เลขที่อนุสิทธิบัตร 22933 อสป/200 - ข

อนุสิทธิบัตร

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญาออกอนุสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ดังที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ	2003001412
วันขอรับอนุสิทธิบัตร	25 มิถุนายน 2563
ผู้ประดิษฐ์	**นางสุดาทิพย์ จันทร และคณะ**
ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์	**กรรมวิธีการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (Paenibacillus polymyxa BTK01) และ/หรือ บาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (Bacillus subtillis BTK07)**

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรนี้มีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ ณ วันที่ 15 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2566
หมดอายุ ณ วันที่ 24 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2569

(นายกิตติวัฒน์ ปัจฉิมนันท์)
รองอธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา ปฏิบัติราชการแทน
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา
ผู้ออกอนุสิทธิบัตร

พนักงานเจ้าหน้าที่

หมายเหตุ
1. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มตั้งแต่ปีที่ 5 ของอายุอนุสิทธิบัตร มิฉะนั้น อนุสิทธิบัตรนี้จะสิ้นอายุ
2. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวได้
3. ภายใน 90 วันก่อนวันสิ้นอายุอนุสิทธิบัตร ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรมีสิทธิขอต่ออายุอนุสิทธิบัตรได้ 2 คราว มีกำหนดคราวละ 2 ปี โดยยื่นคำขอต่ออายุ ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่
4. การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามอนุสิทธิบัตรและการโอนอนุสิทธิบัตรต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่

Ref.256601092156407

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

กรรมวิธีการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และ/หรือ บาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07)

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

สาขาชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพในส่วนที่เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และ/หรือ บาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07)

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

โอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ที่มีองค์ประกอบหลักคือ น้ำตาลที่มีโมเลกุลตั้งแต่ 2 ถึง 15 โมเลกุล เชื่อมต่อด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) โอลิโกแซ็กคาไรด์นิยมมีคุณสมบัติที่ดี จึงถูกใช้ประโยชน์หลากหลาย ได้แก่ การใช้เป็นสารแทนความหวานในเครื่องดื่มในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้เป็นสารให้ความหวานสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน และใช้เป็นสารรักษาสภาพของอาหารในทางการแพทย์ คุณสมบัติที่โดดเด่นของโอลิโกแซ็กคาไรด์คือ การจัดเป็นสารพรีไบโอติกชนิดหนึ่ง ซึ่งสารนี้จะไม่ถูกย่อยหรือดูดซึมในทางเดินอาหารส่วนต้น แต่จะถูกแบคทีเรียชนิดดีในลำไส้ใหญ่ย่อยสลาย และยังสามารถช่วยลดความเจริญเติบโตของแบคทีเรียไม่ดีในลำไส้ ดังนั้น โอลิโกแซ็กคาไรด์จึงสามารถใช้พัฒนาเป็นยารักษาในทางเภสัชกรรมและเป็นอาหารสุขภาพสำหรับผู้บริโภคที่รักสุขภาพ ซึ่งผู้ที่บริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของโอลิโกแซ็กคาไรด์จะทำให้ไปช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียดีในลำไส้ใหญ่ให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อสุขภาพที่ดีของผู้ป่วยและผู้บริโภคอีกด้วย

จากการสืบค้นสิทธิบัตรและอนุสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเซลลูโลสในประเทศไทย พบว่า มีการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดต่าง ๆ จากการบ่มเอนไซม์ของจุลินทรีย์และพืช โดยค้นพบวิธีการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในสิทธิบัตรเลขที่ประกาศโฆษณา 170260 ค้นพบวิธีผลิตสารละลายน้ำตาลและไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ต้องใช้ไซแลนเนส (xylanase) ซึ่งเดิมใช้ไซแลนเนส (xylanase) ที่มีแอกทิวิตีของบีตา-ไซโลซิเดส (β-xylosidase) ต่ำ การประดิษฐ์นี้ค้นพบว่าในกระบวนการร่วมผลิตสารละลายน้ำตาลและไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการเก็บคืนเซลลูเลส (cellulase) ที่ใช้ในกระบวนการผลิตสารละลายน้ำตาลและใช้ซ้ำในกระบวนการไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ สามารถเตรียมไซแลนเนส (xylanase) ที่มีแอกทิวิตีของบีตา-ไซโลซิเดส (β-xylosidase) ต่ำได้ โดยมีต้นทุนต่ำ และสิทธิบัตรเลขที่ประกาศโฆษณา 15050 พบ

