ภาคผนวก ก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

วิธีการวิเคราะห์

การวัดค่าความเป็นกรดด่างของกล้ามเนื้อ (muscle pH measurement)

บันทึกค่า pH เวลา 45 นาที ก่อนการฉีดสารละลาย และ 24 ชั่วโมงหลังจากทำการฉีดสารละลายแล้ว (pH_1) วัดค่า pH 24 ชั่วโมงก่อนการฉีดสารละลายหลังฆ่า และวัดอีกครั้ง ที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังจากฉีดสารละลายแล้ว (pH_2) ด้วยเครื่อง pH – meter (Model 191, Knick, D – Berlin)

การวัดค่าการนำไฟฟ้า (conductivity measurement)

บันทึกค่าการนำไฟฟ้า เวลา 45 นาที ก่อนการฉีดสารละลาย และ 24 ชั่วโมงหลังจากทำการฉีดสารละลายแล้ว (EC_1) วัดค่า EC 24 ชั่วโมงก่อนการฉีดสารละลายหลังฆ่า และวัดอีกครั้ง ที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังจากฉีดสารละลายแล้ว (EC_2) ด้วยเครื่อง conductivity – meter (Model WTW)

การวัดค่าสีของเนื้อ (color measurement)

ใช้กล้ามเนื้อสันนอกด้านซ้าย ที่เวลา 45 นาที และ 24 ชั่วโมง ของกล้ามเนื้อสันนอกด้านขวา หลังการฉีดสารละลายแล้วใส่ถุงพลาสติกผนึกปากถุงเก็บที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อออกจากถุงวางในภาชนะเปิดเก็บในตู้เย็น 1 ชั่วโมง ทำการวัดค่าสีด้วยเครื่อง Minolta Chroma Meter (CR – 300, Osaka) บันทึกค่าเฉลี่ย L (ความสว่าง), a* (แดง – เขียว) และ b* (เหลือง – น้ำเงิน)

การทดสอบชิม (panel test)

นำตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกด้านซ้าย ที่ผ่านการฉีดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 45 นาที และด้านขวา ที่เวลา 24 ชั่งโมง ย่างสุกตัดให้มีขนาดที่เท่ากัน ด้วยเขียงที่มีลักษณะเป็นช่องขนาด 1 เซนติเมตร จากนั้นเสริฟให้แก่ผู้ตรวจชิม ซึ่งได้ผ่านการฝึกฝนการตรวจชิม (ไพโรจน์, 2535) จำนวน 6 ท่าน ผู้ตรวจชิมจะได้รับแบบสอบถามการตรวจชิมเนื้อ (Appendix table 1) และฟังการบรรยายขั้นตอนการทดสอบชิมโดยละเอียด ซึ่งการให้คะแนนจะพิจารณา 4 ลักษณะการตรวจชิม คือ ความนุ่ม (tenderness) กลิ่นและรสชาติ (flavor) ความชุ่มฉ่ำ (juiciness) และความพอใจโดยรวม (overall acceptability) โดยให้คะแนนซึ่งอยู่ในช่วง 1 – 5 คะแนน (1 = เหนียว, กลิ่นรสไม่ดี, แห้ง และไม่ชอบมาก; 5 = นุ่มที่สุด, กลิ่นและรสชาติดีที่สุด, ชุ่มฉ่ำที่สุด และมีความชอบมากที่สุด) ผู้ทดสอบชิมจะได้รับน้ำ และรับประทานผลไม้หลังจากทดสอบชิมเนื้อแต่ละชิ้น

วิธีการวิเคราะห์หาค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (water holding capacity and instron)

การสูญเสียน้ำ (drip loss) (Honikel, 1987; อ้างโดย สัญชัย, 2543) โดยใช้กล้ามเนื้อสันนอกด้านซ้าย ที่ผ่านการฉีดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 45 นาที และด้านขวา ที่เวลา 24 ชั่วโมง ทำการชั่งน้ำหนักเริ่มต้น (Wd_1) ห่อด้วยผ้าก๊อสเก็บในถุงพลาสติกชนิดเย็น และให้ผ้าก๊อสห่างจากก้นถุงประมาณ 2 เซนติเมตร ผนึกปากถุงให้สนิท เก็บในตู้เย็นลักษณะแขวนที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ชั่งน้ำหนัก (Wd_2) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำ (drip loss) จากสูตร

$$\text{Drip loss (\%)} = \left(\frac{Wd_1 - Wd_2}{Wd_1} \right) \times 100$$

การสูญเสียน้ำจากการทำละลายน้ำแข็ง (thawing loss) **และการสูญเสียน้ำจากการประกอบอาหาร** (cooking loss) โดยใช้กล้ามเนื้อสันนอกด้านซ้าย ที่ผ่านการฉีดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 45 นาที และด้านขวา ที่เวลา 24 ชั่งโมง ทำการชั่งน้ำหนัก (Wt_1) เก็บแบบสุญญากาศ (vacuum) ในถุงพลาสติกชนิดเย็นผนึกปากถุงให้สนิท เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ –20°C รอการวิเคราะห์ต่อไป จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาละลายน้ำแข็ง (thawing) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก (Wt_2) นำชิ้นเนื้อที่ได้เก็บในถุงร้อนแบบสุญญากาศต้มในหม้อต้มควบคุมอุณหภูมิ Korimat (Appendix figure 6) อุณหภูมิน้ำเท่ากับ 80°C จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อ 71 – 72°C ใช้เวลาประมาณ 15 – 16 นาที ผึ่งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับน้ำให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก (Wt_3) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะทำละลาย (thawing loss) และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียขณะประกอบอาหาร (cooking loss) จากสูตร

$$\text{Thawing loss (\%)} = \left(\frac{Wt_1 - Wt_2}{Wt_1} \right) \times 100$$

$$\text{Cooking loss (\%)} = \left(\frac{Wt_2 - WT_3}{Wt_2} \right) \times 100$$

นำเนื้อที่ต้มสุกจากการหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียขณะประกอบอาหาร (cooking loss) เจาะตามแนวเส้นใยกล้ามเนื้อ ด้วยเหล็กกลวงชนิดกลม (core) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร วัดค่าแรงตัดผ่านด้วยเครื่อง Instron 5565 หัววัดกำลัง 5 kN (Warner – Bratzler Shear) (Appendix figure 6) ด้วยความเร็ว 200 มม./นาที

ค่าการสูญเสียขณะปิ้งย่าง (grilling loss) โดยนำกล้ามเนื้อสันนอก ที่ทำการตัดแต่งไขมัน และพังผืดออก ทำการชั่งน้ำหนัก (Wg_1) จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ได้ย่างในหม้ออบความร้อน (convection oven) ที่อุณหภูมิ 220°C จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 70°C และนำออกจากเตาย่าง ทำการชั่งน้ำหนัก (Wg_2) คำนวณเปอร์เซ็นต์การสูญเสียขณะปิ้งย่าง จากสูตร

$$\text{Grilling loss (\%)} = \left(\frac{Wg_1 - Wg_2}{Wg_1} \right) \times 100$$

วิธีการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี (chemical composition)

ใช้ตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกที่ฉีดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ทั้งด้านขวาและด้านซ้ายบดด้วยเครื่อง blender เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ไขมันและความชื้น ด้วยวิธี Proximate Analysis (AOAC, 1995) ดังนี้

