



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย (บาซิลลัส ซับทิลิส)
เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช

โดย

พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์ และคณะ

ตุลาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย (บาซิลลัส ซับทิลิส)
เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช

Development of product derived from bacteria (*Bacillus subtilis*)
for plant pathogen control

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์

นายยศนันท์ วีระพล

ภาควิชาเทคโนโลยีเกษตรกรรม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ดร. หฤษฎ์ นิ่มรักษา

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

รองศาสตราจารย์ ดร. อำไพวรรณ ภราดรพันธุ์

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

สัญญาเลขที่	RDG5120080
ชื่อโครงการ	การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย (บาซิลลัส ซับทิลิส) เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช
ชื่อนักวิจัย	พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์, ยศนันท์ วีระพล, หฤษฎ์ นิยมรักษา, อำไพวรรณ ภราดรพันธุ์
ระยะเวลาดำเนินงาน	2 ปี

การใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคพืชเป็นที่นิยมมายาวนานตามแนวทางเกษตรอินทรีย์ อย่างไรก็ตามมีความไม่สะดวกในการใช้งานเนื่องจากต้องใช้เวลาในการหมักเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียให้มีปริมาณเพียงพอต่อการใช้งานจึงทำให้ผลผลิตการเกษตรเสียหายมากขึ้น ในการวิจัยนี้ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของแข็งจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืชจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการแยกตัวเชื้อและทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว โดยผสมกับซิลิกอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ก่อนทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผงละเอียดเมตาบอลิต์แห้งที่เตรียมได้มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราหลังจากทดสอบยืนยันในงานเพาะเชื้อ สารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่เป็นองค์ประกอบในสารเมตาบอลิต์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* คือ surfactin ซึ่งใช้เป็น marker ในการศึกษา การพัฒนาผลิตภัณฑ์โดยนำเมตาบอลิต์แห้งผสมกับสารช่วยแตกตัวร้อยละ 6 ได้ตำรับที่ต่อกรดเป็นเม็ดและสามารถแตกตัวได้ มีความคงสภาพทางกายภาพหลังจากเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในสภาวะเร่งเป็นระยะเวลา 3 เดือน แม้ว่าหลังการทดสอบความคงสภาพตรวจวิเคราะห์ไม่พบ surfactin แต่ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืชที่ใช้ในการศึกษา (*Alternaria solani* Sorauer และ *Alternaria brassicicola*) การทดสอบยืนยันประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ต่อการลูกกลามเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ในแปลงเกษตรโดยใช้ผักกะน้าเป็นต้นแบบพบว่าผลิตภัณฑ์รูปแบบของแข็งที่พัฒนาได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ได้โดยลดความรุนแรงของการเกิดโรคจากร้อยละ 88 เหลือเพียงร้อยละ 40 การเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ในสภาวะเร่งเป็นระยะเวลา 3 เดือนทำให้ประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคเหลือร้อยละ 44 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ *Alternaria solani* Sorauer และ *Alternaria brassicicola* ได้ในแปลงเกษตร

คำสำคัญ: ผลิตภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย, การควบคุมโรคพืช, การควบคุมโดยชีววิธี, บาซิลลัส ซับทิลิส

Abstract

Contract No.	RDG5120080
Project Title	Development of product derived from bacteria (<i>Bacillus subtilis</i>) for plant pathogen control
Researchers	Pornsak Sriamornsak, Yotsanun Weerapol, Harit Nimraksa, Ampaiwan Paradomuwat
Research Duration	2 years

Bacillus subtilis has been used for plant pathogen control in organic agriculture for many years. However, the use of bacteria is inconvenient because of time consuming for fermentation and scaling up for field uses causing the deterioration of the crops. Therefore, the aim of this study was to develop a ready-to-use solid dosage forms containing bacteria (*Bacillus subtilis*) for plant disease control. The incubated broths containing *Bacillus subtilis* were centrifuged and then sterilized. The supernatants were mixed with silicon dioxides and then dried by hot-air oven at 80 °C for 48 hours. The dried incubated broths were effective against fungi when tested by agar diffusion method. The antifungal active substance in the metabolites from *Bacillus subtilis* was surfactin, which was used as a marker in the study. Products were prepared by mixing the dried metabolites with 6% disintegrant and then compacting by hydraulic press machine. The compressed tablets could be disintegrated and were stable even after keeping in accelerated condition for 3 months. Although surfactin could not be detected after 3 months, the products still had the antifungal activity against *Alternaria solani* Sorauer and *Alternaria brassicicola*. The results from field test against *Alternaria brassicicola* in Chinese kale (*Brassica alboglabra*) showed that the products reduced the percent crop loss from 88% to 40%, and to 44% for the products after 3-month stability testing. Hence, it could be concluded that the products derived from *Bacillus subtilis* have a potential to reduce the pandemic fungi, *Alternaria solani* Sorauer and *Alternaria brassicicola*, in agricultural fields.

Keywords: product derived from bacteria, plant pathogen control, biological control, *Bacillus subtilis*

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ ภาควิชาเทคโนโลยีเกษตรกรรม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่อำนวยความสะดวกในการใช้ สถานที่เพื่อทำการวิจัย ขอขอบคุณบุคลากรและนักศึกษาในกลุ่มวิจัย Pharmaceutical Biopolymer Group (PBiG) รวมทั้งเพื่อนร่วมงาน และผู้มีส่วนเกี่ยวข้องที่ไม่ได้เอ่ยนามทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนและกำลังใจ จนนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สารบัญ

บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
สารบัญ	iv
1. บทนำ	1
2. ทบทวนวรรณกรรม	3
3. วิธีดำเนินการวิจัย	6
4. ผลการวิจัย	10
5. สรุปผลการวิจัย	36
6. เอกสารอ้างอิง	37
7. Output จากผลงานวิจัย	39
ภาคผนวก 1	40
ภาคผนวก 2 (สิทธิบัตร)	42
ภาคผนวก 3 (สิทธิบัตร)	52

1. บทนำ

ความสำคัญของปัญหาในการทำวิจัย

เกษตรกรในประเทศไทยสามารถเพาะปลูกผลผลิตทางการเกษตรได้จำนวนมากและมีคุณภาพดี แต่มีต้นทุนการผลิตสูงเนื่องจากค่าใช้จ่ายจากอุปกรณ์การเพาะปลูก ปุ๋ย และสารเคมีป้องกันหรือกำจัดศัตรูพืชซึ่งส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ การสร้างทางเลือกสำหรับเกษตรกรไทย เช่น การใช้วิธีทางชีวภาพ (biological control) เพื่อการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช สามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายหรือต้นทุนในการผลิตผลผลิตทางการเกษตรได้ การใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ (effective microorganisms หรือ EM) ในการควบคุมศัตรูพืชนับว่าเป็นรูปแบบหนึ่งของการใช้วิธีทางชีวภาพที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค สิ่งแวดล้อมและตัวเกษตรกรเอง

จากการศึกษาพบว่า *Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในสารป้องกันศัตรูพืชด้วยวิธีทางชีวภาพ¹ ที่มีลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง อาศัยอยู่ในดินเป็นส่วนใหญ่ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (polymyxin, diffidin, subtilin, mycobacillin)²⁻⁴ ที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตบางชนิด เช่น แบคทีเรีย รา แมลง จึงมีการนำเชื้อ *Bacillus subtilis* รวมถึงเมตาบอไลต์ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของโรคพืช และมีความคงสภาพถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารป้องกันการเจริญเติบโตของศัตรูพืช เช่น การป้องกันการเกิดเชื้อราในพริก⁵ ควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวในการเพาะปลูกมะเขือเทศ ควบคุมโรคในข้าวโพดฝักอ่อน⁶ และควบคุมเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดินจำนวนมากโดยเชื้อราที่อยู่ในดินเหล่านี้จะเข้าทำลายพืชผัก โดยเฉพาะพืชตระกูลถั่ว อ้อย⁷ ตระกูลกะหล่ำ และพืชกินผล และสามารถเข้าทำลายได้ไม่ว่าก่อนหรือหลังออกหรือทั้งก่อนหรือหลังการเก็บเกี่ยว เชื้อราเป็นสาเหตุของโรคในพืชหลายชนิด เช่น โรคเน่าคอดิน เหม่าดำในมันฝรั่ง รากเน่าในฝ้าย โรคผลเน่าของส้มโดยจะมีลักษณะเป็นราสีเขียวที่สามารถสร้างสปอร์ได้ การใช้ *Bacillus subtilis* สามารถควบคุมการเกิดเชื้อราบนผิวส้มหลังการเก็บเกี่ยวโดยมีการพัฒนาสูตรสำหรับผสมและเคลือบป้องกันผิวส้มทดแทนการใช้สารเคมีเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อรา⁸ ซึ่งจะทำให้เกิดการเน่าเสียของผลส้มลดน้อยลง โรคที่เกิดในพืชเหล่านี้มีรายงานการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis*⁹ ว่าสามารถใช้ควบคุมการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีการใช้ *Bacillus subtilis* ในการปศุสัตว์ เช่น การเติมลงในอาหารเลี้ยงสัตว์ร่วมกับสารโปรไบโอติก พบว่าสามารถป้องกันและควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ หรือการเติมลงในบ่อเลี้ยงกุ้งให้เชื้อกินอาหารที่เหลือเพื่อป้องกันการสะสมของเสียและยับยั้งการเจริญของเชื้อที่อาจก่อให้เกิดโรคในกุ้งได้¹⁰

สำหรับประเทศไทยเกษตรกรสามารถเลี้ยงเชื้อที่เป็น EM ไว้ใช้เอง แต่มีความยุ่งยากในการหมักเลี้ยงเชื้อโดยผสมหัวเชื้อกับน้ำที่ปราศจากคลอรีน กรากน้ำตาลหรือเศษอาหารและนำไปหมักในบริเวณที่ไม่มีแสงแดดและไม่สัมผัสกับความร้อนก่อนนำมาใช้งาน ในการหมักแต่ละครั้งทำให้ผู้ใช้และสารควบคุมโรคพืชมีโอกาสการปนเปื้อน จุลินทรีย์ที่มีพิษต่อมนุษย์ได้ การทำการหมักแต่ละครั้งต้องใช้เวลาหลายวันแต่มีอายุการใช้งานสั้นโดยหัวเชื้อสามารถเก็บไว้ใช้ได้ 1 เดือนและหลังทำการหมักแล้วจะเก็บได้เพียง 1-2 สัปดาห์ ไม่สะดวกและไม่สามารถใช้งานได้ทันทีในการควบคุมโรคพืชตามต้องการ ไม่สะดวกในการขนส่ง ใช้พื้นที่และค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาเชื้อมาก ก่อนใช้งานต้องเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนฉีดพ่น ซึ่งต้องอาศัยประสบการณ์เฉพาะบุคคล ในส่วน

ของผลิตภัณฑ์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ในรูปแบบผงแห้งสำหรับละลายน้ำก่อนใช้ฉีดพ่นควบคุมปริมาณในการใช้ยาก และยังคงนำเข้าจากต่างประเทศ โดยยังไม่มีผลิตภัณฑ์ที่ผลิตเองในประเทศไทย ด้วยความมุ่งหวังที่จะพึ่งพาตนเองของประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านการเกษตร นักวิจัยในประเทศไทย (นักวิจัยจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) จึงได้มีการคัดแยกสายพันธุ์และผลิตเชื้อ *Bacillus subtilis* รวมถึงเมตาบอไลต์จากเชื้อที่มีความคงสภาพต่อความร้อน ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค แม้ว่าผ่านการอบแห้งด้วยความร้อนขึ้น (121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที)¹

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* โดยเตรียมจากตัวเชื้อและ/หรือจากเมตาบอไลต์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ได้จากการวิจัยและแยกสายพันธุ์โดยนักวิจัยในประเทศไทยเอง เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช โดยพัฒนาในรูปแบบเม็ดสำหรับละลายน้ำฉีดพ่น ผลิตโดยอาศัยเทคโนโลยีทางเภสัชกรรม ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่สะดวกต่อการใช้งานและยังคงมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชเมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลานานและยังสามารถผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรม เพื่อให้มีการใช้อย่างแพร่หลาย มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม

ลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่จะพัฒนาขึ้น

ผลิตภัณฑ์ที่จะพัฒนาขึ้นจากเชื้อ *Bacillus subtilis* หรือจากเมตาบอไลต์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นรูปแบบเม็ดที่ละลายน้ำได้ง่าย พร้อมทำการฉีดพ่นได้ทันที สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน และสามารถควบคุมปริมาณการใช้งานได้ง่าย โดยจะทำการทดสอบหาค่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคในพืช (minimum inhibitory concentration, MIC) เพื่อกำหนดปริมาณการใช้งานในการฉีดพ่นในแปลงเกษตรกรในแต่ละครั้ง โดยการทำหนดความแรงมาตรฐาน (standardization) จากข้อมูลที่ได้จากการวิจัย รวมถึงการศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ในสภาวะการเก็บรักษา (stability testing) โดยกำหนดสภาวะเลียนแบบสภาพการเก็บรักษาในสภาวะการใช้งานจริงของเกษตรกรเพื่อยืนยันว่าหลังทำการผลิตแล้วเม็ดที่ได้ยังคงมีประสิทธิภาพในการใช้งานเพียงพอต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคสาเหตุได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเตรียมวัตถุดิบจากเชื้อ *Bacillus subtilis*
2. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ในรูปแบบเม็ดสำหรับละลายน้ำฉีดพ่นจากเมตาบอไลต์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช
3. เพื่อกำหนดปริมาณการใช้งานในการฉีดพ่นในแปลงเกษตรกร โดยการทำหนดความแรงมาตรฐาน
4. เพื่อศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์จากเชื้อและ/หรือเมตาบอไลต์ของเชื้อ *Bacillus subtilis*
5. เพื่อทดสอบผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นโดยการทดลองใช้งานในแปลงเกษตรกร (field test)

2. ทบทวนวรรณกรรม

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

เชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกแบบแท่ง (rod-shaped) ในสกุล (family) *Bacillaceae* ที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ (endospores) ซึ่งมีคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วได้ดี (aerobic or facultative) พบได้ทั่วไปในดิน แบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีคุณสมบัติที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น bacitracin, pumulin, laterosporin, gramicidin, tyrocidin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก และ colistin, polymyxin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบ รวมถึง difficidin ซึ่งออกฤทธิ์กว้างในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (broad spectrum) และ subtilin, mycobacillin, zwittermicin ซึ่งสามารถต่อต้านการเจริญของเชื้อราได้ดี แบคทีเรียในสกุลนี้ไม่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์แต่จะมีคุณสมบัติทำให้อาหารเป็นพิษ (food-borne intoxications) ซึ่งไม่พบความเป็นพิษในมนุษย์ที่เกิดขึ้นจากเชื้อ *Bacillus subtilis*²⁻⁴

เชื้อ *Bacillus subtilis* และเมตาบอไลต์ มีคุณสมบัติในการต่อต้านการเกิดโรคพืชได้หลายชนิด จึงได้มีการนำเชื้อ *Bacillus subtilis* มาใช้ทางด้านเกษตรกรรม เพราะเชื้อ *Bacillus subtilis* มีลักษณะเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อโรค แต่ยังไม่มีการใช้เป็นที่แพร่หลายมากนัก เช่น การป้องกันการเกิดเชื้อราโรคแอนแทรคโนสซึ่งเป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่งของพริกที่ส่งผลทำให้เกิดความเสียหายให้กับพริกทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว⁵ สาเหตุโรคนี้เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum capsici* พบว่าโรคนี้ระบาดรุนแรงในช่วงฤดูฝน ทำให้ผลผลิตด้อยคุณภาพและเสียหาย การทดสอบเปรียบเทียบระหว่างการใช้สารเคมีกับการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* พบว่ามีเชื้อ *Bacillus subtilis* มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดโรคได้ ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับการควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวในการเพาะปลูกมะเขือเทศซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ซึ่งส่วนใหญ่สร้างความเสียหายให้กับพืชในวงศ์โซลานาซีอี (Solanaceae)⁵

เชื้อ *Bacillus subtilis* ยังสามารถควบคุมโรคในข้าวโพดฝักอ่อน⁶ และควบคุมเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน เช่น *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium moniliforme*, *Pythium* spp. และ *Phytophthora* spp. โดยเชื้อราเหล่านี้จะสร้างความเสียหายให้กับพืชผักต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชตระกูลถั่ว อ้อย⁷ ตระกูลกะหล่ำ และพืชกินผล เชื้อ *Pythium* spp. จะเป็นสาเหตุหลักในการทำให้เกิดโรคมามากกว่าเชื้อชนิดอื่นๆ เชื้อราชนิดนี้จะสร้างความเสียหายแก่พืชไม่ว่าก่อนหรือหลังงอกส่งผลให้ต้นพืชเกิดเป็นจุดหรือแผลในระดับดินจะทำให้พืชล้มและเหี่ยว โรคนี้เรียกว่าโรคเน่าคอดิน เชื้อ *Rhizoctonia solani* เป็นสาเหตุของโรคในพืชหลายชนิด เช่น โรคเขม่าดำในมันฝรั่ง โรครากเน่าในฝ้าย นอกจากนี้ยังมีเชื้อ *Penicillium digitatum* ที่ทำให้เกิดโรคผลเน่าของส้มโดยจะมีลักษณะเป็นราสีเขียวที่สามารถสร้างสปอร์ได้ซึ่งจะทำให้มีการแพร่กระจายของโรคได้อย่างรวดเร็วจึงก่อให้เกิดความเสียหายแก่ผลผลิตเป็นจำนวนมาก การควบคุมการเกิดเชื้อราบนผิวส้มหลังการเก็บเกี่ยวนั้นได้มีการพัฒนาสูตรสำหรับผสมและเคลือบป้องกันผิวส้มทดแทนการใช้สารเคมีเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อรา ซึ่งจะทำให้เกิดการเน่าเสียของผลส้มลดน้อยลง⁸

นอกจากนี้การใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในด้านปศุสัตว์ เช่น การเติมเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงสัตว์⁹ ร่วมกับโปรไบโอติก ทำให้สามารถป้องกันและควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ ด้วยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ หรือการเติมลงในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทุกสัปดาห์ร่วมกับการเติมอากาศในบ่อเพาะเลี้ยงโดยเปิดเครื่องตีน้ำตลอดเวลาเพื่อเร่งให้เชื้อเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วโดยให้เชื้อกินอาหารที่เหลือและจากการขับถ่ายของกุ้งในบ่อเพาะเลี้ยง เพื่อใช้เชื้อเหล่านี้ในการจับไนโตรเจนและแอมโมเนียให้เปลี่ยนเป็นไนโตรเจนและออกซิเจน (nitrification) ป้องกันการสะสมของเสียและยังปลดปล่อยเมตาบอไลต์เพื่อ

ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคอื่นๆ ที่อาจก่อให้เกิดโรคในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งได้ ดังนั้นจึงสามารถหลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะและสารตกค้างของสารเคมีในผลผลิตการเกษตรเพื่อการส่งออก

คุณสมบัติเมตาบอไลต์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* คือสามารถทนต่อความร้อนได้ดี จากการศึกษานของ ฤทธิ์ นัมรักษา และคณะ¹ พบว่าเมื่อนำเมตาบอไลต์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อด้วยการอบแห้งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนขึ้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค (สายพันธุ์ *Alternaria solani*) อันเป็นสาเหตุของโรคใบจุดสีน้ำตาลในมันฝรั่ง พบว่ายังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเกิดโรคได้ดียิ่งขึ้นโดยระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อราสาเหตุได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุได้เฉลี่ยประมาณร้อยละ 75 ซึ่งดีกว่าสารเคมี benomyl ที่สามารถยับยั้งได้เพียงร้อยละ 62¹ การศึกษาของ Bok และคณะ¹¹ ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวแล้วนำมาปั่นแยก (centrifuge) และลดอุณหภูมิจนถึง 5 องศาเซลเซียสก่อนนำส่วนที่เป็นของเหลว (supernatant) ที่ไม่มีตัวเชื่อมมาทำการสกัดแยกให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น แล้วนำไปวิเคราะห์เพิ่มเติมพบว่าเป็นสารที่ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนกลุ่มเปปไทด์ไซคลิก (cyclic peptide complex) ที่สามารถละลายได้ดีในน้ำ เมทานอล และเอทานอล อีกทั้งมีความคงสภาพต่อความร้อนสูง หลังจากนั้นได้ทำการศึกษาต่อโดยนำเปปไทด์ที่สกัดได้มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดเชื้อราสีเทาในสตอเบอรี่หลังทำการเก็บเกี่ยว โดยนำสตอเบอรี่ที่ทำการฉีดพ่นด้วยสารสกัดเปปไทด์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* จากนั้นนำสตอเบอรี่ดังกล่าวมาเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 สัปดาห์พบว่าสตอเบอรี่ที่ไม่ได้ทำการฉีดพ่นด้วยเปปไทด์จะมีเชื้อราสีเทาเกิดขึ้นจึงสามารถสรุปได้ว่าเปปไทด์ที่สกัดได้มีคุณสมบัติด้านการเกิดเชื้อราสีเทาที่เกิดกับผลสตอเบอรี่ได้¹¹

