อนกล้ามเนื้อจะพบเส้นใยประสาทและหลอดเลือดอยู่ข้างใน โดยจะโผล่ออกนอกกล้ามเนื้อและต่อจากชั้น epimysium แทรกเข้าไปภายในกล้ามเนื้อแล้ว ห่อหุ้มรอบหน่วยเล็กลงไปอีกเรียกว่า fascicule หรือมัดกล้ามเนื้อ (muscle bundle) จะถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เรียกว่าเพอริมิเซียม (perimysium) ภายในมัดกล้ามเนื้อก็ประกอบด้วยหน่วยที่เล็กลงไปอีกเรียกว่าเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibril หรือ muscle fiber) ถูกหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เรียกว่าเอนโดมิเซียม (endomysium)

คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีอยู่มากที่สุดในร่างกาย คือ ประมาณ 30% ของโปรตีนจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั้งหมด (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2539) คอลลาเจนจัดเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีปริมาณมากที่สุด และมีอิทธิพลอย่างมากต่อคุณภาพเนื้อในแง่ความนุ่มของเนื้อ เนื่องจากปริมาณ intermolecular crosslink ที่ทำหน้าที่เชื่อมโมเลกุลของคอลลาเจนเข้าด้วยกัน ดังนั้นเนื้อสัตว์ที่มีปริมาณคอลลาเจนสูงจึงมีความเหนียวของเนื้อสูง นอกจากนี้กล้ามเนื้อส่วนที่มียางหรือไขมันมากหรือรองรับน้ำหนักมาก ๆ เช่น ขาและไหล่ก็จะมีปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสูง แต่หากเป็นกล้ามเนื้อที่ทำหน้าที่เป็นโครงร่างเช่น กล้ามเนื้อสันนอกและกล้ามเนื้อสันในจะมีปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่ำเนื้อจึงมีความนุ่มกว่า นอกจากนั้นความแข็งแรงของโมเลกุลคอลลาเจนยังเกิดจากการสร้างสะพานเชื่อมต่อกันทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล (intra และ inter molecular cross linkage) โดยสัตว์ที่มีอายุมากจะมีความหนาของสะพานเชื่อม (cross linkage) เพิ่มขึ้นจึงทำให้คอลลาเจนมีความแข็งแรงมาก ในสัตว์อายุน้อยจะมีจำนวนเส้นใยและ cross-linkage น้อยจึงทำให้เส้นใยคอลลาเจนไม่แข็งแรงและถูกทำลายได้ง่าย จึงกล่าวได้ว่าปริมาณ และชนิดของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สามารถใช้อธิบายความแตกต่างของสายพันธุ์ในเรื่องความนุ่มได้ และสำหรับโคที่มี double muscle พบว่าเนื้อมีความนุ่มมากเกี่ยวข้องกับปริมาณคอลลาเจนที่ต่ำ (O' Connor *et al.* 1997) ทั้งนี้จากรายงานของ De Smet *et al.* (1998) ที่รายงานว่าโคที่มีลักษณะของ double muscle จะพบปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (collagen) น้อยกว่าซึ่งมีผลต่อความนุ่มของเนื้อ โดยพบว่ามีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำกว่าเนื้อโค Belgian Blue Normal ซึ่งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นเนื้อเยื่อสีขาวประกอบด้วยโปรตีนคอลลาเจนเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้ความร้อนชื้น (moist heat) จะทำให้เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเปลี่ยนเป็นเจลาตินซึ่งทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้น แต่ถ้าให้ความร้อนแห้ง (dry heat) จะทำให้เนื้อเหนียวขึ้นเนื่องจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันไม่สามารถเปลี่ยนเป็นเจลาตินได้ จึงกล่าวได้ว่าวิธีการทำให้เนื้อสุกเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อ และปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีความสัมพันธ์กับการทำงานของกล้ามเนื้อและอายุของสัตว์ นอกจากนี้ Purslow (2005) รายงานว่า ปริมาณการกระจายตัวและส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในกล้ามเนื้อจะมีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อที่ผ่านการปรุงสุก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานอื่นๆ ทั้งนี้สัดส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในกล้ามเนื้อและปริมาณไขมันแทรกที่อยู่ในกล้ามเนื้อมีความสำคัญโดยตรงต่อความเหนียวหรือความนุ่มของเนื้อ

เนื้อส่วนสะโพกหรือเนื้อสันจะมีความนุ่มมากกว่าเนื้อแข็ง ทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่รอบมัดเส้นใยกล้ามเนื้อมากกว่า

ชนิดของกล้ามเนื้อ

Dransfield (1994) กล่าวว่า ชนิดของกล้ามเนื้อมีอิทธิพลอย่างยิ่งต่อคุณภาพของเนื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านของความนุ่ม จากการทดลองของ Shackelford *et al.* (1995) พบว่าค่าเฉลี่ยของค่าแรงตัดผ่านเนื้อในโคลูกผสมระหว่างพันธุ์เฮียร์ฟอร์ด แองกัส และบราห์มัน ที่ผ่านการบ่มนาน 14 วัน มีค่าแตกต่างกันในกล้ามเนื้อแต่ละส่วน โดยพบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อของกล้ามเนื้อ *psoas major* และ *infraspinitus* ไม่แตกต่างกัน และกล้ามเนื้อทั้ง 2 ชนิดมีความนุ่มมากกว่ากล้ามเนื้อชนิดอื่นๆ ได้แก่ กล้ามเนื้อ *triceps brachii* กล้ามเนื้อ *longissimus dorsi* กล้ามเนื้อ *semitendinosus* กล้ามเนื้อ *gluteus medius* กล้ามเนื้อ *supraspinatus* กล้ามเนื้อ *biceps femoris* กล้ามเนื้อ *semimembranosus* และ กล้ามเนื้อ *quadriceps femoris* ทั้งนี้ชนิดของกล้ามเนื้อยังมีอิทธิพลต่อเส้นใยกล้ามเนื้อโดยพบว่ากล้ามเนื้อ *longissimus dorsi* มีปริมาณของ type IIb (white fiber) ในสัดส่วนที่สูงมากถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กล้ามเนื้อ *vastus intermedius* ของเนื้อลูกแกะพรวัว (knuckle) มีปริมาณของ type I (red fiber) สูงถึง 70-80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นขบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในระดับเซลล์เช่น aerobic metabolism ซึ่งต้องการออกซิเจนที่มากับเลือด จึงเกิดขึ้นได้ดีกว่าเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด type IIb (white fiber) และยังพบว่าในเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด type I เท่านั้นที่จะมีการสร้าง intramuscular fat (IMF) รวมถึงกล้ามเนื้อที่ถูกใช้งานบ่อยจะมีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด type I สูงกว่ากล้ามเนื้อที่ไม่ถูกใช้งาน (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2539)

Rhee *et al.* (2004) ที่ได้ทำการศึกษาความนุ่มของเนื้อโคด้วยการทดสอบทางประสาทสัมผัส และการวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อจากกล้ามเนื้อจำนวนทั้งหมด 11 ชนิด ในโคลูกผสมสายพันธุ์ Charolais x MARC III ประกอบไปด้วยกล้ามเนื้อ *Psoas major*, *Infraspinitus*, *Longissimus Triceps brachii*, *Rectus femoris*, *Gluteus medius*, *Adductor* (ส่วนหนึ่งของกล้ามเนื้อพับใน) *Semimembranosus*, *Supraspinatus*, *Semitendinosus* และ *Biceps femoris* จากการศึกษาพบว่ากล้ามเนื้อ *Psoas major* มีความนุ่มมากที่สุด และรองลงมาคือ กล้ามเนื้อ *Infraspinitus* นอกจากนี้ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ ยังมีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อเป็นอย่างมาก โดยกล้ามเนื้อที่มีปริมาณของ red fiber ในสัดส่วนที่สูงกว่า white fiber เนื้อนั้นจะมีความเหนียวมากกว่า (Fiedler *et al.* 1999) ในโคที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber เป็นองค์ประกอบของมัดกล้ามเนื้ออยู่สูง เช่น โคสายเลือดอินเดีย เนื่องจากโคประเภทนี้จะมีความเหนียวมาก เนื่องจากเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber มีเอนไซม์ calpain ในปริมาณที่สูง และในขณะเดียวกันปริมาณของ เอนไซม์ calpastatin ซึ่งทำหน้าที่ขัดขวางการทำงานของ calpain จะมีอยู่สูงเช่นกัน เป็นผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของ

calpain และกระบวนการ proteolysis เกิดได้น้อย ดังนั้นกล้ามเนื้อที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber จึงมีความเหนียวมากกว่า กล้ามเนื้อที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด white fiber เป็นองค์ประกอบ

Klont *et al.* (1998) ได้ศึกษาเรื่องความสัมพันธ์ของชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อจากหลายๆ งานวิจัยพบว่าเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด white fiber จะมีอัตราการเกิดความนุ่มของเนื้อเร็วกว่าเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากใน white fiber มีเมตาบอลิซึมแบบไม่ใช้ออกซิเจน มีอัตราการสลายไกลโคเจนสูง ค่า pH ลดต่ำเร็ว ทำให้เข้าสู่สภาวะเกร็งตัวอย่างถาวรของกล้ามเนื้อ (rigor mortis) ได้เร็วกว่าปกติ เป็นผลทำให้ผนังของ sarcoplasmic reticulum ไม่สามารถเก็บ Ca^{2+} ไว้ได้ ทำให้ Ca^{2+} ถูกปล่อยออกมาและไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ calpain ส่งผลให้เกิดกระบวนการ proteolysis ขึ้น ดังนั้นกล้ามเนื้อที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด White fiber อยู่มาก จึงเกิดความนุ่มได้เร็วกว่า

ขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อ

ขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ เส้นใยกล้ามเนื้อละเอียด (fine texture) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยกล้ามเนื้อเล็ก และเส้นใยกล้ามเนื้อหยาบ (coarse texture) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยกล้ามเนื้อใหญ่กว่า เนื้อที่มีความนุ่มไม่เหนียว จะเป็นเนื้อที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อละเอียด ซึ่งความละเอียดหรือหยาบของเส้นใยกล้ามเนื้อขึ้นอยู่กับอายุ ชนิดของสัตว์ และชนิดของกล้ามเนื้อ จากผลการศึกษาของ ปิยะดา ทวีศรี (2544) ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบชนิดสัตว์เกี่ยวข้องกับขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อในกล้ามเนื้อสันนอก พบว่าโคนมลูกผสมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยกล้ามเนื้อเล็กกว่าโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนและกระบือปลัก อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.05$) และพบว่าโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนมีแนวโน้มค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงกว่าโคนมลูกผสม และกระบือปลัก นอกจากนี้ Koochmaraie *et al.* (1988) กล่าวว่าขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อโคมีความสัมพันธ์ตรงข้ามกับความนุ่มและมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกับค่าแรงตัดผ่านเนื้อ และพบว่าเส้นใยกล้ามเนื้อที่มีขนาดใหญ่จะมีความเหนียวมากกว่าเส้นใยกล้ามเนื้อที่ขนาดเล็กกว่า โดยพบว่าเนื้อสันในที่มีขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อเล็กจะมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำกว่าเนื้อสันนอกและเนื้อไหล่ซึ่งมีขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อใหญ่กว่า

ระดับความเป็นกรด-ด่างในเนื้อ

ค่าความเป็นกรด-ด่างของกล้ามเนื้อในขณะสัตว์กำลังตายนั้นจะมีค่าอยู่ระหว่าง 6.4-7.0 เกิดจากการที่กล้ามเนื้อยังคงมีการทำงานต่อไปอีกเป็นระยะเวลาหนึ่งภายหลังสัตว์ตาย ประกอบกับ กรดแลคติกที่ถูกผลิตออกมาจากปฏิกิริยาไกลโคไลซิสเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนกว่าปริมาณไกลโคเจนที่สะสมอยู่ในกล้ามเนื้อหมดไป จึงให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงไป และเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงจนถึงจุดที่ไม่ลดลงอีกต่อไปคือประมาณ 5.3-5.5 จะเรียกจุดนี้ว่า ultimate pH (pHu) ซึ่ง

กล้ามเนื้อจะเข้าสู่ภาวะเกร็งตัวอย่างถาวร (rigor mortis) (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2539) ภายหลังสัตว์ตายค่าความเป็นกรด-ด่างในเนื้อจะลดลง เนื่องจากพลังงานที่ใช้ในการหดตัวของกล้ามเนื้อหลังจากสัตว์ตายได้จากขบวนการ anaerobic metabolism (ขบวนการสลายไกลโคเจนเป็นพลังงานโดยไม่ใช้ออกซิเจน) ทำให้เกิดกรดแลคติกและความร้อนขึ้นนอกเหนือจากพลังงานที่ได้ โดยทั่วไปพบว่าในโคที่ยังมีชีวิตอยู่ และไม่ได้อยู่ในสภาวะที่เครียดกล้ามเนื้อจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ประมาณ 7.2 แต่หลังสัตว์ตาย 24 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง จะลดลงเหลือ 5.5-5.8 ซึ่งการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ความสามารถในการ อุ่มน้ำของเนื้อ ความนุ่มของเนื้อ และสีของเนื้อเป็นสำคัญ (Warriss, 2000) Wheeler *et al.* (1990) พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อโคลดลงจาก 6.9 เป็น 5.8 ภายหลังจากการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากกล้ามเนื้อยังคงมีการทำงานอยู่ การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง จะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของห้องเย็นที่ใช้ในการเก็บรักษาเนื้อ กล่าวคือ ถ้าอุณหภูมิในกล้ามเนื้อลดลงเร็ว การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในเนื้อก็ช้าลง (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2539)

Dransfield. (1994) กล่าวว่า การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างนั้นนอกจากจะทำให้เกิดการสูญเสียสมบัติบางประการของโปรตีน ผนังเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายและเกิดการย่อยสลายของโปรตีนแล้ว หากค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงอย่างรวดเร็วจะส่งผลให้เส้นใย myosin ถูกทำลาย ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดลักษณะของเนื้อที่เป็น PSE (pale soft exudative) และทำให้เนื้อมีความสามารถอุมน้ำลดลง Anderson *et al.* (1999) กล่าวว่า การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างภายใน 24 ชั่วโมงหลังสัตว์ตายมีผลต่อคุณภาพเนื้อเป็นอย่างมาก ซึ่งการที่ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงเกิดจากการที่ไกลโคเจนที่สะสมอยู่ภายในกล้ามเนื้อเกิดการสลายตัวผ่านขบวนการ anaerobic metabolism ทำให้เกิดกรดแลคติกขึ้น และทำให้โปรตีนบางส่วนในกล้ามเนื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบางประการ

นอกจากนี้อัตราการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในเนื้อ ยังขึ้นอยู่กับระดับของความเครียดก่อนสัตว์ตาย การที่สัตว์เกิดความเครียดอย่างรุนแรงก่อนที่จะถูกฆ่าเป็นสาเหตุที่ทำให้ระบบต่างๆ ภายในร่างกายเกิดการเปลี่ยนแปลงและจะมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยา glycolysis ซึ่งจะส่งผลเสียต่อคุณภาพเนื้อภายหลังสัตว์ตาย การที่กล้ามเนื้อต้องทำงานหนักทำให้ต้องการ ATP อย่างรวดเร็วเป็นจำนวนมากจนเลือดที่มาเลี้ยงกล้ามเนื้อไม่สามารถนำออกซิเจน กลูโคส กรดไขมันเข้าสู่กล้ามเนื้อเพื่อเปลี่ยนเป็น ATP โดยผ่านขบวนการ anaerobic metabolism ซึ่งจะทำให้เกิดกรดแลคติกและความร้อนขึ้น (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2539) กรดแลคติกที่ถูกผลิตขึ้นมานี้เองที่มีผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพของเนื้อในเวลาต่อมา Immonen *et al.* (2000) รายงานว่า ความเครียดที่สัตว์ได้รับก่อนการฆ่ามีความสัมพันธ์กับระดับไกลโคเจนที่สะสมอยู่ภายในกล้ามเนื้อ เมื่อเกิดปฏิกิริยาเร่งการใช้ไกลโคเจนโดยผ่านกระบวนการ anaerobic metabolism นอกจากจะเกิดกรดแลคติกแล้ว ความร้อนยังเพิ่มขึ้นด้วย จึงส่งผลทำให้เนื้อเกิดลักษณะ สีคล้ำ แน่น

แข็ง และแห้ง เรียกเนื้อที่มีลักษณะเช่นนี้ว่า DFD (dark firm dry) หรือ dark cutting ส่งผลให้เนื้อมีคุณภาพด้อยลง นอกจากนี้ไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคเนื่องจากสีที่เข้มผิดปกติของเนื้อแล้วระยะการเก็บรักษาเนื้อยังลดลงด้วย

O'Halloran *et al.* (1997) ศึกษาความสัมพันธ์ของค่า pH ในช่วงแรกภายหลังสัตว์ตายที่มีต่อความนุ่มของเนื้อโคจากกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* (LD) และ *Semimembranosus* (SM) ของโคสาวลูกผสมสายพันธุ์ Hereford x Friesian ทำการวัดค่า pH ที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมงหลังจากสัตว์ตาย โดยแบ่งกลุ่มตามอัตราการลดลงของค่า pH ออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีอัตราการลดลงของค่า pH ช้า หรือ slow glycolysis กลุ่มที่มีอัตราการลดลงของค่า pH ปานกลาง หรือ intermediate glycolysis และกลุ่มที่มีอัตราการลดลงของค่า pH เร็ว หรือ fast glycolysis ตามลำดับ ทำการบ่มเนื้อที่เวลา 2, 7 และ 14 วัน แล้ววัดความนุ่มด้วยวิธีหาค่าแรงตัดผ่านเนื้อ โดยใช้อุณหภูมิในการปรุงสุก 2 ระดับคือ ที่อุณหภูมิ 60 และ 80°C จากการศึกษาพบว่า กลุ่ม fast glycolysis จะมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำในส่วนของกล้ามเนื้อ LD และ SM เนื้อจึงมีความนุ่มมากที่สุด เนื่องจากว่าอัตราการลดลงของค่า pH อย่างรวดเร็วมีผลให้เกิดการเร่งการทำงานของ endogenous enzyme เช่น cathepsin L ให้ย่อยสลายโปรตีนในเนื้อสัตว์ได้มากขึ้น

Silva *et al.* (1999) ทำการศึกษาเรื่องอิทธิพลของค่า ultimate pH (pHu) ที่มีต่อความนุ่มในกล้ามเนื้อ *Longissimus* ของเนื้อโคพื้นเมืองประเทศโปรตุเกส โดยวัดค่า pHu ที่เวลา 28 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย และได้จำแนกเนื้อโคออกเป็น 3 กลุ่มตามค่า pHu ที่วัดได้ ประกอบไปด้วย กลุ่มที่มีค่า pHu เท่ากับ 5.7, 6.1 และ 6.5 จากนั้นนำไปวัดค่าความนุ่มด้วยวิธีการหาค่าแรงตัดผ่านเนื้อ และการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าเนื้อโคกลุ่มที่มีค่า pH 6.5 (DFD) มีค่าแรงตัดผ่านต่ำที่สุด และการทดสอบความนุ่มทางประสาทสัมผัสพบว่า เนื้อในกลุ่ม DFD จะมีความนุ่มมากที่สุด เนื่องมาจากว่าเนื้อ DFD มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ calpains (pH 6.2-6.7) จึงทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งเกิดการสูญเสียน้ำระหว่างปรุงสุกในปริมาณน้อย จึงส่งผลทำให้เนื้อประเภทนี้มีความนุ่ม

Neath *et al.* (2007) ทำการศึกษาความแตกต่างในเรื่องของความนุ่ม การลดลงของค่า pH และการย่อยสลายโปรตีน troponin-T ระหว่างกระบือ (Philippine carabao x Bulgarain murrab) กับโคเนื้อ (Brahman x Philippine native) จากผลการศึกษาพบว่า ค่า Ultimate pH (pHu) ทั้งของโคและกระบือมีค่าเท่ากันที่ 5.4 แต่ในโคจะพบค่า pHu เกิดขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่กระบือจะพบการลดลงของค่า pH ช้ากว่าโดย pHu เกิดขึ้นที่เวลา 48 ชั่วโมง ภายหลังสัตว์ตาย ค่าแรงตัดผ่านเนื้อไม่มีความแตกต่างทางสถิติแต่พบว่าในกระบือมีการย่อยสลายโปรตีน troponin-T ในปริมาณที่มากกว่าโค เนื่องมาจาก การที่ค่า pHu ของกระบือลดลงช้า จึงมีผลทำให้ปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์ในกลุ่มของ calpains ซึ่งทำงานที่ค่า pH สูงเกิดขึ้นได้มากกว่า

ระดับไขมันแทรก

ไขมันแทรกที่ผู้บริโภครู้จักต้องการและนิยมคือ ไขมันแทรกในกล้ามเนื้อ (intramuscular fat หรือ marbling) ซึ่งเป็นไขมันที่สะสมอยู่ระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีชื่อว่า endomysium และ perimysium หุ้มล้อมรอบ muscle bundle (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2539) ระดับไขมันแทรกจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่เป็นตัวบ่งชี้ถึง รสชาติและความนุ่มของเนื้อ Savell and Cross (1988) ได้อธิบายถึงอิทธิพลของระดับไขมันแทรกที่มีผลต่อคุณภาพเนื้อไว้ 2 ประการด้วยกันคือ ระดับไขมันแทรกจะมีความสัมพันธ์ในทางบวกกับความฉ่ำน้ำของเนื้อและความนุ่มของเนื้อ มาลย์ จงเจริญ (2546) ศึกษาความนุ่มของเนื้อโคลูกผสม Charolais ที่มีระดับไขมันแทรกต่างกัน 2 ระดับ คือ 3-3.5 และ 4-5 โดยทำการวัดระดับความนุ่มของเนื้อด้วยการหาค่าแรงตัดผ่านเนื้อ โดยที่ระดับคะแนนไขมันแทรก 1 หมายถึงเนื้อที่มีระดับไขมันแทรกต่ำสุด และ 5 หมายถึงเนื้อที่มีระดับไขมันแทรกสูงที่สุด พบว่าเนื้อที่มีระดับไขมันแทรก 3-3.5 จะมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงกว่าเนื้อที่มีระดับไขมันแทรก 4-5 สรุปได้ว่าเนื้อโคที่มีระดับไขมันแทรกต่ำ จะมีความเหนียวมากกว่าเนื้อที่มีระดับไขมันแทรกสูง

Tuma *et al.* (1962) ศึกษาอิทธิพลร่วมของระดับไขมันแทรก และอายุของโคที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อ ในโคสายพันธุ์ Hereford เพศเมียอายุ 18, 42 และ 90 เดือน จำแนกระดับไขมันแทรกออกเป็น 2 ระดับคือ เนื้อที่มีไขมันแทรกน้อย และเนื้อที่มีไขมันแทรกปานกลาง ทดสอบความนุ่มด้วยวิธีวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ พบว่า ความนุ่มของเนื้อโคอายุ 18 เดือน ที่ระดับไขมันแทรกต่างกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่อีก 2 กลุ่มพบว่าเมื่อระดับไขมันแทรกเพิ่มขึ้น ระดับความนุ่มของเนื้อก็จะเพิ่มขึ้น Platter *et al.* (2003) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับไขมันแทรก ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ และความนุ่มของเนื้อโคที่วัดจากการทดสอบทางประสาทสัมผัส ของเนื้อโคส่วนสันนอก (striploin) โดยจัดกลุ่มเนื้อโคออกเป็น 2 กลุ่มตามระดับไขมันแทรก คือ กลุ่มที่มีไขมันแทรกระดับกลาง และกลุ่มที่มีปริมาณไขมันแทรกเพียงเล็กน้อย พบว่าระดับไขมันแทรก ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ และความนุ่มของเนื้อโคที่วัดโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัส มีความสัมพันธ์ในทางบวก กล่าวคือเมื่อปริมาณไขมันแทรกเพิ่มขึ้น ความนุ่มของเนื้อจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วยเช่นกัน

Killinger *et al.* (2004) ศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อระดับไขมันแทรกในเนื้อโคที่ต่างกัน จากเนื้อโคที่มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากัน โดยจำแนกระดับไขมันแทรกในเนื้อออกเป็น 2 กลุ่มคือ เนื้อที่มีไขมันแทรกระดับสูง และระดับต่ำ ด้วยวิธีทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการชิม พบว่าผู้บริโภคส่วนใหญ่นิยมเนื้อที่มีไขมันแทรกระดับสูงมากที่สุด เนื่องจากเหตุผลที่ว่าเนื้อประเภทนี้มีความนุ่มและฉ่ำน้ำมากกว่า Sethakul *et al.* (2008) พบว่าปริมาณไขมันแทรกส่งผลให้ความนุ่มของเนื้อเพิ่มขึ้น โดยเนื้อโคขุนลูกผสมพันธุ์ชาร์โรเลส์เลือดสูงมีปริมาณไขมันแทรกสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองมาคือเนื้อโคลูกผสมพันธุ์บราห์มันที่เลี้ยงด้วยเปลือกสับปะรดเป็นแหล่งอาหารหยาบ และเนื้อโคลูกผสมพันธุ์บราห์มันที่เลี้ยงแบบทั่วไปส่วนเนื้อโคพื้นเมืองมีปริมาณ

ไขมันแทรกต่ำที่สุด สอดคล้องกับรายงานของ พร้อมลักษณ์ สมบูรณ์ปัญญากุล (2552) ที่รายงานว่า โคขุนลูกผสมพันธุ์ชาร์โรเลส์มีปริมาณไขมันแทรกสูงกว่าเนื้อโคขุนลูกผสมพันธุ์บราห์มัน และเนื้อโคพื้นเมืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามลำดับ

ระยะเวลาในการบ่ม

Pearson and Young (1989) กล่าวว่า ระยะเวลาในการบ่มซากจะช่วยให้เอนไซม์ที่อยู่ในกล้ามเนื้อออกมาทำการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ซึ่งนอกจากจะเป็นการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อแล้ว ยังทำให้รสชาติดีขึ้นด้วย โดยปกติแล้วจะทำการบ่มเนื้อที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส แต่ในบางกรณีจะทำการบ่มซากที่อุณหภูมิ 14-15 องศาเซลเซียส แม้ว่าการบ่มเนื้อที่อุณหภูมิสูงจะเป็นการกระตุ้นให้เอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อทำงานได้ดีขึ้น แต่อาจเกิดปัญหาในการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นได้หากทิ้งเนื้อไว้ที่อุณหภูมิสูง Wheeler *et al.* (1990) รายงานว่า เนื้อที่ได้จากโคพันธุ์บราห์มันจะมีระดับความนุ่มต่ำในระยะแรกของการบ่ม แต่ความนุ่มจะมากขึ้นที่ระยะ 7-14 วัน ในการบ่มภายหลังสัตว์ตาย Johnson *et al.* (1990) รายงานว่าค่าแรงตัดผ่านในโคลูกผสมเลือดบราห์มัน 75 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการบ่มที่ระยะเวลา 1 และ 5 วัน ไม่มีความแตกต่างกันแต่จะพบความแตกต่างเมื่อผ่านการบ่ม 10 วัน ส่วนเนื้อจากโคลูกผสมบราห์มัน 25 เปอร์เซ็นต์ พบแนวโน้มการลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่ระยะการบ่มเพิ่มขึ้น โดยการลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่การบ่ม 10 วัน ในโคพันธุ์เองกัสเท่ากับ 37 เปอร์เซ็นต์ และโคลูกผสมบราห์มันเลือด 25, 52 และ 75 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 2.7, 9.4 และ 16.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่ระยะการบ่ม 1 วัน

Nishimura *et al.* (1998) พบว่าหากยืดระยะเวลาการบ่มให้นานขึ้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งจะส่งผลต่อการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อได้ โดยจากการทดลองเพื่อศึกษาความนุ่มในกล้ามเนื้อ semitendinosus ของโคพันธุ์ญี่ปุ่นนิสแบล็ค (Japanese Black) เพศผู้ตอนอายุ 32 เดือน พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อมียาลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเนื้อถูกบ่มเป็นเวลามากกว่า 10 วัน และจะลดลง จนกระทั่ง 35 วันหลังสัตว์ตาย ทั้งนี้เมื่อวิเคราะห์จากเปอร์เซ็นต์การแตกตัวของเส้นใยเพอร์ไมเซียม พบว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 14 วันหลังสัตว์ตาย จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าความแข็งแรงของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ ในระหว่างการบ่มเนื้อ ดังนั้นหากยืดระยะเวลาการบ่มเนื้อให้นานขึ้น จะทำให้เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยมีการแตกหักมากขึ้นจึงทำให้เนื้อโคมีความนุ่มเพิ่มขึ้น

Muir *et al.* (2000) ศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพเนื้อในโค *Bos taurus* ระหว่างโคพันธุ์ Hereford โคพันธุ์ Holstein friesian และโคลูกผสมพันธุ์ Hereford x Holstein friesian ที่อายุ 27 เดือน พบว่าความนุ่มของเนื้อโคทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่พบว่าเมื่อใช้เวลาบ่มที่นานขึ้นสามารถทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้น วิจิต พรหมอินทร์ (2549) ได้ศึกษาคุณภาพซากและคุณภาพ

เนื้อโคขุนภายใต้ระบบการผลิตของสหกรณ์โคเนื้อกำแพงแสน พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้น โดยระยะเวลาบ่มเป็นเวลา 1, 5, 7, 14 และ 20 วัน มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อาหารและระบบการเลี้ยง

ศรเทพ รัชมวล (2539) กล่าวว่า อาหารเป็นปัจจัยพื้นฐานของการเลี้ยงโคเนื้อ โดยอาหารจำแนกออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ อาหารข้น หรือ concentrate คืออาหารที่มีส่วนของสารเยื่อใยน้อยกว่า 18% ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ปลาช่อน เมล็ดถั่ว กากถั่วเหลือง ปลาป่น และเลือดป่น เป็นต้น และอาหารหยาบ หรือ roughage คืออาหารที่มีส่วนของสารเยื่อใยมากมีสัดส่วนประมาณ 25-35% และมีพลังงานต่ำ ได้แก่ หญ้าสด หญ้าแห้ง ฟางข้าว ฟางหมัก และใบกระถิน เป็นต้น อาหารหลักของสัตว์เคี้ยวเอื้องคืออาหารหยาบ ส่วนใหญ่แล้วคือพอกหญ้า สำหรับประเทศไทยในปัจจุบันพบว่าในฤดูแล้งเกิดการขาดแคลนหญ้าสดสำหรับนำมาใช้เลี้ยงโค ซึ่งเป็นปัญหาต่อระบบการผลิตโคอย่างมาก ดังนั้นจึงได้มีการทดแทนโดยใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรต่างๆ อาทิเช่น ยอดอ้อย ต้นข้าวโพด ชังข้าวโพด เถาฟักทอง และเปลือกสับประรดซึ่งถือว่าเป็นแหล่งอาหารที่ให้พลังงานสูงชนิดหนึ่ง และเมื่อนำไปเลี้ยงโคพบว่าโคจะมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าในโคที่กินหญ้าเพียงอย่างเดียว (กองอาหารสัตว์, 2549)

Bruce *et al.* (2004) ศึกษาการเลี้ยงโคคุณภาพเนื้อในโคเพศผู้ตอนพันธุ์ Brahman โดยแบ่งโคออกเป็น 2 กลุ่มแรกเลี้ยงด้วยอาหารข้นที่ประกอบไปด้วย ข้าวฟ่าง 49% ข้าวโพด 22% และกากเมล็ดฝ้าย 10% กลุ่มที่ 2 เลี้ยงด้วยหญ้าเป็นหลัก (Buffel grass) ทำการขุนเป็นเวลา 74 วัน พบว่าเนื้อโคที่เลี้ยงด้วยอาหารข้นเมื่อนำไปวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อจะมีค่าต่ำกว่า กลุ่มที่กินหญ้าเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าสีของเนื้อในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารข้น จะมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่กินหญ้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) Kerth *et al.* (2007) ทำการศึกษาความนุ่มของกล้ามเนื้อ Longissimus (RG/GRAIN) และกลุ่มที่ 3 เลี้ยงด้วย หญ้าไรย์ เพียงอย่างเดียว (RG) ทำการขุนเป็นระยะเวลา 94 วัน ผลการศึกษาพบว่า ค่าแรงตัดผ่านเนื้อและผลการทดสอบความนุ่มด้วยวิธีการทางประสาทสัมผัสของ เนื้อโคในกลุ่มที่เลี้ยงด้วย GRAIN จะมีความนุ่มมากที่สุด รองลงมาคือ RG/GRAIN และ RG สำหรับสีของเนื้อพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

สารเร่งการเจริญเติบโต

สารเร่งการเจริญเติบโตใช้เพื่อเร่งการสะสมเนื้อ และลดการสะสมไขมันในร่างกายที่เรียกว่า partitioning agents ซึ่งต่างจาก growth promoters เนื่องจากสารในกลุ่มหลังบางครั้งไม่ช่วยปรับปรุงคุณภาพซากหรือเพิ่มปริมาณการสร้างเนื้อแดง แต่ทำให้อัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้นและประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารดีขึ้น โดยการใช้สารในกลุ่มแรกจะช่วยปรับปรุงคุณภาพซาก และ

เพิ่มอัตราการเจริญเติบโต นอกจากจะทำให้ได้คุณภาพซากเป็นที่ต้องการของตลาดแล้ว ยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหาร และทำให้ได้รับผลตอบแทนสูงขึ้น

สารเร่งการสร้างเนื้อแดงที่สำคัญและเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายได้แก่ β -agonist และ procrine somatotropin (PST) ซึ่ง β -agonist เป็นกลุ่มสารสังเคราะห์ที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วน sympathetic เน้นกระตุ้นเซลล์ที่ตำแหน่ง β -site จึงมีชื่อเรียก β -adrenergic agents หรือ β -agonist เป็นสารที่มีผลต่อการทำงานของ β -adrenoreceptors ที่บริเวณผิวของเซลล์ไขมันและกล้ามเนื้อ ใช้ได้ผลดีที่สุดในระยะสุดท้ายของการขุนการใช้ β -agonist ยังพบว่าทำให้ปริมาณไขมันแทรก (marbling) ในเนื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และยังพบว่าเนื้อมีความนุ่มลดน้อยลงแต่ไม่พบว่ามีผลต่อสีและการอุ้มน้ำของเนื้อ ส่วน procrine somatotropin (PST) เป็นสารในกลุ่ม growth hormone เพื่อเร่งสร้างการเจริญเติบโต เป็นฮอร์โมนที่สกัดจากธรรมชาติเมื่อเนื้อผ่านการทำให้สุก และขบวนการย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้ของคน ฮอร์โมนนี้จะหมดฤทธิ์ เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นโปรตีน และยังมีอนุพันธ์ที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงและออกฤทธิ์เหมือนกัน ที่สำคัญมี 4 ตัวคือ cimenteral, clenbuteral, rectopamine และ sulbutamol ให้ผลตอบแทนในการสร้างกล้ามเนื้อแดงในโคดีกว่าในสุกร แต่นิยมใช้ในสุกรที่มีการใช้สารนี้ในรูปของ feed additive (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2539)

Koohmaraie *et al.* (1991) รายงานว่าสาร β -adrenergic agonists มีผลทำให้เนื้อโคเนื้อมีความนุ่มลดลง เนื่องจากการทำให้การสลายตัวของ myofibrillar protein ลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากทำงานของเอนไซม์ m-calpain ลดประสิทธิภาพ สารตัวนี้จะมีส่วนในการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ calpastatin : ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไปขัดขวางการทำงานของ calpains สอดคล้องกับงานวิจัยของ Geesink *et al.* (1993) ที่พบว่าสารดังกล่าว จะเป็นตัวไปลดการทำงานของ เอนไซม์ μ -calpain ในเนื้อสัตว์ อันเป็นผลเนื่องมาจากการเพิ่มปริมาณขึ้นของ calpastatin Gruber *et al.* (2007) ศึกษาอิทธิพลของการเสริม rectopamine ซึ่งเป็นสารเร่งเนื้อแดงในกลุ่ม β -agonist ที่มีผลต่อคุณภาพซากของโค 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย โคพันธุ์ British โคพันธุ์ Brahman และโคลูกผสม Brahman โดยแบ่งโคออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ได้เสริม rectopamine (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่เสริม rectopamine ในระดับ 200 มิลลิกรัม ระยะขุน 28 วัน จากการศึกษาพบว่าในโคกลุ่มที่ได้รับ rectopamine จะมีน้ำหนักซากอ่อนมากกว่า และพื้นที่หน้าตัดเนื้อสันนอกมีขนาดใหญ่ขึ้น ปริมาณไขมันแทรกลดลง

ฮอร์โมน

ฮอร์โมนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของสัตว์ให้เนื้อ ได้แก่

1) **steroid hormone** ที่สำคัญที่สัตว์สร้างขึ้นเอง (endogenous sex hormone) ได้แก่ estradiol, progesterone, testosterone และ androgen ซึ่งฮอร์โมนตัวหลังนี้ เป็นฮอร์โมนที่ถูกสร้างขึ้นจาก adrenal cortex ในระยะที่สัตว์ถึงวัยเจริญพันธุ์ (puberty) โดยทำหน้าที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อภายในร่างกาย ที่สำคัญคือ กล้ามเนื้อที่แสดงถึงความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย คือ

กล้ามเนื้อบริเวณต้นคอและหัว โดยพบว่าการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อในส่วนเสื้อหน้า (fore quarter) เป็นอย่างมาก สอร์โมน testosterone เป็นสอร์โมนที่สร้างจาก testis พบว่าเมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์ สอร์โมนนี้จะถูกสร้างขึ้นอย่างรวดเร็วจะมีส่วนช่วยเร่งการเจริญเติบโต ดังนั้นการคอนสตรัคต์ตั้งแต่ยังเล็กมีผลทำให้ไม่มีการสร้างสอร์โมนตัวนี้ การเจริญเติบโตในสัตว์จึงลดลง ส่วน steroid hormone สังเคราะห์ที่สำคัญได้แก่ trenbolone, zeranol, stilbenes เป็นต้น

2) **peptide hormone** ที่สำคัญคือ growth hormone เป็นสอร์โมนที่สร้างขึ้นจากต่อม pituitary มีความสำคัญมากต่อการควบคุมการเจริญเติบโต และเมตาบอลิซึมของร่างกายสัตว์ก่อนถึงวัยเจริญพันธุ์ และจะทำหน้าที่โดยตรงในเรื่อง growth rate ที่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของอวัยวะภายใน การเจริญของกระดูกอ่อน กระตุ้นการทำงานของ osteoblast ในกระดูก ช่วยในการสังเคราะห์โปรตีน กระตุ้นให้เกิดการสะสมไนโตรเจนในร่างกายและยับยั้งการเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นยูเรีย (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2539)

Laflamme and Burgess (1973) ศึกษาอิทธิพลของการเสริมสอร์โมน diethylstilbestrol (DES) ซึ่งเป็นสอร์โมนที่ช่วยให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารในโคเพิ่มขึ้นประมาณ 15% ต่อความนุ่มของกล้ามเนื้อสันนอก (*longissimus dorsi*) ในโคเพศผู้ลูกผสม Charolais (50%Charolais x 25%Hereford x 25%Short horn) ทำการขุนด้วยอาหารพลังงานสูงเป็นเวลานาน 140 วัน ปริมาณสอร์โมนที่ใช้คือ 36-72 มิลลิกรัม พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อในโคกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสอร์โมนเสริมจะมีค่าต่ำกว่าเนื้อโคที่ได้รับการเสริมสอร์โมนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Barham *et al.* (2003) ศึกษาอิทธิพลของการเสริมสอร์โมนในกลุ่ม anabolic (Synovex-S และ Revalor-S) ซึ่งเป็นสอร์โมนที่ช่วยในเรื่องของการเจริญเติบโต และปรับปรุงคุณภาพเนื้อ ที่มีผลต่อความนุ่มของกล้ามเนื้อสันนอก (*longissimus dorsi*) ในเนื้อโคเพศผู้ตอนพบว่า ค่าแรงตัดผ่านเนื้อจากโคทั้ง 3 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญแต่พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อในเนื้อโคกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการเสริมสอร์โมนมีค่าต่ำที่สุด และเมื่อทำการวัดระดับความนุ่มของเนื้อโคด้วยวิธีการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าเนื้อโคในกลุ่มควบคุมจะมีความนุ่มมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Foutz *et al.* (1997) ที่พบว่าเนื้อโคที่ไม่ได้รับการเสริมสอร์โมนจะมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำกว่ากลุ่มเนื้อโคที่ได้รับการเสริมสอร์โมน

Smith *et al.* (2007) ศึกษาอิทธิพลของการเสริมสอร์โมนในกลุ่ม anabolic steroids (Synovex-Plus โดยมีส่วนผสมของ estradiol benzoate 28 มิลลิกรัม และ trenbolone acetate 200 มิลลิกรัม) ที่มีผลต่อคุณภาพซาก และความนุ่มในเนื้อโคสายพันธุ์ Angus ทำการเสริมสอร์โมนชนิดนี้ร่วมกับอาหารที่มีระดับโปรตีนรวม 12.5% ขุนเป็นเวลา 108 วันจากผลการศึกษาพบว่าในเนื้อโคกลุ่มที่มีการเสริมสอร์โมนจะมีน้ำหนักซากอุ่นมากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดพื้นที่ที่หน้าตัดเนื้อสันนอกมีขนาดใหญ่กว่าและปริมาณไขมันแทรกมากกว่า ในขณะที่ค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่เวลา 24 ชั่วโมงหลัง

สัตว์ตายพบว่าในกลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมนเสริมมีค่าต่ำกว่าในกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.2 กระบวนการย่อยสลายโปรตีนภายหลังสัตว์ตาย (post-mortem proteolysis)

กระบวนการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย (proteolysis) มีผลต่อความนุ่มของเนื้อสัตว์เป็นอย่างมาก เนื่องจากกระบวนการนี้ เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความนุ่มของเนื้อสัตว์นั้นเพิ่มมากขึ้น โดยเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ภายในกล้ามเนื้อสัตว์ซึ่งจะทำให้เกิดการสลายตัวของโปรตีนในกลุ่ม myofibrillar proteins Whipple and Koohmaraie (1991) รายงานว่า desmin เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญที่สุดในการทำให้เนื้อเกิดความนุ่มเพิ่มขึ้น เนื่องจาก desmin จะทำหน้าที่ในการยึดส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์กล้ามเนื้อเข้าด้วยกันเพื่อให้เซลล์กล้ามเนื้อเกิดความคงตัว เมื่อ desmin ถูกย่อยสลายไปส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์กล้ามเนื้อจะแยกออกจากกัน จึงส่งผลให้เนื้อเกิดความนุ่มเพิ่มขึ้นนอกจากนี้โปรตีน nebulin และ desmin ยังเป็น substrate ที่ดีต่อเอนไซม์ calpains ในขณะที่ nebulin จะมีอัตราการสลายตัวได้เร็วกว่า desmin Koohmaraie (1992) รายงานว่าผลจากการสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อหลังจากสัตว์ตายนั้นจะเกิดการย่อยสลายของโปรตีน titin, nebulin และ desmin ซึ่งทำให้เกิดการแตกตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ และการย่อยสลายของโปรตีน troponin-T ซึ่งทำให้พบการปรากฏของ polypeptide ขนาด 30 kDa ทำให้แรงดึงของเส้นใยกล้ามเนื้อหมดลง และยังพบ polypeptide ขนาด 95 kDa และ 27 kDa โดยคาดว่าเป็นผลผลิตที่ได้จากการสลายตัวของโปรตีนขนาดใหญ่ ซึ่งการสลายตัวของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ และการปรากฏของ polypeptide ดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อที่เพิ่มขึ้น

Hedrick *et al.* (1993) ได้สรุปการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตายโดยภายหลังสัตว์ตายจะเกิดการย่อยสลายบริเวณ Z disk ทำให้เส้นใยกล้ามเนื้อฉีกขาด เป็นผลให้โปรตีน titin และ nebulin ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อและควบคุมการยืดหยุ่นของกล้ามเนื้อ และโปรตีน desmin ที่มีหน้าที่ยึดเส้นใยกล้ามเนื้อตามขวาง (transverse cross-linkage) ถูกทำลายจึงทำให้ความตึงของกล้ามเนื้อลดลง การย่อยสลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อเหล่านี้ ทำให้เกิด polypeptides ใหม่ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 95 และ 28 kDa ในขณะที่โปรตีน troponin T ซึ่งทำหน้าที่ยึด actin-myosin complex หายไปทำให้เกิดการปรากฏของ polypeptides ชนิดหนึ่งที่มีน้ำหนักโมเลกุล 28-32 kDa เกิดขึ้น ซึ่งตรวจสอบได้โดยใช้ polyacrylamide gel electrophoresis ส่วน actin และ myosin ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญที่ทำหน้าที่ในการหดตัวของกล้ามเนื้อ ไม่ได้ถูกย่อย แม้ว่าจะนำไปบ่มเป็นระยะเวลาถึง 56 วันก็ตาม

2.3 ความสำคัญของโปรตีน troponin-T ต่อความนุ่มของเนื้อ

Ho *et al.* (1994) ศึกษาการสลายตัวของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและการปรากฏของ polypeptide ขนาด 30 kDa ในเนื้อบ่มที่ระยะเวลา 1, 3, 7, 14 และ 28 วันหลังจากสัตว์ตาย สามารถยืนยันได้ว่าการปรากฏของ polypeptide ขนาด 30 kDa นั้นมาจากการสลายตัวของโปรตีน troponin-T โดยใช้เทคนิค western blot ซึ่งจะเริ่มพบ polypeptide ขนาด 30 kDa ในวันที่ 3 จนถึงวันที่ 28 ของการบ่มหลังจากสัตว์ตาย และยังศึกษาการสลายตัวของ titin, nebulin, desmin และ troponin-T ในกล้ามเนื้อ longissimus ของโคหลังจากถูกกระตุ้นชากด้วยกระแสไฟฟ้าภายหลังการฆ่าในโคลูกผสม *Bos indicus* ระหว่างโคพันธุ์ Brahman x Simmental จำนวน 7 ตัว ทำการเปรียบเทียบในระยะเวลา 0, 1, 3, 7, 14 และ 28 วัน ของการบ่มเนื้อหลังจากสัตว์ตาย ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า แแถบแทน troponin-T ที่ลดลงจะทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ แแถบแทน 30 kDa ทั้งในชากที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและไม่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า และจากการยืนยันแถบแทน troponin-T ด้วยเทคนิค western blot พบว่าอัตราการลดลงของ troponin-T ไม่แตกต่างกันแต่การปรากฏของแถบแทน 30 kDa ในวันที่ 7 ถึง 28 ของชากที่ถูกกระตุ้นที่กระแสไฟฟ้านั้นชัดเจนกว่า (Ho *et al.* 1997)

Huff-Lonergan *et al.* (1996) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในกลุ่ม myofibrillar proteins อันประกอบไปด้วยโปรตีน titin nebulin filamin desmin และ troponin-T ในกล้ามเนื้อสันนอกโค (*longissimus thoracis*) ที่เวลาการบ่ม 1, 3, 7, 14, 28 และ 56 วันหลังจากสัตว์ตาย จำแนกเนื้อโคที่นำมาทดสอบตามค่าแรงตัดผ่านเนื้อออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเนื้อโคที่มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำ (LSF) และกลุ่มที่มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูง (HSF) จากการศึกษาพบว่า การสลายตัวของโปรตีน titin ในเนื้อโคกลุ่ม LSF จะเริ่มมีการสลายตัวในวันที่ 7 ของการทดลอง กลุ่ม HSF จะเริ่มมีการสลายตัวในวันที่ 14 ของการทดลอง การสลายตัวของโปรตีน nebulin พบว่าในเนื้อโคกลุ่ม LSF จะเริ่มมีการสลายตัวตั้งแต่วันแรกของการทดลอง กลุ่ม HSF จะเริ่มมีการสลายตัวในวันที่ 3 ของการทดลอง การสลายตัวของโปรตีน filamin ในเนื้อโคกลุ่ม LSF พบว่าเริ่มมีการสลายตัวในวันที่ 3 ของการทดลอง กลุ่ม HSF จะเริ่มมีการสลายตัวในวันที่ 14 ของการทดลอง การสลายตัวของโปรตีน desmin ในกลุ่ม LSF จะเริ่มมีการสลายตัวในวันแรกของการทดลอง และกลุ่ม HSF จะเริ่มมีการสลายตัวในวันที่ 7 ของการทดลอง การสลายตัวของโปรตีน troponin-T ในเนื้อโคกลุ่ม LSF จะเริ่มมีการสลายตัวในวันที่ 3 ของการทดลอง กลุ่ม HSF จะเริ่มมีการสลายตัวในวันที่ 14 ของการทดลอง Xiong *et al.* (1996) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ myofibrillar proteins อันได้แก่ myosin heavy chain (MHC) α -actinin actin troponin-T (Tn-T) และ polypeptides ขนาด 30 kDa จากโคลูกผสมพันธุ์ Angus ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร ประกอบไปด้วย สูตรที่ 1 เลี้ยงด้วยหญ้าเพียงอย่างเดียว สูตรที่ 2 เลี้ยงด้วยหญ้าผสมเมล็ดธัญพืช และสูตรที่ 3 เลี้ยงด้วยหญ้าผสมเมล็ดธัญพืชร่วมกับการเสริม zeranol ซึ่งเป็นฮอร์โมนสังเคราะห์ในกลุ่ม estrogenic compound ทำการทดสอบในกล้ามเนื้อสะโพกพบใน (*Semimembranosus*) โดยบ่มเนื้อที่เวลา 0, 2, 5 และ 10 วัน ภายหลังสัตว์ตาย จากการศึกษาพบว่า

การเปลี่ยนแปลงของ myofibrillar proteins จากโคทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน โดยวันที่ 0 และ 2 ของการทดลองจะยังไม่พบการเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อหลังจากวันที่ 5 ไปแล้วจึงเริ่มพบความเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งพบว่า Tn-T และโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า MHC (คาดว่าคือ titin) จะมีปริมาณลดลง ในส่วนของ polypeptides ขนาด 30 kDa พบว่าจะมีปริมาณมากที่สุดในวันที่ 10 ของการทดลอง

Ho *et al.* (1997) รายงานว่า ผลจากการย่อยสลายของโปรตีนในกลุ่ม myofibrillar proteins ส่วนใหญ่แล้วมักพบการปรากฏของ polypeptides ที่มีขนาดประมาณ 30 kDa หรือ troponin-T product ซึ่ง polypeptides ขนาด 30 kDa นั้นสามารถพบได้ในกล้ามเนื้อโคทั่วไปภายหลังจากสัตว์ตาย ในขณะที่เดียวกันพบว่า troponin-T จะมีปริมาณลดลง และมีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน ซึ่ง Steen *et al.* (1997) กล่าวว่า การย่อยสลายของ โปรตีน troponin-T และการปรากฏขึ้นของ polypeptides ขนาด 30 kDa ในเวลาเดียวกันนั้น นับว่าเป็นตัวบ่งชี้ได้อย่างดีถึงการเกิดกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อสัตว์โดยเอนไซม์ calpains นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเพิ่มขึ้นของความนุ่ม

Steen *et al.* (1997) ศึกษาโคพันธุ์ Belgian Blue White ที่มีลักษณะ double-muscle โดยใช้ส่วนของกล้ามเนื้อ longissimus thoracis ที่บ่มเป็นเวลา 1, 5, 8 และ 12 วัน หลังสัตว์ตาย พบว่าโปรตีน titin, nebulin, desmin และ troponin-T จะสลายตัวตามระยะเวลาการบ่มที่นานขึ้น โดย troponin-T สลายตัวถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างวันที่ 1 ถึง 8 ของการบ่มและในวันที่ 8 ของการบ่มเนื้อค่าความเข้มข้นของ troponin-T จะมีความสัมพันธ์กับค่าความเข้มข้นของแถบแบน 30 kDa และค่าแรงตัดผ่านชิ้นเนื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงในช่วง 3 ชั่วโมงที่ 3 หลังจากสัตว์ตาย จะมีอัตราการสลายตัวของโปรตีน troponin-T เพิ่มขึ้นในขณะที่เนื้อที่มีอุณหภูมิสูงในช่วง 3 ชั่วโมงที่ 1 และ 3 หลังจากสัตว์ตายอัตราการสลายตัวของโปรตีน troponin-T จะลดลงในวันที่ 5 ของการบ่มทำให้เนื้อมีความนุ่มลดลง

Rhee *et al.* (2000) ศึกษาการใช้กระแสไฟฟ้าในการกระตุ้นซากและสภาวะของอุณหภูมิหลังจากสัตว์ตายที่มีผลต่อการสลายตัวของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อในกล้ามเนื้อ longissimus dorsi ของโคพื้นเมืองเกาหลี (*Bos taurus* x *Bos indicus*) โดยใช้อุณหภูมิที่ 2, 16 และ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมงหลังจากสัตว์ตายและทำการบ่มเนื้อที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1, 2, 3, 7 และ 14 วันหลังจากสัตว์ตาย พบว่าการใช้กระแสไฟฟ้าในการกระตุ้นซากร่วมกับการเก็บซากที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากสัตว์ตายเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมงนั้นเกิดการสลายตัวของ titin, nebulin, desmin และ troponin-T โดย titin จะสลายตัวได้ช้าที่สุดจากโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อทั้ง 4 ชนิด ส่วน troponin-T จะเริ่มพบการสลายตัวอย่างชัดเจนในวันที่ 2 และพบ polypeptides ขนาด 30 kDa ในวันที่ 7 หลังจากสัตว์ตาย ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้รับการกระตุ้นซากด้วยกระแสไฟฟ้าจะพบการสลายตัวของ troponin-T ในวันที่ 7 หลังจากสัตว์ตาย

Kończak *et al.* (2003) ศึกษาการสลายตัวของโปรตีนในเนื้อที่มีอายุแตกต่างกัน ได้แก่ ลูกโค โคสาว และแม่โค ที่ผ่านการบ่มที่ระยะเวลา 1, 6 และ 12 วันหลังจากสัตว์ตาย พบว่าการสลายตัวของโปรตีนในกลุ่มของ contractile α -actinin และโปรตีนกลุ่มควบคุม (regulatory protein) ไม่มีความแตกต่างกันในโคแต่ละกลุ่ม ยกเว้น troponin-T และจะพบการปรากฏของ polypeptides ขนาด 30 kDa ในกลุ่มของลูกโคเร็วที่สุดตรงลงไปเป็นโคสาว และแม่โค ในด้านการย่อยสลายโปรตีน เส้นใยกล้ามเนื้อในแม่โคจะสลายได้ต่ำที่สุดและสูงสุดในลูกโค ทำให้ความนุ่มของเนื้อในลูกโคมีค่าสูงที่สุด Ilian *et al.* (2004) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความนุ่มของเนื้อกับการย่อยสลายของโปรตีน nebulin และ desmin ในช่วงเวลาการบ่มเนื้อ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วันหลังสัตว์ตาย จากผลการทดลองทำให้ทราบว่า nebulin เริ่มมีการสลายตัวในวันที่ 2 ของการทดลอง และหลังจากวันที่ 3 ไปแล้วจะไม่พบการปรากฏของแถบโปรตีน nebulin อีก ส่วน desmin นั้นจะมีอัตราการสลายตัวที่ช้ากว่า โดยเริ่มมีการสลายตัวประมาณวันที่ 3-5 ของการทดลอง เมื่อนำมาทำการหาความสัมพันธ์ระหว่างการสลายตัวของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดพบว่ามีความสัมพันธ์เท่ากับ 0.932 และ 0.511 ตามลำดับ

ชนิดของโปรตีน troponin-T

ชนิดของโปรตีน Tn-T ในกล้ามเนื้อสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม ตามชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ โดยเส้นใยกล้ามเนื้อ type I จะพบโปรตีน Tn-T ชนิด slow Tn-T ส่วนเส้นใยกล้ามเนื้อ type IIa และ type IIb จะพบโปรตีน Tn-T ชนิด fast Tn-T (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 ชนิดของโปรตีน troponin-T โดยแบ่งตามชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ

	ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ		
	Type I	Type IIa	Type IIb
ชนิดของโปรตีน Tn-T	Tn-T 1s	Tn-T 1f	Tn-T 1f
	Tn-T 2s	Tn-T 3f	Tn-T 2f
		Tn-T 4f	

ที่มา: ดัดแปลงจาก Choi and Kim (2009)

Muroya *et al.* (2006) ศึกษาความแตกต่างการย่อยสลายของโปรตีน troponin-T จากกล้ามเนื้อสันนอกในโคพันธุ์ Japanese Black ที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 1, 5 และ 14 วัน หลังสัตว์ตาย ด้วยเทคนิค western blot โดยการจำแนกประเภทของ troponin-T ออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม fast troponin-T ประกอบไปด้วย polypeptide ที่มีขนาด 36.5, 35.4, 34.8 และ 32.8 kDa และกลุ่ม slow troponin-T ประกอบด้วย polypeptide ที่มีขนาด 34.5 และ 32.1 kDa เมื่อศึกษาในเรื่องของการย่อยสลายแล้ว

พบว่า fast troponin-T จะเริ่มมีการย่อยสลายของ troponin-T ในวันที่ 1 ของการบ่ม และพบว่ามี polypeptide ที่มีขนาด 32.1, 30.9, 29.6, 28.3, 27.4, 26.9 และ 26.0 kDa ปรากฏขึ้น และมีปริมาณมากขึ้นในทุกๆ ระยะของการบ่ม ในขณะที่กลุ่ม slow troponin-T พบว่าเริ่มมีการย่อยสลายของ troponin-T ในวันที่ 1 ของการบ่มเช่นกัน และมี polypeptide ที่มีขนาด 31.0 kDa ปรากฏขึ้น

2.4 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายโปรตีนภายหลังสัตว์ตาย

ความนุ่มของเนื้อที่เพิ่มขึ้นภายหลังสัตว์ตายเป็นผลมาจากโปรตีนในกล้ามเนื้อถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ภายในเซลล์ (endogenous proteolytic enzymes) เรียกกระบวนการนี้ว่า กระบวนการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย (post mortem proteolysis) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เนื้อมีความนุ่มมากขึ้นระหว่างการบ่ม (Sentandreu *et al.* 2002) ปัจจุบันพบว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อภายหลังสัตว์ตายอยู่ 3 กลุ่ม (Thomas *et al.* 2004)

ตารางที่ 2.2 กลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อภายหลังสัตว์ตาย

กลุ่มเอนไซม์	แหล่งที่พบ	pH ที่เหมาะสม
Cathepsin	lysosomes	
Cathepsin B		5.5-6.5
Cathepsin D		3.0-5.0
Cathepsin H		6.5-6.8
Cathepsin L		5.5-6.5
Proteasome	cytoplasm	7.0-7.5
Calpain	cytoplasm	7.0-7.5

ที่มา : ดัดแปลงจาก Sentandreu *et al.* (2002)

Cathepsins ทำงานได้ดีในเนื้อที่มีสภาพเป็นกรด หรือ ค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อต่ำกว่า 5 (pH < 5.0) โดยเอนไซม์ตัวนี้จะพบได้ภายใน lysosome ของเซลล์กล้ามเนื้อ หรือ เส้นใยกล้ามเนื้อ เอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วย cathepsins D B L และ H (Uytterhaegen. 1994) ภายหลังสัตว์ตายถ้าค่า pH อยู่ในสภาพเป็นกรดจะทำให้ pH ภายในเซลล์ลดลงด้วยทำให้ถุง lysosome แตกออก เอนไซม์นี้ออกมาอยู่ในบริเวณไซโตพลาสซึม (Thomas *et al.* 2004, Cheret *et al.* 2007) การศึกษาของ Koohmaraie (1994) รายงานว่าเอนไซม์ชนิดนี้ไม่มีความสำคัญต่อการย่อยโปรตีนในกล้ามเนื้อเท่าใดนัก เป็นเพราะหากต้องการให้เอนไซม์นี้สามารถทำงานได้จะต้องทำให้ออกจาก lysosome มาสู่ cytosol โดยจากที่ได้ทำการทดลองพบว่า แม้จะมีการกระตุ้นซากด้วยกระแสไฟฟ้า

แล้วนำซากนั้นไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลาถึง 28 วัน ก็ตาม cathepsins จะยังคงอยู่ภายใน lysosome คงเดิม

Proteasome เป็นเอนไซม์ที่เข้าย่อยสลายเฉพาะ troponin-C และเส้นใย myosin เท่านั้น และทำงานได้ดีในสภาวะความเป็นกรด-ด่าง 7.5-8.0 ที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ดังนั้นบทบาทของเอนไซม์ในระบบนี้จึงไม่เด่นชัดมากนักต่อการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตายที่ทำให้เนื้อเกิดความนุ่ม เนื่องจากสภาวะของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตายไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในระบบนี้ Sentandreu *et al.* (2002) และ Kemp *et al.* (2010) รายงานว่าเอนไซม์กลุ่มนี้ทำงานเกี่ยวข้องกับการควบคุมทางชีวเคมีพื้นฐานภายในเซลล์ เป็นเอนไซม์ที่เข้าย่อยโปรตีนได้ทั้งบริเวณ cytosol และภายในนิวเคลียสของเซลล์โครงสร้างกล้ามเนื้อ

Calpain เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเป็นอย่างมากต่อการย่อยโปรตีนในเนื้อ มีผลทำให้เนื้อเกิดความนุ่มขึ้น ทำงานได้ดีในสภาวะค่า pH ประมาณ 7.0-7.5 เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 14 ตัว แต่มี 2 ตัวที่มีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อสัตว์ตาย ได้แก่ Calpain I หรือ μ -calpain และ Calpain II หรือ m-calpain ซึ่งถูกกระตุ้นการทำงานโดย Ca^{2+} (Goll *et al.* 2003) calpain เป็นเอนไซม์ที่ทำงานอยู่ในบริเวณ sarcoplasm เพียงชนิดเดียวที่มีบทบาทในกระบวนการทำให้เนื้อนุ่ม ภายหลังจากสัตว์ตาย เอนไซม์ m-calpain เป็นเอนไซม์ที่ต้องการความเข้มข้นของ Ca^{2+} ในระดับโมล (mole) หรือ 200-300 μM มาเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำงาน ส่วน μ -calpain เป็นเอนไซม์ที่ต้องการความเข้มข้นของ Ca^{2+} ในระดับมิลลิโมล (millimole) หรือ 10 μM มาเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำงาน (Morgan *et al.* 1993) และ μ -calpain จะถูกกระตุ้นให้ย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อก่อนเอนไซม์ m-calpain ภายใน 3 วันหลังสัตว์ตาย (Taylor *et al.* 1995) โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีบทบาทที่สำคัญมากในการย่อยสลายโปรตีนของกล้ามเนื้อภายหลังจากสัตว์ตาย เนื่องจากจะเข้าสลายโปรตีนบริเวณ Z-line (μ -calpain เข้าย่อยสลายโปรตีน ณ บริเวณ Z-line = 66% บริเวณ I-band = 20% และบริเวณ A-band = 14%) (Koochmaraie. 1994)

การทำงานของ calpains จะถูกยับยั้งโดย calpastatin ซึ่งยับยั้งการทำงานและ ควบคุมอัตราและปริมาณการทำงานของ calpain ได้ถึง 85% ในช่วงที่ pH ประมาณ 7.0 แต่เมื่อ pH มีค่าอยู่ที่ประมาณ 5.5 การยับยั้งจะลดลงเหลือ 33% ในขณะที่การเปลี่ยนแปลง pH ที่เกิดระหว่าง 6.5-5.7 μ -calpain จะถูกกระตุ้นให้ทำปฏิกิริยาเพิ่มจาก 15% เป็น 97% แต่เมื่อ pH มีค่าเท่ากับ 5.7 μ -calpain จะเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยาถึง 60% ในขณะที่ m-calpain ทำปฏิกิริยาได้อย่างเต็มที่ (Zhou *et al.* 2007) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Maddock *et al.* (2005) ที่ได้ทำการศึกษาดังประสิทธิภาพในการทำงานของ μ -calpain ที่ระดับ pH ต่างกัน 3 ระดับคือ pH 7.5, 6.5 และ 6.0 โดยบันทึกผลในการเกิดปฏิกิริยาของ μ -calpain ไว้ 2 ช่วงเวลา คือที่เวลา 30 และ 60 นาที จากผลการศึกษาพบว่า μ -calpain สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ค่า pH 6.5 ทั้งนี้ Huff-Lonergan and Lonergan. (2005) กล่าวว่าในขณะที่เกิด rigor mortis โดย Ca^{2+} ที่ถูกขับออกมาจาก sarcoplasmic reticulum จะมี

บทบาทร่วมกับ calpains ในการทำให้เนื้อนุ่มได้ Pringle *et al.* (1997) ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ calpains ที่ช่วยย่อยสลายโปรตีนในเนื้อ ซึ่งมีผลต่อคุณภาพเนื้อของโคลูกผสมพันธุ์ Angus (*Bos taurus*) และพันธุ์ Brahman (*Bos indicus*) พบว่าโคลูกผสมที่มีระดับเลือด Brahman สูงขึ้น 0, 25, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเอนไซม์ μ -calpain ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปริมาณเอนไซม์ calpastatin และสัดส่วนของ calpastatin: μ -calpain เพิ่มขึ้นเมื่อระดับเลือดโค Brahman สูงขึ้น และพบว่าปริมาณเอนไซม์ μ -calpain มีค่าสหสัมพันธ์ทางลบกับค่าคะแนนทดสอบระดับความนุ่มด้วยประสาทสัมผัสจากการชิม ($p < 0.01$) ซึ่งสอดคล้องกับ Wheeler *et al.* (1990) รายงานว่าปริมาณ calpastatin จะสัมพันธ์กับระดับเลือดของโค Brahman โดยปริมาณ calpastatin จะเพิ่มขึ้นและสัดส่วนของ calpastatin: μ -calpain จะสูงขึ้นเมื่อระดับเลือดโค Brahman เพิ่มขึ้นเป็นผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ calpains ในกระบวนการ proteolysis ทำงานได้น้อย ส่งผลทำให้เนื้อมีความนุ่มลดลง นอกจากนี้ Marais *et al.* (2007) กล่าวว่า calpain มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนในกลุ่ม myofibrillar proteins เช่น titin, nebulin, desmin, tropomyosin และ troponin-T ทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก

2.5 ความสัมพันธ์ของ calpastatin และเอนไซม์ calpain ที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อสัตว์

Koohmaraie *et al.* (1991) กล่าวว่า ความสัมพันธ์ระหว่างความนุ่มของเนื้อกับปริมาณ calpastatin: calpain ในสัตว์แต่ละชนิดจะไม่เท่ากันโดยสามารถเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ ดังนี้ ในเนื้อโค > เนื้อแกะ > เนื้อสุกร การที่เนื้อโคมีความเหนียวมากกว่าสัตว์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีปริมาณ calpastatin ในกล้ามเนื้อมากกว่า และพบว่าเนื้อโคที่มีระดับเลือดของสายพันธุ์ *Bos indicus* อยู่ในระดับที่สูงกว่าจะมีความเหนียวมากกว่า และจากองค์ประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อของโค *Bos indicus* จะมีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber เป็นองค์ประกอบของมัดกล้ามเนื้ออยู่สูง จึงมีเอนไซม์ calpain ในปริมาณที่สูงและในขณะเดียวกันปริมาณของ calpastatin ซึ่งทำหน้าที่ในการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ calpain จะมีอยู่สูงเช่นกัน (Geesink *et al.* 2006)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การใช้สารเร่งการเจริญเติบโตมีผลต่อความนุ่มของเนื้อสัตว์ ซึ่งทราบได้จากการศึกษาของ Luno *et al.* (1999) ที่ทำการศึกษาผลของการใช้สาร clenbuterol (Clenbuterol) ที่มีผลต่อปริมาณเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อโคชาร์โลเลส์เพศเมีย อายุ 8 เดือน ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารและไม่ได้รับสาร (กลุ่มควบคุม) โดยพบว่าการใช้สาร clenbuterol มีผลต่อปริมาณเอนไซม์ μ -calpain ในกล้ามเนื้อสันนอกที่ 3 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย ซึ่งโคที่ได้รับสาร clenbuterol จะมีปริมาณเอนไซม์ μ -calpain ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม ถึง 31 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) แต่จะไม่พบความแตกต่างในส่วนเอนไซม์ m-calpain ในขณะที่โคที่ได้รับสาร clenbuterol

เทอรอลจะมีปริมาณ calpastatin สูงกว่าโคในกลุ่มควบคุม และเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ calpastatin ขึ้น 49 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสัดส่วนของเอนไซม์ μ -calpain : calpastatin มีปริมาณลดลงถึง 53 เปอร์เซ็นต์ จึงแสดงให้เห็นว่าการใช้สาร β -adrenergic agonists มีผลต่อการลดลงของปริมาณ เอนไซม์ย่อยโปรตีนในเนื้อสัตว์ ซึ่งสอดคล้องกับ Geesink *et al.* (1993) และ Koohmarie *et al.* (1991) ที่พบว่า การใช้สารเบต้า-อะโกนิสต์ มีผลทำให้เอนไซม์ μ -calpain ที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย myofibrillar protein เพื่อทำให้เนื้อนุ่มภายหลังสัตว์ตายลดน้อยลง และสารดังกล่าวจะไม่มีส่วนในการเพิ่มปริมาณ calpastatin ซึ่งทำหน้าที่ในการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ calpain

จากการศึกษาพบว่าค่า heritability ของ calpastatin มีค่าเท่ากับ 0.70 (Marshall. 1994) ส่วนค่า heritability ของ calpastatin ที่มีผลต่อความนุ่มมีค่าประมาณ 0.40-0.64 และผลที่มีต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (WBSF) มีค่าเท่ากับ 0.50 ค่า heritability ของ calpastatin activity (CA), intramuscular fat (IMF), Warner-Bratzler Shear (WBS) force, retail product yield (RPY) และ ADG มีค่าเท่ากับ 0.65, 0.93, 0.53, 0.45 และ 0.32 ตามลำดับ จึงอาจกล่าวได้ว่าการคัดเลือกมีส่วนช่วยในการปรับปรุง CA, IMF และ WBS โดยการคัดเลือกให้มี CA น้อยลงจะสามารถเพิ่ม IMF ซึ่งมีผลต่อความนุ่มที่จะเพิ่มขึ้นได้ (Shackelford *et al.* 1994) โคที่มีระดับเลือดของ *Bos indicus* สูงกว่า 50% จะส่งผลให้เนื้อที่ได้มี marbling scores ต่ำกว่า ส่วน genetic correlations ระหว่าง CA กับ WBS, RPY และ ADG มีค่าเท่ากับ 0.50, 0.44 และ -0.52 ตามลำดับ (Pringle *et al.* 1997) สัดส่วนของ calpastatin : μ -calpain จะสูงขึ้นเมื่อระดับเลือดของพันธุ์ราห์มันเพิ่มขึ้น หรืออาจกล่าวได้ว่าการที่ calpastatin มีปริมาณเพิ่มขึ้นภายหลังสัตว์ตายจะมีผลทำให้เอนไซม์ calpain ทำงานได้น้อยลงและจะส่งผลให้ความนุ่มของเนื้อสัตว์ลดลงด้วย (Pringle *et al.* 1997) โคที่มีระดับเลือด 3/8 *Bos indicus* มีปริมาณ calpastatin ที่ระยะ 24 ชั่วโมงหลังสัตว์ตายมากกว่าโคสายพันธุ์ *Bos taurus* อย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเปรียบเทียบโคลูกผสมที่มีระดับเลือด 3/8 *Bos indicus* ในแต่ละสายพันธุ์พบว่าปริมาณ calpastatin ที่ระยะ 24 ชั่วโมงหลังสัตว์ตายของโคพันธุ์ราห์ฟอร์ดสูงกว่าโคพันธุ์ซิมบราห์ ($p < 0.05$) แต่ทั้ง 2 ชนิดไม่แตกต่างจากโคพันธุ์เรดแบรกกัส ส่วนผลของการทดสอบโดยการตรวจชิมและการวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อโคพบว่าสายพันธุ์ไม่มีผลต่อการทดสอบ แต่มีแนวโน้มว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อของโคพันธุ์ราห์ฟอร์ดสูงกว่าพันธุ์เรดแบรกกัสและซิมบราห์ตามลำดับ (O'Conner *et al.* 1997)

Steen *et al.* (1997) ได้ทำการศึกษาการทำงานของ calpain และ calpastatin ที่เกี่ยวข้องกับความนุ่มของเนื้อโคที่มีลักษณะ double muscle ภายหลังสัตว์ตาย โดยพบว่าที่ 24 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตายค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่สูงขึ้นนั้นจะสัมพันธ์กับปริมาณของ calpastatin ที่เพิ่มขึ้นส่วนปริมาณของ calpain กลับพบว่าปริมาณน้อยกว่า calpastatin และไม่พบการทำงานของ μ -calpain ภายหลังจากสัตว์ตายที่ 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการทดลองของ Boehm *et al.* (1998) พบว่าปริมาณ m-calpain จะค่อย ๆ ลดลงประมาณ 63 เปอร์เซ็นต์ ในระหว่างการเก็บเนื้อ ขณะที่ปริมาณ μ -calpain จะลดลง 20 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง และหลังจากนั้นอีก 7 วัน จะมีปริมาณเหลืออยู่น้อยกว่า 4 เปอร์เซ็นต์

ของปริมาณตั้งต้น ส่วนปริมาณ calpastatin จะลดลงอย่างรวดเร็วจากประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง และหลังจากนั้นอีก 7 วัน ภายหลังสัตว์ตายจะมีปริมาณ calpastatin เหลืออยู่เพียง 30 เปอร์เซ็นต์

ปิยะดา ทวีศรี (2550) ได้ทำการตรวจสอบปริมาณโปรตีน calpastatin ด้วยวิธี indirect ELISA จากโปรตีนสกัดของเนื้อโคพันธุ์กำแพงแสนที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน ด้วย calpastatin ซิรัมผลิตในกระต่าย โดยเจือจางโปรตีนสกัดจากเนื้อโคให้มีความเข้มข้น 1:200 และใช้ ซิรัมที่ถูกกระตุ้นด้วย pET-28a.1AD recombinant protein เป็น antibodies โดยเจือจางที่ความเข้มข้น 1: 1,600 ผลการทดลองพบว่าเนื้อโคที่เก็บเป็นระยะเวลา 0 วัน มีค่า O.D._{650nm} สูงกว่าเนื้อโคที่เก็บ 7, 14, 21 และ 28 วัน เนื่องจากมีปริมาณโปรตีน calpastatin สูงกว่า แต่เมื่อระยะเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น ปริมาณโปรตีน calpastatin จะลดลง โดยพบว่าเนื้อโคที่ระยะเวลาการบ่ม 14, 21 และ 28 วัน มีค่า O.D._{650nm} แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นเนื้อที่เก็บไว้ที่ระยะเวลาการบ่ม 14, 21 และ 28 วัน จึงมีปริมาณโปรตีน calpastatin ใกล้เคียงกัน ซึ่งจากรายงานของ Koohmarie *et al.* (1995) พบว่าปริมาณโปรตีน calpastatin ในเนื้อสันนอกของแกะจะลดลงมากที่สุด 62 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 7 วันหลังสัตว์ตาย ดังนั้นหากต้องการเก็บรักษาเนื้อโคให้ปริมาณโปรตีน calpastatin ลดลงซึ่งจะส่งผลให้เนื้อที่ได้มีความนุ่มขึ้น สามารถใช้เวลาในการเก็บเนื้อไว้เพียง 14 วันก็เพียงพอที่จะลด ปริมาณโปรตีน calpastatin ให้อยู่ในระดับต่ำ

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

3.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1.1 กลุ่มโคทดลอง

กลุ่มโคพื้นเมืองภาคเหนือตอนล่าง เป็นโคลูกผสมพื้นเมืองและบราห์มันเพศผู้ มีเลือดโคพื้นเมืองไม่ต่ำกว่า 62.5 เปอร์เซนต์ เลี้ยงอยู่ทั่วไปในจังหวัดตาก เป็นกลุ่มโคที่ถูกคัดเลือกโดยกลุ่มเกษตรกรก้าวหน้าโดยเลี้ยงแบบขังคอกรวมฝูงมีบริเวณให้เดินเล่น เลี้ยงด้วยอาหารหยาบสดโดยตัดมาจากแปลงปลูกหญ้ารวม ซึ่งมีหญ้าแพงโกล่า หญ้าลูซี่ และถั่วฮามาตา เป็นระยะเวลาประมาณ 1 ปี จนได้น้ำหนักตัวประมาณ 250-300 กิโลกรัม อายุเฉลี่ย 2-2.5 ปี ถูกส่งเข้าโรงฆ่าศูนย์วิจัยและปรับปรุงพันธุ์สัตว์ จังหวัดตาก

กลุ่มโคพื้นเมืองภาคกลางเป็นกลุ่มโคพื้นเมืองที่เลี้ยงแบบปล่อยหากินหญ้าตามธรรมชาติ ตามพื้นที่ราบเชิงเขาในจังหวัดกาญจนบุรี เป็นโคพื้นเมืองเพศผู้จำนวน 8 ตัว จนได้น้ำหนักตัวประมาณ 150-180 กิโลกรัม อายุเฉลี่ย 2-2.5 ปี ถูกคัดเลือกส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

กลุ่มโคพื้นเมืองภาคอีสานเป็นกลุ่มโคพื้นเมืองที่เลี้ยงแบบปล่อยหากินหญ้าตามธรรมชาติ ตามพื้นที่ราบเชิงเขา บนเขา นานหญ้าในจังหวัดอุบลราชธานี เป็นโคเพศผู้จำนวน 10 ตัว จนได้น้ำหนักตัวประมาณ 180-200 กิโลกรัม อายุเฉลี่ย 2-2.5 ปี ถูกคัดเลือกส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์เทศบาล อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

กลุ่มโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน เป็นเพศผู้ จำนวน 8 ตัว เลี้ยงแบบขังคอกมีบริเวณให้เดินเล่น ตัดหญ้าจากแปลงปลูกหญ้าแพงโกล่ามาให้กินเป็นระยะเวลาประมาณ 13 เดือน จนได้น้ำหนักตัวประมาณ 300 กิโลกรัม อายุเฉลี่ย 2-2.5 ปี ถูกคัดเลือกส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

กลุ่มโคขุนลูกผสมเลือดยุโรปเป็นโคทดลองที่มาจากโคลูกผสมระหว่างเลือด Taurus และ Indicus แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นโคลูกผสมที่มีระดับเลือดซิมเมนทอล 62.5 เปอร์เซนต์ คละเพศ จำนวน 6 ตัว (5/8 Simmental) กลุ่มที่ 2 มีระดับเลือดซิมเมนทอล 25 เปอร์เซนต์ คละเพศจำนวน 3 ตัว (2/8 Simmental) โดยเลือด Indicus เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ Sahiwal หรือ Brahman กับโคพื้นเมือง ซึ่งเลี้ยงภายใต้ระบบการผลิตของสหกรณ์โคนมโพนยางคำ โดยมีการให้อาหารข้นตลอดช่วงเวลา 10-14 เดือน ร่วมกับฟางข้าวและหญ้าสด ทั้งนี้มีการเสริมกากน้ำตาลให้กินร่วมด้วยเป็นเวลา 6 เดือน ก่อนส่งเข้าโรงฆ่าโดยโคมีน้ำหนักเข้าฆ่าเฉลี่ย 560 กิโลกรัม เข้าฆ่าที่โรงฆ่าสหกรณ์โพนยางคำ จังหวัดสกลนคร และมีคะแนนไขมันแทรกเท่ากัน คืออยู่ที่ระดับ 3

ตารางที่ 3.1 คุณลักษณะและระบบการเลี้ยงของสัตว์ทดลอง

กลุ่มโค	สายพันธุ์	ระบบการเลี้ยง	อาหาร	อายุ (ปี)	น้ำหนักมีชีวิต (กิโลกรัม)
จังหวัดตาก	ลูกผสมพื้นเมืองและบราห์มันเพศผู้ (พื้นเมืองไม่ต่ำกว่า 62.5 เปอร์เซ็นต์)	แบบขังคอกรวมฝูงมีบริเวณให้ เดินเล่น	เลี้ยงด้วยอาหารหยาดสด หญ้าแพงโกเล่า หญ้าธูซี่ และถั่วสามตา	2-2.5	250-300
จังหวัดอุบลราชธานี	โคพันธุ์พื้นเมืองไทย	เลี้ยงปล่อยแทะเล็มหญ้าตามธรรมชาติ	หญ้าตามธรรมชาติ	2-2.5	180-200
จังหวัดกาญจนบุรี	โคพันธุ์พื้นเมืองไทย	เลี้ยงปล่อยแทะเล็มหญ้าตามธรรมชาติ	หญ้าตามธรรมชาติ	2-2.5	150-180
โคขาวลำพูน	โคพันธุ์พื้นเมืองไทย	แบบขังคอกมีบริเวณให้เดินเล่น	หญ้าจากแปลงปลูกหญ้าแพงโกเล่า	2-2.5	300
โคลูกผสมเลือดยุโรป (โคขุนโพนยางคำ)	62.5 % ซิมเมนทอล x 25.0 % ชาฮิวาลหรือบราห์มัน 12.5 % พื้นเมือง	ภายใต้การผลิตของสหกรณ์การเลี้ยง ปศุสัตว์ กรป.กลาง โพนยางคำ	อาหารข้นร่วมกับหญ้าสดหรือฟางข้าวและเสริม กากน้ำตาลหลังจากขุนไปแล้ว 6 เดือน	~5	560
โคลูกผสมเลือดยุโรป (โคขุนโพนยางคำ)	25.0 % ซิมเมนทอล x 50.0 % ชาฮิวาลหรือบราห์มัน 25.0 % พื้นเมือง	ภายใต้การผลิตของสหกรณ์การเลี้ยง ปศุสัตว์ กรป.กลาง โพนยางคำ	อาหารข้นร่วมกับหญ้าสดหรือ ฟางข้าวและเสริมกากน้ำตาลหลังจากขุนไปแล้ว 6 เดือน	~5	560



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



(จ)

ภาพที่ 3.1 แสดงลักษณะของโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา

ก คือ โคพื้นเมืองกลุ่มภาคเหนือจากจังหวัดตาก

ข คือ โคพื้นเมืองกลุ่มภาคอีสานจากจังหวัดอุดรราชธานี

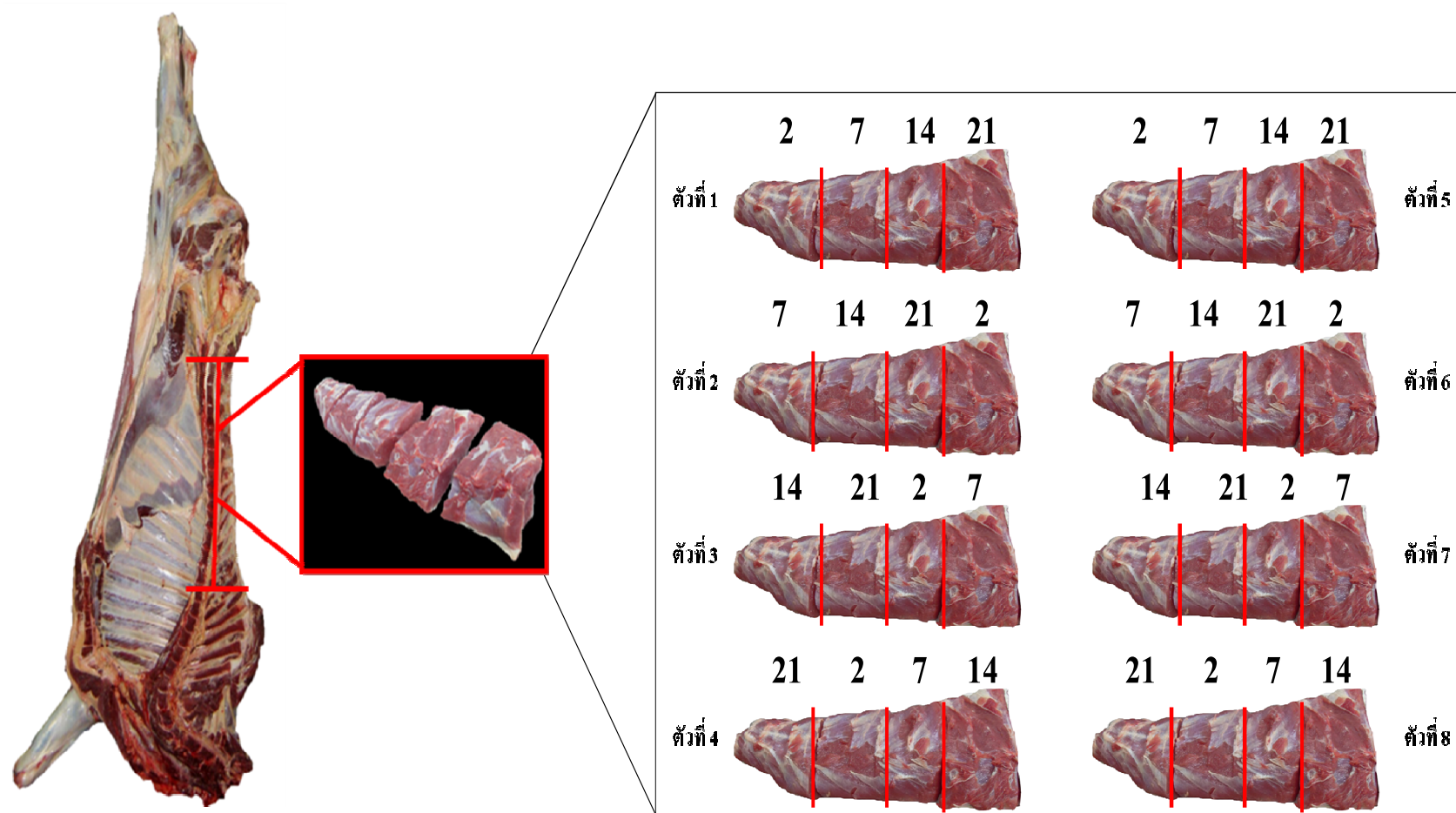
ค คือ โคพื้นเมืองกลุ่มภาคใต้จากจังหวัดกาญจนบุรี

