



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ
เอนไซม์ calpains และ คุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทย”

โดย

ผศ.ดร.จันทร์พร เจ้าทรัพย์ และ คณะ

ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

มกราคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ
เอนไซม์ calpains และ คุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทย”

โดย

ผศ.ดร.จันทร์พร เจ้าทรัพย์

รศ.ดร.จุฑารัตน์ เศรษฐกุล

รศ.ดร.นวลพรรณ งามยี่สุ่น

ดร.ปิยะดา ทวีศรี

ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นของรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในโครงการ “ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ เอนไซม์ calpains และคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทย” นี้ ได้บรรลุผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ โดยได้รับความร่วมมือและความช่วยเหลือจากนักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาสัตวศาสตร์ ได้แก่ นางสาวสไบพร มะเดื่อ นางสาวทิพยาภรณ์ กุสี นางสาวพัชรา เอื้อพัฒนพงศ์ และนายวิวัฒน์ อัสวพันธุ์นิมิต และผู้ช่วยนักวิจัย ได้แก่ นางสาวมยุรินทร์ รักทอง และนายฉันทวัฒน์ อัจฉวาคม ซึ่งได้ให้ความช่วยเหลือในระหว่างการเก็บข้อมูลภาคสนามและการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งขอขอบคุณ Assoc. Prof. Dr. Tim Parr, Department of Nutritional Science, The University of Nottingham, UK ที่ได้ให้ความช่วยเหลือแนะนำเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างในงานวิจัยครั้งนี้

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบุคคลที่ได้กล่าวนามมาข้างต้น ที่ได้ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

งานวิจัยเรื่อง “ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ เอนไซม์ calpains และคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทย” นี้ได้รับเงินวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

คณะผู้วิจัย

มกราคม 2555

บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร

ชื่อโครงการ : ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ เอ็นไซม์ calpains และคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทย

โคพื้นเมืองไทยมีการเลี้ยงแบบปล่อยให้หากินหญ้าตามธรรมชาติในแหล่งป่าชุมชน นาข้าวหลังฤดูการเก็บเกี่ยว รวมทั้งตามป่าและภูเขา เนื้อโคพื้นเมืองมีปริมาณซีสตีนีม สังกะสี และธาตุเหล็กสูงแต่ไม่มีไขมันแทรก ด้วยเหตุผลนี้เองที่อาจทำให้เนื้อโคพื้นเมืองเหมาะกับผู้บริโภคที่ต้องการบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพ แต่อย่างไรก็ตามเนื้อโคไทยมีปัญหาในเรื่องเนื้อค่อนข้างเหนียวซึ่งนับว่าเป็นปัจจัยสำคัญต่อการตัดสินใจเลือกซื้อเนื้อของผู้บริโภค ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงต้องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ เอ็นไซม์ calpains ปริมาณของคอลลาเจน ไกลโคเจน รวมทั้งโภชนะของเนื้อที่มีต่อคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทย ผลจากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้อาจเป็นประโยชน์ในการนำไปปรับปรุงคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทยต่อไป

วัตถุประสงค์ :

การศึกษาค้นคว้านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ ปริมาณของเอ็นไซม์ calpains ปริมาณของคอลลาเจน ไกลโคเจน และโภชนะที่อยู่ในเนื้อ รวมทั้งคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทย โดยทำการศึกษาในกล้ามเนื้อ 3 ชนิด จากโคพื้นเมืองจังหวัดกาญจนบุรีและอุบลราชธานี รวมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ กับลักษณะอื่นที่ทำการศึกษา

วิธีการวิจัย :

การศึกษาค้นคว้านี้ใช้ตัวอย่างกล้ามเนื้อ 3 ชนิดคือ Infraspinatus (IF), Longissimus dorsi (LD) และ Supraspinatus (SS) จากโคพื้นเมือง 14 ตัวจากจังหวัดกาญจนบุรีและอุบลราชธานี โดยทำการศึกษานิสัยเส้นใยกล้ามเนื้อ เอ็นไซม์ calpains ปริมาณของคอลลาเจน ไกลโคเจน และ โภชนะ รวมทั้งคุณภาพของเนื้อโคพื้นเมืองไทย ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย General Linear Model โดยวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยหลักคือ กลุ่มโค และชนิดกล้ามเนื้อ รวมทั้งวิเคราะห์อิทธิพลร่วมของทั้ง 2 ปัจจัยด้วย นอกจากนี้ทำการวิเคราะห์หาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ รวมทั้งค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับลักษณะที่ทำการศึกษาค้นคว้าในครั้งนี้ด้วย

ผลการศึกษาค้นคว้า :

ผลการวิจัยปรากฏว่า IF มีระดับของ MHC I สูงที่สุดแต่มี MHC IIx ต่ำที่สุด ($P < 0.01$) ในขณะที่ LD มี MHC I ต่ำที่สุด แต่มี MHC IIx สูงที่สุด ($P < 0.01$) ชนิดกล้ามเนื้อไม่มีอิทธิพลต่อ calpain activity และปริมาณของ calpastatin ($P > 0.05$) LD มีปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย และคอลลาเจนทั้งหมด น้อยกว่ากล้ามเนื้ออื่น ($P < 0.01$) สีของ LD อ่อนกว่ากล้ามเนื้ออื่นโดยพบว่า ค่า L^* สูง ในขณะที่ค่า a^* และ b^*

ต่ำกว่ากล้ามเนื้ออื่น ($P<0.01$) LD มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงที่สุด รองลงมาคือ SS และ IF ตามลำดับ ($P<0.01$) LD มีปริมาณโปรตีนและเถ้าสูงกว่า ในขณะที่มี ความชื้นและไขมันต่ำกว่ากล้ามเนื้ออื่น ($P<0.01$) โคกายจนบุรี มีปริมาณ fast MHC IIx และมีค่า L^* สูงกว่า ในขณะที่มี calpastatin ไกลโคเจน ค่า a^* เปอร์เซ็นต์การสูญเสียไน้ระหว่างการปรุง ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ และเปอร์เซ็นต์โปรตีน ต่ำกว่าโคอุบลราชธานี ($P<0.01$) การศึกษาครั้งนี้ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดกล้ามเนื้อและกลุ่มโคต่อลักษณะที่ศึกษาก่อนต่อค่า pH_{48} และ อุณหภูมิของเนื้อที่ 48 ชั่วโมงหลังสตัว์ตาย

การศึกษานี้พบสหสัมพันธ์เชิงลบระหว่าง MHC IIa กับ ค่า OD ของ calpastatin ($p<0.01$) fast MHC IIx มีสหสัมพันธ์เชิงลบกับ คอลลาเจนที่ละลายได้ คอลลาเจนที่ไม่ละลายและปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด pH_{48} ค่า a^* ค่า b^* เปอร์เซ็นต์ไขมัน และเปอร์เซ็นต์ความชื้น ในขณะที่พบสหสัมพันธ์เชิงบวกกับ ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียไน้ระหว่างการปรุง เปอร์เซ็นต์โปรตีน และเปอร์เซ็นต์เถ้า ค่าแรงตัดผ่า เนื้อมีสหสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ ค่า pH_{48} ค่า a^* เปอร์เซ็นต์ไขมันและ เปอร์เซ็นต์ความชื้น ในขณะที่พบสหสัมพันธ์เชิงบวก กับ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียไน้ระหว่างการปรุง เปอร์เซ็นต์โปรตีน และเปอร์เซ็นต์เถ้า

โดยสรุปแล้ว กล้ามเนื้อ IF มีลักษณะเป็น slow MHC type I จะมีปริมาณไขมันและคอลลาเจนสูงกว่ากล้ามเนื้อ LD ที่มีลักษณะเป็น fast MHC type IIx ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณไขมันมีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อมากกว่าปริมาณคอลลาเจน ดังที่พบว่ากล้ามเนื้อ IF มีความนุ่มมากกว่ากล้ามเนื้อ LD ดังนั้นผลการทดลองครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์ในการนำไปปรับปรุงคุณภาพเนื้อโคพื้นเมือง โดยเฉพาะในเรื่องของระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเนื้อของกล้ามเนื้อต่างชนิดกัน โดยกล้ามเนื้อ IF ใช้เวลาในการบ่มเนื้อน้อยกว่ากล้ามเนื้อ LD เพื่อเพิ่มความนุ่มของเนื้อ นอกจากนี้แล้วผลการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าโคพื้นเมืองกาญจนบุรีมีเส้นใยกล้ามเนื้อเป็น fast type และพบว่ามีคุณภาพเนื้อดีกว่าโดยมีปริมาณ calpastatin และค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำกว่าโคพื้นเมืองอุบลราชธานี ซึ่งข้อมูลดังกล่าวนี้อาจเป็นประโยชน์ในการนำไปปรับปรุงพันธุ์โคพื้นเมืองเพื่อให้ได้เนื้อที่มีคุณภาพดีขึ้น

Executive Summary

Project title : Relationships between muscle fiber types, calpain enzymes and meat quality of Thai Native Beef

Thai native cattle are raised by grazing naturally available grasses in communal land, post – harvested rice field, forest or highland area. Their beef has greater Se, Zn and Fe concentration as well as greater conjugated linoleic acid while contains no marbling. These reasons may be satisfied the consumers who prefer a healthy food. However, Thai Native beef has a problem with tough meat which is the most important factor for consumer perception. Therefore, this research aimed to investigate the relationship between muscle fiber type, proteolytic calpain enzyme, collagen content, glycogen storage, nutritive values and Thai native beef quality. The basic knowledge gained from this study may be beneficial for improving Thai native beef quality.

Objectives :

The objectives of this study were to classify muscle fiber type and to determine the content of proteolytic calpains enzyme, collagen content, glycogen storage, nutritive values and meat quality of 3 muscle types from Karnjanaburi and Ubonratchathani native beef. The correlation between muscle fiber types, shear force value and other studied traits were also investigated in this study.

Metodology :

Three muscle types; Infraspinatus (IF), Longissimus dorsi (LD) and Supraspinatus (SS) of 14 Thai native cattle from Karnjanaburi (K) and Ubonratchathani (U) province were used to determine muscle fiber type, proteolytic calpains, collagen content, glycogen storage, nutritive values and meat quality. The data were analysed using a General Linear Model, with the main effects of groups of animal (K and U) and muscle types (IF, LD and SS) and their interaction. The Pearson correlation was used to determine the correlation coefficient between muscle fiber types as well as shear force value and other studied traits.

Results :

Three MHC isoforms (MHC I, MHC IIa, MHC IIx) were detected in all 3 muscles. IF showed the greatest proportions of MHC I while showed the least proportions of MHC IIx ($P < 0.01$). In contrast with IF, LD had the least intensity of MHC I while had the greatest intensity of MHC IIx ($P < 0.01$). There was no effect of muscle types on calpain activity and the intensity of calpastatin ($P > 0.05$).

LD showed less levels of insoluble and total collagen than others ($P < 0.01$). Color of LD was lighter as L^* value was greater while a^* and b^* value was less than others ($P < 0.01$). LD had the greatest shear force value, following by SS and IF, respectively ($P < 0.01$). LD showed greater protein and ash content while showed less content of moisture and fat than others ($P < 0.01$). In comparison between groups of animal, Karnjanaburi group had greater levels of fast MHC IIX and L^* value while had less calpastatin intensity, glycogen content, a^* value, % cooking loss, shear force and % protein than those in Ubonratchathani group ($P < 0.01$). There was no interaction between muscle types and groups of animal in this study except for pH_{48} and temperature of meat at 48 hours post mortem.

This study has found negative correlation between MHC IIX and OD of calpastatin ($r = -0.431$, $P < 0.01$). Fast MHC IIX showed negative correlation with soluble, insoluble and total collagen, pH_{48} , a^* and b^* value and % fat while showed positive correlation with shear force, % protein, and % ash. Slow MHC I positively correlated with insoluble and total collagen, pH_{48} , a^* and b^* value, % fat and % moisture whereas negatively correlated with shear force, % cooking loss, % protein and % ash. Shear force showed a negative correlation with soluble collagen, pH_{48} , a^* value, % fat and % moisture while showed a positive correlation with % cooking loss, % protein and % ash.

In conclusion, slow type I IF muscle has greater content of both fat and collagen than fast type IIX LD muscle. In this study, the content of fat has more influence on the tenderness than collagen content as IF muscle is more tender than LD muscle. Therefore, the results of this study potentially had a direct application for improving native beef quality especially on the appropriate ageing period for different muscles. The results showed that slow IF muscle required shorter ageing period than fast LD muscle to improve tenderness. In addition, this study was found that Karnjanaburi Thai native beef had greater content of fast MHC and had better meat quality as showing lower calpastatin content and lower shear force value than Ubonratchathani native beef. This information may be useful for Thai native beef breeding improvement and finally meat quality improvement.

ชื่อโครงการวิจัย ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ เอนไซม์ calpains และคุณภาพเนื้อโค พื้นเมืองไทย

โดย จันทรพร เจ้าทรัพย์ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล นวลพรรณ งามยี่สุน และ ปิยะดา ทวีศรี
สัญญาเลขที่ RDG5320048

บทคัดย่อ

เส้นใยกล้ามเนื้อมีคุณสมบัติเฉพาะที่มีบทบาทสำคัญต่อคุณภาพเนื้อ วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อตรวจสอบชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อในโคพื้นเมืองไทยเพศผู้ โดยอาศัยหลักการจัดจำแนกตามชนิดของ Myosin Heavy Chain โดยวิธีการ electrophoresis และหาความสัมพันธ์ระหว่าง ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อต่อเอนไซม์ calpains ปริมาณคอลลาเจน ปริมาณไกลเจน ส่วนประกอบทางโภชนะ และคุณภาพเนื้อ โดยทดลองในกล้ามเนื้อ 3 ชนิด *Infraspinatus* (IF), *Longissimus dorsi* (LD), *Supraspinatus*(SS) จากโคพื้นเมืองไทยจำนวน 14 ตัว จากจังหวัดกาญจนบุรีและอุบลราชธานี ผลการทดลองปรากฏว่า IF มีระดับของ MHC I สูงที่สุดแต่มี MHC IIx ต่ำที่สุด ($P<0.01$) ในขณะที่ LD มี MHC I ต่ำที่สุด แต่มี MHC IIx สูงที่สุด ($P<0.01$) ชนิดกล้ามเนื้อไม่มีอิทธิพลต่อ calpain activity และปริมาณของ calpastatin ($P>0.05$) LD มีปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย และคอลลาเจนทั้งหมด น้อยกว่ากล้ามเนื้ออื่น ($P<0.01$) สีของ LD อ่อนกว่ากล้ามเนื้ออื่นโดยพบว่า ค่า L^* สูง ในขณะที่ค่า a^* และ b^* ต่ำกว่ากล้ามเนื้ออื่น ($P<0.01$) LD มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงที่สุด รองลงมาคือ SS และ IF ตามลำดับ ($P<0.01$) LD มีปริมาณโปรตีนและเถ้าสูงกว่า ในขณะที่มี ความชื้นและไขมันต่ำกว่ากล้ามเนื้ออื่น ($P<0.01$) โคกาญจนบุรี มีปริมาณ fast MHC IIx และค่า L^* สูงกว่า ในขณะที่มี calpastatin ไกลโคเจน ค่า a^* เปอร์เซ็นต์การสูญเสียไน้ระหว่างการปรุง ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ และเปอร์เซ็นต์โปรตีน ต่ำกว่าโคอุบลราชธานี ($P<0.01$)

การศึกษากลับนี้พบสหสัมพันธ์เชิงลบระหว่าง MHC IIa กับ ค่า OD ของ calpastatin ($p<0.01$) fast MHC IIx มีสหสัมพันธ์เชิงลบกับ คอลลาเจนที่ละลายได้ คอลลาเจนที่ไม่ละลายและปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด pH_{48} ค่า a^* ค่า b^* เปอร์เซ็นต์ไขมัน และเปอร์เซ็นต์ความชื้น ในขณะที่พบสหสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าแรงตัดผ่านเนื้อ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียไน้ระหว่างการปรุง เปอร์เซ็นต์โปรตีน และเปอร์เซ็นต์เถ้า ค่าแรงตัดผ่า เนื้อมีสหสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ ค่า pH_{48} ค่า a^* เปอร์เซ็นต์ไขมันและ เปอร์เซ็นต์ความชื้น ในขณะที่พบสหสัมพันธ์เชิงบวก กับ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียไน้ระหว่างการปรุง เปอร์เซ็นต์โปรตีน และเปอร์เซ็นต์เถ้า

Project title Relationships between muscle fiber types, calpain enzymes and meat quality of Thai Native Beef

By Chanporn Chaosap, Jutarat Sethakul, Nuanpan Ngamyeesoon and Piyada Tavitchsri

Research project code RDG5320048

Abstract

Muscle fiber characteristics play a major role in meat quality. The purpose of the present study was to investigate muscle fiber type in Thai Native bulls based on Myosin Heavy Chain Isoforms by Electrophoresis and to determine the relation of muscle fiber types on postmortem proteolytic calpains, collagen content, glycogen storage, nutritive values and meat quality. Three muscle types, Infraspinatus (IF), Longissimus dorsi (LD), Supraspinatus (SS) were obtained from 14 cattle of 2 groups of Thai native bulls, Kanjanaburi and Ubonratchathani province.

Three MHC isoforms (MHC I, MHC IIa, MHC IIx) were detected in all 3 muscles. IF showed the greatest proportions of MHC I while showed the least proportions of MHC IIx ($P < 0.01$). In contrast with IF, LD had the least intensity of MHC I while had the greatest intensity of MHC IIx ($P < 0.01$). There was no effect of muscle types on calpain activity and the intensity of calpastatin ($P > 0.05$). LD showed less levels of insoluble and total collagen than others ($P < 0.01$). Color of LD was lighter as L*value was greater while a* and b* value was less than others ($P < 0.01$). LD had the greatest shear force value, following by SS and IF, respectively ($P < 0.01$). LD showed greater protein and ash content while showed less content of moisture and fat than others ($P < 0.01$). In comparison between groups of animal, Kanjanaburi group had greater levels of fast MHC IIx and L* value while showed less calpastatin intensity, glycogen content, a* value, % cooking loss, shear force and % protein than those in Ubonratchathani group ($P < 0.01$).

This study has found negative correlation between MHC IIa and OD of calpastatin ($r = -0.431$, $P < 0.01$). Fast MHC IIx showed negative correlation with soluble, insoluble and total collagen, pH₄₈, a* and b* value and % fat while showed positive correlation with shear force, % protein, and % ash. Slow MHC I positively correlated with insoluble and total collagen, pH₄₈, a* and b* value, % fat and % moisture whereas negatively correlated with shear force, % cooking loss, % protein and % ash. Shear force showed a negative correlation with soluble collagen, pH₄₈, a* value, % fat and % moisture while showed a positive correlation with % cooking loss, % protein and % ash.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร	ข
Executive Summary ง	
บทคัดย่อภาษาไทย	ฉ
Abstract	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ต
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญของปัญหา	1
1.2 กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	2
1.3 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
1.3.1 ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ	3
1.3.2 ผลการศึกษาชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อในโค	8
1.3.3 อิทธิพลของเส้นใยกล้ามเนื้อต่อคุณภาพเนื้อ	10
1.3.4 ความสำคัญของเอนไซม์ calpains ต่อความนุ่มของเนื้อ	10
1.3.5 การศึกษา activity ของ เอนไซม์ calpains ด้วยวิธีไซโมกราฟ	12
1.3.6 การศึกษาคุณภาพของเนื้อและองค์ประกอบทางเคมี	14
1.3.7 การศึกษาคุณภาพซากและคุณภาพเนื้อของโคไทย	15
1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	17
1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย	17
1.6 เป้าหมายและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	18
1.7 ระยะเวลาและสถานที่ในการทำวิจัย	18
บทที่ 2 เนื้อเรื่อง	20
2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย	20
2.1.1 การเก็บข้อมูล	20
2.1.2 Myosin Heavy Chain Isoform โดย Electrophoresis	20
2.1.3 Calpain activity โดย casein zymography	23

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.1.4 การวิเคราะห์หา Calpastatin ด้วยวิธี iELISA	26
2.1.5 การวิเคราะห์หา Troponin T โดยเทคนิค Western blot	28
2.1.6 วิเคราะห์หาปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน	31
2.1.7 วิเคราะห์หาปริมาณไกลโคเจน	33
2.1.8 การศึกษาคุณภาพเนื้อ	33
2.1.9 วัดขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อ	34
2.1.10 วัดความยาวซาร์โคเมอร์ด้วยเครื่อง Helium-Neon Laser	34
2.2 การวิเคราะห์ข้อมูล	35
บทที่ 3 ผลการวิจัยและวิจารณ์	37
ผลการวิจัย	37
3.1 ชนิด Myosin heavy chain ด้วย Electrophoresis	37
3.2 เอ็นไซม์ Calpains	38
3.2.1 calpain activity โดยวิธี casein zymography	38
3.2.2 calpastatin ด้วยวิธี iElisa	39
3.3 คุณภาพของเนื้อ	41
3.3.1 ปริมาณคอเลสเตอรอล	41
3.3.2 ปริมาณไกลโคเจน	41
3.3.3 ค่า pH	42
3.3.4 สีของเนื้อ	43
3.3.5 ความนุ่มของเนื้อ	43
3.3.6 การย่อยสลายของโปรตีน Troponin-T	43
3.3.7 คุณค่าทางโภชนา	44
3.3.8 ขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อและความยาวซาร์โคเมอร์	45
3.4 สหสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ Myosin heavy chain กับเอ็นไซม์ calpains และ คุณภาพเนื้อ	46
วิจารณ์ผล	50
สรุปผลการทดลอง	57
เอกสารอ้างอิง	59
ภาคผนวก	65

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 การเรียกชื่อชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ	4
1.2 ลักษณะทางชีวภาพของเส้นใยกล้ามเนื้อแต่ละชนิดโดยแบ่งตามชนิดของ myosin heavy chain	5
1.3 ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อของกล้ามเนื้อชนิดต่าง ๆ ในโค	9
1.4 ค่าสี pH ปริมาณคอลลาเจน และองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อโค 1	5
1.5 ค่าความนุ่ม ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ความยาวของซาร์โคเมอร์ คอลลาเจน และค่าการสูญเสียไรระหว่างการปรุงสุกของเนื้อโค 1	5
1.6 ลักษณะซากของโคพื้นเมืองไทยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น	16
1.7 คุณภาพเนื้อโคภายใต้ระบบการเลี้ยงที่แตกต่างกัน	16
1.8 คุณค่าทางโภชนาการของเนื้อโคไทย	17
3.1 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อ Myosin Heavy chain Isoform 38	
3.2 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อ calpain activity	39
3.3 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อค่า OD ที่ 650 nm ของ calpastatin ที่เวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมงหลังสตัว์ตาย	41
3.4 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเนื้อโค ภายหลังสตัว์ตาย ไม่เกิน 48 ชั่วโมง	41
3.5 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อปริมาณไกลโคเจน ที่ไม่เกิน 1 ชั่วโมง หลังสตัว์ตาย	42
3.6 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อค่า pH และอุณหภูมิของเนื้อที่ 48 ชั่วโมง หลังสตัว์ตาย	42
3.7 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อสีของเนื้อโคที่ 48 ชั่วโมงหลังสตัว์ตาย 4	3
3.8 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อค่าการสูญเสียไรระหว่างการปรุงและค่าแรงตัดผ่านเนื้อภายหลังสตัว์ตาย 48 ชั่วโมง	43
3.9 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อ ความเข้มข้นของแถบโปรตีน Troponin-T ขนาด 28-30 kDa ที่ 48 ชั่วโมงหลังสตัว์ตาย	44
3.10 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อเปอร์เซ็นต์ความชื้นและวัตถุแห้ง	45
3.11 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อ โปรตีน ไขมัน และเถ้า	45
3.12 อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อ และความยาวซาร์โคเมอร์	46

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.13 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ Myosin heavy chain กับเอ็นไซม์ calpains คุณภาพเนื้อ และปริมาณโกชนะในเนื้อโคพื้นเมือง 4	7
3.14 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อ กับเอ็นไซม์ calpains คุณภาพเนื้อ และ ปริมาณโกชนะในเนื้อโคพื้นเมือง	48
3.15 แสดงค่าเฉลี่ย ค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าสัมประสิทธิ์ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูล	49

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 ส่วนประกอบของ Myosin II ที่อยู่ในกล้ามเนื้อลาย	5
1.2 ชนิดของ myosin heavy chain ของโคโตเต็มวัย แยกโดยวิธี electrophoresis	7
1.3 electrophoresis ของกล้ามเนื้อ <i>rectus abdominis</i> จากตัวอย่างโค 13 ตัว เปรียบเทียบกับมาตรฐานจากกล้ามเนื้อ <i>cutaneus trunci</i> (MHC IIa และ IIx) และ <i>masseter</i> (MHC I)	7
1.4 a) การแยกชนิดของ MHC ในกล้ามเนื้อ <i>longissimus thoracic</i> (LT) เลน 1 คือ LT ที่ (<i>Masseter</i>) CT (<i>Cutaneous trunci</i>) ไม่มี MHC IIb เลน 2 คือ LT ที่มี MHC IIb b) การวิเคราะห์ด้วย Western blotting ใช้ antibodies ที่เฉพาะเจาะจง โดย mAb 5B9 ทำปฏิกิริยากับ MHC I pAb A1 ทำปฏิกิริยากับ MHC I และ IIa mAb S48F4 ทำปฏิกิริยากับ MHC IIx และ IIb กล้ามเนื้อ LT1 (<i>longissimus thoracic</i> ที่ไม่มี MHC IIb) LT2 (<i>longissimus thoracic</i> ที่มี MHC IIb) Di (<i>diaphragm</i>) Ma	8
1.5 การเปลี่ยนแปลงของเอ็นไซม์ calpain activity และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ	11
1.6 การเปลี่ยนแปลงของ activity ของเอ็นไซม์ calpain 1 (μ -calpain) calpain 2 (m-calpain) และ calpastatin ของกล้ามเนื้อ <i>Semimembranosus</i> ของโค ในระหว่างการบ่มที่อุณหภูมิ 2 - 4 องศาเซลเซียส	12
1.7 Casein Zymography ของ fraction ที่ผ่านการแยกด้วยเครื่อง anion-exchange liquid Chromatography	13
1.8 ระดับของ calpain activity เปรียบระหว่าง casein assay และ casein zymography	13
2.1 รูปแบบการเจือจางโปรตีนสกัดจากเนื้อโค (antigen) เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ต่อ antibodies ด้วยวิธี checker-board titration (ก) และเพื่อตรวจวัดค่า OD ของ calpastatin ในเนื้อโคที่เก็บรักษาในระยะเวลาที่ต่างกันด้วยวิธี iELISA (ข)	28
2.2 แสดงลักษณะและขนาด band (kDa) ตัวมาตรฐาน Seeblue plus2 Pre-Stained standard	30
3.1 Myosin Heavy chain isoform แยกด้วย Electrophoresis ของกล้ามเนื้อ 7 ชนิด คือ <i>Masseter</i> (MA) <i>Diaphragm</i> (DI) <i>Trapezius</i> (TZ) <i>Longissimus dorsi</i> (LD) <i>Cutaneous trunci</i> (CT) <i>Infraspinatus</i> (IF) และ <i>Supraspinatus</i> (SS) โดยใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 50 นาโนกรัมต่อเลน	37
3.2 Myosin Heavy chain isoform แยกด้วย Electrophoresis	38

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3.3 Zymogram ของ calpain activity	39
3.4 ค่า O.D. ของ anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเอง และ anti-calpastatin ที่ผลิตเพื่อการค้า	40
3.5 สหสัมพันธ์ระหว่าง ค่า O.D. ของ anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเอง และ anti-calpastatin ที่ผลิตเพื่อการค้า	40
3.6 Immunoreactivity ของ Troponin T	44

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

กก	กิโลกรัม
มก/ก	มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
AEBSF	2-(4-aminoethyl)-benzenesulphonyl fluoride
ATP	Adenosine tri phosphate
BSA	Bovine serum albumin
CT	Cutaneous trunci
CV	Coefficient of Variation
DI	Diaphragm
DTT	dithiothrietal
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
IF	Infraspinatus
K	กาญจนบุรี
LD	Longissimus dorsi
LSM	Least squares means
MA	Masseter
MHC	Myosin heavy chain
mM	millimolar
Native PAGE	Native Polyacrylamide-Gel-Electrophoresis
pH ₄₈	ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 48 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย
r	correlation coefficient
SED	Standard Error of the Difference
SE	Standard Error
SS	Supraspinatus
STD	Standard
TEMED	tetramethylethylenediamine
TZ	trapezius
U	อุบลราชธานี
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