NOT-0033

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

กรรมวิธีการผลิตฟรักโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเอนไซม์ผสม บ่มให้เกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ผสมและทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ จะได้สารละลายน้ำตาลฟรักโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากน้ำตาลเหลวหรือผลิตภัณฑ์น้ำเชื่อมพรีไบโอติก

นอกจากนี้ยังวิธีการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดต่าง ๆ จากการบ่มเอนไซม์ของจุลินทรีย์กลุ่มเชื้อราและยีสต์ ได้แก่ สิทธิบัตรเลขที่ประกาศโฆษณา 9833 กรรมวิธีการผลิตฟรักโทสและอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแก่นตะวัน (เยรูซาเลมอาร์ทิโช้ค) และการผลิตฟรักโทสและหรืออินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเอนไซม์ดิบผสม จากเชื้อราแอสเปอร์จิลลัส ไนเจอร์ สายพันธุ์ ทีไอเอสทีอาร์ 3570 (*Aspergillus niger* TISTR 3570) และเชื้อยีสต์ แคนดิดา กิลลิเออมอนดี สายพันธุ์ ทีไอเอสทีอาร์ 5844 (*Candida guilliermondii* TISTR 5844) และสิทธิบัตรเลขที่ประกาศโฆษณา 9233 เป็นกรรมวิธีการผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์และฟรุกโทสจากแก่นตะวันโดยการประยุกต์ใช้เอนไซม์ดิบจากเชื้อราแอสเปอร์จิลลัส ไนเจอร์ สายพันธุ์ ทีไอเอสทีอาร์ 3570 (*Aspergillus niger* TISTR 3570)และเชื้อยีสต์ แคนดิดา กิลลิเออมอนดี สายพันธุ์ ทีไอเอสทีอาร์ 5844 (*Candida guilliermondii* TISTR 5844) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการประดิษฐ์ สิทธิบัตรเลขที่ประกาศโฆษณา 12244 กรรมวิธีการผลิตฟรักโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ โดยทำการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นฟรักโทโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยเอนไซม์ที่ผลิตจุลินทรีย์ออกมาระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยระยะแรกจะเป็นการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ เชื้อราแอสเปอร์จิลลัส ไนเจอร์ สายพันธุ์ ทีไอเอสทีอาร์ 3570 (*Aspergillus niger* TISTR 3570) ส่วนระยะต่อมาเป็นการผลิตฟรักโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยจะทำการเติมน้ำตาลซูโครสเป็นซับสเตรทที่มีความเข้มข้นสูง เพื่อเหนี่ยวนำให้เอนไซม์ผลิตฟรักโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ สิทธิบัตรเลขที่ประกาศโฆษณา 122306 แสดงกรรมวิธีการผลิตเอนไซม์อินูลิเนส (inulinase) เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) และอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (inulo-oligosaccharides) จากเชื้อราแอสเปอร์จิลลัส ไนเจอร์ สายพันธุ์ เอทีซีซี 20611 (*Aspergillus niger* ATCC 20611) มีกิจกรรมผสมของอินเวอร์เทสและบีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดส สามารถใช้ในการผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์จากอินูลินแบบเบ็ดเสร็จ และสิทธิบัตรเลขที่ประกาศโฆษณา 128678 การผลิตไอโซมอลโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (“IMOs”) จากซับสเทรตคาร์โบไฮเดรตและการใช้ของมัน เมื่อมีมอลโทเจนิกเอนไซม์และสารตั้งต้นของ IMO เพิ่มเติม อินเวอร์เทสของแอสเปอร์จิลลัส เอสพี (*Aspergillus* sp.) สามารถผลิต IMOs จากสเลอร์รีแป้ง ความสามารถของอินเวอร์เทส (invertase) ที่ทำหน้าที่เป็นทรานส์กลูโคสิเดสเอนไซม์ได้ให้กลไกเพื่อแซ็กคาริฟิเคชัน IMO โดยพร้อมกัน