การพัฒนาผลิตภัณฑ์

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ในรูปแบบเม็ดโดยใช้เทคโนโลยีทางเภสัชกรรมสามารถทำได้โดยทำการผสมสารสำคัญกับสารช่วย (excipient) ในการตอกอัดเป็นเม็ด¹² ซึ่งส่วนประกอบหลักในเม็ดส่วนใหญ่คือสารเพิ่มปริมาณ (diluents) ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีและมีสารช่วยเจือจางสารสำคัญในเม็ดและอีกทั้งยังสามารถตอกอัดขึ้นรูปเป็นเม็ดได้ดีและมีราคาถูก เช่น แล็กโตส (lactose) ซึ่งสามารถตอกอัดโดยตรง (direct compression) โดยทำการผสมกับสารยึดเกาะ (binder) แล้วตอกอัดเป็นเม็ด หรืออาจทำการผสมในรูปแบบแกรนูลเปียก (wet granulation) หลังจากนั้นนำไปอบแห้งแล้วทำการตอกอัดให้เป็นเม็ด การผสมโดยใช้รูปแบบแกรนูลแห้ง (dry granulation) จะทำการผสมสารในลักษณะเดียวกับการตอกโดยตรง แต่จะทำการตอกอัดให้ได้เม็ดขนาดใหญ่ก่อน (slug) หลังจากนั้นทำการบดให้มีขนาดแกรนูลตามต้องการแล้วจึงทำการตอกอัดอีกครั้งเพื่อเพิ่มคุณสมบัติการไหลของแกรนูลความสามารถในการยึดเกาะเป็นเม็ดรวมถึงความสามารถในการควบคุมน้ำหนักและปริมาณของสารสำคัญตามที่ต้องการนั้น ในการผลิตทางเภสัชกรรมสามารถเพิ่มการละลายน้ำของเม็ดให้ดียิ่งขึ้นโดยการเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) เพื่อช่วยลดแรงตึงผิวบริเวณสัมผัสระหว่างเม็ดกับน้ำทำให้น้ำสามารถเปียกเม็ดได้อย่างรวดเร็ว¹³ นอกจากนั้นการใช้วิธีการเร่งให้เกิดการแตกตัวอย่างรวดเร็วของเม็ดโดยการเติมสารช่วยแตกตัว (disintegrant) เช่น cross-linked sodium carboxymethylcellulose (Ac-di-sol[®]) และ sodium starch glycolate (Primojel[®] or Explotab[®])¹⁴ โดยอาศัยกลไกการดึงน้ำเข้าหาเม็ดหรือการพองตัวอย่างรวดเร็วจนทำให้เม็ดเสียสภาพการยึดเกาะกันในโครงสร้างและเสียความแข็งแรงของเม็ดเพราะน้ำแทรกซึมเข้าไปในเม็ดจนสามารถเพิ่มพื้นที่ผิวในการสัมผัสน้ำให้เม็ดกร่อนและพองตัวจนปลดปล่อยสารสำคัญออกจากเม็ดได้เร็วยิ่งขึ้น¹⁵ การพัฒนาการผลิตเม็ดในระดับอุตสาหกรรมเป็นจำนวนมากนั้นจำเป็นต้องใช้สารช่วย (excipient) อื่นๆ เป็นองค์ประกอบเพิ่มเติมด้วย เช่น สารช่วยลื่น (lubricant) สารกันติด (anti-adherent) เพื่อลดแรงเสียดทานระหว่างการตอกเม็ดให้เม็ดที่ตอกได้ไม่ติดสาก สารช่วยไหล (glidant) ทำให้ง่ายต่อการตอกอัดลงสู่บ่อได้อย่างต่อเนื่องทำให้น้ำหนักเม็ด ปริมาณสารสำคัญและ

ความแข็งในแต่ละเม็ดมีความสม่ำเสมอใกล้เคียงกันทุกเม็ด โดยจะเติมสารดังกล่าวในปริมาณเล็กน้อย ซึ่งมีความสำคัญต่อการตอกเม็ดในเครื่องตอกระดับอุตสาหกรรมทำให้ผลิตเม็ดได้อย่างรวดเร็วและได้ปริมาณมาก ส่วนปริมาณร้อยละของความชื้น (percent moisture contents) หรือปริมาณน้ำในแกรนูลนั้นก่อนที่จะตอกเป็นเม็ดจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการตอกอัดของผงเช่นเดียวกัน โดยความชื้นที่เหมาะสมจึงจะสามารถตอกอัดผงให้มีความแข็งและมีความกรอบอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดได้

การประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์รูปแบบเม็ดและประสิทธิภาพการควบคุมโรคพืช

การประเมินคุณภาพของผลิตภัณฑ์รูปแบบเม็ดในทางกายภาพทำได้โดยศึกษาจากความแข็ง (hardness) ความกรอบ (friability) เวลาในการแตกตัว (disintegration time) และการละลาย (dissolution) โดยการอ้างอิงจากการผลิตยาเม็ดในทางเภสัชกรรม¹⁶ เพื่อใช้ในการปรับสูตรตำรับและปริมาณสารในการผลิตเพื่อให้เม็ดที่ได้มีความแข็ง ความกรอบ เวลาในการแตกตัว และการละลายที่เหมาะสมตามความต้องการ

ในการประเมินประสิทธิภาพของการควบคุมเชื้อโรคพืชต้นแบบที่มีปัญหาบ่อยในการเพาะปลูกทางการเกษตรสามารถทำได้โดยหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อโรคในพืชต้นแบบได้เพื่อจะนำมากำหนดปริมาณความเข้มข้นในการใช้การยับยั้งโรคพืชในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจทำได้โดยวิธีการหาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุของโรคพืช ได้แก่ *Alternaria solani* Sorauer (สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่งและมะเขือเทศ) และ *Alternaria brassicicola* (สาเหตุโรคใบจุดของพืชผักตระกูลกะหล่ำ) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อีกทั้งยังกำหนดมาตรฐานในการผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคศัตรูพืช และทำการปรับปริมาณสารในแต่ละเม็ดอีกครั้งเพื่อกำหนดปริมาณสารสำคัญในการยับยั้งการเกิดโรคพืชให้เหมาะสมในการนำไปใช้

การศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ในสภาวะการเก็บรักษา (stability testing) ทำได้โดยกำหนดสภาวะเลียนแบบสภาพการเก็บรักษาในสภาวะการใช้งานจริงของเกษตรกรเพื่อยืนยันว่าหลังทำการผลิตแล้วเม็ดที่ได้ยังคงมีประสิทธิภาพในการใช้งานเพียงพอต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคสาเหตุได้ โดยอาจจะทดสอบในสภาวะเร่ง (accelerated testing) ซึ่งเก็บเม็ดที่อุณหภูมิ 40 ± 2 องศาเซลเซียส ระดับความชื้นสัมพัทธ์ (relative humidity) ร้อยละ 75 ± 5 หรือการเก็บในสภาวะจริง (long-testing) โดยเก็บเม็ดที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส ระดับความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 70 ± 5 ¹⁷ หลังจากการศึกษาความคงสภาพแล้วควรนำผลิตภัณฑ์มาประเมินคุณภาพในเชิงกายภาพอีกครั้ง ซึ่งอาจสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี (fading) ความแข็ง ความกรอบ เวลาในการแตกตัว การละลาย รวมถึงการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคพืชอีกครั้งโดยจะทำการตรวจสอบความมีชีวิตของเชื้อที่อยู่ในรูปผงผลิตภัณฑ์ชีวภาพโดยการทำ serial dilutions ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA หรือ PDA และตรวจนับปริมาณเชื้อที่เจริญได้บนผิวหน้าวุ้นอาหารในจานเลี้ยงเชื้อโดยกำหนดจะทำตรวจความมีชีวิตของเชื้อในผลิตภัณฑ์ชีวภาพทุก 3 เดือน ซึ่งจะทำให้สามารถคำนวณหาอัตราการสูญเสียประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของเม็ดซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการกำหนดอายุการใช้งานและการเก็บรักษาของเม็ดได้

3. วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

1. Surfactin 98% จาก *Bacillus subtilis* (Sigma-Aldrich, USA)
2. เชื้อแบคทีเรียและเมตาบอไลต์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* (strain CMs026)
3. เชื้อรา *Alternaria solani* Sorauer
4. เชื้อรา *Alternaria brassicicola*
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ beef extract (Difco, USA)
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ peptone (Difco, USA)
7. อาหารเลี้ยงเชื้อ D-glucose (Sigma-Aldrich, USA)
8. อาหารเลี้ยงเชื้อ natural broth (NB) (Merck, Germany)
9. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) (Difco, USA)
10. อาหารเลี้ยงเชื้อ sabouraud dextrose broth (SDB) (Difco, USA)
11. สารเคมีกำจัดเชื้อรา Methyl [1-[butylaminocarbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl] carbamate (benomyl) (Dupont, Thailand)
12. สารเคมีกำจัดเชื้อรา Manganese ethylenebis (dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt (mancozeb) (Dupont, Thailand)
13. สารดูดซับ Colloidal silicon dioxide (Aerosil® 200, Degussa, Germany)
14. Sodium starch glycolate (Explotab®, JRS, Germany)
15. ตัวทำละลายสำหรับวิเคราะห์ด้วย HPLC (high performance liquid chromatography) ได้แก่ acetonitrile (RCI-LabScan Ltd, Thailand), trifluoroacetic acid (Merck, Germany) และ methanol (Merck, Germany)

ขั้นตอนการวิจัย

การดำเนินงานในแผนวิจัยประกอบด้วยเตรียมวัตถุดิบจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งได้ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารเหลวที่มี peptone เป็นองค์ประกอบเป็นเวลา 3 วันหลังจากนั้นนำมาแยกตัวเชื้อ *Bacillus subtilis* ออกโดยการปั่นเหวี่ยงตะกอนด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่หลงเหลือโดยนึ่งด้วยความร้อนขึ้น (121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เทำอุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาทำให้แห้งโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) การพ่นแห้ง (spray drying) หรือการอบแห้ง (oven drying) ทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเชื้อราก่อนและหลังการทำแห้ง โดยใช้วิธีทดสอบในจานเพาะเชื้อรวมทั้งการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของเมตาบอไลต์แห้งที่ได้ และทดลองตั้งตำรับเมตาบอไลต์แห้งที่ได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ประเมินการดำรับที่ได้ โดยมีรายละเอียดขั้นตอนการวิจัยดังนี้

1. การผลิตและเตรียมเมตาบอลิต์จากเชื้อ *Bacillus subtilis*

- 1.1. การศึกษาวิธีการทำให้สารเมตาบอลิต์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* แห้งอย่างเหมาะสม โดยวิธีการทำให้แห้งโดยวิธีการทำแห้ง
 - วิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง การทำเมตาบอลิต์ให้แห้งโดยใช้วิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการระเหิดเอาน้ำออกภายใต้สุญญากาศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
 - วิธีการพ่นแห้ง โดยการศึกษาดังกล่าวได้ทดลองเปลี่ยนแปลงสภาวะของอุณหภูมิของลมเข้าในระหว่างการทำแห้งตั้งแต่ 80 – 120 องศาเซลเซียส
 - วิธีการอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส
- 1.2. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา* ก่อนและหลังการทำแห้ง โดยใช้วิธีทดสอบในจานเพาะเชื้อรา *Alternaria solani* Sorauer และ *Alternaria brassicicola* โดยทำการ pour plate แล้ววาง cork ของเชื้อราสาเหตุกลาง plate เลี้ยงเชื้อราและวัดความกว้างของการเจริญเติบโตหลังจากเชื้อรา control โตเต็ม plate ที่อุณหภูมิห้อง ความชื้น 75±5%

2. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของเมตาบอลิต์จากเชื้อ *Bacillus subtilis*

- 2.1. การทดสอบความชื้นโดยใช้เครื่อง moisture balance การทดสอบคุณสมบัติการไหล (โดยการศึกษา compressibility และ angle of repose วิธี fix base method จากสูตร $\tan \theta = \frac{\text{ความสูงของ cone}}{\text{รัศมีของฐาน}}$) ของเมตาบอลิต์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในรูปผงแห้งเพื่อใช้ในการตั้งตำรับ
- 2.2. การศึกษาความคงสภาพเบื้องต้นที่อุณหภูมิห้อง ของเมตาบอลิต์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในรูปผงแห้งและการแก้ปัญหาและเตรียมเมตาบอลิต์แห้งให้เหมาะสมในการตั้งตำรับ โดยการบดแล้วศึกษาความคงสภาพทางกายภาพที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น การเกาะกลุ่มกัน หรือการดูดความชื้น
- 2.3. การวิเคราะห์เพื่อยืนยันว่ามียีนประกอบในเมตาไลต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชได้จริงโดยวิธี HPLC เพื่อใช้เป็น fingerprint กำหนดมาตรฐานของผลิตภัณฑ์

การศึกษานี้วิเคราะห์หาปริมาณ surfactin ในเมตาบอลิต์เทียบกับสารมาตรฐาน surfactin โดยใช้เทคนิค HPLC (high performance liquid chromatography) โดยการตกตะกอน surfactin ในเมตาบอลิต์ 125 mL ด้วยกรดเกลือ (1 M HCl) ที่ pH 4 ปั่นเหวี่ยงตะกอนความเร็ว 12000 xg ทั้งส่วนใส หลังจากนั้นละลายตะกอนที่ได้ด้วย 1.25 M NaOH (pH 11) 1 mL ปั่นเหวี่ยงตะกอนอีกครั้ง และนำส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์หา surfactin ต่อไป¹⁸ mobile phase คือ 0.1 % trifluoroacetic acid และ acetonitrile 1.1 mL/min, column C18, 5µ 250X4.6 mm ใช้ความ

* เชื้อราสาเหตุของโรคพืชที่เกิดกับพืชทางภาคเหนือ 2 ชนิด คือ *Alternaria solani* Sorauer และ *Alternaria brassicicola* เป็นเชื้อราที่ได้ผ่านการศึกษามีความรุนแรงสูงสุด (ข้อมูลที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์ / วิทยานิพนธ์ของนักศึกษาภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์)

ยาวคลื่น 214 nm สภาวะการฉีด เริ่มต้นด้วย acetonitrile 50%-85% ใน 0.1% trifluoroacetic acid เวลา 15 นาที และคงความเข้มข้น acetonitrile 85% เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเพิ่ม acetonitrile เป็น 100% เป็นเวลา 5 นาที แล้วกลับความเข้มข้นมาที่ 50% ก่อนจะวิเคราะห์ตัวอย่างต่อไป ช่วงเวลาในการเก็บผลข้อมูลตั้งแต่ 19 นาที ถึง 31 นาที¹⁹

3. การพัฒนาผลิตภัณฑ์รูปแบบเม็ดจากเชื้อและ/หรือเมตาบอไลต์ *Bacillus subtilis*

- 3.1. การทดลองตั้งตำรับจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเม็ดละลายน้ำโดยใช้สารช่วยชนิดต่าง ๆ
 - 3.1.1. การทดลองตั้งตำรับจากเมตาบอไลต์แห้งของเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเม็ดละลายน้ำ โดยใช้เมตาบอไลต์แห้งบดผสมกับสารดูดซับ (colloidal silicon dioxide)
 - 3.1.2. การทดลองตั้งตำรับจากเมตาบอไลต์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเม็ดละลายน้ำ โดยใช้เมตาบอไลต์ผสมกับสารดูดซับก่อนทำแห้ง
- 3.2. การศึกษาผลของสารช่วยชนิดต่าง ๆ ต่อคุณสมบัติทางกายภาพของเม็ดผลิตภัณฑ์ เพื่อหาสารช่วยที่เหมาะสมในการตั้งตำรับเม็ด
- 3.3. การประเมินคุณสมบัติเบื้องต้นของเม็ดที่ตกได้
 - 3.3.1. การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ ความแข็งของเม็ดผลิตภัณฑ์โดยเครื่อง texture analyzer (TA-XT plus, Stable Micro System Ltd, England) ความกรอบ หาปริมาณความชื้นของเม็ดโดยเครื่อง moisture balance
 - 3.3.2. การทดสอบการแตกตัวของเม็ดโดยจับเวลาในการแตกตัวโดยศึกษาจากเครื่อง disintegration test ตัวกลางคือน้ำกรอง 1000 mL อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
 - 3.3.3. การทดสอบการละลายของเม็ด *Bacillus subtilis* รวมถึงการศึกษาหาวิธีวิเคราะห์อัตราการละลายที่เหมาะสมสำหรับตำรับเม็ด *Bacillus subtilis* โดยเปรียบเทียบเวลาที่ใช้การละลายผลิตภัณฑ์ (30 นาทีและ 12 ชั่วโมง) เพื่อทดสอบว่าเวลาใดให้การปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ออกมาหมด

4. การศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์จากเชื้อและ/หรือเมตาบอไลต์ของเชื้อ *Bacillus subtilis*

- 4.1. การประเมินความคงสภาพของสูตรตำรับที่เตรียมได้ในสภาวะเร่ง (accelerated testing) อุณหภูมิ 40±2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 75±5% และสภาวะปกติ อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 70±5%
 - 4.1.1. การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ ประเมินความแข็งของเม็ดผลิตภัณฑ์โดยเครื่อง texture analyzer
 - 4.1.2. การทดสอบการแตกตัวของเม็ด
 - 4.1.3. การประเมินความสามารถในการควบคุมเชื้อโรคพืชโดยพิจารณาจาก clear zone บนจานเพาะเชื้อ ตรวจสอบความมีชีวิตของเชื้อที่อยู่ในรูปผงผลิตภัณฑ์ชีวภาพ และตรวจนับปริมาณเชื้อที่เจริญได้บนผิวหน้าอาหารในงานเลี้ยงเชื้อ โดยกำหนดจะทำตรวจความมี

ชีวิตของเชื้อในผลิตภัณฑ์หลัง 3 เดือน

- 4.1.4. การหาปริมาณ surfactin ในผลิตภัณฑ์หลังจากการศึกษาความคงสภาพ
- 4.2. การทดสอบการควบคุมโรคพืชในสภาวะจริงในแปลงเกษตรกร (field test) โดยทำการทดสอบกับพืชผักตระกูลกะหล่ำที่เป็นโรคใบจุดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola*
 - 4.2.1. ทำการฉีดพ่นแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สารเมตาบอไลต์จากเชื้อแบคทีเรีย ผลิตภัณฑ์จากเมตาบอไลต์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในรูปแบบที่ละลายน้ำแล้ว และสารเคมีที่ได้เตรียมไว้ โดยฉีดพ่นลงบนต้นผักคะน้า อายุ 45 วันหลังย้ายปลูก โดยใช้เครื่องพ่นขนาดเล็กขนาดจุ 1 ลิตร ในปริมาณ 20 มิลลิลิตรต่อต้น ด้วยน้ำหมักกดที่สม่ำเสมอ ภายหลังจากการพ่นได้ 1 วัน จึงทำการปลูกเชื้อราสาเหตุ ในความเข้มข้นของ inoculum 3.5×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร
 - 4.2.2. การประเมินพื้นที่ใบที่เป็นโรคต่อต้นในแต่ละการทดลอง
 - ประเมินผลภายหลังการทดลอง 1 สัปดาห์ โดยแบ่งปริมาณของโรคเป็น 11 ระดับ คือ 0-10 โดยที่ 0 = ใบที่ไม่มีอาการของโรค และ 10 = พื้นที่ใบที่เป็นโรค 100% รวมถึงอาการใบร่วงที่เกิดจากโรคด้วย
 - นำค่าที่ได้จากการประเมินผลมาแปลงเป็นค่าความเสียหายของพืช (crop loss assessment) การประเมินความเสียหายทำได้จากการนำผลที่ได้จากการหาปริมาณของโรคมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การถูกทำลาย หรือดัชนีการเข้าทำลาย

$$\text{ดัชนีการเข้าทำลาย (\%)} = \frac{\text{ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้นพืชที่วัด}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของระดับความรุนแรง}}$$

4. ผลการวิจัย

1. การผลิตและเตรียมเมตาบอไลต์จากเชื้อ *Bacillus subtilis*

1.1. การศึกษาวิธีการทำให้สารเมตาบอไลต์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* แห่งอย่างเหมาะสม โดยวิธีการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง การพ่นแห้ง และการอบแห้ง

การทำเมตาบอไลต์ให้แห้งโดยใช้วิธีการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง โดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการระเหิดเอาน้ำออกภายใต้สุญญากาศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเมตาบอไลต์ไม่แห้งสนิทและยังเป็นก้อนเหนียวแข็งสีน้ำตาลเข้ม การเก็บตัวอย่างและนำไปผลิตในขั้นตอนต่อไปได้ยาก ผลที่ได้ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 เมตาบอไลต์แห้งของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ทำแห้งโดยวิธีการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง

การทำเมตาบอไลต์ให้แห้งโดยใช้วิธีการพ่นแห้ง โดยการศึกษาดังกล่าวได้ทดลองเปลี่ยนแปลงสภาวะของอุณหภูมิของลมเข้าในระหว่างการพ่นตั้งแต่ 80 – 120 องศาเซลเซียส เมตาบอไลต์ที่แห้งแล้วจะติดอยู่ในเครื่องพ่นแห้งในบริเวณทำแห้ง เมตาบอไลต์แห้งไม่ตกลงสู่บริเวณเก็บตัวอย่าง

การทำเมตาบอไลต์ให้แห้งโดยใช้วิธีการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมตาบอไลต์แห้งที่ได้มีลักษณะเป็นก้อนแข็งที่อุณหภูมิห้อง

จากการศึกษาการทำแห้งดังกล่าวพบว่าการทำให้เมตาบอไลต์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* สูญเสียน้ำออกไปด้วยวิธีการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นทางเลือกที่ดีในการผลิตเนื่องจากได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่แห้ง ทำได้ครั้งละปริมาณมาก ไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ และง่ายต่อการพัฒนาในขั้นตอนต่อไปเมื่อเทียบกับการทำให้แห้งโดยวิธีการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งและการพ่นแห้ง ผลผลิตที่ได้ประมาณร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักเมตาบอไลต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเชื้อราก่อนและหลังการทำแห้ง โดยใช้วิธีทดสอบในจานเพาะเชื้อรา *Alternaria brassicicola* และ *Alternaria solani* Sorauer

ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุของเมตาบอไลต์ที่ได้จาก supernatant และของเมตาบอไลต์แห่งที่นำไปละลายอีกครั้ง โดยทดสอบในจานเพาะเชื้อรา 2 ชนิด ได้แก่ *Alternaria brassicicola* และ *Alternaria solani* Sorauer แสดงผลดังตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ *Alternaria brassicicola* ของเมตาบอไลต์ (แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อราที่เกิดขึ้น หน่วยเป็นเซนติเมตร) (n=5)

Test concentration	Control*	Benomyl ¹	Mancozeb ²	1%	5%	10%	25%	50%
Before drying (supernatant)	9.0±0.0	9.0±0.0	0.0±0.0	3.4±0.3	1.2±0.0	2.1±0.3	1.7±0.2	1.7±0.2
After drying (reconstituted)	9.0±0.0	9.0±0.0	0.0±0.0	7.8±0.4	6.2±0.6	4.8±0.4	3.7±0.2	3.5±0.4

* เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารอื่นใด

¹ Benomyl คือ Methyl [1-[butylaminocarbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl] carbamate นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในทางการเกษตร

² Mancozeb คือ Manganese ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในทางการเกษตร

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ *Alternaria solani* Sorauer ของเมตาบอไลต์ (แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อราที่เกิดขึ้น หน่วยเป็นเซนติเมตร) (n=5)

Test concentration	Control*	Benomyl ¹	Mancozeb ²	1%	5%	10%	25%	50%
Before drying (supernatant)	9.0±0.0	4.8±0.0	3.1±0.0	5.3±0.7	3.0±0.3	3.0±0.2	2.9±0.5	3.7±0.1
After drying (reconstituted)	9.0±0.0	4.8±0.0	3.1±0.0	9.0±0.0	8.3±0.4	7.2±0.6	6.2±0.8	5.3±0.1

* เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารอื่นใด

¹ Benomyl คือ Methyl [1-[butylaminocarbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl] carbamate นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในทางการเกษตร

² Mancozeb คือ Manganese ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในทางการเกษตร

2. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของเมตาบอไลต์จากเชื้อ *Bacillus subtilis*

2.1. การทดสอบความสามารถในการตกอัดเป็นเม็ด ความชื้น การไหลและความหนาแน่นของเมตาบอไลต์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในรูปผงแห้งที่เตรียมโดยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการตั้งตำรับ

ในการศึกษาและการพัฒนาสูตรต้องทำการลดขนาดของก้อนเมตาบอไลต์ที่ได้โดยใช้โกร่งและลูกโกร่ง การบดด้วยวิธีดังกล่าวไม่สามารถบดย่อยขนาดก้อนเมตาบอไลต์แห้งได้โดยตรงเนื่องจากเมตาบอไลต์แห้งที่ได้ติดภาชนะที่ใช้บดและเหนียวมากขึ้นเมื่อเริ่มย่อยขนาด ซึ่งอาจเกิดการดูดความชื้นอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงต้องทำการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นในระหว่างขั้นตอนการบด ที่อุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส ความชื้นต่ำกว่า 50%RH หลังจากนั้นเก็บผงแห้งที่ได้จากการย่อยขนาดในตู้ดูดความชื้นเพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

หลังจากเก็บเมตาบอไลต์แห้งที่ลดขนาดในตู้ดูดความชื้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าอนุภาคขนาดเล็กรวมตัวกันเป็นก้อนเหนียวเหมือนเดิม จากผลการทดลองดังกล่าว จึงได้เลือกใช้สารดูดซับผสมในเมตาบอไลต์แห้งในขั้นตอนการบดลดขนาด โดยใช้สารดูดซับ (colloidal silicon dioxide, Aerosil® 200) ในปริมาณร้อยละต่างๆ ดังตารางที่ 3 ซึ่งปริมาณสารดูดซับที่แสดงในตารางที่ 3 ไม่เป็นเลขลงตัวเกิดจากการชั่งอย่างรวดเร็วแบบผลต่างเนื่องจากห้องชั่งผงยาไม่สามารถควบคุมความชื้นได้ หลังจากทำการย่อยขนาดแล้วได้ทำการเก็บตัวอย่างไว้ในตู้ดูดความชื้นทันทีแต่ก็ยังพบว่าเกิดการเกาะกลุ่มกันอยู่เมื่อมีซิลิกอนปริมาณร้อยละ 9.13-12.44 ในกรณีที่เป็นสารดูดซับล้วน (ร้อยละ 100) โดยไม่มีเมตาบอไลต์มีความชื้นต่ำ (ปริมาณร้อยละ 9.45)

ตารางที่ 3 ปริมาณ colloidal silicon dioxide ที่ผสมกับเมตาบอไลต์แห้งในปริมาณร้อยละต่างๆ กับปริมาณความชื้นที่อยู่ภายในโดยวัดจากเครื่อง moisture balance (n=3)

Colloidal silicon dioxide in powder blend* (% w/w)	Moisture content (% w/w)
0	5.4 ± 0.3
9.13	18.2 ± 1.7
12.44	20.7 ± 2.3
17.29	25.9 ± 3.1
100	9.45 ± 1.1

* ปริมาณร้อยละของ colloidal silicon dioxide ที่ผสมกับเมตาบอไลต์แห้ง ไม่เป็นเลขลงตัวเกิดจากการชั่งอย่างรวดเร็วแบบผลต่างไม่ได้ชั่งทั้งไว้เนื่องจากเมตาบอไลต์สัมผัสอากาศภายนอกนาน เกิดการดูดความชื้น ทำให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นคลาดเคลื่อน จึงต้องทำการชั่งซิลิกอนไดออกไซด์อย่างรวดเร็วเช่นกัน

2.2. การศึกษาความคงสภาพของเมตาบอไลต์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในรูปผงแห้งและการแก้ปัญหาและเตรียมเมตาบอไลต์แห้งให้เหมาะสมในการตั้งตำรับ

ในงานวิจัยนี้ ได้ทดลองแก้ปัญหาการเยิ้มเหลวของเมตาบอไลต์แห้ง 2 วิธี ได้แก่

2.2.1. การบดผสมเมตาบอไลต์แห้งกับสารดูดซับ

เมื่อแก้ปัญหการบดด้วยวิธีการบดผสมกับสารดูดซับข้างต้นพบว่าสารดูดซับสามารถปรับลักษณะทางกายภาพของเมตาบอไลต์แห้งได้ โดยทำให้การลดขนาดง่ายขึ้น เนื่องจากสาร colloidal silicon dioxide มีความหนาแน่นต่ำ และมีขนาดเล็กทำให้เกิดการแยกผสมได้ง่าย

การลดขนาดของเมตาบอไลต์แห้ง ทำได้โดยการบดผสมและร่งผ่านร่งเบอร์ 80 (80 mesh) เพื่อช่วยให้สารเข้ากันได้ง่ายขึ้น จากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าเมื่อเก็บเมตาบอไลต์แห้งหลังจากการลดขนาดร่วมกับสารดูดซับแล้วเป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่าสูตรที่มี colloidal silicon dioxide ประมาณร้อยละ 5-10 ไม่สามารถช่วยให้เมตาบอไลต์แห้งคงอยู่เป็นผงได้ เกิดการเยิ้มเหลวได้แม้จะเก็บในตู้ดูดความชื้น แต่การใช้ colloidal silicon dioxide ในปริมาณร้อยละ 15-20 (หลังจากเก็บตัวอย่างไว้ในตู้ดูดความชื้น 48 ชั่วโมง ปริมาณความชื้นไม่ส่งผลต่อการเกาะกลุ่มกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้สารให้มีปริมาณสารดูดซับเป็นร้อยละ 15 และ 20 แล้วเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น และไม่พบการเกาะกลุ่มกันของผงเมตาบอไลต์ ดังนั้นจึงเลือกที่จะใช้ปริมาณซิลิกอนไดออกไซด์ร้อยละ 15 และ 20 ในการศึกษาต่อไป) ช่วยให้เมตาบอไลต์แห้งยังคงเป็นผงได้อยู่แม้จะเก็บไว้นานมากกว่า 48 ชั่วโมง

หลังจากได้สัดส่วนของ colloidal silicon dioxide ที่เหมาะสมแล้ว นำเมตาบอไลต์แห้งที่ได้ผสมกับ colloidal silicon dioxide มาทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพต่างๆ เช่น ความหนาแน่นและคุณสมบัติการไหลเพื่อเป็นข้อมูลในการตั้งตำรับแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งพบว่าเมื่อใช้สารดูดซับร้อยละ 20 มีค่า % compressibility เพิ่มขึ้น แต่มีการไหลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

จากการผสมเมตาบอไลต์แห้งกับสารดูดซับในสัดส่วนต่างๆ ได้นำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อราสาเหตุในจานเพาะเชื้อรา *Alternaria brassicicola* และ *Alternaria solani* Sorauer ผลแสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ แสดงในตารางที่ 5 และตารางที่ 6

ตารางที่ 4 ความหนาแน่นและคุณสมบัติการไหลของเมตาบอไลต์แห้งที่มีส่วนผสมของ colloidal silicon dioxide ในสัดส่วนต่างๆ (n=3)

Colloidal silicon dioxide in powder blend (%)	Bulk density (g/mL)	Tab density (g/mL)	% Compressibility	Angle of repose (degree)
15 (A15)	0.35±0.00	0.42±0.01	17.20±0.71	37.43±1.53
20 (A20)	0.26±0.01	0.35±0.00	26.69±1.99	38.74±1.47

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ *Alternaria solani* Sorauer ของเมตาบอไลต์ในรูปแบบต่างๆ (แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อราที่เกิดขึ้น หน่วยเป็นเซนติเมตร) ($n=5$)

Test concentration	Control ¹	Benomyl ²	Mancozeb ³	1%	5%	10%	25%	50%
94.9%*	9.0±0.0	9.0±0.0	0.0±0.0	7.7±0.2	5.5±0.2	4.8±0.2	3.9±0.2	3.5±0.1
91.3%*	9.0±0.0	9.0±0.0	0.0±0.0	7.4±0.4	5.7±0.5	3.6±0.1	3.2±0.3	3.2±0.2
84.2%*	9.0±0.0	9.0±0.0	0.0±0.0	8.3±0.2	6.7±0.3	4.9±0.1	6.4±0.1	5.8±0.1

* ตัวเลขบอกถึงปริมาณเมตาบอไลต์ที่เป็นส่วนประกอบในสูตรตำรับ ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์เทียบจากการใช้เมตาบอไลต์ 100%

¹ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารอื่นใด

² Benomyl คือ Methyl [1-[butylaminocarbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl] carbamate นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในทางการเกษตร

³ Mancozeb คือ Manganese ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในทางการเกษตร

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ *Alternaria brassicicola* ของเมตาบอไลต์ในรูปแบบต่างๆ (แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อราที่เกิดขึ้น หน่วยเป็นเซนติเมตร) ($n=5$)

Test concentration	Control ¹	Benomyl ²	Mancozeb ³	1%	5%	10%	25%	50%
94.9%*	9.0±0.0	4.8±0.0	3.1±0.0	9.0±0.0	7.9±0.3	8.2±1.0	6.6±0.2	5.6±0.2
91.3%*	9.0±0.0	4.8±0.0	3.1±0.0	9.0±0.0	8.8±0.3	5.9±0.3	5.2±0.3	5.6±1.1
84.2%*	9.0±0.0	4.8±0.0	3.1±0.0	9.0±0.0	9.0±0.0	8.3±1.1	4.1±0.1	3.6±0.1

* ตัวเลขบอกถึงปริมาณเมตาบอไลต์ที่เป็นส่วนประกอบในสูตรตำรับ ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์เทียบจากการใช้เมตาบอไลต์ 100%

¹ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารอื่นใด

² Benomyl คือ Methyl [1-[butylaminocarbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl] carbamate นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในทางการเกษตร

³ Mancozeb คือ Manganese ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในทางการเกษตร

2.2.2. การผสมเมตาบอไลต์กับสารดูดซับก่อนการทำแห้ง

เนื่องจากสารดูดซับซิลิกอนไดออกไซด์ที่ผสมลงไปมีความสามารถช่วยให้เมตาบอไลต์มีคุณสมบัติที่คงสภาพเป็นผงละเอียดได้ดี ดังนั้นจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการผสมซิลิกอนไดออกไซด์ก่อนทำแห้งโดยการอบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาบดลดขนาดและผ่านร่อนเบอร์ 80 และศึกษาลักษณะทางกายภาพและประสิทธิภาพในการยับยั้ง โดยใช้สารดูดซับร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 (Formulation AD5, AD10,

AD15, AD20 ตามลำดับ) พบว่าปริมาณสารดูดซับเพียงร้อยละ 5 เพียงพอในการป้องกันการเยิ้มเหลวได้ เช่นเดียวกับวิธีการผสมสารดูดซับร้อยละ 20 หลังจากการทำแห้งเมตาบอลไลต์

ทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลังการทำแห้งโดยวิธีการผสมสารดูดซับร้อยละ 5 ก่อนทำแห้ง (AD5) (เทียบกับน้ำหนักแห้งของเมตาบอลไลต์) โดยใช้วิธีทดสอบในงานเพาะเชื้อ ดังแสดงผลในตารางที่ 7 และ 8

ทำการศึกษาคูณสมบัติทางกายภาพของเมตาบอลไลต์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยการทดสอบวัดความหนาแน่นและคุณสมบัติการไหลของเมตาบอลไลต์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในรูปผงแห้ง (ตารางที่ 9 และ 10)

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ *Alternaria solani* Sorauer ของเมตาบอลไลต์ที่ทำแห้งด้วยการผสมซิลิกอนไดออกไซด์ก่อนการอบแห้ง (แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อราที่เกิดขึ้น หน่วยเป็นเซนติเมตร) (n=5)

	Control ¹	Benomyl ²	Mancozeb ³	1%	5%	10%	25%	50%
AD5	9.0±0.0	9.0±0.0	2.42±0.6	9.0±0.0	9.0±0.0	9.0±0.0	7.5±0.1	6.9±0.4

¹ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารอื่นใด

² Benomyl คือ Methyl [1-[butylaminocarbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl] carbamate นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในทางการเกษตร

³ Mancozeb คือ Manganese ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในทางการเกษตร

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ *Alternaria brassicicola* ของเมตาบอลไลต์ในรูปแบบต่างๆ (แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อราที่หน่วยเป็นเซนติเมตร) (n=5)

	Control ¹	Benomyl ²	Mancozeb ³	1%	5%	10%	25%	50%
AD5	9.0±0.0	4.3±0.2	2.0±0.1	6.6±0.2	6.4±0.3	6.2±1.0	6.1±0.3	5.8±0.0

¹ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารอื่นใด

² Benomyl คือ Methyl [1-[butylaminocarbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl] carbamate นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในทางการเกษตร

³ Mancozeb คือ Manganese ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในทางการเกษตร

ตารางที่ 9 ความหนาแน่นและคุณสมบัติการไหล (flow properties) ของเมตาบอไลต์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในรูปผงแห้งที่เตรียมโดยผสมเมตาบอไลต์กับซิลิกอนไดออกไซด์ก่อนอบแห้ง

Formulations*	Bulk density (mg/mL)	Tapped density (mg/mL)	% Compressibility	Hausner ratio
AD5	0.68±0.04	0.90±0.02	24.63±2.81	1.33±0.05
AD10	0.69±0.00	0.90±0.00	24.14±0.00	1.31±0.00
AD15	0.71±0.00	0.92±0.02	22.62±2.06	1.29±0.03
AD20	0.64±0.01	0.79±0.02	19.15±0.35	1.24±0.01

* Formulation AD5, AD10, AD15, AD20 คือตำรับมีปริมาณซิลิกอนไดออกไซด์ 5, 10, 15 และ 20% ตามลำดับ

ตารางที่ 10 ค่ามุมกองวัสดุของของเมตาบอไลต์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในรูปผงแห้งที่เตรียมโดยผสมเมตาบอไลต์กับซิลิกอนไดออกไซด์ก่อนอบแห้ง

Formulations*	Angle of repose (degree)
AD5	41.85±1.06
AD10	41.23±1.04
AD15	39.97±1.12
AD20	39.33±1.12

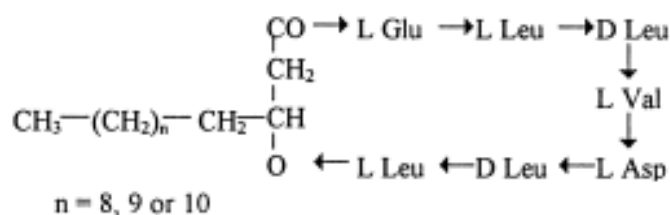
* Formulation AD5, AD10, AD15, AD20 คือตำรับมีปริมาณซิลิกอนไดออกไซด์ 5, 10, 15 และ 20% ตามลำดับ

จากการทดสอบความสามารถในการไหลพบว่าในพารามิเตอร์ต่างๆ การผสมซิลิกอนไดออกไซด์กับเมตาบอไลต์ก่อนทำแห้งในทุกสัดส่วนไม่ส่งผลให้คุณสมบัติในการไหลแตกต่างกัน เมื่อบดเมตาบอไลต์ที่ทำแห้งด้วยวิธีนี้ทิ้งไว้ในตู้ดูดความชื้นอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่าไม่เกิดการเกาะกลุ่มกันและยังคงเป็นอนุภาคที่ไหลได้ดีเช่นเดิม

จากข้อมูลดังกล่าว สรุปได้ว่าการทำให้เมตาบอไลต์แห้งโดยวิธีการผสมซิลิกอนไดออกไซด์กับเมตาบอไลต์ก่อนอบแห้งสามารถบดเมตาบอไลต์แห้งซึ่งมีความคงสภาพเพียงพอที่จะนำไปทำการทดลองต่อ และจะใช้ซิลิกอนไดออกไซด์น้อยกว่าคือร้อยละ 5 ก็เพียงพอในการทำให้เมตาบอไลต์แห้งคงเป็นอนุภาคละเอียดได้อยู่ ดังนั้นวิธีนี้จึงน่าจะเป็นวิธีการทำให้เมตาบอไลต์แห้งที่ดีกว่าวิธีการบดผสมสารดูดซับหลังการทำแห้ง

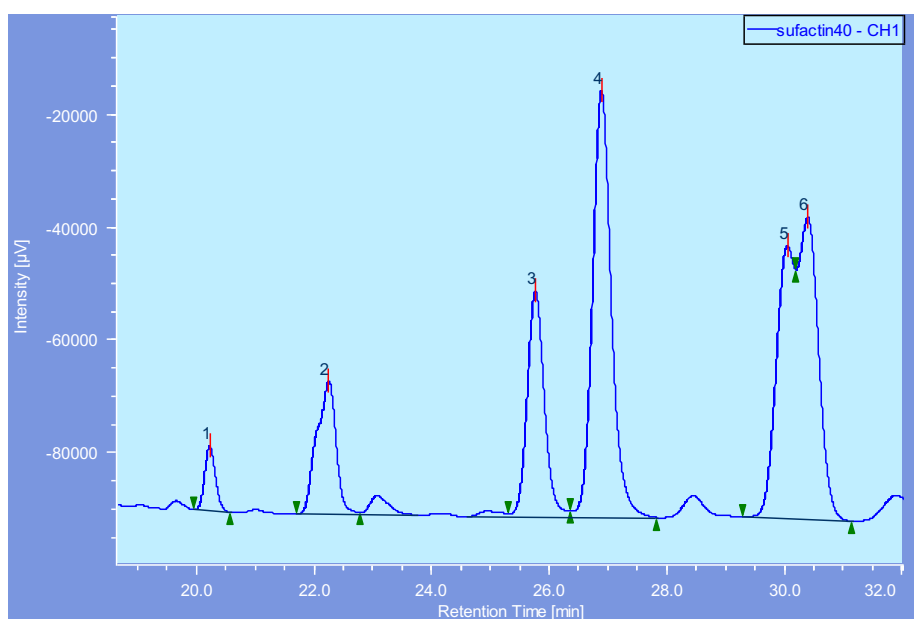
2.3. การวิเคราะห์เพื่อยืนยันว่าองค์ประกอบในเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชได้จริงโดยวิธี HPLC เพื่อใช้เป็น fingerprint กำหนดมาตรฐานของผลิตภัณฑ์

จากรายงานการวิจัยพบว่า เชื้อ *Bacillus subtilis* มีรายงานการใช้เป็นสารชีวภาพในการป้องกันศัตรูพืชมี องค์ประกอบทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อราคือ surfactin ซึ่งสารดังกล่าวเป็น cyclic lipopeptide (รูปที่ 2) ที่ แบคทีเรียขับออกมา มีน้ำหนักโมเลกุลหลายขนาด^{18,20} ในงานวิจัยนี้จึงใช้ surfactin เป็น marker ในการตรวจสอบ องค์ประกอบในเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา เพื่อเป็น fingerprint สำหรับใช้ในการกำหนดมาตรฐานของ ผลิตภัณฑ์

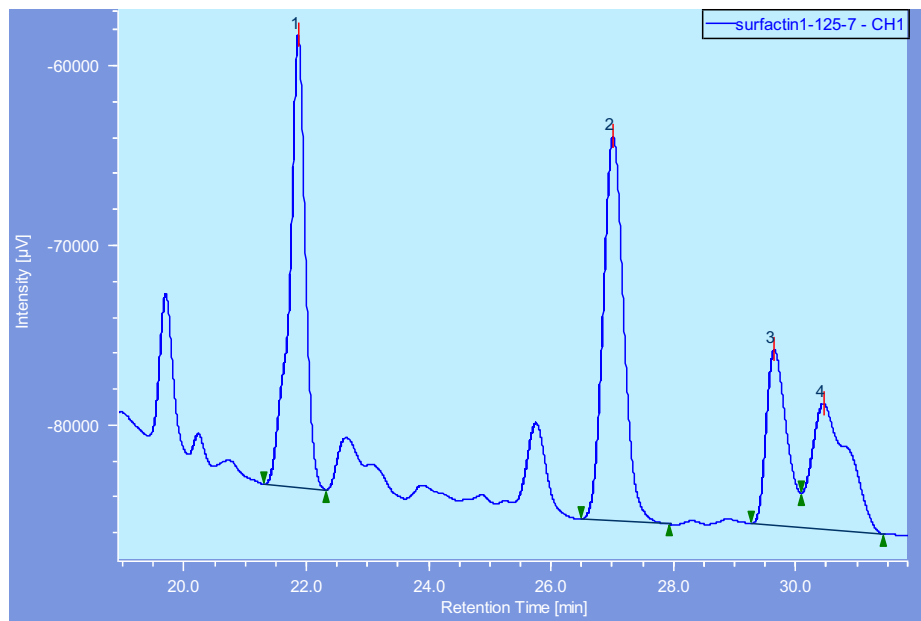


รูปที่ 2 โครงสร้าง cyclic lipopeptide ของ surfactin²⁰

การศึกษานี้วิเคราะห์หาปริมาณ surfactin ในเมตาบอไลต์เทียบกับสารมาตรฐาน surfactin (รูปที่ 3) โดยใช้เทคนิค HPLC (high performance liquid chromatography) โดยการตกตะกอน surfactin ในเมตาบอไลต์ 125 mL ด้วยกรดเกลือ (1 M HCl) ที่ pH 4 ปั่นเหวี่ยงตะกอนความเร็ว 12000 xg ทั้งส่วนใส หลังจากนั้นละลายตะกอน ที่ได้ด้วย 1.25 M NaOH (pH 11) 1 mL ปั่นเหวี่ยงตะกอนอีกครั้ง และนำส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์หา surfactin ต่อไป

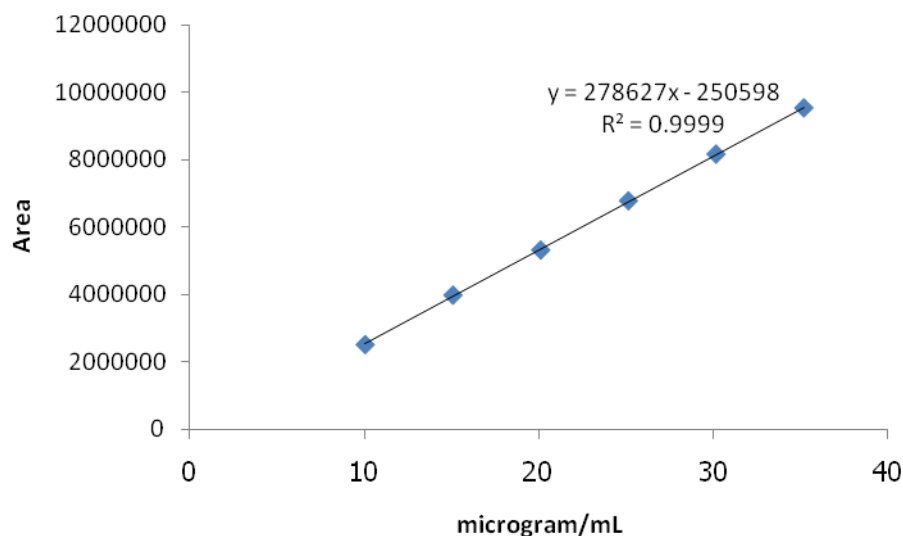


รูปที่ 3 โครมาโตแกรมที่ได้จากสารมาตรฐาน surfactin 0.50 mg/mL (40 μL)