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (protein percentage)

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 0.5 กรัม ใส่ในกระดาษชั่งตัวอย่าง แล้วนำใส่ใน kjeldahl flask
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 2 กรัม (K_2SO_4 : $CuSo_4$; 20 : 1) แล้วเติม conc. sulfuric acid 15 ml.
3. นำ kjeldahl flask เข้าเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 420°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนกระทั่งได้สารละลายสีเขียวใส แล้วทิ้งให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 50 ml. เขย่าให้เข้ากัน
4. ตวงสารละลาย 4% boric acid 25 ml. ใส่ erlenmeyer flask No. 250 ml. แล้วเติม screen methylred indicator
5. นำ kjeldahl flask เข้าเครื่องกลั่น แล้วนำขวด Erlenmeyer flask ที่ใส่สารละลาย 4% boric acid ต่อเข้ากับอีกปลายของ condensor ของเครื่องกลั่น โดยให้ปลายท่อจุ่มในสารละลาย
6. เติม 40% sodium hydroxide ใส่ขวด kjeldahl flask 50 ml. แล้วเปิดน้ำให้ไหลผ่านตัว condensor แล้วจึงเปิดเครื่องกลั่น
7. กลั่นจนได้ปริมาตรของสารละลายในขวด erlenmeyer flask ประมาณ 200 ml.

8. จากนั้นนำขวด erlenmeyer flask ที่มีแอมโมเนียที่เก็บในสารละลาย 4% boric acid มาไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 *N* H_2SO_4 ไตรเตรทจนสีของสารละลายเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีม่วงอมเทา

การคำนวณหาปริมาณโปรตีน

$$\text{Protein percentage} = \frac{(A - B) \times C \times 0.014 \times 100 \times D}{E}$$

A = จำนวนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 0.1 *N* ที่ใช้ในการไตรเตรทกับตัวอย่าง (ml.)

B = จำนวนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 0.1 *N* ที่ใช้ในการไตรเตรทกับ blank (ml.)

C = ความเข้มข้น (*N*) ของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4

D = น้ำหนักตัวอย่าง

E = kjeldahl factor (6.25)

การวิเคราะห์หาความชื้น (moisture percentage)

1. นำถ้วยสำหรับใส่ตัวอย่างวิเคราะห์หาความชื้น (weighting bottle) ที่ล้างสะอาดและเช็ดให้แห้งอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 100°C นาน 1 ชั่วโมง ใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นและชั่งน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดละเอียดแล้วจำนวน 2 กรัม ใส่ใน weighting bottle บันทึกน้ำหนักรวมทั้งหมด และอบที่อุณหภูมิ 100°C 4 ชั่วโมง
3. นำถ้วยที่มีตัวอย่างออกจากตู้อบแห้ง ใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่หายไป คือ ปริมาณความชื้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

การคำนวณหาปริมาณความชื้น

$$\text{Moisture percentage} = \left(\frac{A - B}{C} \right) \times 100$$

A = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

B = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

C = น้ำหนักตัวอย่าง

การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (fat percentage)

1. ชั่งน้ำหนักเนื้อที่บดแล้ว 2 กรัม อบที่ 100°C 4 ชั่วโมง
2. นำบีกเกอร์สำหรับหาไขมันที่ผ่านการล้างสะอาด เช็ดให้แห้ง แล้วอบ 100°C นาน 1 ชั่วโมง และใส่ในโถดูดความชื้น (disiccator) ปล่อยให้เย็น ทำการชั่งหาน้ำหนักที่ได้
3. นำตัวอย่างเนื้อที่ผ่านการอบ หรือผ่านการหาความชื้นแล้ว ใส่ใน thimble alundum ที่สะอาดและแห้ง
4. ใส่ thimble alundum ลงใน sample containers แล้วต่อเข้ากับ holding clips ของเครื่องสกัดไขมันแบบ Soxhlet extraction
5. ใส่ dichloromethane ลงในบีกเกอร์ 30 ml. แล้วนำต่อเข้ากับเครื่องให้สนิท
6. เปิดน้ำเย็นให้ไหลผ่าน condensor ตลอดเวลา
7. เปิดสวิทช์ไฟโดยใช้ความร้อนต่ำสกัด 3 ชั่วโมง
8. นำ sample containers ออก แล้วนำ reclaming tube ใส่แทนที่ ให้ความร้อน dichloromethane จะถูกกลั่น และถูกเก็บใน reclaming tube ส่วนไขมันที่ได้จะอยู่ในบีกเกอร์
9. นำบีกเกอร์ที่มีไขมันอบที่อุณหภูมิ 100°C 30 นาที แล้วนำออกใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นภายหลังการสกัดคือน้ำหนักของไขมัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

การคำนวณหาปริมาณไขมัน

$$\text{Fat percentage} = \left(\frac{A - B}{C}\right) \times 100$$

A = น้ำหนักบีกเกอร์ + น้ำหนักไขมันหลังอบแล้ว

B = น้ำหนักบีกเกอร์

C = น้ำหนักตัวอย่าง

วิธีการวิเคราะห์หาค่าคอลลาเจนที่ละลายได้และละลายไม่ได้ (soluble and insoluble collagen analysis)

ขั้นตอนการแยก (Hill, 1966)

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 4 กรัม ใส่ในหลอด homogenize ขนาด 30 ml.
2. ใส่ strength ringer solution 8 ml.
3. Homogenize 10,000 rpm 1 นาที
4. ต้มใน water bath 77°C 70 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น 1 ชั่วโมง
5. ปั่นเหวี่ยงที่ 5,200*g* 26 นาที
6. แยกส่วน supernatant ใส่ erlenmeyer flask และส่วน residue ใส่ erlenmeyer flask เช่นเดียวกัน

ขั้นตอนการย่อย (AOAC, 1996)

1. เติมกรด sulfuric acid 7 *N* 30 ml. และปิดด้วยกระจกนาฬิกา
2. ใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 105 ± 1°C 16 ชั่วโมง
3. นำตัวอย่างที่ได้จากการย่อยกรองผ่านกระดาษกรองใส่ใน volumetric flask ขนาด 500 ml. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ

ขั้นตอนการทำสี (AOAC, 1996)

1. ปิเปตสารละลายที่ได้ในขั้นตอนแรก 2 ml. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 ml. ตัวอย่างละ 2 หลอด และทำ blank โดยการเติมใช้น้ำกลั่น 2 ml.
2. เติม oxidant solution 1 ml. เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 ± 2 นาที
3. เติม color reagent หลอดละ 1 ml. เขย่าทันที และปิดฝาหลอดให้สนิท
4. ต้มใน water bath 60 ± 0.5°C 15 นาที
5. ทำหลอดให้เย็นโดยการเปิดน้ำให้ไหลผ่าน 3 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

6. ทำหลอดให้แห้งโดยการเช็ดหรือตั้งทิ้งไว้
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 558 ± 2 nm.

