RESEARCH ARTICLE

Determination of Bitter Taste in UHT Milk

Wonganun Narongwanichgarn[1, 2*], Suntaree Mekvisarn[2], Aunyarat Nimthongkom[2]

Abstract

Objective — This is the first study aimed at determining the bitter taste in UHT milk in Thailand.

Materials and methods — Bitter taste in UHT milk is caused by various molecules, such as short peptide, hydrophobic N - amino acids as well as many other aromatic amino acids, which are end products of digestion of casein by protease. We hypothesized that these substrates can be quantified through the absorbance of the test samples once reacted with folin - ciocalteau phenol reagent when compared with that of the standard curve produced by tyrosine, and detected the amount of protease by paper disc agar gel diffusion test.

Results — The results showed that the amount of hydrophobic N - amino acids in bitter UHT milk was greater than 52.99 μg/mL, while that of normal milk ranged from 16.20 - 33.80 μg/mL. In addition, gelatin like mass was found in bitter UHT milk when stored more than 5 months. However, the paper disc agar gel diffusion test was failed to detect protease in milk samples.

Conclusion — This study revealed the method used to determine the bitter taste in UHT milk.

KKU Vet J. 2010;20(1):89-98 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

Keywords: UHT milk; Bitter flavor; Tyrosine; Psychrotrophic bacteria; Enzyme protease; Proteolysis

[1]National Institute of Animal Health, Kasetklang, Chatuchak, Bangkok, 10900, Thailand

[2]Royal Chitralada projects, Dusit, Bangkok, 20303, Thailand

[*]**Corresponding author Tel**: (66) 2-579-8908 -14, E-mail: wonganunn@dld.go.th

การตรวจวิเคราะห์น้ำนมยูเอชทีที่มีรสขม

วงศ์อนันต์ ณรงค์วาณิชการ[1, 2*], สุนทรี เมฆวิสาร[2], อัญญารัตน์ นิ่มทองคำ[2]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อประเมินว่า นอกจากการทดสอบความขมในน้ำนมยูเอชทีโดยการชิมแล้ว การตรวจหาปริมาณเอนไซม์โปรติเอส และการตรวจวัดปริมาณกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) ทั้งที่อยู่บริเวณ C-terminal ของเปปไทด์สายสั้นๆและชนิดโมเลกุลเดี่ยว และ aromatic amino acid อื่นๆ สามารถใช้เป็นวิธีและเกณฑ์ทางห้องปฏิบัติการในการตรวจสอบน้ำนมยูเอชทีที่มีรสขมได้

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ นำตัวอย่างน้ำนมยูเอชทีรสจืดที่มีรสผิดปกติคือมีรสขมและรสจืดปกติมาทดสอบ โดยการวัดความกว้างของวงใสที่เกิดจากเอนไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีนเคซีนในวุ้นน้ำนมด้วยวิธี paper disc agar gel diffusion test แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับสารละลายเอนไซม์โปรติเอสมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ในน้ำนมตัวอย่าง ร่วมกับการวัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำทั้งที่อยู่บริเวณ C-terminal ของเปปไทด์สายสั้นๆและชนิดโมเลกุลเดี่ยว และ aromatic amino acid อื่นๆ ที่เกิดจากโปรตีนเคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสกับ folin - ciocalteau phenol reagent แล้วนำค่าที่ได้ไปเทียบหาปริมาณกับสารละลายเข้มข้นมาตรฐานไทโรซินซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำเช่นเดียวกัน

ผลการศึกษา วิธี paper disc agar gel diffusion test ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณเอนไซม์โปรติเอสในน้ำนมตัวอย่าง แต่พบว่าน้ำนมยูเอชทีรสจืดที่มีรสขม จะมีปริมาณของกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำทั้งที่อยู่บริเวณ C-terminal ของเปปไทด์สายสั้นๆและชนิดโมเลกุลเดี่ยว และ aromatic amino acid อื่นๆ ตั้งแต่ 52.99 μg/mL ขึ้นไป ส่วนน้ำนมยูเอชทีรสจืดจะมีค่าระหว่าง 16.20 - 33.80 μg/mL นอกจากนี้ ยังพบสารแขวนลอยลักษณะคล้ายวุ้นในน้ำนมยูเอชทีรสขมที่มีอายุหลังวันผลิตตั้งแต่ 5 เดือนขึ้นไปด้วย

