บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

น้ำปลาเป็นอาหารหมักพื้นเมืองในประเทศแถบเอเชีย มีชื่อเรียกต่างๆ กันไป เวียตนามเรียก Nouc Mam ฟิลิปปินส์เรียก Patis ญี่ปุ่นเรียก Shiogara หรือ Shotturu (24,25,26)

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (22) ให้ความหมายของน้ำปลาว่า " เป็นของเหลวที่ได้จากการหมักปลาหรือส่วนของปลากับเกลือ หรือกากปลาที่เหลือจากการหมักกับน้ำเกลือตามกรรมวิธีการทำน้ำปลา " และได้กำหนดคุณลักษณะทางกายภาพและเคมีไว้ดังนี้

1. ความหนาแน่นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิ 27/27 °C. ไม่น้อยกว่า 1.2
2. ความเป็นกรดด่าง(pH) 5.0 -6.0
3. โซเดียมคลอไรด์ไม่น้อยกว่า 230 กรัม/ลิตร
4. ไนโตรเจนทั้งหมดไม่น้อยกว่า 20 กรัม/ลิตร
5. อัตราส่วนของกรดกลูตามิคต่อไนโตรเจนทั้งหมด 0.4 - 0.6
6. ไนโตรเจนจากกรดอะมิโน(Amino acid nitrogen)ไม่น้อยกว่า 10 กรัม/ลิตร

ประโยชน์ทางด้านโภชนาการ

1. มีโปรตีนในรูปกรดอะมิโน (Amino acid) อยู่มากมายหลายชนิด โดยเฉพาะมีกรดอะมิโนที่จำเป็น (Essential amino acid) ครบถ้วนทั้ง 10 ชนิดคือ ทริปโตเฟน ธรีโอนีน ลูซีน ไอโซลูซีน ไลซีน เมไธโอนีน เฟนีลอะลานีน เวลีน อาร์จินีน และฮิสติดีน(1)
2. มีไขมันในรูปกรดไขมัน (Fatty acid) ทั้งชนิดที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้
3. มีวิตามินโดยเฉพาะบี 12 มีอยู่ปริมาณมากเมื่อเทียบกับอาหารชนิดอื่น นอกจากนี้ยังมีวิตามิน บี1 บี2 (5,6,7,8) บี6 ไนอาซีน กรดแพนโทธีนิค ไรโบฟลาวิน ไทอามีน (5)
4. แร่ธาตุ แร่ธาตุที่มีอยู่ในน้ำปลาและเป็นประโยชน์ต่อร่างกายได้แก่ โซเดียมคลอไรด์และเกลือของแคลเซี่ยมซึ่งมีอยู่อย่างเพียงพอ นอกจากนี้ยังมีเหล็ก ฟอสฟอรัส แมกนีเซี่ยม แมงกานีส

และไอโอดีน ดังนั้นอาจใช้น้ำปลาเป็นตัวกลางในการเสริมแร่ธาตุบางอย่างเช่น ธาตุเหล็ก ไอโอดีน เพื่อป้องกันการขาดแร่ธาตุเหล่านี้ในผู้ป่วยได้ (6)

ผลทางเศรษฐกิจ

มีผู้คำนวณผู้บริโภคน้ำปลาพบว่าจำนวนประชากรทั้งประเทศซึ่งมีประมาณ 50 ล้านคน พบว่าจะมีการบริโภคน้ำปลาประมาณ 1,340,000 ขวดต่อวัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 2.68 - 6.70 ล้านบาท ถ้าคิดราคาขวดละ 2 - 5 บาท (หรือประมาณ 710 - 2,445 ล้านบาทต่อปี)(7) อีกทั้งมีการส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศเป็นจำนวนมาก(ตารางที่ 1) ดังนั้นจึงจัดว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำรายได้ให้กับประเทศชาติค่อนข้างมาก (8)

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณและมูลค่าน้ำปลาไทยส่งออกต่างประเทศ (8)

ปี (พ.ศ.)	ปริมาณ (กิโลกรัม)	มูลค่า (บาท)
2527	8,754,286	132,134,761.00
2528	9,109,122	145,712,916.00
2529	10,710,650	169,545,228.00
มี.ค.2530	2,057,133	34,873,024.00

วิธีทำน้ำปลา

1. **วัตถุดิบที่ใช้** ได้แก่ ปลา และ เกลือ

1.1. ปลา ใช้ได้ทั้งปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็มทุกชนิด แต่ควรเป็นปลาที่มีราคาถูกหาง่าย มีปริมาณมากและทำให้ได้น้ำปลามากในเวลาอันรวดเร็ว มักเลือกปลาทะเลที่มีขนาดเล็กมากกว่าปลาที่มีขนาดใหญ่ได้แก่ ปลาไส้ตัน (*Stolephorus indicus*) ปลาหัวอ่อนหรือ ปลามะลิ (*S. comersonii*) ปลากะตัก(*S. tri* Bleeker) นอกจากนี้ยังอาจใช้ปลาชนิดอื่น เช่น ปลาหลังเขียว(*Sardinella perforata*) ปลาอกกะแล(*Sardinella gibbosa*) ปลาทู (*Rastrelliger kanagerta*) ปลาทรายแดง ปลาทรายขาว ปลาช้างเหลือง ปลาแป้น ส่วนปลาน้ำจืดที่นิยมนำมาทำน้ำปลานั้นได้แก่ ปลาสร้อย (*Cirrhina spp.*) (3,9) สภาพของปลาที่ใช้ก็มีความสำคัญด้วยโดยปลาที่ใช้ต้องเป็นปลาสด ถ้าเป็นปลาเน่าหรือปลาเกือบเน่าจะทำให้คุณภาพของน้ำปลาไม่ดี อีกทั้งควรเลือกปลาที่มีไขมันมากเพราะเชื่อว่าจะทำให้ได้น้ำปลาที่มีคุณภาพดี กลิ่นหอม แต่ในทางตรงกันข้ามธวัชชัย (1) แนะนำว่าควรใช้ปลาที่มีมันน้อยเพราะถ้ามีไขมันมากเกินไปอาจทำให้น้ำปลาเหม็นหืนได้ ในบรรดาปลาทั้งหมดที่ใช้ทำน้ำปลานี้ปลาไส้ตันหรือปลากะตักจะให้น้ำปลาที่มีคุณภาพดีที่สุด ให้รสดี กลิ่นดี สีสวยคือให้สีเหลืองปนแดง จากการทดลองของสำรอง (11)ในการทำน้ำปลาโดยใช้เอนไซม์โปรเนส-พี ช่วยการย่อยสลายโปรตีนและเปรียบเทียบวัตถุดิบที่ใช้ระหว่างปลาทู ปลาหลังเขียวและปลาไส้ตัน พบว่าน้ำปลาที่ได้จากปลาไส้ตันให้ปริมาณไนโตรเจนจากกรดอะมิโนสูงที่สุด ให้สีสวยและรสดีที่สุด แม้ว่าราคาของปลาไส้ตันจะค่อนข้างสูงกว่าปลาชนิดอื่นแต่ก็นิยมนำมาใช้ทำน้ำปลามากที่สุดดังจะเห็นได้จากการสำรวจของกรมประมงปี 2527 พบว่าโรงงานทำน้ำปลาทั้ง 113 โรงใน 15 จังหวัดชายทะเลของประเทศไทยซึ่งใช้ปลาในการทำน้ำปลารวม 24,226.88 ตัน จะเป็นปลากะตักหรือปลาไส้ตันถึง 76.08 เปอร์เซ็นต์รองลงมาคือปลาหลังเขียว 16.12 เปอร์เซ็นต์ ปลาทู 3.69 เปอร์เซ็นต์ และปลาเบญจพรรณอื่น ๆ 4.11 เปอร์เซ็นต์ (27)

ปลามีส่วนประกอบทางชีวเคมีที่สำคัญคือ โปรตีน ไขมัน น้ำ วิตามิน แร่ธาตุ โดยมีน้ำเป็นส่วนประกอบสูงสุด ดังในตารางที่ 2

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบทางชีวเคมีของปลาบางชนิดที่ใช้ทำน้ำปลา (ในส่วนที่รับประทานได้ 100 กรัม) (28)

