

รายงานการวิจัย
(ฉบับสมบูรณ์)

เรื่อง

การศึกษาการทำงานและการแสดงออกของเอนไซม์กลุ่มคาลเพน
และคาลปาสเทตินในเนื้อวางระหว่างการเก็บบ่ม

Study of Calpain/Calpastatin Enzyme Activity and Expression
in Deer Meat During Aging Storage

โดย

ผศ.ดร. กัญญา

จิระเจริญรัตน์

รศ.ดร. กัญญา

ตันติวิสุทธิกุล

นางสาวอรพิน

พิมพ์สมแดง

RCH
QP
609
•C26
กชชก

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 115221
วัน,เดือน,ปี..... 22 ก.พ. 2553

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2551 บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับงานวิจัยที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่ายหรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสาร

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12286199
b.....
i.....

รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการ

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การศึกษาการทำงานและการแสดงออกของเอนไซม์กลุ่มคาลเปินและคาลปาสเตตินในเนื้อวางระหว่างการเก็บบ่ม

(ภาษาอังกฤษ) Study of Calpain/Calpastatin Enzyme Activity and Expression in Deer Meat During Aging Storage

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก เงินงบประมาณแผ่นดิน บัณฑิตวิทยาลัย

ประจำปีงบประมาณ 2551 จำนวนเงิน 458,360 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2550 ถึง 30 กันยายน 2551

1) หัวหน้าโครงการวิจัย

ผศ.ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์ (Assist.Prof.Dr. Kanya Jirajaroenrat)

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ถ.ฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

โทรศัพท์: 02-737-7000 ต่อ 6047 โทรสาร: 02-326-4313

มือถือ: 089-751-4162

อีเมล: kanyakmitl@yahoo.com

บทบาทในการทำการวิจัย: ควบคุมและดูแลงานวิจัยในส่วนห้องปฏิบัติการ

2) ผู้ร่วมโครงการวิจัย 1

รศ.ดร. กัญญา ตันตวิสุทธิกุล (Assoc.Prof.Dr. Kunya Tuntivisoottikul)

ภาควิชาครุศาสตร์เกษตร คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

โทรศัพท์: 02-737-7000 ต่อ 3699 โทรสาร: 02-326-4324

มือถือ: 081-433-4774

อีเมล: ktkunya@kmitl.ac.th

บทบาทในการทำการวิจัย: ควบคุมและดูแลการเก็บตัวอย่างสัตว์

3) ผู้ร่วมโครงการวิจัย 2

น.ส. อรพิน พิมพ์สมแดง (Miss Orapin Pimsomdaeng)

นักศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ถ.ฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ระดมทุนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

บทบาทในการทำการวิจัย: ผู้ช่วยวิจัย

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาการทำงานและการแสดงออกของเอนไซม์กลุ่มคาลเปินและคาลปาสเตติน ในเนื้อกวางระหว่างการเก็บปม

กัญญา จิระเจริญรัตน์¹ กัญญา ตันติวิสุทธิกุล² และอรพิน พิมพ์สมแดง¹

¹ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

² คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเปินในกล้ามเนื้อสันนอก (*M. longissimus dorsi*) ของกวางรูซ่าหลังการฆ่า โดยนำตัวอย่างชิ้นเนื้อจากกวางจำนวน 10 ตัว มาตัดแบ่งเป็น 6 ส่วนเท่าๆ กัน ใส่ในถุงสุญญากาศและบ่มที่ห้องเย็นอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ตามระยะเวลาหลังการฆ่า 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน เมื่อวิเคราะห์ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (WBSF) พบว่า การบ่มเนื้อหลังการฆ่ามีผลทำให้เนื้อนุ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติด้วยค่า $p < 0.01$ โดยเนื้อที่ผ่านการบ่ม 1 วันมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 9.01 ± 0.83 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร และเมื่อบ่มถึง 21 วัน มีค่าเท่ากับ 4.34 ± 0.10 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์รูปแบบการสลายตัวของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อโดยการแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS-PAGE) พบว่าแถบโปรตีนที่มีขนาด 37 - 39 กิโลดาลตัน มีความเข้มลดลงขณะที่แถบโปรตีนขนาด 29 - 30 กิโลดาลตัน ปรากฏความเข้มเพิ่มขึ้น และเมื่อตรวจสอบยืนยันด้วยเทคนิค western blotting พบว่าโปรตีนดังกล่าวเป็นเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด troponin-T และเมื่อศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ μ -calpain และ m-calpain พบว่าเอนไซม์ μ -calpain มีปริมาณลดลงจากวันที่ 1 ถึง 14 หลังการฆ่า ขณะที่เอนไซม์ m-calpain ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วง 21 วันหลังการฆ่า เมื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์ μ -calpain มีกิจกรรมการทำงานลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติด้วยค่า $p < 0.01$ โดยมีค่าเท่ากับ 1.496 ± 0.423 ถึง 0.194 ± 0.278 หน่วยต่อกรัมของเนื้อในวันที่ 1 ถึง 21 หลังการฆ่า ขณะที่ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain และ calpastatin มีค่าลดลงเล็กน้อย ($p > 0.05$) โดยกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain มีค่าเท่ากับ 22.880 ± 9.642 ถึง 16.954 ± 8.340 หน่วยต่อกรัมของเนื้อ และกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin มีค่าเท่ากับ 9.934 ± 2.365 ถึง 6.820 ± 2.960 หน่วยต่อกรัมของเนื้อ ส่วนค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin มีค่าเท่ากับ 0.915, 0.758 และ 0.462 ตามลำดับ ดังนั้นในการศึกษานี้ยืนยันได้ว่าในเนื้อกวางรูซ่า เอนไซม์ μ -calpain เป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เนื้อมีความนุ่มเมื่อเทียบกับเอนไซม์ m-calpain and calpastatin และทำให้ทราบว่าการบ่มกล้ามเนื้อสันนอกของเนื้อกวางรูซ่าเพียง 14 วันหลังการฆ่าน่าจะเพียงพอและยังช่วยลดต้นทุนในการผลิตลงอีกด้วย

Study of Calpain/Calpastatin Enzyme Activity and Expression in Deer Meat During Aging Storage

Kanya Jirajaroenrat¹, Kunya Tuntivisoottikul² and Orapin Pimsomdaeng¹

¹ Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

² Faculty of Industrial Education, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

Abstract

The objectives of this work were to study pattern of myofibrillar protein degradation as well as expression and activity of calpain enzyme system in the *longissimus dorsi* (LD) muscle of rusa deer (*Cervus timorensis*). The LD muscles (n = 10) were equally divided into 6 pieces, vacuum stored at 0-4°C and analyzed at day 1, 3, 5, 7, 14 and 21 postmortem. Warner-Bratzler shear force (WBSF) determination found that postmortem storage resulted in an increase in meat tenderness with a highly significant reduction of WBSF from 9.01±0.83 kg/cm² at day 1 to 4.34±0.10 kg/cm² at day 21 (p<0.01). Analysis of the myofibrillar protein degradation pattern using SDS-PAGE revealed a decrease in the density of 37-39 kDa protein bands whereas the density of the 29-30 kDa bands was found to increase. Western blotting analysis confirmed that the bands were troponin-T and its degraded products. Study of the expression of μ -calpain and m-calpain showed that μ -calpain was observed from day 1 to day 14 whereas m-calpain was constant over the 21 days of storage. Determination of the enzyme activity indicated that the μ -calpain activity decreased significantly from 1.496±0.423 to 0.194±0.278 units/g of meat (p<0.01), whereas m-calpain activity (22.880±9.642 to 16.954±8.340 units/g of meat) and calpastatin activity (9.934±2.365 to 6.820±2.960 units/g of meat) slightly decreased (p>0.05). The correlation between WBSF values and the three enzymes; μ -calpain, m-calpain and calpastatin activities, were 0.915, 0.758 and 0.462 respectively. Therefore, this study confirmed that in the case of rusa deer, μ -calpain is a key factor controlling postmortem meat tenderness compared to m-calpain and calpastatin, and suggested that storage of 14 days is enough to achieve aging of the LD muscle, which may help to reduce the cost of meat production.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ	
ภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
สารบัญ.....	III
สารบัญตาราง.....	XII
สารบัญภาพ.....	XIII
รายการคำย่อ.....	X
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์.....	2
1.3 สถานที่ดำเนินงานวิจัย.....	2
1.4 ขั้นตอนการศึกษา.....	2
1.5 ระยะเวลาการดำเนินงานวิจัย.....	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ชนิดและลักษณะโดยทั่วไปของกวาง.....	4
2.2 โครงสร้างของเส้นใยกล้ามเนื้อ.....	7
2.3 กระบวนการทางชีวเคมีของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย.....	12
2.4 โปรตีนในกล้ามเนื้อสัตว์.....	15
2.4.1 โปรตีนในกลุ่มซาร์โคพลาสมิก (sarcoplasmic protein).....	15
2.4.2 โปรตีนในกลุ่มเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue protein)	15
2.4.3 โปรตีนในกลุ่มเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein).....	16
2.5 กระบวนการย่อยสลายโปรตีนภายหลังสัตว์ตาย	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลาย โปรตีนภายหลังสัตว์ตาย (post mortem proteolysis).....	17
2.6.1	The lysosomal proteinase	17
2.6.2	The proteasome complexes	18
2.6.3	The calpain system	19
2.7	ปัจจัยที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อ.....	21
2.8	คุณสมบัติของเอนไซม์กลุ่มคาลเปิน.....	21
2.9	คุณสมบัติของเอนไซม์คาลปาสเตติน.....	23
2.10	ความสำคัญของเอนไซม์กลุ่มคาลเปินที่มีต่อความนุ่มของเนื้อ.....	24
บทที่ 3	วิธีดำเนินงานวิจัย.....	27
3.1	ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....	27
3.2	การเก็บตัวอย่าง.....	27
3.3	การวัดค่าแรงตัดผ่านของเนื้อ (Warner-Bratzler shear force)	27
3.4	การวิเคราะห์โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ.....	28
3.4.1	การสกัดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ.....	28
3.4.2	การวัดความเข้มข้นโปรตีน.....	28
3.4.3	การเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์.....	29
3.4.4	การแยกโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	29
3.4.5	การวิเคราะห์โปรตีน troponin-T ด้วยเทคนิค western blotting.....	30
3.5	การวิเคราะห์โปรตีนเอนไซม์กลุ่มคาลเปิน.....	31
3.5.1	การสกัดโปรตีนเอนไซม์กลุ่มคาลเปิน.....	31
3.5.1.1	วิธีการสกัดโปรตีนในเอนไซม์กลุ่มคาลเปินสำหรับวิเคราะห์การ แสดงออกด้วยเทคนิค western blotting.....	31
3.5.1.2	วิธีการสกัดโปรตีนเอนไซม์กลุ่มคาลเปินสำหรับวิเคราะห์กิจกรรม การทำงานของเอนไซม์.....	31
3.5.2	การเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์.....	32
3.5.3	การแยกโปรตีนเอนไซม์กลุ่มคาลเปินด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	32
3.5.4	การวิเคราะห์โปรตีนกลุ่มเอนไซม์คาลเปินด้วยเทคนิค western blotting.....	33

เอกสารนี้เป็นเอกสาร
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.6 การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	33
3.6.1 การบรรจุคอลัมน์.....	33
3.6.2 การเติมตัวอย่างลงในคอลัมน์.....	34
3.6.3 การชะคอลัมน์.....	34
3.6.3.1 การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย NaCl แบบต่อเนื่อง (linear gradient method)	34
3.6.3.2 การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย NaCl แบบลำดับขั้น (stepwise method).....	35
3.7 การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเปิน.....	35
3.7.1 การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin	35
3.7.2 การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain.....	37
3.7.3 การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain	37
3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	38
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	39
4.1 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อในแต่ละระยะการบ่ม.....	39
4.2 รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเส้นใยกลามเนื้อในแต่ละระยะการบ่ม.....	42
4.3 การแสดงออกของเอนไซม์กลุ่มคาลเปินในแต่ละระยะเวลาการบ่มเนื้อ.....	44
4.3.1 ผลการแสดงออกของเอนไซม์ μ -calpain ในแต่ละระยะเวลาการบ่มเนื้อ....	44
4.3.2 ผลการแสดงออกของเอนไซม์ m-calpain ในแต่ละระยะเวลาการบ่มเนื้อ...	46
4.3.3 ผลการแสดงออกของเอนไซม์ calpastatin ในแต่ละระยะเวลาการบ่มเนื้อ...	48
4.4 การทดสอบความเข้มข้นของสารละลาย NaCl ที่เหมาะสมในการชะตัวอย่าง.....	48
4.4.1 ผลการชะคอลัมน์โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย NaCl แบบต่อเนื่อง (linear gradient method).....	48
4.4.2 ผลการชะคอลัมน์โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย NaCl แบบลำดับขั้น (stepwise method).....	50
4.5 การวิเคราะห์โปรตีนที่ชะด้วยคอลัมน์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเปนในแต่ระยะการป่ม.....	61
4.6.1 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain.....	61
4.6.2 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain.....	62
4.6.3 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin.....	63
4.7 สหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ กลุ่มคาลเปน.....	64
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	65
บรรณานุกรม.....	68
ภาคผนวก.....	73
ภาคผนวก ก สารเคมีและการเตรียมสารเคมี.....	74
ภาคผนวก ข ค่าการดูดกลืนแสงของ โปรตีนและค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ กลุ่มคาลเปน.....	83
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 กวางรูซ่า.....	6
2.2 โครงสร้างของเส้นใยกล้ามเนื้อ.....	9
2.3 โครงสร้างการเรียงตัวของไมโอไฟลาเมนต์.....	9
2.4 ลักษณะไมโอซินไฟลาเมนต์.....	10
2.5 โปรตีนในกลุ่มไมโอไฟลาเมนต์ชนิดบาง.....	11
2.6 ตำแหน่งโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของคอสตาเมอร์ในกล้ามเนื้อลาย.....	12
2.7 โครงสร้างของ The proteasome complexes.....	19
2.8 โครงสร้าง μ -calpain และ m-calpain.....	23
2.9 โครงสร้าง mRNA calpastatin ในแต่ละไอโซฟอร์ม.....	23
2.10 โครงสร้างโดยทั่วไปของ calpastatin.....	24
4.1 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและโปรตีน Tn-T ในกล้ามเนื้อสันนอก ของกวางรูซ่าที่ระยะการบ่ม 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วันหลังฆ่า.....	43
4.2 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ μ -calpain ในกล้ามเนื้อสันนอกของกวางรูซ่าที่ระยะการ บ่ม 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วันหลังฆ่า.....	45
4.3 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ m-calpain ในกล้ามเนื้อสันนอกของกวางรูซ่าที่ระยะการบ่ม 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วันหลังฆ่า.....	47
4.4 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างโปรตีน (means \pm SD) ที่ชะออกจากคอลัมน์ด้วย การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย NaCl แบบต่อเนื่องความเข้มข้นตั้งแต่ 20-400 mM (2 ml/fraction).....	49
4.5 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างโปรตีน (means \pm SD) ที่ชะออกจากคอลัมน์ด้วย สารละลาย 200 mM NaCl (2 ml/fraction).....	52
4.6 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างโปรตีน (means \pm SD) ที่ชะออกจากคอลัมน์ด้วย สารละลาย 400 mM NaCl (2 ml/fraction).....	53
4.7 ภาพ SDS-PAGE แสดงปริมาณโปรตีนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 200 mM NaCl.....	54
4.8 ภาพ SDS-PAGE แสดงปริมาณโปรตีนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 400 mM NaCl.....	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.9	กราฟแสดงค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain (means \pm SD) ชะด้วย สารละลาย 200 mM NaCl (2ml/fraction).....56
4.10	กราฟแสดงค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain (means \pm SD) ชะด้วย สารละลาย 400 mM NaCl (2ml/fraction).....57
4.11	กราฟแสดงค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin (means \pm SD) ชะด้วย สารละลาย 200 mM NaCl (2ml/fraction)..... 58
4.12	ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ของโปรตีนที่ชะจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 200 mM NaCl และสารละลาย 400 mM NaCl.....60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการคำย่อ

μg	=	ไมโครกรัม
μl	=	ไมโครลิตร
μm	=	ไมโครเมตร (ไมครอน)
μM	=	ไมโครโมลาร์
Ca ²⁺	=	แคลเซียมไอออน
CaCl ₂	=	แคลเซียมคลอไรด์
cm ³	=	ลูกบาศก์เซนติเมตร
g	=	กรัม
kDa	=	กิโลดาลตัน
kg/cm ²	=	กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร
M	=	โมลาร์
mg/ml	=	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ml	=	มิลลิลิตร
mM	=	มิลลิโมลาร์
MW	=	น้ำหนักโมเลกุล
NaCl	=	โซเดียมคลอไรด์
nm	=	นาโนเมตร
pH	=	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
SDS	=	โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต
SDS-PAGE	=	การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า
TCA	=	กรดไตรคลอโรอะซิติก
Tn-T	=	โปรตีนโทรโปนิน
Units/g of meat	=	ยูนิตต่อน้ำหนักเนื้อ 1 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

กวางรูซ่าจัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจทางเลือกชนิดหนึ่งสามารถให้ผลผลิตหลายอย่าง เช่น เขา กวางอ่อน เป็นยาอายุวัฒนะตามตำรับยาจีนสมัยโบราณ หนังเมื่อฟอกแล้วมีความนิ่มและเหนียว ทนทาน และการขายนี้อกวางนั้นเป็นเป้าหมายอีกประการในการเลี้ยงกวางรองลงมาจากเขากวางอ่อน (ธนากร ฤทธิ์โรสง. 2546) เนื้อกวางจัดว่าเป็นเนื้อที่มีความนุ่ม มีปริมาณ โปรตีนสูงแต่มีไขมันต่ำและมีแร่ธาตุอยู่หลายชนิด (Volpelli. 2003; Hoffman and Wiklund. 2006)

ความนุ่มของเนื้อ จัดเป็นคุณลักษณะที่สำคัญประการหนึ่งที่ผู้บริโภคได้ให้ความสนใจ โดยความนุ่มของเนื้อนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการทั้งปัจจัยก่อนสัตว์ตายได้แก่ ชนิด พันธุ์ เพศ และอายุสัตว์ ชนิดของกล้ามเนื้อและเส้นใยกล้ามเนื้อ ระดับการสะสมไขมัน รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของกล้ามเนื้อหลังสัตว์ตาย ซึ่งจะเป็นการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อทั้งสิ้น (Dransfield. 1994; Morton *et al.* 1999) นอกจากนี้การบ่มเนื้อยังมีผลต่อคุณภาพของเนื้ออีกด้วย (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และญาณิน โอภาสพัฒนกิจ. 2548) ในกลุ่มของเอนไซม์ย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย พบว่า เอนไซม์กลุ่มคาลเพนนั้นมีความสำคัญมากที่สุดและมีบทบาทในการทำให้เนื้อสัตว์นุ่มขึ้น โดยภายหลังสัตว์ตายจะมีการปลดปล่อยแคลเซียมออกจากซาร์โคพลาสมิก เรติคูลัม ไปกระตุ้นเอนไซม์คาลเพนที่อยู่ไนไซโคซอลให้เข้าย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ในบริเวณ Z-line โปรตีนไททิน เดสมิน โทรโปนินและเนบูลิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของกล้ามเนื้อ จึงมีผลทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้น ขณะเดียวกันเอนไซม์คาลปาสเตดินจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเพน ซึ่งจะส่งผลให้เนื้อสัตว์มีความนุ่มลดลง (Koochmaraie. 1992a, 1992b, 1994)

เนื่องจากปัจจุบันการศึกษาวิจัยเรื่องกวาง โดยส่วนใหญ่เน้นทางด้านการจัดการฟาร์มทำให้ข้อมูลทางวิชาการในเชิงลึกถึงระดับชีวโมเลกุลนั้นยังมีไม่มากนัก โดยเฉพาะด้านความนุ่มของเนื้อ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงถือว่าเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาเกี่ยวกับกวางในเชิงลึกด้านคุณภาพ สามารถนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้ ไปใช้ในการตัดสินใจในเรื่องระยะเวลาการบ่มเนื้อกวางรูซ่า เพื่อลดต้นทุนในการผลิตและมีเหมาะสมกับประเทศไทยอย่างแท้จริง

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อศึกษาความนุ่มในเนื้อสันนอกของกวางรูซ่าในแต่ละระยะการบ่ม
- 1.2.2 เพื่อศึกษารูปแบบการสลายตัวของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อในเนื้อสันนอกของกวางรูซ่าในแต่ละระยะการบ่ม
- 1.2.3 เพื่อศึกษาการแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเพนในเนื้อสันนอกของกวางรูซ่าในแต่ละระยะการบ่ม
- 1.2.4 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลุ่ม คาลเพนในเนื้อสันนอกของกวางรูซ่าในแต่ละระยะการบ่ม

1.3 สถานที่ดำเนินงานวิจัย

- 1.3.1 ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
- 1.3.2 ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
- 1.3.3 ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
- 1.3.4 ห้องปฏิบัติการเนื้อสัตว์ สาขาวิชาครุศาสตร์เกษตร คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
- 1.3.5 ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

1.4 ขั้นตอนการศึกษา

แบ่งการศึกษาออกเป็น 4 ขั้นตอน

- 1.4.1 ศึกษาความนุ่มในเนื้อสันนอกของกวางรูซ่า ที่ผ่านการบ่ม 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน
- 1.4.2 ศึกษาแบบการสลายตัวของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ในเนื้อสันนอกของกวางรูซ่า ที่ผ่านการบ่ม 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน
- 1.4.3 ศึกษาการแสดงออกและกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเพนในเนื้อสันนอกของกวางรูซ่า ที่ผ่านการบ่ม 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1.4.4 วิเคราะห์ทางสถิติ ค่าแรงตัดผ่านเนื้อและกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเปิน และสหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเปิน ในเนื้อสันนอกของควารูซ่า ที่ผ่านการบ่ม 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน

1.5 ระยะเวลาการดำเนินงานวิจัย

ใช้เวลาในการดำเนินการวิจัยและสรุปผลเป็นระยะเวลา 12 เดือน

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.6.1 ทราบถึงรูปแบบของการสลายตัวและการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อในเนื้อควารูซ่าในช่วงระยะเวลาการบ่มภายหลังสัตว์ตาย
- 1.6.2 ทราบถึงรูปแบบการแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเปินในเนื้อควารูซ่าในช่วงระยะเวลาการบ่มภายหลังสัตว์ตาย
- 1.6.3 ทราบถึงสหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเปินในเนื้อควารูซ่าในช่วงระยะเวลาการบ่มภายหลังสัตว์ตาย
- 1.6.4 สามารถนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้ ไปใช้ในการตัดสินใจในเรื่องระยะเวลาการบ่มเนื้อควารูซ่าที่เหมาะสมเพื่อลดต้นทุนในการผลิต

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชนิดและลักษณะโดยทั่วไปของกวาง

กวางจัดเป็นสัตว์กีบมีสี่กระเพาะสามารถกินหญ้าและใบไม้ต่าง ๆ ได้หลายชนิดและยังสามารถแทะเปลือกต้นไม้เป็นอาหารได้ด้วย นอกจากนี้ กวางยังจัดเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งในบรรดาสัตว์ที่มีกีบ เลี้ยวเอื้องและมีเขาผลัดได้ กวางมีจุดเด่นที่ไม่เหมือนใคร คือ เป็นสัตว์ที่ผลัดเขาได้ในเพศผู้ยกเว้นกวางเรนเดียร์ ที่เพศเมียมีเขาผลัดได้ด้วยเช่นกัน

ธนากร ฤทธิไธสง (2545) กล่าวว่า กวางอยู่ในวงศ์ Cervidae นั้น แบ่งออกได้เป็น 4 ตระกูลย่อย (sub-family) 17 ประเภท (genus) 40 พันธุ์ (species) และอีกประมาณ 200 ชนิด สัตว์ในวงศ์กวางเกือบทุกชนิดนั้น เป็นเพศผู้จะมีเขาผลัดได้ (antlers) ซึ่งมีลักษณะเป็นกระดูกที่งอกออกมาจากกะโหลกศีรษะ โดยอยู่ได้เพียงชั่วคราวก่อนที่จะหลุดไปในแต่ละปี ลักษณะพิเศษนี้เองที่ทำให้ต้องแบ่งแยกสัตว์พวกนี้ออกมาจากวงศ์ Bovidae หากพิจารณาจากภูมิอากาศของโลกเป็นสำคัญ สามารถแบ่งออกกวางได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ กวางเมืองหนาว พบได้ในทวีปยุโรป อเมริกาเหนือและเอเชียตอนใต้ และกวางเมืองร้อน (tropical) ซึ่งพบส่วนใหญ่ในทวีปเอเชียตอนกลางและตอนใต้

1. กวางเมืองหนาว ได้แก่

1.1 กวางแดง มีชื่อสามัญคือ Red deer และชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Cervus elaphus* มีถิ่นกำเนิดทั่วไปในยุโรป พบมากในทวีปยุโรปตอนกลาง สาเหตุที่เรียกชื่อว่ากวางแดงนั้น เป็นเพราะมีสีแดงน้ำตาลที่สวยงาม กวางแดงเพศผู้มีเขาขนาดใหญ่และแตกกิ่งสวยงาม เพศผู้โตเต็มวัยมีน้ำหนักประมาณ 200 กิโลกรัม สูง 122 เซนติเมตร ในขณะที่เพศเมียโตเต็มวัยมีน้ำหนักประมาณ 90-100 กิโลกรัม สูง 90 เซนติเมตร

1.2 กวางฟอลโล มีชื่อสามัญว่า Fallow deer และชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dama dama* เป็นกวางที่มีถิ่นกำเนิดอยู่บริเวณยุโรปตอนใต้และเอเชียไมเนอร์ เพศผู้โตเต็มวัยมีน้ำหนักประมาณ 90-100 กิโลกรัม สูงประมาณ 90 เซนติเมตร เพศเมียน้ำหนักโตเต็มวัยประมาณ 40-45 กิโลกรัม สูงประมาณ 76 เซนติเมตร

1.3 กวางเอลก์ หรือวาปีติ ชื่อสามัญ Wapiti deer ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Cervus canadensis* มีถิ่นกำเนิดที่ทวีปอเมริกา โดยเพศผู้โตเต็มวัยมีน้ำหนักถึง 500 กิโลกรัม ในขณะที่เพศเมียโตเต็มวัยมีน้ำหนัก 480 กิโลกรัม สูง 140-150 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 กวางเรนเดียร์ ชื่อมาจากภาษาอังกฤษ Reindeer และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Rangifer tarandus tarandus* มีถิ่นกำเนิดอยู่ยุโรปแถบเหนือ คือ จากบริเวณรัสเซียตอนเหนือไปจนถึงมองโกเลียตอนใต้ซึ่งเป็นบริเวณใกล้ขั้วโลกเหนือ กวางเรนเดียร์ที่เลี้ยงกันอยู่ในประเทศแคนาดาและกรีนแลนด์นั้น เป็นกวางที่คนเรานำไปเลี้ยงเป็นฟาร์ม ลักษณะทั่วไป เพศผู้มีสีน้ำตาลเทาถึงสีขาวทั้งตัว โดยได้ท้องมีสีขาว และสามารถเปลี่ยนแปลงสีได้ตามฤดูกาล ทั้งเพศผู้และเพศเมียโตเต็มวัยมีเขาขนาดใหญ่ สูงประมาณ 110-140 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 320-380 กิโลกรัม

1.5 กวางมูส ชื่อกวางชนิดนี้มาจากภาษาอังกฤษ Moose มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Moschus moschiferus* มีถิ่นที่อยู่ดั้งเดิม คือ แถบเอเชียกลางและเอเชียตะวันออกเฉียงเหนือ สำหรับกวางมูสที่มีอยู่ตามธรรมชาตินั้น กำลังจะสูญพันธุ์เพราะการฆ่าเพื่อนำเอาน้ำมันไปใช้เป็นส่วนผสมของหัวน้ำหอม ลักษณะทั่วไปมีขนตามตัวยาวและแข็ง สีจะเปลี่ยนไปตามฤดูกาล สูงประมาณ 160 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 900-1,200 กิโลกรัม

2. กวางเมืองร้อน ได้แก่

2.1 กวางม้าหรือกวางป่า ชื่อสามัญคือ Sambar deer และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cervus unicolor* มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ทวีปเอเชีย คือ อินเดีย มาเลเซีย สุมาตรา จีน ไต้หวัน ไทย ลาว กัมพูชา และพม่า ลักษณะโดยทั่วไป มีสีน้ำตาลเข้ม ขนสั้นและหยาบ มีความสูงประมาณ 140 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 185-260 กิโลกรัม

2.2 เนื้อทราย ชื่อสามัญ Indochinese Hog deer ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cervus porcinus* เป็นสัตว์ป่าขนาดกลาง สูงประมาณ 65-72 เซนติเมตร น้ำหนัก 70-110 กิโลกรัม พบได้ในอินเดีย เนปาล พม่า กัมพูชา ลาว เวียดนาม และไทย ปัจจุบันพบยากมากในป่าธรรมชาติ แต่มีการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ตามสวนสัตว์ของรัฐบาลและเอกชนหลายแห่ง

2.3 ละมั่ง มีชื่อสามัญว่า Eld's deer ถ้าเพศเมียจะนิยมเรียกว่า ละอง ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cervus eldi* เป็นกวางที่มีรูปร่างสูงเพรียวและมีขนาดเล็กกว่ากวางม้าเล็กน้อย สูงประมาณ 120-130 เซนติเมตร น้ำหนักเพศเมีย 100 กิโลกรัม เพศผู้ 150 กิโลกรัม ละมั่งพบได้ในไต้หวัน กัมพูชา ลาว เวียดนาม พม่า และไทย อย่างไรก็ตามในป่าตามธรรมชาตินั้นหาละมั่งได้ยากมากแต่ตามสวนสัตว์ยังคงมีอยู่หลายแห่งในประเทศไทย

2.4 เก้งธรรมดา ชื่อสามัญ Common barking deer ชื่อวิทยาศาสตร์ *Muntiacus muntjak* ชื่อพื้นเมือง เก้ง อีเก้ง ฟาน เป็นสัตว์ป่าขนาดเล็ก สูงประมาณ 50-65 เซนติเมตร น้ำหนัก 20-28 กิโลกรัม พบอยู่แถวทวีปเอเชีย คือ ศรีลังกา อินเดีย เนปาล จีน ลาว กัมพูชา เวียดนาม พม่า มาเลเซีย สุมาตรา บอร์เนียว ชวา และในประเทศไทยพบได้ทั่วไป โดยเฉพาะในเขตอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ภูกระดึง ฯลฯ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งใหญ่นเรศวร ห้วยขาแข้ง ภูเขียวน ฯลฯ

