ห้องสมุดคณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อการสลายตัวของโทรโปนินที

THE INFLUENCE OF MUSCLE TYPES TO THE DISSOLUTION OF TROPONIN-T

โดย

นางสาวฐิติพร สง่าเพ็ชร์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 033172
วัน, เดือน, ปี 2 9 ต.ค. 2556

.b.....
.i.....

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรครุศาสตร์อุตสาหกรรมบัณฑิต
แขนงวิชาเทคโนโลยีการเกษตร-การผลิตสัตว์
สาขาวิชาครุศาสตร์เกษตร
คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัญหาพิเศษ

ปีการศึกษา 2555

ชื่อเรื่อง **อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อการสลายตัวของโทรโปนินที**
The Influence of Muscle Types to Dissolution of Troponin-T

ชื่อ-สกุลนางสาวฐิติพร สง่าเพ็ชร์
แขนงวิชาเทคโนโลยีการเกษตร-การผลิตสัตว์ **สาขาวิชา**ครุศาสตร์เกษตร
คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาผศ.ดร.จันทร์พร เจ้าทรัพย์

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสลายตัวของโปรตีน Troponin-T ในกล้ามเนื้อใบพาย (*Infrasprinatus*, IF) กล้ามเนื้อสันในเทียม (*Supraspinatus*, SS) และกล้ามเนื้อสัน-นอก (*Longissimus dorsi*, LD) ในโคพื้นเมืองไทยในระยะเวลาการบ่ม 21 วัน โดยใช้เนื้อโคพื้นเมืองจำนวน 14 ตัว มาจากจังหวัดอุบลราชธานี 7 ตัว จากจังหวัดกาญจนบุรี 7 ตัว วันโดยเป็นโคที่ปล่อยเลี้ยงตามธรรมชาติอายุไม่เกิน 2 ปีน้ำหนักเข้าฆ่า 180 - 200 กิโลกรัม ในการทดลองครั้งนี้ใช้เทคนิค Western blot ในการวัดปริมาณการย่อยสลายตัวของโปรตีนโทรโปนินที จากการทดลองพบว่า โปรตีน Troponin-T ขนาด 37 kDa ที่ผ่านการบ่มไว้ 21 วัน ใน IF มีแนวโน้มที่จะต่ำกว่า SS และ LD (P=0.097) คือ 11.83, 12.98, และ 12.28 หน่วย/100 ไมโครกรัมโปรตีนตามลำดับ และผลผลิตที่เกิดจากการสลายตัวของโปรตีน Troponin-T ที่มี ขนาด 28-30 kDa พบว่าในกล้ามเนื้อ IF และกล้ามเนื้อ SS นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่กล้ามเนื้อ LD มีการสลายตัวของ Troponin-T มากที่สุดเนื่องจากพบผลผลิตที่เกิดจากการย่อยสลาย Troponin-T ที่มีขนาด 28-30 kDa มากที่สุด (P<0.01)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษนี้สำเร็จลงได้เพราะได้รับความอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงต่อ ผศ.ดร.จันทร์พร เจ้าทรัพย์ ภาควิชาครุศาสตร์เกษตร คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้คำปรึกษาและให้คำแนะนำตลอดจนช่วยแก้ไขปัญหาพิเศษครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ประสานงาน ที่ช่วยตรวจทานแก้ไขรูปเล่มปัญหาพิเศษในครั้งนี้ ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ ทุกคนที่คอยให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่เข้าใจและคอยให้กำลังใจมาโดยตลอดและคอยสนับสนุนในทุกๆเรื่องในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ ครู อาจารย์ และผู้ประสาทวิชาทุกท่าน ทั้งในอดีตและปัจจุบัน ความดีของปัญหาพิเศษเล่มนี้ขอมอบแด่ทุกท่านที่ช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ให้กำลังใจ ตลอดจนผู้ที่ให้ความสนับสนุนผู้วิจัยทุกท่าน

ฐิติพร สง่าเพ็ชร์

พฤษภาคม 2556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของปัญหา	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 โปรตีนในเนื้อสัตว์	3
2.1.1 โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ	3
2.1.2 โปรตีนที่ควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อ	3
2.1.3 โปรตีนที่เป็นโครงร่างของไมโอไฟบริล	4
2.2 การบ่มเนื้อต่อคุณภาพเนื้อ	5
2.3 อิทธิพลของการบ่มเนื้อต่อการย่อยสลายโปรตีน	6
2.4 ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ	7
2.4.1 Type II	7
2.4.2 Type IIa	7
2.4.3 Type IIb	7
2.5 คุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทย	8
2.5.1 ประเภทของเนื้อโคไทย	8
2.5.2 ปัจจัยที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อโค	8
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	11
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	11
3.1.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในเทคนิค SDS-PAGE	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.1.2 อุปกรณ์สำหรับเทคนิค western blot	11
3.1.3 อุปกรณ์และสารเคมีในการเตรียมตัวอย่าง	11
3.2 วิธีการวิจัย	12
3.2.1 วิธีการเตรียมตัวอย่าง	12
3.2.2 การวัดความเข้มข้นโปรตีน	12
3.2.3 การวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE	13
3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณโทรโปนินทีด้วยเทคนิค western blot	14
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	15
4.1 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนโทรโปนินที	15
4.2 วิจารณ์ผล	16
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	17
5.1 สรุป	17
5.2 ข้อเสนอแนะ	17
บรรณานุกรม	18
ภาคผนวก	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเตรียมสารละลาย BSA	12
2	separating gel 10 %	13
3	stacking gel 5%	13
4	อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อการสลายตัวของโปรตีน Troponin-T	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ความสัมพันธ์ของโปรตีน actin tropomyosin และ troponin.....	4
2	โปรตีนของไมโอไฟบริล.....	5
3	Immunoreactivity ของ Troponin-T.....	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมทั้งการปลูกพืชเลี้ยงสัตว์หรือการแปรรูปผลผลิตต่างๆที่เกิดในภาคเกษตรกรรม การเลี้ยงโคเนื้อนับว่าเป็นอีกอาชีพหนึ่งที่ได้รับความนิยมเลี้ยงกันมากทั้งเลี้ยงเป็นธุรกิจ เลี้ยงเพื่อเป็นอาชีพเสริม หรือเลี้ยงในระดับครัวเรือน ซึ่งส่วนใหญ่การเลี้ยงโคเนื้อในระดับครัวเรือนนั้นเป็นเลี้ยงแบบปล่อยหากินตามธรรมชาติมีอายุมาก เป็นการเลี้ยงที่ไม่ได้มีการดูแลเอาใจใส่มากนัก ไม่มีการให้อาหารเสริมเพื่อให้ได้เนื้อคุณภาพดี ทำให้เนื้อที่ได้มีคุณภาพไม่ดีเท่าที่ควร ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด เนื้อมีลักษณะค่อนข้างเหนียว ซึ่งอาจจะเหมาะกับอาหารไทย แต่กับอาหารประเภทที่ต้องการเนื้อที่นุ่มทำให้เนื้อโคพื้นเมืองไม่ได้รับความนิยมเท่ากับเนื้อจากโคขุนลูกผสม ที่มีปริมาณเนื้อมาก คุณภาพเนื้อดี ตรงตามความต้องการของผู้บริโภค

ปัจจุบันในประเทศไทยได้มีการบริโภคเนื้อโคเป็นจำนวนมาก ทั้งในลักษณะเนื้อย่าง เสต็ก ต้ม หรือเนื้ออบ ซึ่งการประกอบอาหารจากเนื้อโคแต่ละประเภทนั้นควรที่จะเลือกกล้ามเนื้อส่วนต่างๆให้เหมาะสม เช่นการทำสเต็กส่วนใหญ่นั้นจะนิยมนำเนื้อส่วน สันใน สันนอก หรือสันคอมาเป็นวัตถุดิบ เนื่องจากเนื้อค่อนข้างที่จะมีความนุ่มเป็นที่ต้องการแก่ผู้บริโภค