ข้อสรุป การตรวจวัดปริมาณกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำทั้งที่อยู่บริเวณ C-terminal ของเปปไทด์สายสั้นๆ และชนิดโมเลกุลเดี่ยว และ aromatic amino acid อื่นๆ โดยทำปฏิกิริยากับ folin - ciocalteau phenol reagent สามารถใช้เป็นวิธีและเกณฑ์ทางห้องปฏิบัติการในการตรวจสอบน้ำนมที่มีรสขมได้

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2553;20(1): 89-98 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

คำสำคัญ: น้ำนมยูเอชที รสขม ไทโรซีน เชื้อแบคทีเรียกลุ่มไซโครโทรบ เอนไซม์โปรติเอส proteolysis

[1]สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[2]โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา เขตดุสิต กรุงเทพฯ 20303

[*]**ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ:** โทร 02-579-8908 -14, E-mail: wonganunn@dld.go.th

บทนำ

น้ำนมเป็นอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายและเหมาะสำหรับผู้บริโภคทุกเพศทุกวัย น้ำนมพร้อมดื่มและผลิตภัณฑ์นมชนิดต่างๆ ที่มีคุณค่าต้องผลิตจากน้ำนมโคดิบที่มีคุณภาพดีเท่านั้น ซึ่งน้ำนมโคดิบคุณภาพดีต้องผ่านเกณฑ์การตรวจคุณภาพ ได้แก่ ไม่มีฝุ่นผงหรือสิ่งเจือปน มีรสหวานเล็กน้อย มีกลิ่นอ่อนๆ แต่ไม่มีกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ มีปริมาณมันเนย เนื้อนมไม่รวมไขมัน และเนื้อนมรวมตามเกณฑ์กำหนดในมาตรฐาน ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและมีจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนในปริมาณต่ำ [1] แต่ในกระบวนการผลิตน้ำนมโคดิบนั้นมักพบปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เสมอ [2] ทั้งจากภายในเต้านมแม่โคที่ป่วยเป็นโรคเต้านมอักเสบ และจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น อุปกรณ์รีดนม วิธีการรีดนม และการเก็บรวบรวมน้ำนมดิบที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เป็นต้น ทั้งนี้ มีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไซโครโทรบ (psychrotrophic bacteria) เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้น้ำนมดิบด้อยคุณภาพและไม่เหมาะที่จะนำไปแปรรูป [3] เพราะเชื้อสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7°C จึงเพิ่มจำนวนได้ในน้ำนมดิบที่เก็บรักษาไว้ในถังทำความเย็นที่ศูนย์รับน้ำนมและทำให้เกิดปฏิกิริยา proteolysis [4] โดยผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่มีคุณสมบัติทนความร้อน [5] ออกมาย่อยโปรตีนเคซีนในน้ำนมให้มีขนาดเล็กลงเป็นโพลีเปปไทด์สายยาว เปปไทด์สายสั้น และกรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยว [6] หากเปปไทด์สายสั้นๆนั้นมีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำอยู่บริเวณ C-terminal [7] และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1.4 KDa. และกรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยวที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ เช่น ไทโรซีน หรือ aromatic amino acid อื่นๆ [8] ในปริมาณมากๆ จะทำให้เกิดรสขมและวุ้นในผลิตภัณฑ์นมชนิดต่างๆได้ เช่น น้ำนมยูเอชที [9-11] น้ำนมพาสเจอไรซ์ [12] cheddar cheese [13] gouda cheese [14] และ cottage cheese [15]

เนื่องจากผลิตภัณฑ์นมที่มีรสขมไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค จึงเป็นปัญหากระทบต่ออุตสาหกรรมนม ดังนั้นจำเป็นต้องมีการตรวจวิเคราะห์รสขมในผลิตภัณฑ์นม ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ การวัดความสามารถในการย่อยโปรตีนเคซีนในวุ้นนมของเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยวิธี agar diffusion method (5, 16) และการวัดปริมาณของกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำทั้งที่อยู่บริเวณ C-terminal ของเปปไทด์สายสั้นๆและชนิดโมเลกุลเดี่ยว และ aromatic amino acid อื่นๆในน้ำนมที่ทำการแยกโปรตีนเคซีนและโพลีเปปไทด์สายยาวออกไปโดยการตกตะกอนด้วย trichloroacetic acid (TCA) ตามวิธีของ Hull (17) หรือวิธีของ McKellar (12)