ง คือ โคพันธุ์ขาวลำพูน จากจังหวัดชัยนาท

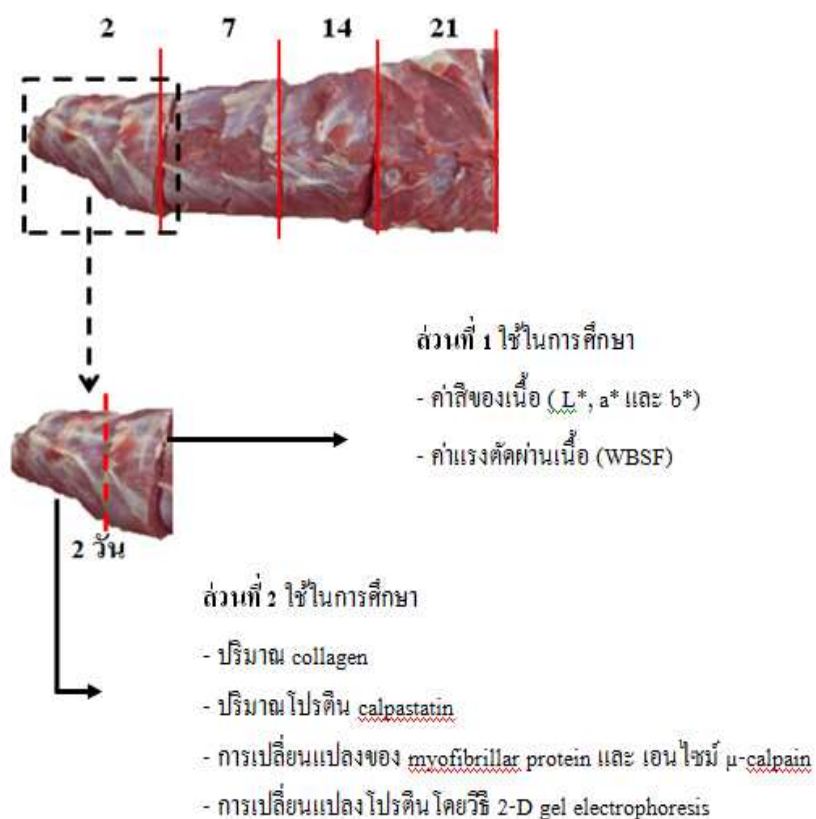
จ คือ โคลูกผสมเลือดยุโรป (โคขุนโพนยางคำ)

3.1.2 การเก็บตัวอย่างเนื้อ

เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) จากซากซีกซ้าย โดยเก็บตัวอย่างเนื้อจำนวน 100 กรัม (24 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย) เพื่อนำไปศึกษาชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ จากนั้นเมื่อครบระยะเวลา 48 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย ทำการตัดแต่งซากโดยเอาแต่กล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) บริเวณซี่โครงคู่ที่ 6 จนถึงปลายกระดูกสันหลัง มาทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอุณหภูมิที่ 48 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย (2 วัน) จากนั้นทำการตัดแบ่งกล้ามเนื้อสันนอกออกเป็น 4 ชิ้น (ภาพที่ 3.2) ให้ได้รูปแบบชิ้นเนื้อสแต็กหนา 2.5 เซนติเมตร ตามระยะเวลาการบ่มที่ 2, 7, 14 และ 21 วัน ภายหลังสัตว์ตาย โดยนำชิ้นเนื้อที่ระยะเวลาการบ่มที่ 7, 14 และ 21 วัน ไปบรรจุถุงสุญญากาศเพื่อทำการบ่มให้ครบตามระยะเวลาการบ่มที่กำหนด ในขณะที่ชิ้นเนื้อที่ระยะเวลาการบ่มที่ 2 วัน จะถูกนำมาทดสอบในทันที โดยทำการแบ่งตัวอย่างเนื้อออกเป็น 2 ส่วน (ภาพที่ 3.3) เพื่อนำไปศึกษาในเรื่องของค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Warner-Bratzler Shear force; WBSF) ค่าสีของเนื้อ (L^* , a^* และ b^*) ปริมาณ collagen ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของไมโอไฟบริลล่าโปรตีน (myofibrillar protein) ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และเทคนิค western blot วิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนในเนื้อโคด้วย 2-D gel electrophoresis (2D-gel) ปริมาณ โปรตีน calpastatin ด้วยเทคนิค Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (iELISA) และการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอนไซม์ μ -calpain โดยเทคนิค western blot แบ่งตัวอย่างได้ดังนี้



ภาพที่ 3.2 แสดงตำแหน่งของการสับตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกจากซากซิกซ่าย ตามระยะเวลาการบ่มเนื้อ 2, 7, 14 และ 21 วันภายหลังกระบวนการฆ่า



ภาพที่ 3.3 แสดงการเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกเพื่อศึกษาคุณภาพของเนื้อ

3.2. การศึกษาคุณภาพเนื้อและปริมาณ collagen ในเนื้อโคที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน

3.2.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และสีของเนื้อโค

1. ภายหลังจากบ่มเนื้อไว้ 2 วัน ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ของทุกระยะเวลาการบ่ม คือ 7, 14 และ 21 วัน (เนื้อในส่วนที่ 1) นำมาวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter (EUTECH pH Spear, Electrode : Mettler Toledo inLab® Solid)

2. วัดค่าสีของก้อนเนื้อจากข้อที่ 1 โดยนำมาตัดบริเวณผิวหนังหน้าตัดเนื้อให้หนาประมาณ 1.5 เซนติเมตร จากนั้นปล่อยให้ผิวหนังที่ถูกตัดนั้นสัมผัสกับอากาศนาน 45 นาที (Goñi *et al.* 2007) แล้วจึงนำมาวัดค่าสีของเนื้อโค (L^* , a^* และ b^*) ด้วยเครื่องวัดสี Minolta Chromameter CR-300

3.2.2 การศึกษาความนุ่มของเนื้อโดยวิธีวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Warner-Bratzler shear force; WBSF)

1. ทำการวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อตามวิธีการของ Boccard *et al.* (1981) โดยนำตัวอย่างเนื้อโคพื้นเมืองแต่ละกลุ่มที่ครบระยะเวลารบ่มที่ 2, 7, 14 และ 21 วันหลังการฆ่า (เนื้อในส่วนที่ 1) ออกจากถุงสุญญากาศมาตัดแต่งเอาพังผืดและไขมันออก
2. จากนั้นตัดชิ้นเนื้อเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าหนา 2.5 เซนติเมตร นำใส่ถุงพลาสติกแล้วทำการไล่อากาศออกให้หมดด้วยเครื่องบรรจุสุญญากาศ ก่อนนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath, Memmert, Germany) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส
3. วัดอุณหภูมิใจกลางชิ้นเนื้อให้ได้ 70-75 องศาเซลเซียส
4. จากนั้นลดอุณหภูมิโดยการแช่ในน้ำที่ไหลผ่าน ให้ใจกลางเนื้อมีอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องนำชิ้นเนื้อออกจากถุง
5. นำชิ้นเนื้อที่ลดอุณหภูมิแล้วมาตัดตามแนวยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อ เป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด กว้าง x ยาว x หนา เท่ากับ 1 x 3 x 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตัวอย่างละ 10 ชิ้น
6. นำไปวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อด้วยเครื่องวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Instron model 1011, USA) โดยกำหนดหน่วยเป็นกิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร (kg/cm^2)

3.2.3 การศึกษาปริมาณ collagen ในเนื้อโคที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน

3.2.3.1 การสกัดตัวอย่างเนื้อโค

1. นำตัวอย่างเนื้อที่ผ่านการบ่มที่ระยะเวลา 2, 7, 14, 21 และ 30 วัน ตัวอย่างละ 0.95 กรัม บดให้ละเอียดร่วมกับ 1/4 Ringer solution (32.75 mM NaCl, 0.5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5 mM KCl) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง homogenizer ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วินาที
2. ต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 77 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใส และส่วนที่ตกตะกอน ใส่ใน test tube เพื่อนำไปหาปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ (soluble collagen) และคอลลาเจนที่ไม่ละลาย (insoluble collagen) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Hill, 1966)

3.2.3.2 ขั้นตอนการย่อย

1. นำหลอดสารละลายส่วนใส เติม 12N HCl ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และหลอดส่วนที่ตกตะกอน เติม 6N HCl ปริมาตร 8 มิลลิลิตร
2. จากนั้นนำไปต้มใน Oil bath ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. เมื่อครบกำหนดทำการเติมผงถ่าน (activated carbon) และกรองด้วยกระดาษกรอง จากนั้นทำการปรับค่า pH ให้ได้ประมาณ 6.5 – 7.0 และปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นใน volumetric flask เพื่อนำไปหาปริมาณคอลลาเจนต่อไป

3.2.3.3 ขั้นตอนการหาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน

1. คัดสารละลายที่ได้จากขั้นตอนการย่อย มาตัวอย่างละ 4 มิลลิลิตร ใส่ใน test tube แล้วเติม Chloramine T reagent หลอดละ 2 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที
2. เติม Color reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปให้ความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาให้นำไปผ่านน้ำประมาณ 2-3 นาที
3. นำไปหาค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 558 nm และทำการคำนวณหาปริมาณคอลลาเจนมีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมของเนื้อสด (mg/g)

3.2.3.4 การทำกราฟมาตรฐานของไฮดรอกซีโพรลีน (standard hydroxyproline)

1. นำสารละลาย hydroxyproline ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้นของ hydroxyproline เท่ากับ 0.5, 1, 2, 3 และ 4 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร
2. จากนั้นนำสารละลายที่มีความเข้มข้นของ hydroxyproline ที่แตกต่างกัน ไปเข้าขั้นตอนการหาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน
3. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากขั้นตอนการหาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของแต่ละตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน มาสร้างกราฟมาตรฐานและคำนวณสมการถดถอย โดยกำหนดให้ค่า x เป็นค่าความเข้มข้นของ hydroxyproline และค่า y เป็นค่าดูดกลืนแสง ซึ่งมีสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณคอลลาเจน mg/g ของเนื้อสด} = \frac{c \times f \times 7.25}{1000 \times w}$$

c = ความเข้มข้นของ hydroxyproline

f = จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายที่ได้จากการย่อย

w = น้ำหนักตัวอย่าง

3.3. การศึกษาชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อในโคที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน

3.3.1 การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ

1. เก็บตัวอย่างเนื้อสันนอกบริเวณซี่โครงซี่ที่ 12-13 และตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาด 1x1x1 เซนติเมตร
2. นำชิ้นเนื้อไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวหุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และนำไปทำการศึกษาต่อไป

3.3.2 การตัดชิ้นเนื้อ

1. ทำการปรับอุณหภูมิชิ้นเนื้อที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
2. จากนั้นทำการตัดชิ้นเนื้อตามแนวขวางของเส้นใยกล้ามเนื้อ ให้ชิ้นเนื้อมีความหนาประมาณ 3-5 ไมโครเมตร วางชิ้นเนื้อที่ได้บนแผ่นสไลด์ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1-2 ชั่วโมง

3.3.3. การย้อมสีสไลด์ด้วยวิธี ATPase ร่วมกับ Diaphorase (Method from Institute of Animal Husbandry, Goettingen University, Germany) โดยทำการย้อมตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ทำการย้อมด้วยสารละลาย Fixed solution โดยแช่ไว้ 1 นาที
2. ล้างด้วย Distill water, 5 นาที 2 รอบ
3. ย้อมด้วย Diaphorase จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
4. ล้างด้วย Distill water, 30 นาที ซับน้ำออก
5. ย้อมด้วย Pre incubation solution ทิ้งไว้ 15 นาที
6. ย้อมด้วย Tris CaCl_2 solution 2 นาที
7. ย้อมด้วย ATPase incubation solution จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
8. ย้อมด้วย CaCl_2 (CaCl_2 wash solution), 30 วินาที 3 รอบ
9. ย้อมด้วย Cobalt (CoCl_2) เป็นเวลา 3 นาที
10. ล้างด้วย Distill water เป็นเวลา 45 วินาที 3 รอบ
11. ย้อมด้วย NH_4SO_3 (Ammonium sulfide) เป็นเวลา 3 นาที
12. ล้างด้วย Distill water เป็นเวลา 5 นาที
13. จากนั้นนำแผ่นสไลด์ไปวิเคราะห์ความแตกต่างของชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ และวิเคราะห์ภาพโดยโปรแกรม scanimage software

3.4 การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนกลุ่มไมโอไฟบรินในเนื้อโคที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน

3.4.1 การสกัดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein) (Claeys *et al.* 1995)

1. นำตัวอย่างเนื้อสันนอกบดละเอียดตามระยะเวลาการบ่มมาตัวอย่างละ 2.5 กรัม
2. จากนั้นใส่สารละลาย STE buffer ปริมาณ 25 มิลลิลิตร (0.25M Sucrose, 1mM EDTA และ 0.05 M Tris; pH 7.6) แล้วบดด้วยเครื่อง homogenizer ที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที
3. นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที

4. เทส่วนใส (supernatant) ที่ นำตะกอนจากการปั่นเหวี่ยงครั้งที่ 1 มาเติมสารละลาย TE buffer 25 มิลลิลิตร (1m M EDTA และ 0.05 M Tris; pH 7.6) คนให้เข้ากัน
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกตะกอนอีกครั้ง เติมสารละลาย KCl buffer 25 มิลลิลิตร (0.15M KCl) คนให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
6. แยกตะกอนครั้งที่ 3 เติมสารละลาย Sample buffer 30 มิลลิลิตร (2% SDS, 0.01 M Imidazol และ 2% Mercaptoethanol) คนให้เข้ากัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
7. เก็บส่วนน้ำใส (supernatant) ภายหลังการปั่นเหวี่ยง แล้วแบ่งใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเก็บที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สารละลายนี้คือส่วนของ myofibrillar protein จากการสกัดชิ้นเนื้อตัวอย่าง

3.4.2 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ

การทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของโปรตีน ทำได้โดยนำสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อ 1 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้นของ BSA เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 ไมโครกรัมต่อ 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายที่มีความเข้มข้นของ BSA ที่แตกต่างกันมาอย่างละ 10 ไมโครลิตร ผสมด้วยน้ำยาลวัดโปรตีน (Protein assay) 300 ไมโครลิตร แล้วนำตัวอย่างทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน มาสร้างกราฟมาตรฐาน และคำนวณสมการถดถอย โดยกำหนดให้ค่า x เป็นค่าความเข้มข้นของ BSA และค่า y เป็นค่าการดูดกลืนแสง ค่า x ที่คำนวณได้คือ ค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่จะนำไปศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ต่อไป

3.4.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Myofibrillar protein ด้วยวิธี SDS-PAGE

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกโปรตีนคือเครื่อง vertical electrophoresis units (TV 100) ขนาด 20 เซนติเมตร เจลสำหรับการแยกโปรตีนจะประกอบไปด้วย 2 ชั้น ชั้นล่างเรียกว่า separating gel มีความเข้มข้นเจลเท่ากับ 12.5% ซึ่งประกอบไปด้วย 40% Acrylamide-bis, 1 M Tris, 10% SDS, TEMED, 1% APS และน้ำกลั่น เจลชั้นนี้จะใช้สำหรับการแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10-200 กิโลดาลตัน (kDa) และเจลชั้นบนเรียก stacking gel มีความเข้มข้น 6% ประกอบด้วย 40% Acrylamide-bis, 1 M Tris, 10% SDS, TEMED, 1% APS และน้ำกลั่น ซึ่งชั้นนี้จะใช้แยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50-1000 kDa

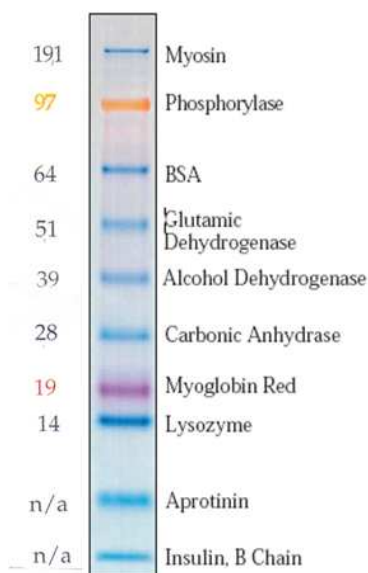
2. ทำการเตรียมเจลโดยใช้ปริมาณดังตารางที่ 3.2 หลังจากทำการเตรียมเจลแล้วจึงใส่ตัวอย่างลงในแต่ละช่อง ช่องละ 10 ไมโครลิตร และ 10 ไมโครลิตร สำหรับตัวมาตรฐานซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับ (standard marker) ตัวมาตรฐานที่ใช้คือ Seebue plus2 Pre-Stained standard (Invitrogen) ซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีน Myosin ขนาด 191 kDa Phosphorylase B ขนาด 97 kDa BSA ขนาด 64 kDa Glutamic dehydrogenase ขนาด 51 kDa Alcohol dehydrogenase ขนาด 39 kDa Carbonic anhydrase ขนาด 28 kDa Myoglobin-Red ขนาด 19 kDa Lysozyme ขนาด 14 kDa Aprotinin และ Insulin, B Chain เมื่อทำการหยอดตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว จึงทำการเปิดเครื่อง vertical slab gels โดยใช้กระแสไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ (V) 50 มิลลิแอมแปร์ (mA) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.2 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม Gel

Stacking gel	4.50%	6%
Water distilled	3.550 ml	3.370 ml
40% Acrylamide-bis (Invitrogen)	0.550 ml	0.730 ml
1 M Tris	0.625 ml	0.625 ml
10% SDS	50. μ l	50 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l
1% APS	250 μ l	250 μ l
total volume	5.035 ml	5.035 ml
Separating gel	12.50%	15%
Water distilled	3.80 ml	3.18 ml
40% Acrylamide-bis (Invitrogen)	3.10 ml	3.72 ml
1M Tris	2.50 ml	2.50 ml
10% SDS	100 μ l	100 μ l
TEMED	20 μ l	20 μ l
1% APS	500 μ l	500 μ l
Total volume	10.02 ml	10.02 ml

3. เมื่อครบตามระยะเวลานำเจลไปย้อมสีใน staining buffer เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลไปล้างสีส่วนที่ไม่ต้องการออกใน destain buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำเจลที่ได้ไปถ่ายภาพเพื่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (gene genius bio imagine system)

4. โปรตีนที่อยู่ภายในเส้นใยกล้ามเนื้อ จะถูกแยกเป็นแถบตามน้ำหนักโมเลกุล และทำการเปรียบเทียบกับแถบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (marker) (ภาพที่ 3.4) จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน มีหน่วยเป็น ไมโครกรัม (μg) โดยใช้โปรแกรม Gene Tools



ภาพที่ 3.4 แสดงลักษณะและขนาด band (kDa) ตัวมาตรฐาน Seeblue plus2 Pre-Stained standard (Invitogen)

3.4.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ troponin ด้วยวิธี SDS-PAGE

1. ทำการศึกษาเช่นเดียวกับ หัวข้อ 3.4.3
2. จากนั้นจะทำการเปรียบเทียบแถบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ถูกแยกกับโปรตีนมาตรฐาน ถ้าแถบโปรตีนที่อ่านได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 39 กับ 37 kDa จัดได้ว่าเป็นโปรตีน troponin – T และแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 kDa จัดว่าเป็นโปรตีน troponin – TProduct (Ho et al., 1997) โดยใช้โปรแกรม Gene Tools ในการเปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน

3.4.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ troponin ด้วยวิธี Western blot

1. ทำการย้ายโปรตีนจากเจล polyacrylamide ไปสู่แผ่นเมมเบรน polyvinylidene difluoride (PVDF) ด้วยเครื่อง vertical electrophoresis units (TV 100K) ขนาด 20 เซนติเมตร กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ (V) 350 (mA) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ transfer buffer (192 mM Glycine, 25 mM Tris, 20 % Methanol) เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า
2. นำแผ่นเมมเบรนมา block ด้วย blocking buffer (0.05M Tris, 3 % nonfat milk) นาน 1 ชั่วโมง นำแผ่นเมมเบรนแช่ในแอนติโทรโปนินที (mouse anti-troponin-T:Sigma) เจือจาง 1:15,000

เป็นแอนติบอดีตัวที่ 1 ในการจับกับโปรตีนตัวอย่างโดยทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำเมมเบรนมาล้างด้วย wash buffer (0.05M Tris, 0.138M NaCl, 0.0027M KCl, 0.05 % Tween 20) 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วทำการแช่แผ่นเมมเบรนอีกครั้งหนึ่งในแอนติบอดีตัวที่ 2 (anti-mouse IgG:Sigma) เจือจาง 1:750 ซึ่งมีความจำเพาะกับแอนติบอดีตัวที่ 1 โดยแอนติบอดีตัวที่ 2 จะติดฉลากเอนไซม์ horseradish peroxidase เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนด้วย wash buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที (Ho *et al.* 1997)

3. ตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาโดยใส่ซับสเตรท (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine) ซึ่งมีความจำเพาะกับเอนไซม์ดังกล่าวเพื่อให้เห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีน Tn-T ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นจึงนำแผ่นเมมเบรนไปสแกนด้วยเครื่อง scanner (Epson perfection V 700 photo)

3.4.6 การวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีนด้วยเทคนิค 2D- gel

3.4.6.1 การสกัดโปรตีน

1. นำตัวอย่างเนื้อที่ผ่านการบ่มเป็นระยะเวลา 2 และ 14 วัน มาบดด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียดให้ได้ตัวอย่างละ 2 กรัม จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดร่วมกับ lysis buffer (8M Urea, 30mM Tris-HCL, 4%(w/v) CHAPS, pH 8.5) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง homogenizer ที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 30 วินาที

2. นำไปเขย่าด้วยเครื่อง shaker ที่ความเร็ว 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x gmax เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใสเพื่อนำไปทำการทดลองต่อไป

3.4.6.2 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีน (ดังวิธีในหัวข้อ 3.4.2)

3.4.6.3 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-gel

1. การแยกโปรตีนทิศทางที่ 1 ด้วยเทคนิค Isoelectric focusing

นำโปรตีนตัวอย่างผสมกับ rehydration buffer (8M Urea, 50mM DTT, 4% CHAPS, 0.2% Carrier ampholytes : pH 3-10, 0.0002% Bromophenol blue) ให้ได้ปริมาณโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อ 125 ไมโครลิตร เติมลงใน rehydration tray จากนั้นนำแถบ IPG strip (pH 3-10:Bio-Rad) ขนาด 7 เซนติเมตร วางลงใน rehydration tray โดยให้ด้านเจลสัมผัสกับโปรตีนตัวอย่าง ทิ้งไว้ 12-16 ชั่วโมง เพื่อให้แถบ IPG ดูดซับโปรตีนตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อครบระยะเวลาดังกล่าวจึงทำการย้ายแถบ IPG มาใส่ใน focusing tray วางให้น้ำเจลติดกับก้นหลุม โดยใช้แถบกระดาษกว้าง 5 มิลลิเมตร ชุมนด้วยน้ำกลั่นเป็นสะพานไฟ และเติม mineral oil ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทุกหลุม จึงนำ focusing tray ไปวางในเครื่อง protein isoelectric focusing (Bio-Rad) เพื่อทำการแยกโปรตีนตามค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้กระแสไฟฟ้าตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงระยะเวลาและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกโปรตีนทิศทางที่ 1 ด้วยเทคนิค Isoelectric focusing

แถบ IPG ขนาด 7 ซม.	โวลต์	เวลา	โวลต์ชั่วโมง
ระยะ 1	250	20 นาที	200
ระยะ 2	4,000	2 ชั่วโมง	200
ระยะ 3	4,000	2 ชั่วโมง 60 นาที	10,000
รวม	8,250	5 ชั่วโมง	14,000

2. การแยกโปรตีนทิศทางที่ 2 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

เมื่อครบระยะเวลาการแยกโปรตีนทิศทางที่ 1 ให้นำแถบ IPG มาปรับสภาพด้วย equilibration buffer 1 (6M Urea, 2% SDS, 0.05M Tris/HCl ;pH 8.8, 40% Glycerol, 2% DTT) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรต่อ 1 แถบ IPG พร้อมเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที และ equilibration buffer 2 (6M Urea, 2% SDS, 0.05M Tris/HCl ;pH 8.8, 40% Glycerol, 2.5% iodoacetamide) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรต่อ 1 แถบ IPG พร้อมเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที จึงวางแถบ IPG ลงให้ขอบสัมผัสกับขอบเจล SDS (12.5%) และเพื่อป้องกันไม่ให้มีฟองอากาศฝังอยู่ระหว่างเจลทั้ง 2 ควรปัดอะกาโรสเหลวลงไปก่อน แล้วใช้ปากคีบค่อยๆ วางแถบ IPG ลง โดยให้กระแสไฟฟ้า 200 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที เมื่อครบเวลานำเจลไปย้อมสีใน staining buffer เป็นเวลา 3 ชั่วโมงก่อนนำไปสแกนด้วยเครื่อง EPSON PERFECTION V 700 photo ในอัตราส่วน 600 dpi

3. การวิเคราะห์ผลความแตกต่างของโปรตีน

ในช่วงการบ่ม 2 และ 4 วันโดยการสแกนเจลในแต่ละช่วงการบ่มของโคแต่ละกลุ่ม ตัวอย่างละ 3 เจล จุดโปรตีนที่นำมาวิเคราะห์ได้จากจุดที่ทำ การหาค่า mean จาก 3 เจลและวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม PDQuest (Bio-Rad) ด้วย Local regression model ที่ 2.0 fold change per treatment

3.4.7 การศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ μ -calpain ในเนื้อโคและที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน

3.4.7.1 การสกัดโปรตีน

1. นำตัวอย่างเนื้อที่ผ่านการบ่มที่ระยะเวลา 2, 7, 14, 21 และ 30 วัน ตัวอย่างละ 2 กรัม บดให้ละเอียดร่วมกับ extraction buffer (100mM Tris-HCL: pH 8.3, 10mM EDTA, 10mM 2-mercaptoethanol) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง homogenizer ที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 30 วินาที

2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 37,500 x gmax เป็นเวลา 120 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนบนเพื่อนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีนรวม (ดัดแปลงจาก Delgado *et al.* 2001)

3.4.7.2 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีน (ดังวิธีในหัวข้อ 3.4.2)

3.4.7.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ μ -calpain ด้วยวิธี western blot

1. แยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวตั้งด้วยเครื่อง Mini-Protein® Tetra Cell (Bio-Rad) สำหรับเจลขนาด 10 x 7 x 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยเจลสำหรับการแยกโปรตีนจะประกอบไปด้วย 2 ชั้น ชั้นล่างเรียกว่า separating gel มีความเข้มข้นเจลเท่ากับ 12.5 % ซึ่งประกอบไปด้วย 40% Acrylamide-bis, 1 M Tris, 10% SDS, TEMED, 1% APS และน้ำกลั่น เจลชั้นนี้จะใช้สำหรับการแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 – 200 กิโลดาลตัน (kDa) และเจลชั้นบนเรียก stacking gel มีความเข้มข้น 5 % ประกอบด้วย 40% Acrylamide – bis, 1 M Tris, 10% SDS, TEMED, 1% APS และน้ำกลั่น ซึ่งชั้นนี้จะใช้แยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50 – 1,000 kDa

2. ใส่ตัวอย่างลงในเจลแต่ละช่อง ช่องละ 120 ไมโครกรัม และ 10 ไมโครลิตร สำหรับตัวมาตรฐานซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (standard marker) ตัวมาตรฐานที่ใช้คือ Seeblue plus2 Pre-Stained standard (Invitogen) ซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีน Myosin ขนาด 191kDa Phosphorylase B ขนาด 97 kDa BSA ขนาด 64 kDa Glutamic dehydrogenase ขนาด 51 kDa Alcohol dehydrogenase ขนาด 39 kDa Carbonic anhydrase ขนาด 28 kDa Myoglobin-Red ขนาด 19kDa Lysozyme ขนาด 14 kDa Aprotinin และ Insulin, B Chain เมื่อทำการหยอดตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว จึงทำการแยกโปรตีน โดยใช้กระแสไฟฟ้าขนาด 200 โวลต์ (V) เป็นเวลา 45 นาที และใช้ running buffer (NuPAGE® MOPS; Invitogen) เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า

3. เมื่อครบเวลาข้างต้นทำการย้ายโปรตีนจากเจล polyacrylamide ไปสู่แผ่นเมมเบรน polyvinylidene difluoride (PVDF) ด้วยเครื่อง Criterion™ Blotter (Bio-Rad) กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ transfer buffer (192mM Glycine, 25mM Tris, 20 % Methanol) เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า

4. นำแผ่นเมมเบรนมา block ด้วย blocking buffer (PBS-Tween20, 3 % nonfat milk) นาน 1 ชั่วโมง นำแผ่นเมมเบรนแช่ใน mouse monoclonal anti- μ -calpain (Sigma) เจือจาง 1:2,000 ใน (PBS-Tween20, 3 % nonfat milk) เป็นแอนติบอดีตัวที่ 1 ในการจับกับโปรตีนตัวอย่างโดยทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำเมมเบรนมาล้างด้วย wash buffer (PBS-Tween20) 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วทำการแช่แผ่นเมมเบรนอีกครั้งหนึ่งในแอนติบอดีตัวที่ 2 (anti-mouse IgG:Sigma) เจือจาง 1:5,000 ใน (PBS-Tween20, 3 % nonfat milk) ซึ่งมีความจำเพาะกับแอนติบอดีตัวที่ 1 โดยแอนติบอดีตัวที่ 2 จะติดฉลากเอนไซม์ horseradish peroxidase เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนด้วย wash buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

5. ตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาโดยใส่ซับสเตรท (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine) ซึ่งมีความจำเพาะกับเอนไซม์ดังกล่าว เพื่อให้เห็นแถบสีน้ำเงินของ μ -calpain ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นจึงนำแผ่นเมมเบรนไปสแกนด้วยเครื่อง scanner (Epson perfection V 700 photo)

3.5 การพัฒนาการใช้ calpastatin antibody ในการตรวจสอบความนุ่มของเนื้อโค

3.5.1 การทดสอบเปรียบเทียบ polyclonal anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเอง (pET-28a. 1AD; Tavitchasri. 2007) กับ monoclonal anti-calpastatin ทางการค้า (clone 1F7E3DD10; Sigma, U.S.A.)

1. ทำได้โดยนำโปรตีน calpastatin antigen (Merck) มาเจือจางด้วย coating buffer ให้มีความเข้มข้น 1: 100, 1: 500, 1: 1,000, 1: 2,000, 1: 4,000, 1: 8,000, 1: 16,000 และ 1: 32,000 ใส่ลงใน microplate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2. นำมาล้างด้วย PBS ที่มี 0.05 Tween 20, 3 ครั้ง แล้ว block ด้วย 1% skim milk ใน PBS ที่มี 0.05% Tween 20 (pH 7.5) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

3. เจือจางซีรัมกระด่าย primary antibody (แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 เป็น 1st Ab. Sigma, U.S.A. และ 1st Ab by Tavitchasri. 2007) ด้วยตัวเจือจางให้มีความเข้มข้น 1: 200 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

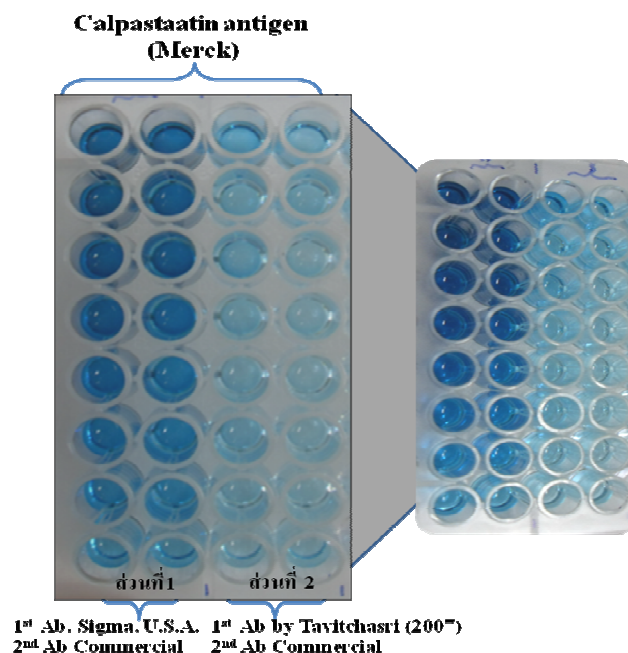
4. เมื่อครบกำหนดเวลาที่ skim milk แล้วใส่ซีรัมกระด่ายที่เตรียมไว้ (จากข้อที่ 3) โดยใส่ ดังภาพที่ 3.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

5. ล้างด้วย PBS ที่มี 0.05 % Tween 20, 3 ครั้ง ใส่ secondary antibody (2nd Ab) ที่เจือจาง 1: 10,000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

6. ล้าง plate 3 ครั้ง ด้วย PBS ที่มี 0.05 % Tween 20

7. ตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาโดยใส่ TMB substrate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

8. หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.01 %SDS ปริมาตร ไมโครลิตร นำไปวัดค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 650 nm.



ภาพที่ 3.5 การทดสอบเปรียบเทียบ monoclonal anti-calpastatin ทางการค้า (ส่วนที่ 1) กับ polyclonal anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเอง (ส่วนที่ 2)

3.5.2 การสกัดโปรตีน (Geesink *et al.* 2005)

1. บดตัวอย่างเนื้อโคประมาณ 10 กรัม (เนื้อในส่วนที่ 2) เดิม 100 mM Tris และ 10 mM EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 20 ml เขย่าให้ผสมกัน
2. นำไปปั่นตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. เก็บส่วนใสมาต้มที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แช่น้ำแข็ง 10 นาที
4. นำไปปั่นตกตะกอนอีกครั้งที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ส่วนใสที่ได้จะมีโปรตีน calpastatin อยู่ด้วยเนื่องจาก calpastatin จัดเป็น heat-stable proteins
5. เก็บส่วนใสไว้เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบ antibodies ต่อ recombinant protein ด้วยวิธี iELISA

3.5.3 การตรวจหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ polyclonal anti-calpastatin (Tavitchasri. 2007) ต่อโปรตีนที่สกัดจากเนื้อโคด้วยวิธี Checker-Board Titration (ภาพที่ 3.6)

1. เจือจางโปรตีนที่สกัดจากเนื้อโค (antigen) ที่เก็บเป็นระยะเวลา 2 วัน ด้วย coating buffer ให้มีความเข้มข้น 1: 100, 1: 200, 1: 400, 1: 800, 1: 1,600, 1: 3,200 และ 1: 6,400 ใส่ลงใน microplate (Maxisorp, NuncTM) แถวที่ A- G ตามลำดับ (ภาพที่ 3.6ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2. ล้างด้วย PBS ที่มี 0.05 % Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง
3. Block ด้วย 1% skim milk ใน PBS ที่มี 0.05% Tween 20 (pH 7.5) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
4. ระหว่างนี้เจือจางซีรัมกระต่าย (recombinant antibodies) ด้วยตัวเจือจางให้มีความเข้มข้น 1: 200, 1: 400, 1: 800, 1: 1,600 และ 1: 3,200 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
5. เมื่อครบกำหนดเวลาทั้ง skim milk แล้วใส่ซีรัมกระต่ายที่เตรียมไว้ลงใน microplate โดยใส่ซีรัมที่มีความเข้มข้น 1: 200 ใน column ที่ 1 และ 2 ความเข้มข้น 1: 400 ใส่ใน column ที่ 3 และ 4 ความเข้มข้น 1: 800 ใส่ใน column ที่ 5 และ 6 ความเข้มข้น 1: 1,600 ใส่ใน column ที่ 7 และ 8 และความเข้มข้น 1: 3,200 ใส่ใน column ที่ 9 และ 10 ตามลำดับ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
6. ล้างด้วย PBS ที่มี 0.05 % Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง ใส่ goat anti-rabbit secondary antibody ที่เจือจาง 1: 2,000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
7. ล้าง plate จำนวน 3 ครั้ง ด้วย PBS ที่มี 0.05 % Tween 20
8. ตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาโดยใส่ TMB substrate (Zymed®) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
9. หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.01 % SDS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่า optical density (O.D.) ด้วยเครื่อง automatic microplate reader (TECAN, Magellen V.5) ที่ความยาวคลื่น 650 nm

3.5.4 การตรวจหาปริมาณโปรตีน calpastatin ในเนื้อโคที่เก็บรักษาในระยะเวลาที่ต่างกันด้วยวิธี iELISA (Sunwoo *et al.* 2002; Lee *et al.* 2002) (ภาพที่ 3.6ข)

1. ตรวจสอบปริมาณโปรตีน calpastatin โปรตีนสกัดจากเนื้อโคที่เก็บเป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน ด้วยซีรัมกระต่าย ทำโดยเจือจางโปรตีนสกัดที่ระยะการเก็บต่างๆ ด้วย coating buffer ให้มีความเข้มข้น 1: 100 ใส่ลงใน microplate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
2. นำมาล้างด้วย PBS ที่มี 0.05 Tween 20, 3 ครั้ง แล้ว block ด้วย 1% skim milk ใน PBS ที่มี 0.05 % Tween 20 (pH 7.5) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
3. ระหว่างนี้เจือจางซีรัมกระต่ายด้วยตัวเจือจางให้มีความเข้มข้น 1: 200 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
4. เมื่อครบกำหนดเวลาทั้ง skim milk แล้วใส่ซีรัมกระต่ายที่เตรียมไว้ลงใน microplate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

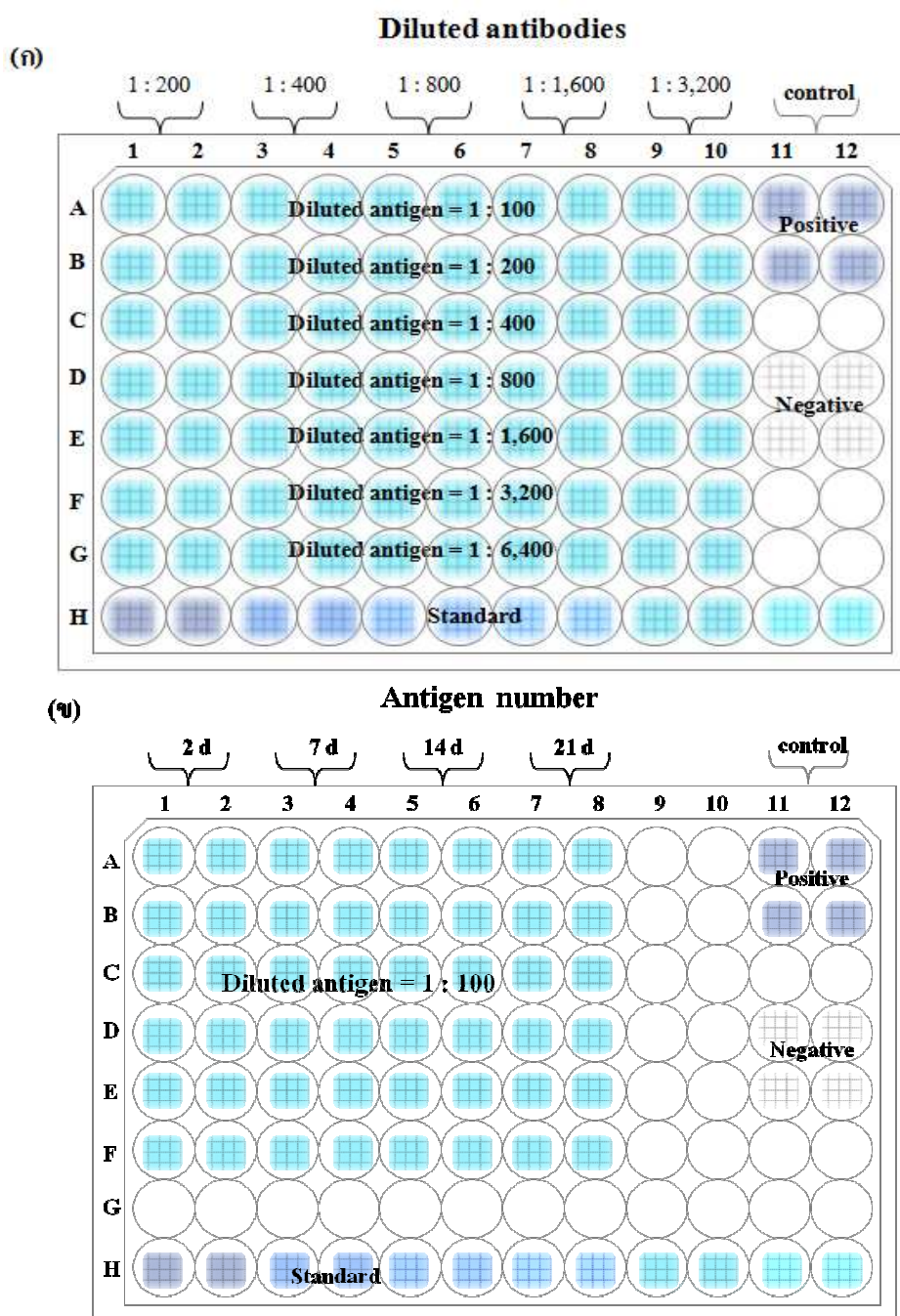
5. ล้างด้วย PBS ที่มี 0.05 % Tween 20, 3 ครั้ง ใส่ goat anti-rabbit secondary antibody ที่เจือจาง 1: 2,000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
6. ล้าง plate 3 ครั้ง ด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween 20
7. ตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาโดยใส่ TMB substrate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
8. หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.01 % SDS ปริมาตร ไมโครลิตร นำไปวัดค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 650 nm.

