

ประสิทธิภาพการจับของเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลกติกสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัสต่อการลดอะฟลาทอกซินบีหนึ่งในถั่วลิสงที่มีการปนเปื้อน

พนิดา วิไลปรมาศ¹, สุพัตรา ปรศุพัฒนา^{2*}, ปิยะดา ส่งเสริมสกุล²

¹นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชเวชและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาเภสัชเวชและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

การได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง (Aflatoxin B₁; AFB₁) ที่ปนเปื้อนในอาหารจัดเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคมะเร็งตับ ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ทำการพิสูจน์กระบวนการลดการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบีหนึ่งโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์สร้างกรดแลกติกสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัส; *Lactobacillus pentosus*, *L. plantarum* และ *L. casei* subsp. *rhamnosus* ต่อการลดปริมาณ AFB₁ ที่ปนเปื้อนในถั่วลิสง ทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณ AFB₁ ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography ร่วมกับ fluorescence detector (HPLC-FLD) ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถจับกับสารมาตรฐาน AFB₁ ที่ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรได้ตลอดการทดลอง (0-120 ชั่วโมง) ที่เวลา 24 ชั่วโมงซึ่งเป็นเวลาที่มีการจับ AFB₁ สูงสุด เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. pentosus*, *L. plantarum* และ *L. casei* subsp. *rhamnosus* มีค่าร้อยละของการจับ (%Binding of aflatoxin fraction; %BAF) เท่ากับ 55.77, 51.26 และ 47.98 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามผลการนำเชื้อทดสอบจับ AFB₁ ที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงได้ค่าร้อยละของ BAF เท่ากับ 27.48, 23.93 และ 23.58 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการลดปริมาณ AFB₁ ที่ปนเปื้อนในถั่วลิสง นอกจากนี้จากผลการทดสอบโดยใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารเพื่อศึกษาการคงสภาพการจับของแบคทีเรียภายใต้สภาวะทางเดินอาหาร พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์แสดงค่าร้อยละ BAF เท่ากับ 55.54, 38.78 และ 12.10 ตามลำดับ แสดงว่าการจับตัวที่เพิ่มขึ้นและลดลงในสภาวะที่ปราศจากน้ำย่อยทางเดินอาหารที่เป็นผลจาก AFB₁ ที่ปล่อยออกจากถั่วลิสงหรือผลจากความคงตัวของเชื้อแบคทีเรีย จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลกติกสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัสสามารถลดปริมาณ AFB₁ ที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงในสภาวะแบบจำลองระบบทางเดินอาหารของร่างกายมนุษย์ ซึ่งอาจเป็นแนวทางการใช้เชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลกติกสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัสต่อการลดปริมาณอะฟลาทอกซินบีหนึ่งที่ปนเปื้อนในอาหารเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในอนาคตได้

คำสำคัญ: อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง แบคทีเรียสร้างกรดแลกติก ถั่วลิสง

*ผู้รับผิดชอบบทความ

ผศ.ดร. สุพัตรา ปรศุพัฒนา

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

E-mail: psupatra@kku.ac.th

Binding efficiency of lactic acid bacteria strain *Lactobacillus* sp. to the reduction of aflatoxin B₁ in aflatoxin B₁-contaminated peanuts

Panida Wilaiparamat¹, Supatra Porasuphatana^{2*}, Piyada Songsermsakul²

¹Graduate Program in Toxicology, Division of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

²Division of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

ABSTRACT

Exposure of aflatoxin B₁ (AFB₁) contaminated in foods has been known as a cause of hepatocellular carcinoma. Therefore, this study aimed to investigate the decontamination processes of AFB₁ by using lactic acid bacteria (LAB); *Lactobacillus pentosus*, *L. plantarum* and *L. casei* subsp. *rhannosus* to reduce AFB₁ in AFB₁-contaminated peanuts. AFB₁ was extracted and analyzed by high performance liquid chromatography equipped with fluorescence detector (HPLC-FLD). Results showed ability of LAB to bind AFB₁ (50 ng/ml) through experimental period (0-120 hours) were found. At 24 hours, the maximal binding time, %binding of aflatoxin fraction (%BAF) for *L. pentosus*, *L. plantarum* and *L. casei* subsp. *rhannosus* were 55.77%, 51.26% and 47.98%, respectively. However, %BAF for the binding to AFB₁ in AFB₁-contaminated peanuts were 27.48%, 23.93% and 23.58%, respectively when compared to tested samples without LAB, indicating capability of LAB to reduce AFB₁ from peanuts. Further study was performed by using *in vivo* digestion model to verify the bacterial binding capability in the digestive system. Tested bacterial strains exhibited %BAF at 55.54%, 38.78% and 12.10%, respectively. The increase and decrease of %BAF when compared with the condition devoid of digestive fluids could be accounted from the amount of AFB₁ released from peanuts or condition that affected bacterial stability. Results showed that *Lactobacillus* sp. were capable of binding AFB₁ in peanuts in the human-mimic digestive system which might imply possibility for the use of LAB to reduce AFB₁ contamination in foods and could be expanded for product development in the future.

