อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อระบบเอนไซม์คาลเปน ปริมาณคอลลาเจน และคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทย

INFLUENCE OF MUSCLE TYPES ON CALPAIN SYSTEM, COLLAGEN CONTENT AND MEAT QUALITY OF THAI NATIVE BEEF

สบาพร มะเด็ง

SABAPORN MADUAE

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2558

KMITL-2015-AG-M-031-199

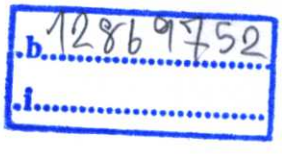
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อระบบเอนไซม์คาลเปน ปริมาณคอลลาเจน และคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทย

INFLUENCE OF MUSCLE TYPES ON CALPAIN SYSTEM, COLLAGEN CONTENT AND MEAT QUALITY OF THAI NATIVE BEEF

สไบพร มะเดื่อ

SABAIPORN MADUAE



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2557

KMITL-2015-AG-M-031-199

INFLUENCE OF MUSCLE TYPES ON CALPAIN SYSTEM, COLLAGEN CONTENT AND MEAT QUALITY OF THAI NATIVE BEEF

SABAIPORN MADUAE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN ANIMAL SCIENCE
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2015

KMITL-2015-AG-M-031-199

COPYRIGHT 2015

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อระบบเอนไซม์คาลเปน ปริมาณคอลลาเจนและคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทย

Influence of Muscle Types on Calpain System, Collagen Content and Meat Quality of Thai Native Beef

นักศึกษา นางสาวสไบพร มะเดื่อ

รหัสประจำตัว 53640401

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สัตวศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.รณชัย สิทธิไกรพงษ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.ดร.จุฑารัตน์ เศรษฐกุล

ผศ.ดร.จันทร์พร เจ้าทรัพย์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.กัญญา	จิระเจริญรัตน์	
ผศ.น.สพ.ดร.จำลอง	มิตรชาวไทย	
รศ.ดร.จุฑารัตน์	เศรษฐกุล	
ผศ.ดร.จันทร์พร	เจ้าทรัพย์	
รศ.ดร.รณชัย	สิทธิไกรพงษ์	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 23 มิถุนายน 2558

สถานที่สอบ ห้องประชุมคณะเทคโนโลยีการเกษตร (ชั้น 1 ตึกบุนนาค L)

คณบดีรับรองแล้ว

มณฑล แก่นมณี

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณฑล แก่นมณี)

คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

วันที่ 21 **เดือน** กรกฎาคม **พ.ศ.** 2558

หัวข้อวิทยานิพนธ์	อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อระบบเอนไซม์คาลเปน ปริมาณคอลลาเจน และคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทย
นักศึกษา	นางสาวสไบพร มะเดื่อ
รหัสประจำตัว	53640401
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สัตวศาสตร์
พ.ศ.	2557
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. รณชัย สิทธิไกรพงษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร. จุฑารัตน์ เศรษฐกุล ผศ.ดร. จันทร์พร เจ้าทรัพย์

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ calpains ปริมาณคอลลาเจน และคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทยที่เลี้ยงในเขตจังหวัดอุบลราชธานี โดยใช้กล้ามเนื้อใบพาย (IF ; *Infraspinatus*) กล้ามเนื้อสันนอก (LD ; *Longissimus dorsi*) และกล้ามเนื้อสันในเทียม (SS ; *Supraspinatus*) จากโคพื้นเมืองจำนวน 14 ตัว ที่เลี้ยงแบบปล่อยหากินตามทุ่งหญ้าธรรมชาติ การศึกษาพบว่าชนิดของกล้ามเนื้อไม่มีอิทธิพลต่อการทำงานเอนไซม์ μ-calpain และ m-calpain ($P>0.05$) โดยการทำงานของเอนไซม์ μ-calpain จะลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย ในขณะที่ m-calpain มีการทำงานตลอดระยะเวลาการบ่ม และพบการย่อยสลายโปรตีน troponin-T ซึ่งปรากฏความเข้มของแถบโปรตีนขนาด 30 กิโลดาลตัน มีความเข้มสูงในกล้ามเนื้อ LD และ SS มีความเข้มต่ำในกล้ามเนื้อ IF ($P<0.01$) ในขณะที่ความเข้มของแถบโปรตีน troponin-T ขนาด 37 กิโลดาลตัน ลดลง และปรากฏความเข้มของแถบโปรตีน ขนาด 30 กิโลดาลตัน เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม ($P<0.01$)

ปริมาณ soluble และ insoluble collagen มีค่าสูงในกล้ามเนื้อ IF และ SS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) และกล้ามเนื้อ SS มี total collagen สูงกว่ากล้ามเนื้อ IF และ LD ตามลำดับ ($P<0.01$) ในขณะที่ % solubility พบว่าในกล้ามเนื้อ LD และ IF มีค่าสูงกว่าในกล้ามเนื้อ SS ($P<0.05$) และพบว่า soluble collagen มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ($P<0.01$) และ % solubility มีค่าสูงขึ้น ($P<0.05$) ตามระยะเวลาการบ่ม นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาการบ่มมีอิทธิพลต่อ thawing loss ($P<0.01$) และ cooking loss ($P<0.01$) ในขณะที่ไม่มีอิทธิพลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ($P>0.05$)

Thesis Title	Influence of Muscle Types on Calpain System, Collagen Content and Meat Quality of Thai Native Beef
Student	Miss Sabaiporn Maduae
Student ID.	53640401
Degree	Master of Science
Program	Animal Science
Year	2015
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Ronachai Sitthigripong
Thesis Co-Advisor	Assoc. Prof. Dr. Jutarat Sethakul
	Asst. Prof. Dr. Chanporn Chaosap

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effects of muscle types on calpains activity, collagen content and meat quality of Thai native beef, that were raised in Ubonratchathani province. Three muscle types; M. *Infraspinatus* (IF), M. *Longissimus dorsi* (LD) and M. *Supraspinatus* (SS) from fourteen cattle were used in this study. The results showed that there was no significant effect of muscle types on the actives of μ-calpain and m-calpain ($P>0.05$). The activity of μ-calpain rapidly declined within 24 hours post-mortem, while m-calpain activity retained much of its proteolytic activity during ageing period. There were no significant difference in both μ-calpain and m-calpain activity among three muscle types ($P>0.05$). The appearance of the degradable product from troponin-T, 30 kDa peptide, was higher in LD and SS, while lower in IF ($P<0.01$). The intact troponin-T 37 kDa band intensity declined gradually concomitant with the rise of the 30 kDa band intensity during post-mortem storage ($P<0.01$).

Soluble and insoluble collagen content were higher in IF and SS, while lower in LD ($P<0.01$). SS had highest total collagen content followed by IF and LD, respectively ($P<0.01$), The percentage of collagen solubility of LD and IF was higher than SS ($P<0.05$). Soluble collagen content ($P<0.01$) and % solubility ($P<0.05$) increased during post-mortem storage. Ageing time had affected on thawing loss ($P<0.01$) and cooking loss ($P<0.01$), while there was no effect on shear force value ($P>0.05$).

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาและคำปรึกษาจาก รศ.ดร.รณชัย สิทธิไกรพงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ ผศ.ดร. จันทร์พร เจ้าทรัพย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนให้ความรู้ในการแก้ปัญหา และประสบการณ์ที่ดีตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย ผู้ทำวิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผศ.น.สพ.ดร.จำลอง มิตรชาวไทย กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนชี้แนะในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมพร ดวนใหญ่ ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างเนื้อ

ขอขอบคุณ นายฉันทวัฒน์ อาชวาคม นางสาวมยุรินทร์ รักทอง นายวิทวัส อัศวพันธุ์นิมิต นางสาวพัชรา เอื้อพัฒนพงศ์ และนายพรชัย เหลืองวารี ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและให้คำปรึกษาในการทำวิจัย

ขอขอบคุณโรงฆ่าสัตว์เทศบาลอำเภอวารินชำราบ ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลทางสัตว์ และห้องปฏิบัติการวิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์ คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำหรับเครื่องมืออุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณรุ่นพี่ รุ่นน้อง และเพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาโททุกท่านสำหรับกำลังใจ และความช่วยเหลือในระหว่างการทำวิจัยตลอดมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่งสำหรับ คุณพ่อพรชัย มะเดื่อ และคุณแม่สมัย มะเดื่อ ที่สนับสนุนทุนการศึกษาและคอยเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยเสมอมา และขอบคุณคุณบังอร มะเดื่อ (น้องสาว) ที่ช่วยเหลือในการทำวิจัย คุณค่าของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขอมอบแด่ ผู้มีพระคุณทุกท่าน ตลอดจนผู้ที่สามารถนำไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อไป

สไบพร มะเดื่อ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญภาพ.....VIII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและที่มา.....1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์.....2

1.3 สถานที่ดำเนินงาน.....3

1.4 ขั้นตอนการศึกษา.....3

1.5 ระยะเวลาการศึกษา.....4

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....4

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5

2.1 สายพันธุ์โคพื้นเมืองไทย.....5

2.2 โครงสร้างกล้ามเนื้อ.....6

2.3 การจำแนกชนิดของโปรตีนในกล้ามเนื้อ.....8

2.4 ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ.....13

2.5 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อและคุณภาพเนื้อ.....14

2.6 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความนุ่มของเนื้อ.....15

2.7 การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย.....16

2.8 กลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนภายหลังสัตว์ตาย.....19

2.9 ความสำคัญของเอนไซม์คาลเปน.....21

2.10 ความสำคัญของโปรตีนคาลปาสตาตินต่อความนุ่มของเนื้อ.....26

2.11 ความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์คาลเปน และโปรตีนคาลปาสตาติน ต่อความนุ่มของเนื้อ.....27

2.12 การย่อยสลายโปรตีน troponin-T ต่อความนุ่มของเนื้อ.....29

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.13 ความสำคัญของคอลลาเจนต่อความนุ่มของเนื้อ.....31
2.14 ระยะเวลาการบ่มต่อความนุ่มของเนื้อ.....36

บทที่ 3 วิธีดำเนินการงานวิจัย.....38
3.1 สัตว์ทดลอง.....38
3.2 อุปกรณ์.....38
3.3 สารเคมี.....39
3.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....41
3.4.1 การสุ่มตัวอย่างเนื้อ.....41
3.4.2 การศึกษา calpain activity โดย casein zymography.....42
3.4.3 การศึกษาการย่อยสลายของโปรตีน troponin-T ด้วยเทคนิค Western blot.....44
3.4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณคอลลาเจน.....46
3.4.5 การศึกษาคุณภาพเนื้อ.....47
3.4.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....48

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....50
4.1 การศึกษาค่าการทำงานของเอนไซม์คาลเปน.....50
4.1.1 อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อการทำงานของเอนไซม์คาลเปน.....50
4.1.2 อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มต่อการทำงานของเอนไซม์คาลเปน.....52
4.2 การศึกษาการย่อยสลายโปรตีน troponin-T.....53
4.2.1 อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อการย่อยสลายโปรตีน troponin-T.....53
4.2.2 อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มต่อการย่อยสลายโปรตีน troponin-T.....56
4.2.3 อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดกล้ามเนื้อและระยะเวลาการบ่มต่อการย่อยสลายโปรตีน troponin-T.....57
4.3 การศึกษาปริมาณคอลลาเจน.....58
4.3.1 อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อปริมาณคอลลาเจน.....58
4.3.2 อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มต่อปริมาณคอลลาเจน.....60

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4 คุณภาพของเนื้อโคพื้นเมืองอุบลราชธานี.....61
4.4.1 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ.....61
4.4.2 ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการละลายเนื้อ.....63
4.4.3 ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างหารปรุงสุก.....64

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....66
5.1 สรุปผลการทดลอง.....66
5.2 ข้อสังเกตและเสนอแนะ.....67

บรรณานุกรม.....68

ภาคผนวก.....77
ภาคผนวก ก.....78
ภาคผนวก ข.....88
ภาคผนวก ค.....92

ประวัติผู้เขียน.....95

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 การจำแนกชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ.....13
2.2 กลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อ.....20
2.3 ผลผลิตจากการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์คาลเปน.....23
2.4 อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มต่อคุณภาพเนื้อและปริมาณโปรตีนคาลปาสตาติน.....27
2.5 ปริมาณคอลลาเจน total collagen, insoluble collagen และ soluble collagen (%) ในโคยุโรป 33
2.6 ปริมาณ total, soluble collagen และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ในกล้ามเนื้อแต่ละชนิด.....35
2.7 ปริมาณไขมันแทรก, total , soluble collagen และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ในกล้ามเนื้อสันนอกที่ระดับคุณภาพซากที่แตกต่างกัน.....35
4.1 การทำงานของเอนไซม์คาลเปน ในกล้ามเนื้อ 3 ชนิด ของโคพื้นเมืองไทยที่เลี้ยงในเขตจังหวัดอุบลราชธานี.....52
4.2 อิทธิพลของกล้ามเนื้อและระยะเวลาการบ่มต่อการย่อยสลายโปรตีน troponin-T 55
4.3 อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดกล้ามเนื้อและระยะเวลาการบ่มต่อโปรตีน troponin-T ขนาด 30 กิโลดาลตัน.....57
4.4 อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อและระยะเวลาการบ่มที่มีต่อปริมาณคอลลาเจน.....59
4.5 คุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองอุบลราชธานีที่ระยะเวลาการบ่มที่แตกต่างกัน.....62

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 โคพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.....6
2.2 ส่วนประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อ.....8
2.3 ส่วนประกอบของ thin filament.....10
2.4 ไมโอซิน ส่วนประกอบของ thick filament.....11
2.5 โปรตีนกลุ่มที่ควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อ.....12
2.6 โปรตีนโครงร่างกลุ่มไมโอไฟบริลาร์.....12
2.7 การเปลี่ยนแปลงในกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย.....18
2.8 โครงสร้างของเอนไซม์คาลเปน.....22
2.9 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ μ-calpain และ m-calpain ภายหลังสัตว์ตาย ในกล้ามเนื้อสันนอก *Longissimus dorsi lumbar* (LDL) ระหว่าง 144 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....25
2.10 การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ (ก) μ-calpain และ (ข) m-calpain ในกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi thoracic* (LDT), *Longissimus dorsi lumbar* (LDL) , *Semimembranosus (SM)*, *Triceps brachii* (TB) และ *Psoas major* (PM) ระหว่าง 144 ชั่วโมง ภายหลังสัตว์ตาย อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....26
2.11 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์คาลเปน โปรตีนคาลปาสตาติน และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ในกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) ของโค Angus 29
2.12 การย่อยสลายของโปรตีน troponin-T ของกล้ามเนื้อ *Masseter* (MS), *Diaphragm* (DP) และ *Longissimus* (LT) ที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 1, 5 และ 14 วัน 31
2.13 การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย.....37
4.1 ตำแหน่งของเอนไซม์คาลเปนและการทำงานของเอนไซม์คาลเปน ในกล้ามเนื้อใบพาย (IF; *Infraspinatus*) กล้ามเนื้อสันนอก (LD; *Longissimus dorsi*) และกล้ามเนื้อสันในเทียม (SS; *Supraspinatus*) 51
4.2 การทำงานของเอนไซม์คาลเปน ที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 2, 7, 14 และ 21 วัน ในกล้ามเนื้อสันนอก (LD; *Longissimus dorsi*) 52
4.3 ตำแหน่งของแถบโปรตีน troponin-T และการย่อยสลายของโปรตีน troponin-T ในกล้ามเนื้อใบพาย (IF; *Infraspinatus*) กล้ามเนื้อสันนอก (LD; *Longissimus dorsi*)

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

เนื้อโคจัดว่าเป็นแหล่งของสารอาหารโปรตีนที่มีคุณภาพดีของคนไทยมาตั้งแต่อดีต โปรตีนในเนื้อโคเป็นโปรตีนที่มีค่าทางชีวภาพสูง (high biological value) เนื่องจากมีกรดอะมิโนจำเป็น ได้แก่ isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophan และ valine เพื่อให้ร่างกายเจริญเติบโตเป็นปกติ และมีการพัฒนาของสมองอย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของสารอาหารรอง (micronutrients) ได้แก่ วิตามินเอ, วิตามินบี 6, วิตามินบี 12, วิตามินดี, และวิตามินอี โดยเฉพาะวิตามินบี 12 ที่มักจะพบในปริมาณน้อยในอาหารชนิดอื่น มีแร่ธาตุที่มีประโยชน์ได้แก่ เหล็ก, ฟอสฟอรัส, สังกะสี, ซีลีเนียม และแมกนีเซี่ยม มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว ประกอบด้วยกรดลิโนเลอิก (linoleic acid ; 18:2, n-6) กรดแอลฟา-ลิโนเลนิก (αlinolenic acid ; 18:3, n-3) กรดอะราชิโดนิก (arachidonic acid ; 20:4, n-6) กรดอีโคซะเพนทาอิโนอิก (eicosapentaenoic acid, EPA ; 20:5, n-3) และกรดโดโคซะเพนทาอิโนอิก (docosapentaenoic acid, DPA ; 22:5, n-3) นอกจากจะเป็นแหล่งสำคัญของโอเมก้า 3 และโอเมก้า 6 แล้ว เนื้อโคยังเป็นแหล่งของ conjugated linoleic acid (CLA) ซึ่งพบว่าช่วยต้านการเกิดเนื้องอก และมะเร็ง และการเกิดหลอดเลือดแข็งตัว (พร้อมลักษณ์ สมบูรณ์ปัญญากุล. 2551)

โคพื้นเมืองไทยส่วนใหญ่ถูกเลี้ยงแบบปล่อยให้กินหญ้าตามธรรมชาติ มีการเลี้ยงทั่วทุกภาคของประเทศไทย คุณภาพด้านความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมืองนั้นค่อนข้างต่ำ เนื้อค่อนข้างเหนียว มีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อความนุ่มของเนื้อ สามารถแบ่งออกเป็นปัจจัยก่อนสัตว์ตาย (background toughness) ได้แก่ ชนิดสัตว์ สายพันธุ์ เพศ อายุ เป็นต้น โดยปัจจัยก่อนสัตว์ตายนี้จะส่งผลต่อชนิดและปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีส่วนประกอบหลักเป็นคอลลาเจน ตำแหน่งและการเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อทำให้มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมากขึ้นส่งผลให้มีความนุ่มของเนื้อลดลง และปัจจัยภายหลังสัตว์ตาย ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีภายหลังสัตว์ตาย การเกิดการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ การย่อยสลายโปรตีนภายในกล้ามเนื้อ และระยะเวลาการบ่ม ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ล้วนส่งผลต่อความนุ่มของเนื้อโค นอกจากนี้ปริมาณไขมันแทรกในกล้ามเนื้อยังช่วยส่งผลให้เนื้อมีความนุ่มมากขึ้น เนื่องจากไขมันจะช่วยลดความหนาแน่นของโปรตีน และไขมันที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ของกล้ามเนื้อ หรือ

ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน จะช่วยลดแรงที่ใช้ในการตัดเนื้อ ซึ่งไขมันที่อยู่ระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อ ช่วยเพิ่มการรับรู้ความนุ่มของเนื้อ (Calkins and Sullivan. 2007)

ภายหลังสัตว์ตายทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อ เนื่องจากพลังงานที่สะสมถูกใช้หมดไป กล้ามเนื้อจะเข้าสู่กระบวนการหดเกร็งตัวอย่างถาวร (rigor mortis) ระบบการทำงานของผนังซาร์โคพลาสมิกเรติคิวลัมสูญเสียไป ส่งผลให้แคลเซียมที่ถูกกักเก็บไว้ในซาร์โคพลาสมิกเรติคิวลัมถูกปล่อยออกมาสู่ซาร์โคพลาสซึม ความเข้มข้นของแคลเซียมที่เพิ่มมากขึ้นจะกระตุ้นเอนไซม์คาลเปนที่อยู่ในไซโตซอลให้เข้าย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein) บริเวณ Z-line โปรตีนไตติน เดสมิน เนบูลิน และโทรโปนิน ทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มมากขึ้น (Warriss. 2000) ซึ่งการบ่มเนื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาหนึ่งจะช่วยให้เนื้อมีความนุ่มมากขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ที่อยู่ในเนื้อเข้าย่อยสลายโปรตีนภายในเนื้อสัตว์ (Dransfield. 1994)

นอกจากนี้ชนิดของกล้ามเนื้อยังส่งผลทำให้เนื้อมีความนุ่ม ความเหนียวแตกต่างกัน เนื่องจากกล้ามเนื้อแต่ละมัดตามจุดต่างๆ ของร่างกายมีการเคลื่อนไหวที่แตกต่างกัน โดยกล้ามเนื้อที่มีการเคลื่อนไหวมาก เช่น เนื้อน่อง เนื้อต้นคอ เนื้อสีข้าง และเนื้อพื้นท้อง จะมีเอ็นและพังผืดอยู่มาก ทำให้เนื้อเหนียว ในทางตรงข้าม เนื้อสันใน และเนื้อสันนอกอยู่ในบริเวณของร่างกายที่มีการเคลื่อนไหวน้อย เนื้อจึงมีความนุ่มมากกว่า (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2552)

เนื่องจากเนื้อโคพื้นเมืองของไทยนั้นมีคุณค่าทางโภชนาการสูง และมีการเลี้ยงอยู่ทั่วไป แต่ปัญหาของคุณภาพด้านความนุ่มของเนื้อโคนั้นส่งผลให้มีการบริโภคไม่มากนัก ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อทราบถึงการทำงานของเอนไซม์คาลเปน ในการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อโดยเฉพาะ troponin-T และทราบถึงสัดส่วนของคอลลาเจนที่ละลายได้กับคอลลาเจนที่ไม่ละลาย และปริมาณคอลลาเจนที่มีในกล้ามเนื้อใบพาย กล้ามเนื้อสันนอก และกล้ามเนื้อสันในเทียม ซึ่งเป็นตัวแทนของกล้ามเนื้อที่ทำการศึกษา เพื่อนำข้อมูลที่ได้ใช้เป็นพื้นฐานในการวิเคราะห์และปรับปรุงความนุ่มของกล้ามเนื้อแต่ละชนิด เพื่อกระตุ้นให้มีการบริโภคเนื้อโคพื้นเมืองเพิ่มมากขึ้นในอนาคต

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์

การศึกษาครั้งนี้ ศึกษาในกล้ามเนื้อ 3 ชนิด คือ กล้ามเนื้อใบพาย (IF ; *Infraspinatus*) กล้ามเนื้อสันนอก (LD ; *Longissimus dorsi*) และกล้ามเนื้อสันในเทียม (SS ; *Supraspinatus*) ของโคพื้นเมืองไทยที่เลี้ยงในเขตจังหวัดอุบลราชธานี ที่มีต่อลักษณะที่ศึกษาดังต่อไปนี้

1.2.1 เพื่อศึกษาอิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อการทำงานของเอนไซม์คาลเปน (calpains) ภายใน 1 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย

1.2.2 เพื่อศึกษาอิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อการย่อยสลายของโปรตีนโทรโปนินที (troponin-T) ที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 7 และ 21 วัน

1.2.3 เพื่อศึกษาอิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อปริมาณคอลลาเจน (collagen) ที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 7 และ 21 วัน

1.2.4 เพื่อศึกษาอิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อคุณภาพเนื้อที่ระยะเวลาการบ่ม 2 และ 7 วัน

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

1.3.1 ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.2 ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.3 ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลทางสัตว์ และห้องปฏิบัติการวิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์ ภาควิชาครุศาสตร์เกษตร คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.4 โรงฆ่าสัตว์เทศบาลอำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

1.4 ขั้นตอนการศึกษา

ศึกษากล้ามเนื้อใบพาย (IF; *Infraspinatus*) กล้ามเนื้อสันนอก (LD ; *Longissimus dorsi*) และกล้ามเนื้อสันในเทียม (SS; *Supraspinatus*) ของโคพื้นเมืองไทยที่เลี้ยงในเขตจังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งลักษณะที่ศึกษามีดังนี้

1.4.1 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ calpains ภายใน 1 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย

1.4.2 ศึกษาการย่อยสลายของโปรตีน troponin-T ที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 7 และ 21 วัน

1.4.3 ศึกษาปริมาณคอลลาเจน ทั้ง soluble, insoluble, total collagen และ % solubility ที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 7 และ 21 วัน

1.4.4 ศึกษาคุณภาพเนื้อที่ระยะเวลาการบ่ม 2 และ 7 วัน

1.5 ระยะเวลาการศึกษา

ระยะเวลาดำเนินงานทั้งสิ้น 12 เดือน

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ทราบถึงการทำงานของเอนไซม์ calpains ภายใน 1 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย

1.6.2 ทราบถึงการย่อยสลายของโปรตีน troponin-T ที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 7 และ 21 วัน

1.6.3 ทราบถึงปริมาณ soluble, insoluble, total collagen และ % solubility ที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 7 และ 21 วัน

1.6.4 ทราบถึงคุณภาพเนื้อที่ระยะเวลาการบ่ม 2 และ 7 วัน

1.6.5 สามารถนำความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิเคราะห์คุณภาพเนื้อและปรับปรุงความนุ่มของเนื้อในกล้ามเนื้อแต่ละชนิด เพื่อกระตุ้นให้มีการบริโภคเนื้อโคพื้นเมืองเพิ่มมากขึ้นในอนาคต

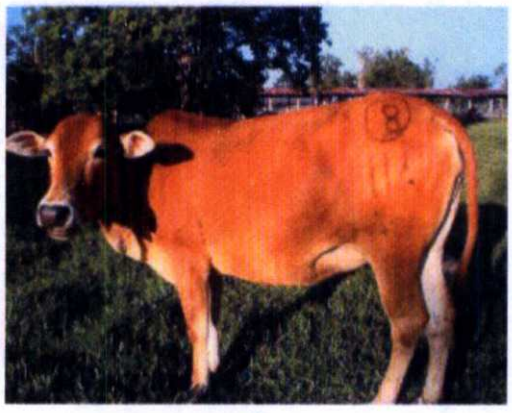
บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สายพันธุ์โคพื้นเมืองไทย

กรมปศุสัตว์ (2547) รายงานว่า โคพื้นเมืองไทยจัดอยู่ในกลุ่มโคซีบูหรือโคอินเดีย (*Bos indicus*) มีลักษณะใกล้เคียงกับโคพื้นเมืองของประเทศเพื่อนบ้าน ยังไม่ทราบแน่ชัดในสายพันธุ์ดั้งเดิม โคพื้นเมืองในประเทศไทย สามารถแบ่งออกตามลักษณะรูปร่างภายนอก ตามภูมิภาคและวัตถุประสงค์ของการเลี้ยงได้ 4 สายพันธุ์ คือ โคพื้นเมืองภาคเหนือ (โคขาวลำพูน) โคพื้นเมืองภาคอีสาน โคพื้นเมืองภาคกลาง (โคลาน) และโคพื้นเมืองภาคใต้ (โคชน) ลักษณะโดยทั่วไป เป็นโคที่มีขนาดเล็ก ขนสั้นเกรียน มีนิสัยเปรียว ตื่นตกใจง่าย รักฝูง จดจำฝูงได้ดี ทนทานต่อโรค แมลง และสภาพดินฟ้าอากาศได้ดี เลี้ยงง่ายหากินเก่งไม่เลือกอาหาร เพราะผ่านการคัดเลือกแบบธรรมชาติ สามารถปรับตัวให้เข้ากับการเลี้ยงโดยใช้ทรัพยากรที่มีอยู่ในพื้นที่ซึ่งมีอยู่อย่างจำกัดได้เป็นอย่างดี ให้ลูกดก ใช้แรงงานได้ดี เนื้อแน่นเหมาะกับการประกอบอาหารแบบไทย แต่มีลักษณะด้อย คือ โคพื้นเมืองไทยมีขนาดเล็ก ภายใต้สภาพการเลี้ยงที่มีอาหารจำกัด จึงส่งผลให้การเจริญเติบโตต่ำ ไม่เหมาะที่จะนำมาเลี้ยงขุน

โคพื้นเมืองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ โคพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีการเลี้ยงกระจายอยู่ทั่วไป โดยเฉพาะแถบชายแดน พบมากที่สุดในจังหวัดอุบลราชธานี ในอดีตการเลี้ยงโคมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้แรงงานในการลากจูงเทียมเกวียน แต่ในปัจจุบันเลี้ยงเพื่อเป็นรายได้เสริม และเป็นอาหารโปรตีนที่สำคัญโดยเฉพาะในงานพิธีและเทศกาลที่สำคัญ น้ำหนักแรกเกิดประมาณ 14 - 16 กิโลกรัม น้ำหนักเพศผู้เมื่อโตเต็มที่ประมาณ 350 - 450 กิโลกรัม เพศเมียประมาณ 230 - 260 กิโลกรัม

เพศผู้



เพศเมีย

ภาพที่ 2.1 โคพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ที่มา : กรมปศุสัตว์ (2547)

2.2 โครงสร้างของกล้ามเนื้อ

กล้ามเนื้อโครงร่างหรือกล้ามเนื้อลายเป็นเนื้อเยื่อที่มีมากที่สุดในร่างกาย ประมาณ 40 - 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว เมื่อกล้ามเนื้อถูกกระตุ้นจากสิ่งเร้าจะมีการส่งกระแสประสาทไปตามส่วนต่างๆ ของเซลล์ ทำให้กล้ามเนื้อมีการหดและคลายตัว ซึ่งการหดและคลายตัวนี้จะทำให้เกิดการเคลื่อนไหวของส่วนต่างๆ ของร่างกาย โครงสร้างของกล้ามเนื้อประกอบด้วยเซลล์ของกล้ามเนื้อที่เรียกว่า เส้นใยกล้ามเนื้อ (muscle fiber) Choi *et al.* (2009) กล่าวว่า เส้นใยกล้ามเนื้อ หรือเซลล์กล้ามเนื้อ เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นเส้นเล็กยาว มีนิวเคลียสแบบ multinucleus ด้านนอกถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเป็นแผ่นบางและโปร่งแสงเรียกว่า ซาร์โคเลมมา (sarcolemma) มีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 10 – 100 ไมครอน (μm) ซึ่งเส้นใยกล้ามเนื้อจะเรียงขนานกันไปตามความยาวของกล้ามเนื้อ ชัยณรงค์ คัณธพนิต (2529) กล่าวว่า ส่วนประกอบของเซลล์กล้ามเนื้อ (ภาพที่ 2.2) มีดังนี้

1. ซาร์โคเลมมา (sarcolemma) เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เป็นเยื่อที่ละเอียดซับซ้อนอยู่ใต้เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ชื่อว่า เอ็นโดไมเซียม แบ่งเป็น 3 ชั้น ได้แก่ ชั้นนอกสุดเป็นโครงข่ายของคอลลาเจน ชั้นกลางมีรูปร่างไม่แน่นอน เรียกว่า amorphous middle layer และชั้นใน คือ inner plasma membrane จะยุบตัวลงไปเพื่อสร้าง transverse (T) system ซึ่งเป็นการขยายส่วนที่เป็น plasma membrane เข้าไปในเซลล์กล้ามเนื้อเพื่อที่จะถ่ายทอดกระแสประสาทผ่านท่อที (transverse tubules) ไปยังเซลล์กล้ามเนื้อกระตุ้นให้เกิดการยืดหดตัว

2. ซาร์โคพลาสซึม (sarcoplasm) เทียบได้กับไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์ชนิดอื่น มีลักษณะเป็นสารกึ่งเหลว (semi-fluid) อยู่ภายในเซลล์กล้ามเนื้อ ทำหน้าที่หล่อเลี้ยงโครงสร้างต่างๆ

ที่อยู่ในเซลล์กล้ามเนื้อ ประกอบด้วยน้ำประมาณ 75 - 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบสารพวกไกลโคเจน (glycogen) ไมโอโกลบิน (myoglobin) และพบว่ามีแคลเซียม (Ca^{2+}) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อสะสมอยู่ในซาร์โคพลาสซึมด้วย แต่ส่วนประกอบ ที่พบมากที่สุดในซาร์โคพลาสซึม คือ ไมโอไฟบริล (myofibril) รวมทั้งออร์แกลแนล (organelles) อื่นๆ เช่น กอลจิคอมเพลกซ์, นิวเคลียส, ไมโตคอนเดรีย และเอ็นโดพลาสมิกเรติคิวลัม

