

## ผลของกากยีสต์ต่อการจับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งในหลอดทดลอง

พีรณีย์ ตันติธีรวิทย์<sup>1</sup> สุพัตรา ปรศุพัฒนา<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น,

<sup>2</sup>คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

### บทคัดย่อ

สารพิษ Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) เป็นสารพิษที่สร้างจากเชื้อราตระกูล *Aspergillus spp.* พบการปนเปื้อนได้ในอาหารหลายชนิดและมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) ได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์หลายชนิด ปัจจุบันมีความพยายามลดปริมาณ AFB<sub>1</sub> ที่ปนเปื้อนในอาหารโดยใช้หลายวิธี ซึ่งหนึ่งในวิธีการคือการใช้สารจากธรรมชาติ รวมถึงการใช้แบคทีเรียและยีสต์ การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ทำการทดสอบความสามารถของกากยีสต์ที่ได้จากกระบวนการหมักเบียร์ในการจับกับสาร AFB<sub>1</sub> ที่ pH 2 โดยทำการบ่มกากยีสต์ร่วมกับ AFB<sub>1</sub> ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแยกสกัดผ่าน solid phase extraction (SPE) ก่อนจะทำการวิเคราะห์หาปริมาณ AFB<sub>1</sub> ด้วย HPLC- fluorescence detector ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เมื่อเติมกากยีสต์ในสารละลาย AFB<sub>1</sub> กากยีสต์แสดงความสามารถในการจับ (adsorptive capacity) กับ AFB<sub>1</sub> ซึ่งมีค่าร้อยละการจับ (%Binding) ขึ้นกับความเข้มข้นของกากยีสต์ โดยความเข้มข้นของกากยีสต์ที่ 5, 10, 25 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรที่ความเข้มข้น AFB<sub>1</sub> เท่ากับ 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร แสดงค่า %Binding ที่ร้อยละ 18.77, 25.28, 35.54 และ 54.55 ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบ %Binding ที่ความเข้มข้นกากยีสต์ 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรต่อการจับ AFB<sub>1</sub> ที่ความเข้มข้นต่างๆ (50, 100, 200, 300, 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ค่าร้อยละการจับมีค่าคงที่เท่ากับ  $39.36 \pm 1.27$  ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า กากยีสต์สามารถลดปริมาณสารพิษ AFB<sub>1</sub> ได้ ซึ่งนำไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ในการลดการปนเปื้อนของสารพิษในธรรมชาติต่อไป

**คำสำคัญ :** อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง, กากยีสต์, ความสามารถในการจับ

\*ผู้รับผิดชอบบทความ

ผศ.ดร. สุพัตรา ปรศุพัฒนา

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

E-mail: psupatra@kku.ac.th

---

***In Vitro* Binding Effect of Yeast Byproduct on Aflatoxin B<sub>1</sub>**

---

**Peeradon Tuntiteerawit<sup>1</sup>, Supatra Porasuphatana<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Graduate program in Toxicology. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University,<sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University**Abstract**

Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) is a fungal toxin produced by *Aspergillus spp.* This type of toxin has been evidently proved to cause hepatocellular carcinoma in various species of animals or even to human. Since a reduction of AFB<sub>1</sub> has been concerned and large numbers of approaches are available, natural-based methods including using of?? bacteria and yeasts are ones that were adopted. In this research, yeast byproduct, which was discarded after fermentation of brewing, was used to adsorb AFB<sub>1</sub> at pH 2 by incubating yeast byproduct concurrently with AFB<sub>1</sub> at 37 °C for 24 hours. Thereafter, an extraction was completed by solid phase extraction (SPE) and AFB<sub>1</sub> concentration?? was analyzed using HPLC-fluorescence detector. The results revealed that yeast byproduct had adsorptive capacity to adsorb AFB<sub>1</sub>, while percent binding was depended on yeast byproduct concentration. In details, percent binding of yeast byproduct concentrations of 5, 10, 25 and 50 mg/mL were 18.77%, 25.28%, 35.54% and 54.55%, respectively, for fixed concentration of 500 ng/mL of AFB<sub>1</sub>. The results showed a constant percent binding at  $39.36 \pm 1.27\%$  of 30 mg/mL of yeast byproduct to different concentrations of AFB<sub>1</sub> (50, 100, 200, 300 and 500 ng/ml). As a result, yeast byproduct represented a capability of AFB<sub>1</sub> reduction, which could be further utilized as a technique for aflatoxin decontamination.

