การสลายตัวของโปรตีน Troponin-T และความนุ่มของเนื้อโคกำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมืองที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน

DEGRADATION OF TROPONIN-T PROTEIN AND MEAT TENDERNESS IN KAMPAENGSAEN AND NATIVE BEEF AT DIFFERENT AGEING PERIODS

ชั้นทวัฒน์ อาชวาคม

CHANTAWAT ARTCHAWAKOM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-AG-M-031-020

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การสลายตัวของโปรตีน Troponin-T และความนุ่มของเนื้อโคกำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมืองที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน

DEGRADATION OF TROPONIN-T PROTEIN AND MEAT TENDERNESS IN KAMPAENGSAEN AND NATIVE BEEF AT DIFFERENT AGEING PERIODS

ฉันทวัฒน์ อาชวาคม

CHANTAWAT ARTCHAWAKOM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-AG-M-031-020

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....T105290
วัน,เดือน,ปี.....18 พ.ย. 2552

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

DEGRADATION OF TROPONIN-T PROTEIN AND MEAT TENDERNESS IN KAMPAENGSAEN AND NATIVE BEEF AT DIFFERENT AGEING PERIODS

CHANTAWAT ARTCHAWAKOM

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

2009

KMITL-2009-AG-M-031-020

COPYRIGHT 2009

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสลายตัวของโปรตีน troponin-T และความนุ่มของเนื้อโคกำแพงแสน และเนื้อโคพื้นเมืองที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน
นักศึกษา	นายฉันทวัฒน์ อาชวาคม
รหัสประจำตัว	48065405
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สัตวศาสตร์
พ.ศ.	2552
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร.จุฑารัตน์ เศรษฐกุล

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสลายตัวของโปรตีน troponin-T (Tn-T) และความนุ่มของเนื้อโคกำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมืองที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน โดยเนื้อได้มาจากโคเนื้อลูกผสมสายพันธุ์กำแพงแสน (KU) (Charolais 50% x Brahman 25% x โคพื้นเมืองไทย 25%) น้ำหนักมีชีวิต 544.64±29.86 กิโลกรัม เลี้ยงภายใต้ระบบการผลิตของสหกรณ์โคเนื้อกำแพงแสน จำนวน 15 ตัว และโคพันธุ์พื้นเมืองไทย (NA) ที่เลี้ยงโดยการปล่อยแทะเล็มหญ้าอย่างอิสระ น้ำหนักมีชีวิต 198.43±11.23 กิโลกรัม จำนวน15 ตัว ตัวอย่างเนื้อโคที่ใช้ในการศึกษา ได้มาจากกล้ามเนื้อสันนอก (longissimus dorsi) บริเวณซี่โครงคู่ที่ 6-12 ของซากซีกซ้ายซึ่งถูกนำไปเก็บที่ห้องเย็นอุณหภูมิประมาณ 0-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำก้อนเนื้อสันนอกมาตัดแบ่ง ให้ได้รูปแบบชิ้นเนื้อสเต็กหนา 2.5 เซนติเมตร 5 ชิ้น บรรจุในถุงสุญญากาศนำไปเก็บในห้องเย็นอุณหภูมิประมาณ 0-4 องศาเซลเซียส เนื้อแต่ละชิ้นจะถูกนำมาตรวจวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (WBSF) และวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีน Tn-T โดยเทคนิค western blot ที่ระยะเวลาการบ่มเนื้อ 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน ภายหลังจากสัตว์ตาย ผลการศึกษาพบว่าชนิดของเนื้อโคมีอิทธิพลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ โดยเนื้อจากโค KU มีค่า WBSF ต่ำกว่าเนื้อโค NA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้นค่าแรงตัดผ่านเนื้อโค KU ลดลงจนถึงวันที่ 30 แต่ในเนื้อโค NA ค่าแรงตัดผ่านเนื้อไม่ลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาการบ่มนานกว่า 14 วัน และค่าความเข้มโปรตีน Tn-T 39 kDa, Tn-T 30 kDa และ Tn-T 28 kDa ในเนื้อโค KU มีค่ามากกว่าเนื้อโค NA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) แต่ Tn-T 37 kDa ในเนื้อโคทั้ง 2 ชนิดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) สำหรับ Tn-T 26 kDa นั้นพบเฉพาะในเนื้อโค NA ที่ระยะเวลาบ่ม 30 วัน จำนวน5 ตัวอย่างทดลองเท่านั้น ในส่วนของการเปลี่ยนแปลง Tn-T 30 kDa และ Tn-T 28 kDa จะมีค่าความเข้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p<0.01$) ในขณะที่ Tn-T 39 kDa และ Tn-T 37 kDa มีค่า

ความเข้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p<0.01$) ทุกช่วงของระยะเวลาบ่ม นอกจากนี้พบว่าค่าสหสัมพันธ์ของค่าแรงตัดผ่านเนื้อโค NA มีค่าความสัมพันธ์ในทางลบระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับค่าความเข้มของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 7, 14 และ 21 ของการบ่มเนื้อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p<0.05$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับค่าความเข้มของโปรตีนในเนื้อโค KU

Thesis Title	Degradation of Troponin-T Protein and Meat Tenderness in Kampaengsaen and Native Beef at Different Ageing Periods
Student	Mr.Chantawat Artchawakom
Student ID.	48065405
Degree	Master of Science
Program	Animal Science
Year	2009
Thesis Advisor	Dr. Kanya Jirajaroenrat
Thesis Co-advisor	Assoc. Prof. Dr. Jutarat Sethakul

ABSTRACT

The objectives of this study were to study degradation of troponin-T (Tn-T) protein and meat tenderness in Kampaengsaen and Native beef at different ageing periods. Beef samples were taken from carcasses from Kampaengsaen crossbred (KU; n=15) (50% Charolais x 25% Brahman x 25% native Thai) under condition of the Production System of Kampaengsaen Beef Cooperative weighed 544.64±29.86 kg and Native cattle (NA; n=15), weighed 198.43±11.23 kg and freely grazed natural forage. Beef longissimus dorsi (LD) muscles were collected from the 6^{th} to the 12^{th} ribs of the abdominal region and transferred to at KMITL laboratory. After 24 hr postmortem storage at 0-4 °C , LD muscles were cut into 2.5-cm-thick steaks and vacuum package stored at 0-4 °C for 1, 7, 14, 21 and 30 days. Warner Bratzler Shear Force (WBSF) and troponin-T (Tn-T) degradation were determined at each ageing period. Results showed that type of beef cattle had affected on WBSF and degradation of Tn-T. Beef from KU had statistically lower WBSF than NA beef ($p<0.01$). The intensities of Tn-T 39 kDa, 30 kDa and 28 kDa band of KU beef had statistically higher than NA beef ($p<0.01$). Tn-T37 kDa band were similar in both beefs. ($P>0.05$). For Tn-T 26 kDa band, it was found only 5 in 15 samples of NA beef at 30 day of ageing period. It showed that as ageing period was longer Tn-T 30 kDa and 28 kDa were increased ($p<0.01$) while WBSF, Tn-T 39 kDa and 37 kDa value decreased ($p<0.01$). It was found that the value relevance of NA beef a negative relationship between WBSF with the increase of protein intensities in the 7, 14 and 21 days of aging period with a statistically significant ($p<0.05$) but not found relationship between WBSF with the protein intensities values in KU beef.

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยคำแนะนำและคำปรึกษาจากอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์ และรศ.ดร. จุฑารัตน์ เศรษฐกุล อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ทำวิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.กันยา ตันติวิสุทธิกุล ภาควิชาครุศาสตรเกษตร คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม ที่ช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในการวิเคราะห์ข้อมูลแก่ผู้วิจัย

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.รณชัย สิทธิไกรพงษ์ และรศ.ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ คุณเสาวลักษณ์ ผ่องลำเจียก นักวิชาการเกษตร ระดับ 8 ประจำศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการเก็บรวบรวมข้อมูลและตัวอย่างในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณสิทธิพร บุรณนัฏ เลขาธิการสมาคมโคเนื้อแห่งประเทศไทย และผู้จัดการสหกรณ์โคเนื้อมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จำกัด จังหวัดนครปฐม ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเนื้อโคที่นำมาทำการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สหกรณ์โคเนื้อกำแพงแสน และเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความสะดวกในการเก็บรวบรวมตัวอย่างในงานวิจัย

งานวิจัยในครั้งนี้ได้รับเงินสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ผู้ทำวิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่งสำหรับ คุณพ่อทักษิณ อาชวาคม และคุณแม่สุวิมล อาชวาคม ที่สนับสนุนทุนการศึกษา นายณฐพล อาชวาคม น้องชาย ตลอดจนสมาชิกในครอบครัวทุกท่าน ที่คอยเป็นกำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอบคุณเพื่อน พี่ และน้อง ทุกคนที่เป็นกำลังใจ และช่วยเหลือผู้วิจัยมาตลอด ประโยชน์และคุณค่าของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขอมอบแด่ ผู้มีพระคุณทุกท่านตลอดจนผู้ที่สามารถนำไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อไป

ฉันทวัฒน์ อาชวาคม

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....IV

สารบัญ.....V

สารบัญตาราง.....IX

สารบัญภาพ.....X

บทที่1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและที่มา.....1

1.2 วัตถุประสงค์.....2

1.3 สถานที่ดำเนินงาน.....2

1.4 ขั้นตอนการศึกษา.....2

1.5 ระยะเวลาการศึกษา.....3

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 เส้นใยกล้ามเนื้อ (muscle fiber).....4

2.1.1 โครงสร้างเส้นใยกล้ามเนื้อ.....4

2.1.2 ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ.....6

2.1.3 การเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อภายหลังจากสัตว์ตาย.....7

2.1.4 การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย.....8

2.1.5 การเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ.....10

2.2 กระบวนการย่อยสลายโปรตีนภายหลังจากสัตว์ตาย.....11

2.2.1 กลุ่มโปรตีนในกล้ามเนื้อ.....11

2.2.2 ระบบเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนในเนื้อหลังสัตว์ตาย.....12

2.2.3 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในกล้ามเนื้อหลังสัตว์ตาย.....13

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อ....13
2.3.1 พันธุ์หรือระดับเลือด....13
2.3.2 อายุ....14
2.3.3 เพศ....15
2.3.4 เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) 16
2.3.5 ชนิดของกล้ามเนื้อ....16
2.3.6 ขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อ....17
2.3.7 ปริมาณไขมันแทรก....17
2.3.8 เอนไซม์....18
2.3.9 ระยะเวลาในการบ่ม (ageing)....19
2.3.10 การเปลี่ยนแปลงระดับความเป็นกรด – ด่าง ในเนื้อ....20
2.3.11 ฮอร์โมน....22
2.3.12 สารเร่งการเจริญเติบโต....22
2.4 ความสำคัญของโปรตีน troponin-T ต่อความนุ่มของเนื้อ....23
2.4.1 ชนิดของโปรตีน troponin-T....23
2.4.2 การย่อยสลายของโปรตีน troponin-T ที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อ....24

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย....26
3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง....26
3.1.1 ตัวอย่างเนื้อโคที่ใช้ในการศึกษา....26
3.1.2 การเก็บตัวอย่างเนื้อโค....26
3.2 การวัดค่าแรงตัดผ่านของเนื้อ (Warner-Bratzler shear force)....26
3.2.1 อุปกรณ์....26
3.2.2 วิธีการวัดค่าแรงตัดผ่านของเนื้อ....27
3.3 การสกัดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ....27
3.3.1 อุปกรณ์....27
3.3.2 สารเคมี....27
3.3.3 วิธีการสกัดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ....28

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน....28
3.4.1 อุปกรณ์....28
3.4.2 สารเคมี....28
3.4.3 วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน....28
3.5 การวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE....29
3.5.1 อุปกรณ์....29
3.5.2 สารเคมี....29
3.5.3 เทคนิค SDS-PAGE....30
3.6 การวิเคราะห์ปริมาณของ troponin-T ด้วยเทคนิค western blot....30
3.6.1 อุปกรณ์....30
3.6.2 สารเคมี....30
3.6.3 เทคนิค western blot....31
3.6.4 การวัดความเข้มของแถบโปรตีน troponin-T ด้วยโปรแกรม Gene Tool....32
3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ....32

บทที่ 4 ผลการทดลอง....33
4.1 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T....33
4.1.1 รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ในแต่ละระยะเวลาการบ่ม....33
4.1.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงโปรตีน Tn-T....33
4.2 ความนุ่มของเนื้อ....41
4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับค่าความเข้มโปรตีน Tn-T....44

บทที่ 5 วิจารย์ผลการทดลอง....46
5.1 อิทธิพลที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน troponin-T....46
5.2 อิทธิพลที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อ....47

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....49
6.1 สรุปผลการทดลอง.....49
6.2 ข้อเสนอแนะ.....50

บรรณานุกรม.....51

ภาคผนวก.....56
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี.....57
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางสถิติ.....64

ประวัติผู้เขียน.....67

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีและกายภาพของเส้นใยกล้ามเนื้อ....17
2.2 ชนิดของโปรตีน troponin-T โดยแบ่งตามชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ....24
4.1 อิทธิพลของชนิดเนื้อโคที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T 35
4.2 อิทธิพลของชนิดเนื้อโคที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T รวม....36
4.3 อิทธิพลของระยะเวลาบ่มเนื้อที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T....37
4.4 อิทธิพลของระยะเวลาบ่มเนื้อที่มีผลต่อค่าความเข้มโปรตีน Tn-T รวม....39
4.5 อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของเนื้อกับระยะเวลาบ่มเนื้อที่มีผลต่อค่า
ความเข้มของโปรตีน Tn-T....40
4.6 ปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ 41
4.7 ปัจจัยร่วมที่มีอิทธิพลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ 42
4.8 เปอร์เซ็นต์การลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อในแต่ละช่วงระยะเวลาบ่ม....43
4.8 แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัวผ่านเนื้อกับค่าความเข้มของ
โปรตีน Tn-T ตามระยะเวลาบ่ม ในเนื้อโคกำแพงแสน....44
4.9 แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัวผ่านเนื้อกับค่าความเข้มของ
โปรตีน Tn-T ตามระยะเวลาบ่ม ในเนื้อโคพื้นเมือง....45
ภาคผนวกที่ ข 1 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติอิทธิพลของชนิดเนื้อโค
และระยะเวลาบ่มต่อความนุ่มของเนื้อ....61
ภาคผนวกที่ ข 2 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติอิทธิพลของชนิดเนื้อโค
และระยะเวลาบ่มต่อการสลายตัวของโปรตีน troponin-T....61

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 แสดงโครงสร้างเส้นใยกล้ามเนื้อ.....14

2.2 แสดงองค์ประกอบของ sarcomere.....15

2.3 แสดงโปรตีนในกลุ่มของ thick และ thin filament.....16

4.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน troponin-T ที่ระยะเวลาบ่ม 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน
โดย (ก) การสลายตัวของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ข) การสลายตัวของ troponin-T
ในเนื้อโคกำแพงแสน และ (ค) การสลายตัวของโปรตีน troponin-T ในเนื้อโคพื้นเมือง
ด้วยเทคนิค western blot.....37

4.2 กราฟแสดงอิทธิพลของชนิดเนื้อโคที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T.....40

4.3 กราฟแสดงอิทธิพลของชนิดเนื้อโคที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T รวม.....41

4.4 กราฟแสดงค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T ในระยะเวลาบ่ม 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน
โดย (ก) การสลายตัวของโปรตีน Tn-T 39 kDa และ 37 kDa
(ข) ผลิตผลของโปรตีน Tn-T 30 kDa และ 28 kDa.....38

4.5 กราฟแสดงอิทธิพลของระยะเวลาบ่มเนื้อที่มีผลต่อค่าความเข้มโปรตีน Tn-T รวม.....39

4.6 กราฟแสดงอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของเนื้อโคตัวอย่างกับระยะเวลาการบ่มเนื้อ
ที่มีผลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ.....42

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

ประเทศไทยนับเป็นประเทศหนึ่งที่มีเศรษฐกิจพื้นฐานมาจากภาคเกษตรกรรม เกษตรกรนิยมทำการเกษตรแบบผสมผสาน และมักทำการเลี้ยงโคในลักษณะอาชีพเสริมเพื่อเพิ่มรายได้ให้กับครอบครัว และนิยมเลี้ยงกันเกือบทุกครอบครัวไม่ว่าจะเป็นโคเนื้อหรือโคนม จำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้นในปัจจุบันทำให้มีผู้บริโภคเนื้อโคสูงขึ้นตามลำดับ จึงมีการสนับสนุนให้เลี้ยงโคเนื้อมากขึ้น เพื่อลดปัญหาการนำโคจากประเทศเพื่อนบ้านเข้ามาในประเทศไทยอย่างผิดกฎหมาย

การบริโภคเนื้อโคในประเทศไทยส่วนมากเป็นเนื้อที่ได้มาจากโคพื้นเมืองของไทยที่เลี้ยงปล่อยให้กินหญ้าตามธรรมชาติหรือโคมันซึ่งเป็นเนื้อจากโคที่ถูกปลดจากการใช้งานหรือมีอายุมาก นำมาขุนด้วยอาหารข้นแล้วส่งขาย ส่งผลให้คุณภาพของเนื้อที่เป็นผลมาจากการทำงานของโคมีความเหนียวมากขึ้น ซึ่งเหมาะกับอาหารไทยที่ต้องใช้เวลาในการเคี่ยวที่นาน นอกจากนี้ยังมีอาหารที่ต้องใช้เนื้อที่บดหยาบ หรือสับละเอียด เช่น ลาบ ผัดกระเพรา แตกต่างจากอาหารตะวันตกที่เน้นเนื้อที่มีความนุ่มในการนำไปทำสเต็ก เนื้ออบ เนื้อย่างบาบิคิว เป็นต้น ทำให้ต้องใช้เนื้อจากโคขุนถ้าเป็นโคขุนลูกผสมพันธุ์บราห์มันเลือดสูงต้องมาจากโคที่ได้รับอาหารข้นเป็นระยะเวลานาน หรือมาจากโคขุนลูกผสมเลือดยุโรปซึ่งในประเทศไทยนิยมเนื้อโคขุนลูกผสมพันธุ์ชาร์โรเล่ส์ (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2552) ทำให้ต้องมีการพัฒนาและปรับปรุงคุณสมบัติของเนื้อให้เป็นที่ยอมรับต่อผู้บริโภคเพิ่มมากขึ้นและถึงแม้ว่าผู้บริโภคจะให้ความสนใจในคุณภาพเนื้อด้านต่าง ๆ เช่น ความนุ่ม ความชุ่มฉ่ำ และรสชาติ แต่ปัจจัยในด้านความนุ่มของเนื้อโคก็ยังคงเป็นลักษณะที่ผู้บริโภคให้ความสำคัญในการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์ทางด้านเนื้อโค

การจัดการภายหลังจากสัตว์ตาย เช่น การบ่ม (aging) ในระยะเวลาที่แตกต่างกันจะมีผลต่อคุณภาพของเนื้อด้วย (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และญาณิน โอภาสพัฒนกิจ. 2548) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในกล้ามเนื้อโดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน troponin-T ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในระบบ calpain protease system ที่มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความนุ่มของเนื้อ (Koohmaraie. 1992; Wheeler *et al.* 2000)

ความสัมพันธ์ของการสลายตัวของ troponin-T กับความนุ่มของเนื้อในโคพื้นเมืองของไทยนั้นยังไม่มีการรายงาน ดังนั้นการศึกษาการสลายตัวของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อโดยเฉพาะ troponin-T ตามระยะเวลาการบ่มที่แตกต่างกันในโคพื้นเมืองไทยเปรียบเทียบกับโคลูกผสมสายพันธุ์ *Bos taurus* เพื่อให้มีความเข้าใจในการสลายตัวของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ซึ่งมีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้ออย่าง

ชัดเจน เพื่อนำไปพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพของเนื้อโคพื้นเมืองในประเทศไทยให้มีคุณภาพตามความต้องการของผู้บริโภคดียิ่งขึ้น

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษารูปแบบการสลายตัวของโปรตีน troponin-T ในแต่ละช่วงระยะเวลาการบ่มของเนื้อโคกำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมือง

1.2.2 ศึกษาความนุ่มของเนื้อในแต่ละช่วงระยะเวลาการบ่มในเนื้อโคกำแพงแสน และเนื้อโคพื้นเมือง

1.2.3 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการสลายตัวของโปรตีน troponin-T กับความนุ่มของเนื้อโคกำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมือง

1.3 สถานที่ดำเนินการ

1.3.1 บริษัทประกอบบีฟโปรดักซ์ จังหวัดราชบุรี

1.3.2 ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

1.3.3 สหกรณ์โคเนื้อมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จำกัด จังหวัดนครปฐม

1.3.4 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์คุณภาพเนื้อสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

1.3.5 ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

1.4 ขั้นตอนการศึกษา

แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ขั้นตอน

1.4.1 ศึกษาความนุ่มของเนื้อโคกำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมืองไทยในช่วงระยะเวลาการบ่มที่ 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน

1.4.2 ศึกษารูปแบบการสลายตัวของ troponin-T ในช่วงระยะเวลาการบ่มที่ 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน

1.5 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัย

ใช้เวลาในการดำเนินการวิจัย และสรุปผลเป็นระยะเวลา 12 เดือน

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ทราบถึงรูปแบบของการสลายตัวและการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน troponin-T ในเนื้อโคกำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมืองไทย ในช่วงระยะเวลาการบ่มภายหลังจากสัตว์ตาย

1.6.2 ทราบถึงความสัมพันธ์ของการสลายตัวของโปรตีน troponin-T กับความนุ่มของเนื้อในเนื้อโคกำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมืองไทย ในช่วงระยะเวลาการบ่มภายหลังจากสัตว์ตาย