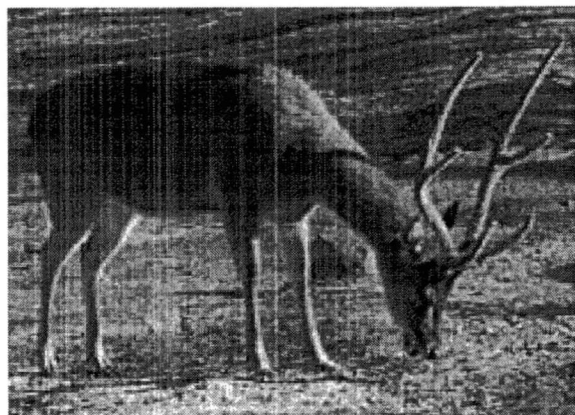
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 เก้งหม้อ ชื่อสามัญ Fea's barking deer ชื่อวิทยาศาสตร์ *Muntiacus feael* ชื่อพื้นเมืองคือ เก้งหม้อ เก้งดำ หรือเก้งจุก ลักษณะทั่วไป เป็นสัตว์ป่าขนาดเล็ก น้ำหนักประมาณ 122 กิโลกรัม ปัจจุบันพบยากมากในป่าธรรมชาติ จึงจัดเป็นสัตว์สงวนชนิดหนึ่ง

2.6 สมัน ชื่อสามัญ Schomburgk's deer ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cervus schomburki* เป็นสัตว์ป่าประเภทกวางที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่และได้สูญพันธุ์ไปแล้ว เป็นสัตว์ที่พบได้ในประเทศไทยเพียงแห่งเดียว

2.7 กวางดาว ชื่อสามัญ Chital deer ชื่อวิทยาศาสตร์ *Axis axis* มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดียและศรีลังกา นำเข้ามาเลี้ยงตามสวนสัตว์ในประเทศไทยตั้งแต่สมัยรัชกาลที่ 5 เพศผู้โตเต็มวัยมีความสูงประมาณ 84-86 เซนติเมตร น้ำหนัก 80-100 กิโลกรัม เพศเมียโตเต็มวัยสูง 75 เซนติเมตร น้ำหนัก 50-60 กิโลกรัม หากดูรูปร่างจะคล้ายเนื้อทรายมากเพราะเตี้ยและน้ำหนักไม่มาก สีของกวางดาวเป็นพื้นสีน้ำตาล ตลอดลำตัวถึงกลางหลังมีจุดขาวอยู่ทั่วไปจึงมองดูสวยงามมาก

2.8 กวางรูซ่า (ภาพที่ 2.1) ชื่อสามัญ Rusa deer ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cervus timorensis* เป็นกวางที่มีถิ่นกำเนิด ณ เกาะชวาของประเทศอินโดนีเซีย เป็นกวางขนาดกลาง เพศผู้โตเต็มวัยสูง 110 เซนติเมตร น้ำหนัก 65-95 กิโลกรัม สีขนเป็นสีน้ำตาลทั่วตัว บริเวณใต้คอและใต้ท้องสีน้ำตาลอ่อน กวางรูซ่าถือว่าเป็นญาติทางสายเลือดที่ใกล้ชิดกับกวางม้า ดังนั้น จึงสามารถผสมข้ามพันธุ์ได้ กวางรูซ่ามีเขาที่ได้ขนาดพอดี คือ อยู่ในระดับกลาง ๆ เนื่องจากกวางรูซ่าเป็นกวางที่นำเข้ามาจากเกาะนิวกาลีโดเนีย ประเทศฝรั่งเศส ดังนั้นจึงสามารถนำมาเลี้ยงได้โดยที่ไม่มีปัญหาในด้านกฎหมายแต่อย่างใด นอกจากนี้ในประเทศออสเตรเลียจะมีกวางรูซ่าอีกชนิดหนึ่ง เรียกว่า โมล็กกันรูซ่า มีชื่อวิทยาศาสตร์เหมือนกันแต่เป็นกวางที่มีขนาดตัวเล็กกว่ากวางรูซ่าที่นำเข้ามาจากนิวกาลีโดเนีย ผลผลิตที่ได้จึงต่ำกว่ากวางรูซ่าจากเกาะนิวกาลีโดเนีย



ภาพที่ 2.1 กวางรูซ่า

ที่มา: Anonymus. (2010a)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 โครงสร้างของเส้นใยกล้ามเนื้อ

กล้ามเนื้อเป็นเนื้อเยื่อที่มีมากที่สุดในร่างกาย ประมาณ 45-50 % ของน้ำหนักตัวสัตว์ คุณสมบัติพื้นฐานของเซลล์กล้ามเนื้อ คือ มีความไวต่อสิ่งเร้า (excitable cell) และสามารถส่งสัญญาณไฟฟ้า (action potential) ไปตามส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ได้เหมือนเซลล์ประสาท เมื่อกล้ามเนื้อหดตัวจะทำให้เกิดแรงและการเคลื่อนไหวของส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย (กัลยพงษ์ จตุรพาณิชย์, 2542) เส้นใยกล้ามเนื้อ (muscle fiber) หรือเซลล์กล้ามเนื้อ (muscle cell) เป็นหน่วยโครงสร้างที่สำคัญของกล้ามเนื้อโครงร่าง (skeletal muscle) เป็นประเภททวินิวเคลียส มีรูปร่างเป็นเส้นกลมยาวคล้ายเส้นด้าย ปลายทั้ง 2 ข้างสอบแหลม และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-100 ไมครอน มีความยาวที่แปรปรวนสูง แต่ส่วนใหญ่จะยาวประมาณ 2.5 เซนติเมตร และยาวไม่เท่ากับความยาวของกล้ามเนื้อทั้งหมด ลักษณะเฉพาะตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อโครงร่าง คือ มีลายปรากฏอยู่ตลอดลายดังกล่าวเป็นผลมาจากลายภายในเส้นใยย่อย (myofibril) โดยภายในแต่ละเส้นใยกล้ามเนื้อจะมีเส้นใยย่อย เรียงตัวตามยาวอัดแน่นกันอยู่อย่างเป็นระเบียบ เส้นใยย่อยเหล่านี้อาจมีจำนวนมากถึง 1,000 เส้นต่อ 1 เส้นใยกล้ามเนื้อ (ชัยณรงค์ คันธพนิต, 2529)

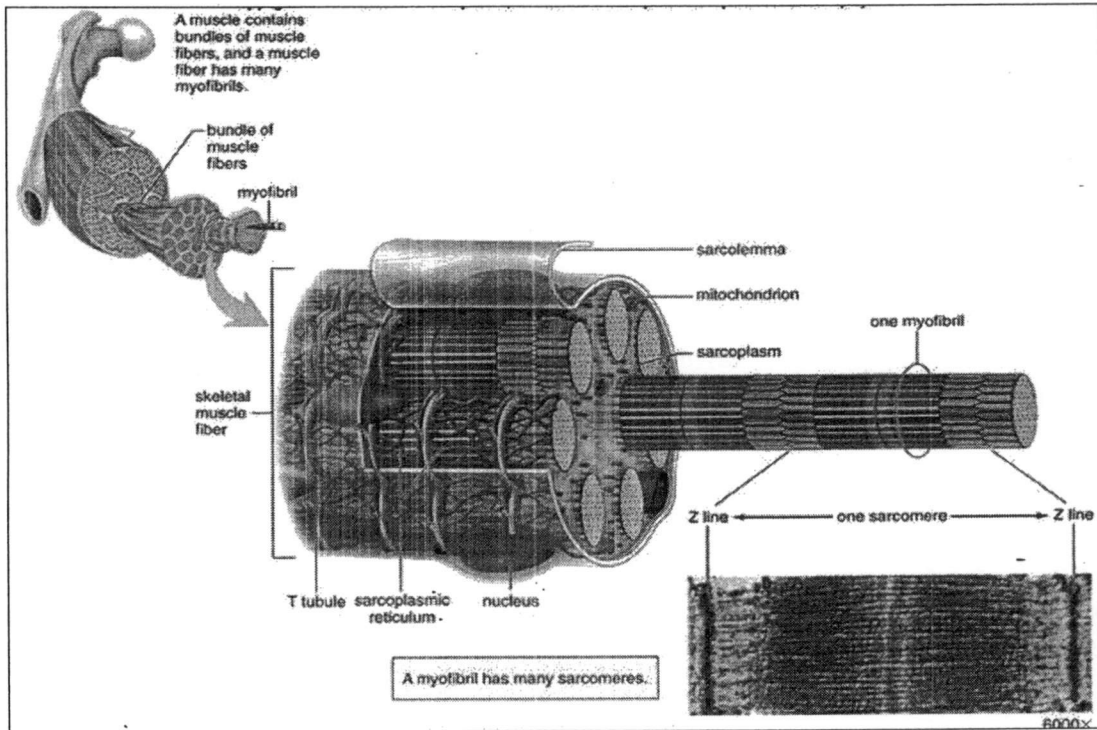
ชัยณรงค์ คันธพนิต (2529) กล่าวว่า เส้นใยกล้ามเนื้อประกอบด้วยองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้ (ภาพที่ 2.2)

1. ซาร์โคเลมมา (sarcolemma) เยื่อหุ้มเส้นใยหรือเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เป็นเยื่อบาง ๆ ที่ห่อหุ้มโดยรอบเส้นใยกล้ามเนื้อจนสามารถแยกเส้นใยแต่ละเส้นออกจากกัน ได้อย่างชัดเจน
2. นิวเคลียส (nucleus) เส้นใยกล้ามเนื้อเป็นประเภททวินิวเคลียส (นิวเคลียสหลายอัน) โดยจะพบอยู่ภายนอกเส้นใยติดกับเยื่อหุ้มเส้นใย และมีรูปร่างวงรี เรียงตัวไปตามแนวยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อ
3. กอลจิคอมเพลกซ์ (golgi complex) เป็นโครงสร้างประกอบด้วยถุงท่อแฉ่วนลอยอยู่ในซาร์โคพลาสซึม ทำหน้าที่เป็นแหล่งรวบรวมผลผลิตที่ได้จากขบวนการย่อยสลายภายในเซลล์
4. ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เป็นโครงสร้างที่มีรูปร่างเป็นแท่งรูปวงรี พบในที่ว่างระหว่างเส้นใยย่อยได้เยื่อหุ้มเส้นใยและมักอยู่ตามบริเวณใกล้เส้น Z-line ไมโทคอนเดรีย ทำหน้าที่ในการเก็บรักษาพลังงานจากอาหารโดยผ่าน Krebs cycle แล้วจึงแปรสภาพเป็นพลังงานรูป ATP
5. ซาร์โคพลาสซึม (sarcoplasm) เป็นสารกึ่งของเหลวอยู่ภายในเส้นใยกล้ามเนื้อและหล่อเลี้ยงโครงสร้างย่อยต่าง ๆ ภายในเซลล์กล้ามเนื้อ เช่น สารย่อยไกลโคเจน (glycolytic enzyme) ไมโอโกลบิน (myoglobin) ไโรโบโซม และเม็ดไขมันต่าง ๆ
6. ไลโซโซม (lysosome) มีรูปร่างเหมือนถุงเล็ก ๆ ที่มีสารย่อยหลายชนิดอยู่ภายใน เช่น เอนไซม์คาร์เธปซิน (cathepsin) ซึ่งมีความสามารถในการย่อยโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อได้ในกรณีที่เก็บเนื้อหรือแช่ซากไว้ในห้องเย็นเป็นเวลานานนั้น เนื้อจะนุ่มได้เพราะเอนไซม์คาร์เธปซินได้ย่อยสลายโปรตีนในเนื้อสัตว์ จึงมีผลทำให้เนื้อมีความนุ่มมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการวิจัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

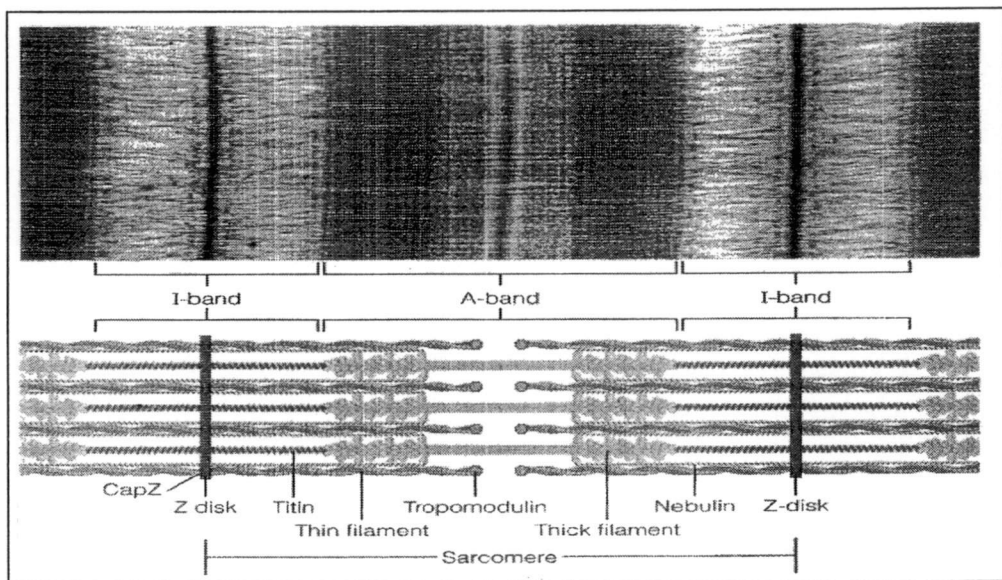
7. ซาร์โคพลาสมิก เรติคูลัม (sarcoplasmic reticulum; SR) และท่อที (T-tubules) ซาร์โคพลาสมิก เรติคูลัม คือ เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมในเซลล์อื่นๆ ไป และอาจหมายถึง ระบบท่อในผนังหุ้ม ซึ่งสามารถสร้างเป็นโครงข่ายหุ้มโดยรอบเส้นใยย่อยแต่ละเส้นอยู่ ถึงแม้ว่า ซาร์โคพลาสมิกเรติคูลัม กับท่อทีจะอยู่ใกล้ชิดกันมาก แต่ท่อทีจะเกี่ยวข้องกับซาร์โคเลมมามากกว่า ในขณะที่ซาร์โคพลาสมิก เรติคูลัม นั้นเป็นสถานที่สะสม Ca^{2+} เมื่อเส้นใยกล้ามเนื้ออยู่ในสภาวะพักตัว (relax)

8. ไมโอไฟบริล หรือเส้นใยย่อย (myofibrils) มีโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นเส้นใยเล็ก ๆ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1 ไมครอน (μm) เรียงตัวขนานกันไปตามความยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อและภายในเส้นใยกล้ามเนื้อ 1 เส้นจะมีจำนวนของไมโอไฟบริลมากถึง 1,000 เส้น ไมโอไฟบริลแต่ละเส้นจะประกอบขึ้นด้วยมัดของเส้นใยกล้ามเนื้อขนาดเล็กจำนวนมาก ที่เรียกว่า ไมโอฟิลาเมนต์ (myofilament) ซึ่งมีด้วยกัน 2 ชนิด คือ ไมโอฟิลาเมนต์ชนิดหนา (thick filament) และไมโอฟิลาเมนต์ชนิดบาง (thin filament) โดยเส้นใยทั้ง 2 ชนิด จะวางตัวอยู่ในแนวขนานตามยาวกับไมโอไฟบริล ทำให้เห็นกล้ามเนื้อที่มีลักษณะลายและมีบางส่วนซ้อนกันทำให้เกิดแถบมืดและแถบสว่าง แถบมืดจะมีส่วนที่มีค่าน้อยกว่าอยู่ตรงกลาง เรียกว่า H band ซึ่งจะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วนด้วยเส้นทึบที่เรียกว่า M line ส่วนแถบสว่างก็จะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กันด้วยเส้นทึบที่เรียกว่า Z-line ซึ่งโครงสร้างของไมโอไฟบริล จาก Z-line หนึ่งไปยังอีก Z-line หนึ่งเรียกว่า ซาร์โคเมียร์ (sarcomere) (สัญญาชัย จตุรสิทธิ์ธา. 2547) เส้นเขตพื้นที่ของแต่ละซาร์โคเมียร์ จะพบแถบทึบแสงอยู่บริเวณส่วนกลาง เรียกว่า A-band ซึ่งมาจากคำว่า Anisotrope ส่วนแถบโปร่งแสงมีพื้นที่อยู่ข้างละครึ่งของ Z-line เรียกว่า I-band ที่มาจากคำว่า Isotrope (ชัยณรงค์ คันธพนิต. 2529) (ภาพที่ 2.3) บริเวณแถบมืดซาร์โคเมียร์จะมี ไมโอฟิลาเมนต์ชนิดหนา (thick filament) และในแถบสว่างจะมี ไมโอฟิลาเมนต์ชนิดบาง (thin filament) โดยบริเวณที่มีค่าน้อยหรือทึบมากที่สุดของ A-band จะเห็น ไมโอฟิลาเมนต์ ทั้ง 2 ชนิดวางซ้อนกันอยู่และบริเวณที่มีความทึบน้อยของ A-band จะพบว่า มีเฉพาะไมโอฟิลาเมนต์ชนิดหนา (thick filament) อยู่เท่านั้นเรียกบริเวณนี้ว่า H-zone (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของเส้นใยกล้ามเนื้อ

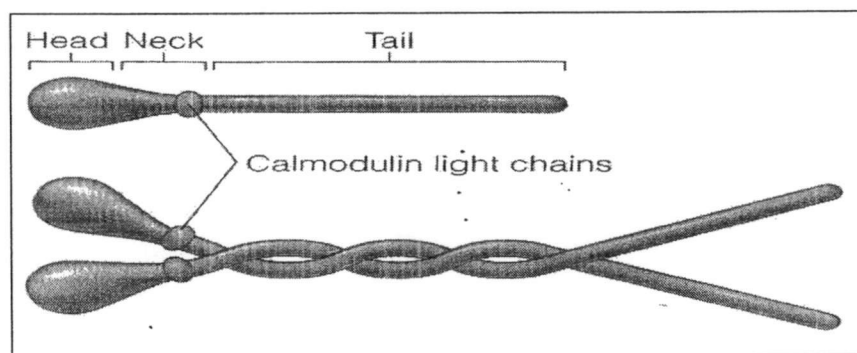
ที่มา : Anonymous. (2010b)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างการเรียงตัวของไมโอไฟลาเมนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ที่มา : Moyes and Schulte. (2008)
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Moyes and Schulte. (2008) กล่าวว่า ไมโอไฟลาเมนต์ชนิดหนา จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 14-16 นาโนเมตร ยาวประมาณ 1.5 ไมครอน และประกอบด้วยโปรตีนไมโอซิน (myosin) เกือบจะทั้งหมด ดังนั้นจึงเรียกชื่อกันโดยทั่วไปว่าไมโอซินฟิลาเมนต์ (myosin filament) มีลักษณะเป็นรูปกลมยาว โดยที่ส่วนปลายด้านหนึ่งเป็นบริเวณส่วนหัว (head region) มีลักษณะเป็นก้อนหนา และส่วนหาง (tail region) มีลักษณะเป็นแท่งกลมยืดยาวออกมา โดยมีส่วนเชื่อมระหว่างหัวกับหาง เรียกว่า คอ (neck) (ภาพที่ 2.4)

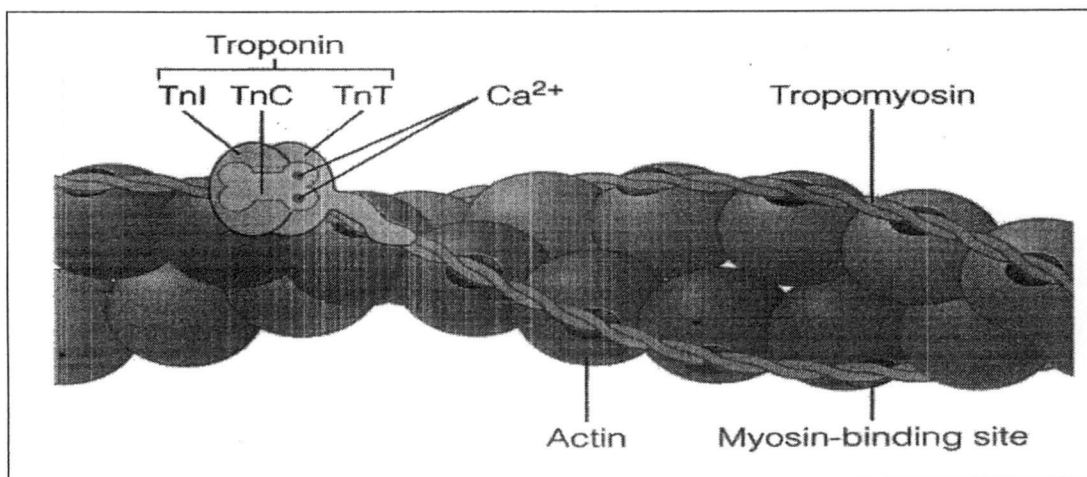


ภาพที่ 2.4 ลักษณะไมโอซินฟิลาเมนต์

ที่มา : Moyes and Schulte. (2008)

ไมโอไฟลาเมนต์ชนิดบาง จะประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด ได้แก่ โปรตีนแอกติน (actin), โทรโปไมโอซิน (tropomyosin) และโทรโปนิน (troponin) โดยโปรตีน actin มีโครงสร้าง 2 แบบ ได้แก่ โปรตีน G-actin (globulin actin) มีลักษณะเป็นก้อนกลมอยู่ในสภาพโมเลกุลเดี่ยว และโปรตีน F-actin (fibrous actin) เป็นโครงสร้างของโปรตีน G-actin ต่อกันเป็นเป็นสายยาว โดยที่ F-actin 2 เส้นจะม้วนตัวเข้าหากันเป็นลักษณะเกลียวเชือก (Warriss. 2000) ส่วนโปรตีน troponin ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย คือ โปรตีนโทรโปนิน ไอ (troponin I; Tn-I) มีขนาด 24 kDa (Wu. 2004) โปรตีนโทรโปนิน ซี (troponin C; Tn-C) มีขนาด 18 kDa (Davis *et al.* 2004) และโปรตีนโทรโปนิน ที (troponin T; Tn-T) มีขนาด 39 และ 37 kDa (Ho *et al.* 1994) มีหน้าที่จับกับ Ca^{2+} เพื่อการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ (Warriss. 2000) และโปรตีน tropomyosin มีลักษณะเป็นเส้นพันอยู่กับ G-actin และวางตัวตามลักษณะเกลียวเชือกและอยู่ในร่องของ F-actin (ภาพที่ 2.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



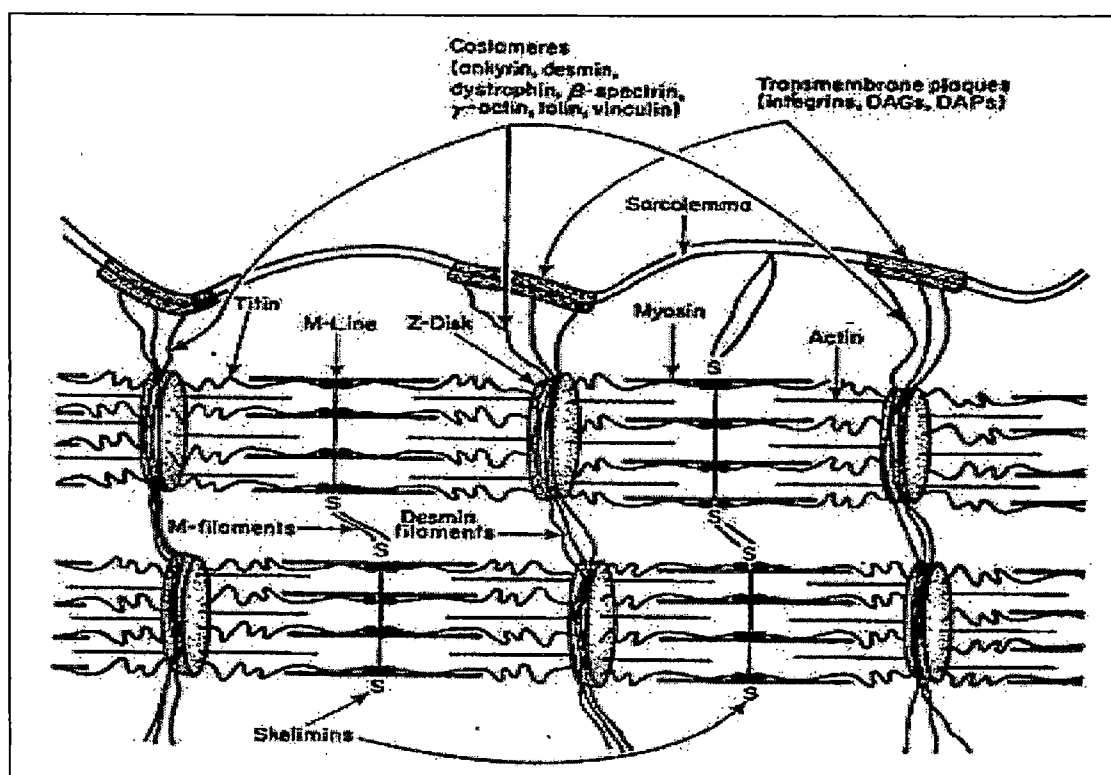
ภาพที่ 2.5 โปรตีนในกลุ่มไมโอไฟลาเมนต์ชนิดบาง

ที่มา : Moyes and Schulte. (2008)

Warris. (2000) กล่าวว่า ภายในเซลล์กล้ามเนื้อจะมีโครงร่างกล้ามเนื้อที่ทำหน้าที่รักษาโครงสร้างและยึดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein) ให้อยู่ในตำแหน่งต่างๆ โดยประกอบด้วยกลุ่มโปรตีนโครงร่าง (cytoskeletal protein) ที่สำคัญได้แก่โปรตีนไททิน (titin, connectin) เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่มากประมาณ 3,000 kDa เชื่อมโปรตีน myosin ของเส้นใยไมโอไฟลาเมนต์ชนิดหนากับ Z-disk และโปรตีนเนบูลิน (nebulin) มีขนาดประมาณ 500 kDa เกาะอยู่กับโปรตีน actin ทำหน้าที่เป็นตัวรักษาทิศทางของฟิลาเมนต์ให้อยู่ในระนาบเดียวกันกับไมโอไฟบริล นอกจากนี้ยังเป็นตัวป้องกันไม่ให้ซาร์โคเมอร์ยืดและหดตัวมากเกินไป และบริเวณ Z-disk ประกอบด้วยโปรตีนแอลฟา แอคตินิน (α -actinin) และโปรตีนเดสมิน (desmin) อีกด้วย

นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างที่เรียกว่าคอสตาเมอร์ (costameres) ที่เชื่อมไมโอไฟบริลกับซาร์โคเลมมา ซึ่งประกอบด้วย โปรตีนหลายชนิด ได้แก่ แกรมม่า-แอคติน (γ -actin), วินคูลิน (vinculin), เบต้า-สเปคทริน (β -spectrin), ทาลิน (talins), เดสมิน (desmin) และไวเมนติน (vimentin) (Taylor *et al.* 1995) (ภาพที่ 2.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



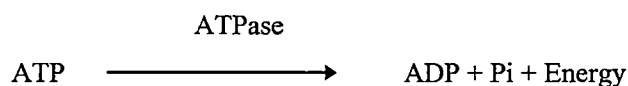
ภาพที่ 2.6 ตำแหน่งโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของคอสตาเมอร์ในกล้ามเนื้อลาย

ที่มา : Taylor *et al.* (1995)

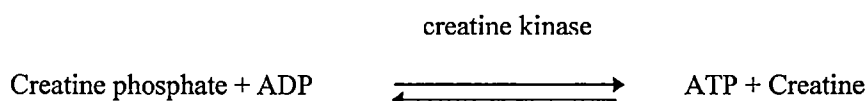
2.3 กระบวนการทางชีวเคมีของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย

สัญญาชัย จตุรสิทธา (2543) กล่าวว่า การเปลี่ยนแปลงภายในกล้ามเนื้อหลังสัตว์ตาย (postmortem change) เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นภายหลังสิ้นสุดขั้นตอนการทำให้สัตว์ตาย ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีภายในกล้ามเนื้อ ความสามารถในการทำหน้าที่ต่างๆของกล้ามเนื้อจะสูญเสียไปทีละน้อย เมื่อเวลาผ่านไปกล้ามเนื้อจะถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อสัตว์โดยสมบูรณ์ โดยการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ภายหลังสัตว์ตายนี้จะมีผลอย่างมากต่อลักษณะทางคุณภาพของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ในขั้นสุดท้าย การพยายามรักษาสมดุลควมมีชีวิตของกล้ามเนื้อจะดำเนินขึ้นทันที หลังกระบวนการเอาเลือดออกจากร่างกายสัตว์เพื่อที่จะพยายามรักษาสภาพต่างๆ ในขณะที่มีชีวิตอยู่ จำเป็นต้องอาศัยพลังงานจำนวนมาก พลังงานเหล่านี้ได้มาจากการสลายสารประกอบ adenosine triphosphate (ATP) โดยเอนไซม์ ATPase ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm)

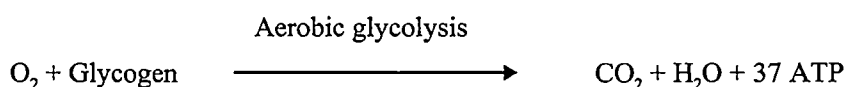
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



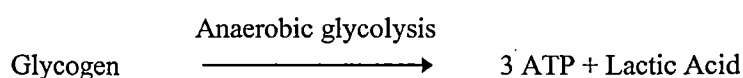
เมื่อดัตตายแล้ว กระบวนการสร้าง ATP ในสภาพปกติจะหยุดชะงัก ดังนั้นปริมาณ ATP ที่สะสมไว้จึงถูกใช้หมดไปอย่างรวดเร็ว จำเป็นต้องหาพลังงานอื่นมาทดแทนส่วนที่ถูกใช้ไป แหล่งแรกที่น่ามาใช้คือ การแลกเปลี่ยนกลุ่มฟอสเฟตระหว่าง creatine phosphate กับ adenosine diphosphate (ADP) โดยเอนไซม์ creatine kinase