นอกจากนั้นพบว่า มีสิทธิบัตรเกี่ยวกับการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการบ่มเอนไซม์ของจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย ได้แก่ สิทธิบัตรเลขที่ประกาศโฆษณา 149753 การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับงานด้านโรคอ้วน เกี่ยวกับการใช้สารเสริมชีวนะเพื่อบำบัดโรคอ้วน รูปลักษณะหนึ่งของการ

22 NOV 2023

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับการใช้แลคโตบาซิลัส แรมโนซัส ซีจีเอ็มซีซี 1.3724 (*Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724) และหรือแลคโตบาซิลัส แรมโนซัส เอ็นซีซี 4007 (*Lactobacillus rhamnosus* NCC 4007) สิทธิบัตรที่เกี่ยวกับการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากพืช ได้แก่สิทธิบัตรเลขที่ประกาศโฆษณา 138904 เป็นวิธีสำหรับการเตรียมเจนทิโอโอลิโกแซ็กคาไรด์ความบริสุทธิ์สูง เป็นการนำอาหารเหลวไปสู่การปลูกเชื้อด้วยจุลินทรีย์ ตามด้วยการบ่มและการหมักเพื่อใช้กลูโคสที่มีอยู่ในเจนทิโอโอลิโกแซ็กคาไรด์ความบริสุทธิ์ต่ำ ยังพบกรรมวิธีที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพืช สิทธิบัตรเลขที่ประกาศโฆษณา 150143 เกี่ยวข้องกับวิธีและวิธีการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ประจุบวกในผนังเซลล์พืช โดยการนำโปรตีนโนดูเลชัน C (Nodulation C protein) ที่รวมตัวกับลำดับแองเคอร์สัญญาณกอลจีที่มีกำเนิดต่างกันเข้าสู่เซลล์พืชดังกล่าว จากการค้นหาสิทธิบัตรเกี่ยวกับการย่อยสลายของฟางข้าว พบสิทธิบัตรเลขที่ประกาศโฆษณา 169467 แสดงกรรมวิธีในการผลิตไซลิทอลจากฟางข้าวโดยใช้กระบวนการหมัก ส่วนสกัดฟางข้าวที่มีปริมาณไซโลสซึ่งเป็นสารตั้งต้น ด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือก สำหรับการผลิตไซลิทอลจากส่วนสกัดฟางข้าว ผ่านกระบวนการปรับสภาพและย่อยสลายฟางข้าว (Pretrcatment and hydrolysis of Rice Straw) ที่ซึ่งกระทำโดยเอนไซม์ไซลาเนส (Xylanase) และด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง

จากการสืบค้นสิทธิบัตรและอนุสิทธิบัตรที่ผ่านมา พบว่า การผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถทำได้หลากหลายวิธี และวิธีที่ใช้ในการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่คือ การผลิตด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบกรรมวิธีการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรียมากนัก และการสืบค้นสิทธิบัตรและอนุสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์นั้นยังไม่ค้นพบ ดังนั้น กรรมวิธีการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และบาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) จะสามารถพัฒนาเพื่อช่วยให้การผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์นั้นมีประสิทธิภาพมากขึ้น ใช้ระยะเวลาในการผลิตที่น้อยลงและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารและเครื่องดื่ม เพื่อลดมูลค่าการผลิตหรือต้นทุนในเชิงพาณิชย์ต่อไปได้

<u>ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์</u>

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และ/หรือ บาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07)

ประกอบด้วยขั้นตอน การเตรียมวัตถุดิบวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรฟางข้าว เพื่อใช้ในการเตรียมผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าว ด้วยเอนไซม์ไซลาเนสจากเพนิบาซิลลัส