**Keyword :** Aflatoxin B<sub>1</sub>, Yeast byproduct, Binding capacity**\*Corresponding author**

Assist. Prof. Dr.Supatra Porasuphatana

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

E-mail: psupatra@kku.ac.th

## บทนำ

Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) จัดเป็นสารพิษที่มีความรุนแรงในการก่อโรคมะเร็งและมีความสามารถในการก่อมะเร็งทั้งในสัตว์และมนุษย์ การปนเปื้อน AFB<sub>1</sub> พบได้ในอาหารหลากหลายชนิด ซึ่งจัดเป็นสาเหตุหลักของการรับสัมผัสในมนุษย์ เป็นที่ยอมรับกันว่าการสัมผัส AFB<sub>1</sub> อย่างต่อเนื่องมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) ในปัจจุบันมีความพยายามหลากหลายแนวทางในการลดการปนเปื้อนของ AFB<sub>1</sub> เพื่อลดโอกาสการรับสัมผัสในมนุษย์ นับตั้งแต่การควบคุมอย่างเป็นระบบเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อราในขั้นตอนการปลูกพืชอาหาร การเก็บเกี่ยว การเก็บหลังการเก็บเกี่ยว และอื่นๆ รวมทั้งความพยายามในการลดปริมาณ AFB<sub>1</sub> ที่ปนเปื้อนในอาหาร

กระบวนการหนึ่งที่มีการศึกษาและรายงานไว้ คือการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ เช่น เชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เช่น *Lactobacillus spp.* เนื่องจากผนังเซลล์ของเชื้อ *Lactobacillus spp.* มีองค์ประกอบสารประเภท polysaccharide<sup>1</sup> และพบว่ามีความสามารถในการจับกับ AFB<sub>1</sub><sup>2</sup> จึงสามารถลดโอกาสการดูดซึม AFB<sub>1</sub> เข้าสู่ร่างกายได้ เมื่อพิจารณาจากคุณสมบัติดังกล่าว การใช้ประโยชน์จากวัสดุที่มีองค์ประกอบหลักกลุ่ม polysaccharide เช่นเดียวกับผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus spp.*<sup>3</sup> เช่น กากยีสต์หรือกากเบียร์ที่เหลือจากขั้นตอนการผลิตเบียร์ อาจให้ผลการจับสารพิษ AFB<sub>1</sub> ได้เช่นกัน มีการรายงานการศึกษาความสามารถของผนังเซลล์ยีสต์

ต่อการจับสารพิษ AFB<sub>1</sub> ทั้งในรูปแบบการใช้ทั้งเซลล์ยีสต์และบางส่วนของผนังเซลล์<sup>4</sup> อย่างไรก็ตามยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตเบียร์จะถูกกำจัดทิ้งเมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตเบียร์ โดยทั่วไปมีการนำไปใช้ประโยชน์ในอาหารสัตว์ การศึกษาค้นคว้าเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของกากยีสต์ในอุตสาหกรรมผลิตเบียร์ในประเทศไทยต่อการจับสารพิษ AFB<sub>1</sub> ซึ่งอาจนำมาเป็นข้อมูลของการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้จากธรรมชาติเพื่อลดสารพิษปนเปื้อนในอาหารได้ต่อไป

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

### สารเคมี

AFB<sub>1</sub>, potassium chloride (KCl), hydrochloric acid (HCl), methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), trifluoroacetic acid (TFA) จาก Sigma-Aldrich กากยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces spp.* ได้จากการอบแห้งภายหลังการหมักเบียร์

### เครื่องมือ

ชุดสกัด Solid phase extraction (SPE), เครื่อง Waters 590 High performance liquid chromatography (HPLC)– Waters 470 scanning fluorescence detector (HPLC-FD), Column C18 (Synergi 4U Fusion-RP 80A ขนาด 150x4.60 มิลลิเมตร 4 ไมโครเมตร), เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสาร (Centrifuge), เครื่องเขย่าพร้อมควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker), ชุดกรองสาร

**การทดสอบการดูดซับ (Adsorption test)**

เตรียมกากยีสต์ความเข้มข้น 0, 5, 10, 25 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ pH 2 และผสมกับ AFB<sub>1</sub> ความเข้มข้น 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

**การทดสอบความสามารถในการดูดซับ (Adsorption capacity)**

เตรียมกากยีสต์ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรใน buffer pH 2 ผสมกับ AFB<sub>1</sub> ความเข้มข้น 50, 100, 200, 300 และ 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

