

การพัฒนาสูตรแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพื่อเป็น
สารเสริมชีวนะ

นางสาว ฐานีรัชต์ บัวทอง
นาย มานะ ชูบรรจง

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2542

Formulation of Lactic Acid Bacteria as Probiotics

MISS THANEERAT BUETHONG

MR.MANA SHUBANCHONG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULLFILMENT
OF THE REQUIREMENT FOR
THE BACHELOR DEGREE OF SCIENCE IN PHARMACY
FACULTY OF PHARMACY
MAHIDOL UNIVERSITY

1999

แบบเสนอโครงการพิเศษ

ชื่อโครงการ: ภาษาไทย การพัฒนาสูตรแลคติกแอซิคแบคทีเรียเพื่อเป็นสารเสริมชีวณะ
: ภาษาอังกฤษ Formulation of lactic acid bacteria as probiotics

จำนวนนักศึกษา 2 คน

ผู้ทำการวิจัย

1 นาย มานะ ชูบรรจง รหัส 3803063 PYPY/B

2 นางสาวฐานันท์ บัวทอง รหัส 3803024 PYPY/B

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

1 รศ.ดร.จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์ ภาควิชา เกษตรจุลชีววิทยา

2 รศ. อารมณ พงษ์พันธุ์ ภาควิชา เกษตรจุลชีววิทยา

3 ผศ. ยุพิน รุ่งเวชวุฒิวิทยา ภาควิชา เกษตรอุตสาหกรรม

สถานที่ทำโครงการพิเศษ

ภาควิชาเกษตรจุลชีววิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ความเป็นมาและเหตุผล

Lactic acid bacteria เป็น micrororganism ในตระกูล Lactobacteriaceae เป็น bacteria gram positive, ไม่สามารถสร้าง spore. รูปร่างเป็นท่อน, ทดสอบ catalase test ให้ผลลบ

Lactic acid bacteria เป็น bacteria ที่ไม่ก่อโรค ซึ่งใช้ประโยชน์เกี่ยวกับอาหารมาแต่โบราณ และได้นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์นม และใช้ในอาหารหมักดอง ซึ่ง bacteria ชนิดนี้สามารถผลิตสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ lactic acid ซึ่งมีฤทธิ์เป็น สารกันบูด (Preservative) (Gonzalay et al ., 1993; Banks, 1986; Gasson, 1993) และได้มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

ในปัจจุบันได้มีการนำ Lactic acid bacteria มาเป็นสารเสริมสุขภาพ (Health Foods) เพราะจะช่วยคงสภาพความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ bacteria ที่สำคัญในการให้ผลที่ส่งเสริมสุขภาพคือ Lactobacillus acidophilus

มีงานวิจัยบ่งบอกถึงประโยชน์ของ Lactic acid bacteria ในด้านต่างๆ ดังนี้

เช่น

- การควบคุมการติดเชื้อในลำไส้ที่เป็นสาเหตุของโรกระบบทางเดินอาหารเช่น

Samonella, Shigella, S.aureus (Hekmat and McMahon, 1992.; Fernandes et al., 1987; Liao, 1994)

- สามารถนำมาใช้กับผู้ป่วยที่ขาดเอนไซม์ย่อยน้ำตาลแลคโตส

- ยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดมะเร็งโดยทำหน้าที่เป็น immunodulator (Marteau and Rambaud, 1993)

- การควบคุมระดับของ serum cholesterol (Walker and Gilland, 1993; Buck and Gilland, 1994)

จากที่กล่าวมาข้างต้น ปัจจุบันจึงได้มีการนำ Lactobacilli ที่มีชีวิตนำมาผลิตเป็นอาหารเสริมสุขภาพ (Health Products) ในรูปแบบต่างๆ เช่น ยาเม็ดและแคปซูล เป็นต้น

อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ก็คือการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในสภาพการเก็บรักษา (Shelf-life) ดังนั้นจึงจะต้องมีสูตรผสมที่ดีช่วยให้จุลินทรีย์มีชีวิตรอดยาวนานขึ้น

ในการศึกษานี้จะได้ทำการเตรียม Formulation ในรูปของ Capsule โดยใช้ แครอท ผักรักกล้วยและฟักทองเป็น diluent เพราะผักและผลไม้เหล่านี้มีสารอาหารที่รู้จักกันดี คือ β -carotene และใช้ Aerosil เป็น lubricant ซึ่ง Formulation นี้จะให้ Ingredient อย่างง่ายและมีผลรบกวนต่อเชื้อน้อยที่สุดและสามารถผลิตได้ด้วยวิธีที่ไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้ที่สำคัญ คือ สารเหล่านี้สามารถลดความชื้นและ เนื่องจากการสัมผัสกับออกซิเจน ทำให้เชื้อมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาสูตรผสม (Formulation) ที่เหมาะสมสำหรับ Lactic acid bacteria สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้เพื่อใช้เป็นสารเสริมชีวนะในคน