ชนิดของปลา(กรัม)	ปลาไส้ตัน	ปลาทูสด	ปลาแป้น
น้ำ	80.5	72.0	74.4
ไขมัน	0.3	6.7	4.3
คาร์โบไฮเดรท	0	0	-
โปรตีน	18.0	20.0	20.2
กาก	0.1	-	0.1
แคลเซี่ยม	218	170	4
ฟอสฟอรัส	0.211	0.060	0.004
เหล็ก	0.0017	0.0119	0.002
วิตามิน เอ (หน่วย)	137	138	119
วิตามิน บี1	0.00002	0.00003	0.00012
วิตามิน บี2	0.00004	0.00062	0.00005
ไนอาซีน	0.0006	0.0092	0.003

ตารางที่ 3 แสดงถึงกรดอะมิโนที่พบในปลาบางชนิด(กรัม/100 กรัม)(27)

ชนิดของกรด อะมิโน	ชนิดของปลา				
	Lemon Sole	Carp Myogen	Cod	Haddock	Herring
อะลานีน	6.94	2.43	7.19	6.99	7.35
อาร์จินีน	6.76	6.38	6.74	6.99	7.33
กรดแอสปาร์ติค	11.80	12.34	10.64	11.61	10.95
กรดกลูตามิค	16.65	12.82	16.57	17.40	16.95
ไกลซีน	5.00	8.14	5.08	5.20	5.06
ฮิสติดีน	3.62	4.07	3.47	3.67	3.69
ไอโซลูซีน	5.47	6.92	4.88	4.68	5.09
ลูซีน	8.70	9.82	9.31	9.31	9.59
เมไธโอนีน	3.42	3.21	2.07	3.22	2.02
เฟนิลอะลานีน	4.85	5.58	4.67	4.67	4.73
โปรลีน	4.73	4.36	4.20	4.27	4.40
ธรีโอนีน	5.70	5.61	5.26	5.79	4.10
เวลีน	5.85	6.70	5.79	5.68	6.00
เซรีน	6.05	-	5.38	6.11	5.63
ไลซีน	10.73	-	10.32	11.02	10.29
ซิสเตอีน	1.44	-	1.42	1.38	1.42
ทริปโตเฟน	1.56	-	1.32	1.43	1.41

โปรตีนของเนื้อปลา ในกล้ามเนื้อปลามีโปรตีนเฉลี่ย 12 - 26 เปอร์เซ็นต์ มีกรดอะมิโนอิสระ (Free amino acid) และมีปริมาณที่แตกต่างกันในปลาแต่ละชนิด (ตารางที่ 3) กรดอะมิโนจะมี สูงกว่ากล้ามเนื้อของสัตว์ชนิดอื่นคือมีอยู่ประมาณ 1 - 5 เปอร์เซ็นต์ของกรดอะมิโนทั้งหมด (29) ดังนั้น เนื้อปลาจึงมีกรดอะมิโนเพียงพอที่จะใช้ในการดำรงชีวิตและเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ นอกจากนี้เนื้อปลายังมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันน้อยและมีน้ำมากซึ่งจะช่วยทำให้การเน่าเสียโดยแบคทีเรียเกิดได้อย่างรวดเร็ว กรดอะมิโนอิสระเหล่านี้จะมีผลต่อกลิ่นและรสของปลา นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณมากน้อยของกรดอะมิโนอิสระในปลาชนิดต่างๆ ทำให้ปลามีรสชาดแตกต่างกันออกไป เช่นกรดฮิสติดีนที่พบมากในปลาบางชนิดที่มีไขมันมากจะทำให้ปลาชนิดนั้นมีรสชาดเฉพาะตัว ส่วนกรดแอสปาร์ติคและกรดกลูตามิค จะช่วยให้ปลามีรสหวานได้ แม้จะมีปริมาณน้อยมากก็ตาม

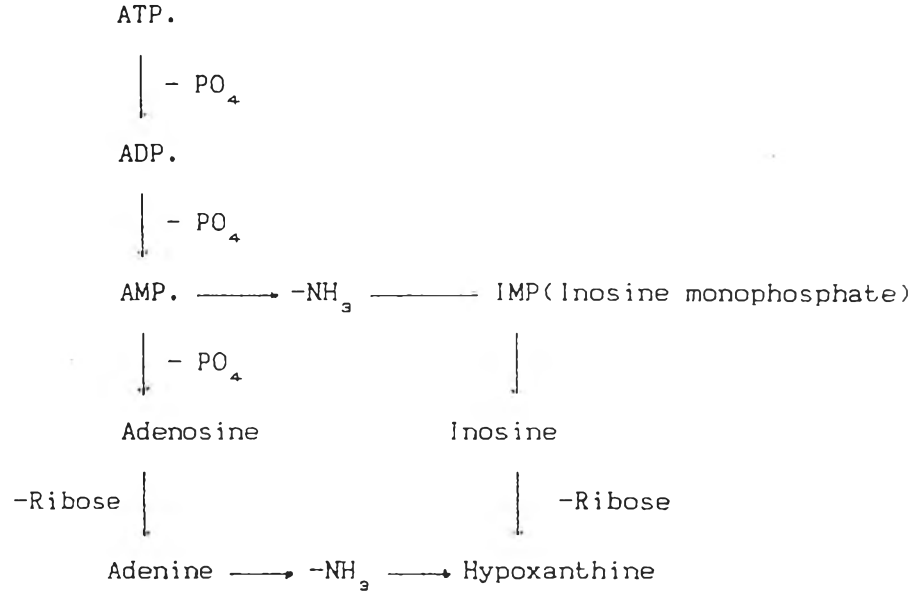
ปริมาณไขมันในปลาแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป ไขมันในตัวปลาจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ย่อยไขมัน(Lipase)ให้เป็นกรดไขมัน เนื่องจากว่าในปลามีกรดไขมันชนิดที่ไม่อิ่มตัวสูงถึง 40 เปอร์เซ็นต์ฉะนั้นไขมันปลาจึงถูกเติมออกซิเจน (Oxidation) ได้ง่าย ทำให้มีกลิ่นเหม็นหืน ผลที่ได้จากการเติมออกซิเจนจะทำให้เกิดสารหลายอย่างเช่น ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ไฮโดรคาร์บอนทั้งชนิดที่ระเหยได้และชนิดที่ระเหยไม่ได้ แอลกอฮอล์ คีโตน ไฮดรอกซีแอซิด เป็นต้น สารเหล่านี้ทำให้มีกลิ่นและรสต่างกันออกไป

แร่ธาตุสำคัญที่พบในปลาได้แก่ ฟอสฟอรัส แคลเซี่ยม และเหล็ก สำหรับวิตามินที่พบได้แก่ วิตามิน เอ บี 1 บี 2 และไนอาซิน

การเน่าเสียของปลาสดเกิดขึ้นจากกระบวนการ 3 อย่าง ด้วยกัน คือ กระบวนการเน่าเสียโดยน้ำย่อย กระบวนการเน่าเสียโดยแบคทีเรีย และกระบวนการเน่าเสียโดยการเติมออกซิเจน การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการกระทำของน้ำย่อยที่มีอยู่ในตัวปลาเองมี 2 ระยะ คือ ระยะ Pre rigor mortis ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของปลาเองส่วนใหญ่เกิดจากปฏิกริยาไกลโคไลซิส(Glycolysis) โดยการสลายไกลโคเจนด้วยเอนไซม์หลายชนิด ในขณะที่ปลายังมีชีวิตอยู่ ผลลัพธ์ของกระบวนการนี้จะเป็นคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ เมื่อปลาตายลงจะขาดออกซิเจนที่จะไปใช้

ในกระบวนการนี้ดังนั้นผลที่ได้จากไกลโคไลซิสตัวสุดท้ายจึงเป็นกรดแลคติคแทน เมื่อไกลโคเจนหมดไปตัวปลาจะแข็งขึ้น pH ในตัวปลาจะลดลงอยู่ในช่วง 6.2 ถึง 6.6 หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะที่ 2 คือระยะ Rigor mortis ระยะนี้จะเกิดการสลายของ ATP. ที่ยังคงเหลืออยู่ตอนที่สัตว์ตายลง โดยเปลี่ยนไปเป็นไฮโปแซนธีน ดังรูปที่ 1 (29)