กระบวนการนี้เกิดขึ้นในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ เพราะว่า creatine phosphate มีปริมาณจำกัดจึงถูกใช้อย่างรวดเร็ว ไกลโคเจน (glycogen) ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่สะสมในกล้ามเนื้อจะถูกนำมาใช้ย่อยสลายโดยมีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้องหลายขั้นตอน เพื่อให้ได้พลังงานในรูป ATP ออกมาทดแทนส่วนที่ถูกใช้ไป กระบวนการนี้เรียกว่าไกลโคไลซิส (glycolysis) ซึ่งถ้ายังมีออกซิเจนเพียงพอในกล้ามเนื้อก็จะเกิดกระบวนการไกลโคไลซิสโดยใช้ออกซิเจน (aerobic glycolysis)



เนื่องจากการขจัดเลือดออกจากร่างกายในการฆ่าสัตว์ ปริมาณออกซิเจนที่เข้าไปในเซลล์กล้ามเนื้อจะลดลงอย่างรวดเร็ว ยังผลให้เกิดกระบวนการย่อยสลายไกลโคเจนแบบไม่ใช้ออกซิเจน เรียกว่ากระบวนการไกลโคไลซิสโดยไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic glycolysis) เกิดขึ้นทดแทน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการสุดท้ายนี้เรียกว่า กระบวนการไกลโคไลซิสภายหลังสัตว์ตาย (post-mortem glycolysis) ซึ่งเมื่อมีการสลายไกลโคเจน จะได้พลังงานออกมา นั่นคือ ATP รวมทั้งกรดแลคติก ซึ่งจะสะสมไว้ในกล้ามเนื้อ

จุฬารัตน์ เศรษฐกุล (2539) กล่าวว่า ในขณะที่สัตว์มีชีวิตค่า pH ของกล้ามเนื้อจะมีค่าอยู่ระหว่าง 6.4-7.0 เกิดจากการที่กล้ามเนื้อจะยังคงมีการทำงานต่อไปอีกเป็นระยะเวลาหนึ่งภายหลังสัตว์ตาย ขณะเดียวกันกรดแลคติกที่ถูกผลิตออกมาจากกระบวนการไกลโคไลซิสเพิ่มมากขึ้นจนกว่าปริมาณไกลโคเจนที่สะสมอยู่ในกล้ามเนื้อหมดไป จึงทำให้ค่า pH ลดลงและเมื่อค่า pH ลดลงจนถึงจุดที่ไม่ลดลงอีกต่อไป คือ ประมาณ 5.3-5.5 จะเรียกจุดนี้ว่า ultimate pH (pHu) ซึ่งกล้ามเนื้อจะเข้าสู่สภาวะการเกร็งตัวอย่างถาวร (rigor mortis) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นหลังจากสัตว์ตาย แบ่งออกได้ 3 ขั้นตอนคือ

1. delay phase เป็นระยะที่มีการเคลื่อนที่ของ actin ผ่านแทรกเข้าไประหว่าง myosin ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีการยึดและหดตัวของซาร์โคเมอร์เกิดข้ามเชื่อมระหว่าง actin กับ myosin (actin-myosin crosslinkage) ไม่มาก การดูดเข้าออกของ Ca^{2+} ระหว่างเซลล์ยังปกติ พลังงานสะสม creatin phosphate และ ATP ยังมีอยู่

2. onset or rapid phase เป็นระยะที่ความสามารถในการยึดหดตัวของกล้ามเนื้อลดลงอย่างรวดเร็ว ไม่พบการดูดเข้า-ออกของ Ca^{2+} พลังงานสะสม creatin phosphate และ ATP หมดไป

3. completion phase (post rigor) ไม่มีการยึดหดตัวของกล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อหดตัวอย่างถาวร เป็นระยะเริ่มการทำงานของเอนไซม์ในเนื้อ พร้อม ๆ กับการเข้าสู่ระยะเน่าเสียของเนื้อ

Wiklund *et al.* (1996; 2010a) กล่าวว่า อาหารและสภาวะทางกายภาพของกวางมีผลต่อปริมาณไกลโคเจนและค่า ultimate pH ของเนื้อกวาง โดยปกติในเนื้อกวางที่ 24 ชั่วโมงหลังฆ่า จะมีค่า pHu อยู่ประมาณ 5.46-5.64

ภายหลังจากเนื้อสัตว์เข้าสู่สภาวะการเกร็งตัวอย่างถาวรเส้นใยกล้ามเนื้อจะหดสั้นลงและเนื้อจะเริ่มเหนียว โดยทั่วไปจะทำการบ่มเนื้อที่ห้องเย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาหนึ่งจะช่วยให้เนื้อมีความนุ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการที่เอนไซม์ที่อยู่ในเนื้อเข้าย่อยสลายโปรตีนภายในเนื้อสัตว์ (Dransfield, 1994) โดยภายหลังสัตว์ตายเมื่อกลิ้ามเนื้อขาด ATP และกล้ามเนื้อเข้าสู่สภาวะการเกร็งตัวอย่างถาวร ระบบการทำงานของผนังซาร์โคพลาสมิก เรติคูลัม สูญเสียไป จึงทำให้ Ca^{2+} ที่ถูกเก็บไว้ในซาร์โคพลาสมิก เรติคูลัม ถูกปล่อยออกมาสู่ซาร์โคพลาสมและอยู่บริเวณโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ทำให้ความเข้มข้นของ Ca^{2+} มากขึ้นแล้วไปกระตุ้นเอนไซม์ μ -calpain ทำให้เกิดกระบวนการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อเกิดขึ้น (proteolysis) (Warriss, 2000)

2.4 โปรตีนในกล้ามเนื้อสัตว์

Pearson and Young (1989) กล่าวว่า โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อมียู่หลายชนิด แต่ละชนิดจะมีหน้าที่และคุณสมบัติแตกต่างกัน ซึ่งโปรตีนที่พบในกล้ามเนื้อ สามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่

2.4.1 โปรตีนในกลุ่มซาร์โคพลาสมิก (sarcoplasmic protein)

เป็นโปรตีนกลุ่มที่ละลายได้ในน้ำและสารละลายของเกลือ พบที่บริเวณซาร์โคพลาสซึม เป็นองค์ประกอบของโปรตีนในกล้ามเนื้อ ประมาณ 30-35 เปอร์เซ็นต์ ที่สำคัญ ได้แก่

1. โปรตีนไมโอเจน (myogen) ประกอบด้วยโปรตีนหลาย ๆ ชนิดรวมกัน มีประมาณเกือบ 20 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนทั้งหมด ได้แก่ เอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิส เอนไซม์ไมโอไคเนส (myokinase) และเอนไซม์ฟอสโฟไรเลส (phosphorylase) เป็นต้น

2. โปรตีนโกลบูลิน เอ็กซ์ (globulin-x) เป็นโปรตีนรูปร่างทรงกลมคล้ายกับเอนไซม์ทั่ว ๆ ไป บทบาทยังไม่ทราบแน่ชัด

3. โปรตีนไมโอโกลบิน (myoglobin) เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการทำให้เกิดสี (chromoprotein) ที่มีฮีม (heme) เป็นองค์ประกอบคล้ายกับฮีโมโกลบิน (haemoglobin) ทำหน้าที่ในการรับ-ส่งออกซิเจนในเซลล์กล้ามเนื้อเป็นตัวการทำให้กล้ามเนื้อมีสี สีของเนื้อขึ้นอยู่กับไมโอโกลบิน กว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือ 10 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับฮีโมโกลบิน โดยทั่วไปในกล้ามเนื้อลายจะพบไมโอโกลบินไม่มาก เพียงประมาณร้อยละ 0.1-0.2 ของโปรตีนทั้งหมด แต่สำหรับกล้ามเนื้อชนิดที่ต้องทำงานหนักและต้องการพลังงานมาก จากกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport system) เช่น กล้ามเนื้อหัวใจจะมีไมโอโกลบินอยู่มากเป็นพิเศษ

2.4.2 โปรตีนในกลุ่มเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue protein)

เป็นโปรตีนกลุ่มที่ไม่ละลายในสารละลายใดๆ โดยเฉพาะที่อุณหภูมิต่ำ ได้แก่ พวกโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue protein) เป็นโปรตีนกล้ามเนื้อที่พัฒนาต่อไปเป็นระบบโครงร่างของร่างกาย เช่น กระดูก, กระดูกอ่อน, เอ็นและฟืน ประกอบไปด้วย คอลลาเจน (collagen), อิลาสติน (elastin), โปรคอลลาเจน (procollagen), โทรโปคอลลาเจน (tropocollagen), เรติคิวลิน (reticulin) เป็นต้น

2.4.3 โปรตีนในกลุ่มเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein)

เป็นกลุ่มโปรตีนที่ละลายได้ในเฉพาะในสารละลายของเกลือเข้มข้น พบเป็นองค์ประกอบประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนทั้งหมด พบได้บริเวณเส้นใยกล้ามเนื้อ นอกจากนี้เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนักผู้จัดทำเห็นว่าไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีน myosin, actin, troponin และ tropomyosin แล้ว ยังมีโปรตีนอื่นชนิดที่ไม่ทราบบทบาทและหน้าที่ชัดเจน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตาราง ที่ 2.1 โปรตีนที่อยู่ในกลุ่มเส้นใยกล้ามเนื้อ

โปรตีน	ขนาด (kDa)	อ้างอิง
Titin	3,000	Fry <i>et al.</i> (1997)
Nebulin	500-800	MeElhinwy <i>et al.</i> (2005)
Synemin	230	Bilak <i>et al.</i> (1998)
Myosin	210	Ishikawa <i>et al.</i> (1991)
M-protein	165	Grove <i>et al.</i> (1989)
C-protein	140	Yasuda <i>et al.</i> (1995)
Troponin complex	80	Warriss <i>et al.</i> (2000)
- Troponin-T	37,39	Ho <i>et al.</i> (1994)
- Troponin-I	24	Wu <i>et al.</i> (2004)
- Troponin-C	18	Davis <i>et al.</i> (2004)
Tubulin	55	Goll <i>et al.</i> (2003)
Desmin	53	Bertini. (1994)
Actin	42	Warriss. (2000)
Tropomyosin	34,36	Ho <i>et al.</i> (1996)
α -actinin	97	Harper <i>et al.</i> (2002)
β -actinin	38	Winegrad. (1999)
γ -actinin	35	Pearson and Young. (1989)

ที่มา : ลลิสรา ศรีสุวรรณ (2551)

2.5 กระบวนการย่อยสลายโปรตีนภายหลังสัตว์ตาย

การบ่มซากภายหลังสัตว์ตายที่ห้องเย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อ เนื่องจากระหว่างการบ่มเนื้อเกิดกระบวนการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ โดยเอนไซม์ในกล้ามเนื้อ ซึ่ง Koochmaraie. (1992a) ได้สรุปเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงภายในเนื้อสัตว์ ที่ทำการเก็บบ่มที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส ภายหลังสัตว์ตาย ดังนี้

1. เกิดการทำลายโครงสร้างและย่อยสลายโปรตีนบริเวณ Z-disk ทำให้เกิดการแตกตัวของเส้นใยไมโอไฟบริล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เกิดการย่อยสลายโปรตีน Tn-T ในขณะเดียวกันก็ปรากฏโพลีเปปไทด์ที่มีขนาด 28-32 kDa
3. เกิดการย่อยสลายของโปรตีน desmin ซึ่งนำไปสู่การแตกตัวของเส้นใยไมโอไฟบริลและเกิดการทำลายโครงสร้าง transverse cross-linkage ของไมโอไฟบริล
4. เกิดการย่อยสลายของโปรตีน titin และโปรตีน nebulin
5. ปรากฏโพลีเปปไทด์ที่มีขนาด 95 kDa ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ที่มีขนาดใหญ่กว่า 95 kDa

นอกจากการบ่มเนื้อภายใต้สภาวะอุณหภูมิการเก็บในห้องเย็น จะมีผลทำให้เนื้อนุ่มขึ้นเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ในเนื้อแล้ว (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2539) แต่ในกระบวนการฆ่าสัตว์ต้องมีการแช่เย็นซากโดยเร็วภายหลังสัตว์ตาย เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจติดมากับซาก แต่ถ้าซากมีอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส ก่อนที่กล้ามเนื้อจะเข้าสู่สภาวะการเกร็งตัวอย่างถาวร จะทำให้เกิดปรากฏการณ์ cold shortening ซึ่งซาร์โคเมอร์หดสั้นมากทำให้เนื้อเหนียว การหดสั้นของซาร์โคเมอร์เป็นสิ่งที่เกิดขึ้นในซากสัตว์ที่แช่เย็นเหมือนกันทุกตัว ภายใต้กระบวนการแช่เย็นซากที่เหมือนกัน แต่สิ่งที่มีความแปรผันมากที่สุดที่เกี่ยวกับความนุ่มของเนื้อ คือการสลายตัวของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและโปรตีนโครงสร้างกล้ามเนื้อ โดยเอนไซม์ภายหลังสัตว์ตาย นอกจากระยะเวลาในการบ่มซากจะช่วยให้อุณหภูมิของเนื้อนุ่มลงแล้ว เอนไซม์ที่ออกมาย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อ ซึ่งเป็นการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อแล้วยังทำให้เนื้อรสชาติดีขึ้นด้วย (Pearson and Young, 1989)

2.6 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายโปรตีนภายหลังสัตว์ตาย (post mortem proteolysis)

การปรับปรุงความนุ่มของเนื้อ เป็นผลมาจากโปรตีนในกล้ามเนื้อถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ภายในเซลล์สัตว์ (endogenous proteolytic enzymes) เรียกกระบวนการนี้ว่า กระบวนการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย (postmortem proteolysis) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เนื้อมีความนุ่มมากขึ้นระหว่างการบ่มเนื้อ (Sentandreu *et al.* 2002) ปัจจุบันพบว่า มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อภายหลังสัตว์ตาย 3 ระบบใหญ่ ๆ (ตารางที่ 2.2) ด้วยกัน (Thomas *et al.* 2004) ได้แก่

2.6.1 The lysosomal proteinase

The lysosomal proteinase ประกอบด้วยเอนไซม์คาเทปซิน ถูกเก็บไว้ภายในถุงไลโซโซม พบได้บริเวณไซโตพลาสซึม มีอยู่ 4 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อระหว่างการบ่ม ได้แก่ คาเทปซิน บี (cathepsins B; EC 3.4.22.1), คาเทปซิน แอล (cathepsins L; EC 3.4.22.15), คาเทปซิน เอช (cathepsins H; EC 3.4.22.16) และคาเทปซิน ดี (cathepsins D;

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์หรือการแจ้งการคัดลอกเพื่อการศึกษา เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EC 3.4.22.5) ทำงานได้ดี ณ สภาวะค่า pH ต่ำกว่า 5 ภายหลังจากที่เซลล์ตาย (cell death) ค่า pH ภายในเซลล์จะลดลง ทำให้ถุงไลโซโซม นี้จะแตกออก ดังนั้น เอนไซม์คาเทปซินจึงออกมาอยู่บริเวณไซโตพลาสซึม (Thomas *et al.* 2004; Chéret *et al.* 2007) การทำงานของเอนไซม์คาเทปซิน ถูกจำกัดในวันแรกของการบ่มเนื้อ ถึงแม้ว่าจะทำการบ่มเนื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 9 วัน แต่ไม่พบว่า โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์คาเทปซิน (Koochmaraie *et al.* 1988; Prates *et al.* 2001) ด้วยเหตุที่เอนไซม์คาเทปซินถูกบรรจุอยู่ในถุงไลโซโซม ดังนั้น ต้องมีการกระตุ้นให้เอนไซม์เหล่านี้ออกจากไลโซโซมมาสู่ไซโตซอล (cytosol) จึงจะสามารถย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อได้ จากการทดลอง พบว่า เมื่อใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้นซากร่วมกับการบ่มซากที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน เอนไซม์คาเทปซิน ก็ยังอยู่ในไลโซโซม เช่นเดิม ดังนั้นเอนไซม์ในกลุ่มนี้จึงไม่ค่อยมีบทบาทมากนักต่อการย่อยสลาย โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อในเนื้อสัตว์ (Koochmaraie. 1994)

ตารางที่ 2.2 ระบบเอนไซม์หลักๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายโปรตีนภายหลังสัตว์ตาย

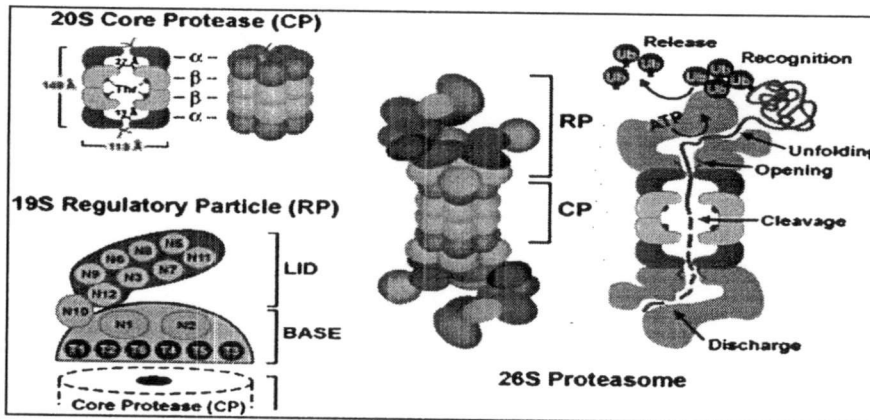
ระบบเอนไซม์	บริเวณที่พบ	ขนาด (kDa)	pH ที่เหมาะสม
cathepsin	lysosomes	30	5.5-6.5
cathepsin B		45	3.0-5.0
cathepsin D		28	6.5-6.8
cathepsin H		28	5.5-6.5
cathepsin L			
proteasome	cytoplasm	700	7.0-7.5
calpain	cytoplasm	80+28	7.0-7.5

ที่มา : คัดแปลงจาก Sentandreu *et al.* (2002); McCormick. (1994)

2.6.2 The proteasome complexes

The proteasome complexes ประกอบด้วยโปรตีนหลายหน่วยย่อยทำงานร่วมกัน (multicatalytic protease complex; MPC) (ภาพที่ 2.7) มีน้ำหนักโมเลกุล 700 kDa ทั้งนี้ จัดเป็น non-lysosomal proteinase ในเซลล์ปกติเอนไซม์กลุ่มนี้จะทำงานเกี่ยวข้องกับการควบคุมวิถีทางชีวเคมีพื้นฐานภายในเซลล์ เป็นเอนไซม์ที่สามารถเข้าย่อยโปรตีนได้ทั้งบริเวณไซโตซอลและภายในนิวเคลียสของเซลล์โครงสร้างกล้ามเนื้อ (Sentandreu *et al.* 2002; Kemp *et al.* 2010) จากการศึกษากของ Koochmaraie. (1992b) พบว่า ในกล้ามเนื้อสัตว์เอนไซม์กลุ่มนี้ทำงานได้ดี ณ สภาวะค่า pH 7.5 – 8.0 ที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายเฉพาะโปรตีน troponin-C และโปรตีน myosin light chain II และ III เท่านั้น ดังนั้นบทบาทของเอนไซม์

ในระบบนี้จึงไม่เด่นชัดมากนัก เนื่องจาก โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่เป็นซับสเตรทของเอนไซม์กลุ่มนี้มีน้อยและสภาวะของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตายไม่เอื้อต่อการทำงานของเอนไซม์นี้



ภาพที่ 2.7 โครงสร้างของ The proteasome complexes

ที่มา : Anonymous (2010c)

2.6.3 The calpain system

The calpain system ประกอบด้วย เอนไซม์คาลเปิน (calpain; EC 3.4.22.17) จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนชนิดซิสเตอีน ทำงานได้ดีในสภาวะค่า pH ประมาณ 7.0-7.5 เอนไซม์ในกลุ่มคาลเปินมีทั้งหมด 14 ชนิดด้วยกัน แต่ตัวที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อหลังสัตว์ตาย มี 2 ชนิด ได้แก่ μ -calpain และ m-calpain ถูกกระตุ้นการทำงานโดย Ca^{2+} (Goll *et al.* 2003) เอนไซม์ μ -calpain และเอนไซม์ m-calpain เป็นเอนไซม์กลุ่มแรกที่ทำให้การย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย โดยโปรตีนที่ถูกย่อยโดยคาลเปินมีหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.3 และคาลปาสเตติน (calpastatin; specific inhibitor) ทำหน้าที่ยับยั้ง ควบคุมอัตราและปริมาณการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain และ m-calpain (Zhou *et al.* 2007) จากการศึกษ โดยทำการบ่มไมโอไฟบริลกับเอนไซม์คาลเปินในหลอดทดลอง พบว่า รูปแบบของโปรตีนที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์คาลเปิน ในหลอดทดลองและที่เกิดขึ้นในเนื้อภายหลังสัตว์ตายนั้นมีลักษณะเหมือนกัน โดยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่เป็นซับสเตรทตัวที่สำคัญของเอนไซม์ μ -calpain และ m-calpain ได้แก่ nebulin, titin, troponin T และ desmin (Huff-Lonergan *et al.* 1996) นอกจากนี้ยังมีโปรตีน actin, myosin heavy chain, myosin light chain I, tropomyosin $\alpha 1$, tropomyosin $\alpha 4$, thioredoxin และ CapZ ที่เป็นซับสเตรทของเอนไซม์ μ -calpain และ m-calpain อีกด้วย (Lametsch *et al.* 2004) เนื่องจากเอนไซม์ μ -calpain และเอนไซม์ m-calpain สามารถย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อชนิดเดียวกันได้ ดังนั้นจึงได้มีความศึกษาว่า เอนไซม์คาลเปินไอโซฟอร์ม (isoform) ไค ที่เกี่ยวข้องต่อการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อในระยะแรกของการบ่มเนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับผูกพันกับเงื่อนไขการดำเนินการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังสัตว์ตายซึ่งมีรายงานว่า เอนไซม์ μ -calpain จะถูกกระตุ้นและเข้าย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อก่อนเอนไซม์ m-calpain ภายใน 3 วันหลังสัตว์ตาย (Taylor *et al.* 1995)

ตารางที่ 2.3 ผลการย่อยสลายโปรตีน โดยเอนไซม์คาลเปิน

โปรตีน	ผลจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์คาลเปิน
C-protein	ย่อยสลายโพลีเพปไทด์ที่มีขนาด 140 kDa ให้เหลือขนาดประมาณ 120 kDa
Desmin	เกิดการย่อยสลายอย่างรวดเร็ว ทำให้เหลือขนาดประมาณ 32 kDa ถึง 37 kDa และปรากฏโพลีเพปไทด์ขนาด 18 kDa
Myosin	มีอัตราการย่อยสลายช้ามาจากโพลีเพปไทด์ที่มีขนาด 210 kDa ไปเป็น 150, 165 และ 180 kDa
Nebulin	มีอัตราการย่อยสลายอย่างรวดเร็ว โดยกลายเป็นชุดของโพลีเพปไทด์ขนาดสั้นๆ มีขนาดตั้งแต่ 30 kDa ไปจนถึงขนาดหลายร้อย kDa โดยชิ้นโพลีเพปไทด์ที่ถูกย่อยนั้นยังจับอยู่กับ actin และยังอยู่บริเวณ Z-disk
Synemin	มีอัตราการย่อยสลายอย่างรวดเร็ว โดยกลายเป็นโพลีเพปไทด์จำนวนมาก มีขนาดตั้งแต่ 40 kDa ถึง 220 kDa โดยโพลีเพปไทด์ที่พบส่วนใหญ่มีขนาดประมาณ 40 kDa (มีความเสถียร) 45, 50, 66 และ 200 kDa
Titin	โปรตีน titin มีขนาดประมาณ 3,000 kDa ถูกย่อยเหลือชิ้นโพลีเพปไทด์ขนาดใหญ่ประมาณ 2,000 kDa และ 1,200 kDa หลังจากนั้น 1,200 kDa จะถูกย่อยเหลือประมาณ 100-500 kDa โดยขนาด 500 kDa มีความเสถียร
Tropomyosin	ถูกย่อยกลายเป็นโพลีเพปไทด์ขนาด 14 kDa และโพลีเพปไทด์ขนาดเล็กๆ
Troponin-I (Tn-I)	ถูกย่อยเป็นโพลีเพปไทด์ขนาดเล็กมาก เช่น ในกล้ามเนื้อหัวใจ Tn-I ขนาด 32 kDa ถูกย่อยเหลือ 26 kDa
Troponin-T (Tn-T)	ถูกย่อยอย่างรวดเร็วกลายเป็นโพลีเพปไทด์ขนาดเล็กมาก ขนาดประมาณ 35, 30 และ 28 kDa โดยที่โพลีเพปไทด์ขนาด 30kDa นั้นมีความเสถียร
Tubulin	มีอัตราการย่อยสลายช้ามาจากโพลีเพปไทด์ขนาด 55 kDa เป็น 50 kDa ถึง 52 kDa
Vinculin	มีการย่อยสลายอย่างรวดเร็วกลายเป็น 90 kDa

ที่มา : คัดแปลงจาก Goll *et al.* (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์การใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อ

คุณภาพเนื้อสัตว์ได้จากปัจจัยหลายประการด้วยกัน เช่น ความอโรยหรือความพึงพอใจในการบริโภคเนื้อ ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (water-holding capacity) คุณค่าทางโภชนาการและความปลอดภัย นอกจากนี้ กลิ่น รสชาติและความนุ่มของเนื้อยังมีอิทธิพลต่อความพึงพอใจในการบริโภคเนื้อสัตว์ และในบรรดาคุณลักษณะต่างๆ นั้น ความนุ่มของเนื้อ (meat tenderness) ถูกจัดเป็นคุณลักษณะสำคัญที่สุด (Miller *et al.* 2001) จากการศึกษาของ Koomaraie and Geesink (2006) ได้สรุปว่า มีปัจจัย 3 ประการหลักๆ ที่เกี่ยวข้องกับความนุ่มของเนื้อ ได้แก่

1. background toughness เป็นสิ่งที่ติดมากับตัวสัตว์และไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายหลังสัตว์ตาย ได้แก่ เพศ อายุ สายพันธุ์และการเลี้ยง เช่น โคที่มีอายุ สายพันธุ์ และการเลี้ยงใกล้เคียงกัน จะมี background toughness ใกล้เคียงกัน ทำให้ความนุ่มของเนื้อใกล้เคียงกันด้วย
2. toughening phase เป็นการหดสั้นของ sarcomere ที่เกิดขึ้นในขณะที่เกิด rigor mortis เช่น ในโค ปกติจะเกิดขึ้นภายใน 24 ชั่วโมงแรกหลังสัตว์ตาย
3. tenderization phase เป็นการสลายตัวของโปรตีนที่เป็นโครงสร้างกล้ามเนื้อ โดยเอนไซม์ภายหลังสัตว์ตาย โดยที่ toughening phase และ tenderization phase จะเกิดระหว่างการบ่มเนื้อภายหลังสัตว์ตาย

2.8 คุณสมบัติของเอนไซม์กลุ่มคาลเปิน

เอนไซม์ในกลุ่มคาลเปินประกอบด้วยเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin โดยที่เอนไซม์ μ -calpain, m-calpain จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนชนิดซิสเตอีน ที่พบได้ทั่วไปตามเนื้อเยื่อต่างๆ (ubiquitous) มี 8 ชนิด ได้แก่ calpain 1 (μ -calpain), calpain 2 (m-calpain), calpain 5, calpain 7, calpain 10, calpain 12, calpain 14 และ calpain 15 นอกจากนี้ยังมีชนิดที่พบได้ในเนื้อเยื่อบางชนิดเท่านั้น (skeletal muscle-specific calpain) คือ calpain 3 (p94) ที่อยู่ในกล้ามเนื้อลาย (Khorchid and Ikura. 2002)

เอนไซม์ในกลุ่มคาลเปินที่มีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อสัตว์ คือ μ -calpain และ m-calpain (Goll *et al.* 2003) ซึ่งจะทำงานในสภาวะที่มี Ca^{2+} มากกระตุ้นในปริมาณที่แตกต่างกัน กล่าวคือ μ -calpain ต้องการ Ca^{2+} ในระดับ μM ส่วน m-calpain ต้องการ Ca^{2+} กระตุ้นในระดับ mM (ตารางที่ 2.4) ทำงานได้ดี ณ สภาวะค่า pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมี calpastatin เป็นตัวยับยั้งการทำงาน (specific endogenous inhibitor) (Sensky *et al.* 1996; Sazili *et al.* 2003) เอนไซม์ μ -calpain (CAN1 human) และเอนไซม์ m-calpain (CAN2 human) มีค่า pI (isoelectric point) เท่ากับ 5.49 และ 4.90 ตามลำดับ (Ilian *et al.* 2004)

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติของเอนไซม์กลุ่มคาลเปิน

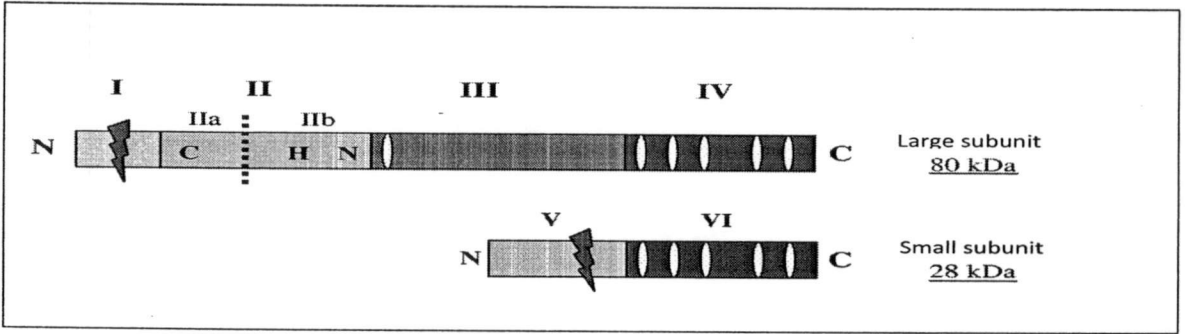
ไอโซฟอร์ม	หน่วยย่อยเพปไทด์	ความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน ในการสลายโปรตีน
μ -calpain	80 kDa + 28 kDa	3-50 μ M
m-calpain	80 kDa + 28 kDa	400-800 μ M