3.5.4.1 การทำกราฟมาตรฐาน (standard curve)

1. นำโปรตีน calpastatin antigen (Merck) มาเจือจางด้วย coating buffer ให้มีความเข้มข้น 1: 64,000, 1: 256,000, 1: 1,024,000, 1: 4,096,000 และ 1: 16,384,000 ใส่ลงใน microplate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
2. จากนั้นทำตามขั้นตอน 3.5.4 และนำไปหาปริมาณโปรตีน calpastatin ต่อไป

3.5.4.2 การหาปริมาณโปรตีน calpastatin

1. นำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันมาสร้างกราฟมาตรฐาน และคำนวณสมการถดถอย โดยกำหนดให้ค่า x เป็นค่าปริมาณโปรตีน calpastatin และค่า y เป็นค่าการดูดกลืนแสง ดังแสดงในภาพที่ 3.5
2. ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่าใด (y) ให้นำค่านั้นไปแทนค่าและคำนวณในสมการถดถอย ค่า (x) ที่คำนวณได้ คือค่าปริมาณโปรตีน calpastatin โดยมีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)



ภาพที่ 3.6 รูปแบบการเจือจางโปรตีนสกัดจากเนื้อโค (antigen) เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อ antibodies ด้วยวิธี checker-board titration (ก) และเพื่อตรวจ ปริมาณ calpastatin protein ในเนื้อโคที่เก็บรักษาในระยะเวลาที่ต่างกันด้วยวิธี iELISA (ข)

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อ (pH) ค่าสีของเนื้อ (L^* a^* และ b^*) ค่าแรงตัดผ่านชิ้นเนื้อ (WBSF) ปริมาณ collagen การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน troponin-T และปริมาณโปรตีน calpastatin ในเนื้อโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มาและที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน มาวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี General Linear Model (GLM) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least Square Means ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปทางสถิติ

3.6.1 ศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา และระยะเวลาในการบ่มต่อคุณภาพเนื้อ ลักษณะที่ศึกษาคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อ (pH) ค่าสีของเนื้อ (L^* a^* และ b^*) ค่าแรงตัดผ่านชิ้นเนื้อ (WBSF) ปริมาณ collagen การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน troponin-T และปริมาณโปรตีน calpastatin โดยมีแบบแผนทางสถิติที่ใช้ในการศึกษาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยดังนี้

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

เมื่อ	Y_{ijk}	= ค่าสังเกตของลักษณะที่ต้องการศึกษา ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อ (pH) ค่าสีของเนื้อ (L^* a^* และ b^*) ค่าแรงตัดผ่านชิ้นเนื้อ (WBSF) ปริมาณ collagen การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน troponin-T และปริมาณโปรตีน calpastatin
	μ	= ค่าเฉลี่ยทั้งหมดของค่าสังเกตที่ต้องการศึกษา
	A_i	= อิทธิพลของกลุ่มโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา ที่ i , $i = 1, 2, 3$ และ 4 (1 คือ โคพื้นเมืองภาคเหนือตอนล่างจากจังหวัดตาก 2 คือ โคพื้นเมืองภาคอีสานจากจังหวัดอุบลราชธานี 3 คือ โคพื้นเมืองภาคกลางจากจังหวัดกาญจนบุรี และ 4 คือ โคพื้นเมืองภาคกลางจากจังหวัดชัยนาท (โคขาวลำพูน)
	B_j	= อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มที่ j , $j = 1, 2, 3$ และ 4 (1 คือ ระยะเวลาการบ่มเนื้อที่ 2, 7, 14 และ 21 วัน)
	$A_i * B_j$	= อิทธิพลร่วมของกลุ่มโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา ที่ i กับระยะเวลาการบ่มเนื้อที่ j
	ϵ_{ijk}	= ค่าความคลาดเคลื่อน

3.6.2 ศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรป และระยะเวลาในการบ่มต่อคุณภาพเนื้อ ลักษณะที่ศึกษาคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อ (pH) ค่าสีของเนื้อ (L^* a^* และ b^*) ค่าแรงตัดผ่านชิ้นเนื้อ (WBSF) ปริมาณ collagen การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน troponin-T และปริมาณโปรตีน calpastatin โดยมีแบบแผนทางสถิติที่ใช้ในการศึกษาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยดังนี้

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

เมื่อ	Y_{ijk}	= ค่าสังเกตของลักษณะที่ต้องการศึกษา ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อ (pH) ค่าสีของเนื้อ (L^* a^* และ b^*) ค่าแรงตัดผ่านชิ้นเนื้อ (WBSF) ปริมาณ collagen การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน troponin-T และปริมาณโปรตีน calpastatin
	μ	= ค่าเฉลี่ยทั้งหมดของค่าสังเกตที่ต้องการศึกษา
	A_i	= อิทธิพลของกลุ่มโค ที่ i , $i = 1$ และ 2 (1 คือ โคลูกผสมที่มีระดับเลือดซิมเมนทอล 62.5 เปอร์เซนต์ และ 2 คือ โคลูกผสมที่มีระดับเลือดซิมเมนทอล 25 เปอร์เซนต์)
	B_j	= อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มที่ j , $j = 1, 2, 3$ และ 4 (1 คือ ระยะเวลาการบ่มเนื้อที่ 2, 7, 14 และ 21 วัน)
	$A_i * B_j$	= อิทธิพลร่วมของกลุ่มโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา ที่ i กับระยะเวลาการบ่มเนื้อที่ j
	ϵ_{ijk}	= ค่าความคลาดเคลื่อน

บทที่ 4

ผลการศึกษา

ตอนที่ 1 ศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา

4.1 อิทธิพลของกลุ่มโคและระยะเวลาการบ่มต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

กลุ่มเนื้อโคไทยมีอิทธิพลต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของเนื้อโคทั้ง 4 กลุ่ม โดยพบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีค่า pH สูงที่สุด ($p < 0.05$) รองลงมาคือ เนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี โดยมีค่า pH เท่ากับ 5.50 ± 0.05 , 5.48 ± 0.03 , 5.46 ± 0.03 และ 5.41 ± 0.03 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) สำหรับระยะเวลาในการบ่มเนื้อมานานขึ้นส่งผลให้ค่า pH ของเนื้อลดลง โดยค่า pH ของเนื้อที่บ่มนาน 21 วันมีค่าต่ำที่สุด (5.48 ± 0.03) เมื่อเทียบกับระยะเวลาการบ่มที่ 0, 7 และ 14 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และระยะเวลาการบ่มเนื้อที่ 7, 14 และ 21 วัน นั้น มีค่า pH ของเนื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.1 อีกทั้งยังไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มเนื้อโคไทยและระยะเวลาการบ่มที่มีผลต่อค่า pH ของเนื้อ ($p > 0.05$)

4.2 อิทธิพลของกลุ่มโคและระยะเวลาการบ่มต่อค่าสีของเนื้อ (colour)

4.2.1 ค่าความสว่าง (lightness; L^*)

กลุ่มเนื้อโคไทยมีอิทธิพลต่อค่าความสว่างหรือค่า L^* ของเนื้อโค โดยเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีมีค่า L^* สูงที่สุด (42.63 ± 0.51) เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อโคกลุ่มอื่นๆ ($p < 0.05$) โดยเนื้อโคที่มีค่า L^* รองลงมาคือ เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน ($p < 0.05$) มีค่าเท่ากับ 40.28 ± 0.46 และ 38.77 ± 0.51 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) ในส่วนของระยะเวลาในการบ่มเนื้อมานานขึ้นนั้นจะส่งผลให้ค่า L^* ของเนื้อเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเนื้อที่บ่มผ่านไป 21 วัน พบว่าสีของเนื้อมีความสว่างสูงสุด (41.36 ± 0.54) ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับระยะเวลาการบ่มที่ 7 วัน ($p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มเนื้อโคไทยและระยะเวลาการบ่มไม่มีผลต่อค่า L^* ของเนื้อ ($p > 0.05$)

4.2.2 ค่าสีแดง (redness; a^*)

กลุ่มเนื้อโคไทยมีอิทธิพลต่อค่า a^* ของเนื้อ ซึ่งในเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูนมีค่า a^* สูงที่สุด คือ 21.63 ± 0.38 รองลงมาคือ เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี โดยมีค่า a^* เท่ากับ 17.40 ± 0.38 , และ 15.80 ± 0.34 ตามลำดับ โดยเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานีมีความแตกต่างกับเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.1) และจากการศึกษาระยะเวลาการบ่มพบว่าค่า a^* ของเนื้อ จะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

โดยเนื้อที่ระยะเวลา 2 วัน มีค่า a^* ต่ำที่สุด (16.50 ± 0.62) แต่อย่างไรก็ตามในระยะเวลาการบ่มที่ 7 และ 21 วัน มีค่า a^* เท่ากับ 18.52 ± 0.40 และ 18.48 ± 0.40 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ทั้งนี้ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มเนื้อโคไทยและระยะเวลาการบ่มที่มีผลต่อค่า a^* ของเนื้อ ($p > 0.05$)

4.2.3 ค่าสีเหลือง (yellowness; b^*)

กลุ่มเนื้อโคไทยมีอิทธิพลต่อค่า b^* ของเนื้อ ซึ่งเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน มีค่า b^* สูงที่สุด (5.19 ± 0.27) รองลงมาคือ เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี โดยมีค่า b^* เท่ากับ 4.21 ± 0.24 และ 3.06 ± 0.27 ตามลำดับ โดยค่า b^* ของเนื้อโคทั้ง 4 กลุ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะที่ระยะเวลาในการบ่มเนื้อมานานขึ้นส่งผลให้ค่า b^* ของเนื้อเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเนื้อที่ระยะเวลาการบ่ม 2 วัน มีค่า b^* ต่ำที่สุด (3.00 ± 0.44) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาการบ่มอื่นๆ แต่ค่า b^* ของเนื้อที่ระยะเวลาการบ่ม 7 และ 21 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 4.84 ± 0.28 และ 5.67 ± 0.28 ตามลำดับ ทั้งนี้ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มเนื้อโคไทยและระยะเวลาการบ่มที่มีผลต่อค่า b^* ของเนื้อ ($p > 0.05$)

4.3 อิทธิพลของกลุ่มโคและระยะเวลาการบ่มต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (WBSF)

กลุ่มเนื้อโคไทยมีอิทธิพลต่อค่าแรงตัดผ่านของเนื้อ โดยเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีค่าแรงตัดผ่านของเนื้อต่ำที่สุด (6.21 ± 0.22 กิโลกรัม) เมื่อเทียบกับเนื้อโคกลุ่มอื่นๆ ($p < 0.05$) และพบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อรองลงมา คือมีค่าเท่ากับ 7.92 ± 0.22 กิโลกรัม ซึ่งต่ำกว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อของเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) มีค่าเท่ากับ 8.11 ± 0.24 , และ 8.37 ± 0.24 กิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) ส่วนของระยะเวลาการบ่มมีอิทธิพลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ โดยค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อมานานขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื้อที่ระยะเวลาการบ่ม 21 วัน มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำที่สุด (6.12 ± 0.23 กิโลกรัม) รองลงมาคือ ที่ระยะเวลาการบ่มเนื้อที่ 14, 7 และ 2 วัน โดยมีค่าเท่ากับ 6.68 ± 0.23 , 8.14 ± 0.23 และ 9.67 ± 0.23 กิโลกรัม ตามลำดับ ($p < 0.05$) ซึ่งระยะเวลาการบ่มเนื้อที่ 14 และ 21 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังภาพ 4.1ก อีกทั้งยังไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มเนื้อโคไทยและระยะเวลาการบ่มที่มีผลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ($p > 0.05$)

4.4 อิทธิพลของกลุ่มโคและระยะเวลาการบ่มต่อปริมาณ collagen

จากการศึกษาปริมาณคอลลาเจนละลายได้ (soluble collagen) และคอลลาเจนที่ไม่ละลาย (insoluble collagen) ที่อยู่ในเนื้อพบว่า คอลลาเจนที่ละลายได้ในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัด

ตากมีปริมาณมากที่สุดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับเนื้อโคทุกแหล่งที่ทำการศึกษา ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 0.26 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อ ขณะที่เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน มีปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 0.16 ± 0.01 , 0.16 ± 0.01 และ 0.16 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อ ตามลำดับ สำหรับคอลลาเจนที่ไม่ละลายพบว่า กลุ่มเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีปริมาณมากที่สุด มีปริมาณไม่แตกต่างกับเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี ($p < 0.05$) 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 (ตารางที่ 4.1)

เมื่อพิจารณาตามระยะเวลาการบ่มพบว่า ปริมาณของคอลลาเจนที่ละลายได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม 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 จะเห็นได้ว่าปริมาณของคอลลาเจนที่ละลายได้ของวันที่ 2 กับวันที่ 7 มีค่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับปริมาณของคอลลาเจนที่ไม่ละลายพบว่า มีปริมาณลดลงตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) 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 (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1ค,ง)

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (LSM±SE) ของอิทธิพลของกลุ่มโคที่มีผลต่อลักษณะคุณภาพเนื้อด้านกายภาพ ปริมาณโปรตีน calpastatin (*CAST*) และปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ (SC) และคอลลาเจนที่ไม่ละลาย (ISC) ที่ระยะเวลาการบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน

ลักษณะที่ศึกษา	กลุ่มโคพื้นเมือง (C)				ระยะเวลาการบ่ม (A)				p-value		
	กาญจนบุรี	ขวาลำพูน	ตาก	อุบลราชธานี	2 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	C	A	C*A
pH	5.41±0.02 ^c	5.48±0.02 ^{bc}	5.50±0.03 ^a	5.46±0.02 ^{bc}	5.51±0.02	5.44±0.02	5.48±0.02	5.43±0.02	0.0496	0.0644	0.6190
L*	42.63±0.51 ^a	38.77±0.51 ^c	-	40.28±0.46 ^b	38.52±0.84 ^y	40.29±0.54 ^{xy}	-	41.36±0.54 ^x	0.0001	0.0158	0.9883
a*	17.40±0.38 ^b	21.63±0.38 ^a	-	15.80±0.34 ^c	16.50±0.62 ^z	18.52±0.40 ^{xy}	-	18.48±0.40 ^x	0.0001	0.0087	0.9193
b*	3.06±0.27 ^c	5.19±0.27 ^a	-	4.21±0.24 ^b	3.00±0.44 ^z	4.84±0.28 ^y	-	5.67±0.28 ^x	0.0001	0.0001	0.9316
WBSF	8.37±0.24 ^a	8.11±0.24 ^a	6.21±0.22 ^b	7.92±0.22 ^a	9.67±0.23 ^x	8.14±0.23 ^y	6.68±0.23 ^z	6.12±0.23 ^z	0.0001	0.0001	0.4214
<i>CAST</i>	1.99±0.04 ^a	1.89±0.04 ^{ab}	1.71±0.04 ^c	1.82±0.04 ^b	2.24±0.04 ^x	1.94±0.04 ^y	1.70±0.04 ^z	1.54±0.04 ^z	0.0001	0.0001	0.6754
SC	0.16±0.01 ^b	0.16±0.01 ^b	0.26±0.01 ^a	0.16±0.01 ^b	0.13±0.01 ^x	0.16±0.01 ^{xy}	0.19±0.01 ^y	0.27±0.01 ^z	0.0001	0.0001	0.4315
ISC	2.07±0.13 ^b	1.44±0.13 ^c	3.19±0.11 ^a	2.87±0.14 ^a	3.31±0.13 ^x	2.50±0.13 ^y	2.04±0.13 ^z	1.71±0.13 ^z	0.0001	0.0001	0.9077

^{a-d} อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนภายใต้อิทธิพลของกลุ่มเนื้อโคไทยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

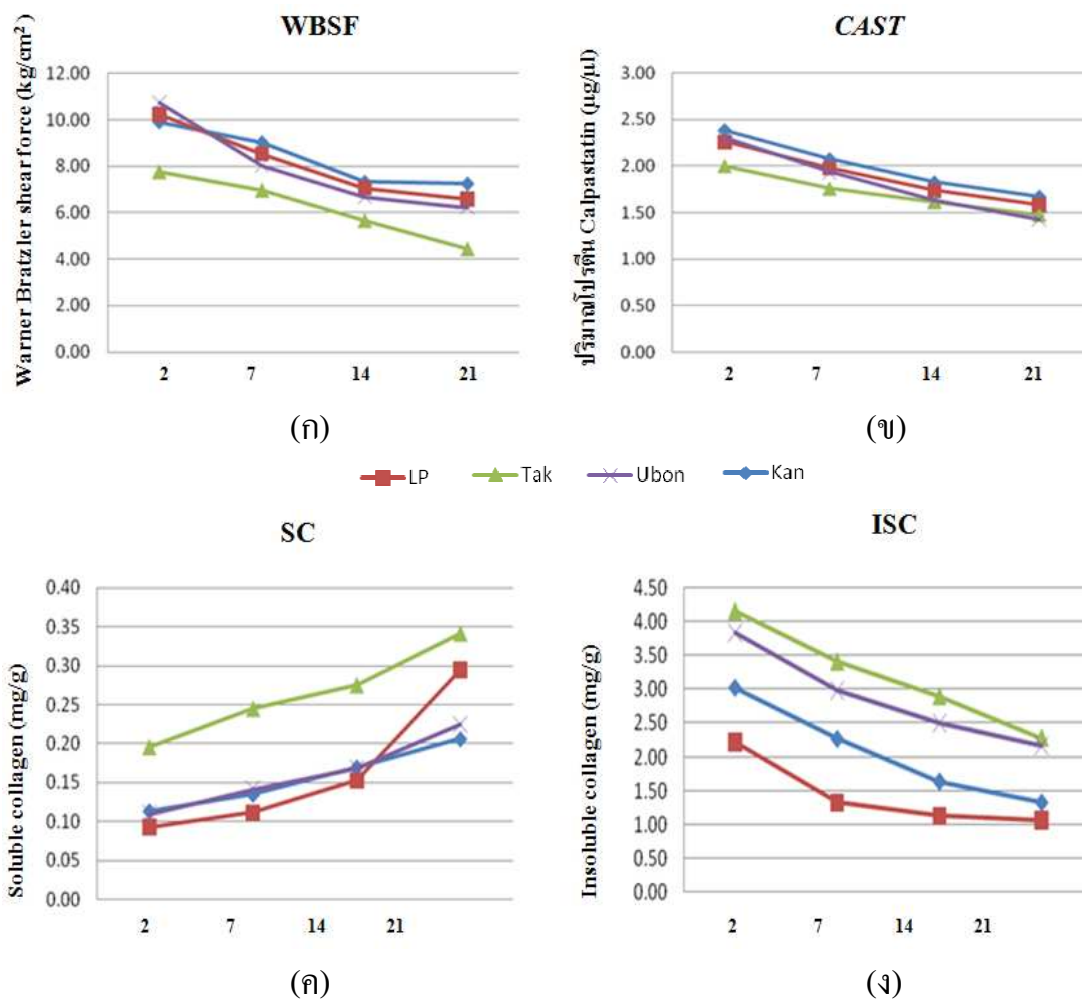
^{w-z} อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนภายใต้อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

- ไม่มีข้อมูลแสดงในบางช่วงการวิจัยเนื่องจากเครื่องมือในการวัดสีเนื้อทำงานผิดปกติ

WBSF คือ ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Warner Bratzler shear force) มีหน่วยเป็น kg/cm²

CAST คือ ปริมาณโปรตีน calpastatin มีหน่วยเป็น µg/µl

Soluble และ Insoluble คือ ปริมาณคอลลาเจนที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ มีหน่วยเป็น mg/g

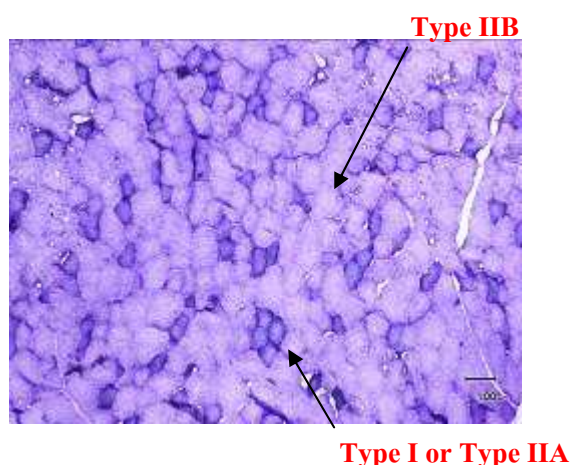


ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงอิทธิพลของกลุ่มโคที่มีผลต่อลักษณะคุณภาพเนื้อ ปริมาณโปรตีน calpastatin (CAST) และปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ (SC) และคอลลาเจนที่ไม่ละลาย (ISC) ที่ระยะเวลาการบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน

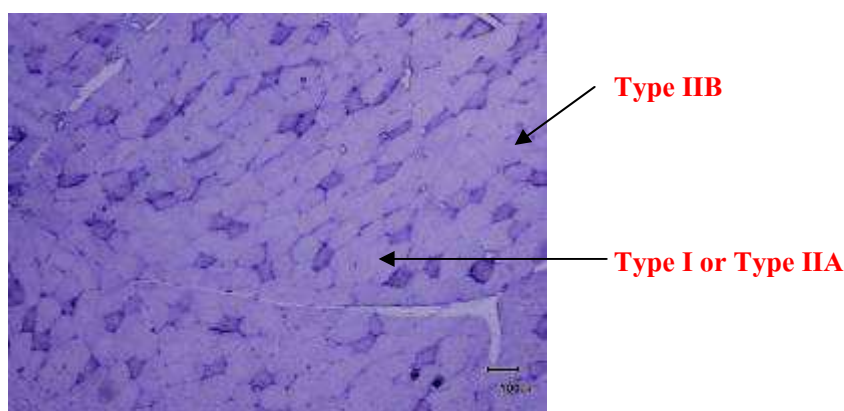
4.5 การศึกษาชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ

ผลของการศึกษาชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ ในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดพัทลุงและโคพื้นเมืองจังหวัดตากโดยใช้เทคนิคในการย้อมด้วย ATPase ร่วมกับ NADH สามารถแยกสีออกมาได้ 3 ลักษณะคือ Type I (red fiber) ติดสีน้ำเงินเข้ม Type IIA (intermediate fiber) รอบตัวเซลล์เป็นสีน้ำเงินส่วนตรงกลางไม่ติดสี และ Type IIB (white fiber) ไม่ติดสี จากการทดลองปรากฏว่ายังไม่สามารถแยกชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อได้ว่าเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินดังกล่าวเป็น Type I หรือ Type IIA (ภาพที่ 4.2 และ 4.3)

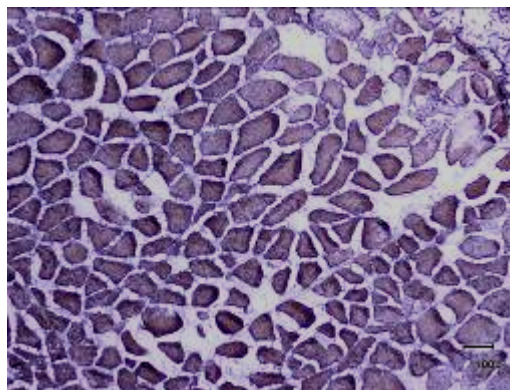
ส่วนในภาพที่ 4.4 เป็นการใช้เทคนิคการย้อมด้วย ATPase ซึ่งจะใช้หลักการเดียวกันกับ ATPase ร่วมกับ NADH แต่จะตัดขั้นตอนของการ diaphorase ด้วย NADH ออกไป ส่งผลให้ลักษณะการติดสีในการย้อมเซลล์เปลี่ยนไป คือ Type I ติดสีดำ Type IIA ไม่ติดสี และ Type IIB ติดสีเทา แต่จากการทดลองปรากฏว่ายังไม่สามารถแยกชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อได้เช่นกัน



ภาพที่ 4.2 การย้อมเส้นใยกล้ามเนื้อของโคพื้นเมืองจากจังหวัดพัทลุงโดยใช้เทคนิคการย้อมด้วย ATPase ร่วมกับ NADH



ภาพที่ 4.3 การย้อมเส้นใยกล้ามเนื้อของโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากโดยใช้เทคนิคการย้อมด้วย ATPase ร่วมกับ NADH โคพื้นเมืองตาก



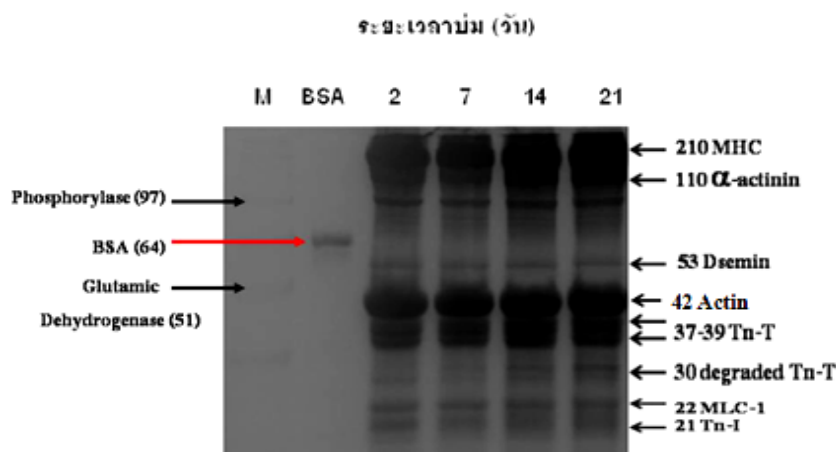
ภาพที่ 4.4 การย้อมเส้นใยกล้ามเนื้อของโคพื้นเมืองจากจังหวัดพัทลุงโดยใช้เทคนิคการย้อมด้วย ATPase

4.6. การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนกลุ่มไมโอไฟบริลล่าโปรตีน ในเนื้อโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา และที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน

4.6.1 ผลของการเปลี่ยนแปลงโปรตีน myofibrillar ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

การศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบการปรากฏแถบของโปรตีนหลายขนาด ได้แก่ แถบโปรตีนขนาด 210, 110 และ 42 kDa คาดว่าเป็นโปรตีน myosin heavy chain (MHC), α -actinin และ actin ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงของแถบโปรตีน เนื่องจากเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญในการหดตัวของกล้ามเนื้อ ขณะที่แถบโปรตีนขนาด 53, 22, และ 21 kDa คาดว่าเป็นโปรตีน desmin, myosin light chain1 (MCL1) และ troponin-I (Tn-I) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อ มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ในขณะที่แถบโปรตีนขนาด 37 และ 39 kDa คาดว่าเป็นโปรตีน troponin-T (Tn-T) มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน แถบโปรตีนดังกล่าวเริ่มจางหายไปตั้งแต่วันแรกของการบ่ม และจางลงอย่างชัดเจนตั้งแต่วันที่ 14-21 ของการบ่ม ดังภาพที่ 4.5

ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้ จึงได้ทำการศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T เพียงชนิดเดียว เนื่องจากโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดเจน อีกทั้งโปรตีน Tn-T ทำหน้าที่ยึด actin-myosin complex เกิดการย่อยสลายทำให้แรงดึงของเส้นใยกล้ามเนื้อหมดลงและทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้น (Hedrick *et al.* 1993) อีกทั้งยังมีรายงานการศึกษาเป็นจำนวนมากที่ระบุถึงความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนชนิดนี้กับความนุ่มของเนื้อที่เพิ่มขึ้นในช่วงการบ่ม (Muroya *et al.* 2007) ซึ่งความนุ่มของเนื้อนั้นจัดเป็นคุณสมบัติของเนื้อที่ผู้บริโภคต้องการมากที่สุด ในลำดับต้นๆ เมื่อกล่าวถึงคุณภาพของเนื้อที่ดี



ภาพที่ 4.5 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงของ myofibrillar protein

M คือ SeeBlue® plus2 Pre-Stained standard, BSA คือ internal marker

4.6.2 ผลการเปลี่ยนแปลงของ Troponin-T (Tn-T) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

การศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโคที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มโปรตีนขนาด 37-39 kDa ที่คาดว่าเป็น Tn-T ปรากฏว่าเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน มีปริมาณของโปรตีน Tn-T ขนาด 37-39 kDa เท่ากับ $1.07 \pm 0.34 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ซึ่งน้อยกว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก (4.01 ± 0.34 และ $3.43 \pm 0.31 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่มีปริมาณไม่แตกต่างกับเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี ($1.65 \pm 0.33 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน ขนาด 30 kDa ที่คาดว่าเป็นโปรตีนผลผลิตที่เกิดจากการย่อยสลายพบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานีมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่า ($0.26 \pm 0.12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี (1.60 ± 0.08 และ $0.97 \pm 0.09 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่มากกว่าเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน ($0.57 \pm 0.09 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังนั้นเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีปริมาณโปรตีน Tn-T ขนาด 30 kDa มากที่สุด ส่วนเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูนมีปริมาณโปรตีน Tn-T ขนาด 30 kDa น้อยที่สุด ($0.26 \pm 0.12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) แตกต่างกับเนื้อโคกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.6ก-ง)

ในการศึกษาอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคและระยะเวลาการบ่มที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของ myofibrillar protein ในเนื้อโคพบว่า อิทธิพลร่วมระหว่างระยะเวลาบ่มมีต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ขนาด 30 kDa โดยที่ระยะเวลาการบ่ม 2 วัน ในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูนไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) แต่มีค่าน้อยกว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.3)

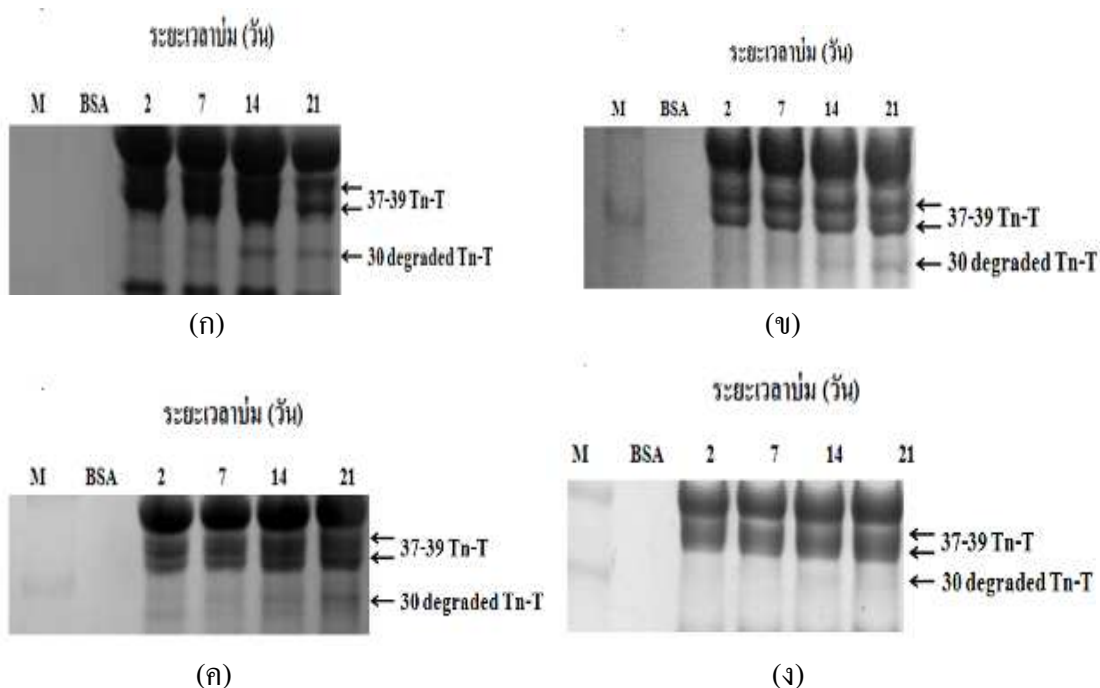
การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างระยะเวลาการบ่มต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ขนาด 37-39 kDa ($p>0.05$)

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (LSM±SE) ของกลุ่มโคที่มีผลต่อความเข้มข้นของโปรตีน Tn-T ขนาด 37-39 และ 30 kDa ($\mu\text{g BSA-equivalent}$)

กลุ่มโคพื้นเมือง	ความเข้มข้นของโปรตีน Tn-T	
	37-39 kDa ¹	30 kDa ²
ตาก	3.43 ± 0.31^{ab}	1.60 ± 0.08^a
อุบลราชธานี	1.65 ± 0.33^{cd}	0.57 ± 0.09^c
กาญจนบุรี	4.01 ± 0.34^a	0.97 ± 0.09^b
ชาวลำพูน	1.07 ± 0.34^d	0.26 ± 0.12^d

^{a-d} อักษรที่แตกต่างกันในแต่ละแถวในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

¹ กลุ่มย่อยสลาย (Tn-T), ² กลุ่มผลผลิต (Tn-T product)



ภาพที่ 4.6 แสดงลักษณะของการเปลี่ยนแปลงของแถบโปรตีนที่ 37-39 kDa (Tn-T) และ 30 kDa (Tn-T product) ที่ระยะเวลาดบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน ของโคพื้นเมืองกลุ่มภาคเหนือจากจังหวัดตาก (ก) โคพื้นเมืองกลุ่มภาคอีสานจากจังหวัดอุบลราชธานี (ข) โคพื้นเมืองกลุ่มภาคใต้จากจังหวัดกาญจนบุรี (ค) เนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน (ง)

M คือ SeeBlue[®] plus2 Pre-Stained standard, BSA คือ internal marker

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ย+ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (LSM±SE) ของอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโค กับระยะเวลาบ่มที่มีต่อความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 37-39 และ 30 kDa (μg BSA-equivalent)

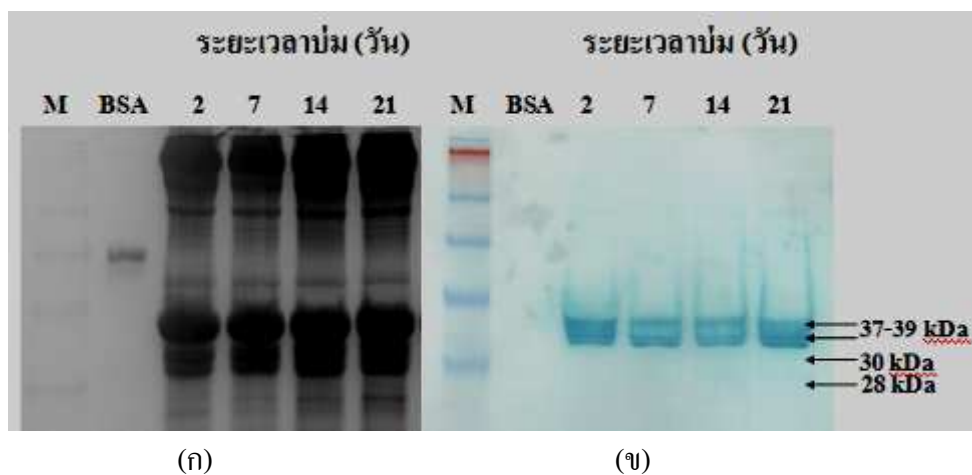
ความเข้มข้น ของโปรตีน Tn-T	กลุ่ม โคพื้นเมือง (C)	ระยะเวลาบ่ม (A)				P-value
		2 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	C*A
37-39 kDa ¹	ตาก	3.61±0.70	3.35±0.70	3.38±0.73	3.39±0.73	0.9644
	อุบลราชธานี	1.42±0.83	1.77±0.73	1.72±0.73	1.69±0.73	
	กาญจนบุรี	5.14±0.78	4.31±0.78	3.35±0.78	3.26±0.78	
	ขาวลำพูน	1.19±0.70	1.19±0.70	1.03±0.73	0.90±0.73	
30 kDa ²	ตาก	1.34±0.18 ^a	1.45±0.16 ^a	1.67±0.16 ^a	1.93±0.16 ^a	0.0047
	อุบลราชธานี	0.55±0.23 ^{bc}	0.54±0.20 ^{bc}	0.52±0.17 ^{bd}	0.68±0.17 ^{bc}	
	กาญจนบุรี	0.26±0.20 ^c	0.51±0.20 ^{bc}	1.17±0.18 ^{ab}	1.94±0.18 ^a	
	ขาวลำพูน	0.17±0.30 ^c	0.23±0.30 ^c	0.33±0.21 ^{cd}	0.31±0.18 ^c	

^{a-d} อักษรที่แตกต่างกันในแต่ละแถวในแนวดิ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

¹ กลุ่มย่อยสลาย (Tn-T) , ² กลุ่มผลผลิต (Tn-T product)

4.6.3 ผลการเปลี่ยนแปลงของ Tn-T ด้วยวิธี Western blot

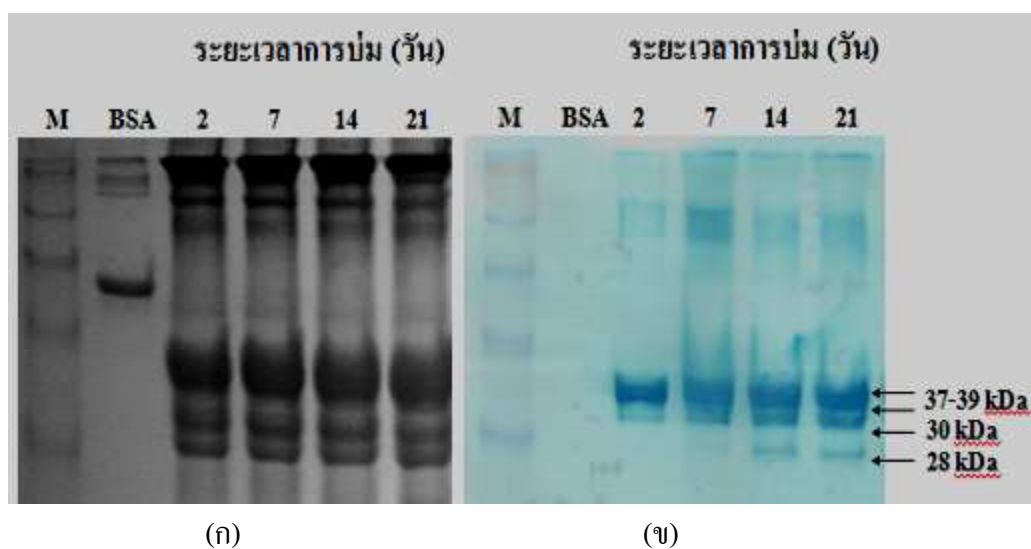
ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ของเนื้อโค 4 กลุ่ม ได้แก่ เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน ชนิดละ 3 ตัว พบการสลายตัวของโปรตีนขนาด 37-39 kDa (Tn-T) และการเพิ่มขึ้นของโปรตีนขนาด 28-30 kDa (Tn-T product) ตามระยะเวลาการบ่มที่ 2, 7, 14 และ 21 วัน ดังภาพที่ 4.7-4.10



ภาพที่ 4.7 แสดงลักษณะของการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ที่ระยะเวลาบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วันของเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก

(ก) เทคนิค SDS-PAGE และ (ข) เทคนิค western blot

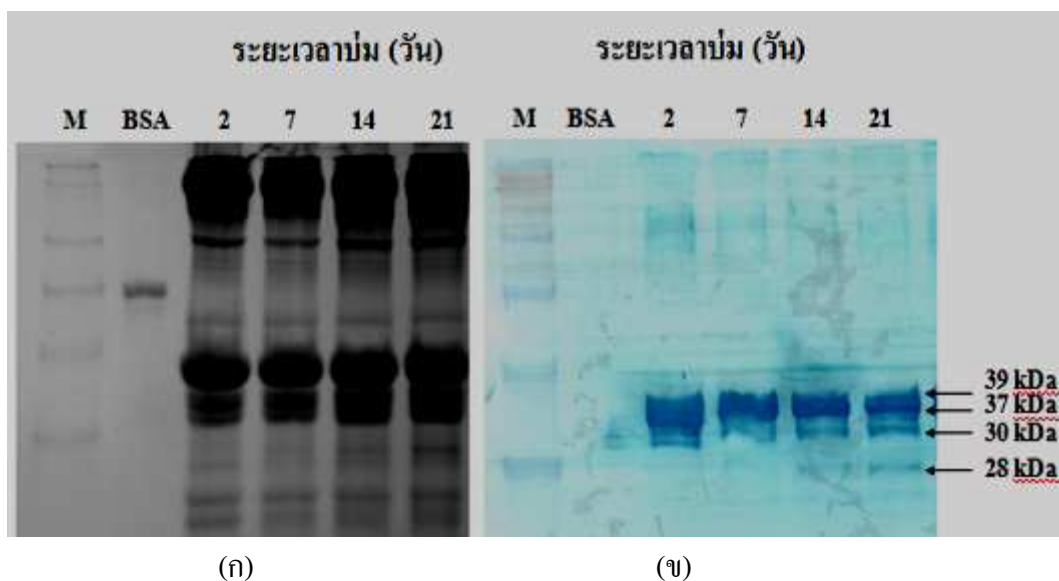
M คือ SeeBlue® plus2 Pre-Stained standard, BSA คือ internal marker



ภาพที่ 4.8 แสดงลักษณะของการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ที่ระยะเวลาบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วันของเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี

(ก) เทคนิค SDS-PAGE และ (ข) เทคนิค western blot

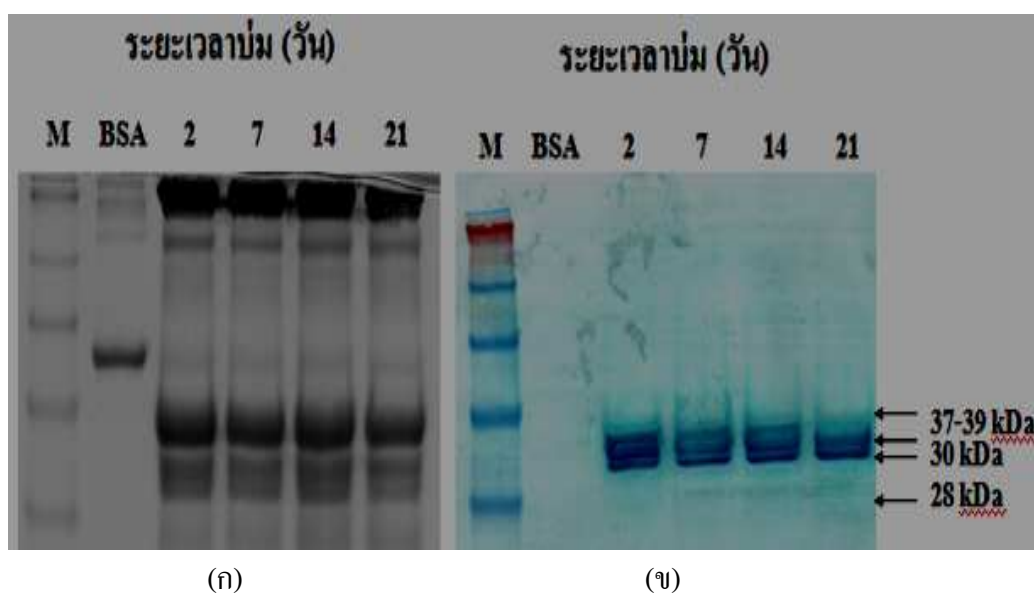
M คือ SeeBlue® plus2 Pre-Stained standard, BSA คือ internal marker



