



เลขที่อนุสิทธิบัตร 25550

อสป/200 - ข

อนุสิทธิบัตร

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

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ดังที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ	2103000422
วันขอรับอนุสิทธิบัตร	11 กุมภาพันธ์ 2564
ผู้ประดิษฐ์	นางสาววิลาวรรณ เชื้อบุญ และ นายสุวิจักขณ์ สมจินดา
ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์	สูตรอาหารเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียและกรรมวิธีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากสูตรดังกล่าว

2564
02
01
11

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรนี้มีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ



ออกให้ ณ วันที่	21 เดือน	เมษายน	พ.ศ. 2568
หมดอายุ ณ วันที่	10 เดือน	กุมภาพันธ์	พ.ศ. 2570



รองอธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา ปฏิบัติราชการแทน
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา
ผู้ออกอนุสิทธิบัตร

พนักงานเจ้าหน้าที่

- หมายเหตุ
- ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มตั้งแต่ปีที่ 5 ของอายุอนุสิทธิบัตร มิฉะนั้น อนุสิทธิบัตรนี้จะสิ้นสุดอายุ
 - ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวได้
 - ภายใน 90 วันก่อนวันสิ้นสุดอายุอนุสิทธิบัตร ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรมีสิทธิขอต่ออายุอนุสิทธิบัตรได้ 2 ครั้ง มีกำหนดคราวละ 2 ปี โดยยื่นคำขอต่ออายุ ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่
 - การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามอนุสิทธิบัตรและการโอนอนุสิทธิบัตรต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่



Ref.256801034440780

รายละเอียดการประดิษฐ์

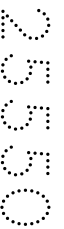
ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

สูตรอาหารเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียและกรรมวิธีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากสูตรดังกล่าว
สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

5 สาขาวิทยาศาสตร์การเกษตร

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

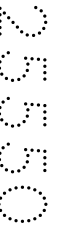
การควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สำคัญ (ดาราวัต, 2558) เช่น การนำ
 เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มาใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสในพริก (มาลีษา และวิลาวรรณ, 2562)
 หรือการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเศรษฐกิจในระยะกล้า เช่น พริก
 10 ค่น้ำ ข้าวโพด (ปัญญาพร และวิลาวรรณ, 2562) แต่ทั้งนี้ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์จะต้องมีอายุ
 การเก็บรักษาที่ยาวนาน และมีปริมาณที่มากกว่ากฎหมายที่กำหนดไว้ ดังนั้น การตรวจสอบ
 ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ตลอดช่วงอายุการเก็บรักษาจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง
 โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืช ที่ยังต้องมีประสิทธิภาพใน
 การควบคุมเชื้อสาเหตุโรคนั้น ๆ อยู่ตลอดช่วงระยะเวลาอายุการเก็บรักษา สุวิจักขณ์ และคณะ
 15 (2562) รายงานถึงประสิทธิภาพของเชื้อบาซิลลัส เมกกะทีเรียม (*Bacillus megaterium*) สายพันธุ์ ทียู
 121 (TU121) ในการควบคุมเชื้อคอสิตอสติคัม แคปซิไซ (*Colletotrichum capsici*) สาเหตุโรคแอน
 แทรกโนส เมื่อทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย
 เท่ากับ 88.33% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีคาร์เบนดาซิม (36.66%) แต่การควบคุมโรคพืช
 โดยชีววิธีที่เน้นการใช้จุลินทรีย์เป็นหลักนั้นประสบความสำเร็จค่อนข้างน้อยเนื่องจากสาเหตุหลาย
 20 ประการ เช่น ประสิทธิภาพไม่สม่ำเสมอ ราคาสูง ระยะเวลาในการเตรียมเชื้อต้องมีการวางแผนล่วงหน้า
 กรณีชีวภัณฑ์รูปแบบที่เกษตรกรต้องเพิ่มปริมาณด้วยตนเอง และในด้านของการพัฒนาชีวภัณฑ์การ
 คัดเลือกแหล่งอาหารของจุลินทรีย์เป็นสิ่งสำคัญ เพราะเป็นปัจจัยหลักในการกำหนดประสิทธิภาพของ
 ชีวภัณฑ์และต้นทุนของชีวภัณฑ์ ดังนั้น การหาสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยใช้วัสดุ หรือวัตถุดิบที่มีราคา
 ถูก เป็นส่วนเหลือของอุตสาหกรรมต่าง ๆ จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการพัฒนาชีวภัณฑ์ในรูปแบบที่
 25 เกษตรกรเพิ่มปริมาณได้เองให้มีราคาประหยัดและเป็นที่ยอมรับต่อไป (หนึ่ง และพรรณลดา, 2554) โดย
 การศึกษาวิจัยนี้จะทำการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่มีราคาประหยัด เพิ่ม
 จำนวนประชากรเชื้อได้สูงในระยะเวลาอันสั้น โดยนำส่วนเหลือจากอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น รำข้าว กาก