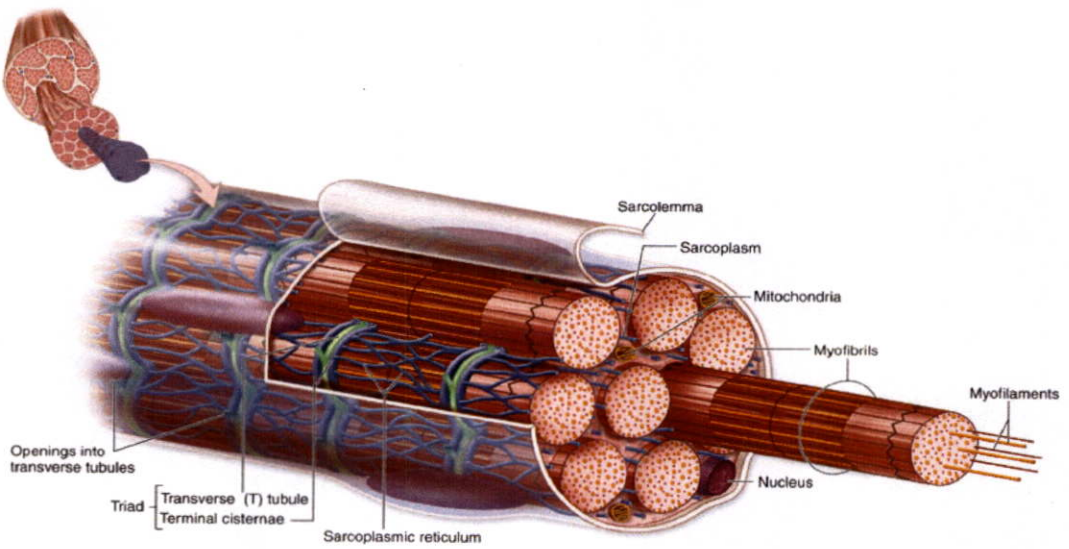
1.6.3 สามารถนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้ไปใช้ในการตัดสินใจในเรื่องระยะเวลาการบ่มเนื้อโคกำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมืองในระยะเวลาที่เหมาะสมทั้งนี้เพื่อประหยัดต้นทุนในการผลิต

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เส้นใยกล้ามเนื้อ (muscle fiber)

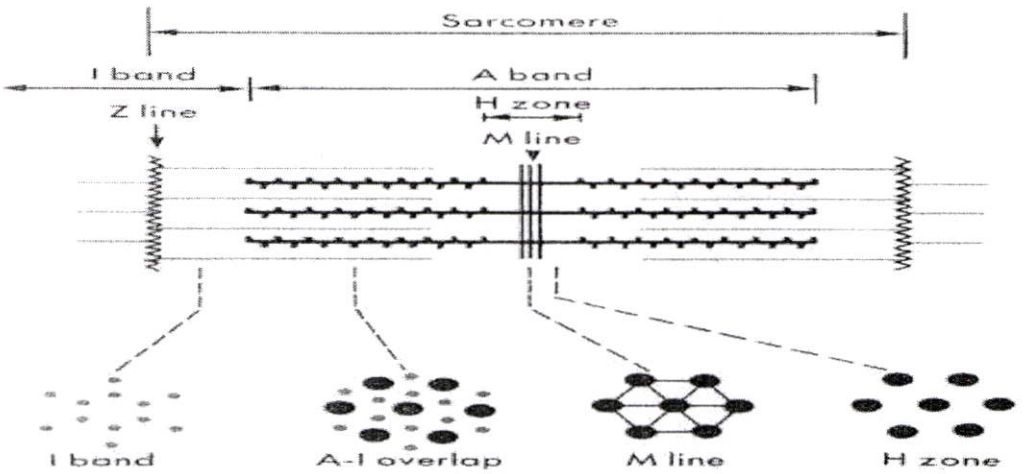
2.1.1 โครงสร้างเส้นใยกล้ามเนื้อ

เส้นใยกล้ามเนื้อเป็นหน่วยโครงสร้างที่สำคัญที่สุดในกล้ามเนื้อ โดยจะประกอบขึ้นจากเยื่อหุ้มแมมเบรน (membrane) เรียกว่า ซาร์โคเลมมา (sarcolemma) ภายในเส้นใยกล้ามเนื้อจะมีมัดของเส้นใยเล็กๆ อีกจำนวนมากเรียกว่าไมโอไฟบริล (myofibril) (ภาพที่ 2.1) ซึ่งในแต่ละไมโอไฟบริลจะประกอบด้วยหน่วยโครงสร้างย่อยที่เรียกว่าซาร์โคเมียร์ (sarcomere) (ภาพที่ 2.2) และแต่ละซาโคเมียร์จะประกอบขึ้นด้วยมัดของเส้นใยกล้ามเนื้อที่เล็กมาก (myofilament) 2 ชนิดคือ thick filament และ thin filament (ภาพที่ 2.3) โดยเส้นใยทั้ง 2 จะวางตัวอยู่ในแนวขนานตามยาวกับไมโอไฟบริล และมีบางส่วนซ้อนกันทำให้เกิดแถบมืดและแถบสว่าง แถบมืดจะมีส่วนที่มืดน้อยกว่าอยู่ตรงกลางกลางเรียกว่า H band ซึ่งจะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วน ด้วยเส้นทึบที่เรียกว่า M line ส่วนแถบสว่างก็จะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กันด้วยเส้นทึบที่เรียกว่า Z line ซึ่งโครงสร้างของไมโอไฟบริลจาก Z line หนึ่งไปยังอีก Z line หนึ่งเรียกว่าซาร์โคเมียร์ (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539)



ภาพที่ 2.1 แสดงโครงสร้างเส้นใยกล้ามเนื้อ

ที่มา: Anonymous. (2001)



ภาพที่ 2.2 แสดงองค์ประกอบของ sarcomere

ที่มา: De Smet *et al.* (2004)

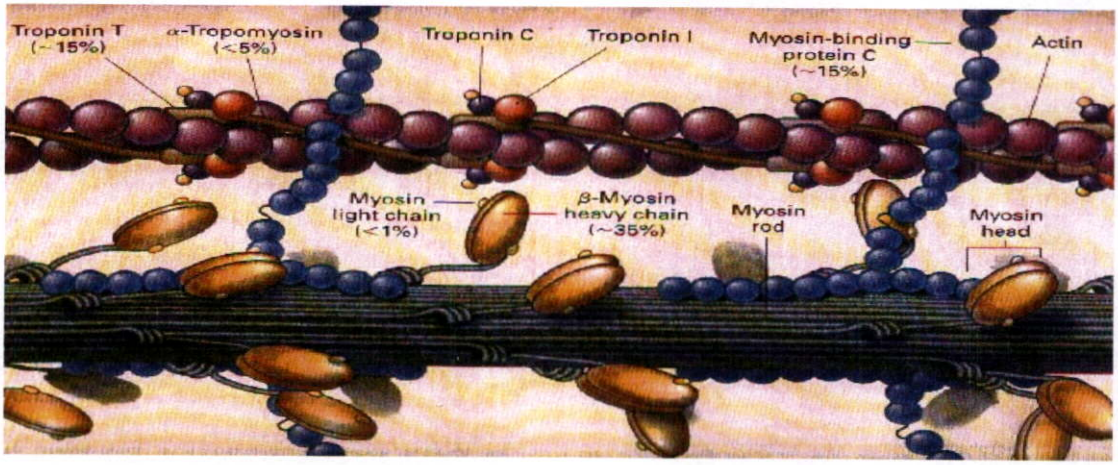
Thick filament แต่ละเส้นจะประกอบขึ้นจากโปรตีนไมโอซิน (myosin) ประมาณ 400 โมเลกุล มาวางรวมกันในลักษณะเป็นมัดใหญ่ โมเลกุลของโปรตีน myosin มีรูปร่างเป็นแท่งขนาดประมาณ 470 กิโลดาลตัน (kDa) ประกอบด้วย polypeptide 3 คู่ โดยคู่ที่ขนาดยาวที่สุดเรียกว่า heavy chain มีลักษณะพันเป็นเกลียวแบบ α–helix ส่วน polypeptide ขนาดเล็กอีก 2 คู่ จะอยู่ด้าน N-terminal ซึ่งเป็นด้านหัวของโมเลกุลเรียกว่า light chain ที่ใช้จับรวมกับ actin ได้ในขณะกล้ามเนื้อหดตัว ทั้ง 2 ส่วนนี้สามารถทำให้โมเลกุลเคลื่อนไหวได้ และยังสามารถตัดให้ขาดจากกันได้ โดยเอนไซม์ปาเปน (papain) และ ทริปซิน (trypsin) (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539)

Thin filament จะประกอบด้วยเส้นใยเอกติน (actin) พันกันเป็นเกลียว 2 เส้น และยังมีโปรตีนอีก 2 ชนิดอยู่ในโครงสร้างคือโทรโปนิน (troponin) และโทรโปไมโอซิน (tropomyosin) โดยโปรตีน actin มี 2 ชนิดคือ G-actin ซึ่งอยู่ในสภาพโมเลกุลเดี่ยว และ F-actin ที่อยู่ในลักษณะต่อกันเป็นเส้นใย โปรตีน tropomyosin ประกอบด้วย polypeptide 2 เส้นโดยจะพันอยู่กับ G-actin วางตัวตามลักษณะเกลียวเชือก และอยู่ในร่องของ F-actin ซึ่งในกล้ามเนื้อลายและกล้ามเนื้อหัวใจจะทำปฏิกิริยากับ actin และ troponin เพื่อควบคุมการรวมตัวกันของ actin และ myosin โปรตีน troponin ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อยตามรายงานของ Peason and Young. (1989) คือ

1) troponin-I (Tn-I) เป็นตัวยับยั้งการทำปฏิกิริยาระหว่าง actin และ myosin

2) tropoinin-C (Tn-C) เป็นหน่วยย่อยที่ใช้จับกับ Ca^{2+}

3) troponin-T (Tn-T) ถ้ามี Ca^{2+} เพียงพอ จะช่วยยึด Tn-I และ Tn-C ให้ติดกับ actin-myosin complex



ภาพที่ 2.3 แสดงโปรตีนในกลุ่มของ thick และ thin filament

ที่มา: Anonymous. (2001)

2.1.2 ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ

จากคุณสมบัติทางชีวเคมีและกายภาพของเส้นใยกล้ามเนื้อ (ตารางที่ 2.1) สามารถจัดแบ่งเส้นใยกล้ามเนื้อแบ่งได้ 3 ชนิด ดังนี้

1) Type I (slow twitch หรือ red fiber หรือ slow twitch oxidative muscle) ความสามารถในการหดตัวช้า มีหลอดเลือดฝอย mitochondria และ myoglobin จำนวนมาก ทำให้กล้ามเนื้อมีสีแดง กล้ามเนื้อนี้สามารถขนส่งออกซิเจนได้มากและมี metabolism แบบใช้ออกซิเจน (aerobic metabolism)

2) Type IIa (fast twitch oxidative muscle) คล้ายกับกล้ามเนื้อ slow twitch คือมี metabolism แบบใช้ออกซิเจน มี mitochondria และหลอดเลือดฝอยจำนวนมากทำให้มีสีแดง แต่มีความสามารถในการหดตัวเร็ว

3) Type IIb (white fiber หรือ fast twitch glycolytic muscle) เป็นกล้ามเนื้อที่มี metabolism แบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic metabolism) ใช้พลังงานจากกระบวนการ glycolysis มี mitochondria และ myoglobin น้อย ความสามารถในการหดตัวเร็ว

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีและกายภาพของเส้นใยกล้ามเนื้อ

คุณสมบัติ	ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ	
	Type I (red fiber)	Type IIb (white fiber)
ปริมาณ connective tissue	ต่ำ	สูง
ปริมาณ glycogen	ต่ำ	สูง
ปริมาณ ไขมัน	สูง	ต่ำ
ปริมาณ creatine phosphate และ ATP	ต่ำ	สูง
ขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อ	เล็ก	ใหญ่
ปริมาณเลือดที่มาเลี้ยงกล้ามเนื้อ	มาก	น้อย
ปริมาณ RNA	สูง	ต่ำ
ปริมาณ sarcoplasmic reticulum	น้อย	มาก
ปริมาณ calcium	สูง	ต่ำ
ปริมาณ mitochondria	สูง	ต่ำ
ความกว้าง Z line	กว้าง	แคบ
ระยะเวลาการหดตัวของกล้ามเนื้อ	ช้า	เร็ว

ที่มา:ดัดแปลงจาก Pearson และ Young (1989)

Geesink *et al.* (2006) พบว่าในโคที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber เป็นองค์ประกอบของมัดกล้ามเนื้ออยู่สูง เช่นโคสายเลือดอินเดีย เนื้อจากโคประเภทนี้จะมีความเหนียวมาก เนื่องจากเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber มีเอนไซม์ calpain ในปริมาณที่สูง และในขณะเดียวกันปริมาณของเอนไซม์ calpastatin ซึ่งทำหน้าที่ขัดขวางการทำงานของ calpain จะมีอยู่สูงเช่นกัน เป็นผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของ calpain และ กระบวนการ proteolysis เกิดได้น้อย ดังนั้นกล้ามเนื้อที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber จึงมีความเหนียวมากกว่ากล้ามเนื้อที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด white fiber เป็นองค์ประกอบ

2.1.3 การเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อภายหลังจากสัตว์ตาย

ภายหลังจากสัตว์ตายแม้ว่าเซลล์กล้ามเนื้อจะไม่มีออกซิเจน มาหล่อเลี้ยงแล้วก็ตาม แต่กล้ามเนื้อของสัตว์ยังมิได้หยุดทำงานโดยทันที ยังคงมีการหดตัวและคลายตัวนานตราบเท่าที่ยังคงมีพลังงานสะสมอยู่ในระดับหนึ่งที่สามารถทำให้กล้ามเนื้อทำงานต่อไปได้ ซึ่งพลังงานนี้คือพลังงานเคมีที่อยู่ในรูปของ ATP ที่ใช้ในการคลายตัวของกล้ามเนื้อ โดยได้มาจากปฏิกิริยาการย่อยสลาย glycogen โดยผ่านขบวนการ anaerobic metabolism มีผลคือนอกจากจะได้ ATP จำนวนน้อยแล้วยังเกิดกรดแลคติกและความร้อนขึ้นในกล้ามเนื้ออีกด้วย (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539)

2.1.4 การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. (2539) กล่าวว่าการเปลี่ยนแปลงภายในกล้ามเนื้อหลังสัตว์ตาย (post-mortem change) เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นภายหลังสิ้นสุดขั้นตอนการทำให้สัตว์ตาย (sticking) ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีภายในกล้ามเนื้อ ความสามารถในการทำหน้าที่ต่างๆ ของกล้ามเนื้อจะสูญเสียไปทีละน้อย เมื่อเวลาผ่านไปกล้ามเนื้อจะถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อสัตว์โดยสมบูรณ์โดยการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ภายหลังสัตว์ตายนี้จะมีผลอย่างมากต่อลักษณะทางคุณภาพของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ในขั้นสุดท้ายการพยายามรักษาสมดุลความมีชีวิตของกล้ามเนื้อจะดำเนินขึ้นทันทีหลังกระบวนการเอาเลือดออกจากร่างกายสัตว์ เพื่อที่จะพยายามรักษาสภาพต่างๆ ในขณะมีชีวิตอยู่จำเป็นต้องอาศัยพลังงานจำนวนมาก พลังงานเหล่านี้ได้มาจากการสลายสารประกอบ adenosine triphophate (ATP) โดยเอนไซม์ ATPase ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm)

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

เมื่อสัตว์ตายแล้ว กระบวนการสร้าง ATP ในสภาพปกติจะหยุดชะงัก ดังนั้นปริมาณ ATP ที่สะสมไว้จึงถูกใช้หมดไปอย่างรวดเร็ว จำเป็นต้องหาพลังงานอื่นมาทดแทนส่วนที่ถูกใช้ไป แหล่งแรกที่นำมาใช้คือ การแลกเปลี่ยนกลุ่มฟอสเฟตระหว่าง creatine phosphate กับ adenosine diphophate (ADP) โดยเอนไซม์ creatine kinase

$$\text{Creatine phosphate} + \text{ADP} \underset{\longrightarrow}{\overset{\text{creatine kinase}}{\longleftarrow}} \text{ATP} + \text{Creatine}$$

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

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

กล้ามเนื้อจะลดลงอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เกิดกระบวนการย่อยสลายไกลโคเจนแบบไม่ใช้ออกซิเจน เรียกว่ากระบวนการไกลโคไลซิสโดยไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic glycolysis) เกิดขึ้นทดแทน

$$\text{Glycogen} \xrightarrow{\text{Anaerobic glycolysis}} 3\ ATP + \text{Lactic Acid}$$

กระบวนการสุดท้ายนี้เรียกว่า กระบวนการไกลโคไลซิสภายหลังสัตว์ตาย (post-mortem glycolysis) ซึ่งเมื่อมีการสลายไกลโคเจน จะได้พลังงานออกมานั่นคือ ATP รวมทั้งกรดแลคติค (lactic acid) ซึ่งสะสมไว้ในกล้ามเนื้อ

เมื่อ ATP ลดลงจนมีพลังงานน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ของพลังงานเริ่มต้น จะเกิด cross bridge ของ thick และ thin filament ซึ่งส่งผลให้กล้ามเนื้อหดตัวจับกันแน่นขึ้น กรดแลคติกที่เกิดขึ้นจะไปเร่งขบวนการ glycolysis ให้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการเกิดขบวนการนี้จะมีการสะสมกรดขึ้นภายในกล้ามเนื้อ ทำให้ค่า ความเป็นกรด-ด่างของกล้ามเนื้อลดลง เมื่อความเป็นกรด-ด่าง ลดลงต่ำกว่า 6.0 - 6.5 ปฏิกิริยา glycolysis จะเกิดขึ้นได้ช้าลงมาก เพราะในกล้ามเนื้อที่มี ความเป็นกรดสูงนั้นจะมีผลให้การทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการ glycolysis ถูกยับยั้ง การสังเคราะห์ ATP หยุดลง กล้ามเนื้อไม่สามารถหดและคลายตัวได้อีกต่อไปเนื่องจากไม่มีพลังงานมาใช้ได้อย่างพอเพียง (Hedrick *et al.* 1993)

Anderson *et al.* (1999) กล่าวว่าการหดตัวและคลายตัวของกล้ามเนื้อมีความสัมพันธ์กับคุณภาพของเนื้อหลายประการ เช่น การเกิดการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่กล้ามเนื้อเกิดการหดตัวอย่างถาวรภายหลังสัตว์ตาย เกิดได้เมื่อพลังงานที่สะสมอยู่ในรูป glycogen, ADP และ ATP ถูกใช้ไปจนหมด ปริมาณของกรดแลคติกที่เกิดขึ้นจากขบวนการ anaerobic metabolism เพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก สภาวะเช่นนี้เนื้อจะมีสภาพเกร็งตัวเนื่องจากเส้นใยในกล้ามเนื้อหดสั้นเข้าเป็นอย่างมาก โดยพบว่าความยาว sarcomere สั้นลงอย่างมากทำให้เนื้อที่ได้ภายหลังสัตว์ตายจึงมีความเหนียวมากกว่าปกติ แต่จากรายงานของ Koohmaraie (1994) พบว่าแม้ว่าภายหลังสัตว์ตายเนื้อจะมีความเหนียวมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อกล้ามเนื้ออยู่ในสภาวะ rigor mortis แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปเอนไซม์ที่อยู่ในเนื้อ จะออกมาทำการย่อยโปรตีนในเนื้อทำให้เนื้อเกิดความนุ่มขึ้น

2.1.5 การเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ

การเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ หรือเรียกว่า rigor mortis นั้นเป็นขั้นตอนที่หลีกเลี่ยงไม่ได้หลังจากที่สัตว์ตายได้ระยะหนึ่ง เนื้อในขณะนี้จะมีความเหนียวที่เกิดจากการจับกันแน่น ระหว่างเส้นใยฝอยเอกตินและไมโอซินในกล้ามเนื้อ ปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นในเวลา 1-24 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของสัตว์แต่ละชนิด เช่น สุกรมีช่วงเวลาหดเกร็งตัวประมาณ 10 ชั่วโมง แกะประมาณ 7-8 ชั่วโมง โคประมาณ 24 ชั่วโมง ไก่ประมาณ 2-4 ชั่วโมง เป็นต้น การเกร็งตัวที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการเคลื่อนที่ของ I-band, A-band และ H-zone ในซาร์โคเมียร์ (sarcomere) ทำให้เส้นใยแอกตินและไมโอซินเคลื่อนตัวเข้าออกผ่านกัน แต่ในขณะที่สัตว์ตายได้ระยะหนึ่งพลังงานในกล้ามเนื้อจะหมดไป ทำให้ไม่เหลือพลังงานในการคลายตัวของกล้ามเนื้อ ถ้าในระยะนี้ซากได้รับอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมจะเกิดภาวะเข้าสู่การเกร็งตัวของกล้ามเนื้อเร็วขึ้น (Forrest *et al.* 1995) ซึ่งจะมีผลต่อความยาวของซาร์โคเมียร์ เป็นผลต่อความนุ่มของเนื้อ ถ้ากล้ามเนื้อมีซาร์โคเมียร์ยาวก็จะให้เนื้อที่มีความนุ่ม

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล (2539) ได้อธิบายขั้นตอนและระยะของการเกิด rigor mortis โดย เริ่มจากการที่ Ca^{2+} ถูกขับออกจาก sarcoplasmic reticulum เข้าสู่ sarcoplasm เนื่องจากขาด ATP ในกล้ามเนื้อเพื่อจะช่วยทำหน้าที่ในการดูดกลับของ Ca^{2+} เข้าสู่ sarcoplasmic reticulum ทำให้ Ca^{2+} เข้าไปจับกับ troponin กระตุ้นการทำงาน myosin ATP-ase ทำให้เกิดการเลื่อนตัวเข้าหากันระหว่าง actin และ myosin filament ประกอบกับการขาด Mg-ATP ที่ทำหน้าที่ให้เกิดการเคลื่อนตัวออกระหว่าง actin และ myosin filament จึงส่งผลให้ actin และ myosin เคลื่อนตัวเข้าหากันเต็มที่เกิด crosslinkage ที่เกาะกันแน่นเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กล้ามเนื้อสัตว์ที่มีชีวิตจะเกิดการหดตัวและเกาะกันของ crosslinkage ระหว่าง actin และ myosin เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีผลทำให้ระยะของ sarcomere สั้น และกล้ามเนื้อเกิดการแข็งตัว

ระยะของการเกิด rigor mortis แบ่งออกได้ 3 ขั้นตอนคือ

1) delay phase เป็นระยะที่มีการเคลื่อนที่ของ actin ผ่านแทรกเข้าไประหว่าง myosin ได้อย่างมีอิสระ มีการยืดและหดตัวของ sarcomere เกิด actin-myosin crosslinkage ไม่มาก การดูดเข้าออกของ Ca^{2+} ระหว่างเซลล์ยังปกติ พลังงานสะสม creatin phosphate และ ATP ยังมีอยู่