เนื้อโคพื้นเมืองไทยที่มาจากระบบการเลี้ยงแบบปล่อยหากินเองตามแหล่งหญ้าธรรมชาติมีความโดดเด่นที่เป็นเอกลักษณ์ต่างจากเนื้อโคขุนในด้านโภชนะที่มีอยู่ในเนื้อที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ นอกเหนือจากการที่เนื้อมีไขมันแทรกต่ำมาก จึงให้พลังงานน้อยกว่าแล้วยังมีแร่ธาตุและกรดไขมันจำเป็นที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ซีลีเนียม (Se) สังกะสี (Zn) และกรดไขมัน CLA (conjugated linolenic acids) สูงอีกด้วย นอกจากนี้ เนื้อโคพื้นเมืองยังมีลักษณะเนื้อสัมผัสเนียนแน่น เส้นใยกล้ามเนื้อละเอียด ซึ่งคุณลักษณะดังกล่าวของเนื้อเหมาะสมสำหรับการนำไปแปรรูปทำผลิตภัณฑ์ และยังสามารถนำไปประกอบอาหารได้หลากหลาย ขึ้นอยู่กับการเลือกชนิดของกล้ามเนื้อไปใช้ประโยชน์ อย่างไรก็ตามเนื้อโคไทยมีข้อจำกัดในเรื่องความนุ่มซึ่งพบว่าเนื้อมีความนุ่มปานกลาง

ดังนั้นการศึกษาวิจัยในประเด็นที่เกี่ยวข้องกับข้อดีของเนื้อโคพื้นเมือง คือ ความนุ่มของเนื้อ ซึ่งเป็นเรื่องสำคัญ และยังไม่มียารงานของการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมืองไทย ซึ่งเป็นโคเลือดอินเดีย (*Bos indicus*) เช่นเดียวกับเนื้อโคบราห์มันที่พบว่ามี การศึกษาวิจัยในต่างประเทศเป็นจำนวนมาก (Ho *et al.* 1997; Riley *et al.* 2005; Stolarski *et al.* 2006) ทั้งนี้จากการศึกษาค้นคว้าพบว่าความนุ่มของเนื้อเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเคมีที่สำคัญภายในกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย คือ ปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์ในเนื้อ (proteolysis) และปฏิกิริยาการใช้พลังงานโดยไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งสัมพันธ์กับชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อและการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในเนื้อ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับความนุ่มของเนื้อ ได้แก่ ปริมาณและชนิดของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และปริมาณไขมันแทรกในเนื้อ

จากงานวิจัยภายใต้โครงการการศึกษากลุ่มโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมือง ได้ศึกษาในกลุ่มโคพื้นเมืองที่เลี้ยงแบบปล่อยหากินตามทุ่งหญ้าธรรมชาติ 3 กลุ่ม ได้แก่ โคตาก โคกาญจนบุรี และโคอุบลราชธานี โคที่เลี้ยงแบบขุน คือ โคพัทลุง และโคที่เลี้ยงแบบขังคอกให้กินหญ้าแพงโกล่าตลอดระยะเวลาการเลี้ยง นอกจากนี้ยังได้ศึกษากลุ่มโคขุนเลือดยุโรป (โคขุนโพนยางคำ) ทั้งนี้กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษากำหนดขึ้นตามกลุ่มโคพื้นเมืองภายใต้โครงการอื่นที่ได้มีการวิจัยคู่ขนานกัน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณภาพเนื้อของโคในแต่ละพื้นที่ จึงเป็นข้อจำกัดของการศึกษาจากข้อมูลภาคสนาม ทำให้ไม่สามารถควบคุมปัจจัยหลาย ๆ อย่างที่จะมีอิทธิพลต่อคุณภาพเนื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องความนุ่มของเนื้อ

ทั้งนี้จากการศึกษาวิจัยในเบื้องต้นได้ทำการศึกษาในเรื่องของการย่อยสลายของโปรตีนในเนื้อ โดยการศึกษาปริมาณ calpastatins ซึ่งเป็นโปรตีนที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่บทบาทสำคัญในการ

ย่อยสลายโปรตีนในเนื้อหลังสัตว์ตาย คือ calpains นั้นเอง โดยศึกษา ควบคุมไปกับการศึกษาปริมาณ polypeptide ที่ได้จากการย่อยสลาย troponin-T ขนาด 28-30 kDa ซึ่งได้ผลเป็นที่น่าพอใจในระดับหนึ่ง แต่ข้อมูลยังไม่สมบูรณ์ ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลด้านผลการตรวจหาชนิดของเส้นกล้ามเนื้อไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากประสบปัญหาในการเก็บตัวอย่างเนื้อและขาดนักวิจัยที่มีประสบการณ์ทางด้านนี้โดยตรง

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาเพิ่มเติมจากโครงการเดิม โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะนำเอาเทคนิคใหม่มาใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อโดยอาศัยหลักการอิเล็กโตรโฟรีซิส รวมทั้งมีการศึกษาถึงปริมาณเอนไซม์ calpain activity รวมถึงศึกษาปริมาณไกลโคเจนซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับปฏิกิริยา glycolysis ไปด้วย ในขณะเดียวกันก็ทำการศึกษาวเคราะห์ลักษณะที่เคยทำการศึกษาแล้วในโครงการเดิม คือวิเคราะห์หาปริมาณ calpastatin ปริมาณของโทรโปนินที่ถูกย่อยสลาย ปริมาณคอลลาเจน รวมทั้งคุณภาพเนื้อไปพร้อมกันด้วย โดยกลุ่มโคที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มาจาก โครงการต้นแบบการจัดการธุรกิจเนื้อโคไทยธรรมชาติสู่ผู้บริโภค กรณีศึกษาโคอุบลราชธานี และโคกาญจนบุรี ยังดำเนินการอยู่ ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าผลการทดลองครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในเรื่องของชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อของโคพื้นเมืองไทย รวมทั้งทราบถึงปัจจัยอื่นๆ ที่อาจมีผลต่อคุณภาพของเนื้อโคพื้นเมืองไทย ซึ่งอาจนำไปเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงคุณภาพของเนื้อโคไทยต่อไป

1.2 กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

เนื้อโคพื้นเมืองที่ทำการศึกษาวจัยครั้งนี้มาจากโคพื้นเมืองที่เลี้ยงแบบปล่อยหากินตามธรรมชาติ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มภายใต้โครงการการพัฒนาต้นแบบห่วงโซ่อุปทานเนื้อโคธรรมชาติอุบลราชธานี และกลุ่มโคพื้นเมืองธรรมชาติจังหวัดกาญจนบุรี ทั้งนี้ผลจากการศึกษาวจัยภายใต้โครงการ “การศึกษากลุ่มโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมือง” ที่ผ่านมา 2 ปี พบว่าเนื้อโคอุบลราชธานีมีความนุ่ม (ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ) ไม่ต่างจากเนื้อโคกาญจนบุรี แต่พบว่าปริมาณ calpastatin ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ calpains ในโคกาญจนบุรีมีสูงกว่าโคอุบลราชธานี ซึ่งผลการศึกษาคพบว่า มีปริมาณ calpastatin น้อยที่สุดและไม่ต่างจากที่พบในเนื้อโคตาก ซึ่งเป็นกลุ่มโคที่ใช้ศึกษาเปรียบเทียบในครั้งนั้น และยังพบว่าเป็นเนื้อโคที่มีความนุ่มมากที่สุดด้วย

ข้อขัดแย้งที่พบในเนื้อโคอุบลราชธานีนี้ จึงควร มีการศึกษาคคุณภาพเนื้อโคอุบลราชธานี เปรียบเทียบกับเนื้อโคกาญจนบุรีอีกครั้ง โดยครั้งนี้จะทำการศึกษาในเรื่องต่อไปนี้

- 1) ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อในกล้ามเนื้อ 3 ชนิด ซึ่งคาดว่าจะเป็นตัวแทนของเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด slow (*Infraspinatus*) intermediate (*Supraspinatus*) และ fast-muscle fiber (*Longissimus dorsi*)
- 2) วัดขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อ และความยาวของ sarcomere ของกล้ามเนื้อทั้ง 3 ชนิด
- 3) enzyme activity ของ calpains
- 4) ปริมาณ calpastatin

- 5) ปริมาณการสลายโปรตีน troponin-T
- 6) ปริมาณไกลโคเจน
- 7) วัดปริมาณและชนิดของคอลลาเจน
- 8) วัดปริมาณไขมันแทรกในเนื้อ
- 9) ตรวจสอบคุณภาพเนื้อทางกายภาพ ได้แก่ สีของเนื้อ และค่า pH ในเนื้อ
- 10) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้นและเถ้า

1.3 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

ในการเลี้ยงสัตว์ให้เนื้อเพื่อการค่านั้น ผู้ผลิตต้องคำนึงถึงคุณภาพของเนื้อเป็นสำคัญ เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่ต้องการเนื้อที่มีคุณภาพ โดยเฉพาะเรื่องของความนุ่มของเนื้อ ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพเนื้อนั้นมีอยู่หลายปัจจัย เช่น อายุ พันธุ์ อาหาร เป็นต้น โดยปัจจัยต่างๆ เหล่านี้จะมีผลต่อลักษณะทางชีวภาพ (biological characteristics) ของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ เช่น ปริมาณคอลลาเจน ไขมัน เอนไซม์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งมีผลต่อลักษณะของเส้นใยกล้ามเนื้อ ซึ่งลักษณะของเส้นใยกล้ามเนื้อมีผลต่อความนุ่มและรสชาติของเนื้อในสัตว์หลายชนิด (Klont *et al.*, 1998) ดังนั้นความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับลักษณะของเส้นใยกล้ามเนื้อนับว่าเป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องทำการศึกษา เพื่อที่จะนำมาใช้เป็นแนวทางในการนำไปปรับปรุงคุณภาพเนื้อ อันจะเป็นการเพิ่มมูลค่าผลผลิตแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ในประเทศต่อไป

1.3.1 ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ

เส้นใยกล้ามเนื้อ ต่างชนิด กันเนื่อง มาจากน้ำหนักรวมของกล้ามเนื้อ ทาบอลิซึม โครงสร้าง และคุณสมบัติในการยืดหดตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อที่ต่างกันนั่นเอง ดังนั้นจึงสามารถจัดจำแนกชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อได้ตามหลายๆ ปัจจัย เช่น การแบ่งกลุ่มตามชนิดของโปรตีนไมโอไฟบริลลา (myofibrillar protein isoforms) ตามชนิดของ metabolic enzymes หรือตามคุณสมบัติของโครงสร้างและการยืดหดตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ (Choi and Kim, 2009) วิธีการจัดจำแนกชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อมีหลายวิธี ดังนี้

1.3.1.1 วิธีการ Histochemistry

เส้นใยกล้ามเนื้อสามารถแบ่งตามลักษณะการยืดหดตัว (contractile) หรือแบ่งตามตามขบวนการเมตาบอลิซึม (metabolic properties) โดยอาศัยวิธีการ Histochemistry

1) การแบ่งตามลักษณะการยืดหดตัว โดยอาศัยภาวะที่มีหลายรูปแบบ (polymorphism) ของโปรตีนไมโอซิน เนื่องจากไมโอซินเป็นส่วนประกอบหลักของเส้นใยหนา (thick filaments) และใช้เป็นตัวชี้วัดการหดตัวของกล้ามเนื้อ การแบ่งตามลักษณะการยืดหดตัวนี้แบ่งเป็นแบบ slow-twitch type I ซึ่งเป็นเส้นใยกล้ามเนื้อที่ใช้รักษาการทรงตัว และ fast-twitch type II ซึ่งเป็นเส้นใยกล้ามเนื้อที่ใช้ในการเคลื่อนไหว (Lefaucheur and Gerrard, 1998) วิธีการวัดโดยอาศัยหลักการ Histochemistry นั้นสามารถ

แบ่ง type I และ type II ด้วย m-ATPase staining โดย type I m-ATPase จะถูกยับยั้งหลังจาก alkaline pre-incubation และ type II จะถูกยับยั้งหลังจาก acid pre-incubation (Picard *et al.*, 2002)

2) การแบ่งตามขบวนการเมแทบอลิซึม สามารถวัดจาก activity ของ metabolic enzymes ในไมโทคอนเดรีย เช่น oxidative enzyme succinate dehydrogenase (SDH) โดย oxidative (red fibre) and non oxidative (white fibre) สามารถแยกได้ด้วย SDH staining (Gauthier, 1969) เมื่อรวมทั้งสองวิธีเข้าด้วยกันโดยจะทำการแบ่งระหว่าง slow type I และ fast type II ด้วย mATPase-based จากนั้นทำการแบ่งระหว่าง fast oxidative และ fast glycolytic ด้วย metabolic enzyme based แต่เนื่องจากหลักการ Histochemistry นั้นเป็นเทคนิคที่ใช้เวลาค่อนข้างมากในการตรวจสอบ ดังนั้นในปัจจุบัน จึงได้มีการนำเอาเทคนิคอื่นๆ เพื่อมาใช้ในการแบ่งชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อเป็นต้นว่า การแบ่งตาม Myosin Heavy Chain (MHC) isoforms ซึ่งสามารถแบ่งได้โดยหลักการ immunohistochemistry ซึ่งอาศัย antibodies ที่เฉพาะเจาะจงกับ MHC isoforms หรือ โดยหลักการ Electrophoresis ในการแยก MHC isoforms ซึ่งเป็นหลักการที่จะนำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ โดยคาดว่าจะสามารถตรวจสอบชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อได้รวดเร็วกว่าแบบ Histochemistry ที่เป็นแบบดั้งเดิม ซึ่งจากผลการทดลองของ Jones *et al.* (1999) พบว่าการแบ่งเส้นใยกล้ามเนื้อตามหลักการ Histochemistry มีความสอดคล้องกับการแบ่งตาม MHC isoforms ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อมีหลายชนิดและมีการเรียกชื่อ (nomenclature) หลายระบบตามวิธีการที่ใช้ในการจัดจำแนก (ตารางที่ 1.1) ลักษณะทางชีวภาพของเส้นใยกล้ามเนื้อแต่ละชนิด ที่จำแนกตามชนิดของ myosin heavy chain ดังตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.1 การเรียกชื่อชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ

Muscle Fiber types				
Nomenclature				
Contractile type	Slow-twitch	Fast twitch		
mATPase activity	I	IIa	IIb	
mATPase activity and SDH activity	BR (red)	OR(red)	OW(white)	
Metabolic type	SO	FOG	FG	
	(Slow Oxidative)	(Fast Oxidative-glycolytic)	(Fast Glycolytic)	
Myosin heavy chain	MHC I	MHC IIa	MHC IIx	MHC IIb

ที่มา: ดัดแปลงจาก Picard และคณะ (2002)

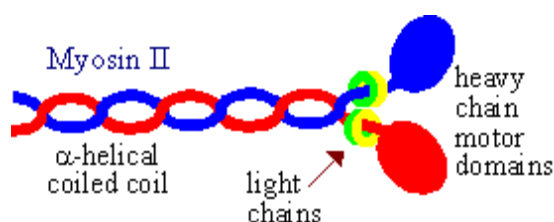
ตารางที่ 1.2 ลักษณะทางชีวภาพของเส้นใยกล้ามเนื้อแต่ละชนิดโดยแบ่งตามชนิดของ myosin heavy chain (+, ต่ำมาก, ++, ต่ำ, +++, ปานกลาง, +++++, สูง, ++++++, สูงมาก)

	Muscle Fiber types			
	I	IIa	IIx	IIb
Contraction speed	+	+++	++++	+++++
Myofibrillar ATPase	+	+++	++++	+++++
Oxidative metabolism	+++++	++++	++	+
Glycolytic metabolism	+	++++	++++	+++++
Mitochondrial ADP affinity	+	+++	+++++	+++++
Fatigue resistance	+++++	+++	++	+
Myoglobin	+++++	++++	++	+
Triglycerides	+++++	++	+	+
Glycogen	+	+++ ++	++++	+++++
Buffering capacity	+	+++ +	++++ +	+++++
Collagen	+++++	+	+	+
Diameter	+	+	++++	+++++

ที่มา: ดัดแปลงจาก Lefaucheur (2006)

1.3.1.2 การแบ่งตามชนิดของ Myosin Heavy Chain (MHC) isoforms

ไมโอซินเป็น molecular motor protein ที่สามารถเปลี่ยนพลังงานเคมี (chemical energy) เป็นพลังงานกลทำให้กล้ามเนื้อเกิดการยืดหดตัวได้ ไมโอซินที่พบในกล้ามเนื้อลายเป็นไมโอซินชนิด II (myosin II) มีน้ำหนักโมเลกุล 520 kDa ประกอบด้วย 1) myosin heavy chains (MHC) มี 2 ส่วน มีขนาด 250 kDa ประกอบด้วยส่วนที่เป็น globular motor domain ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสลาย ATP และทำหน้าที่จับกับแอกติน และส่วนหาง เรียกว่า coiled-coil domain tail 2) myosin light chains (MLC) มี 4 ส่วน โดยแต่ละ MHC จะมี 2 MLC (ภาพที่ 1.1)



ภาพที่ 1.1 ส่วนประกอบของ Myosin II ที่อยู่ในกล้ามเนื้อลาย

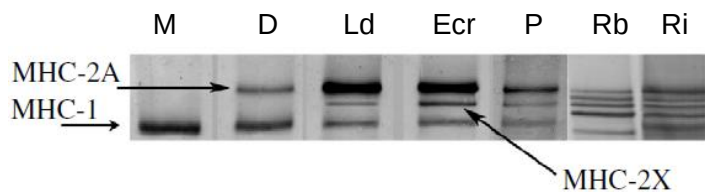
myosin heavy chain (MHC) มี 2 ส่วนดังเส้นสีแดงและสีน้ำเงิน ซึ่งประกอบด้วย ส่วนหัวคือ globular motor domain และส่วนหางคือ α -helical coiled coil myosin light chain (MLC) มีทั้งหมด 4 ส่วน โดยแต่ละส่วนของ MHC จะมี 2 MLC

ที่มา : <http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb2/part1/myosin.htm>

การจัดจำแนกชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อโดยอาศัยความแตกต่างของชนิดของ MHC นั้น พบว่า ส่วนใหญ่ของ MHC ที่พบในกล้ามเนื้อของสัตว์ที่โตเต็มที่แล้ว แบ่งได้ 4 ชนิด คือ MHC I MHC IIa MHC IIx และ MHCIIb (Talmadge, 2000) โดยในกล้ามเนื้อ slow - twitch fibers (type I) จะมี slow MHC I ส่วนในกล้ามเนื้อ fast - twitch fibers ที่เป็น type IIa fibers พบ MHC IIa ในขณะที่ type IIx fiber พบ MHC IIx และ type IIb fiber พบ MHC IIb (Picard and Malek, 2009) โดย MHC ทั้ง 4 ชนิด ตรวจพบได้ในหนู (Weydert *et al*, 1983) ในอดีตเชื่อว่าสัตว์ใหญ่ที่มีการเคลื่อนไหวช้าอาจไม่พบ MHC IIb ซึ่งถือว่าเป็นชนิดที่เป็น fastest glycolytic แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าพบ MHC IIb ในคน (Weiss *et al*, 1999) และในสุกร (Lefaucheur *et al*, 1998) ส่วนในโคนั้นมีรายงานว่าพบ MHC IIb ในกล้ามเนื้อ *Semitendinosus* และเพียงเล็กน้อยใน *Longissimus thoracis* ของโคพันธุ์ Blonde d'Acquitaine แต่เป็นการตรวจพบที่จำกัดเฉพาะในโคที่ทดลองเพียงบางตัวเท่านั้น (Picard *et al*, 2009)

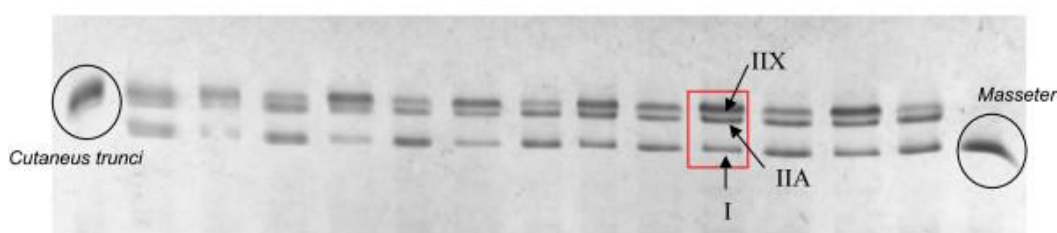
วิธีการแบ่งชนิดของ myosin heavy chain นั้นอาจทำได้หลายวิธี เช่น วิธีที่อาศัย antibodies ที่เฉพาะเจาะจงกับ MHC isoforms เช่น immunohistochemistry หรือ Western blotting รวมทั้งวิธีการ electrophoresis ที่ใช้แยกชนิดของ MHC ออกจากกัน แต่ทั้งนี้ในการใช้วิธี electrophoresis เพื่อแยกชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อนั้น ควรใช้ร่วมกับวิธี immunohistochemistry หรือ Western blotting เพื่อเป็นการยืนยันชนิดของ MHC ด้วย (Reggiani and Mascarello, 2004) สำหรับในรายงานฉบับนี้จะขอกล่าวถึงเฉพาะวิธีการ electrophoresis ซึ่งจะนำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้

การแยกชนิดของ MHC ด้วยวิธีการ electrophoresis นั้น อาศัยหลักการเคลื่อนที่ของชนิดของ MHC ที่ต่างกัน โดย slow MHC จะเคลื่อนที่เร็วที่สุด ส่วน fast MHC จะเคลื่อนที่ช้ากว่า (Choi and Kim, 2009) การเคลื่อนที่ของ fast MHC พบว่ามีรายงานการเคลื่อนที่ที่ต่างกัน จากหลายกลุ่มผู้วิจัย เช่น Toniolo *et al* (2005) รายงานว่าการแยกชนิดของ MHC ด้วย electrophoresis ในกล้ามเนื้อโคที่โตเต็มวัย นั้น MHC I มีการเคลื่อนที่เร็วที่สุดจึงอยู่ด้านล่างสุดของเจล ตามด้วย MHC IIx และ MHC IIa ตามลำดับ (ภาพที่ 1.2) แต่ Picard *et al* (1999; 2009; 2011) และ Oury *et al* (2010) ซึ่งใช้สภาวะของ electrophoresis ที่ต่างกันพบว่า การเคลื่อนที่ของ MHC จากที่เคลื่อนที่เร็วที่สุดซึ่งอยู่ด้านล่างของเจลไป จนถึงช้าที่สุดที่อยู่ด้านบนของเจล คือ MHC I MHC IIa MHC IIx และ MHC II b ตามลำดับ (ภาพที่ 1.3) แต่อย่างไรก็ตามทั้ง 2 กลุ่มได้รายงานตรงกันว่ากล้ามเนื้อ *Masseter* ของโคที่โตเต็มวัยเป็น slow MHC หรือ MHC I ในขณะที่ *Diaphragm* ประกอบด้วย MHC I และ MHC IIa ซึ่งกล้ามเนื้อทั้ง 2 ชนิด นี้จะถูกนำมาใช้เป็นมาตรฐานในการบอกชนิดของ MHC ในแต่ละเจลของการทดลองครั้งนี้ด้วย



ภาพที่ 1.2 ชนิดของ myosin heavy chain ของโคโตเต็มวัย แยกโดยวิธี electrophoresis ในกล้ามเนื้อ M (*masseter*) D (*diaphragm*) Ld (*longissimus dorsi*) Ecr (*extensor carpi-radialis*) P (*pectoralis*) Rb (*retractor bulbi*) Ri (*rectus lateralis*)

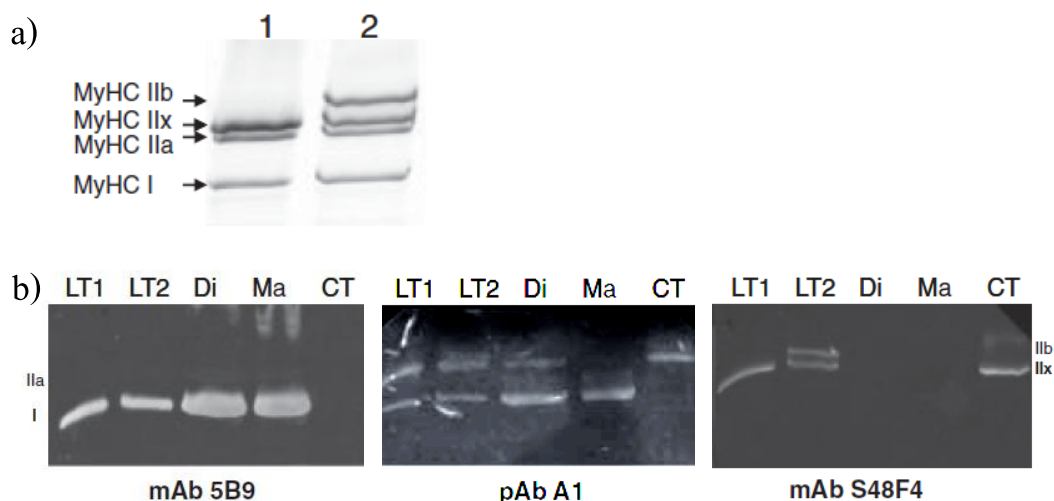
ที่มา : Toniolo *et al* (2005)



ภาพที่ 1.3 electrophoresis ของกล้ามเนื้อ *rectus abdominis* จากตัวอย่างโค 13 ตัว เปรียบเทียบกับมาตรฐานจากกล้ามเนื้อ *cutaneus trunci* (MHC Iia และ Iix) และ *masseter* (MHC I)

ที่มา : Oury *et al* (2010)

Picard *et al* (2011) ทดลองแยกชนิดของ MHC ด้วย electrophoresis แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี Western blotting โดยใช้ antibody 3 ชนิดที่ทำปฏิกิริยากับ MHC ต่างชนิดกัน โดย mAb 5B9 ทำปฏิกิริยากับ MHC I pAb A1 ทำปฏิกิริยากับ MHC I และ MHC Iia ส่วน mAb S48F4 ทำปฏิกิริยากับ MHC Iix และ MHC Iib ผลการทดลองปรากฏว่าเมื่อใช้ mAb 5B9 นั้น กล้ามเนื้อ LT Di และ Ma ยกเว้น CT มีแถบโปรตีนปรากฏ 1 แถบ ผลการใช้ pAb A1 ปรากฏแถบโปรตีนขึ้น 2 แถบใน LT และ Di (MHC I และ MHC Iia) ส่วน Ma ปรากฏเฉพาะแถบ MHC I ส่วน CT ปรากฏเฉพาะแถบ MHC Iia ผลการใช้ mAb S48F4 ปรากฏแถบของ MHC Iix ขึ้นใน LT และ CT ในขณะที่แถบ MHC Iib ปรากฏเฉพาะในตัวอย่างกล้ามเนื้อ LT2 ที่มีแถบของโปรตีนปรากฏขึ้น 4 แถบจากการทดสอบด้วย electrophoresis (ภาพที่ 1.4 a ,b)



ภาพที่ 1.4 a) การแยกชนิดของ MHC ในกล้ามเนื้อ *longissimus thoracic* (LT) เลน 1 คือ LT ที่ไม่มี MHC IIb เลน 2 คือ LT ที่มี MHC IIb

b) การวิเคราะห์ด้วย Western blotting ใช้ antibodies ที่เฉพาะเจาะจง โดย mAb 5B9 ทำปฏิกิริยากับ MHC I pAb A1 ทำปฏิกิริยากับ MHC I และ IIa mAb S48F4 ทำปฏิกิริยากับ MHC IIx และ IIb กล้ามเนื้อ LT1 (*longissimus thoracic* ที่ไม่มี MHC IIb) LT2 (*longissimus thoracic* ที่มี MHC IIb) Di (*diaphragm*) Ma (*Masseter*) CT (*Cutaneous trunci*)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Picard *et al* (2011)

