เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2560; 15(2): 51-62. DOI: 10.14456/cmvj.2017.5

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร

Chiang Mai Veterinary Journal

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; www.vet.cmu.ac.th/cmvj

บทความปริทัศน์

กลยุทธ์การลดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมนด้วยจุลินทรีย์

วาสนา ศิริแสน

หน่วยวิจัยอาหารสัตว์คุณภาพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ต.ตลาด อ.เมือง จ.มหาสารคาม 44000

บทคัดย่อ การเกิดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมนส่งผลเสียต่อการให้ผลผลิต สุขภาพของสัตว์ และความสูญเสียทางเศรษฐกิจ ดังนั้นบทความนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมและนำเสนอผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการลดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมนด้วยจุลินทรีย์ เพื่อเป็นการลดการใช้สารเคมีและสารปฏิชีวนะ โดยการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกเสริมลงในอาหารโดยตรง (Direct fed microbial, DFM) จึงเป็นแนวทางที่มีการยอมรับและใช้กันอย่างกว้างในปัจจุบัน พบว่าโปรไบโอติกในกลุ่มแบคทีเรียที่สำคัญได้แก่ *Megasphera elsdenii, Propionibacteriam* และ *Prevotella* เหมาะสมต่อการนำใช้กรดแลคติกเพื่อผลิตเป็นกรดโพรพิโอนิก และในกลุ่มยีสต์ที่มีคุณลักษณะที่ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ คือทนอยู่ได้ในสภาวะที่เป็นกรดและมีบทบาทลดสภาวะกรดได้ทั้งโดยทางอ้อมและโดยทางตรง โดยในทางอ้อมพบว่ายีสต์ชนิด *S. cerevisiae* ช่วยส่งเสริมการทำงานของแบคทีเรีย *M. elsdenii* และ *S. ruminantium* ในการนำใช้กรดแลคติก และยังช่วยส่งเสริมการทำงานของโปรโตซัวชนิดซีเลีย คือ Entodiniomorphs ในการกลืนกินเม็ดแป้งจึงช่วยลดสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรีย *Streptococcus bovis* และบทบาทโดยตรงของยีสต์ต่อการลดกรดโดยเฉพาะยีสต์ *Candida rugosa* ที่คัดแยกได้จากกระเพาะรูเมนของโคนมที่ได้รับอาหารข้นระดับสูงมีพบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีกรดแลคติกเป็นแหล่งพลังงานเพียงอย่างเดียว ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดหรือบรรเทาการเกิดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมนของสัตว์ลงได้ ทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะ

คำสำคัญ สภาวะกรดในกระเพาะรูเมน, แบคทีเรียโปรไบโอติก, ยีสต์โปรไบติก

* **ผู้รับผิดชอบบทความ** วาสนา ศิริแสน หน่วยวิจัยอาหารสัตว์คุณภาพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ต.ตลาด อ.เมือง จ.มหาสารคาม 44000
โทรศัพท์ : 0-4374-2823 ต่อ 6182 โทรสาร : 0-4374-2823 อีเมล์: Siri.vatsana@gmail.com

ข้อมูลบทความ *วันที่ได้รับบทความ 27 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 11 เมษายน พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 21 เมษายน พ.ศ.2560*

Review article

Strategies to reduce ruminal acidosis by using microorganism

Vatsana Sirisan

Animal Feed Quality Research Unit, Faculty of Veterinary Science, Mahasarakham University, Talat Sub-District, Mueang, Maha Sarakham 44000

Abstract Ruminal acidosis has negative affect on animal production, animal health and economic loss. Therefore, the objective of this article was to review the researches about the use of microbial probiotics to reduce ruminal acidosis. The direct fed microbial are widely used for substitution antibiotic treatment. The bacteria direct fed are composted of *Megasphera elsdenii, Propionibacteriam* and *Prevotella*. All of them are used lactic acid to produce propionic acid. Moreover, yeast has more tolerance acid load than other micro-organism. It has reduced lactic acid load in terms of direct and indirect method. The indirect method; *Saccharomyces cerevisiae* was promoted the *M. elsdenii* and *S. ruminantium* to uptake lactic acid. In addition it was activated the Entodiniomorphs protozoal to engulf starch granules; hence reduce the substrate to produce lactic acid by *Streptococcus bovis*. The mode of action of yeast to reduce lactic acid loads in terms of non-direct was examined the growth rate of yeast in lactic. Especially, the yeast *Candida rugose* was isolated form ruminal fluid of dairy cow fed high concentrate diet has high specific growth rate for lactic acid as sole carbon source. Therefore, microbial probotic is the alternative method to relieve ruminal lactic acidosis for substitution antibiotic treatment.

Keywords; ruminal acidosis, bacteria probiotic, yeast probiotic

* **Corresponding author**: Vatsana Sirisan, Animal Feed Quality Research Unit, Faculty of Veterinary Science, Mahasarakham University, Talat Sub-District, *Mueang, Maha Sarakham 44000* Tel : 0-4374-2823 Ext. **6182** Fax : 0-4374-2823 E-mail: Siri.vatsana@gmail.com

Article history; *received manuscript: 11 March 2017, accepted manuscript: 11 April 2017, published online: 21 April 2017*