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

3) completion phase (post rigor) ไม่มีการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อหดตัวอย่างถาวร เป็นระยะเริ่มการทำงานของเอนไซม์ในเนื้อ พร้อมๆ กับการเข้าสู่ระยะเน่าเสียของเนื้อ

2.2 กระบวนการย่อยสลายโปรตีนภายหลังจากสัตว์ตาย

2.2.1 กลุ่มโปรตีนในกล้ามเนื้อ

โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของกล้ามเนื้อเป็นปัจจัยสำคัญสิ่งหนึ่ง ที่มีผลต่อคุณภาพเนื้อด้านคุณค่าการบริโภค โปรตีนแต่ละชนิดจะมีหน้าที่ และคุณสมบัติที่แตกต่างกันออกไป จุฑารัตน์ เศรษฐกุล (2539) ได้แบ่งโปรตีนในกล้ามเนื้อออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่

1) กลุ่มที่ละลายได้ในเฉพาะในสารละลายของเกลือเข้มข้น ได้แก่ พวก myofibrillar protein พบเป็นองค์ประกอบประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนทั้งหมด นอกจาก myosin และ actin แล้วยังมีโปรตีนอื่นซึ่งส่วนใหญ่มีหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการหดตัวของกล้ามเนื้อ ได้แก่

1.1) alfa-actinin โครงสร้างประกอบด้วย polypeptides 2 สายเป็นองค์ประกอบหลักของ Z line นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโปรตีนนี้มีองค์ประกอบส่วนหนึ่งเป็นเอนไซม์ phosphocreatine kinase

1.2) beta-actinin จับร่วมอยู่กับ F-actin เชื่อกันว่าโปรตีนนี้มีบทบาทในการกำหนดความยาวของ thin filament ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของ G- actin

1.3) C protein พบจำนวนเพียงเล็กน้อย โดยจับรวมอยู่กับ myosin เข้าใจว่ามีบทบาทในการรวมตัวกันของโปรตีน myosin ไปเป็น thick filament

1.4) desmin เป็นโปรตีนที่พบเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของส่วนที่ไม่ละลายของ Z line โปรตีนนี้พบเป็นพิเศษในกล้ามเนื้อหัวใจ

1.5) titin เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ พบมากถึงร้อยละ 5-8 ของโปรตีนทั้งหมด พบใน M line, Z line และรอยต่อระหว่างแถบมืดและแถบสว่างหน้าที่ยังไม่ทราบแน่ชัด

1.6) M protein พบเป็นองค์ประกอบของ M line

2) กลุ่มที่ละลายได้ในน้ำและสารละลายของเกลือ ได้แก่ พวก sarcoplasmic protein พบเป็นองค์ประกอบของโปรตีนในกล้ามเนื้อประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ที่สำคัญ ได้แก่

2.1) myogen ประกอบด้วยโปรตีนหลาย ๆ ชนิดรวมกัน มีประมาณเกือบ 20 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด ได้แก่ เอนไซม์ในกระบวนการ glycolysis เอนไซม์ myokinase และเอนไซม์ phosphorylase เป็นต้น

2.2) globulin x เป็นโปรตีนรูปร่างทรงกลมคล้ายกับเอนไซม์ทั่ว ๆ ไป

2.3) myoglobin เป็นโปรตีน chromoprotein ที่มี heme เป็นองค์ประกอบคล้ายกับ haemoglobin บางทีเรียกว่า haemoglobin ของกล้ามเนื้อทำหน้าที่ในการรับ-ส่งออกซิเจนในเซลล์กล้ามเนื้อเป็นตัวการทำให้กล้ามเนื้อมีสี สีของเนื้อขึ้นอยู่กับ myoglobin ถึงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือ 10 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับ haemoglobin โดยทั่วไปในกล้ามเนื้อลายจะพบ myoglobin ไม่มากเพียงประมาณร้อยละ 0.1-0.2 ของโปรตีนทั้งหมด แต่สำหรับกล้ามเนื้อชนิดที่ต้องทำงานหนักและต้องการ

พลังงานมาก จากกระบวนการ electron transport system เช่น กล้ามเนื้อหัวใจจะมี myoglobin อยู่มากเป็นพิเศษ

3) กลุ่มที่ไม่ละลายในสารละลายใดๆ โดยเฉพาะที่อุณหภูมิต่ำ ได้แก่ พวก connective tissue protein เป็นโปรตีนกล้ามเนื้อที่พัฒนาต่อไปเป็นระบบโครงร่างของร่างกาย เช่น กระดูก กระดูกอ่อน เอ็น และฟัน ประกอบไปด้วย collagen, elastin, procollagen, tropocollagen, reticuin, mucoprotein, cytochrome-c และพวก insoluble enzyme

หากมีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วน ปริมาณ และขนาดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของกล้ามเนื้อต่างๆ จะมีผลทำให้คุณภาพเนื้อด้านคุณค่าการบริโภคมีการเปลี่ยนแปลงตามไปด้วย (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539) โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เป็นพวกกลุ่มเส้นใยโปรตีน (myofibrillar protein) จะเป็นตัวที่มีบทบาทหลักต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพเนื้อด้านคุณค่าการบริโภค (Koohmaraie *et al.* 1991)

2.2.2 ระบบเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนในเนื้อหลังสัตว์ตาย

การย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อเป็นผลมาจากการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) โดยเอนไซม์จะทำให้โปรตีนอ่อนตัวลง ซึ่งจะส่งผลให้กล้ามเนื้อเกิดความนุ่ม (tenderness) ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นหลังจากเนื้อผ่านช่วงเวลาของการเกิด rigor mortis ไปแล้ว Koohmaraie (1994) ได้กล่าวถึงระบบเอนไซม์ที่ช่วยย่อยโปรตีนในเนื้อหลังสัตว์ตายไว้ 3 ระบบคือ

1) Lysosomal cathepsins เอนไซม์นี้จะทำงานอยู่ใน lysosomes ซึ่งหากต้องการให้เอนไซม์นี้ทำงานได้จะต้องทำให้ออกมาสู่ cytosol แต่จากการทดลองพบว่าแม้จะมีการใช้กระแสไฟฟ้าในการกระตุ้นซากร่วมกับการบ่มซากที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาถึง 28 วันก็ตาม lysosomal cathepsins ก็จะยังคงอยู่ภายใน lysosomes ดังนั้นเอนไซม์ในระบบนี้จึงเป็นระบบที่ไม่มีความสำคัญต่อการย่อยโปรตีนในเนื้อมากนัก นอกจากนี้ยังพบว่าไม่ได้มีส่วนร่วมในการย่อยโปรตีนเอกตินและไมโอซิน ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญที่เป็นองค์ประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อ

2) Multicatalytic proteinase complex เป็นเอนไซม์ที่เข้าย่อยสลายเฉพาะ troponin-C และเส้นใย myosin เท่านั้น และทำงานได้ดีในสภาวะความเป็นกรด-ด่าง 7.5-8.0 ที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ดังนั้นบทบาทของเอนไซม์ในระบบนี้จึงไม่เด่นชัดมากนักต่อการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อภายหลังจากสัตว์ตายซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เนื้อเกิดความนุ่ม เนื่องจากสภาวะของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตายไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในระบบนี้

3) Calcium-dependent protenases หรือ calpain เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเป็นอย่างมากต่อการย่อยโปรตีนในเนื้อ มีผลทำให้เนื้อเกิดความนุ่มขึ้น เนื่องจากการย่อยสลายเส้นใยกล้ามเนื้อบริเวณ Z line โดย calpain เป็นเอนไซม์ที่ทำงานอยู่ในบริเวณ sarcoplasm เพียงชนิดเดียวที่มีบทบาทในกระบวนการ

ทำให้เนื้อนุ่มภายหลังจากสัตว์ตาย แต่ก็จะมี calpastatin เป็นตัวยับยั้งการทำงานของ calpain ซึ่งส่งผลให้เนื้อนุ่มที่ลดลง เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีตัวที่สำคัญอยู่ 2 ชนิด (Morgan *et al.* 1993) คือ

3.1) m-calpain เป็นเอนไซม์ที่ต้องการความเข้มข้นของ Ca^{2+} ในระดับโมล (mole) หรือ 200-300 μM มาเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำงาน

3.2) μ-calpain เป็นเอนไซม์ที่ต้องการความเข้มข้นของ Ca^{2+} ในระดับมิลลิโมล (millimole) หรือ 10 μM มาเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำงาน

2.2.3 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในกล้ามเนื้อหลังสัตว์ตาย

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

2.3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อ

2.3.1 พันธุ์หรือระดับเลือด

คุณภาพของเนื้อโคที่มีระดับเลือดของโคสายพันธุ์ *Bos indicus* จะมีอิทธิพลอย่างมากต่อการลดลงของความนุ่ม เนื่องจากโคที่มีระดับเลือด *Bos indicus* ที่มีสัดส่วนเพิ่มขึ้นจะมีความสัมพันธ์กับความนุ่มที่ลดลง โดยเฉพาะทำให้เนื้อที่ได้มีความนุ่มน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโคจาก *Bos taurus* และพบว่าเนื้อที่ได้จากโคลูกผสม *Bos indicus* จะมีความนุ่มน้อยกว่าเนื้อโคลูกผสม *Bos taurus* แม้ว่าโคลูกผสม *Bos indicus* จะมีปริมาณไขมันแทรกในกล้ามเนื้อเท่ากับเนื้อที่ได้จากโคลูกผสม *Bos taurus* ก็ตาม (Wheeler *et al.* 1990)

Pringle *et al.* (1997) ทำการศึกษาระบบเอนไซม์ที่ช่วยย่อยโปรตีนในเนื้อที่มีผลต่อความนุ่มของโคลูกผสมเพศผู้ตอนระหว่างพันธุ์แองกัส และพันธุ์บราห์มันที่ระดับเลือดต่าง ๆ คือ 0, 25, 37, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์บราห์มัน พบว่าที่ระดับเลือด 0 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณ μ-calpain สูงกว่าที่ระดับเลือด 100 เปอร์เซ็นต์บราห์มัน แต่ที่ระดับเลือด 37 เปอร์เซ็นต์บราห์มัน มีปริมาณ μ-calpain สูงที่สุด

ส่วนปริมาณของ calpastatin (ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ μ-calpain และ m-catpain) จะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับเลือดของบราห์มันสูงขึ้น ส่วนปริมาณ m-calpain ในทุกระดับเลือดไม่มีความแตกต่างกัน

นันทนา ช่วยชูวงศ์ (2540) ทำการศึกษาเปรียบเทียบสมรรถภาพการขุนและคุณภาพผลผลิตโคเนื้อ 5 พันธุ์ ที่มีอยู่ในประเทศไทย พบว่าพันธุ์มีผลต่อความนุ่มของเนื้อโค โดยโคพันธุ์กำแพงแสนและโคพันธุ์เดร้าท์มาสเตอร์ นุ่มกว่าโคพันธุ์บราห์มัน และโคพันธุ์ลูกผสมฮินดูบราซิล x บราห์มัน ($P<0.01$) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากโคพันธุ์แบงกัส โดยมีคะแนนความนุ่มเป็น 2.11, 2.14, 3.06, 3.54 และ 2.51 ตามลำดับ

ลลิศรา ศรีสุวรรณ (2551) ได้ศึกษาอิทธิพลของระบบการผลิตโคเนื้อและระยะเวลาการบ่มต่อคุณภาพเนื้อ พบว่าพันธุ์และระดับเลือดของโคในแต่ละระบบการผลิตมีผลต่อความนุ่มของเนื้อ โดยเนื้อโคขุนโพนยางคำที่มีระดับเลือดของพันธุ์ชาร์โรเลส์ 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปมีความนุ่มมากที่สุด รองมาคือเนื้อโคขุนกำแพงแสนที่มีระดับเลือดของพันธุ์ชาร์โรเลส์ 50 เปอร์เซ็นต์ และเนื้อโคขุนลูกผสมบราห์มันเลือดสูงเลี้ยงด้วยเปลือกสับปะรด ส่วนเนื้อโคลูกผสมบราห์มันเลือดสูงเลี้ยงด้วยหญ้า และเนื้อโคพื้นเมืองมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 3.75, 5.59, 8.97, 13.81 และ 13.77 กิโลกรัม ตามลำดับ

2.3.2 อายุ

สัตว์ที่อายุมากจะมี connective tissue ที่เป็นพวก inter และ intra-molecular cross linking ระหว่าง polypeptide ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสูง ซึ่งมีผลทำให้ความร้อนและเอนไซม์เข้าทำลายได้ยากขึ้น (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539) ทั้งนี้ขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อจะใหญ่หรือเล็กขึ้นอยู่กับอายุของสัตว์ด้วย สัตว์ยิ่งอายุมากเนื้อก็จะยิ่งเหนียวมากขึ้น โดยโคที่อายุมากมีความหนาของกล้ามเนื้อลดลงและมีการสะสมไขมันใต้ผิวหนังเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาอายุกับไขมันแทรกแล้วพบว่าเมื่อโคอายุมากขึ้นระดับไขมันแทรกจะสูงตามไปด้วย (ชัยณรงค์ คันธพนิต. 2529)

ระดับของเม็ดสีไมโอโกลบินในกล้ามเนื้อสัตว์อายุมากจะมีเม็ดสีไมโอโกลบินมากกว่าสัตว์อายุน้อย ทำให้เห็นสีเนื้อเป็น สีแดงเข้มกว่าสัตว์อายุน้อย (Warris. 2000) ขนาดและรูปร่างของกระดูกซี่โครงและการแปรสภาพจากกระดูกอ่อนเป็นกระดูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งยอดข้าว (bottons) ของกระดูกสันหลังซากโคที่อายุน้อยจะมีกระดูกสันหลังที่อ่อนและมีรูพรุนมาก โดยส่วนยอดจะเป็นกระดูกอ่อนสีขาวมีขนาดใหญ่ กระดูกซี่โครงจะแคบและออกสีแดง กระดูกสันหลังช่วงสะโพกแต่ละข้อจะมีรอยแยกออกจากกันเห็นได้ชัดและมีกระดูกอ่อนที่กระดูกเชิงกรานผ่าซีก ส่วนลักษณะเนื้อแดงจะเป็นเส้นเนื้อที่ละเอียดผิวหน้าตัดค่อนข้างเรียบและมีสีแดงอ่อน ถ้าซากโคที่มีอายุมาก จะมีกระดูกซี่งโครงมีขนาดกว้างและแบนกล้ามเนื้อสันนอกออกสีแดงเข้มจัดและมีลักษณะหยาบ รูปร่างซากไม่ได้สัดส่วนและยิ่งโคที่มี

อายุมากๆจะมีความหนาของกล้ามเนื้อลดลง และมีการสะสมไขมันใต้ผิวหนังที่ไม่ได้สัดส่วนมาก (ชัยณรงค์ คันธพนิต. 2529)

นอกจากนี้ มาลัย จงเจริญ (2546) ได้ทำการศึกษาคุณภาพซากและผลตอบแทนในการผลิตเนื้อโคคุณภาพสูงจากโคลูกผสมเลือดชาร์โรเลส์ พบว่า น้ำหนักมีชีวิตสุดท้ายและระดับไขมันแทรกเพิ่มสูงขึ้นตามอายุเมื่อส่งฆ่า และพบว่าอายุเมื่อส่งฆ่าที่ 2 และ 3 ปี มีระดับคะแนนไขมันแทรกเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการขุนที่เพิ่มขึ้น ปรารถนา พฤกษะศรี และคณะ (2533) กล่าวว่าระยะแรกของการขุนโคที่ไม่เคยผ่านการขุนมาก่อนจะมีการเจริญเติบโตรวดเร็ว โดยพบว่าโคพื้นเมือง โคลูกผสมบราห์มัน 50 เปอร์เซ็นต์ และโคลูกผสมชาร์โรเลส์ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่เริ่มขุนเมื่ออายุ 1 ปี จะมีประสิทธิภาพการใช้อาหารและเปอร์เซ็นต์ซากดีกว่าโคที่เริ่มขุนเมื่ออายุ 2 ปี ขณะที่อัตราการเจริญเติบโตของสัตว์ทั้งสองระดับอายุที่ค่าใกล้เคียงกัน อัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของโคลูกผสมบราห์มันกับโคลูกผสมชาร์โรเลส์ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ดีกว่าโคพื้นเมืองอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

2.3.3 เพศ

ในโคเพศผู้ที่ผ่านการตอนพบว่าไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ μ-calpain และ m-calpain แต่พบว่าปริมาณ calpastatin ในโคเพศผู้ไม่ตอนมีปริมาณสูงกว่าโคเพศผู้ตอน ซึ่งการที่ปริมาณของ calpastatin สูงจะมีผลทำให้ค่า myofribrillar fracmentation ในเนื้อของเพศผู้ไม่ตอนมีค่าน้อยกว่าเพศผู้ตอนมีผลทำให้เนื้อของโคเพศผู้ไม่ตอนมีความเหนียวกว่าโคเพศผู้ตอน เมื่อนำเนื้อไปหาค่าแรงตัดผ่านเนื้อ พบว่าโคเพศผู้ไม่ตอนมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงกว่าโคเพศผู้ตอนในทุกระยะการบ่ม (1, 7 และ 14 วัน) Morgan *et al.* (1993) ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าโคเพศผู้ไม่ตอนมีอิทธิพล ต่อปริมาณ calpastatin ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลทำให้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยโปรตีนในกล้ามเนื้อ

เพศมีผลต่อระดับความอ้วนของโค ผู้เลี้ยงนิยมเลี้ยงโคเพศผู้มากกว่าโคเพศผู้ตอนเพราะโคเพศผู้เจริญเติบโตได้เร็ว ใช้อาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพและจำหน่ายได้ราคาดีเนื่องจากมีกล้ามเนื้อสูง แต่มีข้อเสียด้านคุณภาพเนื้อคือเนื้อโคมีแนวโน้มที่เหนียว สีที่เข้ม เน่าเสียง่าย และเก็บรักษาได้ไม่นาน สาเหตุของความเหนียวในเนื้อโคเพศผู้เกิดจากมีปริมาณคอลลาเจนที่ละลายน้ำได้ (insoluble collagen) ต่ำและมีปริมาณไขมันแทรกน้อยกว่าโคเพศผู้ตอน ชัยณรงค์ คันธพนิต. (2529) รายงานว่าขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อของเพศผู้จะใหญ่กว่าในสัตว์เพศเมียหรือเพศผู้ตอน และเพศผู้ตอนจะใหญ่กว่าเพศเมีย

2.3.4 เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue)

เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นเนื้อเยื่อที่ห่อหุ้มโครงสร้างในร่างกายสัตว์ โดยกล้ามเนื้อจะถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อิพิไมเซียม (epimysium) มัดกล้ามเนื้อจะถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชื่อ เพอริไมเซียม (perimysium) และเส้นใยกล้ามเนื้อจะถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชื่อ เอนโดไมเซียม (endomysium) ทั้งนี้องค์ประกอบที่สำคัญของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและมีบทบาทต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของเนื้อมากที่สุดคือ เส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) กล้ามเนื้อที่มีการเคลื่อนไหวมากจะมีปริมาณของ endomysium และ perimysium ค่อนข้างสูงโดยเฉพาะกล้ามเนื้อ extensor carpi radialis ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อบริเวณน่อง

จึงกล่าวได้ว่าปริมาณ และชนิดของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สามารถใช้อธิบายความแตกต่างของสายพันธุ์ในเรื่องความนุ่มได้ และสำหรับโคที่มี double muscle พบว่า เนื้อมีความนุ่มมากเกี่ยวข้องกับปริมาณคอลลาเจนที่ต่ำ (O' Connor *et al.* 1997) ทั้งนี้จากรายงานของ De Smet *et al.* (1998) ที่รายงานว่าโคที่มีลักษณะของ double muscle จะพบปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (collagen) น้อยกว่าซึ่งมีผลต่อความนุ่มของเนื้อ โดยพบว่ามีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำกว่าเนื้อโค Belgain Blue Normal ซึ่งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นเนื้อเยื่อสีขาวประกอบด้วยโปรตีนคอลลาเจนเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้ความร้อนชื้น (moist heat) จะทำให้เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเปลี่ยนเป็นเจลลาตินซึ่งทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้น แต่ถ้าให้ความร้อนแห้ง (dry heat) จะทำให้เนื้อเหนียวขึ้นเนื่องจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันไม่สามารถเปลี่ยนเป็นเจลลาตินได้ จึงกล่าวได้ว่าวิธีการทำให้เนื้อสุกเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อ และปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีความสัมพันธ์กับการทำงานของกล้ามเนื้อและอายุของสัตว์

2.3.5 ชนิดของกล้ามเนื้อ

Dransfield (1994) กล่าวว่า ชนิดของกล้ามเนื้อมีอิทธิพลอย่างยิ่งต่อคุณภาพของเนื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านของความนุ่ม จากการทดลองของ Shackelford *et al.* (1995) พบว่าค่าเฉลี่ยของค่าแรงตัดผ่านเนื้อในโคลูกผสมระหว่างพันธุ์เฮียร์ฟอร์ด, แองกัส และบราห์มัน ที่ผ่านการบ่มนาน 14 วัน มีค่าแตกต่างกันในกล้ามเนื้อแต่ละส่วน โดยพบว่ากล้ามเนื้อ psoas major และ infraspinatus มีความนุ่มไม่แตกต่างกันโดยมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 2.5 และ 2.7 กิโลกรัม และมีความนุ่มมากกว่ากล้ามเนื้อชนิดอื่น ๆ ได้แก่ กล้ามเนื้อ triceps brachili, กล้ามเนื้อ longissimus dorsi, กล้ามเนื้อ semitendinosus, กล้ามเนื้อ gluteus medius, กล้ามเนื้อ suprasprintus, กล้ามเนื้อ biceps femoris, กล้ามเนื้อ semimembranosus และ กล้ามเนื้อ quadriceps femoris โดยมีค่าเฉลี่ยของค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 3.9, 4.1, 4.1, 4.4, 4.3, 4.3, 4.3 และ 4.1 กิโลกรัม ตามลำดับ ค่าแรงตัดผ่านเนื้อของกล้ามเนื้อดังกล่าวมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ทั้งนี้ชนิดของกล้ามเนื้อยังมีอิทธิพลต่อเส้นใยกล้ามเนื้อโดยพบว่ากล้ามเนื้อ longissimus dorsi มีปริมาณของ type IIb (white fiber) ในสัดส่วนที่สูงมากถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กล้ามเนื้อ vastus intermedius ของเนื้อลูกมะพร้าว (knuckle) ที่มีปริมาณของ type I (red fiber) สูงถึง 70-80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นขบวนการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นภายในระดับเซลล์เช่น aerobic metabolism ซึ่งต้องการออกซิเจนที่มากับเลือด จึงเกิดขึ้นได้ดีกว่าเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด type IIb (white fiber) และยังพบว่าในเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด type I เท่านั้นที่จะมีการสร้าง intramuscular fat (IMF) รวมถึงกล้ามเนื้อที่ถูกใช้งานบ่อยจะมีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด type I สูงกว่ากล้ามเนื้อที่ไม่ถูกใช้งาน (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539)

