

การเตรียม *Lactobacillus* spp. GP6 โพรไบโอติกบรรจุแคปซูลเคลือบเอนเทอริก

Preparation of *Lactobacillus* spp. GP6 probiotic enteric-coated capsules

วัลยา เสฐวรรกุล^{1*} และ นัฐกาญจน์ แดงมณี²

Wanlaya Settaworrakun^{1*} and Nattakan Dangmanee²

¹นักศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต
ถนนพหลโยธิน ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

²อาจารย์ประจำ หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต
ถนนพหลโยธิน ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

^{1*}Graduate student in Master of Science (Oriental Medicine) of Oriental Medicine College, Rangsit University,
Phahonyothin Rd., Lak-hok, Patumthane, Thailand 12000

²Lecturer in Master of Science (Oriental Medicine) of Oriental Medicine College, Rangsit University,
Phahonyothin Rd., Lak-hok, Patumthane, Thailand 12000

*Corresponding author. E mail: oriental_bb@hotmail.com

บทคัดย่อ

การเตรียมและศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 ในรูปแบบแคปซูลเคลือบเอนเทอริก โดยนำตะกอนของเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 กระจายตัวในสารละลาย soybean oligosaccharides เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใช้เป็นสาร cryoprotectant จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการแช่เยือกแข็ง และนำไปบรรจุแคปซูลเคลือบเอนเทอริก ผลการศึกษาพบว่าแคปซูลเคลือบเอนเทอริกมีเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 10^8 cfu/ml ความสม่ำเสมอของน้ำหนัก 100.15 ± 0.09 มิลลิกรัม การปลดปล่อยตัวเชื้อเกิดขึ้นในระบบจำลองของลำไส้ และมีจำนวนเชื้ออยู่รอดสูงหลังจากเก็บเป็นระยะเวลา 6 เดือน แคปซูลเอนเทอริกที่มีเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 มีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์

คำสำคัญ: โพรไบโอติก ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร *Lactobacillus* spp. GP6

Abstract

Enteric coated capsules containing *Lactobacillus* spp. GP6 were prepared and its properties were examined. *Lactobacillus* spp. GP6 cell pellet was suspended in 1% soybean oligosaccharides as cryoprotectant and then freeze-dried. *Lactobacillus* spp. GP6 dry power was filled into enteric coated capsules. The uniformity of weight, release profile and stability of prepared enteric coated capsules were evaluated. The results showed that

enteric coated capsules contain 10^8 cfu/ml of *Lactobacillus* spp. GP6. The uniformity of weight was complied with the requirement of British Pharmacopoeia criteria. *Lactobacillus* spp. GP6 was released in simulated intestinal tract. Moreover, this strain exhibited high survival rate after storage of 6 months. It is suggested that enteric coated capsules containing *Lactobacillus* spp. GP6 were possible to develop as commercial products.

Keywords: Probiotic, Dietary supplement, *Lactobacillus* sp. GP6

1. บทนำ

โพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์มีชีวิตเมื่อบริโภค ในปริมาณที่เพียงพอจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของ ผู้บริโภค (FAO/WHO, 2001) ซึ่งประโยชน์ของโพรไบโอติกต่อสุขภาพ ได้แก่ การปรับสมดุลของระบบทางเดินอาหารและระบบขับถ่าย การลดภาวะที่ร่างกายไม่สามารถย่อยหรือทนต่อน้ำตาลแลคโตส การป้องกันหรือลดระดับการเกิดสารก่อมะเร็ง การลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด การปรับเปลี่ยนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Marteau et al., 2002; Marianelli et al., 2010; De Vrese et al., 2001; Iannitti and Palmieri, 2010; Nguyen et al., 2007; Park et al., 2007; Oelschlaeger, 2010) โพรไบโอติกจึงได้รับความสนใจนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในรูปแบบต่างๆ เช่น ผง ยาเม็ด ยาแคปซูล ซึ่งการเตรียมผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโพรไบโอติกสำหรับรับประทาน ควรเตรียมเชื้อโพรไบโอติกในรูปแบบผงแห้ง โดยผ่านกระบวนการทำแห้งโดยการแช่เยือกแข็ง (freeze-drying) และใช้สาร cryoprotectant ที่เหมาะสมเพื่อให้เชื้ออยู่รอดได้ปริมาณมากจากกระบวนการดังกล่าว มีรายงานว่าโพรไบโอติกและไฟเบอร์จากพืชบางชนิดสามารถเพิ่มการอยู่รอดของเชื้อในระหว่างกระบวนการ freeze dry ได้ (Saarela et al., 2006; Hongpattarakere et al., 2013) และนำเชื้อโพรไบโอติกที่ได้มาเตรียมในรูปแบบแคปซูลเคลือบ (enteric coating) เพื่อป้องกันการแตกตัวในกระเพาะอาหารและเกิดการแตกตัวในลำไส้ (Gazzaniga et al.,