บทนำ

การให้อาหารคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยสลายง่ายในกระเพาะรูเมน โดยเฉพาะแป้งและน้ำตาลสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องจะส่งผลดีต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการให้ผลผลิต อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้จะส่งเสริมให้เกิดการหมักย่อยได้อย่างรวดเร็วโดยจุลินทรีย์กลุ่มย่อยแป้ง (amylolytic bacteria) โดยเฉพาะ *Streptococcus bovis* ทำให้เพิ่มความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ (Volatile fatty acid; VFA) และกรดแลคติก (p*Ka* 3.9) ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่มีความแรงมากกว่า VFA (p*Ka* 4.8–4.9) จึงส่งผลต่อการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างภายในกระเพาะรูเมน ดังนั้นการสะสมกรดแลคติกจึงเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดสภาวะกรด (Chaucheyras-Durand et al., 2008) ที่ส่งผลกระทบต่อการกินได้ การให้ผลผลิตน้ำนม การย่อยได้ และการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ และเป็นสาเหตุของการเกิดโรคกีบอักเสบ (laminitis) ผนังกระเพาะรูเมนอักเสบ (rumenitis) และตับอักเสบ (hepatitis) (Plaizier et al., 2008; Enemark, 2009) ดังนั้นจากการศึกษาที่ผ่านมาจึงได้มีการนำกลยุทธ์ต่าง ๆ มาใช้แก้ไขปัญหาการเกิดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมน ต่างประเทศนิยมใช้สารปฏิชีวนะแต่ด้วยความตระหนักถึงผลตกค้างและความปลอดภัยต่อผู้บริโภค จึงยกเลิกการใช้สารเคมีหรือปฏิชีวนะแล้วหันมาใช้โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate; $NaHCO_3$) แต่ทำให้สัตว์ดื่มน้ำมากขึ้น ส่งผลต่อการเพิ่มอัตราการเจือจาง (dilution rate) สิ่งย่อย (digesta) เพิ่มอัตราการเคลื่อนย้าย (flow rate) คาร์โบไฮเดรตจากกระเพาะรูเมน ทำให้ประสิทธิภาพการหมักและผลผลิตลดลง (Russel and Jo May Chow, 1993) ปัจจุบันนี้นักวิจัยด้านโภชนศาสตร์สัตว์จึงหันมาให้ความสนใจต่อแนวทางการสร้างสมดุลในกระเพาะรูเมน ซึ่งจะช่วยเพิ่มขีดความสามารถของโคในการใช้อาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ แนวทางหนึ่งที่เป็นไปได้มากคือการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกใส่ลงไปในอาหารโคโดยตรง (direct fed microbial; DFM) เพื่อช่วยจัดสัดส่วนของจุลินทรีย์ที่เราต้องการให้เพิ่มขึ้นในกระเพาะรูเมน หรือการกระตุ้นให้จุลินทรีย์ภายในกระเพาะรูเมนมีความสามารถใช้แหล่งอาหารจากกรดอินทรีย์ (organic acid) โดยเฉพาะกรดแลคติกที่เกิดในกระเพาะรูเมนได้ดีขึ้น (Martin,1998) มีรายงานพบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม DFM ที่ใช้ช่วยลดการเกิดสภาวะกรดในสัตว์เคี้ยวเอื้องได้แก่แบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์ โดยแบคทีเรีย *Megasphera elsdenii* สามารถนำใช้กรดแลคติกได้ถึงร้อยละ 60 ถึง 80 ของกรดแลคติกที่ผลิตขึ้นในกระพาะรูเมนของโคนม (Counotte et al., 1981) เชื้อราในสายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของ *M. elsdenii* และ *Selenomonas ruminantium* ส่งผลต่อการใช้กรดแลคติกในกระเพาะรูเมน ลดความรุนแรงของการเกิดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมนได้ (Meissner et al., 2010) การศึกษาของ Fonty and Chaucheyras-Durand (2006) นอกกาย (*in vitro*) พบว่ายีสต์ทางการค้าคือ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถแย่งใช้น้ำตาลกับ *S. bovis* ช่วยลดกระบวนการหมักน้ำตาลของแบคทีเรีย ลดการเกิดกรดแลคติก รวมทั้งยีสต์ยังเป็นแหล่งของสารส่งเสริมการเจริญเติบโต (growth factor) ที่ช่วยแบคทีเรียที่ใช้กรดแลคติกโดยเฉพาะ *M. elsdenii* และ *S. ruminantium* เจริญเติบโตและเพิ่มการใช้กรดแลคติกมากขึ้น ทำให้ลดการเกิดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมนลง (Rossi et al., 2004) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของบทความนี้เพื่อรวบรวมและสังเคราะห์ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติต่อการลดกรดแลคติก เพื่อเป้าหมายในการลดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมน ช่วยรักษานิเวศวิทยาในกระเพาะรูเมนให้สมดุลต่อการทำหน้าที่ของจุลินทรีย์ อันจะส่งผลดีต่อสุขภาพสัตว์ การให้ผลผลิต และลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจที่จะเกิดขึ้นได้

สภาวะกรดในกระเพาะรูเมน

สภาวะกรดในกระเพาะรูเมนคือ การเปลี่ยนแปลงด้านชีวเคมีและสรีระวิทยาของกระเพาะรูเมน ซึ่งมีสาเหตุมาจากการผลิตกรดอินทรีย์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในกระเพาะรูเมน ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะรูเมนลดลง (Hernandez et al., 2014) โดยเฉพาะเมื่อมีการให้อาหารคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่าย (rapidly fermentable carbohydrates; RFC) ในกระเพาะรูเมนในปริมาณมาก ทำให้แบคทีเรียในกลุ่มย่อยแป้งและกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติก (*S. bovis*) เจริญเติบโตได้เร็วกว่ากลุ่มที่ใช้กรดแลคติก (*M. elsdenii*, *S. ruminantium*) โดยเฉพาะเมื่อความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะรูเมนลดลงอย่างต่อเนื่อง แบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacillus ซึ่งมีความทนทานต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ต่ำได้ จะเจริญเติบโตแทน *S. bovis* ทำให้เกิดการสะสมกรดแลคติกและ VFA ในกระเพาะรูเมนมากขึ้น จนในที่สุดส่งผลให้เกิดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมน (Nagaraja and Lechtenberg, 2007) แต่ในสภาวะปกติกรดที่ผลิตขึ้นในกระเพาะรูเมนประมาณร้อยละ 30 ถึง 50 จะถูกทำให้เป็นกลาง (neutralize) โดยน้ำลายหรือโดยการจับกับแอมโมเนียที่เกิดจากการแตกตัวของยูเรีย และเป็นส่วนน้อยที่กรดจะไหลผ่านไปยังส่วนอื่นของระบบทางเดินอาหาร (Gonzaleza et al., 2012) แต่จะดูดซึมผ่านผนังกระเพาะรูเมน จึงเป็นอีกหนึ่งเหตุผลสำคัญเมื่อมีสภาวะกรดเกิดขึ้นในกระเพาะรูเมนจึงไปลดความสามารถในการดูดซึมของกระเพาะรูเมน ซึ่งทำให้ไม่สามารถรักษาค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะรูเมนให้อยู่ในระดับที่ปกติได้ (Hernández et al., 2014) ก่อให้เกิดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมน ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือสภาวะกรดในกระเพาะรูเมนแบบเฉียบพลันและแบบกึ่งเฉียบพลัน โดยสภาวะกรดแบบเฉียบพลัน (acute ruminal acidosis; ARA) เป็นลักษณะของค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะรูเมนที่ไม่สามารถปรับคืนสภาวะปกติได้หลังจากที่มีการสะสมกรดแลคติกเกิดขึ้น โดยค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะรูเมนจะลดลงอย่างรุนแรง (ต่ำกว่า 4.8) และต่อเนื่องโดยใช้เวลามากกว่า 24 ชั่วโมง และส่วนสภาวะกรดในกระเพาะรูเมนแบบกึ่งเฉียบพลัน (sub-acute ruminal acidosis, SARA) คือลักษณะการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะรูเมนในระดับที่ต่ำกว่า 5.6 ถึง 5.8 เป็นเวลานานมากกว่า 3 ถึง 6 ชั่วโมงต่อวัน (Nikkhah, 2015)

แนวทางการลดการเกิดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมนด้วยจุลินทรีย์โปรไบโอติก

มีสารเสริมในอาหาร (feed additive) หลายชนิดนิยมเสริมลงในอาหารสัตว์ เพื่อป้องกันหรือลดการเกิดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมนของสัตว์ ได้แก่ สารปฏิชีวนะและสารที่เป็นบัฟเฟอร์ (ที่นิยมคือ โซเดียมไบคาร์บอเนต) จากรายงานพบว่าสารเหล่านี้มีประสิทธิภาพต่อการลดสภาวะกรดได้เฉพาะในช่วงระยะเวลาสั้นเท่านั้น (Wiryawan,1994) ปัจจุบันนี้นักวิจัยด้านจุลินทรีย์และด้านโภชนศาสตร์สัตว์ จึงหันมาให้ความสนใจต่อแนวทางการสร้างสมดุลในกระเพาะรูเมน ด้วยการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกใส่ลงไปในอาหารโดยตรง ซึ่งจากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม DFM ที่นิยมใช้ในสัตว์เคี้ยวเอื้องที่เพื่อลดการสะสมกรดแลคติกและลดการเกิดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมนได้ คือ แบคทีเรีย (bacteria) เชื้อรา (fungi) และยีสต์ (yeast)

แบคทีเรีย

แบคทีเรียหลายชนิดที่อยู่ในกระเพาะรูเมนมีรายงานว่าใช้กรดแลคติกเพื่อผลิตสารที่สำคัญในกระเพาะรูเมน โดยเฉพาะกรดโพรพิโอนิก พบว่า *M. elsdenii* เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติพิเศษในการลดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมนที่สำคัญ โดยสามารถนำใช้กรดแลคติกได้ถึงร้อยละ 60 ถึง 80 ของกรดแลคติกที่ผลิตขึ้นในกระพาะรูเมนของโคนม (Counotte et

al.,1981) รวมทั้งมีจำนวนมากถึงร้อยละ 21 ของจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กรดแลคติกได้ในกระเพาะรูเมนของแกะที่ได้รับอาหารข้นระดับสูง (Mackie et al., 1984) โดยพบว่า *M. elsdenii* เป็นจุลินทรีย์ชนิดหลักที่สำคัญต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกในกระเพาะรูเมนโดยอาศัยกรดแลคติกผ่านวิถีอาคริเรท (acryrate pathway) แต่ไม่สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้จากกลูโคส ซึ่งต่างจากจุลินทรีย์โดยส่วนใหญ่ในกระเพาะรูเมนที่สามารถผลิตกรด โพรพิโอนิกได้จากกลูโคสผ่านวิถีซักซิเนท (succinate pathway) ได้แก่ *Selenomonas ruminantium*, *Succinimonas amylolytica* และ *P. acne* (Asanuma and Hino, 2001) จากการศึกษาของ Henning et al. (2010) แสดงให้เห็นว่า *M. elsdenii* ที่ระดับ $5x10^5$ CFU/ml ในอาหารพลังงานสูง (high energy concentration substrate) ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 12 แต่ปริมาณความเข้มข้นของกรดแลคติกและช่วงเวลาที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง มีค่าต่ำกว่า 6 และ 5 เพิ่มขึ้นในกลุ่มควบคุมเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เสริมแบคทีเรีย Long และคณะ (2016) ศึกษาการเสริมแบคทีเรีย *M. elsdenii* H6F32 ที่ตัดต่อพันธุกรรมเปรียบเทียบกับ *M. elsdenii* H6 สายพันธุ์ปกติในแพะที่ได้รับอาหารที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกรดในกระเพาะรูเมน พบว่ากลุ่มที่เสริม *M. elsdenii* ทำให้ความเข้มข้นของกรดแลคติกลดลงและค่าความเป็นกรด-ด่าง ในกระเพาะรูเมนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เสริมเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อที่ตัดต่อพันธุกรรมจะมีประสิทธิภาพในการลดความเข้มข้นของกรดแลคติคได้ดีกว่าเชื้อสายพันธุ์ปกติ นอกจากนี้ *M. elsdenii* ยังสามารถ metabolize กรดแลคติกเป็นผลผลิตหลักคือ กรดอะซิติกและบิวทิริก เพื่อให้ได้พลังงานในรูป ATP แต่จะมีการผลิตไฮโดรเจน (H_2) เกิดขึ้นในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เพื่อเป็นการกำจัดอิเล็กตรอน (reducing equivalent) ดังนั้นการนำใช้กรดแลคติกโดยเชื้อ *M. elsdenii* จึงส่งเสริมให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนซึ่งมีความสำคัญต่อ methanogenic bacteria ใช้ในการผลิตมีเทน (Asanuma and Hino, 2005) ดังนั้นจึงควรให้ความสำคัญในการลดกรดแลคติกด้วยจุลินทรีย์ชนิดอื่นมากกว่า *M. elsdenii* เพื่อลดการผลิตสารที่จำเป็นต่อการสร้างมีเทน

S. ruminantium เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่พบได้ทั่วไปในกระเพาะรูเมนของสัตว์ โดยมีจำนวนมากถึงร้อยละ 22 ถึง 51 ของจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดในกระเพาะรูเมน ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ภายใต้สภาวะของสารอาหารที่หลากหลาย (Nisbet and Martin, 1994) โดยสามารถใช้กรดแลคติกเพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก และกรดซัคซินิก โดยมีการผลิตไฮโดรเจนได้ต่ำกว่า *M. elsdenii* (Asanuma and Hino, 2004) จากข้อมูลของ Asanuma et al. (2002) แสดงให้เห็นว่า *S. ruminantium* มีจำนวน 10^7 เซลล์/มล. ของของเหลวในกระเพาะรูเมนของแกะ และพบว่า *S. ruminantium* ssp. *Lacticlytica* มีจำนวนน้อยกว่าร้อยละ 1 ของจำนวน *S. ruminantium* ทั้งหมด จากการศึกษาของ Nisbet and Martin (1994) ในการเสริม L-malate ที่ระดับ 10 มิลลิโมล ต่อการนำใช้กรดแลคติกของเชื้อ *S. ruminantium* HD4 พบว่าการเสริม L-malate มีผลทำให้การนำใช้กรดแลคติกของเชื้อเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เสริม (45 และ 30 วินาที ตามลำดับ) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Nisbet and Martin (1993) พบว่า *S. ruminantium* HD4 สามารถเจริญได้ในอาหาร L-lactate แต่ไม่สามารถเจริญได้ใน D-lactate แต่พบว่า D-lactate สามารถเปลี่ยนเป็น L-lactate ผ่านเอนไซม์ racemase และทั้งสองไอโซเมอร์ส่งเสริมการเจริญของ *S. ruminantium* HD4 ได้เมื่อมี fumarate เสริมในอาหาร ดังนั้นการเสริมกรดอินทรีย์ในอาหารสัตว์มีผลต่อความสามารถของ *S. ruminantium* ในการใช้กรดแลคติกได้