ภาพที่ 4.9 แสดงลักษณะของการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ที่ระยะเวลาบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วันของเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี

(ก) เทคนิค SDS-PAGE และ (ข) เทคนิค western blot

M คือ SeeBlue® plus2 Pre-Stained standard, BSA คือ internal marker



ภาพที่ 4.10 แสดงลักษณะของการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ที่ระยะเวลาบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วันของเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน

(ก) เทคนิค SDS-PAGE และ (ข) เทคนิค western blot

M คือ SeeBlue® plus2 Pre-Stained standard, BSA คือ internal marker

การศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโคที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ในเนื้อปรากฏว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีมีค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 39 kDa ($391.09 \pm 35.21 \times 10^3$ pixel) ซึ่งมีค่ามากกว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก ($228.97 \pm 35.21 \times 10^3$ pixel) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) แต่ไม่แตกต่างกับเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน (404.31 ± 46.49 และ $304.04 \pm 35.21 \times 10^3$ pixel ตามลำดับ) ($p > 0.05$)

ในส่วนของความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 37 kDa พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีค่าความเข้มของโปรตีน ($542.67 \pm 46.49^a \times 10^3$ pixel) มากกว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน (404.31 ± 46.49 , 370.70 ± 46.49 และ $269.49 \pm 46.49 \times 10^3$ pixel ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีไม่แตกต่างกับเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดชัยนาท (ชาวลำพูน) ($p > 0.05$) (ตารางที่ 4.4)

การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ในกลุ่ม 30 kDa พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีมีค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 30 kDa ($419.73 \pm 26.98 \times 10^3$ pixel) มากกว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน (282.30 ± 26.98 , 275.92 ± 26.98 และ $260.17 \pm 26.98 \times 10^3$ pixel ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานีไม่แตกต่างกับเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน ($p > 0.05$)

สำหรับโปรตีน Tn-T ขนาด 28 kDa พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีมีค่าความเข้มโปรตีน ($242.18 \pm 28.99 \times 10^3$ pixel) มากกว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี (188.18 ± 32.41 และ $139.38 \pm 28.99 \times 10^3$ pixel) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) แต่ไม่แตกต่างกับเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน ($240.07 \pm 32.41 \times 10^3$ pixel ตามลำดับ)

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (LSM±SE) ของอิทธิพลของกลุ่มโคที่มีผลต่อความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 39, 37, 30 และ 28 kDa

กลุ่มโคพื้นเมือง	ความเข้มข้นของโปรตีน Tn-T ($\times 10^3$ pixel)			
	39 kDa ¹	37 kDa ¹	30 kDa ²	28 kDa ²
ตาก	228.97±35.21 ^{bc}	542.67±46.49 ^a	282.30±26.98 ^b	139.38±28.99 ^b
อุบลราชธานี	358.07±35.21 ^a	404.31±46.49 ^{bc}	275.92±26.98 ^b	188.18±32.41 ^{ab}
กาญจนบุรี	391.09±35.21 ^a	370.70±46.49 ^{cd}	419.73±26.98 ^a	242.18±28.99 ^a
ชาวลำพูน	304.04±35.21 ^{ab}	269.49±46.49 ^d	260.17±26.98 ^b	240.07±32.41 ^a

^{a-c} อักษรที่แตกต่างกันในแนวดังกล่าวได้อิทธิพลของกลุ่มเนื้อโคมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

¹ กลุ่มย่อยสลาย (Tn-T) , ² กลุ่มผลผลิต (Tn-T product)

เมื่อทำการศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโคที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T รวม โดยแยกออกเป็นโปรตีน Tn-T กลุ่มที่มีการสลายตัว (37–39 kDa) และกลุ่มผลผลิตจากการสลายตัวของ Tn-T (28–30 kDa) พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีค่าความเข้มโปรตีน Tn-T ขนาด 37–39 kDa มากที่สุด ($771.64 \pm 70.59 \times 10^3$ pixel) แต่ไม่แตกต่างกับเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี (762.38 ± 70.59 และ $761.80 \pm 70.59 \times 10^3$ pixel ตามลำดับ) ทั้งนี้โคทั้ง 3 กลุ่มมีค่าความเข้มโปรตีนมากกว่าเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน ($573.53 \pm 70.59 \times 10^3$ pixel) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ส่วนค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T รวม ในกลุ่มผลผลิตจากการสลายตัวของโปรตีน Tn-T (28–30 kDa) พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีมีค่าความเข้มของโปรตีนมากที่สุด $661.92 \pm 48.95 \times 10^3$ pixel โดยมีค่าความเข้มของโปรตีนมากกว่าเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก (454.51 ± 48.95 , 440.43 ± 48.95 และ $421.68 \pm 48.95 \times 10^3$ pixel ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (LSM±SE) ของอิทธิพลของกลุ่มโคที่มีผลต่อความเข้มของโปรตีน Tn-T รวม ขนาด 37-39 และ 28-30 kDa

กลุ่มโคพื้นเมือง	ความเข้มของโปรตีน Tn-T ($\times 10^3$ pixel)	
	37-39 kDa ¹	28-30 kDa ²
ตาก	771.64±70.59 ^a	421.68±48.95 ^b
อุบลราชธานี	762.38±70.59 ^a	440.43±48.95 ^b
กาญจนบุรี	761.80±70.59 ^a	661.92±48.95 ^a
ขวาลำพูน	573.53±70.59 ^b	454.51±48.95 ^b

^{a, b} อักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่งภายใต้อิทธิพลของกลุ่มเนื้อโคมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

¹ กลุ่มย่อยสลาย (Tn-T), ² กลุ่มผลผลิต (Tn-T product)

จากการศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาบ่มที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ในเนื้อพบว่า เมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อเพิ่มขึ้นความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 39 kDa มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยมีค่าความเข้มของโปรตีนที่ระยะเวลาการบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน เท่ากับ 389.97±35.21, 331.25±35.21, 307.41±35.21 และ 253.54±35.21 $\times 10^3$ pixel ตามลำดับ ส่วนการเพิ่มขึ้นของค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 30 และ 28 kDa พบว่ามีการเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่มอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยมีค่าตามระยะเวลาบ่มที่ 2, 7, 14 และ 21 วัน เท่ากับ 260.76±26.98, 299.09±26.98, 332.21±26.98 และ 346.09±26.98 $\times 10^3$ pixel ตามลำดับ สำหรับโปรตีน Tn-T ขนาด 30 kDa และมีค่าเท่ากับ 167.42±32.41, 188.11±32.41, 191.49±32.41 และ 262.76±32.41 $\times 10^3$ pixel ตามลำดับ สำหรับโปรตีน Tn-T ขนาด 28 kDa (ตารางที่ 4.6) ส่วนความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 37 kDa นั้นไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้น ($p > 0.01$)

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าเฉลี่ย+ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (LSM±SE) ของอิทธิพลของระยะเวลาบ่มเนื้อโคที่มีผลต่อความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 39, 37, 30 และ 28 kDa

ระยะเวลาบ่ม (วัน)	ความเข้มข้นของ Tn-T ($\times 10^3$ pixel)			
	39 kDa	37 kDa	30 kDa	28 kDa
2	389.97±35.21 ^a	425.14±46.49	260.76±26.98 ^c	167.42±32.41 ^y
7	331.25±35.21 ^{ab}	418.14±46.49	299.09±26.98 ^{bc}	188.11±32.41 ^y
14	307.41±35.21 ^{bc}	390.18±46.49	332.21±26.98 ^{ab}	191.49±32.41 ^{xy}
21	253.54±35.21 ^c	353.70±46.49	346.09±26.98 ^a	262.76±32.41 ^x

^{a-c} อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งภายใต้อิทธิพลของระยะเวลาบ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

^{x-z} อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งภายใต้อิทธิพลของระยะเวลาบ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เมื่อทำการศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาบ่มที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T รวมในกลุ่ม 37-39 kDa พบว่าความเข้มของโปรตีนลดลงตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีค่าความเข้มของโปรตีนที่ระยะเวลาการบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน เท่ากับ 815.11 ± 70.59 , 749.39 ± 70.59 , 697.59 ± 70.59 และ $607.224\pm 70.59 \times 10^3$ pixel ตามลำดับ ในขณะที่ค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T รวม ในกลุ่ม 28-30 kDa เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) โดยมีค่าเท่ากับ 394.67 ± 48.95 , 451.34 ± 48.95 , 523.65 ± 48.95 และ $608.86\pm 48.95 \times 10^3$ pixel ตามระยะเวลาบ่มที่ 2, 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

การศึกษาในครั้งนี้ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคกับระยะเวลาบ่ม ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ทั้งจากการวิเคราะห์ทางสถิติของเนื้อโคพื้นเมืองและการวิเคราะห์ทางสถิติของเนื้อโคพื้นเมืองร่วมกับเนื้อโคโพนยางคำ (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (LSM±SE) ของอิทธิพลของระยะเวลาบ่มเนื้อโคที่มีผลต่อความเข้มของโปรตีน Tn-T รวม ขนาด 37-39 และ 28-30 kDa

ระยะเวลาบ่ม (วัน)	ความเข้มของโปรตีน Tn- T ($\times 10^3$ pixel)	
	37-39 kDa ¹	28-30 kDa ²
2	815.11±70.59 ^x	394.67±48.95 ^c
7	749.39±70.59 ^x	451.34±48.95 ^{bc}
14	697.59±70.59 ^{xy}	523.65±48.95 ^{ab}
21	607.224±70.59 ^y	608.86±48.95 ^a

^{a-c} อักษรที่แตกต่างกันในแนวดังภายใต้อิทธิพลของระยะเวลาบ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

^{x, y} อักษรที่แตกต่างกันในแนวดังภายใต้อิทธิพลของระยะเวลาบ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

¹ กลุ่มย่อยสลาย (Tn-T), ² กลุ่มผลผลิต (Tn-T product)

ตารางที่ 4.8 แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มเนื้อโคกับระยะเวลาบ่มที่มีผลต่อความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 37-39 และ 28-30 kDa ($\times 10^3$ pixel)

กลุ่มโคพื้นเมือง (C)	ระยะเวลาบ่ม (A)				P-value
	2 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	C*A
ตาก	896.57	775.52	757.97	656.5	1.0000
อุบลราชธานี	848.03	795.66	786.51	619.32	
กาญจนบุรี	869.43	817.85	707.28	652.63	
ขาวลำพูน	646.44	608.54	538.61	500.55	
ตาก	333.53	390.24	446.73	516.21	0.9887
อุบลราชธานี	312.47	346.83	486.24	616.19	
กาญจนบุรี	530.73	611	706.37	799.57	
ขาวลำพูน	401.96	457.3	455.3	503.49	

¹ กลุ่มย่อยสลาย (Tn-T), ² กลุ่มผลผลิต Tn-T product

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานีมีการสลายตัวสูงที่สุด (26.97 เปอร์เซ็นต์) เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการบ่มที่ 21 วัน รองมาคือ เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน โดยมีเปอร์เซ็นต์การสลายตัวเท่ากับ 26.78, 24.94 และ 22.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 แสดงเปอร์เซ็นต์การสลายตัวของโปรตีน Tn-T ในกลุ่ม 37-39 kDa ในแต่ละระยะเวลาดการบ่มเทียบกับระยะเวลาการบ่มเริ่มต้น

กลุ่มโคพื้นเมือง	ระยะเวลาดบ่ม (วัน)		
	2-7	2-14	2-21
ตาก	13.5	15.46	26.78
อุบลราชธานี	6.18	7.25	26.97
กาญจนบุรี	5.93	18.65	24.94
ขาวลำพูน	5.86	16.68	22.57

4.6.4 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีน ด้วยเทคนิค 2D - gel

การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยเทคนิค 2D- gel พบความแตกต่างของโปรตีนรวมของเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูนในระยะเวลาบ่มที่ 2 และ 14 วัน จำนวน 8 ตำแหน่ง โดยตำแหน่งที่ 1 ถึง 4 พบในวันที่ 14 ของระยะเวลาดบ่มในเนื้อโคทุกชนิดยกเว้นเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดจากกาญจนบุรี ตำแหน่งที่ 5 พบเฉพาะในวันที่ 2 ของระยะเวลาดบ่มในเนื้อโคทุกชนิด ตำแหน่งที่ 6 และ 7 พบในช่วงระยะเวลาดการบ่มที่ 2 และ 14 วัน ในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี สำหรับตำแหน่งที่ 8 พบในช่วงระยะเวลาดการบ่มดังกล่าวเฉพาะในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีเท่านั้น (ตารางที่ 4.10 และภาพที่ 4.11-4.14)

ตารางที่ 4.10 แสดงการปรากฏและการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนรวมของเนื้อโคในแต่ละระยะเวลาบ่ม

ตำแหน่ง ที่	หมายเลข	pI/Mr	ระยะเวลาบ่ม (วัน)	
			2	14
1	4601	4.8 / 40.2	-	a
2	4702	5.0 / 41.5	-	a
3	4703	5.2 / 41.8	-	a
4	4704	5.4 / 41.9	-	a
5	4804	5.4 / 49.9	/	-
6	5201	6.5 / 17.2	b	/
7	6201	6.6 / 17.2	b	/
8	7603	6.6 / 38.1	c	/

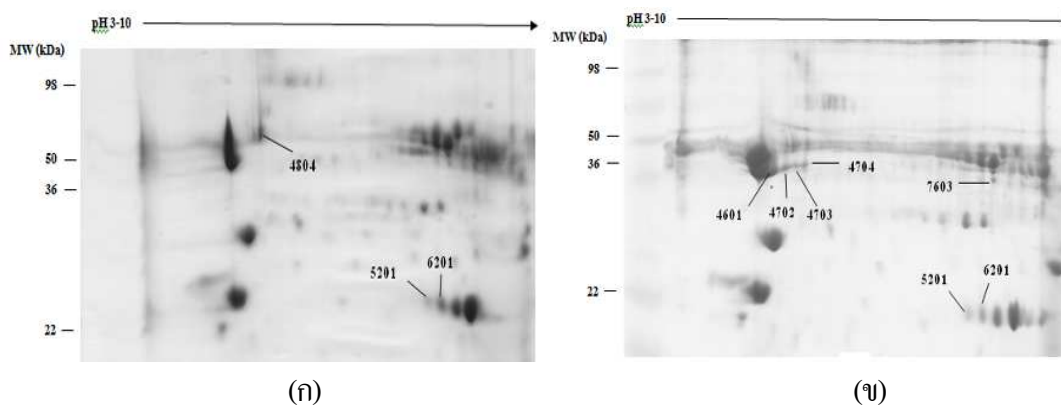
- = ไม่พบตำแหน่งของโปรตีน

/ = พบตำแหน่งของโปรตีนจากเนื้อโคทุกแหล่ง

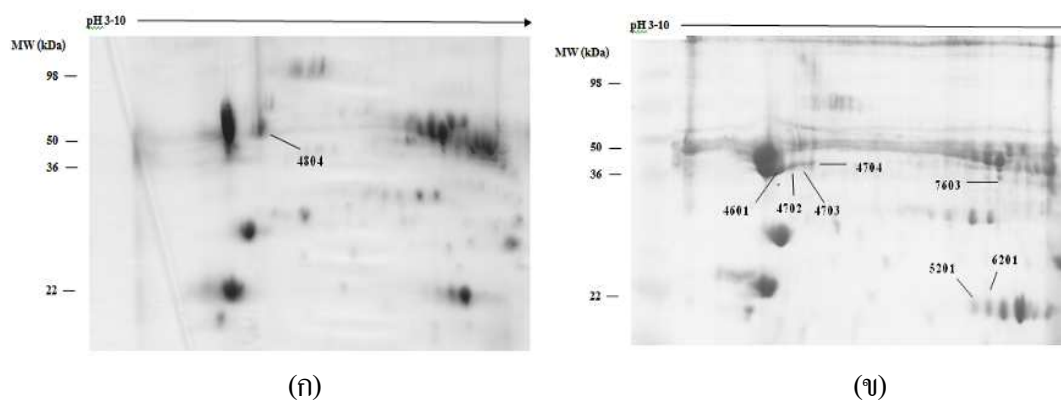
a = พบตำแหน่งของโปรตีนเฉพาะเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน

b = พบตำแหน่งของโปรตีนเฉพาะเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก และกาญจนบุรี

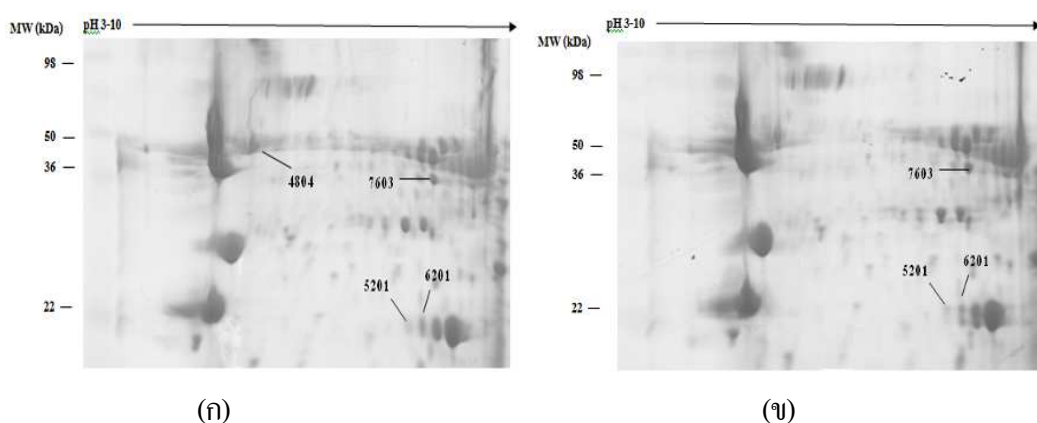
c = พบตำแหน่งของโปรตีนเฉพาะเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี



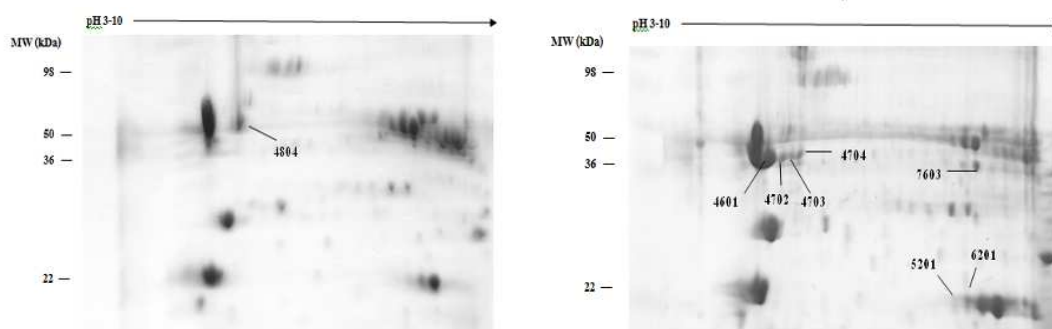
ภาพที่ 4.11 แสดงความแตกต่างของโปรตีนรวมที่ระยะเวลาบ่ม 2 และ 14 วัน ในเนื้อโคพื้นเมืองจาก จังหวัดตาก (ก) ระยะเวลาบ่ม 2 วัน และ (ข) ระยะเวลาบ่ม 14 วัน



ภาพที่ 4.12 แสดงความแตกต่างของโปรตีนรวมที่ระยะเวลาบ่ม 2 และ 14 วัน ในเนื้อโคพื้นเมืองจาก จังหวัดอุบลราชธานี (ก) ระยะเวลาบ่ม 2 วัน และ (ข) ระยะเวลาบ่ม 14 วัน



ภาพที่ 4.13 แสดงความแตกต่างของโปรตีนรวมที่ระยะเวลาบ่ม 2 และ 14 วัน ในเนื้อโคพื้นเมืองจาก จังหวัดกาญจนบุรี (ก) ระยะเวลาบ่ม 2 วัน และ (ข) ระยะเวลาบ่ม 14 วัน



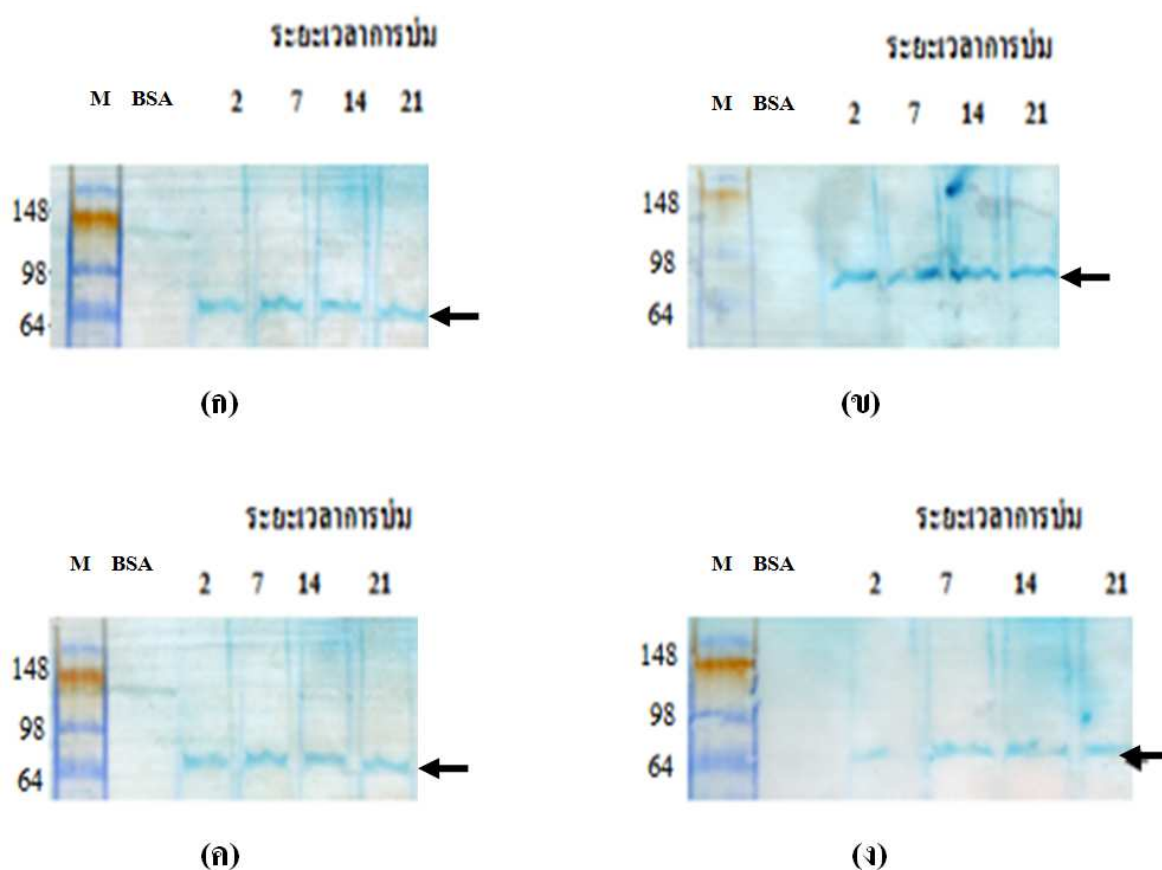
ภาพที่ 4.14 แสดงความแตกต่างของโปรตีนรวมที่ระยะเวลาบ่ม 2 และ 14 วัน ในเนื้อ โคพื้นเมืองพันธุ์
ชาวลำพูน (ก) ระยะเวลาบ่ม 2 วัน และ (ข) ระยะเวลาบ่ม 14 วัน

4.6.5 ผลการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอนไซม์ μ -calpain ด้วยวิธี Western blot

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอนไซม์ μ -calpain ด้วยเทคนิค western blot พบการปรากฏของแถบแบน ขนาดประมาณ 80 kDa ในเนื้อโคทุกชนิด โดยเนื้อโคพื้นเมืองจาก จังหวัดตาก เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูนพบแถบแบนอย่างชัดเจนตั้งแต่วันที่ 2 ของการบ่ม และมีการสลายตัวตามระยะเวลาการบ่มจนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยโดยเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก เนื้อโคพื้นเมืองจาก จังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี มีการสลายตัวเท่ากับ 44.50, 42.98 และ 65.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในวันที่ 30 ของการบ่ม เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดชัยนาท (ชาวลำพูน) มีการสลายตัวในวันที่ 21 ของการบ่ม เท่ากับ 49.21 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับวันแรกของการบ่ม (2 วัน) (ตารางที่ 4.11 และภาพที่ 4.15)

ตารางที่ 4.11 แสดงเปอร์เซ็นต์การสลายตัวของเอนไซม์ μ -calpain ขนาดประมาณ 80 kDa ในแต่ละ
ระยะเวลาการบ่มเทียบกับระยะเวลาการบ่มเริ่มต้น

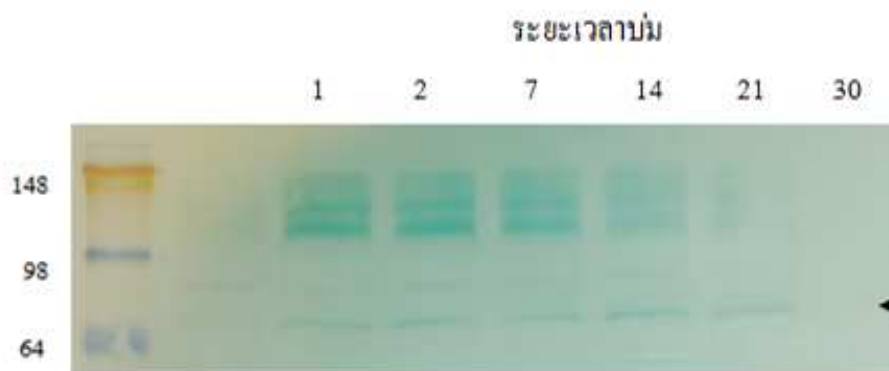
แถบโปรตีน	กลุ่มโคพื้นเมือง	ระยะเวลาบ่ม (วัน)		
		2-7	2-14	2-21
80 kDa	ตาก	4.48	25.96	35.88
	อุบลราชธานี	9.83	12.36	43.34
	กาญจนบุรี	2.07	7.97	13.96
	ชาวลำพูน	9.34	39.0	49.21



ภาพที่ 4.15 การแสดงออกของโปรตีน μ -calpain ในกลุ่มโคต่างชนิดตามระยะเวลาการบ่มที่ 2, 7, 14, และ 21 วัน โดย (ก) เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก (ข) เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี (ค) เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และ (ง) เนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน

← แสดงถึงแถบแบนขนาดประมาณ 80 kDa

ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอนไซม์ μ -calpain ด้วยเทคนิค western blot ในระยะเวลาการบ่มที่ 1 7 14 21 และ 30 วัน เพิ่มเติม พบแถบแบนขนาดประมาณ 80 kDa ในวันที่ 1 ของระยะเวลาการบ่ม และลดลงตามระยะเวลาการบ่ม (ภาพที่ 4.16)

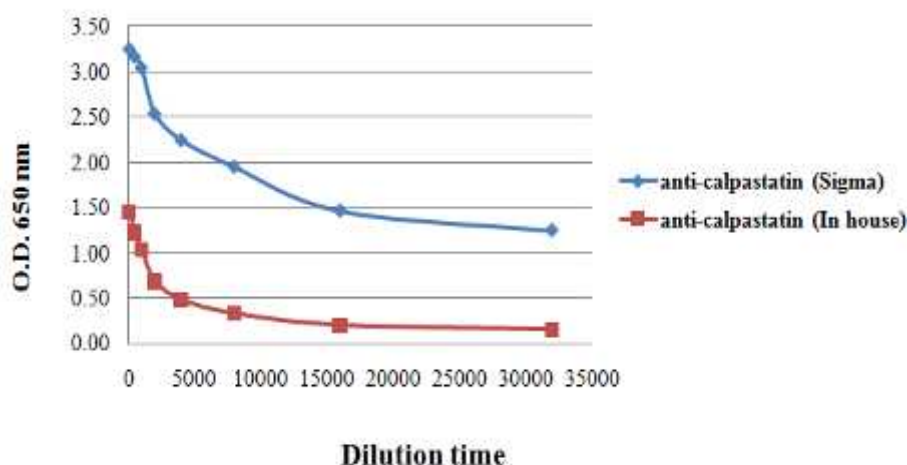


ภาพที่ 4.16 การแสดงออกของโปรตีน μ -calpain ในกลุ่มโคต่างชนิดตามระยะเวลาการบ่มที่ 1, 2, 7, 14, 21 และ 30 วัน
 ←แสดงถึงแถบแบนขนาดประมาณ 80 kDa

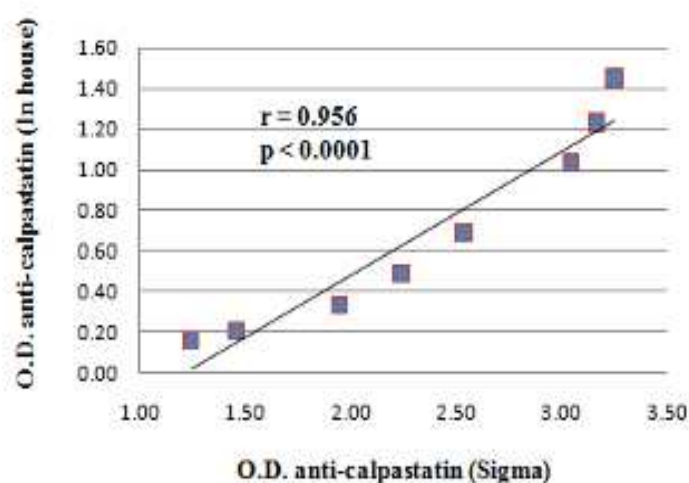
4.7 การพัฒนาการใช้ calpastatin antibody ในการตรวจสอบความนุ่มของเนื้อโค

4.7.1 ผลการทดสอบเปรียบเทียบ polyclonal anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเอง (pET-28a. 1AD; Tavitchasri, 2007) กับ monoclonal anti-calpastatin ทางการค้า (clone 1F7E3DD10; Sigma, U.S.A.)

การทดสอบครั้งนี้พบว่า การใช้ polyclonal anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเองนั้น ไปได้ปริมาณ calpastatin antigen (Merck) ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยวิธี iELISA จะได้ค่า O.D. ที่ 650 nm ต่ำกว่าผลจากการใช้ monoclonal anti-calpastatin ทางการค้า แต่อย่างไรก็ตามแนวโน้มการลดลงของค่า O.D. เมื่อความเข้มข้นของ calpastatin antigen ลดลงของ antibody ทั้ง 2 ชนิดเป็นไปในทำนองเดียวกัน (ภาพที่ 4.17) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง antibody ทั้ง 2 ชนิดมีค่าสูงมากคือ $r = 0.956$ ($p < 0.0001$) ดังภาพที่ 4.18 จึงสรุปได้ว่าการหาปริมาณโปรตีน calpastatin (CAST) ด้วยวิธี iELISA ในตัวอย่างเนื้อโคพื้นเมืองไทยในครั้งนี้สามารถนำ polyclonal anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเองนั้นไปใช้ในการทดสอบได้เป็นอย่างดี



ภาพที่ 4.17 ค่า O.D. ที่ 650 nm ของ polyclonal anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเอง และ monoclonal anti-calpastatin ที่ผลิตเพื่อการค้า



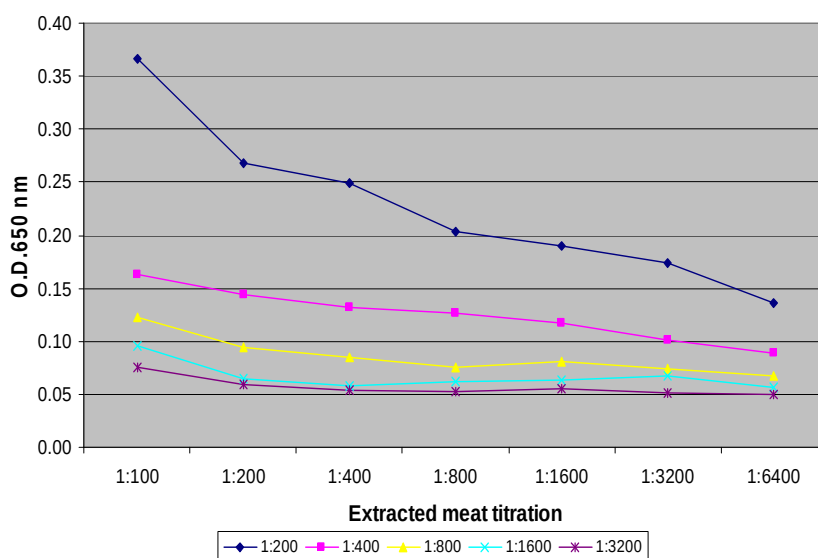
ภาพที่ 4.18 สหสัมพันธ์ระหว่าง ค่า O.D. ที่ 650 nm ของ polyclonal anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเอง และ monoclonal anti-calpastatin ที่ผลิตเพื่อการค้า

4.7.2 ผลการตรวจหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Antibodies ต่อโปรตีนที่สกัดจากเนื้อโค

ตรวจหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antigen และ primary antibodies เพื่อใช้ในการตรวจหาปริมาณโปรตีน CAST โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร (O.D. 650 nm) ในเนื้อโค ใช้โปรตีนสกัดจากเนื้อโคที่ระยะการเก็บ 0 วัน เป็น antigen โดยเจือจางเป็น 2-fold dilution ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 1:100 จนถึง 1:6,400 และใช้ซีรัมกระจายที่ถูกกระตุ้นด้วย pET-28a.1AD recombinant protein (ปิยะดา ทวีศรี. 2550) เป็น antibodies เจือจางให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 1:200 จนถึง 1:3,200 ผลการทดลองพบว่าเมื่อเจือจาง antigen ให้มีความเข้มข้นลดลงจะส่งผลให้ค่า O.D. 650 nm ลดลง และเกือบใกล้เคียงกันในความเข้มข้นสุดท้าย (ภาพที่ 4.19)

ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของ antigen ที่ระดับ 1:100 เพราะความเข้มข้นนี้สามารถอ่านค่า O.D.650 nm ได้ชัดเจนกว่าที่ระดับความเข้มข้นที่ต่ำลง ส่วนการเจือจาง antibodies ให้มีความเข้มข้นที่ลดลงจะเห็นได้ว่าในทุกะดับความเข้มข้นสามารถทำปฏิกิริยากับ antigen ให้ผลเป็นไปในทางเดียวกัน แต่ในการทดลองนี้จะเลือก primary antibodies เจือจางที่ความเข้มข้น 1:200 เนื่องจากที่ระดับความเข้มข้นนี้สามารถที่จะตรวจสอบความแตกต่างของปริมาณโปรตีนได้ดีที่สุด

Checker-Board titration



ภาพที่ 4.19 การตรวจสอบ Checker-Board titration ระหว่างโปรตีนสกัดจากกล้ามเนื้อสันนอกของโคที่เจือจาง 1:100 ถึง 1:6,400 กับซีรัมของกระต่ายที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันด้วย pET-28a.1AD recombinant protein ที่เจือจาง 1:200 ถึง 1:3,200

4.7.3 ผลการตรวจหาปริมาณโปรตีน calpastatin ในเนื้อโคพื้นเมืองไทยและระยะเวลาการบ่มด้วยวิธี iELISA

จากการตรวจสอบปริมาณโปรตีน CAST จากเนื้อโค ด้วยซีรัมกระต่าย โดยเจือจางโปรตีนสกัดจากเนื้อโคให้มีความเข้มข้น 1:100 และใช้ซีรัมกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วย pET-28a.1AD recombinant protein เป็น primary antibodies โดยเจือจางให้มีความเข้มข้น 1:200 พบว่าอิทธิพลของกลุ่มเนื้อโคไทยมีผลต่อปริมาณโปรตีน CAST โดยเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก มีปริมาณโปรตีน CAST ต่ำที่สุด (1.71 ± 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) รองลงมาคือ เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี เนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี โดยมีปริมาณโปรตีน CAST เท่ากับ 1.82 ± 0.04 , 1.89 ± 0.04 และ 1.99 ± 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ตามลำดับ ($p < 0.05$) ซึ่งเนื้อโคพื้นเมืองจาก

จังหวัดอุบลราชธานี เนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีนั้นมีปริมาณโปรตีน *CAST* ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1ข

การศึกษาในส่วนของระยะเวลาการบ่ม พบว่าอิทธิพลของระยะเวลาการบ่มมีผลต่อปริมาณโปรตีน *CAST* โดยที่ระยะเวลาการบ่ม 2 วัน มีปริมาณโปรตีน *CAST* สูงกว่าเนื้อโคที่ระยะเวลาการบ่ม 7, 14 และ 21 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 2.24 ± 0.04 , 1.94 ± 0.04 , 1.70 ± 0.04 และ 1.54 ± 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อระยะเวลาในการบ่มเนื้อมานานขึ้น ปริมาณโปรตีน *CAST* จะลดลง แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างเนื้อที่บ่มนาน 14 และ 21 วัน ดังแสดงในตารางที่ 4.1

อิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มเนื้อโคไทยและระยะเวลาการบ่มไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีน *CAST* ($p>0.05$)

4.8 ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ collagen ชนิดของโปรตีนที่แสดงออกในเนื้อ และปริมาณโปรตีน calpastatin ที่มีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อโค

ค่าสหสัมพันธ์ของตัวชี้วัดคุณภาพเนื้อด้านความนุ่ม ได้แก่ ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณโปรตีน *CAST* ปริมาณ Soluble Collagen(SC) และปริมาณโปรตีน Tn-T₂₈₋₃₀ ของกลุ่มโคพื้นเมืองทั้ง 4 กลุ่มรวมทุกระยะเวลาการบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน แสดงผลในตารางที่ 4.12, 13 ซึ่งให้เห็นว่าค่า แรงตัดผ่านเนื้อ (WBSF) มีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน *CAST* และปริมาณ SC แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน Tn-T₂₈₋₃₀ โดยมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณโปรตีน *CAST* ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ($r=0.68$) ($p<0.01$) และมีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับปริมาณ SC (-0.49) นั่นคือเมื่อความเหนียวของเนื้อเพิ่มมากขึ้นปริมาณโปรตีน *CAST* จะสูงขึ้นและปริมาณ SC จะลดลง ทั้งนี้แม้ว่าปริมาณโปรตีน Tn-T₂₈₋₃₀ จะไม่มีความสัมพันธ์ กับค่าแรงตัดผ่านเนื้อ แต่พบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณ *CAST* โดยมีค่าสหสัมพันธ์ในทางลบ ($r = -0.31$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กล่าวคือ เมื่อปริมาณ *CAST* สูงปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสลายตัวคือ Tn-T₂₈₋₃₀ จะลดลง

ตารางที่ 4.12 แสดงค่าเฉลี่ย สูงสุด ต่ำสุด ของข้อมูลที่ทำการศึกษา

ลักษณะที่ศึกษา	N	Mean	Std Dev	CV	Minimum	Maximum
WBSF (kg/cm ²)	144	7.71	2.14	18.26	3.71	15.54
CAST (μg/μl)	144	1.86	0.38	12.72	1.16	3.16
SC (mg/g)	131	0.19	0.1	36.24	0.02	0.64
ISC (mg/g)	130	2.35	1.16	29.60	0.04	4.92
Tn-T ₂₈₋₃₀ (x10 ³ pixel)	48	462.95	186.49	34.28	173.12	932.51

ตารางที่ 4.13 ค่าสหสัมพันธ์ของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความนุ่มของเนื้อเฉพาะกลุ่มโคพื้นเมือง 4 กลุ่ม โดยรวมทุกระยะเวลาการบ่ม

ลักษณะที่ศึกษา	WBSF	CAST	SC	ISC	Tn-T ₂₈₋₃₀
WBSF (kg/cm ²)	.	0.68**	-0.49**	0.18*	-0.08
CAST (μg/μl)	.	.	-0.46**	0.25**	-0.31*
SC (mg/g)	.	.	.	0.05	0.05
ISC (mg/g)	.	.	.		-0.16
Tn-T ₂₈₋₃₀ (x10 ³ pixel)	.				.

