



เลขที่สิทธิบัตร 108752

สป/200 - ข

สิทธิบัตรการประดิษฐ์

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญาออกสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถ้อยสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ดังที่ปรากฏในสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ 1701002764
วันขอรับสิทธิบัตร 19 พฤษภาคม 2560
ผู้ประดิษฐ์ นายดุสิต อธิณูวัฒน์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์ ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช

108752

ให้ผู้ทรงสิทธิบัตรนี้มีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ



ออกให้ ณ วันที่ 21 เดือน เมษายน พ.ศ. 2568
หมดอายุ ณ วันที่ 18 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2580

(นายกิตติวัฒน์ ปัจฉิมนันท์)
รองอธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา ปฏิบัติราชการแทน
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา
ผู้ออกสิทธิบัตร

- หมายเหตุ
- ผู้ทรงสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มตั้งแต่ปีที่ 5 ของอายุสิทธิบัตร มิฉะนั้น สิทธิบัตรนี้จะสิ้นสุดอายุ
 - ผู้ทรงสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวได้
 - การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามสิทธิบัตรและการโอนสิทธิบัตรต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่

พนักงานเจ้าหน้าที่



Ref.256801034515587

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อแสดงถึงการประดิษฐ์

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

- 5 การประดิษฐ์นี้เป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช (Natural Plant Elicitor, NPE) สูตรผงผสมน้ำก่อนใช้ (Wettable Powder: WP) ซึ่งสารออกฤทธิ์ (active ingredients) ประกอบด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus amyloliquefaciens* TU-Orga8 และ *Pseudomonas aeruginosa* TU-Orga9 โดยมีการคิดค้นอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 2 สูตร ซึ่งเหมาะสมต่อการขยายการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เพื่อทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ รวมทั้งพัฒนาสถานะและขั้นตอนการ
- 10 เพิ่มปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และพัฒนาสูตรสารพาที่สามารถปกป้องเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ให้รอดพ้นจากสภาพอุณหภูมิสูง ตลอดจนพัฒนาสถานะและขั้นตอนการผลิต NPE ในระดับอุตสาหกรรมด้วยวิธีทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry)

- ความมุ่งหมายของการประดิษฐ์นี้ คือ ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช (NPE) ที่สามารถขยายการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย NPE มีประสิทธิภาพส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ควบคุมโรคพืช และกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช ซึ่งง่ายต่อการเก็บรักษาและการขนส่ง โดยที่ผลิตภัณฑ์นี้สามารถใช้ร่วมในระบบการปลูกพืชปลอดภัยและระบบการปลูกพืชอินทรีย์ ตั้งแต่เริ่มปลูกจนกระทั่งเก็บเกี่ยว เพื่อลดและ/หรือทดแทนการใช้ฮอร์โมนพืชสังเคราะห์และสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช โดยมีวิธีการใช้ ได้แก่ ราดดิน คลุกเมล็ด พ่นใบ ผสมดินปลูกหรือผสมในปุ๋ยหมัก
- 15

- 20 สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสาขาการเกษตรและเทคโนโลยีชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

- ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่มีจำหน่ายทางการค้าส่วนใหญ่มีสารออกฤทธิ์ (active ingredients) เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์แกรมบวก ที่มีความคงในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี เช่น *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus* sp. โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่นำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์นั้น จะมาจากการขยายหรือเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีต้นทุนการผลิตสูง ส่งผลให้ราคาของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ เพิ่มสูงขึ้น ทำให้เป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตด้านค่าใช้จ่ายของเกษตรกร ในการซื้อผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ต่าง ๆ มาใช้ควบคุมโรคพืชที่
- 25
- 30 หลากหลายตามฤดูกาล อันส่งผลต่อต้นทุนการผลิตโดยรวมของเกษตรกร