รูปที่ 1 ไดอะแกรมแสดงการสลายตัวของ ATP. เป็นขั้นตอน



ATP. degradation

ทำให้ได้แอมโมเนียและน้ำตาลไรโบส แอมโมเนียจะทำให้สภาวะในเนื้อปลาเป็นกลางหรือด่างซึ่งพอเหมาะกับการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้ปลาเน่าเสีย น้ำตาลไรโบสและกรดอะมิโนอิสระที่มีอยู่ในเนื้อปลาจะเป็นอาหารเริ่มต้นสำหรับแบคทีเรียเหล่านี้ที่จะใช้เจริญเติบโตระยะแรก ๆ นอกจากนี้เอนไซม์ที่อยู่ในทางเดินอาหารของปลาจะย่อยชากของปลานั้น กระบวนการย่อยตัวเองนี้เป็นการเตรียมสภาพของชากให้แบคทีเรียเข้าไปทำลายได้ง่ายเข้า การเน่าเสียระยะสุดท้ายเรียกว่า Post rigor mortis ซึ่งแบ่งการเน่าเสียระยะนี้ออกเป็น 2 ระยะย่อย ๆ คือ ระยะของการเปลี่ยนโปรตีนไปเป็นเปปไทด์และกรดอะมิโนกับระยะของการเกิดสารอื่น ๆ เช่น เอมีน อินโดล ไฮโดรเจนซัลไฟด์ และ Skatol การเน่าเสียระยะนี้เกิดมาจากการกระทำของแบคทีเรียทั้งสิ้น แบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียส่วนใหญ่ปนเปื้อนจากแหล่งที่ปลาอาศัยอยู่ จากเรือจับปลา ชาว

ประมง ภาชนะบรรจุ ที่เก็บ เครื่องมือเครื่องใช้ กรรมวิธีการล้างทำความสะอาด น้ำแข็งที่แช่และการขนถ่าย จากการทดลองเรื่องจำนวนแบคทีเรียของปลาทูสดระหว่างการขนถ่าย (19) พบว่าระหว่างที่ปลาขนจากเรือไปถึงโรงงานห้องเย็นที่สะพานปลานั้นจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นถึงกว่าสิบเท่าตัว คือจาก 23 x 10^3 เป็น 23.9 x 10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร และพบว่าน้ำแข็งแช่ปลามีจำนวนแบคทีเรียถึง 2.46 ล้านเซลล์/มิลลิลิตร

จำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่บนตัวปลานั้นจะแตกต่างกันไปตามฤดูกาล สถานที่ อุณหภูมิของน้ำชนิดของปลาและวิธีจับปลาด้วย จุลินทรีย์เหล่านี้จะติดมากับปลาทางผิวหนัง เหงือก และลำไส้(31) พบว่าปลาที่จับขึ้นจากทะเลใหม่ๆ จะมีจำนวนแบคทีเรียบริเวณผิวหนังปลา 10^2 - 10^7 เซลล์/ตารางเซนติเมตร ของเหลวในลำไส้ 10^3 - 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร บริเวณเหงือกมี 10^3 - 10^6 เซลล์/กรัม แบคทีเรียที่พบเสมอบริเวณเมือกบนตัวปลาได้แก่ *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Micrococcus sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Sarcina sp.*, *Serratia sp.*, *Vibrio sp.*, *Bacillus sp.*, *Achromobacter sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Streptococcus sp.*, *Lactobacillus sp.* แบคทีเรียที่พบบริเวณลำไส้ของปลาได้แก่ *Alcaligenes sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Achromobacter sp.*, *Vibrio sp.*, *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, *Escherichia sp.* สำหรับปลาทะเลแบคทีเรียที่พบมีจำนวนสูงมากได้แก่ *Micrococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Achromobacter sp.*(32) แบคทีเรียที่เข้าไปในตัวปลาเหล่านี้จะอาศัยอาหารที่อยู่ในกล้ามเนื้อปลาเช่น กรดอะมิโนอิสระ วิตามิน แล้วสร้างสารที่ทำให้เกิดกลิ่นและรสต่าง ๆ

1.2. <u>เกลือ</u> นอกจากปลาแล้ววัตถุดิบที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือเกลือ เกลือที่ใช้บริโภคหมายถึงผลึกของโซเดียมคลอไรด์ที่สะอาด เมื่อละลายในน้ำจะให้สารที่มีรสเค็ม สารละลายของเกลือมีลักษณะเป็นกลาง เกลือที่บริสุทธิ์จะดูดน้ำออกจากอากาศได้ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของความชื้นในอากาศที่อุณหภูมิห้อง น้ำเกลือเข้มข้นจะมีคุณสมบัติเป็นน้ำยา Antiseptic เพราะสามารถดูดน้ำที่เชื้อจุลินทรีย์ต้องการออกจากของหรืออาหารที่อยู่ข้างเคียง เกลือที่ใช้ทำน้ำปลามีอยู่ 2 ชนิด

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของเกลือที่ผลิตในประเทศไทย (33)

ความชื้นประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ การละลายในน้ำ ที่ 15 °C. 35.3 กรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 30 °C. 46.6 กรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 40 °C. 52.2 กรัม/100 มิลลิลิตร มี

$MgSO_4$	0.4	เปอร์เซ็นต์
$CaSO_4$	0.5	"
$MgCl_2$	1.0	"

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของเกลือที่ผลิตในประเทศแคนาดา (33)

NaCl	97	เปอร์เซ็นต์
$CaSO_4$	1.08	"
$MgCl_2$	0.30	"
$CaCl_2$	0.24	"
$MgSO_4$	0.17	"
สารอื่นๆที่ไม่ละลายน้ำ	0.40	"
ความชื้น	2.40	"

ตารางที่ 6 องค์ประกอบทางเคมีของเกลือสินเธาว์ที่ผลิตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (34)

ตัวอย่างเกลือ	ความชื้น %	สารไม่ละลาย%	Cl^- %	Ca^{++} %	Mg^{++} %	$SO_4^=$ %	NaCl %	หมายเหตุ
1. เกลือจาก อ.พิมาย	0.67	0.96	57.67	0.02	0.00	0.58	95.03	จากนาเกลือ
2. เกลือจาก อ.บรบือ	2.18	0.84	56.56	0.25	0.00	0.49	93.05	"
3. เกลือจาก อ.วาปีปทุม	0.82	0.59	57.71	0.37	0.03	0.93	95.01	"
4. เกลือบ้านเหลื่อม จ.อุดรฯ	3.26	0.08	56.87	0.65	0.11	0.77	92.23	จากเกลือต้ม

คือเกลือสมุทรหรือเกลือทะเลกับเกลือสินเธาว์ซึ่งมีสูตรทางเคมีเหมือนกันคือ NaCl อาจมีมลพิษของสารประกอบอื่นเจือปนอยู่ด้วยในปริมาณที่มากน้อยต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งและวิธีการผลิต(ดังตารางที่ 4,5,6)

ในการทำน้ำปลาส่วนใหญ่จะเลือกใช้เกลือทะเลเพราะมีจำนวนมาก หาได้ง่ายมีความชื้นพอดี และมีสารประกอบจำพวกเกลือแร่ต่างๆมีคุณค่าทางอาหารมาก ส่วนเกลือสินเธาว์ถึงแม้จะมีความเค็มมากกว่าแต่ความชื้นน้อยกว่าและมักทำให้เกิดปัญหาทางชีวเคมีในการหมักปลาอีกด้วย (1)

สิ่งเจือปนที่ติดมากับเกลือ มีผลต่อการย่อยสลายของเนื้อปลาด้วย (35) จากการศึกษาในกะปิและน้ำปลาฟิลิปปินส์พบว่าถ้าใช้เกลือที่บริสุทธิ์ โปรตีนจะถูกย่อยสลายได้เร็วกว่าเพราะสิ่งเจือปนที่พบในเกลือเช่น แคลเซี่ยมและแมกนีเซี่ยมจะมีผลต่อกระบวนการหมัก คือ ทำให้น้ำเกลือภายนอกเข้าไปในเนื้อปลาได้ช้าลงซึ่งทำให้การย่อยสลายภายในตัวปลาดำเนินไปได้ช้านานยิ่งขึ้นทำให้น้ำปลาเสียคุณภาพ เช่น การเกิดแอมโมเนียโดยแบคทีเรียหรือเอนไซม์ภายในตัวปลาเองทั้งที่มีเกลืออยู่ในปริมาณที่มากแล้วก็ตามและทำให้เนื้อปลาแข็งกระด้าง นอกจากนี้ยังทำให้เกิดกลิ่นและรสต่าง ๆ ที่ไม่พึงประสงค์จากการเติมออกซิเจนในไขมันเนื่องจากมีโลหะหนักปนอยู่จึงทำให้เกิดกลิ่นและรสเสียไป จากการทดลองทำปลาเค็มโดยใช้เกลือที่ไม่บริสุทธิ์ พบว่าถ้าใช้เกลือที่มี $MgCl_2$ ปนอยู่ 4.7 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้การซึมของเกลือเข้าไปในเนื้อปลาช้าลงไป 2 วันเต็ม ๆ ถ้ามีเกลือของแคลเซี่ยมและแมกนีเซี่ยมปนกันอยู่ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ปลาใส่เกลือจะมีลักษณะแข็งกระด้างมีสีขาวกลิ่นไม่ชวนรับประทาน (29)