สูตรในการคำนวณหาปริมาณ hydroxyproline

H, mg/g = (h x 2.5 x 1000)/m

h = hydroxyproline, g/2 ml. อ่านค่าจาก standard curve

m = weight sample, g

นำเอาส่วน ที่ละลายได้ คูณด้วย 7.52 และส่วนที่ไม่ละลาย คูณด้วย 7.25

วิธีการวิเคราะห์หาเอนไซม์ calpain

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมคอลัมน์ DEAE sephacel และการชะล้างคอลัมน์

1. เตรียมคอลัมน์ chromatography ขนาด 1.5 x 40 เซนติเมตร (W. Krannich) รองพื้นด้วยสำลีและใยแก้วให้ได้ความสูงขนาด 1.5 เซนติเมตร และปิดทับด้วยสำลี 1 ชั้น เติมด้วย DEAE sephacel ให้มีความสูงเมื่อผ่านการอัดแน่นประมาณ 12 เซนติเมตร
2. ล้างคอลัมน์ด้วย elution buffer ให้ elution buffer ซึมผ่านชั้นของ DEAE sephacel และนำส่วนของสารละลาย elution buffer วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 278 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าน้อยกว่า 0.100
3. หลังจากการใช้งานทุกครั้งต้องล้างคอลัมน์ด้วย elution buffer ที่มีส่วนผสมของเกลือ sodium chloride 500 mM ปริมาตร 200 ml.
4. หากยังไม่ใช้งานควรแช่ด้วย elution buffer

ขั้นตอนที่ 2 การสกัด (Thomson *et al.*, 1997)

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 ml.
2. ใส่สารละลาย tris – buffer 40 ml.
3. ปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer โดยปั่นครั้งละ 30 วินาที 2 ครั้ง ในอ่างน้ำแข็ง
4. ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 1 *N* sodium hydroxide
5. ปั่นเหวี่ยงที่ระดับ 30,100*g* ปรับอุณหภูมิในการปั่นให้ได้ 4°C เป็นเวลา 30 นาที

ขั้นตอนที่ 3 การแยกเอนไซม์ (Wheeler and Koohrnaraie, 1991)

1. นำส่วนของ supernatant กรองผ่านใยแก้วและสำลีที่ประกอบในไซริงค์ขนาด 20 ml. เพื่อกรองเอาไขมันที่ติดมาในส่วนของ supernatant และป้องกันการอุดตันของคอลัมน์
2. ใส่ส่วนของ supernatant ที่กรองแล้ว กรองผ่านคอลัมน์ให้มีอัตราการไหล 30 ml./ชั่วโมง
3. ชะล้างคอลัมน์ด้วย elution buffer ที่มีส่วนผสมของ sodium chloride 100 mM จำนวน 50 ml. เพื่อไล่ตัวโปรตีนที่ไม่ต้องการออก
4. ใส่ elution buffer ที่มีส่วนผสมของ sodium chloride 100 mM จำนวน 90 ml. เก็บปริมาตรที่ไหลผ่านทั้งหมด (เก็บครั้งละ 5 ml. จะได้ 18 fraction) และรวม fraction ที่ได้ทั้งหมด สำหรับการหา inhibitor ของ calpain (calpastatin)
5. ใส่ elution buffer ที่มีส่วนผสมของ sodium chloride 200 mM จำนวน 75 ml. เก็บปริมาตรที่ไหลผ่านทั้งหมด (เก็บครั้งละ 5 ml. จะได้ 13 fraction) และรวม fraction ที่ได้ทั้งหมด สำหรับการหา μ – calpain
6. ใส่ elution buffer ที่มีส่วนผสมของ sodium chloride 400 mM จำนวน 50 ml. เก็บปริมาตรที่ไหลผ่านทั้งหมด (เก็บครั้งละ 5 ml. จะได้ 10 fraction) และรวม fraction ที่ได้ทั้งหมด สำหรับการหา m – calpain นำส่วนที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 278 นาโนเมตร
7. ชะล้างคอลัมน์ด้วย elution buffer ที่มีส่วนผสมของ sodium chloride 500 mM จำนวน 100 ml. เพื่อทำความสะอาดคอลัมน์

ขั้นตอนที่ 4 การหาปริมาณของเอนไซม์

หาปริมาณเอนไซม์ calpastatin โดย

1. นำ fraction (ข้อ 4 ขั้นตอนที่ 2) 0.5 ml. เติมด้วย 0.2 ml. ของ (ข้อ 4 ขั้นตอนที่ 2 ที่วัดค่าการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร และมีค่าน้อยค่าน้อยกว่า 0.45) ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้ 3 นาที ที่ 25°C
2. เติม assay media 1.5 ml. ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ 60 นาที
3. เติมด้วย stop reaction 2 ml.
4. ปั่นเหวี่ยง 2,000*g* อุณหภูมิ 25°C นาน 30 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 278 นาโนเมตร

หาปริมาณเอนไซม์ μ – calpain โดย

1. นำ fraction (ข้อ 5 ขั้นตอนที่ 2) 1.0 ml. เติมด้วย assay media 1.0 ml. ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ 60 นาที 25°C
2. เติมด้วย stop reaction 2 ml.
3. ปั่นเหวี่ยง 2,000*g* อุณหภูมิ 25°C นาน 30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 278 นาโนเมตร

หาปริมาณเอนไซม์ m – calpain โดย

1. นำ fraction (ข้อ 6 ขั้นตอนที่ 2) 0.5 ml. เติมด้วย assay media 1.5 ml. ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ 60 นาที ที่ 25°C
2. เติมด้วย stop reaction 2 ml.
3. ปั่นเหวี่ยง 2,000*g* อุณหภูมิ 25°C นาน 30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 278 นาโนเมตร

ขั้นตอนการคำนวณหาปริมาณของเอนไซม์ในเนื้อ/กรัม

$$\text{ปริมาณเอนไซม์หน่วยต่อกรัม} = \frac{\text{ปริมาณ fraction (ml) x ปริมาณที่นำมาทำปฏิกิริยา (ml) x ค่าการดูดกลืนแสง (278 nm)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาคผนวก ข

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

การเตรียมสาร

1. Assay media ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่งสารดังต่อไปนี้

- Hydroxymethyl methylamine (tris – buffer) 12.11 กรัม
- Calcium chloride 7.35 กรัม
- Sodium azide 0.65 กรัม
- Casine 5 กรัม
- 2 – mercaptoethanol 0.7 ml.

นำสารที่ได้ทั้งหมดใส่ใน volumetric flask ขนาด 1 ลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย 1 *N* acetic acid

2. Tris – buffer ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่งสารดังต่อไปนี้

- Hydroxymethyl methylamine (tris – buffer) 4.84 กรัม
- Ethylenedinitrilo tetraacetic acid disodium dihydrate salt (EDTA) 3.72 กรัม
- 2 – mercaptoethanol 0.69 ml.
- Alkylphenylpolyetylenglykol (Triton x – 100) 2 ml.

นำสารที่ได้ทั้งหมดใส่ใน volumetric flask ขนาด 1 ลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย 6 *N* hydrochloric acid

3. Elution buffer ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่งสารดังต่อไปนี้

- Hydroxymethyl methylamine (tris – buffer) 4.84 กรัม
- Ethylenedinitrilo tetraacetic acid disodium dihydrate salt (EDTA) 0.18 กรัม
- 2 – mercaptoethanol 0.7 ml.