ที่มา : ดัดแปลงจาก Goll *et al.* (2003)

Goll *et al.* (2003) กล่าวว่า เอนไซม์ μ -calpain และเอนไซม์ m-calpain มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (ภาพที่ 2.8) ได้แก่ หน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 80 kDa และหน่วยย่อยขนาดเล็ก (small subunit) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28 kDa จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโน พบว่า มนุษย์ ถึง หนู โค สุกกร กระต่าย และไก่ มีความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนประมาณ 55-65 เปอร์เซ็นต์ โดยหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของ μ -calpain และ m-calpain นั้นมีขนาดต่างกันเล็กน้อย เนื่องจาก แพลตฟอร์มมาจากยีนที่ต่างกัน แต่หน่วยย่อยขนาดเล็กมีลักษณะเหมือนกันทุกประการ (identical) เนื่องจากแพลตฟอร์มมาจากยีน 1 ยีน และในบรรดาสัตว์มีกระดูกสันหลังนั้น μ -calpain และ m-calpain มีความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนสูงประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์

หน่วยย่อยขนาดใหญ่ของเอนไซม์ μ -calpain และ m-calpain เป็นส่วนของหน่วยเร่งปฏิกิริยา (catalytic unit) จากปลาย NH_2 -terminal ประกอบด้วย domain I (autolytic activation), domain II (cysteine active site), domain III (calmodulin-link calcium bind sites) และ domain IV (calmodulin-link calcium bind sites) และหน่วยย่อยขนาดเล็กเป็นหน่วยควบคุม (regulatory unit) จากปลาย NH_2 -terminal ประกอบด้วย domain V (membrane interaction) และ domain VI (calmodulin-link calcium bind sites) (Sorimachi *et al.* 1997; Ilian *et al.* 2004) โดยเอนไซม์ μ -calpain และ m-calpain ในสภาพธรรมชาติจะอยู่ในรูป inactive proenzymes ต่อเมื่อมี Ca^{2+} มากกระตุ้น จะมีการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ทำให้มีขนาดลดลงและเปลี่ยนไปอยู่ในรูป active proenzyme และสามารถทำงานได้ (Kapprell and Goll. 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

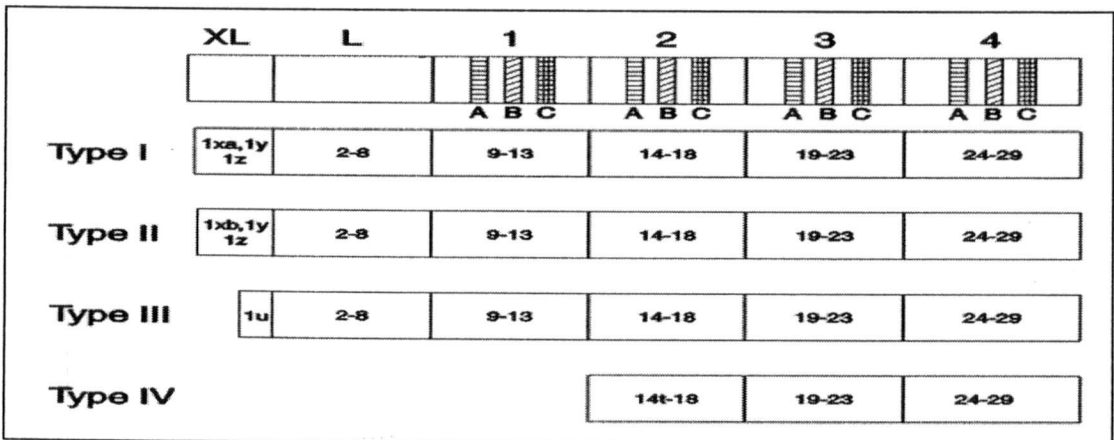


ภาพที่ 2.8 โครงสร้าง μ -calpain และ m-calpain
 ที่มา : Dargalos *et al.* (2008)

2.9 คุณสมบัติของเอนไซม์คาลปาสแตติน

เอนไซม์คาลปาสแตติน (calpastatin; endogenous calpain specific inhibitor) ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain และ m-calpain สามารถทนความร้อนอุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส (heat-stable protein) และไม่สามารถทำให้เสียสภาพได้โดยสารบางชนิด เช่น ยูเรีย (urea), TCA และ SDS (Okitani *et al.* 1976; Otsuka and Goll. 1987; Maki *et al.* 1988)

calpastatin แปรรหัสมาจากยีนเพียง 1 ยีน สามารถถอดรหัสได้สาย mRNA อย่างน้อย 4 ไอโซฟอร์ม ได้แก่ type I, type II, type III และ type IV (ภาพที่ 2.9) เนื่องจากมีโปรโมเตอร์ที่ต่างกันและเกิดการ alternative splicing ในระหว่างกระบวนการถอดรหัสของสาย mRNA (Killefer and Koohmaraie. 1994; Goll *et al.* 2003)

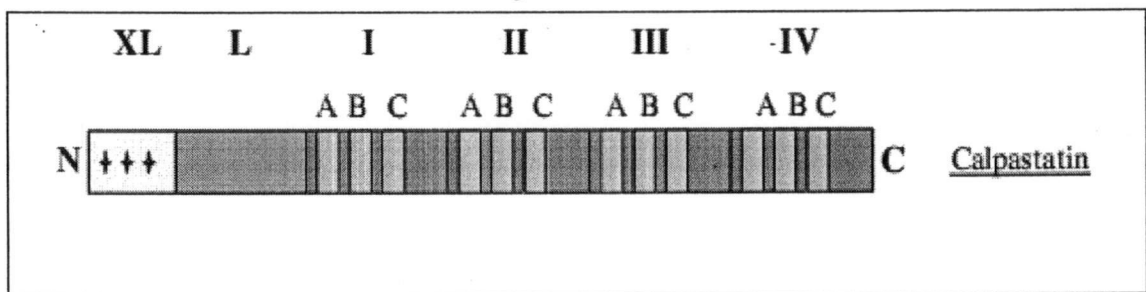


ภาพที่ 2.9 โครงสร้าง mRNA calpastatin ในแต่ละไอโซฟอร์ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ที่มา: Goll *et al.* (2003)
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cong *et al.* (1998) รายงานว่าเอนไซม์ calpastatin มีขนาดตั้งแต่ 17 – 172 kDa พบได้ในเนื้อเยื่อและอวัยวะที่แตกต่างกันไป มีรายงานว่า ในกล้ามเนื้อหัวใจหนู calpastatin มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 145 kDa ซึ่งมีขนาดเท่ากับที่พบในกล้ามเนื้อโครงร่าง (skeletal muscle)

โครงสร้างโดยทั่วไปของ calpastatin ปลายด้าน NH₂-terminal ประกอบด้วย 6 โดเมน (domain) ได้แก่ domain XL, domain L, domain I domain II domain III และ domain IV (ภาพที่ 2.10) โดย domain I, domain II, domain III และ domain IV ประกอบด้วยโดเมนย่อย (subdomain) ที่ซ้ำๆกัน ได้แก่ subdomain A, subdomain B และ subdomain C ซึ่งแต่ละโดเมนย่อย สามารถยับยั้งเอนไซม์คาลเพนได้ 1 โมเลกุลในสภาวะที่มี Ca²⁺ เป็นการยับยั้งแบบผันกลับได้ (reversible inhibition) (Kapprell and Goll. 1989; Dargelos *et al.* 2008)



ภาพที่ 2.10 โครงสร้างโดยทั่วไปของเอนไซม์ calpastatin

ที่มา : Dargalos *et al.* (2008)

2.10 ความสำคัญของเอนไซม์กลุ่มคาลเพนที่มีต่อความนุ่มของเนื้อ

การเปลี่ยนแปลงภายในกล้ามเนื้อที่เกิดขึ้นระยะแรกหลังสัตว์ตายนั้นมีผลอย่างมากต่อคุณภาพเนื้อ ความนุ่มของเนื้อจัดว่าเป็นคุณลักษณะที่สำคัญที่สุดสำหรับผู้บริโภค (Prates *et al.* 2001; Maddock *et al.* 2005) การบ่มเนื้อเป็นการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อภายหลังสัตว์ตาย เป็นผลมาจากโครงสร้างของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อถูกทำลายโดยเอนไซม์ภายในเซลล์สัตว์ ซึ่งนับว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เนื้อมีความนุ่มมากขึ้น (Sentandreu *et al.* 2002)

Koohmaraie. (1994) กล่าวว่า โดยปกติภายในกล้ามเนื้อ จะมีเอนไซม์อยู่หลายชนิดด้วยกันที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อ (proteolytic enzymes) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์บางชนิดที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโมเลกุลของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน มีผลทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้นและมีรสชาติดีขึ้น โดยเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อสัตว์มากที่สุด คือ เอนไซม์ในกลุ่มคาลเพน โดยมีรายงานว่า หลังสัตว์ตาย ATP ถูกใช้ไปเกือบหมด ผนังซาร์โคพลาสมิก

เรติคูลัม ไม่สามารถกักเก็บ Ca²⁺ ไว้ได้ จึงปล่อยออกมาสู่ไซโตซอล เมื่อความเข้มข้นของ Ca²⁺ มาก

ขึ้นเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการทำงานเพื่อการพักผ่อนนั้น ไม่นอนหลับให้ไปใช้ประโยชน์จากค่า
ขึ้นเพียงพอสำหรับการกระตุ้นการทำงานเอนไซม์คาลเพนให้ย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณ Z line ได้แก่ titin, desmin, Troponin T และ Troponin I มีผลทำให้เนื้อนุ่มขึ้น ขณะเดียวกัน calpastatin จะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปิน (Kohmaraie. 1994; Dransfield. 1994; Warriss. 2000) การใช้สารละลาย CaCl_2 ฉีดเข้าในเนื้อสัตว์หลังสัตว์ตาย พบว่าเป็นการเร่งกระบวนการย่อยสลายโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อและทำให้เนื้อมีความนุ่มขึ้น ขณะเดียวกันการฉีด calpastatin กลับพบว่า เป็นการยับยั้งกระบวนการย่อยสลายโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อและทำให้เนื้อมีความนุ่มลดลง (Koochmaraie *et al.* 1988) นอกจากนี้ยังรายงานว่าการใช้สาร β -adrenergic agonists มีผลทำให้อัตราการย่อยสลายของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อลดลง เนื่องจากสารตัวนี้มีส่วนทำให้ในเนื้อสัตว์มีปริมาณ calpastatin เพิ่มขึ้น จึงยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปินมีผลทำให้เนื้อโคมีความนุ่มลดลง (Koochmaraie *et al.* 1991; Geesink *et al.* 1993)

-Veiseth *et al.* (2001) ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain และ m-calpain ในกล้ามเนื้อสันอกของแกะด้วยวิธี in-gel casein assay พบว่า ภายหลังจาก 24 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมงหลังฆ่าสัตว์ เอนไซม์ μ -calpain มีระดับค่อย ๆ ลดลง 42 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($p < 0.05$) และเมื่อผ่านไป 360 ชั่วโมง ไม่สามารถตรวจพบเอนไซม์ μ -calpain . ได้อีก ขณะที่เอนไซม์ m-calpain ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ($p > 0.05$) และการเกิด autolysis ของเอนไซม์ μ -calpain เกิดขึ้น 3 ชั่วโมงหลังฆ่าสัตว์ ซึ่งในตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่สัคคแล้วมีปริมาณ Ca^{2+} เพียงพอสำหรับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain เท่านั้น แต่มีไม่มากพอที่ไปกระตุ้นเอนไซม์ m-calpain ให้ทำงานได้

Volpelli *et al.* (2005) ศึกษาอิทธิพลของอายุและอาหารที่มีต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มคาลเปินของกวางพันธุ์ฟอลโด (*Dama dama*) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ปลอ่ยให้แทะเล็มหญ้าอย่างเดียว (อายุเข้ามา 18 เดือน) ส่วนกลุ่มที่ 2 เสริมอาหารขึ้น (อายุเข้ามา 30 เดือน) เมื่อนำตัวอย่างกล้ามเนื้อสันอกของกวางฟอลโด มาวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มคาลเปิน พบว่า อาหารที่เลี้ยงกวางไม่มีผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มคาลเปิน แต่พบว่า กวางที่มีอายุน้อย (30 เดือน) มีกิจกรรมของ calpastatin มากกว่ากวางที่มีอายุน้อย (18 เดือน) ($p < 0.05$) มีค่าเท่ากับ 0.272 units/g of meat และ 0.199 units/g of meat ตามลำดับ ส่วนค่ากิจกรรมของเอนไซม์ μ -calpain และ m-calpain ของกวางทั้งสองกลุ่มนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

Ouali and Talment. (1990) กล่าวว่า ในสัตว์แต่ละสายพันธุ์ยังมีการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มคาลเปินต่างกันด้วย ซึ่งความแตกต่างของอัตราย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อและความนุ่มของเนื้อในสัตว์แต่ละชนิด อธิบายได้จากการกิจกรรมของ calpastatin ที่ต่างกัน เช่น ในโคยุโรป (*Bos taurus*) และโคอินเดีย (*Bos indicus*) จะมีอัตราย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อและกิจกรรมการทำงานของ calpastatin ต่างกัน จึงทำให้มีความนุ่มต่างกันด้วย

Pring *et al.* (1997) ศึกษาผลของเอนไซม์ในกลุ่มคาลเปินที่มีต่อความนุ่มของโคลูกผสมเพศผู้ตอน ระหว่างสายพันธุ์เองกัสและสายพันธุ์บราห์มัน ซึ่งมีเลือดบราห์มัน ในระดับต่างๆ คือ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25, 37, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่า โคที่มีเลือดบราห์มัน 37 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณ μ -calpain สูงที่สุดและปริมาณของเอนไซม์ calpastatin เพิ่มขึ้นเมื่อระดับเลือดของบราห์มันสูงขึ้น ส่วนปริมาณ m-calpain ในทุกระดับเลือดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาของ Wheeler *et al.* (1990) รายงานว่า ปริมาณของเอนไซม์ calpastatin มีความสัมพันธ์กับการถ่ายทอดระดับเลือดของโคพันธุ์ บราห์มัน โดยปริมาณเอนไซม์ calpastatin จะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับเลือดของบราห์มันเพิ่มขึ้น

Boehm *et al.* (1998) ศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเปนในกล้ามเนื้อพับใน (*Semimembranosus*) ของโค พบว่า ภายหลังจากบ่มเนื้อได้ 7 วัน เอนไซม์ m-calpain มีกิจกรรมการทำงานเหลืออยู่ 63 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เอนไซม์ μ -calpain มีกิจกรรมการทำงานลดลงอย่างรวดเร็วเหลืออยู่น้อยกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ ส่วน calpastatin มีกิจกรรมการทำงานเหลืออยู่เพียง 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค western blotting พบว่า สามารถตรวจสอบแถบของเอนไซม์ m-calpain ที่มีขนาด 80 kDa ได้ภายหลัง 24 ชั่วโมงหลังฆ่าสัตว์ โดยไม่มีการสลายตัวไป ขณะที่แถบของเอนไซม์ μ -calpain นั้นได้สลายตัวไปเหลือโปรตีนที่มีขนาด 76 kDa และปรากฏแถบเอนไซม์ calpastatin ที่มีขนาด 125, 91, 68 และ 42 kDa โดยแถบโปรตีนขนาด 125 kDa เป็นเอนไซม์ calpastatin ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ (native-calpastatin) และเมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อเพิ่มขึ้นปรากฏว่าเอนไซม์ calpastatin ที่มีขนาด 125 และ 91 kDa ได้สลายไปอย่างรวดเร็ว ซึ่ง Lee *et al.* (1992a, b) รายงานว่าเอนไซม์ calpastatin ขนาดต่าง ๆ อาจเกิดจากการสลายตัวของเอนไซม์ calpastatin ขนาด 125 kDa หรือเกิดจากกระบวนการ alternative splicing ในระหว่างการแสดงออกของยีน (gene expression)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การสารเคมีและการเตรียมสารเคมี ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก (*M. longissimus dorsi*) ซีกซ้ายของซาก จากกวางพันธุ์รูซ่า (*Cervus timorensis*) จำนวน 10 ตัว เพศเมีย น้ำหนักมีชีวิตประมาณ 40-60 กิโลกรัม อายุเข้ามา 2 ปี เลี้ยงภายใต้ระบบการผลิตของสหกรณ์กวางแห่งประเทศไทยจำกัด มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เข้ามาที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

3.2 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกซีกซ้ายของซากจากกวางพันธุ์รูซ่า ภายใน 45 นาทีหลังฆ่า โดยทำการห่อด้วยพลาสติกใส ใส่ลงในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง แล้วนำมาบ่มที่ห้องเย็นอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ณ ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จนครบเวลา 24 ชั่วโมงหลังฆ่า (นับเป็นวันที่ 1 ของการบ่ม) หลังจากนั้นจึงนำชิ้นเนื้อสันนอกมาตัดแบ่งเป็น 6 ส่วนเท่าๆ กัน ตามระยะเวลาการบ่มที่ 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วันหลังฆ่า โดยทำการเก็บในถุงสุญญากาศชนิด polyvinyl chloride ใส่อากาศออกด้วยเครื่องบรรจุสุญญากาศ รุ่น VP-600A (Ramon, Germany) แล้วทำการบ่มต่อไปจนครบระยะเวลาที่กำหนด หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างที่ครบระยะเวลาการบ่มที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ และวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มคาลเพน

3.3 การวัดค่าแรงตัดผ่านของเนื้อ (Warner-Bratzler shear force)

ทำการวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อตามวิธีการของ Boccard *et al.* (1981) โดยนำตัวอย่างเนื้อกวางที่ครบระยะเวลาการบ่มที่ 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วันหลังฆ่า มาตัดแต่งเอาพังศีตและไขมันออกและตัดชิ้นเนื้อเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า หน้า 2.5 เซนติเมตร ใส่ในถุงสุญญากาศชนิด polyvinyl chloride แล้วทำการใส่อากาศออกด้วยเครื่องบรรจุสุญญากาศ รุ่น VP-600A (Ramon, Germany) และนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany) ที่ 80 องศาเซลเซียส วัดอุณหภูมิใจกลางเนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่ายหรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ได้ 70-75 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องวัดอุณหภูมิใจกลางเนื้อแบบอิเล็กทรอนิกส์ รุ่น TTX 100 (Ebro, Germany) จึงนำถุงที่ใส่ชิ้นเนื้อไปลดอุณหภูมิโดยการใช้น้ำไหลผ่าน ให้ใจกลางเนื้อมีอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส แล้วตัดชิ้นเนื้อตามแนวยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อให้มีขนาดกว้าง x ยาว x หนา เท่ากับ 1 x 3 x 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตัวอย่างละ 10 ชิ้น แล้วนำไปวัดค่าแรงตัดผ่านของเนื้อ ด้วยเครื่องวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Warner Bratzler Shear Force) รุ่น 1011 (Instron, USA) โดยกำหนดหน่วยเป็นกิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร (kg/cm^2)

3.4 การวิเคราะห์โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ

3.4.1 การสกัดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ

ทำการสกัดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อตามวิธีการของ Claeys *et al.* (1995) โดยทำการบดตัวอย่างเนื้อกว้างที่ผ่านการบ่มที่ระยะเวลา 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วันหลังฆ่า ด้วยเครื่องบดละเอียด รุ่น minipimer MR 430 HC (Moulinex, France) แล้วชั่งตัวอย่างละ 2.5 g นำมาบดในสารละลาย STE buffer ปริมาตร 25 ml ด้วยเครื่อง homogenizer (Ultra tarrax, Germany) ที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Universal 32R (Hettich, Germany) ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนแล้วเติมสารละลาย TE buffer ปริมาตร 25 ml คนให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนของตะกอนที่ได้มาเติมสารละลาย 0.15 M KCl ปริมาตร 25 ml คนให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำส่วนของตะกอนที่ได้มาเติมสารละลาย buffer solution ปริมาตร 30 ml คนให้เข้ากัน ทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บสารละลายส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนและโปรตีนที่สกัดได้นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ SDS-PAGE

3.4.2 การวัดความเข้มข้นโปรตีน

เจือจางน้ำยาวัดโปรตีน Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, U.S.A) ในสัดส่วนน้ำยาวัดโปรตีน 1 ส่วนต่อน้ำกลั่น 4 ส่วน จากนั้นทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยเจือจาง Bovine Serum Albumin (BSA) (Fluka Biochemika, U.S.A) ให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.00 mg/ml จากนั้นนำสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตัวอย่างละ 10 μl ผสมกับน้ำยาวัดโปรตีนที่เจือจางแล้ว 500 μl สำหรับการวัดตัวอย่างโปรตีน ให้นำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ ตัวอย่างละ 10 μl ผสมกับน้ำยาวัดโปรตีนที่เจือจางแล้ว 500 μl จากนั้นผสมสารให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่

อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์รุ่น BioPhotometer plus (Eppendorf, Germany) ที่ความยาวคลื่น 595 nm (A_{595}) โดยใช้ น้ำกลั่น เป็น blank จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของ BSA ที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานและคำนวณสมการถดถอยเชิงเส้น $y = ax \pm b$ โดยค่า y เป็นค่าการดูดกลืนแสง และค่า x เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลาย BSA และทำการคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างได้จากสมการถดถอยเชิงเส้นของกราฟมาตรฐาน ตามลำดับ

3.4.3 การเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์

เตรียมชุดการเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์สำหรับเครื่องแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า รุ่น PROTEAN[®] II xi Cell (Bio Rad, U.S.A) ตามคู่มือของบริษัท จากนั้นทำการเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์สำหรับการแยกโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยเทคนิค SDS-PAGE

สารเคมี	15 % separating gel (ml)	5 % stacking gel (ml)
น้ำกลั่น	24.0	5.7
1.5 M Tris/HCl, pH 8.8	25.0	-
0.5 M Tris/HCl, pH 6.8	-	2.5
30% acrylamide/bis solution (29:1)	50.0	1.7
10 % SDS	1.00	0.1
10 % APS	0.50	0.05
TEMED	0.05	0.01
ปริมาตรรวม (ml)	100	10

ทำการผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันโดย APS และ TEMED ให้ใส่เป็นตัวสุดท้าย พยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศ หลังจากเทชั้น separating gel ใช้ปิเปต isopropanol ลงบนชั้น separating gel ทันที เพื่อทำให้ผิวหน้าด้านบนเรียบ ทิ้งไว้เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นจึงเท stacking gel แล้วใส่หวีปล่อยไว้อีกประมาณ 2 ชั่วโมง จึงสามารถนำเจลมาใช้ได้

3.4.4 การแยกโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ทำการแยกโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) ด้วยเครื่องแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า รุ่น PROTEAN[®] II xi Cell ตามวิธีการที่ดัดแปลง ไม่ว่าการณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จาก Ho *et al.* (1997) ใช้เจลชั้นล่าง (separating gel) ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ และเจลชั้นบน (stacking gel) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยนำตัวอย่างโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ผสมกับ loading buffer ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นทำการหยุดโปรตีนตัวอย่างหลุมละ 30 ไมโครกรัม โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน PageRuler Plus Prestained Protein marker (Fermentus, Canada) หลังจากนั้นทำการแยกโปรตีนโดยใช้ running buffer เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ 80 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำเจลไปย้อมสีใน staining solution เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลไปล้างใน destaining solution เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หรือจนกว่าโปรตีนส่วนเกินจะถูกล้างออกจนหมด จึงนำเจล SDS-PAGE ไปถ่ายรูปด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล รุ่น gene genius bio imagine system (Syngeme, Germany) เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนต่อไป

3.4.5 การวิเคราะห์โปรตีน troponin-T ด้วยเทคนิค western blotting

ทำการแยกโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ตามวิธีการในข้อ 3.4.4 แต่ไม่ต้องนำเจลไปย้อมให้นำมาวิเคราะห์โปรตีน troponin-T ด้วยเทคนิค western blotting ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Ho *et al.* (1997) โดยย้ายโปรตีนจากเจล SDS-PAGE ลงสู่แผ่นเมมเบรน polyvinylidene difluoride (PVDF membrane) (Amersham bioscience, U.K) โดยก่อนการย้ายโปรตีนให้ทำการตัดเจล SDS-PAGE ให้มีขนาด 7 x 10 เซนติเมตร โดยให้ครอบคลุมโปรตีนที่มีขนาดตั้งแต่ 17-55 kDa สังเกตจากโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุล หลังจากนั้นจึงทำการย้ายโปรตีนจากเจล SDS-PAGE ลงสู่แผ่นเมมเบรน PVDF ด้วยเครื่อง Mini Trans-Blo[®] Electrophoretic Transfer Cell (Bio Rad, U.S.A) ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 350 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ transfer buffer เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ใน blocking solution (Sigma, U.S.A) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำแผ่นเมมเบรนแช่ในแอนติบอดีตัวที่ 1 คือ monoclonal anti-troponin T (Clone JLT-12) (Sigma, U.S.A) ที่เจือจางด้วย blocking solution ในอัตราส่วน 1:7,500 ในการจับโปรตีน Tn-T ที่ไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำเมมเบรนมาล้างด้วย washing solution (Sigma, U.S.A) 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที และจึงนำเมมเบรนมาแช่ในแอนติบอดีตัวที่ 2 คือ anti-mouse IgG (Sigma, U.S.A) ที่เจือจางด้วย blocking solution ในอัตราส่วน 1:7,500 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งแอนติบอดีตัวที่ 2 นี้มีความจำเพาะกับแอนติบอดีตัวที่ 1 และติดฉลากเอนไซม์ horseradish peroxidase หลังจากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนด้วย washing solution 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาโดยใส่ TMB substrate (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine) (Sigma, U.S.A) เพื่อให้เห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีน ที่ไว้ข้ามคืน 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ จึงนำแผ่นเมมเบรนไปถ่ายรูปด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล รุ่น gene genius bio imagine system (Syngeme, Germany)

3.5 การวิเคราะห์โปรตีนเอนไซม์กลุ่มคาลเปิน

3.5.1 การสกัดโปรตีนเอนไซม์กลุ่มคาลเปิน

3.5.1.1 วิธีการสกัดโปรตีนในเอนไซม์กลุ่มคาลเปินสำหรับวิเคราะห์การแสดงออกด้วยเทคนิค western blotting

ทำการสกัดโปรตีนในเอนไซม์กลุ่มคาลเปิน ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Delgado *et al.* (2001) โดยนำเนื้อกวางที่ผ่านการบ่มที่ระยะเวลา 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วันหลังฆ่า ชั่งตัวอย่างละ 2.5 g ใส่หลอดเซนติฟิวส์ขนาด 50 ml (Beckman, U.S.A) บดให้ละเอียดใน extraction buffer 10 ml ด้วยเครื่อง homogenizer (Ultra tarrax, Germany) ที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 30 วินาที โดยในระหว่างการบดให้หลอดตัวอย่างอยู่ในน้ำแข็งเสมอ หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง รุ่น Avanti® J-E Centrifuge (Beckman Coulter, U.S.A) ที่ความเร็ว $37,500 \times g_{\max}$ นาน 120 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนบนใส่หลอดเซนติฟิวส์อันใหม่และนำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้นำมาวัดความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการในข้อ 3.4.2 ต่อไป

3.5.1.2 วิธีการสกัดโปรตีนเอนไซม์กลุ่มคาลเปินสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์

ทำการสกัดโปรตีนในเอนไซม์กลุ่มคาลเปิน ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Geesink and Koochmaraie. (1999) โดยนำเนื้อกวางที่ผ่านการบ่มที่ระยะเวลา 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วันหลังฆ่า นำเนื้อกวางที่ผ่านการบ่มที่ระยะเวลา 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ชั่งตัวอย่างละ 10 g ใส่หลอดเซนติฟิวส์ขนาด 50 ml (Beckman, U.S.A) บดให้ละเอียดใน extraction buffer 30 ml ด้วยเครื่อง homogenizer (Ultra tarrax, Germany) ที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที โดยในระหว่างการบดให้หลอดตัวอย่างอยู่ในน้ำแข็งเสมอ แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง รุ่น Avanti® J-E Centrifuge (Beckman Coulter, U.S.A) ที่ความเร็ว $30,000 \times g_{\max}$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เก็บสารละลายส่วนในไซกรองผ่าน glass wool (Supelco, U.S.A) หลังจากนั้นทำการ dialysis ด้วยถุง dialysis (Pierce, U.S.A) ขนาด cut-off 10 kDa ใน dialysis buffer 1,000 ml นาน 12-16 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงอีกครั้ง ที่ความเร็ว $30,000 \times g_{\max}$ นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใสเพื่อนำไปแยกโปรตีนในเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีและทำการวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ต่อไป

3.5.2 การเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์

เตรียมชุดการเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์ สำหรับเครื่องแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า รุ่น mini-PROTEAN[®] 3 Cell (Bio Rad, U.S.A) ตามคู่มือของบริษัท จากนั้นทำการเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์ ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 การเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์สำหรับการแยกเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

สารเคมี	12.5 % separating gel (ml)	4 % stacking gel (ml)
น้ำกลั่น	3.2	6.1
1.5 M Tris/HCl, pH 8.8	2.5	-
0.5 M Tris/HCl, pH 6.8	-	2.5
30% acrylamide/bis solution (29:1)	4.2	1.3
10 % SDS	0.10	0.10
10 % APS	0.05	0.05
TEMED	0.01	0.01
ปริมาตรรวม (ml)	10	10

ทำการผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน โดย APS และ TEMED ให้ใส่เป็นตัวสุดท้าย พยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศ หลังจากเทชั้น separating gel ใช้ปิเปต isopropanol ลงบนชั้น separating gel ทันที เพื่อให้ผิวหน้าด้านบนเรียบ ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงเท stacking gel แล้วใส่หวี ปล่อยให้พักประมาณ 2 ชั่วโมง จึงสามารถนำเจลมาใช้ได้