Key word: Aflatoxin B₁, Lactic acid bacteria, Peanut

*Corresponding author

Asst. Prof. Dr. Supatra Porasuphatana

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

E-mail: psupatra@kku.ac.th

บทนำ

สารพิษอะฟลาทอกซิน (Aflatoxins; AFs) เป็นสารพิษที่ถูกสร้างขึ้นจากเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus spp.*¹ มีด้วยกัน 4 ชนิด คือ อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง (Aflatoxin B₁; AFB₁), อะฟลาทอกซินบีสอง (Aflatoxin B₂; AFB₂), อะฟลาทอกซินจีหนึ่ง (Aflatoxin G₁; AFG₁), อะฟลาทอกซินจีสอง (Aflatoxin G₂; AFG₂) AFB₁ จัดว่ามีความเป็นพิษรุนแรงสูงสุด เนื่องจากสามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษในระดับยีนและยังเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ปัจจุบันองค์การวิจัยโรคมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer: IARC) จัดให้ AFB₁ เป็นสารก่อกลายพันธุ์และก่อมะเร็ง Class I ในมนุษย์² เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus spp.* มักพบการปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตร เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด พริก เป็นต้น ส่วนถั่วลิสงเป็นพืชที่พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินได้มากเนื่องจากมีฝักอยู่ใต้ดินเช่นเดียวกับกับเชื้อรา *Aspergillus spp.* เมื่อมีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินจะทำให้วัตถุดิบเกิดความเสียหายและเสื่อมคุณภาพทางโภชนาการ อีกทั้งยังก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคและยังเป็นปัญหาที่สำคัญในการส่งออกผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร³ ดังนั้นจึงมีการศึกษาแนวทางในการลดการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ซึ่งมีทั้งกระบวนการทางกายภาพ เช่น การใช้สารเคมี และทางชีวภาพ เช่น การใช้จุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบการลดการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินรวมถึงกลุ่มของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก (Lactic acid bacteria: LAB)

แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดแลคติกจากกระบวนการหมักโดยการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลกลูโคส LAB บางชนิดยังมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกซึ่งมีประโยชน์ต่อมนุษย์ LAB สามารถพบได้ในธรรมชาติและพบมากในผลิตภัณฑ์นมและเนื้อหมัก เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต แหนม ปลาซึ่ม เป็นต้น ในด้านโภชนาการ LAB มีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยสามารถเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร ควบคุมการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ทำให้การย่อยน้ำตาลแลคโตสทำได้ดีขึ้น ควบคุมระดับคอเลสเตอรอลในเลือด และควบคุมมะเร็งบางชนิดได้⁴ LAB ถูกแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มคือกลุ่ม *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* และ *Pediococcus* ซึ่งเคยมีการใช้แบคทีเรียเหล่านี้เป็นสารกันบูดเพื่อป้องกันการเน่าเสียและยืดอายุการเก็บของอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องแสดงให้เห็นคุณสมบัติที่น่าสนใจของ LAB ในการใช้ประโยชน์ทางพิษวิทยา มีการศึกษาก่อนหน้าและพบว่าแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกสามารถจับและลดความเป็นพิษของสารพิษจากเชื้อราต่างๆ ได้ เช่น Ochratoxin A (OTA)⁶, Zearalenone (ZEA)⁷ และ Aflatoxins (AFs)^{8,9} ในการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกต่ออะฟลาทอกซินนั้น มีงานวิจัยที่แสดงว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในกลุ่ม *Lactobacillus sp.* สามารถจับสารอะฟลาทอกซิน โดยเฉพาะ AFB₁ ในระดับที่แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตามงานวิจัยก่อนหน้าทั้งหมดแสดงเพียงความสามารถของ LAB ต่อการจับสารมาตรฐาน AFB₁ ในหลอดทดลองภายใต้สภาวะ