3. นิวเคลียส (nucleus) เซลล์กล้ามเนื้อมีหลายนิวเคลียส (multinucleus) พบอยู่ใต้ซาร์โคเลมมา รูปร่างเป็นเม็ดรูปวงรี เรียงตัวตามแนวยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อ

4. กอลจิคอมเพลกซ์ (golgi complex) มีลักษณะเป็นออร์แกนแนลเชิงซ้อนประกอบด้วยเยื่อบางๆ วางซ้อนกันหลายๆ ชั้น ตรงกลางมีเยื่อหุ้มที่บางมากจึงโป่งออกเป็นกระเปาะเล็ก ๆ มีรูปร่างต่างกัน อยู่ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มนิวเคลียส และบางส่วนติดกับเอ็นโดพลาสมิกเรติคิวลัมแบบหยาบ (RER ; rough endoplasmic reticulum) ดังนั้นหน้าที่หนึ่งของกอลจิคอมเพลกซ์ คือช่วยนำโปรตีนที่ RER สร้างเข้าไปรวมในถุงก่อนส่งออกนอกเซลล์ต่อไป

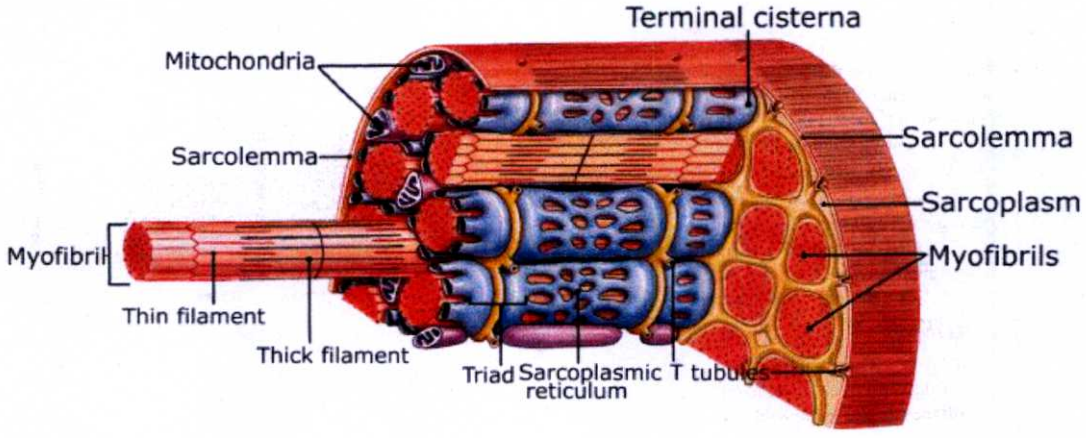
5. ไมโตคอนเดรีย (mitocondria) มีรูปร่างเป็นแท่งรูปวงรี ประกอบด้วยเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ชั้นนอกทำหน้าที่ควบคุมปริมาณและชนิดของสารที่เข้าออกจากไมโตคอนเดรีย ชั้นในเป็นห้องเล็ก ๆ หยักไปหยักมา ช่วยเพิ่มพื้นที่ในการทำงานเรียกว่าคริสตี (cristae) พบในที่ว่างระหว่างเส้นใยย่อยใต้เยื่อหุ้มเส้นใย และมักอยู่ใกล้เส้น Z-line ไมโตคอนเดรียทำหน้าที่ในการรวบรวมพลังงานจากวัฏจักรเครบส์ (Krep's cycle) แล้วส่งต่อไปยังเซลล์ในรูปของ ATP (adenosine triphosphate) ซึ่งภายในไมโตคอนเดรียจะมีเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมหลายชนิด

6. ไลโซโซม (lysosome) มีรูปร่างเหมือนถุงเล็กๆ ที่มีเอนไซม์หลายชนิดอยู่ภายใน รวมทั้งกลุ่มเอนไซม์คาเทปซิน (cathepsins)

7. ซาร์โคพลาสมิกเรติคิวลัม (sarcoplasmic reticulum) คือเอ็นโดพลาสมิกเรติคิวลัมในเซลล์อื่น เป็นผนังหุ้มของระบบท่อที และซิสเตอนี (cisternae) มีหน้าที่สะสมแคลเซียม เมื่อเส้นใยกล้ามเนื้ออยู่ในภาวะพักตัว (relax) ซาร์โคพลาสมิกเรติคิวลัมจะสานรูปร่างเป็นโครงข่ายหุ้มโดยรอบไมโอไฟบริล

8. ไมโอไฟบริลหรือเส้นใยย่อย (myofibril) เป็นส่วนประกอบประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์กล้ามเนื้อ ซึ่งไมโอไฟบริลเป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่ในการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ มีรูปร่างเป็นเส้นยาวทรงกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 – 2 ไมครอน ไมโอไฟบริลจะอยู่ในซาร์โคพลาสซึมและมีความยาวตามความยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อ ประกอบด้วยแถบมืด หรือ A - band (anisotropic band) และแถบสว่าง หรือ I - band (isotropic band) สลับกันทำให้เกิดหน่วยย่อย (unit) ของกล้ามเนื้อ

ขึ้น เรียกว่า ซาร์โคเมียร์ (sarcomere) ทำให้เกิดเป็นลาย (striated) ในกล้ามเนื้อโครงร่าง แถบมืดและแถบสว่างในไมโอไฟบริลเกิดจากการเรียงตัวกันของเส้นใยฝอย (myofilament) 2 ชนิด คือ เส้นใยฝอยชนิดหนา (thick filament) หรืออาจเรียกว่า myosin filament เนื่องจากว่าประกอบด้วยโปรตีนไมโอซินเป็นหลัก และเส้นใยฝอยชนิดบาง (thin filament) หรือ actin filament เพราะประกอบด้วยแอคตินเป็นส่วนใหญ่



ภาพที่ 2.2 ส่วนประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อ

ที่มา : Martini and Frederic (2006)

2.3 การจำแนกชนิดของโปรตีนในกล้ามเนื้อ

โปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกล้ามเนื้อมีหลายชนิด แต่ละชนิดจะมีหน้าที่และคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป โดยโปรตีนที่พบในกล้ามเนื้อสามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

1. กลุ่มซาร์โครพลาสมิกโปรตีน (sarcoplasmic protein)

ซาร์โคพลาสมิกโปรตีนเป็นโปรตีนกล้ามเนื้อที่ห่อหุ้มรอบเส้นใยย่อย ซึ่งละลายอยู่ในส่วนของซาร์โคพลาสซึม เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการละลายน้ำและสารละลายเกลือเจือจาง มีอยู่ประมาณ 30 - 35 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดที่พบในกล้ามเนื้อ (Nui *et al.* 2015) โดยโปรตีนที่สำคัญที่พบในกลุ่มนี้ คือ

1.1 โปรตีนไมโอเจน (myogen) ประกอบไปด้วยโปรตีนหลายๆ ชนิดรวมกัน มีประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด ได้แก่ เอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) เช่น เอนไซม์ไมโอไคเนส (myokinase) และเอนไซม์ฟอสโฟรีเลส (phosphorelase) เป็นต้น

1.2 โปรตีนโกลบลูลิน เอ็กซ์ (globulin X) เป็นโปรตีนรูปร่างทรงกลม บทบาทและหน้าที่ยังไม่ทราบแน่ชัด

1.3 โปรตีนไมโอโกลบิน (myoglobin) เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการทำให้เกิดสี (chromoprotein) ซึ่งมีฮีม (heme) เป็นองค์ประกอบคล้ายกับฮีโมโกลบิน (haemoglobin) ทำหน้าที่รับส่งออกซิเจนให้กับเซลล์กล้ามเนื้อ เป็นตัวที่ทำให้กล้ามเนื้อมีสี สีของเนื้อขึ้นอยู่กับไมโอโกลบิน 90 เปอร์เซ็นต์ และอีก 10 เปอร์เซ็นต์ขึ้นอยู่กับฮีโมโกลบิน

2. โปรตีนกลุ่มเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue protein)

เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นโปรตีนกล้ามเนื้อมีหน้าที่หลักในการเชื่อมและยึดเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกายให้ติดกัน ไม่ละลายในสารละลายใด ๆ โดยเฉพาะที่อุณหภูมิต่ำ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะสามารถพบได้ทุกแห่งในร่างกายสัตว์ เช่น กระดูก เอ็น พังผืด เป็นต้น มีอยู่ประมาณ 10 - 15 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดที่พบในกล้ามเนื้อ (Nui *et al.* 2015) ซึ่งโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจำแนกได้เป็น 3 ชนิด คือ

2.1 เส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่พบมากที่สุดในร่ายกายสัตว์ จะกระจายอยู่ทั่วไป มีลักษณะเป็นเส้นยาว สีขาว เหนียว แข็งแรง และต้านทานแรงตึงได้ เมื่อโดนความร้อนจะแปรสภาพเป็นเจลลาตินได้ง่าย Lepetit. (2007) รายงานว่า เส้นใยคอลลาเจนในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพอริไมเซียม มีความหนาประมาณ 65 - 67 นาโนเมตร (nm) และในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเอ็นโดไมเซียม มีความหนาประมาณ 47 - 48 นาโนเมตร ความหนาของเส้นใยจะผันแปรขึ้นอยู่กับชนิดกล้ามเนื้อ

2.2 เส้นใยอิลาสติน (elastin fiber) เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีปริมาณน้อยกว่าเส้นใยคอลลาเจน เส้นใยมีความยืดหยุ่นมาก แตกเป็นแขนงย่อย เชื่อมกับแขนงของเส้นอื่นเป็นตาข่าย พบตามเส้นเอ็นต่าง ๆ ของร่างกายสัตว์ ซึ่งเส้นใยอิลาสตินจะไม่สลายตัวหรือแปรสภาพไปเป็นเจลาตินเมื่อโดนความร้อน

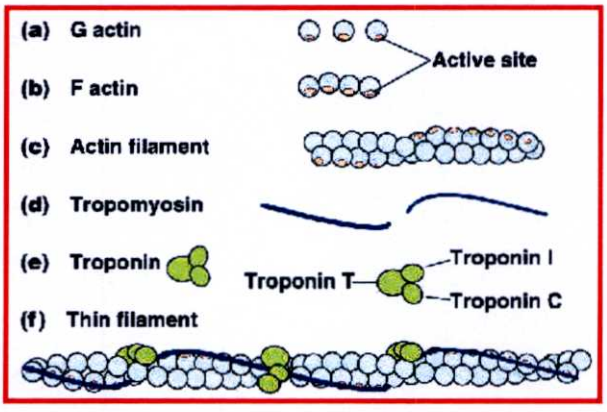
2.3 เส้นใยเรติคิวลาร์ (reticular fiber) มีลักษณะคล้ายเส้นใยคอลลาเจน มีการเรียงตัวสานเป็นร่างแหอิสระ ไม่รวมกันเป็นมัดของเส้นใย มีขนาดเล็กมาก เป็นเส้นบางกว่า และกระจายอยู่ทั่วไป

3. กลุ่มไมโอไฟบริลลาร์โปรตีน (myofibrillar protein)

เป็นโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อพบประมาณ 50 - 55 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนกล้ามเนื้อทั้งหมด (Nui *et al.* 2015) ละลายได้ในสารละลายเกลือเข้มข้น สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม ดังนี้

3.1 โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ (contractile proteins) ประกอบด้วย

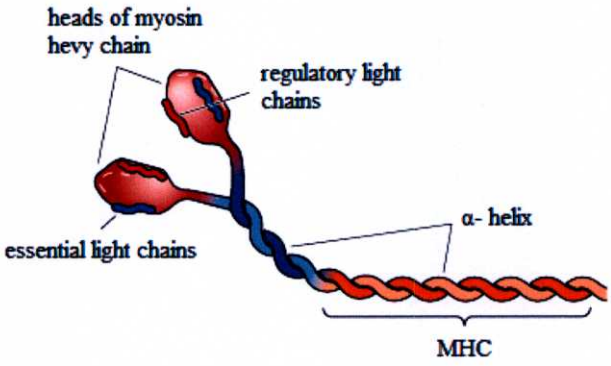
3.1.1 แอคติน (actin) เป็นองค์ประกอบของไมโอฟิลาเมนท์ชนิดบาง (thin filament) มีลักษณะเป็นทรงกลม (globular protein) เรียกว่า G–protein มีประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ มีความยาวประมาณ 1.0 ไมครอน และเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 นาโนเมตร โปรตีนแอคตินโมเลกุลเดี่ยวหลาย ๆ โมเลกุลเรียงตัวกันเป็นโครงสร้างแบบ double helical structure เรียกว่า fibrous actin หรือ F-actin (ภาพที่ 2.3) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 42 – 48 กิโลดาลตัน (kDa) ที่แอคตินมีบริเวณ myosin binding site เป็นบริเวณที่มีความจำเพาะเจาะจงจับกับไมโอซิน ซึ่งมีบริเวณของ actin binding site ที่หัวของไมโอซิน ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ นอกจากนี้แอคติน ยังมีร่องสำหรับโปรตีนโทรโปนิน (troponin) และโทรโปไมโอซิน (tropomyosin) ไปยึดเกาะ โดยเส้นใยแอคตินเป็นองค์ประกอบอยู่ในส่วนแถบสว่าง และจะพบในส่วนแถบมืดเมื่อเซลล์กล้ามเนื้อหดตัว



ภาพที่ 2.3 ส่วนประกอบของ thin filament

ที่มา : http://general.utpb.edu (2015)

3.1.2 ไมโอซิน (myosin) เป็นองค์ประกอบของไมโอฟิลาเมนท์ชนิดหนา (thick filament) มีประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 480 กิโลดาลตัน ไมโอซินมีรูปร่างเป็นแท่งยาวประมาณ 1.5 ไมครอน ประกอบด้วยส่วนหัว (head) ที่มีรูปร่างทรงกลม ส่วนคอ (neck) และส่วนหาง (tail) ซึ่งส่วนของหางเท่านั้นที่พบใน H-zone ส่วนหัวของไมโอซิน ที่อยู่ในเส้นใยฝอยชนิดหนา มี 2 หัว และเป็นส่วนที่จะจับกับแอคติน เพื่อสร้าง crossbridge (ภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.4 ไมโอซิน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ thick filaments

ที่มา : http://www.pansportmedical.ro/english/sports_medicine/articles/Muscle_fiber_a_bidirectional_approach.html (2015)

3.2 โปรตีนที่คอยควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อ (regulatory protein) ประกอบด้วย

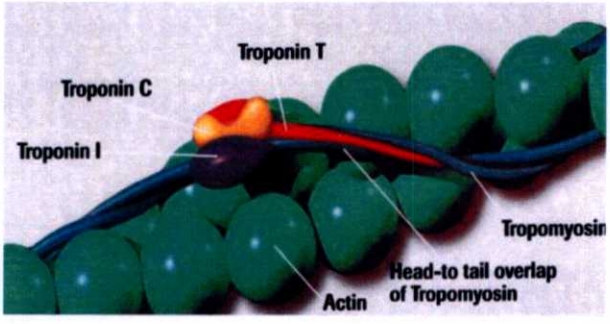
3.2.1 โทรโปไมโอซิน (tropomyosin) เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นเส้นยาวประมาณ 40 นาโนเมตร โดยโทรโปรไมโอซินจะวางพาดอยู่บนร่องที่เกิดจากการบิดเป็นเกลียวของแอคติน โดยแต่ละโมเลกุลของโทรโปนิน จะยาวประมาณ 7 โมเลกุลของแอคติน

3.2.2 โทรโปนิน (troponin) มีอยู่ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ มีลักษณะเป็นแท่งกลมสั้น จะอยู่ใต้เส้นของโทรโปไมโอซิน โดยจะพบโทรโปนิน จำนวน 1 โมเลกุลต่อทุก ๆ 7 - 8 โมเลกุลของแอคติน โดยโทรโปนินประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย (ภาพที่ 2.5) คือ

1) troponin-I (inhibitary) จับกับแอคติน ช่วยทำให้โทรโปนินและโทรโปไมโอซิน อยู่ในตำแหน่งที่ป้องกันการทำปฏิกิริยากันของแอคตินและไมโอซิน มีขนาด 24 กิโลดาลตัน (Wu. 2004)

2) troponin-T (tropomyosin - binding) จับกับโทรโปไมโอซิน มีขนาด 39 และ 37 กิโลดาลตัน (Ho *et al.* 1994)

3) troponin-C (Ca^{2+} binding) จับกับแคลเซียม ทำให้ส่วนของโทรโปนินและโทรโปไมโอซินเลื่อนออกไป แอคตินจึงจับกับไมโอซินได้ ทำให้เกิดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ (Warriss. 2000) มีขนาด 18 กิโลดาลตัน (Davis *et al.* 2004)



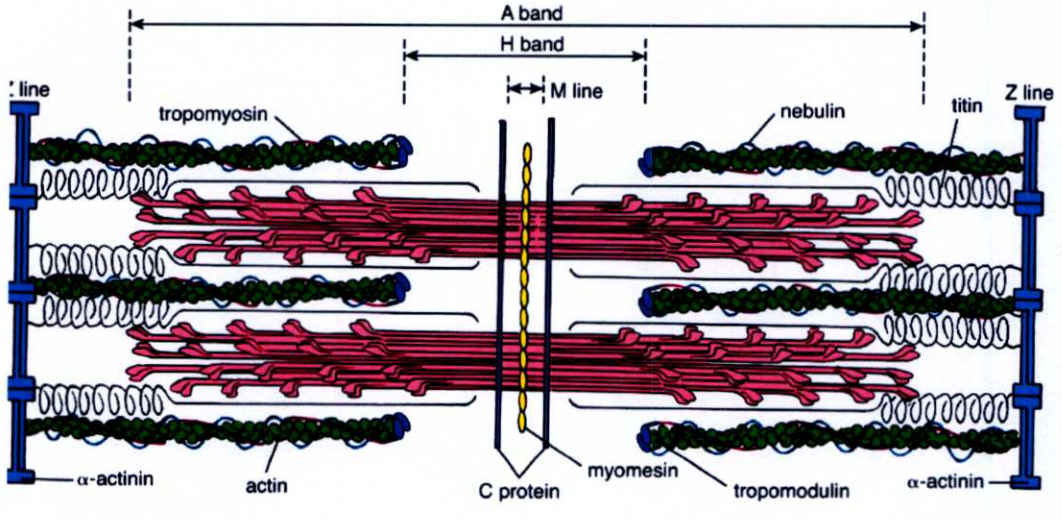
ภาพที่ 2.5 ตำแหน่งของโปรตีนกลุ่มที่ควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อ

ที่มา : Hamm *et al.* (1997)

3.3 โปรตีนที่เป็นโครงร่างของไมโอไฟบริล (cytoskeletal proteins) (ภาพที่ 2.6) ประกอบด้วย

3.3.1 ไตติน (titin) เป็นโปรตีนส่วนใหญ่ในกลุ่มโปรตีนโครงร่าง พบประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ ไตตินยาวครึ่งหนึ่งของซาร์โคเมียร์ ทำหน้าที่เชื่อมระหว่าง Z–line กับ M-line ที่อยู่ตรงกลางของ A–band ช่วยให้โครงสร้างของไมโอไฟบริลคงสภาพอยู่ได้

3.3.2 เนบูลิน (nebulin) พบประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ จะอยู่คู่ขนานกับเส้นใยฝอยชนิดบาง จาก A-band ถึง Z-disc ทำหน้าที่คล้ายแผ่นแม่แบบ (template) เพื่อความมั่นคงให้แก่โครงสร้างของเส้นใยฝอยชนิดบาง



ภาพที่ 2.6 ตำแหน่งโปรตีนโครงร่างกลุ่มไมโอไฟบริลลาร์

ที่มา : www.studyblue.com (2015)

3.3.3 C protein มีอยู่ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ โดยจะพันรอบเส้นใยฝอยชนิดหนา นอกจากนี้ยังพบโปรตีน myomesin, M protein และ skelemin ในส่วนโครงสร้างของ M-line ในส่วนของ Z-disc พบโปรตีน alpha actinin และ Cap Z

2.4 ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ

Karlsson *et al.* (1999) กล่าวว่า หลักการ Histochemical staining ถูกใช้ในการจำแนกชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ red และ white fiber โดยใช้ myosin ATPase staining ที่ pH 9.4 สามารถจำแนกชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อได้ 2 ชนิด คือ type I และ type II ซึ่งเส้นใยกล้ามเนื้อ type I มีปริมาณของ mitochondrial enzyme สูง มี myofibrillar ATPase ต่ำ และมี phosphorylase activity ตรงข้ามกับเส้นใยกล้ามเนื้อ type II ซึ่งเส้นใยกล้ามเนื้อ type II สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่มย่อย คือ IIA , IIB และ IIC มีความสัมพันธ์กับ activity ของ myosin ATPase และอัตราการหดคลายตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ

ความสามารถในการแลกเปลี่ยนออกซิเจนของกล้ามเนื้อ วัดจาก NADH-tetrazolium reductase (NADH-TR) หรือ SDH จากการจำแนกโดยวิธี myosin ATPase และ NADH-TR หรือ SDH สามารถจำแนกเส้นใยออกเป็น slow-twitch high-oxidative (SO ; β-red) , fast-twitch high-oxidative (FOG ; α-red) และ fast-twitch low-oxidative (FG ; α-white)

รูปแบบของ myosin heavy chain (MHC) สามารถใช้จำแนกชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ สอดคล้องกับหลักการ Histochemical แบ่งเป็น type I คือ MHC-I , type IIA คือ MHC-IIA , type IIB คือ MHC-IIB หรือ MHC-IIX

ตารางที่ 2.1 การจำแนกชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ

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

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

ความแตกต่างของกล้ามเนื้อเกิดจากส่วนประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อ อัตราการเปลี่ยนแปลงของเส้นใย และอัตราการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อส่วนใหญ่มีองค์ประกอบเส้นใยที่ผสมผสานกันระหว่าง light fiber และ dark fiber โดย dark muscle จะพบเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด type I และ type IIA มาก ในขณะที่ light muscle พบเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด type IIB มาก ตัวอย่างกล้ามเนื้อที่มีชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ type IIB สูง เช่น *M.Longissimus dorsi, M.Gluteus medius, M.Recturs femoris, M.Biceps femoris, M.Quadriceps femoris, M.Vartus lateralis* และ *M.Semimembranosus* ตัวอย่างกล้ามเนื้อที่มีชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ type I และ type IIA สูง คือ *M. Masseter, M.Trapezius, M.Vartus intermedius, M.Triceps brachii, M.Infraspinatus* และ *M.Supra spinum* (Karlsson *et al.* 1999, Joo *et al.* 2013)

2.5 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อและคุณภาพเนื้อ

Joo *et al.* (2013) กล่าวว่า คุณภาพเนื้อมีความสัมพันธ์กับชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ จำนวนเส้นใยทั้งหมด (total number of fiber ; TNF) พื้นที่หน้าตัดของเส้นใย (cross-section area of fibers ; CSAF) และองค์ประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อ (fiber type composition ; FTC) โดยชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อมีความสัมพันธ์กับค่า pH ของกล้ามเนื้อ ซึ่งเป็นตัวชี้วัดคุณภาพเนื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งองค์ประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อมีความสัมพันธ์กับอัตราการลดลงของค่า pH ในกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย การเพิ่มขึ้นของสัดส่วน fast-twitch glycolytic fiber ส่งผลต่ออัตราการลดลงของค่า pH อย่างรวดเร็วภายหลังสัตว์ตาย

ชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อมีอิทธิพลต่อลักษณะคุณภาพที่ปรากฏ (appearance quality traits ; AQT) ประกอบด้วย สีเนื้อ ความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (water-holding capacity ; WHC) ลักษณะเนื้อสัมผัส และไขมันแทรกในเนื้อ โดยปริมาณไมโอโกลบินและอัตราการแลกเปลี่ยนออกซิเจนของกล้ามเนื้อส่งผลทำให้เกิดเส้นใยกล้ามเนื้อที่มีสีแดง การเพิ่มขึ้นของสัดส่วนเส้นใยกล้ามเนื้อ type I ส่งผลให้ความคงตัวของสีลดลง ความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อเพิ่มขึ้น และสัดส่วนของเส้นใยกล้ามเนื้อ type IIB (fast-twitch glycolytic) ส่งผลต่อความสว่างของเนื้อเพิ่มขึ้น และความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อลดลง โดยเฉพาะสัดส่วนเส้นใยกล้ามเนื้อ type IIA (fast-twitch oxido-glycolytic fibers) ที่เพิ่มขึ้นส่งผลทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อลดลง

องค์ประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันประกอบด้วยไขมันแทรก (Intramuscular fat ; IMF) ซึ่งมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ มีความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่าง CSAF กับ IMF ใน

กล้ามเนื้อสันนอกของสุกร ส่วนในเนื้อโค IMF มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับเส้นใยกล้ามเนื้อสีแดง แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับเส้นใยกล้ามเนื้อ fast-twitch

กล้ามเนื้อชนิด slow-twitch muscle มีปริมาณของคอลลาเจนอยู่สูง ส่งผลให้ความนุ่มของเนื้อลดลง แต่อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อกับความนุ่มของเนื้อยังคงมีข้อขัดแย้งกันอยู่ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง type IIB ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อที่มีขนาดเส้นใยใหญ่เนื้อมีความเหนียวมากกว่ากล้ามเนื้อที่มีขนาดเส้นใยละเอียด ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด fast-twitch glycolytic ซึ่งเป็น type IIB ส่งผลต่อการบ่มและความนุ่มของเนื้อโค โดยกล้ามเนื้อที่มีสัดส่วนของเส้นใยชนิด fast-twitch จะเข้าสู่ภาวะ rigor mortis เร็วกว่าในกล้ามเนื้อ slow-twitch oxidative ส่งผลให้มีเอนไซม์ออกมาย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อเร็วกว่า ซึ่งอย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสัดส่วนของเอนไซม์ calpains : calpastatin มีสูงในกล้ามเนื้อ fast-twitch glycolytic มากกว่าในกล้ามเนื้อ slow-twitch oxidative ซึ่งโปรตีนในเนื้อน่าจะย่อยสลายโปรตีนได้ดีกว่า

Muroya *et al.* (2006) กล่าวว่า ชนิดของกล้ามเนื้อส่งผลต่อการย่อยสลายโปรตีน troponin-T โดยการย่อยสลายโปรตีน slow-troponin-T isoform ใน *Longissimus* (LT) สูงกว่า *Masseter* (MS) เป็นไปได้ว่าเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน เช่น calpain I (μ-calpain) และ calpain II (m-calpain) จะย่อยสลายโปรตีน troponin-T แต่การทำงานของเอนไซม์ calpains ก็จะถูกยับยั้งโดย calpastatin มีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดกล้ามเนื้อ โดยสัดส่วนของเอนไซม์ calpains : calpastatin มีสูงในกล้ามเนื้อ LT ความแตกต่างของสัดส่วนเอนไซม์ calpains : calpastatin ระหว่างกล้ามเนื้อ ทำให้การย่อยสลายโปรตีน troponin-T ในแต่ละกล้ามเนื้อแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าการย่อยสลายของโปรตีน troponin-T ขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ calpains มากกว่าชนิดของ troponin-T

2.6 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความนุ่มของเนื้อ

ปัจจัยที่ส่งผลต่อความนุ่มของเนื้อนั้นมีหลายปัจจัย Calkins and Sullivan. (2007) กล่าวว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อความนุ่มของเนื้อสามารถแบ่งได้ดังนี้

2.6.1 ปัจจัยภายในตัวสัตว์ (Backgruond effect) เป็นสิ่งที่ติดมากับตัวสัตว์ ได้แก่ เพศ สายพันธุ์ อายุ ระบบการเลี้ยงดู เป็นต้น อิทธิพลเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในทุกชนิดกล้ามเนื้อ โดยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันนี้ยังคงมีความแข็งแรงมากแม้ว่าจะยืดระยะเวลาการบ่ม หรือแม้ว่ากล้ามเนื้อจะคลายตัวเต็มที่แล้วก็ตาม แต่ความเหนียวที่เกิดจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันนี้ยังคงอยู่

เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีบทบาทต่อความนุ่มของเนื้อ 2 ประการ คือ ประการแรกเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของคอลลาเจนส่งผลให้เนื้อมีความนุ่มลดลง กล้ามเนื้อที่อยู่ในตำแหน่งที่มี

การเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อมาก จะส่งผลทำให้มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมากขึ้นและมีความนุ่มของเนื้อลดลง ประการที่ 2 การละลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเมื่อได้รับความร้อน การปรุงอาหารที่ให้ความร้อนอย่างช้าๆ ส่งผลให้คอลลาเจนในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกิดการละลายทำให้เนื้อนุ่มขึ้น การละลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันช่วยให้เนื้อนุ่มมากขึ้น ในสัตว์ที่มีอายุมากจะมี cross-link ภายในคอลลาเจนมากกว่าสัตว์ที่มีอายุน้อย ทำให้สัตว์ที่มีอายุมากมีการละลายของคอลลาเจนน้อยกว่าสัตว์ที่อายุน้อย ทำให้สัตว์ที่มีอายุมากมีความนุ่มเนื้อน้อยกว่าสัตว์ที่มีอายุน้อย

2.6.2 Actomyosin effect เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อความนุ่มของเนื้อ เกิดจากซาร์โคเมียร์ในเส้นใยกล้ามเนื้อ ซาร์โคเมียร์จะสั้นลงเมื่อกล้ามเนื้อเกิดการหดเกร็งตัว โดยโปรตีนแอคตินและไมโอซินที่เป็นองค์ประกอบหลักของซาร์โคเมียร์จับกันขณะที่เกิดการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย

ซาร์โคเมียร์หดสั้นลงจะส่งผลต่อความนุ่มของเนื้อ ความยาวของซาร์โคเมียร์ได้รับอิทธิพลจากตำแหน่งของกล้ามเนื้อในระหว่างการเกิดกระบวนการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ (rigor mortis) การยืดกล้ามเนื้อหรือการแขวนซากจะช่วยให้ซาร์โคเมียร์ยาวขึ้น และอุณหภูมิขณะเกิดการหดเกร็งตัว โดยการให้ความเย็นก่อนการหดเกร็งตัวกล้ามเนื้อ (cold pre-rigor) ส่งผลให้ซาร์โคเมียร์หดสั้นลงเนื่องจากความเย็น

กระบวนการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์ (proteolytic degradation) ในกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย ส่งผลทำให้เกิดการแตกตัวของซาร์โคเมียร์ภายหลังการปรุงสุก

2.6.3 Bulk density or lubrication effect เป็นอิทธิพลจากไขมันแทรก (intramuscular fat) ภายในกล้ามเนื้อ ซึ่งไขมันจะช่วยลดปริมาณโปรตีนต่อหน่วยของเนื้อ โดยจะลดความหนาแน่นของโปรตีน ส่งผลทำให้ความนุ่มของเนื้อเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังชี้ให้เห็นว่าไขมันที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ของกล้ามเนื้อ หรือภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน จะช่วยลดแรงที่ใช้ในการตัดเนื้อ นอกจากนี้ไขมันยังเป็นตัวเชื่อมระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อ เพิ่มการรับรู้ความนุ่มของเนื้อ

2.7 การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล (2539) กล่าวว่า การเปลี่ยนแปลงภายในกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย (post-mortem change) เกิดขึ้นภายหลังสิ้นสุดขั้นตอนการทำให้สัตว์ตาย ส่งผลให้ความสามารถในการทำงานของกล้ามเนื้อค่อย ๆ สูญเสียไป การเปลี่ยนแปลงภายหลังสัตว์ตายนี้จะส่งผลต่อลักษณะทางคุณภาพของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ในขั้นสุดท้ายการพยายามรักษาสมดุลของกล้ามเนื้อจะเกิดขึ้นทันทีหลังกระบวนการเอาเลือดออกจากร่างกายสัตว์ เพื่อที่จะพยายามรักษาสภาพต่างๆ ในขณะมีชีวิตอยู่