 นายสุวิจักขณ์ บุญอารี

ถั่ว ยีสต์แห้ง เป็นแหล่งไนโตรเจน (Singh et al., 2002) และใช้กากน้ำตาล (molasses) เป็นแหล่งคาร์บอน (นันทกร และคณะ, 2552) เพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมลงตัวในการเพิ่มปริมาณและคงไว้ซึ่งประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคพืช ผลงานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาชีวภัณฑ์แบบหัวเชื้อเพิ่มปริมาณที่พัฒนามาพร้อมกับถังเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งอัตโนมัติประกอบเป็นชุดที่สะดวกในการเตรียม โดยประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่มีประโยชน์ สายพันธุ์ TU121 ในอาหารสูตร F3 พบว่า หลังเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ TU121 เพียง 3 ชั่วโมง สามารถเพิ่มปริมาณได้สูงสุดเฉลี่ย 2.4×10^{18} โคโลนี/มิลลิลิตร (exponential phase) และคงปริมาณเชื้อเฉลี่ยระหว่าง 10^{15} - 10^{18} โคโลนี/มิลลิลิตร นาน 15-24 ชั่วโมง (stationary phase) และปริมาณเชื้อค่อย ๆ ลดลงและเข้าสู่ death phase จนกระทั่ง 24 ชั่วโมง ไม่สามารถตรวจพบประชากรเชื้อได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับ อาหารนุเทรียนกลูโคสเอบรอต (เอ็นจีบี) (nutrient glucose broth (NGB)) พบว่าประชากรเชื้อในอาหารเอ็นจีบี (NGB) ยังคงเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างต่อเนื่อง หลังตรวจนับประชากรเชื้อ 24 ชั่วโมง

โดยทั่วไปการเลี้ยงเชื้อในระดับเล็กหรือในห้องปฏิบัติการจะทำการเลี้ยงเชื้อในสภาพที่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้ โดยใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีราคาสูง หรือการเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณในระดับอุตสาหกรรมก็เช่นกันจะใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีราคาสูงซึ่งเกษตรกรจะที่ไม่มีเงินทุนและความเชี่ยวชาญในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์จะไม่สามารถเลี้ยงเชื้อได้ แต่ภูมิปัญญาชาวบ้านหรือปราชญ์หลายๆ ท่านก็มีการปรับใช้ถังพลาสติกขนาดต่าง ๆ เช่น 30, 50, หรือ 200 ลิตร ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ แต่พบว่ามีปัญหาการให้ออกซิเจน และกระบวนการเลี้ยงเชื้อจะเกิดการหมัก (Fermentation) ทำให้อาจเกิดแก๊สสะสมจนทำให้เกิดการระเบิดได้ จากปัญหาที่มีดังกล่าวจึงทำให้เกิดการพัฒนาถังเพาะเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งอัตโนมัติที่ราคาถูก ใช้งานง่าย สะดวก และปลอดภัยต่อผู้ใช้งาน ที่มาพร้อมกับชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคสำคัญของพืช ซึ่งประกอบด้วย หัวเชื้อและอาหารเพิ่มปริมาณที่สามารถเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณพร้อมใช้งานได้ภายใน 3 ชั่วโมง สุวิจักขณ์ และวิลาวรรณ (2563) รายงานว่าถังเลี้ยงเชื้อแบบเติมออกซิเจนมีสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณเชื้อ สายพันธุ์ TU121 มีค่า pH และ EC เฉลี่ยเท่ากับ 5 และ 1284.19 $\mu\text{S}/\text{cm}$ รวมทั้งส่งผลให้แบคทีเรียที่มีประโยชน์สายพันธุ์ TU121 เจริญและเพิ่มปริมาณเข้าสู่ระยะ Stationary phase ได้อย่างรวดเร็วภายใน 1 ชั่วโมง และคงปริมาณเชื้อสูงสุดเฉลี่ย 10^{14} โคโลนี/มิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง แล้วจึงเข้าสู่ระยะ Death phase และเมื่อเปรียบเทียบกับ ถังเพาะเลี้ยงเชื้อแบบไม่เติมออกซิเจน พบว่า ประชากรเชื้อเพิ่มปริมาณได้น้อยกว่า โดยมีปริมาณเชื้อสูงสุดเฉลี่ย 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร ซึ่งมีระยะ exponential phase ที่นานประมาณ 48 ชั่วโมง แล้วจึงเข้าสู่ Stationary phase และ Death phase ตามลำดับ