ความนุ่มของเนื้อจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากการเก็บหรือการบ่มซาก (aging) คือ การแช่ซากในห้องเย็นที่มีอุณหภูมิประมาณ 3 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นการลดอุณหภูมิเพื่อให้กระบวนการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อเป็นไปอย่างสมบูรณ์ก่อนนำออกไปตัดแต่ง ทั้งยังเป็นการลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ การบ่มซากที่ต้องการให้ความนุ่มของเนื้อเพิ่มขึ้นนั้นจะต้องมีระยะเวลาการบ่มที่นานขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเนื้อสัตว์แต่ละชนิดจะใช้ระยะเวลาบ่มไม่เท่ากัน โดยสุกรจะใช้ระยะเวลาการบ่มสั้นกว่าโค (จันทร์พร เจ้าทรัพย์, 2554 : 39) ในการศึกษาครั้งนี้ จึงต้องการศึกษาการย่อยสลายตัวของโปรตีนโทรโปนินที ในแต่ละกล้ามเนื้อของโคพื้นเมืองไทย เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทยต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการสลายตัวของโปรตีน Troponin-T ในกล้ามเนื้อใบพาย กล้ามเนื้อสันในเทียม และกล้ามเนื้อสันนอกในโคพื้นเมืองไทยในระยะเวลาการบ่ม 21 วัน

1.3 ขอบเขตของปัญหา

การศึกษาครั้งนี้ ได้ใช้เนื้อโคพื้นเมืองทั้งหมด 14 ตัว จากจังหวัดอุบลราชธานีจำนวน 7 ตัว และโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรีจำนวน 7 ตัว โดยเป็นโคพื้นเมืองที่เลี้ยงแบบปล่อยหากินตามแหล่งธรรมชาติ มีอายุไม่เกิน 2 ปี น้ำหนักเฉลี่ยเข้าฆ่าประมาณ 180-200 กิโลกรัม โดยใช้กล้ามเนื้อ 3 ชนิดคือ กล้ามเนื้อใบพาย กล้ามเนื้อสันในเทียม และกล้ามเนื้อสันนอกที่ผ่านระยะเวลาการบ่ม 21 วัน อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบถึงแนวทางการนำไปปรับปรุงคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 โปรตีนในเนื้อสัตว์

โปรตีนในเนื้อสัตว์ส่วนใหญ่จะได้จากกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทั้งนี้โดยปริมาณมากที่สุดนั้นจะอยู่ในเส้นใยย่อย (myofibril) ซึ่งเป็นเส้นใยขนาดเล็กมากที่อัดอยู่ในเซลล์หรือที่เรียกว่าเส้นใยกล้ามเนื้อ (muscle fiber) โปรตีนเหล่านี้จึงเรียกชื่อรวมๆว่า โปรตีนเส้นใยย่อย (myofibrillar protein) ซึ่งมีผลต่อการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อขณะมีชีวิต โปรตีนเส้นใยย่อยนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

2.1.1 โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ ประกอบไปด้วย

1. แอคติน (actin) เป็นโปรตีนทรงกลม มีประมาณ 20% ของ myofibrillar protein โดยการรวมตัวกันของแอคตินโมเลกุลเดี่ยวหลายๆโมเลกุล จะทำให้เกิดเป็น Fibrous actin หลังจากนั้นจะการพันเป็นเกลียวของ Fibrous actin จะทำให้เกิดเป็น actin filament

2. ไมโอซิน (myosin) มีประมาณ 45% ของ myofibrillar protein โดยไมโอซินมีรูปร่างเป็นแท่งยาวประกอบไปด้วย ส่วนหัว ส่วนตัว และส่วนหาง ส่วนหัวของไมโอซินที่อยู่ใน thick filament มีอยู่ด้วยกันและเป็นส่วนที่จะจับกับแอคตินเพื่อสร้างเป็น crossbridge

2.1.2 โปรตีนที่คอยควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อ ประกอบไปด้วย

1. โทรโปไมโอซิน (tropomyosin) มีอยู่ประมาณ 5% ของmyofibrillar protein มีลักษณะเป็นเส้น โทรโปไมโอซินจะวางพาดอยู่บนร่องที่เกิดจากการบิดเป็นเกลียวของแอคติน

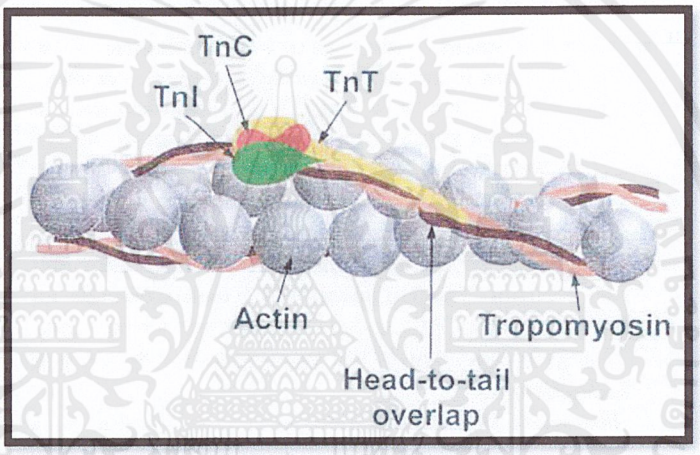
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. โทรโปนิน (troponin) มีอยู่ประมาณ 5 % ของ myofibrillar protein มีลักษณะเป็นแท่งกลมสั้น พบอยู่ภายใต้เส้นของโทรโปไมโอซิน โดยจะพบโทรโปนิน 1 โมเลกุลต่อทุกๆ 7-8 โมเลกุลของแอคติน โทรโปนินประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย คือ

troponin I (inhibitory) จับกับแอคตินช่วยทำให้โทรโปนินและโทรโปไมโอซินอยู่ในตำแหน่งที่ป้องกันการทำปฏิกิริยากันของแอคตินและไมโอซิน

troponin T (tropomyosin-binding) จับกับโทรโปไมโอซิน

troponin C (Ca^{2+} biniding) จับกับ Ca^{2+} ทำให้ส่วนของโทรโปนินและโทรโปไมโอซิน เลื่อนออกไป แอคตินจึงจับกับไมโอซินได้



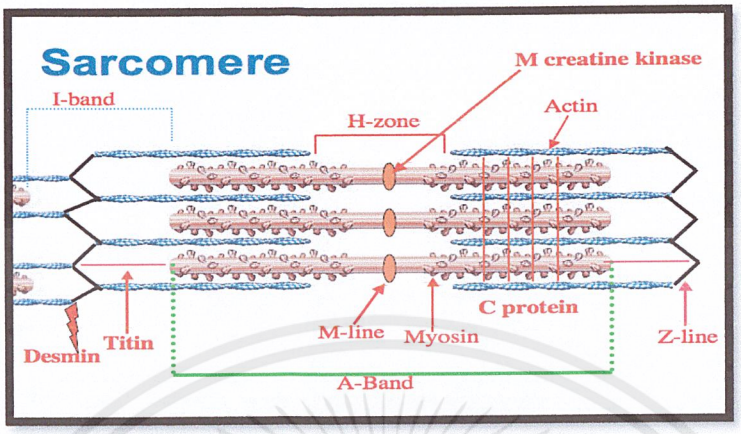
ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน actin Tropomyosin และTroponin

