# การคัดแยกเชื้อยีสต์ที่ใช้กรดแลคติกจากน้ำกระเพาะหมักโคนม

# Isolation of Lactic Acid Utilized Yeasts from Ruminal Fluid of Dairy Cattle

**วาสนา ศิริแสน[1], วิโรจน์ ภัทรจินดา[1*], คณิต วิชิตพันธุ์[2], และ รัตนภรณ์ ลีสิงห์[3]**

**Vatsana Sirisan[1], Virote Pattarajinda[1*], Kanit Vichitphan[2] and Rattanaporn Leesing[3]**

**บทคัดย่อ**: กรดแลคติกเป็นกรดที่มีความรุนแรงกว่ากรดไขมันที่ระเหยได้ (Volatile fatty acid, VFA) 10 เท่า ซึ่งเมื่อมีการสะสมในกระเพาะรูเมนจะส่งผลเสียต่อผลผลิตและสุขภาพสัตว์ การศึกษาครั้งนี้ได้คัดแยกยีสต์ที่ใช้กรดแลคติกเพื่อเป็นแนวทางลดผลกระทบดังกล่าว โดยนำของเหลวจากรูเมนของโคนมที่ได้รับอาหารสูตรรวม (Total mixed ration, TMR) ที่มีสัดส่วนอาหารข้นสูงและกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังระดับสูง มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง YM (Yeast extract Malt extract) บ่มที่อุณหภูมิ 39 °ซ นาน 72 ชม. แล้วเลือกโคโลนีเดี่ยวมาคัดแยกให้บริสุทธิ์ ดูลักษณะการแตกหน่อและทดสอบการเจริญของยีสต์ที่มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น $1x10^5$ และ $1x10^6$ เซลล์/มล. ในอาหารที่มีกรดแลคติกเข้มข้น 6 มล./ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส จากนั้นหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และระยะเวลาการแบ่งเซลล์ของยีสต์ในระยะ log phase ผลการทดลองพบว่าของเหลวจากรูเมนของโคที่ได้รับอาหารTMR ที่มีกากมันระดับสูงมีปริมาณยีสต์มากกว่ากลุ่มทีได้รับอาหารข้นสูง ยีสต์ที่คัดแยกได้จากโคทั้งสองกลุ่มมีทั้งหมด 42 ไอโซเลต และเมื่อพิจารณาจากลักษณะการแตกหน่อพบว่าเหลือเพียง 13 ไอโซเลต ซึ่งเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหาร YM ที่มีกรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ายีสต์ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $1x10^5$ เซลล์/มล. ของทุกไอโซเลต ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่สูงสุดและใช้ระยะเวลาในการแบ่งเซลล์สั้นกว่าที่ระดับ $1x10^6$ เซลล์/มล. แสดงว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้น $1x10^5$ เซลล์/มล. เหมาะสมต่อการผลิตเพื่อเพิ่มจำนวนยีสต์

**คำสำคัญ**: ยีสต์, กรดแลคติก, อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, ระยะเวลาแบ่งเซลล์, โคนม

**ABSTRACT:** Lactic acid has potent 10 times stronger than volatile fatty acid (VFA). The lactic accumulation adversely affects on production and animal health. The study was to isolate yeast from rumen fluid of dairy cattle fed with TMR containing high concentrate (HC) and high cassava pulp (CP). Yeast was spreaded on YM agar and incubated at 39 °C for 72 hour. The single colony was purified and budding cell characteristic was determined. Two levels of starter culture at $1x10^5$ and $1x10^6$ cell/ml were tested on specific growth rate ($\mu$) and generation time (g) in log phase using lactic acid broth (6ml/L) as a sole carbon source. The result showed that rumen of HC cows contained higher amount of yeast than CP cows. A total of 42 yeast isolates of have been found from both groups. After identified by budding cell characteristic, there were only 13 isolates. In lactic acid broth, the growth rate of inoculates $1x10^5$ cell/ml was faster and required shorter generation time than $1x10^6$ cell/ml. This study indicated that yeast isolation from rumen fluid could use lactic acid as a sole carbon source for growth and the optimum concentration was $1x10^5$ cell/ml.
**Keywords:** yeast, lactic acid, specific growth rate, generation time, dairy cow

[1] ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[2] ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[3] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศษสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