สูตรอาหาร ประกอบด้วย

1. หัวเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ บาซิลลัส เมกกะทีเรียม (*Bacillus megaterium*) สายพันธุ์
ทียู 121 (TU121) ที่ถูกบรรจุไว้ในเม็ดปิด (อนุสิทธิบัตร เลขที่คำขอ 2003000178)
น้ำหนักสุทธิ 10 กรัม
- 5 2. สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย ถั่วเหลือง : รำข้าว : ยีสต์ : น้ำตาลโมลาส
(อัตราส่วน 1-5:1-5:1-5:1-10) น้ำหนักสุทธิ 4-25 กรัม ในน้ำ 1-20 ลิตร
3. ถังกึ่งอัตโนมัติสำหรับใช้เพิ่มปริมาณ ถังเป็นถังทึบแสงขนาดจุ 35 ลิตร พร้อมปั๊มอากาศ
ขนาดเล็ก กำลังไฟ 3 วัตต์ หัวทรายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร

กรรมวิธีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

- 10 1. นำสูตรอาหารและหัวเชื้อจากข้อ 1.1 และ 1.2 ใส่ลงในถังเพาะเลี้ยงเชื้อ ข้อ 2 ส่วนผสมชีว
ภัณฑ์ทั้ง 2 ของย่อย (จากข้อ 1) ลงในถังเพิ่มปริมาณ
2. ปิดฝาให้สนิท เปิดปั๊มให้อากาศ
3. รอประมาณ 3 ชั่วโมง จึงพร้อมใช้งาน

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

- 15 การประดิษฐ์นี้เป็นการพัฒนาสูตรอาหารเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียและกรรมวิธีการเลี้ยงเชื้อ
แบคทีเรีย ประกอบด้วย ถั่วเหลือง : รำข้าว : ยีสต์ : น้ำตาลโมลาส ร้อยละ 1-5:1-5:1-5:1-10 โดย
น้ำหนัก ในน้ำ 75-95 โดยน้ำหนัก ในการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ บาซิลลัส เมกกะทีเรียม
(*Bacillus megaterium*) สายพันธุ์ ทียู 121 (TU121) เลี้ยงเพิ่มปริมาณในถังเพาะเลี้ยงแบบกึ่งอัตโนมัติ
ที่พัฒนาขึ้น โดยนำสูตรอาหารและหัวเชื้อใส่ลงในถังเพาะเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งอัตโนมัติ ปิดฝาให้สนิท เปิด
20 ปั๊มให้อากาศ เลี้ยงเชื้อประมาณ 3-48 ชั่วโมง พร้อมใช้งาน

- ความมุ่งหมายของการประดิษฐ์เพื่อพัฒนาสูตรอาหารเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียและกรรมวิธี
การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย แบบกึ่งอัตโนมัติที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำ ใช้เวลาสั้น และสะดวกในการเพิ่ม
ปริมาณ โดยสูตรอาหารเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียและกรรมวิธีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ประดิษฐ์ขึ้นนี้
สามารถแก้ปัญหา 1) การเกิดแก๊สสะสมจนทำให้เกิดการระเบิดได้ 2) ลดระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 3)
25 ต้นทุนการผลิตต่ำ 4) เกษตรกรสามารถปฏิบัติได้เอง 5) ไม่ต้องเตรียมการล่วงหน้า



นายสุวัจชัย บุญอารี

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

สูตรอาหารเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ประกอบด้วย

- 5
- ถั่วเหลือง ร้อยละ 1 - 5 โดยน้ำหนัก
 - รำข้าว ร้อยละ 1 - 5 โดยน้ำหนัก
 - ยีสต์ ร้อยละ 1 - 5 โดยน้ำหนัก
 - น้ำตาลโมลาส ร้อยละ 1 - 10 โดยน้ำหนัก
 - น้ำสุกอุ่น ร้อยละ 75-95 โดยน้ำหนัก

กรรมวิธีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้สูตรอาหารเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรีย มีขั้นตอนดังนี้

- 10
- การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย
- นำเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ บาซิลลัส เมกกะทีเรียม (*Bacillus megaterium*) สายพันธุ์ ทียู 121 (TU121) เลี้ยงในอาหารนูเทรียนบร็อท (Nutrient broth) เขย่าที่ 120 - 150 รอบต่อนาที นาน 24 - 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 3 องศาเซลเซียส) แล้วนำบรรจุเข้าเม็ดปิด ใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับเพิ่มปริมาณ