นายสุวิชัย บุญอารี

ขณะเดียวกันผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช (NPE) ที่ประดิษฐ์ขึ้นนี้ มีสารออกฤทธิ์ (active ingredients) ประกอบด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ 2 สายพันธุ์ ที่มีคุณลักษณะโดดเด่นหลายประการ ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* TU-Orga8 และ *Pseudomonas aeruginosa* TU-Orga9 โดยเฉพาะ TU-Orga9 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และทั่วไปทนอุณหภูมิสูงเพียง 60 องศาเซลเซียส แต่จากการคิดค้นอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์จากวัสดุที่หาง่ายในท้องถิ่นและต้นทุนต่ำ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพภายใต้สภาวะที่จำเพาะเจาะจง (Agit 100 rpm, อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้น 7.0 และ pH สิ้นสุดประมาณ 8.12) ส่งผลให้ TU-Orga8 และ TU-Orga9 มีปริมาณประชากรเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง เป็น $10^{30} - 10^{35}$ cfu/ml และ $10^{18} - 10^{20}$ cfu/ml ตามลำดับ (จากกล้าเชื้อตั้งต้น 10^6 cfu/ml) ประกอบกับการคิดค้นสูตรสารพาหะที่มีประสิทธิภาพปกป้องเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ชนิด ให้รอดพ้นจากสภาพอุณหภูมิสูงภายในเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) ซึ่งเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส อีกทั้ง NPE ยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชโดยตรง ด้วยกลไกการผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiosis) และแย่งแย่งอาหารและที่อยู่อาศัยของเชื้อโรค (competition) โรคพืชที่ควบคุมได้ประสบความสำเร็จ ได้แก่ โรคข้าว (โรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง โรคใบหงิก โรคใบจุดสีน้ำตาล และโรคเมล็ดด่าง) โรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม โรครากเน่าของมันสำปะหลัง และโรคของพืชผัก (โรคเน่าดำ โรคเน่าและ และโรคใบจุดอัลเทอร์นาเรีย) นอกจากนี้ NPE ยังกระตุ้นให้พืชสะสมสาร salicylic acid, β -1,3-glucanase, peroxidase, auxin, indole-3-acetic acid และ gibberellin เป็นต้น เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชให้รอดพ้นจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคและเพิ่มภูมิคุ้มกันพืชให้รอดพ้นจากสภาวะความเครียดต่าง ๆ ทั้งที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิตได้ทันสถานการณ์

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ผู้ประดิษฐ์ได้พัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ สูตร 1 และสูตร 2 ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณ TU-Orga8 และ TU-Orga9 ตามลำดับ โดยในสูตรอาหารดังกล่าว จะมีสารสกัดถั่วเขียวงอกหรือถั่วเหลืองเป็นหลัก เนื่องจากถั่วเขียวและถั่วเหลืองมีปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปฏิปักษ์ และสูตรอาหารดังกล่าวยังประกอบด้วย กลีเซอรอลที่มีคุณสมบัติพิเศษในการปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม โดยเฉพาะอุณหภูมิสูง ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นขั้นตอนการประดิษฐ์ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช (Natural Plant Elicitor, NPE) สูตรผสมน้ำก่อนใช้ (Wettable Powder: WP) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

1. เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ TU-Orga8 และ TU-Orga9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณที่คิดค้นขึ้นมาใหม่ 2 สูตร

ก. สูตร 1 อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณ *Bacillus amyloliquefaciens* TU-Orga8

สูตรผสม ประกอบด้วย

สารสกัดถั่วเขียวงอก ร้อยละ 10-30 โดยปริมาตร



นายสุวิทย์ บุญอารี

กากน้ำตาล	ร้อยละ 5	โดยปริมาตร
กลีเซอรอล	ร้อยละ 10	โดยปริมาตร
น้ำสะอาด	ร้อยละ 55-75	โดยปริมาตร

ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณสูตร 1

- 5 1) เตรียมสารสกัดถั่วเขียวด้วยการแช่เมล็ดถั่วเขียวปริมาตร 100 กรัม ด้วยน้ำสะอาด ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หรือ กระทั่งเมล็ดเริ่มงอก
- 2) บั่นเมล็ดถั่วเขียวงอกด้วยเครื่องปั่น
- 3) กรองด้วยผ้าขาวบางหรือกรวยกรอง เพื่อให้ได้สารสกัดถั่วเขียว
- 4) ผสมสารสกัดถั่วเขียว ร้อยละ 10-30 โดยปริมาตร ที่ได้จากข้อ 3) กับกากน้ำตาล ร้อยละ 5 โดยปริมาตร

10 5 โดยปริมาตร

- 5) เติมกลีเซอรอล ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงในส่วนผสมได้จาก 4)
- 6) ปรับปริมาตรส่วนผสมในข้อ 5) ด้วยน้ำสะอาด ร้อยละ 55-75 โดยปริมาตร
- 7) ต้มฆ่าเชื้ออาหารเพิ่มปริมาณแบบที่เรียปฏิบัติกันนาน 15-20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปใช้เพิ่มปริมาณแบบที่เรียปฏิบัติกัน TU-Orga8 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

- 15 ข. สูตร 2 อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณ *Pseudomonas aeruginosa* TU-Orga9