NOT SCANNED

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และ/หรือ เอนไซม์แมนนาเนสจากบาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต และขั้นตอนการทดสอบการเป็นพรีไบโอติกของผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์

จุดประสงค์ของการประดิษฐ์ คือ เพื่อหากรรมวิธีการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และ/หรือ บาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีประสิทธิภาพ มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น ใช้เป็นสารให้ความหวานในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานและสารรักษาสภาพของอาหาร หรือประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การเติมลงไปในนมสำหรับทารกและเด็ก หรือใช้เป็นสารแทนความหวานในเครื่องดื่มได้ และผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์ยังสามารถเพิ่มมูลค่าและลดต้นทุนการผลิตในเชิงพาณิชย์ได้อีกด้วย

<u>การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์</u>

การประดิษฐ์นี้เป็นการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และ/หรือ บาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07)

โดยกรรมวิธีการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และ/หรือ บาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

ก. เตรียมวัตถุดิบวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรฟางข้าว โดยนำฟางข้าวมาอบให้แห้ง จากนั้นบดและปั่นให้ละเอียด กรองผ่านเครื่องร่อนขนาดตะแกรง 60 เมท (mesh) และอบที่อุณหภูมิ 60 - 80 องศาเซลเซียสจนแห้ง แล้วเก็บในโถดูดความชื้นเพื่อใช้เป็นสับสเตรต (substrate)

ข. ผลิตโอลิโกแซกคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวจากข้อ ก. ด้วยเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และ/หรือ เอนไซม์แมนนาเนสจากบาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) บ่มร่วมกับฟางข้าว 0.5 – 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอชเท่ากับ 7.0

NOT SIGNED

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ค. นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 - 38 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็ว 100 - 150 รอบต่อนาทีนาน 5 - 10 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 - 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 - 5 องศาเซลเซียส นาน 15 - 30 นาที

นอกจากนี้ในขั้นตอนข้อ ข. ยังสามารถนำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และ/หรือ เอนไซม์แมนนาเนสจากบาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) อย่างใดอย่างหนึ่งหรือรวมกันบ่มร่วมกับฟางข้าว 0.5 – 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอชเท่ากับ 7.0 และ/หรือสามารถนำเอนไซม์ผสมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) ต่อเอนไซม์แมนนาเนสจากบาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ถึง 1 ต่อ 10 บ่มร่วมกับฟางข้าว 0.5 – 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอชเท่ากับ 7.0

กรรมวิธีการทดสอบการเป็นพรีไบโอติกของผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

ก. นำผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เก็บเกี่ยวได้จากข้อ ค. ตรวจสอบคุณสมบัติในการเป็นสารพรีไบโอติก โดยเลี้ยงแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก แลกโตบาซิลลัส เอซิโดฟิลัส ทีไอเอสทีอาร์ 1338 (*Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเดอมอง โคโกซ่า แอนด์ ชาเป หรือ อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอส (De Man Rogosa and Sharpe: MRS) บ่มที่อุณหภูมิ 37 - 38 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการเจริญเติบโตด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตรให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5

ข. นำอาหารเหลวปริมาณ 1 – 5 มิลลิลิตร ที่มีแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก แลกโตบาซิลลัส เอซิโดฟิลัส ทีไอเอสทีอาร์ 1338 (*Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338) ปริมาตร 30 – 50 ไมโครลิตรบ่มร่วมกับผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์จากข้อ ค. ที่อุณหภูมิ 37 – 38 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 – 6 ชั่วโมง

ตัวอย่างการทดลองการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และบาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07)

NOT FOR SALE

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ผู้ประดิษฐ์ได้ทำการทดลองศึกษาการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และบาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) ดังมีรายละเอียดและผลการทดลองดังนี้

1.1 การเตรียมวัตถุดิบวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรฟางข้าว โดยนำฟางข้าว มาอบให้แห้ง จากนั้นบด และปั่นให้ละเอียด กรองผ่านเครื่องร่อนขนาด 60 เมท (mesh) อบที่ 60 - 80 องศาเซลเซียสจนแห้ง เก็บในโถดูดความชื้นเพื่อใช้เป็นสับสเตรต ซึ่งฟางข้าวที่ใช้ในการทดลองนี้จะเตรียมเพียงครั้งเดียวและใช้ตลอดการทดลอง