2006) ในด้านอาหาร *Lactobacillus* spp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกมีบทบาทสำคัญต่ออาหารหมักดองหลายชนิด ได้แก่ โยเกิร์ต นมเปรี้ยว ใส้กรอกเปรี้ยว แหนม ผักดอง และผลไม้ดอง มีการศึกษาการคัดแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากอาหารหมักดองชนิดต่างๆ ดังเช่น จากการศึกษาของนิ พิฐ พันธ์ และคณะ (2557) ได้แยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 จากแหนม หมู ซึ่งเชื่อนี้มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีคือ ทนต่อกรดและเกลือ น้ำดี และยับยั้งเชื้อ Enteropathogenic *Escherichia coli* DMST 30546 ได้ดีกว่ายา gentamicin อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงสนใจนำเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในรูปแบบแคปซูลเคลือบเอนเทอริก

2. วัตถุประสงค์

เพื่อเตรียมแคปซูลเคลือบเอนเทอริกของเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากร/กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาวิจัย

เชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 ที่แยกได้จาก แหนมหมู ใช้ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge; Universal 320, 320R)

3.2.2 เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-dryer; SHM 021 16-011 01)

3.2.3 เครื่องบรรจุแคปซูล (capsule filler; Model Panviv A01)

3.2.4 เครื่อง dissolution แบบ rotating paddle (dissolution tester; Model 64-100-121)

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมแคปซูลเคลือบเอนเทอริคที่มีเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6

3.3.1.1 เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 ในอาหาร De Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไม่มีอากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.1.2 นำเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 ที่เลี้ยงไว้มาหมวนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วย PBS pH 7.4 จำนวน 1 ครั้ง

3.3.1.3 นำเชื้อที่ได้ไปกระจายตัวในสารละลาย soybean oligosaccharides เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการแช่เยือก

3.3.1.4 นำผงเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 มาบรรจุลงแคปซูลเคลือบเอนเทอริค เบอร์ 1 โดยใช้เครื่องบรรจุแคปซูล และทำในสภาวะปราศจากเชื้อ

3.3.2 การประเมินคุณสมบัติแคปซูลเคลือบเอนเทอริคที่มีเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6

3.3.2.1 การหาความสม่ำเสมอของน้ำหนัก (uniformity of weight)

จากข้อกำหนดของเภสัชตำรับอังกฤษ (2001) ให้ทำการทดสอบดังนี้ สุ่มยาแคปซูลมา 20 แคปซูล แล้วนำมาชั่งเพื่อหาน้ำหนักของแต่ละแคปซูล จากนั้นจึงคำนวณหาน้ำหนักเฉลี่ยของยาแคปซูล การประเมิน:

ต้องมีไม่เกิน 2 แคปซูลเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ยมากกว่า percentage deviation (10 เปอร์เซ็นต์สำหรับน้ำหนักเฉลี่ยของแคปซูลน้อยกว่า 300 มิลลิกรัม และ 7.5 เปอร์เซ็นต์สำหรับน้ำหนักเฉลี่ยของแคปซูลมากกว่าหรือเท่ากับ 300 มิลลิกรัม) และต้องไม่มีแคปซูลใดเลยเบี่ยงเบนเกิน 2 เท่าของ percentage deviation

3.3.2.2 การศึกษาเกี่ยวกับการปลดปล่อยเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6

ทำศึกษาการปลดปล่อยเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 โดยใช้เครื่อง dissolution แบบ rotating paddle ใส่แคปซูลเคลือบเอนเทอริคที่มีเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 จำนวน 100 แคปซูลลงใน vessel ขนาด 1 ลิตรของเครื่องซึ่งมีระบบจำลองของกระเพาะอาหาร pH 1.2 ปริมาตร 900 มิลลิลิตรเป็น dissolution medium เครื่องทำงานที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแคปซูลใส่ลงในระบบจำลองของลำไส้ pH 7.4 ปริมาตร 900 มิลลิลิตรทันที เครื่องทำงานต่อที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในระหว่างการทดลอง สุ่มตัวอย่าง dissolution medium ที่เวลาต่าง ๆ กันและเติม dissolution medium กลับเข้าไปใน ปริมาตรที่เท่ากันกับการสุ่มตัวอย่างแต่ละครั้ง จากนั้นนำมานับจำนวนเชื้อที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน dissolution medium โดยวิธี plate counting บนอาหาร De Man Rogosa and Sharpe (MRS) agar และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยของเชื้อตามสมการ

$$\text{การปลดปล่อย (\%)} = (N_1/N_0) \times 100\%$$

N_1 คือ จำนวนเชื้อหลังการศึกษาการปลดปล่อยที่เวลาต่าง ๆ

N_0 คือ จำนวนเชื้อก่อนการศึกษาการปลดปล่อย (Dangmanee, 2013)