1.3.2 ผลการศึกษานิสัยเส้นใยกล้ามเนื้อในโค

ส่วนใหญ่ทำการศึกษาในโคกลุ่ม *Bos taurus* จากผลการทดลองของ Kirchofer *et al.* (2002) ที่ศึกษานิสัยของเส้นใยกล้ามเนื้อตามหลักการ Histochemistry โดยแบ่งกลุ่มของชนิดกล้ามเนื้อตามปริมาณของส่วนประกอบของชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ พบว่ากล้ามเนื้อที่เป็นพวก red muscle เช่น *Infraspinatus* และ *Trapezius* มีเส้นใยกล้ามเนื้อแบบ β -red มากกว่า 40 % ในขณะที่กล้ามเนื้อที่เป็น white muscle เช่น *Longissimus dorsi* และ *Biceps femoris* เป็นต้น ประกอบด้วย α -white มากกว่า 40 % ส่วนที่เหลือจัดเป็น intermediate muscle เช่น *Supraspinatus* (ตารางที่ 1.3) Toniolo *et al.* (2005) พบว่าในโคสามารถแบ่งชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อได้เป็น 4 ชนิดตามหลักการ Electrophoresis คือ MHC I MHC IIa MHC IIx และ MHC IIb แต่กล้ามเนื้อแต่ละชนิดอาจไม่พบเส้นใยกล้ามเนื้อทั้ง 4 ชนิด เช่น ในกล้ามเนื้อ *Masseter* พบเพียง MHC I ในขณะที่กล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* พบ MHC I MHC IIa และ MHC IIx การศึกษาเปรียบเทียบในกล้ามเนื้อสันนอกของโค *Bos indicus* (Brahman X Thai Native) และ *Bos taurus* (Charolais X Thai native) พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อทั้งในเรื่องของปริมาณและขนาดของ slow-twitch fiber และ fast-twitch fiber (Warittitham *et al.*, 2010)

ตารางที่ 1.3 ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อของกล้ามเนื้อชนิดต่าง ๆ ในโค

Muscle	Classification	Trait	β -red	α -red	α -white
			Average (SE)	Average (SE)	Average (SE)
Infraspinatus	Red	Number (%)	46.6 (3.0)	28.5 (2.7)	24.9 (3.6)
		Diameter (μm)	36.7 (0.8)	44.3 (0.9)	52.9 (1.0)
		Area (μm^2)	1,143.3 (51.7)	1,624.0 (67.1)	2,289.6 (86.8)
		Percent area	32.9 (0.6)	29.8 (1.1)	37.3 (1.2)
Longissimus dorsi	White	Number (%)	35.0 (1.4)	21.8 (3.4)	43.2 (4.4)
		Diameter (μm)	41.9 (0.9)	54.8 (1.1)	60.7 (1.3)
		Area (μm^2)	1,429.9 (60.9)	2,431.7 (98.1)	2,982.0 (125.6)
		Percent area	22.3 (1.4)	22.9 (1.0)	54.8 (0.9)
Supraspinatus	Intermediate	Number (%)	35.7 (3.1)	30.6 (4.4)	33.7 (7.3)
		Diameter (μm)	35.7 (0.9)	49.8 (1.2)	56.3 (1.2)
		Area (μm^2)	1,062.9 (51.5)	2,100.7 (102.2)	2,596.7 (106.4)
		Percent area	21.0 (1.0)	32.3 (1.1)	46.7 (1.2)
Trapezius	Red	Number (%)	62.6 (3.7)	21.5 (3.1)	16.0 (3.0)
		Diameter (μm)	35.0 (0.8)	40.9 (0.9)	46.5 (1.0)
		Area (μm^2)	991.8 (42.7)	1,364.0 (62.9)	1,751.7 (65.1)
		Percent area	51.9 (1.3)	24.8 (1.4)	23.2 (1.5)
Biceps femoris	White	Number (%)	21.7 (1.9)	29.0 (2.3)	49.3 (4.0)
		Diameter (μm)	34.3 (0.8)	47.0 (0.9)	59.5 (1.1)
		Area (μm^2)	956.0 (42.8)	1,778.4 (70.0)	2,873.1 (106.2)
		Percent area	10.5 (1.0)	25.2 (1.0)	64.4 (1.1)
Semimembranosus	White	Number (%)	26.3 (1.2)	28.6 (2.0)	45.1 (2.4)
		Diameter (μm)	38.6 (0.9)	43.7 (1.0)	47.0 (1.0)
		Area (μm^2)	1,242.0 (54.4)	1,546.1 (66.7)	1,849.4 (77.0)
		Percent area	21.1 (0.4)	28.5 (0.8)	50.4 (1.0)
Semitendinosus	White	Number (%)	24.3 (2.0)	26.0 (1.6)	49.7 (3.3)
		Diameter (μm)	37.9 (0.9)	46.9 (0.9)	60.9 (1.2)
		Area (μm^2)	1,161.7 (52.2)	1,787.1 (67.9)	2,982.3 (122.0)
		Percent area	13.1(0.7)	21.0 (0.9)	65.9 (1.1)

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

1.3.3 อิทธิพลของเส้นใยกล้ามเนื้อต่อคุณภาพเนื้อ

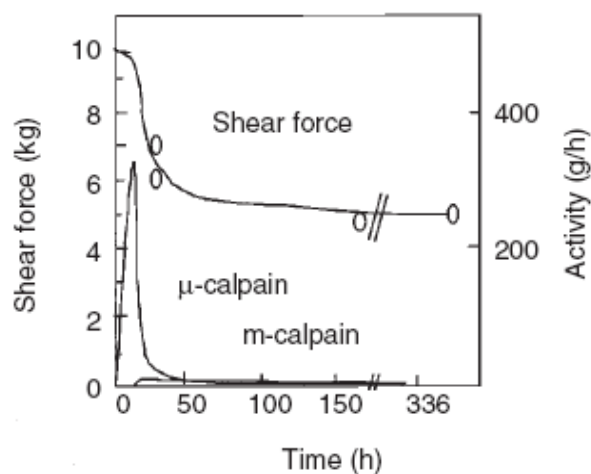
Rehfeldt และ Kuhn (2006) รายงานว่าทั้งขนาดและปริมาณของเส้นใยกล้ามเนื้อมีผลต่อทั้งปริมาณและคุณภาพของเนื้อ มีรายงานว่าชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อมีอิทธิพลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในกล้ามเนื้อ ดังนั้นจึงส่งผลถึงคุณภาพเนื้อ โดยเฉพาะในเรื่องของความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (water holding capacity) ที่เป็นผลจากการลดลงของค่า pH ในเนื้อหลังสัตว์ตาย (Sonesson *et al.*, 1998; Brocks *et al.*, 2000) โดย Ryu และ Kim (2006) รายงานว่า เส้นใยกล้ามเนื้อชนิด type I มีค่าสหสัมพันธ์เชิงลบกับค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการเก็บรักษา (drip loss) และการสูญเสียระหว่างการปรุง สุก (cooking loss) และ ค่าความสว่าง (lightness) ของสีเนื้อ ในขณะที่กล้ามเนื้อที่มีปริมาณเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด type IIB จะมีค่าการสูญเสียน้ำสูงกว่า ซึ่งอัตราการลดลงของค่า pH หลังสัตว์ตายที่สูงกว่าในกล้ามเนื้อที่เส้นใยชนิด type IIB สูงนั้น เนื่องมาจากมีการสะสมไกลโคเจนสูงกว่า type I ดังนั้นหลังสัตว์ตาย การสลายพลังงานจะเป็นแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic glycolysis) ซึ่งทำให้ได้กรดแลคติกสูงกว่าด้วย ส่งผลให้ค่า pH ลดลงมากกว่า นอกจากนี้ Seideman และ Crouse (1986) พบว่าขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อมีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อ โดยกล้ามเนื้อที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อที่มีขนาดใหญ่โดยเฉพาะ type IIB นั้นมีความเหนียวของเนื้อมากกว่ากล้ามเนื้อที่มีเส้นใยขนาดเล็ก สำหรับปริมาณไขมันแทรก (intramuscular fat) ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อคุณภาพเนื้อ โดย Renand *et al.* (2001) รายงานค่าสหสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างปริมาณไขมันแทรกและความนุ่มของเนื้อ ในขณะที่ปริมาณไขมันแทรกมีค่าสหสัมพันธ์เชิงลบกับขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อ (Karlsson *et al.*, 1999) ในโคพบว่าเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด type I มีค่าสหสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณไขมันแทรก (Calkins *et al.*, 1981) ดังนั้นจึงพอจะสรุปได้ว่ากล้ามเนื้อที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อขนาดเล็กชนิด type I สูงจะมีคุณภาพดีกว่ากล้ามเนื้อที่มีเส้นใยขนาดใหญ่ โดยเฉพาะ type IIB ในเรื่องของความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ ปริมาณไขมันแทรก แต่สำหรับเรื่องของความนุ่มของเนื้อยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจน

1.3.4 ความสำคัญของเอนไซม์ calpains ต่อความนุ่มของเนื้อ

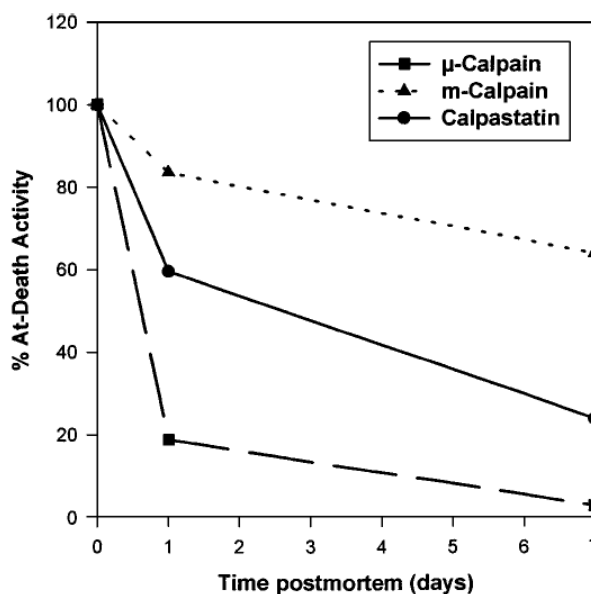
เอนไซม์ Calpains จะทำงานเมื่อถูกกระตุ้นด้วย Ca^{2+} และทำปฏิกิริยาได้ดีในสภาพเป็นกลาง calpain จะมีอยู่ 2 รูปคือ calpain 2 (m - calpain) จะถูกกระตุ้นด้วย Ca^{2+} ปริมาณสูง (1 - 2 mM) และ calpain 1 (μ - calpain) จะถูกกระตุ้นด้วย Ca^{2+} ปริมาณต่ำ (50 - 100 μM) เอนไซม์นี้จะอยู่บริเวณ z - line การทำงานของ calpain จะทำให้เกิดการแตกหักของ tropomyosin และ titin (connectin) โดยหลังจากการทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนแล้วเอนไซม์ calpain จะเกิดการสลายตัว (autolysis)

หลังจากสัตว์ตายแล้ว เมื่อ ATP ถูกใช้จนหมด จากนั้นกระบวนการ rigor mortis จะเริ่มขึ้น ซึ่งส่งผลให้ พลังของซาร์โคพลาสมิกเรติคูลัมและไมโทคอนเดรียไม่สามารถเก็บ Ca^{2+} ไว้ได้ ทำให้ Ca^{2+} ถูกปล่อยออกสู่ซาร์โคพลาซึม และไปท่วมไมโอไฟบริล (Jeacocke, 1993) ซึ่งปริมาณของ Ca^{2+} ที่เพิ่มขึ้นนี้เองจะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ calpains มีรายงานผลการทดลองว่า calpain 1 มีอิทธิพลต่อความ

นุ่มของเนื้อที่เพิ่มขึ้นหลังการบ่มซากไว้มากกว่า calpain 2 โดยปกติเอ็นไซม์กลุ่มนี้เมื่อทำการย่อยสลายโปรตีนแล้วจะเกิดการย่อยสลายตัวเอง ซึ่งวัดได้จากการลดลงของ activity นั้นเอง จากผลการทดลองของ te Pas *et al.* (2004) พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลงในระหว่าง 24 ชั่วโมงหลังสัตว์ตาย สอดคล้องกับการลดลงของ calpain 1 activity ในช่วงเวลาเดียวกัน ในขณะที่ calpain 2 activity ที่ค่อนข้างต่ำและลดลงน้อยมากในช่วง 50 ชั่วโมงแรกหลังสัตว์ตาย (ภาพที่ 1.5) Boehm *et al.* (1998) พบว่า calpain 1 และ calpastatin มี activity ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นหลังสัตว์ตาย จากการศึกษาในกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* และ *Psoas major* ของโคพบว่า calpain 1 activity ลดลง 71 และ 93 เปอร์เซ็นต์ และ calpastatin ลดลง 76 และ 71 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ calpain 2 มี activity ลดลงเพียง 9 และ 27 เปอร์เซ็นต์ที่ 24 ชั่วโมงหลังสัตว์ตาย ตามลำดับ ส่วนผลในกล้ามเนื้อ *Semimembranosus* ดังภาพที่ 1.6



ภาพที่ 1.5 การเปลี่ยนแปลงของเอ็นไซม์ calpain activity และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ
ที่มา : te Pas *et al.* (2004)



ภาพที่ 1.6 การเปลี่ยนแปลงของ activity ของเอ็นไซม์ calpain 1 (μ - calpain) calpain 2 (m - calpain) และ calpastatin ของกล้ามเนื้อ *Semimembranosus* ของโคในระหว่างการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 2 - 4 องศาเซลเซียส

ที่มา : Boehm *et al.* (1998)

1.3.5 การศึกษา activity ของ เอ็นไซม์ calpains ด้วยวิธีไซโมกราฟ

การศึกษา activity ของ เอ็นไซม์ calpains ด้วยวิธีไซโมกราฟ นั้นนับว่าเป็นวิธีที่ประหยัดทั้งเวลาและต้นทุนในการวิเคราะห์ เมื่อเปรียบเทียบกับการวัด activity ของเอ็นไซม์ calpains แบบดั้งเดิมที่ต้องทำการแยกเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์ก่อน โดยต้องแยกทั้ง calpain 1 calpain 2 และ calpastatin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ calpains ด้วย ซึ่งมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและใช้เวลาค่อนข้างนาน ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ว่าทั้งวิธีไซโมกราฟและแบบดั้งเดิมนั้นมีความสัมพันธ์กัน ดังผลการศึกษาของ Sensky *et al.* (1999) ที่ทำการแยกชนิดของเอ็นไซม์ calpain ออกจากกันด้วยเครื่อง anion-exchange liquid chromatography เมื่อนำเอา fraction ที่แยกออกมาไปทำ Western blot โดยใช้แอนติบอดีของ calpain 1 และ calpain 2 เป็นตัวทดสอบ พบว่า fraction ที่แยกออกมาก่อนทำปฏิกิริยากับ anti - calpain 1 ส่วน fraction ที่แยกออกมาทีหลังทำปฏิกิริยากับ anti - calpain 2 จึงสรุปได้ว่า calpain 1 จะถูกแยกออกมาก่อน calpain 2

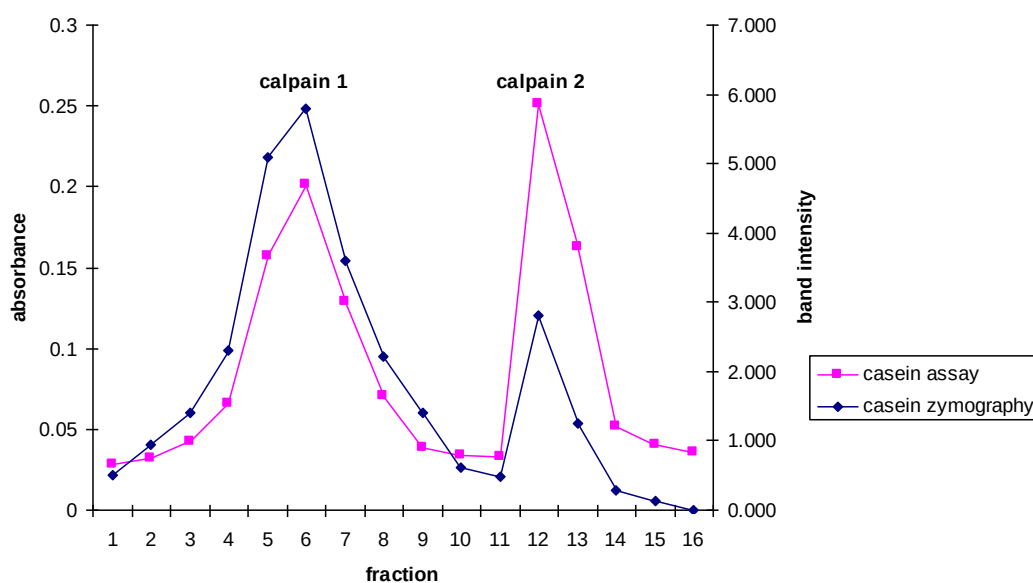
Chaosap (2010) นำ fraction ที่ได้จากการแยกด้วยเครื่อง anion-exchange liquid chromatography มาทำทดสอบ activity ของเอ็นไซม์ calpains พบว่า calpain 1 จะอยู่ในตำแหน่งที่สูงกว่า calpain 2 ใน casein gel ดังภาพที่ 1.7 ซึ่งสอดคล้องกับ Arther and Mykles (2000), Veiseth *et al.* (2001) และ Camou *et al.* (2007) จากการศึกษาของ Chaosap (2010) ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบระดับของ activity ของทั้งเอ็นไซม์ calpain 1 และ calpain 2 ด้วยวิธี casein zymography และวิธีการดั้งเดิมที่

วัดจากการย่อยเคซีนด้วยเอนไซม์ calpain 1 และ calpain 2 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ตามวิธีการของ Higgins *et al.* (1988) นั้นพบว่าแต่ละ fraction ที่แยกออกมามีระดับของปฏิกิริยา calpain 1 และ calpain 2 ที่สอดคล้องกัน (ภาพที่ 1.8) จึงสรุปได้ว่าการศึกษา activity ของ calpains นั้นสามารถใช้วิธี casein zymography มาทำการทดสอบได้



ภาพที่ 1.7 Casein Zymography ของ fraction ที่ผ่านการแยกด้วยเครื่อง anion-exchange liquid chromatography

ที่มา : Chaosap (2010)



ภาพที่ 1.8 ระดับของ calpain activity เปรียบระหว่าง casein assay และ casein zymography

ที่มา : Chaosap (2010)

1.3.6 การศึกษาคุณภาพของเนื้อและองค์ประกอบทางเคมี

คุณภาพเนื้อเป็นสิ่งสำคัญที่ผู้บริโภคคำนึงถึงก่อนการตัดสินใจเลือกซื้อเนื้อเพื่อนำไปบริโภค ดังนั้นผู้ผลิตจึงต้องพยายามปรับปรุงคุณภาพของเนื้อให้ได้ตรงกับความต้องการของผู้บริโภค คุณลักษณะที่ใช้เป็นตัวชี้วัดในเรื่องคุณภาพของเนื้อ มีหลายปัจจัยด้วยกัน ทั้งในด้านคุณค่าทางการนำไปบริโภค (eating value or sensory value) ได้แก่ คุณภาพด้าน สี รสชาติ กลิ่น ความนุ่ม และความคงทนของเนื้อ โดยเฉพาะความนุ่มจัดเป็นคุณลักษณะที่ผู้บริโภคให้ความสำคัญมากที่สุด นอกจากนี้ยังมีคุณค่าทางด้านการนำไปแปรรูป (technology value) ที่สำคัญที่มีผลต่อคุณภาพเนื้อ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนในเนื้อ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำระหว่างการเก็บรักษา (drip loss) และการสูญเสียระหว่างการปรุง (cooking loss) เป็นต้น (จุฑารัตน์และญานิน , 2548) คุณสมบัติเหล่านี้มีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้อง ไม่ว่าจะเป็นปัจจัยจากตัวสัตว์เอง เช่น พันธุ์ เพศ ชนิด กล้ามเนื้อ เป็นต้น และปัจจัยภายนอก เช่น อาหาร และวิธีการจัดการเลี้ยงดู นอกจากนี้ยังมีปัจจัยด้านลักษณะและชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อและเอนไซม์กลุ่มที่ย่อยสลายโปรตีนหลังสัตว์ตาย (endogenous proteolytic enzyme) ที่อยู่ในเซลล์กล้ามเนื้อซึ่งมีผลโดยตรงต่อคุณภาพของเนื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อความนุ่มของเนื้อ (Rehfeldt และ Kuhn, 2006; Kemp *et al.*, 2010)

สีของเนื้อนับว่าเป็นสิ่งที่ผู้บริโภคมองเห็นได้และคำนึงถึงเป็นอันดับแรกในการตัดสินใจเลือกซื้อเนื้อเพื่อการบริโภค สีเนื้อ มีอิทธิพลมาจากปริมาณไมโอโกลบินที่อยู่ในมัดกล้ามเนื้อ จะผันแปรไปตามชนิดของสัตว์ อายุ เพศ กล้ามเนื้อ และกิจกรรมที่ทำ (จันทร์พร , 2554) นอกจากนี้ Von Seggern *et al* (2005) ยังรายงานว่า สีของเนื้อมีความสัมพันธ์ กับน้ำหนักซากด้วย โดยพบว่า ค่า L^* a^* b^* จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อน้ำหนักซากเพิ่มขึ้น ชนิดกล้ามเนื้อก็เป็นอิทธิพลหนึ่งที่มีผลต่อคุณภาพเนื้อ จากการศึกษาของ Von Seggern *et al* (2005) พบว่าชนิดกล้ามเนื้อมีอิทธิพลต่อสี pH ปริมาณคอลลาเจน และโภชนะของเนื้อโค (ตารางที่ 1.4) โดย พบว่า ค่า L^* ของ *Infraspinus* (IF) มีค่าต่ำกว่า ในขณะที่ค่า b^* มีค่าสูงกว่า *Longissimus dorsi* (LD) และ *Supraspinatus* (SS) ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า ค่า pH ของ IF สูงกว่า LD และ SS ($P < 0.05$) ผลการศึกษาถึงปริมาณคอลลาเจนในกล้ามเนื้อแต่ละชนิดพบว่า IF มีปริมาณคอลลาเจนสูงที่สุด รองลงมาคือ SS และ LD ตามลำดับ โภชนะของเนื้อโคพบว่ากล้ามเนื้อที่มีปริมาณไขมันสูงจะมีค่าต่ำ ดังกล้ามเนื้อ IF ที่มีไขมันสูงที่สุด รองลงมาคือ LD และ SS ($P < 0.05$) ตามลำดับ ในขณะที่พบว่า IF มีปริมาณเถ้าต่ำกว่า LD และ SS มีปริมาณสูงที่สุด ($P < 0.05$) ส่วนความชื้นของ IF และ LD มีค่าต่ำกว่า SS ($P < 0.05$) Rhee *et al* (2004) ศึกษาถึงอิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อที่มีต่อคุณภาพของโคลูกผสมชาร์โลเลส์ (ตารางที่ 1.5) พบว่า IF มีความนุ่มมากที่สุด รองลงมาคือ LD และ SS ตามลำดับ โดยพบว่าคะแนนความนุ่มของ IF สูงที่สุดในขณะที่มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำที่สุด ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า IF มีความยาวซาร์โคเมอร์มากที่สุด รองลงคือ SS และ LD ตามลำดับ ($P < 0.05$) ส่วนปริมาณคอลลาเจนนั้นพบว่า SS มีปริมาณสูงที่สุด รองลงมาคือ IF และ LD ตามลำดับ ($P < 0.05$) เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงของ SS สูงกว่า IF และ LD ($P < 0.05$)

ตารางที่ 1.4 ค่าสี pH ปริมาณคอลลาเจน และองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อโค

	<i>Infraspinatus</i>		<i>Longissimus dorsi</i>		<i>Supraspinatus</i>	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Color L*	38.85 ^b	2.60	40.55 ^a	3.03	40.82 ^a	3.35
a*	31.25	3.08	31.13	3.46	30.92	3.03
b*	24.82 ^a	3.64	23.98 ^b	4.00	23.83 ^b	3.51
pH	5.97 ^a	0.25	5.76 ^b	0.33	5.69 ^b	0.24
Total collagen	19.94 ^a	7.09	4.40 ^c	0.85	9.46 ^b	2.04
Fat	9.18 ^a	2.54	7.74 ^b	1.95	4.95 ^c	1.08
Moisture	70.81 ^b	2.05	70.52 ^b	1.58	74.29 ^a	0.95
Ash	1.08 ^c	0.11	1.20 ^b	0.14	1.37 ^a	0.15

^{abc} P < 0.05

ที่มา : คัดแปลงจาก Von Seggern *et al* (2005)

ตารางที่ 1.5 ค่าความนุ่ม ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ความยาวของซาร์โคเมอร์ คอลลาเจน และค่าการสูญเสีย น้ำระหว่างการปรุงสุกของเนื้อโค

	<i>Infraspinatus</i>		<i>Longissimus dorsi</i>		<i>Supraspinatus</i>	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Overall tenderness	5.9 ^a	0.62	5.7 ^b	0.84	4.1 ^c	0.61
WBSF, kg	3.27 ^c	0.44	3.99 ^b	0.86	4.95 ^a	0.83
Sarcromere length , μ m	2.25 ^a	0.10	1.80 ^c	0.06	1.94 ^b	0.09
Collagen content,mg/g	7.58 ^b	1.19	4.52 ^c	0.66	9.04 ^a	0.95
Cooking loss,%	20.7 ^b	1.4	20.7 ^b	1.3	27.3 ^a	1.5

^{abc} P < 0.05

ที่มา : คัดแปลงจาก Rhee *et al* (2004)

1.3.7 การศึกษาคุณภาพซากและคุณภาพเนื้อของโคไทย

คุณภาพซากของเนื้อโคไทยที่มีการศึกษาโดยนักวิจัยหลายๆ ท่าน ซึ่ง Opatpatanakit *et al* (2010) ได้รวบรวมผลการศึกษาไว้ ดังตารางที่ 1.6 Sethakul *et al* (2008) รายงานผลการศึกษาคูณภาพเนื้อโคภายใต้ระบบการเลี้ยงที่แตกต่างกัน ในโคสายพันธุ์ *Bos indicus* และ *Bos Taurus* ดังตารางที่ 1.7 นอกจากนี้ พร้อมลักษณ์ (2552) ได้รายงานส่วนประกอบทางโภชนะของเนื้อโคทั้งที่เป็นโคพื้นเมืองไทยที่เลี้ยงด้วยการปล่อยให้กินหญ้าตามธรรมชาติ โคลูกผสมบราห์มัน 75 % ที่ผ่านการขุนเป็นเวลา 3 เดือน รวมทั้งโคลูกผสมชาร์โลเลส์ 50 % ที่ผ่านการขุนเป็นเวลา 12 เดือน ไว้ดังตารางที่ 1.8

ตารางที่ 1.6 ลักษณะซากของโคพื้นเมืองไทยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น

	Central (n = 15)	North (n = 26)	North (n = 15)	South (n = 15)	South (n = 16)	NE ¹ (n = 24)	Brahman crossbred (n = 297)	Charolais crossbred (n = 417)
Slaughter weight (kg)	198.73	172.15	205.35	187.01	212.69	153.7	437.0	623.26
Hot carcass (%)	50.73	49.26	49.53	51.43	50.66	46.7	53.77	58.22
Lean (%)	72.61	73.18	72.62	75.38	71.43	74.0	74.11	67.98
Bone (%)	20.05	24.46	19.87	19.18	22.95	21.9	15.83	13.34
Fat (%)	2.88	ND	2.51	5.57	2.08	ND	5.48	13.08
Tendon and scrap (%)	3.81	ND	2.29	2.78	ND	ND	4.26	3.96

¹ North East

ND = not determine

ที่มา : Opatpatanakit and Sethakul (2010)

ตารางที่ 1.7 คุณภาพเนื้อโคภายใต้ระบบการเลี้ยงที่แตกต่างกัน

Item	Indicus cattle			Taurus cattle
	N (n = 11)	BG (n = 16)	BP (n = 11)	C (n = 9)
Moisture (%)	75.55 ^a	75.16 ^a	74.02 ^a	68.89 ^b
Protein (%)	21.30	21.85	21.83	21.41
Fat (%)	0.77 ^c	1.83 ^{bc}	2.87 ^b	8.58 ^a
Total CLA (mg/g fat)	3.68 ^a	1.37 ^b	0.76 ^c	0.27 ^d
Fiber diameter (μm)	66.18 ^c	87.79 ^b	86.35 ^b	98.47 ^a
Shear force (kg)	15.78 ^a	15.53 ^a	11.88 ^b	5.10 ^c
Meat colour				
L* (lightness)	37.76 ^b	35.01 ^b	40.15 ^a	38.76 ^a
a* (redness)	15.07 ^b	16.05 ^b	16.35 ^b	21.49 ^a
b* (yellowness)	4.27 ^c	5.07 ^{bc}	5.06 ^b	8.55 ^a

^{a-d} Means within a row with different superscripts significantly differ (P < 0.05)

N = native thai callte grazed natural grass, BG = Brahman crossbred fed grass and finished with 3 month concentrate, BP = BG = Brahman crossbred fed pineapple byproducts and finished with 6 month concentrate, and C = at least 50% Charolais crossbred steer finished with 12 to 18 month concentrate.