เกลือมีความสำคัญอย่างยิ่งในการถนอมและแปรรูปผลิตภัณฑ์พวกโปรตีนจากสัตว์ เช่นการทำปลาเค็ม ปลาแห้ง กะปิ น้ำปลา ปลาร้า ปลาเจ่า ฯลฯ ต้องใช้เกลือทั้งสิ้นเพราะเกลือมีคุณสมบัติป้องกันการเน่าเสียของสัตว์น้ำในระยะเริ่มต้นของการหมัก (36) น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นสูงจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้ปลาเน่าเสียได้ เนื่องจากเกลือจะไปดึงเอาน้ำ (Available water)ที่แบคทีเรียต้องการใช้ไปทำให้เกิดแรงดันออสโมซิส(Osmotic pressure) ยังผลให้เซลล์แบคทีเรียเกิดการพลาสโมไลซิส(Plasmolysis)ซึ่งอาจทำให้เซลล์ตายหรือชงักการเจริญเติบโต แบคทีเรียบางชนิดที่ไวต่อ Na^+ และ Cl^- จะตายได้ น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นสูงมีผล

ไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่จะมาย่อยโปรตีนโดยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของเอนไซม์ อาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพไปอย่างสมบูรณ์หรือบางส่วนทำให้เอนไซม์ทำงานได้ช้าลง ตัวอย่างเช่น เอนไซม์แคเธปซิน จะทำงานได้ช้าลงไปมากถ้าอยู่ในน้ำเกลือสูงกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ (37) การทำงานของเอนไซม์จากกระเพาะปลาและแบคทีเรียจะลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ในที่มีความเข้มข้นของเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ (38) น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นสูงยังลดการละลายของออกซิเจนทำให้เกิดสภาพค่อนข้างเป็น anaerobe จึงเป็นการจำกัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียพวกที่ต้องการออกซิเจนมากๆ น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นไม่ต่ำกว่า 16 เปอร์เซ็นต์จะช่วยป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์พวกที่เป็นอันตรายและก่อให้เกิดการเน่าเสียเจริญได้ในถังหมัก (39,40)

ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเกลือเป็นปัจจัยตัวหนึ่งที่มีผลต่อการกำหนดชนิดของจุลินทรีย์ที่เจริญในถังหมักน้ำปลา จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในถังหมักนั้นมีทั้งพวกที่ทนเค็มได้และทนเค็มไม่ได้ พวกที่ทำให้เกิดการเน่าเสียหรือพวกที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นเน่ามักเป็นพวกที่ทนเค็มไม่ได้พวกนี้จะตายไปหรือหยุดเจริญเนื่องจากทนความเข้มข้นของเกลือในถังหมักน้ำปลาซึ่งสูงไม่น้อยกว่า 23 เปอร์เซ็นต์ไม่ได้ ส่วนจุลินทรีย์พวกที่ทนเค็มได้มักมีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์โดยเฉพาะกรดแลคติคช่วยให้อาหารหมักไม่เกิดการเน่าเสีย

ได้มีผู้ศึกษาถึงชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเกลือ และรายงานไว้ดังนี้

Suntinanalert (41) ศึกษาชนิดของแบคทีเรียจากเกลือทะเลและเกลือสินเธาว์ในประเทศไทยซึ่งพบว่าในเกลือทะเลมักมี Halobacterium, Halococcus, Bacillus และกลุ่ม Coryneform แต่ที่พบจำนวนมากที่สุดได้แก่ Halococcus และ Halobacterium บางตัวอย่างของเกลือที่นำมาทดสอบอาจพบ Micrococcus ,Staphylococcus ส่วนเกลือสินเธาว์พบ Micrococcus, Bacillus และกลุ่ม Coryneform

มัทนา (42) แยกเชื้อจากเกลือป่น 19 ชนิด จำนวน 120 ถุง และเกลือเม็ด 10 ชนิด จำนวน 30 ถุง จากตลาดต่างๆในกรุงเทพมหานครโดยใช้ Plate count agar เติมเกลือ 2, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับบ่มเชื้อนาน 7 - 14 วัน ที่อุณหภูมิ 28 - 32 °C พบว่ามีแบคทีเรียเจริญในอาหารที่เติมเกลือ 2, 5, 10, 15 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ส่วนใหญ่

เป็นพวกที่ทนเค็มไม่ได้และพวกที่ทนเค็มได้เล็กน้อย จำนวนที่พบสูงสุดคือ ระหว่าง 1.2×10^{1} - 3.0×10^{3} เซลล์/กรัม ไม่พบพวก Moderate halophilic bacteria แบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่คือสกุล Bacillus พบบ้างเล็กน้อยในพวก Staphylococcus, Arthrobacter และ Corynebacterium

2. ขั้นตอนในการทำน้ำปลาและระยะเวลาในการหมัก

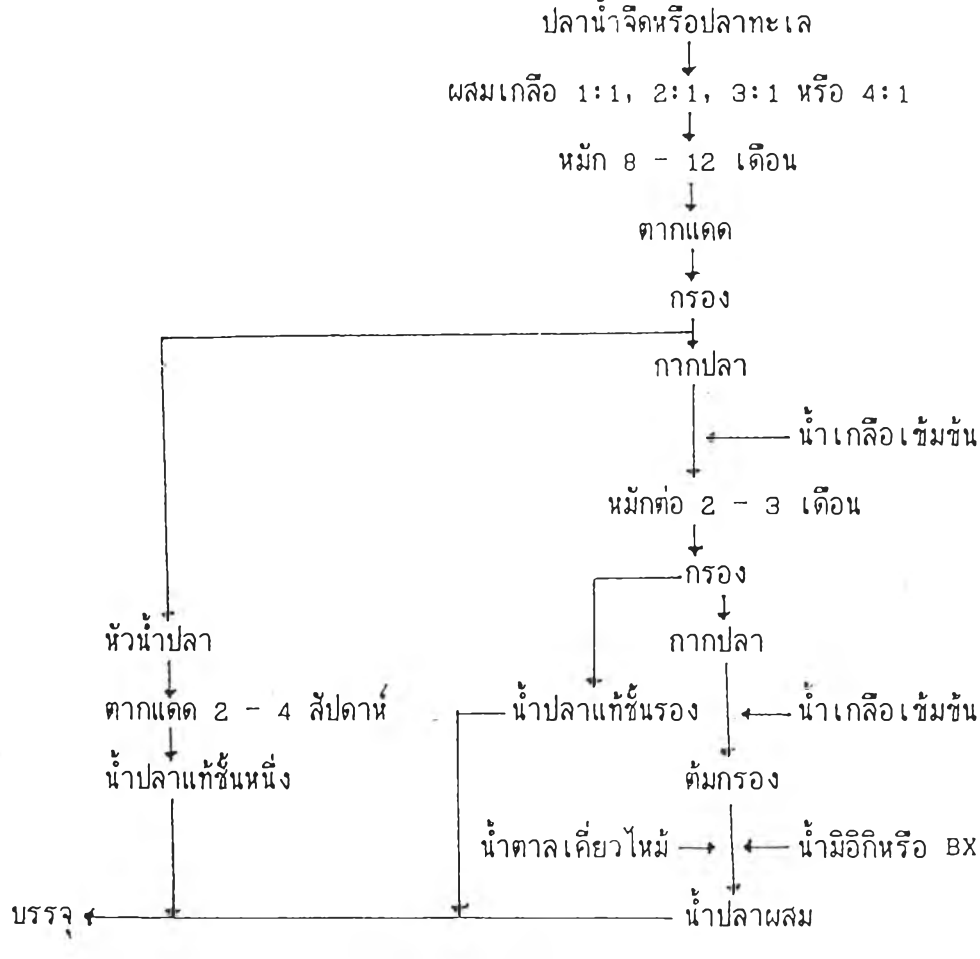
นำปลาสดมาล้างให้สะอาดเพื่อล้างน้ำคาวปลา เลือด หรือโคลนให้หลุดออกไป และเพื่อให้ปลาเปียก ถ้าปลายังมีคาวหรือไม่เปียกปลาจะมีอาการที่เรียกว่าไม่กินเกลือ หรือเกลือจะแทรกเข้าไปในตัวปลาได้น้อยหรือเข้าไปไม่ได้เลยเนื่องจากผิวปลาแห้ง หลังจากนั้นนำมาคลุกเคล้ากับเกลือเม็ดในอัตราส่วน ปลาต่อเกลือเท่ากับ 1 : 1, 3 : 1 หรือ 4 : 1 แต่ที่นิยมทำน้ำปลาในทางอุตสาหกรรมคืออัตราส่วน 2 : 1 หรือ 3 : 1 ถ้าใช้ปริมาณเกลือน้อยไปจะทำให้ปลาเน่าหรือได้น้ำปลาที่มีกลิ่นไม่ดี แต่ถ้าใช้ปริมาณเกลือมากไปปลาจะแข็งตัวไม่เละ คลุกเคล้าให้ปลาและเกลือเข้ากันเป็นอย่างดีโดยต้องผสมให้ปลาถูกกับเกลืออย่างสม่ำเสมอมิฉะนั้นอาจทำให้ปลาเน่าได้ นำปลาที่คลุกเคล้ากับเกลือแล้วไปใส่ในภาชนะหมักซึ่งอาจจะเป็น ไห โอ่ง หรือบ่อซีเมนต์ ในโรงงานอุตสาหกรรมมักก่อเป็นถังคอนกรีตฝังลึกในดิน ภาชนะเหล่านี้จะมีเกลือรองอยู่ชั้นหนึ่งก่อน เมื่อบรรจุปลาลงไปแล้วโรยเกลือทับชั้นบน ปิดด้วยเสื่อลำแพนหรือพลาสติก ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ เมื่อมีน้ำออกมาแล้วทับหรือชัดด้วยไม้ไผ่เพื่อป้องกันไม่ให้ปลาลอยขึ้นมา ระยะเวลาหมักตั้งแต่ 2 - 18 เดือน แต่ปกติมักใช้ช่วงเวลาการหมักระหว่าง 8 - 12 เดือน(9,10)