3.5.3 การแยกโปรตีนเอนไซม์กลุ่มคาลเปินด้วยเทคนิค SDS-PAGE

นำโปรตีนที่สกัดตามวิธีการในข้อ 3.5.1.1 มาทำการแยกโปรตีนกลุ่มเอนไซม์คาลเปินด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) ด้วยเครื่องแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า รุ่น mini-PROTEAN[®] 3 Cell ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Delgado *et al.* (2001) ใช้ separating gel ความเข้มข้นของ 12.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้ stacking gel ความเข้มข้นของ 4 เปอร์เซ็นต์ โดยนำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ผสมกับ loading buffer ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 3 mg/ml แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นทำการหยอดโปรตีนตัวอย่างหลุมละ 60 μ g โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน PageRuler Plus Prestained Protein marker (Fermentus, Canada) หลังจากนั้นทำการแยกโปรตีนโดยใช้ running buffer เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 50 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์อื่นใดได้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรซินตกตะกอนแล้วเทน้ำกลั่นออก ทำซ้ำ 2-3 รอบ หลังจากนั้นจึงปรับสถานะของเรซินโดยการแช่เรซินใน equilibration buffer ใช้แท่งแก้วคน จนเรซินมีลักษณะเหนียว ก่อนการบรรจุลงคอลัมน์

ทำการเตรียมคอลัมน์โดยยัดคอลัมน์แก้ว ขนาด 1.5 x 40 เซนติเมตร กับที่ยัดที่ประกออบอยู่กับแท่นยัดบนฐาน เติม equilibration buffer ลงไปพอประมาณ นำสำลีสองไว้ที่ก้นคอลัมน์พร้อมกับใช้แท่งแก้วยาวๆ กดไล่ฟองอากาศออกจากสำลีสองให้หมด แล้วค่อยๆ เทเรซินที่เตรียมไว้ลงในคอลัมน์ผ่านกรวย โดยขณะเทเรซิน ลงในคอลัมน์ต้องทำการกวนตลอดเวลาเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากคอลัมน์ แล้วปล่อยให้เรซินเรียงตัวตามแรงโน้มถ่วงของโลก เป็นเวลา 60 นาที โดยทำการเทเรซินให้มีความสูงประมาณ 10 เซนติเมตร และให้ equilibration buffer มีความสูงกว่าระดับผิวหน้าเรซินประมาณ 1 เซนติเมตร ดังนั้น เรซินที่บรรจุลงคอลัมน์จะมีปริมาตรประมาณ 18 ml จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย equilibration buffer แล้วปรับวาล์ว ปลายเปิดด้านล่างของคอลัมน์ให้มีอัตราการไหลออกของสารละลายบัฟเฟอร์อย่างสม่ำเสมอ แล้วทำการปรับสถานะเรซินด้วย equilibration buffer อีกครั้งประมาณ 1-2 เท่าของปริมาตรเรซิน

3.6.2 การเติมตัวอย่างลงในคอลัมน์

ทำการแยกเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) โดยใช้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุเป็นเรซินชนิด DEAE Sephacel™ เมื่อเตรียมคอลัมน์ที่บรรจุเรซินเรียบร้อยแล้ว ทำการลดระดับ equilibration buffer ให้มีระดับสูงกว่าชั้นผิวเรซินประมาณ 1 เซนติเมตร โดยใช้ปิเปตดูดออกจากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดตามวิธีการในข้อ 3.5.1.2 ปิเปตลงบนผิวด้านหน้าเรซินเบาๆ เมื่อตัวอย่างผ่านเข้าไปในชั้นเรซินจนหมด ให้ดูดสารละลาย elution buffer ปริมาตรเล็กน้อยชะไล่ตัวอย่างโปรตีนลงมาแล้วทำการชะคอลัมน์ด้วย elution buffer ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเรซินที่สารละลายส่วนนี้ไปซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนที่ไม่จับกับเรซินในคอลัมน์ (unbound protein) ส่วนเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin จะจับอยู่กับเรซิน จากนั้นจึงทำการชะเอาเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin ออกจากคอลัมน์

3.6.3 การชะคอลัมน์

3.6.3.1 การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย NaCl แบบต่อเนื่อง (linear gradient method)

ทำการชะตัวอย่างออกจากคอลัมน์โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย NaCl แบบต่อเนื่อง ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Delgado *et al.* (2001) โดยใช้สารละลาย NaCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 20 ถึง 400 mM ต่อเนื่องกัน ดังนี้ 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380 และ 400 mM ความเข้มข้นละ 2 ml ตามลำดับ และทำ

การเก็บตัวอย่างที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ fraction ละ 2 ml และนำตัวอย่างในแต่ละ fraction ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280}) และทำการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และคำนวณกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ต่อไป

3.6.3.2 การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย NaCl แบบลำดับขั้น (stepwise method)

ทำการชะตัวอย่างออกจากคอลัมน์โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย NaCl แบบลำดับขั้น ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Geesink and Koochmarai. (1999) โดยภายหลังจากเติมตัวอย่างลงคอลัมน์เรียบร้อยแล้ว ให้ชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย 200 mM NaCl ปริมาตร 80 ml และชะคอลัมน์ต่อด้วยสารละลาย 400 mM NaCl ปริมาตร 80 ml ทำการเก็บตัวอย่างที่ชะออกจากคอลัมน์ fraction ละ 2 ml นำตัวอย่างแต่ละ fraction ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{280} และทำการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และคำนวณกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ต่อไป

3.7 การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเปิน

การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain และ m-calpain มีหลักการโดยสังเขป ดังนี้ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain และ m-calpain สามารถวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{280} ของเปปไทด์ ที่ได้จากการย่อยยับสเตรท เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ด้วย reaction mixture I ที่มีส่วนผสมหลัก ๆ คือ CaCl_2 เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ และเคซีน (casein) เป็นยับสเตรท บ่มภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย TCA และนำไปปั่นเหวี่ยง ส่วนใสที่ได้นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{280} ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นั้นจะนำไปคำนวณเป็นค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ต่อไป สำหรับเอนไซม์ calpastatin วิเคราะห์ได้จากความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ m-calpain โดยมีหน่วยเป็นยูนิตต่อเนื้อ 1 กรัม (units/g of meat)

3.7.1 การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin

ทำการวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Geesink and Koochmarai (1999) โดยนำตัวอย่างที่ชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 200 mM NaCl ต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อให้ μ -calpain เสื่อมสภาพ จากนั้นแช่น้ำแข็งแล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงรุ่น Universal 32R (Hettich, Germany) ที่ความเร็ว $1,500 \times g_{\text{max}}$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำการเก็บส่วนใสในน้ำแข็ง จากนั้นทำการเตรียมปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงการเตรียมปฏิกิริยาเพื่อการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ calpastatin

ปฏิกิริยา	m-calpain (μ l)	ตัวอย่าง* (μ l)	Reaction mixture I ^a (μ l)	Reaction mixture II ^b (μ l)	dH ₂ O (μ l)	Total (μ l)
ควบคุม 1	150	-	150	-	100	400
ควบคุม 2	-	100	-	150	150	400
ทดสอบ	150	100	150	-	-	400

* ตัวอย่าง โปรตีนที่ชะจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 200 mM NaCl

^a Reaction mixture I (100 mM Tris-acetic acid, pH 7.5, 10 mM MCE, 5 mg/ml Casein, 1 mM NaN₃, 5 mM CaCl₂)

^b Reaction mixture II (100 mM Tris-acetic acid, pH 7.5, 10 mM MCE, 5 mg/ml Casein, 1 mM NaN₃, 10 mM EDTA)

โดยหลอดควบคุม 1 ใส่ m-calpain และ CaCl₂ ให้เป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตั้งต้น ส่วนหลอดควบคุม 2 ไม่ใส่ CaCl₂ ให้เป็น sample blank

ทำการบ่มหลอดควบคุม 1 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที หลังจากนั้นนำทุกหลอดทดลองมาบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิ (Vision, Korea) นาน 60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย TCA ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 400 μ l จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Universal 32R (Hettich, Germany) ที่ความเร็ว 2,000 x g_{max} ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A₂₈₀ สามารถคำนวณค่าการทำงานของเอนไซม์ calpastatin มีหน่วยเป็นยูนิตต่อเนื้อ 1 กรัม (units/g of meat) โดยคำนวณจากค่าการทำงานของเอนไซม์ m-calpain ในปฏิกิริยาที่หายไป เนื่องจากการเข้ายับยั้งของเอนไซม์ calpastatin ในตัวอย่างโปรตีน มีสูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin} = A_{280} \text{ หลอดควบคุม 1} - (A_{280} \text{ หลอดทดสอบ} - A_{280} \text{ หลอดควบคุม 2}) \times \text{dilution factor}$$

กำหนดให้ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin 1 unit หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ยับยั้งการทำงานของ m-calpain 1 unit ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 60 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.2 การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain

ทำการวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Geesink and Koohmaraie (1999) เอนไซม์ที่แยกได้จากการชะคอแลมน์ด้วยสารละลาย NaCl แบบลำดับขั้น โดยใช้สารละลาย 200 mM NaCl ชะเอาเอนไซม์ μ -calpain และ calpastatin ออกมาพร้อมกัน เมื่อทำการต้มตัวอย่างใน fraction นี้จึงทำให้ μ -calpain เสื่อมสภาพไป แต่ calpastatin ยังไม่เสื่อมสภาพ ดังนั้น จึงสามารถวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain ได้จากค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin หลังต้มลบด้วยก่อนต้ม มีสูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ } \mu\text{-calpain} = \text{กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin หลังต้ม} - \text{กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin ก่อนต้ม}$$

กำหนดให้ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain 1 unit หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อย casein ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น 1 unit ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 60 นาที

3.7.3 การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain

ทำการวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Koohmaraie (1990) โดยทำการเตรียมปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 แสดงการเตรียมปฏิกิริยาเพื่อการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ m-calpain

ปฏิกิริยา	Reaction mixture I ^a (μ l)	Reaction mixture II ^b (μ l)	ตัวอย่าง [*] (μ l)	total volume (μ l)
ควบคุม	-	150	50	200
ทดสอบ	150	-	50	200

* ตัวอย่างโปรตีนที่ชะจากคอแลมน์ด้วยสารละลาย 400 mM NaCl

^a Reaction mixture I (100 mM Tris-acetic acid, pH 7.5, 10 mM MCE, 5 mg/ml Casein, 1 mM NaN_3 , 5 mM CaCl_2)

^b Reaction mixture II (100 mM Tris-acetic acid, pH 7.5, 10 mM MCE, 5 mg/ml Casein, 1 mM NaN_3 , 10 mM EDTA)

นำหลอดปฏิบัติการไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิ (Vision, Korea) นาน 60 นาที หยดปฏิบัติการด้วย TCA ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Universal 32R (Hettich, Germany) ที่ความเร็ว 2,000 x g_{max} ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{280} แล้วคำนวณค่าการทำงานของเอนไซม์ m-calpain มีสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain} = (A_{280} \text{ หลอดทดสอบ} - A_{280} \text{ หลอดควบคุม}) \times \text{dilution factor}$$

กำหนดให้ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain 1 unit หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อย casein ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น 1 unit ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 60 นาที

3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองโดยใช้ Completely Randomized Design (CRD) โดยทำการศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาการบ่มที่มีต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อและค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan โดยมีแบบหุ่นทางสถิติ ดังนี้

$$Y_{ij} = \mu + A_i + e_{ij}$$

Y_{ij} = ลักษณะที่ศึกษา คือ ค่าแรงตัดผ่านเนื้อและค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin ของสัตว์ตัวที่ j ($j = 1, 2, 3, \dots, 10$)

μ = ค่าเฉลี่ยของลักษณะที่ศึกษา

A_i = ระยะเวลาการบ่มเนื้อกว้างที่ i ($i = 1, 2, 3, \dots, 6$, โดย 1 ถึง 6 เท่ากับระยะเวลาการบ่มที่ 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วันหลังสัตว์ตาย)

e_{ij} = ความคลาดเคลื่อนทั้งหมดของการทดลอง

ส่วนการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อและค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain, m-calpai และ calpastatin โดยใช้ Pearson Correlation

บ่มเนื้อที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญเชิงทางสถิติ ($p \leq 0.001$) โดยค่าแรงตัดของเนื้อกวางที่ผ่านการบ่มที่ 1, 7 และ 21 วันหลังฆ่า มีค่าลดลงเท่ากับ 14.20, 11.40 และ 6.80 kg/cm² ตามลำดับ และเมื่อบ่มเนื้อภายหลังจากวันที่ 21 หลังฆ่า เป็นต้นไป พบว่า ค่าแรงตัดผ่านเนื้อไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) เช่นเดียวกับกับการศึกษาของ Wiklund *et al.* (2010b) พบว่า เนื้อสันนอกของกวางแดงที่ผ่านการบ่ม 21 วันหลังฆ่า มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อ เท่ากับ 4.28±0.38 kg/cm² ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าแรงตัดผ่านเนื้อของกวางรูซ่าที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ (4.34±0.10 kg/cm²) และจากการศึกษาของ Volpelli *et al.* (2003) พบว่า เนื้อสันนอกของกวางพันธุ์ฟอลโล (*Dama dama*) ที่ผ่านการบ่ม 7 วัน มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อ เท่ากับ 4.88 kg/cm² และจากการศึกษาของ Wiklund *et al.* (1997) พบว่า เนื้อสันนอกของกวางเรนเดียร์ (*Rangifer tarandus tarandus* L.) ที่ผ่านการบ่มที่ 3, 7 และ 14 วัน มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อ มีแนวโน้มลดลง ($p > 0.05$) มีค่าเท่ากับ 3.4±0.3, 2.6±0.2 และ 2.2±0.3 kg/cm² ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าแรงตัดผ่านเนื้อในแต่ละระยะเวลาการบ่มที่แตกต่างกัน

ระยะเวลาการบ่ม (วัน)	ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ¹ (kg/cm ²)
1	9.01±0.83 ^a
3	8.20±0.63 ^{ab}
5	6.92±0.67 ^{bc}
7	6.47±1.12 ^{bc}
14	5.12±0.88 ^{cd}
21	4.34±0.10 ^d

^{a,b,c,d} อักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

¹ Means±SD

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (kg/cm²) ระหว่างกวางแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	ระยะเวลาการบ่มเนื้อ (วัน)						อ้างอิง
	1	3	5	7	14	21	
กวางรูซ่า	9.01	8.20	6.92	6.47	5.12	4.34	การศึกษานี้
กวางฟอลโล	-	-	-	4.88	-	-	Volpelli <i>et al.</i> (2003)
กวางเรนเดียร์	-	3.40	-	2.60	2.20	-	Wiklund <i>et al.</i> (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการเปรียบเทียบค่าแรงตัดผ่านเนื้อระหว่างกวางแต่ละสายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่า เนื้อสันนอกของกวาง 3 สายพันธุ์ ที่ผ่านการบ่มที่ระยะเวลาที่เท่ากันที่ 7 วันหลังฆ่า ค่าแรงตัดผ่านเนื้อของกวางรูซามีค่ามากที่สุด รองลงมาคือกวางฟอลโลและกวางเรนเดียร์มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อน้อยสุด มีค่าเท่ากับ 6.47, 4.88 และ 2.60 kg/cm² ตามลำดับ แสดงว่าเนื้อแกวกรูซามีความเหนียวมากกว่าเนื้อกวางฟอลโลและกวางเรนเดียร์ ตามลำดับ

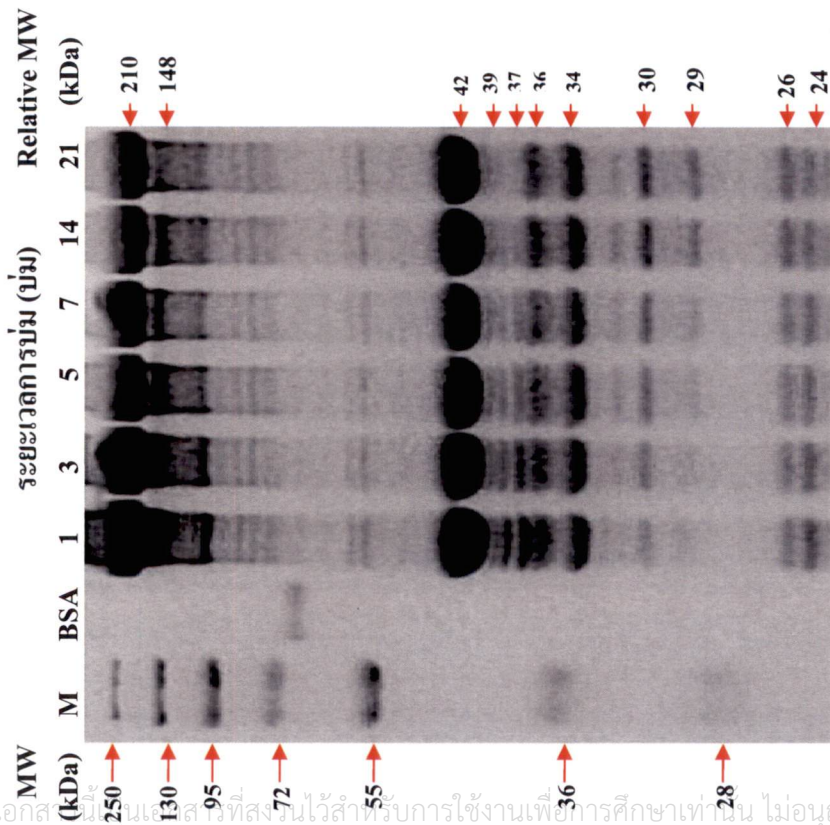
การที่ค่าแรงตัดผ่านเนื้อในแต่ละระยะเวลาการบ่มมีค่าลดลง เหตุผลเนื่องมาจากระหว่างการบ่มเนื้อเกิดการชะลอการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ โดยเอนไซม์ที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์ โดยภายหลังสัตว์ตาย เอนไซม์เหล่านี้จะเข้าย่อยสลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของกล้ามเนื้อ มีผลทำให้โครงสร้างเส้นใยกล้ามเนื้อถูกทำลายและแรงยึดระหว่างโครงสร้างต่างๆ ลดลง (Dransfield. 1994) และเมื่อนำชิ้นเนื้อที่ผ่านการบ่มมาทำการวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ จึงพบว่า มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลง (เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้น)

ปริมาณการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างกล้ามเนื้อหลังสัตว์ตาย มีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อ เมื่อมีการย่อยสลายโปรตีนดังกล่าวมากขึ้นจะทำให้ความนุ่มของเนื้อเพิ่มขึ้น (Koochmaraie and Geesink. 2006) และระยะเวลาการบ่มเนื้อที่นานขึ้นมีผลทำให้ค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลง เป็นผลเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มคาลเปนที่ทำการสลายโปรตีน Tn-T ในกล้ามเนื้อ ทำให้การเพิ่มระยะเวลาการบ่มจึงสามารถลดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้น (Peason and Young 1989)

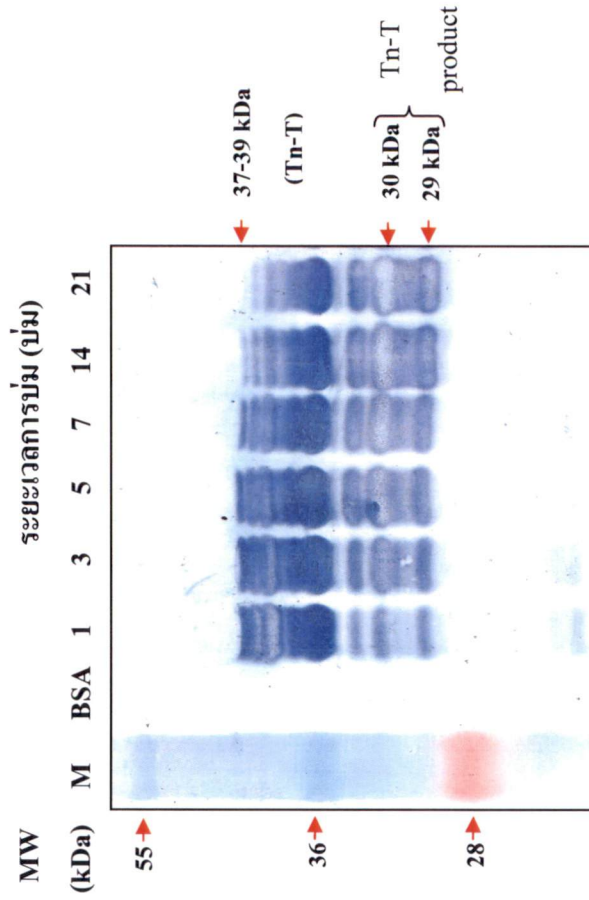
จากผลการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับค่าแรงตัดผ่านเนื้อในกวางรูซ่าในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มระยะเวลาการบ่มที่นานขึ้นสามารถลดค่าแรงตัดผ่านเนื้อได้ในแต่ละระยะเวลาการบ่มได้ โดยเนื้อที่ผ่านการบ่มที่ 1 วัน มีค่าลดลงเมื่อสิ้นสุดการบ่มที่ 21 วัน (9.01 ± 0.83 kg/cm² และ 4.34 ± 0.10 kg/cm²) ($p < 0.01$) ซึ่งในช่วงวันที่ 14 ของการบ่มเนื้อนั้นค่าแรงตัดผ่านเนื้อไม่แตกต่างกับวันที่ 21 ของการบ่มเนื้อ (5.12 ± 0.88 kg/cm² และ 4.34 ± 0.10 kg/cm²) ($p > 0.05$) หากเราทำการบ่มเนื้อนานขึ้น ค่าแรงตัดผ่านเนื้ออาจจะลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้น ผู้ประกอบการหรือผู้เลี้ยงกวางเพื่อการผลิตเนื้อ สามารถทำการบ่มเนื้อกวางรูซ่าเพียง 14 วัน ก็น่าจะเพียงพอแล้ว เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต นอกจากนี้การบ่มที่นานเกินไปอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในด้านของคุณภาพเนื้อ เนื่องจากการทำงานของจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนและการนำเสียของเนื้อ เนื่องมาจากสุขอนามัยในกระบวนการฆ่าและตัดแต่งที่ไม่ถูกต้อง

4.2 รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อในแต่ละระยะการบ่ม

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อสันนอกของกวางรูซ่า ในแต่ละระยะการบ่มหลังฆ่า พบว่า ภายหลังจากโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ภาพที่ 4.1 ก) ปรากฏ แถบของโปรตีนหลายขนาดด้วยกัน ได้แก่ แถบโปรตีนขนาดประมาณ 210, 148 และ 42 kDa ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลง แถบโปรตีนดังกล่าวคาดว่าเป็นโปรตีน myosin, α -actin และ actin ซึ่งเป็นโปรตีน โครงสร้างของเส้นใยกล้ามเนื้อหลักและไม่ย่อยสลายได้ง่าย ขณะเดียวกันโปรตีนขนาดประมาณ 34 และ 36 kDa คาดว่าเป็นโปรตีน tropomyosin และโปรตีนขนาด 24 และ 26 kDa คาดว่าเป็นโปรตีน tropinin I ซึ่งโปรตีนเหล่านี้เป็นองค์ประกอบของไมโอไฟลาเมนต์ชนิดบางก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเช่นกัน ขณะที่แถบโปรตีนที่มีขนาด 37 และ 39 kDa มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน โดยความเข้มของโปรตีนขนาดดังกล่าวเริ่มจางหายไปตั้งแต่เริ่มบ่มเนื้อที่ 1 วันหลังฆ่า และไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 21 หลังฆ่า เนื่องจากเกิดการย่อยสลายของโปรตีนขนาดดังกล่าวจึงทำให้ความเข้มของแถบโปรตีน ขนาด 37 และ 39 kDa มีปริมาณลดลง ขณะเดียวกันก็ได้ปรากฏโพลีเปปไทด์ขนาด 29 และ 30 kDa โดยความเข้มของแถบโพลีเปปไทด์ขนาด 29 และ 30 kDa มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงวันที่ 21 ของการบ่มเนื้อ หลังจากนั้นเมื่อทำการตรวจยืนยันโปรตีนขนาด 37 และ 39 kDa ด้วยเทคนิค western blotting โดยใช้ monoclonal Tn-T เป็นแอนติบอดีตัวที่ 1 ซึ่งมีความจำเพาะต่อโปรตีน Tn-T จากการทดลอง (ภาพที่ 4.1 ข) พบว่า แอนติบอดีสามารถจับกับแถบโปรตีนที่มีขนาด 37 และ 39 kDa ได้ และโพลีเปปไทด์ขนาด 29 และ 30 kDa ดังนั้น จึงยืนยันว่าโปรตีนดังกล่าว คือโปรตีน Tn-T และเป็นผลผลิตที่เกิดจากการย่อยสลายตัวของโปรตีน Tn-T ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Wiklund *et al.* (1997) ที่ได้ทำการศึกษาในกล้ามเนื้อสันนอกของกวางเรนเดียร์ พบว่า ในแต่ละระยะการบ่มที่ 1, 3, 7 และ 14 วันหลังฆ่า เกิดการย่อยสลายตัวของโปรตีน Tn-T เพิ่มขึ้น โดยปรากฏแถบของโปรตีน Tn-T ที่มีปริมาณลดลง ขณะเดียวกัน Tn-T product ก็มีปริมาณเพิ่มขึ้น และ Huff-Lonergan *et al.* (1996) รายงานว่า การย่อยสลายตัวของโปรตีน Tn-T ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ calpain ซึ่งเข้าย่อยสลายโปรตีน Tn-T



(ก)



(ข)

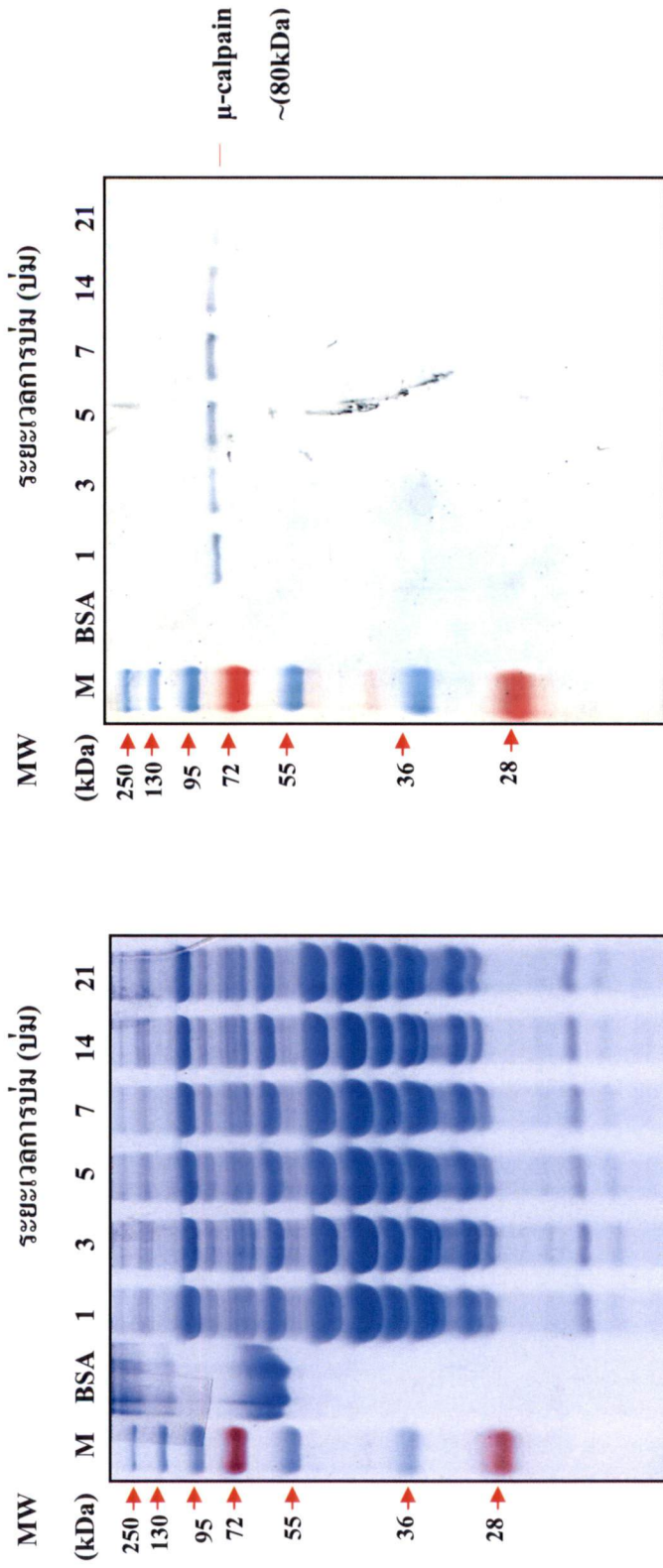
ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและโปรตีน Tn-T ในกล้ามเนื้อเนื้อสันนอกของควาญงูที่ระยะการบ่ม 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วันหลังฆ่า Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน PageRuler Plus Prestained Protein marker และ Lane BSA คือ bovine serum albumin 2 µg (ก) รูปแบบการสลายตัวของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ข) รูปแบบการสลายตัวของโปรตีน Tn-T ด้วยเทคนิค western blot

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไป
 ใช้อื่นๆโดยไม่ได้รับอนุญาต หากต้องการนำเอกสารนี้ไปใช้ กรุณาติดต่อเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การแสดงออกของเอนไซม์กลุ่มคาลเปนในแต่ละระยะเวลาการบ่มเนื้อ

4.3.1 ผลการแสดงออกของเอนไซม์ μ -calpain ในแต่ละระยะเวลาการบ่มเนื้อ

เมื่อเราสกัด โปรตีนกลุ่มเอนไซม์คาลเปนและนำมาแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ภาพที่ 4.2 ก) พบว่า ไม่สามารถระบุตำแหน่งของเอนไซม์ μ -calpain ได้ เนื่องจากปรากฏแถบโปรตีนขนาดอื่นๆ ด้วย ดังนั้นจึงทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค western blotting (ภาพที่ 4.2 ข) โดยใช้ monoclonal anti- μ -calpain เป็นแอนติบอดีตัวที่ 1 ในการจับเอนไซม์ μ -calpain โดยแอนติบอดีชนิดนี้จะทำปฏิกิริยากับ μ -calpain polypeptide บริเวณหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (80 kDa) ดังนั้น แถบโปรตีนที่ทำการตรวจสอบจึงเป็นส่วนของหน่วยย่อย 80 kDa และไม่ปรากฏแถบโปรตีนหน่วยย่อยขนาดเล็กที่มีขนาดเล็ก (28 kDa) จากผลการทดลอง พบว่า สามารถตรวจพบแถบเอนไซม์ μ -calpain ที่มีขนาดประมาณ 80 kDa ได้ในตัวอย่างเนื้อกวางที่ผ่านการบ่มที่ 1 ถึง 14 วันของการบ่มเนื้อ และหลังจากนั้น ตัวอย่างเนื้อที่ผ่านการบ่มที่ 21 วัน ได้ปรากฏแถบของเอนไซม์ μ -calpain มีความเข้มของโปรตีนไม่มาก แสดงว่า เนื้อที่ผ่านการบ่มที่ 21 วันหลังฆ่า มีปริมาณเอนไซม์ μ -calpain ลดลง