ที่มา http://www.uic.edu/classes/phyb/phyb516/regulatoryproteinsu3.htm

2.1.3 โปรตีนที่เป็นโครงร่างของไมโอไฟบริล (cytoskeletal protein) ประกอบด้วย

1. ไตติน (titin) เป็นโปรตีนที่พบ 10 % ของ myofibrillar protein โดยไตตินยาวครึ่งหนึ่งของซาร์โคเมียร์ ทำหน้าที่เชื่อมระหว่าง Z-line กับ M-line ที่อยู่ตรงกลางของ A-band ถึง Z-disc ทำหน้าที่คล้ายแผ่นที่คล้ายแผ่นแม่แบบ (template) เพิ่มความมั่นคงให้แก่โครงสร้างของ thin filament

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 โปรตีนของไมโอไฟบริล
ที่มา http://www.unm.edu/~lkravitz/Exercise%20Phys/musclesarcomere.html

2. C-protein มีอยู่ประมาณ 2% เปอร์เซ็นต์ของ myofibrillar protein โดยจะพันรอบ thick filament นอกจากนี้ยังพบโปรตีน M-protein และ skelemin ในส่วนโครงสร้างของ M-line ในส่วนของ Z-disc พบในโปรตีน alpha actinin และ cap Z นอกจากนี้ยังมีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ intermediate filament

2.2 การบ่มเนื้อต่อคุณภาพเนื้อ

การบ่มซากมีผลทำให้เนื้อนุ่มเนื่องจากการบ่มซากนั้นทำให้เนื้อมีอุณหภูมิและpH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ calpains ที่อยู่ในเนื้อโดยหลังจากที่ผ่านกระบวนการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อแล้วแคลเซียมที่อยู่ในเอ็นโดพลาสมิกเรติคิวลัมจะเกิดการรั่วไหลออกมาสู่ซาร์โคพลาสซึม ปริมาณแคลเซียมที่เพิ่มขึ้นนี่เองจะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ calpains โดยเฉพาะอย่างยิ่ง u-calpains ทำให้เกิดการย่อยสลายเส้นใยกล้ามเนื้อเป็นผลทำให้เนื้อนุ่มขึ้น (จันทร์พร เจ้าทรัพย์, 2554 : 39)

เมื่อสัตว์ตายการไหลเวียนของเลือดหยุดลงกล้ามเนื้อจึงต้องสลับเปลี่ยนจากการเผาผลาญอาหารเป็นแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic metabolism) และสาร ATP จะสลายไป ไกลโคเจนในกล้ามเนื้อจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก pH ลดลง ยิ่งมีไกลโคเจนมากก็จะมีการผลิตกรดแลคติกมาก ซึ่งจะทำให้ความเป็นกรดลดลงอยู่ที่ระดับอยู่ที่ยอมรับได้คือ pH ระหว่าง 5.3 - 5.7 หากสัตว์มีไกลโค-เจนไม่เพียงพอ กรดแลคติกที่ผลิตได้จะไม่มาก เนื้อจึงยังมี pH สูงอยู่ทำให้มีสีคล้ำ

ทันทีที่โคตาย อุณหภูมิกล้ามเนื้อจะสูงเล็กน้อยแล้วลดลงมา ซึ่งขึ้นอยู่กับอุณหภูมิห้อง ขนาดซาก และปริมาณไขมันหุ้มซาก กล้ามเนื้อจะไม่มีอากาศและ pH ลดลงนั้นในขณะที่เกิดกระบวนการนี้โปรตีนที่หดตัวได้แก่ แอคติน และไมโอซิน จะเลื่อนตัวซ้อนไขว้ประสานกันอย่างแข็งแรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(crossbridge) เส้นใยกล้ามเนื้อเหนียวขึ้น การแข็งตัวของกล้ามเนื้อหลังจากการตายที่ทำให้ร่างกายแข็งตึงนี้เรียกว่า ไรกอร์ มอร์ติส (rigor mortis)

ไรกอร์ มอร์ติส (rigor motis) คือ การเกร็งตัวของเนื้อสัตว์เป็นการเปลี่ยนแปลงของเนื้อสัตว์หลังการฆ่า เกิดจากการหดตัวในระดับโมเลกุลของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (miofibril) เนื่องจากการจับตัวของโปรตีนแอคติน และ ไมโอซิน เป็นแอคโตไมโอซิน ขณะที่สัตว์มีชีวิตอยู่ การจับตัว ของแอคติน และไมโอซิน จะคลายตัวได้ เนื่องจากมีพลังงาน ATP จากการหายใจทำให้กล้ามเนื้อยืดหดเคลื่อนไหวได้ เมื่อสัตว์ตาย เซลล์กล้ามเนื้อ ขาดพลังงานจากการหายใจ แอคตินกับไมโอซิน จะจับกันล็อกแน่น กล้ามเนื้อหดตัว แต่ไม่คลายตัว เนื่องจากขาด ATP ทำให้ซากสัตว์แข็งที่ออยู่ระยะหนึ่งหลังจากที่สัตว์ตาย สัตว์ที่มีขนาดใหญ่เช่น วัว ควาย หมู จะมีระยะ ไรกอร์ มอร์ติส นานกว่าสัตว์เล็กเช่น สัตว์ปีก สัตว์น้ำเป็นระยะที่เนื้อแน่น เหนียวโดยเฉพาะสัตว์ใหญ่เช่น วัว ไม่เหมาะกับนำเนื้อสัตว์ไปปรุงอาหาร ควรรอให้พ้นระยะนี้ไปแล้ว ด้วยการเก็บเนื้อไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิประมาณ 0 - 5 องศาเซลเซียส เรียกว่า การบ่มเนื้อสัตว์ เอนไซม์โปรติเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ ย่อยแอคโตไมโอซิน จะทำให้เนื้อมีความนุ่มมากขึ้น(พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมวงศ์ และคณะ, ม.ป.ป. : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1296/rigor-mortis)

ระยะเวลาสิ้นสุดลงการแข็งตัวขึ้นอยู่กับการเก็บซากและระยะเวลาที่ซากถูกทำให้เย็นลง การหดตัวจะสิ้นสุดใน 15 ชั่วโมงเมื่อเก็บที่ 12 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูงและมีโอกาสที่ซากเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ได้ง่าย หากเก็บไว้ที่ 5-7 องศาเซลเซียส การสิ้นสุดของการแข็งตัวจะนานกว่านี้แต่โอกาสที่ซากจะเสียเนื่องจากจุลินทรีย์น้อยลงหลังการแข็งตัวการเก็บซากไว้ในที่เย็นไม่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อ

อิทธิพลของอุณหภูมิและ pH ของเนื้อมีผลต่อความนุ่มหาก pH ของซากลดลงช้าเกินไปในขณะที่อุณหภูมิลดลงอย่างรวดเร็วก็จะเกิดการเกร็งตัวจากความเย็น (cold shortening) เนื้อจะเหนียวมากและมีสีคล้ำแต่ถ้า pH ลดลงเร็วเกินไปในขณะที่อุณหภูมิยังสูงอยู่จะเกิดการเกร็งตัวจากความร้อน (heat shortening) เกิดผลเสียหลายอย่างได้แก่ เนื้อเหนียวขึ้นแต่จะไม่เท่ากับการเกร็งตัวจากความเย็น มีสีซีดและฉ่ำน้ำ (Pale Soft Exudative หรือ PSE) เนื้อมีสองสีทำให้ไม่น่ากินและเมื่อบ่มซาก ความนุ่มจะไม่เพิ่มขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ที่มาย่อยให้เนื้อนุ่มเสื่อมสภาพไปแล้ว (กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์, 2551 : http://www.dld.go.th)