น้ำปลาที่ได้ในครั้งแรกนี้เป็นหัวน้ำปลาหรือน้ำปลาชั้นหนึ่ง ไม่นิยมนำออกจำหน่ายมักเก็บไว้ผสมเป็นน้ำปลาแท้ชั้นสอง เพื่อขายเป็นน้ำปลาดี กากที่เหลือจากการทำน้ำปลาแท้ชั้นหนึ่งผู้ผลิตจะนำไปหมักต่อเพื่อใช้ทำน้ำปลาชั้นรองโดยหมักน้ำเกลือเข้มข้นอีก 2 - 3 ครั้ง แต่ละครั้งใช้เวลาประมาณ 2 - 3 เดือนจะได้น้ำปลาคุณภาพลดหลั่นกันตามลำดับ กากปลาที่เหลือชั้นสุดท้ายนำไปต้มกับน้ำเกลือแล้วกรองเพื่อทำน้ำปลาอีกครั้งหนึ่ง โดยนำไปผสม ปรุงแต่งสี กลิ่น รส เรียกน้ำปลาผสม

การเปลี่ยนแปลงในกระบวนการหมักน้ำปลา

1. **การเปลี่ยนแปลงทางเคมี** ทันทีที่ปลาถูกกับเกลือ เกลือจะซึมเข้าไปในเนื้อปลาอย่างรวดเร็ว ขณะเดียวกันน้ำและสารภายในตัวปลาที่ละลายได้ เช่นโปรตีน เปบไทด์ กรดอะมิโน เกลือแร่และวิตามินต่างๆซึ่งมีอยู่เดิมภายในตัวปลาแล้ว จะซึมออกมาภายนอกตัวปลาอย่างรวดเร็วเช่นกัน เนื่องจากความดันออสโมซิสของน้ำเกลือภายนอกสูงกว่าภายในเซลล์เนื้อปลา(43) ในขณะที่เกลือยังแทรกซึมเข้าไปไม่ถึงภายในตัวปลา เอนไซม์ภายในตัวปลาเองจะทำการย่อยโปรตีนโดยกระบวนการย่อยตัวเอง(Autolysis) ซึ่งเกิดขึ้นก่อนแล้วทันทีที่ปลาตายลง กระบวนการย่อยตัวเองนี้อาศัยเอนไซม์จากทางเดินอาหารมากที่สุดซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เปบซิน ทริปซิน จะเริ่มย่อยผนังท้องแล้วแพร่กระจายไปยังกล้ามเนื้อส่วนต่างๆ(29) ส่วนในกล้ามเนื้อปลามีเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่

แผนภูมแสดงกรรมวิธีในการผลิตน้ำปลาพื้นบ้าน



014409

แคเธปซิน เปบติเดส ทรานสะมิเนส ดีคาร์บอกไซเลส ดีไฮโดรจิเนส ออกซิเดส (44) เอนไซม์ในกล้ามเนื้อปลาเหล่านี้จะไปมีผลในการสลายกรดอะมิโนมากกว่า กระบวนการ Autolysis นี้มีความสำคัญมากในระยะแรกของกระบวนการหมักน้ำปลา แบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับปลาและเกลือที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้จะช่วยในการย่อยสลายโปรตีนด้วยเช่นกัน มีผลทำให้ได้โปรตีนที่มีโมเลกุลเล็กลง เช่น เปบไทด์ กรดอะมิโน ซึ่งละลายได้ในน้ำเกลือ ดังนี้

$$\text{โปรตีน} \xrightarrow{\text{โปรติเอส}} \text{เปบไทด์} \xrightarrow{\text{เปบติเดส}} \text{กรดอะมิโน}$$

ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรกของการหมัก ส่วนกรดอะมิโนจำนวนหนึ่งจะถูกย่อยสลายต่อไปอีกเป็น เอมีน คีโตแอซิด แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์

ไขมันจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ไลเปสจากภายในตัวปลาเองและจากแบคทีเรียบางชนิดที่ปนเปื้อนมา ทำให้ได้กรดไขมันทั้งชนิดระเหยได้และระเหยไม่ได้รวมทั้งสารพวกคีโตนและอัลดีไฮด์

กลิ่นของน้ำปลาเชื่อว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรีย (35) มีรายงานว่า *Pediococcus halophilus* เป็นตัวทำให้เกิดกลิ่นรสของน้ำปลา กรดแลคติคที่พบในน้ำปลาก็เกิดจากแบคทีเรียนี้และได้ศึกษาพบว่ามีแบคทีเรียที่พบในน้ำปลาที่ทำให้เกิดกลิ่นได้มี 3 พวกคือ

1. พวกที่สร้างกลิ่นหอมคล้ายกุหลาบเป็นแบคทีเรียรูปแท่ง แกรมบวก Obligate anaerobe ต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อผสมเกลือไม่น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์
2. พวกที่สร้างกลิ่นเหมือนกลิ่นเนื้อเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เคลื่อนที่ไม่ได้รูปแท่งสั้นและมน
3. พวกที่ให้กลิ่นที่เป็นกรดใกล้เคียงกับกลิ่นของน้ำปลา เป็นแบคทีเรียรูปกลมอยู่กันเป็นกลุ่มและได้วิเคราะห์คุณภาพของกลิ่นน้ำปลาพบว่าประกอบด้วยกรดอินทรีย์ระเหยได้ 5 ชนิดคือกรดฟอร์มิค กรดอะซีติค กรดโพรพิโอนิค กรดไอโซบิวทีริค และกรดอีกตัวหนึ่งซึ่งจำแนกไม่ได้ และพบกรดอินทรีย์ที่ระเหยไม่ได้อีก 1 ชนิด คือ กรดแลคติค