(ข)

(ค)

ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ μ-calpain ในกล้ามเนื้อสันนอกของกวางรูซ่าที่ระยะเวลาบ่ม 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วันหลังฆ่า

Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน PageRuler Plus Prestained Protein marker และ Lane BSA คือ bovine serum albumin 2 μg

(ก) รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเอนไซม์กลุ่มแคลเปินด้วยเทคนิค SDS-PAGE

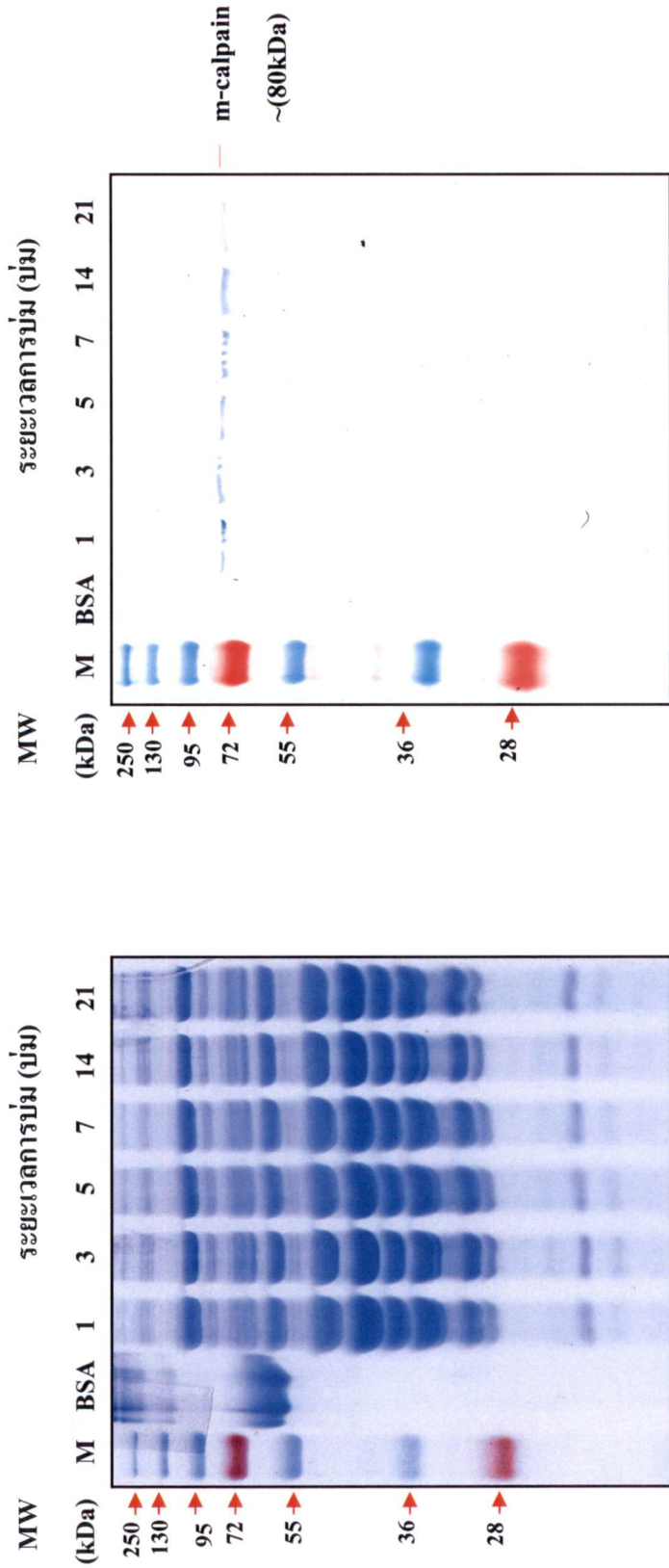
(ข) รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ μ-calpain วิเคราะห์โดยเทคนิค western blot ตรวจสอบโดยใช้ monoclonal anti-μ-calpain

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 ผลการแสดงผลของเอนไซม์ m-calpain ในแต่ละระยะเวลาการบ่มเนื้อ

เมื่อเรสกัดโปรตีนกลุ่มเอนไซม์คาลเปินและนำมาแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ภาพที่ 4.3 ก) พบว่า ไม่สามารถระบุตำแหน่งของเอนไซม์ m-calpain ได้ เนื่องจากปรากฏแถบโปรตีนขนาดอื่นๆ ด้วย ดังนั้นจึงทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค western blotting (ภาพที่ 4.3 ข) โดยใช้ monoclonal anti-m-calpain เป็นแอนติบอดีตัวที่ 1 ในการจับเอนไซม์ m-calpain โดยแอนติบอดีชนิดนี้จะทำปฏิกิริยากับ m-calpain polypeptide บริเวณหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (80 kDa) ดังนั้น แถบโปรตีนที่ทำการตรวจสอบจึงเป็นส่วนของหน่วยย่อย 80 kDa และไม่ปรากฏแถบโปรตีนหน่วยย่อยขนาดเล็กที่มีขนาดเล็ก (28 kDa) จากผลการทดลอง พบว่า สามารถตรวจพบแถบเอนไซม์ m-calpain ที่มีขนาดประมาณ 80 kDa ให้เห็นอย่างชัดเจนในตัวอย่างเนื้อทุกช่วงระยะเวลาของการบ่ม ตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงวันที่ 21 ของการบ่มเนื้อ หลังฆ่า โดยไม่เกิดการ autolysis เกิดขึ้น เนื่องจากไม่ปรากฏแถบของโปรตีนขนาดอื่นๆ ที่มีขนาดลดลง เมื่อสิ้นสุดการบ่มเนื้อที่ 21 วัน

การศึกษาการแสดงผลของเอนไซม์ μ -calpain และ m-calpain ในเนื้อกวางรูซ่าด้วยเทคนิค western blot ในครั้งนี้มีผลสอดคล้องกับ Boehm *et al.* (1998) ที่ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ μ -calpain และ m-calpain ในกล้ามเนื้อพับใน (*Semimembranosus*) ของโค โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงส่วนที่เป็นหน่วยย่อยขนาดใหญ่ 80 kDa พบว่า เอนไซม์ m-calpain ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อทำการบ่มเนื้อผ่านไป 7 วันหลังฆ่า แต่เอนไซม์ μ -calpain นั้น หน่วยย่อยขนาดใหญ่ 80 kDa มีขนาดลดลงเป็น 76 kDa



(ก)

(ข)

ภาพที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ m-calpain ในกล้ามเนื้อสันนอกของควารูซ่าที่ระยะการบ่ม 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วันหลังฆ่า

Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน PageRuler Plus Prestained Protein และ Lane BSA คือ bovine serum albumin 2 µg

(ก) รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเอนไซม์กลุ่มแคลาซินด้วยเทคนิค SDS-PAGE

(ข) รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ m-calpain วิเคราะห์โดยเทคนิค western blot ตรวจสอบโดยใช้ monoclonal anti-m-calpain

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

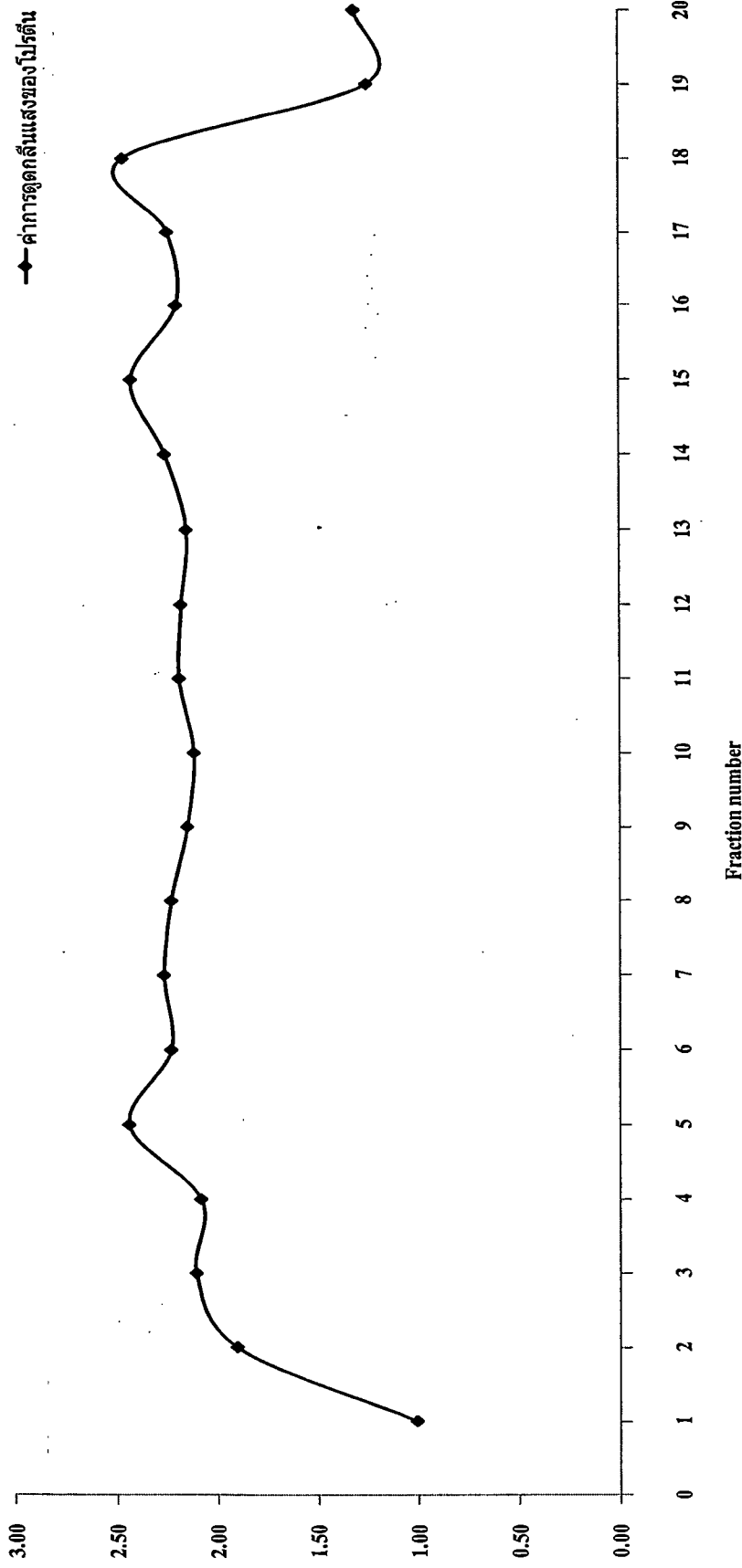
4.3.3 ผลการแสดงออกของเอนไซม์ calpastatin ในแต่ละระยะเวลาการบ่มเนื้อ

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของเอนไซม์ calpastatin ด้วยเทคนิค western blotting โดยใช้ monoclonal anti-calpastatin เป็นแอนติบอดีตัวที่ 1 ในการจับเอนไซม์ calpastatin โดยแอนติบอดีชนิดนี้จะทำปฏิกิริยากับ calpastatin polypeptide ที่มีขนาด 150, 125, 90 และ 70 kDa จากผลการทดลองพบว่า ไม่สามารถตรวจสอบเอนไซม์ calpastatin ในเนื้อกวางได้ อาจมีผลเนื่องมาจากโปรตีนที่ใช้ผลิตแอนติบอดีชนิดนี้นำมาจากกล้ามเนื้อ โคอาจะมีผลทำให้ไม่สามารถทำปฏิกิริยาต่อ calpastatin ในกล้ามเนื้อกวางได้

4.4 การทดสอบความเข้มข้นของสารละลาย NaCl ที่เหมาะสมในการชะตัวอย่าง

4.4.1 ผลการชะคอลัมน์โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย NaCl แบบต่อเนื่อง (linear gradient method)

จากการชะคอลัมน์เพื่อแยกเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin โดยใช้สารละลาย NaCl ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นแบบต่อเนื่อง (20-400 mM) พบว่า ภายหลังจากนำตัวอย่างโปรตีนที่ชะจากคอลัมน์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{280} ซึ่งบ่งบอกถึงปริมาณโปรตีนที่ชะออกจากคอลัมน์และการชะคอลัมน์โดยวิธีนี้ทำให้โปรตีนถูกชะออกจากคอลัมน์อย่างต่อเนื่องทำให้โปรตีนในแต่ละ fraction ไม่แยกออกจากกัน ทำให้ไม่สามารถแยกเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin ไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ (ภาพที่ 4.4) ดังนั้น การชะตัวอย่างโดยวิธีนี้จึงไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มแคลเปินได้



ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง โปรตีน (means±SD) ที่ระออกจากการระกอลึมนั้ด้วยความเพิ่มขงสารละลาย NaCl แบบต่อเนื่อง ความเข้มข้นตั้งแต่ 20-400 mM (2 ml/fraction)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ผลการชะคอตัมน์โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย NaCl แบบลำดับขั้น (stepwise method)

การจากทดสอบความเข้มข้นของสารละลาย NaCl ที่เหมาะสมในการชะตัวอย่างเอนไซม์ กลุ่มคาลเปิน โดยใช้สารละลาย 200 mM NaCl และ 400 mM NaCl ตามลำดับ พบว่า เอนไซม์ μ -calpain จะถูกชะออกจากคอตัมน์พร้อมกับ calpastatin เมื่อชะคอตัมน์ด้วยสารละลาย 200 mM NaCl หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย NaCl เป็น 400 mM ในการชะคอตัมน์สามารถแยกส่วนของ เอนไซม์ m-calpain ออกมาได้ ตามลำดับ

ภายหลังจากนำตัวอย่างที่เก็บได้ fraction ละ 2 ml จากการชะคอตัมน์ด้วยสารละลาย 200 mM NaCl และ 400 mM NaCl ความเข้มข้นละ 80 ml ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{280} และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟ พบว่า ลักษณะพีคที่ปรากฏนั้นเป็นรูปประฆังค่าและแสดงเส้นฐานของพีคค่อนข้างชัดเจน โดยเป็นการบ่งบอกปริมาณ โปรตีนที่ชะออกจากคอตัมน์ ดังแสดงในภาพที่ 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ

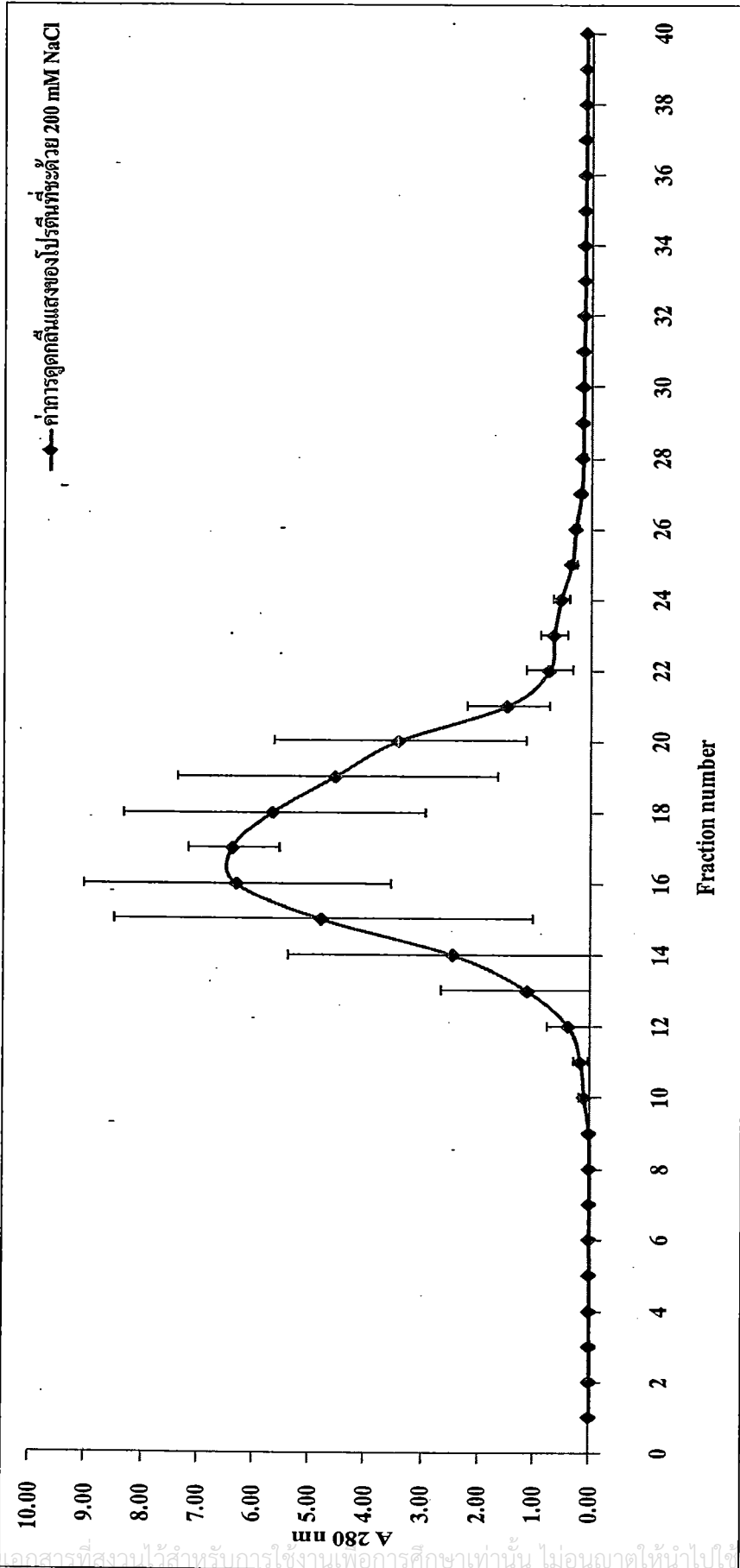
โดยตัวอย่างที่ชะด้วยสารละลาย 200 mM NaCl (ภาพที่ 4.5) พบว่า โปรตีนเริ่มชะออกมาที่ fraction ที่ 10 มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.109 ± 0.116 และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ fraction ที่ 17 เท่ากับ 6.386 ± 0.823 และค่าการดูดกลืนแสงลดลงจนถึงประมาณ fraction ที่ 27 ส่วนตัวอย่างที่ชะด้วยสารละลาย 400 mM NaCl (ภาพที่ 4.6) พบว่า โปรตีนเริ่มชะออกมาที่ fraction ที่ 10 มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.226 ± 0.059 และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ fraction ที่ 12 ที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.682 ± 0.096 และค่าการดูดกลืนแสงลดลงจนถึงประมาณ fraction ที่ 22

เมื่อนำตัวอย่างที่ชะจากคอตัมน์ไปแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า ตัวอย่างที่ชะออกจากคอตัมน์ด้วยสารละลาย 200 mM NaCl (ภาพที่ 4.7) ปรากฏแถบของโปรตีนตั้งแต่ fraction ที่ 13 ถึง fraction ที่ 27 โดยความเข้มของแถบโปรตีนมากที่สุดใน fraction ที่ 17 และ 18 ส่วนตัวอย่างที่ชะออกจากคอตัมน์ด้วยสารละลาย 400 mM NaCl (ภาพที่ 4.8) ปรากฏแถบของโปรตีนตั้งแต่ fraction ที่ 11 ถึง fraction ที่ 22 โดยความเข้มของแถบโปรตีนมากที่สุดใน fraction ที่ 15 และ 16

นอกจากนี้ โปรตีนที่ชะออกจากคอตัมน์ยังได้นำมาตรวจสอบค่ากิจกรรมการทำงานของ เอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin พบว่า โปรตีนที่ชะออกจากคอตัมน์ด้วยสารละลาย 200 mM NaCl มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain ใน fraction ที่ 8 ถึง 20 โดยมีค่าสูงสุดที่ fraction ที่ 18 มีค่าเท่ากับ 0.122 ± 0.106 units/g of meat (ภาพที่ 4.9) และมีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin ใน fraction ที่ 14 ถึง 22 โดยมีค่าสูงสุดที่ fraction ที่ 17 มีค่าเท่ากับ 0.196 ± 0.053 units/g of meat (ภาพที่ 4.11) ส่วนโปรตีนที่ชะออกจากคอตัมน์ด้วยสารละลาย 400 mM NaCl มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain ใน fraction ที่ 13 ถึง 20 โดยมีค่าสูงสุดที่ fraction ที่ 16 มีค่าเท่ากับ 0.153 ± 0.023 units/g of meat (ภาพที่ 4.10)

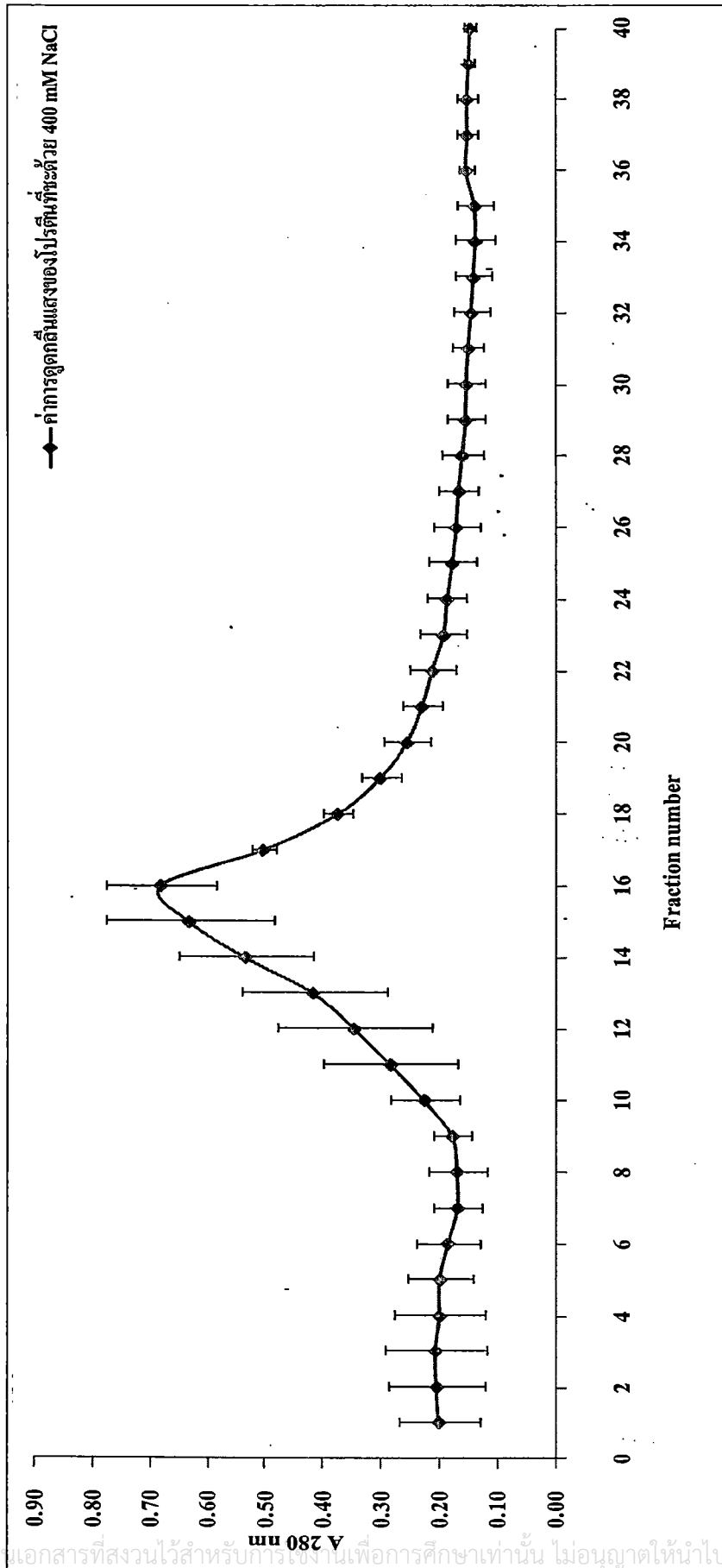
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืน, วิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin ร่วมกัน พบว่า ในการชะลอตัวโดยสารละลาย 200 mM NaCl และสารละลาย 400 mM NaCl เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด จะถูกชะออกมาใน fraction ที่ประมาณ 10 ถึง 20 ดังนั้นในการทดลอง จึงทำการเก็บตัวอย่างเฉพาะ fraction ที่ 10 ถึง 20 เท่านั้น



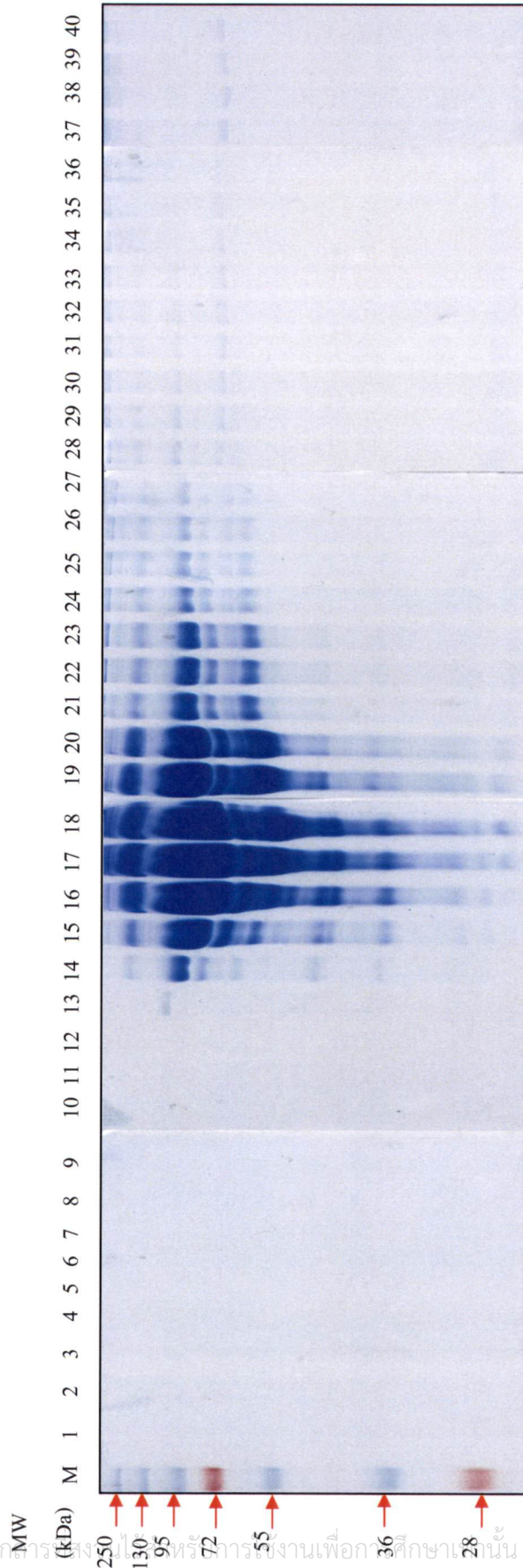
ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างโปรตีน (means±SD) ที่ชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 200 mM NaCl (2 ml/fraction)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างโปรตีน (means±SD) ที่ชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 400 mM NaCl (2 ml/fraction)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

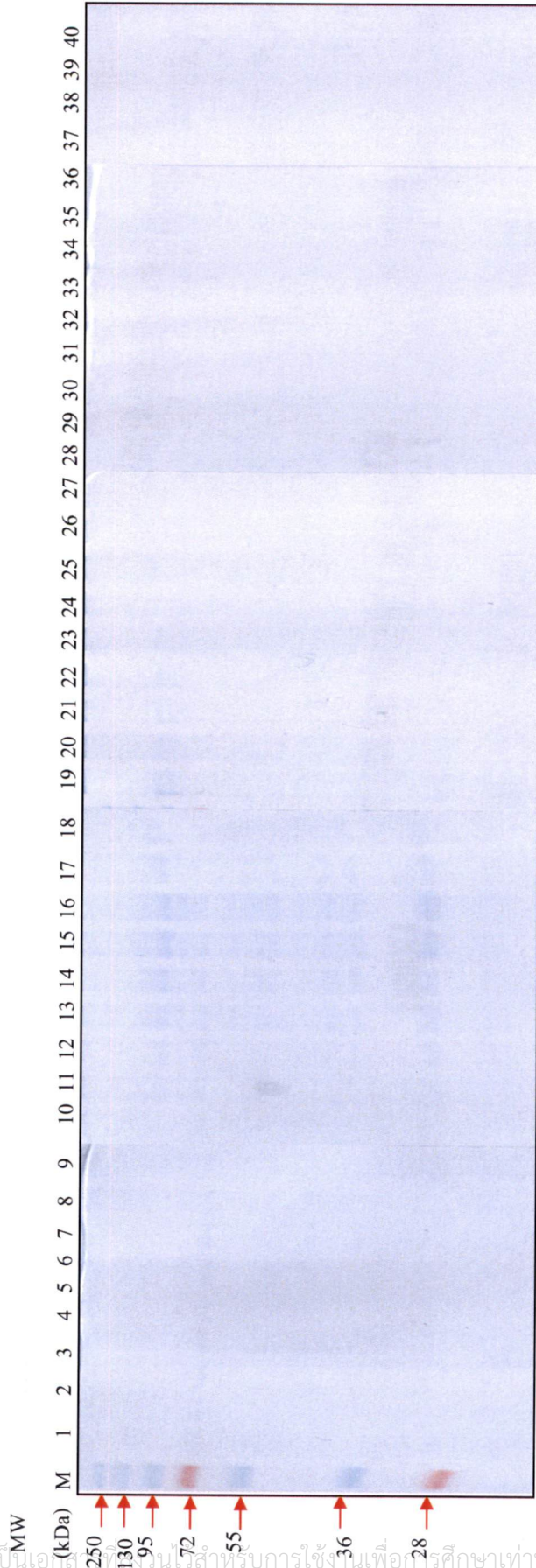


ภาพที่ 4.7 ภาพ SDS-PAGE แสดงปริมาณโปรตีนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 200 mM NaCl

Lane M = โปรตีนมาตรฐาน PageRuler Plus Prestained Protein marker

Lane 1-40 = โปรตีนที่ชะจากคอลัมน์ fraction ที่ 1-40 (2ml/fraction)