2.3 อิทธิพลของการบ่มเนื้อต่อการย่อยสลายโปรตีน

การย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อเป็นผลมาจากการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยโปรตีน โดยจะทำให้โปรตีนอ่อนตัวลงซึ่งจะส่งผลให้กล้ามเนื้อเกิดความนุ่มปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นหลังจากเนื้อผ่านช่วงเวลาของการเกิด rigor mortis ไปแล้ว (ฉันทวัฒน์ อาชวาคม, 2552 : 12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตายมีผลต่อความนุ่มของเนื้อ ความนุ่มที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากกระบวนการตามธรรมชาติเมื่อเก็บเนื้อไว้ในห้องเย็นซึ่งในทางปฏิบัติโดยทั่วไปแล้วจะเก็บเนื้อสัตว์ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 3 องศาเซลเซียส ความนุ่มที่เกิดขึ้นนั้นจะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในเนื้อสัตว์ คือ เอนไซม์ calpain จะทำงานเมื่อถูกกระตุ้นด้วย Ca^{2+} และทำปฏิกิริยาได้ดีในสภาพเป็นกลาง calpain จะมี 2 รูปคือ m-calpain จะถูกกระตุ้นด้วย Ca^{2+} ปริมาณสูง และ u-calpain จะถูกกระตุ้นด้วย Ca^{2+} ปริมาณต่ำ เอนไซม์นี้จะอยู่บริเวณ Z-line การทำงานของ calpain จะทำให้เกิดการแตกหักของ tropomyosin และ titin โดยหลังจากการทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนแล้วเอนไซม์ calpain จะเกิดการสลายตัว (จันทร์พร เจ้าทรัพย์, 2554 : 41)

Pearson and young. (1989) กล่าวไว้ว่า ระยะเวลาในการบ่มซากจะช่วยให้เอนไซม์ที่อยู่ในกล้ามเนื้อออกมาทำการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ซึ่งนอกจากจะเป็นการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อแล้วยังทำให้รสชาติดีอีกด้วย โดยปกติแล้วจะทำการบ่มเนื้อที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส แต่ในบางกรณีจะทำการบ่มซากที่อุณหภูมิ 14-15 องศาเซลเซียส แม้ว่าการบ่มเนื้อที่อุณหภูมิสูงจะเป็นการกระตุ้นให้เอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อทำงานได้ดีขึ้นแต่อาจเกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้

2.4 ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ

2.4.1 Type I (slow twitch หรือ red fiber หรือ slow twitch oxidative muscle) ความสามารถในการหดตัวช้ามีหลอดเลือดฝอย mitochondria และ myoglobin จำนวนมากทำให้กล้ามเนื้อมีสีแดง กล้ามเนื้อนี้สามารถขนส่งออกซิเจนได้มากและมี metabolism แบบใช้ออกซิเจน

2.4.2 Type IIa (fast twitch oxidative muscle) คล้ายกับกล้ามเนื้อ slow twitch คือมี metabolism แบบใช้ออกซิเจนมี mitochondria และหลอดเลือดฝอยจำนวนมากทำให้มีสีแดง แต่มีความสามารถในการหดตัวเร็ว

2.4.3 Type IIb (white fiber หรือ fast twitch glycolytic muscle) เป็นกล้ามเนื้อที่มี metabolism แบบไม่ใช้ออกซิเจน ใช้พลังงานจากกระบวนการ glycolysis มี mitochondria และ myoglobin น้อย ความสามารถในการหดตัวช้า (ฉันทวัฒน์ อาชวาคม, 2552 : 6)

จากการทดลองของ Muroya et al. (2010) การทดลองในสุกรพบว่าโปรตีนเดสมินและโปรตีน โทรโปนินที มีการย่อยสลายในกล้ามเนื้อ ชนิด Type IIb เร็วกว่ากล้ามเนื้อชนิด Type I การบ่มเนื้อพบว่าเดสมินเริ่มมีการย่อยสลายในวันที่ 6 ของการบ่ม ในขณะที่ โทรโปนินที เริ่มย่อยสลายตั้งแต่วันแรกของการบ่ม พบว่าชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อมีอิทธิพลต่อการย่อยสลายโปรตีนและความนุ่มของเนื้อหลังสัตว์ตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองของฉันทวัฒน์ อาชวาคม, (2552 : 37) ในเนื้อโคพื้นเมืองและเนื้อโคกำแพงแสน ในกล้ามเนื้อ LD ระยะเวลาการบ่ม 1 วัน 7 วัน 14 วัน 21 วัน และ 30 วัน พบว่าผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายของโปรตีนโทรโปนินทีขนาด 28 kDa มีปริมาณเพิ่มขึ้น 13% 30% 46% และ 61% ตามลำดับ ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายของโปรตีนโทรโปนินทีขนาด 30 kDa มีปริมาณเพิ่มขึ้น ในระยะเวลาการบ่ม 1 วัน 7 วัน 14 วัน 21 วัน และ 30 วัน เป็น 13% 23% 29% และ 44% ตามลำดับ แต่โปรตีน โทรโปนินที 37 kDa มีการย่อยสลายลดลง ในระยะเวลาการบ่ม 1 วัน 7 วัน 14 วัน 21 วัน และ 30 โดยมีการย่อยสลาย 92 % 87% 79% และ 70% ตามลำดับ

2.5 คุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทย

ตามที่ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และคณะ. (2552 : 6-8) ได้กล่าวไว้

2.5.1 ประเภทของเนื้อโคไทย

1. เนื้อโคคุณภาพสูง หมายถึง เนื้อโคที่มีความนุ่มมาก มีไขมันแทรกในเนื้อ และผ่านการบ่มเนื้อภายใต้อุณหภูมิการเก็บรักษาเนื้อในห้องเย็น 0-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน ซึ่งเนื้อโคประเภทนี้ได้จากลูกโคลูกผสมเลือดยุโรปมากกว่า 50 %

2. เนื้อโคขุนคุณภาพปานกลาง หมายถึง เนื้อโคที่มีความนุ่มปานกลาง เป็นเนื้อที่ไม่มีไขมันแทรกได้มาจากการขุนโคลูกผสมพันธุ์บราห์มันเลือดสูง

3. เนื้อโคมัน หมายถึง เนื้อที่ได้มาจากโคอายุมาก ส่วนใหญ่เป็นโคลูกผสมบราห์มันและพันธุ์พื้นเมือง เนื้อจะค่อนข้างเหนียวและมีกลิ่นแรง เส้นใยเนื้อหยาบ ไขมันหุ้มซากหนา

4. เนื้อโคพื้นเมือง หมายถึง เนื้อโคที่ได้มาจากโคพื้นเมือง ซึ่งถูกเลี้ยงแบบปล่อยให้หากินตามธรรมชาติ เนื้อโคพื้นเมืองคุณภาพไม่คงที่ ขึ้นอยู่กับอายุโค ความสมบูรณ์ของอาหาร เนื้อที่ได้จะมีความนุ่มปานกลาง เส้นใยกล้ามเนื้อละเอียด ไม่มีไขมันแทรก เนื้อมีสีออกแดงคล้ำ ผิวสัมผัสเป็นมันวาว เนื้อจะค่อนข้างแห้งไม่ฉ่ำน้ำ

5. เนื้อโคแก่ หมายถึง เนื้อที่ได้มาจากโคอายุมาก โคคัดทิ้ง โคผอม เนื้อโคจะเหนียวมาก ไม่มีไขมัน มีพังผืด เนื้อมีกลิ่นแรง ส่วนใหญ่ถูกส่งเข้าโรงงานทำลูกชิ้น

6. เนื้อโคนมขุน จัดอยู่ในกลุ่มเนื้อโคขุนคุณภาพสูง เนื้อมีความนุ่มมากและมีไขมันแทรกเนื่องจากเป็นเนื้อโคที่มีเลือดยุโรปสูง