- 15
- การเตรียมถังเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแบบกึ่งอัตโนมัติ
- ก. ใช้ถังทึบแสงขนาดความจุ 35 ลิตร พร้อมฝาปิด
- ข. ป้อนอากาศขนาดเล็ก กำลังไฟ 3 วัตต์
- ค. หัวทรายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2.5 เซนติเมตร
- 20
- การเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณ
- ก. เทส่วนผสม หัวเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ บาซิลลัส เมกกะทีเรียม (*Bacillus megaterium*) สายพันธุ์ ทียู 121 ร้อยละ 1-10 โดยน้ำหนัก
- ข. เทอาหารเพิ่มปริมาณร้อยละ 4 - 25 โดยน้ำหนัก ลงในถังเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแบบกึ่งอัตโนมัติ
- ค. เติมน้ำสุกอุ่น ปริมาตร 1-20 โดยน้ำหนัก
- ง. ปิดฝาแล้ว เปิดป้อนให้อากาศ
- 25
- จ. รอประมาณ 3-48 ชั่วโมง ชีวภัณฑ์จึงพร้อมใช้งาน

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เหมือนกับที่ได้กล่าวไว้แล้วในการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์



นายสุวัจชัย บุญอารี

ข้อถ้อยสิทธิ

1. สูตรอาหารเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ประกอบด้วย

- | | | | |
|---|---------------|---------------|------------|
| 5 | - ถั่วเหลือง | ร้อยละ 1 - 5 | โดยน้ำหนัก |
| | - รำข้าว | ร้อยละ 1 - 5 | โดยน้ำหนัก |
| | - ยีสต์ | ร้อยละ 1 - 5 | โดยน้ำหนัก |
| | - น้ำตาลโมลาส | ร้อยละ 1 - 10 | โดยน้ำหนัก |
| | - น้ำสุกอุ่น | ร้อยละ 75-95 | โดยน้ำหนัก |

2. กรรมวิธีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้สูตรอาหารเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 1 มีขั้นตอนดังนี้

10 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ บาซิลลัส เมกกะทีเรียม (*Bacillus megaterium*) สายพันธุ์ ทียู 121 (TU121) เลี้ยงในอาหารนูเทรียนบรอต (Nutrient broth) เขย่าที่ 120 - 150 รอบต่อนาที นาน 24 - 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 3 องศาเซลเซียส) แล้วนำบรรจุเข้าเม็ดปิด ใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับเพิ่มปริมาณ

15 การเตรียมถังเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแบบกึ่งอัตโนมัติ

- ก. ใช้ถังที่บ่งขนาดความจุ 35 ลิตร พร้อมฝาปิด
- ข. บั้มอากาศขนาดเล็ก กำลังไฟ 3 วัตต์
- ค. หัวทรายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2.5 เซนติเมตร

การเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณ

- | | |
|----|---|
| 20 | ก. เทส่วนผสมหัวเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ บาซิลลัส เมกกะทีเรียม (<i>Bacillus megaterium</i>) สายพันธุ์ ทียู 121 (TU121) ร้อยละ 1 - 10 โดยน้ำหนัก |
| | ข. เทอาหารเพิ่มปริมาณร้อยละ 4 - 25 โดยน้ำหนัก ลงในถังเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแบบกึ่งอัตโนมัติ |
| | ค. เติมน้ำสุกอุ่น ปริมาตร 1 - 20 โดยน้ำหนัก |
| 25 | ง. ปิดฝาแล้ว เปิดบั้มให้อากาศ |
| | จ. รอประมาณ 3 - 48 ชั่วโมง ชีวภัณฑ์จึงพร้อมใช้งาน |



หน้า 1 ของจำนวน 1 หน้า

บทสรุปการประดิษฐ์

สูตรอาหารเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียและกรรมวิธีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากสูตรดังกล่าว มีองค์ประกอบหลัก 3 ส่วน คือ 1) สารอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนประชากรเชื้อ สูตรอาหารเพิ่มปริมาณ ประกอบด้วย ถั่วเหลือง, รำข้าว, ยีสต์, น้ำตาลโมลาส และน้ำ 2) เชื้อ *B. megaterium* 5 สายพันธุ์ TU121 บรรจุในเม็ดปิด เพื่อทำเป็นหัวเชื้อแบคทีเรีย และ 3) ถังเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มี ประโยชน์แบบกึ่งอัตโนมัติ

25550