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

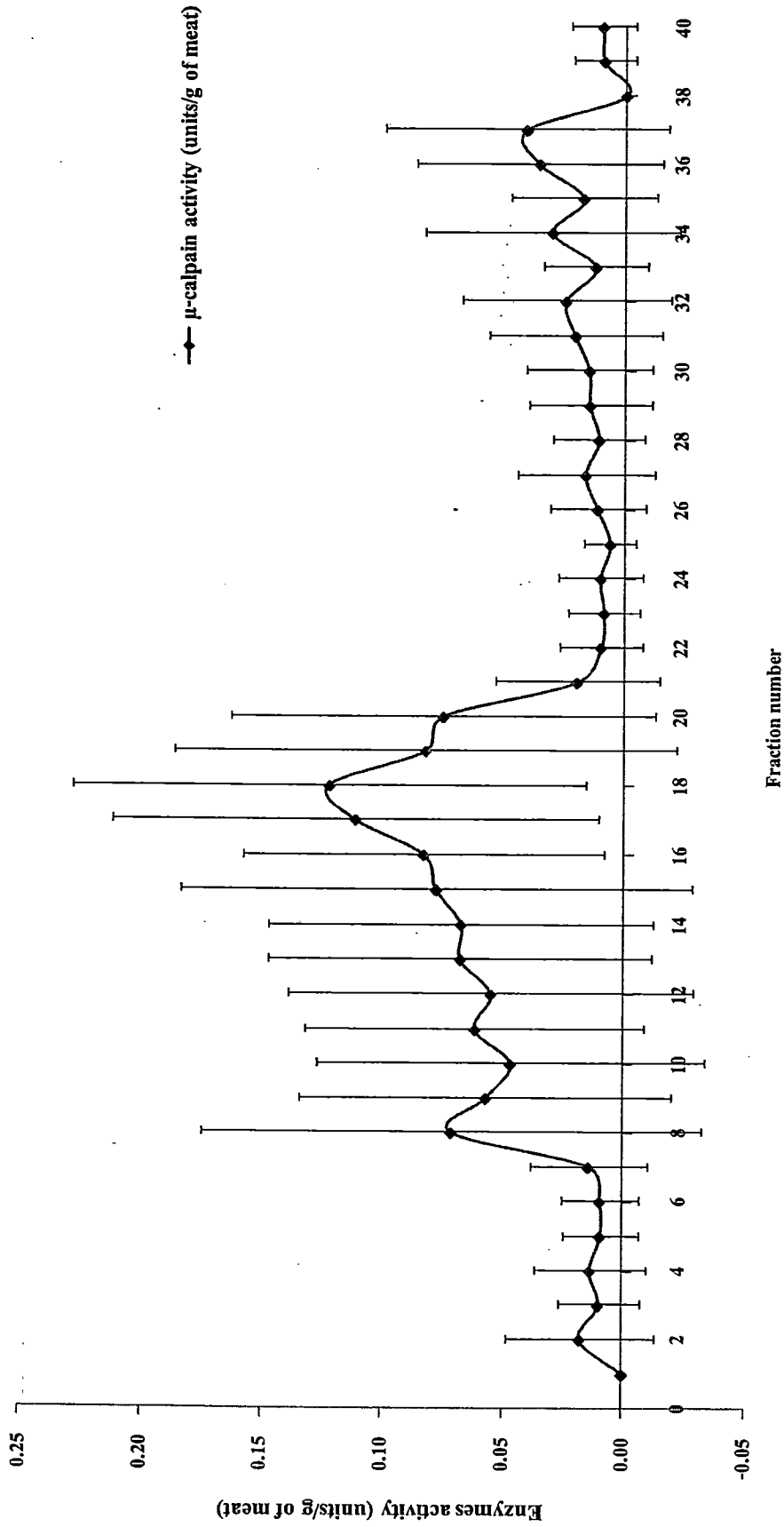


ภาพที่ 4.8 ภาพ SDS-PAGE แสดงปริมาณโปรตีนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 400 mM NaCl

Lane M = โปรตีนมาตรฐาน PageRuler Plus Prestained Protein marker

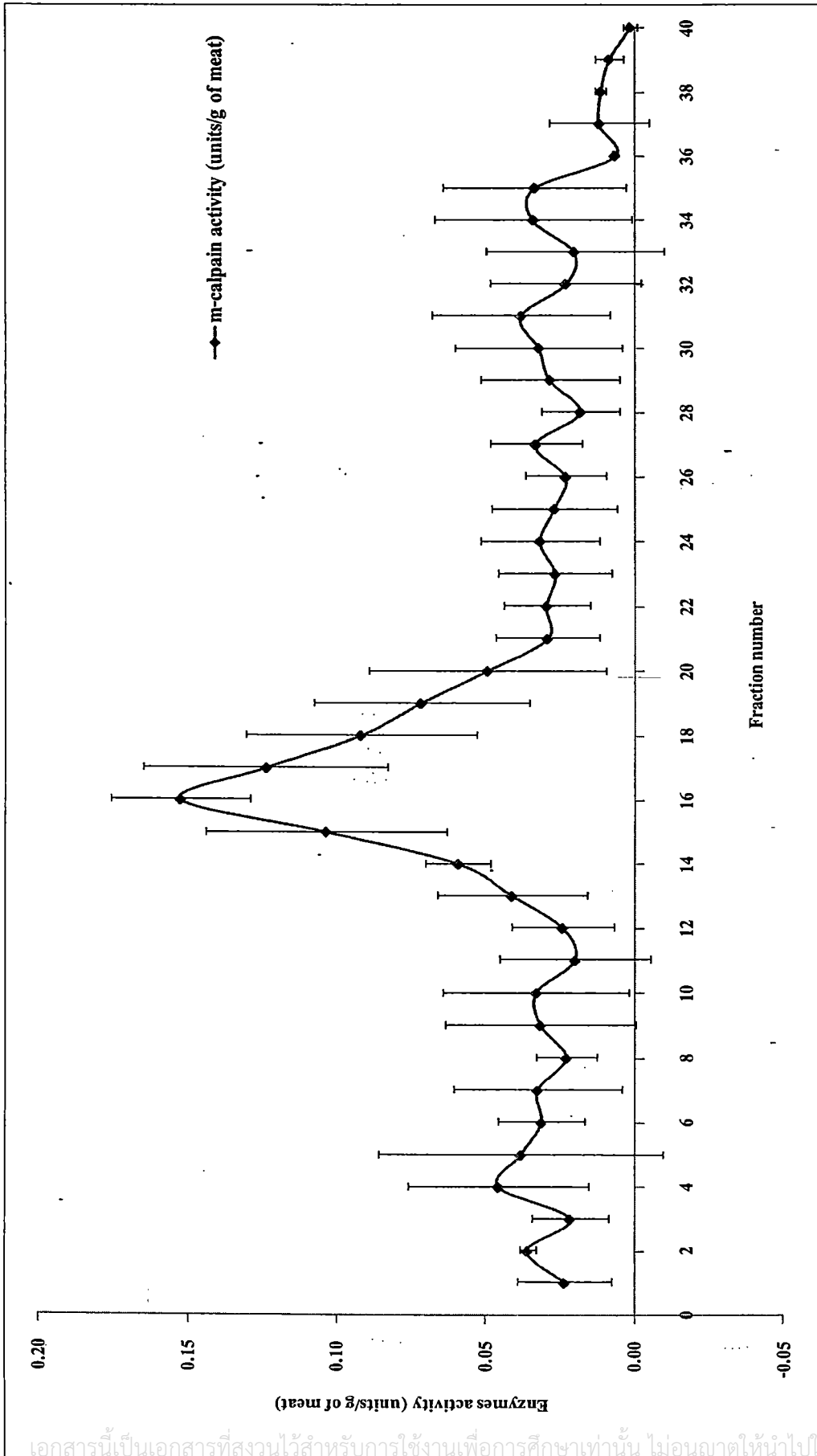
Lane 1-40 = โปรตีนที่ชะจากคอลัมน์ fraction ที่ 1-40 (2ml/fraction)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ทางโรงเรียนได้รับบริการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



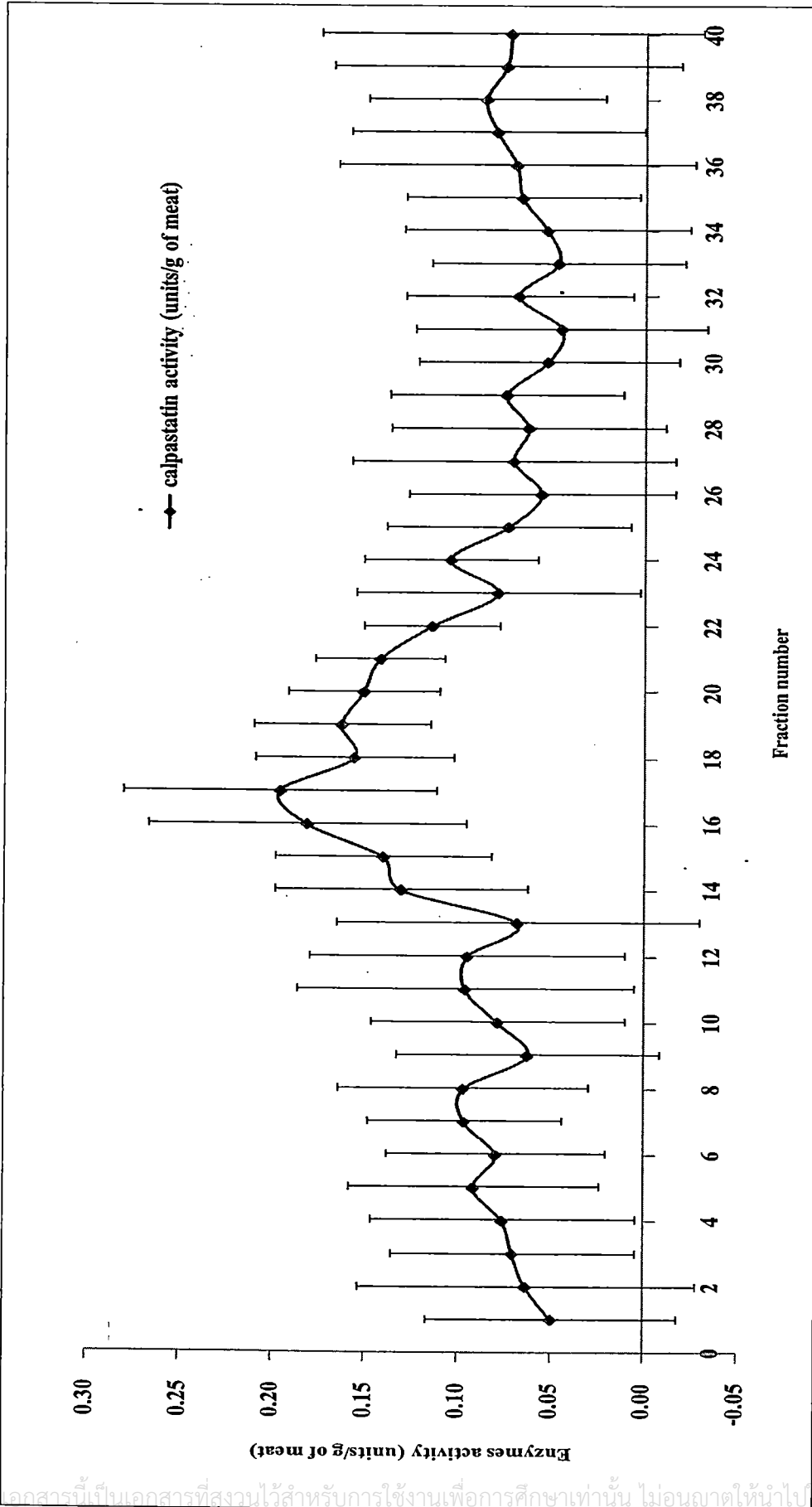
ภาพที่ 4.9 กราฟแสดงค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ-calpain (means±SD) ของตัวอย่างสารละลาย 200 mM NaCl (2ml/fraction)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain (means±SD) ตรวจจับสารละลาย 400 mM NaCl (2ml/fraction)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



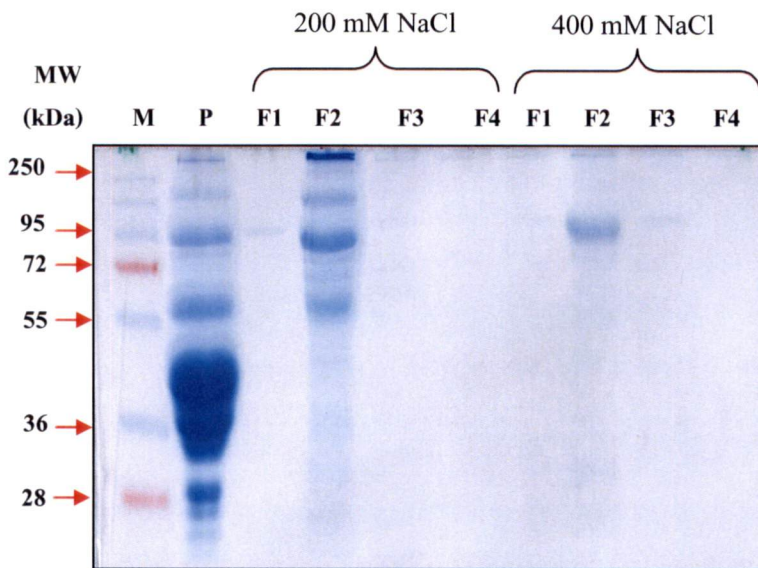
ภาพที่ 4.11 กราฟแสดงค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin (means±SD) ซึ่งด้วยสารละลาย 200 mM NaCl (2ml/fraction)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การวิเคราะห์โปรตีนที่หะด้วยคอลัมน์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ในการศึกษาครั้งนี้ จากผลการทดสอบความเข้มข้นของสารละลาย NaCl ที่เหมาะสมในการชะตัวอย่าง พบว่า การชะตัวอย่างโดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย NaCl แบบลำดับขั้น เป็นวิธีที่เหมาะสมในการแยกเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin เพื่อนำมาวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ โดยสามารถแยกเอนไซม์ μ -calpain ออกมาพร้อมกับ calpastatin โดยการชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย 200 mM NaCl ส่วน m-calpain แยกได้โดยการชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย 400 mM NaCl ความเข้มข้นละ 80 ml ตามลำดับ พบว่า fraction ที่ 10 ถึง 20 เหมาะสมในการนำมาวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ จึงได้ทำการปรับวิธีการเก็บตัวอย่างจากคอลัมน์เป็น fraction ละ 20 ml ซึ่งจะได้ 4 fraction ต่อการชะด้วยสารละลาย NaCl แต่ละความเข้มข้น เมื่อนำตัวอย่างใน fraction ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ภาพที่ 4.12) พบว่า fraction ที่ 2 ของการชะแต่ละความเข้มข้นปรากฏแถบโปรตีนอย่างชัดเจน ขณะที่ fraction อื่นๆ ไม่ปรากฏแถบโปรตีนขึ้นแต่อย่างใด ดังนั้น fraction ที่ 2 จึงเป็น fraction ที่เหมาะสมในการนำมาวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในการทดลองครั้งนี้

เมื่อนำตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกของกวางรุซ่าที่ผ่านการบ่มในแต่ละระยะ (1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน หลังฆ่า) มาทำการสกัดโปรตีนตามวิธีการในข้อ 3.5.1.2 จากนั้นจึงนำโปรตีนที่สกัดได้แต่ละระยะเวลาการบ่มมาทำการแยกเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin โดย 1 ตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ในแต่ละระยะเวลาการบ่มจะต้องนำมาแยกเอนไซม์ผ่านคอลัมน์โดยจะต้องทำการเตรียมและบรรจุเรซินใหม่ทุกครั้ง (ตัวอย่างเนื้อ 1 ระยะเวลาบ่มต่อ 1 คอลัมน์) หลังจากนั้นทำการชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย NaCl แบบลำดับขั้น (200 mM และ 400 mM NaCl) ความเข้มข้นๆ ละ 80 ml และทำการเก็บตัวอย่าง fraction ละ 20 ml ต่อเนื่องกัน ต่อการชะด้วยสารละลาย NaCl แต่ละความเข้มข้น โดยตัวอย่างที่เก็บได้จากการชะคอลัมน์แต่ละความเข้มข้นต้องแยกออกจากกัน หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างใน fraction ที่ 2 มาทำการวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์และคำนวณค่าการทำงานของเอนไซม์ต่อไป



ภาพที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ของโปรตีนที่ชะจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 200 mM NaCl และสารละลาย 400 mM NaCl

Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน PageRuler Plus Prestained Protein

Lane P คือ ตัวอย่างโปรตีนก่อนการทำบริสุทธิ์

Lane F1-F4 คือ ตัวอย่างโปรตีน fraction ที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ (fraction ละ 20 ml)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเปนินในแต่ละระยะการบ่ม

4.6.1 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain

จากการศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาการบ่มที่มีต่อค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain พบว่า เมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อเพิ่มขึ้น กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) เนื้อที่ผ่านการบ่มที่ 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน มีค่าเท่ากับ $1.496 \pm 0.0.423$, 1.052 ± 0.544 , 0.736 ± 0.466 , 0.606 ± 0.455 , 0.460 ± 0.329 และ 0.194 ± 0.278 units/g of meat ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) โดยเนื้อกวางที่ผ่านการบ่มช่วงระยะเวลาที่ 1 วัน ถึง 3 วัน นั้นค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain มีค่าลดลง แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ในขณะที่วันที่ 7 จนถึง สิ้นสุดการบ่มเนื้อที่ 21 วัน หลังจากนั้น กลับพบว่า ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain ลดลงโดยเหลือค่ากิจกรรมการทำงานน้อยกว่าครึ่งหนึ่ง (0.606 ± 0.455 ถึง 0.194 ± 0.278 units/g of meat) ของค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain ในวันที่ 1 ของการบ่มเนื้อ ($1.496 \pm 0.0.423$ units/g of meat) โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อสิ้นสุดการบ่มเนื้อ ที่ 21 วัน ปรากฏว่า ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain นั้น มีค่าเหลืออยู่เพียงแค่ 0.194 units/g of meat เท่านั้น แสดงว่าเอนไซม์ μ -calpain มีกิจกรรมการทำงานมากในช่วงแรกของการบ่มเนื้อ คือ 1-3 วัน ในช่วงหลังของการบ่มเนื้อ เอนไซม์ μ -calpain มีการทำงานลดลง ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ Taylor *et al.* (1995)

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain (Means \pm SD) ในแต่ละระยะเวลาการบ่มที่แตกต่างกัน

ระยะเวลาการบ่ม (วัน)	μ -calpain activity (units/g of meat)
1	1.496 ± 0.423^a
3	1.052 ± 0.544^{ab}
5	0.736 ± 0.466^{ab}
7	0.606 ± 0.455^{bc}
14	0.460 ± 0.329^{bc}
21	0.194 ± 0.278^c

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

4.6.2 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain

จากการศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาการบ่มที่มีต่อค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain พบว่า เมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อเพิ่มขึ้น ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain มีแนวโน้มลดลง ($p>0.05$) โดยเนื้อที่ผ่านการบ่มที่ 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน มีค่าเท่ากับ 22.880 ± 9.642 , 21.060 ± 8.567 , 20.186 ± 8.944 , 20.016 ± 8.950 , 18.684 ± 8.721 และ 16.954 ± 8.340 units/g of meat ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ตลอดระยะเวลาการบ่มเนื้อ ค่าการทำงานของเอนไซม์ m-calpain มีค่าลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อเทียบกับการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain ซึ่งอาจมีเหตุผลเนื่องมาจาก ในช่วงแรกของการบ่มเนื้อนั้นเอนไซม์ μ -calpain ได้รับการกระตุ้นจาก Ca^{2+} แล้วย่อยโปรตีนในเนื้อสัตว์ก่อน m-calpain โดยภายหลังสัตว์ตายปริมาณ Ca^{2+} ถูกปล่อยออกมาซึ่งไฮโดรฟอสเฟตมีปริมาณเพียงพอสำหรับกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain เท่านั้น แต่มีไม่เพียงพอสำหรับกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ m-calpain (Boehm *et al.* 1998)

จากการศึกษา Brown and Crawford. (1993) รายงานว่า บริเวณปลายด้าน N-terminal ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (80 kDa) ของเอนไซม์ m-calpain จะถูก block จึงทำให้เอนไซม์ m-calpain ไม่สามารถทำงานได้และ/หรือทำงานได้น้อยมาก

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain (Means \pm SD) ในแต่ละระยะเวลาการบ่มที่แตกต่างกัน

ระยะเวลาการบ่ม (วัน)	m-calpain activity (units/g of meat)
1	22.880 ± 9.642
3	21.096 ± 8.567
5	20.186 ± 8.944
7	20.016 ± 8.950
14	18.684 ± 8.721
21	16.954 ± 8.340
Degree of significant	0.361^{ns}

^{ns} ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)

4.6.3 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin

จากการศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาการบ่มที่มีต่อค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin พบว่า เมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อเพิ่มขึ้น ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin มีแนวโน้มลดลง ($p>0.05$) โดยเนื้อที่ผ่านการบ่มที่ 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน มีค่าเท่ากับ 9.934 ± 2.365 , 9.294 ± 2.100 , 8.956 ± 1.990 , 7.586 ± 2.605 , 7.180 ± 2.998 และ 6.820 ± 2.958 units/g of meat ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin (Means \pm SD) ในแต่ละระยะเวลาการบ่มที่แตกต่างกัน

ระยะเวลาการบ่ม (วัน)	calpastatin activity (units/g of meat)
1	9.934 \pm 2.365
3	9.294 \pm 2.100
5	8.956 \pm 1.990
7	7.586 \pm 2.605
14	7.180 \pm 2.998
21	6.820 \pm 2.958
Degree of significant	0.097 ^{ns}

^{ns} ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)

ในการวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเปินของเนื้ออกวางรูซ่าในแต่ละระยะเวลาการบ่มในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนในระหว่างการบ่มเนื้ออกวางนั้นคือ เอนไซม์ μ -calpain ในขณะที่ เอนไซม์ m-calpain และเอนไซม์ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain และ m-calpain นั่นคือ calpastatin มีค่าการทำงานเปลี่ยนแปลงไปโดยมีแนวโน้มลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น สอดคล้องกับจากผลการศึกษาของ Wiklund *et al.* (1997) ที่ทำการศึกษาในเนื้อสันนอกของกวางเรนเดียร์ ที่ผ่านการบ่มที่ 1, 3 และ 14 วัน หลังฆ่า พบว่า ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain มีค่าลดลงในแต่ละระยะการบ่มมีค่าเท่ากับ 18.4 ± 3.5 , 12.0 ± 3.5 และ 12.8 ± 3.5 units/g of meat ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) และการศึกษาของ Volpelli *et al.* (2005) ในกล้ามเนื้อสันนอกของกวางพันธุ์ฟอลโล (*Dama dama*) (อายุเข้าฆ่า 30 เดือน) พบว่า ภายหลังจากสัตว์ตาย 6 ชั่วโมง กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain และ m-calpain มีค่าเท่ากับ 0.083 และ 0.105 units/g of meat ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า กวางที่อายุมาก (30 เดือน) มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin มากกว่ากวางที่มีอายุน้อย (18 เดือน) ($p < 0.05$) มีค่าเท่ากับ 0.272 และ 0.199 units/g of meat ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับผลการศึกษางานของเอนไซม์กลุ่มคาลเปินในสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น Geesink and Koochmariaie. (1999) รายงานว่า ในเนื้อแกะภายหลัง 24 ชั่วโมงหลังฆ่า กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin มีค่าอยู่ประมาณ 1.23 units/g of meat, 1.36 units/g of meat และ 3.63 units/g of meat ตามลำดับ และ Koochmariaie. (1990) รายงานว่า ในโคภายหลัง 24 ชั่วโมงหลังฆ่า พบว่า ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin มีค่าอยู่ประมาณ 1.08 ± 2.06 , 1.08 ± 11.92 และ 3.45 ± 21.64 units/g of meat ตามลำดับ

4.7 สหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเปิน

จากการศึกษาสหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อสันนอกของควารูซากับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin จากตารางที่ 4.5 พบว่า ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (WBSF) มีความสัมพันธ์อย่างมากกับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain ($r = 0.915$) และ m-calpain ($r = 0.758$) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) ในขณะที่ค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับกิจกรรมการทำงานของ calpastatin ($r = 0.462$) นั้นความแตกต่างอย่างไม่มีความสำคัญที่ระดับความคลาดเคลื่อนกัน 5 เปอร์เซ็นต์ หากพิจารณาที่ระดับความคลาดเคลื่อน 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า กิจกรรมการงานของเอนไซม์ calpastatin นั้นมีความสัมพันธ์กับค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ($p = 0.053$)

ตารางที่ 4.6 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin

	μ -calpain activity	m-calpain activity	calpastatin activity
WBSF	0.915**	0.758**	0.462 ^{ns}
μ -calpain activity		0.632**	0.745**
m-calpain activity			0.852**

** $p < 0.01$

^{ns} ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

จากผลการทดลองครั้งนี้ ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (WBSF) มีความสัมพันธ์อย่างมากกับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain ($r = 0.915$) และ m-calpain ($r = 0.758$) ในขณะที่ค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับกิจกรรมการทำงานของ calpastatin นั้นมีแนวโน้มสัมพันธ์กัน ($r = 0.462$) ซึ่งการศึกษาของ Volpelli *et al.* (2005) พบว่า ในกล้ามเนื้อสันนอกของควารูซัพอลโล ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ใกล้เคียงกับผลการศึกษานี้ในควารูซาค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin เอนไซม์เหล่านี้มีหน้าที่ในการสลายโปรตีนของกล้ามเนื้อให้เป็นกรดอะมิโนและกรดไขมัน ซึ่งสามารถนำไปใช้เพื่อสร้างพลังงานและซ่อมแซมเนื้อเยื่อได้

กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin นั้นมีแนวโน้มว่าสัมพันธ์กัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.506 และ 0.462 ตามลำดับ ขณะที่ในกล้ามเนื้อสันนอกของกวางฟอลโลนั้น พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อไม่มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain และเอนไซม์ m-calpain ($p>0.05$)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า เนื้อสันนอกของกวางรูซ่าในแต่ละระยะการบ่มที่เพิ่มขึ้น กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain และเอนไซม์ m-calpain มีความสัมพันธ์กับค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่ลดลง ($p<0.01$) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain มีค่ามากกว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain โดยมีค่าเท่ากับ 0.915 และ 0.758 ตามลำดับ นั้นแสดงว่า เอนไซม์ μ -calpain ได้เข้าย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อได้มากกว่าเอนไซม์ m-calpain ทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้นเมื่อเราทำการบ่มเนื้อกวางรูซ่าที่ระยะการบ่มเพิ่มขึ้นด้วย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

- 1) ค่าแรงตัดผ่านเนื้อของกล้ามเนื้อสันนอกของกวางรูซ่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อเพิ่มขึ้น โดยเนื้อที่ผ่านการบ่มที่ 1 มีค่าเท่ากับ $9.01 \pm 0.83 \text{ kg/cm}^2$ เมื่อสิ้นสุดการบ่มที่ 21 วัน มีค่าเท่ากับ $4.34 \pm 0.10 \text{ kg/cm}^2$ ตามลำดับ
- 2) ความเข้มของแถบโปรตีนที่มีขนาด 37 และ 39 kDa ลดลงอย่างชัดเจน ภายหลังจากการบ่มเนื้อ หลังหลังฆ่า โดยโปรตีนขนาดดังกล่าวนั้นเริ่มย่อยสลายไป และไม่สามารถตรวจสอบได้ในวันที่ 14 และ 21 วันหลังฆ่า ขณะเดียวกันก็ปรากฏโพลีเปปไทด์ขนาด 29 และ 30 kDa โดยมีความเข้มเพิ่มขึ้น ซึ่งเมื่อตรวจสอบยืนยันแล้วพบว่าโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีน Tn-T
- 3) เอนไซม์ μ -calpain สามารถพบได้ในตัวอย่างเนื้อกวางที่ผ่านการบ่มที่ 1 ถึง 14 วัน และลดลงในวันที่ 21 ของการบ่มเนื้อ ขณะที่เอนไซม์ m-calpain นั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อสิ้นสุดการบ่มเนื้อที่ 21 วัน
- 4) เมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อเพิ่มขึ้น กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ขณะที่ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain และ calpastatin นั้นมีแนวโน้มลดลง ($p > 0.05$)
- 5) ค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีความสัมพันธ์อย่างมากกับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain ($r = 0.915$) และ m-calpain ($r = 0.758$) ในขณะที่ค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีแนวโน้มสัมพันธ์กับค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin ($r = 0.462$)
- 6) ในการศึกษาครั้งนี้ ทำให้ทราบว่า การบ่มเนื้อกวางรูซ่าเพียง 14 วัน ก็น่าจะเพียงพอแล้ว เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการการผลิต

บรรณานุกรม

- กัลยพงษ์ จตุรพานิชย์. 2542. สรีรวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- จุกวรัตน์ เศรษฐกุล และญาณิน โอภาสพัฒนกิจ. 2548. คุณภาพเนื้อโคภายใต้ระบบการผลิต และการตลาดของประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: สุพีเรียร์นิตติ้งเฮาส์
- จุกวรัตน์ เศรษฐกุล. 2539. วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ชั้นสูง. เอกสารประกอบการสอน วิชาวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ชั้นสูง. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.
- ชัยณรงค์ กันธพนิต. 2529. วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชนากร ฤทธิ์ไธสง. 2545. ครบเครื่องเรื่องกวาง คู่มือการเลี้ยงกวางอย่างมืออาชีพ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : นานาสาส์น.
- ชนากร ฤทธิ์ไธสง. 2546. สัตว์เศรษฐกิจเงินล้าน รวมเทคนิคการเลี้ยงสัตว์เศรษฐกิจเงินล้าน. กรุงเทพฯ : นานาสาส์น.
- ลลิตรา ศรีสุวรรณ. 2551. “อิทธิพลของระบบการผลิตโคเนื้อและระยะการบ่มต่อคุณภาพเนื้อ.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สัญญาชัย จตุรสิทธา. 2543. เทคโนโลยีเนื้อสัตว์. เชียงใหม่ : ธนบรรณการพิมพ์.
- สัญญาชัย จตุรสิทธา. 2547. การจัดการเนื้อสัตว์. เชียงใหม่ : ธนบรรณการพิมพ์.
- Anonymous. 2010a. [Online]. Available : http://www.dpi.qld.gov.au/4790_8276.htm. [4-08-2010.]
- Anonymous. 2010b. [Online]. Available : http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201_McKiney/muscular.html. [12-07-2010.]
- Anonymous. 2010c. [Online]. Available : <http://plantsubq.genomics.purdue.edu/html/guide>.
- Boccard, R., Buchter, I., Casteels, M., Cosentino, E., Dransfield, E. and Hood, D. E. 1981. “Procedures for measuring meat quality characteristics in beef production experiments.” **Lives. Prod. Sci.** 8: 385-397.
- Boehm, M. L., Kendall, T. L., Thompson, V. F. and Goll, D. E. 1998. “Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle.” **J. Anim. Sci.** 76: 2415-2434.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ho, C. Y., Stromer, M. H. and Robson, R. M. 1994. "Identification of 30 kDa polypeptide in post mortem skeletal muscle as a degradation product of troponin -T." **Biochimie.** 76: 369-375.
- Ho, C. Y., Stromer, M. H., Rousek, G. and Robson, R. M. 1997. "Effects of electrical stimulation and postmortem storage on changes in titin, nebulin, troponin-T and muscle ultrastructure in *Bos indicus* crossbreed cattle." **J. Anim. Sci.** 75: 366-376.
- Hoffman, L. C. and Wiklund, E. 2006. "Game and venison – Meat for the modern consumer." **Meat Science.** 74: 197-208.
html [10-09-2010.]
- Huff-Lonergan, E., Mitsuhashi, T., Beekman, D. D., Parrish, F. C., Jr., Olson, D. G., Robson, R. M. 1996. "Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle." **J. Anim. Sci.** 74: 993-1008.
- Ilian, M. A., Bekhit, A. E. A. and Bickerstaffe., R. 2004. "Does the newly discovered calpain 10 play a role in meat tenderization during post-mortem storage?." **Meat Sci.** 66: 317-327.
- Kapprell, H. P. and Goll, D. E. 1989. "Effect of Ca^{2+} on binding of the calpains to calpastatin." **J. Biol. Chem.** 264: 17888-17896.
- Kemp C. M., Sensky, P. L., Bardsley R. G., Buttery P. J., Parr, T. 2010. "Tenderness-an enzymatic view." **Meat Sci.** 84: 248-256
- Khorchid, A. and Ikura, M. 2002. "How calpain is activated by calcium?." **Nat. Struct. Biol.** 9: 239-241.
- Killefer, J. and Koohmaraie, M. 1994. "Bovine skeletal muscle calpastatin: cloning, sequence analysis, and steady-state mRNA expression." **J. Anim. Sci.** 72: 606-614.
- Koohmaraie, M. 1990. "Quantification of Ca^{2+} -dependent protease activities by hydrophobic and ion-exchange chromatography." **J. Anim. Sci.** 68: 659-665.
- Koohmaraie, M. 1992a. "The role of Ca^{2+} -dependent proteases (calpain) in postmortem proteolysis and meat tenderness." **Biochimie.** 74: 239-245.
- Koohmaraie, M. 1992b. "Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteasome) : purification, characterization, and comparison of its effects on myofibrils with μ -calpains." **J. Anim. Sci.** 70: 3697-3708.
- Koohmaraie, M. 1994. "Muscle proteinases and meat ageing." **Meat Sci.** 36: 93-104.