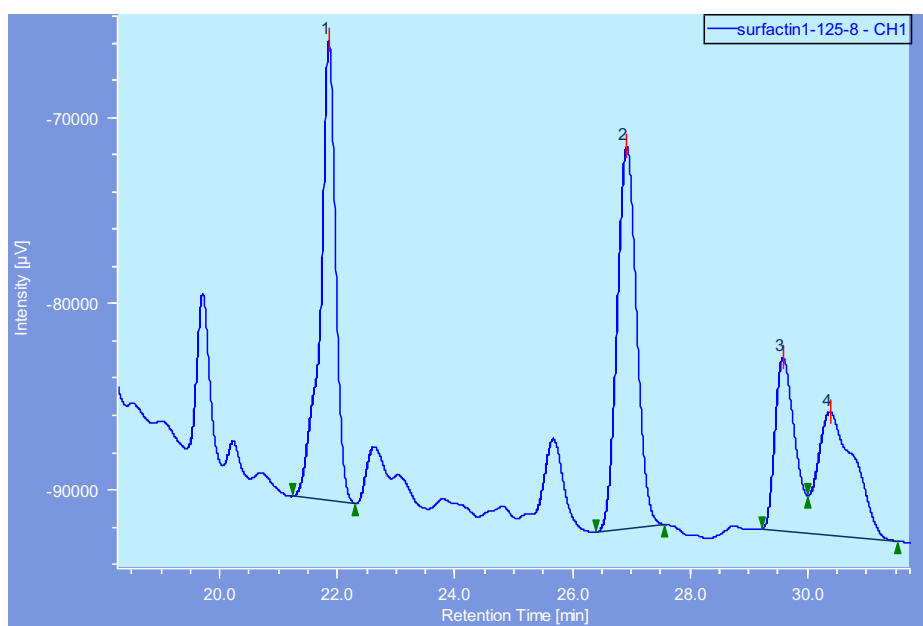


รูปที่ 4 ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ได้จากการสกัดเมตาบอไลต์

รูปที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์พบว่ามีความสำคัญ surfactin อยู่เนื่องจากพบพีคของ surfactin เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน surfactin ดังนั้นในตัวอย่างเมตาบอไลต์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* จึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยมีความเข้มข้น surfactin ประมาณ $0.44 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ ($n=3$) เมื่อคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเข้มข้นและพื้นที่ของ surfactin จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



รูปที่ 6 โครมาโตแกรมของเมตาบอไลต์ที่ได้จากการทำแห้งด้วยวิธีการผสมซิลิกอนไดออกไซด์ 5% ก่อนการทำแห้ง (เทียบกับน้ำหนักแห้งของเมตาบอไลต์)

รูปที่ 6 แสดงโครมาโตแกรมของเมตาบอไลต์ที่ได้จากการสกัดเมตาบอไลต์จากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และทำแห้งด้วยวิธีการผสมสารดูดซับซิลิกอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (AD5) ก่อนการทำแห้ง ซึ่งยังคงพบพีคของ surfactin ในตัวอย่างเมตาบอไลต์ ช่วยยืนยันว่าการผสมสารดูดซับไม่ได้รับกวนหรือทำลาย surfactin ที่อยู่ในเมตาบอไลต์

3. การพัฒนาผลิตภัณฑ์รูปแบบเม็ดจากเชื้อและ/หรือเมตาบอไลต์ *Bacillus subtilis*

จากการศึกษาเบื้องต้นนำเมตาบอไลต์ที่แห้งแล้วผสมกับซิลิกอนไดออกไซด์ในสัดส่วน 80:20 ตอกเม็ดด้วยเครื่องตอกอัดเม็ดชนิด hydraulic press พบว่าเม็ดที่ได้มีความแข็งแรงน้อยกว่า 1 kg แม้ว่าจะเพิ่มแรงตอก นอกจากนั้นผงแห้งของเมตาบอไลต์ติดสากจนไม่สามารถตอกอัดเม็ดได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้สารช่วยในตำรับที่มีความสามารถช่วยให้เมตาบอไลต์มีความสามารถในการตอกอัดได้ดีและไม่ดูดความชื้น โดยเลือกสารช่วย 3 ชนิด ได้แก่

- Lactose monohydrate ซึ่งมีความสามารถในการตอกอัดเกิดเป็นเม็ดที่ให้ความแข็งแรงสูงและละลายน้ำได้
- Lactose anhydrous ดูดความชื้นได้น้อยแต่ให้ความแข็งแรงหลังการตอกอัดไม่ดึ้นก
- D-mannitol ดูดความชื้นต่ำที่สุด แต่ให้ความแข็งแรงของหลังการตอกอัดน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารข้างต้น

3.1. การทดลองตั้งตำรับจากเมตาบอไลต์แห้งของเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเม็ดละลายน้ำ โดยใช้เมตาบอไลต์แห้ง บดผสมกับสารดูดซับ

ผสมเมตาบอไลต์แห้งที่เตรียมจากสัดส่วน เมตาบอไลต์ต่อซิลิกอนไดออกไซด์ 80:20 กับสารช่วยชนิดต่างๆ ดังในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 สัดส่วนตำรับที่มี *lactose monohydrate*, *lactose anhydrous* หรือ *D-mannitol*

Formulation	Amount of the mixture of colloidal silicon dioxide : metabolite (20 : 80)	Lactose monohydrate	Lactose anhydrous	D-mannitol
A20	100	-	-	-
A20LM20	80	20	-	-
A20LM40	60	40	-	-
A20LM60	40	60	-	-
A20LA20	80	-	20	-
A20LA40	60	-	40	-
A20LA60	40	-	60	-
A20MA20	80	-	-	20
A20MA40	60	-	-	40
A20MA60	40	-	-	60

ทำการศึกษาผลของสารช่วยทางเภสัชกรรมชนิดต่างๆ ต่อคุณสมบัติทางกายภาพของเม็ดผลิตภัณฑ์ (ความหนาแน่นของผงแห้งและคุณสมบัติการไหลของผงแห้งที่เตรียมได้) เพื่อหาสารช่วยที่เหมาะสมในการตั้งตำรับ ดังแสดงผลในตารางที่ 12 และ 13

ทำการตอกเม็ดขนาด 9.53 มิลลิเมตร น้ำหนัก 300 มิลลิกรัม โดยเครื่องตอกอัดชนิด hydraulic press ใช้แรงตอก 1 ตัน เป็นเวลา 10 วินาทีในทุกตำรับ แต่ไม่สามารถประเมินความแข็งได้เนื่องจากเม็ดที่ได้มีความแข็งน้อยและไม่สามารถคงรูปได้ความสามารถในการไหลไม่แตกต่างกันมากนัก จากตารางที่ 12 และ 13

ตารางที่ 12 ความหนาแน่นและคุณสมบัติการไหล (flow properties) ของส่วนผสมในสูตรตำรับต่างๆ

Formulations	Bulk density (g/mL)	Tapped density (g/mL)	% Compressibility	Hausner ratio
A20LM20	N/A	N/A	N/A	N/A
A20LM40	N/A	N/A	N/A	N/A
A20LM60	0.55±0.02	0.69±0.01	27.30±1.78	1.30±0.03
A20LA20	0.22±0.00	0.30±0.00	26.36±1.65	1.36±0.03
A20LA40	0.28±0.00	0.37±0.00	26.12±0.50	1.35±0.01
A20LA60	0.38±0.02	0.46±0.01	17.2±0.71	1.22±0.07
A20MA20	0.22±0.00	0.30±0.01	25.72±2.26	1.35±0.04
A20MA40	0.25±0.00	0.34±0.02	25.59±3.77	1.34±0.03
A20MA60	0.33±0.01	0.46±0.01	23.08±2.08	1.30±0.04

ตารางที่ 13 ค่ามุมกองวัสดุ (Angle of repose) ของตำรับต่างๆ (n=3)

Formulations	Angle of repose (degree)
A20	38.74±1.47
A20LM20	N/A*
A20LM40	N/A*
A20LM60	35.54±3.17
A20LA20	40.02±0.72
A20LA40	39.18±1.28
A20LA60	38.76±0.75
A20MA20	43.19±0.65
A20MA40	39.60±1.47
A20MA60	33.19±1.70

*N/A ไม่สามารถวัดค่าได้เนื่องจากอนุภาคเกาะกลุ่มกันจนไม่สามารถนำมาศึกษาการไหลได้

3.2. การทดลองตั้งตำรับจากเมตาบอไลต์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเม็ดละลายน้ำ โดยใช้เมตาบอไลต์ผสมกับสารดูดซับก่อนทำแห้ง

ทดลองตั้งตำรับจากเมตาบอไลต์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเม็ด โดยใช้เมตาบอไลต์ผสมกับสารดูดซับร้อยละ 5 (AD5) ก่อนการทำแห้ง และศึกษาผลของสารช่วยทางเภสัชกรรมชนิดต่างๆ ต่อคุณสมบัติทางกายภาพของเม็ดผลิตภัณฑ์ เพื่อหาสารช่วยที่เหมาะสมในการตั้งตำรับเม็ด และประเมินคุณสมบัติเบื้องต้นของเม็ดที่ดอกได้

3.2.1. การดกอัดเม็ดและการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ

ดอกเม็ดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.53 มิลลิเมตร น้ำหนัก 300 มิลลิกรัมต่อเม็ด โดยเครื่องดกอัดเม็ดชนิด hydraulic press ใช้แรงดก 1 ตัน เป็นเวลา 10 วินาที ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเม็ดแข็งคล้ายเม็ดยา สีน้ำตาลเข้ม (รูปที่ 7) และวัดความแข็งได้ดังในตารางที่ 14

จากค่าความแข็งของเม็ดเมตาบอไลต์ที่เตรียมโดยวิธีผสมสารดูดซับก่อนการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เมื่อให้แรงดกที่ 1 ตัน และแรงดกที่ 3 ตัน เม็ดที่ได้หลังจากการดกมีความกร่อนสูงมากทุกตำรับ หลังจากเม็ดออกมาจากปาก ขอบเม็ดไม่สมบูรณ์และมักจะ capping และ laminate ทันทีเมื่อดกอัด



รูปที่ 7 ผลิตภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย (บาซิลลัส ซับทิลิส)

ตารางที่ 14 ความแข็งของเม็ดเมตาบอไลต์ที่เตรียมโดยวิธีผสมสารดูดซับร้อยละ 5 ก่อนการอบแห้ง (AD5) (ดกด้วยแรง 1 ตัน และ แรง 3 ตัน ด้วยเวลา 10 วินาที)

Formulations	Hardness (kg) $\pm$ SD n=5
AD5 (1ton)	5.36 $\pm$ 0.64
AD5 (3tons)	7.86 $\pm$ 1.23
AD20 (1ton)	7.38 $\pm$ 1.52
AD20 (3tons)	12.52 $\pm$ 0.51

ตารางที่ 15 แสดงความแข็งของเม็ดเมตาบอไลต์ที่เตรียมโดยวิธีผสมสารดูดซับร้อยละ 5 ก่อนการอบแห้ง (AD5) เมื่อตกด้วยแรง 1 ตัน ด้วยเวลา 10 วินาที โดยมีสารช่วยแตกตัวผสมอยู่ในปริมาณร้อยละ 2-6 เทียบกับ น้ำหนักผงแห้ง ซึ่งมีค่าความแข็งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อมีปริมาณของสารช่วยแตกตัวเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 15 ความแข็งของเม็ดเมตาบอไลต์ที่เตรียมโดยวิธีผสมสารดูดซับร้อยละ 5 ก่อนการอบแห้ง (AD5) เมื่อตกด้วยแรง 1 ตัน ด้วยเวลา 10 วินาที โดยมีสารช่วยแตกตัวผสมอยู่

Amount of sodium starch glycolate (Explotab®)	Hardness (kg) $\pm$ SD n=5
2%	8.50 $\pm$ 0.50
4%	10.10 $\pm$ 1.23
6%	11.20 $\pm$ 1.50

3.2.2. การทดสอบการแตกตัวของเม็ด

การทดสอบการแตกตัวของเม็ดเมตาบอไลต์ที่เตรียมโดยวิธีผสมสารดูดซับก่อนการอบแห้งโดยผสมสารช่วยแตกตัว (superdisintegrant) โดยใช้เครื่องมือทดสอบเลียนแบบการทดสอบการแตกตัวของเม็ดยา (disintegration apparatus) และใช้ตัวกลางทดสอบเป็นน้ำกลั่น 1000 mL ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

จากตารางที่ 16 เมื่อเพิ่มปริมาณสารช่วยแตกตัวจะทำให้ใช้เวลาในการแตกตัวน้อยลง เมื่อใช้สารช่วยแตกตัว sodium starch glycolate ร้อยละ 6 (A5E6) ทำให้เวลาในการแตกตัวลดลงจาก 80.00 $\pm$ 0.00 นาที เหลือ 37.73 $\pm$ 5.02 นาที และมีปริมาณความชื้นสูงขึ้นด้วย (ตารางที่ 17) แต่ลักษณะทางกายภาพที่มองด้วยตาเปล่าไม่มีการเปลี่ยนแปลง ไม่เกิดการเยิ้มเหลวที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 16 เวลาในการแตกตัวของเม็ดเมตาบอไลต์ที่เตรียมโดยวิธีผสมสารดูดซับร้อยละ 5 ก่อนการอบแห้ง (AD5) และเติม sodium starch glycolate (Explotab®) เป็นสารช่วยแตกตัว

Amount of sodium starch glycolate (Explotab®)	Disintegration time (min) $\pm$ SD, n=5
0%	80.00 $\pm$ 0.00
2%	60.20 $\pm$ 3.20
4%	38.40 $\pm$ 0.00
6%	37.73 $\pm$ 5.02

ตารางที่ 17 ความชื้นของเม็ดเมตาบอไลต์ (n=5)

Formulation	% moisture
AD5	3.612±3.391
A5E6	7.198±1.354

AD5 คือเมตาบอไลต์ที่ผสมสารดูดซับร้อยละ 5 ก่อนการทำแห้ง

A5E6 คือเมตาบอไลต์ที่ผสมสารดูดซับร้อยละ 5 ก่อนการทำแห้ง (AD5) จากนั้นผสมกับ sodium starch glycolate (Explotab[®]) อีกร้อยละ 6 เมื่อเทียบกับ AD5

จากการทดลองการบดผสมสารดูดซับกับเมตาบอไลต์แห้งและวิธีการผสมสารดูดซับกับเมตาบอไลต์แห้งก่อนการทำแห้งพบว่า วิธีการผสมสารดูดซับกับเมตาบอไลต์ก่อนการทำแห้งทำให้ได้ลักษณะทางกายภาพเมตาบอไลต์แห้งที่สะดวกต่อการพัฒนาต่อไปมากกว่าวิธีการบดผสมสารดูดซับกับเมตาบอไลต์แห้ง

3.2.3. การทดสอบการละลายของเม็ดเมตาบอไลต์จาก *Bacillus subtilis*

การทดสอบการละลายของเม็ดเมตาบอไลต์จาก *Bacillus subtilis* รวมถึงการศึกษาหาวิธีวิเคราะห์อัตราการละลายที่เหมาะสมสำหรับตำรับเม็ดเมตาบอไลต์จาก *Bacillus subtilis* โดยการทดสอบการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยแบ่งกลุ่มการทดสอบเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่ทำการทดสอบการละลายจากเม็ดเมตาบอไลต์ (AD5) เป็นเวลา 30 นาที และ 12 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา

ผลการทดสอบพบว่าการทำทั้งสองวิธี มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ *Alternaria solani* Sorauer ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 18 ซึ่งอาจเนื่องมาจากเมื่อเม็ดละลายในน้ำได้หมดทำให้สารออกฤทธิ์ละลายหรือปลดปล่อยออกมาได้หมด อย่างไรก็ตามเมื่อแช่เม็ดเมตาบอไลต์ทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมงทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ *Alternaria brassicicola* ลดลงเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 19 ซึ่งอาจเนื่องมาจากความไม่คงสภาพของสารออกฤทธิ์

ตารางที่ 18 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ *Alternaria solani* Sorauer ของเมตาบอไลต์ที่ผสมสารดูดซับ 5% ก่อนการอบแห้ง (AD5) หลังการละลายออกจากเม็กดอกอัดที่เวลาต่างๆ กัน (แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อราที่เกิดขึ้น หน่วยเป็นเซนติเมตร) (n=5)

Time	Control ¹	Benomyl ²	Mancozeb ³	1%	5%	10%	25%	50%
30 min	9.0±0.0	9.0±0.0	2.42±0.6	9.0±0.0	9.0±0.0	9.0±0.0	7.5±0.1	6.9±0.4
12 h	9.0±0.0	9.0±0.0	2.42±0.6	9.0±0.0	9.0±0.0	9.0±0.0	7.5±0.1	6.9±0.5

¹ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารอื่นใด

² Benomyl คือ Methyl [1-[butylaminocarbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl] carbamate นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในทางการเกษตร

³ Mancozeb คือ Manganese ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในทางการเกษตร

ตารางที่ 19 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ *Alternaria brassicicola* ของเมตาบอไลต์ที่ผสมสารดูดซับร้อยละ 5 ก่อนการอบแห้ง (AD5) หลังการละลายออกจากเม็กดอกอัดที่เวลาต่างๆ กัน (แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อราที่หน่วยเป็นเซนติเมตร) (n=5)

Time	Control ¹	Benomyl ²	Mancozeb ³	1%	5%	10%	25%	50%
30 min	9.0±0.0	4.3±0.2	2.0±0.1	6.6±0.2	6.4±0.3	6.2±1.0	6.1±0.3	5.8±0.0
12 h	9.0±0.0	4.3±0.2	2.0±0.1	7.0±0.1	7.0±0.1	7.0±0.2	6.8±0.1	6.0±0.1

¹ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารอื่นใด

² Benomyl คือ Methyl [1-[butylaminocarbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl] carbamate นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในทางการเกษตร

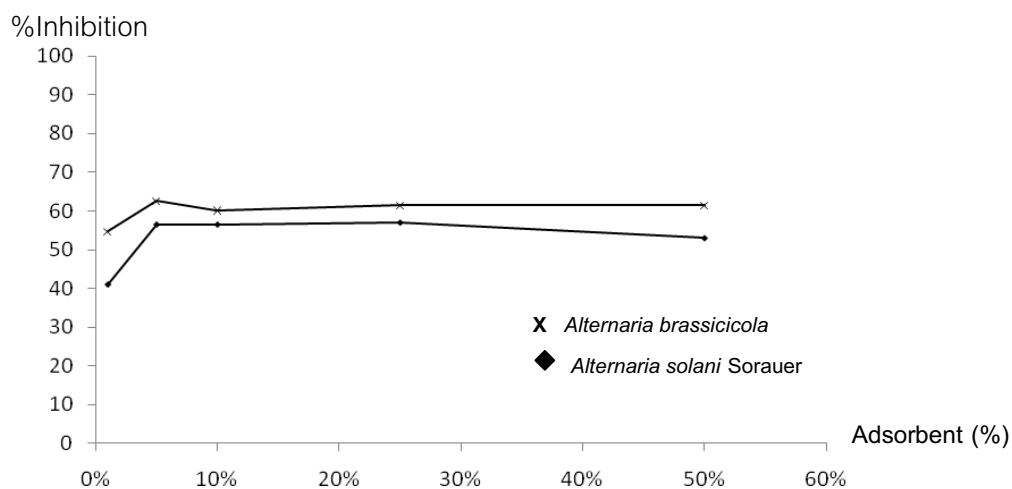
³ Mancozeb คือ Manganese ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในทางการเกษตร

3.2.4. การกำหนดความแรงมาตรฐาน (standardization)

การกำหนดความแรงมาตรฐานโดยหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อโรคพืช (MIC) ของ *Alternaria solani* Sorauer และ *Alternaria brassicicola* คำนวณจากความเข้มข้นของสารสำคัญในตำรับเทียบกับประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ ดังแสดงในตารางที่ 20-21 และรูปที่ 8-9

ตารางที่ 20 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุของเมตาบอไลต์

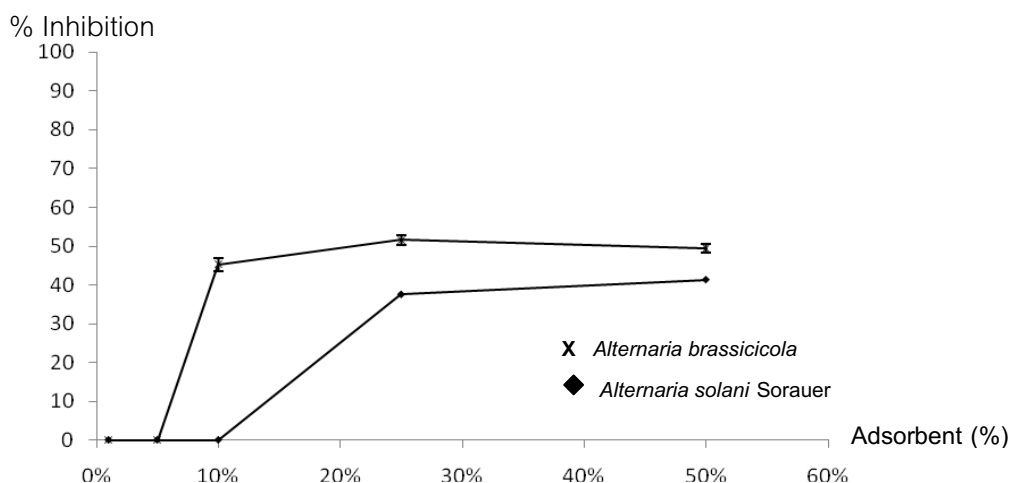
Test concentration (%)	Surfactin (µg/mL)	% inhibition <i>Alternaria solani</i> Sorauer	% inhibition <i>Alternaria brassicicola</i>
1	0.004	41.01±6.14	54.72±1.50
5	0.022	56.60±1.48	62.55±0.08
10	0.044	56.60±0.84	60.15±1.06
25	0.110	57.11±2.42	61.42±0.56
50	0.221	53.06±0.49	61.42±0.56



รูปที่ 8 ผลของความเข้มข้นของสารเมตาบอไลต์ในรูปสารละลายต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา

ตารางที่ 21 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ ของเมตาบอไลต์รูปผลิตภัณฑ์แห้งของเมตาบอไลต์ที่ผสมสารดูดซับ 5% ก่อนการอบแห้ง (AD5)

Test concentration (%)	Surfactin (µg/mL)	% inhibition <i>Alternaria solani</i> Sorauer	% inhibition <i>Alternaria brassicicola</i>
1	0.004	0.00±0.00	0.00±0.00
5	0.021	0.00±0.00	0.00±0.00
10	0.043	0.00±0.00	45.28±1.75
25	0.107	37.53±9.06	51.60±1.25
50	0.214	41.32±5.63	49.43±1.20



รูปที่ 9 ผลของความเข้มข้นของสารเมตาบอไลต์ในรูปผลิตภัณฑ์แห้งของเมตาบอไลต์ที่ผสมสารดูดซับ 5% ก่อนการอบแห้ง (AD5) ต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา

รูปที่ 8 แสดงผลของความเข้มข้นเมตาบอไลต์ พบว่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา (MIC) คือร้อยละ 5 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารมากขึ้นไม่ส่งผลเพิ่มความสามารถการยับยั้งเชื้อราได้สูงขึ้นมากนัก โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria solani* Sorauer และ *Alternaria brassicicola* คือ ร้อยละ 56.60 และ 62.55 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับในรูปผลิตภัณฑ์แห้งของเมตาบอไลต์ที่ผสมสารดูดซับร้อยละ 5 ก่อนการอบแห้ง (AD5) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้ต่ำกว่า (รูปที่ 9) โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Alternaria solani* Sorauer มีความเข้มข้นร้อยละ 25 (ใช้เม็ดผลิตภัณฑ์ขนาด 300 มิลลิกรัม 4½ เม็ดละลายในน้ำ 1 ลิตร[†]) และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเพียงร้อยละ 37.53 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Alternaria brassicicola* มีความเข้มข้นร้อยละ 10 (ใช้เม็ดผลิตภัณฑ์ขนาด 300 มิลลิกรัม 2 เม็ดละลายในน้ำ 1 ลิตร) และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งร้อยละ 45.28

จากข้อมูลการยับยั้งเชื้อสาเหตุ สรุปได้ว่าความแรงมาตรฐานของสารรูปผลิตภัณฑ์แห้งของเมตาบอไลต์ที่ผสมสารดูดซับ 5% ก่อนการอบแห้ง (AD5) สำหรับในการยับยั้งเชื้อมีความเข้มข้นของ surfactin 0.44 ± 0.01 µg/g ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria solani* Sorauer ใช้ความเข้มข้นต่ำสุด 0.107 mg/mL และเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ใช้ความเข้มข้นต่ำสุด 0.043 mg/mL ทั้งนี้การอบแห้งส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ ดังนั้นอาจเลือกใช้วิธีการทำแห้งด้วยวิธีอื่นซึ่งไม่ทำให้สารสำคัญสลายตัว แต่มักเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายสูงไม่เหมาะกับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

[†] เม็ดเมตาบอไลต์ที่พัฒนาขึ้น (AD5) 539.0 mg ในน้ำ 1 ลิตรมีความเข้มข้นเมตาบอไลต์ 10%

4. การทดสอบความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก *Bacillus subtilis*

4.1. การประเมินความคงสภาพของสูตรตำรับที่เตรียมได้ในสภาวะเร่งและสภาวะจริง

จากตำรับทั้งหมดผู้วิจัยได้เลือกสูตรที่มีเหมาะสมที่สุดคือสูตรที่ทำการเตรียมโดยวิธีผสมซิลิกอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ก่อนการอบแห้งด้วยวิธี hot air oven และบดเป็นผงละเอียด (AD5) ผสมกับ sodium starch glycolate ใช้เป็นสารช่วยแตกตัวร้อยละ 6 (A5E6) ของผงละเอียดข้างต้น

4.1.1. การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ

การศึกษาคูณสมบัติทางกายภาพของเม็ดผลิตภัณฑ์ ได้ทำการศึกษาความแข็งของเม็ดผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการเก็บรักษาในสภาวะจริงและสภาวะเร่งโดยทำการสุ่มตัวอย่าง เมื่อผ่านช่วงเวลา 1 เดือนและ 3 เดือน แสดงในตารางที่ 22 โดยวัดความแข็งด้วยเครื่อง texture analyser ความแข็งของ AD5 เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือนทั้งในสภาวะจริงและสภาวะเร่งมีความแข็งไม่แตกต่างจากวันที่เริ่มเก็บตัวอย่างมากนัก แต่การเก็บในสภาวะเร่งทำให้ความแข็งของ A5E6 ลดลงเมื่อเทียบกับวันที่เริ่มเก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 22 ผลการทดสอบความแข็งของเม็ดผลิตภัณฑ์หลังการทดสอบความคงสภาพ

		Hardness (kg) $\pm$ SD		
		ระยะเวลาเก็บตัวอย่าง (เดือน)		
		0	1	3
สภาวะเร่ง	AD5*	5.36 $\pm$ 0.64	4.52 $\pm$ 0.41	5.28 $\pm$ 1.41
	A5E6**	11.20 $\pm$ 1.50	3.36 $\pm$ 0.00	6.03 $\pm$ 0.37
สภาวะจริง	A5*	5.36 $\pm$ 0.64	4.70 $\pm$ 0.66	5.18 $\pm$ 0.62
	A5E6**	11.20 $\pm$ 1.50	2.61 $\pm$ 0.60	5.29 $\pm$ 0.8

การทดสอบความแข็ง (n=5) ด้วยเครื่อง texture analyzer

*AD5 สูตรที่ทำการเตรียมโดยวิธีผสมกับซิลิกอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกตัวเชื้อและฆ่าเชื้อแล้วก่อนการทำการอบ 80 องศาเซลเซียส

**A5E6 สูตรที่ทำการผสม sodium starch glycolate ร้อยละ 6 กับผงละเอียดของ AD5

4.1.2. การทดสอบการแตกตัวของเม็ดเมตาบอลิต์

การทดสอบหาระยะเวลาที่เม็ดผลิตภัณฑ์ใช้ในการแตกตัวเมื่อผ่านการเก็บในสภาวะจริงและสภาวะเร่งโดยทำการสุ่มตัวอย่าง เมื่อผ่านช่วงเวลา 1 เดือน และ 3 เดือนแสดงในตารางที่ 23

จากตารางที่ 23 การทดสอบระยะเวลาในการแตกตัวโดยใช้เครื่อง disintegration tester พบว่าการเก็บ AD5 ในสภาวะจริงจะทำให้ใช้ระยะเวลาการแตกตัวของ AD5 ลดลงเพียงเล็กน้อยในระยะเวลาการเก็บ 3 เดือน แต่ผลิตภัณฑ์ A5E6 ใช้เวลาในการแตกตัวน้อยลงในช่วง 3 เดือน จากประมาณ 37 นาทีเหลือประมาณ 11 นาที การ

เก็บในสภาวะเร่ง ผลิตภัณฑ์ AD5 และ A5E6 ใช้เวลาในการแตกตัวน้อยลงในช่วงเวลา 3 เดือนเช่นเดียวกับการเก็บในสภาวะจริง ซึ่งอาจเกิดจากความแข็งแรงของเม็ดผลิตภัณฑ์ที่ลดลง

ตารางที่ 23 การแตกตัวของเม็ดตัวอย่างเมตาบอไลต์แห้งหลังการทดสอบความคงสภาพ

		เวลาในการแตกตัว (นาที่)		
		ระยะเวลาเก็บตัวอย่าง (เดือน)		
		0	1	3
สภาวะเร่ง	AD5*	80.00±0.00	74.12±1.10	69.18±12.33
	A5E6**	37.73±5.02	10.33±0.912	10.62±0.84
สภาวะจริง	AD5*	80.00±0.00	75.90±4.19	73.24±4.76
	A5E6**	37.73±5.02	12.05±0.44	9.38±1.43

การทดสอบการแตกตัว (n=6) ตัวกลางคือน้ำกรอง 1000 mL อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

*AD5 สูตรที่ทำการเตรียมโดยวิธีผสมกับซิลิกอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกตัวเชื้อและฆ่าเชื้อแล้วก่อนการทำการอบ 80 องศาเซลเซียส

**A5E6 สูตรที่ทำการผสม sodium starch glycolate ร้อยละ 6 กับผงละเอียดของ AD5

4.1.3. การประเมินความสามารถในการควบคุมเชื้อโรคพืช

การประเมินความสามารถในการควบคุมเชื้อโรคพืชโดยพิจารณาจาก clear zone บนจานเพาะเชื้อตรวจสอบความมีชีวิตของเชื้อที่อยู่ในรูปผงผลิตภัณฑ์ และตรวจนับปริมาณเชื้อที่เจริญได้บนผิวหน้าอาหารในจานเพาะเชื้อ โดยกำหนดตรวจความมีชีวิตของเชื้อในผลิตภัณฑ์ในระยะเวลา 3 เดือน

จากการทดสอบในจานเพาะเชื้อเมื่อเก็บตัวอย่างไว้เป็นเวลา 3 เดือนในสภาวะจริง (ตารางที่ 24 และ 25) พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งของเมตาบอไลต์แห้งผลิตภัณฑ์ AD5 และ A5E6 ไม่แตกต่างกับการทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อนการเก็บรักษา แต่พบว่าเมื่อเก็บตัวอย่างในสภาวะเร่งเป็นเวลา 3 เดือน ประสิทธิภาพของเมตาบอไลต์แห้งผลิตภัณฑ์ AD5 และ A5E6 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ *Alternaria solani* Sorauer และ *Alternaria brassicicola* ลดลง

ตารางที่ 24 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ *Alternaria solani* Sorauer ของเมตาบอไลต์ที่ผ่านการทดสอบความคงสภาพสภาวะเร่งและสภาวะจริงในเวลาเริ่มต้นและ 3 เดือน (แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อราที่เกิดขึ้น หน่วยเป็นเซนติเมตร) ($n=5$)

	ระยะเวลาการเก็บ (เดือน)									
	0					3				
	Test concentration					Test concentration				
AD5*	5%	10%	25%	50%		5%	10%	25%	50%	
	9.0±0.0	9.0±0.0	7.5±0.1	6.9±0.4	สภาวะเร่ง	9.0±0.0	9.0±0.0	8.6±0.1	6.3±0.0	
					สภาวะจริง	9.0±0.0	8.2±0.2	6.1±0.1	4.7±0.1	
A5E6**	5%	10%	25%	50%		5%	10%	25%	50%	
	9.0±0.0	9.0±0.0	7.5±0.1	6.9±0.4	สภาวะเร่ง	9.0±0.0	9.0±0.0	9.0±0.0	5.6±0.1	
					สภาวะจริง	9.0±0.0	7.6±0.0	6.6±0.1	5.0±0.5	

ตารางที่ 25 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ *Alternaria brassicicola* ของเมตาบอไลต์ที่ผ่านการทดสอบความคงสภาพสภาวะเร่งและสภาวะจริงในเวลาเริ่มต้นและ 3 เดือน (แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อราที่เกิดขึ้น หน่วยเป็นเซนติเมตร) ($n=5$)

	ระยะเวลาการเก็บ (เดือน)									
	0					3				
	Test concentration					Test concentration				
AD5*	5%	10%	25%	50%		5%	10%	25%	50%	
	6.4±0.3	6.2±1.0	6.1±0.3	5.8±0.0	สภาวะเร่ง	7.5±0.0	7.5±0.1	7.1±0.1	5.1±0.0	
					สภาวะจริง	6.3±0.1	7.0±0.2	6.4±0.1	6.7±0.1	
A5E6**	5%	10%	25%	50%		5%	10%	25%	50%	
	6.4±0.3	6.2±1.0	6.1±0.3	5.8±0.0	สภาวะเร่ง	7.8±0.0	7.6±0.1	6.5±0.2	6.0±0.1	
					สภาวะจริง	7.9±0.2	7.6±0.2	6.0±0.2	5.3±0.2	

4.1.4. การหาปริมาณ surfactin ในผลิตภัณฑ์หลังจากการศึกษาความคงสภาพ

ผลการทดสอบหาปริมาณสารสำคัญโดยใช้ HPLC สอดคล้องกับผลการทดสอบในจานเพาะเชื้อ โดยพบว่าเมื่อเก็บผลิตภัณฑ์จากเมตาบอไลต์แห่ง AD5 และ A5E6 ในสภาวะจริงเป็นเวลา 1 เดือนปริมาณ surfactin มีค่าลดลงเหลือ 0.25±0.05 µg/g และ 0.20±0.06 µg/g ตามลำดับ แต่เมื่อเก็บในสภาวะเร่งมีค่าลดลงเหลือ 0.16±0.04 µg/g และ 0.15±0.55 µg/g ตามลำดับ หลังจากเก็บเมตาบอไลต์แห่งผลิตภัณฑ์ AD5 และ A5E6 เป็นเวลา 3 เดือน

จากการวิเคราะห์โดย HPLC ไม่พบ surfactin เหลืออยู่ แต่เมื่อเก็บเมตาบอไลต์แห้งผลิตภัณฑ์ AD5 และ A5E6 ในตู้เย็นอุณหภูมิ 6-8 องศาเซลเซียส ยังคงมีปริมาณ surfactin ใกล้เคียงกับเวลาเริ่มต้นการศึกษา ดังนั้นสารสำคัญ surfactin ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพในเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่ใช้เป็น marker ในการศึกษาได้มีส่วนแสดงให้เห็นถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์เมตาบอไลต์แห้ง AD5 และ A5E6 แต่อย่างไรก็ตาม AD5 และ A5E6 ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอยู่เนื่องจากมีสารอื่นในเมตาบอไลต์ยังคงประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราสาเหตุได้

ตารางที่ 26 ปริมาณสารออกฤทธิ์ surfactin ที่มีอยู่ในตัวอย่าง (n=3) หลังเก็บไว้เป็นเวลา 0, 1 และ 3 เดือน

	ระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง (เดือน)			
	ปริมาณ surfactin (µg/g)			
	0		1	3
AD5*	0.44±0.01	สภาวะเร่ง	0.16±0.04	0
		สภาวะจริง	0.25±0.05	0
		เก็บในตู้เย็น	0.44±0.00	0.43±0.01
A5E6**	0.44±0.01	สภาวะเร่ง	0.15±0.55	0
		สภาวะจริง	0.20±0.06	0
		เก็บในตู้เย็น	0.43±0.01	0.43±0.02

*AD5 สูตรที่ทำการเตรียมโดยวิธีผสมกับซิลิกอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกตัวเชื้อและฆ่าเชื้อแล้วก่อนการทำการอบ 80 องศาเซลเซียส

**A5E6 สูตรที่ทำการผสม sodium starch glycolate ร้อยละ 6 กับผงละเอียดของ AD5

4.2. ทดสอบการควบคุมโรคพืชในแปลงเกษตร (field test)

การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคใบจุดของผักคะน้า ดังนี้

ตัวอย่างการทดลอง

1. ชุดควบคุมไม่ปลูกเชื้อ (control)
2. ชุดควบคุมปลูกเชื้อราสาเหตุ *Alternaria brassicicola* เพียงอย่างเดียว (-ve control)
3. ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*
4. ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นเมตาบอไลต์จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*
5. ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สูตร A5E6

6. ปลูกรั้วราสาเหตุและฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สูตร AD5
7. ปลูกรั้วราสาเหตุและฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สูตร A5E6 หลังจากเก็บไว้ในสภาวะเร่งเป็นเวลา 3 เดือน
8. ปลูกรั้วราสาเหตุและฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สูตร A20
9. ปลูกรั้วราสาเหตุและฉีดพ่นสารเคมีกำจัดรา benomyl (+ve control)
10. ปลูกรั้วราสาเหตุและฉีดพ่นสารเคมีกำจัดรา mancozeb (+ve control)

ตารางที่ 27 บันทึกความรุนแรงของโรคใบจุดของผักคะน้า

ตัวอย่างการทดลอง (Treatment)	ระดับความรุนแรงของโรคใบจุด				
	R1	R2	R3	R4	R5
1	0	0	0	0	0
2	9	8	9	10	8
3	1	0	1	1	1
4	2	1	2	2	1
5	4	4	3	5	4
6	4	4	4	3	4
7	3	5	6	4	4
8	3	4	3	3	3
9	1	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0

หมายเหตุ R1, R2, R3, R4, และ R5 คือต้นคะน้า

ระดับความรุนแรงของโรคใบจุดแบ่งเป็น 11 ระดับ คือ 0-10 (ดูรายละเอียดในวิธีดำเนินการวิจัยหัวข้อ 4.2.2)

ตารางที่ 28 ร้อยละความรุนแรงของโรคใบจุดของผักคะน้า

ตัวอย่างการทดลอง (Treatment)	เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย					เฉลี่ย (%)
	R1	R2	R3	R4	R5	
1	0	0	0	0	0	0
2	90	80	90	100	80	88
3	10	0	10	10	10	8
4	20	10	20	20	10	16
5	40	40	30	50	40	40
6	40	40	40	30	40	38
7	30	50	60	40	40	44
8	30	40	30	30	30	32
9	10	0	0	0	0	2
10	0	0	0	0	0	0

หมายเหตุ R1, R2, R3, R4, และ R5 คือต้นคะน้า

เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย คำนวณโดยใช้สมการซึ่งได้แสดงไว้ในวิธีดำเนินการวิจัยหัวข้อ 4.2.2



ตัวอย่างที่ 1



ตัวอย่างที่ 2



ตัวอย่างที่ 3



Tr. 4 ตัวอย่างที่ 4 (ct)



ตัวอย่างที่ 5



ตัวอย่างที่ 6

รูปที่ 10 ผักคะน้าหลังการทดสอบการยับยั้งโรคและเปรียบเทียบความรุนแรงจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* โดยใช้สารยับยั้งจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

หมายเหตุ ตัวอย่างที่ 1 = ชุดควบคุมไม่ปลูกเชื้อ (control) / ตัวอย่างที่ 2 = ชุดควบคุมปลูกเชื้อราสาเหตุ

Alternaria brassicicola เพียงอย่างเดียว (-ve control) / ตัวอย่างที่ 3 = ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* / ตัวอย่างที่ 4 = ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นเมตาบอไลต์จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* / ตัวอย่างที่ 5 = ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สูตร A5E6 / ตัวอย่างที่ 6 = ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สูตร AD5 / ตัวอย่างที่ 7 = ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สูตร A5E6 หลังจากเก็บไว้ในสภาวะเร่งเป็นเวลา 3 เดือน / ตัวอย่างที่ 8 = ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สูตร A20 / ตัวอย่างที่ 9 = ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นสารเคมีกำจัดรา benomyl (+ control) / ตัวอย่างที่ 10 = ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นสารเคมีกำจัดรา mancozeb (+ control)



ตัวอย่างที่ 7



ตัวอย่างที่ 8



ตัวอย่างที่ 9



ตัวอย่างที่ 10

รูปที่ 10 (ต่อ)

การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคใบจุดของผักคะน้าในแปลงเกษตรมีความสอดคล้องกันกับการทดลองในจานเพาะเชื้อ เมตาบอไลต์ที่ผ่านการทำแห้งยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ *Alternaria brassicicola* ประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราลดลงหลังทำให้เมตาบอไลต์แห้งโดยวิธีการอบแห้ง แต่วิธีการอบแห้ง 2 วิธีคือการอบแห้งเมตาบอไลต์ก่อนบดผสมกับซิลิกอนไดออกไซด์ A20 และวิธีการผสมเมตาบอไลต์กับซิลิกอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (AD5) ก่อนการอบแห้งให้ผลการยับยั้งลดลงเล็กน้อยโดยมีความรุนแรงของโรคร้อยละ 32 และ 38 ตามลำดับ หลังจากนั้นเมื่อ นำเมตาบอไลต์แห้ง AD5 มาตั้งตำรับโดยผสมกับสารช่วยแตกตัวร้อยละ 6 (A5E6) การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เกิดขึ้นกับคะน้าก็ยังคงประสิทธิภาพในการยับยั้งอยู่ โดยมีความรุนแรงของโรคร้อยละ 40 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เกิดขึ้นโดยใช้สารยับยั้ง A5E6 ที่ผ่านการทดสอบความคงสภาพโดยสภาวะเร่งให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราลดลงเล็กน้อยโดยมีความรุนแรงของโรคร้อยละ 44

5. สรุปผลการวิจัย

ผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ใช้ในการควบคุมโรคพืชถูกพัฒนามาจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการแยกตัวเชื้อและปราศจากเชื้อแล้ว เมื่อนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์รูปแบบของแข็งต้องผสมกับซิลิกอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ก่อนทำการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงเมตาบอลไลต์แห้งที่ได้สามารถบดเป็นผงละเอียดและยังคงมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราสาเหตุ สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราคือ surfactin ซึ่งสามารถพบได้ในสารเมตาบอลไลต์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ถูกนำมาใช้เป็น marker

ในการศึกษานี้ นำเมตาบอลไลต์แห้งที่ได้ผสมกับสารช่วยแตกตัว ดำรับที่ได้มีประสิทธิภาพในการดกอดเป็นเม็ดและสามารถแตกตัวให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเช่นเดิม ลักษณะผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะคล้ายเม็ดยา สีน้ำตาลเข้ม จากการทดสอบความคงสภาพในสภาวะเร่งและสภาวะจริงของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ พบว่าในสภาวะเร่งที่ช่วงเวลา 3 เดือน ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการเก็บรักษาตรวจวิเคราะห์ไม่พบสาร surfactin แต่เมื่อนำผลิตภัณฑ์ไปทดสอบในจานเลี้ยงเชื้อพบว่า ผลิตภัณฑ์ A5E6 ยังคงมีความสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุ *Alternaria solani* Sorauer และ *Alternaria brassicicola*

การทดสอบยืนยันประสิทธิภาพในแปลงเกษตรในผักคะน้าต่อต้านเชื้อรา *Alternaria brassicicola* พบว่าผลิตภัณฑ์ A5E6 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ในผักคะน้า ลดความรุนแรงของการเกิดโรคได้เหลือร้อยละ 40 แต่การเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ในสภาวะเร่ง (accelerated testing อุณหภูมิ 40 ± 2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5) เป็นเวลา 3 เดือน จะทำให้ประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคเหลือร้อยละ 44 ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ *Alternaria solani* Sorauer และ *Alternaria brassicicola* ได้ แต่สารที่ได้เป็นสารชีวภาพซึ่งมีส่วนผสมของสารหลายชนิด สารบางชนิดอาจเสื่อมสลายไป ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในวิธีการเก็บรักษาให้คงประสิทธิภาพเหมาะสมกับการนำไปใช้ในแปลงเกษตรต่อไป

6. เอกสารอ้างอิง

1. Nimraksa, H., 2008. Using of biological control of potato early blight disease caused by *Alternaria solani* Sorauer. PhD Thesis, Kasetsart University.
2. Madigan, M., Martinko, J., 2005. *Brock Biology of Microorganisms*, 11th ed., Prentice Hall, Washington DC.
3. Nakano, M.M., Zuber, P., 1998. Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Ann. Rev. Microbiol.*, 52, 165-90.
4. Ryan, K.J., Ray, C.G., 2004. *Sherris Medical Microbiology*, 4th ed., McGraw-Hill, New York.
5. Gnanamanickam, S.S., 2002. *Biological Control of Crop Diseases*. Marcel Dekker, New York.
6. กรมพัฒนาที่ดิน, 2549. การจัดการดินและระบบการปลูกข้าวโพดฝักอ่อน. กรมพัฒนาที่ดิน กรุงเทพมหานคร. Available at: http://www.idd.go.th/new_hp/vichakarn/manual/corn/p3.html. (8 December 2007)
7. ประเสริฐ ฉัตรวิริยะวงศ์, 2549. การวิจัยด้านโรคอ้อย. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม. Available at: <http://cropthai.ku.ac.th/ked/text/dis.html>. (8 December 2007)
8. วิจิตรา ลีละศุภกุล, 2547. การควบคุมโรคของผลส้มหลังการเก็บเกี่ยวโดยชีววิธี. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. Available at: www.sc.psu.ac.th/units/qa/Download/2547/detail_stand_2.2_47nov.xls. (8 December 2007)
9. ศุภชัย บุญนำมา, สุชาดา ไชยสวัสดิ์, ดารารวรรณ ทองบุตร, ธนวัฒน์ ถิรวสิน, 2542. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต *Bacillus subtilis* ในอุตสาหกรรมโพรไบโอติก. สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ, กรุงเทพมหานคร. Available at: <http://www.kmutt.ac.th/rippc/pron39.htm>. (8 December 2007)
10. ดารารวรรณ ทองบุตร, สุชาดา ไชยสวัสดิ์, ศุภชัย บุญนำมา, ธนวัฒน์ ถิรวสิน, 2547. การแปรรูปผลผลิต *Bacillus subtilis* (Bs) เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง. สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ, กรุงเทพมหานคร. Available at: <http://www.kmutt.ac.th/rippc/bacillus.htm>. (8 December 2007)
11. Helbig, J., Bochow, H., 2001. Effectiveness of *Bacillus subtilis* (isolate 25021) in controlling *Botrytis cinerea* in strawbeery. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz*, 108(6), 545-559.
12. Ansel, H.C., Allen, L.V., Popovich, N.G., 1999. *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7th ed., Lippincott Williams & Wilkins, New York.
13. Chowdary, K.P.R., Manjula, T., 2000. Effect of surfactants on the solubility and dissolution rate of nimesulide from tablets. *Indian J. Pharm. Sci.*, 62(2), 97-101.
14. Sunada, H., Bi, Y., 2002. Preparation, evaluation and optimization of rapidly disintegration tablets. *Powd. Technol.*, 122, 188-198.
15. Carter, J.C., 2002. The role of disintegrants in solid oral dosage manufacturing. *Pharm. Can.*, 3(2), 11-13.

16. พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์, 2549. เอกสารคำสอนเรื่องการประเมินคุณภาพยาเม็ด. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.
17. กองควบคุมยา, 2550. แนวทางการทดสอบความคงสภาพของยา. กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, กรุงเทพมหานคร. Available at:
http://wwwapp1.fda.moph.go.th/drug/zone_gmp/gmp_book/book2.asp. (31 January 2008)
18. Chen, H.-L., Chen, Y.-S., Juang, R.-S., 2007. Separation of surfactin from fermentation broths by acid precipitation and two-stage dead-end ultrafiltration processes. *J. Membrane Sci.*, 299(1-2), 114-121.
19. Isa, M.H.M., Coraglia, D.E., Frazier, R.A., Jauregi, P., 2007. Recovery and purification of surfactin from fermentation broth by a two-step ultrafiltration process. *J. Membrane Sci.*, 296(1-2), 51-57.
20. Deleu, M., Razafindralambo, H., Popineau, Y., Jacques, P., Thonart, P., Paquot, M., 1999. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 152(1-2), 3-10.

7. Output จากผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยที่ได้จากการดำเนินโครงการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้นำไปจดสิทธิบัตร 2 เรื่อง และนำเสนอผลการวิจัยในการประชุมวิชาการ 2 ครั้ง ดังต่อไปนี้

สิทธิบัตร

1. พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์ ยศนันท์ วีระพล. กรรมวิธีการทำแห้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารดูดซับรูปพรุน. คำขอรับสิทธิบัตร 0901005886, 30 ธันวาคม 2552.
2. พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์ ยศนันท์ วีระพล. องค์ประกอบของรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงและของแข็งจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อสำหรับควบคุมโรคพืช. คำขอรับสิทธิบัตร 1001000228, 15 กุมภาพันธ์ 2553.

การนำเสนอผลการวิจัย

1. Weerapol Y, Siamornsak P. Development of solid dosage forms containing incubated bacteria (*Bacillus subtilis*) broth for plant pathogen control. *The 5th Thailand Pharmacy Congress*, Bangkok, 27-28 December 2009.
2. Weerapol Y, Siamornsak P. Characterization of product derived from *Bacillus subtilis* for plant disease control. *Proceedings of the 3rd Silpakorn University Research Fair 2010*; 3: P124-P128. [Nakhon Pathom, 28-29 January 2010]

ผลงานวิจัยที่ได้ยังมีประโยชน์ต่อการเรียนการสอนด้านเทคโนโลยีเภสัชกรรม การผลิตยาและการออกแบบระบบนำส่งยา รวมถึงการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเพื่อประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมยา ทั้งในระดับปริญญาบัณฑิตและบัณฑิตศึกษา

ภาคผนวก 1

การเตรียมต้นพืชเพื่อทดสอบโรคใบจุดของผักคะน้า

1. การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดของคะน้าที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* โดยเตรียมวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดิน แกลบ ปุ๋ยหมัก ในอัตราส่วน 5:1:1 ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงบรรจุลงในกระถางที่สะอาดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว โดยใส่ดินประมาณ $\frac{3}{4}$ ของกระถาง ย้ายต้นกล้าคะน้าปลูกลงในกระถางที่เตรียมไว้กระถางละ 1 ต้น เริ่มทำการทดสอบประสิทธิภาพภายหลังจากคะน้ามีอายุ 45 วัน หลังย้ายปลูก

2. การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* เลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 9 เซนติเมตร เป็นเวลา 14 วัน เชื้อจะเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร เเทน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในจานอาหารปริมาตร 15 มิลลิลิตร ใช้ loop ปลอดเชื้อเขี่ยสปอร์ให้หลุดออก แล้วนำ suspension ที่ได้มาปรับความเข้มข้นเป็น 3.5×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ด้วย Haemocytometer ก่อนนำไปฉีดพ่นต้นคะน้าในกระถางปลูกกระถางละ 20 มิลลิลิตร

3. การเตรียมแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* โดยเลี้ยงในอาหาร NB เลี้ยงในสภาพเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง นำมาเตรียมเซลล์แขวนลอยและปรับให้มีความเข้มข้น 10^8 cfu/mL (สปอร์/มิลลิลิตร)

4. การเตรียมสารชีวภาพจากแบคทีเรีย โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในอาหาร SDB ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาพเขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง นำ suspension ที่ได้จากการเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที นำส่วนใสที่อยู่ด้านบน (supernatant) ที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C ระยะเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปฉีดพ่น

5. การเตรียมผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* โดยการนำ supernatant ที่ได้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพ โดยพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพจำนวน 4 สูตร คือ A5E6**, AD5*, A5E6 ที่ผ่านการเก็บไว้ในสภาวะแรง 3 เดือน และ A20*** ละลายในน้ำให้มีความเข้มข้นร้อยละ 50 (%supernatantในน้ำ)

* AD5 สูตรที่ทำการเตรียมโดยวิธีผสมกับซิลิกอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกตัวเชื้อและฆ่าเชื้อแล้วก่อนการทำการอบ 80 องศาเซลเซียส

** A5E6 สูตรที่ทำการผสม sodium starch glycolate ร้อยละ 6 กับผงละเอียดของ AD5

*** A20 สูตรที่ทำการอบแห้งก่อนบดผสมกับซิลิกอนไดออกไซด์ร้อยละ 20

6. การเตรียมสารเคมีกำจัดเชื้อรา benomyl และ mancozeb โดยการนำสารเคมีมาเตรียมเป็นสารละลายแขวนลอยโดยใช้อัตราที่ระบุไว้บนฉลาก benomyl อัตราที่ใช้คือ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และ mancozeb อัตราที่ใช้คือ 80 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

7. การทดลองในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดยทำการฉีดพ่นแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สารเมตาบอไลต์จากเชื้อแบคทีเรีย ผลิตภัณฑ์ และสารเคมีที่ได้เตรียมไว้ ฉีดพ่นลงบนต้นผักคะน้าอายุ 45 วันหลังย้ายปลูก โดยใช้เครื่องพ่นขนาดเล็กขนาดจุ 1 ลิตร โดยฉีดพ่น 20 มิลลิลิตร/ต้น ด้วยน้ำหนักรดที่สม่ำเสมอเพื่อให้ได้ปริมาณ

ของสปอร์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย สารจากเชื้อแบคทีเรีย ผลิตภัณฑ์ และสารเคมีที่ตกลงบนผิวพืชมีปริมาณที่เท่ากัน ภายหลังจากการพ่นได้ 1 วัน จึงทำการปลูกเชื้อราสาเหตุที่ความเข้มข้นของ inoculum 3.5×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ลงบนต้นผักคะน้า การฉีดพ่นแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุพยายามให้ทั่วถึงโดยฉีดทั้งทางด้านบนและด้านข้างของต้นผักคะน้าอย่างสม่ำเสมอโดยให้หัวฉีดห่างจากต้นประมาณ 1 ฟุต ปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเกิดโรค โดยการใช้อุณหภูมิสูงและชื้นแต่ระดับของผักคะน้า ($n=5$)

ภาคผนวก 2 (คำขอสิทธิบัตร)

แบบ สป/สผ/อสป/001-ก
หน้า 1 ของจำนวน 3 หน้า

 คำขอรับสิทธิบัตร / อนุสิทธิบัตร ☒ การประดิษฐ์ ☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์ ☐ อนุสิทธิบัตร ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ.2522 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร(ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2535 และ พระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542	สำหรับเจ้าหน้าที่	
	วันรับคำขอ 30 ธ.ค. 2552	เลขที่คำขอ 09010053886
	วันยื่นคำขอ	
	สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	
	ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์ ประเภทผลิตภัณฑ์	
วันประกาศโฆษณา	เลขที่ประกาศโฆษณา	
วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	
ไม่ขอเจ้าหน้าที่		

1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์
กรรมวิธีการทำแห้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารดูดซับพรุน

2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอครั้งแรก
ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)
มหาวิทยาลัยศิลปากร 22 ถนนบรมราชชนนี เขตคลองสาน กรุงเทพมหานคร
10170 ประเทศไทย และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (ในข้อ)

3.1 สัญชาติ ไทย
3.2 โทรศัพท์ 02-8807374
3.3 โทรสาร
3.4 อีเมล

4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☒ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5. ตัวแทน (ถ้ามี) ที่อยู่ (เลขที่ ถนน จังหวัด รหัสไปรษณีย์)
นาย ชัยรัตน์ จิตตสินนา ศูนย์บ่มเพาะธุรกิจ มหาวิทยาลัยศิลปากร
เลขที่ 6 ถนนราชมนฑลใน ต.พระปฐมเจดีย์ อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

5.1 ตัวแทนเลขที่ 2216
5.2 โทรศัพท์ 034-251524
5.3 โทรสาร 034-251544
5.4 อีเมล -

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)
รองศาสตราจารย์ ดร. พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์ ภาควิชาเทคโนโลยีสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (ในข้อ)

7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม
ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร
เลขที่ วันยื่น เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ
☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม่อาจระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ในจัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียด

แบบ สป/สผ/อสป/001-ก(ใบต่อ)
หน้า 2 ของจำนวน 3 หน้า

8. การยื่นคำขออนุญาตออกจำหน่าย				
วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการ ประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				
8.4 ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอสิทธิให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย ☐ ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ ☐ ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้				
9. การแสดงการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ให้ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด วันแสดง _____ วันเปิดงานแสดง _____ ผู้จัด _____				
10. การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ				
10.1 เลขทะเบียนฝากเก็บ		10.2 วันที่ฝากเก็บ		10.3 สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ
11. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ที่จัดทำ เป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอยื่นเป็นภาษา ☐ อังกฤษ ☐ ฝรั่งเศส ☐ เยอรมัน ☐ ญี่ปุ่น ☐ อื่น ๆ				
12. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตรหรือจดทะเบียนและประกาศโฆษณาอนุสิทธิบัตรนี้ หลังจากวันที่ _____ เดือน _____ พ.ศ. _____ ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้รูปเขียนหมายเลข _____ ในการประกาศโฆษณา				
13. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย ก. แบบพิมพ์คำขอ 3 หน้า ข. รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์ 5 หน้า ค. ข้อถ้อยสิทธิ 1 หน้า ง. รูปเขียน รูป หน้า ช. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์ ☐ รูปเขียน รูป หน้า ☐ รูปถ่าย รูป หน้า จ. บทสรุปการประดิษฐ์ 1 หน้า			14. เอกสารประกอบคำขอ ☐ เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☐ หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบ ผลิตภัณฑ์ ☐ หนังสือมอบอำนาจ ☐ เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ ☐ เอกสารการขอรับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็น วันยื่นคำขอในประเทศไทย ☐ เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ ☒ เอกสารอื่น ๆ	
15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ☒ การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรมาก่อน ☐ การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก.....				
16. ลายมือชื่อ (☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร / อนุสิทธิบัตร; ☒ ตัวแทน) นายชัชรัตน์ จิตตสินินวา (ตัวแทน)				

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงขอ ความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่
เพื่อไม่ให้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน

แบบ สป/สผ/อสป/001-ก (ใบต่อ)

หน้า 3 ของจำนวน 3 หน้า

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ) (ต่อ)

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย อยู่ที่ดิน 14 อาคารเอส เอ็ม ทาวเวอร์ 979 / 17-21 ถนนพหลโยธิน
แขวงสามเสนใน เขตพญาไท กรุงเทพมหานคร 10400 ประเทศไทย

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)

รองศาสตราจารย์ ดร. พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์

อยู่ที่ ภาควิชาเทคโนโลยีเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์
เลขที่ 6 ถนน ราชมรรคาใน ตำบลพระปฐมเจดีย์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000 ประเทศไทย

นาย ยศนันท์ วีระพล

อยู่ที่ ภาควิชาเทคโนโลยีเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์
เลขที่ 6 ถนน ราชมรรคาใน ตำบลพระปฐมเจดีย์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000 ประเทศไทย

หน้า 1 ของจำนวน 5 หน้า

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

กรรมวิธีการทำแห้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารดูดซับรุกราน

5 สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการผลิต

การประดิษฐ์นี้อยู่ในสาขาวิชาเทคโนโลยีเกษตรกรรมและเทคโนโลยีการเกษตรด้านการควบคุมโรคพืช

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

ลักษณะของการประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการทำแห้งอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารดูดซับรุกราน ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยเปปโตน หรือสารสกัดจากยีสต์ หรือสารสกัดจากเนื้อวัว (beef) หรือน้ำตาลกลูโคส หรือของผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวข้างต้นเป็นองค์ประกอบ เป็นเวลาประมาณ 3 วัน แล้วแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากตัวเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงตะกอน เก็บส่วนใสที่ได้ไปมาเชื้อที่หลงเหลืออยู่ จากนั้นผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับสารดูดซับ แล้วนำของผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับสารดูดซับไปทำแห้ง หรือทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อแห้งก่อนแล้วจึงบดผสมกับสารดูดซับ โดยใช้วิธีทำแห้งด้วยการพ่นแห้ง หรือการทำแห้งแบบเยือกแข็ง หรือการอบแห้ง โดยเมื่อกำจัดน้ำออกจากของผสมดังกล่าวแล้วนำไปบดลดขนาดให้เป็นอนุภาคขนาดเล็กตามต้องการ

15 ความมุ่งหมายของการประดิษฐ์นี้เพื่อให้ได้กรรมวิธีในการทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารออกฤทธิ์ต่อเชื้อโรคพืช ให้เป็นผงแห้ง มีขนาดอนุภาคเล็กละเอียด มีความคงตัวอยู่ได้ทั้งอุณหภูมิห้อง สามารถละลายน้ำได้ดี และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุของโรคพืชได้

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

เกษตรกรในประเทศสามารถเพาะปลูกผลิตผลทางการเกษตรได้จำนวนมากและมีคุณภาพดี แต่มีต้นทุนการผลิตสูงเนื่องจากค่าใช้จ่ายจากอุปกรณ์การเพาะปลูก ปุ๋ย และสารเคมีป้องกันหรือกำจัดศัตรูพืชซึ่งส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ การสร้างทางเลือกสำหรับเกษตรกรไทย เช่น การใช้วิธีทางชีวภาพ (biological control) เพื่อการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช สามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายหรือต้นทุนในการผลิตผลิตผลทางการเกษตรได้ การใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ (effective microorganisms หรือ EM) ในการควบคุมศัตรูพืชนับว่าเป็นรูปแบบหนึ่งของการใช้วิธีทางชีวภาพที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค สิ่งแวดล้อมและตัวเกษตรกรเอง

25 จากการศึกษพบว่า *Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในสารป้องกันศัตรูพืชด้วยวิธีทางชีวภาพ ที่มีลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง อาศัยอยู่ในดินเป็นส่วนใหญ่ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (polymyxin, diffcicidin, subtilin, mycobacillin)¹⁻³ ที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตบางชนิด เช่น แบคทีเรีย รา แมลง จึงมีการนำเชื้อ *Bacillus subtilis* รวมถึงอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของโรคพืชและความคงตัวถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารป้องกันการเจริญเติบโตของศัตรูพืช เช่น การป้องกันการเกิดเชื้อราในพริก⁴ ควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวในการเพาะปลูกมะเขือเทศ ควบคุมโรคในข้าวโพดฝักอ่อน⁵ และควบคุมเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดินจำนวนมากโดยเชื้อราที่อยู่ในดินเหล่านี้จะเข้าทำลายพืชผัก โดยเฉพาะพืชตระกูลถั่ว อ้อย⁶ กระถุนกะหล่ำ และพืชกินผล และสามารถเข้าทำลายได้ไม่ว่าก่อนหรือหลังออกหรือทั้งก่อนหรือหลังการเก็บเกี่ยว เชื้อราเป็นสาเหตุของโรคในพืชหลายชนิด เช่น โรคเน่าคอดิน เขม่าดำในมันฝรั่ง รากเน่าในฝ้าย โรคผลเน่าของส้มโดยจะมีลักษณะเป็นราสีเขียวที่สามารถสร้างสปอร์ได้ การใช้ *Bacillus subtilis* สามารถควบคุมการเกิดเชื้อราบนผิวส้มหลังการเก็บเกี่ยวโดยมีการพัฒนาสูตรสำหรับผสมและเคลือบป้องกันผิวส้มทดแทนการใช้สารเคมีเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อรา ซึ่งจะทำให้เกิดการเน่าเสียของผลส้มลดน้อยลง⁷ โรคที่เกิดในพืชเหล่านี้มีรายงานการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* ว่าสามารถใช้ควบคุมการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีการใช้ *Bacillus subtilis* ในการปศุสัตว์ เช่น การเติมลงในอาหารเลี้ยงสัตว์ร่วมกับสาร โปรไบโอติก⁸ พบว่าสามารถป้องกันและควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้

หน้า 2 ของจำนวน 5 หน้า

โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ หรือการเติมลงในบ่อเลี้ยงกุ้งให้เชือกินอาหารที่เหลือเพื่อป้องกันการสะสมของเสียและยับยั้งการเจริญของเชื้อที่อาจก่อให้เกิดโรคในกุ้งได้

สำหรับประเทศไทยเกษตรกรสามารถเลี้ยงเชื้อที่เป็น EM ไว้ใช้เอง แต่มีความยุ่งยากในการหมักเลี้ยงเชื้อ โดยผสมหัวเชื้อกับน้ำที่ปราศจากคลอรีน กากน้ำตาลหรือเศษอาหารและนำไปหมักในบริเวณที่ไม่มีแสงแดดและไม่สัมผัสกับความ
5 ร้อนก่อนนำมาใช้งาน ในการหมักแต่ละครั้งทำให้ผู้ใช้และสารควบคุมโรคพิษมีโอกาสนำไปเป็นจุลินทรีย์ที่มีพิษต่อมนุษย์ได้ การทำการหมักแต่ละครั้งต้องใช้เวลานานหลายวันแต่มีอายุการใช้งานสั้นโดยหัวเชื้อสามารถเก็บไว้ใช้ได้ 1 เดือน และหลังทำการหมักแล้วจะเก็บได้เพียง 1-2 สัปดาห์ ไม่สะดวกและไม่สามารถใช้งานได้ทันทีในการควบคุมโรคพิษตามต้องการ ไม่สะดวกในการขนส่ง ใช้พื้นที่และค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาเชื้อมาก ก่อนใช้งานต้องเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนฉีดพ่น ซึ่งต้องอาศัยประสบการณ์เฉพาะบุคคล

10 นักวิจัยในประเทศไทย ได้คัดแยกสายพันธุ์และผลิตเชื้อ *Bacillus subtilis* (strain CMs026) รวมถึงอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความคงตัวต่อความร้อน ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคแม้ว่าผ่านการอบแห้งด้วยความร้อนขึ้น (121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที)¹⁰

สารดูดซับที่ใช้เป็นสารที่มีรูปทรงจำนวนมากในโครงสร้างกักเก็บสารอื่นไว้ภายใน ปรับคุณสมบัติทางกายภาพ
15 สารที่ถูกดูดซับ เช่น ช่วยให้เกิดเป็นอนุภาคนาโนเล็ก ไหลได้ดี และช่วยดูดซับความชื้นอีกด้วย สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารดูดซับ เช่น อนุพันธ์ของซิลิกา ไดแก๊ว แคลเซียมซิลิเกต แมกนีเซียมอลูมิเนียมซิลิเกต แมกนีเซียมซิลิเกต ซิลิกอนไดออกไซด์