* Corresponding author: virotekku@hotmail.com

## บทนำ

การให้ปริมาณอาหารข้นที่มากเกินไป หรืออาหารที่ส่งเสริมให้เกิดการสะสมกรดแลคติกในกระเพาะรูเมนล้วนแล้วแต่เป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดการสร้างและสะสมกรดแลคติกขึ้น ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลง pH ในกระเพาะรูเมน ทั้งนี้เนื่องจากกรดแลคติกเป็นกรดที่มีความรุนแรง (pKa 3.9) กว่ากรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fattty acid, VFA) (pKa 4.9) ประมาณ 10 เท่า (Nagaraja and Titgemeyer, 2007) ซึ่งการสะสมกรดแลคติกจึงเป็นอุบัติการณ์ที่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสมดุลการหมักย่อยในกระเพาะรูเมน ผลผลิตและสุขภาพของสัตว์ (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2006) อย่างไรก็ตามจากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในกระเพาะ รูเมนของโคมีจุลินทรีย์ชนิดหลักๆ ที่สามารถนำใช้กรดแลคติกได้ ได้แก่ *Megasphera elsdenii* และ *Selenomonas ruminantium* แต่เมื่อ pH ในกระเพาะรูเมนลดลงต่ำกว่า 5.6 เป็นเวลานานกว่า 3 ชม.ต่อวัน (subacute ruminal acidosis, SARA) จะส่งผลให้จำนวนประชากรของแบคทีเรียใช้กรดแลคติกในกระเพาะรูเมนลดลง (Nagaraja and Lechtenberg, 2007) ดังนั้นการค้นหาจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติพิเศษต่อการนำใช้กรดแลคติก รวมทั้งอยู่รอดในสภาวะ pH ที่เป็นกรดได้ จึงเป็นแนวทางที่ช่วยลดการเกิดผลกระทบต่อการสะสมกรดแลคติกในกระเพาะรูเมนลงได้ ยีสต์จัดว่าเป็นจุลินทรีย์เซลล์เดียวเจริญทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีที่ pH ต่ำกว่าระดับ 3.7 -3.8 (สาวิตรี, 2549) และมีเอนไซม์ Lactate dehydogenase จึงสามารถนำใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Patrick and Maurice, 1974) อีกทั้งยีสต์ยังสามารถขนส่งกรดแลคติกผ่านเข้าภายในเซลล์โดย proton symport เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน (Cassio et al. 1987) การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกยีสต์ในกระเพาะรูเมนของโคนมที่สามารถใช้กรดแลคติก และอยู่รอดได้ในสภาวะที่เป็นกรด เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นโปรไบโอติคที่มีสามารถลดสภาวะกรดในกระเพาะรูเมนต่อไป

## วิธีการศึกษา

### 1. สัตว์ทดลองและแหล่งเก็บน้ำกระเพาะหมัก

ใช้โคนมรุ่นลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชียนเพศเมีย น้ำหนักตัว 350 ± 50 กก. จำนวน 4 ตัว ที่ได้รับอาหารสูตรรวม (Total mixed ration, TMR) ที่มีสัดส่วนอาหารข้นระดับสูง และใช้โคนมในระยะนมแห้ง น้ำหนักตัว 500 ± 50 กก. จำนวน 4 ตัว ที่ได้รับอาหาร TMR ที่มีกากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบหลัก เป็นระยะเวลา 14 วัน เพื่อใช้เป็นแหล่งเก็บน้ำกระเพาะหมัก (rumen fluid) สำหรับคัดแยกยีสต์ สุ่มเก็บตัวอย่าง rumen fluid จากโค แต่ละตัว หลังจากที่โคได้รับอาหารตอนเช้าแล้ว 4 ชม. โดยใช้ท่อดูดผ่านกระเพาะ (stomach tube)

### 2. การเพาะเลี้ยงยีสต์ (yeast culture)

นำตัวอย่าง rumen fluid จากโคแต่ละตัวมา 1 มล. มาเจือจางลำดับส่วน (serial dilution) เป็น 1:10, $1:10^2$ และ $1:10^3$ เพื่อหาปริมาณยีสต์ด้วยวิธี Total plate count แล้วคัดแยกเชื้อยีสต์ด้วยเทคนิคกระจายเชื้อ (spread plate) และขีดลากแบบไขว้ (cross-streak technique) ในอาหาร YM agar (yeast extract Malt extract) ที่มีส่วนประกอบของ ยีสต์สกัด (yeast extract ) 3 กรัม/ลิตร, มอลต์สกัด (malt extract) 3 กรัม/ลิตร, เปปโตน (peptone) 5 กรัม/ลิตร, กลูโคส (glucose) 10 กรัม/ลิตร และวุ้น 20 กรัม/ลิตร ฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดัน (autocave) ที่ 121 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที เติม streptomycin ปริมาณ 100 ไมโครกรัม/ลิตร เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 39 °ซ นาน 48-72 ชม. ตรวจนับจำนวนโคโลนี แล้วคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาไปแยกให้บริสุทธิ์ โดยการ streak plate แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน นำเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วเก็บไว้ในอาหารแข็งเอียง (slant agar) ในหลอดฝาเกลียว บ่มที่ 39 °ซ หลอดที่มีเชื้อขึ้นเก็บไว้เป็น strock ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อใช้ศึกษาลักษณะการแตกหน่อของยีสต์บนอาหาร Malt extract เป็นเวลา 72 ชม. โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า และศึกษาคุณสมบัติของยีสต์ในการใช้กรดแลคติกต่อไป

