ชุดโครงการวิจัย : การเพิ่มมูลค่าผลิตผลทางการเกษตร

โครงการวิจัย : การเพิ่มมูลค่าผลิตผลทางการเกษตร

กิจกรรม : การใช้สารสำคัญในผลิตภัณฑ์ใหม่

ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : ศึกษาผลของเชื้อ *Oenococcus oeni* ต่อการหมักกรดแลคติกในกระบวนการผลิตไวน์ในประเทศเขตร้อนชื้น

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Studies of *Oenococus oeni* in Malo-Lactic Fermentation in Tropical Vinification

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าโครงการ นายโกเมศ สัตยาวุธ	สังกัดกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
ผู้ร่วมงาน นางสาวพัชรี ลิมปิษเฐียร	สังกัดกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
ผู้ร่วมงาน นางสาววิไลศรี ลิมปพยอม	สังกัดกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
ผู้ร่วมงาน นางสาววิมลวรรณ วัฒนวิจิตร	สังกัดกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
ผู้ร่วมงาน นางสาวอกนิษฐ์ พิศาลวัชรินทร์	สังกัดกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

Abstracts

Thailand has four important varieties of grapevines with high potential in the wine industry: Shiraz, White Malaga, Columbard and Black queen which have the quality and different efficiency of fermentation to produce wine. This study aims to develop a process for grape's malo-lactic fermentation by using the most effective lactic acid bacteria to improve tropical wine quality. Research conducted at the Post-harvesting and processing Research and Development Division between the years 2014 - 2016 in the tropical grapes. The volatile phenol produced by microbial after malo-lactic fermentation used to explain why the best microorganism of malo-lactic fermentation stands *Oenococcus oeni*. This microbe will not produce this undesired substance during fermentation. By using the temperatures above 30 degrees Celsius, the result of the lactic acid bacteria production in wine will not exceed than 15% and produce the optimum amount of lactic acid. After monthly inspection, cell growth will increase rapidly in the first week and gradually decreases until standstill after fermentation is completed, which is why the microbes will release sugars and essential acids to stay alive under an convenient factor. It is noticed that pH will drop rapidly during the fermentation and gradually increase when the fermentation is completed. The alcohol content is slightly different in the two first weeks of fermentation, which confirmed that there will not have an alcohol production during malo-lactic fermentation.

Lactic acid bacteria strain CB5 and CH35 converted acid L-malic to L-lactic for the rate of 0.671 and 0.572 g / l, which makes L-lactic produced by CB5 were higher by the rate of acid L-lactic at 0.537 g / l and CH35 to a production rate of 0.253 g / l. The amount of D-glucose and D-fructose intake has been reduced significantly. Without affecting the sensory differences between these different microorganisms.The genetic tests also indicate that *Oenococcus oeni* bacteria or microorganisms *Leuconostoc oenos* potential in lactic acid fermentation is only the best for malo-lactic fermentation.

Keywords: the lactic acid fermentation, the wine, *Oenococcus oeni*, grapes

บทคัดย่อ

องุ่นสายพันธ์เศรษฐกิจในประเทศไทยมี 4 สายพันธ์ที่มีศักยภาพสูงในอุตสาหกรรมไวน์ได้แก่ องุ่นแดงชีราจ องุ่นขาวโคลัมบาท องุ่นแดงป็อกดำและอุง่นขาวไวท์มะละกาและคุณภาพและประสิทธิภาพการหมักไวน์ขององุ่นที่แตกต่างกัน การทดลองนี้จึงมุ่งพัฒนากรรมวิธีการผลิตไวน์องุ่นโดยการศึกษาการหมักกรดแลกติกที่มีคุณภาพเพื่อศึกษาจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการหมักและปัจจัยที่เหมาะสม ดำเนินการวิจัยที่กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ระหว่างปี 2556 - 2558 ในองุ่นทั้ง 4 สายพันธ์ โดยประสิทธิภาพการผลิต volatile phenol ของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการหมักกรดแลคติกและ *Oenococcus oeni* ถือเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ผลิตผลิตภัณฑ์ที่ไม่พึงประสงค์ระหว่างการหมัก อุณหภูมิที่สูงกว่า 30 องศาเซลเซียสจะส่งผลต่อการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียและปริมาณแอลกอฮอล์ในไวน์ที่ไม่เกิน15% ถือเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติก และการเจริญเติบโตของเซลล์จะมีการเพิ่มขึ้นรวดเร็วในสัปดาห์แรกและค่อยๆหยุดนิ่งจนลดลงหลังการหมักเสร็จสิ้นซึ่งเหตุผลสำคัญมาจากจุลินทรีย์จะปล่อยน้ำตาลและกรดสำคัญเพื่อดำรงชีวิตอยู่ภายใต้ปัจจัยที่ไม่เหมาะสมโดยสังเกตุได้จากค่า pH ที่ลดลงอย่างรวดเร็วในระหว่างการหมักและค่อยๆเพิ่มขึ้นเมื่อการหมักเสร็จสิ้น ค่าปริมาณแอลกอฮอล์มีค่าแตกต่างกันเล็กน้อยในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการหมักซึ่งยืนยันได้ว่าจะไม่มีการผลิตแอลกอฮอล์ แบคทีเรียแลคติก strain CB5 ที่คัดเลือกมาและCH35 จะมีการใช้กรด L-malic ไปปริมาณ 0.671 และ 0.572 g/l ใกล้เคียงกันซึ่งจะทำให้กรด L-lactic มีค่าสูงขึ้นจากการหมักโดย CB5 จะมีอัตราการผลิตกรด L-lactic ที่ 0.537 g/l และ CH35 จะมีอัตราการผลิตที่ 0.253 g/l สำหรับปริมาณ D-glucose และ D-fructose จะมีปริมาณที่ลดลงอย่างชัดเจน โดยไม่มีผลความแตกต่างทางการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่แตกต่างกันระหว่างจุลินทรีย์ชนิกใหม่และจุลินทรีย์ทางการค้า โดยการทดสอบทางพันธุศาสตร์ยังชี้ชัดว่าจุลินทรีย์ *Oenococcus oeni* หรือ *Leuconostoc oenos* เป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการหมักกรดแลคติกดีที่สุดเพียงชนิดเดียว

คำหลัก : การหมักกรดแลกติก, การผลิตไวน์, *Oenococcus oeni*, องุ่น

คำนำ

"ไวน์"ถือเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จากองุ่นที่ทั่วโลกให้ความยอมรับในความละเอียดอ่อนในการผลิตซึ่งขั้นตอนการผลิตไวน์ถือเป็นหลักสำคัญในการควบคุมคุณภาพ การผลิตองุ่นที่ครั้งหนึ่งเคยมีการผลิตเพียงในประเทศเขตหนาวหากแต่เกษตรกรรมการปลูกองุ่นนั้นมีความต้องการน้ำเพียงน้อยนิดและชั่วโมงแสงแดดมีมากกว่า การขยายเขตพื้นที่เพาะปลูกจึงมากขึ้นไม่ว่าจะเป็น เวียดนาม พม่า อินเดีย บราซิลและประเทศไทยเองถือเป็นเรื่องใหม่ดังนั้น การทำการศึกษาถึงลักษณะเฉพาะของการผลิตองุ่นและการผลิตไวน์ประจำท้องที่จึงเป็นเรื่องที่จำเป็นและสำคัญ

การหมักไวน์ นั้นแบ่งออกเป็น สองช่วงสำคัญได้แก่ การหมักแอลกอฮอล์(Alcohol Fermentation) และการหมักกรดแลคติก (Malo-Lactic Fermentation) อย่างไรก็ตามการให้ความสำคัญในการหมักชนิดหลังนั้นยังไม่มากนัก แม้จะมีความจำเป็นอย่างมากในการกำหนดคุณภาพของไวน์ที่ผลิตนั้นจะถือว่าการหมักแลคติกนี้เป็นตัวกำหนดคุณภาพหรือการให้บอดี้ (Body) ในไวน์นั้นเอง ตั้งแต่ปี 1961 Jean Riberau-Gayon และ Emile Peynaud สองบิดาแห่งศาสตร์การผลิตไวน์ของฝรั่งเศสได้กล่าวว่า “ตั้งแต่ยี่สิบปีที่ผ่านมาเรารู้จักการหมักกรดแลคติกมานาน หากแต่การปฏิบัตินั้นมักเกิดจากความบังเอิญ การควบคุมและการเข้าใจในศาสตร์ดังกล่าวยังถือว่าน้อยมาก” ซึ่งการหมักกรดแลคติกแท้จริงเป็นเรื่องง่ายและจำเป็นอย่างยิ่งในกรรมวิธีการผลิตไวน์แดง โดยเฉพาะในองุ่นที่สุกไม่เต็มที่ การหมักดังกล่าวจะเป็นตัวควบคุมปริมาณกรดมาลิกให้ต่ำลง นอกจากนี้การควบคุมความสมดุลของจุลินทรีย์ในไวน์ยังมีผลมาจากการหมักกรดแลคติกนี้ด้วย

