

<b>Thesis Title</b>	Development of Probiotic Tablets	
<b>Author</b>	Miss Srikanjana Klayraung	
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Pharmacy)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Assoc.Prof.Dr.Siriporn Okonogi	Chairperson
	Prof.Dr.Helmut Viernstein	Member
	Assoc.Prof.Dr.Jakkapan Sirithunyalug	Member

### ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) isolates were gathered from one hundred faecal samples of healthy children and one hundred of various Thai fermented foods, particularly in Chiang Mai Province, Thailand. Resistance to acid and bile tolerance were used as the primary criteria to select the possible probiotic bacteria. The strains were further examined for survival in phosphate buffer at pH 2, 2.5, 3 and 7 for 2 hours, growth in the presence of 0.3, 0.5 and 1% bile salt (Oxgall), antibacterial activities against *Escherichia coli* TISTR 780, *Salmonella typhi* DMST 5784, and *Staphylococcus aureus* TISTR 029 using agar spot on lawn method and hydrophobicity. According to the obtained results, nine selected isolates which

showed the highest probiotic properties were identified to species by determination of biochemical characteristics using API 50 CHL and Biolog System, and PCR techniques - *Lactobacillus fermentum* and *L.plantarum*. Furthermore, the antibiotic susceptibility of these selected isolates were also determined using agar dilution method. Most of selected isolates were susceptible to tested antibiotic agents: chloramphenicol, quinupristin, erythromycin, kanamycin linezolid, rifampicin, streptomycin, and tetracycline, however they were classified as resistant to ciprofloxacin and vancomycin. Beside in vitro study, strains of *L. fermentum* no. FTL 2311, FP 3007, and FP 3010 showed safety for acute oral toxicity test in animal experiment. . A very high inoculation dosage ( $10^{10}$  cfu/mouse/day) of the test strains was used. All animals were healthy and survived the inoculation after 14 days. Moreover, the mice treated with  $10^{10}$  cfu/mouse/day of the isolated lactobacilli presented a significantly higher weight gain than those in the control group. From all results, we concluded that *L. fermentum* FTL 2311 showed the highest probiotic potential.

According to the results from the first part, *L. fermentum* FTL 2311 was considered for probiotic formulation studies. The probiotic products available in the market nowadays are mostly in the form of liquid or semisolid formulations which show low cell viability after oral administration, mainly because the bacteria do not survive the harsh conditions in the stomach. The development of suitable dosage forms to give a higher bacterial survival is the main aim of the present study. Therefore, a study was done to evaluate whether it is possible to develop a tablet formulation of probiotics. An anticipated advantage is that due to the low water-activity lyophilized bacterial cells will preserve their viability. Further, by a proper

selection of the tablet forming matrix, it is foreseen that the entrapped bacteria are protected against the low pH in the stomach. In this study, the effects of cellulose, hydroxypropyl methylcellulose phthalate 55 (HPMCP 55) as tablet excipient and a compression force on bacterial survival were investigated. Additionally, the effect of some swelling agents on bacterial survival was investigated as well. The results showed that tablet excipients and compression force affected the properties of probiotic tablets in terms of hardness and disintegration as well as the survival of the bacteria. The hardness of the tablets increased with increase of HPMCP content. Tablets with high compression force showed a slow disintegration time and high bacterial cell viability (more than 80%). Incorporation of sodium alginate in the tablets resulted in higher cell survival in the simulated GI fluid (>90%) and a suitable disintegration time (approximately 5 h). Furthermore, inulin, a prebiotic sugar, and banana which has been reported as a kind of fruit containing prebiotic sugar, were also used as excipients to formulate probiotic tablets. The survival rate of all tablets containing inulin and banana powder showed the potential to protect the LAB in acidic gastric condition. Moreover, tablets containing HPMCP 55 and banana powder, it was found that the formulation tablets containing HPMCP 55, sodium alginate and banana powder showed the highest survival rates in acidic condition. From this study, it can be concluded that probiotic bacteria can be formulated in tablet dosage forms. By a proper design of the formulation, a tablet with a good disintegration time and a high preservation of bacterial cell viability was obtained.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การพัฒนาขี้เถ้าโพรวินโต	
ผู้เขียน	นางสาวศรียาภรณ์ คล้ายเรือง	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.ศิริพร โอโกโนกิ	ประธานกรรมการ
	Prof.Dr.Helmut Viernstein	กรรมการ
	รศ.ดร.จักรพันธ์ ศิริธัญญาลักษณ์	กรรมการ
	บทคัดย่อ	

การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรวินโต โดยเริ่มจากการแยกแบคทีเรียแลคติกจากอุจจาระเด็ก จำนวน 100 ตัวอย่าง และ จากอาหารหมักพื้นเมืองจำนวน 100 ตัวอย่าง ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ โดยคุณสมบัติเบื้องต้นที่ใช้ในการคัดเลือก คือ ความทนทานต่อกรด และเกลือ น้ำดี จากนั้นนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มาทดสอบเพิ่มเติม โดยตรวจอัตราการรอดชีวิต และอัตราการเจริญในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 2, 2.5, 3 และ 7) และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ น้ำดี 0.3, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Escherichia coli* TISTR 780, *Salmonella typhi* DMST 5784 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 029 และหาค่า

hydrophobicity ต่อสารประกอบ hexadecane จากการทดสอบข้างต้น พบเชื้อแบคทีเรียแลคติกจำนวน 9 ไอโซเลต ที่มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก ผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวโดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ ชุดทดสอบ API 50 CH และ Biolog system รวมทั้งการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่าอยู่ในสปีชีส์ *Lactobacillus fermentum* และ *L. plantarum* นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ จำนวน 13 ชนิด โดยวิธี agar dilution เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านความปลอดภัยในการนำไปใช้ สรุปได้ว่า เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวไวต่อ chloramphenicol, quinupristin, erythromycin, kanamycin linezolid, rifampicin, streptomycin และ tetracycline ในขณะที่มีลักษณะคือยาต่อ ciprofloxacin และ vancomycin นอกเหนือจากนั้นได้ศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งในหนูทดลอง โดยให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียสูงที่สุดในปริมาณ 10<sup>10</sup> cfu/ตัว/วัน หนูทดลองทั้งหมดไม่ตาย และมีสุขภาพดีหลังจากทำการศึกษานาน 14 วัน ยิ่งไปกว่านั้นน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าหนูในชุดการทดลองควบคุม

จากผลการทดลองข้างต้นจึงพิจารณา *L. fermentum* FTL 2311 มาศึกษาการเตรียมตำรับยาโพรไบโอติก ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในท้องตลาดส่วนใหญ่อยู่ในรูปของเหลว หรือกึ่งแข็งกึ่งเหลว ซึ่งจะมีปริมาณการเซลล์ที่รอดชีวิตต่ำเนื่องจาก แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถผ่านสภาวะที่รุนแรงในกระเพาะอาหารได้ การพัฒนารูปแบบยาที่เหมาะสมที่จะทำให้การรอดชีวิตสูงจึงเป็นจุดประสงค์หลักของการทดลองนี้ ดังนั้นจึงได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาโพรไบโอติกในรูปแบบเม็ด โดยการเตรียมเม็ดยาในลักษณะของการเกิดโครงข่าย เพื่อเป็นการปกป้องเชื้อแบคทีเรียจากสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร ในการศึกษานี้เป็นการตรวจสอบผลการใช้ hydroxypropyl methylcellulose phthalate 55 (HPMCP 55) เป็น excipient ในการเตรียม

เม็ดยา และ แรงที่ใช้ในการตอกเม็ดยา ต่อการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรีย นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของการเติม swelling agent บางชนิด ต่อคุณสมบัติของเม็ดยา ได้แก่ ความแข็งของเม็ดยา การแตกตัวของเม็ดยา รวมถึงการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรีย จากผลการทดลองพบว่า excipient และแรงตอกอัด มีผลต่อคุณสมบัติของเม็ดยาทั้ง ความแข็งของเม็ดยา และการแตกตัวของเม็ดยา รวมทั้งการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรีย โดยความแข็งของเม็ดยาจะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณ HPMCP 55 เพิ่มขึ้นเมื่อแรงตอก การแตกตัวของเม็ดยาจะช้าลง และอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียจะสูงขึ้น (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเติม sodium alginate ลงในสูตรอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียในของเหลว simulated gastrointestinal tract จะสูงขึ้น (มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ inulin ซึ่งเป็นน้ำตาล prebiotic และ กล้วยซึ่งมีการรายงานว่าน้ำตาล prebiotic เป็นส่วนประกอบได้ถูกนำมาใช้ในการเตรียมตำรับโพรไบโอติกชนิดเม็ดด้วย โดย inulin และ ผงกล้วยมีประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์จากสภาพกรดในกระเพาะอาหาร ยิ่งไปกว่านั้นเม็ดยาโพรไบโอติกที่ประกอบด้วย HPMCP 55 และผงกล้วย ร่วมกับการเติม sodium alginate ยังให้อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียสูงที่สุดด้วย จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าสามารถเตรียมแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปแบบของยาเม็ดได้ ซึ่งจะสามารถแตกตัวได้ในเวลาที่ตี และสามารถป้องกันให้แบคทีเรียให้มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงด้วย