2.3.6 ขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อ

ขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ เส้นใยกล้ามเนื้อละเอียด (fine texture) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยกล้ามเนื้อเล็ก และเส้นใยกล้ามเนื้อหยาบ (coarse texture) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยกล้ามเนื้อใหญ่กว่า เนื้อที่มีความนุ่มไม่เหนียว จะเป็นเนื้อที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อละเอียด ซึ่งความละเอียดหรือหยาบของเส้นใยกล้ามเนื้อขึ้นอยู่กับอายุ ชนิดของสัตว์ และชนิดของกล้ามเนื้อ จากผลการศึกษาของ ปิยะดา ทวิชศรี (2544) ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบชนิดสัตว์เคี้ยวเอื้องต่อขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อในกล้ามเนื้อสันนอก พบว่าโคนมลูกผสมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยกล้ามเนื้อเล็กกว่าโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนและกระบือปลัก อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่าโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนมีแนวโน้มค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงกว่าโคนมลูกผสม และกระบือปลัก นอกจากนี้ Koohmaraie *et al.* (1988) กล่าวว่าขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อโคมีความสัมพันธ์ตรงข้ามกับความนุ่มและมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกับค่าแรงตัดผ่านเนื้อ และพบว่าเส้นใยกล้ามเนื้อที่มีขนาดใหญ่จะมีความเหนียวมากกว่าเส้นใยกล้ามเนื้อที่ขนาดเล็กกว่า โดยพบว่าเนื้อสันในที่มีขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อเล็กจะมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำกว่าเนื้อสันนอกและเนื้อไหล่ซึ่งมีขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อใหญ่กว่า

2.3.7 ปริมาณไขมันแทรก

ไขมันแทรกที่ผู้บริโภคต้องการและนิยมคือ ไขมันแทรกในกล้ามเนื้อ (intramuscuiar fat หรือ marbling) ซึ่งเป็นไขมันที่สะสมอยู่ระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีชื่อว่า endomysium และ perimysium ที่หุ้มล้อมรอบ muscle bundle (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539) ระดับไขมันแทรกจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่เป็นตัวบ่งชี้ถึง รสชาติและความนุ่มของเนื้อ

Sherbeck *et al.* (1995) ได้ทำการศึกษาคุณภาพเนื้อของโคพันธุ์เฮียฟอร์ด (H) บราห์มัน (B) โคลูกผสมระดับเลือด (H:75xB:25) และโคลูกผสมระดับเลือด (H:50xB:50) พบว่าเนื้อที่ผ่านการบ่ม 18 วัน ในโคลูกผสมที่มีระดับเลือดบราห์มันเพิ่มขึ้นค่าแรงตัดผ่านเนื้อจะสูงขึ้นเท่ากับ (H:75xB:25) 3.27 และ (H50xB:50) 3.75 กิโลกรัม โดยมีคะแนนความนุ่มลดลงต่ำลงเท่ากับ 5.25 และ 4.83 อย่างมี

105290

นัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับ Marshall. (1994) ที่กล่าวว่าระดับไขมันแทรกและความนุ่มของเนื้อลดต่ำลงโดยมีระดับไขมันแทรกที่ 393, 351 และ 306 ตามลำดับ และค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 5.16, 5.80 และ 6.68 กิโลกรัมตามลำดับ เมื่อระดับเลือดบราห์มันเพิ่มขึ้นเป็น 25, 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์

Sethakul *et.al.* (2008) ได้ศึกษาคุณภาพเนื้อโคแต่ละประเภทที่เลี้ยงภายใต้ระบบการผลิตโคเนื้อประเทศไทย พบว่าปริมาณไขมันแทรกส่งผลให้ความนุ่มของเนื้อเพิ่มขึ้น โดยเนื้อโคขุนลูกผสมพันธุ์ชาร์โรเลส์เลือดสูงมีปริมาณไขมันแทรกสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รองมาคือเนื้อโคลูกผสมพันธุ์บราห์มันที่เลี้ยงด้วยเปลือกสับปะรดเป็นแหล่งอาหารหยาบ และเนื้อโคลูกผสมพันธุ์บราห์มันที่เลี้ยงแบบทั่วไปส่วนเนื้อโคพื้นเมืองมีปริมาณไขมันแทรกต่ำที่สุด มีค่าเท่ากับ 8.58, 2.87, 1.83 และ 0.77 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 5.10, 11.88, 15.53 และ 15.78 กิโลกรัมตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ พร้อมลักษณ์ สมบูรณ์ปัญญากุล. (2552) ที่กล่าวว่าโคขุนลูกผสมพันธุ์ชาร์โรเลส์มีปริมาณไขมันแทรกสูงกว่าเนื้อโคขุนลูกผสมพันธุ์บราห์มัน และเนื้อโคพื้นเมืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) มีค่าเท่ากับ 4.14, 1.34 และ 0.58 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

2.3.8 เอนไซม์

กระบวนการย่อยโปรตีนในกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย (proteolysis) มีผลต่อความนุ่มของเนื้อ โดยพบว่าทำให้เกิดการฉีกขาดของ myofibrilla protein

Koohmaraie. (1994) กล่าวว่า โดยปกติแล้วภายในกล้ามเนื้อจะมีเอนไซม์อยู่หลายชนิด (proteolytic enzymes) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวย่อยสลายโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์บางชนิดที่ทำปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน มีผลทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้นและมีรสชาติดีขึ้น ทั้งนี้ปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลงเมื่อนำเนื้อไปแช่แข็งไว้ และปฏิกิริยาจะหยุดเมื่ออุณหภูมิลดลงต่ำกว่า -80 องศาเซลเซียส

Calpain เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยโปรตีนในเนื้อมากในการย่อยสลายเส้นใยกล้ามเนื้อปริมาณ Z line เอนไซม์ชนิดนี้จะถูกกระตุ้นให้ทำงานโดย Ca^{2+} ที่ถูกปลดปล่อยออกมาสู่ภายนอกเซลล์กล้ามเนื้อภายหลังการทำงานของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตายสิ้นสุดลง การฉีดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้าไปในกล้ามเนื้อจะเป็นการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ calpain ให้ดีขึ้นทำให้มีการทำลาย Z line มากขึ้นเนื้อจึงมีความนุ่มเพิ่มขึ้น (Koohmaraie. 1994)

2.3.9 ระยะเวลาในการบ่ม (ageing)

Pearson and Young (1989) กล่าวว่า ระยะเวลาในการบ่มซากจะช่วยให้เอนไซม์ที่อยู่ในกล้ามเนื้อออกมาทำการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ซึ่งนอกจากจะเป็นการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อแล้ว ยังทำให้รสชาติดีขึ้นด้วย โดยปกติแล้วจะทำการบ่มเนื้อที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส แต่ในบางกรณีจะทำการบ่มซากที่อุณหภูมิ 14-15 องศาเซลเซียส แม้ว่าการบ่มเนื้อที่อุณหภูมิสูงจะเป็นการกระตุ้นให้เอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อทำงานได้ดีขึ้น แต่อาจเกิดปัญหาในการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นได้หากทิ้งเนื้อไว้ที่อุณหภูมิสูง Wheeler *et al.* (1990) รายงานว่า เนื้อที่ได้จากโคพันธุ์บราห์มันจะมีระดับความนุ่มต่ำในระยะแรกของการบ่ม แต่ความนุ่มจะถูกปรับปรุงขึ้นที่ระยะ 7-14 วัน ในการบ่มภายหลังสัตว์ตาย

Johnson *et al.* (1990) รายงานว่าค่าแรงตัดผ่านในโคลูกผสมเลือดบราห์มัน 75 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการบ่มที่ระยะเวลา 1 และ 5 วัน ไม่มีความแตกต่างกันแต่จะพบความแตกต่างเมื่อผ่านการบ่ม 10 วัน ส่วนเนื้อจากโคลูกผสมบราร์มัน 25 เปอร์เซ็นต์ พบแนวโน้มการลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่ระยะการบ่มเพิ่มขึ้น โดยพบการลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่การบ่ม 10 วัน ในโคพันธุ์แองกัสเท่ากับ 37 เปอร์เซ็นต์ และโคลูกผสมบราห์มันเลือด 25, 52 และ 75 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 2.7, 9.4 และ 16.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่ระยะการบ่ม 1 วัน

Nishimura *et al.* (1998) รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในเนื้อเกิดขึ้นน้อยมากในระหว่างการบ่ม แต่พบว่าหากยืดระยะเวลาการบ่มให้นานขึ้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปซึ่งจะส่งผลต่อการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อได้ โดยจากการทดลองเพื่อศึกษาความนุ่มในกล้ามเนื้อ semitendinosus ของโคพันธุ์เจเปนนีส แบล็ค (Japanese Black) เพศผู้ตอนอายุ 32 เดือน พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเนื้อถูกบ่มเป็นเวลามากกว่า 10 วัน และจะลดลง จนกระทั่ง 35 วันหลังสัตว์ตาย ทั้งนี้เมื่อวิเคราะห์จากเปอร์เซ็นต์การแตกตัวของเส้นใยเพอริไมเซียม พบว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 14 วันหลังสัตว์ตาย จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าความแข็งแรงของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้า ๆ ในระหว่างการบ่มเนื้อ ดังนั้นหากยืดระยะเวลาการบ่มเนื้อให้นานขึ้น จะทำให้เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยมีการแตกหักมากขึ้นจึงทำให้เนื้อโคมีความนุ่มเพิ่มขึ้น

วิชิต พรหมอินทร์. (2549) ได้ศึกษาคุณภาพซากและคุณภาพเนื้อโคขุนภายใต้ระบบการผลิตของสหกรณ์โคเนื้อกำแพงแสน พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้น โดยระยะเวลาบ่มเป็นเวลา 1, 5, 7, 14 และ 20 วัน มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) มีค่าเท่ากับ 7.39, 5.99, 4.99, 4.46 และ 3.82 กิโลกรัม

โรงฆ่าสัตว์ที่ได้มาตรฐานจะนำซากเข้าห้องเย็นที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส ทันทีเพื่อลดอุณหภูมิซากจาก 38 องศาเซลเซียสเป็น 10 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมินี้ไปจนครบ 24 ชั่วโมง (ชัยณรงค์ คันธพนิต. 2529) เพื่อให้ซากมีความแข็งตัวและอุณหภูมิที่ต่ำนี้ยังช่วยชะลอการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์อีกด้วย นอกจากนี้การแช่เย็นจะทำให้เนื้อมีความคงตัวทำให้สะดวกในการตัดแต่ง แต่ในทางตรงข้าม Dransfield *et al.* (1994) พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิให้กล้ามเนื้อทุก ๆ 10 องศาเซลเซียส จะสามารถปรับปรุงความนุ่มของเนื้อโคได้ถึง 2.5 เท่า แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินกว่า 60 องศาเซลเซียส อัตราความนุ่มของเนื้อจะลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากเอนไซม์ในเนื้อถูกทำลาย การนำซากเข้าแช่เย็นภายหลังสัตว์ตายเพื่อลดอุณหภูมิในในเนื้อจาก 37 องศาเซลเซียส ลงเหลือ 4 องศาเซลเซียส มีความสำคัญต่อความนุ่มของเนื้อเป็นอย่างมาก และจากการทดลองพบว่าภายใน 24 ชั่วโมงหลังฆ่าเมื่อเนื้อเกิดสภาวะการเกร็งตัวของกล้ามเนื้ออย่างถาวรผ่านไปแล้ว อุณหภูมิในเนื้อที่สูงอยู่จะสามารถปรับปรุงความนุ่มของเนื้อได้ถึง 86 เปอร์เซ็นต์ แต่หากนำเนื้อเข้าแช่เย็นแล้วจะสามารถปรับปรุงความนุ่มได้เพียง 8 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

2.3.10 การเปลี่ยนแปลงระดับความเป็นกรด – ด่าง ในเนื้อ

ค่าความเป็นกรด-ด่างของกล้ามเนื้อในขณะสัตว์กำลังตายนั้นจะมีค่าอยู่ระหว่าง 6.4-7.0 เกิดจากการที่กล้ามเนื้อจะยังคงมีการทำงานต่อไปอีกเป็นระยะเวลาหนึ่งภายหลังสัตว์ตาย ประกอบกับกรดแลคติกที่ถูกผลิตออกมาจากปฏิกิริยาไกลโคไลซิสเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนกว่าปริมาณไกลโคเจนที่สะสมอยู่ในกล้ามเนื้อหมดไป จึงให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงไป และเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงจนถึงจุดที่ไม่ลดลงอีกต่อไปคือประมาณ 5.3-5.5 จะเรียกจุดนี้ว่า ultimate pH (pHu) ซึ่งกล้ามเนื้อจะเข้าสู่สภาวะเกร็งตัวอย่างถาวร (rigor mortis) (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539)

ภายหลังสัตว์ตายค่าความเป็นกรด-ด่างในเนื้อจะลดลง เนื่องจากพลังงานที่ใช้ในการหดตัวของกล้ามเนื้อหลังจากสัตว์ตายได้จากขบวนการ anaerobic metabolism (ขบวนการสลายไกลโคเจนเป็นพลังงานโดยไม่ใช้ออกซิเจน) ทำให้เกิดกรดแลคติกและความร้อนขึ้นนอกเหนือจากพลังงานที่ได้โดยทั่วไปพบว่าในโคที่ยังมีชีวิตอยู่ และไม่ได้อยู่ในสภาวะที่เครียดกล้ามเนื้อจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ประมาณ 7.2 แต่หลังสัตว์ตาย 24 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง จะลดลงเหลือ 5.5-5.8 และจะไม่ลดลงอีก ซึ่งจุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ไม่ลดลงอีกนี้เรียกว่า Ultimate pH (pHu) ซึ่งการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ความสามารถในการ อุ้มน้ำของเนื้อ ความนุ่มของเนื้อ และสีของเนื้อเป็นสำคัญ (Warriss. 2000)

Anderson *et al.* (1999) กล่าวว่าการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างภายใน 24 ชั่วโมง หลังสัตว์ตายมีผลต่อคุณภาพเนื้อเป็นอย่างมาก ซึ่งการที่ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงเกิดจากการที่ไกลโคเจนที่สะสมอยู่ภายในกล้ามเนื้อเกิดการสลายตัวผ่านขบวนการ anaerobic metabolism ทำให้เกิดกรดแลคติกขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้โปรตีนบางส่วนในกล้ามเนื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติบางประการ

Dransfield. (1994) กล่าวว่า การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างนั้นนอกจากจะทำให้เกิดการสูญเสียสมบัติบางประการของโปรตีน ผนังเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายและเกิดการย่อยสลายของโปรตีนแล้ว หากค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงอย่างรวดเร็วจะส่งผลให้เส้นใย myosin ถูกทำลาย ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดลักษณะของเนื้อที่เป็น PSE (pale soft exudative) ขึ้นได้และทำให้เนื้อมีความสามารถอุ้มน้ำลดลง

Wheeler *et al.* (1990) พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อโคลดลงจาก 6.9 เป็น 5.8 ภายหลังจากการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากกล้ามเนื้อยังคงมีการทำงานอยู่ ทั้งนี้การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง จะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของห้องเย็นที่ใช้ในการเก็บรักษาเนื้อ กล่าวคือ ถ้าอุณหภูมิในกล้ามเนื้อลดลงเร็ว การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในเนื้อก็ช้าลง (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539)

นอกจากนี้อัตราการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในเนื้อ ยังขึ้นอยู่กับระดับของความเครียดก่อนสัตว์ตาย การที่สัตว์เกิดความเครียดอย่างรุนแรงก่อนที่จะถูกฆ่านั้นเป็นสาเหตุที่ทำให้ระบบต่างๆ ภายในร่างกายเกิดการเปลี่ยนแปลงและจะมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยา glycolysis ซึ่งจะส่งผลเสียต่อคุณภาพเนื้อภายหลังสัตว์ตาย การที่กล้ามเนื้อต้องทำงานหนักทำให้ต้องการ ATP อย่างรวดเร็วเป็นจำนวนมาก จนเลือดที่มาเลี้ยงกล้ามเนื้อไม่สามารถนำออกซิเจน กลูโคส กรดไขมันเข้าสู่กล้ามเนื้อเพื่อเปลี่ยนเป็น ATP โดยผ่านขบวนการ anaerobic metabolism ซึ่งจะทำให้เกิดกรดแลกติกและความร้อนขึ้น (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539) กรดแลกติกที่ถูกผลิตขึ้นมานี้เองที่มีผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพของเนื้อในเวลาต่อมา

Immonen *et al.* (2000) รายงานว่า ความเครียดที่สัตว์ได้รับก่อนการฆ่ามีความสัมพันธ์กับระดับไกลโคเจนที่สะสมอยู่ภายในกล้ามเนื้อ เนื่องจากมีปริมาณไกลโคเจนที่สะสมไม่มากพอที่จะทำให้กรดแลคติคเพิ่มมากขึ้น ในปฏิกิริยาเร่งการใช้ไกลโคเจนโดยผ่านกระบวนการ anaerobic metabolism นอกจากจะเกิดกรดแลคติคแล้ว ความร้อนยังเพิ่มขึ้นด้วย จึงส่งผลทำให้เนื้อเกิดลักษณะ สีคล้ำ แน่นแข็งและแห้ง เรียกเนื้อที่มีลักษณะเช่นนี้ว่า DFD (dark firm dry) หรือ dark cutting ส่งผลให้เนื้อมีคุณภาพด้อยลง นอกจากไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคเนื่องจากสีที่เข้มผิดปกติของเนื้อแล้วการเก็บรักษาเนื้อยังลดลงด้วย

พันธุ์มีอิทธิพลต่อความเครียดในสัตว์ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดลักษณะเนื้อ DFD ได้เช่นกัน Lorenzen *et al.* (1992) รายงานว่าโคที่มีเลือด *Bos taurus* มีโอกาสเกิดลักษณะ DFD ได้มากกว่าโคที่มีเลือด *Bos indicus* นอกจากนี้ยังพบโคนมมีโอกาสเกิดเนื้อ DFD ได้ถึง 9.7 เปอร์เซ็นต์

2.3.11 ฮอร์โมน

ฮอร์โมนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของสัตว์ให้เนื้อ ได้แก่

1) steroid hormone ที่สำคัญโดยที่สัตว์สร้างขึ้นเอง (endrogenous sex hormone) ได้แก่ estradiol, progesterone, testosterone และ androgen ซึ่งฮอร์โมนตัวหลังนี้ เป็นฮอร์โมนที่ถูกสร้างขึ้นจาก adrenal cortex ในระยะที่สัตว์ถึงวัยเจริญพันธุ์ (puberty) โดยทำหน้าที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อภายในร่างกาย ที่สำคัญคือ กล้ามเนื้อที่แสดงถึงความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย คือ กล้ามเนื้อบริเวณต้นคอและหัว โดยพบว่ามีการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อในส่วนเสี้ยวหน้า (fore quarter) เป็นอย่างมาก steroid hormone สังเคราะห์ที่สำคัญได้แก่ trenbolone, zeranol, slillbenes เป็นต้น ส่วน ฮอร์โมน testosterone เป็นฮอร์โมนที่สร้างจาก testis พบว่าเมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์ ฮอร์โมนนี้จะถูกสร้างขึ้นอย่างรวดเร็วจะมีส่วนช่วยเร่งการเจริญเติบโต ดังนั้นการตอนสัตว์ตั้งแต่ยังเล็กมีผลทำให้ไม่มีการสร้างฮอร์โมนตัวนี้ การเจริญเติบโตในสัตว์จึงลดลง

2) peptide hormone ที่สำคัญคือ growth hormone เป็นฮอร์โมนที่สร้างขึ้นจากต่อม pituitary มีความสำคัญมากต่อการควบคุมการเจริญเติบโต และเมตตาโบลิซึมของร่างกายสัตว์ก่อนถึงวัยเจริญพันธุ์ และจะทำหน้าที่โดยตรงในเรื่อง growth rate ที่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของอวัยวะภายใน การเจริญของกระดูกอ่อน กระตุ้นการทำงานของ osteoblast ในกระดูก ช่วยในการสังเคราะห์โปรตีน กระตุ้นให้เกิดการสะสมไนโตรเจนในร่างกายและยับยั้งการเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นยูเรีย (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539)

2.3.12 สารเร่งการเจริญเติบโต

สารเร่งการเจริญเติบโตนิยมใช้เพื่อเร่งการสะสมเนื้อ และลดการสะสมไขมันในร่างกายที่เรียกว่า partitioning agents ซึ่งต่างจาก growth promoters เนื่องจากสารในกลุ่มหลังบางครั้งไม่ช่วยปรับปรุงคุณภาพซากหรือเพิ่มปริมาณการสร้างเนื้อแดง แต่ทำให้อัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้นและประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารดีขึ้น โดยการใช้สารในกลุ่มแรกจะช่วยปรับปรุงคุณภาพซาก และเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต นอกจากจะทำให้ได้คุณภาพซากเป็นที่ต้องการของตลาดแล้ว ยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหาร และทำให้ได้รับผลตอบแทนสูงขึ้น

สารเร่งการสร้างเนื้อแดงที่สำคัญและเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายได้แก่ β-agronist และ procrine somatotropin (PST) ซึ่ง β-agronist เป็นกลุ่มสารสังเคราะห์ที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วน sympathetic เน้นกระตุ้นเซลล์ที่ตำแหน่ง β-site จึงมีชื่อเรียก β-adrenerigicagents หรือ β-agronist เป็นสารที่มีผลต่อการทำงานของ β-adrenoreceptors ที่บริเวณผิวของเซลล์ไขมันและกล้ามเนื้อ ใช้ได้ผลดีที่สุดในระยะสุดท้ายของการขุนการใช้ β-agronist ยังพบว่าทำให้ปริมาณไขมันแทรก (marbling) ในเนื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และยังพบว่าเนื้อมีความนุ่มลดน้อยลงแต่ไม่พบว่ามีผลต่อสีและการอุ้มน้ำของเนื้อ ส่วน procrine somatotropin (PST) เป็นสารในกลุ่ม growth hormone เพื่อเร่งสร้างการเจริญเติบโต เป็น