อย่างไรก็ตาม วิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว สำหรับตรวจสอบน้ำนมยูเอชทีที่มีรสขมนั้น คือ การชิม แต่ผลการทดสอบที่ได้อาจมีข้อขัดแย้งเกิดขึ้น เพราะผู้ทดสอบแต่ละคนมีความสามารถในการรับรู้รสขมต่างกัน ดังนั้น การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินวิธีและหาเกณฑ์ทางห้องปฏิบัติการที่สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจสอบน้ำนมยูเอชทีที่มีรสขมได้ โดยการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์โปรติเอสในน้ำนมโดยวิธี paper disc agar gel diffusion test แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับสารละลายเอนไซม์โปรติเอสมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ในน้ำนมตัวอย่าง ร่วม

กับการตรวจวัดปริมาณกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำทั้งที่อยู่บริเวณ C-terminal ของเปปไทด์สายสั้นๆและชนิดโมเลกุลเดี่ยว และ aromatic amino acid อื่นๆที่ทำปฏิกิริยากับ folin - ciocalteau phenol reagent โดยดัดแปลงจากวิธีของ Hull (17)

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นน้ำนมยูเอชทีชนิดรสจืดของบริษัทหนึ่งซึ่งได้รับแจ้งจากผู้บริโภคว่าดื่มผลิตภัณฑ์ชุดที่มีอายุหลังการผลิต 4 เดือนชุดหนึ่ง แล้วรู้สึกว่ามีรสผิดปกติ คือ รสขม จึงทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมยูเอชทีชนิดรสจืดของบริษัทดังกล่าวสองชุด คือ ชุดที่มีรสขมและชุดที่มีรสจืดปกติซึ่งเป็นชุดที่มีวันผลิตใกล้กัน จากร้านค้าสะดวกซื้อที่วางผลิตภัณฑ์ไว้ในห้องปรับอากาศ อุณหภูมิ 25 ˚C และจากที่พักของผู้บริโภคที่วางไว้ในอุณหภูมิห้อง ทั้งนี้ทำการเก็บรักษาตัวอย่างน้ำนมแต่ละชนิดในสภาพแวดล้อมเดิมตลอดการทดสอบ เพื่อเปรียบเทียบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเกิดรสขมอย่างไร ตัวอย่างน้ำนมแต่ละชนิดจะถูกสุ่มมาทำการวิเคราะห์เดือนละหนึ่งครั้ง เป็นจำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งประกอบด้วยน้ำนมยูเอชทีที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25˚C รสขม 2 ตัวอย่าง รสจืดปกติ 2 ตัวอย่าง และน้ำนมยูเอชทีที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง รสขม 1 ตัวอย่าง และรสจืดปกติ 1 ตัวอย่าง

การตรวจวัดปริมาณเอนไซม์โปรติเอสในน้ำนมโดยวิธี paper disc agar gel diffusion test

หยดสารละลายมาตรฐานเอนไซม์โปรติเอส (Sigma, Germany) ใน 1% skim milk ที่เตรียมให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 5,000, 2500, 1250,..., 78.125 μg/mL ปริมาตร 20 μL ในแต่ละความเข้มข้น และตัวอย่างน้ำนมยูเอชทีที่ใช้ทดสอบ ตัวอย่างละ 20μL ลงบนกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 cm ตัวอย่างละ 3 แผ่น (3 ซ้ำ) ทิ้งไว้ให้แห้ง จึงนำไปทำการทดสอบ

เตรียมวุ้นนม 3% (3% skim milk agar) ที่มีวิธีเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยชั่ง skim milk 3 กรัม และ Noble agar 3 กรัม ใส่ในขวด เติมน้ำกลั่น 100 mL ต้มจนละลายจึงเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 mL ต่อจาน ปิดฝาทิ้งให้แข็งตัว นำเข้าตู้อบเพื่อให้หน้าวุ้นแห้งไม่มีหยดน้ำเกาะ จากนั้นนำกระดาษกรองที่ชุบสารละลายมาตรฐานหรือตัวอย่างน้ำนมยูเอชทีวางบนวุ้นนมและใช้สารละลาย 1% skim milk ที่ไม่เติมเอนไซม์โปรติเอสเป็นตัวควบคุมผลลบ (blank) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55˚C นาน 18 ชม. วัดความกว้างของวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นด้วยเวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์และบันทึกผลเป็นหน่วยเซนติเมตร นำความกว้างของวงใสที่ได้จากสารละลายมาตรฐานเอนไซม์โปรติเอส เปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำนมยูเอชที และคำนวณหาความเข้มข้นของเอนไซม์โปรติเอสในตัวอย่างน้ำนมยูเอชที

การวัดปริมาณกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำทั้งที่อยู่บริเวณ C-terminal ของเปปไทด์สายสั้น ๆ และชนิดโมเลกุลเดี่ยว และ aromatic amino acid อื่น ๆ

เตรียมสารละลายมาตรฐานไทโรซีน (Fluka, Japan) ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 0.5 mg/mL และทำการเจือจางด้วยเทคนิค two-fold serial dilution ให้หลอดสุดท้ายมีความเข้มข้น 0.015625 mg/mL เตรียม 0.72 N TCA โดยชั่ง TCA 11.76 g ละลายในน้ำกลั่น 100 mL และเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย sodium carbonate (Na_2CO_3) 75 g และ sodium hydrogen phosphate ($NaHPO_4$) 10 g ในน้ำกลั่น 100 mL

ดัดแปลงจากวิธีของ Hull (17) ทำการแยกโปรตีนเคซีนในน้ำนมตัวอย่างออกจากเปปไทด์สายสั้นๆ ที่มีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำอยู่บริเวณ C-terminal กรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยวที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ และ aromatic amino acid อื่นๆ ด้วยวิธีตกตะกอน โดยนำหลอดที่มีสารละลายมาตรฐานไทโรซีนความเข้มข้นต่างๆ หรือตัวอย่างน้ำนมยูเอชทีที่ใช้ทดสอบ 5 mL มาเติมน้ำกลั่น 1 mL และ 0.72 N TCA 10 mL ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จึงกรองผ่านกระดาษกรอง นำส่วนใสที่กรองได้ 6 mL มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ 12 mL เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนใสที่ได้มา 15 mL เติม folin - ciocalteau phenol reagent ลงไป 3 mL ซึ่ง folin - ciocalteau phenol reagent ที่เติมลงไปนั้น จะทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยวที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ เช่น ไทโรซีน หรือ aromatic amino acid อื่นๆ ทำให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเมื่อตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จึงนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Du-64 Spectrophotometer (Beckman, USA) ที่ความยาวคลื่น 650 nm. นำค่าที่วัดได้มาเขียนกราฟและคำนวณหาสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสง ในขณะเดียวกัน น้ำนมยูเอชทีรสขมที่นำมาทดสอบนั้น มีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำทั้งที่อยู่บริเวณ C-terminal ของเปปไทด์สายสั้นๆและชนิดโมเลกุลเดี่ยว และ aromatic amino acid อื่นๆอยู่ สารละลายจึงเกิดการเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเมื่อเติม folin - ciocalteau phenol reagent ลงไป ดังนั้น สามารถนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากตัวอย่างน้ำนมยูเอชทีไปแทนค่าในสมการเพื่อคำนวณหาปริมาณกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำทั้งที่อยู่บริเวณ C-terminal ของเปปไทด์สายสั้นๆและชนิดโมเลกุลเดี่ยว และ aromatic amino acid อื่นๆ ได้

ผลการศึกษา

การตรวจวัดปริมาณเอนไซม์โปรติเอสในน้ำนมโดยวิธี paper disc agar gel diffusion test

พบวงใส (clear zone) ในวุ้นนมรอบแผ่นกระดาษกรองที่ชุบสารละลายมาตรฐานเอนไซม์โปรติเอส เพราะโปรตีนเคซีนในวุ้นนมถูกย่อย โดยมีความกว้างของวงใสแตกต่างกันตามปริมาณของเอนไซม์ ดังแสดงใน **Table 1** แต่ไม่พบวงใสรอบแผ่นกระดาษกรองที่ชุบน้ำนมยูเอชทีทั้งที่มีรสปกติและรสขม นอกจากนี้ ยังพบสารแขวนลอยลักษณะคล้ายวุ้นในน้ำนมยูเอชทีที่มีรสขมเมื่อมีอายุหลังวันผลิตตั้งแต่ 5 เดือน ขึ้นไป

การวัดปริมาณกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำทั้งที่อยู่บริเวณ C-terminal ของเปปไทด์สายสั้น ๆและชนิดโมเลกุลเดี่ยว และ aromatic amino acid อื่น ๆ