การหมักกรดแลคติกในไวน์เรารู้จักแบคทีเรียชนิดเดียวที่ช่วยในการหมักชื่อว่า *Oenococus oeni* หรือ *Leuconostoc oenos* แบคทีเรียดังกล่าวจะเจริญเติบโตในรูปแบบ antagonist กับ ยีส ที่ใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ซึ่งจะเริ่มมีบทบาทหลังจบการหมักแอลกอฮอล์ แต่การกำหนดเวลาการเริ่มต้นการหมักและหยุดหมักให้แน่ชัดนั้นยังไม่มีงานวิจัยที่แน่ชัด อย่างไรก็ตามการศึกษาเรื่องผลพลอยได้จากการหมักนั้นนับเป็นสิ่งที่น่าสนใจกว่า และการประเมินการวิเคราะห์การจบของการหมักกรดแลคติกทำได้โดยการใช้โครมาโทกราฟีกระดาษ (Riberau-Gayon, 1953) เพื่อตรวจสอบปริมาณกรดมาลิกที่เหลืออยู่ งานวิจัยเรื่องการหมักกรดแลคติกในองุ่นที่ปลูกในประเทศเขตร้อนจะทำให้ได้ข้อมูลเพื่อตอบรับถึงทฤษฎีการหมักกรดแลคติกที่มีอยู่และการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลตามมาจากผลของการหมักดังกล่าว เพื่อกำหนดความจำเป็นในการทำการหมักกรดแลคติกและลักษณะเฉพาะของการผลิตไวน์เขตร้อนโดยศึกษาในสภาวะที่แตกต่างของการผลิตองุ่นและการหมัก ซึ่งการหมักกรดแลคติกยังเป็นต้นเหตุสำคัญในการเกิดโรคในไวน์ได้อีกเช่นกัน การหมักที่เกิดจากแบคทีเรียในไวน์นั้นแบ่งออกได้เป็นอีกสองอย่างได้แก่การหมักกรดแลคติกและการหมักกรดซิตริก ซึ่งความสำคัญของการหมักกรดแลคติกนั้นมีความสำคัญมากกว่าเนื่องมาจากเราจะใช้เพื่อการกำหนดคุณภาพของไวน์ที่เกิดมาจากการหมักดังกล่าว ซึ่งในห้องทดลองเราสามารถอธิบายได้ว่า จากกรด L-Malic จะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น L-Lactic ซึ่งเสนอปฏิกิริยาดังกล่าวโดย Seifeit ในปี 1990 โดยการศึกษาทาง Stereoisomer

$$\text{L-malic} \longrightarrow \text{L-lactic}$$

ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่เรียกว่า Decarboxylation โดยไม่มีผลิตภัณฑ์กลาง (Peynaud, 1968) ซึ่งแปลว่าไม่ผ่านการเกิดกรดไพรูวิกมาก่อน และเรายังพบงานวิจัยหลายอย่างได้ให้ความสำคัญกับเอนไซม์ที่ใช้ในการหมักดังกล่าวไม่ว่าจะเป็น

เอนไซม์ มาลิกดีไฮโดรจีเนส(MDH):

$$\text{L-malic} \longrightarrow \text{Oxaloacetic} + \text{NADH} + H^+$$

เอนไซม์ มาลิก

$$\text{L-malic} + NAD^+ \xrightarrow{\quad} \text{Pyruvic} + CO_2 + NADH + H^+$$

ซึ่งสมมติฐานในปัจจุบันเราได้พบว่า เอนไซม์ชนิดเดียวของปฏิกิริยาการหมักกรดแลคติกนั้นมีเอนไซม์ที่ชื่อว่า เอนไซม์มาโลแลคติก(Malolactic enzyme) ซึ่งสกัดได้จากแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* (Lonvaud, 1975; Schutz et Radler, 1974) เอนไซม์ดังกล่าวเป็นโปรตีนแบบ Tetrameric หรือ Dimeric มีขนาด 60,000 Da และ pHi 4.35 ซึ่งตัวผลิตภัณฑ์กรดแลคติกจะเป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเองแต่อย่างไรก็ตามยังมีคำถามถึงหน้าที่ของ NAD^+ และชนิดของปฏิกิริยาในเรื่อง oxydo-reduction นอกจากนี้ยังมีความพยายามในการโคลนยีนการหมักกรดแลคติกจากแบคทีเรียโดยทีมจากทวีปแอฟริกาของ Stellenbosh เป็นผู้ทำสำเร็จโดยนำยีนดังกล่าวไปใส่ในยีสต์ *Schizosaccharomyces pombe* เพื่อการลดจุลินทรีย์ในการผลิตไวน์แต่ผลออกมาไม่น่าพอใจเนื่องจากยีสต์ไม่สามารถพัฒนาปฏิกิริยาอย่างอื่นที่แบคทีเรียทำ โดยเฉพาะการพัฒนารสและกลิ่น(Van Vuuren et Husnik, 2003) น้ำองุ่น ถือเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของจุลินทรีย์ ในการหมักต่างๆไม่ว่าจะเป็นการ หมักแอลกอฮอล์และการหมักกรดแลคติก กรดแลคติกถือเป็นผลิตภัณฑ์สำคัญในการพัฒนารสและกลิ่นของไวน์ ซึ่งเป็นผลจากการหมักกรดแลคติกของแบคทีเรีย *Oenococus oeni* การหมักกรดแลคติกจึงจำเป็นต้องมีเพียงปฏิกิริยาเดียวและสมบูรณ์ โดยไม่มีการย้อนกลับ (Lonvaud, 1975; Schutz et Radler, 1974) การเกิดผลิตภัณฑ์อื่นจึงถือเป็นสิ่งที่เกิดจากปฏิกิริยาคู่ขนานและเกิดจากแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น การหมักกรดซิตริก เป็นต้น (Weinzorn, 1985) งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษากรรมวิธีการหมักกรดแลคติกโดยเชื้อแบคทีเรีย *Oenococcus oeni* ในการผลิตองุ่นเพื่อการผลิตไวน์ในประเทศเขตร้อน โดยการควบคุมปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ ปัจจัยในการหมักปฏิกิริยาคู่ขนานที่สามารถเกิดได้และผลต่อการเกิดโรคในไวน์

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1.วัสดุทดลอง

1.1 องุ่น สายพันธ์พันธุ์ป็อกดำ (Black queen) และ พันธุ์ White Malaga และกลุ่มที่สองได้แก่พันธุ์ยุโรปที่นิยมใช้ในการผลิตไวน์ (*Vitis vinifera*) พันธุ์ Cabernet Sauvignon, พันธุ์ Merlot Noir, พันธุ์ Pinot Noir, พันธุ์ Riesling ที่ผลิตในประเทศไทยจากภาคเหนือและศูนย์วิจัยเกษตรหลวง จังหวัดเชียงใหม่

1.2 ตัวกรองสาร Semi-phase extraction (SPE) ในการสกัดขั้นตอน liquid-liquid extraction ตามคู่มือ Visiprep (Supelco) โดยเปรียบเทียบระหว่าง ตัวกรอง Semi-phase extraction (SPE) C18 silicate (ENVI-18, 0.5g, 6ml) และ Copolymer Styrene-divinylbenzene (PS-DVB, Bond Elut PPL, 0.2g, 3 ml) โดยใช้ตัวทำละลายเดียวกับสารสกัดโดยใช้ความเร็วในการบีบผ่านตัวกรอง 0.5 $mL.min^{-1}$

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีเพื่อใช้ทดสอบการสกัด คือ

(1) Acetone

(2) Acetonitrile

2.2 สารเคมีเพื่อใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้น้ำ Demineralize ในการทำละลาย เตรียมที่ความเข้มข้น 10 $mg.L^{-1}$ เก็บในขวดทึบเพื่อป้องกันแสงและเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 สัปดาห์ คือ

(1) Malic acid

(2) Lactic acid

3. เครื่องมือ

3.1 High Performance Liquid Chromatography – Fluorescence ที่มีปั๊มแปรผันแรงดันต่ำ (Varian 9010) หัวฉีดชนิด (Rheodyne 7125) ที่แบ่งปริมาณฉีดที่ 20 ไมโครลิตร, การ์ดคอลัมน์ชนิด C18 Silica, คอลัมน์ชนิด C18 Silica (Supelcosil LC-PAH 20cm x 4.6 mm(5µm)), เตาอบชนิด Water Column Heater Module โดยใช้ตัวควบคุมอุณหภูมิชนิด Waters Temperature Control Module เพื่อควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์, ตัวตรวจจับสัญญาณชนิด Fluorescence (Thermo Quest FL 3000) มีโปรแกรมแปรผล(TC4 Navigator), ความเร็วของ Mobile Phase ที่ 1.5 $mL.min^{-1}$ โดยในช่วงแรกอุณหภูมิของคอลัมน์ยังไม่เสถียรดังนั้นการปรับ gradient จึงใช้ที่อุณหภูมิห้องและรอจนอุณหภูมิของคอลัมน์อยู่ที่ 35 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 55 นาที

3.2 High Performance Liquid Chromatography – Ultraviolet ที่มีปั๊มแปรผันแรงดันต่ำ (ยี่ห้อ Shimadzu LC-6A), หัวฉีดชนิด Manual injection ที่แบ่งปริมาณฉีดที่ 20 ไมโครลิตร, การ์ดคอลัมน์ชนิด C18 Silica, คอลัมน์ชนิด C18 Silica (EnviroSep-PP-PAH (EPA Method 610) 125 x 4.6 mm), ตัวตรวจจับสัญญาณชนิด DAD (Shimadzu SPD-SAV),เครื่องแปรผล (รุ่น SPD-SAV) และโปรแกรมแปรผล (LCanalysis), ความเร็วของ Mobile Phase ที่ 0.8 $mL.min^{-1}$ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 30 นาที

4. **กลิ่นมาตรฐาน** Scent of Wine (Nez du vin) จากบริษัท Aromes de VIN ประกอบไปด้วย 54 กลิ่นหลักในกาแฟเพื่อใช้ในการฝึกและทดสอบ Cup tasting