Propionibacteria เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีการนำใช้กรดแลคติกเพื่อเปลี่ยนเป็นกรดโพรพิโอนิก (propionic acid producing bacteria; PAB) เป็นหลัก จึงสามารถช่วยลดการเกิดสภาวะกรดและเพิ่ม

ขบวนการสังเคราะห์กลูโคส (gluconeogenesis) จากรายงานของ Weiss et al. (2008) พบว่าการเสริม *Propionibacterium* ที่ระดับ 10^9 โคโลนี/มล./วัน ในอาหารโครุ่น และที่ระดับ 6x 10^{11} โคโลนี/มล./วัน ในอาหารโคให้นมพบว่าสามารถเพิ่มสัดส่วนกรดโพรพิโอนิคในกระเพาะรูเมนของโคได้ สอดคล้องกับ De Ondarz and Seymour (2008) พบว่า *P. freudenreichii* สายพันธุ์ P169 ที่ระดับ 6x10^{10} โคโลนี/มล./วัน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลผลิตในโคนมที่ให้ผลผลิตน้ำนมสูง อย่างไรก็ตามรายงานการศึกษาส่วนใหญ่แสดงให้เห็นว่าการเสริม *Propionibacteria* ไม่ให้ผลตอบสนองที่ชัดเจนต่อการลดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมนของสัตว์ แต่จะให้ผลที่เด่นชัดต่อการให้ผลผลิตของสัตว์ ทั้งนี้เนื่องจาก *Propionibacteria* เจริญเติบโตได้ช้าในสภาวะกรด และไม่ทนต่อสภาวะกรดแลคติกที่รุนแรงในกระเพาะรูเมนได้ (Kung, 2001)

Prevotella เป็นแบคทีเรียที่พบในกระเพาะรูเมนของสัตว์ โดยจัดว่าเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้จากกรดแลคติกโดยผ่าน arcylate pathway เช่นเดียวกับ *M. elsdenii* (Asanuma and Hino, 2001) จากรายงานการศึกษาพบว่า *P. bryantii* สายพันธุ์ 25A ที่ได้จากการคัดแยกจากกระเพาะรูเมนของโคนมที่ได้รับอาหารข้นจะเจริญเติบโตได้เร็วในอาหารที่มีแป้ง มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.66 ต่อชั่วโมง และใช้เวลาในการแบ่งเซลล์ 63 นาที และเมื่อเสริมในอาหารแกะที่ระดับ 10^{11} โคโลนี/มล. และในอาหารโคนมที่ระดับ 10^{12} โคโลนี/มล. พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ในกระเพาะรูเมนมีค่าเพิ่มขึ้น และความเข้มข้นของกรดแลคติกในกระเพาะรูเมนมีค่าลดลงในชั่วโมงที่ 4 หลังจากให้อาหาร เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม (Rodriquez, 2003) การเสริมเชื้อ *P. bryanti* มีชีวิตที่ระดับ 2-29x10^{10} เซลล์/ตัว/วัน พบว่าความเข้มข้นของกรดแลคติกที่วัดหลังจากให้อาหารในกลุ่มที่ได้รับการเสริมมีค่าต่ำกว่า ($P<0.05$) กลุ่มควบคุม (29.2 และ 66.2 มก./100 มล. ตามลำดับ) (Chiquette et al.,2008) นอกจากนี้พบว่าปริมาณ VFA รวม มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับการเสริมเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ในกระเพาะรูเมน

เชื้อรา

เชื้อราที่นิยมเสริมในอาหารสัตว์ที่มีผลต่อการลดการสะสมกรดแลคติกในกระเพาะรูเมน ที่มีการรายงานเอาไว้โดยส่วนใหญ่จะเป็น *Aspergillus oryzae* ที่อยู่ในรูปสกัด (*A. oryzae* fermentation extract) รู้จักกันในชื่อทางการค้าคือ Amaferm (AMF; Biozyme Inc., St. Joseph, MO) ที่มีบทบาทเป็น พรีไบโอติก (prebiotic) โดยส่งเสริมให้เพิ่มการนำใช้กรดแลคติกโดย *M. elsdenii* และ *S. ruminantium* พบว่า Amaferm เป็นแหล่งของกรดอะมิโน และวิตามินบีที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *M.elsdenii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดแลคติกเป็นองค์ประกอบ (Zerby et al.,2011) นอกจากนี้ Nisbet and Martin (1990) ได้ศึกษาผลการเสริม Amaferm, L-aspartate, fumarate และ L-malate ต่อการเจริญของเชื้อ *S. ruminantium* ในอาหารที่มีกรดแลคติกเป็นองค์ประกอบ 2 กรัม/ลิตร พบว่าที่ระดับ 10 มิลลิโมล ของ L-aspartate, fumarate, และ L-malate สามารถกระตุ้นการเจริญของเชื้อได้ 10 เท่า แต่ Amaferm ที่ระดับ 10 กรัม/ลิตร สามารถกระตุ้นการเจริญของเชื้อได้มากกว่า 12 เท่า ดังนั้นเชื้อราที่เสริมในอาหารสัตว์ในรูปสกัด หรือในด้านของการเป็น prebiotic จึงช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียต่อการใช้กรดแลคติกได้ดีกว่ากรดอินทรีย์

เชื้อยีสต์

นอกจากนี้พบว่ายีสต์ คือรากลุ่มหนึ่งที่มีการดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยว ซึ่งได้มีการยอมรับและใช้กันอย่างกว้างขวางในการเสริมในอาหารสัตว์โดยตรง หรือที่เรียกว่า Yeast direct fed โดยวัตถุประสงค์ของการใช้เพื่อป้องกันการเกิดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมน

รักษาสมดุลการหมักย่อยในกระเพาะรูเมนให้คงที่ โดยเฉพาะในสัตว์ที่ได้รับอาหารข้นที่มีพลังงานสูง จากการศึกษาของ Desnoyers et al. (2009) ซึ่งใช้วิธีการทางสถิติแบบการการวิเคราะห์อภิมาน (meta-analysis) ผลงานวิจัยด้านการเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง พบว่าค่าค่าความเป็นกรด-ด่างและความเข้มข้นของ VFA ในกระเพาะรูเมนเพิ่มขึ้น และความเข้มข้นของกรดแลคติกในกระเพาะรูเมนมีแนวโน้มลดลง แต่ไม่มีผลต่อสัดส่วนอะซิเตทต่อโพรพิโอเนท (C2:C3 ratio) อย่างไรก็ตามจากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาเป็นเพียงการนำเสนอบทบาทของยีสต์ต่อการลดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมนโดยทางอ้อม (indirect) ซึ่งการศึกษาบทบาทหรือกลไกของยีสต์ต่อการลดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมนโดยตรง (direct) ยังคงมีข้อมูลค่อนข้างจำกัด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาค้นคว้าวิจัยให้ทราบถึงบทบาทของยีสต์ต่อการลดสภาวะกรดทั้งในทางตรงและในทางอ้อม ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

บทบาทของยีสต์ต่อการลดสภาวะกรดโดยทางอ้อม

บทบาทของยีสต์ต่อการลดสภาวะกรดโดยทางอ้อมนั้น จะกล่าวถึงยีสต์ที่ไม่ได้มีบทบาทโดยตรงต่อการนำใช้กรดแลคติก เพียงแต่ทำหน้าที่กระตุ้นหรือส่งเสริมให้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติพิเศษต่อการนำใช้กรดแลคติก สามารถทำหน้าที่ได้ดีขึ้นจนในที่สุดส่งผลต่อการลดสภาวะกรดที่เกิดขึ้นได้ ซึ่งสามารถจำแนกออกได้เป็น 3 คือ 1) บทบาทด้านการส่งเสริมการทำงานของแบคทีเรียใช้กรดแลคติก 2) บทบาทในด้านการเพิ่มจำนวนประชากรจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน และ 3) บทบาทของยีสต์ต่อการลดสภาวะกรดโดยตรง

บทบาทด้านการส่งเสริมการทำงานของแบคทีเรียใช้กรดแลคติก

การใช้ยีสต์เสริมในอาหารสัตว์ โดยเฉพาะยีสต์ทางการค้าที่ได้รับความนิยมเสริมในอาหารสัตว์โดยตรง คือ *S. cerevisiae* พบว่าสามารถส่งเสริมแบคทีเรียใช้กรดแลคติกในกระเพาะรูเมนให้มีขีดความสามารถในการนำใช้กรดได้ดีขึ้น ซึ่ง Moya et al.(2009) พบว่ายีสต์ประกอบด้วยสารส่งเสริมการเจริญ ได้แก่กรดอะมิโน วิตามินบี และกรดอินทรีย์ ที่ช่วยกระตุ้นให้จำนวนประชากรของ *M. elsdenii* เพิ่มขึ้น ทำให้มีขีดความสามารถนำใช้กรดได้ดีขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Rossi et al. (2004) ในการประเมินองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่สกัดจากยีสต์ *S. cerevisiae* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง (high pressure liquid chromatography; HPLC) ที่มีผลต่อการเจริญของ *M. elsdenii* พบว่ายีสต์มีกรดอะมิโนไลซีน (lysine) และฮีสทิดีน (histidine) ค่อนข้างสูง ที่ช่วยกระตุ้นการเจริญของ *M. elsdenii* ได้มากกว่าร้อยละ 18.5 และการนำใช้กรดแลคติกได้สูงถึงร้อยละ 74.1 นอกจากนี้จากการศึกษาของ Chaucheyras et al. (1996) ถึงผลของการเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีชื่อทางการค้าว่า Levucell SC ต่อการเมทแทบอลิซึมกรดแลคติกของ *M. elsdenii* มีการเลี้ยงในระบบ coculture โดยการเติมเชื้อยีสต์มีชีวิตที่ระดับ 10^7 เซลล์/มล. ร่วมกับเชื้อ *S. bovis* และ *M. elsdenii* ในอาหารที่มีกลูโคส พบว่าการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *S. bovis* ลดลง โดยยีสต์มีชีวิตสามารถแข่งขันกับเชื้อ *S. bovis* ในการนำใช้กลูโคสในสภาวะไร้ออกซิเจน รวมทั้งพบว่ายีสต์มีชีวิตกระตุ้นการใช้กรดแลคติกโดยเชื้อ *M. elsdenii* ทั้งนี้เนื่องจากการเจริญเติบโตของเชื้อที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเพิ่มปริมาณของผลผลิตสุดท้ายของการหมัก (end product) ในกลุ่มที่มีการเติมยีสต์ โดยพบว่ากรดอะมิโนและวิตามิน กระตุ้นแบคทีเรียให้มีการเจริญเติบโตจำเพาะต่อการนำใช้กรดแลคติก ดังนั้นจากการศึกษาจึงชี้ให้เห็นว่าการเสริมยีสต์มีชีวิตสามารถช่วยลดการสะสมกรดแลคติกในระบบ *in vitro* ระหว่างที่มีการหมักกลูโคสได้

บทบาทในด้านการเพิ่มจำนวนประชากรจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน

มีรายงานการศึกษาการใช้ *S. cerevisiae* ช่วยป้องกันการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะรูเมน โดยกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนประชากรของโปรโตซัวชนิดซีเลีย (Ciliated protozoa) ซึ่งจากรายงานของ Fonty and Chauchyras (2006) พบว่าโปรตัวซัวชนิด Entodiniomorphid จัดว่าเป็น ciliated protozoa ที่มีความสามารถในการกินเม็ดแป้ง (engulf) ได้อย่างรวดเร็ว จึงแข่งขันกับแบคทีเรียกลุ่ม amylolytic ในการนำใช้สารอาหาร รวมทั้งอัตราการหมักย่อยแป้งของโปรโตซัวจะช้ากว่ากลุ่ม amylolytic และผลผลิตสุดท้ายของการหมักย่อยจะได้เป็น VFA มากกว่ากรดแลคติก ดังนั้นการเพิ่มจำนวนประชากรของโปรโตซัวจึงอาจมีส่วนช่วยในการป้องกันการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะรูเมนได้ การศึกษาของ William and Coleman (1992) พบว่าโปรโตซัวชนิด Entodiniomorphid มีอัตราการกินเม็ดแป้งและอัตราการย่อยสลายแป้งสูงสุด (770 และ 8.6 ไมโครกรัม/มิลลิกรัมโปรโตซัว /นาที ตามลำดับ) แต่มีค่าต่ำสุดในโปรโตซัวชนิด Diploplastron (2.3 และ 0.49 ไมโครกรัม / มิลลิกรัมโปรโตซัว / นาที ตามลำดับ) จากการศึกษาของ Galip (2006) ในการเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ระดับ 5 กรัม/วัน ($25x10^9$ เซลล์/มล.) และ 10 กรัม/วัน ($50x10^9$ เซลล์/มล.) ในอาหารแกะพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะรูเมน และปริมาณของโปรโตซัวชนิด *Entodinium* spp. มีค่าเพิ่มขึ้นตามระดับการเสริมยีสต์ที่เพิ่มขึ้น