เมื่อเติมสารละลายบัฟเฟอร์ลงไปในสารละลายมาตรฐานไทโรซีน และสารละลายที่ได้จากการตกตะกอนน้ำนม จะมีตะกอนขุ่นขาวเกิดขึ้นเฉพาะในตัวอย่างที่ได้จากน้ำนมเท่านั้น จึงต้องทำการปั่นแยกเอาตะกอนออกก่อน หลังจากนั้นจึงเติม folin - ciocalteau phenol reagent ลงไป สีของสารละลายทดสอบทุกชนิดจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน โดยความเข้มของสีขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยวที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ และ aromatic amino acid อื่นๆในสารละลายที่ใช้ทดสอบ ซึ่งได้แก่ไทโรซีน สามารถสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายไทโรซีนได้ ดังแสดงใน **Figure 1** และนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำทั้งที่อยู่บริเวณ C-terminal ของเปปไทด์สายสั้นๆ และชนิดโมเลกุลเดี่ยว และ aromatic amino acid อื่นๆในตัวอย่างน้ำนมยูเอชทีได้ ดังแสดงใน **Table 2** โดยน้ำนมยูเอชทีที่มีรสขมจะมีค่าตั้งแต่ 52.99 μg/mL ขึ้นไป ส่วนน้ำนมยูเอชทีที่มีรสจืดปกติ จะมีค่าระหว่าง 16.20 - 33.80 μg/mL เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละเดือนที่ทำการตรวจวิเคราะห์ น้ำนมยูเอชทีทั้งสองชนิดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจะมีปริมาณเปปไทด์สายสั้นๆที่มีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำอยู่บริเวณ C-terminal กรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยวที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ และ aromatic amino acid อื่นๆ มากกว่าน้ำนมยูเอชทีที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 ˚C

Table 1. Comparison between Concentration of Protease and Diameter of the Clear Zone[a]

Sample Tested	Concentration of Protease (μg/mL)	Diameter of the Clear Zone(SD) (cm)
Standard control	5,000	1.37 (0.06)
Standard control	2,500	1.20 (0.00)
Standard control	1,250	1.10 (0.00)
Standard control	625	0.80 (0.00)
Standard control	312.5	0.68 (0.39)
Standard control	156.25	0.00
Standard control	78.125	0.00
Milk with Normal Taste	*	0.00
Milk with Bitter Taste	*	0.00

[a]The study was done on skim milk agar plate after incubation at at 55˚C for 18 hours.

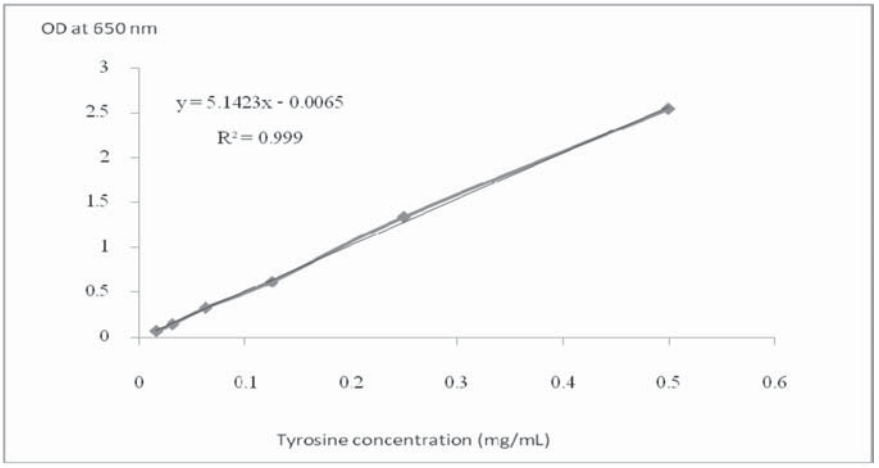
*The concentration of protease in the milk samples cannot determined. SD=standard deviation

Table 2. Concentration of Short Peptides, Hydrophobic Amino Acids and Aromatic Amino Acids in UHT Milk Kept at Different Temperatures and Storage Times