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

จำเป็นต้องอาศัยพลังงานจำนวนมาก พลังงานเหล่านี้ได้มาจากการสลายสารประกอบ adenosine triphosphate (ATP) โดยเอนไซม์ ATPase ในไซโตพลาสซึม

$$ATP \xrightarrow{ATPase} ADP + Pi + Energy$$

เมื่อสัตว์ตายแล้ว กระบวนการสร้างพลังงานในสภาพปกติจะหยุดชะงัก ดังนั้นพลังงานที่สะสมไว้จึงถูกใช้หมดอย่างรวดเร็ว จำเป็นต้องหาพลังงานอื่นมาทดแทน แหล่งแรกที่ถูกนำมาใช้คือการแลกเปลี่ยนกลุ่มฟอสเฟตระหว่าง creatine phosphate กับ adenosine diphosphate (ADP) โดยเอนไซม์ creatine kinase

$$\text{Creatin phosphate} + ADP \underset{}{\overset{\text{creatine kinase}}{\rightleftharpoons}} ATP + \text{Creatine}$$

กระบวนการนี้เกิดขึ้นในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ เพราะ creatine phosphate มีปริมาณจำกัดจึงถูกใช้อย่างรวดเร็ว แหล่งพลังงานถัดมาคือ ไกลโคเจน (glycogen) ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่สะสมในกล้ามเนื้อจะถูกนำมาสลายเพื่อให้ได้พลังงานในรูป ATP ซึ่งถ้ายังมีออกซิเจนเพียงพอในกล้ามเนื้อก็จะเกิดกระบวนการไกลโคไลซีสโดยใช้ออกซิเจน (aerobic glycolysis)

$$O_2 + \text{Glycogen} \xrightarrow{\text{Aerobic glycolysis}} CO_2 + H_2O + 37\ ATP$$

เมื่อออกซิเจนหมดลงจะเกิดการสลายไกลโคเจนโดยไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic glycolysis) เกิดขึ้นทดแทน

$$\text{Glycogeen} \xrightarrow{\text{Anaerobic glycolysis}} 3\ ATP + \text{Lactic acid}$$

การสลายไกลโคเจนแบบไม่ใช้ออกซิเจนนี้จะได้พลังงานในรูป ATP และกรดแลกติก สะสมในกล้ามเนื้อ

กรดแลกติกที่สะสมในกล้ามเนื้อเพิ่มมากขึ้น จะเร่งการสลายไกลโคเจนให้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้ค่า pH ลดลง จนถึงจุดที่จะไม่ลดลงอีกต่อไป จุดนี้เรียกว่าจุด ultimate pH (pHu) มีค่าประมาณ 5.3-5.5 โดยกล้ามเนื้อที่มีความเป็นกรดสูงนั้นจะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซีส ทำให้การสังเคราะห์พลังงานลดลง กล้ามเนื้อไม่สามารถหดและคลายตัวได้อีกเนื่องจากไม่มีพลังงานเพียงพอ (Hedrick *et al.* 1993) กล้ามเนื้อจะเข้าสู่สภาวะเกร็งตัวอย่างถาวร (rigor mortis) ซึ่ง

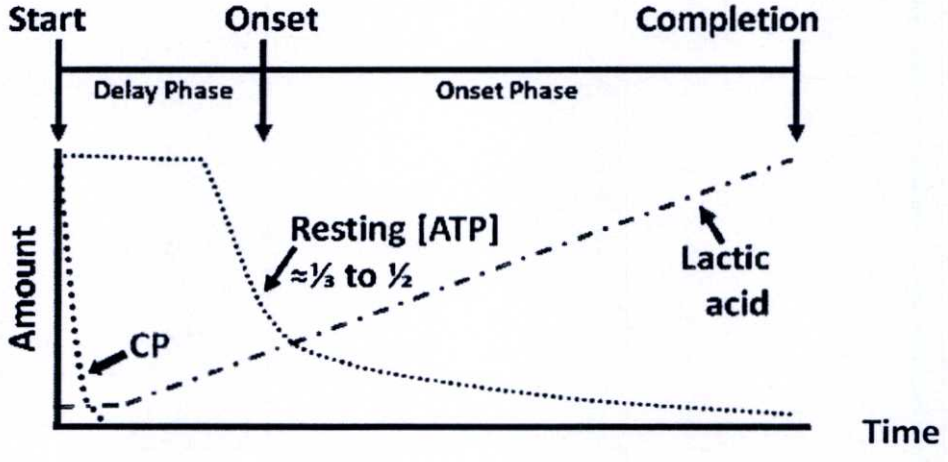
148467

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล (2539) ได้อธิบายขั้นตอนการเกิดกระบวนการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย โดยเริ่มจากแคลเซียมถูกขับออกจากซาร์โคพลาสมิกเรติคิวลัมเข้าสู่ซาร์โคพลาสซึม ในสภาวะปกติจะมีการดูดกลับของแคลเซียมเข้าสู่ซาร์โคพลาสมิกเรติคิวลัม ภายหลังสัตว์ตายเมื่อพลังงานหมดลงแคลเซียมจะไม่ถูกดูดกลับ ทำให้แคลเซียมเข้าไปจับกับ troponin-C กระตุ้นการทำงานของ myosin ATPase ทำให้เกิดการเคลื่อนตัวเข้าหากันของแอคตินและไมโอซิน ประกอบกับขาด Mg-ATP ที่ทำให้เกิดการเคลื่อนตัวออกของแอคตินและไมโอซิน ทำให้เกิดการ cross-linkage ที่เกาะกันแน่น ส่งผลให้ซาร์โคเมียร์สั้นลง ซึ่งปรากฏการณ์ที่เกิดภายหลังสัตว์ตาย (ภาพที่ 2.7) แบ่งออกได้ 3 ขั้นตอน คือ

1. delay phase เป็นระยะที่มีการเคลื่อนที่ของแอคตินและไมโอซินอย่างอิสระ มีการยืดและหดตัวของซาร์โคเมียร์ การดูดเข้าออกของแคลเซียมระหว่างเซลล์ปกติ พลังงานสะสม creatin phosphate และ ATP ยังมีอยู่

2. onset or rapid phase เป็นระยะที่มีความสามารถในการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อลดลงอย่างรวดเร็ว ไม่พบการดูดเข้า-ออกของแคลเซียม พลังงานสะสมในรูปของ creatin phosphate และ ATP หมดไป

3. completion phase เป็นระยะที่ไม่มีการยืดตัวของกล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อเกิดการหดเกร็งตัวอย่างถาวร เป็นระยะเริ่มมีการทำงานของเอนไซม์ในเนื้อ พร้อมๆ กับการเข้าสู่ระยะการเน่าเสียของเนื้อ



ภาพที่ 2.7 การเปลี่ยนแปลงในกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย

ที่มา : http://qpc.adm.slu.se/ 6_Fundamentals_of_WHC/page_16.htm (2015)

Warriss (2000) กล่าวว่า ภายหลังสัตว์ตายเมื่อกล้ามเนื้อขาดพลังงาน กล้ามเนื้อจะเข้าสู่สภาวะการหดเกร็งตัวอย่างถาวร ระบบการทำงานของผนังซาร์โคพลาสมิกเรติคิวลัมสูญเสียไป ทำให้แคลเซียมที่กักเก็บไว้ในซาร์โคพลาสมิกเรติคิวลัมถูกปล่อยออกมาสู่ซาร์โคพลาสซึม ความเข้มข้นของแคลเซียมที่มากขึ้นจะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ calpains ทำให้เกิดกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อขึ้น (proteolysis)

2.8 กลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนภายหลังสัตว์ตาย

การย่อยสลายโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ในกล้ามเนื้อสัตว์ โดยเฉพาะตรงตำแหน่งของ Z-line เชื่อว่าเป็นผลมาจากการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยโปรตีน (proteolytic enzymes) (ตารางที่ 2.2) ประกอบไปด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่ม ที่ทำงานในสภาวะแวดล้อมภายในเนื้อที่แตกต่างกัน ได้แก่ lysosomal proteinases, multicatalytic proteinases complex และ calcium-dependent proteinases (Ouali and Talmant. 1990 ; Ouali. 1992)

1. Lysosomal proteinases หรือ cathepsins ทำงานได้ดีในเนื้อที่มีสภาพเป็นกรด หรือค่า pH < 5.0 สาเหตุที่เรียกชื่อว่า lysosomal enzyme เนื่องมาจากว่าเรียกตามตำแหน่งที่พบ โดยเอนไซม์ตัวนี้จะพบได้ภายในไลโซโซมของเซลล์กล้ามเนื้อ หรือเส้นใยกล้ามเนื้อ เอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วย cathepsins D, B, L และ H (Uytterhaegen *et al.* 1994) เอนไซม์ชนิดนี้ไม่มีความสำคัญต่อการย่อยโปรตีนในกล้ามเนื้อเท่าใดนัก เป็นเพราะหากต้องการให้เอนไซม์นี้สามารถทำงานได้จะต้องทำให้ออกจากไลโซโซมมาสู่ไซโตซอล โดย Koohmaraie. (1994) รายงานว่า แม้จะมีการกระตุ้นซากด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วนำซากนั้นไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาถึง 28 วัน เอนไซม์คาเธปซินก็ยังคงอยู่ภายในไลโซโซมดังเดิม

2. Multicatalytic proteinases complex หรือ proteasome หรือ macropain เป็นเอนไซม์ที่ต้องการพลังงาน (ATP) มาเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำปฏิกิริยา ทำงานได้ดีในเนื้อที่มีค่าความเป็นด่างสูง หรือ pH 7.0 - 9.0 ทำหน้าที่ในการย่อยโปรตีนทุกชนิดที่อยู่ในกลุ่มโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์และโปรตีนซาร์โคพลาสมิก โดยในการย่อยโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์นั้นจะเข้าย่อยสลายเฉพาะ troponin-C จึงไม่มีบทบาทที่สำคัญต่อการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อภายหลังสัตว์ตายมากนัก (Goll *et al.* 1991)

ตารางที่ 2.2 กลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อ

เอนไซม์ย่อยโปรตีนในกล้ามเนื้อ	เอนไซม์ในกลุ่ม	ตำแหน่งที่พบ	ขนาด (กิโลดาลตัน)	pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน	ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงาน
Cathepsins	cathepsin B		30	5.5 – 6.5	
	cathepsin D	lysosomes	45	3.0 – 5.0	pH
	cathepsin L		28	6.5 - 6.8	
	cathepsin H		28	5.5 – 6.5	
Proteasome		sarcoplasm	700	7.0 – 7.5	pH
Calpains	calpain I	sarcoplasm	28, 80	6.5 – 7.5	pH, calcium
	calpain II				calpastatin

ที่มา : ดัดแปลงจาก Ouali 1992 ; Sentandreu *et al.* 2002

3. Calcium-dependent proteinases หรือ calpains เป็นเอนไซม์ที่ต้องการแคลเซียม (calcium) ที่อยู่ในรูปประจุ (Ca^{2+}) มาเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำงาน ซึ่งการฉีดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) เข้าไปในกล้ามเนื้อจะเป็นการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ calpains ให้ดีขึ้น ส่งผลให้เนื้อนั้นมีความนุ่มเพิ่มขึ้น (Koohmaraie. 1994) เอนไซม์นี้ทำงานได้ดีในเนื้อที่มีสภาวะค่า pH ที่ 6.0-7.0 โดยพบว่ามี calpastatin เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ calpains โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเอนไซม์ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ

3.1 calpain I หรือ μ-calpain เป็นเอนไซม์ที่ต้องการความเข้มข้นของแคลเซียมมาเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำงานในระดับ 10 ไมโครโมล

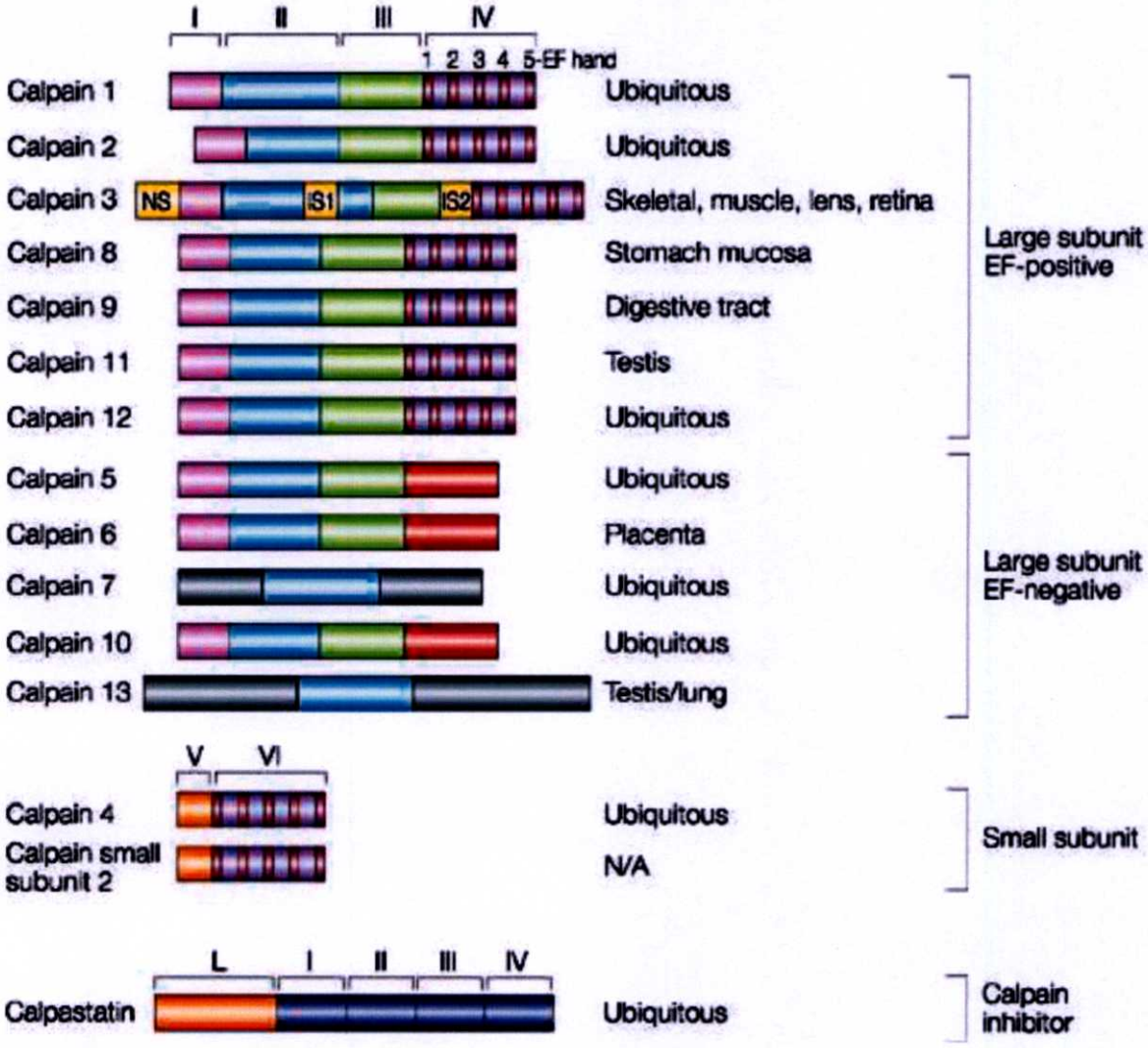
3.2 calpain II หรือ m-calpain เป็นเอนไซม์ที่ต้องการความเข้มข้นของแคลเซียมมาเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำงานในระดับ 200-300 ไมโครโมล (Morgan *et al.* 1993)

โดยเอนไซม์กลุ่มนี้จะมีบทบาทที่สำคัญมากในการย่อยสลายโปรตีนของกล้ามเนื้อภายหลังจากสัตว์ตาย เนื่องจากจะเข้าสลายโปรตีนบริเวณ Z-line (μ-calpain เข้าย่อยสลายโปรตีน ณ บริเวณ Z-line = 66 เปอร์เซ็นต์ บริเวณ I-band = 20 เปอร์เซ็นต์ และบริเวณ A-band = 14 เปอร์เซ็นต์) (Koohmaraie. 1994)

2.9 ความสำคัญของเอนไซม์คาลเปน (calpains)

Neath *et al.* (2007) กล่าวว่า กระบวนการทำให้เนื้อนุ่มภายหลังสัตว์ตาย เกิดจากการย่อยสลายโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ โดยเอนไซม์ calpains ส่งผลทำให้โครงสร้างกล้ามเนื้อถูกย่อยและทำให้เนื้อนุ่มเพิ่มขึ้น Frame *et al.* (2002) รายงานว่า เอนไซม์ calpains มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 30 และ 80 กิโลดาลตัน ซึ่งหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของเอนไซม์ทั้ง 2 เป็นส่วนของหน่วยเร่งปฏิกิริยา (catalytic unit) โดยทั่วไปสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 4 domains ประกอบด้วย domain I เป็น short pro-domain region จากปลาย NH_2-terminal, domain II (cysteine protease) เป็นตำแหน่งกระตุ้น, domain III (calmodulin-like calcium bind sites) เป็นส่วนที่ไม่เหมือนกับส่วนอื่นๆ อีกทั้งยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน และ domain IV (calcium binding) เป็นส่วนที่จับกับแคลเซียมและในเอนไซม์ calpain 4 ยังพบอีก 2 domain ซึ่งเป็นหน่วยควบคุม (regulatory unit) จากปลาย NH_2-terminal ประกอบด้วย domain V (membrane interaction) และ domain VI (calmodulinlike calcium bind sites) ในส่วน domain IV และ domain VI จะมีโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่า EF hand อยู่ 5 ตำแหน่งสำหรับใช้จับกับแคลเซียมในการกระตุ้นการทำงานของ calpains (ภาพที่ 2.8)

Goll *et al.* (2003) กล่าวว่า เอนไซม์ calpains จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนชนิดซีสเตอีนที่พบตามเนื้อเยื่อต่างๆ (ubiquitous) ได้แก่ calpain 1 (μ-calpain), calpain 2 (m-calpain), calpain 5, calpain 7, calpain 10, calpain 12, calpain 14 และ calpain 15 และยังมีชนิดที่พบได้ในบางเนื้อเยื่อเท่านั้น (skeleton muscle specific calpain) คือ calpain 3 (p94) ที่พบในกล้ามเนื้อลาย โดยเอนไซม์กลุ่ม calpains ที่มีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อ คือ μ-calpain และ m-calpain จะทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลาง (pH 7.5) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่มีแคลเซียมมากระตุ้น การทำงานของเอนไซม์ calpains ในการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ โดยจะทำการย่อยบริเวณ Z-line ได้แก่ titin, desmin, troponin-T และ troponin-I เป็นต้น (Koohmaraie and Geesink. 2006 ; Kemp *et al.* 2010) ซึ่งผลผลิตจากการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์ calpains ดังแสดงในตารางที่ 2.3



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของเอนไซม์คาลเปน

ที่มา : Margaret *et al.* (2002)

ตารางที่ 2.3 ผลผลิตจากการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์คาลเปน

โปรตีน	ผลจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์คาลเปน
C-protein	ย่อยสลาย polypeptide ที่มีขนาด 140 กิโลดาลตัน ให้เหลือขนาดประมาณ 120 กิโลดาลตัน
desmin	เกิดการย่อยสลายอย่างรวดเร็ว ทำให้เหลือขนาดประมาณ 32 - 37 กิโลดาลตัน และปรากฏ polypeptide ขนาด 18 กิโลดาลตัน
myosin	มีอัตราการย่อยสลายช้ามากจาก polypeptide ขนาด 210 กิโลดาลตัน ไปเป็น 150, 165 และ 180 กิโลดาลตัน
nebulin	มีอัตราการย่อยสลายอย่างรวดเร็ว กลายเป็นชุดของ polypeptide ขนาดสั้น ๆ มีขนาดตั้งแต่ 30 กิโลดาลตัน ไปจนถึงขนาดหลายร้อยกิโลดาลตัน โดย polypeptide ที่ถูกย่อยนั้นยังจับอยู่กับ actin และยังอยู่บริเวณ (Z-disk)
synemin	มีอัตราการย่อยสลายอย่างรวดเร็ว โดยกลายเป็น polypeptide จำนวนมาก ที่พบส่วนใหญ่มีขนาดประมาณ 40, 45, 50, 66 และ 200 กิโลดาลตัน ซึ่งขนาด 40 กิโลดาลตัน (มีความเสถียร)
titin	โปรตีน titin มีขนาดประมาณ 3,000 กิโลดาลตัน ถูกย่อยเหลือ polypeptide ขนาดใหญ่ประมาณ 2,000 กิโลดาลตัน และ 1,200 กิโลดาลตัน หลังจากนั้น 1,200 กิโลดาลตัน จะถูกย่อยเหลือประมาณ 100 - 500 กิโลดาลตัน โดยขนาด 500 กิโลดาลตัน มีความเสถียร
tropomyosin	ถูกย่อยกลายเป็น polypeptide ขนาด 14 กิโลดาลตัน และ polypeptide ขนาดเล็ก ๆ
troponin-I	ถูกย่อยกลายเป็น polypeptide ขนาดเล็กมาก เช่น ในกล้ามเนื้อหัวใจ troponin-I ขนาด 32 กิโลดาลตัน ถูกย่อยเหลือ 26 กิโลดาลตัน
troponin-T	ถูกย่อยอย่างรวดเร็ว จาก polypeptide ขนาด 37 กิโลดาลตัน กลายเป็น polypeptide ขนาดประมาณ 35 , 30 และ 28 กิโลดาลตัน โดย polypeptide ขนาด 30 กิโลดาลตัน นั้นมีความเสถียร
tubulin	มีอัตราการย่อยสลายช้ามากจาก polypeptide ขนาด 55 กิโลดาลตัน เป็น 50 - 52 กิโลดาลตัน
vinculin	มีการย่อยสลายอย่างรวดเร็วกลายเป็น polypeptide ขนาด 90 กิโลดาลตัน

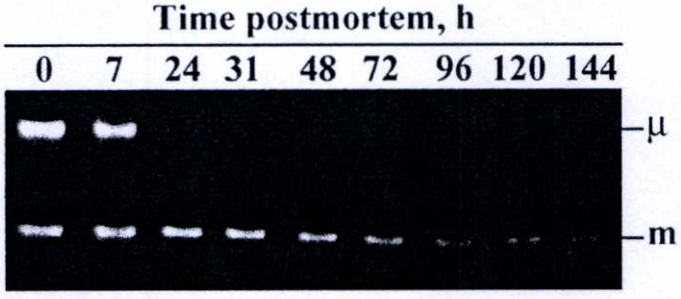
ที่มา : ดัดแปลงจาก Goll *et al.* (2003)

Ouali and Talmant. (1990) กล่าวว่า ในสัตว์แต่ละสายพันธุ์มีการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม calpains ที่แตกต่างกันด้วย ซึ่งความแตกต่างของอัตราการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อและความนุ่มของเนื้อในสัตว์แต่ละชนิดอธิบายได้จากกิจกรรมของ calpastatin ที่แตกต่างกัน โดยในโคยุโรป (*Bos taurus*) และโคอินเดีย (*Bos indicus*) มีอัตราการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อและการทำงานของ calpastatin ต่างกัน จึงส่งผลให้มีความนุ่มต่างกันด้วย ในโคอินเดียมีปริมาณ และการทำงานของ calpastatin สูงกว่าในโคยุโรป ส่งผลให้การย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อลดลง เนื้อจึงมีความนุ่มน้อยกว่าในโคยุโรป (O'conner *et al.* 1997)

Pomponio and Ertbjerg (2012) กล่าวว่า μ-calpain และ m-calpain เป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายของโปรตีนระหว่างการบ่มเนื้อ จะทำงานโดยอาศัยแคลเซียมเป็นตัวกระตุ้น ความเข้มข้นของแคลเซียมอิสระจะเพิ่มขึ้นจากความเข้มข้น 106 ไมโครโมล ในวันที่ 1 เป็น 189 ไมโครโมล ในวันที่ 7 ภายหลังสัตว์ตาย (กล้ามเนื้อสันนอกแกะ) ส่วนในกระต่าย สุกร โค และไก่ จะพบแคลเซียมอิสระประมาณ 220 ไมโครโมล และความเข้มข้นแตกต่างกันตามชนิดกล้ามเนื้อ นอกจากความเข้มข้นของแคลเซียมแล้วยังมีปัจจัยอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ และค่า pH ที่มีผลต่อการทำงานของระบบเอนไซม์ calpains โดย m-calpain จะมีการทำงานอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ค่า pH 7.5 ในขณะที่ μ-calpain จะทำงานได้ดีที่ค่า pH 6.5 ซึ่งจากการศึกษา พบว่า กล้ามเนื้อที่มีอุณหภูมิสูงภายหลังจากสัตว์ตายจะส่งผลต่อการย่อยสลายโปรตีนและการทำงานของเอนไซม์ calpains ภายหลังสัตว์ตาย โดยอุณหภูมิภายในกล้ามเนื้อที่สูงขึ้นนั้นเกิดจากการสลายพลังงานในกล้ามเนื้อ ทำให้ค่า pH ลดลง และกระตุ้นให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ calpains ในการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อมากขึ้น ส่งผลให้เนื้อมีความนุ่มมากขึ้น จากการศึกษาโดยวิธี Western blot ในกล้ามเนื้อที่บ่มที่อุณหภูมิสูงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีการทำงานของ μ-calpain เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 25 - 35 องศาเซลเซียสในเนื้อแกะ และที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ในเนื้อโค ซึ่งการบ่มที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส ระหว่างเกิดกระบวนการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ จะช่วยลดการทำงานของ calpastatin ซึ่งการย่อยสลายโปรตีนจะเกิดอย่างรวดเร็วในช่วงแรกภายหลังสัตว์ตาย และจะลดลงตามระยะเวลาการบ่มที่นานขึ้น

Pomponio and Ertbjerg (2012) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ calpains พบว่า กล้ามเนื้อที่บ่มในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการทำงานของเอนไซม์ μ-calpain สูง และมีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนประมาณ 24 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย แต่อุณหภูมิที่สูงนี้จะทำให้เกิดการย่อยสลาย (autolysis) ของเอนไซม์ μ-calpain อย่างรวดเร็วเช่นกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกล้ามเนื้อที่ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียสทันทีภายหลังสัตว์ตาย พบว่า การทำงานของเอนไซม์

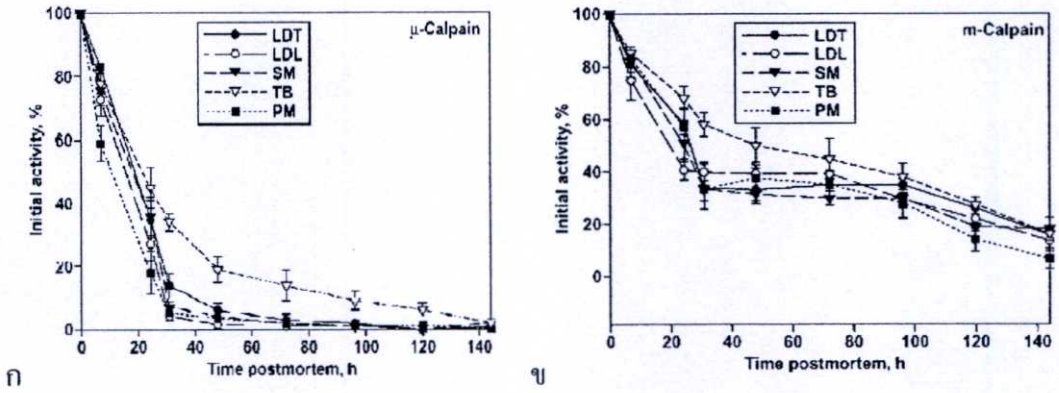
μ-calpain เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย ทำให้มีการสลายโปรตีนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แม้ว่าจะมีการทำงานยาวนานถึง 120 ชั่วโมงก็ตาม การบ่มเนื้อในอุณหภูมิที่สูงจะส่งผลให้เกิดการสลายพลังงานโดยไม่ใช้ออกซิเจน ทำให้ค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็ว และมีการดูดกลับของแคลเซียมอิสระเข้าสู่เซลล์ได้น้อย (lower sarcoplasmic ion pump) ทำให้มีแคลเซียมอิสระเข้มข้นสูง และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้มากขึ้น



ภาพที่ 2.9 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ μ-calpain และ m-calpain ภายหลังสัตว์ตาย ในกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi, lumbar* (LDL) ระหว่าง 144 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ที่มา : Camou *et al.* (2007)

Camou *et al.* (2007) ทำการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ μ-calpain และ m-calpain ในกล้ามเนื้อโค 5 ชนิด ภายหลังสัตว์ตาย โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายใต้เงื่อนไขที่ต่างกัน เพื่อตรวจสอบอิทธิพลของระยะเวลาการบ่ม ค่า pH และอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ μ-calpain และ m-calpain ในกล้ามเนื้อโครงร่างของโค พบว่า การทำงานของ μ-calpain มีการย่อยสลายโปรตีนในชั่วโมงที่ 0 - 24 ภายหลังสัตว์ตาย โดยมีค่าการทำงานลดลงเรื่อยๆ และเกือบจะเป็น 0 ภายใน 48 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย ส่วนการทำงานของ m-calpain มีค่าลดลงอย่างช้าๆ ประมาณ 10 – 20 เปอร์เซ็นต์ของค่ากิจกรรมเริ่มต้น ภายหลังสัตว์ตาย และพบว่าค่าการทำงานของ m-calpain ยังคงเหลืออยู่หลังจากผ่านไป 144 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย (ภาพที่ 2.9)



ก ข

ภาพที่ 2.10 การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ (ก) μ-calpain และ (ข) m-calpain ในกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi thoracic* (LDT), *Longissimus dorsi lumbar* (LDL), *Semimembranosus* (SM), *Triceps brachii* (TB) และ *Psoas major* (PM) ระหว่าง 144 ชั่วโมง ภายหลังสัตว์ตาย อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ที่มา : Camou *et al.* (2007)

การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ทั้ง μ-calpain และ m-calpain จะมีลักษณะคล้ายกันมากในกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi thoracic* (LDT), *Longissimus dorsi lumbar* (LDL), *Semimembranosus* (SM) และ *Psoas major* (PM) แต่การเปลี่ยนแปลงในกล้ามเนื้อ *Triceps brachii* (TB) จะลดลงช้ากว่ากล้ามเนื้ออื่น แต่ไม่แตกต่างกันมากนัก อาจเนื่องมาจากความแตกต่างกันของชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 2.10ก และ ภาพที่ 2.10ข)

2.10 ความสำคัญของโปรตีนคาลปาสตาตินต่อความนุ่มของเนื้อ

Koohmaraie and Geesink (2006) กล่าวว่า calpastatin เป็นตัวยับยั้งที่จำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ μ-calpain และ m-calpain ที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เนื้อนุ่มภายหลังสัตว์ตาย ซึ่งโปรตีนนี้มีหลาย isoform แต่ isoform ที่พบในกล้ามเนื้อโครงร่างจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ calpains โดย calpastatin จะจับกับแคลเซียมและขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ calpains

Pomponio and Ertbjerg (2012) กล่าวว่า calpastatin เป็นโปรตีนที่มีความคงตัวทนความร้อนได้ถึง 100 องศาเซลเซียส การทำงานของ calpastatin จะลดลงตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้น ($P<0.001$) และอุณหภูมิที่บ่ม ($P<0.02$) ซึ่งภายหลังจากที่บ่มเป็นระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส การทำงานของ calpastatin จะลงลดถึง 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 2 ภายหลัง

สัตว์ตาย ($P<0.01$) และการบ่มเป็นระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การทำงานของ calpastatin ลดลงถึง 33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 2 ภายหลังสัตว์ตาย ($P<0.001$)