**การวิเคราะห์หาปริมาณ aflatoxin B1 ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)**

นำตัวอย่างผสมระหว่างกากยีสต์และ AFB<sub>1</sub> ไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำชั้นของเหลวไปผ่านการสกัดด้วย solid phase extraction (SPE) column ที่มีการเตรียมคอลัมน์ก่อนโดยใช้ 80% MeOH ล้างคอลัมน์ 2 ครั้ง ครั้งละ 3 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ตัวอย่างลงในคอลัมน์ตามด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร และใช้ 100% MeOH สกัด 2 ครั้ง ครั้งละ 3 มิลลิลิตร นำไประเหยแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน จากนั้นทำให้เกิดการเรืองแสงโดยการเติม trifluoroacetic acid 200 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วย ACN:H<sub>2</sub>O (1:9) จนครบ 1 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC-FD (Ex 360 nm, Em 440 nm) เพื่อหาปริมาณ AFB<sub>1</sub>

โดยการเปรียบเทียบค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area under the peak) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ AFB<sub>1</sub> กับพื้นที่ใต้กราฟ และคำนวณหา %Binding ระหว่างปริมาณ AFB<sub>1</sub> กับกากยีสต์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากสูตร

$$\%Binding = \frac{Amount\ AFB_{1\ Before} - Amount\ AFB_{1\ After}}{Amount\ AFB_{1\ Before}} \times 100$$

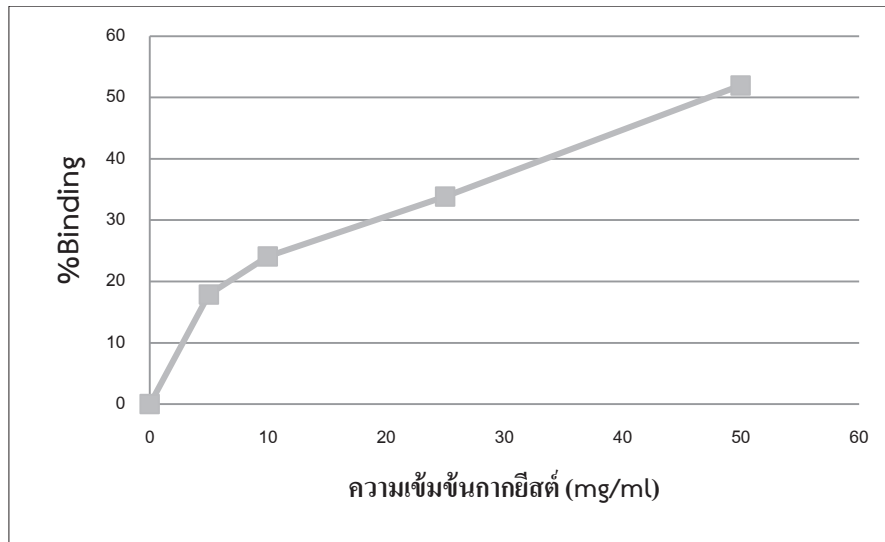
โดย  $Amount\ AFB_{1\ Before}$  = ปริมาณ AFB<sub>1</sub> ที่วัดได้  
เมื่อไม่ใส่กากยีสต์

$$Amount\ AFB_{1\ After} = \text{ปริมาณ AFB}_1 \text{ ที่}$$

คงเหลือ หลังใส่กากยีสต์

**ผลการศึกษาวิจัย**

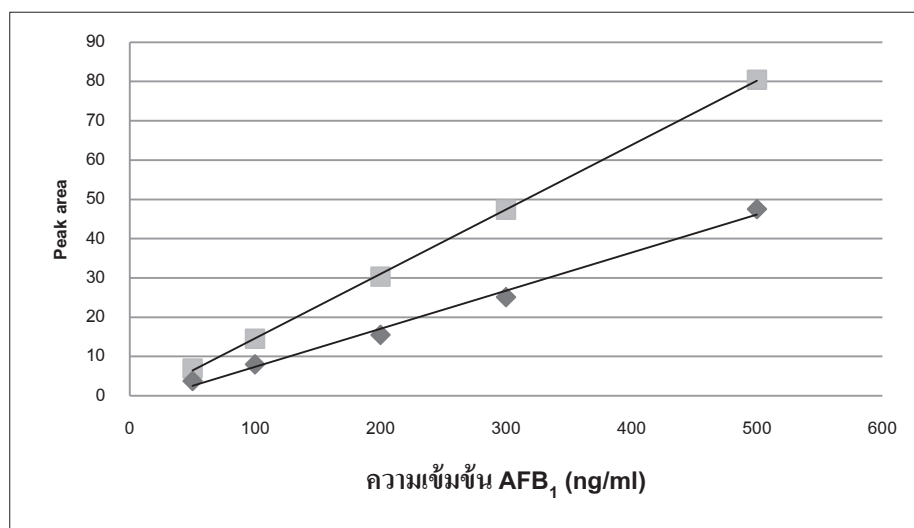
ผลการทดสอบเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ AFB<sub>1</sub> กับค่าพื้นที่ใต้กราฟพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ AFB<sub>1</sub> ตั้งแต่ 50, 100, 200, 300, 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ( $r^2=0.9961$ ) เมื่อทำการทดสอบความสามารถของกากยีสต์ความเข้มข้น 5, 10, 25 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในการจับกับ AFB<sub>1</sub> ความเข้มข้น 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหาปริมาณ และคำนวณหาร้อยละการจับกับสาร AFB<sub>1</sub> (%Binding) เพื่อประเมินผลของกากยีสต์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการจับ AFB<sub>1</sub> ที่ความเข้มข้นสูง ผลการศึกษาพบความสามารถในการจับกับ AFB<sub>1</sub> (แสดงในรูป %Binding) ของกากยีสต์ความเข้มข้น 5, 10, 25 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น คือร้อยละ 18.8, 25.3, 35.5 และ 54.6 ตามลำดับ (รูปที่ 1)