วิธีการทดลอง มี 5 ขั้นตอนได้แก่

1.คัดเลือกพันธุ์องุ่นที่ใช้ในการทดลอง ที่ปลูก ณ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวง จังหวัดเชียงใหม่ โดยจำแนกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกมาจากพันธุ์พื้นเมืองหรือองุ่นพันธุ์เอเชีย (*Vitis ameurensus*) พันธุ์ที่รู้จักกันทั่วไปในประเทศไทย ได้แก่ พันธุ์ป็อกดำ (Black queen) และ พันธุ์ White Malaga และกลุ่มที่สองได้แก่พันธุ์ยุโรปที่นิยมใช้ในการผลิตไวน์ (*Vitis vinifera*) พันธุ์ Cabernet Sauvignon, พันธุ์ Merlot Noir, พันธุ์ Pinot Noir, พันธุ์ Riesling

2. ศึกษาผลของการหมักแอลกอฮอล์จากยีส *Saccharomyces cerevisiae* และคุณภาพขององุ่นในการหมักแต่ละชนิดโดยเน้นข้อมูลของปริมาณแอลกอฮอล์, pH, กรดมาลิก และปริมาณเอนไซม์มาโลแลคติก โดยทำแบบ 4 ซ้ำ ในช่วง 2 ปีของงานวิจัย เพื่อศึกษาภาวะที่เอื้อต่อการเริ่มการหมักกรดแลคติก

3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการหมักกรดแลคติกไม่ว่าจะเป็นปริมาณกรดซัลฟูริก, ปัจจัยของความเป็นกรด, ปัจจัยของอุณหภูมิ, ปัจจัยในการให้อากาศ เป็นต้น ในช่วง 2 ปีของงานวิจัย โดยการศึกษาปฏิกิริยาคู่ขนานจากการหมัก ผลผลิตพลอยได้จากการหมัก กลศาสตร์การหมัก ด้วยการทดสอบทางชีวเคมีและประยุกต์กับผลของการเกิดโรคในไวน์เป็นสำคัญโดยเฉพาะ Piqure Lactique (โรคเปรี้ยวจากกรดแลคติก)

4. ศึกษาการหมักไวน์ระดับอุตสาหกรรมที่ปริมาตรการผลิตสำคัญอย่างน้อย 100 ลิตร โดยการใช้ถังหมักสแตนเลทในผลอุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนและความขุ่นที่พอเหมาะต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เลือกไว้ โดยใช้วิธีการหมักแบบ Malo sur marc เพื่อการกำหนดคุณลักษณะของไวน์ที่ได้ต่อไป ในช่วง 2 ปีของงานวิจัย

5. สรุปและรายงานผลรวมทั้งเสนอผลงานเพื่อตีพิมพ์ในวารสารต่างๆและจัดสัมมนาเพื่อให้ส่วนราชการและเอกชนทราบถึงข้อมูลเกี่ยวกับวิธีการเลือกพันธุ์ยีสต่อผลการหมักไวน์ที่เหมาะสม

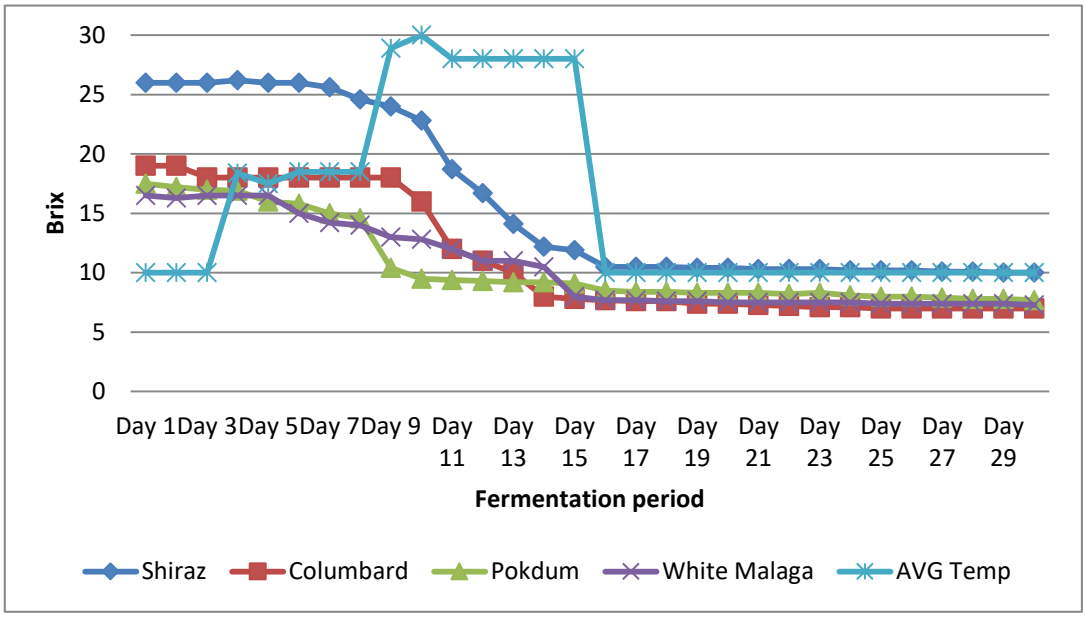
ระยะเวลา ตุลาคม 2555 – กันยายน 2557

สถานที่ดำเนินการ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร แปลงเกษตรกรจังหวัดชุมพร, จังหวัดสุราษฎร์ธานี, จังหวัดนครศรีธรรมราช, จังหวัดจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดนครราชสีมา

ผลการทดลองและวิจารณ์

1 ผลของพันธ์องุ่นที่มีผลต่อการหมักกรดแลคติกในไวน์องุ่นและปัจจัยที่ส่งผลต่อการหมัก

พบว่าพันธ์องุ่นที่ใช้ในการทดสอบทั้งสิ้น 4 สายพันธ์ได้แก่ สายพันธ์พื้นเมือง ได้แก่ สายพันธ์ปอกดำ (องุ่นดำ) และ ไวท์มะละกา (องุ่นขาว) สายพันธ์ยุโรป ได้แก่ สายพันธ์ชีราจ (องุ่นดำ) และ โคลำบาท (องุ่นขาว)



ภาพที่ 1 แสดงการทดสอบหมักขององุ่นทั้ง 4 สายพันธ์เพื่อเริ่มต้นการหมักกรดแลคติก

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกมาจากโรงงานแอลกอฮอล์ทั่วประเทศ โรงงานน้ำตาล โรงงานนมและไร่องุ่นมาได้ทั้งหมด 70 isolates (13 isolates จากไร่องุ่น 28 isolates จากโรงงานแอลกอฮอล์และโรงงานน้ำตาลและ 18 จากโรงงานนม 11 isolates จากทางการค้า) โดยใช้ *Oenococcus oeni* LALL เป็นตัวควบคุมโดยคำนวณจาก

$$\% \text{ Yield} = \frac{\text{ปริมาณกรด L-lactic (g/L)} \times 100}{\text{ปริมาณกรด L-Malic (g/L)}}$$

พบว่า isolate AA2 สามารถผลิตกรดแลคติกได้มาที่สุด (51.85%) ในขณะที่พบถึง 8 isolates ที่ไม่สามารถผลิตได้เลยแต่มีเพียง 33 isolates ที่สามารถผลิต CO2 จากกลูโคสได้ซึ่งจำแนกเป็น heterofermentive (heterolactic) bacteria และผลิตกรดแลคติกได้น้อยโดยได้คัดเลือก 7 isolates ที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงมาทดลองต่อรวมกับอีก 2 isolates ที่ผลิตกรดแลคติกมากที่สุดในกลุ่ม heterolactic อีกด้วย

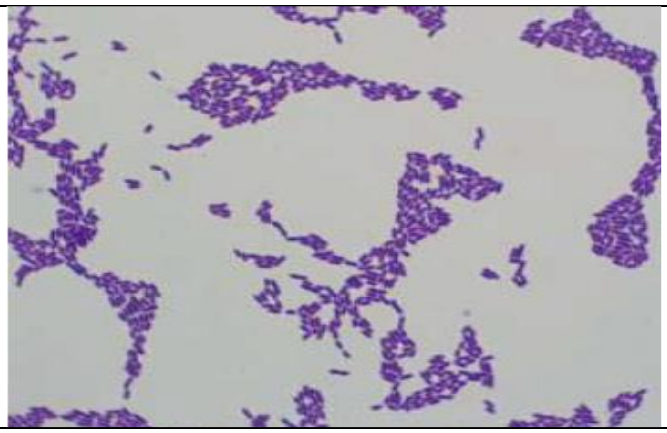
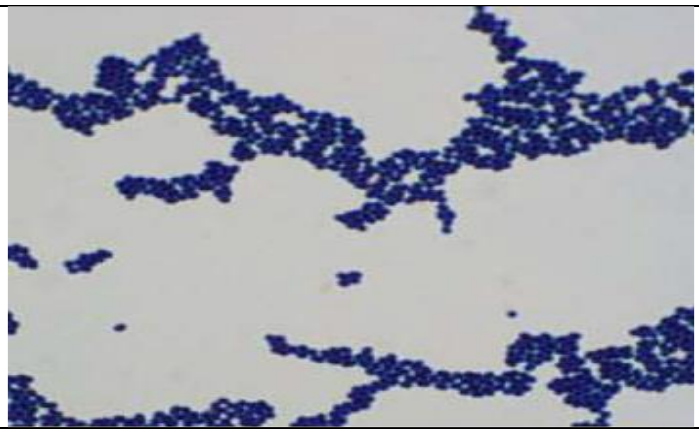
ตารางที่ 1 แสดง yield ของการผลิตกรด L-lactic จาก isolate แบคทีเรียที่คัดเลือกมา 70สายพันธ์