พัชรา เอื้อพัฒนพงศ์ (2553) ทำการศึกษาคุณภาพเนื้อและปริมาณของโปรตีน calpastatin ระหว่างการบ่มในเนื้อโคไทย พบว่าอิทธิพลของระยะเวลาการบ่มมีผลต่อปริมาณโปรตีน calpastatin โดยที่ระยะเวลาการบ่ม 0 วัน มีปริมาณโปรตีน calpastatin สูงกว่าเนื้อโคที่ระยะเวลาการบ่ม 7, 14 และ 21 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 2.56 ± 0.07, 2.10 ± 0.07, 1.85 ± 0.07 และ 1.68 ± 0.07 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อระยะเวลาในการบ่มเนื้อนานขึ้น ปริมาณโปรตีน calpastatin จะลดลง แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างเนื้อที่บ่มนาน 14 และ 21 วัน (ตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มต่อคุณภาพเนื้อและปริมาณโปรตีนคาลปาสตาติน

ลักษณะที่ศึกษา	ระยะเวลาการบ่ม				P-value
	0 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	
WBSF (kg)	9.21 ± 0.23^{x}	7.89 ± 0.23^{y}	6.64 ± 0.23^{z}	5.91 ± 0.23^{z}	<0.001
calpastatin (μg/μl)	2.56 ± 0.07^{x}	2.10 ± 0.07^{y}	1.85 ± 0.07^{z}	1.68 ± 0.07^{z}	<0.001

$^{x-z}$ อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนภายใต้อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ที่มา : ดัดแปลงจาก พัชรา เอื้อพัฒนพงศ์ (2553)

2.11 ความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์คาลเปนและโปรตีนคาลปาสตาตินต่อความนุ่มของเนื้อ

ปริมาณเอนไซม์ที่ทำการย่อยสลายโปรตีนภายหลังสัตว์ตาย เช่น เอนไซม์ calpains และโปรตีนที่ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ calpains คือ calpastatin ในสัตว์แต่ละสายพันธุ์ก็มีปริมาณเอนไซม์ และโปรตีนในสัดส่วนที่แตกต่างกัน ทำให้เนื้อมีความนุ่มแตกต่างกัน ซึ่ง Pringle *et al.* (1997) กล่าวว่า สัดส่วนของ calpastatin : μ-calpain จะสูงขึ้นเมื่อระดับเลือดของพันธุ์บราห์มันเพิ่มขึ้น หรืออาจกล่าวได้ว่าการที่มีการทำงานของ calpastatin เพิ่มขึ้นภายหลังสัตว์ตาย จะมีผลทำให้เอนไซม์ calpains ทำงานได้น้อยลงและจะส่งผลให้ความนุ่มของเนื้อสัตว์ลดลงด้วย ทั้งนี้ O'conner *et al.* (1997) ได้ทำการศึกษาในโคที่มีระดับเลือด 3/8 *Bos indicus* และโคสายพันธุ์ *Bos taurus* พบว่ามีปริมาณ calpastatin ที่ระยะ 24 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย ในโคลูกผสมที่มีระดับเลือด 3/8 *Bos indicus*

มากกว่าโคสายพันธุ์ *Bos taurus* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (4.43 และ 3.96 ไมโครกรัม ตามลำดับ) แต่เมื่อเปรียบเทียบโคลูกผสมที่มีระดับเลือด 3/8 *Bos indicus* ในแต่ละสายพันธุ์พบว่าปริมาณ calpastatin ที่ระยะ 24 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย ของโคพันธุ์บราฟอร์ดสูงกว่าโคพันธุ์ซิมบราห์ ($P<0.05$)

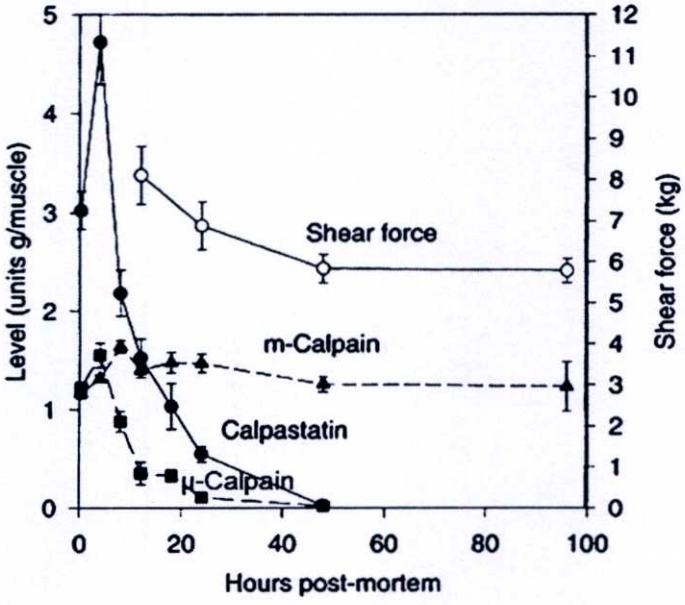
Fiedler *et al.* (1999) รายงานว่ากล้ามเนื้อที่มีปริมาณของ red fiber ในสัดส่วนที่สูงกว่า white fiber เนื้อนั้นจะมีความเหนียวมากกว่า โคที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber เป็นองค์ประกอบของมัดกล้ามเนื้ออยู่สูง เช่น โคสายเลือดอินเดีย (*Bos indicus*) เนื้อจากโคประเภทนี้จะมีความเหนียวมาก เนื่องจากเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber มีเอนไซม์ calpains ในปริมาณที่สูง และในขณะเดียวกันปริมาณ calpastatin ซึ่งทำหน้าที่ขัดขวางการทำงานของ calpains จะมีอยู่สูงเช่นกัน เป็นผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ calpains และกระบวนการย่อยสลายโปรตีนเกิดได้น้อย ดังนั้นกล้ามเนื้อที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber จึงมีความเหนียวมากกว่า กล้ามเนื้อที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด white fiber เป็นองค์ประกอบ

Kemp *et al.* (2010) กล่าวว่า เอนไซม์ calpains ทำให้เนื้อมีความนุ่มแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด (specie) โดยในเนื้อโคน้อยกว่าเนื้อแกะ และเนื้อแกะน้อยกว่าเนื้อหมู ซึ่งแปรผกผันกับอัตราส่วนของ calpastatin : calpains ในเนื้อโคมากกว่าเนื้อแกะ และเนื้อแกะมากกว่าเนื้อหมู นอกจากนี้ยังเกิดจากการใช้สารเบต้าอะโกรนิส จะทำให้การย่อยสลายโปรตีนของกล้ามเนื้อลดลง เนื่องจากมีปริมาณของ calpastatin เพิ่มขึ้นและไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ calpains ทำให้เนื้อมีความนุ่มลดลง

Klont *et al.* (1998) ได้ศึกษาเรื่องความสัมพันธ์ของชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อ พบว่าเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด white fiber จะมีอัตราการเกิดความนุ่มของเนื้อเร็วกว่าเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากใน white fiber มีเมตาบอลิซึมแบบไม่ใช้ออกซิเจน มีอัตราการสลายไกลโคเจนสูง ค่า pH ลดต่ำเร็ว ทำให้เข้าสู่สภาวะเกร็งตัวอย่างถาวรของกล้ามเนื้อ (rigor mortis) ได้เร็วกว่าปกติ เป็นผลทำให้ผนังของซาร์โคพลาสมิกเรติคิวลัมไม่สามารถเก็บแคลเซียมไว้ได้ ทำให้แคลเซียมถูกปล่อยออกมามาก และไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ calpains ส่งผลให้เกิดกระบวนการการย่อยสลายโปรตีนขึ้น ดังนั้นกล้ามเนื้อที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด white fiber อยู่มาก จึงเกิดความนุ่มได้เร็วกว่า

ค่า pH ของกล้ามเนื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความนุ่มของเนื้อ ซึ่งค่า pH ของเนื้อทำให้การทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความนุ่มของเนื้อทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยปกติทั่วไป m-calpain จะทำงานได้ดีในค่า pH สุดท้ายที่สูง ประมาณ 7.0 - 8.0 จึงพบว่าเนื้อที่มีค่า pH สูง (DFD) จะไปกระตุ้นให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความนุ่มทำงานได้ดี และยังพบว่ามี

ความสัมพันธ์กับการสลายตัวของ nebulin ส่วน μ-calpain จะทำงานได้ดีที่ช่วงของค่า pH ที่กว้างกว่า m-calpain



ภาพที่ 2.11 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์คาลเปน โปรตีนคาลปาสตาติน และค่าแรงตัดผ่านเนื้อในกล้ามเนื้อสันนอก (LD ; *Longissimus dorsi*) ของโค Angus

ที่มา : Morton *et al.* (1999)

Morton *et al.* (1999) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ μ-calpain, m-calpain, โปรตีน calpastatin และค่าแรงตัดผ่านเนื้อในกล้ามเนื้อสันนอก พบว่า การทำงานของเอนไซม์ μ-calpain และโปรตีน calpastatin ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง ภายหลังสัตว์ตาย ส่วนค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่ลดลงมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ μ-calpain ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อ ในขณะที่การทำงานของเอนไซม์ m-calpain นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 2.11)

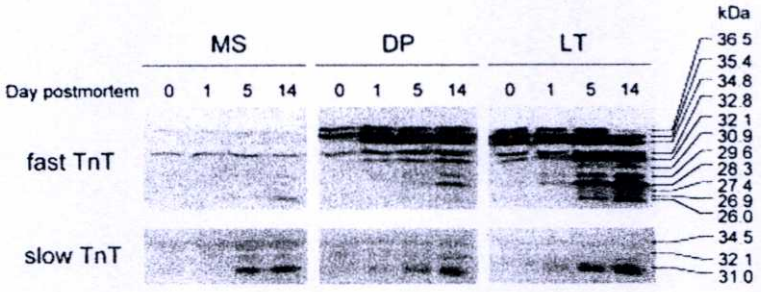
2.12 การย่อยสลายโปรตีน troponin-T ต่อความนุ่มของเนื้อ

โปรตีน troponin-T (TnT) เป็นหนึ่งในโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ของกล้ามเนื้อ จะสลายตัวในระหว่างที่บ่มภายหลังสัตว์ตาย การย่อยสลายของโปรตีน troponin-T มีความสัมพันธ์สูงกับความนุ่มของเนื้อ ($r = 0.78$) แม้ว่าการย่อยสลายของโปรตีน troponin-T จะมีความสำคัญในหลายด้าน แต่การย่อยสลายของโปรตีน troponin-T ต่อคุณภาพเนื้อยังไม่แน่ชัด ในสายพันธุ์สัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูก

ด้วยนม พบความหลากหลายของโปรตีน troponin-T โดยการเลือก splicing messenger RNA จากยีน fast และ slow troponin-T เช่นเดียวกับกล้ามเนื้อโค ซึ่งมี fast-type troponin-T อย่างน้อย 8 ชนิด ได้แก่ fTnT1/16, fTnT1/17, fTnT2/16, fTnT2/17, fTnT3/16, fTnT3/17, fTnT4/16 และ fTnT4/17 และมี slow-type TnT 2 ชนิด ได้แก่ sTnT1 และ sTnT2 ทำให้เกิดความแตกต่างกันในการย่อยสลายของโปรตีน troponin-T (Muroya *et al.* 2006)

Ho *et al.* (1997) รายงานว่า ผลจากการย่อยสลายโปรตีนในกลุ่มไมโอไฟบริลลาร์ ส่วนใหญ่มักจะพบ polypeptide ขนาด 30 กิโลดาลตัน สามารถพบได้ในกล้ามเนื้อทุกชนิดภายหลังสัตว์ตาย ในขณะเดียวกันพบว่าโปรตีน troponin-T จะมีปริมาณลดลง และมีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน

ความแตกต่างของการย่อยสลายโปรตีน troponin-T แต่ละ isoform ในกล้ามเนื้อ *Masseter* (MS) , *Diaphragm* (DP) และ *Longissimus* (LT) ของโคสายพันธุ์ Japanese Black ที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 1, 5 และ 14 วัน ภายหลังสัตว์ตาย ด้วยเทคนิค Western blot (ภาพที่ 2.12) พบว่า ในกล้ามเนื้อ MS ไม่มีการย่อยสลายของโปรตีน fast-type TnT จนกระทั่งผ่านระยะเวลาการบ่ม 14 วัน จะพบ polypeptide ที่มีขนาด 29.6, 28.3, 26.9 และ 26.0 กิโลดาลตัน ปรากฏขึ้น โดยใช้แอนติบอดี้ชนิด anti-fast troponin-T ในการจับ ส่วนกล้ามเนื้อ DP ตรวจพบการย่อยสลายโปรตีน fast-type troponin-T ในวันที่ 1 ภายหลังสัตว์ตาย พบ polypeptide ที่มีขนาด 32.1 กิโลดาลตัน และพบมากขึ้นที่ระยะเวลาบ่ม 5 วัน และ 14 วัน (29.6 และ 28.3 กิโลดาลตัน ตามลำดับ) และในกล้ามเนื้อ LT พบการย่อยสลายโปรตีน fast-type troponin-T ภายหลังสัตว์ตาย ที่ระยะเวลาบ่ม 1 วัน พบ polypeptide ขนาด 32.1, 29.6 และ 28.3 กิโลดาลตัน และเพิ่มมากขึ้นขณะที่ทำการบ่ม โดยในวันที่ 14 ภายหลังการบ่ม พบ polypeptide ขนาด 30.9, 27.4, 26.9 และ 26.0 กิโลดาลตัน เพิ่มขึ้น แต่มีปริมาณ polypeptide ขนาด 36.5, 35.4 และ 32.8 กิโลดาลตัน ลดลง ส่วนการย่อยสลายของโปรตีน slow-type troponin-T ในกล้ามเนื้อ MS ซึ่งเริ่มมีการสลายตัว และพบ polypeptide ขนาด 31.0 กิโลดาลตัน ที่ระยะเวลาการบ่ม 5 วัน ภายหลังสัตว์ตาย ส่วนกล้ามเนื้อ DP และ LT พบว่า เริ่มมีการสลายตัวที่ระยะเวลาการบ่ม 1 วัน ภายหลังสัตว์ตาย โดยพบ polypeptide ขนาด 31.0 กิโลดาลตัน ปรากฏขึ้น (Muroya *et al.* 2006)



ภาพที่ 2.12 การย่อยสลายของโปรตีน troponin-T ของกล้ามเนื้อ *Masseter* (MS), *Diaphragm* (DP) และ *Longissimus* (LT) ที่ระยะเวลาบ่ม 0, 1, 5 และ 14 วัน

ที่มา : Muroya *et al.* (2006)

2.13 คอลลาเจนในกล้ามเนื้อ

คอลลาเจน คือโปรตีนโครงสร้างที่สำคัญของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เป็นส่วนประกอบของเส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) และเส้นใยเรติคิวลาร์ (reticular fiber) ทำหน้าที่แตกต่างจากโปรตีนโดยทั่วๆ ไป

คอลลาเจนแบ่งได้ 2 ชนิด ตามการละลายเมื่อได้รับความร้อน ซึ่งคอลลาเจนที่สามารถละลายได้เมื่อได้รับความร้อน เรียกว่า soluble collagen และคอลลาเจนที่ไม่ละลายเมื่อได้รับความร้อน เรียกว่า insoluble collagen ความแข็งแรงและคุณสมบัติที่ไม่ละลายของเส้นใยคอลลาเจนเป็นผลมาจาก intermolecular cross linkage ซึ่งชนิดของการเกิด cross links ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน แบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ heat-soluble bond และ heat-insoluble bond (Kerry and Ledward. 2002) โดยโพลีเปปไทด์ของคอลลาเจนจะขดเป็นเกลียวเกือบทั้งสาย ยกเว้นส่วนปลาย ซึ่งส่วนปลายด้านหนึ่งจะประกอบด้วยกรดอะมิโน (NH_2) และอีกด้านหนึ่งจะประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิล (COOH) โครงสร้างคอลลาเจนประกอบด้วยกรดอะมิโนไกลซีน (glycine) โพรลีน (proline) และไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) สูง โมเลกุลคอลลาเจนจะเชื่อมต่อกันทั้งจากปลายและด้านข้าง เกิดเป็นเส้นใยคอลลาเจน เรียกว่า collagen fiber จะมีลักษณะเป็นสายเกลียวที่มีหน่วยโมเลกุลเกี่ยวพันกันมากมาย ทำให้คอลลาเจน เป็นโปรตีนที่แข็งแรงและเหนียวมาก ดังนั้นถ้าอยู่ในโครงสร้างใด โครงสร้างนั้นจะมีความแข็งแรงมาก เช่น เนื้อสัตว์ แต่ถ้านำไปต้มคอลลาเจนจะเปลี่ยนเป็นเจลาติน (gelatin) ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ โดย soluble collagen เป็นโปรตีนที่มีการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลของคอลลาเจนยังไม่แข็งแรงมากนัก จึงสามารถแตกตัวและละลายได้เมื่อได้รับความร้อน ในทางตรงข้าม insoluble collagen จะมีการเชื่อมโยง (cross linkage) ระหว่างโมเลกุลของคอลลาเจนที่แข็งแรงและมี

จำนวน cross links ต่อโมล ของคอลลาเจนสูงมาก ทำให้เมื่อได้รับความร้อนแล้วยังคงมีปริมาณ insoluble collagen เหลืออยู่ภายในเนื้อเยื่อ ซึ่งภายในกล้ามเนื้อนั้นจะมีทั้ง soluble และ insoluble collagen ดังนั้นถ้ามีสัดส่วนของ insoluble collagen อยู่ปริมาณสูงก็จะทำให้เนื้อนั้นมีความเหนียวมากขึ้น (Nishimura *et al.* 1999)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณคอลลาเจน นิยมวิเคราะห์หาจากปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีน เนื่องจากเป็นส่วนประกอบที่ค่อนข้างคงที่ของคอลลาเจน โดยมีอยู่ประมาณ 13 – 14 เปอร์เซ็นต์ โดยพบเส้นใยคอลลาเจนในอวัยวะและเนื้อเยื่อที่สำคัญรวมทั้งกล้ามเนื้อ ปริมาณของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดนี้ขึ้นอยู่กับกิจกรรมของตัวสัตว์ พบมากในกล้ามเนื้อที่ออกกำลังสูง เช่น ขา และไหล่ ซึ่งทำให้กล้ามเนื้อส่วนนี้มีความเหนียวมากกว่ากล้ามเนื้อสันนอกและสันใน (Torrescano *et al.* 2003)

Kerry and Ledward (2002) รายงานว่า เปอร์เซ็นต์ของ insoluble bond จะเพิ่มขึ้นตามอายุของสัตว์ เนื้อจึงมีความเหนียวเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของ heat-insoluble collagen bond ดังนั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจึงเกี่ยวข้องกับความเหนียวของเนื้อ สายพันธุ์ที่โตเต็มวัยเร็ว (early maturity) จะมีสัดส่วนของ insoluble collagen สูง ทำให้เนื้อมีความเหนียวมากกว่า ในขณะที่สายพันธุ์ที่โตช้า (late maturity) จะมีการสะสมโปรตีนในกล้ามเนื้อช้า แต่ภายหลังระยะโตเต็มวัยจะมีการสะสมไขมันอย่างรวดเร็ว ทำให้ cross-link ระหว่างโมเลกุลของคอลลาเจนไม่แข็งแรง และละลายเมื่อได้รับความร้อน ส่งผลให้มีสัดส่วนของ soluble collagen สูงกว่าและมีเนื้อนุ่มกว่าสายพันธุ์ที่โตเต็มวัยเร็ว

Christensen *et al.* (2011) ศึกษาถึงอิทธิพลของสายพันธุ์ต่อปริมาณคอลลาเจน ทั้ง total collagen, insoluble collagen และ soluble collagen ซึ่งในโค Jursey, Holstein และ Danish Red Cattle เป็นสายพันธุ์โคนม มีขนาดเล็ก พบว่า มีระดับไขมันปานกลางถึงสูง มี insoluble และ total collagen สูงกว่า ในโคสายพันธุ์ Limousin, South Devon, Charolais และ Aberdeen Angus เป็นสายพันธุ์โคที่มีลักษณะพิเศษคือมีกล้ามเนื้อสูง พบว่า มีระดับไขมันปานกลาง มี insoluble และ total collagen ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับโคนม (ตารางที่ 2.5)

ตารางที่ 2.5 ปริมาณคอลลาเจน total collagen, insoluble collagen และ soluble collagen (%) ใน โคยุโรป

Breed	Total collagen (mg/g wet tissue)	Insoluble collagen (mg/g wet tissue)	Soluble collagen (%)	Total lipid (mg/g wet tissue)
Jursey	4.07±0.09^{a}	2.96±0.06^{a}	27.3±0.58^{a}	37.8±2.08^{b}
Holstein	3.86±0.09^{ab}	3.02±0.06^{a}	21.7±0.59^{g}	57.2±2.15^{a}
Danish Red Cattle	3.83±0.09^{bc}	2.98±0.06^{a}	22.0±0.60^{fg}	61.8±2.15^{a}
Aberdeen Angus	3.76±0.09^{bcd}	2.74±0.06^{b}	26.7±0.59^{ab}	39.6±2.11^{b}
Charolais	3.68±0.09^{bcd}	2.78±0.06^{b}	24.2±0.58^{de}	23.4±2.08^{ef}
Simmental	3.35±0.11^{ef}	2.49±0.08^{c}	25.2±0.72^{bcde}	22.1±2.58^{efg}
South Devon	3.12±0.09^{fg}	2.31±0.07^{c}	26.0±0.61^{abc}	22.8±2.22^{ef}
Limousin	2.87±0.09^{h}	2.15±0.06^{d}	24.8±0.58^{cde}	16.0±2.08^{gh}

^{a,b,c,d,e,f,g,h} ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Christensen *et al.* (2011)

Nishimura *et al.* (1999) รายงานว่า การเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจนและเส้นใยคอลลาเจน ในระหว่างการเจริญเติบโตจะส่งผลให้เนื้อมีความเหนียว ขึ้นอยู่กับปริมาณ total collagen หรือ ลักษณะการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลคอลลาเจน (intermolecular cross-linkage) โดยปริมาณของคอลลาเจน และจำนวน cross-links ระหว่างโมเลกุลคอลลาเจน ในสัตว์ที่โตเต็มที่จะมีปริมาณเพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้เนื้อเหนียว โดยกลไกความคงตัวของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันภายในมัดกล้ามเนื้อ ไม่เพียงขึ้นอยู่กับ intermolecular cross-linkage ของคอลลาเจนเท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับขนาดและการเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจนด้วย การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันภายในมัดกล้ามเนื้อ อาจส่งผลให้เนื้อมีความเหนียวมากขึ้น โดยการจัดเรียงของเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันภายในมัดกล้ามเนื้อ (intramuscular connective tissue) จะมีอิทธิพลมากเนื่องจากจะมีความซับซ้อนมากขึ้นในระหว่างที่มีการพัฒนาของกล้ามเนื้อโค

Lepetit. (2007) กล่าวว่า ความสัมพันธ์ระหว่างความนุ่มของเนื้อ และ soluble collagen มีค่อนข้างต่ำ เนื่องจากในกล้ามเนื้อมีสัดส่วนของ insoluble collagen สูง สามารถทนร้อนได้มาก และ cross-links ระหว่างโมเลกุลมีความแข็งแรง ทำให้การละลายเมื่อได้รับความร้อนน้อยลง ทำให้เนื้อค่อนข้างเหนียว

สัญชัย จตุรสิทธา (2550) กล่าวว่า สัตว์ที่มีอายุมากขึ้นเนื้อจะมีความเหนียวเพิ่มขึ้นเนื่องจากปริมาณ intramolecular และ intermolecular cross-linkage เพิ่มขึ้นและมีความแข็งแรงมากขึ้น จึงทำให้เนื้อมีความเหนียวกว่าสัตว์ที่มีอายุน้อย โดยสัตว์มีอายุมากขึ้นนั้น ถึงแม้ว่าปริมาณของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ปริมาณของ intermolecular cross-links ภายในเส้นใยย่อยของคอลลาเจนมีเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการขุนโคจึงต้องขุนโคให้ได้ขนาดพร้อมส่งโรงฆ่าสัตว์ โดยจะต้องมีอายุไม่เกิน 3 ปี เพราะสัตว์ที่มีอายุน้อย ปริมาณของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีปริมาณเท่าเดิม แต่เส้นใยกล้ามเนื้อขยายขนาดใหญ่ขึ้น ภายในพื้นที่ที่เท่ากัน จึงทำให้ดูเหมือนว่าปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีน้อยลง ซึ่งปริมาณของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในกล้ามเนื้อต่างๆ เป็นสิ่งสะท้อนถึงหน้าที่ของกล้ามเนื้อนั้นๆ เช่น กล้ามเนื้อน่องหรือไหล่ เป็นส่วนที่ต้องใช้ทำงานเป็นประจำของสัตว์ รองรับและเชื่อมต่อส่วนต่างๆ ของร่างกาย ฉะนั้นจึงพบเนื้อเยื่อเกี่ยวพันประเภทคอลลาเจนในกล้ามเนื้อที่มีการทำงานหนัก ห่อหุ้มและแทรกตัวเข้าภายในกล้ามเนื้อจนถึงระดับเส้นใยกล้ามเนื้อ ทำให้เกิดโครงสร้างที่เหนียวและแข็งแรง สอดคล้องกับ Kerry and Ledward (2002) ได้รายงานว่า กล้ามเนื้อที่มีการใช้งานมากหรือมีการเคลื่อนไหวมากจะมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสูงกว่ากล้ามเนื้อที่มีการใช้งานน้อย

ความนุ่มของเนื้อเกิดจากอิทธิพลของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในกล้ามเนื้อ myofibrillar protein และอิทธิพลร่วมของ 2 ปัจจัย ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะประกอบด้วยคอลลาเจน และอิลาสติน โดยคอลลาเจนเป็นส่วนประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในกล้ามเนื้อ ส่งผลต่อความเหนียวของเนื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง soluble collagen มีความสัมพันธ์ต่อความนุ่มของเนื้อ ซึ่งจะมีปริมาณแตกต่างกันในแต่ละกล้ามเนื้อจากตำแหน่งการเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อ โดยไขมันแทรกจะแทรกอยู่บริเวณ fasiculi และแทรกอยู่ระหว่างโครงสร้างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน endomysium และ perimysium ช่วยให้เนื้อมีความนุ่มมากขึ้น (Nishimura *et al.* 1999)

ในการศึกษาของ Moon (2006) ทำการศึกษาอิทธิพลของเกรดคุณภาพเนื้อและชนิดกล้ามเนื้อต่อปริมาณคอลลาเจน และความนุ่มของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและ myofibrillar protein ของโค Hanwoo ประเทศเกาหลี พบว่า ในกล้ามเนื้อ *Psoas major* (PM) มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำที่สุดและมีปริมาณของ total และ soluble collagen ต่ำที่สุดอีกด้วย ในขณะที่กล้ามเนื้อ *Semimembranosus* (SM) และ *Semitendinosus* (ST) มีปริมาณ total collagen สูง และมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูง เนื้อจึงมีความเหนียวมากกว่ากล้ามเนื้อ PM ดังแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ปริมาณ total, soluble collagen และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ในกล้ามเนื้อแต่ละชนิด

ชนิดกล้ามเนื้อ	Total collagen (mg/g)	Soluble collagen (mg/g)	WBSF (kg/cm^2)
Longissimus thoracis	4.52^{y}	1.57^{x}	5.4^{y}
Gluteus medius	4.25^{y}	1.34^{xy}	5.2^{y}
Semimembranosus	5.53^{xy}	0.64^{y}	6.6^{xy}
Semitendinosus	6.85^{x}	1.26^{xy}	7.2^{x}
Psoas major	3.71^{z}	0.78y	3.4^{z}

^{x,y,z} ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Moon (2006)

ตารางที่ 2.7 ปริมาณไขมันแทรก, total , soluble collagen และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ในกล้ามเนื้อสันนอกที่ระดับคุณภาพซากที่แตกต่างกัน

traits	Quality grade		
	1	2	3
Marbling score	12.33^{x}	7.00^{y}	1.67^{z}
Total collagen (mg/g)	5.14^{yz}	4.97^{z}	6.35^{x}
Soluble collagen (mg/g)	1.58	1.54	1.61
Shear force (g/cm^2)	4.79^{y}	5.35^{xy}	6.18^{x}

^{x,y,z} ในแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Moon (2006)

ปริมาณไขมันแทรกพบว่ามีค่าสูงในคุณภาพเนื้อเกรด 1 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับคุณภาพเนื้อเกรด 2 และ 3 ปริมาณ total collagen ในคุณภาพเนื้อเกรด 1 และ 2 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่แตกต่างจากเกรด 3 ปริมาณ soluble collagen ไม่มีความแตกต่าง

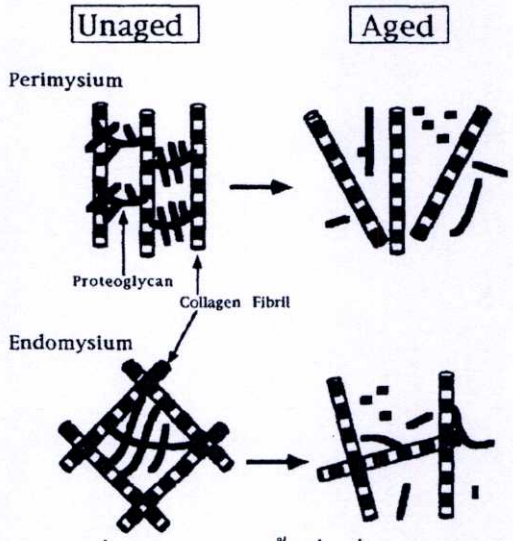
กันทางสถิติ (P>0.05) ส่วนค่าแรงตัดผ่านเนื้อ พบว่าคุณภาพเนื้อเกรด 1 และ 2 มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเกรด 3 ดังตารางที่ 2.7 (Moon. 2006) และมีรายงานว่าไขมันแทรกสูงจะส่งผลให้มีปริมาณ total collagen ลดลง และมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในกล้ามเนื้อที่อ่อนนุ่มขึ้น (Nishimura *et al.* 1999)

2.14 ระยะเวลาการบ่มต่อความนุ่มของเนื้อ

การบ่มซากเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการปรับปรุงคุณภาพทางด้านความนุ่มของเนื้อ ซึ่งการบ่มซากจะก่อให้เกิดกระบวนการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ เนื่องจากมีเอนไซม์เข้าไปย่อยโปรตีนที่บริเวณ Z-line และ M-line ตลอดจนย่อยสลายโปรตีนในกลุ่มไมโอไฟบริลลาร์ เช่น โทรโปนินที, เนบูลิน, ฟิลามิน และไตติน การสูญเสียโครงสร้างของเส้นใยโปรตีนไตติน และเนบูลิน ทำให้เนื้อที่เก็บไว้ในห้องเย็นภายหลังสัตว์ตายมีความนุ่มเพิ่มขึ้น (Koohmarraie. 1992)

Boehm *et al.* (1998) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ calpains และ calpastatin ระหว่างการบ่มเนื้อโค พบว่า ปริมาณ m-calpain จะค่อย ๆ ลดลงประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ในระหว่างการเก็บเนื้อ ขณะที่ปริมาณ μ-calpain จะลดลง 20 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 20 ชั่วโมง และหลังจากนั้นอีก 7 วัน จะมีปริมาณเหลืออยู่ไม่เกิน 4 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณตั้งต้น ส่วนปริมาณ calpastatin ลดลงอย่างรวดเร็วประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง และหลังจากนั้นอีก 7 วันภายหลังสัตว์ตายจะลดลงอีก 30 เปอร์เซ็นต์

Nishimura *et al.* (1996) กล่าวว่า การแตกตัวของเส้นใยเพอริไมเซียม และความแข็งแรงของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะเปลี่ยนแปลงไปอย่างช้าๆ ระหว่างที่บ่ม และเมื่อยืดระยะเวลาการบ่มให้นานขึ้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยมีการแตกหักมากขึ้นหรือเกิดการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) จึงทำให้เนื้อโคมีความนุ่มเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 2.13)



ภาพที่ 2.13 การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในกล้ามเนื้อภายหลังการบ่ม

ที่มา : Nishimura *et al.* (1996)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการงานวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

โคพื้นเมืองไทยที่ทำการศึกษาคือ โคพื้นเมืองที่เลี้ยงในจังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเลี้ยงแบบปล่อยหากินตามทุ่งหญ้าธรรมชาติ อายุประมาณ 2 ปี น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 150 กิโลกรัม จำนวน 14 ตัว เข้าฆ่าที่โรงฆ่าสัตว์เทศบาล อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

3.2 อุปกรณ์

1) เครื่องมือวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในเนื้อ (Mettler Toledo model SG-2, China)
2) เครื่องมือวัดอุณหภูมิ (Ebro model TTX100, Germany)
3) เครื่องมือวัดสีของเนื้อ (Minolta Chromameter CR-300, Japan)
4) เครื่องมือวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Instron model 1011, USA)
5) เครื่องบรรจุสุญญากาศ (Vacuum Package, Ramon)
6) ถุงสุญญากาศชนิด Polyvinyl Chloride (PVC)
7) อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany)
8) เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Tanita model 1144, Japan)
9) เครื่องชั่งชนิดละเอียด (Sartorius, Germany)
10) เครื่องเขย่าสาร (Vision Scientific co., ltd., Korea)
11) ไมโครปิเปต ขนาด 2 -1000 ไมโครลิตร (Eppendrof, USA)

12) Microplate (Maxisorp, NuncTM)

13) เครื่อง automatic microplate reader (TECAN, England)

14) ชุดอิเลคโตรโฟรีซิส (Biorad, USA)

15) Scanner Epson Perfection V700 Photo

16) Software Quantity One (Biorad, USA)

17) เครื่องปั่นเหวี่ยง Centrifuge (Centurion , UK)

18) เครื่องปั่น Homogenizer (Ika, Germany)

3.3 สารเคมี

1) โปรตีนมาตรฐาน (Protein marker) Precision plus protein standard (Biorad, USA)
2) 30%acrylamide-bis solution (37.5:1) (Biorad, USA)
3) SDS (sodium dodecyl sulfate) (Biorad, USA)
4) Tris (Promega, USA)
5) 2-mercaptoethanol (Merck, Germany)
6) TEMED (tetramethylelediamine) (Bio Basic Inc., USA)
7) APS (ammonium persulfate) (Ajax Finechem, Australia)
8) methanol (Univer, Australia)
9) bromophenal blue (Ajax Finechem, Australia)
10) coomessie blue (Research organics, USA)
11) ethanol (Merck, Germany)
12) BSA (bovine serum albumin) (Fluka Biochemika, USA)
13) phosphoric acid (Merck, Germany)
14) glycine (Promega, USA)
15) mouse anti-Troponin-T (Sigma, USA)
16) anti-mouse IgG (Roche, Germany)
17) 3,3' ,5,5' – tetramethyl-benzidine (Sigma, USA)
18) Phosphate buffer saline (PBS)
19) Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA; Univar, Australia)

20) Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride (Tris-Hcl; Vivantis, U.S.A)

21) Potassium chloride (KCl; Ajax Finechem, Australia)

22) Anti-Rabbit IgG (whole molecule peroxidase conjugate) (Sigma, U.S.A)

23) 1% skim milk (Sigma, U.S.A)

24) Hydrochloric acid (HCl; Merck, Germany)

25) Potassium dihydrogen orthophosphate (KH2PO4; Ajax Finechem, Australia)

26) Sodium azide (NaN_3; Univer, Australia)

27) Sodium chloride (NaCl; Univer, Australia)

28) 0.05% Tween 20 (Sigma, U.S.A)

29) TMB (Zymed®) (Invitrogen, U.S.A)

30) 40% Acrylamide-bis (Biorad, U.S.A.)