3.3.2.3 การศึกษาความคงตัว

เก็บแคปซูลเคลือบเอนเทอริกที่มีเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 ในภาชนะที่ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน ในระหว่างการเก็บสุ่มยาแคปซูลมาทุก 1 เดือนเพื่อสังเกตลักษณะภายนอกของยาแคปซูลและจำนวนเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 ที่อยู่รอด และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดตามสมการ

$$\text{การอยู่รอด (\%)} = (N_1/N_0) \times 100\%$$

N_1 คือ จำนวนเชื้อหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่เวลาต่าง ๆ

N_0 คือ จำนวนเชื้อก่อนการศึกษาความคงตัว

4. ผลการวิจัย

4.1 แคปซูลเคลือบเอนเทอริกที่มีเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6

นำผงเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 บรรจุลงแคปซูลเคลือบเอนเทอริก เบอร์ 1 โดยใช้เครื่องบรรจุแคปซูล และทำในสภาวะปราศจากเชื้อ มีเชื้อ 3.34×10^8 cfu/ml (100 มิลลิกรัม)

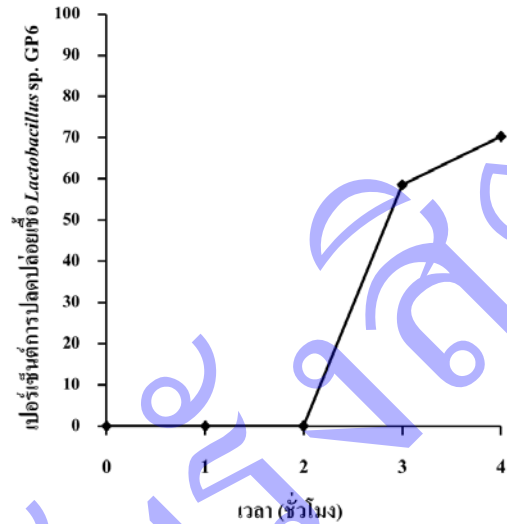
4.2 คุณสมบัติแคปซูลเคลือบเอนเทอริกที่มีเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6

4.2.1 ความสม่ำเสมอของน้ำหนัก (uniformity of weight)

น้ำหนักเฉลี่ยของยาแคปซูลเท่ากับ 100.15 ± 0.09 มิลลิกรัม เป็นไปตามข้อกำหนดของเภสัชตำรับอังกฤษให้ทำการทดสอบดังนี้ นั่นคือต้องมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 90.135-110.165 มิลลิกรัม

4.2.2 การปลดปล่อยเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6

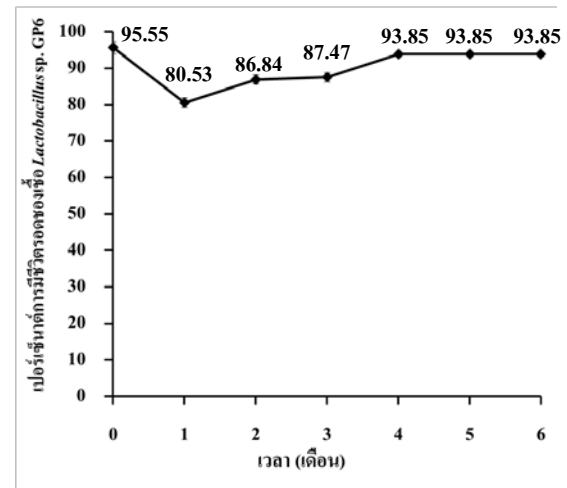
เชื้อเริ่มมีการปลดปล่อยออกจากแคปซูลหลังเวลา 2 ชั่วโมงในระบบจำลองของลำไส้ pH 7.4 มีการปลดปล่อยเพิ่มมากขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 4 (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 จากแคปซูลเคลือบ

4.2.3 ความคงตัว

ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน พบว่า เชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 มีการอยู่รอดสูงอยู่ในช่วง 81-94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาเริ่มต้นซึ่งมีจำนวนเชื้อ 96 เปอร์เซ็นต์ พบว่าจำนวนเชื้อลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 จากแคปซูลเคลือบเอนเทอริก