Isolate	% Yield	Isolate	% Yield	Isolate	% Yield
AA1	40.32	CA1	1.36	CB10	1.44
AA2	51.85	CA2	0.00	CB11	0.00
AA3	1.47	CA3	13.50	CB12	3.29
AA4	1.75	CA4	1.57	CB13	2.70
AA5	0.00	CA5	0.00	DA1	1.60
AA6	5.20	CA6	1.66	DA2	1.63
AB1	8.03	CA7	2.74	DA3	2.12
AB2	2.70	CA8	1.48	DA4	1.85
AB3	11.16	CA9	1.58	DA5	1.77
AB4	2.71	CA10	0.00	DA6	6.48
AB5	28.79	CA11	1.62	DA7	43.34
BA1	17.77	CA12	0.00	DA8	2.19
BA2	18.67	CA13	2.36	DA9	0.00
BA3	1.66	CA14	1.65	DA10	1.65
BA4	30.63	CA15	2.24	DA11	2.33
BA5	1.93	CB1	0.00	DB1	1.63
BA6	16.32	CB2	2.65	DB2	3.46
BB1	44.99	CB3	1.57	DB3	41.10
BB2	21.38	CB4	6.49	DB4	1.96
BB3	2.56	CB5	5.93	DB5	2.52
BB4	17.64	CB6	1.64	DB6	23.07
BB5	2.15	CB7	1.63	DB7	3.08
BB6	1.32	CB8	4.42	LALL	2.68
BB7	41.50	CB9	1.62		

2. ผลของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ส่งผลต่อคุณภาพไวน์องุ่นในเชิงคุณภาพ

พบว่าจุลินทรีย์มาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบการหมักกรดแลคติก (Malolactic fermentation) ยังคงเป็นเชื้อ *Oenococcus oeni* 2.2 โดบผลการศึกษาการผลิต volatile phenol ที่ส่งผลต่อคุณภาพไวน์ โดยการนำจุลินทรีย์มาตรฐานมาทดสอบเปรียบเทียบกับแบคทีเรียแลคติกและยีสต์ชนิดอื่นพบว่าไม่มีจุลินทรีย์ตัวใดที่นำมาทดสอบให้ผลการทดลองการผลิตสาร volatile phenol น่าพึงพอใจหรือผลิตสารให้กลิ่นฉุนน้อยเท่า Strain *Oenocoocus oeni* จึงเป็นที่ยืนยันได้ว่าการหมักกรดแลคติกในไวน์องุ่นนั้น *O.oeni* จะเป็นทางเลือกที่ดีที่สุด

ผลการศึกษาปัจจัยการหมักกรดแลคติกที่ทำการทดลองต่อโดยใช้ medium เพิ่ม ethanol ไม่มี glucose และ fructose ในระดับ 0%, 5%, 7.5%, 10% 12.5% และ 15% (v/v) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 20C, 25C และ 30C เวลา 2 สัปดาห์ โดยใช้ CH35 ที่เป็น isolate จาก LALL เป็นตัวควบคุมและศึกษาปริมาณ yield ของกรดแลคติกที่ได้พบว่า isolate CH35 ผลิตกรดแลคติกได้ดีที่สุดไม่ว่าจะเป็นอุณหภูมิ 20C หรือ 25C ในภาวะที่มีแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15% v/v ขณะที่อุณหภูมิ 30C มีการผลิตกรดแลคติกอยู่บ้างยกเว้น isolate BA4 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าในอุณหภูมิที่สูงกว่า 30 องศาเซลเซียสจะส่งผลต่อการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียและปริมาณแอลกอฮอล์ในไวน์ที่ไม่เกิน15% ถือเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติก

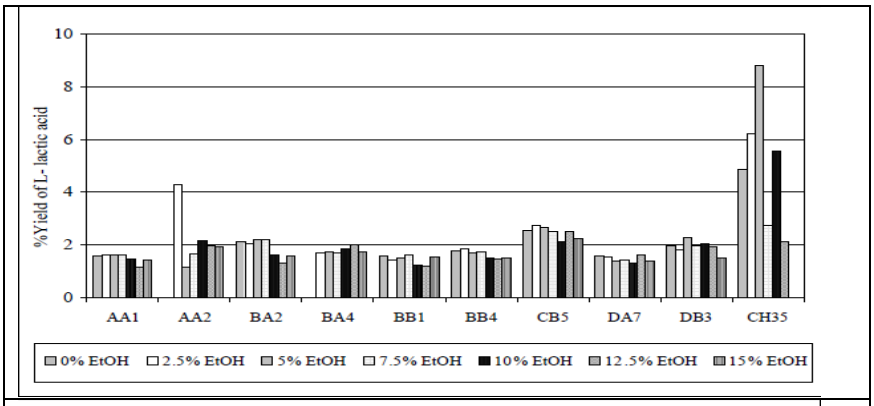
Oenococcus oeni LALL1 ที่ได้รับจากบริษัท lallaman	*Oenococcus oeni LALL2* ที่ได้รับจาก ATCC ประเทศฝรั่งเศส
	

ภาพที่ 2 แสดงภาพถ่ายของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มา 2 isolate สังเกตได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่ได้รับจากATCC หลังจากทำการย้อมสีแกรมและส่งใต้กล่องจุลทรรศน์มีความหนาแน่นของเซลล์มากกว่าของบริษัทเอกชน ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียมาตรฐานในการทดลองการหมักกรดแลคติก

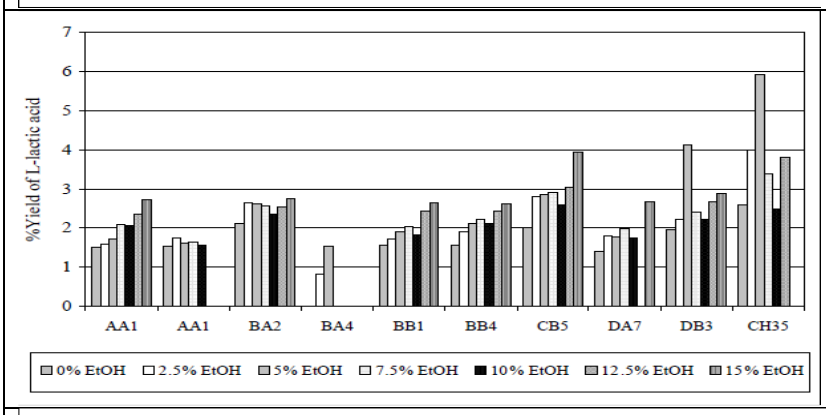
ตารางที่ 2 แสดงการผลิตสาร volatile phenol ของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี hydroxycinnamic acid (5 mg/l) ภายในเวลา 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสโดยไม่ให้ออกซิเจน (anaerobic)

จุลลินทรีย์	Malic Acid Residu (g/l)	Volatile Phenol (µg/l)			
		trans ferulic acid		*Trans* p-coumaric acid	
		Vinyl-4-gaiacol	Vinyl-4-phenol	Ethyl-4-gaiacol	Ethyl-4-phenol
ไม่เติมเชื้อ	8.5	0	0	0	0
Lactobacillus higardii R771	0.01	57	44	2	10
Lactobacillus plantarum CHL	0.03	0	154	25	230
Lactobacillus brevis 8407	0.01	65	1909	0	3
Pediococcus pentosaceus 33316	0.01	37	2063	10	2
Pediococcus damnosus 25248	0.01	12	14	10	12
Oenococcus oeni LALL1	1.2	3	9	11	0
Oenococcus oeni LALL2	1.25	0	0	0	0
Oenococcus oeni 8417	0.05	100	89	0	0
Dekkera intermidia MUCL 27706	8.5	25	15	3947	2915
Saccharomyces cerevisiae	8.5	700	1185	0	0