31) $CaCl_2.2H_2O$ (Ajax Finechem, Australia)

32) Trisodium citrate (Merck, Germany)

33) Citric acid (Merck, Germany)

34) Sodium acetate (Ajax Finechem, Australia)

35) Chloramine T (Sigma, U.S.A)

36) Acetate/citrate buffer (Ajax Finechem, Australia)

37) *p*-dimethyamino-benzadehyde (Sigma, U.S.A)

38) 60% perchloric acid

39) Isopropanal (Merck, Germany)

40) Hydroxyproline (Sigma, U.S.A)

41) Parafin oil

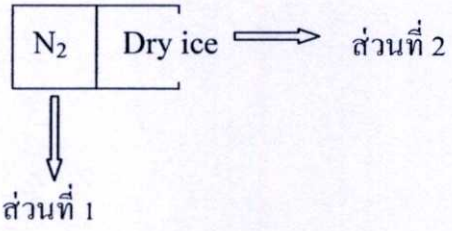
42) Distilled water

3.4 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.4.1 การสุ่มตัวอย่างเนื้อ

ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อ 3 ชนิดกล้ามเนื้อ ได้แก่ กล้ามเนื้อใบพาย (IF ; *Infraspinatus*) กล้ามเนื้อสันนอก (LD ; *Longissimus dorsi*) และกล้ามเนื้อสันในเทียม (SS ; *Supraspinatus*) ภายหลังจากการฆ่า การเก็บตัวอย่างจะเก็บจากซากซีกซ้าย ซึ่งการสุ่มตัวอย่างแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เก็บตัวอย่างเนื้อจากกล้ามเนื้อ 3 ชนิด ภายใน 1 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 จะแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที เพื่อหยุดปฏิกิริยาต่าง ๆ และหยุดการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย ในระหว่างขนส่งสู่ห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างจะถูกแช่ในน้ำแข็งแห้ง เมื่อถึงห้องปฏิบัติการตัวอย่างจะถูกเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการบดตัวอย่างด้วยโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลวในการรักษาอุณหภูมิ จากนั้นจะเก็บตัวอย่างที่บดแล้วในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อทำการศึกษาปริมาณแอนไซม์คาลเปนในกล้ามเนื้อ ส่วนที่ 2 ภายหลังจากเก็บตัวอย่าง ตัวอย่างเนื้อจะถูกขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการ โดยแช่ในน้ำแข็งแห้ง เมื่อถึงห้องปฏิบัติการตัวอย่างจะถูกเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการย่อยสลายโปรตีน troponin-T และปริมาณคอลลาเจนในกล้ามเนื้อ 3 ชนิด



กลุ่มที่ 2 เก็บตัวอย่างเนื้อจากกล้ามเนื้อ 3 ชนิด ภายหลังจากสัตว์ตาย ตัวอย่างเนื้อจะถูกขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการโดยแช่ในน้ำแข็งแห้ง เมื่อถึงห้องปฏิบัติการตัวอย่างจะถูกตัดและเก็บในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 2, 7 และ 21 วัน เมื่อครบระยะเวลาการบ่มแล้ว ตัวอย่างจะถูกเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการย่อยสลายโปรตีน troponin-T และปริมาณคอลลาเจนในกล้ามเนื้อ 3 ชนิด

ระยะเวลาการบ่ม (วัน)

2	7	21

กลุ่มที่ 3 เก็บตัวอย่างเนื้อจากกล้ามเนื้อ 3 ชนิด ภายหลังสัตว์ตาย ตัวอย่างเนื้อจะถูกขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการโดยแช่ในน้ำแข็งแห้ง เมื่อถึงห้องปฏิบัติการตัวอย่างจะถูกตัดเป็นชิ้นหนาประมาณ 3 เซนติเมตร และเก็บในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 2 และ 7 วัน เมื่อครบระยะเวลาการบ่มแล้ว ตัวอย่างจะถูกเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการศึกษาคุณภาพของเนื้อ ซึ่งได้แก่ ศึกษาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการละลายเนื้อ ศึกษาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการปรุงสุก และศึกษาความนุ่มของเนื้อด้วยการวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ

ระยะเวลาการบ่ม (วัน)

2	7

3.4.2 การศึกษา Calpain activity โดย Casein Zymography

การสกัดโปรตีน

ทำการสกัดโปรตีนจากตัวอย่างกล้ามเนื้อ 3 ชนิด คือ กล้ามเนื้อใบพาย สันนอก และสันในเทียม ที่ระยะเวลาภายใน 1 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย โดยนำตัวอย่างที่บดแล้วจากตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส มาชั่งตัวอย่างเนื้อประมาณ 0.2 กรัม แล้วเติม extraction buffer (50 mM tris pH 7.5, 5mM EDTA, Distilled water, HCl) ลงไป 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer (Ika, Germany) ที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centurion , UK) ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใส 100 µl และเติม sample buffer 100 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัด calpain activity ด้วยวิธี casein zymography ทันที และเก็บสารละลายส่วนใส 100 µl ผสมกับ 0.1 M NaOH 900 µl จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนต่อไป

การทำอิเลคโตรโฟรีซิส แบบ Native PAGE

ทำการแยกเอนไซม์ calpain I และ calpain II โดยการทำอิเลคโตรโฟรีซิส แบบ Native PAGE ด้วยเครื่องแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า รุ่น Mini-Protein Tetra Cell (Biorad, USA) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Arther and Mykle, (2000) ใช้เจลชั้นล่าง (separating gel) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และเจลชั้นบน (stacking gel) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีวิธีการเตรียมดังนี้

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

จากนั้นนำโปรตีนที่ได้จากการสกัด ผสมกับ sample buffer (Glycerol, 1M Tris pH 6.8, 1M DTT, bromophenol blue, distilled water) ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ประมาณ 30 วินาที ก่อนนำไปใส่ลงในหลุม (well) บนเจล ก่อนใส่ตัวอย่างลงไปในเจล จะต้องทำการ run ก่อนเป็นเวลา 30 นาที โดยเจลอยู่ในชุดอิเล็กโตรโฟริซีสที่มี running buffer (25mM tris base, 125mM Glycine, 1mM EDTA, 1mM DTT, distilled water) อยู่และต้องทำการใส่เครื่องแยกโปรตีนลงในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งหล่อเย็นตลอดเวลา จากนั้นต่อขั้วบวก (Anode) เข้ากับ Chamber ล่างและขั้วลบ (Cathod) เข้ากับ Chamber บน และเปิดสวิทช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้ไฟที่ความต่างศักย์คงที่ 125 โวลต์ เมื่อครบ 30 นาทีแล้วปิดสวิทช์ก่อนแล้วใช้ไมโครปิเปตค่อย ๆ ใส่ตัวอย่าง 6 ไมโครลิตรลงไปในเจล แล้วทำการ run ประมาณ 4 ชั่วโมง หรือหลังจากเห็น Bromophenol blue หลุดออกจากเจลแล้วให้ run ต่อไปอีกประมาณ 1 ชั่วโมง

จากนั้นนำเจลไปแช่ใน Ca^{2+} incubation buffer (10mM Tris pH 7.0, 1mM$CaCl_2$, 2mM DTT, Distilled water) โดยเปลี่ยน buffer 3 ครั้งทุกๆ 20 นาที แล้วแช่ไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วนำเจลมาแช่ใน Fixing solution (10% (v/v) (acetic acid, distilled water) เป็นเวลา 20 นาที นำไปย้อมสีด้วย Staining solution (0.2% (w/v) coomassie brilliant blue, 0.2% (w/v) amido black, 10% (v/v)

acetic acid, 40%(v/v) methanol, distilled water) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วย 10 % Acetic acid จนกระทั่งมองเห็นแถบสว่างอย่างชัดเจน แถบสว่างนี้เกิดจากเอนไซม์ calpain I และ calpain II ย่อยสลายเคซีนที่อยู่ในเจล

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

3.4.3 การศึกษาการย่อยสลายของโปรตีน troponin-T ด้วยเทคนิค Western blot

การสกัดโปรตีน

นำตัวอย่างเนื้อที่ได้จากการบ่มเป็นระยะเวลา 0, 7 และ 21 วัน มาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลวในการรักษาอุณหภูมิ และชั่งตัวอย่างเนื้อ ประมาณ 0.25 กรัม ใส่สารละลาย Extraction buffer 2.5 มิลลิลิตร (50mM tris, 5mM EDTA ; pH 7.5) และนำไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer ที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที จากนั้นปิเปตมา 200 ไมโครลิตร เติมสาร 2X SDS mix (Glycerol, 1M Tris pH 6.8, 10% SDS, 1M DTT, bromophenol blue, distilled water) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมเป็นเนื้อเดียวกันโดยการปั่นเหวียง 30 วินาที

การวัดความเข้มข้นของโปรตีน

วัดความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Lowry โดยแต่ละตัวอย่างทำการวัด 2 ซ้ำ นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ที่เจือจางของ Bovine serum albumin (BSA; Sigma, UK) ด้วย 0.1 M NaOH ให้มีความเข้มข้น ระหว่าง 0 - 90 ไมโครกรัม จากนั้นปิเปต 50 ไมโครลิตรของสารละลายมาตรฐาน ตัวอย่างที่เจือจางด้วย 0.1 M NaOH จนมีความเข้มข้นอยู่ในช่วงเดียวกับสารละลายมาตรฐาน และใช้ 0.1 M NaOH เป็น blank ลงในหลุมของไมโครเพลท แล้วเติม solution A ลงไป 50 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน (solution A ประกอบด้วย 5 ml of 2%(w/v) Na_2CO_3 in 0.1 M NaOH, 0.5 ml 1%(w/v) $CuSO_4$, 0.5 ml KNaTartate) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาทีแล้วเติม solution B ลงไป 50 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน (solution B ประกอบด้วย 5 ml 0.1 M NaOH, 0.5 ml Folin Ciocalteu reagent) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Tecan Sunrise, UK)

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

สารละลาย BSA จากนั้นทำการคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่าง โดยใช้สมการถดถอยเชิงเส้นของกราฟมาตรฐาน

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน troponin-T ด้วยวิธี SDS – PAGE

อุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกโปรตีนคือเครื่อง vertical electrophoresis units (TV 100) ขนาด 20 เซนติเมตร เจลสำหรับการแยกโปรตีนจะประกอบไปด้วย 2 ชั้น ชั้นล่างเรียกว่า separeting gel มีความเข้มข้นเจลเท่ากับ 12% ประกอบไปด้วย 30% Acrylamide–bis, 2 M Tris pH 8.8, 10% SDS, TEMED, 10% AMPS และน้ำกลั่น เจลชั้นนี้จะใช้สำหรับการแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 - 200 กิโลดาลตัน (kDa) และเจลชั้นบนเรียก stacking gel มีความเข้มข้น 6% ประกอบด้วย Acrylamide – bis, 1 M Tris pH 6.8, 10% SDS, TEMED, 10% AMPS และน้ำกลั่น ซึ่งชั้นนี้จะใช้แยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50 - 1000 กิโลดาลตัน

หลังจากทำการเตรียมเจลจึงใส่ตัวอย่างลงในแต่ละช่อง ช่องละ 10 ไมโครลิตร และ 10 ไมโครลิตร สำหรับตัวมาตรฐาน ซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (standard marker) ตัวมาตรฐานที่ใช้คือ Precision plus protein™ standards เมื่อทำการใส่ตัวอย่างเรียบร้อย จึงทำการเปิดเครื่อง vertical slab gels โดยใช้กระแสไฟฟ้าขนาด 200 โวลต์ (V) 80 มิลลิแอมแปร์ (mA) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

myofibrillar protein จะถูกแยกเป็นแถบตามน้ำหนักโมเลกุล เปรียบเทียบแถบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ถูกแยกกับโปรตีนมาตรฐาน ถ้าแถบโปรตีนที่อ่านได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 39 กับ 37 กิโลดาลตัน จัดได้ว่าเป็นโปรตีน troponin – T และแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน จัดว่าเป็นโปรตีน troponin – $T_{Product}$ (Ho *et al.*, 1997)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน troponin-T ด้วยวิธี Western blot

ทำการย้ายโปรตีนจากเจล polyacrylamide ไปสู่แผ่นเมมเบรน polyvinylidene difluoride (PVDF) ด้วยเครื่อง vertical electrophoresis units (TV 100K) ขนาด 20 เซนติเมตร กระแสไฟฟ้า 200 มิลลิแอมแปร์ (mA) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ transfer buffer (192mM Glycine, 25mM Tris, 20 % Methanol) เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า

นำแผ่นเมมเบรนแช่ใน TBS-T 5 นาที แล้วล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมา block ด้วย blocking buffer (0.05M Tris, 3 % nonfat milk) นาน 1 ชั่วโมง นำแผ่นแมมเบรนแช่ใน anti-troponin-T (Sigma) เจือจาง 1 : 15,000 เป็นแอนติบอดีตัวที่ 1 ในการจับกับโปรตีนตัวอย่างโดยทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำแมมเบรนมาล้างด้วย washing buffer (0.05 M Tris, 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.05 % Tween 20) 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที แล้วทำ

การแช่แผ่นแมมเบรนอีกครั้งหนึ่งในแอนติบอดีตัวที่ 2 (anti-mouse IgG:Sigma) เจือจาง 1:5000 ซึ่งมีความจำเพาะกับแอนติบอดีตัวที่ 1 โดยแอนติบอดีตัวที่ 2 จะติดฉลากเอนไซม์ horseradish peroxidase โดยแช่ไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นแมมเบรนด้วย wash buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที ตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาโดยใส่ซับสเตรท (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine) ซึ่งมีความจำเพาะกับเอนไซม์ดังกล่าวเพื่อให้เห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีน troponin-T ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นจึงนำแผ่นแมมเบรนไป แสกนด้วยเครื่อง scaner Epson V700 และทำการวัดความเข้มข้นโปรตีนโดยใช้โปรแกรม Quantity One (Biorad, USA)

3.4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณคอลลาเจน

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ และคอลลาเจนที่ไม่ละลาย (soluble and insoluble collagen) ดัดแปลงจากวิธีการของ Hill (1966) โดยทำการบดตัวอย่างด้วยเครื่องปั่นเนื้อให้ละเอียดและชั่งตัวอย่างประมาณ 0.95 กรัม เติม ¼ Ringer solution 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer (Ika, Switzerland) แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 77 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centurion, UK) ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการแยกส่วนที่เป็นส่วนใส (supernatant) ซึ่งมีคอลลาเจนที่ละลายได้ (soluble collagen) ผสมอยู่และส่วนที่ตกตะกอน (pellet) ซึ่งมีคอลลาเจนที่ไม่ละลาย (insoluble collagen) ผสมอยู่ โดยนำส่วนใสมาเติม 12 N HCl 4 มิลลิลิตร และ เติม 6 N HCl 8 มิลลิลิตร ลงในส่วนที่ตกตะกอน แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมผงถ่าน (activated carbon) แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman, Germany) ปรับ pH ให้ได้ประมาณ pH 6.7 จากนั้นนำไปปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร ทำการเจือจาง ตัวอย่างสัดส่วน 1 : 10 ในตัวอย่างที่ได้จากส่วนที่ตกตะกอน จากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้ มาตัวอย่างละ 4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติม chloramine T reagent โดยใช้ 7 % (w/v) chloramine T กับ acetate buffer pH 6.0 (sodium acetate, trisodium citrate และ citric acid ละลายใน isopropanol และน้ำ) ในอัตราส่วน 1 : 4 เติมหลอดละ 2 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วเติม color reagent ซึ่งประกอบด้วย p-dimethyamino-benzadehyde in 60% perchloric acid กับ Isopropanol ในอัตราส่วน 3 : 13 โดยเติมหลอดละ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปหาค่าดูดกลืนแสง ภายในเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง microplate reader (Tecan Sunrise, UK) ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

ในการทำกราฟมาตรฐานใช้ความเข้มข้นของไฮดรอกซีโพรลีนเท่ากับ 0, 0.2, 0.5, 0.7, 1, 1.2, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5 และ 6 ไมโครกรัมของไฮดรอกซีโพรลีนต่อมิลลิลิตร

$$\text{ปริมาณคอลลาเจน (มิลลิกรัม/กรัมของเนื้อสด)} = \frac{c \times f \times 7.25}{1000 \times w}$$

c = ความเข้มข้นของไฮดรอกซีโพรลีน

f = จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายที่ได้จากการย่อย

w = น้ำหนักตัวอย่าง

3.4.5 การศึกษาคุณภาพเนื้อ

การศึกษาคุณภาพเนื้อของโคพื้นเมืองจังหวัดอุบลราชธานี และที่ระยะเวลาการบ่มต่าง ๆ กัน ดังนี้

นำตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก ใบพาย และสันในเทียม ที่ระยะเวลาการบ่ม 2 และ 7 วัน โดยทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่างชิ้นเนื้อก่อนบ่ม บันทึกเป็นน้ำหนักเริ่มต้น (W1) จากนั้นบรรจุตัวอย่างชิ้นเนื้อในถุงสุญญากาศ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบตามแต่ละระยะเวลาการบ่มจะเก็บตัวอย่างไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เมื่อทำการศึกษาจะนำตัวอย่างชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับให้แห้งเล็กน้อย และชั่งน้ำหนักอีกครั้ง บันทึกเป็นน้ำหนักสุดท้าย (W2) เพื่อนำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของการสูญเสียน้ำหนักระหว่างการละลายน้ำแข็งในถุงสุญญากาศ จากสูตร

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

จากนั้นทำการต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที โดยเนื้อมีอุณหภูมิใจกลางเนื้อ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำถุงที่บรรจุตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ผ่านการทำให้สุกแล้วไปทำให้เย็น โดยการแช่ในน้ำและให้น้ำไหลผ่านนาน 30 นาที หรือจนกระทั่งได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อลดลงเหลือประมาณ 32 องศาเซลเซียส นำเนื้อออกจากถุงซับให้แห้งเล็กน้อย และชั่งน้ำหนักอีกครั้ง บันทึกเป็นน้ำหนักภายหลังการต้ม (W3) เพื่อนำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของการสูญเสียน้ำหนักระหว่างการปรุงสุก จากสูตร

เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการปรุงสุก = $[(W2 - W3) \times 100] / W2$

จากนั้นนำตัวอย่างเนื้อมาหาค่าความนุ่มของเนื้อ โดยนำตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เย็นแล้วมาตัดตามแนวยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 1 x 3 x 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตัวอย่างละ 10 ชิ้น แล้วนำไปวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Warner-Bratzler shear force ; WBSF) ด้วยเครื่อง Instron Model 1011 โดยกำหนดหน่วยเป็นกิโลกรัม

3.4.6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูล

1) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้เพื่อดูการกระจายตัวของข้อมูล โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft excel และ SAS เพื่อวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด และค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปรของข้อมูล

2) ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ calpains ที่ระยะเวลา 0 วัน (1 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย) ในกล้ามเนื้อ 3 ชนิดของโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Procedure General Linear Model (GLM) และเปรียบเทียบอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษาด้วย PDIFF

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

โดยที่

Y_{ij} คือ ค่าสังเกตใด ๆ ของลักษณะที่ทำการวิเคราะห์

μ คือ ค่าเฉลี่ยทั้งหมดของค่าสังเกตที่ต้องการศึกษา

A_i คือ อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อที่ i , i = 1, 2, 3 (1 คือ กล้ามเนื้อใบพาย , 2 คือ กล้ามเนื้อสันนอก และ 3 คือ กล้ามเนื้อสันในเทียม)

E_{ij} คือ ความคลาดเคลื่อนทั้งหมดของการทดลอง

3) ศึกษาการย่อยสลายโปรตีน troponin-T และปริมาณคอลลาเจนในกล้ามเนื้อ 3 ชนิดของโคพื้นเมืองจากจังหวัดอุบลราชธานี ที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 7 และ 21 วัน ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Procedure General Linear Model (GLM) และเปรียบเทียบอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษาด้วย PDIFF โดยมีแบบหุ่นทางสถิติ ดังนี้

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + A_iB_j + E_{ijk}$$

โดยที่

Y_{ijk} คือ ค่าสังเกตใด ๆ ของลักษณะที่ทำการวิเคราะห์

μ คือ ค่าเฉลี่ยทั้งหมดของค่าสังเกตที่ต้องการศึกษา

A_i คือ อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อที่ i , i = 1, 2, 3 (1 คือ กล้ามเนื้อใบพาย , 2 คือ กล้ามเนื้อสันนอก และ 3 คือ กล้ามเนื้อสันในเทียม)

B_j คือ อิทธิพลของระยะเวลาการบ่ม j , j = 1 - 3 (1 คือ ระยะเวลาบ่มที่ 0 วัน, 2 คือ ระยะเวลาบ่มที่ 7 วัน และ 3 คือ ระยะเวลาบ่มที่ 21 วัน)

A_iB_j คือ อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดกล้ามเนื้อที่ i และระยะเวลาการบ่มที่ j

E_{ijk} คือ ความคลาดเคลื่อนทั้งหมดของการทดลอง

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาเรื่องอิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อการทำงานของเอนไซม์ calpains การย่อยสลายโปรตีน troponin-T ปริมาณ collagen และคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองไทยที่เลี้ยงในเขตจังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเลี้ยงแบบปล่อยหากินตามทุ่งหญ้าธรรมชาติ อายุประมาณ 2 ปี น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 150 กิโลกรัม จำนวน 14 ตัว เข้าฆ่าที่โรงฆ่าสัตว์เทศบาล อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี ทำการศึกษาในกล้ามเนื้อใบพาย (IF; *Infraspinatus*) กล้ามเนื้อสันนอก (LD; *Longissimus dorsi*) และกล้ามเนื้อสันในเทียม (SS; *Supraspinatus*) จากการศึกษาของ ทิพยาภรณ์ กุสี (กำลังตีพิมพ์) ที่ทำการศึกษาชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อโดยใช้ตัวอย่างกล้ามเนื้อจากโคพื้นเมืองไทยที่เลี้ยงในจังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเป็นโคชุดเดียวกัน พบว่ากล้ามเนื้อ IF เป็น slow-twitch muscle เนื่องจากมีปริมาณ MHC-I สูงที่สุด กล้ามเนื้อ LD เป็น fast-twitch muscle เนื่องจากมีปริมาณ MHC-IIx สูงที่สุด และกล้ามเนื้อ SS เป็น intermediate-twitch muscle เนื่องจากมีปริมาณ MHC-I กับ MHC-IIx ใกล้เคียงกัน จึงมีคุณสมบัติของเส้นใยกล้ามเนื้อเป็นกลางอยู่ระหว่างกล้ามเนื้อ IF และ LD จากการศึกษาในกล้ามเนื้อทั้ง 3 ชนิดได้ผลการศึกษาดังนี้

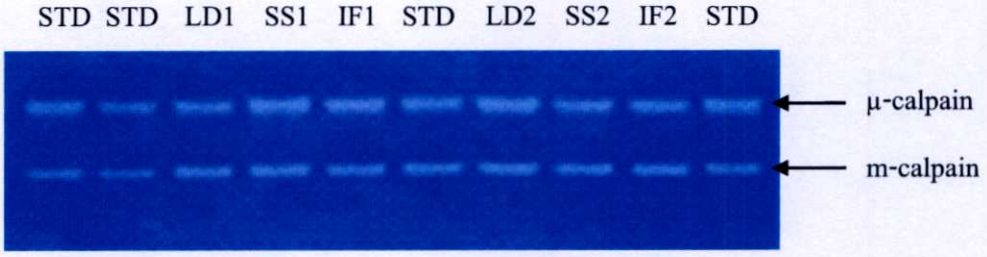
4.1 การศึกษาค่าการทำงานของเอนไซม์คาลเปน

ในการศึกษาอิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อ คือ กล้ามเนื้อใบพาย (IF) เป็นตัวแทนของ slow-twitch muscle กล้ามเนื้อสันนอก (LD) เป็นตัวแทนของ fast-twitch muscle และกล้ามเนื้อสันในเทียม (SS) เป็นตัวแทนของ intermediate-twitch muscle ทำการศึกษาภายใน 1 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย พบการทำงานของเอนไซม์ calpains ดังนี้

4.1.1 อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อการทำงานของเอนไซม์คาลเปน

จากตารางที่ 4.1 การทำงานของเอนไซม์คาลเปนในกล้ามเนื้อ 3 ชนิด พบว่าการทำงานของเอนไซม์ calpain I หรือ μ-calpain และการทำงานของเอนไซม์ calpain II หรือ m-calpain ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยการทำงานของเอนไซม์ μ-calpain ในกล้ามเนื้อสันในเทียม กล้ามเนื้อใบพาย และกล้ามเนื้อสันนอก มีค่าเท่ากับ 6.69 6.52 และ 6.37 หน่วยต่อ 100 ไมโครกรัมโปรตีน ตามลำดับ และการทำงานของเอนไซม์ m-calpain ในกล้ามเนื้อใบพาย กล้ามเนื้อสันในเทียม

และกล้ามเนื้อสันนอก มีค่าเท่ากับ 5.32 5.10 และ 4.30 หน่วยต่อ 100 ไมโครกรัมโปรตีน แม้ว่าการทำงานของเอนไซม์ μ-calpain และ m-calpain ในกล้ามเนื้อทั้ง 3 ชนิด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่จากการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย ซึ่ง Joo *et al.* (2013) กล่าวว่า กล้ามเนื้อที่มีสัดส่วนของเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด fast-twitch muscle (type IIB) มีการสะสมพลังงานในรูปของไกลโคเจน ส่งผลให้มีค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็วภายหลังสัตว์ตาย กล้ามเนื้อเข้าสู่สภาวะการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ผนังของซาร์โคพลาสมิกเรติคิวลัมไม่สามารถกักเก็บแคลเซียมไว้ได้ แคลเซียมที่มีความเข้มข้นเพียงพอกระตุ้นให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ calpains ด้วยเหตุนี้น่าจะส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ μ-calpain และ m-calpain ในกล้ามเนื้อสันนอก (type IIB) มากกว่าในกล้ามเนื้อใบพาย (type I) อีกทั้ง Ouali and Talmant. (1990) รายงานว่า ในกล้ามเนื้อชนิด slow-twitch muscle (red fiber) มีปริมาณโปรตีน calpastatin สูง ซึ่ง Fiedler *et al.* (1999) กล่าวว่าโปรตีน calpastatin ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ calpains ส่งผลให้มีการย่อยสลายโปรตีนลดลง และ Joo *et al.* (2013) รายงานว่ากล้ามเนื้อชนิด fast-twitch muscle มีสัดส่วนของ μ-calpain : calpastatin สูงกว่าในกล้ามเนื้อชนิด slow-twitch muscle โดยกล้ามเนื้อที่มีสัดส่วนของ μ-calpain : total calpastatin อยู่สูง จะมีอัตราการย่อยสลายของโปรตีนสูงกว่ากล้ามเนื้อที่มีสัดส่วนของ μ-calpain : total calpastatin ต่ำ (Veiseth *et al.* 2004)



ภาพที่ 4.1 ไซโมแกรมการทำงานของเอนไซม์ calpains ในกล้ามเนื้อใบพาย (IF ; *Infraspinatus*) กล้ามเนื้อสันนอก (LD ; *Longissimus dorsi*) และกล้ามเนื้อสันในเทียม (SS ; *Supraspinatus*) กล้ามเนื้อมาตรฐาน (STD ; Standard) .ใช้เพื่อเปรียบเทียบระหว่างเจลและภายในเจล โดยตัวอย่างที่ใช้เป็นกล้ามเนื้อสันนอกของโคตัวที่ 5