สูตรผสม ประกอบด้วย

สารสกัดถั่วเหลือง	ร้อยละ 10-30	โดยปริมาตร
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	ร้อยละ 0.5	โดยปริมาตร
กลีเซอรอล	ร้อยละ 10	โดยปริมาตร
น้ำสะอาด	ร้อยละ 60-80	โดยปริมาตร

20

ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณสูตร 2

- 1) เตรียมสารสกัดถั่วเหลืองด้วยการแช่เมล็ดถั่วเหลืองปริมาตร 100 กรัม ด้วยน้ำสะอาด ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
- 2) บั่นเมล็ดถั่วเหลืองด้วยเครื่องปั่น
- 25 3) กรองด้วยผ้าขาวบางหรือกรวยกรอง เพื่อให้ได้สารสกัดถั่วเหลือง
- 4) ผสมสารสกัดถั่วเหลือง ร้อยละ 10-30 โดยปริมาตรที่ได้จากข้อ 3) กับโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร
- 5) เติมกลีเซอรอล ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงในส่วนผสมได้จาก 4)
- 6) ปรับปริมาตรส่วนผสมในข้อ 5) ด้วยน้ำสะอาดร้อยละ 60-80 โดยปริมาตร
- 30 7) ต้มฆ่าเชื้ออาหารเพิ่มปริมาณนาน 15-20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปใช้เพิ่มปริมาณแบบที่เรียปฏิบัติกัน TU-Orga9 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ


นายสุวิชัย บุญอารี

2. สภาวะและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ประกอบด้วย

ก. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์สูตร 1 หรือ 2 ในปริมาณที่ต้องการใส่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ข. เติมหักเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml) ร้อยละ 1 โดยปริมาตรและ
5 Antifoam ร้อยละ 3 โดยปริมาตร

ค. เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ภายใต้สภาวะ Agit 100 rpm, อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้น 7.0 และ pH สิ้นสุดประมาณ 8.12 เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จะได้หัวเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่พร้อมทำแห้งแบบพ่นฝอย

3. สภาวะและขั้นตอนการผลิตผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช (NPE) ในระดับ
10 อุตสาหกรรมด้วยวิธีทำแห้งแบบพ่นฝอย

ก. เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยการเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ TU-Orga8 และ TU-Orga9 ให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^{18} - 10^{20} cfu/ml

ข. ผสมหัวเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และสารพาต่าง ๆ สำหรับการทำแห้งแบบพ่นฝอย ได้แก่ สารแขวนลอยเซลล์ TU-Orga8 (10^{18} - 10^{20} cfu/ml): สารแขวนลอยเซลล์ TU-Orga9 (10^{18} - 10^{20} cfu/ml) : คา
15 โอสิน (kaolin) : มอลโทเดกซ์ทริน (maltodextrin) อัตราส่วน 1:2:4:0.5

ค. ทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยการฉีดส่วนผสมหัวเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และสารพาต่าง ๆ ด้วย
เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยในระดับอุตสาหกรรม ภายใต้สภาวะ อุณหภูมิขาเข้า (inlet) 110 องศา
เซลเซียส อุณหภูมิขาออก (outlet) 65 องศาเซลเซียส จะได้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช
(NPE) ที่พร้อมบรรจุใบบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสม เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

20 ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช (NPE) จาก *Bacillus amyloliquefaciens* TU-Orga8
และ *Pseudomonas aeruginosa* TU-Orga9 ที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ (laboratory scales) ซึ่งผสมน้ำ
ก่อนใช้จนได้ความเข้มข้นประมาณ 1×10^{10} cfu/ml แล้วนำมาพ่นดินนาก่อนปลูกข้าว ร่วมกับการจัดการ
ธาตุอาหารพืช โดยใส่ปุ๋ยคอก 500 กิโลกรัม/ไร่ หินฟอสเฟต 20 กิโลกรัม/ไร่ และโพแทสเซียมฮิวเมต 1
กิโลกรัม/ไร่ และพ่นต้นข้าวเมื่อมีอายุ 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน รวม 8 ครั้ง สามารถส่งเสริมการ
25 เจริญเติบโตของต้นข้าวและลดการระบาดของโรคเมล็ดด่าง (ที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia lunata*,
Cercospora oryzae, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium semitectum* และ *Alternaria padwickii*) ใบขีดโปรงแสง
(ที่เกิดจากแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*) และขอบใบแห้ง (ที่เกิดจากแบคทีเรีย *X. oryzae*
pv. *oryzae*) เท่ากับ 65-70%, 70-80% และ 70-80% ตามลำดับ เนื่องจากการกระตุ้นให้ต้นข้าวสะสม
salicylic acid, peroxidase และ β -1,3-glucanases สูงสุด 3-6 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด ภายใน 3-7 วัน
30 หลังพ่นใบข้าว ซึ่งสารเหล่านี้จัดเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันพืช รวมทั้งผลิตภัณฑ์นี้ยังสามารถ
เพิ่มผลผลิตข้าว 30-40% เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร

เมื่อนำผลิตภัณฑ์นี้มาพ่นต้นคะน้า 6 ครั้ง เมื่อพืชอายุ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมโรคขอบใบทองที่เกิดขึ้นเองในสภาพธรรมชาติ 55-70% เนื่องจากการชักนำให้เกิดการสะสม salicylic acid ภายในต้นคะน้าสูงสุดเท่ากับ 2-5 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด ภายใน 2-7 วัน หลังพ่นใบคะน้า ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร ที่สามารถลดความรุนแรงโรคเพียง 25-40% แสดงให้เห็นว่า ผลิตภัณฑ์นี้สามารถลดความรุนแรงโรคขอบใบทองได้ดีกว่ากรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร

เมื่อนำผลิตภัณฑ์นี้คลุกเมล็ดพันธุ์ข้าวและคะน้า พบว่ามีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการกระตุ้นให้ต้นข้าวและคะน้ามีการเจริญเติบโต เนื่องจากการสะสมฮอร์โมนพืช indole-3-acetic acid เพิ่มขึ้นสูงอย่างรวดเร็ว 25-30 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม น้ำหนักสด ภายใน 3-5 วัน ส่งผลให้พืชมีความยาวรากและลำต้นสูงขึ้น ซึ่งจากการศึกษาในสภาพห้องปฏิบัติการ (laboratory conditions) เรือนปลูกพืชทดลอง (greenhouse conditions) สภาพไร่ของเกษตรกร (field conditions) และจากการผลิตผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช (NPE) ในระดับห้องปฏิบัติการ (laboratory scales) คณะผู้วิจัยพบว่าผลิตภัณฑ์นี้มีความเป็นไปได้ในการขยายผลสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรม (industrial scales) จึงได้พัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณสำหรับ TU-Orga8 และ TU-Orga9 ต้นทุนต่ำ เหมาะสมต่อระดับอุตสาหกรรม (10-20 บาท/ลิตร) ทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ (100 บาท/ลิตร) ตลอดจนพัฒนาสถานะและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียปฏิบัณ TU-Orga8 และ TU-Orga9 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพและพัฒนาสูตรสารพืที่สามารถปกป้องเซลล์แบคทีเรียปฏิบัณให้รอดพ้นจากสภาพอุณหภูมิสูงภายในเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยได้ ตลอดจนพัฒนาสถานะและขั้นตอนการผลิต NPE ในระดับอุตสาหกรรม

พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณสูตร 1 ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณ TU-Orga8 ในระดับอุตสาหกรรม ประกอบด้วย สารสกัดหัวเขี้ยวอก ร้อยละ 10-30 โดยปริมาตร กากน้ำตาล ร้อยละ 5 โดยปริมาตร กลีเซอรอล ร้อยละ 10 โดยปริมาตร และน้ำสะอาด ร้อยละ 55-75 โดยปริมาตร และอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณสูตร 2 ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณ TU-Orga9 ในระดับอุตสาหกรรม ประกอบด้วย สารสกัดหัวเหียง ร้อยละ 10-30 โดยปริมาตร โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร กลีเซอรอล ร้อยละ 10 โดยปริมาตร และน้ำสะอาด ร้อยละ 60-80 โดยปริมาตร โดยการใช้แบบที่เรีปฏิบัติในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เหมาะสม ได้แก่ การใช้กลีเซอรอลแบคทีเรียปฏิบัณตั้งต้น (ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml) ร้อยละ 1 และ Antifoam ร้อยละ 3 ภายใต้สภาวะ Agit 100 rpm, อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้น 7.0 และ pH สิ้นสุดประมาณ 8.12 เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