ต่างๆ การจะนำองค์ความรู้ดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ได้จริง จึงต้องมีการทดสอบความสามารถการจับ AFB₁ ที่มีการปนเปื้อนในอาหารจริง การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ LAB ต่อการจับ AFB₁ ที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงทั้งในสถานะการทดสอบเบื้องต้นและสถานะทางเดินอาหารจำลองเพื่อดูผลของระบบการย่อยในร่างกายมนุษย์ต่อการคงความสามารถการจับ AFB₁ ของ LAB

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมต่อการจับสารมาตรฐาน AFB₁ ของเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* ทั้ง 3 สายพันธุ์

เป็นการศึกษาความสามารถในการจับกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก (LAB) จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus pentosus*, *L. plantarum* และ *L. casei* subsp. *rhamnosus* (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) และสารมาตรฐาน AFB₁ (Sigma-Aldrich) โดยการบ่มสารมาตรฐาน AFB₁ ความเข้มข้น 50 ng/ml และ LAB ทั้ง 3 สายพันธุ์ (10⁹ CFU/ml) ที่แขวนลอยใน PBS ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 0, 6, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา สกัดตัวอย่างด้วย SPE column (Water®) เพื่อให้ได้ AFB₁ อิสระ (free AFB₁) จากนั้นระเหยสารสกัดด้วยก๊าซไนโตรเจน และทำอนุพันธ์ด้วย Trifluoroacetic acid (TFA) (200 ไมโครลิตร) (Sigma-Aldrich) เจือจางใน ACN: H₂O (1:9) และทำการวิเคราะห์ปริมาณ AFB₁ โดยเครื่อง HPLC-FLD (Agilent®) ปริมาณ AFB₁ ที่สามารถวิเคราะห์ได้จึงเป็นปริมาณ AFB₁ อิสระ ที่เหลือจากการจับ

โดยแบคทีเรียและนำมาคำนวณเพื่อแสดงในรูปค่า %Binding aflatoxin fraction (%BAF) ซึ่งแสดงถึงความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการจับ AFB₁

$$\%BAF = (1 - (\text{ปริมาณ AFB}_1 \text{ ของกลุ่มตัวอย่าง} / \text{ปริมาณ AFB}_1 \text{ ของกลุ่มควบคุม})) \times 100$$

ความสามารถของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกในการจับกับสาร AFB₁ ที่ปนเปื้อนในถั่วลิสง

การศึกษาถึงความสามารถของเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกในการจับ AFB₁ ที่ปนเปื้อนในถั่วลิสง นำถั่วลิสงที่ทราบปริมาณ AFB₁ ความเข้มข้นที่ประมาณ 500 ng/5 g และเชื้อ LAB ทั้ง 3 สายพันธุ์ (10⁹ CFU/ml) แขวนลอยใน PBS บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงนำมากรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No.1) เพื่อเก็บตะกอนถั่ว นำตะกอนถั่วไปสกัดด้วย 80% methanol เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง เจือจางส่วนใสที่ได้จากการกรองด้วยน้ำกลั่น (1:4; v/v) และสกัดด้วย SPE column เพื่อให้ได้ AFB₁ อิสระ ทำอนุพันธ์และวิเคราะห์ปริมาณ AFB₁ โดยเครื่อง HPLC-FLD

ความสามารถของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกในการจับกับ AFB₁ ที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงภายใต้สถานะของระบบทางเดินอาหาร

การศึกษาผลของน้ำย่อยและสารคัดหลั่งต่างๆ ในระบบทางเดินอาหารต่อความสามารถในการจับของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกต่อ AFB₁ โดยนำถั่วลิสงบด 5 g เติมเชื้อ LAB ทั้ง 3 สายพันธุ์ (10⁹ CFU/ml) แขวนลอยใน PBS (Loba Chemie) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำลายเทียม 6 มล. (Sigma-Aldrich)