ที่มา : Sethakul *et al.* (2008)

ตารางที่ 1.8 คุณค่าทางโภชนาของเนื้อโคไทย

Item	N	B	C
Chemical composition			
Moisture (%)	76.15 ^a	75.14 ^a	72.20 ^b
Protein (%)	20.67 ^b	21.42 ^{ab}	22.05 ^a
EE (%)	0.58 ^c	1.34 ^b	4.14 ^a
Ash (%)	1.14	1.31	1.07
NFE (%)	1.23 ^a	0.65 ^b	0.60 ^b
Gross energy (kcal)	92.81 ^b	100.79 ^b	127.78 ^a
Vitamin E (µg/100g)	374.20	334.25	327.50
Cholesterol (mg/100g)	33.53 ^b	39.13 ^b	69.74 ^a
Iron (mg/100g)	1.30	1.18	1.37
Zinc (mg/100g)	1.04	1.31	1.19
Calcium (mg/100g)	2.80	4.19	4.82
Selenium (µg/100g)	1.55	0.38	0.23

^{abc} Means within a row with different superscripts significantly differ ($P < 0.05$)

N = native thai cattle grazed natural grass, B = over 75% Brahman crossbred fattened for 3 month, and C = over 50% Charolais crossbred steer finished for 12 month

ที่มา : พร้อมลักษณ์ (2552)

1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) ศึกษาชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อของกล้ามเนื้อ 3 ชนิดจากโคพื้นเมืองจังหวัดกาญจนบุรี และอุบลราชธานี
- 2) วิเคราะห์ปริมาณเอ็นไซม์ calpains ปริมาณของคอลลาเจน ไกลโคเจน และโภชนาที่อยู่ในเนื้อ รวมทั้งคุณภาพเนื้อของกล้ามเนื้อ 3 ชนิด จากโคพื้นเมืองจังหวัดกาญจนบุรีและอุบลราชธานี
- 3) หาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ กับลักษณะอื่นที่ศึกษา

1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยมุ่งเน้นศึกษาถึงชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อซึ่งมีผลต่อขบวนการเมตาบอลิซึมของเนื้อหลังสัตว์ตาย โดยเฉพาะการสลายของไกลโคเจนซึ่งมีผลต่อ pH ในเนื้อซึ่งส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพ และศึกษาถึงเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการย่อยสลายของโปรตีนหลังสัตว์ตายที่มีผลต่อความนุ่ม ของเนื้อในกลุ่มของเอ็นไซม์ calpains ตลอดจนศึกษาถึงปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อคุณภาพเนื้อในเรื่องของปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ปริมาณไกลโคเจน ค่า pH สีของเนื้อ ระดับไขมันในเนื้อ และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ โดยทำการศึกษาในเนื้อโคพื้นเมืองจาก 2 แหล่งที่มา คือ จากภาคกลาง คือ จังหวัดกาญจนบุรี และภาค

ตะวันออกเฉียงเหนือ คือ จังหวัดอุบลราชธานี อีกทั้งศึกษาในกลุ่มเนื้อต่างชนิดกันซึ่งคาดว่าจะมีเส้นใยกล้ามเนื้อต่างกันที่ ซึ่งอาจทำให้มีคุณภาพเนื้อที่ต่างกัน คือ กล้ามเนื้อใบพาย (*Infraspinatus*) กล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) และ กล้ามเนื้อสันในเทียม (*Supraspinatus*)

1.6 เป้าหมายและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลพื้นฐานของโคพื้นเมืองไทยที่เกี่ยวข้องกับชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ เอ็น ไชม์ที่มีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อในกลุ่มของ calpains คุณภาพของเนื้อ ตลอดจนทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ เอ็น ไชม์ calpains ที่มีต่อคุณภาพเนื้อ โดยข้อมูลที่ได้นี้จะป็น หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่บ่งชี้คุณลักษณะเฉพาะของเนื้อโคพื้นเมืองไทย

1.7 ระยะเวลาและสถานที่ในการทำวิจัย

แผนการดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานและผู้รับผิดชอบ	เดือนที่								ผลที่คาดว่าจะได้รับ
	1	2	3	4	5	6	7	8	
1. เก็บตัวอย่างเนื้อโคพื้นเมือง และเตรียมสารเคมีและอุปกรณ์	●								ทราบถึงชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อของโคพื้นเมือง เอ็น ไชม์ calpain activity และปริมาณของ calpastatin ตลอดจนทราบถึงคุณภาพของเนื้อโคพื้นเมือง ได้แก่ ปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ระดับของไกลโคเจน ค่า pH สีของเนื้อ ความนุ่มของเนื้อ ขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อ และความยาวซาร์เมียร์
2. ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง		●	●	●	●	●	●		
2.1 ศึกษาถึงชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ (ผศ.ดร.จันทพร เจ้าทรัพย์)									
2.2 การศึกษาถึงเอ็น ไชม์ calpain									
2.2.1 การวัด calpain 1 และ calpain 2 activity (ผศ.ดร.จันทพร เจ้าทรัพย์)									
2.2.2 การวัดระดับ calpastatin (ดร.ปิยะดา ทวีศรี และ รศ.ดร.นวลพรรณ งามยี่สุน)									
2.2.3 การตรวจวิเคราะห์การย่อยสลายโปรตีน (รศ.ดร.นวลพรรณ งามยี่สุน)									
2.3 การวัดคุณภาพเนื้อ									
2.3.1 วิเคราะห์หาปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (ผศ.ดร.จันทพร เจ้าทรัพย์)									
2.3.2 วิเคราะห์หาปริมาณไกลโคเจน (ผศ.ดร.จันทพร เจ้าทรัพย์)									
2.3.3 การวัดค่า pH สีเนื้อ และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (ดร.ปิยะดา ทวีศรี)									
2.3.4 การวัดขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อและความยาวซาร์โคเมียร์ (ผศ.ดร.จันทพร เจ้าทรัพย์)									
3. วิเคราะห์ผลทางสถิติ (ผศ.ดร.จันทพร เจ้าทรัพย์)							●	●	ทราบผลการศึกษาเปรียบเทียบของคุณลักษณะที่ศึกษา
4. สรุปผลและเขียนรายงาน (ผศ.ดร.จันทพร เจ้าทรัพย์ รศ.ดร.นวลพรรณ งามยี่สุน และ ดร.ปิยะดา ทวีศรี)							●	●	รายงานฉบับสมบูรณ์

สถานที่ดำเนินงาน

- 1) ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ และศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- 2) ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- 3) ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- 4) ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- 5) ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาครุศาสตร์เกษตร คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- 6) โรงฆ่าสัตว์เทศบาลอำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี
- 7) โรงฆ่าสัตว์ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์มหาวิทยาลัยเกษตรวิทยาเขตกำแพงแสน

บทที่ 2

เนื้อเรื่อง

2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1.1 การเก็บข้อมูล

การวิจัยใช้โคพื้นเมืองที่เลี้ยงแบบปล่อยหากินตามแหล่งหญ้าธรรมชาติอายุไม่เกิน 2 ปี น้ำหนักเฉลี่ยเข้าฆ่าประมาณ 180-200 กิโลกรัม จำนวน 14 ตัว เป็นโคจากจังหวัดกาญจนบุรี 7 ตัว และจากอุบลราชธานี 7 ตัว โดยก่อนเข้าฆ่ามีการอดอาหารเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (กินน้ำตามปกติ) สำหรับโคจากจังหวัดกาญจนบุรีนั้นทำการฆ่าที่โรงฆ่ามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ต้องเข้าของฆ่าตามแบบมาตรฐานสากล โดยมีการยิงสลบก่อนด้วยปืนยิงสลบแล้วจึงแทงคอเอาเลือดออก ตัดหัว ลอกหนัง ตัดแข้ง ควั่นรอบทวารหนัก ผ่ากระดูกอก และกระดูกเชิงกราน เอาอวัยวะภายในออก ผ่าซากออกเป็นสองซีก แล้วทำการแช่เย็นซากทั้งสองซีกไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส ทำการวัด pH และอุณหภูมิที่ลดลงที่เวลา 45 นาทีและที่ 24 ชั่วโมงหลังสัตว์ตายที่ตำแหน่งกล้ามเนื้อสันนอก ส่วนโคจากจังหวัดอุบลราชธานีนั้น ทำการฆ่าที่โรงฆ่าสัตว์เทศบาลอำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี โดยไม่มีการทำสลบก่อนฆ่า ภายหลังฆ่าทำการเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อ (*Infraspinus*; IF) กล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*; LD) และ กล้ามเนื้อ *Supraspinatus* (SS) ภายในเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมงโดยแช่ในไนโตรเจนเหลวก่อนที่จะนำมาเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ยกเว้นตัวอย่างสำหรับวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อนั้นจะทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 1-4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วจึงทำการเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์หาค่าแรงตัดผ่านเนื้อ

2.1.2 Myosin Heavy Chain Isoform โดย Electrophoresis

สารเคมี

1) Extraction buffer

- 20 mM NaPPi
- 50 mM Tris/HCl pH 8.0
- 1 mM EDTA
- 0.5 mM NaCl
- 1.0 mM DDT

2) Gel loading buffer

- Pyronin Y
- 87% glycerol
- SDS
- 1M Tris/HCl pH 6.8
- Distilled water

3) Gel solution

- 2M Tris/HCl pH 8.8
- 1M Tris/HCl pH 6.8
- 1M Glycine
- 100 mM EDTA pH 8.8
- 87% (v/v) Glycerol
- 10%(w/v) SDS
- 10% (w/v) Ammonium persulphate
- TEMED

4) การเตรียมเจล

Solution	2 Gel	
	Separating gel (ml)	Stacking gel (ml)
Acrylamide (40% w/v) 37.5:1 acrylamide:bis-acrylamide solution	1.50	0.56
Acrylamide (40% w/v)	0.50	0.20
2 M Tris-HCl, pH 8.8	1.15	-
1 M Tris-HCl, pH 6.8	-	0.54
1 M glycine	1.15	-
100 mM EDTA	-	0.31
87% (v/v) glycerol	3.97	2.68
10% (w/v) SDS	0.46	0.31
Water	1.14	0.32
Mix		
TEMED	6.0 ul	5.0 ul
10% (w/v) Ammonium persulphate	120 ul	80 ul

Upper running buffer

- 100 mM Tris/HCl
- 150 mM glycine
- 0.1% (w/v) SDS
- 10 mM β -Me (This needs to added fresh when running the gel, 175 μ l/250 ml)

Lower running buffer

Half the running buffer concentration without β -Me

5) Fixing solution

- 30% (v/v) ethanol
- 5% (v/v) acetic acid

6) Staining solution

- 25% (v/v) isopropanol
- 10% (v/v) acetic acid
- 0.2% (w/v) coomassie blue

7) Destain solution

- 30% (v/v) ethanol
- 5% (v/v) acetic acid

การสกัดตัวอย่าง

ทำการสกัดตัวอย่างโดยใช้กล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อ 7 ชนิดคือ กล้ามเนื้อ *Masseter* (MA) *Diaphragm* (DI) *Trapezius* (TZ) *Longissimus dorsi* (LD) *Cutaneous trunci* (CT) *Infraspinatus* (IF) และ *Supraspinatus* (SS) ที่เก็บทันทีหลังสัตว์ตาย แล้วนำมาเก็บต่อไว้ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส โดยกล้ามเนื้อ MA DI TZ และ CT จะถูกใช้เป็นมาตรฐานในการบ่งชี้ชนิดของแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นบนเจล ในการสกัดตัวอย่างจะทำการชั่งตัวอย่างเนื้อ 0.5 กรัม แล้วเติม extraction buffer ลงไป 5 มิลลิกรัม นำไปปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer ที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วแบ่งเก็บสารละลายส่วนใสออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่หนึ่งเก็บสารละลายส่วนใสพร้อมทั้งเติม 87% glycerol ในอัตราส่วน 1:1 แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์หา ชนิดของ MHC ด้วยวิธี electrophoresis และส่วนที่สองเก็บสารละลายส่วนใส 900 ไมโครลิตรแล้วเติม NaOH 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อนำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีน เพื่อที่จะสามารถเจือจางโปรตีนที่สกัดได้ให้เหมาะสมที่จะนำไปวิเคราะห์หาชนิดของ MHC ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสต่อไป

การวัดความเข้มข้นของโปรตีน

วัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเทคนิค Lowry โดยแต่ละตัวอย่างทำการวัด 2 ซ้ำ นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ที่เจือจางของ Bovine serum albumin (BSA; Sigma, UK) ด้วย 0.1 M NaOH ให้มีความเข้มข้น ระหว่าง 0 – 90 ไมโครกรัม จากนั้นเปิด 50 ไมโครลิตรของสารละลายมาตรฐาน ตัวอย่างที่เจือจางด้วย 0.1 M NaOH จนมีความเข้มข้นอยู่ในช่วงเดียวกับสารละลายมาตรฐาน และใช้ 0.1 M NaOH เป็น blank ลงในหลุมของไมโครเพลท แล้วเติม solution 1 ลงไป 50 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน (solution 1 ประกอบด้วย 5 ml of 2%(w/v) Na_2CO_3 in 0.1 M NaOH, 0.5 ml 1%(w/v) CuSO_4 , 0.5 ml KNaTartate) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาทีแล้ว เติม solution 2 ลงไป 50

ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน (solution 2 ประกอบด้วย 5 ml 0.1 M NaOH, 0.5 ml Folin Ciocalteu reagent) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง automicroplate reader (Tecan Sunrise, UK)

จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของ BSA ไปสร้างกราฟมาตรฐานและคำนวณหาสมการถดถอยเชิงเส้น $Y = aX \pm b$ โดยค่า Y เป็นค่าการดูดกลืนแสงและค่า X เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลาย BSA จากนั้นทำการคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างโดยใช้สมการถดถอยเชิงเส้นของกราฟมาตรฐาน

การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำตัวอย่างที่ทำการเจือจางจนได้ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรมาผสมกับ 2X loading buffer ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 10 วินาที ก่อนที่จะนำไปใส่ในหลุมเจล

ประกอบเจลในชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วใส่ upper running buffer ลงช่องตรงกลางของโมเดล แล้วใช้ไมโครปิเปตค่อย ๆ ใส่ตัวอย่าง 5 ไมโครลิตรลงในหลุมบนเจล จากนั้นเติม lower running buffer รอบนอก แล้วต่อขั้วบวก (anode) เข้ากับ chamber ล่างและขั้วลบ (cathod) เข้ากับ chamber บน และเปิดสวิตช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้ไฟที่ความต่างศักย์คงที่ 70 โวลต์ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ซึ่งการ run gel ต้องให้เครื่องแยกโปรตีนนั้นเย็นตลอดเวลา อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

เมื่อครบเวลานำเจลที่ได้ไปล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนแล้วจึงนำเจลไปแช่ fixing solution เป็นเวลา 30 นาที นำไปย้อมสีด้วย staining solution เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วย destain solution ประมาณ 4 ครั้งๆ ละ 30 นาที

นำเจลที่ได้ไปทำการสแกนด้วยเครื่องสแกน Epson V700 ให้เก็บอยู่ในรูปแบบ Tiff file โดยบันทึกภาพเป็นแบบ Gray scale 16 bit จากนั้นนำภาพที่ได้ไปวัดความเข้มข้นของแถบโปรตีน ด้วยโปรแกรม Quantiy One (Biorad, USA)

2.1.3 Calpain activity โดย casein zymography

สารเคมี

1) Extraction buffer

- 50mM Tris/HCl pH 7.5
- 5 mM EDTA

added the following proteinase inhibitors before use

- 200 μ g/ml AEBSF (20 mg/ml stock solution)
- 1 μ g/ml leupeptin (5 mg/ml stock solution)
- 1 μ g/ml pepstatin (5 mg/ml stock solution)

2) Gel sample buffer

- 2 ml glycerol
- 1.25 ml 1 M Tris/HCl
- 1 ml 1 M DTT (from a 0.154 g/ml solution)
- make to 10 ml with distilled water
- add few grains of Bromophenol blue

3) Casein solution

- 10 mg/ml casein in 0.75 M Tris-HCl, pH 8.8
- for 0.75 M Tris-HCl take 3.75 mls of 2 M Tris/HCl pH 8.8 plus 6.25 mls H₂O

4) Gel solutions

- เตรียม 40% acrylamide ในอัตราส่วน 75:1 ของ Acrylamide:Bis ถ้าต้องการเตรียม 10 ml จะต้องใช้ 5 ml of 40% (w/v) Acrylamide/Bis-acrylamide solution 37.5:1 ผสมกับ 5 ml of 40% (w/v) Acrylamide solution

- 2M Tris-HCl, pH 8.8
- 1M Tris-HCl, pH 6.8
- Ammonium Persulphate (Sigma, UK)
- N,N,N',N' tetramethylethylenediamine (Sigma, UK)

5) Electrophoresis buffer (5 x stock):

- 125 mM Tris base
- 625 mM glycine
- 5mM EDTA, pH 8.3

จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1x ก่อนใช้และเติม 1 mM DTT 0.154g/ml solution (1 mM DTT 500µl ต่อ buffer 500ml) และต้องทำให้เย็นก่อนนำไปใช้โดยแช่ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

6) Ca²⁺ incubation buffer

- 50 mM Tris/HCl pH 7.0
- 5 mM CaCl₂
- 10 mM DTT

7) Fixing solution

- 10% (v/v) acetic acid

8) Staining solution

- 0.2% (w/v) coomassie blue, 0.2% (w/v) amido black, 10% (v/v) acetic acid)

9) Destain solution

- 10% (v/v) acetic acid

10) การเตรียม non reducing gel

Solution	2 Gel		4 Gel	
	Resolving gel (ml)	Stacking gel (ml)	Resolving gel (ml)	Stacking gel (ml)
Acrylamide:bis (75:1) 40% w/v acylamide solution	2.5		5	
Acrylamide:bis (37.5:1) 40% w/v acylamide solution		0.6		1.2
2 M Tris-HCl, pH 8.8	1.13		2.25	
1 M Tris-HCl, pH 6.8		0.63		1.25
Casein, 10 mg/ml	2		4	
Water	4.31	3.78	8.62	7.56
	Mix			
TEMED	10 ul	5 ul	20 ul	10 ul
10% (w/v) Ammonium persulphate	50 ul	25 ul	100 ul	50 ul

การสกัดโปรตีน

ทำการสกัดโปรตีนจากตัวอย่างกล้ามเนื้อ 3 ชนิด คือ IF LD และ SS ที่เก็บทันทีหลังสัตว์ตาย แล้วเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส โดยชั่งเนื้อตัวอย่าง 1 กรัม แล้วเติม extraction buffer ลงไป 3 มล. นำไปปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer (Ika, Germany) ที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centurion, UK) ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เก็บสารละลายส่วนใส 200 μ l และเติม sample buffer 200 μ l ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัด calpain activity ด้วยวิธี casein zymography ทันที เก็บสารละลายส่วนใส 20 μ l ผสมกับ 0.1 M NaOH 900 μ l จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ก่อนนำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนต่อไป (ดังรายละเอียดใน 2.1.2)

การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบ Native PAGE

ทำการแยกเอ็นไซม์ calpain 1 และ calpain 2 โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบ Native PAGE ด้วยเครื่องแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า รุ่น Mini-Protein Tetra Cell (Biorad, USA) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก (Arther and Mykles, 2000) ใช้เจลชั้นล่าง (separating gel) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และเจลชั้นบน (stacking gel) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ดังวิธีการเตรียมใน ข้อ 1.10 นำส่วนใสที่ได้จากการสกัดโปรตีนของตัวอย่างเนื้อโคผสมกับ loading buffer ในอัตราส่วน 1 : 2 ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ประมาณ 30 วินาที ก่อนนำไปใส่ลงในหลุม (well) บนเจล

ก่อนใส่ตัวอย่างลงไปในเจล จะต้องทำการ pre-run ก่อนเป็นเวลา 30 นาที โดยเจลอยู่ในชุด อิเล็กโตรโฟรีซิสที่มี running buffer อยู่และต้องทำการใส่เครื่องแยกโปรตีนลงในช่องโคมที่มีน้ำแข็งหล่อเย็นตลอดเวลา จากนั้นต่อขั้วบวก (Anode) เข้ากับ Chamber ล่างและขั้วลบ (Cathod) เข้ากับ Chamber บน และเปิดสวิทช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้ไฟที่ความต่างศักย์คงที่ 125 โวลต์ เมื่อครบ 30 นาทีแล้วปิดสวิทช์ก่อนแล้วใช้ไมโครปิเปตค่อยๆ ใส่ตัวอย่าง 6 ไมโครลิตรลงไปในเจล แล้วทำการ run ต่อโดยใช้ไฟที่ความต่างศักย์คงที่ 125 โวลต์ ประมาณ 4 ชั่วโมงหรือหลังจากเห็น Bromophenol blue หลุดออกจากเจลให้ run ต่อไปอีกประมาณ 1 ชั่วโมง

จากนั้นนำเจลไปแช่ใน Ca^{2+} incubation buffer โดยเปลี่ยน buffer 3 ครั้งทุกๆ 10 นาที แล้วแช่ไว้ที่อุณหภูมิห้องจนครบ 1 คืน แล้วนำเจลมาแช่ใน Fixing solution เป็นเวลา 20 นาที นำไปย้อมสีด้วย Staining solution เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วย 10 % Acetic acid จนกระทั่งมองเห็นแถบสว่างอย่างชัดเจนซึ่งแถบสว่างนี้เกิดจากเอนไซม์ calpain 1 และ calpain 2 ย่อยสลายเคซีนที่อยู่ในเจล

นำเจลที่ได้ไปทำการสแกนด้วยเครื่องสแกนเนอร์ Epson V700 ให้อยู่ในรูปแบบ Tiff file โดยภาพเป็นแบบ Gray scale 16 bit จากนั้นนำภาพที่ได้ไปทำการ quantify band ด้วยโปรแกรม Quantiy One (Biorad, USA)

2.1.4 การวิเคราะห์หา Calpastatin ด้วยวิธี iELISA

นำตัวอย่างกล้ามเนื้อ IF LD และ SS ของโคพื้นเมือง 2 กลุ่ม ได้แก่ โคอุบลราชธานีจำนวน 7 ตัว และโคกาญจนบุรีจำนวน 7 ตัว มาตัดแต่งเอาไขมันและพังผืดออก นำมาสกัดโปรตีนออกจากเนื้อ

การสกัดโปรตีนจากเนื้อโค (Geesink *et al.*, 2005)

1) บดตัวอย่างเนื้อโคประมาณ 10 กรัม เติม 100 mM Tris และ 10 mM EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 20 ml เหย้าให้ผสมกัน

2) นำไปปั่นตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 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

6) หาความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง (ดังรายละเอียดใน 2.1.2)

การตรวจหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Antibodies ต่อโปรตีนที่สกัดจากเนื้อโคด้วยวิธี Checker-Board Titration (ภาพที่ 2.1 ก)

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, Nunc™) แถวที่ A – G ตามลำดับ (ภาพที่ 2.1ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2) ล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween 20 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 (antibodies) ด้วยตัวเจือจางให้มีความเข้มข้น 1:200, 1:400, 1:800, 1:1,600 และ 1:3,200 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

5) เมื่อครบกำหนดเวลาทิ้ง 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 3 ครั้ง ใส่ goat anti-rabbit secondary antibody ที่เจือจาง 1:2,000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

7) ล้าง plate 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 Sunrise, UK) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

การวัดปริมาณ Calpastatin โดยวิธี iELISA

วิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ครั้งนี้อ้างอิงจากเทคนิคของ Sunwoo *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002

1) ตรวจสอบปริมาณ calpastatin protein จากโปรตีนสกัดจากเนื้อโคที่เก็บภายหลังสตั๊ตด้วยทันที 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

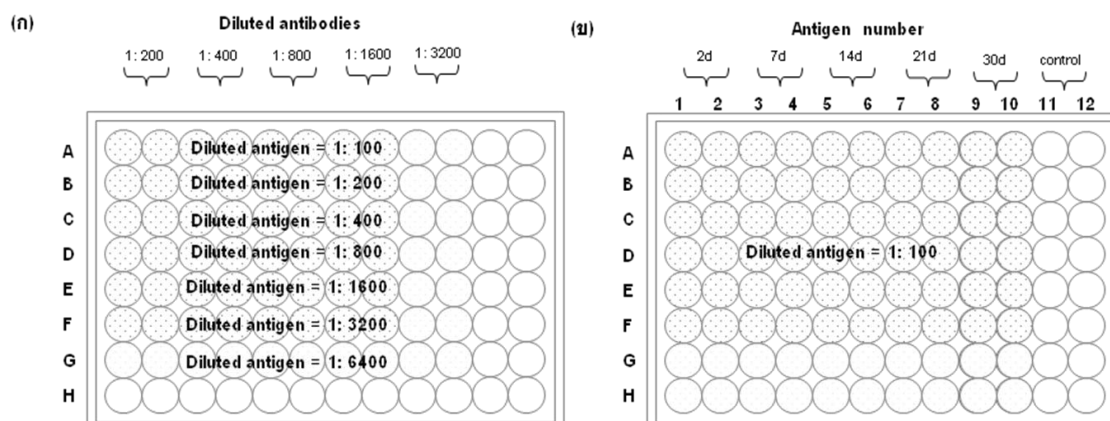
4) เมื่อครบกำหนดเวลาทิ้ง skim milk แล้วใส่ซีรัมกระต่ายที่เตรียมไว้ลงใน microplate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

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) ตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาโดยใช้ TMB substrate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

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



ภาพที่ 2.1 รูปแบบการเจือจางโปรตีนสกัดจากเนื้อโค (antigen) เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อ antibodies ด้วยวิธี checker-board titration (ก) และเพื่อตรวจวัดค่า OD ของ calpastatin ในเนื้อโคที่เก็บรักษาในระยะเวลาที่ต่างกันด้วยวิธี iELISA (ข)

2.1.5 การวิเคราะห์หา Troponin T โดยเทคนิค Western blot

การสกัดโปรตีน

นำตัวอย่างเนื้อที่ได้จากการบ่ม 2 วัน ของโคแต่ละตัวในแต่ละกลุ่ม มา ทำการสกัดโปรตีน (ดังรายละเอียดใน 2.1.3) โดยส่วนที่ผ่านการ Homogenize แล้วมาเติม loading buffer แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot โดยต้องมีการวัดความเข้มข้นของโปรตีนก่อน (ดังรายละเอียดใน 2.1.2) พร้อมทั้งต้องปรับปริมาณของโปรตีนของแต่ละตัวอย่างให้เท่ากัน คือ 100 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ก่อนนำไป load ลงเจล

วิธี SDS – PAGE ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Troponin-T

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

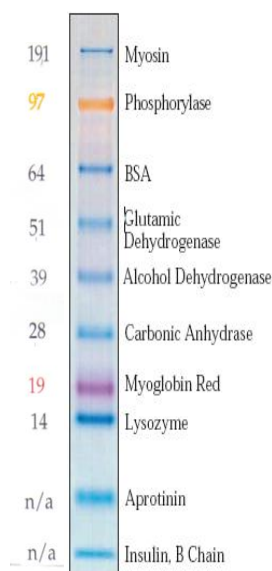
ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Gel

Stacking gel	4.5 %	6%
Water distilled	3.55 ml	3.37 ml
40% Acrylamide-bis (Invitrogen)	0.55 ml	0.73 ml
1 M Tris	0.625 ml	0.625 ml
10% SDS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl
1% APS	250 µl	250 µl
total volume	5.035 ml	5.035 ml
Separating gel	12.5 %	15%
Water distilled	3.8 ml	3.18 ml
40% Acrylamide-bis (Invitrogen)	3.1 ml	3.72 ml
1M Tris	2.5 ml	2.5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl
TEMED	20 µl	20 µl
1% APS	500 µl	500 µl
total volume	10.02 ml	10.02 ml

หลังจากทำการเตรียมเจลจึงใส่ตัวอย่างลงในแต่ละช่อง ช่องละ 10 ไมโครลิตรและ 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 (ภาพที่ 2.2) เมื่อทำการใส่ตัวอย่างลงในเจลเรียบร้อยแล้วจึงทำการเปิดเครื่อง vertical slab gels โดยใช้กระแสไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ (V) 50 มิลลิแอมแปร์ (mA) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

โปรตีนจะถูกแยกเป็นแถบตามน้ำหนักโมเลกุล เปรียบเทียบแถบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ถูกแยกกับโปรตีนมาตรฐาน ถ้าแถบโปรตีนที่อ่านได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 39 กับ 37 kDa จัดได้ว่าเป็นโปรตีน troponin – T และแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 kDa จัดว่าเป็นโปรตีน troponin – T_{Product} (Ho *et al.*, 1997) โดยใช้โปรแกรม Gene Tools สำหรับการคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน มีหน่วยเป็น ไมโครกรัม (μg)



ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะและขนาด band (kDa) ตัวมาตรฐาน Seeblue plus2 Pre-Stained standard (Invitogen)

วิธี Western blot ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลง Troponin-T

ทำการย้ายโปรตีนจากเจล polyacrylamide ไปสู่แผ่นเมมเบรน polyvinylidene difluoride (PVDF) ด้วยเครื่อง vertical electrophoresis units (TV 100K) ขนาด 20 เซนติเมตรกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ (V) 350 (mA) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ transfer buffer (192mM Glycine, 25mM Tris, 20 % Methanol) เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า

นำแผ่นแมมเบรามา block ด้วย blocking buffer (0.05M Tris, 3 % nonfat milk) นาน 1 ชั่วโมง นำแผ่นแมมเบรามาแช่ในแอนติโทรโปนินที (mouse anti-troponin-T:Sigma) เจือจาง 1:15,000 เป็นแอนติบอดีตัวที่ 1 ในการจับกับโปรตีนตัวอย่างโดยทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำแมมเบรามาล้างด้วย wash buffer (0.05M Tris, 0.138M NaCl, 0.0027M KCl, 0.05 % Tween 20) 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วทำการแช่แผ่นแมมเบรามาอีกครั้งหนึ่งในแอนติบอดีตัวที่ 2 (anti-mouse IgG:Sigma) เจือจาง 1:750 ซึ่งมีความจำเพาะกับแอนติบอดีตัวที่ 1 โดยแอนติบอดีตัวที่ 2 จะติดฉลากเอนไซม์ horseradish peroxidase เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นแมมเบรามาด้วย wash buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาโดยใส่ซับสเตรท (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine) ซึ่งมีความจำเพาะกับเอนไซม์ดังกล่าวเพื่อให้เห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีน troponin-T ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นจึงนำแผ่นแมมเบรามาไปสแกนด้วยเครื่อง scanner

2.1.6 วิเคราะห์หาปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

วิธีการวิเคราะห์หาค่าคอลลาเจนที่ละลายได้ และคอลลาเจนที่ไม่ละลาย (soluble and insoluble collagen) ดัดแปลงจากวิธีการของ Hill (1966)

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

วิธีการ

การเตรียมตัวอย่าง

- 1) ชั่งตัวอย่างเนื้อ 0.95 กรัม เติม $\frac{1}{4}$ Ringer solution 5 มิลลิลิตร
- 2) Homogenized ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที
- 3) ต้มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 77°C เป็นเวลา 60 นาที

- 4)ปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบ/นาที ที่ 4°C เป็นเวลา 20 นาที
- 5) แยกส่วนที่เป็น supernatant (ส่วนใส) และ pellet (ส่วนที่ตกตะกอน) ใส่ใน test tube

การย่อย

1) นำหลอดทดลองที่มีส่วนใส มาเติม 12N HCl 4 มิลลิลิตร และ test tube ส่วนที่ตกตะกอน มาเติม 6 N HCl 8 มิลลิลิตร

2) นำหลอดทดลองจากข้อ 1 ไปย่อยใน Oil bath ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) นำสารละลายที่ได้จากการย่อยในข้อ 2 ไปทำให้ใสโดยเติมผงถ่าน (Activated carbon) แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง และปรับ pH ให้ได้ประมาณ 6.5 – 7.0 จากนั้นนำไปปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

การหาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน

1) ดูดสารละลายที่ได้จากขั้นตอนการย่อย มาตัวอย่างละ 4 มิลลิลิตร ใส่ใน หลอดทดลอง แล้วเติม Chloramine T reagent หลอดละ 2 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที

2) เติม Color reagent 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปให้ความร้อนใน Water bath ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาให้นำไปผ่านน้ำประมาณ 2-3 นาที

3) นำไปหาค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 558 nm

การทำ Standard Hydroxyproline

Stock hydroxyproline : Hydroxyproline 25 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

Working standard hydroxyproline : ดูด Stock hydroxyproline มา 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask

ในการทำกราฟมาตรฐานใช้ Working standard hydroxyproline 2.5, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1, 2, 3 และ 4 ไมโครกรัมของ hydroxyproline ต่อ มิลลิลิตร

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

c = ความเข้มข้นของ hydroxyproline

f = จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายที่ได้จากการย่อย

w = น้ำหนักตัวอย่าง

2.1.7 วิเคราะห์หาปริมาณไกลโคเจน (ดัดแปลงจาก Adamo and Graham, 1998)

สารเคมี

- 1) 8% Perchloric acid
- 2) saturated Sodium bicarbonate
- 3) 0.2 M Sodium acetate buffer pH 4.8
- 4) Amyloglucosidase (Sigma, USA)
- 5) enzymatic glucose reagent (Thermo Scientific, Australia)

วิธีการ

1) การเตรียมตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างกล้ามเนื้อ IF LD และ SS ที่ระยะเวลาไม่เกินหนึ่งชั่วโมง หลังสัตว์ตาย มาบดในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไกลโคเจนในเนื้อ

2) นำตัวอย่างจากข้อ 1 มาชั่ง 0.4 กรัม ใส่หลอดทดลองและเติม 8% Perchloric acid 2 มล. ปั่น ด้วยเครื่อง Homogenize

3) นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากการทำการ neutralize โดยการปิเปตเอาส่วนใส ใส่หลอดทดลอง 133 ไมโครลิตร แล้วเติม Sodium bicarbonate และ 0.2M Sodium acetate จนได้สารละลาย pH 5.2 จากนั้นปิเปตสารละลายนั้น มา 200 ไมโครลิตร นำย่อยด้วยการเติม amyloglucosidase 5 ไมโครลิตร

4) นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

5) ปิเปตส่วนใส 10 ไมโครลิตร เติม glucose oxidase 190 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ ที่ 25 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วนำไปวัดค่า OD ที่ 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง automatic microplate reader (Tecan Sunrise, UK)

2.1.8 การศึกษาคุณภาพเนื้อ

- 1) ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง และ อุณหภูมิของเนื้อ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิของตัวอย่างกล้ามเนื้อ IF LD และ SS ที่ระยะเวลาการบ่ม 2 วัน ด้วยเครื่อง pH meter (Metler, USA) โดยใช้หัววัดแบบ puncture สำหรับวัดเนื้อโดยตรง

- 2) วัดค่าสีเนื้อ

วัดค่าสีของเนื้อ ที่ระยะเวลาการบ่ม 48 ชั่วโมง หรือ 2 วันหลังสัตว์ตาย โดยนำตัวอย่างชิ้นเนื้อมา ตัดผิวหน้าออกประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วทิ้งให้ชิ้นเนื้อสัมผัสกับอากาศประมาณ 45 นาที จากนั้นทำการวัดสีบริเวณหน้าตัดของเนื้อด้วยเครื่องมือวัดสีเนื้อ ซึ่งจะแสดงผลในรูปของค่า L^* a^* และ b^* ด้วยเครื่อง Chromameter (Minolta, Japan)

3) วัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการปรุง

วัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่ระยะเวลาการต้ม 2 วัน โดยทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่างชิ้นเนื้อก่อนต้ม บันทึกเป็นน้ำหนักเริ่มต้น (W1) จากนั้นบรรจุตัวอย่างชิ้นเนื้อในถุงสุญญากาศ แล้วนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิโดยใช้ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นานประมาณ 30 นาที หรือจนกระทั่งได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำถุงที่บรรจุตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ผ่านการทำให้สุกแล้วไปทำให้เย็น โดยการแช่น้ำและให้น้ำไหลผ่านนาน 30 นาที หรือจนกระทั่งได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อลดลงเหลือประมาณ 32 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องนำออกจากถุง จากนั้นนำเนื้อออกจากถุง ซับให้แห้งเล็กน้อย และชั่งน้ำหนักอีกครั้ง บันทึกเป็นน้ำหนักสุดท้าย (W2)

โดยเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการปรุง = $[(W1 - W2) \times 100] / W1$

จากนั้นนำตัวอย่างเนื้อไปวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อโดยนำตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เย็นแล้วมาตัดตามแนวยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 1 x 3 x 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตัวอย่างละ 10 ชิ้น แล้วนำไปวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อด้วยเครื่อง tensile tester model 1011 (Instron, USA) โดยกำหนดหน่วยเป็นกิโลกรัม

2.1.9 วัดขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อ

แช่ตัวอย่างเนื้อใน neutral formalin 4% อย่างน้อย 48 ชั่วโมง ในตู้เย็นอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส สไลด์ตัวอย่างให้หนาประมาณ 1/8 นิ้ว แล้วใส่ตัวอย่างในเครื่องปั่น เติม NaCl 0.9% ลงในเครื่องปั่นประมาณ 50 ml. จากนั้นปั่นตัวอย่างประมาณ 30 วินาที จากนั้นสารละลายที่ปั่นได้หยดลงบนแผ่นสไลด์ นำไปวัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x X 15x วัดความกว้างของเส้นใยกล้ามเนื้อทั้งหมด 50 เส้นต่อหนึ่งตัวอย่างด้วยโปรแกรม Dino lite (Taiwan) แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

2.1.10 วัดความยาวซาร์โคเมียร์ด้วยเครื่อง Helium-Neon Laser

วิธีการ

1) เตรียม Solution A โดยเติม KCl 7.46 กรัม Boric acid 2.49 กรัม EDTA 1.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม Glutaraldehyde 25 % 100 มิลลิลิตร ทำการปรับค่า pH 7.1 หลังจากนั้นให้ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

2) เตรียม Solution B โดยเติม KCl 1.86 กรัม Boric acid 2.49 กรัม EDTA 1.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม Glutaraldehyde 25 % 100 มิลลิลิตร ทำการปรับค่า pH ให้ค่า pH = 7.1 หลังจากนั้นให้ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

3) ตัดชิ้นเนื้อที่จะทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ชิ้น ชิ้นละประมาณ 0.5 กรัม แช่ใน Solution A 25 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4) ย้ายชิ้นเนื้อจาก Solution A มาแช่ใน Solution B 25 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5) ใช้เข็มทิ่มชิ้นเนื้อมาเล็กน้อยมาวางบนแผ่นกระจกสไลด์ ใช้ช้อนแท่งแก้วยี่ชิ้นเนื้อให้แตก

6) นำแผ่นกระจกสไลด์ที่เตรียมเสร็จแล้วไปทำการวัดหาความยาวซาร์โคเมอร์ด้วยเครื่อง Helium-Neon Laser (Reserch eletro-optics, USA) โดยใช้ไม้บรรทัดวัดความกว้างของแสงเลเซอร์ที่ทะลุผ่านบนแผ่นสไลด์มายังพื้นรองรับภาพในหน่วยวัดเซนติเมตร ทำการวัดตัวอย่างละ 30 ซ้ำ แล้วนำผลที่ได้มาเข้าสมการในการหาหน่วยค่าความยาวซาร์โคเมอร์ในหน่วยวัดไมโครเมตร (μm)

7) การหาค่าความยาวซาร์โคเมอร์โดยใช้สมการ (ในหน่วยวัด μm)

$$\mu = 0.6328 \sqrt{\left(\frac{D}{T}\right)^2 + 1}$$

เมื่อ D = ระยะห่างระหว่างแผ่นสไลด์กับจอรับภาพ

T = $\frac{\text{ค่าความยาวของซาร์โคเมอร์ที่วัดได้}}{2}$

2

2.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูล

2.2.1 ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้เพื่อดูการกระจายตัวของข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft excel และ SAS version 9 (2002) ในขั้นนี้จะวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด และสัมประสิทธิ์ของความผันแปรของข้อมูล

2.2.2 วิเคราะห์หาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่ทำการศึกษา

1) นำนักชาก ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของประชากร 2 กลุ่มที่อิสระต่อกัน ด้วย PROC TTEST (independent groups)

2) ชนิดของ Myosin heavy chain เอนไซม์ calpain activity ปริมาณ calpastatin ปริมาณคอลลาเจน ปริมาณไกลโคเจน ค่า pH สีเนื้อ ความนุ่มของเนื้อ การย่อยสลายของโทรโปนิน และปริมาณโภชนะของเนื้อ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลให้อยู่ในรูปของ Least Squares Means โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS, PROC GLM ของแต่ละลักษณะ จากนั้นทำการเปรียบเทียบผลที่ได้ด้วยการใช้ PDIF

$$\text{สำหรับโมเดลทางสถิติที่ใช้} \quad Y_{ijk} = \mu + A_i + A_i B_j + E_{ijk}$$

โดยที่

Y_{ijk} คือ ค่าสังเกตใด ๆ ของลักษณะที่ทำการวิเคราะห์

μ คือ ค่าเฉลี่ยรวมที่เกิดขึ้นกับทุก ๆ ค่าสังเกต

A_i คือ อิทธิพลของแหล่งที่มาของโคพื้นเมืองที่ i (i = 1, 2)

B_j คือ อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อที่ j (j = 1, 2, 3)

$A_i B_j$ คือ อิทธิพลร่วมระหว่างแหล่งที่มาของโคพื้นเมืองที่ i และชนิดของกล้ามเนื้อที่ j

E_{ijk} คือ ความคลาดเคลื่อนที่วัดไม่ได้

- 3) วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ เอ็นไซม์ calpains และคุณภาพเนื้อ โดยใช้ PROC CORR
- 4) ขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อ และ ความยาวซาร์โคเมอร์ ทำ การวิเคราะห์ข้อมูลให้อยู่ในรูปของ Least Squares Means โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS, PROC GLM ของแต่ละลักษณะ จากนั้นทำการเปรียบเทียบผลที่ได้ด้วยการใช้ PDIFF โดยมีปัจจัยที่ศึกษาคืออิทธิพลของกล้ามเนื้อ 3 ชนิด

บทที่ 3

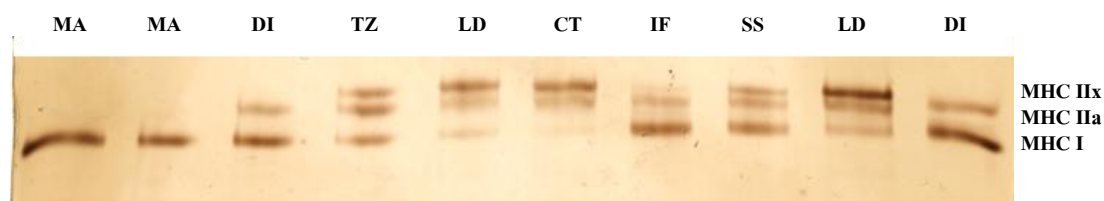
ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการวิจัย

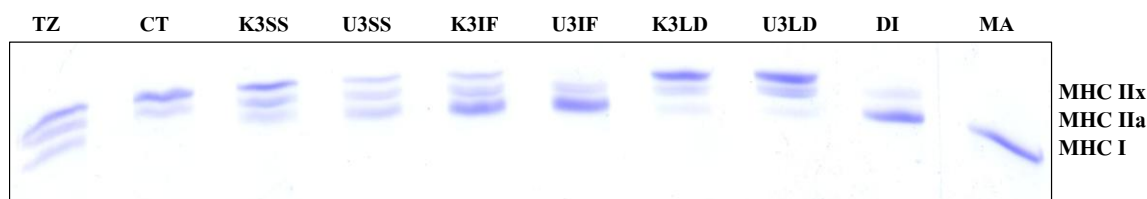
โคพื้นเมืองไทยที่ทำการศึกษาค้างนี้มาจาก 2 กลุ่ม คือโคจากกาญจนบุรีและโคจากอุบลราชธานี ภายหลังขบวนการฆ่าแล้วทำการชั่งน้ำหนักซาก พบว่าโคทั้ง 2 กลุ่มมีน้ำหนักซากร่อนไม่ต่างกันทางสถิติ ($P = 0.471$) โดยมีค่าเท่ากับ 74.87 และ 70.14 กิโลกรัม สำหรับกลุ่มโคจากกาญจนบุรีและกลุ่มโคอุบลราชธานี ตามลำดับ ผลการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ เอ็นไซม์ calpains และคุณภาพของเนื้อ ในกล้ามเนื้อ 3 ชนิด คือ IF LD และ SS เป็นดังต่อไปนี้

3.1 ชนิด Myosin heavy chain ด้วย Electrophoresis

ผลการศึกษาเบื้องต้นในการแยกชนิดของ Myosin heavy chain ของโคพื้นเมืองไทย โดยใช้วิธีการ electrophoresis ในกล้ามเนื้อ 7 ชนิดคือ กล้ามเนื้อ *Masseter* (MA) *Diaphragm* (DI) *Trapezius* (TZ) *Longissimus dorsi* (LD) *Cutaneous trunci* (CT) *Infraspinatus* (IF) และ *Supraspinatus* (SS) พบว่าปรากฏแถบของโปรตีน 3 แถบ คือ MHC I MHC IIa และ MHC IIx โดยเป็นแถบของโปรตีนที่ปรากฏจากด้านล่างสุด ตรงกลาง และบนสุดของเจล ตามลำดับ (ภาพที่ 3.1) ซึ่งลำดับของ MHC ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นดังรายงานของ Picard *et al* (1999; 2009; 2011) และ Oury *et al* (2010) ซึ่งเป็นวิธีการที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ โดยผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า MA มีเพียง MHC I DI เกิดแถบของ MHC I และ MHC IIa ส่วน CT จะเกิดแถบของ MHC IIa และ MHC IIx ในขณะที่ TZ จะเกิดทั้ง 3 แถบของ MHC I MHC IIa และ MHC IIx ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Picard *et al* (1999; 2009; 2011) และ Oury *et al* (2010) ส่วนกล้ามเนื้อ 3 ชนิดที่จะใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาค้างนี้คือ IF LD และ SS นั้นพบว่ามีแถบของ MHC เกิดขึ้นทั้ง 3 ชนิด โดย IF จะปรากฏแถบ MHC I เข้มที่สุด ในขณะที่ LD แถบ MHC IIx ปรากฏเข้มที่สุด ส่วน SS มีแถบของ MHC ทั้ง 3 ชนิดปรากฏชัดเจนแต่แถบของ MHC I นั้นจะเข้มกว่าแถบอื่น ได้จากการทดลองในเบื้องต้นนี้จะถูกนำไปใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ต้องการศึกษาต่อไป โดยในแต่ละเจลที่ทำการศึกษาค้างจะต้องมีตัวอย่างกล้ามเนื้อ 4 ชนิดคือ MA DI TZ และ CT เป็นมาตรฐานด้วยทุกครั้ง ดังภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.1 Myosin Heavy chain isoform แยกด้วย Electrophoresis ของกล้ามเนื้อ 7 ชนิด คือ *Masseter* (MA) *Diaphragm* (DI) *Trapezius* (TZ) *Longissimus dorsi* (LD) *Cutaneous trunci* (CT) *Infraspinatus* (IF) และ *Supraspinatus* (SS) โดยใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 50 นาโนกรัมต่อเลน



ภาพที่ 3.2 Myosin Heavy chain isoform แยกด้วย Electrophoresis

โดยภาพนี้มาจากโคตัวที่ 3 จากกลุ่มโคกาญจนบุรี (K) และ อุบลราชธานี (U) และกล้ามเนื้อ 3 ชนิด *Longissimus dorsi* (LD) *Infrapinnatus* (IF) และ *Supraspinatus* (SS) โดยใช้ตัวอย่างกล้ามเนื้อ *Masseter* (MA) *Diaphragm* (DI) *Trapezius* (TZ) และ *Cutaneous trunci* (CT) เป็นมาตรฐานในการบอกชนิดของ MHC โดยใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 4 ไมโครกรัมต่อเลน

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าโคพื้นเมืองจากกาญจนบุรีมีปริมาณ MHC IIx มากกว่าโคจาก อุบลราชธานี ($P = 0.003$) ดังตารางที่ 3.1 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดของกล้ามเนื้อพบว่า MHC I ของ IF สูงที่สุด รองลงมาคือ SS และ LD ต่ำที่สุด ($P < 0.0001$) ในทางตรงกันข้ามพบว่า LD มีปริมาณ MHC IIx สูงที่สุด รองลงมาคือ SS และ IF ต่ำที่สุด ($P < 0.0001$) แต่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณ MHC IIa ในกล้ามเนื้อทั้ง 3 ชนิด ผลการทดลองครั้งนี้ ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคที่ทำการศึกษาและชนิดกล้ามเนื้อมีอิทธิพลต่อชนิดของ MHC ($P > 0.05$)

ตารางที่ 3.1 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อ Myosin Heavy chain Isoform

Trait	n	MHC I ¹			MHC IIa ¹			MHC IIx ¹		
		LSM	SED	P - value	LSM	SED	P - value	LSM	SED	P - value
Group										
K	21	6.45	0.600	0.266	4.56	0.342	0.129	7.66 ^a	0.407	0.003
U	21	5.49			3.35			5.82 ^b		
Muscle type										
IF	14	9.07 ^a	0.734	<.0001	3.74	0.419	0.768	2.08 ^c	0.498	<.0001
LD	14	1.90 ^c			4.18			12.90 ^a		
SS	14	6.94 ^b			3.95			5.25 ^b		

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แต่ละระดับแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

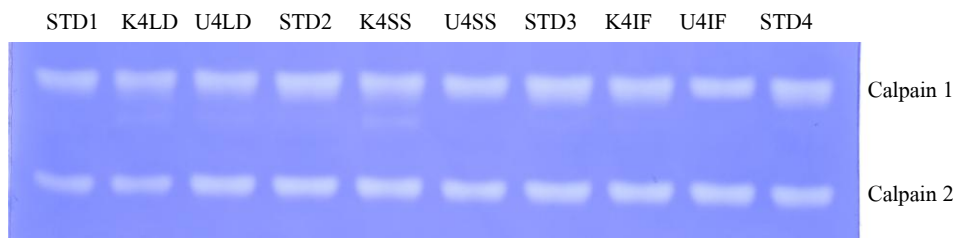
¹ ความเข้มข้นของแถบโปรตีน/โปรตีน 4 ไมโครกรัม

3.2 เอ็นไซม์ Calpains

3.2.1 calpain activity โดยวิธี casein zymography

ผลการทดลองพบแถบสว่างที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนใน native casein gel ของเอ็นไซม์ calpain 1 ปรากฏด้านบนของเจล ส่วนแถบสว่างที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนของเอ็นไซม์ calpain 2 ปรากฏด้านล่างของเจล (ภาพที่ 3.3) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Arther and Mykles (2000);

Veiseth *et al.* (2001); Camou *et al.* (2007) และ Chaosap (2010) ที่รายงานว่า calpain 1 จะอยู่ในตำแหน่งที่สูงกว่า calpain 2 ใน native casein gel ผลการศึกษาด้วยวิธี casein zymography ครั้งนี้พบว่า กลุ่มโค ชนิดของมัดกล้ามเนื้อ รวมทั้งอิทธิพลของทั้งสองปัจจัยมี activity ของทั้งเอ็นไซม์ calpain 1 และ calpain 2 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 3.2



ภาพที่ 3.3 Zymogram ของ calpain activity

Zymogram ของโคตัวที่ 4 จากกลุ่มโคกาญจนบุรี(K) และ อุบลราชธานี(U) และกล้ามเนื้อ 3 ชนิด คือ *Longissimus dorsi* (LD) *Infraspinatus* (IF) และ *Supraspinatus* (SS) โดยใช้ตัวอย่างกล้ามเนื้อมาตรฐาน ใส่ลงเจล ตำแหน่ง (STD 1- 4) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเจล โดยแต่ละตัวอย่างสกัดจากเนื้อโคที่น้ำหนักเท่ากันคือ 0.2 กรัม

ตารางที่ 3.2 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อ calpain activity

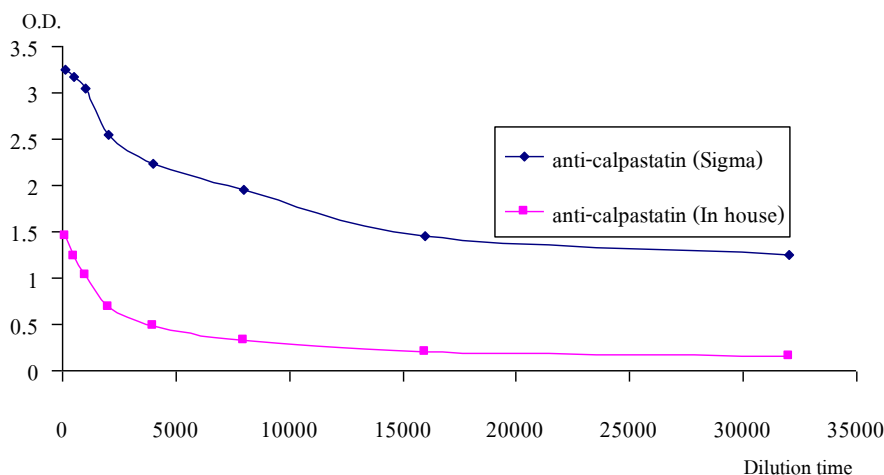
Trait	n	Calpain 1 ¹			Calpain 2 ¹		
		LSM	SED	P - value	LSM	SED	P - value
Group							
K	21	5.24	0.139	0.285	4.58	0.121	0.922
U	21	5.02			4.56		
Muscle type							
IF	14	4.97	0.170	0.490	4.61	0.148	0.936
LD	14	5.16			4.53		
SS	14	5.26			4.57		

¹ ความเข้มของแถบโปรตีน/0.2 กรัมเนื้อสด

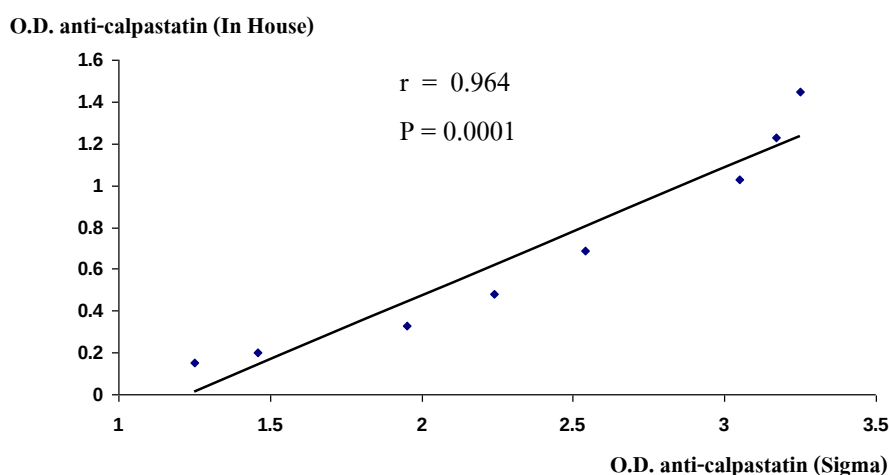
3.2.2 calpastatin ด้วยวิธี iElisa

ในการศึกษาครั้งนี้ antibody ที่ใช้ คือ anti-calpastatin ซึ่งผลิตขึ้นเอง (ปิยะดา, 2550) ดังนั้นเพื่อเป็นการทดสอบประสิทธิภาพของ antibody ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง จึงทำการทดสอบเปรียบเทียบกับ monoclonal anti-calpastatin (clone 1F7E3D10; Sigma, USA) พบว่าการใช้ anti-calpastatin ซึ่งผลิตขึ้นเองนั้น เมื่อนำไปวัดปริมาณ calpastatin antigen (Merck, USA) ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยวิธี iElisa จะได้ค่า O.D. ที่ต่ำกว่าผลจากการใช้ anti-calpastatin (Sigma) แต่อย่างไรก็ตาม แนวโน้มในการลดลงของค่า O.D. เมื่อความเข้มข้นของ calpastatin antigen ลดลงของแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดเป็นไปในทำนองเดียวกัน (ภาพที่ 3.4) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าสหสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดมีค่าที่สูงมากคือ $r = 0.964$ ($P < 0.0001$) ดังภาพที่ 3.5 จึงสรุปได้ว่าการวิเคราะห์หา

ปริมาณ calpastatin ด้วยวิธี iElisa โดยใช้ anti-calpastatin ที่ผลิตโดย ปิยะดา (2550) ในตัวอย่างเนื้อโคพื้นเมืองในครั้งนี้ ถ้าค่า O.D. ที่ได้มีค่าที่สูงแสดงว่าในตัวอย่างนั้นมีปริมาณ calpastatin ที่สูงด้วย