ส่วนรสของน้ำปลาเป็นรสของสารต่างๆที่ละลายอยู่ในน้ำปลาได้แก่รสเค็มของเกลือรสกรดและรสของกรดอะมิโนที่ละลายอยู่ในน้ำปลาซึ่งมีรสเฉพาะตัว กรดอะมิโนที่พบทุกระยะของการหมักคือ ไลซีน แอสปาร์ติค กลูตามิค ไกลซีน อิสติดีน ลูซีน ไอโซลูซีน และฟีนิลอะลานีน จำนวนสารประกอบอะมิโนจะลดน้อยลงเมื่อระยะการหมักนานขึ้น ระยะ 1 - 3 เดือนแรกของการหมักจะมีจำนวนของสารประกอบอะมิโนมากที่สุดคือ 20 - 22 ชนิด และเมื่อหมักครบ 1 ปี จะเหลือเพียง 13 ชนิด เนื่องจากระยะหลังของการหมักอัตราการเกิดของกรดอะมิโนจะน้อยกว่าอัตราการทำลาย การหายไปของกรดอะมิโนนั้นเนื่องจากกลายเป็นอาหารของแบคทีเรียหรือจากปฏิกริยาการเกิดสารสีน้ำตาล

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำปลา

ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนซึ่งอยู่ในรูปของกรดอะมิโน นอกจากนี้ยังมีเกลือ วิตามิน แร่ธาตุ และกรดอินทรีย์อื่นๆ ทั้งที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้ ซึ่งปริมาณกรดอะมิโนในน้ำปลาจะแตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 7

Thongthai and Okada (48) ศึกษากรดอะมิโนที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักน้ำปลา พบว่า ระยะ 0 - 3 สัปดาห์แรกกรดอะมิโนจะถูกปลดปล่อยออกมามาก ระยะ 3 - 20 สัปดาห์ กรดอะมิโนถูกปลดปล่อยออกมาเล็กน้อย และ 20 - 52 สัปดาห์ไม่มีกรดอะมิโนถูกปลดปล่อยออกมาอีกเลย กรดอะมิโนที่ถูกปลดปล่อยออกมาได้แก่ เมไธโอนีน ไอโซลูซีน เฟนิลอะลานีน ธรีโอนีน ลูซีน และเซรีน กรดอะมิโนที่ถูกปลดปล่อยออกมาได้มากได้แก่ กรดกลูตามิค กรดแอสปาร์ติค อะลานีน ไกลซีน โปรลีน เวลีน และไลซีน แต่จะไม่พบ อาร์จินีน และ ซิสเตอีน ในตัวอย่างน้ำปลา

เกลือที่พบในน้ำปลาส่วนใหญ่อยู่ในรูปของโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 26 - 29 เปอร์เซ็นต์ (49) ส่วนแร่ธาตุที่พบได้แก่ ฟอสฟอรัส 0.266 - 0.566 กรัม/ลิตร แคลเซี่ยม 0.439 - 0.541 กรัม/ลิตร แมกนีเซี่ยม 2.208 - 2.310 กรัม/ลิตร และสารอินทรีย์ของกำมะถัน 0.54 - 1.16 กรัม/ลิตร(50)แร่เหล็ก 10 - 22 มิลลิกรัม/ลิตร(33,51) ส่วนวิตามินมีหลายชนิดที่พบมากที่สุดคือ บี 12 ซึ่งมีอยู่ระหว่าง 3.22 - 0.20 ไมโครกรัม/100 กรัม(4) (52) ศึกษาสารประกอบที่ระเหยได้ในน้ำปลาฟิลิปปินส์พบว่ามีกรด 19 ชนิด แอลกอฮอล์ 14 ชนิด สารที่มีไนโตรเจนเป็น

ตารางที่ 7 แสดงชนิดและจำนวนของกรดอะมิโนที่พบในน้ำปลาไทยและน้ำปลาเวียตนาม

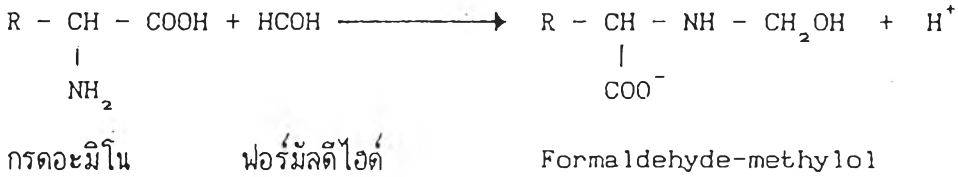
ชนิดของ	น้ำปลาไทยราคาแพง (กรัม/100 มิลลิลิตร)				น้ำปลาเวียตนาม
กรดอะมิโน	ก[1]	ข[1]	ค[1]	ง[2]	คุณภาพสูง[3]
ทริปโตเฟน	-	-	-	0.384	0.090
ธรีโอนีน	0.348	0.400	0.369	0.364	0.360
ไอโซลูซีน	0.320	0.036	0.283	0.336	0.720
ลูซีน	0.427	0.434	0.307	0.384	0.720
ไลซีน	1.033	1.170	1.070	1.120	0.720
เมไธโอนีน	0.206	0.141	0.107	0.265	0.144
ซิสเตอีน	-	-	-	-	0.045
เฟนิลอะลานีน	0.416	0.341	0.244	0.368	0.270
ไทโลซีน	0.119	0.114	0.074	0.078	0.144
เวลีน	0.376	0.591	0.508	0.517	0.540
อาร์จินีน	-	0.021	-	0.571	0.360
ฮิสติดีน	0.257	0.368	0.312	0.516	0.054
อะลานีน	0.496	0.636	0.638	0.649	0.760
กรดแอสปาร์ติค	0.377	0.653	0.575	0.638	0.450
กรดกลูตามิค	1.034	0.988	1.325	0.359	0.720
ไกลซีน	0.251	0.306	0.257	0.295	0.450
โปรลีน	-	0.244	0.214	0.218	0.090
เซรีน	0.160	0.277	0.246	0.295	0.144

ที่มา [1] (4) [2] (46) [3] (47)

องค์ประกอบ 12 ชนิด คาร์บอนิล 3 ชนิด เอสเทอร์ 5 ชนิด สารที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ 3 ชนิด ฟีนอล 1 ชนิด ไฮโดรคาร์บอน 7 ชนิด และอื่นๆ 2 ชนิด สำหรับกรดนั้นมีอยู่ 5 ชนิดที่มี ปริมาณมากถึง 98 เปอร์เซ็นต์ซึ่งในจำนวนนี้เป็นกรดเอ็น-บิวทาโนอิคมากถึงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์

และเนื่องจากโปรตีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงมักจะวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำปลาโดยวิเคราะห์ปริมาณของไนโตรเจน ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมของไทย(1) กำหนดให้น้ำปลาแท้ต้องมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen) ไม่ต่ำกว่า 20 กรัม/ลิตร ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน (Amino acid nitrogen) ไม่ต่ำกว่า 10 กรัม/ลิตร

ในการหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด(Total nitrogen)จะใช้วิธีการของ Kjeldahl ซึ่งถูกนำมาปรับปรุงในเรื่องของตัวเร่งปฏิกริยา(53) ส่วนปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนนั้นคือผลต่างระหว่างฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน(Formaldehyde nitrogen)และแอมโมเนียคัลไนโตรเจน (Ammoniacal nitrogen) So/rensen Formal Titration Method พบว่าพวกที่มีหมู่อะมิโน ($-NH_2$) เมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางจะทำปฏิกริยากับฟอร์มัลดีไฮด์ให้สารที่เป็นกรดขึ้น และเนื่องจากในน้ำปลาเองมีทั้งกรดอะมิโนและแอมโมเนียปนอยู่ด้วยกัน สารทั้ง 2 ชนิดนี้จะสามารถทำปฏิกริยากับฟอร์มัลดีไฮด์ในสภาพที่เป็นกลางให้สารที่เป็นกรด pH จึงต่ำลงซึ่งสามารถนำมาไตเตรทกับ Standard NaOH เพื่อจะได้ทราบถึงปริมาณหมู่อะมิโนที่ทำให้เกิดกรดนั้นขึ้นโดยไตเตรทกลับไปที่ pH ที่เป็นกลางตามเดิม ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นเป็นดังนี้



กรดอะมิโน ฟอร์มัลดีไฮด์ Formaldehyde-methylol derivative

การหาแอมโมเนียคัลไนโตรเจน(Ammoniacal nitrogen)เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณของแอมโมเนีย (NH_3) หรือเกลือแอมโมเนียม (NH_4^+) หรือเอมีน และพวกด่างระเหยได้อื่น ๆ วิเคราะห์ตาม A.O.A.C.(54) โดยกลั่นสารเหล่านี้ลงในกรดบอริคเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปไตเตรทกับ Standard H_2SO_4 เพื่อหาปริมาณสารพวกแอมโมเนียม ดังปฏิกริยา

$$NH_3 + H_3BO_3 \longrightarrow NH_4^+ + H_2BO_3^-$$

$$2NH_4^+ + H_2BO_3^- + H_2SO_4 \longrightarrow (NH_4)_2SO_4 + 2H_2BO_3$$

ตัวอย่างการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนโตรเจนในรูปต่างๆในน้ำปลาดังแสดงในตารางที่ 8