บทบาทของยีสต์ต่อการลดสภาวะกรดโดยตรง

บทบาทของยีสต์ต่อการลดสภาวะกรดโดยตรงจะกล่าวถึงบทบาทของยีสต์ที่สามารถนำใช้กรดแลคติกได้โดยตรง ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถเจริญอยู่ได้ในสภาวะที่เป็นกรด (ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3-4) (Laukova et al., 2003) และสามารถปรับตัวอยู่ได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ Lactic acid dehydrogenase และ Alcohol dehydogenase รวมทั้งสามารถนำใช้สารอาหาร (substrate) ที่หลากหลาย โดยเฉพาะกรดแลคติกเพื่อเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตและสร้างเซลล์ (biomass) โดยยีสต์ที่สามารถนำใช้กรดแลคติกได้แก่ *Torulaspora delbrueckii*, *S.cerecisiae*, *Candida utilis*, *Kluyzeromyces marxianus* โดยพบว่า *S. cerecisiae* และ *C. utilis* นำกรดแลคติกเข้าเซลล์โดยวิธี proton symport ในขณะที่ *K. marxianus* นำกรดแลคติกเข้าเซลล์โดยอาศัยกลไก uniport ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะการเจริญของยีสต์ว่ามีออกซิเจน (aerobic condition) หรือไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition)

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนของของยีสต์ *S. cerevisiae* และ *C. utilis* สามารถนำใช้กรดแลคติกได้โดยขั้นตอนแรกคือการขนส่งกรดแลคติกผ่านเข้า plasma membrane โดยกลไก proton symport ซึ่งถูกกำหนดโดยปริมาณสารสัมพันธ์ (stoichiometry) ระหว่างค่าความเป็นกลางทางไฟฟ้าของโปรตอน (electroneutral proton symport) กับค่าความเป็นกรดของโปรตอน (proton - acid) ที่อัตราส่วน 1:1 รวมทั้งเกิดจากแสดงออกของ lactate permase JEN1 จากนั้นกรดแลคติกจะถูกออกซิไดซ์ (oxidized) เป็นไพรูเวท (pyruvate) (Lodi et al.,2002) ดังนั้นกรดแลคติกจึงเป็นทั้งผลผลิตสุดท้าย (end product) และสารตั้งต้น (precursor) ของการ metabolism กลูโคส รวมทั้งกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในสัตว์หรือมนุษย์ จะเกิดจากวิถีไกลโคไลซีสจะสามารถเปลี่ยนกลับไปเป็นไพรูเวทก่อนที่จะถูก metabolize ซึ่งกรดแลคติกจึงถูก oxidize หลังจากที่เปลี่ยนไปเป็นไพรูเวทหรือขับออกจากเซลล์ไปที่ระบบเลือด กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อ เช่น ตับ โดยในตับกรดแลคติกจะเกิดการ

oxidize ไปเป็นไพรูเวทและเปลี่ยนไปเป็นกลูโคสผ่านวิถี gluconeogenesis ซึ่งมีบทบาทที่สำคัญต่อการควบคุมสมดุลกลูโคส ดังนั้นจากความรู้ด้านการนำใช้กรดแลคติกทั้งในสัตว์และยีสต์ที่จัดว่าเป็นยูคาริโอต จึงมีความสำคัญต่อขบวนการ metabolism คาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะในสัตว์จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของกรดแลคติกที่พบในเลือดจะเป็นตัวสะท้อนให้เห็นถึงความสมดุลของการผลิตและการนำใช้กรดแลคติกที่เกิดขึ้นว่ามีประสิทธิภาพหรือไม่

อย่างไรก็ตามในบทบาทของยีสต์ที่อยู่ในสภาวะมีออกซิเจนจะมีอัตราการใช้กลูโคส (glucose consumption) ต่ำกว่าในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน รวมทั้งถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบสูงจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ permase ซึ่งจะเห็นได้ว่าการนำใช้กรดแลคติกของยีสต์จึงถูกยับยั้งด้วยกลูโคส นอกจากนี้จากรายงานการศึกษาพบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* และ *C. utilis* ยังสามารถนำกรดแลคติกที่อยู่รูปไม่แตกตัว (undissociate) ผ่านเข้าเซลล์ได้อย่างอิสระโดยวิธี passive diffusion จากนั้นกรดจะเกิดการแตกตัวภายในเซลล์ (เนื่องจากภายในเซลล์มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูง) ทำให้ค่าค่าความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์ (intracellular pH, pH_i) มีค่าสูงกว่าค่า pK_a ของกรดแลคติก (pK_a = 3.86) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดสภาวะกรดในเซลล์ (acidification) โดยสภาวะเช่นนี้เซลล์ยีสต์ถูกกระตุ้นให้ต้องการพลังงานมากขึ้น เพื่อเพิ่มการทำงานของ H^+ -ATP_{ase} ในการขับ proton ออกภายนอกเซลล์ เพื่อเป็นการรักษาสมดุลค่าความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์ (Halm et al.,2004) ดังนั้นยิ่งความเข้มข้นของกรดแลคติกมากยิ่งส่งผลต่อการเพิ่มกิจกรรมของ H^+ -ATP_{ase} มากขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการสูญเสียพลังงานเพื่อการเจริญเติบโต (Brul and Coote, 1999) จากการรายงานพบว่าภายใต้สภาวะการหมักของยีสต์ *S. cerevisiae* จะรักษาค่าความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์มีค่าระหว่าง 5.5-5.75 เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างภายนอกเซลล์เท่ากับ 3 หรือจะรักษาค่าความเป็นกรด-ด่างภายในให้มีค่า 5.9-6.75 เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างภายนอกเซลล์มีค่าระหว่าง 6-10 โดยการรักษาค่าความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์ให้คงที่เกิดจากการขับโปรตอนออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งต้องอาศัยพลังงาน ดังนั้นค่า Y_{ATP} จึงใช้ในการประเมินปริมาณเซลล์ที่ผลิตต่อโมลของ ATP ที่ผลิตได้ ซึ่งพบว่าค่า Y_{ATP} ลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดเพิ่มขึ้น