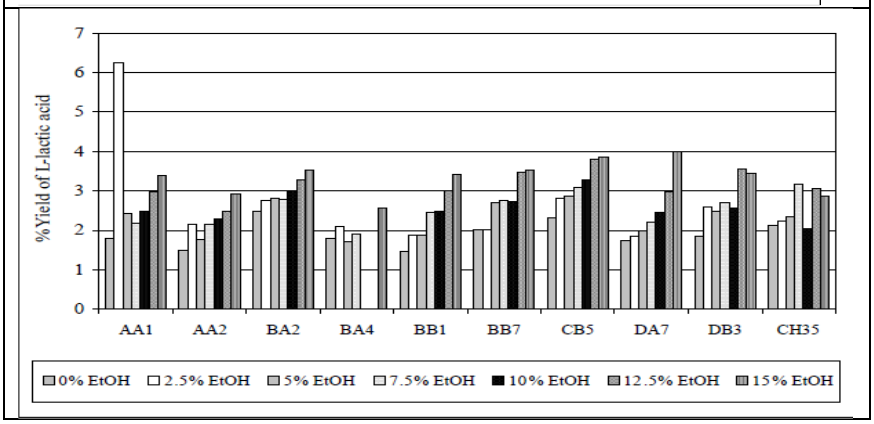
20 องศาเซลเซียส



25 องศาเซลเซียส



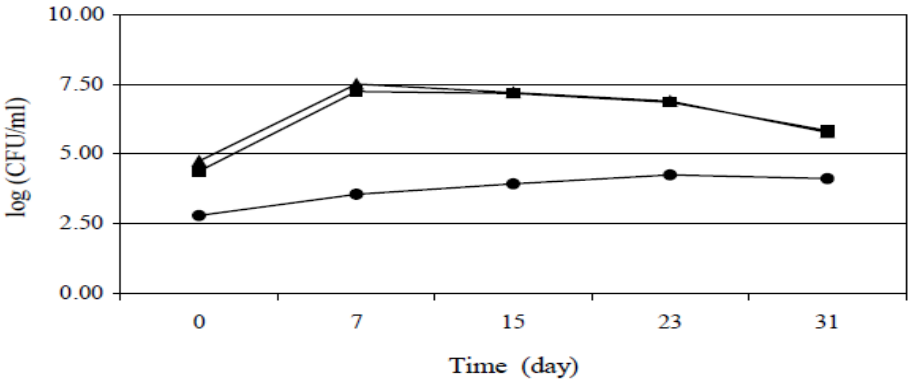
30องศาเซลเซียส



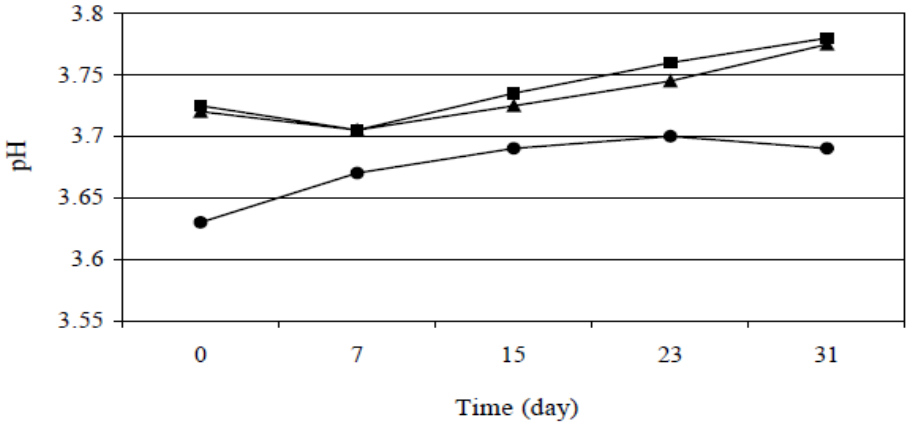
ภาพที่ 3 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการหมักกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก Strain ที่คัดเลือก

ผลการศึกษาการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไวน์โดยการนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไปหมักกรดแลคติก CB5เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์มาตรฐาน CH35 โดยถือเป็น positive control โดยหมักที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมีการติดตามผลทุกสัปดาห์โดยศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์จะมีการเพิ่มขึ้นรวดเร็วในสัปดาห์แรกและค่อยๆหยุดนิ่งจนลดลงหลังการหมักเสร็จสิ้นซึ่งเหตุผลสำคัญมาจากจุลินทรีย์จะปล่อยนำตาลและกรดสำคัญเพื่อดำรงชีวิตอยู่ภายใต้ปัจจัยที่ไม่เหมาะสมโดยสังเกตุได้จากค่า pH ที่ลดลงอย่างรวดเร็วในระหว่างการหมักและค่อยๆเพิ่มขึ้นเมื่อการหมักเสร็จสิ้น ค่าปริมาณแอลกอฮอล์มีค่าแตกต่างกันเล็กน้อยในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการหมักซึ่งยืนยันได้ว่าจะไม่มีการผลิตแอลกอฮอล์เกิดขึ้นนั้นเอง

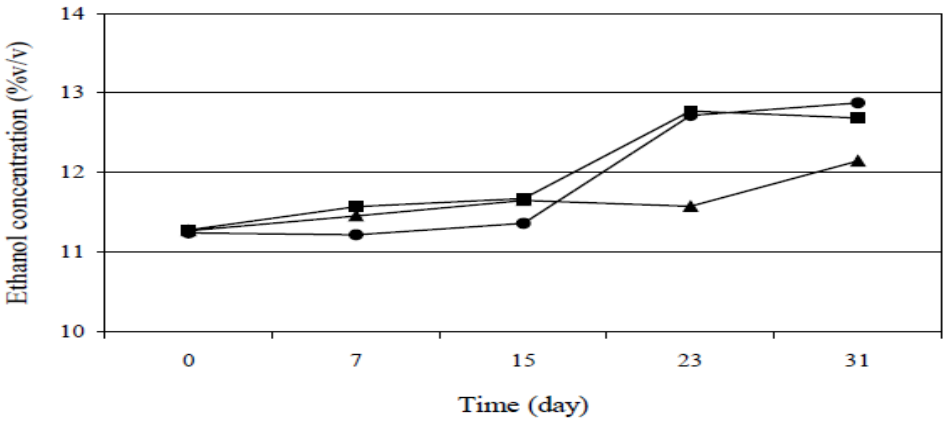
ภาพที่ 4 Total viable counts ของจุลินทรีย์ในไวน์; isolate CB5 (▲), isolate CH 35 (■) และ control (●)



ภาพที่ 5 pH ของไวน์; isolate CB5 (▲), isolate CH 35 (■) และ control (●)

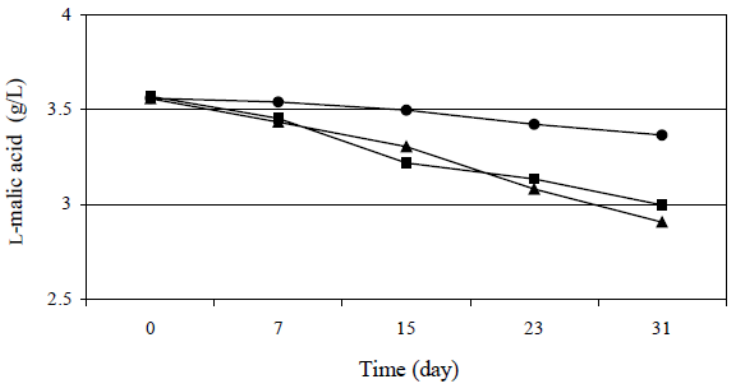


ภาพที่ 6 ความเข้มข้นของเอทานอลในไวน์; isolate CB5 (▲), isolate CH 35 (■) และ control (●)

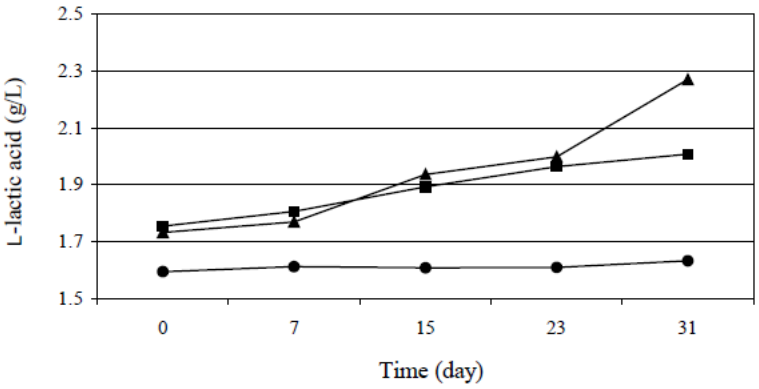


นอกจากนี้ยังได้ติดตามปริมาณสาร L-malic, L-lactic, D-glucose และ D-fructose โดยการวิเคราะห์เอนไซม์ของ Boehringer Manneheim test kit พบว่า strain CB5 หรือ CH35 จะมีการใช้กรด L-malic ไปปริมาณ 0.671 และ 0.572 g/l ใกล้เคียงกันซึ่งจะทำให้กรด L-lactic มีค่าสูงขึ้นจากการหมักโดย CB5 จะมีอัตราการผลิตกรด L-lactic ที่ 0.537 g/l และ CH35 จะมีอัตราการผลิตที่ 0.253 g/l สำหรับปริมาณ D-glucose และ D-fructose จะมีปริมาณที่ลดลงอย่างชัดเจนโดยเฉพาะในสัปดาห์แรก ทั้งนี้เนื่องมาจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

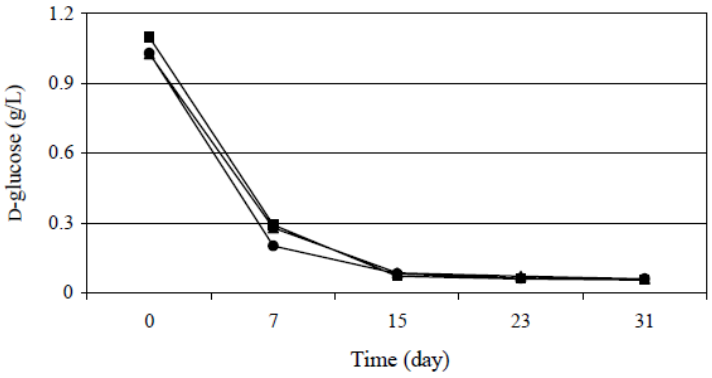
ภาพที่ 7 ความเข้มข้นของL-malic ในไวน์; isolate CB5 (▲), isolate CH 35 (■) และ control (●)



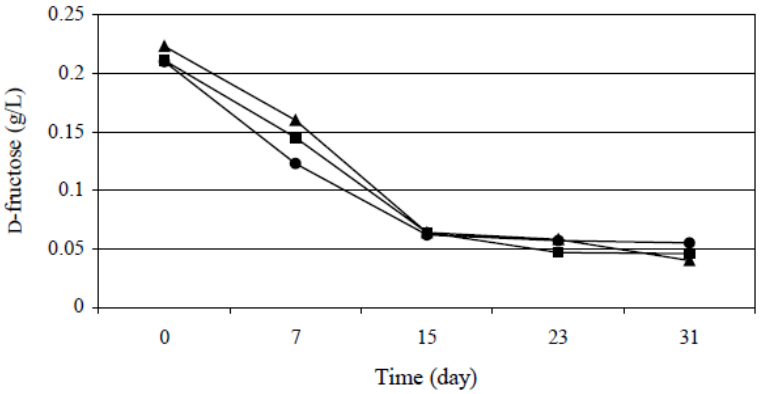
ภาพที่ 8 ความเข้มข้นของL-lactic ในไวน์; isolate CB5 (▲), isolate CH 35 (■) และ control (●)