นำสารที่ได้ทั้งหมดใส่ใน volumetric flask ขนาด 1 ลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ให้ได้ 7.45 ด้วย 6 *N* hydrochloric acid

4. Stop reaction 5% ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง trichloroacetic acid (TCA) 50 กรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 1 ลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น

5. Sulfuric acid 7 *N*

เติมน้ำกลั่นใส่ใน volumetric flask ขนาด 2 ลิตร 750 ml. เติม Sulfuric acid 375 ml. เขย่าเบา ๆ และเติมน้ำให้ครบ 2 ลิตร (เก็บที่อุณหภูมิห้อง หรือห้องเย็น)

6. Buffer solution pH 6

ชั่งสารดังต่อไปนี้

- Citric acid monohydrate 30 กรัม
- Sodium hydroxide 15 กรัม
- Sodium acetate trihydrate 90 กรัม

นำทั้งหมดละลายในน้ำ 500 ml. แล้วเทสารละลายที่ได้ใส่ volumetric flask ขนาด 1 ลิตร เติมด้วย 1 – propanol 290 ml. ปรับ pH ด้วยน้ำกลั่น (เก็บในขวดสีชา ได้นาน 2 เดือน)

7. Oxidant solution

ละลาย 1.41 กรัม ของ chloramine – T – Reagent ใน buffer solution 100 ml. (เก็บที่ 4°C ในขวดสีชาได้นาน 7 วัน)

8. Color reagent

ละลาย 4 – dimethylaminobenzaldehyde 10 กรัม ใน perchloric acid (60% wt/wt) 35 ml. (เติมช้า ๆ พร้อมเขย่าเบา ๆ) เติม 2 – propanol 65 ml. (เตรียมใช้วันต่อวัน)

9. Hydroxyproline standard solution

- Stock solution ระดับความเข้มข้น 600 µg/ml.

โดยละลาย hydroxyproline 30 mg. ในน้ำกลั่น 50 ml. (เก็บใน volumetric flask ที่อุณหภูมิ 4°C ได้นาน 2 เดือน)

- Intermediate solution ระดับความเข้มข้น 6 µg/ml.

โดยปิเปต stock solution 5 ml. ใส่ใน volumetric flask ขนาด 500 ml. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น (เตรียมวันต่อวัน)

- Working solution

โดยปิเปต intermediate solution ปริมาตร 10, 20, 30 และ 40 ml. ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 ml. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml. ระดับความเข้มข้น hydroxyproline จะเท่ากับ 0.6, 1.2, 1.8 และ 2.4 µ hydroxyproline/ml. ตามลำดับ (เตรียมวันต่อวัน)

10. การเตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 200, 300 และ 400 มิลลิโมล

ชั่งแคลเซียมคลอไรด์ดังต่อไปนี้

- 29.40 กรัม
- 44.10 กรัม
- 58.80 กรัม

ละลายแคลเซียมคลอไรด์แต่ละระดับใน volumetric flask ขนาด 1,000 ml. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

11. การเตรียม elution ที่ระดับความเข้มข้น 100, 200, 400 และ 500 mM

โดยชั่ง sodium chloride น้ำหนักต่อไปนี้

- 5.84 กรัม
- 11.68 กรัม
- 23.37 กรัม
- 29.22 กรัม

นำแต่ละน้ำหนักใส่ volumetric flask ขนาด 1 ลิตร ปรับปริมาตรด้วย elution buffer ให้ครบ

ภาคผนวก ค

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

(F)

Appendix figure 1 Slaughtering process: weighing **(A)**, stunning **(B, C)**, bleeding **(D, E)** and deskining **(F)**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

(A)

(B)

Appendix figure 2 Preparation sample before calcium chloride injection at 45 minute **(A)** and 24 hour **(B)**

(A)

(B)

Appendix figure 3 Conduct – meter **(A)** and pH – meter **(B)**

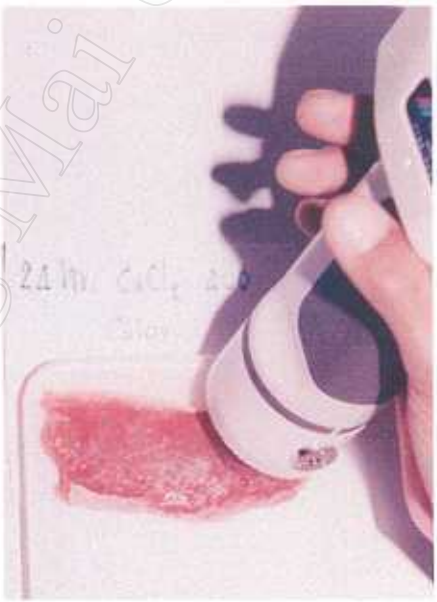
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

(A)

(B)

Appendix figure 4 Soxhlet extraction **(A)** and kjeldahl extraction **(B)**

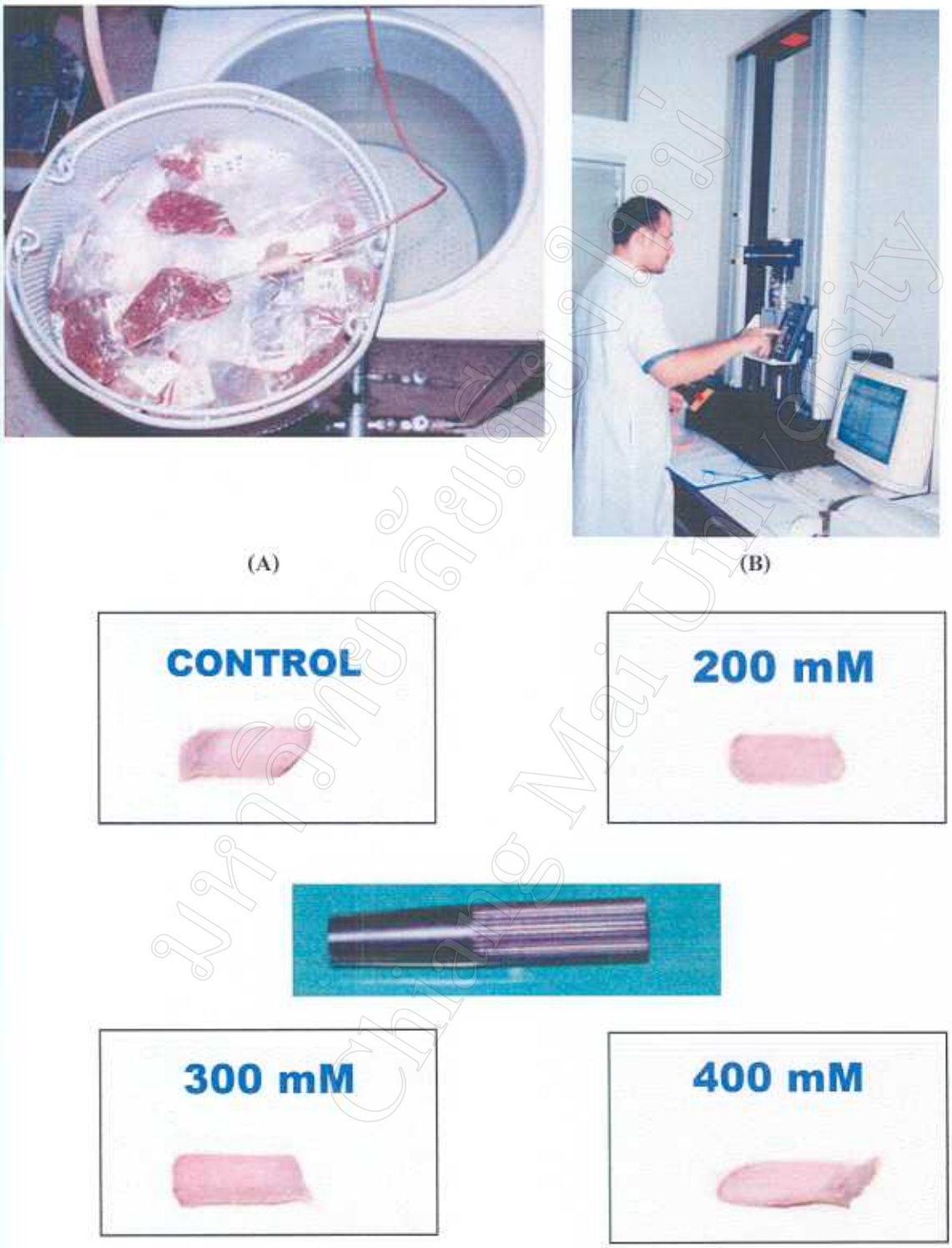
(A)