Maiorella et al. (1983) รายงานว่าเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* มีปริมาณลดลงกว่าร้อยละ 80 เมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีกรดแลคติกเป็นองค์ประกอบที่ความเข้มข้น 38 กรัม/ลิตร และกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 7.5 กรัม/ลิตร สอดคล้องกับ Narendranath et al.(2001) ศึกษาผลของกรดอะซิติกและกรดแลคติกต่อการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่อยู่ในรูปทางการค้า คือ Alltech และ ATCC 26602 พบว่าช่วงระยะ lag phase ของเชื้อนานขึ้น และระยะ exponential phase ลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซิติกและกรดแลคติกในอาหาร โดยพบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibitory concentration; MIC) ของกรดอะซิติกร้อยละ 0.6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และกรดแลคติก ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ ที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติกร้อยละ 0.05-1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และกรดแลคติกร้อยละ 0.2-0.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เริ่มทำให้ยีสต์เกิดความเครียดและอัตราการเจริญเติบโตลดลง จากการศึกษาของ Sirisan et al. (2012) ในการทดสอบอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ใช้กรดแลคติกที่ได้จากการคัดแยกจากกระเพาะรูเมนของโคนมที่ได้รับอาหารข้นในระดับสูงกว่าปกติ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะรูเมน 6.0 ได้แก่เชื้อ *C. rugosa, Kodamaea ohmeri* และ *Pichia kudriavzevii* ที่ระดับเชื้อเริ่มต้น 10^5 เซลล์/มล.ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดแลคติกร้อยละ 0.6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อในระยะเอ็กโพเนล

เทียล และหาปริมาณความเข้มข้นของกรดแลคติกคงเหลือด้วย HPLC พบว่ายีสต์ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีกรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก ซึ่งการลดลงของปริมาณกรดแลคติกในระยะการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์แบบเอ็กโพเนลเทียลเป็นตัวชี้วัดถึงการใช้กรดแลคติกในการเจริญเติบโตได้ โดยเฉพาะ *C. rugosa* มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) สูงกว่า *Kodamaea ohmeri* และ *Pichia kudriavzevii* (0.8, 0.71 และ 0.52 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีสต์สายพันธุ์ *C. rugose* สามารถใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น แต่จากการศึกษาของ Laukova et al.(2003) พบว่ายีสต์ *C. maltosa* มีระยะ lag phase นานขึ้น และค่าการเจริญเติบโตจำเพาะลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าระหว่างร้อยละ 0.72-1.59 ดังนั้นยีสต์สามารถใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตได้ที่ระดับร้อยละ0.6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

บทสรุป

แนวทางในการลดการเกิดสภาวะกรด ที่สำคัญคือการใช้จุลินทรีย์เสริมลงในอาหารสัตว์โดยตรง หรือการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติก โดยโปรไบโอติกในกลุ่มแบคทีเรียที่สำคัญต่อการลดกรดแลคติกได้แก่ *M. elsdenii* ที่ระดับ $8.7x10^6$ โคโลนี/มิลลิลิตร, *Propionibacteriam* ที่ระดับ $6x\ 10^{10}$ โคโลนี/มิลลิลิตร และ *Prevotella* ที่ระดับ 10^{10}-10^{12} โคโลนี/มิลลิลิตร เหมาะสมต่อการนำใช้กรดแลคติกเพื่อเปลี่ยนเป็นกรดโพรพิโอนิก แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียใช้กรดเหล่านี้ไม่สามารถเจริญอยู่ได้ในสภาวะที่เป็นกรด แต่ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณลักษณะพิเศษที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนรวมทั้งทนอยู่ได้ในสภาวะที่เป็นกรด โดยมีบทบาทต่อการลดกรดทั้งโดยทางอ้อมและโดยตรง โดยในทางอ้อมพบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีการเสริมในอาหารสัตว์ที่ระดับ 10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร ช่วยส่งเสริมการทำงานของแบคทีเรีย *M.elsdenii* และ *S. ruminantium* ในการนำใช้กรดแลคติก และที่ระดับการเสริม 10^{10} โคโลนี/มิลลิลิตร ช่วยส่งเสริมการทำงานของโปรโตซัวชนิดซีเลีย คือ Entodiniomorphs ในการกลืนกินเม็ดแป้ง จึงช่วยลด substrate ในการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรีย *S. bovis* และบทบาทของยีสต์โดยตรงต่อการลดกรดพบว่ายีสต์ *C. rugosa* ที่ระดับ 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.80 ต่อชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดแลคติกร้อยละ 0.6 น้ำหนัก/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์เสริมในอาหารสัตว์จึงเป็นอีกหนึ่งแนวทางเพื่อใช้ลดการเกิดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมน

เอกสารอ้างอิง

Asanuma N., and Hino,T., 2001.Molecular characterization, enzyme properties and transcriptional regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate kinase in a ruminal bacterium, *Selenomonas ruminantium*. Microbiol. 147, 681–690.

Asanuma N, Iwamoto, M., Kawato, M., and Hino, T., 2002. Numbers of nitrate-reducing bacteria in the rumen as estimated by competitive polymerase chain reaction. Anim Sci J. 73,199–205.

Asanuma N, and Hino, T., 2004. Prevention of rumen acidosis and suppression of ruminal methanogenesis by augmentation of lactate utilization. *Nihon Chikusan Gakkaiho*. 75,543– 550.

Asanuma, N., and Hino, T., 2005. Ability to utilize lactate and related enzymes of a ruminal bacterium, *Selenomonas ruminantium*. Anim Sci J. 76,345-352.

Brul, S., and Coote,P., 1999. Presevative agents in food: mode of action and microbial resistance mechanisms. Int. J. Food Microbial. 50,1-17.

Chaucheyras, F.,Fonty, G., Bertin ,G., Salmon, J.M., Gouet, P.,1996. Effects of a strain of *Saccharomyces cervisiae* (Levucell SC1), a microbial additive for

ruminants, on lactate metabolism *in vitro*. Can. J. Microbiol. 42, 927–933.

Chaucheyras-Durand, F., Walker, N. D., and Bach, A., 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. Anim. Feed Sci. Technol. 145, 5-26.

Chiquette, J.,Allison, M. J., and Rasmussen, M., A.2008. *Prevotella bryantii* 25A used as a probiotic in early-lactation dairy cows: Effect on ruminal fermentation characteristics, milk production, and milk composition. J. Dairy Sci. 91,3536-3543.

Counotte, G. H., Prins, R. A., Janssen,R.A.M., and de Bie, M.J.A., 1981. Role of Mega*sphaera elsdenii* in the fermentation of DL-lactate in the rumen of dairy cattle. Appl. Environ. Microbiol. 42,649.