2.5.2 ปัจจัยที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อโค

1. พันธุ์ โคยุโรป (*Bos taurus*) และโคอินเดีย (*Bos indicus*) มีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อ เนื้อที่มาจากโคที่มีเลือดยุโรปสูงจะมีความนุ่มมากกว่า ดังนั้นโคพื้นเมือง โคพันธุ์บราห์มันหรือโคที่มีเลือดพันธุ์บราห์มันระดับสูงจะมีความเหนียว เนื่องจากมีปริมาณ calpastatin สูงซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ calpains

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. อายุ โคที่มีอายุน้อยมีเนื้อนุ่มกว่าโคที่มีอายุมาก เนื่องจากโคที่มีอายุมากมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดที่แข็งแรง ยากต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในเนื้อ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วโคขุนคุณภาพดีควรมีอายุไม่เกิน 3 ปี

3. ระดับไขมันแทรก เนื้อโคที่มีปริมาณไขมันแทรกสูงจะนุ่มกว่าเนื้อโคที่ไม่มีไขมันแทรก ซึ่งจะมีผลต่อรสชาติและความนุ่มของเนื้อ

4. ขนาดและชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ เส้นใยกล้ามเนื้อที่มีขนาดเล็กจะมีความนุ่มมากกว่า ในขณะเดียวกันชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อคือ red และ white fiber type ก็มีส่วนสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อเช่นเดียวกัน โดยพบว่ากล้ามเนื้อที่มีปริมาณ red fiber ในสัดส่วนที่สูงกว่า white fiber เนื้อจะเหนียวเนื่องจากเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด oxidative type ดังนั้นค่า pH ในกล้ามเนื้อลดลงช้า มีผลทำให้ปฏิกิริยาย่อยสลายโปรตีน (proteolysis) โดยเอนไซม์ในเนื้อเกิดขึ้นได้ช้า โคพื้นเมืองเป็นโคที่ยังไม่ถูกพัฒนาปรับปรุงด้านการสร้างกล้ามเนื้อ ดังนั้นจึงมีขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อละเอียด มีสัดส่วนของ red และ white fiber type สูงและอยู่ในตระกูล *Bos indicus* ดังนั้นเนื้อโคพื้นเมืองจึงเหนียวกว่าเนื้อโคที่ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์เป็นโคเนื้อ

5. ชนิดของกล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อจากชิ้นส่วนต่างๆ ของร่างกายมีความนุ่ม ความเหนียวแตกต่างกัน เนื่องจากความแตกต่างของปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและไขมันที่เป็นส่วนประกอบของกล้ามเนื้อนั้นๆ เนื้อจากส่วนที่มีการเคลื่อนไหวมาก จะมีเอ็นและพังผืดอยู่มาก ในทางตรงกันข้ามเนื้อสันใน เนื้อสันนอก อยู่ในบริเวณของร่างกายที่เคลื่อนไหวน้อยดังนั้นเนื้อจึงนุ่มกว่ามาก

6. ระบบการเลี้ยงและการให้อาหาร ระบบการเลี้ยงแบบปล่อยให้แทะเล็มหญ้าโดยไม่มีการเสริมอาหารข้นที่มีพลังงานสูงเนื้อโคจะเหนียวกว่าระบบการเลี้ยงแบบขุนโคในคอก โดยให้อาหารข้นในระดับสูงนอกจากนี้ความนุ่มยังสัมพันธ์กับระยะเวลาในการขุนด้วยอาหารข้นที่นานขึ้น

7. การตอนและไม่ตอน โคขุนที่ถูกตอนจะลดความคึกคะนองการใช้พลังงานเพื่อการทำงานของร่างกายลดน้อยลงทำให้การสะสมไขมันในกล้ามเนื้อดีขึ้นจึงมีส่วนทำให้เนื้อนุ่มขึ้น

8. สารเร่งเนื้อแดงและฮอร์โมนสร้างกล้ามเนื้อ โคขุนที่มีการใช้สารเร่งเนื้อแดงในกลุ่มเบต้าอะโกนิส เพื่อเร่งสร้างเนื้อแดงจะมีผลทำให้เนื้อมีความเหนียวมากขึ้น เพราะการใช้สารเร่งเนื้อแดงจะมีปริมาณ calpastatin เพิ่มขึ้น

9. การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาไกลโคไลซิสภายหลังสัตว์ตาย ปฏิกิริยาไกลโคไล-ซิส ภายหลังสัตว์ตายมีผลทำให้เกิดการใช้ไกลโคเจนในกล้ามเนื้อเพื่อสร้างพลังงานทำให้กล้ามเนื้อยังทำงานได้ภายหลังสัตว์ตาย จะมีผลให้เกิดกรดแลคติกซึ่งทำให้ค่า pH ในกล้ามเนื้อลดลง

10. ระยะเวลาในการบ่มเนื้อ เนื้อโคจะนุ่มต้องอาศัยเอนไซม์ในเนื้อที่สำคัญคือ calpain และ calpastatin เข้าทำการย่อยโปรตีนในเนื้อให้แตกสลายจึงนุ่มได้ การทำงานของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องอาศัยระยะเวลาซึ่งใช้เวลามากหรือน้อยก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องอีกมาก โดยทั่วไปแล้วเนื้อโคขุนพันธุ์บราห์มันจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการบ่มนานกว่าเนื้อโคขุนเลือดยุโรป

11. ความเร็วในการลดอุณหภูมิเนื้อ การลดอุณหภูมิเนื้ออย่างรวดเร็วภายหลังกระบวนการฆ่าสิ้นสุดอาจมีผลทำให้เนื้อเหนียวมากขึ้น เนื่องจากความเย็น (cold shortening) ปรากฏการณ์นี้อาจจะเกิดขึ้นได้ในกรณีที่นำซากโคเข้าห้องเย็นที่อุณหภูมิต่ำ ถ้าอุณหภูมิในเนื้อลดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 10 ชั่วโมง ลดลงต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส ประกอบกับค่า pH ในกล้ามเนื้อสูงกว่า 6.0 โอกาสที่จะเกิดสภาวะดังกล่าวมีสูงมากโดยทั่วไปแล้วซากโคที่น้ำหนักสูงและไขมันหุ้มซากหนา โอกาสจะเกิดขึ้นน้อยกว่าโคที่มีไขมันหุ้มซากน้อย เนื่องจากอุณหภูมิภายในเนื้อลดลงได้ช้ากว่า (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และคณะ, 2552 : 13-20)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในเทคนิค SDS-PAGE

1. เครื่องแยกโปรตีนแบบ vertical slab gel ขนาด 7×10×0.75 ลูกบาศก์เซนติเมตร (Biorad, USA)
2. 40% Acrylamide 37.5:1 (Biorad, USA)
3. Tris (promega, USA)
4. SDS (sodium dodecyl sulfate) (Biorad, USA)
5. Temed (Biorad, USA)
6. Ammonium persulfate (Biorad, USA)

3.1.2 อุปกรณ์สำหรับเทคนิค western blot

1. เครื่องเคลื่อนย้ายโปรตีนจากเจล polyacrylamide ไปสู่แผ่นเมมเบรน (Biorad, USA)
2. แผ่นเมมเบรน polyvinylidene difluoride (PVDF) (Amersham bioscience, UK)