โดยการเลี้ยง TU-Orga8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่คิดค้นขึ้นใหม่สูตร 1 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพตามสถานะและขั้นตอนที่กล่าวไว้ข้างต้น ทำให้ TU-Orga8 มีปริมาณ 10^{30} - 10^{35} cfu/ml ขณะที่อาหารสูตรมาตรฐาน nutrient glucose broth (NGB) ซึ่งประกอบด้วย สารสกัดจากเนื้อสัตว์หรือกระดูก (beef extract) 3 กรัม เปปโตน (peptone) 5 กรัม กลูโคส (glucose) 2.5 กรัม สามารถเพิ่มปริมาณ TU-Orga8 ประมาณ 10^{12} - 10^{15} cfu/ml หลังเลี้ยงเชื้อไว้นาน 24-48 ชั่วโมง สำหรับการเลี้ยง TU-Orga9 ในอาหาร


นายสุวิชัย บุญอารี

เลี้ยงเชื้อที่คิดค้นขึ้นใหม่สูตร 2 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพตามสภาวะและขั้นตอนที่กล่าวไว้ข้างต้น ทำให้ TU-Orga9 มีปริมาณประชากร 10^{18} - 10^{20} cfu/ml ขณะที่อาหารสูตรมาตรฐาน NGB สามารถเพิ่มปริมาณประชากร TU-Orga9 ประมาณ 10^{10} - 10^{12} cfu/ml หลังเลี้ยงเชื้อไว้นาน 24-48 ชั่วโมง

- อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างหัวเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะและสารพาต่าง ๆ สำหรับการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) ได้แก่ สารแขวนลอยเซลล์ TU-Orga8 (10^{18} - 10^{20} cfu/ml): สารแขวนลอยเซลล์ TU-Orga9 (10^{18} - 10^{20} cfu/ml) : คาโอลิน (kaolin) : มอลโทเดกซ์ทริน (maltodextrin) อัตราส่วน 1:2:4:0.5 และกระบวนการที่เหมาะสมต่อการผลิต NPE ด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย ในระดับอุตสาหกรรม คือ อุณหภูมิขาเข้า (inlet) 110 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิขาออก (outlet) 65 องศาเซลเซียส

10 วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

108752

ข้อก๊อสิทอิ

1. พลิตภัณัฑัธรรมาชิกระดัณัณภูมิคุ้มกันพิช ตามการประดิษฐ์นี้ ประกอบด้ว การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียปฏิภักชิในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณ TU-Orga8 และ TU-Orga9

สูตร 1 อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณ *Bacillus amyloliquefaciens* TU-Orga8 ประกอบด้ว

- 5 สารสกัดถั่วเขียวอก ร้อยละ 10-30 โดยปริมาตร
กากน้ำตาล ร้อยละ 5 โดยปริมาตร
กลีเซอรอล ร้อยละ 10 โดยปริมาตร
น้ำสะอาด ร้อยละ 55-75 โดยปริมาตร

2. กรรมวิธีการเตรียมพลิตภัณัฑัธรรมาชิกระดัณัณภูมิคุ้มกันพิช ตามข้อก๊อสิทอิ 1 ที่ซึ่งการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียปฏิภักชิในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณ TU-Orga8 มีขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณสูตร 1 ดังนี้

- ก. เตรียมสารสกัดถั่วเขียวด้วยการแช่เมล็ดถั่วเขียวปริมาตร 100 กรัม ด้วยน้ำสะอาด ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หรือ กระทั่งเมล็ดเริ่มงอก
ข. ปั่นเมล็ดถั่วเขียวอกด้วยเครื่องปั่น
15 ค. กรองด้วผ้าขาวบางหรือกรวยกรอง เพื่อให้ได้สารสกัดถั่วเขียว
ง. ผสมสารสกัดถั่วเขียว ร้อยละ 10-30 โดยปริมาตรที่ได้จากข้อ ค. กับกากน้ำตาล ร้อยละ 5 โดยปริมาตร
จ. เติมกลีเซอรอล ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงในส่วนผสมที่ได้จาก ง.
ฉ. ปรับปริมาตรส่วนผสมในข้อ จ. ด้วยน้ำสะอาด ร้อยละ 55-75 โดยปริมาตร
20 ช. ต้มฆ่าเชื้ออาหารเพิ่มปริมาณแบคทีเรียปฏิภักชินาน 15-20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปใช้เพิ่มปริมาณแบคทีเรียปฏิภักชิ TU-Orga8

3. พลิตภัณัฑัธรรมาชิกระดัณัณภูมิคุ้มกันพิช ตามข้อก๊อสิทอิ 1 ที่ซึ่งสูตร 2 อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณ *Pseudomonas aeruginosa* TU-Orga9 ประกอบด้ว