Desnoyers, M.,Giger-Reverdin, S., Sauvant, D., Bertin, G., and Duvaux-Ponter, C., 2009. The influence of acidosis and live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on time-budget and feeding behaviour of dairy goats receiving two diets of differing concentrate proportion. Applied Animal Behaviour Sci. 121, 108 –119.

De Ondarza, M. B., and Seymour, W. M., 2008. CASE STUDY: Effect of Propionibacteria Supplementation on Yield of Milk and Milk Components of Dairy Cows. The Professional Animal Scientist. 24,254–259.

Enemark, J. M. D., 2009. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. Vet. J. 176, 32-43.

Fonty, G., and Chaucheyras-Durand, F., 2006. Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. Biologia, Bratislava. 6,741-750.

Galip,N., 2006. Effect of Supplemental Yeast Culture on Ruminal Protozoa and Blood Parameters in Rams. Revue Med. Vet.11, 519-524.

Gonzáleza, L.A., Mantecab, X., Calsamigliab, S., Schwartzkopf-Genswein, K.S., Ferret, A., 2012. Ruminal acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). Anim Feed Sci and Tech. 172,66-79.

Halm, M. T. Hornbaek, N., Arneborg, S. Sefa-Dedeh, and Jespersen, L., 2004. Lactic acid tolerance determined by measurement of intracellular pH of single cell of Candia krusei and Sacharomyces serevisiae isolated from fermented maoze dough. Int. J. Food Microbial. 94,97-103.

Henning, P.H.,Horn C.H., Steyn, D.G., Meissner, H.H., and Hagg, F.M., 2010 The potential of *Megasphaera elsdenii* isolates to control ruminal acidosis. Anim Feed Sci and Technol. 157,13–19.

Hernández,J., Benedito, J.J., Abuelo, A., and Castillo, C., 2014. Ruminal Acidosis in Feedlot: From Aetiology to Prevention. The Scientific World J.

Kung, L. J., 2001. Developing rumen fermentation with direct fed microbials. Feed Mix. 9,3.

Laukova, D., Lubomir, V., and Fridrich, G., 2003. Effect of lactic acid on the growth dynamics of *Candida maltose* YP1. Czech J. Food Sci. 21,43-49.

Lodi, T., Fontanesi, F., and Guiard, B., 2002. Co-ordinate regulation of lactate metabolism genes in yeast: the role of lactate permease gene JEN1. Mol Genet Genomics. 266, 838-847.

Martin, S.A.,1998. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. J. of Anim Sci. 76,3123-3132.

Narendranath, N.V., Thomas, K.C., and Ingledew, W.M., 2001. Effects of acetic acid and acetic acid on the growth of *Saccharomyced cerevisiae* in a minimal medium. J. Industrial Microbiol and Biotech. 26, 171-177.

Maiorella, B.,Blanch, H.W., and Wile, C.R., 1983. Byproduct inhibition effects on ethanlic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotech Bioeng. 25, 103-121.

Meissner, H.H., Henning, P.H., Horn C.H., Leeuw, K.J., Hagg, F.M. and Fouché, G., 2010. Ruminal acidosis: A review with detailed reference to the

controlling agent *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125. S Afr J Anim Sci. 40, 79-100.

Long, M.,Peng, L.,Zhang, Y., Xinliang, C., Zenggui, G., and Guowen, L., 2016. Evaluation of the protective effect of the acid-tolerant engineered bacterial strain M. elsdenii H6F32 as a probiotic fed to sheep during the lactic acidosis challenge. Indian J. Anim. Res. 50,330-334.

Moya, D., Mazzenga, A.,Holtshausen, L.,Cozzi, G., González, L. A.,Calsamiglia, S., Gibb, D. G.,McAllister, T. A.,Beauchemin, K. A., and Schwartzkopf-Genswein, K., 2011. Feeding behavior and ruminal acidosis in beef cattle offered a total mixed ration or dietary components separately. J Anim Sci. 9,520-530.

Nagaraja, T.G.,and Lechtenberg, K. F., 2007. Acidosis in feed lot cattle. Vet Clin Food Anim. 23,333–350.

Nikkhah, A., 2015. Management Consistencies to Minimize Subacute Rumen Acidosis: A Herd Probiotic. J. Prob. Health.3,2

Nisbet, D.J., and Martin, S.A.,1990. Effect of dicarboxylic acids and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on lactate uptake by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Environ. Microbiol*., 56, 3515-3518.

Nisbet, D. J., and Martin, S. A., 1993. Effects of fumarate, L-malate, and an *Aspergillus oryzae* fermentation extract on D-lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. Curr. Microbiol. 26,133.

Nisbet, D. J., and Martin, S. A., 1994. Factors affecting L-lactate utilization by *Selenomonas ruminantium*. J. Anim. Sci. 72, 1355–1361.

Plaizier, J.C., Krause, D.O., Gozho, G.N. and McBride, B.W., 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. Vet J. 176,21-31.

Rodriguez, F., 2003. Control of lactate accumulation in ruminants using *Prevotella bryantii*. PhD Thesis. Iowa State University, Ames.

Rossi, F., Luccia, A.D.,Vincenti, D., Cocconcelli, P.S., 2004. Effects of peptidic fractions from *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and metabolism of the ruminal bacteria *Megasphaera elsdenii*. Anim. Res. 53,177–186.

Russell, J.B., and Chow, J.M., 1993. Another theory for the action of ruminal buffer salts: decreased starch fermentation and propionate production. J. Dairy Sci. 76,826–830.

Sirisan, V., Pattarajinda, V., Vichitphan, K., and Leesing, R., 2012. Effect of lactic acid on growth parameter of yeast strains obtained from ruminal fluid of dairy cattle. Proceeding of the 15th AAAP Animal Science Congress Vol. II 26-30 November 2012. Thammasat University, Rangsit Campus, Thailand.

Weiss, W. P., Wyatt, D. J., and McKelvey, T. R., 2008. Effect of Feeding Propionibacteria on Milk Production by Early Lactation Dairy Cows. J. Dairy Sci. 91,646–652.

Williams A. G., and Coleman, G. S., 1992. The Rumen Protozoa. New York: Brock /Springer series in contemporary bioscience, Springer Verlag, USA.

Wiryawan, I.K.G., 1994. Microbial control of lactic acidosis in grain- fed sheep. Department of Animal Science, Faculty of Agricultural and Natural Resource Sciences, The University of Adelaide, South Australia.

Zerby, H. N., Bard, J. L.,Loerch, S. C.,Kuber, P. S., Radunz, A. E., and Fluharty, F. L.,2011. Effects of diet and *Aspergillus oryzae* extract or *Saccharomyces cervisiae* on growth and carcass characteristics of lambs and steers fed to meet requirements of natural markets. J. Anim Sci. 89,2257-2264.