3.1.3 อุปกรณ์และสารเคมีในการเตรียมตัวอย่าง

1. เครื่อง Homoginizer (Becthai,Thailand)
2. Extraction Buffer (50 mMTris-HCl pH 7.5 , 5mM EDTA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 วิธีการเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างเนื้อโคน้ำหนัก 0.3 กรัม แล้วเติม extraction buffer 3 ml จึงนำเข้าเครื่อง Homoginizer โดยมีน้ำแข็งหล่อเย็นอยู่ตลอด แล้วแบ่งตัวอย่างเป็น 3 ชุด ชุดแรกเพื่อนำวัดค่าความเข้มข้นโปรตีนโดยใช้ตัวอย่าง 100 ul : 0.1M NaOH 900 ul ชุดที่ 2 ใส่ตัวอย่าง : 2X SDS เท่ากับ 1:1 ชุดที่ 3 รอใส่ 1X SDS หลังการคำนวณ

3.2.2 การวัดความเข้มข้นโปรตีน

โดยนำ Bovine Serum Albumin (BSA) มาเจือจางดังนี้ เพื่อเตรียมไว้เป็น protein standard

ตารางที่ 1 การเตรียมสารละลาย BSA

Protein ug/200 ug (per well)	Conc.Required(mg/ml)	Volume BSA (ul) stock 5mg/ml	Volume 0.1M NaOH (ml)
Blank	0	0	5
10	0.05	50	4.95
20	0.10	100	4.90
30	0.15	150	4.85
40	0.20	200	4.8
50	0.25	250	4.75
60	0.30	300	4.7
70	0.35	350	4.65
80	0.40	400	4.60
90	0.45	450	4.55
100	0.50	500	4.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำ standard 200 ul ลง microplate 2 ซ้ำ ตัวอย่าง 20 ul และ 0.1M NaOH 180 ul ลงใน microplate 2 ซ้ำ ตามด้วยsolutionA 50 ul ทุกช่อง ทิ้งไว้ 5นาที จึงโหลด solution B 50 ul ลงไป ทิ้งไว้ 20 นาที จึงวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานและคำนวณสมการถดถอย y = ax+b โดยค่า y เป็นค่าการดูดกลืนแสงและค่า x เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลาย BSA และคำนวณค่าที่จะต้องใส่ 1X SDS

3.2.3 การวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE

ในการเตรียมเจลนั้นจะมี 2 ชั้น คือชั้น separate gel ซึ่งมีความเข้มข้น10% และชั้น stacking gel มีความเข้มข้น 5 %

ตารางที่ 2 separating gel 10%

Separate gel 10%	2 gel	4gel
40% Acrylamide bis37.5:1	2.67 ml	5.34 ml
2MTris-HCl pH8.8	1.88 ml	3.76 ml
10% SDS	100 ul	200 ul
น้ำกลั่น	5.26 ml	10.56 ml
TEMED	8 ul	16 ul
10% APS	80 ul	160 ul

ตารางที่ 3 stacking gel 5%

stacking gel 5%	2gel	4gel
40% Acrylamide bis 37.5:1	0.62 ml	1.24 ml
1M Tris-HCl pH6.8	1.26ml	2.52 ml
10% SDS	100 ul	200 ul
น้ำกลั่น	3.02ml	6.04
TEMED	8 ul	16 ul
10% APS	80 ul	160 ul

เมื่อเตรียมเจล และคำนวณได้ปริมาณ 1X SDS แล้วนำผสมกับตัวอย่างที่ดึงมาจากหลอด2X SDS ตามที่คำนวณได้และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที จึงนำมาโหลดลงหลุมละ 10 ul และรัน 200 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง ใน running buffer (0.25M Tris, 1.92M glycine, น้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณของ Troponin-T ด้วยเทคนิค Western blot

ทำการย้ายโปรตีนจากเจล polyacrylamide ไปสู่แผ่นเมมเบรน polyvinylidene difluoride (PVDF) ด้วยเครื่อง vertical electrophoresis units (TV 100K) ขนาด 20 เซนติเมตร กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ (V) 350 (mA) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ transfer buffer (60g glycine, 6g Tris, Isopropanol 100 ml และปรับน้ำกลั่นให้ได้ 2 ลิตร) เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า

นำแผ่นแมมเบรนมา block ด้วย blocking buffer (5g skimmilk, TBS-T) นาน 1 ชั่วโมง นำแผ่นแมมเบรนแช่ในแอนติโทรโปนินที (mouse anti-troponin-T:Sigma) เจือจาง 1:15,000 เป็นแอนติบอดีตัวที่ 1 ในการจับกับโปรตีนตัวอย่างโดยทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียส แล้วนำแมมเบรนมาล้างด้วย wash buffer (0.05M Tris, 0.138M NaCl, 0.0027M KCl, 0.05 % Tween 20) 5 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที แล้วทำการแช่แผ่นแมมเบรนอีกครั้งหนึ่งในแอนติบอดีตัวที่ 2 (anti-mouse IgG:Sigma) เจือจาง 1:7,500 ซึ่งมีความจำเพาะกับแอนติบอดีตัวที่ 1 โดยแอนติบอดีตัวที่ 2 จะติดฉลากเอนไซม์ horseradish peroxidase เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงล้างแผ่นแมมเบรนด้วย wash buffer 5 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที ตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาโดยใส่ซับสเตรท (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine) ซึ่งมีความจำเพาะกับเอนไซม์ดังกล่าวเพื่อให้เห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีน troponin-T ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นจึงนำแผ่นแมมเบรนไปแสกนด้วยเครื่อง scaner แล้วจึงวัดความเข้มข้นแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Quntity one (Biorad, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Troponi-T

การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Troponin-T ในแต่ละกล้ามเนื้อ

ตารางที่ 4 อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อการสลายตัวของโปรตีน Troponin-T

ลักษณะที่ศึกษา	ความเข้มข้นของแถบโปรตีน Troponin-T*			SED	P-value
	IF	LD	SS		
37 kDa	11.83	12.98	12.28	0.863	<0.097
28-30 kDa	1.94[a]	6.06[b]	3.31[a]	0.526	<.0001

[a,b] อักษรในแนวนอนมีความแตกต่างกันทางสถิติ

* หน่วย / 100 ไมโครกรัมโปรตีน

จากผลการทดลองพบว่า โปรตีน Troponin-T ขนาด 37 kDa ที่ผ่านการบ่มไว้ 21 วัน พบว่าในกล้ามเนื้อใบพายมีแนวโน้มย่อยสลายน้อยกว่ากล้ามเนื้อชนิดอื่น (P = 0.097) โดยมีปริมาณเท่ากับ 11.83, 12.98 และ 12.28 หน่วย/100 ไมโครกรัมโปรตีน ในกล้ามเนื้อใบพาย สันนอก และสันในเทียมตามลำดับ ส่วนผลผลิตที่เกิดจากการสลายตัวของโปรตีน Troponin-T ที่มี ขนาด 28-30 kDa พบว่าในกล้ามเนื้อใบพายและกล้ามเนื้อสันในเทียมนั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่กล้ามเนื้อสันนอก มีการสลายตัวของ Troponin-T มากที่สุดเนื่องจากพบผลผลิตที่เกิดจากการย่อยสลาย Troponin-T ที่มีขนาด 28-30 kDa มากที่สุด (P<0.01)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 วิจารณ์ผล