ตาราง 8 สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนของน้ำปลาเวียตนามในช่วงเวลาหมักต่างๆ (55)

วันที่เก็บตัวอย่าง	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด	ฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน	แอมโมเนียคัลไนโตรเจน	ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน
1	5.32	..	0.67	..
3	8.96	..	1.12	..
10	11.20	5.15	1.34	3.81
20	16.74	8.18	1.65	6.52
30	18.62	9.52	2.02	7.50
40	19.88	11.26	2.18	9.07
60	21.84	12.21	2.66	9.55
80	22.12	11.87	2.97	8.90
120	23.80	13.89	3.42	10.47
150	23.80	14.78	3.64	11.14
180	23.80	14.67	4.79	9.88

จุลินทรีย์ที่พบในน้ำปลา

ส่วนใหญ่ติดมากับปลาและเกลือที่ใช้เป็นวัตถุดิบ (9) จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักน้ำปลานั้นมีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบได้แก่ แบคทีเรียที่สร้างโปรติเอสเช่น *Clostridium sp.* และ *Bacillus sp.* และแบคทีเรียสร้างกรดแลคติครวมอยู่ด้วย ส่วนยีสต์และราพบน้อย

กฤษดา(19) ได้ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากน้ำปลาที่มีอายุการหมักต่างๆ กันจากโรงงานต่างๆในพื้นที่ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ HMA (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) เติมเกลือ 15,20,25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ในการแยกเชื้อ พบว่าในจำนวน 58 เชื้อที่คัดเลือกไว้ศึกษาจำแนกตามความต้องการเกลือแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ทนเกลือและชอบเกลือความเข้มข้นปานกลางมีจำนวน 43 เชื้อนั้น ได้แก่พวก *Staphylococcus sp.* 6 เชื้อ, *Staphylococcus saprophyticus* 2 เชื้อ, *Micrococcus varian* 6 เชื้อ,*Micrococcus luteus* 3 เชื้อ, *Bacillus circulans* 6 เชื้อ,*Bacillus brevis* 2 เชื้อ ,Coryneforms 9 เชื้อ และพวกรูปท่อนแกรมลบ 10 เชื้อ ส่วนกลุ่มที่ชอบความเข้มข้นของเกลือสูงมีจำนวน 15 เชื้อ ซึ่งได้แก่ *Halococcus morrhuae* 6 เชื้อ และ *Halobacterium salinarium* 9 เชื้อ และได้ทดลองนำ *Halobacterium salinarium* มาทดลองหมักน้ำปลาพบว่าให้กลิ่นหอมของน้ำปลามากภายใน 28 วัน เหมือนกับน้ำปลาหมักตามธรรมชาติ

สายสมร(56) คัดเลือกแบคทีเรียจากน้ำปลาอายุต่างๆและต่างถังหมักกันพบว่ามีแบคทีเรียอยู่ 7 สกุลคือ Micrococcus , Staphylococcus , Bacillus , Streptococcus, Sarcina, Lactobacillus และ Pseudomonas รวมทั้งกลุ่มแบคทีเรียอีก 1 กลุ่มคือ Coryneform พวก Micrococcus, Staphylococcus และ Bacillus พบบ่อยที่สุด ส่วน Streptococcus และ Coryneform พบในบางตัวอย่าง พวก Sarcina ,Lactobacillusและ Pseudomonas พบน้อยมาก และได้สรุปว่า 1) Micrococcus, Staphylococcus, Bacillus และอาจรวม Coryneform สามารถย่อยโปรตีนและกรดอะมิโนได้ดีจึงน่าจะเป็นพวกที่ทำให้เกิดการ

หอสมุดกลาง สถาบัน
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เปลี่ยนแปลงไปเป็น น้ำของปลา และแบคทีเรียพวกนี้ซึ่งเหลืออยู่ในระยะหลังของการหมักสามารถทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีของน้ำปลาได้ 2) Streptococcus และ Lactobacillus สามารถทำให้เกิดกรดอินทรีย์ต่างๆ 3) Pseudomonas และ Sarcina มีบทบาทเช่นเดียวกับแบคทีเรียในข้อ 1) แต่มีจำนวนน้อยจึงอาจไม่มีความสำคัญ

สิทธิพันธ์(57) ได้แยกแบคทีเรียจากน้ำปลาทั้งที่ทำจากปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็มที่มีอายุต่างๆ กัน พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ในสภาพที่ปราศจากออกซิเจนเมื่อนำมาเลี้ยงในสภาพที่มีออกซิเจน พบว่าเจริญได้ดีทุกตัวแสดงว่าแบคทีเรียที่พบเป็นพวก facultative anaerobe ส่วนแบคทีเรียที่แยกได้ในสภาพที่มีออกซิเจนพบว่าจากน้ำปลาปลาน้ำจืดพบแบคทีเรียรูปกลมแกรมบวก 83 isolates จาก 121 isolates และเป็นพวกรูปท่อนแกรมบวกสร้างสปอร์ได้ 38 isolates ส่วนในน้ำปลาปลาน้ำเค็มพบแบคทีเรียรูปกลมแกรมบวก 160 isolates จาก 168 isolates และเป็นรูปท่อนแกรมบวกสร้างสปอร์ได้ 8 isolates และได้สรุปว่า แบคทีเรียรูปกลมแกรมบวกน่าจะเป็นตัวการสำคัญในกระบวนการหมักน้ำปลา ซึ่งแบคทีเรียรูปกลมที่พบจัดอยู่ในสกุล Pediococcus ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain heart infusion agar(BHI) ที่ไม่เติมเกลือได้ ให้กรดแลคติคและให้กลิ่นน้ำปลาเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว BHI ส่วนพวกรูปท่อนจัดอยู่ในสกุล Bacillus เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ที่ไม่เติมเกลือ เติมเกลือ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์แต่ไม่เจริญที่ 20 เปอร์เซ็นต์เกลือ ไม่ให้กรดแลคติคและไม่ให้กลิ่นน้ำปลาเมื่อเลี้ยงบนอาหารเหลว BHI จากการศึกษาของยงยศ(58)พบว่า *Pediococcus sp.*ที่แยกได้จากน้ำปลาเป็นพวก Moderate halophile ที่เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic peptone broth ที่ความเข้มข้นของเกลือ 2 - 5 เปอร์เซ็นต์ส่วนที่ 0 และ 18 เปอร์เซ็นต์เจริญได้เล็กน้อยและช้า แต่เป็นพวกที่มีบทบาทในการสร้างกลิ่นและรสของน้ำปลาจึงน่าจะเป็นประโยชน์ในการย่นระยะเวลาในการทำน้ำปลาลงโดยเติมลงไปในขั้นสุดท้ายของกระบวนการหมักในอุตสาหกรรมการทำน้ำปลา

มัทนาและสมศักดิ์ (3) คัดเลือกเชื้อจากน้ำปลา พบว่าในระยะแรกของการหมักจะพบแบคทีเรียรูปกลมเป็นส่วนใหญ่ซึ่งอยู่ในสกุล Micrococcus ได้แก่ *Micrococcus roseus*, *Micrococcus varians* , *Pediococcus cereviseae* กับ *Pediococcus halophilus* โดยพวกสกุล Micrococcus มีมากกว่า Pediococcus ระยะหลังของการหมักพบ

แบคทีเรียรูปแท่งซึ่งอยู่ในสกุล Bacillus ทั้งหมดได้แก่ *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. firmus*, *B. alvei* และ *Bacillus laterosporus*

Fujii, Tateo and Hisao, Sakai(25) พบว่าใน Shotturu (น้ำปลาญี่ปุ่น)จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นพวกต้องการออกซิเจน และแบคทีเรียที่พบมากที่สุดเป็นพวกที่เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 2.5 เปอร์เซ็นต์ได้แก่แบคทีเรียในสกุล Streptococcus เป็นส่วนใหญ่ ส่วนบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์พบแบคทีเรียสกุล Halobacterium ,Micrococcus, Bacillus และ Unidentified cocci