**3. ศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพการใช้อาหารที่มีกรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอน**

เชื้อยีสต์ที่คัดแยก ได้ถูกนำมาทดสอบคุณสมบัติด้านการเจริญในอาหารเหลว YM ที่มีการเติมกรดแลคติก (6g/L) เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส ตามวิธีของ Callaway and Martin (1997) โดยเตรียม rumen fluid มาจากกระเพาะหมักโค เพื่อใช้เป็น sterile rumen fluid ที่ปริมาตร 20 % ในการเตรียมอาหาร ตามวิธีของ Kung et al. (1997) เติมเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ลงไปที่ระดับ $1x10^5$ และ $1x10^6$ เซลล์/มล. หมักแบบเขย่า (shaking) ในสภาวะ anaerobic ที่ 39°ซ ทำการวัดการเจริญของเชื้อยีสต์ทุก 2 ชม. เป็นเวลาติดต่อกัน 24 ชม. โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, OD) ที่ 600 นาโนเมตร พร้อมกับนับจำนวนเซลล์ผ่าน heamacytometer นำข้อมูลการเจริญของเชื้อยีสต์มาคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, μ), ระยะเวลาที่ยีสต์ใช้แบ่งเซลล์ (generation time, g หรือ doubling time, $t_d$) ในระยะ log phase

**Table 1** Specific growth rate and generation time of isolated yeast from dairy cattle fed TMR containing high concentrate diet (HC1-HC3) and high cassava pulp (CP1-CP10)

| Isolate | Level of cell | Specific growth rate (μ), $h^{-1}$ | Generation time (g), h |
|---|---|---|---|
| HC1 | $1x10^5$ | 0.43 | 0.68 |
| | $1x10^6$ | 0.22 | 1.35 |
| HC2 | $1x10^5$ | 0.27 | 1.11 |
| | $1x10^6$ | 0.20 | 1.48 |
| HC3 | $1x10^5$ | 0.30 | 0.99 |
| | $1x10^6$ | 0.16 | 1.82 |
| CP1 | $1x10^5$ | 0.39 | 0.75 |
| | $1x10^6$ | 0.24 | 1.22 |
| CP2 | $1x10^5$ | 0.45 | 0.66 |
| | $1x10^6$ | 0.46 | 0.65 |
| CP3 | $1x10^5$ | 0.38 | 0.78 |
| | $1x10^6$ | 0.35 | 0.84 |
| CP4 | $1x10^5$ | 0.37 | 0.81 |
| | $1x10^6$ | 0.17 | 1.69 |
| CP5 | $1x10^5$ | 0.32 | 0.91 |
| | $1x10^6$ | 0.16 | 1.82 |
| CP6 | $1x10^5$ | 0.59 | 0.50 |
| | $1x10^6$ | 0.20 | 1.48 |
| CP7 | $1x10^5$ | 0.20 | 1.46 |
| | $1x10^6$ | 0.34 | 0.88 |
| CP8 | $1x10^5$ | 0.41 | 0.71 |
| | $1x10^6$ | 0.30 | 0.98 |
| CP9 | $1x10^5$ | 0.32 | 0.92 |
| | $1x10^6$ | 0.31 | 0.96 |
| CP10 | $1x10^5$ | 0.28 | 1.04 |
| | $1x10^6$ | 0.21 | 1.39 |

## ผลการศึกษา

จากการตรวจนับจำนวนเชื้อยีสต์ด้วยวิธี total plate count โดยการทำ serial dilution ที่ระดับ 1:10 - 1:1000 พบว่าจาก rumen fluid ของโคที่ได้รับอาหาร TMR ที่มีอาหารข้นระดับสูงพบปริมาณเชื้อยีสต์ $1.5x10^3$ CFU/ml และจากโคที่ได้รับอาหาร TMR ที่มีกากมันสำปะหลังระดับสูงพบปริมาณเชื้อยีสต์ $7x10^4$ CFU/ml และสามารถคัดแยกยีสต์จากลักษณะสัณฐานวิทยาจากโคที่ได้รับอาหาร TMR ที่มีอาหารข้นระดับสูงได้จำนวน 10 ไอโซเลต และจากโคที่ได้รับอาหาร TMR ที่มีกากมันสำปะหลังระดับสูงได้จำนวน 32 ไอโซเลต และเมื่อคัดแยกจากลักษณะการแตกหน่อของยีสต์สามารถเลือกยีสต์ที่มีลักษณะการแตกหน่อต่างกันจากโคที่ได้รับ TMR ที่มีอาหารข้นระดับสูงได้จำนวน 3 ไอโซเลต (High concentrate, HC1-HC3) และจากกากมันสำปะหลังระดับสูงได้จำนวน 10 ไอโซเลต (Cassava pulp, CP1-CP10)