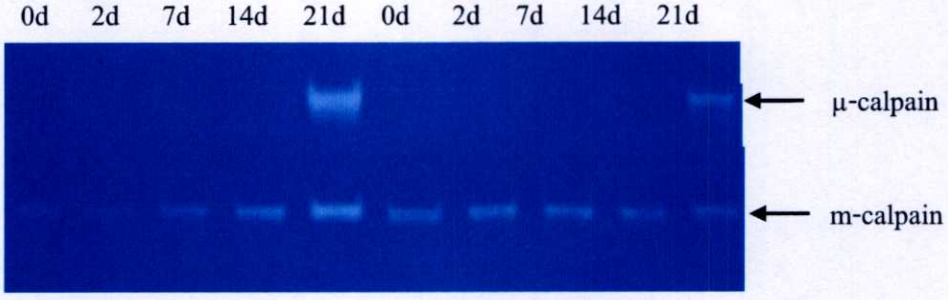
ตารางที่ 4.1 การทำงานของเอนไซม์คาลเปนในกล้ามเนื้อ 3 ชนิด ของโคพื้นเมืองที่เลี้ยงในเขตจังหวัดอุบลราชธานี

ชนิดกล้ามเนื้อ	ค่าการทำงานของเอนไซม์คาลเปน (units/100 μg of protein)	
	calpain I	calpain II
IF	6.52	5.32
LD	6.37	4.30
SS	6.69	5.10

4.1.2 อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มต่อการทำงานของเอนไซม์คาลเปน

จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์คาลเปนที่ระยะเวลาการบ่มแตกต่างกัน พบว่า เมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มมากขึ้นการทำงานของเอนไซม์ μ-calpain ลดลง จากภาพที่ 4.2 จะเห็นว่าเอนไซม์ μ-calpain มีการทำงานในวันที่ 0 (ภายใน 24 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย) เมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้นจะไม่พบการทำงานของเอนไซม์ μ-calpain ส่วนเอนไซม์ m-calpain พบว่าการทำงานคงอยู่จนถึงระยะเวลาการบ่มที่ 21 วัน โดยมีการทำงานลดลงตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้น ซึ่งภายหลังสัตว์ตายเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในกล้ามเนื้อ ส่งผลให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมอิสระออกมาสู่ซาร์โคพลาสซึมกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์คาลเปน (Warris. 2000) โดยจะกระตุ้นเอนไซม์ μ-calpain ให้เกิดการทำงานก่อน เนื่องจากเอนไซม์ μ-calpain ต้องการความเข้มข้นของแคลเซียมในระดับไมโครโมล ดังนั้นจึงสามารถทำงานได้ดีภายใต้สภาวะค่า pH ที่เหมาะสมภายหลังสัตว์ตาย ส่งผลให้มีการย่อยสลายโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว ในขณะเดียวกันเอนไซม์ μ-calpain จะเกิดการย่อยสลายไป (autolysis) ส่งผลให้พบการทำงานของเอนไซม์ μ-calpain ในช่วงแรกภายหลังสัตว์ตายเท่านั้น (Boehm *et al.* 1998 ; Steen *et al.* 1997 ; Kim *et al.* 2012) ซึ่ง Camou *et al.* (2007) กล่าวว่า การทำงานของเอนไซม์ μ-calpain ลดลง 30 - 60 เปอร์เซ็นต์ภายหลังการบ่ม 120 ชั่วโมง ที่ pH 6.5 - 7.5 แต่ที่ระดับ pH 5.8 การทำงานของเอนไซม์ μ-calpain จะลดลงอย่างรวดเร็ว และไม่พบการทำงานที่ 24 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย ในขณะที่เอนไซม์ m-calpain นั้น มีความต้องการความเข้มข้นของแคลเซียมอิสระที่ระดับมิลลิโมลเพื่อกระตุ้นการทำงาน ทำให้การทำงานของ m-calpain เกิดเพียงเล็กน้อยในระยะแรก และมีการทำงานลดลงอย่างช้าๆ ระหว่างที่บ่มภายหลังสัตว์ตาย (Kim *et al.* 2012) จากการศึกษาของ Ji and Takahashi (2006) ที่ทำการศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมอิสระในกล้ามเนื้อสันนอกของโค Japanese Black พบว่า ความเข้มข้นของแคลเซียมภายหลังสัตว์ตาย 40 นาที มีค่าเท่ากับ 16 ไมโครโมล และ

เพิ่มขึ้นเป็น 640 - 970 ไมโครโมล ภายใน 14 วันภายหลังสัตว์ตาย ซึ่งความเข้มข้นของแคลเซียมที่เพิ่มขึ้นภายหลังการบ่มจะกระตุ้นให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ m-calpain ให้สามารถย่อยสลายโปรตีนได้ภายหลังการบ่ม และการทำงานของเอนไซม์ m-calpain จะลดลง 10 - 20 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังบ่ม 144 ชั่วโมง ส่งผลให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้นภายหลังการบ่ม (Camou *et al.* 2007) และการศึกษาของ อรพิน พิมพ์สมแดง (2553) ทำการศึกษาการย่อยสลายโปรตีนและการทำงานของเอนไซม์คาลเปนในกล้ามเนื้อสันนอกของกวางรูซ่า พบว่า การทำงานของเอนไซม์ μ-calpain ลดลงอย่างรวดเร็วภายหลังสัตว์ตาย ในขณะที่ m-calpain มีการทำงานลดลงภายหลังการบ่ม

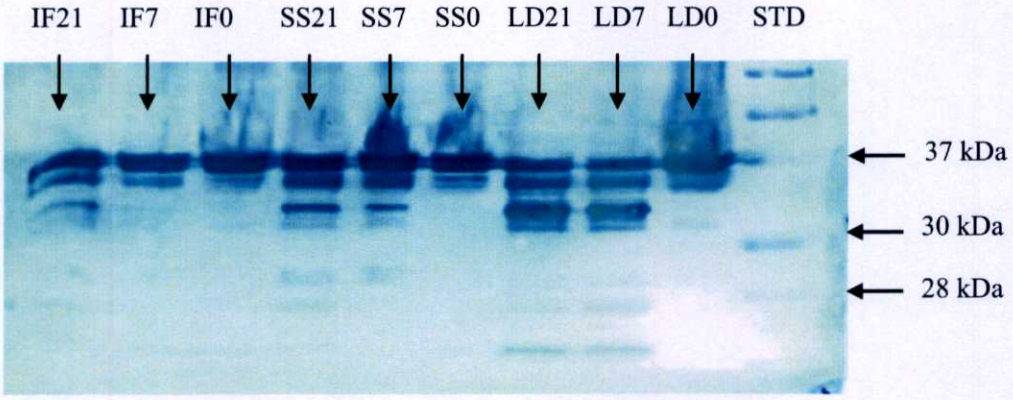


ภาพที่ 4.2 ไซโมแกรมการทำงานของเอนไซม์ calpains ที่ระยะเวลาการบ่ม 0 2 7 14 และ 21 วัน ในกล้ามเนื้อสันนอก (LD ; *Longissimus dorsi*) ของโคตัวที่ 3

4.2 การศึกษาการย่อยสลายโปรตีน troponin-T

4.2.1 อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อต่อการย่อยสลายโปรตีน troponin-T

จากการศึกษาอิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อ คือ กล้ามเนื้อใบพาย กล้ามเนื้อสันนอก และกล้ามเนื้อสันในเทียม ที่ระยะเวลาการบ่ม 0 7 และ 21 วัน ที่ส่งผลต่อการย่อยสลายโปรตีน troponin-T พบว่า ในกล้ามเนื้อสันนอกและกล้ามเนื้อสันในเทียม มีความเข้มของแถบโปรตีน troponin-T ขนาด 37 กิโลดาลตัน มีค่าเท่ากับ 8.26 และ 7.97 หน่วย/100 ไมโครกรัมโปรตีน ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกล้ามเนื้อใบพาย มีค่าเท่ากับ 6.27 หน่วย/100 ไมโครกรัมโปรตีน Steen *et al.* (1997) กล่าวว่า การย่อยสลายไมโอไฟบริลลาร์โปรตีน troponin-T ขนาด 39 และ 37 กิโลดาลตัน ทำให้เกิดแถบโปรตีน troponin-T ขนาด 30 กิโลดาลตัน ใช้เป็นตัวชี้วัดการย่อยสลายไมโอไฟบริลลาร์โปรตีนภายหลังสัตว์ตาย ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ภายในกล้ามเนื้อ



ภาพที่ 4.3 แถบโปรตีน troponin-T และผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลาย troponin-T ในกล้ามเนื้อใบพาย (IF ; *Infraspinatus*) กล้ามเนื้อสันนอก (LD ; *Longissimus dorsi*) และกล้ามเนื้อสันในเทียม (SS ; *Supraspinatus*) ที่ระยะเวลาการบ่มแตกต่างกัน

การศึกษาครั้งนี้ พบว่า ในกล้ามเนื้อสันนอก และกล้ามเนื้อสันในเทียมมีการสลายโปรตีนสูง โดยมีความเข้มของแถบโปรตีน troponin-T ขนาด 30 กิโลดาลตัน เท่ากับ 3.53 และ 3.30 หน่วย/100 ไมโครกรัมโปรตีน ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกล้ามเนื้อใบพาย มีค่าเท่ากับ 1.62 หน่วย/100 ไมโครกรัมโปรตีน (ตารางที่ 4.2) อาจเนื่องมาจากกล้ามเนื้อสันนอกประกอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อ type IIB มีการสลายพลังงานแบบไม่ใช้ออกซิเจน ส่งผลให้ค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็ว และเข้าสู่กระบวนการหดเกร็งตัวอย่างรวดเร็วภายหลังสัตว์ตาย ส่งผลให้ผนังของซาร์โคพลาสมิกเรติคิวลัมเสียสภาพ ไม่สามารถกักเก็บแคลเซียมไว้ได้ และแคลเซียมอิสระจะกระตุ้นให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ calpains ภายหลังสัตว์ตายรวดเร็วกว่ากล้ามเนื้อใบพาย อีกทั้งในเส้นใยกล้ามเนื้อ type IIB มีสัดส่วนของ μ-calpain : calpastatin สูง ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนสูง (Joo *et al.* 2013) และ Greesink *et al.* (1995) กล่าวว่า กล้ามเนื้อที่มีสัดส่วนของเส้นใยกล้ามเนื้อ type I slow oxidative มีกิจกรรมของโปรตีน calpastatin สูง ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนภายหลังสัตว์ตายเกิดขึ้นน้อยกว่ากล้ามเนื้อที่มีสัดส่วนของเส้นใยกล้ามเนื้อ type II glycolytic สอดคล้องกับการศึกษาของ Cruzen *et al.* (2014) ได้ทำการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ calpains ในกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* (LD) *Semimembranosus* (SM) และ *Triceps brachii* (TB) พบว่า กล้ามเนื้อ LD และ SM มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด type IIb มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ จัดอยู่ในกลุ่ม fast fiber type มีสัดส่วนของ μ-calpain : calpastatin สูง ทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีน troponin-T สูงกว่ากล้ามเนื้อ TB ที่อยู่ในกลุ่ม intermediate fiber type และพบว่าในกล้ามเนื้อ TB นั้นมีปริมาณ total calpastatin สูง ซึ่งโปรตีน

calpastatin จะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ calpains ทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีน troponin-T ได้ลดลง

ตารางที่ 4.2 อิทธิพลของกล้ามเนื้อและระยะเวลาการบ่มต่อการย่อยสลายโปรตีน troponin-T

ความเข้มของแถบโปรตีน troponin-T (หน่วย/100 ไมโครกรัมโปรตีน)	ชนิดกล้ามเนื้อ (A)			ระยะเวลาการบ่ม (วัน) (B)			ระดับนัยสำคัญทางสถิติ		
	IF	LD	SS	0	7	21	A	B	A*B
37 kDa	6.27^{a}	8.26^{b}	7.97^{b}	8.85^{b}	7.38^{a}	6.28^{a}	*	**	ns
30 kDa	1.62^{a}	3.53^{b}	3.30^{b}	0.45^{a}	3.31^{b}	4.70^{c}	**	**	*
37 kDa + 30kDa	7.90^{a}	11.80^{b}	11.26^{b}	9.30	10.68	10.98	**	ns	ns
% 30kDa[1/]	19.90^{a}	28.57^{b}	26.26^{ab}	4.96^{a}	27.45^{b}	42.32^{c}	*	**	ns

^{abc}ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

[1/] %30 kDa คือ เปอร์เซ็นต์ความเข้มของแถบโปรตีนขนาด 30 kDa ต่อความเข้มของแถบโปรตีนขนาด 37 kDa + 30 kDa

* คือ $P<0.05$

** คือ $P<0.001$

ns คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

โปรตีน troponin-T ขนาด 37 kDa + 30kDa พบว่า ในกล้ามเนื้อสันนอกและกล้ามเนื้อสันในเทียม มีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 11.80 และ 11.26 หน่วย/100 ไมโครกรัมโปรตีน ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกล้ามเนื้อใบพาย มีค่าเท่ากับ 7.90 หน่วย/100 ไมโครกรัมโปรตีน และ %30 kDa troponin-T พบว่าในกล้ามเนื้อสันนอกมีค่าสูงที่สุด รองมาคือกล้ามเนื้อสันในเทียม และกล้ามเนื้อใบพาย มีค่าเท่ากับ 28.57 26.26 และ 19.90 หน่วย/100 ไมโครกรัมโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งกล้ามเนื้อสันนอกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกล้ามเนื้อใบพาย ส่วนในกล้ามเนื้อสันในเทียมไม่มีความแตกต่างกับกล้ามเนื้อใบพาย ($P>0.05$) (ตารางที่ 4.2) ซึ่งจากการทำงานของเอนไซม์คาลเปนในกล้ามเนื้อ fast-twitch (type IIB) ที่มีการทำงานสูงกว่าในกล้ามเนื้อ slow-twitch (Joo *et al.* 2013) จึง

ส่งผลให้ %30 kDa troponin-T ในกล้ามเนื้อสันนอกมีความเข้มของแถบโปรตีนสูงกว่ากล้ามเนื้อสันในเทียม และกล้ามเนื้อใบพาย

4.2.2 อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มต่อความเข้มของแถบโปรตีน troponin-T

การศึกษาระยะเวลาการบ่มต่อความเข้มของแถบโปรตีน troponin-T พบว่า เมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มมากขึ้นนั้นส่งผลให้มีการสลายตัวของโปรตีน troponin-T ขนาด 37 กิโลดาลตัน เพิ่มขึ้น ทำให้ความเข้มของแถบโปรตีนลดลง ซึ่งที่ระยะเวลาการบ่ม 0 วัน มีแถบโปรตีน troponin-T เข้มเท่ากับ 8.85 หน่วย/100 ไมโครกรัมโปรตีน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) กับระยะเวลาการบ่มที่ 7 และ 21 วัน มีความเข้มของแถบโปรตีนเท่ากับ 7.38 และ 6.28 หน่วย/100 ไมโครกรัมโปรตีน ตามลำดับ ส่วนระยะเวลาการบ่มที่ 7 และ 21 วัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนความเข้มของแถบโปรตีนขนาด 30 กิโลดาลตัน พบว่า ที่ระยะเวลาการบ่มที่ 0 วัน มีความเข้มของแถบโปรตีน troponin-T ขนาด 30 กิโลดาลตัน ต่ำที่สุด เนื่องจากการสลายตัวของโปรตีนน้อย มีค่าเท่ากับ 0.45 หน่วย/100 ไมโครกรัมโปรตีน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) กับระยะเวลาการบ่มที่ 7 และ 21 วัน มีค่าเท่ากับ 3.31 และ 4.70 หน่วย/100 ไมโครกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยที่ระยะเวลาการบ่มที่ 7 วัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.001$) กับระยะเวลาการบ่มที่ 21 วัน (ตารางที่ 4.3) ระยะเวลาการบ่มเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีการสลายโปรตีน troponin-T ขนาด 37 กิโลดาลตัน ทำให้ความเข้มของแถบโปรตีนลดลงตามระยะเวลาการบ่ม และพบแถบโปรตีน troponin-T ขนาด 30 กิโลดาลตัน มีความเข้มเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม อาจเป็นผลมาจากการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์ calpains ที่มีอยู่ภายในกล้ามเนื้อ ทำหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีน troponin-T และผลที่เกิดจากการย่อยสลายคือโปรตีน troponin-T ขนาด 30 และ 28 กิโลดาลตัน (Koohmaraie. 1992 และ Hedrick *et al.* 1993) การศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Steen *et al.* (1997) ที่ทำการศึกษาการย่อยสลายโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ในกล้ามเนื้อสันนอกที่ระยะเวลาการบ่ม 1 5 และ 8 วัน พบว่า มีความเข้มของแถบโปรตีน troponin-T ขนาด 39 และ 37 กิโลดาลตันลดลง และเกิดการปรากฏของโปรตีน troponin-T ขนาด 30 และ 28 กิโลดาลตัน เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม และสอดคล้องกับการศึกษาของ Claeys *et al.* (1995) ได้ทำการศึกษาความเข้มของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-Page ที่ระยะเวลาการบ่ม 0 1 6 และ 12 วัน พบว่า ความเข้มของแถบโปรตีน troponin-T ขนาด 37 กิโลดาลตัน ลดลง ส่วนความเข้มของแถบโปรตีนขนาด 30 กิโลดาลตัน มีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ และ Anderson *et al.* (2012) ได้

ทำการศึกษาเกี่ยวกับการย่อยสลายโปรตีน troponin-T ที่ระยะเวลาการบ่ม 1 3 7 และ 14 วัน พบว่ามีการย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม ทุกชนิดกล้ามเนื้อ

4.2.3 อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดกล้ามเนื้อและระยะเวลาการบ่มต่อการย่อยสลายโปรตีน troponin-T

จากการศึกษาอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดกล้ามเนื้อและระยะเวลาการบ่มต่อโปรตีน troponin-T ขนาด 30 กิโลดาลตัน พบว่า ความเข้มของแถบโปรตีน troponin-T ขนาด 30 กิโลดาลตัน มีการย่อยสลายต่ำที่สุดในกล้ามเนื้อใบพายที่ระยะเวลาการบ่ม 0 วัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากในกล้ามเนื้อใบพายมีเส้นใยกล้ามเนื้อ type I มีปริมาณของโปรตีน calpastatin สูง ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ calpains (Fiedler *et al.* 1999) ส่งผลให้มีการย่อยสลายโปรตีนน้อยกว่ากล้ามเนื้อสันนอก และกล้ามเนื้อสันในเทียม และพบว่ามีการย่อยสลายโปรตีนสูงในกล้ามเนื้อสันนอกที่ระยะเวลาการบ่ม 21 วัน อาจเนื่องจากมีเส้นใยกล้ามเนื้อ type IIB มีการทำงานของเอนไซม์ calpains สูง ส่งผลให้เกิดการสลายโปรตีนสูง (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดกล้ามเนื้อและระยะเวลาการบ่มต่อความเข้มของแถบโปรตีน troponin-T ขนาด 30 กิโลดาลตัน

ชนิดกล้ามเนื้อ (หน่วย/100 ไมโครกรัมโปรตีน)	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)			ค่าเฉลี่ยของชนิดกล้ามเนื้อ
	0	7	21	
IF	0.32^{e}	1.64^{de}	2.91^{cd}	1.62^{x}
LD	0.50^{e}	4.04^{bc}	6.08^{a}	3.53^{y}
SS	0.52^{e}	4.24^{bc}	5.13^{ab}	3.30^{y}
ค่าเฉลี่ย	0.45^{f}	3.31^{g}	4.70^{h}	

^{abcde} ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

^{fgh} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

^{xyz} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

4.3 การศึกษาปริมาณคอลลาเจนในกล้ามเนื้อของโคพื้นเมืองอุบลราชธานี

การศึกษาอิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อ คือกล้ามเนื้อใบพาย กล้ามเนื้อสันนอก และกล้ามเนื้อสันในเทียม ที่ระยะเวลาการบ่ม 0 7 และ 21 วัน ที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจน ได้แก่ soluble collagen insoluble collagen และ total collagen ดังนี้ (ตารางที่ 4.4)

4.3.1 อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อที่มีต่อปริมาณคอลลาเจน

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าในกล้ามเนื้อใบพายและกล้ามเนื้อสันในเทียม มี soluble collagen สูง มีค่าเท่ากับ 0.57 และ 0.53 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อสด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) กับกล้ามเนื้อสันนอก มีค่าเท่ากับ 0.40 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อสด ซึ่ง Kirchofer *et al.* (2002) กล่าวว่า กล้ามเนื้อใบพาย (type I) และกล้ามเนื้อสันในเทียม (type IIA) เป็นกล้ามเนื้อชนิด red muscle และ intermediate muscle มีการสะสมพลังงานในรูปของไขมัน ซึ่งไขมันเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และแทรกอยู่ตามเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน endomysium และ perimysium ส่งผลให้ cross-link ระหว่างโมเลกุลคอลลาเจนไม่แข็งแรง จึงเกิดการละลายเมื่อได้รับความร้อน (Moon. 2006) สอดคล้องกับการศึกษาของ Jeremiah *et al.* (2003) พบว่า ในกล้ามเนื้อใบพายมีปริมาณ soluble collagen สูงที่สุด รองมาคือกล้ามเนื้อสันในเทียม และกล้ามเนื้อสันนอก ตามลำดับ

ปริมาณ insoluble และ total collagen พบว่า ในกล้ามเนื้อสันในเทียม มีค่าเท่ากับ 9.55 และ 10.27 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อสด และในกล้ามเนื้อใบพายมีค่าเท่ากับ 7.91 และ 8.48 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อสด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) กับกล้ามเนื้อสันนอก มีค่าเท่ากับ 5.43 และ 5.82 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อสด ซึ่ง 2 ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจน คือ การเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อ ทั้งนี้ Kerry and Ledward. (2002) และ Calkins and Sullivan. (2007) ได้รายงานว่า กล้ามเนื้อที่มีการใช้งานมากหรือมีการเคลื่อนไหวมากจะมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสูงกว่า และมีความแข็งแรงของ cross-link ระหว่างโมเลกุลมากกว่ากล้ามเนื้อที่มีการใช้งานน้อย เช่น กล้ามเนื้อน่อง กล้ามเนื้อไหล่ เป็นส่วนที่ต้องใช้เคลื่อนไหว รองรับและเชื่อมต่อส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ฉะนั้นจึงพบเนื้อเยื่อเกี่ยวพันประเภทคอลลาเจนในกล้ามเนื้อสูง โดยจะห่อหุ้มและแทรกตัวเข้าภายในกล้ามเนื้อจนถึงระดับเส้นใยกล้ามเนื้อ ทำให้เกิดโครงสร้างที่เหนียวและแข็งแรง (สัญชัย. 2550) และการศึกษาของ Jeremiah *et al.* (2003) พบว่า ในกล้ามเนื้อใบพาย (flat iron) มีปริมาณ total collagen และ insoluble collagen สูงที่สุด รองมาคือกล้ามเนื้อสันในเทียม (chuck tender) และกล้ามเนื้อสันนอก (striploin) ตามลำดับ และอีกปัจจัยคือ การสะสมพลังงานในกล้ามเนื้อ ซึ่ง Karlsson *et al.* (1999) กล่าวว่า กล้ามเนื้อชนิด white muscle มีการสะสมพลังงานในรูปของไกลโคเจน จึงมีการสะสมไขมันในกล้ามเนื้อเพียงเล็กน้อย

ซึ่งผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าในกล้ามเนื้อสันนอก (type IIB) เป็นกล้ามเนื้อชนิด white muscle มีปริมาณคอลลาเจนทั้ง soluble insoluble และ total collagen ต่ำที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Von Seggern *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับคุณลักษณะของกล้ามเนื้อ 39 ชนิด พบว่า ในกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* มีปริมาณคอลลาเจนต่ำที่สุด

ตารางที่ 4.4 อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อและระยะเวลาการบ่มที่มีต่อปริมาณคอลลาเจน

ชนิดคอลลาเจน (mg/g)	ชนิดกล้ามเนื้อ (A)			ระยะเวลาการบ่ม (วัน) (B)			ระดับนัยสำคัญทางสถิติ		
	IF	LD	SS	0	7	21	A	B	A x B
soluble collagen	0.57 [b]	0.40 [a]	0.53 [b]	0.41 [a]	0.51 [b]	0.58 [b]	**	**	ns
insoluble collagen	7.91 [b]	5.43 [a]	9.55 [b]	6.94	8.00	7.95	**	ns	ns
total collagen	8.48 [b]	5.82 [a]	10.27 [c]	7.35	8.51	8.72	**	ns	ns
% solubility	7.58 [b]	8.24 [b]	6.03 [a]	6.74 [a]	6.94 [a]	8.41 [b]	*	*	ns

[abc] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

* คือ $P<0.05$

** คือ $P<0.001$

ns คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

% solubility พบว่าในกล้ามเนื้อสันนอก มี % solubility มีค่าเท่ากับ 8.24 เปอร์เซ็นต์ กล้ามเนื้อใบพาย มีค่าเท่ากับ 7.58 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกล้ามเนื้อสันในเทียม มีค่าเท่ากับ 6.03 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่ากล้ามเนื้อสันนอกจะมีการสะสมไขมันน้อย และอยู่ในตำแหน่งที่มีการเคลื่อนไหวน้อย ส่งผลให้ cross-link ระหว่างโมเลกุลของคอลลาเจนไม่แข็งแรงมากนัก (สัญชัย จตุรสิทธา. 2550 และ Kerry and Ledward. 2002) จึงอาจส่งผลให้มีการละลายของคอลลาเจนออกมาในสัดส่วนที่มากเมื่อเทียบกับปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด ส่วนในกล้ามเนื้อใบพาย แม้ว่าจะอยู่ในตำแหน่งที่มีการเคลื่อนไหวสูง แต่เป็นกล้ามเนื้อ red muscle ที่มีการสะสมพลังงานในรูปของไขมัน ซึ่งไขมันที่แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะส่งผลให้ cross-link ระหว่างโมเลกุลของคอลลาเจนไม่แข็งแรง

มากนัก (Nishimura *et al.* 1999 และ Moon. 2006) จึงเกิดการละลายเมื่อได้รับความร้อน สอดคล้องกับการศึกษาของ Stolowski *et al.* (2006) ที่ทำการศึกษาความนุ่มในโคสายพันธุ์ Angus x Brahman พบว่า % solubility ของกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* (type IIB) มีค่าเท่ากับ 17.21 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าในกล้ามเนื้อ *Semimembranosus* (type IIB) *Semitendinosus* (type IIA) และ *Triceps brachii* (type IIA) มีค่าเท่ากับ 15.05 12.67 และ 13.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($P<0.05$)

4.3.2 อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มที่มีต่อปริมาณคอลลาเจน

ระยะเวลาการบ่มที่มีต่อปริมาณ soluble collagen พบว่า เมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มมากขึ้น จะมีปริมาณของ soluble collagen เพิ่มสูงมากขึ้นด้วย โดยระยะเวลาการบ่ม 0 วัน มีปริมาณ soluble collagen เท่ากับ 0.41 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อสด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) กับระยะเวลาการบ่ม 7 และ 21 วัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.51 และ 0.58 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อสด ตามลำดับ

ปริมาณ insoluble collagen และปริมาณ total collagen พบว่า เมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มมากขึ้น ปริมาณของ insoluble collagen นั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาของ Modzelewska-Kapitula *et al.* (2015) พบว่า ปริมาณ insoluble collagen และ total collagen ที่ระยะเวลาการบ่ม 1 5 10 15 และ 20 วัน มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

% solubility พบว่า เมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มมากขึ้น % solubility นั้น มีค่าเพิ่มมากขึ้นด้วย โดยที่ระยะเวลาการบ่ม 0 วัน และระยะเวลาการบ่ม 7 วัน มีค่าเท่ากับ 6.74 และ 6.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับระยะเวลาการบ่ม 21 วัน มีค่าเท่ากับ 8.41 เปอร์เซ็นต์

Nishimura *et al.* (1995) กล่าวว่า การเปลี่ยนโครงสร้างคอลลาเจนระหว่างการบ่ม ในกล้ามเนื้อ *Semitendinosus* เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงภายหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 10 วัน เนื่องจากเกิดการสลายตัวของเส้นใยคอลลาเจนและการย่อยสลายของ proteoglycan ใน collagen fiber ภายหลังสัตว์ตายส่งผลให้เกิดการอ่อนตัวของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ส่งผลให้เนื้อมีความนุ่มมากขึ้น (Dransfield *et al.* 2003) ซึ่งระยะเวลาการบ่มจะส่งผลให้เกิดการย่อยสลายพันธะ intermolecular cross-link ภายในเส้นใยคอลลาเจน (Modzelewska-Kapitula *et al.* 2015) และ Nishimura *et al.* (1996) กล่าวว่า ความแข็งแรงของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะเปลี่ยนแปลงไปอย่างช้าๆ ระหว่างที่บ่ม และเมื่อยืดระยะเวลาการบ่มให้นานขึ้น เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยมีการแตกหักของเส้นใยเพอริไมเซียมมากขึ้นหรือเกิดการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) จึงทำให้เนื้อโคมีความนุ่มเพิ่มขึ้น

4.4 คุณภาพของเนื้อโคพื้นเมืองอุบลราชธานี

ในการศึกษาอิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อ คือกล้ามเนื้อใบพาย กล้ามเนื้อสันนอก และกล้ามเนื้อสันในเทียม ที่ระยะเวลาการบ่ม 2 และ 7 วัน ที่ส่งผลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการทำละลาย และค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก ดังนี้

4.4.1 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ

การศึกษาค่าแรงตัดผ่านเนื้อ พบว่า กล้ามเนื้อสันนอก มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 8.92 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) กับกล้ามเนื้อใบพาย และกล้ามเนื้อสันในเทียม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.78 และ 7.39 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ และกล้ามเนื้อใบพาย แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) กับกล้ามเนื้อสันในเทียม ซึ่งในกล้ามเนื้อใบพายเป็นกล้ามเนื้อ red muscle จึงมีการสะสมไขมันสูง โดย Calkins and Sullivan. (2007) กล่าวว่า ไขมันจะช่วยลดปริมาณโปรตีนต่อหน่วยของเนื้อ โดยจะลดความหนาแน่นของโปรตีน ส่งผลทำให้ความนุ่มของเนื้อเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังชี้ให้เห็นว่าไขมันที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ของกล้ามเนื้อหรือภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน จะช่วยลดแรงที่ใช้ในการตัดเนื้อ นอกจากนี้ไขมันยังเป็นตัวเชื่อมระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อ เพิ่มการรับรู้ความนุ่มของเนื้อ สอดคล้องกับการศึกษาของ Hildrum *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการจำแนกความแตกต่างของกล้ามเนื้อด้วยคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส (sensory) และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ซึ่งความนุ่มทางประสาทสัมผัส สามารถจำแนกได้ 3 กลุ่ม โดยกล้ามเนื้อ *Infraspinatus* ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่มีความนุ่มมากที่สุด ส่วนกลุ่มที่มีความนุ่มปานกลาง ได้แก่ กล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* *Triceps brachii* และ *Supraspinatus* เป็นต้น และกลุ่มที่เนื้อเหนียว ได้แก่ กล้ามเนื้อ *Biceps femeris* และ *Semimembranosus* เป็นต้น ส่วนความชุ่มฉ่ำ (juiciness) พบว่า กล้ามเนื้อ *Infraspinatus* *Triceps brachii* และ *Biceps femeris* เป็นกล้ามเนื้อที่มีความชุ่มฉ่ำสูงที่สุด ส่วนกลุ่มที่มีความชุ่มฉ่ำปานกลาง ได้แก่ กล้ามเนื้อ *Supraspinatus* และ *Longissimus dorsi* เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่มีความชุ่มฉ่ำน้อย ได้แก่ กล้ามเนื้อ *Semimembranosus* และเมื่อทำการศึกษาค่าแรงตัดผ่านเนื้อพบว่ากล้ามเนื้อ *Infraspinatus* มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำที่สุด รองมาคือกล้ามเนื้อ *Triceps brachii* และ *Supraspinatus* และกล้ามเนื้อที่มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูง ได้แก่ *Semimembranosus* *Longissimus dorsi* และ *Biceps femeris* เป็นต้น สอดคล้องกับ Calkins and Sullivan. (2007) กล่าวว่า ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความนุ่มของเนื้อ จากค่าแรงตัดผ่านเนื้อ พบว่ากล้ามเนื้อ *Infraspinatus* มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำที่สุด มีค่าเท่ากับ 3.2 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร รองมาคือกล้ามเนื้อ *Supraspinatus* และกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 4.71 และ 5.15 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 คุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองอุบลราชธานีที่ระยะเวลาการบ่มแตกต่างกัน