* p<0.05, ** p<0.01

ตอนที่ 2 ศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรป

4.9 อิทธิพลของกลุ่มโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรป

จากการศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโคลูกผสมพันธุ์ซิมเมนทอลที่มีผลต่อคุณภาพเนื้อบางประการที่ทำการศึกษา พบว่าโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูง (5/8 Simmental) สีของเนื้อจะมีความสว่าง (L^*) และมีค่าสีแดงของเนื้อ (a^*) มากกว่าเนื้อโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำ (2/8 Simmental) โดยมีค่า L^* เท่ากับ 38.97 และ 35.46 ตามลำดับ ส่วนค่า a^* มีค่าเท่ากับ 25.39 และ 23.06 ตามลำดับ ($p < 0.05$) ในส่วนของค่าสีเหลืองของเนื้อ (b^*) พบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณไขมันแทรกในเนื้อ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างโคทั้ง 2 กลุ่ม

จากการศึกษาความนุ่มของเนื้อโคขุน พบว่าโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูงมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อน้อยกว่ากลุ่มโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำ โดยมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 5.06 และ 6.46 กิโลกรัม ตามลำดับ ($p < 0.05$)

4.10 อิทธิพลของระยะเวลาการบ่ม

อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มที่แตกต่างกันมีอิทธิพลต่อค่าสีของเนื้อและค่าแรงตัดผ่านเนื้อ พบว่าเมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้น สีของเนื้อจะมีความสว่างมากขึ้น ($p < 0.05$) ส่วนค่า a^* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ($p > 0.05$) สอดคล้องกับค่า b^* ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อบ่มเนื้อเป็นระยะเวลานานขึ้นด้วยเช่นกัน ($p < 0.05$) แต่เนื้อที่บ่มนานกว่า 7 วันจะมีค่าสี (L^* , a^* และ b^*) ที่วัดได้สูงขึ้นตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

ค่าแรงตัดผ่านเนื้อและปริมาณโปรตีน CAST จะมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้น ($p < 0.05$) โดยที่ระยะเวลาการบ่ม 2 วัน มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 6.94 ± 0.40 กิโลกรัม และ 3.11 ± 0.19 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ตามลำดับ และมีความแตกต่างกับเนื้อที่ผ่านการบ่ม 7, 14 และ 21 วัน ($p < 0.05$) แต่จะเห็นได้ว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อและปริมาณโปรตีน CAST ที่บ่มนาน 14 วันไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติกับเนื้อที่บ่มนาน 21 ($p > 0.05$)

ในส่วน of ปริมาณ total collagen (TC) และปริมาณ insoluble collagen (ISC) พบว่ามีการย่อยสลายสูงขึ้นโดยมีค่าลดลงตามระยะเวลาการบ่มเนื้อมานานขึ้น (Kołczak *et al.* 2008) ทั้งนี้มีปริมาณ TC เท่ากับ 3.70 ± 0.39 , 2.24 ± 0.39 , 0.98 ± 0.39 และ 0.80 ± 0.39 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อ ตามลำดับ ส่วนปริมาณ ISC มีค่าเท่ากับ 1.85 ± 0.22 , 1.25 ± 0.24 , 0.95 ± 0.24 และ 0.76 ± 0.22 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อ ตามลำดับ ($p < 0.05$) ทั้งนี้เนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ cathepsin ซึ่งจะทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันภายหลังจากเอนไซม์ calpain ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (Pearson and Young, 1989) ทำให้โปรตีนเกิดการย่อยสลายเป็นมากขึ้น จึงทำให้เนื้อโคที่ผ่านการบ่มมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลง (Nishimura *et al.* 1998) ซึ่งจะส่งผลต่อความนุ่มของเนื้อเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.14 แสดงค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (LSM±SE) ของอิทธิพลของกลุ่มโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรปและระยะเวลาบ่มที่มีผลต่อลักษณะคุณภาพเนื้อปริมาณโปรตีน calpastatin (*CAST*) ปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด (TC) และที่ไม่ละลาย (ISC)

ลักษณะที่ศึกษา	ระดับเลือด (B)		ระยะเวลาการบ่ม (A)				B	A	B*A
	2/8 Simmental	5/8 Simmental	2 Day	7 Day	14 Day	21 Day			
pH	5.43±0.06	5.49±0.04	5.50±0.07	5.34±0.07	5.53±0.07	5.49±0.07	0.3870	0.2386	0.1884
L* (lightness)	35.46±0.74 ⁿ	38.97±0.47 ^m	34.45±0.92 ^c	36.52±0.92 ^{bc}	38.13±0.78 ^{ab}	39.76±0.90 ^a	0.0006	0.0028	0.3916
a* (redness)	23.06±0.65 ⁿ	25.39±0.41 ^m	22.51±0.80	24.27±0.80	24.74±0.68	25.38±0.78	0.0059	0.0895	0.9767
b* (yellowness)	8.09±0.67	8.39±0.43	6.29±0.83 ^b	8.06±0.83 ^{ab}	9.45±0.70 ^a	9.15±0.81 ^a	0.7063	0.0414	0.9664
WBSF (kg/cm ²)	6.46±0.33 ^m	5.06±0.23 ⁿ	6.94±0.40 ^a	5.77±0.40 ^b	5.39±0.40 ^b	4.96±0.40 ^b	0.0018	0.0117	0.6561
<i>CAST</i> (µg/µl)	2.37±0.14	2.60±0.11	3.11±0.19 ^a	2.47±0.19 ^b	2.21±0.19 ^b	2.14±0.19 ^b	0.2398	0.0039	0.6863
ISC (mg/g)	1.42±0.18	0.99±0.14	1.85±0.22 ^a	1.25±0.24 ^{ab}	0.95±0.24 ^b	0.76±0.22 ^b	0.0723	0.0104	0.2748
Total Collagen (mg/g)	2.35±0.32 ^m	1.51±0.23 ⁿ	3.70±0.39 ^a	2.24±0.39 ^b	0.98±0.39 ^c	0.80±0.39 ^c	0.0421	<.0001	0.2046

^{m, n} อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

^{a - c} อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

4.11 ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ collagen ชนิดของโปรตีนที่แสดงออกในเนื้อ และปริมาณโปรตีน calpastatin กับความนุ่มของเนื้อโคลูกผสมเลือดยุโรป

ค่าสหสัมพันธ์ของตัวชี้วัดความนุ่มในเนื้อของกลุ่มโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรปหรือโคขุน โพนยางคำ (ตารางที่ 4.14-15) แสดงให้เห็นว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน Tn-T₂₈₋₃₀ โดยมีค่าสหสัมพันธ์ในทางลบเท่ากับ 0.67 ($p < 0.05$) และมีค่าสหสัมพันธ์ในทางบวกกับ ปริมาณโปรตีน CAST และ SC เท่ากับ 0.52 และ 0.48 ตามลำดับ ทั้งนี้ไม่พบว่าปริมาณโปรตีน Tn-T₂₈₋₃₀ มีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน CAST

ตารางที่ 4.15 แสดงค่าเฉลี่ย สูงสุด ต่ำสุด ของข้อมูลที่ทำการศึกษา

ลักษณะที่ศึกษา	N	Mean	Std Dev	CV	Minimum	Maximum
WBSF (kg/cm ²)	52	5.39	1.41	22.45	2.88	8.44
CAST (μg/μl)	52	2.64	0.77	23.36	1.45	4.45
SC (mg/g)	46	0.74	0.91	68.31	0.00	2.84
ISC (mg/g)	45	1.26	0.82	61.05	0.04	3.99
Tn-T ₂₈₋₃₀ (x10 ³ pixel)	12	673.01	103.46	10.82	488.21	815.62

ตารางที่ 4.16 แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (WBSF) ปริมาณโปรตีน calpastatin (CAST) ปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ (SC) คอลลาเจนที่ไม่ละลาย (ISC) และ ความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 28-30 kDa

ลักษณะที่ศึกษา	WBSF	CAST	SC	ISC	Tn-T ₂₈₋₃₀
WBSF (kg/cm ²)	-	0.52**	0.48**	0.11	-0.67*
CAST (μg/μl)	.	.	0.46**	0.2	-0.10
SC (mg/g)	.	.	.	0.64**	-0.88**
ISC (mg/g)	.	.	.	.	-0.29
Tn-T ₂₈₋₃₀ (x10 ³ pixel)	.	.	.	.	-

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมืองต่างกลุ่มพื้นที่การเลี้ยง

ในการศึกษาความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมืองในครั้งนี้ใช้ข้อมูลค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณ soluble collagen (SC) ความเข้มข้นของกลุ่มโปรตีนที่มีการสลายตัว Tn-T ขนาด 37-39 kDa และกลุ่มผลผลิตจากการสลายตัวคือ Tn-T ขนาด 28-30 kDa โดยวิธีการ SDS-Page ปริมาณโปรตีน calpastatin (CAST) ผลปรากฏว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำที่สุด แต่ระหว่างกลุ่มโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี โคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน และโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานีไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลของปริมาณโปรตีน CAST ที่พบในกลุ่มโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากต่ำที่สุด และสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนกลุ่ม Tn-T ขนาด 28-30 kDa ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายโปรตีนกลุ่ม Tn-T ขนาด 37-39 kDa ที่พบว่าโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีปริมาณความเข้มข้นสูงที่สุด รองลงมาเป็นโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี โคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับปริมาณ SC ที่พบในโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมากที่สุด ในขณะที่กลุ่มโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน โคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีไม่มีความแตกต่างกัน

การที่โปรตีน CAST (protein inhibitor) มีปริมาณเพิ่มขึ้นจะไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ calpains ที่ย่อยไปสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อเป็น ผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ calpains ในกระบวนการ proteolysis ทำงานได้น้อย ส่งผลทำให้เนื้อมีความนุ่มลดลง (Pringle *et al.* 1997, Huff-Lonergan and Lonergan 1999) และการที่มีปริมาณโปรตีน Tn-T ขนาด 28-30 kDa มากขึ้นแสดงถึงปริมาณการย่อยสลายโปรตีน Tn-T ขนาด 37-39 kDa ทั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Ho *et al.* (1997) ที่รายงานว่าผลจากการย่อยสลายโปรตีนในกลุ่ม myofibrillar protein ส่วนใหญ่แล้วมักพบการปรากฏของโปรตีนที่มีขนาด 30 kDa หรือ Tn-T products ซึ่งสามารถพบได้ในกล้ามเนื้อโคภายหลังการสตั๊ตตาย และมีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อที่เพิ่มขึ้น ซึ่ง Steen *et al.* (1997) กล่าวว่า การย่อยสลายของโปรตีน Tn-T และการปรากฏขึ้นของโปรตีนขนาด 30 kDa ในเวลาเดียวกันนั้น นับว่าเป็นตัวบ่งชี้ได้อย่างดีถึงการเกิดกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อสัตว์โดยเอนไซม์ calpains และมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเพิ่มขึ้นของความนุ่ม

การที่ปริมาณ soluble collagen ในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีมากที่สุด อาจจะเป็นผลเนื่องมาจากโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากเป็นโคที่ถูกคัดเลือกตัวที่มีลักษณะดีมาจากกลุ่มโคพื้นเมืองของเกษตรกรที่เลี้ยงในจังหวัดตาก และถูกนำมาเลี้ยงในพื้นที่ที่จำกัดบริเวณและไม่ต้องเดินออกไปหากินหญ้าตามธรรมชาติ แต่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารหยาบที่มีคุณภาพสูงซึ่งประกอบด้วย ถั่วฮามาตา

หญาฐ์ และหญาแพงโกล่า ซึ่งเป็นอาหารหยาบที่มีค่าพลังงานสูงกว่าอาหารหยาบจากหญาธรรมชาติหรือหญาแพงโกล่าแต่เพียงอย่างเดียว จึงมีผลทำให้ความแข็งแรงของ collagen ที่เกิดจากสะพานเชื่อม (crosslinkage) ระหว่างโมเลกุลของเส้นใยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (intra และ intermolecular crosslinkage) ลดลง ซึ่งจะสัมพันธ์กับปริมาณ soluble collagen ที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้ Bruce *et al.* (2004) ที่ได้ศึกษาระบบการเลี้ยงด้วยอาหารข้นและหญาเป็นอาหารหลัก พบว่าเนื้อโคที่เลี้ยงด้วยอาหารข้นมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำกว่ากลุ่มที่กินหญาเพียงอย่างเดียว

5.2 ความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมืองต่างระยะเวลาการบ่มเนื้อ

ผลจากการศึกษาความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมืองที่ระยะเวลาการบ่มต่างกันคือ 2, 7, 14 และ 21 วัน พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลงอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้น แต่ไม่พบความแตกต่างที่ระยะเวลาการบ่ม 14 และ 21 วัน สอดคล้องกับปริมาณโปรตีน calpastatin ที่ลดลงตามระยะเวลาการบ่มที่นานขึ้นแต่ไม่แตกต่างกันที่ระยะเวลาการบ่ม 14 และ 21 วัน อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณ soluble collagen เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงอายุการบ่ม 21 วัน

เมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้นมีผลทำให้เนื้อนุ่มขึ้นเป็นผลเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ในเนื้อที่เข้าย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ทั้งนี้ Koohmaraie (1994) และ Dransfield (1994) ได้รายงานว่าเอนไซม์ในเนื้อโดยเฉพาะ calpains มีบทบาทสำคัญและเอนไซม์ตัวนี้จะทำการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อในช่วงแรกของระยะเวลาการบ่ม (Sentandreu *et al.* 2002) ทั้งนี้มีรายงานของ Boehm *et al.* (1998) พบว่าปริมาณเอนไซม์ m-calpain จะค่อยๆ ลดลง ในระหว่างการเก็บเนื้อขณะที่ปริมาณ μ -calpain จะลดลง 20 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง และจากนั้นอีก 7 วัน จะมีปริมาณเหลืออยู่น้อยกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณตั้งต้น ส่วนปริมาณ calpastatin จะลดลงอย่างรวดเร็วประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง และหลังจากนั้นอีก 7 วัน จะมีปริมาณเหลืออยู่เพียง 30 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงมีผลทำให้การยืดระยะเวลาการบ่มให้นานออกไปจะไม่มีผลต่อการย่อยสลายของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อโดยการทำงานของเอนไซม์ calpains

ปริมาณ soluble collagen จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้นมีส่วนช่วยทำให้เนื้อนุ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการบ่มที่มากขึ้น สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Palka (2003) และ Failla *et al.* (2008) นอกจากนี้ Nishimura *et al.* (1998) การยืดระยะเวลาในการบ่มให้นานขึ้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั้งนี้จะพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 14 วันของการบ่ม โดยจะพบว่าความแข็งแรงของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ ในระหว่างการบ่ม ดังนั้นการยืดระยะเวลาการบ่มให้นานขึ้นจะทำให้เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยมีการแตกหักมากขึ้นดังนั้นเนื้อโคจึงมีความนุ่มเพิ่มขึ้น

5.3 คุณภาพเนื้อด้านกายภาพในเนื้อโคพื้นเมืองต่างพื้นที่การเลี้ยงและที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน

5.3.1 อิทธิพลของกลุ่มโคและระยะเวลาการบ่มต่อค่า pH ในเนื้อ

ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ค่า pH ในกล้ามเนื้อสันนอกของพบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีค่า pH สูงที่สุด ($p < 0.05$) รองลงมาคือ โคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งมีค่า pH เท่ากับ 5.48 ± 0.03 , 5.46 ± 0.03 และ 5.41 ± 0.03 ตามลำดับ ในส่วนของระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มเนื้อ พบว่ามีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในเนื้อโคไทยทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยค่า pH ที่ระยะเวลาการบ่ม 2 วัน จะมีค่า pH สูงที่สุด (5.51 ± 0.02) รองลงมาคือ ที่ระยะเวลาการบ่ม 7, 14 และ 21 วัน มีค่าเท่ากับ 5.44 ± 0.02 , 5.48 ± 0.02 และ 5.43 ± 0.02 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) เนื่องจากการบรรจุเนื้อแบบสุญญากาศ จะใช้ถุงบรรจุที่มีคุณสมบัติป้องกันการเข้าและออกของออกซิเจน โดยจะส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์กรดแลคติกขึ้น เป็นสาเหตุให้เนื้อที่บ่มมีความเป็นกรดเพิ่มมากขึ้น ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับ อัจฉรา เพิ่ม (2550) ที่พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลในอาหารให้เป็นกรดแลคติก ส่งผลให้ค่า pH ของอาหารลดลง แต่ถ้าหากเพิ่มระยะเวลาการบ่มเนื้อให้นานขึ้นค่า pH ในเนื้อจะมีแนวโน้มว่าไม่แตกต่างกัน เนื่องจากภายหลังสัตว์ตายร่างกายจะมีปริมาณ glycogen ที่จะนำมาสร้างพลังงานให้กับร่างกายโดยผ่านกระบวนการ anaerobic metabolism เพื่อให้ได้กรดแลคติกและพลังงานความร้อนนั้นเหลืออยู่ไม่มาก จึงส่งผลให้ค่า pH ในกล้ามเนื้อสัตว์ลดลงน้อยจนไม่สามารถลดลงต่อไปอีก (Andersen *et al.* 1999) สอดคล้องกับการศึกษาของมยุรินทร์ และคณะ (2552) ที่พบว่าเมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อเพิ่มขึ้น ค่า pH ของเนื้อมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และจากรายงานของ Ray (2004) รายงานว่า แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตกรดแลคติกและกรดอะมิโนบางชนิด ขึ้นมาระหว่างการเก็บรักษาเนื้อสัตว์โดยอาศัยกลูโคสในเนื้อสัตว์ ซึ่งเป็นสารที่แบคทีเรียกลุ่มนี้ใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโต แต่หลังจากกลูโคสในเนื้อหมดไป แบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีจำนวนลดลง

5.3.2 ค่าสีของเนื้อ (L^* , a^* , b^*)

ผลการศึกษาค่าสีของกล้ามเนื้อในส่วนของค่า L^* พบว่าโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีมีค่า L^* ของเนื้อสูงเนื้อจึงมีสีซีดกว่า เนื่องมาจากการที่โคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีมีค่า pH ในเนื้อต่ำที่สุด ส่งผลให้โปรตีนมีความสามารถจับกับน้ำได้ไม่ดี ความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อก็จะต่ำกว่าเนื้อโคพื้นเมืองกลุ่มอื่นๆ ที่มีค่า pH สูงกว่า ทำให้การสะท้อนกลับของแสงบนผิวหน้าตัดของเนื้อเกิดได้สูง (Lawrie 2006) และจากการศึกษาของจันทร์พร เจ้าทรัพย์ (2555) พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีมีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด type IIb (MHC IIx) ซึ่งเป็นเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด white fiber สูงกว่าในโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี จึงมีผลทำให้เนื้อโคพื้นเมืองจาก

จังหวัดกาญจนบุรีมีสีซีดกว่า และเมื่อระยะเวลาในการบ่มเนื้อมานานขึ้นค่า L^* ของเนื้อโคทุกกลุ่มจะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจาก ค่า pH ลดลง ส่งผลให้สีของเนื้อมีความสว่างมากขึ้นสอดคล้องกับ Page *et al.* (2001) ที่พบว่าค่าสีของเนื้อมีความสัมพันธ์ทางลบกับค่า pH ของเนื้อ

ค่า a^* (redness) เป็นค่าที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณเม็ดสีในเนื้อ (myoglobin) ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่ม sarcoplasmic protein (Dunne *et al.* 2005) จากการศึกษาพบว่าโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูนมีค่า a^* สูงที่สุด (21.63 ± 0.38) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่โคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูนได้รับอาหารหยาบคือ หญ้าแพงโกล่าที่มีคุณภาพสูงกว่าหญ้าที่มีอยู่ตามธรรมชาติ โคจึงมีการสร้างโปรตีนในกล้ามเนื้อได้มากกว่า มีผลทำให้ค่า a^* สูงขึ้น ทั้งนี้ Bruce *et al.* (2004) ที่รายงานว่า การขุนโคด้วยอาหารชั้นในระดับสูงเป็นเวลานาน จะมีค่า a^* สูงกว่าการขุนในเวลาสั้น เนื่องจากการขุนโคในเวลาที่นานกว่านั้น ร่างกายของโคจะมีการสะสมของโปรตีนกล้ามเนื้อ และไขมันได้มากกว่าการขุนในเวลาสั้น

การที่ค่า a^* มีการเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อมานานขึ้นได้มีรายงานของ Boakye and Mittal (1995) อธิบายว่าเป็นผลเนื่องมาจากการที่ออกซิเจนที่มีอยู่ในอากาศ ไม่สามารถผ่านเข้าไปในก้อนเนื้อได้ส่งผลให้เอนไซม์ที่อยู่ลึกลงไปภายในเนื้อที่ต้องใช้ออกซิเจนในการทำปฏิกิริยาต่างๆ จะค่อยๆ เสื่อมสภาพไป ซึ่งยิ่งเวลาในการบ่มเนื้อมานานขึ้นเอนไซม์เหล่านี้จะยิ่งหมดไปเรื่อยๆ และเมื่อเนื้อมีการสัมผัสกับออกซิเจนอีกครั้ง myoglobin ในเนื้อจึงสามารถเข้าจับกับออกซิเจนได้อย่างเต็มที่ จึงเป็นเหตุให้ค่า a^* มีค่าเพิ่มขึ้น

ค่า b^* (yellowness) ในโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูนมีค่าสูงสุด (5.19 ± 0.27) อาจเป็นเพราะโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูนถูกเลี้ยงด้วยอาหารหยาบที่มีคุณภาพสูงเป็นเวลานาน อีกทั้งปิ่นโคที่ได้รับการเลี้ยงแบบขังคอกไม่ได้ปล่อยให้หากินตามธรรมชาติ การสะสมของไขมันในกล้ามเนื้อมีโอกาสที่จะสะสมได้มากกว่า รองลงมาคือ เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งมีค่า b^* เท่ากับ 4.21 ± 0.24 ตามลำดับ ขณะที่เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีจะมีค่า b^* ต่ำที่สุด เท่ากับ 3.06 ± 0.27

เมื่อระยะเวลาในการบ่มเนื้อมานานขึ้น ค่า b^* จากเนื้อโคทุกกลุ่มจะมีค่าเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) การที่ค่า b^* มีค่าเพิ่มขึ้น Warriss (2000) ได้รายงานว่าเป็นผลเนื่องมาจากการที่ไขมันนั้นเมื่อสัมผัสกับอากาศที่มีออกซิเจนเป็นเวลานานๆ จะทำให้ไขมันเกิดการ oxidation หรือเกิดการหืนขึ้น ส่งผลให้ไขมันที่เคยมีลักษณะอ่อน และมีสีเหลืองใส เปลี่ยนสภาพเป็นมีความขุ่นและแข็งขึ้น อีกทั้งสีจะมีความขุ่นขึ้น จึงเป็นเหตุให้ค่า b^* มีค่าเพิ่มมากขึ้น

5.3.3 การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนกลุ่ม myofibrillar protein ในเนื้อโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา และระยะเวลาการบ่มต่างกัน

การศึกษากการเปลี่ยนแปลงของ myofibrillar protein ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โปรตีนจะถูกแยกตามขนาดน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละชนิดโปรตีนทำให้เห็นการเคลื่อนที่ของโปรตีน ในขณะที่

โปรตีนที่มีขนาดเท่ากันหรือใกล้เคียงกันจะมองเห็นเป็นแถบเดียวกันได้ง่าย แต่การนำเอา monoclonal antibody ของ Tn-T มาทำการศึกษาต่อโดยใช้เทคนิค western blot จะเป็นการยืนยันแถบของโปรตีน Tn-T ให้เห็นชัดเจนและยังสามารถแสดงให้เห็นความเข้มของปริมาณ Tn-T ได้อีกด้วย จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ด้วยเทคนิค western blot ในครั้งนี้พบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T เริ่มต้นขนาด 37-39 kDa มากกว่าเนื้อโคพื้นเมืองทุกกลุ่ม อาจเนื่องจากเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากเป็นโคที่มีระดับเลือด *Bos indicus* ต่ำกว่าจึงส่งผลให้มีการสะสมโปรตีนในกล้ามเนื้อมากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ฉันทวัฒน์ อาชะวคม (2552) ที่ได้ทำการศึกษการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ด้วยเทคนิค western blot ในเนื้อโคกำแพงแสนซึ่งเป็นโคลูกผสมกลุ่มเลือด *Bos taurus x Bos indicus* กับเนื้อโคพื้นเมืองที่เป็นโคกลุ่มเลือด *Bos indicus* พบว่าค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T ขนาด 39, 30 และ 28 kDa ในเนื้อโคกำแพงแสนมีค่ามากกว่าเนื้อโคพื้นเมือง สำหรับค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T เริ่มต้นขนาด 37-39 kDa รองลงมาจากเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก คือ เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูนมีค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T เริ่มต้นขนาด 37-39 kDa น้อยที่สุด ($p < 0.01$)

นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากามีเปอร์เซ็นต์การสลายตัวของโปรตีน Tn-T ขนาด 37-39 kDa ใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับค่าแรงตัดผ่านเนื้อและปริมาณโปรตีน calpastatin ในเนื้อโคจากจังหวัดตากที่มีค่าต่ำกว่าเนื้อโคพื้นเมืองทุกกลุ่ม ส่งผลให้มีความนุ่มของเนื้อมากกว่าเนื้อโคพื้นเมืองทั้ง 3 กลุ่ม ดังนั้นเนื้อที่มีปริมาณโปรตีน calpastatin ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ calpain ในการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อน้อยกว่าจึงส่งผลต่อความนุ่มของเนื้อที่เพิ่มขึ้น และเปอร์เซ็นต์การสลายตัวของโปรตีน Tn-T ขนาด 37-39 kDa

การตรวจพบปริมาณโปรตีน Tn-T precursors ขนาด 37-39 kDa ด้วยวิธี Western blot ในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากในปริมาณมากกว่าโคพื้นเมืองกลุ่มอื่นนั้น จากผลดังกล่าวคาดหมายว่าควรพบปริมาณโปรตีน Tn-T products ขนาด 28-30 kDa ในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากในปริมาณมากกว่าโคพื้นเมืองกลุ่มอื่นด้วยเช่นกัน แต่ผลจากการทดลองกลับพบ Tn-T products ในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากในปริมาณต่ำที่สุด อาจเนื่องมาจากการตรวจสอบปริมาณโปรตีน Tn-T ด้วยวิธี Western blot จะต้องตรวจสอบความจำเพาะโดยใช้ antibody (mouse anti-troponin-T:Sigma) ซึ่งเป็นไปได้ว่า antibody ดังกล่าวสามารถตรวจสอบโปรตีน Tn-T ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อเมื่อเป็นโปรตีนที่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ (intact protein) แต่เมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้นโปรตีน Tn-T จะเกิดการย่อยสลาย ซึ่งการย่อยสลายดังกล่าวอาจทำให้บริเวณจดจำที่ใช้เป็นตัวกำหนดความเฉพาะเจาะจงของ antigen (epitope หรือ determinants) กับ antibody ถูกทำลายไป การตรวจสอบความจำเพาะระหว่าง antibody กับ antigen ของโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบจึงไม่

ตรงกันทำให้ไม่สามารถตรวจพบโปรตีน Tn-T products ที่ถูกย่อยสลายได้ทั้งหมด จึงพบปริมาณ Tn-T products ในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากในปริมาณต่ำ

5.3.4 การวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีนด้วยเทคนิค 2D- gel

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีนด้วยเทคนิค 2D- gel เห็นจุดโปรตีนที่แตกต่างกัน 8 ตำแหน่ง ในช่วง pH 3-10 และช่วงน้ำหนักโมเลกุลที่ 98-22 kDa ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นกลุ่มโปรตีน Tn-T ผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจสอบจุดดังกล่าวโดยการทำ western blotting ด้วย monoclonal antibody ต่อ Tn-T ผลการทดลองเป็น negative คือ ไม่สามารถมองเห็นจุดที่เกิดจากปฏิกิริยาเฉพาะระหว่าง antigen และ antibody ซึ่งเป็นไปได้ที่ปริมาณของ Tn-T ที่ต้องการตรวจสอบอาจน้อยเกินไป ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Muroya *et al.* (2007) รายงานว่า Tn-T สามารถสลายตัวได้หลาย isoform และในเนื้อโคมีรายงานอย่างน้อย 8 ชนิด ได้แก่ fast-type Tn-T (fTn-T) isoforms (fTn-T 1/16 และ 17) fTn-T 2/16 และ 17 fTn-T3/16 และ 17 fTn-T 4/16 และ 17 และ slow-type Tn-T (sTn-T) isoforms (sTnT1 และ sTnT1)

5.3.5 การศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ μ -calpain ที่ระยะเวลาการบ่มต่างๆ

การศึกษการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอนไซม์ μ -calpain ด้วยเทคนิค western blot พบการปรากฏของแถบแบน ขนาดประมาณ 80 kDa ในเนื้อโคทุกกลุ่ม โดยเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูนพบแถบแบนอย่างชัดเจนตั้งแต่วันที่ 2 ของการบ่ม และมีการสลายตัวเล็กน้อยตามระยะเวลาการบ่มจนถึงสิ้นสุดการทดลองแสดงให้เห็นว่า μ -calpain ยังคงอยู่ไม่มีการนำมาใช้ในการย่อยสลายเส้นใยกล้ามเนื้อ เนื่องจากมีปริมาณโปรตีน calpastatin ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain ซึ่งเห็นได้ชัดเจน โดยเฉพาะในกลุ่มเนื้อโคพื้นเมืองไทยซึ่งจัดเป็นกลุ่มโค *Bos indicus* มีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อ เนื้อที่มาจากโคที่มีเลือดยุโรปสูงจะมีความนุ่มมากกว่า ดังนั้นโคพื้นเมือง โคพันธุ์บราห์มัน หรือโคที่มีสายเลือดพันธุ์บราห์มันระดับสูงจะเหนียว เนื่องจากองค์ประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อของโค *Bos indicus* จะมีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber เป็นองค์ประกอบของมัดกล้ามเนื้ออยู่สูง จึงมีเอนไซม์ calpain ปริมาณสูง และในขณะเดียวกันปริมาณของโปรตีน calpastatin ซึ่งทำหน้าที่ในการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ calpain (Wheeler *et al.* 1990) ก็มีอยู่สูงด้วยเช่นกัน (Geesink *et al.* 2006)

5.3.6 การพัฒนาการใช้ calpastatin antibody ในการตรวจสอบความนุ่มของเนื้อโค

จากการตรวจสอบปริมาณโปรตีน calpastatin ในเนื้อโคโดยเจือจางโปรตีนสกัดจากเนื้อโคให้มีความเข้มข้น 1:100 และใช้ซีรัมกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วย pET-28a.1AD recombinant protein เป็น primary antibodies เจือจางให้มีความเข้มข้น 1:200 พบว่าอิทธิพลของกลุ่มโคพื้นเมืองต่างแหล่งที่มา ทั้ง 4 กลุ่ม มีผลต่อปริมาณโปรตีน calpastatin โดยเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี มีปริมาณโปรตีน calpastatin สูงที่สุด ($1.99 \pm 0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) รองลงมาคือ เนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ขาว

ลำพูนเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากโดยมีปริมาณโปรตีน calpastatin เท่ากับ 1.99 ± 0.04 , 1.89 ± 0.04 , 1.82 ± 0.04 และ 1.71 ± 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ตามลำดับ ($p < 0.05$) ซึ่งปริมาณโปรตีน calpastatin ในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และเนื้อโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูนนั้นไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ขณะที่เนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี มีความแตกต่างกันกับเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก และเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลจากปริมาณของโปรตีน calpastatin อาจกล่าวได้ว่าโคพื้นเมืองจากจังหวัดตากมีความนุ่มมากกว่าโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี โคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูนและโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งสอดคล้องกับค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่ลดลงกลุ่มโคพื้นเมืองไทยซึ่งเป็น *Bos indicus* ด้วยกัน เช่นเดียวกับ Wheeler *et al.* (1990) ที่รายงานว่าปริมาณโปรตีน CAST จะสัมพันธ์กับระดับเลือดของโค Brahman ซึ่งเป็น *Bos indicus* โดยปริมาณโปรตีน CAST จะเพิ่มขึ้นและสัดส่วนของ calpastatin: μ -calpain จะสูงขึ้นเมื่อระดับเลือดโค Brahman เพิ่มขึ้น แสดงว่าการที่โปรตีน calpastatin (calpain inhibitor) มีปริมาณเพิ่มขึ้นโปรตีนตัวนี้จะไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ calpains ที่ไปย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อ เป็นผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ calpains ในกระบวนการ proteolysis ทำงานได้น้อย ส่งผลทำให้เนื้อมีความนุ่มลดลง

จากการศึกษาในส่วนขอระยะเวลาการบ่มพบว่า อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มมีผลต่อปริมาณโปรตีน calpastatin โดยเมื่อระยะเวลาในการบ่มเนื้อมานานขึ้นปริมาณโปรตีน CAST จะลดลงเกิดจากโปรตีน calpastatin ถูกย่อยสลายในระหว่างการเก็บรักษา ปริมาณจึงลดลงและสูญเสีย activity ไป ส่งผลให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้น (Doumit and Koohmaraie, 1999 และ Koohmaraie *et al.* 1995) ซึ่งสอดคล้องกับ Huff-Loneragan and Lonergan (1999) ที่รายงานว่าเปลี่ยนแปลงของโปรตีน calpastatin ในเนื้อโคและเนื้อแกะมีความสัมพันธ์กับการย่อยสลายของโปรตีนในเนื้อภายหลังสัตว์ตาย โดยพบว่าปริมาณโปรตีน calpastatin จะลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บเนื้อมานานขึ้นและเป็นไปในทางเดียวกับการลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อซึ่งเป็นผลทำให้เนื้อนุ่มขึ้น ดังนั้นเนื้อที่ระยะเวลาการบ่ม 2 วัน จึงมีปริมาณโปรตีน calpastatin สูงกว่าเนื้อโคที่เก็บ 7, 14 และ 21 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

5.4 ความสัมพันธ์ระหว่างตัวชี้วัดความนุ่มในเนื้อโคพื้นเมือง

ค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณโปรตีน calpastatin ($r = 0.68$) ($p < 0.01$) และ insoluble collagen ($r = 0.18$) ($p < 0.05$) ซึ่งจากการศึกษาของ Volpelli *et al.* (2005) พบว่า ในกล้ามเนื้อสันนอกของกวางพันธุ์ฟอลโล ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมการทำงานของโปรตีน calpastatin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.506 และจากการศึกษาของ อรพิน พิมพัสสมแดง (2553) ได้พบค่าแรงตัดผ่าน

เนื้อมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมการทำงานของโปรตีน calpastatin โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.462 ขณะที่ปริมาณโปรตีน calpastatin มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับปริมาณ soluble collagen ($r = -0.46$) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับปริมาณการสลายตัวของโปรตีน Tn-T₂₈₋₃₀ ($p > 0.05$) แต่พบว่าปริมาณโปรตีน calpastatin มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณ insoluble collagen ($r = 0.25$) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) แต่มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับปริมาณโปรตีน Tn-T₂₈₋₃₀ ($r = -0.31$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และปริมาณ soluble collagen ($r = -0.49$) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) การที่ค่าแรงตัดผ่านเนื้อในโคพื้นเมืองไม่มีความสัมพันธ์กับโปรตีนย่อยสลาย Tn-T₂₈₋₃₀ แสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่เป็นตัวชี้วัดความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมืองที่สำคัญตามลำดับคือ ปริมาณโปรตีน calpastatin ปริมาณ soluble collagen และปริมาณ insoluble collagen ทั้งนี้เนื่องจากโคพื้นเมืองเป็นโคเลือด *Indicus* ซึ่งผลจากรายงานวิจัยด้านคุณภาพเนื้อชี้ให้เห็นว่าระดับเลือด *Indicus* มีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน calpastatin (Wheeler *et al.* 1990; Shackelford *et al.* 1994) และจากการศึกษาของ Riley *et al.* (2005) ยังพบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อโคพันธุ์บราห์มัน (*Bos indicus*) มีความสัมพันธ์กับปริมาณ total collagen และปริมาณ insoluble collagen ตามระยะเวลาการบ่ม 7, 14 และ 21 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของ total collagen เท่ากับ 0.66, 0.56 และ 0.82 ตามลำดับ และปริมาณ insoluble collagen มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.66, 0.57 และ 0.83 ตามลำดับ

5.5 ความนุ่มของเนื้อโคเนื้อผสมเลือดยุโรป

จากการศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโคลูกผสมพันธุ์ซิมเมนทอลที่มีผลต่อคุณภาพเนื้อบางประการที่ทำการศึกษา พบว่าโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูง (5/8 Simmental) สีของเนื้อจะมีความสว่าง (L^*) และมีค่าสีแดงของเนื้อ (a^*) มากกว่าจึงทำให้เนื้อมีสีแดงสดใส สว่างกว่าเนื้อโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำ (2/8 Simmental) โดยมีค่า L^* เท่ากับ 38.97 และ 35.46 ตามลำดับ ส่วนค่า a^* มีค่าเท่ากับ 25.39 และ 23.06 ตามลำดับ ($p < 0.05$) เหตุผลที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากกลุ่มโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูงจะมีระดับเลือดของ *Taurus* สูงด้วย และกลุ่มโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำก็จะมีระดับเลือด *Indicus* สูงด้วยเช่นกัน ซึ่งจากการศึกษาของ ปิยชนิต อินทรพรอุดม. (2552) พบว่าโคเลือดยุโรปจะมีสีของเนื้อที่สดใสและจะมีค่า L^* ที่สูงกว่าเนื้อโคเลือด *Indicus* ในส่วนของค่าสีเหลืองของเนื้อ (b^*) พบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณไขมันแทรกในเนื้อ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างโคทั้ง 2 กลุ่ม เนื่องจากโคทั้ง 2 กลุ่ม มีระดับไขมันแทรกไม่แตกต่างกัน คืออยู่ที่ระดับ 3

จากการศึกษาความนุ่มของเนื้อโคขุน พบว่าโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดสูง มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อน้อยกว่ากลุ่มโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำ โดยมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 5.06 และ 6.46 กิโลกรัม ตามลำดับ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มโคขุนซิมเมนทอลที่มีระดับเลือดต่ำ

ก็จะมึระดับเลือด *Indicus* สูงด้วย จึงส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนทั้งหมดที่มีอยู่สูงกว่า ($p < 0.05$) และมีแนวโน้มแสดงให้เห็นว่าปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลายมีปริมาณสูงกว่าเช่นกัน ($p > 0.05$) ดังนั้นจึงส่งผลให้เนื้อโคมีค่าความนุ่มต่ำกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wheeler *et al.* (1990) ที่พบว่าเมื่อระดับเลือดโคบราห์มันซึ่งเป็นโคในตระกูล *Indicus* ยิ่งสูงความเหนียวของเนื้อโคจะยิ่งเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งการศึกษาของ Riley *et al.* (2005) ที่รายงานว่าความเหนียวของเนื้อโคในตระกูล *Indicus* เป็นผลเนื่องมาจากปริมาณและชนิดของคอลลาเจน และจากการศึกษาในครั้งนี่ยังพบว่าปริมาณโปรตีน calpastatin ที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ calpains ที่ทำให้เนื้อนุ่มในระหว่างเนื้อโคทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$)

5.6 ความนุ่มของเนื้อโคลูกผสมเลือดยุโรปต่างระยะเวลาการบ่มเนื้อ

อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มที่แตกต่างกันมีอิทธิพลต่อค่าสีของเนื้อและค่าแรงตัดผ่านเนื้อพบว่าเมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้น สีของเนื้อจะมีความสว่างมากขึ้น ($p < 0.05$) เนื่องจากประสิทธิภาพในการอุ้มน้ำของโปรตีนในกล้ามเนื้อลดลงทำให้น้ำในเนื้อถูกปล่อยออกมาเป็นอิสระมากขึ้นจึงเกิดการสะท้อนกลับของแสงได้มาก (Bruce *et al.* 2004) ส่วนค่า a^* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ($p > 0.05$) สอดคล้องกับค่า b^* ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อบ่มเนื้อเป็นระยะเวลานานขึ้น ($p < 0.05$) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีของไขมัน โดยเกิดปฏิกิริยา lipid oxidation ส่งผลให้ไขมันที่เคยมีลักษณะอ่อน และมีสีเหลืองใส เปลี่ยนสภาพเป็นมีความขุ่นและแข็งขึ้น อีกทั้งสีจะมีความขุ่นขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Berruga *et al.* (2005) ที่พบว่าค่าความเข้มของ b^* จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่มอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อบ่มเนื้อ 7 วันขึ้นไป สีของเนื้อจะเข้มขึ้น และค่าความเข้มของสีเหลืองจะเพิ่มขึ้นมากกว่าเนื้อที่ไม่ได้บ่มอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) แต่เนื้อที่บ่มนานกว่า 7 วันจะมีค่าสี (L^* , a^* และ b^*) ที่วัดได้สูงขึ้นตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

ค่าแรงตัดผ่านเนื้อและปริมาณโปรตีน calpastatin จะมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้น ($p < 0.05$) โดยที่ระยะเวลาการบ่ม 2 วัน มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 6.94 ± 0.40 กิโลกรัม และ 3.11 ± 0.19 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันกับเนื้อที่ผ่านการบ่ม 7, 14 และ 21 วัน ($p < 0.05$) ที่เป็นเช่นนี้เป็นผลเนื่องมาจากการลดลงของโปรตีน calpastatin ทำให้เอนไซม์ calpain เข้าทำการย่อยสลายโปรตีนของกล้ามเนื้อภายหลังจากสัตว์ตายได้ดีจึงส่งผลให้เนื้อที่บ่มเกิดความนุ่มเพิ่มขึ้น (Dransfield 1994) แต่จะเห็นได้ว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อและปริมาณโปรตีน calpastatin ที่บ่มนาน 14 วันไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติกับเนื้อที่บ่มนาน 21 ($p > 0.05$) อาจเป็นเพราะเอนไซม์ calpain ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อมีปริมาณลดลงหรือมีความสามารถในการทำงานลดลงทำให้ค่าแรงตัดผ่านเนื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือมีการเปลี่ยนแปลงน้อยลง (Veiseth *et al.* 2004) ซึ่งสอดคล้องกับ Huff-Lonergan and Lonergan (1999) ที่รายงานว่า การเปลี่ยนแปลง

ของ โปรตีน calpastatin ในเนื้อโคและเนื้อแกะมีความสัมพันธ์กับกระบวนการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อภายหลังสัตว์ตาย โดยพบว่าปริมาณโปรตีน calpastatin จะลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บเนื้อนานขึ้นและเป็นไปได้ในทางเดียวกับการลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อ แต่เมื่อถึงระยะเวลาการบ่มที่ 14 และ 21 วัน จะมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ในส่วน of ปริมาณ total collagen และ insoluble collagen พบว่ามีการย่อยสลายสูงขึ้นโดยมีค่าลดลงตามระยะเวลาการบ่มเนื้อนานขึ้น (Kołczak *et al.* 2008) ทั้งนี้มีปริมาณคอลลาเจนทั้งหมดเท่ากับ 3.70 ± 0.39 , 2.24 ± 0.39 , 0.98 ± 0.39 และ 0.80 ± 0.39 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อ ตามลำดับ ส่วน insoluble collagen มีค่าเท่ากับ 1.85 ± 0.22 , 1.25 ± 0.24 , 0.95 ± 0.24 และ 0.76 ± 0.22 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อ ตามลำดับ ($p<0.05$) ทั้งนี้เนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ cathepsin ซึ่งจะทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันภายหลังจากเอนไซม์ calpain ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (Pearson and Young. 1989) ทำให้โปรตีนเกิดการย่อยสลายเป็นมากขึ้น จึงทำให้เนื้อโคที่ผ่านการบ่มมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลง (Nishimura *et al.* 1998) ซึ่งจะส่งผลต่อความนุ่มของเนื้อเพิ่มขึ้น

5.7 ความสัมพันธ์ระหว่างตัวชี้วัดความนุ่มในเนื้อโคลูกผสมเลือดยุโรป (โคโพนยางคำ)

ค่าสหสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ที่ทำการศึกษาเฉพาะกลุ่มโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรป ได้แก่ ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณโปรตีน calpastatin ปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ ปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย และปริมาณโปรตีน Tn-T₂₈₋₃₀ พบว่า ปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้เป็นตัวชี้วัดที่ไม่เหมาะสมในการวัดความนุ่มของเนื้อโคลูกผสม *Bos taurus* X *Bos indicus* ซึ่งเป็นกลุ่มโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรป สอดคล้องกับที่ Riley *et al.* (2005) รายงานว่า ปริมาณและชนิดของคอลลาเจนมีอิทธิพลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อมากกว่าปัจจัยอื่นๆ ในโคพันธุ์บราห์มัน (*Bos indicus*) สำหรับเนื้อโคขุนโพนยางคำคาดว่าปริมาณไขมันแทรกที่สูงซึ่งมีรายงานว่าเนื้อโคที่มีไขมันแทรกสูงกว่า 8% จะมีผลทำให้เส้นใยโปรตีน collagen (perimysium) บางลงและลดความแข็งแรง (Nishimura *et al.* 1999)

บทที่ 6

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. กลุ่มโคที่ทำการศึกษแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มโคพื้นเมืองและกลุ่มโคเลือดยุโรป