ระเบียบวิธีทำโครงการพิเศษ

วิธีการดำเนินงาน

1. เลือก Lactic acid bacteria สายพันธุ์ที่เหมาะสมจาก ที่มีอยู่แล้วใน Stock culture
2. ตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อ Lactic acid bacteria สายพันธุ์ที่คัดเลือกมา
3. นำเชื้อ Lactic acid bacteria ที่ตรวจสอบแล้วมาเลี้ยงให้ได้ปริมาณมากพอใน MRS Broth

4. นำเชื้อไป Lyophilize จนแห้ง
5. นำมาผสมกับสารช่วยอื่นๆที่เตรียมไว้แล้วได้แก่ ผงแห้งของแคโรท ฝรั่ง กล้วยและฟักทอง ผลิตออกมาเป็น Capsule
6. ทำการวิเคราะห์และแปรผลโดยเทียบความแตกต่างของจำนวนรอดชีวิตของเชื้อระหว่าง Formulation ต่างๆ

แผนการดำเนินงาน

กิจกรรม	เดือน1	เดือน2	เดือน3	เดือน4
1. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ Lactic acid bacteria ให้ได้ปริมาณมากที่สุด	_____			
2. ค้นคว้าหา Formulation ที่เหมาะสมกับเชื้อ Lactic acid bacteria	_____	_____		
3. ทำการผลิต Capsule โดยการใช้ Capsule Filling Machine Panviv A01		_____	_____	
4. ทำการประเมินผล Capsule ที่ผลิตได้ทุกเดือนละครึ่ง		_____	_____	_____

เครื่องมือที่ใช้

1. Plate
2. Lyophilize
3. Capsule Filling Machine Panviv A01
4. Capsule
5. Autoclave
6. Hot Air Oven
7. Milling Machine
8. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบดิจิทัล

การวิเคราะห์และแปลผลข้อมูล

โดยการเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเชื้อใน Formulation ต่างๆกับจำนวนเชื้อที่เดิมลงไป ใน Formulation นั้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สูตรผสมของสารเสริมชีวิตที่เหมาะสมสำหรับ Lactic acid bacteria สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกไว้ ซึ่งสูตรผสมเหล่านั้น ทำให้ Lactic acid bacteria ยังคงมีชีวิตอยู่ได้ดีที่สุด และในปริมาณที่มากพอที่จะเป็นสารเสริมชีวิตได้

งบประมาณ

1. MRS Media จำนวน	1	ขวด	เป็นเงิน	1,200	บาท
2. แครอทสด จำนวน	1	กิโลกรัม	เป็นเงิน	40	บาท
3. ฟรุ้งสด จำนวน	1	กิโลกรัม	เป็นเงิน	25	บาท
4. ฟักทองสด จำนวน	1	กิโลกรัม	เป็นเงิน	50	บาท
5. กลัวยสด จำนวน	1	หวี	เป็นเงิน	25	บาท
6. Capsule No.1จำนวน	2,000	Capsule	เป็นเงิน	1,000	บาท

เอกสารอ้างอิง

- Banks,J.G., Boards,R.G., and Sparks,N.H.C. 1986. Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation of the future. *Biotech.Appl.Biochem.* 8:103-147.
- Buck,L.M., and Gilland,S.E. 1994. Comparisons of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth.*J. Dairy Sci.* 77:2925-2933.
- Fernandes,C.F.,Shahani,K.M., and Amer,M.A. 1987. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dietary products. *FEMS Microbiol. Rev.* 46:343-356.
- Gasson,M.J. 1993. Progress and potential in the biotechnology of the lactic acid bacteria. *FEMS.Microbiol. Rev.* 12:3-19.
- Gonzalez,S.N.,Apella,M.C., Romero,N.C.,DeMacias,M.E.N.and Oliver,G. 1993. Inhibition of enteropathogen by lactobacilli strains used in fermented milk. *J. Food Protect.* 56:773-776.

- Hekmat,S., and McMahon,D.J. 1992. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food.J. Dairy Sci. 75:1415-1422.
- Liao,C.C., Yousef,A.E., Chism,G.W.,andRichte,E.R., 1994. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in buffer, culture media and foods by lacidin A, a bacteiocin produced by *Lactobacillus acidophilus* OSU 133. J.Food Safety. 14:87-100.
- Marteau,P., and Rambaud,J.C.,1993. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. FEMS Microbiol. Rev. 12:207-220.
- Walker,D.K., andGilliland,S.E. 1993. Relationship among bile tolerance, bile salt deconjugation and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*.J. Dairy Sci. 76:956-961.

การพัฒนาสูตรตำรับแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพื่อเป็นสารเสริมชีวนะ

ฐานิรัชต์ บัวทอง,มานะ ชูบรรจง

อาจารย์ที่ปรึกษา: จันทรเพ็ญ วิวัฒน์*, อารมณ พงศ์พันธุ์*, ยุพิน รุ่งเวชวุฒิวิทยา *

,*ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล*

,*ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยมหิดล

คำสำคัญ: แลคติกแอซิดแบคทีเรีย, สารเสริมชีวนะ, สารเพิ่มปริมาณ, สารด้านการออกซิเดชัน

เป็นการพัฒนาตำรับของแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพื่อเป็นสารเสริมชีวนะ ให้สามารถเก็บรักษาได้นานยิ่งขึ้นในรูปแบบของแคปซูล โดยใช้ผลไม้ชนิดต่างๆเป็นสารเพิ่มปริมาณ ได้แก่ กล้วย น้ำว้า ฝรั่ง พักทอง และข้าวโพด เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus fermentum* 71 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TGE agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ได้เชื้อความเข้มข้น 10^{14} CFU/mL แล้วนำเชื้อที่ได้ มาเตรียมตำรับเป็นจำนวน 8 ตำรับ โดยแบ่งเป็น 2 สภาวะ คือสภาวะที่ไม่มีสารด้านการออกซิเดชัน และสภาวะที่มีสารด้านการออกซิเดชัน จากนั้นทำการประเมินผลโดยการหาปริมาณแบคทีเรีย ที่ยังคงรอดชีวิตในสูตรตำรับต่างๆ แล้วเปรียบเทียบการลดลงของแบคทีเรียในสูตรตำรับต่างๆ พบว่าการลดลงของแบคทีเรียในสภาวะที่มีสารด้านการออกซิเดชัน มีการลดลงน้อยกว่าสภาวะ ที่ไม่มีสารด้านการออกซิเดชันในทุกตำรับ การใช้สารเพิ่มปริมาณชนิดต่างๆ พบว่าในสภาวะที่มี สารด้านการออกซิเดชัน ตำรับที่ผสมผงพักทองมีการลดลงของแบคทีเรียน้อยที่สุด (จาก 5.6×10^9 CFU/capsule เป็น 4.1×10^9 CFU/capsule) รองลงมา คือตำรับที่ผสมผงฝรั่ง ,ผงกล้วย และผงข้าวโพด ตามลำดับ ในสภาวะที่ไม่มีสารด้านการออกซิเดชัน ตำรับที่ผสมผงฝรั่งมีการลดลง ของแบคทีเรียน้อยที่สุด (จาก 8.2×10^9 CFU/capsule เป็น 4×10^9 CFU/capsule) รองลงมา คือตำรับที่ผสมผงข้าวโพด,ผงพักทอง,และผงกล้วย ตามลำดับ

Formulation of Lactic Acid Bacteria as Probiotics

Thaneerat Buethong, Mana Shubanchong

Project advisor: Chanpen Wiwat*, Arome Pongpun*, Yupin Rungvachvuttivittaya*

*Department of Microbiology Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

*Department of Manufacturing Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Key word: Lactic Acid Bacteria, Probiotics, diluent, antioxidant

Formulation of Lactic Acid Bacteria (LAB) capsule as Probiotics was developed for longer shelf life. In this study, dosage form were prepared by using fruit powders e.g. banana, guava, pumpkin, and corn starch as diluents. *Lactobacillus fermentum* 71 was grown in TGE agar incubated at 37C for 24 hours . Cells were harvested and suspended in 20% skim milk containing 1% sodium glutamate to be 10^{14} CFU /mL. Eight formulations were divided into 2 group, with and without antioxidant, which was ascorbic acid. The number of survival in all formulations were counted weekly for 11 weeks. The results found that the formulations containing antioxidant could preserve bacteria better than the ones without antioxidant. In the presence of antioxidant, the survivors in formulations containing pumpkin, guava, banana, or corn starch decreased from 5.6×10^9 , 5.8×10^9 7×10^9 , 1.8×10^{10} CFU/capsule to 4.1×10^9 , 4×10^9 , 5.1×10^9 , 7×10^9 CFU/capsule, respectively. In condition without antioxidant, the survivors in formulations containing banana, pumpkin, guava or corn starch decreased from 2.9×10^{10} , 3.1×10^{10} , 8.2×10^9 , 2.9×10^{10} CFU/capsule to 1.8×10^9 , 3.8×10^9 , 4×10^9 , 4.3×10^9 CFU/capsule respectively.