1.2 การเตรียมผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยด้วยเอนไซม์แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดทดสอบที่หนึ่ง คือ เอนไซม์ไซลาเนสจากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) ปริมาตร 25 - 30 มิลลิลิตร บ่มร่วมกับฟางข้าว 0.5 – 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอชเท่ากับ 7.0 ปริมาตร 25 - 30 มิลลิลิตร ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 50 - 80 มิลลิลิตร ชุดทดสอบที่สอง คือ เอนไซม์แมนนาเนสจากบาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) ปริมาตร 25 - 30 มิลลิลิตรบ่มร่วมกับฟางข้าว 0.5 – 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอชเท่ากับ 7.0 ปริมาตร 25 - 30 มิลลิลิตร ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 50 - 80 มิลลิลิตร ชุดทดสอบที่สาม คือ เอนไซม์ผสมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) ต่อเอนไซม์แมนนาเนสจากบาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ปริมาตร 25 - 30 มิลลิลิตร (ควบคุมกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร) บ่มร่วมกับฟางข้าว 0.5 – 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอชเท่ากับ 7.0 ปริมาตร 25 - 30 มิลลิลิตร ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 50 - 80 มิลลิลิตร

1.3 บ่มแต่ละชุดการทดลองในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 - 38 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็ว 100 - 150 รอบต่อนาทีนาน 5 - 10 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 - 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 - 30 นาที แยกเก็บส่วนใสเพื่อใช้การทดสอบขั้นต่อไป ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

NSC

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

1.4 วิเคราะห์ปริมาณโอลิโกแซกคาไรด์จากส่วนใสที่ได้จากการทดลองทั้ง 3 ชุดการทดลอง ด้วยวิธีการใช้สารละลายกรดไดไนโตซาลิกไซลิก (DNS) (Miller & Gail, 1959) ขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้ นำสารละลายส่วนใสจากชุดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรกับสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วทำให้เย็นลง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเปรียบเทียบกับกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลที่มีปริมาณสูงที่สุดในฟางข้าว ผลการทดลองพบว่า ปริมาณโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์ไซลาเนสจากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) มีค่าเท่ากับ 410 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ปริมาณโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์แมนนาเนสจากบาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) มีค่าเท่ากับ 513 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามปริมาณโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์ผสมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) ต่อเอนไซม์แมนนาเนสจากบาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (ควบคุมกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร) มีค่าเท่ากับ 462 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.5 วิเคราะห์คุณสมบัติความเป็นสารพรีไบโอติก โดยนำโอลิโกแซ็กคาไรด์จากส่วนใสที่ได้จากการทดลองทั้ง 3 ชุดการทดลอง ไปบ่มร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเดอ มอง โคโกซ่า แอนด์ ชาเป หรือ อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอส (De Man Rogosa and Sharpe: MRS) ปริมาตร 4 มิลลิลิตรที่มีเชื้อ แลกโตบาซิลลัส เอซิโดฟิลัส ทีไอเอสทีอาร์ 1338 (*Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้ววิเคราะห์ผลของผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อ แลกโตบาซิลลัส เอซิโดฟิลัส ทีไอเอสทีอาร์ 1338 (*Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338) ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค spread plate บนอาหาร MRS agar (CFU/ml) พบว่า ผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการย่อยด้วย

NSCS

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

เอนไซม์ไซลาเนสจากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) สามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อแลกโตบาซิลลัส เอซิโดฟิลัส ทีไอเอสทีอาร์ 1338 (*Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338) ได้สูงที่สุด โดยมีค่าการเจริญเติบโตเท่ากับ 6.7 x 10^7 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแลกโตบาซิลลัส เอซิโดฟิลัส ทีไอเอสทีอาร์ 1338 (*Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338) ร่วมกับผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์แมนนาเนสจากบาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) พบว่า สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตได้เท่ากับ 3.07 x 10^7 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) และผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์จากการใช้เอนไซม์ผสมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) ต่อเอนไซม์แมนนาเนสจากบาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ในการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ และเมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติพรีไบโอติก พบว่า สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแลกโตบาซิลลัส เอซิโดฟิลัส ทีไอเอสทีอาร์ 1338 (*Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338) เท่ากับ 4.27 x 10^7 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) ฉะนั้นผลิตภัณฑ์โอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากกรรมวิธีดังกล่าวมีคุณสมบัติพรีไบโอติกตามที่ได้กล่าวข้างต้น