คลุกเคล้าด้วยเครื่องเขย่าที่ 55 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 นาที น้ำย่อยเติมในส่วนกระเพาะ 12 มล. (Sigma-Aldrich) คลุกเคล้าด้วยเครื่องเขย่าที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติมน้ำย่อยเติม ในส่วนของลำไส้เล็ก 12 มล. (Sigma-Aldrich) น้ำดี 6 มล. (Sigma-Aldrich) และ 1 M sodium hydrogen carbonate 1 มล. ดังแสดงในตารางที่ 1 นำไป คลุกเคล้าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ผ่านน้ำย่อยไปปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็วรอบ 2800g เป็นเวลา 5 นาที เก็บ สารละลายใส 20 มล. เติม 2.1 M phosphoric acid 1 มล. และ chloroform 50 มล. เขย่าที่ความเร็ว 80 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายใสชั้นล่าง ระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 40°C เติม Methanol:Water (20:80) 25 มล. สกัดด้วย Pentane 25 มล. เขย่าเป็น เวลา 1 นาที แยกชั้นล่างไปสกัดด้วย SPE column ทำอนุพันธ์ด้วย TFA และวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC-FLD ต่อไป

ตารางที่ 1 การเตรียมน้ำย่อยเติมในส่วนต่างๆ ในแบบจำลองระบบทางเดินอาหาร

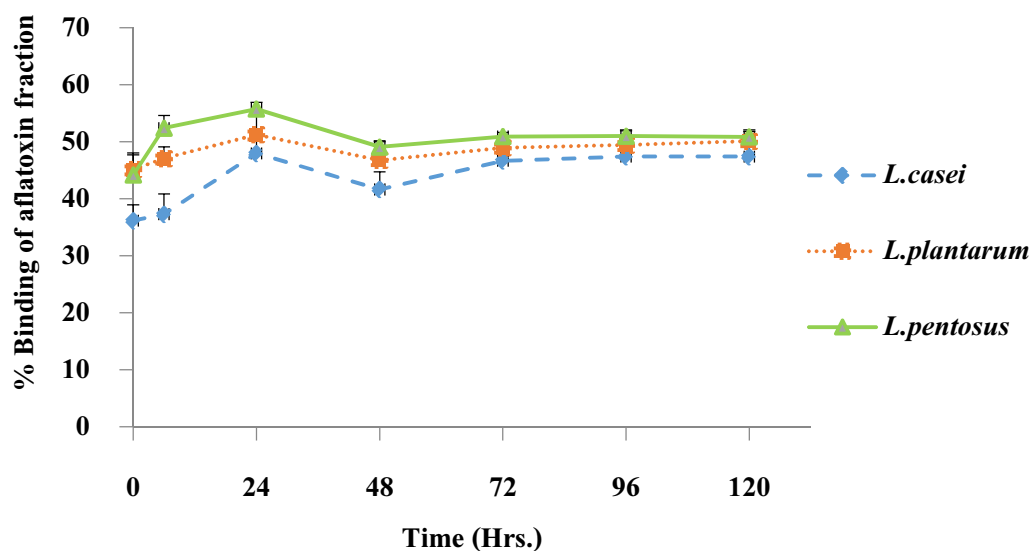
	Saliva	Gastric juice	Duodenal juice	Bile juice
Inorganic solution	10 ml KCl (89.6 g/l)	15.7 ml NaCl (175.3 g/l)	40 ml NaCl (175.3 g/l)	30 ml NaCl (175.3 g/l)
	10 ml KSCN (20 g/l)	3 ml NaH ₂ PO ₄ (88.8 g/l)	40 ml NaHCO ₃ (84.7 g/l)	68.3 ml NaHCO ₃
	10 ml NaH ₂ PO ₄ (88.8 g/l)	9.2 ml KCl (89.6 g/l)	10 ml KH ₂ PO ₄ (8 g/l)	(84.7 g/l)
	10 ml NaSO ₄ (57 g/l)	18 ml CaCl ₂ ·2H ₂ O (22.2 g/l)	6.3 ml KCl (89.6 g/l)	4.2 ml KCl (89.6 g/l)
	1.7 ml NaCl (175.3 g/l)	10 ml NH ₄ Cl (30.6 g/l)	10 ml MgCl ₂ (89.6 g/l)	150 µl HCl
	20 ml NaHCO ₃ (84.7 g/l)	6.5 ml HCl	180 µl HCl	
Organic solution	8 ml Urea (25 g/l)	10 ml Glucose (65 g/l)	4 ml Urea (25 g/l)	10 ml Urea (25 g/l)
		10 ml Glucuronic acid (2 g/l)		
		3.4 ml Urea (25 g/l)		
		10 ml Glucoseamine hydrochloride (33 g/l)		
Add to mixture organic + inorganic solution	290 mg α-amylase	1 g BSA	9 ml CaCl ₂ ·2H ₂ O (22.2 g/l)	10 ml CaCl ₂ ·2H ₂ O (22.2 g/l)
	15 mg Uric acid	2.5 g Pepsin		
	25 mg Mucin	3 g Mucin	1 g BSA	1.8 g BSA
			9 g Pancreatin	30 g Bile
			1.5 g Lipase	
pH	6.8±0.2	1.3±0.02	8.1±0.2	8.2±0.2