จากการทดลองพบว่าในกล้ามเนื้อสันนอก (LD) ของเนื้อโคพื้นเมืองไทยที่ทำการศึกษาในครั้งนี้เป็นโคทดลองชุดเดียวกับ จันทร์พร เจ้าทรัพย์ และคณะ, (2554) ได้ทำการทดลองพบว่ากล้ามเนื้อ LD จัดว่าอยู่ในกลุ่ม fast muscle เนื่องจากปริมาณ myosin heavy chain (MHC) ชนิด IIx มากที่สุดส่วนกล้ามเนื้อ IF เป็น slow muscle เนื่องจากมี MHC IIx ต่ำที่สุด และที่มี MHC I มากที่สุด ในขณะที่กล้ามเนื้อ SS เป็น intermediate เนื่องจากมีปริมาณ MHC ทั้ง 3 ชนิดอยู่ระหว่างกล้ามเนื้อ LD และ IF ผลการศึกษาการย่อยสลายของโทรโปนินที ที่ระยะการบ่ม 21 วันในครั้งนี้พบว่ากล้ามเนื้อสันนอกมีผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายของโทรโปนินทีขนาด 28-30 kDa มากที่สุด ซึ่งจากการทดลองของ Muroya et al, (2553) พบว่ากล้ามเนื้อของสุกรที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด fast type IIb มากจะมีการย่อยสลายของโทรโปนินทีเร็วกว่ากล้ามเนื้อที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด slow type I โดยเริ่มย่อยสลายตั้งแต่วันแรกของการบ่ม จากรายงานของ Iowa State University (2009) พบว่ากล้ามเนื้อสะโพกโคที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด type I มาก จะมีสหสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณโทรโปนินทีขนาด 37 kDa มากด้วย แสดงว่ากล้ามเนื้อชนิด slow type I มีการย่อยสลายของโทรโปนินทีน้อย ซึ่งสอดคล้องกับ Muroya et al, (2006) รายงานไว้ว่า กล้ามเนื้อ Longissimus thoracis (LT) ซึ่งจัดว่าเป็น fast type muscle มีการย่อยสลายของโทรโปนินที มากกว่า Diaphram และ Masseter ซึ่งเป็น slow type muscle

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

การศึกษาอิทธิพลของการบ่มเนื้อ 21 วันต่อการย่อยสลายของโปรตีนโทรโปนินที ในเนื้อโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี 7 ตัว และโคพื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี 7 โดยใช้กล้ามเนื้อในการทดลอง 3 กล้ามเนื้อ คือ กล้ามเนื้อใบพาย กล้ามเนื้อสันนอก และกล้ามเนื้อสันในเทียมผลการศึกษาพบว่า โปรตีนโทรโปนินทีขนาด 37 kDa ในกล้ามเนื้อใบพายมีแนวโน้มต่ำกว่ากล้ามเนื้อสันนอก และกล้ามเนื้อสันในเทียม และผลผลิตที่เกิดจากการสลายตัวของโปรตีน โทรโปนินที ที่มีขนาด 28-30 kDa พบว่าในกล้ามเนื้อใบพายและกล้ามเนื้อสันในเทียมนั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่กล้ามเนื้อสันนอก มีผลผลิตที่เกิดจากการย่อยสลาย Troponin-T ที่มีขนาด 28-30 kDa มากที่สุด

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองจึงได้แนวทางในการปรับปรุงคุณภาพเนื้อโคพื้นเมือง คือในกล้ามเนื้อสันนอกนั้นเหมาะแก่การบ่ม 21 วัน ก่อนที่จะจำหน่าย เพราะว่าเป็นกล้ามเนื้อที่มีการสลายตัวของโทรโปนินที มากที่สุดซึ่งส่งผลทำให้เนื้อนุ่ม ในขณะที่กล้ามเนื้อใบพาย และกล้ามเนื้อสันในเทียมนั้นอาจจะไม่จำเป็นบ่มถึง 21 วัน เพราะว่าการสลายของโทรโปนินทีมีน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

033172

บรรณานุกรม

กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์. 2551. “การบ่มเนื้อต่อคุณภาพเนื้อ”. กลุ่มวิจัยและพัฒนาโคเนื้อกองบำรุงพันธุ์สัตว์. แหล่งที่มา : http://www.dld.go.th/researchAHD/Document/cattle/quality_beef_meat/qbeefs_2.pdf.; 27 เมษายน 2556.

ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน actin Tropomyosin และTroponin. แหล่งที่มา : http://www.uic.edu/classes/phyb/phyb516/regulatoryproteinsu3.htm; 25 เมษายน 2556.

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และคณะ. 2552. คุณค่าเนื้อโคไทย. กรุงเทพฯ : อัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พลับลิชชิง. 98 น.

จันทร์พร เจ้าทรัพย์. 2554. เทคโนโลยีการฆ่าสัตว์. กรุงเทพฯ : มีนเซอร์วิส ซัพพลาย. 201 น.

จันทร์พร เจ้าทรัพย์. 2554. ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อและความสัมพันธ์ต่อคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทย. โครงการวิจัยของศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์. 65 น.

ฉันทวัฒน์ อาชวาคม. 2552. การสลายตัวของโปรตีน Troponin-T และความนุ่มของเนื้อโคกำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมืองที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน. กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 67 น.

ชัยณรงค์ คันธพนิต. 2529. วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์. กรุงเทพฯ : ไทยวัฒนาพานิช. 276 น.

โปรตีนของไมโอไฟบริล. แหล่งที่มา : http://www.unm.edu/~lkravitz/Exercise%20Phys/musclesarcomere.html, 27 เมษายน 2556.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, เกียรติคุณ และนิธิยา รัตนาปนนท์. ม.ป.ป. “ไรกอร์ มอร์ติส”. Rigor mortis. แหล่งที่มา :http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1296/rigor-mortis ; 1 พฤษภาคม 2556.

สัญชัย จตุรสิทธา. 2547. การจัดการเนื้อสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 3. เชียงใหม่ : มิ่งเมือง. 170 น.

Iowa State University. 2009. “Influence of Fiber Type on Palatability Attributes of Beef Round.” Digital Repository @ Iowa State University. Available : http://lib.dr.iastate.edu/ans_air/vol655/iss1/16/, april 27 2013.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม (ต่อ)

Pearson, A.M. and Young, R.B. 1998. Muscle and Meat Biochemistry. San Diego : Academic Pres

Muroya S, I. Nakajima, M. Oe, and K. Chikuni. 2006 Differrence in postmortem degradation pattern among troponin T isoforms expressed in bovine longissimus, diaphragm, and masseter muscle. Meat Science 72 : 245-251.

Susumu Muroya, Per Ertbjerg, Luigi Pomponio, Mette Christensen. 2010. "Desmin and troponin T are degaraed faster in type IIb muscle fibers than in type I fibers during postmortem aging of porcine muscle". Meat Science. Available : http://www.deepdyve.com/lp/elsevier/desmin and troponin-t are degraded-faster-in-type-iib-muscle-fibers-3NlEavz95E/1 ; April 27 2013.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

การเตรียม Extraction Buffer

50mM Tris-HCl pH 7.5	6.057 g
5mM EDTA	1.41625 g

น้ำกลั่น ปรับให้ได้ 1 ลิตร

การเตรียมสารละลายสำหรับเทคนิค SDS-PAGE

2M Tris-HCl pH 8.8 (1l)

Tris	242.28 g
น้ำกลั่น	700 ml
HCl	

ละลาย Tris ในน้ำกลั่นจากนั้นปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บในตู้เย็น

1 M Tris-HCl pH 6.8 (1l)

Tris	121.14 g
น้ำกลั่น	800 ml
HCl	

ละลาย Tris ในน้ำกลั่นจากนั้นปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บในตู้เย็น

10 % SDS (10 ml)

SDS	1 g
น้ำกลั่น	10 ml

10% APS

APS	1 g
น้ำกลั่น	10 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Separating gel 10% สำหรับ 2 เจล

40% Acrylamide bis37.5:1	2.67 ml
2MTris-HCl pH8.8	1.88 ml
10% SDS	100 ul
น้ำกลั่น	5.26 ml
TEMED	8 ul
10% APS	80 ul

Stacking gel 5% สำหรับ 2 เจล

40% Acrylamide bis 37.5:1	0.62 ml
1M Tris-HCl pH6.8	1.26ml
10% SDS	100 ul
น้ำกลั่น	3.02ml
TEMED	8 ul
10% APS	80 ul