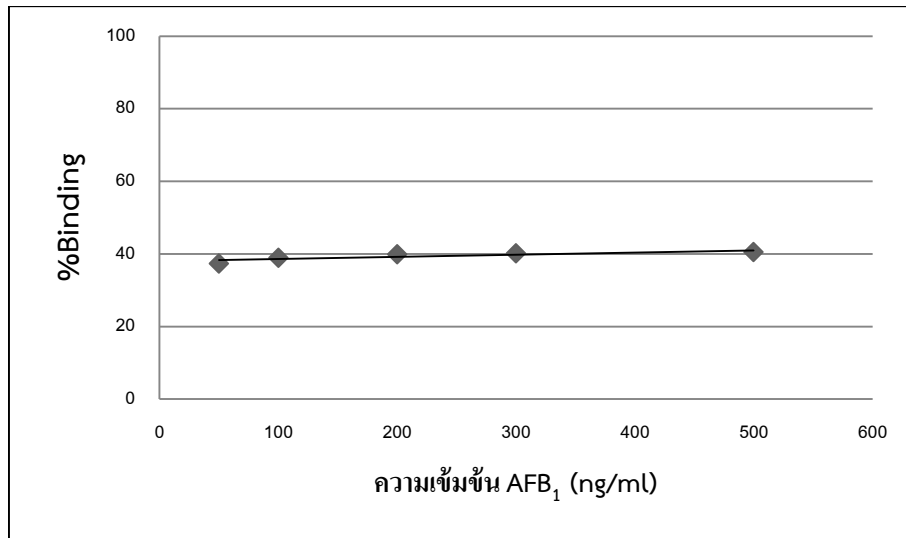
รูปที่ 1 ความเข้มข้นของกาบียีสต์กับร้อยละการจับกับสาร AFB<sub>1</sub>

จากนั้นเมื่อทำการคงความเข้มข้นของกาบียีสต์ที่ 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อทดสอบความสามารถในการจับกับ AFB<sub>1</sub> ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันได้แก่ 50, 100, 200, 300 และ 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบระหว่างมีการเติมและไม่มีการเติมกาบียีสต์ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนของปริมาณ AFB<sub>1</sub> ที่ตรวจวัด

ได้ (พิจารณาจากค่า peak area) โดยพบว่าการเติมกาบียีสต์ใน AFB<sub>1</sub> ที่ความเข้มข้นต่างๆ สามารถลดปริมาณ AFB<sub>1</sub> ได้ (ภาพที่ 2) และเมื่อพิจารณา ร้อยละการจับ (%Binding) ของกาบียีสต์กับ AFB<sub>1</sub> ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันของ AFB<sub>1</sub> พบว่าค่าร้อยละการจับมีสัดส่วนค่อนข้างคงที่ที่ร้อยละ  $39.36 \pm 1.27\%$  (รูปที่ 3)



รูปที่ 2 ความเข้มข้นของ AFB<sub>1</sub> กับค่า peak area ที่มีการเติม (◆) และไม่มีการเติมกาบียีสต์ (■)



รูปที่ 3 ความเข้มข้นของ AFB<sub>1</sub> กับร้อยละการจับกับสาร AFB<sub>1</sub>

### บทวิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การทดสอบ Adsorption test ที่ใช้ความเข้มข้นของกากยีสต์ ตั้งแต่ 5, 10, 25 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในการจับกับสาร AFB<sub>1</sub> ความเข้มข้น 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร พบว่าในช่วงดังกล่าว เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกากยีสต์ ความสามารถในการจับกับ AFB<sub>1</sub> ซึ่งแสดงอยู่ในรูปร้อยละการจับกับ AFB<sub>1</sub> (%Binding) ก็จะมีค่าสูงขึ้นตามลำดับ ตั้งแต่ร้อยละ 18.8 - 54.6 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการจับ AFB<sub>1</sub> คือปริมาณกากยีสต์และการทดสอบ Adsorption capacity เพื่อทดสอบความสามารถในการจับ AFB<sub>1</sub> (ในช่วงความเข้มข้น 50-500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) เมื่อคงปริมาณกากยีสต์ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ AFB<sub>1</sub> สูงขึ้น ปริมาณ AFB<sub>1</sub> ที่ถูกจับโดยกากยีสต์จะมีค่ามากขึ้น

ด้วย โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละความสามารถในการจับ (%Binding) คงที่ที่ประมาณร้อยละ 39.36 ± 1.27

ความสามารถของกากยีสต์ต่อการจับ AFB<sub>1</sub> สามารถอธิบายได้จากลักษณะเฉพาะของผนังเซลล์ยีสต์ที่มี polysaccharide เป็นส่วนประกอบอยู่ถึงประมาณร้อยละ 80-90 และองค์ประกอบชั้นในที่อยู่ในรูปสายยาวของ β-D-glucan<sup>7</sup> ที่นอกจากจะเรียงร้อยเป็นตาข่ายเพื่อเพิ่มความแข็งแรงของผนังเซลล์แล้วยังสามารถจับสารพิษต่างๆ รวมทั้ง AFB<sub>1</sub> การจับกันระหว่าง β-D-glucan และ AFB<sub>1</sub> โดยการสร้างพันธะไฮโดรเจนร่วมกับพันธะ van der Waals ระหว่าง aromatic ring กับหมู่ lactone และ ketone ของ AFB<sub>1</sub> ทำให้ผนังเซลล์ของยีสต์มีคุณสมบัติในการจับสารพิษ AFB<sub>1</sub> ได้<sup>6</sup> การศึกษาครั้งนี้เลือกใช้กากยีสต์ที่ผ่านกระบวนการหมักเบียร์และถูกทำให้แห้งโดยการอบแล้ว รวมถึงการเตรียมกากยีสต์ที่

pH ต่ำช่วยทำให้เกิดการปรากฏของ  $\beta$ -D-glucan ได้มากขึ้น จึงทำให้เห็นความสามารถอย่างชัดเจนของกากยีสต์ต่อการจับ AFB<sub>1</sub> ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งมีค่าร้อยละการจับเพิ่มขึ้น (ปริมาณ AFB<sub>1</sub> ถูกนำออกไปมากขึ้น) เมื่อความเข้มข้นกากยีสต์เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อปริมาณกากยีสต์คงที่ค่าร้อยละการจับ AFB<sub>1</sub> พบว่ามีค่าคงที่เช่นกันแม้ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันของ AFB<sub>1</sub> ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแม้ยีสต์ที่ผ่านการนำไปใช้หมักเบียร์มาแล้ว แต่ก็มีความสามารถในการจับกับสาร AFB<sub>1</sub> ได้ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้เพื่อลดการปนเปื้อนสารพิษ AFB<sub>1</sub> ในอาหารได้ในอนาคต

#### กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณบริษัทขอนแก่นบุญรอดบริวเวอรี่ จำกัด ที่ให้การสนับสนุนกากยีสต์สำหรับการวิจัยครั้งนี้

#### เอกสารอ้างอิง

1. Nikbakth Nasrabadi E, 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 Applied Microbiol* 2013;114:1507-15.
2. Wilaiparamat P, Porasuphatana S, Songsermsakul P. Binding efficiency of lactic acid bacteria strain *Lactobacillus* spp. to the reduction of aflatoxin B<sub>1</sub> in aflatoxin B<sub>1</sub>-contaminated peanuts. *Thai Journal of Toxicology* 2013;29:38-47.
3. Madrical-santillan, E, Morales-Gonzalez JA, Vargas-Mendoza N, et al. Antigenotoxic studies of different substances to reduce the DNA damage induced by aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A. *Toxins* 2010;2:738-57.
4. Bovo F, Franco LT, Rosim RE, et al. *In vitro* ability of beer fermentation residue and yeast-based products to bind aflatoxin B<sub>1</sub>. *Braz J Microbiol* 2015;46:577-81.
5. Jouany JP, Yiannikouris A, Bertin, G. The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. *Arch Zootec* 2005;26:50.
6. Rahaie S, Emam-Djomeh Z, Razavi SH, et al. Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* as a potential aflatoxin decontaminating agent in pistachio nuts. *Braz J Microbiol* 2010;41:82-90.