- Koohmaraie, M. and Geesink, G. H. 2006. "Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system." **Meat Sci.** 74: 34–43.
- Koohmaraie, M., Babiker, A. S., Schroeder, A. L., Merkel, R. A., and Dutson, T. R. 1988. "Acceleration of postmortem tenderization in ovine carcasses through activation of Ca^{2+} -dependent proteases." **J. Food Sci.** 53: 1638.
- Koohmaraie, M., Whipple, G., Kretchmar, D. H., Crouse, J. D. and Mersmann, H.J. 1991. "Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses." **J. Anim. Sci.** 69: 617 – 624.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." **Nature.** 227:680 - 685.
- Lametsch, R., Roepstorff, P., Møller, H. S., Bendixen, E. 2004. "Identification of myofibrillar substrates for μ -calpain". **Meat Sci.** 68: 515-521.
- Lee, W. J., Hatanaka, M. and Maki, M. 1992a. "Multiple forms of rat calpastatin cDNA in the coding region of functionally unknown amino-terminal domain." **Biochim. Biophys. Acta.** 1129: 251-253.
- Lee, W. J., Ma, H., Takano, E., Yang, H. Q., Hatanaka, M., and Maki, M. 1992b. "Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatin by exon skipping." **J. Biol. Chem.** 267: 8437–8442.
- Maddock, K. R., Huff-Lonergan, E., Rowe, L. J. and Lonergan, S. M. 2005. "Effect of pH and ionic strength on μ - and m-calpain inhibition by calpastatin." **J. Anim. Sci.** 83: 1370-1376.
- Maki, M., Takano, E., Osawa, T., Ooi, T., Murachi, T., and Hatanaka, M. 1988. "Analysis of structure-function relationship of pig calpastatin by expression of mutated cDNAs in *Escherichia coli*." **J. Biol. Chem.** 263: 10254 –10261.
- McCormick R. J. 1994. "Structure and properties of tissue." 25-62. in Kinsman, D. M., Kotula, A. W. and Breidenatein, B. C. **Muscle Food, Meat, Poultry and Seafood technology.** New York : Chapman and Hall.
- Miller, M. F., Carr, M. F., Ramsey, C. B., Crockett, K. L. and Hoover, L. C. 2001. "Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness". **J. Ani. Sci.** 79: 3062–3068.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Morton, J. D., Bickerstaffe, R., Kent, M. P., Dransfield, E., and Keeley, G. M. 1999. "Calpain-calpastatin and toughness in *M. longissimus* from electrically stimulated lamb and beef carcasses." **Meat Sci.** 52: 71-79.
- Moyes, C. D. and Schulte, P. M. 2008. **Principles of Animal Physiology.** 2 nd ed. San Francisco : Benjamin Cummings.
- Okitani, A., Goll, D. E., Stromer, M. H. and Robson, R. M. 1976. "Intracellular inhibitor of a Ca^{2+} -activated protease involved in myofibrillar protein turnover." **Federation Proc.** 35: 1746.
- Otsuka, Y. and Goll, D. E. 1987. "Purification of the Ca^{2+} -dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca^{2+} -dependent proteinase". **J. Biol. Chem.** 262: 5839-5851.
- Ouali, A. and Talmant, A. 1990. "Calpain and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscle." **Meat Sci.** 28: 331-348.
- Pearson, A. M. and Young, R. B. 1989. **Muscle and Meat Biochemistry.** San Diego : Academic Press.
- Prates, J. A. M., Ribeiro, A. M. R., Correia, A. A. D. 2001. "Role of cysteine endopeptidases (EC 3.4.22) in rabbit meat tenderisation and some related changes." **Meat Sci.** 57: 283-290.
- Pring, T. D., Williams, S. E., Lamb, B. S., Johnson, D. D. and Weat, R. L. 1997. "Carcass characteristics, the calpain proteinase system and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers." **J. Anim. Sci.** 75: 2955-2961.
- Sazili, A. Q., Lee, G. K., Parr, T., Sensky, P. L., Bardsley, R. G. and Buttery, P. J. 2003. "The effect of altered growth rates on the calpain proteolytic system and meat tenderness in cattle." **Meat Sci.** 66: 195-201.
- Sensky, P. L., Parr, T., Bardsley, R. G. and Buttery, P. J. 1996. "The relationship between plasma epinephrine concentration and the activity of the calpain enzyme system in porcine longissimus muscle." **J. Anim. Sci.** 74: 380-387
- Sentandreu, M. A., Coulis, G., Ouali, A. 2002. "Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness." **Trends Food Sci. Tech.** 13: 400-421.
- Sorimachi, H., Ishiura, S. and Suzuki, K. 1997. "Structure and physiological function of calpain." **Biochem. J.** 328: 721-732.

- Taylor, R. G., Geesink, G. H., Thompson, V. F., Koohmaraie, M. and Goll, D. E. 1995. "Is Z-disk degradation responsible for post-mortem tenderization?" **J. Anim. Sci.** 73: 1351-1367.
- Thomas, A. R., Gondoza, H., Louwrens, C., Hoffman., Oosthuizen., Naudé, R. J. 2004. "The roles of the proteasome, and cathepsin B, L, H and D, in ostrich meat tenderisation." **Meat Sci.** 67: 113-120.
- Veiseth, E., Shackelford, S. D. Wheeler, T. L. and Koohmaraie, M. 2001. "Effect of postmortem storage on μ -calpain and m-calpain in ovine skeletal muscle." **J. Anim. Sci.** 79: 1502-1508.
- Volpelli, L. A., Failla, S., Sepulcri, A. and Piasentier, E. 2005. "Calpain system in vitro activity and myofibril fragmentation index in fallow deer (*Dama dama*): effects of age and supplementary feeding." **Meat Sci.** 69: 579-582.
- Volpelli, L. A., Valussoa, R., Morgantea, M., Pittiab, P., Piasentiera, E. 2003. "Meat quality in male fallow deer (*Dama dama*) : effects of age and supplementary feeding". **Meat Sci.** 65: 555-562.
- Warriss, P. D. 2000. **Meat Science.** UK : CAB International.
- Wheeler, T. L., Savell, J. W., Cross, H. R., Lunt, D. K. and Smith, S. B. 1990. " Mechanism associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle." **J. Anim. Sci.** 68: 4206-4220.
- Wiklund, E., Andersson, A., Malmfors, G. and Lundstrom, K. 1996. "Muscle glycogen levels and blood metabolites in reindeer (*Rangifer Tarandus Tarandus* L.) after transport and lairage." **Meat Sci.** 42: 133-144.
- Wiklund, E., Barnier, V. M. H., Smulderqç, F. J. M. Lundstriim, K. 1997. "Proteolysis and Tenderisation in Reindeer (*Rangifeer tarandus tarandus* L.) Bull *longissimus thoracis* Muscle of Varying Ultimate pH." **Meat Sci.** 46: 33-43.
- Wiklund, E., Dobbie P., Stuart, A., Littlejohn, R. P. 2010a. "Seasonal variation in red deer (*Cervus elaphus*) venison (*M. longissimus dorsti*) driploss, calpain activity, colour and tenderness." **Meat Sci.** 86: 720-727.
- Wiklund, E., Kemp, R. M., leRoux, G. J., Li, Y., Wu. G., 2010b. "Spray chilling of deer carcasses - effects on carcass weight, meat moisture content, purge and microbiological quality". **Meat Sci.** 86: 926-930.

- Wiklund, E., Stevenson-Barryb, J. M., Duncanb, S. J., Littlejohn, R. P. 2001. "Electrical stimulation of red deer (*Cervus elaphus*) carcasses - effects on rate of pH-decline, meat tenderness, colour stability and water-holding capacity." **Meat Sci.** 59: 211–220.
- Wu, A. H. B. 2004. "Role of cardiac troponin in the recent redefinition of acute myocardial infarction." **Clin. Lab. Sci.** 17: 50-52.
- Zhou, H. Hickford, J. G. H. and Gong, H. 2007. "Polymorphism of the ovine calpastatin gene." **Molecular and Cellullar Probes.** 21: 242-244.

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สารเคมีและการเตรียมสารเคมี

สารเคมี

- 1) 2 – mercaptoethanol (MCE) (Merck, Germany)
- 2) 30% acrylamide/bis solution (29:1) (Bio Rad, U.S.A)
- 3) Acetic acid(Univer, Australia)
- 4) Anti-mouse IgG (peroxidase conjugate) (Roche, Germany)
- 5) Anti-mouse IgG (whole molecule peroxidase conjugate) (Sigma, U.S.A)
- 6) APS (ammoniumpersulfate) (Ajax Finechem, Australia)
- 7) Blocking solution (Tris buffered Saline, pH 8.0, with 3% nonfat milk) (Sigma, U.S.A)
- 8) Bromophenol blue (Ajax Finechem, Australia)
- 9) BSA (bovine serum albumin) (Fluka Biochemika, USA)
- 10) Calcium chloride (CaCl₂) (Univer, Australia)
- 11) Casein (USB, U.S.A)
- 12) Coomassie blue R-250 (Research organics, U.S.A)
- 13) EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt) (Univar, Australia)
- 14) Glycerol (Univer, Australia)
- 15) Glycine (Vivantis, U.S.A)
- 16) Hydrochloric acid (HCl) (Merck, Germany)
- 17) Imidazol (Fluka Biochemika, U.S.A)
- 18) Leupeptin (Sigma, U.S.A)
- 19) Methanol (Univer, Australia)
- 20) Monoclonal anti- μ -calpain (domain III clone 9A4H8D3) (Sigma, U.S.A)
- 21) Monoclonal anti-calpastatin (clone 1F7E3D10) (Sigma, U.S.A)
- 22) Monoclonal anti-m-calpain (domain III/IV clone 107-85) (Sigma, U.S.A)
- 23) Monoclonal anti-troponin T (Clone JLT-12) (Sigma, U.S.A)
- 24) Ovomuroid (Sigma, U.S.A)
- 25) Phenylmethysulfony fluoride (PMSF) (Sigma, U.S.A)
- 26) Potassium chloride (KCl) (Ajax Finechem, Australia)
- 27) SDS (sodium dodecyl sulfate) (Vivantis, U.S.A)

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยมหิดล ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 28) Sodium azide (NaN_3) (Univer, Australia)
- 29) Sodium chloride (NaCl) (Univer, Australia)
- 30) Sucrose (Ajax Finechem, Australia)
- 31) TEMED (tetramethylethylenediamine) (Bio Basic Inc., USA)
- 32) TMB substrate (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine) (Sigma, U.S.A)
- 33) Trichloroacetic acid (TCA) (Sigma, U.S.A)
- 34) Tris-base (Vivantis, U.S.A)
- 35) Washing solution (Tris Buffer Saline, with Tween[®] 20 , pH 8.0) (Sigma, U.S.A)
- 36) ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุเรซิน ชนิด DEAE-Sephacel™ (GE, Sweden)
- 37) น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ
- 38) น้ำยาวัด โปรตีน Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, U.S.A)
- 39) โปรตีนมาตรฐาน PageRuler Plus Prestained Protein (Fermentus, Canada)

การเตรียมสารเคมี

การสกัดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ

- **STE solution, pH 7.6**

Sucrose	0.25 M
EDTA	1 mM
Tris base	0.05 M
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	
เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส	

- **TE solution, pH 7.6**

Tris	0.05 M
EDTA	1 mM
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	
เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส	

- **KCl solution**

KCL	0.15 M
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	
เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- **Buffer solution**

Imidazole	0.01M
SDS	2% (w/v)
MCE	2% (v/v)
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	
เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส	

การวัดความเข้มข้นโปรตีน

- **Standard BSA 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/ml**

BSA 1 mg/ml = BSA 10 mg : Distilled water 10 ml -----(1)
BSA 0.8 mg/ml = ๑๐๐ (1) มล 800 μ l : Distilled water 200 μ l
BSA 0.6 mg/ml = ๑๐๐ (1) มล 600 μ l : Distilled water 400 μ l
BSA 0.4 mg/ml = ๑๐๐ (1) มล 400 μ l : Distilled water 600 μ l
BSA 0.2 mg/ml = ๑๐๐ (1) มล 200 μ l : Distilled water 800 μ l
BSA 0.1 mg/ml = ๑๐๐ (1) มล 100 μ l : Distilled water 900 μ l

- **น้ำยาวัดโปรตีน Bio-Rad Protein Assay 100 ml**

น้ำยาวัดโปรตีน Bio-Rad Protein Assay	25 ml
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	75 ml

เทคนิค SDS-PAGE และ western blot

- **Tris 3 M pH 8.8 (1L)**

Tris	365 g
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	700 ml
HCl	

ละลาย Tris ในน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อจากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8.8 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส

- **Tris 1.5 M pH 8.8 (1L)**

Tris 3 M pH 8.8	500 ml
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	500 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- **Tris 0.5M pH 6.8 (1L)**

Tris	60.6 g
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	700 ml

HCl

ละลาย Tris ในน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วย HCl และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อให้ครบ 1,000 ml เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส

- **10 % SDS (10 ml)**

SDS	1 g
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	10 ml

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

Ammonium persulphate	0.1 g
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	1 ml

- **1 % Bromophenol blue (10 ml)**

Bromophenol blue	0.01 g
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	10 ml

- **Loading buffer (15 ml)**

น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	5,500 μ l
0.5M Tris – HCl pH 6.8	1,900 μ l
10 % SDS	3,000 μ l
100 % Glycerol	1,500 μ l
0.1 % Bromophenol blue	3,000 μ l
2 – Mercaptoethano	75 μ l

- **10X Running buffer (1L)**

Glycine	144 g
Tris-base	30 g
SDS	10 g

ละลายสาร Tris-base, Glycine และ SDS และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อให้ครบ 1,000 ml เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส

- **Transfer buffer (1L)** (25mM Tris pH 8.3, 192mM glycine, 20% (v/v) methanol)

Tris-base	3.03 g
Glycine	14.4 g
Methanol	200 ml

ละลายสาร Tris-base และ Glycine และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อให้ครบ 1,000 ml เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส

- **Staining solution (2L)** (40% Methanol, 10% Acetic acid, 0.1% Coomassie blue R-250)

น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	1,000 ml
Methanol	800 ml
Acetic acid	200 ml
Coomassie blue R-250	2 g

เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส

- **Destaining solution** (40% Methanol, 10% Acetic acid ; 2L)

น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	1,000 ml
Methanol	800 ml
Acetic acid	200 ml

เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส

การสกัดโปรตีนเอนไซม์กลุ่มคาลเปน

- **Extraction buffer**

Tris-HCl, pH 8.3	100 mM
EDTA	10 mM
MCE	10 mM
Leupeptin	6 mg/L
Ovomucoid	100 mg/L
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	2 mM

น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ

เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 1 เดือน

- **Dialysis buffer**

Tris-HCl pH 7.35	40 mM
EDTA	5 mM
MCE	0.05 % (v/v)
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	
เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส	

การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

- **Equilibration buffer**

Tris/HCl pH 7.35	40 mM
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	
เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส	

- **Elution buffer**

Tris/HCl pH 7.35	40 mM
EDTA	0.5 mM
MCE	0.05 % (vol/vol)
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	
เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส	

- **200 mM NaCl in elution buffer (1L)**

1M NaCl	200 ml
Elution buffer	800 ml
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	
เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส	

- **400 mM NaCl in elution buffer (1L)**

1M NaCl	400 ml
Elution buffer	600 ml
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	
เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเปิน

● Reaction mixture I

Tris-acetic acid, pH 7.5	100 mM
MCE	10 mM
Casein	5 mg/ml
Sodium azide (NaN_3)	1 mM
Calcium chloride (CaCl_2)	5 mM

น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ

เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 1 สัปดาห์

● Reaction mixture II

Tris-acetic acid, pH 7.5	100 mM
MCE	10 mM
Casein	5 mg/ml
EDTA	10 mM

น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ

เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 1 สัปดาห์

● 5% TCA (100 ml)

น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	95 ml
100% Trichloroacetic acid	5 ml

ภาคผนวก ข

ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนและค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเปิน

ตารางภาคผนวกที่ ข 1 ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างโปรตีนที่ชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 200 mM NaCl (2 ml/fraction) และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain และเอนไซม์ calpastatin

fraction number	ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย 400 mM NaCl		ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain (units/g of meat)		ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin (units/g of meat)	
	Mean	\pm SD	Mean	\pm SD	Mean	\pm SD
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.067
2	0.000	0.000	0.018	0.031	0.063	0.091
3	0.002	0.003	0.010	0.017	0.070	0.066
4	0.005	0.005	0.013	0.023	0.076	0.071
5	0.007	0.006	0.009	0.016	0.091	0.068
6	0.012	0.010	0.009	0.016	0.080	0.059
7	0.012	0.013	0.014	0.024	0.097	0.053
8	0.014	0.015	0.071	0.104	0.097	0.067
9	0.018	0.019	0.057	0.077	0.063	0.071
10	0.109	0.116	0.047	0.080	0.079	0.068
11	0.181	0.137	0.062	0.070	0.096	0.091
12	0.393	0.401	0.055	0.084	0.095	0.085
13	1.127	1.552	0.068	0.079	0.068	0.097
14	2.464	2.936	0.067	0.079	0.131	0.068
15	4.796	3.733	0.078	0.106	0.141	0.058
16	6.316	2.742	0.083	0.075	0.182	0.086
17	6.386	0.823	0.111	0.101	0.196	0.085
18	5.668	2.695	0.122	0.106	0.157	0.053
19	4.556	2.855	0.082	0.104	0.163	0.048

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข 1 ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างโปรตีนที่ชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 200 mM NaCl (2 ml/fraction) และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain และเอนไซม์ calpastatin (ต่อ)

fraction number	ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย 200 mM NaCl		ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain (units/g of meat)		ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin (units/g of meat)	
	Mean	\pm SD	Mean	\pm SD	Mean	\pm SD
20	3.434	2.243	0.075	0.088	0.151	0.041
21	1.508	0.735	0.020	0.034	0.143	0.035
22	0.759	0.413	0.010	0.017	0.115	0.036
23	0.673	0.238	0.009	0.015	0.079	0.076
24	0.550	0.138	0.010	0.018	0.105	0.047
25	0.359	0.077	0.006	0.011	0.074	0.066
26	0.292	0.044	0.011	0.020	0.056	0.071
27	0.198	0.050	0.016	0.028	0.071	0.087
28	0.167	0.039	0.011	0.019	0.063	0.074
29	0.164	0.018	0.015	0.025	0.075	0.063
30	0.158	0.017	0.015	0.026	0.053	0.070
31	0.155	0.006	0.021	0.036	0.045	0.079
32	0.145	0.006	0.025	0.043	0.068	0.061
33	0.137	0.007	0.012	0.022	0.047	0.068
34	0.138	0.005	0.030	0.053	0.053	0.077
35	0.132	0.001	0.017	0.030	0.067	0.063
36	0.131	0.000	0.036	0.051	0.070	0.096
37	0.128	0.002	0.041	0.058	0.080	0.079
38	0.121	0.000	0.000	0.000	0.086	0.064
39	0.117	0.006	0.009	0.013	0.075	0.094
40	0.116	0.000	0.009	0.013	0.073	0.103

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข 2 ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง โปรตีนที่ชะคอถัมน้ด้วยสารละลาย 400 mM NaCl (2 ml/fraction) และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain

fraction number	ค่าการดูดกลืนแสงของ โปรตีนที่ชะคอถัมน้ด้วยสารละลาย 400 mM NaCl		ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain (units/g of meat)	
	Mean	\pm SD	Mean	\pm SD
1	0.201	0.069	0.024	0.016
2	0.204	0.082	0.036	0.003
3	0.206	0.088	0.022	0.013
4	0.199	0.079	0.046	0.030
5	0.199	0.057	0.038	0.048
6	0.185	0.055	0.031	0.014
7	0.169	0.042	0.033	0.028
8	0.169	0.050	0.023	0.010
9	0.177	0.032	0.032	0.032
10	0.226	0.059	0.033	0.031
11	0.284	0.116	0.020	0.025
12	0.346	0.134	0.024	0.017
13	0.416	0.126	0.041	0.025
14	0.534	0.116	0.059	0.011
15	0.632	0.147	0.104	0.041
16	0.682	0.096	0.153	0.023
17	0.503	0.021	0.124	0.041
18	0.374	0.024	0.092	0.039
19	0.301	0.035	0.072	0.036
20	0.256	0.040	0.049	0.040
21	0.230	0.034	0.029	0.017
22	0.213	0.039	0.030	0.015
23	0.193	0.040	0.027	0.019

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข 2 ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างโปรตีนที่ชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย 400 mM NaCl (2 ml/fraction) และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain (ต่อ)

fraction number	ค่าการดูดกลืนแสงของ โปรตีนที่ชะคอลัมน์ ด้วยสารละลาย 400 mM NaCl		ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain (units/g of meat)	
	Mean	±SD	Mean	±SD
24	0.187	0.034	0.032	0.020
25	0.177	0.042	0.027	0.021
26	0.171	0.041	0.023	0.014
27	0.166	0.034	0.033	0.015
28	0.160	0.034	0.018	0.013
29	0.155	0.032	0.028	0.023
30	0.153	0.033	0.032	0.028
31	0.150	0.027	0.038	0.030
32	0.145	0.031	0.023	0.025
33	0.141	0.032	0.020	0.030
34	0.137	0.034	0.034	0.033
35	0.138	0.031	0.034	0.031
36	0.153	0.012	0.006	0.001
37	0.151	0.018	0.012	0.017
38	0.152	0.018	0.011	0.002
39	0.149	0.009	0.009	0.005
40	0.147	0.011	0.002	0.002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ค 1 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้านค่าแรงตัดผ่านเนื้อในแต่ละระยะเวลาการป่มที่แตกต่างกัน

sf

Duncan^a

age	N	Subset for alpha = 0.01			
		1	2	3	4
21	3	4.3400			
14	3	5.1200	5.1200		
7	3		6.4700	6.4700	
5	3		6.9167	6.9167	
3	3			8.2033	8.2033
1	3				9.0067
Sig.		.238	.018	.022	.226

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวกที่ ค 2 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain ในแต่ละระยะเวลาการป่มที่แตกต่างกัน

mu

Duncan^a

age	N	Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
21	5	.1940		
14	5	.4600	.4600	
7	5	.6060	.6060	
5	5	.7360	.7360	.7360
3	5		1.0520	1.0520
1	5			1.4960
Sig.		.076	.053	.012

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

เอกสารนี้เป็นเอกสารทสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ต่อแหล่งอื่นหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค 3 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ m-calpain ในแต่ละระยะเวลาการบ่มที่แตกต่างกัน

m

Duncan^a

age	N	Subset for alpha = 0.01	
		1	
21	5	16.9540	
14	5	18.6840	
7	5	20.0160	
5	5	20.1860	
3	5	21.0960	
1	5	22.8800	
Sig.		.361	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size =5.000.

ตารางภาคผนวกที่ ค 4 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ calpastatin ในแต่ละระยะเวลาการบ่มที่แตกต่างกัน

cast

Duncan^a

age	N	Subset for alpha = 0.01	
		1	
21	5	6.8200	
14	5	7.1800	
7	5	7.5860	
5	5	8.9560	
3	5	9.2940	
1	5	9.9340	
Sig.		.097	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค 5 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติสหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (WBSF) กับค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ μ -calpain, m-calpain และ calpastatin

		WBSF	μ -calpain	m-calpain	calpastatin
WBSF	Pearson Correlation	1	0.915**	0.758**	0.462
	Sig. (2-tailed)		0.000	0.000	0.053
	N	18	18	18	18
μ -calpain	Pearson Correlation	0.915**	1	0.632**	0.745**
	Sig. (2-tailed)	0.000		0.000	0.000
	N	18	30	30	30
m-calpain	Pearson Correlation	0.758**	0.632**	1	0.852**
	Sig. (2-tailed)	0.000	0.000		0.000
	N	18	30	30	30
calpastatin	Pearson Correlation	0.462	0.745**	0.852**	1
	Sig. (2-tailed)	0.053	0.000	0.000	
	N	18	30	30	30

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	9.0067	.82706	.47751	6.9521	11.0612	8.08	9.67
3	3	8.2033	.63311	.36553	6.6306	9.7761	7.52	8.77
5	3	6.9167	.66980	.38671	5.2528	8.5805	6.52	7.69
7	3	6.4700	1.11660	.64467	3.6962	9.2438	5.43	7.65
14	3	5.1200	.87618	.50587	2.9434	7.2966	4.31	6.05
21	3	4.3400	.10000	.05774	4.0916	4.5884	4.24	4.44
Total	18	6.6761	1.78796	.42143	5.7870	7.5652	4.24	9.67
1	5	1.4960	.42259	.18899	.9713	2.0207	1.19	2.21
3	5	1.0520	.54431	.24342	.3762	1.7278	.45	1.72
5	5	.7360	.46603	.20841	.1574	1.3146	.03	1.17
7	5	.6060	.45506	.20351	.0410	1.1710	.02	1.14
14	5	.4600	.32856	.14694	.0520	.8680	.00	.83
21	5	.1940	.27781	.12424	-.1510	.5390	.00	.60
Total	30	.7573	.57670	.10529	.5420	.9727	.00	2.21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 หรือในลักษณะอื่นใดที่ก่อให้เกิดผลประโยชน์ และต้องอ้างถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Descriptives (ต่อ)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	5	22.8800	9.64193	4.31200	10.9080	34.8520	6.16	30.21
3	5	21.0960	8.56725	3.83139	10.4584	31.7336	5.88	26.25
5	5	20.1860	8.94414	3.99994	9.0804	31.2916	4.36	26.25
7	5	20.0160	8.94961	4.00239	8.9036	31.1284	4.20	26.23
14	5	18.6840	8.72088	3.90009	7.8556	29.5124	3.60	25.47
21	5	16.9540	8.33933	3.72946	6.5994	27.3086	2.63	23.04
Total	30	19.9693	8.28563	1.51274	16.8754	23.0632	2.63	30.21
1	5	9.9340	2.36465	1.05750	6.9979	12.8701	6.43	13.06
3	5	9.2940	2.10034	.93930	6.6861	11.9019	6.19	12.09
5	5	8.9560	1.99077	.89030	6.4841	11.4279	5.89	11.45
7	5	7.5860	2.60487	1.16493	4.3516	10.8204	3.97	11.10
14	5	7.1800	2.97869	1.33211	3.4815	10.8785	3.08	11.08
21	5	6.8200	2.95838	1.32303	3.1467	10.4933	3.02	10.70
Total	30	8.2950	2.58456	.47187	7.3299	9.2601	3.02	13.06

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ควรแก้ไขโดยไม่ได้รับอนุญาต และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
sf	Between Groups	47.229	5	9.446	15.929	.000
	Within Groups	7.116	12	.593		
	Total	54.345	17			
mu	Between Groups	5.308	5	1.062	5.875	.001
	Within Groups	4.337	24	.181		
	Total	9.645	29			
m	Between Groups	102.674	5	20.535	.261	.930
	Within Groups	1888.223	24	78.676		
	Total	1990.897	29			
cast	Between Groups	40.214	5	8.043	1.257	.314
	Within Groups	153.504	24	6.396		
	Total	193.718	29			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้