จากการนำยีสต์ 13 ไอโซเลตที่คัดแยกได้มาทดสอบคุณสมบัติด้านการเจริญในอาหารที่มีกรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส โดยทำการทดสอบไอโซเลตละ 2 ระดับคือ $1x10^5$ และ $1x10^6$ เซลล์/มล. พบว่า ยีสต์ที่คัดแยกได้และที่ระดับเชื้อเริ่มต้น $1x10^5$ เซลล์/มล. ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงและใช้ระยะเวลาในการแบ่งเซลล์น้อยกว่าระดับเชื้อที่เพิ่มขึ้น (Table 1) แสดงว่ายีสต์ที่คัดแยกได้และที่ระดับเชื้อที่เหมาะสมคือ $1x10^5$ เซลล์/มล. สอดคล้องกับรายงานของ Griffin (1994) อ้างโดย สาวิตรี (2549) ที่พบว่ายีสต์ที่มีอัตราการเจริญจำเพาะ 0.52 ชม. จะใช้เวลาแบ่งเซลล์ในระยะก่อนสร้างดีเอ็นเอ (ระยะ G1, Gap 1 phase) 13 นาที แต่ที่อัตราการเจริญจำเพาะ 0.1 ชม. จะใช้เวลาแบ่งเซลล์ 173 นาที ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายิ่งค่าอัตราการเจริญจำเพาะเพิ่มขึ้นยิ่งใช้ระยะเวลาในการแบ่งเซลล์สั้นลง สอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าไอโซเลตที่มีอัตราการเจริญจำเพาะต่ำสุด 0.16 จะใช้เวลาแบ่งเซลล์ 1.82 ชม. และไอโซเลตที่มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.59 จะใช้เวลาแบ่งเซลล์ 0.50 ชม.

## สรุป

ของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคที่ได้รับอาหาร TMR ที่มีสัดส่วนของกากมันสำปะหลังระดับสูงมีปริมาณยิสต์มากกว่ากลุ่มที่มีอาหารข้นสูง โดยทั้งสองกลุ่มพบเชื้อยิสต์รวมกันจำนวนทั้งหมด 42 ไอโซเลต แต่เมื่อคัดแยกจากลักษณะการแตกหน่อพบว่ามีเพียง 13 ไอโซเลต เมื่อทดสอบการเจริญเติบโตในอาหาร YM ที่มีกรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว พบว่าระดับเชื้อยีสต์ที่ $1x10^5$ เซลล์/มล. ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่สูงและใช้ระยะเวลาในการแบ่งเซลล์สั้นกว่าที่ระดับ $1x10^6$ เซลล์/มล. อีกทั้งยังสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีกรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี ดังนั้นปริมาณเชื้อเริ่มต้น $1x10^5$ เซลล์/มล. จึงเหมาะสมต่อการผลิตเพื่อเพิ่มจำนวนยีสต์

## ขอขอบคุณ

สถานีทดลองและฝึกอบรมเกษตรกรรมร้อยเอ็ด คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นห้องปฏิบัติการน้ำนม ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ศูนย์วิจัยการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่สนับสนุนแหล่งทุน อุปกรณ์และสถานที่ในการศึกษาวิจัย

## เอกสารอ้างอิง


สาวิตรี ลิ้มทอง. 2549. ยีสต์ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 597 หน้า.

Callaway, E.S., and S.A. Martin. 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. J. Dairy Sci. 80:2035-2044.

Cassio, F., L. Cecilia, and N. Van Uden. 1987. Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. and Environ. Microb. 509-513.

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

Kung,JR.L., E.M. Kreck, R.S. Tung, A.O. Hession, A.C. Sheperd, M.A. Coheb, H.E.Swain, and J.A.Z. Leedle. 1997. Effects of a live yeast culture and enzymes on *in vitro* ruminal fermentation and milk production of dairy cows. J. Dairy Sci.80:2045-2051.

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

Nagaraja,T. G., and E. C. Titgemeyer. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook. J. Dairy Sci. 90:17–38.

Patrick, P., and L. C. Maurice.1974. Utilization by yeast of D-Lactate and L-lactate as sources of energy in the presence of Antimycin A. Eur. J. Biochem. 49:275-285.