Taste of UHT milk	Sample number	The concentration of short peptides, hydrophobic amino acids and aromatic amino acids (μg /mL)							
		4 months*		5 months*		6 months*		7 months*	
		25°C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
Bitter taste	1	52.99	-	70.90	-	75.5	-	102.6	-
	2	56.88	-	74.00	-	78.7	-	127.6	-
	3	-	63.88	-	82.90	-	82.90	-	147.10
Normal taste	4	17.99	-	19.60	-	22.0	-	16.20	-
	5	18.96	-	18.70	-	26.7	-	19.20	-
	6	-	26.54	-	29.40	-	28.20	-	33.80

Symbols: * = Storage time, - = Not determined

Figure 1. Linear Relationship between Concentration of Standard Tyrosine Solution and Its Absorbance Value at 650 nm



วิจารณ์

เนื่องจากรสขมของน้ำนมพร้อมดื่ม มีสาเหตุจากการจัดการน้ำนมดิบที่ไม่สะอาด ทำให้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มไซโครโทรบที่ปนเปื้อนสามารถเจริญเพิ่มจำนวนและผลิตเอนไซม์โปรติเอสออกมามาก เอนไซม์นี้สามารถทนความร้อนและไม่ถูกทำลายแม้จะผ่านขบวนการถนอมอาหารด้วยระบบยูเอชที จึงทำให้เกิดปฏิกิริยา proteolysis ขึ้นในน้ำนมพร้อมดื่ม โดยโปรตีนเคซีนจะถูกย่อยจนกลายเป็น

เปปไทด์สายสั้นๆ ที่มีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำอยู่บริเวณ C-terminal กรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยวที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ และ aromatic amino acid อื่นๆ ซึ่งสารต่างๆ เหล่านี้มีคุณสมบัติทางเคมีทำให้เกิดรสขมขึ้นที่ต่อมรับรสบริเวณลิ้นได้ ทั้งนี้ การศึกษารสขมในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมมีหลายวิธี ได้แก่ การตรวจชนิดและปริมาณของรสขม (18) การตรวจวัดปริมาณกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำทั้งที่อยู่บริเวณ C-terminal ของเปปไทด์สายสั้นๆและชนิดโมเลกุลเดี่ยว และ aromatic amino acid อื่นๆ (17, 18) การวัดปริมาณเอนไซม์โปรติเอส (5) เป็นต้น ในการศึกษานี้ใช้วิธี paper disc agar gel diffusion test ในการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์โปรติเอสในน้ำนม พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์โปรติเอสน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดวงใสรอบแผ่นกระดาษกรองเท่ากับ 312.5 μg/mL แต่ไม่พบวงใสจากตัวอย่างน้ำนมทั้งชนิดปกติและชนิดมีรสขม จากผลการทดลองนี้มีความเป็นไปได้ว่า วิธีที่ใช้นี้มีความไวต่ำ ไม่สามารถวัดเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 312.5 μg/mL ได้ หรือเอนไซม์โปรติเอสมีการสูญเสียประสิทธิภาพไป (5) หรือ ความเข้มข้นของเอนไซม์โปรติเอสที่ทำให้น้ำนมยูเอชทีมีรสขมนั้น มีค่าน้อยกว่า 312.5 μg/mL นอกจากนี้ ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองอาจไม่เพียงพอสำหรับทำการทดสอบเอนไซม์ในตัวอย่างน้ำนม ดังนั้น เทคนิคการวัดความสามารถในการย่อยโปรตีนเคซีนในวุ้นนมของเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยวิธี agar diffusion method ในการศึกษานี้ไม่เหมาะสมสำหรับตรวจวิเคราะห์น้ำนมยูเอชทีที่มีรสขม

ส่วนการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง tyrosine กับ folin - ciocalteau phenol reagent ที่ทำให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน และสามารถสร้างสมการความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของ tyrosine กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm. และสมการดังกล่าวสามารถใช้คำนวณหาปริมาณกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำทั้งที่อยู่บริเวณ C-terminal ของเปปไทด์สายสั้นๆและชนิดโมเลกุลเดี่ยว และ aromatic amino acid อื่นๆ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้น้ำนมยูเอชทีมีรสขมได้นั้น จากผลการทดสอบพบว่าน้ำนมยูเอชทีที่มีรสขมในทุกตัวอย่าง จะมีความเข้มข้นตั้งแต่ 52.99 μg/mL ขึ้นไป ส่วนน้ำนมยูเอชทีที่มีรสปกติ จะมีความเข้มข้นระหว่าง 16.20 - 33.80 μg/mL ทั้งนี้ ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณเปปไทด์สายสั้นๆที่มีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำอยู่บริเวณ C-terminal กรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยวที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ และ aromatic amino acid อื่นๆ ซึ่งแปรผันโดยตรงกับความขมของผลิตภัณฑ์นม ได้แก่ ชนิดและปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบ ระยะเวลาที่เชื้อฟักตัวอยู่ในน้ำนมดิบก่อนผ่านขบวนการถนอมอาหาร ปริมาณเริ่มต้นของโปรตีนเคซีนและเอนไซม์ protease ในน้ำนม ความเป็นกรดด่างของน้ำนม รวมทั้งอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นมนั้นๆ (5)