กลุ่มโคพื้นเมืองที่ศึกษามีความแตกต่างกันด้านแหล่งที่มาของโคที่เลี้ยง แหล่งที่เลี้ยงและระบบการเลี้ยง อย่างไรก็ตามเป็นโคพื้นเมืองที่กินอาหารหยาบสดตลอดระยะเวลาการเลี้ยง ซึ่งจัดได้เป็น 4 กลุ่มคือ โคพื้นเมืองจังหวัดกาญจนบุรี โคพื้นเมืองจังหวัดอุบลราชธานี เลี้ยงแบบปล่อยหากินอิสระตามธรรมชาติ โคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูนและโคพื้นเมืองจังหวัดตากเลี้ยงแบบจำกัดบริเวณแต่มีพื้นที่ให้เดินเล่น โดยให้กินอาหารหยาบมาจากแปลงปลูกหญ้าแพงโกล่า สำหรับโคพื้นเมืองตากจะมีหญ้ารัฐและถั่วฮามาตาปนอยู่ในหญ้าแพงโกล่าที่ตัดมาให้กิน

กลุ่มโคลูกผสมเลือดยุโรปเป็นโคลูกผสมเลือด Simmental เลือด 62.5% และกลุ่มลูกผสมเลือด Simmental เลือด 25% เลี้ยงภายใต้ระบบการผลิตของสหกรณ์โคขุนโพธิ์ยางคำ ศึกษาคุณภาพของเนื้อตามระยะเวลาการบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน โดยตัวชี้วัดความนุ่มที่ทำการศึกษาคือ ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณ soluble collagen ปริมาณโปรตีน calpastatin ปริมาณโปรตีน Troponin-T (28-30 kDa) และคุณภาพเนื้อด้านกายภาพได้แก่ ค่า pH ในเนื้อ และค่าสีของเนื้อ L^* , a^* , b^*

2. สรุปผลจากการศึกษาตามกลุ่มโคที่ได้ทำการศึกษาดังนี้

กลุ่มโคพื้นเมือง

1) โคพื้นเมืองจังหวัดตาก เป็นโคพื้นเมืองที่ได้รับการคัดเลือกจากฝูงโคพื้นเมืองของกลุ่มเกษตรกรจังหวัดตาก ได้รับอาหารหยาบที่มีคุณภาพสูง ประกอบกับมีเลือดโคเนื้อพันธุ์รามันอยู่บ้าง (ไม่เกิน 37.5%) พบว่าเนื้อโคมีความนุ่มมากที่สุด โดยผลสอดคล้องกับตัวชี้วัดความนุ่มของเนื้อที่ทำการศึกษาคือ ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการย่อยสลายโปรตีน Troponin วิธี Western blot ส่วนโคพื้นเมืองกลุ่มอื่นไม่พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติทางด้านความนุ่ม

2) โคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูนมีค่าสีแดงของเนื้อ (a^*) สูงที่สุด แสดงว่าเนื้อสีแดงเข้มมากที่สุด ขณะที่โคพื้นเมืองกาญจนบุรีมีค่าความสว่างของเนื้อ (L^*) สูงที่สุด แสดงว่าเนื้อสีขาวมากที่สุด

3) ความนุ่มของเนื้อเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาการบ่ม แต่พบว่าที่ระยะเวลาการบ่มนาน 21 วัน ไม่มีผลทำให้ค่าแรงตัดผ่านเนื้อปริมาณโปรตีน calpastatin และ soluble collagen แตกต่างจากการบ่มที่ระยะ 14 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระยะเวลาการบ่มที่นานขึ้นมีผลทำให้ค่า L^* , a^* และ b^* ของเนื้อสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง

4) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างตัวชี้วัดคุณภาพเนื้อที่ได้ทำการศึกษาในกลุ่มเนื้อโคพื้นเมืองที่รวมทุกระยะเวลาการบ่ม พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีความสัมพันธ์สูงที่สุดกับปริมาณ

โปรตีน calpastatin ($r=0.68$) คือ soluble collagen ($r=-0.49$) แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับ Tn-T₂₈₋₃₀ โดยวิธี Western blot อย่างไรก็ตามพบว่า ปริมาณโปรตีน calpastatin ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ทางลบกับ Tn-T₂₈₋₃₀ ($r=-0.31$)

กลุ่มโคอูมผสมเลือดยุโรป

1) เนื้อโคขุนโพนยางคำที่มาจากกลุ่มโคระดับเลือดชิดเมนทอลสูงมีความนุ่มมากกว่าเนื้อจากมีปริมาณคอลลาเจนรวม และชนิดของคอลลาเจนที่ไม่ละลายต่ำกว่าแต่ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณโปรตีน calpastatin นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อโคขุนโพนยางคำที่มาจากกลุ่มโคระดับเลือดชิดเมนทอลสูงมีเนื้อที่มีสีแดงและสดใสมากกว่า

ระยะเวลาการบ่มมีผลต่อการลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณคอลลาเจนรวม ชนิดของคอลลาเจนที่ไม่ละลาย และปริมาณโปรตีน calpastatin อย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการบ่มแต่ไม่พบความแตกต่างภายหลังระยะเวลาการบ่ม 7 วัน

2) ค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน Tn-T₂₈₋₃₀ โดยมีค่าสหสัมพันธ์ในทางลบและมีค่าสหสัมพันธ์ในทางบวกกับปริมาณโปรตีนปริมาณและปริมาณคอลลาเจนละลายได้ ($p<0.05$) ทั้งนี้ไม่พบว่าปริมาณโปรตีน Tn-T₂₈₋₃₀ มีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน calpastatin

ผลต่อการเปลี่ยนแปลง myofibrillar protein

จากการศึกษาด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏแถบของโปรตีนหลายขนาด แต่ที่แถบโปรตีนขนาด 37 และ 39 kDa ที่เป็นโปรตีน Troponin-T (Tn-T) มีการเปลี่ยนแปลงโดยเริ่มจางหายอย่างชัดเจนตามระยะเวลาการบ่ม ทั้งนี้ปรากฏแถบโปรตีนขนาด 28 และ 30 kDa เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม และการนำเอา monoclonal antibody ของ Tn-T มาศึกษาโดยใช้เทคนิค Western blot เป็นการยืนยันแถบโปรตีน Tn-T ให้เห็นชัดเจนและสามารถแสดงความเข้มของปริมาณ Tn-T ได้

ผลของการใช้ calpastatin antibody

ในการวิเคราะห์หาปริมาณ calpastatin ด้วยวิธี iElisa โดยใช้ anti-calpastatin ที่ผลิตโดยปิยะดา (2550) ในตัวอย่างเนื้อโคได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ antibody ที่ผลิตได้เองเปรียบเทียบกับ monoclonal anti-calpastatin (clone 1F7E3D10; Sigma USA) พบว่าค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง O.D ของ anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเองและที่ผลิตเพื่อการค้ามีค่าสหสัมพันธ์ $r = 0.964$ จึงสรุปได้ว่าสามารถพัฒนาการใช้ calpastatin antibody ที่ผลิตขึ้นได้เองในการตรวจสอบความนุ่มของเนื้อได้

จากผลการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ μ -calpain ด้วยเทคนิค western blot ในกลุ่มโคพื้นเมืองพบแถบโปรตีน μ -calpain (80 kDa) อย่างชัดเจนในวันที่ 2 ของการบ่ม และมีการสลายตัวเล็กน้อยตามระยะเวลาการบ่มจนถึงสิ้นสุดการทดลอง แสดงให้เห็นว่า μ -calpain ยังคงอยู่ มีการนำมาใช้ย่อยสลายเส้นใยกล้ามเนื้อน้อย ทั้งนี้เนื่องจากกลุ่มโคพื้นเมืองมีปริมาณโปรตีน calpastatin ที่ยับยั้งการทำงานของ μ -calpain อยู่สูง

เนื้อโคขุนโพนยางคำพบแถบแบน 80 kDa ไม่ชัดเจนในวันที่ 2, 7 และ 14 และหายไปในวันที่ 21 ของการบ่มแสดงว่าเอนไซม์ μ -calpain ได้ถูกใช้ไปในการย่อยสลายโปรตีนอย่างมากในโคขุนโพนยางคำซึ่งเป็นโคลูกผสม Bos taurus x Bos indicus ในขณะที่มีปริมาณโปรตีน calpastatin สูงด้วย

3. ข้อสังเกตและเสนอแนะ

1) ความนุ่มของเนื้อโคนั้นเกิดจากปัจจัยหลายประการด้วยกัน เช่น อายุ และการสะสมไขมันในกล้ามเนื้อของโค ดังนั้นปริมาณของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในเนื้อสัตว์ (proteolytic enzymes) เป็นเพียงปัจจัยหนึ่งที่เป็นองค์ประกอบของความนุ่มของเนื้อ ซึ่งนอกจากจะพิจารณาปริมาณโปรตีน calpastatin แล้วควรพิจารณาถึงการทำงานและปริมาณของเอนไซม์ calpain ร่วมด้วย

แม้ว่าการตรวจสอบปริมาณโปรตีน calpastatin ด้วยวิธี iELISA จะสามารถนำมาใช้ในการบ่งบอกถึงความนุ่มของเนื้อได้ก็ตาม เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ต้องการ ควรศึกษาถึงปัจจัยอื่นๆ เช่น ปริมาณและชนิดของ collagen ในเนื้อ ตลอดจนชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ

2) การบ่มเป็นการช่วยปรับปรุงคุณภาพเนื้อทางด้านความนุ่ม โดยจากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบว่าเนื้อสามารถนุ่มขึ้นได้ โดยการบ่มเนื้อเพียง 14 วัน ก็เพียงพอ โดยพิจารณาจากปริมาณโปรตีน calpastatin ที่ไม่ลดลงต่อไปแม้จะยืดอายุการบ่ม อย่างไรก็ตามความนุ่มของเนื้อที่ผ่านการบ่มก็ยังไม่อยู่ในระดับความนุ่มที่ผู้บริโภคพึงพอใจ คือ 3.9 กิโลกรัม (Morgan *et al.* 1993) เนื่องจากกลุ่มโคที่ทำการศึกษาเป็นโคพื้นเมืองเป็นส่วนใหญ่ อีกทั้งการบ่มเนื้อที่นานขึ้นก็ยังเสี่ยงต่อการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพเนื้อ เนื่องจากการทำงานของจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนและการเน่าเสียของเนื้อ หากมีความต้องการที่จะทำให้เนื้อโคพื้นเมืองนุ่มขึ้น ควรใช้เทคโนโลยีทางด้านอื่นแทนการบ่มหรืออาจหาเทคโนโลยีทางด้านอื่นมาใช้ควบคู่ไปกับการบ่ม

บทที่ 7

ปัญหาและอุปสรรค

1. ผู้วิจัยไม่ประสบความสำเร็จในการตรวจสอบหาชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อโดยวิธีทาง Histochemistry ในกลุ่มโคพื้นเมืองที่ทำการศึกษานี้เนื่องจากมีปัญหาในการเก็บรักษาตัวอย่างในตู้แช่เยือกแข็ง -80 องศาเซลเซียสเพื่อรอการตรวจสอบในเวลาใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ตู้แช่เยือกแข็งดังกล่าวมีปัญหาขัดข้องเกี่ยวกับระบบควบคุมอุณหภูมิของผู้จึงต้องย้ายตัวอย่างเนื้อไปเก็บไว้ ณ ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

เมื่อนักวิจัยเริ่มดำเนินการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคการย้อมด้วยวิธี ATPase ร่วมกับ Diaphorase พบว่า สามารถย้อมสีเซลล์ของเส้นใยกล้ามเนื้อโดยแยกเซลล์ออกมาได้ 3 ลักษณะคือ Type I (red fiber) Type IIA (intermediate fiber) และ Type IIB (white fiber) แต่ไม่สามารถแยกชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อระหว่าง Type I กับ Type IIA ได้ จึงทดลองปรับปรุงการย้อมสีใหม่โดยยังคงหลักการเดิมคือใช้ ATPase ร่วมกับ diaphorase แต่ตัดขั้นตอนของการ diaphorase ด้วย NADH ออกไป ปรากฏว่าลักษณะการติดสีในการย้อมเซลล์เปลี่ยนไป ทั้งนี้นักวิจัยที่ให้คำปรึกษาในเรื่องนี้ได้วิเคราะห์ว่า อาจเกิดจากเซลล์กล้ามเนื้อตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเกิดการเสื่อมสภาพไป เนื่องจากอุณหภูมิในการเก็บมีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้น นักวิจัยจึงเปลี่ยนเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของคอลลาเจน ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถจะตรวจสอบหาความนุ่มเหนียวของเนื้อได้

ปัญหานี้ได้รับการแก้ไขแล้วโดยทางศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ ได้เชิญผู้เชี่ยวชาญจากต่างประเทศมาถ่ายทอดเทคโนโลยีในการตรวจหาชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อโดยใช้ Electrophoresis separation of myosin heavy chain isoforms ร่วมกับ ผศ.ดร. จันทพร เจ้าทรัพย์ นักวิจัยของศูนย์ ซึ่งสามารถแยกชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อในเนื้อโคพื้นเมืองได้เป็นผลสำเร็จในห้องปฏิบัติการของศูนย์และนักวิจัยของศูนย์ดังกล่าวได้รับงบประมาณสนับสนุนในการศึกษาวิจัยเรื่อง ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ เอนไซม์ calpains และคุณภาพเนื้อโคพื้นเมือง ซึ่งเป็นโครงการต่อเนื่อง

2. ขาดบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญทางการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งทำให้นักวิจัยต้องใช้เวลาในการศึกษาและทดสอบผล ทำให้ผลการวิเคราะห์ล่าช้าและมีผลต่อเนื่องถึงการผลิตผลงานวิจัย (full paper) ไม่เสร็จตามแผนที่วางไว้

3. โคพื้นเมืองที่ใช้เป็นตัวแทนของโคที่เลี้ยงต่างภูมิภาคกันไม่มีข้อมูลที่ชี้ชัดถึงความแตกต่างด้านสายพันธุ์ อีกทั้งยังมีความแตกต่างด้านระบบการเลี้ยงทั้งนี้เนื่องจากโครงการวิจัยแม่บทเป็นการวิจัยภาคสนามจึงทำให้ไม่สามารถตัดปัจจัยร่วมที่อาจมีผลต่อข้อมูลด้านคุณภาพเนื้อที่ทำการศึกษาได้ อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าพบข้อมูลพื้นฐานใน

การศึกษากลุ่มโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมือง ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนและจะเป็นจุดเริ่มต้นของการวิจัยเชิงลึกต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

- กองอาหารสัตว์. 2549. การศึกษาเปรียบเทียบการใช้หญ้าสดกับเปลือกสับประรดเป็นอาหารโค. กรุงเทพมหานคร: กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- จรัญ จันทลักษณ์. 2515. การผลิตโคเนื้อ. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.
- จันทร์พร เจ้าทรัพย์. 2555. ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ เอนไซม์ calpains และคุณภาพเนื้อโคพื้นเมือง. รายงานฉบับสมบูรณ์. สำนักงานสนับสนุนกองทุนวิจัย (สกว.)
- จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539. เอกสารประกอบการสอนวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ชั้นสูง. ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.
- ฉันทวัฒน์ อาชะคม. 2552. การสลายตัวของโปรตีน Troponin-T และความนุ่มของเนื้อโคกำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมืองที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.
- ชัยณรงค์ คันทพนิต. 2529. วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์. สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.
- นันทนา ช่วยชูวงศ์. 2540. การศึกษาเปรียบเทียบสมรรถภาพการขุน คุณภาพผลผลิตและผลตอบแทนทางเศรษฐกิจของโคเนื้อ 5 พันธุ์ ที่มีอยู่ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรดุษฎีบัณฑิต สาขาสัตวบาล บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.
- ปิยะดา ทวีศรี. 2544. อิทธิพลของชนิดสัตว์เคี้ยวเอื้องและอัตราการเจริญเติบโตต่อคุณภาพเนื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.
- ปิยะดา ทวีศรี. 2550. การผลิต Polyclonal Antibodies เพื่อตรวจสอบปริมาณโปรตีน Calpastatin ในเนื้อโคพันธุ์กำแพงแสน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรดุษฎีบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.
- พร้อมลักษณ์ สมบูรณ์ปัญญากุล. 2552. คุณค่าทางด้านโภชนาการของเนื้อโค หน้า 35. โดย จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. และพรรณิภา ศิวะพิรุฬห์เทพ. คุณค่าเนื้อโคไทย. กรุงเทพมหานคร : อัมรินทร์พรินติงแอนด์พลับลิชชิงค์.

- มาลัย จงเจริญ. 2546. คุณภาพซากและผลตอบแทนในการผลิตเนื้อโคคุณภาพสูงจากโคลูกผสม เลือดชาร์โลเลส์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- มยุรินทร์ รักทอง ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ รุจริน ลิ้มสุกวานิช และจุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2552. ผลของระยะเวลาการบ่มต่อคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองขุนที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่มีแหล่งอาหารหยาดต่างกัน. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีเนื้อสัตว์ ครั้งที่ 1 ณ โรงแรมรามารการ์เด็น ในวันที่ 17-18 ธันวาคม 2552.
- ลลิตรา ศรีสุวรรณ. 2551. อิทธิพลของระบบการผลิตโคเนื้อและระยะเวลาการบ่มต่อคุณภาพเนื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.
- วิจิต พรหมอินทร์. 2549. คุณภาพซากและคุณภาพเนื้อโคขุนภายใต้ระบบการผลิตของสหกรณ์โคนอ์กำแพงแสน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.
- ศรเทพ ธีรवास. 2539. การเลี้ยงโคเนื้อ แนวทางการพัฒนาอาชีพของเกษตรกรไทย. กรุงเทพมหานคร : ฟันนี่พับบลิชชิง
- สัณชัย จตุรติทรา. 2547. การจัดการเนื้อสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 4 ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- อัจฉรา เพิ่ม. 2550. แบทที่เรียกรดแลคติก. สงขลา : ภาพพิมพ์.
- Anderson, J.R., Borggaard, C., Rasmussen, A.J. and Houmoller, L.P. 1999. Optical measurement of pH in meat. *Meat Sci.* 53: 135–141.
- Barham, B.L., Brooks, J.C., Blanton., J.R., Herring, A.D, Carr, M.A., Kerth, C.R. and Miller, M.F. 2003. Effect of growth implants on consumer perceptions of meat tenderness in beef steers. *J. Anim. Sci.* 81: 3052-3056.
- Berruga, T.B., Vergara, H. and Gallego, L. 2005. Influence of packing conditions on microbial and lipid oxidation on lamb meat. *Meat Sci.* 57: 257-264.
- Boakye, K. and Mittal, G.S. 1996. Changes in colour of beef *M. Longissimus doris* muscle during ageing. *Meat Sci.* 42: 347-354.
- Boccard, R., Buchter, I., Casteels, M., Cosentino, E., Dransfield, E. and Hood, D.E. 1981. Procedures for measuring meat quality characteristics in beef production experiments. *Lives. Prod. Sci.* 8: 385–397.
- Boehm, M. L., Kendall, T. L., Thompson, V. F. and Goll, D. E. 1998. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. *J. Anim. Sci.* 76: 2415-2434.

- Bruce, H.L., Stark, J.L. and Beilken, S.L. 2004. The effects of finishing diet and postmortem ageing on the eating quality of the M. *Longissimus thoracis* of electrically stimulated Brahman steer carcasses. *Meat Sci.* 67: 261-268
- Chéret, R., Delbarre, L. D., Lamballerie, A. M. and Verrez, B. V. 2007. Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chem.* 101: 1474-1479.
- Choi, Y.M. and Kim, B.C. 2009. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. *Livest. Sci.* 122: 105-118.
- Claeys, E., Uytterhaegen, L., Buts, B. and Demeyer, D. 1995. Quantitation of beef myofibrillar protein by SDS-PAGE. *Meat Sci.* 39: 177-193.
- Close, H.R. 1997. Nutritional Manipulation of Meat Quality in pig and Poultry. 181-192. In T.P. Lyons and K.A. Jacques. *Biotechnology in the Feed Industry*. Nottingham:Nottingham university press.
- Cranwell, C. D., Unruh, J. A., Brethour, J. R. and Simms, D. D. 1996. Influence of steroid implants and concentrate feeding on carcass and longissimus muscle sensory and collagen characteristics of cull beef cows. *J. Anim. Sci.* 74: 1777-1783.
- Delgado, E.F., Geesink, G.H., Marchello, J. A., Goll, D. E. and Koohmaraie, M. 2001. The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep. *J. Anim. Sci.* 79: 398-412
- De Smet, S., Cleays, E., Buysse, C., Lenaerts, C. and Demeyer, D. 1998. Tenderness measurement in four muscle of Belgian Blue Normal and double-muscle bulls. 44th International Congress of Meat Science and Technology.
- Doumit, M.E. and Koohmaraie, M. 1999. Immunoblot analysis of calpastatin degradation: evidence for cleavage by calpain in postmortem muscle. *J. Anim. Sci.* 77: 1467-1473.
- Dransfield, E. 1994. Optimisation of tenderization, ageing and tenderness. *Meat Sci.* 36: 105-121.
- Dunne, P.G., O'Mara, F.P., Monahan, F.J., French, P. and Moloney, A.P. 2005. Colour of muscle from 18-month-old steers given long-term daily exercise. *Meat Sci.* 71: 219-229
- Failla, S., Juárez, M., Vincent, F., Ballico, S., Mormile, M. and González, F. 2008. Changes in meat quality characteristics of two beef muscles during ageing. II: tenderness and myofibrillar degradation. In 54th International Congress of Meat Science and Technology (54th ICoMST), 10-15 August 2008, Cape Town, South Africa
- Fiedler, I., Ender, K., Wicke, M., Maak, S., Lengerken, G. and Meyer, W. 1999. Structural and functional characteristics of muscle fibers in pigs with different malignant hyperthermia susceptibility [MHS] and different meat quality. *Meat Sci.* 53: 9-15.

- Foutz, C.P., Dolezal, H.G., Gardner, T.L., Gill, D.R., Hensley, J.L. and Morgan, J.B. 1997. Anabolic implant effect on steer performance, carcass traits, subprimal yields, and longissimus muscle properties. *J. Anim. Sci.* 75: 1256-1265.
- Geesink, G.H., Ouali, A. and Smulders, F.J.M. 1992. Tenderisation, calpain/calpastatin activities and osmolarity of 6 different beef muscles. pp 363-366. In: Proc. 38th. Cong. Of Meat Sci. and Technol., Clermont Ferrand.
- Geesink, G.H., Smulders, F.J., van Laack, H.L., van der Kolk, J.H., Wensing, T. and Breukink, H.J. 1993. Effect on meat quality of the use of clenbuterol in veal calves. *J. Anim. Sci.* 71: 1161-1170
- Geesink, G.H., van der Palen, J.G.P., Kent, M.P., Veiseth, E., Hemke, G. and Koohmaraie, M. 2005. Quantification of calpastatin using an optical surface plasmon resonance biosensor. *Meat Sci.* 71: 537-541.
- Geesink, G.H., Kuchay, S., Chishti, A.H. and Koohmaraie, M. 2006. μ -calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins . *J. Anim. Sci.* 84: 2834-2840.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W. and Cong J. 2003. The calpain system. *Physiol Rev.* 83: 731-801.
- Goñi, M.V., Beriain, M.J., Indurain, G. and Insausti, K. 2007. Predicting longissimus dorsi texture characteristics in beef based on early post-mortem colour measurements. *Meat Sci.* 76: 38-45.
- Gruber, S.L., Tatum, J.D., Engle, T.E., Mitchell, M.A., Laudert, S.B., Schroeder, A.L. and Platter, W.J. 2007. Effects of ractopamine supplementation on growth performance and carcass characteristics of feedlot steers differing in biological type. *J. Anim. Sci.* 12 : 634-654.
- Hedrick, H.B., Aberle, E.D., Forrest J.C., Judge M.D. and Merkel R.A. 1993. Principles of Meat Science. 3rd ed. Kendall/Hunt Puvl. Co., Iowa.
- Hill F. 1966. The solubility of intramuscular collagen in meat animals of various ages. *Journal of Food Sci.* 31 : 161-166.
- Ho, C.Y., Stromer, M.H. and Robson, R.M. 1994. Identification of 30 kDa polypeptide in post mortem skeletal muscle as a degradation product of troponin-T. *Biochimie.* 76: 369-375.
- Ho, C.Y., Stromer, M.H., Rousek, G. and Robson, R.M. 1997. Effedts of electrical stimulation and postmortem storage on changes in titin, nebulin, troponin-T and muscle ultrastructure in *Bos indicus* crossbreed cattle. *J. Anim. Sci.* 75: 366-376.

- Huff-Lonergan, E., Mitsuhashi, T., Beekman, D.D., Parrish, F.C., Olson, D.G. and Robson, R.M. 1996. Proteolysis of specific muscle structural protein by μ -calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. *J. Anim. Sci.* 74: 993-1008.
- Huff-Lonergan, E. and Lonergan, S.M. 1999. Postmortem mechanisms of meat tenderization: The roles of the structural proteins and the calpain system, pp. 229-251. In Y.L. Xiong, C.T. Ho and F. Shahidi, eds. *Quality attributes of muscle food*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Huff-Lonergan, E. and Lonergan, S.M. 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Sci.* 71: 194-204.
- Hwang, I.H., Park, B.Y., Cho S.H. and Lee, J.M. 2004. Effects of muscle shortening and proteolysis on Warner-Bratzler shear force in beef *longissimus* and *semitendinosus*. *Meat sci.* 68: 497-505.
- Ilian, M.A., Bekhit, A.E. and Bickerstaffe, R. 2004. The relationship between meat tenderization, myofibril fragmentation and autolysis of calpain 3 during post-mortem aging. *Meat Sci.* 66: 387-397.
- Immonen, K., Kauffman, R.G., Schaefer, D.M. and Puolanne, E. 2000. Glycogen concentration in bovine *longissimus dorsi* muscle. *Meat Sci.* 54: 163-167.
- Johnson, D.D., Huffman, R.D., Williams, S.E. and Hargrove, D.D. 1990. Effect of percentage Brahman and Angus breeding, age-season of feeding and slaughter end point on meat palatability and muscle characteristic. *J. Anim. Sci.* 68: 1980-1986.
- Keane, M.G. and Allen, P. 1998. Effects of production system intensity on performance, carcass composition and meat quality of beef cattle. *Livest. Prod Sci.* 56: 203-214.
- Kemp, C.M., Sensky, P.L., Bardsley, R.G., Buttery, P.J. and Parr, T. 2010. Tenderness-An enzymatic view. *Meat Sci.* 84: 248-256
- Kent, M.P., Spencer, M.J and Koohmaraie, M. 2004. Postmortem proteolysis is reduced in transgenic mice overexpressing calpastatin. *J. Anim Sci.* 82(3): 794-801.
- Kerth, C.R., Braden, K.W., Cox, R., Kerth, L.K. and Rankins Jr, D.L. 2007. Carcass, sensory, fat color and consumer acceptance characteristics of Angus-cross steers finished on ryegrass (*Lolium multiflorum*) forage or on a high-concentrate diet *Meat Sci.* 75: 324-331.
- Killinger, K.M., Calkins, C.R., Umberger, W.J., Feuz, D.M. and Eskridge, K.M. 2004. Consumer sensory acceptance and value for beef steaks of similar tenderness, but differing in marbling level. *J. Anim. Sci.* 82: 3294-3301.

- King, D.A., Morgan, W.W., Miller, R.K., Sanders, J.O., Lunt, D.K., Taloy, J.F. Gill, C.A. and Savell, J.W. 2005. Carcass merit between and among family groups of *Bos indicus* crossbred steers and heifers. *Meat Sci.* 72: 496-502.
- Klont, R. E., Brocks, L. and Eikelenboom, G. 1998. Muscle fibre type and meat quality. *Meat Sci.* 49: 219–229.
- Kończak, T., Pospiech, E., Palka, K. and Łacki, J. 2003. Changes of myofibrillar and centrifugal drip and shear force of *psoas major* and *minor* and *semitendinosus* muscles from calves, heifers and cows during post-mortem ageing. *Meat Sci.* 64: 69-75.
- Koohmaraie, M., Babiker, A. S., Schroeder, A. L., Merkel, R. A. and Dutson, T. R. 1988. Acceleration of postmortem tenderization in ovine carcasses through activation of Ca^{2+} -dependent proteases. *J. Food Sci.* 53: 1638.
- Koohmaraie, M., Whipple, G., Kretchmar, D.H., Crouse, J.D. and Mersmann, H.J. 1991. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *J. Anim. Sci.* 69: 617-624.
- Koohmaraie, M. 1992. The role of Ca^{2+} -dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie.* 74: 239-245.
- Koohmaraie, M. 1994. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Sci.* 36: 93-104.
- Koohmaraie, M., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Lonergan, S. M. and Doumit, M. E. 1995. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): Characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. *J. Anim. Sci.* 73: 3596-3607.
- Koohmaraie, M. 1996. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. *Meat Sci.* 43: 193-201.
- Laflamme, L. and Burgess, T.D. 1973. Effect of castration, ration and hormone implants on the performance of finishing cattle. *J. Anim. Sci.* 36 : 762-767.
- Lee, E. N., Sunwoo, H. H., Menninen, K and Sim, J. S. 2002. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Poult. Sci.* 81: 632-641.
- Lorenzen, C.L. 1992. Nation beef quality audit : carcass grade traits of U.S. fed cattle. *J. Anim. Sci.* 70: 227
- Luno, M., Beltran, J.A., Jaime, I. and Roncales, P. 1999. Textural assessment of clenbuterol treatment in beef. *Meat Sci.* 51: 297-303.

- Maddock, K. R., Huff-Lonergan, E., Rowe, L. J. and Lonergan, S. M. 2005. Effect of pH and ionic strength on μ and m-calpain inhibition by calpastatin. 83. : 1370-1376.
- Marais, G.L., Frylinck, L., Strydom, P.E., Snyman, J.D. and Anderson, J. 2007. Calpain system expression in three South African beef cross-breeds. 197-198. In Zhou, G.H., and Zhang, W.L. Proceedings of 53rd international congress of meat science and technology. Beijing: China Agricultural University.
- Marshall, D.M. 1994. Breed differences and genetic parameters for body composition traits in beef cattle. J. Anim. Sci. 72: 2745-2755.
- Marais, G.L., Frylinck, L., Strydom, P.E., Snyman, J.D. and Anderson, J. 2007. Calpain system expression in three South African beef cross-breeds. pp. 197-198. In Mies, P.D., Belk, K.E., Smith G.C and Tatum J.D. 1998. Effects of postmortem aging on beef tenderness and aging guidelines to maximize tenderness of different beef subprimal cuts. Næringsmiddelforskningen ved NLH. Available Source: http://www.nlh.no/forskning/nmf/english/english_version/biff0699eng.html, eptember 25, 2002.
- Morgen, J.B., Wheeler, J.B., Koohmaraie, M., Savll, J.W. and Crouse, J.D. 1993. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in *longissimus* muscle of young bulls and steers. J. Anim. Sci. 71: 1471-1476.
- Muir, P.D., Wallace, G.J., Dobbie, P.M. and Bown, M.D. 2000. A comparison of animal performance and carcass and meat quality characteristics in Hereford x Friesian and Friesian steers grazed together at pasture. N. Z. J. Agri. Res. 43: 193-205.
- Muroya, S., Nakajima, I., Oe, M. and Chikuni, K. 2006. Difference in postmortem degradation pattern among troponin-T isoforms expressed in bovine longissimus, diaphragm and masseter muscle. Meat Sci. 72: 245-251.
- Muroya, S., Ohnishi-Kameyama, M., Oe, M., Nakajima, I. and Chikuni, K. 2007. Postmortem changes in bovine troponin T isoforms on two-dimensional electrophoretic gel analyzed using mass spectrometry and western blotting: The limited fragmentation into basic polypeptides Meat Sci. 75: 506-514.
- Neath, K.E., Del Barrio, A.N., Lapitan, R.M., Herrera, J.R.V., Cruz, L.C., Fujihara, T., Muroya, S., Chikuni, K., Hirabayashi, M., and Kanai, Y. 2007. Difference in tenderness and pH decline between water buffalo meat and beef during postmortem aging. Meat Sci. 75: 499-505.
- Nishimura, T., Lin, A., Hattori, A. and Taknhashi, K. 1998. Changes in mechanical strength of intramuscular connective tissue during postmortem aging of beef. J. Anim. Sci. 76: 528-532.

- O'Connor, S.F., Tatum, J.D., Wulf, D.M., Green, R.D and Smith, G.C. 1997. Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. J. Anim. Sci. 75: 1822-1830.
- O'Halloran, G.R., Troy, D.J. and Buckley, D.J. 1997. The relationship between early post-mortem pH and the tenderization of beef muscles. Meat Sci. 45: 239-251.
- Page, J.K., Wulf, D.M and Schwotzer, T.R. 2001. A survey of beef muscle color and pH. J. Anim. Sci. 79: 678-687.
- Palka, K. 2003. The influence of post-mortem ageing and roasting on the microstructure, texture and collagen solubility of bovine *semitendinosus* muscle. Meat Sci. 64: 191-198.
- Pearson, A.M and Young, R.B. 1989. Muscle and meat biochemistry, USA.
- Platter, W.J., Tatum, J.D., Belk, K.E., Chapman, P.L., Scanga, J.A. and Smith, G.C. 2003. Relationships of consumer sensory ratings, marbling score, and shear force value to consumer acceptance of beef strip loin steaks. J. Anim. Sci. 81: 2741-2750.
- Pringle, T.D., Williams, S.E., Lamb, B.S., Johnson, D.D and West, R.L. 1997. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. J. Anim. Sci. 75: 2955-2961.
- Purslow, P.P. 2005. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. Meat Sci. 70: 435-447.
- Ray, B. 2004. Fundamental Food Microbiology. 3rd ed. Florida : CRC Press LLC.
- Rhee, M.S., Ryu, Y.C., Imm J.Y. and Kim, B.C. 2000. Combination of low voltage electrical stimulation and earlypostmortem temperature conditioning on degradation of myofibrillar proteins in Korean native cattle (Hanwoo). Meat Sci. 55: 391-396.
- Rhee, M.S., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D. and Koohmaraie, M. 2004. Variation in palatability and biochemical traits within and among eleven beef muscles. J. Anim. Sci. 82: 534-550.
- Riley, D.G., Johnson, D.D., JR. Chase, C.C., West, R.L., Coleman, S.W., Olson, T.A. and Hammond, A.C. 2005. Factors influencing tenderness in steak from Brahman cattle. Meat Sci. 70: 347-356.
- Savell, J.W. and Cross, H.R. 1988. The role of fat in the palatability of beef, pork and lamp. In Designing foods: Animal product option in the marketplace. Washington: National academy press.
- Sentandreu, M.A., Coulis, G and Ouali, A. 2002. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. Trends Food Sci Tech. 13: 400-421.

- Sethakul, J., Opatpatanakit, Y., Sivapirunthep, P and Intrapornudom, P. 2008. Beef quality under production systems in Thailand: preliminary remarks. In Asian-Australasian association of animal production societies. Proceedings of the 13th animal science congress of the Asian-Australasian association of animal production societies. Hanoi: Animal husbandry association of Vietnam.
- Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Cundiff, L.V., Gregory, K.E., Rohrer, G.A and Savell, J.W. 1994. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine post rigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. *J. Anim. Sci.* 72: 857-863.
- Shackelford, S.D., Wheeler, T.L. and Koohmaraie, M. 1995. Relationship between shear force and trained sensory panel tenderness rating of 10 major muscle from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 3333-3340.
- Silva, J.A., Patarata, L. and Martins, C. 1999. Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. *Meat Sci.* 52: 453-459.
- Smith, K.R., Duckett, S.K., Azain, M.J., Sonon, R.N. and Pringle, T.D. 2007. The effect of anabolic implants on intramuscular lipid deposition in finished beef cattle. *J. Anim. Sci.* 85: 430-440.
- Steen, D., Claeys, E., Uytterhaegen, L., De Smet, S and Demeyer, D. 1996. Early post-mortem condition and the calpain/calpastatin system in relation to tenderness of double-muscled beef. *Meat Sci.* 45: 307-319.
- Steen, D., Claeys, E., Uytterhaegen, L., De Smet, S. and Demeyer, D. 1997. Early post-mortem conditions and the calpain/calpastatin system in relation to tenderness of double-muscled Beef. *Meat Sci.* 45: 307-319.
- Sunwoo, H.H., Li, X., Lee, E.N., Kim, Y.K and Sim, J.S. 2000. Preparation of antigen specific IgY for food application. In Egg nutrition and biotechnology. Eds. Sim, J.S., Nakai, S and Guenter, W. pp. 311-322. CAB International.
- Tavitchasri, P., Kanthapanit, C., Wajjwalku, W and Sethakul, J. 2007. Production of polyclonal antibodies against calpastatin gene domain I from skeletal muscle of the Kamphaeng Saen beef breed, *Kasetsart Journal Natural Science*, 41: 493-501.
- Taylor, R. G., Geesink, G. H., Thompson, V. F., Koohmaraie, M. and Goll, D. E. 1995. Is Z-disk degradation responsible for post-mortem tenderization. *J. Anim. Sci.* 73: 1351-1367.