Running Buffer (10X)

0.25M Tris	30 g
1.92M glycine	144 g
น้ำกลั่น	1 l

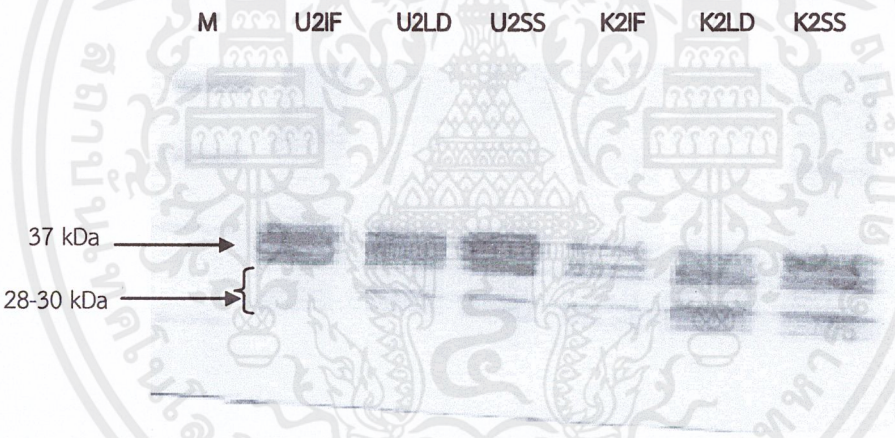
การเตรียมสารเคมีสำหรับเทคนิค Western Blot

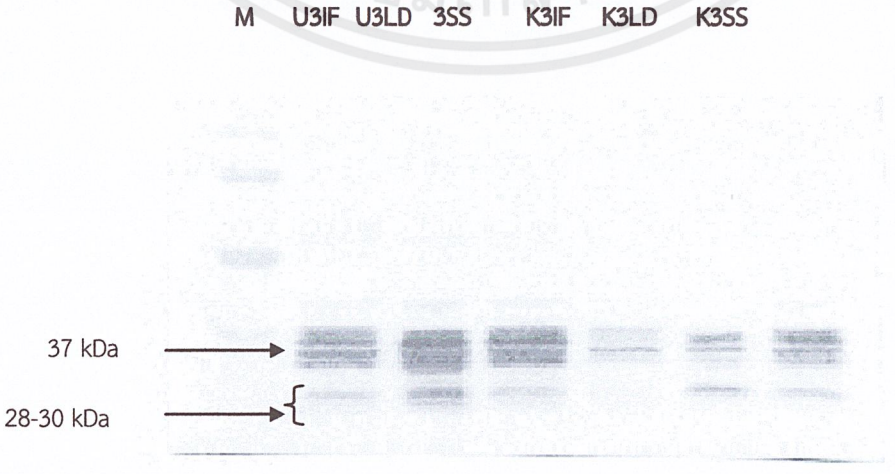
w-blot buffer

glycine	60 g
Tris	6 g
Isopropanol	100 ml
ปรับน้ำกลั่นให้ได้ 2 ลิตร	

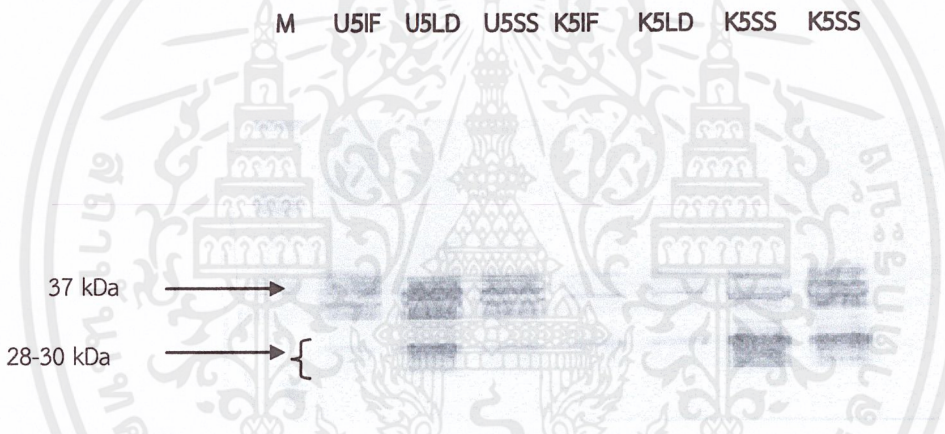
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

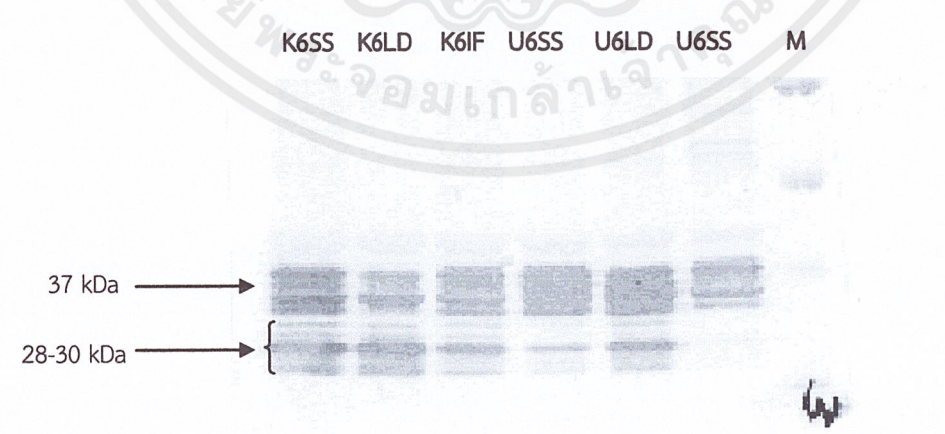
ภาคผนวก ข



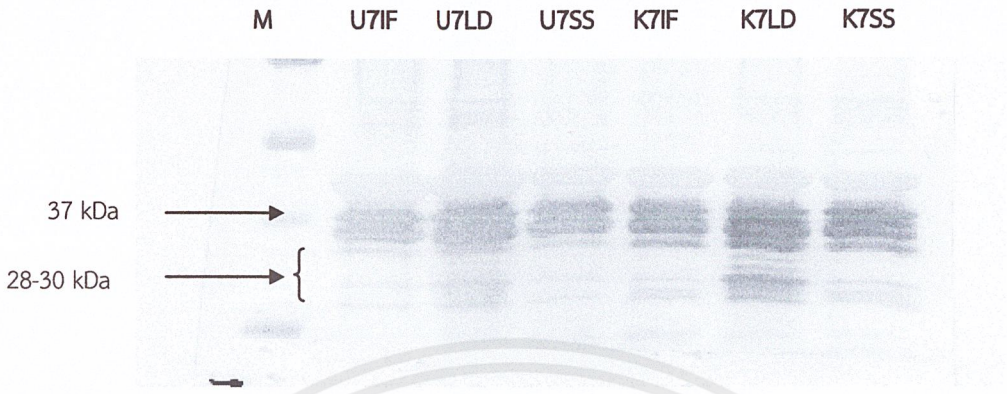


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ข Immunoreactivity ของ Troponin-T

โดยภาพนี้มาจากโคตัวที่ 1-7 จากกลุ่มโคอุบลราชธานี (U) และกาญจนบุรี (K) กล้ามเนื้อทั้ง 3 ชนิดคือ Longissimus dorsi (LD) Infraspinatus (IF) และ Supraspinatus (SS) โดยใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 100 ไมโครกรัมต่อเลน M คือ โปรตีนมาตรฐาน Precision Protein Standard (Biorad)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้