(B)

Appendix figure 5 Minolta chromameter **(A)** and meat color measurement **(B)**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



Appendix figure 6 Boiling for cooking loss **(A)** Warner – Bratzler shear measurement (instron machine) **(B)** and preparation sample for instron

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

(A) (B)

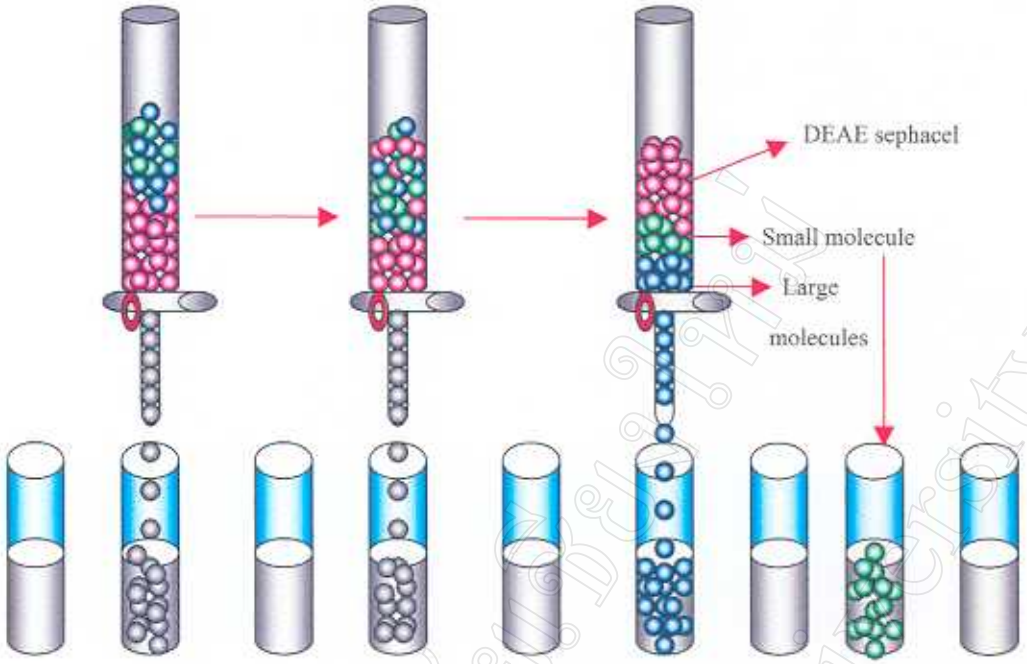
Appendix figure 7 The part of collagen method **(A)** and spectrophotometric **(B)**

Appendix figure 8 Preparation column chromatography DEAE sephacel filtration for purified calpain protease and inhibitor (calpastatin)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Appendix figure 9 A schematic of DEAE sephacel filtration column chromatography

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



Appendix figure 10 A schematic illustration of DEAE sephacel filtration chromatography (purple dots) A DEAE sephacel that encloses an internal solvent space. Smaller molecules (green dots) and large molecules (blue dots) can freely enter the internal solvent space of the DEAE sephacel from the external solvent space (adapted from Voet and Voet, 1995)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก ง

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Appendix table 1 Example of questionnaire for panel test

ชื่อ.....เพศ.....อายุ.....

วันที่.....

ขั้นตอนการตรวจชิมเนื้อ

1. บ้วนปากด้วยน้ำสะอาด
2. ชิมตัวอย่างเนื้อชิ้นแรก พร้อมกับประเมินผลของการตรวจชิมลงในแบบฟอร์มการตรวจชิม
3. รับประทานผลไม้สลับ 1 ชิ้น
4. บ้วนปากด้วยน้ำสะอาด
5. ชิมเนื้อตัวอย่างชิ้นต่อไป และปฏิบัติตามข้อที่ 3, 4 และ 5 จนครบทุกตัวอย่าง

แบบประเมินผลการตรวจชิมเนื้อ

ตัวอย่างเนื้อ เบอร์	ความนุ่ม	รสชาติ	ความชุ่มฉ่ำ	ความพอใจโดยรวม
1	.....	.....	.....	.....
2	.....	.....	.....	.....
3	.....	.....	.....	.....
4	.....	.....	.....	.....
5	.....	.....	.....	.....
6	.....	.....	.....	.....
7	.....	.....	.....	.....
8	.....	.....	.....	.....

หมายเหตุ: ความนุ่มมี 5 ระดับ คือ 1 = เหนียวที่สุด 5 = นุ่มที่สุด

รสชาติมี 5 ระดับ คือ 1 = ไม่ดีเลย 5 = ดีที่สุด

ความชุ่มฉ่ำมี 5 ระดับ 1 = แห้งที่สุด 5 = ชุ่มฉ่ำที่สุด

ความพอใจโดยรวม มี 5 ระดับ คือ 1 = ไม่ชอบเลย 5 = ชอบที่สุด

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

Appendix table 2 ANOVA of pH_1 (R – Square = 0.0212)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.01	0.005	0.20	0.89
Error	28	0.74	0.02		
Total	**31**	**0.75**			

Appendix table 3 ANOVA of pH_2 (R – Square = 0.0084)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.004	0.0015	0.08	0.97
Error	28	0.53	0.019		
Total	**31**	**0.54**			

Appendix table 4 ANOVA of pH_3 (R – Square = 0.0250)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.007	0.002	0.25	0.86
Error	28	0.29	0.01		
Total	**31**	**0.30**			

Appendix table 5 ANOVA of pH_4 (R – Square = 0.1519)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.08	0.02	1.67	0.19
Error	28	0.47	0.01		
Total	**31**	**0.56**			

Appendix table 6 ANOVA of EC_1 (R – Square = 0.0041)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.01	0.005	0.04	0.98
Error	28	3.63	0.12		
Total	**31**	**3.65**			

Appendix table 7 ANOVA of EC_2 (R – Square = 0.0803)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	2.64	0.88	0.84	0.48
Error	28	29.21	1.04		
Total	**31**	**31.86**			

Appendix table 8 ANOVA of EC_3 (R – Square = 0.7140)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	92.08	30.60	23.38	0.0001**
Error	28	36.75	1.31		
Total	**31**	**128.83**			

Appendix table 9 ANOVA of EC_4 (R – Square = 0.3144)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	21.76	7.25	4.28	0.01**
Error	28	47.46	1.69		
Total	**31**	**69.23**			