<u>วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด</u>

ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

NO NO 3033

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ข้อถือสิทธิ

1. กรรมวิธีการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และ/หรือ บาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

ก. เตรียมวัตถุดิบวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรฟางข้าว โดยนำฟางข้าวมาอบให้แห้ง จากนั้นบดและปั่นให้ละเอียด กรองผ่านเครื่องร่อนขนาดตะแกรง 60 เมท (mesh) และอบที่อุณหภูมิ 60 - 80 องศาเซลเซียสจนแห้ง แล้วเก็บในโถดูดความชื้นเพื่อใช้เป็นสับสเตรต (substrate)

ข. ผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวจากข้อ ก. ด้วยเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และ/หรือ เอนไซม์แมนนาเนสจากบาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) บ่มร่วมกับฟางข้าว 0.5 – 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอชเท่ากับ 7.0

ค. นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 - 38 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็ว 100 - 150 รอบต่อนาทีนาน 5 - 10 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 - 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 - 5 องศาเซลเซียส นาน 15 - 30 นาที

2. กรรมวิธีการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (Paenibacillus polymyxa BTK01) และ/หรือ บาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (Bacillus subtillis BTK07) ตามข้อถือสิทธิที่ 1 ที่ซึ่ง ในขั้นตอนข้อ ข. นำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และ/หรือ เอนไซม์แมนนาเนสจากบาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) อย่างใดอย่างหนึ่งหรือรวมกันบ่มร่วมกับฟางข้าว 0.5 – 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอชเท่ากับ 7.0

3. กรรมวิธีการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (Paenibacillus polymyxa BTK01) และ/หรือ บาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (Bacillus subtillis BTK07) ตามข้อถือสิทธิที่ 2 ที่ซึ่ง นำเอนไซม์ผสมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) ต่อเอนไซม์แมนนาเนสจากบาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ถึง 1 ต่อ 10 บ่มร่วมกับฟางข้าว 0.5 – 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอชเท่ากับ 7.0

4. ผลิตภัณฑ์โอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากกรรมวิธีการผลิต ตามข้อถือสิทธิที่ 1 ถึง 3 ข้อใดข้อหนึ่ง

5. ผลิตภัณฑ์โอลิโกแซคคาไรด์ตามข้อถือสิทธิที่ 4 มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และ/หรือ บาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) โดยเตรียมวัตถุดิบวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรฟางข้าวมาอบให้แห้ง บดและปั่นให้ละเอียด กรองผ่านเครื่องร่อนขนาดตะแกรง 60 เมท (mesh) และอบที่ 60-80 องศาเซลเซียสจนแห้ง เก็บในโถดูดความชื้นเพื่อใช้เป็นสับสเตรต จากนั้นเตรียมผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์ ไซลาเนสจากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และ/หรือ เอนไซม์แมนนาเนสจากบาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) โดยการประดิษฐ์นี้เป็นการประดิษฐ์แรกที่รายงานสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์จากเพนิบาซิลลัส พอลิไมซา สายพันธุ์ บีทีเค 01 (*Paenibacillus polymyxa* BTK01) และ/หรือ บาซิลลัส ซับทีลีส สายพันธุ์ บีทีเค 07 (*Bacillus subtillis* BTK07) ที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก เพื่อพัฒนาให้ใช้ระยะเวลาในการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ให้สั้นลงและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารและเครื่องดื่ม เพื่อลดมูลค่าการผลิตหรือต้นทุนในเชิงพาณิชย์ได้อีกด้วย

22933

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA