

เลขที่อนุสิทธิบัตร 9285



อสป/200 - ข

อนุสิทธิบัตร

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542
ยัติกรรมทรัพย์สินทางปัญญาออกอนุสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี)
ปรากฏในอนุสิทธิบัตร

เลขที่คำขอ 1203000376
วันขอรับอนุสิทธิบัตร 28 มีนาคม 2555
ผู้ประดิษฐ์ นางสาวเกตุการ ดาจันทร์หา

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง

ให้ผู้ทรงสิทธิบัตรนี้มีสิทธิหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ 22 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2557
หมดอายุ 27 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2561

(ลงชื่อ)



พนักงานเจ้าหน้าที่

- หมายเหตุ
1. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มแต่ปีที่ 5 ของอายุสิทธิบัตร มิฉะนั้น อนุสิทธิบัตรจะสิ้นสุดอายุ
 2. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวกันก็ได้
 3. ภายใน 90 วันก่อนวันสิ้นสุดอายุอนุสิทธิบัตร ผู้ทรงสิทธิบัตรมีสิทธิขอต่ออายุอนุสิทธิบัตรได้ 2 ครั้ง
มีกำหนดคราวละ 2 ปี โดยยื่นคำขอต่ออายุ ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่
 4. การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามอนุสิทธิบัตรและการโอนอนุสิทธิบัตรต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่

019373

1

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

5 วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

- ในประเทศไทยมีรายงานการผลิตผงกล้ำเชื้อสำหรับกระบวนการผลิตอาหารหมักพื้นบ้านหลายชนิด เช่น ผงกล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับการผลิตหน่อไม้เปรี้ยว (วรรณทิพาและศรีเวียง, 2539) ผงกล้ำเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter* สำหรับการผลิตน้ำส้มสายชู (รสสุคนธ์และนภา, 2532) และผงกล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับการผลิตปลาต้ม (ชุตินุช, 2543) เป็นต้น กระบวนการผลิตผงกล้ำเชื้อมีหลายวิธี เช่น วิธีการพ่นฝอย การทำแห้งด้วยวิธีการแช่แข็งแบบระเหิด และการใช้สารพยุ้ง การผลิตผงกล้ำเชื้อด้วยวิธีการใช้สารพยุ้งเป็นวิธีการที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำเนื่องจากไม่ต้องใช้เครื่องมือขั้นสูงที่มีราคาแพงเช่นเดียวกับวิธีการพ่นฝอยและการทำแห้งด้วยวิธีการแช่แข็งแบบระเหิดซึ่งต้องใช้เครื่อง spray dryer และ freeze-dryer ตามลำดับ จากรายงานของชุตินุช (2543) ที่ได้ศึกษาชนิดของแป้งที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารพยุ้งกล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับผลิตปลาต้ม โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR423 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 กรัม เปปโตน 10 กรัม ยีสต์แอกซ์แทรกต์ 10 กรัม โซเดียมอะซิเตด 10 กรัม สารละลายบี (ประกอบด้วย แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัม แมงกานีสซัลเฟต 10 กรัม เฟอร์รัสซัลเฟต 10 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) จำนวน 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงแยกเอาเฉพาะเซลล์ของแบคทีเรียนำไปผสมกับสารพยุ้งแป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียวและแป้งข้าวเจ้าผสมแป้งข้าวเหนียวจะได้ผงกล้ำเชื้อสำหรับหมักปลาต้ม ผลการศึกษาพบว่าแป้งทั้ง 3 ชนิดสามารถใช้เป็นสารพยุ้งที่ดีทำให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกมีอัตราการรอดที่สูง
- 10
- 15
- 20

- สำหรับการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มีรายงานการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโมลาส (molasses broth medium) ซึ่งมีส่วนประกอบคือ โมลาส 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร (Younis et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานของโสพลและคณะ (2010) ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและกากถั่วเหลืองในเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* ในระดับอุตสาหกรรม และไวรจันและคณะ (2550) ได้รายงานสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์ 2 สูตรคือ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาล 19.85 กรัม/ลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.35 กรัม/ลิตร และ
- 25
- 30

แมงกานีสซัลเฟต โมโนไฮดรต 0.15 กรัม/ลิตร และสูตรที่มีกากถั่วเหลือง 20 กรัม/ลิตร กากน้ำตาล 3 กรัม/ลิตร และไคโปแตสเซียมฟอสเฟต 0.5 กรัม/ลิตร สำหรับการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจากแป้งสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อพัฒนาเป็นผงกล้าเชื้อสำหรับหมักถั่วมาหรือถั่วเหลืองหมักของไทยยังไม่พบการรายงาน ปัญหาที่พบในการประดิษฐ์ที่มีอยู่คือ ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ผลิตได้จากผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ตามการประดิษฐ์เดิมนั้น จะมีกลิ่นเหม็นของแอมโมเนียมาก อีกทั้งยังอาจประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เป็นสาเหตุให้ไม่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคเท่าที่ควร การประดิษฐ์นี้มีขึ้นเพื่อต้องการแก้ไขข้อบกพร่องดังกล่าว โดยการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง ขึ้นมาใหม่ ที่ซึ่งมีราคาไม่สูง และสามารถทำได้ง่าย

10 ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งตามการประดิษฐ์นี้ ประกอบด้วยแป้งสาลี 200-400 กรัม น้ำตาลซูโครส 10 กรัม โปแตสเซียมไคไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัม ไคโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยมีขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว เริ่มจากการนำส่วนผสมไปฆ่าเชื้อก่อนเติมแป้งสาลี และสารละลายแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* จากนั้นนำแป้งสาลีหมักไปอบแห้ง แล้วบรรจุในเครื่องปั่นปลดเพื่อจนเป็นผงละเอียด

วัตถุประสงค์ในการประดิษฐ์อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งนี้ เพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* ก่อนนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อชนิดผง ซึ่งนอกจากจะเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาไม่สูงแล้วยังสามารถทำได้ง่าย และใช้เทคโนโลยีการผลิตที่ไม่ซับซ้อน กล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดผงที่ผลิตได้ตามการประดิษฐ์นี้ จะมีลักษณะภายนอกเป็นผงละเอียด สีขาวครีม ความชื้นร้อยละ 10 - 13 มีปริมาณเชื้อ *Bacillus subtilis* 10^6 - 10^7 สปอร์ ในผงแป้ง 1 กรัม สามารถนำไปใช้ในการหมักถั่วเหลืองได้ 1 กิโลกรัม ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ผลิตได้จากผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ตามการประดิษฐ์นี้ จะมีกลิ่นเหม็นของแอมโมเนียน้อยกว่าการหมักด้วยวิธีดั้งเดิม ปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคมากกว่าถั่วเหลืองที่หมักด้วยวิธีดั้งเดิม

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง ตามการประดิษฐ์นี้ ประกอบด้วย

	น้ำตาลซูโครส	10	กรัม
	โปแตสเซียมไคไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัม
30	ไคโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัม
	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

แป้งสาลี

200-400

กรัม

- การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง มีขั้นตอนเริ่มจากการละลาย ส่วนประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งทั้งหมดในน้ำก้น โดย ยกเว้นแป้งสาลีที่ทำการแยกส่วนในการฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 5 นาน 15 นาที แล้วจึงปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแป้งสาลีปลอดเชื้อ ในอัตราร้อยละ 20 - 40 ของน้ำหนัก แล้วจึงเขย่าผสมให้เข้ากันดี

- เพื่อให้ได้ผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง มี ขั้นตอนเริ่มจาก การเพาะเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth ที่ซึ่งได้ผ่าน การฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วจึงทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 - 48 ชั่วโมง แล้วจึงเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิด เหลวจากแป้ง ในอัตราส่วนร้อยละ 2 - 4 โดยปริมาตร ก่อนทำการบ่มในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 - 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 - 48 ชั่วโมง

- จากนั้นจึงเติมแป้งสาลีปลอดเชื้อ ที่ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็น เวลานาน 15 นาที ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งที่ผ่านการบ่มเรียบร้อยแล้ว 15 แล้วในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงผสมให้เข้ากันดี ก่อนนำไปหมักต่อในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 - 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง

จากนั้นจึงทำการอบแห้งแป้งหมักในตู้อบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 80 - 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 - 6 ชั่วโมง แล้วจึงบดแป้งหมักอบแห้งในเครื่องปั่นปลอดเชื้อจนเป็นผงละเอียด จึง จะได้กล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดผง

20 วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ข้อถ้อยสัญญา

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง ที่มีลักษณะเฉพาะประกอบด้วย

5	น้ำตาลซูโครส	10	กรัม
	โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัม
	ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัม
	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
	แป้งสาลี	200-400	กรัม

2. กรรมวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งตามข้อถ้อยสัญญา 1 มีขั้นตอนดังนี้

10 ละลายส่วนผสมของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งทั้งหมดในน้ำกลั่น โดยยกเว้นแป้งสาลีที่ทำการแยกส่วนในการฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วจึงปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแป้งสาลีปลอดเชื้อ ในอัตราร้อยละ 20 - 40 ของน้ำหนัก แล้วจึงผสมให้เข้ากัน

3. กรรมวิธีการเตรียมผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งตามข้อถ้อยสัญญา 1 มีขั้นตอนดังนี้

15 เพาะเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth ที่ซึ่งได้ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วจึงทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 - 48 ชั่วโมง แล้วจึงเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง ตามข้อถ้อยสัญญา 1 ในอัตราส่วนร้อยละ 2 - 4 โดยปริมาตร ก่อนทำการบ่มในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 - 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 - 48 ชั่วโมง แล้วจึง

25 เติมแป้งสาลีปลอดเชื้อ ที่ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งที่ผ่านการบ่มเรียบร้อยแล้วในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงผสมให้เข้ากันดี ก่อนนำไปหมักต่อในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 - 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นจึง

ทำการอบแห้งแป้งหมักในตู้อบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 80 - 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 - 6 ชั่วโมง แล้วจึงบดแป้งหมักอบแห้งในเครื่องปั่นปลอดเชื้อจนเป็นผงละเอียด

บทสรุปการประดิษฐ์

- อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งตามการประดิษฐ์นี้ ประกอบด้วยแป้ง
สาลี น้ำตาลซูโครส โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และ
น้ำกลั่น โดยมีขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงดังกล่าว เริ่มด้วยการนำส่วนผสมไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่ง
5 ความดันไอน้ำ แล้วเติมแป้งสาลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ก่อนจะเขย่าผสมให้เข้ากันดี