Appendix table 10 ANOVA of color (L) 45 min (R – Square = 0.0382)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	12.61	4.20	0.37	0.77
Error	28	317.22	11.32		
Total	**31**	**329.83**			

Appendix table 11 ANOVA of color (L) 24 hrs (R – Square = 0.0486)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	17.72	5.90	0.48	0.70
Error	28	346.29	12.36		
Total	**31**	**364.02**			

Appendix table 12 ANOVA of color (L) of A x B (R – Square = 0.1332)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	100.62	14.37	1.19	0.32
Error	54	654.56	12.12		
Corrected total	61	755.19			
Time	1	68.78	68.78	5.67	0.02*
$CaCl_2$	3	31.13	10.37	0.86	0.46
Time x $CaCl_2$	3	0.70	0.23	0.02	0.99

Appendix table 13 ANOVA of color (a*) 45 min (R – Square = 0.1136)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	24.80	8.26	1.20	0.32
Error	28	193.50	6.91		
Total	**31**	**218.30**			

Appendix table 14 ANOVA of color (a*) 24 hrs (R – Square = 0.0537)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	8.09	2.69	0.53	0.66
Error	28	142.36	5.08		
Total	**31**	**150.45**			

Appendix table 15 ANOVA of color (a*) of A x B (R – Square = 0.1660)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	66.89	9.55	1.59	0.15
Error	56	335.87	5.99		
Corrected total	63	402.76			
Time	1	33.99	33.99	5.67	0.02*
$CaCl_2$	3	24.02	8.00	1.34	0.27
Time x $CaCl_2$	3	8.86	2.95	0.49	0.68

Appendix table 16 ANOVA of color (b*) 45 min (R – Square = 0.1640)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	62.47	20.82	1.83	0.16
Error	28	318.24	11.36		
Total	**31**	**380.71**			

Appendix table 17 ANOVA of color (b*) 24 hrs (R – Square = 0.0698)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	4.71	1.57	0.70	0.55
Error	28	62.87	2.24		
Total	**31**	**67.59**			

Appendix table 18 ANOVA of color (b*) of A x B (R – Square = 0.2324)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	115.38	16.48	2.42	0.03*
Error	56	381.11	6.80		
Corrected total	63	496.50			
Time	1	48.19	48.19	7.08	0.01**
$CaCl_2$	3	32.54	10.84	1.59	0.20
Time x $CaCl_2$	3	34.64	11.54	1.70	0.17

Appendix table 19 ANOVA of maximum force (N) 45 min (R – Square = 0.7374)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	13749.73	4583.24	26.21	0.0001**
Error	28	4895.78	174.84		
Total	**31**	**18645.52**			

Appendix table 20 ANOVA of maximum force (N) 24 hrs (R – Square = 0.3487)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	5243.98	1747.99	5.00	0.006**
Error	28	9791.87	349.70		
Total	**31**	**15035.86**			

Appendix table 21 ANOVA of maximum force (N) of A x B (R – Square = 0.5915)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	21271.18	3038.74	11.59	0.0001**
Error	56	14685.59	262.24		
Corrected total	63	35956.78			
Time	1	2281.01	2281.01	8.70	0.004**
$CaCl_2$	3	17682.41	894.13	22.48	0.0001**
Time x $CaCl_2$	3	1307.74	435.91	1.66	0.18

Appendix table 22 ANOVA of energy (J) 45 min (R – Square = 0.0688)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.008	0.002	0.69	0.56
Error	28	0.11	0.003		
Total	**31**	**0.11**			

Appendix table 23 ANOVA of energy (J) 24 hrs (R – Square = 0.0417)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.01	0.004	0.41	0.74
Error	28	0.30	0.01		
Total	**31**	**0.32**			

Appendix table 24 ANOVA of energy (J) of A x B (R – Square = 0.0822)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	0.037	0.005	0.72	0.65
Error	56	0.41	0.007		
Corrected total	63	0.45			
Time	1	0.01	0.01	2.13	0.15
$CaCl_2$	3	0.01	0.004	0.66	0.58
Time x $CaCl_2$	3	0.006	0.002	0.30	0.82

Appendix table 25 ANOVA of extension (mm) 45 min (R – Square = 0.0399)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	13.86	4.62	0.39	0.76
Error	28	333.23	11.90		
Total	**31**	**347.10**			

Appendix table 26 ANOVA of extension (mm) 24 hrs (R – Square = 0.0128)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	7.13	2.37	0.12	0.94
Error	28	548.38	19.58		
Total	**31**	**555.51**			

Appendix table 27 ANOVA of extension (mm) of A x B (R – Square = 0.0271)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	24.20	3.45	0.22	0.97
Error	56	881.61	15.74		
Corrected total	63	905.81			
Time	1	3.19	3.19	0.20	0.65
$CaCl_2$	3	19.60	6.53	0.42	0.74
Time x $CaCl_2$	3	1.39	0.46	0.03	0.99

Appendix table 28 ANOVA of protein percentage 45 min (R – Square = 0.0109)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	1.14	0.38	0.10	0.93
Error	28	103.98	3.71		
Total	**31**	**105.12**			

Appendix table 29 ANOVA of protein percentage 24 hrs (R – Square = 0.0252)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	1.33	0.44	0.24	0.86
Error	28	51.70	1.84		
Total	**31**	**53.04**			

Appendix table 30 ANOVA of protein percentage of A x B (R – Square = 0.0684)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	11.44	1.63	0.59	0.76
Error	56	155.77	2.78		
Corrected total	63	167.21			
Time	1	8.94	8.94	3.21	0.07
$CaCl_2$	3	0.22	0.07	0.03	0.99
Time x $CaCl_2$	3	2.27	0.75	0.27	0.84

Appendix table 31 ANOVA of fat percentage 45 min (R – Square = 0.0430)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	2.74	0.91	0.42	0.74
Error	28	60.91	2.17		
Total	**31**	**63.65**			

Appendix table 32 ANOVA of fat percentage 24 hrs (R – Square = 0.0225)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	1.44	0.48	0.22	0.88
Error	28	62.90	2.24		
Total	**31**	**64.35**			

Appendix table 33 ANOVA of fat percentage of A x B (R – Square = 0.0332)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	4.26	0.60	0.28	0.96
Error	56	123.81	2.21		
Corrected total	63	128.07			
Time	1	0.07	0.07	0.03	0.85
$CaCl_2$	3	3.89	1.29	0.59	0.62
Time x $CaCl_2$	3	0.29	0.09	0.04	0.98

Appendix table 34 ANOVA of moisture percentage 45 min (R – Square = 0.0011)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.14	0.04	0.01	0.99
Error	28	126.37	4.51		
Total	**31**	**126.52**			

Appendix table 35 ANOVA of moisture percentage 24 hrs (R – Square = 0.0421)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	7.87	2.62	0.41	0.74
Error	28	178.99	6.39		
Total	**31**	**186.87**			

Appendix table 36 ANOVA of moisture percentage of A x B (R – Square = 0.1079)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	36.94	5.27	0.97	0.46
Error	56	305.37	5.45		
Corrected total	63	342.31			
Time	1	28.91	28.91	5.30	0.02*
$CaCl_2$	3	3.28	1.09	0.20	0.89
Time x $CaCl_2$	3	1.74	1.58	0.29	0.83