5. การอภิปรายผล

แคปซูลเคลือบเอนเทอริก ที่มีเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 ซึ่งเชื้ออยู่ในรูปของผงแห้งที่ใช้ soybean oligosaccharides เป็น cryoprotectant ในกระบวนการ freeze-dry ทำให้เชื้อมีอัตราการอยู่รอดสูง และลักษณะการใช้โพรไบโอติก soybean oligosaccharides ผสมกับโพรไบโอติก *Lactobacillus* spp. GP6 นี้ เรียกว่า ซินไบโอติก (symbiotic) จากการศึกษาคุณสมบัติของแคปซูลพบว่าความสม่ำเสมอของน้ำหนักแคปซูลเป็นไปตามกำหนดของเก็ซต์สำหรับอังกฤษซึ่งอยู่ในช่วง 90.135-110.165 มิลลิกรัม และเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 ถูกปลดปล่อยออกจากแคปซูลในระบบจำลองของลำไส้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อโพรไบโอติกนี้จะถูกนำส่งไปสู่ลำไส้ สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้มีรายงาน ว่า เชื้อโพรไบโอติก *Lactobacillus plantarum* T23/3 ที่มีการผลิตในรูปแบบผงแห้งและบรรจุในแคปซูลที่เคลือบด้วย Eudragit® L100 (Nakpheng et al., 2012) ซึ่งเมื่อไม่เกิดการปล่อยเชื้อโพรไบโอติกในสภาวะจำลองกระเพาะอาหาร แต่เชื้อถูกปลดปล่อยในสภาวะจำลองของลำไส้ ทำให้เชื้อถูกปลดปล่อยที่อวัยวะเป้าหมาย นั่นคือ ลำไส้ และก่อนจะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยในสัตว์ทดลองและมนุษย์ต่อไป

6. บทสรุป

แคปซูลเคลือบเอนเทอริก ที่มีเชื้อ *Lactobacillus* spp. GP6 พบ ปริมาณ เชื้อ สูง ตามมาตรฐานของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกคือ ควรมีปริมาณเชื้อ 10^8 cfu/ml ในด้านคุณสมบัติของแคปซูลเคลือบ พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของยาแคปซูลเป็นไปตามข้อกำหนดของเก็ซต์สำหรับอังกฤษ เชื้อเริ่มมีการปลดปล่อยออกจากแคปซูลในระบบจำลองของลำไส้

และเชื้อมีการอยู่รอดสูงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ เป็นเวลา 6 เดือน

7. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปีการศึกษา 2557

8. เอกสารอ้างอิง

นิพิฐพนธ์ จารุวัฒนาชนต์, กนกวรรณ พลับจิ้น และ วันวิภา สกุลธนะศักดิ์. (2557). การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากແหมหม. ปรินซิพนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต, สาขาการแพทย์แผนตะวันออก วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก, มหาวิทยาลัยรังสิต.

Dangmanee, N. (2013). Probiotic Properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 and pharmaceutical preparation design. Doctor of Philosophy in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University.

British Pharmacopoeia. (2011). Uniformity of weight (Ph. Eur. Method 2.9.5) London: The Stationary Office. V/1: A326.

De Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fensalau, S., Laue, C. & Schrezenmeir, J. (2001). Probiotics compensation for lactase insufficiency. The American Journal of Clinical Nutrition. 73: 421S-429S.

Gazzaniga, A., Maroni, A., Sangalli, M.E. & Zema, L. (2006). Time-controlled oral delivery

- systems for colon targeting. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 3: 583-597.
- Hongpattarakere, T., Rattanaubon, P. & Buntin, N. (2013). Improvement of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* survival using water extracts and crude fibers from food crops. *Food and Bioprocess Technology*. 6: 1885-1896.
- Iannitti, T. & Palmieri, B. (2010). Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clinical Nutrition*. 29: 701-725.
- Marianelli, C., Cifani, N. & Pasquali, P. (2010). Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions. *Research in Microbiology*. 161: 673-680.
- Marteau, P., Seksik, P. & Jian, R. (2002). Probiotics and intestinal health: a clinical perspective. *British Journal of Nutrition*. 88: s51-s57.
- Nakpheng, T., Kha, R., Balekar, N., Kaewnopparat, S. & Srichana, T. (2012). *Lactobacillus plantarum* T23/3 as a potential probiotic strain isolated from feces. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 36: 83-93.
- Nguyen, T.D.T., Kang, J.H. & Lee, M.S. (2007). Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *International Journal of Food Microbiology*. 113: 358-361.
- Oelschlaeger, T.A. (2010). Mechanisms of probiotic actions – A review. *International Journal of Medical Microbiology*. 300: 57-62.
- Park, Y.H., Kim, J.G., Shin, Y.W., Kim, S.H. & Whang, K.Y. (2007). Effect of dietary inclusion of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17: 655-662.
- Saarela, M., Virkajärvi, L., Nohynek, L., Vaari, A. & Mättö, J. (2006). Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. *International Journal of Food Microbiology*. 112: 171-178.