ฮอร์โมนที่สกัดจากธรรมชาติเมื่อเนื้อผ่านการทำให้สุก และขบวนการย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้ของคน ฮอร์โมนนี้จะหมดฤทธิ์ เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นโปรตีน และยังมีอนุพันธ์ที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงและออกฤทธิ์เหมือนกัน ที่สำคัญมี 4 ตัวคือ cimenteral, clenbuteral, rectoparnine และ sulbutamol ให้ผลตอบสนองในการสร้างกล้ามเนื้อแดงในโคดีกว่าในสุกร แต่นิยมใช้ในสุกรที่มีการใช้สารนี้ในรูปของ feed additive (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539)

2.4 ความสำคัญของโปรตีน troponin-T ต่อความนุ่มของเนื้อ

2.4.1 ชนิดของโปรตีน troponin-T

ชนิดของโปรตีน Tn-T ในกล้ามเนื้อสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม ตามชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ โดยเส้นใยกล้ามเนื้อ type I จะพบโปรตีน Tn-T ชนิด slow Tn-T ส่วนเส้นใยกล้ามเนื้อ type IIa และ type IIb จะพบโปรตีน Tn-T ชนิด fast Tn-T (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 ชนิดของโปรตีน troponin-T โดยแบ่งตามชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ

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

ที่มา: ดัดแปลงจาก Choi และ Kim (2009)

Muroya *et al.* (2006) ศึกษาความแตกต่างการย่อยสลายของโปรตีน troponin-T จากกล้ามเนื้อสันนอกในโคพันธุ์ Japanese Black ที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 1, 5 และ 14 วัน หลังสัตว์ตาย ด้วยเทคนิค western blot ทำการจำแนกประเภทของ troponin-T ออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม fast troponin-T ประกอบไปด้วย polypeptide ที่มีขนาด 36.5, 35.4, 34.8 และ 32.8 kDa และกลุ่ม slow troponin-T ประกอบด้วย polypeptide ที่มีขนาด 34.5 และ 32.1 kDa เมื่อศึกษาในเรื่องของการย่อยสลายแล้วพบว่า fast troponin-T จะเริ่มมีการย่อยสลายของ troponin-T ในวันที่ 1 ของการบ่ม และพบว่ามี polypeptide ที่มีขนาด 32.1, 30.9, 29.6, 28.3, 27.4, 26.9 และ 26.0 kDa ปรากฏขึ้น และมีปริมาณมากขึ้นในทุกๆระยะของการบ่ม ในขณะที่กลุ่ม slow troponin-T พบว่าเริ่มมีการย่อยสลายของ troponin-T ในวันที่ 1 ของการบ่มเช่นกัน และมี polypeptide ที่มีขนาด 31.0 kDa ปรากฏขึ้น

2.4.2 การย่อยสลายของโปรตีน troponin-T ที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อ

Koohmaraie (1992) รายงานว่าผลจากการสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อภายหลังจากสัตว์ตายนั้นจะเกิดการย่อยสลายของโปรตีน titin, nebulin และ desmin ซึ่งทำให้เกิดการแตกตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ และการย่อยสลายของโปรตีน troponin-T ซึ่งทำให้พบการปรากฏของ polypeptide ขนาด 30 kDa ทำให้แรงตึงของเส้นใยกล้ามเนื้อหมดลง และยังพบ polypeptide ขนาด 95 kDa และ 27 kDa โดยคาดว่าเป็นผลผลิตที่ได้จากการสลายตัวของโปรตีนขนาดใหญ่ ซึ่งการสลายตัวของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและการปรากฏของ polypeptide ดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อที่เพิ่มขึ้น

Hedrick *et al.* (1993) อธิบายการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนจากการสลายตัวของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อว่าจะเกิดการสลายตัวของโปรตีน titin, nubulin, desmin และ troponin-T โดยการสลายตัวของ troponin-T ทำให้เกิด polypeptide ที่มีน้ำหนักขนาด 28-30 kDa และยังพบ polypeptide ขนาด 95 kDa ในขณะที่โปรตีน actin และ myosin ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในการยึดและหดตัวของกล้ามเนื้อไม่ถูกย่อยสลายเหมือนกับโปรตีนตัวอื่น ๆ

Ho *et al.* (1994) ศึกษาการสลายตัวของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและการปรากฏของ polypeptide ขนาด 30 kDa ในเนื้อบ่มที่ระยะเวลา 1, 3, 7, 14 และ 28 วันหลังจากสัตว์ตาย สามารถยืนยันได้ว่าการปรากฏของ polypeptide ขนาด 30 kDa นั้นมาจากการสลายตัวของโปรตีน troponin-T โดยใช้เทคนิค western blot เพื่อยืนยันโปรตีนดังกล่าว ซึ่งจะเริ่มพบ polypeptide ขนาด 30 kDa ในวันที่ 3 จนถึงวันที่ 28 ของการบ่มหลังจากสัตว์ตาย

Ho *et al.* (1997) ศึกษาการสลายตัวของ titin, nubulin, desmin และ troponin-T ในกล้ามเนื้อ longissimus ของโคหลังจากถูกกระตุ้นซากด้วยกระแสไฟฟ้าภายหลังการฆ่าในโคลูกผสม *Bos indicus* ระหว่างโคพันธุ์ Brhaman x Simmental จำนวน 7 ตัว ทำการเปรียบเทียบในระยะเวลา 0, 1, 3, 7, 14 และ 28 วัน ของการบ่มเนื้อหลังจากสัตว์ตาย ด้วยเทคนิค SDS – PAGE พบว่า แถบแบน troponin-T ที่ลดลงจะทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ 30 kDa ทั้งในซากที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและไม่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า และจากการยืนยันแถบแบน troponin-T ด้วยเทคนิค western blot พบว่าอัตราการลดลงของ troponin-T ไม่แตกต่างกันแต่การปรากฏของแถบแบน 30 kDa ในวันที่ 7 ถึง 28 ของซากที่ถูกกระตุ้นที่กระแสไฟฟ้านั้นชัดเจนกว่า

Steen *et al.* (1997) ศึกษาโคพันธุ์ Belgian Blue White ที่มีลักษณะ double-muscle โดยใช้ส่วนของกล้ามเนื้อ longissimus thoracis ที่บ่มเป็นเวลา 1, 5, 8 และ 12 วัน หลังสัตว์ตาย พบว่าโปรตีน titin, nubulin, desmin และ troponin-T จะสลายตัวตามระยะเวลาการบ่มที่นานขึ้น โดย troponin-T สลายตัวถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างวันที่ 1 ถึง 8 ของการบ่มและในวันที่ 8 ของการบ่มเนื้อค่าความเข้มข้นของ troponin-T จะมีความสัมพันธ์กับ 30 kDa และค่าแรงตัดผ่านชิ้นเนื้อ และยังพบว่าเนื้อที่มีค่าความเป็นกรด – ด่างสูงในชั่วโมงที่ 3 หลังจากสัตว์ตายจะเพิ่มอัตราการสลายตัวของโปรตีน troponin-T ในขณะที่

เนื้อที่มีอุณหภูมิสูงในชั่วโมงที่ 1 และ 3 หลังจากสัตว์ตายจะลดอัตราการสลายตัวของโปรตีน troponin-T ในวันที่ 5 ของการบ่ม ทำให้เนื้อมีความนุ่มลดลง

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

Kolezak *et al.* (2003) ศึกษาการสลายตัวของโปรตีนในเนื้อที่มีอายุแตกต่างกัน ได้แก่ ลูกโค โคสาว และแม่โค ที่ผ่านการบ่มที่ระยะเวลา 1, 6 และ 12 วันหลังจากสัตว์ตาย พบว่าการสลายตัวของโปรตีนในกลุ่มของ contractile α-actinin และโปรตีนกลุ่มควบคุม (regulatory protein) ไม่มีความแตกต่างกันในโคแต่ละกลุ่ม ยกเว้น troponin-T และจะพบการปรากฏของ polypeptides ขนาด 30 kDa ในกลุ่มของลูกโคเร็วที่สุดรองลงไปเป็นโคสาว และแม่โค ในด้านของการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อในแม่โคจะสลายได้ต่ำที่สุดและสูงสุดในลูกโค ทำให้ความนุ่มของเนื้อในลูกโคมีค่าสูงที่สุด

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 ตัวอย่างเนื้อโคที่ใช้ในการศึกษา

1) เนื้อโคพื้นเมืองไทย เลี้ยงด้วยระบบปล่อยแทะเล็มหญ้าตามธรรมชาติ ในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี และจังหวัดนครปฐม จำนวน15 ตัว น้ำหนักมีชีวิต 198.43±11.23 กิโลกรัม เข้าฆ่าที่บริษัทประกอบบีฟโปรดักส์ จังหวัดราชบุรี และศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

2) เนื้อโคลูกผสมพันธุ์กำแพงแสน (ชาโรเลส์ 50% x บราห์มัน 25% x โคพื้นเมืองไทย 25%) เลี้ยงภายใต้ระบบการผลิตของสหกรณ์โคเนื้อกำแพงแสน จำนวน 15 ตัว น้ำหนักมีชีวิต 544.64±29.86 กิโลกรัม เข้าฆ่าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

3.1.2 การเก็บตัวอย่างเนื้อโค

ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อโคจากกล้ามเนื้อสันนอก (longissimus dorsi) บริเวณซี่โครงซี่ที่ 6-12 จากซีกซ้ายของซาก จากโคทดลองทั้ง 2 ชนิด จากนั้นนำเก็บไว้ในห้องเย็นที่มีอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส จนถึงเวลา 24 ชั่วโมง หลังการฆ่า จึงนำชิ้นเนื้อมาตัดแบ่งตามระยะเวลาการบ่มที่ 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน โดยให้ได้รูปแบบชิ้นเนื้อสเต็กที่มีความหนา 2.5 เซนติเมตร ใส่ในถุงสุญญากาศ จากนั้นนำไปบ่มในห้องเย็นที่มีอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาการบ่มตามที่กำหนดในแต่ละวันจึงนำชิ้นเนื้อตัวอย่างมาทำการศึกษาค่าความนุ่มของเนื้อด้วยวิธีวัดค่าแรงตัดผ่าน และการสลายตัวของ troponin-T ด้วยเทคนิค western blot

3.2 การวัดค่าแรงตัดผ่านของเนื้อ (Warner-Bratzler shear force)

3.2.1 อุปกรณ์

1) เครื่องบรรจุสุญญากาศ รุ่น VP-600A (vacum packaging machine) (Ramon, Germany)

2) ถุงสุญญากาศชนิด polyvinyl chloride

3) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Memmert, Germany)

4) เครื่องมือวัดอุณหภูมิใจกลางเนื้อแบบอิเลคโทรนิค รุ่น TTX 100 (Ebro, Germany)

5) เครื่องมือวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ รุ่น 1011 (WarnerBratzler Shear Force) (Instron, USA)

6) ห้องแช่เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ 2-4 องศาเซลเซียส

3.2.2 วิธีการวัดค่าแรงตัดผ่านของเนื้อ

นำตัวอย่างเนื้อโคที่ครบระยะเวลาบ่มที่ 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน มาตัดแต่งเอาพังผืดและไขมันออก และตัดชิ้นเนื้อเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า หนา 2.5 เซนติเมตร ใส่ในถุงร้อนแล้วทำการไล่อากาศออกด้วยเครื่องบรรจุสุญญากาศ และนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อที่ 70-75 องศาเซลเซียส จึงนำถุงที่ใส่ชิ้นเนื้อไปลดอุณหภูมิ โดยการใช้น้ำไหลผ่านประมาณ 20 นาที แล้วตัดชิ้นเนื้อตามแนวยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อให้มีขนาด กว้าง x ยาว x หนา เท่ากับ 1 x 3 x 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตัวอย่างละ 10 ชิ้น แล้วนำไปวัดค่าแรงตัดผ่านของเนื้อ ด้วยเครื่องวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อรุ่น 1011 โดยกำหนดหน่วยเป็น กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร (Boccard *et al.* 1981)

3.3 การสกัดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ

3.3.1 อุปกรณ์

1) เครื่องชั่งน้ำหนักแบบดิจิตอล ขนาด 220 กรัม รุ่น CP2243 (Sartorius, Germany)
2) เครื่องบดละเอียด รุ่น minipimer MR 430 HC (Moulinex, France)
3) เครื่อง homogenizer (Ultra tarrax, Germany)
4) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Universal 32R (Hettich, Germany)
5) เครื่องเขย่าสาร รุ่น incubated shaker KBLee 1001 (Daiki, Korea)
6) micropipet (Gilson, France)
7) micro tube (Eppendorf, Germany)
8) ตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส

3.3.2 สารเคมี

1) Sucrose (Ajax Finechem, Australia)
2) EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt) (Univar, Australia)
3) Tris (Promega, USA)
4) Potassium chloride (KCl) (Ajax Finechem, Australia)
5) Imidazol (Fluka Biochemika, USA)
6) SDS (sodium dodecyl sulfate) (Bio Basic Inc., USA)
7) 2 – mercaptoethanol (Merck, Germany)

3.3.3 วิธีการสกัดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ

นำตัวอย่างเนื้อสดที่ผ่านการบ่มที่ระยะเวลา 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ แล้วนำตัวอย่างเนื้อที่บดแล้วตัวอย่างละ 2.5 กรัม มาทำการบดละเอียด ด้วยเครื่อง homogenizer ที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที ร่วมกับสารละลาย STE buffer 25 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่าง ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนของตะกอนมาเติมสารละลาย TE buffer 25 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนของตะกอนที่ได้มาเติม สารละลาย 0.15M KCl 25 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3,500 รอบ ต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอีกครั้งหนึ่ง

จากนั้นนำส่วนของตะกอนที่ได้มาเติมสารละลาย sample buffer 30 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนของสารละลายซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่ตู้แช่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Claeys *et al.* 1995)

3.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน

3.4.1 อุปกรณ์

1) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น ultrospec 1100 pro UV/visible spectrophotometer (Amersham phamasia biotechnique, United Kingdom)
2) micropipet (Gilson, France)
3) micro tube (Eppendorf, Germany)

3.4.2 สารเคมี

1) น้ำยาวัดโปรตีน (protein assay) (BioRad, USA)
2) BSA (bovine serum albumin) (Fluka Biochemika, USA)
3) น้ำกลั่น

3.4.3 วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน

ทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารละลายโปรตีนโดยนำ Bovine Serum Albumin (BSA) มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันมาอย่างละ 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำยาวัดโปรตีน (BioRad) 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน และ

คำนวณสมการถดถอย y = ax + b โดยค่า y เป็นค่าการดูดกลืนแสง และค่า x เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลาย BSA

3.5 การวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE

3.5.1 อุปกรณ์

1) เครื่องสำหรับการแยกโปรตีนแบบ vertical slab gels ขนาด 7 x 10 x 0.75 ลูกบาศก์เซนติเมตร (BioRad, USA)
2) เครื่องเขย่าสาร รุ่น incubated shaker KBLee 1001 (Daiki, Korea)
3) เครื่องถ่ายรูปเจล รุ่น gene genius bio imagine system (Syngeme, Germany)

3.5.2 สารเคมี

1) โปรตีนมาตรฐาน (protein marker) PageRuler Plus Prestained Protein (Fermentus, Canada)
2) 30% acrylamide-bis solution (29:1) (Serva, USA)
3) SDS (sodium dodecyl sulfate) (Bio Basic Inc., USA)
4) Tris (Promega, USA)
5) 2 – mercaptoethanol (Merck, Germany)
6) TEMED (tetramethylethylenediamine) (Bio Basic Inc., USA)
7) APS (ammoniumpersulfate) (Ajax Finechem, Australia)
8) น้ำกลั่น
9) coomassie blue R250 รุ่น CI42660 (Research organics, USA)
10) methanol (Univer, Australia)
11) bromophenol blue (Ajax Finechem, Australia)
12) ethanol (Merck, Germany)
13) BSA (bovine serum albumin) (Fluka Biochemika, USA)
14) phosphoric acid (H3PO4) (Merck, Germany)
15) glycine (Promega, USA)

3.5.3 เทคนิค SDS-PAGE

ใช้เครื่องแยกโปรตีนแบบ vertical slab gel ขนาด 7 x 10 x 0.75 ลูกบาศก์เซนติเมตร ความเข้มข้นของเจลชั้นล่างคือส่วนของ separating gel 12.5 % และความเข้มข้นเจลชั้นบนคือส่วนของ stacking gel 4 % การหยอดโปรตีนตัวอย่างให้ช่องที่ 1 เป็นโปรตีนมาตรฐาน (protein marker) เพื่อใช้เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่าง ประกอบด้วย 250 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 17 kDa และ 11 kDa ตามลำดับ ช่องที่ 2 ให้เป็นช่องของสารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 67 kDa เพื่อใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน สำหรับช่องที่ 3 เป็นต้นไปเป็นโปรตีนตัวอย่างโดยใช้ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม และ sample buffer ลงไปด้วยในอัตราส่วน myofibrillar proteins : sample buffer เท่ากับ 3 : 1 เพื่อให้เห็นการเคลื่อนที่ของโปรตีนใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ (V) 50 มิลลิแอมแปร์ (mA) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ running buffer เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า (Ho *et al.* 1997)

เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำเจลไปย้อมสีใน straining buffer เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลไปล้างสีส่วนที่ไม่ต้องการออกใน destrain buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำเจลที่ได้ไปถ่ายรูปเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนด้วยเครื่องถ่ายรูปเจล

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณของ Tn-T ด้วยเทคนิค western blot

3.6.1 อุปกรณ์

1) เครื่องสำหรับการแยกโปรตีนแบบ vertical slab gels ขนาด 7 x 10 x 0.75 ลูกบาศก์เซนติเมตร (BioRad, USA)
2) เครื่องสำหรับการย้ายโปรตีนจากเจล polyacrylamide ไปสู่แผ่นเมมเบรน (BioRad, USA)
3) แผ่นเมมเบรน polyvinylidene difluoride (PVDF) (Amersham bioscience, United Kingdom)
4) เครื่องถ่ายรูปเจล รุ่น gene genius bio imagine system (Syngeme, Germany)

3.6.2 สารเคมี

1) โปรตีนมาตรฐาน (protein marker) PageRuler Plus Prestained Protein (Fermentus, Canada)
2) 30% acrylamide-bis solution (29:1) (Serva, USA)
3) SDS (sodium dodecyl sulfate) (Bio Basic Inc., USA)
4) Tris (Promega, USA)
5) 2 – mercaptoethanol (Merck, Germany)
6) TEMED (tetramethylethylenediamine) (Bio Basic Inc., USA)

7) APS (ammoniumpersulfate) (Ajax Finechem, Australia)

8) bromophenol blue (Ajax Finechem, Australia)

9) glycine (Promega, USA)

10) น้ำกลั่น

11) mouse anti-troponin-T (Sigma, USA)

12) anti-mouse IgG (Roche, Germany)

13) 3,3',5,5'- tetramethyl-benzidine (Sigma, USA)

14) blocking buffer(0.05M Tris, 3 % nonfat milk)

15) wash buffer (0.05M Tris, 0.138M NaCl, 0.0027M KCl, 0.05 % Tween 20)

16) running buffer (192mM Glycine, 25mM Tris, 0.1 % SDS)

17) transfer buffer (192mM Glycine, 25mM Tris, 20 % Methanol)

3.6.3 เทคนิค western blot

ทำการวิเคราะห์ความการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน troponin-T โดยใช้เครื่องแยกโปรตีนแบบ vertical slab gel ขนาด 7 x 10 x 0.75 ลูกบาศก์เซนติเมตร ความเข้มข้นของเจลชั้นล่างคือส่วนของ separating gel 12.5 % และความเข้มข้นเจลชั้นบนคือส่วนของ stacking gel 4 % การหยอดโปรตีนตัวอย่างให้ช่องที่ 1 เป็นโปรตีนมาตรฐาน (protein marker) เพื่อใช้เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่าง ประกอบด้วย 250 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 17 kDa และ 11 kDa ตามลำดับ สำหรับช่องที่ 2 เป็นต้นไปเป็นโปรตีนตัวอย่างโดยใช้ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม และ sample buffer ลงไปด้วยในอัตราส่วน myofibrillar proteins : sample buffer เท่ากับ 3 : 1 เพื่อให้เห็นการเคลื่อนที่ของโปรตีนใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ (V) 50 มิลลิแอมแปร์ (mA) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ running buffer เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า

ทำการย้ายโปรตีนจากเจล polyacrylamide ไปสู่แผ่นเมมเบรน polyvinylidene difluoride (PVDF) ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ (V) 350 (mA) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ transfer buffer เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า นำแผ่นแมมเบรนมาล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นทำการ block ด้วย blocking buffer นาน 1 ชั่วโมง จึงนำแผ่นแมมเบรนแช่ในแอนติโทรโปนินที (mouse anti-troponin-T) เจือจาง 1:15,000 เป็นแอนติบอดีตัวที่ 1 ในการจับกับโปรตีนตัวอย่างโดยทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำแมมเบรนมาล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นทำการแช่แผ่นแมมเบรนอีกครั้งหนึ่งในแอนติบอดีตัวที่ 2 (anti-mouse IgG) เจือจาง 1:750 ซึ่งมีความจำเพาะกับแอนติบอดีตัวที่ 1 โดยแอนติบอดีตัวที่ 2 จะติดฉลากเอนไซม์ horseradish peroxidase เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นแมมเบรนด้วย wash buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที (Ho *et al.* 1997)

ตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาโดยใส่ซับสเตรท (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine) ซึ่งมีความจำเพาะกับเอนไซม์ดังกล่าวเพื่อให้เห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีน troponin-T ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นจึงนำแผ่นแมมเบรนไปถ่ายรูป และทำการวิเคราะห์ความเข้มของแถบโปรตีน troponin-T ด้วยโปรแกรม Gene Tool

3.6.4. การวัดความเข้มของแถบโปรตีน Tn-T ด้วยโปรแกรม Gene Tool

เมื่อนำรูปแผ่นแมมเบรนที่ถ่ายไว้มาเปิดในโปรแกรม Gene Tool เพื่อทำการวิเคราะห์โดยเริ่มจาก การกำหนดน้ำหนักของโปรตีนมาตรฐานเพื่อใช้เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนตัวอย่างที่ศึกษา จากนั้นจึงกำหนดขอบเขตของแถบโปรตีนที่ศึกษา เพื่อให้โปรแกรมวิเคราะห์และรายงานผล โดยเลือกรูปแบบการรายงานผลไปที่โปรแกรม Microsoft Excel