Appendix table 37 ANOVA of drip loss percentage 45 min (R – Square = 0.3563)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	57.79	19.26	5.17	0.005**
Error	28	104.40	3.72		
Total	**31**	**162.20**			

Appendix table 38 ANOVA of drip loss percentage 24 hrs (R – Square = 0.2621)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	16.74	5.58	3.32	0.03*
Error	28	47.15	1.68		
Total	**31**	**63.89**			

Appendix table 39 ANOVA of drip loss percentage of A x B (R – Square = 0.3507)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	81.75	11.67	4.32	0.0007**
Error	56	151.34	2.70		
Corrected total	63	233.09			
Time	1	7.28	7.28	2.70	0.10
$CaCl_2$	3	64.13	21.37	7.91	0.0002**
Time x $CaCl_2$	3	10.33	3.44	1.72	0.29

Appendix table 40 ANOVA of thawing loss percentage 45 min (R – Square = 0.2718)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	145.98	48.66	3.48	0.02*
Error	28	391.08	13.96		
Total	**31**	**537.07**			

Appendix table 41 ANOVA of thawing loss percentage 24 hrs (R – Square = 0.1608)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	66.38	22.12	1.79	0.17
Error	28	346.36	12.37		
Total	**31**	**412.75**			

Appendix table 42 ANOVA of thawing loss percentage of A x B (R – Square = 0.2236)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	212.43	30.34	2.30	0.03*
Error	56	737.45	13.16		
Corrected total	63	949.88			
Time	1	0.05	0.05	0.00	0.94
$CaCl_2$	3	175.98	58.66	4.45	0.0071**
Time x $CaCl_2$	3	36.38	12.12	0.92	0.43

Appendix table 43 ANOVA of cooking loss percentage 45 min (R – Square = 0.2047)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	141.15	47.05	2.40	0.08
Error	28	548.38	19.58		
Total	**31**	**689.53**			

Appendix table 44 ANOVA of cooking loss percentage 24 hrs (R – Square = 0.0791)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	47.31	15.77	0.8	0.51
Error	28	550.66	19.66		
Total	**31**	**597.98**			

Appendix table 45 ANOVA of cooking loss percentage of A x B (R – Square = 0.2442)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	355.19	50.74	2.59	0.02*
Error	56	1099.04	19.62		
Corrected total	63	1454.24			
Time	1	166.73	166.73	8.50	0.005**
$CaCl_2$	3	104.32	34.77	1.77	0.16
Time x $CaCl_2$	3	84.13	28.04	1.43	0.24

Appendix table 46 ANOVA of grilling loss 45 min (R – Square = 0.0954)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	142.81	47.60	0.98	0.41
Error	28	1358.36	47.33		
Total	**31**	**1496.17**			

Appendix table 47 ANOVA of grilling loss 24 hrs (R – Square = 0.0574)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	162.55	54.18	0.57	0.64
Error	28	2668.38	95.29		
Total	**31**	**2830.93**			

Appendix table 48 ANOVA of grilling loss percentage of A x B (R – Square = 0.1022)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	457.92	65.41	0.91	0.50
Error	56	4021.74	71.81		
Corrected total	63	4479.66			
Time	1	152.55	152.55	2.12	0.15
$CaCl_2$	3	226.02	75.34	1.05	0.37
Time x $CaCl_2$	3	79.34	26.44	0.37	0.77

Appendix table 49 ANOVA of tenderness 45 min (R – Square = 0.2982)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	6.72	2.24	3.97	0.017*
Error	28	15.82	0.56		
Total	**31**	**22.55**			

Appendix table 50 ANOVA of tenderness 24 hrs (R – Square = 0.0836)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	1.72	0.57	0.85	0.47
Error	28	18.88	0.67		
Total	**31**	**20.61**			

Appendix table 51 ANOVA of tenderness of A x B (R – Square = 0.2259)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	10.12	1.44	2.33	0.03*
Error	56	34.71	0.61		
Corrected total	63	44.84			
Time	1	1.67	1.67	2.71	0.10
$CaCl_2$	3	5.40	1.80	2.91	0.04*
Time x $CaCl_2$	3	3.04	1.01	1.64	0.19

Appendix table 52 ANOVA of juiciness 45 min (R – Square = 0.1609)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	1.09	0.36	1.79	0.17
Error	28	5.68	0.20		
Total	**31**	**6.77**			

Appendix table 53 ANOVA of Juiciness 24 hrs (R – Square = 0.0513)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.48	0.16	0.51	0.68
Error	28	9.04	0.32		
Total	**31**	**9.53**			

Appendix table 54 ANOVA of juiciness of A x B (R – Square = 0.1170)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	1.94	0.27	1.06	0.40
Error	56	14.67	0.26		
Corrected total	63	16.62			
Time	1	0.36	0.36	1.38	0.24
$CaCl_2$	3	0.35	0.11	0.45	0.71
Time x $CaCl_2$	3	1.23	0.41	1.57	0.20

Appendix table 55 ANOVA of flavor 45 min (R – Square = 0.0714)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.25	0.08	0.72	0.54
Error	28	3.33	0.11		
Total	**31**	**3.59**			

Appendix table 56 ANOVA of flavor 24 hrs (R – Square = 0.0097)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.04	0.01	0.09	0.96
Error	28	4.95	0.17		
Total	**31**	**4.99**			

Appendix table 57 ANOVA of flavor of A x B (R – Square = 0.0097)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	0.27	0.03	0.26	0.96
Error	56	8.44	0.15		
Corrected total	63	8.71			
Time	1	0.001	0.0015	0.01	0.92
$CaCl_2$	3	0.19	0.06	0.44	0.72
Time x $CaCl_2$	3	0.07	0.02	0.17	0.91

Appendix table 58 ANOVA of acceptability 45 min (R – Square = 0.2395)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	1.64	0.54	2.94	0.05*
Error	28	5.21	0.18		
Total	**31**	**6.85**			

Appendix table 59 ANOVA of acceptability 24 hrs (R – Square = 0.0006)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.005	0.001	0.01	0.99
Error	28	9.52	0.34		
Total	**31**	**9.52**			

Appendix table 60 ANOVA of acceptability of A x B (R – Square = 0.1181)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	1.95	0.27	1.07	0.39
Error	56	14.56	0.26		
Corrected total	63	16.52			
Time	1	0.06	0.06	0.24	0.62
$CaCl_2$	3	1.01	0.33	1.31	0.28
Time x $CaCl_2$	3	0.87	0.29	1.12	0.35

Appendix table 61 ANOVA of solubility collagen 45 min (R – Square = 0.0502)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.05	0.01	0.56	0.64
Error	32	0.98	0.03		
Total	**35**	**1.03**			

Appendix table 62 ANOVA of solubility collagen 24 hrs (R – Square = 0.0559)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.03	0.01	0.63	0.59
Error	32	0.61	0.01		
Total	**35**	**0.65**			

Appendix table 63 ANOVA of solubility collagen of A x B (R – Square = 0.1011)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	0.18	0.02	1.03	0.42
Error	64	1.60	0.02		
Corrected total	71	1.78			
Time	1	0.09	0.09	3.66	0.06
$CaCl_2$	3	0.08	0.02	1.17	0.32
Time x $CaCl_2$	3	0.001	0.0003	0.01	0.99