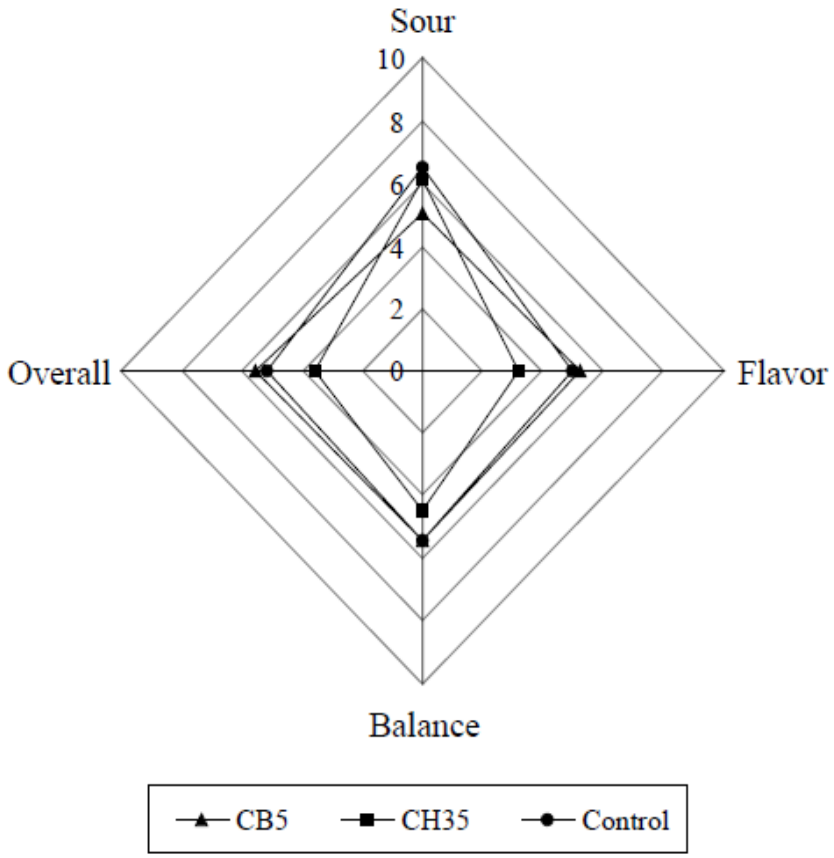
ภาพที่ 9 ความเข้มข้นของD-Glucose ในไวน์; isolate CB5 (▲), isolate CH 35 (■) และ control (●)



ภาพที่ 10 ความเข้มข้นของD-Fuctose ในไวน์; isolate CB5 (▲), isolate CH 35 (■) และ control (●)



ผลของการหมักกรดแลคติกต่อคุณภาพไวน์โดยการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยการทดสอบโดยผู้ชิมที่ได้รับการฝึกฝนทั้งสิ้น 9 คนโดยใช้การทดสอบแบบ triangle test ผลแสดงในรูปแบบ radar graph โดยใช้ hedonist scale 10 เพื่อพิจารณาข้อมูลด้าน sour (ความเข้มข้น), flavor (กลิ่น), balance of acidity (ความเป็นกรด), alcohol content (ปริมาณแอลกอฮอล์), fruit flavor (กลิ่นผลไม้) และ astringency (ความเฝื่อน) คำนวนค่า Least Significant Different(LSD) ตามตาราง



ภาพที่ 11 Polar coordinate graph สำหรับการประเมินทางประสาทสัมผัสของการทดสอบ triangle test ใน 4 หัวข้อ sour, flavor, balanceและ overall ($p < 0.05$)

ตารางที่ 3 Mean rating และLeast Significant Differences (LSD)

Characters	Sample		
	CB5	CH35	Control
Sour	5.03a	6.14a	6.52a
Flavor	5.24a	3.16a	4.99a
Balance	5.43a	4.47a	5.42a
Overall	5.53a	3.58a	5.14a

Means in column followed by the same letter are not significantly different (p> 0.05)

ผลการศึกษา Morphological และ physiological ของ strains ที่คัดเลือกโดยนำทั้ง 70 isolates มาทดสอบการผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักกลูโคสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth พบว่ามีเพียง 33 isolates ที่ผลิตแก๊สได้ซึ่งจัดเป็น heterofermentative bacteria โดยแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตเอธานอล กรดอาเซติกและแก๊สคาร์บอนดออกไซด์ได้ซึ่งถือเป็น secondary product ของการหมักกรดแลคติกนั้นเองโดยอีก 37 isolates นั้นจัดเป็น homofermenters

ตารางที่ 4 แสดงการผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ของแบคทีเรีย 70 isolate บน MRS broth

Isolate	CO2 prod.	Isolate	CO2 prod.	Isolate	CO2 prod.
AA1	-	CA1	+	CB10	-
AA2	-	CA2	-	CB11	-
AA3	-	CA3	-	CB12	-
AA4	+	CA4	+	CB13	+
AA5	-	CA5	-	DA1	+
AA6	-	CA6	+	DA2	+
AB1	-	CA7	+	DA3	+
AB2	+	CA8	+	DA4	+
AB3	-	CA9	+	DA5	+
AB4	+	CA10	-	DA6	-
AB5	-	CA11	-	DA7	-
BA1	-	CA12	-	DA8	-
BA2	+	CA13	-	DA9	-
BA3	+	CA14	-	DA10	-
BA4	-	CA15	+	DA11	+
BA5	+	CB1	+	DB1	-
BA6	-	CB2	+	DB2	+
BB1	-	CB3	-	DB3	-
BB2	-	CB4	-	DB4	+
BB3	+	CB5	+	DB5	+
BB4	-	CB6	+	DB6	-
BB5	+	CB7	+	DB7	+
BB6	+	CB8	-	CH35	+
BB7	-	CB9	-		

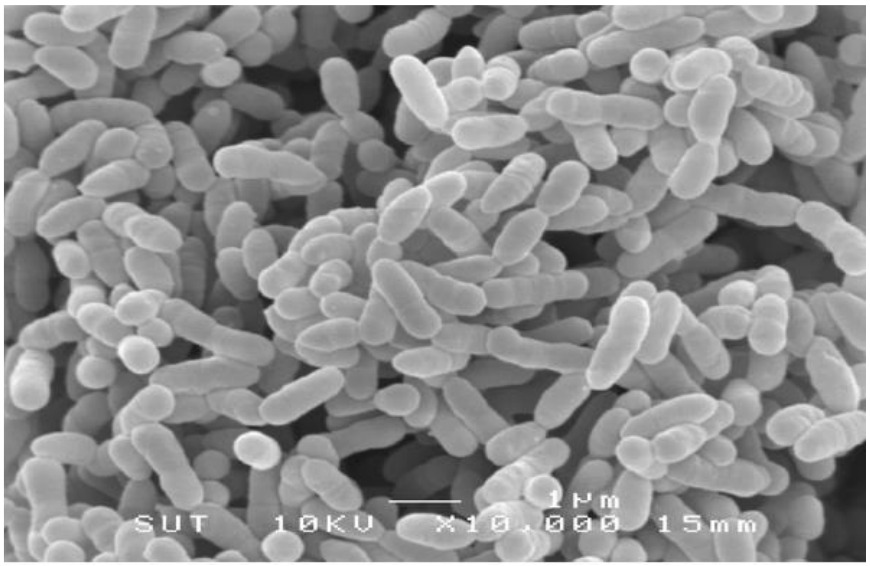
ผลการคัดเลือกแบคทีเรียมาทั้งสิ้น 9 strains โดยใช้หลักการทดสอบทางเอนไซม์ catalase แล้วทำการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธ์ที่มีศักยภาพในการหมักกรดแลคติกรวมทั้ง strains CB5 ก่อนจะทดสอบโดยชุดทดสอบ API 50 CH เพื่อตรวจสอบสายพันธ์แบคทีเรียเบื้องต้นเพื่อสืบหาคุณสมบัติทางชีวเคมี

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียทั้ง 9 isolates ที่คัดเลือกมา

Characteristics	Isolates of Malolactic bacteria								
	AA1	AA2	BA2	BA4	BB1	BB7	CB5	DA7	DB3
Cell shape	ovoid	ovoid	ovoid	ovoid	ovoid	ovoid	Ovoid-rod	ovoid	ovoid
Cell size (μm)	0.71	0.70	0.61	0.75	0.80	0.56	0.5x1.2	0.88	0.86
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase test	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO2 production	-	-	+	-	-	-	+	-	-

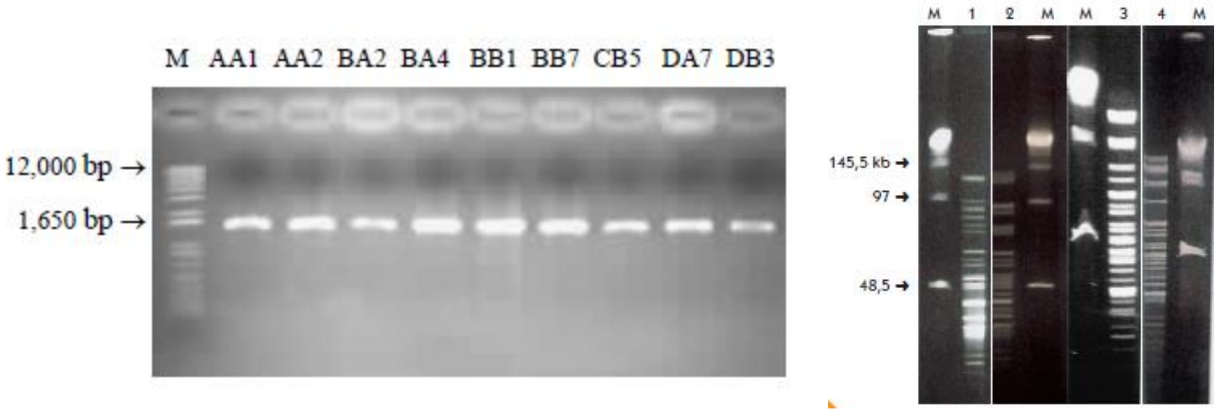
ตารางที่ 6 ผลการทดสอบของชุดทดสอบ API 50CH ของการทดสอบทางชีวเคมี carbohydrate assimilation และ fermentation patterns เพื่อศึกษาชนิดของ strains