ผสมสารละลายอินทรีย์และสารละลายอนินทรีย์ให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วจึงปรับค่าความเป็นกรดต่าง

ผลการศึกษา

จากผลการศึกษาหาเวลาที่เชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์จับกับสารมาตรฐาน AFB₁ ได้สูงที่สุดพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถจับกับสารมาตรฐาน AFB₁ ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0-120 และจับได้ดีที่สุดชั่วโมงที่ 24 ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่สามารถจับกับสารมาตรฐาน AFB₁ ได้ดีที่สุดที่ 24

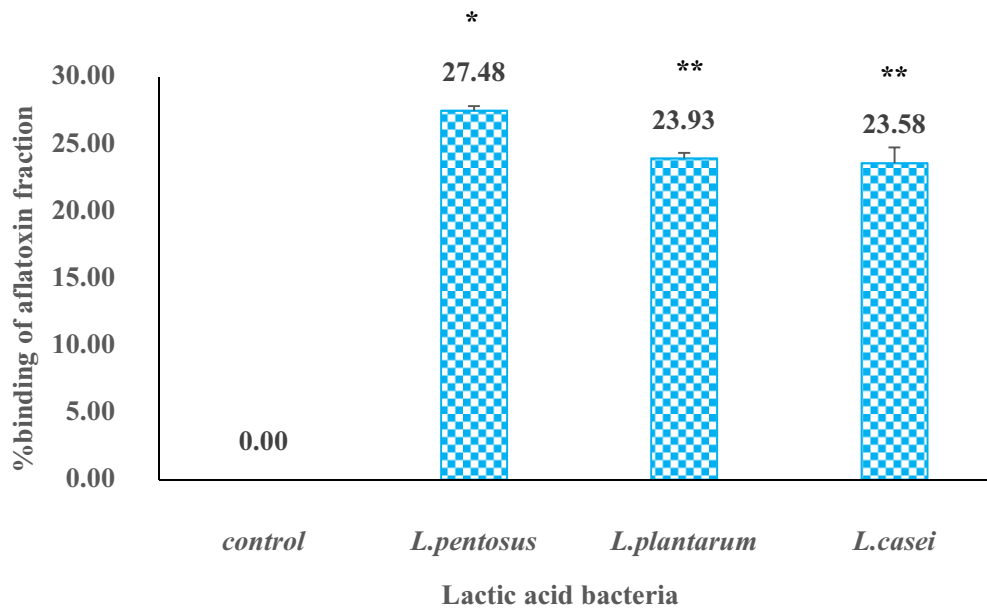
ชั่วโมง คือเชื้อ *L. pentosus* มี %BAF เท่ากับ 55.77 รองลงมาคือ *L. plantarum* และ *L. subsp. rhamnosus* โดยมีค่า %BAF เท่ากับ 51.26 และ 47.98 ตามลำดับ หลังจาก 24 ชั่วโมงไปเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์จับกับ AFB₁ ในอัตราที่คงที่เวลา 120 ชั่วโมงที่เป็นเวลาสิ้นสุดการทดสอบ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ระยะเวลาที่เชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์จับกับสารมาตรฐาน AFB₁ ตั้งแต่ 0 ชั่วโมงถึง 120 ชั่วโมง (n=4, Mean±SD)

จากการทดสอบความสามารถของ LAB ในการจับกับสาร AFB₁ ที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถจับ AFB₁ ที่ปนเปื้อนในถั่วลิสง (485.60 ng/5 g) โดย LAB ที่จับกับ AFB₁ ได้สูงที่สุดคือ *L. pentosus* มี %BAF เท่ากับ 27.48 รองลงมาคือ *L. plantarum* และ *L. casei* subsp. *rhamnosus* มี %BAF เท่ากับ 23.93