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสลายตัวของโปรตีน troponin-T และความนุ่มของเนื้อโคในกลุ่มตัวอย่าง วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี Proc. GLM ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Proc. Pdiff โดยมีแบบหุ่นทางสถิติ ดังนี้

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

Y_{ijk} = ลักษณะที่ศึกษา ได้แก่ การสลายตัวของโปรตีน troponin-T และความนุ่มของเนื้อตัวที่ k (k = 1, 2, 3, …, 30)

μ = ค่าเฉลี่ยของลักษณะที่ศึกษา

A_i = อิทธิพลของชนิดเนื้อโคที่ i = 1, 2 (1 = เนื้อโคกำแพงแสน, 2 = เนื้อโคพื้นเมือง)

B_j = อิทธิพลของระยะเวลาบ่มเนื้อที่ j = 1, 2, 3, 4, 5 โดยบ่มที่ 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน ตามลำดับ

AB_{ij} = อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดเนื้อโคที่ i = 1, 2 (1 = เนื้อโคกำแพงแสน, 2 = เนื้อโคพื้นเมือง) กับระยะเวลาบ่มเนื้อที่ j = 1, 2, 3, 4, 5 โดยบ่มที่ 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน ตามลำดับ

e_{ijk} = ความคลาดเคลื่อนทั้งหมดของการทดลอง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T

4.1.1 รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ในแต่ละระยะเวลาการบ่ม

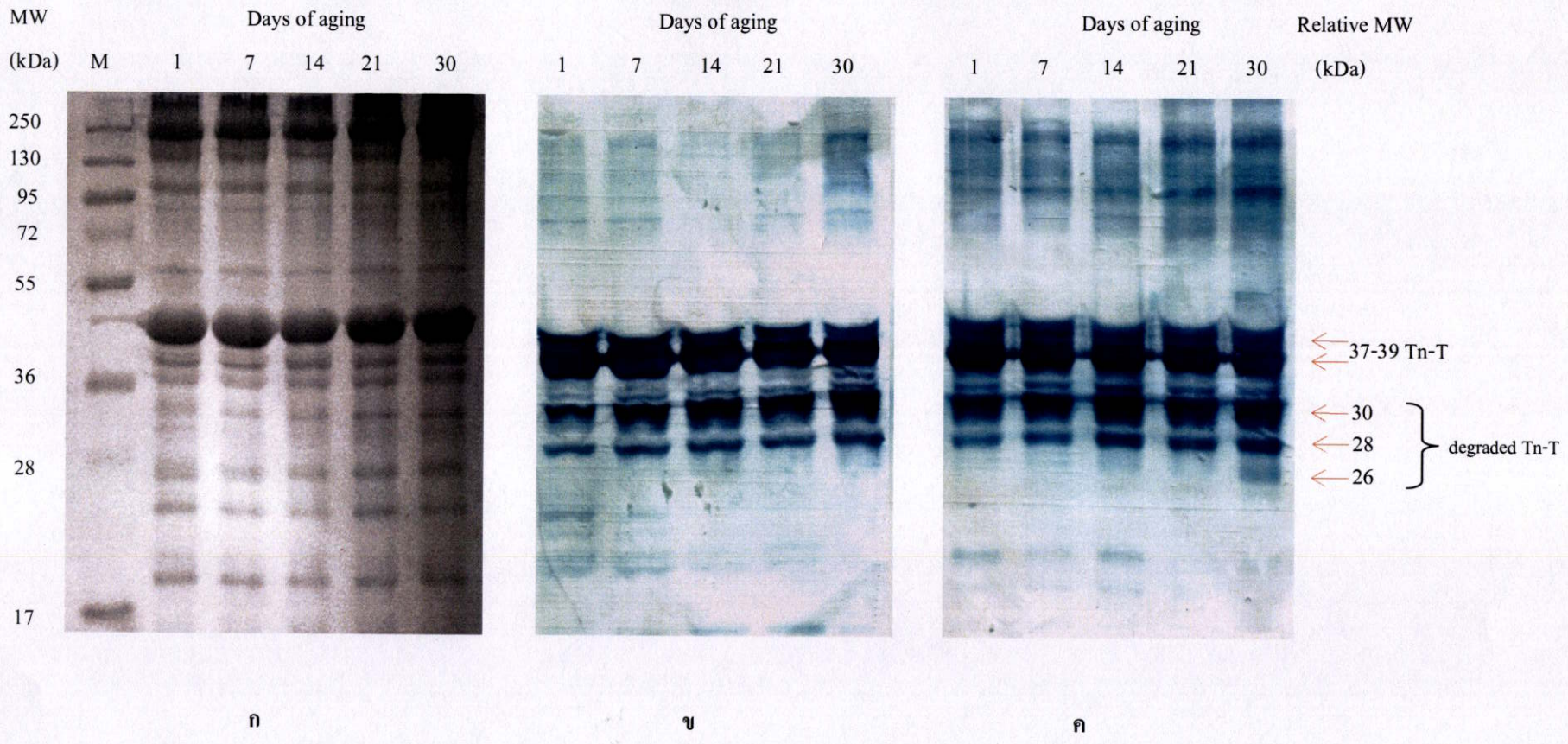
จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Tn-T ในเนื้อโคกำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมือง ชนิดละ 15 ตัวอย่าง พบว่าเนื้อโคกำแพงแสนมีค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T สูงกว่าเนื้อโคพื้นเมืองในทุกช่วงระยะเวลาการบ่ม และการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ในเนื้อโคทั้ง 2 ชนิด ที่ระยะเวลาบ่ม 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน พบว่าโปรตีน Tn-T 39 kDa และ 37 kDa มีการสลายตัวตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน Tn-T 30 และ 28 kDa เกิดขึ้น ตลอดช่วงระยะเวลาการบ่มเนื้อ ในขณะที่โปรตีน Tn-T 26 kDa จะพบ เฉพาะในเนื้อโคพื้นเมือง จำนวน 5 ตัวอย่างทดลองในวันที่ 30 ของการบ่ม (ภาพที่ 4.1)

4.1.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงโปรตีน Tn-T

1) ชนิดเนื้อโค

จากการศึกษาอิทธิพลของชนิดเนื้อโคกำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมือง พบว่าค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T 39 kDa, 30 kDa และ 28 kDa ในเนื้อโคกำแพงแสนสูงกว่าเนื้อโคพื้นเมืองอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) โดยในเนื้อโคกำแพงแสนมีค่าเท่ากับ 406.85±12.73, 464.87±11.18 และ 304.24±7.66 ($x10^3$ พิกเซล) ตามลำดับ ในเนื้อโคพื้นเมืองมีค่าเท่ากับ 252.81±12.73, 283.73±11.18 และ 180.92±7.66 ($x10^3$ พิกเซล) ตามลำดับ ในขณะที่ Tn-T 37 kDa ในเนื้อโคทั้ง 2 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.1 และ ภาพที่ 4.2)

เมื่อนำโปรตีน Tn-T 39 kDa และ 37 kDa ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่มที่มีการสลายตัวของเนื้อโคแต่ละชนิดมารวมกันจะพบว่าเนื้อโคกำแพงแสนมีค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T สูงกว่าเนื้อโคพื้นเมืองอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) มีค่าเท่ากับ 839.70±19.67 และ 657.47±19.67 ($x10^3$ พิกเซล) ตามลำดับ และเมื่อนำโปรตีน Tn-T 30 kDa, 28 kDa และ 26 kDa ของเนื้อโคแต่ละชนิดมารวมกันพบว่าเนื้อโคกำแพงแสนมีค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T สูงกว่าเนื้อโคพื้นเมืองอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) มีค่าเท่ากับ 769.11±16.56 และ 472.38±16.56 ($x10^3$ พิกเซล) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2 และ ภาพที่ 4.3)

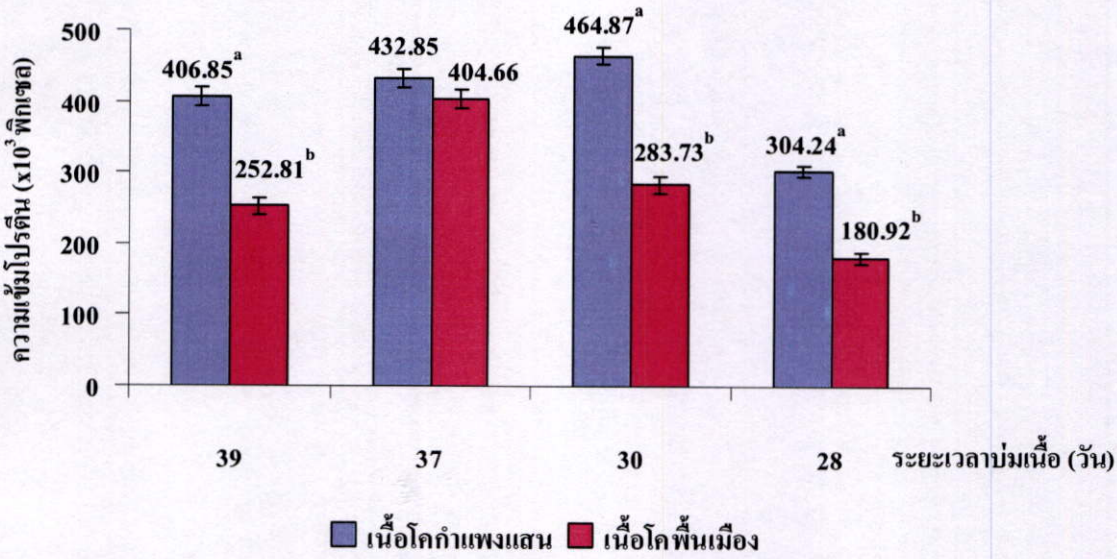


ภาพที่ 4.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T ที่ระยะเวลาบ่ม 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน โดย (ก) การสลายตัวของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ข) การสลายตัวของ Tn-T ในเนื้อโคกำแพงแสน และ (ค) การสลายตัวของโปรตีน Tn-T ในเนื้อโคพื้นเมือง ด้วยเทคนิค western blot

ตารางที่ 4.1 อิทธิพลของชนิดเนื้อโคที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T (LSM±SE)

ค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T ($x10^3$ พิกเซล)	ชนิดเนื้อโค		P-value
	เนื้อโคกำแพงแสน	เนื้อโคพื้นเมือง	
39 kDa	406.85±12.73[a]	252.81±12.73[b]	0.0001
37 kDa	432.85±12.57	404.66±12.57	0.1149
30 kDa	464.87±11.18[a]	283.73±11.18[b]	0.0001
28 kDa	304.24±7.66[a]	180.92±7.66[b]	0.0001

[a, b] อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)



ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงอิทธิพลของชนิดเนื้อโคที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T

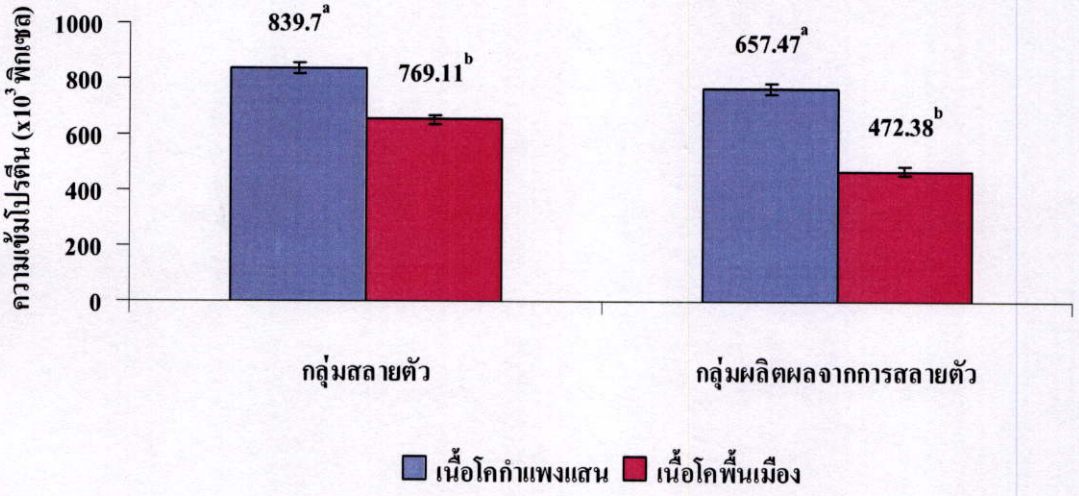
ตารางที่ 4.2 อิทธิพลของชนิดเนื้อโคที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T รวม (LSM±SE)

ค่าความเข้มของโปรตีน (x10^3 พิกเซล)	ชนิดเนื้อโค		P-value
	เนื้อโคกำแพงแสน	เนื้อโคพื้นเมือง	
กลุ่มสลายตัว[1]	839.70±19.67^a	657.47±19.67^b	0.0001
กลุ่มผลิตผลจากการสลายตัว[2]	769.11±16.56^a	472.38±16.56^b	0.0001
เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายโปรตีน	32.24	34.80	

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

[1] โปรตีน Tn-T 39 kDa และ 37 kDa

[2] โปรตีน Tn-T 30 kDa, 28 kDa และ 26 kDa



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงอิทธิพลของชนิดเนื้อโคที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T รวม

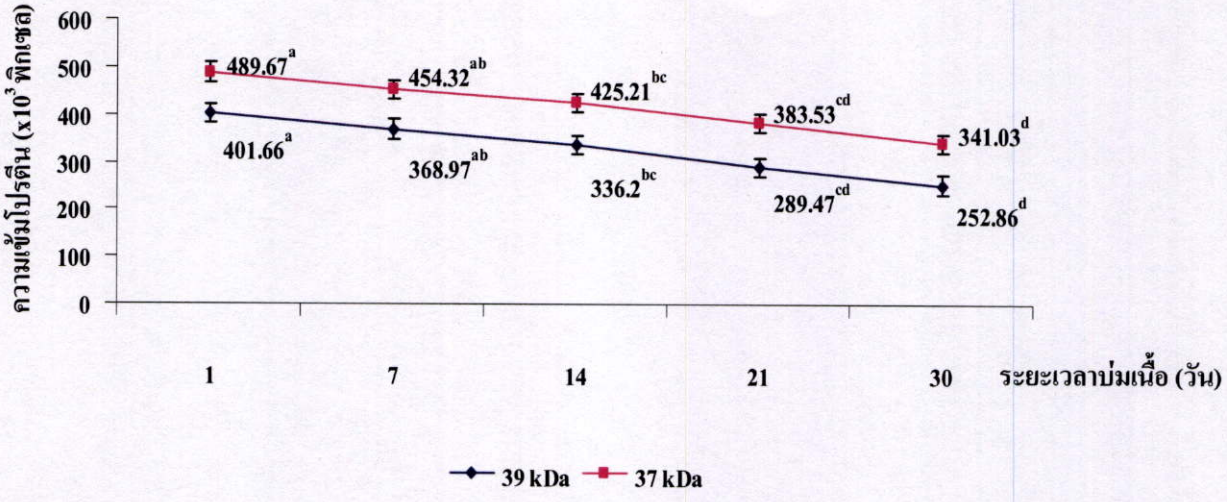
2) ระยะเวลาบ่มเนื้อ

ค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T พบว่าค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T 39 kDa และ 37 kDa จะลดลงเมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) โดยโปรตีน Tn-T 39 kDa มีค่าที่ระยะเวลาการบ่ม 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน เท่ากับ 401.66±20.12, 368.97±20.12, 336.20±20.12, 289.47±20.12 และ 252.68±20.12 (x10^3 พิกเซล) ตามลำดับ และโปรตีน Tn-T 37 kDa มีค่าเท่ากับ 489.67±19.87, 454.32±19.87, 425.21±19.87, 383.53±19.87 และ 341.03±19.87 (x10^3 พิกเซล) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3 และ ภาพที่ 4.4)

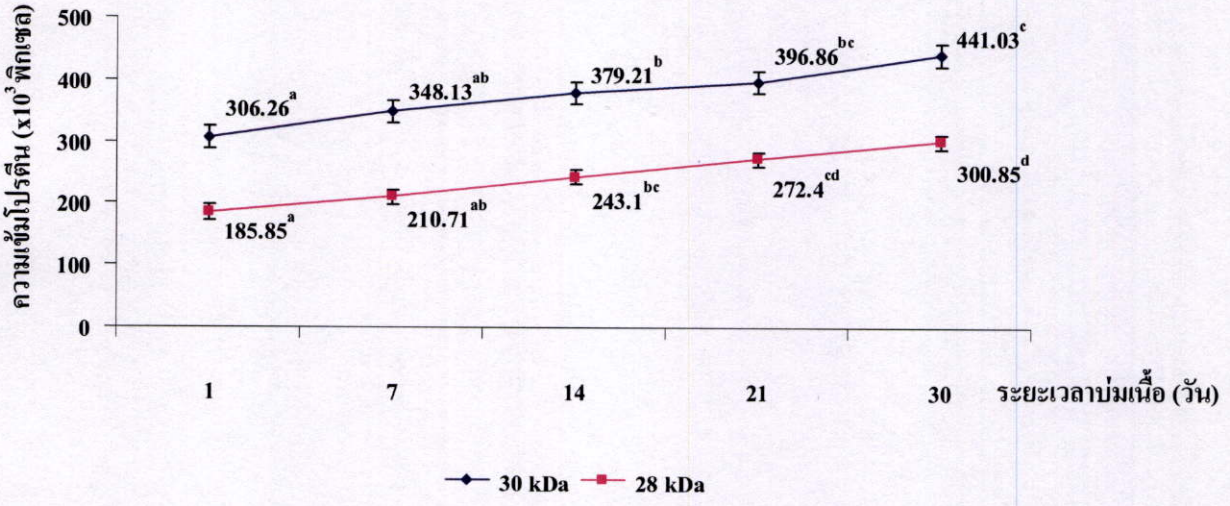
ตารางที่ 4.3 อิทธิพลของระยะเวลาบ่มเนื้อที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T (LSM±SE)

ค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T ($x10^3$ พิกเซล)	ระยะเวลาบ่มเนื้อ (วัน)					P-value
	1	7	14	21	30	
39 kDa	401.66±20.12^{a}	368.97±20.12^{ab}	336.20±20.12^{bc}	289.47±20.12^{cd}	252.86±20.12^{d}	0.0001
37 kDa	489.67±19.87^{a}	454.32±19.87^{ab}	425.21±19.87^{bc}	383.53±19.87^{cd}	341.03±19.87^{d}	0.0001
30 kDa	306.26±17.68^{a}	348.13±17.68^{ab}	379.21±17.68^{b}	396.86±17.68^{bc}	441.03±17.68^{c}	0.0001
28 kDa	185.85±12.11^{a}	210.71±12.11^{ab}	243.10±12.11^{bc}	272.40±12.11^{cd}	300.85±12.11^{d}	0.0001

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



ก



ข

ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T ในระยะเวลาบ่ม 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน โดย (ก) การสลายตัวของโปรตีน Tn-T 39 kDa และ 37 kDa (ข) ผลิตผลของโปรตีน Tn-T 30 kDa และ 28 kDa

เมื่อนำโปรตีน Tn-T 39 kDa และ 37 kDa ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่มที่มีการสลายตัวของเนื้อโคตัวอย่างแต่ละชนิดมารวมกันจะพบว่ามีการสลายตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ ($p<0.01$) เฉพาะระยะเวลาการบ่มที่1, 7 และ 14 วัน มีค่าเท่ากับ 891.32±31.10, 823.29±31.10 และ 761.42±31.10 ($x10^3$ พิกเซล) ตามลำดับ และเมื่อนำโปรตีน Tn-T 30 kDa, 28 kDa และ 26 kDa ของเนื้อโคแต่ละชนิดมารวมกันพบว่าค่าความเข้มของโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ ($p<0.01$) ตามระยะเวลาการบ่มที่ 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน มีค่าเท่ากับ 492.11±26.18, 558.84±26.18, 622.31±26.18, 669.26±26.18 และ 761.20±26.18 ($x10^3$ พิกเซล) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4 และ ภาพที่ 4.5)

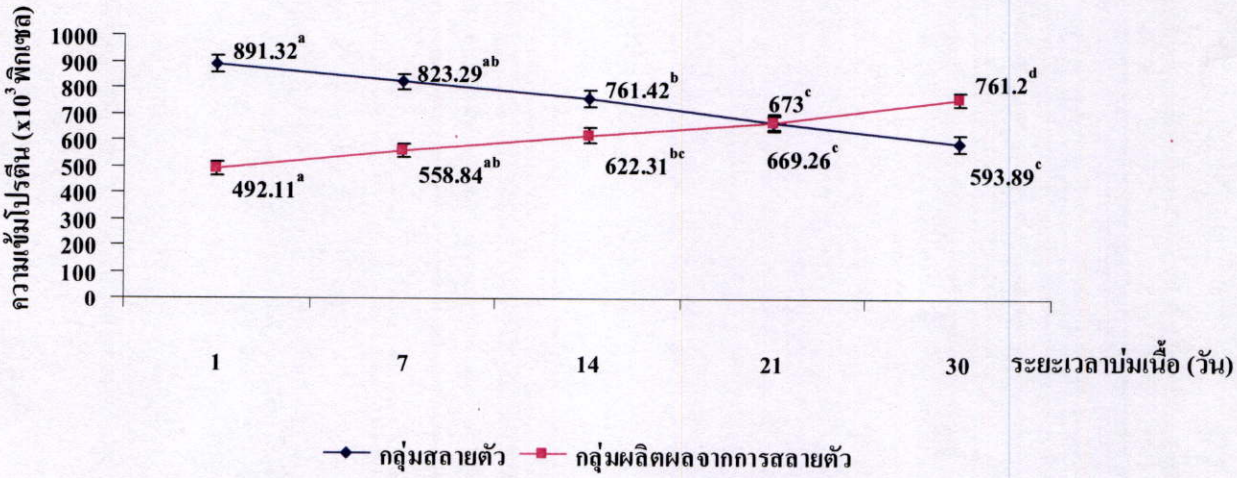
ตารางที่ 4.4 อิทธิพลของระยะเวลาบ่มเนื้อที่มีผลต่อค่าความเข้มโปรตีน Tn-T รวม (LSM±SE)