นอกจากนี้ Datta และ Deeth, (20) ได้รายงานลักษณะผิดปกติอื่นๆที่อาจพบได้ในน้ำนม คือ การเกิดก้อนวุ้นลอยอยู่บริเวณผิวหน้าของน้ำนมยูเอชที ซึ่งเกิดจากสาเหตุต่างๆ ได้แก่ องค์ประกอบและคุณภาพของน้ำนมดิบ ความร้อนในระหว่างการผลิต การเก็บรักษา และการเกิดปฏิกิริยา proteolysis ในน้ำนมภายหลังการผลิต จากการศึกษานี้ พบก้อนวุ้นในน้ำนมยูเอชทีเฉพาะที่มีรสขมเท่านั้นเมื่อมีอายุการเก็บรักษาหลังผลิตได้ 5 เดือน ซึ่งเป็นผลจากการเกิด proteolysis ด้วย ดังนั้น การศึกษานี้พบว่า น้ำนมยูเอชทีมีรสขมได้เพราะเกิดปฏิกิริยา proteolysis คือ เอนไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีนเคซีน

จนกลายเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ที่มีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำอยู่บริเวณ C-terminal กรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยวที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ และ aromatic amino acid อื่นๆ ปริมาณตั้งแต่ 52.99 μg/mL ขึ้นไป และหากเก็บน้ำนมยูเอชทีที่มีรสขมไว้นานๆ อาจพบก้อนวุ้นลอยอยู่บริเวณผิวหน้าได้

โดยทั่วไป กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์นมคุณภาพดี ประกอบด้วยผู้เกี่ยวข้องหลักสามฝ่าย คือ เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม ศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบ และโรงงานผู้ผลิต ซึ่งน้ำนมยูเอชทีรสขมที่ใช้ศึกษานี้มีรสขมเมื่อมีอายุหลังวันที่ผลิตประมาณสามเดือนเศษ จากการตรวจสอบโรงงานผู้ผลิต พบว่าน้ำนมดิบที่นำมาแปรรูปผ่านการตรวจคุณภาพน้ำนมดิบก่อนโรงงานจะรับซื้อ เมื่อทำการเก็บน้ำนมยูเอชทีชุดการผลิตนี้ที่จำหน่ายไปยังหลายๆแห่งมาตรวจสอบ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิดจากการเพาะเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อตรวจสอบศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบที่ทางโรงงานรับซื้อ พบว่า ทางศูนย์ฯ ได้เก็บน้ำนมดิบชุดนี้ไว้ในถังทำความเย็นนานสามวัน เพราะต้องการรวบรวมน้ำนมดิบให้มากพอเพื่อประหยัดค่าขนส่งไปจำหน่ายให้โรงงาน โดยเจ้าหน้าที่ของศูนย์ฯเข้าใจว่าที่อุณหภูมิ 4°C ในถังทำความเย็นสามารถรักษาน้ำนมดิบให้คงคุณภาพได้นานแม้จะเก็บไว้หลายวัน ดังนั้น การเกิดรสขมในน้ำนมยูเอชทีในครั้งนี้ จึงมีสาเหตุจากศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบปฏิบัติไม่ถูกต้อง ทำให้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มไซโครโทรบ สามารถเจริญได้ดีในสภาพดังกล่าว และยังผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ทนร้อนออกมาย่อยสลายโปรตีนเคซีนในน้ำนม ทำให้น้ำนมมีรสขมในที่สุด