Isolated malolactic bacteria	% similarity	Identification
AA1	75.4%	*Lactococcus lactis ssp. lactics*
AA2	75.4%	*Lactococcus lactis ssp. Lactics*
BA2	75.4%	*Lactococcus lactis ssp. Lactics*
BA4	75.4%	*Lactococcus lactis ssp. Lactics*
BB1	75.4%	*Lactococcus lactis ssp. Lactics*
BB7	75.4%	*Lactococcus lactis ssp. Lactics*
CB5	99.9%	*Leuconostoc mesenteroides*
DA7	88.3%	*Lactobacillus plantalrum*
DB3	88.3%	*Lactobacilus plantalrum*



ภาพที่ 12 ภาพถ่ายของจุลินทรีย์ strains CB5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS โดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

ผลการศึกษาทางพันธุศาสตร์ โดยเริ่มศึกษาโดยการใช้วิเคราะห์ 16s rDNA โดยใช้กระบวนการ PCR amplification โดยใช้ primer POmod(forward) และ PC5 (reverse) เป็นตัวทดสอบความเหมือนของ strains ที่ได้คัดเลือกมาโดยชิ้นส่วน DNA ที่ตัดมาได้จะมาขนาดประมาณ +/- 1.650 base pairs



ภาพที่ 13 ภาพของ Agarose gel หลังการทำ electrophoresis ของ 16S rDNA-PCR ของจุลินทรีย์ทั้ง 9 ชนิด

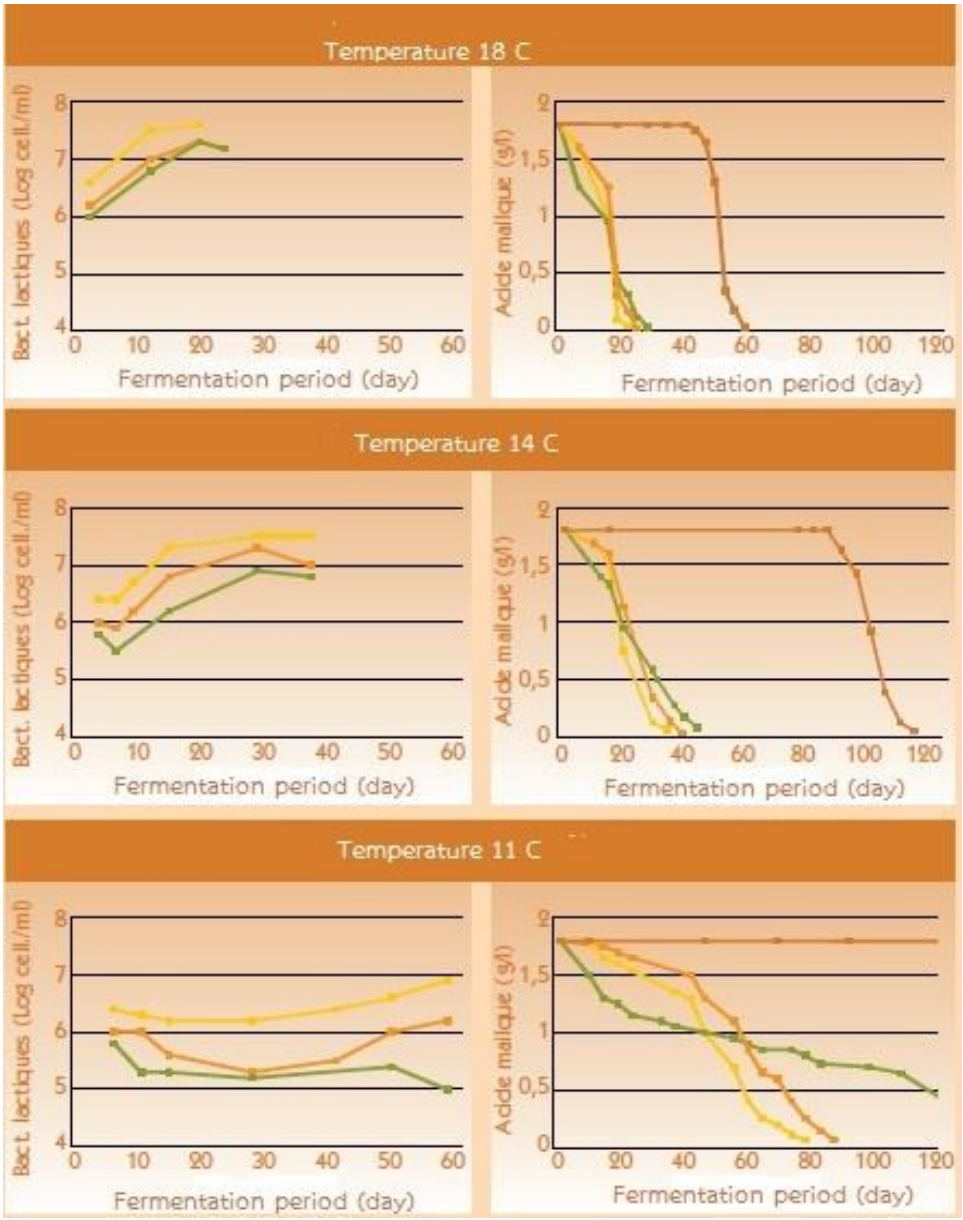
3. ผลการพัฒนาการหมักกรดแลคติกในเขตร้อนและปัจจัยส่งเสริมการหมักเพื่อการพัฒนากลิ่นสีในไวน์และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

ปัจจัยที่ส่งผลต่อกระบวนการหมักกรดแลคติดที่ทำให้การผลิตไวน์มีคุณภาพได้แก่ปริมาณแอลกอฮอล์ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิและปริมาณสารซัลเฟอร์ไดออกไซด์ โดยการหมักกรดแลคติกจำเป็นต้องมีปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำไม่สูงกว่า 12% (v/v) มีค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH) สูงกว่า 3.0 อุณหภูมิระหว่าง 10 – 20 องศาเซลเซียสและปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ไม่สูงกว่า 50 ppm

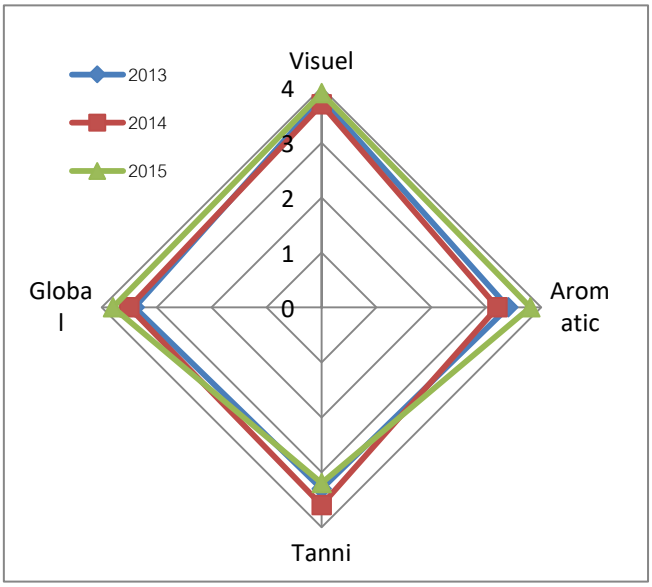
เทคนิคที่ส่งเสริมต่อการหมักกรดแลคติกได้แก่ การบ่มแบบคาร์บอนนิคก่อนหมัก (carbo-maceration) หรือกระบวนการทำการบ่มในเมล็ด (pellicle maceration) โดยเฉพาะในองุ่นขาว นอกจากนี้คือการเลือกใช้ยีสต์ที่ไม่ทำให้ปริมาณกรดทั้งหมดลดลงและไม่ทำการลดปริมาณกรดในน้ำองุ่นและในไวน์ (deacidification) และปัจจัยที่ทำให้เกิดปัญหาในการหมักกรดแลคติกได้แก่การใช้ยีสต์สายพันธ์ที่มีการผลิตซัลเฟอร์ไดออกไซด์ระหว่างการหมัก การเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ระหว่างการหมัก การบ่มในอุณหภูมิเย็นจัดและการเพิ่มกรดระหว่างการหมักกรดแลคติก