ระยะเวลาบ่มเนื้อ (วัน)	ค่าความเข้มของโปรตีน ($x10^3$ พิกเซล)	
	กลุ่มสลายตัว[1]	กลุ่มผลิตผลจากการสลายตัว[2]
1	891.32±31.10^{a}	492.11±26.18^{a}
7	823.29±31.10^{ab}	558.84±26.18^{ab}
14	761.42±31.10^{b}	622.31±26.18^{bc}
21	673.00±31.10^{c}	669.26±26.18^{c}
30	593.89±31.10^{c}	761.20±26.18^{d}
P-value	0.0001	0.0001

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

[1] โปรตีน Tn-T 39 kDa และ 37 kDa

[2] โปรตีน Tn-T 30 kDa, 28 kDa และ 26 kDa



ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงอิทธิพลของระยะเวลาบ่มเนื้อที่มีผลต่อค่าความเข้มโปรตีน Tn-T รวม

3) อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของเนื้อกับระยะเวลาบ่มเนื้อที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T

ในการศึกษาอิทธิพลร่วมระหว่างเนื้อโคกำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมืองกับระยะเวลาการบ่มเนื้อ 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน ที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T 39 kDa, 37 kDa, 30 kDa และ 28 kDa และอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของเนื้อกับระยะเวลาบ่มเนื้อที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T รวมในแต่ละกลุ่ม ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างเนื้อโคทั้ง 2 ชนิด กับระยะเวลาการบ่มที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของเนื้อกับระยะเวลาบ่มเนื้อที่มีผลต่อค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T

ชนิดเนื้อโค	ระยะเวลาบ่ม (วัน)	ความเข้มของโปรตีน Tn-T ($x10^3$ พิกเซล)			
		39 kDa	37 kDa	30 kDa	28 kDa
โคกำแพงแสน	1	474.06±28.45	522.42±28.10	389.07±25.00	244.78±17.13
	7	452.11±28.45	469.83±28.10	435.35±25.00	275.62±17.13
	14	417.36±28.45	443.65±28.10	471.76±25.00	302.07±17.13
	21	359.11±28.45	384.75±28.10	481.79±25.00	330.04±17.13
	30	331.61±28.45	343.59±28.10	546.36±25.00	368.69±17.13
โคพื้นเมือง	1	329.25±28.45	456.91±28.10	223.46±25.00	126.91±17.13
	7	285.83±28.45	438.81±28.10	260.92±25.00	145.80±17.13
	14	255.05±28.45	406.78±28.10	286.66±25.00	184.13±17.13
	21	219.83±28.45	382.31±28.10	311.92±25.00	214.76±17.13
	30	174.11±28.45	338.46±28.10	335.70±25.00	233.00±17.13
P-value		0.9877	0.7920	0.9031	0.9689

4.2 ความนุ่มของเนื้อ

ในการศึกษาค่าแรงตัดผ่านเนื้อระหว่างเนื้อโคกำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมือง ชนิดละ 15 ตัว ที่ผ่านการบ่มเป็นระยะเวลา 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน พบว่า อิทธิพลของชนิดเนื้อโคที่มีผลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อในเนื้อโคกำแพงแสนมีค่าต่ำกว่าเนื้อโคพื้นเมืองอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) คือ 7.90±0.078 และ 10.33±0.087 กิโลกรัม ตามลำดับ และการศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาบ่มเนื้อที่ 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน ที่มีผลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ พบว่าระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้นสามารถลดค่าแรงตัดผ่านเนื้อในแต่ละช่วงระยะเวลาการบ่มอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) คือ 13.06±0.125, 10.42±0.130, 8.49±0.132, 7.40±0.139 และ 6.20±0.132 กิโลกรัม ตามลำดับ ในส่วนของอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของเนื้อโคตัวอย่างกับระยะเวลาการบ่มเนื้อที่มีผลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ โดยเนื้อโคกำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมืองที่ระยะเวลาการบ่ม 1 วัน มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) เท่ากับ 10.81±0.176 และ 15.31±0.178 กิโลกรัม ตามลำดับ และที่ระยะเวลาบ่ม 30 วัน มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) เท่ากับ 4.91±0.176 และ 7.49±0.197 กิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6-4.7 และ ภาพที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 ปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (กก.)

ปัจจัยที่ศึกษา	ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (LSM±SE)	P-value
ชนิดเนื้อโค		
กำแพงแสน	7.90±0.078[a]	0.0001
พื้นเมือง	10.33±0.087[b]	0.0001
ระยะเวลาบ่ม (วัน)		
1	13.06±0.125[m]	0.0001
7	10.42±0.130[n]	0.0001
14	8.49±0.132[o]	0.0001
21	7.40±0.139[p]	0.0001
30	6.20±0.132[q]	0.0001

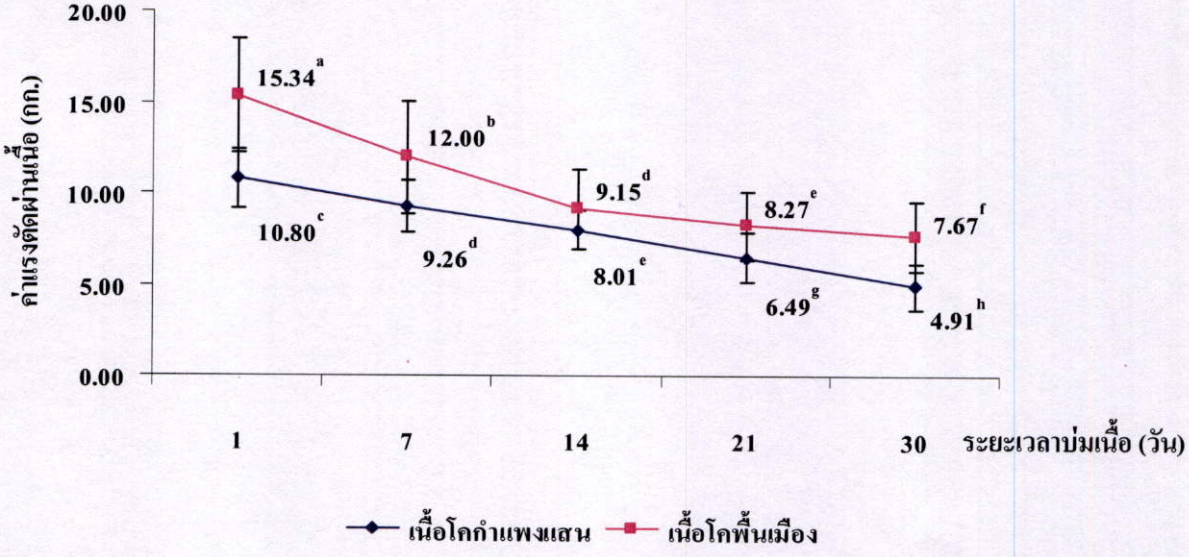
[a, b] อักษรที่แตกต่างกันในแต่ละปัจจัยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

[m, n, o,...] อักษรที่แตกต่างกันในแต่ละปัจจัยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

ตารางที่ 4.7 ปัจจัยร่วมที่มีอิทธิพลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (กก.)

ปัจจัยที่ศึกษา		ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (LSM±SE)	P-value
ชนิดเนื้อโค	ระยะเวลาบ่ม (วัน)		
กำแพงแสน	1	10.81±0.176^{c}	0.0001
	7	9.26±0.176^{d}	0.0001
	14	8.01±0.176^{e}	0.0001
	21	6.49±0.176^{g}	0.0001
	30	4.91±0.176^{h}	0.0001
พื้นเมือง	1	15.31±0.178^{a}	0.0001
	7	11.59±0.192^{b}	0.0001
	14	8.97±0.196^{d}	0.0001
	21	8.31±0.214^{e}	0.0001
	30	7.49±0.197^{f}	0.0001

$^{a, b, c, \ldots}$ อักษรที่แตกต่างกันในแต่ละปัจจัยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของเนื้อโคตัวอย่างกับระยะเวลาการบ่มเนื้อที่มีผลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ

ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าการเพิ่มระยะเวลาการบ่มที่นานกว่า 14 วันในเนื้อโคพื้นเมือง ค่าแรงตัดผ่านเนื้อจะมีอัตราของการลดลงต่ำกว่าช่วงวันที่ 1-14 ของระยะเวลาการบ่ม ซึ่งเปอร์เซ็นต์การลดลงในช่วง 1-7 และ 7-14 วัน เท่ากับ 24.30 และ 22.61 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับในขณะที่อัตราการลดลงในช่วง 14-30 วันของระยะการบ่มในช่วง 14-21 และ 21-30 วัน มีค่าเท่ากับ 7.36 และ 9.87 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ในเนื้อโคกำแพงแสน ปรากฏผลของอัตราการลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อในช่วง 1-14 วัน ของระยะการบ่มเท่ากับ 14.34 และ 13.50 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 1-7 และ 7-14 วัน ตามลำดับ ในขณะที่อัตราการลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อในช่วง 14-30 วัน ของระยะการบ่ม ยังคงมีแนวโน้มที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องเท่ากับ 18.98 และ 24.35 เปอร์เซ็นต์ ที่ช่วงระยะการบ่ม 14-21 และ 21-30 วัน ตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการบ่มเนื้อที่ 30 วัน เปอร์เซ็นต์การลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อในเนื้อโคกำแพงแสน (54.54 เปอร์เซ็นต์) มากกว่าเนื้อโคพื้นเมือง (50 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์การลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อในแต่ละช่วงระยะเวลาบ่ม

ระยะเวลาบ่ม (วัน)	เปอร์เซ็นต์การลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อ	
	โคกำแพงแสน	โคพื้นเมือง
1 - 7	14.34	24.30
7 - 14	13.50	22.61
14 - 21	18.98	7.36
21 - 30	24.35	9.87
1-30	54.54	50.00

4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับค่าความเข้มโปรตีน Tn-T

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัวผ่านเนื้อกับค่าความเข้มข้นโปรตีน Tn-T กลุ่มที่สลายตัว (โปรตีน Tn-T 39 kDa และ Tn-T 37 kDa) และโปรตีน Tn-T กลุ่มผลิตผลจากการสายตัว (โปรตีน Tn-T 30 kDa และ Tn-T 28 kDa) พบว่าในเนื้อโคพื้นเมืองมีค่าความสัมพันธ์ในทางลบระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับค่าความเข้มข้นโปรตีนในวันที่ 7, 14 และ 21 ของการบ่มเนื้อมีค่าเท่ากับ 0.53, 0.56 และ 0.56 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัวผ่านเนื้อกับค่าความเข้มข้นโปรตีน Tn-T ในเนื้อโคกำแพงแสน

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัวผ่านเนื้อกับค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T ตามระยะเวลาบ่ม ในเนื้อโคกำแพงแสน (n=15)

ระยะเวลาบ่ม (วัน)	ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะที่ศึกษา	
		กลุ่มสลายตัว	กลุ่มผลิตผลจากการสลายตัว
1	กลุ่มผลิตผลจากการสลายตัว	0.07	.
	ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ	0.08	0.01
7	กลุ่มผลิตผลจากการสลายตัว	0.25	.
	ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ	0.03	-0.13
14	กลุ่มผลิตผลจากการสลายตัว	0.34	.
	ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ	-0.39	-0.01
21	กลุ่มผลิตผลจากการสลายตัว	0.51	.
	ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ	-0.008	0.45
30	กลุ่มผลิตผลจากการสลายตัว	0.6*	.
	ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ	0.08	-0.04

* : ($p<0.05$)

ตารางที่ 4.10 แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัวผ่านเนื้อกับค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T ตามระยะเวลาบ่ม ในเนื้อโคพื้นเมือง (n=15)

ระยะเวลาบ่ม (วัน)	ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะที่ศึกษา	
		กลุ่มสลายตัว	กลุ่มผลิตผลจากการสลายตัว
1	กลุ่มผลิตผลจากการสลายตัว	0.48	.
	ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ	-0.31	-0.40
7	กลุ่มผลิตผลจากการสลายตัว	0.60*	.
	ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ	-0.36	-0.53*
14	กลุ่มผลิตผลจากการสลายตัว	0.50	.
	ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ	-0.20	-0.56*
21	กลุ่มผลิตผลจากการสลายตัว	0.53*	.
	ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ	-0.30	-0.56*
30	กลุ่มผลิตผลจากการสลายตัว	0.59*	.
	ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ	-0.26	-0.42

* : ($p<0.05$)

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 อิทธิพลที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Tn-T

จากการศึกษาค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T กลุ่มสลายตัวและกลุ่มผลิตผลจากการสลายตัว จากกล้ามเนื้อสันนอกในเนื้อโคกำแพงแสน ปรากฏว่า มีค่าสูงกว่าเนื้อโคพื้นเมือง เหตุผลอาจเนื่องมาจากเนื้อโคกำแพงแสนซึ่งเป็นโคลูกผสมระหว่างโคกลุ่ม *Bos taurus* x *Bos indicus* มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด white fiber ในปริมาณที่สูงกว่าเนื้อโคพื้นเมืองที่เป็นโคกลุ่ม *Bos indicus* ทั้งนี้ Geesink *et al.* (2006) รายงานว่าในโคกลุ่ม *Bos indicus* มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber เป็นองค์ประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้ออยู่สูง ซึ่ง Choi and Kim. (2009) ได้จัดเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber อยู่ในกลุ่มโปรตีนย่อยสลายช้า (slow Tn-T) และเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด white fiber จัดอยู่ในกลุ่มโปรตีนย่อยสลายเร็ว (fast Tn-T) ดังนั้นเนื้อโคพื้นเมือง ซึ่งมีเลือดของโคกลุ่ม *Bos indicus* จึงจัดอยู่ในกลุ่มโปรตีนย่อยสลายช้า (slow Tn-T) เนื่องจากมีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber เป็นองค์ประกอบในสัดส่วนที่สูง และจากรายงานของ Muroya *et al.* (2006) กล่าวว่ากล้ามเนื้อสันนอกที่มีองค์ประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด white fiber พบโปรตีน Tn-T กลุ่ม fast Tn-T (36.5, 35.4, 34.8 และ 32.8 kDa) และกลุ่ม slow Tn-T (34.5 และ 32.1 kDa) มากกว่ากล้ามเนื้อที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber เป็นองค์ประกอบ เหตุผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่าค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T 39 kDa, 30 kDa และ 28 kDa ในเนื้อโคกำแพงแสนมีค่าที่สูงกว่าเนื้อโคพื้นเมืองอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

ผลการศึกษาครั้งนี้พบโปรตีน Tn-T 26 kDa ในวันที่ 30 ของการบ่มเนื้อโคพื้นเมือง ในขณะที่ไม่พบโปรตีนดังกล่าวในเนื้อโคกำแพงแสน ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเนื้อโคพื้นเมืองมีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber เป็นองค์ประกอบอยู่สูงสอดคล้องกับ Muroya *et al.* (2006) ที่พบว่าการสลายตัวของกล้ามเนื้อที่มีองค์ประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber เป็นองค์ประกอบ มีการปรากฏของโปรตีน Tn-T ขนาด 32.1, 30.9, 29.6, 28.3, 27.4, 26.9 และ 26.0 kDa ปรากฏขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนดังกล่าวในเนื้อโคกำแพงแสนถูกย่อยสลายไปในระหว่างช่วงเวลาการบ่มที่ไม่ได้ทำการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้

สำหรับระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้นนั้นมีผลทำให้การย่อยสลายของโปรตีน Tn-T และการปรากฏของโปรตีนจากการสลายตัวเพิ่มขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T 39 kDa และ 37 kDa มีค่าความเข้มลดลงทำให้เกิดการปรากฏของโปรตีน Tn-T 30 kDa และ 28 kDa ที่มีค่าความเข้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่มที่ 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน เป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ calpain ที่มีอยู่ในกล้ามเนื้อทำหน้าที่ในการย่อยสลาย Tn-T และผลที่เกิดจากการย่อยสลายคือ Tn-T 30 kDa และ 28 kDa เกิดขึ้น (Koohmaraie. 1992 and Hedrick *et al.* 1993) ทั้งนี้ ลลิศรา ศรีสุวรรณ (2551) รายงาน

ว่า การเพิ่มระยะเวลาในการบ่มในเนื้อโคลูกผสมพันธุ์ชาโรเลส์ที่เลี้ยงภายใต้ระบบของสหกรณ์โคเนื้อกำแพงแสน และเนื้อโคพื้นเมืองทำให้การย่อยสลายของโปรตีน Tn-T 39 kDa และการปรากฏของผลิตผลของโปรตีน Tn-T 30 kDa เพิ่มขึ้นเช่นกัน

5.2 อิทธิพลที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อ

จากการศึกษาพบว่าเนื้อโคกำแพงแสน (*Bos taurus* x *Bos indicus*) มีความนุ่มมากกว่าเนื้อโคพื้นเมือง (*Bos indicus*) โดยมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) คือ 7.90 ± 0.078 และ 10.33 ± 0.087 ตามลำดับ เป็นผลมาจากพันธุ์โคที่ทำการทดลองแตกต่างกัน โดยโคกำแพงแสนเป็นโคลูกผสมที่มีเลือดของโคพันธุ์ชาโรเลส์ซึ่งเป็นโคในกลุ่ม *Bos taurus* แต่ในเนื้อโคพื้นเมืองเป็นโคในกลุ่ม *Bos indicus* ทั้งนี้ Koohmaraie. (1996); O'Conner *et al.* (1997); Wulf *et al.* (1997); Pringle *et al.* (1997) และ Geesink *et al.* (2006) กล่าวว่าในโคกลุ่ม *Bos indicus* มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิด red fiber เป็นองค์ประกอบของมัดกล้ามเนื้ออยู่สูงทำให้มีปริมาณเอนไซม์ calpastatin ซึ่งทำหน้าที่ขัดขวางการทำงานของ calpain เป็นผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของ calpain เกิดได้น้อย และปริมาณของเอนไซม์ calpastatin จะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับเลือดของโคกลุ่ม *Bos indicus* สูงขึ้น

นอกจากนี้การที่เนื้อโคกำแพงแสนนุ่มกว่าเนื้อโคพื้นเมือง อาจเนื่องมาจากระบบการเลี้ยงที่แตกต่างกัน จากการศึกษานี้โคกำแพงแสนเป็นโคที่มีการเลี้ยงในรูปแบบของการขุนด้วยอาหารข้นพลังงานสูงเป็นเวลานานจึงมีการสะสมไขมันหุ้มซากสูงกว่า ทำให้การลดลงของอุณหภูมิภายในซากในกระบวนการเก็บซากในห้องเย็นเป็นไปได้ช้า มีผลทำให้ไปเร่งกระบวนการทำงานของเอมไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนภายในกล้ามเนื้อทำงานได้เร็วขึ้น แต่ในโคพื้นเมืองเลี้ยงแบบปล่อยแทะเล็มหญ้าตามธรรมชาติจะไม่ปรากฏไขมันหุ้มซาก ทำให้การลดลงของอุณหภูมิภายในซากเป็นไปอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากโคกำแพงแสนมีปริมาณไขมันแทรกในกล้ามเนื้อสูงกว่าเนื้อโคพื้นเมือง ทั้งนี้พร้อมลักษณ์ สมบูรณ์ปัญญากุล. (2552) และสลิศรา ศรีสุวรรณ (2551) รายงานว่า เนื้อโคขุนลูกผสมพันธุ์ชาโรเลส์เลือดสูงมีปริมาณไขมันแทรกสูงกว่าเนื้อโคพื้นเมืองที่เลี้ยงแบบปล่อยแทะเล็มหญ้าตามธรรมชาติ จึงส่งผลให้เนื้อมีความนุ่มมากกว่า

จากการศึกษาระยะเวลาการบ่มที่มีผลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ พบว่าระยะเวลาการบ่มเนื้อที่นานขึ้นในเนื้อโคกำแพงแสน และเนื้อโคพื้นเมืองมีผลทำให้ค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) จนถึงวันที่ 30 ของระยะเวลาบ่ม เป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ calpain ที่ทำการสลายโปรตีน Tn-T ในกล้ามเนื้อ ทำให้การเพิ่มระยะเวลาการบ่มสามารถลดค่าแรงตัดผ่านเนื้อทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้น (Pearson and Young 1989) จากการศึกษาครั้งนี้ปรากฏผลว่าการเพิ่มระยะเวลาการบ่มที่นานกว่า 14 วันในเนื้อโคพื้นเมือง ค่าแรงตัดผ่านเนื้อจะมีอัตราของการลดลงต่ำกว่าช่วงวันที่ 1-14 ของระยะเวลาการบ่ม ซึ่งเปอร์เซ็นต์การลดลงในช่วง 1-7 และ 7-14 วัน เท่ากับ 24.30 และ 22.61 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับในขณะที่อัตราการลดลงในช่วง 14-30 วันของระยะการบ่มในช่วง 14-21 และ 21-30 วัน มีค่าเท่ากับ 7.36 และ 9.87 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับค่าสหสัมพันธ์ในทางลบของค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับค่าความเข้มของกลุ่มโปรตีน Tn-T เป็นผลจากการสลายตัวในโคพื้นเมืองที่ระยะเวลาบ่ม 7, 14 และ 21 วัน แต่ไม่พบที่ระยะการบ่ม 30 วัน แต่ในเนื้อโคกำแพงแสน ปรากฏผลของอัตราการลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อในช่วง 1-14 วัน ของระยะการบ่มเท่ากับ 14.34 และ 13.50 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 1-7 และ 7-14 วัน ตามลำดับ ในขณะที่อัตราการลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อในช่วง 14-30 วัน ของระยะการบ่ม ยังคงมีแนวโน้มที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (18.98 และ 24.35 เปอร์เซ็นต์ ที่ช่วงระยะการบ่ม 14-21 และ 21-30 วัน ตามลำดับ) ทั้งนี้ผลการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อกับค่าความเข้มของกลุ่มโปรตีน Tn-T ในเนื้อโคกำแพงแสน ซึ่งการที่เนื้อโคกำแพงแสนมีอัตราการลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อในช่วง 14-21 และ 21-30 วัน ของการบ่มมากกว่าเนื้อโคพื้นเมือง อาจจะเป็นผลมาจากการย่อยสลายของปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ (soluble collagen) ในเนื้อโคกำแพงแสน ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ cathepsin ที่ทำงานได้ดีในสภาวะของค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำ (Pearson and Young 1989) สอดคล้องกับรายงานของ Nishimura *et al.* (1998) ที่กล่าวว่าการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในโคเพศผู้ตอน จะเกิดขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป 14 วันหลังสัตว์ตาย ทำให้เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยมีการแตกหักมากขึ้นจึงทำให้เนื้อโคมีความนุ่มเพิ่มขึ้น ทั้งนี้โคกำแพงแสนที่ทำการศึกษาเป็นโคเพศผู้ตอนเช่นกัน ส่วนโคพื้นเมืองเป็นโคเพศผู้ที่ไม่ผ่านการตอน จึงอาจกล่าวได้ว่าอิทธิพลที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อโคกำแพงแสนนอกจากจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายของโปรตีน Tn-T แล้วยังเกี่ยวข้องกับปริมาณไขมันแทรกในเนื้อ และปริมาณของคอลลาเจนที่ละลายได้อีกด้วย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

1) จากการศึกษาชนิดของเนื้อโค ได้แก่ เนื้อโคกำแพงแสนและเนื้อโคพื้นเมืองไทย พบว่าเนื้อโคกำแพงแสนมีความนุ่มมากกว่าเนื้อโคพื้นเมืองไทยอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ ($p<0.01$)

2) ค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T 39 kDa, 30 kDa และ 28 kDa ในเนื้อโคกำแพงแสน มีมากกว่าเนื้อโคพื้นเมืองไทยอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ ($p<0.01$)

3) ค่าความเข้มของโปรตีน Tn-T 37 kDa ในเนื้อโคทั้ง 2 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4) เฉพาะเนื้อโคพื้นเมืองไทยเท่านั้นที่พบโปรตีน Tn-T 26 kDa จำนวน 5 ตัวอย่าง จากทั้งหมด

5) การเพิ่มระยะเวลาในการบ่มเนื้อที่ 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน มีผลให้ความนุ่มของเนื้อเพิ่มขึ้นในเนื้อโคทั้ง 2 ชนิด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

6) การสลายตัวของโปรตีน Tn-T 39 kDa และ 37 kDa ลดลงในทุกๆระยะของการบ่มเนื้ออย่างชัดเจนและมีการเพิ่มปริมาณความเข้มของโปรตีน Tn-T 30 kDa และ 28 kDa เพิ่มขึ้นทุกระยะของการบ่ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

7) เมื่อสิ้นสุดระยะการบ่มที่ 30 วัน เปอร์เซ็นต์การสลายตัวของโปรตีนในเนื้อโคกำแพงแสนใกล้เคียงเนื้อโคพื้นเมือง คือ 32.24 และ 34.80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

8) ค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่ลดลงมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเข้มของโปรตีนกลุ่มผลิตผลจากการสลายตัวของโปรตีน Tn-T เฉพาะในเนื้อโคพื้นเมืองที่ระยะเวลาบ่ม 7, 14 และ 21 วัน

9) เนื้อโคพื้นเมืองควรใช้ระยะเวลาในการบ่มที่ 14 วันเนื่องจากการ อัตราการลดลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อจะต่ำลงในช่วงระยะเวลาการบ่มที่นานกว่า 14 วัน

10) ความนุ่มของเนื้อโคกำแพงแสนจากการศึกษาในครั้งนี้ที่ระยะเวลาการบ่ม 30 วัน (4.91 กก.) ยังไม่อยู่ในระดับความนุ่มที่ผู้บริโภคพึงพอใจคือ 3.9 กก. (*Morgan et al.* 1991) แต่การบ่มที่นานขึ้นควรระวังในเรื่องการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพเนื้อ เนื่องจากการทำงานของจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนและการเน่าเสียของเนื้อ อันเนื่องมาจากสุขอนามัยในกระบวนการฆ่าและตัดแต่งไม่ถูกต้อง

6.2 ข้อเสนอแนะ

1) เนื้อโคที่ใช้ในการศึกษามี 2 สายพันธุ์ คือเนื้อโคกำแพงแสน ลูกผสมระหว่าง *Bos taurus* x *Bos indicus* จัดอยู่ในกลุ่มของ *Bos taurus* และอีกสายพันธุ์หนึ่งคือเนื้อโคพื้นเมืองไทย ซึ่งเป็นโคในกลุ่ม *Bos indicus* จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางระดับเลือดของ *Bos taurus* กับ โปรตีน troponin-T และความนุ่มของเนื้อทำให้เห็นการสลายตัวของโปรตีน troponin-T ได้ไม่ชัดเจน ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรเลือกเนื้อโคสายพันธุ์แท้หรืออาจเพิ่มชนิดของเนื้อโคให้มากขึ้นเพื่อให้เห็นการสลายตัวขอโปรตีน troponin-T ได้อย่างชัดเจน

2) เนื้อโคแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณเอนไซม์ calpain และ calpastatin แตกต่างกัน ทำให้เกิดการสลายตัวของโปรตีน troponin-T แตกต่างกัน ดังนั้นควรศึกษาการทำงานของเอนไซม์ calpain และ calpastatin เพื่อให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างสลายตัวของโปรตีน troponin-T กับ การทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด

บรรณานุกรม

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539. **วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ขั้นสูง.** เอกสารประกอบการสอน วิชาวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ขั้นสูง. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2552. "การใช้ประโยชน์จากเนื้อโคไทย" หน้า 5. โดย จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. และพรรณิภา ศิวะพิรุฬห์เทพ. **คุณค่าเนื้อโคไทย.** กรุงเทพมหานคร : อัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พลับลิชชิงค์.

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และญาณิน โอภาสพัฒนกิจ. 2548. **คุณภาพเนื้อโคภายใต้ระบบการผลิต และการตลาดของประเทศไทย.** กรุงเทพมหานคร: สุพีเรียพริ้นติ้งเฮาส์

ชัยณรงค์ คันธพนิต. 2529. **วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์.** ภาควิชาสัตวบาล, คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นันทนา ช่วยชูวงศ์. 2540. "การศึกษาเปรียบเทียบสมรรถภาพการขุน คุณภาพผลผลิตและผลตอบแทนทางเศรษฐกิจของโคเนื้อ 5 พันธุ์ ที่มีอยู่ในประเทศไทย". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาสัตวบาล บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรารถนา พฤกษะศรี, สมบัติ ศรีจันทร์, ชัยณรงค์ คันธพนิต และสมศักดิ์ เพียบพร้อม. 2533. "อิทธิพลของพันธุ์โค อายุโค และชนิดของอาหารหยาบในการเลี้ยงโคขุน" หน้า 153. **ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 28.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิยะดา ทวิชศรี. 2544. "อิทธิพลของชนิดสัตว์เคี้ยวเอื้องและอัตราการเจริญเติบโตต่อคุณภาพเนื้อ" วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ปิยะดา ทวิชศรี. 2550. "การผลิต Polyclonal Antibodies เพื่อตรวจสอบปริมาณโปรตีน Calpastatin ในเนื้อโคพันธุ์กำแพงแสน". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

พร้อมลักษณ์ สมบูรณ์ปัญญากุล. 2552. "คุณค่าทางด้านโภชนาการของเนื้อโค" หน้า 35. โดย จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. และพรรณิภา ศิวะพิรุฬห์เทพ. **คุณค่าเนื้อโคไทย.** กรุงเทพมหานคร : อัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พลับลิชชิงค์.

มาลัย จงเจริญ. 2546. "คุณภาพซากและผลตอบแทนในการผลิตเนื้อโคคุณภาพสูงจากโคลูกผสมเลือดชาร์โลเล่ส์". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิชิต พรหมอินทร์. 2549. "คุณภาพซากและคุณภาพเนื้อโคขุนภายใต้ระบบการผลิตของสหกรณ์โคเนื้อกำแพงแสน". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.

Anderson, J.R., Borggaard, C., Rasmussen, A.J. and Houmoller, L.P. 1999. "Optical measurement of pH in meat". **Meat Sci.** 53: 135 – 141.

Anonymous. 2001. [Online]. Available : http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201_McKinley/muscular.htm. [05/08/51.]

Boccard, R., Buchter, I., Casteels, M., Cosentino, E., Dransfield, E. and Hood, D.E. 1981. "Procedures for measuring meat quality characteristics in beef production experiments". **Lives. Prod. Sci.** 8: 385-397.

Claeys, E., Uytterhaegen, L., Buts, B. and Demeyer, D. 1995. "Quantitation of beef myofibrillar protein by SDS-PAGE". **Meat Sci.** 39: 177-193.

Choi, Y.M., Kim, B.C. 2009. "Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality". **Livest. Sci.** 122: 105-118.

De Smet, S., Cleays, E. and Rase, K. 2004. Workshop on quality and functionality of meat. [Slide]. Gent: University of Gent.

De Smet, S., Cleays, E., Buysse, C., Lenaerts, C. and Demeyer, D. 1998. "Tenderness measurement in four muscle of Belgian Blue Normal and double-muscle bulls". **44th International Congress of Meat Science and Technology.**

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.

Forrest, J. C., Aberle, E. D., Judge, M. D., Merkel, R. A. 1995. **Principles of Meat Science**. W. H. Freeman and Company.

Geesink, G.H., Kuchay, S., Chishti, A.H. and Koohmaraie, M. 2006. "μ-calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins " . **J. Anim. Sci.** 84: 2834-2840.

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

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

Ho, C.Y., Stromer, M.H., Rousek, G. and Robson, R.M. 1997. "Effedts of electrical stimulation and postmortem storage on changes in titin, nebulin, troponin–T and muscle ultrastructure in *Bos indicus* crossbreed cattle". **J. Anim. Sci.** 75: 366-376.

Immonen, K., Kauffman, R.G., Schaefer, D.M. and Puolanne, E. 2000. "Glycogen concentration in bovine *longissimus dorsi* muscle". **Meat Sci.** 54: 163-167.

Johnson, D.D., Huffman, R.D., Williams, S.E and Hargrove, D.D. 1990. "Effect of percentage Brahman and Angus breeding, age-season of feeding and slaughter end point on meat palatability and muscle characteristic". **J. Anim. Sci.** 68: 1980-1986.

Kolezak, T., Pospiech, E., Palka, K., and Lacki, J. 2003. "Changes of myofibrillar and centrifugal drip and shear force of psoas major and minor and semitendinosus muscles from calves, heifers and cows during post – motem aging". **Meat Sci.** 64: 69-75.

Koohmaraie, M. 1992. "The role of Ca(2+)-dependent proteases (calpain) in postmortem proteolysis and meat tenderness". **Biochimie.** 74: 239-245.

Koohmaraie, M. 1994. "Muscle proteinases and meat aging". **Meat Sci.** 36: 93 – 104.

Koohmaraie, M. 1996. "Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat". **Meat Sci.** 43: 193-201.

Koohmaraie, M., Babiker, A. S., Schroeder, A. L., Merkel, R. A., and Dutson, T. R. 1988. "Acceleration of postmortem tenderozation inovine carcasses through activation of Ca^{2+}-dependent proteases". **J. Food Sci.** 53: 1638.

Koohmaraie, M., Whipple, G., Kretchmar, D.H., Crouse, J.D. and Mersmann, H.J. 1991. "Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses". **J. Anim. Sci.** 69: 617 – 624.

Lorenzen, C.L. 1992. "Nation beef quality audit : carcass grade traits of U.S. fed cattle". **J. Anim. Sci.** 70: 227

Marshall, D.M. 1994. "Breed differences and genetic parameters for body composition traits in beef cattle". **J. Anim. Sci.** 72: 2745-2755.

Morgen, J.B., Wheeler, J.B., Koohmaraie, M., Savll, J.W. and Crouse, J.D. 1993. "Meat tenderness and the calpain proteolytic system in *longissimus* muscle of young bulls and steers". **J. Anim. Sci.** 71: 1471-1476.

Muroya, S., Nakajima, I., Oe, M. and Chikuni, K. 2006. . " Difference in postmortem degradation pattern among troponin-T isoforms expressed in bovine longissimuss, diaphragm and masseter muscle ". **Meat Sci.** 72: 245-251.

Nishimura, T., Lin, A, Hattori, A. and Taknhashi, K. 1998. "Changes in mechanical strength of intramuscular connective tissue during postmortem aging of beef". **J. Anim. Sci.** 76: 528-532.

O'Connor, S.F., Tatum, J.D., Wulf, D.M., Green, R.D. and Smith, G.C. 1997. "Genetic effect on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos Taurus* ". **J. Anim. Sci.** 75: 1822-1830.

Pearson, A.M. and Young, R.B. 1989. **Muscle and Meat Biochemistry**. San Diego:Academic Press.

Pringle, T.D., Williams S.E., Lamb B.S., Johnson D.D. and West R.L. 1997. "Carcass agedtenderness of Aungus and Brahman crossbred steers". **J. Anim. Sci.** 75: 2955-2961.

Rhee, M.S., Ryu, Y.C., Imm J.Y. and Kim, B.C. 2000. "Combination of low voltage electrical stimulation and earlypostmortem temperature conditioning on degradation of myobrillar proteins in Korean native cattle (Hanwoo)". **Meat Sci.** 55: 391-396.

Sethakul, J., Opatpatanakit, Y., Sivapirunthep, P. and Intrapornudom, P. 2008. "Beef quality under production systems in Thailand: preliminary remarks". In Asian-Australasian association of animal production societies. **Proceedings of the 13th animal science congress of the Asian-Australasian association of animal production societies**. Hanoi: Animal husbandry association of Vietnam.

Shackelford, S.D., Wheele, T.L. and Koohmaraie, M. 1995. "Relationship between shear force and trained sensory panel tenderness rating of 10 major muscle from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle". **J. Anim. Sci.** 73: 3333-3340.

Sherbeck, J.A., Tatum, J.D., Field, T.G., Morgan, J.B. and Smith, G.C. 1995. "Feedlot performance carcass traits and palatability traits of Hereford and Hereford x Brahman steers". **J. Anim. Sci.** 73: 3613-3620.

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

Warris, P.D. 2000. **Meat Science**. UK : School of Veternary Science University of Bristol.

Wheeler, T.L., Savell, J.W., Cross, H.R., Lunt, D.K. and Smith, S.B. 1990. " Mechanism associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle ". **J. Anim. Sci.** 68: 4206-4220.

Wheeler, T.L., Shackelford, S.D. and Koohmaraie, M. 2000. "Variation in proteolysis, sarcomere length, collagen content, and tenderness among major pork muscles". **J. Anim. Sci.** 78: 958-965.

Wulf, D.M., O'Connor, S.F., Tatum, J.D., Green, R.D. and Smith, G.C. 1997. " Using objective measure of muscle color to predict beef longissimus tenderness ". **J. Anim. Sci.** 75: 684-692 .

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารละลายสำหรับการสกัดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ

STE solution (1L)

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

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

TE solution (1L)

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

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

KCl solution 0.15M (1L)

- KCl 11.20 g
- Distilled water

ละลาย KCl ใน Distilled water จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1ลิตร ด้วย Distilled water เก็บในตู้เย็น 20 °C

Buffer solution (100 ml)

- Imidazol 6.8 g
- SDS 2 g
- Distilled water 70 ml
- H3PO4

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

Sample buffer solution (1L)

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

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

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นโปรตีน

เตรียมน้ำยาวัดโปรตีน

- เจือจางน้ำยาวัดโปรตีน 1 ส่วน : Distilled water 4 ส่วน (น้ำยาวัดโปรตีน 50 ml : Distilled water 200 ml)
- เตรียม standard BSA ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 mg/ml

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

การวัดความเข้มข้นโปรตีน

- การวัดความเข้มข้น ของ standard BSA
  - น้ำยาวัดโปรตีน 300 µl
  - Standard BSA (0.1 0.2 0.4 0.6 และ 0.8) 10 µl
- การวัดความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่าง (myofibrillar protein solution)
  - น้ำยาวัดโปรตีน 300 µl
  - myofibrillar protein solution 10 µl
- การเตรียม Blank
  - น้ำยาวัดโปรตีน 300 µl
  - Distilled water 10 µl

การเตรียมสารละลายสำหรับเทคนิค SDS-PAGE

Tris 3M pH 8.8 (1L)

- Tris 365 g
- Distilled water 700 ml
- HCl

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

Tris 1.5M pH 8.8 (1L)

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

Tris 0.5M pH 6.8 (1L)

- Tris 60.6 g
- Distilled water 700 ml
- HCl

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

10 % SDS (10 ml)

- SDS 1 g
- Distilled water 10 ml

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

- Ammonium persulphate 0.1 g
- Distilled water 1 ml

1 % Bromophenol blue (10 ml)

- Bromophenol blue 0.01 g
- Distilled water 10 ml

Sample buffer (ใช้ผสม sample สำหรับ load ในอัตราส่วน sample buffer 1 : sample 3)

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

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

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

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

Stainning solution (2L)

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

Destanning solution (3L)

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

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

• Distilled water	1 ml
• BSA	2 mg

Separating gel 15% (30 ml)

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

ผสม Distilled water, Tris 1.5M pH 8.8, 30% Acrylamide – Bis, 10% SDS, 10% APS และ TEMEDให้เข้ากัน จากนั้นเทสารละลายใส่ใน slap gel ที่เตรียมไว้ แล้วเติม Isopropanol ลงไป ปล่อยทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นเทส่วนของ Isopropanol ทิ้ง แล้วจึงเทส่วนของ stacking gel ลง

Separating gel 12.5% (10 ml)

• Distilled water	6,400 µl
• Tris 1.5M pH 8.8	5,000 µl
• 30% Acrylamide – Bis	8,000 µl
• 10% SDS	200 µl
• 10% APS	100 µl
• TEMED	10 µl
• Isopropanol	30 µl

ผสม Distilled water, Tris 1.5M pH 8.8, 30% Acrylamide – Bis, 10% SDS, 10% APS และ TEMEDให้เข้ากัน จากนั้นเทสารละลายใส่ใน slap gel ที่เตรียมไว้ แล้วเติม Isopropanol ลงไป ปล่อยทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นเทส่วนของ Isopropanol ทิ้ง แล้วจึงเทส่วนของ stacking gel ลง

Stacking gel 4% (5 ml)

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

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

การเตรียมสารละลายสำหรับเทคนิค Western blot

Transfer buffer (1X) (1L)

• Distilled water	800 ml
• Glycine	14.4 g
• Tris	3.03 g
• Methanol	200 ml

Tris buffer saline with tween 20 (1L)

• Tris	0.05M
• NaCl	0.138M
• KCl	0.0027M
• Tween 20	0.05%

Tris buffer saline with 3% nonfat milk (100ml)

• Tris	0.05M
• NaCl	0.138M
• KCl	0.0027M
• Nonfat milk	3% (w/v)

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ข 1 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้านอิทธิพลของชนิดเนื้อโคและระยะเวลาบ่มต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ

Dependent Variation: SF

Source	DF	SS	MS	F	Pr>F
Model	9	11067.51785	1229.72421	265.08	<.0001
Error	1354	6281.23711	4.63902		
Corrected Total	1363	17348.75496			
Source	DF	Type III SS	MS	F	Pr > F
Breed	1	1996.307416	1996.307416	430.33	<.0001
Aging	4	8134.549106	2033.637276	438.38	<.0001
breed*aging	4	485.698574	121.424643	26.17	<.0001

R-Square = 0.637943 Coeff Var = 23.61707 Root MSE = 2.153839 SF Mean = 9.119839

SF คือ ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ

ตารางภาคผนวกที่ ข 2 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้านอิทธิพลของชนิดเนื้อโคและระยะเวลาบ่มต่อการสลายตัวของโปรตีน troponin-T

Dependent Variation: b39

Source	DF	SS	MS	F	Pr>F
Model	9	1.3223343	146926031897	12.10	<.0001
Error	140	1.70024	12144571222		
Corrected Total	149	3.0225743			
Source	DF	Type III SS	MS	F	Pr > F
Breed	1	889785415901	889785415901	73.27	<.0001
Aging	4	428548558081	107137139520	8.82	<.0001
breed*aging	4	4000313088.8	1000078272.2	0.08	0.9877

R-Square = 0.437486 Coeff Var = 33.41170 Root MSE = 110202.4 b39 Mean = 329831.8

b39 คือ ค่าความเข้มโปรตีน troponin-T 39 kDa

Dependent Variation: b37

Source	DF	SS	MS	F	Pr>F
Model	9	458349410585	50927712287	4.30	<.0001
Error	140	1.6581115	11843653381		
Corrected Total	149	2.1164609			
Source	DF	Type III SS	MS	F	Pr > F
Breed	1	29807463128	29807463128	2.52	0.1149
Aging	4	408513335624	102128333906	8.62	<.0001
breed*aging	4	20028611833	5007152958.4	0.42	0.7920

R-Square = 0.216564 Coeff Var = 25.98883 Root MSE = 108828.6 b37 Mean = 418751.3

b37 คือ ค่าความเข้มโปรตีน troponin-T 37 kDa

Dependent Variation: b30

Source	DF	SS	MS	F	Pr>F
Model	9	1.5490973	172121917335	18.36	<.0001
Error	140	1.3126688	9376205692.6		
Corrected Total	149	2.8617661			
Source	DF	Type III SS	MS	F	Pr > F
Breed	1	1.2303489	1.2303489	131.22	<.0001
Aging	4	308997107192	77249276798	8.24	<.0001
breed*aging	4	9751288411.5	2437822102.9	0.26	0.9031

R-Square = 0.541308 Coeff Var = 25.86989 Root MSE = 96830.81 b30 Mean = 374299.2

b30 คือ ค่าความเข้มโปรตีน troponin-T product 30 kDa

Dependent Variation: b28

Source	DF	SS	MS	F	Pr>F
Model	9	828246255989	92027361777	20.91	<.0001
Error	140	616114923878	4400820884.8		
Corrected Total	149	1.4443612			
Source	DF	Type III SS	MS	F	Pr > F
Breed	1	570287950929	570287950929	129.59	<.0001
Aging	4	255570370261	63892592565	14.52	<.0001
breed*aging	4	2387934799.3	596983699.84	0.14	0.9689

R-Square = 0.573434 Coeff Var = 27.34714 Root MSE = 66338.68 b28 Mean = 242580.0

b28 คือ ค่าความเข้มโปรตีน troponin-T product 28 kDa

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายฉันทวัฒน์ อาชวาคม
วัน/เดือน/ปีเกิด	28 พฤศจิกายน 2525
ที่อยู่	เลขที่ 99/97 ซอย 11 ก. หมู่ 16 ถนนกรุงเทพกรีฑา หมู่บ้านนักกีฬา แหลมทอง เขตสะพานสูง กรุงเทพมหานคร 10250
ประวัติการศึกษา	2541 มัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนศรีพฤฒา กรุงเทพมหานคร 2544 ปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม
ผลงานวิชาการ	ผลงานตีพิมพ์ "Myofibrillar Protein Profiles of Kampaengsaen Beef and Thai Native Beef During Aging Period" **The 13th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies.** Hanoi, Vietnam. 22nd-26th September 2008.