- Thomas, A. R., Gondoza, H., Louwrens, C., Hoffman, L.C., Oosthuizen, V. and Naudé, R. J. 2004. The roles of the proteasome, and cathepsin B, L, H and D, in ostrich meat tenderisation. *Meat Sci.* 67: 113-120.
- Tuma, H.J., Venable, J.H., Wuthier, P.R. and Henrickson, R.L. 1962. Relationship of fiber diameter to tenderness and meatiness as influenced by *Bovine* age. *J. Anim. Sci.* 21: 33-36.
- Uriyapongson, S., Potchanapa, R., Sankaew, A., Tatong, T., Toburan, W and Uriyapongson, J. 2005. Comparative study on composition of meat, eating quality and appearance of loin from 4 Native Thai cattle. pp. T70. In Rowlinson, P., Wachirapakorn, C., Pakdee, P., and Wanapat, M. Proceedings of AHAT/BSAS international conference, Khon Kaen, Thailand.
- Uytterhaegen, L., Claeys, E and Demeyer, D. 1994. Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility. *J. Anim. Sci.* 72: 1209-1223.
- Veiseth, E., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L. and Koohmaraie, M. 2004. "Factors regulating lamb longissimus tenderness are affected by age at slaughter." *Meat Sci.* 68: 635-640.
- Volpelli, L. A., S. Failla, A. Sepulcri and E. Piasentier. 2005. Calpain system in vitro activity and myofibril fragmentation index in fallow deer (*Dama dama*): effects of age and supplementary feeding." *Meat Sci.* 69: 579-582.
- Warriss, P.D. 2000. Meat science an introductory text, UK.
- Wheeler, T.L., Savell, J.W., Cross, H.R., Lunt, D.K and Smith, S.B. 1990. Mechanism associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. *J. Anim. Sci.* 68: 4206-4220.
- Whipple, G. and Koohmaraie, M. 1991. Degradation of myofibrillar proteins by extractable lysosomal enzymes and m-calpain, and the effects of zinc cholate. *J. Anim. Sci.* 69:4449-4460.
- Wulf, D.M., O'Connor, S.F., Tatum, J.D., Green, R.D and Smith, G.C. 1997. Using objective measure of muscle color to predict beef longissimus tenderness. *J. Anim. Sci.* 75: 684-692.
- Xiong, Y.L., Moody, W.G., Blanchard, S.P., Liu, G. and Burris, W.R. 1996. Postmortem proteolytic and organoleptic changes in hot-boned muscle from grass and grain-fed and zeranol-implanted cattle. *Food. Res.* 29: 27-34.
- Zhou, H. Hickford, J. G. H. and Gong, H. 2007. Polymorphism of the ovine calpastatin gene. *Molecular and Cellular Probes.* 21: 242-244.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อุปกรณ์และสารเคมี

1. การศึกษาคุณภาพเนื้อและปริมาณ collagen

1.1 อุปกรณ์

- 1) เครื่องมือวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในเนื้อ (Mettler Toledo model SG-2, Switzerland)
- 2) เครื่องมือวัดอุณหภูมิ (Mettler Toledo model SG-2, Switzerland)
- 3) เครื่องมือวัดสีของเนื้อ (Minolta Chromameter CR-300, Japan)
- 4) เครื่องมือวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Instron model 1011, USA)
- 5) เครื่องบรรจุสุญญากาศ (Vacuum Package; Ramon, Germany)
- 6) ถุงพลาสติกชนิดสุญญากาศ (K-Nylon/LLDPE)
- 7) อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath, Memmert, Germany)
- 8) เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Tanita model 1144, Tanita Corporation, Japan)

1.2 สารเคมี

2. การศึกษาชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ

2.1 สารเคมี

- 1) NaCl
- 2) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 3) KCl
- 4) Trisodium citrate
- 5) Citric acid
- 6) Sodium acetate
- 7) Chloramine T
- 8) Acetate/citrate buffer
- 9) *p*-dimethylamino-benzaldehyde
- 10) 60% perchloric acid
- 11) Isopropanol
- 12) Hydroxyproline
- 13) Paraffin oil

2.2 การเตรียมสารเคมี

Hydroxyproline standard solution

- Stock hydroxyproline : Hydroxyproline 25 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร
 - Working standard hydroxyproline : งด Stock hydroxyproline มา 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask
 - ทำ Standard 5 ตัวอย่าง : งด Working standard hydroxyproline มา 2.5, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1, 2, 3 และ 4 ไมโครกรัมของ hydroxyproline ต่อมิลลิลิตร แล้วทำ standard curve

Ringer solution โดยมีส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

- NaCl 1.916 กรัม (32.75 mM)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.073 กรัม (0.5 mM)
- KCl 0.224 กรัม (1.5 mM)

Acetate/citrate buffer (pH 6.0) ต่อ 1 ลิตร

- Sodium acetate 57.0 กรัม
- Trisodium citrate 37.5 กรัม
- Citric acid 5.50 กรัม

ละลายใน Isopropanol 385 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

Chloramine-T reagent

- นำ Chloramine T 7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
- Acetate/citrate buffer

นำสาร a และสาร b มาผสมกันในสัดส่วน 1:4

Color reagent

- นำ *p*-dimethyamino-benzaldehyde 2 กรัม ละลายใน 60% perchloric acid 3 มิลลิลิตร
- Isopropanal

นำสาร a และสาร b มาผสมกันในสัดส่วน 1:13

3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Myofibrillar protein ด้วยวิธี SDS-PAGE

3.1 อุปกรณ์

- 1) เครื่องชั่งน้ำหนักแบบดิจิตอล ขนาด 220 กรัม รุ่น CP2243 (Sartorius)

- 2) เครื่องบดละเอียด รุ่น minipimer MR 430 HC (Braun)
- 3) เครื่อง homogenizer (Ultra tarrax)
- 4) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Universal 32R (Hettich)
- 5) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น ultrospec 1100 pro UV/visible spectrophotometer (Amersham phamasia biotechnique)
- 6) เครื่องสำหรับการแยกโปรตีนแบบ vertical slab gels ขนาด 18 ซม. x 16 ซม. x 0.15 ซม. รุ่น SE600 (Hoefer)
- 7) เครื่องถ่ายภาพเจล รุ่น gene genius bio imagine system (Syngeme)
- 8) เครื่องเขย่าสาร รุ่น incubated shaker KBLee 1001 (Daiki)
- 9) Micropipet ขนาด 1000 200 และ 20 ไมโครลิตร (Gilson®)
- 10) Micro tube (Eppendorf)
- 11) กระดาษพาราฟิล์ม (Parafilm®)
- 12) ห้องแช่เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ 0-4 °C
- 13) ตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิที่ -20 °C
- 14) ตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิที่ -80 °C

3.2 สารเคมี

- 1) น้ำกลั่น (distilled water)
- 2) โปรตีนมาตรฐาน (protein marker) รุ่น SeeBlue® Plus2 Pre-stained standard (Invitrogen)
- 3) น้ำยาวัดโปรตีน (protein assay) (Bio-Rad, U.S.A)
- 4) BSA (bovine serum albumin) (Fluka Biochemika, U.S.A)
- 5) 0.25M sucrose (Ajax Finechem, Australia)
- 6) EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt) (Univar, Australia)
- 7) Tris (Vivantis, U.S.A)
- 8) Hydrochloric acid (HCl; Merck, Germany)
- 9) 0.15M potassium chloride (KCl; Ajax Finechem, Australia)
- 10) Imidazol (Fluka Biochemika)
- 11) SDS (sodium dodecyl sulfate) (Bio Basic Inc.)
- 12) Phosphoric acid (H₃PO₄) (Merck, Germany)
- 13) 2-mercaptoethanol (Biochemical™)
- 14) 30% acrylamide-bis solution (29:1) (Serva)
- 15) Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Bio Basic Inc.)
- 16) APS (ammoniumpersulfate) (Ajax Finechem, Australia)

- 17) Isopropanol (LAB-SCAN Analytical sciences)
- 18) Glycine (Vivantis, U.S.A)
- 19) Coomassie blue R250 รุ่น CI42660 (Research organics, U.S.A)
- 20) Methanol (Univer, Australia)
- 21) Bromophenol blue (Ajax Finechem, Australia)
- 22) Ethanol (Merck, Germany)

3.3 การเตรียมสารเคมี

STE solution (1L) (Solution)

- 0.25M Sucrose 85.6 g
- 1mM EDTA 0.37 g
- 0.05M Tris 6.05 g
- Distilled water 700 ml
- HCl

ละลาย Sucrose EDTA และ Tris ใน Distilled water จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 7.6 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วย Distilled water เก็บในตู้เย็น 20 °C

TE solution (1L)

- 1mM EDTA 0.37 g
- 0.05M Tris 6.05 g
- Distilled water 700 ml
- HCl

ละลาย EDTA และ Tris ใน Distilled water จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 7.6 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วย Distilled water เก็บในตู้เย็น 20 °C

KCl solution 0.15M (1L)

- KCl 11.20 g
- Distilled water

ละลาย KCl ใน Distilled water จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วย Distilled water เก็บในตู้เย็น °C

Buffer solution (100 ml)

• Imidazol	6.8	g
• SDS	2	g
• Distilled water	70	ml
• H ₃ PO ₄		

ละลาย Imidazol และ SDS ใน Distilled water จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 7.6 ด้วย H₃PO₄ และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วย Distilled water เก็บในตู้เย็น 20 °C

Sample buffer solution (1L)

• Buffer solution	100	ml (ได้จากการเตรียม buffer solution)
• SDS	20	g
• 2-mercapto-ethanol	20	ml
• Distilled water	700	ml

ผสม buffer solution, SDS และ 2-mercapto-ethanol ใน Distilled water จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1L ด้วย Distilled water เก็บในตู้เย็น 20 °C

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นโปรตีน**เตรียมน้ำยาล้างโปรตีน**

• เจือจางน้ำยาล้างโปรตีน 1 ส่วน : Distilled water 4 ส่วน (น้ำยาล้างโปรตีน 50 ml : Distilled water 200 ml)

- เตรียม standard BSA ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 mg/ml
 - BSA 0.8 mg/ml = BSA 8 mg : Distilled water 10 ml ----1)
 - BSA 0.6 mg/ml = 1) 750 µl : Distilled water 250 µl
 - BSA 0.4 mg/ml = 1) 500 µl : Distilled water 500 µl
 - BSA 0.2 mg/ml = 1) 250 µl : Distilled water 750 µl
 - BSA 0.1 mg/ml = 1) 125 µl : Distilled water 875 µl

การวัดความเข้มข้นโปรตีน

- การวัดความเข้มข้น ของ standard BSA
 - น้ำยาล้างโปรตีน 300 µl
 - Standard BSA (0.1 0.2 0.4 0.6 และ 0.8) 10 µl

• การวัดความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่าง (myofibrillar protein solution)

- น้ำยาวัดโปรตีน	300	μl
- myofibrillar protein solution	10	μl

• การเตรียม Blank

- น้ำยาวัดโปรตีน	300	μl
- Distilled water	10	μl

Gel electrophoresis (Solution)

Tris 3M pH 8.8 (1L)

• Tris	365	g
• Distilled water	700	ml
• HCl		

ละลาย Tris ใน Distilled water จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8.8 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วย Distilled water เก็บในตู้เย็น 20 °C

Tris 1.5M pH 8.8 (1L)

• Tris 3M pH 8.8	500	ml
• Distilled water	500	ml

Tris 0.5M pH 6.8 (1L)

• Tris	60.6	g
• Distilled water	700	ml
• HCl		

ละลาย Tris ใน Distilled water จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วย Distilled water เก็บในตู้เย็น 20 °C

10 % SDS (10 ml)

• SDS	1	g
• Distilled water	10	ml

10 % Ammonium persulphate solution ; APS (1 ml) (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

• Ammonium persulphate	0.1	g
• Distilled water	1	ml

1 % Bromophenol blue (10 ml)

• Bromophenol blue	0.01	g
• Distilled water	10	ml

Running buffer (ใช้ผสม sample สำหรับ load ในอัตราส่วน running buffer 1 : sample 3)

• 100 mM DTT	1	ml (1 หลอด)
• Distilled water	4,800	μl
• 0.5M Tris-HCl pH 6.8	1,200	μl
• Glycerol	1,000	μl
• 10% SDS	2,000	μl
• Bromophenol blue	500	μl

Cathode buffer (5X) (1L) (เวลาใช้ ให้เจือจางเป็น 1X)

• Glycine	144	g
• Tris	30	g
• SDS	5	g
• Distilled water	700	ml

ละลาย Glycine, Tris และ SDS ใน Distilled water จากนั้นปรับ ปริมาตร ให้ครบ 1ลิตร
ด้วย Distilled water เก็บในตู้เย็น 20 °C

Anode buffer pH 8.9 (5X) (1L) (เวลาใช้ ให้เจือจางเป็น 1X)

• Tris	121.15	g
• Distilled water	700	ml
• HCl		

ละลาย Tris ใน Distilled water ให้จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8.9 ด้วย HCl และปรับปริมาตร
ให้ครบ 1ลิตร ด้วย Distilled water เก็บในตู้เย็น 20 °C

Staining solution (2L)

• Distilled water	1,560	ml
• Methanol	400	ml
• Phosphoric acid	40	ml
• Coomassie blue	2	g

Destaining solution (3L)

• Distilled water	2,100	ml
• Methanol	600	ml
• Acetic acid	300	ml

BSA marker (2 µg / µl)(1 ml) (ใช้ 1 µl สำหรับ load)

• Distilled water	1	ml
• BSA	2	mg

Separating gel 15% (30 ml)

• Distilled water	7,100	µl
• Tris 1.5M pH 8.8	7,500	µl
• 30% Acrylamide-Bis	15,000	µl
• 10% SDS	300	µl
• 10% APS	150	µl
• TEMED	100	µl
• Isopropanol	300	µl

ผสม Distilled water, Tris 1.5M pH 8.8, 30% Acrylamide-Bis, 10% SDS, 10% APS และ TEMED ให้เข้ากัน จากนั้นเทสารละลายใส่ใน slab gel ที่เตรียมไว้ แล้วเติม Isopropanol ลงไป ปล่อยให้ทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นเทส่วนของ Isopropanol ที่ทิ้ง แล้วจึงเทส่วนของ stacking gel ลง

Stacking gel 4% (5 ml)

• Distilled water	3,000	µl
• Tris 0.5M pH 6.8	1,250	µl
• 30% Acrylamide-Bis	670	µl
• 10% SDS 50 µl • 10% APS	30	µl

- TEMED 10 μ l

ผสมสารละลายทุกอย่างให้เข้ากัน จากนั้นเทใส่ใน slap gel ที่มี separating gel อยู่ เสียบ comb รอให้แข็ง (ประมาณ 2 ชั่วโมง) จึงสามารถนำไปใช้งานได้

5. การพัฒนาการใช้ calpastatin antibody ในการตรวจสอบความนุ่มของเนื้อโค

5.1 อุปกรณ์

- 1) เครื่องปั่น (Mulinex: multi moulinette, Thailand)
- 2) เครื่อง homogenizer (Ultra tarrax T25 BAsic, Germany)
- 3) เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany)
- 4) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Universal 3200, Hettich,)
- 5) เครื่องเขย่าสาร (Vortex, Vision Scientific co., ltd. model KMC-1300V, Korea)
- 6) ไมโครปิเปต ขนาด 200-1000 ไมโครลิตร (Eppendorf, USA)
- 7) ไมโครเพลท (Maxisorp, NuncTM)
- 8) เครื่อง automatic microplate reader (TECAN, Magellen V.5)

5.2 สารเคมี

- 1) RC DC Protein Assay (Bio-Rad, U.S.A)
- 2) Bovine serum albumin (BSA; Fluka Biochemika, U.S.A)
- 3) Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA; Univar, Australia)
- 4) Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride (Tris-Hcl; Vivantis, U.S.A)
- 5) Potassium chloride (KCl; Ajax Finechem, Australia)
- 6) Anti-Rabbit IgG (whole molecule peroxidase conjugate) (Sigma, U.S.A)
- 7) 1% skim milk (Sigma, U.S.A)
- 8) Hydrochloric acid (HCl; Merck, Germany)
- 9) Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4 ; Ajax Finechem, Australia)
- 10) Sodium azide (NaN_3 ; Univer, Australia)
- 11) Sodium chloride (NaCl; Univer, Australia)
- 12) 3, 3',5, 5'-tetramethyl-benzidine (TMB substrate; Sigma, U.S.A)
- 13) 0.05% Tween[®] 20 (Sigma, U.S.A)
- 14) Isopropyl β -D-1Thiogalactopyranoside (IPTG)
- 15) Kanamycin
- 16) Distilled water

5.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 1) Agar (Merck, Germany)
- 2) Tryptone broth (Merck, Germany)
- 3) Yeast extract (Merck, Germany)

การสกัดโปรตีนจากเนื้อโค

- **TE solution (1M Tris, 0.5M EDTA, pH 8.0)**

1) Tris 1M pH 8.0 (1L)

Tris	121.14	g
Distilled water	700	ml
HCl		

ละลาย Tris ใน Distilled water จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 ml ด้วย Distilled water เก็บในตู้เย็น 20 °C

2) EDTA 0.5M pH 8.0 (200 ml)

EDTA	93.06	g
Distilled water	500	ml
NaOH		

ละลาย EDTA ใน Distilled water จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 200 ml ด้วย Distilled water เก็บในตู้เย็น 20 °C

3) TE solution (500 ml)

Tris	50	ml
EDTA	10	ml
Distilled water	440	ml

ผสม Tris กับ EDTA ใน Distilled water แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 ml เก็บในตู้เย็น 20 °C

การตรวจปริมาณโปรตีน calpastatin โดยวิธี iELISA

- **5x Coating buffer stock solution (pH 9.6)**

Na ₂ CO ₃	1.12	g
NaHCO ₃	2.94	g
NaN ₃	0.20	g
Distilled water	120	ml

NaOH

ละลาย Na_2CO_3 , NaHCO_3 และ NaN_3 ใน Distilled water จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 9.6 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 200 ml ด้วย Distilled water เก็บในตู้เย็น 20 °C

● **Phosphate Buffer Saline (PBS) (200 ml)**

K_2HPO_4	0.2	g
$\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9	g
NaCl	8.0	g
KCl	0.2	g
Distilled water	150	ml

ละลาย K_2HPO_4 , $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, NaCl และ KCl ใน Distilled water แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 200 ml เก็บในตู้เย็น 20 °C

● **Washing solution (Phosphate Buffer Saline, Tween® 20; PBST) (1L)**

PBS	1,000	ml
0.05% Tween® 20	500	μl

ผสม PBS กับ 0.05% Tween® 20 ให้เข้ากัน เก็บในตู้เย็น 20 °C

● **Blocking solution (10 ml)**

PBST	100	ml
1% skim milk	1	g
ผสมให้เข้ากัน		

การเตรียมตัวเจือจาง (diluent)

● **LB medium (1L)**

Tryptone	10	g
NaCl	10	g
Yeast extract	5	g
Distilled water	1,000	ml

ละลาย Tryptone, NaCl, NaCl และ Yeast extract ใน Distilled water ปริมาตร 1,000 ml แล้วนำไป autoclave เก็บที่อุณหภูมิห้อง

- LB agar (1L)

Tryptone	10	g
NaCl	10	g
Yeast extract	5	g
Agar	1.5%	
Distilled water	1,000	ml

ละลาย Tryptone, NaCl, NaCl, Yeast extract และ Agar ใน Distilled water ปริมาตร 1,000 ml แล้วนำไป autoclave เก็บที่อุณหภูมิห้อง

- Kanamycin stock solution

Kanamycin	30	mg
Distilled water	1	ml

ละลาย Kanamycin กับ Distilled water จากนั้นกรองแล้วแบ่งเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

- Isopropyl β -D-1Thiogalactopyranoside stock solution (1M IPTG)

IPTG	238	mg
Distilled water	1	ml

ละลาย IPTG กับ Distilled water จากนั้นกรองแล้วแบ่งเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

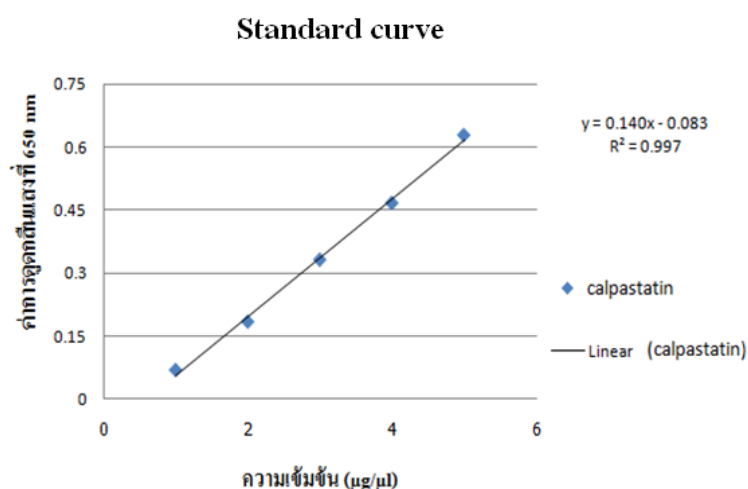
ขั้นตอนการเตรียมตัวเชื้อ

1. เลี้ยง transformant E.coli strain BL 21 ที่มีพลาสมิด pET-28a ใน LB broth ที่มี Kanamycin (30 μ g/ml) เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
2. Subculture ในสัดส่วน 1:50 เขย่าต่ออีก 3 ชั่วโมง
3. เติม 0.4 mM IPTG แล้วเขย่าต่ออีก 4 ชั่วโมง
- 4.ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 1,050 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อหลอด
5. นำตะกอนมาล้างด้วย 1 x PBS 2 ครั้ง แล้วละลายตะกอนด้วย 1 x PBS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
6. ทำให้โปรตีนเสียสภาพโดยนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที
7. จากนั้น sonicate 3 ครั้งๆ ละ 1 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การทำกราฟมาตรฐาน

หาปริมาณโปรตีน calpastatin

- นำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันมาสร้างกราฟมาตรฐาน และคำนวณสมการถดถอย โดยกำหนดให้ค่า x เป็นค่าปริมาณโปรตีน calpastatin และค่า y เป็นค่าการดูดกลืนแสง ดังแสดงในภาพที่ 3.5
- ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่าใด (y) ให้นำค่านั้นไปแทนค่าและคำนวณในสมการถดถอย ค่า (x) ที่คำนวณได้ คือค่าปริมาณ โปรตีน calpastatin โดยมีหน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อ ไมโครลิตร ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)



ภาพที่ 3.5 กราฟมาตรฐาน (standard curve) ของโปรตีน calpastatin มาเจือจางด้วย coating buffer ให้มีความเข้มข้น 1: 64,000, 1: 256,000, 1: 1,024,000, 1: 4,096,000 และ 1: 16,384,000 วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่นแสง 650 นาโนเมตร โดยกำหนดให้ค่า x เป็นค่าปริมาณโปรตีน calpastatin และค่า y เป็นค่าการดูดกลืนแสง

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ข ที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านสถิติจากการศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโค
พื้นเมืองและระยะเวลาการบ่มต่อค่า pH ของเนื้อ

Source	DF	SS	MS	F	Pr>F
Model	15	0.3188247	0.021255	1.50	0.1195
Error	108	1.5350100	0.014213		
Corrected Total	123	1.8538347			
Source	DF	Type III SS	MS	F	Pr>F
Breed	3	0.11492093	0.0383070	2.70	0.04960
Ageing	3	0.10604273	0.0353476	2.49	0.06440
Breed *Ageing	9	0.10205617	0.0113396	0.80	0.61900

R-Square = 0.171981 Coeff Var = 2.183780 Root MSE = 0.119219 pH Mean = 5.459274

ตารางภาคผนวก ข ที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านสถิติจากการศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโค
พื้นเมืองและระยะเวลาการบ่มต่อค่า L* ของเนื้อ

Source	DF	SS	MS	F	Pr>F
Model	14	364.5938	26.04242	3.12	0.0005
Error	100	835.0573	8.350573		
Corrected Total	114	1199.651			
Source	DF	Type III SS	MS	F	Pr>F
Breed	3	249.046	83.01534	9.94	<.0001
Ageing	3	90.66246	30.22082	3.62	0.0158
Breed *Ageing	8	14.12682	1.765852	0.21	0.9883

R-Square = 0.303917 Coeff Var = 7.133664 Root MSE = 2.889736 L* Mean = 40.50843

หมายเหตุ Breed = กลุ่มโคในประเทศไทยมี 4 กลุ่ม คือ โคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก โคพื้นเมือง
จากจังหวัดอุบลราชธานี โคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน

Ageing = ระยะเวลาการบ่มเนื้อที่ 2, 7, 14 และ 21 วัน

ตารางภาคผนวก ข ที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านสถิติจากการศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโค
พื้นเมืองและระยะเวลาการบ่มต่อค่า a^* ของเนื้อ

Source	DF	SS	MS	F	Pr>F
Model	14	727.8264	51.9876	11.37	<.0001
Error	100	457.3747	4.573747		
Corrected Total	114	1185.201			
Source	DF	Type III SS	MS	F	Pr>F
Breed	3	629.9777	209.9926	45.91	<.0001
Ageing	3	56.23474	18.74491	4.1	0.0087
Breed*Ageing	8	14.5593	1.819912	0.4	0.9193
R-Square = 0.614095 Coeff Var = 11.84815 Root MSE = 2.138632 a^* Mean = 18.05035					

ตารางภาคผนวก ข ที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านสถิติจากการศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโค
พื้นเมืองและระยะเวลาการบ่มต่อค่า b^* ของเนื้อ

Source	DF	SS	MS	F	Pr>F
Model	14	273.1882	19.51344	8.38	<.0001
Error	100	232.7448	2.327448		
Corrected Total	114	505.933			
Source	DF	Type III SS	MS	F	Pr>F
Breed	3	105.3447	35.11489	15.09	<.0001
Ageing	3	77.8405	25.94683	11.15	<.0001
Breed*Ageing	8	6.980306	0.872538	0.37	0.9316
R-Square = 0.539969 Coeff Var = 34.67541 Root MSE = 1.525598 b^* Mean = 4.399652					

หมายเหตุ Breed = กลุ่มโคในประเทศไทยมี 4 กลุ่ม คือ โคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก โคพื้นเมือง
จากจังหวัดอุบลราชธานี โคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน

Ageing = ระยะเวลาการบ่มเนื้อที่ 2, 7, 14 และ 21 วัน

ตารางภาคผนวก ข ที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านสถิติจากการศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโคพื้นเมืองและระยะเวลาการบ่มต่อค่า WBSF ของเนื้อ

Source	DF	SS	MS	F	Pr>F
Model	15	402.8793	26.85862	13.99	<.0001
Error	128	245.7756	1.920122		
Corrected Total	143	648.6549			
Source	DF	Type III SS	MS	F	Pr>F
Breed	3	108.3377	36.11256	18.81	<.0001
Ageing	3	268.8326	89.61087	46.67	<.0001
Breed *Ageing	9	17.7634	1.973711	1.03	0.4214
R-Square = 0.6211 Coeff Var = 18.26223 Root MSE = 1.385685 WBSF Mean = 7.587708					

ตารางภาคผนวก ข ที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านสถิติจากการศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโคพื้นเมืองและระยะเวลาการบ่มต่อค่า Soluble collagen ของเนื้อ

Source	DF	SS	MS	F	Pr>F
Model	15	0.697723	0.046515	9.58	<.0001
Error	115	0.558135	0.004853		
Corrected Total	130	1.255858			
Source	DF	Type III SS	MS	F	Pr>F
Breed	3	0.302672	0.100891	20.79	<.0001
Ageing	3	0.341081	0.113694	23.43	<.0001
Breed *Ageing	9	0.04438	0.004931	1.02	0.4315
R-Square = 0.55557 Coeff Var = 36.24402 Root MSE = 0.06966 Soluble Mean = 0.192214					

หมายเหตุ Breed = กลุ่มโคในประเทศไทยมี 4 กลุ่ม คือ โคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก โคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี โคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน

Ageing = ระยะเวลาการบ่มเนื้อที่ 2, 7, 14 และ 21 วัน

ตารางภาคผนวก ข ที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านสถิติจากการศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโค
พื้นเมืองและระยะเวลาการบ่มต่อค่า Insoluble collagen ของเนื้อ

Source	DF	SS	MS	F	Pr>F
Model	15	110.7089	7.380593	14.34	<.0001
Error	114	58.68891	0.514815		
Corrected Total	129	169.3978			
Source	DF	Type III SS	MS	F	Pr>F
Breed	3	62.77177	20.92392	40.64	<.0001
Ageing	3	45.11313	15.03771	29.21	<.0001
Breed *Ageing	9	2.06166	0.229073	0.44	0.9077
R-Square = 0.65354 Coeff Var = 29.6047 Root MSE = 0.71750 insoluble Mean = 2.42361					

ตารางภาคผนวก ข ที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านสถิติจากการศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโค
ในประเทศไทยและระยะเวลาการบ่มต่อค่า calpastatin (CAST) ของเนื้อ

Source	DF	SS	MS	F	Pr>F
Model	15	11.78466	0.785644	14.29	<.0001
Error	128	7.039485	0.054996		
Corrected Total	143	18.82415			
Source	DF	Type III SS	MS	F	Pr>F
Breed	3	1.491804	0.497268	9.04	<.0001
Ageing	3	9.810317	3.270106	59.46	<.0001
Breed*Ageing	9	0.364225	0.040469	0.74	0.6754
R-Square = 0.62604 Coeff Var = 12.71979 Root MSE = 0.234512 CAST Mean = 1.843681					

หมายเหตุ Breed = กลุ่มโคในประเทศไทยมี 4 กลุ่ม คือ โคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก โคพื้นเมือง
จากจังหวัดอุบลราชธานี โคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน

Ageing = ระยะเวลาการบ่มเนื้อที่ 2, 7, 14 และ 21 วัน

ตารางภาคผนวก ค

ประกอบผลการศึกษาคูณภาพเนื้อ

ตารางภาคผนวก ค ที่ 1 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ (p-value) จากการวิเคราะห์หัตถิพผลต่างๆ ต่อ
 คูณภาพเนื้อที่ทำการศึกษา

Effect	pH	L*	a*	b*	WBSF	Soluble	Insoluble	calpastatin
Breed	0.04960	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Ageing	0.06440	0.0158	0.0087	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Breed *Ageing	0.61900	0.9883	0.9193	0.9316	0.4214	0.4315	0.9077	0.6754

Breed = กลุ่มโคในประเทศไทยมี 4 กลุ่ม คือ โคพื้นเมืองจากจังหวัดตาก โคพื้นเมืองจาก
 จังหวัดอุบลราชธานี โคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี และโคพื้นเมืองพันธุ์ขาวลำพูน

Ageing = ระยะเวลาการบ่มเนื้อที่ 2, 7, 14 และ 21 วัน

ตารางภาคผนวก ค ที่ 2 ค่า pH ในกล้ามเนื้อสันนอกของกลุ่มโคในประเทศไทยและระยะเวลาการบ่ม
 การบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน

กลุ่มโค	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)				ค่าเฉลี่ยของกลุ่มโค
	2	7	14	21	
ตาก	5.55±0.05	5.48±0.05	5.53±0.05	5.44±0.05	5.50±0.03 ^{bc}
อุบลราชธานี	5.52±0.04	5.39±0.04	5.47±0.04	5.48±0.04	5.46±0.02 ^{bc}
กาญจนบุรี	5.48±0.04	5.39±0.04	5.42±0.04	5.37±0.04	5.41±0.02 ^c
ขาวลำพูน	5.48±0.04	5.51±0.04	5.49±0.04	5.43±0.04	5.48±0.02 ^{bc}
ค่าเฉลี่ยของ ระยะเวลาการบ่ม	5.51±0.02 ^w	5.44±0.02 ^x	5.48±0.02 ^x	5.43±0.02 ^x	

^{a-c} อักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

^{y, z} อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางภาคผนวก ค ที่ 3 ค่า L* ในกล้ามเนื้อสันนอกของกลุ่มโคในประเทศไทยและระยะเวลาการบ่ม
การบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน

กลุ่มโค	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)				ค่าเฉลี่ยของกลุ่มโค
	2	7	14	21	
ตาก	36.86±2.89	39.61±1.29	MS	41.55±1.29	MS
อุบลราชธานี	38.55±0.91	40.49±0.91	40.97±0.91	41.10±0.91	40.28±0.46 ^b
กาญจนบุรี	41.76±1.02	42.53±1.02	43.17±1.02	43.08±1.02	42.63±0.51 ^a
ชาวลำพูน	36.91±1.02	38.53±1.02	39.91±1.02	39.71±1.02	38.77±0.51 ^c
ค่าเฉลี่ยของ ระยะเวลาการบ่ม	38.52±0.84 ^y	40.29±0.54	MS	41.36±0.54 ^w	

^{a-d} อักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

^{y, z} อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

MS ไม่มีข้อมูลแสดงในบางช่วงการวิจัยเนื่องจากเครื่องมือในการวัดสีเนื้อมีข้อผิดพลาด

* ไม่สามารถเปรียบเทียบข้อมูลได้

ตารางภาคผนวก ค ที่ 4 ค่า a* ในกล้ามเนื้อสันนอกของกลุ่มโคในประเทศไทยและระยะเวลาการบ่ม
การบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน

กลุ่มโค	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)				ค่าเฉลี่ยของกลุ่มโค
	2	7	14	21	
ตาก	15.81±2.24	18.26±0.96	MS	17.60±0.96	MS
อุบลราชธานี	14.67±0.68	15.56±0.68	16.53±0.68	16.42±0.68	15.80±0.34 ^d
กาญจนบุรี	16.09±0.76	18.15±0.76	17.78±0.76	17.57±0.76	17.40±0.38 ^c
ชาวลำพูน	19.45±0.76	22.13±0.76	22.62±0.76	22.33±0.76	21.63±0.38 ^b
ค่าเฉลี่ยของ ระยะเวลาการบ่ม	16.50±0.62 ^x	18.52±0.40 ^w	MS	18.48±0.40 ^w	

^{a-c} อักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

^{y, z} อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

MS ไม่มีข้อมูลแสดงในบางช่วงการวิจัยเนื่องจากเครื่องมือในการวัดสีเนื้อมีข้อผิดพลาด

* ไม่สามารถเปรียบเทียบข้อมูลได้

ตารางภาคผนวก ค ที่ 5 ค่า b* ในกล้ามเนื้อสันนอกของกลุ่มโคในประเทศไทยและระยะเวลาการบ่ม
การบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน

กลุ่มโค	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)				ค่าเฉลี่ยของกลุ่มโค
	2	7	14	21	
ตาก	5.07±1.53	6.18±0.68	MS	7.54±0.68	MS
อุบลราชธานี	2.61±0.48	3.95±0.48	5.08±0.48	5.20±0.48	4.21±0.24 ^b
กาญจนบุรี	1.22±0.54	3.48±0.54	3.54±0.54	4.00±0.54	3.06±0.27 ^c
ขาวลำพูน	3.08±0.54	5.75±0.54	5.98±0.54	5.94±0.54	5.19±0.27 ^a
ค่าเฉลี่ยของ ระยะเวลาการบ่ม	3.00±0.44 ^x	4.84±0.28 ^w	MS	5.67±0.28 ^w	

^{a-d} อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

^{y, z} อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

MS ไม่มีข้อมูลแสดงในบางช่วงการวิจัยเนื่องจากเครื่องมือในการวัดสีเนื่อทำงานผิดปกติ

* ไม่สามารถเปรียบเทียบข้อมูลได้

ตารางภาคผนวก ค ที่ 6 ค่า WBSF ในกล้ามเนื้อสันนอกของกลุ่มโคในประเทศไทยและระยะเวลา
การบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน

กลุ่มโค	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)				ค่าเฉลี่ยของกลุ่มโค
	2	7	14	21	
ตาก	7.77±0.44	6.97±0.44	5.67±0.44	4.44±0.44	6.21±0.22 ^c
อุบลราชธานี	10.75±0.44	8.03±0.44	6.68±0.44	6.23±0.44	7.92±0.22 ^b
กาญจนบุรี	9.91±0.49	9.03±0.49	7.31±0.49	7.24±0.49	8.37±0.24 ^{ab}
ขาวลำพูน	10.23±0.49	8.53±0.49	7.07±0.49	6.59±0.49	8.11±0.24 ^b
ค่าเฉลี่ยของ ระยะเวลาการบ่ม	9.67±0.23 ^w	8.14±0.23 ^x	6.68±0.23 ^y	6.12±0.23 ^y	

^{a-d} อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

^{x-z} อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวก ค ที่ 7 ค่า Soluble collagen ในกล้ามเนื้อสันนอกของกลุ่มโคในประเทศไทยและ
ระยะเวลาการบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน

กลุ่มโค	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)				ค่าเฉลี่ยของกลุ่มโค
	2	7	14	21	
ตาก	0.20±0.02	0.25±0.02	0.28±0.02	0.34±0.02	0.26±0.01 ^a
อุบลราชธานี	0.11±0.03	0.14±0.03	0.17±0.03	0.22±0.03	0.16±0.01 ^b
กาญจนบุรี	0.11±0.02	0.14±0.02	0.17±0.02	0.21±0.02	0.16±0.01 ^b
ขาวลำพูน	0.09±0.02	0.11±0.02	0.15±0.02	0.30±0.02	0.16±0.01 ^b
ค่าเฉลี่ยของ ระยะเวลาการบ่ม	0.13±0.01 ^x	0.16±0.01 ^{xy}	0.19±0.01 ^y	0.27±0.01 ^z	

ตารางภาคผนวก ค ที่ 8 ค่า Insoluble collagen ในกล้ามเนื้อสันนอกของกลุ่มโคในประเทศไทยและ
ระยะเวลาการบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน

กลุ่มโค	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)				ค่าเฉลี่ยของกลุ่มโค
	2	7	14	21	
ตาก	4.15±0.23	3.41±0.23	2.90±0.23	2.28±0.23	3.19±0.11 ^a
อุบลราชธานี	3.84±0.29	2.99±0.27	2.50±0.27	2.17±0.27	2.87±0.14 ^a
กาญจนบุรี	3.03±0.25	2.27±0.25	1.64±0.25	1.33±0.25	2.07±0.13 ^b
ขาวลำพูน	2.23±0.25	1.33±0.25	1.13±0.25	1.07±0.27	1.44±0.13 ^c
ค่าเฉลี่ยของ ระยะเวลาการบ่ม	3.31±0.13 ^x	2.50±0.13 ^y	2.04±0.13 ^z	3.31±0.13 ^x	

ตารางภาคผนวก ค ที่ 9 ค่าโปรตีน calpastatin ในกล้ามเนื้อสันนอกของกลุ่มโคในประเทศไทยและ
ระยะเวลาการบ่มการบ่ม 2, 7, 14 และ 21 วัน

กลุ่มโค	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)				ค่าเฉลี่ยของกลุ่มโค
	2	7	14	21	
ตาก	2.00±0.07	1.76±0.07	1.61±0.07	1.47±0.07	1.71±0.04 ^c
อุบลราชธานี	2.30±0.07	1.94±0.07	1.64±0.07	1.43±0.07	1.82±0.04 ^b
กาญจนบุรี	2.39±0.08	2.08±0.08	1.83±0.08	1.67±0.08	1.99±0.04 ^a
ขาวลำพูน	2.26±0.08	1.98±0.08	1.74±0.08	1.58±0.08	1.89±0.04 ^{ab}
ค่าเฉลี่ยของ ระยะเวลาการบ่ม	2.24±0.04 ^x	1.94±0.04 ^y	1.70±0.04 ^z	1.54±0.04 ^z	

^{a-c} อักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

^{x-z} อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวก ค ที่ 10 อิทธิพลของกลุ่มโคในประเทศไทยต่อคุณภาพเนื้อ (LSMeans)

ลักษณะ	กลุ่มโคพื้นเมือง				p-value
ที่ศึกษา	ตาก	อุบลราชธานี	กาญจนบุรี	ขาวลำพูน	
pH	5.50±0.03 ^a	5.46±0.02 ^{bc}	5.41±0.02 ^c	5.48±0.02 ^{bc}	0.0496
L*	MS	40.28±0.46 ^b	42.63±0.51 ^a	38.77±0.51 ^c	0.0001
a*	MS	15.80±0.34 ^c	17.40±0.38 ^b	21.63±0.38 ^a	0.0001
b*	MS	4.21±0.24 ^b	3.06±0.27 ^c	5.19±0.27 ^a	0.0001
WBSF	6.21±0.22 ^b	7.92±0.22 ^a	8.37±0.24 ^a	8.11±0.24 ^a	0.0001
Calpastatin	1.71±0.04 ^c	1.82±0.04 ^b	1.99±0.04 ^a	1.89±0.04 ^{ab}	0.0001
Soluble	0.26±0.01 ^a	0.16±0.01 ^b	0.16±0.01 ^b	0.16±0.01 ^b	0.0001
Insoluble	3.19±0.11 ^a	2.87±0.14 ^a	2.07±0.13 ^b	1.44±0.13 ^c	0.0001

^{a-d} อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

MS ไม่มีข้อมูลแสดงในบางช่วงการวิจัยเนื่องจากเครื่องมือในการวัดสีเนื้อทำงานผิดปกติ

ตารางภาคผนวก ค ที่ 11 อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มที่มีผลต่อคุณภาพเนื้อ (LSMeans)

ลักษณะที่ศึกษา	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)				p-value
	2	7	14	21	
pH	5.51±0.02	5.44±0.02	5.48±0.02	5.43±0.02	0.0644
L*(lightness)	38.52±0.84 ^y	40.29±0.54 ^{xy}	MS	41.36±0.54 ^x	0.0158
a*(redness)	16.50±0.62 ^z	18.52±0.40 ^{xy}	MS	18.48±0.40 ^x	0.0087
b*(yellowness)	3.00±0.44 ^z	4.84±0.28 ^y	MS	5.67±0.28 ^x	0.0001
WBSF	9.67±0.23 ^x	8.14±0.23 ^y	6.68±0.23 ^z	6.12±0.23 ^z	0.0001
calpastatin	2.24±0.04 ^x	1.94±0.04 ^y	1.70±0.04 ^z	1.54±0.04 ^z	0.0001
Soluble	0.13±0.01 ^x	0.16±0.01 ^{xy}	0.19±0.01 ^y	0.27±0.01 ^z	0.0001
Insoluble	3.31±0.13 ^x	2.50±0.13 ^y	2.04±0.13 ^z	1.71±0.13 ^z	0.0001

^{x-z} อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

MS ไม่มีข้อมูลแสดงในบางช่วงการวิจัยเนื่องจากเครื่องมือในการวัดสีเนื่อทำงานผิดปกติ

ตารางภาคผนวก ค ที่ 12 อิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคพื้นเมืองและระยะเวลาการบ่ม (LSMeans)

ลักษณะที่ศึกษา	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)	กลุ่มโคพื้นเมือง				p-value
		ตาก	อุบลราชธานี	กาญจนบุรี	ขาวลำพูน	
pH	2	5.55±0.05	5.52±0.04	5.48±0.04	5.48±0.04	0.6190
	7	5.48±0.05	5.39±0.04	5.39±0.04	5.51±0.04	
	14	5.53±0.05	5.47±0.04	5.42±0.04	5.49±0.04	
	21	5.44±0.05	5.48±0.04	5.37±0.04	5.43±0.04	
L* (lightness)	2	36.86±2.89	38.55±0.91	41.76±1.02	36.91±1.02	0.9883
	7	39.61±1.29	40.49±0.91	42.53±1.02	38.53±1.02	
	14	MS	40.97±0.91	43.17±1.02	39.91±1.02	
	21	41.55±1.29	41.10±0.91	43.08±1.02	39.71±1.02	

MS ไม่มีข้อมูลแสดงในบางช่วงการวิจัยเนื่องจากเครื่องมือในการวัดสีเนื่อทำงานผิดปกติ

ตารางภาคผนวก ค ที่ 12 (ต่อ) อิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคพื้นเมืองและระยะเวลาการบ่ม (LSMeans)

ลักษณะที่ศึกษา	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)	กลุ่มโค				p-value
		ตาก	อุบลราชธานี	กาญจนบุรี	ขาวลำพูน	
a* (redness)	2	15.81±2.24	14.67±0.68	16.09±0.76	19.45±0.76	0.9193
	7	18.26±0.96	15.56±0.68	18.15±0.76	22.13±0.76	
	14	MS	16.53±0.68	17.78±0.76	22.62±0.76	
	21	17.60±0.96	16.42±0.68	17.57±0.76	22.33±0.76	
b* (yellowness)	2	5.07±1.53	2.61±0.48	1.22±0.54	3.08±0.54	0.9316
	7	6.18±0.68	3.95±0.48	3.48±0.54	5.75±0.54	
	14	MS	5.08±0.48	3.54±0.54	5.98±0.54	
	21	7.54±0.68	5.20±0.48	4.00±0.54	5.94±0.54	
WBSF	2	7.77±0.44	10.75±0.44	9.91±0.49	10.23±0.49	0.4214
	7	6.97±0.44	8.03±0.44	9.03±0.49	8.53±0.49	
	14	5.67±0.44	6.68±0.44	7.31±0.49	7.07±0.49	
	21	4.44±0.44	6.23±0.44	7.24±0.49	6.59±0.49	
Soluble collagen	2	0.20±0.02	0.11±0.03	0.11±0.02	0.09±0.02	0.4315
	7	0.25±0.02	0.14±0.03	0.14±0.02	0.11±0.02	
	14	0.28±0.02	0.17±0.03	0.17±0.02	0.15±0.02	
	21	0.34±0.02	0.22±0.03	0.21±0.02	0.30±0.02	
Insoluble collagen	2	4.15±0.23	3.84±0.29	3.03±0.25	2.23±0.25	0.9077
	7	3.41±0.23	2.99±0.27	2.27±0.25	1.33±0.25	
	14	2.90±0.23	2.50±0.27	1.64±0.25	1.13±0.25	
	21	2.28±0.23	2.17±0.27	1.33±0.25	1.07±0.27	
Calpastatin	2	2.00±0.07	2.30±0.07	2.39±0.08	2.26±0.08	0.6754
	7	1.76±0.07	1.94±0.07	2.08±0.08	1.98±0.08	
	14	1.61±0.07	1.64±0.07	1.83±0.08	1.74±0.08	
	21	1.47±0.07	1.43±0.07	1.67±0.08	1.58±0.08	

ตารางภาคผนวก ค ที่ 13 อิทธิพลร่วมของกลุ่มโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรปและระยะเวลาบ่มที่มีผลต่อ
ลักษณะคุณภาพเนื้อ

ลักษณะที่ศึกษา	กลุ่มโค	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)				p-value
		2	7	14	21	
pH	2/8 Simmental	5.49±0.11	5.18±0.11	5.56±0.11	5.51±0.11	0.1884
	5/8 Simmental	5.52±0.08	5.50±0.08	5.49±0.08	5.47±0.08	
L* (lightness)	2/8 Simmental	31.86±1.56	34.13±1.56	37.35±1.27	38.50±1.56	0.3916
	5/8 Simmental	37.04±0.98	38.90±0.98	38.91±0.90	41.02±0.90	
a* (redness)	2/8 Simmental	21.13±1.35	23.01±1.35	23.65±1.11	24.47±1.35	0.9767
	5/8 Simmental	23.89±0.86	25.54±0.86	25.84±0.78	26.30±0.78	
b* (yellowness)	2/8 Simmental	6.00±1.41	7.66±1.41	9.50±1.15	9.19±1.41	0.9664
	5/8 Simmental	6.58±0.89	8.47±0.89	9.39±0.81	9.12±0.81	
WBSF	2/8 Simmental	7.83±0.66	6.72±0.66	5.68±0.66	5.62±0.66	0.6561
	5/8 Simmental	6.04±0.47	4.82±0.47	5.09±0.47	4.30±0.47	
CAST	2/8 Simmental	2.85±0.30	2.28±0.30	2.21±0.30	2.14±0.30	0.6863
	5/8 Simmental	3.37±0.22	2.66±0.22	2.21±0.22	2.14±0.22	
ISC	2/8 Simmental	2.44±0.36	1.21±0.36	1.07±0.36	0.95±0.36	0.2748
	5/8 Simmental	1.27±0.26	1.30±0.31	0.83±0.26	0.58±0.26	
TC	2/8 Simmental	4.87±0.64	2.42±0.64	1.10±0.64	1.00±0.64	0.2046
	5/8 Simmental	2.53±0.45	2.06±0.45	0.85±0.45	0.61±0.45	