รายงานนี้เป็นการตรวจวิเคราะห์น้ำนมยูเอชทีที่มีรสขมเป็นครั้งแรกในประเทศไทย ซึ่งมีสาเหตุจากการจัดการน้ำนมดิบที่ไม่ถูกต้องของศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบ ทำให้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มไซโครโทรบที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7°C เพิ่มจำนวนและผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่มีคุณสมบัติทนร้อนออกมามาก เกิดการย่อยโปรตีนเคซีนในน้ำนมยูเอชที กลายเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ที่มีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำอยู่บริเวณ C-terminal กรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยวที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ และ aromatic amino acid อื่นๆ ปริมาณตั้งแต่ 52.99 μg/mL ขึ้นไป และทำให้น้ำนมยูเอชทีมีรสขม ผลจากการศึกษานี้ทำให้ได้วิธีการตรวจสอบและเกณฑ์ในการตัดสินความผิดปกติที่เกิดขึ้น อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาวิธีคัดกรองน้ำนมดิบที่มีอายุการเก็บในถังทำความเย็นนานเกินกำหนดเพื่อป้องกันปัญหาผลิตภัณฑ์นมมีรสขมเกิดขึ้นอีก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ. สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์โปรติเอส และ สพ.ญ.มนทกานต์ วงศ์ภากร สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ folin - ciocalteau phenol reagent ที่ใช้ในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

1. วิพิชญ์ ไชยศรีสงคราม การตรวจคุณภาพน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม กองสัตวแพทยสาธาณสุข กรมปศุสัตว์ กรุงเทพฯ 2541
2. Cousins CM, Bramley AJ. The microbiology of raw milk. In: Robinson RK, editor. Dairy Microbiology. The Microbiology of Milk. Applied Science Publishers Ltd. Essex. 1983;1: pp. 119-163.
3. Shipe WF, Bassette R, Deane DD, Dunkley WL, Hammond EG, Harper WJ, Kleyn DH, Morgan M E, Nelson JH, Scanlan RA. Off falvours of milk: nomenclature, standards, and bibliography. *J Dairy Sci.* 1978;61:855-869.
4. Sorhaug T, Stepaniak L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends in Food Sci Technol.* 1997;8: 35-41.
5. Adam DM, Barach JT, Speck ML. Heat resistant protease produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J Dairy Sci.* 1975;58: 829-834.
6. Fox PF, McSweeny PLH. Proteolysis in cheese. *Food Reviews International.* 1996;12: 457-509.
7. Matoba T, Hata T. Relationaship between bitterness of peptides and their chemical structures. *Agri Biol Chem.* 1972;36:1423-1431.
8. Hockney LJ, Cousin MA. Dection of heat resistant proteases produced by psychrotrophs in refrigerated milk. *J Dairy Sci.* 1983;68: 810-816.
9. Adam DM, Barach JT, Speck ML. Effects of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultra-high temperature treatment. *J Dairy Sci.* 1976;59: 823.
10. Law BA, Andrews AT, Thorpe ME. Gelation of ultra-high temperature-sterilized milk by proteases from a strain of pseudomonas fluorescens isolated from raw milk. *J Dairy Res.* 1977;44: 145.
11. Richardson BC, Newstead DF. Effect of heat-stable proteases on the storage life of UHT milk. *NZJ Dairy Sci Technol.* 1979;14: 273-279.
12. McKellar RC. Development of off-flavors in ultra-high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. *J Dairy Sci.* 1981;64: 2138-2145.
13. Fryer TF. Microflora of Cheddar cheese and its influence on cheese flavour. *Dairy Sci Abstr.* 1969;31: 471-490.
14. Raadsveld W. Bitter compounds from cheese. *Proceedings 13th Int. Dairy Congr,* 1953;2: 676.
15. Stone WK, Naft DM. Increases in soluble nitrogen and bitter flavor development in Cottage cheese. *J Dairy Sci.* 1967;50: 1497-1500.
16. Christen GL, Marshall RT. Selected properties of lipase and protease of P. fluorescens 27 produced on four media. *J Dairy Sci.* 1984; 67: 1680.
17. Hull ME. Studies on milk proteins. II Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *J Dairy Sci.* 1947;30: 881-884.
18. Harwalkar VR, Elliott JA. Isolation of bitter and astringent fractions from Cheddar cheese. *J Dairy Sci.* 1971;54: 8-11.
19. Reimerdes EH, Klostermeyer H. Determination of proteolytic activites on casein substrates. In: Methods in enzymology. New York: Academic Press; 1976;45: 26-28.
20. Datta N. Deeth HC. Age gelation of UHT-milk-A review. *Trans I ChemE.* 2001;79: 197-210.