ในการประดิษฐ์ทำโดยการทำแห้งอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น วิธีการผสมสารดูดซับกับอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนทำให้แห้ง
และวิธีผสมสารดูดซับกับอาหารเลี้ยงเชื้อหลังทำให้แห้งโดยใช้สารดูดซับ โดยใช้วิธีการทำแห้งด้วยการพ่นแห้ง การทำแห้งแบบเยือกแข็ง หรือการอบแห้ง แต่หลังจากทำแห้งแล้วอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวสามารถละลายน้ำได้ดีจึงมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพิษ

20 การเปิดเผยการผลิตโดยสมบูรณ์

การประจักษ์นี้เกี่ยวข้องกับวิธีทำแห้งที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้วกับสารดูดซับ โดย
หลังจากแห้งแล้วสามารถอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่แห้งให้เป็นผงละเอียดที่คงตัวอยู่ในอุณหภูมิห้องได้ กรรมวิธีการผลิตประกอบด้วย การเตรียมวัตถุดิบจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งได้ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตน หรือสารสกัดจากยีสต์ หรือสารสกัดจากเนื้อวัว (beef) หรือน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ เป็นเวลาประมาณ 3 วัน หลังจากนั้น
25 นำมาแยกตัวเชื้อ *Bacillus subtilis* ออกโดยการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยความเร็วประมาณ 1500-3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15-30 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่หลงเหลือโดยนึ่งด้วยความร้อนขึ้น ดังทิ้งไว้ให้เย็นทำอุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาทำให้แห้งโดยจะนำมาผสมกับสารดูดซับก่อนการทำแห้ง ในสัดส่วนคือ

อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว 70-95% (น้ำหนักแห้ง)

สารดูดซับ 5-30%

30 ซึ่งสารดูดซับที่ใช้เป็นสารกลุ่มอนุพันธ์ของซิลิกา ไดแก๊ว แคลเซียมซิลิเกต แมกนีเซียมอลูมิเนียมซิลิเกต แมกนีเซียมซิลิเกต ซิลิกอนไดออกไซด์ และใช้วิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) หรือการพ่นแห้ง (spray drying) หรือการอบแห้ง (oven drying) นอกจากนี้การทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อแห้งก่อนแล้วจึงผสมกับสารดูดซับสามารถทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความคงตัวได้เช่นเดียวกันแต่ใช้ปริมาณสารดูดซับต่างกัน

35 ตัวอย่างผลการทดลอง

ตัวอย่างที่ 1 เตรียมวัตถุดิบจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งได้เลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตน สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากเนื้อวัว (beef) และ น้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ เป็นเวลาประมาณ 3 วัน หลังจากนั้นนำมาแยกตัวเชื้อ

หน้า 3 ของจำนวน 5 หน้า

- Bacillus subtilis* ออกโดยการปั่นเหวี่ยงตะกอนด้วยความเร็วประมาณ 1500-3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15-30 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (1.21 บาร์) เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาผสมกับซิลิกอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นสารดูดซับ แล้วนำไปทำแห้งโดยวิธีการอบแห้ง จากนั้นนำไปบดจนเป็นผง นำไปศึกษาคุณสมบัติการไหลโดยใช้ประเมินความหนาแน่นของผงอนุภาค (tapped density และ bulk density) และการยับยั้งเชื้อ
- 5 สาเหตุโรคพืชด้วยเทคนิค diffusion agar ซึ่งวางเชื้อราไว้ตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารออกฤทธิ์ที่จะทดสอบไว้ในสัดส่วนต่างๆ หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อและวัดการเจริญของเชื้อราสาเหตุที่แผ่เป็นรัศมีออกไป

สัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อซิลิกอนไดออกไซด์

ส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* 95% (น้ำหนักแห้ง)

ซิลิกอนไดออกไซด์ 5%

10

(ตารางที่ 1) ผลการศึกษาคุณสมบัติการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารดูดซับ 5%**

% Compressibility	Hausner ratio	Angle of repose (degree)
24.63±2.81	1.33±0.05	41.85±1.06

(ตารางที่ 2) ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ *Alternaria solani* Sorauer ของผงแห้งที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารดูดซับ 5% (แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อราที่เกิดขึ้น หน่วยเป็นเซนติเมตร) (n=5)

ความเข้มข้นตัวอย่างที่ 1	Control***	1%	5%	10%	25%	50%
เส้นผ่านศูนย์กลาง	9.0±0.0	9.0±0.0	9.0±0.0	9.0±0.0	7.5±0.1	6.9±0.4

15 ***control คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารใด

(ตารางที่ 3) ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ *Alternaria brassicicola* ของผงแห้งที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารดูดซับ 5% (แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อราที่หน่วยเป็นเซนติเมตร) (n=5)

ความเข้มข้นตัวอย่างที่ 1	Control***	1%	5%	10%	25%	50%
เส้นผ่านศูนย์กลาง	9.0±0.0	6.6±0.2	6.4±0.3	6.2±1.0	6.1±0.3	5.8±0.0

***control คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารใด

20

ตัวอย่างที่ 2 ทำการเตรียมและทำการทดสอบเหมือนตัวอย่างที่ 1 ต่างกันที่นำอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธีการอบแห้งก่อน จึงนำไปผสมกับซิลิกอนไดออกไซด์โดยสัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งต่อซิลิกอนไดออกไซด์ คือ

อาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง 85%

ซิลิกอนไดออกไซด์ 15%

25

(ตารางที่ 4) ผลการศึกษาคุณสมบัติการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารดูดซับ 15%**

% Compressibility	Hausner ratio	Angle of repose (degree)
17.20±0.71	1.2±0.01	37.43±1.53

(ตารางที่ 5) ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ *Alternaria solani* Sorauer ของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งที่ผสมสารดูดซับ 15% (แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อราที่เกิดขึ้น หน่วยเป็นเซนติเมตร) (n=5)

หน้า 4 ของจำนวน 5 หน้า

ความเข้มข้นตัวอย่างที่ 2	Control***	1%	5%	10%	25%	50%
เส้นผ่านศูนย์กลาง	9.0±0.0	8.3±0.2	6.7±0.3	4.9±0.1	6.4±0.1	5.8±0.1

***control คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารใด

(ตารางที่ 6) ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ *Alternaria brassicicola* ของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งที่ผสมสารดูดซับ 15% (แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อราที่หน่วยเป็นเซนติเมตร) (n=5)

ความเข้มข้นตัวอย่างที่ 2	Control***	1%	5%	10%	25%	50%
เส้นผ่านศูนย์กลาง	9.0±0.0	9.0±0.0	9.0±0.0	8.3±1.1	4.1±0.1	3.6±0.1

5 ***control คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารใด

** (ตารางที่ 7 และตารางที่ 8) คุณสมบัติการไหลเทียบกับมุมกองวัสดุ (Angle of repose) มุมมีค่าน้อยแสดงว่าผงอนุภาคมีคุณสมบัติการไหลที่ดีเช่นเดียวกับค่า Compressibility Index และ Hausner Ratio ซึ่งหาจาก

Flow Property	Angle of Repose (degree)
Excellent	25-30
Good	31-35
Fair	36-40
Passable	41-45
Very poor	56-65
Very, very poor	>66

Compressibility Index (%)	Flow Character	Hausner Ratio
≤10	Excellent	1.00-1.11
11-15	Good	1.12-1.18
16-20	Fair	1.19-1.25
21-25	Passable	1.26-1.34
26-31	Poor	1.35-1.45
32-37	Very poor	1.46-1.59
>38	Very very poor	>1.60

10 เอกสารอ้างอิง

1. Madigan, M., Martinko, J., 2005. *Brock Biology of Microorganisms*, 11th ed., Prentice Hall, Washington DC.
2. Nakano, M.M., Zuber, P., 1998. Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Ann. Rev. Microbiol.*, 52, 165-90.
3. Ryan, K.J., Ray, C.G., 2004. *Sherris Medical Microbiology*, 4th ed., McGraw-Hill, New York.
4. Gnanamanickam, S.S., 2002. *Biological Control of Crop Diseases*. Marcel Dekker, New York.

15

หน้า 5 ของจำนวน 5 หน้า

5. กรมพัฒนาที่ดิน, 2549. การจัดการดินและระบบการปลูกข้าวโพดฝักอ่อน. กรมพัฒนาที่ดิน กรุงเทพมหานคร.
Available at: http://www.ddd.go.th/new_hp/vichakarn/manual/corn/p3.html. (8 December 2007)
6. ประเสริฐ นัทรวิระวงษ์, 2549. การวิจัยด้านโรคพืช. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
นครปฐม. Available at: <http://cropthai.ku.ac.th/ked/text/dis.html>. (8 December 2007)
- 5 7. วิจิตรา ลีละสุกุล, 2547. การควบคุมโรคของผลส้มหลังการเก็บเกี่ยวโดยชีววิธี. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. Available at:
www.sc.psu.ac.th/units/qa/Download/2547/detail_stand_2.2_47nov.xls. (8 December 2007)
8. สุขชัย บุญนำมา, สุชาดา ไชยสวัสดิ์, คาราวรรณ ทองบุตร, ธนวัฒน์ ถิรวิน, 2542. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมใน
การผลิต *Bacillus subtilis* ในอุตสาหกรรมโพรไบโอติก. สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ,
10 กรุงเทพมหานคร. Available at: <http://www.kmutt.ac.th/rippc/pron39.htm>. (8 December 2007)
9. คาราวรรณ ทองบุตร, สุชาดา ไชยสวัสดิ์, สุขชัย บุญนำมา, ธนวัฒน์ ถิรวิน, 2547. การแปรรูปผลผลิต *Bacillus*
subtilis (Bs) เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง. สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ, กรุงเทพมหานคร.
Available at: <http://www.kmutt.ac.th/rippc/bacillus.htm>. (8 December 2007)
10. Nimraksa, H., 2008. Using of biological control of potato early blight disease caused by *Alternaria solani*
15 Sorauer. PhD Thesis, Kasetsart University.
11. Helbig, J., Bochow, H., 2001. Effectiveness of *Bacillus subtilis* (isolate 25021) in controlling *Botrytis cinerea* in
strawbeery. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz*, 108(6), 545-559.
12. Ansel, H.C., Allen, L.V., Popovich, N.G., 1999. *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7th
ed., Lippincott Williams & Wilkins, New York.
- 20 13. Chowdary, K.P.R., Manjula, T., 2000. Effect of surfactants on the solubility and dissolution rate of nimesulide
from tablets. *Indian J. Pharm. Sci.*, 62(2), 97-101.
14. Sunada, H., Bi, Y., 2002. Preparation, evaluation and optimization of rapidly disintegration tablets. *Powd.*
Technol., 122, 188-198.
15. Carter, J.C., 2002. The role of disintegrants in solid oral dosage manufacturing. *Pharm. Can.*, 3(2), 11-13.
- 25 16. พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์, 2549. เอกสารคำสอนเรื่องการประเมินคุณภาพยาเม็ด. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย
ศิลปากร, นครปฐม.
17. กองควบคุมยา, 2550. แนวทางการทดสอบความคงสภาพของยา. กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหาร
และยา, กรุงเทพมหานคร. Available at: http://www.wapp1.fda.moph.go.th/drug/zone_gmp/gmp_book/book2.asp.
(31 January 2008)

30

วิธีการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เหมือนกับที่บรรยายไว้แล้วในข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

หน้า 1 ของจำนวน 1 หน้า

ข้อถกเถียง

- 5 1. กรรมวิธีการทำแห้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารดูดซับรูปพูนมีขั้นตอนประกอบด้วย การเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งที่เลือกจากกลุ่มของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตน สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากเนื้อวัว (beef) น้ำตาลกลูโคส หรือเลี้ยงเชื้อในของผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อข้างต้นเป็นองค์ประกอบ เป็นเวลาประมาณ 3 วัน แล้วแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากตัวเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยความเร็วประมาณ 1500-3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15-30 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C จากนั้นผสมสารดูดซับกับอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนทำให้แห้งโดยใช้สารดูดซับ 5-30% ค่อน้ำหนักอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง 70-95% นำของผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับสารดูดซับมาทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งโดยการพ่นแห้ง หรือการทำแห้งแบบเยือกแข็ง หรือการอบแห้ง โดยเมื่อกำจัดน้ำออกหมดแล้วสามารถบดสารผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อกับสารดูดซับให้มีขนาดเล็ก คงตัวอยู่ได้ ที่อุณหภูมิห้อง ละลายน้ำได้ดีและมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อสาเหตุ
- 10 2. กรรมวิธีการทำแห้งอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อถกเถียง 1 ที่ซึ่ง เชื้อที่นำมาเลี้ยงคือเชื้อ *Bacillus subtilis*
3. กรรมวิธีการทำแห้งอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อถกเถียง 1 หรือ 2 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่งของผสมอาหารเลี้ยงเชื้อคือของผสมของเปปโตน สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากเนื้อวัว (beef) และน้ำตาลกลูโคส
- 15 4. กรรมวิธีการทำแห้งอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อถกเถียง 1-3 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่งผสมสารดูดซับอนุพันธ์ซิลิกาเลือกได้จากกลุ่มของ แคลเซียมซิลิเกต แมกนีเซียมออลูมิเนียมซิลิเกต แมกนีเซียมซิลิเกต ซิลิกอนไดออกไซด์
5. กรรมวิธีการทำแห้งอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อถกเถียง 1-4 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่งทำการอบแห้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C แล้วผสมกับสารดูดซับ
- 20 6. กรรมวิธีการทำแห้งอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อถกเถียง 1-5 ข้อใดข้อหนึ่งที่ซึ่งปริมาณส่วนผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับสารดูดซับ คือสารดูดซับ 5% ค่อน้ำหนักอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง 95%
7. กรรมวิธีการทำแห้งอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อถกเถียง 5 ที่ซึ่ง ปริมาณส่วนผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับสารดูดซับ คือสารดูดซับ 15% ค่อน้ำหนักอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง 85%

หน้า 1 ของจำนวน 1 หน้า

บทสรุปการประดิษฐ์

- กรรมวิธีการทำแห้งอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารดูดซับรูพรุน ประกอบด้วยขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อ โดยวิธีการเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตเน หรือ สารสกัดจากยีสต์ หรือสารสกัดจากเนื้อวัว (beef) หรือน้ำตาลกลูโคสหรือของผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวข้างต้นเป็นองค์ประกอบ เป็นเวลาประมาณ 3 วัน แล้วทำการแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากตัวเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วประมาณ 1500-3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15-30 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่ 5 หลงเหลืออยู่ จากนั้นผสมสารดูดซับกับอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนทำให้แห้งโดยใช้สารดูดซับ 5-30% ต่อน้ำหนักอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง 70-95% ใช้วิธีการทำแห้งโดยการพ่นแห้ง หรือการทำแห้งแบบเยือกแข็ง หรือการอบแห้ง โดยเมื่อกำจัดน้ำออกแล้วสามารถบดอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งให้มีขนาดเล็ก คงตัวได้ดีที่อุณหภูมิห้อง ละลายน้ำได้ดีและมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อสาเหตุ ซึ่ง 10 การผสมสารดูดซับสามารถทำหลังการทำแห้งได้แตกต่างกันที่ใช้ปริมาณสารดูดซับมากกว่า

ภาคผนวก 3 (คำขอสิทธิบัตร)

แบบ สป/ตม/อสป/001-ก
หน้า 1 ของจำนวน 3 หน้า

 คำขอรับสิทธิบัตร / อนุสิทธิบัตร	สำหรับเจ้าหน้าที่ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">วันรับคำขอ 15 ก.พ. 2553</td> <td style="width: 50%;">เลขที่คำขอ</td> </tr> <tr> <td>วันยื่นคำขอ</td> <td style="text-align: center; font-size: 1.2em;">1001000228</td> </tr> <tr> <td colspan="2">สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ</td> </tr> <tr> <td colspan="2">ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์</td> </tr> <tr> <td colspan="2">ประเภทผลิตภัณฑ์</td> </tr> <tr> <td>วันประกาศโฆษณา</td> <td>เลขที่ประกาศโฆษณา</td> </tr> <tr> <td>วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร</td> <td>เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่</td> </tr> </table>	วันรับคำขอ 15 ก.พ. 2553	เลขที่คำขอ	วันยื่นคำขอ	1001000228	สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ		ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์		ประเภทผลิตภัณฑ์		วันประกาศโฆษณา	เลขที่ประกาศโฆษณา	วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่	
วันรับคำขอ 15 ก.พ. 2553	เลขที่คำขอ																
วันยื่นคำขอ	1001000228																
สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ																	
ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์																	
ประเภทผลิตภัณฑ์																	
วันประกาศโฆษณา	เลขที่ประกาศโฆษณา																
วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร																
ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่																	
☒ การประดิษฐ์ ☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์ ☐ อนุสิทธิบัตร																	
ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ.2522 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร(ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2535 และ พระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542																	
1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์ องค์ประกอบของรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงและของแข็งจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ สำหรับควบคุมโรคพืช																	
2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่ ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน																	
3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ) มหาวิทยาลัยศิลปากร 22 ถนนบรมราชชนนี เขตดุสิต กรุงเทพมหานคร 10170 ประเทศไทย และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (ในข้อ)	3.1 สัญชาติ ไทย 3.2 โทรศัพท์ 02-8807374 3.3 โทรสาร 3.4 อีเมล																
4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☒ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุนั้น																	
5. ตัวแทน (ถ้ามี) ที่อยู่ (เลขที่ ถนน จังหวัด รหัสไปรษณีย์) นาย ชัยรัตน์ จิตตสินนา ศูนย์บ่มเพาะธุรกิจ มหาวิทยาลัยศิลปากร เลขที่ 6 ถนนราชมรรคาใน ต.พระปฐมเจดีย์ อ.เมือง จ.นครปฐม 73000	5.1 ตัวแทนเลขที่ 2216 5.2 โทรศัพท์ 034-251524 5.3 โทรสาร 034-251544 5.4 อีเมล																
6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ) รองศาสตราจารย์ ดร. พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์ ภาควิชาเทคโนโลยีสารสนเทศ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (ในข้อ)																	
7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบายว่าคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร เลขที่ วันยื่น เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ ☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ																	

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม่อำนาจรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียดเพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อ ความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่ เพื่อให้ได้ซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน

แบบ สป/สผ/อสป/001-ก (ใบต่อ)
หน้า 3 ของจำนวน 3 หน้า

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ) (ต่อ)

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย อยู่ที่ดิน 14 อาคารเอส เอ็ม ทาวเวอร์ 979 / 17-21 ถนนพหลโยธิน
แขวงสามเสนใน เขตพญาไท กรุงเทพมหานคร 10400 ประเทศไทย

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)

รองศาสตราจารย์ ดร. พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์
อยู่ที่ ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์
เลขที่ 6 ถนน ราชวรราไพน์ ตำบลพระปฐมเจดีย์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000 ประเทศไทย

นาย ยศนันท์ วีระพล
อยู่ที่ ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์
เลขที่ 6 ถนน ราชวรราไพน์ ตำบลพระปฐมเจดีย์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000 ประเทศไทย

หน้า 1 ของจำนวน 7 หน้า

รายละเอียดการประดิษฐ์

ข้อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

องค์ประกอบของรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงและของแข็งจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ สำหรับควบคุม

5 โรคพืช

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการผลิต

การประดิษฐ์นี้อยู่ในสาขาวิชาเทคโนโลยีเกษตรกรรมและเทคโนโลยีการเกษตรด้านการควบคุมโรคพืช

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

ลักษณะของการประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงและของแข็งจาก
10 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ สำหรับควบคุมโรคพืช ซึ่งรูปแบบผงมีองค์ประกอบคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ และสารดูดซับ และรูปแบบของแข็งมีองค์ประกอบคือ ของผสมระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อกับสารดูดซับ และสารช่วยแตกตัว โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตเน หรือ สารสกัดจากยีสต์ หรือสารสกัดจากเนื้อวัว (beef) หรือน้ำตาล กุลโคสหรือของผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวข้างต้นเป็นองค์ประกอบ

ความมุ่งหมายของการประดิษฐ์นี้เพื่อให้ได้รูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงและของแข็งที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
15 สำหรับควบคุมโรคพืช โดยที่รูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงและของแข็งจากอาหารเลี้ยงเชื้อ มีความคงตัวอยู่ได้ ที่อุณหภูมิห้อง สามารถละลายน้ำได้ดี และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุของโรคพืชได้

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดด้านเทคโนโลยีการเกษตรอินทรีย์ได้พัฒนาขึ้นเนื่องจากความต้องการลดการใช้และการสะสมของเคมี
กำจัดศัตรูพืช ทำให้มีความพยายามหาทางเลือกอื่นในการควบคุมโรคพืช เช่น การใช้สารต้านเชื้อราชีวภาพ (biofungicides)
20 เช่น แบคทีเรียบาซิลลัส ซับทิลิส (*Bacillus subtilis*) ซึ่งมีสาร surfactin⁽¹⁾ ที่มีประสิทธิภาพเป็นสารต้านจุลชีพและมี คุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) มีระดับความเข้มข้นของสารในการเกิดเป็นไมเซลล์ต่ำทำให้สาร เกาะติดผิวของเชื้อโรคได้ดี⁽²⁾ แบคทีเรียบาซิลลัส ซับทิลิสเป็นแบคทีเรียแกรมบวกผลิตสารต้านจุลชีพหลายชนิด เช่น surfactin, iturin และ fengycin⁽³⁾ สามารถทำลายโครงสร้างพอลิเมอร์ของผนังเซลล์เชื้อรา แบคทีเรีย เป็นต้น บาซิลลัส ซับทิลิส มีความสามารถต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิด เช่น *Cercospora* spp., *Pythium aphanidermatum*,
25 *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Rhizoctonia solani*⁽⁴⁾ นอกจากนี้แบคทีเรียชนิดนี้ยังสามารถ ป้องกันการติดโรคของพืชหลังการเก็บเกี่ยวที่มีสาเหตุมาจากเชื้อโรคบริเวณดินที่เพาะปลูก เช่น การป้องกันการติดเชื้อรา หลังการเก็บเกี่ยวใน โสม (*Panax quinquefolius*)⁽⁵⁾ แบคทีเรียบาซิลลัส ซับทิลิสสามารถต้านเชื้อราเขียวของดินส้มหลังจาก ถูกเหี่ยวมาให้เป็นโรค⁽⁶⁾ ในประเทศไทยเกษตรกรใช้ แบคทีเรียบาซิลลัส ซับทิลิสในน้ำหมักชีวภาพ EM (Effective Microorganisms) การใช้ต้องหมักแบคทีเรียที่เก็บอยู่ในรูปสารละลายกับกากน้ำตาลเป็นเวลาอย่างน้อย 3-5 วันก่อนฉีดพ่น
30 ในการหมักแต่ละครั้งทำให้ผู้ใช้และสารควบคุมโรคพืชมีโอกาสการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่มีพิษต่อมนุษย์ได้ การทำการหมัก แต่ละครั้งต้องใช้เวลานานหลายวันแต่มีอายุการใช้งานสั้น โดยหัวเชื้อสามารถเก็บไว้ใช้ได้ 1 เดือนและหลังทำการหมักแล้ว จะเก็บได้เพียง 1-2 สัปดาห์ ไม่สะดวกและไม่สามารถใช้งานได้ทันทีในการควบคุมโรคพืชตามต้องการ ไม่สะดวกในการ ขนส่ง ใช้พื้นที่และค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาเชื้อมาก ก่อนใช้งานต้องเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนฉีดพ่น ซึ่ง ต้องอาศัยประสบการณ์เฉพาะบุคคล รูปแบบการเตรียมแบคทีเรียในลักษณะเอนโดสปอร์ก็เช่นเดียวกันจำเป็นต้องรอเวลา ให้แบคทีเรียเจริญเติบโตและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพียงพอในการยับยั้งเชื้อโรคสาเหตุดังกล่าวนี้ทำให้พืชผล
35 ทางเกษตรเสียหายมาก

หน้า 2 ของจำนวน 7 หน้า

การศึกษาก่อนหน้านี้นับว่าอาหารเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียบาซิลลัส ซับทิลิส (strain CMs026) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria solani* และ *Alternaria brassicicola* และทนต่อความร้อนขึ้น (121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที)¹⁰ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา⁽⁷⁾

สารดูดซับที่ใช้เป็นสารที่พื้นที่มีความสามารถดูดซับสารอินทรีย์ในบริเวณผิว ปรับคุณสมบัติทางกายภาพสารที่ถูกดูดซับ เช่น ช่วยให้เกิดเป็นอนุภาคนาโนขนาดเล็ก ใกล้เคียงกับเซลล์ และช่วยดูดซับความชื้นอีกด้วย สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารดูดซับ เช่น อนุพันธ์ของซิลิกา ได้แก่ แคลเซียมซิลิเกต แมกนีเซียมอลูมิเนียมซิลิเกต แมกนีเซียมซิลิเกต ซิลิกอนไดออกไซด์

ในการประดิษฐ์นี้เป็นการทำอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งและอาหารเลี้ยงเชื้อในรูปของแข็งโดยผสมสารดูดซับกับอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนทำให้แห้งโดยใช้วิธีการทำแห้งด้วยการพ่นแห้ง การทำแห้งแบบเยือกแข็ง หรือการอบแห้ง แต่หลังจากทำแห้งแล้วอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวสามารถละลายน้ำได้จึงมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช อาหารเลี้ยงเชื้อในรูปของแข็งทำจากอาหารเลี้ยงเชื้อผงแห้งโดยผสมกับสารช่วยแตกตัวหรือสารช่วยยึดเกาะแล้วตอกเป็นเม็ดแข็งลักษณะคล้ายเม็ดยาโดยลักษณะของแข็งที่ได้สามารถแตกตัวและละลายในน้ำยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

การเปิดเผยการผลิต โดยสมบูรณ์

1.1 การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้วกับสารดูดซับ โดยหลังจากการทำแห้งแล้วสามารถบดอาหารเลี้ยงเชื้อที่แห้งให้เป็นผงละเอียดที่คงตัวอยู่ในอุณหภูมิห้องได้ กรรมวิธีการผลิตประกอบด้วย การเตรียมวัตถุดิบจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งได้ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตน หรือสารสกัดจากยีสต์ หรือสารสกัดจากเนื้อวัว (beef) หรือน้ำตาลกลูโคสหรือของผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อข้างต้นเป็นองค์ประกอบ เป็นเวลาประมาณ 3 วัน หลังจากนั้นนำมาแยกตัวเชื้อออกโดยการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยความเร็วประมาณ 1500-3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15-30 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิหนึ่งด้วยความร้อนขึ้น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาทำให้แห้งโดยจะนำมาผสมกับสารดูดซับก่อนการทำแห้ง ในสัดส่วนคือ

อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว	70-95% (น้ำหนักแห้ง)
สารดูดซับ	5-30%

ซึ่งสารดูดซับที่ใช้เป็นสารกลุ่มอนุพันธ์ของซิลิกา ได้แก่ แคลเซียมซิลิเกต แมกนีเซียมอลูมิเนียมซิลิเกต แมกนีเซียมซิลิเกต ซิลิกอนไดออกไซด์ และใช้วิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) หรือการพ่นแห้ง (spray drying) หรือการอบแห้ง (oven drying)

1.2 การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบของแข็งที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งซึ่งมีองค์ประกอบคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้วกับสารดูดซับผสมกับสารช่วยแตกตัวหรือของผสมสารช่วยแตกตัว ในสัดส่วนคือ

อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว	70-95%(น้ำหนักแห้ง)
สารดูดซับ	5-30%
สารช่วยแตกตัวหรือของผสมของสารช่วยแตกตัว	0-9% (จากน้ำหนักของ X)

ซึ่งสารช่วยแตกตัวที่ใช้สามารถเลือกได้จากกลุ่มของ โซเดียม สเตาท์ ไกลโคเลต (sodium starch glycolate) คลอสคาเมลโลสโซเดียม (croscarmellose sodium) และของผสมของ โซเดียม สเตาท์ ไกลโคเลต กับ คลอสคาเมลโลสโซเดียม นำส่วนผสมที่ได้มาตอกเป็นเม็ดคล้ายเม็ดยา

หน้า 3 ของจำนวน 7 หน้า

ตัวอย่างผลการทดลอง

- ตัวอย่างที่ 1 เตรียมวัตถุดิบจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งได้เลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตน สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากเนื้อวัว (beef) และ น้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ เป็นเวลาประมาณ 3 วัน หลังจากนั้นนำมาแยกตัวเชื้อ *Bacillus subtilis* ออกโดยการปั่นเหวี่ยงตะกอนด้วยความเร็วประมาณ 1500-3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15-30 นาที เก็บ
- 5 ส่วนใสที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาผสมกับซิลิกอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นสารดูดซับ แล้วนำไปทำแห้งโดยวิธีการอบแห้ง จากนั้นนำไปบดจนเป็นผง นำไปศึกษาคุณสมบัติการไหลโดยใช้ประเมินความหนาแน่นของผงอนุภาค (tapped density และ bulk density) และการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพิษด้วยเทคนิค diffusion agar ซึ่งวางเชื้อราไว้ตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารออกฤทธิ์ที่จะทดสอบไว้ใน
- 10 สักส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อซิลิกอนไดออกไซด์
- | | |
|--|-------------------|
| ส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> | 95% (น้ำหนักแห้ง) |
| ซิลิกอนไดออกไซด์ | 5% |
- ตัวอย่างที่ 2 เหมือนตัวอย่างที่ 1 ต่างกันที่ทำการทำแห้งอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธีการอบแห้งก่อน จึงนำไปบดผสมกับ
- 15 ซิลิกอนไดออกไซด์โดยสัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งต่อซิลิกอนไดออกไซด์
- สัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อซิลิกอนไดออกไซด์
- | | |
|---|-----|
| อาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง <i>Bacillus subtilis</i> | 85% |
| ซิลิกอนไดออกไซด์ | 15% |
- ตัวอย่างที่ 3 เหมือนตัวอย่างที่ 1 ต่างกันที่ทำการทำแห้งอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวโดยไม่ใช้สารดูดซับ
- สัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อซิลิกอนไดออกไซด์
- 20 อาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง *Bacillus subtilis* 100%
- ซิลิกอนไดออกไซด์ 0%
- ตัวอย่างที่ 4 นำอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* แล้วกับสารดูด
- ซับผสมกับสารช่วยแตกตัว สัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อและซิลิกอนไดออกไซด์ต่อสารช่วยแตกตัวและของผสม
- ของสารช่วยแตกตัว โดยสัดส่วนของของผสมคือ
- 25 อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว 95%(น้ำหนักแห้ง)
- ซิลิกอนไดออกไซด์ 5%
- สารช่วยแตกตัวหรือของผสมของสารช่วยแตกตัว 0%(จากน้ำหนักของ X)
- นำอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งที่ผ่านกรรมวิธีการทำแห้งโดยผสมสารดูดซับก่อนการอบมาผสมกับสารช่วยแตกตัวสอง
- ชนิด ได้แก่ โซเดียม สเตาท์ โกลโคเลต (sodium starch glycolate) และ/หรือ คอสคารเมลโลส โซเดียม (croscarmellose
- 30 sodium) หลังจากนั้นคอกด้วยเครื่องคอกสาคเคี้ยวแบบใช้แรงดัน 1 ตันเป็นเวลา 10 วินาที จนได้เป็นเม็ดแข็งคล้ายเม็ดยา
- ตัวอย่างที่ 5 เหมือนตัวอย่างที่ 4 แต่ประกอบด้วย
- | | |
|--|---------------------|
| อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว | 95%(น้ำหนักแห้ง) |
| ซิลิกอนไดออกไซด์ | 5% |
| สเตาท์ โกลโคเลต | 2%(จากน้ำหนักของ X) |
- 35 ตัวอย่างที่ 6 เหมือนตัวอย่างที่ 4 แต่ประกอบด้วย
- | | |
|--|---------------------|
| อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว | 95%(น้ำหนักแห้ง) |
| ซิลิกอนไดออกไซด์ | 5% |
| สเตาท์ โกลโคเลต | 4%(จากน้ำหนักของ X) |

หน้า 4 ของจำนวน 7 หน้า

5	ตัวอย่างที่ 7	เหมือนตัวอย่างที่ 4 แต่ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว	95%(น้ำหนักแห้ง)
		ซิลิกอนไดออกไซด์	5%
		สดาท ไกลโคเลด	6%(จากน้ำหนักของ X)
10	ตัวอย่างที่ 8	เหมือนตัวอย่างที่ 4 แต่ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว	95%(น้ำหนักแห้ง)
		ซิลิกอนไดออกไซด์	5%
		คลอสตามัลโลสโซเดียม	1%(จากน้ำหนักของ X)
15	ตัวอย่างที่ 9	เหมือนตัวอย่างที่ 4 แต่ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว	95%(น้ำหนักแห้ง)
		ซิลิกอนไดออกไซด์	5%
		คลอสตามัลโลสโซเดียม	2%(จากน้ำหนักของ X)
20	ตัวอย่างที่ 10	เหมือนตัวอย่างที่ 4 แต่ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว	95%(น้ำหนักแห้ง)
		ซิลิกอนไดออกไซด์	5%
		คลอสตามัลโลสโซเดียม	3%(จากน้ำหนักของ X)
25	ตัวอย่างที่ 11	เหมือนตัวอย่างที่ 4 แต่ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว	95%(น้ำหนักแห้ง)
		ซิลิกอนไดออกไซด์	5%
		สดาท ไกลโคเลด	2%
30	ตัวอย่างที่ 12	เหมือนตัวอย่างที่ 4 แต่ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว	95%(น้ำหนักแห้ง)
		ซิลิกอนไดออกไซด์	5%
		คลอสตามัลโลสโซเดียม	1%
35	ตัวอย่างที่ 13	เหมือนตัวอย่างที่ 4 แต่ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว	95%(น้ำหนักแห้ง)
		ซิลิกอนไดออกไซด์	5%
		สดาท ไกลโคเลด	6%
	ตัวอย่างที่ 14	เหมือนตัวอย่างที่ 4 แต่ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว	95%(น้ำหนักแห้ง)
		ซิลิกอนไดออกไซด์	5%
		สดาท ไกลโคเลด	2%
		คลอสตามัลโลสโซเดียม	2%

หน้า 5 ของจำนวน 7 หน้า

5	ตัวอย่างที่ 15	เหมือนตัวอย่างที่ 4 แต่ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว	95%(น้ำหนักแห้ง)
		ซิลิกอนไดออกไซด์	5%
		สตาท ไกลโคเลต	4%
		คลอสตาเมลโลสโซเดียม	2%
	ตัวอย่างที่ 16	เหมือนตัวอย่างที่ 4 แต่ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว	95%(น้ำหนักแห้ง)
10		ซิลิกอนไดออกไซด์	5%
		สตาท ไกลโคเลต	6%
		คลอสตาเมลโลสโซเดียม	2%
	ตัวอย่างที่ 17	เหมือนตัวอย่างที่ 4 แต่ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว	95%(น้ำหนักแห้ง)
		ซิลิกอนไดออกไซด์	5%
15		สตาท ไกลโคเลต	2%
		คลอสตาเมลโลสโซเดียม	3%
	ตัวอย่างที่ 18	เหมือนตัวอย่างที่ 4 แต่ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว	95%(น้ำหนักแห้ง)
		ซิลิกอนไดออกไซด์	5%
		สตาท ไกลโคเลต	4%
20		คลอสตาเมลโลสโซเดียม	3%
	ตัวอย่างที่ 19	เหมือนตัวอย่างที่ 4 แต่ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว	95%(น้ำหนักแห้ง)
		ซิลิกอนไดออกไซด์	5%
		สตาท ไกลโคเลต	6%
		คลอสตาเมลโลสโซเดียม	3%

(ตารางที่ 1) ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุของผงแห้งที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารดูดซับ (แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อราที่เกิดขึ้น หน่วยเป็นเซนติเมตร) (n=5)

ความเข้มข้น	ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุ											
	<i>Alternaria solani</i> Sorauer						<i>Alternaria brassicicola</i>					
	Control***	1%	5%	10%	25%	50%	Control***	1%	5%	10%	25%	50%
ตัวอย่าง 1	9.0±0.0	9.0±0.0	9.0±0.0	9.0±0.0	7.5±0.1	6.9±0.4	9.0±0.0	6.6±0.2	6.4±0.3	6.2±1.0	6.1±0.3	5.8±0.0
ตัวอย่าง 2	9.0±0.0	8.3±0.2	6.7±0.3	4.9±0.1	6.4±0.1	5.8±0.1	9.0±0.0	9.0±0.0	9.0±0.0	8.3±1.1	4.1±0.1	3.6±0.1
ตัวอย่าง 3	9.0±0.0	9.0±0.0	9.0±0.0	9.0±0.0	6.7±1.6	5.6±0.7	9.0±0.0	9.0±0.0	9.0±0.0	4.8±0.2	3.9±0.2	4.2±0.2

***control คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารใด

หน้า 6 ของจำนวน 7 หน้า

ตารางที่ 2 เวลาในการแตกตัว *(นาทึ) ของผลิตภัณฑ์ของแข็งที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งและผสมสารช่วยแตกตัวในปริมาณต่างๆ

ตัวอย่างที่	เวลาในการแตกตัว(นาทึ)
4	80.00 ± 0.00
5	60.20 ± 3.20
ตัวอย่างที่	เวลาในการแตกตัว(นาทึ)
6	38.40 ± 0.00
7	37.73 ± 5.02
8	69.00±1.00
9	60.00±2.01
10	49.30±1.13
11	48.23±1.30
12	43.18±1.31
13	44.80±1.30
14	44.48±2.21
15	51.10±1.10
16	40.27±1.13
17	41.30±1.12
18	40.75±0.00
19	39.70±1.14

*ทดสอบการแตกตัวในน้ำ 1000 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสโดยเลียนแบบการทดสอบการแตกตัวของ

5 ยามีค

ทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์โดยสกัดหาปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ (surfactin) เมื่อเก็บในภาชนะปิดสนิท ทดสอบในอุณหภูมิห้องและสภาวะเร่ง (40 องศาเซลเซียส ความชื้น 75 %) ได้ข้อมูลดังตาราง

ตารางที่ 3 ปริมาณ surfactin ในตัวอย่างเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 0 และ 1 เดือน

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นของ surfactin (mcg/g)		
	เริ่มต้น	สภาวะเร่งเมื่อผ่านไป 1 เดือน	เก็บที่อุณหภูมิห้องผ่านไป 1 เดือน
1	0.43±0.01	0.44±0.11	0.46±0.02
7	0.43±0.01	0.42±0.00	0.42±0.01

10

เอกสารอ้างอิง

1. Hashizume H, Nishimura Y, Atta-ur-Rahman FRS. Cyclic lipopeptide antibiotics. Studies in Natural Products Chemistry: Elsevier; 2008. p. 693-751.

15

หน้า 7 ของจำนวน 7 หน้า

2. Chen H-L, Chen Y-S, Juang R-S. Separation of surfactin from fermentation broths by acid precipitation and two-stage dead-end ultrafiltration processes. *Journal of Membrane Science*. 2007;299(1-2):114-21.
3. .Ahimou F, Jacques P, Deleu M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000;27(10):749-54.
- 5 4. Collins DP, Jacobsen BJ, Maxwell B. Spatial and temporal population dynamics of a phyllosphere colonizing *Bacillus subtilis* biological control agent of sugar beet cercospora leaf spot. *Biological Control*. 2003;26(3):224-32.
5. Liu X, Pang J, Yang Z. The Biocontrol Effect of *Trichoderma* and *Bacillus Subtilis* SY1. *Journal of Agricultural Science* 2009;1(2):1-5.
- 10 6. Leelasuphakul W, Hemmanee P, Chuenchitt S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 2008;48(1):113-21.
7. Nimraksa H. Using of biological control of potato early blight disease caused by *Alternaria solani* Sorauer: Kasetsart University; 2008.
- 15 8. Helbig, J., Bochow, H., 2001. Effectiveness of *Bacillus subtilis* (isolate 25021) in controlling *Botrytis cinerea* in strawbeery. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz*, 108(6), 545-559.
9. Ansel, H.C., Allen, L.V., Popovich, N.G., 1999. *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7th ed., Lippincott Williams & Wilkins, New York.
10. Chowdary, K.P.R., Manjula, T., 2000. Effect of surfactants on the solubility and dissolution rate of nimesulide from tablets. *Indian J. Pharm. Sci.*, 62(2), 97-101.
- 20 11. Sunada, H., Bi, Y., 2002. Preparation, evaluation and optimization of rapidly disintegration tablets. *Powd. Technol.*, 122, 188-198.
12. Carter, J.C., 2002. The role of disintegrants in solid oral dosage manufacturing. *Pharm. Can.*, 3(2), 11-13.
13. พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์, 2549. เอกสารคำสอนเรื่องการประเมินคุณภาพยาเม็ด. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.
- 25 14. กองควบคุมยา, 2550. แนวทางการทดสอบความคงสภาพของยา. กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, กรุงเทพมหานคร. Available at: http://www.wap1.fda.moph.go.th/drug/zone_gmp/gmp_book/book2.asp. (31 January 2008)
- 30 วิธีการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด
เหมือนกับที่บรรยายไว้แล้วในข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

หน้า 1 ของจำนวน 1 หน้า

ข้อถ้อยสัญญา

1. องค์ประกอบของรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงและของแข็งจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ สำหรับควบคุมโรคพืช ซึ่งรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงประกอบด้วย สารดูดซับ 5-30% โดยน้ำหนัก อาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง 70-95% โดยน้ำหนัก ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งที่เลือกจากกลุ่มของเปปโตเน สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากเนื้อวัว (beef) และน้ำตาลกลูโคส หรือของผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อข้างต้นเป็นองค์ประกอบ โดยบดของผสมสารดูดซับกับอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการทำให้แห้งโดยการปั่นแห้ง หรือการทำแห้งแบบเยือกแข็ง หรือการอบแห้ง และรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบของแข็งประกอบด้วยรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผง 91-100 % และสารช่วยแตกตัว 0-9% ผสมเข้ากันและคอกอัดเป็นเม็ด
2. องค์ประกอบของรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงและของแข็งจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ สำหรับควบคุมโรคพืชตามข้อถ้อยสัญญา 1 ที่ซึ่ง เชื้อที่นำมาเลี้ยงคือเชื้อ *Bacillus subtilis*
3. องค์ประกอบของรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงและของแข็งจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ สำหรับควบคุมโรคพืชตามข้อถ้อยสัญญา 1 หรือ 2 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่งของผสมอาหารเลี้ยงเชื้อคือของผสมของเปปโตเน สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากเนื้อวัว (beef) และน้ำตาลกลูโคส
4. องค์ประกอบของรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงและของแข็งจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ สำหรับควบคุมโรคพืชตามข้อถ้อยสัญญา 1-3 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่งสารดูดซับสามารถเลือกได้จากกลุ่มของ แคลเซียมซิลิเกต แมกนีเซียมอลูมิเนียมซิลิเกต แมกนีเซียมซิลิเกต ซิลิกอนไดออกไซด์
5. องค์ประกอบของรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงและของแข็งจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ สำหรับควบคุมโรคพืชตามข้อถ้อยสัญญา 1-4 ข้อใดข้อหนึ่งที่ซึ่งรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงมีส่วนผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับสารดูดซับ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง 95% สารดูดซับ 5%
6. องค์ประกอบของรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงและของแข็งจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ สำหรับควบคุมโรคพืชตามข้อถ้อยสัญญา 1-5 ข้อใดข้อหนึ่งที่ซึ่งรูปแบบผลิตภัณฑ์ของแข็งใช้สารช่วยแตกตัวที่เลือกได้จากกลุ่มของโซเดียมสตาร์ชไกลโคเลต (sodium starch glycolate) คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสโซเดียม (crosscarmellose sodium) และของผสมของโซเดียมสตาร์ชไกลโคเลตกับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสโซเดียม
7. องค์ประกอบของรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงและของแข็งจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ สำหรับควบคุมโรคพืชตามข้อถ้อยสัญญา 1-6 ข้อใดข้อหนึ่งที่ซึ่งรูปแบบผลิตภัณฑ์ของแข็งใช้สารช่วยแตกตัว คือ โซเดียมสตาร์ชไกลโคเลตปริมาณ 6%

หน้า 1 ของจำนวน 1 หน้า

บทสรุปการประดิษฐ์

- 5 องค์ประกอบของรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงและของแข็งจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ สำหรับควบคุมโรคพิษ ซึ่งรูปแบบผงมีองค์ประกอบคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ 70-95% และ สารดูดซับ 5-30% และรูปแบบของแข็งประกอบด้วยรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผง 91-100 % และสารช่วยแตกตัว 0-9% โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตน หรือ สารสกัดจากยีสต์ หรือสารสกัดจากเนื้อวัว (beef) หรือน้ำตาลกลูโคสหรือของผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวข้างต้น เป็นองค์ประกอบ ซึ่งรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบผงและของแข็งที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับควบคุมโรคพิษจากการประดิษฐ์ มีความคงตัวอยู่ที่อุณหภูมิห้อง อาหารเลี้ยงเชื้อสามารถละลายน้ำได้ดี และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุของโรคพิษได้

10