Fujii, Tateo and Hisao, Sakai (26) พบว่าใน Shotturu (น้ำปลาญี่ปุ่น) ที่ผลิตในประเทศญี่ปุ่น แบคทีเรียที่พบเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 2.5 เปอร์เซ็นต์เป็นจำนวนมากส่วนใหญ่อยู่ในสกุล Vibrionaceae และ Bacillus ส่วนพวกที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์ส่วนใหญ่เป็นพวกสกุล Halobacterium,Bacillus และ Unidentified cocci Itoh,Hiroshi (59) ได้คัดเลือก แบคทีเรียที่สร้างกรดจากน้ำปลาที่ทำในประเทศไทยและญี่ปุ่นพบว่ามีแบคทีเรียพวก *Pediococcus halophilus* ,*Staphylococcus saprophyticus*,*Micrococcus varians*, *Aerococcus haloviridans*, *Paracoccus halodenitrificans* และ Heterofermentative lactic acid bacteria คือ *Peptococcus anaerobius*(variable) Zenitani (60) แยกแบคทีเรียจาก Shiokara (fish sauce) พบว่ามีพวกสกุล Micrococcus, Bacillus, Achromobacter,Flavobacterium,Vibrios พวกสกุล Bacillus เจริญได้ดีที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์นอกนั้นเจริญได้ดีที่ 10 - 20 เปอร์เซ็นต์และสรุปว่าพวกสกุล Micrococcus เป็นพวกที่ทำให้เกิด ripening ใน Shiokara ส่วน halophilic vibrio และ Achromobacter ทำให้น้ำปลาเสีย แต่สกุล Bacillus ไม่น่ามีความสำคัญในกระบวนการ ripening Kasermsarn(49) พบว่าการเปลี่ยนแปลงจำนวนของแบคทีเรียที่พบในน้ำปลาอายุต่างๆ กัน เมื่อแยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI และ BHI เติมเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์จะลดลงตลอดยกเว้นใน BHI เติมเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ซึ่งจำนวนแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่งในปลายเดือนที่ 9 แล้วค่อยๆ ลดลงตอนปลายเดือนที่ 12 แบคทีเรียที่พบเป็น Predominant ส่วนใหญ่ได้แก่พวก

รูปกลมแกรมบวกและรูปแท่งแกรมบวก ส่วนพวกรูปกลมแกรมลบและรูปแท่งแกรมลบพบเป็นบางครั้ง (61) พบแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดที่ระเหยได้ในน้ำปลา คือสกุล Bacillus 10 ชนิด Coryneform 1 ชนิด, Streptococcus 2 ชนิด Micrococcus 1 ชนิด และ Staphylococcus 1 ชนิด

การพัฒนากระบวนการหมักน้ำปลาเพื่อย่นระยะเวลาในการหมัก

Saisithi et.al.(24) แบ่งขั้นตอนการเกิดน้ำปลาได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ 1) การเกิด hydrolysis ของโปรตีน 2) การเกิดสี 3)การเกิดกลิ่น ในการหมักน้ำปลาตามวิธีธรรมชาตินั้นเป็นวิธีที่ต้องใช้ระยะเวลานานมากคือประมาณ 18 เดือน ซึ่งเป็นวิธีการที่ไม่อาจเพิ่มผลผลิตและไม่สามารถควบคุมคุณภาพได้ จึงได้มีผู้ศึกษาและวิจัยหาวิธีการย่นระยะเวลาในการหมักและได้น้ำปลาที่ได้มาตรฐาน มักใช้วิธีการย่อยสลายเนื้อปลาให้เกิดเป็นน้ำปลาได้เร็วขึ้นโดยใช้วิธีการทางเคมีและชีวเคมีเข้ามาช่วย วิธีการดังกล่าว ดังแสดงในตาราง 9 ซึ่งวิธีการเหล่านี้มักมีปัญหาเรื่องกลิ่นและรสไม่ดีเท่าที่ควร แต่ถ้าหมักร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ชอบเค็มจะให้กลิ่นที่ดีขึ้น(20)

ตารางที่ 9 วิธีการที่นำมาใช้ในการพัฒนากระบวนการหมักน้ำปลา

วิธีการ	เอกสารอ้างอิง
1. การย่อยสลายเนื้อปลาโดยใช้กรด	(15,16)
2. การหมักน้ำปลาโดยการเพิ่มอุณหภูมิ	(17)
3. การย่อยสลายเนื้อปลาโดยใช้ด่าง	(18)
4. การหมักน้ำปลาโดยใช้เอนไซม์(Artificial enzymes)	(11,12,13,14,62)
5. การหมักน้ำปลาโดยใช้ pyroric enzyme ร่วมกับแบคทีเรียชอบเค็ม *Halobacterium sp.*	(20)
6. การหมักน้ำปลาโดยการเติมเชื้อที่สร้างเอนไซม์โปรติเอส *Bacillus sp.*	(21)
7. การหมักน้ำปลาโดยใช้ Crude enzyme ที่แยกได้จากแบคทีเรียชอบเค็ม *Pseudomonas sp.*	(63)

แบคทีเรียชอบเค็ม(Halophilic bacteria)

ส่วนใหญ่จะหมายถึงแบคทีเรียที่ต้องการความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 3 โมลาร์ ขึ้นไปตามการจัดจำแนกกลุ่มแบคทีเรียชอบเค็มของ Baxter and Gibbons(64) จะแบ่งเป็น 2 พวก คือ Extreme halophile ที่ต้องการความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 3 โมลาร์ขึ้นไป และใช้คำว่า Moderate halophile สำหรับพวกที่เจริญได้ในที่มีความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 0.5 - 3.5 โมลาร์(ประมาณ 3 - 25 เปอร์เซ็นต์) แหล่งที่พบแบคทีเรียชอบเค็มมักพบในสถานที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง เช่นใน นาเกลือ ทะเลสาปน้ำเค็ม อาหารที่เก็บรักษาโดยมีความเข้มข้นของเกลือสูง แบคทีเรียเหล่านี้มีรงควัตถุสีแดงสดหรือสีชมพู ซึ่งเป็นพวก carotenoid (65,66)

Moderate halophile ประกอบด้วยแบคทีเรียหลายสปีชี่ส์ทั้งแกรมบวกแกรมลบและมีรูปร่างของเซลล์ต่างๆตัวที่ได้รับการศึกษามากที่สุดคือ *Micrococcus halodenitrificans* และ *Vibrio costicolus* การศึกษา Moderate halophile มีมากกว่า Extreme halophile เพราะ Extreme halophile จะมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมที่เลี้ยงต่างกันและการย้อมสีก็ยุ่งยากมากจึงมักทำให้สับสนในการจำแนก(23)

ใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1 (67) จัดให้แบคทีเรียชอบเค็มที่เซลล์รูปร่างเป็นแท่ง(Rod)อยู่ในสกุล Halobacterium โคโลนีมีสีชมพู สีส้มถึงสีแดงสด ค่อนข้างโปร่งแสงถึงโปร่งแสง แกรมลบ บางสายพันธุ์มีคุณสมบัติ highly pleomorphic Resting stage ยังไม่ทราบ มักมีแก๊สแวคคิโอลไม่เคลื่อนที่ถ้าเคลื่อนที่จะมีแฟลกเจลลาชนิด lophotrichous ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจน(Stricts aerobes) อาจมีพวก facultative anaerobe บ้าง เจริญได้ดีที่ 40 - 50 °C. คาตาเลส ออกซิเดสเป็นบวก และส่วนใหญ่ย่อยเจลลาตินได้ เป็นพวก Chemoorganotrophic ใช้กรดอะมิโนหรือน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนต้องการเกลือไม่ต่ำกว่า 2.5 โมลาร์ มี 5 สปีชี่ส์คือ *H. salinarium*, *H. volcanii* , *H. sacharovolum*, *H. vallismortis* ,*H. pharaonis* ส่วนแบคทีเรียชอบเค็มที่เซลล์รูปร่างกลม(coccus)จัดอยู่ในสกุล Halococcus อยู่กับเป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม สีของโคโลนีอยู่ในกลุ่มสีแดง เช่น *Halococcus morrhuae*

การศึกษาเอนไซม์ของแบคทีเรียซอบเค็ม โดย Baxter และ Gibbons(64,68,69) Holmes et al.(72) Hochstein และ Dalton(71) พบว่าเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรียเหล่านี้ทำงานได้ในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงและส่วนใหญ่จะไม่ทำงานเมื่อไม่มีเกลือ K^+ มักเป็น effective activator มากกว่า Na^+