- 25 สารสกัดถั่วเหลือง ร้อยละ 10-30 โดยปริมาตร
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร
กลีเซอรอล ร้อยละ 10 โดยปริมาตร

108752-7/10

น้ำสะอาด

ร้อยละ 60-80 โดยปริมาตร

4. กรรมวิธีการเตรียมผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช ตามข้อถือ 1 หรือ 3 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่งการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณ TU-Orga9 มีขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณสูตร 2
- 5 ก. เตรียมสารสกัดหัวเชื้อด้วยการแช่เมล็ดหัวเชื้อปริมาณ 100 กรัม ด้วยน้ำสะอาดปริมาตร 500 มิลลิตร เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
- ข. ปั่นเมล็ดหัวเชื้อด้วยเครื่องปั่น
- ค. กรองด้วยผ้าขาวบางหรือกรวยกรอง เพื่อให้ได้สารสกัดหัวเชื้อ
- ง. ผสมสารสกัดหัวเชื้อ ร้อยละ 10-30 โดยปริมาตรที่ได้จากข้อ ค. กับโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร
- 10 จ. เติมหีสเตอร์ ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงในส่วนผสมที่ได้จาก ง.
- ฉ. ปรับปริมาตรส่วนผสมในข้อ จ. ด้วยน้ำสะอาดร้อยละ 60-80 โดยปริมาตร
- ช. ต้มฆ่าเชื้ออาหารเพิ่มปริมาณนาน 15-20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปใช้เพิ่มปริมาณแบคทีเรียปฏิบั้กษ TU-Orga9
- 15 5. ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช ตามข้อถือสิทธิ 1 ถึง 4 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่งสภาวะและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียปฏิบั้กษในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ประกอบด้วย
- ก. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียปฏิบั้กษสูตร 1 หรือ 2 ในปริมาตรที่ต้องการใส่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ
- ข. เติมหัก้าเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษ ร้อยละ 1 และ Antiforam ร้อยละ 3 โดยปริมาตร
- 20 ค. เลี้ยงแบคทีเรียปฏิบั้กษในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ภายใต้สภาวะ Agit 100 rpm, อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้น 7.0 และ pH สิ้นสุด 8.12 เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จะได้หัวเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษที่พร้อมทำแห้งแบบพ่นฝอย
6. กรรมวิธีการเตรียมผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช ตามข้อถือสิทธิ 1 ถึง 4 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่งสภาวะและขั้นตอนการผลิตผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช (NPE) ในระดับอุตสาหกรรมด้วยวิธี
- 25 ทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry)



นายสุวัจชัย บุญอารี

ก. เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะโดยการเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ TU-Oga8 และ TU-Oga9 ให้มีความเข้มข้น 10^{18} - 10^{20} cfu/ml

ข. ผสมหัวเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะและสารพาต่างๆ สำหรับการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) ได้แก่ สารแขวนลอยเซลล์ TU-Oga8 (10^{18} - 10^{20} cfu/ml) : สารแขวนลอยของเซลล์ TU-Oga9 (10^{18} - 10^{20} cfu/ml): คาโอลิน (kaolin) : มอลโทเดกซ์ทริน (maltodextrin) อัตราส่วน 1:2:4:0.5

ค. ทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยการฉีดส่วนผสมหัวเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะและสารพาต่าง ๆ ด้วยเครื่อง ทำแห้งแบบพ่นฝอยในระดับอุตสาหกรรม ภายใต้สภาวะ อุณหภูมิ inlet 110 องศาเซลเซียส outlet 65 องศาเซลเซียส จะได้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช (NPE) ที่พร้อมบรรจุในบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสม เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

108752



นายสุวิทย์ บุญอารี

บทสรุปการประดิษฐ์

5 การประดิษฐ์นี้เป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช (Natural Plant Elicitor, NPE) สูตรผงผสมน้ำก่อนใช้ (Wettable Powder: WP) ซึ่งสารออกฤทธิ์ (active ingredients) ประกอบด้วยแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus amyloliquefaciens* TU-Orga8 และ *Pseudomonas aeruginosa* TU-Orga9 โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียปฏิชีวนะ จำนวน 2 สูตร เหมาะสมต่อการขยายการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เพื่อทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ รวมทั้งพัฒนาสถานะและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียปฏิชีวนะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ตลอดจนพัฒนาสถานะและขั้นตอนการผลิต NPE ในระดับอุตสาหกรรมด้วยวิธีทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) ให้มีประสิทธิภาพส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชควบคุมโรคพืช และกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืช

108752