Items	ชนิดกล้ามเนื้อ (A)			ระยะเวลาการบ่ม (วัน) (B)		ระดับนัยสำคัญทางสถิติ		
	IF	LD	SS	2	7	A	B	A x B
Shear force (kg/cm^2)	5.78^a	8.92^c	7.39^b	7.40	7.32	**	ns	ns
Thawing loss (%)	2.54^a	6.83^c	4.97^b	4.35^a	5.21^b	**	*	*
Cooking loss (%)	27.69^a	33.69^b	38.45^c	30.76^a	35.79^b	**	**	ns

^{abc}ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

* คือ $P<0.05$

** คือ $P<0.001$

ns คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ส่วนระยะเวลาการบ่มที่มีต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ พบว่า ที่ระยะเวลาการบ่ม 2 วัน มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อ เท่ากับ 7.40 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับระยะเวลาการบ่ม 7 วัน ที่มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อ เท่ากับ 7.32 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร ส่วนผลการศึกษาอิทธิพลร่วมของชนิดกล้ามเนื้อและระยะเวลาการบ่มต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.5) เนื่องจากภายหลังสัตว์ตายการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกายก็จะสิ้นสุดลง ในกล้ามเนื้อจะมีการย่อยสลายโดยไม่ใช้ออกซิเจน ทำให้ค่า pH ในเนื้อลดลง ส่งผลให้เอนไซม์ถูกกระตุ้นและเข้าย่อยสลายโปรตีนของเซลล์กล้ามเนื้อ การศึกษาครั้งนี้บ่มเพียง 7 วัน อีกทั้งเป็นโคพื้นเมืองที่ปล่อยเลี้ยงตามธรรมชาติ จึงไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีแนวโน้มว่ามีความนุ่มเพิ่มขึ้น ซึ่ง Lee *et al.* (2000) ทำการศึกษาค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่ระยะเวลาการบ่ม 3 7 และ 14 วัน พบว่ามีค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 10.07 8.10 และ 7.56 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร และการศึกษาของ Kim and Lee (2003) ศึกษาอิทธิพลของเกรดคุณภาพซากต่อลักษณะทางเคมี กายภาพ และประสาทสัมผัสในโคพื้นเมืองเกาหลี พบว่ามีค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่ระยะเวลาการบ่ม 1 7 และ 14 วัน มีค่าเท่ากับ 6.62 3.67 และ 3.04 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ในขณะที่การศึกษาของ Steen *et al.* (1997) ได้ทำการศึกษาค่าแรงตัดผ่านเนื้อในกล้ามเนื้อสันนอก (LT) ที่ระยะเวลาการบ่ม 1 5 8 และ 12 วัน พบว่า ค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีค่าลดลงตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้น

ในขณะที่ Monsón *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์และระยะเวลาการบ่มต่อความนุ่มของเนื้อโค โดยใช้ consumer test พบว่าทุกสายพันธุ์มีค่าความนุ่มของเนื้อเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม และ Stolowski *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อความนุ่มของเนื้อในกล้ามเนื้อ 7 ชนิด จากโค 3 สายพันธุ์ พบว่า เมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลง

4.4.2 ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการละลาย

การศึกษาค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการทำละลาย พบว่า กล้ามเนื้อสันนอก มีค่าการสูญเสียน้ำสูงที่สุด รองมาคือ กล้ามเนื้อสันในเทียม และกล้ามเนื้อใบพาย มีค่าเท่ากับ 6.83 4.97 และ 2.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) โดยกล้ามเนื้อสันนอกมีเส้นใยกล้ามเนื้อ type IIB มีสัดส่วนของ white fiber อยู่สูง และมีการสะสมปริมาณ glycogen สูง ดังนั้นการสลายพลังงานโดยไม่ใช้ออกซิเจนภายหลังสัตว์ตาย ส่งผลให้ค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพและจับน้ำได้ไม่ดี ความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อลดลง (Karlsson *et al.* 1999) นอกจากนี้ Joo *et al.* (2013) กล่าวว่า การหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ (rigor mortis) ภายหลังสัตว์ตาย ทำให้เกิดพื้นที่ว่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน perimysium และพื้นที่ว่างระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน epimysium ซึ่งอาจทำให้มีน้ำเข้าแทรกอยู่ระหว่างพื้นที่ว่างนั้น และเมื่อทำการละลายน้ำแข็ง จึงทำให้มีการสูญเสียน้ำออกมาระหว่างการทำละลาย และนอกจากนี้ขณะที่มีการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อมีการใช้พลังงานสูง ซึ่งการสลายพลังงานทำให้เกิดกรด ส่งผลให้ค่า pH อย่างรวดเร็วภายหลังสัตว์ตาย โดยค่า pH ที่ลดลงนี้จะส่งผลให้โปรตีนสามารถจับกับน้ำได้ลดลง สอดคล้องกับการศึกษาของ Jeremiah *et al.* (2003a) ซึ่งได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับคุณลักษณะทางเคมีของกล้ามเนื้อโค พบว่า กล้ามเนื้อสันนอก (striploin) มีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการทำละลายสูงถึง 14 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกล้ามเนื้อสันในเทียม (chuck tender) มีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการทำละลายประมาณ 11 เปอร์เซ็นต์ และกล้ามเนื้อใบพาย (flat iron) มีค่าสูญเสียการทำละลายประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาระยะเวลาการบ่มเนื้อต่อค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการทำละลาย พบว่า ระยะเวลาการบ่มที่ 2 วัน มีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการทำละลายต่ำกว่าที่ 7 วัน มีค่าเท่ากับ 4.35 และ 5.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งเกิดจากค่า pH ที่ลดลงส่งผลให้โปรตีนเสื่อมสภาพและจับน้ำได้ไม่ดี ทำให้มีการสูญเสียน้ำเพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับ Jaturasitha *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการทำละลายในกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* ของโค *Bos indicus* ที่ผ่านการบ่ม 4 องศาเซลเซียส เป็น

ระยะเวลา 45 นาที และ 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พบว่า ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการทำละลายเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้น โดยมีค่าเท่ากับ 8.18 และ 9.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.4.3 ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก

การศึกษาค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก พบว่า กล้ามเนื้อสันในเทียม (SS) มีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกสูงที่สุด เท่ากับ 38.45 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.001$) กับกล้ามเนื้อสันนอก (LD) และกล้ามเนื้อใบพาย (IF) มีค่าเท่ากับ 33.69 เปอร์เซ็นต์ และ 27.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และกล้ามเนื้อสันในเทียม (SS) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) กับกล้ามเนื้อใบพาย (IF) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้กล้ามเนื้อ *Infraspinatus* เป็นกล้ามเนื้อชนิด slow-twitch มีการสะสมไขมันแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน endomysium และ perimysium (Moon. 2006) ไขมันนี้จะห่อหุ้มกล้ามเนื้อส่งผลให้น้ำที่อยู่ในกล้ามเนื้อมีการสูญเสียน้อยเมื่อได้รับความร้อน อีกทั้งกล้ามเนื้อชนิด red muscle หรือกล้ามเนื้อ type I เป็นกล้ามเนื้อที่มีความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อสูง (Ryu and Kim. 2005) อาจส่งผลให้มีการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกเพียงเล็กน้อย แต่ในกล้ามเนื้อสันในเทียม เป็นกล้ามเนื้อชนิด intermediate-twitch มีไขมันสะสมในกล้ามเนื้อเล็กน้อย ซึ่งภายหลังจากการทำละลายยังคงมีน้ำหลงเหลืออยู่ภายในกล้ามเนื้อเนื่องจากมีไขมันห่อหุ้มไว้ และเมื่อได้รับความร้อนจึงทำให้มีน้ำสูญเสียออกมามากกว่ากล้ามเนื้อสันนอก อีกทั้งขนาดกล้ามเนื้อสันในเทียมที่ทำการศึกษาครั้งนี้มีขนาดเล็กกว่ากล้ามเนื้อใบพายและสันนอก เมื่อได้รับความร้อน อาจส่งผลให้มีการสูญเสียน้ำสูงกว่ากล้ามเนื้ออื่น ส่วนในกล้ามเนื้อสันนอกเป็นกล้ามเนื้อชนิด fast-twitch มีค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็วภายหลังสัตว์ตาย เมื่อได้รับความร้อนโปรตีนจะเสื่อมสภาพและไม่สามารถจับกับน้ำได้ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำมาก จากการศึกษาของ Von Seggern *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกในกล้ามเนื้อ 39 ชนิด จากซากที่มีน้ำหนักมากกว่า 250 กิโลกรัมขึ้นไป พบว่ากล้ามเนื้อ S*upraspinatus* มีการสูญเสียน้ำมากที่สุด รองมาคือ กล้ามเนื้อ *Infraspinatus* และกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* มีค่าเท่ากับ 39.67 38.48 และ 37.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยในกล้ามเนื้อใบพายไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกล้ามเนื้อสันในเทียมและกล้ามเนื้อสันนอก ($P>0.05$) ในขณะที่กล้ามเนื้อสันในเทียมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกล้ามเนื้อสันนอก และการศึกษาของ Jeremiah *et al.* (2003) ในกล้ามเนื้อสันในเทียม (chuck tender) มีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกสูงที่สุด รองมาคือกล้ามเนื้อใบพาย (flat iron) และสันนอก (striploin) มีค่าเท่ากับ 37 32 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาการบ่มต่อการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก พบว่า ค่าการสูญเสียน้ำเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Jaturasitha *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบว่ามีการสูญเสียน้ำเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ Anderson *et al.* (2012) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับคุณลักษณะทางการบริโภคในกล้ามเนื้อสันนอก ที่ระยะเวลาการบ่ม 1 3 7 และ 14 วัน พบว่ามีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้มีการทำงานของเอนไซม์ในกล้ามเนื้อเข้าย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อ ส่งผลให้ความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อลดลง และการปรุงสุกทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของโปรตีนในกล้ามเนื้อ (Modzelewska-Kapitula *et al.* 2015)

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

เนื้อโคที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มาจากโคพื้นเมืองที่เลี้ยงในเขตจังหวัดอุบลราชธานี ภายใต้ระบบการเลี้ยงแบบปล่อยหากินตามทุ่งหญ้าธรรมชาติ อายุเฉลี่ย 2 ปี น้ำหนักประมาณ 150 กิโลกรัม จำนวน 14 ตัว ทำการศึกษาอิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อ ได้แก่ กล้ามเนื้อใบพาย กล้ามเนื้อสันนอก และกล้ามเนื้อสันในเทียม ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ calpains การย่อยสลายโปรตีน troponin-T ปริมาณคอลลาเจน ที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน ผลการศึกษาสามารถสรุปได้ ดังนี้

1. การทำงานของเอนไซม์ calpains ได้แก่ μ-calpain และ m-calpain ในแต่ละชนิดกล้ามเนื้อ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนระยะเวลาการบ่มพบว่า μ-calpain มีการทำงานลดลงอย่างชัดเจน และไม่พบการทำงานภายหลัง 24 ชั่วโมงภายหลังสัตว์ตาย และ m-calpain ยังคงมีการทำงานอยู่แม้ว่าจะผ่านการบ่ม 21 วัน มีการทำงานลดลงเพียงเล็กน้อย

2. การย่อยสลายโปรตีน troponin-T ขนาด 37 กิโลดาลตัน พบว่ามีความเข้มของแถบโปรตีนสูงในกล้ามเนื้อสันนอกและกล้ามเนื้อสันในเทียม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกล้ามเนื้อใบพาย ซึ่งโปรตีนถูกย่อยสลายไปและพบความเข้มของแถบโปรตีน troponin-T ขนาด 30 กิโลดาลตัน มีค่าสูงในกล้ามเนื้อสันนอก และกล้ามเนื้อสันในเทียม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) กับกล้ามเนื้อใบพาย ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ calpains ในกล้ามเนื้อสันนอกเป็นกล้ามเนื้อชนิด fast-twitch เข้าสู่สภาวะการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อเร็ว ส่งผลให้มีแคลเซียมอิสระเข้มข้นออกมากระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ calpains รวดเร็ว จึงมีการสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อสูง อีกทั้งในกล้ามเนื้อใบพาย เป็นกล้ามเนื้อชนิด slow-twitch ซึ่งมีปริมาณโปรตีน calpastatin สูง ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ calpains ส่งผลให้มีการสลายโปรตีนน้อยกว่ากล้ามเนื้อสันนอก ส่วนระยะเวลาการบ่ม พบว่า มีการสลายของโปรตีน troponin-T เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม ($P<0.01$) ซึ่งระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้มีแคลเซียมอิสระมีความเข้มข้นสูงขึ้น กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ส่งผลให้มีการสลายโปรตีนได้เพิ่มขึ้น

3. ปริมาณคอลลาเจน พบว่า กล้ามเนื้อสันนอก มีปริมาณ soluble insoluble และ total collagen ต่ำกว่ากล้ามเนื้อสันในเทียม และกล้ามเนื้อใบพาย อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) ซึ่งในกล้ามเนื้อสันนอก เป็นกล้ามเนื้อชนิด fast-twitch อีกทั้งอยู่ในตำแหน่งที่มีการเคลื่อนไหวน้อย ส่งผลให้มีปริมาณคอลลาเจนต่ำ และ % solubility พบว่ามีค่าสูงในกล้ามเนื้อสันนอก และกล้ามเนื้อใบพาย ซึ่งในกล้ามเนื้อ

สันนอก อยู่ในตำแหน่งที่มีการเคลื่อนไหวน้อยส่งผลให้ cross-link ระหว่างโมเลกุลของคอลลาเจนไม่แข็งแรง ส่งผลให้มีการละลายของคอลลาเจนเมื่อได้รับความร้อนในสัดส่วนที่สูง ส่วนในกล้ามเนื้อใบพายนั้นมีการสะสมไขมันแทรกตามเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน endomysium และ perimysium ส่งผลให้ cross-link ระหว่างโมเลกุลของคอลลาเจนไม่แข็งแรง เมื่อได้รับความร้อนจึงมีการละลายของคอลลาเจนสูง ส่วนระยะเวลาการบ่ม พบว่า soluble collagen และ % solubility มีค่าสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้น ($P<0.01$ และ $P<0.05$ ตามลำดับ)

4. ค่าแรงตัดผ่านเนื้อในกล้ามเนื้อใบพายมีค่าต่ำกว่า กล้ามเนื้อสันในเทียม และกล้ามเนื้อสันนอก ($P<0.01$) ส่วนระยะเวลาการบ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ซึ่งระยะเวลาการบ่มเพียง 7 วัน อาจไม่เพียงพอให้เนื้อโคพื้นเมืองไทยมีความนุ่มเพิ่มขึ้น

5. ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการทำละลาย มีค่าต่ำในกล้ามเนื้อใบพาย กล้ามเนื้อสันในเทียม และกล้ามเนื้อสันนอก ตามลำดับ ($P<0.01$) ส่วนระยะเวลาการบ่มส่งผลให้มีการสูญเสียน้ำระหว่างการทำละลายสูงขึ้น ($P<0.05$)

6. ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก พบว่าในกล้ามเนื้อใบพาย มีค่าต่ำกว่าในกล้ามเนื้อสันนอก และกล้ามเนื้อสันในเทียม ตามลำดับ ($P<0.01$) ส่วนระยะเวลาการบ่มส่งผลให้มีการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกสูงขึ้น ($P<0.01$) ซึ่งความร้อนจะส่งผลให้โปรตีนเสื่อมสภาพและจับกับน้ำได้ไม่ดี อีกทั้งมีเอนไซม์ออกมาย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อส่งผลให้โปรตีนจับกับน้ำได้ลดลง

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การทำงานของเอนไซม์ calpains เข้าย่อยสลายโปรตีน troponin-T ขนาด 37 กิโลดาลตัน ทำให้พบความเข้มของแถบโปรตีน troponin-T ขนาด 30 กิโลดาลตัน ซึ่งการทำงานเอนไซม์ในกล้ามเนื้อนั้น มีโปรตีน calpastatin เป็นตัวขัดขวางการทำงาน ดังนั้นการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ calpains เพียงอย่างเดียว อาจไม่สามารถอธิบายถึงการย่อยสลายโปรตีน troponin-T ได้ จึงควรศึกษาควบคู่กับปริมาณโปรตีน calpastatin

2. การศึกษาความนุ่มของเนื้อด้วยค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ที่ระยะเวลาการบ่ม 2 และ 7 วัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ จึงควรเพิ่มระยะเวลาการบ่มเนื้อ อาจพบความแตกต่างด้านความนุ่มของเนื้อ ซึ่งโคที่กินหญ้าเพียงอย่างเดียวจะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่าปกติถึง 25 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงและเนื้อมีความเหนียว

บรรณานุกรม

กรมปศุสัตว์. 2547. **มาตรฐานของลักษณะประจำพันธุ์โคเนื้อ.** กรุงเทพฯ : กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เกล็ดแก้ว ด่านวิวัฒน์. 2546. **จุลกายวิภาคศาสตร์.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

จันทร์พร เจ้าทรัพย์. 2554. **เทคโนโลยีการฆ่าสัตว์.** กรุงเทพฯ :โครงการตำรา คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2552. "การใช้ประโยชน์จากเนื้อโคไทย." หน้า 5 - 34. ใน จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ พรรณิภา ศิวะพิรุฬห์เทพ (บรรณาธิการ). **คุณค่าเนื้อโคไทย**. กรุงเทพฯ : อมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์พับลิชชิง).

ชัยณรงค์ คัณธพนิต. 2529. **วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์.** กรุงเทพมหานคร : ไทยวัฒนาพานิช.

ทิพยาภรณ์ กุสี. กำลังตีพิมพ์. "ความสัมพันธ์ของชนิดกล้ามเนื้อต่อคุณลักษณะเนื้อของโคพื้นเมืองไทย." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พัชรา เอื้อพัฒนพงศ์. 2553. "คุณภาพเนื้อและปริมาณของโปรตีน calpastatin ระหว่างการบ่มในเนื้อโคไทย." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พร้อมลักษณ์ สมบูรณ์ปัญญากุล. 2555. "คุณค่าทางด้านโภชนาการของเนื้อโค : องค์ประกอบทางเคมี." กองส่งเสริมและพัฒนาการปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. [Online]. Available : http://extension.dld.go.th [05/01/2014]

อรพิน พิมพ์สมแดง. 2553. "การย่อยสลายโปรตีน และกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลุ่มคาลเปนในกล้ามเนื้อสันนอกของกวางรูซ่า." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สัญชัย จตุรสิทธา. 2550. **การจัดการเนื้อสัตว์.** เชียงใหม่ : ธณบรรณการพิมพ์.

Anderson, M.J., Lonergan, S.M., Fedler, C.A., Prusa, K.J., Binning, J.M. and Huff-Lonergan, E. 2012. "Profile of biochemical traits influencing tenderness of muscles from the beef round." **Meat Science.** 91 : 247 – 254.

Anonymous. 2012. "Skeletal Muscle Fiber." [Online]. Available :

http://on-line.ucol.ac.nz/mt100/Muscle%20Tissue.htm [25/01/2012]

Anonymous. 2015. [Online]. Available : http://general.utpb.edu [12/01/2015]

Anonymous. 2015. [Online]. Available : http://www.studyblue.com [12/01/2015]

Anonymous. 2015. [Online]. Available : http://www.pansportmedical.ro/english/sports_medicine/articles/Muscle_fiber_a_bidirectional_approach.html [19/02/2015]

Archile-Contreras, A.C., Mandell, I.B. and Purslow, P.P. 2010. "Disparity of dietary effects on collagen characteristics and toughness between two beef muscles." **Meat Science.** 86 : 491 – 497.

Boccard, R., Buchter, L., Casteels, M., Cosentino, E., Dransfield, E. and Hood, D.E. 1981. "Procedures for measuring meat quality characteristics in beef production experiments." **Livestock Product Science.** 8 : 385-397.

Boehm, M.L., Kendall, T.L., Thompson, V.F. and Goll, D.E. 1998. "Changes in the calpains and calpastatin during post-mortem storage of bovine muscle." **Journal of Animal Science.** 76 : 2415 - 2434.

Calkins, C.R. and Sullivan, G. 2007. "Ranking of beef muscles for tenderness." **Beef Facts : Product Enhancement.** Cattlemen's Beef Board.

Camou, J.P., Marchello, J. A., Thompson, V.F., Mares, S.W. and Goll, D.E. 2007. "Effect of post-mortem storage on activity of μ-calpain and m-calpain in five bovine muscles." **Journal of Animal Science.** 85 : 2670 - 2681.

Choi, Y.M. and Kim, B.C. 2009. "Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality." **Livestock of Science**. 122 : 105 – 118.

Chriki, S. Renand, G., Picard, B., Micol, D., Journaux, L. and Hocquette, J.F. 2013. "Meta-analysis of the relationships between beef tenderness and muscle characteristics." **Livestock Science.** : 424 – 434.

Christensen, M., Ertbjerg, P., Failla, S., Sañnudo, C., Richardson, R.I., Nute, G.R., Olleta, J.L., Panea, B., Albertí, P., Juárez, M., Hocquette, J.F. and Williams, J.L. 2011. "Relationship between collagen characteristics, lipid content and raw and cooked texture of meat from young bulls of fifteen European breeds." **Meat Science.** 87 : 61 - 65.

Claeys, E., Uytterhaegen, L., Buts, B. and Demeyer, D. 1995. "Quantification of beef myofibrillar

proteins by SDS-PAGE." **Meat Science.** 39 : 177 – 193.

Cruzen, S.M., Paulino P.V.R., Lonergan, S.M. and Huff-Lonergan, E. 2014. "Post-mortem proteolysis in three muscles from growing and mature beef cattle." **Meat Science.** 96 : 854 - 861.

Davis, J. P., Rall, A. A., Alionte, C. and Tikunova, S. B. 2004. "Mutation of hydrophobic residues in the N-terminal domain of troponin C affect calcium binding and exchange with the troponin C-troponin $_{196\text{-}148}$ complex and muscle force production." **The Journal of Biological Chemistry.** 17 : 17348 – 17360.

Dransfield, E., Martin, J.F., Bauchart, D., Abouelkaram, S., Lepetit, J., Culioli, J., Jurie, C. and Picard, B. 2003. "Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls." **Animal Science.** 76 : 387 – 399.

Dransfield, E. 1994. "Tenderness of meat, poultry and fish." 289 – 315. In Pearson, A. M. and Dutson, T. R. **Quality Attributes and their Measurement in Meat, Poultry and Fish Product.** Blackie Academic and Professional : London.

Dubost, A., Micol, D., Picard, B., Lethias, C., Andueza, D., Bauchart, D. and Listrat, A. 2013. "Structural and biochemical characteristics of bovine intramuscular connective tissue and beef quality." **Meat Science.** 95 : 555 – 561.

Fiedler, I., Ender, K., Wicke, M., Maak, S., Lengerken, G. and Meyer, W. 1999. " Structural and functional characteristics of muscle fibers in pigs with different malignant hyperthermia susceptibility [MHS] and different meat quality." **Meat Science.** 53 : 9 - 15.

Frame, M.C., Fincham, V. J., Carragher, N.O. and Wyke, J.A. 2002. "The calpain protease family." **Molecular Cell Biology.** 3 : 233 - 245.

Geesink, G.H., Koolmees, P.A., van Laack, H.L.J.M. and Smulders, F.J.M. 1995. " Determinants of tenderization in beef *longissimus dorsi* and *triceps brachii* muscles." **Meat Science.** 41 : 7 - 17.

Geesink, G.H., van der Palen, J.G.P., Kent, M.P., Veiseth, E., Hemke, G. and Koohmaraie, M. 2005. "Quantification of calpastatin using an optical surface plasmon resonance biosensor." **Meat Science.** 71 : 537 - 541.

Goll, D.E., Thompson, V.F., Taylora, R.G. and Christensen, J.A. 1991. "Role of the calpain system in

muscle growth." **Biochimie.** 74 : 225 - 237.

Goll, D.E., Thomson, V.F., Li, H., Wei, W. and Cong, J. 2003. "The Calpain System." **Physiological Review.** 83 : 731 – 801.

Hamm, W.C., Goldman, B.U., Heeschen, C., Kreymann, G., Berger, J. and Meinertz, T. 1997. "Emergency room triage of patients with acute chest pain by means of rapid testing for cardiac troponin T or troponin I." **The New England Journal of Medicine.** 337 : 1648 – 1653.

Hedrick, H.B., Aberle, E.D., Forrest, J.C., Judge, M.D. and Merkel, R.A. 1993. **Principles of Meat Science. 3rd ed.** Kendall/Hunt Publishing Co., Dubuque, Iowa.

Hildrum, K.I., Rødbotten, R., Høy, M., Berg, J., Narum, B. and Wold, J.P. 2009. "Classification of different bovine muscles according to sensory characteristics and Warner Bratzler shear force." **Meat Science.** 83 : 302 - 307.

Hill F. 1966. "The solubility of intramuscular collagen in meat animals of various ages." **Journal of Food Science.** 31 : 161 - 166.

Ho, C.Y., Stromer, M.H. and Robson, R.M. 1994. "Identification of the 30 kDa polypeptide in post-mortem skeletal muscle as a degradation product of troponin-T." **Biochimie.** 76 : 369 - 375.

Ho, C.Y., Stromer, M. H., Rouse, G., and Robson, R. M. 1997. "Effects of electrical stimulation and post-mortem storage on changes in titin, nebulin, desmin, troponin-T, and muscle ultrastructure in Bos indicus crossbred cattle." **Journal of Animal Science.** 75 : 366 - 367.

Houbak, M.B., Ertbjerg, P. and Therkildsen, M. 2008. "*In vitro* study to evaluate the degradation of Bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and μ-calpain." **Meat Science.** 79 : 77 – 85.

Jaturasitha, S., Thirawong, P., Leangwunta,V. and Kreuzer, M. 2004. "Reducing toughness of beef from *Bos indicus* draught steers by injection of calcium chloride : Effect of concentration and time post-mortem." **Meat Science.** 68 : 61 - 69.

Jeremiah, L.E., Dugan, M.E.R., Aalhus, J.L. and Gibson, L.L. 2003a. "Assessment of the chemical and cooking propoties of the major beef muscles and muscle groups." **Meat Science.** 65 : 985 – 992.

Jeremiah, L.E., Dugan, M.E.R., Aalhus, J.L. and Gibson, L.L. 2003b. "Assessment of the relationship between chemical components and palatability of major beef muscles and muscle groups." **Meat Science.** 65 : 1013 – 1019.

Jeremiah, L.E. and Gibson, L.L. 2003. "Cooking influence on the palatability of roasts from the beef hip." **Food Research International.** 36 : 1 – 9.

Ji, J.R., and Takahashi, K. 2006. "Changes in concentration of sarcoplasmic free calcium during Post-mortem ageing of meat." **Meat Science.** 73 : 395 - 403.

Joo, S.T., Kim G.D., Hwang, Y.H. and Ryu, Y.C. 2013. "Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics." **Meat Science.** 95 : 828 – 836.

Jurie, C., Picard, B., Hocquette, J.-F., Dransfield, E., Micol, D. and Listrat, A. 2007. "Muscle and meat quality characteristics of Holstein and Salers cull cows." **Meat Science.** 77 : 459 – 466.

Kalsson, A.H., Klont, R.E. and Fernandez, X. 1999. "Skeletal muscle fibers as factors for pork quality." **Livestock Production Science.** 60 : 255 – 269.

Kemp, C.M., Sensky, P.L., Bardsley, R.G., Buttery, P.J. and Parr, T. 2010. "Tenderness - an enzymatic view." **Meat Science.** 84 : 248 - 256.

Kerry, J. and Ledward, D. 2002. **"Meat Processing Improving Quality."** Cambridge : Woodhead publishing.

Kim, Y.H.B., Huff-Lonergan, E. and Lonergan S.M. 2012. "Effect of calcium lactate on m-calpain activity and protein degradation under oxidizing condition." **Food Chemistry.** 131 : 73 - 78.

Kim, C.J. and Lee, E.S. 2003. "Effects of quality grade on the chemical, physical and sensory characteristics of Hanwoo (Korean native cattle) beef." **Meat Science.** 63 : 397 – 405.

Klont, R.E., Brocks, L. and Eikelenboom, G. 1998. "Muscle fiber type and meat quality." **Meat Science.** 49 : 219 - 229.

Koohmaraie, M. 1994. "Muscle protinases and meat ageing." **Meat Science.** 36 : 93 – 104.

Koohmaraie, M. 1992. "Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteasome) : Purification characterization and comparison of its effects on myofibrils with μ-calpains." **Journal of Animal Science.** 70 : 3697 - 3708.

Koohmaraie, M. and Geesink, G.H. 2006. "Contribution of post-mortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system." **Meat**

Science. 74 : 34 - 43.

Lee, S., Stevenson-Barry, J.M., Fauffman, R.G. and Kim, B.C. 2000. "Effect of ion fluid injection on beef tenderness in association with calpain activity." **Meat Science.** 56 : 301 – 310.

Lepetit, J. 2007. "A theoretical approach of the relationships between collagen content, collagen cross-links and meat tenderness." **Meat Science.** 76 : 147 – 159.

Maiorano, G., Filetti, F., Salvatori, G., Gambacorta, M., Bellitti, A. and Oriani, G. 2001. "Growth, slaughter and intramuscular collagen characteristics in Garganica kids." **Small Ruminant Research.** 39 : 289 – 294.

Margaret, C., Frame, V. J., Fincham, N., Carragher, O. and John A. W. 2002. "The calpain protease family." **Molecular Cell Biological** 3 : 233 - 245.

Martini, F.H. 2006. "**Fundamentals of Anatomy And Physiology**." 7th ed. Pearson Education Inc., New York.

Modzelewska-Kapitula, M., Kwiatkowska, A., Jankowska, B. and Dabrowska, E. 2015. "Water holding capacity and collagen profile of bovine *m.infraspinatus* during post-mortem ageing." **Meat Science.** 100 : 209 – 216.

Modzelewska-Kapitula, M., Dabrowska, E., Jankowska, B., Kwiatkowska, A. and Cierach, M. 2012. "The effect of muscle, cooking method and final internal temperature on quality parameters of beef roast." **Meat Science.** 91 : 195 – 202.

Monsón, F., Sañudo, C. and Sierra, I. 2005. "Influence of breed and ageing time on the sensory meat quality and consumer acceptability in intensively reared beef." **Meat Science.** 71 : 471-479.

Moon, S.S. 2006. "The effect of quality grade and muscle on collagen content and tenderness of intramuscular connective tissue and myofibrillar protein for Hanwoo beef." **Journal of Animal Science.** 19 : 1059 – 1064.

Morgan, J.B., Wheeler, T.L., Koohmaraie, M., Savell, J.W. and Crouse, J.D. 1993. "Meat tenderness and the calpain proteolytic system in *longissimus* muscle of young bulls and steers." **Journal of Animal Science.** 71 : 1471 - 1476.

Muroya, S., Nakajima, I., Oe, M. and Chikuni, K. 2006. "Difference in post-mortem degradation pattern among troponin-T isoforms expressed in bovine *longissimus, diaphragm*, and *masseter* muscles." **Meat Science.** 72 : 245 - 251.

Muroya, S., Ertbjerg, P., Pomponio, L. and Christensen, M. 2010. "Desmin and troponin-T are degraded faster in type IIb muscle fibers than in type I fibers during post-mortem ageing of porcine muscle." **Meat Science.** 86 : 764 – 769.

Neath, K.E., Barrio, D.A.N., Lapitan, R.M., Herrera, J.R.V., Cruz b, L.C., Fujihara, T., Muroya, S., Chikuni, K., Hirabayashi, M. and Kanai, Y. 2007. "Protease activity higher in post-mortem water buffalo meat than Brahman beef." **Meat Science.** 77 : 389 – 396.