Appendix table 64 ANOVA of insolubility collagen 45 hrs (R – Square = 0.0101)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	1.94	0.64	0.11	0.95
Error	32	189.45	5.92		
Total	**35**	**191.40**			

Appendix table 65 ANOVA of insolubility collagen 24 hrs (R – Square = 0.0117)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.97	0.32	0.13	0.94
Error	32	81.94	2.56		
Total	**35**	**82.91**			

Appendix table 66 ANOVA of insolubility collagen of A x B (R – Square = 0.0583)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	16.82	2.40	0.57	0.78
Error	64	271.39	4.24		
Corrected total	71	288.22			
Time	1	13.89	13.89	3.28	0.07
$CaCl_2$	3	0.15	0.05	0.01	0.99
Time x $CaCl_2$	3	2.77	0.92	0.22	0.88

Appendix table 67 ANOVA of total collagen 45 min (R – Square = 0.0105)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	2.14	0.71	0.11	0.95
Error	32	201.21	6.28		
Total	**35**	**203.36**			

Appendix table 68 ANOVA of total collagen 24 hrs (R – Square = 0.0114)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.98	0.32	0.12	0.94
Error	32	84.84	2.65		
Total	**35**	**85.82**			

Appendix table 69 ANOVA of total collagen of A x B (R – Square = 0.0634)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	19.38	2.76	0.62	0.73
Error	64	286.10	4.47		
Corrected total	71	305.49			
Time	1	16.25	16.25	3.64	0.06
$CaCl_2$	3	0.29	0.09	0.02	0.99
Time x $CaCl_2$	3	2.84	0.94	0.21	0.88

Appendix table 70 ANOVA of calpastatin 45 min (R – Square = 0.0021)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.05	0.01	0.03	0.99
Error	36	23.43	0.65		
Total	**39**	**23.48**			

Appendix table 71 ANOVA of calpastatin 24 hrs (R – Square = 0.0002)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.007	0.002	0.00	0.99
Error	36	27.19	0.75		
Total	**39**	**27.19**			

Appendix table 72 ANOVA of calpastatin of A x B (R – Square = 0.0032)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	0.16	0.02	0.03	1.00
Error	72	50.62	0.70		
Corrected total	79	50.78			
Time	1	0.10	0.10	0.15	0.70
$CaCl_2$	3	0.04	0.01	0.02	0.99
Time x $CaCl_2$	3	0.01	0.005	0.01	0.99

Appendix table 73 ANOVA of μ – calpain 45 min (R – Square = 0.0012)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.03	0.014	0.01	0.99
Error	36	27.14	0.75		
Total	**39**	**27.18**			

Appendix table 74 ANOVA of μ – calpain 24 hrs (R – Square = 0.0046)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.14	0.40	0.06	0.98
Error	36	30.25	0.84		
Total	**39**	**30.39**			

Appendix table 75 ANOVA of μ – calpain of A x B (R – Square = 0.0045)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	0.26	0.03	0.05	0.99
Error	72	57.39	0.79		
Corrected total	79	57.66			
Time	1	0.08	0.08	0.11	0.74
$CaCl_2$	3	0.14	0.04	0.06	0.97
Time x $CaCl_2$	3	0.02	0.008	0.01	0.99

Appendix table 76 ANOVA of m – calpain 45 min (R – Square = 0.0025)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.02	0.006	0.03	0.99
Error	36	8.03	0.22		
Total	**39**	**8.05**			

Appendix table 77 ANOVA of m – calpain 24 hrs (R – Square = 0.0065)

SOV	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	3	0.05	0.01	0.07	0.97
Error	34	8.65	0.25		
Total	**37**	**8.70**			

Appendix table 78 ANOVA of m – calpain of A x B (R – Square = 0.0082)

Source	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	0.05	0.008	0.06	0.99
Error	48	7.12	0.14		
Corrected total	55	7.18			
Time	1	0.001	0.001	0.01	0.92
$CaCl_2$	3	0.01	0.005	0.04	0.99
Time x $CaCl_2$	3	0.04	0.01	0.09	0.96

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล	นายประหยัด ทิราวงศ์
วัน เดือน ปี เกิด	4 มกราคม 2517
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) จาก สถาบันราชภัฏอุตรดิตถ์ ปีการศึกษา 2540

ผลงานตีพิมพ์

สัญชัย จตุรสิทธา, **ประหยัด ทิราวงศ์**, วราภรณ์ เหลืองวันทา และ ชัยณรงค์ คันธพนิต. 2545. ผลของการเสริมสารเร่งการเจริญเติบโตโดยไม่ทราบองค์ประกอบ (พาแนกซิน) ในสูตรอาหารต่อประสิทธิภาพการผลิต คุณภาพซาก และเนื้อของสุกรระยะขุน. การสัมมนาวิชาการหลังการเก็บเกี่ยว/หลังการผลิตแห่งชาติ ครั้งที่ 1 ระหว่างวันที่ 22 – 23 สิงหาคม 2545 ณ โรงแรมอิมพีเรียล แม่ปิง. เชียงใหม่. 194 น.

สัญชัย จตุรสิทธา, **ประหยัด ทิราวงศ์**, วราภรณ์ เหลืองวันทา และ เทอดชัย เวียรศิลป์. 2545. สมรรถภาพการผลิต คุณภาพซาก และเนื้อของสุกรระยะขุนที่น้ำหนัก 100 และ 110 กิโลกรัม ที่เสริมสารเร่งการเจริญเติบโตโดยไม่ทราบองค์ประกอบ (พาแนกซิน) ในสูตรอาหาร. การประชุมวิชาการครั้งที่ 4 ระหว่างวันที่ 2 – 3 ธันวาคม 2545 ณ ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 157 น.

ประหยัด ทิราวงศ์. 2545. ผลของการเสริมสารเร่งการเจริญเติบโตโดยไม่ทราบองค์ประกอบ (พาแนกซิน) ในสูตรอาหารต่อประสิทธิภาพการผลิต คุณภาพซาก และเนื้อของสุกรระยะขุน. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. 40 น.

วราภรณ์ เหลืองวันทา, สัญชัย จตุรสิทธา, **ประหยัด ทิราวงศ์**, อำนวย เลี้ยวธารากุล และ อังคณา ผ่องแผ้ว. 2546. ศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพเนื้อ, ไขมัน และผลของการใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ต่อคุณภาพเนื้อของไก่พื้นเมือง และไก่เนื้อ (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)

สัญชัย จตุรสิทธา, วราภรณ์ เหลืองวันทา, **ประหยัด ทิราวงศ์**, อำนวย เลี้ยวธารากุล และ อังคณา ผ่องแผ้ว. 2546. การประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเวียนนา จากไก่พื้นเมือง และไก่ลูกผสมพื้นเมือง (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)

Jaturasitha, S., W. Praharnipurab, S. Pinpong, S. Kamopas, P. Rurksasen, S. Pichitpantapong, Y. Wudthithumkanaporn, **P. Thirawong**, L. Worachai, T. Vearsilp and U. ter Meulen. 2000. A comparative study on carcass and meat quality in pig production based on increasing Landrace lines. Georg – August – University, GÖttingen, Germany.

Jaturasitha, S., **Thirawong P.,** V. Leangwunta , T. Verasilpa and Chainarong Kanthapanit. 2002. Effect of Calcium Chloride Concentration Multi–level Injection on Improving Beef Tenderness. (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)