และ 23.58 ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมคือถั่วลิสงที่ปนเปื้อน AFB₁ และไม่เติมเชื้อแบคทีเรีย ไม่พบการจับของ AFB₁ แต่อย่างใด เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าร้อยละของ BAF ของเชื้อแบคทีเรีย *L. pentosus* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* และ *L. casei* subsp. *rhamnosus* (ภาพที่ 2)

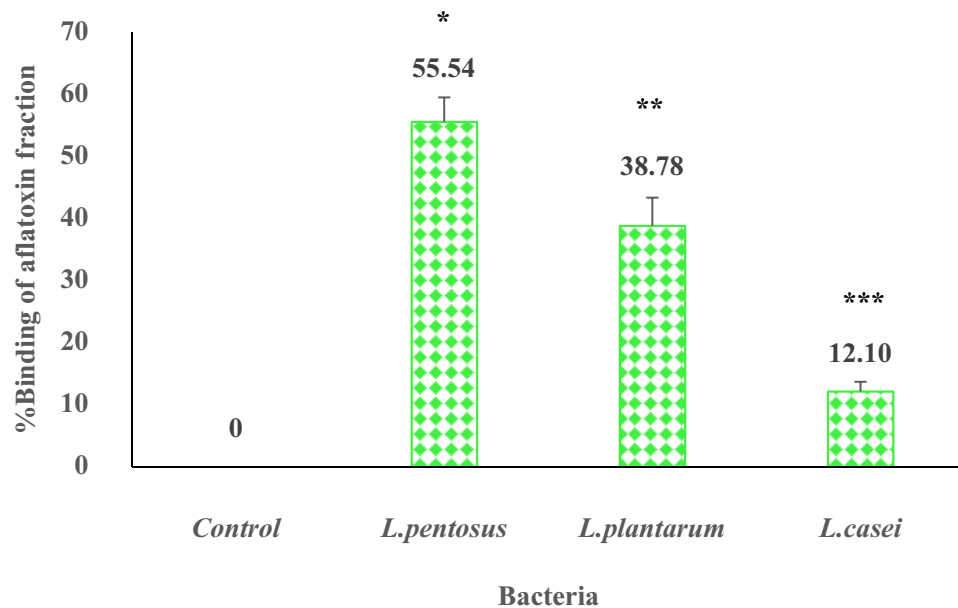


ภาพที่ 2 ค่า %Binding of aflatoxin fraction ของกลุ่มควบคุมและเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์จับกับอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในถั่วลิสง (n=4, Mean±SD) (* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$)

จากการศึกษาการคงสภาพการจับกันระหว่าง LAB และ AFB₁ ในทางเดินอาหารของมนุษย์ โดยใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารเพื่อพิสูจน์ผลของน้ำย่อยและสารคัดหลั่งต่อการทำงานของ LAB ในการจับกับ AFB₁ พบว่า LAB ทั้ง 3 สายพันธุ์มีความสามารถจับกับ AFB₁ เมื่ออยู่ในแบบจำลองระบบทางเดินอาหาร โดย LAB ที่มีความสามารถในการจับกับ AFB₁ ในระบบทางเดินอาหารได้ดีที่สุดคือ *L. pentosus* มี %BAF เท่ากับ 55.54 และเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* มี %BAF เท่ากับ 38.78 ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *L. casei* subsp. *rhamnosus* มี %BAF เท่ากับ 12.10 ผลการทดสอบทางสถิติแสดง %BAF ที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย ($p<0.05$) (ภาพที่ 3)

สรุปและวิจารณ์ผล

การศึกษาเวลาที่ LAB ทั้ง 3 สายพันธุ์จับกับสารมาตรฐาน AFB₁ เป็นการศึกษาหาเวลาที่ LAB จับกับสารมาตรฐาน AFB₁ ที่ช่วงเวลาแตกต่างกัน จากผลการทดลองพบว่า LAB ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถจับกับสารมาตรฐาน AFB₁ ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ El-Nezami และคณะ¹⁰ ที่แสดงถึงการจับกันอย่างรวดเร็ว และระยะเวลาการบ่มที่ LAB จับกับ AFB₁ ให้ค่า %BAF สูงสุดคือ 24 ชั่วโมง ซึ่งอาจเป็นผลจากการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ LAB ใน 24 ชั่วโมงแรก โดยที่เชื้อ *L. pentosus* มีความสามารถจับกับ AFB₁ ได้สูงที่สุดโดยคิดเป็น %BAF เท่ากับ 55.77 ส่วน LAB สายพันธุ์ *L. plantarum* และ *L. casei* subsp. *rhamnosus* มี %BAF เท่ากับ 51.26 และ 47.98 ตามลำดับ