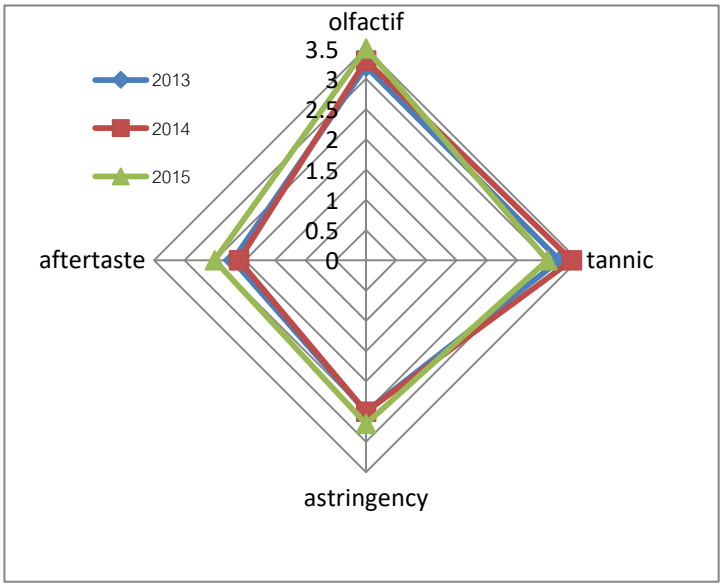
ผลศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักกรดแลคติกโดยทำการทดสอบในองุ่นสายพันธ์ Syrah โดยใช้แบคทีเรียสายพันธ์ที่คัดเลือกไว้ CB5, CB35 และสายพันธ์ Expertise S (สายพันธ์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่จากการทำ genetic mutation ระหว่างสองสายพันธ์แรก) ติดตามการเจริญเติบโตและจำนวนประชากรของแบคทีเรียและปริมาณการใช้กรดมาลิคที่อุณหภูมิ 9 จุดตั้งแต่ 11 - 19 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 14 องศาเซลเซียสมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียระหว่างการหมักกรดแลคติคในระดับดีมากโดยแบคทีเรียมีจำนวนประชาการกว่า 10^6 และมีการหมักกรดมาลิกที่สม่ำเสมอโดยเฉพาะใน 40 วันแรกของการหมักดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักกรดแลคติกจึงต้องสูงกว่า 14 องศาเซลเซียสโดยใช้แบคทีเรียแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการหมัก

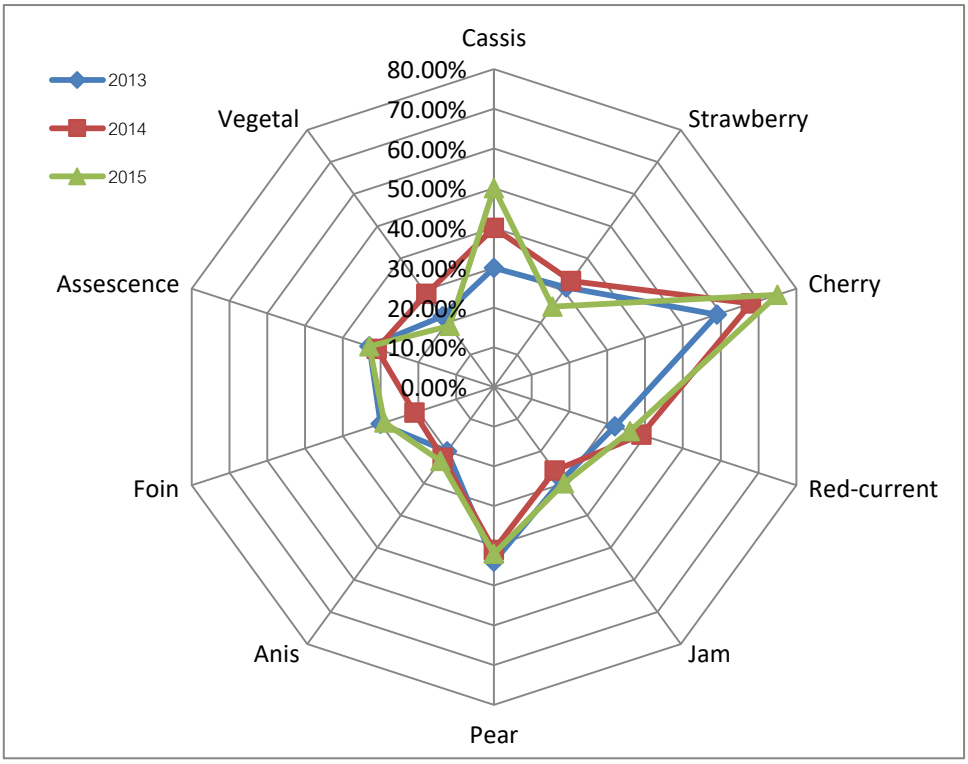
ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของไวน์จากสามปีที่ทำการทดลองปี 2556, 2557 และปี 2558 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความเข้มข้น คุณภาพแต่มีความแตกต่างกันทางกลิ่นที่เกิดขึ้นซึ่งในปี 2558 ที่ถือเป็นปีที่แห้งมีปริมาณน้ำฝนเพียงไม่เกิน 700 มิลลิเมตรคุณภาพของกลิ่นผลไม้และเบอร์รี่จะต่ำกว่าปีที่ฝนตกมากกว่าในอีกสองปีแต่คุณภาพของ tannin และความเข้มข้นของรสชาติปี 2558 จะดีกว่ามากโดยเฉพาะ Global taste



ภาพที่ 14 ผลของอุณหภูมิต่อการหมักกรดแลคติกในการผลิตไวน์องุ่น โดยสายพันธ์แบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ CB5, CB35 และสายพันธ์ Expertise S







ภาพที่ 15 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสต่อการหมักกรดแลคติกในการผลิตไวน์องุ่น โดยสายพันธ์แบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ CB5, CB35 และสายพันธ์ Expertise S

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

องุ่นสายพันธ์เศรษฐกิจทั้งสิ้น 4 สายพันธ์ที่ประเทศไทยมีศักยภาพสูงในอุตสาหกรรมไวน์ได้แก่ องุ่นแดงชีราจ องุ่นขาวโคลัมบาท องุ่นแดงป็อกดำและอุง่นขาวไวท์มะละกา มีคุณภาพและประสิทธิภาพการหมักไวน์ขององุ่นแต่ละสายพันธ์ที่ผลิตในประเทศไทยที่แตกต่างกัน โดยประสิทธิภาพการผลิต volatile phenol ของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการหมักกรดแลคติกและ *Oenococcus oeni* ถือเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ผลิตผลิตภัณฑ์ที่ไม่พึงประสงค์ระหว่างการหมัก อุณหภูมิที่สูงกว่า 30 องศาเซลเซียสจะส่งผลต่อการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียและปริมาณแอลกอฮอล์ในไวน์ที่ไม่เกิน15% ถือเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติก และการเจริญเติบโตของเซลล์จะมีการเพิ่มขึ้นรวดเร็วในสัปดาห์แรกและค่อยๆหยุดนิ่งจนลดลงหลังการหมักเสร็จสิ้นซึ่งเหตุผลสำคัญมาจากจุลินทรีย์จะปล่อยน้ำตาลและกรดสำคัญเพื่อดำรงชีวิตอยู่ภายใต้ปัจจัยที่ไม่เหมาะสมโดยสังเกตุได้จากค่า pH ที่ลดลงอย่างรวดเร็วในระหว่างการหมักและค่อยๆเพิ่มขึ้นเมื่อการหมักเสร็จสิ้น ค่าปริมาณแอลกอฮอล์มีค่าแตกต่างกันเล็กน้อยในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการหมักซึ่งยืนยันได้ว่าจะไม่มีการผลิตแอลกอฮอล์ แบคทีเรียแลคติก strain CB5 ที่คัดเลือกมาและCH35 จะมีการใช้กรด L-malic ไปปริมาณ 0.671 และ 0.572 g/l ใกล้เคียงกันซึ่งจะทำให้กรด L-lactic มีค่าสูงขึ้นจากการหมักโดย CB5 จะมีอัตราการผลิตกรด L-lactic ที่ 0.537 g/l และ CH35 จะมีอัตราการผลิตที่ 0.253 g/l สำหรับปริมาณ D-glucose และ D-fructose จะมีปริมาณที่ลดลงอย่างชัดเจน โดยไม่มีผลความแตกต่างทางการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่แตกต่างกันระหว่างจุลินทรีย์ชนิกใหม่และจุลินทรีย์ทางการค้า โดยการทดสอบทางพันธุศาสตร์ยังชี้ชัดว่าจุลินทรีย์ *Oenococcus oeni* หรือ *Leuconostoc oenos* เป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการหมักกรดแลคติกดีที่สุดเพียงชนิดเดียว

เอกสารอ้างอิง

Blateyron, L. Delteil, D. , 2005 Etude pratique de quelques facteurs technologiques pouvant influer sur le deroulement de la fermentation malolactique, ICV

Delteil D., 2000 La gestion pratique de la fermentation malolactique des vins rouges mediteranees. Revues des Oenologues, No.95, 23-26

Feuillat M., Guilloux-Benatier M., Charpentier C. Role des macromolecules d'origine levurienne dans les vins : Incidence sur la fermentescibilite malolactique. Interactions avec les aromes.

Guilloux-Benatier M., Son H.S., Bouhier S., Feuilat M., 1993. Activites enzymatiques . glycosidase et peptidases chez chez *Leuconostoc oenos* au cours de la croissance bacterienne. Influence des macromolecules de levure. Vitis. 32, 51-57

Nielsen J.C., Pilatte E., Prahl C., 1996 Maitrise de la fermentation malolactique par l'ensemencement direct du vin. Revue Francais d'oenologie, No. 160

Pilatte E., 1998 Maitrise de la fermentation malolactique. Mieux gerer et anticiper. Revue des oenologues. No.88, 21-22

Ribereau-Gayon J., Peynaud E., Riberau-Gayon P., Sudrau P.,1975, in Traite d'oenologie. Sciences et Techniques du Vin, Tome II, Denod.

Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B.,Lonvaud A., 2004, Traite d'oenologie : Tome I Microbiologie du vin, Vinifications, 5e , Dunod

Rosi I., Gheri A. et Ferrari S., 1998 Effet des levures produisant des polysaccharides parietaux sur certaines caracteristiques des vins rouges pendant la fermentation. Revue Francais d'oenologie, no.172, 24-26