ภาพที่ 3.4 ค่า O.D. ของ anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเอง และ anti-calpastatin ที่ผลิตเพื่อการค้า



ภาพที่ 3.5 สหสัมพันธ์ระหว่าง ค่า O.D. ของ anti-calpastatin ที่ผลิตขึ้นเอง และ anti-calpastatin ที่ผลิตเพื่อการค้า

การศึกษาถึงปริมาณด้วยยังการทำงานของเอ็นไซม์ calpains หรือ calpastatin ด้วยวิธี iElisa นั้น ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ 650 นาโนเมตรที่สูงกว่าจะแสดงถึงปริมาณของ calpastatin ที่มากกว่านั่นเอง ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้ พบว่ากลุ่มโคกาญจนบุรีมีปริมาณ calpastatin ต่ำกว่าโคอุบลราชธานี ($P = 0.006$) แต่ไม่พบอิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อ รวมทั้งอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อระดับของ calpastatin ($P > 0.05$)

ตารางที่ 3.3 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อค่า OD ที่ 650 nm ของ calpastatin ที่เวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมงหลังสตั๊ตตาย

Trait	n	LSM	SED	P – value
Group				
K	21	0.20 ^b	0.013	0.006
U	21	0.25 ^a		
Muscle type				
IF	14	0.23	0.016	0.964
LD	14	0.22		
SS	14	0.22		

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แต่ละระดับแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.3 คุณภาพของเนื้อ

3.3.1 ปริมาณคอลลาเจน

การศึกษานี้พบว่าโคทั้ง 2 กลุ่มมีปริมาณคอลลาเจนไม่ต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่พบว่าชนิดของกล้ามเนื้อมีอิทธิพลต่อปริมาณของคอลลาเจน โดยพบว่า SS และ IF มีปริมาณ คอลลาเจนที่ละลายได้และคอลลาเจนทั้งหมด สูงกว่า LD ($P = 0.002$) แต่ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อปริมาณคอลลาเจน (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเนื้อโค ภายหลังสตั๊ตตายไม่เกิน 48 ชั่วโมง

Trait	n	Soluble collagen ¹			Insoluble collagen ¹			Total collagen ¹		
		LSM	SED	P - value	LSM	SED	P - value	LSM	SED	P – value
Group										
K	21	0.55	0.042	0.309	5.41	0.349	0.429	5.96	0.377	0.534
U	21	0.49			5.81			6.30		
Muscle type										
IF	14	0.53	0.052	0.052	5.82 ^a	0.427	0.002	6.35 ^a	0.462	0.002
LD	14	0.42			4.35 ^b			4.78 ^b		
SS	14	0.61			6.66 ^a			7.27 ^a		

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แต่ละระดับแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

¹ มิลลิกรัม / กรัมเนื้อสด

3.3.2 ปริมาณไกลโคเจน

ผลการศึกษานี้พบว่าโคพื้นเมืองกลุ่มกาญจนบุรีมีปริมาณไกลโคเจนต่ำกว่ากลุ่มอุบลราชธานี ($P = 0.009$) แต่ไม่พบว่าชนิดของกล้ามเนื้อ และอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อมีผลต่อปริมาณไกลโคเจน ($P > 0.05$) ดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อปริมาณไกลโคเจน ที่ไม่เกิน 1 ชั่วโมงหลังสตัว์ตาย

Trait	n	LSM ¹	SED	P – value
Group				
K	21	24.54 ^b	2.951	0.009
U	21	36.06 ^a		
Muscle type				
IF	14	33.01	3.615	0.148
LD	14	33.50		
SS	14	24.38		

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แต่ละระดับแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

¹ มิลลิกรัม / กรัมเนื้อสด

3.3.3 ค่า pH

ค่า pH ของโคพื้นเมืองกลุ่มกาญจนบุรีไม่แตกต่างจากกลุ่มอุบลราชธานี ($P = 0.615$) ดังตารางที่ 3.6 แต่พบว่าชนิดของกล้ามเนื้อมีอิทธิพลต่อค่า pH ของเนื้อ โดยพบว่า LD มีค่า pH₄₈ ต่ำกว่า IF และ SS ($P < 0.0001$) นอกจากนี้ยังพบอิทธิพลร่วมของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อค่า pH โดยพบว่า กล้ามเนื้อ LD ของโคกลุ่มอุบลราชธานีมีค่า pH ต่ำที่สุด รองจากกล้ามเนื้อ LD ของโคกลุ่มกาญจนบุรี ($P = 0.023$) ผลการวัดอุณหภูมิที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังสตัว์ตาย พบว่ากล้ามเนื้อ LD มีค่าต่ำกว่า IF และ SS ($P < 0.0001$) และพบอิทธิพลร่วมของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่ออุณหภูมิของเนื้อ โดยพบว่า กล้ามเนื้อ LD ของโคกลุ่มอุบลราชธานีมีค่าอุณหภูมิต่ำที่สุด ($P = 0.004$)

ตารางที่ 36 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อค่า pH และอุณหภูมิของเนื้อที่ 48 ชั่วโมงหลังสตัว์ตาย

Trait	n	pH ₄₈			Temperature ₄₈ (°C)		
		LSM	SED	P - value	LSM	SED	P - value
Group							
K	21	5.81	0.035	0.615	10.78	0.596	0.057
U	21	5.78			9.12		
Muscle type							
IF	14	6.03 ^b	0.043	<0.0001	10.82 ^a	0.731	0.001
LD	14	5.43 ^a			7.55 ^b		
SS	14	5.93 ^b			11.47 ^a		
Interaction							
KIF	7	5.97 ^a	0.060	0.023	10.64 ^a	1.033	0.004
KLD	7	5.54 ^b			10.55 ^a		
KSS	7	5.92 ^a			11.14 ^a		
UIF	7	6.08 ^a			11.01 ^a		
ULD	7	5.31 ^c			4.54 ^b		
USS	7	5.94 ^a			11.79 ^a		

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แต่ละระดับแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.3.4 สีของเนื้อ

สีของเนื้อโคกายจนบุรีมีค่า L^* สูงกว่า ในขณะที่มีค่า a^* ต่ำกว่าโคอุบลราชธานี ($P = 0.0001$) ดังตารางที่ 3.7 กล้ามเนื้อ LD และ SS มีค่า L^* สูงกว่า IF ($P = 0.005$) ส่วนกล้ามเนื้อ IF และ SS มีค่า a^* และ b^* สูงกว่า LD ($P < 0.01$) อิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อไม่มีผลต่อสีของเนื้อ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 3.7 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อสีของเนื้อโคที่ 48 ชั่วโมงหลังสตัว์ตาย

Trait	n	L*			a*			b*		
		LSM	SED	P - value	LSM	SED	P - value	LSM	SED	P - value
Group										
K	21	38.20 ^a	0.643	<0.0001	12.69 ^b	0.332	0.0001	13.57	0.267	0.053
U	21	32.72 ^b			14.72 ^a			14.32		
Muscle type										
IF	14	33.19 ^b	0.787	0.005	16.39 ^a	0.407	<0.0001	14.83 ^a	0.327	<0.0001
LD	14	36.64 ^a			10.62 ^b			12.64 ^b		
SS	14	36.55 ^a			14.11 ^a			14.38 ^a		

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แต่ละระดับแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.3.5 ความนุ่มของเนื้อ

ค่าการสูญเสียไอน้ำระหว่างการปรุง ($P = 0.001$) และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ($P < 0.0001$) ของโคกายจนบุรีต่ำกว่าโคอุบลราชธานี (ตารางที่ 3.8) กล้ามเนื้อ LD มีแนวโน้มที่จะมีค่าการสูญเสียไอน้ำระหว่างการปรุง ($P = 0.064$) สูงกว่ากล้ามเนื้อชนิดอื่น ชนิดของกล้ามเนื้อไม่มีอิทธิพล ต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่า LD มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงที่สุด รองลงมาคือ SS และ IF ตามลำดับ ($P < 0.0001$) ผลการทดลองครั้งนี้ไม่พบอิทธิพลร่วมของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อค่าการสูญเสียไอน้ำระหว่างการปรุงและค่าแรงตัดผ่านเนื้อ

ตารางที่ 3.8 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อค่าการสูญเสียไอน้ำระหว่างการปรุงและค่าแรงตัดผ่านเนื้อภายหลังสตัว์ตาย 48 ชั่วโมง

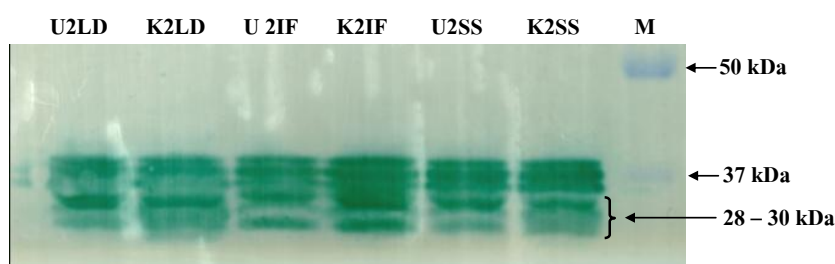
Trait	n	Cooking loss (%)			Shear force (kg)		
		LSM	SED	P - value	LSM	SED	P - value
Group							
K	21	41.67 ^b	1.310	0.001	7.04 ^b	0.328	<.0001
U	21	48.48 ^a			9.11 ^a		
Muscle type							
IF	14	42.50	1.605	0.064	6.22 ^c	0.401	<.0001
LD	14	48.00			10.08 ^a		
SS	14	44.71			7.92 ^b		

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แต่ละระดับแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.3.6 การย่อยสลายของโปรตีน Troponin-T

ผลการศึกษาอิทธิพลของกลุ่มโค ชนิดกล้ามเนื้อ รวมทั้งอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อที่มีต่อการย่อยสลายของ troponin-T ที่เวลาหลังสตัว์ตาย 48 ชั่วโมง พบว่าชิ้นส่วนขนาด

ประมาณ 28-30 kDa ที่ได้จากการย่อยสลายของ troponin-T ซึ่งโดยปกติมีขนาด 37 kDa (ภาพที่ 3.6) นั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3.9)



ภาพที่ 3.6 Immunoreactivity ของ Troponin-T

โดยภาพนี้มาจากโคตัวที่ 2 จากกลุ่มโคกาญจนบุรี (K) และ อุบลราชธานี (U) และ กล้ามเนื้อ 3 ชนิด คือ *Longissimus dorsi* (LD) *Infraspinalis* (IF) และ *Supraspinalis* (SS) โดยใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 100 ไมโครกรัมต่อเลน M คือ โปรตีนมาตรฐาน Precision Plus Protein Standard (Biorad)

ตารางที่ 3.9 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อ ความเข้มของแถบโปรตีน Troponin-T ขนาด 28-30 kDa ที่ 48 ชั่วโมงหลังสัตว์ตาย

Trait	n	LSM ¹	SED	P – value
Group				
K	12	16.30	0.774	0.514
U	12	17.03		
Muscle type				
IF	8	17.31	0.948	0.159
LD	8	15.11		
SS	8	17.58		

¹ ความเข้มของแถบโปรตีนขนาด 28 -30 kDa/โปรตีน100 ไมโครกรัม

3.3.7 คุณค่าทางโภชนา

ผลการวิเคราะห์หาค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นในเนื้อโค พบว่าโคกลุ่มกาญจนบุรีมีความชื้นสูงกว่าในขณะเดียวกันมีวัตถุแห้งต่ำกว่าโคอุบลราชธานี ($P < 0.0001$) กล้ามเนื้อ IF และ SS มีความชื้นสูงกว่าในขณะที่วัตถุแห้งต่ำกว่ากล้ามเนื้อ LD ($P < 0.0001$; ตารางที่ 3.10) โคกลุ่มกาญจนบุรีมีเปอร์เซ็นต์โปรตีนของเนื้อต่ำกว่าโคกลุ่มอุบลราชธานี ($P < 0.0001$) ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ไขมันและเถ้าไม่ต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกล้ามเนื้อ พบว่ากล้ามเนื้อ LD มีเปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงที่สุด รองลงมาคือ SS และ

IF ตามลำดับ ($P < 0.0001$) กล้ามเนื้อ LD มีเปอร์เซ็นต์ไขมันต่ำกว่า ($P = 0.0002$) ในขณะที่เปอร์เซ็นต์เถ้าสูงกว่า ($P < 0.0001$) กล้ามเนื้อ IF และ SS (ตารางที่ 3.11)

ตารางที่ 3.10 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อเปอร์เซ็นต์ความชื้นและวัตถุแห้ง

Trait	n	M (%)			DM (%)		
		LSM	SED	P - value	LSM	SED	P – value
Group							
K	21	78.31 ^a	0.124	<0.0001	21.69 ^b	0.124	<0.0001
U	21	77.07 ^b			22.93 ^a		
Muscle type							
IF	14	78.03 ^a	0.152	<0.0001	21.97 ^b	0.152	<0.0001
LD	14	77.06 ^b			22.94 ^a		
SS	14	77.99 ^a			22.01 ^b		

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แต่ละระดับแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 3.11 อิทธิพลของกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อ โปรตีน ไขมัน และเถ้า

Trait	n	Protein (%)			Ether Extract (%)			Ash (%)		
		LSM	SED	P - value	LSM	SED	P – value	LSM	SED	P – value
Group										
K	21	19.35 ^b	0.122	<0.0001	1.028	0.006	0.316	1.12	0.008	0.202
U	21	20.29 ^a			0.93			1.13		
Muscle type										
IF	14	19.16 ^c	0.150	<0.0001	1.22 ^a	0.082	0.0002	1.10 ^b	0.010	<0.0001
LD	14	20.62 ^a			0.68 ^b			1.17 ^a		
SS	14	19.69 ^b			1.03 ^a			1.11 ^b		

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แต่ละระดับแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.3.8 ขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อและความยาวซาร์โคเมอร์

ผลศึกษาขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อและความยาวซาร์โคเมอร์โคพื้นเมืองไทยจากจังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเป็นโคที่เลี้ยงในนาข้าวอินทรีย์และเป็นโคกลุ่มใหม่ที่ต่างจากกลุ่มโคอุบลที่ทำการศึกษามาดัง ผลการทดลอง ช้างต้น เนื่องจากข้อจำกัดในการเก็บตัวอย่างทำให้ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อและความยาวซาร์โคเมอร์ในโคกลุ่มแรกได้ ดังนั้นข้อมูลดังต่อไปนี้จึงเป็นเพียงตัวแทนที่จะใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อและความยาวซาร์โคเมอร์ของโคพื้นเมืองไทยเท่านั้น ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อ ของ LD เล็กกว่า IF และ SS ($P = 0.0002$)

ความยาวซาร์โคเมอร์ของกล้ามเนื้อทั้ง 3 ชนิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.0001$) โดยพบว่า IF มีความยาวซาร์โคเมอร์ยาวที่สุด ตามด้วย SS และ LD ตามลำดับ (ตารางที่ 3.12)

ตารางที่ 3.12 อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อ และความยาวซาร์โคเมอร์

Trait	n	Muscle			SED	P-value
		LD	SS	IF		
Muscle diameter (μm)	14	42.17 ^a	44.96 ^b	45.48 ^b	0.604	0.0002
Sarcomere length (μm)	14	1.86 ^c	1.91 ^b	1.92 ^a	0.084	<0.0001

3.4 สหสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ Myosin heavy chain กับเอ็นไซม์ calpains และ คุณภาพเนื้อ

ผลการศึกษาสหสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ MHC กับกลุ่มเอ็นไซม์ calpains (ตารางที่ 3.13) พบว่า MHC IIa เท่านั้นที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) กับปริมาณ calpastatin ($r = -0.431$) ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างชิ้นส่วนขนาด 28-30 kDa ที่ได้จากการย่อยสลาย troponin T กับชนิดของ MHC เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ MHC กับคอลลาเจน พบว่า MHC I มีสหสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย ($r = 0.452$) และปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด ($r = 0.446$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง MHC IIa กับปริมาณคอลลาเจน ($P > 0.05$) ในขณะที่ MHC IIx มีสหสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับคอลลาเจนที่ละลายได้ ($P < 0.01$; $r = -0.306$) และอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) กับคอลลาเจนที่ไม่ละลาย ($r = -0.438$) และคอลลาเจนทั้งหมด ($r = -0.439$)

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ MHC กับคุณภาพเนื้อ พบว่า MHC I มีสหสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่า pH_{48} ($P < 0.01$; $r = 0.557$) ในขณะที่ MHC IIx มีสหสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่า pH_{48} ($P < 0.01$; $r = -0.798$) ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ MHC กับสีเนื้อ พบว่า MHC I มีสหสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่า a^* ($P < 0.01$; $r = 0.545$) และ b^* ($P < 0.01$; $r = 0.407$) ในขณะที่พบสหสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง MHC IIx กับค่า L ($P < 0.05$; $r = 0.364$) แต่พบสหสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง MHC IIx กับค่า a^* ($P < 0.01$; $r = -0.828$) และค่า b^* ($P < 0.01$; $r = -0.686$) ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ MHC กับความนุ่มของเนื้อ พบว่า MHC I มีสหสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ($P < 0.01$; $r = -0.490$) ในขณะที่ MHC IIx มีสหสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ($P < 0.01$; $r = 0.545$) นอกจากนี้ยังพบว่า MHC I มีสหสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเปอร์เซ็นต์การสูญเสียไอน้ำระหว่างการปรุง ($P < 0.05$; $r = -0.344$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ MHC กับปริมาณไกลโคเจน ($P > 0.05$)

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ MHC กับปริมาณโกชนะในเนื้อ พบว่า MHC I มีสหสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) กับเปอร์เซ็นต์โปรตีน ($r = -0.525$) และเปอร์เซ็นต์เถ้า ($r = -0.485$) ในขณะที่พบสหสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) กับเปอร์เซ็นต์ไขมัน ($r = 0.475$) และความชื้น ($r = 0.463$) ส่วน MHC IIx มีสหสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) กับเปอร์เซ็นต์โปรตีน ($r = 0.493$) และเปอร์เซ็นต์เถ้า ($r = 0.534$) ในขณะที่พบสหสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) กับเปอร์เซ็นต์ไขมัน ($r = -0.527$)

ตารางที่ 3.13 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ Myosin heavy chain กับเอ็นไซม์ calpains คุณภาพเนื้อ และปริมาณโกชนะในเนื้อโคพื้นเมือง

Trait	MHC I	MHC IIa	MHC IIx
Calpain system			
Calpain 1 activity	0.090	-0.045	0.024
Calpain 2 activity	0.253	-0.275	-0.175
Calpastatin	-0.020	-0.431**	-0.116
Troponin –T 28 -30 kDa	0.148	-0.123	-0.349
Connective tissue			
Soluble collagen	0.247	0.150	-0.306*
Insoluble collagen	0.452**	0.035	-0.438**
Total collagen	0.446**	0.048	-0.439**
pH48	0.557**	-0.072	-0.798**
Color			
L*	-0.090	0.116	0.364*
a*	0.545**	-0.161	-0.828**
b*	0.407**	-0.289	-0.686**
Shear force	-0.490**	-0.125	0.545**
Cooking loss	-0.344*	-0.077	0.178
Glycogen	-0.160	-0.207	-0.004
Nutritive value			
Protein	-0.525**	-0.065	0.493**
Ether extract	0.475**	-0.032	-0.527**
Moisture	0.463**	0.039	-0.269
Ash	-0.485**	0.097	0.534**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

ค่าแรงตัดผ่านเนื้อก็มีสหสัมพันธ์เชิงลบกับคอลลาเจนที่ละลายได้ ($r = -0.338$) pH₄₈ ($r = -0.606$) ค่า a* ($r = -0.471$) เปอร์เซ็นต์ไขมัน ($r = -0.353$) และเปอร์เซ็นต์ความชื้น ($r = -0.597$) ในขณะที่เดียวกัน ค่าแรงตัดผ่านเนื้อก็มีสหสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าการสูญเสียไอน้ำระหว่างการปรุง ($r = 0.476$) เปอร์เซ็นต์โปรตีน ($r = 0.720$) และเปอร์เซ็นต์เถ้า ($r = 0.490$) ดังตารางที่ 3.14

ตารางที่ 3.14 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อ กับเอ็นไซม์ calpains คุณภาพเนื้อ และปริมาณโภชนาในเนื้อโคพื้นเมือง

Trait	r
Calpain system	
Calpain 1 activity	0.136
Calpain 2 activity	-0.036
Calpastatin	0.212
Troponin –T 28 -30 kDa	-0.092
Connective tissue	
Soluble collagen	-0.338*
Insoluble collagen	-0.204
Total collagen	-0.224
pH48	-0.606**
Color	
L*	0.088
a*	-0.471**
b*	-0.264
Cooking loss	0.476**
Glycogen	0.268
Nutritive value	
Protein	0.720**
Ether extract	-0.353**
Moisture	-0.597**
Ash	0.490**

* P < 0.05, ** P < 0.01

จากการศึกษาครั้งนี้มีค่าเฉลี่ย ค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าสัมประสิทธิ์ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูล ดังแสดงในตารางที่ 3.15

ตารางที่ 3.15 แสดงค่าเฉลี่ย ค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าสัมประสิทธิ์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูล

Variable	n	Mean	SE	Minimum	Maximum	CV
Carcass weight, kg	14	72.51	3.118	54.40	91.40	16.09
MHC						
I	42	5.97	0.625	0.60	14.44	67.92
IIa	42	3.96	0.254	1.37	9.30	41.64
IIx	42	6.74	0.778	0.13	16.48	74.82
Calpain 1	42	5.13	0.096	3.67	6.44	12.16
Calpain 2	42	4.57	0.081	3.23	5.44	11.53
Calpastatin	42	0.23	0.010	0.11	0.47	28.88
Soluble collagen (mg/g)	42	0.52	0.031	0.28	1.09	38.63
Insoluble collagen (mg/g)	42	5.61	0.277	2.92	9.48	32.05
Total collagen (mg/g)	42	6.13	0.299	3.22	10.12	31.57
Glycogen (mmol/g)	42	30.30	2.273	6.79	64.40	48.62
pH 48	42	5.79	0.048	5.15	6.31	5.40
Temperature	42	9.95	0.550	3.50	19.90	35.84
L*	42	35.46	0.655	27.62	47.79	11.98
a*	42	13.71	0.467	6.09	19.50	22.08
b*	42	13.95	0.244	9.98	18.70	11.33
Cooking loss (%)	42	45.07	1.086	34.00	64.00	15.62
Shearforce (kg)	42	8.07	0.37	4.29	12.29	29.70
Troponin-T	24	16.67	0.586	11.34	24.08	17.25
Moisture (%)	42	77.69	0.146	75.55	79.38	1.22
Dry matter (%)	42	22.31	0.146	20.62	24.45	4.26
Protein (%)	42	19.82	0.145	18.10	21.74	4.75
Ether extract (%)	42	0.98	0.057	0.24	1.92	37.76
Ash (%)	42	1.12	0.007	1.03	1.26	4.32
Muscle fiber diameter (μm) ¹	2100	44.20	0.349	3.40	104.70	36.27
Sarcomere length (μm) ²	1259	1.89	0.002	1.14	2.20	3.95

¹ ค่าเฉลี่ยจากโคอุบลราชธานี 14 ตัว กล้ามเนื้อ 3 ชนิด (IF LD SS) แต่ละตัวอย่างทำการวัด 50 ซ้ำ

² ค่าเฉลี่ยจากโคอุบลราชธานี 14 ตัว กล้ามเนื้อ 3 ชนิด (IF LD SS) แต่ละตัวอย่างทำการวัด 30 ซ้ำ มี missing data = 1

วิจารณ์ผล

Myosin Heavy Chain

ในกล้ามเนื้อลาย ไมโอซินเป็นไมโอไฟบริลลาโปรตีนที่พบมากที่สุด โดยโครงสร้างประกอบด้วย myosin heavy chain 2 ส่วน และ myosin light chain 4 ส่วน ซึ่งความเร็วในการยึดหดตัวนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของ MHC เนื่องจากส่วนหัวของ MHC จะมี ATPase ซึ่งทำหน้าที่สลาย ATP ให้เป็นพลังงานที่ใช้ในการยึดหดตัวของกล้ามเนื้อ (Schiaffino and Reggiani, 1996) การแบ่งชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อตามชนิดของ myosin heavy chain จะแบ่งได้เป็น 4 ชนิด คือ MHC I MHC IIa MHC IIx และ MHC IIb ตามลำดับความเร็วในการยึดหดตัวจากน้อยไปมาก เมื่อเปรียบเทียบกับ การแบ่งชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยวิธี histochemistry นั้น MHC I จะใกล้เคียงกับ type I (slow oxidative, red) ส่วน MHC IIa ใกล้เคียงกับ type IIa (fast oxidative glycolytic, white) ในขณะที่ MHC IIx จะมีคุณสมบัติในการยึดหดตัวอยู่ระหว่าง type IIa และ type IIb ดังนั้น MHC IIb จึงเป็นเส้นใยกล้ามเนื้อที่สามารถยึดหดตัวได้เร็วที่สุด โดยถือว่ามีความใกล้เคียงกับ type IIb (fast glycolytic, white; Lefaucheur, 2010)

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถใช้วิธีการ electrophoresis มาใช้ในการแยกชนิดของ MHC ของกล้ามเนื้อโคพื้นเมืองได้ โดยโคพื้นเมืองกลุ่มกาญจนบุรีมีปริมาณ MHC IIx มากกว่าโคกลุ่มอุบลราชธานี แสดงว่าโคกลุ่มกาญจนบุรีมีกล้ามเนื้อที่เป็น fast muscle มากกว่าโคกลุ่มอุบล ผลการเปรียบเทียบระหว่างชนิดของกล้ามเนื้อพบว่า IF มีความเป็น slow muscle มากที่สุด เนื่องจาก มี MHC I สูงที่สุด แต่มี MHC IIx ต่ำที่สุด ในขณะที่ LD มีความเป็น fast muscle มากที่สุด เพราะมีปริมาณ MHC I ต่ำที่สุด แต่ MHC IIx สูงที่สุด ส่วน SS มีคุณสมบัติของเส้นใยกล้ามเนื้ออยู่ระหว่าง IF และ LD ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับ Kirchofer *et al* (2002) รายงานว่าในกล้ามเนื้อโค IF จัดอยู่ในกลุ่ม red muscle เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์ของ β red fiber สูงที่สุดโดยมีเกิน 40 % LD จัดอยู่ในกลุ่ม white muscle เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์ของ α white fiber สูงที่สุดเกิน 40 % ส่วน SS จัดว่าเป็น intermediate muscle เนื่องจากมีปริมาณทั้ง β red fiber และ α white fiber น้อยกว่า 40 % Therkildsen *et al* (2002) พบว่ากล้ามเนื้อ *longissimus lumborum* ของโคไฮสไตน์ฟริเชียนมีปริมาณ type I type IIa และ type IIb เป็น 17 % 23 % และ 54 % ตามลำดับ ในขณะที่ *supraspinatus* มีปริมาณ type I มากที่สุด คือ 55 % ส่วน type IIa และ type IIb เป็น 15 % และ 14 % ตามลำดับ สอดคล้องกับ Hwang *et al* (2010) ที่ทดลองในโคพื้นเมืองเพศผู้ตอนของเกาหลี พบว่าจากผลของ histochemistry กล้ามเนื้อสันนอกมีลักษณะเป็น fast fiber โดยปริมาณ type IIb สูงที่สุด รองลงมาคือ type IIa ส่วน type I ต่ำที่สุด Oury *et al* (2010) รายงานผลของ electrophoresis ของกล้ามเนื้อ *Longissimus thoracis* ของโคพันธุ์ชาร์โลเลส์มีปริมาณ MHC I 20.7 % MHC IIa 25.5 % และ MHC IIx 53.8 % ซึ่งสอดคล้องกับผลของ histochemistry ที่พบว่า มี slow oxidative fiber 28.0 % fast oxidative glycolytic 19.6 % และ fast glycolytic 52.4 % และผลของ immuno-histochemistry ที่พบว่า มี type I 27.6 % type IIa 23.9 % และ type IIx 42.4 %

MHC IIb จัดว่าเป็น fastest twitch muscle ซึ่งโดยทั่วไปมีรายงานการตรวจพบในสัตว์เล็ก เช่น หนู (Weydert *et al.*, 1983) มีสมมติฐานว่าอาจจะไม่พบ MHC IIb ในกล้ามเนื้อของสัตว์ขนาดใหญ่ เนื่องจากมีการเคลื่อนไหวที่ช้า (Hämäläinen and Pette, 1995) แต่ต่อมาก็มีรายงานการตรวจพบ MHC IIb ในคน (Weiss *et al.*, 1999) และ ในสุกร (Lefaucher *et al.*, 1998) การทดลองในโคพื้นเมืองไทย ครั้งนี้ไม่พบ MHC IIb ในกล้ามเนื้อทั้ง 3 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับ Chikuni *et al* (2004) ที่รายงานว่าในกล้ามเนื้อของโคไฮสไตน์ฟริเชียน พบยีนของ MHC I MHC IIa และ MHC IIx แต่ไม่พบ MHC IIb Toniolo *et al* (2005) รายงานว่าพบว่าการแสดงออกของ MHC IIb ทั้งในระดับยีนและโปรตีน เพียงในกล้ามเนื้อ extraocular ของโค *Bos taurus* เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการตรวจพบ MHC IIb ในกล้ามเนื้อ *Semitendinosus* และพบปริมาณเพียงเล็กน้อยในกล้ามเนื้อ *Longissimus thoracis* โดยพบเฉพาะในโคบางตัวจากโคพันธุ์ Blonde d'Aquitaine จำนวน 11 ตัว (Picard and Malek, 2009)

Calpain system

ความนุ่มของเนื้อที่เพิ่มขึ้นภายหลังการบ่มเนื้อไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 1-3 องศาเซลเซียส เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในเนื้อนั้นเอง Koohmarie and Geesink, (2006) รายงานว่าเอนไซม์ calpains มีบทบาทสำคัญยิ่งต่อการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของกล้ามเนื้อ โดยพบว่า calpain 1 มีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อมากกว่า calpain 2 (Koohmarie *et al.*, 1987; Boehm *et al.*, 1998; Ilian *et al.*, 2001). การทำงานของ calpains หลังจากทำการย่อยสลายโปรตีนแล้วเอนไซม์นี้จะสลายตัว (autolysis) ดังพบการลดลงของ calpain 1 activity อย่างรวดเร็วหลังสัตว์ตาย ในขณะที่ calpain 2 activity มีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างช้า ซึ่งการลดลงของ calpain 1 activity นั้นเกิดจากการสลายหลังการย่อยสลายโปรตีน จึงทำให้ activity ลดลง (Koohmarie *et al.*, 1987; Boehm *et al.*, 1998; Ilian *et al.*, 2001; Veiseth *et al.*, 2001; Camou *et al.*, 2007) การทดลองที่ยืนยันความสำคัญของ calpain1 ต่อความนุ่มของเนื้อ คือการศึกษาในหนูที่ถูกยับยั้งการทำงานของ calpain 1 (calpain 1 knockout) จะเกิดการย่อยสลายโปรตีนหลังสัตว์ตายเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Geesink *et al.*, 2006) สำหรับ calpain inhibitor หรือ calpastatin จากการศึกษาในโค พบว่า calpastatin activity ที่ลดลงที่ 24 ชั่วโมงหลังสัตว์ตายสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อที่เพิ่มขึ้น และ calpastatin มีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อที่เพิ่มขึ้นประมาณ 40 % (Shackelford *et al.*, 1991; Koohmarie *et al.*, 1992; Koohmarie *et al.*, 1995).

ผลการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบอิทธิพลของทั้งกลุ่มโค ชนิดกล้ามเนื้อ รวมทั้งอิทธิพลร่วมของทั้งสองปัจจัย ต่อการทำงานของ calpain 1 และ calpain 2 เมื่อวัดที่เวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมงหลังสัตว์ตาย ผลการวัดปริมาณของ calpastatin ด้วยวิธี iElisa พบว่ากลุ่มโคกาญจนบุรีมีปริมาณ calpastatin ต่ำกว่าโคอุบลราชธานี แต่ไม่พบอิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อ และอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อ ต่อระดับของ calpastatin ผลการทดลองครั้งนี้แตกต่างจาก Therkildsen *et al* (2002) ที่ศึกษาในโคไฮส

ไคน์ฟรีเซียนพบว่ากล้ามเนื้อ *longissimus lumborum* มี activity ของ calpain 1 และ calpain 2 รวมทั้ง calpastatin ต่ำกว่า *supraspinatus* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับ Ouali and Talmant (1990) ที่รายงานว่ากล้ามเนื้อ fast muscles ที่มีการยึดหดตัวเร็ว glycolytic สูงในขณะที่มี oxidative ต่ำ จะมี activity ของ calpain 2 และ calpastatin ต่ำกว่า slow muscles

คุณภาพของเนื้อ

คุณภาพของเนื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความนุ่มของเนื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพเนื้อ อันจะนำไปสู่การยอมรับของผู้บริโภค Koochmarie *et al* (2002) รายงานว่าปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อคือ ความยาวของซาร์โคเมอร์ ปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และการย่อยสลายของโปรตีน แต่ Riley *et al* (2005) รายงานว่าสำหรับโคพันธุ์ราบห์มันแล้วพบว่าปริมาณของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อมากที่สุด

จากผลของ electrophoresis ซึ่งแสดงให้เห็นว่า LD มีลักษณะเป็น fast muscle มากที่สุด SS เป็น intermediate muscle ในขณะที่ IF จัดว่าเป็น slow muscle ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าโคพื้นเมืองไทย ทั้ง 2 กลุ่มมีปริมาณคอลลาเจนไม่ต่างกัน ในขณะที่พบว่ากล้ามเนื้อ intermediate muscle SS และ slow muscle IF มีปริมาณ คอลลาเจนที่ละลายได้ คอลลาเจนที่ไม่ละลาย และคอลลาเจนทั้งหมด สูงกว่า fast muscle LD ในขณะที่ Jurie *et al* (2005; 2006) รายงานว่าคอลลาเจนทั้งหมด และ คอลลาเจนที่ไม่ละลาย มีปริมาณสูงในกล้ามเนื้อโคที่มี fast glycolytic fiber สูงคือ *semitendinosus* แต่มีปริมาณต่ำในกล้ามเนื้อที่มีปริมาณ slow oxidative สูงคือ *longissimus thoracis*

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าโคพื้นเมืองกลุ่มกาญจนบุรีมีปริมาณไกลโคเจน ต่ำกว่ากลุ่มอุบลราชธานี แต่ไม่พบว่าชนิดของกล้ามเนื้อ และอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อมีผลต่อปริมาณไกลโคเจน โดยทั่วไปแล้ว fast type IIb muscles จะมีไกลโคเจน สูงกว่า slow type I muscles (Karlsson *et al.*, 1999 ; Schiaffino and Reggiani, 1996) แต่ในการทดลองครั้งนี้พบว่าโคกาญจนบุรีมีเส้นใยกล้ามเนื้อที่เป็น fast type มากกว่าโคอุบลราชธานีโดยจากผลของ electrophoresis พบว่าโคกาญจนบุรีมีปริมาณ MHC IIx สูงกว่าโคอุบลราชธานีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กลับพบว่าที่เวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมงหลังสัตว์ตายปริมาณไกลโคเจนของโคกาญจนบุรีต่ำกว่า ซึ่งอาจอธิบายตาม Pethick *et al* (2004) และ Bowker *et al* (2000) ที่รายงานว่า fast muscle fibers มีอัตราการสลายของไกลโคเจนเร็วกว่า slow muscle fiber เนื่องจากมี ATPase activity ที่สูงกว่าทำให้ระดับของ ATP ลดลงเร็วกว่าซึ่งจะเป็นการไปเร่งปฏิกิริยาไกลโคไลซิสทำให้เกิดการสลายตัวของไกลโคเจนเร็วกว่าจึงอาจเป็นผลให้ปริมาณของไกลโคเจนเหลืออยู่น้อยกว่า slow muscle fibers

ค่า pH ของโคพื้นเมืองกลุ่มกาญจนบุรีไม่แตกต่างจากกลุ่มอุบลราชธานี ถึงแม้ว่าจะพบว่าโคพื้นเมืองกลุ่มกาญจนบุรีมีปริมาณไกลโคเจน ต่ำกว่ากลุ่มอุบลราชธานี ที่เวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมงหลังสัตว์ตาย ชนิดของกล้ามเนื้อมีอิทธิพลต่อค่า pH ของเนื้อ โดยพบว่า LD มีค่า pH₄₈ ต่ำกว่า IF และ SS โดยค่า

pH ของ LD ที่ต่ำกว่ากล้ามเนื้ออื่นนั้น อาจเนื่องมาจากปริมาณไกลโคเจนที่สูงกว่า นอกจากนี้ยังพบว่า กล้ามเนื้อ LD ของโคกลุ่มอุบลราชธานีมีค่า pH ต่ำที่สุด รองจากกล้ามเนื้อ LD ของโคกลุ่มกาญจนบุรี สีของเนื้อโคกาญจนบุรีมีค่า L^* สูงกว่า ในขณะที่มีค่า a^* ต่ำกว่าโคอุบลราชธานี กล้ามเนื้อ LD และ SS มีค่า L^* สูงกว่า IF ส่วนกล้ามเนื้อ IF และ SS มีค่า a^* และ b^* สูงกว่า LD Hwang *et al* (2010) ทำการศึกษาในโคพื้นเมืองเกาหลี พบว่ากล้ามเนื้อ *semimembranosus* (SM) มี type IIb fiber มากที่สุด รองลงมาคือ *longissimus dorsi* (LD) ส่วน *psoas major* (PM) มีน้อยที่สุด และในทางตรงกันข้ามพบว่า PM มี type I fiber มากกว่า LD ส่วน SM มีน้อยที่สุด แต่กลับรายงานค่า pH ที่ 24 ชั่วโมงหลังสตัว์ตายของ PM และ SM ไม่แตกต่างกันแต่มีค่าต่ำกว่าของ LD ในขณะที่ LD มีค่า L^* สูงกว่า PM และ SM ตามลำดับ

ค่าการสูญเสียไอน้ำระหว่างการปรุง และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ของโคกาญจนบุรีต่ำกว่าโคอุบลราชธานี กล้ามเนื้อ LD มีแนวโน้มที่จะมีค่าการสูญเสียไอน้ำระหว่างการปรุง สูงกว่ากล้ามเนื้อชนิดอื่น LD มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงที่สุด รองลงมาคือ SS และ IF ตามลำดับ Hwang *et al* (2010) รายงานว่า PM ซึ่งมีลักษณะของ slow muscle มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำที่สุด รองลงมาคือ LD และ SM ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างของการสูญเสียไอน้ำระหว่างการเก็บรักษา

โปรตีน Troponin-T มีขนาดโมเลกุลตามการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS gel electrophoresis เท่ากับ 37 kDa (Greaser and Gergely, 1973) การย่อยสลายของ Troponin-T ในเนื้อที่ผ่านการบ่มไว้ที่ 1-4 องศาเซลเซียสได้ชิ้นส่วนของ polypeptide ขนาดประมาณ 30 kDa ออกมา โดย Ho *et al* (1994) ใช้เทคนิค Western blot ในการพิสูจน์ว่าเป็นชิ้นส่วนที่มาจาก troponin-T โดย Huff-Lonergan *et al* (1996) รายงานว่าการย่อยสลายของ troponin - T นั้นเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ calpains Huff-Lonergan *et al* (1995) และ Kuber *et al* (2004) พบว่ากล้ามเนื้อที่มีความนุ่มจะมีแถบ 30 kDa ที่เข้มกว่าเนื้อที่เหนียว ผลการศึกษาครั้งนี้ไม่พบอิทธิพลของกลุ่มโค ชนิดกล้ามเนื้อ รวมทั้งอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อต่อการย่อยสลายของ troponin T ที่เวลาหลังสตัว์ตาย 48 ชั่วโมง Muroya *et al* (2006) รายงานว่า กล้ามเนื้อ *Longissimus thoracis* (LT) ซึ่งจัดว่าเป็น faster - type muscle มีการย่อยสลายของ troponin T มากกว่า *Diaphragm* และ *Masseter* ซึ่งเป็น slow - type muscle ซึ่งผู้วิจัยกลุ่มนี้อธิบายว่าอาจเป็นเพราะว่า LT มี protease enzyme activity เช่น calpain 1 และ calpain 2 ที่สูงกว่า slow muscle นั่นเอง อย่างไรก็ตามการที่ไม่พบอิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อการย่อยสลาย troponin T ในการทดลองครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการวัดที่ระยะเวลาเพียง 48 ชั่วโมงหลังสตัว์ตาย หรืออีกประการหนึ่งอาจเนื่องมาจากโค *Bos indicus* ซึ่งมีรายงานว่า มีการย่อยสลายของ troponin T ค่อนข้างต่ำ ดังผลการทดลองของฉันทวัฒน์ (2552) ที่พบว่า โคกำแพงแสนซึ่งเป็นโคลูกผสมชาร์โลเลส์ 50 % มีการสลายตัวของ troponin T มากกว่าโคพื้นเมืองไทย

โคกลุ่มกาญจนบุรีมีความชื้นสูงกว่าแต่มีเปอร์เซ็นต์โปรตีนของเนื้อต่ำกว่าโคอุบลราชธานี ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ไขมันและเถ้าไม่ต่างกันทางสถิติ กล้ามเนื้อ IF และ SS มีความชื้นสูงกว่า LD

เปอร์เซ็นต์โปรตีนของ LD สูงที่สุด รองลงมาคือ SS และ IF ตามลำดับ LD มีเปอร์เซ็นต์ไขมันต่ำกว่า ในขณะที่เปอร์เซ็นต์เล้าสูงกว่า IF และ SS แต่จากการศึกษาของ Hwang *et al* (2010) พบว่า LD มีเปอร์เซ็นต์ไขมันสูงที่สุด รองลงมาคือ PM และ SM ตามลำดับ

ผลศึกษาขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อและความยาวซาร์โคเมอร์โคพินเมืองไทยจากจังหวัด อุบลราชธานี ซึ่งเป็นโคที่เลี้ยงในนาข้าวอินทรีย์และเป็นโคกลุ่มใหม่ที่ต่างจากกลุ่มโคอุบลที่ทำการศึกษามาดังข้างต้น ข้อมูลนี้จึงเป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้นในเรื่องของขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อและความยาวซาร์โคเมอร์ ของโคพื้นเมืองไทยเท่านั้น ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า ขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อของ IF และ SS มีขนาดใหญ่กว่าเส้นใยกล้ามเนื้อของ LD ซึ่งขัดแย้งกับ Kirchofer *et al* (2002) ที่รายงานว่า ขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อโดยวัดจากความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยกล้ามเนื้อทั้งชนิด α -white α -red และ β -red ของกล้ามเนื้อ LD มีความยาวกว่าของกล้ามเนื้อ SS และ IF ตามลำดับ และ Warritthitham *et al* (2010) รายงานว่าโคลูกผสมบราห์มันและพื้นเมืองไทยมีพื้นที่หน้าตัดของ fast-twitch fiber มีขนาดใหญ่เป็น 2 เท่าของ slow-twitch fiber คือ 6,773 และ 3,819 ไมครอน ตามลำดับ ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าความยาวซาร์โคเมอร์ของ IF ยาวที่สุด รองลงมาคือ SS และ LD ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้ค่อนข้างสอดคล้องกับ Hwang *et al* (2010) รายงานว่า PM มีซาร์โคเมอร์ยาวที่สุด รองลงมาคือ LD และ SM ตามลำดับ ดังจะเห็นว่าทั้ง IF และ PM ที่จัดว่าอยู่ในกลุ่ม slow muscle นั้นมีความยาวซาร์โคเมอร์มากกว่ากล้ามเนื้อ fast muscle คือ LD และ SM

สหสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ Myosin heavy chain กับเอ็นไซม์ calpains และ คุณภาพเนื้อ

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า MHC IIa ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม fast fiber มีสหสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณ calpastatin สอดคล้องกับ Ouali and Talmant (1990) ที่รายงานว่า slow muscles ของโค สุกร และแกะ มี calpastatin activity สูงกว่า fast muscles สอดคล้องกับ O'Halloran *et al* (1997) ที่รายงานว่า fast glycolytic muscles มี calpastatin activity ต่ำกว่าและมีความนุ่มมากกว่า slow muscles

MHC I สหสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย และปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด ในขณะที่ MHC IIx มีสหสัมพันธ์เชิงลบกับทั้งคอลลาเจนที่ละลายได้ คอลลาเจนที่ไม่ละลาย และคอลลาเจนทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับ Jurie *et al* (2006) ที่รายงานว่า fast glycolytic semitendinosus มีคอลลาเจนทั้งหมด และ คอลลาเจนที่ไม่ละลาย สูงกว่า slow oxidative longissimus thoracis แต่ขัดแย้งกับ Stolorski *et al* (2006) ที่รายงานว่าในโคลูกผสมแองกัสบราห์มัน กล้ามเนื้อ longissimus dorsi มีปริมาณคอลลาเจนสูงกว่า semitendinosus

MHC I มีสหสัมพันธ์เชิงบวกค่า pH_{48} ในขณะที่ MHC IIx มีสหสัมพันธ์เชิงลบกับค่า pH_{48} ส่วนเนื้อพบว่า MHC I มีสหสัมพันธ์เชิงบวกค่า a^* และ b^* ในขณะที่พบสหสัมพันธ์เชิงลบระหว่าง MHC IIx กับ ค่า L แต่พบสหสัมพันธ์เชิงลบระหว่าง MHC IIx กับค่า a^* และค่า b^* ซึ่ง ตรงข้ามกับ Hwang *et al* (2010) ที่รายงานสหสัมพันธ์เชิงลบระหว่าง type I fiber กับค่า L* และสหสัมพันธ์เชิงลบระหว่าง

type IIa fiber และ type IIb fiber กับค่า L^* ยกเว้นในเรื่องของ pH ที่ระบุว่า ultimate pH มีสหสัมพันธ์เชิงลบกับ fast IIa fiber

ในเรื่องของความนุ่มของเนื้อ พบว่า MHC I มีสหสัมพันธ์เชิงลบกับค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ในขณะที่ MHC IIx มีสหสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าแรงตัดผ่านเนื้อ นอกจากนี้ยังพบว่า MHC I มีสหสัมพันธ์เชิงลบกับเปอร์เซ็นต์การสูญเสียระหว่างการปรุง แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ MHC กับปริมาณไกลโคเจน Hwang *et al* (2010) ได้รายงานว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อ มีสหสัมพันธ์เชิงลบกับ type I fiber แต่มีสหสัมพันธ์เชิงบวกกับ type IIb fiber

MHC I มีสหสัมพันธ์เชิงลบกับเปอร์เซ็นต์โปรตีน และเปอร์เซ็นต์เถ้า ในขณะที่พบสหสัมพันธ์เชิงบวก กับเปอร์เซ็นต์ไขมัน และความชื้น ส่วน MHC IIx มีสหสัมพันธ์เชิงบวกกับเปอร์เซ็นต์โปรตีน และเปอร์เซ็นต์เถ้า ในขณะที่พบสหสัมพันธ์เชิงลบ กับเปอร์เซ็นต์ไขมัน Hwang *et al* (2010) รายงานว่า type I fiber มีสหสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณไขมัน แต่เป็นเชิงลบกับความชื้น ในขณะที่ type IIa fiber และ type IIb fiber มีสหสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณไขมัน แต่เป็นเชิงบวกกับความชื้น

สหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพเนื้ออื่นๆ

การศึกษาครั้งนี้พบว่าถ้าคอลลาเจนที่ละลายได้มีปริมาณสูงความนุ่มของเนื้อจะเพิ่มขึ้น โดยพบสหสัมพันธ์เชิงลบของค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับคอลลาเจนที่ละลายได้แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าแรงตัดผ่านเนื้อปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย และปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด ในขณะที่ Riley *et al* (2005) รายงานว่าในโคพันธุ์บราห์มันปริมาณคอลลาเจนมีอิทธิพลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อมากกว่าปัจจัยอื่นๆ โดยพบสหสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับคอลลาเจนที่ไม่ละลาย และคอลลาเจนทั้งหมด มีค่า $r = 0.66$ และ 0.66 ตามลำดับ แต่สำหรับโค *Bos taurus* พบว่าปริมาณคอลลาเจนไม่ใช่ปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อ ดังรายงานของ Christensen *et al* (2011) ที่ไม่พบสหสัมพันธ์ระหว่างคอลลาเจนและค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่ปรุงสุกแล้วในโคยุโรป 15 พันธุ์ รวมทั้งจากรายงานของ Rhee *et al* (2004) ที่ระบุว่าสมบัติของสหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อและปริมาณคอลลาเจนเปอร์เซ็นต์การสูญเสียระหว่างการปรุงไม่มีนัยสำคัญทางสถิติในการศึกษาในกล้ามเนื้อ *Infraspinatus Longissimus* และ *Supraspinatus* ของโคลูกผสมชาร์โลเลส์เพศผู้ตอน

ผลการทดลองครั้งนี้พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อ มีสหสัมพันธ์เชิงลบกับ ค่า pH_{48} ค่า a^* สำหรับความสัมพันธ์ระหว่าง pH และ ค่าแรงตัดผ่านเนื้อนั้น Beltrán *et al* (1997) อธิบายว่าเนื้อที่มีค่า pH สูง โดยมี $pH > 5.8$ จะมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำเนื่องจาก calpain 2 ทำงานได้ดีในสภาวะที่ pH สูงเช่นนี้ จึงทำให้เกิดการย่อยสลายของโปรตีนไมโอไฟบริลลาได้ดีกว่านั่นเอง

ผลการ ทดลองครั้งนี้พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อ มีสหสัมพันธ์เชิงลบกับ เปอร์เซ็นต์ไขมัน และ เปอร์เซ็นต์ความชื้น แต่พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อ มีสหสัมพันธ์เชิงบวกกับเปอร์เซ็นต์โปรตีน และ เปอร์เซ็นต์เถ้า ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ มีสหสัมพันธ์เชิงลบกับ เปอร์เซ็นต์ไขมันในเรื่องของการศึกษาครั้งนี้

สอดคล้องกับทั้งผลการศึกษาในโค *Bos indicus* (Riley *et al.*, 2005) และ *Bos taurus* (Christensen *et al.*, 2011) นอกจากนี้ผลการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีสหสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงด้วย

ผลการศึกษาในโคพื้นเมืองไทยครั้งนี้ โดยรวมแล้วพบว่ากล้ามเนื้อ LD มีเส้นใยกล้ามเนื้อส่วนใหญ่เป็น fast fiber ซึ่งพบว่าการสะสมไขมันไว้ในเนื้อน้อย ถึงแม้ไม่พบความแตกต่างของปริมาณกรดไขมันก็ตาม แต่ก็พบว่ากล้ามเนื้อสันนอกมี pH₄₈ ต่ำกว่าและเนื้อนุ่มน้อยกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณคอลลาเจนต่ำกว่าด้วย ในขณะที่มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงกว่ากล้ามเนื้อ IF ซึ่งมีเส้นใยกล้ามเนื้อส่วนใหญ่เป็น slow fiber ค่าแรงตัดผ่านเนื้อของ LD ที่สูงกว่านี้อาจเนื่องมาจากอิทธิพลของปริมาณไขมันในเนื้อที่มีอิทธิพลอย่างมากต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อดังพบว่า LD มีปริมาณไขมันต่ำกว่า IF ประมาณครั้งหนึ่ง และพบสหสัมพันธ์เชิงลบระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับปริมาณไขมันในเนื้อ ($r = -0.353$) นอกจากนี้ยังพบว่า LD มีปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย ($P = 0.002$) และปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด ($P = 0.002$) ต่ำที่สุด ในขณะที่ปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้มีแนวโน้มที่จะต่ำกว่ากล้ามเนื้ออื่นด้วย ($P = 0.052$) ดังนั้นการที่ LD มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงกว่ากล้ามเนื้อชนิดอื่นอาจเนื่องจากปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ต่ำกว่านั่นเอง ซึ่งปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้นั้นถือว่ามีอิทธิพลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้ออย่างมาก ดังที่พบว่ามีสหสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ($r = -0.338$)

สรุปผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อของโคพื้นเมืองโดยอาศัยวิธีการ electrophoresis ในการแยกชนิดของ Myosin heavy chain สามารถแยกได้เป็น 3 ชนิด คือ MHC I MHC IIa และ MHC IIx โดยกล้ามเนื้อของกลุ่มกาญจนบุรีมีปริมาณของ MHC IIx ซึ่งมีลักษณะที่เป็น fast fiber มากกว่าโคกลุ่มอุบลราชธานี และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกล้ามเนื้อ 3 ชนิด ปรากฏว่ากล้ามเนื้อ LD มีลักษณะของ fast fiber มากที่สุด เนื่องจากมีปริมาณของ MHC IIx มากที่สุดในขณะที่ MHCI น้อยที่สุด กล้ามเนื้อ SS มีลักษณะของ intermediate fiber ส่วน IF มีลักษณะเป็น slow fiber
2. ไม่พบความแตกต่างของ activity ของทั้ง calpain 1 และ calpain 2 ในการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มโคและชนิดกล้ามเนื้อ รวมทั้งอิทธิพลร่วม แต่พบว่าโคกลุ่มกาญจนบุรีมีปริมาณของ Calpastatin ต่ำกว่าโคกลุ่มอุบลราชธานี
3. คุณภาพเนื้อ พบว่าชนิดของกล้ามเนื้อมีอิทธิพลต่อปริมาณคอลลาเจน โดยพบว่า LD มีปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลายและคอลลาเจนทั้งหมดต่ำกว่า IF และ SS ไม่พบอิทธิพลต่อปริมาณไกลโคเจนแต่พบค่า pH 48 และอุณหภูมิ 48 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย ของ LD ต่ำที่สุด ส่วนค่าสี IF มีสีเข้มที่สุดโดยมีค่า L* ต่ำที่สุดแต่มีค่า a* และ b* สูง ค่าแรงตัดผ่านเนื้อของ IF ต่ำที่สุด ในขณะที่ LD สูงที่สุด เปอร์เซ็นต์ความชื้นและไขมันของ LD ต่ำกว่า ในขณะที่เปอร์เซ็นต์โปรตีนและเถ้าสูงกว่ากล้ามเนื้ออื่น
4. โคพื้นเมืองทั้ง 2 กลุ่มมีปริมาณคอลลาเจนไม่ต่างกัน แต่พบว่าโคกลุ่มกาญจนบุรี ปริมาณไกลโคเจนต่ำกว่ากลุ่มโคอุบลราชธานี ส่วนสีเนื้อนั้นพบว่าโคกาญจนบุรีมีค่า L* สูงกว่าในขณะที่มีค่า a* ต่ำกว่าโคอุบลราชธานี โคกาญจนบุรีมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำกว่าโคอุบลราชธานี ส่วนประกอบทางโภชนา พบว่าโคกาญจนบุรีมีเปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงกว่าในขณะที่มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่ำกว่าโคอุบลราชธานี
5. ความสัมพันธ์โดยรวมของชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อต่อคุณภาพของเนื้อ พบว่ามีสหสัมพันธ์เชิงลบระหว่าง fast MHC IIa กับปริมาณ calpastatin ระหว่าง fast MHC IIx กับปริมาณคอลลาเจนค่า a* และ b* และเปอร์เซ็นต์ไขมัน แต่พบว่ามีสหสัมพันธ์เชิงบวกระหว่าง fast MHC IIx กับค่า L* ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ เปอร์เซ็นต์โปรตีนและเถ้าในเนื้อ
6. ขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อของ IF และ SS มีขนาดใหญ่กว่า LD ส่วนความยาวซาร์โคเมอร์ ของ IF ยาวที่สุด รองลงมาคือ SS และ LD ตามลำดับ
7. slow MHC I มีสหสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้และคอลลาเจนทั้งหมด pH₄₈ และ a* b* เปอร์เซ็นต์ไขมันและความชื้น ในขณะที่พบสหสัมพันธ์ เชิงลบ ค่าแรงตัดผ่านเนื้อการสูญเสียไนระหว่างปรุงสุก เปอร์เซ็นต์โปรตีนและเถ้าในเนื้อ

8. ผลการทดลองครั้งนี้ พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อสหสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ pH_{48} ค่า a^* เปอร์เซ็นต์ไขมันและความชื้น ในขณะที่มีสหสัมพันธ์เชิงบวกกับเปอร์เซ็นต์การสูญเสียไนระหว่างปรุงสุกรวมทั้งเปอร์เซ็นต์โปรตีนและเถ้าในเนื้อ

โดยสรุปแล้ว กล้ามเนื้อ IF มีลักษณะเป็น slow type I จะมีปริมาณไขมันและคอลลาเจนสูงกว่ากล้ามเนื้อ LD ที่มีลักษณะเป็น fast type IIx ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณไขมันมีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อมากกว่าปริมาณคอลลาเจน ดังที่พบว่ากล้ามเนื้อ IF มีความนุ่มมากกว่ากล้ามเนื้อ LD ดังนั้นผลการทดลองครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์ในการนำไปปรับปรุงคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองโดยเฉพาะในเรื่องของระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเนื้อของกล้ามเนื้อต่างชนิดกัน โดยกล้ามเนื้อ IF ใช้เวลาในการบ่มเนื้อน้อยกว่ากล้ามเนื้อ LD เพื่อเพิ่มความนุ่มของเนื้อ

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้มีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อ ดังผลการทดลองครั้งนี้ที่พบสหสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้กับค่าแรงตัดผ่านเนื้อ จึงควรที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงอิทธิพลของระยะเวลาในการบ่มเนื้อต่อปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเนื้อเพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มมูลค่าของเนื้อโคไทยต่อไปในอนาคต

2. เนื่องจากแหล่งที่มาของโคพื้นเมืองมีผลอิทธิพลต่อชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ จึงทำให้มีคุณภาพเนื้อต่างกัน จึงควรที่จะมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของพันธุกรรมของโคทั้ง 2 กลุ่ม เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการนำไปปรับปรุงพันธุ์โคพื้นเมืองไทยเพื่อให้ได้เนื้อที่มีคุณภาพดีต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- จันทร์พร เจ้าทรัพย์. 2554. เทคโนโลยีการฆ่าสัตว์. มิน เซอร์วิส ซัพพลาย, กรุงเทพฯ
- จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และณณิน โอภาสพัฒนกิจ. 2548. คุณภาพเนื้อโค ภายใต้ระบบการผลิตและการตลาดของประเทศไทย. สุพีเรียฟรินดิงเฮาส์ จำกัด, กรุงเทพฯ.
- ฉันทวัฒน์ อาชะวคม. 2552. การสลายตัวของโปรตีน Troponin – T และความนุ่มของเนื้อโค กำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมืองที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน. วิทยานิพนธ์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 67 หน้า.
- ปิยะดา ทวีศรี. 2550. การผลิต Polyclonal Antibodies เพื่อการตรวจสอบปริมาณโปรตีน calpastatin ในเนื้อโคพันธุ์กำแพงแสน. วิทยานิพนธ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 89 หน้า.
- พร้อมลักษณ์ สมบูรณ์ปัญญากุล. 2552. คุณค่าเนื้อโคไทย. อัมรินทร์พรินดิง. กรุงเทพฯ.
- Arther, J.S.C., and L. Mykles. 2000. Calpain Zymography with casein or fluorescein isothiocyanate casein. In Calpain methods and protocols. Edited by J. S. ELce. Humana Press Inc., Totowa, NJ.343 p.
- Beltrán, J.A., I., Jaime, and P. Santolaria. 1997. Effect of stress-induced high post-mortem pH on protease activity and tenderness of beef. Meat Science 45 : 201-207.
- Boehm, M.L., T.L., Kendall, V.F., Thompson, and D.E., Goll. 1998. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. Journal of Animal Science 76 : 2415–2434.
- Bowker B.C., A.L.Grant, J.C.Forrest and D.E.Gerrard. 2000. Muscle metabolism and PSE pork. Proceedings of the American Society of Animal Science.
- Calkins, C. R., T. R. Dutson, G. C. Smith, Z. L. Carpenter, and G. W. Davis. 1981. Relationship of fiber type composition to marbling and tenderness of bovine muscle. Journal of Food Science 46:708–710.
- Camou J.P., J.A., Marchello, V.F.,Thompson, S.W., Mares and D.E., Goll. 2007. Effect of postmortem storage on activity of μ - and m-calpain in five bovine muscles. Journal of Animal Science 85 : 2670–2681
- Chaosap C. 2010. The Effect of Compensatory Growth on Performance and Muscle Biochemistry in Pigs. Thesis present to The University of Nottingham.
- Chikuni, K., S. Muroya and I. Nakajima. 2004. Myosin heavy chain isoforms expressed in bovine skeletal muscles. Meat Science 67(1): 87-94.
- Choi, Y. M., and B. C. Kim. 2009. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. Livestock Science 122:105–118.