ภาพที่ 3 ค่า %Binding of aflatoxin fraction ของกลุ่มควบคุม (ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย) และกลุ่มที่เติมเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์จับกับอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงแล้วนำมาผ่านแบบจำลองทางเดินอาหาร (n=4, Mean±SD) (* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$)

หลังจาก 48 ชั่วโมง LAB ยังคงสามารถจับกับ AFB₁ ได้ในอัตราคงที่ไปจนถึง 120 ชั่วโมงซึ่งเป็นระยะเวลาสิ้นสุดการศึกษา ความสามารถในการจับ AFB₁ คงที่อาจเกิดเนื่องจากการจับที่ผนังเซลล์โดยตรงและไม่เกี่ยวข้องกับการมีชีวิตของเซลล์ ดังนั้นถึงแม้ว่าเป็นแบคทีเรียที่ตายแต่ผนังเซลล์ยังมีความสามารถในการจับกับสาร AFB₁ เมื่อศึกษาผลการวิจัยของ Fazeli และคณะ¹¹ โดยการนำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *L. casei*, *L. plantarum* และ *L. fermentum* ทำการทดสอบจับสารมาตรฐาน AFB₁ พบว่า LAB มีความสามารถในการจับกับ AFB₁ ได้ที่ประมาณร้อยละ 25-61 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยในครั้งนี้พบว่า การจับของ LAB มีร้อยละของการจับกับ AFB₁ อยู่ในระดับที่ดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Pizzolitto และคณะ¹² ที่แสดงความสามารถใน

การจับกับสาร AFB₁ ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ที่มีค่าร้อยละของการจับอยู่ที่ประมาณ 13-42

การศึกษาความสามารถของ LAB ต่อการจับกับ AFB₁ ที่ปนเปื้อนจริงในถั่วลิสง พบว่า LAB ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ทำการทดสอบสามารถจับกับ AFB₁ ที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงได้โดย *L. pentosus* จัดว่ามีความสามารถในการจับ AFB₁ ที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงได้สูงที่สุด โดยมี %BAF เท่ากับ 27.48 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย แสดงถึงความสามารถในการดึง AFB₁ ออกจากถั่วลิสง ส่วน *L. plantarum* และ *L. casei* subsp. *rhamnosus* มีค่าร้อยละของ BAF เท่ากับ 23.93 และ 23.58 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับ การจับสารมาตรฐาน AFB₁ พบว่า %BAF ในการทดลองจับกับสารมาตรฐาน AFB₁ มีค่าสูงกว่า

ในการทดลองจับกับ AFB₁ ที่ปนเปื้อนในถั่วลิสง เนื่องจากการจับ AFB₁ ที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงมีข้อจำกัดหลายประการ เช่นการสัมผัสกันโดยตรงระหว่าง LAB กับ AFB₁ ในการทดลองกับสารมาตรฐาน AFB₁ นั้น LAB มีการสัมผัสกับสาร ในขณะที่ถั่วลิสง LAB ไม่ได้สัมผัสกับ AFB₁ ในเนื้อถั่วโดยตรง และยังมีตัวรบกวนจากถั่วลิสง เช่น ไขมันจากถั่วลิสงจึงทำให้มี %BAF น้อยกว่า

การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกในการจับกับ AFB₁ ที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงภายใต้สภาวะของระบบทางเดินอาหาร เพื่อดูความคงตัวของสารจับกันระหว่าง LAB และ AFB₁ ที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงภายใต้ระบบทางเดินอาหาร พบว่า LAB ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ทำการทดสอบยังมีความสามารถจับกับ AFB₁ เมื่ออยู่ในระบบทางเดินอาหารและผ่านน้ำย่อยในระบบต่างๆของระบบทางเดินอาหาร โดย *L. pentosus* เป็น LAB ที่มีความคงตัวในการจับกับ AFB₁ ในระบบทางเดินอาหารได้ดีที่สุด ที่มี %BAF เท่ากับ 55.54 และ *L. pentosus* และ *L. plantarum* มีความสามารถจับกับ AFB₁ จากถั่วลิสงเมื่อผ่านน้ำย่อยได้เพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากสภาวะน้ำย่อยทางเดินอาหาร ทำให้เกิดการปล่อยสาร AFB₁ ออกมามากขึ้น ส่วน *L. casei* subsp. *rharmnosus* ที่มี %BAF ลดลง อาจเนื่องจากค่าความเป็นกรดต่ำที่เปลี่ยนแปลงของแบบจำลองทางเดินอาหาร ทำให้เชื้อไม่คงตัว¹³

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า LAB สายพันธุ์แลคโตบาซิลลัสทั้ง 3 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบไปด้วยเชื้อแบคทีเรีย *L. pentosus*, *L. plantarum* และ *L. casei* subsp. *rharmnosus* มีความสามารถในการจับกับสารมาตรฐาน AFB₁ และจับกับ AFB₁ ที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงได้ โดยที่ *L. pentosus* สามารถ

จับกับ AFB₁ ได้สูงที่สุด ซึ่งงานวิจัยในครั้งนี้ทำการทดลองกับถั่วลิสงที่ปนเปื้อน AFB₁ จากธรรมชาติ ทำให้ได้ทราบถึงข้อมูลของ LAB ที่มีความสามารถในการลดปริมาณการปนเปื้อน AFB₁ ในอาหารซึ่งเป็นข้อมูลที่น่าสนใจในการนำไปศึกษาต่อไป เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ไปประยุกต์ใช้ในการลดการปนเปื้อนของ AFB₁ ในอาหารของมนุษย์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Lahtinen SJ, Haskard CA, Ouwehand AC, *et al.* Binding of aflatoxin B₁ to cell wall components of *Lactobacillus rharmnosus* strain GG. *Food Addit Contam* 2004; 21(2): 158-164.
2. International Agency for Research on Cancer. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2002; 40(82): 1-556.
3. บดินทร์ บุตรอินทร์. สารพิษจากเชื้อรา: อะฟลาท็อกซิน. *วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่* 2555; 45(2): 1-8.
4. Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, *et al.* Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr Opin Biotech* 2005; 16: 204-11.
5. Dalie DKD, Deschamps AM, Richard-Forget F. Lactic acid bacteria-potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Cont* 2010; 21: 370-80.

6. Slizewska K, Piotrowska M. Reduction of ochratoxin a in chicken feed using probiotic. *Ann Agric Environ Med* 2014; 21(4): 676-80.
7. Abbès S, Ben Salah-Abbès J, Sharafi H, *et al.* *Lactobacillus paracasei* BEJ01 prevents immunotoxic effects during chronic zearalenone exposure in Balb/c mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2013; 35(3): 341-8.
8. Ben Salah-Abbès J, Abbès S, Jebali R, *et al.* Potential preventive role of lactic acid bacteria against Aflatoxin M₁ immunotoxicity and genotoxicity in mice. *J Immunotoxicol* 2014; 17: 1-8.
9. Nikbakhi NE, Jamaluddin R, Abdul Mutalib MS, *et al.* Reduction of aflatoxin level in aflatoxin-induced rats by the activity of probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota. *J. Appl Microbiol* 2013; 114(5): 1507-15.
10. El-Nezami H, Kankaanpaa P, Salminen S, *et al.* Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, Aflatoxin B₁. *Food Chem Toxicol* 1998; 36: 321-6.
11. Fazeli MR, Hajimohammadari M, Moshkani A, *et al.* Aflatoxin B₁ binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. *J. Food Prot* 2009; 72(1): 189-92.
12. Pizzolitto RP, Beuno DJ, Armando MR, *et al.* Binding of aflatoxin B₁ to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: a useful model to determine the most efficient microorganism. *Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology* [online] 2011. Available at www.intechopen.com, accessed Jan 6, 2015.
13. Faye T, Tamburello A, Vegarud GE, *et al.* Survival of lactic acid bacteria from fermented milks in an *in vitro* digestion model exploiting sequential incubation in human gastric and duodenum juice. *J. Dairy Sci* 2012; 95: 558-66.