Nishimura, T., Hattori, A. and Takahashi, K. 1999. "Structural changes in intramuscular connective tissue during the fattening of Japanese black cattle : effect of marbling on beef tenderization." **Journal of Animal Science.** 77 : 93 - 104.

Nishimura, T., Hattori, A. and Takahashi, K. 1996. "Relationship between degradation of proteoglycans and weakening of the intramuscular connective tissue during post-mortem ageing of beef." **Meat Science.** 42 : 251 - 260.

Nishimura, T., Hattori, A. and Takahashi, K. 1995. "Structural weakening of intramuscular connective tissue during conditioning of beef." **Meat Science.** 39 : 127 – 133.

Nui, L., Rasco, B.A., Tang, J., Lai, K. and Huang, Y. 2015. "Relationship of changes in quality attributes and protein solubility of ground beef under pasteurization conditions." **Food Science and Technology.** 61 : 19 – 24.

O'connor, S.F., Tatum, J.D., Wulf, D.M., Green, R.D. and Smith, G.C. 1997. "Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos Taurus* cattle." **Journal of Animal Science.** 75 : 1822 - 1830.

Ouali, A. 1992. " Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development." **Biochimie.** 74 : 251 - 265.

Ouali, A., and Talmant, A. 1990. "Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and Ovine skeletal muscles." **Meat Science.** 28 : 331 - 348.

Oury, M.P., Picard, B., Briand, M., Blanquet, J.P. and Dumont, R. 2009. "Interrelationships between meat quality traits, texture measurements and physicochemical characteristics of M. *rectus abdominis* from Charolais heifers." **Meat Science.** 83 : 293 – 301.

Picard, B., Lefaucheur, L., Berri, C. and Duclos, M.J. 2002. "Muscles fiber ontogenesis in farm animal species." **Reproduction Nutrition Development**. 42 : 415 - 431.

Pomponio, L. and Ertbjerg, P. 2012. "The effect of temperature on the activity of μ- and m-calpain and calpastatin during post-mortem storage of porcine *longissimus* muscle." **Meat Science.** 91 : 50 – 55.

Pringle, 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." **Journal of Animal Science.** 75 : 2955 - 2961.

Ryu, Y.C. and Kim, B.C. 2005. "The relationship between muscle fiber characteristic, post-mortem metabolic rate and meat quality of pig *longissimus dorsi* muscle." **Meat Science.** 71 : 351 – 357.

Schönfeldt, H.C. and Strydom, P.E. 2011. "Effect of age and cut on tenderness of South African beef." **Meat Science.** 87 : 206 – 218.

Sentandreu, M.A., Coulis, G. and Ouali, A. 2002. "Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness." **Trends in Food Science and Technology.** 13 : 400 – 421.

Steen, D., Claeys, E., Uytterhaegen, L., De Smet, S. and Demeyer, D. 1997. "Early post-mortem conditions and the calpain/calpastatin system in relation to tenderness of double-muscled beef." **Meat Science.** 45 : 307 – 319.

Stolowski, G.D., Baird, B.E., Miller, R.K., Savell, J.W., Sams, A.R., Taylor, J.F., Sanders, J.O. and Smith, S.B. 2006. "Factors influencing the variation in tenderness of seven major beef muscles from three Angus and Brahman breed crosses." **Meat Science.** 73 : 475 - 483.

Sunwoo, H.H., Li, X., Lee, E.N., Kim, Y.K., and Sim, J.S. 2000. "Preparation of antigen specific IgY for food application." 311-322 In Sim, J.S., Nakai, S. and Guenter, W. **Egg nutrition and biotechnology.** CAB International : New York.

Torrescano, G., Sánchez-Escalante, A., Giménez, B., Roncalés, P. and Beltrán, J.A. 2003. "Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics." **Meat Science.** 64 : 85 – 91.

Uytterhaegen, L., Claeys, E. and Demeyer, D. 1994. " Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility." **Journal of Animal Science.** 72 : 1209 - 1223.

Veiseth, E., Shackelford, S.D., Wheeler, T L., and Koohmaraie, M. 2004 . "Factors regulating lamb *longissimus* tenderness are affected by age at slaughter." **Meat Science.** 68 : 635-640.

Vestergaard, M., Therkildsen, M., Henckel, P., Jensen, L.R., Andersen, H.R. and Sejrsen, K. 2000. "Influence of feeding intensity, grazing and finishing feeding on meat and eating quality of young bulls and the relationship between muscle fiber characteristics, fiber fragmentation and meat tenderness." **Meat Science.** 54 : 187 – 195.

Von Seggern, D.D., Calkins, C.R., Johnson, D.D., Brickler, J.E. and Gwartney, B.L. 2005. "Muscle profiling : Characterizing the muscles of the beef chuck and round." **Meat Science.** 71 : 39 – 51.

Warriss, P. D. 2000. **Meat Science** : An Introductory Text. CAB International : New York.

Whipple, G. and Koohmaraie, M. 1992. " Effects of lamb age, muscles type, and 24-hour activity of endogenous proteinases on post-mortem proteplysis." **Journal of Animal Science.** 70 : 798 - 804.

Wu, A. H. B. 2004. "Role of cardiac troponin in the recent redefinition of acute myocardial infarction." **Clinical Laboratory Science**. 17 : 50 - 52.

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. Calpains : Casein zymography

1.1 Sample extraction buffer

- 50 mM Tris pH 7.5 6.057 g
- 5mM EDTA 1.86 g
- Distilled water 700 ml
- HCl

ละลาย Tris และ EDTA ด้วย Distilled water ปรับ pH ให้เป็น 7.5 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วย Distilled water จากนั้นทำการเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

1.2 Gel sample buffer (10ml)

- Glycerol 2 ml
- 1M Tris pH 6.8 1.25 ml
- 1M DTT (0.154g/ml) หรือ 2-mercaptoethanol 1 ml
- Bromophenol blue
- Distilled water

ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ml ด้วย Distilled water

1.3 Tris 2M pH 8.8 (1L)

- Tris 243 g
- Distilled water 700 ml
- HCl

ละลาย Tris ด้วย Distilled water จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8.8 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วย Distilled water จากนั้นทำการเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

1.4 Casein solution (10ml)

- 10mg/ml casein 100 mg
- 2M Tris pH 8.8 3.75 ml
- Distilled water 6.25 ml

การเตรียม Gel

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

1.5 Electrophoresis buffer (5x Stock)

- 125mM Tris base 15.14 g
- 625mM Glycine 46.92 g
- 5mM EDTA 1.86 g
- 1mM DTT หรือ 2-Mercaptanol
- Distilled water

ละลาย Tris Glycine และ EDTA ด้วย Distilled water แล้วปรับ pH 8.3 ก่อนใช้ dilute เป็น 1x ด้วย Distilled water แล้ว เติม 1mM DTT 1 ml/1000ml

1.6 Calcium incubation (5x stock)

- 50mM Tris pH7.0 30.30 g
- 5mM $CaCl_2$ 3.68 g
- 10 mM DTT
- Distilled water

ละลาย Tris และ $CaCl_2$ ด้วย Distilled water แล้วปรับ pH 7.0 ก่อนใช้ dilute เป็น 1x ด้วย Distilled water แล้ว เติม 10mM DTT 10 ml/1000ml

1.7 Fixing solution

- 10% (v/v) acetic acid
- Distilled water

1.8 Staining solution

- 0.2% (w/v) coomassie brilliant blue
- 0.2%(w/v) amido black
- 10%(v/v) acetic acid
- 40%(v/v) methanol
- Distilled water

1.9 Destain solution

- 10% acetic acid
- 40%(v/v) methanol
- Distilled water

2. Troponin-T : Western blot

2.1 การเตรียมสารละลายสำหรับสกัดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ

2.1.1 Sample extraction buffer

- 50mM Tris 6.057 g

- 5mM EDTA 1.86 g
- Distilled water 700 ml
- HCl

ละลาย Tris และ EDTA ด้วย Distilled water ปรับ pH ให้เป็น 7.5 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วย Distilled water จากนั้นทำการเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

2.1.2 10% SDS (10ml)

- SDS 1 g
- Distilled water 10 ml

2.1.3 Tris 1M pH 6.8 (1 L)

- Tris 121.14 g
- Ditilled water 700 ml
- HCl

ละลาย Tris ด้วย Distilled water จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วย Distilled water จากนั้นทำการเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

2.1.4 Gel sample buffer (2X SDS mix)

- Glycerol 2 ml
- 1M Tris pH 6.8 1.25 ml
- 10% SDS 4 ml
- 1M DTT (0.154g/ml) หรือ 2-mercaptoethanol 1 ml
- Bromophenol blue
- Distilled water

ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ml ด้วย Distilled water

2.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีน

2.2.1 0.1M NaOH (1L)

- NaOH
- Distilled water 1000 ml

2.2.2 Solution A

- 2% Na_2CO_3 in o.1M NaOH 5 ml
- 1% $CuSO_4$ 0.5 ml
- 2%KNa Tartrate 0.5 ml

2.2.3 Solution B

- 0.1M NaOH 5 ml
- Folin's Clocaltev's reagent 0.5 ml

2.3 การเตรียม Standard BSA (bovine serum albumin)

เตรียม STD BSA ความเข้มข้น 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 และ 110 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จาก stock BSA 5 mg/ml

ความเข้มข้น BSA (µg/ml)	ปริมาณ BSA (µl)	ปริมาณ NaOH (ml)
0	0	5
10	50	4.95
20	100	4.90
30	150	4.85
40	200	4.80
50	250	4.75
60	300	4.70
70	350	4.65
80	400	4.60
90	450	4.55
100	500	4.50
110	550	4.45

2.4 การเตรียมสารละลายสำหรับ SDS-PAGE

2.4.1 Tris 3M pH 8.8 (1L)

- Tris 365 g
- Distilled water 700 ml
- HCl

ละลาย Tris ด้วย Distilled water จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8.8 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วย Distilled water จากนั้นทำการเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

2.4.2 Tris 2M pH 8.8 (1 L)

- Tris 3M pH 8.8 666 ml
- Distilled water 334 ml

2.4.3 Tris 1M pH 6.8 (1 L)

- Tris 121.14 g
- Ditilled water 700 ml
- HCl

ละลาย Tris ด้วย Distilled water จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วย Distilled water จากนั้นทำการเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

2.4.4 10% SDS (10ml)

- SDS 1 g
- Distilled water 10 ml

2.4.5 10% Ammonium persulphate solution ; APS (1 ml) เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

- Ammonium persulphate 0.1 g
- Distilled water 1 ml

2.4.6 1% Bromophenol blue (10 ml)

- Bromophenol blue 0.01 g
- Distilled water 10 g

2.4.7 Running buffer (5X) (1L)

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

ละลาย Glycine Tris และ SDS ด้วย Distilled water จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วย Distilled water เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

2.5 การเตรียม Gel

Solution	2 Gel		4 Gel	
	Resolving gel	Stacking gel	Resolving gel	Stacking gel
Acrylamide:bis mix 30% w/v (37.5:1)	4 ml		8 ml	
Acrylamide:bis		1.19 ml		2.38 ml
2 M Tris-HCl, pH 8.8	1.88 ml		3.76 ml	
1 M Tris-HCl, pH 6.8		0.88 ml		1.76 ml
10%SDS	0.1 ml	70 µl	0.2	140 µl
Water	3.93 ml	4.76 ml	7.86 ml	9.52 ml
Mix				
TEMED	8 µl	11 µl	16 µl	22 µl
10%(w/v)Ammonium persulphate solution	80 µl	110 µl	160 µl	220 µl

2.6 การเตรียมสารละลายสำหรับเทคนิค Western blot

2.6.1 Transfer buffer (1L)

- 400mM Glycine 30 g
- 25mM Tris 3 g
- 2-propanol 50 ml
- Distilled water

ละลาย Glycine และ Tris ด้วย 2-propanol จากนั้นเติม Distilled water ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml เก็บไว้ในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส

2.6.2 Stock 10x TBS (800 ml)

- NaCl 72 g
- 1M Tris pH 7.5 160 ml
- Distilled water

ละลาย NaCl ด้วย 1M Tris แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 800 ml

2.6.3 TBS-T

- TBS 10x 100 ml
- Distilled water 900 ml
- 0.1% Tween 20 1 ml

2.6.4 Ponceau S stain

- 0.5% (w/v) Ponceau S 0.5 g
- 5% (w/v) Trichloroacetic acid 5 g
- Distilled water 100 ml

2.6.5 Blocking buffer

- 5% Skim milk 25 g
- TBS-T 500 ml

2.6.6 Washing buffer

- 1% Skim milk 5 g
- TBS-T 500 ml

3. Collagen : Collagen content

3.1 Ringer's solution

- 32.75 mM NaCl 1.916 g
- 1.5 mM KCl 0.1118 g
- 0.5mM $CaCl_2$ 0.073 g
- Distilled water

ละลาย NaCl KCl และ $CaCl_2$ ด้วย Distilled water ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml เก็บไว้ในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส

3.2 Oxidant solution

a) Chloramine-T reagent

- 7%(w/v) Chloramine T
- Distilled water

b)Acetate/citrate buffer pH 6.0

- Sodium acetate 57 g
- Trisodium citrate 37.5 g
- Citric acid 5.5 g
- 2-propanol 385 ml
- Distilled water
- NaOH

นำสารละลาย (a) มาผสมในสารละลาย (b) ด้วยอัตราส่วน 1:4 เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.3 Ehrlich's reagent solution

a) p-Dimethyamino-benzagehyde in 60% $HClO_4$ made up daily

- p-Dimethyamino-benzagehyde 2 g
- 60%Perchloric acid 3 ml

b) 2-propanol

นำสารละลาย (a) มาผสมในสารละลาย (b) ด้วยอัตราส่วน 3:13 เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.4 Hydroxyproline standard solution

เตรียม STD Hydroxyproline ความเข้มข้น 0 0.2 0.5 0.7 1.0 1.5 2 2.5 3 3.5 4 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จาก stock Hydroxyproline 1 mg/ml

ความเข้มข้น Hydroxyproline (µg/ml)	ปริมาณ Hydroxyproline (ml)	ปริมาณ H_2O (ml)
0	0	10
0.2	0.2	9.8
0.5	0.5	9.5
0.7	0.7	9.3
1.0	1.0	9.0
1.5	1.5	8.5
2.0	2.0	8
2.5	2.5	7.5
3.0	3.0	7
3.5	3.5	6.5
4.0	4.0	6
5.0	5.0	5

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ 1ข ค่าเฉลี่ย ค่าต่ำสุด สูงสุด และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการบ่ม และค่าการสูญเสียน้ำระหว่างปรุงสุก ในกล้ามเนื้อ 3 ชนิด ที่ระยะเวลาการบ่ม

Items	Ageing	Muscle	Mean	Minimum	Maximum	STD
Shear force (kg/cm^2)	2 day	IF	6.05	4.14	8.21	0.32
		LD	8.71	2.45	13.14	0.75
		SS	7.44	5.82	9.06	0.25
	7 day	IF	5.51	3.52	7.05	0.28
		LD	9.12	3.04	13.56	0.77
		SS	7.33	4.54	9.61	0.38
Drip loss	2 day	IF	2.27	1.30	4.42	0.25
		LD	6.97	0.90	11.90	0.78
		SS	3.80	1.45	8.51	0.44
	7 day	IF	2.80	1.06	4.95	0.32
		LD	6.69	1.75	12.60	0.78
		SS	6.14	2.94	8.70	0.47
Cooking loss	2 day	IF	27.05	16.66	35.65	1.60
		LD	29.77	11.36	37.50	1.75
		SS	35.60	30.93	40.96	0.79
	7 day	IF	28.33	10.16	53.92	2.73
		LD	37.60	13.33	58.06	2.58
		SS	41.45	36.06	44.62	0.65

ตารางที่ 2ข ค่าเฉลี่ย ค่าต่ำสุด สูงสุด และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทำงานเอนไซม์คาลเปน ในกล้ามเนื้อ 3 ชนิด

Item	Muscle	Mean	Minimum	Maximum	STD
calpain I	IF	6.52	3.04	8.68	0.47
	LD	6.37	3.38	9.37	0.52
	SS	6.69	3.94	8.51	0.34
calpain II	IF	5.32	0.97	8.69	0.64
	LD	4.30	1.41	7.71	0.50
	SS	5.10	1.62	7.95	0.50

ตารางที่ 3ข ค่าเฉลี่ย ค่าต่ำสุด สูงสุด และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของปริมาณคอลลาเจนในกล้ามเนื้อ 3 ชนิด ที่ระยะเวลาการบ่มต่าง ๆ

Muscle	Ageing	Item	Mean	Minimum	Maximum	STD
IF	0	soluble collagen	0.449	0.146	0.719	0.04
		insoluble collagen	7.048	1.188	12.412	0.79
		total collagen	7.498	1.334	12.983	0.81
		%soluble collagen	6.748	3.600	12.007	0.77
	7	soluble collagen	0.578	0.181	1.333	0.02
		insoluble collagen	8.375	2.385	21.498	0.85
		total collagen	8.953	2.717	22.189	0.86
		%soluble collagen	7.579	3.114	16.904	0.87
	21	soluble collagen	0.698	0.358	1.488	0.04
		insoluble collagen	8.304	4.030	14.224	0.905
		total collagen	9.002	4.949	15.712	0.937
		%soluble collagen	8.418	3.513	18.562	0.666

ตารางที่ 3ข (ต่อ) แสดงค่าเฉลี่ย ค่าต่ำสุด สูงสุด และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของปริมาณคอลลาเจนในกล้ามเนื้อ 3 ชนิด ที่ระยะเวลาการบ่มต่างๆ

Muscle	Ageing	Item	Mean	Minimum	Maximum	STD
LD	0	soluble collagen	0.302	0.090	0.529	0.08
		insoluble collagen	5.711	0.750	13.525	1.408
		total collagen	6.014	0.840	13.783	1.45
		%soluble collagen	6.313	1.866	13.120	1.103
	7	soluble collagen	0.396	0.072	1.256	0.07
		insoluble collagen	5.545	1.214	11.863	0.91
		total collagen	5.941	1.303	13.119	0.967
		%soluble collagen	7.131	3.274	11.304	0.749
	21	soluble collagen	0.497	0.232	0.917	0.07
		insoluble collagen	5.149	0.981	8.658	1.402
		total collagen	5.641	1.224	9.330	1.429
		%soluble collagen	11.029	2.839	28.133	0.88
SS	0	soluble collagen	0.491	0.238	0.781	0.083
		insoluble collagen	8.049	2.194	14.221	0.799
		total collagen	8.540	2.518	15.001	0.825
		%soluble collagen	6.419	3.749	12.871	1.150
	7	soluble collagen	0.544	0.130	1.279	0.054
		insoluble collagen	10.087	2.254	18.964	0.735
		total collagen	10.631	2.563	19.335	0.737
		%soluble collagen	6.123	1.920	12.047	2.079
	21	soluble collagen	0.545	0.206	0.771	0.051
		insoluble collagen	10.649	3.397	17.139	1.376
		total collagen	11.740	3.771	17.909	1.40
		%soluble collagen	5.384	2.159	13.944	0.955

ตารางที่ 4ข ความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพเนื้อ การทำงานของเอนไซม์ calpain I calpain II ปริมาณ soluble, insoluble และ total collagen % solubility และความเข้มของแถบโปรตีน troponin-T ขนาด 37 kDa 30 kDa และ %30 kDa ที่ระยะเวลาการบ่มแตกต่างกัน

	TL2	CL2	TL7	CL7	CI	CII	S0	I0	T0	PS0	S7	I7	T7	PS7	S21	I21	T21	PS21	37k0	30k0	37k7	30k7	37k21	30k21
SF2	0.45**	0.15	0.44**	0.44**	-0.16	-0.29	-0.13	0.02	0.02	-0.27	-0.07	0.04	0.03	-0.11	-0.20	-0.07	-0.08	-0.01	0.13	-0.01	0.15	-0.02	0.14	0.20
SF7	0.51***	0.19	0.39*	0.47**	-0.03	-0.15	-0.10	0.02	0.02	-0.18	-0.17	-0.01	-0.02	-0.10	-0.13	-0.07	-0.08	0.11	0.13	0.17	0.22	0.00	0.19	0.29
TL2		0.23	0.60***	0.30	-0.04	-0.07	-0.18	-0.07	-0.08	-0.04	-0.17	-0.19	-0.19	-0.04	-0.23	-0.20	-0.21	0.23	0.35*	-0.14	0.36*	0.21	0.35*	0.32*
CL2			0.45**	0.63***	0.17	0.36	0.23	0.41**	0.41**	-0.25	0.03	0.11	0.10	-0.06	0.21	0.10	0.11	0.20	0.12	0.01	0.34*	0.05	0.24	0.08
TL7				0.42**	0.00	0.04	-0.09	0.20	0.19	-0.25	0.15	-0.10	-0.08	0.09	-0.04	-0.05	-0.05	0.11	0.38*	0.00	0.42**	0.11	0.43**	0.25
CL7					-0.04	0.08	-0.04	0.19	0.18	-0.24	-0.07	0.07	0.06	-0.14	-0.03	0.08	0.08	0.05	0.06	0.20	0.30	0.07	0.37	0.18
CI						0.75***	0.13	0.00	0.01	0.17	0.05	0.23	0.22	-0.14	0.10	0.31*	0.32*	-0.29	-0.13	-0.04	-0.12	-0.29	0.05	-0.11
CII							0.20	0.20	0.20	-0.05	0.20	0.09	0.10	0.15	0.46**	0.30	0.32*	0.01	0.01	0.09	-0.01	-0.33*	0.00	-0.18

SF = shear force TL= thawing loss CL = cooking loss CI = calpain I CII = calpain II

S0 = soluble collagen 0 day , S7 = soluble collagen 7 day , S21 = soluble collagen 21 day

I0 = insoluble collagen 0 day , I7 = insoluble collagen 7 day , I21 = insoluble collagen 21 day

T0 = total collagen 0 day , T7 = total collagen 7 day , T21 = total collagen 21 day

PS0 = %solubility 0 day , PS7 = %solubility 7 day , PS21 = %solubility 21 day

37k0 = troponin-T 37 kDa 0 day, 37k7 = troponin-T 37 kDa 7 day, 37k21 = troponin-T 37 kDa 21 day

30k0 = troponin-T 30 kDa 0 day, 37k7 = troponin-T 30 kDa 7 day, 30k21 = troponin-T 30 kDa 21 day

* Correlation significant at $P<0.05$

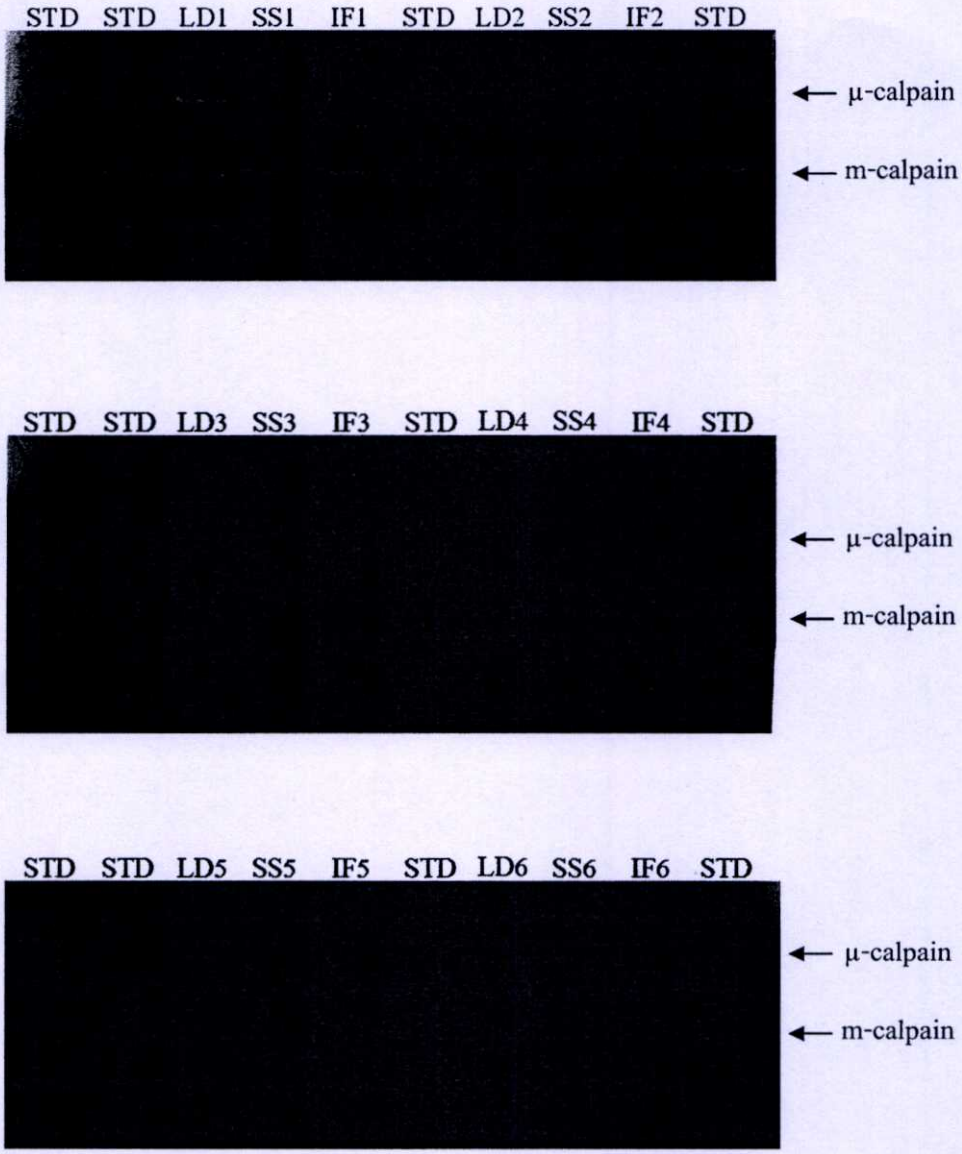
** Correlation significant at $P<0.01$

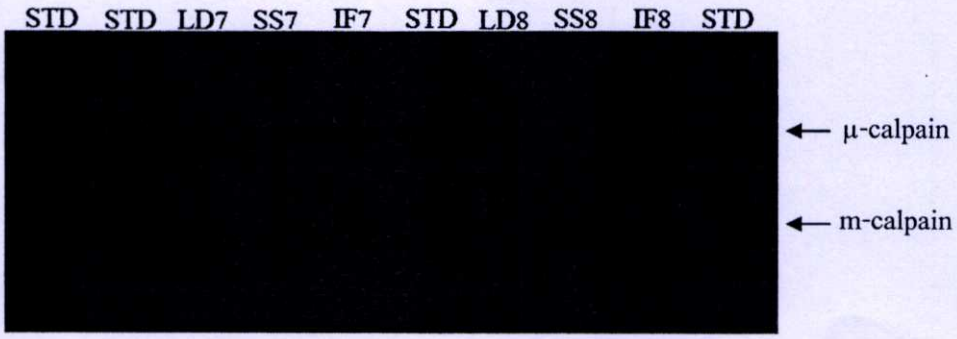
*** Correlation significant at $P<0.001$

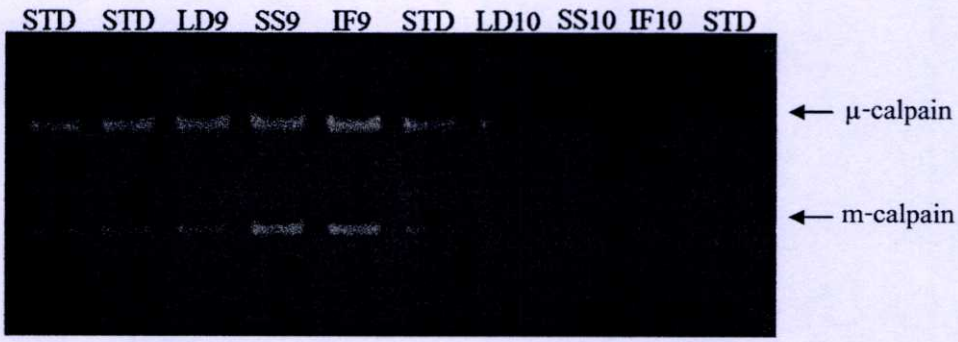
ภาคผนวก ค

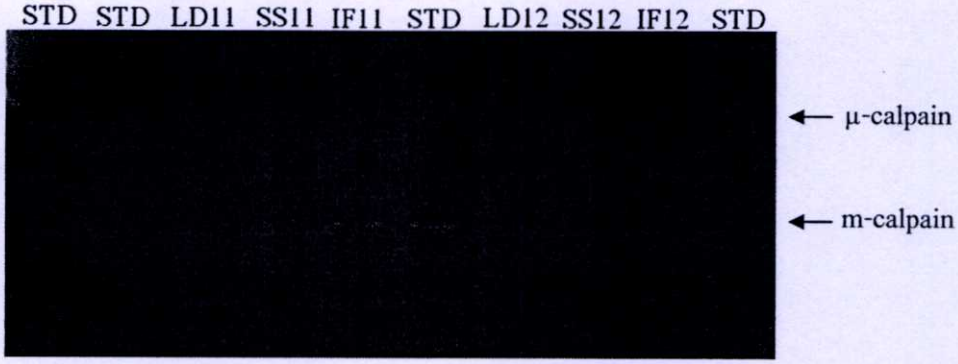
รูปภาพ

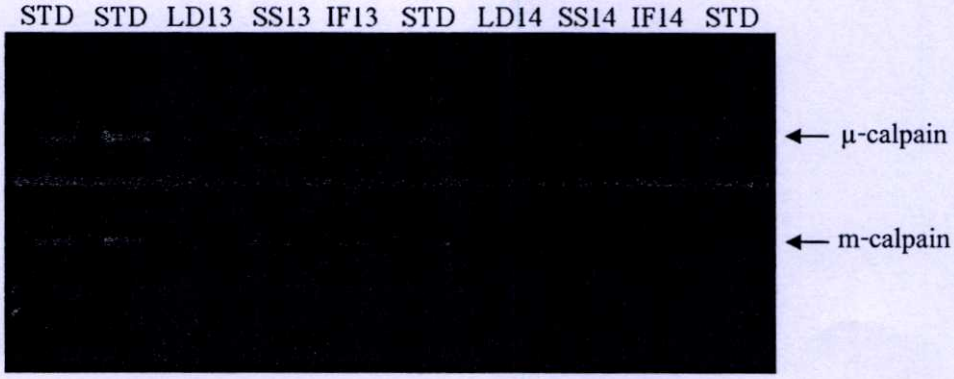
ภาพแสดงการย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์ μ-calpain และ m-calpain




STD STD LD7 SS7 IF7 STD LD8 SS8 IF8 STD
μ-calpain
m-calpain


STD STD LD9 SS9 IF9 STD LD10 SS10 IF10 STD
μ-calpain
m-calpain


STD STD LD11 SS11 IF11 STD LD12 SS12 IF12 STD
μ-calpain
m-calpain


STD STD LD13 SS13 IF13 STD LD14 SS14 IF14 STD
μ-calpain
m-calpain

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสไบพร มะเดื่อ
วัน เดือน ปีเกิด	25 ธันวาคม 2530
ที่อยู่	53 หมู่ 10 ตำบลหัวช้าง อำเภออุทุมพรพิสัย จังหวัดศรีสะเกษ 33120
ประวัติการศึกษา	2552 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานวิชาการ	ผลงานตีพิมพ์ "อิทธิพลของชนิดกล้ามเนื้อ และระยะเวลาการบ่มต่อปริมาณคอลลาเจนในโคพื้นเมืองไทยจากจังหวัดกาญจนบุรีและอุบลราชธานี." *ใน* **การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีเนื้อสัตว์ ครั้งที่ 3**. วันที่ 21-22 มิถุนายน พ.ศ. 2555. ศูนย์แสดงสินค้าและการประชุม อิมแพ็ค เมืองทองธานี นนทบุรี หน้า 96-101.