- Christensen M., P., Ertbjerg, S., Failla, C., Sañudo, R.I., Richardson, G.R., Nute, J.L., Olleta, B., Panea, P., Albertí, M., Juárez, J.F., Hocquette and J.L. Williams. 2011. Relationship between collagen characteristics, lipid content and raw and cooked texture of meat from young bulls of fifteen European breeds. *Meat Science* 87(1) : 61-65.
- Gauthier G.F. 1969. On the relationship of ultrastructural and cytochemical features to color in mammalian skeletal muscle. *Cell and Tissue Research* 95(3), 462–482.
- Geesink, G.H., S., Kuchay, A.H., Chishti and M. Koohmaraie. 2006. Micro-calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *Journal of Animal Science* 84 : 2834-2840.
- Greaser M. and J. Gergely. 1973. Purification and properties of the components from troponin. *The Journal of Biological Chemistry* 248 (6) : 2125-2133.
- Hämäläinen, N. and D., Pette. 1995. Patterns of myosin isoforms in mammalian skeletal muscle Fibres. *Microscopy Research and Technique* 30 : 381-389.
- Higgins, J.A., Y.V., Lasslett, R.G., Bardsley, and P.J., Buttery. 1988. The relation between dietary restriction or clenbuterol (a selective β_2 agonist) treatment on muscle growth and calpain proteinase (EC 3.4.22.17) and calpastatin activities in lambs. *British Journal of Nutrition* 60 : 645-652.
- Hill F. 1966. The solubility of intramuscular collagen in meat animals of various ages. *Journal of Food Science* 31 : 161-166.
- Ho, C.-Y., M. H., Stromer and R. M., Robson. 1994. Identification of the 30 kDa polypeptide in post mortem skeletal muscle as a degradation product of troponin-T. *Biochimie* 76 : 369–375.
- Ho, C.Y., M. H., Stromer, G., Rouse, and R. M., Robson. 1997. Effects of electrical stimulation and postmortem storage on changes in titin, nebulin, desmin, troponin-T, and muscle ultrastructure in *Bos indicus* crossbred cattle. *Journal of Animal Science* 75 : 366-367.
- Huff-Lonergan, E., F. C. Parrish, Jr., and R. M. Robson. 1995. Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle. *Journal of Animal Science* 73:1064–1073.
- Huff-Lonergan, E., T., Mitsuhashi, D. D., Beekman, F. C., Jr., Parrish, D. G., Olson and R. M. Robson. 1996. Proteolysis of specific muscle structural proteins by l-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. *Journal of Animal Science* 74 : 993–1008.
- Hwang Y., G. Kim, J. Jeong, S. Hur and S. Joo. 2010. The relationship between muscle fiber characteristics and meat quality traits of high marbled Hanwoo (Korean native cattle) steers. *Meat Science* 86(2) : 456-61.

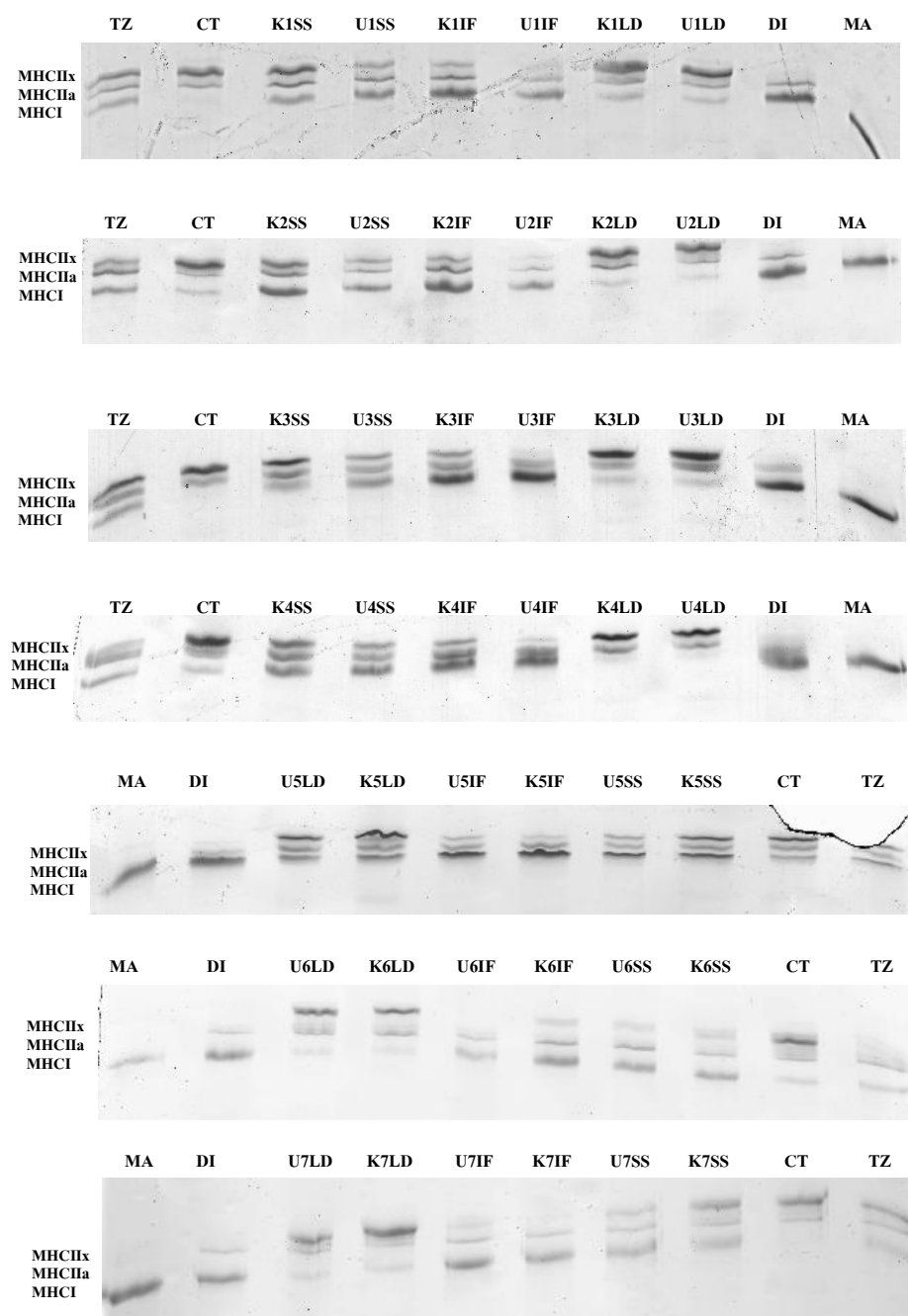
- Ilian, M.A., J.D., Morton, M.P., Kent, C.E., Le Couteur, J., Hickford, R., Cowley, and R., Bickerstaffe. 2001. Intermuscular variation in tenderness: association with the ubiquitous and muscle-specific calpains. *Journal of Animal Science* 79 : 122-132.
- Jeacocke, R. E. 1993. The concentrations of free magnesium and free calcium ions both increase in skeletal muscle fibres entering rigor mortis. *Meat Science* 35(1) : 27–45.
- Jurie, C., J-F. Martin, A. Listrat, R. Jailler, J. Culioli and B. Picard. 2005. Effect of age and breed of beef bulls on growth parameter, carcass and muscle characteristics. *Animal Science* 80:257-263.
- Jurie C., J-F. Martin, A. Listrat, R.Jailler, J.Culioli and B. Picard. 2006. Carcass and muscle characteristics of beef cull cow between 4 and 9 years of age. *Animal Science* 82 : 415-421.
- Karlsson, A.H., R.E. Klont, and X., Fernandez. 1999. Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livestock Production Science* 60 : 255-269
- Kirchofer, K. S., C. R. Calkins, and B. L. Gwartney. 2002. Fiber-type composition of muscles of the beef chuck and round. *Journal of Animal Science* 80 (11) : 2872-2878.
- Klont, R.E., L. Brocks and G. Eikelenboom. 1998. Muscle fiber type and meat quality. *Meat Science*. 49 suppl. S216–S229.
- Koohmaraie, M., S. C., Seideman, J. E., Schollmeyer, T. R., Dutson and J. D., Crouse. 1987. Effect of post-mortem storage on Ca^{++} -dependent proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. *Meat Science* 19 : 187–196.
- Koohmaraie, M. 1992. Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteasome): purification, characterization, and comparison of its effect on myofibrils with m calpain. *Journal of Animal Science* 70 : 3697-3708.
- Koohmaraie, M., G., Whipple, D. H., Kretchmar, J.D., Crouse and H.J., Mersmann. 1995. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): Characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. *Journal of Animal Science* 69 : 617–624.
- Koohmaraie, M., M. P., Kent, S.D., Shackelford, E. Veiseth and T.L., Wheeler. 2002. Meat tenderness and muscle growth: Is there any relationship. *Meat Science* 62 : 345–352.
- Kuber P.S., J.R., Busboom, E. Huff-Lonergan, S.K. Duckett, P.S. Mir, Z. Mir, R. J. McCormick, M.V. Dodson, C.T. Gaskins, J.D. Cronrath, D.J. Marks, and J.J. Reeves. 2004. Effects of biological type and dietary fat treatment on factors associated with tenderness: I. Measurements on beef longissimus muscle. *Journal of Animal Science* 82(3) : 770-778.
- Lefaucheur L. 2006. Myofibre typing and its relationship to growth performance and meat quality. *Arch. Tierz. Dummerstorf* 49 : 4-17.

- Lefaucheur, L. 2010. A second look into fibre typing - Relation to meat quality. *Meat Science* 84 : 257–270.
- Lefaucheur, L. and D., Gerrard. 1998. Muscle fiber plasticity in farm mammals. *Proceeding of the American Society of Animal Science*, 1-19.
- Muroya S., I. Nakajima, M. Oe, and K. Chikuni. 2006. Difference in postmortem degradation pattern among troponin T isoforms expressed in bovine longissimus, diaphragm, and masseter muscles. *Meat Science* 72 : 245–251.
- Myosin. Retrieved July, 1, 2011, from <http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb2/part1/myosin.htm>
- O'Halloran, G.R., D.J. Troy, D.J. Buckley and W.J. Reville. 1997. The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolysing muscle. *Meat Science* 47 : 187–210.
- Opatpatanakit Y. and J. Sethakul. Natural beef from Thai Native Cattle : from farmers to consumers. *Proceeding of the 14th Animal Science Congress of the Asean-Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP) August 23 -27, 2010. Pintung, Taiwan.*
- Ouali, A., and A. Talmant. 1990. Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat science* 28:331-348.
- Oury M.P., R. Dumont, C. Jurie, J.F. Hocquette, and B. Picard. 2010. Specific fibre composition and metabolism of the rectus abdominis muscle of bovine Charolais cattle. *BMC Biochemistry* 11:12.
- Pethick D.W., D.M. Fergusson, G.E. Gardner, J.F. Hocquette, J.M. Thompson and R. Warner. 2004. Muscle metabolism in relation to genotypic and environmental influences on consumer defined quality of red meat. Retrieved August, 1, 2011, from http://www.eaap.org/Previous_Annual_Meetings/2004Bled/papers/C6.5_Pethick.pdf
- Picard, B. 2011. Protocol for high-resolution electrophoresis separation of myosin heavy chain Isoforms in bovine skeletal muscle. *Electrophoresis* 32(14): 1804-1806.
- Picard, B., C. Barboiron, D. Chadeyron and C. Jurie. 1999. Electrophoretic separation of bovine muscle myosin heavy chain isoforms. *Meat Science* 53(1) : 1-7.
- Picard, B., L., Lefaucheur, C., Berri and M. J., Duclos. 2002. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reproduction Nutrition Development* 42 : 415-431.
- Picard B., C., Jurie, M.P., Duris and G., Renand. 2006. Consequences of selection for higher growth rate on muscle fibre properties in cattle. *Livestock Production Science* 102 : 107-120.

- Picard, B. and I. Cassar-Malek. 2009. "Evidence for expression of IIb myosin heavy chain isoform in some skeletal muscles of Blonde d'Aquitaine bulls. *Meat Science* 82(1): 30-36.
- Reggiani, C. and F. Mascarello. 2004. Fibre Type Identification and Functional Characterization in Adult Livestock Animals. In *Muscle Development of Livestock Animals Physiology, Genetics and Meat Quality*. eds M.F.W. te Pas, M.E. Everts and H.P. Haagsman. Wallingford : CABI.
- Rehfeldt, C. and G. Kuhn. 2006. Consequences of birth weight for postnatal growth performance and carcass quality in pigs as related to myogenesis. *Journal of Animal Science* 84, Suppl: E113-E123.
- Renand, G., B. Picard, C. Touraille, P. Berge and J. Lepetit. 2001. Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. *Meat Science* 59 : 49-60.
- Rhee, M. S., T. L. Wheeler, S. D. Shackelford and M. Koohmaraie. 2001. Variation in palatability and biochemical traits within and among eleven beef muscles. *Journal of Animal Science* 82:534-550.
- Riley, D.G., D.D., Johnson, C.C., Chase, R.L., West, S.W., Coleman, T.A., Olson and A.C. Hammond. 2005. Factors influencing tenderness in steaks from Brahman cattle. *Meat Science* 70 : 347–356.
- Ryu, Y. C. and B. C. Kim. 2006. Comparison of histochemical characteristics in various pork groups categorized by postmortem metabolic rate and pork quality. *Journal of Animal Science* 84(4): 894-901.
- Schiaffino, S. and C. Reggiani. 1996. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiological Reviews* 76 : 371–423.
- Seideman, S.C., and J.D., Crouse. 1986. The Effects of Sex Condition, Genotype and Diet on Bovine Muscle Fiber Characteristics. *Meat Science* 17: 55-72.
- Sensky, P.L., T., Parr, A.K., Lockley, R.G., Bardsley, P.J., Buttery, J.D., Wood and C., Warkup. 1999. Altered calpain levels in longissimus muscle from normal pigs and heterozygotes with the ryanodine receptor mutation. *Journal of Animal Science* 77 : 2956–2964.
- Sethakul, J., Y. Opatpatanakit, P. Sivapirunthep and P. Intrapornudom. 2008. Beef quality under production systems in Thailand. *Proceeding of the 13th Animal Science Congress of the Asean-Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP) September 22-26, 2008. Hanoi, Vietnam.*
- Shackelford, S.D., J.B., Morgan, H.R., Cross, and J.W. Savell. 1991. Identification of threshold levels for Warner-Bratzler shear force in beef top loin steaks. *Journal of Muscle Foods* 2 : 289–296.
- Sonesson, A.K., K.H., de Greef and T.H.E. Meuwissen. 1998. The Genetic parameters and trends of meat quality, carcass composition and performance traits in two selected lines of Large White pigs. *Livestock Production Science* 57: 23-32.

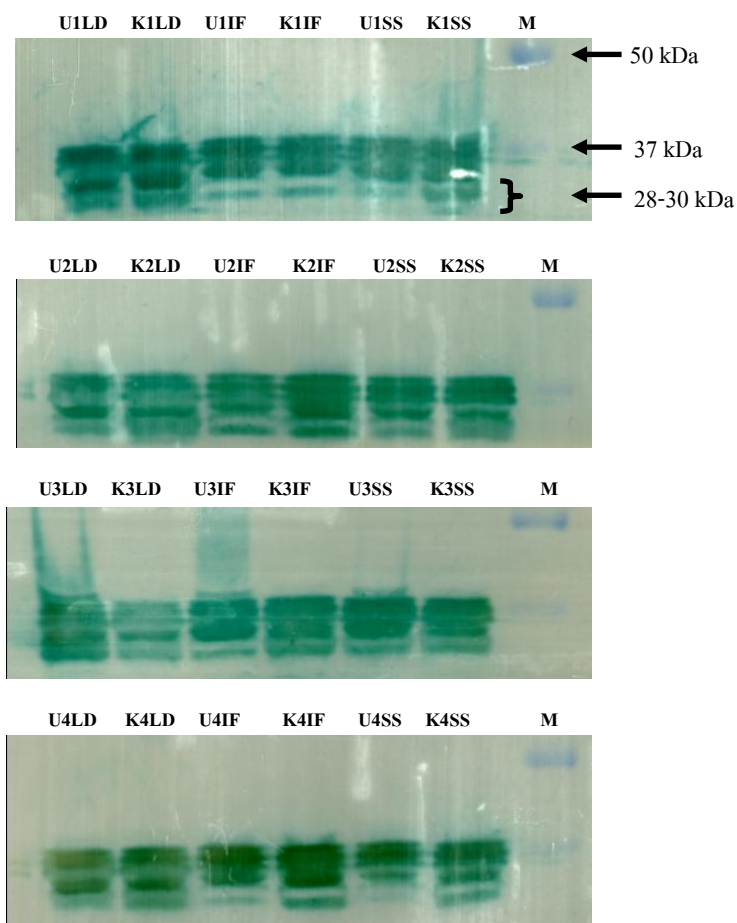
- Stolowski, G.D., B.D., Braird, R.K., Miller, J.W., Savel, A.R., Sams, J.F., Taylor, J.O., Sanders and S.B. Smith. 2006. Factors influencing the variation in tenderness of seven major beef muscles from three Angus and Brahman breed crosses. *Meat Science* 73(3): 475-483.
- Sunwoo, H.H., X. Li, E.N., Lee, Y.K., Kim and J.S. Sim. 2000. Preparation of antigen specific IgY for food application. In *Egg nutrition and biotechnology*. eds. Sim, J.S., Nakai, S., and W., Guenter. Wellingford : CABI.
- Talmadge, R.J. 2000. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: Potential regulatory mechanisms. *Muscle Nerve* 23 : 661–679.
- te Pas, M.F., A.H. Visscher, and K.H., de Greef. 2004. Molecular genetic and physiologic background of the growth hormone-IGF-I axis in relation to breeding for growth rate and leanness in pigs. *Domestic Animal Endocrinology* 27 : 287-301.
- Therkildsen, M., L. Melchior Larsen and M. Vestergaard. 2002. Influence of growth rate and muscle type on muscle fibre type characteristics, protein synthesis capacity and activity of the calpain system in Friesian calves. *Animal Science* 74:243-251.
- Toniolo L, L. Maccatrozzo, M. Patruno, F. Caliaro, F. Mascarello, and C. Reggiani. 2005. Expression of eight distinct MHC isoforms in bovine striated muscles: evidence for MHC-2B presence only in extraocular muscles. *The Journal of Experimental Biology* 208: 4243-4253.
- Veiseth, E., S.D., Shackelford, T.L., Wheeler and M., Koohmaraie. 2001. Effect of postmortem storage on -calpain and m-calpain in ovine skeletal muscle. *Journal of Animal Science* 79 : 1502–1508.
- Von Seggern, D.D., C.R. Calkins, D.D. Johnson, J.E. Brickler and B.L. Gwartney. 2005. Muscle profiling: Characterizing the muscles of the beef chuck and round. *Meat Science* 71:39-51.
- Waritthitham, A., C. Lambertz, H.-J., Langholz, M., Wicke and M. Gauly. 2010. Muscle fiber characteristics and their relationship to water holding capacity of longissimus dorsi muscle in Brahman and Charolais crossbred bulls. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences* 23 (5) : 665 – 671.
- Weiss A., S., Schiaffino and L.A. Leinwand. 1999. Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: implications for functional diversity. *Journal of Molecular Biology* 290 : 61–75.
- Weydert, A., P., Daubas, M., Caravatti, A., Minty, G., Bugaisky, A., Cohen, B. Robert and M., Buckingham. 1983. Sequential accumulation of mRNAs encoding for different myosin heavy chain isoforms during skeletal development in vitro detected with a recombinant plasmid identified as coding for an adult fast myosin heavy chain from mouse skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry* 258 : 13867-13874.

ภาคผนวก



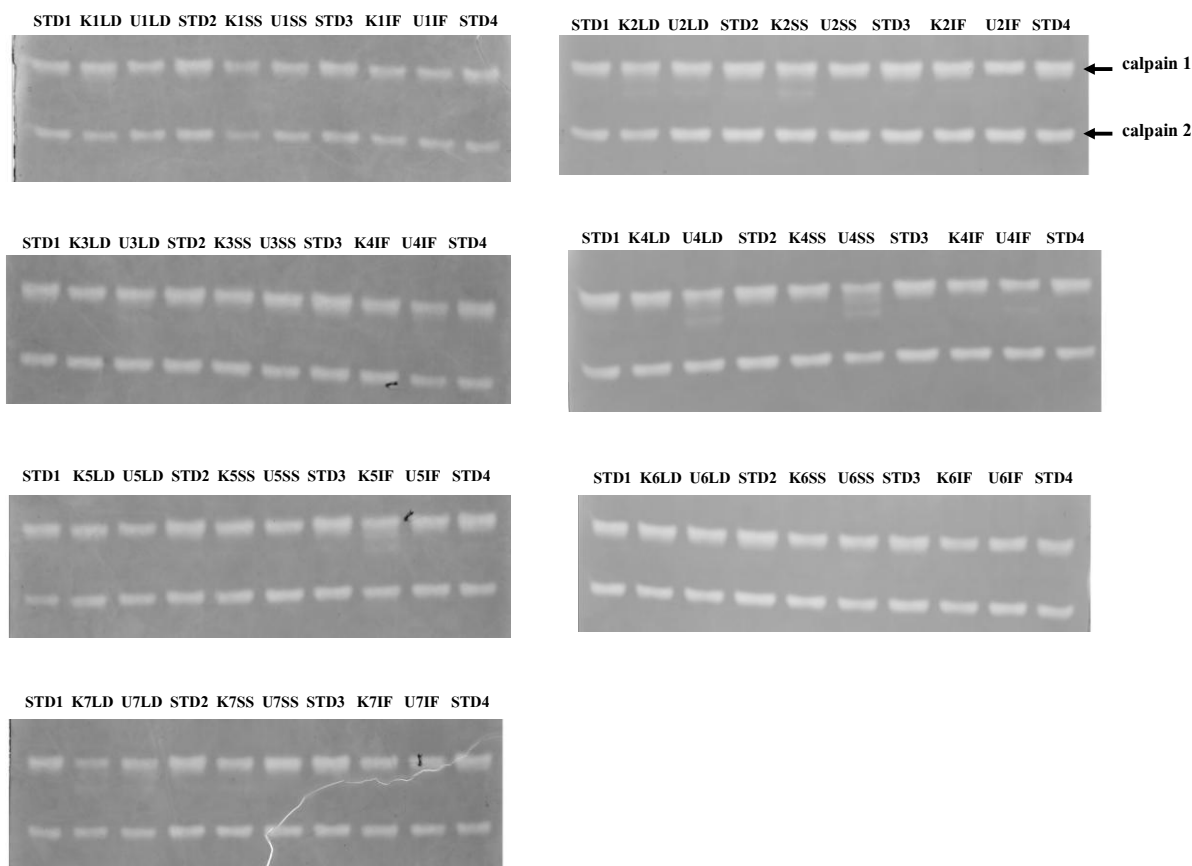
ภาพผนวกที่ 1 Myosin Heavy chain isoform แยกด้วย Electrophoresis

โดยภาพนี้มาจากโคตัวที่ 1 - 7 จากกลุ่มโคกาญจนบุรี (K) และ อุบลราชธานี (U) และ กล้ามเนื้อ 3 ชนิด *Longissimus dorsi* (LD) *Infraspinatus* (IF) และ *Supraspinatus* (SS) โดยใช้ตัวอย่างกล้ามเนื้อ *Masseter* (MA) *Diaphragm* (DI) *Trapezius* (TZ) และ *Cutaneous trunci* (CT) เป็นมาตรฐานในการบอกชนิดของ MHC โดยใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 4 ไมโครกรัมต่อเลน



ภาพผนวกที่ 2 Immunoreactivity ของ Troponin-T

โดยภาพนี้มาจากโคตัวที่ 1 -4 จากกลุ่มโคกายจนบุรี (K) และ อุบลราชธานี (U) และ กล้ามเนื้อ 3 ชนิด คือ *Longissimus dorsi* (LD) *Infraspinatus* (IF) และ *Supraspinatus* (SS) โดยใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 100 ไมโครกรัมต่อเลน M คือ โปรตีนมาตรฐาน Precision Plus Protein Standard (Biorad)



ภาพผนวกที่ 3 Zymogram ของ calpain activity

Zymogram ของโคตัวที่ 1-7 จากกลุ่มโคกาญจนบุรี(K) และ อุบลราชธานี(U) และกล้ามเนื้อ 3 ชนิด คือ *Longissimus dorsi* (LD) *Infrapinatus* (IF) และ *Supraspinatus* (SS) โดยใช้ ตัวอย่างกล้ามเนื้อมาตรฐาน ใส่ลงเจล ตำแหน่ง (STD 1- 4) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเจล โดยแต่ละตัวอย่างสกัดจากเนื้อโคที่น้ำหนักเท่ากันคือ 0.2 กรัม