Thesis Title Development of Colon-Specific Starch Delivery System as Nutraceutical Product

Author Mrs. Tanaporn Ratithammatorn

Degree Doctor of Philosophy (Pharmacy)

Thesis Advisory Committee
Assoc. Prof. Dr. Jakkapan Sirithunyalug Advisor
Asst. Prof. Dr. Songwut Yotsawimonwat Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Narumol Thongwai Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Busaban Sirithunyalug Co-advisor

ABSTRACT

This study was undertaken to investigate the ability of *Lactobacillus* spp. and various kinds of bacteria from human faecal of healthy volunteers to hydrolyze native starch, also the development of starch in granule form by coating it with synthetic polymer and pectin for the development of colon-specific starch delivery system as a nutraceutical product.

Starches of glutinous rice, corn, potato, and mung bean were used to replace the standard carbon source (2% w/v) in a culture medium prepared at a temperature of 47 ± 2°C. These four kinds of starch still maintained their morphology when

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

examined by using an optical microscope under normal and polarized light conditions, after media preparation. They also exhibited birefringence as seen in native starch granules. The 15 species of *Lactobacillus* were used to test their potential in starch hydrolysis. Evidently, *L. amylovorus* was the only strain which could consume and produce a clear zone on the medium plates containing glutinous rice or corn starch. This phenomenon correlated with an adhesion test of bacteria applied to the two kinds of starch, which were suspended in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.0 as 2% by weight. The result revealed that adhesion was about 90%.

Various kinds of bacteria prepared from human feces were used in the *in vitro* 48 h fermentation study of these four kinds of native starches. The pH values of test samples significantly decreased ($P < 0.05$) after fermentation for 6, 12, 24 and 48 h when compared to non-fermentation. Short chain fatty acid concentration of acetic acid and propionic acid showed a trend to increase after 48 h. The amount of butyrate significantly increased ($P < 0.05$) after 48 h compared with the 1 h result. The starch granules began to change their morphology after 1 h of fermentation and a marked change was observed at 48 h when compared to the granules at the beginning of the experiment. The results were confirmed by X-ray diffraction, which revealed that the internal structure of these four kinds of starch granules became more amorphous as the incubation progressed, from 1 to 48 h, showing a halo pattern.

Glutinous rice starch was selected as a model of native starch because it can be easily hydrolyzed and is a carbon source for *L. amylovorus*. The glutinous rice starch was prepared in coated granule form by wet granulation as a colon-specific starch delivery system. The starch granules were coated with polymer Eudragit®

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

L100 and S100 in a ratio of 1:1 by a film coating technique of various film thicknesses resulting in 25%, 50%, and 100% weight increases. None of the coated starch granules could tolerate the acid condition, 0.1 N HCl pH 1.2, as simulated gastric fluid within 2 h. The starch granules that were coated with pectin types LC 710 (low methoxyl pectin; LM) and AMD 382 (high methoxyl pectin; HM) by an ionotropic gelation technique at various ratios (1:0, 0:1, 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1, 1:4 and 4:1 as concentration of 10% by weight), were taken to test the tolerance along the gastrointestinal tract. The pectin coated starch granule with LC 710 showed the highest effective protection against starch hydrolysis using a simulated gastric and small intestine fluid (PBS pH 6.8, 2 h), but then completely releasing starch granules in a PBS pH 7.4 as a simulated colonic fluid after 4 h. On the other hand, granules coated with AMD 382 could not tolerate the simulated gastric fluid condition. When the coating system was changed by using a combination of both types of pectin at various formulations, the effectiveness of starch protection depended on the ratio of pectin type LC 710 and AMD 382, from high to low in a series of combinations as follows; 4:1 > 3:1 > 2:1 > 1:1 > 1:2 > 1:3 > 1:4.

In conclusion, it could be stated in the present study that glutinous rice starch can be prepared in granule form and coated with pectin LC 710 that can tolerate acid media as a simulated gastric fluid and enzyme mimiced small intestine, releasing starch in media as simulated colonic fluids, which could be developed further to a nutraceutical product.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาระบบนำส่งแป้งสู่ลำไส้ใหญ่เพื่อเป็นอาหารเสริมสุขภาพ

ผู้เขียน นางธนาภร รติธรรมธร

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. จักรพันธ์	ศิริธัญญาลักษณ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผศ.ดร. ทรงวุฒิ	ยศวิมลวัฒน์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ.ดร. นฤมล	ทองไว	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ.ดร. บุษบัน	ศิริธัญญาลักษณ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการพิสูจน์ความสามารถของแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสและแบคทีเรียหลากสายพันธุ์ที่ได้จากอุจจาระอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีในการย่อยสลายแป้งดิบชนิดต่างๆ รวมถึงการพัฒนาวิธีการนำส่งแป้งที่อยู่ในรูปแกรนูลโดยการเคลือบด้วยโพลิเมอร์และเคลือบด้วยเพคติน เพื่อพัฒนาไปสู่ระบบการนำส่งแป้งไปยังลำไส้ใหญ่ในการใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ

แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง และแป้งถั่วเขียว ถูกนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณร้อยละสองโดยน้ำหนักที่อุณหภูมิ $47 \pm 2°C$ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย หลังจากการเตรียมแป้งทั้ง 4 ชนิด เม็ดแป้งไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและยังคงแสดงคุณสมบัติการบิดระนาบแสงโพลาไรซ์ (birefringence) เหมือนที่พบในแป้งดิบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับความสามารถในการย่อยแป้งทั้ง 4 ชนิดที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ *Lactobacillus* จำนวน 15 ชนิดพบว่า มีเพียง *Lactobacillus amylovorus* ชนิดเดียวเท่านั้นที่มีความสามารถในการย่อยแป้งข้าวเหนียวและแป้งข้าวโพด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาถึงความสามารถในการเกาะติดของ *L. amylovorus* บนเม็ดแป้งทั้งสองชนิดนี้ที่ใช้แป้งในปริมาณร้อยละสองโดยน้ำหนักใน phosphate buffered saline (PBS) pH 7.0 โดยมีการยึดเกาะได้ถึง 90%

แบคทีเรียหลากสายพันธุ์ที่ได้จากอุจจาระถูกนำมาใช้ในการหมักแป้งดิบทั้ง 4 ชนิดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำการศึกษาแบบ *in vitro* พบว่า ค่า pH ของน้ำหมักจากแป้งทุกชนิดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ที่ 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงเมื่อเปรียบเทียบกับค่า pH เมื่อเริ่มต้น ภายหลังการหมักในชั่วโมงที่ 48 ปริมาณของกรดไขมันสายสั้น (acetate และ propionate) มีปริมาณสูงขึ้นเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ปริมาณของ butyrate มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชั่วโมงที่ 1 ของการทดลอง หลังการหมักเมื่อตรวจสอบโครงสร้างเม็ดแป้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า เม็ดแป้งทั้ง 4 ชนิด หลังการย่อย 1 ชั่วโมง เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะและการเปลี่ยนแปลงชัดเจนยิ่งขึ้นในชั่วโมงที่ 48 เมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดแป้งก่อนการหมัก ซึ่งเป็นผลที่สอดคล้องกับผลการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-ray diffraction) ที่บ่งบอกถึงความเป็นผลึกของโครงสร้างเม็ดแป้งทั้ง 4 ชนิดที่เริ่มเปลี่ยนแปลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 และเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

แป้งข้าวเหนียวถูกเลือกมาใช้เป็นตัวอย่างของแป้งดิบในการทดลองเพราะสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและถูกย่อยโดยแบคทีเรีย *L. amylovorus* แป้งข้าวเหนียวถูกเตรียมให้อยู่ในรูปแกรนูลและนำมาเคลือบเพื่อพิจารณาเป็นระบบการนำส่งแป้งไปยังลำไส้ใหญ่ หลังการเคลือบมีการทดสอบแบบ *in vitro* พบว่าการเคลือบโดยใช้โพลิเมอร์ Eudragit® L100 : S100 ในอัตราส่วน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1:1 ด้วยวิธีการเคลือบฟิลม์ เพื่อให้ได้ฟิล์มที่หนาในระดับต่างๆ คือ 25% , 50% และ 100% ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และนำไปทดสอบการทนต่อกรด 0.1 N HCl pH 1.2 นาน 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการเลียนแบบสภาพน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร พบว่าไม่สามารถผ่านขั้นตอนนี้ได้ ส่วนการเคลือบแกรนูลแป้งโดยใช้เพคตินชนิด LC 710 ที่มีหมู่เมธอกซิลต่ำ และ AMD 382 ที่มีหมู่เมธอกซิลสูง ด้วยวิธีการ Ionotropic gelation technique ในอัตราส่วน 1:0, 0:1, 1:1: 1:2: 2:1, 1:3, 3:1, 1:4 และ 4:1 ที่ความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนัก และนำไปทดสอบในน้ำย่อยเสมือนของระบบทางเดินอาหาร พบว่าแกรนูลแป้งที่เคลือบด้วยเพคติน LC 710 เพียงชนิดเดียวมีประสิทธิภาพสูงสุดในการปกป้องแกรนูลแป้งให้ทนต่อสภาพเสมือนของน้ำย่อยในส่วนของกระเพาะอาหารและส่วนลำไส้เล็ก (PBS pH 6.8, 2 ชั่วโมง) ของทางเดินอาหารได้และมีการปล่อยแป้งออกมาทั้งหมดในตัวกลางที่มีสภาพเสมือนในลำไส้ใหญ่ (PBS pH 7.4, 4 ชั่วโมง) ในขณะที่การเคลือบด้วยเพคติน AMD 382 เพียงชนิดเดียวไม่สามารถทนต่อสภาพเสมือนของน้ำย่อยตั้งแต่เริ่มต้นในกระเพาะอาหารได้ ส่วนการเคลือบแกรนูลแป้งด้วยอัตราส่วนผสมต่างๆของเพคตินทั้งสองชนิดนี้ พบว่า ประสิทธิภาพในการปกป้องแกรนูลแป้งขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของเพคตินชนิด LC 710 และ AMD 382 โดยพบว่าอัตราส่วนการเคลือบที่มีประสิทธิภาพในการปกป้องแกรนูลแป้งเป็นลำดับ คือ 4:1 > 3:1 > 2:1 > 1:1 > 1:2 > 1:3 > 1: 4

โดยสรุป ผลการทดลองครั้งนี้มีความเป็นไปได้ในการที่จะนำแป้งข้าวเหนียวมาเตรียมเป็นแกรนูลและเคลือบด้วยเพคติน LC 710 ที่สามารถทนต่อกรดและน้ำย่อยที่มีสภาพเสมือนในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก และปลดปล่อยแป้งออกมาในสภาพเสมือนที่ลำไส้ใหญ่ เพื่อนำไปพัฒนาเป็นอาหารเสริมสุขภาพได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved